

· 烧伤后早期脏器损害 ·

# 缺氧早期大鼠心肌细胞微管损害的观察

邝勇 黄跃生



**【摘要】** 目的 了解缺氧早期心肌细胞微管损害程度。 方法 将分离培养的 Wistar 大鼠心肌细胞分为正常组、缺氧组(建立缺氧细胞模型并设缺氧 10、20、30、60 min 为观察时相点)。用激光共聚焦显微镜及扫描电镜观察 2 组细胞微管分布、形态变化,对微管蛋白荧光强度进行半定量分析,用蛋白质印迹法检测 2 组细胞游离  $\alpha$  微管蛋白的表达。 结果 与正常组比较,缺氧 10 min 后,缺氧组细胞微管念珠状结构消失,但排列尚有规律、数量无明显减少;缺氧 20 min 不仅念珠状结构消失,而且微管排列散乱,远离胞核区出现微管缺失;缺氧 30、60 min 时微管发生扭曲、断裂,纹理紊乱,完全丧失规律性。缺氧组心肌细胞微管蛋白荧光强度较正常组下降,且随缺氧时间延长愈加明显;缺氧组心肌细胞内游离的  $\alpha$  微管蛋白表达(缺氧 10 min 为  $46\ 644 \pm 145$ )高于正常组( $13\ 357 \pm 98$ ),两组比较,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),随缺氧时间的延长此升高趋势愈加明显。 结论 在缺氧状态下,心肌细胞微管发生解聚时间较早,其结构和分布规律被破坏。微管解聚在缺氧所致心肌细胞早期病理损害中的作用值得深入研究。

**【关键词】** 细胞低氧; 肌细胞,心脏; 微管; 微管蛋白

Study on injury to microtubule of cardiomyosites at early post-hypoxia stage KUANG Yong, HUANG Yue-sheng. Institute of Burn Research, Southwest Hospital, State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, The 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 degree of injury to microtubule of myocardium at early post-hypoxia stage. Methods Cardiomyocytes from Wistar rats were isolated and cultured, and they were then divided into normal control and hypoxia groups. The distribution and morphological changes in microtubules were observed with laser confocal microscopy and scanning electron microscope at 10, 20, 30 post-hypoxia minutes (PHM) and 1 post-hypoxia hour (PHH). Then the fluorescence intensity of  $\alpha$ -microtubulin was detected with RT-PCR, the morphology of microtubule was observed, and the expression of dissociative  $\alpha$ -microtubulin was determined by Western blot. Results Compared with normal control group, the bead-like structure of the microtubule in hypoxia group disappeared at 10 PHM, but no obvious change was observed in the distribution and number of microtubules. Despite the disappearance of bead-like structure of the microtubule, the microtubule derangement and loss of microtubule at the edge of cell were observed at 20 PHM. The fragmentation, derangement of texture, and loss of regularity in cardiomyocytes were observed at 30 PHM and 1 PHH. The fluorescence intensity of  $\alpha$ -microtubulin in hypoxia group was evidently decreased than that in normal group in a time-dependent manner. The expression of dissociative  $\alpha$ -microtubulin in hypoxia group at 10 PHM ( $46\ 644 \pm 145$ ) was obviously higher than that in normal group ( $13\ 357 \pm 98$ ,  $P < 0.01$ ), and its increase was maintained with elapse of time. Conclusion Microtubule injury to cardiomyocytes occurs at early stage of post-hypoxia, with destruction of its structure and distribution.

**【Key words】** Cell hypoxia; Myocytes, cardiac; Microtubules; Tubulin

体液大量丢失导致的缺血缺氧是严重烧伤后早期最主要的病理损害,而能量代谢障碍是缺氧导致细胞和组织器官损伤的根本原因。但缺氧致能量代谢障碍的确切机制目前尚不清楚,临床上更缺乏有效的防治措施。有研究结果表明,常氧下体外培养

的心肌细胞,加入微管解聚剂可导致其线粒体呼吸功能下降及线粒体通透性转换孔(MPTP)开放增强<sup>[1]</sup>,提示微管可能在线粒体功能损害机制中具有重要作用。笔者以动物实验为基础,对缺氧早期心肌细胞中微管的变化进行了初步观察。

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

## 1 材料与方法

### 1.1 动物、试剂及仪器来源

清洁级出生 3 d 内 Wistar 大鼠(第三军医大学实验动物中心),DMEM 培养液(美国 APLS 公司),

小鼠抗大鼠  $\alpha$  微管蛋白单克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司),异硫氰酸荧光素标记的兔抗小鼠 IgG(美国 JIRL 公司),混合气体(体积分数分别为 1%、5%、94% 的氧气、二氧化碳、氮气,重庆市朝阳气体有限公司),激光共聚焦显微镜(TCS-NT 型,美国 Leica 公司),扫描电镜(AMRAY-1000B 型,美国 Leica 公司)。

1.2 心肌细胞培养、分组与缺氧模型制作

采用胰蛋白酶消化法分离培养大鼠心肌细胞(原代),收集细胞于盖玻片和培养瓶中继续培养,5 d 内应用。将细胞分为正常组、缺氧组(设缺氧 10、20、30、60 min 4 个观察时相点)。将缺氧组细胞置入密闭容器并充入混合气体,调整气体平衡(5 L/min 流量下,共充气 3 次、5 min/次、每次间隔 5 min)后,按时相点给予相应的缺氧处理。

1.3 检测方法

1.3.1 观察并测定细胞微管蛋白荧光强度 取各组盖玻片上培养的细胞,参照文献[2]方法处理后用激光共聚焦显微镜观察、照相,并用相应软件行半定量分析。

1.3.2 扫描电镜观察 取各组培养于盖玻片上的细胞,根据文献[3]方法处理,并用扫描电镜观察、照相。

1.3.3 蛋白质印迹法检测细胞游离  $\alpha$  微管蛋白的表达 取各组培养瓶中的心肌细胞,在冰浴中进行如下处理:弃去培养液,磷酸盐缓冲液漂洗 3 次、5 min/次,加入 1.0 ml RIPA 裂解缓冲液(含蛋白酶抑制剂)裂解细胞,12 000  $\times g$  离心 20 min 后将上清液移入 1.5 ml EP 管中,4,4'-二羧酸-2,2'-二喹啉法测定蛋白含量。

1.4 统计学处理

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

2 结果

2.1 激光共聚焦显微镜下心肌细胞微管的分布、形态结构及蛋白荧光强度

正常组心肌细胞微管结构完整、纹理清晰细密。缺氧组细胞缺氧 20 min 后,微管出现扭曲、断裂,连续性、完整性被破坏,纹理紊乱,此变化随缺氧时间延长而加重。见图 1。缺氧组心肌细胞缺氧 10、20、30、60 min,微管蛋白荧光强度分别为  $59 \pm 9$ 、 $50 \pm 4$ 、 $46 \pm 4$ 、 $41 \pm 5$ ,均明显低于正常组的  $73 \pm 20$  ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),随缺氧时间延长此下降趋势愈

加明显。

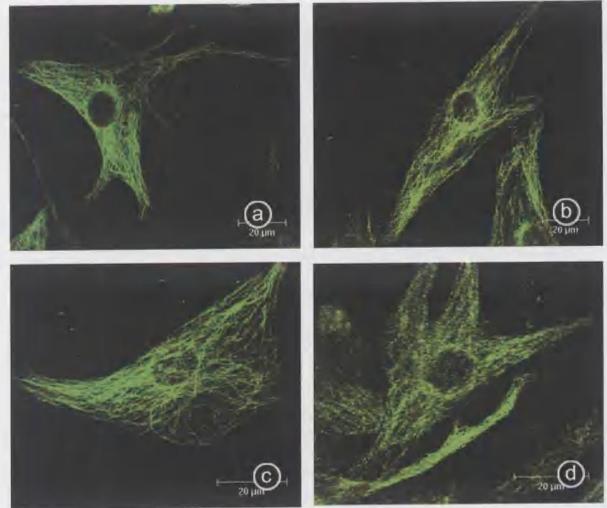


图 1 各组心肌细胞微管的分布(激光共聚焦显微镜)。a. 正常组心肌细胞微管以胞核为中心向四周呈放射状分布  $\times 120$ ; b. 缺氧 10 min 心肌细胞微管结构受损不明显  $\times 120$ ; c. 缺氧 20 min 心肌细胞微管出现扭曲断裂,排列开始紊乱  $\times 170$ ; d. 缺氧 60 min 心肌细胞微管散乱、缺失严重  $\times 180$

2.2 扫描电镜下心肌细胞微管的分布及形态结构

正常组心肌细胞微管念珠状的原纤维排列规则,数量丰富。缺氧组缺氧 10 min 微管念珠状结构消失,但排列规律及数量无明显变化;缺氧 20 min 微管出现排列散乱及缺失;缺氧 30、60 min 则微管结构完全被破坏,丧失规律性。见图 2。

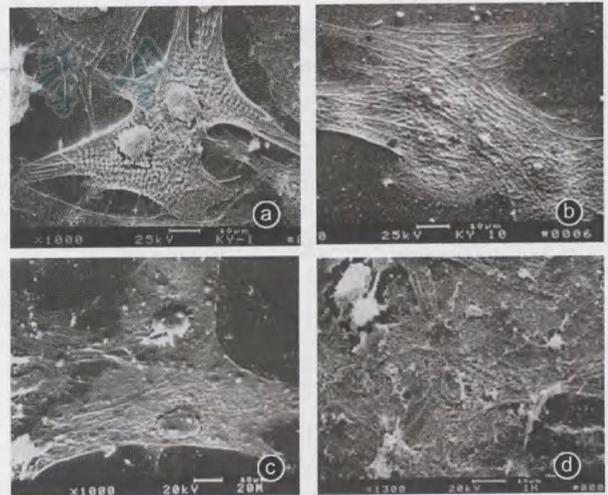


图 2 各组心肌细胞微管的分布及形态变化(扫描电镜)。a. 正常组心肌细胞微管呈清晰的念珠状,排列较规则  $\times 1000$ ; b. 缺氧 10 min 心肌细胞微管念珠状结构消失,但排列有规律  $\times 1000$ ; c. 缺氧 20 min 心肌细胞微管排列开始散乱,出现缺失  $\times 1000$ ; d. 缺氧 60 min 心肌细胞微管被完全破坏  $\times 1300$

2.3 游离  $\alpha$  微管蛋白的表达

缺氧组心肌细胞缺氧 10、20、30、60 min,胞内游

离的α微管蛋白的表达水平分别为46 644 ± 145、51 293 ± 167、51 527 ± 176、61 944 ± 132,均明显高于正常组的 13 357 ± 98( P < 0.01)。

### 3 讨论

微管蛋白是由α微管蛋白和β微管蛋白这2个亚基[每个亚基相对分子质量为(55 000 ± 2000)]组成的念珠状原纤维,微管是由13条微管原纤维定向排列组成的中空管状结构。正常细胞中聚合态和游离态微管蛋白保持动态平衡。目前人们已认识到,微管参与细胞形态的维持并与细胞的运动、分裂、分化及细胞内物质运输有关;另外微管还是心肌细胞外信息系统(细胞外基质—肌纤维膜—微管—细胞核)的重要环节<sup>[3]</sup>。

本研究结果显示,随缺氧时间的延长,心肌细胞微管结构破坏逐渐加重,直至分布规律性完全丧失。微管蛋白荧光强度和蛋白质印迹法检测结果也表明,在缺氧10 min时即出现微管损害和解聚,且随缺氧时间的延长而加重。表明在缺氧情况下,微管很早即发生解聚,正常结构和分布规律被破坏。

关于微管损害的原因,既往认为是线粒体损害后导致细胞能量耗竭,骨架蛋白磷酸化酶可抑制骨架蛋白聚集、装配,促进骨架解聚,从而造成细胞骨架包括微管的损伤。近年来的大量研究结果,使人们对上述传统认识产生怀疑。Ganote等<sup>[4]</sup>的研究结果表明,心肌细胞缺血缺氧可直接损伤心肌细胞骨架。Iwai等<sup>[5]</sup>观察到,微管作为维持肌纤维和细胞器完整的重要骨架,在心肌严重缺血出现不可逆的损伤前即被明显破坏。Hein等<sup>[6]</sup>也证实,缺血缺氧情况下心肌细胞骨架的变化先于其他细胞器的变化。另外,Lampidis等<sup>[7]</sup>认为,各种影响微管功能的制剂均能调节心肌细胞收缩力和心律;Rowinsdy和Barlow<sup>[8]</sup>报道紫杉酚能与微管紧密结合,用药后有5%的患者发生明显的心肌兴奋性障碍;Undrovinas等<sup>[9]</sup>观察到细胞骨架对心肌电压依赖性钠通道有调节作用。这些研究说明微管的功能尚未被完全揭示,其在病理损害中的作用还需深入研究。

Saetersdal等<sup>[10]</sup>通过电镜观察,已证实心肌细胞微管与线粒体外膜相连。Capetanaki<sup>[11]</sup>则认为微管与电压依赖性阴离子通道(VDAC)之间可能存在某种未知的“桥梁”分子,这种分子通过与细胞外膜VDAC相连,使VDAC构象发生变化,导致MPTP开放异常,促使腺苷二磷酸外流,腺苷二磷酸与腺苷三磷酸的比值降低,从而使线粒体呼吸功能受抑。上述研究结果均提示,微管可能参与了线粒体功能的调节,进一步研究微管与线粒体损害的关系,对揭示能量代谢障碍的机制将具有重要意义。

### 参考文献

- [1] 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.
- [2] 熊江辉,李莹辉,聂捷琳,等. 槲皮素对模拟微重力条件下体外培养大鼠心肌细胞骨架的影响. *动物学报*, 2003, 49(1): 98 - 103.
- [3] Webster DR. Regulation of post-translationally modified microtubule populations during neonatal cardiac development. *J Mol Cell Cardiol*, 1997, 29(6): 1747 - 1761.
- [4] Ganote CE, Uchidak R, Entman ML, et al. Ischemia and the myocyte cytoskeleton: review and speculation. *Cardiovasc Res*, 1993, 27(8): 1387 - 1403.
- [5] Iwai K, Hori M, Kitabatake A, et al. Disruption of microtubules as an early sign of irreversible ischemia injury. *Immunohistochemical study of insitucaine hearts*. *Circ Res*, 1990, 67(3): 694 - 706.
- [6] Hein S, Scheffold T, Schaper J. Ischemia induces early changes to cytoskeletal and contractile proteins in diseased human myocardium. *J Thorac Cardiovas Surg*, 1995, 110(1): 89 - 98.
- [7] Lampidis TJ, Kolonias D, Savaraj N, et al. Cardiostimulatory and an arrhythmic activity of tubulin-binding agents. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(4): 1256 - 1260.
- [8] Rowinsdy EK, Barlow C. Cardiac disturbances during the administration of taxol. *J Clin Oncol*, 1991, 9(9): 1704 - 1712.
- [9] Undrovinas AI, Dayton WR, Means AR, et al. Cytoskeleton modul at esgating of voltage-dependent sodium channel in heart. *Am J Physiol*, 1995, 269 (1 Pt 2): 203.
- [10] 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.
- [11] Capetanaki Y. Desmin cytoskeleton: a potential regulator of muscle mitochondrial behavior and function. *Trends Cardiovasc Med*, 2002, 12(8): 339 - 348.

(收稿日期:2006-06-23)

(本文编辑:赵敏)