DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.02.001

缺氧、烧伤血清对培养心肌细胞膜生物物理特性影响的实验研究*

论著

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膜损伤的机制。方法: 采用体外心肌细胞培养模型,研究缺氧、烧伤血清对心肌细胞活力、细胞膜脂质过氧化、细胞膜脂流动性的影响。结果: 单纯缺氧、单纯烧伤血清损伤 6 h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心肌细胞活力则明显下降 ($P < 0.01$)。单纯缺氧损伤 3 h MDA含量增加 ($P < 0.05$)。单纯烧伤血清损伤 6 h MDA含量增加 ($P < 0.01$)。缺氧加烧伤血清损伤 3、6h MDA含量增加 (P均 < 0.01)。单纯缺氧损伤 3 h和缺氧加烧伤血清损伤 1 h,心肌细胞膜荧光偏振度、微粘度和分子排列有序性系数即出现增加 ($P < 0.05 \sim 0.01$)。结论: 缺氧、烧伤血清对心肌细胞的损伤可能与膜脂质过氧化增强有关,从而导致心肌细胞膜脂流动性降低,细胞从相对比较流动变为相对固化,细胞膜更趋于凝胶相。

关键词 烧伤;心肌细胞;膜流动性

中图法分类号 R542.2; R644

近期的研究结果表明,烧伤后早期心功能严重障碍,发生非常迅速,心肌损害明显[1];而有关心肌损害的机制目前尚不完全清楚。细胞膜首先介导了细胞外因子、介质对细胞引发的各种反应,因而是维持细胞内环境稳定的物质基础。近来认为生物膜损伤是心肌细胞由可逆性损伤转化为不可逆损伤的早期特征和重要标志[2]。为了更好地从细胞和分子水平研究烧伤后心肌损害机制,我们研究了缺氧、烧伤血清损伤心肌细胞膜生物物理特性的可能机制。

1 材料和方法

1.1 心肌细胞培养

出生 48 h以内的乳鼠,无菌条件下开胸取心脏。Hanks液冲洗去除血迹,剥离心包膜。留心脏尖部剪碎,加入 0.05% 胰酶 5 ml, 0.01% EDTA 5 ml, 37℃消化 20 min,轻轻吹打,使组织充分被消化。将所收集的上清液在 1 000 r/min下离心 5 min, Hanks液洗涤 2次,细胞悬浮于 DMEM 培养液(含 10% 小牛血清)中,调整细胞数在 1×10^6/ml,接种在无或放有小块盖玻片的培养瓶及 96孔可折式培养板内,放入 37℃ 5% CO_2培养箱常规培养,隔日换液。

1.2 损伤实验及分组

1.2.1 ① 正常对照组 (Group C): 心肌细胞在含 10% 小牛血清 DMEM 培养液中常规培养 7 d,实验当天吸除培养液, PBS液清洗 3次,改加含 10% 正常大鼠血清的 DMEM 培养液;② 单纯缺氧组 (Group H): 细胞常规培养至第 7天,实验时将 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): 细胞常规培养至第 7天,实验时吸除培养液, PBS液清洗 3次,改加含 10% 大鼠烧伤血清的 DMEM培养液;④ 双因素致伤组 (Group HS): 细胞常规培养至第 7天,实验时换液后改用含 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 (n= 5)进行检测。

1.2.2 细胞活力 MTT比色法 参见文献 [3]。

1.2.3 细胞丙二醛 (MDA)含量测定 按测定试剂盒说明书进行。

1.2.4 细胞膜流动性测定 参见文献 [4]。

1.2.5 扫描电镜观察 参见文献 [2]。

2 结果

2.1 缺氧、烧伤血清对培养心肌细胞活力的影响

结果显示,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进一步下降 ($P < 0.01$)。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 MDA含量的影响

在培养的心肌细胞,单纯缺氧损伤 3 h MDA含量即开始增加 ($P < 0.05$),6 h达高值 ($P < 0.01$)。单纯烧伤血清损伤 6 h MDA含量增加 ($P < 0.01$)。缺氧加烧伤血清损伤 3、6 h MDA含量增加 (P均 < 0.01),且于损伤 6 h较单纯缺氧、单纯烧伤血

* 国家自然科学基金资助重大项目, No. 39290700

** 迟路湘,男,36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

清损伤组增加明显 ($P < 0.01$)。

2.3 缺氧、烧伤血清对培养心肌细胞膜流动性的影响

从表 1可见,单纯缺氧损伤 3 h心肌细胞膜荧光偏振度升高 ($P < 0.01$),膜流动性下降,微粘度和脂双层分子排列有序性系数增加 ($P < 0.01$),6 h达高值。缺氧加烧伤血清损伤 1 h心肌细胞膜荧光偏振度、微粘度和分子排列有序性系数即出现增加 ($P < 0.05$),6 h达高值。

2.4 缺氧复合烧伤血清损伤心肌细胞的扫描电镜观察

正常心肌细胞呈梭形或多角形,多伪足,伸展平坦,彼此连接紧密。细胞质膜无缺损,中部较厚,边缘较薄,呈索状皱褶状突起 (微嵴),微嵴分布均一,细胞表面微绒毛丰富,分布均匀。缺氧复合烧伤血清损伤 1 h即可见心肌细胞表面微嵴分布紊乱、微嵴减少,见图 1 细胞表面微绒毛减少。长的细胞伪足和短的微绒毛断裂多见,细胞间彼此分离,呈脱离前征象。部分细胞表面有空白或嵴消失小区,部分细胞的微嵴变得致密。细胞质膜有破损,以伤后 3 6 h变化最为明显,见图 2

表 1 缺氧、烧伤血清对培养心肌细胞膜荧光偏振度 (P)、微粘度 (η)、分子排列有序系数 (γ)的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Effects of hypoxia, burnt serum on membrane polarization (P), microviscocity (η) and order parameter (γ) in cultured myocardial cells ($\bar{x} \pm s$)

Group		Time after injury			
		0	1 h	3 h	6 h
C	P	0.159± 0.043	——	——	——
	η	1.117± 0.493	——	——	——
	γ	0.113± 0.033	——	——	——
H	P	——	0.179± 0.036	0.251± 0.028**	0.264± 0.042**
	η	——	0.798± 0.256	2.447± 0.514**	2.871± 1.014**
	γ	——	0.090± 0.021	0.182± 0.022**	0.193± 0.034**
HS	P	——	0.232± 0.030*	0.219± 0.062*	0.264± 0.023**
	η	——	2.083± 0.510*	2.028± 1.027*	2.754± 0.574**
	γ	——	0.168± 0.024*	0.158± 0.048*	0.193± 0.019**

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ *vs* group C

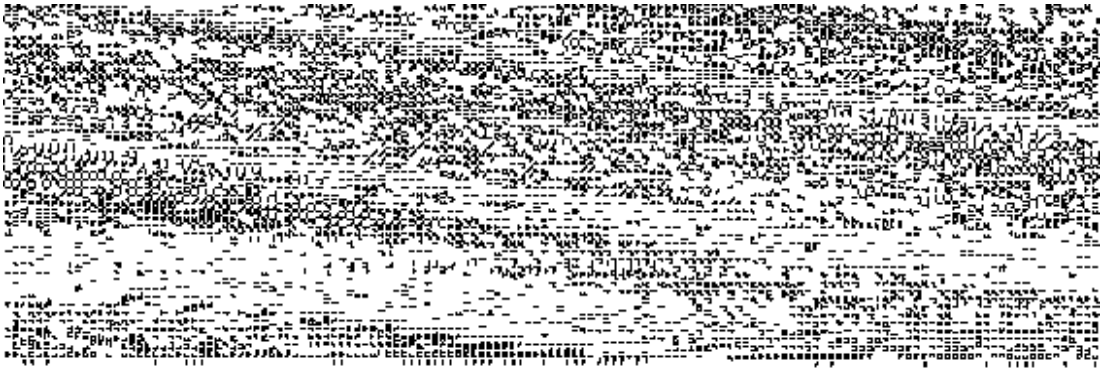


图 1 缺氧加烧伤血清损伤 1 h,心肌细胞表面微嵴分布紊乱,减少,微绒毛减少 (SEM× 7 500)

Fig 1 After culture under the condition of hypoxia and burnt-serum for 1 h. Both microridge and microvilli on myocardial cell surface become fewer and abnormal (SEM× 7 500)

图 2 缺氧加烧伤血清损伤 3 h,心肌细胞质膜不完整,破损,呈脱离前征象 (SEM× 5 000)

Fig 2 Cultured myocardial cells under the condition of hypoxia and burnt-serum for 3 h. Cell membrane ruptured. Cultured cells showed some sign of detachment (SEM× 5 000)

3 讨论

细胞膜的流动性和通透性是细胞的基本和最重要的生物物理性质,膜流动性不仅能影响膜通透,且影响膜上的酶活性、受体功能及能量传递,也影响细胞膜的保护功能。膜流动性反映着膜磷脂的分子运动状态,包括侧向扩散,绕分子长轴的旋转,异构运动和翻转运动。流动性是脂双层中磷脂分子各种运动状态的总和的平均表现[5]。本实验结果说明:缺氧、烧伤血清、缺氧加烧伤血清损伤早期可引起心肌细胞活力下降,细胞膜脂质过氧化增强,心肌细胞 MDA含量增加,同时伴心肌细胞膜荧光偏振度升高,膜流动性下降,膜微粘度和脂双层分子排列有序性系数增加。细胞膜从相对较流动变得更趋于凝胶相。形态学观察还可见心肌细胞表面微嵴分布紊乱、微嵴减少;细胞膜表面微绒毛减少。长的细胞伪足和短的微绒毛断裂多见,细胞间彼此分离,呈脱离前征象。造成细胞膜流动性变化的机制为[6]:① 多不饱和脂肪酸的过氧化,活性氧自由基作用

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

于心肌细胞膜及线粒体膜等部位的不饱和脂肪酸,形成脂质过氧化;而且,脂质过氧化产物又可进一步作用于生物膜使脂质过氧化反应再度被激活,从而形成恶性的连锁反应,由此导致心肌细胞膜流动性降低,膜上酶、受体及离子通道的脂质微环境改变② 蛋白质的氧化与交联,活性氧与脂质过氧化产物可使蛋白质分子交联形成变性的高聚物,从而使细胞膜流动性下降. 同时不饱和脂肪酸氧化后,不饱和键大量减少,膜脂相凝固点相对升高,流动性降低,相变温度升高。另一方面,Petkova等[7]证明膜流动性与膜上内源性磷脂酶 A_2 呈负相关,即膜的硬化可激活内源性磷脂酶 A_2. 同时又指出改变脂质体的脂成分就改变了膜的流动性. 由此我们认为烧伤后缺氧、烧伤血清对心肌细胞膜的损伤与氧自由基诱发的膜脂质过氧化,细胞内钙超载导致的磷脂酶 A_2活化,以及溶血磷脂的去垢样作用,即"脂质三联体"效应有关[8]。心肌细胞膜结构和功能的损伤最终导致细胞质膜崩解、细胞坏死. 因此,"脂质三联体"反应所引起的心肌细胞膜损伤可能在烧伤后心肌损伤向不可逆转化中具有决定性的作用。

参考文献

1 迟路湘,杨宗城,黎　鳌,等.严重烧伤早期心肌细胞骨架损伤的力学研究. 中华创伤杂志, 1998, 14(1): 6

2 张友云,董传仁,汪长华,等. 大豆磷脂脂质体对培养的缺血心肌细胞膜损伤保护作用的电镜观察. 解剖学报, 1995, 26(1): 77

3 王培勇,许蜀闽,孙秉庸,等. 缺氧复合失血性休克动物血浆对血管内皮细胞形态及活力的影响. 第三军医大学学报, 1995, 17(4): 301

4 陆松敏,刘建仓,郭素清,等. 失血性休克时红细胞膜脂流动性及其相变温度的变化. 第三军医大学学报, 1995, 17(5): 399

5 何作云,王瑞兴 主编. 临床细胞流变学. 重庆: 重庆大学出版社, 1997. 126~134

6 吴其夏 主编. 体液因素和血液循环病理生理学. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1992. 282~294

7 Petkova D H, Monchilova-Pankova A B, Kounanov K S, *et al*. Effect of liver plasma membrane fluidity to endogenous phospholipase A_2 activity. Biochem, 1987, 69(6): 1251

8 Meerson F Z, Kagan V E, Kozlov Y P, *et al*. The role of lipid peroxidation in pathogenesis of ischemic damage and the antioxidant protection of the heart. Basic Res Cardiol, 1982, 77(4): 465

(收稿: 1998-04-24;修回: 1998-10-27)

(编辑　张大春)

An experimental study on effects of hypoxia and burn serum on membrane of cultured myocardial cells*

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

Abstract Objective: To explore the mechanism of myocardial cell membrane injury after burns. Methods: The myocardial cells were cultured and injured with hypoxia and burn serum. The changes in the viability of the cells and the membranous lipid peroxidation and fluidity were observed. Results: The viability of the myocardial cells was significantly decreased at the 6th h after being injured with hypoxia or burn serum alone and at the 3rd h after being injured with the two in combination. The content of malondialdehyde (MDA) in the cells was significantly increased at the 3rd h after being injured with hypoxia alone or hypoxia and burn serum in combination and at the 6th h after being injured with burn serum alone. The membrane polarization and microviscocity of membrane bilayer were significantly increased at the 3rd h after the cells were injured with hypoxia alone and at the 1st h with hypoxia and burn serum in combination. Conclusion: The damage of myocardial cells is related to the membrane lipid peroxidation resulting in reduction of membrane fluidity. The membrane of myocardial cells changes from a relatively fluid state to relatively solid one after being injured with hypoxia and burn serum.

Key words burns; myocardial cell; membrane fluidity

* 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