

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 munc-18、乙酰胆碱的影响

王 囡, 王 芬, 蔡瑶俊, 朱德发

摘要 目的 观察甲状腺素联合多奈哌齐对成年期甲状腺功能减退症(简称甲减)大鼠海马 munc-18 表达及乙酰胆碱含量的影响,探讨甲减脑损伤及恢复的可能分子机制。方法 55 只 SD 大鼠随机均分为甲减组、甲状腺素治疗组、多奈哌齐治疗组、联合治疗组及对照组。丙基硫氧嘧啶(PTU)建立成年期大鼠甲减模型共 6 周。第 5 周起,在继续甲减造模的前提下,甲状腺素治疗组每日给予左旋甲状腺素($L-T_4$) $6 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ 体重(BW)腹腔注射,多奈哌齐治疗组每日在饮用水中加入 0.005% (w/v) 多奈哌齐,联合治疗组每日给予 $L-T_4$ $6 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ BW 腹腔注射以及在饮用水中加入 0.005% (w/v) 多奈哌齐,对照组每日给与等量的生理盐水腹腔注射。采用放射免疫法测定血清甲状腺激素水平,碱性羟胺比色法测定海马内乙酰胆碱含量,免疫组织化学法观察 munc-18 在大鼠海马各层的表达与分布。结果 与对照组比较,甲减组中大鼠血清三碘甲状腺原氨酸(T_3)、四碘甲状腺原氨酸(T_4)水平减低($P < 0.01$),促甲状腺激素(TSH)水平升高($P < 0.01$),munc-18 在 CA3 区起始层(SO)、放射层(SR)、DG 区分子层(ML)、DG 区多形层(PL)表达明显减少($P < 0.01$),海马内乙酰胆碱含量下降($P < 0.05$);与对照组比较,甲状腺素治疗组及多奈哌齐治疗组中乙酰胆碱表达恢复,但 munc-18 表达仍然低下($P < 0.05$);联合治疗组中乙酰胆碱含量及 munc-18 的表达与对照组相比差异无统计学意义。结论 甲状腺素联合多奈哌齐可以改善成年期甲减造成的海马内突触蛋白损伤。

关键词 甲状腺功能减退症; 海马; munc-18; 乙酰胆碱; 甲状腺素; 多奈哌齐

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(2014)01-0055-04

成年期甲状腺功能减退症(简称甲减)可造成中枢神经系统广泛的结构损害和功能紊乱,海马是中枢神经系统认知和学习功能的重要结构基础^[1],有研究^[2]表明甲减可以损害海马中胆碱能系统及突触蛋白的表达。脑内乙酰胆碱作为一个重要的神

经递质,与学习记忆功能密切相关,在该神经递质的释放过程中有多种突触蛋白的参与,munc-18 是其中之一^[3]。munc-18 是神经元胞内蛋白,它可以促进含神经递质的囊泡在靶膜上的锚定及囊泡与靶膜的融合^[4]。研究^[5]表明,甲状腺素替代疗法治疗甲减可以使血清甲状腺素恢复至正常水平,但此时脑内突触蛋白的损害并未完全恢复。提示有必要寻找其它可用于治疗甲减认知功能损害的方法。多奈哌齐是胆碱酯酶抑制剂,在改善认知功能和神经保护方面起作用^[6]。该研究旨在观察成年期甲减对大鼠海马内乙酰胆碱、munc-18 表达的影响以及评估甲状腺素联合多奈哌齐对上述生化指标的干预效果。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康 3 月龄成年 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 55 只,雄性,普通级,购自南京实验动物中心。常规条件下喂养,所有大鼠接受标准啮齿类食物,自由饮水。

1.2 主要仪器及试剂 丙基硫氧嘧啶(propylthiouracil, PTU)、三碘甲状腺原氨酸(triiodothyronine, T_3)、四碘甲状腺原氨酸(tetraiodothyronine, T_4)、多奈哌齐(美国 Sigma 公司);抗 munc-18 蛋白多克隆抗体(美国 BD 公司); T_3 、 T_4 放射免疫试剂盒(北京北方生物技术研究所);DAB 染色试剂盒、SP-0022 生物素标记羊抗兔 IgG SP 超敏试剂盒(北京博奥森公司);DFM 296 型 16 管放射免疫 γ 计数器(合肥众成机电技术开发有限公司);DXM1200F 光学显微镜(日本 Nikon 公司);JEDR 801D 形态学图像分析系统(江苏捷达科技发展有限公司)。

1.3 模型制备 适应性喂养 1 周后,将大鼠随机分成 5 组:甲减组($n = 11$)、甲状腺素治疗组($n = 10$)、多奈哌齐治疗组($n = 11$)、联合治疗组($n = 11$)、对照组($n = 12$)。用 PTU 0.05% (w/v) 饮水共 6 周建立成年期大鼠甲减模型。第 5 周起,在继续甲减造模的前提下,甲状腺素治疗组每日腹腔注射左旋甲状腺素(levothyroxine, $L-T_4$) $6 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ 体重(body weight, BW),多奈哌齐治疗组每日在饮用水中加入

2013-08-13 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:王 囡,女,硕士研究生;

朱德发,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: zdfa0168@sina.com

0.005% (w/v) 多奈哌齐, 联合治疗组每日腹腔注射 L-T4 6 $\mu\text{g}/100\text{ g BW}$ 以及在饮用水中加入 0.005% (w/v) 多奈哌齐, 对照组每日腹腔注射等量的生理盐水。

1.4 标本制备 血清制备: 造模结束后, 称体重, 按每 100 g 体重注射 0.3 ml 水合氯醛麻醉后打开腹腔, 腹主动脉取血, 3 000 r/min 离心 10 min 后取血清置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存待测 T3、T4。脑标本制备: 取血后将大鼠断头处死, 冰上迅速分离脑组织, 右脑置于 4% 的多聚甲醛溶液中固定待做免疫组化; 左脑分离海马, -80 $^{\circ}\text{C}$ 储存待测乙酰胆碱含量。

1.5 甲状腺激素水平测定 采用放射免疫法检测血清 T3、T4、促甲状腺激素 (thyroid stimulating hormone, TSH) 水平, 严格按照试剂盒说明书操作。

1.6 乙酰胆碱含量测定 左脑分离出的海马组织用 4 $^{\circ}\text{C}$ 生理盐水冲洗, 除去血液, 滤纸拭干, 按 1 g 脑组织加 9 ml 生理盐水制作成脑组织匀浆, 5 000 r/min 离心 5 min 取上清液, 碱性羟胺比色法^[7]测定大鼠海马中乙酰胆碱含量。

1.7 免疫组化染色 免疫组化检测行超敏 SP 法。采用光学显微镜拍摄海马 DG、CA1 和 CA3 区, 生物图像分析系统对 DG 区分子层 (molecular layer, ML)、多形层 (polymorphic layer, PL)、CA1 的起始层 (stratum oriens, SO)、放射层 (stratum radiatum, SR)、腔隙分子层 (stratum lacunosum-moleculare, SLM) 及 CA3 区的起始层 (SO)、透明细胞层 (stratum lucidum, SL)、SR 的 munc-18 免疫反应产物进行光密度值分析, 取其平均光密度。

1.8 统计学处理 采用 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, 进一步 Post hoc 分析采用 LSD 法进行多重比较。

2 结果

2.1 大鼠血清 T3、T4 水平 与对照组比较, 甲减组大鼠血清 T3、T4 水平减低, TSH 水平升高, 差异有统计学意义 ($F = 6.818, 34.221, 25.767, P <$

0.01); 甲状腺素治疗组及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。见表 1。

表 1 各组大鼠血清 T3、T4、TSH 水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	T3 (nmol/L)	T4 (nmol/L)	TSH ($\mu\text{IU}/\text{ml}$)
对照	12	0.83 $\pm$ 0.03	49.81 $\pm$ 1.08	1.02 $\pm$ 0.14
甲减	11	0.60 $\pm$ 0.03**	18.19 $\pm$ 1.72**	19.78 $\pm$ 3.01**
多奈哌齐治疗	11	0.57 $\pm$ 0.02**	18.58 $\pm$ 0.91**	19.55 $\pm$ 3.29**
甲状腺素治疗	10	0.83 $\pm$ 0.08##	52.42 $\pm$ 1.92##	1.21 $\pm$ 0.32##
联合治疗	11	0.77 $\pm$ 0.07#	52.71 $\pm$ 2.04##	1.07 $\pm$ 0.15##

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

2.2 大鼠海马各区 munc-18 蛋白表达的变化 大鼠脑切片, 肉眼可见海马结构清晰, 染色较强, 呈棕黄色。光镜下观察, munc-18 的免疫反应产物呈棕黄色颗粒, 在海马 CA1、CA3 及 DG 区各层中均有表达。与对照组比较, 甲减组大鼠海马中 munc-18 在 CA3-SO 层、CA3-SR 层、DG-ML 层及 DG-PL 层表达水平下降, 差异有统计学意义 ($F = 4.218, 9.706, 4.633, 5.448, P < 0.01$)。甲状腺素治疗组 munc-18 在上述海马各层中表达水平仍然低下, 差异有统计学意义 ($P = 0.047, 0.015, 0.044, 0.033$)。联合治疗组中 munc-18 在海马各层中表达与对照组相比, 差异无统计学意义。见图 1、表 2。

2.3 大鼠海马内乙酰胆碱的含量 与对照组比较, 甲减组大鼠海马中乙酰胆碱含量明显减少, 差异有统计学意义 ($F = 6.041, P < 0.01$); 多奈哌齐治疗组、甲状腺素治疗组及联合治疗组乙酰胆碱含量与对照组比较, 差异无统计学意义。多奈哌齐治疗组乙酰胆碱含量是甲减组的 1.17 倍, 差异无统计学意义; 甲状腺素治疗组及联合治疗组乙酰胆碱含量与甲减组相比明显增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05, P < 0.01$), 见表 3。

3 讨论

本研究中, 甲减组大鼠海马中 munc-18 表达与

表 2 各组大鼠海马内 munc-18 表达情况 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CA1			CA3			DG	
		SO	SR	SLM	SO	SL	SR	ML	PL
对照	12	4.63 $\pm$ 0.90	3.82 $\pm$ 0.85	4.37 $\pm$ 0.76	4.62 $\pm$ 0.72	3.55 $\pm$ 0.88	4.88 $\pm$ 0.76	4.61 $\pm$ 0.70	4.11 $\pm$ 0.50
甲减	11	4.43 $\pm$ 0.88	3.53 $\pm$ 0.56	3.93 $\pm$ 0.87	3.63 $\pm$ 0.72**	3.12 $\pm$ 0.79	3.42 $\pm$ 0.53**	3.34 $\pm$ 0.93**	3.31 $\pm$ 0.78**
多奈哌齐治疗	11	4.43 $\pm$ 1.02	3.61 $\pm$ 0.66	4.06 $\pm$ 0.74	3.91 $\pm$ 0.88**	3.19 $\pm$ 0.60	3.69 $\pm$ 0.63**	3.61 $\pm$ 1.31**	3.42 $\pm$ 0.46**
甲状腺素治疗	10	4.53 $\pm$ 0.66	3.69 $\pm$ 0.97	4.09 $\pm$ 0.76	4.05 $\pm$ 0.68*#	3.21 $\pm$ 0.67	4.19 $\pm$ 0.55*#	3.80 $\pm$ 0.91*	3.54 $\pm$ 0.64*
联合治疗	11	4.67 $\pm$ 0.97	3.91 $\pm$ 0.77	4.21 $\pm$ 0.78	4.68 $\pm$ 0.70##	3.67 $\pm$ 0.77	4.59 $\pm$ 0.69##	4.67 $\pm$ 0.59##	4.26 $\pm$ 0.65##

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

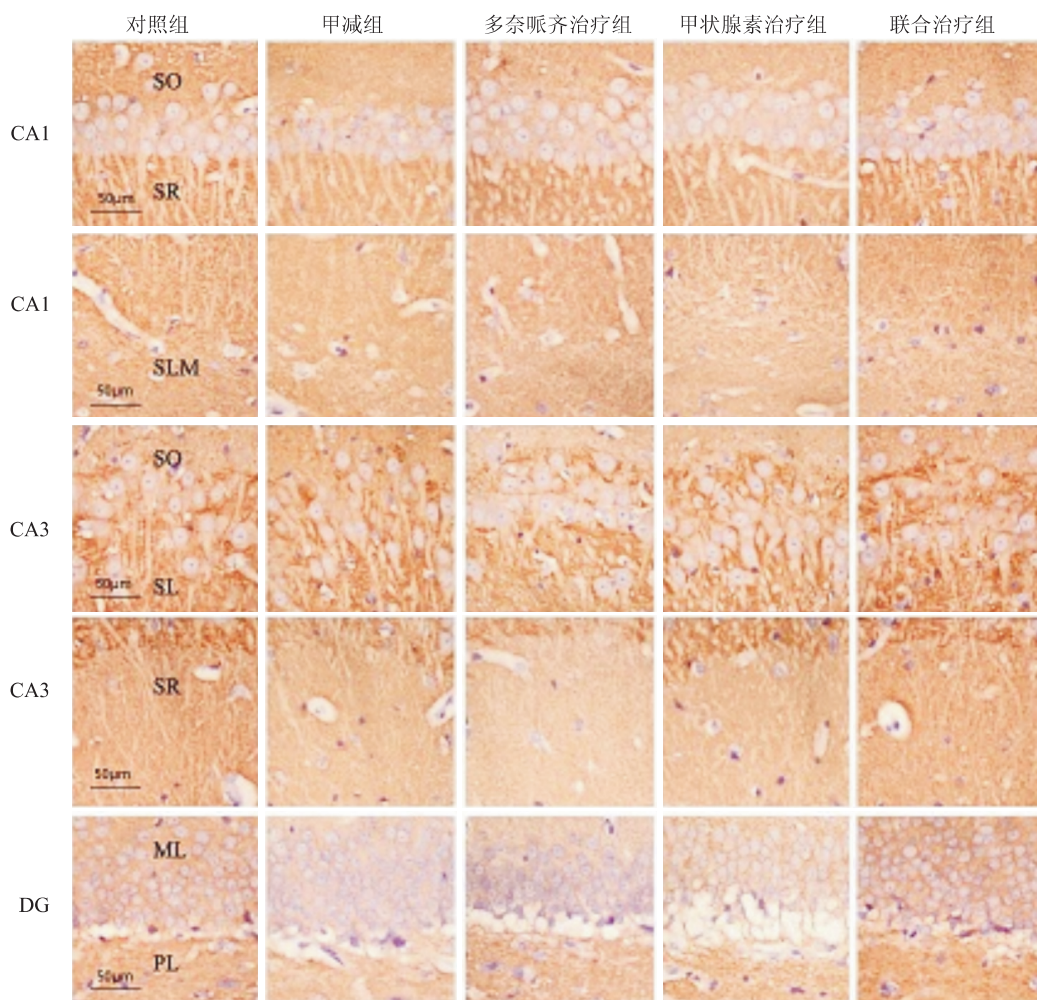


图1 munc-18 免疫反应产物在大鼠海马 CA1、CA3、DG 区的表达 SP × 400

表3 各组大鼠海马内乙酰胆碱含量(μg/mg, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	乙酰胆碱
对照	12	22.27 ± 3.82
甲减	11	14.80 ± 2.24*
多奈哌齐治疗	11	17.35 ± 2.31
甲状腺素治疗	10	18.98 ± 4.88 [#]
联合治疗	11	23.31 ± 5.22 ^{##}

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与甲减组比较: [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$

对照组相比明显减少,与以往文献^[8]结论相符。有研究^[9]表明甲状腺素可以影响脑内蛋白质的合成。在甲减状态下,脑内甲状腺素总体水平降低,海马内激素水平降低尤为明显^[9]。甲减状态下海马内 munc-18 表达减少可能是由于海马内甲状腺素水平低下所致。

本研究表明成年期甲减大鼠海马内乙酰胆碱含量减少。其原因可能与成年期甲减损害了海马中胆碱能神经发生有关^[10]。另外,有研究^[9]证实在鼠类大脑中 munc-18 参与了乙酰胆碱的释放。甲减也许

可以通过对突触蛋白的损害来影响神经递质的释放。在甲状腺素治疗组中,乙酰胆碱含量恢复至对照组水平,提示甲状腺素可以增强胆碱能功能^[9]。多奈哌齐治疗后,甲减大鼠海马中乙酰胆碱含量也恢复至正常水平。这与文献^[11]中报道的胆碱酯酶抑制剂可以通过抑制胆碱酯酶对乙酰胆碱的水解作用从而增加乙酰胆碱含量的结论相符。经过单一常规剂量甲状腺素治疗后,甲减大鼠海马内 munc-18 表达仍未达到对照组水平。这种现象的原因可能与脑内甲状腺素剂量不足有关。研究^[12]表明,血清中甲状腺素浓度远远高于其在中枢神经系统中的浓度,当外源性给与小剂量甲状腺素替代治疗甲减时,血清甲状腺素水平可以恢复至一个比较宽的正常值范围,而此时脑内甲状腺素水平可能尚未达到正常。因此,当给予大剂量甲状腺素冲击治疗时,突触蛋白表达才能恢复至正常水平,但同时会造成血清甲状腺素水平升高,有诱导甲状腺功能亢进的风险^[9]。联合治疗组中, munc-18 表达恢复至对照组水平,且

血清甲状腺素处于正常范围。多奈哌齐为胆碱酯酶抑制剂,近年来文献^[8]表明多奈哌齐具有神经保护的作用,可以延缓阿尔茨海默病中海马的萎缩,减少神经元损失以及增加海马神经元树突的长度和密度。本研究中联合治疗组大鼠海马突触蛋白恢复正常可能是多奈哌齐神经保护作用的一个方面。

综上所述,甲状腺素联合多奈哌齐治疗成年期甲减大鼠,在血清甲状腺素水平正常时,可恢复海马内 munc-18 的异常表达,提示甲状腺素联合多奈哌齐治疗对甲减造成的海马内突触蛋白损害有益。

参考文献

- [1] 刘俊霞,朱德发,王 芬,等. 甲状腺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.
- [2] 宁 丹,朱洋波,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.
- [3] Gengyo-Ando K, Kitayama H, Mukaida M, et al. A murine neural-specific homolog corrects cholinergic defects in *Caenorhabditis elegans* unc-18 mutants [J]. *J Neurosci*, 1996, 16(21): 6695-702.
- [4] Weimer R M, Richmond J E, Davis W S, et al. Defects in synaptic vesicle docking in unc-18 mutants [J]. *Nat Neurosci*, 2003, 6(10): 1023-30.
- [5] Zhu Y, Ning D, Wang F, et al. Effect of thyroxine on munc-18

- and syntaxin-1 expression in dorsal hippocampus of adult-onset hypothyroid rats [J]. *Eur J Histochem*, 2012, 56(2): e22.
- [6] 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.
- [7] Martin J V, Padron J M, Newman M A, et al. Inhibition of the activity of the native gamma-aminobutyric acid A receptor by metabolites of thyroid hormones: correlations with molecular modeling studies [J]. *Brain Res*, 2004, 1004(1-2): 98-107.
- [8] Smith J W, Evans A T, Costall B, et al. Thyroid hormones, brain function and cognition: a brief review [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2002, 26(1): 45-60.
- [9] Ahmed M T, Sinha A K, Pickard M R, et al. Hypothyroidism in the adult rat causes brain region-specific biochemical dysfunction [J]. *J Endocrinol*, 1993, 138(2): 299-305.
- [10] Desouza L A, Ladiwala U, Daniel S M, et al. Thyroid hormone regulates hippocampal neurogenesis in the adult rat brain [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2005, 29(3): 414-26.
- [11] Kroker K S, Rast G, Giovannini R, et al. Inhibition of acetylcholinesterase and phosphodiesterase-9A has differential effects on hippocampal early and late LTP [J]. *Neuropharmacology*, 2012, 62(5-6): 1964-74.
- [12] van Doorn J, Roelfsema F, van der Heide D. Concentrations of thyroxine and 3,5,3'-triiodothyronine at 34 different sites in euthyroid rats as determined by an isotopic equilibrium technique [J]. *Endocrinology*, 1985, 117(3): 1201-8.

Effects of thyroxine and donepezil on hippocampal munc-18 expression and acetylcholine content in hypothyroid adult rats

Wang Nan, Wang Fen, Cai Yaojun, et al

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

Abstract Objective To evaluate the thyroxine and donepezil (DON) effect on the acetylcholine (Ach) content and munc-18 expression in the hippocampus of adult hypothyroid rats and clarify the possible mechanism under the hypothyroidism-induced cognitive dysfunction. **Methods** 55 Sprague-Dawley rats were randomly divided into five groups: control, hypothyroid (PTU: 0.05%; added to the drinking water), hypothyroid treated with T4 (6 µg/100 g body weight once daily; ip injection), hypothyroid treated with DON (0.005%; added to the drinking water) and a combination of both drugs (T4: 6 µg/100 g; DON: 0.005%). Concentration of Ach was determined in the homogenated hippocampus of each animal and Ach content was measured by the modified method of Hestrin. Protein levels of munc-18 were determined by immunohistochemistry. The radioimmunoassay kits were applied to assay the levels of serum T3, T4 and TSH. **Results** Compared to the controls, the content of Ach in the hippocampus of the hypothyroid rats was significantly decreased, munc-18 in the hippocampus was expressed at significantly lower levels in the stratum radiatum in CA3 as well as in dentate gyrus. A two-week treatment with T4 alone restored the content of Ach but failed to normalize the expression of munc-18. Munc-18 was restored completely in all layers to normal levels by two-week T4 plus DON treatment. **Conclusion** Our findings suggest that the thyroid hormone may have a direct effect on the metabolism of hippocampal Ach in adult rats and the DON treatment can ameliorate the synaptic protein impairment induced by hypothyroidism to some extent.

Key words hypothyroidism; hippocampus; munc-18; acetylcholine; thyroxine; donepezil