DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.01.028
第23卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 1
2001年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2001

文章编号:1000-5404(2001)01-0059-03

论著

模拟缺血-再灌注诱导原代培养乳鼠窦房结细胞凋亡的研究

钟 理,宋治远 (第三军医大学附属西南医院心血管内科,重庆 400038)

提 要:目的 模拟缺血-再灌注诱导培养窦房结细胞凋亡,为窦房结病变的病因研究与临床防治提供理论依据。方法 取Wistar乳鼠的窦房结组织进行原代细胞培养,随机分为3组:正常对照组;模拟单纯缺血组;模拟缺血-再灌注组。应用TUNEL法对凋亡细胞进行定性检测,并用流式细胞技术对凋亡细胞进行定量检测。结果 ①单纯缺血4、8、16 h以及缺血2、4、8、16 h后再灌注3 h各组均可见TUNEL阳性的窦房结细胞。②从单纯缺血4 h起,随缺血时间延长,窦房结细胞凋亡率显著增加;而缺血-再灌注组也较相同时间单纯缺血时窦房结细胞凋亡率显著增加。结论 单纯缺血及缺血-再灌注均可诱导乳鼠窦房结细胞凋亡,且随缺血时间延长,细胞凋亡率逐渐增加。

关键词:窦房结;细胞凋亡;缺血-再灌注;乳鼠
中图法分类号:R329.25;R654.2 文献标识码:A

Apoptosis of cultured sinoatrial node cells from neonatal rats induced by simulating ischemia and reperfusion

ZHONG Li, SONG Zhi-yuan (Department of cardiology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To explore apoptosis of cultured neonatal rat sinoatrial node (SAN) cells induced by ischemia and reperfusion for the theoretical basis of pathogenesis and prevention of SAN disorders. **Methods** Primary culture of isolated Wistar neonatal rat SAN cells were prepared and divided into 3 groups: control group, simulating ischemia group and ischemia-reperfusion group. Terminal deoxynucleotidyl-transferase mediated biotin-dUTP nick-end labeling (TUNEL) and flow cytometry (FCM) were used respectively to determine the apoptotic SAN cells qualitatively and quantitatively. **Results** ①TUNEL positive SAN cells were found after simulating ischemia for 4, 8, and 16 h or 2, 4, 8, and 16 h ischemia followed by 3 h of reperfusion. ②For cells in ischemia for 4 h or more, the number of apoptotic cells increased significantly in a time-dependent manner; and in ischmia reperfusion group, more cells were apoptosis than those in ischemia group for same ischemic time. **Conclusion** Both ischemia and ischemia-reperfusion can induce apoptosis of SAN cell in a time-dependent manner.

Key words: sinoatrial node; apoptosis; ischemia/reperfusion; rat

近年来的离体、在体研究均证实缺血-再灌注可诱导心肌细胞凋亡[1,2],但缺血-再灌注能否诱导窦房结细胞凋亡目前尚未见文献报道。我们成功培养了乳鼠窦房结(Sinoatrial node, SAN)细胞并进行形态学及电生理学鉴定[3],在此基础上进行窦房结细胞模拟缺血-再灌注研究,旨在观察缺血-再灌注能否诱导培养窦房结细胞凋亡,为窦房结病变的病因研究与临床防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与配制

模拟缺血溶液 mmol/L:NaCl 98.5 mmol/L、KCl 10 mmol/L、NaH_2PO_4 0.9 mmol/L、$NaHCO_3$ 6.0 mmol/L、$CaCl_2$ 1.8 mmol/L、$MgSO_4$ 1.2 mmol/L、乳酸钠 40 mmol/L、HEPES 20 mmol/L,pH6.8,37 ℃,预先用混合气(95%N_2-5%CO_2)饱合(PO_2< 4 kpa);模拟再灌注溶液:NaCl 129.5 mmol/L、KCl 5.0 mmol/L、NaH_2PO_4 0.9 mmol/L、$NaHCO_3$ 20 mmol/L、$CaCl_2$ 1.8 mmol/L、$MgSO_4$ 1.2 mmol/L、葡萄糖 55 mmol/L、HEPES 20 mmol/L,pH7.4 37 ℃,用时加10%胎牛血清。用模拟缺血溶液替换正常培养液即缺血,再用模拟再灌注溶液替换模拟缺血溶液即为再灌注。

1.2 实验分组与缺血-再灌注损伤模型

1.2.1 分组 新生24 h Wistar乳鼠(由第三军医大学实验动物中心提供),雌雄不拘,进行窦房结细胞纯化培养,以形态学及电生理学方法鉴定后进行分组实验[3]:①正常对照组。②模拟单纯缺血组:缺血0.5、1、2、4、8、16 h。③模拟缺血-再灌注组:缺血0.5、1、2、4、8、16 h后再灌注3 h。

1.2.2 模拟缺血-再灌注损伤模型的建立 模拟缺血-再灌注模型参照文献报道方法[1,3]进行,并加以改进,具体步骤如下:①窦房结细胞消化分离后接种到预先置有消毒盖玻片的24孔板上,或25 ml培养瓶中,进行窦房结细胞培养。5 d后倒置显微镜下随机计数100个细胞,选取梭形细胞占所有细胞60%以上的培养细胞进行实验。②模拟缺血:先将培养液吸弃,加入模拟缺血溶液。再将培养容器放入缺氧培养装置中,充入混合气(95%N_2-5%CO_2,由重庆三峡气体厂配制),流量10 L/min。用O_2-CO_2浓度检测仪测得O_2浓度< 1%时,同时关闭进气口与出气口,放入孵箱中培养。③模拟再灌注:从缺氧培养装置中取出培养容器,吸出模拟缺血溶液,加入模拟再灌注溶液,放回5%CO_2孵箱中培养。

1.3 检测方法

1.3.1 细胞凋亡的定性检测 应用原位末端标记(TUNEL)法,观察细胞核是否着色。细胞核呈棕黄色为TUNEL阳性细

基金项目:国家自然科学基金资助课题(39770324)
作者简介:钟 理(1972-),男,四川省简阳市人,硕士,医师,主要从事心脏电生理方面的研究。电话:(023)65427174
收稿日期:2000-09-16;修回日期:2000-12-05

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

胞，根据染色强度分为5级：(－)阴性；(±)淡棕色，弱阳性；(＋)阳性；(＋＋)棕色，中度阳性；(＋＋)褐色，强阳性。正常培养组(不模拟缺血)为阴性对照。

1.3.2 细胞凋亡的定量检测 将细胞消化后加入荧光素标记的Annexin-V与PI，用美国BD公司的FACS Calibuer型流式细胞仪分析检测。检测结果用BD公司CELLQuest程序分析处理。

1.4 数据的处理与分析

文中数据以$\bar{x}\pm s$表示，采用医用统计程序包SPLM软件进行双因素方差分析。

2 结果

2.1 TUNEL染色

正常对照组，单纯缺血0.5、1、2 h组，及缺血0.5、1 h后再灌注3 h组均未见胞核阳性着色；而单纯缺血4、8、16 h以及缺血2、4、8、16 h后再灌注3 h各组均可见胞核呈棕黄色阳性着色的窦房结细胞，见图1、2。

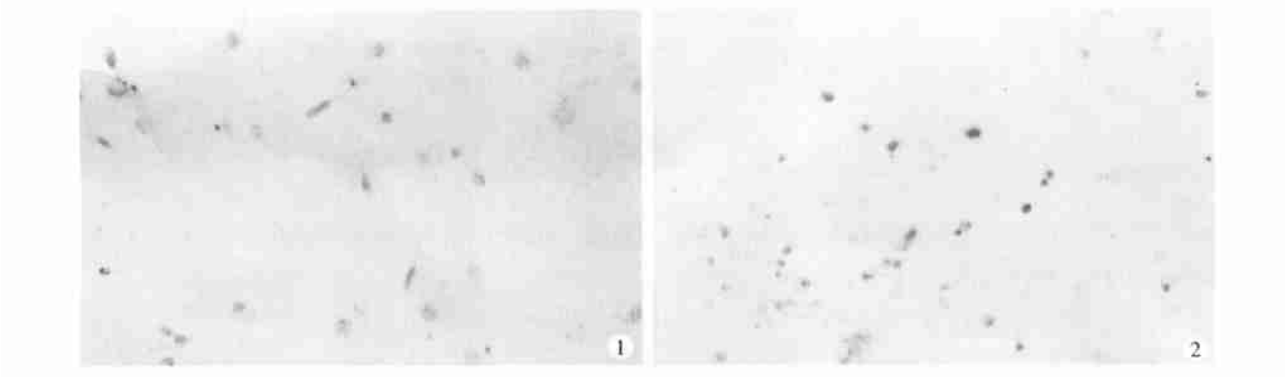


图1 培养窦房结细胞缺血4 h后TUNEL阳性细胞 (TUNEL×200)

Fig 1 TUNEL positve cells of cultured SAN cells after ischemia for 4 h (TUNEL×200)

图2 培养窦房结细胞缺血4 h再灌注3 h的TUNEL阳性细胞 (TUNEL×200)

Fig 2 TUNEL positve cells of cultured SAN cells after ischemia for 4 h followed by reperfusion for 3 h (TUNEL×200)

2.2 流式细胞术检测窦房结细胞凋亡率

用流式细胞术(FCM)检测单纯缺血及缺血-再灌注时窦房结细胞凋亡率的变化，见表1。

表1 FCM检测不同缺血时间及缺血-再灌注后窦房结细胞凋亡率(%)

Tab 1 Percentage of SAN cells apoptosis induced by different time of ischemia and reperfusion

Duration(h)	Ischemia	Reperfusion 3 h
0(Control)	0.39±0.02	
0.5	0.37±0.03	0.38±0.01
1	0.40±0.02	0.39±0.01
2	0.39±0.01	3.42±0.69**
4	2.87±0.58△	7.11±1.46**
8	5.19±0.70▲	13.44±3.27**
16	9.76±1.13▲▲☆	20.89±3.98**

**: $P<0.01$ *vs* ischemia; △: $P<0.01$ *vs* control; ▲: $P<0.05$, ▲▲: $P<0.01$ *vs* ischemia 4 h; ☆: $P<0.05$ *vs* ischemia 8 h

由表1可知，与对照相比，缺血2 h再灌注3 h及单纯缺血4 h均可见细胞凋亡率显著增加，且随缺血时间延长，窦房结细胞凋亡率增加越显著($P<0.01$)；而且相同时间的缺血-再灌注较单纯缺血时窦房结细胞凋亡率显著增加($P<0.01$)。

3 讨论

3.1 窦房结细胞凋亡损伤模型的评价

本实验采用的模拟缺血-再灌注模型参照了Tanaka[1]与Bielawska[2]诱导心肌细胞凋亡的损伤模型，并稍作改进。Tanaka等的实验在用混合气体置换空气时，没有用模拟缺血溶液置换正常培养液，因此他们的实验仅能反映缺氧对心肌细胞凋亡的影响，不能做到对缺血环境的模拟。毕竟缺血与缺氧对细胞生化与代谢等方面的影响有所不同，这可能就是本实验诱导出细胞凋亡的时间早于单纯缺氧诱导出细胞凋亡的原因。Bielawska等的实验考虑了培养基中血清与葡萄糖的因素，因此在模拟缺血时将培养基中的血清与葡萄糖去除。但是在组织缺血时，除了引起细胞内环境血清与葡萄糖的缺乏，由于糖酵解引起的酸碱平衡紊乱、离子浓度改变等因素，对细胞凋亡的发生都有重要影响。现已证实细胞凋亡的重要特征之一是细胞内酸化，并可影响凋亡机制中的重要酶—核酸内切酶的活性。心肌缺血-再灌注时细胞内酸化可引起Na^+/H^+交换蛋白(Natrium hydrogen exchange，NHE)活化，有证据表明NHE的活化介导了缺血-再灌注损伤，而抑制NHE则能减轻缺血区细胞凋亡[4]。本实验所用的模拟缺血与再灌注溶液反映了缺血-再灌注时离子浓度的变化与酸碱平衡的紊乱，正是考虑了以上几方面的因素。当然，培养细胞的内环境单一、胞间联系少、没有神经内分泌等因素影响，故尚不能完全模拟在体损伤情况。

3.2 缺血-再灌注诱导窦房结细胞凋亡的机制及意义

迄今为止，已有较多有关缺血-再灌注诱导心肌细胞凋亡的报道[1,2]，而缺血-再灌注能否诱导窦房结细

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

胞凋亡, 尚未见报道。本实验首次证实了模拟缺血-再灌注可诱导培养窦房结细胞凋亡, 且随缺血时间的延长, 窦房结细胞凋亡率逐渐增加。

窦房结细胞来源于原始未分化、幼稚的"工作"心肌细胞, 其细胞结构与代谢均与普通心肌细胞相似, 故认为缺血-再灌注诱导窦房结细胞凋亡同诱导心肌细胞凋亡可能有相同的机制。有报道[5] 认为缺血-再灌注时产生的 TNF-α 通过神经鞘磷脂信号途径来诱导心肌细胞凋亡。缺血-再灌注时产生的活性氧分子在心肌细胞凋亡中起了重要作用, 活性氧除了通过促进 TNF-α 生成增加这一途径来诱导心肌细胞凋亡外, 还能通过影响 bcl-2 家族蛋白诱导心肌细胞凋亡。Harsdorf 等[6] 发现不同的活性氧分子促进细胞凋亡的途径不同。可见, 有多种细胞因子、信号途径参与了缺血-再灌注心肌细胞凋亡的机制。究竟是缺血还是再灌注启动细胞凋亡过程, 目前尚不十分明确。Maulik 等[7] 应用高表达薄层色谱法对此进行了研究, 推测是缺血启动了凋亡信号。本研究结果显示, 单纯缺血及缺血-再灌注均可诱导窦房结细胞凋亡, 且缺血-再灌注诱导的窦房结细胞凋亡率较相同时间单纯缺血时诱导的窦房结细胞凋亡率明显增加, 表明缺血-再灌注加重了窦房结细胞凋亡。

已有实验证实缺血性心脏病的细胞死亡形式在缺血早期主要以细胞凋亡为主, 因此可以推测细胞凋亡是窦房结缺血早期细胞死亡的主要形式, 尤其是缺血程度较轻、长期反复发作更易引起窦房结细胞凋亡的发生。作为心脏电活动的起搏点, 窦房结的病变定会引起心脏电活动的改变。病窦综合征(病窦)是引起心脏性晕厥和猝死的主要原因之一, 而病窦发生的机制尚不清楚, 可能系窦房结细胞长期缺血诱导了窦房结细胞凋亡, 从而导致窦房结功能异常。James 等[8,9] 对 3 例完全性传导阻滞猝死患者的窦房结研究发现, 窦房结几乎完全毁损, 呈非炎性退变, 没有异常纤维化或浸润, 但有大量 TUNEL 阳性细胞; 并用电镜观察了 5 例长 QT 间期综合征频发晕厥伴室性心律失常患者手术切除的窦房结, 均有典型的细胞凋亡超微结构改变。这些文献报道则从临床角度为我们的推测提供了佐证。

本实验从单细胞水平研究了缺血-再灌注对窦房结细胞凋亡的影响, 为进一步探讨窦房结细胞凋亡的机制, 研究参与窦房结细胞凋亡的各种因子与信号途径奠定了实验基础。由本研究结果可推测采用抑制病理性细胞凋亡的措施, 可望为临床防治窦房结及心脏传导系统病变提供新的方法。

参考文献:

[1] Tanaka M, Ito H, Adachi S, *et al*. Hypoxia induces apoptosis with enhanced expression of Fas antigen messenger RNA in cultured neonatal rat cardiomyocytes[J]. Circ Res, 1994, 75(4): 426-433.

[2] Bielawaska A E, Shapiro J P, Jing L I, *et al*. Ceramide is involved in triggering of cardiomyocyte apoptosis induced by ischemia and reperfusion[J]. Am J Pathol, 1997, 151(6): 1 257-1 263.

[3] 钟　理, 宋治远. 乳鼠窦房结细胞取材与纯化培养方法的探讨[J]. 中国心脏起搏与心电生理杂志, 2000, 14(3): 188-190.

[4] Humphreys K A, Haist J V, Chakrabarti S, *et al*. Orally administered NHE1 inhibitor Cariporide reduce acute response to coronary occlusion and reperfusion[J]. Am J Physiol, 1999, 276(2 pt 2): 749-751.

[5] Guyton K Z, Liu Y, Yumas Y, *et al*. Activation of mitogen-activated protein kinase by H_2O_2: Role in cells survival following oxidant injury[J]. J Biol Chem, 1997, 271(19): 4 138-4 142.

[6] Harsdorf V R, Li P F, Dietz R. Signaling pathways in reactive oxygen species-induced cardiomyocyte apoptosis[J]. Circulation, 1999, 99(13): 2 934-2 941.

[7] Maulik N, Kagan Ve, Tyurin V A, *et al*. Redistribution of phosphatidylethandamine and phosphatidylserine precedes reperfusion-induced apoptosis [J]. Am J Physiol, 1998, 274(1 pt 2): H242-H248.

[8] James T N, Terasak F, Pavlovich E R, *et al*. Apoptosis and pleomorphic micromitochondriosis in the sinus nodes surgically excised from patients with the long QT syndrone[J]. J Lab Clin Med, 1993, 122(2): 309-323.

[9] James T N, Martin E S, Willis P W, *et al*. Apoptosis as a possible cause of gradual development of complete heart block and fatal arrhythmias associated with absence of the AV node, sinus node, and internodal pathways [J]. Circulation, 1996, 93(13): 2 424-2 438.

(编辑　王　红)

(上接 58 页)

2.5　加强营养支持

Ⅲ度创面焦痂剥离和创面愈合时间较为迟缓, 除积极手术植皮、尽早闭合创面外, 加强营养支持护理尤为重要。必要时营养的摄入采用口服, 鼻饲和静脉三者同时补给的方法。应尽可能鼓励老人多餐少食。应正确处理好病人的饮食习惯、特殊嗜好和营养价值的关系, 不能仅迁就病人的饮食习惯而使营养补充不足, 在照顾病人习惯的基础上, 合理配置肉蛋类、蔬菜类及米饭面粉比例, 尽量作到饮食多样化, 营养价值充足, 易于消化吸收。高龄烧伤病人一日三餐间应辅以 2-3 顿辅餐如服食加营素、各类水果等。治疗要集中进行, 尽量减少饭前治疗, 以免影响病人的食欲。要定期疏通大便, 但不宜用泻药, 以免扰乱胃肠功能。

2.6　其它

本组 13 例高龄病人有 2 例因家属放弃治疗, 自动出院, 一例Ⅲ度面积 8 %, 一例Ⅲ度面积 10%, 不积极治疗将凶多吉少, 因此, 在做病人护理基础上还应协助医生, 积极做家属思想工作, 提高病人及家属战胜疾病的信心, 这一点对于提高高龄烧伤的治愈率也非常重要。

关键词: 烧伤护理; 高龄病人
中图法分类号: R473.6　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 汪仕良, 黎　鳌. 烧伤创面处理[A]. 见: 黎　鳌, 主编. 烧伤治疗学[M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1995. 194-223.

[2] Pruitt B A. The burn patient initial care[J]. Curr Probl Surg, 1979, 16(4): 1-55.

(编辑　郭建秀)

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