论著

文章编号:1000-5404(2006)16-1698-03

2,3,7,8-四氯二苯并二噁英作用下鼠胚及乳鼠心脏组织 ANF mRNA 的表达变化

孙黎黎,常 青,梁志清,史常旭 (第三军医大学西南医院妇产科,重庆 400038)

提 要: 目的 目前认为心房利钠因子或多肽(atrial natriuretic factor, ANF)mRNA 的表达水平可作为心脏疾病严重程度的诊断标准,研究 2,3,7,8-四氯二苯并二噁英(2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, TCDD)作用下 SD 大鼠胎鼠及乳鼠心肌组织 ANF mRNA 表达变化特点,探讨 TCDD 是否对心脏功能产生一定影响。**方法** 将实验动物分为 0.05、0.5、5、10 μg/kg 4 个实验组,采用 RT-PCR 半定量法,检测对照组及 TCDD 实验组胎鼠及乳鼠心肌组织 ANF mRNA 表达的变化。**结果** 与对照组比较,实验组心脏组织中 ANF mRNA 的表达出现不同程度的增加。**结论** TCDD 染毒可以使胎鼠及乳鼠心脏组织 ANF mRNA 表达升高,从而推测 TCDD 可能对心脏功能产生一定的损伤。

关键词: TCDD;心肌组织;ANF mRNA

中图法分类号: R322.11;R394.2;R994.6 **文献标识码**: A

Changes of ANF mRNA expression in the myocardial tissue of rat embryo and suckling induced by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin

SUN Li-li, CHANG Qing, LIANG Zhi-qing, SHI Chang-xu (Department of Gynecology and Obstetrics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the changes of ANF mRNA expression in the myocardial tissues of rat embryo and neonate induced by 2, 3, 7, 8-TCDD so as to determine if TCDD can cause injuries of cardiac functions. Methods SD rat embryos were divided into 4 groups respectively exposed to TCDD at the dose of 0.05, 0.5, 5, 10 μg/kg. The mRNA expression of ANF/ANP in the myocardial tissues of rat embryos of day 15, 19 and suckling rats aged 5 days were detected by semiquantitative RT-PCR analysis. Results TCDD could up-regulate ANF mRNA expression in the myocardial tissues of rat embryos and suckling rats, as compared with control group. Conclusion TCDD can up-regulate ANF mRNA expression in myocardial tissues, suggesting that TCDD may cause injuries of cardiac functions of rat embryos and suckling rats.

Key words: TCDD; cardiac tissue; ANF mRNA

ANF 是一种具有舒张血管、降低血压,减少静脉回流和心房充盈压及影响心功能和改善心律失常作用的活性多肽,亦称心钠素(cardionatrin)。此外,ANF 可明显扩张冠状血管,增加冠脉血流量,有利于心肌营养[1]。近些年,人们对 ANF 在体内的分布、释放、代谢、受体、功能及调节进行了大量的研究,目前认为 ANF 的表达水平可作为心脏疾病严重程度的诊断标准[2]。

2,3,7,8-四氯二苯并二噁英(2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, TCDD)作为环境雌激素的一种广泛而稳定地存在于生态环境中,其最大危险是具有致畸、致癌、致突变("三致")毒性。在研究 TCDD 对鼠胚心脏组织的损害时,我们选择了 ANF mRNA 的表达作为大鼠胚胎及乳鼠心功能指标。

1 材料与方法

1.1 实验动物

将体质量 250~300 g 雌雄 SD 大鼠(由第三军医大学实验动物中心提供)按 1∶1 比例合笼过夜,翌日发现有阴栓者为怀孕第 0 天。于妊娠第 8 天向实验组孕鼠腹腔注射 TCDD(二甲基亚砜溶解),对照组(3 只)仅腹腔内注射二甲基亚砜 2 ml,实验组分为 0.05、0.5、5、10 μg/kg 4 组,每组 3 只。分别取胎龄 15、19 d 胎鼠心脏及新生 5 d 乳鼠心脏。

1.2 主要试剂

TCDD(由中国科学院水生物所徐盈教授提供),DMSO、DEPC、MOPS、EB (Sigma, 美国), Tripure Isolation Reagent (Roche,美国),RT-PCR 试剂盒、Oligo(dT)(Promega,美国),PCR 引物(上海生物工程技术服务有限公司合成),其他均为国

作者简介:孙黎黎(1978-),女,安徽省阜阳市人,硕士研究生,医师,主要从事妇科内分泌疾病方面的研究,现在武汉空军医院妇产科。电话:(023)60822457

通讯作者:常 青,电话:(023)68765399,E-mail:CQLi99@yahoo.com.cn

收稿日期:2005-09-09;修回日期:2005-12-05

产试剂。

1.3　实验方法

1.3.1　心脏组织总 RNA 的提取　　用 Tripure 试剂快速提取总 RNA，紫外分光测定 $D(260)/D(280)$ 确定其纯度和量，1.2% 甲醛变性凝胶电泳鉴定其完整性。

1.3.2　RT-PCR 扩增 cDNA　　取 2 μg 总 RNA，用 AMV 逆转录酶合成 cDNA，取 2 μl cDNA 进行 PCR 扩增。ANF 的引物自行设计，β-actin 作为内源性对照。ANF 的引物序列为：5′-GAGCAGACCGATGAAGCG-3′和 5′-AGTGGCAATGCGACCAAG-3′，扩增产物长度为 348 bp；以 β-actin 的 PCR 作为参照（扩增产物长度为 738 bp）。在对 Mg^{2+} 浓度、cDNA 用量及引物和退火温度优化中，选择最亮条带对应的反应体系和反应条件为最佳反应条件，最终确定 PCR 反应体系 20 μl 为：dNTP（10 mmol/L）0.36 μl、*Taq* DNA 酶（5 U/μl）0.5 μl、$MgCl_2$（25 mmol/L）1.5 μl、上下游引物各 0.5 μl、10 × RNA PCR buffer 2 μl、cDNA 模板2 μl。ANF 的 PCR 扩增条件为：94 ℃ ×5 min，一个循环；94℃ ×30 s，56 ℃ ×30 s；72 ℃ ×1 min，30 个循环；72 ℃ ×5 min。

1.3.3　PCR 产物的鉴定和半定量　　取 3 μl RT-PCR 产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳，结果在紫外凝胶图像分析仪上观察并分析，计算目的片断和内参照条带的灰度比值。

1.4　统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件进行 t 检验。

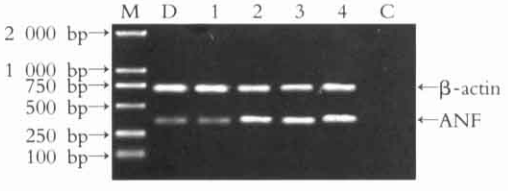
2　结果

2.1　RNA 的纯度、完整性鉴定

从胎鼠及乳鼠心脏组织中提取的总 RNA 用分光光度仪进行测定，由其 $D(260)/D(280)$ 提示总 RNA 无明显降解。1.2% 甲醛变性凝胶电泳可见完整清晰的 28、18、5 S 条带，其间见分子量大小不一的云雾状 mRNA。

2.2　TCDD 对鼠胚及乳鼠心肌组织 ANFmRNA 表达的变化

电泳结果可见，TCDD 实验组与对照组比较，TCDD 实验组 ANF 条带较亮，且随 TCDD 染毒剂量的增加而亮度增强（图 1）。不同时间段取心脏标本中 ANF 条带亮度无明显差异。

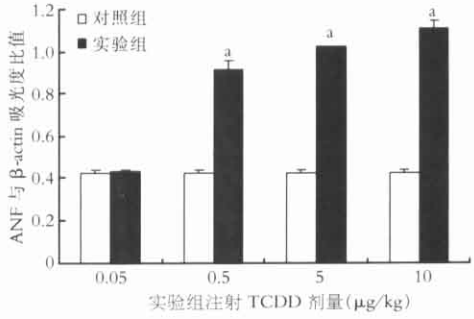


M：PCR 标准；D：DMSO 对照；1：0.05 μg/kg TCDD；2：0.5 μg/kg TCDD；3：5 μg/kg TCDD；4：10 μg/kg TCDD；C：空白对照

图 1　TCDD 对心肌组织 ANF mRNA 表达的影响

用凝胶图像扫描分析软件分析 ANF 基因 mRNA 在各个时间段对照组与实验组的各条相应条带的吸光度值，并计算各时间点与 β-actin 吸光度值的比值。

分析 ANF 基因 mRNA 在各个时间段对照组与实验组的各条相应条带的吸光度值比值，可见实验组除 0.05 μg/kg 组与对照组比较 ANF mRNA 表达无明显差异外，其余 3 组表达均有不同程度的上调，与对照组比较有显著统计学意义（$P<0.01$），如图 2 所示为 TCDD 对胎龄 19 d 鼠胚心肌组织 ANF mRNA 表达的影响；胎龄 15、19 d 及新生 5 d 的心脏组织中 ANF mRNA 表达相比较无统计学意义（$P>0.05$）。



a：$P<0.01$，与对照组比较

图 2　TCDD 对 19 d 鼠胚心肌组织 ANF mRNA 表达的影响（$\bar{x} \pm s$）

3　讨论

已有的研究表明，心脏压力和容量负荷过重的患者（如充血性心脏病、急性心肌梗死、室上性心动过速、原发性高血压等）在尚未出现心力衰竭时，循环 ANF 已明显升高，心力衰竭患者的 ANF 可较正常值高出 1 倍至数 10 倍，ANF 浓度与心力衰竭严重程度密切相关，血浆 ANF 水平与血流动力学指标如右房压、肺动脉楔压、左室射血分数、心输出量等指标均有相关性[3]。经强心、利水、扩血管治疗后，随着症状和心功能的改善，ANF 水平明显降低；而在治疗不当，病情恶化时，ANF 水平又进行性升高。因此，ANF 水平是反映血流动力学异常和心力衰竭严重程度、观察疗效、随访病情的可靠指标[4]。

本次实验实验组除 0.05 μg/kg 组与对照组比较 ANF mRNA 表达无明显差异外，其余 3 组表达均有不同程度的上调，并表现为剂量依赖性，提示孕鼠妊娠第 8 天经腹腔注射染毒 TCDD，已对其胎鼠及乳鼠心脏功能产生不良影响。这与 Mulay 等[5]利用鸡胚模型得出的结论一致：TCDD 染毒后心脏组织 ANF mRNA 表达增强，且与心脏形态变化一致。

本研究还提示：胎龄 15、19 d 及新生 5 d 的心脏组织中 ANF mRNA 表达相比较无统计学意义（$P>0.05$）。而 Walker 等[6]发现在鸡胚模型中孵育后第 8、10 和第 12 天心脏组织 ANF mRNA 的表达依次增强。鼠胚心房钠尿肽最早出现在第 11 ~ 14 天鼠胚心房，不同胎龄胚胎心脏各部位心房钠尿肽的含量与胎龄的变化具有密切关系，其中心房和心耳的含量随胎龄的增长而增加，而心室则反之[7]。正常情况下心脏

内的 ANF 主要分布于心房肌，心室肌内的含量很少，且基本不含有 ANF 的分泌颗粒；但在心功能不全时这种分布特点可发生变化[8]；随着心衰的加重，心室肌亦参与 ANF 的合成与分泌，这可能是充血性心力衰竭时心脏的一种代偿性改变。显然，ANF mRNA 的表达受众多因素的影响，利用鼠胚和鸡胚模型检测 TCDD 对不同天数心脏组织 ANF mRNA 表达的影响，我们得到不同的结果，此不同是否与种属差异有关，尚需进一步研究。但可以肯定的是测定 ANF 水平对评价心脏血流动力学异常变化的程度有重要临床意义。Sodian 等[9]临床试验证明给慢性心衰终末期的患者安装心脏辅助设备后，血浆 ANF 水平下降可作为心功能恢复的指标。

综上所述，2,3,7,8-TCDD 可对胎鼠及乳鼠心脏功能产生一定损伤，上调心肌组织 ANF mRNA 的表达。ANF mRNA 表达在心脏组织中升高可反映出心脏血流动力学恶化的严重性，在理论上，减少 ANF mRNA 表达或血浆中 ANF 浓度的治疗也应该可以解除心室负荷和降低室壁张力和心肌需氧。因此，我们也许可以通过给 TCDD 染毒动物输入药物剂量的 ANF 从而找到一种减慢心肌功能下降速度的方法，是否可行，有待进一步研究。

参考文献：

[1] KIM T G, CHEN J, SADOSHIMA J, *et al*. Jumonji represses atrial natriuretic factor gene expression by inhibiting transcriptional activities of cardiac transcription factors[J]. Mol Cell Biol, 2004, 24(23): 10151-10160.

[2] MERCADIER J J, SAMUEL J L, MICHEL J B, *et al*. Atrial natriuretic factor gene expression in rat ventricle during experimental hypertension[J]. Am J Physiol, 1989, 257(3 Pt 2): H979-H987.

[3] DI NARDO P, MINIERI M, CARBONE A, *et al*. Myocardial expression of atrial natriuretic factor gene in early stages of hamster cardiomyopathy[J]. Mol Cell Biochem, 1993, 125(2): 179-192.

[4] HOWIE, CALDWELL M A, DRACUP K. The Measurement of brain natriuretic peptide in heart failure: precision, accuracy, and implications for practice[J]. AACN Clin Issues, 2003, 14(4): 520-531.

[5] MULAY S,CONLIFFE P R,VARMA D R. Increased natriuretic peptides in fetal hearts of diabetic rats[J]. J Endocrinol, 1995, 146(2): 255-259.

[6] WALKER M K, CATRON T F. Characterization of cardiotoxicity induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related chemicals during early chick embryo development[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2000, 167(3): 210-221.

[7] CAMERON V A, ELLMERS L J. Minireview: natriuretic peptides during development of the fetal heart and circulation[J]. Endocrinology, 2003, 144(6): 2191-2194.

[8] EDWARDS B S, ACKER-MANN D M, LEE M E, *et al*. Identification of atrial natriuretic factor within ventricular tissue in hamsters and humans with congestive heart failure[J]. J Clin Invest, 1988, 81(1): 82-86.

[9] SODIAN R, LOEBE M, SCHMITT C, *et al*. Decreased plasma concentration of brain natriuretic peptide as a potential indicator of cardiac recovery in patients supported by mechanical circulatory assist systems [J]. J Am Coll Cardiol, 2002, 38(7): 1942-1949.

（编辑 薛国文）

（上接 1697 页）

影响幸福感的因素：各组间婚姻状况、年龄、性别、教育程度、病程之间无统计学意义（$P>0.05$），病种、付费方式比较差异有统计学意义（$P<0.05$）。3 种付费方式之间经单因素方差分析，组间比较差异有统计学意义，F 值为 9.086（$P<0.01$）；多因素比较示公费与部分公费（含基本医疗保险）及自费幸福感比较差异有统计学意义（$P<0.01$）。

影响焦虑、特质焦虑心理状态的因素：492 例慢性疾病患者影响焦虑、特质焦虑的因素中，婚姻状况、教育程度、疾病、病程、对医保的态度比较差异无统计学意义（$P>0.05$），性别、年龄、职业、付费方式比较差异有统计学意义（$P<0.05$）。

3 讨论

本研究表明，慢性心功能不全、高血压和冠心病（含糖尿病）患者存在明显心理障碍，心理健康状况较差。

492 例患者幸福感明显低于国内其他疾病的相关研究[2]，这可能与被调查者所患的均是慢性疾病有关。健康状况是影响幸福感的重要因子之一[1]，在影响的因素中，结果显示慢性心功能不全患者、冠心病（含糖尿病）的幸福感弱于单纯高血压病患者，这可能与单纯高血压用药易于控制血压，其危险因素易于控制，预后相对较好有关。冠心病、高血压、糖尿病患者普遍存在情绪障碍[1]，但本研究中患者中重度焦虑状态比例高于其他研究，说明焦虑与慢性心血管病间存在相互影响。年龄、性别、职业、付费方式均是影响焦虑、特质焦虑的因素。与其他研究不一致的是教育程度不是影响患者情绪变化的重要因素[1]。

根据以上研究，我们在护理工作中应注意以下情况：1 加强护士对不良情绪表现的识别及对策的培训；2 患者住院初期或疾病加重时心理状态最差，因此心理干预应早期随时进行；3 全面准确评估患者情况，增强护患沟通，建立良好的护患关系；4 重视提高患者的主观幸福感。

关键词：心内科慢性病患者；幸福感；情绪特征
中图法分类号：R395.1 文献标识码：B

参考文献：

[1] 汪向东，王希林，马 弘，等. 心理卫生评定手册[J]. 中国心理卫生杂志，1993，（增刊）：82-83，194-195，235-241.

[2] 张静平，姚树桥，周乐山，等. 322 例内科住院患者的心理状态分析[J]. 中华护理杂志，2005，40(4)：244-246.

[3] 张怀惠，陆 峥，蔡 军. 住院冠心病患者的临床心理特征分析[J]. 上海精神医学，2003，15(1)：7-9.

（编辑 栗 嘉）