DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.08.011

论著

文章编号:1000-5404(2003)08-0676-04

缺血再灌注对在体兔窦房结细胞形态结构影响的研究

李永华,宋治远 (第三军医大学附属西南医院心血管内科,重庆400038)

提 要:目的 探讨缺血再灌注对在体兔窦房结细胞形态结构的影响。方法 取家兔90只分为对照组、单纯缺血组(又分为缺血10、30、60及120 min 4个亚组)及缺血再灌注组(又分为4个亚组,分别缺血10、30、60及120 min后均再灌注4h),每组10只。当达各预定时间点后,迅速取窦房结组织固定,供光镜及电镜观察。结果 ①与对照组比较,缺血10 min组光镜观察窦房结细胞未见异常,电镜观察则显示胞质及线粒体轻度肿胀,而缺血10 min再灌注组窦房结细胞的光镜及电镜观察均未见异常。②缺血30、60及120 min组中分别有7、6及8只兔子的窦房结细胞发现形态结构改变,其中光镜下主要表现为细胞肿胀、核固缩及灶性坏死;电镜下可见线粒体肿胀,嵴紊乱或断裂,并以缺血120 min组细胞损伤最为严重。③缺血30、60及120 min再灌注组中分别有6、8及7只兔子的窦房结细胞发现形态结构异常,其光镜及电镜观察见窦房结细胞形态结构改变与缺血组相似,但其损伤程度则较相同缺血时间的缺血组重。结论 缺血及缺血再灌注均可引起在体兔窦房结细胞形态结构改变,且随着缺血时间的延长,细胞损伤进一步加重;相同缺血时间的缺血再灌注组细胞损伤较单纯缺血组重,表明有缺血再灌注损伤的存在。

关键词:窦房结;兔;缺血再灌注;电镜;光镜

中图法分类号:R322.11;R654.1;R654.202 文献标识码:A

Effects of ischemia-reperfusion on the morphological changes of sinoatrial node cells in rabbits *in vivo*

LI Yong-hua, SONG Zhi-yuan (Department of Cardiology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of ischemia-reperfusion on the morphological changes of sinoatrial node (SAN) cells in rabbits *in vivo*. Methods Ninety healthy adult rabbits were randomly divided into 3 groups with 10 rabbits in control and every subgroup: control group [a suture passed under the root section of right coronary artery (RCA) without ligation], ischemia group (occluding the root section of RCA for 10, 30, 60 and 120 min respectively), ischemia-reperfusion group (10, 30, 60 and 120 min ischemia after respectively followed by 4 hours' reperfusion). Results ① Compared with control group, abnormal structure of SAN cells was not seen in 10 min ischemia group and 10 min ischemia-reperfusion group with light microscopy, except slight mitochondrial swelling of SAN cells in former group with electron microscopy. ② There were morphological changes of SAN cells in 7, 6 and 8 rabbits in 30, 60 and 120 min ischemia group, presenting mainly as cellular swelling, karyopyknosis, and focal necrosis under a light microscope, and mitochodrial swelling, cristae disorganization or break under an electron microscope. The most severe cellular damages were found in 120 min ischemia group. ③ In ischemia-reperfusion group, there were morphological abnormalities of SAN cells in 6, 8 and 7 rabbits in 30, 60 and 120 min ischemia-reperfusion groups. The morphologic changes were similar to those in ischemia group, but injury degree was more severe than that in ischemia group with the same ischemic time. Conclusion Ischemia and ischemia-reperfusion can induce morphological changes of SAN cells in a time-dependent manner in rabbits *in vivo*, and the injury degree is more severe in ischemia-reperfusion group than that in ischemia group with the same ischemic time.

Key words: sinoatrial node; rabbit; ischemia-reperfusion; electron microscopy; light microcopy

病态窦房结综合征(简称病窦综合征)临床常见,对人类健康危害较大,但其发病原因目前尚不十分清楚,而窦房结细胞缺血性损伤可能是病窦综合征形成的原因之一,但在体窦房结细胞在缺血及缺血再灌注后其形态结构改变如何?尚未见文献报道。本研究通过结扎或放松兔右冠状动脉,致窦房结细胞缺血及缺

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39770324)

作者简介:李永华(1971—),男,重庆市垫江县人,硕士,医师,主要从事心脏电生理方面的研究。电话:(023)65387390

收稿日期:2002-04-28;修回日期:2003-01-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

血再灌注后, 通过光镜和电镜观察其形态结构的改变, 以了解缺血再灌注对在体兔窦房结细胞形态结构的影响, 旨在为临床防治病窦综合征提供实验依据。

1　材料和方法

1.1　实验动物及分组

健康大白兔 90 只(由第三军医大学实验动物中心提供), 雌雄不拘, 体质量 2.0～3.5 kg, 分为以下 3 组。① 缺血组: 根据缺血时间不同又分为 4 个亚组, 分别缺血 10、30、60 及 120 min, 每组 10 只兔; ② 缺血再灌注组: 又分为缺血 10、30、60 及 120 min 后再灌注 4 h 4 个亚组, 每组 10 只兔; ③ 正常对照组: 取 10 只兔子于右冠状动脉下穿线而不结扎。

1.2　在体兔窦房结细胞缺血再灌注模型的制备

先用 3%戊巴比妥钠(1 ml/kg)对兔进行静脉麻醉, 而后将兔固定于兔台上, 于胸前及颈部剪毛、消毒。用针形电极刺入四肢皮下, 与示波器和心电描计议相连, 进行心电监护, 并常规记录Ⅱ导联心电图。切开颈部, 分离出气管, 放置气管插管, 行人工正压呼吸; 沿胸正中线稍偏右开胸暴露心脏, 从主动脉根部分离出右冠状动脉, 在右冠状动脉起始部套一丝线, 丝线穿过一细塑料管, 通过塑料管钳夹或放松两端丝线以造成缺血或再灌注; 当达各预定时间点时, 迅速取出心脏, 于上腔静脉入口以下至从腔耳角向外下沿界嵴到下腔静脉口这一区域切取窦房结组织, 并将切下的窦房结组织横向切开分为两部分, 分别用于光镜及电镜制样、观察。

1.3　光镜标本的制备与观察

将切取的窦房结组织标本迅速用 4%的多聚甲醛固定, 48 h 后行脱水、透明及石蜡包埋, 而后行连续横切或纵切, 厚度 4 μm, HE 染色后进行光镜观察, 并用 Olympus BH-2 型显微照相设备进行拍照。

1.4　电镜标本的制备与观察

迅速将切取的窦房结组织标本约 1 mm× 1 mm× 1 mm^3 于 3%的戊二醛溶液中固定 24 h, 先用 PBS 冲洗 30 min, 再用 1%锇酸溶液固定 2 h, 并再次用 PBS 冲洗 15 min, 逐级乙醇脱水, 用 Epon812 包埋, 超薄切片作醋酸铀和枸橼酸铅双重染色, 而后用电子显微镜观察窦房结细胞的超微结构变化。

2　结果

2.1　正常对照组兔窦房结细胞的形态学观察

2.1.1　光镜观察　　光镜下见窦房结区域内细胞小而密, 胞质淡染, 其中主要为 P 细胞(起搏细胞)及 T 细胞(过渡细胞)。P 细胞主要位于窦房结中央, 呈圆形、椭圆形或不规则形, 核大而呈圆形或椭圆形、位于细胞中央或一侧; T 细胞主要位于窦房结的周边, 大小介于 P 细胞和心房肌细胞之间, 呈长形或梭形, 核呈椭圆形, 胞内可见横纹; 此外尚可见丰富的胶原纤维、成纤维细胞及数量不等的脂肪组织。

2.1.2　电镜观察　　电镜观察见 P 细胞膜光滑, 细胞器少, 电子密度低, 核大, 呈圆形或椭圆形, 约占细胞横径一半, 近核膜有染色质凝聚; 线粒体少, 大小形状不一, 排列散乱无序, 嵴少而不规则; 高尔基体发达, 位于核旁, 附近有多泡小体。T 细胞胞核呈长圆形, 表面凹凸不平, 与细胞长轴一致; 线粒体较多, 存在于肌原纤维之间, 并散布于核周或核膜下, 嵴稀疏, 基质透明, 核周可见高尔基复合体及多泡小体; 细胞内肌微丝含量不一, 排列成束, 可见较完善的肌节。

2.2　缺血对在体兔窦房结细胞形态结构的影响

2.2.1　光镜观察　　通过对不同缺血时间各组兔窦房结细胞的观察发现, 缺血 10 min 组兔窦房结 P 细胞及 T 细胞的形态结构与正常对照组无差别; 但缺血 30 min 组中发现 7 只兔窦房结细胞有轻度肿胀; 缺血 60 min 组中有 6 只兔窦房结细胞肿胀明显, 部分胞质可见空泡及散在的细胞核固缩, 并可见粒细胞浸润, 其中 2 只兔窦房结细胞胞质内可见强嗜酸性颗粒; 缺血 120 min 组中有 8 只兔窦房结细胞明显肿胀, 其中 5 只兔窦房结细胞胞质嗜酸性增强, 胞核固缩, 并可见局灶性坏死, 见图 1。

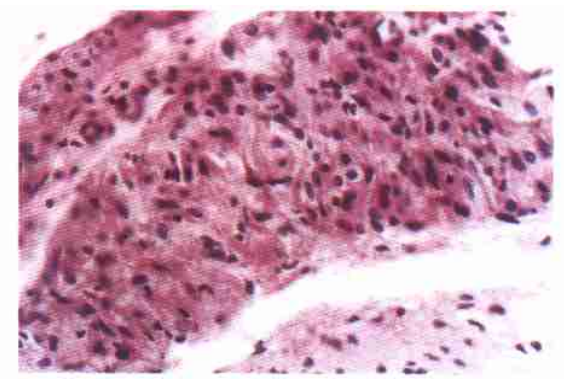


图 1　光镜下缺血 120 min 兔窦房结细胞　细胞明显肿胀, 胞质嗜酸性变, 部分核固缩及局灶性坏死　(HE× 400)

Fig 1　Light micrograph of SAN cells in rabbits of 120 min ischemia group　Acidophilic cytoplasm, partial karyopyknosis, and focal necrosis in obvious swollen cells were observed　(HE× 400)

2.2.2　电镜观察　　电镜观察结果显示, 缺血 10、30、60 及 120 min 各组中分别有 6、7、6 及 8 只兔子的窦房结 P 细胞及 T 细胞出现超微结构的变化, 其中缺血 10 min 组主要表现为胞质及线粒体基质轻度水肿, 缺血 30 min 组则表现为线粒体肿胀及嵴断裂, 并有鼓泡现象, 胞质及胞核呈局灶性水肿, 见图 2; 缺血 60 min 组, 窦房结细胞线粒体肿胀更加明显, 个别线粒体嵴溶解; 缺血 120 min 组, 则表现为窦房结细胞线粒体明显肿胀、嵴紊乱或断裂成空泡, 部分线粒体膜破裂, 另有少数线粒体致密、固缩, 处于退变状态。以上结果表明, 随着缺血时间的延长, 窦房结细胞的损伤则进一步加重。

2.3　缺血再灌注对在体兔窦房结细胞形态结构的影响

2.3.1　光镜观察　　通过对缺血再灌注 4 个亚组观察发现, 缺血 10 min 再灌注 4 h 组, 窦房结 P 细胞及 T 细胞形态均正常; 缺血 30 min 再灌注 4 h 组有 6 只兔子窦房结细胞显示轻度肿胀; 缺血 60 min 再灌注 4 h 组有 8 只兔子窦房结细胞肿胀明显, 胞质内有空泡, 部分核固缩, 并可见片状的细胞溶解及坏死; 缺

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

血 120 min 再灌注 4 h 组有 7 只兔子窦房结细胞呈现大片灶性坏死及肌原纤维断裂，坏死灶内有粒细胞浸润，见图 3。而缺血 60 min 及 120 min 再灌注组窦房结细胞病理改变较相同缺血时间的单纯缺血组明显，表明有缺血再灌注损伤存在。



图 2 电镜下缺血 **30 min** 兔窦房结细胞 见线粒体肿胀、嵴断裂及基质局灶性水肿 (TEM×3 000)

Fig 2 Electron microgram of SAN cells in rabbits of 30 min ischemia group Swollen mitochondria, broken cristae and focally edemous cytoplasmertie matrix (TEM× 3 000)

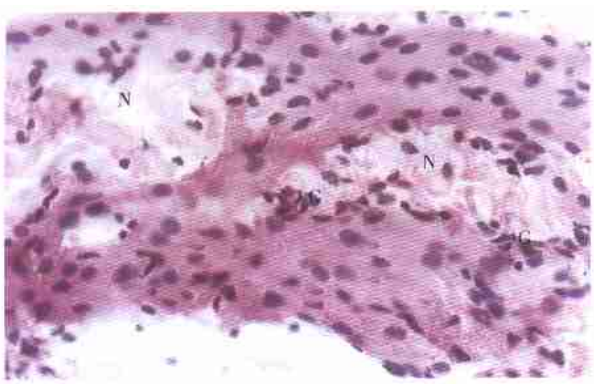


图 3 缺血 **120 min** 再灌注 **4 h** 兔窦房结细胞光镜观察，可见大片灶性坏死(**N**)及粒细胞浸润(**G**) (HE× 400)

Fig 3 Light microgram of SAN cells in rabbits in 120 min ischemia-reperfusien group Focal necrosis(N) and granulocyte infiltration(G) (HE× 400)

2.3.2 电镜观察 电镜观察显示：缺血 10 min 再灌注 4 h 组，窦房结细胞的超微结构正常；而缺血 30 min 再灌注 4 h 组，有 6 只兔子窦房结细胞胞质水肿，线粒体肿胀，嵴断裂，部分线粒体膜不完整，胞核有局限性水肿；缺血 60 min 再灌注 4 h 组，有 8 只兔子窦房结细胞滑面内质网高度扩张，肌质网扩张明显，肌丝或胞质有灶性溶解，胞质内有自噬小体，线粒体高度肿胀、嵴断裂、成空泡，核膜极不规整，染色质边集，见图 4；缺血 120 min 再灌注 4 h 组，有 7 只兔子窦房结细胞线粒体呈高度肿胀、嵴断裂及基质电子密度减低，少数溶解成空泡，可见扩大的肌质网；T 细胞显示肌丝模糊、片状溶解或坏死，肌原纤维断裂及核仁裂解。

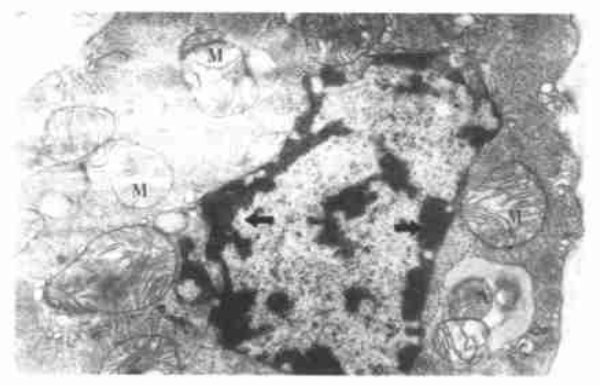


图 4 缺血 **60 min** 再灌注 **4 h** 兔窦房结细胞电镜观察，见线粒体(**M**)高度肿胀，嵴断裂，胞质内有自噬小体 **A** 及核染色质边集(➡)现象 (TEM× 3 000)

Fig 4 Electron microgram of SAN cells in rabbits in 60 min ischemia-reperfusion group Significantly swollen mitochondria(M), broken cristae, autophagosomes(A) in the cytoplasm, and chromatin gathering(➡) at the edge of the nuclear membrane (TEM× 3 000)

3 讨论

3.1 在体兔窦房结细胞缺血再灌注损伤模型的评价

研究在体兔窦房结细胞缺血再灌注损伤时的关键问题之一是动物模型的建立，但由于窦房结血供的特殊性，目前尚无成熟的在体兔窦房结细胞缺血再灌注损伤模型供研究应用，同时也制约了缺血再灌注对在体窦房结细胞形态结构及功能改变影响的研究；因此，探索建立在体兔窦房结细胞缺血再灌注损伤模型的可行性，对于深入研究缺血再灌注对在体窦房结细胞形态结构及功能改变的影响，将具有重要意义。

众多研究表明，窦房结血供主要由窦房结动脉支配，而人及大部分哺乳动物的窦房结动脉约 2/3 起源于右冠状动脉，另约 1/3 起源于左冠状动脉旋支[1,2]。对于同一动物而言，其窦房结动脉可能起源于右冠状动脉或左冠状动脉旋支，因此在制作窦房结细胞缺血再灌注模型时，最好同时结扎右冠状动脉与左冠状动脉旋支起始部，以确保造成该动物窦房结细胞完全缺血，但若同时阻断右冠状动脉与左冠状动脉旋支的血供，必将引起大面积心肌细胞缺血性损伤，并可因致命性心律失常而死亡。由于兔窦房结动脉有 66.7%起源于右冠状动脉[3]，且窦房结多由单支动脉供血[2,4]，在实验中结扎或放松右冠状动脉起始部，即可使约2/3的兔子窦房结细胞出现缺血及再灌注损伤。本实验研究结果显示，在发现病理性改变的各组中，有约 70%的兔子窦房结细胞出现相应的病理变化，表明这部分兔子的窦房结动脉系起源于右冠状动脉，而少数窦房结细胞未发生病理性改变的兔子其窦房结动脉可能起

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

源于左冠状动脉旋支。以上结果表明, 单纯结扎或放松右冠状动脉起始部, 制作在体兔窦房结细胞缺血再灌注模型, 虽然不能使所有兔子的窦房结细胞造成缺血再灌注损伤, 但有约 2/3 的兔子被成功地制作了在体窦房结细胞缺血再灌注模型, 可以满足实验需要, 故认为该方法可行, 是目前研究缺血再灌注对在体兔窦房结细胞形态结构及电生理功能影响的理想模型。

3.2　缺血再灌注对在体兔窦房结细胞形态结构的影响及意义

目前, 有关缺血再灌注对在体心肌细胞形态结构影响的研究较多[5,6], 但缺血再灌注对在体窦房结细胞形态结构的影响如何? 尚未见文献报道。窦房结细胞作为一种特殊分化的心肌细胞, 其具有与心肌细胞相似的生物学特性, 故认为缺血再灌注同样可致窦房结细胞损伤。钟理等[7] 在对原代培养乳鼠窦房结细胞的研究中发现, 模拟缺血及缺血再灌注损伤均可诱导窦房结细胞凋亡, 但缺血再灌注对在体兔窦房结细胞形态结构的影响及其变化规律尚不清楚, 这也正是本研究的目的所在。

本研究在成功制作在体兔窦房结细胞缺血再灌注模型的基础上, 用普通光镜及电子显微镜观察了不同缺血时间的缺血及缺血再灌注对窦房结细胞形态结构的影响, 结果发现, 缺血时间在 30 min 以上的缺血组及缺血再灌注组均可见窦房结细胞呈现病理性改变, 且随缺血时间的延长, 窦房结细胞损伤进一步加重; 此外, 缺血再灌注组较相同时间缺血组窦房结细胞的病理改变重, 表明有缺血再灌注损伤存在。心肌缺血再灌注损伤机制的研究认为, 细胞缺血致细胞膜受损及钙离子进入细胞内是造成心肌细胞形态结构改变的主要机制, 而钙离子及氧自由基与心肌细胞缺血再灌注损伤密切相关[8]; 由于窦房结细胞与心肌细胞具有相似的生物学特性, 故认为缺血再灌注致窦房结细胞损伤的机制也与心肌细胞相似, 即当缺血后再灌注时, 细胞内钙超负荷和氧自由基生成增加, 将导致细胞代谢异常, 进而引起窦房结细胞线粒体肿胀、嵴断裂等, 甚可致细胞坏死, 本研究电镜观察结果也符合上述特点。但本研究发现缺血 10 min 组光镜观察未见细胞形态结构改变, 电镜观察则见有线粒体轻度肿胀; 而缺血 10 min 再灌注组 4 h 组窦房结细胞的光镜及电镜观察均未见形态结构的改变, 表明及时的再灌注可使轻度受损的窦房结细胞结构得以恢复。

综上所述, 在体窦房结细胞的急性缺血及缺血再灌注均可引起窦房结细胞形态结构的改变, 而在窦房结细胞缺血时及早给予再灌注, 并于再灌注时采取一些抗氧化、清除自由基的措施, 对于减轻窦房结细胞损伤、保护窦房结细胞的生理功能及防治病窦综合征的发生, 都具有非常重要的意义。

参考文献:

[1] Sow M L, Ndoye J M, Lô E A. The artery of the sinuatrial node: anatomic considerations based on 45 injection-dissections of the heart[J]. Surg Radiol Anat, 1996, 18: 103—109.

[2] DiDio L J, Lopes A C, Caetano A C, *et al*. Variations of the origin of the artery of the sinoatrial node in normal human hearts[J]. Surg Radiol Anat, 1995, 17(1): 19—26.

[3] 南开大学实验动物解剖学编学组编. 实验动物解剖学[M]. 北京: 人民教育出版社, 1980. 23—27.

[4] Kyriakidis M, Vyssoulis G, Barbetseas J, *et al*. A clinical angiographic study of the arterial blood supply to the sinus node[J]. Chest, 1988, 94(5): 1054—1057.

[5] Welt K, Fitzl G, Mark B. Lipoxygenase inhibitor FLM 5011, an effective protectant of myocardial microvessels against ischemia-reperfusion injury? An ultrastructural-morphometric study[J]. Exp Toxicol Pathol, 2000, 52(1): 27—36.

[6] Azhar G, Gao W, Liu L, *et al*. Ischemia-reperfusion in the adult mouse heart influence of age[J]. Exp Gerontol, 1999, 34(5): 699—714.

[7] 钟　理, 宋治远. 模拟缺血—再灌注诱导原代培养乳鼠窦房结细胞凋亡的研究[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(1): 59—61.

[8] Flitter W D, Siompson P J, Iuccheei B R, *et al*. Free radical and myocardial reperfusion injury[J]. Br Med Bull, 1994, 49(9): 545—546.

（编辑　汪勤俭）

书讯

《英语医学论文选句》

由第三军医大学全军复合伤研究所、防原医学教研室教授何庆嘉、高京生、冉新泽等编著, 程天民院士作序, 史景泉、欧阳子倩、陈维佩、冯崇英、陈志勇等教授审阅的《英语医学论文选句》(英译汉版本) 一书, 近日由学苑出版社出版。本书的内容按医学论文结构的格式编排, 包括论文标题、摘要、引言、材料与方法、结果及讨论等六部分, 各部分的开头都简要叙述该部分书写的要求, 接着是英文句子和中文译文, 英文句子选自国外英语医学期刊论文, 翻译忠实于原著, 一般采用直译便于英汉对照。附录有英语医学期刊名称及其缩写、我国医学机构(英汉对照)及主要参考文献。本书内容丰富实用, 英文句子结构规范, 语法现象复杂多样, 翻译准确顺畅, 可供医务工作者、医科院校师生及医学期刊编辑人员阅读和参考。全书 31 万字, 定价 25 元/册。

地　　址: 重庆市沙坪坝区高滩岩第三军医大学全军复合伤研究所、防原医学教研室　　邮政编码: 400038

联 系 人: 彭晓莉、冉新泽　　电　　话: (023)68752278

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net