DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.01.001

大鼠严重烧伤早期心肌细胞膜阴离子位点改变的研究*

论著

迟路湘** 杨宗城 吴 军 张 宁 陈希炜 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:探讨严重烧伤后早期心肌细胞膜结构损伤的分子病理学基础。方法:以聚乙烯亚胺(PEI)为阳离子探针,运用透射电镜观察大鼠严重烧伤早期心肌细胞膜基板阴离子位点的变化,并进行心肌硝酸镧示踪观察,同时测定心肌组织含水量变化。结果:正常心肌细胞表面 PEI颗粒沿基膜外呈较规则的点阵式、线性排列分布。烧伤后 1 h PEI颗粒已开始有所减少,烧伤后 6h PEI颗粒进一步减少,并可见心肌细胞基膜与质膜分离,基膜缺损或质膜断裂。伤后 1 h镧颗粒穿过心肌细胞膜进入细胞内。伤后 3 h心肌组织含水量增加($P < 0.01$)。结论:证实严重烧伤后早期心肌细胞膜基板阴离子位点减少可导致肌膜通透性增加,心肌组织水肿加剧,膜保护屏障功能下降。

关键词 烧伤;心肌细胞;阴离子位点;聚乙烯亚胺
中图法分类号 R644

细胞表面存在阴离子位点,负电荷主要来源于糖链末端的唾液酸[1],用阳离子探针可显示阴离子位点的位置[2]。心肌细胞表面的唾液酸是一种存在于细胞膜的糖蛋白,对维持细胞膜功能具有重要作用。烧伤对心肌细胞膜结构和功能都有明显的影响,但是否也涉及到心肌细胞膜基板阴离子位点的改变尚有待研究。本研究旨在通过对烧伤大鼠心肌细胞膜基板阴离子位点变化进行观察,进一步了解心肌细胞膜损伤的机制。

1 材料与方法

1.1 动物致伤模型及分组

健康成年 Wistar大鼠,体重 220± 20 g 单笼喂养 1周随机分为正常对照组($n = 10$)和烧伤组($n = 50$)。动物经 1%戊巴比妥(30 mg/kg)腹腔麻醉下背部剃毛,10% Na_2S脱毛,置脱毛区于 92℃水浴中 18 s,造成 30% TBSAⅢ°烧伤(病理切片证实)。正常对照组除不予烧伤外,其余处理与烧伤组相同。分别于致伤前和伤后 1、3、6、12、24 h观测各指标。

1.2 心肌细胞膜基板阴离子位点组织化学电镜方法[1,2]

标本均取材于左室前壁,将 1 mm× 1 mm× 1 mm小块组织:① 浸泡于 4℃下,0.5% 聚乙烯亚胺(PEI)水溶液中 30 min;② 转入 0.1%戊二醛和 2%磷钨酸混合液浸泡 60 min;③ 再入 0.5% PEI 30 min,每次浸泡后用二甲砷酸缓冲液清洗数次。最后用 1%锇酸后固定,常规脱水包埋,超薄切片(85 nm),透射电镜观察。

1.3 心肌硝酸镧示踪组织化学电镜方法[3]

取左心室肌 1 mm× 1 mm× 1 mm大小,置于含 2%硝酸镧的 2.5%戊二醛 0.1 mol二甲砷酸钠缓冲液(pH7.4)内固定 2 h,含 1%硝酸镧 0.1 mol二甲砷酸钠缓冲液漂洗 2 h,1%锇酸后固定 2 h,环氧树脂 812包埋,超薄切片,透射电镜观察。

1.4 心肌组织含水量测定[4]

采用干湿重法。

2 结果

2.1 大鼠烧伤后心肌细胞膜基板阴离子位点改变

大鼠正常对照组心肌细胞表面 PEI颗粒沿基膜外呈较规则的点阵式、线性排列分布。颗粒间距为 40~ 80 nm,直径 20~ 30 nm,见图 1。烧伤后 1h PEI颗粒已开始有所减少,见图 2;同时可见线粒体出现肿胀,嵴消失和基质空泡等相应改变。烧伤后 6 h PEI颗粒进一步减少,部分损伤严重的心肌出现基膜下空泡,基膜与质膜分离,基膜缺损或质膜断裂。基膜缺损处仅有少量 PEI颗粒零散分布,且附着于基板内侧的细胞衣或质膜,见图 3。

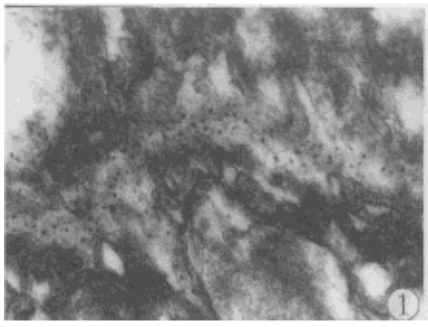
2.2 大鼠烧伤后心肌硝酸镧示踪观察

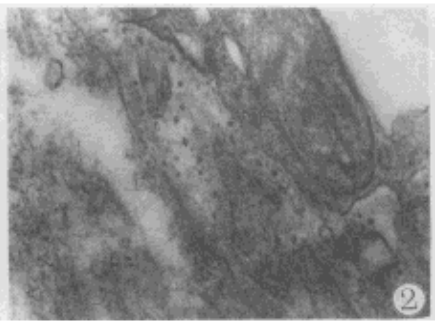
正常心肌组织学及超微结构未见明显异常。硝酸镧示踪切片:电子致密性镧颗粒见于心肌细胞膜和细胞外间隙,细胞内线粒体和肌浆网等处未见镧颗粒沉积,见图 4。大鼠烧伤后 1 h电子致密性镧颗粒除沉积于心肌细胞膜和细胞外间隙等处外,并可见围绕线粒体外膜沉积,形成一条清晰的电子致密线。伤后 3 h一些线粒体外膜上有散在的镧颗粒沉积,有些线粒体内嵴间隙处也可见镧颗粒沉积,且线粒体外膜有破坏。线粒体内镧颗粒数目不等,直径约 40~ 60 nm,见图 5。

2.3 大鼠烧伤后心肌含水量的变化,见附表

大鼠烧伤后 3 h心肌组织含水量明显增加($P < 0.01$),伤后 6 h达高值,24 h仍高于对照组水平($P < 0.01$)。

* 国家自然科学基金资助项目 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





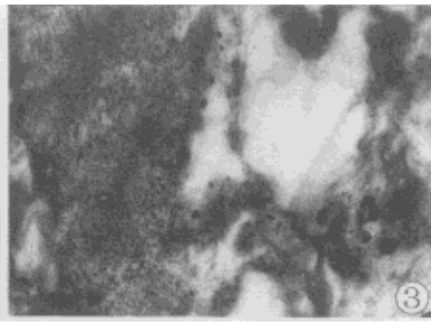


图 1 正常心肌细胞,PEI颗粒沿心肌细胞表面呈线性排列,颗粒间距为 40~ 80 nm (TEM× 28 500)

Fig 1 The anion sites of basal lamina of the myocardial cell showed regular linear lattice arrangement (40~ 80 nm) (TEM× 28 500)

图 2 烧伤后 1 h,心肌细胞表面 PEI颗粒已开始有所减少 (TEM× 28 500)

Fig 2 The PEI granules of the basal lamina decreased at 1 h after burn injury (TEM× 28 500)

图 3 烧伤后 6 h,心肌细胞基膜与质膜分离,基膜损伤处仅有少量 PEI颗粒零散分布 (TEM× 52 000)

Fig 3 The PEI granules of the basal lamina decreased at 6 h after burn injury, Meanwhile, there was the dissociation of basal lamina from plasma membrane (TEM× 52 000)

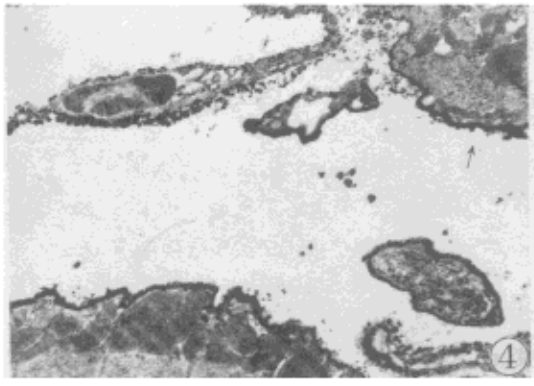




图 4 正常心肌细胞,镧颗粒见于心肌细胞膜和细胞外间隙 (TEM× 8 900)

Fig 4 There were the lanthanum granules at the membrane and extracellular space of the myocardial cell (TEM× 8 900)

图 5 烧伤后 3 h,心肌线粒体外膜,内嵴间隙处有散在镧颗粒沉积,伴线粒体肿胀,基质空泡 (TEM× 21 000)

Fig 5 The mitochondria swelling and vacullated, with the accumulation of the lanthanum granules in the membrane and cisternae of the mitochondria at 3 h after burn injury (TEM× 21 000)

附表 大鼠烧伤后心肌含水量 (ml/g干组织)变化 ($\bar{x}\pm s$)

Table The change of rat myocardial water contents (ml/g dry tissue) after burn injury ($\bar{x}\pm s$)

Control	Postburn time (t /h)				
	1	3	6	12	24
2.13± 0.09	2.19± 0.07	2.29± 0.05**	2.44± 0.07**	2.43± 0.06**	2.35± 0.07**

** : $P < 0.01$ *vs* control

3 讨论

烧伤后心肌细胞功能受到明显损害,表现为心肌细胞内标志酶、肌球蛋白轻链漏出增加[5,6],膜活性下降。其原因可能与烧伤后膜结构改变有关。应用镧离子可研究病理情况下心肌细胞膜的通透性改变[4]。本

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

实验用国产硝酸镧作为示踪剂,发现大鼠严重烧伤后早期心肌细胞内均有镧颗粒沉积;随后伴心肌组织含水量明显增加。表明严重烧伤后早期心肌细胞膜通透性即有明显改变。进一步分析发现大鼠严重烧伤后早期心肌细胞基板阴离子位点显著减少。心肌细胞的外表面有一层厚约 30 nm的糖萼(Glycocalyx),称外板或基板[7]。基板的外表面覆有带阴电荷的表面衣,它发出许多交织的微线(Microthread)构成细胞外骨架,连接于相邻肌细胞之间。目前大多主张将糖链构成的质膜外表层视为一个独立成分即细胞衣。糖链残基的终端多为带大量负电荷的唾液酸分子,故糖链彼此相斥而分散,其间充满被吸引的水分子[7]。细胞衣的功能意义近年来日益受到重视,它不仅与表面抗原性有关,而且与细胞识别、细胞分化、接触抑制等相关联。更重要的是还有保护细胞,调理微环境物质浓度的分子筛(Molecular sieving)滤过作用[7]。心肌细胞膜表面存在阴离子位点,负电荷主要来源于糖链末端的唾液酸[1,2],用阳离子探针 PEI可显示阴离子位点的位置与数量。PEI为乙烯亚胺的球形聚合物,具有很强的阳离子特性,可与阴离子位点牢固结合并能在原位与某些重金属元素络合成为不透电子的颗粒。本研究结果表明正常情况下 PEI颗粒分布于大鼠心肌细胞基板表面,以较规则的间距(40~80 nm)呈线性排列,这与 Lee等[2]对人心肌细胞观察的结果一致。大鼠严重烧伤后早期心肌细胞膜基板阴离子位点显著减少,电镜观察并可见心肌间质水肿、肌膜下空泡形成,肌膜断裂,肌膜与质膜分离、肌膜完整性丧失等一系列心肌损害表现。因此,作者认为心肌细胞膜基板破坏可导致肌膜通透性增加,心肌组织水肿加剧,膜保护屏障功能下降。有研究表明影响细胞膜通透性的因素很多,电荷屏障是其中之一。如用相同分子量的两种乳酸脱氢酶同功酶进行示踪,发现带负电荷者(LDH-M_4-^{125}I)对血管壁的通透率明显低于带正电荷者(LDH-M_4-^{131}I)。显然,这种电荷屏障作为大小选择屏障(Size selective barrier),同时作为物质流通通路,调节细胞基底膜的通透性有着非常重要的意义[8]。进一步研究发现烧伤后心肌组织唾液酸含量减少[9],心肌组织 Na^+-K^+-ATPase,Ca^{2+}、Mg^{2+}-ATPase以及功能障碍,细胞内 Na^+、Ca^{2+} 超负荷[10],同时 Ca^{2+} 超负荷还可激活磷脂酶 A_2,水解心肌细胞膜磷脂,导致膜完整性破坏,细胞水肿形成、加剧。而给予外源性含有唾液酸的神经节苷脂能明显改善再灌注损伤后心肌组织 ATPase功能,减轻组织水肿[10]。据此,心肌细胞膜基板阴离子位点的变化不仅是细胞结构损伤的一种反映,亦可作为细胞功能活动变化的一个客观依据。有关烧伤后心肌细胞膜基板阴离子位点变化的确切机制及其意义尚有待进一步探讨。

参考文献

1 Barron E A, Markwald R R, Nathan R D. Localization of sialic acid at the surface of embryonic myocardial cells. J Mol Cell Cardiol, 1982; 14: 381

2 Lee Y S. Appraisal of polyethyleneimine used as a tracer for anionic sites in human cardiac tissues with a brief reference to anionic molecular organization in altered basement membranes. J Mol Cell Cardiol, 1986; 18: 529

3 陆江阳,梁延杰,李　玲等.大鼠多器官衰竭前期各脏器硝酸镧示踪电镜观察.中华物理医学杂志, 1995; 17(1): 35

4 郇京宁,葛绳德,陈玉林等.烧伤对大鼠心肌组织 NO产生的影响.中华外科杂志, 1995; 33(9): 568

5 郇京宁,葛绳德,陈玉林等.烧伤病人血清心肌酶谱的改变.第二军医大学学报, 1992; 13(4): 336

6 杨建明,杨宗城,陈发明等.大鼠严重烧伤后早期血浆心肌肌球蛋白轻链的变化.中华创伤杂志, 1996; 12(3): 190

7 成令忠主编.组织学.第 2版.北京:人民卫生出版社, 1993: 448~449

8 文建国,郭绢霞.细胞表面与基膜阴离子位点.国外医学:生理病理科学与临床分册, 1991; 11(4): 187

9 郇京宁,霍礼政,陈玉林等.烧伤后大鼠心肌组织液酸含量的变化.中华整形烧伤外科杂志, 1996; 12(3): 174

10 迟路湘,杨宗城,黄跃生等.钙分布异常对烧伤早期心肌力学障碍的影响.中华整形烧伤外科杂志, 1998; 14(1): 31

(收稿: 1997-06-12;修回: 1997-12-24)

(编辑　张大春)

Changes of anionic sites on myocardial cell membrane in the early stage after severe burns in rats

Chi Luxiang, Yang Zongcheng, Wu Jun, Zhang Lin, Chen Xiwei, Li Ao (Research Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract　Objective: To acquire more understanding about the myocardial cell membrane structural

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

damage during severe burns on the molecular level. **Methods**: In the in vivo burn model established in rats, alterations of the anion sites at basal lamina of the myocardial cells was assessed with a PEI cationic probe. The membrane permeability of the myocardial cells was observed using colloidal lanthanum as a marker and the myocardial water content measured. **Results**: The anion sites of basal lamina of the myocardial cells showed regular linear lattice arrangement (40~ 80 mm). The PEI granules of the basal lamina were decreased at the 1st h and decreased significantly at the 6th h after burns. The lanthanum granules entered into the myocardial cells at the 1st h and the myocardial water content was significantly increased ($P < 0.01$) at the 3rd h after burns. **Conclusion**: The damage of the basal lamina and decrease of the anion sites on the myocardial cells might be a contributive factor causing the increase of membrane permeability, tissue edema and membrane protective barrier dysfunction after severe burns

Key words burns; myocardial cell; anionic site; polyethyleneimine; sialic acid; basal lamina

博士生论文摘要

NHE-1基因表达在人肺癌细胞 pHi调节及凋亡调控中的作用

The effect of NHE-1 gene on the pHi regulation and apoptosis in lung cancer cells

黄桂君* 钱桂生 (第三军医大学附属新桥医院呼吸内科研究所) 重庆, 400037

肿瘤细胞普遍增强的糖酵解优势,导致其酸性产物的异常增加,因而存在其 pHi调节的内在规律和特点。探明肿瘤细胞 pHi调节的分子机制,将为以酸化肿瘤细胞和诱发肿瘤细胞凋亡的治疗策略提供重要的依据和手段。为此,本实验以人肺癌组织细胞为对象,探讨人肺癌细胞在整体条件下 pHi调节的分子机制。阐明 Na^+/H^+ 交换泵家族第一亚型 NHE-1基因表达在人肺癌细胞 pHi调节及凋亡调控中的作用。以半定量逆转录 PCR及 mRNA原位杂交技术研究了 27例人肺癌组织手术新鲜标本 NHE-1基因表达水平,并对其 pHi调节的分子机制和特点进行了初步探讨。在体外细胞培养中,以反义技术等手段研究了 NHE-1硫代型反义核酸对人肺癌 A549细胞酸化及凋亡的诱导作用。以套式引物 PCR及分子克隆技术,构建反义表达 NHE-1基因部分序列的重组逆转录病毒载体。人肺癌组织细胞 NHE-1 mRNA表达水平非常显著地高于正常肺组织($P < 0.001$),系正常肺组织的 11.81倍。A549细胞在 20μmol/L 浓度 NHE-1反义核酸作用下,出现胞内酸化(pHi= 6.55)及细胞凋亡。随作用时间增加,细胞凋亡率增高。在反义核酸作用 24 48 72h后,细胞凋亡率分别为 30.1%、91.2%、99.6%。电镜下可见"凋亡小体"等细胞凋亡的形态特征。细胞凋亡原位检测到基因组 DNA降解片段。在 NHE-1反义核酸作用下,A549细胞的 NHE-1表达受抑制,细胞 mRNA原位杂交显示其 mRNA含量减少,并与细胞酸化及凋亡的时相吻合。从人肺癌组织细胞克隆出了 NHE-1 cDNA的部分序列,并成功地构建了其反义表达的重组逆转录病毒载体。人肺癌组织细胞通过上调 NHE-1基因超表达,以增加其胞膜 NHE-1的数量分布和 Na^+/H^+ 交换,可能是其在整体条件下 pHi调节的主要分子机制和特点。NHE-1基因的超表达事件对维持人肺癌细胞在机体内的抗凋亡生长亦起着重要的作用。针对 NHE-1基因的硫代型反义核酸能有效地抑制人肺癌细胞 NHE-1的表达,并能诱导胞内 pHi下降与胞内酸化。在 NHE-1反义核酸作用下,当肺癌细胞 pHi下降到 6.55时,可诱发细胞凋亡;其诱发机制可能与酸性 pHi依赖的核酸内切酶激活有关。所构建的反义表达重组载体,将为在有机整体实施基因治疗研究奠定基础。

关键词 细胞内 pH;酸碱平衡;肺肿瘤;NHE-1基因;基因表达;凋亡;反义技术;基因治疗

中图法分类号 R734.2

(收稿: 1997-11-14;修回: 1997-12-10)

(编辑 王 红)

* 黄桂君,男,33岁,主治医师,讲师,博士研究生

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