

桥本甲状腺炎鼠动情周期子宫内膜半乳糖凝集素-1 含量变化

高伟伟^{1,2} 李莉¹ 樊华¹ 杨昊¹ 柳田田¹ 王囡¹ 朱德发¹

摘要 目的 研究桥本甲状腺炎鼠动情周期子宫内膜半乳糖凝集素-1 (galectin-1) 表达。方法 选取 8~9 周龄的雌性小鼠共 40 只,按照随机数字表法将其均分成观察组和对照组。其中观察组小鼠于尾根部予以猪甲状腺球蛋白皮下注射,建立桥本甲状腺炎模型。分别比较 2 组小鼠血清甲状腺球蛋白抗体 (TgAb)、甲状腺过氧化物酶抗体 (TPOAb)、三碘甲状腺原氨酸 (T3)、四碘甲状腺原氨酸 (T4)、促甲状腺激素 (TSH) 水平、动情各期的子宫内膜厚度、galectin-1 mRNA 表达情况、galectin-1 蛋白的平均吸光度值 (AOD)、子宫组织匀浆肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和白细胞介素-17a (IL-17a) 水平。结果 与对照组相比,观察组小鼠血清 TgAb、TPOAb 水平增高 ($P < 0.05$),甲状腺激素水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$);动情期子宫内膜厚度增加 ($P < 0.05$),galectin-1 蛋白的表达减少 ($P < 0.05$),动情周期 galectin-1 mRNA 水平减低

($P < 0.05$),动情周期子宫组织匀浆中 TNF- α 、IL-17a 表达减少 ($P < 0.05$)。结论 桥本甲状腺炎鼠动情期子宫内膜增厚,galectin-1 含量减低。子宫组织匀浆内 TNF- α 和 IL-17a 两种细胞因子减少。

关键词 桥本甲状腺炎;半乳糖凝集素-1;子宫内膜;动情周期;细胞因子

中图分类号 R 581.9

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)03-0344-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.03.005

桥本甲状腺炎属于自身免疫性疾病之一,主要发生于女性人群^[1]。研究^[2]显示,不孕女性具有较高的桥本甲状腺炎发生率。因此,对桥本甲状腺炎与女性妊娠的关系进行深入研究尤为重要。人及哺乳动物的子宫内膜经过短暂的“着床窗口期”才允许胚胎着床,这一过程受到各种信号物质、细胞因子的调节。半乳糖凝集素家族成员在免疫调节、炎症反应以及肿瘤细胞的浸润、转移等一系列生理过程中发挥着重要作用^[3]。既往,半乳糖凝集素-1 (galactose agglutinin-1, galectin-1) 在肿瘤疾病的发生、进展、转移等方面的相关研究较多,由于胚胎着床和

2019-06-26 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 安徽省第二人民医院普内科,合肥 230041

作者简介:高伟伟,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

lished by the internationally recognized single prolonged stress (SPS) method. After 6 h of modeling, the rats in the electro-acupuncture group and electro-acupuncture control group were given acupuncture treatment. The open field test and Morris water maze were used to test the emotional arousal level and learning and memory ability of rats. The morphological changes of hippocampal CA1 region were observed by HE staining. Then the expression of Bcl-2/Bax protein in hippocampal CA1 region was detected by Western blot. **Results** Compared with the model group, the standing and crossing times of the control group and the electro-acupuncture group increased, the average incubation period and crossing latency shortened, the number of crossing times increased, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The results of HE staining showed that compared with the control group, the hippocampal neurons in CA1 area of the model group were disorderly arranged and had an unusual structure, and the hippocampal neurons in CA1 area of the electro-acupuncture group were arranged in order and the structure tended to be normal. Compared with the control group, the expression of Bcl-2/Bax protein in CA1 region of hippocampus in the model group increased, and the expression of Bcl-2/Bax protein in CA1 region of hippocampus in the electro-acupuncture group decreased compared with the model group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Electro-acupuncture can improve the learning and memory ability of PTSD-like rats, which may be related to the down-regulation of Bcl-2/Bax protein expression in CA1 region of hippocampus.

Key words post-traumatic stress disorder; Bcl-2; Bax; learning and memory

肿瘤转移的生物学行为存在高度相似,因此近年来 galectin-1 于生殖领域中的相关研究日益增多。有研究^[4]报道,galectin-1 与妊娠的维持和成功存在一定相关性,被认为可能是子宫内膜容受性的标志物之一。鉴于此,现通过研究子宫内膜厚度的改变及 galectin-1、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-17a (interleukin-17a, IL-17a) 含量关系,为临床研究桥本甲状腺炎和不孕的关系提供线索,同时为桥本甲状腺炎患者不孕症的治疗提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选取 8~9 周龄的清洁级健康 NOD 雌性小鼠共 40 只,体质量 20~23 g,均购自北京华阜康生物科技有限公司,饲养于安徽医科大学病理科实验室。所有小鼠均予以自然昼夜节律光照,控制室内温度 20~24 °C、湿度 40%~60%,适应性饲养 7 d。小鼠实验方式严格遵守伦理学原则,且与安徽医科大学实验动物管理相关条例相符。

1.2 研究方法

1.2.1 桥本甲状腺炎造模 40 只小鼠随机均分为 2 组,经 7 d 适应性饲养后,取 25 μ g 的猪甲状腺球蛋白加入 100 μ l 的 PBS 溶液中混匀,按照 1:1 的比例取弗氏完全佐剂与猪甲状腺球蛋白溶液混合在研钵之内,并于冰浴上研磨,直至其呈“油包水”状。固定小鼠,采用一次性注射器抽取已制备好的乳状剂于尾根部行皮下注射,注射剂量为 0.1 ml。14 d 后按照 1:1 的比例将弗氏不完全佐剂和猪甲状腺球蛋白混合制成乳化液,随后按照上述方式进行操作。对照组小鼠注射等量不含有猪甲状腺球蛋白的弗氏完全佐剂进行干预。造模成功与否由病理实验室工作人员进行判定,成功模型的主要表现为甲状腺滤泡结构发生较为严重的破坏,且淋巴细胞浸润比较明显。

1.2.2 动情周期确定 主要分为动情前期、动情期、动情后期、动情间期,周期为 4~5 d。在小鼠造模周期结束后 1 周内进行小鼠阴道脱落细胞瑞氏染色涂片,在确定动情周期后立即取静脉血,以颈椎脱臼法处死小鼠。

1.2.3 标本制备 迅速取出小鼠的完整“Y”形子宫,并从子宫分叉处剪断。将左半子宫放置于 4% 的多聚甲醛中固定 24 h,行石蜡包埋,作矢断面连续切片,片厚 5 μ m,用于 HE 以及免疫组化染色。另一侧子宫以 4% 的多聚甲醛固定,用于组织匀浆待

行细胞因子检测。

1.2.4 血清抗甲状腺球蛋白抗体 (thyroglobulin antibody, TgAb)、甲状腺抗过氧化物酶抗体 (thyroid peroxidase antibody, TPOAb)、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) 水平检测 确定动情周期后的小鼠进行乙醚吸入法麻醉处理,随后打开腹腔将下腔静脉充分暴露,进行下腔静脉采血。以 3 000 r/min 离心 10 min,取上层血清保存在 4 °C 的冰箱中待检。电化学发光免疫分析法检测血清 T3、T4、TgAb、TPOAb,ELISA 法检测血清 TSH,具体操作严格按照试剂盒说明书进行。

1.2.5 染色 ① HE 染色:小鼠子宫予以脱蜡、复水处理,以苏木精染色 20 min,随后予以脱水处理,并于透明后烘干封片,采用光学显微镜进行图片的拍摄。② 免疫组织化学染色:取小鼠子宫蜡片进行脱蜡、水化、阻断内源性过氧化物酶操作,并以柠檬酸盐微波炉加热暴露抗原决定簇,以山羊血清封闭。上述各项操作结束后均采用 PBS 重复 3 次洗涤,3 min/次。加入 galectin-1 抗体 (1:50) 于室温下孵育 1 h 后转移至 4 °C 条件下孵育过夜,采用 PBS 洗涤, DAB 显色,苏木精复染,常规脱水、透明、封片。随机选取每张切片高倍镜下 5 个视野,采用 IPP6.0 图像分析软件进行免疫反应产物观密度值的分析,取平均吸光度 (average optical density, AOD) 值。

1.2.6 mRNA 获取 采用 TRIzol 试剂盒提取总 RNA,并通过逆转录获取 cDNA,随后以 PCR 扩增技术获取 mRNA,其中 PCR 反应体系 20 μ l,包括 5 μ l 2 \times SYBR Green mixture,正向 (10 μ mol/L) 与反向引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ l, cDNA 1 μ l,核糖核酸酶游离水 2 μ l,总 RNA 10 μ l。反应条件如下:95 °C、2 min,95 °C、5 s,60 °C、10 s,共 40 个循环。其中 galectin-1 正向引物为 GCCTCCATGTGTTCTTGCTC,反向引物为 CTCACCCTCTGTGGTCACTT。

1.2.7 采用流式微球捕获技术 (CBA) 以 CBA 人 Th1/Th2/Th17 细胞因子试剂盒检测组织匀浆 TNF- α 、IL-17a 水平。具体操作严格按照试剂盒说明书进行,试剂盒购自美国 BD 公司。

1.2.8 观察指标 分别比较 2 组小鼠血清 TgAb、TPOAb、T3、T4、TSH 水平,HE 染色镜下拍照,多功能图像分析仪测量动情期的子宫内膜厚度水平,动情期、动情前期、动情后期、动情间期 galectin-1 mRNA 表达情况,组织匀浆 TNF- α 、IL-17a 水平。

1.3 统计学处理 采用 SPSS20.0 软件分析相关数据, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用两独立样本 *t* 检验。 $P < 0.05$ 说明差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组小鼠血清 TgAb、TPOAb、T3、T4、TSH 水平对比 观察组小鼠血清 TgAb、TPOAb 水平相对照组较高 (均 $P < 0.05$)。见表 1。

2.2 两组小鼠动情周期的子宫内膜厚度水平对比 观察组小鼠动情期子宫内膜厚度相对照组更厚 ($P < 0.05$)。见表 2、图 1。

2.3 两组小鼠动情周期 galectin-1 mRNA 表达情况对比 观察组小鼠动情各期 galectin-1 mRNA 表达水平相对照组降低 ($P < 0.05$)。见表 3。

2.4 两组小鼠动情周期 galectin-1 蛋白的 AOD 对比 观察组动情期和动情后期的 galectin-1 蛋白的 AOD 值均较对照组更低 ($P < 0.05$) ,而在动情前期和动情间期的 AOD 值与对照组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 4。

2.5 两组小鼠组织匀浆 TNF- α 、IL-17a 水平对比 观察组小鼠组织匀浆 TNF- α 、IL-17a 水平相对照组较低 (均 $P < 0.05$)。见表 5。

表 1 2 组小鼠 TgAb、TPOAb、T3、T4、TSH 水平 ($n = 20, \bar{x} \pm s$)

组别	TgAb (IU/mol/L)	TPOAb (IU/mol/L)	T3 (nmol/L)	T4 (nmol/L)	TSH (μ mol/L)
观察	207.95 \pm 14.75*	98.44 \pm 5.10*	1.44 \pm 0.30	35.38 \pm 7.49	355.62 \pm 2.31
对照	173.11 \pm 8.26	84.56 \pm 4.77	1.42 \pm 0.28	35.02 \pm 7.50	354.11 \pm 3.05
<i>t</i> 值	9.217	8.889	0.218	0.152	1.765
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001	0.829	0.880	0.086

与对照组比较: * $P < 0.05$

表 2 两组小鼠动情期的子宫内膜厚度水平对比 (μ m $\bar{x} \pm s$)

组别	动情期 ($n = 8$)	动情前期 ($n = 4$)	动情后期 ($n = 4$)	动情间期 ($n = 4$)
观察	377.53 \pm 36.20*	354.28 \pm 18.57	367.32 \pm 14.18	248.82 \pm 13.48
对照	341.32 \pm 20.15	352.31 \pm 17.65	364.57 \pm 14.23	250.31 \pm 12.67
<i>t</i> 值	2.472	0.344	0.612	0.360
<i>P</i> 值	0.027	0.733	0.544	0.721

与对照组比较: * $P < 0.05$

表 3 两组小鼠动情周期 galectin-1 mRNA 表达情况对比 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动情期 ($n = 8$)	动情前期 ($n = 4$)	动情后期 ($n = 4$)	动情间期 ($n = 4$)
观察	0.67 \pm 0.05*	0.54 \pm 0.02*	0.52 \pm 0.03*	0.50 \pm 0.03*
对照	1.64 \pm 0.10	1.28 \pm 0.06	1.23 \pm 0.06	1.19 \pm 0.06
<i>t</i> 值	24.539	23.401	21.168	20.572
<i>P</i> 值	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

与对照组比较: * $P < 0.05$

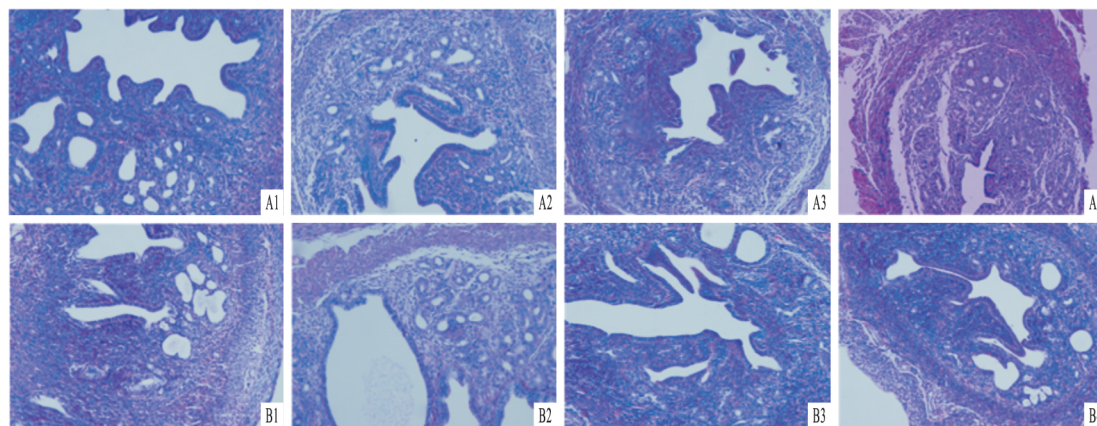


图 1 2 组小鼠子宫内膜动情周期 HE \times 100

A: 观察组; B: 对照组; 1: 动情期; 2: 动情前期; 3: 动情后期; 4: 动情间期

表4 两组小鼠动情周期 galectin-1 蛋白的 AOD 对比($\bar{x} \pm s$)

组别	动情期 ($n=8$)	动情前期 ($n=4$)	动情后期 ($n=4$)	动情间期 ($n=4$)
观察	0.165 7 ± 0.002 9*	0.083 1 ± 0.002 5	0.081 4 ± 0.002 1*	0.042 8 ± 0.002 7
对照	0.201 8 ± 0.003 6	0.082 9 ± 0.002 3	0.139 7 ± 0.002 0	0.043 3 ± 0.002 6
<i>t</i> 值	22.088	0.118	40.207	0.267
<i>P</i> 值	<0.001	0.910	<0.001	0.799

与对照组比较: * $P < 0.05$

表5 两组小鼠组织匀浆 TNF- α 、IL-17a

水平对比 (pg/ml $n=20 \bar{x} \pm s$)

组别	TNF- α	IL-17a
观察	0.92 ± 0.11*	0.36 ± 0.02*
对照	1.57 ± 0.25	0.68 ± 0.15
<i>t</i> 值	10.643	9.457
<i>P</i> 值	<0.05	<0.05

与对照组比较: * $P < 0.05$

3 讨论

近年来的研究^[5]发现不孕症女性合并桥本甲状腺炎的几率高于生育能力正常的女性,这提示了桥本甲状腺炎与不孕症存在密切相关。本文采用猪甲状腺球蛋白于尾根部皮下注射,建立桥本甲状腺炎模型。病理下观察甲状腺组织滤泡结构发生较为严重的破坏,且淋巴细胞浸润比较明显。观察组小鼠血清 TgAb、TPOAb 水平相比对照组较高,这与既往研究^[6]报道一致,提示造模成功。小鼠动情期相当于女性月经周期的分泌期,为了有利于胚胎的顺利植入及着床,动情期的子宫内膜较其他3期明显增厚。本实验通过阴道涂片染色确定动情周期,结果表明观察组小鼠存在动情周期,且节律与对照组无差异,提示动情周期的节律未受其疾病影响而改变。HE染色光镜下观察显示观察组鼠动情期子宫内膜较同期对照组增厚、内膜腺体增大、数量增多。推测机体免疫改变、炎性反应累及子宫内膜。

实验结果显示观察组小鼠 galectin-1 mRNA 水平低于对照组。同时,观察组小鼠的 galectin-1 蛋白的 AOD 值在动情周期出现了异常表达,动情期低于对照组。galectin-1 主要表达在滋养细胞中,属于母胎间相互作用的重要蛋白质之一。其在胎盘植入、子宫螺旋动脉重铸等过程中发挥着至关重要的作用,可通过诱导子宫免疫耐受性树突细胞的扩张,对母胎界面的 Th1/Th2 免疫平衡产生影响,促进免疫耐受^[7-8]。动情期作为妊娠过程关键时期,推测 galectin-1 蛋白低表达可能减弱了细胞间识别黏附能力,以及增强诱导 T 细胞凋亡,促使免疫失衡,不利

于妊娠的顺利进行^[9-10]。

本研究选取2组小鼠右半侧子宫组织匀浆进行 TNF- α 、IL-17a 水平测定,结果显示观察组小鼠 TNF- α 、IL-17a 水平相比对照组均较低,提示存在免疫反应异常。TNF- α 是一种由活化的单核细胞和巨噬细胞产生的细胞因子,除具有抗肿瘤作用外,还能够激活 T 细胞、促进 IL-21、IL-22 等细胞因子的产生与分泌,促进炎症及免疫反应。其中 Aikawa et al^[11]的研究表明, TNF- α 已经参与类风湿性关节炎、银屑病、多发性硬化症等自身免疫性疾病的发病过程中。IL-17a 是 IL-17 家族中的重要成员,其可通过募集中性粒细胞、刺激巨噬细胞等多种促炎介质的产生,诱导炎症级联反应,并与 TNF- α 具有协同作用,加强致炎效应,目前已被证实^[12]在 RA 等自身免疫性疾病中高表达。若敲除小鼠 IL-17 基因后,其自身免疫受到抑制。本研究对于 TNF- α 、IL-17a 水平下降的原因,推测可能与 galectin-1 表达水平的下降有关。研究^[13]表明 galectin-1 可以抑制活化 T 细胞的增殖,促进其凋亡,抑制促炎性细胞因子的分泌并抵抗炎症反应。另有报道^[14]显示 galectin-1 的敲除可减弱对 TNF- α 的促增殖作用的抑制。上述提示了本实验中 galectin-1 蛋白可能通过影响 TNF- α 、IL-17a 两种细胞因子的分泌来调节免疫反应并维持妊娠。

综上所述,桥本甲状腺炎小鼠动情期子宫内膜厚度增加,动情期子宫内膜 galectin-1 水平较对照组降低,且存在局部免疫反应,从而可能导致子宫内微环境改变,对怀孕产生影响。

参考文献

- [1] Leonardi A, Penta L, Cofini M, et al. Rhabdomyolysis in a young girl with van Wyk-Grumbach syndrome due to severe hashimoto thyroiditis[J]. Int J Environ Res Public Health, 2018, 15(4): E704.
- [2] Bastón JI, Barañao RI, Ricci AG, et al. Targeting galectin-1-induced angiogenesis mitigates the severity of endometriosis[J]. J Pathol 2014, 234(3): 329-37.
- [3] Hayashi T, Yasuda K, Kimura T, et al. Prognostic significance of

- asymptomatic brain natriuretic peptide elevation at nephrology referral in patients with chronic kidney disease [J]. *Am J Nephrol*, 2018, 48(3):205–13.
- [4] Vergetaki A, Jeschke U, Vrekoussis T, et al. Galectin-1 overexpression in endometriosis and its regulation by neuropeptides (CRH, UCN) indicating its important role in reproduction and inflammation [J]. *PLoS One* 2014, 9(12):e114229.
- [5] 樊华, 李莉, 夏琴等. 桥本甲状腺炎对子宫雌激素受体 α 表达影响 [J]. *安徽医科大学学报* 2019, 54(2):247–51.
- [6] 戴庆, 何军, 张凡等. IL-1 β 在桥本甲状腺炎外周血中的表达及其与 TgAb 和 TPOAb 的关系 [J]. *中国老年学杂志*, 2018, 38(7):1574–5.
- [7] Martinez-Bosch N, Barranco L E, Orozco C A, et al. Increased plasma levels of galectin-1 in pancreatic cancer: potential use as biomarker [J]. *Oncotarget* 2018, 9(68):32984–96.
- [8] Tsai M S, Chiang M T, Tsai D L, et al. Galectin-1 restricts vascular smooth muscle cell motility via modulating adhesion force and focal adhesion dynamics [J]. *Sci Rep* 2018, 8(1):11497.
- [9] 唐敏悦, 朱依敏. 半乳糖凝集素 1 在母胎界面参与胚胎着床和妊娠维持的研究进展 [J]. *浙江大学学报(医学版)*, 2017, 46(3):321–7.
- [10] Tang M, You J, Wang W, et al. Impact of galectin-1 on trophoblast stem cell differentiation and invasion in *in vitro* implantation model [J]. *Reprod Sci* 2018, 25(5):700–11.
- [11] Emi Aikawa N, De Carvalho J F, Artur Almeida Silva C, et al. Immunogenicity of anti-TNF- α agents in autoimmune diseases [J]. *Clinic Rev Allergy Immunol*, 2010, 38(2–3):82–9.
- [12] Nakae S, Nambu A, Sudo K, et al. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice [J]. *J Immunol*, 2003, 171(11):6173–7.
- [13] Chung C D, Patel V P, Moran M, et al. Galectin-1 induces partial TCR zeta-chain phosphorylation and antagonizes processive TCR signal transduction [J]. *J Immunol*, 2000, 165(7):3722–9.
- [14] Najjar M, Raicevic G, Id Boufker H, et al. Modulated expression of adhesion molecules and galectin-1: Role during mesenchymal stromal cell immunoregulatory functions [J]. *Exp Hematol*, 2010, 38(10):922–32.

Changes of galectin-1 content in endometrium of Hashimoto thyroiditis rats during estrous cycle

Gao Weiwei^{1,2}, Li Li¹, Fan Hua¹, et al

(¹Dept of Geriatric Endocrinology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022; ²Dept of General Internal Medicine, The Second People's Hospital of Anhui, Hefei 230041)

Abstract Objective To study the expression of galactose agglutinin-1 (galectin-1) in endometrium of Hashimoto's thyroiditis rats during estrous cycle. **Methods** A total of 40 female mice aged 8~9 weeks were selected and divided into observation group and control group by random number table method, with 20 mice in each group. In the observation group, pig thyroglobulin was injected subcutaneously at the tail root to establish Hashimoto's thyroiditis model. Mice serum thyroglobulin antibodies (TgAb), thyroid peroxidase antibody (TPOAb), triiodothyronine (T3), tetraiodothyronine (T4), thyroid stimulating hormone (TSH) level of two groups were compared respectively. The endometrial thickness, galectin-1 mRNA expression, and the average optical density (AOD) of galectin-1 protein in each period of estrus cycle were also compared. The levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-17A (IL-17A) were compared between the two groups. **Results** Compared with the control group, serum TgAb and TPOAb levels in the observation group increased ($P < 0.05$), and there was no statistically significant difference in thyroid hormone levels ($P > 0.05$). In the estrous phase, the endometrial thickness increased ($P < 0.05$) while the expression of galectin-1 protein decreased ($P < 0.05$). The mRNA level of galectin-1 decreased ($P < 0.05$) during the estrous cycle, and the expressions of TNF- α and IL-17a in the uterine tissue homogenate decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** The endometrium of Hashimoto's thyroiditis rats becomes thicker and the content of galectin-1 decreases during estrus. Uterine tissue homogenate TNF- α and IL-17a decrease.

Key words hashimoto's thyroiditis; galectin-1; endometrium; estrous cycle; cytokines