DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.23.008
第26卷第23期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 23
2102 2004年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)23-2102-03

烧伤血清加缺氧条件下高牵张对心肌细胞的影响

范鹏举[1],黄跃生[1],黄晓元[2],郑 军[1] ([1]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;[2]中南大学湘雅医院烧伤整形外科,长沙 430008)

提 要:目的 研究烧伤血清加缺氧条件下,高牵张对心肌细胞的影响,探讨高负荷在严重烧伤后对心肌细胞的作用。方法 采用原代培养的乳鼠心肌细胞,给予正常血清(SN组)、烧伤血清+缺氧(1%O_2)(SH组)、烧伤血清+缺氧(1%O_2)+10%轴向静态牵张(SHS组)3种刺激,MTT法检测心肌细胞活力、并测定培养上清中乳酸脱氢酶(LDH)和肌酸激酶(CK)的活力来反映心肌细胞受损程度。结果 和正常血清比较,烧伤血清+缺氧刺激在1、3 h对心肌细胞活力无明显影响,6 h明显降低心肌细胞活力($P<0.01$),LDH和CK活力在1 h已经明显升高($P<0.01$);和前两者比较,烧伤血清+缺氧+牵张刺激对细胞活力影响在1 h就已经明显($P<0.01$),LDH和CK活力呈现出爆发式的增高,最高可为正常组的50倍,同时相点烧伤SH组的5~6倍。结论 在烧伤血清合并缺氧条件下,高负荷加剧了心肌细胞的损伤。

关键词:烧伤;缺氧;牵张;心肌细胞
中图法分类号:R322.11;R363.11;R644 文献标识码:A

High stretch aggravates the damage to cardiomyocytes under burn sera and hypoxia

FAN Peng-ju[1], HUANG Yue-sheng[1], HUANG Xiao-yuan[2], ZHENG Jun[1] ([1]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Department of Burns, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 430008, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of high stretch on cardiomyocytes under burn sera and hypoxia in order to explore the effects of high load on cardiomyocytes after severe burn. **Methods** Cardiac ventricular myocytes isolated from neonatal rats were employed as the target cells. The cells were respectively stimulated by sera from normal rat, burn sera plus hypoxia and burn sera plus hypoxia and 10% axial static stretch. The viability of cardiomyocytes was determined using MTT assay, and the degree of damages on cardiomyocytes by detection of the activities of lactate dehydrogenase (LDH) and creatine phosphokinase (CK). **Results** Compared with that in normal group, the cell viability decreased mildly at 1 and 3 h after cells were stimulated by burn sera plus hypoxia and decreased markedly at 6 h after stimulation ($P<0.01$). The activities of LDH and CK increased significantly at 1 h after stimulation ($P<0.01$). Compared with that in the former two groups, the cell decreased significantly by burn sera plus hypoxia and 10% axial static stretch at 1 h, and the activities of LDH and CK increased at a very high level which reached 70—80 times as much as those in the normal group and 5—6 times as much as those in burn sera plus hypoxia group at the same time point. **Conclusion** High stretch can aggravate the damage to cardiomyocytes uner burn sera combined with hypoxia.

Key words: burn; hypoxia; stretch; cardiomyocyte

严重烧伤后,机体失去正常皮肤保护,创面大量蒸发水分,组织反应性水肿,致有效循环血量锐减,直至发生低血容量性休克,机体各脏器处于缺血缺氧状态,合并呼吸道烧伤后,机体缺氧将更加严重;再者,应激反应、缺血再灌注损伤、失控性炎症反应等致血管内皮细胞和中性粒细胞结构和功能改变,进一步引起微循环障碍,可加重烧伤早期脏器的缺氧缺氧损害。实验证实:即使正常及时补液,严重烧伤后心肌局部血流量1 h即显著低于正常水平,致伤后24 h仍显著低于对

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054205);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) (G1999054205) and the National Science Fund for Young Distinguished Scholars (30125040)

作者简介:范鹏举(1973—),男,河南省林州市人,博士研究生,主要从事创面修复,瘢痕形成机制及严重烧伤后脏器功能方面的研究。电话:(0731)4327006
通信作者:黄跃生,电话:(023)68754173,E-mail:yshuang@public.cta.cq.cn

收稿日期:2004-09-10;修回日期:2004-11-15

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

照水平[1]。现代烧伤治疗强调早期大量补液对于纠正休克状态具有重要意义, 但过量补液尤合并吸入性损伤却会增加心脏负荷, 本研究目的在于探讨在缺氧烧伤血清背景下, 高负荷对心肌细胞的作用。

1　材料与方法

1.1　主要试剂和仪器

DMEM/F12 培养基、硅酮膜(由重庆大学生物工程学院黄启平博士提供), 分光光度计(Beckman 美国)、乳酸脱氢酶试剂盒(南京建成生物工程研究所)、肌酸激酶试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

1.2　方法

1.2.1　乳鼠原代心肌细胞培养及纯化　　心肌细胞来源于正常 SD 大鼠之乳鼠心室肌, 心肌细胞分离采用胰酶组织消化法, 纯化采用差速贴壁法和 Brdu 化学抑制法。具体方法参见文献[2]; 将消化后细胞接种至 FBS 衬底的硅酮膜上(将 FBS 加入硅酮膜上, 37 ℃静置 4 h 后弃去 FBS, 并以 PBS 冲洗两次即完成衬底)。置入细胞培养箱, 隔日换液, 改用不含 Brdu 的培养基。4 ~5 d 后施加刺激因素。

1.2.2　细胞牵张装置的制备及牵张方法　　裁取 3.6 cm× 6.4 cm 大小的硅酮膜, 硅酮膜两端各使用硅胶粘着固定 3.6 cm 长硅胶管(内径 1.5 mm, 外径 3 mm), 选直径 12 cm 的培养皿内选取 7.2 cm× 3.6 cm 区域, 四角分别粘着固定一段 5 mm 长硅胶管。牵张时, 7 cm 长的钢针穿过硅酮膜两端的硅胶管, 向两端牵拉硅酮膜将其固定于支架上, 此时硅酮膜牵张延长约 10%(误差 0.3 mm 内)。根据实验要求牵张相应时间。

1.2.3　正常大鼠及烧伤大鼠血清制备　　正常及 40%、III度烧伤 6 h 后 SD 大鼠, 无菌操作抽取腹主动脉血。4 ℃过夜待血块凝缩, 仔细吸出血清, 4 ℃离心(3 000 r/min) 15 min, 取上清, 56 ℃加热 30 min 灭活补体。分装, -20 ℃冻存备用。

1.2.4　损伤实验、分组及时相点设置　　正常组(SN 组): 正常培养的心肌细胞。烧伤血清+缺氧组(SH 组): 于正常培养的心肌细胞中加入体积分数 10% 的烧伤血清进行缺氧培养(37 ℃, O_2、N_2、CO_2 的体积分数分别为 1%、94%、5%); 制作烧伤缺氧模型。烧伤血清+缺氧+10%牵张组(SHS 组): 在缺氧复合烧伤血清条件下, 牵张硅酮膜。每组取 3 个标本, 刺激 1、3、6、12 h 后收集相应标本进行检测。

1.3　观察指标

1.3.1　MTT 法检测细胞活力　　细胞培养 4~5 d, 刺激, 按培养基的 1/10 比例加入 MTT(5 mg/ml), 继续孵育 4 h, 终止培养, 吸弃上清。加入定量二甲亚砜, 振荡 10 min, 使结晶充分溶解。490 nm 波长分光光度计测定各时相点 D_{490} 值(空白对照为不加细胞只加培养液, 空白孔调零)。

1.3.2　乳酸脱氢酶检测　　收集培养上清, 200× g 离心 2 min, 取上清, 另取试管, 将烧伤血清加入双蒸水中调至 10%, 培养上清及含 10%烧伤血清的双蒸水按南京建成生物工程研究所 LDH 检测试剂盒说明书检测 LDH。除正常组外, 其余各组乳酸脱氢酶的活力等于实测的乳酸脱氢酶活力减去含 10%烧伤血清的双蒸水所测的 LDH 活力。

1.3.3　肌酸激酶的测定　　培养上清按测 LDH 活力方法同样处理, 肌酸激酶采用南京建成生物工程研究所的"肌酸激酶(CK)测试盒", 并按提供商使用说明使用。烧伤血清+缺氧组及烧伤血清+缺氧+10%牵张组的结果为实测结果减去含 10%烧伤血清双蒸水的测定值。

1.4　统计学处理

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 的表示, 采用 office2000 中 excel 进行方差分析和 t 检验。

2　结果

2.1　细胞活力

SH 组, 细胞活力缺氧 3 h 少量下降, 20 h 活力下将较为显著, SHS 组, 细胞活力 1 h 有较明显下降, 见表 1。

表 1　心肌细胞活力变化(MTT 法)($\bar{x} \pm s$)

Tab 1　Changes of the viability of cardiomyocytes (MTT) ($\bar{x} \pm s$)

Group		Stimulating time(h)			
		1	3	6	12
SN	0.141±0.014				
SH		0.136±0.011	0.134±0.014	0.123±0.012 ##	0.104±0.01 ##
SHS		0.127±0.012 ##	0.115±0.007 ##	0.104±0.006 ##	0.094±0.005 ##

##: $P<0.01$, *vs* SN

2.2　乳酸脱氢酶活力

SH 组和 SHS 各时相点和 SN 比较都有明显升高, SHS 组和 SH 组比较, 前者增高较后者更加明显, 见表 2。

表 2　LDH 活力测定(U/L, $\bar{x} \pm s$)

Tab 2　Determination of viability of LDH (U/L, $\bar{x} \pm s$)

Group		Stimulating time(h)			
		1	3	6	12
SN	79.42±15.64				
SH		211.23±36.54 **	404.04±30.34 ##	680.7 ±40.85 ##	1 144.4 ±32.81 ##
SHS		3 477.09±36.78 ##	4 078.52±26.8 ##	5 908.51±41.82 ##	6 142.88±44.57 ##

##: $P<0.01$, *vs* SN

2.3　肌酸激酶

各时相点 CK 活力都较正常有所增高, 缺氧较牵张增高更明显, 缺氧牵张较单纯缺氧或牵张增高更加显著, 见表 3。

表 3　CK 活力测定值(U/L, $\bar{x} \pm s$)

Tab 3　Determination of viability of CK (U/L, $\bar{x} \pm s$)

Group		Stimulating time(h)			
		1	3	6	12
SN	0.558 6±0.038				
SH		1.146 5±0.082 ##	1.188 2±0.053 ##	2.037 4±0.25 ##	2.872 14±0.28 ##
SHS		2.117 4±0.190 ##	2.745 5±0.309 ##	3.706 5±0.298 ##	5.010±0.26 ##

##: $P<0.01$, *vs* SN

3　讨论

先前研究示: 严重烧伤后, 可致"休克心", 并认为缺血缺氧和细胞因子是"休克心"发生的两大重要原

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

因[3]。现代烧伤治疗强调早期大量补液对于纠正休克的重要作用,但过量补液会增加心脏负担,严重烧伤后加重心脏负担对心肌细胞影响如何少见报道。本实验通过施加烧伤血清和缺氧,模拟严重烧伤后机体的缺血缺氧环境,并牵拉硅酮膜上的乳鼠心肌细胞,构建严重烧伤背景下心肌细胞高负荷模型。

实验结果显示:烧伤血清+缺氧情况下,心肌细胞活力下降,LDH 和 CK 增高。其损伤机制为严重烧伤时,缺血缺氧和机体反应性分泌的多种激素、炎性因子互为因果,细胞损伤信号表达增强,心肌细胞发生 Ca^{2+} 超载,能量代谢障碍[4,5],产生大量的 ROS 相关产物,最终导致心肌细胞变性坏死和凋亡。

张力刺激对心肌细胞的正常的形态及生理功能的维持有重要作用,张力对心肌细胞的作用是通过所谓的机械感受和机械传导而发生作用,干扰心肌细胞正常的机械感受和传导功能会导致心肌细胞形态及生理功能畸变[6],许多临床及实验研究支持高机械刺激能够导致心肌细胞肥大,并出现 3 个特征性的变化,即:早期即时基因的表达、蛋白合成增强、心肌细胞体积增大[7],心肌细胞反应性肥大是对高张力的适应性反应,一定程度上对机体有利,但长久持续机械刺激最终导致心力衰竭,高血压心脏病就是典型例子。本实验中,烧伤血清+缺氧条件下,牵张心肌细胞早期(1 h)就有细胞明显受损,有研究认为:机械牵张可导致膜的紧张性增大[8],机械刺激可直接导致膜局部出现破损,并认为是机械传导由胞外到胞内的必要条件[9];其次,缺血缺氧条件下,大量 ROS 及其相关产物可氧化细胞膜成分,致膜顺应性降低,细胞膜更容易为机械刺激损伤,这可能是缺氧牵张情况下,细胞活力下降,LDH、Ck 爆发性增高的重要原因;再者,机械张力通过整合素可影响细胞骨架[10],严重烧伤时,心肌细胞骨架破坏[11],细胞缺少内在骨架支撑也可能是心肌细胞坏死加重,活力下降的重要原因。此外,机械牵张激活 MAPK 信号通路可能也参与了心肌细胞的损伤。

综上所述,在烧伤血清+缺氧背景下,高牵张加重心肌细胞损害,为"休克心"提供另一佐证。但本实验仅是观察到一种现象,其确切机制仍须继续探讨。

参考文献:

[1] 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.

[2] 胡安根,黄跃生. c-jun 反义基因重组体转染对缺氧复合烧伤血清刺激下大鼠心肌细胞的保护作用[J]. 中华烧伤杂志,2003,19(5):267-270.

[3] 黄跃生. 重视缺血缺氧与细胞因子在"休克心"发生机制中的作用[J]. 中华烧伤杂志,2002,18(5):261-262.

[4] 梁晚益,杨宗城,黄跃生. $mtPLA_2$ 在严重烧伤早期心肌线粒体损害中的作用[J]. 第三军医大学学报,2002,22(3)210-212.

[5] 梁晚益,唐立新,杨宗城,等. 大鼠严重烧伤早期心肌线粒体 F0-F1ATPase 活性变化及其对能量代谢的影响[J]. 第三军医大学学报,2001,23(7)780-782.

[6] Keller R S, Shai S Y, Babbitt C J, *et al*. Disruption of integrin function in the murine myocardium leads to perinatal lethality, fibrosis, and abnormal cardiac performance[J]. Am J Pathol, 2001, 158(3): 1079-1090.

[7] Harada K, Komuro I, Shiojima I, *et al*. Pressure overload in auces cardiac hypertrophy in angiotensin II type 1A receptor knockout mice[J]. Circulation, 1998, 97(19): 1952-1959.

[8] Dai J, Sheetz M P. Regulation of endocytosis, exocytosis, and shape by membrane tension[J]. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1995, 60(5): 567-571.

[9] Grembowicz K P, Sprague D, McNeil P L, *et al*. Temporary disruption of the plasma membrane is required for c-fos expression in response to mechanical stress[J]. Mol Biol Cell, 1999, 10(4): 1247-1257.

[10] Davis M J, Wu X, Nurkiewicz T R, *et al*. Integrins and mechanotransduction of the vascular myogenic response[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001, 280(4): H1427-H1433.

[11] 黄跃生,杨宗城,迟潞湘,等. 烧伤后"休克心"的研究[J]. 中华烧伤杂志,2000,16(5):275-278.

(编辑 刘洪娥)

欢迎订阅《中南大学学报》

《中南大学学报(医学版)》原名《湖南医科大学学报》,为教育部主管、中南大学主办的医药卫生类综合性学术期刊。本刊是中国科技论文统计源期刊、中国生物医学核心期刊及中国期刊方阵的"双效"期刊;多次被国家和省部级新闻和出版部门评为优秀科技期刊;2004 年又获教育部全国高校优秀科技期刊(A 类期刊)评比二等奖;并已进入美国医学索引(IM, MEDLINE),荷兰医学文摘(EM),美国化学文摘(CA),美国生物学文摘(BA),中国科学引文索引(核心库)等多家国际国内知名检索系统。

本刊创刊于 1958 年,为双月刊,铜版纸彩色印刷,逢双月月末出版,A4 开本,国内外公开发行。定价:10 元,国内统一刊号:CN43-1427/R,国际标准刊号:ISSN 1672-7347;国内邮发代号:42-10,国外邮发代号:BM422;各地邮局(所)均可订阅,漏订者也可直接与本刊编辑部联系订阅。

地 址:湖南省长沙市湘雅路 110 号湘雅医学院 75 号信箱 邮 编:410078

电 话:(0731)4805495, 4805496 传 真:(0731)4804351

E-mail: xyxb@xysm.net Http://hnykdx.periodical.net.cn

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net