

扩张型心肌病大鼠心肌细胞亚细胞器超微结构分析

常红波 王振涛 吴鸿

【摘要】 目的:观察扩张型心肌病(DCM)大鼠心肌细胞亚细胞器超微结构变化。

方法:将 60 只 Wistar 大鼠随机分为正常组($n=10$)、DCM 组($n=50$)。正常组大鼠给予基础饮食,未进行干预;DCM 组大鼠每日给予 70% 呋喃唑酮溶液诱导 DCM 模型,给药 10 周。采用超声心动仪检测大鼠心脏功能,透射电子显微镜观察各组大鼠心肌细胞亚细胞器变化。 **结果:**与正常组比较,DCM 组左室收缩末期内径(LVESD)和左室舒张末期内径(LVEDD)增加,左室缩短分数(LVFS)和左室射血分数(LVEF)降低(P 均 <0.05)。与正常组比较,DCM 组心肌细胞核增大,线粒体出现肿胀、空泡化,闰盘中间连接和桥粒结构模糊,内质网紊乱,溶酶体异常增大且附近散在糖原颗粒,横管结构破坏,肌原纤维排列紊乱。 **结论:**DCM 大鼠存在心肌细胞亚细胞器损伤及细胞器间联系失衡。

【关键词】 扩张型心肌病;心肌细胞亚细胞器;超微结构;透射电子显微镜

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2021.05.010

Ultrastructure of sub-organelles of cardiomyocytes in rats with dilated cardiomyopathy

CHANG Hongbo¹, WANG Zhenhao², WU Hong¹. ¹Laboratory of Cell Imaging, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450002; ²Department of Cardiovascular, Henan Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450002, China

【Abstract】 Objective: To analyze the ultrastructural changes of sub-organelles of cardiomyocytes in rats with dilated cardiomyopathy (DCM). **Methods:** Sixty Wistar rats were randomly divided into normal group ($n=10$) and DCM group ($n=50$). The rats in normal group were fed with basic diet only, while the rats in DCM group were given 70% furazolidone solution daily for 10 weeks to establish DCM models. The function of heart were quantified by echocardiography. Transmission electron microscopy was used to observe the ultrastructural changes of sub-organelles of cardiomyocytes in both groups.

Results: Compared with the normal group, left ventricular end systolic diameter (LVESD) and left ventricular end diastolic diameter (LVEDD) in model group were higher, while left ventricular fractional shortening (LVFS) and left ventricular ejection fraction (LVEF) were lower (both $P < 0.05$). Compared with the normal group, the nucleus of the model group was enlarged, and the mitochondria appeared swollen and vacuolated. The structure of the middle junction and desmosome in the disc were blurred, with disordered endoplasmic reticula. The lysosome was abnormally enlarged and there were scattered glycogen particles nearby. The structure of transverse canal was destroyed, and the myofibrils were disordered. **Conclusions:** The damage of sub-organelles and imbalance of organelle exist in cardiomyocytes of rats with DCM.

【Key words】 Dilated cardiomyopathy; Cardiomyocytes sub-organelle; Ultrastructure; Transmission electronmicroscope

基金项目:河南中医药大学博士科研启动基金(DSRBSJJ2019-31);河南省特色骨干学科中医学学科建设项目(STG-ZYXKY-2020035)

作者单位:450046 郑州,河南中医药大学细胞成像实验室(常红波,吴鸿);450002 郑州,河南省中医院心血管科(王振涛)

通信作者:吴鸿,E-mail:wuhong@hactcm.edu.cn

扩张型心肌病(DCM)患者主要以心腔扩大、心肌收缩功能减退为特征,临床常表现为进行性心力衰竭^[1-2]。心肌细胞是心脏收缩和舒张的基本结构单元,由细胞膜结构、肌纤维、细胞核、线粒体等多种细胞器构成。多种原因导致心肌重构时,这些亚细胞器会出现一系列改变,使细胞出现功能紊乱^[3]。了解心肌细胞亚细胞器的超微结构变化与细胞功能的关系及其在 DCM 发生、发展中的作用,对 DCM 的早期诊断和治疗具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

60 只 3 周龄 SPF 级雄性 Wistar 大鼠,体质量(50±5)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,质量合格证号为 11400700277616,饲养于河南中医药大学细胞成像实验室动物中心,实验动物使用许可证号为 SYXK(豫)2016-0009。本实验遵守国家有关实验动物保护和实验准则。

1.2 实验分组与模型制备

按随机编号方法在 Wistar 大鼠尾部标号,分为正常组($n=10$)和 DCM 组($n=50$)。正常组不进行干预,给予基础饮食;DCM 组每日给予 70% 呋喃唑酮溶液诱导 DCM 模型,连续给药 10 周后进行超声心动仪检测。

1.3 超声心动图检测

采用小动物超声心动仪,将超声探头放在大鼠乳头肌水平处,获取大鼠胸骨左室长轴切面视野图,M 超测量线放在乳头肌后缘,切换 M 超视野,测量和计算左室收缩末期内径(LVESD)、左室舒张末期内径(LVEDD)、左室缩短分数(LVFS)、左室射血分数(LVEF)。1 位专业超声人员对所有大鼠进行检测,测量 3 个心动周期,每个指标取平均值。

1.4 透射电子显微镜观察亚细胞器超微结构

取出心脏,迅速剪取左心室心尖部位小块心肌组织,切成 3~4 个 1 mm×1 mm×1 mm 的组织标本,立即放入 2.5% 戊二醛固定液,固定 4 h,换液,1% 锇酸固定 2 h,磷酸盐缓冲液(0.1 mol/L, pH=7.2)冲洗 3 次,15 min/次,用梯度浓度 30%、50%、70%、80%、90%、100% 的酒精脱水,15 min/次,常规树脂包埋,超薄切片,醋酸铀-枸橼酸铅双染色,透射电子显微镜下观察并拍照。

1.5 统计学分析

数据采用 SPSS 21.0 统计学软件进行分析,符合正态分布的数据以均数±标准差表示,多组间比

较用单因素方差分析,方差齐时两组间比较采用 LSD 法检验,方差不齐时两组间比较采用 Tamhane's 法检验。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组心脏超声结果比较

采用高分辨率的小动物超声探头测定各组大鼠心脏结构和功能的变化。与正常组比较,DCM 组的 LVESD 和 LVEDD 明显增加,LVFS 和 LVEF 显著降低(P 均 <0.05),见图 1、表 1。

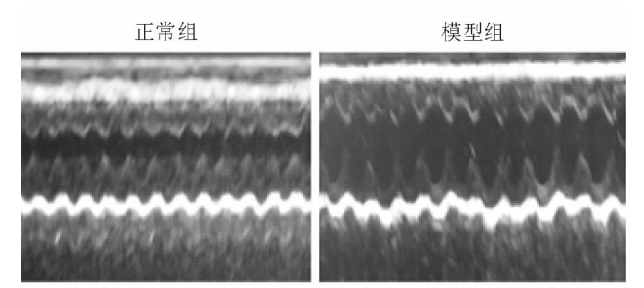


图 1 正常组和 DCM 组超声心动图结果

表 1 两组大鼠超声心动图检测结果比较

项目	正常组	DCM 组
LVESD/mm	3.21±0.14	5.64±0.16 ⁽¹⁾
LVEDD/mm	5.80±0.33	6.92±0.25 ⁽¹⁾
LVFS/%	38.76±2.09	20.65±2.49 ⁽¹⁾
LVEF/%	83.09±3.29	54.17±2.33 ⁽¹⁾

注:与正常组比较,⁽¹⁾ $P<0.05$

2.2 正常组心肌细胞亚细胞器超微结构

正常组心肌细胞肌丝排列整齐,线粒体呈线状排列在肌丝束间,肌小节及其 Z 线清晰可见;闰盘弯曲走行,其近旁的肌浆有糖原颗粒及少量囊泡存在,嵌于闰盘网的肌丝清晰可见;肌原纤维呈规则的带状结构;核染质颗粒分布较均匀,脂滴适量,溶酶体小且少见,见图 2。

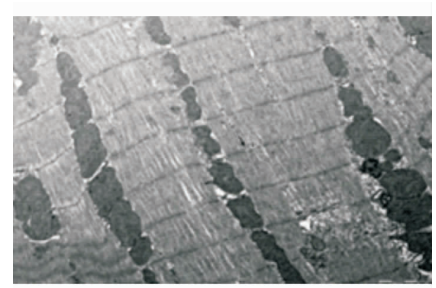
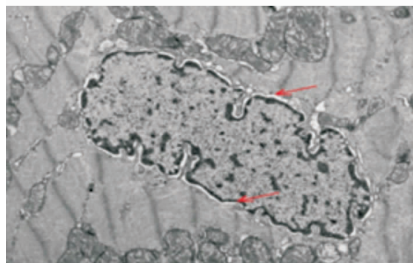


图 2 正常心肌细胞超微结构(×12 000)

2.3 DCM 组心肌细胞核结构变化

DCM 组心肌细胞核增大且较长,核周间隙明显增宽。见图 3。

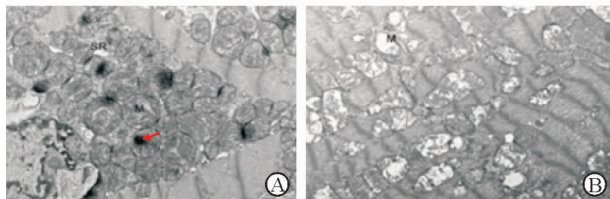


注:DCM 大鼠心肌细胞核增大;红色箭头所指为核周间隙

图 3 DCM 大鼠心肌细胞核超微结构($\times 12\ 000$)

2.4 DCM 组心肌细胞线粒体结构变化

DCM 组心肌细胞线粒体数量异常增多,聚集成簇,线粒体基质内有钙盐样致密颗粒沉积;线粒体出现高度肿胀、嵴断裂或消失、空泡化。见图 4。

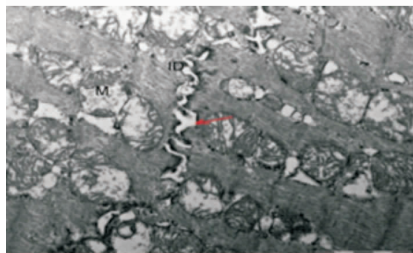


注:A 示心肌细胞线粒体数量增多,聚集成簇,红色箭头所指为线粒体基质内钙盐样致密颗粒沉积;B 示线粒体形态变化,M 为线粒体

图 4 DCM 大鼠心肌细胞线粒体超微结构($\times 12\ 000$)

2.5 DCM 组心肌细胞闰盘结构变化

DCM 组闰盘的中间连接及桥粒结构模糊,间隙增宽,亦可见线粒体肿胀、空泡化。见图 5。



注:红色箭头所指为闰盘中间连接;M 为线粒体;ID 为闰盘

图 5 DCM 大鼠心肌细胞闰盘超微结构($\times 12\ 000$)

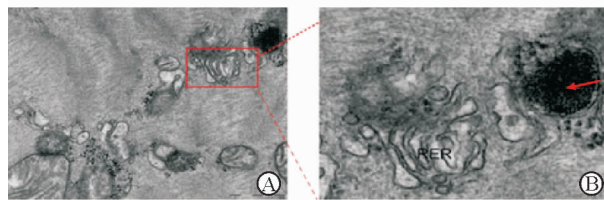
2.6 DCM 组内质网和溶酶体结构变化

内质网由片状和管状两种结构连接组成,如图 6 所示。DCM 组片状内质网主要分布在细胞核周围区域,向内与外核膜相连;管状内质网则通常连接形成网络结构。DCM 组细胞中溶酶体异常增大,且附近有散在糖原颗粒。

2.7 DCM 组横管和肌质网结构变化

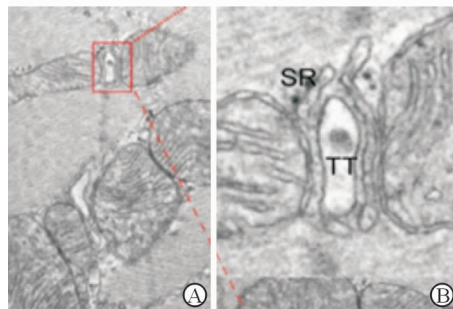
DCM 组心肌细胞膜深入肌细胞内形成的横管,横靠心肌纤维 Z 线,与心肌细胞肌质网分支互相吻合,网孔明显增大。DCM 组横管结构发生破

坏,肌原纤维和线粒体亦出现紊乱。见图 7。



注:A 为 $\times 12\ 000$;B 为 $\times 36\ 000$,B 是图 A 中红框放大所示,红色箭头所指为溶酶体,RER 为粗面内质网

图 6 DCM 大鼠心肌细胞内质网和溶酶体超微结构



注:A 为 $\times 30\ 000$;B 为 $\times 90\ 000$,是图 A 中红框放大所示,SR 为肌质网,TT 为横管

图 7 DCM 大鼠心肌细胞横管和肌质网超微结构

3 讨论

对充血性心力衰竭不同动物模型的研究发现,细胞内各种亚细胞器损伤及细胞器之间的联系失衡可引起细胞损伤,导致心脏结构和功能失代偿,引发心力衰竭^[4]。

线粒体是心肌细胞内的产能细胞器。心肌肥大时,先出现线粒体肥大,它的改变早于肌原纤维的肥大^[5-6]。随着疾病进一步发展,线粒体出现肿胀、空泡化,进而出现功能障碍,引起细胞能量代谢紊乱,最终导致 DCM 的发生。本研究观察到 DCM 大鼠心肌细胞线粒体增生,数量异常增多,聚集成簇,线粒体出现肿胀变形、嵴断裂消失及空泡化现象。线粒体的结构损伤使膜通透性增大,导致线粒体膜功能障碍。闰盘主要由桥粒、中间连接和缝隙连接组成,其在心肌细胞的电、机械和代谢耦联中发挥重要作用^[7]。本研究发现 DCM 大鼠闰盘的中间连接及桥粒结构模糊。闰盘中间连接增宽,可使心肌细胞收缩减弱,破坏细胞间的机械-电耦合,促使心肌间质纤维化发生,导致 DCM。内质网应激(ERS)的发生常早于基因转录水平的细胞核反应和代谢水平的线粒体反应,持续而严重的 ERS 可触发细胞凋亡,造成细胞损伤^[8-9],引起 DCM。溶酶体作为一种膜包裹的囊状细胞器,通过自噬降解受损的

细胞器,调节底物供应以维持心肌能量,从而维持正常的心脏功能和心肌细胞稳态^[10-11]。研究表明,心肌细胞横管重构在心肌肥大代偿期即已发生^[12-13]。本研究观察到 DCM 大鼠横管结构发生破坏,溶酶体异常增大,肌原纤维出现排列紊乱,随着 DCM 发展,溶酶体和横管结构紊乱加重。

心肌细胞及其亚细胞器超微结构的改变早于心脏收缩功能障碍,深入了解心肌细胞超微结构变化和影响心肌细胞亚细胞器稳态的相关调控蛋白作用,可为 DCM 临床诊治提供新思路。

参 考 文 献

- [1] 中华医学会心血管病学分会,中国心肌炎心肌病协作组. 中国扩张型心肌病诊断和治疗指南[J]. 临床心血管病杂志, 2018, 34(5):421-434.
- [2] 黄妹丹,何凤珍,张倬华,等. 扩张型心肌病常见致病基因及其致病机制的研究进展[J]. 中国临床新医学, 2018, 11(10):1052-1056.
- [3] Singh RM, Waqar T, Howarth FC, et al. Hyperglycemia-induced cardiac contractile dysfunction in the diabetic heart [J]. Heart Fail Rev, 2018, 23(1):37-54.
- [4] Dhalla NS, Dent MR, Tappia PS, et al. Subcellular remodeling as a viable target for the treatment of congestive heart failure[J]. J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2006, 11(1):31-45.
- [5] Hu L, Ding M, Tang D, et al. Targeting mitochondrial dynamics by regulating Mfn2 for therapeutic intervention in

diabetic cardiomyopathy[J]. Theranostics, 2019, 9(13): 3687-3706.

- [6] Govindaraj P, Rani B, Sundaravadivel P, et al. Mitochondrial genome variations in idiopathic dilated cardiomyopathy[J]. Mitochondrion, 2019, 48:51-59.
- [7] 于瀛,李毅刚. 闰盘处蛋白质的相互作用以及相关心脏疾病[J]. 复旦学报(医学版), 2016, 43(2):241-243.
- [8] Tao S, Chen L, Song J, et al. Tanshinone II A ameliorates diabetic cardiomyopathy by inhibiting Grp78 and CHOP expression in STZ-induced diabetes rats[J]. Exp Ther Med, 2019, 18(1):729-734.
- [9] West G, Gullmets J, Virtanen L, et al. Deleterious assembly of the lamin A/C mutant p. S143P causes ER stress in familial dilated cardiomyopathy [J]. J Cell Sci, 2016, 129(14): 2732-2743.
- [10] 陈芳,邹联洪,刘协红,等. NRF2 减轻阿霉素诱导的心肌 H9C2 细胞氧化应激和溶酶体功能障碍[J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(8):1359-1364.
- [11] 刘丹. 全氟辛烷磺酸抑制自噬——溶酶体通路致小鼠 ES 细胞衍生心肌细胞损伤的机制研究[D]. 杭州:浙江大学, 2019.
- [12] 李盛村,王婷,王国祥. 心肌中 t-tubule 重构与治疗新策略[J]. 生理科学进展, 2014, 45(6):468-471.
- [13] 王世强,杨华乾. 心肌细胞兴奋收缩耦联的分子机制[J]. 中国科学:生命科学, 2013, 43(10):833-841.

(收稿:2020-12-18 修回:2021-07-08)

(本文编辑:胡晓静)