



高原低氧适应动物新疆灰旱獭右心室 重构的组织学改变

马媚, 姜涛, 张春, 魏琴, 段明军, 王雪梅, 李志强, 寿玺, 陈启龙

(新疆医科大学第一附属医院新疆医学动物模型研究重点实验室, 乌鲁木齐 830054)

【摘要】 目的 探讨新疆灰旱獭高原低氧适应性改变致右心室重构组织学改变。方法 应用免疫组化技术检测新疆灰旱獭右心室缝隙连接蛋白43(CX43)蛋白表达,同时应用HE染色和Masson染色观察心室肌结构和纤维化程度变化。结果 心肌细胞肥大,胶原纤维增多,右心室壁厚指数、体重指数明显增高。CX43蛋白表达减少和(或)分布的改变。结论 高原低氧致新疆灰旱獭右心室结构重构,可作为研究高原低氧适应性机制的理想动物模型。

【关键词】 高原低氧;新疆灰旱獭;右心室重构

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 02-0045-03

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2014.02.010

Histological changes of the right ventricular remodeling in Xinjiang *Marmota baibacina* adapted to high-altitude hypoxia

MA Mei, JIANG Tao, ZHANG Chun, WEI Qin, DUAN Min-jun, WANG Xue-mei,
LI Zhi-qiang, SHOU Xi, CHEN Qi-long

(Xinjiang Key Laboratory for Medical Animal Model Research, First Teaching Hospital of
Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China)

【Abstract】 Objective To investigate the histological changes of the right ventricular remodeling in Xinjiang *Marmota baibacina* which are adapted to high-altitude hypoxia. **Methods** Hematoxylin and eosin and Masson staining was used to examine the pathological changes and degree of fibrosis, and immunohistochemical technique was used to detect connexin 43 (CX43) expression in the right ventricular myocardium. **Results** In the right ventricular myocardium, cardiomyocyte hypertrophy and increased amount of collagen fibers were observed. The right ventricular hypertrophy index and weight index of *Marmota baibacina* were significantly higher, and expression of CX43 was significantly reduced than that of normal rats ($P < 0.05$ for both). **Conclusions** High-altitude hypoxia induces right ventricular remodeling in Xinjiang *Marmota baibacina*. It can be used as an ideal animal model for studies on the mechanisms of hypoxia adaptation on high-altitude plateau.

【Key words】 High-altitude hypoxia; Right ventricular remodeling; Xinjiang *Marmota baibacina*

海拔在3000 m以上的地区,称为高原地区,其特点为气压低,氧分压也相应降低,易导致人体缺氧。高原低氧条件下,过度通气、红细胞生成、酸碱平衡、血液学改变和血管生成等介导了高原低氧习服过程^[1]。反之,如果人体对外界低氧环境应激发

败,就会发生高原病。高原环境改变着整个生命规律,不同的动物种属有不同的生物学适应模式。高原环境改变着某些疾病发生发展的规律,高血压、冠心病、心肌梗塞的相对发病率在高原地区低于平原,而与肺动脉高压相关的某些先心病和慢性阻塞性肺

[基金项目] 新疆维吾尔自治区科技厅基础条件平台建设项目(PT1205);新疆医学动物模型研究重点实验室开放课题(XJDX1103-2011-04)。

[作者简介] 马媚(1981-),男,实验师,研究方向:人类疾病动物模型研究,Email: mamei0011@sina.com

[通讯作者] 陈启龙(1965-),男,教授,Email: chenqilong651003@sohu.com

疾患则发病率很高。这些特点揭示了环境与疾病间的密切关系。新疆灰旱獭是肝炎、肝癌、肥胖病、心血管疾病、肾炎等疾病的良好动物模型,因其在天山 2000 ~ 3800 m 的高山草原上繁衍生息,又是研究高原低氧适应机理的理想实验动物。本文观察了新疆灰旱獭的右心室组织学结构,为全面和深入研究新疆灰旱獭低氧适应机理提供动物实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

新疆灰旱獭组:新疆灰旱獭 6 只,捕自新疆呼图壁县境内(海拔 2000 ~ 3800 m),海拔大于 3000 m,依据尾部及皮肤毛色判断年龄均大于两周岁,体重 4 ~ 5 kg,雌性 2 只,雄性 4 只。灰旱獭捕捉后在实验室饲养 7 d 适应新的饲养环境后再进行实验。SD 大鼠组:SD 大鼠 6 只,雌雄各半,体重 250 ~ 270 g,由新疆医科大学实验动物中心提供[SCXK(新)2011-0004]。大鼠分笼饲养,正常光照,自由饮水和摄食,温度 22℃,相对湿度 50% ~ 70%。动物实验按照实验动物饲养和使用指南规定进行,并通过新疆医科大学第一附属医院实验动物中心动物饲养和管理委员会批准,伦理审批号:A-20120309008。

1.1.2 试剂

一抗为兔抗大鼠 CX43 多克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司);SP 免疫组化检测试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 标本采集和病理形态学观察

给予各组实验动物静脉注射 3% 戊巴比妥钠溶液大于标准麻醉剂量的 3 倍,然后采用无菌技术开胸,取出心脏。用冷盐水冲洗后取右心室标本。用 4% 甲醛固定,经过石蜡包埋切片,室温下放置备用。各组实验动物取相同部位的右心室组织包埋,切片,每只动物切片 15 张,每组切片 90 张。每只动物的蜡块取 5 张切片常规 HE 染色,显微镜下(放大倍数 400 ×),每张切片摄取相同部位的 5 个视野观察组织像。每只动物的蜡块取 5 张切片经 Masson 染色,显微镜下拍片(放大倍数 400 ×),每张切片摄取相同部位的 5 个视野。用 ImagePro-Plus 图像分析软件计算心肌胶原容积百分比(CVF)。

1.2.2 缝隙连接蛋白 43(connexin 43, CX43)蛋白的免疫组化检测

每只实验动物取 5 张石蜡切片,片厚 4 μm。标本脱蜡、高压热修复抗原。采用 SP 免疫组化染色法对 CX43 染色。阴性对照以 PBS 代替一抗,CX43 着色表现为胞质染成棕褐色为阳性结果。阳性细胞必须具备:细胞结构清晰,阳性颗粒定位和定性好;着色明显高于背景^[2]。切片选取 5 个不重复高倍(×400)视野。

1.2.3 右心室肥厚指数(RVHI)、体重指数(CPI)和心室纤维化程度(CVF)比较

分离出右心室、左心室和室间隔,用滤纸吸干水分后称其质量,计算右心室重/(左心室重 + 室间隔重)[RV/(LV + S)]和右心室重量/体重量(RW/BW)。

1.3 统计学分析

用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析。定量检测结果用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间率的比较采用 Fisher 精确概率检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组右心室组织 HE 染色、Masson 染色和 CX43 表达

新疆灰旱獭右心室组织的 HE 染色心肌细胞排列紊乱,呈波纹状;细胞核大小不规则,心肌细胞之间的间隔增宽。如图 1-A。Masson 染色胶原纤维呈现蓝色,肌肉和胞质红细胞呈现红色,大量胶原纤维相互连接成网状。如图 1-B。CX43 蛋白表达着色较淡,在心肌润盘处呈斑点分布。如图 1-C。SD 大鼠 HE 染色结果显示,心肌细胞结构完整,排列整齐,细胞核大而清晰。如图 2-A。肌纤维为红色,Masson 染色结果显示,胶原纤维为蓝绿色,少量分布于肌纤维之间,胶原组织分布均匀。如图 2-B。CX43 蛋白表达清楚,位于心肌润盘处。如图 2-C。

2.2 两组右心室肥厚指数、体重指数及纤维化程度比较

结果显示,与 SD 大鼠组比较,新疆灰旱獭组的右心室肥厚指数、体重指数及纤维化程度明显增高($P < 0.05$)。

3 讨论

高原低氧环境对心血管系统的影响,主要是心肌的缺氧或低氧血症所致,故除高原反应外,各类型高原病中都可能或多或少有不同程度的心肌损害。

表 1 右心室肥厚指数、体重指数及纤维化程度比较 ($\bar{x} \pm s, \%, n=6$)Tab. 1 Comparison right ventricle hypertrophy index, the cardiac ponderal index and cardiac ventricular fibrosis of Xinjiang *Marmota baibacina* group and SD rats group

分组 Group	RVHI	CPI	CVF
新疆灰旱獭组 Xinjiang <i>Marmota baibacina</i> group	41.25 ± 3.25	0.84 ± 0.02	13.14 ± 2.54
SD 大鼠组 SD rat group	30.36 ± 2.14 *	0.78 ± 0.05 *	7.56 ± 2.35 *

注:与新疆灰旱獭组相比, * $P < 0.05$.Note: Compared with the Xinjiang *Marmota baibacina* group, * $P < 0.05$

心血管系统是高原低氧环境下受影响较大的系统之一^[3],急性与慢性高原低氧对机体的影响及机体对低氧环境的适应机制深受人们关注。高原心脏适应性变化以右心室为主的心肌细胞肥大、纤维化伴心功能上调为主要特点。Naeije 等^[4]实验表明,缺氧对离体心肌纤维具有负性肌力作用。心肌细胞对缺氧非常敏感,能量代谢障碍是缺氧后心肌损害的重要机制,缺氧后心肌细胞能量产生障碍、氧自由基堆积、细胞膜渗透性改变,兴奋收缩偶联机制破坏,影响心肌的收缩功能^[5]。国内动物实验证实^[6],缺氧对心肌的损害,可导致左心功能的轻度减退,表现为心肌收缩力及原功能的降低。Heath 等^[7]实验研究证实,将大鼠暴露于模拟海拔 5500 m 高原,5 周后即出现了右心室增大。为适应高原缺氧环境机体会产生复杂的代偿适应性变化,具体表现在心脏方面则发生以右心室为主的心功能显著改变,以适应低氧环境,满足组织对氧的需求。以右心室肌肥厚、心肌纤维化为主的心肌重塑是缺氧环境下心功能代偿的组织学基础。缝隙连接的构成及连接蛋白的表达、分布的改变可能是不同心脏病中心律失常发生的物质基础。Rudy 等^[8]实验显示,间隙连接蛋白数量的减少使心肌的电传导速度减慢,心肌各部位的兴奋性不均一,可能导致单项阻滞。而心肌细胞肥大、胶原纤维增生可能是导致 CX43 水平下降的原因。本实验研究显示新疆灰旱獭右心室 CX43 蛋白表达较弱,HE 染色和 Masson 染色显示心肌细胞肥大,胶原纤维比 SD 大鼠明显增多,心室肌结构重构,CX43 是构成心室间隙连接的主要结构蛋白,连接蛋白表达减少和(或)分布的改变,进一步导致缝隙连接通道的重构,兴奋收缩及电偶联机制破坏。

国外资料表明,高原低氧对心脏重构的作用主要是指右心室重构包括:心肌实质的改变:心室壁增厚或心腔扩大,质量和体积增加^[9,10]。心肌间质的重构:心脏间质胶原纤维增多,网络紊乱。本研究结果显示,新疆灰旱獭右心室肥厚指数、体重指数及纤维化程度均高于 SD 大鼠,进一步提示新疆灰旱獭右心室肥厚,心肌纤维化明显,表明新疆灰旱獭在高

原低氧适应过程中右心室结构发生重构。新疆灰旱獭系啮齿目松鼠科旱獭属的大型地栖性啮齿动物,近年来用该动物制作人类疾病的动物模型的研究越来越深入,本实验选择新疆高原地区灰旱獭为研究对象是高原低氧适应性机制的理想实验动物。实验结果对新疆高原病动物模型的选择和深入研究缺氧性心肌重塑的发生机制,阐明高原心脏病的发生机制和寻找有效的防治措施具有十分重要的意义。

参 考 文 献

- [1] Brugniaux JV, Hodges AN, Hanly PJ, et al. Cerebrovascular responses to altitude [J]. *Respir Physiol Neurobiol*, 2007, 158(2-3):212.
- [2] 张立涛,于织波,刘洪英,等. 辛伐他汀处理对脓毒症大鼠心肌细胞诱导型一氧化氮合酶表达的影响及意义 [J]. *医学研究生学报*, 2013, 26(4):356-359.
- [3] 崔建华,张芳,哈振德,等. 银杏叶片、红景天、酪氨酸对高原人体运动心肌酶活性的影响. *西藏医药杂志*, 2003, 24(2):1-3.
- [4] Naeije R. Physiological adaptation of the cardiovascular system to high altitude [J]. *Prog Cardiovasc Dis*, 2010, 52(6):456-466.
- [5] 徐孝华,黄国英. 低氧性心脏损害发病机制及治疗的研究进展 [J]. *国际儿科学杂志*, 2007, 34(4):277-279.
- [6] 赵锋仓,岑维俊,陈诗泉. 慢性高原病左心功能分析 [J]. *西藏医药杂志*, 1992, 13(2):9-10.
- [7] Heath D, Edwards M, Winson, et al. Effects on the right ventricle, pulmonary vasculature and carotid bodies of the rat of exposure to, and recovery from, simulated high altitude [J]. *Thorax*, 1973, 28(1):24-28.
- [8] Rudy Y, Shaw RM. Cardiac excitation: an interactive process of ion channels and gap junctions [J]. *Adv Exp Med Biol*, 1997, 430:269-279.
- [9] Gerdes AM, Onodera T, Wang X, et al. Myocyte remodeling during the progression to failure in rats with hypertension [J]. *Hypertension*, 1996, 28(4):600-614.
- [10] Intengan HD, Schiffrin EL. Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis [J]. *Hypertension*, 2001, 38(3 Pt 2):581-587.

[收稿日期] 2013-09-08