



大鼠采用体积分数 5% 水合氯醛腹腔注射麻醉,迅速开胸经体积分数 4% 戊二醛溶液等压灌流固定后,置于体积分数 4% 戊二醛溶液固定 4~12 h,修块,切成 1 mm×1 mm×2 mm 小块用于电镜样品制作。

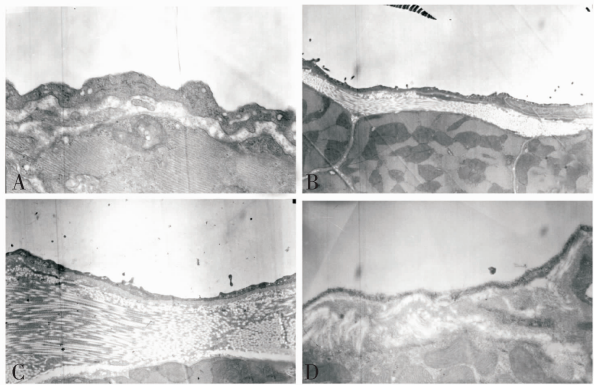
**1.2 主要仪器和试剂** TEM(日本 Hitachi, H-7500 型), SEM(荷兰 FEI Quanta 200FEG), 超薄切片机(德国 Leica, UC6 型)。戊二醛、锇酸、丙酮、乙醇及 ep-812 包埋剂均为市售分析纯。

**1.3 TEM 及 SEM 样品制作观察** TEM 样品制作:将固定的组织样品用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)洗涤 24 h, 锇酸后固定液固定 1 h, PBS 洗涤 2 次, 每次 15 min, 然后依次用体积分数 50%、70%、80%、90%、95%、100% 的丙酮梯度脱水, 每次约 10 min, 树脂 812 浸透 24 h, 定向包埋聚合 96 h, 制作 60 nm 超薄切片, 醋酸铀—枸橼酸铅双染色, TEM 观察内皮细胞及内皮下胶原超微结构, 并摄片。SEM 样品制作:用 0.1 mol·L<sup>-1</sup>、pH 7.0 的 PBS 漂洗样品 3 次, 每次 1 h; 体积分数 1% 的锇酸溶液固定样品 1 h, 用 0.1 mol·L<sup>-1</sup>、pH 7.0 的 PBS 漂洗样品 3 次, 每次 15 min; 梯度乙醇脱水, 每种浓度处理 20 min; 体积分数 100% 的乙醇处理 2 次, 每次 20 min; 乙醇与醋酸异戊酯的混合液(体积比 1:1)处理样品 30 min, 纯醋酸异戊酯处理样品 1~2 h。临界点干燥, 镀膜, SEM 观察心肌内皮超微结构。

2 结果

**2.1 TEM 观察心内膜结果** 新生组大鼠内皮细胞无核部分较厚, 呈波浪状, 质膜小泡较多, 细胞器清晰可见, 细胞游离面光滑, 有圆润突起; 青年组和中年组大鼠内皮细胞无核部分较少且平直, 游离面光滑有细小的突起, 质膜小泡多, 细胞器清晰可见; 老年组大鼠内皮细胞无核部分薄且疏松, 质膜小泡少见, 细胞器模糊不清, 细胞游离面粗糙, 突起较少见。新生组大鼠基膜明显, 中年组大鼠基膜最厚, 老年组大鼠基膜断裂不延续, 内皮下层和心内膜下层逐渐变厚。新生组大鼠基质成分丰富, 胶原成分稀少; 青年组和中年组大鼠胶原逐渐增多, 胶原束排列规则有序; 老年组大鼠胶原束排列紊乱松散, 胶原束之间基质成分增多(图 1)。

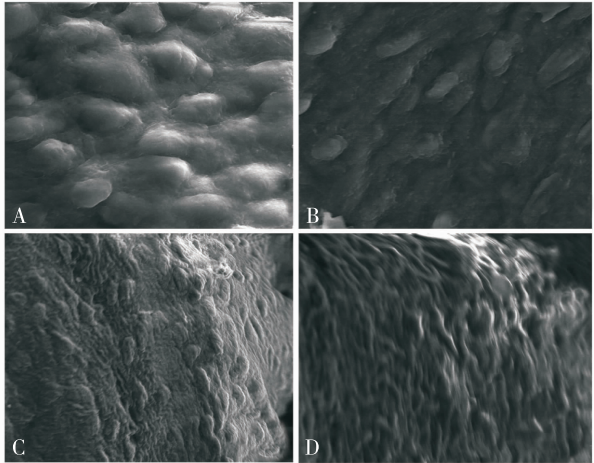
**2.2 SEM 观察心内膜结果** 新生组大鼠内皮细胞表面光滑, 细胞核呈椭圆形, 细胞核排列方向一致性不明显; 青年组大鼠内皮细胞表面光滑, 皱折较少, 细胞核呈橄榄形, 其长轴方形排列一致; 中年组大鼠内皮细胞表面呈颗粒状, 有皱折, 细胞核形状和排列方向与青年组相似; 老年组大鼠内皮细胞表面皱折较多, 细胞核呈长梭形。细胞核/面积比随年龄增长显著变小(图 2)。



A: 新生组; B: 青年组; C: 中年组; D: 老年组。

图 1 各组大鼠心肌内皮细胞和内皮下胶原超微结构(TEM, ×10 000)

Fig. 1 Ultrastructure of endotheliocyte and the subendothelial collagen in the groups(TEM, ×10 000)



A: 新生组; B: 青年组; C: 中年组; D: 老年组。

图 2 各组大鼠心肌内皮超微结构(SEM, ×3 000)

Fig. 2 Ultrastructure of myocardial endothelial in the groups(SEM, ×3 000)

3 讨论

本实验研究结果显示, 新生大鼠内皮质膜较厚,

青年大鼠和中年大鼠厚度相差不大,老年大鼠内皮质膜较薄并且松散,提示幼年阶段心内膜功能处于最活跃状态,中青年较为稳定,而老年则出现功能下降。质膜小泡的数目在幼年到中年没有太大的变化,老年质膜小泡的数目少见,尽管关于质膜小泡的功能说法不一,本实验结果显示,质膜小泡体现了内皮细胞的活跃程度。另外,随着年龄的增长,大鼠左心室心内膜内皮下胶原增多,在青年和中年阶段,其排列规则,这有利于适应心脏的收缩及舒张。而在老年阶段,胶原纤维束排列紊乱,表明随着衰老进程,这些结构变化已很难适应心脏的功能,从而造成失代偿。本实验还观察到内皮细胞下胶原随年龄的增长而增多,这与郭志坤等<sup>[4]</sup>的研究结果一致。

心脏内皮细胞为衬贴于心脏腔面的单层扁平上皮,作为血管的内衬,形成光滑游离面,便于血液流动,其形态的变化会对心脏的功能造成影响<sup>[5]</sup>。国内外学者大多认为,老年退行性心瓣膜疾病是包括心脏老化、长期血流冲击、磨损及机械应力等多因素综合作用的结果<sup>[6]</sup>。本实验结果显示,内皮细胞同心肌细胞一样,其长轴生长态势与血液流动方向一致,这更有利于适应心脏的泵血功能。尽管内皮有很强的再生和适应能力,但随着年龄的增长,其内皮细胞直接受流体的冲击、磨损,其自我修复能力明显下降,进而影响心肌功能,造成老年心脏相关疾病的发生。另外,心肌胶原纤维是心肌间的重要组成部分,包绕心肌细胞和肌束,并相互交织成网,保证心肌组织的硬度<sup>[7]</sup>。本实验结果显示,随年龄增长,心肌胶原数量逐渐增多,特别是青年期和中年期的胶原束排列规则有序,而到了老年期,胶原束的排列

却变得紊乱松散,胶原束之间基质成分也明显增多,这可能是造成老年期心肌功能减退的原因之一。

本研究从形态学角度对大鼠左心室内膜超微结构增龄特征进行了初步探索,但心内膜的发生机制,以及心内膜结构的改变与临床相关心脏性疾病之间的关系仍需更深入研究。另外,考虑到心室不同部位其内膜的厚度存在差异,本实验各组均统一选择左心室室中上部位,但由于 TEM 取材切片的局限,本研究主要对内皮和内皮下胶原进行观察,其他部分还需进一步深入研究。

参考文献:

[1] Milgrom-Hoffman M,Harrelson Z,Ferrara N,*et al.* The heart endocardium is derived from vascular endothelial progenitors[J]. *Development*,2011,138(21):4777-4787.

[2] Luca A C,Iordache C. Infectious endocarditis with five localisations;case reports[J]. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*,2014,118(1):81-86.

[3] Kołodzińska A,Kutarski A,Kozłowska M,*et al.* Biodegradation of the outer silicone insulation of endocardial leads[J]. *Circ Arrhythm Electrophysiol*,2013,6(2):279-286.

[4] 郭志坤,徐振平,李和. 大鼠心脏 I、Ⅲ型胶原增龄变化的免疫组织化学观察[J]. *解剖学报*,2004,35(3):316-319.

[5] Goldsmith I,Kumar P,Carter P,*et al.* Atrial endocardial changes in mitral valve disease;a scanning electron microscopy study[J]. *Am Heart*,2000,140(5):777-784.

[6] 兰桂林. 老年退行性心脏瓣膜病相关危险因素分析[D]. 呼和浩特:内蒙古医学院,2007.

[7] 郭志坤,王琦,李和. 缺血再灌注对大鼠心肌间质胶原网络的影响[J]. *解剖学杂志*,2004,27(3):291-294.

( 本文编辑:王 燕 英文编辑:王 燕)