

内皮素在围生期甲亢大鼠心脏中的表达情况研究

李斌, 陈晶, 赵紫薇 (包头医学院基础学院, 内蒙古包头 014060)

摘要 [目的]研究内皮素在甲亢和正常母鼠心脏中的差异表达。[方法]首先建立妊娠合并甲亢模型,观察大鼠的行为变化、体重变化,检测甲功水平;然后对孕16、18、20 d母鼠和出生5、10、15 d母鼠心脏,免疫组化检测内皮素的差异表达。[结果]甲亢合并妊娠组大鼠心脏中的内皮素表达高于对照组,并且甲亢组心脏中的内皮素随着受孕时间的延长而加剧,在产后也随着时间的延长而加剧。[结论]该研究可为探讨妊娠合并甲亢对心脏的损伤情况奠定基础。

关键词 围生期;甲亢;心脏;内皮素

中图分类号 S857.14⁺² 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2013)01-00157-02

Expression of Endothelin on Hearts of Hyperthyroidism Rats in Perinatal Stage

LI Bin et al (Foundation School of Baotou Medical College, Baotou, Inner Mongolia 014060)

Abstract [Objective] To study the differential expression of endothelin on hearts between the hyperthyroidism and normal rats in perinatal stage. [Method] First set up the model of hyperthyroidism with pregnancy, observing the change of behavior and weight, detecting hyperthyroidism level; Then get the hearts of 16th day, 18th day, 20th day after gestation and 5th day, 10th day, 15th day after parturition, detecting the expression of endothelin through immunohistochemistry. [Result] The expression of endothelin in hyperthyroidism rats are more than the normal ones in the perinatal age. Moreover this change increased with time prolonged. [Conclusion] The study will lay a foundation for discussing the harmful effects of hyperthyroidism with pregnancy on hearts.

Key words Perinatal stage; Hyperthyroidism; Heart; Endothelin

内皮素(Endothelin, ET)是1988年日本Yanagisawa等^[1]从猪主动脉内皮细胞中分离、纯化并鉴定的一种小分子活性肽。ET是目前发现体内最强的缩血管多肽,可由血管内皮细胞、心肌、平滑肌等合成及分泌,通过促进血管平滑肌细胞钙离子内流导致血管强烈收缩^[2]。甲亢,即甲状腺功能亢进,常会引起甲亢性心脏病,约占甲亢病人的13.4%~21.8%^[3]。由于甲亢以育龄女性多见,常出现甲亢合并妊娠。张巍报道妊娠合并甲亢的发生率为0.05%~0.80%^[4]。如果甲亢合并妊娠,在妊娠期甲亢对母体心脏的影响以及内皮素的表达是否存在差异,则少有报道。笔者通过建立妊娠合并甲亢模型,研究心脏的组织学变化过程和内皮素的表达情况,以期探讨妊娠合并甲亢对心脏的损伤情况奠定基础。

1 材料与与方法

1.1 实验动物及造模 成年Wistar雌性大鼠48只(购于内蒙古大学实验动物中心,编号SCXK(蒙)2002-0001),体重180~210 g;成年雄鼠10只,280~320 g。室温18~25℃,相对湿度50%~70%,动物室保持清洁通风。实验动物适应性饲养1周,雌性大鼠随机分为甲亢组和对照组,数量各半,连续经口灌胃给药,每天1次。模型组按照100 mg/(kg·d)^[5]的剂量灌胃甲状腺素片(山东中泰药业股份有限公司),对照组按照10 ml/kg·d的剂量灌服生理盐水。每天记录饮食、饮水量,行为指征;每隔3 d称量体重,调整给药量。当发现行为指征出现甲亢症状时,眶静脉采血2~3 ml,采用竞争性放射免疫分析方法检测游离三碘甲腺原氨酸(FT₃)、游离四碘甲腺原氨酸(FT₄) (山东潍坊市三维诊断技术有限公司,

20100105B)。检测确定甲亢后,挑选发情期雌鼠与雄鼠2:1合笼,次日凌晨进行阴道涂片检查。若显微镜下发现有精子即视为交配,并记为孕0 d,受孕期间继续灌胃。

1.2 取材 分别于孕16 d、孕18 d、孕20 d、产后5 d、产后10 d、产后15 d处死母鼠,摘取心脏,称量心脏重量,并计算心脏相对质量分数,即心脏重量/大鼠体重比值。

1.3 免疫组化与图像分析 取心室组织,使用多聚甲醛固定,石蜡切片后裱于防脱切片,脱蜡至水,3% H₂O₂·甲醇室温孵育10 min,热抗原修复,5% BSA 37℃封闭30 min,滴加1:150兔抗大鼠ET抗体工作液(购于武汉博士德生物工程有限公司)于4℃过夜,滴加兔IGg(购于武汉博士德),37℃ 30 min,滴加SABC。以上各步之间用0.01 mol/L PBS(pH7.5)洗涤3次,每次10 min。DAB室温避光显色,在显微镜下观察终止显色。每组分别取3张切片,每张切片在光镜下(10×40)随机测10个单位面积,使用捷达801图像分析系统,通过测定平均光密度值来测定ET相对表达量。

1.4 数据处理与分析 使用SPSS 11.5软件采用配对T检验进行分析,试验数据用均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

2 结果与分析

2.1 造模结果 对照组大鼠精神状况、活动情况、毛色光泽均未见异常。造模组出现易怒好斗、饮食饮水量多,并且部分大鼠毛色枯槁,脱毛较多。采用配对T检验,比较试验前后各组大鼠体重变化,试验前对照组和模型各组大鼠体重无统计学差异;试验后对照组大鼠体重自然增长,平均增重约(35.4±5.49)g;造模组增长缓慢,平均增重约(21.0±6.27)g。检测甲亢组和对照组甲功FT₃、FT₄水平,见表1。甲功检测结果表明甲亢组FT₃、FT₄水平均高于对照组,综合以上结果显示造模成功。

2.2 心脏相对质量分数 按照以下公式计算心脏相对质量分数:心脏相对质量分数=心脏重量/体重×100%。从图

基金项目 内蒙古自然科学基金项目(2010MS1130)。

作者简介 李斌(1977-),男,内蒙古包头人,讲师,从事心血管疾病致病机理研究。

收稿日期 2012-10-30

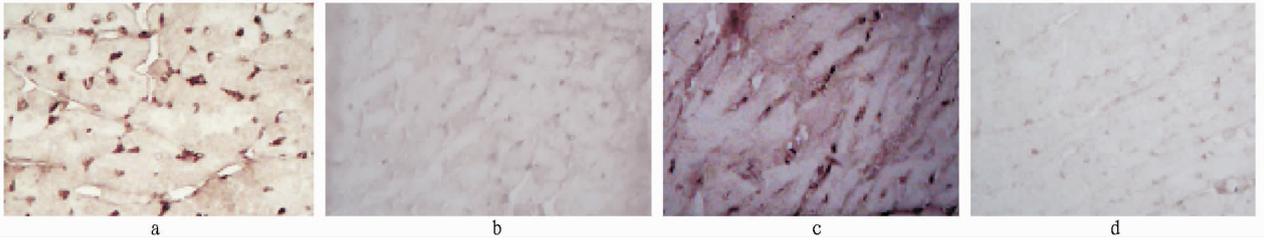
1 可以看出,甲亢组心脏质量分数高于相同孕天数的对照组,差异极显著($P < 0.01$)。在对照组中,从孕 16 d 至产后 15 d,心脏质量分数差异不大;在甲亢组中,心脏质量分数逐渐增大,尤其从孕 16 d 到孕 20 d 变化最为明显。

表 1 大鼠血清 FT₃ 和 FT₄ 水平($n=24, \bar{x} \pm s$) pmol/L

组别	FT ₃	FT ₄
甲亢组	15.90 ± 4.05**	28.69 ± 4.63**
对照组	5.90 ± 1.60	9.63 ± 2.81

注:**表示与对照组差异极显著($P < 0.01$)。

2.3 免疫组化结果 经免疫组化,内皮素在心肌细胞的胞膜、核膜中表达,其中以在核膜上表达最强,在部分细胞胞浆中呈颗粒状弥散分布(图 2)。



注:a. 甲亢组心肌细胞横断面;b. 正常组心肌细胞横断面;c. 甲亢组心肌细胞纵断面;d. 正常组心肌细胞纵断面。

图 2 ET 在甲亢组和正常组的差异表达(10×40)

表 2 ET 在甲亢母鼠和正常母鼠心肌中的差异表达($n=30$)

组别	孕 16 d	孕 18 d	孕 20 d	产后 5 d	产后 10 d	产后 15 d
甲亢组	0.179 4 ± 0.015 9**	0.195 8 ± 0.008 4**	0.209 1 ± 0.016 7**	0.305 3 ± 0.046 4**	0.362 7 ± 0.057 5**	0.396 5 ± 0.060 3**
对照组	0.148 7 ± 0.009 3	0.172 3 ± 0.013 9	0.174 1 ± 0.016 2	0.174 1 ± 0.024 8	0.187 2 ± 0.030 2	0.174 3 ± 0.003 9

注:**表示与对照组差异极显著($P < 0.01$)。

3 讨论

该试验结果表明,在围生期甲亢母鼠心脏中,ET 表达高于同期对照组,这种变化与心脏相对质量分数的变化趋势相似。笔者研究甲亢对妊娠后期母鼠心脏 Masson 染色结果表明,甲亢合并妊娠组大鼠心肌间胶原纤维增多,心肌细胞直径变大、细胞变长,并且这种改变随着受孕时间的延长而加剧^[6]。这说明甲亢可以导致围生期母体心脏出现心肌肥厚、心肌纤维化,可以引起心肌细胞中 ET 表达升高。

甲亢时 FT₃、FT₄ 水平升高,基础代谢率增高,引起外周组织及心肌耗氧量增多、循环血容量增加、心输出量增高等显著的血流动力学改变,由于心脏长期容量负荷过重,可导致心脏扩大,诱发甲亢性心脏病。ET 对离体心脏具有剂量依赖性的正性肌力作用,可增加心脏自发收缩的频率。在生理状况下,由于内皮细胞合成 ET 很少,且清除速度快,因此血浆中的 ET 浓度很低;但是在内皮细胞损伤、组织缺血、缺氧等情况下,内皮细胞大量合成 ET 并释放入血,参与疾病的病理生理过程。在心血管系统中,已经证实 ET 与血管平滑肌增殖和心肌肥厚有关,在多种疾病如急性心肌梗死、动脉粥样硬化以及慢性充血性心力衰竭中,ET 水平会升高。另外, T₃ 升高可直接促进心肌细胞蛋白质的合成和心肌细胞的生

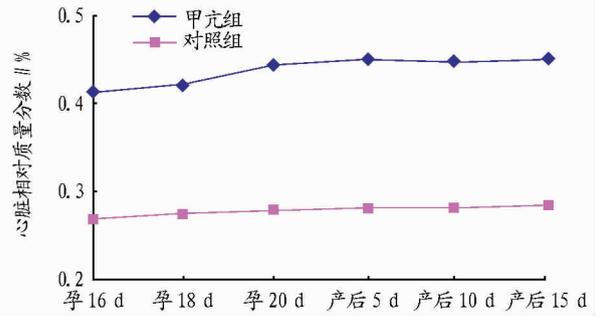


图 1 围生期母鼠心脏相对质量分数的变化

由表 2 可知,甲亢组母鼠心肌细胞中的 ET 表达强于对照组,并且随着孕期的延长,ET 表达增强;在产后,ET 表达也随时间的延长而增强;对照组在不同时间内变化不大。

长,引起心肌肥大^[7]。ET 属于心脏纤维化刺激因子,研究表明衰竭心脏中内皮素表达增加,内皮素的增加也导致了心肌细胞过度生长和胶原合成增加^[8],这与围生期甲亢母鼠心脏 ET 表达增高和胶原纤维增多相一致。由于妊娠期循环系统生理性变化如心率先增快后渐降、心排出量增加,妊娠又会进一步加重甲亢病人的心血管负担,因此应该密切注视围生期甲亢母体的心脏情况。

参考文献

- [1] YANAGISAWA M, KURIHARA H, KIMURA S, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells[J]. Nature, 1988, 332(6163): 411-415.
- [2] DONALD E, KOHEN M D. Endothelin in normal and diseased kidney[J]. Am J Kidney Dis, 2002, 29: 2.
- [3] 陈叙, 崔洪艳. 妊娠合并甲亢性心脏病的诊治[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2005, 21(10): 595-597.
- [4] 张巍. 妊娠合并甲状腺疾病对子代的影响[J]. 实用妇产科杂志, 2006, 22(10): 583-584.
- [5] 李斌, 陈晶, 宋芳, 等. 雌性甲亢大鼠模型的建立[J]. 包头医学院学报, 2010, 26(6): 1-2.
- [6] 陈晶, 李斌, 郝奋. 甲亢对妊娠后期母鼠心脏的组织学影响[J]. 包头医学院学报, 2011, 27(6): 3-5.
- [7] MORGAN H E, BAKER K M. Cardiac hypertrophy - mechanical, neural and endocrine dependence[J]. Circulation, 1991, 83: 13-25.
- [8] 邓玮, 陈庆伟. 心力衰竭与心脏胶原纤维[J]. 心血管康复医学杂志, 2004, 23(2): 198-202.