

· 论著 ·

# 微管解聚对大鼠心肌细胞自主搏动和动作电位的影响及其机制

兰晓东 党永明 李凌霄 张琼 黄跃生



**【摘要】** 目的 观察微管解聚对大鼠心肌细胞自主搏动频率、动作电位(AP)、耗氧量的影响并探究其机制。方法 将180只SD大鼠乳鼠分12批处理进行实验,每批取15只大鼠乳鼠处死,剪取心脏组织分离培养心肌细胞,分别接种至1个铺有6块圆形盖玻片的12孔板、1个铺有6块方形盖玻片的12孔板、2个细胞培养瓶、2个细胞培养皿。将培养3d的各容器中细胞按随机数字表法分为正常对照组(加入3mL 37℃复温的DMEM/F12培养液,常规培养3h)和微管解聚组(加入3mL 37℃复温的含终浓度为8 μmol/L秋水仙碱的DMEM/F12培养液,常规培养3h),每组分别3孔、1瓶、1皿。免疫荧光染色后激光扫描共聚焦显微镜下观察细胞微管形态变化,蛋白质印迹法检测细胞游离态及聚合态α微管蛋白的含量变化。倒置显微镜下观察并计算细胞自主搏动频率。氧微电极监测系统测定含有心肌细胞的DMEM/F12培养液加入秋水仙碱前后的溶解氧浓度,另测定单纯培养液和秋水仙碱+培养液溶解氧浓度。采用全细胞膜片钳记录模式记录细胞AP、延迟整流型钾离子通道电流( $I_K$ )和L型钙离子通道电流( $I_{Ca-L}$ )变化,绘制电流密度-电压(I-V)曲线。对数据行独立或配对样本t检验。**结果** (1)正常对照组细胞微管结构完整,围绕核周呈放射状分布,线性管状结构清晰。微管解聚组细胞微管结构破坏,呈现弥散性分布,线性管状结构粗糙而不光滑。(2)微管解聚组细胞游离态α微管蛋白含量为 $0.61 \pm 0.03$ ,明显高于正常对照组的 $0.46 \pm 0.03$ ,  $t = -6.99$ ,  $P < 0.05$ ;聚合态α微管蛋白含量为 $0.57 \pm 0.04$ ,明显低于正常对照组的 $0.88 \pm 0.04$ ,  $t = 9.09$ ,  $P < 0.05$ 。(3)微管解聚组细胞自主搏动频率为 $(59 \pm 8)$ 次/min,较正常对照组的 $(41 \pm 7)$ 次/min明显增加( $t = 5.62$ ,  $P < 0.01$ )。(4)含心肌细胞的培养液溶解氧浓度为 $(138.4 \pm 2.5)$  μmol/L,秋水仙碱处理后下降为 $(121.7 \pm 3.6)$  μmol/L,差异明显( $t = 26.31$ ,  $P < 0.05$ )。单纯培养液和秋水仙碱+培养液溶解氧浓度无明显差异( $t = 0.72$ ,  $P > 0.05$ )。(5)与正常对照组比较,微管解聚组细胞AP形态发生明显变化,复极化平台期不明显,动作电位时程(APD)明显缩短。微管解聚组细胞的APD<sub>20</sub>、APD<sub>50</sub>、APD<sub>90</sub>分别为 $(36.2 \pm 3.8)$ 、 $(73.7 \pm 5.7)$ 、 $(115.1 \pm 8.0)$  ms,较正常对照组的 $(40.2 \pm 2.3)$ 、 $(121.4 \pm 7.0)$ 、 $(169.4 \pm 5.6)$  ms明显缩短( $t$ 值分别为2.61、15.88、16.75,  $P$ 值均小于0.05)。(6)微管解聚组细胞 $I_K$ 的I-V曲线较正常对照组上移,激活后各测试电压(0~40 mV)下微管解聚组 $I_K$ 电流密度均高于正常对照组( $t$ 值为2.70~3.76,  $P$ 值均小于0.05)。(7)2组细胞 $I_{Ca-L}$ 的I-V曲线基本重叠,激活后各测试电压(-30~50 mV)下 $I_{Ca-L}$ 电流密度相近( $t$ 值为-1.57~1.66,  $P$ 值均大于0.05)。**结论** 微管解聚后 $I_K$ 增强, $I_{Ca-L}$ 变化不明显,使得AP复极化加快,进而缩短APD,加快大鼠心肌细胞自主搏动频率,增加其耗氧量。

**【关键词】** 肌细胞,心脏; 微管; 动作电位; 延迟整流型钾离子通道电流; L型钙离子通道电流

**Effects of microtubule depolymerization on spontaneous beating and action potential of cardiac myocytes in rats and its mechanism** Lan Xiaodong, Dang Yongming, Li Lingfei, Zhang Qiong, Huang Yuesheng. Institute of Burn Research, Southwest Hospital, State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China  
Corresponding author: Huang Yuesheng, Email: yshuangtmmu@163.com

**【Abstract】 Objective** To explore the effects of microtubule depolymerization (MD) on the spontaneous beating rate, action potential (AP), and oxygen consumption of cardiac myocytes in rats and its

DOI:10.3760/ema.j.issn.1009-2587.2015.03.009

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81272086)

作者单位:400038 重庆,第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室

通信作者:黄跃生,Email:yshuangtmmu@163.com

**mechanism. Methods** One-hundred and eighty neonatal SD rats divided into 12 batches were used in the experiment, and 15 rats in each batch were sacrificed for the isolation and culture of cardiac myocytes after the heart tissues were harvested. The cardiac myocytes were respectively inoculated in one 12-well plate filled with 6 round cover slips, one 12-well plate filled with 6 square cover slips, two cell culture flasks, and two cell culture dishes. After routine culture for three days, the cardiac myocytes from all the containers were divided into normal control group (NC, routinely cultured with 3 mL DMEM/F12 solution rewarmed at 37 °C for 3 h) and group MD (routinely cultured with 3 mL DMEM/F12 solution rewarmed at 37 °C and containing 8 μmol/L colchicine for 3 h) according to the random number table, with 3 holes, 1 flask, or 1 dish in each group. The morphological changes in microtubules were observed with confocal laser scanning microscope after immunofluorescent staining. The content of polymerized or dissociative α-tubulin was determined by Western blotting. Spontaneous beating rate of the cells was observed and calculated under inverted microscope. Dissolved oxygen concentration of DMEM/F12 solution containing cardiac myocytes was determined by oxygen microelectrode system before and after the addition of colchicine. Additionally, dissolved oxygen concentration of DMEM/F12 solution and colchicine + DMEM/F12 solution was determined. The whole-cell patch-clamp technique was used to record AP, delayed rectifier K<sup>+</sup> current (I<sub>k</sub>), and L-type Ca<sup>2+</sup> current (I<sub>Ca-L</sub>) in cardiac myocytes; current density-voltage (I-V) curves were drawn based on the traces. Data were processed with independent or paired samples *t*-test. **Results** (1) In group NC, microtubules of cardiac myocytes were around the nucleus in radial distribution with intact and clear linear tubiform structure. The microtubules in group MD were observed in dispersive distribution with damaged structure and rough linear tubiform structure. (2) In group MD, the content of dissociative α-tubulin of cells (0.61 ± 0.03) was obviously higher than that in group NC (0.46 ± 0.03, *t* = -6.99, *P* < 0.05), while the content of polymerized α-tubulin (0.57 ± 0.04) was significantly lower than that in group NC (0.88 ± 0.04, *t* = 9.09, *P* < 0.05). (3) Spontaneous beating rate of cells was (59 ± 8) times per min in group MD, which was distinctly higher than that in group NC [(41 ± 7) times per min, *t* = 5.62, *P* < 0.01]. (4) Dissolved oxygen concentration of DMEM/F12 solution containing cardiac myocytes was (138.4 ± 2.5) μmol/L, and it was reduced to (121.7 ± 3.6) μmol/L after the addition of colchicine (*t* = 26.31, *P* < 0.05). There was no obvious difference in dissolved oxygen concentration between DMEM/F12 solution and colchicine + DMEM/F12 solution (*t* = 0.72, *P* > 0.05). (5) Compared with that of group NC, AP morphology of cells in group MD changed significantly, with unobvious repolarization plateau phase and shorter action potential duration (APD). The APD<sub>20</sub>, APD<sub>50</sub>, and APD<sub>90</sub> were respectively (36.2 ± 3.8), (73.7 ± 5.7), and (115.1 ± 8.0) ms in group MD, which were significantly shorter than those of group NC [(40.2 ± 2.3), (121.4 ± 7.0), and (169.4 ± 5.6) ms, with *t* values respectively 2.61, 15.88, and 16.75, *P* values below 0.05]. (6) Compared with that of group NC, the I-V curve of I<sub>k</sub> of cells in group MD moved up with higher current density under each test voltage (0 to 40 mV) after activation (with *t* values from 2.70 to 3.76, *P* values below 0.05). (7) There was not much alteration in current density of I<sub>Ca-L</sub> under each test voltage (-30 to 50 mV) between 2 groups (with *t* values from -1.57 to 1.66, *P* values above 0.05), and their I-V curves were nearly overlapped. **Conclusions** After MD, the I<sub>k</sub> is enhanced without obvious change in I<sub>Ca-L</sub>, making AP repolarization faster and APD shortened. Then the rapid spontaneous beating rate increases oxygen consumption of cardiac myocytes of rats.

**【Key words】** Myocytes, cardiac; Microtubules; Action potentials; Delayed rectifier K<sup>+</sup> current; L-type Ca<sup>2+</sup> current

根据“休克心”理论,微管解聚是严重烧伤后心肌细胞早期出现的病理现象;与此同时,心肌细胞发生了以动作电位时程(APD)改变为特征的电生理特性变化<sup>[1-2]</sup>。值得注意的是,微管与心肌细胞离子通道关系密切<sup>[3]</sup>,微管解聚很可能参与了严重烧伤后心肌细胞电生理的改变。目前鲜有研究系统阐释微管解聚对心肌细胞自主搏动、动作电位(AP)的影响及其具体机制。本研究记录了微管解聚对大鼠乳鼠心肌细胞 AP、自主搏动频率、耗氧量的影响,并观察复极化过程中 2 种主要离子电流:延迟整流型钾离子通道电流(I<sub>k</sub>)和 L 型钙离子通道电流(I<sub>Ca-L</sub>)的变化以探究其发生机制,以期进一步阐明严重烧伤早

期心肌电生理活动异常和心功能障碍的机制,为临床诊疗提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物及主要材料来源

180 只 1~2 d 龄健康清洁级 SD 大鼠乳鼠,雌雄不拘,体质量(9.1 ± 1.9)g,由第三军医大学实验动物中心提供,许可证号:SYXK(军)2002-029。

秋水仙碱、4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)、4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)、乙二醇双(2-氨基乙醚)四乙酸(EGTA)、四乙基氯化铵(TEAC)、氯化铬、聚乙二醇辛基苯基醚 Triton X-100 等均购自美国

Sigma 公司。牛血清白蛋白(BSA)购自美国 Genview 公司。兔抗大鼠  $\alpha$  微管蛋白多克隆抗体、花青素 Cy3 标记的山羊抗兔 IgG 荧光二抗购自美国 Protein-Tech 公司,兔抗大鼠电压依赖性阴离子通道蛋白(VDAC)多克隆抗体购自美国 Abcam 公司,辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔二抗购自美国 Santa Cruz 公司,HRP 标记的小鼠来源的抗 GAPDH 抗体购自上海康成生物工程有限公司,增强型化学发光检测试剂盒购自美国 Pierce 公司。

3131 型二氧化碳培养箱、Varioskan Flash 型多功能酶标仪均购自美国 Thermo Scientific 公司,ChemiDoc XRS 型凝胶成像仪购自美国 Bio-Rad 公司,LSM700 型激光扫描共聚焦显微镜购自德国 ZEISS 公司,CK40 型倒置显微镜购自上海奥林巴斯(中国)有限公司,氧微电极监测系统购自丹麦 Unisense 公司。膜片钳系统中 P-97 型微电极控制仪购自美国 Sutter 公司,BX51WI 型光学显微镜购自日本奥林巴斯公司,MC-35A 型微操纵器购自日本 Narishige 公司,Axopatch 200B 型膜片钳放大器、Digdata 1200 数/模转换器、pClamp 10.0 数据采集和分析软件均购自美国 Axon 公司。

## 1.2 心肌细胞培养及分组处理

将大鼠分 12 批次处理(结果取均值),每批取 15 只大鼠乳鼠,断颈处死后暴露并剪取心脏组织,混合后剪碎按文献[4]方法采用胰蛋白酶组织消化法分离培养原代乳鼠心肌细胞,计数后采用 DMEM/F12 培养液将细胞浓度调整为约  $1 \times 10^7$  个/mL。根据后续实验需要将心肌细胞分别接种至 1 个铺有 6 块圆形盖玻片的 12 孔板(每块  $100 \mu\text{L}$ )、1 个铺有 6 块方形盖玻片的 12 孔板(每块  $100 \mu\text{L}$ )、2 个底面积为  $25 \text{ cm}^2$  的细胞培养瓶(每瓶 4 mL)、3 个直径为 60 mm 的细胞培养皿(每皿 3 mL)。将分装后的细胞置入二氧化碳培养箱常规培养,隔日换液。

将培养 3 d 的各种容器中的细胞按随机数字表法分为正常对照组和微管解聚组(每组分别 3 孔、1 瓶、1 皿)并进行以下相应处理,剩余 1 个细胞培养皿用于细胞培养液溶解氧浓度检测。正常对照组:加入 3 mL  $37^\circ\text{C}$  复温的 DMEM/F12 培养液,置于  $37^\circ\text{C}$ 、体积分数 5% 二氧化碳培养箱中培养 3 h;微管解聚组:加入 3 mL  $37^\circ\text{C}$  复温的含终浓度为  $8 \mu\text{mol/L}$  秋水仙碱的 DMEM/F12 培养液,置于  $37^\circ\text{C}$ 、体积分数 5% 二氧化碳培养箱中处理 3 h。

## 1.3 观测指标

**1.3.1 细胞微管形态** 取圆形盖玻片上细胞,按

文献[5]方法采用免疫荧光染色法观察。 $37^\circ\text{C}$  复温的 PBS 漂洗 3 次,40 g/L 多聚甲醛固定 15 min, PBS 漂洗 3 次,体积分数 0.1% Triton X-100 通透 20 min, PBS 漂洗 3 次,滴加 50 g/L BSA 封闭 2 h。弃 BSA,加入兔抗大鼠  $\alpha$  微管蛋白多克隆抗体(稀释比为 1:100)  $4^\circ\text{C}$  孵育过夜。PBS 漂洗 3 次,加入花青素 Cy3 标记的山羊抗兔 IgG 荧光二抗(稀释比为 1:100)  $37^\circ\text{C}$  避光孵育 1 h。PBS 漂洗 3 次,避光 DAPI(稀释比为 1:100)室温染核 5 min。PBS 漂洗 4 次,抗荧光淬灭封片剂封片后于激光扫描共聚焦显微镜下观察  $\alpha$  微管蛋白荧光染色情况,采用 ZEN 2012(蓝色版)显微图像分析软件(德国 ZEISS 公司)获取微管形态灰度图像。本实验重复 3 次。

**1.3.2 细胞不同状态  $\alpha$  微管蛋白含量** 采用蛋白质印迹法测定。取 2 组各 1 个培养瓶的细胞,按文献[4]方法分别提取细胞聚合态和游离态微管蛋白的总蛋白并定量。取上述 2 种总蛋白样品各  $10 \mu\text{g}$ ,行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳、湿法转膜、50 g/L BSA 封闭 2 h。切取微管蛋白所在膜区域,加入兔抗大鼠  $\alpha$  微管蛋白多克隆抗体一抗(稀释比为 1:1 000),切取 GAPDH、VDAC 所在膜区域,加入 HRP 标记的小鼠来源的抗 GAPDH 抗体(稀释比为 1:5 000)和兔抗大鼠 VDAC 多克隆抗体一抗(稀释比为 1:1 000)作为内参照,  $4^\circ\text{C}$  孵育过夜。以 Tris 吐温 20 缓冲液(TBST)漂洗 4 次后加入 HRP 标记的山羊抗兔二抗(稀释比为 1:4 000)室温孵育 1 h, TBST 再漂洗 4 次。超敏化学发光试剂曝光,采用 Quantity One 软件进行灰度分析,结果以目的蛋白与内参照灰度值比值表示。本实验重复 3 次。

**1.3.3 细胞自主搏动频率** 按文献[6]方法,将 2 组各 1 个培养皿的细胞置于 200 倍倒置显微镜下,选择 5 个视野实时录制细胞自主搏动视频约 1 min,于视频中选择 10 个搏动稳定且规律的细胞作为观察对象,记录其在 30 s 内的自主搏动次数,并计算搏动频率。

**1.3.4 细胞培养液溶解氧浓度** 按文献[7]方法,取剩余的 1 个细胞培养皿换液并常规培养原代心肌细胞 5 h,使培养液中溶解氧达到稳定水平。在细胞培养箱内,以校准后的氧微电极监测系统测定并记录细胞培养液的溶解氧浓度。随后加入秋水仙碱,使其终浓度为  $8 \mu\text{mol/L}$ (下同),处理 3 h 后再次检测并记录培养液的溶解氧浓度。选取氧微电极监测系统读数稳定后 1 min 记录数据(设定每秒记录 1 次)的平均值。为排除秋水仙碱与培养液成分相

互作用引起溶解氧浓度改变的可能,此处增加单纯培养液(培养皿中仅有 3 mL DMEM/F12 培养液)和秋水仙碱+培养液(DMEM/F12 培养液中加秋水仙碱)作对照,同前检测培养液溶解氧浓度。

**1.3.5 细胞电生理指标** 每组取 3 块方形盖玻片,以下每个指标用 1 块,按文献[8-9]方法采用全细胞膜片钳记录模式分别记录 2 组细胞 AP、 $I_K$  和  $I_{Ca-L}$ ,该实验每个指标各重复 5 个细胞。

(1) AP。配制检测 AP 的细胞外液:5.4 mmol/L 氯化钾、137.0 mmol/L 氯化钠、1.8 mmol/L 氯化钙、0.3 mmol/L 磷酸氢二钠、10.0 mmol/L 无水葡萄糖、1.0 mmol/L 氯化镁、10.0 mmol/L HEPES,加入氢氧化钠调节 pH 值至 7.4;细胞内液:5 mmol/L 三磷酸腺苷二钠、120.0 mmol/L 氯化钾、1.0 mmol/L 氯化钙、5.0 mmol/L 氯化镁、11.0 mmol/L 无水葡萄糖、11.0 mmol/L EGTA、10.0 mmol/L HEPES,加入氢氧化钠调节 pH 值至 7.2。将 1 根外径 1.5 mm 的玻璃毛细管用微电极拉制仪拉制成玻璃微电极,内充检测 AP 的细胞内液。室温下在标本槽内注入检测 AP 的细胞外液,放入心肌细胞贴壁生长的方形盖玻片,400 倍光学显微镜下选择表面光洁、搏动良好的细胞作为目标细胞,控制微操纵器使充满细胞内液的玻璃微电极浸入细胞外液(电极内施少许正压,防止外液倒流或尘粒堵塞电极尖端),玻璃微电极浸入时电阻为 2~5 M $\Omega$ 。调节极化电压补偿钮,使基线至零位。调整玻璃微电极逐渐接近目标细胞,触到细胞膜使电阻增大,负压持续吸引形成高阻封接(5~10 G $\Omega$ ),给予电极电容补偿,吸破细胞膜形成全细胞记录模式,此时给予膜电容补偿。记录膜电容,稳定 2 min 后确认封接良好即开始实验。设置放大器电流为 0,此时可直接在放大器显示屏上读取静息电位(RP)。在电流钳模式下,以 1.5 倍的阈上电流(0.6~1.2 nA,时程 10 ms)刺激引发细胞 AP(分为除极期、快速复极初期、平台期、快速复极末期、静息期)。电流信号经放大器放大和转换器转换成可记录的数字信号,采样频率为 10 kHz,结果经 4 kHz 高斯低通滤波处理。采用数据采集和分析软件测定 AP 相关参数,动作电位振幅(AMP)为 AP 除极期的最大值,APD 为 AP 从除极开始到复极完成所需要的时间,APD<sub>20</sub>、APD<sub>50</sub>、APD<sub>90</sub> 分别为 20%、50%、90% 复极化时 AP 持续时间。结果取 3 个连续 AP 的以上指标的平均值。

(2)  $I_K$ 。配制检测  $I_K$  的细胞外液:5.5 mmol/L 无水葡萄糖、5.4 mmol/L 氯化钾、0.5 mmol/L 氯化

镁、136.5 mmol/L 氯化钠、0.5 mmol/L 氯化镉、5.5 mmol/L HEPES,加入氢氧化钠调节 pH 值至 7.4;细胞内液:140.0 mmol/L 氯化钾、1.0 mmol/L 氯化镁、3 mmol/L 三磷酸腺苷二钠、0.1 mmol/L 三磷酸鸟苷二钠、0.1 mmol/L EGTA、5.0 mmol/L HEPES,加入氢氧化钾调节 pH 值至 7.2。应用检测  $I_K$  的细胞内外液,按 AP 检测步骤形成全细胞记录模式。在电压钳模式下,给予钳制电压 -50 mV, -40 mV 指令电压处理 200 ms 灭活钠离子通道,随后在指令电压 -50~40 mV、步阶 10 mV、步长 300 ms 下记录  $I_K$ 。于细胞外液滴加 10 mmol/L TEAC,该电流被阻断,验证为  $I_K$ 。为消除细胞间差异,以电流强度比膜电容,即电流密度(单位 pA/pF)作为记录指标。以测试电压为横坐标,电流密度为纵坐标绘制  $I_K$  的电流密度-电压(I-V)曲线。

(3)  $I_{Ca-L}$ 。配制检测  $I_{Ca-L}$  的细胞外液:5.4 mmol/L 氯化钾、0.5 mmol/L 氯化镁、1.8 mmol/L 氯化钙、136.5 mmol/L 氯化钠、5.5 mmol/L 无水葡萄糖、5.5 mmol/L HEPES,加入氢氧化钠调节 pH 值至 7.4,细胞内液:140 mmol/L 氯化铯、1.0 mmol/L 氯化镁、3 mmol/L 三磷酸腺苷二钠、0.1 mmol/L EGTA、0.1 mmol/L 三磷酸鸟苷二钠、5.0 mmol/L HEPES,加入氢氧化铯调节 pH 值至 7.2。应用  $I_{Ca-L}$  检测细胞内外液,按 AP 检测步骤形成全细胞记录模式。在电压钳模式下,给予钳制电压 -80 mV, -40 mV 指令电压处理 200 ms 灭活钠离子通道,随后在指令电压 -60~60 mV、步阶 10 mV、步长 300 ms 下记录  $I_{Ca-L}$ 。于细胞外液滴加 0.2 mmol/L 氯化铬,该电流被阻断,验证为  $I_{Ca-L}$ 。据记录结果同上绘制  $I_{Ca-L}$  的 I-V 曲线。

#### 1.4 统计学处理

计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 17.0 统计软件行独立样本 *t* 检验或配对样本 *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

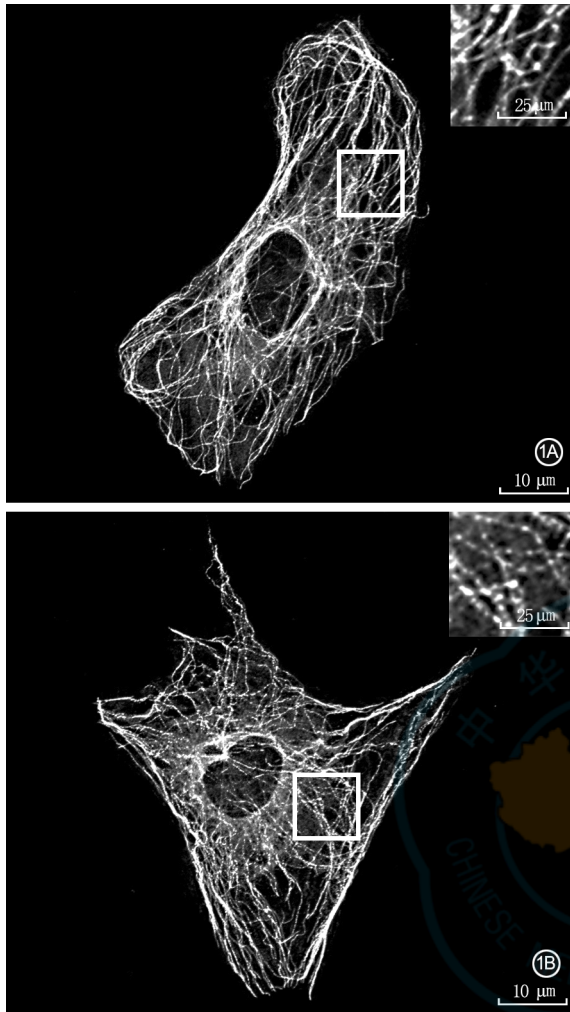
## 2 结果

### 2.1 细胞微管形态

正常对照组细胞微管结构完整,围绕核周呈放射状分布,线性管状结构清晰。微管解聚组细胞微管结构破坏,荧光强度减弱,呈现弥散性分布特点,线性管状结构连续性丧失,粗糙而不光滑,呈卷曲状改变。见图 1。

### 2.2 细胞不同状态 $\alpha$ 微管蛋白含量

微管解聚组细胞游离态  $\alpha$  微管蛋白含量  $0.61 \pm$



注:各图中大框区域为小框区域的放大,大图标尺为 10 μm,右上方小图标尺为 25 μm

图 1 2 组大鼠乳鼠心肌细胞 α 微管蛋白免疫荧光染色灰度图 激光扫描共聚焦显微镜 ×630。1A. 正常对照组线性管状结构清晰;1B. 微管解聚组线性管状结构不清晰,呈卷曲状改变

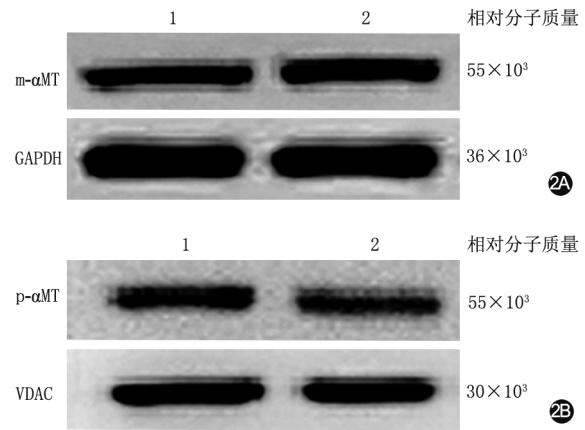
0.03, 明显高于正常对照组的  $0.46 \pm 0.03$ ,  $t = -6.99$ ,  $P < 0.05$ ; 细胞聚合态 α 微管蛋白含量为  $0.57 \pm 0.04$ , 明显低于正常对照组的  $0.88 \pm 0.04$ ,  $t = 9.09$ ,  $P < 0.05$ 。见图 2。

### 2.3 细胞自主搏动频率

微管解聚组细胞自主搏动频率( $59 \pm 8$ )次/min, 较正常对照组的( $41 \pm 7$ )次/min 明显增加( $t = 5.62$ ,  $P < 0.01$ )。

### 2.4 细胞培养液溶解氧浓度

含心肌细胞的 DMEM/F12 培养液溶解氧浓度为( $138.4 \pm 2.5$ ) μmol/L, 经秋水仙碱处理后下降为( $121.7 \pm 3.6$ ) μmol/L, 差异有统计学意义( $t = 26.31$ ,  $P < 0.05$ )。单纯培养液的溶解氧浓度为( $201.3 \pm 3.2$ ) μmol/L, 秋水仙碱 + 培养液的溶解氧



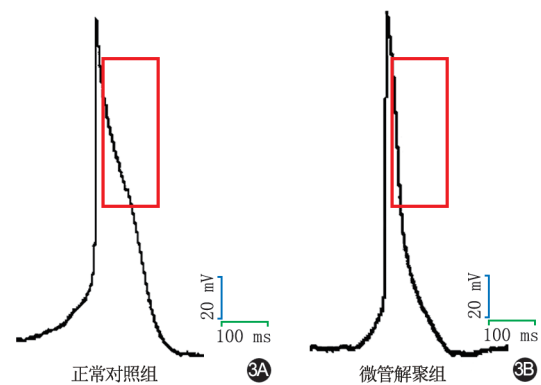
注:1. 正常对照组, 2. 微管解聚组; m-αMT 为游离态 α 微管蛋白, p-αMT 为聚合态 α 微管蛋白, VDAC 为电压依赖性阴离子通道蛋白

图 2 蛋白质印迹法检测 2 组大鼠乳鼠心肌细胞不同状态 α 微管蛋白含量。2A. m-αMT 含量; 2B. p-αMT 含量

浓度为( $199.2 \pm 2.3$ ) μmol/L, 无明显差异( $t = 0.72$ ,  $P > 0.05$ )。

### 2.5 AP

与正常对照组比较, 微管解聚组细胞 AP 形态发生明显变化, 复极化平台期不明显。微管解聚组、正常对照组细胞 RP 分别为( $68 \pm 6$ )、( $67 \pm 4$ ) mV, 无明显差异( $t = 0.83$ ,  $P > 0.05$ )。微管解聚组、正常对照组细胞 AMP 分别为( $84 \pm 7$ )、( $87 \pm 5$ ) mV, 也无明显差异( $t = 0.42$ ,  $P > 0.05$ )。微管解聚组细胞的  $APD_{20}$ 、 $APD_{50}$ 、 $APD_{90}$  分别为( $36.2 \pm 3.8$ )、( $73.7 \pm 5.7$ )、( $115.1 \pm 8.0$ ) ms, 较正常对照组的( $40.2 \pm 2.3$ )、( $121.4 \pm 7.0$ )、( $169.4 \pm 5.6$ ) ms 明显缩短( $t$  值分别为 2.61、15.88、16.75,  $P$  值均小于 0.05)。见图 3。

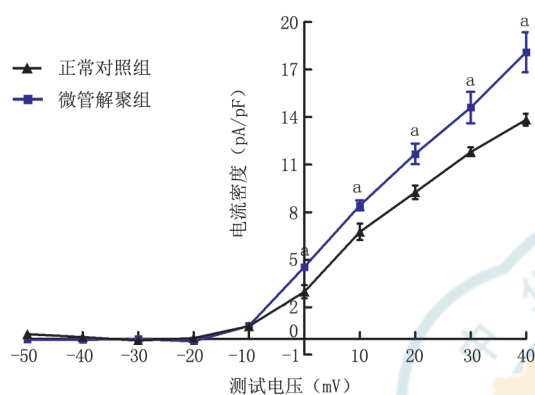


注:图中绿线示水平单位距离为 100 ms, 蓝线示垂直单位距离为 20 mV, 红色方框区域示平台期

图 3 2 组大鼠乳鼠心肌细胞动作电位形态图。3A. 正常对照组动作电位形态正常, 平台期明显; 3B. 微管解聚组动作电位形态改变, 时程缩短, 未见明显平台期

## 2.6 $I_K$

2 组细胞  $I_K$  的 I-V 曲线提示,该电流激活电压阈值约为  $-10$  mV,有明显的延迟整流特点。微管解聚组细胞  $I_K$  的 I-V 曲线较正常对照组上移。微管解聚组细胞  $I_K$  激活后  $0 \sim 40$  mV 电压下电流密度由  $(4.55 \pm 0.11)$  pA/pF 递增至  $(18.10 \pm 2.54)$  pA/pF,正常对照组由  $(2.97 \pm 0.83)$  pA/pF 递增至  $(13.83 \pm 0.75)$  pA/pF;微管解聚组  $I_K$  电流密度均高于正常对照组 ( $t$  值为  $2.70 \sim 3.76$ ,  $P$  值均小于  $0.05$ )。见图 4。



注:与正常对照组比较,  $^a P < 0.05$

图 4 2 组大鼠乳鼠心肌细胞延迟整流型钾离子通道电流的电流密度-电压曲线

## 2.7 $I_{Ca-L}$

2 组细胞  $I_{Ca-L}$  的 I-V 曲线基本重叠,为明显的内向电流,激活电压阈值约为  $-40$  mV,逆转电压为  $-10$  mV。微管解聚组细胞  $I_{Ca-L}$  激活后  $-30 \sim 50$  mV 电压下电流密度由  $(-4.8 \pm 0.8)$  pA/pF 递增至  $(-2.3 \pm 0.4)$  pA/pF,正常对照组由  $(-4.2 \pm 0.4)$  pA/pF 递增至  $(-2.2 \pm 0.4)$  pA/pF。2 组间无电压依赖的电流差异 ( $t$  值为  $-1.57 \sim 1.66$ ,  $P$  值均大于  $0.05$ )。见图 5。

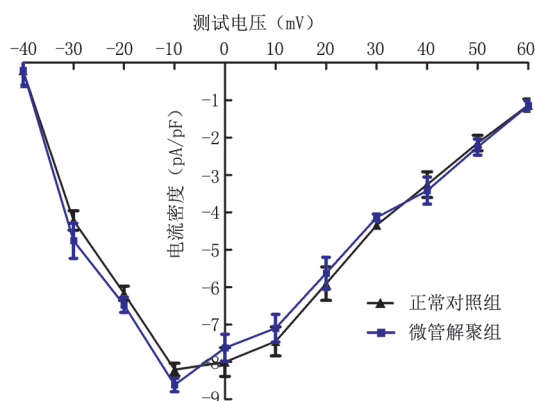


图 5 2 组大鼠乳鼠心肌细胞 L 型钙离子通道电流的电流密度-电压曲线

## 3 讨论

严重烧伤早期,作为心脏功能重要基础的电生理活动发生了一系列改变,并直接影响患者预后。124 例严重烧伤患者早期心电图分析结果显示异常者占 74.2%,且其病死率明显高于心电图结果正常患者<sup>[10]</sup>。严重烧伤患者心律失常发生率较高,早期以心动过速为主,心率增快不仅增加了心肌耗氧,而且由此引起的舒张期缩短、心脏冠状动脉供血减少,进一步加重了心肌缺血,常提示预后不良<sup>[11]</sup>。笔者单位以往的研究显示,严重烧伤早期缺血缺氧引起的微管解聚,是心肌损伤和功能下降的重要原因之一<sup>[2]</sup>。有研究证实,微管解聚确实直接或间接地参与了缺氧引起的离子电流改变<sup>[12-14]</sup>。因此,明确微管解聚对心肌细胞 AP 及相关离子通道的影响,有助于进一步加深对严重烧伤后“休克心”的认识。严重烧伤后心肌细胞缺氧引起其电生理特性改变的原因并不单一,本研究绕过缺氧引起的复杂病理改变,以秋水仙碱模拟缺氧后的微管解聚效应,探讨大鼠乳鼠心肌细胞电生理改变及其机制。

笔者单位前期研究提示,应用  $8 \mu\text{mol/L}$  秋水仙碱处理大鼠乳鼠心肌细胞 3 h,可模拟体积分数 1% 氧气的缺氧 30 min 对大鼠乳鼠心肌细胞造成的微管破坏效应<sup>[15]</sup>。本研究再次明确  $8 \mu\text{mol/L}$  秋水仙碱可引起大鼠乳鼠心肌细胞微管明显解聚,然后着眼于微管解聚后大鼠乳鼠心肌细胞电生理特性的改变展开实验。结果显示:微管解聚组心肌细胞 AP 复极化平台期不明显,复极化加速,APD 缩短,自主搏动频率较正常对照组明显增加,耗氧量也相应增加。上述结果提示,微管解聚引起离子通道功能或结构异常,导致 AP 出现异常,异常的 AP 进一步引起心律失常,严重影响心肌细胞功能。在 AP 形成中,复极化平台期时程最长,主要由外向  $I_K$  和内向  $I_{Ca-L}$  共同作用形成,特别是在应激条件下,这 2 种离子电流改变对 APD 影响很大<sup>[16]</sup>。本研究进一步证实,微管解聚增强了大鼠乳鼠心肌细胞  $I_K$ ,而对  $I_{Ca-L}$  无明显影响。因此,是外向钾离子电流增强而内向钙离子电流不变使得 AP 复极化增快,复极化平台期缩短,进而缩短了 APD,上述 AP 变化使得心肌细胞自律性增强,单位时间内自主搏动增多,同时与心肌细胞收缩频率密切相关的耗氧量也相应增加。上述改变与严重烧伤早期心肌电生理功能改变相符,侧面说明微管解聚参与了该病理过程<sup>[1]</sup>。

综上所述,微管解聚通过增强  $I_K$  使 AP 复极化增快,进而缩短 APD,加快心肌细胞搏动频率,增加

心肌细胞耗氧。微管解聚在严重烧伤后心电活动中具有重要意义。然而,由于涉及复杂的缺氧因素和种类众多的离子通道,该领域仍待大量研究探索。这些研究成果必然会为临床上以微管作为靶点治疗严重烧伤后心功能障碍提供新的理论依据和思路。

参考文献

[1] Suzuki M, Aoki K, Sekine K, et al. Correlation between QT dispersion and burn severity[J]. Burns, 2002,28(5): 481-485.

[2] 黄跃生, 杨宗城, 迟路湘, 等. 烧伤后“休克心”的研究[J]. 中华烧伤杂志, 2000,16(5): 275-278.

[3] Steele DF, Fedida D. Cytoskeletal roles in cardiac ion channel expression[J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1838(2): 665-673.

[4] Hu JY, Chu ZG, Han J, et al. The p38/MAPK pathway regulates microtubule polymerization through phosphorylation of MAP4 and Op18 in hypoxic cells[J]. Cell Mol Life Sci, 2010, 67(2): 321-333.

[5] Xu X, Zhang Q, Hu JY, et al. Phosphorylation of DYNLT1 at serine 82 regulates microtubule stability and mitochondrial permeabilization in hypoxia[J]. Mol Cells, 2013, 36(4): 322-332.

[6] Mechiche H, Grassin-Delye S, Robinet A, et al. Prostanoid receptors involved in regulation of the beating rate of neonatal rat cardiomyocytes[J]. PLoS One, 2012, 7(9): e45273.

[7] Chen B, Longtine MS, Nelson DM. Pericellular oxygen concentration of cultured primary human trophoblasts[J]. Placenta, 2013, 34(2): 106-109.

[8] Millis RM, Alvin ZV, Zhao A, et al. Effects of IGF-1 on I(K) and I(K1) channels via PI3K/Akt signaling in neonatal cardiac myocytes[J]. Int J Cell Biol, 2012: 712153.

[9] Wu AZ, Loh SH, Cheng TH, et al. Antiarrhythmic effects of (-)-epicatechin-3-gallate, a novel sodium channel agonist in cultured neonatal rat ventricular myocytes[J]. Biochem Pharmacol, 2013, 85(1): 69-80.

[10] 韩玲, 陈正岗, 刘芳. 124 例重度烧伤患者早期心电图分析[J]. 实用医药杂志, 2007,24(6): 680.

[11] Ivanova IG, Kaem RI. Comparison of electrocardiographic and pathomorphologic data in severe burn disease[J]. Kardiologija, 1970, 10(5): 105-108.

[12] Calaghan SC, Le Guennec JY, White E. Cytoskeletal modulation of electrical and mechanical activity in cardiac myocytes[J]. Prog Biophys Mol Biol, 2004, 84(1): 29-59.

[13] Hori M, Sato H, Kitakaze M, et al. Beta-adrenergic stimulation disassembles microtubules in neonatal rat cultured cardiomyocytes through intracellular Ca<sup>2+</sup> overload[J]. Circ Res, 1994, 75(2): 324-334.

[14] Wald FA, Figueroa Y, Oriolo AS, et al. Membrane repolarization is delayed in proximal tubules after ischemia-reperfusion: possible role of microtubule-organizing centers[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2003, 285(2): F230-240.

[15] 郑霖, 张西联, 周军利, 等. 微管解聚与心肌细胞缺氧性损害的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2006,28(7): 617-620.

[16] Janse MJ. Electrophysiological changes in heart failure and their relationship to arrhythmogenesis[J]. Cardiovasc Res, 2004, 61(2): 208-217.

(收稿日期:2014-12-11)

(本文编辑:贾津津)

· 消息 ·

《中华烧伤杂志》多会合一短时高效

2015 年 4 月 15—18 日,《中华烧伤杂志》主编工作扩大会、第十二届全国烧伤救治专题研讨会审稿会、中国医师协会烧伤科医师分会(简称医师分会)换届筹备组会议、中华医学会烧伤外科学分会(简称烧伤分会)常委会多会合一在成都顺利召开。出席本次会议的专家身兼数职,不仅是杂志骨干,也是烧伤分会常委,部分专家同时还是医师分会换届改选筹备组的主要成员。正因为他们扮演着不同的角色,也决定了他们肩负着更多的责任。个别因公务不能到会的专家均以请假的方式表示对会议的重视和对主办方的尊重。

主编工作扩大会由杂志主编黄跃生教授主持,编辑部王旭主任作杂志工作报告。最近 2 年编辑部特别邀请万方数据库和中国科学院文献情报中心对本刊进行了数据分析,王主任根据分析结果结合杂志现状,在前期所做的大量调研工作基础上,向莅会专家汇报了杂志取得的喜人成绩和面临的挑战,提出改办月刊的设想,客观列举了从双月刊改为月刊的优势与可能需要应对的压力。随后,各位专家围绕是否改办月刊、投稿量与稿件质量、重点号设置、是否暂停每年 1 次的研讨会等议题进行热烈讨论。

专业发展和信息时代都要求学术不断创新及时交流,大家纷纷表示,愿意在宣传杂志扩大稿源、对稿件质量严格把关方面承担更多的责任。关于重点号设置,“不求多、但求细”应该成为本刊的策划追求,即将一个专题细化为不同的方面,进行多方面的报道。有专家在会上当即表示愿意就相关专题进行组稿,得到部分专家响应。大家对明年暂停举办研讨会这一决定感到遗憾,认为研讨会是编委会组织全国烧伤界学者就某一专题内容进行深入讨论的最好形式,已经打造出自己的品牌,成为大家习惯性年度工作计划的重要内容,很难割舍,建议将这一重要学术会议与烧伤分会年会合并召开。

随后,大家听取了第十二届全国烧伤救治专题研讨会的筹备情况汇报,共同审阅了近千篇会议投稿并推荐出 30 余篇大会交流稿件,商议并通过了大会组织形式议案。

本次会议多会合一,用较短的时间解决了多个学术组织的相关问题,节约了各位专家的大量时间和差旅费用,得到与会专家的高度认可和赞赏,他们纷纷表示这种会议组织形式值得借鉴和推广。

本刊编辑部