文章编号:1000-5404(2012)06-0517-05

论著

NTIS大鼠血清及脑组织甲状腺激素水平及其转运蛋白OATP1C1和MCT8 mRNA变化

袁大华[1,2],王 群[2] (528000 广东 佛山,佛山市第一人民医院神经内科[1];510515 广州,南方医科大学南方医院神经内科[2])

[摘要] **目的** 观察非甲状腺疾病综合征(nonthyroidal illness syndrome,NTIS)大鼠血清及脑组织甲状腺激素水平及其转运蛋白有机阴离子转运多肽(organic anion transporting polypeptide 1C1,OATP1C1)和单羧酸转运蛋白(monocarboxylate transporter 8,MCT8)mRNA的变化。**方法** 选取成年SPF级SD雄性大鼠23只,分为正常组($n=12$)和NTIS组($n=11$)。NTIS动物采用肝纤维化模型,利用四氯化碳(1∶6)用玉米油稀释,0.025 ml腹腔注射,3次/周,共8周。正常组大鼠相同剂量玉米油,腹腔注射,3次/周,共8周。造模成功后2组利用水迷宫法测试学习记忆能力。随后处死,取血及脑组织,放免法测定血清甲状腺激素(T_3、T_4、rT_3、TSH)及脑组织甲状腺激素(T_3、T_4、rT_3);RT-PCR法测定脑组织中OATP1C1及MCT8 mRNA水平。**结果** ①NTIS组血清T_3、T_4水平较正常组明显降低[T_3(0.53±0.18)mmol/L *vs* (0.73±0.22)mmol/L,$P<0.05$;T_4(24.58±7.73)mmol/L *vs* (39.97±14.74)mmol/L,$P<0.01$],rT_3、TSH水平2组之间无显著性差异($P>0.05$);NTIS组脑组织中T_3、T_4浓度较正常组稍升高,但差异无统计学意义($P>0.05$);②NTIS组OATP1C1和MCT8 mRNA水平较正常组明显升高[OATP1C1 mRNA(0.054±0.032) *vs* (0.019±0.016),$P<0.01$;MCT8 mRNA(0.058±0.048) *vs* (0.017±0.012),$P<0.05$];③2组大鼠空间探索和定位航行之间无显著性差异($P>0.05$)。**结论** NTIS大鼠脑内通过OATP1C1和MCT8代偿,保持脑内T_3、T_4水平相对稳定,从而维持中枢甲状腺功能正常。

[关键词] 非甲状腺疾病综合征;甲状腺激素;认知;转运蛋白
[中图法分类号] R322.81;R581.02;R394.3 [文献标志码] A

Changes of thyroid hormone and mRNA of OATP1C1 and MCT8 in serum and brain of rat with nonthyroidal illness syndrome

Yuan Dahua[1,2], Wang Qun[2] ([1]Department of Neurology, First People's Hospital of Foshan, Foshan, Guangdong Province, 528000; [2]Department of Neurology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong Province, 510515, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the changes of thyroid hormone level and mRNA expressions of thyroid hormone transporter organic anion transporting polypeptide1C1 (OATP1C1) and monocarboxylate transporter 8 (MCT8) in the sera and brain tissues of rats with nonthyroidal illness syndrome (NTIS). **Methods** Twenty-three male SD rats were divided into a control group ($n=12$) and a NTIS group ($n=11$). The rats of the NTIS group and the control group were given intraperitoneal injection of carbon tetrachloride (CCl_4) (1∶6, diluted by corn oil) 0.025 ml and corn oil 0.025 ml, respectively, 3 times/week for 8 weeks. Morris water-maze test was used to detect the ability of learning and memory of the rats. Then the rats were sacrificed and sera and brain tissues were collected. The levels of thyroid hormone (TH) in the sera (T_3, T_4, rT_3 and TSH) and brain tissues (T_3, T_4 and rT_3) were detected by radioimmunoassay (RIA), and the mRNA levels of OATP1C1 and MCT8 in the brain tissues were detected by RT-PCR. **Results** (1) The levels of T_3 and T_4 in the sera of the NTIS group decreased as compared with those of the control group [T_3(0.53±0.18) mmol/L *vs* (0.73±0.22) mmol/L, T_4(24.58±7.73) mmol/L *vs* (39.97±14.74) mmol/L; $P<0.05$, $P<0.01$]. The levels of T_3 and T_4 in the brain tissues showed no significant difference between the two groups, although they slightly increased in the NTIS group. The levels of TSH and rT_3 in the sera and brain tissues showed no significant differences between the 2 groups ($P>0.05$). (2) The mRNA expressions of OATP1C1 and MCT8 in the brain tissues increased significantly in the NTIS group as compared with those in the control group [OATP1C1 mRNA (0.054±0.032) *vs* (0.019±0.016), MCT8 mRNA (0.058±0.048) *vs* (0.017±0.012); $P<0.05$, $P<0.01$]. (3) The abilities of space exploration and place navigation of the rats between the 2 groups showed no significant difference ($P>0.05$). **Conclusion** The compensated upregulations of

[通信作者] 王 群,电话:(020)62741965,E-mail: zhpn@fimmu.com

OATP1C1 and MCT8 contribute to maintain a relatively stable TH level in the brains of rats with NTIS, so as to maintain normal functions of thyroid.

[**Key words**] nonthyroidal illness syndrome; thyroid hormone; cognition; thyroid hormone transporter

Corresponding author: Wang Qun, Tel: 86-20-62741965, E-mail: zhpn@fimmu.com

甲状腺激素(thyroid hormone, TH)对组织正常代谢以及器官发育具有非常重要的作用,尤其在脑组织。TH通过活性形式即三碘甲状原氨酸(triiodothyronine, T_3)与其靶细胞上的核受体(thyroid hormone receptor, TR)结合并发挥作用[1]。有机阴离子转运多肽1C1(organic anion transporting polypeptide 1C1, OATP1C1)和单羧酸转运蛋白8(monocarboxylate transporter 8, MCT8)是TH的重要中枢神经系统转运体[2]。TH对细胞增殖、发育和成熟具有重要作用,胎儿期及幼儿期发育期间,脑内TH缺乏可引起智力低下及呆小症[3]。而在成人切除甲状腺不能肯定是否引起脑内结构损害,但明显的甲状腺功能减退(overt hypothyroidism, OH)与认知障碍有密切联系已是定论[4]。我们前期研究已发现脑内甲状腺功能低下可引起认知功能下降[5]。其他研究也发现在甲状腺切除大鼠,随着小脑和皮层T_3水平显著下降,其海马依赖认知功能和晚时相长时程增强(late-phase long-term potentiation, L-LTP)受到严重损害[6-7]。这些研究提示TH对于正常脑生理功能具有重要意义。

非甲状腺疾病综合征(non-thyroidal illness syndrome, NTIS)亦称为低T_3综合征或正常甲状腺病态综合征,是非甲状腺的全身性疾病、手术和禁食引起的甲状腺功能检查的异常[8]。NTIS不是一个真正的综合征,而是反映了甲状腺激素水平改变,包括低血清T_3、正常或低T_4、高反T_3,在各种临床疾病中均可见到,这种现象在多达75%的住院患者中发生[9]。甲状腺功能异常可在急性期疾病几小时内或慢性病种发生,并且其变化程度与疾病严重性密切相关。越低水平的T_3和T_4预示生存率的下降。另外,血清T_4低于4 μg/dl,死亡率可上至50%,而血清T_4水平降至2 μg/dl,死亡率可上升至80%[10]。

然而至今,极少研究针对组织内的TH水平,并且对NTIS患者是否具有临床甲状腺功能降低意见不一,尤其在脑组织内[10-11]。因此,NTIS患者是否需要TH替代治疗仍有争议[12]。为进一步明确这一问题,对NTIS动物模型脑组织内的TH水平变化以及这种变化对认知功能影响的研究具有重要意义。因此,我们通过肝纤维化动物制成NTIS模型,分析其脑组织内OATP1C1及MCT8表达以及TH水平和记忆认知功能变化。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

23只成年清洁级SD雄性大鼠(由南方医院实验动物中心提供),体质量(230±24)g。饲养环境:标准鼠笼饲养,光照周期12 h/12 h,相对湿度45%~50%,环境温度22~23 ℃。23只SD大鼠分组:正常组(12只)、NTIS组(11只)。

1.2 动物模型制作

肝纤维化模型(NTIS组):CCl_4分析纯0.025 ml按1∶6用玉米油稀释,腹腔注射,3次/周,共8周。造模过程中发现大鼠精神萎靡,毛色黯淡,进食减少。

正常组:腹腔注射同样剂量的玉米油,3次/周,共8周。

8周后2组各取2只大鼠,处死后取出肝脏,置于10%福尔马林,并进行病理切片,HE染色。利用200倍光学显微镜观察病理改变。

1.3 主要试剂和仪器

CCl_4分析纯(广州化学试剂厂),甲状腺激素放免试剂盒(北京原子高科、尚柏生物),Amberlite CG-400(Sigma-Aldrich公司),Trizol、5×逆转录buffer、5×SYBR Green Ⅰ、PCR buffer、dNTPs、M-MLV、*Taq*酶(达安基因),SN-682放射免疫γ计数器(上海核福光电),岛津220型紫外分光光度计,ABI3900台式高通量DNA合成仪,HC-3018R高速冷冻离心机(科大创新),ABI 9700 PCR仪,ABI7500全自动荧光定量PCR仪。

1.4 学习记忆能力检测

Morris水迷宫法[13]:水迷宫的水池直径为100 cm,高60 cm,水深42 cm,水温(25±1)℃,站台高度为40 cm,站台顶端平面10 cm×10 cm,平台没于水面下2 cm,水池周围参照物保持不变。实验包括:①适应性训练:实验前1 d让动物在无安全平台的水中适应性游泳2 min;②定位航行实验:实验历时5 d,操作者将大鼠面向池壁从4个象限入水,发现平台后,让其在平台上站立30 s,将大鼠从平台上拿下来休息60 s,再随机由下一象限入水进行实验,如果120 s内找不到平台,则由操作者帮助其上平台,潜伏期记为最高分120 s。记录大鼠找到平台的时间(逃避潜伏期);③空间探索实验:第6天,撤去平台,取随机一点投大鼠入水池中,记录2 min内大鼠穿过平台所在象限的时间。

1.5 脑组织准备及血清TH水平测定

2组大鼠于实验终点,所有大鼠利用10%水合氯醛麻醉,从下腔静脉取血采血,室温下3 000 r/min离心10 min,制备上清,利用放射免疫法测定血清T_3、T_4、FT_3、FT_4、rT_3、TSH浓度。所有大鼠取血后5 min内断头取脑,去除小脑和脑干,用眼科剪分成2份,称量,液氮下迅速冷冻,置于-80 ℃冰箱冻存待用。

1.6 脑组织匀浆T_3、T_4、rT_3测定

T_3、T_4、rT_3提纯[14]:测定时取出,称量,取400 mg脑组织,

利用 0.8 ml 0.15 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.35 ~ 7.4)制备匀浆,并置于冰水浴中 5 min,随即加入 2 ml 95% 乙醇,振摇 3 min 充分混匀,4 ℃过夜,1 000 × *g* 离心 10 min,取上清,经 Amberlite CG-400 柱层析纯化,氮气吹干,以 0.5 ml 0.04 mol/L NaOH 溶液溶解,供放射免疫测定。

1.7 RT-PCR 法测定 OATP1C1 和 MCT8 mRNA

1.7.1 总 RNA 提取及 cDNA 合成 取各组大鼠脑组织约 100 mg, 以 Trizol 一步法提取总 RNA ,提取物用紫外分光光度计确定总 RNA 含量及纯度[要求 $D(260)/D(280)$ 为 1.7 ~ 2.0]。取 4 μl 总 RNA,采用 M-MLV 逆转录酶,总反应体系为 20 μl。反转录使用 ABI9700 仪进行,反应条件为:37 ℃ 60 min,95 ℃ 3 min。合成好的 cDNA −20 ℃保存备用。

1.7.2 引物 根据 GenBank 公布的基因序列,各引物采用 Primer express 2.0 软件设计,由 ABI3900 台式高通量 DNA 合成仪合成。引物序列: OATP1C1(101 bp):上游引物 5′-CAGCCGGAGTGGAAGAACA-3′, 下游引物 5′-TCTGACACCTGCCCATCATG-3′; MCT8 (102 bp): 上游引物 5′-AGGCCTTGGACGTCTCGTCT-3′, 下游引物 5′-GACATCAAGCCCAGGAGCAG-3′;以 GAPDH 为内参照(134 bp),上游引物 5′-TGGTCTACATGTTCCAGTATGACT-3′, 下游引物 5′-CCATTTGATGTTAGCGGGATCTC-3′。

1.7.3 荧光定量 PCR 利用 ABI ABI7500 全自动荧光定量 PCR 仪,按照操作指引操作。合成体系如下 5 × SYBR Green Ⅰ PCR 缓冲液 10 μl, 上游引物(10 pmol/μl) 1 μl, 下游引物(10 pmol/μl) 1 μl, dNTPs(10 mmol/L) 1 μl, *Taq* 酶(3 U/μl) 1 μl,cDNA 或阳性标准品 5 μl, ddH_2O 31 μl。反应条件为:93 ℃ 3 min,然后 93 ℃ 30 s,55 ℃ 45 s,共 40 循环。所有标本重复 3 次。所有数据采用相对 C_t 方法。

1.8 统计学处理

全部数据采用 SPSS 11.5 统计软件。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。定向航行实验逃避潜伏期的测量结果使用测量数据的多因素方差分析。空间探索成绩、血清、脑组织 TH 水平及 RT-PCR 结果均采用独立样本 *t* 检验。

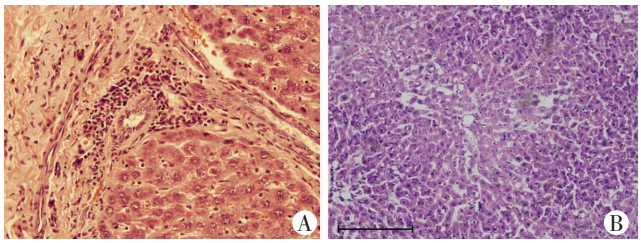
2 结果

2.1 NTIS 大鼠肝脏病理表现

CCl_4 处理的大鼠表现精神萎靡、毛色黯淡、体质量下降,肝脏 HE 染色结果显示,200 倍光镜下 NTIS 组大鼠肝脏肝小叶结构尚存在,肝细胞肿胀排列成索状,部分细胞质内有胆汁淤积;汇管区慢性炎细胞浸润伴纤维组织增生,部分纤维组织伸入肝小叶内,将肝小叶分割呈结节状,局灶假小叶形成。正常组大鼠肝脏肝小叶结构正常,肝细胞索排列有序,未见脂肪变形、坏死,无炎症细胞浸润,无纤维增生。见图 1。

2.2 定向航行和空间探索实验

利用 Morris 实验,累计训练 4 d,每天 4 个方向逃避潜伏期结果,取平均值。采用重复测量数据的多因素方差分析,NTIS 组大鼠与正常组大鼠潜伏期分别为(29.23 ± 29.30)、(23.40 ± 17.82)s;并且 NTIS 组与正常组大鼠 120 s 内穿越原平台象限时间即空间探索能力分别为(51.14 ± 13.30)、(49.00 ± 13.91)s,提示 2 组大鼠的学习记忆能力相似。



A:NTIS 组;B:正常组

图 1 NTIS 组和正常组大鼠肝脏病理学观察(HE ×200)

2.3 血清和脑组织甲状腺激素水平

NTIS 组大鼠血清 T_4 水平显著低于正常组[(24.58 ± 7.73) mmol/L *vs* (39.97 ± 14.74) mmol/L, $P = 0.008$],血清 T_3 水平亦低于正常组[(0.53 ± 0.18) mmol/L *vs* (0.73 ± 0.22) mmol/L, $P = 0.041$],而 NTIS 组和正常组之间血清 TSH 水平[(0.20 ± 0.06) mIU/L *vs* (0.23 ± 0.10) mIU/L]和 rT_3 水平[(0.34 ± 0.07) mmol/L *vs* (0.35 ± 0.10) mmol/L]差异无统计学意义($P > 0.05$),并且 NTIS 组脑组织中 T_3 浓度稍高于正常组[(27.28 ± 10.44) ng/g *vs* (24.24 ± 8.52) ng/g],T_4 浓度也较正常组稍高[(346.06 ± 111.80) ng/g *vs* (317.99 ± 103.35) ng/g],但差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.4 脑组织 OATP1C1 和 MCT8 表达水平

NTIS 组 OATP1C1 mRNA 表达水平较正常组显著升高[(0.054 ± 0.032) *vs* (0.019 ± 0.016), $P = 0.008$]; NTIS 组 MCT8 mRNA 表达水平较正常组亦明显增高[(0.058 ± 0.048) *vs* (0.017 ± 0.012), $P = 0.014$]。

3 讨论

本实验结果表明,NTIS 大鼠血清 TH 浓度(FT_3、FT_4、T_4、T_3)下降,而 TSH 和 rT_3 浓度无明显变化,具有典型 NTIS 特征,这与 Adler 等[9]报道一致。虽然血清 TH 水平下降,但随着 OATP1C1 和 MCT8 表达水平的显著上升,通过血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)利用 OATP1C1 转运进入脑内的 T_4 水平相对正常,因而脑内的 T_3 水平也保持相对稳定。而且,我们通过水迷宫实验发现 NTIS 组大鼠认知功能没有受到损伤。这些均提示肝纤维化 NTIS 大鼠中枢 TH 转运蛋白 OATP1C1 和 MCT8 表达增加是保持脑内 TH 浓度相对稳定及维持认知功能正常的重要因素。

T_3 和 T_4 均产生于甲状腺,而且主要分泌 T_4,随后释放入血,随后经脱碘酶(iodothy-ronine deiodinases , D1 ~ D2)转化为 T_3。靶细胞的 TH 生物活性主要由细胞内 T_3 浓度决定,而这取决于多个因素,包括循环内的 T_3 水平和其前体 T_4 水平,D1 ~ D3 的活性、血管膜转运体促进细胞摄取或外溢 T_4 和 T_3 能力[15]。而研究发现啮齿类动物脑内 80% T_3 是由 T_4 在局部通过 D2 脱碘转化而来[16],因此,脑组织从血循环中摄取 T_4 水平决定 TH 在脑内发挥生物作用的关键一步。

T_3、T_4 进入脑内需通过 BBB 或脉络膜-脑脊液屏障(choroid plexus-cerebrospinal fluid barrier, CP-CSFB)。

既往普遍认为 T_4 主要是通过与脉络膜合成的转甲状腺蛋白(transthyretin,TTR)结合后形成复合物进入脑脊液,随后进入脑组织[17]。但近年来发现 T_3、T_4 主要通过 BBB 进入脑内,而在脑室膜细胞、脑室周围器官则是通过 CP-CSFB[18]。随着研究进展,近年来人们逐渐发现 TH 进入脑内是一个载体介导过程。目前已确认的中枢 TH 的运载体主要是 OATP1C1 和 MCT8,脑毛细血管上皮细胞内 OATP1C1 将 T_4 从循环血中摄取进入星形胶质细胞,随即 T_4 在这里通过 D_2 转化为 T_3,并通过 MCT8 转运被神经元摄入,在那里 T_3 与 TR 结合发挥生物学效应[2]。因此,TH 调节脑发育过程受到局部星形胶质细胞和神经元控制,过低或过高的局部 TH 浓度能够导致异常信号,引起脑的异常发育[19]。在本实验中,NTIS 大鼠随着外周 TH 水平下降,脑组织 OATP1C1 表达水平显著升高,升高的 OATP1C1 增强了从循环血中摄取 T_4 进入星形胶质细胞能力,从而代偿局部脑组织 T_4 浓度的降低,保持脑内 TH 水平的相对稳定,提示 OATP1C1 对维持中枢神经系统 T_4 的正常水平有重要作用。这与国外研究发现在甲状腺功能低下环境中 Oatp14(现称为 OATP1C1)在脑毛细血管表达增高相似[20]。同样,MCT8 活性增加提高了神经元摄取 T_3 能力,增加神经元内 T_3 水平,促进与 TR 结合发挥生物学作用。因此,这些结果说明,肝纤维化 NTIS 大鼠脑内存在一个代偿机制来维持脑内 TH 的正常水平。有研究发现在切除了甲状腺大鼠中,其大脑皮层 D2 活性显著提高[6],这提示,外周 TH 水平下降,重要脏器如脑,通过代偿机制来维持脑内 TH 正常水平,从而保证正常的生理功能。

TH 在脑发育过程和脑正常生理功能中有重要作用。Alzoubi 等[21]报道甲状腺切除大鼠的学习能力、短时和长时记忆能力严重受损,甲状腺激素替代治疗能够恢复这些受损能力。因此,我们推断外周血清 TH 水平低下可导致脑内 TH 水平低下,从而引起学习和记忆受损,这与 Escobar-Morreale[6] 和 Pedraza 等[22]报道一致。但本实验中 NTIS 组大鼠认知能力无明显障碍,这与其脑内 TH 正常水平有密切关系。这些结果更进一步说明,正常 TH 水平是保证正常认知能力的重要因素。当然其他因素,如 D2 和 TR 活性在 NTIS 时对认知能力是否存在影响有待于将来进一步研究。

对于 NTIS 患者是否需要 TH 替代治疗目前仍存在争议。有研究认为甲状腺激素水平低下是通过减少代谢,降低氧耗来适应病情[12,23],相反,如给予 TH 可增强代谢,增加氧耗,促使病情恶化。因此,在多数情况下未给予 NTIS 患者 TH 治疗。然而,Adler 等[9]报道甲状腺功能低下可加剧 NTIS 患者病程,因此需给予 TH 治疗。通过本实验,我们发现尽管 NTIS 大鼠外周 TH 水平明显降低,但脑内 TH 水平无明显变化,并且其认知能力也未受到影响,即没有中枢甲状腺功能低下(central hypothyroidism,CH)。我们认为外周疾病引起的血清 TH 水平低下不会影响脑内 TH 水平及脑部正常生理功能,因此不需要 TH 替代治疗。

总之,中枢 TH 转运蛋白 OATP1C1 和 MCT8 表达增加能够代偿脑部摄入 T_4 和神经元细胞摄取 T_3 不足,从而有助于保持 NTIS 大鼠脑内正常 TH 水平和认知能力。这说明外周 TH 水平低下能够启动自动调节系统从而保持脑内正常的 TH 水平及其生理功能。

参考文献:

[1] Yen P M. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action [J]. Physiol Rev, 2001, 81(3): 1097-1142.

[2] Visser W E, Friesema E C, Visser T J. Minireview: thyroid hormone transporters: the knowns and the unknowns [J]. Mol Endocrinol, 2011, 25(1): 1-14.

[3] Laurberg P. Thyroid function: thyroid hormones, iodine and the brain-an important concern[J]. Nat Rev Endocrinol, 2009, 5(9): 475-476.

[4] Davis J D, Stern R A, Flashman L A. Cognitive and neuropsychiatric aspects of subclinical hypothyroidism: significance in the elderly[J]. Curr Psychiatry Rep, 2003, 5(5): 384-390.

[5] 李永军, 王群. 初次搜索策略对大鼠 Morris 水迷宫试验成绩的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2004, 14(21): 7-10, 14.

[6] Escobar-Morreale H F, Obregon M J, Escobar-del-Rey F, *et al*. Tissue-specific patterns of changes in 3, 5, 3′-triiodo-L-thyronine concentrations in thyroidectomized rats infused with increasing doses of the hormone. Which are the regulatory mechanisms? [J]. Biochimie, 1999, 81(5): 453-462.

[7] Gerges N Z, Alzoubi K H, Park C R, *et al*. Adverse effect of the combination of hypothyroidism and chronic psychosocial stress on hippocampus-dependent memory in rats[J]. Behav Brain Res, 2004, 155(1): 77-84.

[8] Economidou F, Douka E, Tzanela M, *et al*. Thyroid function during critical illness[J]. Hormones (Athens), 2011, 10(2): 117-124.

[9] Adler S M, Wartofsky L. The nonthyroidal illness syndrome [J]. Endocrinol Metab Clin North Am, 2007, 36(3): 657-672, vi.

[10] De-Groot L J. Dangerous dogmas in medicine: the nonthyroidal illness syndrome[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1999, 84(1): 151-164.

[11] Stathatos N, Wartofsky L. The euthyroid sick syndrome: is there a physiologic rationale for thyroid hormone treatment? [J]. J Endocrinol Invest, 2003, 26(12): 1174-1179.

[12] Luca F, Goichot B, Brue T. Non thyroidal illnesses (NTIS) [J]. Ann Endocrinol (Paris), 2010, 71 Suppl 1: S13-S24.

[13] Hosseini M, Headari R, Oryan S, *et al*. The effect of chronic administration of L-arginine on the learning and memory of estradiol-treated ovariectomized rats tested in the morris water maze[J]. Clinics (Sao Paulo), 2010, 65(8): 803-807.

[14] Mebis L, Debaveye Y, Ellger B, *et al*. Changes in the central component of the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in a rabbit model of prolonged critical illness[J]. Crit Care, 2009, 13(5): R147.

[15] Heuer H, Visser T J. Minireview: Pathophysiological importance of thyroid hormone transporters [J]. Endocrinology, 2009, 150(3): 1078-1083.

[16] Chatonnet F, Picou F, Fauquier T, *et al*. Thyroid hormone action in cerebellum and cerebral cortex development [J]. J Thyroid Res, 2011, 2011: 145762.

[17] Palha J A, Fernandes R, de-Escobar G M, *et al*. Transthyretin regulates thyroid hormone levels in the choroid plexus, but not in the brain

parenchyma: study in a transthyretin-null mouse model[J]. Endocrinology, 2000, 141(9): 3267 - 3272.
[18] Trajkovic M, Visser T J, Mittag J, *et al*. Abnormal thyroid hormone metabolism in mice lacking the monocarboxylate transporter 8[J]. J Clin Invest, 2007, 117(3): 627 - 635.
[19] Ahmed O M, El-Gareib A W, El-Bakry A M, *et al*. Thyroid hormones states and brain development interactions[J]. Int J Dev Neurosci, 2008, 26(2): 147 - 209.
[20] Sugiyama D, Kusuhara H, Taniguchi H, *et al*. Functional characterization of rat brain-specific organic anion transporter (Oatp14) at the blood-brain barrier: high affinity transporter for thyroxine[J]. J Biol Chem, 2003, 278(44): 43489 - 43495.
[21] Alzoubi K H, Gerges N Z, Aleisa A M, *et al*. Levothyroxin restores hypothyroidism-induced impairment of hippocampus-dependent learning and memory: Behavioral, electrophysiological, and molecular studies[J]. Hippocampus, 2009, 19(1): 66 - 78.
[22] Pedraza P E, Obregon M J, Escobar-Morreale H F, *et al*. Mechanisms of adaptation to iodine deficiency in rats: thyroid status is tissue specific. Its relevance for man[J]. Endocrinology, 2006, 147(5): 2098 - 2108.
[23] 黄文, 朱佩芳, 王正国. 下丘脑-垂体-甲状腺轴内分泌激素的变化及其临床意义[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(4): 367 - 368.

(**收稿**:2011-10-10;**修回**:2011-12-19)
(编辑 王小寒)

文章编号:1000-5404(2012)06-0521-01

个案与短篇

子痫前期患者胎盘中 p38MAPK 及 COX-2 的表达及意义

陈丽红[1],邱中原[2],胡继芬[1] (350005 福州,福建医科大学:附属第一医院妇产科[1],附属第三医院妇产科[2])

[**关键词**] 子痫前期;环氧合酶-2;丝裂原活化蛋白激酶
[**中图法分类号**] R714.245 [**文献标志码**] B

子痫前期是妊娠期特有疾病,目前其病因及发病机制尚未明确。本研究通过检测子痫前期患者胎盘组织中 p38MAPK 及 COX-2 的表达及其关系,探讨它们在子痫前期的病理生理过程中,特别是胎盘血管炎症反应中发挥的作用。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选择 2007 年 8 月至 2009 年 10 月在福建医科大学附属第一医院妇产科住院分娩的孕妇 60 例,分 2 组。①试验组 30 例:重度子痫前期 18 例,年龄(28.94 ± 3.98)岁,孕(36.56 ± 2.94)周;轻度子痫前期 12 例,年龄(27.50 ± 3.61)岁,孕(36.67 ± 3.25)周。诊断标准参照乐杰主编的《妇产科学》第 6 版。② 对照组 30 例:正常孕妇。年龄(28.53 ± 4.01)岁,孕(38.97 ± 3.03)周。研究对象均无其他妊娠合并症,既往健康,未进入产程,均以选择性剖宫产结束分娩。2 组孕妇的年龄、孕周比较差异无统计学意义($P > 0.05$),但实验组收缩压、舒张压、平均动脉压均显著高于对照组($P < 0.05$)。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 胎盘娩出后立即剪取其母体面中央的组织约 100 mg 装入 RNA 酶灭活的 EP 管内,-70 ℃保存。取胎盘母体面中央 1.0 cm × 1.0 cm × 1.0 cm 大小组织,10% 甲醛固定 12 h,石蜡包埋,制成 4 μg 厚切片。

1.2.2 RT-PCR 方法 取胎盘组织约 100 mg,抽提胎盘组织总 RNA,-20 ℃冻存备用。采用 cDNA 合成试剂盒(Promega 公司),将 mRNA 反转录为 cDNA。PCR 仪扩增,以 β-actin 为内参照。引物由上海生工公司合成。制备含 EB 的 1.0% 琼脂糖凝胶,取 10 μl PCR 产物加适量载样缓冲液点样电泳,电泳后采用凝胶成像及分析系统自带扫描软件,扫描 p38MAPK、COX-2、β-actin 条带,求其实际灰度值。

1.2.3 免疫组织化学方法 采用 S-P 法,一抗为鼠抗人单克隆抗体 p-p38MAPK 浓缩液,使用 1∶100 的工作浓度;兔抗人单克隆抗体 COX-2 工作液;按 PV-9000 试剂盒操作。采用 Image8000彩色图像分析,每张切片随机选取 5 个高倍视野(×100),以阳性区进行平均光密度分析,取其平均值作为结果。

1.3 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件,组间比较采用单因素方差分析,并进行直线相关分析。

2 结果

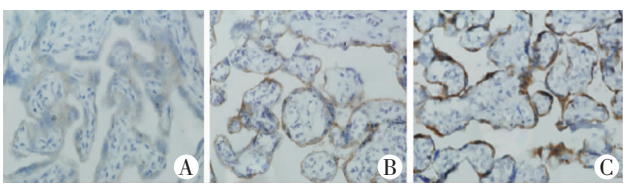
2.1 胎盘组织 p38MAPK、COX-2 mRNA 和蛋白的表达

与对照组比较,试验组 p38MAPK、COX-2 mRNA 和蛋白表达明显增强($P < 0.05$),重度子痫前期 COX-2 mRNA 和蛋白表达较轻度子痫前期增强($P < 0.05$),见表 1。试验组胎盘 p38MAPK、COX-2 细胞质染色均较对照组明显增强,见图 1、2。

表 1 2 组胎盘组织 p38MAPK、COX-2 mRNA 和蛋白的表达($\bar{x} \pm s$)

组别	n	p38MAPK mRNA	COX-2 mRNA	p38MAPK 蛋白	COX-2 蛋白
对照组	30	0.51 ± 0.01	0.76 ± 0.04	203.29 ± 13.38	181.07 ± 13.80
试验组					
轻度子痫前期	12	0.82 ± 0.02[a]	0.83 ± 0.04[a]	305.51 ± 85.66[a]	232.09 ± 54.20[a]
重度子痫前期	18	0.83 ± 0.02[a]	0.92 ± 0.04[ab]	371.25 ± 85.07[ab]	298.13 ± 146.11[ab]

a:$P < 0.05$,与对照组比较,b:$P < 0.05$,与轻度子痫前期比较



A:对照组; B:试验组轻度子痫前期; C:试验组重度子痫前期
图 1 免疫组化检测各组胎盘组织中 p38MAPK 的表达 (S-P ×100)

[**通信作者**] 胡继芬,E-mail:hujifen@yahoo.com.cn

(下转 525 页)