论著

文章编号:1000-5404(2011)09-0932-04

甲状腺素对兔心房和肺静脉神经和组织重构的影响

李华康[1],殷跃辉[2],宋治远[1] (400038 重庆,第三军医大学西南医院心血管内科,重庆市介入心脏病学研究所[1];400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院心血管内科,重庆市心律失常治疗中心[2])

【摘要】 目的 研究酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase,TH)和生长相关蛋白-43(growth associated protein-43,GAP-43)在心房和肺静脉中的表达,从而探讨甲状腺素对心房和肺静脉组织及神经重构的影响。**方法** 新西兰大白兔20只,采用完全随机分组法分为实验组和对照组,每组10只。实验组腹腔注射左旋甲状腺素[levothyroxine, L-Thy 50 μg/(kg·d)×28 d]建立甲亢动物模型。分别于实验第0、7、14、21、28天测定兔心率、体质量、体温,耳缘静脉采血,用放免法测 TT_3、TT_4。于实验第28天收集心房后壁和肺静脉组织,光镜下观察心房、肺静脉形态结构,测定心肌细胞直径,Van Gieson(VG)染色测定胶原容积分数(CVF),免疫组化半定量检测 GAP-43 在左、右心房及肺静脉中的表达,RT-PCR 半定量检测 TH、GAP-43 mRNA 在左、右心房和肺静脉中的表达。**结果** 实验组与对照组相比,心房肌细胞直径增加[左心房(9.58±0.57) *vs* (4.79±0.31) mm;右心房 (8.19±0.65) *vs* (4.67±0.29) mm,$P<0.01$]、心肌胶原容积分数升高[左心房(6.71±0.11) *vs* (0.36±0.06);肺静脉(4.29±0.12) *vs* (0.19±0.01);右心房(4.62±0.40) *vs* (0.30±0.12),$P<0.01$];实验组左、右心房及肺静脉 GAP-43 阳性表达较对照组明显增加($P<0.01$);实验组左、右心房及肺静脉GAP-43 mRNA 和 TH mRNA 表达较对照组增加($P<0.01$)。**结论** L-Thy 可诱导心肌细胞结构改变、心肌间质纤维化以及心房和肺静脉交感神经增生。

【关键词】 甲状腺素;神经重构;TH;GAP-43

【中图法分类号】 R322.11;R322.123;R977.14 **【文献标志码】** A

Effects of thyroid hormone on nerve and tissue remodeling of cardiac atria and pulmonary vein in rabbits

Li Huakang[1], Yin Yuehui[2], Song Zhiyuan[1] ([1]Department of Cardiology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]Department of Cardiology, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

【Abstract】 Objective To study the expressions of tyrosine hydroxylase (TH) and growth associated protein 43 (GAP-43) in cardiac atria and pulmonary vein, and to explore the effects of thyroid hormone on nerve and tissue remodeling of cardiac atria and pulmonary vein. Methods Twenty New Zealand rabbits were randomly divided into two groups: a control group ($n=10$) and an experimental group ($n=10$). A hyperthyroidism animal model was established by levothyroxine (L-Thy) peritoneal injection in the experimental group [50 μg/(kg·d)×28 d]. All the rabbits were followed up for 4 weeks. On the 0th, 7th, 14th, 21st, and 28th day after L-Thy injection, blood samples were collected from the marginal ear vein and used to test serum TT_3 and TT_4 levels by radioimmunoassay, and the heart rate, body weight, and body temperature of the rabbits were measured at the same time points. The posterior walls of cardiac atria and the pulmonary vein tissues were collected at the 28th day. The morphologies of cardiac atria and pulmonary vein were observed by light microscopy. The cardiomyocyte diameter was measured. The collagen volume fraction (CVF) was measured by a pathological image analysis system after Van Gieson (VG) staining. The GAP-43 expression in left and right atria (LA and RA) as well as in pulmonary vein (PV) was semi-quantified by immunohistochemistry. The mRNA expression of TH and GAP-43 in left and right atria as well as in pulmonary vein was semi-quantified with RT-PCR. Results The experimental group possessed increased cardiomyocyte diameter when compared with the control group (LA 9.58±0.57 *vs* 4.79±0.31 mm; RA 8.19±0.65 *vs* 4.67±0.29 mm), and increased CVF (LA 6.71±0.11 *vs* 0.36±0.06; PV 4.29±0.12 *vs* 0.19±0.01; RA 4.62±0.40 *vs* 0.3±0.12). Besides, the experimental group also had a significantly higher protein level of GAP-43 (LA 0.46±0.12 *vs* 0.15±0.04; PV 0.28±0.10 *vs* 0.10±0.04; RA 0.34±0.09 *vs* 0.13±0.05) ($P<0.01$), as well as

【通信作者】 李华康,E-mail:lihuakang1980@yahoo.com.cn

significantly higher mRNA levels of TH (LA 1.62 ± 0.2 *vs* 0.77 ± 0.08; PV 1.23 ± 0.13 *vs* 0.68 ± 0.09; RA 1.02 ± 0.15 *vs* 0.48 ± 0.10) and GAP-43 (LA 0.61 ± 0.17 *vs* 0.27 ± 0.06; PV 0.34 ± 0.14 *vs* 0.20 ± 0.09; RA 0.42 ± 0.15 *vs* 0.22 ± 0.07) ($P < 0.01$) in cardiac atria and pulmonary vein. **Conclusion** L-Thy can induce the morphological changes of cardiomyocytes, myocardial interstitial fibrosis and sympathetic nerve hyperplasia in cardiac atria and pulmonary vein. The nerve remodeling of cardiac atria and pulmonary vein may correlate with the pathogenesis of atrial fibrillation related to hyperthyroidism.

[Key words] thyroid hormone; nerve remolding; tyrosine hydroxylase; growth associated protein-43

Corresponding author: Li Huakang, E-mail: lihuakang1980@yahoo.com.cn

心脏是甲状腺素的靶器官之一,过量的甲状腺素会导致心脏扩大、心律失常和心力衰竭等一系列表现,其确切机制现在尚未完全阐明,可能与甲状腺素对心肌的直接毒性、心肌对儿茶酚胺的敏感性增加以及肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system RAS)的激活等[1]有关。近年有报道神经重构在房性心律失常(尤其是心房颤动)和心力衰竭发生和维持中发挥了重要的作用。本实验通过观察酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)、生长相关蛋白-43(growth associated protein-43, GAP-43)在心房和肺静脉中的表达,来探讨甲状腺素对心房和肺静脉组织及神经重构的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

Trizol试剂购自上海生物有限公司,RT-PCR试剂盒购自成都天泰生物有限公司,GAP-43的一抗及SABC试剂盒购自武汉博士德生物有限公司。

1.2 实验动物与分组

健康新西兰大白兔20只(购自重庆医科大学实验动物中心,体质量2.0~2.5 kg,雌雄各10只),完全随机分组法分为实验组和对照组,每组10只。实验前测量体质量、体温和心率,耳缘静脉取血,用放免法测定血清TT_3、TT_4浓度,实验组腹腔内注射左旋甲状腺素[levothyroxine, L-Thy 50 μg/(kg·d)×28 d]建立甲亢动物模型。

1.3 光镜观察及心肌细胞直径测定

取左右心房后壁和肺静脉组织放入10%中性甲醛中固定24~48 h,常规脱水,透明,石蜡包埋,行HE及Van Gieson(VG)染色,光镜观察。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,取平均值。

1.4 心肌胶原容积分数的测定

在VG染色切片中,用病理图像分析系统计算心肌胶原容积分数:胶原面积=阳性积分光密度/阳性平均光密度心肌胶原容积分数=每一视野胶原面积/每一视野总面积每一张切片按顺序移动统计10个视野,取平均值。

1.5 免疫组化检测GAP-43的表达

用SABC法检测GAP-43在心房和肺静脉中的表达。将石蜡标本制成4 μm厚切片。常规二甲苯脱蜡、酒精至水。浸入3% H_2O_2溶液中,室温下孵育10 min,以阻断内源性过氧化物酶的活性。用蒸馏水冲洗干净后,切片浸入0.01 mol/L枸橼酸溶液(pH 6.0)中,用500 W微波炉煮沸3次,每次5 min,进行微波抗原修复。蒸馏水冲洗干净后加正常二抗动物血清封闭,室温下孵育30 min,消除非特异性反应。取出甩干后(不洗),滴加一抗,在4 ℃恒温箱中孵育过夜。经磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗干净后,滴加生物素标记的二抗,室温下孵育30 min。PBS冲洗干净后加SABC复合物溶液,室温下孵育30 min。PBS冲洗干净后,加DAB-H_2O_2显色剂显色,在显微镜下控制反应时间。蒸馏水冲洗干净后苏木精复染,脱水,透明,中性树胶封片,光镜下观察。GAP-43的阳性细胞位于细胞质或细胞间质,光镜下呈棕黄色颗粒。然后将染色切片经病理图像分析系统计算面密度作为GAP-43的阳性表达,面密度=积分阳性光密度/管壁面积。

1.6 RT-PCR检测TH mRNA、GAP-43 mRNA表达

①RNA提取与cDNA的合成:取100 mg心肌组织采用Trizol法提取RNA,然后将总RNA逆转录成cDNA。②RT-PCR:TH上游引物为5′-CGTGCTAAACCTGCTCTTCTC-3′,下游引物为5′-CTGTACTGGAAGGCGATCTCA-3′,扩增片段为402 bp;GAP-43上游引物5′-CACTGATAACTCGCCGTCCTC-3′,下游引物5′-GGTTCCTCTTCTTTACCCTCGT-3′,扩增片段为252 bp;β-actin上游引物5′-CACCACACCTTCTACAATGAGC-3′,下游引物5′-GTGATCTCCTTCTGCATCCTGT-3′,扩增片段为707 bp。所有引物由成都天泰生物有限公司合成。反应体系5×PCR Buffer 10 μl,灭菌蒸馏水28.75 μl,TaKaRa *Ex Taq* HS 0.25 μl,目的基因上游引物和下游引物各0.5 μl。反应条件:β-actin循环参数:94 ℃ 2 min 1个循环;94 ℃ 1 min,60 ℃ 1 min,72 ℃ 2 min 35个循环;72 ℃ 5 min 1个循环。TH循环参数:94 ℃ 2 min 1个循环;94 ℃ 40 s,58 ℃ 50 s,72 ℃ 2 min 32个循环;72 ℃ 5 min 1个循环。GAP-43循环参数:94 ℃ 2 min 1个循环;94 ℃ 30 s,55 ℃ 40 s,72 ℃ 2 min 30个循环;72 ℃ 5 min 1个循环。反应结束后,取PCR反应液5 μl进行琼脂糖凝胶电泳,确认PCR反应产物。凝胶成像系统扫描成像。将凝胶置于Gel Doc 2000凝胶图像分析系统,采用Version 4.0软件分析处理,PCR产物量以光密度×面积表示。各时相点目的基因mRNA表达以与β-actin mRNA的比值表示。

1.7 统计学分析

计量资料以$\bar{x} \pm s$表示,采用SPSS 13.0统计软件,样本均数比较经重复测定的方差分析和t检验。

2 结果

2.1 两组体温、体质量、心率和血清TT_3、TT_4水平变化

经重复测定方差分析,与对照组相比,实验组第7、14、21、28天的体温明显升高($P<0.01$),心率显著增加($P<0.01$),体质量显著降低($P<0.01$)。与实验前相比,实验组第7、14、21、

28天血清 TT_3 和 TT_4 水平明显升高($P<0.01$)。

2.2 心肌纤维形态学观察

光镜下见实验组心肌纤维明显增粗,排列紊乱;心肌细胞内可见空泡变性,部分心肌细胞断裂、坏死,周围见炎性细胞浸润和纤维结缔组织增生。对照组细胞形态排列均正常。

2.3 心肌细胞直径和心肌胶原容积分数

实验组与对照组相比,左、右心房心肌细胞直径增加[左心房(9.58±0.57) *vs* (4.79±0.31) mm, $P<0.01$;右心房(8.19±0.65) *vs* (4.67±0.29) mm, $P<0.01$],左、右心房和肺静脉胶原容积分数增加,两者相比有统计学意义($P<0.01$);且实验组左心房胶原容积分数显著高于右心房和肺静脉($P<0.01$)。见表1。

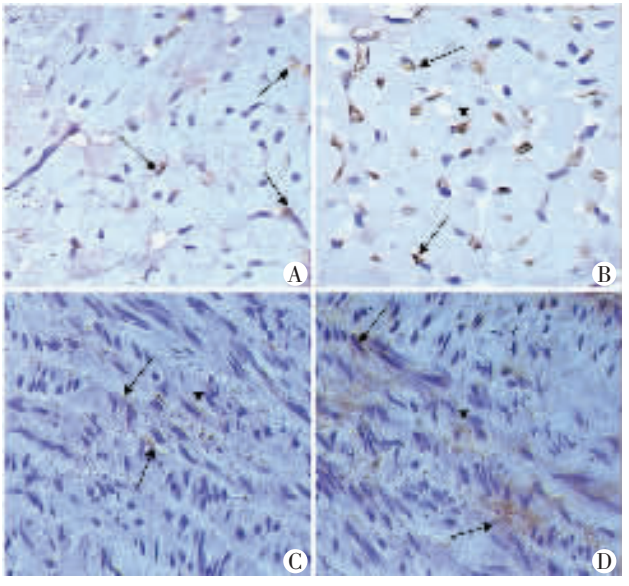
表1 实验组和对照组大白兔心肌胶原容积分数比较($n=10$, $\bar{x}\pm s$)

组别	LA	RA	PV
对照组	0.36±0.06	0.30±0.12	0.19±0.01
实验组	6.71±0.11[a]	4.62±0.40[a]	4.29±0.12[a]

LA:左心房;RA:右心房;PV:肺静脉;a:$P<0.01$,与对照组比较

2.4 心房和肺静脉 GAP-43 表达

与对照组相比,实验组左房、右房和肺静脉 GAP-43 阳性表达较对照组增加(图1),两者相比有统计学意义($P<0.01$)。见表2。



A:对照组左心房;B:实验组左心房;C:对照组肺静脉;D:实验组肺静脉 ↑:阳性表达

图1 免疫组化检测两组大白兔左心房和肺静脉 GAP-43 的表达(SABC ×400)

表2 实验组和对照组大白兔心房和肺静脉的 GAP-43 表达($n=10$, $\bar{x}\pm s$)

组别	LA	RA	PV
对照组	0.15±0.04	0.13±0.05	0.10±0.04
实验组	0.46±0.12[a]	0.34±0.09[a]	0.28±0.10[a]

LA:左心房;RA:右心房;PV:肺静脉;a:$P<0.01$,与对照组比较

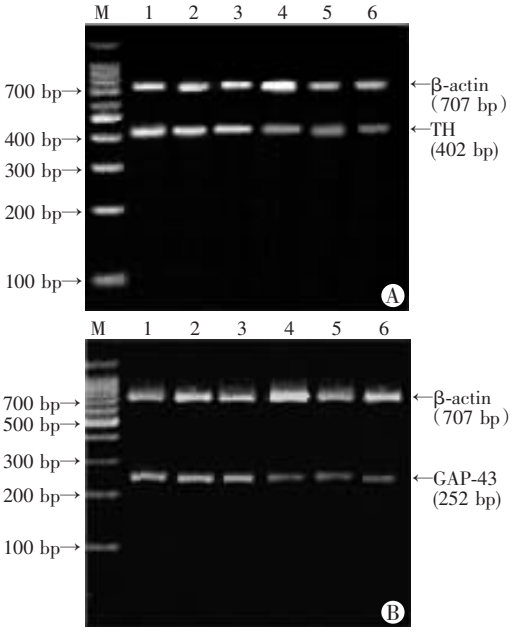
2.5 心房和肺静脉 GAP-43 和 TH mRNA 表达

与对照组相比,实验组左、右心房和肺静脉 GAP-43、TH mRNA 表达较对照组增加,两者相比有统计学意义($P<0.01$);并且实验组和对照组 TH mRNA 的表达左心房>肺静脉>右心房($P<0.05$)。见表3、图2。

表3 实验组和对照组大白兔心房和肺静脉的 GAP-43、TH mRNA 表达($n=10$, $\bar{x}\pm s$)

组别	GAP-43 mRNA			TH mRNA		
	LA	RA	PV	LA	RA	PV
对照组	0.27±0.06	0.22±0.07	0.20±0.09	0.77±0.08	0.48±0.10	0.68±0.09
实验组	0.61±0.17[a]	0.42±0.15[a]	0.34±0.14[a]	1.62±0.20[a]	1.02±0.15[a]	1.23±0.13[a]

LA:左心房;RA:右心房;PV:肺静脉;a:$P<0.01$,与对照组比较



M:标准;1:实验组左心房;2:实验组右心房;3:实验组肺静脉;4:对照组左心房;5:对照组右心房;6:对照组肺静脉

图2 RT-PCR 检测实验组和对照组大白兔左、右心房及肺静脉 TH mRNA(A)和 GAP-43 mRNA(B)的表达

3 讨论

本实验通过新西兰大白兔注射 L-Thy 后出现血 TT_3、TT_4 水平升高,体质量下降,体温升高,心率加快等表现,证实已成功建立甲亢动物模型。组织学检查发现心肌纤维增粗,排列紊乱,肌纤维束及小血管周围纤维组织增生,心肌细胞直径及胶原容积分数增高,在左、右心房和肺静脉中 TH、GAP-43 的表达增加,提示 L-Thy 可诱导心肌细胞结构改变、心肌间质纤维化以及心房和肺静脉交感神经增生。

TH 位于去甲肾上腺素能神经纤维的细胞质内,是儿茶酚胺合成的限速酶。GAP-43 是一种突触前蛋白,广泛存在于神经组织中,尤其是在生长、分化和再生的轴突末端以及突触前膜含量极高。它在神经纤维的生长、发育、轴突再生以及突触功能的维持等方面起着重要作用,并参与神经递质释放的调节,被认为是神经元发育和再生的一个内在决定因子[2]。交感神经纤维为 TH 阳性纤维,本实验通过 RT-PCR 的方法检测心房和肺静脉 TH 含量,间接反映交感神经密度,用免疫组化和 RT-PCR 的方法检测心房和肺静脉 GAP-43 含量来代表神经生长,发现实验组心房和肺静脉交感神

经密度显著高于对照组($P<0.01$),实验组和对照组左房的交感神经密度大于肺静脉和右房($P<0.05$),实验组心房和肺静脉GAP-43含量高于对照组,提示正常心房和肺静脉交感神经分布呈现空间差异性,甲状腺素促进心房和肺静脉交感神经增生,并且交感神经分布仍呈现空间差异性。

Jayachandran等[3]用右房长时间起搏造成犬持续性房颤模型,观察到房颤组左、右心房的交感神经密度明显高于对照组,且右房高于左房。Chang等[4]在相同的模型中也发现:房颤组心房有交感神经萌出,右房萌出量多于左房。公永太等[5]也发现长期心房快速起搏诱发房颤犬心房肌存在显著神经萌出和交感神经过度支配。Hamabe等[6]用左房心外膜起搏诱发犬房颤,神经萌出量差别显著:左房>左上肺静脉>右房,空间分布存在明显变异。Nguyen等[7]在人持续性房颤模型中发现心房和肺静脉交界处交感神经密度增加,Saygili等[8]用电刺激心房肌也可见显著交感神经萌芽,上述神经重构现象可能既是房颤的结果,同时也可使房颤易于发生和维持。Jayachandran等[3]利用正电子发射图像断层技术发现心房颤动犬心房有明显交感神经增生,心房交感神经分布的空间差异性与心肌兴奋性和不应期不均一有关,易于诱发房颤。与上述研究不同,Tan等[9]发现人肺静脉与左房交接处有丰富的交感神经分布,Chevalier等[10]也证实人左房交感神经分布具有空间差异性的特征,这与本实验观察到左房的交感神经密度大于肺静脉和右房是一致。甲状腺素促进心肌神经萌芽和交感神经增生的可能与心肌耗氧量增加诱导交感神经增生,以及局部细胞因子和生长因子促进交感神经增生有关[11]。

Haissaguerre等[12]的研究表明,肺静脉触发活动是大多数阵发性房颤的发生机制。Scherlag等[13]发现在心房的肺静脉入口处分布着交感与副交感神经丛,如果在激动该神经丛同时,对右上肺静脉进行早搏程序刺激,则可诱发房颤;如果预先采用射频电流消融该神经丛,则不能诱发房颤[14]。Patterson等[15]对肺静脉肌袖动作电位记录也发现,刺激肺静脉周围的自主神经可导致肺静脉的动作电位时程和不应期缩短,而且使用β受体阻滞剂可以使肺静脉电活动明显减少,因此,交感神经参与了肺静脉异常电活动的形成。Chen等[16]证实肺静脉微折返有利于不规则快速节律的维持,本实验发现甲状腺素诱导了心房和肺静脉细胞肥大、空泡变性和纤维结蹄组织增生等病理改变,有利于微折返的产生和维持,说明在高甲状腺素状态下,肺静脉易于发生房性心律失常是有组织学依据的。

交感神经重构导致心房颤动发生的具体机制还不甚明确,可能与交感神经密度增高使局部组织交感神经递质浓度增加,使心肌离子通道发生重构等有关。本实验发现甲状腺素诱导了心房和肺静脉交感神经重构,可能为甲亢性房颤的发生提供理论依据。

参考文献:

[1] 张安,邓武,殷跃辉. 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[J]. 第三军医大学学报,2007,29(22):2156-2159.

[2] Benowitz L I, Routtenberg A. GAP-43:an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity[J]. Trends Neurosci, 1997, 20(2):84-91.

[3] Jayachandran J V, Sih H J, Winkle W, *et al*. Atrial fibrillation produced by prolonged rapid atrial pacing is associated with heterogeneous changes in atrial sympathetic innervation[J]. Circulation, 2000, 101(10):1185-1191.

[4] Chang C M, Wu T J, Zhou S, *et al*. Nerve sprouting and sympathetic hyperinnervation in a canine model of atrial fibrillation produced by prolonged right atrial pacing[J]. Circulation, 2001, 103(1):22-25.

[5] 公永太,李为民,李悦,等. 心房颤动心房交感神经过度支配机制的实验研究[J]. 哈尔滨医科大学学报,2009,43(1):21-24.

[6] Hamabe A, Chang C M, Zhou S, *et al*. Induction of atrial fibrillation and nerve sprouting by prolonged left atrial pacing in dogs[J]. Pacing Clin Electrophysiol, 2003, 26(12):2247-2252.

[7] Nguyen B L, Fishbein M C, Chen L S, *et al*. Histopathological substrate for chronic atrial fibrillation in humans[J]. Heart Rhythm, 2009, 6(4):454-460.

[8] Saygili E, Schauerte P, Kuppers F, *et al*. Electrical stimulation of sympathetic neurons induces autocrine/paracrine effects of NGF mediated by TrkA[J]. J Mol Cell Cardiol, 2010, 49(1):79-87.

[9] Tan AY, Li H, Wachsmann-Hogiu S, *et al*. Autonomic innervation and segmental muscular disconnections at the human pulmonary vein-atrial junction:implications for catheter ablation of atrial-pulmonary vein junction[J]. J Am Coll Cardiol, 2006, 48(1):132-143.

[10] Chevalier P, Tabib A, Meyronnet D, *et al*. Quantitative study of nerves of the human left atrium[J]. Heart Rhythm, 2005, 2(5):518-522.

[11] Gabriel A S, Ahnve S, Wretlind B, *et al*. IL-6 and IL-1 receptor antagonist in stable angina pectoris and relation of IL-6 to clinical findings in acute myocardial infarction[J]. J Intern Med, 2000, 248(1):61-66.

[12] Haissaguerre M, Jais P, Shah D C, *et al*. Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins[J]. N Engl J Med, 1998, 339(10):659-666.

[13] Scherlag B J, Yamanashi W, Patel U, *et al*. Autonomically induced conversion of pulmonary vein focal firing into atrial fibrillation[J]. J Am Coll Cardiol, 2005 45(11):1878-1886.

[14] Nakagawa H, Scherlag B J, Aoyama H, *et al*. Catheter ablation of cardiac autonomic nerves for prevention of atrial fibrillation in a canine model[J]. Heart Rhythm, 2004, 1:S10.

[15] Patterson E, Po S S, Scherlag B J, *et al*. Triggered firing in pulmonary veins initiated by *in vitro* autonomic nerve stimulation[J]. Heart Rhythm, 2005, 2(6):624-631.

[16] Chen Y J, Chen S A, Chang M S, *et al*. Arrhythmogenic activity of cardiac muscle in pulmonary veins of the dog:implication for the genesis of atrial fibrillation[J]. Cardiovasc Res, 2000, 48(2):265-273.

(收稿:2010-11-29 修回:2011-01-26)
(编辑 邓强庭)