

· 实验研究 ·

愈心痛对犬缺血心肌细胞线粒体超微结构
损伤保护作用的体视学研究

雷 燕

(北京中医药大学基础医学院病理室 100029)

陈可冀 尚晓泓 刘建勋 吴 昱

(中国中医研究院西苑医院 北京 100091)

摘 要 本实验在结扎麻醉犬冠状动脉左前降支中段造成急性心肌缺血的模型上,动态检测了犬血清肌酸磷酸激酶(CPK)活性变化,并运用电镜技术产体视学研究方法对缺血心肌细胞线粒体的超微结构损伤进行了形态定量分析,以探讨具有益气活血功效的中药复方愈心痛胶囊对急性心肌缺血的保护作用。心肌酶检测显示:心肌缺血时间越长,血清 CPK 活性越高,而愈心痛可阻止缺血心肌 CPK 的漏出,使其活性显著低于生理盐水对照组;电镜体视学研究表明:缺血心肌细胞线粒体的体密度(V_v)明显增加,面数密度(N_A)和比表面(S)却降低,提示线粒体高度水肿,而给予愈心痛后可显著降低缺血心肌线粒体的 V_v ,同时增加 N_A 和 S 表明愈心痛胶囊可减轻缺血造成的心肌线粒体水肿,阻止缺血心肌膜损伤,有稳膜作用,在一定程度上维持膜结构的完整性,从而保护心肌超微结构,防治心肌缺血性损伤。提示愈心痛胶囊对缺血性心脏病的治疗具有潜在的临床应用价值。

关键词 愈心痛胶囊 心肌缺血 线粒体 体视学研究

本研究在结扎麻醉犬冠脉左前降支中段造成的急性心肌缺血模型上,动态监测了犬血清肌酸磷酸激酶(CPK)水平,并运用电镜技术和体视学研究方法对缺血心肌细胞线粒体的超微结构损伤进行了形态定理分析,以期根据心肌酶的变化和线粒体的改变,评定各组缺血心肌损伤程度,了解愈心痛胶囊对心肌缺血性损伤的保护效应。

材 料 和 方 法

1 实验药物 愈心痛胶囊主要成分为红参、三七,其提取干粉由吉林敖东制药厂提供;硫氮卓酮,30mg/片,上海延安制药厂生产,批号:9001003。0.9%氯化钠注射液,石家庄市第四制药厂生产,批号:2112003。上述实验药物均在实验前用生理盐水配制等体积(3ml/kg)以备用。

2 模型建立及标本制备 选用健康成年犬 20 只,雌雄不限,体重 13.85 ± 1.96 kg,由中国中医研究院西苑医院动物室提供。随机分为(1)空白对照组 5 只,生理盐水 3ml/kg;(2)阳性药对照组 5 只,硫氮卓酮 5mg/kg;(3)愈心痛胶囊低剂量组 5 只,1g 生药/kg;(4)愈心痛胶囊高剂量组 5 只,2g 生药/kg。以结扎麻醉犬冠脉左前降支中段的方式,复制

心肌缺血病理模型,结扎冠脉 15 分钟后,各组经十二指肠给予实验药物和生理盐水,分别于冠脉结扎后 15 分钟(药前)、药后 60、120、180 分钟抽取股静脉血各 2ml,1500rpm 离心 10 分钟,分离血清,用酶偶联法在 DONE 牌选择性化学分析仪上测血清 CPK 活性。结扎后 3 小时,迅速取下心脏,以冰生理盐水洗去残血,立即以皮钻(内径 3mm)在左心室第三片标本的缺血中心区和非缺血区取材,将中间部分切成 1mm^3 大小组织粒,每例取材 2~3 块,3%戊二醛固定,按透射电镜制片常规脱水、包埋、切片,醋酸铀和枸橼酸铅双重染色,JEU-100CX 型透射电镜观察与摄片,每组分别在一万倍下随机拍摄 25~30 个视野,用透明胶片自制成共有 108 个测试点的长方形测试格,将此测试格与电镜底片迭印后,在 FuFi-SD690 放大机下放大 2 倍,照片上印着测试格,作为定量测试的原始资料。每组电镜照片 20~28 张不等,系在拍摄过程中卡片所致。

3 体视学研究方法^[1] 采用体视学中体密度(V_v)、面数密度(N_A)和比表面(S) 3 个指标对心肌细胞线粒体进行形态定量测算,运用点计数法(Point Counting Method),其体密度和面数密度均以整张照片观察总面积(P_{ri})作为参照系。

3.1 体密度的测算 体密度乃指某一细胞结构成分的总体积与它所在的参照系总体积之比,以 V_v 表示,其数值可从每张照片上落在某种结构内的测试点数目(P_{xi})与同一张照片落在参照系截面内的测试点数目(P_{ri})之比求得,比值可用百分率表示,即:

$$V_v = \frac{P_{xi}}{P_{ri}}$$

由于每张照片中的参照系面积不完全相等,故需要用加权平均, Σ 是对所有照片求和,其标准差按下式计算

$$S = \frac{\sqrt{\frac{\sum (P_{xi}^2 + M^2 - 2MP_{xi})}{(N-1)(\sum P_{xi})^2}}}$$

此式为各参数的通用标准差公式,在体密度的点计数法中,其 x 为 P_{xi} , y 为 P_{ri} , M 为平均值, N 为照片张数。

3.2 面数密度的测算 面数密度是指参照系截面的单位面积内某种颗粒截面的数目,以 N_A 表示,即

$$N_A = \frac{N_x}{aP_{ri}}$$

式中 N_x 为每张照片上参照系内某种颗粒的截

面数, P_{ri} 为参照系截面积, a 为一个测试点对应的测试小方格面积,本实验中 $a = 1/4\mu m^2$, 抽样误差的计算同体密度,但需乘一个 $1/a$ 因子。

3.3 比表面的测算 比表面是指某种结构本身单位体积所具有的表面积,它只与结构本身有关,而与原来的参照系无关,用 δ 表示。根据体视学原理,某一规则外型的结构表面积和它的断面周边长有一定关系,而周边长可通过某界膜与测试线的交叉点来反映,其点计数法公式为

$$\delta = \frac{2L_{xi}}{ZP_{xi}}$$

式中 L_{xi} 为膜截线与测试线交叉点数, P_{xi} 意义同体密度, Z 为常数,是一个测试点所代表的测试线长,即等于小方格边长的 2 倍,在本实验中,每一小方格的边长为 $1/2\mu m$, $Z = 1$, 其误差的计算同体密度,但要乘上 $2/Z$ 的因子。

所有数据均以 $\bar{x} \pm S$ 表示,统计学处理采用 t 检验和方差分析。

结 果

1 对血清 CPK 活性的影响(见表 1)

表 1 各组给药前后血清 CPK 活性的比较($\bar{x} \pm S$)

组 别	剂量(/kg)	CPK 活性(IU/L)			
		药 前	药后 60min	药后 120min	药后 180min
生 理 盐 水 (n=5)	3ml	608.80±122.61 (100%变化率)	819.20 ± 179.16 ± 31.21	1122.00 ± 223.46△△ ± 36.71	1517.00 ± 313.74△△△ ± 51.53
硫氮卓酮 (n=5)	5mg	665.33±98.37 (100%变化率)	639.00 ± 134.85 ± 20.27*	771.20 ± 179.40 ± 26.96**	996.00 ± 288.28△ ± 43.33**
愈心痛胶囊 (n=5)	1g	494.60±217.38 (100%变化率)	630.00 ± 363.81 ± 73.56	708.00 ± 387.97 ± 78.44	786.00 ± 245.03 ± 49.54*
愈心痛胶囊 (n=5)	2g	535.00±294.28 (100%变化率)	658.80 ± 234.98 ± 43.92	726.60 ± 110.65 ± 20.69*	822.60 ± 183.79 ± 34.35**

注:与药前自身比较:△ $p < 0.05$, △△ $p < 0.01$, △△△ $p < 0.001$;其变化百分率与生理盐水组同期比较: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

由表 1 可见,血清 CPK 活性随着冠脉结扎时间的延长逐渐增高,以结扎 15 分钟时(给药前)测量值为对照,生理盐水组给药后 60、120、180 分钟分别增加 34.56%、83.30%($p < 0.01$) 及 149.18% ($p < 0.001$),说明心肌有急性损伤;而愈心痛两个剂量组及硫氮卓酮组均能明显抑制 CPK 的漏出,使其活性显著低于盐水对照组,表明心肌损伤程度较轻。

2 心肌超微结构的变化

电镜下可见,非缺血区心肌细胞结构正常,肌原纤维明暗带清晰,周围有较多的簇状糖原颗粒,胞质内线粒体丰富饱满,基质均匀致密,嵴排列整齐;生理盐水组肌原纤维大量溶解,肌丝松散,无明显暗带,线粒体部分肿胀,部分收缩,嵴扭曲变形,少数断裂,基质内有絮状物沉淀,属不可逆性损伤;高剂量愈心

痛组心肌组织的损伤明显轻于生理盐水组,肌原纤维排列较规则,明暗带较清楚,线粒体结构尚完整,部分线粒体稍肿胀,嵴大部分清楚,基质均匀,属可逆性损伤;低剂量愈心痛组和硫氮卓酮组心肌细胞损伤程度相似,肌丝排列尚规则,明暗带可辨,线粒

体轻度水肿,嵴排列较疏松,部分结构模糊,基质较淡,其心肌超微结构的损伤程度较生理盐水组轻,但不如高剂量愈心痛组的效果,也主要是可逆性损伤。

3 心肌线粒体的定量分析(见表 2)

表 2 各组线粒体 V_v 、 N_A 、 δ 的变化比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	剂量(/kg)	照片数	V_v (%)	N_A (μm^{-2})	δ (μm^{-1})
非缺血区	—	20	17.9 $\pm$ 3.73	0.214 $\pm$ 0.041	5.18 $\pm$ 1.45
生理盐水	3ml	28	25.23 $\pm$ 4.82 $\triangle\triangle\triangle$	0.108 $\pm$ 0.043 $\triangle\triangle\triangle$	3.46 $\pm$ 1.28 $\triangle\triangle\triangle$
硫氮卓酮	5mg	23	20.37 $\pm$ 6.70*	0.175 $\pm$ 0.091*	4.27 $\pm$ 1.77**
愈心痛胶囊	1g	25	21.20 $\pm$ 7.81*	0.170 $\pm$ 0.074*	4.17 $\pm$ 1.75**
愈心痛胶囊	2g	27	19.53 $\pm$ 4.80**	0.185 $\pm$ 0.085**	4.40 $\pm$ 1.34**

注:与非缺血区比: $\triangle\triangle\triangle P<0.001$;与生理盐水组比较: * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

从体视学研究来看,结扎犬冠状动脉左前降支后,缺血区心肌细胞线粒体的 V_v 明显增加,而 N_A 、 δ 却降低,与非缺血区心肌相比,有非常显著的差异($P<0.001$),示线粒体肿胀严重;各用药组心肌线粒体 V_v 也呈增高趋势,而 N_A 、 δ 减少,但其变化幅度较生理盐水组明显减轻,组间差异 $P<0.05\sim 0.01$,示线粒体水肿较轻,各用药组组间无明显差异,与非缺血区心肌相比差异也不显著。

讨 论

近年来,体视学研究方法已逐步应用于生物医学领域,对组织和细胞进行原位定量分析,从而使定性、定位、定量同步化研究成为可能。线粒体不仅是细胞内产生能量的主要场所,而且是维持细胞内环境稳定的重要细胞器,因此,线粒体结构和功能的正常是细胞生存的基本条件,在异常生理、病理条件下,线粒体也是最敏感的细胞器之一,因而成为进行超微结构生理、病理研究的较理想的指标之一。

线粒体的体密度(V_v)为参考系统中线粒体所占的百分数,线粒体的面数密度(N_A)是指单位参考系统中线粒体的数目,比表面(δ)是反映结构与功能关系最重要的形态参数,在相同表面积情况下,体积越大,比表面越小,反之体积越小,比表面越大,在相同体积情况下,球的比表面最小。本实验发现,在遭受缺血事件后,心肌线粒体等超微结构严重受损,其

体密度明显增大,而面数密度比表面显著减少,表面线粒体高度水肿且数量减少,线粒体膜及基本结构发生病变。从体视学测量结果来看,生理盐水组 V_v 最大, N_A 、 δ 最小,提示此组线粒体水肿最严重,超微结构的破坏也以生理盐水组最重,与线粒体变化平行,而各用药组较生理盐水组 V_v 减少, N_A 、 δ 增大,心肌损伤程度也较轻,说明各用药组均有减轻缺血造成的线粒体水肿的作用,尤以愈心痛高剂量组作用明显。

细胞膜和亚细胞膜的完整是维持细胞功能的重要前提。最近认为^[2],生物膜损伤是心肌细胞由可逆性损伤转化为不可逆损伤的早期特征和重要环节。因此,阻止心肌缺血时线粒体膜的损伤具有重要意义。本研究通过动态监测心肌缺血犬 CPK 水平,发现愈心痛可抑制缺血心肌 CPK 的漏出,对生物膜有稳定作用,在一定程度上维持膜结构的完整性,心肌超微结构的观察和定量分析也证实了这一点,表明愈心痛对实验性犬急性心肌缺血性损伤有一定的保护作用。这种保护作用的机理可能与该方益气活血功能和阻止心肌缺血时的膜损伤的作用有关。本研究为愈心痛胶囊抗心肌缺血的药理作用提供了亚细胞水平的形态学依据;定性 with 定量,结构与功能相结合地研究中药作用机理,也是中西医结合研究方法的一种有益尝试。

(收稿日期:1997-01-15)

**A Study on the Relationship between Spleen-qi-deficiency Symptom
and Neuro-endocrino-immunologic Network**

Jin Jingshan (金敬善) et al· Beijing Institnte of TCM(100010)

On the basic of our past experiment about on spleen-qi-defeiciency Symptom, this study want to learn the relationship betwenn Spleen-qi-deficiency Symptom and neuromediums, gastrointerestinal hormones, interleukins, immune globulins· The clinical research show comparing to the mormal peoples, spleen-qi-deficiency patients arehigher in motilin and total carhonyl group in blood, and lower in IgG, IgA, IgM· Non-spleen-qi-deficiency patients are higher in motilin, gastrin and total carbonyl group in blood, The laboratroiy research show that spleen-qi-deficiency animals are lower in gastrin in blood and higher in motilin in blood· SijunziTang could recover the motilin of spleen-qi-deficiency animals to mormal· The spleen-qi-deficiency animals with CAG are normal in ⁵-HT in brai homogenate, gastrin in blood and higher in ⁵-HIAA in brain homogenate, in motilin in blood· The above research will useful in learning the relationship between spleen-qi-deficiency sympton and neuro-endocrino-im-munologic network·

Key words spleen-qi-deficiency symptom, neuro-ndocrino-immunologic network, animal model

**Epidemiological Survey on Syndromes
Distribution in PMS**

Qiao Mingqi et al(乔明琦) et al· Shandong Univ· of TCM Shandong(250014)

Abstract According to the diagnosis standard of Premenstrual Syndrome and the related syndromes in TCM, the epidemiological survey was carried out on clinical manifestation and distribution in the adult female of different oc-cupation in shandong area, 526 cases' symptoms and signs differentiated, the investigated result show that distri-bution of syndromes of TCM in PMS are Clear, and manifested as rule of disorder of Liver-qi smoothing qi flow, 4 syndromes of the liver-qi invasion the Liver-qi stagnation flaming-up of the Liven-fire and deficiency of the heart and spleen covered 95 percent of PMS, the former 2 syndromes are 58.9/and 27.5 per cent separately, so they are main syndromes in PMS·

Key wards PMS/Differentiation / Main syndrome

**Study on the Protective Effects of YXT on Mitochondrial
Ultrastructural Damage of Ischemic Myocardium by Cell Morphometry**

Lei Yan(雷 燕) et al· Xiyuang Hospital, China Academy of TCM · Beijing(100091)

Abstract In this experiment, the protective effects of Yuxintong(YXT) on myocardial ischemic injury were studied· The acute myocardial ischemia models were reproduced in anesthetized dogs by ligating the left coronary artery at the middle of anterior descending branch· The serum creatine phosphokinasse (CPK) activity was monitored after coronary occlution in different times, and then the ultrastructural degenerative changes of the dog's myocardium were observed after 180 minutes ischemia and assayed by cell morphome-try· Results showed that YXT capsule were able to effectively inhibit the leakage of CPK, alleviate the my-ocardial ultrastructural degenerative changes, reduce mitochondrial volume density and increase its special surface as well as numerical density on area, therefore, attenuating the damage of mitochondrial ultrastruc-ture of dog's myocardium caused by acute ischemia· It suggested that YXT capsule had notable protective action on integrity of myocardial structure and cytomembrance·

Key words: Yuxintong capsule, myocardial ischemia, mitochondria, cell morphometry·