DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.03.008

烧伤后心肌细胞间隙连接通讯变化的机制研究*

迟路湘** 杨宗城 王 旭 黎 鳌 (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所) 重庆,400038

提 要 目的:探讨烧伤后心肌细胞间隙连接通讯(Gap junctional intercellular communication, GJIC)功能变化的病理生理机制。方法:采用缺氧、烧伤血清损伤培养心肌细胞模型,用划痕标记染料示踪技术检测GJIC功能,同时测定心肌细胞活力、胞浆游离钙及跨膜钙内流的变化。结果:缺氧及烧伤血清损伤后,心肌细胞活力明显降低,跨膜钙内流明显增加,同时伴胞浆游离钙浓度明显增加;正常心肌细胞培养后具有GJIC功能,LY荧光传递达划痕标记附近4列细胞。缺氧、缺氧加烧伤血清损伤后1 h即出现GJIC功能传导阻滞。缺氧6 h及缺氧加烧伤血清损伤3 h可出现荧光染料停滞在划痕线边沿细胞。结论:心肌GJIC功能保证心肌组织高度有序、同步收缩,烧伤后心肌细胞内钙稳态失控,GJIC功能障碍是导致心肌非均一性行为增强的病理基础。

关键词 划痕标记染料示踪技术;细胞间隙连接通讯;钙;心肌细胞;烧伤
中图法分类号 R644

我们以往的研究表明烧伤后心肌损伤存在非均一性[1]。由此推测可引起心肌收缩、舒张不协调,心室壁可能存在矛盾运动,导致心肌机械力学"内耗"。细胞间隙连接通讯(Gap junctional intercellular communication, GJIC)是一种近距离的细胞间通讯方式,主要传递组织或细胞群体内基因信号,对细胞的正常增殖、分化和代谢功能以及组织自身稳定等起着重要调节作用。因此,我们通过检测缺氧、烧伤血清对培养心肌细胞GJIC功能的影响,进一步深入探讨烧伤后心肌细胞GJIC功能障碍的机制。

1 材料和方法

1.1 试剂

Fura-2/AM(中国医学科学院药物研究所提供),$^{45}CaCl_2$(中国原子能科学研究院同位素研究所提供),噻唑蓝、胰蛋白酶、DMEM、Desmin单抗(IgG_1, clone no. DE-U-10)、Lucifer Yellow (LY)均购于Sigma公司。

1.2 实验动物

出生后1~2 d新生Wistar鼠,雌雄不限,由第三军医大学动物中心提供。

1.3 心肌细胞分离、培养、鉴定

新生Wistar鼠用1%苯巴比妥钠麻醉,迅速取心脏切成1~2 mm小块置0.05%胰蛋白酶-0.01% EDTA中,37℃消化20 min,收集细胞,悬浮于培养瓶(含10%小牛血清)中,接种在培养瓶,放入37℃,5% CO_2,pH 7.4培养箱常规培养。心肌细胞鉴定采用Desmin单抗免疫组化方法。

1.4 损伤实验及分组

① 正常对照组(Group C):心肌细胞(4×10^6/瓶)置于含95%空气、5% CO_2的10%正常大鼠血清DMEM培养液。② 单纯缺氧组(Group H):将95%空气、5% CO_2改换为92% N_2、4% O_2、4% CO_2混合气体充入培养皿中,模拟缺氧环境。③ 单纯烧伤血清组(Group S):实验时吸除培养液,改加含10%大鼠烧伤血清的DMEM培养液;该烧伤血清取自30% TBSA Ⅲ度烧伤后6 h大鼠。④ 双因素致伤组(Group HS):实验时改换10%大鼠烧伤血清的DMEM培养液,并充入缺氧混合气体取代有氧培养。以上各组均于致伤后1、3、6 h收集样本进行检测。

1.5 心肌细胞活力测定[2]

心肌细胞于致伤后各时相点弃培养液清洗,加入噻唑蓝(Sigma公司产品,5 mg/ml PBS),每孔20 μl,37℃温育4 h,显微镜下可见黑色结晶形成,加入细胞裂解液(0.01 mol/L HCl的10% SDS) 100 μl/孔,振荡至结晶溶解,避光10 min,酶标仪上570 nm波长计光密度值(D_{λ})。

1.6 心肌细胞胞浆游离钙浓度测定[3]

心肌细胞悬液加入Fura-2/AM,终浓度5 μmol/L;置37℃下温育30 min,用日立MPF-4型荧光分光仪检测,以nmol/L单位表示心肌细胞胞浆游离钙浓度。

1.7 心肌细胞跨膜钙内流测定[4]

心肌细胞用PBS冲洗3次,然后将1×10^6心肌细胞置于PBS中,37℃孵育15 min,加入3.7×10^4 Bq ^{45}Ca,37℃孵育5 min,用无Ca^{2+} 2 mmol/L EGTA-PBS(4℃)冲洗2次,终止^{45}Ca内流,加入闪烁剂后测心肌细胞放射性强度。

* 国家自然科学基金资助项目,No. 39290700
** 迟路湘,男,35岁,主治医生,讲师,博士,现在心血管内科

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

1.8 划痕标记染料示踪技术(Scrape-loading and dye transfer, SLDT)检测 GJIC[5]

接种于盖玻片的心肌细胞培养一周,待单层细胞覆盖密度达饱和时进行致伤。致伤结束时吸除培养液,PBS液(pH7.2)冲洗 3次,用手术刀在盖玻片上轻轻划痕数条,相距约 20 mm,将含有 0.05% LY的 PBS溶液 2 ml加入平皿,浸泡盖玻片 3 min,吸净荧光染料,PBS漂洗 2次,去除游离残余染料,细胞盖玻片浸泡在 PBS液内,Olympus荧光显微镜下观察,照像。每个时相点重复试验 2次。

1.9 统计学处理

所有数据以 $\bar{x} \pm s$表示,两组之间比较用 t检验。

2 结果

2.1 培养心肌细胞鉴定及细胞活力变化

心肌细胞种植 20 h,见部分细胞贴壁伸展,呈梭状、三角形或有多个细而长的触突,倒置显微镜下心肌细胞搏动明显,各细胞搏动频率不一。免疫组化表明结蛋白呈棕黄色丝状网络分布。证明培养的细胞为心肌细胞。

单纯缺氧、单纯烧伤血清刺激 6 h培养心肌细胞活力明显下降($P < 0.01$),而缺氧加烧伤血清损伤 3 h培养心肌细胞活力则明显下降($P < 0.01$)。缺氧加烧伤血清组与单纯缺氧、单纯烧伤血清组比较,于伤后 6 h相差显著($P < 0.05$)。

2.2 缺氧、烧伤血清对培养心肌细胞胞浆游离钙浓度的影响

单纯缺氧损伤 1 h心肌细胞胞浆游离 Ca^{2+}浓度即出现增加($P < 0.05$),6 h达最高值($P < 0.01$)。缺氧加烧伤血清损伤 1 h心肌细胞胞浆游离 Ca^{2+}浓度增加明显($P < 0.01$),6 h达最高值($P < 0.01$)。

2.3 缺氧、烧伤血清对培养心肌细胞钙内流的影响

单纯缺氧损伤 3 h心肌细胞钙内流即明显增加($P < 0.05$),6 h达最高值($P < 0.01$)。单纯烧伤血清损伤 3、6 h心肌细胞钙内流均明显增加($P < 0.01$)。缺氧加烧伤血清损伤 1h即出现心肌细胞钙内流增加($P < 0.01$),6 h达最高值。

2.4 缺氧、烧伤血清对培养心肌 GJIC的影响

正常乳鼠心肌细胞培养后具有细胞间隙连接通讯功能,LY荧光传递达划痕标记附近 4列细胞,至染料传输前沿,荧光强度逐渐减弱。荧光染料浓度由近及远逐渐因消耗而降低,未划痕区细胞无荧光标记现象。缺氧、缺氧加烧伤血清损伤后 1 h即出现 GJIC功能传导阻滞,着色细胞与划痕线之间距离缩短,呈点状横向排列。烧伤血清损伤 6 h及缺氧 3 h,心肌细胞 LY染料传输达 2排细胞。缺氧 6 h及缺氧加烧伤血清损伤 3 h可出现荧光染料停滞在划痕线边沿细胞不再扩展,表明心肌细胞 GJIC功能受到明显抑制。各组比较以缺氧加烧伤血清组损伤出现早,且最为严重,见表 1。

表 1 缺氧、烧伤血清对培养心肌细胞间隙连接通讯的影响

Tab 1 Effects of hypoxia, burnt serum on gap junctional intercellular communication in cultured myocardial cells

Time after injury	Group C	Group H	Group S	Group HS
1 h	+ + +	+ +	+ + +	+
3 h	+ + +	+	+ +	-
6 h	+ + +	-	+	-

"-": The LY fluorescence was limited to the primary loads cell; "+ —— + + + ": Rows of cells the LY fluorescence reached; "+ ": 2 rows; "+ + ": 3 rows; "+ + + ": 4 rows

3 讨论

本研究发现体外培养心肌细胞约 20 h,分散的心肌细胞以不同的步调进行搏动,也有些细胞尚未搏动,经过一段生长发育后,细胞发出突起与邻近细胞接触,或细胞因分裂增殖而密度加大,相邻细胞体得以紧贴,它们便呈节律性同步博动。与文献[6]报道吻合。说明心肌细胞通过膜与胞内骨架系统可能存在一种通讯功能。细胞 GJIC属相邻细胞间的穿膜通讯方式,几乎存在于所有细胞,包括胚胎期在内的相邻细胞间,是细胞语言学的物质基础[7]。间隙连接的基本结构单位是连接单元,其长度应为 200Å 左右,通道内径 10~15Å。荧光分子扩散实验结果证实哺乳动物心脏细胞间耦联通道允许通过的最大分子为 1K~10^3u(如 cAMP、磷酸盐、碱基和氨基酸等)。但特异性酶、蛋白质及 RNA则不能通过。这种细胞间通讯不仅有信号传递功能,还可进行细胞间物质直接交流,代谢协调、同步活动、调节细胞生长分化等重要作用。

本研究发现用小分子荧光染料 LY标记被划破的细胞,LY可以通过间隙连接,从标记细胞传输到邻近细胞。LY染料的传输现象代表细胞间隙连接通讯功能。缺氧、烧伤血清刺激损伤心肌细胞后 1 h即出现 GJIC功能受抑制,随致伤时间延长,荧光材料停滞在划痕线边沿不再扩展,提示心肌细胞 GJIC功能抑制显著,同时形态学扫描电镜观察表明致伤后心肌细胞表面微嵴分布紊乱,部分细胞有微嵴消失小区,长的细胞伪足和短的微绒毛断裂,细胞间彼此分离,进一步还

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

发现伤后心肌细胞胞浆游离钙浓度增高、钙内流增加。有研究表明间隙连接通道具有门控(Gating)作用,即短时间操纵通道的开启和关闭,影响通道的通透性。当细胞内 Ca^{2+} 上升到较高水平,可使细胞间的偶联下降。其机制可能是:①心肌细胞内 Ca^{2+} 增加,可能通过对细胞间通道电导的控制,或通过改变连接蛋白的构象,使通道的通透性降低[8]。② Ca^{2+} 可能通过 Ca^{2+}-ATP酶启动酶促反应,或通过钙调蛋白改变通道蛋白的构象而使通道闭合[9]。心肌间隙连接的存在保证电信号经间隙连接直接在相邻细胞传导,造成相邻细胞的电耦合和机械耦合、从而保证心肌组织的同步收缩。另一方面,间隙连接的存在还保证了细胞与细胞在代谢上的合作和行为上的协调,此称为代谢耦合。因此,作者认为烧伤后心肌细胞 GJIC功能降低,心肌电、机械、代谢耦合功能障碍是心肌非均一性行为增强的病理基础之一。

参考文献

1 迟路湘,杨宗城,黎 鳌.大鼠严重烧伤后早期心肌血流量及其病理学基础研究.第三军医大学学报,1998,20(2):111

2 易先金,金一尊,丁 立,等. MTT法研究三种放射增敏剂对视网膜母细胞瘤的毒性作用.上海医科大学学报,1994,21(5):347

3 徐 春,孙明智,李玉荣,等.降钙素基因相关肽对大鼠分离的心肌细胞内游离 Ca^{2+} 含量的影响.中国应用生理杂志,1995,11(3):244

4 郭 棋,杨英珍,顾全保,等.病毒感染对培养心肌细胞钙离子内流的影响.中华医学杂志,1993,73(9):562

5 韩亚玲,张志谦,蔡险峰,等.生长特性差别的胃癌 MGC803细胞亚系间细胞骨架、细胞通讯与癌基因表达的比较研究.实验生物学报,1996,29(1):15

6 王瑞锦,常 青,戎城兴.肌组织.见:成令忠 主编.组织学.第 2版,北京:人民卫生出版社,1993.448~450

7 郑文岭,马文丽.细胞语言学——细胞精密的通讯机制.科技导报,1994,8(1):3

8 孙君洁.影响间隙连接的形成及其通透性的因素.生理科学进展,1989,20(2):123

9 Noma A, Tsuboi N. Dependence of junctional conductance on proton, calcium and magnesium ions in cardiac paired cells of guinea-pig. J Physiol, 1987, 382(1): 193

(收稿:1997-03-20;修回:1998-06-27)

(编辑 汪勤俭)

Changes of gap junctional intercellular communication in the myocardial cells and its mechanism after burns*

Chi Luxiang, Yang Zongcheng, Wang Xu, Li Ao (Research Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To understand the pathophysiological mechanism of the alteration of the myocardial cell gap junctional intercellular communication after burns. Methods: After the myocardial cells suffered from hypoxia were cultured with burn serum in vitro, the gap junctional intercelluarl communication was observed with crape-loading and dye transferring. Meanwhile, the viability of and cytosolic free calcium ion concentration (Ca^{2+}) and Ca^{2+} influx in the myocardial cells were also determined. Results: The LY fluorescence reached 4 rows of cells from the scraped line in the normal myocardial cells. The gap junctional intercellular communication was blocked at the 1st h after hypoxia, hypoxia and burn serum injury. The LY fluorescence was limited to the primary loading cells at the 6th h after hypoxia and at the 3rd h after hypoxia and burn serum injury. Conclusion: The function of gap junctional intercellular communication of the myocardial cells is to maintain high order synchronous contraction of the myocardial cells. After burns, the runaway calcium homeostasis and impairment of the gap junctional intercellular communication might contribute to the pathological basis of myocardial heterogeneous behavior.

Key words scrape-loading and dye transferring; gap junctional intercellular communication; calcium; myocardial cell; burns

* This project was supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 39290700

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