

甲状腺激素减少对大鼠肾脏解耦联蛋白-2 表达的影响

许静 田秀标 房辉 刘鹏 孟庆义

【摘要】 目的 观察甲状腺激素减少时肾脏线粒体解耦联蛋白-2(UCP2)表达的改变,探讨甲状腺激素减少时肾脏损伤的发生机制。方法 按随机数字表法将 Wistar 大鼠分为对照组和甲状腺激素减少组(甲减组),每组 10 只。采用低碘饮食复制甲状腺功能减退大鼠模型,对照组摄碘量 10.00 $\mu\text{g}/\text{d}$,甲减组 1.24 $\mu\text{g}/\text{d}$,两组均适应喂养 1 周,条件饲养 3 个月取血测定甲状腺功能指标,取肾脏组织,用免疫组化法及逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)测定 UCP2 的蛋白及 mRNA 表达。结果 与对照组比较,甲减组促甲状腺激素(TSH, mU/L)明显上升(4.88 ± 1.37 比 1.65 ± 0.33 , $P < 0.05$),三碘甲状腺原氨酸总量(TT_3)、甲状腺素总量(TT_4)、游离三碘甲状腺原氨酸(FT_3)、游离甲状腺素(FT_4)均明显下降(TT_3 (nmol/L): 0.54 ± 0.07 比 0.98 ± 0.17 ; TT_4 (nmol/L): 7.82 ± 2.18 比 48.78 ± 3.65 ; FT_3 (pmol/L): 2.28 ± 0.22 比 2.99 ± 0.10 ; FT_4 (pmol/L): 11.38 ± 1.74 比 29.27 ± 0.95 , 均 $P < 0.01$)。免疫组化显示,甲减组 UCP2 蛋白在肾小球和肾小管中的表达均低于对照组(肾小球: 0.17 ± 0.02 比 0.24 ± 0.04 , 肾小管: 0.19 ± 0.02 比 0.25 ± 0.02 , 均 $P < 0.01$)。RT-PCR 显示,甲减组 UCP2 mRNA 表达明显低于对照组(0.70 ± 0.19 比 1.30 ± 0.09 , $P < 0.01$)。结论 甲状腺激素减少时肾脏中 UCP2 表达下调,提示可能会有损伤肾脏,其机制与肾脏线粒体 UCP2 表达下调有关。

【关键词】 甲状腺激素减少; 解耦联蛋白-2; 肾脏; 大鼠

Study on the expression of uncoupling protein 2 in the kidney of the rats with hypothyroidism XU Jing*, TIAN Xiu-biao, FANG Hui, LIU Peng, MENG Qing-yi. * Department of Endocrinology, Tangshan Workers' Hospital, Tangshan 063000, Hebei, China

Corresponding author: MENG Qing-yi, Email: mqy301@sina.com

【Abstract】 Objective To observe the change in the expression of uncoupling protein 2 (UCP2) in kidney mitochondria in rats with hypothyroidism, and study the mechanism of renal injury due to hypothyroidism. **Methods** The Wistar rats were randomly divided into control group ($n=10$) and hypothyroidism group ($n=10$). The hypothyroidism rat model was reproduced by low-iodine diet. The intake of iodine in control group and hypothyroidism group were 10.00 $\mu\text{g}/\text{d}$ and 1.24 $\mu\text{g}/\text{d}$, respectively. The rats were raised under these conditions respectively for 3 months after they adapted to the feeding for 1 week. Then the thyroid function parameters were measured in blood, and the expressions of UCP2 protein and mRNA in renal tissue were measured by immunohistochemistry and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) methods. **Results** The thyrotropic-stimulating hormone (TSH, mU/L) in hypothyroidism group was significantly higher than that in control group (4.88 ± 1.37 vs. 1.65 ± 0.33 , $P < 0.05$). The levels of total triiodothyronine (TT_3), total thyroxine (TT_4), free triiodothyronine (FT_3) and free thyroxine (FT_4) in serum in hypothyroidism group were significantly lower than those in control group [TT_3 (nmol/L): 0.54 ± 0.07 vs. 0.98 ± 0.17 , TT_4 (nmol/L): 7.82 ± 2.18 vs. 48.78 ± 3.65 , FT_3 (pmol/L): 2.28 ± 0.22 vs. 2.99 ± 0.10 , FT_4 (pmol/L): 11.38 ± 1.74 vs. 29.27 ± 0.95 , all $P < 0.01$]. The immunohistochemistry study revealed that the UCP2 protein expression in both renal glomeruli and tubule tissues in the hypothyroidism group was significantly lower than that of control group (renal glomeruli: 0.17 ± 0.02 vs. 0.24 ± 0.04 , renal tubule: 0.19 ± 0.02 vs. 0.25 ± 0.02 , both $P < 0.01$). The RT-PCR showed that the UCP2 mRNA expression in the hypothyroidism group was significantly lower than that of control group (0.70 ± 0.19 vs. 1.30 ± 0.09 , $P < 0.01$). **Conclusion** Hypothyroidism may produce damage to kidney, which is related to the down-regulation of UCP2 expression in the mitochondria of renal cells.

【Key words】 Hypothyroidism; Uncoupling protein 2; Kidney; Rat

既往的研究表明,在没有甲状腺疾病的危重症患者中,约 44% 存在循环甲状腺激素减少现象,并

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2010.12.009

基金项目:科技部科技基础性工作专项项目(2006FY230300);解放军总医院科技创新基金项目(200800684)

作者单位:063000 河北,唐山市工人医院内分泌二科(许静、房辉);大港区油田总医院(田秀标);解放军总医院(刘鹏、孟庆义)

通信作者:孟庆义,Email:mqy301@sina.com

称之为非甲状腺性病变综合征(NTIS)或正常甲状腺病态综合征(ESS)^[1-2]。由于这种甲状腺激素减少现象的发生机制目前还未明确,故对这类危重病患者是否补充甲状腺激素尚存在争议^[3];尤其是甲状腺激素减少是否对其他重要器官造成严重影响,可能诱发或加重多器官功能不全的发生,已成为人们关注的问题之一^[4-7]。肾脏是人体重要器官,退行性

变常累及的器官之一,也是甲状腺激素作用的重要靶器官,故推测甲状腺激素减少可能会造成肾脏细胞的损伤^[8-10]。解耦联蛋白-2(UCP2)是线粒体内膜上一种具有调节质子跨膜转运作用的阴离子转运蛋白,除参与能量代谢、脂类代谢、调节胰岛素分泌、动脉粥样硬化、巨噬细胞介导的免疫应答和炎症过程、巨噬细胞的分化成熟外,还与细胞凋亡等现象密切相关^[10-11]。据此,本研究中拟通过观察甲状腺功能减退模型大鼠肾脏 UCP2 基因及蛋白的表达,探讨甲状腺激素减少造成大鼠肾脏损伤的发生机制。

1 材料与方 法

1.1 实验动物及分组:选择 4~5 周龄、体重 70~100 g 的健康 Wistar 大鼠,雌雄各半,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物合格证号:SCXK(京)2002-0003。按随机数字表法将大鼠分为甲状腺激素减少组(甲减组)和对照组,每组 10 只。

1.2 甲状腺功能减退动物模型的复制:甲减组大鼠给予河北省兴隆山区重度缺碘地区出产的粮食作为低碘饲料饲养。每公斤低碘饲料含黄豆 40%、玉米 30%、无机盐 40~80 g、水溶性维生素 20~40 g、脂溶性维生素 5 g、甲硫氨酸 3 g、赖氨酸 1 g,含碘量 50 μg/kg。两组大鼠摄碘情况:对照组 10.00 μg/d,甲减组 1.24 μg/d。适应喂养 1 周,条件饲养 3 个月 后处死大鼠,取血、肾脏组织冻存于-80 °C 冰箱中 备用。

1.3 甲状腺激素测定:采用化学发光免疫分析法测定血清促甲状腺激素(TSH)、三碘甲状腺原氨酸总量(TT₃)、甲状腺素总量(TT₄)、游离三碘甲状腺原氨酸(FT₃)、游离甲状腺素(FT₄)水平,设备及试剂均为德国拜耳公司产品。

1.4 免疫组化法检测大鼠肾脏 UCP2 蛋白表达:将大鼠肾脏纵切/横断,厚度<0.5 cm,4%多聚甲醛固定,常规梯度乙醇脱水,石蜡包埋后切片(4 μm)。链霉卵白素(SP)法检测肾脏 UCP2 蛋白表达,严格按试剂盒说明书进行操作。结果用图像分析系统进行分析,根据积分吸光度与总面积的比值计算单位面积平均吸光度(图中棕黄色区域代表阳性染色区域,颜色越深阳性表达量越多)。

1.5 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测大鼠肾脏 UCP2 mRNA 表达:取 100 mg 肾组织于液氮中保存,提取总 RNA,-70 °C 冰箱保存待检。UCP2、β-肌动蛋白(β-actin)上、下游引物由上海生物工程有限公司合成,扩增产物大小为 300 bp、156 bp。将总 RNA 逆转录为 cDNA 扩增目的基因 UCP2,以 β-actin 作为内参照,1.2%琼脂糖凝胶电泳后应用 BIO-Rad 2000 采集图像,图像分析系统进行灰度测量,结果取目的基因与内参照的比值进行半定量分析。RT 反应条件:50 °C 20 min,99 °C 5 min,5 °C 5 min,1 个循环。PCR 反应条件:94 °C 2 min 预变性;94 °C 30 s,68~64 °C 30 s(每个循环降 1 °C),63~62 °C 30 s(每 5 个循环降 1 °C),61~60 °C 30 s(每 6 个循环降 1 °C),59 °C 30 s(3 个循环),58 °C 30 s(2 个循环),72 °C 延伸 30 s,共 32 个循环;72 °C 10 min。β-actin 反应条件:94 °C 2 min 预变性;94 °C 30 s,57 °C 30 s,72 °C 30 s,共 28 个循环;72 °C 10 min。

1.6 统计学处理:应用 SPSS 13.0 统计软件进行数据处理与统计分析,所有数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用两独立样本 t 检验,P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 甲状腺功能比较(表 1):与对照组比较,甲减组 TSH 明显上升,TT₃、TT₄、FT₃、FT₄ 均明显下降(P<0.05 或 P<0.01),提示甲状腺激素减少动物模型复制成功。

2.2 肾脏 UCP2 蛋白表达(图 1):甲减组肾小球及肾小管 UCP2 表达均明显低于对照组(肾小球:0.17±0.02 比 0.24±0.04,肾小管:0.19±0.02 比 0.25±0.02,均 P<0.01)。

2.3 肾脏 UCP2 mRNA 表达(图 2):甲减组肾脏 UCP2 mRNA 表达明显低于对照组(0.70±0.19 比 1.30±0.09,P<0.01)。

3 讨 论

NTIS 是危重病患者常见的一种甲状腺功能异常。危重病患者在严重应激状态下发生的内分泌代谢紊乱,引起一系列代谢、营养、免疫功能改变,以及

表 1 两组大鼠甲状腺功能指标比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	TSH(mU/L)	TT ₃ (nmol/L)	TT ₄ (nmol/L)	FT ₃ (pmol/L)	FT ₄ (pmol/L)
对照组	10	1.65±0.33	0.98±0.17	48.78±3.65	2.99±0.10	29.27±0.95
甲减组	10	4.88±1.37 ^a	0.54±0.07 ^b	7.82±2.18 ^b	2.28±0.22 ^b	11.38±1.74 ^b

注:甲减:甲状腺激素减少,TSH:促甲状腺激素,TT₃:三碘甲状腺原氨酸总量,TT₄:甲状腺素总量,FT₃:游离三碘甲状腺原氨酸,FT₄:游离甲状腺素;与对照组比较,^aP<0.05,^bP<0.01

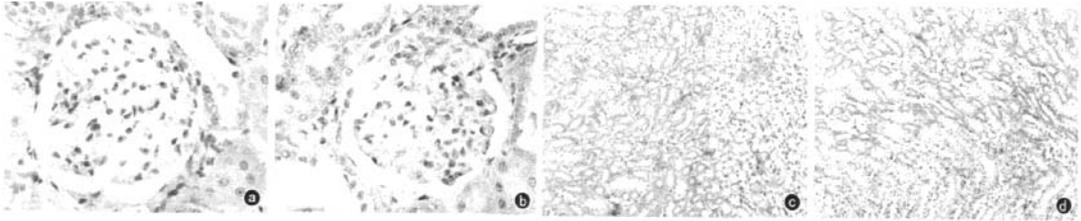
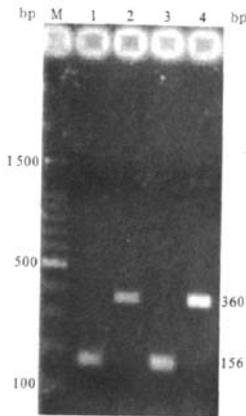


图 1 光镜下观察两组大鼠肾脏解耦蛋白-2(UCP2)蛋白表达 甲状腺激素减少组(甲减组, a)肾小球 UCP2 蛋白表达荧光强度及面积均明显小于对照组(b) 免疫组化 ×400;甲减组(c)肾小管 UCP2 蛋白表达荧光强度面积均明显小于对照组(d) 免疫组化 ×100



UCP2:解耦蛋白-2; M:Marker, 1, 2: 甲状腺激素减少组 β-肌动蛋白(β-actin)、UCP2, 3, 4: 对照组 β-actin、UCP2

图 2 逆转录-聚合酶链反应检测两组大鼠肾脏 UCP2 mRNA 表达

相应的器官功能改变。本研究结果显示,甲减组 UCP2 在肾小球和肾小管中的蛋白表达减少,UCP2 mRNA 表达下调,说明大鼠甲状腺激素减少可造成肾脏功能的改变;提示在危重病患者中,下丘脑-垂体-甲状腺轴功能状态的变化可能会加重或导致肾脏等器官功能的损害。

UCP2 是线粒体内膜上一种具有调节质子跨膜转运作用的阴离子转运蛋白,广泛表达于人体各种组织,包括心、肾、肺、淋巴细胞和白色脂肪组织。甲状腺激素对 UCP2 具有调节作用,近年来的基础与临床研究结果已证实,甲状腺激素调节 UCP2 的机制主要表现在基因转录和分子水平的调节^[11-14]。本研究表明,与对照组相比,甲减组大鼠肾脏 UCP2 mRNA 和蛋白表达明显下调,与国外学者报道的甲状腺激素对 UCP2 具有正向调节作用^[11]相一致。

危重病患者 NTIS 的发病机制尚未完全明确,可能与以下几个原因有关:危重病患者处于严重的病理状态及经常处于饥饿状态,谷胱甘肽作为 5'-脱碘酶的辅助酶活性降低,使三碘甲状腺原氨酸(T₃)

生成减少;垂体甲状腺素轴功能改变导致血清甲状腺素(T₄)、T₃ 水平降低,甲状腺素结合球蛋白、白蛋白生成减少或与甲状腺素亲和力下降,细胞核受体及受体后激素作用降低;另外,机体应激状态时皮质醇分泌增多,抑制外周组织 T₄ 转为 T₃^[15]。同时,体内 T₄ 代谢清除率加快,而反三碘甲状腺原氨酸(rT₃)廓清率下降,致无生物活性 rT₃ 增高^[16],其临床意义被认为是疾病状态下储存能量的适应性反应。由此可见,危重病患者 T₃、T₄、TSH 减少是由于多因素造成,而甲状腺激素减少可以引起肾脏等重要器官的改变,影响其生长、结构、功能及特异性基因产物的生物合成。

近年来人们逐渐认识到甲状腺激素减少还与细胞凋亡密切相关,可导致大鼠甲状腺、心肌、大脑皮质和海马等组织细胞的凋亡^[17]。但在危重病患者中,有关甲状腺激素减少时肾脏细胞是否发生了凋亡目前尚不明确。本研究中仅从线粒体 UCP2 表达改变角度,对甲状腺激素减少大鼠肾脏细胞凋亡机制中的一部分进行初步探讨,而甲状腺激素不仅作用于线粒体,还参与内质网等亚细胞结构重要蛋白的合成与分解的调节,且各凋亡通路之间又存在细胞间通讯。在甲状腺激素减少时所致的肾脏细胞凋亡当中是否还有其他抗凋亡因子、细胞周期调节因子等参与,都有待于进一步研究。

总之,本研究表明在甲状腺激素减少大鼠肾脏中存在 UCP2 表达下调现象。这提示在危重病患者中,甲状腺功能状态的变化可能与肾脏功能的损害有一定的关系。

参考文献

- [1] Suvarna JC, Fande CN. Serum thyroid hormone profile in critically ill children. Indian J Pediatr, 2009, 76: 1217-1221.
- [2] Lechan RM. The dilemma of nonthyroidal illness syndrome. Acta Biomed, 2008, 79: 165-171.
- [3] Warner MH, Beckett GJ. Mechanisms behind the non-thyroidal illness syndrome; an update. J Endocrinol, 2010, 205: 1-13.
- [4] Tognini S, Marchini F, Dardano A, et al. Non-thyroidal illness

- syndrome and short-term survival in a hospitalised older population. *Age Ageing*, 2010, 39:46-50.
- [5] Cini G, Carpi A, Mechanick J, et al. Thyroid hormones and the cardiovascular system: pathophysiology and interventions. *Biomed Pharmacother*, 2009, 63:742-753.
- [6] Kostopanagiotou G, Kalimeris K, Mourouzis I, et al. Thyroid hormones alterations during acute liver failure: possible underlying mechanisms and consequences. *Endocrine*, 2009, 36:198-204.
- [7] 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. *Crit Care*, 2009, 13: R147.
- [8] Abozenah H, Shueb S, Sabry A, et al. Relation between thyroid hormone concentration and serum levels of interleukin-6 and interleukin-10 in patients with nonthyroidal illness including chronic kidney disease. *Iran J Kidney Dis*, 2008, 2:16-23.
- [9] den Hollander JG, Wulkan RW, Mantel MJ, et al. Correlation between severity of thyroid dysfunction and renal function. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2005, 62:423-427.
- [10] 张丽丽, 练涛, 李昭瑛. 甲状腺激素对仔鼠大脑皮质和海马细胞凋亡的影响. *中国地方病学杂志*, 2006, 25:254-256.
- [11] Gjedde S, Gormsen LC, Riis AL, et al. Reduced expression of uncoupling protein 2 in adipose tissue in patients with hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010, 95: 3537-3541.
- [12] 崔莹, 张玉想, 李春学, 等. 血必净注射液对脓毒症肾脏损伤大鼠一氧化氮及其合酶作用的影响. *中国危重病急救医学*, 2009, 21:497-498.
- [13] 刘勇, 林建东, 肖雄箭, 等. 乌司他丁预处理对脓毒症大鼠肾组织基因表达的影响. *中国危重病急救医学*, 2010, 22:547-552.
- [14] 李鑫, 马晓春. 血必净注射液对脂多糖诱导大鼠肾脏微血管内皮细胞组织因子表达的影响及机制探讨. *中国中西医结合急救杂志*, 2009, 16:218-222.
- [15] 杨年红, 王重建, 许明佳, 等. UCPs 和 PPAR γ 2 基因在饮食诱导大鼠肥胖抵抗中的作用. *卫生研究*, 2005, 34:556-558.
- [16] 黄文庆, 张孟贤. 危重患者 APACHE II 评分与甲状腺激素水平的关系. *中国危重病急救医学*, 2002, 14:300-302.
- [17] Huang XW, Yin HM, Ji C, et al. Effects of perinatal hypothyroidism on rat behavior and its relation with apoptosis of hippocampus neurons. *J Endocrinol Invest*, 2008, 31:8-15.

(收稿日期:2010-08-29)

(本文编辑:李银平)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

《中国危重病急救医学》杂志对运用统计学方法的有关要求

- 1 统计学符号:按 GB 3358-1982《统计学名词及符号》的有关规定,统计学符号一律采用斜体。
- 2 研究设计:应告知研究设计的名称和主要方法。例如:调查设计分为前瞻性、回顾性还是横断面调查研究;实验设计应告知具体的设计类型,如自身配对设计、成组设计、交叉设计、析因设计、正交设计等;临床试验设计应告知属于第几期临床试验,采用了何种盲法措施等。主要做法应围绕重复、随机、对照、均衡 4 个基本原则概要说明,尤其要告知如何控制重要非试验因素的干扰和影响。
- 3 资料的表达与描述:用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表达近似服从正态分布的定量资料,用中位数(四分位数间距)[$M(Q_R)$]表达呈偏态分布的定量资料。用统计表时,要合理安排纵横标目,并将数据的含义表达清楚。用统计图时,所用统计图的类型应与资料性质相匹配,并使数轴上刻度值的标法符合数学原则。用相对数时,分母不宜小于 20,要注意区分百分率与百分比。
- 4 统计学分析方法的选择:对于定量资料,应根据所采用的设计类型、资料所具备的条件和分析目的,选用合适的统计学分析方法,不应盲目套用 t 检验和单因素方差分析。对于定性资料,应根据所采用的设计类型、定性变量的性质和频数所具备的条件及分析目的,选用合适的统计学分析方法,不应盲目套用 χ^2 检验。对于回归分析,应结合专业知识和散布图,选用合适的回归类型,不应盲目套用简单直线回归分析;对具有重复实验数据检验回归分析资料,不应简单化处理;对于多因素、多指标资料,要在一元分析的基础上,尽可能运用多元统计分析方法,以便对因素之间的交互作用和多指标之间的内在联系做出全面、合理的解释和评价。
- 5 统计结果的解释和表达:当 $P < 0.05$ (或 $P < 0.01$) 时,应说对比组之间的差异具有统计学意义,而不应说对比组之间具有显著性(或非常显著性)差异;应写明所用统计学方法的具体名称(如:成组设计资料的 t 检验、两因素析因设计资料的方差分析、多个均数之间两两比较的 q 检验等),统计量的具体值(如: $t = 3.45$, $\chi^2 = 4.68$, $F = 6.79$ 等);在用不等式表示 P 值的情况下,一般情况下选用 $P > 0.05$, $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 3 种表达方式,无须再细分为 $P < 0.001$ 或 $P < 0.0001$ 。当涉及总体参数(如总体均数、总体率等)时,在给出显著性检验结果的同时,应再给出 95% 可信区间。

《中国危重病急救医学》杂志对图表的要求

作者投稿时,原稿中若有图(表),每幅图表应单占 1 页,集中附于文后,分别按其在正文中出现的先后次序连续编号。每幅图图表应冠有图(表)题。说明性的文字应置于图(表)下方注释中,并在注释中标明图表中使用的全部非公知公用的缩写。线条图应墨绘在白纸上,高宽比例以 5:7 为宜。以计算机制图者应提供激光打印图样。照片图要求有良好的清晰度和对比度;图中需标注的符号(包括箭头)请用另纸标上,不要直接写在照片上。每幅图的背面应贴上图号、方向及作者姓名。若刊用人像,应征得本人的书面同意,或遮盖其能被辨认出系何人的部分。大体标本照片在图内应有尺度标记。病理照片要求注明染色方法和放大倍数。图表中如有引自他刊者,应注明出处。电子版投稿中图片建议采用 JPG 格式。

关于表格,建议采用三横线表(顶线、表头线、底线),如遇有合计和统计学处理内容(如 t 值、 P 值等),则在此行上面加一条分界横线。表内数据要求同一指标有效位数一致,一般按标准差的 1/3 确定有效位数。