论著

文章编号:1000-5404(2006)12-1286-04

二氯乙酸对肥大心肌细胞缺氧复氧的抗凋亡作用

徐 静[1],何作云[2],冯 兵[2] (第三军医大学新桥医院:[1]内分泌科,[2]心血管内科,全军心血管内科中心,重庆 400037)

提 要:目的 研究缺氧复氧损伤诱导体外培养新生大鼠的肥大心肌细胞凋亡及干预糖代谢对此过程的作用。**方法** 取体外培养的新生大鼠心肌细胞,以血管紧张素Ⅱ(angiotensin Ⅱ, AngⅡ)诱导其肥大,分4组:一组于3% O_2、5% CO_2、92% N_2的培养箱中培养12、24、36 h,再恢复正常条件培养4 h,造成缺氧复氧损伤的肥大心肌细胞模型;另三组加入二氯乙酸盐(dichloroacetate, DCA)分别使其终浓度为10^{-3}、10^{-4}、10^{-5} mmol/L,再缺氧复氧相同时间;电镜观察肥大心肌细胞及凋亡细胞的超微结构变化;Hochest33342/PI荧光染色识别凋亡细胞;TUNEL法观察心肌细胞凋亡形态学特征,并记数凋亡心肌细胞数,检测心肌细胞凋亡率。**结果** 肥大心肌细胞在缺氧12、24和36 h后复氧4 h,TUNEL法可检测到阳性的凋亡细胞,凋亡率分别为:(19.99±4.88)%,(22.66±5.08)%和(24.47±5.74)%;肥大心肌细胞缺氧培养12、24、36 h后加入DCA10^{-3}mmol/L再复氧4 h检测其凋亡率分别为(16.5±3.24)%,(9.7±3.52)%和(22.5±3.41)%;肥大心肌细胞缺氧培养12、24、36 h后加入DCA10^{-4}mmol/L再复氧4 h检测其凋亡率分别(17.4±3.72)%,(20.6±3.94)%和(23.5±3.76)%;肥大心肌细胞缺氧培养12、24、36 h后加入DCA10^{-5}mmol/L再复氧4 h检测其凋亡率分别(18.4±3.44)%,(21.3±3.77)%和(23.8±3.73)%。**结论** 缺氧引起的心肌细胞凋亡率随着缺氧时间的延长而增高;缺氧复氧较单纯缺氧肥大心肌细胞凋亡率增加;DCA对缺氧复氧损伤引起的肥大心肌细胞凋亡有抑制作用。

关键词:肥大心肌细胞;缺氧复氧;凋亡;二氯乙酸

中图法分类号:R364.4;R541.61;R977.7 **文献标识码**:A

Antiapoptotic effects of rat hypertrophic cardiomyocytes induced with hypoxia/reoxygenation by dichloroacetate

XU Jing[1], HE Zuo-yun[2], FENG Bing[2] ([1]Department of Endocrinology, [2]Department of Cardiovasology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of hypoxia/reoxygenation on apoptosis of rat hypertrophic cardiomyocytes and the metabolic pathway changes of hypertrophic cardiomyocytes by dichloroacetate. **Methods** The isolated ventricular cardiomyocytes from neonatal Wistar rat were cultured and purified with differential attachment, then BrdU was added to reduce the rate of non-myocytes. The cultured cells were identified by morphology, spontaneous contraction and specific immunocytochemical stain. Hypertrophic cardiomyocyte model induced by angiotensin Ⅱ was set up and assessed by [^{3}H]-Leu incorporation. The cultured media were replaced by low glucose DMEM before hypoxia. The cardiomyocytes were incubated at 37 ℃ in an air-tight incubator containing 92% N_2, 5% CO_2, 3% O_2 for 24 h to simulate hypoxia, then under the condition of 23% O_2, 5% CO_2 for 4 h to simulate reoxygenation. Apoptotic cells was evaluated by a modified TUNEL assay (DeadEnd™ Colorimetric TUNEL). **Results** The apoptotic rate of cardiomyocytes increased with time prolongation of hypoxia/reoxygenation (H/R). The apoptotic cell model induced by H/R in rat hypertropic cardiomyocytes was established successfully. When the hypertropic cardiomyocytes were pretreated with Dichloroacetate, the apoptotic rate decreased in a dose-dependent manner. The metabolic pathway changes had effect on the apoptosis of rat hypertrophic cardiomyocytes. **Conclusion** By collagense digestion, it is convenient to obtain primary neonatal Wistar rat ventricular cardiomyocytes. This method is one of vital research tools in the fields of cardiac hypertrophy. Angiotensin Ⅱ could accelerate cellular proliferation, structural protein biosynthesis and cardiac hypertrophy. Dichloroacetate has the effect of antiapoptosis.

Key words: cardiomyocyte hypertrophy; hypoxia/reoxygenation; apoptosis; dichloroacetate

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30100069)

Supported by the National Natural Science Foundation of China(30100069)

作者简介:徐 静(1972-),女,四川省自贡市人,硕士,主治医师,讲师,主要从事糖尿病与冠心病等危症方面的研究。电话:(023)68774079

通讯作者:何作云,电话:(023)68755593

收稿日期:2005-11-04;**修回日期**:2006-01-11

心肌缺血-再灌注损伤是心血管疾病中常见而重要的病理过程。细胞凋亡可能为心肌缺血-再灌注损伤发病机制中的一个重要环节[1]，亦是引发心肌肥厚向心力衰竭转化的重要机制。目前对细胞凋亡的生化过程和信号转导过程已基本阐明，即死亡受体和线粒体凋亡途径，引发终极 caspase 级联反应。线粒体主要功能是能量代谢，近年来，国内外研究均表明，心肌细胞线粒体能量代谢功能失衡与心肌肥大、心力衰竭有关。线粒体能量代谢依靠脂肪酸和糖氧化，二者相互调节，各种中间产物代谢完全，但在缺血缺氧等病理条件下，容易出现代谢中间环节受阻，堆积有害产物，脂肪酸代谢急剧增强，糖代谢受抑，这种变化直接与心绞痛有关。DCA 为丙酮酸脱氢酶激活物，可显著活化葡萄糖氧化，抑制脂肪酸代谢。临床上，应用活化糖代谢或抑制脂肪酸代谢的药物，已收到了良好的抗心绞痛治疗效果。但对于活化糖代谢有氧氧化能否抑制心肌细胞凋亡，尚有争议，若能抑制细胞凋亡，将对逆转心肌肥大向心力衰竭转变极为有利。本实验通过在细胞水平模拟心肌缺血-再灌注损伤，探讨在肥大心肌细胞缺氧复氧损伤以及干预糖代谢对心肌细胞凋亡的影响，为防治心肌肥大向心力衰竭转变提供新的理论依据或措施。

1　材料与方法

1.1　实验材料

1～3 d 龄新生 SD 品系大鼠仔鼠 100 只，购于第三军医大学实验动物中心。转铁蛋白购于 Gibco 公司。胎牛血清、高糖及低糖 DMEM 购于 Hyclone 公司。血管紧张素Ⅱ（angiotensinⅡ，AngⅡ）购于 Sigma 公司。Hochest33342/PI 荧光染料购于 Sigma 公司，DNA 末端标记凋亡检测试剂盒（*In Situ* Cell Death Detection Kit. POD）购于 Roch 公司。

1.2　实验方法

1.2.1　新生大鼠心肌细胞的分离及原代培养　　取 1～3 d SD 仔鼠，在其剑突下剪开十字切口，将心脏在跳动时取下，D-Hanks 液冲洗后，将每个心脏剪成 4 小块，经 0.125% 胰酶分 5～6 次消化，收集消化后的悬液，加入少量含 100 mmol/L 胎牛血清（FCS）的高糖 DMEM，1 500 r/min 离心 5 min，弃去上清，以高糖 DMEM 悬浮，接种于 10 cm 培养皿中，用差速贴壁法于孵箱中培养 2 h。由于纤维细胞较心肌细胞更易于贴壁，用此法可使大部分纤维细胞贴壁，剩下富含心肌细胞的培养液。将此培养液离心，再次接种于含 10 mmol/L 胎牛血清的高糖 DMEM 中，细胞密度约为 5×10^5/L。按此法培养的心肌细胞，于培养后 12 h 即可见部分细胞收缩，24 h 后换液，换用含转铁蛋白和胰岛素的高糖 DMEM，去除血清，此时心肌细胞约 90% 以上都在收缩，速率达 70～150 次/min。取生长 72 h 的心肌细胞进行实验研究。

1.2.2　心肌细胞肥大模型的建立　　常规培养心肌细胞，方法同前，48 h 后换液，换用无血清的 DMEM 培养基，加入 AngⅡ，使其终浓度为 10^{-7} mol/L，继续培养 48 h。心肌细胞[^{3}H]-亮氨酸掺入（[^{3}H]-Leu incorporation/min）测定检测心肌细胞蛋白质合成速率。掺入指数（incorporation index）= 干预组 CPM/对照组 CPM。

1.2.3　肥大心肌细胞缺氧复氧损伤的形成　　首先在 3 组用 AngⅡ培养 48 h 后之单层心肌细胞的培养基中，加入 DCA 使其终浓度分别为 10^{-3}、10^{-4}、10^{-5} mmol/L，培养 2 h 后换用低氧（3% O_2、5% CO_2、92% N_2）孵箱中饱和 2 h 的低糖 DMEM 培养基，并放入 37 ℃的 3% O_2、5% CO_2、92% N_2 的孵箱中，在此缺氧条件下培养 12、24、36 h；另一组不加干预试剂，培养方法同前。将 4 组心肌细胞均换用高糖 DMEM 培养液后同时放入 37 ℃ 3% O_2、5% CO_2 正常孵箱中继续培养 4 h，造成缺氧复氧损伤。

透射电镜：将心肌细胞以 0.125% 胰蛋白酶和 0.01% EDTA 溶液消化后，PBS 洗 2 次，1 000 r/min 离心 10 min，小心吸去上清液。用预冷的 3% 戊二醛溶液于 4℃冰箱固定 2 h 以上，常规制作电镜标本，利用透射电镜观察凋亡细胞。

TUNEL 染色：取上述各组心肌细胞爬片，经空气干燥后，以新制备的 4% 多聚甲醛/PBS 于 4 ℃固定 30 min。将细胞片浸入 0.1% Triton X 100/枸橼酸钠液中，冰浴 2 min，使细胞通透性增强，加用 50 μl 核苷酸和脱氧核苷酸末端转移酶（TdT）的混合液，于 37 ℃作用 60 min，再加入酶标记抗荧光素抗体（POD）于 37 ℃作用 30 min，加入 50 μl DAB 底物溶液，10 min 后在光镜下观察，细胞核染色棕褐色即为凋亡细胞。以核阳性作为结果判定的标准。阴性对照为不加 TdT 液处理的细胞，阳性对照为以 Dnase Ⅰ处理的细胞。

1.2.4　Hoechst33342（HO）/PI 双染　　取接种有心肌细胞的 12 孔培养板（每孔所需的心肌细胞数约 10^5～10^6 个），每孔在 1 ml DMEM 培养基中加入 10 μl HO 储存液混匀，37 ℃温育 5～15 min。将细胞置于冰上冷却后，去除上清，将细胞置于 1 ml PBS 中，加入 10 μl PI 储存液混匀，37 ℃温育 10～15 min。PBS 洗涤 2 min×3 次。荧光显微镜下观察（上述过程均需避光）。

1.3　统计学处理

数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 软件进行 t 检验。

2　结果

心肌细胞[^{3}H]-亮氨酸掺入（[^{3}H]-Leu incorporation/min）测定结果见表 1。实验结果表明 1。AngⅡ组心肌细胞[^{3}H]-亮氨酸掺入较对照组明显增强，提示细胞肥大、蛋白质合成增强。

表 1　不同组别[^{3}H]-亮氨酸掺入率及掺入指数 [($\bar{x}\pm s$)%]

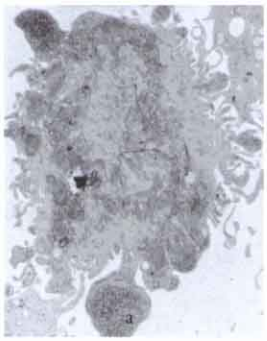
组别	[^{3}H]-亮氨酸掺入率	掺入指数
对照组	76956.23±10087.37	1
AngⅡ组	92474.37±8437.39[a]	1.202

a：$P<0.05$，与对照组比较

2.1　透射电镜观察

正常对照心肌细胞膜规则，核染色质细腻均匀、细胞器无明

显改变，凋亡细胞膜皱褶，细胞器固缩，并可见凋亡小体（图1）。



a：凋亡小体

图1 透射电镜观察凋亡心肌细胞 （TEM ×8 000）

2.2 TUNEL染色结果

TUNEL染色阳性信号为棕褐色，位于细胞核，呈小圆形、环形或新月形，见图2。取5个视野，每个视野计数至少100个细胞，每个视野计数阳性细胞率（阳性细胞数/总细胞数）计算平均阳性细胞率。均用相同的显微镜（×200）观察。肥大心肌细胞在缺氧12、24和36 h后复氧6 h，TUNEL法可检测到阳性的凋亡细胞，凋亡率分别为：（19.99 ± 4.88）%，（22.66 ± 5.08）%和（24.47 ± 5.74）%（$P<0.05$）；肥大心肌细胞加入DCA10^{-3} mmol/L ML-1后缺氧培养12、24、36 h后再复氧4 h检测其凋亡率分别（16.5 ± 3.24）%，（19.7 ± 3.52）%和（22.5 ± 3.41）%；肥大心肌细胞加入DCA 10^{-4} mmol/L后缺氧培养12、24、36 h后再复氧4 h检测其凋亡率分别（17.4 ± 3.72）%，（20.6 ± 3.94）%和（23.5 ± 3.76）%；肥大心肌细胞加入DCA10^{-5} mmol/L后培养12、24、36 h再复氧4 h检测其凋亡率分别（18.4 ± 3.44）%，（21.3 ± 3.77）%和（23.8 ± 3.73）%（$P<0.05$）。

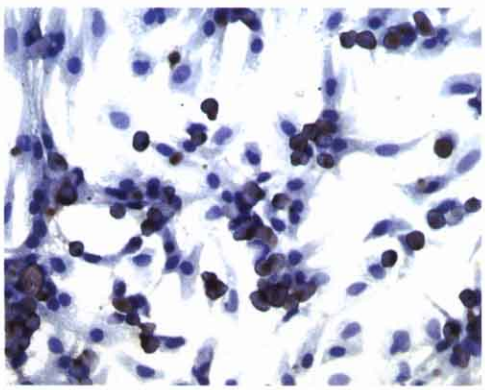


图2 TUNEL染色观察缺氧24 h/复氧凋亡心肌细胞
（荧光显微镜×400）

2.3 HO/PI染色结果

凋亡细胞呈蓝色荧光，强于非凋亡细胞，且光散射能力降低，晚期凋亡及坏死细胞呈红色荧光（图3）。

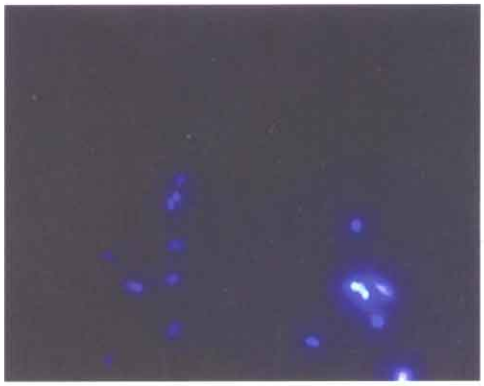


图3 HO/PI双染观察缺氧24 h/复氧后肥大心肌细胞
（荧光显微镜×400）

3 讨论

动物心肌细胞培养已应用于许多研究如缺血缺氧再灌注模型、细胞移植、细胞凋亡等细胞分子水平的研究。对肥大心肌细胞体外培养，国内外报道甚少。本实验采用胰酶分步消化培养法可很快获得大量活细胞，AngⅡ诱导建立肥大心肌模型，原代细胞培养产量高，且细胞的活性状态较好。近年来，国内外对AngⅡ在心肌肥大中的作用机制进行了深入的研究，AngⅡ可直接作用于心肌细胞的血管紧张素受体，促进心肌细胞的增生及结构蛋白的生物合成[3] AngⅡ促细胞生长作用是由其Ⅰ型受体（ATl）介导的，并呈浓度依赖性[3] AngⅡ通过其受体、C蛋白、磷脂酶C（PLC）及第二信使三磷酸肌醇（IP_3）、二酰基甘油（DAG）、UAPK系统等的介导，调控细胞质内钙离子浓度与蛋白激酶C（PKC），激活原癌基因*c-fos*、*c-cyc*，进而促进蛋白质合成[4]。

心肌细胞凋亡是心肌肥厚向心力衰竭转化的重要机制。根据本实验的结果，缺氧和缺氧/复氧均可引起心肌细胞凋亡，凋亡很可能是缺氧和缺氧/复氧早期心肌细胞的主要死亡形式，且凋亡随着缺氧时间的延长而加重。缺氧/复氧后的凋亡率高于单纯缺氧（$P<0.05$），这提示再给氧可促进心肌细胞凋亡。而缺氧36 h以上后再给氧，心肌细胞凋亡率增加幅度降低，发现细胞碎片明显增多，提示已有大量细胞死亡，这进一步表明再给氧可加剧心肌细胞损伤，同时也说明经历严重缺氧后再给氧引起的大量心肌细胞死亡与凋亡密切相关。提示在心肌缺血的治疗中，一方面要尽可能在缺血早期及时进行再灌注治疗，改善心肌细胞的血液供应；另一方面要采取细胞保护措施，即抑制细胞

凋亡，改善细胞的功能状态。缺氧/复氧后的凋亡率高于单纯缺氧（$P<0.05$），提示再给氧可促进心肌细胞凋亡。在 36 h 缺氧后复氧一定时间内，细胞凋亡率呈上升趋势，这可能与复氧后改善细胞能量有关，因为复氧所致的能量恢复为凋亡相关激酶的激活提供能量保障，而可能促进细胞凋亡发生。本研究观察到再给氧后，心肌细胞损伤加重，且与凋亡密切相关。

越来越多的实验室和临床研究表明：心肌缺血主要是一种代谢事件，深入研究缺氧/复氧能量代谢损伤的调控机制仍然是解决缺血再灌注损伤治疗的关键。最近的研究认为在再灌注的初始阶段，微循环血管内皮细胞可释放较多的氧自由基，并产生和释放一些炎性介质如血小板激活因子、肿瘤坏死因子，诱导心肌细胞凋亡[5, 6]。

在肥大心脏再灌注时，糖酵解增强而糖氧化和细胞功能恢复降低，二氯乙酸能刺激糖氧化和明显降低糖酵解，明显改善心脏功能[7]。DCA 通过刺激糖氧化而提高糖代谢，进而改善心脏的机械功能和有效性[8]。心肌能量代谢尤其是糖代谢的异常改变增加了肥大心脏对缺血再灌注损伤的易感性。刺激糖氧化改善糖酵解和糖氧化的协调平衡对缺血后再灌注心脏具有明确的益处，所以 DCA 在缺血后再灌注心脏具有明显的好处。我们发现 DCA 可明显抑制缺氧/复氧所致的凋亡程度并呈剂量依赖性。

这提示我们，在心肌缺血的治疗中，一方面要在缺血早期及时再灌注可减少心肌细胞凋亡，另一方面，DCA 对缺氧/复氧诱导的肥大心肌细胞凋亡有抑制作用。

本研究结果提示在心肌细胞缺氧复氧损伤模型的基础上，探讨了 DCA 在这一过程中的作用，DCA 可抑制缺氧复氧损伤诱导的心肌细胞凋亡而起到心肌细胞保护作用，为临床上探索治疗心肌缺血再灌注损伤的新方法提供了实验依据。

参考文献：

[1] LEWANDOWSKI E D, WHITE L T. Pyruvate dehydrogenase influences postischemic heart function[J]. Circulation, 1995, 91(7): 2071 - 2079.

[2] CHEN X, CUI Z, ZHANG F, *et al*. Angiotensin II and cAMP regulate AT(1)-mRNA expression in rat cardiomyocytes by transcriptional mechanism[J]. Eur J Pharmacol, 2002, 448(1): 1 - 9.

[3] DELBOSC S, CRISTOL J P, DESCOMPS B, *et al*. Simvastatin prevents angiotensin II-induced cardiac alteration and oxidative stress[J]. Hypertension, 2002, (40): 142 - 147.

[4] RAKUGI H, OGIHARA T. Role of angiotensin in the metabolic syndrome and cardiovascular complications[J]. Nippon Rinsho, 2002, 60(10): 1898 - 1903.

[5] CARDEN D L, GRANGER D N. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury[J]. J Pathol, 2000, 190(3): 255 - 266.

[6] 付春景，郭龙辉，申　琦，等. 心肌肥大和心力衰竭大鼠心肌细胞凋亡及 Bax 和 Bcl-2 的表达[J]. 郑州大学学报：医学版，2005，40(3)：500 - 502.

[7] WAMBOLT R B, LOPASCHUK G D, BROWNSEY R W, *et al*. Dichloroacetate improves postischemic function of hypertrophied rat hearts[J]. J Am Coll Cardiol, 2000, 36(4): 1378 - 1385.

[8] LIU Q, DOCHERTY J C, RENDELL J C, *et al*. High levels of fatty acids delay the recovery of intracellular pH and cardiac efficiency in post-ischemic hearts by inhibiting glucose oxidation[J]. J Am Coll Cardiol, 2002, 39(4): 718 - 725.

（编辑　陈聪莲）

2007 年第五届全国烧伤救治专题研讨会征文通知

经中华医学会烧伤外科学分会和《中华烧伤杂志》编辑委员会常委今年 4 月份在南昌审稿会上确认，拟定于 2007 年 6 月中旬，在重庆市召开“第五届全国烧伤救治专题研讨会”，重点探讨严重烧伤后脏器损害的发病机制及临床处理措施。文稿被收入会议的论文汇编后，当年可在“中国重要会议论文全文数据库”中检索并阅读。征文要求：(1)未曾公开发表或近 1 年来发表但未在本系列研讨会交流过的论文全文 1 份及 300 字以内的中文摘要 2 份。(2)撰写顺序：文题、姓名、作者单位、邮政编码、摘要、正文。(3)稿件用 A4 纸打印，加盖单位公章并附寄 word 格式软盘。欢迎用电子邮件形式投稿！截稿日期：2007 年 3 月 31 日。

地　址：重庆市沙坪坝区西南医院《中华烧伤杂志》编辑部收　　邮　编：400038

联系人：付佑梅　　电　话：(023)68754670

传　真：(023)65460398　　E-mail：cmashz@mail.tmmu.com.cn