维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2004)01-0045-03

大鼠离体心肌细胞晚期"缺血"预处理模型的建立

韩君勇 , 陈运贞

(重庆医科大学临床学院心内科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨建立一种方便、实用的离体大鼠心肌细胞"缺血"预处理模型。方法:实验分为 4 组(对照组 1、对照组 2、"缺血"预处理组 1、"缺血"预处理组 2),将原代培养的新生大鼠心肌细胞置入一个改造的密闭保鲜盒内,通入 95% N_2 和 5% CO_2 混合气(预处理 1)或 100% N_2(预处理 2),进行"缺血"预处理,以 LDH 释放和台盼蓝排斥试验判断心肌细胞损伤程度。结果:"缺血"预处理组 1 的 LDH 释放较对照组 1 少、细胞存活率高($P<0.01$);"缺血"预处理组 2 的 LDH 释放较对照组 2 少、细胞存活率高($P<0.01$);"缺血"预处理组 1 与"缺血"预处理组 2 的 LDH 释放、细胞存活率无差异($P>0.05$)。结论:本文建立了一种方便、实用的大鼠离体心肌细胞"缺血"预处理模型,为进一步研究预处理的心肌保护作用提供有效的方法。

【关键词】心肌细胞;缺血预处理;培养;模型

【中国图书分类法分类号】R654.4 【文献标识码】A 【收稿日期】2002-11-28

Development of ischemic preconditioning model of cultured neonatal rat cardiomyocyte in vitro

HAN Junyong , et al

(*Department of Cardiology , College of Clinical Medicine , Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To make a convenient and practical ischemic preconditioning model in cultured neonatal rat ventricular myocytes. *Methods*: The cultured cardiomyocytes dissociated from neonatal rat ventricle were placed in a modified chamber and mixture gas(95% N_2, 5% CO_2)or 100% N_2 was put inside. The injury of cardiomyocytes was assessed by LDH release and trypan blue exclusion in four groups($n=6$ in each)—Group control-1, Group IPC-1, Group control-2 and Group IPC-2. *Results*: The release of LDH was lower and cell viability was higher in Group IPC-1 than Group control-1. Similar results were obtained in Group IPC-2 compared with Group control-2. The difference in the release of LDH and cell viability was not significant between Group IPC-1 and Group IPC-2 ($P>0.05$). *Conclusion*: The isehemic preconditioning model in vitro may be induced easily by oxygen deprivation in cultured neonatal cardiomyocytes, and can be used to further studyon the mechanism of the late phase of preconditioning.

【Key words】Ischemic preconditioning; Cardiomyocyte; Culture; Model

心肌缺血预处理是目前心血管病研究的热点,离体心肌细胞"缺血"预处理模型有其独特的特点,能够解决在体动物实验不能解决的问题,尤其是在药物预处理及在细胞信号传导的研究方面,能避免药物通过全身作用对心肌的影响,同时能减少昂贵的阻断剂用量,另外对细胞生化、生理和基因表达的研究更具有优势。目前国内外离体心肌细胞"缺血"预处理模型的方法主要有氧(或氧糖)剥夺预处理模型[1~3]和药物预处理模型[4,5]。本文利用家用保鲜盒成功建立离体心肌细胞"缺血"(氧剥夺)预处理模型,方法简便、易行、效果良好。

1 材料与方法

1.1 实验动物

出生 1~3 天的 Wistar 大鼠,由重庆医科大学动物中心提供。

1.2 心肌细胞原代培养

取出生 1~3 天的大鼠乳鼠,消毒,剪开胸腔,钝性分离心脏。放入 D-Hank's 液中漂洗至洗液清亮。去掉心包,大血管及心房组织,剪碎心肌成 $1mm^3$ 的组织块,加入 0.125% 的胰蛋白酶,0.02% EDTA,3mg% Dnase I,37℃ 消化 5min,反复吹打约 1min,静置片刻,吸取含细胞之液体经 100 目钢网过滤,用含血清的 D-Hank's 液洗涤、离心终止消化。未消

作者介绍:韩君勇(1964-),男,副教授,
主要研究方向:心血管疾病。

维普资讯 http://www.cqvip.com

化的心肌组织重复上述步骤,至基本消化完全为止。收集所有细胞加入含 15%胎牛血清的 M199 培养液,接种于玻璃培养瓶中,5%CO_2、37℃细胞培养箱中培养。约 1.5h 后将未贴壁的心肌细胞按 5×10^5,接种于 24 孔培养板中培养,培养前 3 天加入 Brdu(5－溴—2 脱氧尿苷)抑制成纤维细胞分裂增生,细胞单层融合即可进行实验。以上在超净工作台完成。

1.3 缺氧装置

参照张拥波等[6]的方法,并作改进。用家用微波炉保鲜盒(体积 2L),确保其密封不漏气,在其顶部和底部分别穿刺一个小孔,将医用三通管一端插入其中并固定,另外两端,一个接输液器,另一个用于抽气检测。顶部的三通管为进气口,底部的为排气口,进气口的输液器与气体流量表相连;排气口的输液器另一端插入装有无菌水的水封瓶中,通过气泡以观察排气情况。

1.4 心肌细胞"缺血"预处理模型

实验中采用两种气体分别充气,以剥夺氧。一为混合气组:95%N_2 和 5%CO_2,混合气充气;另一为 100%N_2。心肌细胞于实验前换为无血清的 M199 培养基培养 24h,然后放入缺氧盒中,接好进出气管,缺氧盒置于 37℃的恒温干燥箱中,打开三通管阀门,以 2L/min 的流量,持续注入上述气体 20min,再将流量减少至 1L/h,以维持水封瓶刚有气体溢出,于充气后 10min,20min,30min,50min 抽气测定缺氧盒中的氧含量。50min 后将培养细胞放回二氧化碳培养箱中培养(37℃,95%空气,5%CO_2),培养 1h 后,再重复上述循环 1 次。即为"缺血"预处理。待预处理的细胞培养 48h 后,再次进行缺氧,将注入气体的时间延长至 2h,如此为致死性缺氧。

1.5 分组及测定指标

1.5.1 分组

实验分为四组:"缺血"预处理组 1(IPC1):95%N_2 和 5%CO_2 的混合气充气,进行"缺血"预处理和致死性缺氧;"缺血"预处理组 2(IPC2):用 100%N_2 进行"缺血"预处理和致死性缺氧;对照组 1(CON1):为正常培养的心肌细胞,95%N_2 和 5%CO_2 的混合气进行致死性缺氧;对照组 2(CON2):正常心肌细胞,用 100%N_2 进行致死性缺氧。

1.5.2 乳酸脱氢酶的测定

每组均在致死性缺氧后 1h 收集心肌细胞培养液,用全自动生化分析仪测定乳酸脱氢酶(LDH)的活性(U/L)。

1.5.3 培养细胞台盼蓝排斥试验

将培养的细胞制成悬液,用 0.4%的台盼蓝以 1:9 的比例混合,3min 内在细胞计数池上计成活细胞数,并得出细胞成活率(%)。

1.6 统计分析

数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,以 SPSS 统计分析软件包的 Independent sample test 进行统计处理,以 $P<0.05$ 为检验显著水准。

2 结 果

2.1 缺氧盒中氧的测定

如表 1 示:通入混合气和 100%N_2 前,容器中的氧含量分别为 21.2%±0.27%和 21.58%±1.09%,通入气体后 20min,氧含量分别为 0.215%±0.03%和 0.22%±0.037%;以后均进一步降低。可见持续通入气体 20min 以后即可达到容器内低氧或缺氧的目的。通入两种气体后相对应时间点比较,容器中的氧含量无显著差异($P>0.05$)。

2.2 "缺血"预处理对心肌细胞培养液中 LDH 释放的影响

如表 2 示:致死性缺氧 2h 后,IPC1 组的培养液中 LDH 较 CON1 组明显降低,差异极显著($P<0.01$);IPC2 组 LDH 较 CON2 组明显减少,差异极显著($P<0.01$);IPC1 组与 IPC2 组间,CON1 组与 CON2 组间 LDH 释放量无差异($P>0.05$)。

2.3 "缺血"预处理对心肌细胞存活率的影响

如表 2 示;IPC1 组的细胞存活率较 CON1 组高,差异极显著($P<0.01$);IPC2 组细胞存活率较 CON2 组明显增加,差异极显著($P<0.01$);IPC1 组与 IPC2 组间,CON1 组与 CON2 组间细胞存活率无差异($P>0.05$)。

表 1 缺氧盒中氧含量变化(%)($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

时 间	混合气	N_2
缺血前	21.2±0.27	21.58±1.09*
缺血 10min	0.61±0.022	0.59±0.074*
缺血 20min	0.215±0.03	0.22±0.037*
缺血 50min	0.103±0.022	0.118±0.038*
缺血 2h	0.017±0.009	0.014±0.009*

*:相对应时间点比较,$P>0.05$

表 2 "缺血"预处理的心肌细胞保护效应($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组 别	CON1	CON2	IPC1	IPC2
LDH(U/L)	30.00±6.51	32.17±5.84#	15.50±2.99*	17.17±5.87☆△
细胞存活率(%)	27.50±4.82	26.67±5.65#	81.67±4.78*	77.67±9.72☆△

*:与 CON1 组比较,$P<0.01$;☆:与 CON2 组比较,$P<0.01$;#:与 CON1 组比较,$P>0.05$;△:与 IPC1 组比较,$P>0.05$

维普资讯 http://www.cqvip.com

3 讨 论

心肌缺血预处理是目前心血管研究的热点，离体心肌细胞"缺血"预处理模型的建立具有重要价值。它能避免活体模型研究中药物干预可能通过影响血管阻力、心肌收缩力，心率、房室传导而干扰结果。不仅可以研究心肌细胞的生长、分化、离子通道，而且可以研究药物对其生化、生理、基因表达的影响[7]。

目前，离体心肌细胞"缺血"预处理模型主要有氧(或氧糖)剥夺预处理模型和药物预处理模型。药物预处理模型是通过药物(如腺苷受体激动剂)模拟缺血预处理效应，再给予致死性缺血。该法需要特殊药物干预，而且不能很好地摸拟在体心肌缺血模型，较多用的是前一种方法。剥夺氧(或氧糖)的方法常用的有两种，一种是将培养细胞制成悬液，离心去除培养液，在沉淀的细胞团上加矿物油密封，隔绝空气，达到氧(或氧糖)剥夺[8]。此法经济、不需要特殊设备，但操作复杂，而且矿物油的干扰给实验带来不便，影响实验结果。另一种是缺氧箱法，即直接给缺氧箱通入不同浓度的氮气和二氧化碳混合气或其它惰性气体造成低氧或缺氧，同时去除培养基中的葡萄糖，造成氧(或氧糖)剥夺[1~3]。此法能较好的模拟在体心肌缺血模型，但需要特殊设备，国外多用密封的恒温、恒湿度缺氧箱(如 Bactron I 等)[9]，也有用二氧化碳孵箱进行缺氧研究的，但价格昂贵，一般实验室不具备。国内多用有机玻璃定制或用真空干燥器改制成缺氧小室，较复杂，不方便[10]。我们参照张拥波等[6]的方法，并作相应改进，用家用微波炉保鲜盒制成了方便、经济、适用的缺氧盒。

用于剥夺氧的气体，不同实验不尽相同，多数用的是 95%N_2 和 5%CO_2 的混合气及 99%N_2 和 1%CO_2 的混合气，也有用 100%N_2 或 100%Ar。本实验中分别采用了 95%N_2 和 5%CO_2 的混合气和 100%N_2 两种气体剥夺氧，建立"缺血"预处理模型，实验显示，两种气体灌注，在所有相应时间点上缺氧盒中氧的含量相当且无统计学差异($P>0.05$)。说明两种气体剥夺缺氧盒中氧的效率相当。实验还显示：与 CON 组比较，两 IPC 组的 LDH 释放明显减少，细胞存活率增高，差异有极显著性($P<0.01$)，说明经"缺血"预处理后，产生了心肌保护作用。而 CON1 组与 CON2 组比较，IPC1 与 IPC2 组比较，相应两组间 LDH 释放，细胞存活率无差异，说明用两种气体剥夺氧进行"缺血"预处理，产生的心肌保护效应相当。由于 N_2 气较 95%N_2 和 5%CO_2 的混合气价廉，易于获得，因此以 100%N_2 剥夺氧进行"缺血"预处理更具有优势。

以家用微波炉保鲜盒成功地建立了离体心肌细胞"缺血"预处理模型，该方法能简单地模拟活体心肌"缺血"预处理，对预处理心肌保护作用的研究有重要意义。该方法简便、实用、无需特殊设备，且易于控制，方法与结果稳定，是一种较好的研究预处理心肌保护作用的方法。

参 考 文 献

[1] Yao Z, Tong J, Tan X, et al. Role of reactive oxygen species in acetylcholine induced preconditioning in cardiomyocytes[J]. Am J Physiol, 1999;277:H2505 - 2509.

[2] Ovelgonne, Van W. R, Verkleij A. J, et al. Cultured neonatal rat heart cells can be preconditioning by ischemia, but not by heat shock: the role of stress proteins[J]. J Mol Cell Cardiol, 1996;28:1617 - 1629.

[3] Zhao J, Renner O, Wightman L, et al. The expression of constiutively active isotypes of protein kinase C to investigate preconditioning[J]. J Biol Chem, 1998;273:23072 - 23079.

[4] Ikonomidis J. S, Shirai T, Weisel R. D, et al. Preconditioning cultured human pediatric myocytes requires adenosine and prptein konase C[J]. Am J Physiol, 1997;277:H1120 - 1230.

[5] Liang B. T, Grost GT. Direct preconditioning of cardiac myocytes via opioid receptor and KATP channels[J]. Circ Res, 1999;84:1396 - 1400.

[6] 张拥波，董为伟. 氧糖剥夺离体神经元缺血模型的建立[J]. 重庆医科大学学报，2001;2:116 - 118.

[7] Marber MS. Ischemic preconditioning in isolated cells [J]. Circ Res, 2000;86:926 - 931.

[8] Armstrong SC, De lacey M, Ganote CE. Phosphorylation state of hsp27 and p38 MAPK during preconditioning and protein phosphatase inhibitor protection of rabbit cardiomyocytes [J]. J Mol Cell Cardiol, 1999;31:555 - 567.

[9] Joel S, Kariner JS. Neonatal mouse cardiac myocytes exhibit cardiopretection induced by hypoxie and pharmacologic preconditioning and by transgenic overexpression of human Cu/Zn superoxide dismutase[J]. J Moll Cell cardiol, 2000;32:1779 - 1786.

[10] 谢 崧，钱桂生，陶学斌. 一种用于研究的经济实用的缺氧小容器[J]. 第三军医大学学报，1998;20:92.