

RT - 3DSTI 技术所有向量都是在全容积状态下跟踪的,评估的是心肌在三维空间内的实时运动,不存在心肌斑点“跨平面失追踪”,除了二维斑点追踪成像(2D - STI)可检测的参数外,还可定量心内膜面积应变、心室整体三维应变及其同步性指标等^[8]。研究证实,3D - STI 较 2D - STI 评价心肌运动更加准确、省时和简便^[9]。Tatsumi 等^[10]应用三维斑点追踪面积应变对不同 QRS 波时限心力衰竭患者左心室机械不同步的研究结果与本研究结果相似,即均证实 QRS 波时限正常的心力衰竭患者存在着左心室壁收缩不同步,但其程度要轻于 QRS 波时限增宽的心力衰竭患者。QRS 波时限增宽的 CHF 患者的左心室收缩不同步指标均较 QRS 波时限正常组增大,可能是前者的心肌自身病变及电传导障碍较严重所致。至于在所有左心室收缩不同步指标中,仅 QRS 波时限正常 CHF 组与对照组的 Tsks - diff 测值无统计学差异,可能与心肌纵向运动不同步指标的敏感度较径向及圆周方向低有关,也可能与左心室心尖部纵向指标的重复性欠佳以及本研究的样本量较小等影响有关,有待于进一步观察。

本研究结果表明,QRS 波时限并不能完全反映心肌收缩的同步性,QRS 波时限正常的慢性心力衰竭患者同样可以存在心肌收缩不同步,提示即使 QRS 波时限正常的 CHF 患者也可能从 CRT 中收益。本研究也存在一些局限性:目前所用的三维斑点追踪技术时间分辨率较低,可能遗漏对心肌大幅度快速运动的追踪;3D - STI 图像采集均是由数个心动周期的三维数据叠加而成,因此对心肌运动同步性分析可能产生一些误差;本研究未能对心力衰竭伴不同 QRS 波

时限的患者 CRT 术后的疗效进行评价。

参考文献

- 陈治松,徐文俊. 窄 QRS 波心力衰竭的心脏再同步化治疗[J]. 国际心血管病杂志,2011,38(4):227 - 230
- 黄君红,谢明星,王新房,等. 二维斑点追踪成像评价慢性心力衰竭患者左心室收缩不同步及其与收缩功能的关系[J]. 中华超声影像学杂志,2009,18(5):369 - 373
- Yu CM, Bax JJ, Monaghan M, et al. Echocardiographic evaluation of cardiac dyssynchrony for predicting a favourable response to cardiac resynchronization therapy[J]. Heart,2004,90(6):17 - 22
- 黄君红,谢明星,王新房,等. 超声二维斑点追踪显像技术评价慢性心力衰竭患者左心室运动同步性的初步临床研究[J]. 中华超声影像学杂志,2009,18(1):4 - 7
- 蔡彬妮,黄卫斌,陈江华. 晚期扩张型心肌病患者 QRS 波时限与心脏机械同步性的相关性研究[J]. 中国心脏起搏与心电生理杂志,2008,22(5):414 - 416
- Santos JF, ParreiraL, Madeira J, et al. Predictors of response to cardiac resynchronization therapy – importance of left ventricular dyssynchrony [J]. Rev Port Cardiol,2006,25(6):569 - 581
- Auricchio A, Yu CM. Beyond the measurement of ORS complex toward mechanical dyssynchrony: cardiac resynchronization therapy in heart failure patients with a normal QRS duration [J]. Heart,2004,90(5):479 - 481
- Crosby J, Amundsen BH, Hergum T, et al. 3 - D speckle tracking for assessment of regional left ventricular function [J]. Ultrasound Med Biol, 2009, 35(3):458 - 471
- 康瑜,崔洁,陈海燕,等. 三维斑点追踪显像分析左心室收缩功能及同步性的初步研究[J]. 中华超声影像学杂志,2011,20(12):1029 - 1032
- Tatsumi K, Tanaka H, Matsumoto K, et al. Mechanical left ventricular dyssynchrony in Heart failure patients with narrow QRS duration as assessed by three - dimensional speckle area tracking strain[J]. Am J Cardiol 2011,108(6):867 - 872 (收稿日期:2014 - 03 - 11)

(修回日期:2014 - 03 - 18)

阴囊热应激引起小鼠生殖系统 HSP90 α 表达变化和抗氧化能力改变

韩俊岭 孔晓君 李建远

摘要 目的 探讨阴囊急性热应激后小鼠抗氧化酶活性的变化和生殖系统热休克蛋白 90 α (HSP90 α) 的表达变化及规律。**方法** 将 56 只 8 周龄雄性小鼠随机分为 7 组:对照组和 6 个热应激处理组(热应激后再置于室温环境中,时间点为 0、1、4、

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31071262)

作者单位:750004 银川,宁夏医科大学检验学院(韩俊岭、孔晓君);264000 烟台,青岛大学附属烟台毓璜顶医院中心实验室(李建远)(韩俊岭和孔晓君为共同第一作者)

通讯作者:李建远,电子信箱:sdcj231@163.com

12、24、48h)。分别测定各组小鼠的相应脏器指数,检测精子相关指标、睾丸和附睾中 HSP90 α 的表达、血清中抗氧化酶的活性。结果 阴囊急性热应激处理后,小鼠睾丸和肝脏指数在 48h 内无显著变化,而附睾指数在 0、1h 时显著低于对照组;精子活力 0h 组显著低于对照组,精子畸形率 12、24h 时间点明显高于对照组,其他试验组与对照组相比差异无统计学意义;0、1、4、12h 组睾丸中 HSP90 α 的表达均显著高于对照组($P < 0.05$),0、1、4、12、24h 组附睾中 HSP90 α 的表达明显高于对照组($P < 0.05$),其他试验组与对照组无统计学差异($P > 0.05$);0、4h 血清中超氧化物歧化酶(SOD)活性显著升高($P < 0.05$),24、48h 组和对照组相比无统计学差异($P > 0.05$)。结论 急性阴囊热应激可引起小鼠血清中 SOD 活性升高和生殖系统损伤及睾丸和附睾中 HSP90 α 的高表达。HSP90 α 的表达随时间变化且在热应激后 48h 基本恢复正常,提示其可能保护机体受到高热损伤。

关键词 热休克蛋白 90 α 热应激 生殖 小鼠

[中图分类号] R697.24

[文献标识码] A

Scrotal Heat Stress Causes an Alteration of Anti - oxidative Ability and Induction of HSP90 α Expression in Heat - stressed Mice. Han Junling, Kong Xiaojun, Li Jianyuan. School of Medical Examination, Ningxia Medical University, Ningxia 750004, China

Abstract Objective To investigate the changes of anti - oxidative ability and Hsp90 α gene expression in reproductive system of mice with acute heat stress in scrotal. **Methods** Healthy 56 male mice, 8 weeks old, were randomly divided into 7 groups: control group and six heat stress treatment group (in room temperature at 0, 1, 4, 12, 24 and 48h after heat stress). Organ index, antioxidant enzyme activities, and the expression HSP90 α gene in testicle and epididymis were determined. **Results** Mouse testis and liver index had no significant change at 48h, but at 0h and 1h the epididymis index was significantly higher than that in the control group. Sperm deformity rate was significantly higher than that in the control group at 12h and 24h. Sperm motility was significantly lower than that in the control group at 0h and there was no difference compared with the control group at other times($P > 0.05$). Gene expression of HSP90 α in testicle was significantly higher than that in the control group at 0, 1, 4 and 12h. Gene expression of HSP90 α in epididymis at 0, 1, 4, 12 and 24h was significantly higher than it in the control group ($P < 0.05$). At 0h and 4h, SOD level in serum increased significantly after scrotal treated with heat stress ($P < 0.05$), but at 24h or 48h, there was no significant difference compared with the control group ($P > 0.05$).

Conclusion Acute heat stress in scrotal resulted in the increased SOD level in serum and the damage of reproductive system, and the increased expression of HSP90 α gene in testicle and epididymis. The increased expression of HSP90 α gene was almost restored to the normal level at 48h after heat stress, suggesting it may protect cells from heat damage.

Key words Heat shock protein90 α ; Heat stress; Reproduction; Mice

热应激反应是指生物在高温环境下发生的应激反应。热应激能引起机体产生活性氧,导致氧化损伤,改变胞内的信号传递,该过程中生物体能够选择性合成一组多肽:热休克蛋白(HSPs)^[1]。根据分子质量和等电点分为 HSP90、HSP70、HSP60、HSP40 等家族^[2]。其中 HSP90 是 HSPs 中高度保守的胞质蛋白,也是重要的成员,其中又以亚型 HSP90 α 研究最为广泛,且 HSP90 α 主要存在于大脑和睾丸中^[3]。因此,了解阴囊热应激后机体生殖系统中 HSP90 α 的表达及机体抗氧化能力的改变具有重要意义。本实验通过建立阴囊热应激模型,探讨热应激后小鼠生殖系统 HSP90 的表达规律及小鼠抗氧化能力的改变。

材料与方法

1. 实验动物及试剂:实验所用雄性小鼠 40 只,8 周龄,体重 40~45g,SPF 级,由滨州医学院动物实验中心提供。SOD、MDA 检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所。TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒购自碧云天公司。实验中所用其他化学试剂均为分析纯。分光光度计为英国柏基 Biowave II 紫外可见分光光度计(Biochrom WPA Biowave II),图像分析采用德国

共聚焦激光扫描显微镜(LSM - 510 META)分析仪,全自动精子分析仪采用美国汉密尔顿(IVOS - CASA)系统。

2. 实验方法:(1)实验设计:将 56 只小鼠随机分为正常对照组和热应激组。各组热应激后再按 0、1、4、12、24、48h 随机分成 7 个亚组,每组 10 只小鼠。试验组小鼠在饲养 7 天后进行热应激处理。热应激模型参照 Cai 等^[4]的研究方法:热应激组小鼠予 5% 水合氯醛(0.7ml/100g)麻醉后,将小鼠身体的下 1/3 部分(包括阴囊、后腿、尾巴)浸于 43℃ 恒温水中 30min,擦干后回笼。对照组浸于 22℃ 恒温水中 30min。各亚组小鼠分别于热应激后 0、1、4、12、24、48h 采用摘除眼球法取血,并分离血清检测血清中的 SOD。待血液流尽后予颈椎脱臼处死,取左侧睾丸、附睾及肝脏称重,用于计算脏器系数,之后置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 24h,常规石蜡包埋、切片(5μm),用于组织学研究。右侧睾丸取一部分组织提取 RNA,用作 PCR 检测。右侧附睾用于制备精子悬液,计算精子活力、存活率及畸形率。(2)检测项目:①睾丸结构变化检测,通过荧光 TUNEL 实验检测热应激后睾丸的细胞凋亡情况;②睾丸、附睾质量指数,睾丸、附睾质量系数公式为:质量指数 = 器官质量(mg)/小鼠质量(g);③精子活力、活率、畸形率检测,取出右侧附睾,置于适量 37℃ 的 PBS 中,用眼科剪剪碎,制成

精子悬液。滴 1 滴悬液于干净的玻片上,用全自动精子分析仪检测相关指标。评估精子的活力等级,将其分为 3 级(快速前向运动;非前向运动精子;不运动精子)。累计检测 400 个精子,计算精子活力。精子活力(%)=(前向运动+非前向运动)/精子总数×100%。取上述悬液滴加于玻片上,加等量的 1% 的伊红染液混匀,加盖玻片静置 30s,用相差显微镜计数 400 个精子,计算精子存活率。将悬液涂片,干燥后用甲醇固定 5min,用 HE 染色。计数 400 个精子并检查精子形态,计数结构完整精子;④睾丸、附睾中 HSP90 α 基因的 RT-PCR 检测,提取睾丸和附睾中 RNA,反转录后对 HSP90 α 基因和 β -actin 进行 PCR 扩增。取 PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳,采用凝胶成像系统拍照并进行光密度分析;⑤清 SOD、MDA 检测,按照

试剂盒操作说明测定对照组和应激后 0、4、24、48h 组小鼠血液中 SOD、MDA 含量,分析小鼠抗氧化能力的改变。

3. 统计学方法:使用 SPSS 13.0 进行统计学分析,采用单向方差分析,计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

1. 热应激对睾丸细胞的影响:由结果可知,热应激后会造成小鼠睾丸细胞的凋亡,且主要集中在精原细胞和初级精母细胞,同时睾丸中其他细胞的凋亡也增加,并且细胞的凋亡程度在 12h 时最为严重,48h 时基本恢复正常(图 1)。

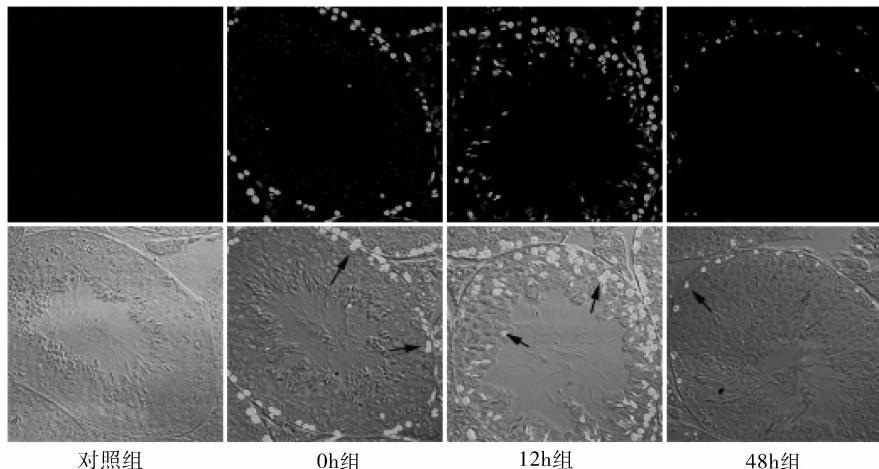


图 1 热应激后睾丸细胞凋亡的情况($\times 400$)

2. 阴囊热应激对小鼠脏器指数的影响:各组小鼠的睾丸、附睾的重量及质量指数结果见表 1。随着应激时间的延长,其中各个时间点睾丸指数、肝脏指数与对照组相比无统计学差异($P > 0.05$)。0、1h 组的附睾指数与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。

时间的延长,精子畸形率在 12h 和 24h 时最高,明显高于对照组($P < 0.05$),到 48h 时基本恢复正常,结果见表 2。

表 2 阴囊热应激对精子活力、存活率及形态的影响($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	n	精子活力	存活率	畸形率
对照组	6	84.13 ± 3.12	86.82 ± 5.86	8.04 ± 0.53
0h 组	6	70.41 ± 4.09 *	80.11 ± 5.56	9.21 ± 0.75
1h 组	6	74.07 ± 4.01	82.76 ± 3.29	14.33 ± 1.03 **
4h 组	6	75.71 ± 3.68	84.17 ± 3.75	12.26 ± 0.14 *
24h 组	6	77.43 ± 2.47	83.98 ± 4.72	9.41 ± 0.21

与对照组比较,* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3. 阴囊热应激对精子活力、存活率及形态的影响:阴囊热应激后,小鼠精子活力、存活率及正常精子率都有不同程度的下降,其中 0h 组精子活力明显低于对照组($P < 0.05$),而存活率 48h 内下降趋势不显著,与对照组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。随着

4. 急性热应激对小鼠睾丸、附睾中 HSP90 α 表达的影响:在正常情况下,睾丸、附睾组织中 HSP90 α 的表达量较低。急性热应激处理后,睾丸中 HSP90 α 的表达水平开始升高,在 4h 达到高峰(图 2A)。0、1、4、12h 组均显著高于对照组($P < 0.05$),随着时间的延长 HSP90 α 表达量逐渐恢复,24、48h 组与对照组差

差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 2B)。HSP90 α 在附睾中的表达在 0、1、4、12、24h 组均显著高于对照组 ($P < 0.05$), 48h 组表达水平仍高于正常水平, 但与对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 3)。

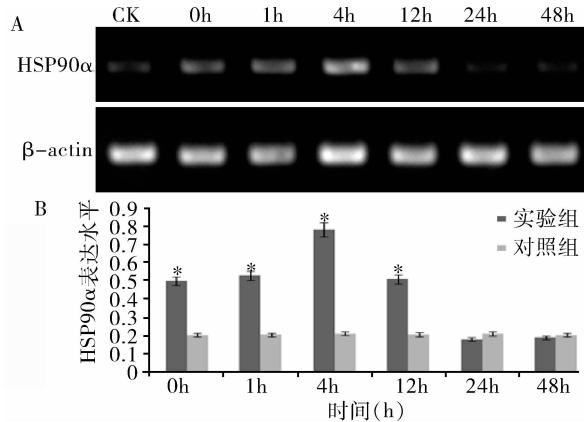


图 2 热应激后 HSP90 α 在睾丸中的表达

A. HSP90 α 在睾丸中表达的电泳图谱, CK. 对照组; B. HSP90 α 在睾丸中表达丰度; 与对照组比较, * $P < 0.05$

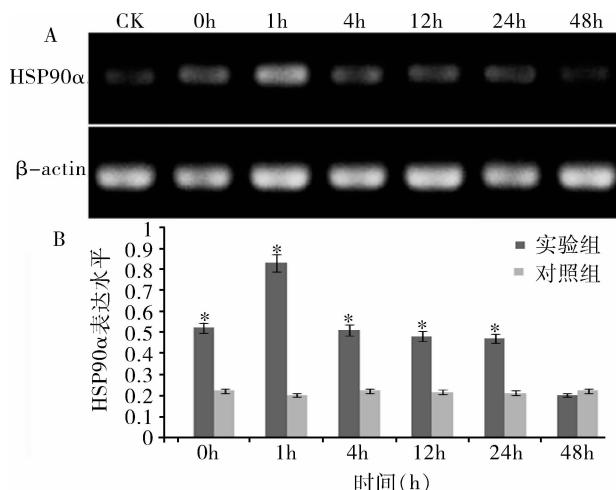


图 3 热应激后 HSP90 α 在附睾中的表达

A. HSP90 α 在附睾中表达的电泳图谱, CK. 对照组; B. HSP90 α 在附睾中的表达丰度; 与对照组比较, * $P < 0.05$

5. 阴囊热应激对小鼠血清抗氧化能力的影响: 热应激处理后, 小鼠血清中 SOD 水平明显升高, 其中 0、4h 组显著高于对照组 ($P < 0.05$), 而 24、48h 组基本恢复正常。血清中 MDA 含量在热应激处理后 4h 显著增加, 明显高于对照组 ($P < 0.05$), 24h 组有所下降, 与对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 表 3)。

讨 论

哺乳动物的睾丸和附睾的温度比身体核心温度低, 精子发生过程在睾丸内进行, 只有睾丸保持较低的温度才能保证生精小管内精子的正常产生^[5]。哺

表 3 阴囊热应激对小鼠血清抗氧化能力的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	SOD (U/ml)	MDA (nmol/ml)
对照组	10	199.13 ± 23.62	8.02 ± 0.87
0h 组	10	253.41 ± 34.09 **	8.41 ± 0.53
4h 组	10	219.47 ± 27.01 *	9.72 ± 0.49 *
24h 组	10	205.73 ± 23.18	7.98 ± 0.45
48h 组	10	197.43 ± 21.47	8.08 ± 0.62

与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

乳类动物睾丸位于体外的阴囊内, 对温度的变化非常敏感, 并且阴囊对温度有特殊的调节能力, 可以使睾丸内保持适宜温度, 有利于精子的发生。如果阴囊温度升高至一定程度, 睾丸温度会随之升高而超出最适温度范围, 致使睾丸组织正常的结构发生改变, 引起生精细胞凋亡, 最终导致睾丸的生精功能受到损害, 精子畸形率升高、活力下降, 而且性腺激素分泌量及成分发生改变, 严重时可能导致雄性不育^[6]。当阴囊温度升高, 超过其调节能力时, 也会对附睾内精子的成熟产生影响, 导致精子相关指标下降。热休克蛋白普遍存在于原核和真核生物体内, 高温、寒冷、低氧、创伤等均可引起热休克蛋白的高表达, 其中 HSP90 可通过维持信号分子蛋白的稳定性, 参与细胞内多条信号转导通路的生理过程, 从而协助机体对抗不良环境^[7]。

本实验结果显示, 在阴囊热应激后, 睾丸细胞出现了明显的凋亡现象, 该结果和相关的研究结果相似^[8]。一般认为认为凋亡途径包括: 内源性途径(也称线粒体途径)和外源性途径(也称死亡受体途径)。Absalan 等^[6]研究发现, 睾丸温度升高能够引起多种细胞凋亡相关因子的改变, 如 Bax、Bel-2、P53、survivin-140 等, 故推断阴囊热应激时通过两种凋亡途径引起睾丸细胞损伤。

热应激后不同时间点的试验组小鼠睾丸指数均有所下降, 但与对照组相比, 差异无统计学意义, 但相对于睾丸指数的变化不显著, 附睾指数则显著增加, 该结果和曹文等^[9]的研究结果一致。睾丸、附睾质量指数变化的趋势不同, 该结果可能与他们的组织结构、生理功能不同相关, 具体原因和机制需要进一步研究。此外阴囊热应激导致小鼠精子的活力明显下降、畸形率显著升高, 引人注意的是 12h 组精子的畸形率最高, 其原因和机制有待进一步分析和研究。李德军等^[10]的研究进一步表明, 热应激能够降低小鼠的精子数, 并损伤小鼠的精子。以上结果说明 43℃ 的阴囊应激条件已经超出了其对温度的调节能力, 并

对生殖系统造成损伤。

HSP90 α 是胞内蛋白,与热应急和氧化损伤密切相关,由于其作用底物与多种细胞信号转导通路密切相关,且可以作为分子伴侣发挥作用,其生理作用越发引起人们的关注,但在生殖系统中的研究较少^[11]。本实验研究了热应激前、后 HSP90 α 在睾丸、附睾中的表达情况,PCR 结果显示热应激前 HSP90 α 在睾丸中有表达,但相对较弱。热应激后表达量明显增强,且有时间性。提示在阴囊热应激过程中,在不同的时间点 HSP90 α 发挥着对生殖系统的保护作用。本实验发现阴囊热应激时,在睾丸和附睾中 HSP90 α 高表达的同时血清中 SOD 明显升高,MDA 也有所升高,提示机体整体的抗氧化能提高,具体机制需要做进一步研究。

综上所述,阴囊热应激对雄性小鼠的生殖系统造成了损伤。PCR 结果表明 HSP90 α 可能参与睾丸中精子的发生与附睾内精子的成熟,然而目前为止,对于 HSP90 α 在雄性生殖系统中的作用的认识非常有限。这些方面需要人们做进一步的研究,以便更深入地了解雄性生殖和雄性不育。

参考文献

- Zhang HJ, Xu L, Drake VJ, et al. Heat - induced liver injury in old rats is associated with exaggerated oxidative stress and altered transcription factor activation [J]. FASEB Journal, 2003, 17: 2293 – 2295

- Vos MJ, Hageman J, Carra S, et al. Structural and functional diversities between members of the human HSPB, HSPH, HSPA, and DNAJ chaperone families [J]. Biochemistry, 2008, 47(27):7001 – 7011
- 戎成婷,韩俊岭,杜振宁. HSP90 $\beta\beta$ 在小鼠生殖系统中的表达及调控 [J]. 南方医科大学学报, 2013, 33(4):491 – 495
- Cai H, Ren Y, Li XX, et al. Scrotal heat stress causes a transient alteration in tight junctions and induction of TGF – beta expression [J]. Int J Androl, 2011, 34(4): 352 – 362
- Ivell R. Lifestyle impact and the biology of the human scrotum [J]. Reprod Biol Endocrinol, 2007, 5: 15 – 22
- Absalan F, Movahedin M, Mowla SJ. Germ cell apoptosis induced by experimental cryptorchidism is mediated by molecular pathways in mouse testis [J]. Andrologia, 2010, 42(1) : 5 – 12
- Chen JX, Meyrick B. Hypoxia increases Hsp90 binding to eNOS via PI₃K – Akt in porcine coronary artery endothelium [J]. Laboratory Investigation, 2004, 84(2) : 182 – 190
- Paul C, Teng S, Spears PT. A single, mild, transient scrotal heat stress causes hypoxia and oxidative stress in mouse testes, which induces germ cell death [J]. Biol Reprod, 2009, 80(5) : 913 – 919
- 曹文,黄攀,张磊,等. 急性热应激对性成熟雄性小鼠睾丸、附睾、输精管中热休克蛋白 70 表达的影响 [J]. 中华男科学杂志, 2009, 15(3):200 – 206
- 李德军,田文儒,刘运枫,等. 热应激对鼠精液质量的研究 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2010, 52: 101 – 102
- Jascut T, Brickner H, Salles – Passador I, et al. Regulation of p21 (WAF1/CIP1) stability by WISp39, a Hsp90 binding TPR protein [J]. Mol Cell, 2005, 17(2) : 237 – 249

(收稿日期:2014-03-12)

(修回日期:2014-03-16)

中国青年男性二尖瓣舒张早期血流峰值 参考值与地理环境的主成分分析

王子轩 董 婕 葛 森 韩 嘉 何进伟

摘要 目的 为制定标准化的中国青年男性二尖瓣舒张早期血流峰值(E 峰)参考值提供科学依据,分析青年男性 E 峰参考值与地理因素之间的关系。**方法** 收集中国各地青年男性 E 峰参考值,运用相关分析将青年男性 E 峰参考值与选取的 8 项地理因素指标进行研究,确定数据与地理因素存在相关关系,并进行主成分分析建立模型。最后,运用 ArcGIS 地统计分析对数据进行分布检测,用普通克里金法插值并输出地理分布图。**结果** 分析出中国健康青年男 E 峰参考值与海拔高度、年日照时数、年平均风速、表土参考容量、表土基本饱和度存在关系,并建立了主成分预测模型。**结论** 若已知中国某地的 8 项地理因素指标,运用主成分模型就可计算出该地二尖瓣舒张早期血流峰值流速参考值,中国青年男性 E 峰参考值的大小呈现出由东南沿海向西北内陆递减的分布规律。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(40971060)

作者单位:710119 西安,陕西师范大学旅游与环境学院健康地理研究所

通讯作者:葛森,研究员,博士生导师,电子信箱:grape610@163.com