doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.15.011

促甲状腺激素对大鼠心肌成纤维细胞影响的研究 *

倪 菁[1] 白 丹[1] 雷 飞[2] 马建梅[1] 周 韵[1] 王春阳[1]

（1 西安医学院临床医学院 陕西 西安 710021；2 西安医学院第二附属医院口腔科 陕西 西安 710038）

摘要 目的：探讨促甲状腺激素（TSH）对 SD 乳鼠心肌成纤维细胞（CFs）的影响及机制。**方法：**新生 1-3 d 的 SD 乳鼠 15 只，处死后进行 CFs 的分离与培养，倒置显微镜对原代培养细胞形态进行鉴定，免疫组织化学染色法对 CFs 胞浆内波动蛋白进行染色并鉴定。后续实验过程中，按照使用 bTSH 工作液的稀释浓度分为 A 组（1 μmol·L^{-1}）、B 组（2 μmol·L^{-1}）、C 组（4 μmol·L^{-1}）。MTT 法检测心肌成纤维细胞增殖率。酶联免疫吸附法（ELISA）检测培养细胞的上清液中Ⅰ、Ⅲ型胶原蛋白含量。荧光定量 PCR 反应测定培养细胞上清液中基质金属蛋白酶 -2（MMP-2）、基质金属蛋白酶 -9（MMP-9）mRNA 的相对表达量。Western-blot 法检测培养细胞上清液中 MMP-2、MMP-9 的蛋白表达水平。**结果：**CFs 的形态学变化及纯度鉴定结果显示乳鼠 CFs 培养成功。MTT 试验结果显示，24 h 时后，A、B、C 组 CFs 的增殖率分别为 112.91± 10.23、123.22± 9.34、132.56± 9.36；48 h 时后，A、B、C 组 CFs 的增殖率分别为 124.4± 8.34、133.5± 9.02、139.6± 11.36。随着 bTSH 浓度的增加，CFs 增殖率呈逐渐增加趋势。ELISA 检测结果显示，A、B、C 组 I 型胶原蛋白表达水平分别为（2.61± 0.31）μg·L^{-1}、（5.53± 0.66）μg·L^{-1}、（7.91± 0.74）μg·L^{-1}；A、B、C 组 III 型胶原蛋白表达水平分别为（3.96± 0.25）μg·L^{-1}、（6.72± 0.52）μg·L^{-1}、（8.11± 0.65）μg·L^{-1}。随着 bTSH 浓度的升高，I 型和 III 型胶原蛋白表达水平呈升高趋势。荧光定量 PCR 法检测结果显示，A、B、C 组 MMP-2 的 mRNA 表达量分别为 9.124± 1.021、15.223± 1.536、18.678± 1.742；A、B、C 组 MMP-9 的 mRNA 表达量分别为 16.447± 1.664、17.402± 1.881、24.247± 2.364。随着 bTSH 浓度的增加，MMP-2、MMP-9 的 mRNA 相对表达量呈增加趋势。Western-blot 法检测结果显示，A、B、C 组 MMP-2 灰度值分别为 165.41± 16.57、198.25± 21.34、223.41± 19.08；A、B、C 组 MMP-9 灰度值分别为 140.30± 15.09、190.47± 20.06、230.14± 21.45。随着 bTSH 浓度的增加，MMP-2、MMP-9 的蛋白表达水平呈增加趋势。**结论：**TSH 能够促进乳鼠 CFs 细胞增殖及 I、III 型胶原蛋白表达增加，导致细胞外基质成分降解及合成过程失调。

关键词：促甲状腺激素；心肌成纤维细胞；胶原；金属蛋白酶

中图分类号：R-33；R54；Q575.14 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273（2018）15-2855-06

The Effect of Thyroid-Stimulating Hormone on Rat Cardiac Fibroblasts*

NI Jing[1], BAI Dan[1], LEI Fei[2], MA Jian-mei[1], ZHOU Yun[1], WANG Chun-yang[1]

(1 Clinical Medicine, Xi'an Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710021, China;

2 Department of stomatology, Second affiliated hospital of Xi'an Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710038, China)

ABSTRACT Objective: To explore the effect and mechanism of TSH on cardiac fibroblast (CFs) in rat. **Methods:** 1-3 d SD rats (n=15) were put death, to separate and culture CFs. The cell morphology of the original culture was identified by the inverted microscope and the immunohistochemical staining method was used to dye and identify the volatile protein in CFs cytoplasm. According concentration of the working fluid of bTSH, which were divided into group A (1 μmol·L^{-1}), group B (2 μmol·L^{-1}), and group C (4 μmol·L^{-1}). Myocardial fibroblast proliferation rate was detected by MTT method. The supernatant of cultured cells Ⅰ, Ⅲ collagen content was detected by ELISA method. Fluorescence quantitative PCR was used to determine the relative expression of MMP-2 and MMP-9 mRNA in cultured cells. The protein expression levels of MMP-2 and MMP-9 were cultured in cultured cells by Western- blot. **Results:** CFs morphological changes and purity identification results showed that CFs culture was successful. The results of MTT test showed, after 24 h, the proliferation rate of CFs of group A, B and C were 112.91± 10.23, 123.22± 9.34, 132.56± 9.36; after 48 h, the proliferation rate of CFs of group A, B and C were 124.4± 8.34, 133.5± 9.02, 139.6± 11.36. With the increase of bTSH concentration, the proliferation of CFs increased. ELISA test results showed, expression of type I collagen of group A, B and C were (2.61± 0.31)μg·L^{-1},(5.53± 0.66)μg·L^{-1}, (7.91± 0.74)μg·L^{-1}; type III collagen of group A, B and C were (3.96± 0.25)μg·L^{-1},(6.72± 0.52)μg·L^{-1},(8.11± 0.65)μg·L^{-1}. With the increase of bTSH concentration, the expression of type I and type III collagen increased. The PCR results showed, mRNA relative expression in group A, B and C of MMP-2 were 9.124± 1.021, 15.223± 1.536, 18.678± 1.742; MMP-9 were 16.447± 1.664, 17.402± 1.881, 24.247± 2.364. With the increase of bTSH concentration, the mRNA relative expression of MMP-2 and MMP-9 increased. The results of Western-blot test showed, grey value of MMP-2 in group A, B and C were 165.41± 16.57, 198.25± 21.34, 223.41± 19.08; grey value of

* 基金项目：陕西省教育厅科技计划项目(17JK0667)；西安医学院校级课题(2016QN14)

作者简介：倪菁（1987-），硕士，助教，住院医师，研究方向：分泌与代谢性疾病，E-mail：382669507@qq.com，电话：18793139676

(收稿日期：2017-12-07 接受日期：2017-12-31)

MMP-9 were 140.30± 15.09, 190.47± 20.06, 230.14± 21.45. With the increase of bTSH concentration, the expression level of MMP-2 and MMP-9 increased. **Conclusions:** TSH can promote CFs cell proliferation and the expression of I, III collagen, resulting in the degradation of extracellular matrix components and the dysregulation of the synthesis process.

Key words: TSH; Cardiac fibroblasts; Collagen; MMPs

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R54; Q575.14 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2018)15-2855-06

前言

冠状动脉性心脏病(coronary heart disease, CHD)简称冠心病,为临床常见疾病,发病率及病死率逐年升高,为人类死亡的主要原因之一[1]。甲状腺激素在人体内有广泛的生理作用,能够通过特定机制导致心血管系统异常[2]。甲状腺功能减退(甲减,hypothyroidism)可导致心脏舒缩功能的异常改变,研究显示甲状腺激素(thyroid hormones, TH)表达水平降低可能是导致这一改变的主要机制[3]。最新研究显示:亚临床甲状腺功能减退(subclinical hypothyroidism, SCH)亦可导致心脏舒缩功能改变[4];但 SCH 患者血清 TH 表达正常,仅有促甲状腺激素(thyroid stimulating hormone, TSH)水平升高。推测,不伴随 TH 表达降低的单纯 TSH 表达水平增高亦可引起心脏舒缩功能的改变。因此,本研究拟观察不同浓度 TSH 表达水平对乳鼠心肌成纤维细胞(cardiac fibroblasts, CFs)的影响,探讨不同 TSH 表达水平对心脏舒缩功能的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物和试剂

清洁级 SD 乳鼠(共 15 只)由第四军医大学实验动物中心提供(动物证号:SCXK(军)2017-007),雌雄不拘。bTSH 购于 Sigma 公司,兔抗鼠 MMP-2、MMP-9 抗体购自 SantaCruz 公司,ELISA 试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.2 实验方法

1.2.1 心肌成纤维细胞原代培养及形态学观察和鉴定 CFs 的分离培养:新生 1-3 d 的 SD 乳鼠,处死后 75%酒精消毒 2 次,无菌条件下取出心脏。消毒后剪取心尖部组织,于 4 ℃的 PBS 缓冲液中清洗,剪刀将心尖组织剪成 1 mm^3 的组织碎块,冲洗去除血液。加入胰酶(5 $g·L^{-1}$),37℃消化 5 min,弃上清。重复上述步骤直至组织完全消化。将细胞浓度调整为 $5\times 10^5·mL^{-1}$ 后接种于 96 孔培养板,37℃,5%二氧化碳饱和湿度的 CO_2 培养箱中培养。采用差速贴壁法分离心脏成纤维细胞(去除未贴壁的其他细胞)。用倒置显微镜对原代培养细胞形态进行鉴定,免疫组织化学染色法对 CFs 胞浆内波动蛋白进行染色并鉴定。

1.2.2 TSH 母液的配制 将 5 mL 灭菌超纯水加入牛的 TSH 提取物(bTSH)中,充分溶解,配制成终浓度为 40 $\mu mol·L^{-1}$ 的 bTSH 溶液。后续使用过程中分别稀释为 1、2、4 $\mu mol·L^{-1}$ [5]的 bTSH 工作液,保存条件 -20 ℃。

1.2.3 MTT 法检测心肌成纤维细胞增殖率 取生长状况良好的细胞,以 5×10^4/ 孔的细胞浓度接种于 96 孔板上,37℃、5% CO_2 及饱和湿度下培养 24 h,换成无血清培养基培养 24 h,此时细胞进入生长静止期。按对照组、A 组、B 组、C 组分别添加至培养孔,每组设 4 个复孔。A、B、C 组分别以 1 $\mu mol·L^{-1}$、2 $\mu mol·L^{-1}$、4 $\mu mol·L^{-1}$ 的 bTSH 处理 24 h、48 h 后(对照组不进行 bTSH 处理),每孔加入 MTT(5 $mg·mL^{-1}$,pH7.4)20 μL,37℃孵育 4 h。吸去含 MTT 培养液,加入二甲基亚砜(150 μL),酶联免疫检测仪上 490 nm 波长处测各孔的吸光度值(A)。

1.2.4 酶联免疫吸附法(ELISA)检测胶原蛋白含量 各组培养细胞经胰酶消化计数,调整细胞浓度 1000 个 / 孔,接种至 24 孔培养板,待细胞融合(70%-80%),加入培养基(含 1%胎牛血清)24 h 后加入条件培养基,72 h 后取上清进行检测,按照说明书要求进行操作,用酶联免疫吸附法检测培养上清中Ⅰ、Ⅲ型胶原蛋白含量,利用标准曲线计算各指标浓度。

1.2.5 荧光定量 PCR 反应测定金属蛋白酶水平 采用 Trizol 试剂盒提取细胞 RNA,逆转录合成 cDNA,进行 PCR 扩增,计算各组间目标基因的相对表达量。(引物序列由上海生工合成提供)。

MMP-2:上游引物序列:5'-GTCCTGACCAAG-GATATAGCC-3',

下游引物序列:5'-AGACCCAGTACTCATTCCCTG-3';

MMP-9:上游引物序列:5'-CCACCGAGCTATCCACT-CAT-3',

下游引物序列:5'-GTCCG-GTTTCAGCATGTTTT-3';

1.2.6 Western-blot 法测定金属蛋白酶表达水平 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白并测定;SDS 凝胶电泳分离;一抗及二抗孵育。ECL 化学发光法显影检测 MMP-2、MMP-9 蛋白表达水平。用 gel pro-4.0 软件进行条带灰度值分析。

1.3 统计学处理

实验数据应用 SPSS 22.0 软件分析,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,两样本均数比较采用独立样本 t 检验,多个样本均数间比较采用单因素方差分析。计数资料用率表示,组间比较采用 x^2 检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CFs 的形态学变化及纯度鉴定

原代分离及纯化后的 CFs 经培养后基本贴壁,倒置显微镜下可见 CFs 为细长梭形、多角形,多成网状、放射状、旋涡状分布;细胞核呈椭圆形,细胞质透明。见图 1。CFs 胞浆内波动蛋白(vimentin)的免疫组织化学染色结果显示:阳性染色的 CFs,胞质呈棕黄色,胞核拒染或仅淡染。非心肌成纤维细胞表达阴性。显微镜下任意选取 5 个视野,每个视野计数 10 个细胞,vimentin 阳性染色细胞纯度>90%。见图 2。

2.2 不同浓度 bTSH 对 CFs 增殖能力的影响

各组测得的吸光度值占正常对照组吸光度值的百分比即为 CFs 的增殖率。MTT 试验结果显示,bTSH 作用 24 h、48 h

时，组间 CFs 增殖率比较均有统计学差异（P＜0.05）。随着 bTSH 浓度的增加，CFs 增殖率呈逐渐增加趋势。见表 1，图 3。

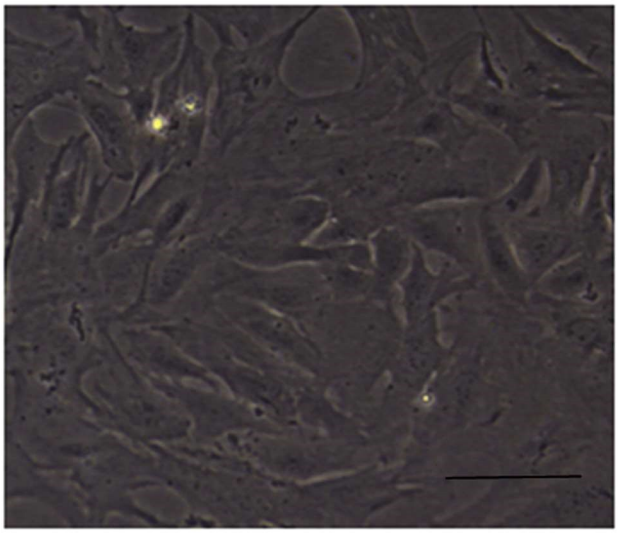

图 1 CFs 形态学变化

Fig.1 CFs morphology(× 400)

Note: Bar=25 μm

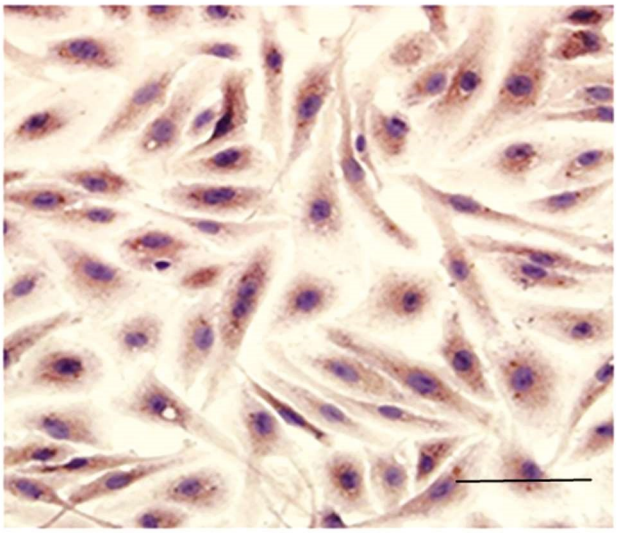

图 2 CFs 胞浆内 vimentin 免疫组织化学染色

Fig.2 CFs Intracytoplasmic vimentin immunohistochemical staining

表 1 各组 bTSH 作用 24 h、48 h 后 CFs 的增殖率($\bar{x}\pm$ s，n=15, %)

Table 1 The proliferation rate of CFs after 24h and 48h by bTSH ($\bar{x}\pm$ s, n=15, %)

Group	bTSH(μmol·L-1)	24 h	48 h
Control	0	100.00	100
A group	1.0	112.91± 10.23△	124.4± 8.34△
B group	2.0	123.22± 9.34*△	133.5± 9.02*△
C group	4.0	132.56± 9.36*#△	139.6± 11.36*△
F	-	16.3124	15.2147
P	-	＜0.05	＜0.05

Note: Compared with A group, *P＜0.05; Compared with B group, #P＜0.05; Compared with control, △P＜0.05.

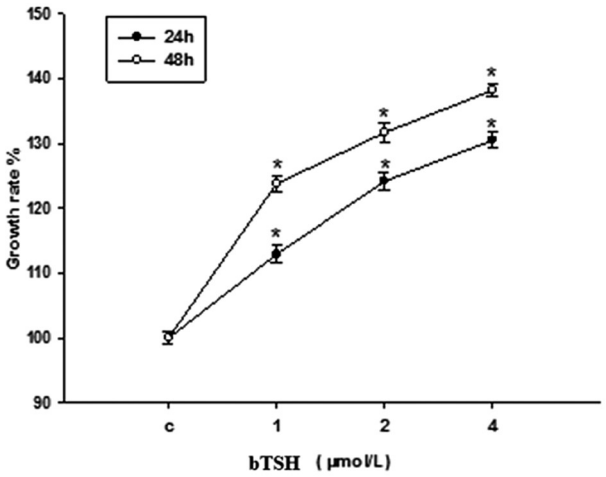

图 3 TSH 对心肌成纤维细胞的增殖作用

Fig.3 Effect of TSH on CFs proliferation

2.3 不同浓度 bTSH 对 CFs 分泌胶原蛋白的影响

不同浓度 bTSH 分别作用于 CFs 后，培养液中胶原浓度呈 bTSH 浓度依赖性升高。I 型和 III 型胶原蛋白分泌量，组间比较差异均有统计学意义(P＜0.05)。随着 bTSH 浓度的升高，I 型和 III 型胶原蛋白表达水平呈升高趋势。见表 2，图 4。这表明 bTSH 有促进心肌成纤维细胞分泌 I 型和 III 型胶原蛋白分泌的作用。

2.4 不同浓度的 bTSH 作用后对 MMP-2、MMP-9 mRNA 和蛋白表达的影响

荧光定量 PCR 法检测结果显示，各组间 MMP-2、MMP-9 的 mRNA 相对表达量存在明显统计学差异(P＜0.01)。A、B、C 组 MMP-2、MMP-9 的 mRNA 相对表达量均明显高于对照组，经比较差异有统计学意义（P＜0.05）。B 组、C 组 MMP-2、MMP-9 mRNA 的相对表达量均明显高于 A 组，经比较差异有统计学意义(P＜0.05)。C 组 MMP-2、MMP-9 mRNA 的相对表达量明显高于 B 组，经比较差异有统计学意义(P＜0.05)。见表 3，图 5。

Western-blot 法检测结果显示，各组间 MMP-2、MMP-9 蛋白表达存在明显差异。各组间 MMP-2、MMP-9 灰度值比较存在统计学差异(P＜0.01)。B、C 组 MMP-2、MMP-9 灰度值均明显高于 A 组，C 组 MMP-2、MMP-9 灰度值均明显高于 B 组，经比较差异有统计学意义(P＜0.05)。见表 4，图 6。

3 讨论

甲状腺激素对心脏的作用机制涉及多个方面：首先，甲状

表 2 TSH 对 I 型和 III 型胶原蛋白表达的影响($\bar{x}\pm$ s,μg·L^{-1},n=15)

Table 2 Effect of TSH on The type I/III collagens content($\bar{x}\pm$ s, μg·L^{-1}, n=15)

Group	bTSH(μmol·L^{-1})	I collagens	III collagens
Control	0	2.25± 0.24	2.52± 0.23
A group	1.0	2.61± 0.31$^{\triangle}$	3.96± 0.25$^{\triangle}$
B group	2.0	5.53± 0.66*$^{\triangle}$	6.72± 0.52*$^{\triangle}$
C group	4.0	7.91± 0.74*$^{\#\triangle}$	8.11± 0.65*$^{\#\triangle}$
F	-	16.1478	15.3374
P	-	＜0.05	＜0.05

Note: Compared with A group, *P＜0.05; Compared with B group, $^{\#}$P＜0.05; Compared with control, $^{\triangle}$P＜0.05.

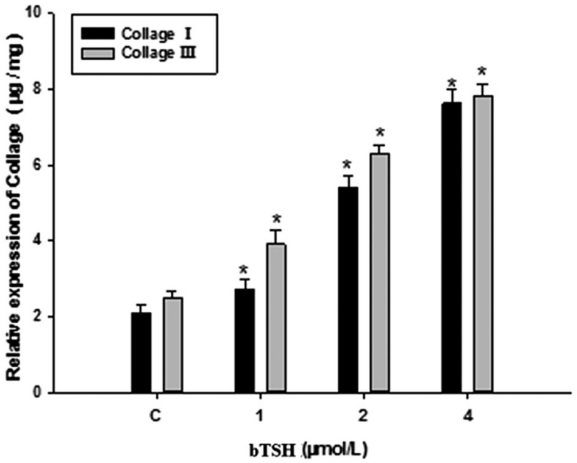

图 4 不同浓度 bTSH 对 CFs 分泌胶原蛋白的影响

Fig.4 Effect of TSH on The type I/III collagens content

腺激素可通过与细胞内甲状腺受体结合后，与细胞核中特定 DNA 序列结合，影响基因表达[6,7]，对心肌细胞发挥直接生物学效应，即甲状腺激素核内效应；甲状腺激素还也可与细胞核外的受体结合，通过细胞膜上离子通道产生生物学效应[8]。其次，甲状腺激素可通过对交感系统的作用，增强对心脏的作用[9]，已经得到证实，这一过程与交感肾上腺系统活性增加有关[10]。当体内甲状腺激素水平表达异常，可产生特殊血液动力学变化，经证实，甲状腺激素能够使收缩压明显升高，而舒张压相对降低，脉压增宽。亚临床甲状腺疾病也称为轻度甲状腺疾病，通常无临床症状或临床症状轻微[11,12]。

甲状腺功能减退可导致多种心脏疾病的发生，如冠心病、心力衰竭等[13,14]。甲减时相关激素水平的改变与心脏功能异常间存在广泛联系 [15]。有研究认为甲减可导致心脏舒缩功能异常，其主要机制为甲状腺激素水平降低引起的心室扩张、心室

表 3 bTSH 对 MMP-2、MMP-9 mRNA 表达的影响($\bar{x}\pm$ s,n=15)

Table 3 Effect of bTSH on MMP-2, MMP-9 mRNA($\bar{x}\pm$ s, n=15)

Group	bTSH(μmol·L^{-1})	MMP-2	MMP-9
Control	0	7.542± 0.841	12.531± 1.036
A group	1.0	9.124± 1.021$^{\triangle}$	16.447± 1.664$^{\triangle}$
B group	2.0	15.223± 1.536*$^{\triangle}$	17.402± 1.881*$^{\triangle}$
C group	4.0	18.678± 1.742*$^{\#\triangle}$	24.247± 2.364*$^{\#\triangle}$
F	-	22.3148	24.0651
P	-	＜0.01	＜0.01

Note: Compared with A group, *P＜0.05; Compared with B group, $^{\#}$P＜0.05; Compared with control, $^{\triangle}$P＜0.05.

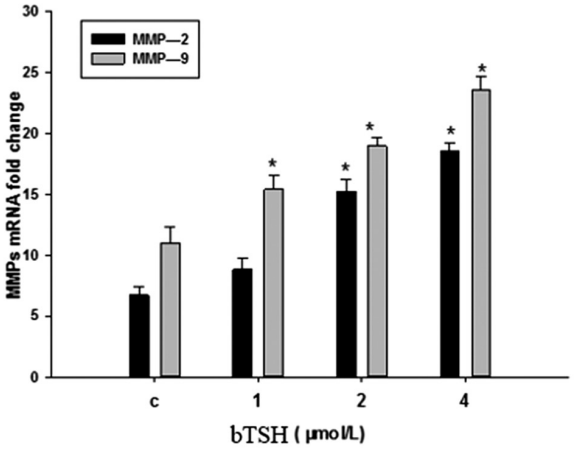

图 5 不同浓度 TSH 对 MMP-2、MMP-9 mRNA 表达的影响

Fig. 5 Effect of TSH on MMP-2, MMP-9 mRNA

等容舒张时间增加、心室射血分数降低和全身血管阻力增加等因素[16]。

除甲减可引起心脏舒缩功能改变外，研究发现 SCH 亦可引起与心脏的异常舒缩[17]。研究显示：SCH 患者心脏前负荷显著减低，后负荷增加，心输出量及每搏输出量减少。最新研究显示：高水平 TSH 可导致肥厚性心肌病患者左室舒张功能损害[18]。Gencer[19]等研究证实 TSH 表达水平增高与心衰发生成正相关。Vidali 等[20]在研究中探讨了慢性心力衰竭患者治疗前、治疗后血清甲状腺激素水平及心脏超声参数的变化。结果发现，慢性心力衰竭患者伴有甲状腺功能异常，FT3 与心力衰竭的严重程度密切相关，可用于预测慢性心力衰竭的病理程度与预后的评估。Alonso 等[21]在研究中将甲状腺激素替代治疗用于老年甲状腺功能减退的治疗中，观察其对心功能及血脂的影响。结果发现，甲状腺激素替代治疗能够明显改善患者的血脂水平及心功能。

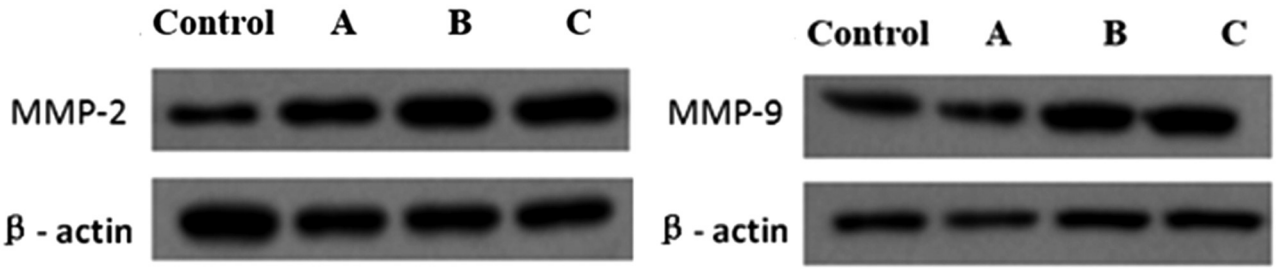

图 6 不同浓度 TSH 作用后对 MMP-2、MMP-9 蛋白表达的影响

Fig.6 Effect of TSH on MMP-2, MMP-9

表 4 各组 MMP-2、MMP-9 灰度值比较($\bar{x}\pm$ s, n=15)

Table 4 The gray value of MMP-2, MMP-9 in groups($\bar{x}\pm$ s, n=15)

Group	MMP-2	MMP-9
Control	134.52± 15.46	142.36± 13.08
A group	165.41± 16.57△	140.30± 15.09
B group	198.25± 21.34*△	190.47± 20.06*△
C group	223.41± 19.08*#△	230.14± 21.45*#△
F	36.6675	32.1489
P	<0.01	<0.01

Note: Compared with A group, *P<0.05; Compared with B group, #P<0.05; Compared with control, △ P<0.05.

SCH 在成年人群中的发病率为 4%-20%,可影响机体的心功能、血管功能、内分泌功能。许多研究均发现,SCH 患者存在左心室舒张功能受损现象[22-24]。CFs 广泛分布于心肌组织中,约占细胞总数的 65%,起到包裹心肌细胞、连接细胞间质的功能。细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的合成和沉积亦与 CFs 密切相关,维持 ECM 内环境稳态的关键是胶原纤维合成与降解的平衡,其主要组成为由 CFs 分泌的 I 型、III 型胶原纤维,起到支撑心脏结构、传递细胞间机械信号等功能,从而促进心脏进行有序舒缩。本实验研究显示:TSH 作用于 CFs 后,培养液中胶原浓度呈 TSH 浓度依赖性升高,ELISA 检测结果显示,A、B、C 组 I 型胶原蛋白表达水平分别为 (2.61± 0.31)μg·L^{-1}、(5.53± 0.66)μg·L^{-1}、(7.91± 0.74)μg·L^{-1};A、B、C 组 III 型胶原蛋白表达水平分别为(3.96± 0.25)μg·L^{-1}、(6.72± 0.52)μg·L^{-1}、(8.11± 0.65)μg·L^{-1}。随着 bTSH 浓度的升高,I 型和 III 型胶原蛋白表达水平呈升高趋势。表明 TSH 具有促进 CFs 分泌 I、III 型胶原纤维的作用。胶原纤维含量改变可影响心肌组织的伸展与回弹,因而,当 TSH 含量增高,胶原纤维过度合成,可导致心肌纤维化和心室重构的发生,进一步影响心脏的舒缩功能[25]。

另一方面,ECM 中胶原纤维的含量,不仅取决于其合成量,同时还受胶原纤维降解量的影响。在胶原纤维降解过程中基质金属蛋白酶(Matrix Metalloproteinases, MMPs)起关键作用[26]。MMP-2 和 MMP-9 是 MMPs 家族中的重要组成,其中 MMP-2 的合成增加与心室重构、心脏衰竭密切相关[27]。在心肌修复阶段,MMPs 含量增加可使细胞外基质胶原纤维网状结构断裂,从而分泌细胞因子增加炎症细胞浸润,并促进 CFs 的增殖、分化及迁移,最终使细胞外基质沉积再平衡并形成瘢痕[28,29]。基于此,本研究分别从蛋白水平和 mRNA 水平检测 TSH 浓度增高对 CFs 细胞中 MMP-2 和 MMP-9 表达水平的影响,荧光定量 PCR 法检测结果显示,A、B、C 组 MMP-2 的 mRNA 表达量分别为 9.124± 1.021、15.223± 1.536、18.678± 1.742;A、B、C 组 MMP-9 的 mRNA 表达量分别为 16.447± 1.664、17.402± 1.881、24.247± 2.364。随着 bTSH 浓度的增加,MMP-2、MMP-9 的 mRNA 相对表达量呈增加趋势。Western-blot 法检测结果显示,A、B、C 组 MMP-2 灰度值分别为 165.41± 16.57、198.25± 21.34、223.41 ± 19.08;A、B、C 组 MMP-9 灰度值分别为 140.30± 15.09、190.47± 20.06、230.14± 21.45。随着 bTSH 浓度的增加,MMP-2、MMP-9 的蛋白表达水平呈增加趋势。发现高浓度 TSH 可促进 CFs 增值并破坏 ECM 中胶原纤维合成、降解的平衡,进而形成恶性循环、加速心室重构,最终导致心室舒缩功能的异常。

综上所述,本研究通过培养原代 SD 乳鼠心肌成纤维细胞,研究不同浓度 TSH 对乳鼠心肌成纤维细胞的影响,证实 TSH 能够促进乳鼠 CFs 细胞增殖及 I、III 型胶原蛋白表达增加,通过影响基质金属蛋白酶的表达,导致细胞外基质成分降解及合成过程失调。分析可能参与了心脏舒缩功能异常的发生发展,是对甲减患者和 SCH 患者出现心脏舒缩功能障碍、引起心血管疾病发生发展机制的进一步补充。

参 考 文 献(References)

[1] Dalen JE, Alpert JS, Goldberg RJ, et al. The epidemic of the 20(th) century: coronary heart disease[J]. Am J Med, 2014, 127(9): 807-812

[2] Lamprou V, Varvarousis D, Polytarchou K, et al. The role of thyroid hormones in acute coronary syndromes: Prognostic value of alterations in thyroid hormones[J]. Clin Cardiol, 2017, 40(8): 528-533

[3] Burkauskas J, Bunevicius A, Brozaitiene J, et al. Cognitive Functioning in Coronary Artery Disease Patients: Associations with Thyroid Hormones, N-Terminal Pro-B-Type Natriuretic Peptide and High-Sensitivity C-Reactive Protein [J]. Arch Clin Neuropsychol, 2017, 32(2): 245-251

[4] Chen W J, Lin K H, Lee Y S. Molecular characterization of myocardial

fibrosis during hypothyroidism: evidence for negative regulation of the pro-alpha1(I) collagen gene expression by thyroid hormone receptor[J]. Molecular & Cellular Endocrinology, 2000, 162(1): 45-55

[5] Tian L, Ni J, Guo T, et al. TSH stimulates the proliferation of vascular smooth muscle cells[J]. Endocrine, 2014, 46(3): 651-658

[6] Figliozzi RW, Chen F, Hsia SV. Reversing thyroid-hormone-mediated repression of a HSV-1 promoter via computationally guided mutagenesis[J]. J Cell Sci, 2017, 130(21): 3740-3748

[7] Pinto VMS, Minakhina S, Qiu S, et al. Naturally Occurring Amino Acids in Helix 10 of the Thyroid Hormone Receptor Mediate Isoform-Specific TH Gene Regulation [J]. Endocrinology, 2017, 158(9): 3067-3078

[8] Farhangi MA, Dehghan P, Tajmiri S, et al. The effects of Nigella sativa on thyroid function, serum Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) - 1, Nesfatin-1 and anthropometric features in patients with Hashimoto's thyroiditis: a randomized controlled trial[J]. BMC Complement Altern Med, 2016, 16(1): 471

[9] Kyono Y, Sachs LM, Bilesimo P, et al. Developmental and Thyroid Hormone Regulation of the DNA Methyltransferase 3a Gene in Xenopus Tadpoles[J]. Endocrinology, 2016, 157(12): 4961-4972

[10] Guo ML, Zheng X, Yang LX, et al. Coexistence of resistance to thyroid hormone and ectopic thyroid: ten-year follow-up [J]. Arch Endocrinol Metab, 2016, 60(6): 601-604

[11] Flamant F. Futures Challenges in Thyroid Hormone Signaling Research[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2016, 22(7): 58

[12] Kyono Y, Subramani A, Ramadoss P, et al. Liganded Thyroid Hormone Receptors Transactivate the DNA Methyltransferase 3a Gene in Mouse Neuronal Cells[J]. Endocrinology, 2016, 157(9): 3647-3657

[13] Rodondi N, Elzen W P J D, Bauer D C, et al. Subclinical Hypothyroidism and the Risk of Coronary Heart Disease and Mortality [J]. Jama, 2010, 304(12): 1365-1374

[14] Schmidt-Ott U M, Ascheim D D. Thyroid hormone and heart failure [J]. Current Heart Failure Reports, 2006, 3(3): 114-119

[15] Vargasuricoechea H, Sierratorres C H. Thyroid hormones and the heart[J]. Hormone Molecular Biology & Clinical Investigation, 2014, 18(1): 15-26

[16] Ozturk S, Alcelik A, Ozyasar M, et al. Evaluation of left ventricular systolic asynchrony in patients with subclinical hypothyroidism [J]. Cardiology Journal, 2012, 19(4): 374-380

[17] Ilic S, Tadic M, Ivanovic B, et al. Left and right ventricular structure and function in subclinical hypothyroidism: the effects of one-year levothyroxine treatment [J]. Medical Science Monitor International Medical Journal of Experimental & Clinical Research, 2013, 19(19): 960-968

[18] Chen S, Yuan J, Qiao S, et al. A high-normal thyrotropin level is associated with the severity of left ventricular diastolic dysfunction in patients with hypertrophic cardiomyopathy [J]. Kardiologia Polska, 2013, 71(2): 143-151

[19] Gencer B, Collet T-H, Virgini V, et al. Subclinical thyroid dysfunctionand the risk of heart failure events: an individual participantdata-analysis from 6 prospective cohorts [J]. Circulation 2012, 126 (9): 1040-1049

[20] Vidali S, Chéret J, Giesen M, et al. Thyroid Hormones Enhance Mitochondrial Function in Human Epidermis [J]. J Invest Dermatol, 2016, 136(10): 2003-2012

[21] Alonso-Merino E, Martín Orozco R, Ruíz-Llorente L, et al. Thyroid hormones inhibit TGF-β signaling and attenuate fibrotic responses[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016, 113(24): E3451-3460

[22] Huang W, Xu F, Qu T, et al. Identification of Thyroid Hormones and Functional Characterization of Thyroid Hormone Receptor in the Pacific Oyster Crassostrea gigas Provide Insight into Evolution of the Thyroid Hormone System[J]. PLoS One, 2015, 10(12): e0144991

[23] Bullock M, Ren Y, O'Neill C, et al. TERT promoter mutations are a major indicator of recurrence and death due to papillary thyroid carcinomas[J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2016, 85(2): 283-290

[24] Roman C, Fuior EV, Trusca VG, et al. Thyroid hormones upregulate apolipoprotein E gene expression in astrocytes [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 468(1-2): 190-195

[25] Wu X, Qi X, Lu Y, et al. Liguzinediol protects against cardiac fibrosis in rats in vivo and in vitro[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2016, 3(33): 260-267

[26] Lin H, Angeli M, Chung K J, et al. sFRP2 activates Wnt/β-catenin signaling in cardiac fibroblasts: differential roles in cell growth, energy metabolism and extracellular matrix remodeling[J]. Am JPhysiol Cell Physiol, 2016, 311(5): 137

[27] Polyakova V, Loeffler I, Hein S, et al. Fibrosis in endstage human heart failure: severe changes in collagen metabolism and MMP/TIMP profiles[J]. International Journal of Cardiology, 2011, 151(1): 18-33

[28] Dong J, Gao C, Liu J, et al. TSH inhibits SERCA2a and the PKA/PLN pathway in rat cardiomyocytes[J]. Oncotarget, 2016, 7(26): 39207-39215

[29] Gao C, Li T, Liu J, et al. Endothelial Functioning and Hemodynamic Parameters in Rats with Subclinical Hypothyroid and the Effects of Thyroxine Replacement[J]. Plos One, 2015, 10(7): e0131776