

# 甲状腺功能亢进性心脏病猝死者左心室心肌连接蛋白 43 的分布改变

苏 波<sup>1</sup>, 云 鹏<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>长江大学医学院病理学教研室,湖北 荆州 434000;<sup>2</sup>长江大学临床医学院内科学教研室,湖北 荆州 434000)

**[摘要]** 目的:探讨甲亢性心脏病猝死者心肌连接蛋白 43 (myocardial connexin 43, Cx43)表达及其与猝死的关系。方法:挑选长江大学医学院病理学教研室 2010~2012 年尸体解剖案例 26 例,分为 2 组,每组各 13 例。①实验组:男 9 例,女 4 例,年龄 20~52 岁,平均年龄 34.7 岁,均为甲亢性心脏病猝死。②非心源性死亡对照组:男 7 例,女 6 例,年龄 22~60 岁,平均年龄 38.8 岁。每例心脏进行常规病理学检查并取材后,运用免疫组织化学和图像分析技术,检测左心室肌的 Cx43 染色情况。结果:实验组心肌 Cx43 阳性颗粒数分布于心室肌细胞内或细胞侧-侧连接处;对照组心肌 Cx43 阳性颗粒数分布于闰盘。定量检测并经统计分析发现,实验组 Cx43 蛋白染色阳性的面积和与对照组均有非常显著的差异( $P < 0.01$ ),而平均光密度比较,两组之间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论:甲亢性心脏病猝死者心室肌 Cx43 蛋白的分布发生明显改变,甲亢性心脏病的猝死可能与 Cx43 的分布变化有一定的关系。

**[关键词]** 连接蛋白 43;甲亢性心脏病;免疫组织化学;法医病理学

**[中图分类号]** R541.85

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2013)01-086-04

**doi:**10.7655/NYDXBNS20130118

## Changes of connexin 43 distribution in myocardial cell of the left ventricle in the cases of sudden-death due to hyperthyroid heart disease

Su Bo<sup>1</sup>, Yun Peng<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Pathology, School of Medicine, Yangtze University, Jingzhou 434023; <sup>2</sup>Department of Internal Medicine, School of Clinic Medicine, Yangtze University, Jingzhou 434000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the relationship between the expression of myocardial connexin 43 (Cx43) in myocardial cell of the left ventricle in the cases of sudden-death due to hyperthyroid heart disease. **Methods:** Selected 26 autopsy cases from the Department of Forensic Medicine School of medicine, Yangtze University during 2010 to 2012. The cases were divided into two groups, 13 cases in each group. ① Experimental group: 9 cases male, 4 female; age range is 20 to 52 with average age is 34.7 years old, Suddenly died of hyperthyroid heart disease and sudden death. ② Control group: 7 males, 6 females, age range is 22-60 with average age is 38.8 years old. After conventional pathological examination, Cx43 in the left ventricular muscle of each case was detected with immunohistochemic staining and image analysis. **Results:** In control group, the Cx43 positive staining were found in the intercalated disc. In experimental group, the Cx43 positive staining were found in the cytoplasm or side-side connection of ventricular myocyte, and the positive area of Cx43 positive particles were significantly decreased than control group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** The expression of myocardial connexin (Cx43) was significantly decreased in sudden-death patients with hyperthyroid heart disease, which suggests the decreased expression of Cx43 may have relation with sudden death of hyperthyroid heart disease.

**[Key words]** connexin 43; hyperthyroid heart disease; immunohistochemistry; forensic pathology

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(1): 086-089]

甲状腺功能亢进性心脏病(甲亢性心脏病)是由于超生理量的甲状腺激素作用于心脏,使心肌代

谢加速,心肌缺氧和营养物质缺乏,常导致心肌肥厚。心肌肥厚不仅导致心脏结构从可逆性改变向不可逆性改变发展,更是心血管系统疾病病死率升高的独立危险因素<sup>[1]</sup>。近年来,有关连接蛋白(Connexin, Cx),特别是对连接蛋白 43 (connexin 43,

**[基金项目]** 湖北省教育厅资助项目(XD2010185)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: 66489754@qq.com

Cx43)在心源性猝死及扩张型心肌病中的研究日趋深入<sup>[2-4]</sup>。但是,关于 Cx43 与甲亢性心脏病猝死者之间的关系尚无文献报道。本实验通过免疫组织化学法比较甲亢性心脏病猝死者与非心源性死亡者左心室心肌细胞内 Cx43 的表达差异,探讨 Cx43 与甲亢性心脏病猝死的关系。

## 1 资料与方法

### 1.1 资料

从长江大学医学院病理学教研室 2010~2012 年有完整的病历资料、尸检记录、病理组织学切片及尸检报告书的尸体解剖案例中挑选出 26 例,分为 2 组。甲亢性心脏病猝死组(实验组)13 例,甲亢性心脏病为猝死的唯一直接死因,纳入标准:①左心室壁厚度 $\geq 1.2$  cm,②心脏重量 $\geq 400$  g。其中男 9 例,女 4 例,年龄 20~52 岁,平均年龄 34.7 岁。非心源性死亡组(对照组)13 例,纳入标准:①左心室壁厚度 $< 1.2$  cm,②心脏重量 $< 350$  g。其中男 7 例,女 6 例,年龄 22~60 岁,平均年龄 38.8 岁,交通事故重型颅脑外伤引起的即时死 11 例,急性重症肝炎猝死 1 例,自发性蛛网膜下腔出血猝死 1 例。排除标准:排除高血压性心脏病、原发性心肌病、冠状动脉狭窄、心肌梗死等导致心肌损害的相关疾病。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 病理学检查及标本制备

两组尸体均在死后 24 h 内 4℃保存,1~3 d 内解剖,提取心脏后沿血流方向剪开,10%福尔马林固定。每例心脏标本称重,测量左心室壁厚度,观察左右冠状动脉主干及分支是否有狭窄;并在左心室前壁纵向取材,常规石蜡包埋,切片(厚度 4  $\mu$ m),苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色。

#### 1.2.2 免疫组织化学染色

采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法(strept avidin peroxidase conjunction method, SP 法),兔抗人 Cx43 多克隆抗体(71-0700,美国 Invitrogen 公司)工作液浓度为 1:200,其余操作步骤按免疫组织化学试剂盒(85-9643,美国 Invitrogen 公司)说明书。每例均以 PBS 液代替一抗作为空白对照。

#### 1.2.3 图像分析

采用 Image-Pro Plus6.0 图像分析系统,对每张 Cx43 免疫组化染色切片的阳性表达颗粒进行定量测量。每张切片放大 400 倍,随机选取 5 个视野,测量 Cx43 阳性面积值和平均光密度值。

### 1.3 统计学方法

所有数据均以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,用 SPSS 18.0 统计软件对数据进行统计分析,组间差异比较采用 *t* 检验分析, $P \leq 0.05$  认为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 心脏的大体病变及 HE 染色

实验组:心脏平均重 513 g(410~680 g);肉眼观察心脏轻度增大,心尖部钝圆,各瓣膜未见器质性病变,乳头肌和肉柱增粗,左心室壁增厚,左心室平均厚度 1.47 cm(1.30~2.20 cm),左右冠状动脉通畅,未见明显粥样斑块或血栓;镜下观察部分心肌细胞变粗,心肌细胞核增大,圆形或椭圆形,核深染色,2 例有心肌间质纤维化。对照组:心脏平均重 294 g(210~346 g);肉眼观察心脏增大不明显,各瓣膜未见器质性病变,左心室平均厚度 1.00 cm(0.80~1.10 cm),左右冠状动脉通畅,未见明显粥样斑块或血栓;镜下观察心肌细胞结构未见明显异常。

### 2.2 Cx43 免疫组织化学染色

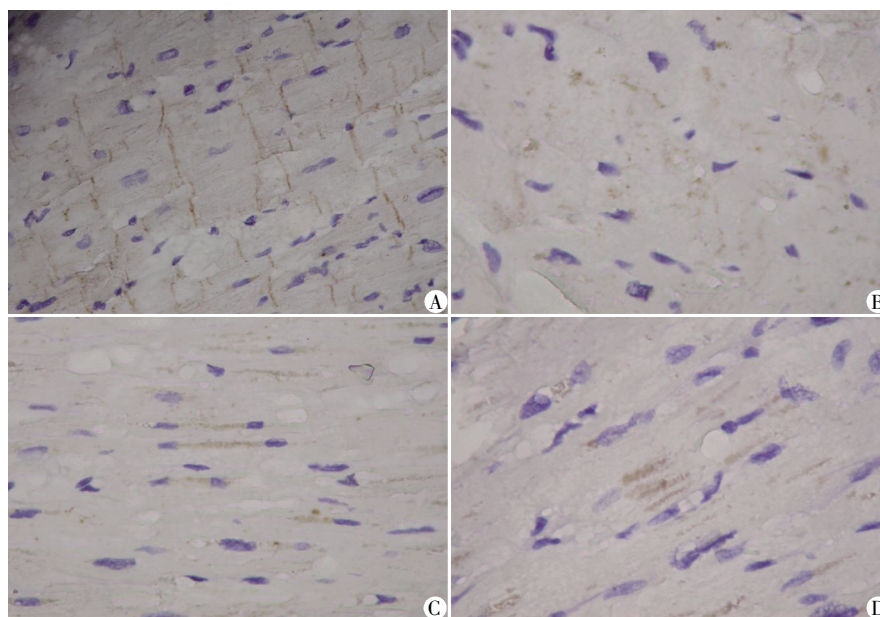
对照组:Cx43 阳性颗粒呈棕黄色,呈带状密集分布于心室肌细胞端-端连接处,与心肌细胞长轴垂直,也就是闰盘所在的区域(图 1A)。实验组:Cx43 阳性颗粒分布不均,有的呈点状散在分布于细胞内(图 1B),有的部分分布于细胞胞浆内与细胞长轴平行(图 1C)或分布于细胞侧-侧连接处(图 1D)。

### 2.3 图像分析及统计学结果

SPSS18.0 定量检测两组 Cx43 染色的阳性面积值和平均光密度值,各组数据呈正态分布。配对样本 *t* 检验结果显示,实验组与对照组 Cx43 阳性面积值相比  $t = 3.588, P = 0.004$ ,差异有统计学意义;实验组与对照组平均光密度值相比, $t = 2.006, P = 0.07$ ,差异无统计学意义(表 1)。

## 3 讨论

心肌细胞间起电耦联作用的是缝隙连接(gap junction, GJ),主要分布在闰盘,缝隙连接是心肌细胞维持电生理搏动的结构基础<sup>[5]</sup>。每一个 GJ 通道是由位于细胞膜上的两个连接小体对接而成。每个连接小体由 6 个哑铃形称为 Cx 的蛋白亚单位,构成一窄小的六棱形小孔道,它允许离子电流和分子量小于 1 000 的小分子通过。人类的心肌细胞主要表达 3 种 Cx 即 Cx40、Cx43 和 Cx45,心室肌细胞表达最多的是 Cx43。Cx43 的正常表达与分布是缝隙连接电耦联功能正常、心脏正常电活动和协调舒缩的



A: 对照组心肌 Cx43 阳性颗粒密集分布于闰盘处; B: 实验组心肌 Cx43 颗粒呈点状散在分布于细胞内; C: 实验组心肌 Cx43 呈颗粒状分布于细胞内, 与心肌细胞长轴平行; D: 实验组心肌 Cx43 分布于细胞侧-侧连接处。

图 1 2 组心肌细胞 Cx43 表达情况(免疫组化 SP 法,  $\times 400$ )

Figure 1 Myocardial Cx43 expression of two groups(IHC SP staining,  $\times 400$ )

表 1 免疫组织化学方法检测 2 组心肌细胞 Cx43 表达情况

Table 1 The Cx43 expression of myocardial cells in two groups

组别	阳性面积值	平均光密度值
实验组	$1.539 \pm 0.185^*$	$0.129 \pm 0.007$
对照组	$1.856 \pm 0.287$	$0.136 \pm 0.005$

与对照组比较,  $*P < 0.01$ 。

重要保证。Peters 等<sup>[6]</sup>通过对犬心肌梗死灶心外膜下边缘区存活心肌的研究,发现在能诱发持续性室性心动过速的犬心肌上,从梗死灶到心外膜全层的心肌中 Cx43 分布紊乱,通过激光共聚焦显微镜发现 Cx43 紊乱分布的部位正是折返环路的共同通路所在的位置。这项研究直接证明了 Cx43 紊乱分布和折返环路的关系,在分子水平上阐明了折返性心律失常的解剖学基础。

本实验首次对甲亢性心脏病猝死者左心室肌标本的 Cx43 表达情况进行研究,通过图像分析发现,对照组心室肌 Cx43 阳性颗粒着色一致,均匀分布于心室肌细胞端-端连接处,与心肌细胞长轴垂直;实验组心室肌 Cx43 阳性表达颗粒分布不均。统计学分析结果显示,实验组 Cx43 蛋白阳性面积与对照组的差异非常显著,而两组的平均光密度无差异。说明甲亢性心脏病猝死者的心室肌 Cx43 的分布模式发生显著改变,而 Cx43 的数量没有发生改变。推

测原因可能为: ①长期甲状腺素刺激可增加心肌  $Ca^{2+}$ /钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II ( $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II, CaMK II) 的活性<sup>[7]</sup>, CaMK II 的过度表达又可引起心肌肥大<sup>[8]</sup>, 形成心室重构; ②甲状腺素与甲状腺素反应元件结合后,心肌局部血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 增加<sup>[9]</sup>, 一方面心肌组织上与 G 蛋白耦联的 Ang II 的 I 型 (angiotensin II type1, AT1) 受体受到 Ang II 直接作用,使胞内  $Ca^{2+}$  浓度升高并激活蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC), 促使与心肌肥厚相关的蛋白质表达,形成心肌肥厚<sup>[10]</sup>, 另一方面,增多的 Ang II 刺激层黏连蛋白和纤维连接素 mRNA 及蛋白表达,增强基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 对细胞外基质的降解,形成心肌纤维化<sup>[11]</sup>; ③甲状腺素促进基质金属蛋白酶诱导因子合成,诱导 MMPs 表达增加,促进心肌纤维化的发生发展<sup>[12]</sup>。心室重构及心肌纤维化导致心肌间质纤维增生,进而挤压、包裹 Cx43,使 Cx43 的分布发生显著改变。

生理状态下磷酸化 Cx43 (p-Cx43) 和非磷酸化 Cx43 蛋白共同存在于细胞膜上,完成缝隙连接通道功能的是 p-Cx43<sup>[13]</sup>。通过对 Wistar 大鼠的心肌梗死模型研究发现,发生梗死的心肌细胞中 Cx43 发生去磷酸化<sup>[14]</sup>。本次研究中实验组的 p-Cx43 是否发生了去磷酸化形成非磷酸化 Cx43 进而导致缝隙连接

电耦联功能下降,而 Cx43 总蛋白量没有发生改变,有待进一步研究。

本研究的不足之处,应纳入生前罹患甲亢性心脏病但死于非心源性死亡的案例作为第二对照组,但是符合上述标准的案例太少,达不到统计学要求,故在本研究中只设一组对照。

综上所述,甲亢性心脏病患者可能由于心肌细胞端-端连接处 Cx43 分布模式的改变导致心肌细胞间失耦联,使纵向传导速度下降,传导的各向异性发生显著改变,从而导致传导阻滞和折返传导,并进一步诱发心律失常,从而引起猝死。

#### [参考文献]

- [1] Sanganalmath SK, Barta J, Takeda N, et al. Antiplatelet therapy mitigates cardiac remodeling and dysfunction in congestive heart failure clue to myocardial infarction[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2008, 86(4): 180-189
- [2] 罗 斌,程灵犀,林俊莲,等.青壮年猝死综合症心肌细胞内 Cx43 的表达[J]. *中国法医学杂志*, 2010, 25(3): 159-161
- [3] 陈新山,金秀文,张益鹞,等.心脏病猝死者心肌连接蛋白 43 的免疫组化染色观察[J]. *中国法医学杂志*, 2006, 21(2): 76-78
- [4] 陈新山,徐顺清,郭 晖,等.扩张型心脏病患者心肌 Cx43 基因表达的研究[J]. *华中科技大学学报:医学版*, 2011, 4(1): 88-94
- [5] Sever NJ, Bruce AF, Dupont E, et al. Remodelling of gap junctions and connexin expression in diseased myocardium[J]. *Cardiovasc Res*, 2008, 80(1): 9-19
- [6] Peters NS, Coromilas J, Severs NJ, et al. Disturbed connexin43 gap junction distribution correlates with the location of reentrant circuits in the epicardial border zone of healing canine infarcts that cause ventricular tachycardia [J]. *Circulation*, 1997, 95(4): 988-996
- [7] 李 超,刘善红,张家明,等.长期甲状腺素刺激对大鼠心肌  $Ca^{2+}$ /钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II 的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2012, 28(1): 147-151
- [8] 曲辅政,孙书勤,姜泽强,等.辛伐他汀对心力衰竭家兔钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II 的影响[J]. *中华高血压杂志*, 2009, 17(4): 334-338
- [9] 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
- [10] Liang B, Leenen FH. Prevention of salt-induced hypertension and fibrosis by AT1-receptor blockers in Dahl S rats[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2008, 51(5): 457-466
- [11] Praddaude F, Cousins SW, Pecher C, et al. Angiotensin II induced hypertension regulates AT 1 receptor subtypes and extracellular matrix turnover in mouse retinal pigment epithelium[J]. *Exp Eye Res*, 2009, 89(1): 109-118
- [12] Yoon YW, Kwona HM, Hwang KC, et al. Upstream regulation of matrix metalloproteinase by EMMPRIN; extracellular matrix metalloproteinase inducer in advanced atherosclerotic plaque[J]. *Atherosclerosis*, 2005, 180(1): 37-44
- [13] Cao Z J, Xu X, Que LL, et al. Dephosphorylation of cardiomyocyte Cx43 is associated with myocardial ischemia and reperfusion injury[J]. *JUMU*, 2009, 23(3): 163-167
- [14] 温华知,江 洪,胡笑容,等.美托洛尔对大鼠心肌梗死周边区缝隙连接蛋白 43 的影响[J]. *武汉大学学报:医学版*, 2010, 31(2): 170-173

[收稿日期] 2012-10-30