

## ·基础研究·

## 力竭游泳运动对大鼠心肌细胞中间纤维和超微结构的影响\*

王鑫<sup>1</sup> 陈正东<sup>1</sup> 吴昊<sup>2</sup> 吴洪海<sup>2</sup> 朱永泽<sup>2,3</sup>

**摘要** 目的:探讨力竭游泳运动对大鼠心肌细胞中间纤维和超微结构的影响,以期为运动对心肌的生理和病理变化研究提供形态学依据。方法:SD大鼠进行1次力竭游泳,分别在力竭游泳运动后即刻(0h)、3h、24h、48h和100h,取左心室肌进行石蜡切片样本处理和常规透射电镜样本处理,石蜡切片分别进行结蛋白和波形蛋白的免疫组织化学染色(Envision法),观察和计算其平均光密度和阳性面积,电镜标本观察肌细胞内超微结构的改变。结果:1次力竭游泳后从即刻到24h,心肌结蛋白和波形蛋白持续降低至最低点,超微结构也出现损伤性改变;运动后48h,心肌结蛋白和波形蛋白开始增加,超微结构的损伤也开始改善。结论:力竭游泳运动可以引起大鼠心肌中间纤维和超微结构的形态变化,运动后大鼠心肌细胞的中间纤维和超微结构出现逐渐恢复的过程。

**关键词** 大鼠;游泳;心肌;结蛋白;波形蛋白;超微结构

中图分类号:R493,R54 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2007)-11-0968-03

The effects of intermediate filaments and ultrastructure of rat's cardiac muscle by single exhausted swimming/WANG Xin, CHEN Zhengdong, WU Hao, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2007, 22(11): 968—970

**Abstract Objective:** To explore the effects of intermediate filaments(IF) and ultrastructure of rat's cardiac muscles by single exhausted swimming (SES), so as to provide some morphological basis of the changes of physiology and pathology by the exercise-induced injury and recuperation of cardiac muscle. **Method:** After exercises of SES, rat's cardiac muscles were cut off on 0h, 3h, 24h, 48h and 100h. These specimens were treated respectively with regular procedures of paraffin sections and transmission electron microscope(TEM). The paraffin sections were stained by Desmin and Vimentin immunohistochemistry, their mean optics density and percentage of stained areas were observed and calculated. The ultrastructure of muscles were observed by TEM. **Result & Conclusion:** Single exhausted swimming exercises will provide effects on IF and ultrastructure of rat's cardiac muscles, and the changes of IF and ultrastructure of cardiac muscle cell after exercises of SES are a gradual recuperation process.

**Author's address** Yangzhou Wutaishan Hospital of Jiangsu Province, 225003

**Key words** rat; swimming; cardiac muscle; desmin; vimentin; ultrastructure

运动引起心脏结构与功能改变及调节机制等方面的研究,一直是众多学者探讨的热点问题。结蛋白(desmin,Des)是肌细胞特异性中间纤维蛋白(intermediate filaments, IF),主要存在于心肌的Z线中,而波形蛋白(vimentin,Vim)主要分布于心肌结缔组织中<sup>[1]</sup>。Des对心肌细胞收缩装置和细胞器位置的固定有着重要的作用,并将心肌细胞整合成一个收缩的整体,使肌细胞在收缩和舒张过程中保持正常结构。目前,关于力竭游泳运动对心肌中间纤维蛋白影响文献报道不多,本实验通过建立大鼠力竭游泳运动模型,观察力竭游泳运动对大鼠心肌细胞中间纤维和超微结构的影响,以期为运动对心肌引起的生理和病理变化研究提供必要的形态学依据。

## 1 材料与方法

## 1.1 实验材料

健康SD大鼠60只,7周龄,体重 $200\pm 25$ g,雌雄各半,由扬州大学医学院实验动物房提供。分笼饲养,自然光照,国家标准固体混合饲料喂养,自由饮水。免疫组织化学试剂均购于丹麦DAKO公司,其中一抗:抗Des单克隆抗体编号M076029,抗Vim单克隆抗体编号M702029,二抗,DAB显色液,编号GK500705;电子显微镜制备材料所需试剂均由扬州大学测试中心提供。图像分析软件:捷达JD801形态图像分析系统软件(1.0)。

\*基金项目:江苏省教育厅自然科学基金资助项目[05KJD310267]

1 江苏省扬州五台山医院,扬州市新民路,225003

2 扬州大学

3 通讯作者:朱永泽(扬州大学)

作者简介:王鑫,男,住院医师

收稿日期:2007-04-26

## 1.2 方法

大鼠购进后, 适应性喂养 3d, 所有大鼠均在 1 周内适应性游泳 3 次, 游泳池为 300L 塑料水箱, 四壁光滑, 水深为 60cm, 约为大鼠身长的 2 倍, 水温控制在  $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ , 每次 15min, 最后一次将大鼠进行一次力竭运动; 随机分为力竭训练组 (single exhausted swimming exercises, SE) 和安静对照组 (exhausted swimming control, EC) 两大组, 力竭判断的标准按照 Thomas 的标准, 即大鼠连续 3 次沉入水底, 每次超过 10s, 不能自主浮上水面; 协调运动丧失, 放在平面无法完成翻正反射<sup>[2]</sup>。SE 组分别在运动后即刻 0h、3h、24h、48h 和 100h 取材, 由于在力竭运动中有大鼠死亡, 最终每组各 6 只。

## 1.3 大鼠心肌组织材料的制备

力竭组各组按运动后各时间点分别取材。大鼠先用 2% 的戊巴比妥钠腹腔注射麻醉, 在低温下用锐利的剪刀和刀片剪去心尖, 剪取左心室肌组织, 约  $0.5\text{cm}\times 0.5\text{cm}\times 0.8\text{cm}$  大小; 而后分别进行常规组织化学材料和超微结构材料, 在染色前分别通过 HE 染色和半薄切片定位, 确定心肌组织为纵行切面后再进行染色。

## 1.4 免疫组化染色

Envision 法, 其中 Des 和 Vim 一抗效价均为 1:300。每次染色均做 1 张阴性对照片, 即用 PBS 缓冲液代替一抗, 其他步骤同上。免疫组化染色步骤均按照抗体供应商提供的方法进行。每小组取 5 例进行免疫组化染色。

## 1.5 免疫组化染色的显微图像分析方法<sup>[3]</sup>

每小组每例中随机选一张做图像分析, 每小组共五张切片。首先在放大倍数为  $10\times 10$  的显微镜下观察标本, 确定观察位置, 然后在  $40\times 10$  放大倍数下取上、中、下三个视野进行分析, 参数由图像分析仪自动给出。

测量参数: ①每个视野中阳性区域的平均光密度; ②每个视野中阳性区域的面积值。

计算参数: ①每个视野中阳性区域的平均光密度; ②阳性区域面积占总面积的百分比。

阳性面积百分比 = 每个视野阳性区域面积 / 每个视野面积  $\times 100\%$ , 本测试中每个视野面积为  $8400112\mu\text{m}^2$ 。

## 1.6 电镜材料的制片

超薄切片厚度为 60nm, 经醋酸铀、柠檬酸铅染色后, 在透射电镜下观察照相。相应的每小组各取 5 例进行观察和分析。

## 1.7 超微结构的图像观察和分析方法<sup>[4]</sup>

每个电子显微镜切片, 首先在 3K 倍的低倍视野下确定观测区域, 然后在 10K 倍的视野内观察肌纤维的情况。主要观察内容包括肌原纤维和肌节排列的规则情况, 肌节明带 (I 带) 和暗带 (A 带) 的完整情况和位置关系; Z 线异常率, Z 线异常变化包括 Z 线流、Z 线模糊、Z 线扭曲和 Z 线消失, 有上述任何一种情况出现的 Z 线均算作异常 Z 线。异常 Z 线数占被观察总数的百分率即 Z 线异常率; 线粒体异常率, 线粒体异常包括线粒体肿胀、线粒体膜破裂、线粒体嵴断裂、线粒体消失, 有上述任何一种情况出现的线粒体均算做异常线粒体。异常线粒体占被观察总数的百分率即是线粒体异常率。每只大鼠所观察的 Z 线总数在 500 条左右, 所观察的线粒体总数在 100 个左右; 同时观察其他细胞器的变化。

## 1.8 统计学分析

所有测量的原始数据经整理归类后, 输入统计软件 SPSS11.0 中, 运用单因素 ANOVA 程序进行单因素方差变异数分析, 运用 Post Hoc Tests 进行多重比较  $t$  检验, 所得结果以均数  $\pm$  标准差表示, 显著性水平为  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 Des 免疫组化染色切片光镜一般观察

以棕褐色颗粒表示的 Des 均出现在安静对照组和各运动组中, 主要分布在胞浆。EC 组心肌纵向切片中, 其以规律性横纹形式遍布整个肌纤维并延伸至肌纤维的边缘。1 次力竭运动后即刻, 心肌 Des 染色出现模糊、变淡 (图 1, 见后置彩色插页 2), 1 次力竭运动后 3h、24h, 染色模糊、变淡现象更为严重, 甚至出现明显的 Des 缺染现象 (图 2, 见后置彩色插页 2), 1 次力竭运动后 48h, Des 染色情况开始逐渐好转, 缺染区域开始减少, 染色深度也有所增强, 1 次力竭运动后 100 h, 染色的区域和深度已基本接近对照组 (图 3, 见后置彩色插页 2)。见表 1。

### 2.2 Vim 免疫组化染色切片光镜一般观察

棕褐色颗粒表示 Vim 的着色部位。EC 组心肌纵向切片中, Vim 只出现在相邻肌纤维的间隙处, 而肌纤维中并没有棕褐色颗粒出现。1 次力竭运动后即刻, 心肌中的 Vim 的染色并没有明显改变 (图 4, 见后置彩色插页 2), 运动后 3 h 切片染色已有所减少, 运动后 24 和 48 h 的切片中, 其染色的深度和区域已明显减少 (图 5, 见后置彩色插页 2), 该现象至运动后 100h 才有所缓解, 着色深度和区域开始增加 (图 6, 见后置彩色插页 2)。见表 1。

### 2.3 心肌超微结构改变

见图 7—9(见后置彩色插页 2)。EC 组心肌纤维排列整齐, 明、暗带交替, 各带和 M 线、Z 线和肌小节清晰可辨; 线粒体丰富, 分布在肌原纤维间, 其形态和大小正常, 膜完整, 嵴密集, 基质电子密度高。细胞核呈卵圆形, 位于中央, 核内异染色质分布均匀; 闰盘在 Z 线水平, 有中间连接和桥粒。在 1 次力竭运动后即刻, 肌原纤维排列开始出现紊乱, Z 线出现模糊、扭曲等现象, 线粒体数量没有明显改变, 但体积开始肿胀, 嵴数量减少, 基质电子密度降低, 有的成

絮状, 有的甚至出现空泡, 细胞核异染色质分布开始不均匀。随后, 心肌超微结构破坏加剧, 甚至出现肌原纤维过度收缩的现象, 至运动后 24h, 肌原纤维排列更加紊乱, 出现 Z 线流、Z 线模糊、Z 线扭曲和 Z 线消失等现象; 线粒体数目有所减少, 体积更加肿胀, 膜有破裂, 嵴断裂或消失, 基质电子密度普遍降低; 闰盘可见扩张, 与之连接的肌纤维减少。而在运动后 48h, 以上情况开始好转, 至运动后 100h, 心肌超微结构较 24h 已有明显改善。见表 2。

表 1 心室肌 Des 和 Vim 免疫组化染色切片图象统计学分析比较

( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别        | 图象分析数 | 心室肌 Des                    |                            | 心室肌 Vim                   |                           |
|-----------|-------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|
|           |       | 心肌结蛋白平均光密度                 | 心肌结蛋白阳性面积值                 | 心肌波形蛋白平均光密度               | 心肌波形蛋白阳性面积值               |
| EC 组      | 15    | 0.463±0.025                | 0.576±0.026                | 0.326±0.013               | 0.114±0.007               |
| SE 0h 组   | 15    | 0.378±0.018 <sup>①③</sup>  | 0.517±0.016 <sup>①③</sup>  | 0.317±0.010 <sup>③</sup>  | 0.109±0.005 <sup>③</sup>  |
| SE 3h 组   | 15    | 0.354±0.015 <sup>①②③</sup> | 0.514±0.014 <sup>①③</sup>  | 0.309±0.008 <sup>①③</sup> | 0.098±0.004 <sup>③</sup>  |
| SE 24h 组  | 15    | 0.328±0.011 <sup>①②</sup>  | 0.488±0.020 <sup>①②</sup>  | 0.281±0.008 <sup>①②</sup> | 0.080±0.008 <sup>①②</sup> |
| SE 48h 组  | 15    | 0.382±0.013 <sup>①③</sup>  | 0.544±0.012 <sup>①②③</sup> | 0.293±0.010 <sup>①②</sup> | 0.097±0.010 <sup>①③</sup> |
| SE 100h 组 | 15    | 0.478±0.020 <sup>②③</sup>  | 0.530±0.018 <sup>①③</sup>  | 0.307±0.009 <sup>①③</sup> | 0.104±0.009 <sup>③</sup>  |

与 EC 组比较: ① $P<0.05$ ; 与 SE 0h 比较: ② $P<0.05$ ; 与 SE 24h 比较: ③ $P<0.05$

表 2 运动后心肌 Z 线和线粒体异常百分率 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别        | 例数 | 运动后心肌 Z 线<br>异常百分率(%)     | 运动后心肌线粒体<br>异常百分率(%)      |
|-----------|----|---------------------------|---------------------------|
| EC 组      | 5  | 1.98±0.91                 | 3.15±0.89                 |
| SE 0h 组   | 5  | 7.38±1.08 <sup>①③</sup>   | 5.98±1.08 <sup>①③</sup>   |
| SE 3h 组   | 5  | 13.05±2.12 <sup>①②③</sup> | 8.34±1.42 <sup>①②③</sup>  |
| SE 24h 组  | 5  | 24.16±5.28 <sup>①②</sup>  | 19.31±5.24 <sup>①②</sup>  |
| SE 48h 组  | 5  | 14.49±4.56 <sup>①②③</sup> | 11.39±3.31 <sup>①②③</sup> |
| SE 100h 组 | 5  | 8.52±3.74 <sup>③</sup>    | 6.58±2.58 <sup>③</sup>    |

与 EC 组比较: ① $P<0.05$ ; 与 SE 0h 比较: ② $P<0.05$ ; 与 SE 24h 比较: ③ $P<0.05$

### 3 讨论

本实验观察到, 1 次力竭性游泳运动后, 大鼠心肌超微结构就出现了损伤性变化, 而且这种损伤变化还表现出一种延迟性, 即在运动后的中期, 这种损伤性变化表现得更为显著。在运动后的后期, 损伤情况开始好转。这与国内外学者研究的结果相似<sup>[5]</sup>。说明 1 次力竭性游泳运动对大鼠的心肌超微结构造成了一定的损伤, 这种损伤具有在运动后恢复时间中可变性的特点。心肌中的 IF 对心脏的结构和功能都有着重要的影响, 其主要作用是稳定心肌细胞结构、对抗心肌外界牵张阻力等<sup>[6-8]</sup>。关于不同强度的运动对心肌形态和功能影响, 国内外已有报道, 但是, 关于研究运动对心肌 IF 影响的报道还不多见。本实验观察到, 经过 1 次力竭性游泳运动, 大鼠心肌中的 Des, 在运动后即刻就有所降低, 而 Vim 却没有显著改变。Des 和 Vim 是心肌组织中的中间纤维蛋白, 在活细胞中存在着聚合和解聚的动态平衡。研究发现, 心肌缺血期和缺血再灌注期, 心肌细胞中的 IF 均发生不同程度的损伤性丢失, 同时心肌细胞的超微结构也发生损伤性变化<sup>[9]</sup>。因此本实验结果可能

与急性力竭运动造成心肌在一定程度上缺血有关。这种缺血不是绝对意义上的心肌缺血, 而是由于运动使得心肌需血量剧增, 此时心肌供血又无法满足, 造成的“相对心肌缺血”<sup>[10-11]</sup>。就可能是这种“相对心肌缺血”, 让心肌中的 Des 在运动后即刻表达有所下降, 但对 Vim 的表达影响不大。

在运动后 24h, 心肌的 Des 和 Vim 表达都降到最低, 此时心肌超微结构的损伤程度也达到最高, 而在运动后 48h 和 100h, 它们的表达量都开始逐渐恢复, 心肌超微结构的损伤程度也开始好转, 可见心肌中 IF 的变化与心肌超微结构的变化有着密切的联系。心肌中 IF 和超微结构的变化可能与运动后心肌“相对性缺血再灌注损伤”和自由基损伤、蛋白水解酶等多种因素有关<sup>[12-14]</sup>。力竭运动停止后, 心脏的血供开始增加, 又形成了一种“相对性缺血再灌注”。研究证明, 大鼠经力竭游泳后, 心肌中自由基丙二醛含量显著上升, 而清除自由基的 SOD 活性明显下降, 心肌组织受损。而在缺血期和再灌注初期, 心肌中  $\text{Ca}^{2+}$  浓度升高, 某些蛋白酶被激活, 这些都是加剧 IF 丢失和超微结构损伤的因素。随着时间的推移, 大鼠心肌中清除自由基的防御系统逐渐恢复, 缺血以及缺血再灌注损伤得以改善, 细胞胞浆中  $\text{Ca}^{2+}$  逐渐开始恢复到正常水平, 因而, 心肌中的 IF 也开始重新进行聚合。在力竭运动后 48h, Des 的表达量已经由最低开始上升, 但是值得注意的是, 直到运动后 100h, Des 的表达量还没有完全恢复到运动前水平, 说明 1 次力竭性游泳对大鼠心肌 IF 的影响有个较长的过程。

(下转 973 页)