文章编号:1000-5404(2011)10-0991-04

论著

大鼠心肌挫伤后细胞结蛋白破坏与钙超载的实验研究

陈小波,余祖滨,闵家新,黄 一,熊 健 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院胸外科)

【摘要】 目的 研究大鼠心肌挫伤(myocardial contusion, MC)后细胞结蛋白(desmin)的破坏与钙超载情况,评价心肌挫伤后结蛋白破坏与钙超载的关系。**方法** 110只SD大鼠按随机数字表法分为标准对照组(S组,$n=10$)、单纯致伤组(T组,$n=50$)和致伤+地尔硫卓组(D组,$n=50$),BIM-Ⅲ生物撞击机建立胸部撞击致心肌挫伤模型,致伤后D组腹腔注射盐酸地尔硫卓(0.5 mg/kg),分别于伤前,伤后2、4、8、24、48 h检测心肌细胞Ca^{2+}浓度,免疫组化法及Western blot检测心肌细胞结蛋白变化情况,RT-PCR检测结蛋白mRNA表达变化情况。**结果** ①T组伤后2 h心肌细胞Ca^{2+}浓度较S组明显增高[(110.4±17.6) *vs* (74.0±9.3), $P<0.01$],伤后4 h达最高值(141.1±17.8)后逐渐下降,48 h恢复至伤前水平(78.6±10.3);②MC后早期即出现严重的结蛋白破坏,T组伤后8 h结蛋白表达量降至最低[与S组比较,(0.11±0.11) *vs* (1.23±0.27), $P<0.01$],24 h开始部分恢复,伤后48 h结蛋白表达增高且出现排列紊乱和无规则聚集的现象;③与T组比较,D组显著降低了伤后4、8 h细胞内Ca^{2+}浓度[(84.6±9.7)、(89.3±11.8)],结蛋白表达量在伤后2、4 h两组相较无明显差异,但在伤后8 h,D组(0.55±0.18)高于T组($P<0.05$);④T、D组结蛋白mRNA伤后表达增高,24 h达峰值,D组24 h后表达低于T组。**结论** MC后早期结蛋白的破坏以细胞的机械损伤为主,随着细胞内Ca^{2+}浓度增高,其介导的心肌结蛋白降解增加。通过伤后应用钙通道阻滞剂降低Ca^{2+}浓度可有效减缓解结蛋白的降解破坏。

【关键词】 创伤;心肌挫伤;结蛋白;钙超载;钙拮抗剂
【中图法分类号】 R642;R331.31;R329.24 **【文献标志码】** A

Experimental study on correlation between desmin degradation and calcium overload in rats with myocardial contusion

Chen Xiaobo, Yu Zubin, Min Jiaxin, Huang Yi, Xiong Jian (Department of Thoracic Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

【Abstract】 **Objective** To study the correlation between desmin degradation and calcium overload in rats with myocardial contusion (MC). **Methods** One-hundred-and-ten SD rats were randomly divided into a trauma (T) group ($n=50$), a trauma + diltiazem (D) group ($n=50$), and a control (S) group ($n=10$). The MC models were established by chest impact with BIM-III Bio-impactor. The animals in the D group were given diltiazem hydrochloride (0.5 mg/kg) through intraperitoneal injection after trauma. The Ca^{2+} concentration, protein expression of desmin, and mRNA expression of desmin in myocardial cells were measured by confocal laser scanning microscopy, immunohistochemistry and Western blotting, and RT-PCR, respectively, before and after (2, 4, 8, 24, and 48 h) trauma. **Results** Compared with that in the S group, the Ca^{2+} concentration in myocardial cells in the T group increased significantly 2 h after trauma (110.4±17.6 *vs* 74.0±9.3, $P<0.01$), reached the peak 4 h after trauma (141.1±17.8), and then decreased gradually to the level before trauma 48 h after trauma (78.6±10.3). Compared with that in the S group, the protein expression of desmin in the T group decreased to the lowest level 8 h after trauma (0.11±0.11 *vs* 1.23±0.27, $P<0.01$), began to increase 24 h after trauma (1.06±0.33), and was higher than the level before trauma 48 h after trauma (1.82±0.41). Irregular aggregation of desmin was found in the T group at 48 h after trauma. Compared with the T group, the D group had a significantly lower Ca^{2+} concentration in 4 and 8 h after trauma (84.6±9.7, 89.3±11.8). The protein expression of desmin showed no significant difference between the T group and D group in 2 and 4 h after trauma, but was higher in the D group than in the T group 8 h after trauma (0.55±0.18 *vs* 0.11±0.11, $P<0.05$). Compared with that of the S group (0.62±0.23), the mRNA ex-

【基金项目】 国家自然科学基金(30700823);国家重点基础研究发展计划(973计划,2005CB522602)
【通信作者】 闵家新,电话:(023)68755616,E-mail:mjx8@163.com

pression of desmin in the D group and T group increased after trauma and reached the peak at 24 h after trauma (1.24 ± 0.30 and 1.63 ± 0.31). The mRNA expression of desmin in the T group was higher than that in the D group in 24 and 48 h after trauma (1.63 ± 0.31 *vs* 1.24 ± 0.30, $P < 0.05$; 1.04 ± 0.22 *vs* 0.78 ± 0.21, $P < 0.05$). **Conclusion** Desmin disruption is directly caused by mechanical trauma in the early stage of MC, and the increase of intracellular Ca^{2+} concentration after trauma can promote desmin degradation. The use of calcium channel blocker diltiazem hydrochloride can decrease intracellular Ca^{2+} concentration and thus reduce desmin degradation after trauma.

[Key words] trauma; myocardial Contusion; desmin; calcium overload; calcium channel blockers

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30700823) and the National Basic Research Program of China (973 Program, 2005CB522602). Corresponding author: Min Jiaxin, Tel: 86-23-68755616, E-mail: mjx8@163.com

胸部撞击伤是临床常见伤类,特别在交通事故中,胸部撞击伤是继颅脑损伤后的第2位致死因素。在胸部撞击所致的心脏损伤中,心肌挫伤(myocardial contusion, MC)因其发病隐秘,临床缺乏可靠的诊断标准,特别是在合并其他系统伤情时,往往容易忽略心脏损伤的严重性。实验研究发现MC后心功能障碍,尤以舒张功能损害为主,同时心肌细胞内Ca^{2+}浓度明显增高[1]。结蛋白是心肌细胞骨架结构的重要组成部分,其在维持细胞形态、细胞内能量及信号传递方面起着重要作用。通过心衰患者心肌细胞活检证实了结蛋白的破坏与心功能障碍的关系[2]。研究还发现细胞损伤过程中细胞内Ca^{2+}浓度增加介导了结蛋白的降解破坏[3],但MC后浓度增高与结蛋白破坏的关系尚不明了。本实验建立胸部撞击伤致心肌损伤动物模型,观察伤后不同时相点心肌细胞内Ca^{2+}浓度变化与结蛋白的破坏情况,并在伤后应用钙通道阻滞剂降低细胞内Ca^{2+}浓度后观察结蛋白的破坏情况,探讨心肌挫伤后结蛋白的破坏与心肌细胞钙超载的关系。

1 材料与方法

1.1 动物分组及模型制备

1.1.1 实验动物及分组 110只成年健康SD大鼠,雌雄不拘,体质量230~260 g,由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。按随机数字表法分为标准对照组(S组)10只,麻醉后不撞击,于麻醉后2 h检测相关指标;单纯致伤组(T组)50只,分别于撞击致伤后2、4、8、24、48 h检测相关指标;致伤+地尔硫卓组(D组)50只,致伤后2 h腹腔注射盐酸地尔硫卓注射液0.5 mg/kg(间隔2 h给药1次,持续12 h),指标检测时相点同T组。

1.1.2 MC模型的制备 大鼠后腿肌肉注射速眠新(0.2 mg/kg)麻醉,应用BIM-Ⅲ小型多功能生物撞击机,撞击头直径1.1 cm,质量22 g,撞击距离18 cm,驱动压220 kPa,撞击部位剑突左侧0.5 cm,撞击后立即行胸部按压以恢复呼吸。伤后即刻死亡者不计入统计数据。

1.2 指标检测

1.2.1 激光共聚焦系统检测心肌细胞Ca^{2+}浓度 活杀大鼠后取心尖部组织约100 mg,用0.125%胰酶+0.1%Ⅱ型胶原酶混合消化40 min(37 ℃振荡水浴),消化完成后加入荧光探针Flou3-AM 37 ℃孵育40 min,将孵育完成的心肌细胞迅速置于激光共聚焦显微镜下观察,使用激发光波长488 nm,接收波长530 nm,用装有显微镜的共聚焦激光扫描系统探测荧光信号,Ca^{2+}浓度用荧光强度表示。

1.2.2 Western blot免疫印记分析 取组织样品100 mg,抽提总蛋白后行蛋白浓度测定。取40 μg蛋白样品上样,行聚丙烯酰胺凝胶电泳,电转移至PVDF膜,脱脂奶粉封闭,孵一抗、二抗,化学荧光发光法显影(碧云天公司),操作过程按说明书进行。Bio-Rad凝胶成像系统测定目的显影条带和内参GAPDH的光吸收度值,用Quantity One软件对目的条带进行分析,以目的蛋白的灰度值与内参蛋白的灰度值的比值代表蛋白的相对表达量。

1.2.3 RT-PCR检测结蛋白mRNA表达 取组织样品100 mg应用Trizol法常规提取总RNA,微量核酸定量分析仪定量后取2 μg总RNA,随机引物法逆转录合成cDNA,用GAPDH作为内参照。结蛋白上游引物:5′-GGGGCCTGAAAAATGTCCTC-3′,下游引物:5′-GCCCACTCTCTGCCTCTCTCTT-3′,扩增产物长度为176 bp;GAPDH(扩增长度159 bp)上游引物:5′-ACCCATCACCATCTTCCAGGAG-3′,下游引物:5′-GAAGGGGCGGAGATGATGAC-3′。反应条件:94 ℃ 5 min→(94 ℃ 30 s→59 ℃ 30 s→72 ℃ 30 s)×30个循环→72 ℃ 10 min。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳分离。对结果进行灰度扫描分析,计算各组间灰度值与内参的比值。

1.2.4 免疫组化检测 取心尖部组织福尔马林固定组织标本,常规石蜡包埋,组织切片厚4 μm,HE染色后镜下观察到典型心肌细胞结构者为入选标本。免疫组化步骤按SABC试剂盒(武汉博士德)说明书操作,二氨基联苯胺(DAB)显色。

1.3 主要试剂及仪器设备

注射用盐酸地尔硫卓由天津田边制药有限公司提供(批号1008013),钙离子探针Flou3-AM购自日本同仁化学研究所(货号F026),羊抗大鼠结蛋白多克隆抗体(SANTA公司),BIM-Ⅲ小型多功能生物撞击机由大坪野战外科研究所自行研制,激光共聚焦显微镜(Leica TCS-SP2 德国莱卡公司)。

1.4 统计学分析

数据以$\bar{x} \pm s$表示,采用SPSS 13.0统计软件,两组比较用

独立样本 t 检验，组间比较采用方差分析和 q 检验。

2 结果

2.1 各组细胞内 Ca^{2+} 浓度变化

T 组伤后 2 h 细胞内 Ca^{2+} 浓度明显增高，与 S 组比较差异有统计学意义（$P<0.01$），伤后 4 h 达最高值后开始下降，伤后 48 h 恢复至伤前水平；D 组与 T 组比较，显著降低了伤后 4、8 h 细胞内 Ca^{2+} 浓度（$P<0.01$），见表 1。

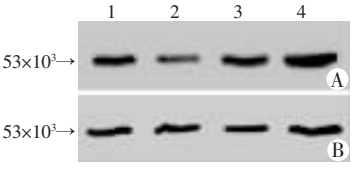
表 1　各组心肌细胞 Ca^{2+} 浓度、结蛋白及 mRNA 相对表达量（$\bar{x}\pm s$）

组别		Ca^{2+} 浓度	结蛋白	结蛋白 mRNA
S 组		74.0 ± 9.3	1.23 ± 0.27	0.62 ± 0.23
T 组	2 h	110.4 ± 17.6[b]	0.87 ± 0.22[a]	0.89 ± 0.26
	4 h	141.1 ± 17.8[b]	0.57 ± 0.24[b]	0.96 ± 0.28
	8 h	119.5 ± 18.0[b]	0.11 ± 0.11[b]	1.23 ± 0.35[b]
	24 h	89.4 ± 10.6[a]	1.06 ± 0.33	1.63 ± 0.31[b]
	48 h	78.6 ± 10.3	1.82 ± 0.41[a]	1.04 ± 0.22[a]
D 组	2 h	104.1 ± 13.9	0.88 ± 0.22[a]	0.85 ± 0.19
	4 h	84.6 ± 9.7[d]	0.62 ± 0.19	0.93 ± 0.22
	8 h	89.3 ± 11.8[d]	0.55 ± 0.18[bd]	0.96 ± 0.23
	24 h	81.4 ± 9.8	0.96 ± 0.25	1.24 ± 0.30[bc]
	48 h	79.7 ± 10.2	1.29 ± 0.27[c]	0.78 ± 0.21[c]

a $P<0.05$，b $P<0.01$，与 S 组比较；c $P<0.05$，d $P<0.01$，与 T 组比较

2.2 Western blot 检测结蛋白表达水平变化

与 S 组相比，T、D 组致伤后 2 h 心肌细胞结蛋白表达明显降低（$P<0.05$），至 8 h 降至最低（$P<0.01$）；但随后其表达开始逐渐增加，D 组伤后 48 h 检测表达量超过了 S 组（$P<0.05$）；D 组伤后 8 h 结蛋白表达量明显高于 T 组（$P<0.01$），伤后 48 h 表达量低于 T 组（$P<0.05$）。见图 1、表 1。

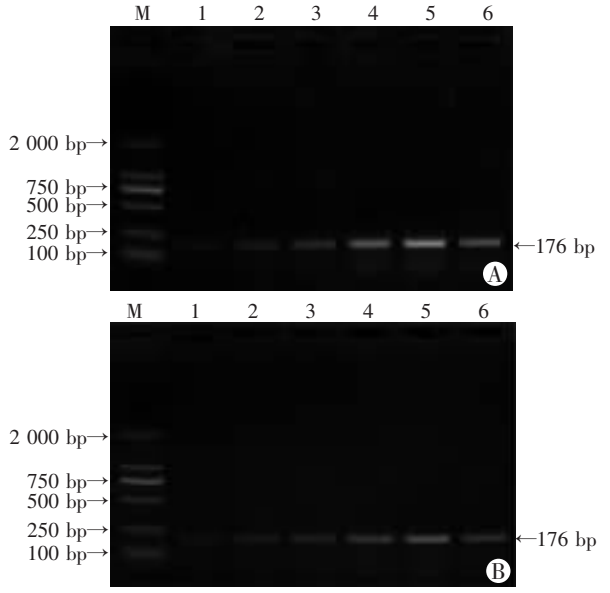


1：S 组；2：伤后 8 h；3：伤后 24 h；4：伤后 48 h　A：单纯致伤组；B：致伤 + 地尔硫卓组

图 1　各组结蛋白在心肌细胞中的表达

2.3 RT-PCR 检测结蛋白 mRNA 表达变化

伤后结蛋白 mRNA 表达随时间而增高，伤后 2 ~ 4 h 表达量虽有所增高，但与 S 组比较无统计学差异（$P>0.05$），至伤后 24 h 结蛋白 mRNA 表达量明显高于 S 组（$P<0.01$），伤后 48 h 仍高于 S 组（$P<0.05$）；D 组与 T 组比较，降低了伤后 24、48 h 结蛋白 mRNA 的表达量（$P<0.05$）。见图 2、表 1。



M：DNA 标准；1：S 组；2：伤后 2 h；3：伤后 4 h；4：伤后 8 h；5：伤后 24 h；6：伤后 48 h　A：单纯致伤组；B：致伤 + 地尔硫卓组

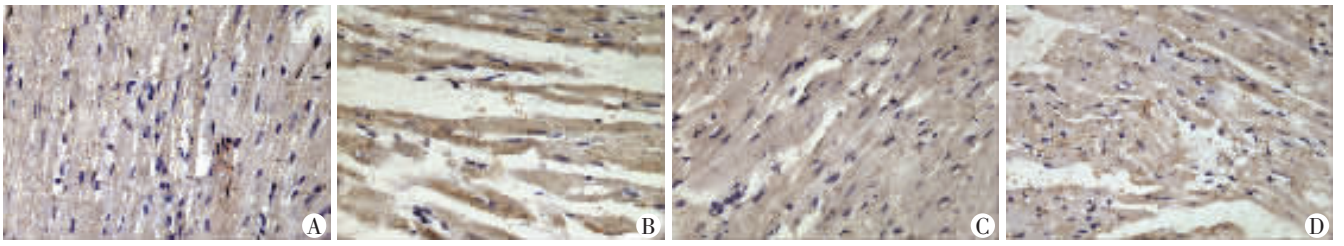
图 2　RT-PCR 检测各组结蛋白 mRNA 表达变化

2.4 免疫组化检测结蛋白的表达

S 组心肌结蛋白的分布规律，染色清晰，呈横纹状，未见明显缺失区域（图 3A）；T 组伤后 2 h 表达呈灶状缺失，部分区域横纹样结构不明显（图 3B），伤后 8 h 可见心肌组织内大片无表达区域（图 3C），在伤后 48 h 结蛋白表达增强，呈灶状分布，杂乱聚集（图 3D）；D 组伤后 2、4 h 与 T 组比较差异无统计学意义（$P>0.05$），伤后 8 h 结蛋白表达强于 T 组，伤后 48 h 大片结蛋白杂乱聚集的情况较 T 组减轻。

3 讨论

胸部撞击伤常发生于车祸撞击、高处坠落等意外事故，外力对胸部的强烈撞击常引起心脏损伤。随着工业社会的发展，越来越多的交通事故成为青壮年非正常死亡的重要因素[4]。1984 年 Copper 等[5] 应用高速摄影的方法观察胸部受撞击后的力学变化，定义了胸部撞击伤所致的心肌挫伤。一项研究对急诊胸部撞击伤患者进行持续性的心脏损伤指标监测，发现 25% 的患者存在明显的心脏伤情[6]。但 MC 因其发病隐秘且缺乏可靠的临床诊断标准，常被其他表面看似严重但并不危及生命的伤情覆盖[7]。目前国内外对 MC 的



A：S 组；B：伤后 2 h；C：伤后 8 h；D：伤后 48 h

图 3　S 组与 T 组伤后不同时相点心肌细胞结蛋白免疫组织化学表达　（SABC ×400）

研究多集中于对其临床表现与诊断鉴别方面的探讨，而在创伤对心肌结构的破坏以及创伤后细胞内外环境变化所致的继发性损伤方面的研究较少。

结蛋白是心肌特异性的中间纤维蛋白，其作为心肌内最主要的中间纤维蛋白，不仅在维持细胞形态，保持细胞内部结构中起重要作用，而且与细胞内的物质运输、能量传递、信息转换等生命活动密切相关。研究发现心肌结蛋白降解引起细胞骨架结构的改变可通过其对线粒体间能量传递的限制，影响心脏的收缩舒张功能[8]。通过对慢性心衰患者的心肌活检发现心肌结蛋白表达异常的患者较结蛋白正常表达的患者死亡率高[9]。钙超载与结蛋白破坏的关系最初在心肌缺血再灌注损伤的研究中被发现，缺血再灌注过程中细胞内 Ca^{2+} 浓度增加时，微摩尔级别的 Ca^{2+} 浓度增加即可激活钙蛋白酶系统，这种钙超载介导的结蛋白破坏被认为是缺血再灌注过程中细胞损伤的重要因素之一[10]。MC 后心肌细胞内 Ca^{2+} 含量也明显增高，且在伤后 4～8 h 表现最为明显[1]，与缺血再灌注损伤不同的是，MC 后心肌细胞损伤是外力对细胞结构的直接破坏与伤后细胞内外环境变化的综合损伤过程。本研究显示，MC 伤后 2 h 即可见明显的结蛋白破坏，伤后 8 h 结蛋白的表达量降至最低，这与伤后细胞内 Ca^{2+} 浓度的增加基本一致；但在进一步的研究中发现，虽然伤后应用钙通道阻滞剂能有效减轻细胞内 Ca^{2+} 的聚集，而结蛋白的破坏在伤后 2～4 h 并未明显减轻，2 组结蛋白的表达在伤后 8 h 才开始出现明显差异，同时，免疫组化显示在伤后 2 h 成片的细胞坏死无组织区，该区域未见结蛋白表达（图 4B），提示伤后早期的结蛋白破坏以细胞的机械破坏为主，而并非细胞内 Ca^{2+} 浓度增高所主导，但其后随着 Ca^{2+} 浓度不断增高，其介导的结蛋白破坏逐渐增强；而伤后应用钙通道阻滞剂通过有效的降低细胞内 Ca^{2+} 浓度，减轻了细胞内环境变化对心肌细胞的“二次打击”，这对 MC 后心肌细胞的保护有着重要作用。

本实验观察到 MC 后结蛋白基因呈逐步上调趋势，而蛋白的表达在伤后 8 h 达最低值后也开始明显增高，应用钙通道阻滞剂减少结蛋白降解的同时也显著降低了结蛋白基因的表达（表 1）。细胞损伤后第 1 天即开始激活蛋白的修复过程，受损细胞结蛋白重组参与的损伤修复过程是心肌细胞病理修复的重要因素[11-12]，但受损细胞结蛋白基因表达上调启动机制并不明了。多项实验研究均发现在钙蛋白酶介导的结蛋白降解中，结蛋白被降解为 2 个小片段，而该降解产物可进入细胞核与染色质上的组蛋白结合调节基因表达[3,10,13]，这种基因表达的调节是否与伤后结蛋白基因表达上调有关，是否结蛋白降解的小片段参与其重组修复的过程尚需更进一步实验研究证实。

MC 后早期结蛋白的破坏以细胞的机械损伤为主，随着细胞内 Ca^{2+} 浓度增高，其介导的心肌结蛋白降解增加，通过伤后应用钙通道阻滞剂降低 Ca^{2+} 浓度可有效减缓解结蛋白的降解破坏；结蛋白基因在伤后出现明显的表达增高，结蛋白降解产物是否是上调结蛋白基因表达的原因尚需进一步研究。

参考文献：

[1] 闵家新，朱佩芳，王正国. 兔心肌挫伤心功能障碍与心肌细胞内 Ca^{2+} 和线粒体 ATP 酶的变化[J]. 第三军医大学报，2002，24（10）：1211－1213.

[2] Di-Somma S，Di-Benedetto M P，Salvatore G，*et al*. Desmin-free cardiomyocytes and myocardial dysfunction in end stage heart failure[J]. Eur J Heart Fail，2004，6（4）：389－398.

[3] Sung M M，Schulz C G，Wang W，*et al*. Matrix metalloproteinase-2 degrades the cytoskeletal protein alpha-actinin in peroxynitrite mediated myocardial injury[J]. J Mol Cell Cardiol，2007，43（4）：429－436.

[4] 楚军，徐世伟，孙溦，等. 急诊救治胸部创伤 420 例的疗效分析[J]. 第三军医大学学报，2003，25（12）：1112，1118.

[5] Cooper G J，Maynard R L，Pearce B P，*et al*. Cardiovascular distortion in experimental nonpenetrating chest impacts[J]. J Trauma，1984，24（3）：188－200.

[6] Emet M，Akoz A，Aslan S，*et al*. Assessment of cardiac injury in patients with blunt chest trauma[J]. Eur J Trauma Emerg Surg，2010，36（5）：441－447.

[7] Teixeira P G，Georgiou C，Inaba K，*et al*. Blunt cardiac trauma：lessons learned from the medical examiner[J]. J Trauma，2009，67（6）：1259－1264.

[8] Wilding J R，Joubert F，de-Araujo C，*et al*. Altered energy transfer from mitochondria to sarcoplasmic reticulum after cytoarchitectural perturbations in mice hearts[J]. J Physiol，2006，575（Pt 1）：191－200.

[9] Pawlak A，Gil R J，Walczak E，*et al*. Desmin expression in human cardiomyocytes and selected clinical and echocardiographic parameters in patients with chronic heart failure[J]. Kardiol Pol，2009，67（9）：955－961.

[10] Blunt B C，Creek A T，Henderson D C，*et al*. H_2O_2 activation of HSP25/27 protects desmin from calpain proteolysis in rat ventricular myocytes[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol，2007，293（3）：H1518－H1525.

[11] Lam L，Tsoutsman T，Arthur J，*et al*. Differential protein expression profiling of myocardial tissue in a mouse model of hypertrophic cardiomyopathy[J]. J Mol Cell Cardiol，2009，48（5）：1014－1022.

[12] Nakatsuji S，Yamate J，Kuwamura M，*et al*. *In vivo* responses of macrophages and myofibroblasts in the healing following isoproterenol-induced myocardial injury in rats[J]. Virchows Arch，1997，430（1）：63－69.

[13] Bar H，Sharma S，Kleiner H，*et al*. Interference of amino-terminal desmin fragments with desmin filament formation[J]. Cell Motil Cytoskeleton，2009，66（11）：986－999.

（收稿 2011-01-04 修回 2011-02-06）

（编辑 王 红）