

不同运动量游泳运动对大鼠左心室心肌闰盘结构和间隙连接蛋白43的影响

韦晓英^{1,2} 马彬¹ 吴洪海¹ 陈应柱³ 朱永泽^{1,4}

摘要

目的:探讨不同运动量游泳运动对大鼠左心室心肌闰盘结构和间隙连接蛋白43(Cx43)的影响,以期运动对心肌的生理和病理变化研究提供参考资料。

方法:SD大鼠分为不同运动量运动组和力竭运动组,前者进行12周的低、中和高运动量游泳运动,后者进行1次力竭游泳运动。运动后取左心室心肌组织进行常规透射电镜样品制备和Cx43免疫组化染色,电镜观察左心室心肌闰盘结构变化,光镜和图像分析方法对Cx43的分布和含量改变进行研究。

结果:安静对照组大鼠左心室心肌细胞闰盘结构清晰,由粘着连接、桥粒和间隙连接组成,呈阶梯状排列,Cx43主要分布在闰盘处。低和中运动量大鼠闰盘结构、Cx43分布和含量与安静对照组差异不大。高运动量大鼠闰盘连接间隙明显增宽,Cx43在心肌细胞侧对侧连接增加,含量明显降低。力竭运动大鼠闰盘结构紊乱,局部断裂或折迭;力竭后即刻Cx43含量与安静对照组差异不明显,随着力竭运动后时间的延长,Cx43含量显著降低。

结论:高运动量和力竭运动可以导致左心室心肌闰盘结构破坏,Cx43降解和分布模式改变。

关键词 游泳运动;大鼠;左心室;闰盘;连接蛋白43

中图分类号:R87 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2013)-01-0023-05

Effects of different loading swimming exercises on structure of myocardial intercalated disk of ventriculus sinister and connexin 43 in rats/WEI Xiaoying, MA Bin, WU Honghai, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2013, 28(1): 23—27

Abstract

Objective: To explore the effects of different loading swimming exercise on structures of myocardial intercalated disk of ventriculus sinister and connexin 43(Cx43) in rats, so as to provide some information for the changes of physiology and pathology by the exercise-induced injury and recuperation of cardiac muscles.

Method: SD rats were randomly divided into two groups: different loading exercise group and exhaustive exercise group. In the different loading exercise group, 12-week low, moderate and high loading swimming models were carried out in rats. In the exhaustive exercise group, a single exhaustive swimming was carried out in rats. After exercise, rat's ventriculus sinister were cut off, and treated with routine procedures of transmission electron microscopy before observing the structures of intercalated disks. Immunohistochemical technique and image-analysis method were used to study the changes in distribution and content of Cx43 in myocardial tissues.

Result: In control group rats ventriculus sinister showed clear structure of myocardial intercalated disks, which were composed of adhering junction, desmosome and gap junction and arranged as a flight of stairs. Cx43 was mainly distributed in intercalated disk. In low and moderate loading swimming groups the structure of intercalated disk and the distribution and content of Cx43 were similar to that of control group. In high loading swimming group the gaps of intercalated disks became wider, the contents of Cx43 decreased, and distribution of Cx43 at

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2013.01.006

1 扬州大学医学院,225001; 2 扬州大学医疗中心; 3 江苏省苏北人民医院; 4 通讯作者

作者简介:韦晓英,女,主治医师; 收稿日期:2012-02-17

side-to-side junction of myocardial cells increased. In exhaustive exercise group the myocardial intercalated disks were disorganized and some regions of intercalated disks were destroyed or folded; the content of Cx43 was similar to control group at the end of exhaustive exercise, but significantly decreased with time prolongation after exhaustive exercise.

Conclusion: High loading swimming and exhaustive exercise could destroy the structures of myocardial intercalated disks of ventriculus sinister, and result in degradation and change in distribution pattern of Cx43.

Author's address Medical College of Yangzhou University, Jiangsu, 225001

Key word swimming exercise; rat; ventriculus sinister; intercalated disk; connexin 43

运动引起心脏结构与功能改变及调节机制等方面的研究,一直是众多学者探讨的热点问题^[1-2]。剧烈运动特别是超长时间的反复大强度运动和力竭运动导致机体心脏功能方面的严重医学问题已成为人们日益关注的焦点^[3-4]。闰盘是心肌细胞之间的连接,是由非特化肌膜、粘着膜、桥粒和间隙连接共同组成的特殊结构,它是心肌电、机械和代谢耦联的结构基础^[5]。运动对心室肌细胞超微结构的影响已有不少报道^[1,6-8],但对心肌闰盘结构的影响研究还未见报道。间隙连接是直接连接邻近心肌细胞的跨膜通道,是心肌细胞间进行物质交换和信息交流的唯一通道,其结构的破坏可导致心电活动和心肌收缩功能的异常。连接蛋白组成心脏的间隙连接,它的有序化分布是维持和保证心脏收缩和舒张的基本解剖学基础。心肌连接蛋白43(connexin 43, Cx43)是十余个组成间隙连接的连接蛋白家族成员中的一个,是心室肌中表达最多的连接蛋白^[9]。本实验通过建立大鼠不同运动量和力竭游泳运动模型,利用透射电镜技术观察左心室心肌细胞闰盘结构的变化,采用免疫组化染色分析间隙连接蛋白Cx43分布和含量的变化,探讨运动对心肌闰盘和连接蛋白43的影响,为运动训练与心脏功能关系的研究,合理制订运动训练强度,提供必要的参考资料。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康SD大鼠73只,8周龄,体重 180 ± 25 g,雌雄各半,由扬州大学医学院实验动物中心提供。分笼饲养,每笼5只,自然光照,国家标准固体混合饲料喂养,自由饮水。

1.2 游泳运动及分组

大鼠购进后,适应性喂养3d,所有大鼠均在1周

内适应性游泳3次,每次15min。游泳池为300L塑料水箱,四壁光滑,水深为60cm,约为大鼠身长的2倍,水温控制在 $30 \pm 1^\circ\text{C}$ 。最后一次游泳后,将大鼠随机分为安静对照组(control group, CG),低运动量运动组(low loading exercise group, LG),中运动量运动组(moderate loading exercise group, MG),高运动量运动组(high loading exercise group, HG)和力竭组(exhaustive exercise group, EG)。CG组12只,自由进食饮水,平时不运动。LG组12只,自由进食饮水,每天游泳45min,每周游6次,共12周。MG组12只,自由进食饮水,每天游泳90min,每周游6次,共12周。HG组12只,自由进食饮水,每天游泳150min,每周游6次,共12周。EG组25只,自由进食饮水,平时不运动,在第12周进行一次力竭游泳运动前,做2次负重适应性游泳,尾部负重重量为体重的2%(用柔软的金属丝缠绕在大鼠尾巴根部),每次30min。力竭运动时,对在短时间内力竭的大鼠,捞出休息5min后,再进行游泳运动。力竭判断的标准按照Thomas的标准,即大鼠连续3次沉入水底,每次超过10s,不能自主浮上水面;协调运动丧失,放在平面无法完成翻正反射^[9]。EG组分别在运动后即刻0h (E0G)、1h (E1G)、3h (E3G)、12h (E12G)和24h (E24G)取材,每次取5只大鼠。每次游泳后捞出大鼠,迅速用干抹布擦干水分,电暖风机吹干后,置于笼中休息。

1.3 心肌细胞连接样品制备与观察

大鼠先用2%的戊巴比妥钠腹腔麻醉,仰卧固定,剪开胸壁取其心脏,在低温下用锋利的剪刀和刀片剪去心尖,剪取左心室肌组织,迅速浸在2.5%戊二醛固定液中(0.1M, pH7.2磷酸钠缓冲液配制), 4°C 冰箱中保存。样品经0.1M, pH7.2磷酸钠缓冲液室温清洗3次,每次20min。1%四氧化锇固定液

(0.1M, pH7.2 磷酸钠缓冲液配制)室温后固定 3h,然后用缓冲液清洗 3 次,双蒸水清洗 3 次,每次 20min。样品经 30%、50%、70%、90%、100%(3 次)乙醇脱水,每次 20min。样品最后经环氧丙烷置换后,Epon 812 树脂渗透和包埋,60℃下聚合 48h,获得样品树脂包埋块。树脂包埋块在 Leica U6 超薄切片机上,先用玻璃刀修块,再用钻石刀切取 70nm 的超薄切片。超薄切片经醋酸双氧铀和柠檬酸铅双重染色后,在 Philips Tecnai 12 透射电子显微镜下观察与拍照。

1.4 心肌细胞 Cx43 免疫组化染色与图像分析

将左心室肌组织迅速浸在 4% 多聚甲醛和 0.25% 戊二醛固定液中(0.1M, pH7.2 磷酸钠缓冲液配制),4℃ 冰箱中固定一周。样品按常规石蜡切片制样,切片厚度 8μm。免疫组织化学染色采用 SABC 法。兔抗大鼠间隙连接蛋白 Cx43 一抗和 SABC(兔 IgG)-POD 试剂盒均购自武汉博士德生物工程有限公司。切片用去离子水冲洗,3% H₂O₂ 封闭 8min,去离子水冲洗,抗原热修复,PBS 冲洗,加生物素封闭液 A 10min,PBS 冲洗,加生物素封闭液 B 10min,PBS 冲洗,滴加正常山羊血清 20min,滴加 Cx43 一抗,4℃ 过夜,37℃ 复温,PBS 冲洗;滴加二抗 37℃ 20min,PBS 冲洗,滴加 SABC 20min,Tween+PBS 混合液冲洗 2h,DAB 显色,蒸馏水冲洗。苏木精复染,分化,脱水、透明,中性树胶封片。每次染色设阴性对照染色,PBS 取代一抗,其他程序相同。Olympus 光学显微镜 BX53 观察和 CCD-DP72 拍照,所有的图像均以同一曝光时间及相同条件采集。每张切片随机选取心肌纵切视野 5 个,每组选取 3 只大鼠的左心室进行分析。将数字化图像储存于计算机。应用捷达 JD801 形态图像分析系统软件(1.0)对免疫组化染色阳性反应产物进行定量分析,用平均光密度值(MOD)表示。

1.5 统计学分析

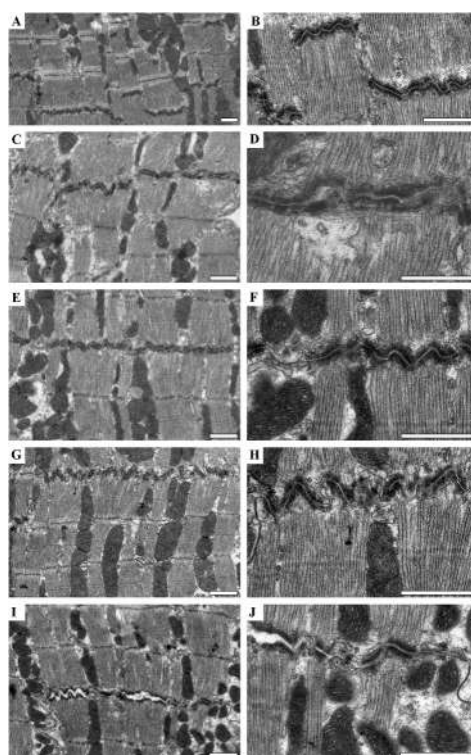
采用 SPSS11.0 软件进行数据分析,计算平均值和标准差。组间差异比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 不同运动量运动与大鼠左心室心肌闰盘结构

安静对照组,闰盘结构清晰,形态正常,呈阶梯状排列,主要由粘着连接、桥粒和间隙连接组成,横向部位主要是粘着连接和桥粒以及小的间隙连接,少量间隙连接位于纵向部位(图 1, A—D)。低运动量大鼠心肌细胞闰盘结构与安静对照组无明显改变(图 1, E—F)。中运动量大鼠闰盘结构清楚,与安静对照组相比,粘着连接的起伏较大(图 1, G—H)。高运动量大鼠闰盘处的连接间隙明显增宽(图 1, I—J)。

图 1 不同运动量大鼠左心室心肌细胞闰盘结构



A—D:CG 组;E、F:LG 组;G、H:MG 组;I、J:HG 组;A 示心肌组织闰盘结构,C、E、G 和 I 示心肌细胞闰盘结构,B、D、F、H 和 J 分别为 A、C、E、G 和 I 的局部放大。标尺 1μm。

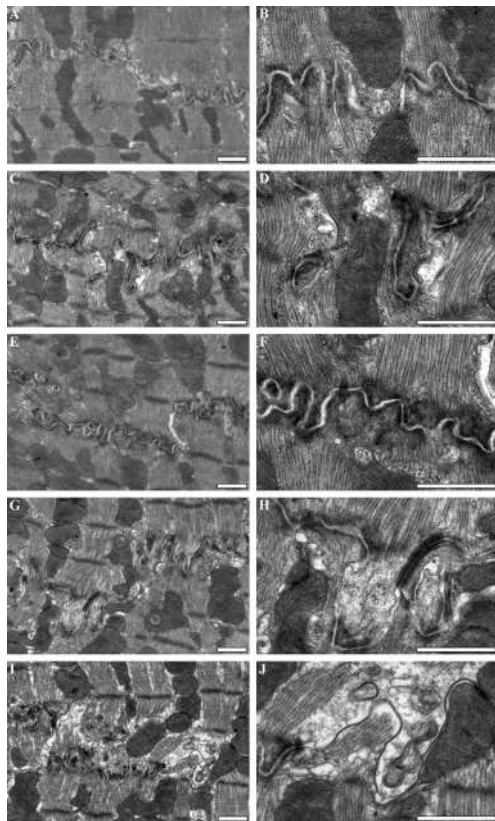
2.2 力竭运动对大鼠左心室心肌闰盘结构的影响

力竭运动大鼠左心室心肌闰盘结构紊乱,失去正常结构(图 2)。局部区域闰盘处的细胞膜不连续,可见断裂;有些区域闰盘折迭,可见多重闰盘;有的区域闰盘连接间隙变宽。随着力竭后时间的延长,闰盘结构逐渐恢复。

2.3 不同运动量运动与大鼠左心室心肌间隙 Cx43

不同运动量运动对大鼠左心室心肌纵切间隙连接 Cx43 的免疫组化结果见图 3。阴性对照显示,心肌细胞上没有显色的阳性物质存在(图 3, A)。安静

图2 力竭运动大鼠左心室心肌细胞闰盘结构



A、B: E0G组; C、D: E1G组; E、F: E3G组; G、H: E12G组; I、J: E24G组;
A、C、E、G和I示心肌细胞闰盘结构, B、D、F、H和J分别为A、C、E、G
和I的局部放大。标尺1 μ m。

表1 不同运动量和力竭运动大鼠左心室Cx43含量 ($\bar{x} \pm s$)

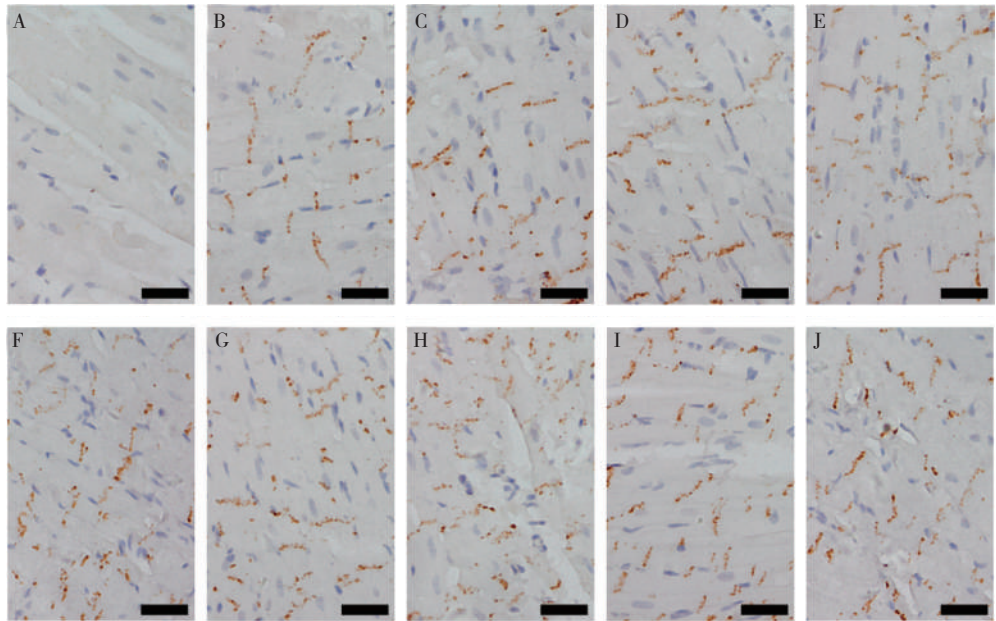
组别	平均光密度
CG	0.284 $\pm$ 0.052
LG	0.282 $\pm$ 0.047
MG	0.288 $\pm$ 0.046
HG	0.222 $\pm$ 0.031 ^①
E0G	0.271 $\pm$ 0.052
E1G	0.264 $\pm$ 0.045 ^①
E3G	0.249 $\pm$ 0.045 ^{①②}
E12G	0.244 $\pm$ 0.053 ^{①②}
E24G	0.256 $\pm$ 0.050 ^{①②}

注: ①与CG组相比, $P < 0.05$; ②与E0G组相比, $P < 0.05$

对照组心肌细胞显示阳性反应部位为棕黄色颗粒, 呈斑点状, 连成带状或呈链状, 主要分布于心肌细胞的闰盘处(图3, B)。低和中运动量大鼠虽与安静对照组相比无明显差异, 但在心肌细胞侧面也有少量阳性颗粒分布(图3, C—D)。随着运动负荷的增加, Cx43分布变化明显。高运动量大鼠心肌阳性反应颗粒分布散乱, 不仅仅局限于闰盘处, 而且在心肌细胞侧面分布也增多(图3, E)。力竭运动大鼠心肌Cx43分布主要在闰盘处, 比较紊乱(图3, F—J)。

表1显示, 不同运动量大鼠左心室心肌Cx43含量的变化。低和中运动量大鼠Cx43含量与安静对照组差异不大; 高运动量大鼠Cx43在心肌细胞中的含量明显降低; 力竭运动大鼠力竭后即刻Cx43含量

图3 不同运动量和力竭运动大鼠左心室Cx43的免疫组化染色



A: 阴性对照; B: CG组; C: LG组; D: MG组; E: HG组; F: E0G组; G: E1G组; H: E3G组; I: E12G组; J: E24G组。标尺20 μ m。

与安静对照组差异不明显,随着力竭运动后时间的延长,Cx43含量显著降低。

3 讨论

研究发现,反复进行的持续大强度运动和急性力竭运动对机体产生不利影响,常导致运动性疲劳与损伤的发生,尤其是运动性心肌微损伤^[10]。王东辉等^[11]研究发现,力竭运动引起的心肌损伤表现为心肌脂质过氧化加强,钙离子超载,这种损伤在6h的时相较严重,24h后有所减轻。梅焰等^[6]研究了不同运动负荷大鼠心肌超微结构变化,发现过度负荷组大鼠左心室心肌呈现病理性改变,心肌肌丝断裂。王鑫等^[1]研究力竭游泳运动对大鼠左心室心肌细胞中间纤维和超微结构的影响,发现力竭运动可以引起大鼠心肌中间纤维和超微结构的形态发生改变。闰盘是由非特化肌膜、粘着膜、桥粒和间隙连接共同组成的特殊结构^[5]。本文的结果表明,低和中运动量运动对左心室闰盘结构基本没有影响,而高运动量运动和力竭运动可导致闰盘连接间隙增宽和结构紊乱。

心肌的损伤可直接影响执行心肌特殊功能的蛋白质的表达异常,造成心肌功能的异常^[10]。间隙连接是存在于相邻细胞间的一种由特殊膜蛋白通道组成的、具有亲水性的特殊低阻抗区域,是细胞间直接交换物质进行信息通讯的唯一途径^[12]。Cx43是十余个组成连接蛋白保守家族的成员中的一个,也是心肌细胞中分布最多的连接蛋白。Cx43是心肌缺血时最易降解的结构蛋白之一,它的大量降解并且分布模式明显改变,可导致心肌细胞间失耦联,整体传导速度明显减慢,传导的各向异性改变。这些改变将导致传导阻滞和折返传导,并进一步诱发心律失常发生。因此,Cx43的降解和分布模式改变被认为是急性缺血后心肌在分子水平上发生的最初重构,也是心肌细胞间电耦联失常和心律失常的解剖学基础^[13]。李梁和常芸^[3]研究了力竭运动后不同时相大鼠心肌Cx43的变化,发现力竭运动后各时相组心肌Cx43分布模式发生明显改变,由端对端连接为主转变为侧对侧连接为主,其含量都显著低于安静对照组。王友华和田振军^[14]研究了不同强度训练对大鼠

心室肌Cx43的影响,结果表明,大强度训练可导致Cx43表达量显著减少。本文的结果表明,低和中运动量运动对大鼠左心室心肌Cx43影响不大,但高运动量运动和力竭运动可导致心肌Cx43分布模式和含量发生改变,与前人的结果相一致。

参考文献

- [1] 王鑫, 陈正东, 吴昊, 等. 力竭游泳运动对大鼠心肌细胞中间纤维和超微结构的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2007, 22(11): 968—970.
- [2] 彭峰林, 陆燕玲, 张林, 等. 间歇运动训练对缺血再灌注损伤大鼠心脏的保护作用[J]. 中国康复医学杂志, 2009, 24(10): 910—913.
- [3] 李梁, 常芸. 力竭运动后不同时相大鼠心肌连接蛋白43的变化[J]. 中国运动医学杂志, 2007, 26(4): 397—402.
- [4] 韦晓英, 马彬, 吴洪海, 等. 不同运动量游泳运动对大鼠心房肌细胞钠素颗粒的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2012, 27(2): 107—110.
- [5] Severs NJ, Bruce AF, Dupont E, et al. Remodelling of gap junctions and connexin expression in diseased myocardium[J]. Cardiovasc Res, 2008, 80: 9—19.
- [6] 梅焰, 毛宗珍, 葛新发. 不同运动负荷大鼠心肌超微结构变化的研究[J]. 武汉体育学院学报, 2003, 37(2): 47—49.
- [7] 李海英, 赵娟, 佟长青, 等. 间歇性低氧及游泳运动对大鼠右心室线粒体超微结构的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2010, 25(7): 643—645.
- [8] 赵娟, 李海英, 薄海, 等. 低氧及跑台运动对大鼠左心室线粒体超微结构的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2011, 26(12): 1104—1107.
- [9] Thomas DP. Effect of acute and chronic exercise on myocardial ultrastructure[J]. Med Sci Sports Exerc, 1985, 17: 546—553.
- [10] Tata CA, Hyek MF, Taffet GE. Mechanisms for the responses of cardiac muscle to physical activity in age[J]. Med Sci Sports Exerc, 1994, 26: 561—567.
- [11] 王东辉, 熊若虹, 郑兵, 等. 大鼠力竭游泳运动后不同时相心肌和血清SOD、GSH-Px、MDA和Ca²⁺的变化[J]. 沈阳体育学院学报, 2004, 23(3): 332.
- [12] Haefliger JA, Bruzzone R, Jenkins NA, et al. Four novel members of the connexin family of gap junction proteins[J]. Biol Chem, 1992, 267: 2057—2064.
- [13] Salfitz JE. Regulation of intercellular coupling in acute and chronic heart disease[J]. Braz J Med Biol Res, 2000, 33: 407—412.
- [14] 王友华, 田振军. 不同强度运动训练对大鼠心室肌胶原纤维和Cx43、Cx45影响的实验研究[J]. 北京体育大学学报, 2009, 32(6): 47—50.