

微管解聚剂在缺氧早期大鼠心肌细胞线粒体损害中的作用

邝勇 黄跃生



【摘要】 目的 了解微管解聚剂在缺氧早期大鼠心肌细胞线粒体损害中的作用。方法 常规方法分离培养 Wistar 乳鼠心肌细胞,分为正常组、微管解聚组(培养液中加入 4 $\mu\text{mol/L}$ 秋水仙碱)、缺氧组、缺氧解聚组(4 $\mu\text{mol/L}$ 秋水仙碱联合缺氧处理)。分别采用激光共聚焦显微镜检测 4 组细胞线粒体分布情况,透射电镜观察线粒体形态变化,生物氧耗呼吸仪检测呼吸调节比(RCR),高效液相色谱仪检测腺苷三磷酸(ATP)含量。缺氧组及缺氧解聚组所设时相点为缺氧后 10、20、30、60 min。结果 正常组线粒体呈粒状、排列规则,微管解聚组较之发生轻微改变。缺氧 20、30、60 min,缺氧解聚组线粒体分布的无规律性及形态结构损害均较缺氧组严重;细胞 RCR 分别为 1.58 ± 0.37 、 1.51 ± 0.32 、 1.12 ± 0.11 ,明显低于缺氧组 3.85 ± 0.56 、 2.98 ± 0.44 、 1.79 ± 0.73 ($P < 0.01$);ATP 含量分别为 (419 ± 83) 、 (326 ± 73) 、 (295 ± 58) ng/mg,亦明显低于缺氧组 (475 ± 68) 、 (397 ± 59) 、 (336 ± 67) ng/mg ($P < 0.01$)。结论 微管解聚剂可加重缺氧引起的心肌细胞线粒体分布紊乱和形态结构损害,以及线粒体呼吸功能和能量代谢障碍,它在线粒体缺氧损害机制中具有重要作用。

【关键词】 线粒体; 微管; 缺氧; 秋水仙碱; 肌细胞,心脏

Effect of the microtubule depolymerization on mitochondria damage in rat myocardiocytes early after hypoxia
 KUANG Yong, HUANG Yue-sheng. Institute of Burn Research, State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, P. R. China
 Corresponding author: HUANG Yue-sheng, Email: yshuang@public.cta.cq.cn, Tel: 023-68754173

【Abstract】 Objective To investigate the effect of microtubule depolymerization on mitochondria damage in rat myocardiocytes early after hypoxia. Methods Myocardiocytes from Wistar rats were isolated according to routine procedure, and they were randomly divided into control group, depolymerization group (with treatment of 4 $\mu\text{mol/L}$ colchicines in the culture medium), hypoxia group, hypoxia and depolymerization group (with treatment of 4 $\mu\text{mol/L}$ colchicines in the culture medium combined with low oxygen tension). The changes in distribution of the mitochondria were examined with laser confocal microscopy, the morphology and the structure of mitochondria was observed by transmission electron microscope, the respiration control ratio (RCR) was determined by respirometer, and the content of adenosine triphosphate (ATP) in endochylema was detected with liquid chromatograph at 20, 30, 60 post-hypoxia minutes (PHM). Results In control group, the mitochondria was in granular form, with regular arrangement, while mild changes were observed in depolymerization group. At 20, 30, and 60 PHM, the disarrangement in distribution and morphologic damage were aggravated in hypoxia depolymerization group, and the RCR (1.58 ± 0.37 , 1.51 ± 0.32 , 1.12 ± 0.11 , respectively) were evidently lower than those in hypoxia group (3.85 ± 0.56 , 2.98 ± 0.44 , 1.79 ± 0.73 , respectively, $P < 0.01$). The content of ATP showed the same tendency at the same time-points (419 ± 83 , 326 ± 73 , 295 ± 58 ng/mg) compared with hypoxia depolymerization group [$(475 \pm 68, 397 \pm 59, 336 \pm 67$ ng/mg) in hypoxia group]. Conclusion The disarrangement in distribution of mitochondria, as well as the damage in mitochondrial structure, respiratory function and energy metabolism, can be aggravated by microtubule depolymerization after hypoxia, which indicates that microtubule depolymerization plays an important role in the mitochondria damage.

【Key words】 Mitochondria; Microtubules; Anoxia; Colchicine; Myocytes, cardiac

线粒体是细胞缺血缺氧损害的核心靶点,其损

害是全身性缺血缺氧损害的关键环节。近年来已形成了以线粒体为中心,研究严重烧伤后缺血缺氧损害发生机制与防治策略的新思路^[1]。但至今有关烧伤后线粒体损害的具体途径和机制并不完全清楚。有研究提示,胞质骨架特别是微管很可能对线粒体损害的关键环节具有重要作用^[2]。笔者应用特异性微管解聚剂秋水仙碱解聚心肌细胞微管,观

基金项目:国家自然科学基金(30430680);国家重点基础研究发展规划(2005CB522601)

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

通讯作者:黄跃生,Email: yshuang@public.cta.cq.cn,电话:023-68754173

察缺氧心肌细胞内线粒体的分布、形态结构、呼吸功能及能量代谢变化,以探讨缺氧条件下秋水仙碱在心肌细胞线粒体损害中的作用。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂和仪器

DMEM/F12 培养基(美国 APLS 公司),罗丹明 123(美国 Sigma 公司),体积分数为 1% 氧气、5% 二氧化碳、94% 氮气的混合气体(重庆市朝阳气体有限公司)。TCS-NT 型激光共聚焦显微镜(美国 Leica 公司),TECNAI 10 型透射电镜(荷兰 Philip 公司),782 型生物耗氧呼吸仪(英国 Strathkelvin 公司),高效液相色谱仪(美国 Glison 公司),CSF 型超声波发生器(上海超声波仪器厂)。

1.2 心肌细胞培养、分组与缺氧模型制作

参照胰蛋白酶消化法分离清洁级 Wistar 大鼠(鼠龄 \leq 出生后 3 d,第三军医大学实验动物中心)心肌细胞,于培养瓶、6 孔培养板及置有盖玻片的培养皿培养。培养 5 d 后将细胞分为正常组、微管解聚组、缺氧组、缺氧解聚组。前 2 组细胞常规培养;后 2 组细胞放入密闭容器,充入前述混合气体达平衡,建立缺氧模型。微管解聚组与缺氧解聚组均参照文献[3]在培养液中加入 4 $\mu\text{mol/L}$ 秋水仙碱。设缺氧后 10、20、30、60 min 4 个观察时相点,用正常组和微管解聚组检测结果作参照。

1.3 观察心肌细胞线粒体分布情况

取盖玻片上生长的各组心肌细胞,加入 1 μg 罗丹明 123 作用 15 min,以 37 $^{\circ}\text{C}$ 磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗。激光共聚焦显微镜(激发光波长 488 nm、发射光波长 515 nm)下观察线粒体的分布情况。

1.4 观察心肌细胞线粒体形态变化

常规消化培养瓶中的细胞并制成悬液,加入 10 倍细胞体积的体积分数 2.5% 戊二醛(4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷),常规漂洗,10 g/L 锇酸固定,饱和醋酸铀过夜,系列丙酮脱水,环氧丙烷置换,环氧树脂 618 包埋,超薄切片切片,透射电镜下观察胞内线粒体的形态。

1.5 检测心肌细胞呼吸调节比(RCR)

1.5 ml 反应介质(250 mmol/L 蔗糖、3 mmol/L KH_2PO_4 、0.4 mmol/L 乙二胺四乙酸钾, pH 7.4)加入反应池,孵育 2 min,加入心肌细胞悬液 0.1 ml 预温 2 min,依次加入 0.5 mmol/L 苹果酸钠、0.5 mol/L 丙酮酸钠的混合物(作为反应底物)共 10 μl 以及 0.5 mol/L 腺苷二磷酸(ADP) 5 μl 。采用生物耗氧呼吸仪记录氧耗曲线,并测定加入 ADP 后的氧耗量(Ⅲ态

呼吸, ST_3)和 ADP 耗尽后的氧耗量(Ⅵ态呼吸, ST_4),计算线粒体 RCR(ST_3/ST_4)。

1.6 高效液相色谱仪检测心肌细胞腺苷三磷酸(ATP)含量

将培养板置于冰上,每孔加入 100 g/L 高氯酸 500 μl 裂解心肌细胞,收集裂解液。冰浴中应用超声波发生器破碎细胞,进行蛋白浓度测定。4 $^{\circ}\text{C}$ 下 12 000 $\times g$ 离心 30 min,收集上清液于 1.5 ml EP 管中,加入 2.5 mol/L K_2CO_3 调节 pH 值至 6.5,取 20 μl 上清液上柱检测。根据 ATP 的校正曲线计算 ATP 的含量(ng/mg)。

1.7 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计学软件进行 t 检验。

2 结果

2.1 心肌细胞线粒体分布及形态变化

2.1.1 线粒体分布 正常组线粒体呈粒状,嵴清晰,直径 0.5 ~ 1.0 μm 、长 2 ~ 10 μm ,以胞核为中心向四周呈放射状规律性排列。微管解聚组线粒体变化轻微。缺氧组缺氧 30 min 时线粒体发生融合、肿大、基质变淡,分布方式与微管基本一致;缺氧 60 min 时线粒体出现小空泡状结构,分布较紊乱。缺氧解聚组缺氧 30 min 时线粒体出现弥散、空泡状结构,分布失去规律性,基质变淡,与缺氧组缺氧 60 min 时的改变相似;缺氧 60 min 时线粒体分布完全失去规律性,基质明显变淡。见图 1。

2.1.2 各组心肌细胞线粒体形态结构 缺氧组缺氧 20 min 时线粒体有浓缩表现,个别线粒体出现肿胀但不明显,嵴模糊;缺氧 30 min 时部分线粒体有空泡化现象;缺氧 60 min 时线粒体嵴模糊、出现溶解,微丝不整齐,Z 线不明显。缺氧解聚组缺氧 30 min 时细胞、胞核形态不规则,核膜有凹陷皱褶现象,微丝积聚,线粒体排列极性消失、堆积,少数线粒体肿胀、嵴模糊;缺氧 60 min 时线粒体扩张,嵴完全溶解,空泡化,呈堆积状分布。缺氧解聚组缺氧后各时相点损害均较缺氧组加重。见图 2。

2.2 线粒体呼吸功能及能量代谢

缺氧 20、30、60 min 时,缺氧组心肌细胞 RCR 明显低于正常组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),缺氧解聚组明显低于缺氧组($P < 0.01$)。见表 1。缺氧 20、30、60 min 时,缺氧组心肌细胞 ATP 含量低于正常组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),缺氧解聚组明显低于缺氧组($P < 0.01$)。见表 2。

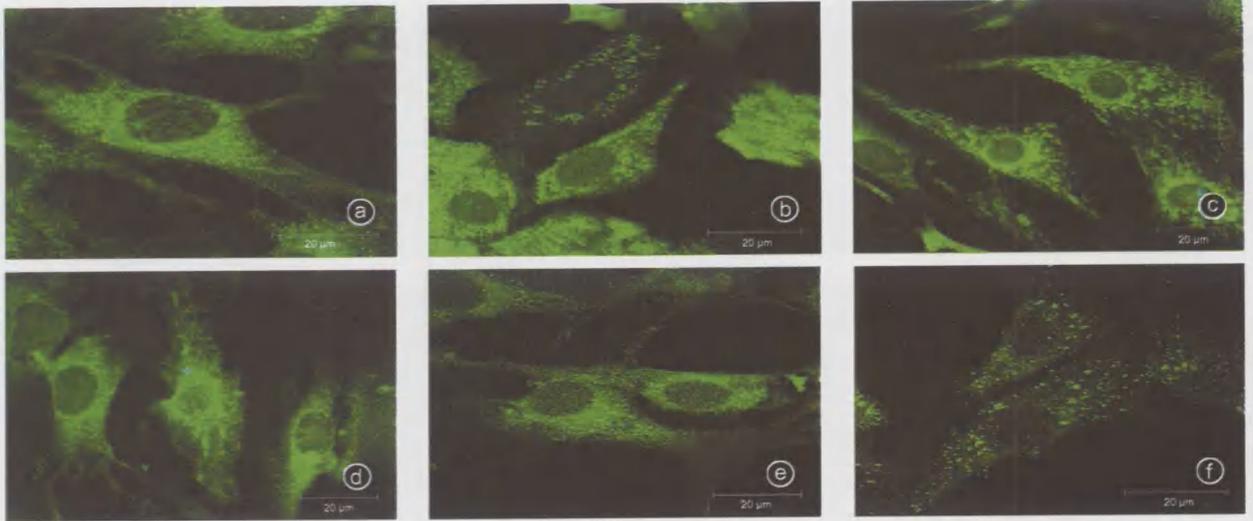


图 1 各组大鼠心肌细胞线粒体的分布情况(激光共聚焦显微镜,放大比例见图中标尺)。a. 正常组线粒体排列规则;b. 微管解聚组线粒体分布较正常组发生轻微改变;c. 缺氧组缺氧 30 min 时线粒体融合肿大、基质变淡;d. 缺氧解聚组缺氧 30 min 时线粒体失去规律性,基质变淡;e. 缺氧组缺氧 60 min 时线粒体出现小空泡状结构,规律性基本丧失;f. 缺氧解聚组缺氧 60 min 时线粒体分布完全失去规律性,基质明显变淡

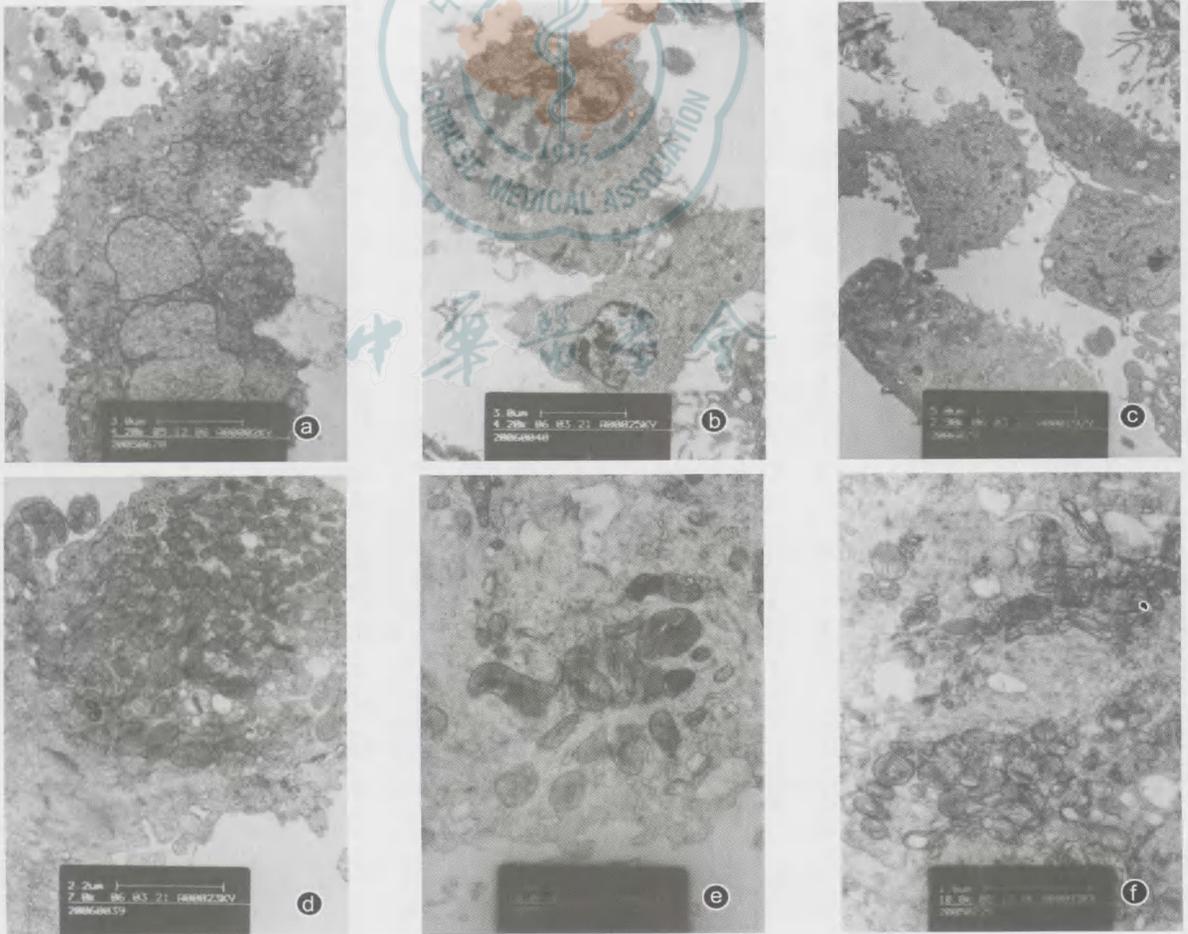


图 2 各组大鼠心肌细胞线粒体形态结构 透射电镜×4000。a. 正常组线粒体呈粒状;b. 缺氧组缺氧 20 min 时线粒体有浓缩表现;c. 缺氧组缺氧 30 min 时大量线粒体有空泡化现象;d. 缺氧解聚组缺氧 30 min 时线粒体排列极性消失;e. 缺氧组缺氧 60 min 时线粒体嵴模糊,出现溶解;f. 缺氧解聚组缺氧 60 min 时线粒体扩张呈堆状分布

表 1 各组心肌细胞 RCR 的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	缺氧时间 (min)			
		10	20	30	60
缺氧组	14	4.02 ± 0.36	3.85 ± 0.56 ^a	2.98 ± 0.44 ^b	1.79 ± 0.73 ^b
		3.39 ± 0.22 ^{bc}	1.58 ± 0.37 ^{bd}	1.51 ± 0.32 ^{bd}	1.12 ± 0.11 ^{bd}

注:RCR 为呼吸调节比;正常组 RCR 为 4.25 ± 0.24 , 微管解聚组 RCR 为 3.54 ± 0.19 ;与正常组比较,a: $P < 0.05$,b: $P < 0.01$;与缺氧组比较,c: $P < 0.05$,d: $P < 0.01$

表 2 各组心肌细胞 ATP 含量的比较 (ng/mg, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	缺氧时间 (min)			
		10	20	30	60
缺氧组	6	485 ± 76	475 ± 68 ^a	397 ± 59 ^b	336 ± 67 ^b
		425 ± 57 ^{bc}	419 ± 83 ^{bd}	326 ± 73 ^{bd}	295 ± 58 ^{bd}

注:ATP 为腺苷三磷酸;正常组 ATP 为 (487 ± 57) ng/mg, 微管解聚组 ATP 为 (414 ± 45) ng/mg;与正常组比较,a: $P < 0.05$,b: $P < 0.01$;与缺氧组比较,c: $P < 0.05$,d: $P < 0.01$

3 讨论

细胞缺氧是严重烧(创)伤及其他多种疾病条件下常见的病理生理现象之一^[4,5],而能量代谢障碍是缺氧导致细胞和组织器官损害的根本原因。缺氧时细胞能量代谢障碍,表现为有氧代谢抑制(线粒体途径)和代偿性糖酵解启动。在有氧代谢方面,以往对缺氧或缺血缺氧条件下能量代谢障碍的研究,大多仅从线粒体入手,主要研究缺氧条件下线粒体结构变化(如结构破坏、线粒体通透性转换及离子通道开放异常等)、有氧代谢酶活性、线粒体 DNA 损伤导致相关代谢酶转录及合成下降、线粒体能荷降低等;在代偿性糖酵解方面,主要研究缺血缺氧条件下,糖酵解关键酶活性的变化与能量代谢的关系,以及某些因子(如缺氧诱导因子等)调理糖酵解的作用等。长期以来,尽管从上述两个方面开展了大量的工作,但对缺氧条件下能量代谢障碍尤其是线粒体损害的确切机制尚不清楚,临床上缺乏有效的调理措施。

细胞骨架除了具有锚定亚细胞结构(如线粒体、高尔基体、细胞核、肌丝等)而对细胞起稳定性的作用外,还参与调节信号转导、核转录及蛋白质合成等^[2]。研究表明,线粒体在胞质中的分布和迁移往往与微管有关,故线粒体常常排列成长链状,并与微管的分布相对应^[6]。Saetersdal 等^[7]通过免疫电镜方法证实,微管与线粒体外膜相连。Capetanaki^[8]

研究认为,微管与线粒体外膜蛋白——电压依赖阴离子通道(VDAC)之间可能存在某种未知的桥梁分子,它通过与细胞外膜 VDAC 相连接,可以引起后者构象变化。我们已有的研究结果显示,在缺氧 10 min 时即出现微管损害和解聚,且随缺氧时间延长损害加重^[9]。为了解较早发生的微管损害是否参与了后续发生的线粒体损害,我们应用微管解聚剂对此作了进一步探讨。结果表明,在常氧下使用微管解聚剂,虽然线粒体形态、结构变化不明显,但 RCR、ATP 等线粒体功能指标均显著降低。且缺氧情况下使用微管解聚剂处理 30 min 和 60 min 后,线粒体排列、分布及形态的损害均较单纯缺氧组加重,而 RCR 和 ATP 含量显著低于单纯缺氧组。这些结果均提示微管参与了缺氧早期线粒体的细胞内定位及线粒体呼吸功能和能量代谢的调节。鉴于微管在细胞功能中的复杂性,笔者认为微管在线粒体损害的机制中起到了关键作用。这为研究线粒体损害机制提供了新的切入点,值得进一步研究。

参考文献

- [1] 黄跃生. 烧伤早期脏器损害防治的研究进展. 中华烧伤杂志, 2003, 19(5): 257-260.
- [2] Appaix F, Kuznetsov AV, Usson Y, et al. Possible role of cytoskeleton in intracellular arrangement and regulation of mitochondria. *Exp Physiol*, 2003, 88(1): 175-190.
- [3] 冯兵, 王德文, 何作云, 等. 细胞骨架在牵张刺激心肌细胞肥大过程中的作用. 第三军医大学学报, 2000, 22(6): 516-518.
- [4] Huang Y, Li Z, Yang Z. Roles of ischemia and hypoxia and the molecular pathogenesis of post-burn cardiac shock. *Burns*, 2003, 29(8): 828-833.
- [5] 黄跃生, 李志清, 吴庆云, 等. 缺血缺氧在大鼠烧伤后“休克心”中的作用及其机制探讨. 中华创伤杂志, 2002, 18(4): 205-209.
- [6] Karbowski M, Spodnik JH, Teranishi M. Opposite effects of microtubule-stabilizing and microtubule-destabilizing drugs on biogenesis of mitochondria in mammalian cells. *J Cell Sci*, 2001, 114(Pt 2): 281-291.
- [7] Saetersdal T, Greve G, Dalen H. Associations between beta-tubulin and mitochondria in adult isolated myocytes as shown by immunofluorescence and immunoelectron microscopy. *Histochemistry*, 1990, 95(1): 1-10.
- [8] Capetanaki Y. Desmin cytoskeleton: a potential regulator of muscle mitochondrial behavior and function. *Trends Cardiovasc Med*, 2002, 12(8): 339-348.
- [9] 邝勇, 黄跃生. 缺氧早期大鼠心肌细胞微管损害的观察. 中华烧伤杂志, 2007, 23(3): 172-174.

(收稿日期: 2006-09-26)

(本文编辑: 莫愚)