

• 论 著 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.07.002

网络首发 <https://kns.cnki.net/KCMS/detail/50.1097.R.20191226.0926.008.html> (2019-12-26)

## 孕鼠甲状腺激素水平对胎鼠心肌细胞凋亡的影响研究

范稣圳,陶 波,刘浙波,崔胜宇,徐 林<sup>△</sup>

(武汉大学心血管病研究所/心血管病湖北省重点实验室/武汉大学人民医院心内科,武汉 430060)

**[摘要]** **目的** 探讨妊娠期母体甲状腺激素(TH)水平异常对子代心脏损伤的作用及可能的机制。**方法** 12 只 SD 雌鼠分为对照组、左甲状腺素(L-T<sub>4</sub>)组、丙硫氧嘧啶(PTU)组。与雄鼠合笼后,L-T<sub>4</sub> 和 PTU 分别添加于孕鼠饮水中。收集各组孕鼠血清,ELISA 法测定孕鼠血清甲状腺素(T<sub>4</sub>)和三碘甲状腺原氨酸(T<sub>3</sub>)水平。记录胎鼠体质量、心、肾质量。各组胎鼠心脏通过 HE 染色和醋酸铀-枸橼酸铅染色观察其形态学和超微结构的改变,采用 TUNEL 法评估其心肌细胞凋亡水平,Western blot 法检测心肌组织 Bcl-2、Bax、胱天蛋白酶(caspase)-3、caspase-8、caspase-9 水平及细胞质细胞色素 c(Cyt-c)、凋亡诱导因子(AIF)等线粒体途径介导凋亡相关因子的水平。**结果** 各组孕鼠未见畸形胎和死胎。与对照组相比,L-T<sub>4</sub> 组孕鼠血清 T<sub>4</sub>、T<sub>3</sub> 水平增高,PTU 组孕鼠血清 T<sub>4</sub>、T<sub>3</sub> 水平降低,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。与对照组比较,L-T<sub>4</sub> 组、PTU 组胎鼠心肌组织可见形态学和超微结构改变,TUNEL 染色阳性面积和强度增加,Bax、caspase-3、caspase-8、caspase-9 表达及细胞质 Cyt-c、AIF 水平增高,Bcl-2 表达降低,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。**结论** 孕鼠 TH 水平的过高或过低均会增加胎鼠心肌细胞凋亡,且与心肌细胞线粒体损伤有一定关系。

**[关键词]** 甲状腺激素;细胞凋亡;妊娠期甲状腺功能异常;子代心肌细胞

**[中图分类号]** R541.1

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2020)07-1036-06

## Effects of maternal thyroid hormone level on the apoptosis of fetal cardiomyocytes in rats

FAN Suzhen,TAO Bo,LIU Zhebo,CUI Shengyu,XU Lin<sup>△</sup>

(Department of Cardiology,Institute of Cardiovascular Diseases of Wuhan University/Hubei Key Laboratory of Cardiovascular Diseases/People's Hospital of Wuhan University,Wuhan,Hubei 430060,China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effects of abnormal maternal thyroid hormone (TH) level during pregnancy on cardiac injury of fetal rats and the underlying mechanisms. **Methods** Twelve Sprague-Dawley (SD) female rats were divided into the control group, the L-thyroxine (L-T<sub>4</sub>) group, the propylthiouracil (PTU) group. L-T<sub>4</sub> and PTU were added in drinking water for pregnant rats after mating, respectively. Serum of pregnant rats was collected from each group. The serum TH (T<sub>4</sub>) and triiodothyronine (T<sub>3</sub>) were determined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Body weight, heart weight and kidney weight were measured in fetal rats. The morphological and ultrastructural changes of fetal rats' heart were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining and uranyl acetate-lead citrate staining. The apoptosis of cardiomyocytes was observed by TdT mediated dUTP nick end labeling (TUNEL). The levels of Bcl-2, Bax, caspase-3, caspase-8, caspase-9 in myocardial tissue and cytoplasmic cytochrome c (Cyt-c), apoptosis-inducing factor (AIF) in cytoplasm, which were related to mitochondrial pathway-mediated apoptosis, were detected by Western Blot. **Results** No deformed fetus and stillbirth were observed. Compared with the control group, serum T<sub>4</sub> and T<sub>3</sub> levels increased in the L-T<sub>4</sub> group and decreased in the PTU group ( $P<0.05$ ). Compared with the control group, morphological and ultrastructural changes were observed in myocardial tissue of fetal rat in the L-T<sub>4</sub> group and the PTU group, the positive area and intensity of TUNEL staining increased. And the expressions of Bax, caspase-3, caspase-8, caspase-9, cytoplasmic Cyt-c and AIF increased, and the expressions of Bcl-2 decreased, with statistically significant differences ( $P<0.05$ ). **Conclusion** High or low level of maternal thyroid hormone may cause the increase of cardiomyocytes apoptosis in fetal rats, and has a certain correlation with mitochondrial of cardiomyocytes.

**[Key words]** thyroid hormone; apoptosis; gestational dysfunction of thyroid; cardiomyocyte of fetus

血液循环中的甲状腺激素(thyroid hormone, TH)包括甲状腺素(thyroxine,  $T_4$ )和三碘甲腺原氨酸(3,5,3'-triiodothyronine,  $T_3$ )。妊娠期 TH 水平异常可由妊娠本身引起,或见于原发甲状腺功能异常合并妊娠。妊娠期甲状腺功能异常是较为常见的妊娠并发症之一。母体于妊娠期出现一系列的生理性变化,如肾小球滤过率增加、碘相对或绝对缺乏及甲状腺代偿性增生、人绒毛膜促性腺激素和雌激素水平增加、血清甲状腺素结合球蛋白增多等,使得妊娠期母体血清促甲状腺激素(TSH)、 $T_4$  和  $T_3$  水平出现波动,即妊娠期甲状腺功能异常<sup>[1-2]</sup>。而包括 Graves 病和桥本甲状腺炎在内的原发甲状腺功能异常多与自身免疫有关。

临床资料表明,由于 TH 可通过胎盘屏障,妊娠期母体过高或过低的血 TH 不仅与先天畸形、死胎、流产或早产有关<sup>[2]</sup>,而且心脏是 TH 的靶器官之一,异常的血 TH 水平可能是造成新生儿心功能损伤的危险因素<sup>[3-5]</sup>。此外,由于包括 TSH 受体抗体在内的自身抗体可通过胎盘,原发甲状腺功能异常患者妊娠可能会造成胎儿的甲状腺功能异常。目前,对于妊娠合并甲状腺功能亢进的治疗多采用丙硫氧嘧啶(PTU)、甲巯咪唑(methimazole, MMI)等抗甲状腺药物(antithyroid drugs, ATD)。对于妊娠合并甲状腺功能减退则采用左甲状腺素( $L-T_4$ )替代治疗。但妊娠 11~12 周后,胎儿甲状腺逐渐发育,通过胎盘的 ATD 和外源性  $L-T_4$  也可能造成胎儿甲状腺功能异常;而且 PTU 和 MMI 等常用 ATD 存在较严重的致畸风险<sup>[6]</sup>。可见,妊娠期血 TH 水平异常的治疗方案存在较多的局限性。

TH 是动物正常生长发育所必需的激素之一,与动物心血管发育关系密切。既往实验研究表明,TH 不仅与心脏肌浆网钙泵、肌球蛋白重链、肌钙蛋白、电压依赖性钾通道等蛋白的表达密切相关<sup>[7-9]</sup>,而且与心肌细胞的凋亡相关<sup>[10-11]</sup>。本文旨在探讨孕鼠 TH 水平对胎鼠心肌细胞凋亡的影响及其机制,以求寻找更佳的干预方式。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

雌性 SD 大鼠 12 只,80 日龄,体质量 230~280 g;雄性 SD 大鼠 6 只,90 日龄,体质量 330~380 g,均购自北京维通利华实验动物技术有限公司。大鼠于室温 24~26℃、相对湿度 45%~55% 的无特殊病原体环境饲养,耳标法标记,予生长繁殖饲料,自由饮水。本研究经武汉大学人民医院动物实验伦理委员会审核[WDRM 动(福)第 20181011 号]。

### 1.2 试剂与仪器

$L-T_4$ (上海源叶生物科技有限公司);PTU(美国 Sigma-Aldrich 公司);兔抗大鼠 Bcl-2、胱天蛋白酶(cysteine aspartate-specific protease, caspase)-3、caspase-8、caspase-9、凋亡诱导因子(apoptosis-indu-

cing factor, AIF)抗体(英国 Abcam 公司);内参蛋白 GAPDH 抗体(英国 Abcam 公司);兔抗大鼠 Bax、细胞色素 c(Cytochrome c, Cyt-c)抗体(美国 CST 公司);HRP 标记的山羊抗兔抗体(南非 ASPEN 公司);细胞核蛋白与细胞质蛋白抽提试剂盒、RIPA 裂解液(上海碧云天生物技术有限公司);血清  $T_4$  与  $T_3$  ELISA Kit 试剂盒(武汉云克隆生物科技有限公司);H-7800 透射电子显微镜(日本 HITACHI 公司)。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 动物分组与造模

将雌鼠分对照组、 $L-T_4$  组、PTU 组,每组 4 只。用阴道涂片法观察发情周期,2:1 将雌、雄鼠合笼,次日阴道涂片可见活性精细胞为受孕,记为 E0.5。 $L-T_4$  组自 E9.5~18.5 按 16 mg/L 的浓度在雌鼠饮水中加入  $L-T_4$ <sup>[12]</sup>,PTU 组自 E0.5~18.5 按 3 000 mg/L 的浓度在饮水中加入 PTU<sup>[13]</sup>。E18.5 见孕鼠腹部明显膨隆、分笼,于 E19.5 对孕鼠在颈椎脱臼后取材。

#### 1.3.2 标本采集

孕鼠仰卧固定,备皮、消毒,开腹。于孕鼠下腔静脉取血 1 mL。直视下剪开孕鼠子宫,取出胎鼠。测量胎鼠体质量。胎鼠于直视下开胸、腹,取出心脏、左侧肾脏。挤出心腔内残血,用生理盐水冲洗,滤纸吸干水分,测量心、肾质量。

#### 1.3.3 孕鼠 TH 水平测定

孕鼠血标本 4℃、3 000 r/min 条件下离心 10 min 取上清液,-80℃保存。用血清  $T_4$  与  $T_3$  ELISA Kit 试剂盒测定血  $T_4$ 、 $T_3$  水平,操作步骤参照说明书。

#### 1.3.4 胎鼠心肌细胞形态学与超微结构观察

将心脏用 10%氯化钾溶液冲洗,使其充分舒张。切取心肌组织,用 4%多聚甲醛溶液固定 48 h。石蜡包埋、连续切片,行苏木精-伊红(HE)染色后于正置显微镜下观察。取 3 组切片,用转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记测定(TUNEL)法观察细胞凋亡情况。于正置荧光显微镜下观察心肌凋亡细胞,400 倍的放大倍数下,随机选取 10 个视野,计算视野内心肌细胞凋亡细胞核数目及总细胞核数目,二者的比值为凋亡指数。心肌组织用 2.5%戊二醛溶液和 1%锇酸溶液固定,经脱水、浸透后,用 812 树脂聚合包埋、超薄切片,行醋酸铀-枸橼酸铅染色,于透射电子显微镜下观察心肌细胞超微结构。

#### 1.3.5 Western blot 法检测凋亡相关蛋白水平

胎鼠心肌组织块漂洗后,冰浴、匀浆。用 RIPA 裂解液提取组织蛋白以测定 Bcl-2、Bax、caspase-3、caspase-8、caspase-9,细胞核蛋白与细胞质蛋白抽提试剂盒提取细胞质蛋白以测定 Cyt-c、AIF。4℃12 000 r/min 离心 5 min,收集上清液,BCA 法测定蛋白浓度,以确定上样量。样品加入蛋白上样缓冲液后沸水浴 5 min。制备凝胶,以 GAPDH 为内参<sup>[14-15]</sup>恒压电泳,至溴酚蓝到达胶板下沿。恒流转膜 1 h,5%

脱脂牛奶室温封闭 1 h,在稀释后的一抗中 4 ℃ 过夜, TBST 漂洗。稀释的二抗孵育 1 h,TBST 漂洗。滴加新配制的 ECL 混合液到膜蛋白面,曝光。将胶片进行扫描存档,AlphaEaseFC 软件处理系统分析目标带的光密度值。以目的蛋白灰度值/GADPH 灰度值表述目的蛋白的相对表达水平。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 22.0 统计软件进行分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用  $t$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 孕鼠妊娠与生产情况

饲养期间,各组孕鼠未见早产、流产、死产。E 19.5 各组孕鼠未见宫腔内死胎和明显畸形胎鼠。

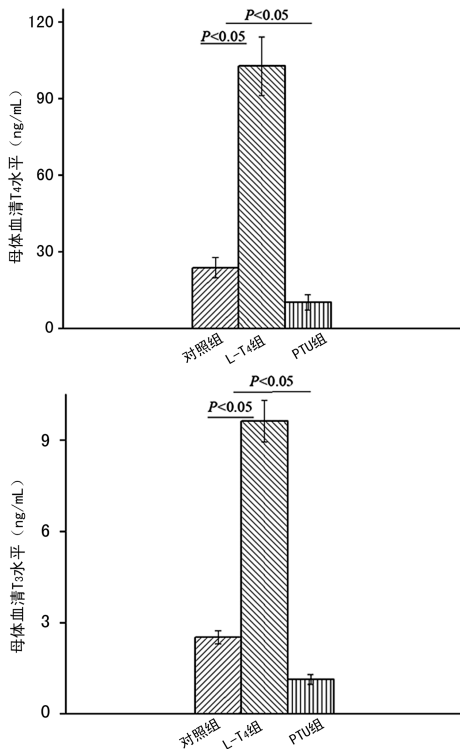


图 1 各组孕鼠血清 T<sub>4</sub>、T<sub>3</sub> 水平比较

2.2 孕体 TH 水平测定

L-T<sub>4</sub> 组孕鼠血清 T<sub>4</sub>、T<sub>3</sub> 水平较对照组增高, PTU 组较对照组降低,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),见图 1。

2.3 胎鼠体质量和心、肾质量比较

L-T<sub>4</sub> 组胎鼠体质量、心质量和对照组比较,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ );PTU 组体质量、心质量和对照组比较,差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ );L-T<sub>4</sub> 组、PTU 组肾质量与对照组比较,差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),见图 2。

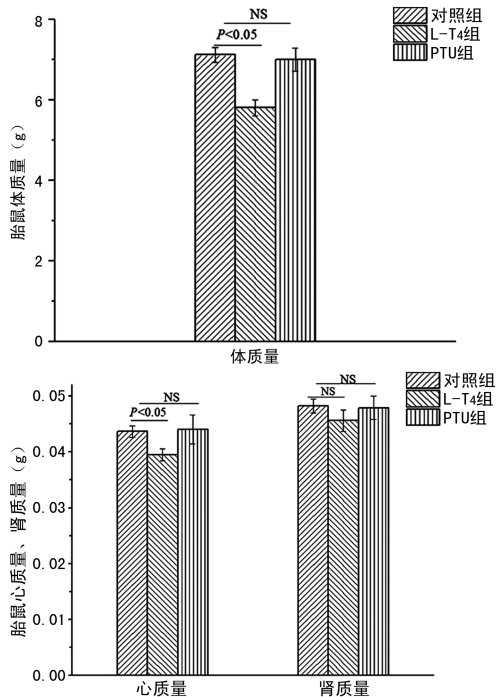


图 2 各组胎鼠体质量和心、肾重量比较

2.4 胎鼠心肌组织形态学改变

对照组心肌细胞排列有序,心肌纤维和横纹尚不清晰,细胞核居中,细胞染色均匀;L-T<sub>4</sub> 组心肌细胞排列紊乱,间隙增宽,间质水肿,细胞质淡染,心肌纤维和横纹尚不清晰;PTU 组可见心肌细胞稀疏、间隙增宽,间质水肿,心肌纤维和横纹尚不清晰,细胞质淡染,见图 3。

取 3 组胎鼠心肌细胞组织切片,用 TUNEL 法观察细胞凋亡情况。正常细胞细胞核呈蓝色荧光,凋亡细胞细胞核呈红色荧光,见图 4。细胞凋亡指数 = 凋亡细胞细胞核/正常细胞细胞核  $\times 100\%$ ,L-T<sub>4</sub> 组、PTU 组凋亡指数与对照组比较,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),见图 5。

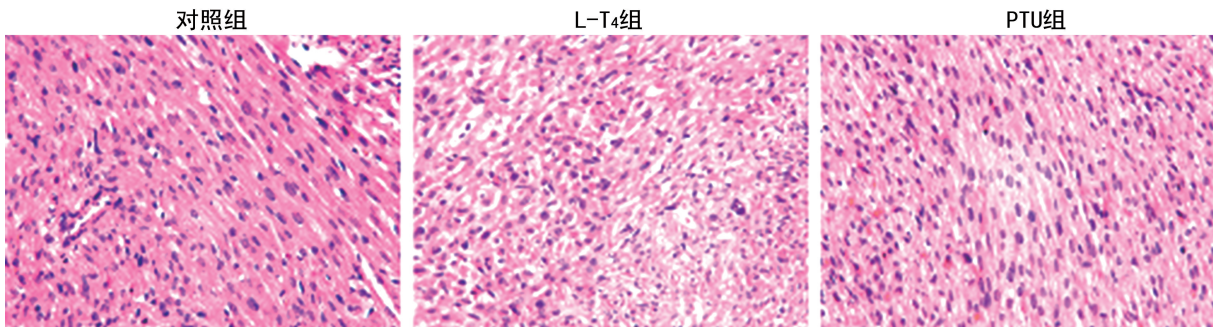


图 3 各组胎鼠心肌组织切片光镜观察结果(HE 染色  $\times 400$ )



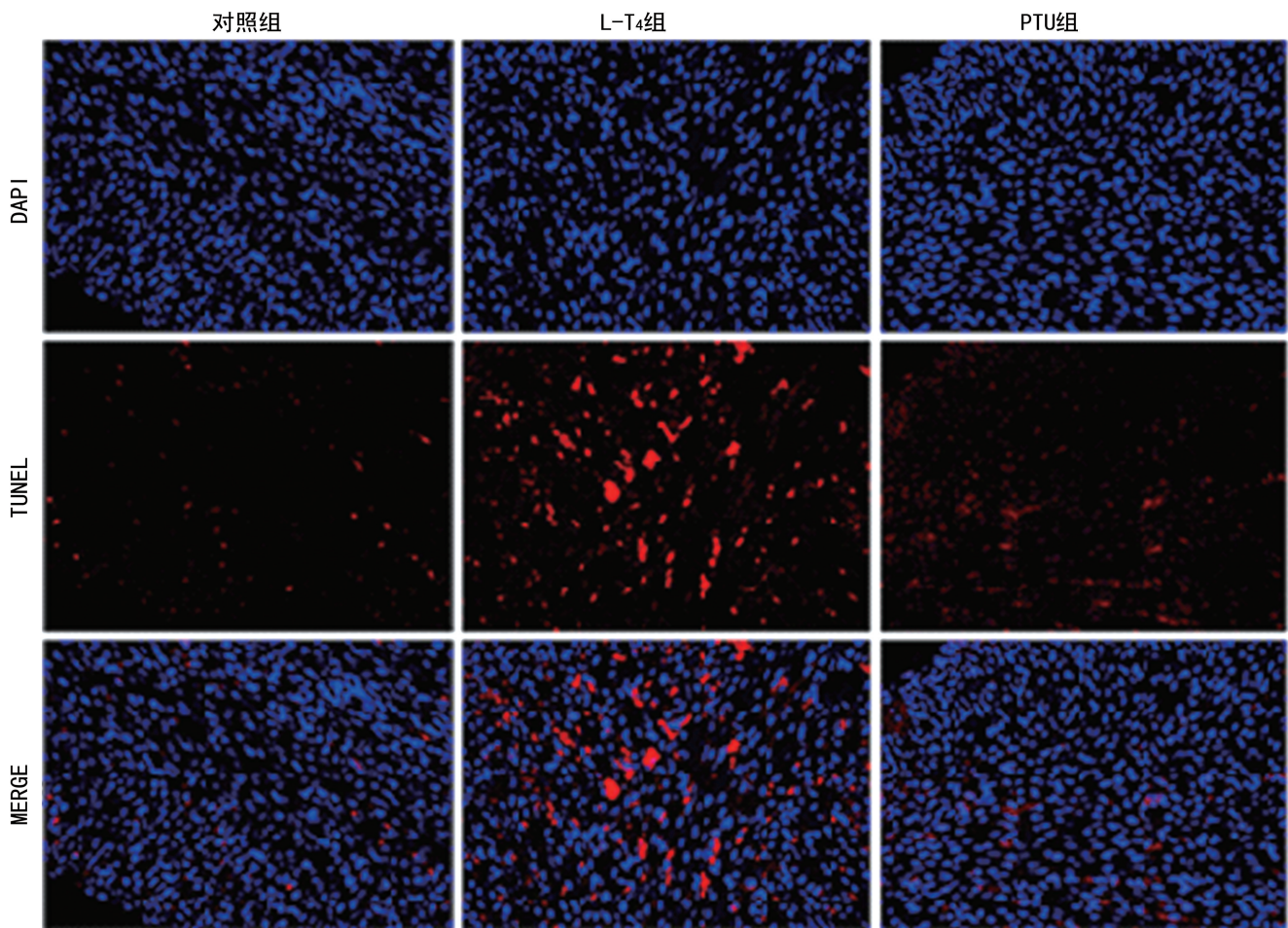


图 4 各组胎鼠心肌细胞凋亡情况(TUNEL 法×400)

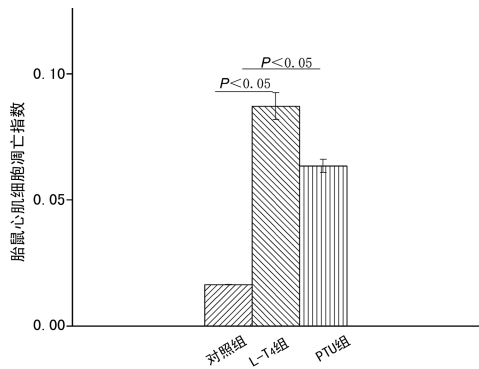


图 5 各组胎鼠心肌细胞凋亡指数

对照组心肌细胞肌纤维和横纹可见、整齐,线粒体内膜和线粒体嵴清晰,肌浆网未见肿胀,未见脂滴和糖原颗粒。L-T<sub>4</sub> 组心肌细胞肌纤维和横纹紊乱,线粒体内膜和嵴模糊,肌浆网肿胀。PTU 组心肌细胞肌纤维和横纹可见,线粒体内膜和嵴模糊,肌浆网肿胀,细胞内可见脂滴和糖原颗粒,见图 6。

2.5 各组心肌组织凋亡相关蛋白的定量分析

与对照组比较,L-T<sub>4</sub> 组、PTU 组心肌组织 caspase-3、caspase-8、caspase-9、Bax 表达水平增高,Bcl-2 表达降低,细胞质中 Cyt-c、AIF 水平增加,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见图 7。

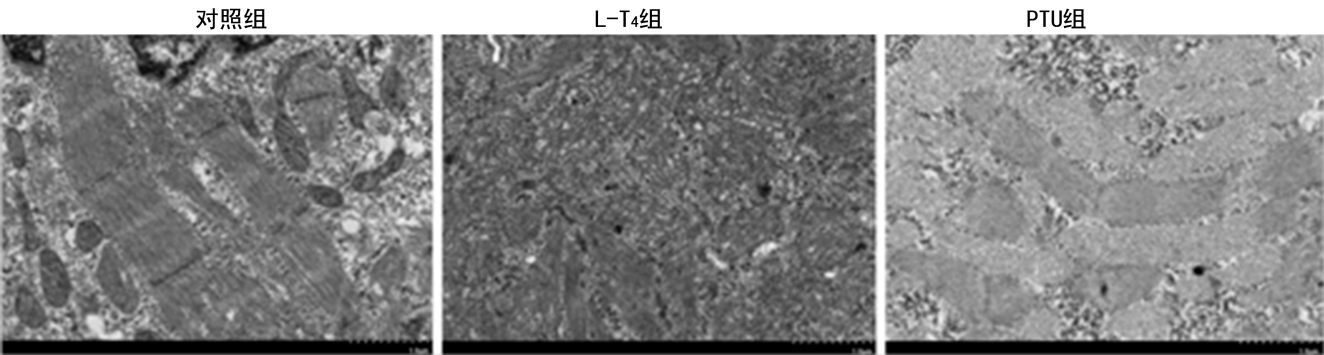


图 6 各组胎鼠心肌组织透射电镜下观察结果



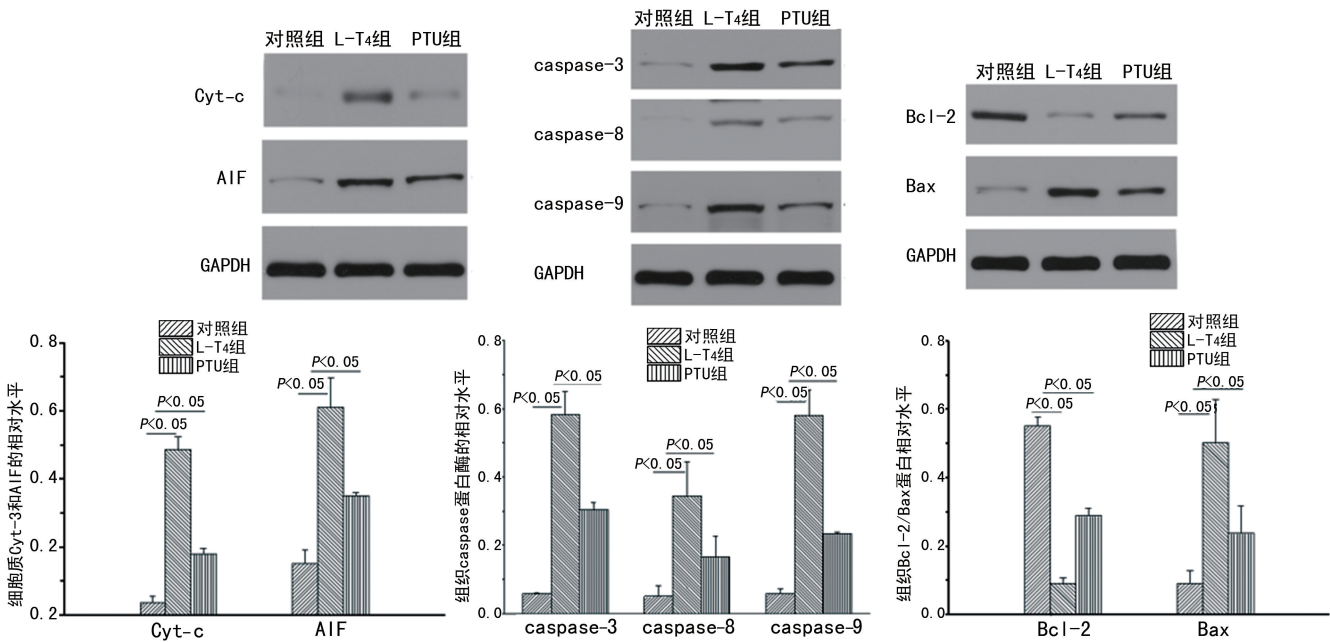


图7 各组胎鼠心肌组织凋亡相关蛋白表达

### 3 讨论

妊娠期常由于患者既往甲状腺功能控制欠佳或妊娠诱发的甲状腺功能异常而出现母体血 TH 水平异常。实验研究表明,TH 在胎儿和幼儿生长发育过程中有着非常重要的作用。临床资料表明,妊娠期甲状腺功能异常会导致胎儿的甲状腺功能异常和心功能损伤<sup>[5,16]</sup>,但在妊娠期间给予一定的干预可避免上述的心功能损伤<sup>[17]</sup>。但现有的甲状腺治疗药物尚存在较多的不良反应和局限性。

细胞凋亡是一种主动的细胞死亡<sup>[18-19]</sup>,表现为正常细胞群体中的单个细胞的有序死亡,具有细胞核固缩、凋亡小体形成、细胞膜磷脂酰丝氨酸外翻等特征性形态学变化和染色质 DNA 非随机性降解、线粒体膜通透性增加、线粒体内蛋白漏出等分子水平变化。人体在生命活动中受到损伤的细胞需通过凋亡加以清除,而且在胚胎发育过程中一些特定结构的形成是通过凋亡来完成的。但过度的凋亡会造成心肌细胞数量的减少和心功能的损伤,与慢性心功能不全等多种疾病的发生相关<sup>[20]</sup>。本实验结果表明,无论孕鼠 TH 水平的过高或过低,其所产胎鼠的心肌细胞凋亡水平均高于对照组胎鼠。

在心肌细胞凋亡过程中,涉及多种酶的参与和多种蛋白、因子的调控。caspase 家族是引起凋亡的关键酶,其中 caspase-8 和 9 等接到凋亡信号后自剪接激活,通过激活 caspase-3、6、7 等启动胞内蛋白降解的级联反应。细胞受到凋亡信号刺激后,线粒体膜通透性增加,使得线粒体内的 AIF、Cyt-c 等蛋白分别转位和漏出至胞核内和胞浆内。Cyt-c 与凋亡蛋白激酶激活因子-1 (apoptosis protease activating factor-1, APAF-1) C 端结合形成复合体,而 APAF-1 上的 caspase 募集区 (caspase recruitment domain, CARD) 可在 ATP/dATP 参与下募集 caspase-9,并激活

caspase-3,形成凋亡体启动凋亡。而 AIF 则能引起染色体的固缩和 DNA 的片段化。Bcl-2 蛋白家族包括 Bcl-2、Bcl-xl 等抗凋亡蛋白和 Bax、Bak、Bad 等促凋亡蛋白。其中,Bcl-2 家族抗凋亡蛋白能通过抑制线粒体膜通透性的增加,减少 AIF、Cyt-c 的释放,并结合或灭活 Cyt-c、APAF-1 来抗凋亡。而 Bcl-2 家族促凋亡蛋白则能通过参与线粒体孔洞的形成来促凋亡。本实验显示,相较于对照组,高血 T<sub>4</sub> 和低 T<sub>4</sub> 水平孕鼠所产胎鼠的心肌细胞内 Bcl-2 表达降低,caspase-3、8、9 和 Bax 及细胞质内 AIF、Cyt-c 水平增高。表明 Bax、Bcl-2、AIF、Cyt-c 和 caspase-3、8、9 参与了孕鼠血 T<sub>4</sub> 水平异常影响下的胎鼠心肌细胞凋亡,其与胎鼠出生后心功能之间关系值得探讨。

综上所述,笔者通过实验证实了孕鼠血 TH 水平的升高或降低都会增加胎鼠心肌细胞的凋亡,并会造成一定的形态学改变,存在一定的致病风险。本研究还为孕期甲状腺功能异常对胎儿心脏的影响做出了有益的探索,为今后更为安全有效进行孕期甲状腺功能与 TH 水平调节提出了一些实验依据。同时,本实验尚存在一定局限性,由于胎鼠具有一定的分泌 TH 能力,本实验中未涉及孕鼠 TH 的高低与胎鼠自身 TH 分泌之间的关系,胎鼠自身 TH 分泌在其心肌细胞凋亡中的作用,尚不能区分胎鼠自身 TH 与孕鼠血 TH 水平在胎鼠心肌细胞凋亡中的归因比例。此外,本实验尚未证实孕鼠血 TH 水平的升高或降低对胎鼠心功能的潜在影响及该影响与胎鼠心肌细胞凋亡之间的直接关系。如要证实上述三者问题,尚需进一步的实验研究。

### 参考文献

[1] American College of Obstetricians and Gynecologists. Practice Bulletin: Management of Thyroid Disease in Pregnancy. Obstet Gynecol. 2007;110(5):1273-1282.

- cologists. Thyroid disease in pregnancy[J]. *Obstet Gynecol*, 2015, 125(4):996-1005.
- [2] SPENCER L, BUBNER T, BAIN E, et al. Screening and subsequent management for thyroid dysfunction pre-pregnancy and during pregnancy for improving maternal and infant health[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2015, 21(9):CD011263.
- [3] SATO Y, MURATA M, SASAHARA J, et al. A case of fetal hyperthyroidism treated with maternal administration of methimazole[J]. *J Perinatol*, 2014, 34(12):945-947.
- [4] ARSLAN A, BAS V N, UYTUN S, et al. Effects of L-thyroxine treatment on heart functions in infants with congenital hypothyroidism[J]. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 2017, 30(5):557-560.
- [5] LIU M, YU J, FU X, et al. Quantitative assessment of cardiac function in fetuses of women with maternal gestational thyroid dysfunction using VVI echocardiography [J]. *Med Sci Monit*, 2015, 2(21):2956-2968.
- [6] 孙伟杰, 杨慧霞. 妊娠期甲状腺疾病对胎儿及新生儿的影响:解读 2017 年美国甲状腺学会“妊娠期和产后甲状腺疾病诊治指南”[J]. *中华围产医学杂志*, 2017, 20(11):779-782.
- [7] ZHAO W, LIU L, PAN B, et al. Epigenetic regulation of cardiac myofibril gene expression during heart development[J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2015, 15(3):203-209.
- [8] NISHIMURA K, TAKEDA M, YAMASHITA J K, et al. Type 3 iodothyronine deiodinase is expressed in human induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes[J]. *Life Sci*, 2018, 15(203):276-281.
- [9] LI M, IISMAA S E, NAQVI N, et al. Thyroid hormone action in postnatal heart development [J]. *Stem Cell Res*, 2014, 13(3):582-591.
- [10] YE J, ZHONG X, DU Y, et al. Role of levothyroxine and vitamin E supplementation in the treatment of oxidative stress-induced injury and apoptosis of myocardial cells in hypothyroid rats[J]. *J Endocrinol Invest*, 2017, 40(7):713-719.
- [11] ALCIGIR M E, DOGAN H O, ATALAY VURAL S, et al. Neuroprotective activity of cannabinoid receptor-2 against oxidative stress and apoptosis in rat pups having experimentally-induced congenital hypothyroidism[J]. *Dev Neurobiol*, 2017, 77(11):1334-1347.
- [12] LINO C A, SHIBATA C E, BARRETO-CHAVES M L. Maternal hyperthyroidism alters the pattern of expression of cardiac renin-angiotensin system components in rat offspring[J]. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 2014, 15(1):52-60.
- [13] YOUSEFZADEH N, JEDDI S, ALIPOUR M R. Effect of fetal hypothyroidism on cardiac myosin heavy chain expression in male rats [J]. *Arq Bras Cardiol*, 2016, 107(2):147-153.
- [14] 徐金玲, 赵林双, 王敏. 血管紧张素 II 型受体自身抗体在甲亢大鼠心肌肥大中的作用及其与 PI3K/Akt 信号通路的关系[J]. *第二军医大学学报*, 2014, 35(2):154-160.
- [15] 邓刚, 胡海燕, 张晓晴, 等. 高压氧联合 rh-EPO 对窒息新生大鼠心肌细胞 Bcl-2/Bax 表达的影响[J]. *中国妇幼保健*, 2017, 32(5):1058-1060.
- [16] THAKER V V, LEUNG A M, BRAVERMAN L E, et al. Iodine-induced hypothyroidism in full-term infants with congenital heart disease: more common than currently appreciated[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2014, 99(10):3521-3526.
- [17] MATSUMOTO T, MIYAKOSHI K, SAISHO Y, et al. Antenatal management of recurrent fetal goitrous hyperthyroidism associated with fetal cardiac failure in a pregnant woman with persistent high levels of thyroid-stimulating hormone receptor antibody after ablative therapy[J]. *Endocr J*, 2013, 60(12):1281-1287.
- [18] 周春燕, 冯作化. 医学分子生物学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2014:181-196.
- [19] XIA P, LIU Y, CHENG Z. Signaling pathways in cardiac myocyte apoptosis[J]. *Biomed Res Int*, 2016, 2016:9583268.
- [20] TAKEMURA G, KANAMORI H, OKADA H, et al. Anti-apoptosis in nonmyocytes and pro-autophagy in cardiomyocytes: two strategies against postinfarction heart failure through regulation of cell death/degeneration [J]. *Heart Fail Rev*, 2018, 23(5):759-772.