DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.05.014

急性压力超负荷损伤大鼠心肌的病理观察*

冯 兵** 陈意生 (第三军医大学基础医学部病理学教研室)重庆,400038
何作云 周小波 黄 敏 (第三军医大学附属新桥医院心血管内科)重庆,400037

提 要 目的:探讨压力超负荷致心肌自分泌生长因子(血管紧张素Ⅱ)的机制。方法:联合应用心肌缺氧性损伤特殊染色、心肌酶组织化学染色和透射电镜观察急性压力超负荷后大鼠心肌形态学的动态变化。结果:急性压力超负荷可引起心肌明显的缺氧性损伤。结论:这种缺氧性损伤可能与急性压力超负荷后心肌局部内分泌活化有关。

关键词 心肌/病理学;急性压力超负荷;缺氧性损伤;内分泌活化;大鼠
中图法分类号 R542.2

大量临床和动物实验证实压力超负荷是心肌肥大的独立致病因素,但有关心肌细胞将压力超负荷力学信号转化为细胞内生化信号的具体机制仍不明确。有学者报道,在生理条件下,许多有收缩活性的组织细胞常存在一种可恢复的瞬时胞膜破裂,伴随胞膜破裂,细胞浆内蛋白分子可释放到细胞外而充当自分泌或旁分泌信使分子作用[1,2],本研究拟探讨急性压力超负荷是否对大鼠心肌有损伤作用,为进一步分析压力超负荷致心肌肥大的跨膜信号传递机制提供资料。

1 材料与方法

1.1 实验分组与动物模型

选用雄性 Wistar大鼠35只,体重(12±15)g,随机分为假手术对照组(Control group, CG, 15只)和部分缩窄腹主动脉形成高血压组(Observe group, OG, 20只),并分10 min、30 min、1、4、24 h 5个时相点亚组。假手术组除不结扎腹主动脉外,其余损伤同手术组。

1.2 观测指标和实验方法

1.2.1 血液动力学测定 大鼠腹腔注射(戊巴比妥钠30 mg/kg)麻醉后,暴露右颈总动脉,插入自制的直径约0.5 mm的硬塑料导管,连接二导生理记录仪记录动脉收缩压(SAP)、舒张压(DAP)及心率(HR)。

1.2.2 心肌缺氧性损伤特殊染色[3] 大鼠在测完血液动力学后,开胸迅速取出心脏,按预定取材顺序取左心室游离壁心肌于4%多聚甲醛缓冲液中固定,石蜡包埋,切片用变色酸亮绿法作心肌缺氧性损伤染色。

1.2.3 心肌酶组织化学染色 取新鲜左心室心肌组织于液氮中速冻后作冰冻切片,分别作乳酸脱氢酶(LDH)、琥珀酸脱氢酶(SDH)酶组织化学染色[3],并用显微分光光度术测定570 nm处光密度值(D),共测5个随机视野,组织周边为参照空白,酶活性用相对D值表示(随意单位)[4]。

1.2.4 心肌超微病理观察及线粒体立体计量 取1 mm×1 mm×1 mm大小新鲜左心室心肌于3%戊二醛中固定,每例切片透射电镜观察超微改变后,随机摄片3张,图像摄入图像分析系统(MD20型真彩色图像仪)定标后,测定单位体积内线粒体数量(N, number),线粒体面积(A, area)及线粒体体密度(Vv, volume density)。

1.3 统计学处理

所有数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,并作组间 t 检验。

2 实验结果

2.1 腹主动脉部分缩窄大鼠血液动力学的变化

腹主动脉部分结扎后大鼠 SAP、DAP、MAP(平均动脉压)均逐渐升高,在术后4 h后显著升高(与假手术组比较 $P<0.05$),而心率无明显变化,见表1。

表1 腹主动脉部分缩窄大鼠血压、心率的变化(ρ/mmHg△, beats/min)

Tab 1 Changes of arterial pressure and heart rate in rats after abdominal aorta constriction

Parameter	Group	10 min	30 min	60 min	4 h	24 h
SAP	CG(n=3)	119±21	116±12	115±12	118±13	120±18
	OG(n=4)	127±17	127±17	132±23	147±10*	169±15**
DAP	CG	99±14	96±11	101±7	101±28	104±17
	OG	108±13	101±10	108±11	133±11*	141±19
MAP	CG	111±17	109±10	107±9	110±27	113±12
	OG	117±8	116±28	117±14	143±25*	159±26**
HR	CG	451±41	442±57	462±31	434±45	420±62
	OG	471±43	475±46	481±56	454±57	482±51

△: 1 mmHg=0.133 kPa; *: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* CG

* 国家自然科学基金资助项目,No. 39600041
** 冯 兵,男,30岁,主治医师,讲师,博士,现在附属新桥医院心血管内科
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.2　心肌缺氧性损伤特殊染色结果

Gonori变色酸亮绿法染色,使变性及早期坏死的心肌染呈深粉红色。实验发现,腹主动脉部分缩窄术后 10 min,心肌开始出现点状变性,见图 1.术后 30~ 60 min出现斑片状心肌变性,术后 4 h后可见心肌大面积缺氧性改变,尤其在左心室游离壁中层及心内膜下心肌变性多见,术后 24 h,心肌缺氧性改变开始减轻。

2.3　心肌 LDH及 SDH活性的变化,见表 2

实验发现,术后 60 min至 24 h, SDH活性较假手术对照组显著降低($P < 0.05$),而 LDH活性无明显变化。

2.4　心肌超微结构变化及线粒体立体计量结果

电镜观察发现,术后 10 min出现心肌散在线粒体不同程度肿胀,见图 2.术后 30 min至 24 h,肿胀线粒体增多,部分线粒体甚至空化;此时,肌节明带增宽,点片状肌原纤维溶解,散在肌原纤维扭曲及收缩带形成;细胞核染色质边集,基质电子密度降低,核周间隙增宽;细胞膜扭曲不规则,胞膜下电子密度降低及宽度增大,但未见典型破口;间质区轻度水肿,尤以毛细血管周明显。

线粒体立体计量结果见表 3.术后 30 min至 24 h线粒体数密度 N显著降低;术后 10 min至 24 h线粒体表面积 A显著增大;线粒体体密度 V_V在术后 30 min开始增加, 1~ 4 h达最大 24 h时有所降低。

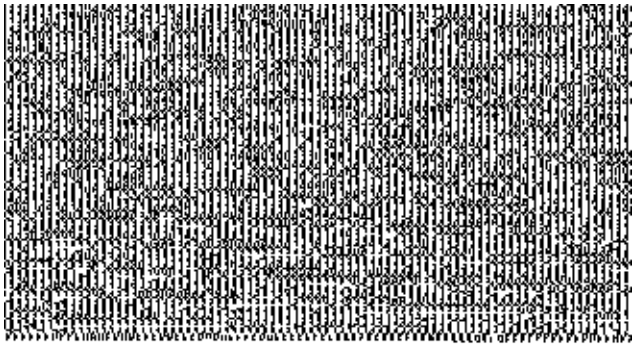


图 1　术后 **10 min**,左室游离壁中层及心内膜下可见点片状心肌缺氧性损伤 (变色酸亮绿法× 200)

Fig 1　**Hypoxemic injury of media myocardium and infraendocardium of left ventricular free wall of rat 10 minutes after abdomial aorta constriction**　(Chromotropic acid and brilliant green staining× 200)

表 **2**　急性压力超负荷大鼠心肌酶活性的变化 (D_A, $\bar{x} \pm s$)

Tab 2　**Changes of myocardial SDH and LDH activity in rats after acute pressure overload**(D_A, $\bar{x} \pm s$)

Parameter	Group	10 min	30 min	60 min	4 h	24 h
LDH	CG	0.397± 0.010	0.380± 0.032	0.373± 0.061	0.378± 0.052	0.381± 0.027
	OG	0.375± 0.035	0.361± 0.054	0.0358± 0.082	0.364± 0.043	0.419± 0.015
SDH	CG	0.805± 0.012	0.799± 0.033	0.801± 0.043	0.792± 0.022	0.787± 0.017
	OG	0.775± 0.035	0.760± 0.007	0.658± 0.007*	0.521± 0.041*	0.605± 0.136*

* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$ *vs* CG

表 **3**　急性压力超负荷心肌线粒体立体定量的变化 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 3　**Results of mitochondria image analysis in cardiocyte after acute pressure overload**($\bar{x} \pm s$)

Parameter	Group	10 min	30 min	60 min	4 h	24 h
N	CG	0.795± 0.017	0.793± 0.011	0.788± 0.024	0.782± 0.047	0.779± 0.037
	OG	0.763± 0.050	0.710± 0.026*	0.708± 0.033*	0.708± 0.050*	0.708± 0.036*
A	CG	0.214± 0.002	0.213± 0.011	0.211± 0.009	0.212± 0.010	0.210± 0.007
	OG	0.217± 0.001*	0.219± 0.001**	0.222± 0.002**	0.223± 0.002**	0.225± 0.002**
Vv	CG	0.154± 0.005	0.153± 0.010	0.155± 0.011	0.149± 0.012	0.147± 0.002
	OG	0.148± 0.008	0.166± 0.029	0.133± 0.037*	0.182± 0.042*	0.166± 0.004*

* : $P < 0.05$,** : $P < 0.01$ *vs* CG

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

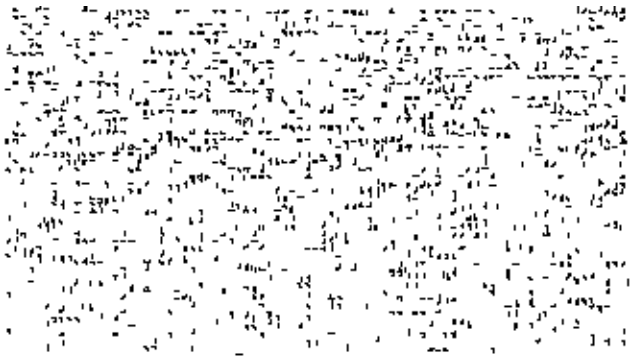


图 2 术后 10 min,左室心肌细胞内线粒体轻度肿胀变性 (TEM× 6600)

Fig 2 Slight swelling degeneratian of mitochrondria in left ventricular cardiocyte 10 minutes after abdominal aorta constriction (TEM× 6600)

3 讨论

急性压力超负荷后大鼠心肌的形态学动态变化及其意义尚未见详细报道。本研究设计了极短间隔的连续观察时相点,并联合应用心肌缺氧损伤特殊染色、透射电镜及酶组织化学染色等形态学研究手段,结合定量分析,发现急性压力超负荷可引起心肌明显的缺氧性损伤。电镜观察的结果在亚细胞层次上最具有可靠性,其证据包括线粒体肿胀、空化,细胞核染色质边集、核周间隙增宽,细胞膜扭曲,膜下电子密度降低等变性表现,甚至出现肌原纤维的灶性溶解,肌节扭曲、收缩带形成。线粒体立体计量分析也发现线粒体数密度逐渐降低,线粒体表面积逐渐拉大,线粒体体密度首先升高,24 h轻度下降,均提示急性压力超负荷后心肌线粒体肿胀变性。酶组化并定量分析其活性发现氧化代谢酶活性降低,从代谢角度证实急性压力超负荷对心肌的损伤作用。

急性压力超负荷损伤心肌的机制主要与心肌需求性缺氧有关[5],也可能与心肌组织中血管紧张素II 浓度急剧升高,从而明显抑制线粒体呼吸功能有关[6]。因为我们用小剂量卡托普利预喂大鼠发现,虽然服药大鼠腹主动脉部分缩窄术后动脉血压仍逐渐升高,但心肌缺氧性损伤出现的时相延迟、程度明显较轻(另文发表),提示血管紧张素II 的致伤作用。

急性压力超负荷导致心肌缺氧性损伤的意义尚不明确。有实验发现,生理条件下心肌细胞存在可恢复性瞬时胞膜破裂,伴随胞膜破裂细胞内蛋白分子可释放到细胞外。心肌缺氧或收缩力增强时,这种可复性膜破裂增加 3倍以上[7]。因此,我们推测,急性压力超负荷引起心肌缺氧性损伤与急性压力超负荷后心肌的自分泌或旁分泌活化有关。这些释放出的蛋白分子可包括生长因子、细胞因子,它们可通过自身正反馈作用刺激自身表达,并诱导心肌肥厚反应。

参考文献

1 McNeil P L. Cellular and molecular adaptations to injurious mechanical force. Trends Cell Biol, 1993, (3): 302

2 Clarke M S F, Caldwell R W, Chao H, *et al*. Contraction-induced cell wounding and release of fibroblast growth factor in heart. Circ Res, 1995, 76(6): 927

3 龚志锦,詹溶洲.病理组织制片和染色技术.上海: 上海科技出版社, 1994. 96~ 100

4 Spammer C, Pettte D. Activity patterns of phosphofructokinase, glyceraldephosphate dehydrogenase, lactate dehydrogenase and malate dehydrogenase in microdissected fast and slow fibers from rabbit poas and soleus muscle. Histochemistry, 1977, 52(2): 210

5 Samaja M, Motterlini R, Allibardis C, *et al*. Myocardial metabolism and function in acutely ischemic and hypoxemic isolated rat hearts. J Mol Cell Cardiol, 1995, 27(5): 1213

6 苏晓华,王孝铭,朱世军,等.血管紧张素II 对离体心肌线粒体呼吸功能和膜电位的影响.中国病理生理杂志, 1996, 13(3): 313

7 Takahashi H, Kawaguchi H, Iizuka K, *et al*. The leakage of fatty acid binding protein in cultured myocardial cells during hypoxia. Cardiovasc Drugs Ther, 1991, 5(6): 1021

(收稿: 1997-12-29;修回: 1998-09-17)

(编辑 仇玉福)

Effects of acute pressure overload on the myocardium in rats*

Feng Bin, Chen Yisheng (Department of Pathology, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

He Zuoyun, Zhou Xiaobo, Huang Min (Department of Cardiology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037)

Abstract Objective: To explore the mechanism of the activation of cardiac autocrine or paracrine

* This project was supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 39600041

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

growth factor induced by pressure overload. **Methods**: After the myocardium was injured by acute pressure overload in rats, the morphological changes of the myocardium were dynamically observed with special staining for myocardial hypoxic injury, enzyme histochemical staining and electron microscopy. **Results**: Acute pressure overload caused myocardial hypoxic injury. **Conclusion**: The hypoxic injury might be related to the activation of cardiac autocrine or paracrine growth factor after acute pressure overload.

Key words pressure overload; acute hypoxic injury; activation; rat

自体移植脾组织对红细胞免疫功能影响的初步探讨

Preliminary study on autologous spleen implantation on red-cell immune

蒋登金* 陈维佩 郭光金 张天飞 (第三军医大学基础医学部外科应用解剖与手术学教研室) 重庆, 400038

红细胞不仅具有载氧功能而且还有重要的免疫功能,脾切除后会导致红细胞免疫功能不同程度的损伤。自体脾组织移植是否能减轻或免除这种损害,目前尚不十分清楚,本研究就此作一初步探讨,为临床自体脾组织移植提供一定参考资料。

1 材料与方法

21只雄性昆明种小鼠随机分为切脾组、自体半脾移植组、假手术组。每组 7只,于术后 6、20、50、90、120 d分别取尾静脉血 10μl,用酵母菌花环试验进行外周血红细胞 C3b受体粘附能力的测定,以红细胞粘附酵母菌(结合 2个酵母菌以上)的百分率作为红细胞 C3b受体粘附能力的指标。

2 结果

C3b受体花环结合率:假手术组术后 20 d明显升高,切脾组和移植组处于较低水平,但移植组第 50天显著升高,90 d达假手术组水平,切脾组一直处于低水平状态,见图 1

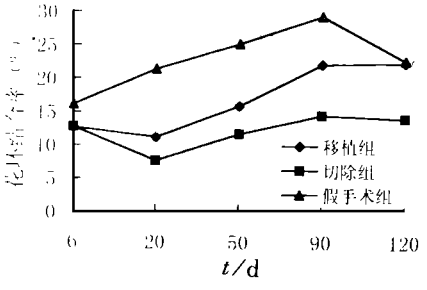


图 1 各组动物血中 C_{3b}受体花环结合率变化图

3 讨论

红细胞具有多种免疫功能,除了运载抗原抗体补体复合物外,还参与 r-INF, IL-12, IL-1,免疫球蛋白的产生, NK、LAK 细胞的免疫调控,促进植物血凝素刺激外周血单个核细胞的增殖[1],特别是红细胞膜上的 C3b受体(粘附分子)能粘附血清调理过的靶细胞如肿瘤细胞,加强各种淋巴细胞对靶细胞的免疫反应[2,3]。年轻女性红细胞免疫功能低下,可能是发生癌症的早期表现之一[4],陈双等首先报道脾切除后红细胞膜上的 C3b受体粘附性降低,红细胞免疫功能受损[5],本研究发现切脾组术后 4个月时, C3b受体粘附性显著低于移植组和假手术组,而移植组于术后 3个月恢复到假手术组水平。C3b受体粘附性的恢复与移植脾组织的再生时间基本一致。可见自体移植脾组织不仅恢复了脾脏本身的某些免疫功能,而且对红细胞免疫功能的正常化具有重要的作用。

(本实验得到太光平同志大力帮助,致以衷心感谢!)

关键词 脾/移植;移植,自体;红细胞/免疫学

中图法分类号 R656

参考文献

1 李素华,牛理丽,陈 莉,等.红细胞促进外周血单个核细胞对 PHA增植反应的实验观察.上海免疫学杂志, 1998, 18(2): 97

2 Buster B L, Mattes K A, Scheld W M. Monoclonal antibody-mediated, complement-independent binding of human tumor necrosis factor-α to primate erythrocytes via complement receptor. J Infect Dis, 1997, 176(4): 1041

3 郭 峰.红细胞调控细胞免疫的事实与意义.上海免疫学杂志, 1991, 11(1): 62

4 郭 峰,张俊洁,赵书平,等.癌症患者红细胞 CR1基因多肽性研究.上海免疫学杂志, 1998, 18(2): 88

5 陈 双,郭金朋,郭从陆,等.脾功能与血液学关系研究(二):脾切除对红细胞免疫粘附功能的影响.蚌埠医学院学报, 1991, 16(1): 43

(收稿: 1997-11-26;修回: 1998-07-02)

(编辑 冷怀明)

* 蒋登金,男,35岁,硕士,讲师

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