

· 基础研究 ·

复方红景天制剂对高+Gz 应激大鼠心肌线粒体超微结构的影响

陈良恩¹, 王永新^{1*}, 魏日胞², 詹 皓¹, 辛益妹¹(¹空军航空医学研究所第一研究室, 北京 100142; ²解放军总医院肾病科, 北京 100853)

【摘要】目的 观察复方红景天制剂对高+Gz 应激大鼠心肌线粒体超微结构的影响。方法 将 60 只 SD 大鼠随机分为空白对照组、应激对照组、高+Gz 应激组、复方高剂量组、复方中剂量组和复方低剂量组, 每组 10 只。各组动物均灌胃给药 (20ml/kg), 每日一次, 连续 14 d。复方高剂量组、中剂量组和低剂量组分别按 3.0, 1.5 和 0.75 g/kg 给予复方红景天制剂, 空白对照组、应激对照组和高+Gz 应激组给予等量生理盐水。第 15 天进行离心机暴露。观察各组动物心肌线粒体超微结构并计算线粒体的体视学参数。结果 高+Gz 应激组肌原纤维离散, 线粒体肿胀变性, 线粒体基质电子密度降低, 线粒体嵴减少、断裂或消失。复方红景天制剂预处理组线粒体超微结构损伤减轻, 其中高剂量组线粒体超微结构与对照组接近。高+Gz 应激组线粒体体视学参数与空白对照组和应激对照组相比, 体积密度、表面积密度、平均体积、平均表面积变大, 数密度变小。与高+Gz 应激组相比, 复方红景天制剂预处理组线粒体体积密度、表面积密度、平均体积、平均表面积变小、数密度变大; 中剂量组和高剂量组大部分指标与对照组相比没有明显差异。结论 复方红景天制剂对高+Gz 应激导致的大鼠心肌线粒体超微结构损伤具有一定的保护作用。

【关键词】 复方红景天制剂; 高+Gz 应激; 线粒体; 超微结构

【中图分类号】 R542.2

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-5403 (2011) 03-0261-04

Effect of rhodiola crenulata compounds on ultrastructure injury of myocardial mitochondria in rats exposed to high +Gz stress

CHEN Liang'en¹, WANG Yongxin^{1*}, WEI Ribao², ZHAN Hao¹, XIN Yimei¹(¹First Department, Institute of Aviation Medicine of Air Force, Beijing 100142, China; ²Department of Nephrology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

【Abstract】 Objective To study the effect of rhodiola crenulata compounds on ultrastructural injury of myocardial mitochondria in rats after high +Gz stress. **Methods** Sixty healthy SD rats were divided randomly into six groups, including blank control group, stress control group, high +Gz stress group, high dose compounds group, medium dose compounds group and low dose compounds group, with 10 in each group. Menstruum (20 ml/kg) was fed to each rat once per day for 14 days. High dose compounds group, medium dose compounds group and low dose compounds group were fed with rhodiola crenulata compounds at doses of 3.0, 1.5, and 0.75 g/kg respectively. Blank control group, stress control group and high +Gz stress group were fed with equal volume saline. Ultrastructural changes of myocardial mitochondria were observed under electron microscope and stereology parameters were calculated. **Results** The ultrastructural changes of the cardiac muscle were observed in rats of high +Gz stress group: myofibril disorganized; mitochondria swelled, degenerated and decreased; mitochondrial cristae broke or disappeared. The injury of mitochondria ultrastructure induced by high +Gz stress relieved in rhodiola crenulata compounds preconditioning groups and that of high dose compounds group was essentially normal. Compared with blank control group or stress control group, the stereology parameters of high +Gz stress group, including volume density, surface density, average volume and average surface area were significantly higher, and numerical density was lower. However, these parameters in rhodiola crenulata compounds preconditioning groups changed reversely. Most parameters of high dose compounds and medium dose compounds groups had no significant difference with those of blank or stress control groups. **Conclusion** Rhodiola crenulata compounds has some protective effects on injury of myocardial mitochondria ultrastructure in rats exposed to high +Gz stress.

【Key words】 rhodiola crenulata compounds; high +Gz; stress; mitochondria; ultrastructure

This work was supported by Funds for Medical Science and Health Care Research of Military and Air Force (06MA265, KW08Z06) and National Natural Science Foundation of China(81073083).

收稿日期: 2011-02-12; 修回日期: 2011-03-10

基金项目: 全军和空军医药卫生基金 (06MA265, KW08Z06); 国家自然科学基金 (81073083)

通讯作者: 王永新, Tel: 010-66927087, E-mail: wyx7087@163.com

现代高性能战斗机在机动飞行中所产生的正加速度 (+Gz) 具有高 G 值、快增长率、长持续时间以及反复出现等特点, 高+Gz 暴露引起的心脏疾病已经对飞行员的身心健康和飞行安全构成了现实威胁^[1]。动物实验证实, 重复高强度+Gz 暴露可导致肌原纤维变性、线粒体肿胀、溶酶体破裂以及闰盘结构解离等多种超微结构损伤^[2-4]。+Gz 暴露对心肌的损伤除了机械性作用外, +Gz 作用下强烈应激反应及一定程度的心肌缺血缺氧亦是重要因素^[5]。近年来, 中草药对心肌缺血缺氧损伤的保护作用受到越来越多的关注, 但其对高+Gz 应激致心肌损伤的作用效果尚未见报道。本研究采用高+Gz 暴露大鼠心脏损伤模型, 通过观察复方红景天中药制剂预处理对高+Gz 应激大鼠心肌线粒体超微结构的影响, 探讨该制剂对高+Gz 应激致心肌损伤的保护作用, 为临床使用中药制剂提高加速度耐力提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

健康成年雄性 SD 大鼠 60 只, 体重 (200±25) g, 由第四军医大学实验动物研究中心提供。将大鼠随机分为空白对照组、应激对照组、高+Gz 应激组、复方高剂量组、复方中剂量组和复方低剂量组, 每组 10 只。各组动物每天上午灌胃给药 1 次, 连续 14d, 给药体积为 20 ml/kg, 每只动物每天灌胃前称取体重以确定灌药量, 复方高剂量组、复方中剂量组和复方低剂量组分别按 3.0, 1.5 和 0.75 g/kg 给予复方红景天制剂 (由中国医学科学院药用植物研究所化学室提供), 其余 3 组动物每天给等量的生理盐水。末次给药当日 20:00 开始禁食, 次日进行+Gz 暴露。

1.2 动物+Gz 暴露

采用动物离心机 (第四军医大学航空航天医学系 C-97 型动物离心机) 进行+Gz 暴露, 将大鼠置于自制的有机玻璃盒中, 水平固定于离心机的转臂上, 大鼠头部朝向离心机旋转轴心。离心机半径为 2m, 由计算机进行加速度程序控制。实验组大鼠暴露+10Gz 水平, 持续 5min, 加速度增长率为 1G/s。空白对照组不做任何处理, 应激对照组只在离心机转臂上的动物舱内束缚 5min, 不做离心机暴露处理。

1.3 标本处理

大鼠高+Gz 应激后 1 h, 断头处死, 速取心脏, 用

4℃生理盐水冲洗, 取每只大鼠左室心尖部心肌组织, 置于 4℃, 20 ml/L 戊二醛溶液中固定过夜, 然后置于 10 g/L 锇酸溶液 (pH 7.4, 45℃, 30~60 min) 锇化, 经梯度乙醇脱水及醋酸铀染色后, 用 Epon 812 包埋、修块。用 LKB 8800III 型超薄切片机 (LKB 公司, 瑞典) 做超薄切片, 5%醋酸铀和柠檬酸铅双染色, 置于 JEM-2000EX 型透射电镜 (JEOL 公司, 日本) 观察与拍照。

1.4 体视学参数计量方法

在电镜下对观测目标随机确定视野并摄片, 每例标本随机取 5 个视野, 每组各摄片 50 张。按体视学原理, 线粒体三维体视学参数的分析以每例标本中的所有照片为一个样本, 线粒体平面形状分析以每个线粒体为基本样本单位。采用 Image pro 图像分析软件进行测试, 以每幅照片中所洗印出的尺度标刻对图像分析软件中的像素进行标定^[6], 通过光标分别勾描每幅照片的线粒体, 测试其周长、面积、圆度、长轴及短轴, 同时测试每幅照片的面积^[7]。选用的体视学参数有: 体积密度 (volume density, Vv)、表面积密度 (surface density, Sv)、平均体积 (average volume, v)、平均表面积 (average surface area, s) 和数密度 (numerical density, Nv)。按体视学公式计算出参数值^[8], 密度参数的参照空间为细胞质^[9]。

1.5 统计学处理

所有参数用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 10.0 统计软件分析处理, 线粒体体视学参数值采用单因素方差分析法, 两两比较采用 LSD 法。以 $P < 0.05$ 为显著性差异。

2 结果

2.1 各组大鼠心肌超微结构观察

空白对照组及应激对照组大鼠心肌结构良好, 肌丝排列规则、整齐; 线粒体规则分布在肌丝之间, 结构正常、线粒体嵴密集、基质内有较多致密的基质颗粒 (图 1A, B)。高+Gz 应激组大鼠心肌出现明显损伤, 肌丝疏松、排列紊乱, 出现坏死、断裂等变化; 线粒体大小不一、形状多样, 大部分线粒体明显肿胀、线粒体的嵴模糊、局部或全部断裂和消失、线粒体基质变淡 (图 1C)。复方红景天制剂预处理组大鼠与高+Gz 应激组相比, 损伤减轻, 尤其是复方高剂量组, 心肌及线粒体结构未发现明显损伤, 肌丝排列规则, 线粒体结构正常 (图 1D, E, F)。

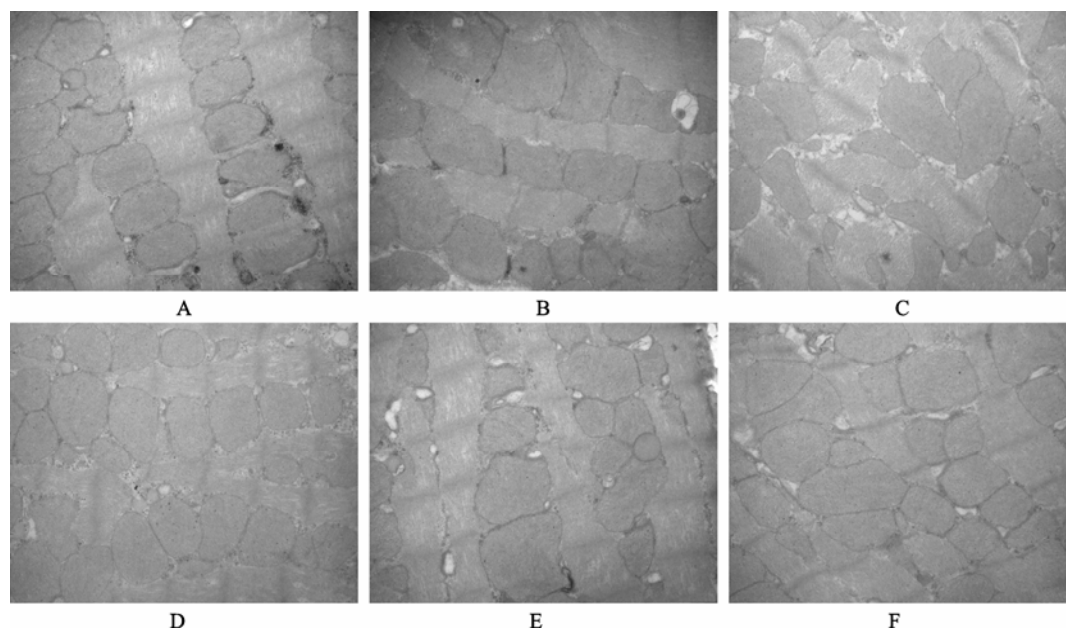


图 1 大鼠心肌超微结构观察 (TEM×12500)

A: 空白对照组; B: 应激对照组; C: 高+Gz 应激组; D: 复方高剂量组; E: 复方中剂量组; F: 复方低剂量组

2.2 体视学参数计量结果

与空白对照组和应激对照组比较, 高+Gz 应激组大鼠心肌线粒体 V_v , S_v , v 和 s 增大, N_v 变小。与高+Gz 应激组比较, 复方红景天制剂预处理组, 尤其是复方

高、中剂量组大鼠心肌线粒体 V_v , S_v , v 和 s 变小, 大部分指标与空白对照组和应激对照组相比没有明显差异。 N_v 变大, 其中复方高剂量组不但高于高+Gz 应激组, 也明显高于空白对照组和应激对照组 (表 1)。

表 1 各组大鼠心肌线粒体结构定量测定结果

(n=50, $\bar{x} \pm s$)

组别	V_v	$S_v (\mu m^{-1})$	$N_v (\mu m^{-3})$	$v (\mu m^3)$	$s (\mu m^2)$
空白对照组	0.19 ± 0.04	1.13 ± 0.43	0.27 ± 0.08	0.77 ± 0.20	4.18 ± 1.25
应激对照组	0.20 ± 0.04	1.24 ± 0.20	0.27 ± 0.03	0.75 ± 0.13	4.61 ± 0.61
高+Gz 应激组	$0.26 \pm 0.06^{***}$	$1.57 \pm 0.30^{***}$	$0.22 \pm 0.05^{***}$	$1.23 \pm 0.41^{***}$	$7.40 \pm 2.00^{***}$
复方高剂量组	$0.20 \pm 0.05^{\Delta\Delta}$	$1.14 \pm 0.30^{\Delta\Delta}$	$0.30 \pm 0.08^{*\Delta\Delta}$	$0.74 \pm 0.31^{\Delta\Delta}$	$4.11 \pm 1.56^{\Delta\Delta}$
复方中剂量组	$0.21 \pm 0.08^{\Delta\Delta}$	$1.29 \pm 0.24^{\Delta\Delta}$	0.25 ± 0.07	$0.93 \pm 0.38^{*\Delta\Delta}$	$5.77 \pm 2.06^{***\Delta\Delta}$
复方低剂量组	$0.24 \pm 0.05^{***}$	$1.34 \pm 0.37^{**\Delta\Delta}$	$0.22 \pm 0.06^{***}$	$1.13 \pm 0.35^{***}$	$5.99 \pm 1.26^{***\Delta\Delta}$

注: V_v : 体积密度; S_v : 表面积密度; N_v : 数密度; v : 平均体积; s : 平均表面积。与空白对照组比较, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$; 与应激对照组比较, $^{\#}P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$; 与高+Gz 应激组比较, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$

3 讨 论

心肌线粒体是心肌细胞生命活动控制中心, 在高+Gz 应激导致缺血缺氧损伤心肌细胞的过程中, 线粒体首当其害, 进而损伤整个细胞。在本研究中, 高+Gz 应激大鼠线粒体多呈肿胀、变性改变, 线粒体基质电子密度降低。线粒体嵴浓缩、减少、断裂或消失, 其形态学变化和以往报道一致^[3]。本研究除了对线粒体进行形态学定性观察外, 还采用体视学的方法对线粒体进行了定量测量, 结果显示, 与空白对照组和应激对照组比较, 高+Gz 应激组 V_v , S_v ,

v , s 增大, N_v 变小。 V_v 等参数变大的原因主要是由于线粒体肿胀引起, 线粒体是细胞内对缺氧极为敏感的细胞器, 缺氧会损害线粒体的氧化磷酸化的过程, 使 ATP 产生减少甚至停止, 结果导致线粒体内钠离子增多, 最终致使线粒体因吸收水分增多而肿胀。线粒体 N_v 变小是因为线粒体肿胀变大, 导致单位视野内线粒体的数量减少, 也有可能是因为 ATP 减少导致线粒体瓦解, 致使线粒体数量减少。

复方红景天制剂由红景天、黄芪、当归、丹参、白芍等主要成分组成, 这些单体均含多种有效化学成份, 可以通过改善冠脉循环、降低心肌耗氧量以

及抗氧自由基的生成等机制保护缺血缺氧导致的心肌损伤^[10-13]。在本研究中,复方红景天制剂预处理组大鼠心肌线粒体超微结构损伤与高+Gz 应激组大鼠相比明显减轻,电镜下线粒体结构完好,高剂量组线粒体超微结构与对照组接近。复方高、中剂量组大鼠心肌线粒体的 Vv、Sv 等体视学参数与高+Gz 应激组相比明显变小, Nv 明显变大,大部分指标与空白对照组和应激对照组相比没有明显差异。线粒体超微结构的定性观察以及线粒体体视学参数的定量测量均可以说明复方红景天制剂对高+Gz 应激导致的线粒体超微结构损伤具有一定的保护作用。

目前提高飞行员加速度耐力的措施,包括抗荷动作和防护装备,主要是为了对抗因+Gz 惯性力引起的全身血液向下转移,确保中枢神经和视觉功能的正常,这些措施非但不利于高+Gz 作用下心肌损伤的保护,而且会升高血液流体静压,加重人体心血管功能损伤^[14]。目前对心血管系统的功能异常和病理损伤尚缺乏有效防护措施。本研究从形态学和体视学方面观察了复方红景天制剂对高+Gz 导致的线粒体超微结构损伤的保护作用,进一步研究了该制剂对高+Gz 动物线粒体,进而对心脏器官功能的保护作用,探索了采用中药制剂对抗+Gz 导致的心肌损伤,为提高飞行员加速度耐力提供了新的方法和措施,对于保证飞行员的飞行安全具有重要的意义。

【参考文献】

- [1] 郑 翠,肖晓光,姚克纯,等.不同水平+Gz 暴露后飞行员心脏功能的变化[J].中华航空航天医学杂志,2004,15(2): 65-69.
- [2] Laughlin MH. Analysis of the risk of human cardiac damage during +Gz stress: a review[J]. Aviat Space Environ Med, 1982, 53(5): 423-431.
- [3] 陆江阳,詹 皓,辛益妹,等.重复高+Gz 应激对大鼠心肌超微结构的损伤效应[J].中华航空航天医学杂志,2001,12(3): 137-139.
- [4] 张 政,詹 皓,陆江阳,等.重复正加速度暴露对大鼠心血管内皮超微结构和 ICAM-1 表达的影响[J].中国应用生理学杂志,2002,18(3): 245-248.
- [5] Burton RR, MacKenzie WF. Cardiac pathology associated with high sustained +Gz: I. Subendocardial hemorrhage[J]. Aviat Space Environ Med, 1976, 47(7): 711-717.
- [6] 丁晓平,申 洪.病理组织结构定量的显微测试网格与图像分析仪测试的比较[J].中国体视学与图像分析,1999,4(2): 102-105.
- [7] van Hensbergen Y, Luyckx-de Bakker SA, Heideman DA, et al. Rapid stereology based quantitative immunohistochemistry of dendritic cells in lymph nodes: a methodological study[J]. Anal Cell Pathol, 2001, 22(3): 143-149.
- [8] 申 洪,沈忠英.实用生物体视学技术[M].广州:中山大学出版社,1991: 26-63.
- [9] Shen H. Regular form factor. A new concept and calculating method for quantitative form description[J]. Anal Quant Cytol Histol, 2000, 22(6): 453-458.
- [10] 李昱柳,苏巧娟,李灵芝.红景天苷药理活性研究进展[J].武警医学院学报,2007,16(1): 98-100.
- [11] 宋锦叶,孟立强,李晓玫.黄芪与当归的现代药理学研究进展[J].中国中西医结合肾病杂志,2008,9(9): 833-835.
- [12] 韩 珍,贺 弋.白芍总苷的药理作用及其毒性研究进展[J].宁夏医科大学学报,2008,30(4): 538-541.
- [13] 曹 媛,曹婉雯,陈渊成,等.丹参水溶性成分抗心肌缺血的作用机制[J].药学进展,2010,34(6): 248-255.
- [14] 詹 皓,魏利召,李 彤,等.重复高 G 应激后大鼠血清心肌酶谱的变化[J].中华航空航天医学杂志,2002,13(1): 33-35.

(编辑:王雪萍)