DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.06.004
第22卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 6
516 2000年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2000

论著

文章编号:1000-5404(2000)06-0516-03

细胞骨架在牵张刺激心肌细胞肥大过程中的作用

冯 兵[1],王德文[2],何作云[1],罗惠兰[1] ([1]第三军医大学附属新桥医院心血管内科,重庆 400037;[2]军事医学科学院放射医学研究所,北京 100850)

提 要:目的 探讨细胞骨架在牵张刺激心肌细胞肥大过程中的作用。方法 在可变形膜上培养心肌细胞,采用^{3}H-亮氨酸掺入法反映心肌细胞肥大指标和放射免疫测定培养上清血管紧张素Ⅱ和内皮素的含量,观察细胞骨架解聚剂对牵张刺激心肌细胞肥大的影响。结果 4 μmol/L秋水仙素即可部分地抑制牵张刺激诱导的^{3}H-亮氨酸掺入($P<0.05$),而细胞松驰素B对牵张刺激诱导的^{3}H-亮氨酸掺入无影响。牵张刺激细胞骨架解聚剂处理后的培养上清刺激心肌细胞^{3}H-亮氨酸掺入的活性显著低于单纯牵张刺激时的培养基。同时,细胞骨架解聚剂显著抑制牵张刺激心肌细胞分泌血管紧张素Ⅱ和内皮素。结论 细胞骨架仅通过介导细胞自分泌细胞生长因子参与牵张刺激诱导的心肌细胞肥大反应。

关键词:细胞骨架;牵张刺激;心肌肥大;自分泌
中图法分类号:R318.01;R329.24 文献标识码:A

Role of cytoskeleton in stretch-induced hypertrophy of cardioc myocytes *in vitro*

FENG Bing, WANG De-wen, HE Zuo-yun, LUO Hui-lan (Department of Cardiology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To study the role of cytoskeleton in the stretch-induced hypertrophy of cardioc myocytes *in vitro*. Methods After culture on a deformable membrane with or without colchicine or/and cytochalasin B, the cardioc myocytes were incorporated with ^{3}H-leucine (^{3}H-leu) in order to determine the hypertrophic index. The content of angiotensin Ⅱ and endothelin was measured in the supernatant of the cultural medium with radioimmunoassay. Results ^{3}H-leu incorporation into the stretch-stimulated cardioc myocytes was partially inhibited with colchicine 4 μmol/L and cytochalasin B exerted no effect in this event. The radioactivity of ^{3}H-leu incorporation in the supernatant of the culture medium of the stretch-stimulated cardioc myocytes treated with colchinin (4 μmol/L) and cytochalasin B (0.4 μmol/L) was significantly lower than that of the culture medium of the simple stretch-stimulated cardioc myocytes. In addition, the 2 agents inhibited markedly the cardioc myocytes to secret angiotensin Ⅱ and endothelin. Conclusion The cytoskeleton plays a role in the stretch-induced hypertrophy of cardioc myocytes through the mediation of the cell growth factor secreted by the cells themselves.

Key words: cytoskeleton; stretch; cardiocyte; hypertrophy; autocrine

近年来,由于体外模拟装置的建立和应用,对牵张刺激引起的心肌细胞内信号系统的变化已有较为详细的了解[1]。目前,研究热点是阐明心肌细胞的机械感受机制。Ingber[2]认为心肌细胞骨架系统在机械感受机制中起到了关键作用,即机械刺激可能是通过细胞骨架拉动把力学信息传递进入细胞核而引起心肌肥大反应(基因表达、蛋白合成增加),但至今还没有令人信服的证据。本室在参照文献建立了牵张刺激培养盒的基础上,应用细胞骨架解聚剂探讨了心肌细胞骨架在牵张刺激心肌细胞肥大中的作用。

1 材料与方法

1.1 心肌细胞培养

参照Simpson[3]方法。按1×10^5/ml将心肌细胞接种于牵张培养盒中,24 h后换液1次,此后每隔2 d换液。牵张刺激培养盒的制作及牵张参数,参见文献[4]。

1.2 秋水仙素和细胞松弛素B对牵张刺激心肌细胞肥大的影响

第4天时换以无血清DMEM培养基培养24 h,再换以3 ml

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39600041)
作者简介:冯 兵(1967—),男,四川省遂宁市人,博士,主治医师,主要从事心肌肥大方面的研究,发表论文20篇。电话:(023)68755114—74601
收稿日期:1999-07-25;修回日期:2000-01-27

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

无血清 DMEM, 然后进行以下 20% 拉长牵张刺激实验[4]: ① 秋水仙素(Colchicine, Col)[5] 解聚微管浓度效应实验, 分设 1、2、3、4、5 μmol/L 5 个浓度组。② 细胞松弛素 B(Cytochalasin B, Cyto B)[6] 解聚微丝浓度效应实验, 分设 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 μmol/L 5 个浓度组。在分别加入上述试剂 10 min 后, 按 1 μCi/ml 培养基加入 ^{3}H-亮氨酸[7], 检测心肌细胞蛋白质合成变化。每组重复 4 次实验。

1.3　秋水仙素和细胞松弛素 B 对牵张刺激心肌细胞自分泌活化的影响

选择 4 μmol/L 秋水仙素、0.4 μmol/L 细胞松弛素 B 联合应用, 观察细胞骨架干预药物对牵张刺激诱导的生长因子分泌的影响。收集对照组和无干预药物牵张组的培养上清作为条件培养基, 分别用于放免检测及观察其刺激心肌细胞 ^{3}H-亮氨酸掺入的影响, 方法同前。

1.4　细胞骨架解聚剂对牵张刺激心肌细胞分泌血管紧张素Ⅱ和内皮素的影响

取出牵张完成后的培养上清 3 ml, 分作 2 份, 分别测定内皮素(Endothelin, ET)(按 301 医院提供的试剂盒操作说明进行)和血管紧张素Ⅱ(Angiotensin Ⅱ, Ang Ⅱ)(按海军总医院提供的药盒及说明进行)含量。

1.5　统计学处理

所有数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 用 t 检验作组间差异显著性检验。

2　结果

2.1　秋水仙素对牵张刺激后心肌细胞 ^{3}H-亮氨酸掺入的影响

单纯牵张刺激可显著诱导心肌细胞 ^{3}H-亮氨酸掺入(显示蛋白合成代谢), 秋水仙素浓度为 0～4 μmol/L 时, 对牵张刺激诱导的 ^{3}H-亮氨酸掺入率无影响, 发现浓度大于 4 μmol/L 时, 秋水仙素可部分地抑制牵张刺激诱导的 ^{3}H-亮氨酸掺入, 见图 1。

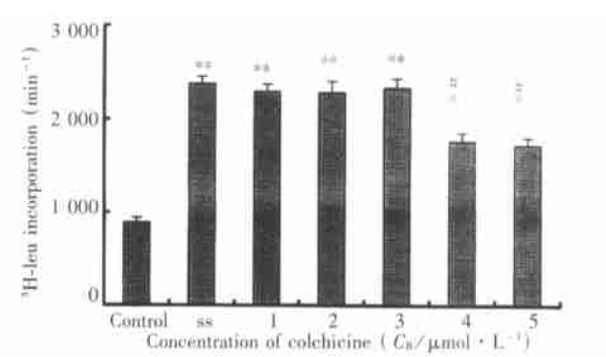


图 1　秋水仙碱对牵张刺激心肌细胞 ^{3}H-亮氨酸掺入的影响

Fig 1　Effect of colchicine on ^{3}H-leu incorperation into the strech-stimulated cardiomyocytes

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control; #: $P<0.05$ *vs* simple strech-stimulated group

2.2　细胞松弛素 B 对牵张刺激后心肌细胞 ^{3}H-亮氨酸掺入的影响

同样牵张刺激前向培养心肌细胞中加入不同浓度的细胞松弛素 B, 发现各浓度对牵张刺激诱导的 ^{3}H-亮氨酸掺入均无影响。

2.3　条件培养基对心肌细胞 ^{3}H-亮氨酸掺入的影响

牵张刺激后的条件培养基可显著刺激心肌细胞 ^{3}H-亮氨酸掺入, 说明牵张刺激可诱导心肌细胞分泌细胞生长因子, 而加入细胞骨架解聚剂组的条件培养基对 ^{3}H-亮氨酸掺入无明显刺激作用, 提示细胞骨架解聚剂基本抑制了牵张刺激引起的心肌细胞生长因子分泌, 见图 2。另外, 把单纯牵张刺激心肌细胞后的培养上清加入细胞骨架解聚剂牵张组, 可完全恢复细胞骨架解聚剂对 ^{3}H-亮氨酸掺入的抑制作用, 见图 3。

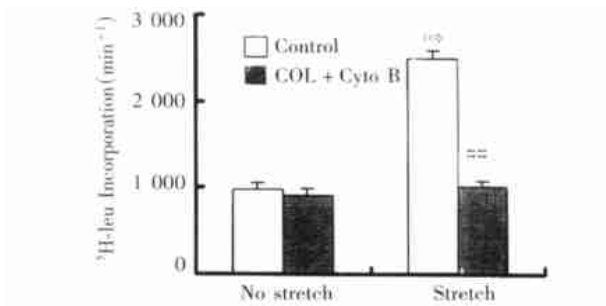


图 2　细胞骨架解聚剂对牵张刺激心肌细胞生长因子分泌的影响

Fig 2　Effect of colchicine and cytochalasin B on the secretion of growth factors in cultured strech-stimulated cardioc myocytes

**: $P<0.01$ *vs* no stretch control; ##: $P<0.01$ *vs* stretch control

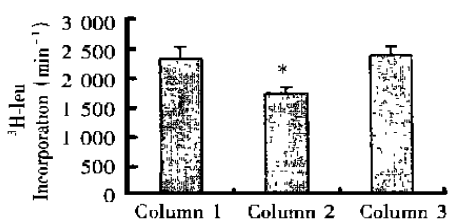


图 3　细胞骨架解聚剂对牵张刺激心肌细胞 ^{3}H-氨基酸掺入的影响

Fig 3　Effect of cell skeleton disrupting agents on the incorporation of ^{3}H-leu into strech-stimulated cardioc myocytes

Column 1: Stretch; Column 2: Col+Cyto B+Stretch; Column 3: Col+Cyto B+Stretch+Con; *: $P<0.05$ *vs* Column 1

2.4　细胞骨架解聚剂对牵张刺激心肌细胞分泌血管紧张素Ⅱ、内皮素的影响

放免测定结果见表 1, 牵张刺激可诱导心肌细胞分泌血管

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

紧张素Ⅱ、内皮素显著增加，而细胞骨架解聚剂可显著抑制牵张刺激诱导的心肌细胞分泌血管紧张素Ⅱ、内皮素增加，进一步支持条件培养基刺激实验结果。

表1 细胞骨架解聚剂对牵张刺激心肌细胞分泌血管紧张素Ⅱ、内皮素的影响(pg/ml)

Tab 1 Effect of cell skeleton disrupting agents on secretion of strech-stimulated cardioc myocytes(pg/ml)

	Ang Ⅱ		ET	
	No stretch	stretch	No stretch	stretch
Control	4.2±0.2	25.8±0.7*	21.9±0.9	62.1±1.9*
Col+Cyto B	4.0±0.3	4.1±0.2#	21.5±1.1	20.1±0.5#

*：$P<0.01$ *vs* no stretch；#：$P<0.01$ *vs* control

3 讨论

牵张刺激心肌细胞肥大反应已为不争的事实，但对于心肌细胞感受机械刺激并将其跨膜传导、转化为细胞内化学信号的机制至今尚不明了。有人提出细胞外间质-整合素-细胞骨架传递机制和细胞自分泌机制2个假说[1]，对于前者尚无有力证据，对于后者，近年来动物实验证实细胞自分泌确实参与了牵张刺激心肌细胞肥大反应的中介机制，但并非唯一机制[7,8]。细胞骨架不仅与保持细胞形态有关，还与细胞内蛋白激酶-磷酸化级联反应等生理功能有关，因此可以设想，细胞骨架可能与细胞自分泌活化有关，从而通过这一途径参与牵张刺激心肌肥大反应。

本研究参照文献[4]报道的牵张刺激装置参数建立了牵张刺激细胞培养盒，利用细胞骨架解聚剂观察了细胞骨架系统在牵张刺激心肌细胞肥大反应中的作用。实验发现，20%拉长硅酮膜可显著刺激心肌细胞蛋白质合成及心肌肥大反应，加入浓度大于4 μmol/L的秋水仙素可部分抑制牵张刺激诱导的^{3}H-亮氨酸掺入，而细胞松弛素B基本无抑制作用。以往实验提示微管蛋白具有G蛋白功能，解聚微管，可能就失去了G蛋白功能，进而抑制牵张刺激心肌肥大反应，但具体作用环节需要进一步研究。

虽然本实验未发现解聚微丝对牵张刺激心肌细胞肥大反应有抑制作用(其原因尚不清楚)，但微丝可部分补偿微管的形态支持作用，因此，要进一步观察微管的作用须同时应用微丝解聚剂。本实验用条件培养基刺激法观察到合用秋水仙素、细胞松弛素B后再进行牵张刺激的培养上清刺激心肌细胞^{3}H-亮氨酸掺入的活性显著降低，提示细胞骨架解聚剂抑制了牵张刺激引起的心肌细胞自分泌作用。通过测定该培养上清中的血管紧张素Ⅱ、内皮素的含量，发现应用细胞骨架解聚剂后牵张刺激的培养上清中血管紧张素Ⅱ、内皮素的含量均明显减少，这一结果进一步支持上述推论。另外，把单纯牵张刺激心肌细胞后的培养上清加入细胞骨架解聚剂牵张组，可完全恢复细胞骨架解聚剂对^{3}H-亮氨酸掺入的抑制作用，说明细胞骨架解聚剂可能是通过抑制牵张刺激引起的心肌细胞生长因子分泌而部分抑制牵张刺激心肌细胞肥大反应的。细胞骨架在牵张刺激心肌细胞自分泌细胞生长因子的具体机制尚有待研究，可能与加速细胞内分泌囊泡向细胞外运输有关。

参考文献：

[1] Sadoshima J, Inzumu S. The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress[J]. Annu Rev Physiol, 1997, 59: 551-571.

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

[3] Simpson P, McGrath A, Savion S. Myocyte hypertrophy in neonatal rat heart cultures and its regulation by serum and catecholamines[J]. Circ Res, 1982, 51(6): 787-801.

[4] 冯 兵, 何作云, 王德文, 等. 培养细胞牵张刺激装置的建立及初步作用[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(5): 498-500.

[5] Wang N, Butler J P, Ingber D E. Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton[J]. Science, 1993, 260(5 111): 1 124-1 127.

[6] Sadoshima J, Xu Y, Slayter H S, *et al*. Molecular characterization of the stretch-induced adaptation of cultured cardiac cells[J]. J Biol Chem, 1992, 267(15): 10 551-10 560.

[7] Sadoshima J, Xu Y, Slayter H S, *et al*. Autocrine release of angiotensin Ⅱ mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes *in vitro*[J]. Cell, 1993, 75(5): 977-984.

[8] Yamazaki T, Komuro I, Kudoh S, *et al*. Endothelin is involved in mechanical stress-induced cardioc myocytes hypertrophy[J]. J Biol Chem, 1996, 271(6): 3 221-3 228.

(编辑 郭建秀)

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