维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2006)05-0673-04

Fas、FasL 在兔甲亢性心脏病中的表达及其意义

李华康，戴　引，殷跃辉

（重庆医科大学附属第二医院心内科，重庆　400010）

【摘　要】目的：研究 Fas、FasL 在甲亢性心脏病心肌组织中的表达，并探讨其在甲亢性心脏病发病中的可能作用及临床意义。方法：新西兰白兔 20 只，随机分为两组：实验组和对照组，每组各 10 只。实验组腹腔注射左旋甲状腺素(50 μg/kg/d × 28 天)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、体重、体温，耳缘静脉采血，用放免法测 TT3、TT4。实验前后超声心动图检测左室（LV）、左室后壁(LVPW)、室间隔（IVS）厚度、左房（LA）内径及左室射血分数（LVEF）。光镜下观察心房、心室肌形态结构，测定心肌细胞直径，Masson 染色测定胶原容积分数（CVF），免疫组化半定量检测 Fas、FasL 在左、右心房及心室的表达。结果：实验组 LA、LV、LVPW、IVS 厚度，心室质量指数，心肌细胞直径、CVF 以及左房、左室 Fas 阳性表达较对照组明显增加，两者比较有统计学意义（$P<0.05$）。结论：左旋甲状腺素（Levothyroxine L-Thy）可诱导心肌肥厚、心肌细胞结构改变、心肌细胞凋亡以及心肌间质纤维化；Fas/FasL 系统可能与甲亢性心脏病的发生发展有关。

【关键词】甲亢性心脏病；Fas；FasL

【中国图书分类法分类号】R541.20　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2006-03-07

Expression and Significance of Fas and FasL in Hyperthyroid Cardiopathy

LI Huakang, et al

(*Department of Cardiology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the expression of Fas and FasL in hyperthyroid cardiopathy and to explore its possible effect and clinical significance in the pathogenesis of the hyperthyroid cardiopathy. *Methods:* Twenty New Zealand rabbits were randomly divided into two *groups:* control group (n =10) and experimental group(n =10). Hyperthyroidism animal model was established by peritoneal injection of Levothyroxine (L-Thy) in experimental group. All the rabbits were followed up for 4 weeks. Every 7 days blood samples were obtained. Serum TT3 and TT4 were measured with radioimmunoassays (RIAs). Electrocardiogram(ECG) was performed to determine heart rate(HR). All the rabbits underwent echocardiography and the thickness of IVS、LV、LA、LVPW and LVEF were measured at the end of the follow-up period. Ventricular tissues were collected at 4th weeks. Cardiac hypertrophy index, cardiomyocyte diameter, structural change were detected. Cardiac fibrosis was displayed by Masson stain and collagen volume fraction(CVF)was measured using pathological image analytic system. Protein of Fas and FasL were localized by immunohistochemistry and semi-quantified with pathological image analytic system. *Results:* In experimental group, the thickness of IVS、LV、LA、LVPW, cardiac quality index, cardiomyocyte diameter, collagen volume fraction(CVF) and the expression of Fas in left atrium and left ventricle increased obviously($P<0.05$). *Conclusion:* L-Thy could induce myocardial hypertrophy, structural change of cadiomyocyte, myocardium interstitial fibrosis and cell apoptosis. The system of Fas/FasL may correlate with the pathogenesis and course of the hyperthyroid cardiopathy.

【Key Words】Hyperthyroid cardiopathy; Fas; FasL

甲状腺功能亢进症（简称甲亢）是临床内科中较常见的疾病，甲亢性心脏病是其常见的并发症之一，它有随年龄增长而增加的趋势，并且随着甲亢的治愈或控制可以消失，也可继续存在[1-4]，其发病机制目前尚未完全阐明。本实验采用腹腔内注射 L-Thy 的方法建立甲亢性心脏病模型，用免疫组化的方法检测 Fas、FasL 在甲亢性心脏病心肌组织中的表达，从而探讨其在甲亢性心脏病中的可能作用及临床意义。

1　材料和方法

1.1　实验材料

健康新西兰白兔 20 只，2.0~2.5kg，雌雄不拘，购自重庆

作者介绍：李华康（1980-　），男，硕士研究生，住院医师，主要研究方向：心律失常。

维普资讯 http://www.cqvip.com

医科大学动物实验中心。L-Thy 购自美国 sigma 公司，Fas、FasL 的一抗及 SABC 试剂盒购自武汉博士德生物有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 实验动物及其分组 健康新西兰白兔 20 只，随机分为两组：实验组和对照组各 10 只。实验前测量体重、体温，清醒状态下记录 II 导联心电图，由心电图计算心率，耳缘静脉取血，用放免法测定血清 TT3、TT4 浓度，实验组腹腔内注射 L-Thy (50μg/kg/d × 28 天)建立甲亢动物模型。

1.2.2 心脏 B 超检查 兔清醒状态下仰卧位固定于操作台，胸部去毛，行经胸二维超声心动图检查，测定 LA、LV、IVS、LVPW 的厚度及 LVEF。

1.2.3 光镜观察及心肌细胞直径测定 取左心室游离壁中部心室肌，放入 10%中性甲醛中固定 24 至 48h，常规脱水，透明，石蜡包埋，切片（5μm 厚），行 HE 及 Masson 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。

1.2.4 心肌胶原容积分数的测定 在 Masson 染色切片中，用彩色图像分析系统计算心肌胶原容积分数：

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。

1.2.5 心室质量指数的测定 兔称重后耳缘静脉注射 30g/L 的戊巴比妥钠（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，冰冷生理盐水冲洗干净，清洁滤纸吸干水分后称左心室和右心室湿重，计算左心室湿重 / 体重 (LVW/ BW，mg/g) 和右心室湿重 / 体重(RVW/BW，mg/g)，即为左心室心肌质量指数和右心室心肌质量指数。

1.2.6 免疫组化检测 Fas、FasL 的表达 用 SABC 法检测 Fas、FasL 在心肌中的表达。将石蜡标本制成 4μm 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 10min，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 0.01mol/L 枸橼酸溶液(pH6.0)中，用 500W 微波炉煮沸 3 次，每次 5min，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 30min，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 30min。PBS 冲洗干净后加 SABC 复合物溶液，室温下孵育 30min。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。Fas、FasL 的阳性细胞位于细胞浆或细胞膜，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 Fas、FasL 的阳性表达，面密度 = 积分阳性光密度 / 管壁面积。

1.3 统计学处理

所有数据用均数 ± 标准差表示，结果用重复测定的方差分析和 t 检验，$P<0.05$ 为差异有显著性。

2 结 果

2.1 实验第 0、7、14、21、28 天体温、体重和心率变化

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（$P<0.05$），心率显著增加（$P<0.05$），体重显著降低（$P<0.05$），见表 1。

表 1 体温(℃)、体重(Kg)、心率(次/分)变化

组数	0d	7d	14d	21d	28d
对照组体温	39.08 ± 0.21	39.13 ± 0.22	39.15 ± 0.23	39.18 ± 0.18	39.17 ± 0.16
实验组体温	39.02 ± 0.18	40.57 ± 0.33*	40.62 ± 0.30*	40.65 ± 0.29*	40.72 ± 0.22*
对照组体重	2.31 ± 0.18	2.35 ± 0.16	2.39 ± 0.16	2.44 ± 0.14	2.47 ± 0.13
实验组体重	2.37 ± 0.12	2.24 ± 0.12*	2.13 ± 0.11*	2.01 ± 0.12*	1.92 ± 0.13*
对照组心率	236.5 ± 28.6	238 ± 39.6	243 ± 36	247 ± 38.2	246 ± 34.1
实验组心率	245.5 ± 21.7	403.5 ± 17.3*	407.5 ± 13.2*	411 ± 10.5*	414 ± 7.8*

*$P<0.05$ vs 对照组

2.2 实验第 0、7、14、21、28 天血清 TT3、TT4 水平

经重复测定的方差分析，和实验前相比，实验组第 7、14、21、28 天血清 TT3 和 TT4 水平明显升高（$P<0.05$），见表 2。

表 2 血清 TT3、TT4 水平(nmol/ml)

组数	0d	7d	14d	21d	28d
对照组 TT_3	2.32 ± 0.34	2.39 ± 0.37	2.35 ± 0.37	2.36 ± 0.39	2.37 ± 0.41
实验组 TT_3	2.34 ± 0.41	16.46 ± 0.93*	16.57 ± 1.01*	16.62 ± 0.99*	16.72 ± 1.0*
对照组 TT_4	35.99 ± 2.02	36.76 ± 1.77	37.00 ± 1.84	37.26 ± 2.15	36.80 ± 1.97
实验组 TT_4	36.01 ± 1.86	225.62 ± 14.76*	245.60 ± 14.79*	242.84 ± 14.57*	240.70 ± 14.30*

*$P<0.05$ vs 对照组

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.3 经胸 B 超检查

实验组较对照组左室后壁及室间隔均明显增厚，左房增大，心腔变窄，各组射血分数无明显差异，见表 3。

表 3 经胸心脏 B 超参数比较

组数	IVS(cm)	LV(cm)	IVPW(cm)	LA(cm)
对照组	0.21 ± 0.02	0.86 ± 0.09	0.20 ± 0.02	0.56 ± 0.05
实验组	0.33 ± 0.03*	1.32 ± 0.07*	0.28 ± 0.03*	0.84 ± 0.06*

*P<0.05 vs 对照组

2.4 左右心室心肌质量指数、心室肌细胞直径及心室肌胶原容积分数

与对照组相比，实验组左右心室心肌质量指数明显升高(P<0.05)，心室肌细胞直径及胶原容积分数显著高于对照组(P<0.05)，见表 4。

表 4 心室质量指数、心室肌细胞直径和胶原容积分数

组数	LVW/BW (mg/g)	RVW/BW (mg/g)	心肌细胞直径 (μmol/L)	胶原容积分数(%)
对照组	0.84 ± 0.06	0.26 ± 0.05	13.19 ± 0.33	0.79 ± 0.07
实验组	1.36 ± 0.10*	0.43 ± 0.07*	20.11 ± 0.73*	2.47 ± 0.09*

*P<0.05 vs 对照组

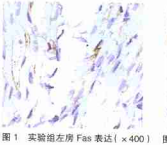


图 1 实验组左房 Fas 表达(×400)

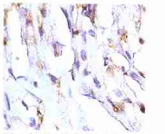


图 2 实验组左室 Fas 表达(×400)

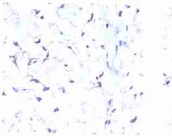


图 1 对照组左房 Fas 表达(×400)

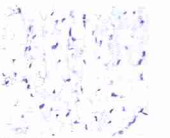


图 2 对照组左室 Fas 表达(×400)

2.5 光镜观察

光镜下见实验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，部分心肌细胞断裂、变性坏死，周围见炎细胞浸润及纤维母细胞增生，间隙增宽，见明显纤维结缔组织增生；对照组细胞形态排列均正常。

2.6 Fas、FasL 的表达

与对照组相比，实验组左房的 Fas 阳性表达高于对照组(0.336 ± 0.074 vs 0.043 ± 0.023，P<0.05)，左室的 Fas 阳性表达亦高于对照组 (0.45 ± 0.05 vs 0.041 ± 0.022，P<0.05)；而右房、右室的 Fas 阳性表达及左房、左室、右房、右室的 FasL 阳性表达与对照组无明显差异。

3 讨 论

甲亢是由多种病因导致甲状腺功能增强，分泌甲状腺素(TH)过多所致的临床综合征，甲亢性心脏病是其常见的并发症之一。本实验观察到新西兰白兔注射 L-Thy 后出现血 T3、T4 水平显著升高，体重下降、体温升高、心率明显加快等类似甲亢的临床表现，经胸 B 超提示左室后壁及室间隔明显增厚，心腔变窄；光镜观察见心肌纤维增粗，排列紊乱，部分心肌细胞内见空泡变性，肌纤维束及小血管周围见纤维组织增生，心室质量指数、心肌细胞直径及胶原容积分数明显增高，证实已成功建立了甲亢性心脏病模型，同时，Fas 在左房、左室阳性表达明显增加，说明 L-Thy 可诱导心肌肥厚、心肌细胞结构改变、心肌细胞凋亡以及心肌间质纤维化。

Fas 又称 APO-1，即 CD-95 分子，为近年来发现的一种调节细胞凋亡的Ⅰ型跨膜糖蛋白受体，属于肿瘤坏死因子(TNF)受体/生长因子受体超家族。Fas 配体(Fas-L)是细胞表面的一种Ⅱ型膜蛋白，属于肿瘤坏死因子亚家族。Fas 与 FasL 结合后可诱导细胞凋亡。有研究表明：在大鼠高血压心脏病模型中，左室肥厚而未发生心衰组的 Fas 阳性表达明显高于正常对照组，FasL 表达与正常对照组无明显差异；而左室肥厚伴有心衰组的 Fas 和 FasL 的阳性表达均明显高于正常对照组。这与本实验观察到的 Fas 在实验组左心室阳性表达高于对照组，FasL 表达与对照组无明显差异相符合，说明 Fas/FasL 系统可能在心室肥厚中发挥了一定的作用。近年来有报道，甲状腺素可通过与甲状腺素反应元件结合，在转录水平上调心脏肾素 mRNA 表达，并使心肌局部肾素和 AngII 增加，提示 RAS 系统可能参与甲状腺素诱导的心肌肥厚过程[6,7]。另有资料表明：在局部 RAS 增多的情况下，可刺激某些凋亡基因活化和凋亡蛋白(如 Fas)的合成，使心肌细胞凋亡增加，从而导致心肌收缩和泵血功能不足。机体为了恢复心

维普资讯 http://www.cqvip.com

肌收缩和泵血功能，可能启动负反馈机制，刺激心肌细胞增殖。而心肌细胞是永久细胞，一般情况下不发生增殖或增殖率极低，所以当心肌细胞凋亡增加时，由于心脏不能依靠心肌细胞增殖来完成功能修复，机体便通过系列的调节，刺激成纤维细胞增殖，通过间质纤维化和胶原增加来维持心脏的结构。但是这种代偿往往是无益的，反而启动或促进了甲亢性心脏病的形成。

心房颤动是临床上常见的心律失常，其发病率和致残率都很高。临床观察甲亢患者约 4%~20%并发房颤[9]。关于甲亢性房颤的确切机制现在尚未完全阐明，可能与甲状腺素对心脏的直接毒性有关。本实验观察到实验组左房体积增大，心肌纤维化程度增加，左房 Fas 阳性表达增加，这提示 Fas/FasL 可能参与了左房的结构重构，从而为房颤的发生提供了基质。

甲亢性心脏病是多种因素作用的结果，近几年，随着分子生物学研究的进展，对甲亢性心脏病发病机制的认识已更加深入。本实验观察到 Fas 在左房、左室的表达高于对照组，说明 Fas/FasL 可能在甲亢性心脏病和甲亢性房颤中发挥了一定的作用，因此干预 Fas/FasL 介导的细胞凋亡途径也许能成为甲亢性心脏病和甲亢性房颤的一种辅助治疗方法。

参 考 文 献

[1] Kahaly GJ, Kampmann C, Mohr-Kahaly S. Cardiovascular hemodynamics and exercise tolerance in thyroid disease [J].Thyroid, 2002; 12 (6): 473-481.

[2] Biondi B, Palmieri EA, Lombardi G, et al. Effects of thyroid hormone on cardiac function: the relative importance of heart rate, loading conditions, and myocardial contractility in the regulation of cardiac performance in human hyperthyroidism [J].J Clin Endocrinol Metab, 2002; 87 (3): 968-974.

[3] Riaz K, Forker AD, Isley WL, et al. Hyperthyroidism: a "curable" cause of congestive heart failure-three case reports and a review of the literature[J].Congest Heart Fail, 2003; 9 (1): 40-46.

[4] 祝宝华，张寄南，马文珠，等. 肌浆网钙泵测定及其在高血压心肌中的变化[J].南京医科大学学报，1998；18（5）：390-392.

[5] Thomas LR, Henson A, Reed JC, et al. Direct binding of Fas-associated death domain (FADD) to the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor DR5 is regulated by the death effector domain of FADD[J]. J Biol Chem, 2004; 279 (31): 32780-32785.

[6] Kobori H, Ichihara A, Suzuki H, et al. Role of the renin-angiotensin system in cardiac hypertrophy induced in rat by hyperthyroidism [J].Am J physiol, 1997; 273: H593-H564.

[7] Kobori H, Hayashi M, Saruta T. Thyroid Hormone Stimulates Renin Gene Expression Through the thyroid hormone Response Element[J].Hypertension, 2001; 37 (1): 99-104.

[8] Nitahara JA, Cheng W, Liu Y, et al. Intracelluar calcium, DNAse activity and myocyte apoptosis in the aging Fischer 344 rats [J]. J Mol Cell Cardiol, 1998; 30: 519-535.

[9] Klein I, Ojamaa K. Thyroid hormone and the cardiovascular system[J]. N Engl J Med, 2001; 344: 501-509.

（上接第 640 页）

参 考 文 献

[1] Lee CJ, Suh EJ, Kang HT, et al. Induction of senescence-like state and suppression of telomerase activity through inhibition of HPV E6/E7 gene expression in cells immortalized by HPV 16 DNA [J].Exp Cell Res, 2002; 277 (2): 173-182.

[2] Tuschl T, Borkhardt A. Small interfering RNAs: a revolutionary tool for the analysis of gene function and gene therapy [J].Mol Interv, 2002; 2 (3): 158-167.

[3] Boutla A, Delidakis C, Livadaras I, et al. Variations of the 3' protruding ends in synthetic short interfering RNA (siRNA) tested by microinjection in Drosophila embryos [J].Oligonucleotides, 2003; 13 (5): 295-301.

[4] DiPaolo JA, Alvarez-Salas LM. Advances in the development of therapeutic nucleic acids against cervical cancer [J].Expert Opin Biol Ther, 2004; 4 (8): 1251-1264.

[5] zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application [J].Nat Rev Cancer, 2002; 2 (5): 342-350.

[6] Butz K, Ristriani T, Hengstermann A, et al. siRNA targeting of the viral E6 oncogene efficiently kills human papillomavirus-positive cancer cells [J].Oncogene, 2003; 22 (38): 5938-5945.

[7] Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, et al. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in Drosophila melanogaster embryo lysate [J].EMBO J, 2001; 20 (23): 6877-6888.