文章编号:1000-5404(2006)15-1547-03

论著

微管损伤与缺氧心肌细胞线粒体损害的关系研究

邝 勇,黄跃生 (第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨心肌细胞在缺氧条件下微管损伤与线粒体损害的关系。**方法** 常规方法分离培养Wistar乳鼠心肌细胞,分为正常对照组、缺氧组及缺氧微管解聚组,分别于缺氧30 min、1 h对3组进行缺氧处理,并对缺氧微管解聚组进行特异性微管解聚剂秋水仙素解聚微管后采用流式细胞仪定量检测α-微管蛋白荧光强度变化,激光共聚焦显微镜检测α-微管蛋白及线粒体形态、分布及荧光强度变化。**结果** 与正常对照组比较,缺氧组α-微管蛋白免疫荧光强度明显减弱($P<0.01$);微管断裂,分布紊乱,线粒体分布亦出现紊乱,规律性基本丧失。与缺氧组比较,缺氧并微管解聚组微管断裂、分布紊乱、荧光强度减弱明显($P<0.01$);线粒体分布弥散,完全失去规律性,基质变淡显著,荧光染色强度亦明显降低($P<0.01$)。**结论** 心肌细胞缺氧早期(30 min)即出现微管损伤,说明微管损伤可能是导致心肌细胞线粒体损害的因素。

关键词: 心肌细胞;缺氧;微管;线粒体;激光共聚焦;流式细胞术
中图法分类号: R322.11; R329.27; R364.4 **文献标识码:** A

Correlation between microtubule damage and mitochondria damage in hypoxic cardiomyocytes

KUANG Yong, HUANG Yue-sheng (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the relationship between microtubule damage and mitochondria damage in hypoxic cardiomyocytes. **Methods** Cardiomyocytes from neonatal Wistar rat were isolated and cultured for 3-5 d, then divided into three groups: normal control, hypoxia (cultured in hermetic container containing 1% O_2, 5% CO_2, 95% N_2), hypoxia with microtubule depolymerization (by adding 4 μmol/L colchicine). The fluorescence intensity of α- microtubule was determined by flow cytometry, the morph and distribution of α- microtubule and mitochondria were checked by confocal laser scanning microscopy (CLSM) at 30 min, 1 h after the cadiomyocytes being oxygen deficit. **Results** As compared with the normal control cells, the fluorescence intensity of α- microtubule decreased and the microtubule ruptured and distributed confusedly, and the mitochondria changed into disorder in hypoxic cells. As compared with the hypoxic cells, the distribution of mitochondria confused and the fluorescence intensity decreased in the cells of hypoxia with microtubule depolymerization. **Conclusion** Microtubule damage occurred at the early stage of hypoxia (30 min). Microtubule damage may lead to mitochondria damage in hypoxic cardiomyocytes.

Key words: cardiomyocytes; hypoxia; microtubule; confocal laser scanning microscopy; flow cytometry

线粒体是细胞缺血缺氧损害的核心靶点,其损害是全身性缺血缺氧损害的关键环节。近年来已形成了以线粒体为中心,研究严重烧伤后缺血缺氧损害发生机制与防治策略的新思路[1]。但至今有关烧伤后线粒体损害的具体途径和机制并不完全清楚。近年的研究提示,细胞质骨架特别是微管很可能对线粒体损害的关键环节具有重要作用[2]。本研究应用特异性微管解聚剂秋水仙素解聚缺氧心肌细胞微管后,观察了缺氧心肌细胞内线粒体的分布及荧光强度变化,以探讨心肌细胞在缺氧条件下微管损伤与线粒体损害的关系。

1 材料与方法

1.1 实验模型及分组

采用常规方法分离培养Wistar乳鼠心肌细胞,获得原代乳

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) and the Key Program of the National Natural Science Foundation of China (30430680) and the National Science Fund for Young Distinguished Scholars (30125040)

作者简介:邝 勇(1971-),男,山东省济阳县人,博士研究生,主治医师,主要从事烧伤与整形方面的研究,发表论文10余篇。电话:13436181428
通讯作者:黄跃生,电话:(023)68754173

收稿日期:2005-07-26;修回日期:2006-02-28

鼠心肌细胞，3～5 d后进行分组实验。心肌细胞分为正常、缺氧及缺氧并微管解聚3组。心肌细胞置于充入1% O_2、5% CO_2、94% N_2混合气体的密闭容器，建立缺氧模型。培养瓶中加入4 μmol/L秋水仙素建立缺氧微管解聚模型。

1.2 心肌细胞流式细胞术

培养细胞消化，1 000 r/min离心10 min，弃上清；加入500 μl预冷(4 ℃)固定液(主要成分有4%多聚甲醛、NaOH、磷酸二氢钠、1%胎牛血清，购自北京晶美基因谷科技有限公司，pH值调至7.4～7.6)，室温孵育10 min；1 000 r/min离心5 min，弃上清；加入PBS洗1次，1 000 r/min离心5 min，弃上清；加入1.5 ml破膜剂，室温孵育10 min；1 000 r/min离心5 min，弃上清；加入适量破膜剂重悬细胞；将1∶200 α-微管蛋白单抗100 μl加入5×10^5细胞悬液中并设阴性对照，孵育后加入1∶20羊抗鼠FITC-IgG 100 μl，采用流式细胞仪进行单参数检测，将测量数据和图形通过免疫流式细胞学软件处理后，以平均荧光强度表示α-微管蛋白的相对含量。每组10个样本，取均值进行组间t检验，比较3组细胞荧光强度的变化。

1.3 微管免疫荧光细胞化学

从培养瓶中取出细胞培养片，PBS漂洗3次，每次5 min；室温下，3.7%多聚甲醛固定30 min，PBS漂洗3次，每次5 min；1% Tritonx-100处理15 min，PBS漂洗3次，每次5 min；羊血清(5%，PBS稀释)处理30 min，PBS漂洗3次，每次5 min；小鼠抗大鼠α-微管蛋白单抗室温下孵育90 min，PBS漂洗3次，每次5 min；FITC标记兔抗小鼠IgG(1∶100)室温下孵育150 min，PBS漂洗3次，每次5 min；封片，4 ℃过夜后用激光共聚焦显微镜观察，随机选择细胞未重叠的区域进行拍摄，图像大小存储为512×512像素，观测α-微管蛋白在细胞内的分布情况；每个样本均选取10个区域记录荧光强度，取均值。每组10个样本，再次取均值，比较3组细胞内荧光强度的变化。

1.4 线粒体形态、分布观测

贴壁生长的细胞消化计数，接种在培养板上培养，3 d后加入1 μg/μl罗丹明123，15 min后，以37 ℃ PBS洗去细胞外罗丹明123。激光共聚焦显微镜(激发光波波长488 nm、发射光波波长515 nm)观察罗丹明123在细胞内的分布情况，每个样本均选取10个区域记录荧光强度，取均值。每组10个样本，再次取均值，进行组间t检验，比较3组细胞内荧光强度的变化。

1.5 统计学处理

数据以$\bar{x}\pm s$表示，采用SPSS 10.0统计软件行t检验。

2 结果

2.1 流式细胞术α-微管蛋白荧光强度

3组心肌细胞流式细胞术α-微管蛋白免疫荧光强度变化见表1。缺氧组心肌细胞较正常对照组α-微管蛋白荧光强度明显降低($P<0.01$)，缺氧1 h组较缺氧30 min组明显降低($P<0.01$)。说明心肌细胞缺氧后存在微管损伤，而且微管损伤程度随缺氧时间延长而加重。缺氧并微管解聚组FCT-MT荧光强度较缺氧组和正常对照组均明显降低($P<0.01$)，则验证了秋水仙素对微管的解聚作用。

表1 心肌细胞α-微管蛋白及线粒体荧光强度变化($\bar{x}\pm s$)

组别	流式细胞术	激光共聚焦	
	α-微管蛋白	α-微管蛋白	线粒体
缺氧30 min	515.3±20.13[a]	53.56±6.79[a]	76.52±11.54
缺氧30 min微管解聚	198.76±22.35[abc]	29.57±4.22[a]	51.42±9.27[a]
缺氧1 h	498.73±16.93[ab]	42.50±8.43[a]	79.69±1.76
缺氧1 h微管解聚	163.27±28.75[abc]	25.35±7.99[a]	25.89±5.77[a]
正常对照	601.93±19.89	71.63±9.72	90.40±12.87

a：$P<0.01$，与正常对照组比较；b：$P<0.01$，与缺氧30 min组比较；c：$P<0.01$，与缺氧1 h组比较

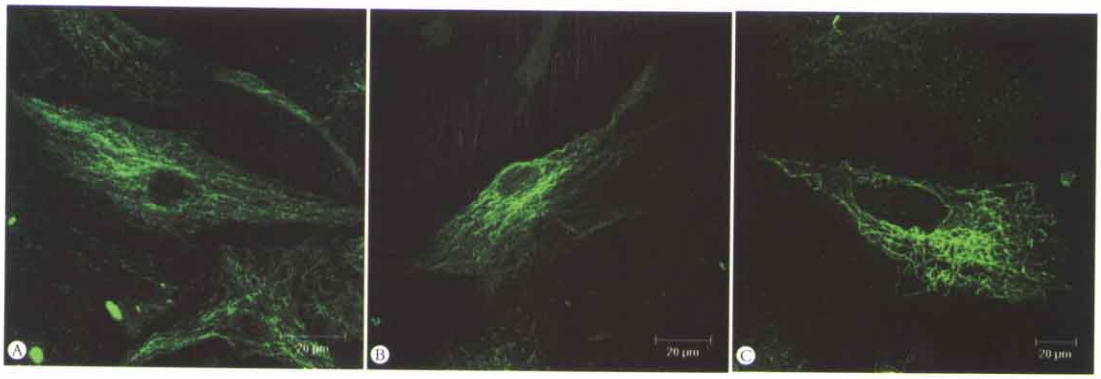
2.2 激光共聚焦α-微管蛋白荧光强度及微管形态、分布变化

3组心肌细胞激光共聚焦α-微管蛋白荧光强度变化见表1。与正常对照组比较，缺氧组微管荧光染色强度降低($P<0.01$)，且随缺氧时间延长而加重。与缺氧组比较，缺氧并微管解聚组荧光染色强度降低更为明显($P<0.01$)。

微管形态、分布变化见图1。与正常对照组比较，缺氧30 min组微管出现扭曲，部分断裂；缺氧1 h组微管大部分扭曲、断裂加重；缺氧并微管解聚组微管扭曲、断裂，连续性、完整性破坏明显。

2.3 激光共聚焦线粒体荧光强度及形态、分布变化

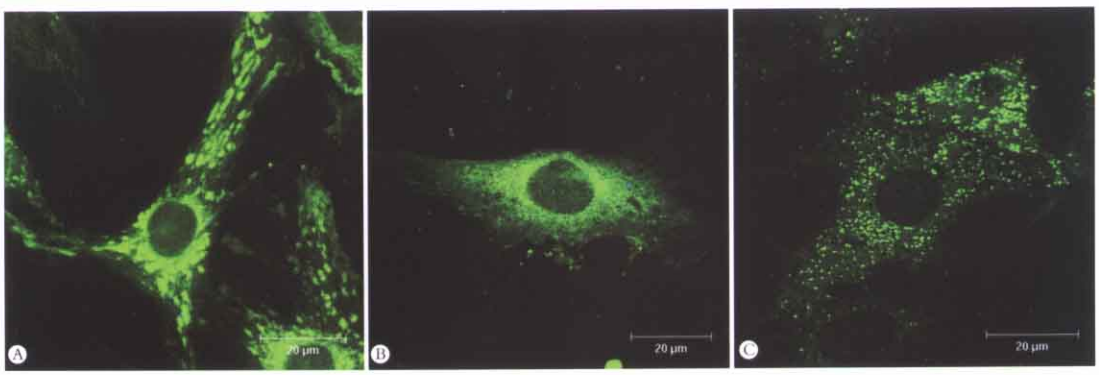
3组心肌细胞激光共聚焦线粒体荧光强度变化见表1。与正常对照组比较，缺氧组心肌细胞线粒体荧光强度的改变并不明显($P>0.05$)。分析可能是由于缺氧30 min、1 h后，线粒体的完整性并没有破坏，仍能被罗丹明123染色。而缺氧并微管解聚组线粒体荧光强度与正常对照组相比则明显降低($P<0.01$)。



A：缺氧30 min组；B：缺氧1 h组；C：缺氧1 h微管解聚组

图1 心肌细胞微管激光共聚焦显微镜检测结果 (免疫荧光细胞化学染色)

线粒体形态、分布变化见图 2。正常心肌细胞线粒体呈粒状，大小不一，一般直径为 0.5 ~ 1.0 μm，长 2 ~ 10 μm。线粒体在心肌细胞内的分布有一定的规律性，以细胞核为中心，向四周呈放射状排列，与微管的排列方式一致。缺氧心肌细胞的线粒体形态、数目、大小及分布均发生不同程度的变化：缺氧 30 min 组线粒体发生融合，变肿大，基质变淡，但分布方式还基本与微管一致（可能此时微管损伤较轻）；缺氧 1 h 组线粒体出现小空泡状结构，分布出现紊乱，规律性基本丧失；缺氧并微管解聚组心肌线粒体分布弥散，完全失去规律性，基质变淡显著。



A：缺氧 30 min 组；B：缺氧 1 h 组；C：缺氧 1 h 微管解聚组

图 2　心肌细胞线粒体激光共聚焦显微镜检测结果　（罗丹明 123 染色）

3　讨论

细胞缺氧是严重烧伤、创伤及其他多种疾病条件下最常见的病理生理现象之一[3,4]，而能量代谢障碍是缺氧导致细胞和组织器官损害的根本原因。缺氧时细胞能量代谢障碍，表现为有氧代谢抑制（线粒体途径）和代偿性糖酵解启动。长期以来，尽管从各个方面开展了大量的研究，但对缺氧条件下能量代谢障碍尤其是线粒体损害的确切机制尚不清楚，临床上缺乏有效的调理措施。

细胞骨架一般是指由微管、微丝和中间丝构成的细胞质骨架（广义上还包括核骨架及细胞外基质等）。作为胞内的刚性物质，细胞骨架除了具有锚定亚细胞结构如线粒体、高尔基体、细胞核、肌丝等而对细胞起稳定性作用外，还参与调节信号转导、核转录及蛋白质合成等[5]。线粒体在细胞质中的分布和迁移往往与微管有关，故线粒体常常排列成长链状，并与微管的分布相对应[6]。Saetersdal 等[7]通过免疫电镜方法证实微管与线粒体外膜相连。Capetanaki[8]研究认为可能在微管与线粒体外膜蛋白 VDAC 之间存在某种未知的桥梁分子，这种未知的桥梁分子通过与细胞外膜 VDAC 相连接，可以引起 VDAC 构象变化。我们的检测结果表明细胞骨架对线粒体胞内定位及分布起重要作用。因此，有理由推测细胞骨架参与了线粒体的调节过程。研究结果还显示缺氧早期的心肌细胞存在微管损伤（缺氧 30 min 后即已经出现），再对其施加特异性微管解聚后，线粒体的分布、荧光染色强度均较单纯缺氧细胞出现明显差异，说明在缺氧早期（本研究早于 1 h）微管损伤可能是导致心肌细胞线粒体损害的因素。提示微管损伤与线粒体损害可能互为因果，不同的是可能两者在缺氧的早、晚期，先后占据缺氧病理损害的主次地位。这一观点的证实尚需对微管损伤情况下心肌细胞线粒体能量代谢功能改变作进一步研究。

参考文献：

[1] 黄跃生. 烧伤早期脏器损害防治的研究进展[J]. 中华烧伤杂志，2003，19(5)：257 - 260.

[2] 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.

[3] HUANG Y，LI Z，YANG Z. Roles of ischemia and hypoxia and the molecular pathogenesis of post-burn cardiac shock[J]. Burns，2003，29 (8)：828 - 833.

[4] 黄跃生，李志清，吴庆云，等. 缺血缺氧在大鼠烧伤后“休克心”中的作用及其机制探讨[J]. 中华创伤杂志，2002，18(4)：205 - 209.

[5] DE-LANEROLLE P，COLE A B. Cytoskeletal proteins and gene regulation：form，function，and signal transduction in the nucleus[J]. Sci STKE，2002，2002(139)：PE30.

[6] 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，2000，114(Pt 2)：281 - 291.

[7] SAETERSDAL T，GREVE G，DALEN H. Associations between beta-tubulin and mitochondria in adult isolated heart myocytes as shown by immunofluorescence and immunoelectron microscopy[J]. Histochemistry，1990，95 (1)：1 - 10.

[8] CAPETANAKI Y. Desmin cytoskeleton：a potential regulator of muscle mitochondrial behavior and function[J]. Trends Cardiovasc Med，2002，12(8)：339 - 348.

（编辑　王　红）