

之为硅小体(B)。证明其活动属布朗运动。本文进一步用电感耦合等离子发射光谱分析了培养液及双蒸水中可溶性的硅含量在不同质量的容器及不同时间的变化,证明了硅小体的增多主要来源于培养液对玻璃器皿的侵蚀,部分来

源于被培养的细胞。

参 考 文 献

- [1] 张鸿卿, 1988, 细胞培养中一种新微生物污染的初步研究, 中国细胞生物学会动物细胞和组织培养第四次学术讨论会论文摘要。

1,6-二磷酸果糖抗心肌细胞缺氧性 损伤作用的定量组织学研究

程 薇 李 鹏 卢 兴 杨继声

(西安医科大学病理生理教研室)

关于培养心肌细胞缺氧性损伤的研究, 近年报道较多^[1,2], 但所采用的方法以定性为主。1,6-二磷酸果糖(FDP)是糖代谢的中间底物和驱动物质。近年研究表明, FDP具有保护心肌缺氧、防止膜系统受损的作用^[3,4], 但从定量角度探讨其抗缺氧损伤的作用机制尚未见报道。本实验利用培养心肌细胞缺氧模型, 从代谢、形态和功能3方面定量地探讨心肌细胞缺氧性损伤的规律及FDP对其影响, 为阐明FDP保护缺氧心肌细胞的机制提供实验依据。

方 法

1. 选新生2—3天Wistar乳鼠, 参照Acosta等^[1]方法培养心肌细胞, 在培养72小时后分为对照组、缺氧组、缺氧加葡萄糖组(G组)、缺氧加FDP组(FDP组)。参照Deluca等^[2]方法建立缺氧模型(氧分压 ≤ 30 mmHg)。心肌细胞搏动的振幅和频率采用光电转换搏动器记录。

2. 琥珀酸脱氢酶(SDH)和乳酸脱氢酶(LDH)均以Pearson法显示^[5], PAS阳性物质以Horobin法显示^[6]。每张标本选30个细胞, 用图像分析系统(Leitz-TAS)在波长为589 nm下测定心肌细胞内SDH、LDH及PAS阳性物质的含量, 并同时测定心肌细胞面积的大小, 结果输入电子计算机, 得出单个细胞的SDH、LDH和PAS的相对含量。

3. 每个光、电镜标本分别以 10^3 和 10^4 倍率随机拍照5—6张照片, 每组各取30张, 电镜照片放大

倍数经光栅复型校正。用TAS分别测量每张照片的心肌细胞线粒体和核的横截面积及周长, 数据的其他获得及立体学计算公式, 均参照郑富盛等^[7]方法。采用比表面法, 将所有参数经电子计算机处理, 得出各组线粒体的平均体积及平均单个心肌细胞的线粒体数目。

结 果

一、心肌细胞SDH、LDH及PAS阳性物质的含量变化

1. SDH定量 对照组心肌细胞胞浆中SDH二甲腓颗粒数目多, 呈深紫色, TAS测定其相对含量为0.4615; 缺氧组在缺氧60分钟后SDH二甲腓数目有所减少, 着色变淡(图版图1), TAS测定其含量为0.3079, 至缺氧120分钟为0.2091, 均明显低于对照组; 60分钟G组二甲腓颗粒数目亦见减少, 着色变淡, TAS测定其含量为0.3257, 至缺氧120分钟为0.2336, 均明显低于对照组; 而60分钟FDP组SDH二甲腓颗粒数目及着色强度与对照组无明显差异, TAS测定其含量虽较对照组低, 但却明显高于相应缺氧组(图版图2), 至缺氧120分钟仍明显高于相应缺氧组(表1)。

2. LDH定量 对照组心肌细胞胞浆中LDH的二甲腓颗粒数目多, 呈深紫色, TAS测定其相对含量为0.5417, 镜下未发现60、

表1 各组培养心肌细胞SDH相对含量(M±SD, n=6)

	60 min	90 min	120 min
对照组	0.462±0.035	0.474±0.034	0.452±0.024
缺氧组	0.308±0.027**	0.272±0.056**	0.209±0.094**
G组	0.326±0.045**	0.283±0.055**	0.234±0.059**
FDP组	0.387±0.026***	0.348±0.041***	0.264±0.072***

** 与对照组相比 p<0.01;

*** 与对照组相比 p<0.01, 与缺氧组相比 p<0.05。

表2 各组培养心肌细胞LDH相对含量(M±SD, n=6)

	60 min	90 min	120 min
对照组	0.542±0.024	0.551±0.021	0.552±0.032
缺氧组	0.573±0.047	0.558±0.041	0.497±0.044*
G组	0.569±0.031	0.548±0.045	0.504±0.041*
FDP组	0.608±0.048*	0.587±0.031	0.574±0.034*

* 与对照组相比 p<0.05; * 与缺氧组相比 p<0.05。

90和120分钟缺氧组和G组LDH二甲腓颗粒的明显改变。用TAS测定这两组60分钟的LDH含量均高于对照组,但无统计学意义,至120分钟含量明显低于对照组;而60分钟FDP组LDH二甲腓颗粒数目较多,着色深;TAS测定的LDH含量为0.6081,显著高于对照组,至缺氧120分钟仍不低于对照组(表2,图版图3、4)。

3. PAS阳性物质的定量 对照组心肌细胞胞浆中PAS阳性物质呈暗红色颗粒,散布于细胞质中,颗粒饱满,TAS定量为0.3682;30分钟缺氧组PAS阳性颗粒着色变淡,数目减少,TAS定量为0.2134,至缺氧60分钟PAS阳性颗粒几乎消失,TAS定量为0.0968;30、60分钟G组和FDP组PAS阳性颗粒数目亦有所减少,着色变淡,TAS定量PAS值明显低于对照组,与缺氧组无显著差异(表3)。

二、心肌细胞、线粒体形态和心肌细胞搏动的变化

1. 心肌细胞 对照组心肌细胞呈长梭形、不规则形,胞浆着色均匀,核大,可见1-3个核仁。30分钟缺氧组细胞明显肿胀,胞浆着色变淡,并可见细小淡红色颗粒,TAS测

表3 各组培养心肌细胞PAS阳性物质相对含量(M±SD, n=6)

	30 min	60 min
对照组	0.368±0.054	0.373±0.045
缺氧组	0.231±0.048*	0.097±0.049**
G组	0.255±0.051*	0.108±0.049**
FDP组	0.243±0.078*	0.094±0.056**

* 与对照组相比 p<0.05;

** 与对照组相比 p<0.01。

定每个细胞的平均面积为1325 μm²,显著大于对照组;30分钟G组心肌细胞亦肿胀,TAS测量其面积为1284 μm²,显著大于对照组,而30分钟FDP组细胞未见明显改变。60分钟缺氧组细胞肿胀更甚,胞浆透明空化似筛网状,TAS测定其面积为1710 μm²,与对照组相比差异非常显著,60分钟G组细胞肿胀,TAS测量其面积为1538 μm²,与对照组相比差异非常显著,而FDP组细胞面积为1127 μm²,与对照组无显著差异(表4)。

2. 线粒体 对照组心肌细胞胞浆中富含线粒体,其基质呈均匀中等电子密度,嵴排列致密规则,其平均体积为0.6178 μm³,数目为3778个/细胞,30分钟缺氧组线粒体肿胀明显,

表4 各组培养心肌细胞面积
(μm^2)($M \pm SD$, $n=6$)

	30 min	60 min
对照组	965 \pm 137	961 \pm 115
缺氧组	1326 \pm 132**	1711 \pm 103**
G组	1284 \pm 118*	1538 \pm 125**
FDP组	986 \pm 113**	1127 \pm 120**

* 与对照组相比 $p < 0.05$

** 与对照组相比 $p < 0.01$

** 与缺氧组相比 $p < 0.01$

嵴疏松缺损, 排列无序, 形成囊泡状改变, 基质中出现多个范围不同的透光区, 其平均体积为 $1.3268 \mu\text{m}^3$, 数目为 2879 个/细胞, 与对照有显著差异; 30 分钟 G 组线粒体亦见肿胀, 嵴排列疏松, 局部见灶状缺损, 基质电子密度

比较透明, 而 30 分钟 FDP 组线粒体形态基本正常, TAS 测定其体积与数目与对照组无明显差异。60 分钟缺氧组线粒体肿胀更甚, 嵴排列紊乱, 结构模糊不清, 多数线粒体基质中出现电子致密不规则絮状物质, 外膜断裂、缺损, 其平均体积为 $1.9837 \mu\text{m}^3$, 数目为 1634 个/细胞, 与对照组相比差异非常显著(图版图 5); 60 分钟 G 组线粒体肿胀, 嵴排列紊乱, 线粒体基质中亦见电子致密不规则絮状物质; 而 60 分钟 FDP 组线粒体形态凡无改变, 嵴排列规则, 局部见灶状缺损(图版图 6), 其平均体积为 $0.6836 \mu\text{m}^3$, 与对照组相比显著差异, 数目为 2832 个/细胞, 显著低于对照组(表 5)。

3. 心肌细胞搏动 对照组 心肌细胞搏动

表5 各组培养心肌细胞线粒体的体积和数目($M \pm SD$, $n=6$)

	30 min		60 min	
	体积(μm^3)	数目(个/细胞)	体积(μm^3)	数目(个/细胞)
对照组	0.633 \pm 0.296	3788 \pm 1719	0.603 \pm 0.169	3767 \pm 1742
缺氧组	1.327 \pm 0.226**	2879 \pm 1482*	1.984 \pm 0.240**	1634 \pm 1655**
FDP组	0.649 \pm 0.199**	3664 \pm 1687*	0.684 \pm 0.174**	2832 \pm 1758**

* 与对照组相比 $p < 0.05$

** 与对照组相比 $p < 0.01$

* 与缺氧组相比 $p < 0.05$

** 与缺氧组相比 $p < 0.01$

** 与对照组和缺氧组相比分别 $p < 0.05$

表6 各组培养心肌细胞搏动的频率和振幅($M \pm SD$, $n=60$)

	30 min		60 min	
	振幅	频率	振幅	频率
对照组	2.58 \pm 0.77	214 \pm 77	2.64 \pm 0.85	218 \pm 75
缺氧组	0.84 \pm 0.77**	90 \pm 88**	0.52 \pm 0.85**	62 \pm 63**
G组	0.90 \pm 1.08**	133 \pm 84***	0.60 \pm 0.69**	74 \pm 68**
FDP组	1.58 \pm 0.77***	164 \pm 72***	1.21 \pm 0.77***	137 \pm 74***

** 与对照组相比 $p < 0.01$

*** 与对照组相比 $p < 0.01$, 与缺氧组相比 $p < 0.05$

*** 与对照组相比 $p < 0.05$, 与缺氧组相比 $p < 0.01$

*** 与对照组相比 $p < 0.01$, 与缺氧组相比 $p < 0.01$

振幅高, 频率快, 节律规则。30 分钟缺氧组细胞搏动的振幅和频率均明显低于对照组, 至 60 分钟进一步降低, 节律失常多。30、60 分钟 G 组细胞搏动的振幅和频率也明显降低, 除 30 分钟搏动频率外, 与缺氧组无明显差异。

30、60 分钟 FDP 组细胞搏动的振幅和频率虽低于对照组, 但却明显高于其相应缺氧组(表 6)。

讨 论

一、缺氧早期心肌细胞损伤的演变过程

正常情况下,心肌主要靠有氧代谢供能,而缺氧后,能量则由糖酵解供应。众所周知,LDH可以代表糖代谢无氧酵解的活性,SDH则反映糖有氧代谢的改变。本实验采用了Deluca等^[2]人建立的培养心肌细胞缺氧模型,从细胞水平上运用TAS定量细胞化学动态观察了缺氧早期心肌细胞内LDH,SDH及PAS的变化规律。

既往对缺氧后2小时内心肌细胞LDH活性改变的规律尚缺乏系统研究。我们的实验结果表明,缺氧60分钟心肌细胞内LDH活性有所增加,直到缺氧120分钟才明显下降。但缺氧后SDH活性的下降则较明显,缺氧60分钟即已明显低于对照组。可见,SDH和LDH对缺氧损伤的耐受性明显不同,SDH活性下降早于LDH活性的改变且较严重。缺氧后SDH活性下降标志着糖有氧代谢功能的降低。缺氧时,无氧酵解是缺氧心肌主要供能途径,缺氧早期LDH活性的增高,可能是细胞对缺氧的一种代偿表现,通过无氧酵解直接供能,对缺氧心肌有一定的保护作用。但到缺氧120分钟,LDH活性减弱,说明酵解代偿保护作用也开始减弱。

线粒体对缺氧十分敏感,但缺氧时,线粒体肿胀至何种程度出现裂解,目前尚无定论,我们观察到,缺氧后,线粒体体积和其数目呈高度负相关($r = -0.84, p < 0.01$)。缺氧30分钟,当线粒体的体积增大至113%时,线粒体裂解明显增多,其数目减少24%,也就是说,当线粒体肿胀超过其本身大小1倍时,其裂解破坏明显增多。

二、FDP对缺氧心肌细胞的保护作用

研究表明,FDP能改善缺氧心肌细胞的能量代谢,保护缺氧心肌。本实验观察到,FDP可明显改善缺氧后心肌细胞SDH和LDH活性,LDH含量在缺氧60分钟明显高于对照组,FDP组的细胞和线粒体形态在缺氧60分仍无明显改变,心肌细胞搏动功能也明显好于相应缺氧组。

有关缺氧时能量供应与心肌细胞损伤的关系早有研究。Deluca等^[2]观察到心肌细胞缺氧后,当ATP水平低于正常的50%时,心肌细胞释放LDH量显著增加。本实验观察到,FDP能增加缺氧后心肌细胞内LDH活性,加速能量代谢,故表现为减轻缺氧后心肌细胞和线粒体肿胀,改善细胞搏动和防止心律失常等。但G组各指标测定均明显劣于FDP组,而两组的PAS值无明显差异。可见,FDP保护缺氧心肌细胞,除其直接供能外,可能还与其调节和保护LDH活性,加速糖酵解产生ATP有关。我们既往实验还发现,FDP还具有抗心肌缺氧后的脂质过氧化作用,FDP能保护缺氧心肌细胞,可能也与其抗脂质过氧化有关。

摘 要

用TAS定量研究了培养心肌细胞缺氧后,心肌的细胞化学、形态学和功能改变以及1,6-二磷酸果糖的作用。结果表明,心肌细胞缺氧后,LDH活性呈先高后低的双相改变,SDH活性的降低早于LDH活性的改变且较严重;线粒体明显肿胀,当肿胀至其自身大小的一倍时,裂解破坏增多。FDP可显著改善心肌细胞的SDH和LDH活性,减轻心肌细胞和线粒体肿胀,并可改善心肌细胞功能。

参 考 文 献

- [1] Acosta, D. et al., 1978, *In Vitro.*, 14: 728-734.
- [2] Deluca, M. A. et al., 1974, *Biochem Biophys Res Commun* 59: 749-756.
- [3] Marchionni, N. et al., 1985, *Am J Cardiol.*, 56: 266-273.
- [4] 金惠明等, 1987, 中国意大利上海 FDP论文集, 5-6.
- [5] Pearson, B. J. 1958, *Histochem. Cytochem.*, 6: 112-114.
- [6] Horobih, R. W. 1971, *Stain Technol.*, 46: 53-58.
- [7] 郑富盛, 1984, 中国电镜学会第三次全国学术交流会资料.
- [8] 程 薇, 1989, 中国病理生理杂志, 5: 1-4.