

网络出版时间: 2020/5/29 13:03 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20200527.1643.018.html>

桥本甲状腺炎对妊娠早期小鼠海马 5-羟色胺及受体的影响

夏 琴 杨 昊 柳田田 程 锦 吴章碧 王 囡 朱德发

摘要 目的 研究桥本甲状腺炎(HT)对妊娠早期小鼠海马组织 5-羟色胺(5-HT)含量及 5-羟色胺 2c 受体(5-HT_{2CR})分布的影响。方法 将 70 只 NOD 雌性小鼠随机均分为正常怀孕组(CON 组)、HT 怀孕组(HT 组)。通过猪甲状腺球蛋白(pTg)联合弗氏佐剂 2 次诱导免疫建立 HT 小鼠模型。随后与雄鼠合笼,妊娠 4.5 d 结束,每组随机选取 16 只孕鼠取材。通过 ECLIA、ELISA 测定血清甲状腺激素及抗体水平;甲状腺 HE 染色;ELISA 检测各组小鼠海马 5-HT 含量;Western blot 及免疫组织化学法观察各组小鼠海马 5-HT_{2CR} 含量及分布情况。结果 与 CON 组相比,HT 组血清甲状腺过氧化物酶抗体(TPOAb)、抗甲状腺球蛋白抗体(TGAb)水平升高($P < 0.05$)。游离三碘甲状腺原氨酸(FT₃)、游离四碘甲状腺原氨酸(FT₄)、促甲状腺激素(TSH)差异无统计学意义;HE 染色显示,HT 组小鼠较 CON 组小鼠甲状腺可见部分甲状腺滤泡破坏及淋巴细胞浸润;与 CON 组相比,HT 组小鼠海马 5-HT 表达水平降低($P < 0.01$);与 CON 组相比,HT

组 5-HT_{2CR} 表达水平升高($P < 0.001$),主要分布在海马 CA3 区锥体细胞层($P < 0.01$),CA1 和 DG 区有增高趋势。结论 HT 导致妊娠早期小鼠海马 5-HT 表达降低,5-HT_{2CR} 表达增加。

关键词 桥本甲状腺炎;妊娠;5-羟色胺;5-羟色胺 2C 受体

中图分类号 R 581.9; R 714.1; R 338.14

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)06-0915-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.06.018

桥本甲状腺炎(hashimoto's thyroiditis, HT)是一种自身免疫性疾病,又称慢性淋巴细胞性甲状腺炎,多发于女性^[1]。其特征为血清甲状腺过氧化物酶抗体(thyroid peroxidase antibody, TPOAb)、抗甲状腺球蛋白抗体(thyroid globulin antibody, TGAb)滴度显著升高,伴部分甲状腺滤泡破坏、甲状腺淋巴细胞浸润。近年来临床^[2-3]发现妊娠合并 TPOAb、TGAb 阳性患者情绪障碍的发病率增加。5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)是一种参与情绪调节的重要神经递质,其神经元位于脑干中缝核投射大脑半球的许多区域,包括前额叶皮质、海马、伏隔核、纹状体等^[4]。5-HT 有 7 种受体,可通过与受体作用发挥

2019-10-15 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81272152)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院老年内分泌科,合肥 230022

作者简介:夏 琴,女,硕士研究生;

朱德发,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-

mail: zdfa0168@sina.com

and empty virus. Then three types of wild type, Arg 307 > Gln mutant and empty virus were set up separately, and each type was randomized into three groups: monosodium urate (MSU) (Group M), MSU and adenosine triphosphate (ATP) (Group MA) and unstimulated control group (Group C). Three groups of cells were stimulated by Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA), then PMA was removed by centrifugation. Group M and MA were added with MSU incubation, then ATP was added to MA group. Three groups of serum and cells were collected. Interleukin-1 β (IL-1 β) protein expression level in serum was detected by ELISA while mRNA expression of IL-1 β , oligomerization domain (NOD)-like receptor family, pyrin domain containing 3 (NLRP3), apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase-1 recruitment domain (ASC) and Caspase-1 in transfected THP-1 cells was detected by qRT-PCR. **Results** There was no significant difference between wild type, Arg 307 > Gln mutant and empty virus after adding MSU crystals alone ($P > 0.05$). However after incubation with ATP, the levels of IL-1 β and NLRP3 in the wild type were significantly higher than those in the Arg 307 > Gln mutant, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The mRNA levels of ASC and Caspase-1 in the ATP-P2X7R-IL-1 β signaling pathway were not significantly different between wild type and Arg 307 > Gln mutant ($P > 0.05$). **Conclusion**

Arg 307 > Gln mutant significantly down-regulated the function of P2X7R and reduced the expression levels of IL-1 β and NLRP3. Caspase-1 and ASC may be degraded during the activation pathway under high uric acid background.

Key words gouty arthritis; single nucleotide polymorphism; Arg 307 > Gln; interleukin-1 β

多种生理功能。其中 5-羟色胺 2c 受体 (5-hydroxytryptamine_{2c} receptor, 5-HT_{2CR}) 与情绪反应密切相关^[5]。现通过建立妊娠早期 HT 小鼠模型, 观察其海马 5-HT 和 5-HT_{2CR} 含量及分布是否受到影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 5~6 周龄 NOD 雌性小鼠 70 只, 雄性小鼠 16 只, 体质量 20~23 g, 取自北京华阜康生物科技有限公司, 在安徽医科大学实验动物中心 SPF 级动物实验室标准条件(室温 20~24 °C, 湿度 55%) 下喂养。

1.2 主要试剂及仪器 猪甲状腺球蛋白 (porcine thyroglobulin, pTg)、完全弗氏佐剂 (complete Freund's adjuvant, CFA)、不完全弗氏佐剂 (incomplete Freund's adjuvant, IFA) 均购自美国 Sigma 公司; 游离三碘甲状腺原氨酸 (free triiodothyronine, FT₃) 试剂盒、游离四碘甲状腺原氨酸 (free tetraiodothyronine, FT₄) 试剂盒、TGAb、TPOAb 试剂盒均购自德国 Roche 公司; 促甲状腺激素 (thyroid stimulating hormone, TSH) ELISA 试剂盒购自武汉云克隆科技股份有限公司; HE 染色试剂盒购自上海科汇生物技术有限公司; 5-HT ELISA 试剂盒 (瑞士 Enzo 公司, ADI-900-475); 兔抗鼠 5-HT_{2CR} 抗体 (北京博奥森公司, bs-2959 R); 免疫组织化学染色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 荧光显微镜 (日本 Olympus 公司); 形态学图像分析系统 (Image-ProPlus 6.0 美国 MEDIA CYBERNETICS 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物模型制备 适应性喂养 1 周后, 将 70 只 NOD 雌性小鼠随机均分为 2 组: 正常怀孕组 (CON 组)、HT 怀孕组 (HT 组)。造模步骤: 将 25 µg pTg 溶于 100 µl 生理盐水溶液中, CFA 与 pTg 溶液 1:1 混合于研钵中, 冰浴条件下研磨至完全乳化。在 HT 组小鼠尾部皮下注射 0.1 ml/只。CON 组注射含有等量生理盐水的 CFA 乳化剂。14 d 后将 CFA 替换成 IFA, 与 pTg 制备成乳化液, 同样操作方法在 HT 组小鼠尾根部 1 cm 处皮下注射 0.1 ml/只。在 CON 组注射等量不含 pTg 的 IFA 乳化剂。7 周后将 2 组小鼠分别以 2:1 比例随机与雄鼠合笼, 检测到阴栓记为 0.5 d。4.5 d 造模结束。每组各随机选取 16 只孕鼠进行实验。本实验经实验动物伦理审查。

1.3.2 血清制备及甲状腺激素水平测定 对小鼠

深度麻醉后处死, 打开小鼠腹腔, 用 1 ml 注射器行下腔静脉采血。4 °C 冰箱静置 6~8 h, 高速离心机 15 000 r/min 离心 15 min 2 次, 分离血清。ECLIA 检测 FT₃、FT₄、TGAb、TPOAb; ELISA 检测血清 TSH。

1.3.3 标本制备 小鼠处死后, 在冰上迅速解剖脑组织, 左侧脑组织固定于多聚甲醛中 24 h 后, 石蜡包埋, 连续矢状位切片 (5 µm 厚)。右侧脑组织迅速分离出海马组织放置无酶管中, -80 °C 冰箱保存; 分离甲状腺, 固定于多聚甲醛中, 石蜡包埋, 每只小鼠选取 5 个不相邻的冠状位切面。

1.3.4 甲状腺 HE 染色 甲状腺石蜡切片经二甲苯脱蜡后、各级乙醇水洗后, 苏木精染料染色 15 min, 盐酸乙醇分化后水洗返蓝后, 伊红染色 10 s, 再经脱水、封片。光学显微镜下拍摄图片。

1.3.5 ELISA 检测海马 5-HT 表达 在涂有 GxR IgG 抗体的孔中加入标准品和样品, 随后加入与碱性磷酸酶结合的 5-HT 溶液, 再加入兔血清素多克隆抗体溶液。在室温下同时孵育期间, 抗体以竞争性的方式与样品或结合物中的 5-HT 结合, 然后加入 pNpp 基体溶液。碱性磷酸酶催化 5-HT 偶联物致底物变成黄色, 添加停止液。酶标仪 405 nm 处测定吸光度 (optical density, OD) 值。计算样本中 5-HT 的浓度。

1.3.6 海马 5-HT_{2CR} 总蛋白提取和 Western blot

1.3.6.1 海马总蛋白提取 取海马组织置于 1.5 ml EP 管中, 加入组织裂解液及蛋白酶抑制剂, 电动匀浆器冰上匀浆。4 °C、15 000 r/min 离心 15 min; 重复操作 1 次; 用 BCA 法对样品进行蛋白定量。按比例样品中加入 5 × 蛋白电泳上样缓冲液, 然后热浴锅 100 °C、10 min 蛋白变性, -20 °C 冰箱分装保存。

1.3.6.2 Western blot 各样本上样量 18 µg, 加电泳缓冲液进行 SDS-PAGE 电泳; 转膜 3 h, 丽春红染色; 脱脂牛奶室温封闭 2 h; GAPDH (1:4 000) 室温孵育 40 min, 一抗 5-HT_{2CR} (1:500) 室温孵育 120 min; GAPDH 二抗 (1:150 000) 室温孵育 40 min, 5-HT_{2CR} 二抗 (1:100 000) 室温孵育 120 min。丽春红染色后三蒸水水洗 3 次, 每次 10 min, 牛奶封闭后水洗 3 次 7 min, 一抗二抗用 PBST 清洗 3 次 + PBS 清洗, 各 10 min。滴加超敏显影液置化学发光成像仪显影, 运用 IPP 6.0 分析蛋白条带灰度值。

1.3.7 免疫组织化学法 将海马石蜡切片放置 60 °C 烤箱 30 min, 二甲苯脱蜡 3 次 10 min, 乙醇梯度降低水化; PBS + Triton X-100 + 30% 过氧化氢细胞通

透; 枸橼酸钠盐加热修复抗原暴露抗原决定簇; 山羊血清封闭 30 min; 以上各步骤间使用 PBS 洗涤 3 次, 每次 3 min。5-HT₂CR 抗体(1:200)室温孵育 1 h 后孵育过夜(4℃); HRP 标记山羊抗兔 IgG 孵育 40 min(37℃); 以上各步骤间使用 PBS 洗涤 5 次, 每次 5 min; DAB 显色, 苏木精染色 18 s, 流水冲洗, PBS 8 min, 脱水、封片。应用光学显微镜观察 5-HT₂CR 分布及表达情况。

1.4 统计学处理 统计分析应用 SPSS 17.0 软件, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用两独立样本 *t* 检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠血清甲状腺激素及抗体水平 HT 组血清 TGA_b、TPOA_b 水平高于 CON 组(*P* < 0.05), FT₃、FT₄、TSH 水平差异无统计学意义。见表 1。

表 1 各组血清甲状腺激素及抗体水平(nmol/L, $\bar{x} \pm s$, *n* = 16)

项目	CON 组	HT 组	<i>t</i> 值
FT ₃	6.14 ± 0.64	6.07 ± 0.07	0.265
FT ₄	32.78 ± 5.25	31.59 ± 4.00	0.725
TSH	272.13 ± 38.24	273.42 ± 26.45	-0.111
TGA _b	13.07 ± 1.84	181.68 ± 46.00***	-14.649
TPOA _b	23.40 ± 6.34	49.25 ± 16.05***	-5.991

与 CON 组比较: *** *P* < 0.001

2.2 甲状腺 HE 染色 CON 组小鼠甲状腺组织分布均匀, 淋巴细胞浸润少见。HT 组小鼠甲状腺滤泡排列紊乱伴部分破坏及淋巴细胞浸润。见图 1。

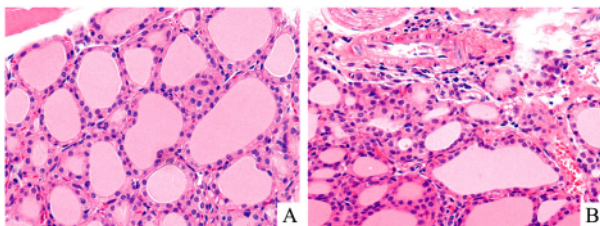


图 1 各组小鼠甲状腺 HE × 400

A: CON 组; B: HT 组

2.3 海马 5-HT 表达水平 与 CON 组相比, HT 组小鼠海马 5-HT 表达水平降低(*P* < 0.01)。见图 2。

2.4 海马 5-HT₂CR 的表达 与 CON 组相比, HT 组小鼠海马 5-HT₂CR 的含量上调(*P* < 0.001)。见图 3。

2.5 5-HT₂CR 在小鼠海马各区表达及分布情况 光镜下观察 5-HT₂CR 免疫反应产物呈棕黄色颗粒。主要存在于海马 CA1、CA3 区锥体细胞层和 DG 区

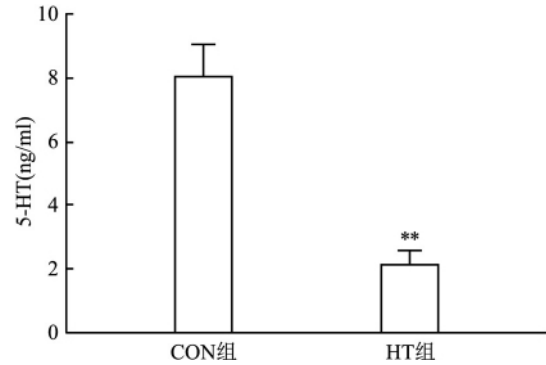


图 2 各组小鼠 5-HT 表达

与 CON 组比较: ** *P* < 0.01

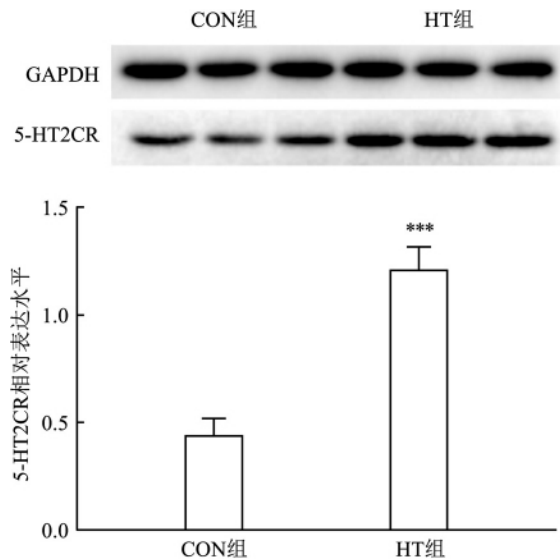


图 3 各组小鼠海马 5-HT₂CR 的表达

与 CON 组比较: *** *P* < 0.001

颗粒细胞中。CA1 区阳性颗粒主要分布锥体层, 腔隙层、放射层颗粒相对较少。CA3 区锥体细胞呈圆形或椭圆形, 突起长。免疫阳性反应物在锥体层最密集、深染, 呈小片或树枝交叉状分布, 放射层和腔隙层分布较少, 呈中空树样分布。DG 区颗粒细胞排列紧密 5-HT₂CR 免疫阳性反应物主要分布在分子层外三分之二。光镜下可见, HT 组棕黄色面积大于且颜色深于 CON 组。见图 4。

统计学分析小鼠海马各区 5-HT₂CR 免疫反应产物, 结果显示与 CON 组相比, HT 组 CA3 区表达增加(*P* < 0.01)。CA1 区、DG 区 AOD 值也有一定程度升高, 但差异无统计学意义。见表 2。

3 讨论

本研究选用 NOD 雌性小鼠, 利用 pTg 结合弗氏完全佐剂尾部底部皮下注射、弗氏不完全佐剂二次

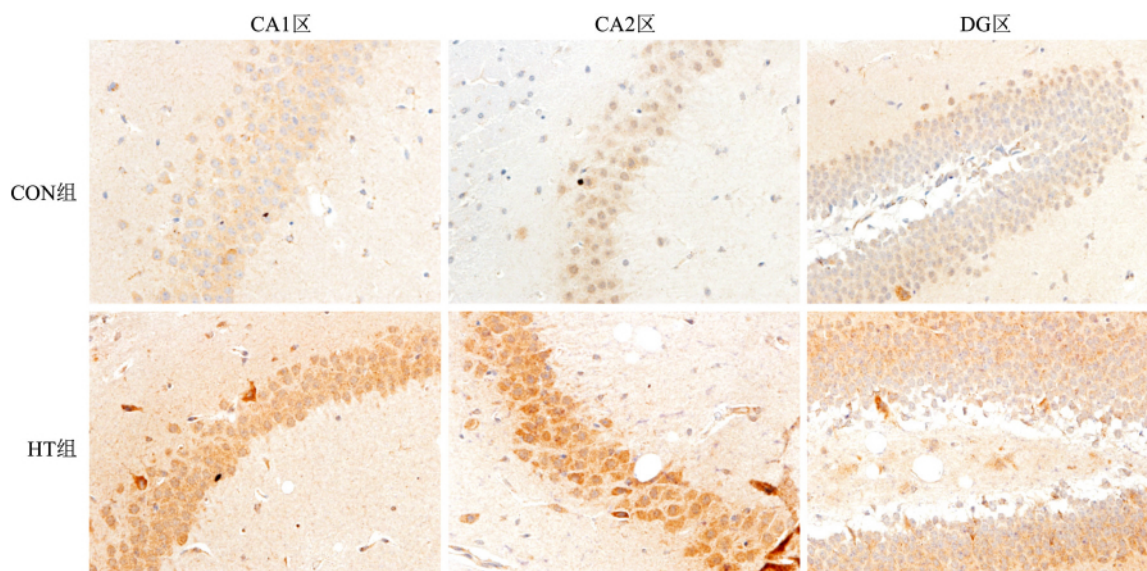


图4 5-HT2CR 免疫反应产物在小鼠海马各区的表达 ×400

表2 各组小鼠海马各区 5-HT2CR 表达水平($\bar{x} \pm s$ $n=16$)

项目	CON 组	HT 组	F 值
CA1	0.09 ± 0.04	0.12 ± 0.02	-1.482
CA3	0.08 ± 0.02	0.15 ± 0.00 **	-7.104
DG	0.10 ± 0.01	0.12 ± 0.01	-2.071

与 CON 组比较: ** $P < 0.01$

免疫^[6-7], 然后与雄鼠合笼, 妊娠 4.5 d 造模完成。结果显示, HT 组小鼠血清 TGAb 和 TPOAb 较 CON 组升高, 甲状腺病理切片呈甲状腺滤泡部分破坏及淋巴细胞浸润等形态学改变。FT3、FT4、TSH 与 CON 组相比差异无统计学意义, 提示造模成功。

实验通过 ELISA 检测显示在妊娠早期, HT 组小鼠海马组织中 5-HT 浓度低于 CON 组。课题组前期研究^[8]发现桥本甲状腺炎小鼠额叶内吲哚胺 2, 3-双加氧酶 1 (indoleamine pyrrole-2, 3-dioxygenase, IDO) 和 5-HT 转运体上调。IDO1 是 5-HT 前体色氨酸的关键代谢酶, 当 IDO1 激活时, 可以耗竭局部组织的色氨酸, 可能导致 5-HT 原料不足, 进而减少 5-HT 合成。而 5-HT 转运体表达上调则加速了该神经递质的再摄取, 推测桥本鼠额叶内 5-HT 减少与 IDO1 和 5-HT 转运体表达的变化有关。Metaxas et al^[9]研究发现阿尔茨海默症可增加小胶质细胞活化, 炎性因子释放增加, 诱导 5-HT 转运体失调机制, 干扰 5-羟色胺能神经传递, 降低 5-HT 水平。Wixey et al^[10]发现早产儿缺血缺氧后会导致神经炎症, 释放细胞毒性物质, 影响 5-HT 转运体的表达, 损伤 5-HT 能系统。结合以上研究推测在妊娠早

期, HT 小鼠海马内 5-HT 浓度降低可能与 IDO1 和 5-HT 转运体表达异常有关, 具体机制有待进一步研究。

5-HT 主要通过激活受体发挥作用。其中 5-HT_{2CR} 是 G 蛋白偶联受体, 为突触后受体, 通过磷脂酶 C 激活第二信使传递信号引起下游细胞级联反应^[11], 主要分布在啮齿动物海马 CA3 区的锥体层, 其次为 CA1 区^[12], 与情绪反应密切相关。本实验通过 Western blot 法测得 HT 组海马组织 5-HT_{2CR} 相对灰度值高于 CON 组。免疫组化法显示 5-HT_{2CR} 免疫阳性颗粒主要表达于海马锥体细胞和颗粒细胞中。与 CON 相比, 阳性颗粒在 HT 组小鼠 CA3 区锥体层表达最多, CA1 区和 DG 区也有增高趋势。说明在妊娠早期, HT 小鼠海马 CA3 区 5-HT_{2CR} 的表达增加。Di et al^[13] 研究报道 5-HT 的缺失增加了 5-HT_{2CR} mRNA 的表达, 通过这种微调节机制以适应突触活动的变化。Han et al^[14] 研究表明在帕金森患者中缝核 5-HT_{2CR} 激活, 对 5-HT 的负性调控作用增强, 引起 5-HT 含量降低, 从而诱导焦虑行为发生。本实验研究与之一致。

参考文献

- [1] Michels A W, Eisenbarth G S. Immunologic endocrine disorders [J]. J Allergy Clin Immunol J Allergy Clin Immunol, 2010, 125 (2 Suppl 2): S226-37.
- [2] Pop V J, de Rooy H A, Vader H L, et al. Microsomal antibodies during gestation in relation to postpartum thyroid dysfunction and depression [J]. Acta Endocrinol (Copenh), 1993, 129(1): 26-30.

- [3] Wisner K L , Sit D K , McShea M C , et al. Onset timing , thoughts of self-harm , and diagnoses in postpartum women with screen-positive depression findings [J]. *JAMA Psychiatry* , 2013 , 70 (5) : 490 – 8.
- [4] Brummelte S , Mc Glanagh E , Bonnin A , et al. Developmental changes in serotonin signaling: Implications for early brain function , behavior and adaptation [J]. *Neuroscience* , 2017 , 342 : 212 – 31.
- [5] Tohda M , Nomura M , Nomura Y. Molecular pathopharmacology of 5-HT_{2C} receptors and the RNA editing in the brain [J]. *J Pharmacol Sci* , 2006 , 100 (5) : 427 – 32.
- [6] Damotte D , Colomb E , Cailleau C , et al. Analysis of susceptibility of NOD mice to spontaneous and experimentally induced thyroiditis [J]. *Eur J Immunol* , 1997 , 27 (11) : 2854 – 62.
- [7] Wang X , Liu H , Zhang Y , et al. Effects of isolated positive maternal thyroglobulin antibodies on brain development of offspring in an experimental auto-immune thyroiditis model [J]. *Thyroid* , 2015 , 25 (5) : 551 – 8.
- [8] Cai Y J , Wang F , Chen Z X , et al. Hashimoto's thyroiditis induces neuroinflammation and emotional alterations in euthyroid mice [J]. *J Neuroinflammation* , 2018 , 15 (1) : 299.
- [9] Metaxas A , Anzalone M , Vaitheeswaran R , et al. Neuroinflammation and amyloid-beta 40 are associated with reduced serotonin transporter (SERT) activity in a transgenic model of familial Alzheimer's disease [J]. *Alzheimers Res Ther* , 2019 , 11 (1) : 38.
- [10] Wixey J A , Reinebrant H E , Buller K M. Inhibition of neuroinflammation prevents injury to the serotonergic network after hypoxia-ischemia in the immature rat brain [J]. *J Neuropathol Exp Neurol* , 2011 , 70 (1) : 23 – 35.
- [11] Wold EA , Wild C T , Cunningham K A , et al. Targeting the 5-HT_{2C} receptor in biological context and the current state of 5-HT_{2C} receptor ligand development [J]. *Curr Top Med Chem* , 2019 , 19 (16) : 1381 – 98.
- [12] Clemett D A , Punhani T , Duxon M S , et al. Immunohistochemical localisation of the 5-HT_{2C} receptor protein in the rat CNS [J]. *Neuropharmacology* , 2000 , 39 (1) : 123 – 32.
- [13] Di Giovanni G , Di Matteo V , Pierucci M , et al. Central serotonin_{2C} receptor: from physiology to pathology [J]. *Curr Top Med Chem* , 2006 , 6 (18) : 1909 – 25.
- [14] Han L N , Zhang L , Li L B , et al. Activation of serotonin (2C) receptors in the lateral habenular nucleus increases the expression of depression-related behaviors in the hemiparkinsonian rat [J]. *Neuropharmacology* , 2015 , 93 : 68 – 79.

Effect of Hashimoto's thyroiditis on serotonin and receptors in hippocampus of mice during early pregnancy

Xia Qin , Yang Hao , Liu Tiantian , et al

(Dept of Elderly Endocrinology , The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University , Hefei 230022)

Abstract Objective To study the effects of Hashimoto's thyroiditis (HT) on the content of serotonin (5-HT) and the distribution of serotonin 2c receptor (5-HT_{2CR}) in hippocampus of early pregnant mice. **Methods** 70 NOD female mice were randomly divided into normal pregnancy group (CON group) and HT pregnancy group (HT group) . The HT mouse model was established by 2 times induction of immunization with porcine thyroglobulin (pTg) plus Freund's adjuvant. Then they were caged with male rats and ended at 4.5 d of pregnancy. Each group randomly selected 16 pregnant rats. Serum thyroid hormone and antibody levels were determined by electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) and enzyme-linked ELISA. Thyroid was stained by HE staining. The content of 5-HT in hippocampus of mice in each group was measured by ELISA. The content and distribution of 5-HT_{2CR} in hippocampus of mice in each group were observed by Western blot and immunohistochemistry. **Results** Compared with the CON group , the levels of thyroid peroxidase antibody (TPOAb) and anti-thyroglobulin antibody (TGAb) in the HT group increased ($P < 0.05$) , and there was no statistically significant difference in free triiodothyronine (FT₃) , free tetraiodothyronine (FT₄) and thyrotrophin (TSH) . HE staining showed that some thyroid follicles were destroyed and lymphocytes infiltrated in the thyroid gland of mice in HT group than those in CON mice. The expression of 5-HT in hippocampus of HT group was lower than that of CON group ($P < 0.01$) . The expression level of 5-HT_{2CR} of HT group was higher than that of CON group. The increase ($P < 0.001$) was mainly distributed in the pyramidal cell layer of hippocampal CA3 region ($P < 0.01$) , and the CA1 and DG regions showed an increasing trend. **Conclusion** HT leads to the decrease of 5-HT expression and the increase of 5-HT_{2CR} expression in hippocampus of early pregnancy mice.

Key words hashimoto's thyroiditis; pregnancy; 5-hydroxyammonia; 5-hydroxytryptamine_{2c} receptor