

· 烧伤后早期脏器损害 ·

微管干预剂对大鼠缺氧心肌细胞能量生成的影响



滕苗 黄跃生 郑霖 党永明 张琼

【摘要】 目的 了解缺氧条件下微管干预剂对大鼠心肌细胞能量生成的影响。方法 常规分离、培养大鼠心肌细胞,分为单纯缺氧组、缺氧+秋水仙碱(微管解聚剂)组及缺氧+5、10、15 mmol/L 紫杉醇(微管稳定剂)组。每组细胞加入刺激剂后,缺氧培养 0.5、1.0、3.0、6.0、12.0、24.0 h。采用锥虫蓝染色检测细胞死亡率,常规比色法检测细胞肌酸激酶(CK)活性,高效液相色谱法检测细胞腺苷三磷酸(ATP)及腺苷二磷酸(ADP)含量。**结果** (1)缺氧+秋水仙碱组及缺氧+15 mmol/L 紫杉醇组细胞培养 1.0~24.0 h 死亡率均高于单纯缺氧组($P < 0.01$);缺氧+5、10 mmol/L 紫杉醇组 6.0~24.0 h 时均低于单纯缺氧组($P < 0.05$)。(2)缺氧+秋水仙碱组培养 1.0~12.0 h 时 CK 活性均高于单纯缺氧组($P < 0.01$)。0.5~12.0 h 时,缺氧+15 mmol/L 紫杉醇组 CK 活性均高于单纯缺氧组($P < 0.01$);缺氧+5、10 mmol/L 紫杉醇组低于单纯缺氧组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。(3)缺氧+5 mmol/L 紫杉醇组培养 0.5~6.0 h ATP 含量[(49.9±2.8)、(40.7±2.0)、(25.8±1.9)、(19.1±1.2) μg/10⁶ 个细胞]高于单纯缺氧组[(42.9±5.8)、(29.5±1.8)、(18.2±0.9)、(14.1±0.7) μg/10⁶ 个细胞, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$]。0.5~12.0 h 时,缺氧+秋水仙碱组低于单纯缺氧组($P < 0.01$);缺氧+15 mmol/L 紫杉醇组低于单纯缺氧组及缺氧+10 mmol/L 紫杉醇组($P < 0.01$)。各组 ADP 含量变化趋势与 ATP 相反。**结论** 微管解聚剂和高浓度微管稳定剂可使缺氧心肌细胞 ATP 含量锐减。适宜浓度的微管稳定剂在缺氧早期可促进心肌细胞能量生成,对心肌具有保护作用。

【关键词】 肌细胞,心脏; 微管; 缺氧; 能量代谢; 秋水仙碱; 紫杉醇

The influence of microtubule intervention drugs on the energy metabolism of myocardial cells after hypoxia
 TENG Miao, HUANG Yue-sheng, ZHENG Ji, DANG Yong-ming, ZHANG Qiong. Institute of Burn Research, Southwest Hospital, State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, 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 influence of microtubule intervention drugs on the energy metabolism of myocardial cells after hypoxia. **Methods** The primary passage of cultured myocardial cells from neonatal rats were divided into A (with hypoxia), B (with hypoxia and administration of 10 μmol/ml colchicine), C (with hypoxia and administration of 5 μmol/ml taxol), D (with hypoxia and administration of 10 μmol/ml taxol) and E (with hypoxia and administration of 15 μmol/ml taxol) groups. The creatine kinase (CK) activity and contents of ATP and ADP were assayed with colorimetry and HPLC, respectively, and the vitality of myocardial cells were determined by trypan blue method at 0.5, 1.0, 3.0, 6.0, 12.0, 24.0 post-hypoxia hours (PHH). **Results** The mortality was obviously higher in B and E groups than those in A group ($P < 0.05$) at each time-points, but that in C and D groups were markedly lower than those in A group during 6.0 to 24.0 PHH ($P < 0.01$). The CK activity was significantly higher in B group than that in A group during 1.0 to 24.0 PHH, while that in E group was evidently higher, but it was lower in C and D groups than that in A group at each time-points ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The ATP contents in C group during 0.5 to 6.0 PHH were [(49.9±2.8), (40.7±2.0), (25.8±1.9), (19.1±1.2) μg/10⁶ cells, respectively], which were obviously higher than those in A group [(42.9±5.8), (29.5±1.8), (18.2±0.9), (14.1±0.7) μg/10⁶ cells, respectively, $P < 0.05$ or $P < 0.01$], and those in E group at each time-point were significantly lower than those in A and D groups ($P < 0.01$). The changes in the contents of ADP were on the contrary to the above. **Conclusion** Microtubule-destabilizing drugs and high concentration microtubule-stabilizing drugs can sharply decrease ATP content in myocardiocytes under hypoxic conditions, while suitable amount of microtubule-stabilizing drugs can protect myocardiocytes by promoting its energy production.

【Key words】 Myocytes, cardiac; Microtubules; Hypoxia; Energy metabolism; Colchicine; Taxol

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

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

缺血缺氧是严重烧伤后最基本的病理生理改变之一,可导致心肌细胞结构、功能及能量生成障碍,进而引发“休克心”^[1]。缺氧后心肌细胞内的能量生成由氧化磷酸化为主逐渐转变为以糖酵解为主,有效改善了缺氧状态下的能量供应。缺氧心肌细胞细胞骨架会发生明显变化^[2]。研究显示,常氧培养的心肌细胞线粒体锚定在微管上并沿微管分布;加入微管解聚剂可导致心肌细胞线粒体呼吸功能下降,其中微管结构重排致使线粒体游离,结构发生改变进而影响氧化供能^[3,4]。但这一结论有待进一步证实。笔者观察微管解聚剂秋水仙碱和微管稳定剂紫杉醇对缺氧心肌细胞能量生成的影响,旨在为严重烧伤后“休克心”的防治提供新思路^[5]。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂与仪器

紫杉醇、秋水仙碱购自美国 Sigma 公司, DMEM/F12 培养液购自美国 Gibco 公司,肌酸激酶(CK)检测试剂盒为南京建成生物工程研究所产品。DU27 型紫外-可见分光光度计为美国 Beckman 公司产品,高效液相色谱仪购自法国 Gilson 公司。

1.2 心肌细胞的分离、培养

选用出生后 1~2 d 的 SD 大鼠(第三军医大学实验动物中心),参照文献^[6]方法分离心肌细胞,常规接种、培养于 6 孔培养板中待用。

1.3 实验分组

将心肌细胞分为单纯缺氧组、缺氧+秋水仙碱组及缺氧+5、10、15 mmol/L 紫杉醇组。细胞缺氧条件为:37℃下,使用含糖 DMEM/F12 培养液,于含体积分数 94% N₂、5% CO₂、1% O₂ 环境中培养^[6]。单纯缺氧组细胞设缺氧培养 0.5、1.0、3.0、6.0、12.0、24.0 h 6 个时相点,每时相点 5 孔。后 4 组细胞先于常氧条件下培养,第 3 天更换培养液时分别加入终浓度为 10 mmol/L 的秋水仙碱及终浓度为 5、10、15 mmol/L 的紫杉醇,并进行缺氧培养,所设时相点及样本数同单纯缺氧组^[7,8]。

1.4 细胞活性检测

分别于缺氧培养 1.0、6.0、12.0、24.0 h 时对各组细胞进行锥虫蓝染色,计数蓝染的死亡心肌细胞数,并计算百分率,以此判断细胞活性。

1.5 能量生成相关指标测定

1.5.1 CK 活性 取各组细胞缺氧培养 0.5~12.0 h 时的上清液,采用常规比色法测定 CK 活性,按试剂盒说明书操作。

1.5.2 腺苷三磷酸(ATP)、腺苷二磷酸(ADP)含量

用高氯酸提取缺氧培养 0.5~12.0 h 的各组心肌细胞,采用高效液相色谱法测定细胞中 ATP、ADP 的含量。

1.6 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 12.0 统计软件进行单因素方差分析和 *t* 检验。

2 结 果

2.1 细胞活性

各组细胞死亡率随培养时间的延长均呈逐步上升趋势。其中单纯缺氧组培养 24.0 h 时近半数细胞死亡;缺氧+秋水仙碱组及缺氧+15 mmol/L 紫杉醇组各时相点死亡率均高于单纯缺氧组($P < 0.01$),12.0 h 时即出现半数以上细胞死亡;缺氧+5、10 mmol/L 紫杉醇组培养 1.0 h 时死亡率与单纯缺氧组接近($P > 0.05$),随后低于单纯缺氧组($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 CK 活性

各组细胞 CK 活性随培养时间的延长均呈逐步上升趋势,缺氧+秋水仙碱组及缺氧+15 mmol/L 紫杉醇组升高尤为明显。缺氧+秋水仙碱组 1.0~12.0 h 时均显著高于单纯缺氧组($P < 0.01$),但缺氧培养 3.0、6.0 h 时低于缺氧+15 mmol/L 紫杉醇组($P < 0.05$)。各时相点下,缺氧+15 mmol/L 紫杉醇组 CK 活性均高于单纯缺氧组($P < 0.01$);缺氧+5、10 mmol/L 紫杉醇组均低于单纯缺氧组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 2。

表 1 各组心肌细胞死亡率的比较(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	缺氧时间(h)			
		1.0	6.0	12.0	24.0
单纯缺氧组	20	2.6 ± 1.4	10.1 ± 2.2	30.3 ± 3.9 ^c	44.4 ± 3.9 ^c
缺氧+秋水仙碱组	20	13.4 ± 2.1 ^b	36.3 ± 3.5 ^{bc}	55.9 ± 4.7 ^{bc}	85.7 ± 4.2 ^{bc}
缺氧+5 mmol/L 紫杉醇组	20	2.4 ± 7.5	6.9 ± 1.4 ^a	17.2 ± 4.2 ^{ac}	35.6 ± 2.6 ^{ac}
缺氧+10 mmol/L 紫杉醇组	20	3.3 ± 2.1	6.4 ± 3.4 ^a	18.8 ± 6.1 ^a	32.3 ± 4.1 ^a
缺氧+15 mmol/L 紫杉醇组	20	11.5 ± 2.3 ^b	37.8 ± 3.8 ^{bc}	52.8 ± 2.4 ^{bc}	77.6 ± 9.9 ^{bc}

注:与单纯缺氧组比较,a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$;与组内缺氧培养 1.0 h 比较,c: $P < 0.01$

表 2 各组心肌细胞肌酸激酶活性的比较(U/g 蛋白, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	缺氧时间(h)				
		0.5	1.0	3.0	6.0	12.0
单纯缺氧组	25	0.22 ± 0.05	0.36 ± 0.04	0.70 ± 0.07	0.89 ± 0.05	1.26 ± 0.12
缺氧 + 秋水仙碱组	25	0.27 ± 0.05	0.74 ± 0.05 ^b	0.89 ± 0.06 ^b	1.33 ± 0.11 ^b	1.62 ± 0.14 ^b
缺氧 + 5 mmol/L 紫杉醇组	25	0.13 ± 0.04 ^a	0.24 ± 0.08 ^a	0.47 ± 0.06 ^b	0.67 ± 0.09 ^a	0.89 ± 0.07 ^b
缺氧 + 10 mmol/L 紫杉醇组	25	0.15 ± 0.08 ^a	0.26 ± 0.11 ^a	0.52 ± 0.15 ^a	0.61 ± 0.14 ^a	0.77 ± 0.11 ^b
缺氧 + 15 mmol/L 紫杉醇组	25	0.36 ± 0.06 ^{bc}	0.81 ± 0.04 ^{bc}	1.52 ± 0.11 ^{bcd}	1.62 ± 0.17 ^{bcd}	1.69 ± 0.12 ^{bc}

注:与单纯缺氧组比较,a: P < 0.05, b: P < 0.01;与缺氧 + 10 mmol/L 紫杉醇组比较,c: P < 0.01;与缺氧 + 秋水仙碱组比较,d: P < 0.05

表 3 各组心肌细胞腺苷三磷酸含量的比较($\mu\text{g}/10^6$ 个细胞, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	缺氧时间(h)				
		0.5	1.0	3.0	6.0	12.0
单纯缺氧组	25	42.9 ± 5.8	29.5 ± 1.8	18.2 ± 0.9	14.1 ± 0.7	11.5 ± 1.1
缺氧 + 秋水仙碱组	25	28.5 ± 2.9 ^b	14.9 ± 2.1 ^b	11.6 ± 1.1 ^b	7.6 ± 0.5 ^b	5.5 ± 0.4 ^b
缺氧 + 5 mmol/L 紫杉醇组	25	49.9 ± 2.8 ^a	40.7 ± 2.0 ^b	25.8 ± 1.9 ^{bc}	19.1 ± 1.2 ^b	12.1 ± 0.9
缺氧 + 10 mmol/L 紫杉醇组	25	50.7 ± 3.1 ^b	44.8 ± 6.9 ^b	38.3 ± 4.3 ^b	23.6 ± 2.6 ^b	13.4 ± 2.1
缺氧 + 15 mmol/L 紫杉醇组	25	33.6 ± 2.1 ^{bc}	28.0 ± 9.6 ^{bc}	11.4 ± 0.8 ^{bc}	11.4 ± 0.8 ^{bc}	7.7 ± 0.5 ^{bc}

注:与单纯缺氧组比较,a: P < 0.05, b: P < 0.01;与缺氧 + 10 mmol/L 紫杉醇组比较,c: P < 0.01

表 4 各组心肌细胞腺苷二磷酸含量的比较($\mu\text{g}/10^6$ 个细胞, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	缺氧时间(h)				
		0.5	1.0	3.0	6.0	12.0
单纯缺氧组	25	16.2 ± 0.3	28.7 ± 2.0	37.2 ± 0.9	42.3 ± 1.1	48.4 ± 1.4
缺氧 + 秋水仙碱组	25	24.4 ± 1.4 ^a	34.7 ± 1.6 ^a	40.9 ± 1.1 ^a	47.9 ± 1.5 ^a	53.8 ± 1.2 ^a
缺氧 + 5 mmol/L 紫杉醇组	25	10.9 ± 0.9 ^a	15.3 ± 0.8 ^a	21.1 ± 0.6 ^a	37.7 ± 0.6 ^a	40.8 ± 0.8 ^a
缺氧 + 10 mmol/L 紫杉醇组	25	10.2 ± 1.2	12.3 ± 1.5	17.5 ± 1.3	33.3 ± 3.2	38.8 ± 2.4
缺氧 + 15 mmol/L 紫杉醇组	25	21.9 ± 1.4 ^{ab}	33.1 ± 1.6 ^{ab}	41.9 ± 1.1 ^{ab}	46.9 ± 0.5 ^{ab}	52.4 ± 0.6 ^{ab}

注:与单纯缺氧组比较,a: P < 0.01;与缺氧 + 10 mmol/L 紫杉醇组比较,b: P < 0.01

2.3 ATP 含量

各组心肌细胞 ATP 含量均呈逐渐减少趋势。缺氧 + 5 mmol/L 紫杉醇组 0.5 ~ 6.0 h 均显著高于单纯缺氧组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);缺氧 + 秋水仙碱组各时相点均低于单纯缺氧组 ($P < 0.01$);缺氧 + 15 mmol/L 紫杉醇组各时相点显著低于单纯缺氧组及缺氧 + 10 mmol/L 紫杉醇组 ($P < 0.01$)。见表 3。

2.4 ADP 含量

各组心肌细胞 ADP 含量均呈逐渐升高趋势。缺氧 + 秋水仙碱组和缺氧 + 15 mmol/L 紫杉醇组各时相点均显著高于单纯缺氧组 ($P < 0.01$),此 2 组之间比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$);缺氧 + 5、10 mmol/L 紫杉醇组 3.0 h 以前增幅较缓,3.0 ~ 6.0 h 陡然升高。见表 4。

3 讨论

常氧情况下,心肌细胞由有氧氧化和氧化磷酸化供能。严重烧伤后早期,心肌细胞糖酵解显著增强,成为主要的能量供应形式,这一改变是由缺氧诱发的。近来的研究显示,严重烧伤后早期心肌细胞

骨架发生破坏性重构,网络结构和支架作用消失,其中微管损伤较为严重,由解聚和聚合过程的动态平衡转变为过解聚状态,且随着缺氧时间的延长愈发严重,进而出现不可逆损伤^[9]。由于细胞骨架被破坏、各种细胞器解离,锚定在细胞骨架上的心肌细胞亚单位供能势必严重受损,作为心肌细胞能量供应中心的线粒体也从微管上游离。有研究显示,常氧下体外培养的心肌细胞加入微管解聚剂,可导致线粒体呼吸功能下降及线粒体通透性转换孔开放增强^[10,11]。由此推测:细胞骨架(微管)的完整性对维持线粒体的结构和功能具有重要作用;在缺氧条件下,微管变化必将进一步影响线粒体功能,这可能是缺氧导致心肌细胞线粒体能量生成障碍的重要环节^[11]。近来有研究显示,在肿瘤细胞中,微管的形态学改变可以通过缺氧诱导因子途径影响细胞缺氧时的糖酵解供能,从而影响其能量代谢^[12]。该研究进一步证实了笔者的推测,这将有助于从新的角度揭示缺氧细胞能量生成障碍的发生机制与调控环节,对防止严重烧伤后“休克心”具有重要的理论意义与临床指导价值。

本研究中心肌细胞锥虫蓝染色和 CK 活性检测结果,应用微管解聚剂和高浓度微管稳定剂,可通过改变微管的生理结构而加速缺氧细胞的损伤,12.0 h 时死亡率达 50.0% 以上,24.0 h 时达 80.0% 左右。故我们将观察能量生成相关指标的时相点控制在 12.0 h 内。相比之下,低浓度微管稳定剂能显著缓解心肌细胞的损伤和死亡,从施加干预因素开始,其对微管的适度稳定作用显著减缓了 CK 的产生,24.0 h 时死亡细胞仅占 35.0% 左右。

从能量生成的相关指标来看,加入适宜浓度(5、10 mmol/L)微管稳定剂早期缺氧心肌细胞 ATP 含量即显著高于单纯缺氧组;虽然随着缺氧时间的延长,ATP 含量迅速减少,但 12.0 h 内各时相点均高于单纯缺氧组。就单纯缺氧而言,此时微管的过解聚或过稳定均显著影响了 ATP 释放,从而阻碍了能量产生。ADP 含量的检测结果进一步说明,缺氧状态下施加外源性因素保持微管的正常生理状态,能促进心肌细胞的能量生成,使之产生更多 ATP;而破坏或固定微管结构,则产生相反作用。

总之,缺氧状态下心肌细胞的活性和能量生成与微管的结构密切相关。通过施加一定剂量的微管稳定剂,能显著减轻细胞损伤、延缓其死亡,但是这一作用呈时间依赖性,即发生在缺氧后早期。同时,保持心肌细胞微管正常生理结构,能够为缺氧后心肌代谢提供更多能量;反之,破坏这一正常的生理结构,无论是过解聚或过稳定均会显著加速细胞的损伤甚至导致其死亡,同时阻止心肌细胞氧化供能。因此我们推测,对心肌细胞微管的适度稳定不失为早期保护心肌缺氧细胞的一种方式,可以为后期展开救治赢得时间。但是目前还缺乏有力的体内实验证明这一保护作用。同时,作为抗肿瘤药物的微管干预剂,尤其是低浓度的微管稳定剂,对缺氧时心肌

细胞及其亚单位是否有其他损伤作用,还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 黄跃生. 深入研究烧伤休克及缺血缺氧损害的细胞分子机制. 中华烧伤杂志, 2005, 21(5): 324 - 325.
- [2] 党永明, 黄跃生, 周军利, 等. 缺氧诱导因子 1 α 对缺氧条件下大鼠心肌细胞糖酵解的影响. 中华烧伤杂志, 2005, 21(5): 339 - 342.
- [3] Elisabeth E, Jean-Claude P. Cardiomyocyte cytoskeleton and myofibrillogenesis in healthy and diseased heart. Heart Failure Reviews, 2000, 5(3): 259 - 269.
- [4] Vandrous D, Schaeffer C, Tissier C, et al. Microtubule alteration is an early cellular reaction to the metabolic challenge in ischemic cardiomyocytes. Mol Cell Biochem, 2004, 258(1/2): 99 - 108.
- [5] Naomi KF. The cytoskeleton and the regulation of gluconeogenesis: a hypothesis. Metabolism, 2002, 51(1): 79 - 91.
- [6] 王达理, 曾爱萍, 南柏松. 心肌细胞培养方法和活细胞嘧啶蓝法测定. 空军医高专学报, 1999, 21(4): 191 - 193.
- [7] Karbowski M, Spodnik JH, Teranishi M, et al. Opposite effects of microtubule-stabilizing and microtubule-destabilizing drugs on biogenesis of mitochondria in mammalian cells. J Cell Science, 2001, 114(Pt 2): 281 - 291.
- [8] Yuri VE, Vera VTS, Sidash S. Microtubule-active drugs suppress the closure of the permeability transition pore in tumour mitochondria. FEBS Letters, 1996, 393(1): 86 - 88.
- [9] 郑霁, 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. 第三军医大学学报, 2006, 28(7): 617 - 620.
- [10] Iku N, Kazuhisa K. Cytomagnetic study of interactions between microfilaments and microtubules by measuring the energy imparted to magnetic particles within the cells. J Magnetism Magnetic Materials, 2005, 293(4): 358 - 364.
- [11] Cristina C, Luisa C, Monica RR. Microtubule cytoskeleton perturbation induced by taxol and colchicine affects chaperonin containing TCP-1 (CCT) subunit gene expression in tetrahymena cells. Biochim Biophys Acta Gene Struct Express, 2001, 1552(1): 9 - 21.
- [12] Escuin D, Kline ER, Giannakakou P. Both microtubule-stabilizing and microtubule-destabilizing drugs inhibit hypoxia-inducible factor-1 α accumulation and activity by disrupting microtubule function. Cancer Res, 2005, 65(19): 9021 - 9028.

(收稿日期: 2006-08-14)

(本文编辑: 罗勤)

· 消息 ·

本刊论文获“第四届中国科协期刊优秀学术论文”奖

由中国科协组织的“第四届中国科协期刊优秀学术论文”奖评选近日揭晓。本刊 2002 年第 1 期刊登的文章“烧伤后早期增生性瘢痕相关细胞骨架基因表达研究”(作者: 马兵等) 获奖。该评选活动始于 2003 年, 每年 1 届。本届论文的评比范围为: 自 2001 年 1 月 1 日至 2005 年 12 月 31 日发表的中国科协所属全国性学会主办的科技期刊上的原创性学术论文, 中文和英文 2 种语种, 综述性文章和科普文章不参评。

经全国各学会、协会、研究会主办的学术期刊编辑部初评, 所属学会组织专家复评, 以及少量作者自荐, 共收到有效论文 710 篇, 涉及主办学会 105 个、学术期刊 283 种。经“中国科协期刊优秀学术论文”评审委员会评审, 最终评选出优秀学术论文 200 篇。中华医学会系列共 46 种杂志选送参评论文 114 篇, 其中 29 种杂志的 42 篇论文榜上有名。