

DOI:10.16781/j.0258-879x.2017.05.0589

· 论 著 ·

二甲双胍对甲状腺功能减退大鼠甲状腺激素的影响

薛 嵩, 王超群, 邹俊杰, 刘志民*

第二军医大学长征医院内分泌科, 上海 200003

[摘要] **目的** 探讨二甲双胍对甲状腺功能减退大鼠甲状腺激素水平的影响及其机制。**方法** 取3个月龄雄性SD大鼠36只,随机分为正常对照(NC)组、甲状腺功能减退(HT)组、二甲双胍(Met)组。HT组和Met组以含0.01%氨基三唑的饮用水喂养大鼠4周制备甲状腺功能减退大鼠模型,NC组大鼠喂养普通饮用水。造模成功后,Met组用200 mg/kg二甲双胍灌胃,HT组和NC组用等体积0.05%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)灌胃。于灌胃第8周时对3组大鼠甲状腺组织行H-E染色,采用qPCR检测下丘脑促甲状腺激素释放激素前体(*proTRH*) mRNA的表达;于灌胃第8、12周时采用电化学发光法检测3组大鼠血清T₃、T₄水平,采用qPCR和蛋白质印迹法检测甲状腺组织钠碘同向转运体(NIS) mRNA和蛋白表达。**结果** 在灌胃8、12周时,HT组大鼠血清T₃、T₄水平均低于NC组,而Met组T₃、T₄水平均高于HT组($P<0.05$)。灌胃8周时,H-E染色结果显示NC组滤泡大小不等,内见大量胶质及吸收空泡;HT组大鼠甲状腺滤泡缩小,滤泡上皮成柱状,滤泡周围吸收空泡减少;Met组滤泡上皮增生较HT组稍改善。灌胃8周时,qPCR结果显示HT组大鼠下丘脑*proTRH*和甲状腺组织NIS mRNA表达均高于NC组,而Met组均低于HT组($P<0.05$);蛋白质印迹法检测结果显示Met组NIS蛋白表达低于HT组($P<0.05$),而HT组和NC组NIS蛋白表达差异无统计学意义($P>0.05$)。灌胃12周时,HT组和Met组甲状腺组织NIS mRNA表达差异无统计学意义($P>0.05$),Met组NIS蛋白表达高于HT组($P<0.05$)。**结论** 二甲双胍能升高甲状腺功能减退大鼠的甲状腺激素水平,但短期内并不是由甲状腺NIS表达升高所致。

[关键词] 甲状腺;二甲双胍;甲状腺激素类;甲状腺功能减退症;钠碘同向转运体

[中图分类号] R 581.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2017)05-0589-06

Effect of metformin on thyroid hormone in rats with hypothyroidism

XUE Song, WANG Chao-qun, ZOU Jun-jie, LIU Zhi-min*

Department of Endocrinology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

[Abstract] **Objective** To explore the effect of metformin on thyroid hormone in rats with hypothyroidism and its mechanisms. **Methods** A total of 36 three-month-old male SD rats were randomly divided into normal control (NC) group and hypothyroidism (HT) group, metformin (Met) group. The rats in HT group and Met group was fed with 0.01% amino three triazole (AMT) water for 4 weeks to create hypothyroidism rat model, while NC group were fed with normal water. After modeling, the rats in Met group were intragastrically administrated with metformin 200 mg/kg, while the rats in HT group and NC group were intragastrically administrated with equal volume of 0.05% carboxymethylcellulose sodium (CMC-Na). After intragastric administration for eight weeks, the rats in each group were sacrificed to observe thyroid tissues with H-E staining, and to detect prothyrotropin-releasing hormone (*proTRH*) mRNA expression with qPCR assay. After intragastric administration for 8 and 12 weeks, serum T₃ and T₄ levels were detected using electrochemiluminescence assay, rat thyroid sodium/iodide symporter (NIS) mRNA and protein expressions were detected by qPCR and Western blotting, respectively. **Results** T₃ and T₄ levels of rats in HT group were significantly lower than those in NC group after 8 and 12 weeks of intragastric administration, while T₃ and T₄ in Met group were significantly higher than those in HT group ($P<0.05$). At week eight of intragastric administration, H-E staining showed that there was a greater variability in the size of folliculars, in which a large number of colloid and vacuoles were observed in the NC group; thyroid folliculars in the HT group were shrunk, the follicular epithelial tissues were columnar, and vacuoles around the follicles were decreased; and the thyroid follicular epithelial tissues hyperplasia in the Met group was slightly improved versus the HT group. At week eight of intragastric administration, the results

[收稿日期] 2016-10-24 **[接受日期]** 2017-03-17

[作者简介] 薛 嵩, 硕士, 主治医师. E-mail: rx3500@163.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-81885375, E-mail: zmliu_cz@hotmail.com

of qPCR showed that thyroid tissue *NIS* mRNA and hypothalamic *proTRH* mRNA expressions in HT group were higher than those in NC group, while those in Met group were lower than those in HT group ($P < 0.05$); Western blotting results showed that *NIS* protein expression in Met group was significantly lower than that in HT group ($P < 0.05$), and there was no significant difference in *NIS* protein expression between HT group and NC group ($P > 0.05$). After 12 weeks, there was no significant difference in *NIS* mRNA expression between HT group and Met group ($P > 0.05$), while *NIS* protein in Met group was significantly higher than that in HT group ($P < 0.05$). **Conclusion** Metformin can increase the thyroid hormone level, but its short-term mechanism may not be related to promoting the level of *NIS*.

[Key words] thyroid gland; metformin; thyroid hormones; hypothyroidism; sodium iodide symporters

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2017, 38(5): 589-594]

在糖尿病患者中,甲状腺功能异常的发生率居高不下,其中以甲状腺功能减退(以下简称“甲减”)最为常见^[1]。一项基于 1 310 例糖尿病患者的大型临床研究显示,甲状腺功能障碍的总体患病率为 13.4%,其中包括 8.8%的男性和 16.8%的女性,明显高于基础人群的患病率(6.6%)^[2]。二甲双胍(metformin)是经典的降糖药物之一,但除了降糖作用以外,其还可用于治疗多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)^[3]、肿瘤^[4]、非酒精性脂肪性肝炎^[5]等。研究表明二甲双胍能降低糖尿病合并甲减或者亚临床甲减患者的促甲状腺激素(thyroid stimulating hormone, TSH)水平^[6-8],另有研究发现服用二甲双胍的糖尿病患者形成甲状腺肿和甲状腺结节的风险低于未服用患者^[9]。

目前,二甲双胍对甲状腺功能的研究仅限于有限的临床资料研究,而对于二甲双胍对甲状腺激素改变、形态及其机制尚缺乏动物实验研究。二甲双胍作用的细胞和分子机制是非常复杂和多方面的,但普遍认为二甲双胍诱导的腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)的激活在诸多效应中起了重要作用^[10-11]。而近年来有细胞实验表明 AMPK 通路能影响甲状腺的钠碘同向转运体(sodium/iodide symporter, *NIS*)水平和碘摄取^[12-13],碘的摄取对于甲状腺激素的合成至关重要。本实验通过构建甲减的大鼠模型,观察二甲双胍灌胃对甲减大鼠甲状腺激素水平的影响,并通过检测甲状腺 *NIS* 表达、观察甲状腺组织 H-E 染色情况等初步探讨其影响机制,为临床上二甲双胍应用于甲减的辅助治疗或者甲状腺肿瘤术后的 TSH 抑制治疗提供依据。

1 材料和方法

1.1 动物 取 3 个月龄雄性 SD 大鼠 36 只,体质量

(297.06±12.71) g,同批次购自上海斯莱克实验动物有限公司,饲养于第二军医大学药学院实验动物房[动物生产许可证号:SCXK(沪)2012-0003;动物使用许可证号:SYXK(沪)2012-0003],给予 12 h/12 h 昼夜节律,不限制摄食和饮水,每笼 6 只。室温控制在 20~25 °C,湿度控制在 55%左右。

1.2 动物模型的建立与分组处理 大鼠适应性饮水摄食 3 d 后,按体质量从低到高排序编号:1~36 号,然后根据在线随机种子数随机分组为正常对照(NC组)、甲减大鼠模型组(HT组)和二甲双胍组(Met组)。对 HT组和 Met组大鼠进行甲减造模,方法如下:将氨基三唑(AMT;美国 Sigma公司)按质量分数 0.01%溶于饮用水,喂养大鼠 4 周时于眼眶取血,检测血清 T₃、T₄ 水平以验证造模是否成功。造模成功后,HT组和 Met组饮用水改为 0.005% AMT 维持。NC组大鼠同期喂养普通饮用水。然后 Met组大鼠灌胃给予 1 mL/100 g 二甲双胍溶液[将 20 mg 二甲双胍(中美上海施贵宝制药有限公司,批号:国药准字 H20023371)溶解于 1 mL 5%羟甲基纤维素钠(CMC-Na;美国 Sigma公司)溶液];HT组和 NC组灌胃给予等体积的 0.05% CMC-Na。

1.3 甲状腺、下丘脑标本采集 大鼠腹腔注射 10%水合氯醛麻醉,股动脉放血处死大鼠后,剪开大鼠颈部皮肤,用镊子分开肌肉,可见甲状腺位于气管两侧,将甲状腺及气管剪下立即拍照,然后摘除甲状腺保存于-80 °C备用或固定行 H-E 染色。断头后剪除颅顶及侧壁骨质,充分显露脑组织,将鼠脑翻转,可见位于脑底中心、与周围组织界限清楚、米粒大小的菱形区域,即下丘脑,用镊子小心摘取保存于-80 °C备用。

1.4 甲状腺组织 H-E 染色 在灌胃 8 周后每组随机取 3 只大鼠,按照 1.3 项方法摘取甲状腺后,用 10%甲醛溶液固定 2 d,逐级脱水,二甲苯透明处理。

在恒温箱里石蜡包埋约 30 min 后,予-20 ℃冰冻切片机 4~7 μm 厚切片。然后置于 65 ℃恒温箱烤片 30 min,再依次脱蜡、逐级水化,用纯水冲洗 10 min。苏木精液染色 5 min,伊红染色 2 min,最后用二甲苯透明,65 ℃恒温箱放置 15 min 后通过显微镜观察拍照。

1.5 电化学发光法检测大鼠血清 T₃、T₄ 水平 分别于灌胃第 8 周和第 12 周后处死大鼠(每组 6 只),股动脉放血取血,离心后的血清采用德国罗氏 CobasE602 型全自动电化学发光分析仪检测 T₃、T₄ 水平。T₃、T₄ 正常参考值范围分别是 1.3~3.1 nmol/L、66.00~181.00 nmol/L。

1.6 qPCR 检测大鼠下丘脑促甲状腺激素释放激素前体(*proTRH*)和甲状腺 NIS mRNA 表达 于灌胃第 8 周和第 12 周末摘取大鼠下丘脑和甲状腺组织,采用 TRIzol 法提取样品总 RNA,反转录合成 cDNA,以 β actin 作为内参照基因,采用 qPCR 试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司)检测大鼠下丘脑 *proTRH* 和甲状腺 NIS mRNA 表达。反应条件:95 ℃ 5 min;95 ℃ 15 s,56 ℃ 20 s,72 ℃ 35 s,循环 40 次。引物序列为 *proTRH*:F 5'-GAC CCT GGA TTC GGG AGT AT-3',R 5'-CAT CCT GGA GTC TGC GAA GTG-3'; NIS: F 5'-GAG CCA CCA ACG CTT CCA AC-3',R 5'-AGG TCC CAC CAC AGC AAT CC-3'; β actin: F 5'-GCT ATG TTG CCC TAG ACT TCG A-3',R 5'-GAT GCC ACA GGA TTC CAT ACC-3'。所得数据用 ABI Prism 7300 SDS 软件整理,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行半定量分析。

1.7 蛋白质印迹法检测大鼠甲状腺组织 NIS 蛋白表达 分离甲状腺组织,剪碎、匀浆,提取组织样品,BCA 法行蛋白定量,PAGE 胶分离蛋白,转膜,5% 脱脂奶粉封闭 1 h,分别加入稀释好的 NIS 抗体(1:1 000;A9605,美国 ABclonal 公司)和内参照蛋白 GAPDH 抗体(1:1 000;5174,美国 CST 公司)4 ℃孵育过夜,TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,加二抗孵育,洗膜后显影拍照。用 Image J 图像分析软件测定灰度值并进行半定量分析。

1.8 统计学处理 应用 SPSS 19.0 软件进行数据分析。计量资料若符合正态分布则用 $\bar{x}\pm s$ 表示;若不符合正态分布,则用中位数(Q₁,Q₃)表示。正态分布的计量资料两组间比较采用 *t* 检验;正态分布且方差齐性时多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),并采用 SNK 检验进行两两比较;若非正态分布或者方差不齐时则用非参数检验。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 一般情况 NC 组大鼠毛发整齐,有光泽,体质量随时间增加。HT 组和 Met 组大鼠饮用含 0.01% AMT 水 4 周后体质量几乎没有增加,且毛发稍杂乱,色泽轻微晦暗,精神较差。造模后称量体质量显示 HT 组、Met 组大鼠体质量均低于 NC 组大鼠($P<0.05$),而 HT 组与 Met 组差异无统计学意义($P>0.05$)。灌胃给药 8 周和 12 周后,HT 组、Met 组大鼠体质量均仍低于 NC 组大鼠($P<0.05$),HT 组与 Met 组差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠不同时间点的体质量

Tab 1 Body mass of rats at different time points in each group

Group	m/g, $\bar{x}\pm s$			
	Before modeling n=12	After modeling n=12	Intragastric administration for 8 weeks n=6	Intragastric administration for 12 weeks n=6
NC	304.40±7.97	450.17±20.19	509.55±30.04	539.00±30.58
HT	295.94±12.28	304.83±24.29*	348.73±37.12*	465.20±40.74*
Met	295.79±13.63	299.76±26.07*	359.93±29.68*	453.69±32.13*

NC: Normal control; HT: Hypothyroidism; Met: Metformin. * $P<0.05$ vs NC group

2.2 二甲双胍减轻甲减大鼠的甲状腺肿大 如图 1 所示,灌胃 12 周后 NC 组大鼠甲状腺颜色淡红,峡部菲薄,两侧甲状腺对称而体积正常;HT 组甲状腺颜色暗红,血流丰富,峡部明显增厚,两侧甲状腺不规则肿大;Met 组甲状腺较 HT 组颜色淡,相对 HT 组峡部较薄,甲状腺肿大较 HT 组改善。

2.3 二甲双胍改善甲减大鼠的甲状腺滤泡上皮增生 H-E 染色结果显示 NC 组滤泡大小不等,内见大量胶质及吸收空泡;HT 组大鼠甲状腺滤泡缩小,滤泡上皮成柱状,滤泡周围吸收空泡减少,部分滤泡间纤维组织增生;Met 组甲状腺滤泡大小不等,滤泡上皮增生较 HT 组稍改善(图 2)。

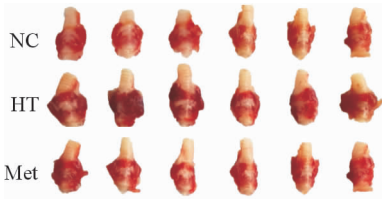


图1 灌胃12周后各组大鼠甲状腺外观图

Fig 1 Appearance of rat thyroids in each group after intragastric administration for 12 weeks

NC: Normal control; HT: Hypothyroidism; Met: Metformin

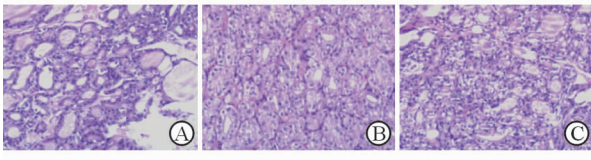


图2 各组大鼠甲状腺组织H-E染色

Fig 2 Thyroid tissues of rats in each group by H-E staining

A: Normal control; B: Hypothyroidism; C: Metformin. Original magnification: $\times 200$

2.4 二甲双胍升高甲减大鼠的血清 T₃、T₄ 水平 饮用0.01% AMT 4周后 HT组、Met组大鼠血清 T₃、T₄ 水平均低于 NC组 ($P < 0.05$)。灌胃8周、12周后 HT组大鼠血清 T₃、T₄ 水平均低于 NC组 ($P < 0.05$)；Met组 T₃、T₄ 水平均高于 HT组 ($P < 0.05$)。见图3。

2.5 二甲双胍对甲减大鼠下丘脑 *proTRH* mRNA 及甲状腺 NIS 的 mRNA 和蛋白表达的影响 灌胃8周后, HT组 (1.66 ± 0.55) 大鼠下丘脑 *proTRH* mRNA 表达高于 NC组 (1.00 ± 0.33), 而 Met组 (1.27 ± 0.54) 表达低于 HT组 (P 均 < 0.05)。检测

大鼠甲状腺组织中 NIS mRNA 和蛋白表达水平, 结果(图4A~4C)显示灌胃8周时, HT组 NIS mRNA 水平高于 NC组 ($P < 0.05$), 两组间 NIS 蛋白表达水平差异无统计学意义, 而 Met组大鼠甲状腺组织中 NIS mRNA 和蛋白表达均低于 HT组 ($P < 0.05$)；灌胃12周(图4D~4F)时, HT组大鼠甲状腺组织中 NIS mRNA 表达与 Met组差异无统计学意义, 但 Met组 NIS 蛋白表达高于 HT组 ($P < 0.05$)。

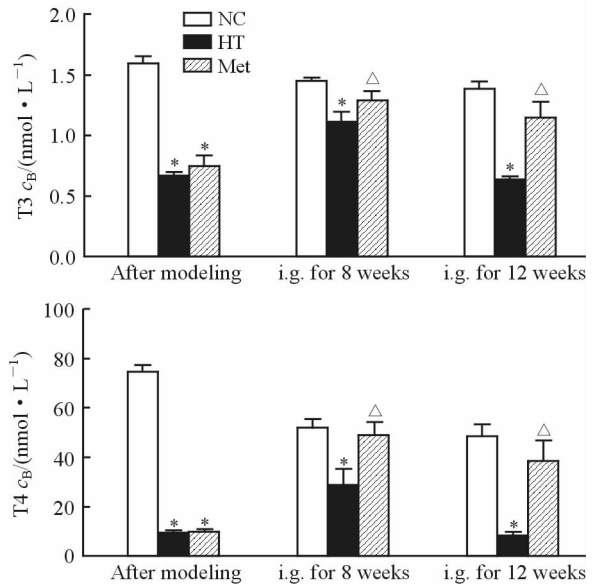


图3 二甲双胍对甲减大鼠血清 T₃、T₄ 水平的影响

Fig 3 Effect of metformin intragastric administration on serum T₃ and T₄ levels of HT rats

NC: Normal control; HT: Hypothyroidism; Met: Metformin. i. g. : Intra-gastric administration. * $P < 0.05$ vs NC group; $\Delta P < 0.05$ vs HT group. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$

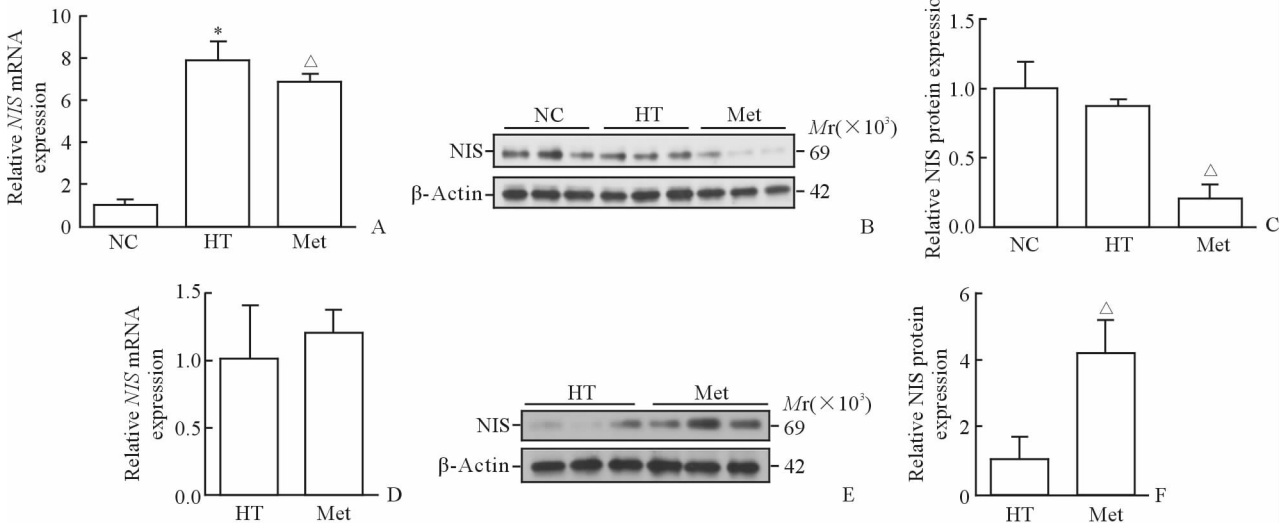


图4 二甲双胍对甲减大鼠甲状腺 NIS mRNA 和蛋白表达的影响

Fig 4 Effect of metformin intragastric administration on expression of NIS mRNA and protein in thyroid of HT rats

A-C: Intra-gastric administration for 8 weeks; D-F: Intra-gastric administration for 12 weeks. NC: Normal control; HT: Hypothyroidism; Met: Metformin. NIS: Sodium/iodide symporter. * $P < 0.05$ vs NC group; $\Delta P < 0.05$ vs HT group. $n = 6$ in Fig 4A and 4D; $n = 3$ in Fig 4C and 4F.

3 讨论

糖尿病合并甲减或亚临床甲减是临床上较为常见的现象,而二甲双胍又是糖尿病患者应用最多的一线口服降糖药物。Vigersky 等^[14]对 3 例伴有原发性甲减的糖尿病患者加用口服二甲双胍后,发现 TSH 水平明显降低,其降低程度与二甲双胍剂量相关,而 T₃、T₄ 水平无明显变化。后来基于多个临床研究的 meta 分析也表明二甲双胍能降低糖尿病伴甲减或者亚临床甲减患者的 TSH 水平,但不改变 T₃、T₄ 水平^[15],其具体机制目前尚不明确。

本实验首先通过将 AMT 溶于水配成 0.01% AMT 水喂养大鼠 4 周,成功构建了甲减模型。AMT 构建甲减模型具有周期短、造模方便等优势,是常用的甲减造模方法^[16-17]。造模成功后,HT 组大鼠精神状态差,体质量下降,毛发无光泽,摄食、饮水量减少,检测甲状腺功能显示 T₃、T₄ 水平低于正常值。甲状腺外观显示,甲减大鼠甲状腺明显肿大,峡部增厚,颜色加深提示血流丰富,均符合甲减表现。H-E 染色结果显示 NC 组大鼠甲状腺滤泡大小不等,内见大量胶质及吸收空泡;而 HT 组大鼠甲状腺滤泡缩小,滤泡上皮成柱状,滤泡周围吸收空泡减少,部分滤泡间纤维组织增生,滤泡上皮增生,符合甲减时应对 TSH 刺激的表现。

对甲减大鼠分别灌胃 8 周、12 周二甲双胍后,Met 组大鼠相比 HT 组 T₃、T₄ 水平升高,差异均有统计学意义。这不同于以往大多数临床研究提出的二甲双胍仅可以降低甲减患者 TSH 水平而对 T₃、T₄ 水平无影响的观点^[7-8,14],我们的动物实验表明二甲双胍还能升高甲减大鼠 T₃、T₄ 水平,同时降低下丘脑 *proTRH* mRNA 表达水平。值得注意的是,Isidro 等^[6]的前瞻性研究使用二甲双胍干预糖尿病合并甲减的患者后,不仅 TSH 水平下降,游离 T₄ (FT₄) 的平均水平也有所上升,但差异无统计学意义;停用二甲双胍 3 个月后,FT₄ 水平下降且差异有统计学意义,该研究与我们的结果一致,提示二甲双胍降低 TSH 水平可能与直接提高甲状腺激素水平有关。特别是近年来报道二甲双胍作为一种 AMPK 激动剂,能影响甲状腺的 NIS 蛋白及摄碘功能,更加支持了二甲双胍对甲状腺激素合成的直接效应。甲状腺激素的合成与多种因素相关,包括碘的摄取、酪氨酸的碘化、甲状腺过氧化物酶的活性等。其中 NIS 介导的碘的摄取是甲状腺激素合成的第一步^[18]。2011 年 Andrade 等^[12]最早报道

AMPK 能调节 NIS 表达和碘摄取,他们使用 AMPK 激动剂 AICAR 处理 PCCL3 大鼠甲状腺滤泡上皮细胞后,其碘摄取和 NIS 表达均被抑制,而这个效应能被 AMPK 抑制剂 compound C 逆转。随后,2014 年 Abdulrahman 等^[13]在通过用二甲双胍和 compound C 处理 CFRTL-5 大鼠甲状腺滤泡上皮细胞得到了类似的结果,分别能降低和升高 NIS 水平和摄碘率。

为了探究二甲双胍改善甲状腺功能的原因是否与 NIS 转录和表达水平相关,我们检测了 8 周和 12 周 2 个不同时间点的 NIS mRNA 和蛋白水平。我们发现构建大鼠甲减模型后,HT 组 NIS mRNA 表达高于 NC 组,这与其他文献^[19]报道的甲减模型相一致。其 NIS mRNA 升高原因一方面是甲减后 TSH 反馈性升高,而 TSH 是影响 NIS 表达和定位的重要因素,对 NIS 基因的表达起到促进作用^[20];另外 AMT 本身可能与丙硫氧嘧啶相似,能在 TSH 不存在的情况下促进 NIS 蛋白表达^[21]。而用二甲双胍灌胃 8 周后,Met 组 NIS mRNA 和蛋白水平均较 HT 组下降,这与 Abdulrahman 等^[13]的细胞实验结果相一致,提示二甲双胍能降低甲状腺 NIS 的转录和表达水平。但继续延长灌胃时间到 12 周后,Met 组 NIS mRNA 表达与 HT 组差异无统计意义,而 NIS 蛋白表达高于 HT 组,但灌胃第 8 周和第 12 周时 Met 组 T₃、T₄ 水平均高于 HT 组,提示甲减大鼠 8 周内甲状腺激素的增加并非由 NIS 表达升高所致,而 12 周时甲状腺的摄碘功能的提高可能与 NIS 蛋白表达增加有关。

本实验尚存在一些不足之处。第一,TSH 作为一个重要的甲状腺功能指标,不能通过临床所用的电化学发光仪器检测,故本实验缺乏大鼠血清 TSH 的数据,我们将会在后期的实验中用放射免疫检测方法检测这一指标,以进一步明确本实验结论。第二,甲减大鼠二甲双胍灌胃第 8 周和第 12 周时得到 NIS mRNA 和蛋白表达结果不同,这一现象值得进一步探讨。

二甲双胍作为甲减的补充治疗可能减少甲状腺激素的用量,从而最大限度地减少高剂量甲状腺激素诱导的骨代谢异常和心血管不良反应的发生,值得进一步深入研究,为糖尿病以及甲减的综合治疗提供新的思路和方法。本实验发现二甲双胍能够改变甲减大鼠甲状腺 NIS mRNA 和蛋白的表达,且能升高甲状腺激素水平,这些结论可能对以后的相关临床工作有着深远意义。

[参考文献]

- [1] KADIYALA R, PETER R, OKOSIEME O E. Thyroid dysfunction in patients with diabetes: clinical implications and screening strategies[J]. *Int J Clin Pract*, 2010, 64: 1130-1139.
- [2] PERROS P, McCRIMMON R J, SHAW G, FRIER B M. Frequency of thyroid dysfunction in diabetic patients: value of annual screening[J]. *Diabet Med*, 1995, 12: 622-627.
- [3] PALOMBA S, FALBO A, JR O F, ZULLO F. Effect of preconceptional metformin on abortion risk in polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials[J]. *Fertil Steril*, 2009, 92: 1646-1658.
- [4] CURRIE C J, POOLE C D, GALE E A. The influence of glucose-lowering therapies on cancer risk in type 2 diabetes[J]. *Diabetologia*, 2009, 52: 1766-1777.
- [5] UYGUN A, KADAYIFCI A, ISIK A T, OZGURTAS T, DEVECI S, TUZUN A, et al. Metformin in the treatment of patients with non-alcoholic steatohepatitis [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2004, 19: 537-544.
- [6] ISIDRO M L, PENÍN M A, NEMIÑA R, CORDIDO F. Metformin reduces thyrotropin levels in obese, diabetic women with primary hypothyroidism on thyroxine replacement therapy[J]. *Endocrine*, 2007, 32: 79-82.
- [7] CAPPELLI C, ROTONDI M, PIROLA I, AGOSTI B, GANDOSSI E, VALENTINI U, et al. TSH-lowering effect of metformin in type 2 diabetic patients: differences between euthyroid, untreated hypothyroid, and euthyroid on L-T4 therapy patients [J]. *Diabetes Care*, 2009, 32: 1589-1590.
- [8] FOURNIER J P, YIN H, YU O H, AZOULAY L. Metformin and low levels of thyroid-stimulating hormone in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. *CMAJ*, 2014, 186: 1138-1145.
- [9] BLANC E, PONCE C, BRODSCHI D, NEPOTE A, BARRETO A, SCHNITMAN M, et al. Association between worse metabolic control and increased thyroid volume and nodular disease in elderly adults with metabolic syndrome[J]. *Metab Syndr Relat Disord*, 2015, 13: 221-226.
- [10] GIANNARELLI R, ARAGONA M, COPPELLI A, DEL P S. Reducing insulin resistance with metformin: the evidence today[J]. *Diabetes Metab*, 2003, 29(4 Pt 2): 6S28-6S35.
- [11] RENA G, PEARSON E R, SAKAMOTO K. Molecular mechanism of action of metformin: old or new insights? [J]. *Diabetologia*, 2013, 56: 1898-1906.
- [12] ANDRADE B M, ARAUJO R L, PERRY R L, SOUZA E C, CAZARIN J M, CARVALHO D P, et al. A novel role for AMP-kinase in the regulation of the Na⁺/I⁻-symporter and iodide uptake in the rat thyroid gland[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2011, 300: C1291-C1297.
- [13] ABDULRAHMAN R M, BOON M R, SIPS H C, GUIGAS B, RENSEN P C, SMIT J W, et al. Impact of metformin and compound C on NIS expression and iodine uptake *in vitro* and *in vivo*: a role for CRE in AMPK modulation of thyroid function[J]. *Thyroid*, 2014, 24: 78-87.
- [14] VIGERSKY R A, FILMORE-NASSAR A, GLASS A R. Thyrotropin suppression by metformin[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006, 91: 225-227.
- [15] LUPOLI R, DI M A, TORTORA A, AMBROSINO P, LUPOLI G A, DI M M. Effects of treatment with metformin on TSH levels: a meta-analysis of literature studies[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2014, 99: 143-148.
- [16] CARNEIRO I, CASTRO-PIEDRAS I, MUÑOZ A, LABANDEIRA-GARCÍA J L, DEVEJA J, ARCE V M. Hypothyroidism is associated with increased myostatin expression in rats[J]. *J Endocrinol Invest*, 2008, 31: 773-778.
- [17] LÓPEZ M, VARELA L, VÁZQUEZ M J, RODRÍGUEZ-CUENCA S, GONZÁLEZ C R, VELAGAPUDI V R, et al. Hypothalamic AMPK and fatty acid metabolism mediate thyroid regulation of energy balance[J]. *Nat Med*, 2010, 16: 1001-1008.
- [18] DOHÁN O, DE L V A, PARODER V, RIEDEL C, ARTANI M, REED M, et al. The sodium/iodide symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance[J]. *Endocr Rev*, 2003, 24: 48-77.
- [19] AEL-A H, ABBAS A M, EL WAKIL G A, ELSAMANOUDY A Z, EL AZIZ A A. Effect of chronic excess iodine intake on thyroid function and oxidative stress in hypothyroid rats[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2012, 90: 617-625.
- [20] TAKI K, KOGAI T, KANAMOTO Y, HERSHMAN J M, BRENT G A. A thyroid-specific far-upstream enhancer in the human sodium/iodide symporter gene requires Pax-8 binding and cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate response element-like sequence binding proteins for full activity and is differentially regulated in normal and thyroid cancer cells[J]. *Mol Endocrinol*, 2002, 16: 2266-2282.
- [21] SUE M, AKAMA T, KAWASHIMA A, NAKAMURA H, HARA T, TANIGAWA K, et al. Propylthiouracil increases sodium/iodide symporter gene expression and iodide uptake in rat thyroid cells in the absence of TSH[J]. *Thyroid*, 2012, 22: 844-852.