

网络出版时间: 2018-4-23 09:59 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20180420.1408.009.html>

左甲状腺素钠联合多奈哌齐治疗对成年甲减大鼠后扣带回 SNAP-25 表达的影响

陈章祥¹ 吴波¹ 朱敏¹ 李莉¹ 王取南² 朱德发¹

摘要 目的 研究左甲状腺素钠(L-T4)与多奈哌齐(DON)联合治疗对甲状腺功能减退症(简称甲减)大鼠后扣带回突触相关蛋白25(SNAP-25)表达的影响。方法 40只清洁级SD雄性大鼠,适应性饲养1周后随机分为正常对照组(CON组)、甲减组(Hypo组)、L-T4替代治疗组(L-T4组)、多奈哌齐治疗组(DON组)、联合治疗组(L-T4+DON组)。CON组正常饲养,余4组通过给予0.05%丙硫氧嘧啶(PTU)水饮用6周建立甲减大鼠模型。造模5周开始,给予左甲状腺素钠、多奈哌齐、左甲状腺素钠联合多奈哌齐治疗2周。通过放射免疫法测定血清甲状腺激素水平,尼氏染色法观察尼氏体数量,免疫组化法、Western blot法观察大鼠后扣带回SNAP-25的表达。结果 Hypo组、DON组大鼠较CON组血清甲状腺激素水平显著降低($P < 0.01$),L-T4组、L-T4+DON组血清甲状腺素水平与正常对照组差异无统计学意义。尼氏染色显示Hypo组较CON组尼氏体数量降低($P < 0.05$),DON组尼氏体数量较Hypo组增加($P < 0.05$),未恢复至CON组水平($P < 0.05$),L-T4+DON组尼氏染色显示与CON组比较差异无统计学意义,尼氏体数量恢复。免疫组化染色、Western blot法显示Hypo组、DON组后扣带回SNAP-25表达高于CON组($P < 0.05$);L-T4组SNAP-25表达低于Hypo组($P < 0.05$),未恢复至CON组水平($P < 0.05$);L-T4+DON组后扣带回SNAP-25表达与CON组差异无统计学意义。结论 成年期甲减大鼠后扣带回SNAP-25蛋白表达量升高($P < 0.05$)、尼氏体数量减少($P < 0.05$)。左甲状腺素钠与多奈哌齐联合治疗能够有效恢复突触蛋白和尼氏体的损伤。

关键词 甲状腺功能减退症;后扣带回;SNAP-25

中图分类号 R 581.2; R 322.81; R 347.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)04-0537-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.04.009

甲状腺功能减退症(简称甲减)可引起中枢神

2017-12-22 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81272152)

作者单位: ¹ 安徽医科大学第一附属医院老年内分泌科,合肥 230022

² 安徽医科大学卫生毒理学教研室,合肥 230032

作者简介: 陈章祥 男 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

经系统结构和功能异常^[1],甲减患者常存在工作记忆、学习能力损伤^[2]。过去研究多基于海马和额叶。甲减的功能影像学显示扣带回等边缘系统在学习、记忆功能中有重要作用^[1]。后扣带回(posterior cingulate cortex, PCC)是边缘系统的重要组成部分,是监控感觉及记忆的组织。有研究^[3]显示轻度认知障碍的阿尔兹海默症患者即可出现后扣带回损伤,本研究通过神经元的尼氏体和可溶性 NSF 附着蛋白受体(soluble nethylmaleimidesensitive fusion protein attachment protein receptors, SNARE)复合体中的SNAP-25表达来观察后扣带回改变。尼氏体是神经元的特征性结构之一,主要合成细胞器更新所需蛋白、合成递质所需的酶等。突触相关蛋白25(synaptosomal associated protein25, SNAP-25)是SNARE复合体的重要组成部分,通过影响突触小泡的胞吐外排和递质释放改变突触信号强度^[4],在学习记忆中有重要意义。多奈哌齐(donepezil)是选择性乙酰胆碱酯酶抑制剂,能够提高脑部乙酰胆碱功能,有效改善认知功能障碍,也有研究^[5]显示其对神经元有直接保护作用。该研究旨在观察甲减大鼠PCC内SNAP-25蛋白和尼氏体的表达情况,观察L-T4联合多奈哌齐治疗效果。

1 材料与方法

1.1 实验动物 清洁级健康SD雄性大鼠(10周龄)40只,240~270 g,购自安徽医科大学实验动物中心。温度21~23℃,湿度(55±5)%,自由饮水,标准饲料喂养。实验过程遵循《安徽医科大学实验用动物管理和使用指南》。

1.2 主要试剂及仪器

1.2.1 试剂 丙硫氧嘧啶(propylthiouracil, PTU)(上海朝晖药业有限公司);左甲状腺素(levothyroxine, L-T4)(德国默克雅柏药业有限公司);盐酸多奈哌齐(donepezil)(日本卫材药业有限公司);三碘甲状腺原氨酸(triiodothyronine, T3)、四碘甲状腺原氨酸(tetraiodothyronine, T4)、促甲状腺激素(thyroid-stimulating hormone, TSH)放射免疫试剂盒(北京北

方生物技术研究所以;尼氏染色液(上海碧云天生物技术研究所以);兔来源抗 SNAP-25 抗体、抗 GAPDH 单克隆抗体(美国 Abcam 公司);DAB 染色试剂盒、辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔 IgG 抗体(美国 Abclonal 公司)。

1.2.2 仪器 Microfuge 20R 台式微量离心机(美国贝克曼库尔特商贸有限公司);Synergy4 多功能酶标仪(美国伯腾仪器有限公司);GZX-9140MBE 电热恒温鼓风干燥箱(上海博讯宝业有限公司);WD-9405B 型脱色摇床(济南科赛特科技有限公司);DP71 光学显微镜(日本奥林巴斯株式会社);Fine-do X6 化学发光成像系统(上海天能科技有限公司)。

1.3 动物模型制备 适应性喂养 1 周后,采用随机数表法将大鼠随机均分为 5 组:正常对照组(CON 组)、甲减组(Hypo 组)、L-T₄ 替代治疗组(L-T₄ 组)、多奈哌齐治疗组(DON 组)、联合治疗组(L-T₄ + DON 组)每组 8 只。CON 组正常饮水,其余 4 组给予 0.05% PTU 喂养 6 周制备甲减模型。造模第 5 周起,DON 组于饮水中加入 0.005% 多奈哌齐,L-T₄ 组每日给予腹腔注射 L-T₄(溶于生理盐水,6 μg/100 g 体重),L-T₄ + DON 组饮用水加入 0.005% 多奈哌齐以及腹腔注射 L-T₄。余下 3 组每日腹腔注射等量生理盐水。各组大鼠每周称重,治疗共 2 周,期间根据体重调整给药剂量。

1.4 标本制备 10% 水合氯醛(0.3 ml/100 g 体重)腹腔注射麻醉大鼠后,打开腹腔,腹主动脉采血。取血后立即断头处死大鼠,于冰台迅速分离大脑后扣带回组织,左侧后扣带回置于 -80 ℃ 冰箱储存,用于 Western blot 检测;右侧后扣带回浸泡于 4% 多聚甲醛溶液,固定待做尼氏染色、免疫组化染色。

1.5 血清甲状腺激素水平测定 放射免疫法测定大鼠血清 T₃、T₄、TSH 水平,严格按照放射免疫试剂盒操作说明进行。

1.6 尼氏染色 大鼠后扣带回蜡片置于 60 ℃ 烤箱 30 min,二甲苯脱蜡 3 次,每次 8 min,梯度乙醇水化;三蒸水洗涤 3 次,每次 2 min;尼氏染色液染色 1 h(37 ℃),三蒸水冲去染液;95% 乙醇分化 3 s,常规脱水、透明、封片;光学显微镜拍摄;图像分析软件分析染色物光密度值,取平均光密度(average optical density, AOD)值。

1.7 免疫组织化学染色 大鼠后扣带回蜡片置于 60 ℃ 烤箱 30 min,二甲苯脱蜡 3 次,每次 10 min,梯

度乙醇水化;TritonX-100 细胞通透,30% 过氧化氢阻断内源性过氧化物酶;柠檬酸盐微波炉加热暴露抗原决定簇;山羊血清封闭;以上各步骤间使用 PBS 洗涤 3 次,每次 3 min。SNAP-25 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 30 min(37 ℃);以上各步骤间使用 PBS 洗涤 5 次,每次 5 min;DAB 显色,常规脱水、透明、封片;应用光学显微镜拍摄;图像分析软件分析免疫反应产物的光密度值,取 AOD 值。

1.8 Western blot 法检测 SNAP-25

1.8.1 总蛋白提取 取后扣带回组织置于玻璃匀浆器中,加入 RIPA 裂解液 500 μl 和蛋白酶抑制剂 5 μl,冰上匀浆 70~75 次。4 ℃、15 000 r/min 离心 15 min,吸取上清液后 4 ℃、15 000 r/min 离心 5 min,吸取上清液,用 Lorry 法测定总蛋白浓度。使用 2 × 上样缓冲液稀释定量,100 ℃、10 min 蛋白变性,分装保存。

1.8.2 Western blot 法检测 制备 SDS-PAGE 凝胶,各组分别取蛋白样本 20 μg 进行电泳;聚偏二氟乙烯(PVDF)膜转膜 3 h;5% 脱脂奶粉封闭 1 h 30 min,三蒸水洗涤 3 次,每次 7 min;加入一抗 SNAP-25(1:5 000)或 GAPDH(1:10 000)孵育过夜(4 ℃)。PBST 洗膜 3 次,每次 10 min,PBS 洗涤 10 min;加入 HRP 室温孵育 1 h 30 min,PBST 洗膜 3 次,每次 10 min,PBS 洗涤 10 min;滴加 ECL 发光液,使用化学发光成像仪拍摄蛋白条带;Image pro plus 图像分析软件进行光密度分析,计算目的蛋白与内参对照 GAPDH 的光密度比值。

1.9 统计学处理 运用 SPSS 16.0 软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多样本均数比较采用单因素方差分析,进一步比较采用 LSD 法。

2 结果

2.1 大鼠血清甲状腺激素水平 Hypo 组、DON 组 T₃、T₄ 浓度较 CON 组显著降低,TSH 水平较 CON 组显著升高($P < 0.01$);L-T₄ 组和 L-T₄ + DON 组 T₃、T₄ 和 TSH 恢复正常,与 CON 组比较差异无统计学意义。见表 1。

2.2 尼氏染色 对各组大鼠后扣带回尼氏染色切片进行光密度值分析,Hypo 组较 CON 组 AOD 值减少($P < 0.05$),神经元内尼氏体数量减少;DON 组较 Hypo 组 AOD 值增加($P < 0.05$),未恢复至 CON 组水平($P < 0.05$);L-T₄ 组较 Hypo 组 AOD 值增加($P < 0.05$),未恢复至 CON 组水平($P < 0.05$);L-T₄

表1 各组大鼠血清甲状腺素水平($n=8$, $\bar{x} \pm s$)

项目	CON 组	Hypo 组	DON 组	L-T4 组	L-T4 + DON 组	F 值
T3(nmol/L)	0.80 ± 0.09	0.55 ± 0.06 **	0.57 ± 0.04 **	0.79 ± 0.14	0.82 ± 0.23	7.86
T4(nmol/L)	51.6 ± 3.79	19.36 ± 2.49 **	20.49 ± 3.22 **	50.9 ± 4.01	52.3 ± 5.32	139.78
TSH(μ mol/L)	0.99 ± 0.21	20.48 ± 7.13 **	19.18 ± 6.45 **	1.42 ± 0.52	1.17 ± 0.32	39.35

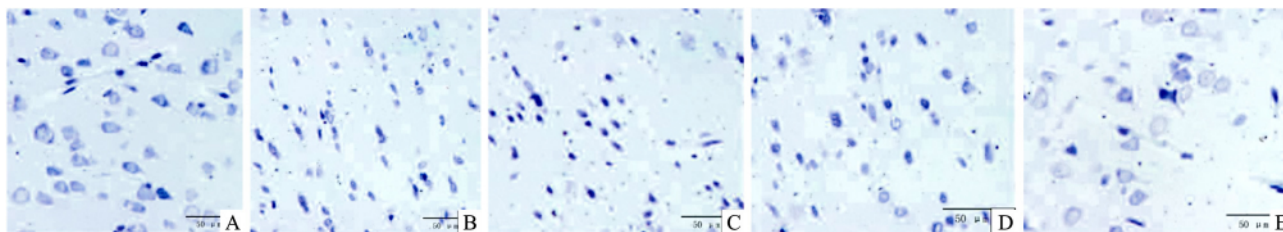
与 CON 组比较: ** $P < 0.01$ 

图1 各组后扣带回尼氏染色图片 SP × 400

A: CON 组; B: Hypo 组; C: DON 组; D: L-T4 组; E: L-T4 + DON 组

表2 各组大鼠尼氏染色 AOD 值($n=8$, $\bar{x} \pm s$)

项目	CON 组	Hypo 组	DON 组	L-T4 组	L-T4 + DON 组	F 值
尼氏染色	0.0554 ± 0.0081	0.0326 ± 0.0033 *	0.0414 ± 0.0041 * #	0.0385 ± 0.0042 * #	0.0547 ± 0.0076	28.24
免疫组化染色	0.153 ± 0.014	0.223 ± 0.026 *	0.213 ± 0.029 *	0.187 ± 0.027 * #	0.159 ± 0.019	16.90

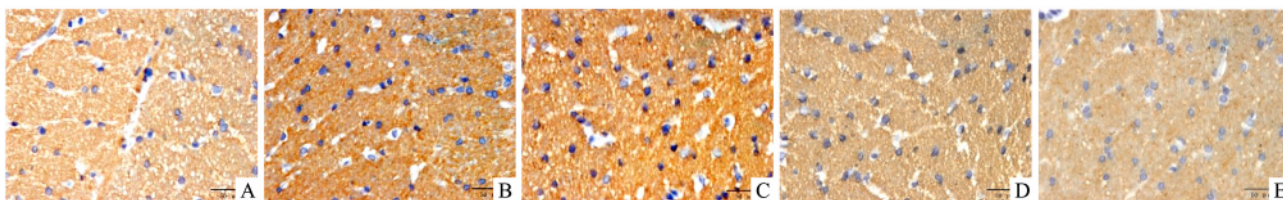
与 CON 组比较: * $P < 0.05$; 与 Hypo 组比较: # $P < 0.05$ 

图2 各组后扣带回 SNAP-25 免疫组化染色图片 SP × 200

A: CON 组; B: Hypo 组; C: DON 组; D: L-T4 组; E: L-T4 + DON 组

+ DON 组与 CON 组比较差异无统计学意义, 尼氏体数量恢复。见图1、表2。

2.3 免疫组化结果 光镜下可见后扣带回内 SNAP-25 免疫复合物呈棕黄色颗粒, Hypo 组 SNAP-25 的 AOD 值高于 CON 组 ($P < 0.05$); DON 组 SNAP-25 的 AOD 值较 Hypo 组差异无统计学意义, L-T4 组 SNAP-25 的 AOD 值较 Hypo 组有下降 ($P < 0.05$), 未恢复至 CON 组水平 ($P < 0.05$); L-T4 + DON 组 SNAP-25 的 AOD 值与 CON 组比较差异无统计学意义。见图2、表2。

2.4 Western blot 结果 Hypo 组大鼠 PCC 内 SNAP-25 表达较 CON 组显著增加 ($P < 0.05$), L-T4 组, DON 组损伤蛋白未恢复至正常水平 ($P < 0.05$), L-T4 + DON 组 SNAP-25 表达恢复, 与 CON 组比较差异无统计学意义。见图3。

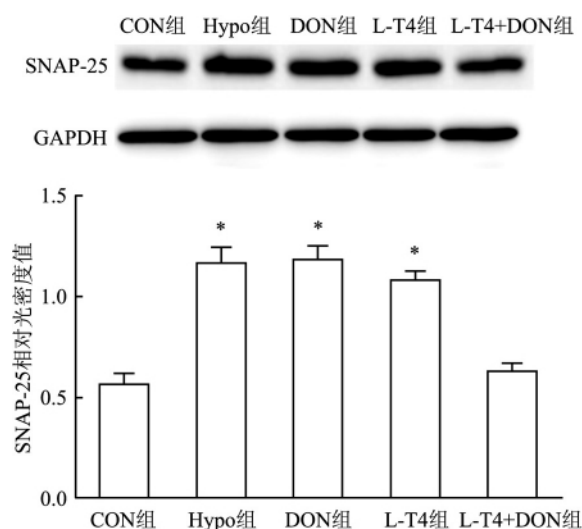


图3 各组大鼠后扣带回 SNAP-25 的表达

与 CON 组比较: * $P < 0.05$

3 讨论

尼氏体是神经元的特征性结构,主要分布于神经元胞体和树突内。当神经元受损,尼氏体将逐渐崩解,甚至消失,这种变化具有可逆性。本研究显示 Hypo 组大鼠尼氏体相较 CON 组数量减少,这种减少在甲减大鼠的海马中也有发现^[6],这提示神经递质合成受到影响。SNAP-25 是 SNARE 复合体组成部分,其在突触膜融合过程中起重要作用,也可以影响 SNARE 复合体形成过程,进而影响递质释放。免疫组化法和 Western blot 法显示在 Hypo 组大鼠 PCC 内 SNAP-25 表达较 CON 组增高。既往有研究^[7]显示甲减大鼠海马内 SNAP-25 表达增高,在成年期甲减大鼠额叶也表达增高^[8];小脑内 SNAP-25 表达水平未受影响^[9],差异原因尚不明确。有研究^[10]显示 SNAP-25 增多可能与甲减时裂解 SNAP-25 的钙蛋白酶减少有关。另一研究^[11]表明 SNAP-25 改变可能与 SNARE 复合体相关的突触结合蛋白(syt-1)有关。

L-T4 替代治疗是目前治疗甲减的标准方案,目标是使 T3、T4、TSH 恢复至正常水平。本试验给予 L-T4 替代治疗 2 周后,L-T4 组大鼠血清甲状腺素水平与 CON 组比较差异无统计学意义;尼氏染色显示 L-T4 组大鼠 PCC 内尼氏体较 Hypo 组数量增加,未能恢复至 CON 组水平。免疫组化显示 L-T4 组大鼠 PCC 内 SNAP-25 蛋白表达水平较 Hypo 组下降,未恢复至 CON 组水平。这提示 L-T4 替代治疗 2 周后,甲减大鼠 PCC 内尼氏体数量和 SNAP-25 蛋白表达均未能恢复至正常水平。Quintanar et al^[12]给予 T4 替代治疗 20 d 后,甲减大鼠垂体的 SNAP-25 表达未恢复正常。也有研究^[13]显示给予大剂量 L-T4 (20 μ g/100 g 体重)替代治疗 2 周,额叶内 SNAP-25 能够有效恢复,甲状腺素可能是通过与甲状腺素受体结合发挥调节作用^[9],大剂量 L-T4 替代治疗能够充分与甲状腺素受体结合发挥作用;但其血清甲状腺素显著高于正常对照组,存在甲亢的风险。

本研究尝试寻找完全修复甲减导致的 PCC 尼氏体和 SNAP-25 表达损伤的可能性。多奈哌齐是一种胆碱酯酶抑制剂,广泛应用于阿尔兹海默症的临床治疗。实验研究^[5]表明其具有神经保护作用,本实验尝试给予多奈哌齐单独治疗,尼氏染色显示 DON 组大鼠 PCC 内尼氏体较 Hypo 组数量增加,提示多奈哌齐能够在甲减大鼠中发挥神经保护作用。本实验尝试给予 L-T4 + DON 组大鼠 L-T4 联合 DON

治疗后,PCC 尼氏体 AOD 值与 CON 组比较差异无统计学意义,尼氏体数量恢复;PCC 内 SNAP-25 表达水平与 CON 组比较差异无统计学意义。多奈哌齐能够增强神经再生^[14],有研究^[15]表明多奈哌齐能够显著减少炎症因子分泌和表达。提示 L-T4 + DON 组大鼠 PCC 尼氏体数量和 SNAP-25 表达恢复可能与多奈哌齐的神经保护及炎症抑制作用有关。

综上所述,甲减可引起后扣带回内 SNAP-25 表达增高和尼氏体损伤,L-T4 替代治疗和多奈哌齐单独治疗均未能使后扣带回 SNAP-25 表达和尼氏体损伤完全恢复,L-T4 联合多奈哌齐治疗能够使后扣带回 SNAP-25 表达和尼氏体损伤恢复至正常水平。提示 L-T4 与多奈哌齐联合治疗有利于修复甲减引起的后扣带回 SNAP-25 表达异常和尼氏体损伤。

参考文献

- [1] He X S, Ma N, Pan Z L, et al. Functional magnetic resource imaging assessment of altered brain function in hypothyroidism during working memory processing[J]. *Eur J Endocrinol* 2011, 164(6): 951-9.
- [2] Beydoun M A, Beydoun H A, Rostant O S, et al. Thyroid hormones are associated with longitudinal cognitive change in an urban adult population[J]. *Neurobiol Aging* 2015, 36(11): 3056-66.
- [3] Guo Z, Liu X, Hou H, et al. (1) H - MRS asymmetry changes in the anterior and posterior cingulate gyrus in patients with mild cognitive impairment and mild Alzheimer's disease[J]. *Compr Psychiatry* 2016, 69: 179-85.
- [4] Shi Y, Zhang Y, Lou J. The influence of cell membrane and SNAP25 linker loop on the dynamics and unzipping of SNARE complex[J]. *PLoS One* 2017, 12(4): e0176235.
- [5] Noh M Y, Koh S H, Kim S M, et al. Neuroprotective effects of donepezil against A β 42-induced neuronal toxicity are mediated through not only enhancing PP2A activity but also regulating GSK-3 β and nAChRs activity[J]. *J Neurochem* 2013, 127(4): 562-74.
- [6] Gong J, Dong J, Wang Y, et al. Developmental iodine deficiency and hypothyroidism impair neural development up-regulate caveolin-1 and down-regulate synaptophysin in rat hippocampus[J]. *J Neuroendocrinol* 2010, 22(2): 129-39.
- [7] Cao L, Wang F, Yang Q G, et al. Reduced thyroid hormones with increased hippocampal SNAP-25 and Munc18-1 might involve cognitive impairment during aging[J]. *Behav Brain Res* 2012, 229(1): 131-7.
- [8] 吴波, 吴章碧, 陈章祥, 等. 甲状腺激素联合多奈哌齐治疗对成年甲减大鼠额叶 SNAP-25 的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2017, 52(1): 57-61.
- [9] Hepp R, Grant N J, Espliguero G, et al. Adrenal gland SNAP-25 expression is altered in thyroid hormone receptor knock-out mice[J]. *Neuroreport* 2001, 12(7): 1427-30.

- [10] Ando K, Kudo Y, Takahashi M. Negative regulation of neurotransmitter release by calpain: a possible involvement of specific SNAP-25 cleavage [J]. *J Neurochem* 2005 94(3): 651–8.
- [11] Schupp M, Malsam J, Rüter M, et al. Interactions between SNAP-25 and synaptotagmin-1 are involved in vesicle priming, clamping spontaneous and stimulating evoked neurotransmission [J]. *J Neurosci* 2016 36(47): 11865–80.
- [12] Quintanar J L, Salinas E. Effect of hypothyroidism on synaptosomal-associated protein of 25 kDa and syntaxin-1 expression in adenohypophyses of rat [J]. *J Endocrinol Invest* 2002 25(9): 754–8.
- [13] 刘俊霞, 贾雪梅, 桂丽, 等. 突触相关蛋白 25 在成年期甲状腺功能减退症大鼠额叶内表达变化及甲状腺素治疗效应 [J]. *中国临床保健杂志* 2011 14(3): 284–7, 339.
- [14] Yu T S, Kim A, Kernie S G. Donepezil rescues spatial learning and memory deficits following traumatic brain injury independent of its effects on neurogenesis [J]. *PLoS One* 2015 10(2): e0118793.
- [15] Kim H G, Moon M, Choi J G, et al. Donepezil inhibits the amyloid-beta oligomer-induced microglial activation *in vitro* and *in vivo* [J]. *Neurotoxicology* 2014 40: 23–32.

Effects of levothyroxine sodium combined with donepezil on expression of SNAP-25 in posterior cingulate gyrus of adult hypothyroidism rats

Chen Zhangxiang, Wu Bo, Zhu Min, et al

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

Abstract Objective To study the effect of combination therapy of L-T₄ and donepezil (DON) on the expression of synaptic-associated protein 25 (SNAP-25) in posterior cingulate gyrus of hypothyroidism rats. **Methods** Forty healthy male SD rats were randomly divided into normal control group (CON group), hypothyroid group (Hypo group), L-T₄ substitution group (L-T₄ group), donepezil treatment group (DON group), combined therapy group (L-T₄ + DON group). The rats were treated with 0.05% propylthiouracil (PTU) for 6 weeks to establish a hypothyroidism model except for the CON group. 5 weeks after the model establishment, levothyroxine sodium, donepezil, levothyroxine sodium and donepezil were given for 2 weeks. The radioimmunoassay was used to measure the level of serum thyroid hormones. The Nissl's staining method was applied in the observation of Nissl body number, and we also determined the expression of SNAP-25 by immunohistochemistry and Western blot. **Results** The level of serum thyroxine in the Hypo and DON group were significantly lower than those in the CON group ($P < 0.01$). There was no significant difference between the L-T₄ and the L-T₄ + DON group as well as the CON group. The number of Nissl bodies in Hypo group was decreased as compared to the CON group ($P < 0.05$), while DON group increased the number of Nissl bodies in the hypothyroid rats ($P < 0.05$), however, it was still lower than that in CON group ($P < 0.05$). Interestingly, the number of Nissl body was up-regulated nearly to that in the CON group by the combination therapy of L-T₄ + DON group. The expression of SNAP-25 was significantly up-regulated in the hypothyroid or the DON group treated rats than that in CON group ($P < 0.05$), while the level of SNAP-25 was repressed by L-T₄ comparing to the Hypo group ($P < 0.05$), but still higher than that in CON group ($P < 0.05$). And of note, the level of SNAP-25 in the L-T₄ + DON group treated rats was not altered as compared to the CON group. **Conclusion** The expression of SNAP-25 is increased and the number of Nissl body is reduced in posterior cingulate gyrus in adult hypothyroid rats ($P < 0.05$), and the combined treatment of levothyroxine sodium and donepezil can effectively protect the synaptic protein and Nissl body against injury.

Key words hypothyroidism; posterior cingulate gyrus; SNAP-25