DOI:10.16016/j.1000-5404.1992.02.014

大鼠实验性心肌梗塞的病理变化及氧自由基在其发生机制中的作用

郭乔楠 陈意生 （第三军医大学训练部 病理学教研室）630038

提 要 本实验运用光镜、电镜、酶组化、钙组化和心肌及血清MDA水平测定观察2个月内心肌冠状动脉结扎后心肌梗塞的动态病理变化。主要发现为早期的心肌纤维坏死和晚期的修复。电镜改变出现早，几乎累及所有细胞器；晚期的修复主要为不完全再生，并见少量心肌细胞再生及成纤维细胞间的“连接”结构。梗塞后各种酶活性迅速被抑制，提示能量代谢的耗竭。心肌MDA于结扎后24h内升高，提示心肌缺血确可使自由基引发的LPO反应增强，此可能是心肌缺血后不可逆性膜损伤的机制之一。

关键词 心肌梗塞/超微结构；过氧化脂质类；大鼠

本实验通过光、电镜及LDH、SDH(succinic dehydrogenase)、ATPase 组化和酶相对含量测定以及心肌梗塞后缺血心肌和血清脂质过氧化物—丙二醛（MDA)的测定，试图从形态与代谢相结合的角度，采用多指标的综合性动态研究，了解心肌梗塞后心肌形态与代谢的动态演变规律及其发生机制，为心肌梗塞的研究和临床诊治提供病理学基础。

1 材料与方法

1.1 Wistar大鼠150只，重190～250g，雌雄各半。按Selye的方法[1]，于肺动脉圆锥与左心耳之间，离起源2～3mm处结扎左冠脉根部。实验组设结扎后0.5、1、3、6、12h，1、2、3、5、7、15、30和60d，每组6只鼠，测MDA的组为12只。30只假手术鼠作总体对照。动物在1%戊巴比妥钠麻醉下采腔静脉血3ml，离心分离血清，将左室前下游离壁剪下制成10%的匀浆，测定MDA[2]。切取心脏，沿房室环方向从心尖至心底切成约4mm厚的A、B、C 3片，A片用于酶组化和钙组化染色[3]，LDH、SDH 采用结合酶的标准方法（Pearse, 1972; Rearson, 1958)[4]，镁激活的ATPase用Wachstein及Meisel (1957,1960) 方法染色[4]。其中LDH、SDH用MAS-1计算机图象分析系统分别测定梗塞区及梗塞边缘区的相对酶含量。B片在梗塞区及边缘区各取1mm^{3}的组织块，常规程序电镜制样，H-300型电镜观察。C片置于1%氯化硝基四氮唑（TTC）磷酸缓冲液中，大体染色投影放大后用求积仪计算左室梗塞面积（占左室体积的百分比），其组织块常规光镜制样，连续切片两张，作HE、Barbeito-Lopèz(BLTS) 染色[5]。

1.2 所有指标以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，组间学处理用两样本均数的t检验。

2 实验结果

2.1 心脏大体观及心肌梗塞范围

2.1.1 心脏大体观：冠脉结扎后0.5～6h，心外膜有少量淡黄色渗出物，左室前壁充血呈紫红色；12h点，坏死心肌与正常心肌间始有不规则分界线，呈灰白色，横切面心腔略有扩大；1～5d左室游离壁明显变薄，界限更加明显；7d后各点的心脏左室壁变薄更甚，心壁切面最薄处仅0.5mm，室间隔厚度则随时相点延长而增加，最厚为正常的1.5倍。

2.1.2 心肌梗塞范围 (Infarct Size, IS)

12h以前的IS是逐渐增加的(表1)；12～120h，IS趋于稳定，平均为39.41±2.5%LV；7～60d点，IS亦趋于稳定，但较前点稍下降，平均为33.99±0.19%LV。

2.2 心肌的组织学改变

2.2.1 HE染色

冠脉结扎后0.5～24h见心肌早期坏死性改变，主要表现为心肌纤维变细拉长，呈波形，肌纤维嗜酸性增强，可见收缩横带；胞浆横纹消失，呈均质化或颗粒状。心肌间质显充血、水肿，血管腔内及其周围可见中性粒细胞。

冠脉结扎后1～5d见心肌晚期坏死性改变。主

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

表1 心肌梗塞范围

不同时相（h）	梗塞范围(IS,%LV)($\bar{x}\pm s$)
0.5	23.76±3.9
1	29.50±2.3
3	34.13±3.0
6	39.74±4.5
12	46.74±5.9
24	42.23±5.0
48	37.80±2.4
72	38.20±2.6
120	36.50±3.2
168	35.40±2.4
360	33.80±4.0
720	34.18±6.5
1440	33.99±7.0

要表现为心肌纤维断裂，核固缩与核溶解常见，细胞崩解成碎片状。梗塞区内可见出血灶。心肌间质仍显充血水肿，结扎后1～2d，中性粒细胞浸润达高峰，以后逐渐减少，淋巴、单核细胞增多，成纤维细胞和胶原纤维也增多。边缘区正常细胞与梗塞区增生胶原之间有Antischkow[9]描述的核呈“毛虫样”（纵切）或“鹰眼”（横切）细胞。

冠脉结扎后7～60d见心肌的修复性改变。主要表现为坏死心肌逐渐被吸收，至30～60d，坏死心肌完全被吸收，成为心肌疤痕。边缘区血管增生，被纤维组织包围的心肌纤维形态大小不一，有的肥大，有的萎缩。

在整个过程中，心内膜下、心外膜下及血管周围有2～3层形态正常的存活的心肌纤维。

2.2.2 BLTS染色正常心肌胞浆染成绿色。冠脉结扎后0.5h，即可显示心肌坏死，细胞染成淡黄色，还可见细胞浆内的局部黄染以及收缩横带的黄染，随时相点延长，黄染的细胞逐渐增多。

2.3 电镜观察所见

电镜改变早于光镜出现，其坏死改变呈一渐进的动态过程，与光镜相吻合。几乎累及所有细胞器，主要是线粒体、膜，核及肌丝的改变。

冠脉结扎后0.5～24h，I带增宽，Z线模糊不清或弥散入I带，最后Z线、H线、M线都消失。肌膜下水肿，Z线与肌膜连接复合体的锚纤维断裂，形成肌膜下液泡，早期仔细观察可见质膜的小断裂，随后可见明显的质膜断裂，但基膜仍保持完整（图1）。线粒体肿胀，有些线粒体随肌节拉长至

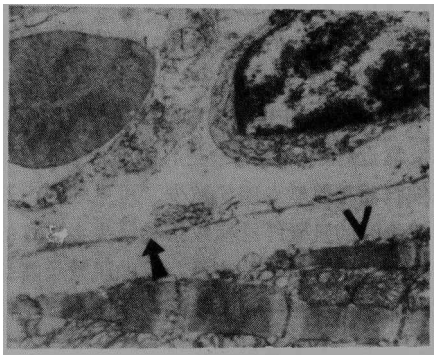


图1 肌膜下液泡(V)，肌质膜断裂(→)，基膜完整。结扎后3 h，×7 000

2～3个肌节长，基质内可见小絮状物，随后线粒体肿胀逐渐明显，空泡化，基质内出现絮状物或螺旋小体(图2)。肌核异染色质结块、边集，核周间隙增宽，见核膜溶解。间质中毛细血管内皮细胞显灶性胞浆空化、细胞器变性，管腔内含血小板、红细胞及中性粒细胞。

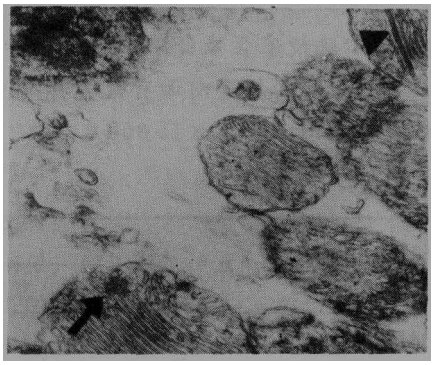


图2 心肌线粒体(M)内絮状致密物(→)及螺环小体(▲)。结扎后1 d，×20 000

冠脉结扎后1～5d，坏死心肌裂成不同方向上的碎片，核减少明显。1～2d时，中性粒细胞增多，边缘区肌原纤维多数呈收缩状态，甚至出现收缩带样改变；胞质糖原颗粒增多，核仁及高尔基复合体发达。有些闰盘染色密度增加，闰盘两侧附着的纤维有溶解和破坏现象，还可见闰盘特化区与非特化区间隙都增宽。

结扎后7～60d，梗塞区基本上被成纤维细胞和胶原纤维取代，有时可见成纤维细胞之间有细胞突起凹凸镶嵌现象，镶嵌处局部膜两侧有致密物质附

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

着，类似细胞间连接结构（图3）。梗塞区及边缘区可见一些散在、与正常细胞不同的细胞，其特征是胞质散在不成熟肌微丝，大量游离核糖体和小线粒体，考虑为新生的心肌细胞。另见有些残余的心肌细胞似骨骼肌“出芽”一样，向外伸出一芽状突起，在小芽内，肌节较正常短，且线粒体小（图4）。靠近纤维组织的一些心肌细胞呈退化性改变，细胞器和肌微丝明显减少，可见细胞内连接结构。边缘区的肌原纤维横纹结构已失去原有的周期性，粗细两种微丝排列紊乱；有的肌微丝断裂而被巨线粒体所占位，一些线粒体有融合成巨线粒体的趋势，其它尚见T管扩张。

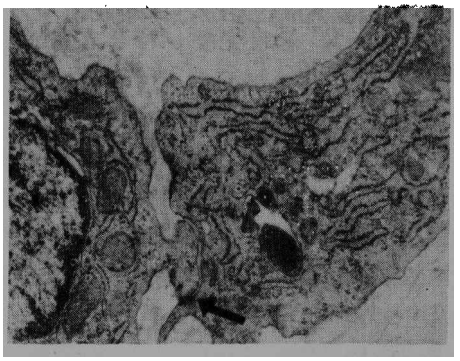


图 3　心肌梗塞区成纤维细胞间连接（→），两侧膜内面有致密物质。结扎后30d，×15 000



图 4　心肌细胞的“出芽”式再生方式，“芽内”肌节短、线粒体小。结扎后15d，×7000

2.4 心肌酶组化反应

2.4.1 LDH和SDH测定结果见表2、3。

2.4.2 ATPase：ATP ase主要分布于心肌内冠状动脉和毛细血管壁内，心肌细胞内此酶的活性相对较低。冠脉结扎后各组梗塞区染色逐渐减弱，甚至消失（6h），但结扎后1～2d，边缘区可见血管染色增强、增多，3～7d达高峡，以后减少。

2.5 心肌钙组化染色

对照组心肌钙染色阴性，冠脉结扎后6h始有弱阳性反应，1～2d反应最强，以后为阴性。

2.6 MDA测定

结果见表4。

表 2　心肌梗塞后LDH活性变化

组别 (h)	n	缺血区		边缘区	
		灰度值	相对含量（%）	灰度值	相对含量（%）
对照组	8	64.25	100	64.25	100
梗塞组					
0.5	4	47.89	75	—	—
1	4	36.34	57	—	—
3	4	17.71	28	66.40	102
6	4	14.51	23	70.15	109
12	4	2.13	3	90.26	140
24	4	2.61	4	89.81	139
48	4	3.76	6	75.43	117
72	4	0.21	0	69.00	107
120	4	3.09	5	65.70	102
168	4	4.57	7	63.25	98

“—”＝没有测量

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

表3 心肌梗塞后SDH活性变化

组别 (h)	n	缺血区		边缘区	
		灰度值	相对含量（%）	灰度值	相对含量（%）
对照组	8	61.26	100	61.26	100
梗塞组					
0.5	4	14.19	23	—	—
1	4	13.21	22	—	—
3	4	4.84	8	62.47	102
6	4	8.13	13	63.10	103
12	4	10.39	17	75.32	123
24	4	7.89	13	69.10	113
48	4	6.94	11	72.20	118
72	4	5.54	9	60.15	98
120	4	0.44	0	61.24	99
168	4	2.48	4	59.39	97

"—" = 没有测量

表4 大鼠心肌梗塞后缺血心肌和血清MDA动态变化

时相 (h)	n	匀浆MDA nmol/mg pr ($\bar{x}\pm s$)	血浆MDA nmol/ml ($\bar{x}\pm s$)
对照组	14	0.85±0.11	2.70±0.89
梗塞组			
0.5	6	1.23±0.15**	2.47±0.52
1	6	1.40±0.08**	3.17±0.77
3	6	1.62±0.13**	4.62±0.91**
24	6	1.08±0.33	5.07±0.91**
72	6	0.73±0.19	3.36±0.49
168	6	0.65±0.17**	2.74±0.74
360	6	0.63±0.12**	2.98±0.63

注：**两组有非常显著差异（$P<0.01$）

结扎后0.5h心肌匀浆MDA已上升，3h达高峰，24h心肌MDA虽高于正常，但统计学处理无显著性差异。结扎后3d，心肌MDA接近正常水平，但至7～15d已显著低于正常对照组（$P<0.01$）。血清MDA 3h开始升高，24h达高峰，72h虽高于正常，但统计学处理无显著性差异。结扎后7～15d，血清MDA恢复至正常水平。

3 讨论

本实验对心肌梗塞进行了多指标的综合性动态研究。揭示了能量代谢的耗竭是心肌坏死的原因之一，冠脉结扎后，有氧呼吸酶SDH和糖酵解酶LDH活性皆迅速下降，使代谢产物堆积。80年代以来，一般将缺血后可逆性损伤到不可逆性损伤的发生归因于心肌细胞膜的破坏[7]。本实验从生化和形态两方面观察了膜的改变。血清及心肌匀浆MDA测定结果表明，心肌梗塞后24h内，心肌缺血确可使脂质过氧化反应增强，同时心肌超微结构显示线粒体嵴模糊、断裂、减少及心肌质膜出现断裂。因此根据文献[3]和本实验上述观察结果，我们认为心肌缺血后从可逆性到不可逆性损伤的发生与心肌膜系统脂质过氧化反应有关。MDA的升高是一过性的，结扎后24h已基本恢复正常，尽管此时中性粒细胞浸润较多，但心肌坏死明显，能够形成MDA的物质（如磷脂等）显著减少，故MDA逐渐降低。血清MDA的变化是心肌MDA变化的结果。超微结构改变中以细胞骨架损伤出现最早，如Z线与肌膜连接复合体的锚纤维断裂、Z线间连接断裂、Z线物质扩散到I带，Z线与M线同于消失或先于M线消失。细胞骨架损伤可使肌膜脆性增加，使继之的细胞水肿造成膜破坏，引起不可逆损伤。细胞骨架损伤的原因可能与钙依

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

赖的中性蛋白酶激活有关[9]。钙在细胞坏死中也起重要作用，但本实验钙组化染色中早期并未显示阳性，仅在结扎后1～2d显示强阳性，其所代表的意义和机制有待进一步研究。

对心肌梗塞IS的动态观察发现IS呈一动态过程，可能受到病变及测量方法等诸多因素影响。所以用大鼠模型来评价药物疗效时，对其结果的解释应作具体分析。

心肌梗塞后侧面边缘带的存在与否一直是有争议的问题[8]。本实验结果表明，其侧面边缘带客观存在，证据是梗塞区与边缘区超微结构和代谢变化均不相同。心肌梗塞后的修复为不完全再生，再生心肌细胞数量有限。心肌疤痕内成纤维细胞的类似“连接”结构以前未见报道，其所代表的功能意义还有待进一步研究。

本实验用TTC、BLTS及HE染色的波形纤维对心肌梗塞进行早期病理诊断，但BLTS可较早在镜下发现其他方法所不能发现的心肌坏死病变，不失为一种较好的心肌病理检查方法。

参考文献

1. Selye H, Bajusz E, Grasso S, et al. Simple techniques for surgical occlusion of coronary vessels in the rat. Angiology 1960;11:398～407
2. 王光亚 李文仙 杨光圻。人和动物血清及组织中脂质过氧化物的测定方法。卫生研究 1980；1:73～78
3. 孙 琦 刘爱莲。心肌缺血和再灌流的钙组化观察。解剖学杂志 1988;11(1):45
4. 陈啸梅。组织化学手册。北京：人民卫生出版社，1980
5. Barbeito-Lopez J. A new trichrome stain. Am J Clin Pathol Tech 1946; 16:53
6. Bouchardy B, Majno G. Histopathology of early myocardial infarcts. New approach. Am J Pathol 1974;74:301
7. 傅良雄。急性缺血时膜损伤机制。国外医学：病理生理学分册 1987;1:6
8. Rao PS, Cohen MV, Mueller HS. Production of free radicals and lipid peroxide in early experimental myocardial ischemia. J Mol Cell Cardial 1983;15:713
9. Sage MD, Jennings RB. Cytoskeletal injury and subsarcolemmal bleb formation in dog heart during in vitrototal ischemic. Am J Pathol 1988:133(2):327
10. Olivetti G, Ricci R, Beghi C, et al. Response of the border zone to myocardial infarction in rats. Am J Pathol 1986; 125:476

(收稿：1991-07-17；修回：1992-01-15)

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

Experimental study of pathological changes and role of oxygen free radical in the pathogenesis of myocardial infarction in rats

Guo Qiaonan, Chen Yisheng (Department of Pathology, Third Military Medical College, Chongqing, 630038)

Abstract The pathological changes of myocardial infarction induced by ligation of a coronary artery were studied under optical and electron microscopy and with enzymohistochemistry, calcium histochemistry, and determination of serum and myocardium homogenate MDA levels in a period of 2 months. The main findings were characterized by early myocardial necrosis and late repair. The ultrastructural changes occurred earlier and involved almost all the organells. The late repair was mainly incomplete regeneration with the findings of a few regenerated myocardial cells and an"interjunction-like"structure of fibroblasts. The products of enzymatic reactions decreased rapidly after ligation, which suggests the disturbance of energy metabolism. MDA level of the myocardial homogenate increased in the first 24 hours after liagtion, which implies that myocardial ischemia actually increases lipid oxidation induced by oxygen free radicals and it might be one of the factors for the irreversibility of ischemic myocardial damage.

Key words myocardial infarct/UL; lipid peroxides; rats

（上接137页）

目前肾上腺皮质醇增多症检查多作尿17-羟、17-酮测定，地塞米松抑制试验，血甲状腺素、皮质醇、头颅X摄片和腹膜后空气造影、B超检查等，CT由于收费高，临床上小儿检查受到局限，但CT检查不失为检查皮质醇增多症的好方法。

关键词 肾上腺皮质疾病；婴儿

参 考 文 献

1. 韦 俊。小儿皮质醇增多症10例临床分析。实用儿科临床杂志 1988；3（4）：196
2. 诸福棠 吴瑞萍。实用儿科学。第四版。北京：人民卫生出版社 1985:899

（收稿：1991-08-08；修回：1992-01-21）

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