文章编号:1000-5404(2006)07-0617-04

论著

微管解聚与心肌细胞缺氧性损害的实验研究

郑 霁[1],张西联[1],周军利[1],党永明[1],张家平[1],柳春雨[2],张东霞[1],宋华培[1],张 琼[1],黄跃生[1] (第三军医大学西南医院:[1]全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,[2]神经内科,重庆 400038)

提 要:目的 观察缺氧引起的心肌细胞微管解聚是否能导致细胞线粒体通透性转换孔开放,降低细胞活性,引起细胞缺氧性损害。**方法** 将原代培养的乳鼠心肌细胞随机分为对照(常氧)组(A组)、缺氧组(B组)、常氧+微管解聚剂组(C组)、缺氧+微管稳定剂组(D组)。检测各组0.5、1、3、6、12 h微管免疫荧光,了解微管结构变化,以免疫印迹(Western blot)法半定量分析聚合态微管蛋白变化,用酯化钙黄绿素和氯化钴共孵育的方法检测线粒体通透性转换孔开放,用MTT法测定细胞活性。**结果** B组和C组聚合态微管在缺氧0.5 h后即发生明显破坏,同时能观察到线粒体通透性转换孔开放和细胞活性下降,且随着缺氧时间的延长,以上现象愈发显著。而同一时相点D组聚合态微管被破坏程度、线粒体通透性转换孔开放情况和细胞活性下降均明显轻于B组。**结论** 缺氧可引起心肌细胞聚合态微管明显破坏,导致细胞线粒体通透性转换孔开放,进而影响细胞活性,引起细胞缺氧性损害。微管解聚剂能较好地模拟缺氧引起的微管破坏作用,导致细胞活性下降,而微管稳定剂能有效减轻缺氧引起的微管破坏,保护细胞活性,明显减轻心肌细胞的缺氧性损害。

关键词:心肌细胞;缺氧性损害;微管;免疫荧光;免疫印迹
中图法分类号:R322.11;R329.25;R364.4 **文献标识码**:A

Effects of microtubule disassembly on hypoxic injury of cultured cardiomyocytes

ZHENG Ji[1], ZHANG Xi-lian[1], ZHOU Jun-li[1], DANG Yong-ming[1], ZHANG Jia-ping[1], LIU Chun-yu[2], ZHANG Dong-xia[1], SONG Hua-pei[1], ZHANG Qiong[1], HUANG Yue-sheng[1] ([1]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, [2]Department of Neurology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate whether microtubule disassembly plays an important role in the pathogenesis of the opening of mitochondria permeability transition pore (MPTP) in hypoxic cardiomyocytes and the decrease of its activity, resulting in its hypoxic injury. **Methods** Neonatal rat cardiomyocytes in primary culture were randomized as normoxia group (A), hypoxic group (B), normoxia treated with microtubule destabilizing agent (Colchicine) group (C), hypoxia treated with microtubule stabilizing agent (Taxol) group (D). At 0.5, 1, 3, 6, 12 h after treatment, polymeric tubulin was detected by immunofluorescence and Western blotting, mitochondria permeability transition pore (MPTP) open by coloading with calcein AM and cobalt chloride, and the activity of cells by measuring the mitochondrial-dependent reduction of MTT to formazan. **Results** Early microtubule disassembly, MPTP open and activity decrease of cardiomyocytes in both groups B and C were observed at 0.5 h after treatment. These phenomena all became more and more significant with the prolongation of treatment. However, microtubule disassembly, MPTP open and activity decrease of cardiomyocytes of group D were significantly lower than those of group B. **Conclusion** Microtubule disassembly happened at 0.5 h after hypoxic treatment. Microtubule stabling agent Taxol and destabilizing agent Colchicine can regulate microtubule integrity efficiently. The microtubule damage plays an important role in the hypoxic injury of cardiomyocytes.

Key words: cardiomyocyte; hypoxic injury; microtubule; immunofluorescence; Western blotting

微管是真核细胞骨架的主要组成部分,微管结构参与胞内物质运输及有丝分裂的染色体分离,并对细胞的命运起决定性作用[1]。Vandroux等[2]的研究表明微管损伤是细胞缺氧性损害的早期特征。

线粒体是细胞缺氧性损害的核心细胞器[3],其膜上的通透性转换孔(mitochondria permeability transition pore, MPTP)直接参与启动细胞的坏死和凋亡。我们以往的研究发现,MPTP的开放引起线粒体通透性转换(mitochondria permeability transition, MPT),导致线粒体基质膨胀、外膜破裂,凋亡信号分子从内外膜间释

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(2005CB522601);国家自然科学基金资助重点项目(30430680);国家杰出青年科学基金资助项目(30125040)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China("973" Projects, 2005CB522601), the National Natural Science Foundation of China (30430680) and the National Science Fund for Young Distinguished Scholars(30125040)

作者简介:郑 霁(1982-),男,江西省九江市人,硕士研究生,主要从事烧伤后心脏损害方面的研究。电话:(023)68754148-8064, E-mail: Stephen_Zheng_2@hotmail.com
通讯作者:黄跃生,电话:(023)68754173,E-mail:yshuang@public.cta.cq.cn

收稿日期:2005-10-31;修回日期:2006-01-10

放,引起细胞的坏死和凋亡;MPTP 的开放导致线粒体的不可逆损伤是缺氧性心肌细胞损害的关键环节[4]。

细胞骨架除了对线粒体胞内定位及分布起一定作用外[5],还可能参与线粒体呼吸功能的调节过程。但微管结构稳定性下降是否能导致 MPTP 开放,从而引起心肌细胞缺氧性损害尚少见报道。本研究通过运用微管解聚剂秋水仙碱(Colchicine)和稳定剂紫杉醇(Taxol)模拟及干预缺氧状态微管结构稳定性变化,以期探讨心肌细胞缺氧状态下细胞微管结构稳定性变化与 MPTP 开放及细胞缺氧性损害的关系。

1 材料与方法

1.1 主要材料

Taxol(Sigma),Colchicine(Sigma),小鼠抗大鼠 β-tubulin 一抗(Santa Cruz),山羊抗小鼠荧光二抗(Santa Cruz),BCA 蛋白试剂盒(Pierce),PVDF 膜(Osmomes),碱性磷酸酶标记山羊抗小鼠二抗(Santa Cruz),碱性磷酸酶标记抗 GAPDH 抗体(上海康成),Calcein AM(Biotium),$CoCl_2$(Sigma),MTT(Sigma)。

1.2 乳鼠心肌细胞原代培养

采用 SD 大鼠 1~2 d 龄乳鼠(第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供),依照本实验室建立的方法[6],采用胰酶组织消化法分离培养心肌细胞。

1.3 缺氧模型的建立

缺氧培养依靠在密闭容器中充入预先配制好的混合气体进行。密闭容器作为缺氧培养装置。混合气体配方为:95% N_2,5% CO_2,1% O_2 由重庆朝阳气体有限公司配制。将混合气体以 10 L/min 流量充入约 5 L 的密闭容器,按照充 5 min 夹闭 5 min,再充 5 min 的办法,最后将进气口和出气口都夹闭,容器内的氧终浓度为 1%,形成缺氧环境。

1.4 实验分组及各组处理方式

将同一批次细胞以随机数字表法分为对照组(常氧组)、缺氧组、常氧 + 微管解聚剂组和缺氧 + 微管稳定剂组。缺氧模型如上述。常氧 + 解聚剂组组加入 8 μmol/L Colchicine 室温平衡 30 min。缺氧 + 稳定剂组加入 10 μmol/L Taxol 室温平衡 30 min 后和缺氧组一起开始缺氧处理。

1.5 微管免疫荧光检测

参照文献[2]的方法荧光染色聚合态 β-微管蛋白,荧光显微镜镜检。

1.6 聚合态微管蛋白的免疫印迹(Western blot)检测

提取心肌细胞聚合态微管,用 BCA 法测蛋白浓度。采用 5% 的积层胶和 10% 的分离胶,其长度分别为 1.5 cm 和 9 cm。每孔上样量为 30 μg 心肌细胞总蛋白,积层胶 60 V 电泳 30 min,分离胶 120 V 电泳 60 min。采用孔径为 0.45 μm 的 PVDF 膜,按照膜的大小 1.5 mA/cm^2 半干转膜法转膜 2 h。转膜结束后,5% 的脱脂奶粉封闭 1 h,1∶500 小鼠抗大鼠 β-tubulin 一抗 4 ℃ 孵育过夜,TBST 漂洗 15 min × 3 次,同时与 1∶5 000 HRP 标记的山羊抗小鼠二抗、1∶10 000 HRP 标记 GAPDH 抗体杂交 1 h,TBST 漂洗 15 min × 3 次后,常规胶片曝光、拍照。用 Quantity one Version 4.4 软件分析,测定各条带的积分光密度(IOD)。

1.7 线粒体 MPTP 开放的检测

按照 Jones 等[7]的方法用 Calcein-AM(酯化钙黄绿素)和氯化钴共孵育的方法检测活细胞 MPT。将消化分离后的心肌细胞滴在 20 mm × 20 mm 大小的盖玻片上。同时加入 2 μmol/L 钙黄绿素和 4 mmol/L 氯化钴,37 ℃ 闭光孵育 15 min 后,激光共聚焦显微镜镜检(激发光 488 nm,检测光 500~540 nm)。

1.8 心肌细胞活性检测(MTT 法)

将心肌细胞按约 2 000/孔接种于 96 孔板,细胞施加刺激因素后,吸弃培养基,每孔加入 5 mg/ml MTT 20 μl,37 ℃ 继续培养 4 h,弃 MTT 液,每孔加入 DMSO 100 μl,震荡 20 min 至紫色结晶充分溶解后,测波长 490 nm 处的 OD 值[$D(490)$]。

1.9 统计学分析

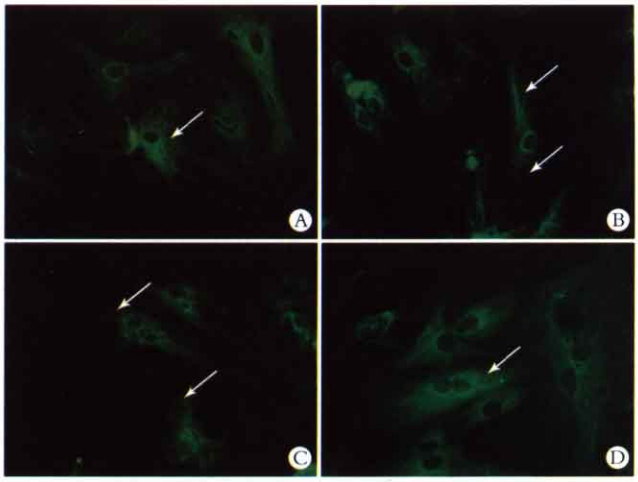
计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 10.0 统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 聚合态微管形态及表达变化

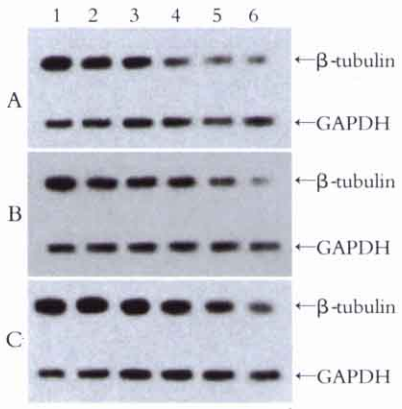
正常心肌细胞微管围绕核周呈放射状排列,微管管状结构非常清晰。缺氧 30 min 后,细胞微管结构即遭受破坏,表现为免疫荧光减弱,微管结构的连续性开始丧失,变得粗糙且不光滑,微管结构不清晰。常氧 + 微管解聚剂组微管免疫荧光也减弱,微管遭受明显破坏,连续性丧失,且呈卷曲状结构。且以上两组聚合态微管较常氧组明显减少。而缺氧 + 稳定剂组微管的免疫荧光与对照组相比无明显变化,微管结构基本正常,其聚合态微管较常氧组无明显变化(图 1,2)。

各组细胞处理 0.5 h 后,缺氧组及常氧 + 微管解聚剂组微管结构即发生明显破坏,其免疫荧光强度与对照组相比明显降低,聚合态微管较对照组明显减少;且随着处理时间的延长,其微管蛋白免疫荧光强度和聚合态微管与对照的比值不断降低,表示随着处理时间的延长,这两组细胞微管破坏程度不断加重。而缺氧 + 稳定剂组微管的免疫荧光强度及聚合态微管与对照组相比无明显变化,且要明显高于缺氧组,说明稳定剂可以明显减轻缺氧对微管的破坏作用(图 2,表 1)。



A:对照组(常氧组);B:缺氧组;C:常氧 + 解聚剂组;D:缺氧 + 稳定剂组;↓:微管结构

图 1 处理 0.5 h 后各组 β-微管蛋白免疫荧光染色 (荧光显微镜 ×200)



A：缺氧组；B：常氧＋解聚剂组；C：缺氧＋稳定剂组；1：对照组；2：0.5 h；3：1 h；4：3 h；5：6 h；6：12 h

图 2　聚合态微管变化情况

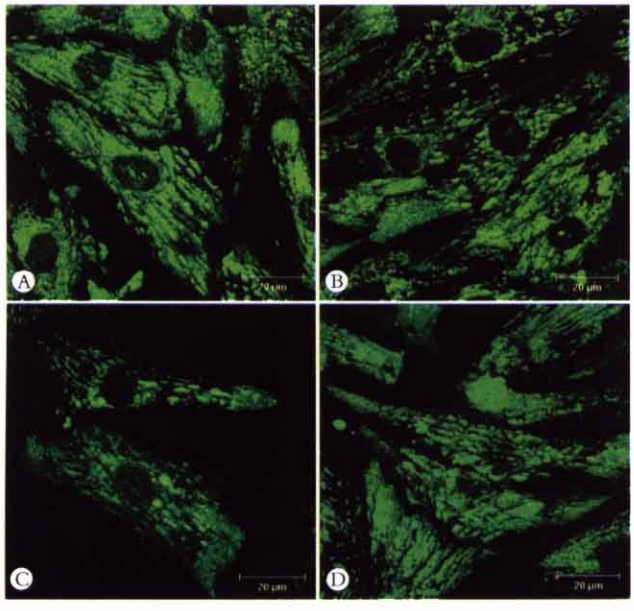
表 1　免疫印迹检测聚合态微管蛋白变化（$n=10$）

组别	聚合态微管/GAPDH 的 IOD 值				
	0.5 h	1 h	3 h	6 h	12 h
对照组	100.00 ± 2.53	100.00 ± 4.75	100.00 ± 3.17	100.00 ± 5.59	100.00 ± 2.55
缺氧组	79.56 ± 6.16[a]	65.43 ± 2.71[b]	37.93 ± 3.28[b]	24.32 ± 2.54[b]	17.02 ± 2.51[b]
常氧＋解聚剂组	78.79 ± 2.96[a]	64.54 ± 4.95[b]	38.65 ± 2.75[b]	23.24 ± 2.32[b]	15.59 ± 4.95[b]
缺氧＋稳定剂组	93.86 ± 3.09	91.09 ± 6.43[c]	88.29 ± 4.99[d]	81.35 ± 5.44[d]	74.98 ± 6.54[ad]

表中数据为占对照组的百分数；a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与对照组比较；c：$P<0.05$，d：$P<0.01$，与缺氧组比较

2.2　MPTP 开放的检测

正常组心肌细胞线粒体免疫荧光较强，呈颗粒状。处理 0.5 h 后，缺氧组及常氧＋微管解聚剂组即发生明显的 MPTP 开放，表现为线粒体荧光强度与对照相比减弱。而缺氧＋稳定剂组线粒体的免疫荧光与对照组相比无明显差别（图 3）。



A：对照组（常氧组）；B：缺氧组；C：常氧＋解聚剂组；D：缺氧＋稳定剂组

图 3　处理 0.5 h 后各组 MPTP 开放免疫荧光检测　（Bar = 20 μm）

缺氧组和常氧＋解聚剂组在处理 0.5 h 之后即发生明显的 MPTP 开放，且随着处理时间的延长，MPTP 开放开放的程度越来越大，表现为 ROI 区域免疫荧光强度与对照组的比值越来越小；而缺氧＋稳定剂组 MPTP 开放程度较缺氧组明显减轻（表 2）。

表 2　定量分析 MPTP 开放（$n=15$，$\bar{x}\pm s$）

组别	线粒体荧光强度				
	0.5 h	1 h	3 h	6 h	12 h
对照组	100.00 ± 3.19	100.00 ± 4.18	100.00 ± 2.75	100.00 ± 3.43	100.00 ± 5.51
缺氧组	85.60 ± 4.50[a]	61.81 ± 4.52[b]	42.81 ± 2.80[b]	33.45 ± 4.08[b]	26.61 ± 3.36[b]
常氧＋解聚剂组	83.35 ± 5.15[a]	58.13 ± 3.45[b]	42.81 ± 2.80[b]	30.88 ± 4.07[b]	22.34 ± 4.73[b]
缺氧＋稳定剂组	92.96 ± 2.74	87.28 ± 3.46[c]	80.71 ± 4.01[d]	76.29 ± 5.26[ad]	70.19 ± 4.86[ad]

表中数据为占对照组的百分数；a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与对照组比较；c：$P<0.05$，d：$P<0.01$，与缺氧组比较

2.3　心肌细胞活性的检测

缺氧组和常氧＋解聚剂组在处理 0.5 h 之后细胞线粒体呼吸功能即发生明显降低，且随着处理时间的延长，细胞线粒体呼吸功能不断降低；而缺氧＋稳定剂组细胞线粒体呼吸功能较缺氧组得到明显改善（表 3）。

表 3　心肌细胞活性检测（$n=12$，$\bar{x}\pm s$）

组别	D(490)				
	0.5 h	1 h	3 h	6 h	12 h
对照组	100.00 ± 4.17	100.00 ± 2.55	100.00 ± 3.47	100.00 ± 2.44	100.00 ± 4.13
缺氧组	79.04 ± 5.98[a]	59.61 ± 3.40[b]	35.01 ± 1.98[b]	24.16 ± 0.92[b]	14.33 ± 1.61[b]
常氧＋解聚剂组	76.57 ± 5.77[a]	58.25 ± 2.3[b]	30.82 ± 5.77[b]	20.88 ± 1.02[b]	14.03 ± 1.87[b]
缺氧＋稳定剂组	90.73 ± 6.32	88.04 ± 3.57[c]	81.51 ± 4.49[d]	75.12 ± 4.89[ad]	69.91 ± 2.04[ad]

表中数据为占对照组的百分数；a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与对照组比较；c：$P<0.05$，d：$P<0.01$，与缺氧组比较

3　讨论

有越来越多的证据表明，细胞骨架的破坏，尤其是微管稳定性的变化可能在心肌缺氧性损伤的发病机制中占有重要地位[1]。微管对缺氧非常敏感，常常是缺氧导致细胞不可逆性损伤的早期标志[2]。本研究表明，微管在缺氧 0.5 h 后即发生变化，缺氧 1 h 后，这种变化更加明显，并且在 12 h 之内，微管的缺氧性损害呈时间相关性。微管解聚剂组微管稳定性下降的趋势和缺氧组较为类似，故微管解聚剂能较好地模拟缺氧情况下微管稳定性变化的规律。而微管稳定剂 Taxol 能有效地减轻缺氧对微管稳定性的破坏作用。

Bernier 等[8]很早就发现线粒体和微管在空间结构上是结合在一起的，微管能通过微管相关蛋白与线粒体膜相互作用。但微管稳定性破坏能否影响线粒体通透性转换孔的开放呢？我们的研究发现常氧＋微管解聚剂组在 0.5 h 也能检测到线粒体呼吸功能下降，并发现缺氧＋稳定剂组线粒体呼吸功能下降的程度较缺氧组及常氧＋微管解聚剂组明显减轻，这说明微管

稳定性下降能导致线粒体呼吸功能下降，而减轻缺氧导致的微管稳定性下降可以有效减轻线粒体呼吸功能下降的程度，从而减轻心肌细胞微管破坏所引起的缺氧性损害。Appaix 等[9]发现加入 trypsin 破坏细胞微管等细胞骨架后，可导致线粒体呼吸功能下降，提示微管稳定性与线粒体呼吸功能可能密切相关。

我们猜测，细胞缺氧以后会引起线粒体呼吸功能下降，正常的微管平衡-解聚平衡被破坏，微管的稳定性下降，使得线粒体呼吸功能进一步下降，导致本被破坏的微管平衡状态更加紊乱，两者形成一个“恶性循环”，当这个恶性循环达到一定程度，细胞就可能发生凋亡甚至坏死。

参考文献：

[1] GANOTE C, ARMSTRONG S. Ischemia and the myocyte cytoskeleton: review and speculation[J]. Cardiovasc Res, 1993, 27(8): 1387-1403.

[2] VANDROUX D, SCHAEFFER C, TISSIER C, *et al*. Microtubule alteration is an early cellular reaction to the metabolic challenge in ischemic cardiomyocytes[J]. Mol Cell Biochem, 2004, 258(1-2): 99-108.

[3] 黄跃生. 烧伤早期损害防治研究近况[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(18): 1593-1595.

[4] 梁晚益，黄跃生，杨宗城. 大鼠严重烧伤早期心肌线粒体通透性转换孔状态改变及其机制[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(18): 1606-1608.

[5] KARBOWSKI M, SPODNIK J H, TERANISHI M, *et al*. Opposite effects of microtubule-stabilizing and microtubule-destabilizing drugs on biogenesis of mitochondria in mammalian cells[J]. J Cell Sci, 2001, 114(Pt 2): 281-291.

[6] 李晓东，黄跃生，张东霞，等. 机械牵张加重模拟缺血缺氧心肌细胞损伤的研究[J]. 第三军医大学学报, 2003, 26(17): 1557-1560.

[7] JONES R A, SMAIL A, WILSON M R. Detecting mitochondrial permeability transition by confocal imaging of intact cells pinocytically loaded with calcein[J]. Eur J Biochem, 2002, 269(16): 3990-3997.

[8] BERNIER-VALENTIN F, ROUSSET B. Interaction of tubulin with rat liver mitochondria[J]. J Biol Chem, 1982, 257(12): 7092-7099.

[9] APPAIX F, KUZNETSOV A V, USSON Y, *et al*. Possible role of cytoskeleton in intracellular arrangement and regulation of mitochondria[J]. Exp Physiol, 2003, 88(1): 175-190.

（编辑　薛国文）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2006)07-0620-01

激光配合垫板行包皮环切手术

廖皓宇[1]，王　静[2]　（[1]重庆市中山医院泌尿外科，重庆 400013；[2]重庆市西彭镇人民医院外科，重庆 401326）

由包皮口狭窄或（和）包皮龟头粘连形成的包茎以及完全覆盖龟头尿道口形成的包皮过长，国内外都主张施行包皮环切手术。但除传统术式[1,2]外，教科书及各临床论述都言简意赅，给医学生和临床工作者诸多不便。2001-2005年初，我们采取 CO_2 激光配合垫板手术，简单易行，初学者容易掌握，值得推广。现介绍如下。

1　资料与方法

1.1　垫板制备

根据刘玉良“汉族成人阴茎大小正常标准”[1]，将诸如易拉罐等罐体铝薄皮剪成 8 cm×2.5 cm 和 3 cm×1 cm 的大小长条，2%戊二醛消毒液浸泡备用。

1.2　临床资料

患者1 636例，年龄4~84岁，其中1例为84岁直肠癌晚期患者。包茎患者975例（包括先天性和继发性粘连者），其中4~12岁395例，18~30岁579例，84岁1例；包皮过长患者659例，年龄20~60岁。

1.3　手术方法

消毒铺巾，用7号针头滴肾上腺素1滴（约1/15 ml）加入5 ml利多卡因，行阴茎根部阻滞麻醉。据成人或幼儿选用铝皮，在铝皮外面包裹2~4层的纱布用生理盐水浸透。纱布长度为铝皮的1.5~2.0倍。在阴茎自然状态下，用左手稍拉阴茎体，保证阴茎体的皮肤与长度相适应；再用右手在阴茎体上相当于冠状沟平行的位置将垫板缠绕1周，稍加力箍紧阴茎体；外翻包皮，暴露冠状沟，使垫板套入外翻的包皮与阴茎体之间；调节并平整地展开包皮，再在翻转的包皮上缠绕1块沿长轴折叠的湿纱布，距龟头冠状沟缘0.5~0.7 cm处，距系带0.7~1.0 cm处，用蚊钳固定；用激光沿固定的湿纱布龟头缘切割包皮。对于包茎或包皮口过小的患者，先用湿的狭窄垫板纵行置于龟头与包皮间，再在包皮上作纵行方向的小切口，以利于包皮外翻，余同前。缝合、包扎。术后口服消炎药3 d。

2　结果

术后龟头显露完全，切缘整齐，系带保留适度，阴茎体外观美观。伤口一期愈合，极少发生龟头水肿。主张成人仍用丝线

（下转625页）

作者简介：廖皓宇（1979-），男，四川省平昌县人，医师，主要从事泌尿外科临床方面的研究。电话：（023）66528948，E-mail：liaohaoyu@yahoo.com.cn

收稿日期：2005-10-21；修回日期：2006-03-14