DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.05.008

应用微管吸吮技术进行心肌细胞力学实验*

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

提 要 目的:通过建立心肌细胞力学模型,为进一步了解心肌细胞生物力学特性奠定基础。方法:采用微管吸吮技术研究心肌细胞的粘弹特性。结果:测得正常心肌细胞弹性系数 K_1值为 407.9± 137.9 dyn/cm²,弹性系数 K_2值为 229.3± 139.6 dyn/cm²,粘性系数 μ 值为 54.0± 14.5 dyn·s/cm²。结论:由此推论心肌细胞弹性成分影响心肌变形,主要反映心肌细胞的初始变形程度。心肌细胞粘性成分影响心肌形变速度,反映了心肌细胞变形对时间的依赖性。

关键词 心肌细胞;生物力学;微管吸吮

中图法分类号 R318.01

长期以来,心肌细胞主动性兴奋-收缩耦联观念统治着心脏生理学,而忽略了心肌细胞被动的生物力学特性,即心肌细胞本身固有的粘弹特性。微管吸吮技术(Micropipette aspiration technique)是一种评价单个细胞或细胞对变形或粘附特性的重要研究手段[1-3]。本研究采用标准线性固体模型对粘弹性实验结果进行了简要分析。

1 材料和方法

1.1 心肌细胞培养

出生 1~2 d的 Wistar大鼠,取心室肌用 0.1%胰蛋白酶液分次消化,生长液用含 10%小牛血清的 DMEM培养液。常规培养 1周。

1.2 实验技术

将约 0.5 ml细胞悬液注入一特定的圆形小室内,置于倒置显微镜载物台上。微管采用普通玻璃毛细管由微管拉制器(P-87, 美国)拉制,微管与显微微操作器(MR5170, 德国)相连并通过它连接于压力控制和记录系统。利用显微微操作器控制微管尖部靠近细胞表面,并用重庆大学研制的自动压力控制和记录系统通过微管给细胞施以 475 N/m²的阶跃负压,使细胞的一小部分吸入微管,见图 1。细胞在微管内的变形时间过程由图象处理仪(Vidas21, 德国)记录,并通过回放所记录的图象测量细胞在微管内的变形值。所有实验均在室温(约 15℃)进行。整个系统在图像监视器上的放大倍数约为 3500倍,并用 40 mm的光栅尺进行标定。

1.3 细胞粘弹性模型

为了对实验结果进行归类和比较,采用一粘弹性数学模型拟合实验结果,可定量测定细胞的粘弹性参数。参照 Sung等[1]有关白细胞粘弹性的实验结果和理论分析,选用标准线性固体模型拟合心肌细胞变形的实验数据。该模型由二条平行的"臂"组成,其中一"臂"由弹性系数为 K_1的弹性元件组成,另一"臂"则由弹性系数为 K_2的弹性元件与粘性系数为 m的阻尼器串联组成。假定线性弹簧即刻产生与载荷成正比的变形。假定阻尼器可于任一瞬间产生与载荷成正比的速度。其标准线性固体模型的本构方程由下式给出:

$$\sigma_{ij}' + \frac{\mu}{K_2}\sigma_{ij}' = \varepsilon_{ij}' K_1 + \varepsilon_{ij}'\mu\left(1 + \frac{K_1}{K_2}\right)$$

在此方程,K和 K_2代表二个弹性系数,μ 是粘性系数,σ_{ij}'和 ε_{ij}'分别为应力和应变对时间的偏导数。弹性系数 K_1和 K_2与时间无关,主要反映细胞的初始变形程度,随 $[(1/K_1)+(1/K_2)]$ 而变化[3]。粘性系数 μ 反映了细胞变形对时间的依赖性。在本实验所设计的蠕变力学实验中,细胞蠕变特性由时间常数 $\mu[(1/K_1)+(1/K_2)]$ 确定,最大变形值正比于 $1/K_4$。

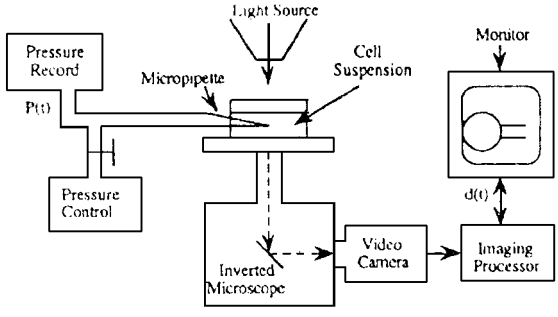


图 1 微管吸吮系统示意图

Fig 1 Diagram of the micropipette aspiration system

* 国家自然科学基金资助重大项目,No. 39290700

** 迟路湘,男 36岁,主治医师,讲师,博士,现在心血管内科

*** 重庆大学生物医学工程学院细胞力学研究室 重庆,400044

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

2 结果

心肌细胞在 475 N /m²的阶跃负压下在微管内变形的时间序列图,发现心肌细胞在微管内的变形经历了一个初始快速响应和其后稳定增加的时间过程,见图 2 心肌细胞变形的时间过程,见图 3,测得正常心肌细胞弹性系数 K_1值为 (407.9± 137.9) dyn /cm²,弹性系数 K_2值为 (229.3± 139.6) dyn /cm²,粘性系数 μ 值为 (54.0± 14.5) dyn· s /cm²。



图 2　心肌细胞变形的典型时间序列图

Fig 2　Typical time sequences of a myocardial cell deformation in a micropipette

A. 0 ms　B. 400 ms　C. 1200 ms　D. 1800 ms

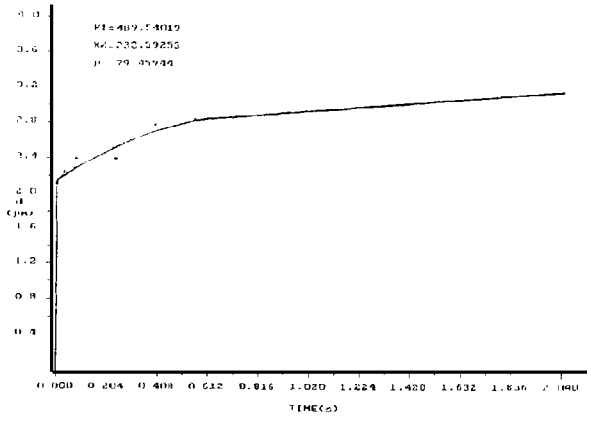


图 3　心肌细胞变形的典型时间过程

Fig 3　Typical time course of the myocardial cell deformation

3 讨论

从实验可以看出,心肌细胞变形时间过程均经历了一个初始的快速变化相和其后的缓慢蠕变相,说明心肌细胞在外加阶跃负压作用下先表现出一个弹性响应阶段 (阶跃变形),其后再显示粘性响应过程 (蠕变)。由此我们推论心肌细胞弹性成分和粘性成分是决定心肌顺应、弛张的两个因素。这两个因素通过不同的途径对心肌顺应产生不同的影响。弹性成分影响心肌形变程度,而粘性成分影响心肌形变速度。心肌顺应的研究工作主要涉及应力、应变、应力变化速率和应变率,对它们进行精确定量是实验工作的必要环节。本工作采用细胞微管吸吮实验装置,达到以上要求。心肌顺应是心肌组织的一项生物物理特性,其定量评定的探索是目前心肌顺应研究领域中的重点[4]。开展心肌细胞力学的实验研究对推动心肌细胞生物力学特性的认识起着非常重要的作用。我们将在此基础上进一步探讨影响心肌细胞生物力学特性的可能机制。

参考文献

1 Sung K L P, Sung L A, Crimmins M, *et al*. Dynamic changes in viscoelastic properties in cytotoxic T-lymphocyte-mediated killing. J Cell Sci, 1988, 91(1): 179

2 严宗毅编译.测量单个人血细胞的力学性质.国外医学: 生物医学工程分册, 1994, 17(5): 273

3 龙　勉,吴泽志,王红兵,等.肝细胞粘弹性实验研究.生物物理学报, 1996, 12(1): 169

4 Van de Werf F, Bole A, Math L, *et al*. Diastolic properties of the left ventricle in normal adults and in patients with third sounds. Circulation, 1984, 69(3): 1070

(收稿: 1997-10-25;修回: 1998-07-20)

(编辑　冷怀明)

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

An experimental study of cellular mechanic properties of myocardial cells by micropipette aspiration*

Chi Luxiang, Yang Zongcheng, Li Ao, Wu Zezhi, Long Mian (Research Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To further understand the mechanic properties of the myocardial cells. Methods: The viscoelastic properties of the myocardial cells were determined by micropipette aspiration. Results: The elastic coefficient K^1 was 407.9± 137.9 dyn/cm^2 and K^2 was 229.3± 139.6 dyn/cm^2. The viscous coefficient μ was 54.0± 14.5 dyn·s/cm^2. Conclusion: The elastic component can reflect the degree of initial deformation of the myocardial cells and makes a notable impact on the deformation of the myocardial cells. The viscous component can reflect deformation time-dependent property of the myocardial cells and influences the velocity of the myocardial deformation.

Key words myocardial cell; mechanics; micropipette aspiration

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

左侧直入路二肾一夹法复制肾血管性高血压大鼠动物模型

Left side direct entering approach and two-kidney one-clip method to establish renovascular hypertensive rat model

王立文* 刘光耀 杨成明 祝之明 王旭开 (第三军医大学附属大坪医院高血压研究室) 重庆, 400042

肾血管性高血压大鼠动物模型复制简便、动物来源充足, 是高血压机制研究和药物实验的常用动物模型。现介绍该模型复制的解剖入路、手术方式, 并对易发生问题进行探讨。

1 材料和方法

动物: 健康 Wistar大鼠雌雄各半, 体重180~220 g, 3月龄, 由第三军医大学野战外科研究所动物中心提供。

手术器械: 常规小动物手术器械及鼠台, 眼科镊、开睑器、0.2 mm固定钢丝、银夹、银夹钳。

手术过程: 大鼠经1%戊巴比妥钠30 mg/kg腹腔麻醉, 右侧位固定于鼠台上。体外触及左侧肾脏, 剪去局部3 cm×3 cm被毛, 消毒铺巾。在触诊肾脏与脊柱之间沿与脊柱平行方向切开皮肤, 切口1.5~2 cm, 逐层分离皮下筋膜及肌肉, 以盐水棉球推开肾周脂肪囊, 用开睑器撑开充分显露手术视野, 于腹膜后仔细分离肾动脉, 用手指追查至肾脏, 检查无误后在肾动脉自主动脉分叉处放置标准钢丝, 银夹钳夹闭银夹, 然后取出标准钢丝, 逐层关闭肌肉、皮肤。

血压: 鼠尾测压仪购自中日友好医院。术后2周血压高于术前3个标准差且高于18.7 kPa(140 mmHg)为模型复制成功[1]。对血压连续观察12周。

2 结果

共行手术58例, 存活56例, 成功56例, 成功/存活率100%。术后2周达到高血压标准后血压可继续升高, 4周左右达高峰并保持在稳定水平。死亡2例均行尸体解剖, 1例麻醉过量抢救无效死亡, 1例动脉变异误伤致死。

3 讨论

既往肾血管性高血压大鼠模型复制采用腹正中切口或左侧斜切口术式, 成功/存活率95%[2]。腹正中切口长3~4 cm, 需翻转胃肠等腹内脏器显露后腹膜, 破坏腹膜后方能暴露肾动脉, 创伤大易造成腹腔感染。左侧斜切口与肋弓平行, 显露肾脏后自肾蒂逆行分离肾动脉, 易造成肾蒂牵拉伤, 且肾门处动、静脉被同一血管鞘包被, 解剖困难。

我们行左侧直切口于腹膜后缩窄肾动脉不入腹、切口小, 成功/存活率达100%。选择左侧入路是因为右侧在肾动脉高度还从主动脉发出肝总动脉和肠系膜前动脉, 毗邻关系复杂易发生误夹事故, 而左侧在相同高度发出的大动脉仅肾动脉一支, 解剖关系较单纯。

实验中易发生血管损伤和麻醉意外, 因此必须精细操作和按体重用药。有报道大鼠麻醉用戊巴比妥钠为3%[3], 浓度过高不易掌握剂量, 经改为1%大大减少了麻醉意外机会。

关键词 疾病模型, 动物; 高血压, 肾血管

中图法分类号 R544.14

参考文献

1 赵 清, 张维忠. 肾血管性高血压大鼠心肌纤维化发展过程的实验研究. 高血压杂志, 1997, 5(1): 4

2 徐叔云, 卞如濂, 陈 修. 药理实验方法学. 北京: 人民卫生出版社, 1991. 818~819

3 Challah M, Nicoletti A, Arnal J F, *et al*. Cardiac angiotensin converting enzyme overproduction indicats interstitial activation in renovascular hypertension. Cardiovasc Res, 1995, 30(2): 231

(收稿: 1998-01-08; 修回: 1998-05-27)

(编辑 汪勤俭)

* 王立文, 女, 28岁, 硕士研究生

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