DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.17.019
第26卷第17期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 17
2004年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2004

文章编号:1000-5404(2004)17-1557-04

论著

机械牵张加重模拟缺血缺氧心肌细胞损伤的研究

李晓东[1],黄跃生[1],张东霞[1],蒋建新[2],粟永萍[3] (第三军医大学:[1]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]大坪医院野战外科研究所第四研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042,[3]预防医学院全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室;重庆 400038)

提 要:目的 验证机械牵张加重模拟缺血缺氧对心肌细胞的损伤效应。方法 利用所建立的心肌细胞体外牵张模型,模拟施加缺血缺氧因素,观察心肌细胞形态、培养液中乳酸脱氢酶(LDH)含量及碘化丙啶(PI)染色阳性细胞比例的变化。结果 10%牵张后,心肌细胞形态完整,LDH及PI染色阳性细胞比例无明显变化。模拟缺血缺氧后形态明显破坏,LDH及PI染色阳性细胞比例显著增加。牵张复合模拟缺血缺氧后,细胞形态破坏加剧,LDH含量急剧上升,PI染色阳性细胞比例进一步显著增加($P<0.01$)。结论 机械牵张加剧了模拟缺血缺氧对心肌细胞的损伤效应,提示严重烧伤早期过多过快补液导致心脏前负荷的迅速增加对心肌组织产生牵拉可能会加剧业已存在的心肌细胞损伤,从而进一步促进了心肌损害的发生。

关键词:心肌细胞;机械牵张;缺血/缺氧
中图法分类号:R363.11;R364.4;R542.202 文献标识码:A

Mechanical stretch aggravates cardiomyocyte injury caused by ischemia/hypoxia

LI Xiao-dong[1], HUANG Yue-sheng[1], ZHANG Dong-xia[1], JIANG Jian-xin[2], Su Yong-ping[3] ([1]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burn Research, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]State key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department 4, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042; [3]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To clarify if mechanical stretch aggravates cardiomyocyte injury caused by ischemia/hypoxia. **Methods** Cardiomyocytes were cultured *in vitro* and a uniaxial static mechanical stretch device was successfully manufactured. Lactate dehydrogenase (LDH) leaking, ratio of propidium iodide (PI) staining positive cells, and cardiomyocyte morphology were observed to test the effects of mechanical stretch cardiomyocytes exposed to simulated ischemia/hypoxia. **Results** Mechanical stretch (10%) resulted in no obvious changes of morphology of cardiomyocytes, LDH leakage and ratio of PI staining positive cells ($P>0.05$). When mechanical stretch and simulated ischemia/hypoxia were imposed on cardiomyocytes simultaneously, LDH leakage and ratio of PI staining positive cells increased greatly and cell morphology changed obviously ($P<0.01$). **Conclusion** Mechanical stretch may aggravate cardiomyocyte injury caused by ischemia/hypoxia, which may be another pathological cause of shock heart.

Key words: cardiomyocyte; mechanical stretch; ischemia/hypoxia

生物体本身处于外在的力学环境中,而生物体内部也保持着一种静态或动态的力学相互作用。研究表明,外在物理力和内部应力对于细胞生长、形态维持和分化起到了重要的作用。正常情况下,心脏内血流使心肌充盈,心腔扩张,对心肌产生一定的机械牵张刺激。严重烧伤早期由于缺血缺氧与炎症反应失控即发生了器质性心肌损害[1]。此时血容量的减少以及过多过快补液所造成的血容量迅速增加等血液动力学的急剧变化使心肌细胞所受到的牵张刺激发生变化。这种变化对于业已存在的心肌损害有何影响尚不清楚。我们推测,严重烧伤后早期缺血缺氧损害对心肌细胞造成损伤的基础上,血液动力学的变化(机械刺激)可能

基金项目:国家杰出青年科学基金资助项目(30125040),国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054202);创伤烧伤复合伤国家重点实验室开放课题基金资助项目(200304)
Supported by the National Science Fund for Young Distinguished Scholars (30125040), the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects), and the Funds for State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury (200304)
作者简介:李晓东(1976-),男,河南省郑州市人,硕士,医师,主要从事烧伤早期脏器损害方面的研究。电话:(023)66838583,E-mail:lixiaodong1976@hotmail.com
通信作者:黄跃生,电话:(023)68754173
收稿日期:2004-02-08;修回日期:2004-06-15

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

会加重这种损伤。为了验证这一设想，本研究建立了体外培养的心肌细胞机械牵张模型，并施加缺血缺氧损伤因素，模拟严重烧伤早期过多过快补液导致心脏前负荷的迅速增加对心肌组织产生牵拉这一临床现象，明确机械因素对缺血缺氧损害心肌细胞的作用，从而进一步明确阐明烧伤早期心肌损害发生发展的机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料与试剂

SD 乳鼠（本校实验动物中心），DMEM/F12 培养基（Gibco 公司），标准胎牛血清（Hyclone 公司），FITC 标记的 Phalloidin（Sigma 公司），荧光显微镜（Olympus 公司），5-溴-2-尿嘧啶脱氧核苷（Brdu）（Sigma 公司）。

1.2 心肌细胞原代分离与培养

按文献[2]方法，取出生 1～2 d 的 SD 乳鼠 30 只（本校实验动物中心），无菌条件下取出乳鼠心脏，去除心房后剪碎心室组织，并用质量浓度 0.125% 胰蛋白酶消化成单细胞悬液。细胞经离心、洗涤后加入含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基中，37 ℃、体积分数 5%CO_2 孵育 1 h。去除间质细胞将未贴壁的心肌细胞按 1×10^6/ml 接种于预先以胎牛血清表衬的硅酮膜上，置于培养皿中，24 h 后换液 1 次。此后每隔 2 d 及实验干预前换液。

1.3 细胞的牵张刺激与模拟缺血缺氧培养

参照 Sadoshima 等[3]介绍的方法，对培养心肌细胞施加固定牵张刺激，牵张刺激强度以拉长硅酮膜 10% 作为标准。实验分 3 组，分别 10% 牵张组（Sketch，S）、模拟缺血缺氧培养组（Ischemia/hypoxia，I）、10% 牵张＋模拟缺血缺氧培养组（Ischemia/hypoxia＋sketch，IS）。未刺激前作为对照组。

缺氧依靠在密闭容器中充入预先配制好的混合气体进行。密闭容器作为缺氧培养装置。混合气体配方为：95% N_2、5% CO_2，由重庆朝阳气体有限公司配制。将混合气体以 10 L/min 流量充入密闭容器，持续 10 min，同时关闭进气口和出气口，容器内氧终浓度为 1%。缺血为缺氧刺激前更换培养液时将培养液换成无糖的 DMEM/F12 培养液，模拟缺血环境[4]。

1.4 免疫荧光染色

刺激因素去除后，进行免疫荧光染色。－20 ℃甲醇固定 3 min 后 TBS 清洗，以含 0.5% Triton X-100 的 TBS 液温育打孔 10 min，TBS 漂洗后 2% 牛血清白蛋白封闭 10 min。以含有 phalloidin-FITC 的封闭液 37 ℃水浴中闭光（以下同）孵育 30 min 对 F-actin 进行荧光标记。TBS 漂洗后封片行激光共聚焦检测。

1.5 培养液中 LDH 测定

施加刺激因素后收集培养上清，按南京建成检测试剂盒说明书加下列样品：丙酮酸、标准品（样品）、双蒸水、基质缓冲液辅酶溶液，混匀，37 ℃水浴 15 min，再加入 2,4-二硝基苯肼溶液，混匀，37 ℃水浴 15 min，最后加入 0.4 m 氢氧化钠溶液，混匀，室温放置 3 min，440 nm，蒸馏水调零，测各管吸光度。LDH 活力＝（测定管－测定空白管）/（标准管－标准空白管）×2 000（U/L）。

1.6 心肌细胞 PI 染色阳性率检测

取爬片贴壁的心肌细胞，实验前 PBS 洗 2 遍，更换培养液。施加实验刺激因素，PBS 洗两遍。以 PI 荧光染液于 37 ℃染色 20 min，荧光显微镜下见部分心肌细胞核红染明显后及时以 PBS 漂洗 3 次，彻底去除 PI 残余后于荧光显微镜下观察照相。

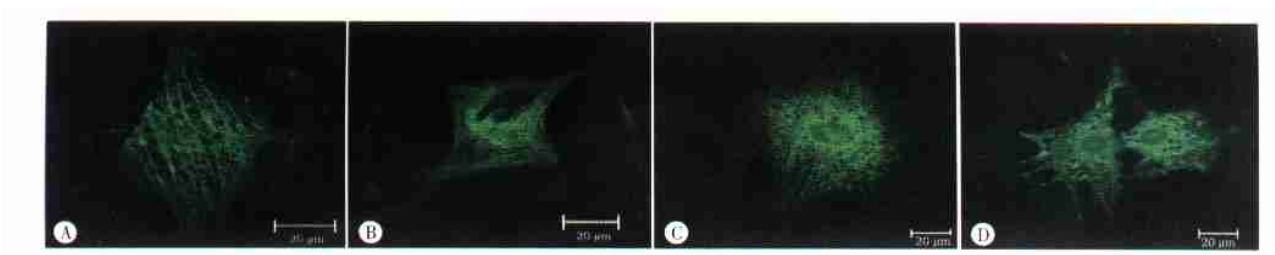
1.7 统计学处理

采用 SPSS10.0 统计学软件进行重复测量的方差分析、多重比较及独立样本的 t 检验，所有数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。

2 结果

2.1 不同刺激因素对心肌细胞形态的影响

在激光共聚焦显微镜下，正常心肌细胞呈梭形或不规则形（图 1A）。牵张 3 h 后细胞形态完好，与周边分界清楚，细胞铺展面积增加，局部呈增强趋势（图 1B）；模拟缺血缺氧 3 h 细胞完整性即出现破坏，周边毛糙不规则，细胞膜完整性受损，细胞内出现空泡（图 1C）；10% 牵张＋缺血缺氧 3 h 细胞外形破坏明显，细胞形态不规则，胞浆内见空泡，微丝结构几乎完全破坏（图 1D）。



A: Normal control group; B: Group S at 3 h; C: Group I at 3 h; D: Group IS at 3 h

图 1 心肌细胞形态

Fig 1 Morphology of cardiomyocyte

2.2 不同刺激因素对心肌细胞铺展面积及长度的影响

正常心肌细胞牵张后细胞面积增加，10% 牵张 3、12 h 后细胞面积明显增大（$P<0.05$）。模拟缺血缺氧培养下，细胞出现收缩，面积变小。模拟缺血缺氧牵张 12 h 后细胞面积明显变小（$P<0.01$）。细胞长度在牵拉后也呈增加趋势，其中以牵张 12 h 增加最为明显（$P<0.05$）。10% 牵张＋模拟缺血缺氧后细胞长度缩短，但统计学意义不明显。细胞面积长度比总体上呈牵张后增加，10% 牵张＋缺血缺氧后变小趋势（表 1）。

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

表 1　不同刺激对心肌细胞面积、长度的影响

Tab 1　Effects of different stimuli on cell area and length

	Area ($\bar{x}\pm s$)	Length ($\bar{x}\pm s$)	Area:length
Normal	11 249.1±1 704.2	208.7±21.2	53.71
S 3	13 532.3±1 429.7 *#	227.3±16.1 *	59.15
S 12	13 776.8±2 944.2 *#	249.6±24.9 *	56.01
I 3	10 989.5±2 381.4	206.4±24.8	53.26
I 12	10 007.9±2 034.8	204.8±20.7	48.69
IS 3	10 462.4±1 880.1	198.7±12.7	52.58
IS 12	8 763.4±1 537.6 **	202.1±16.0	43.56

The value of area and length were the number of pixels. $F=11.364$; *: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* normal; #: $P<0.05$; ##: $P<0.01$, *vs* group IS

2.3　不同刺激因素对细胞培养液 LDH 含量的影响

正常离体培养的心肌细胞培养液中 LDH 含量低, 其含量变化随时间约成线性关系。10%牵张后 LDH 升高不明显, 与正常组无明显差异($P>0.05$)。缺血缺氧后 LDH 升高趋势明显, 1、3 h 高于正常对照组, 6、12 h 升高更加明显($P<0.01$)。10%牵张+缺血缺氧组 LDH 急剧升高, 各个时相点均显著高于正常组($P<0.01$), 且与其它各组比较均明显增高($P<0.01$), 见表 2。

2.4　不同刺激对 PI 染色阳性心肌细胞比例的影响

正常情况下离体培养的心肌细胞 PI 染色阳性数目极少。10%牵张 12 h 后 PI 染色阳性心肌细胞比例无明显变化, 与正常相比无显著差异 ($P>0.05$)。模拟缺血缺氧组 PI 染色阳性心肌细胞比例明显增加, 3、12 h 均显著高于正常组($P<0.01$)。10%牵张+模拟缺血缺氧组 PI 染色阳性心肌细胞比例明显增加, 3、12 h 均高于正常, 且明显高于其它各组($P<0.01$)(表 3)。图 2 为同一视野光镜、荧光显微镜图像合成。

表 2　不同刺激因素对细胞培养液 LDH 含量的影响(单位: IU/L)

Tab 2　Effects of different stimuli on LDH concentration

Group	Time of stimulation (h)				
	0	1	3	6	12
Normal	0	157.4±40.5	376.0±38.4	615.9±62.1	710.6±59.5
S	0	171.2±28.6 #	394.0±45.5 #	580.7±50.8 #	744.4±66.7 #
I	0	280.1±38.8 *#	474.3±50.5 *#	1054.7±61.2 **#	1877.2±173.0 **#
IS	0	5496.6±478.8 **	6078.5±359.7 **	6903.5±421.3 **	8142.9±562.7 **

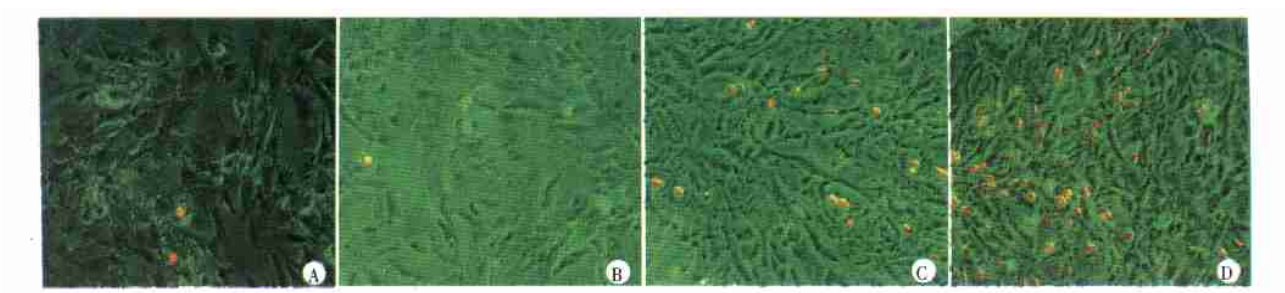
*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* normal; #: $P<0.05$, *vs* group IS

表 3　不同刺激因素对 PI 染色阳性心肌细胞比例的影响(%)

Tab 3　Effects of different stimuli on the ratio of PI staining positive cells (%)

Group	Before stimulation	Time of stimulation (h)	
		3	12
S	0.53	0.55 #	0.54 #
I		3.2 *#	12.7 *#
IS		10.2 *	28.9 *

*: $P<0.01$, *vs* before stimulation; #: $P<0.01$, *vs* group IS



A: Normal control group; B: Group S at 12 h; C: Group I at 12 h; D: Group IS at 12 h

图 2　PI 染色阳性心肌细胞　(×200)

Fig 2　PI staining of cardiomyocyte　(×200)

3　讨论

3.1　模拟缺血缺氧条件的选择

在本研究中, 我们选择以缺血缺氧模拟烧伤后心肌损害的主要致病因素, 主要基于以下考虑: 缺血缺氧损伤是严重烧伤后脏器功能受损的根本原因, 心脏亦不例外。烧伤后 30 min 可使心肌营养性血流量减少 15%, 12 h 后减少 60%, 24 h 仍低于正常水平, 表明严重烧伤早期心脏血供已有明显减少。同时, 低灌流及红细胞破坏所造成的缺氧亦同时并存。然而, 严重烧伤后心肌细胞外周的确切氧浓度或氧分压并不清楚, 选用何种程度的氧浓度作为烧伤后心肌缺氧的参数国内外亦无相应的资料可供借鉴。正常情况下, 组织液的氧分压一般为 20 mmHg。而目前国内外学者在心肌细胞低氧性损害研究中大多采用正常大气压下 1%的氧浓度作为缺氧的具体参数[5,6], 依此计算 心肌细胞培养液中氧分压约为 7.6 mmHg。因此, 我们参照文献[7], 利用缺氧装置进行置换充气后, 采取密闭容器中的细胞培养液进行分析, 证实了培养液中氧分压约为 7~8 mmHg(培养液中 pH 值也在缺氧期间无明显变化)。所以, 本研究同样采用了 1%的氧浓度作为心肌细胞缺血缺氧损伤研究的氧浓度标准。

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

3.2 机械牵张加重缺血缺氧对心肌细胞形态的破坏

在本研究的细胞模型中，10%牵张组细胞表现出铺展面积的增加，微丝发生与受力方向相关的重排，局部呈增强趋势，细胞形态完整无破坏，随时间延长，此趋势更加明显，与文献[8]报道相一致，提示了机械牵张促进细胞合成代谢，导致细胞肥大的作用。模拟缺血缺氧3 h细胞内出现空泡，微丝部分破坏，细胞完整性受损；随时间延长，空泡明显增多变大，微丝结构几乎完全破坏，表明损伤随时间延长而加重。10%牵张＋模拟缺血缺氧3 h时细胞形态变化即非常明显，细胞完整性破坏，边缘毛糙不规则。上述研究结果表明，机械牵张明显加剧了模拟缺血缺氧心肌细胞形态的破坏作用明显。相应地，形态的显著变化必然伴随着细胞生理功能的异常。

3.3 机械牵张加重模拟缺血缺氧对心肌细胞(膜)的损伤

研究结果显示，10%牵张＋模拟缺血缺氧时培养液中LDH含量爆发性上升，远远超过缺血缺氧造成心肌细胞损伤时LDH的释放。虽然，胞浆内酶的释放可能与漏出、胞吐(exocytosis)及膜泡脱落(shedding of membrane blebs)几种方式有关[9]，与细胞(膜)的可逆性损伤及不可逆性损伤都有密切的关系，但大量的爆发性的酶释放则几乎完全与细胞膜的严重破坏有关(这也与我们实验中PI染色阳性细胞数目的明显增多相一致)。发生这种现象可能与缺血缺氧造成心肌细胞广泛的膜受损或脆性增强，对机械牵张的耐受下降有关；也可能与在缺血缺氧情况下机械牵张造成的细胞大量死亡，胞内物质大量释放有关。而且，上述两种也可能同时存在[10]。10%牵张刺激时PI染色阳性心肌细胞比例与正常无明显差别；缺血缺氧后阳性率才明显上升；10%牵张＋模拟缺血缺氧时PI染色阳性心肌细胞比例更加显著的上升表明复合刺激对细胞的破坏极其严重，这与模拟缺血缺氧组存在显著差异。由于PI只能进入细胞膜有严重损伤的细胞内，因此对发生不可逆损伤的细胞可以标记，而活细胞基本不着色。所以PI染色阳性心肌细胞比例的显著增加则明确提示了机械牵张加剧了模拟缺血缺氧造成的不可逆性细胞损伤。

以上研究结果初步表明，机械牵张加重了模拟缺血缺氧对离体培养心肌细胞的损伤，证实了我们的设想。在模型较好的模拟了严重烧伤后体内情况的基础上，我们进一步推测，严重烧伤早期过多过快补液导致心脏前负荷的迅速增加对心肌组织产生牵拉，这种机械因素可能会加剧业已存在的由低血容量所造成缺血缺氧性心肌细胞损伤，从而进一步促进了心肌损害的发生。这对于阐明严重烧伤早期心肌损害的发生发展机制及其防治具有重要意义。

参考文献：

[1] Huang Y S, Li Z Q, Yang Z C. Roles of ischemia and hypoxia and the molecular pathogenesis of post-burn cardiac shock[J]. Burns, 2003, 29(8): 828－833.

[2] Chlopcikova S, Psotova J, Miketova P. Neonatal rat cardiomyocytes-a model for the study of morphological, biochemical and electrophysiological characteristics of the heart[J]. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomuc Czech Repub, 2001, 145(2): 49－55.

[3] Jun-ichi Sadoshima, Lothar Jahn, Toshiyuki Takahashi. Molecular characterization of the stretch-induced adaptation of cultured cardiac cells[J]. J Biol Chem, 1992, 267(15): 10551－10560.

[4] Katrina Mackay, Daria Mochly-Rosen. Arachidonic acid protects neonatal rat cardiac myocytes from ischaemic injury through protein kinase C[J]. Cardiovas Res, 2001, 50(1): 65－74.

[5] Yue T L, Wang C, Gu J L. Inhibition of extracellular signal-regulated kinase enhances Ischemia/Reoxygenation-induced apoptosis in cultured cardiac myocytes and exaggerated reperfusion injury in isolated perfused heart[J]. Circ Res, 2000, 86(6): 692－699.

[6] Katrina M, Daria M R. An inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase protects neonatal cardiac myocytes from ischemia[J]. J Biol Chem, 1999, 274(10): 6272－6279.

[7] Cavalli A L, Ligutti J A, Gellings N M. The Role of TNFα and sphingolipid signaling in cardiac hypoxia: evidence that cardiomyocytes release TNFα and sphingosine[J]. Basic Appl Myol, 2002, 12(4): 167－175.

[8] Mann D L, Kent R L, Cooper G. Load regulation of the properties of adult feline cardiocytes: growth induction by cellular deformation[J]. Circ Res, 1989, 64(6): 1079－1090.

[9] Monika Hiiser, Emilia Stegemann, Helmut Kamrnermeier. Is enzyme release a sign of irreversible injury of cardiomyocytes[J]? Life Sci, 1996, 58(7): 545－550.

[10] Skobel E, Kammermeier H. Relation between enzyme release and irreversible cell injury of the heart under the influence of cytoskeleton modulating agents[J]. Biochim Biophys Acta, 1997, 1362(2-3): 128－134.

(编辑 汪勤俭)

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