

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 24520131153463

UDC _____

廈門大學

硕士学位论文

甲亢性心脏病中 T4 对心磷脂合成及 TREK-1 和
KCNQ1 的影响

Effects of T4 on the Synthesis of Cardiolipin
and TREK-1 , KCNQ1 Potassium Channels
in Hyperthyroid Heart Disease

郭凡

指导教师姓名: 叶本兰教授

专业名称: 生理学

论文提交日期: 2016 年 5 月

论文答辩时间: 2016 年 5 月

学位授予日期:

答辩委员会主席: _____

评阅人: _____

2016 年 7 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(心磷脂在甲亢性心脏功能变化中的作用及其钾离子调控途径的作用机制)课题(组)的研究成果,获得(国家自然科学基金 81170727 号项目)课题(组)经费或实验室的资助,在(厦门大学医学院生理学科)实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月

缩略语索引

英文缩写	英文全名	中文全名
H9C2	H9c2 (2-1)	大鼠心肌细胞
HHD	Hyperthyroid heart disease	甲亢性心脏病
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
T4	3,5,3',5'-tetraiodothyronine	四碘甲腺原氨酸
CL 18: 1	Cardiolipin18:2	心磷脂 18:2 (不饱和)
CL 18: 2	Cardiolipin14:0	心磷脂 14:0 (饱和)
CL 14: 0	Cardiolipin18:1	心磷脂 18:1 (不饱和)
TH	Thyroid hormones	甲状腺激素
T3	3,5-triiodothyronine	甲状腺素 T3
FT4	Free thyroxine	血清游离甲状腺素
FT3	Free triiodothyronine	游离三碘甲状腺原氨酸
FBS	Fetal Bovine Serum	胎牛血清
RAAS	Renin-angiotensin-aldosterone System	肾素-血管紧张素-醛固酮系统
PBS	Phosphate Buffered Saline	磷酸盐缓冲液
CLS	Cardiolipin synthase	心磷脂合酶
PLA2	Phospholipase A ₂	磷脂酶 A ₂
TREK-1	Two-pore domain potassium channel	双孔钾离子通道
KCNQ1	KvLQT1	慢速延迟整流钾离子通道
LQTS	Long Q T Syndrome	长 QT 间期综合征
IKs	Slow delayed rectifier potassium channels	慢速延迟整流钾离子通道
PTU	Propylthiouracil	丙基硫氧嘧啶

摘要

甲状腺功能亢进性心脏病是指在甲状腺功能亢进症时，甲状腺激素对心脏的直接或间接作用所致的心脏扩大、心功能不全、心房纤颤、心绞痛甚至心肌梗死等一系列心血管症状和体征的一种内分泌代谢紊乱性心脏病，已证实心磷脂

(Cardiolipin, CL) 在甲亢性心脏功能变化中起作用。心磷脂合酶 (CLS) 是心磷脂从头合成过程的关键酶，而磷脂酶 A2 (PLA2) 在心磷脂重构过程中发挥重要作用。双孔钾通道 TREK-1 在静息膜电位的形成、复极过程和调控细胞兴奋性方面发挥重要作用，KCNQ1 钾通道是心肌细胞复极化平台期的重要成分，二者都与心律失常密切相关。为了探究在甲亢性心脏病中 CLS 和 PLA2 是否受到甲状腺激素 T4 的调控进而导致心磷脂含量发生改变，以及心功能变化中 TREK-1 和 KCNQ1 钾离子通道如何受到 T4 的影响，本研究沿用课题组的小鼠甲亢模型，从在体实验上进行探讨。同时在离体实验中检测 TREK-1 通道的变化，采用心肌细胞株 H9C2 以及 H9C2 心磷脂合酶基因敲除细胞系，建立 T4 和心磷脂模型，探讨心磷脂是否直接参与此过程。结果发现：

一、体内实验中心磷脂合酶 (CLS) 和磷脂酶 A2 (PLA2) 在甲亢组的心脏组织中表达含量均降低，甲减组含量增加，二者的表达情况几乎一致。

二、体内实验中 TREK-1 通道在甲亢组的表达含量减少，甲减组表达量显著增加。体外实验中，正常 H9C2 细胞内 T4 可以促进 TREK-1 通道的表达，而 CL 对 TREK-1 的影响较小，但 T4 与 CL 结合可显著增加 TREK-1 的含量；CLS 基因敲除细胞内 TREK-1 的表达水平降低，外加 T4 和 CL 未产生明显影响。

三、体内实验中 KCNQ1 通道在甲亢组表达含量下降，甲减组含量有所增加。

上述实验结果与课题组前期的研究综合表明，甲亢性心脏病中心磷脂含量的增加是通过心磷脂从头合成和重构途径中酶类的增加引起的；T4 可影响细胞的 TREK-1 和 KCNQ1 通道，这种影响可能是通过心磷脂含量的改变来实现。

关键词： T4 心磷脂 TREK-1 KCNQ1

Abstract

Hyperthyroid heart disease (HHD) is induced by excessive thyroid hormone production causing many heart diseases like arrhythmia, cardiomegaly and heart failure etc ,it's been proven that cardiolipin(CL) plays a role in HHD. Cardiolipin synthase(CLS) is the key enzyme of de novo synthesis of cardiolipin, while phospholipase A2(PLA2) plays an important role in the remodeling process. TREK-1 potassium channel contributes for the formation of the resting membrane potential, repolarization and regulating cell excitability, KCNQ1 potassium channel is the important element of the myocyte repolarization, they both are related to the arrhythmia. To figure out whether CLS and PLA2 are regulated by thyroid hormone as well as does misbalance in thyroid hormone affect the activity of TREK-1 and KCNQ1 , this study was carried out by using hyperthyroid experimental mouse model in vivo to estimate effects of T4. Meanwhile, we established a stable H9C2 cell line and CLS knock-down shH9C2 cell line to detect the expression of TREK-1 to confirm whether the cardiolipin has impact on the activity of TREK-1 and is it directly involved in the activity of T4.

The results showed that:

1. The expression of CLS and PLA2 is reduced in hyperthyroidism, while increases in hypothyroidism., the results of the two enzymes are almost consistent.
2. The expression of TREK-1 channel is reduced in hyperthyroid group, while significantly increases in hypothyroid group. T4 obviously increases expression of TREK-1 in normal H9C2 cells, CL slightly affects TREK-1 , while T4 along with CL shows significant influence . In the CLS knocked-down group, expression of TREK-1 is reduced ,T4 and CL show no effects on TREK-1.
- 3.The expression level of KCNQ1 channel drops in hyperthyroidism group , while significantly increases in hypothyroidism.

Combined with previous studies, the results suggest that cardiolipin content is increased in the hyperthyroid heart disease through the increase of enzymes in de

novo and remodeling .T4 can affect TREK-1 and KCNQ1 channel, the effects may be done by the change of cardiolipin content.

Key words : T4;cardiolipin;TREK-1;KCNQ1

厦门大学博硕士论文摘要库

目 录

缩略语索引	I
摘 要.....	I
Abstract.....	I
第一章 前 言	1
1.1 研究背景.....	1
1.1.1 甲状腺功能紊乱	1
1.1.1.1 甲状腺功能亢进性心脏病	1
1.1.1.2 甲状腺功能减退性心脏病	3
1.1.2 心磷脂及其研究进展	4
1.1.3 钾离子通道及其研究进展	7
1.1.3.1 TREK-1 钾离子通道	8
1.1.3.2 KCNQ1 钾离子通道	9
1.2 研究目的与研究意义	11
第二章 实验材料与方法	14
2.1 实验材料.....	14
2.1.1 实验细胞及动物	14
2.1.2 实验仪器与设备	14
2.1.3 实验试剂	15
2.1.4 实验试剂的配置	16
2.1.4.1 细胞消化液的配置	16
2.1.4.2 细胞冻存培养液	16
2.1.4.3 心磷脂的溶解	16
2.1.4.4 细胞水平用 T4 溶液（30mM）	17
2.1.4.5 甲亢模型用 T4 溶液（0.2mg/ml）	17
2.1.4.6 甲减模型用 PTU 溶液.....	17
2.2 实验方法.....	19

2.2.1 心肌细胞 H9C2(2-1)的传代与培养	19
2.2.2 心肌细胞 H9C2 敲低 CLS 基因细胞系构建	19
2.2.3 动物模型制备及分组	20
2.2.4 实验手术器械的准备	21
2.2.5 小鼠心脏组织的分离及称重	21
2.2.6 蛋白样品制备	21
2.2.6.1 单层贴壁细胞总蛋白的提取	21
2.2.6.2 组织中总蛋白的提取	22
2.2.7 蛋白浓度检测 (BCA 法)	22
2.2.8 Western Blotting	22
2.2.9 mRNA 样品制备	24
2.2.9.1 单层贴壁细胞总 mRNA 的提取	24
2.2.9.2 组织样本总 mRNA 的提取	24
2.2.10 mRNA 逆转录	25
2.2.11 PCR	26
2.2.12 Real Time PCR	26
2.2.13 数据统计分析	27
第三章 结果	28
3.1 CLS 在甲亢组和甲减组小鼠心脏组织中的表达	28
3.2 PLA2 在甲亢组和甲减组小鼠心脏组织中的表达	29
3.3 TREK-1 在甲亢组和甲减组小鼠心脏组织中的表达	29
3.3.1 心室组织中 TREK-1 的表达	30
3.3.2 心房组织中 TREK-1 的表达	31
3.4 TREK-1 在心肌细胞 H9C2 中的表达	32
3.4.1 TREK-1 在正常的 H9C2 细胞中的表达	32
3.4.1.1 H9C2 细胞中 T4 对于 TREK-1 通道表达的影响	32
3.4.1.2 H9C2 细胞中心磷脂对于 TREK-1 通道表达含量的影响	33
3.4.1.3 H9C2 细胞中单独 T4 处理与 T4 合并 CL 处理对 TREK-1 通道表达含量的影响对比	35

3.4.1.4 H9C2 细胞中单独 CL 处理与 T4 合并 CL 处理对 TREK-1 通道表达含量的影响对比.....	36
3.4.2 TREK-1 在 CLS 基因敲除的 H9C2 细胞中的表达.....	37
3.4.2.1 CLS 基因敲除组 (KD) 和正常组 (N) H9C2 细胞中 TREK-1 的表达.....	37
3.4.2.2 CLS 基因敲除组 (KD) H9C2 细胞中 T4 对 TREK-1 的表达影响.....	38
3.4.2.3 CLS 基因敲除组 (KD) H9C2 细胞中 CL 对 TREK-1 的表达影响.....	38
3.5 KCNQ1 在甲亢组和甲减组小鼠心脏组织中的表达.....	39
第四章 讨 论	41
4.1 心磷脂合酶和磷脂酶 A2 在在甲亢性心脏病中的变化	42
4.2 TREK-1 通道在甲亢性心脏病中的变化及心磷脂的作用机制	43
4.3 KCNQ1 通道在甲亢性心脏病中的变化	44
结 论.....	46
致 谢.....	47
参 考 文 献	48

Catalogue

Abbreviation	I
Abstract in Chinese	II
Abstract in English	III
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Background	1
1.1.1 Thyroid dysfunction.....	1
1.1.1.1 Hyperthyroid heart disease	1
1.1.1.2 Hypothyroid heart disease.....	3
1.1.2 Cardioliipin	4
1.1.3 Potassium channels	7
1.1.3.1 TREK-1 potassium channel	8
1.1.3.2 KCNQ1 potassium channel.....	9
1.2 Purpose and Significance of Study	11
Chapter 2 Material and Method	14
2.1 Material	14
2.1.1 Cells and Animals	14
2.1.2 Instruments and Equipments.....	14
2.1.3 Reagents	15
2.1.4 Preparation of Reagents	16
2.1.4.1 Preparation of Trypsin enzyme	16
2.1.4.2 Preparation of preservent solutions.....	16
2.1.4.3 Preparation of Cardioliipin.....	16
2.1.4.4 Preparation of T4 Solution for vitro studies (30mM)	17
2.1.4.5 Preparation of T4 Solution for vivo studies (0.2mg/ml)	17
2.1.4.6 Preparation of PTU Solutions for vivo studies	17
2.2 Method	19

2.2.1 Cell Culture of H9C2	19
2.2.2 Preparation of CLS gene knocked-down cells.....	19
2.2.3 Preparation of animal model	20
2.2.4 Preparation of surgical instruments	21
2.2.5 Collection and weighing of heart samples	21
2.2.6 Extraction of protein	21
2.2.6.1 Extraction of protein from cell samples	21
2.2.6.2 Extraction of protein from tissue samples	22
2.2.7 Detection of protein concentration (BCA assay)	22
2.2.8 Western Blotting	22
2.2.9 Preparation of mRNA	24
2.2.9.1 Extraction of total mRNA from cells.....	24
2.2.9.2 Extraction of total mRNA from tissue.....	24
2.2.10 Transcription of mRNA	25
2.2.11 Polymerase Chain Reaction(PCR).....	26
2.2.12 Real Time PCR	26
2.2.13 Statistical analysis	27
Chapter 3 Results.....	28
3.1 CLS in hyperthyroid and Hypothyroid heart disease	28
3.2 PLA2 in hyperthyroid and Hypothyroid heart disease	29
3.3 TREK-1 in hyperthyroid and Hypothyroid heart disease	29
3.3.1 TREK-1 in ventricle.....	30
3.3.2 TREK-1 in atrium	31
3.4 TREK-1 in H9C2 cells	32
3.4.1 TREK-1 in normal H9C2 cells	32
3.4.1.1 TREK-1 in T4 treated H9C2 cells	32
3.4.1.2 TREK-1 in CL treated H9C2 cells.....	33
3.4.1.3 TREK-1 in T4 and T4 with CL treated H9C2 cells.....	35
3.4.1.4 TREK-1 in CL and T4 with CL treated H9C2 cells	36

3.4.2 TREK-1 in CLS knocked-down shH9C2 cells	37
3.4.2.1 TREK-1 in CLS knocked-down shH9C2 cells and normal H9C2 CELLS ..	37
3.4.2.2 TREK-1 in T4 treated shH9C2 cells	38
3.4.2.3 TREK-1 in CL treated shH9C2 cells	38
3.5 KCNQ1 in hyperthyroid and Hypothyroid heart disease	39
Chapter 4 Discussion	41
4.1 CLS and PLA2 in hyperthyroid heart disease	42
4.2 TREK-1 Potassium Channel in hyperthyroid heart disease and the action mechanism of cardiolipin	43
4.3 KCNQ1 Potassium Channel in hyperthyroid heart disease	44
Conclusion	46
Acknowledgement.....	47
References.....	48

第一章 前言

1.1 研究背景

1.1.1 甲状腺功能紊乱

1.1.1.1 甲状腺功能亢进性心脏病

甲状腺功能亢进症是由于各种原因导致血循环中甲状腺激素过多而导致的以神经、循环、消化等系统兴奋性增高和代谢亢进为主要特征的一组临床综合征^[1]。近年来甲亢发病率逐年上升,成为威胁人类健康的常见病之一,属于内分泌病中的常见病。甲亢可引起多种并发症,心律失常即为甲亢性心脏病的表现之一^[2]。临床可见各种类型,如窦性心动过速、阵发性室上性心动过速、早搏、心房纤颤等,其发病机制与甲状腺激素作用于心脏有关^[3]。

甲状腺功能亢进性心脏病(甲亢性心脏病, HHD)是指过量的甲状腺激素对心脏的直接作用或通过儿茶酚胺的间接影响而引起的心律失常、心脏扩大及心力衰竭^[4]。其特点为甲亢得到完全控制后,大部分患者的心脏功能可恢复正常。甲状腺功能亢进时心律失常最常见,表现为窦性心动过速、房性期前收缩、心室扑动、心房纤颤^[5]。

甲状腺激素(TH)代谢紊乱是一种和心脏疾病及心力衰竭发展密切相关的危险因素^[6]。HHD在甲亢患者中的发病率大概为10%~20%^[7],主要表现为心律失常、心力衰竭和心脏扩大等临床表现,多发生于甲亢病程长而未得到很好治疗的病情较重的病人,尤以老年人多见^[8]。一般认为甲状腺激素的直接作用、自主神经功能紊乱、心脏基因表达异常等导致心脏生理学发生改变和血流动力学改变,从而引起HHD。

甲亢性心脏病发病机制大致有以下几点:

1 甲状腺激素的直接作用

甲亢时过多甲状腺激素直接作用于心肌,可直接促进心肌蛋白质的合成和心肌细胞的生长,而使心肌收缩增强和心输出量增加引起心肌肥大^[9]。甲亢产生的心脏功能障碍和氧化应激诱导氧化及抗氧化酶活性和蛋白质表达增加有关^[10]。甲状腺激素过多时导致蛋白质合成增多,增加心肌中Na⁺-K⁺-ATP酶的活性,提升

肌浆中 Ca^{2+} -ATP 酶的活性, 增大肌球蛋白 ATP 酶活性, 从而增强心肌收缩力和心搏量^[9]。此外甲状腺激素可直接与心肌细胞膜特异性甲状腺激素受体结合使心肌细胞环磷酸腺苷产生增加, 兴奋心肌腺苷环化酶活性, 增加受体数目和心房的应激性, 提升儿茶酚胺作用和敏感性^[11], 造成心率加快, 心肌收缩增强, 增加心脏负荷^[12]。同时甲状腺激素可以增强大脑、肝脏、心脏组织的氧化和抗氧化系统, 但增加的抗氧化活性不足以防止氧化损伤^[13]。甲状腺功能对 NT-Pro-BNP 水平也有影响, 主要是甲状腺激素的直接刺激作用^[14], 甲亢患者神经末端 B 型利钠肽 (NT-Pro-BNP) 水平低于正常人, FT4 和 FT3 独立的和 NT-PRO-BNP 水平相关, 和心输出量、心率无关^[15], 血清游离甲状腺素 (FT4) 浓度轻微变化都可能影响 HHD 心衰的程度, HHD 时心房利钠肽 (ANP) 水平显著下降, 且生理节律消失^[16]。甲状腺激素还可以引起血管内皮功能异常, 甲亢患者血管细胞黏附分子 (VCAM-1) 显著增高, 并且和 TH 水平成正相关。过量的甲状腺激素还可诱发肥厚心肌中的 Ca^{2+} 浓度比正常增加, 使心肌细胞内钙超载, 这与心肌细胞损伤有关^[17]。研究还发现过量甲状腺激素刺激可以使心房肌细胞瞬时的外向钾离子流增加, 而动物实验及体外细胞培养均发现 T3 可以减少心房 L 型 Ca^{2+} 通道的表达, 导致复极速度加快, 动作电位时程以及有效不应期缩短, 从而促使心房颤动的发生^[18]。

2 心脏基因表达异常

甲状腺激素是心脏功能和血流动力学的一个重要调节器^[18]。甲状腺激素可通过调整钙离子来调控心肌基因表达, 从而影响心脏收缩和舒张功能, 还直接作用于周围血管平滑肌, 改变左心室和动脉偶联^[19]。T3 是甲状腺激素的生理激活型, T3 对心血管系统的影响主要表现为舒张血管平滑肌, 使动脉阻力下降, 舒张压下降, 可与细胞核受体蛋白结合调整一些重要的心脏基因表达 (正调节基因包括: 肌球蛋白 (MHC)- α 重链、肌浆网 Ca^{2+} -ATP 酶; 负调节基因包括: MHC- β 、肌浆网磷酸受体蛋白)^[20], 组蛋白是 T3 调整心脏 MHC- α 转录的辅助因子^[21]。研究发现, 甲亢鼠钙通道 mRNA 基亚 a-1c 比甲状腺功能正常鼠要低, 比索洛尔对甲状腺激素介导的 mRNA 基亚 a-1c 减少。鼠心室肌细胞通过 TH 激活 L-钙通道腺嘌呤核苷酸环化酶, 在钙通道基因减少时增加 L-钙流量^[22]。在研究大鼠心脏、脑对甲状腺激素的反应的实验中发现 T3 特异地作用于大鼠心肌激动相关的钾通道基因转录 RNA^[23]。

3 自主神经功能紊乱

甲状腺激素提高心肌 β -肾上腺素受体的密度和组织对儿茶酚胺的敏感性使自主神经功能紊乱^[24]。甲亢时机体处于代谢亢进状态,导致心肌收缩力增强、心率加快、传导加速,长期负荷过重导致心脏血流动力学发生改变及心房心室增大,最终导致心力衰竭^[25]。同时外周血管阻力下降,回心血量增加,使交感神经张力增强导致冠状动脉血管痉挛发生心绞痛和心肌梗死。因此,交感神经兴奋性增强,迷走神经张力失衡是导致甲亢性心脏病的根本因素,可导致血管肾素活性增加,激活肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS),对心血管系统产生不利影响,导致心脏重构和心肌纤维化^[26]。研究发现甲亢患者心率变异性(HRV)和正常人有显著差别^[27],也有研究指出心率变异性是交感神经和迷走神经协同作用引起的心脏潜在变化,甲状腺功能亢进具有特征性的自主神经紊乱,是增高的交感神经活性降低了迷走神经的张力^[28]。

综上所述,甲亢性心脏病的发病原因主要与甲状腺激素的直接作用、心脏基因表达异常、自主神经功能紊乱等相关。

1.1.1.2 甲状腺功能减退性心脏病

甲状腺功能减退症(甲减)是指组织的甲状腺激素作用不足或缺如的一种病理状态,即由于甲状腺激素合成和分泌不足或组织利用不足而导致的全身代谢减低综合征^[29]。甲减可影响多个器官系统,临床表现多样化,其对心血管系统的影响尤为突出^[30]。甲减引起心脏损害最早是由 Zondex 于 1918 年报道的,目前认为 70%~80%的甲减伴有心血管病变^[31],其发病机制尚不十分清楚。甲减性心脏病发病隐袭、缓慢,临床可出现心悸、胸闷、气促等症状,往往掩盖了甲减的基本临床表现,至今漏诊、误诊率仍很高^[32]。

甲减性心脏病的发病机制如下:心脏是甲状腺激素(主要是 T3)的主要靶器官,甲减对心脏的代谢、结构和生理功能均产生影响。甲状腺激素不足可直接影响窦房结起搏,心肌收缩力和传导速度;也可以通过儿茶酚胺对心血管系统发挥间接作用,导致心率减慢、心电稳定性减低等心脏电活动的改变^[33]。甲减可加快心肌重构,诱导心肌细胞凋亡以及细胞间质变性,并心肌内血管床密度降低,减少心肌血液供应,促进心肌损害发展^[34]。标准的超声心动图表明,甲减患者等容

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.