

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

吴波^{1,2} 吴章碧^{1,2} 陈章祥^{1,2} 王取南³ 朱德发^{1,2}

摘要 目的 研究甲状腺激素联合多奈哌齐治疗对成年甲减大鼠额叶突触相关蛋白 25 (SNAP-25) 的表达的影响。方法 将 50 只成年健康 SD 大鼠随机分为 5 组: 对照组 (CON)、甲减组 (Hypo)、多奈哌齐组 (DON)、左甲状腺激素钠组 (L-T4)、左甲状腺激素钠联合多奈哌齐组 (L-T4 + DON); 除对照组外, 其余 4 组通过含 0.05% 丙基硫氧嘧啶 (PTU) 饮用水喂养 6 周诱导成年期甲减大鼠模型; DON 组、L-T4 组、L-T4 + DON 组分别予多奈哌齐、左甲状腺激素钠、左甲状腺激素钠联合多奈哌齐治疗 2 周后, 放射免疫法测定血清甲状腺激素水平, 免疫组化法、Western blot 法观察大鼠额叶 SNAP-25 的表达。结果 与 CON 组相比, Hypo 组大鼠血清三碘甲状腺原氨酸 (T3)、四碘甲状腺原氨酸 (T4) 水平显著降低 ($P < 0.01$), 促甲状腺激素 (TSH) 显著上升 ($P < 0.01$); 额叶 SNAP-25 的表达水平显著高于 CON 组 ($P < 0.05$)。L-T4 组与 CON 组比较, 血清 T3、T4、TSH 差异无统计学意义; SNAP-25 的表达升高 ($P < 0.05$)。DON 组与 CON 组比较, 血清 T3、T4、TSH 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); SNAP-25 的表达升高 ($P < 0.05$)。L-T4 + DON 组与 CON 组比较, 血清 T3、T4、TSH 差异无统计学意义; SNAP-25 的表达差异无统计学意义。结论 甲状腺激素联合多奈哌齐治疗能有效地恢复成年甲减大鼠额叶 SNAP-25 的表达。

关键词 甲状腺功能减退症; 额叶; 甲状腺激素; 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(2017)01-0057-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.01.012

成年期甲状腺功能减退症 (简称成年期甲减) 可引起中枢神经系统功能损伤和相应的结构异常^[1]。成年期甲减可以损伤额叶内突触相关蛋白的表达^[2]。突触相关蛋白 25 (synaptosomal associated protein of 25 ku, SNAP-25) 为神经递质释放所必

需的突触前膜蛋白^[3]。在成年期甲减大鼠额叶中该蛋白表达上升^[4]。常用的标准剂量的甲状腺激素治疗后 SNAP-25 蛋白未恢复到正常水平。有研究^[5]尝试大剂量甲状腺素治疗时, SNAP-25 虽恢复到正常水平, 但血清三碘甲状腺原氨酸 (Triiodothyronine, T3)、四碘甲状腺原氨酸 (Tetraiodothyronine, T4) 水平升高至甲状腺功能亢进水平。甲减时大鼠脑内乙酰胆碱含量降低^[6]。多奈哌齐是一种乙酰胆碱酯酶抑制剂, 能提高甲减大鼠额叶内的乙酰胆碱水平^[7], 有神经保护作用^[8]。而多奈哌齐对成年甲减大鼠的脑额叶 SNAP-25 的表达有无影响尚未见报道。该研究通过单用多奈哌齐和左旋甲状腺素 (Levothyrocine, L-T4) 联合多奈哌齐来检测多奈哌齐对甲减大鼠额叶 SNAP-25 表达有无影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 普通成年 (8 周龄) 健康 SD 雄性大鼠 50 只, 260~300 g, 购自南京市实验动物中心。自然通风采光条件下, 自由接受饮水及标准啮齿类动物食物喂养。实验遵循《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 丙基硫氧嘧啶 (propylthiouracil, PTU)、L-T4、多奈哌齐 (donepezil)、兔来源 SNAP-25 蛋白多克隆抗体 (1:2500) (美国 Sigma 公司); 促甲状腺激素 (thyroid-stimulating hormone, TSH)、T3、T4 放射免疫试剂盒 (北京北方生物技术研究所); DAB 显色剂盒、SP-0022 生物素标记羊抗兔 IgG、超灵敏过氧化物酶生物素 (SPB) 试剂盒 (上海迈新公司); 兔来源抗 SNAP-25、GAPDH 蛋白多克隆抗体 (美国 Abcam 公司); 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗兔 IgG (美国 Santa Cruz 公司); HRP 标记的抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 单抗 (上海康成生物工程有限公司); 山羊血清 (1:20, 美国 Vector Laboratories 公司); BCA 蛋白定量试剂盒 (美国 Thermo 公司)。

1.2.2 仪器 DFM296 型 16 管放射免疫计数器

2016-08-02 接收

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (编号: 81272152)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院¹ 老年病研究所、² 老年内分泌科, 合肥 230022

³ 安徽医科大学卫生毒理学教研室, 合肥 230032

作者简介: 吴波, 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

(合肥众成机电技术开发有限公司);酶标仪(美国 Biote 仪器有限公司);EPS-300 电泳仪、VE-180 垂直电泳槽、VE-186 转膜电泳槽、Fine-doX6 显影仪(上海天能科技有限公司);Nikoneclipse80i 显微镜(日本尼康公司);Meta Morph 图像获取分析软件(上海美谷分子仪器有限公司)。

1.3 动物模型建立 大鼠适应性喂养 1 周后,随机均分为 5 组:对照(CON)组、甲减(Hypo)组、多奈哌齐(DON)组、左甲状腺激素钠(L-T4)组、左甲状腺激素钠联合多奈哌齐(L-T4 + DON)组。CON 组自由饮水,余下各组予含 0.05% PTU 饮用水喂养 6 周制备甲减模型。第 5 周起,DON 组在饮用水中加多奈哌齐(0.005%),L-T4 组每日腹腔注射给予 L-T4(6 μg/100 g 体重),L-T4 + DON 组每日予饮用水中加入多奈哌齐(0.005%)以及腹腔注射 L-T4(6 μg/100 g 体重)。同时,CON 组、Hypo 组、DON 组每日腹腔注射等量的无菌生理盐水,自由饮水。各组大鼠每周定期称重,根据体重调整给药剂量,治疗 2 周。

1.4 标本制备 腹主动脉采血待测 T3、T4 和 TSH。取血后立即将大鼠断头处死,于冰台上分离取大脑额叶部位组织,左侧额叶置于 -80 °C 保存,用于 Western blot 检测;右侧额叶浸泡于 4% 的多聚甲醛溶液中固定用于免疫组化检测。

1.5 甲状腺激素水平测定 采用放射免疫法,严格按照放射免疫试剂盒说明操作测定血清 T3、T4 和 TSH 水平。

1.6 免疫组化法检测 SNAP-25 的表达 采用免疫组化超敏 SP 法进行检测。应用光学显微镜 Nikone-clipse80i 分别拍摄额叶各层:分子层(I 层)、外颗粒层(II 层)、外锥体细胞层(III 层)、内颗粒层(IV 层)、内锥体细胞层(V 层)随后应用图像分析系统分析 I、II、III、IV、V 层 SNAP-25 的免疫反应产物的光密度值,取其平均光密度值(average optical density AOD)。

1.7 Western blot 法检测 SNAP-25 的表达

1.7.1 总蛋白提取 取额叶组织置于玻璃匀浆器中,加入 RIPA 裂解液(100 mmol/L Tris-HCl 50 ml,

pH 7.4 ,NaCl 876.6 mg ,脱氧胆酸钠 1 g ,Triton X-100 1 ml ,10% SDS 1 ml ,100 mmol/L EDTA 1 ml) 500 μl ,加入蛋白酶抑制剂 PMSF (100 mmol/L) 5 μl ,冰上匀浆。4 °C、15 000 r/min 离心 15 min ,取上清液后再次 15 000 r/min 离心 5 min ,所获得上清液即为总蛋白,取 5 μl 上清液,加超纯水稀释至 1 250 μl ,采用 LORRY 法测蛋白浓度。最后用 2 × 上样缓冲液稀释定量,100 °C 变性后分装保存。

1.7.2 Western blot 检测 分别取总蛋白样本 20 μg 依次进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,聚偏二氟乙烯膜(PVDF 膜)转膜,0.5% 脱脂奶粉封闭液封闭 1 h ,加入一抗(兔来源抗 SNAP-25 多克隆抗体 IgG 1 : 1 000)或兔来源 GAPDH 多克隆抗体 IgG (1 : 4 000),室温免疫反应 2 h ,0.05% PBST 洗 3 次,每次 10 min ,而后加二抗(HRP 标记的山羊抗兔 IgG , 1 : 100 000)和内参(HRP 标记的抗 GAPDH 抗体, 1 : 100 000),室温孵育 1.5 h ,0.05% PBS-T 洗涤 3 次,每次 10 min ,加入 ECL 显色液后拍摄蛋白条带。对条带进行光密度分析,通过 SNAP-25 与内参照 GAPDH 的条带光密度值的比值间接反映 SNAP-25 的表达量。

1.8 统计学处理 应用统计软件 SPSS 16.0 进行数据分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组均数的比较采用方差分析,进一步分析采用 LSD 比较,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 大鼠 T3、T4 和 TSH 水平 Hypo、DON 组 T3、T4 浓度显著低于 CON 组,TSH 水平显著高于 CON 组($P < 0.01$);L-T4 组 T3、T4 和 TSH 水平与 CON 组比较差异无统计学意义,见表 1。

2.2 SNAP-25 免疫组化结果 Hypo 组 I、II、III、V 各层 SNAP-25 光密度值均明显高于 CON 组($P < 0.05$);DON 组 I、II、III、V 各层 SNAP-25 光密度值均明显高于 CON 组($P < 0.05$);L-T4 组 I、II、III、V 各层 SNAP-25 光密度值均明显高于 CON 组($P < 0.05$);L-T4 + DON 组各层与 CON 组比较差异无统计学意义。见图 1、表 2。

表 1 各组大鼠 T3、T4、TSH 水平比较($n = 10 \bar{x} \pm s$)

项目	CON 组	Hypo 组	DON 组	L-T4 组	L-T4 + DON 组	F 值
T3 (nmol/L)	0.84 ± 0.16	0.60 ± 0.07**	0.58 ± 0.15**	0.81 ± 0.23	0.82 ± 0.22	5.12
T4 (nmol/L)	52.43 ± 4.11	17.20 ± 4.69**	18.17 ± 3.13**	51.27 ± 5.26	54.52 ± 6.05	32.70
TSH (μmol/L)	0.92 ± 0.27	21.26 ± 9.93**	20.96 ± 11.10**	1.38 ± 0.98	1.02 ± 0.47	23.36

与 CON 组比较: ** $P < 0.01$

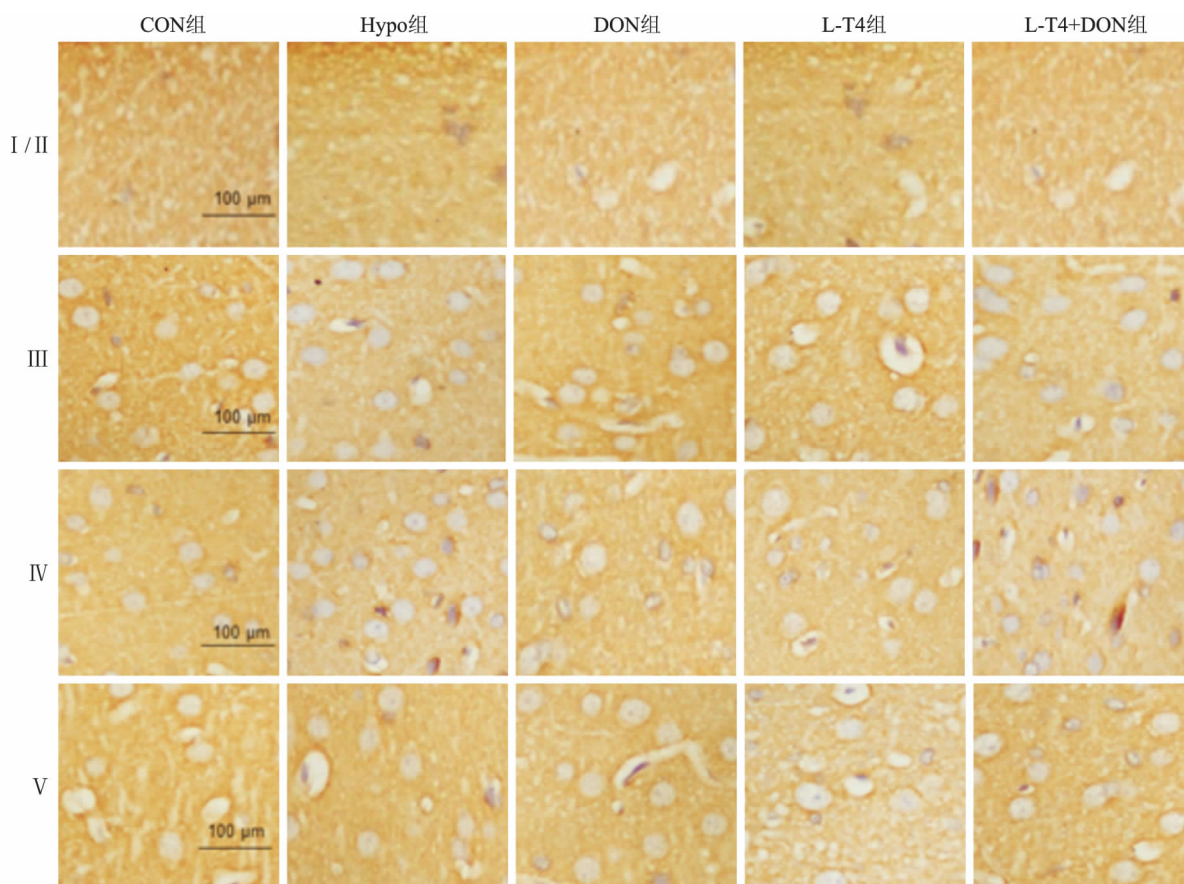


图1 各组额叶各层 SNAP-25 免疫组织化学图片 SP×200

表2 额叶不同层面免疫组织化学法 SNAP-25 的 AOD 测量结果 (n = 10 $\bar{x} \pm s$)

层面	CON	Hypo	DON	L-T4	L-T4 + DON	F 值
I	5.60 ± 0.39	8.95 ± 0.57**	8.16 ± 0.73**	7.86 ± 0.72**	5.46 ± 0.38	7.43
II	4.07 ± 0.57	7.78 ± 1.12**	7.08 ± 0.87*	6.42 ± 0.70*	4.83 ± 0.69	3.64
III	5.00 ± 0.63	9.43 ± 0.78**	8.80 ± 0.40**	7.42 ± 0.70**	5.96 ± 0.57	8.84
IV	4.68 ± 0.70	4.83 ± 0.72	5.82 ± 0.72	5.08 ± 0.65	5.00 ± 0.87	0.36
V	5.59 ± 0.78	9.18 ± 0.79**	8.53 ± 0.73**	7.91 ± 0.75*	6.19 ± 0.71	4.15

与 CON 组比较: * P < 0.05, ** P < 0.01

2.3 Western blot 检测结果 Hypo 组、DON 组、L-T4 组 SNAP-25 表达均高于 CON 组 (F = 22.42, P < 0.05) L-T4 + DON 组 SNAP-25 表达与 CON 组比较差异无统计学意义,见图 2。

3 讨论

本研究显示 Hypo 组 T3、T4 显著低于 CON 组, TSH 显著高于 CON 组。PTU 是一种常见的甲减模型诱导剂,能抑制甲状腺激素合成并抑制外周组织的 T4 转化为 T3,降低血清 T3、T4 水平并通过负反馈使 TSH 水平升高,提示造模成功。

SNAP-25 是突触前胞膜上的靶蛋白 (t-SNARE)

中的一种,作为 SNARE 核心复合体构成元素之一,介导突触囊泡的着位,在神经递质的传递与释放起重要作用。CON 组免疫组化、Western blot 结果表明 SNAP-25 在额叶各层均有表达。Hypo 组 SNAP-25 表达较 CON 组显著升高,特别是在 I、II、III、V 层表达较 CON 组显著升高,而 IV 层无显著性差异。这种差异主要集中 I、II、III、V 层可能由于 I、II、III、V 层广泛分布神经纤维或锥体细胞。研究^[9]提示甲减可导致动物额叶单位表面积锥体细胞数量增多。IV 层主要由大量星形细胞聚集而成,甲状腺激素的减少对其影响不大。成年甲减大鼠额叶 SNAP-25 表达的增高可能与甲状腺激素降低导致突触结

合蛋白 (synaptotagmin-1 ,SYT-1) 减少^[4] 有关。研究^[10] 表明 ,在 SYT-1 基因敲除大肠杆菌中 SNAP-25 代偿性表达 其具体机制仍需进一步研究。为改善成年大鼠体内甲状腺激素减少的危害 ,常规的方法是单一甲状腺激素标准剂量替代治疗。

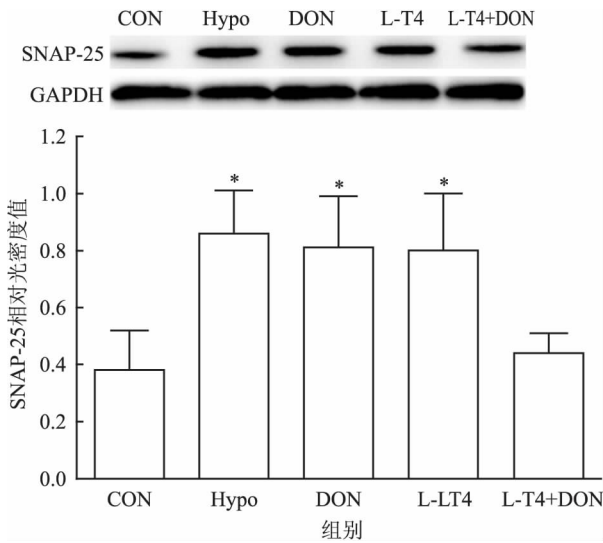


图2 成年甲减大鼠额叶中 SNAP-25 的表达与 CON 组比较: * P < 0.05

本实验中甲状腺激素替代治疗后 ,血清甲状腺激素恢复到正常水平 ,但额叶 SNAP-25 的表达却未恢复 ,这种异常表现在额叶 I、II、III、V 层。研究^[11] 表明 ,垂体切除术大鼠肾上腺的 SNAP-25 表达上升 ,而甲状腺激素替代治疗可降低这种升高;另有研究^[5] 提示 ,大剂量甲状腺激素治疗能恢复 SNAP-25 的表达 ,但又导致甲亢的风险。本实验结果可能由于大鼠脑内甲状腺激素未完全恢复。而延长治疗时间使脑内甲状腺激素恢复则不能排除衰老对 SNAP-25 的影响^[12]。因此 ,本实验采用单一或联合多奈哌齐来观察其对甲减大鼠额叶 SNAP-25 表达的影响。

本实验中甲状腺激素联合多奈哌齐治疗后 SNAP-25 表达完全恢复正常 ,这种恢复表现在 Hypo 组 SNAP-25 表达异常的各层。单一使用多奈哌齐未恢复 SNAP-25 表达 ,但有下降的趋势。这表明多奈哌齐对成年甲减大鼠额叶 SNAP-25 表达有恢复作用 ,其具体机制未明。研究^[13] 表明 ,在甲减大鼠中乙酰胆碱酯酶的活性下降。在哺乳动物神经系统中主要存在乙酰胆碱酯酶突触型 (AChE-S) 和通读型 (AChE-R) 两种亚型。乙酰胆碱酯酶除了其经典

的催化功能外还具有非经典功能。AChE-R 能促进神经修复 ,延缓神经退化;而 AChE-S 可增强神经毒性、加速神经退行性变。多奈哌齐是一种胆碱酯酶抑制剂 ,使用多奈哌齐后额叶 SNAP-25 表达下降 ,可能与 AChE-R 功能增强、AChE-S 功能减弱有关^[14]。另外 ,在多奈哌齐的作用下 ,额叶内乙酰胆碱水解减少 ,甚至恢复到正常水平^[6]。研究^[15] 显示 ,额叶内的乙酰胆碱不仅包括作为神经递质的神经细胞的 Ach ,也包括作为一种局部的信号分子的非神经细胞的 Ach。后者作为一个局部的调节系统在非神经依赖的细胞中广泛表达 ,表明对维持细胞和组织的稳态有着重要作用。这种局部作用也可能对 SNAP-25 的表达产生影响。

综上所述 ,甲状腺激素联合多奈哌齐治疗能完全恢复 SNAP-25 表达 ,这为修复甲状腺功能减退引起的大脑损伤提供了新的依据。

参考文献

- [1] Samuels M H. Cognitive function in untreated hypothyroidism and hyperthyroidism [J]. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes , 2008 , 15 (5) :429 - 33.
- [2] Sui L , Wang F , Li B M. Adult-onset hypothyroidism impairs paired-pulse facilitation and long-term potentiation of the rat dorsal hippocampo-medial prefrontal cortex pathway *in vivo* [J]. Brain Res , 2006 , 1096 (1) :53 - 60.
- [3] Oyler G A , Higgins G A , Hart R A , et al. The identification of a novel synaptosomal-associated protein ,SNAP-25 , differentially expressed by neuronal subpopulations [J]. J Cell Biol , 1989 , 109 (6 Pt 1) :3039 - 52.
- [4] 张晓亮 ,王 芬 ,王 囡 ,等. 甲状腺激素对成年大鼠额叶内 synaptotagmin 1 及 SNAP-25 表达的影响 [J]. 中国临床保健杂志 2013 , 16 (2) :173 - 5 226.
- [5] 王 迅 ,徐永霞 ,朱德发. SNAP-25 在成年期甲减大鼠海马内表达变化及甲状腺素治疗效应 [J]. 安徽农业大学学报 , 2010 , 37 (1) :36 - 40.
- [6] 刘俊霞 ,朱德发 ,王 芬 ,等. 甲状腺激素对大鼠额叶乙酰胆碱的影响 [J]. 中国临床保健杂志 2011 , 14 (6) :608 - 10.
- [7] 蔡瑶俊 ,查小雪 ,宁 丹 ,等. 甲状腺素联合多奈哌齐对成年期甲状腺功能减退症大鼠额叶乙酰胆碱、munc-18 的影响 [J]. 安徽医科大学学报 2015 , 50 (1) :25 - 9.
- [8] Yoshiyama Y , Kojima A , Ishikawa C , et al. Anti-inflammatory action of donepezil ameliorates tau pathology , synaptic loss , and neurodegeneration in a tauopathy mouse model [J]. J Alzheimers Dis , 2010 22 (1) :295 - 306.
- [9] Madeira M D , Pereira A , Cadete-Leite A , et al. Estimates of volumes and pyramidal cell numbers in the prelimbic subarea of the prefrontal cortex in experimental hypothyroid rats [J]. J Anat ,

- 1990, 171:41-56.
- [10] Mohrmann R, De Wit H, Connell E et al. Synaptotagmin interaction with SNAP-25 governs vesicle docking, priming, and fusion triggering [J]. *J Neuroscience*, 2013, 33(36):14417-30.
- [11] Hepp R, Grant N J, Chasserot-Golaz S et al. The hypophysis controls expression of SNAP-25 and other SNAREs in the adrenal gland [J]. *J Neurocytol*, 2001, 30(9-10):789-800.
- [12] 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.
- [13] Wang F, Zeng X, Zhu Y et al. Effects of thyroxine and donepezil on hippocampal acetylcholine content, acetylcholinesterase activity, synaptotagmin-I and SNAP-25 expression in hypothyroid adult rats [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(2):775-82.
- [14] Johnson G, Swart C, Moore S W. Non-enzymatic developmental functions of acetylcholinesterase-the question of redundancy [J]. *FEBS J*, 2008, 275(20):5129-38.
- [15] 刘梅, 杨胜利. 乙酰胆碱及其受体的非神经递质作用和肿瘤 [J]. *肿瘤*, 2006, 1(1):98-101.

Effects of donepezil combined with thyroxine on frontal SNAP-25 expression in adult rats with hypothyroidism

Wu Bo^{1,2}, Wu Zhangbi^{1,2}, Chen Zhangxiang^{1,2}, et al

(¹Institute of Anhui Geriatric, ²Dept of Endocrinology,

The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To study the effect of thyroxine combined with donepezil on the expression of the frontal synaptosomal associated protein of 25 ku (SNAP-25) in adult rats with hypothyroidism. **Methods** 50 healthy adult SD rats were randomly divided into 5 groups: control group (CON), hypothyroidism group (Hypo), donepezil group (DON), levothyroxine sodium group (L-T4), levothyroxine sodium combined with donepezil group (L-T4 + DON). In addition to the control group, the hypothyroid adult rats of the other groups were induced by the drinking water including 0.05% propylthiouracil (6-n-propyl-2-thiouracil, PTU) for six weeks. Then, the latter three groups were treated respectively with donepezil, levothyroxine sodium and levothyroxine sodium combined with donepezil for 2 weeks. The radioimmunoassay kit was used to determine the levels of serum T3, T4, TSH. The immunohistochemical method and Western blot were used to observe the frontal SNAP-25 expression in all rats. **Results** Compared with the control group, serum triiodothyronine (T3) and tetraiodothyronine (T4) levels in hypothyroid rats decreased significantly ($P < 0.01$), thyroid-stimulating hormone (TSH) ($P < 0.01$) increased significantly, and the expression level of SNAP-25 in frontal lobe was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$). There was no statistically significant difference in serum T3, T4 and TSH between the L-T4 group and the control group and the expression of SNAP-25 in L-T4 group was increased ($P < 0.05$). In the DON group, the serum T3, T4 and TSH were statistically significantly increased ($P < 0.01$), compared with the control group and the expression of SNAP-25 ($P < 0.05$) was higher. The comparison of serum T3, T4, TSH levels and the expression of SNAP-25 were not statistically significant. **Conclusion** The treatment of thyroxine combined with donepezil can effectively recover the expression of frontal SNAP-25 in adult rats with hypothyroidism.

Key words hypothyroidism; frontal; thyroxine; SNAP-25