论著

文章编号:1000-5404(2007)22-2156-04

甲亢性心肌病兔心肌血管紧张素转换酶和细胞外信号调节激酶的变化

张 安,邓 武,殷跃辉 (重庆医科大学附属第二医院心血管内科,重庆 400010)

提 要:目的 探讨甲亢性心肌病的发病机制。**方法** 健康成年新西兰大白兔40只,按随机数字表法分为4组:空白对照组、左旋甲状腺素(L-Thy)组、咪哒普利组、缬沙坦组。L-Thy(45 μg·kg^{-1}·d^{-1}×28 d)腹腔注射建立甲亢性心肌病模型,第28天收集心肌标本测定左右心室心肌肥厚指数,光镜下观察心肌细胞结构,测定心肌细胞直径,Masson's染色测定胶原容积分数(collagen volume fraction, CVF),透射电镜观察心肌细胞超微结构改变,Western blot检测血管紧张素转换酶(angiotensin converting enzyme, ACE)、细胞外信号调节激酶(ERK)及磷酸化细胞外信号调节激酶(p-ERK)的蛋白表达。**结果** L-Thy可诱导心肌肥厚、心肌细胞结构改变以及纤维组织增生,ACE、ERK和p-ERK蛋白表达上调,ERK及p-ERK表达与心肌细胞平均直径和CVF呈正相关。咪哒普利和缬沙坦均可显著抑制L-Thy诱导的心肌细胞肥厚和纤维化,从而降低ERK、p-ERK的表达。**结论** 肾素-血管紧张素系统(RAS)和ERK信号传导通路可能参与甲亢性心肌病的发病机制,ERK信号传导通路的激活可能与RAS有关,咪哒普利和缬沙坦可以抑制ERK信号传导通路的激活并改善L-Thy诱导的心肌重构。

关键词:甲状腺功能亢进;心肌病;血管紧张素转换酶;细胞外信号调节激酶

中图法分类号:R345;R542.202;R581.1 **文献标识码**:A

Changes of ACE and ERK in rabbits with hyperthyroid cardiomyopathy induced by Levothyroxine

ZHANG An, DENG Wu, YIN Yue-hui (Department of Cardiovascular Disease, Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective To explore the etiology of hyperthyroid cardiomyopathy. **Methods** Forty New Zealand rabbits were randomly and equally divided into 4 groups: control group, levothyroxine(L-Thy) group, imidapril group, and valsartan group. Except the control group, rabbit model of hyperthyroidism was established by daily intraperitoneal injections of L-Thy (45 μg·kg^{-1}·d^{-1}×28 d), and the animals of later 2 groups received 0.5 mg/kg imidapril and 8 mg/kg valsartan respectively at same period. Ventricular tissues were collected at 4 weeks. Cardic hypertrophy index, cardiomyocyte diameter, structural and ultrastructural changes were detected. Cardiac fibrosis was displayed by Masson's staining and collagen volume fraction (CVF) was measured using pathological image analytic system. Expressions of angiotensin converting enzyme (ACE), extracellular signal-regulated kinase (ERK), and phosphorylated ERK (p-ERK) were evaluated with Western blot analyses. **Results** Compared with control group, rabbits of L-Thy group displayed remarkable myocardial hypertrophy, extracellular matrix fibrosis, and morphological changes in both structure and ultrastructure. Western blot analysis revealed increased protein expressions of ACE, ERK and p-ERK proteins. ERK and p-ERK expressions were correlated positively well with both cardiomyocyte diameter and CVF. Both imidapril and valsartan alleviated cardiomyocyte hypertrophy, extracellular matrix fibrosis, and structural damage induced by L-Thy. Compared with L-Thy group, expressions of lower ERK and p-ERK were found in both imidapril and valsartan groups. **Conclusion** Renin-angiotension system (RAS) and ERK signaling pathway may play important

基金项目:重庆市卫生局科研基金(2004-53)

Supported by the Foundation for the Scientific Research Project of Chongqing Bureau of Public Health(2004-53)

作者简介:张 安(1970-),男,重庆市人,硕士,主治医师,主要从事心肌肥厚发病机制及药物干预方面的研究,现在本院急诊科。电话:13452392917, E-mail: zhangan19700221@163.com

通讯作者:殷跃辉,E-mail: yinyuehui63@yahoo.com.cn

收稿日期:2007-04-20;**修回日期**:2007-09-04

roles in hyperthyroid cardiomyopathy. Activated RAS is possibly responsible for activation of ERK signaling pathway. Imidapril and valsartan may inhibit activation of ERK signaling pathway and retarding myocardial remodeling in hyperthyroid cardiomyopathy induced by L-Thy.

Key words: hyperthyroidism; cardiomyopathy; angiotensin converting enzyme; extracellular signal-regulated kinase

心脏是甲状腺素的靶器官之一。过量的甲状腺素可引起心律失常、心肌肥厚及心力衰竭等一系列心脏表现。甲亢性心肌病主要表现为心肌肥大及间质纤维化,其发病机制尚不清楚。现有研究提示,肾素-血管紧张素系统(renio-angiotension system, RAS)可能参与了甲亢性心肌病心肌肥厚和间质改变的过程[1-3],而其涉及的信号传导通路复杂,有关报道较少。本研究选用左旋甲状腺素腹腔注射建立甲亢性心肌病动物模型,以探讨兔甲亢性心肌病心肌重构及其可能的信号传导通路。

1　材料与方法

1.1　药品

咪哒普利为天津田边制药厂产品,缬沙坦为北京诺华公司产品,左旋甲状腺素(L-Thy)购自 Promega 公司。

1.2　动物模型的建立和实验分组

健康新西兰大白兔 40 只,雌雄不拘,体质量 2.20 ~ 2.85 kg,购自重庆医科大学实验动物中心,将其按随机数字表法分为 4 组:空白对照组($n=10$)、L-Thy 组(仅予 L-Thy,$n=10$)、咪哒普利组(L-Thy + 咪哒普利,$n=10$)、缬沙坦组(L-Thy + 缬沙坦,$n=10$)。参照文献[1,2]方法,L-Thy 0.1 g/L 混悬于 5 g/L 的羧甲基纤维素钠,用前充分研磨,除空白对照组外,均制成实验性甲亢动物模型,方法为腹腔注射 L-Thy 45 $\mu g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1} \times 28$ d。空白对照组每日腹腔注射 5 g/L 的羧甲基纤维素钠;咪哒普利组每日灌服 1 次咪哒普利 0.5 mg/kg;缬沙坦组每日灌服 1 次缬沙坦 8 mg/kg;空白对照组及 L-Thy 组每日灌服等体积生理盐水。

1.3　标本的采集与保存

兔称质量后于耳缘静脉注射戊巴比妥钠(浓度为 30 g/L)30 mg/kg,麻醉后直接开胸切取心脏,沿室间隔分离左心室(包括室间隔)和右心室,用冰冷生理盐水冲洗干净,迅速用清洁滤纸吸干水分后称左心室湿重和右心室湿重。取左心室游离壁中部心室肌,部分放入 10% 中性甲醛中固定,部分液氮保存作 Western blot 用。

1.4　心肌肥厚指数

计算左心室湿重/体质量(LVW/BW, mg/g)和右心室湿重/体质量(RVW/BW, mg/g),即为左心室心肌肥厚指数和右心室心肌肥厚指数。

1.5　心肌细胞直径

在 HE 染色切片中,光镜下取心肌横断面,测定每个心肌细胞跨核处最窄的直径,测量 75 个细胞,取其平均值。

1.6　胶原容积分数测定

在 Masson's 染色切片中,用彩色图像分析系统(TD 2000,北京)计算心肌胶原容积分数(collagen volume fraction, CVF):CVF = 每一视野胶原面积/每一视野总面积,每张切片按顺序移动,统计 10 个视野,取其平均值。

1.7　光镜观察

取左心室游离壁中部心室肌,放入 10% 中性甲醛中固定 24 ~ 48 h,常规脱水、透明、石蜡包埋、切片(5 μm),行 HE 及 Masson's 染色,在光镜下观察。

1.8　电镜观察

取左心室游离壁中部心室肌,切成 1 mm × 1 mm × 1 mm 大小,于 2.5% 戊二醛中固定 48 h,再用 1% 四氯化锇固定 1.5 h,梯度丙酮脱水,环氧树脂包埋,超薄切片(1 μm), JEM-2000 透射电镜观察。

1.9　Western blot

①总蛋白提取:取 100 mg 心肌组织剪碎匀浆,加入 3 ~ 5 倍体积的组织裂解液,于冰盒中吹打、离心后取上清液;以考马斯亮蓝法进行定量。②SDS-PAGE:电泳分离胶浓度为 5%(ACE)和 10%(ERK, p-ERK),积层胶浓度为 5%,取稀释并煮沸的蛋白质样品加入等体积的上样缓冲液,电压 80 V 电泳至溴酚蓝从积层胶进入分离胶后,再将电压调至 100 V,继续电泳至溴酚蓝到达凝胶底部为止。③电转印:电流 90 mA,4 ℃过夜。④杂交与显色:以 5%(质量体积分数)脱脂奶粉封闭,加入以封闭液稀释的 ACE 单克隆抗体(Novocastra Laboratories Ltd, United Kingdom) 1∶400、ERK 多克隆抗体(博士德公司) 1∶200、p-ERK 多克隆抗体(博士德公司)1∶200,室温下置摇床上 50 min,洗膜 3 次,加入用封闭液稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗(1∶250),室温下置摇床上 50 min 后,洗膜, DAB 显色,照相,结果用 Gel Doc 2000 凝胶成像系统(Bio-Rad,美国)对目的条带进行密度分析,蛋白含量以相对光密度(ROD) × 面积表示。

1.10　统计学处理

各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 软件,组间比较行 t 检验和相关分析。

2　结果

2.1　心室肥厚指数、心肌细胞直径及 CVF 测定结果

L-Thy 组左右心室肥厚指数、心肌细胞直径及 CVF 显著高于空白对照组($P<0.05$),咪哒普利组和缬沙坦组左心室肥厚指数、心肌细胞直径及 CVF 较 L-Thy 组明显降低($P<0.05$),咪哒普利组 CVF 较缬沙坦组明显降低($P<0.05$)。见表 1。

2.2　光镜观察结果

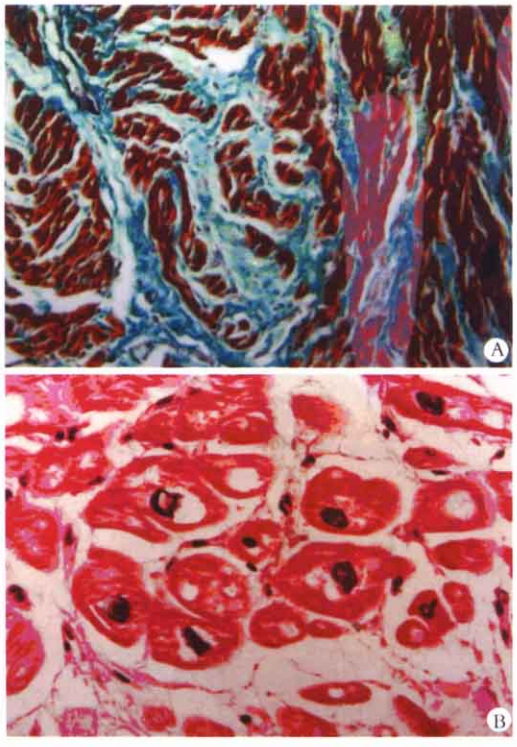
光镜下见 L-Thy 组心肌纤维明显增粗,排列紊乱,可见肌束中断现象,心肌细胞内可见空泡变性,部分心肌细胞变性坏死,周围见炎性细胞浸润及成纤维细胞增生,间隙增宽,有明显的纤维结缔组织增生。空白对照组细胞形态排列均正常,咪哒

普利组和缬沙坦组仅见心肌纤维轻度增生，肌纤维结构和排列大致正常，肌细胞内[illegible]水样变性少见，纤维组织增生不明显（图1）。

表1 心室肥[illegible]、心肌细胞直径及CVF（$x \pm s$）

组别	左心室肥指数（mg/[illegible]	右心室肥指数（mg/g）	心肌细胞直径（μm）	CVF（%）
空白对照组	0.82 ±0.[illegible]	0.25 ±0.04	3.14 ±1.99	0.78 ±0.17
L-Thy 组	1.38 ±0.[illegible]	0.46 ±0.09[b]	19.94 ±2.12[b]	2.49 ±0.21[b]
咪哒普利组	1.04 ±0.1[illegible]	0.32 ±0.07	15.43 ±1.60[a]	1.11 ±0.16[a]
缬沙坦组	1.09 ±0.14	0.35 ±0.06	15.93 ±1.70[a]	1.58 ±0.17[ac]

a：$P<0.05$，与 L-Thy 组比较；b：$P<0.05$，与空白对照组比较；c：$P<0.05$，与咪哒普利组比较



A：肌束间和小血管周围纤维结缔组织增生，可见肌束中断现象（Masson's ×200）；B：心肌纤维肥大，细胞质内空泡变性，细胞核增大，浓染（HE ×400）

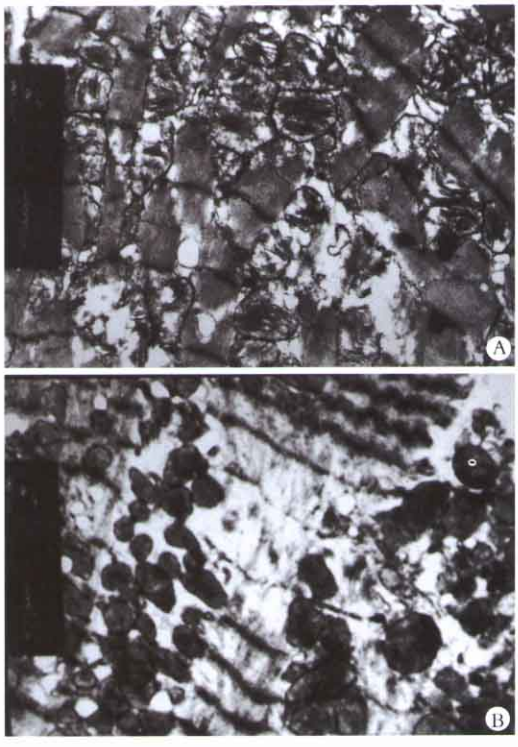
图1 光学显微镜下观察 L-Thy 组心肌结构的改变

2.3 电镜观察结果

透射电镜下可见 L-Thy 组心肌纤维肥大，线粒体显著增多，部分线粒体水肿、空泡化，部分退化，内质网扩张。肌丝溶解现象，部分肌原纤维束变细、退化。心肌细胞核肥大，核仁明显，有时见核内及核膜下染色质积聚。间质内见成纤维细胞及胶原纤维增生，血管内皮细胞增生，基底膜增厚（图2）。咪哒普利组和缬沙坦组心肌细胞超微结构大致正常，未见明显肌丝溶解及内质网扩张。

2.4 ACE、ERK 和 p-ERK 蛋白表达

L-Thy 组较空白对照组 ACE、ERK、p-ERK 蛋白表达均显著上调（$P<0.05$）；咪哒普利组和缬沙坦组 ERK、p-ERK 蛋白表达均显著低于 L-Thy 组（$P<0.05$）。心肌纤维直径和 CVF 均与 ERK 表达水平呈正相关（$r=0.831$，$r=0.845$，$P<0.01$），与 p-ERK 表达水平呈正相关（$r=0.858$，$r=0.892$，$P<0.01$）。见表2，图3。



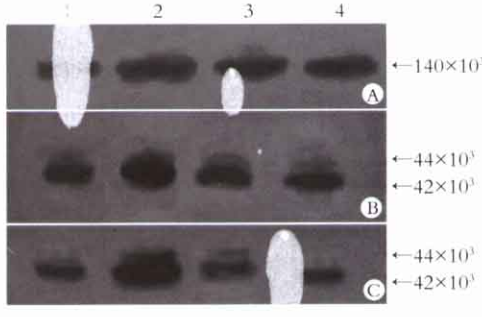
A：线粒体肿胀、空泡化，线粒体膜破裂；B：肌浆网扩张，肌丝溶解

图2 电子显微镜下观察 L-Thy 组心肌超微结构的改变（TEM ×7 000）

表2 ACE、ERK、p-ERK 蛋白的表达（$x \pm s$）

组别	ACE	ERK	p-ERK
空白对照组	1.03 ±0.11	1.09 ±0.13	1.03 ±0.07
L-Thy 组	1.98 ±0.15[b]	2.16 ±0.19[b]	2.08 ±0.11[b]
咪哒普利组	2.06 ±0.16	1.32 ±0.16[a]	1.20 ±0.10[a]
缬沙坦组	2.02 ±0.11	1.41 ±0.12[a]	1.35 ±0.08[a]

a：$P<0.05$，与 L-Thy 组比较；b：$P<0.05$，与空白对照组比较



1：空白对照组；2：L-Thy 组；3：咪哒普利组；4：缬沙坦组

A：ACE；B：ERK；C：p-ERK

图3 ACE、ERK、p-ERK Western blot 结果

3 讨论

本实验观察到，给新西兰大白兔腹腔注射 L-Thy 后心室湿重指数、心肌细胞直径及 CVF 明显增高。光镜下观察见心肌纤维增粗，排列紊乱，部分心肌细胞内空泡变性，肌纤维束及小血管周围见纤维组织增生。电镜下观察见线粒体显著增生，部分心肌丝细胞内见肌丝溶解，线粒体肿胀空泡化及内质网扩张，成纤维细

胞增生活跃，证实 L-Thy 可诱导心肌肥厚、心肌细胞结构改变以及心肌间质纤维化。

心肌局部的血管紧张素Ⅱ（AngⅡ）的来源包括心肌细胞从循环中摄取和心肌组织自身合成，后者包括 ACE 途径和非 ACE 途径。关于这两种途径在 AngⅡ生成中的作用尚未取得一致意见。但近来有研究提示，对整个心脏而言，血管紧张素Ⅰ（AngⅠ）的转化有 80% 是通过经典的 ACE 途径完成的[4]，可见 ACE 途径仍是心脏局部 AngⅡ生成的主要途径。已有的基础和临床研究均证实 RAS 参与了高血压、心肌梗死后的心肌重构。最近，王江等[5]研究表明，瓣膜病所致心力衰竭患者心肌组织 ACE 和 AngⅡ表达明显增加，直接参与心肌重构的发展。在 RAS 中，AngⅡ为主要的效应物质，AngⅡ的绝大部分作用（如缩血管和促增殖等）均由 1 型 AngⅡ受体（AT_1R）介导。本实验观察到咪哒普利组、缬沙坦组、L-Thy 组较空白对照组心肌局部 ACE 蛋白表达上调，从而使得局部 AngⅡ生成增多。以往研究表明甲亢性心肌病时心室 AT_1R 表达上调，这样 AngⅡ活性更为增加，相应的病理生理效应也增强[2]。本实验中也观察到上述心肌重构的有关指标较空白对照组明显增高。咪哒普利为血管紧张素转换酶抑制剂（ACEI），通过抑制 ACE 而使循环和局部 AngⅡ生成减少，缬沙坦为 AT_1R 拮抗剂，可干扰 AngⅡ与 AT_1R 的结合而降低 AngⅡ的活性，在一定程度上可改善 L-Thy 所致的心肌重构，故咪哒普利组和缬沙坦组在心肌重构的有关指标方面较 L-Thy 组有显著改善，再次证实甲亢性心肌病与局部 RAS 的激活有关。另外本实验还观察到咪哒普利组较缬沙坦组 CVF 更为降低，可能与咪哒普利对循环 RAS 的抑制有关。

心肌肥厚和间质改变为许多心血管病的共同病理过程，其涉及的信号通路复杂。目前研究证实在高血压及慢性压力负荷所致的左心室肥厚中存在丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）/ERK 的活化[6-8]，应用 AT_1R 拮抗剂（缬沙坦）对高血压大鼠 ERK 活化有抑制作用，可改善左心室肥厚及间质纤维化[9]。ERK 属于 MAPK 超家族成员，该通路是迄今研究最为透彻的 1 条 MAPK 信号通路，也是多种促增殖信号转导途径的细胞外终点。已有研究表明，ERK 信号通路参与了高血压大鼠的心肌重构，而 L-Thy 所致的甲亢性心肌病心室重构是否也是经 ERK 信号通路传导，目前尚不清楚。最近有研究证实甲状腺激素所致的血管生成作用是经 ERK 信号通路介导的[10]。本实验中 L-Thy 组较空白对照组 ERK、p-ERK 蛋白表达均显著上调，而咪哒普利组和缬沙坦组 ERK、p-ERK 蛋白表达均显著低于L-Thy 组，可能与咪哒普利减少 AngⅡ生成、缬沙坦则降低其活性，从而使 ERK、p-ERK 蛋白表达有别有关。另外，本实验还观察到 ERK、p-ERK 蛋白表达水平与心肌细胞直径、CVF 呈正相关，推测甲亢性心肌病心室重构不但有 ERK 信号通路的活化，而且该信号通路可能为甲亢性心肌病心室重构的主要信号通路。

甲亢性心肌病时，局部 ACE 表达增加，局部 AngⅡ生成亦增加，后者通过与心肌细胞和心肌成纤维细胞 AT_1R 结合（主要是通过受体偶联的 Gq 型 G 蛋白激活磷脂酶 C），从而激活相关信号通路，其间经过了 MAPK 多级信号转导。本实验中观察到 L-Thy 组心室 ERK 表达增加，说明甲亢性心肌病存在 ERK 途径的激活，增加的 p-ERK 移位至细胞核，催化转录因子磷酸化而活化，增加调节基因的表达和开放，使细胞活化，相应功能增强。

甲亢性心肌病存在 RAS 激活，在信号通路传导方面与 ERK 活化有关，阻断 ERK 的活化过程可能有利于延缓甚至阻断、逆转心肌重构。因此，深入研究甲亢性心肌病信号传导通路，对该病的预防和治疗均具有重要意义。

参考文献：

[1] Kobori H, Ichihara A, Miyashita Y, *et al*. Local renin-angiotensin system contributes to hyperthyroidism-induced cardiac hypertrophy[J]. J Endocrinol, 1999, 160(1): 43-47.

[2] 项　阳，黄　峻，杨国平，等. 甲亢性心肌病中肾素-血管紧张素系统和肌浆网钙泵的变化[J]. 北京大学学报：医学版，2002，34(4)：337-341.

[3] 张　静，王秋娟，徐进宜，等. 新型 AT_1 受体拮抗剂 Ib 对 L-甲状腺素诱发大鼠心肌肥厚的作用[J]. 中国药科大学学报，2006，37(2)：157-160.

[4] De-Mello W C, Danser A H. Angiotensin Ⅱ and the heart: on the intracrine renin-angiotensin system [J]. Hypertension, 2000, 35(6): 1183-1188.

[5] 王　江，田　颖，聂　凌，等. 不同严重程度心力衰竭患者心肌组织 ACE 和蛋白的表达[J]. 第三军医大学学报，2007，29(5)：445-447.

[6] 孙宁玲，王洪懿，陈源源，等. ERK 表达及活化在自发性高血压大鼠心肌肥厚中作用的研究[J]. 高血压杂志，2002，10(4)：352-355.

[7] 李莹洁，柏树令. 慢性压力负荷所致心肌肥厚及心衰大鼠左心室肌 ERK 的动态变化[J]. 中国老年学杂志，2004，24(6)：544-546.

[8] Kacimi R, Gerdes A M. Alterations in G protein and MAP kinase signaling pathways during cardiac remodeling in hypertension and heart failure[J]. Hypertension, 2003, 41(4): 968-977.

[9] 胡钢英，王晋明，江　洪，等. 螺内酯和缬沙坦对高血压大鼠心肌肥大信号通路的影响[J]. 第三军医大学学报，2006，28(3)：223-226.

[10] Mousa S A, O'Connor L, Davis F B, *et al*. Proangiogenesis action of the thyroid hormone analog 3,5-diiodothyropropionic acid (DITPA) is initiated at the cell surface and is integrin mediated[J]. Endocrinology, 2006, 147(4): 1602-1607.

（编辑　郭建秀）