DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.16.014
第26卷第16期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 16
2004年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2004

文章编号:1000-5404(2004)16-1455-04

论著

Phalloidin对机械牵张复合模拟缺血缺氧心肌细胞MHCmRNA表达的影响

李晓东,黄跃生,袁志强,粟永萍,蒋建新 (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)

提 要:目的 探讨肌动蛋白细胞骨架稳定剂鬼笔槐酞(Phalloidin)对机械牵张复合模拟缺血缺氧损伤心肌细胞肌球蛋白重链(myosin heavy chain,MHC)mRNA表达的影响。方法 建立离体培养的心肌细胞机械牵张模型,并施加无糖缺氧刺激因素,模拟烧伤后缺血缺氧损害。采用RT-PCR方法检测phalloidin对心肌细胞MHCmRNA表达的影响,并利用凝胶分析软件对PCR结果进行分析。结果 10%牵张导致MHCmRNA由α型、β型表达均增加,且以β型增加为主。模拟缺血缺氧时MHCmRNAα型减少,β型增多后下降。10%牵张+模拟缺血缺氧时,α型、β型变化加剧,随刺激时间的延长转化加剧,12 h后,α型、β型MHCmRNA表达均下调($P<0.01$、$P<0.05$)。应用Phalloidin后,显著改善了10%牵张+模拟缺血缺氧时α型向β型的异常转化。结论 机械牵张进一步加剧了模拟缺血缺氧对MHC基因表达由α型向β型的异常转化及下调,肌动蛋白细胞骨架稳定剂Phalloidin对其有一定的保护作用。

关键词:心肌细胞;缺血;缺氧;MHC;细胞骨架
中图法分类号:R322.11;R394.2;R977 文献标识码:A

Phalloidin stabilizes MHC gene expression of cardiomyocyte treated by mechanical stretch in combination with ischemia and hypoxia

LI Xiao-dong, HUANG Yue-sheng, YUAN Zhi-qiang, SU Yong-ping, JIANG Jian-xin (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of phalloidin on MHC gene expression of cardiomyocyte treated by static stretch in combination with ischemia and hypoxia *in vitro*. **Methods** Cardiomyocytes were cultured *in vitro* and stimulated by mechanical stretch in combination with ischemia and hypoxia. Before and after addition of phalloidin into culture media, the changes of MHC gene expression was detected by RT-PCR and analysis were carried out using gel image analysis software. **Results** Static mechanical stretch on cells resulted in an increase of both α and β MHC, but β-MHC increased more obviously. In cells treated with ischemia and hypoxia, changes of MHC gene changing from α to β accelerated. At 12 h after treatment, the sum of α and β mRNA expressions were down regulated. When static mechanical stretch was added in cells treated with ischemia and hypoxia, the change from α to β exaggerated. The expression of the two genes decreased at 12 h after treatment. In phalloidin treatment group, MHC genes maintained normal expression to some extent in contrast with the former group. **Conclusion** Mechanical stretch combined with ischemia and hypoxia down-regulates MHC gene expression in cardiomyocytes, which might be one of the factors leading to cardiac dysfunction during the early stage after burn, and phalloidin can alleviate the changes to a certain extent.

Key words: cardiomyocyte; ischemia; hypoxia; myosin heavy chain; cytoskeleton

机械转导机械感受功能是近年来的一个研究热点,心肌细胞、成骨细胞、内耳毛细胞均能对机械刺激发生反应并导致细胞内部结构与功能诸如生长、分化、牵移、基因表达、蛋白质合成和凋亡等变化[1]。随着研究的深入,有证据表明,肌动蛋白所构成的细胞骨架在机械信号转导中起到了重要作用。严重烧伤早期发生的器质性心肌损害即"休克心"表现为细胞结构破坏、细胞骨架损伤、心肌细胞功能下降等[2]。此时的心脏在接受大量快速补液时,前负荷的迅速提高会对心肌产生机械牵拉作用。在严重缺血缺氧时,细胞及其骨

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、烧伤与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), National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects) (G1999054202), and the Open Research Foundation 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,硕士研究生,医师,主要从事烧伤早期脏器损害方面的研究。电话:(023)68754173,E-mail:lixiaodong1976@hotmail.com
通信作者:黄跃生,电话:(023)68754173
收稿日期:2004-01-20;修回日期:2004-04-10

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

架结构已经受损的基础上，细胞接受机械刺激后其反应如何？研究这种病理生理情况下的变化对于“休克心”的防治有重要意义。本研究旨在探讨心肌细胞在模拟缺血缺氧条件下接受机械牵张刺激时心肌细胞肌球蛋白重链(myosin heavy chain，MHC)基因表达的改变，并施加细胞骨架稳定剂，研究肌动蛋白骨架在其中的作用，以期进一步探明烧伤后早期心肌损害的机制，并为临床防治提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料与试剂

出生1～2 d龄SD大鼠(本校实验动物中心)，DMEM/F12培养基(Gibco)，标准胎牛血清(Hyclone)，山羊抗大鼠desmin一抗(Santa Cruz)，荧光显微镜(Olympus)，5-溴-2-尿嘧啶脱氧核苷(Brdu)(Sigma)，二步法RT-PCR试剂盒(Takara)，DEPC(Roche)，Quantity One V4.4凝胶图像分析软件，PCR反应扩增仪(Gene AmpPCR System 9600)(美国)，phalloidin(Sigma)，测氧仪(Vascular Technology；Bradford，MA)。

1.2 心肌细胞原代分离与培养

取1～2 d龄SD大鼠，无菌条件下取出心脏，去除心房后剪碎心室组织，用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培养基种植于培养瓶内，37 ℃、5%CO_2孵箱中培养60 min，去除间质细胞后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

参照文献[3]，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。将培养皿分为4组，分别为10%牵张组(sketch，S)、模拟缺血缺氧培养组(simulated ischemia+ hypoxia，I)及10%牵张+模拟缺血缺氧培养组(sketcht simulated ischemia+hypoxia，IS)、phalloidin干预组。未刺激前为对照(N)。各组分别于刺激后1、3、6、12 h收取标本检测。

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%。缺氧刺激前将培养液换成无糖的DMEM/F12培养液，模拟缺血环境[4]。

1.4 Phalloidin干预

溶解phalloidin于二甲基亚砜形成1 mmol/L溶液，－20 ℃备用。施加牵张及缺血刺激前15 min，更换无糖培养液时加入phalloidin至终浓度为1 μmol/L。

1.5 MHC mRNA的RT-PCR分析

施加实验刺激因素，按Tripure试剂使用说明，提取乳鼠心肌细胞总RNA并计算其浓度。引物序列：内参照β-actin5′-CAGTAACAGTCCGCCTAGAA-3′(上游)，5′-GATTACTGCTCTGGCTCCTA-3′(下游)，片段长度175 bp；β-MHC 5′-GTGGACGTTTATTGACTTCGG-3′(上游)，5′-TTCTTTGCTTTGCCTTTGC-3′(下游)，片段长度399 bp；α-MHC 5′-AAACCTGAGGACCACCCAT-3′(上游)，5′-TCTTTGACTCGCCCGAACT-3′(下游)，片段长度603 bp。依二步法RT-PCR试剂盒说明加样后将样品置于PCR反应仪，反转录条件为60 ℃，30 min。94 ℃变性4 min，94 ℃变性30 s、55 ℃退火30 s、68 ℃延伸45 s(35次循环)，68 ℃最后延伸7 min。产物检测：取15 μl PCR产物与1 μl上样缓冲液均匀混合行电泳，凝胶照相后，用Gel Doc 2000凝胶图像分析系统进行扫描，Quantity One V4.4凝胶图像分析软件分析扫描结果，分别测定目的基因条带α-MHC、β-MHC与β-actin带的光密度值。用目的条带光密度值/β-actin光密度值的比值反映目的基因的相对表达量，比值越大，目的基因在细胞内表达的相对含量越多。

1.6 统计分析

所有数据以$\bar{x}\pm s$表示，采用SPSS10.0统计学软件进行重复测量的方差分析及多重比较。

2 结果

2.1 MHC mRNA RT-PCR电泳结果

正常情况下β-MHC mRNA表达弱，α-MHC mRNA表达较强。10%牵张组(图1)，β-MHC mRNA表达呈逐渐增强趋势，α-MHC mRNA亦有增强。模拟缺血缺氧组(图2)β-MHC mRNA表达呈现为先升后降，6 h点表达最强；α-MHC mRNA呈下降趋势。10%牵张复合模拟缺血缺氧组(图3)β-MHC mRNA表达峰值出现于3、6、12 h下降明显；α-MHC mRNA亦表现为下降。Phalloidin干预10%牵张复合模拟缺血缺氧组表现为α-MHC mRNA表达下降减慢及β-MHC mRNA波动减小(图4)。

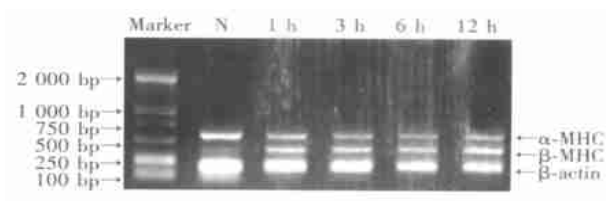


图1 10%牵张对MHC mRNA表达的影响

Fig 1 MHC mRNA expression in group S

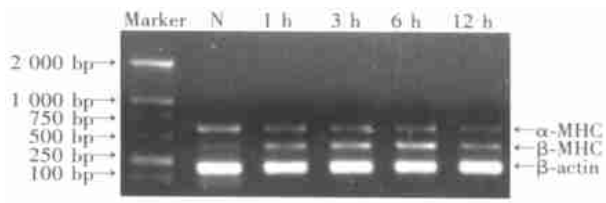


图2 模拟缺血缺氧对MHC mRNA表达的影响

Fig 2 MHC mRNA expression in group I



图3 10%牵张+模拟缺血缺氧对MHC mRNA表达的影响

Fig 3 MHC mRNA expression in group IS

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

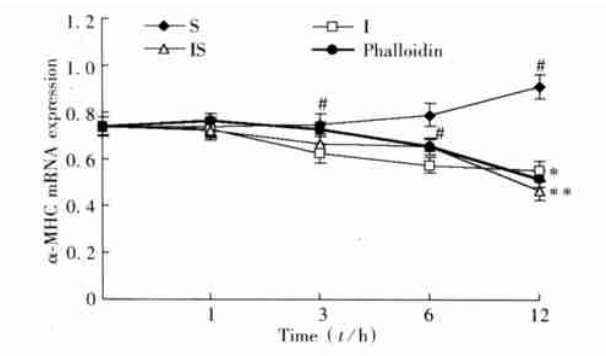


图 4　phalloidin 对 10%牵张+模拟缺血缺氧 MHC mRNA 表达的影响

Fig 4　Effects of phalloidin on MHC mRNA expression in group IS

2.2　两型 MHC mRNA 相对表达量折线图

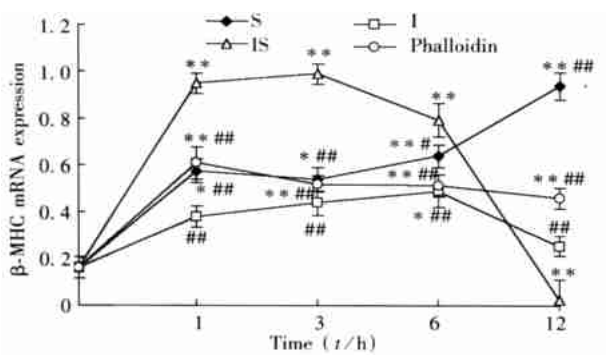
上述电泳图采用凝胶图像分析软件 Quantity One V4.4 分析各目的条带相对表达量后依各数值做出不同因素作用下两型 MHC mRNA 相对表达量变化折线图(图5、6)。



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

图 5　不同因素对 α-MHC mRNA 表达的影响

Fig 5　Effects of different factors on α-MHC mRNA expression



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

图 6　不同因素对β-MHC mRNA 表达的影响

Fig 6　Effects of different factors on β-MHC mRNA expression

由折线图可见: 10%牵张导致 MHC mRNA 由α型、β 型表达均增加, 且以β 型增加为主。模拟缺血缺氧时 MHC 由α型向β型的转化加速, 12 h 后心肌细胞α型 MHC mRNA 表达下调明显($P<0.05$)。10%牵张+模拟缺血缺氧时,α 型向β 型的转化更加明显, 表达峰提前, 12 h 时相点α型、β 型MHC mRNA 表达均下调。Phalloidin 干预 10%牵张+模拟缺血缺氧组后, 与后者比较,α型 MHC mRNA 表达下降速度减慢, 总体水平高于未干预组;β 型 MHC mRNA 表达峰值降低, 12 h 与正常无显著差异($P<0.05$)。

3　讨论

细胞骨架是由微管, 微丝, 中间丝蛋白相互交织所形成的网络结构。其介导的机械力和细胞功能之间的联系是细胞机械感受与转导的研究热点。关于其机制有许多解释, 较有影响的是张力整合结构理论(tensegrity theory)[5]。该理论认为: 细胞膜上的粘附分子作为机械感受器, 细胞内细胞骨架蛋白被视为是由胞膜及注入其中的粘性胞浆所包绕的刚性结构, 由多种成分形成网络, 可以做为机械信号由胞膜到胞核的主要转导通路。力学传递的效率由细胞骨架及胞核的机械特性所决定。phalloidin 是从有毒菌类 Amanita phalloides 中提取出来的一种真菌毒素, 它能与 actin 多聚体及寡聚体特异性的结合, 导致其异常稳定。我们利用 phalloidin 能够与心肌细胞中非肌节型微丝特异性的结合[6] 并使之稳定, 研究其对缺血缺氧性心肌细胞损伤的保护作用。

心脏表达 MHC 有α、β 两种亚型, 两者的基因串联排列在染色体 14q11.2~q13 上, 依电泳泳动速率递减顺序分 3 种同工型: V1 (αα), V2 (αβ), V3 (ββ)。正常哺乳动物和人的心室肌球蛋白异构体的分布与种属、年龄等因素有关。成年人左心室心肌肌球蛋白以 V3 为主占 60%~90%, 而小哺乳类动物左心室心肌肌球蛋白以 V1 为主占 60%~90%, 人类和哺乳类小动物心房肌球蛋白以 V1 为主。含 V1 的心肌纤维具有高效的三酸腺苷 (ATP)酶活性和有力的肌纤维收缩, V3 则相反。α-亚型 ATP 酶活性较β-亚型高 3~4 倍, 心脏α-亚型表达较多, 有较快的收缩速度。动物实验证实α-亚型向β-亚型转换可作为衰竭心肌的分子生物学标志物。

超负荷刺激引起大鼠心肌肥厚可诱导左心室β-MHC 基因表达及 V3 肌球蛋白增多。利用乳鼠分离培养的心肌细胞, 在体外进行机械牵张与心肌肥厚的实验研究表明, 机械牵张引起大鼠心肌细胞 MHC mRNA 表达增高。Shyu 等[7] 用 Northernblot 分析研究了分离培养的乳鼠心肌细胞周期性牵张对 MHC mRNA 表达的影响, 与对照组相比显示在不同时相点 MHC mRNA 最高增加了 12 倍。本实验中, 静态机械牵张导致α、β-MHC mRNA 均增高, 且以β 型增高为主与此相似。

Pissarek[8] 等在慢性低氧大鼠模型研究中发现, 在蛋白水平大鼠左、右心室都有一个明显的α-MHC 向β-MHC 的转换。本实验中, 单纯无糖缺氧培养时α-MHC mRNA 向β-MHC mRNA 的转化异常明显, 于 6 h 达到高峰, 其后下降。

10%牵张刺激时,α、β-MHC mRNA 均增高, 随着时

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

间延长，心肌细胞将向肥大方向展；无糖缺氧培养时，α-MHC mRNA 持续性下降，β-MHC mRNA 缓慢升高后下降可能与细胞自身的代偿机制有关：缺氧初始，细胞受损伤尚较轻，代偿机制尚完善，MHC mRNA 由α型向β型转换。随着时间延长，缺氧加重后，损伤超过细胞自身代偿功能，致使β-MHC mRNA 的表达亦下调；机械牵张复合缺血缺氧刺激时，MHC mRNA 的变化首先表现为机械刺激的特点：α、β-MHC mRNA 均有增高，3 h 达到高峰。其后缺氧因素占据主导，二型 MHC mRNA 均表现为下降。值得指出的是，机械牵张复合缺血缺氧刺激12 h 后二型MHC mRNA 表达量均低于单纯缺氧组，表明了机械牵张加剧了缺血缺氧对心肌细胞 MHC-mRNA 表达的下调作用。

烧伤后“休克心”的机制较为复杂，我们的研究证明，缺血缺氧与炎症反应失控是“休克心”的主要因素[9]。但伤后早期大量快速补液引起的心脏容量负荷迅速增加会对缺血损伤的心肌形成机械牵拉，其是否在“休克心”的发生中起作用尚少有报道。本实验在细胞水平模拟了严重烧伤早期缺血缺氧损害时大量快速补液的病理生理背景，研究结果显示：缺血缺氧条件下机械牵张导致α-MHC mRNA 呈一过性轻度升高后迅速下降，12 h 明显低于正常水平；β-MHC mRNA 增高一度明显，3 h 达到高峰，12 h 后明显下降。由于 MHC mRNA 水平与细胞收缩功能联系的一致性，可以认为，其mRNA 水平代表了心肌细胞的收缩功能。因此，机械牵张加剧缺血缺氧时心肌细胞 MHC mRNA 表达的下调，就提示了机械牵张加剧缺血缺氧对心肌收缩功能的损害，从而进一步导致严重烧伤早期器质性心肌损害即“休克心”的发生。

缺血缺氧时心肌细胞的骨架蛋白受到破坏，其机械转导功能必将出现异常。据此，我们对之进行调控，在施加破坏性的缺血缺氧因素前事先加入 phalloidin 这一肌动蛋白骨架稳定剂，利用其不可逆地与 F-actin 结合的特性预先保护细胞骨架，验证肌动蛋白骨架在 MHC mRNA 表达中的作用。结果显示，加入 phalloidin 后，能明显抑制机械牵张复合缺血缺氧对 MHC mRNA 表达的影响，其表达 12 h 时仍较接近正常水平。该结果提示，肌动蛋白细胞骨架与 MHC mRNA 的表达相关，以其稳定剂保护缺血缺氧等因素对骨架的破坏可以有效地抑制 MHC mRNA 的异常转化，有利于细胞正常功能的维持，从而为心肌损害的防治提供了新的思路。

参考文献：

[1] Meyer C J, Alenghat F J, Rim P, *et al*. Mechanical control of cyclic AMP signalling and gene transcription through integrins[J]. Nat Cell Biol, 2000, 2(9): 666-668.

[2] 黄跃生. 烧伤后“休克心”与早期损害[J]. 中国医师杂志, 2002, 4(2): 120-121.

[3] Yost M J, Simpson D, Wrona K. Design and construction of a uniaxial cell stretcher[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000, 279(6): H3124-H3130.

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

[5] Ingber D E. tensegrity: the architectural basis of cellular mechanotransduction[J]. Annu Rev Physiol, 1997, 59: 575-599.

[6] Yang X, Salas P J, Pham T V, *et al*. Cytoskeletal actin microfilaments and the transient outward potassium current in hypertrophied rat ventriculocytes[J]. J Physiol, 2002, 541(Pt 2): 411-421.

[7] Shyu K G, Chen J J, Shih N J, *et al*. Regulation of human cardiac myosin heavy chain genes by cyclical mechanical stretch in cultured cardiocytes[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1995, 210(2): 567-573.

[8] Pissarek M, Bigard X, Mateo P, *et al*. Adaptation of cardiac myosin and creatine kinase to chronic hypoxia: role of anorexia and hypertension[J]. Am J Physiol, 1997, 272(4 Pt 2): H1690-H1695.

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

（编辑 汪勤俭）

欢迎订阅《中华创伤骨科杂志》

《中华创伤骨科杂志》(CN 44-1568/R, ISSN 1671-7600)是国家级创伤骨科学术性期刊，国内外公开发行，为中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)。于2004年3月被国际六大检索系统之一——俄罗斯《文摘杂志》收录。本刊以骨科、创伤外科及相关学科的临床、教学和科研人员为读者对象，着重报道创伤骨科的临床研究，介绍新理论、新业务、新技术、新进展，报道最新的研究成果，关注临床热点、难点、疑点问题，开展学术讨论。本刊为月刊，A4开本，每期120页，铜版纸印刷，每月15日出版，每期定价16元，由邮局发行，邮发代码国内46-268、国际Q1671。本刊编辑部全年接受征订邮购，全年192元(免邮费)。

地 址：广州市广州大道北1838号南方医院内《中华创伤骨科杂志》编辑部 邮 编：510515

电 话：(020)61641748 传 真：020-61360066 E-mail：cjot@fimmu.com

网 址：http://www.chinjot.com

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net