DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.02.005

缺氧复合烧伤血清刺激对新生大鼠心肌细胞粘弹特性影响的初步研究*

王 旭** 迟路湘 杨宗城 黎 鳌 (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所) 重庆, 400038
吴泽志 龙 勉 (重庆大学生物医学工程院) 重庆, 400044

提 要 目的: 了解烧伤后因缺氧、烧伤血清对心肌细胞骨架的损伤机制及由此而产生的损伤效应和意义。方法: 通过心肌细胞骨架免疫组化、骨架蛋白流式细胞术及心肌细胞粘弹性测定技术,动态观察体外培养乳鼠心肌细胞致伤前后的变化。结果: 大鼠严重烧伤早期,即可引起心肌细胞弹性下降,骨架蛋白的荧光强度降低,中间丝及部分微管阳性信号减弱,培养心肌细胞呈脱落前征象。结论: 心肌细胞骨架对维持心肌细胞的完整性是必需的,细胞骨架损伤可引起细胞脆性增加,细胞粘弹性下降,导致细胞生物力学特性改变,而这种变化可能直接参与烧伤后心肌损害的发生发展和转归过程。

关键词 心肌细胞;细胞骨架;灼伤;大鼠
中图法分类号 R322.11; R644

我们以往的研究,已发现严重烧伤后缺血、缺氧在早期脏器损害中起着非常重要的作用。冠脉血流降低,心肌无氧代谢加强,高能磷酸化合物耗竭,多种小分子物质形成,由此而产生的细胞胞浆渗透脆性增加,细胞外水份大量涌入。此肿胀的细胞在形态学上表现为大的肌膜下空泡形成,肌膜破裂,且与肌膜-细胞骨架复合体断裂有关。然而,目前有关心肌细胞骨架的认识和研究,国内外都刚刚起步[1~4],尚无心肌细胞机械脆性变化的直接证据。

1 材料与方法

1.1 心肌细胞培养及实验分组

新生 Wistar大鼠,1%戊巴比妥钠麻醉,开胸取心脏剥离心包膜。剪碎,加入0.01%胰蛋白酶溶液,37℃消化 15 min,至组织细胞分离。Hanks液吹打洗涤后离心,1000 r/min×5 min,弃上清液,将细胞悬浮于含10%小牛血清的 DMEM培养液,滴入96孔培养板,密度2000个细胞/孔,37℃ 5% CO_2培养箱常规培养,隔日换液。

正常对照组: 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清洗3次,改加含10%正常大鼠血清的 DMEM培养液。

损伤组: 心肌细胞按常规方法培养至第7天,将5% CO_2改换为92% N_2, 4% O_2, 4% CO_2混合气体充入培养容器模拟缺氧环境;将培养液中10%小牛血清改为10%大鼠烧伤血清(烧伤血清根据本研究所烧伤动物模型制备所得),于致伤后1、3、6 h收集标本,4%多聚甲醛或70%酒精固定,4℃冷藏待测。

1.2 心肌细胞骨架免疫组化

0.01 mol/L PBS(pH7.4)缓冲液清洗标本3次,每次5 min,加入0.03%过氧化氢甲醛液10 min,灭活内源性过氧化物酶及类过氧化物酶活性。PBS漂洗3次,每次5 min,室温作用10 min,中和电荷,降低非特异性反应。分别加入1:50 Desmin、1:200β-tubulin小鼠抗大鼠单克隆抗体50μl,5℃孵育3 h,室温4 h。PBS冲洗,加入1:100生物素二抗50μl,20 min后加入1:100 S-P复合物50μl,室温作用20 min。0.05% DAB-0.01% H_2O_2显色3~5 min,染色强度显微镜下观察适度为准。

1.3 心肌细胞骨架蛋白流式细胞术

将1:100 Vinculin单抗、1:200β-tubulin单抗、1:100 Desmin单抗各100μl分别加入5×10⁵细胞悬液中并设阴性对照,孵育后加入1:20羊抗鼠 FITC-IgG 100μl,采用流式细胞仪(美国 FACS420型)进行单参数检测,将测量数据和图形通过免疫流式细胞学软件处理后,以平均荧光强度表示骨架蛋白 Vinculin、β-tubulin和 Desmin的相对含量。

1.4 心肌细胞粘弹性模型

采用微管吸吮技术对单个心肌细胞的生物力学(粘弹性)特性进行实验测试。该系统由倒置显微镜、显微操作器、图像处理仪、压力控制和记录系统及微管等部分组成。将正常组及损伤组各时相点心肌细胞制备成低浓度细胞悬液(2000个细胞/ml),取0.5 ml注入特定的圆形小室内,置于倒置显微镜载物台上。利用显微镜操作拉制微管尖部靠近细胞表面,并用自动压力控制和记录系统(重庆大学研制)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。细胞在微管内的变形时间过程由图像处理仪记录,并通过回放用40μm的光栅尺进行标定,测量细胞在微管内的变形值。通过标准线性固

* 国家自然科学基金资助项目, No. 39290700-03
** 王 旭,女,42岁,主管技师

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

性粘弹模型方程显示心肌细胞的粘弹特性。

2 实验结果

2.1 心肌细胞培养

单细胞种植 20 h见部分细胞巾壁伸展,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,从 86次 /min到 149次 /min不等。48 h后贴壁细胞增多,搏动活跃。相近细胞融合后搏动频率逐渐一致,直至单层细胞覆盖整个培养容器,为时 5~ 7 d。

2.2 缺氧、烧伤血清对培养心肌细胞骨架形态结构的影响

中间丝:正常培养心肌细胞均呈结蛋白免疫染色阳性细胞。心肌细胞胞质内中间丝呈均质状染色,核周浓染。损伤后 1 h即可出现细胞质内阳性着色范围减少,阳性信号减弱,以细胞周边损伤较重,同时伴细胞密度降低。损伤 6 h典型细胞的中间丝改变呈区域性阳性信号缺失,核周阳性染色同时减弱。

微管:正常培养心肌细胞均呈微管染色阳性细胞,胞质内微管呈丝状、片状均质分布,核周浓染,形成一较明显的“环”。损伤后 1 h细胞出现空化,部分微管染色阳性信号减弱,以胞质变化明显,核周较强,细胞边缘皱褶,呈脱落前征象。典型细胞的微管改变呈网络状结构松散,间距增大,丝状结构断裂,空化,细胞边缘损伤较重。

2.3 缺氧复合烧伤血清对培养心肌细胞骨架蛋白平均荧光强度的影响

缺氧加烧伤血清损伤 1 h,心肌细胞骨架蛋白 Vinculin、Desmin、β-tubulin的平均荧光强度即出现明显降低 ($P < 0.01$),6 h达最低值。三者出现类似的平行改变,见表 1。

表 1 缺氧复合烧伤血清对培养心肌细胞骨架蛋白平均荧光强度的影响 ($n = 5$)

Tab 1 Effects of hypoxia and burn serum on mean fluorescence intensity of cytoskeletal proteins of cultured cardiomyocytes ($n = 5$)

	Control	Post-injury (t /h)		
		1	3	6
Vinculin	86.4± 6.9	75.4± 3.8**	61.0± 1.9**	54.8± 4.9**
Desmin	83.6± 2.7	67.6± 3.8**	60.8± 2.9**	49.4± 2.3**
β-tubulin	87.2± 6.8	68.2± 10.5**	68.6± 5.1**	61.0± 4.0**

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

2.4 缺氧复合烧伤血清对培养心肌细胞粘弹特性的影响

在微管负压吸吮作用下,正常对照组心肌细胞变形小,易恢复,仅形成较小的“舌”,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。而受缺氧复合烧伤血清损伤后的心肌细胞变形快,形成较大的“舌”,且可见较长的蠕变相,同时伴细微的胞质活动,变形不易恢复,脱离微管后仍可见细胞有一较大的突起[5]。采用非线性迭代方法拟合实验结果,测得缺氧复合烧伤血清损伤后 3 h的心肌细胞弹性系数 K_1、K_2即明显下降 ($P < 0.05$~ 0.01),并达最低值。同时粘性系数 μ 也出现明显下降 ($P < 0.05$),并于损伤后 6 h达最低值 ($P < 0.05$),见表 2。

表 2 缺氧复合烧伤血清对培养心肌细胞粘弹特性的影响 ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

Tab 2 Effects of hypoxia and burn serum on the viscoelastic properties of cultured cardiomyocytes ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

	Control	Post-injury (t /h)		
		1	3	6
K_1 (dyn /cm^2)	407.9± 137.9	362.4± 123.8	204.4± 174.5*	229.6± 126.9*
K_2 (dyn /cm^2)	229.3± 139.6	141.8± 56.4	41.7± 24.9**	91.6± 55.5*
μ (dyn-s /cm^2)	54.0± 14.5	30.4± 12.4	20.2± 9.9*	17.1± 5.4*

* : $P < 0.05$,** : $P < 0.01$ *vs* control

3 讨论

心肌细胞骨架主要由微丝、微管、中间丝组成,起着支撑点的作用并定位细胞内各细胞器的有序分布,传递细胞间的跨膜力,完成胞内结构与功能的整合。目前有关烧伤后心肌细胞骨架损伤的研究国外报道不多[1~4],国内刚刚起步。流式细胞术本应用于肌细胞的研究亦仅限于国外。本组细胞骨架蛋白利用流式细胞术结合免疫组化观察细胞骨架形态结构的改变。结果表明大鼠严重烧伤早期 (伤后 1 h)即出现 Vinculin

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

Desmin、β-tubulin的免疫荧光强度降低,胞内网络状结构消失,提示β-tubulin发生结构重排,即沿应力方向损伤较重。Desmin分布减少,有序的横纹、网络状结构消失,提示心肌细胞中间纤维骨架体系出现塌陷。

此外,烧伤血清是含有多种毒性成份的混合液,它可干扰细胞膜的正常功能和抑制细胞的糖代谢,从而引起细胞肿胀坏死[6]。我们的研究表明缺氧复合烧伤血清刺激可以反映体内心肌细胞损伤的基本情况。

综上所述,严重烧伤后心肌细胞骨架损伤在心肌缺血、缺氧性损害中的表现可分为二步过程,首先为缺血缺氧所致细胞骨架损伤,而这一过程不易被常规光镜和电镜察觉,这是因为只要有μmol/L水平的 Ca^{2+} 增加,就可激活非溶酶体系的钙中性蛋白酶,引起心肌细胞骨架破坏,心肌细胞及其肌膜稳定性降低,脆性增加[7]。其后缺血加重,合并烧伤血清的直接损伤作用,导致继发性细胞水肿和收缩可机械地破坏肌膜,造成细胞骨架进一步破坏,细胞内环境失衡,最终导致心肌细胞坏死。

国内外学者曾对离体心肌细胞的生物力学粘弹特性进行过积极地探索,从理论上建立了心肌粘弹性的工作模型[8],然而,目前尚未见从细胞水平研究心肌细胞生物力学特性的报道。本研究发现缺氧复合烧伤血清损伤3 h心肌细胞弹性系数 K_1、K_2即明显下降,同时伴粘性系数μ也明显下降。因此,本实验结果表明缺氧复合烧伤血清刺激可引起心肌细胞膜流动降低,Vinculin, Desmin及 Tubulin荧光强度下降,骨架结构破坏;继之细胞出现空化,凝胶样胞质变为溶胶样,同时伴心肌细胞粘弹力学特性障碍,细胞脆性增加,直接显示了心肌细胞骨架与生物力学特性变化的关系。故心肌细胞力学模型反映了心肌细胞肌膜及其肌膜下骨架体系的粘弹性变化。结果提示烧伤后心肌细胞、骨架损伤决定性影响心肌细胞力学特性。

参考文献

1 Steenbergen C, Murphy E, Watts J A *et al*. Correlation between cytosolic free calcium, contractre, ATP, and irreversible ischemic injury in perfused rat heart. Circ Res, 1990; 66(1): 135

2 Hohl C M, Anse A, Altschuld R A *et al*. Contracture of isolated rat heart cells on anaerobic to aerobic transition. Am J Physiol, 1982; 242(6): H1022

3 Jennings R B, Rerimer K A, Steenbergen C Editorial. Myocardial ischemia revisited. The osmolar load, membrane damage and reperfusion. J Mol Cell Cardiol, 1986; 18(8): 769

4 Cartwright J, Goldstein M A. Microtubules in the heart muscle of the postnatal and adult rat. J Mol Cell Cardiol, 1985; 17(1): 1

5 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

6 黎 鳌,杨宗城.烧伤治疗学.第2版.北京:人民卫生出版社,1995 50~52

7 Geisbuhler T P, Rovett M J. Lactate does not enhance anoxia-reoxygenation damage in adult cardiac myocytes. J Mol Cell Cardiol, 1990; 22(11): 1325

8 Hilenski L L, Teraciol L, Sawyer R *et al*. Effects of extracellular matrix on cytoskeletal and myofibrllar organization *in vitro*. Scanning Microsc, 1989; 3(2): 535

(收稿: 1997-06-03;修回: 1998-02-13)

(编辑 王 红)

Effects of hypoxia combined with burn serum on the viscoelastic characteristics of myocardial cells in newborn rats*

Wang Xu, 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 explore the mechanism of the injury of the cytomembrane and skeleton of cardiac muscle cells caused by the two injurious factors of hypoxia and burn serum after burns. Methods: The changes of the myocardial cells in the newborn rats were dynamically observed with immunohistochemistry, cytometry and measurement of cytomembranous viscoelasticity. Results: In the early stage after severe burns, the elasticity, the fluorescent intensity of the skeleton protein and the number of the positive signals of the intermediate filament and some microtubules were markedly decreased. Conclusion: The skeleton of

* This project was supported by the National Natural Science Foundation of China No. 39290700-03

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

the myocardial cells is essential to the integrity of its cytomembrane. The changes of the biomechanic characteristics of the cytomembrane resulted from the increase of cellular fragility and decrease of cytomembranous viscoelasticity caused by injury of the cellular skeleton might directly participate in the occurrence, development and improvement of the myocardial injury after burns.

Key words myocardial cell; skeleton; burns; rat

拔 T管致胆汁性腹膜炎5例原因分析及治疗体会

个案与短篇

Analysis of the cause and experience in treatment of biliary peritonitis after pulling out "T" tube

刘大平* 李智华 周永碧 何振平 (第三军医大学附属西南医院肝胆外科中心) 重庆, 400038

胆总管探查 T管引流术是肝胆外科常见的手术方式,拔 T管后发生胆汁性腹膜炎的情况,近年来也屡见报道[1-4]。我科从1991年1月至1997年7月,行胆总管探查 T管引流术512例,发生拔 T管后胆汁性腹膜炎5例。发生率0.97%。全组均治愈出院。现报告如下。

1 临床资料

本组男3例,女2例。年龄最大65岁,最小2岁。其中胆道结石4例,胆道蛔虫1例。3例术前伴梗阻性黄疸(总胆红素85.5~225.6μmol/L),低蛋白血症2例,1例少量腹水。无肝硬化、糖尿病等合并症。拔管时间为术后16~26 d不等。拔管前全经常规夹管及 T管造影,无异常。拔管后几分钟至第2天出现腹痛及腹膜炎体征。5例病人都经腹穿抽出胆汁而确诊。其中非手术治疗成功1例,再次手术4例,再次手术时间为拔管后当天,第1、2、7天。术中见窦道形成不全2例,窦道过长成角2例,1例胆道残余结石梗阻。重新置 T管2例,窦道修补置胶管引流2例。

2 讨论

发生原因:① 患者体质差影响窦道的形成: T管窦道的形成是一种增生性组织修复过程,低蛋白血症、贫血、肝硬化腹水及年幼或高龄因都会影响窦道的形成。本组2例窦道形成不全者均存在低蛋白血症及年龄影响因素。② 残余结石: 胆道残余结石在拨管后可使胆道梗阻或排通不畅,胆道压力增加,引起胆道或窦道炎,使窦道壁水肿,脆弱和坏死而致胆漏,本组1例再次手术发现胆总管下端1.0 cm结石,肝总管2枚0.6 cm结石,而 T管造影并未发现结石及胆道梗阻。③ T管在腹腔内路经太长,窦道不能全长形成: 本组2例 T管窦道呈反"C"字型,并在转角处形成不全。④ 拨管后剧烈活动,本组1例拨管顺利,2 d后出院,乘长途汽车返家后出现胆漏,再次手术见窦壁破裂,估计为活动时窦道撕裂。

治疗:① 保守治疗: 考虑到胆漏应设法从原 T管口插入合适的尿管引流胆汁,配合禁食及抗生素等治疗,对窦道破损小、胆汁漏出不多者多可治愈。但对保守治疗病情无明显改善且出现弥漫性腹膜炎者应果断开腹探查。本组1例欲行保守治疗并在局麻下行右下腹小切口腹腔灌洗引流,6 d后病情加重,被迫急诊手术,分析小切口腹腔引流不彻底,引流管易被纤维凝块及脓苔堵塞,极易残留膈下,肝旁及肠间脓肿。② 手术治疗: 对保守治疗无效,出现弥漫性腹膜炎者应及早手术,清洗腹腔,修补漏口,重新置 T管或尿管行窦道及腹腔引流。否则将发生胆管炎及化脓性腹膜炎,进而使肝脏及其它重要器官发生中毒性损害。文献[3]报道胆漏致胆汁性腹膜炎的病死率为28.6%。

预防措施: 胆道探查后 T管的正确安置对窦道的按期形成起重要作用, T管在腹腔内的路径应短而直;术毕应常规将大网膜填于肝下间隙;对右半大网膜缺失或大网膜过于短薄的病人应行大网膜延长,包绕固定于 T管周围,这对预防胆漏有举足轻重的作用;对于年幼、老年体弱,特别是伴贫血、低蛋白血症、肝功能差及接受皮质激素治疗者,拨管时间宜延长到6~8周;笔者主张拨管应在床旁进行,先开放 T管排尽胆汁,拨管后瘘道口宜敞开,若胆汁外流较多,也可置入一导尿管引流,如无异常再予拔除。

关键词 T管;胆汁性腹膜炎;胆道探查
中图法分类号 R656

参考文献

1 喻晓明,郑英键.拔 T管致胆汁性腹膜炎的教训分析.腹部外科杂志, 1997; 10(4): 188
2 成盘吉,陆松春.胆道手术后胆漏35例教训分析.中国实用外科杂志, 1997; 17(5): 307
3 曹 齐,杜 微,李 殿等.胆道术后胆汁性腹膜炎14例分析.实用外科杂志, 1993; 13: 377
4 黎东明,梁立建.拔 T管后胆漏6例分析.中国实用外科杂志, 1997; 17(4): 236

(收稿: 1997-11-10;修回: 1998-01-05)
(编辑 冷怀明)

* 刘大平,男,37岁,主治医师,基金班学员,现在成都军区昆明总医院曲靖分院 曲靖, 655000

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