

大鼠心肺复苏后甲状腺的损伤及其影响因素

周乃胜, 杨兴易^{*}, 林兆奋, 赵 良, 王学斌

(第二军医大学长征医院急救科, 解放军急救医学中心, 上海 200003)

[摘要] 目的: 观察心肺复苏后大鼠甲状腺滤泡细胞损伤情况并研究其影响因素。方法: 采用模拟窒息(肌注琥珀酰胆碱 1.5 mg/kg)合并冰氯化钾(0.5 mol/L, 1.2 ml/kg)停跳液致大鼠心跳骤停 5 min 后开始心肺复苏的动物模型。健康雄性大鼠 40 只, 随机分为 5 组: 对照组(仅行假手术)、复苏后 3 h 组、复苏后 6 h 组、复苏后 12 h 组、复苏后 24 h 组。采用酶微粒子捕捉法、荧光偏振法测定各组大鼠血清中 T_3 、 T_4 、TSH 的浓度; 采用透射电镜观察甲状腺滤泡细胞的损伤情况; 采用比色法测定甲状腺组织丙二醛(MDA)含量及超氧化物歧化酶(SOD)、 $Na^+ - K^+ - ATPase$ 活力。结果: 复苏后 3 h 血清中 T_3 、 T_4 浓度开始降低, 并在随后 24 h 持续在低水平状态, 而血清中 TSH 浓度仅在复苏后 12 h 出现短暂降低; 复苏后各组甲状腺组织中 MDA 含量较对照组显著升高($P < 0.05$), 同时 SOD 及 $Na^+ - K^+ - ATPase$ 活力显著降低($P < 0.05$); 透射电镜下可见复苏后大鼠甲状腺滤泡细胞损伤表现。结论: 心跳骤停及心肺复苏后大鼠存在急性甲状腺滤泡细胞损伤; 氧自由基(OFR)介导的脂质过氧化、细胞能量代谢障碍在复苏后甲状腺滤泡细胞损伤中起着重要作用。

[关键词] 心肺复苏; 甲状腺损伤; 丙二醛; 超氧化物歧化酶

[中图分类号] R 605.974 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2004)11-1173-04

Thyroid injury and its influencing factors after cardiopulmonary resuscitation in rats

ZHOU Nai-Sheng, YANG Xing-Yi^{*}, LIN Zhao-Fen, ZHAO Liang, WANG Xue-Bin (Department of Emergency, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Critical Care Medicine Center of PLA, Shanghai 200003, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the thyroid follicular cells injury and its influencing factors after cardiopulmonary resuscitation (CPR) in rats. **Methods:** Sprague-Dawley rat models of cardiac arrest (CA) and CPR were induced by asphyxiation combined with iced KCl. Forty male SD rats were randomized into 5 groups: control group (sham), post-resuscitation 3 h, 6 h, 12 h, 24 h groups. Except for control group, rats were reperfused spontaneously for 3 h, 6 h, 12 h, 24 h after CPR. Serum concentration of T_3 , T_4 , thyroid-stimulating hormone (TSH) were determined in each group. The chromatometry, the quantity of maleic dialdehyde (MDA) and enzyme activity of superoxide dismutase (SOD) and $Na^+ - K^+ - ATPase$ in thyroid tissues were analyzed using chromatometry in all groups. **Results:** Three hours after resuscitation, the serum concentration of T_3 and T_4 began to decline and remained in a lower level during the following subsequent 24 h, while there was only a transient decrease in the serum concentration of TSH on 12 h. Under TEM, injury of follicular epithelial cells was observed in post-resuscitation rats. MDA increased greatly after CPR ($P < 0.05$), meanwhile, enzyme activity of SOD and $Na^+ - K^+ - ATPase$ in thyroid declined significantly compared to those of control group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Acute thyroid follicular cells injury happens in rats after CPR. OFR-triggered lipid peroxidation, cellular energy metabolism disturbance and apoptosis may be principal manifestations of thyroid follicular cells injury in post-resuscitation rats.

[KEY WORDS] cardiopulmonary resuscitation; thyroid injury; maleic dialdehyde; superoxide dismutase

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(11): 1173-1176]

* 心跳骤停及心肺复苏过程中, 机体经历循环停止、严重缺氧、酸中毒和缺血再灌注等一系列的应激过程, 大量神经内分泌因子参与这一过程。早在 20 世纪 70 年代人们就已注意到许多危重病患者都伴有血清甲状腺素水平的下降^[1], 认为激素水平下降的程度与患者预后密切相关^[2]。

本实验通过观察心肺复苏后 SD 大鼠甲状腺滤泡细胞的超微结构与功能的变化, 并检测组织中丙二醛(MDA)含量、超氧化物歧化酶(SOD)及 $Na^+ - K^+ - ATPase$ 活力。从氧化应激、能量代谢等不同层

面研究心肺复苏后甲状腺组织细胞的损伤情况及其可能的影响因素。

1 材料和方法

1.1 实验动物 健康 SD 雄性大鼠 48 只, 体质量

* [基金项目] 上海市科技发展基金攻关计划(001119019)。

[作者简介] 周乃胜(1965-), 男(汉族), 硕士, 主治医师。现在解放军第 401 医院干部病房科, 青岛 266071。

E-mail: cnsqd401@yahoo.com.cn

*Corresponding author. E-mail: xyxprofessor@126.com

(272.03 ± 31.42) g, 由中国科学院上海分院动物实验中心提供。预实验 8 只; 其余 40 只随机分为 5 组: 对照组(仅行假手术)、复苏后 3 h 组、复苏后 6 h 组、复苏后 12 h 组、复苏后 24 h 组, 每组 8 只。

1.2 心肺复苏模型制备 术前禁食不禁水 12 h, 称量, 氯胺酮 150 mg/kg 经腹腔注射麻醉, 颈部正中切口, 行气管插管和左侧颈外静脉、右侧颈总动脉置管, 监测有创动脉血压, 监测心电图、呼吸及直肠温度。操作完成并稳定 20 min 后经颈静脉注射肌松剂(琥珀酰胆碱, 1.5 mg/kg)抑制呼吸, 同时注射 0.5 mol/L 冰氯化钾(4, 1.2 ml/kg)停跳液致大鼠心跳骤停^[3], 持续 5 min 后行心肺复苏, 出现自主心律、脉搏波且收缩压 60 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa), 持续 10 min 以上判定为自主循环恢复(ROSC)。所有实验参数设计和记录均参照复苏实验研究的 Utstein 模式^[4]。对照组仅进行插管等手术操作, 不进行心跳骤停和心肺复苏。由于麻醉和手术意外, 对照组和复苏后 12 h 组各死亡 1 只大鼠。

1.3 标本采集 复苏后 6、12、24 h 组再次以氯胺酮麻醉, 分离左侧颈外静脉采血 8 ml 后剪开, 经右侧颈总动脉灌注生理盐水 200 ml (对照组和复苏后 3 h 组不需麻醉直接进行上述操作); 取一侧甲状腺组织, 用锐利刀片切成 1 mm³ 大小 3 块(每组随机选 1 只大鼠)放入 2.5% 戊二醛液中固定冷藏, 用于 TEM 观察组织细胞超微结构; 剩余甲状腺组织液氮冷藏, 用于检测 MDA、SOD、Na⁺-K⁺-ATPase。

1.4 指标检测

1.4.1 甲状腺功能测定 试剂盒由美国雅培公司生产, 采用酶微粒子捕捉法、荧光偏振法测定, 在 AXSYM 酶微粒子发光全自动分析仪上检测血清 T₃、T₄、TSH 浓度。

1.4.2 甲状腺组织中 MDA 含量及 SOD、Na⁺-K⁺-ATPase 活力的测定 试剂盒购自南京建成生物工程研究所, 严格按说明书操作。

1.4.3 电镜检查 4、2.5% 戊二醛固定 4 h, 0.1 mol/L PBS 液漂洗, 2% 锇酸后固定 2 h, 乙醇丙酮梯度脱水, 812 包埋剂包埋, 超薄切片, 常规铅铀染色, 日立 HE-800 透射电镜下观察。

1.5 统计学处理 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较用 *t* 检验, 多组间两两比较用 SNK-*q* 检验。统计学分析采用 SPSS 11.0 统计软件。

2 结果

2.1 各组间血清中 T₃、T₄ 及 TSH 变化 复苏后各时相血清中 T₃、T₄ 浓度逐渐降低, 较对照组有显著差异 ($P < 0.05$), 6 h 组较 3 h 组血清中 T₃、T₄ 浓度显著下降 ($P < 0.05$), 6 h 组与 12 h 组比较, 血清中 T₃、T₄ 浓度持续较低状态, 无显著变化, 但 24 h 组较 12 h 组血清中 T₃、T₄ 浓度再次显著下降 ($P < 0.05$); 复苏后 12 h 血清 TSH 浓度较对照组明显下降 ($P < 0.05$), 其余各组间血清中 TSH 浓度无显著差异(表 1)。

表 1 各实验组血清中 T₃、T₄ 及 TSH 浓度

Tab 1 Serum concentration of T₃, T₄ and TSH in different groups

Group	n	$(\bar{x} \pm s)$		
		T ₃ (pB/ng · mL ⁻¹)	T ₄ (pB/μg · L ⁻¹)	TSH (zB/μIU · mL ⁻¹)
Control	7	0.56 ± 0.056	51.1 ± 3.9	1.61 ± 0.40
CPR				
3 h	8	0.47 ± 0.08*	35.1 ± 4.4*	1.50 ± 0.36
6 h	8	0.31 ± 0.07*	28.1 ± 5.5*	1.46 ± 0.35
12 h	7	0.30 ± 0.07*	27.9 ± 5.1*	1.17 ± 0.27*
24 h	8	0.23 ± 0.05*	15.5 ± 3.5*	1.44 ± 0.35

CPR: Cardiopulmonary resuscitation; * $P < 0.05$ vs control group; $P < 0.05$ vs CPR 3 h group; $P < 0.05$ vs CPR 12 h group

2.2 电镜结果 通过透射电镜(TEM)我们观察到对照组甲状腺滤泡细胞基本正常: 细胞低矮, 呈扁平状, 核为圆形或椭圆形, 位于中央, 染色质分布均匀, 胞质内有丰富的粗面内质网, 线粒体呈短粗状, 数量不多。而复苏后可见明显甲状腺滤泡细胞损伤: 细胞核变形, 染色质边集, 核膜破裂, 核固缩; 线粒体肿大, 基质变淡, 嵴变短甚至消失, 部分空泡化; 粗面内质网扩张, 池内分离; 细胞内胶质颗粒减少(图 1)。

2.3 甲状腺组织中 Na⁺-K⁺-ATPase、SOD 活力及 MDA 含量的变化 Na⁺-K⁺-ATPase 活力于复苏后 3 h 明显下降 ($P < 0.05$), 3、6、12、24 h 持续在较低水平, 组间比较无显著性差异; 甲状腺组织中 MDA 含量于复苏后 3 h 有显著升高 ($P < 0.05$), 6 h 再次显著升高(与 3 h 组比较 $P < 0.05$), 6、12、24 h 组间无显著性差异。而组织中 SOD 活力于复苏后 3 h 有显著降低 ($P < 0.05$), 并且在 6、12、24 h 有继续降低趋势(表 2)。

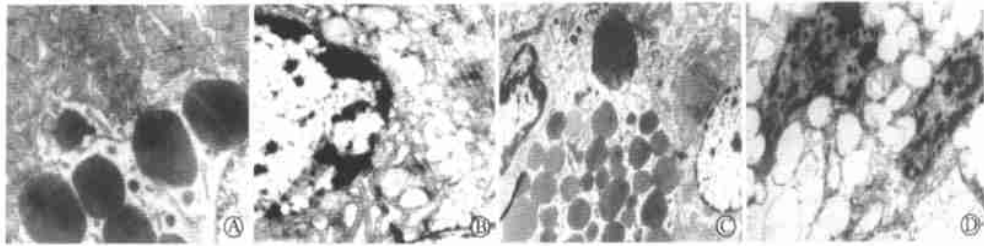


图 1 甲状腺滤泡细胞超微结构的变化

Fig 1 Ultrastructural alterations of thyroid follicular cells

A: Normal ultrastructure of thyroid follicular cells in control group ($\times 3\ 500$); B: The ultrastructure of thyroid follicular cells after CPR 6 h. Nuclear shrinkage with swelling of mitochondria and rough endoplasmic reticulum ($\times 6\ 000$); C: The ultrastructure of thyroid follicular cells after CPR 12 h. Nuclear shrinkage and pyknosis, margination of nuclear chromatin. The structure of organelle tumoil ($\times 3\ 000$); D: The ultrastructure of thyroid follicular cells after CPR 24 h. Nuclear shrinkage with swelling of mitochondria and rough endoplasmic reticulum, vacuolization of mitochondria and margination of nuclear chromatin, a paucity of colloid droplets in the follicle lumen ($\times 3\ 500$)

表 2 甲状腺组织中 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$, SOD 活力及 MDA 含量

Tab 2 Enzyme activity of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$, SOD and content of MDA in thyroid tissue

($\bar{x} \pm s$)				
Group	n	$\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ ($\text{zB}/\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	MDA ($\text{mB}/\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$)	SOD ($\text{zB}/\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$)
Control	7	1.06 \pm 0.17	0.49 \pm 0.09	11.10 \pm 0.98
CPR				
3 h	8	0.55 \pm 0.08*	0.87 \pm 0.12*	9.59 \pm 1.22*
6 h	8	0.50 \pm 0.09*	1.33 \pm 0.16*	8.99 \pm 1.24*
12 h	7	0.44 \pm 0.12*	1.39 \pm 0.16*	8.99 \pm 1.21*
24 h	8	0.46 \pm 0.08*	1.52 \pm 0.21*	7.80 \pm 1.14*

CPR: Cardiopulmonary resuscitation; * $P < 0.05$ vs control group; $P < 0.05$ vs CPR 3 h group

3 讨论

3.1 心肺复苏后血清甲状腺素浓度的改变 甲状腺是人体最大的内分泌腺体, 甲状腺素与机体许多器官的活动有关, 通过下丘脑-腺垂体-甲状腺轴组成的完整自控回路对甲状腺功能的调节, 血浆中甲状腺激素的浓度得以维持相对稳定。但是, 许多非甲状腺疾病在疾病发展过程中都会伴有血清中甲状腺素浓度的改变, 报道较多的疾病有严重饥饿、创伤、休克、骨髓移植、多器官功能障碍综合征 (MODS) 等, 称之为“非甲状腺疾病病态综合征 (NTIS)”^[5, 6]。Factor 等^[7]对健康犬诱发室颤 9 min 后实施复苏, 复苏后 12 h 检测到血清中 T_3 、 T_4 及游离 T_3 、 T_4 浓度明显降低, 而 rT_3 浓度显著升高, 甚至在心跳骤停仅 30 s 即可测得类似结果, 认为心肺复苏后出现 NTIS。我们通过对模拟窒息合并冰氯化钾输注致大鼠心跳骤停心肺复苏后血清甲状腺素浓度的测定发

现, 复苏后大鼠血清 T_3 、 T_4 浓度显著下降, 而血清中 TSH 水平无明显改变, 与文献报道基本一致。

3.2 心肺复苏后甲状腺滤泡细胞损伤及其影响因素 既往大多数学者认为 NTIS 血清甲状腺激素改变基于如下因素出现的短暂改变: (1) 下丘脑-垂体-甲状腺轴功能紊乱; (2) 甲状腺激素与血浆载体蛋白的结合障碍; (3) 甲状腺激素被甲状腺外组织吸收; (4) 甲状腺激素生成和降解发生改变; (5) 甲状腺激素受体水平发生改变^[8]。而未见报道甲状腺本身损伤在导致血清甲状腺激素水平改变中的作用。我们从形态上观察复苏后甲状腺的变化, 电镜下见复苏后甲状腺滤泡上皮细胞核变形, 染色质边集, 核膜破裂, 核固缩; 线粒体肿大, 基质变淡, 嵴变短甚至消失, 部分空泡化; 粗面内质网扩张, 池内分离; 细胞内胶质颗粒减少。证实心跳骤停及心肺复苏后造成了急性甲状腺滤泡细胞损伤。

多因素参与了心肺复苏后甲状腺细胞损伤, 缺血再灌注 (I/R) 可能是导致损伤的主要原因。本实验从氧自由基 (OFR) 介导的脂质过氧化损伤、细胞能量代谢障碍等方面探讨心跳骤停及心肺复苏后甲状腺滤泡细胞损伤的影响因素。

3.2.1 氧自由基介导的脂质过氧化损伤 心跳骤停及心肺复苏后机体经历 I/R 过程, 缺血期间组织细胞内能量迅速耗竭导致细胞内外离子失衡, Ca^{2+} 大量内流, 从而引起黄嘌呤脱氢酶大量转变成黄嘌呤氧化酶, 经黄嘌呤氧化酶途径产生的超氧阴离子 (O_2^-) 在甲状腺再灌注期间有氧条件下, 并在 SOD 作用下或经 Haber-Weiss-Fenton 反应产生大量的过氧化氢 (H_2O_2) 和羟自由基 ($\text{OH} \cdot$)。这些自由基作用

于甲状腺内生物膜中富含的多不饱和脂肪酸(PU-FA),引起链式反应(脂质过氧化反应)并产生大量的脂质过氧化物(LPO)及其降解产物MDA等,这些物质可以造成甲状腺组织细胞生物膜的破坏而进一步丧失功能,甲状腺功能随之受损;同时组织中源性清除OFR的酶系SOD等则因大量消耗而活力降低^[9]。

目前,直接测定OFR的电子自旋共振(ESR)方法由于要求高、价格昂贵等因素而应用受限^[10],但通过测定甲状腺组织内MDA和SOD水平可以间接反映甲状腺组织内OFR反应情况和甲状腺滤泡细胞损伤程度。本实验复苏后各时相甲状腺组织中MDA含量均显著增高,最高达对照组的3.10倍,同时SOD活力显著降低,而且组织中MDA和SOD水平与滤泡细胞凋亡程度密切相关,结合电镜下甲状腺细胞生物膜结构的严重损害,表明OFR介导的脂质过氧化反应在复苏后甲状腺滤泡细胞损伤中起重要作用。

3.2.2 细胞能量代谢障碍对甲状腺组织损伤及其功能变化的影响 心跳骤停导致全身各组织器官低灌注和微循环障碍,甚至无灌注和微循环衰竭。若血供只能维持正常的15%~25%,则组织内葡萄糖代谢受到影响,ATP迅速减少,细胞代谢紊乱,此时如不能提高血供,细胞将发生不可逆损害;细胞内线粒体氧分压<0.13 kPa时,占耗氧90%的电转移机制即告丧失,表现为氧化磷酸化失偶联,ATP形成渐趋停止,随之出现线粒体肿胀、外膜延长,终致衬膜和其他细胞器断裂破坏,出现细胞DNA、RNA损害和乳酸中毒^[11]。本实验复苏后大鼠甲状腺组织 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活力显著低于对照组,复苏后24h较对照组 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活力降低56.6%。证实复苏后大鼠存在细胞能量代谢障碍。钠泵功能的衰竭,使 K^+ 自细胞内外逸, Na^+ 和水进入细胞内,导致细胞水肿;因 Na^+ 大量内流,使在正常情况下的 $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ 交换出现翻转,加重细胞内 Ca^{2+} 超载,从而引起一系列病理、生化改变,加重甲状腺滤泡细胞损伤。

I从血液转运进入甲状腺滤泡上皮细胞内,是依赖 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活动提供的能量来完成的主动转运过程。我们推测,由于 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活力降低使甲状腺滤泡细胞聚碘功能障碍,可能是引起

复苏后大鼠NTIS的因素之一。

甲状腺激素的储存有两个特点,一是储存于细胞外(滤泡腔内);二是储存量大,可供机体利用50~120d之久,在激素储存量上居首位。但是甲状腺激素的释放必须先通过吞饮作用以甲状腺球蛋白形式进入滤泡上皮,然后经过水解释放入血。甲状腺生物膜的脂质过氧化损伤及能量代谢障碍,而使甲状腺素释放受阻可能也是复苏后NTIS的重要机制之一。

[参考文献]

- [1] Iervasi G, Pingitore A, Landi P, et al. Low T_3 syndrome: a strong prognostic predictor of death in patients with heart disease[J]. *Circulation*, 2003, 107(5): 708-713
- [2] Girvent M, Maestro S, Hernandez R, et al. Euthyroid sick syndrome, associated endocrine abnormalities, and outcome in elderly patients undergoing emergency operation[J]. *Surgery*, 1998, 123(5): 560-567.
- [3] Li MM, Payne RS, Reid KH, et al. Correlates of delayed neuronal damage and neuroprotection in a rat model of cardiac-arrest-induced cerebral ischemia[J]. *Brain Res*, 1999, 826(1): 44-52
- [4] 陈尔真, 蒋健. 复苏实验研究Ustein模式[J]. *中国急救医学*, 1999, 19(2): 70-73
- [5] Eber B, Schumacher M, Langsteiger W, et al. Changes in thyroid hormone parameters after acute myocardial infarction[J]. *Cardiology*, 1995, 86(2): 152-156
- [6] Pavlou HN, Kliridis PA, Panagiotopoulos AA, et al. Euthyroid sick syndrome in acute ischemic syndromes[J]. *Angiology*, 2002, 53(6): 699-707.
- [7] Factor MA, Mayor GH, Nachreiner RF, et al. Thyroid hormone loss and replacement during resuscitation from cardiac arrest in dogs[J]. *Resuscitation*, 1993, 26(2): 141-162
- [8] Chopra IJ. Euthyroid sick syndrome: is it a misnomer[J]? *Clin Endocrinol Metab*, 1997, 82(2): 329-334
- [9] Gando S, Nanzaki S, Morimoto Y, et al. Out-of-hospital cardiac arrest increases soluble vascular endothelial adhesion molecules and neutrophil elastase associated with endothelial injury[J]. *Intensive Care Med*, 2000, 26(1): 38-44
- [10] Iijima T, Bauer R, Hossmann KA. Brain resuscitation by extracorporeal circulation after prolonged cardiac arrest in cats[J]. *Intensive Care Med*, 1993, 19(2): 82-88
- [11] Libberthson RR, Nagel EL, Hirschman JC, et al. Prehospital ventricular defibrillation. Prognosis and follow-up course[J]. *Engl J Med*, 1974, 291(7): 317-321.

[收稿日期] 2004-06-14

[修回日期] 2004-09-16

[本文编辑] 孙岩