

甲状腺素联合多奈哌齐对成年期甲状腺功能减退症大鼠海马 syntaxin-1 的影响

李保山¹, 查小雪², 朱德发², 康冬梅¹

摘要 目的 观察甲状腺素(T₄)联合多奈哌齐对成年期甲状腺功能减退症(甲减)大鼠的海马内突触前膜相关蛋白1(syntaxin-1)表达的影响,探讨甲减脑损伤及可能的恢复机制。**方法** 44只SD大鼠随机分为4组:对照组、甲减组、T₄替代治疗组及T₄和多奈哌齐联合治疗组。通过饮水给予丙基硫氧嘧啶0.05%建立成年期大鼠甲减模型共6周。第5周开始,对照组腹腔注射等量生理盐水,T₄替代治疗组每日给予左旋甲状腺素(L-T₄) 6 μg/100 g 体重(BW)腹腔注射,联合治疗组每日给予6 μg/100g BW L-T₄腹腔注射及饮用水中加入0.005%多奈哌齐。采用免疫组织化学法和Western blot 法分析4组大鼠海马 syntaxin-1 的表达情况。**结果** 与对照组比较,甲减组大鼠血清三碘甲状腺原氨酸(T₃)、T₄水平减低,促甲状腺激素(TSH)水平升高($P < 0.01$),海马内 syntaxin-1 在CA1、CA3各层及齿状区多形层(DG-PL)表达显著增加($P < 0.01$);T₄替代治疗后,血清T₃、T₄和TSH水平恢复至正常水平,syntaxin-1 蛋白的表达未完全恢复到对照组水平($P < 0.05$);T₄联合多奈哌齐治疗后 syntaxin-1 蛋白表达与对照组比较差异无统计学意义。**结论** T₄联合多奈哌齐治疗可以修复成年期甲减导致的脑损伤。**关键词** 甲状腺功能减退症;甲状腺素;多奈哌齐; syntaxin-1; 海马

中图分类号 R 581.2; R 322.81; R 446.6-3; R 977.14

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2015)10-1390-04

成年期甲状腺功能减退症(甲减)可引起广泛的中枢神经系统损伤和功能障碍,其机制可能与甲状腺素(thyroxine, T₄)的缺乏引起突触可塑性改变有关^[1]。突触融合蛋白1(syntaxin-1)是特异性分布在神经细胞突触前膜上的蛋白,通过与SNAP-25和synaptobrevin/VAMP蛋白聚合,进而形成被认为是

神经突触囊泡融合必要因子的SNARE核心复合体,与突触可塑性有关^[2]。海马是负责认知和学习的神经结构基础,主管空间记忆和事件记忆的形成。研究^[3]显示T₄缺乏引起的认知功能障碍可能与海马内的 syntaxin-1 水平升高有关,常规剂量的T₄替代治疗并不能使 syntaxin-1 水平完全恢复。该研究用丙基硫氧嘧啶(propylthiouracil, PTU)建立成年期大鼠甲减模型,旨在探讨T₄联合多奈哌齐对成年期甲减大鼠海马 syntaxin-1 表达水平的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 成年雄性SD大鼠44只,12周龄,普通级,体重260~300 g,南京实验动物中心提供。

1.2 主要仪器及试剂 三碘甲状腺原氨酸(triiodo-thyronine, T₃)、T₄放射免疫试剂盒购自北方生物技术有限公司;辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的兔抗山羊IgG购自美国Santa Cruz公司;HRP标记的GAPDH单抗购自上海康成生物工程有限公司;山羊抗大鼠抗 syntaxin-1 蛋白多克隆抗体、DAB试剂盒、SP-022生物素标记羊抗兔IgG超敏试剂盒均购自北京博奥森公司;DFM 296型16管放射免疫γ计数器购自合肥众成机电技术开发有限公司;DXM 1200F光学显微镜购自日本尼康公司;JEDR801D形态学图像分析系统购自江苏捷达科技发展有限公司;PTU、左旋甲状腺素(L-T₄)及多奈哌齐购自美国Sigma公司;VE-180垂直电泳槽、EPS-300电泳仪、VE-186转膜电槽购自上海天能科技有限公司。

1.3 模型制备 大鼠适应性喂养1周,随机分为4组,每组11只:对照组、甲减组、T₄替代治疗组(T₄组)、联合治疗组(T₄+多奈哌齐组),用0.05% PTU饮水6周建立成年期大鼠甲减模型。第5周起,对照组予以等量生理盐水腹腔注射;T₄组每日腹腔注射6 μg/100 g 体重(body weight, BW) L-T₄;T₄+多奈哌齐组每日腹腔注射6 μg/100 g BW T₄并在饮用水中加入0.005%多奈哌齐。治疗时间为2周。

1.4 标本制备 血清制备:造模结束,称重,水合氯

2015-05-07 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81272152);安徽省科技计划项目(编号:12010402134)

作者单位:¹安徽医科大学附属省立医院老年内分泌科,合肥230001

²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:李保山,男,硕士研究生;

康冬梅,女,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: kangdongmei2006@sina.com

醛 0.3 ml/100 g 麻醉后打开腹腔,采取腹主动脉血,3 000 r/min 离心 10 min,取血清置于 4 °C 冰箱保存待测 T3、T4 和促甲状腺激素(thyroid stimulating hormone, TSH)。

脑标本制备:取血结束将大鼠断头处死,冰上取脑组织,右脑置于 4% 多聚甲醛溶液中固定待做免疫组化染色,左脑分离出海马组织后于 -80 °C 冰箱保存待做 Western blot 检测。

1.5 甲状腺激素水平测定 采用放射免疫法检测血清 T3、T4、TSH 水平,检测过程严格按照试剂盒说明书。

1.6 免疫组化染色 采用超敏 SP 法行免疫组化检测。通过光学显微镜拍摄海马 CA1、CA3 和齿状回(dentate gyrus, DG) 区,采用生物图像分析系统对 DG 区的分子层(ML)和多形层(PL),CA1 区的起始层(SO)、放射层(SR)和腔隙分子层(SLM),CA3 区的 SO 层、透明细胞层(SL)和 SR 层的 syntaxin-1 免疫反应产物进行光密度(optical density, OD)值分析,取其平均 OD 值。

1.7 突触小体提取及 Western blot 法检测 4 °C 生理盐水冲洗海马组织,去除血液,滤纸拭干,玻璃匀浆器中匀浆,提取突触小体后通过 Western blot 法检测 syntaxin-1 蛋白,具体操作参照文献^[3]进行。分析条带相对 OD 值,通过 syntaxin-1 与内参 GAPDH 的条带 OD 值的比值来间接反映 syntaxin-1 的表达量。

1.8 统计学处理 应用 SPSS 13.0 软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析,多重比较采用 LSD 检验。

2 结果

2.1 大鼠血清 T3、T4 及 TSH 水平 与对照组比较,甲减组大鼠血清 T3、T4 水平显著降低,而 TSH 水平则显著升高($F = 8.765, 33.264, 26.809, P < 0.01$);T4 组大鼠血清 T3、T4 及 TSH 水平恢复至正常水平($P > 0.05$);联合治疗组大鼠血清 T3、T4 及 TSH 水平与对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠血清甲状腺激素水平比较($n = 11, \bar{x} \pm s$)

组别	T3 (nmol/L)	T4 (nmol/L)	TSH (μ IU/ml)
对照	0.81 $\pm$ 0.02	48.88 $\pm$ 1.12	1.05 $\pm$ 0.12
甲减	0.59 $\pm$ 0.03 **	19.08 $\pm$ 1.67 **	19.68 $\pm$ 3.03 **
T4	0.81 $\pm$ 0.06 ##	51.74 $\pm$ 1.93 ##	1.19 $\pm$ 0.33 ##
T4 + 多奈哌齐	0.75 $\pm$ 0.07 #	52.81 $\pm$ 1.94 ##	1.04 $\pm$ 0.13 ##

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与甲减组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

2.2 免疫组化法检测大鼠海马各区 syntaxin-1 表达 右脑组织切片,可见海马结构清晰,染色较强(阳性着色呈棕黄色)。光镜下观察,syntaxin-1 免疫反应产物分布在 CA1、CA3 和 DG 区各层,呈棕黄色颗粒,在甲减组中 CA1、CA3 所有层区和 DG-ML 层棕黄色颗粒更为密集,T4 组的 DG-ML 层和 DG-PL 层的 syntaxin-1 表达较对照组较高,而 syntaxin-1 表达水平在 T4 + 多奈哌齐联合治疗组与对照组基本相似。见图 1。

量化分析 4 组大鼠海马内 CA1、CA3 及 DG 区各层 syntaxin-1 免疫反应产物的 OD 值,与对照组比较,甲减组海马内 CA1、CA3 各层及 DG-PL 层表达显著增加($F = 9.279, 7.182, 7.423, 5.202, 5.060, 4.014, 2.250, 3.139, P < 0.05$)。T4 组 DG-ML 和 DG-PL 层 syntaxin-1 的 OD 值仍大于对照组($F = 1.524, 1.848, P < 0.05$)。T4 + 多奈哌齐联合治疗组各层 syntaxin-1 的 OD 值更接近于对照组($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 4 组大鼠海马内 syntaxin-1 表达($n = 11, \bar{x} \pm s$)

亚区	层	对照组	甲减组	T4 组	T4 + 多奈哌齐组
CA1	SO	0.35 $\pm$ 0.10	1.17 $\pm$ 0.36 **	0.40 $\pm$ 0.11	0.36 $\pm$ 0.10
	SR	0.46 $\pm$ 0.51	1.30 $\pm$ 0.17 **	0.49 $\pm$ 0.11	0.45 $\pm$ 0.76
	SLM	0.40 $\pm$ 0.12	1.13 $\pm$ 0.43 **	0.47 $\pm$ 0.15	0.40 $\pm$ 0.13
CA3	SO	0.87 $\pm$ 0.12	1.20 $\pm$ 0.32 **	1.01 $\pm$ 0.33	0.89 $\pm$ 0.25
	SL	1.03 $\pm$ 0.17	1.57 $\pm$ 0.56 **	1.07 $\pm$ 0.19	1.00 $\pm$ 0.11
	SR	0.70 $\pm$ 0.92	1.30 $\pm$ 0.36 **	0.74 $\pm$ 0.10	0.71 $\pm$ 0.16
DG	ML	1.71 $\pm$ 0.66	1.93 $\pm$ 0.58 *	1.85 $\pm$ 0.59 *	1.54 $\pm$ 0.67
	PL	2.04 $\pm$ 0.50	2.87 $\pm$ 0.53 **	2.38 $\pm$ 0.35 *	2.05 $\pm$ 0.44

与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.3 Western blot 法检测大鼠海马 syntaxin-1 表达变化 甲减组大鼠海马内 syntaxin-1 表达水平明显高于对照组,为对照组的 1.38 倍,差异有统计学意义($P < 0.05$);T4 组和联合治疗组大鼠海马内 syntaxin-1 表达水平分别为对照组的 1.29 倍和 1.17 倍,与对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 2。

3 讨论

本研究中,甲减组大鼠海马突触小体内 syntaxin-1 表达与对照组比较明显增加,与研究^[3]结论基本一致。syntaxin-1 蛋白是参与中枢神经系统神经递质释放的重要调节蛋白之一,研究^[4-6]显示甲减大鼠模型中不同的组织 syntaxin-1 表达水平不一致。PTU 诱导的甲减大鼠的脑前额叶中内 syntaxin-1 减

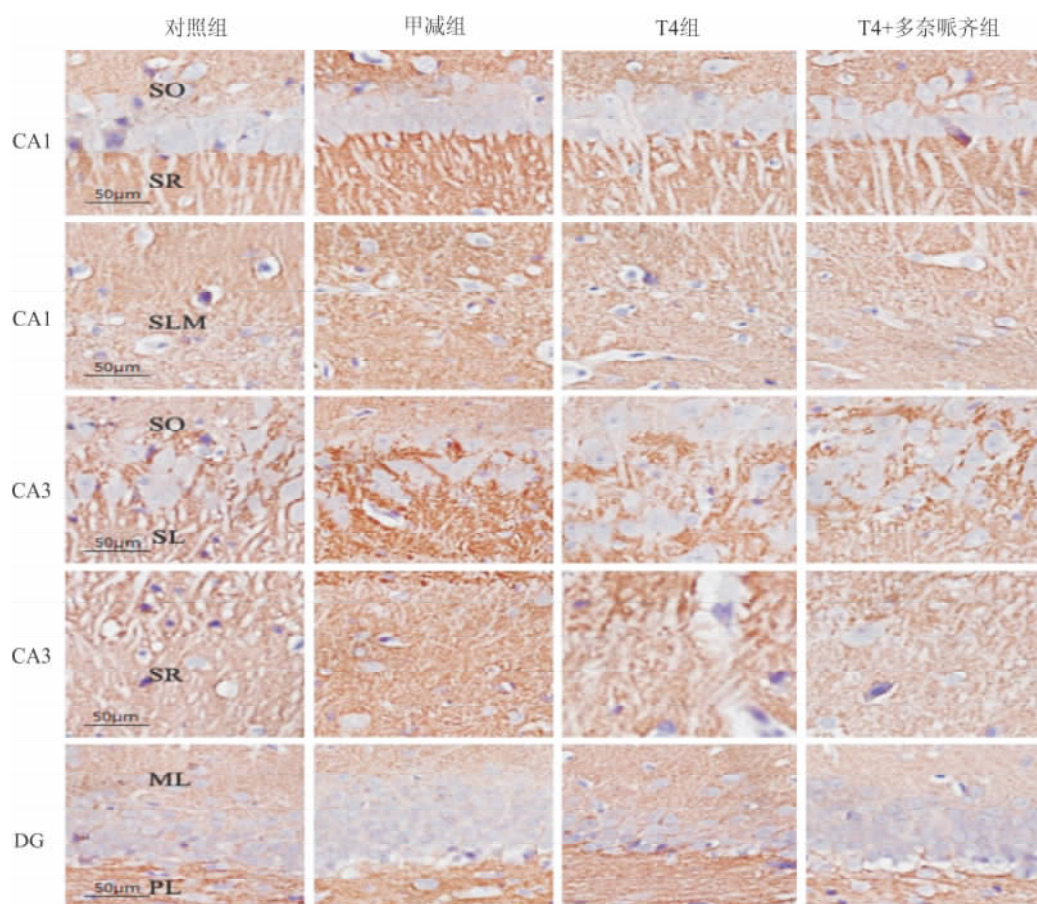


图1 syntaxin-1 免疫反应产物在4组大鼠海马 CA1、CA3 和 DG 区的表达 SP×400

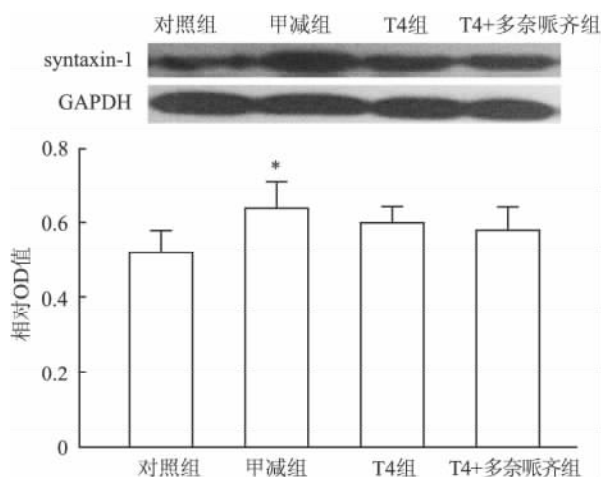


图2 各组大鼠海马 syntaxin-1 的表达
与对照组比较: * $P < 0.05$

少^[4],甲状腺切除的甲减模型的腺垂体内 syntaxin-1 表达也下调^[5],而垂体切除的甲减模型肾上腺内 syntaxin-1 表达升高^[6]。研究^[7]表明甲减可以导致 T4 或甲状腺激素受体 (thyroid hormone receptor, TR) 在不同的组织分布不同。提示 syntaxin-1 表达不一致可能与不同组织对甲状腺激素缺乏的反应性

不同有关。

T4 替代治疗是临床治疗甲减的经典方法,其标准是血清甲状腺激素恢复至正常水平,对甲减脑损伤修复程度的研究^[6,8]结论并不一致。研究^[6]显示常规 T4 替代治疗后甲减导致的突触相关蛋白未完全恢复至对照组水平,文献^[8]显示常规 T4 替代治疗后突触相关蛋白表达水平完全恢复。本研究中 T4 组大鼠血清 T3、T4 及 TSH 水平恢复至正常水平,但是该 T4 水平下 syntaxin-1 表达未完全恢复至对照组水平。其原因可能是 T4 主要通过结合 TRs 发挥作用,与受体结合不够有关。研究^[9]显示,在分别多次注射低剂量 T3 和单次注射大剂量 T3 后,TRs 结合率分别是 49% 和 86%。研究^[10]显示,与低剂量 T4 比较,大剂量 T4 能够更有效的恢复树突棘数量。因此,大剂量的 T4 替代治疗可以增加 TRs 的结合率,从而发挥更大的生理效应。

T4 替代治疗的同时加用多奈哌齐后,研究显示 syntaxin-1 的表达恢复至对照组水平。本研究首次显示这一现象,目前多奈哌齐作用机制尚不明确,研究^[11]证明多奈哌齐对神经退行性病变具有独立的

保护作用,能够保护大脑皮层神经元,增加神经元树突的长度和数量,避免海马线粒体损伤和延缓阿尔兹海默病海马萎缩。另外,多奈哌齐也被证明可以有效保护 Tau 蛋白病模型大鼠海马内突触相关蛋白和脊髓^[12]。

综上所述,成年期甲减导致海马内 syntaxin-1 表达水平明显增加,T4 替代治疗可以改善 syntaxin-1 表达水平,T4 + 多奈哌齐联合治疗能够完全恢复。提示 T4 联合多奈哌齐对甲减导致的脑损伤的治疗更有价值。

参考文献

- [1] 时美琴,杨 昊,朱德发. 原发性甲状腺功能减退症对记忆功能的影响[J]. 中国临床保健杂志,2008,11(5):449-50.
- [2] 孙坚原,Thomas C Südhof. Syntaxin-1 蛋白的多重功能[J]. 生物物理学报,2011,27(10):821-7.
- [3] 宁 丹,朱杨波,沈玉先,等. 成年期甲减大鼠海马 syntaxin-1 表达及甲状腺素干预效应[J]. 安徽医科大学学报,2011,46(11):1138-41.
- [4] Yang H Y, Sun C P, Jia X M, et al. Effect of thyroxine on SNARE complex and synaptotagmin-1 expression in the prefrontal cortex of rats with adult-onset hypothyroidism[J]. J Endocrinol Invest, 2012, 35(3):312-6.
- [5] Quintanar J L, Salinas E. Effect of hypothyroidism on synaptosomal-associated protein of 25 kDa and syntaxin-1 expression in adeno-

- hypophyses of rat[J]. J Endocrinol Invest, 2002, 25(9):754-8.
- [6] 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.
- [7] Broedel O, Eravci M, Fuxius S, et al. Effects of hyper- and hypothyroidism on thyroid hormone concentrations in regions of the rat brain[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2003, 285(3):E470-80.
- [8] Ambrogini P, Cuppini R, Ferri P, et al. Thyroid hormones affect neurogenesis in the dentate gyrus of adult rat[J]. Neuroendocrinology, 2005, 81(4):244-53.
- [9] Diez D, Grijota-Martinez C, Agretti P, et al. Thyroid hormone action in the adult brain: gene expression profiling of the effects of single and multiple doses of triiodo-L-thyronine in the rat striatum[J]. Endocrinology, 2008, 149(8):3989-4000.
- [10] Gloud E, Allan M D, McEwen B S. Dendritic spine density of adult hippocampal pyramidal cells is sensitive to thyroid hormone[J]. Brain Res, 1990, 525(2):327-9.
- [11] Dong H, Yuede C M, Coughlan C A, et al. Effects of donepezil on amyloid-beta and synapse density in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease[J]. Brain Res, 2009, 1303:169-78.
- [12] Shen H, Kihara T, Hongo H, et al. Neuroprotection by donepezil against glutamate excitotoxicity involves stimulation of alpha7 nicotinic receptors and internalization of NMDA receptors[J]. Br J Pharmacol, 2010, 161(1):127-39.

Effects of thyroxine and donepezil on hippocampal syntaxin-1 expression in adult rats with hypothyroidism

Li Baoshan¹, Zha Xiaoxue², Zhu Defa², et al

(Dept of Geriatrics Endocrinology, ¹The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001;

²The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To observe the effects of thyroxine (T4) and donepezil on hippocampal syntaxin-1 expression in adult hypothyroidism rats, and clarify the possible mechanism under the hypothyroidism-induced cognitive dysfunction. **Methods** The Sprague-Dawley rats were randomly classified into four groups: normal control, hypothyroid (PTU: 0.05%, add to the drinking water), hypothyroid receiving levothyroxine replacement therapy (6 µg/100 g body weight once daily, ip injection), and a combination of both drugs (levothyroxine: 6 µg/100 g; donepezil 0.005%). Serum T3, T4 and TSH concentrations were obtained using a radioimmunoassay kit. Protein levels of syntaxin-1 were determined by immunohistochemistry and Western blot. **Results** Compared to the control, the serum T3 and T4 levels of the hypothyroid group rats were significantly decreased, serum TSH elevated, syntaxin-1 in the hippocampus was significantly increased in CA1, CA3 and DG-PL regions. After levothyroxine or combined with donepezil treatment, serum T3, T4 and TSH were returned to the normal. But treatment with levothyroxine alone failed to normalize the expression of syntaxin-1. The level of syntaxin-1 was restored completely to the control group. **Conclusion** Our findings suggest that adult-onset hypothyroidism may induce increment of syntaxin-1 in the hippocampus, which could be restored preferably by T4 combined with donepezil treatment.

Key words hypothyroidism; thyroxine; donepezil; syntaxin-1; hippocampus