

· 论 著 ·

高脂血症对大鼠心肌与肾皮质微细结构的影响

陈荟婷, 柳洁

湖南医药学院医学形态中心, 湖南 怀化 418000

摘要: **目的** 观察高脂血症大鼠心肌与肾皮质微细结构的改变,探讨人体重要脏器微血管及实质细胞损伤与冠心病形成、发展的关系。**方法** 20 只雄性 SD 大鼠,随机分成对照组与实验组,每组 10 只。实验组以高脂饮食制作高脂血症病理模型,对照组普通动物饲料喂食。喂养 8 周后,处死大鼠,右心房采血,分别采用总胆固醇酶法(COD-PAP)、甘油三酯酶法(GPO-PAP)和过氧化氢酶(CAT)法检测血清胆固醇(TCH)、甘油三酯(TG)及高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)与低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C);制作心脏与肾脏切片,采用 HE 染色和免疫组化 PV-9000 二步法染色,光镜观察心肌与肾皮质的微细结构及作为凋亡相关因子的死亡因子(Fas-L)与细胞骨架相关的肌动蛋白(Actin)的表达,Mimics10.0 行图像灰度分析,SPSS13.0 行统计学分析。**结果** 实验组大鼠血清 TCH、TG 及 HDL-C、LDL-C 水平均高于对照组($P < 0.05$, $P < 0.01$),显示大鼠高脂血症模型制备成功。实验组心肌与肾皮质间质增宽,微静脉与毛细血管扩张并淤血,小动脉与微动脉内皮细胞增多,内膜增厚,局部隆起,管腔内可见微血栓。心肌内有小片状变性、坏死区与散在变性、坏死的肌纤维,肾皮质血管球扩张与淤血,肾小管上皮细胞变性与坏死,管腔内有空泡与絮状物。图像灰度分析显示,实验组 Actin 表达的灰度值明显高于对照组($P < 0.05$),Fas-L 心肌、肾皮质的表达明显低于对照组(P 均 < 0.05)。**结论** 高脂血症可能通过增加 Fas-L 在心肌、肾皮质的表达,减少 Actin 在心肌的表达引起大鼠心肌与肾皮质微血管和实质细胞结构发生改变,推测可能与冠心病形成与发展有着密切的关系。

关键词: 高脂血症; 心肌; 肾皮质; 微血管病变; 实质细胞损伤; 死亡因子; 肌动蛋白; 冠心病

中图分类号: R-33 R 589.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2016)05-0577-04

Influence of hyperlipemia on microstructures of myocardium and renal cortex in rats

CHEN Hui-ting, LIU Jie

Center of Medical Morphology, Hunan Medical College, Huaihua, Hunan 418000, China

Corresponding author: LIU Jie, E-mail: hhyzlj@126.com

Abstract: Objective To observe the microstructural changes of myocardium and renal cortex in rats with hyperlipidemia and evaluate the relationship between the damages of microvessels of vital organs of the human body and renal parenchymal cells and the formation and development of coronary heart disease. **Methods** Twenty male SD rats were randomly divided into contrast group and experiment group ($n = 10$ each). The hyperlipemia pathological model were made by feeding high-fat diets in the experimental group, and common animal feed was given in control group. The rats were killed after 8 weeks of feeding. Collecting right atrium blood samples, total cholesterol enzyme method COD-PAP, triglyceride enzyme method (GPO-PAP), catalase (CAT) method were used to respectively detect serum total cholesterol (TCH), triglyceride (TG), and high density lipoprotein cholesterol (HDL-C), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C). The cardiac and renal sections were made. After HE staining and immunohistochemistry PV-9000 two step dyeing, the microstructure of myocardium and renal cortex and the expressions of apoptosis-related factor death factor (Fas-L) and actin associated with cytoskeleton were observed under the light microscope. The image gray scale analysis was performed by Mimics10.0. The statistical analysis was made by SPSS13.0. **Results** The levels of TCH, TG, HDL-C and LDL-C in experimental group were all significantly higher than those in control group, which suggested that the rat hyperlipemia model was established successfully. In experiment group, the widths of myocardial and renal cortical interstices increased; the venules and capillaries were dilated and congested; the increased endothelial cells, thickened intima, local eminencing and microthrombi in the lumen were seen

in small arteries and arterioles; there were small patchy area of degeneration and necrosis and scattered muscle fibers of degeneration and necrosis in myocardium; the renal cortical glomeruli were dilated and congested; the degeneration and necrosis of renal tubules epithelial cells and vacuoles and floccule in the lumen were found. The image gray scale analysis showed that the gray scale of actin expression in myocardium increased significantly compared with in control group ($P < 0.05$), and the gray scales of Fas-L expressions in myocardium and renal cortex decreased significantly compared with in control group (all $P < 0.05$). **Conclusion** The hyperlipemia can cause the microstructure changes of myocardium and renal cortex through increasing Fas-L expressions in myocardium and renal cortex and decreasing actin expression in myocardium. It may be closely related to the formation and development of coronary heart disease.

Key words: Hyperlipemia; Myocardium; Renal cortex; Microangiopathy; Parenchymal cell injury; Death factor; Actin; Coronary heart disease

高脂血症与冠心病的形成、发展有着极为密切的联系^[1-2]。在临床,冠心病患者高脂血症的诊治仍存在不少困惑与难题,有些冠心病患者首发临床表现不典型,有些即使表现典型,影像检查却未见冠状动脉狭窄与栓塞^[3-5]。许多冠状动脉狭窄或栓塞的患者,虽经冠脉搭桥或支架植入,却未能阻止病情继续发展^[6]。所以尽管冠状动脉较大血管的再灌注,能使冠心病预后获得极大改善,仍需密切关注冠状动脉微循环及心肌细胞水平的再灌注^[7]。种种迹象显示,高脂血症绝非仅影响冠状动脉主干及分支,心、肾等重要脏器微血管与实质细胞的损伤可能参与了冠心病形成、发展的全过程。为探讨人体重要脏器微血管及实质细胞损伤与冠心病形成、发展的关系,本研究对高脂血症大鼠心肌与肾皮质的微细结构进行观察。

1 材料与方法

1.1 实验试剂 一抗为兔抗鼠肌动蛋白(Actin)与死亡因子(Fas-L),购于武汉博士德生物工程有限公司;PV-9000 二步法免疫组化试剂盒与二氨基联苯胺(DAB),购于北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 材料 健康雄性 6 周龄 SD 大白鼠 20 只(中南大学实验动物中心提供),随机分成对照组与实验组,每组 10 只。对照组大鼠喂普通动物饲料,实验组喂高脂饲料(1%胆固醇、0.5%胆盐、25%猪油、15%蛋黄粉),两组均喂养 8 周。

1.3 标本制备 1%异戊巴比妥钠麻醉大鼠,开胸,右心房采血,每只 2 ml;剪断升主动脉放血处死大鼠;剖开胸、腹腔,取出心与肾,观察形态结构,而后将其放入 4%多聚甲醛液中固定,经脱水、透明、浸蜡、包埋等步骤,制成蜡块。

1.4 实验方法 总胆固醇酶法(COD-PAP)测定血清胆固醇(TCH),甘油三酯酶法(GPO-PAP)测定甘油三酯(TG),过氧化氢酶(CAT)法测定高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)与低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)。每只大鼠心脏与肾脏各切 4 张切片,经脱蜡至蒸馏

水。4 张切片中,1 张行 HE 常规染色,另外 3 张行 PV-9000 免疫组织化学二步法染色。免疫组化染色的切片经过氧化氢溶液处理和微波抗原修复后,用正常山羊血清封闭,封闭后的切片留下 1 张不加一抗,作为阴性对照片,另外 2 张分别滴加 1:100 稀释的兔抗大鼠 Actin 与 Fas-L,在 4 °C 的冰箱中过夜孵育,PBS 洗 3 次,滴加免疫组化试剂盒中的试剂一,37 °C 恒温箱内 30 min,PBS 冲洗 3 次,每次 2 min,再滴加试剂盒中的试剂二,37 °C 恒温箱内 30 min,PBS 冲洗 3 次,每次 2 min,DAB 显色,镜下控制,水洗,苏木素复染,脱水与透明后封片。以阴性对照片为参照,光镜观察 Fas-L 与 Actin 表达,组织细胞被染成灰蓝色为阴性表达,黄色为阳性表达,棕色为强阳性表达。用 Mimics10.0 测量肾小体的直径,对放大 400 倍、1 000 mm²范围的图像行灰度分析。

1.5 统计学方法 所有检测数据用 SPSS 13.0 行统计学处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用独立样本 t 检验。取 $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 心、肾大体结构 对照组大鼠心脏与肾脏呈淡紫色,实验组呈紫色,心肌张力较低。

2.2 血脂检测 实验组大鼠血清 TCH、TG、HDL-C、LDL-C 水平均明显高于对照组($P < 0.05$, $P < 0.01$),表明大鼠高脂血症模型的制备是成功的。见表 1。

2.3 心肌与肾皮质的微细结构

2.3.1 HE 染色及光镜观察 实验组大鼠心肌与肾皮质间质增宽,其中含大小不等的空泡,毛细血管与微、小静脉扩张淤血。小动脉内皮细胞增多,细胞核呈水滴状或蝌蚪形,染色深,位于细胞的顶端。血管腔内可见小血栓(图 1a)。心肌微动脉与肾小体出、入球微动脉内膜增厚,局部向管腔隆起,可见内皮细胞脱落,有的微血管内可见血细胞聚集、微血栓或大小不等的小泡(图 1b、1c)。心肌纤维增粗,其间可见散在变性、坏死的肌纤维。变质肌纤维中有颗粒、丝

网或泡沫样结构。坏死肌纤维肌膜断裂,肌浆与间质沟通;有的细胞轮廓消失,肌纤维裂解成碎片,细胞核固缩或碎裂(图 1d)。对照组肾小体直径为(0.428 ± 0.031)mm,实验组为(0.499 ± 0.04)mm,实验组肾小体直径大于对照组($P < 0.01$)。实验组肾小体血管球毛细血管扩张,血管腔内有血细胞滞留,肾小囊腔明显扩大。近、远端小管管腔狭窄,上皮细胞内有红色细小颗粒与小泡,部分近曲小管上皮细胞顶端溶解,管腔扩大,其中可见絮状物与空泡(图 1e)。上述观察表明,心肌与肾皮质内有散在的实质细胞颗粒变性、水样变性、脂肪变性与点状坏死,微、小血管有内膜损伤、微血栓形成及微脂滴栓塞。

2.3.2 免疫组化染色及光镜观察 (1) Actin 表达:对照组大鼠心肌纤维染棕色,横纹清晰,呈 Actin 强阳性表达(图 2a)。实验组大鼠心肌纤维染浅棕色,呈 Actin 阳性表达,横纹较清晰(图 2b)。实验组大鼠增厚的微动脉内膜中可见棕色颗粒或小圆环,根据血小板周围含大量 Actin 微丝这一结构特点判断,这些结构可能是微动脉内膜中聚集的血小板(图 2c)。(2) Fas-L 表达:对照组大鼠心肌纤维、肾小体与肾小管染灰蓝色,呈 Fas-L 阴性表达。实验组大鼠心肌纤维染浅黄色,呈 Fas-L 弱阳性表达,其间可见棕色,呈 Fas-L 强阳性表达的肌纤维,这些心肌纤维的肌浆中有大小不等的空泡(图 2d)。微动脉中膜内可见棕色、呈 Fas-L 强阳性表达的平滑肌纤维,内膜中可见棕色、呈 Fas-L 强阳性表达的细胞(图 2e)。肾小体血管球毛细血管的内皮及基膜染成棕黑色,呈 Fas-L 强阳性表达。球内系膜中可见棕黑色、呈 Fas-L 强阳

性表达的颗粒。近、远曲小管上皮染成棕色,呈 Fas-L 强阳性表达(图 2f)。

2.3.3 图像分析与统计处理 实验组大鼠心肌 Actin 表达的灰度值高于对照组($P < 0.01$),心肌及肾皮质 Fas-L 表达的灰度值均低于对照组(P 均 < 0.01)。见表 2。由于灰度值与免疫组织化学反应程度(吸光度)呈反比关系,灰度值大,免疫组织化学反应程度小,反之反应程度大,故实验组心肌 Actin 表达弱于对照组,心肌与肾皮质 Fas-L 表达强于对照组。观察与分析结果表明,高脂血症能增加心肌与肾皮质表达 Fas-L,减少心肌表达 Actin。

3 讨论

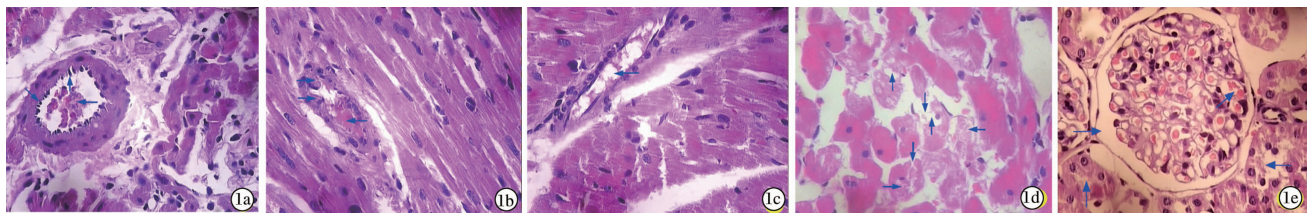
本实验结果表明,高脂血症能损伤心肌与肾皮质的微血管与实质细胞。心肌微血管壁的损伤及血管腔内微血栓与微脂滴形成,可引起心肌缺血与缺氧,进而导致肌纤维变质与坏死。在冠心病的发病过程

表 1 大鼠血脂检测值 ($n = 10, \text{mmol/L}, \bar{x} \pm s$)

组别	TCH	TG	HDL-C	LDL-C
对照组	1.27 ± 0.15	0.75 ± 0.09	0.61 ± 0.08	0.11 ± 0.02
实验组	3.94 ± 0.94	1.64 ± 1.03	0.73 ± 0.12	0.90 ± 0.27
P 值	< 0.01	< 0.05	< 0.05	< 0.01

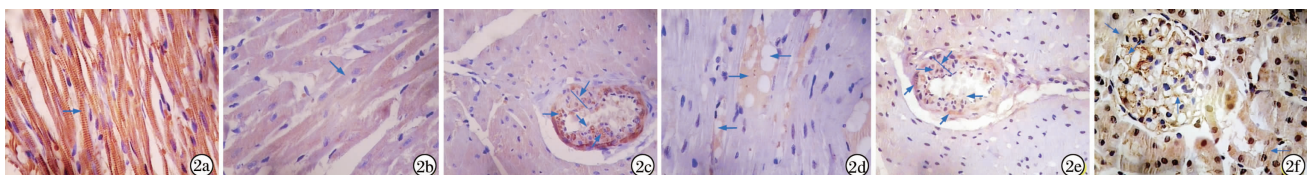
表 2 大鼠心肌、肾皮质 Actin 和 Fas-L 的表达 ($n = 10, \text{灰度值}, \bar{x} \pm s$)

组别	心肌 Actin 表达	心肌 Fas-L 表达	肾皮质 Fas-L 表达
对照组	465.89 ± 77.37	1429.25 ± 74.82	1130.18 ± 25.56
实验组	1089.41 ± 292.21	976.42 ± 219.51	998.51 ± 114.87
P 值	< 0.01	< 0.01	< 0.01



注:1a:小动脉横切(蝌蚪形细胞核↘;小血栓←;水滴状细胞核↑);1b:微动脉纵切(内膜增厚→;微血栓形成←);1c:微动脉纵切(空泡←;1d:心肌纤维横切,肌膜破裂↓,颗粒样结构→,空泡样结构↑,丝网样结构←);1e:肾皮质切片(肾小囊腔扩张→,毛细血管扩张淤血↗,肾小管管腔狭窄↑,肾小管上皮细胞顶端溶解与管腔扩大←)。

图 1 心肌和肾皮质 HE 染色病理图(×400)



注:2a:心肌纤维纵切(Actin 强阳性表达的心肌纤维→);2b:心肌纤维纵切(Actin 阳性表达的心肌纤维↘);2c:微动脉横切(内膜增厚↙,内皮脱落↘,Actin 强阳性表达的圆形颗粒→,Actin 强阳性表达的圆环↗);2d:心肌纤维纵切(Fas-L 强阳性表达的心肌纤维→,空泡←);2e:微动脉横切(内膜增厚↙,内皮脱落←,Fas-L 强阳性表达的平滑肌纤维↗, Fas-L 强阳性表达的细胞→);2f:肾皮质免疫组化图(肾小体↘, Fas-L 强阳性表达的内皮与基膜↙, Fas-L 强阳性表达的球内系膜颗粒↑, Fas-L 强阳性表达的肾小管上皮细胞←)。

图 2 心肌和肾皮质 PV-9000 二步法染色病理图(×400)

中,不仅存在大血管的问题,还存在微血管的病变,心肌微血管与心肌纤维的病理变化,是冠心病形成的基础。高脂血症能损伤肾皮质的微血管,引起入球微动脉与出球微动脉狭窄、血管球扩张及肾间质肿胀,导致肾皮质缺血与缺氧,通过肾素—血管紧张素—醛固酮系统,最终形成全身性水钠潴留及微循环障碍。这些病理变化,可加速心肌微血管与实质细胞的损伤,促进冠心病的形成与发展^[8-9]。

高脂血症对心肌与肾皮质微血管及实质细胞的影响,是一个缓慢而渐进的病理过程,加之心、肾具有巨大的代偿潜能,故冠心病形成隐匿,早期缺乏典型的临床症状与体征。随着病理变化的进一步发展,心肌与肾皮质变性、坏死的实质细胞数量增加,微血管病变范围扩大,最终导致心、肾功能严重受损与衰竭,尚若此时冠状动脉的大分支未形成狭窄与栓塞,则患者往往缺乏典型的心绞痛与心肌梗死等临床症状与体征,这可能是造成疾病漏诊与误诊的原因。

高脂血症所致微血管与实质细胞损伤是广泛性的。微血管的病理改变首见于血管内膜层,血小板与微脂滴在血管内膜与管腔中堆积,引起内膜增厚、血管腔内微血栓形成与微脂滴栓塞^[10]。当高脂性病理损伤发展到一定程度时,即可波及冠状动脉的主支,导致其狭窄或栓塞,临床表现为心绞痛或心肌梗死。近些年针对心绞痛或心肌梗死而实施的冠脉搭桥与支架植入术,虽取得了一定的近期疗效,然而回顾性调查显示,两者均有较高的病死率与栓塞复发率,这充分说明手术虽然能改善心肌的缺血与缺氧,但不能阻止病变的扩散与发展,而降脂与中药活血祛瘀治疗则能明显缓解症状、延缓病情发展。治疗结果从另一侧面显示,高脂血症引起的病理变化是全身性的,其主要病变部位在心肌与肾皮质,肾皮质微血管病变与微循环障碍,加速了心肌的病理发展,冠状动脉粥样斑块形成与栓塞,只是高脂血症引起的病理变化某一阶段的表征^[11-12]。

为证实凋亡是否参与了心肌与肾皮质实质细胞死亡的病理变化过程,以及这一病理过程对肌纤维及血小板结构的影响,本实验观察了作为凋亡相关因子的 Fas-L 在心肌和肾皮质的表达,及 Actin 在心肌的表达。Fas-L 属 II 型细胞膜表面糖蛋白,称为死亡因子,Fas 为死亡分子或死亡受体,Fas-L 通过与 Fas 交联,从而介导表达 Fas 的细胞发生凋亡。Actin 是活细胞表达的一种结构与功能蛋白,构成细胞骨架、细胞丝与微丝,参与细胞的运动。有研究报道,高脂血症能引起组织细胞缺血、缺氧,并通过不同途径激活

细胞凋亡程序,引起细胞变质与凋亡^[13-15]。本实验观察发现,实验组大鼠心肌纤维、肾血管球基膜、毛细血管内皮、球内系膜及肾小管上皮均有 Fas-L 强阳性表达,实验组 Actin 表达比对照组弱,提示高脂血症能增加心肌与肾皮质表达 Fas-L,减少心肌表达 Actin,可能促进心肌与肾皮质实质细胞的凋亡。

综上所述,高脂血症能引起心肌与肾皮质微细结构发生改变,推测可能与冠心病的形成与发展有着密切的关系。

参考文献

- [1] Berger S, Raman G, Vishwanathan R, et al. Dietary cholesterol and cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis [J]. *Am J Clin Nutr*, 2015, 102(2): 276-294.
- [2] 王薇, 赵冬, 刘军, 等. 我国住院急性冠状动脉综合征患者合并多重危险因素及临床治疗现状 [J]. *中华内科杂志*, 2014, 53(8): 611-616.
- [3] 许冬秀, 纪翠玲, 刘俊法, 等. 冠状动脉造影正常的急性心肌梗死的临床特点 [J]. *中国急救医学*, 2007, 27(11): 990-992.
- [4] 肖卫田. 不典型症状冠心病的临床分析 [J]. *中国医药指南*, 2015, 13(29): 91-92.
- [5] 康连鸣, 张健. 冠心病和心力衰竭 [J]. *中国分子心脏病学杂志*, 2010, 10(29): 1-3, 16.
- [6] Daniel D, Hardigan P, Jawaid A, et al. The Effect of Elevated Triglycerides on the Onset and Progression of Coronary Artery Disease: A Retrospective Chart Review [J]. *Cholesterol*, 2015; 29293.
- [7] 王朝晖. 冠状动脉斑块与微血管病变—2013 ESC-SCAD 指南的启示 [J]. *临床心血管病志*, 2014, 30(7): 557-559.
- [8] 滕丽新. 高血脂致大鼠心肌微血管损伤和心肌缺血性改变及与备解素关系的研究 [D]. 重庆: 第三军医大学, 2005.
- [9] 张岩, 甘华. 高血脂所致肾脏损害及机理 [J]. *国外医学(泌尿系统分册)*, 2001, 21(5): 219-220.
- [10] 陈煜, 李剑. 血小板致动脉粥样硬化斑块形成的相关研究 [J]. *国际心血管病杂志*, 2010, 37(6): 375-360.
- [11] 罗亚玮, 陈方, 张维东, 等. 冠状动脉多支病变患者不同介入性血运重建方式的远期随访比较 [J]. *中国全科医学*, 2010, 13(6): 607-609.
- [12] 程远渡, 易有金, 易传祝, 等. 植物甾醇酯和葛根素联合使用对高脂血症小鼠降血脂作用研究 [J]. *中国油脂*, 2015, 40(4): 64.
- [13] Osipov RM, Bianchi C, Feng J, et al. Effect of hypercholesterolemia on myocardial necrosis and apoptosis in the setting of ischemia-reperfusion [J]. *Circulation*, 2009, 120 (11 Suppl): S22-S30.
- [14] de Vries JE, Vork MM, Roemen TH, et al. Saturated but not mono-unsaturated fatty acids induce apoptotic cell death in neonatal rat ventricular myocytes [J]. *J Lipid Res*, 1997, 38(7): 1384-1394.
- [15] Minville-Walz M, Gresti J, Pichon L, et al. Distinct regulation of stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression by cis and trans C18:1 fatty acids in human aortic smooth muscle cells [J]. *Genes Nutr*, 2012, 7(2): 209-216.