

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.07.035

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2017.07.035

## 电镜在心脏疾病中的研究及诊断意义

孙洋<sup>1</sup> 综述 赵红<sup>2</sup> 审校

(中国医学科学院, 北京协和医学院, 国家心血管病中心, 阜外医院, 心血管疾病国家重点实验室

1. 实验诊断中心; 2. 血栓性疾病中心, 北京 100037)

**[摘要]** 心脏疾病的病因及发病机制复杂。随着生物医学研究手段的拓展, 研究者需要将分子改变与表型建立联系, 电子显微镜作为观察超微结构的成熟技术, 在医学领域重新成为研究者们认识疾病的重要工具。

**[关键词]** 电子显微镜; 超微结构; 心脏疾病

## Research and diagnostic value of electron microscope in heart diseases

SUN Yang<sup>1</sup>, ZHAO Hong<sup>2</sup>

(1. Department of Diagnostic Laboratory Service; 2. Thrombosis and Vascular Medicine Center, State Key Laboratory of Cardiovascular Disease, Fuwai Hospital, National Center for Cardiovascular Disease, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100037, China)

**Abstract** The pathogenesis of heart diseases is very complicated. With biomedical techniques development, researchers need a bridge to connect molecular changes with phenotype. As a mature technology, electron microscope was reused as an important tool to understand diseases. This paper reviewed EM use in both basic research and clinical diagnosis.

**Keywords** electron microscope; ultrastructure; heart diseases

1950年至1980年是医学领域电子显微镜(electron microscope, EM)研究的黄金时代, 这个阶段尤其是透射电子显微镜(transmission electron microscopy, TEM)积累了大量生物样本的超微结构信息, 为随后的生化研究和功能研究提供了组织及细胞超微结构形态学基础。然而, 此后的20多年间, 由于EM制样繁琐, 加之对EM观察者

经验要求较高, 因此未能在临床广泛应用, 在基础医学研究中的应用也逐渐减少。随着组学、分子生物学、生物化学、纳米材料、干细胞移植等技术的心脏疾病研究中的应用, 研究者们一方面需要从超微结构方面对新材料、细胞形态进行鉴定, 另一方面需要将分子改变与疾病形态学建立有机联系。EM因能够直接观察细胞超微结构改

收稿日期 (Date of reception): 2017-03-27

通信作者 (Corresponding author): 赵红, Email: zhaohongfw@aliyun.com

基金项目 (Foundation item): 院所特色项目基金 (2012-FWTS-03), 院所青年基金 (2015-F05)。This work was supported by Chinese Academy of Medical Sciences Characteristics Project Foundation (2012-FWTS-03) and Youth Science Fund of Chinese Academy of Medical Sciences (2015-F05), China.

变, 重新成为研究者们应用的重要工具。在积累了一定的基础研究数据后, 研究者们逐渐开始在人类心脏组织中, 使用EM技术对疾病的超微结构改变进行观察, 尝试重新认识疾病、从超微结构改变方面解释病因。本文对EM在心脏疾病研究及诊断中的应用进行综述。

## 1 EM在心脏疾病基础研究中的应用

### 1.1 观察心肌细胞发育、分化及衰老

心脏发育非常复杂, 长期以来一直是基础医学和临床医学研究者关注的焦点。通过EM对胚胎发育的观察, 人们认识到从幼稚心肌细胞发育为成熟心肌细胞, 需要经历由椭圆形变为长杆形的形态变化, 胞浆内核糖体减少, 内质网逐渐形成肌浆网, 肌丝逐渐形成肌节乃至肌原纤维。然而其具体过程如何启动、如何调控? 心肌细胞如何分裂<sup>[1]</sup>? 肌原纤维如何拆解? 肌节如何形成<sup>[2]</sup>? 如何重新激活和提高心肌细胞的分裂和增生潜能以改善心脏功能? 这些问题正慢慢成为研究热点。使用细胞或动物模型模拟心肌细胞发育过程, 使用EM观察超微结构改变, 为有效的研究手段。如Liu等<sup>[3]</sup>使用TEM观察成年大鼠心肌细胞分裂过程发现, 心肌细胞首先从长杆状变为圆形, 闰盘破碎导致闰盘附近Z线两侧力量失衡, 随后肌原纤维从心肌细胞的游离端开始拆解, 闰盘的完整性和肌球蛋白和肌动蛋白之间的相互作用在肌原纤维的拆解中发挥重要作用。

心脏发育过程中, 心脏前体细胞分化为心房肌细胞、心室肌细胞、具有自律性的窦房结细胞或具有传导功能的浦肯野细胞等特化细胞类型, 组成心脏器官。不同的细胞类型具有不同的超微结构, 通过EM观察, 有助于研究基因如何调节细胞分化。基因重编程及诱导分化技术飞速发展, 研究者<sup>[4]</sup>不仅能够将已分化细胞诱导为多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSC), 而且能够将瘢痕组织中的成纤维细胞通过基因敲除及蛋白诱导, 直接转化为心肌细胞。这些进展有助于人们开发出心肌梗死时能够减小心脏瘢痕并补充健康心肌细胞的新疗法。而通过EM对细胞超微结构的观察是鉴定诱导成功与否的重要手段。

随着人口老龄化, 心脏功能衰退是另一研究热点。心脏衰老涉及众多的细胞和分子过程, 衰老患者围手术期心脏功能障碍的风险升高。针对衰老模型及老年患者进行血流动力学性能、代谢参数及超微结构的变化研究具有重要临床意义<sup>[5]</sup>。在衰

老相关研究中, 线粒体的数量、形态、排列、细胞核形态、脂褐素沉积等指标的改变, 需要通过TEM进行观察。

### 1.2 观察细胞自噬、凋亡、线粒体代谢等过程

TEM可以直观观察细胞生理、病理过程。线粒体是心肌细胞内最多和最重要的细胞器, TEM可以很好地观察线粒体形态、位置和数量的变化, 并可辅助诊断线粒体心肌病。

自噬是细胞消化胞质内成份的一种溶酶体降解途径, 参与细胞存活、分化、生长, 维持内环境平衡, 在饥饿刺激下维持自身能量供给。自噬不良或自噬失衡都会引发或促进疾病。TEM可以观察到自噬体形成的过程, 并评估自噬小体的数量, 是自噬研究的重要手段<sup>[6]</sup>。

心肌细胞属于终末分化细胞, 病理情况下由于缺血、缺氧、代谢改变或信号通路激活引起的心肌细胞凋亡增多或凋亡不平衡, 参与多种心血管疾病。在预激综合征(Wolff Parkinson white, WPW)中, 凋亡过度为病人发生恶性心律失常和猝死的原因之一<sup>[7]</sup>。凋亡具有典型的超微形态学特征, 表现为染色质浓缩、边集, 细胞膜出芽、胞质进行性浓缩、细胞骨架改变、凋亡小体形成等, 依靠TEM观察判断<sup>[8]</sup>。

### 1.3 观察心肌间质

随着对心肌组织研究的深入, 基质成分和间质细胞在心脏疾病中的作用引起越来越多关注。如特络细胞(Telocytes, TCs)是一种新发现的间质细胞, 在正常心肌组织中构成网状支架。文献[9]报道在心肌梗死、心肌病和心力衰竭心脏中TCs减少, 存在增殖和凋亡间的不平衡。作为一种新发现的细胞, 对其功能及来源尚需做大量研究工作, 使用TEM可以很好地观察TCs, 通过细胞形态、大小、细长胞质突起(telopodes, Tps) (100  $\mu\text{m}$ )、TPs内结构, 及TCs细胞内或相邻TCs间的Tps形成复杂的迷宫样连接结构, 结合c-kit免疫标记准确识别TCs。

## 2 EM在疑难心脏疾病诊断中的应用

病理诊断的正确性以及病因的判断和提示, 直接关系到临床医师合理治疗方案的制定和疗效评价, 更关系到诊疗水平的提高。心血管疾病与其他系统疾病最大的区别在于肿瘤发生率很低, 而与正常心脏组织学区分度较小的原发性心

肌病、继发性心脏疾病、系统性疾病累及心脏等病种类众多、病因复杂。在对心血管疾病病理诊断时,不能仅凭光镜组织学和经验,还应充分了解临床病史、相关检查结果及有关资料,从多方面考虑,部分病例需要用到科研中的技术和方法学辅助诊断。在心血管疾病病理诊断中,EM的应用较免疫组织化学、流式细胞术及分子诊断技术更为重要,特别是贮积性疾病的诊断。

## 2.1 贮积性疾病

糖原分支酶缺乏症,临床表型复杂且不具有特异性,诊断困难,心脏大体及组织学表现与扩张型心肌病难以区别。使用TEM进行超微结构检查是一个有价值手段,通过发现结构异常的丝状糖原积累,可证实Andersen病的诊断<sup>[10]</sup>。PNPLA2突变引起中性脂质贮积性疾病与肌病(neutral lipid storage disease with myopathy, NLSDM),患者中约44%并发心肌病,超微结构可见心肌细胞内富含包含中性脂质的空泡<sup>[11]</sup>。Fabry病由于溶酶体 $\alpha$ 半乳糖苷酶的 $\beta$ 同工酶缺乏所致,TEM下可见胞质内丰富的类脂包涵体,外有单层膜结构包绕,内含均质高电子密度或板层体结构<sup>[12]</sup>。Danon病是一种罕见的溶酶体疾病,由于LAMP-2基因异常所致,特点是肥厚性心肌病、骨骼肌病、精神发育迟滞和视网膜病变,TEM可见细胞内溶酶体贮积<sup>[13]</sup>。淀粉样变性由于淀粉样蛋白在皮肤,黏膜或内脏器官的细胞外沉积引起,TEM见直径8~10 nm的淀粉样物质沿肌细胞膜杂乱沉积,位于细胞外、扩张的T管或胞膜内陷的间质中和血管壁内<sup>[14]</sup>。

## 2.2 遗传病

单纯表皮大疱松解(epidermolysis bullosa simplex, EBS)是以皮肤表皮与真皮分离为表现的一组遗传性疾病,心脏症状常表现为扩张型心肌病,TEM可见细胞连接处的闰盘结构异常,发育不全的半桥粒,以辅助诊断<sup>[15]</sup>。肌纤维肌病(myofibrillar myopathy, MFM)由于细胞骨架蛋白中间丝Desmin突变引起,TEM观察到肌原纤维自Z线上脱落,形成异常蛋白聚集在胞质内<sup>[15]</sup>。由于核纤层蛋白基因突变引起的扩张型心肌病,TEM可见畸形怪状的细胞核<sup>[16]</sup>。

## 2.3 病毒性心肌炎

目前心肌炎的诊断主要依赖光镜,病毒的鉴定主要依靠PCR和测序。然而在病毒性心肌炎诊断过程中,由于分子病毒学技术的不成熟及病毒

数据库有限等原因,仅凭分子技术易造成漏诊,TEM仍然是病原学诊断中重要的辅助诊断工具。传统的病毒形态学分类依据为病毒的大小、螺旋与核衣壳的比例、形态结构、衣壳的对称性、壳微粒数、排列方式、是否芽生成熟、及其复制组装方式等<sup>[17-18]</sup>,特异性较低,免疫电镜技术可以提高病毒快速诊断的敏感性和特异性。另外,通过EM技术对研究某些病毒感染的发病机理,对心肌损伤机制的研究也很有帮助<sup>[19]</sup>。

## 2.4 心肌病

心肌病病因迄今不清,部分心肌病可以使用遗传基因突变解释,然而多数病人的病因仍需更多的研究。然而不同心肌病超微结构特点不同,使用TEM可以观察到由于肌节基因突变导致肥厚型心肌病、限制型心肌病<sup>[20]</sup>中存在肌原纤维的排列紊乱,在桥粒蛋白突变的(arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, ARVC)中发现闰盘间隙增宽,桥粒结构异常<sup>[21]</sup>。TEM的形态学研究配合生物遗传学分析,可以对病因学做出更深入的解释。使用患者自身iPSC进行疾病建模<sup>[22]</sup>,之后使用TEM观察细胞超微结构,是揭示病因学的方法之一。如使用具有相关致病性突变的ARVC患者的真皮成纤维细胞,重组生成iPSCs后再诱导分化为心肌细胞(ARVC-hiPSC-CMs),使用TEM观察发现ARVC-hiPSC-CMs缺乏桥粒结构,胞浆中出现脂滴等ARVC心肌细胞的特征性表现<sup>[23-24]</sup>。

## 3 EM在心脏疾病治疗研究中的应用

### 3.1 冠心病干细胞治疗

冠心病是发达国家的主要心血管病,我国人群冠心病的发病率和病死率呈明显上升趋势<sup>[25]</sup>。干细胞治疗是心肌再生及心肌组织工程的重要研究方向。种子细胞的分离、培养及定向分化是干细胞治疗的技术关键<sup>[26]</sup>,EM技术是鉴定心肌细胞分化的重要手段。扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)不仅可判断、鉴定单层心肌细胞的形态,还可观测心肌细胞在支架纤维上排布的结构图;TEM可直观观察诱导生长形成的心肌细胞团,通过肌原纤维、肌节、Z线、线粒体排布、T管系统形成、闰盘等心肌特征,以鉴定是否诱导成功<sup>[27]</sup>。

### 3.2 治疗方法改进对心肌细胞的影响

当使用新药或采用新的手术方法进行治疗

时, 通过TEM观察心肌细胞超微结构改变, 为评估心肌损伤或治疗的保护作用提供依据。如白藜芦醇减轻心肌缺血/再灌注损伤过程中的炎症反应<sup>[28]</sup>, 人参皂苷Rg1在高脂饮食诱导的糖尿病大鼠模型中对心肌细胞具有保护作用<sup>[29]</sup>, 在对心脏二尖瓣瓣膜成形术进行改良后, 通过TEM对心肌超微结构观察发现新的手术方式具有更好的心肌保护作用<sup>[30]</sup>。

### 3.3 对纳米级材料的观察

新型纳米材料应用于心脏疾病治疗中, 以及使用外泌体进行疾病治疗时, TEM在鉴定、观察及评价中有独特的优势。工程纳米材料虽然具有优良的理化性质, 但若用于人体, 仍需对其心脏毒性进行体内、外实验评估<sup>[31]</sup>, EM不仅可以观察工程材料结构、表面被覆的组织成份, 还可评价受体组织细胞的改变, 是重要的研究方法。

外泌体是细胞释放进入血液的纳米级囊泡, 直径30~100 nm, 内含丰富脂质、蛋白质、核酸, 广泛作用于全身各个器官传输信号。自2009年Lai等首次证实缺血再灌注损伤中注入间充质干细胞源的外泌体促进心肌细胞存活, 减少梗死面积后, 外泌体这一治疗新策略逐渐为研究者青睐, 通过TEM观察从血液中分离得到的Exosomes的形态特点、分析其内容物, 为研究它的功能提供帮助<sup>[32]</sup>。

## 4 结语

随着科学技术的不断发展, EM样品制备技术也在快速发展。在常规技术基础上, 出现了电镜核酸原位杂交技术、冷冻电镜技术、扫描隧道显微镜、蚀刻复型技术、管道铸型技术等新型电镜技术。电子显微学逐步发展成一门学科, 延伸出电子晶体学、单颗粒三维重构和电子断层成像三个技术方向。使用单颗粒三维重构的方法, 已可获得接近原子的分辨率结构<sup>[33]</sup>。新型电镜技术逐渐开始在蛋白质结构分析、离子通道结构和功能、免疫反应、光合作用、核糖体生物起源、RNA代谢和病毒结构等研究中应用。虽然科研中的应用逐渐增多, 然而EM在临床诊治疾病中应用仍具有相当大的局限性, 主要原因为EM不是临床常规技术手段, 对观察到的结构改变的判断主观性强, 目前没有行业内统一的EM疾病诊断标准。然而在疑难心脏疾病, 特别是心脏贮积性疾病中, EM能够提供重要诊断信息, 应重点应用。

## 参考文献

1. Ahuja P, Perriard E, Perriard JC, et al. Sequential myofibrillar breakdown accompanies mitotic division of mammalian cardiomyocytes[J]. *J Cell Sci*, 2004, 117(Pt 15): 3295-3306.
2. Nishii K, Morimoto S, Minakami R, et al. Targeted disruption of the cardiac troponin T gene causes sarcomere disassembly and defects in heartbeat within the early mouse embryo[J]. *Dev Biol*, 2008, 322(1): 65-73.
3. Liu H, Qin W, Wang Z, et al. Disassembly of myofibrils and potential imbalanced forces on Z-discs in cultured adult cardiomyocytes[J]. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 2016, 73(5): 246-257.
4. Zhou Y, Wang L, Vaseghi HR, et al. Bmi1 is a key epigenetic barrier to direct cardiac reprogramming[J]. *Cell Stem Cell*, 2016, 18(3): 382-395.
5. Böning A, Rohrbach S, Kohlhepp L, et al. Differences in ischemic damage between young and old hearts—Effects of blood cardioplegia[J]. *Exp Gerontol*, 2015, 67: 3-8.
6. Cao J, Xie H, Sun Y, et al. Sevoflurane post-conditioning reduces rat myocardial ischemia reperfusion injury through an increase in NOS and a decrease in phosphorylated NHE1 levels[J]. *Int J Mol Med*, 2015, 36(6): 1529-1537.
7. Yang X, Mudgett J, Bou-About G, et al. Physiological expression of AMPK $\gamma$ 2RG mutation causes Wolff-Parkinson-White syndrome and induces kidney injury in mice[J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(45): 23428-23439.
8. Wang B, Zhong S, Zheng F, et al. N-n-butyl haloperidol iodide protects cardiomyocytes against hypoxia/reoxygenation injury by inhibiting autophagy[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(28): 24709-24721.
9. Richter M, Kostin S. The failing human heart is characterized by decreased numbers of telocytes as result of apoptosis and altered extracellular matrix composition[J]. *J Cell Mol Med*, 2015, 19(11): 2597-2606.
10. Kakkar A, Sharma MC, Nambirajan A, et al. Glycogen storage disorder due to glycogen branching enzyme (GBE) deficiency: a diagnostic dilemma[J]. *Ultrastruct Pathol*, 2015, 39(4): 293-297.
11. Kaneko K, Kuroda H, Izumi R, et al. A novel mutation in PNPLA2 causes neutral lipid storage disease with myopathy and triglyceride deposit cardiomyopathy: a case report and literature review[J]. *Neuromuscul Disord*, 2014, 24(7): 634-641.
12. Gambarin FI, Disabella E, Narula J, et al. When should cardiologists suspect Anderson-Fabry disease?[J]. *Am J Cardiol*, 2010, 106(10): 1492-1499.
13. Alroy J, Pfannl R, Slavov D, et al. Electron microscopic findings in skin biopsies from patients with Danon disease[J]. *Ultrastruct Pathol*, 2010, 34(6): 333-336.

14. Faria TQ, Almeida ZL, Cruz PF, et al. A look into amyloid formation by transthyretin: aggregation pathway and a novel kinetic model[J]. *Phys Chem Chem Phys*, 2015, 17(11): 7255-7263.
15. Gostyńska KB, Nijenhuis M, Lemmink H, et al. Mutation in exon 1a of PLEC, leading to disruption of plectin isoform 1a, causes autosomal-recessive skin-only epidermolysis bullosa simplex[J]. *Hum Mol Genet*, 2015, 24(11): 3155-3162.
16. Selcen D, Engel AG. Mutations in ZASP define a novel form of muscular dystrophy in humans[J]. *Ann Neurol*, 2005, 57(2): 269-276.
17. Fidziańska A, Walczak E, Glinka Z, et al. Nuclear architecture remodelling in cardiomyocytes with lamin A deficiency[J]. *Folia Neuropathol*, 2008, 46(3): 196-203.
18. Koepsell SA, Anderson DR, Radio SJ. Parvovirus B19 is a bystander in adult myocarditis[J]. *Cardiovasc Pathol*, 2012, 21(6): 476-481.
19. Guan J, Sun X, Liang Y, et al. Atorvastatin attenuates Coxsackie virus B3m-induced viral myocarditis in mice[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2010, 56(5): 540-547.
20. 赵红, 孙洋, 宋来凤, 等. 原发性限制型心肌病受体心脏病理形态学及超微结构研究[J]. *中华心血管病杂志*, 2014, 42(10): 856-859. ZHAO Hong, SUN Yang, SONG Laifeng, et al. Myocardial changes in heart transplantation recipients with primary restrictive cardiomyopathy[J]. *Chinese Journal of Cardiology*, 2014, 42(10): 856-859.
21. Li D, Liu Y, Maruyama M, et al. Restrictive loss of plakoglobin in cardiomyocytes leads to arrhythmogenic cardiomyopathy[J]. *Hum Mol Genet*, 2011, 20(23): 4582-4596.
22. Chang D, Wen Z, Wang Y, et al. Ultrastructural features of ischemic tissue following application of a bio-membrane based progenitor cardiomyocyte patch for myocardial infarction repair[J]. *PLoS One*, 2014, 9(10): e107296.
23. Caspi O, Huber I, Gepstein A, et al. Modeling of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with human induced pluripotent stem cells[J]. *Circ Cardiovasc Genet*, 2013, 6(6): 557-568.
24. Ma D, Wei H, Lu J, et al. Generation of patient-specific induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes as a cellular model of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy[J]. *Eur Heart J*, 2013, 34(15): 1122-1133.
25. Jugdutt BI, Dhalla NS. *Cardiac remodeling: molecular mechanisms*[M]. New York: Springer Science, 2013.
26. Terzic A, Behfar A. Regenerative heart failure therapy headed for optimization[J]. *Eur Heart J*, 2014, 35(19): 1231-1234.
27. Khan M, Xu Y, Hua S, et al. Evaluation of changes in morphology and function of human induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes (HiPSC-CMs) cultured on an aligned-nanofiber cardiac patch[J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0126338.
28. Dong W, Yang R, Yang J, et al. Resveratrol pretreatment protects rat hearts from ischemia/reperfusion injury partly via a NALP3 inflammasome pathway[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(8): 8731-8741.
29. Yu HT, Zhen J, Pang B, et al. Ginsenoside Rg1 ameliorates oxidative stress and myocardial apoptosis in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2015, 16(5): 344-354.
30. Ahmed MI, Guichard JL, Rajasekaran NS, et al. Disruption of desmin-mitochondrial architecture in patients with regurgitant mitral valves and preserved ventricular function[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2016, 152(4): 1059-1070.
31. Tong H, McGee JK, Saxena RK, et al. Influence of acid functionalization on the cardiopulmonary toxicity of carbon nanotubes and carbon black particles in mice[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2009, 239(3): 224-232.
32. Vicencio JM, Yellon DM, Sivaraman V, et al. Plasma exosomes protect the myocardium from ischemia-reperfusion injury[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2015, 65(15): 1525-1536.
33. Marton J, Albert D, Wiltshire SA et al. Cyclosporine a treatment inhibits abcc6-dependent cardiac necrosis and calcification following coxsackievirus B3 infection in mice[J]. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0138222.

本文引用: 孙洋, 赵红. 电镜在心脏疾病中的研究及诊断意义[J]. *临床与病理杂志*, 2017, 37(7): 1524-1528. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.07.035

**Cite this article as:** SUN Yang, ZHAO Hong. Research and diagnostic value of electron microscope in heart diseases[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2017, 37(7): 1524-1528. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.07.035