

线粒体不但是细胞反应过程重要的能量供应者,而且能通过其膜上的通透性转换孔(MPTP)直接参与启动细胞的坏死和凋亡^[1]。以往的研究表明,MPTP的开放引起线粒体通透性转换(MPT),导致线粒体基质膨胀、外膜破裂,凋亡信号分子例如细胞色素c从内外膜间释放,引起细胞的坏死和凋亡;线粒体的不可逆损伤是缺氧性心肌细胞损害的关键环节^[2]。微管是真核细胞骨架的主要组成部分,它参与胞内物质运输及有丝分裂过程中染色体的分离,并对细胞的命运具有决定性作用^[3]。Vandroux等^[4]的研究表明,微管损伤是细胞缺氧性损害的早期特征。细胞骨架除了对线粒体胞内定位及分布起一定作用外^[5],还可能参与线粒体呼吸功能的调节过程。但微管结构稳定性变化与MPT之间的关系尚不清楚。本研究运用微管干预剂模拟及干预并观察心肌细胞缺氧状态下微管结构的变化,以期探讨其与MPT、线粒体呼吸功能变化间的关系。

材料与方 法

1. 主要试剂与仪器:噻唑蓝(MTT)、四甲基罗丹明乙酯(TMRE)、紫杉醇、秋水仙素、酯化钙黄绿素、氯化钴(美国Sigma公司),小鼠抗大鼠 β 微管蛋白一抗、山羊抗小鼠荧光二抗(美国Santa Cruz公司)。图像分析软件Imag J(美国国立卫生研究院);荧光显微镜(IX-70型,日本Olympus公司);激光共聚焦显微镜(TCSSP2型,德国Leica公司);自动酶标仪(680型,美国Bio-Rad公司)。

2. 乳鼠心肌细胞原代培养:选用出生后1~2d的SD大鼠乳鼠(第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心),按文献^[6]采用胰蛋白酶组织消化法分离、培养乳鼠心肌细胞。

3. 实验分组:将同批培养的心肌细胞随机分为对照组、缺氧组、常氧+解聚剂组和缺氧+稳定剂组。常氧+解聚剂组细胞加入8 $\mu\text{mol/L}$ 秋水仙素室温平衡30 min后,与对照组一起行常氧培养。缺氧+稳定剂组细胞加入10 $\mu\text{mol/L}$ 紫杉醇室温平衡30 min后,和缺氧组一起行缺氧^[7]培养。

4. 检测项目:对照组与处理0.5、1.0、3.0、6.0、12.0 h的其他组细胞,分别进行如下检测:(1)微管免疫荧光检测:参照文献^[4]方法操作,对聚合态 β 微管蛋白进行荧光染色,在荧光显微镜下观察。(2)MPTP开放情况检测:用酯化钙黄绿素检测活细胞的MPT^[8]。将心肌细胞滴在20 mm \times 20 mm的盖玻片上,滴加4 mmol/L氯化钴和2 $\mu\text{mol/L}$ 酯化钙

黄绿素,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育15 min后,激光共聚焦显微镜下进行观察,激发光波长为488 nm、检测光波长500~540 nm。随机选择细胞内几个线粒体组成兴趣区域(region of interests, ROIs),通过Imag J软件分析ROIs中线粒体荧光强度进而量化MPTP开放情况。(3)线粒体内膜电位检测:参照文献^[9]的方法用TMRE检测线粒体内膜电位。加入TMRE至终浓度为50 nmol/L,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育15 min后,于激光共聚焦显微镜下进行观察,激发光波长为543 nm、检测光波长560~610 nm。(4)采用MTT法检测线粒体呼吸功能:将心肌细胞按2 000个/孔接种于96孔板,对其施加刺激因素后吸弃培养基,每孔加入5 mg/L MTT 20 μl ,37 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养4 h后,弃MTT液,每孔加入二甲亚砜100 μl ,振荡20 min至紫色结晶充分溶解后,于490 nm下检测吸光度(A)值。上述指标检测结果均以其他组检测值 \div 对照组检测值 \times 100%表示。

5. 统计学处理:数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 10.0统计软件进行t检验。

结 果

1. 对照组心肌细胞微管围绕核周呈放射状排列,管状结构非常清晰。处理0.5 h,缺氧组细胞微管结构遭受破坏,免疫荧光较弱,其连续性开始丧失,变得粗糙、不清晰;常氧+解聚剂组微管免疫荧光也较弱,被明显破坏,连续性丧失呈卷曲状结构,两组与对照组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。随着缺氧时间的延长,微管破坏程度不断加重。缺氧+稳定剂组处理1.0~12.0 h细胞结构基本正常,微管免疫荧光强于缺氧组($P < 0.05$ 或0.01)。见表1。

2. 对照组心肌细胞线粒体荧光强度高,呈颗粒状(图1a)。处理0.5 h,缺氧组及常氧+解聚剂组MPTP明显开放,荧光强度减弱(图1b,c);随着缺氧时间的延长,ROIs荧光强度与对照组的比值越来越小,MPTP开放的程度越来越大。缺氧+稳定剂组MPTP开放程度较缺氧组明显减轻(图1d)。见表2。

3. 对照组心肌细胞线粒体内膜电位较高,其线粒体荧光强度较强(图2a)。处理0.5 h,缺氧组及常氧+解聚剂组线粒体内膜电位明显降低,荧光强度减弱(图2b,c);随着缺氧时间的延长,内膜电位损耗的程度不断加重。缺氧+稳定剂组内膜电位的损耗程度较缺氧组明显改善(图2d)。见表3。

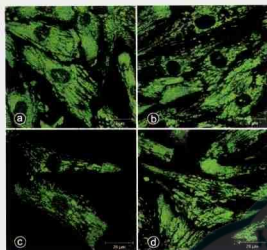


图1 各组心肌细胞处理0.5 h时MPTP的开放情况。激光共聚焦显微镜 $\times 200$ 。对照组(a)、缺氧+稳定剂组(d)心肌细胞线粒体荧光强度高,呈粗粒状;缺氧组(b)及常氧+解聚剂组(c)线粒体荧光强度减弱。

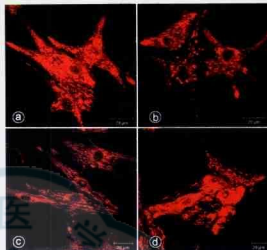


图2 各组心肌细胞处理0.5 h时线粒体内膜电位损耗情况。激光共聚焦显微镜 $\times 200$ 。对照组(a)、缺氧+稳定剂组(d)线粒体荧光强度高;缺氧组(b)及常氧+解聚剂组(c)线粒体荧光强度减弱。

4. 处理0.5 h, 缺氧组和常氧+解聚剂组的细胞线粒体呼吸功能明显降低;随着缺氧时间的延长, 细

胞线粒体呼吸功能不断降低。缺氧+稳定剂组细胞线粒体呼吸功能较缺氧组有明显改善。见表4。

表1 各组心肌细胞微管免疫荧光强度的比较(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数(个)	处理时间(h)			
		0.5	1.0	3.0	6.0
缺氧组	100	76.1 \pm 3.9*	63.4 \pm 3.8*	35.9 \pm 4.2*	26.5 \pm 3.8*
常氧+解聚剂组	100	74.8 \pm 5.0*	60.8 \pm 4.4*	34.8 \pm 4.0*	25.9 \pm 2.6*
缺氧+稳定剂组	100	92.8 \pm 4.0	90.1 \pm 6.6*	87.2 \pm 4.8*	80.9 \pm 5.3*

注:数据以其他组荧光强度值 \div 对照组荧光强度值 $\times 100\%$ 表示;对照组样本数为20个视野中细胞内的免疫荧光,强度为(100.0 \pm 0.0)%;与对照组比较,* $P < 0.05$, # $P < 0.01$;与缺氧组比较, $\Delta P < 0.05$, $\square P < 0.01$ 。

表2 各组心肌细胞MPTP开放情况的比较(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数(个)	处理时间(h)			
		0.5	1.0	3.0	6.0
缺氧组	75	85.6 \pm 4.5*	61.8 \pm 4.5*	42.8 \pm 2.8*	33.5 \pm 4.1*
常氧+解聚剂组	75	83.4 \pm 5.2*	58.1 \pm 3.5*	41.9 \pm 3.0*	30.9 \pm 4.1*
缺氧+稳定剂组	75	93.0 \pm 2.7	87.3 \pm 3.5*	80.7 \pm 4.0*	76.3 \pm 5.3*

注:数据以其他组荧光强度值 \div 对照组荧光强度值 $\times 100\%$ 表示;对照组选用150个ROI, MPTP开放(100.0 \pm 0.0)%;与对照组比较,* $P < 0.05$, # $P < 0.01$;与缺氧组比较, $\Delta P < 0.05$, $\square P < 0.01$ 。

表3 各组心肌细胞线粒体内膜电位变化的比较(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数(个)	处理时间(h)			
		0.5	1.0	3.0	6.0
缺氧组	75	82.2 \pm 4.9*	58.4 \pm 4.9*	40.8 \pm 4.4*	29.9 \pm 3.2*
常氧+解聚剂组	75	82.0 \pm 4.1*	56.8 \pm 4.3*	40.7 \pm 5.9*	24.6 \pm 4.8*
缺氧+稳定剂组	75	92.3 \pm 4.4	84.7 \pm 4.5*	78.2 \pm 4.1*	74.0 \pm 4.5*

注:数据以其他组荧光强度值 \div 对照组荧光强度值 $\times 100\%$ 表示;对照组选用150个ROI, 膜电位为(100.0 \pm 0.0)%;与对照组比较,* $P < 0.05$, # $P < 0.01$;与缺氧组比较, $\Delta P < 0.05$, $\square P < 0.01$ 。

表4 各组心肌细胞线粒体呼吸功能变化的比较(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数(孔)	处理时间(h)			
		0.5	1.0	3.0	6.0
缺氧组	60	79.0 \pm 6.0*	59.6 \pm 3.4*	35.0 \pm 2.0*	24.2 \pm 0.9*
常氧+解聚剂组	60	76.6 \pm 5.8*	58.3 \pm 2.3*	30.8 \pm 5.8*	20.9 \pm 1.0*
缺氧+稳定剂组	60	90.7 \pm 6.3	88.0 \pm 3.6*	81.5 \pm 4.5*	75.1 \pm 4.9*

注:数据以A_{515nm}值 \div 4 \div 对照组值 $\times 100\%$ 表示;对照组样本数为12孔,呼吸功能为(100.0 \pm 0.0)%;与对照组比较,* $P < 0.05$, # $P < 0.01$;与缺氧组比较, $\Delta P < 0.05$, $\square P < 0.01$ 。

讨 论

细胞骨架的破坏尤其是微管稳定性的变化,可能在心肌缺氧性损伤的发病机制中占有重要地位^[4]。本研究结果表明,缺氧组、常氧+解聚剂组心肌细胞在处理 0.5 h 时微管结构即发生变化,1.0 h 时变化更为明显,并且在 12.0 h 内微管的缺氧性损害程度呈时间相关性。微管解聚剂能较好地模拟缺氧情况下微管稳定性变化的规律,而微管稳定剂能有效减轻缺氧对微管稳定性的破坏作用。

Rhonna 等^[10]的研究表明,细胞缺氧性损伤导致其发生 MPT,内膜电位下降是细胞发生凋亡的重要原因。本文结果显示,缺氧组细胞在处理 0.5 h 时即发生 MPTP 开放和内膜电位下降,1.0~12.0 h 变化更为明显。Bernier-Valentin 等^[11]的研究表明,线粒体和微管在空间结构上是结合在一起的,微管能通过其相关蛋白与线粒体膜相互作用,但有关其稳定性被破坏能否影响线粒体的功能却鲜见报道。本研究中常氧+解聚剂组在处理 0.5 h 时也能检测到 MPTP 开放和内膜电位下降;1.0~12.0 h 缺氧+稳定剂组 MPTP 开放和内膜电位下降的程度较缺氧组、常氧+解聚剂组明显减轻,这说明微管稳定性下降能导致 MPTP 的开放,而减轻其下降程度则可有效减轻 MPTP 开放的程度。Appaix 等^[12]已证实,加入胰蛋白酶破坏细胞微管等细胞骨架后,可导致线粒体呼吸功能下降,提示微管稳定性与线粒体呼吸功能密切相关。本研究中细胞线粒体呼吸功能的检测结果也支持这一观点。

由此可以推测,细胞缺氧以后引起正常的微管聚合-解聚平衡被破坏和稳定性下降,导致线粒体呼吸功能进一步降低,后者使已被破坏的微管平衡状

态更加紊乱,进而形成“恶性循环”,当其达到一定程度,细胞就可能发生凋亡甚至坏死。

参 考 文 献

- 1 Kim JS, He L, Lemasters JJ. Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 304: 463-470.
- 2 梁晚益,黄跃生,杨宗城.大鼠严重烧伤早期心肌线粒体通透性转换孔状态改变及其机制. *第三军医大学学报*, 2003, 25: 1606-1608.
- 3 Oakley B. γ -Tubulin. In: Hyams JS, Lloid CW, eds. *Microtubules*. New York: Wiley-Liss, 1994. 33-45.
- 4 Vandroux 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: 99-108.
- 5 Mariusz K, Jan HS, Masa-Aki T. Opposite effects of microtubule-stabilizing and microtubule-destabilizing drugs on biogenesis of mitochondria in mammalian cells. *J Cell Sci*, 2000, 114: 281-291.
- 6 李晓东,黄跃生,张家平.机械牵张对缺血缺氧心肌细胞肌球蛋白重链 mRNA 表达的影响. *中华烧伤杂志*, 2004, 20: 138-140.
- 7 Hernandez OM, Discher DJ, Bishopric NH. Rapid activation of neutral sphingomyelinase by hypoxia-reoxygenation of cardiac myocytes. *Circ Res*, 2000, 86: 198-204.
- 8 Rachel AJ, Alison S, Mark RW. Detecting mitochondrial permeability transition by confocal imaging of intact cells pinocytically loaded with calcein. *Eur J Biochem*, 2002, 269: 3990-3997.
- 9 O'Reilly CM, Fogarty KE, Drummond RM, et al. Quantitative analysis of spontaneous mitochondrial depolarizations. *Biophys J*, 2003, 85: 3350-3357.
- 10 Rhonna M, Gurevich MS, Kelly MR, et al. Serpin protein crmA suppresses hypoxia-mediated apoptosis of ventricular myocytes. *Circulation*, 2001, 103: 1984-1991.
- 11 Bernier-Valentin F, Rousset B. Interaction of tubulin with rat liver mitochondria. *Biol Chem*, 1982, 257: 7092-7099.
- 12 Appaix F, Kuznetsov AV, Usson Y, et al. Possible role of cytoskeleton in intracellular arrangement and regulation of mitochondria. *Exp Physiol*, 2003, 88: 175-190.

(收稿日期:2005-10-21)

(本文编辑:苟学萍 莫愚)

读者·作者·编者

本刊关于论文二次发表的注意事项

作者在国内或国外进行科学研究的成果以非中文的形式发表后,可在本刊以中文形式二次发表(secondary publication),但需满足以下条件并提供相应材料:(1)论文首次发表的期刊编辑部和本刊编辑部均同意发表作者的同一篇文章,作者须向本刊提供首次发表该文的编辑部的书面许可材料,以及该文首次发表的出版时间和论文的复印件、单行本或原稿;(2)二次发表的时间至少在首次发表后 1 周;(3)二次发表的论文应该面向不同的读者,通常译成短篇论著的形式发表;(4)二次发表的论文必须完全忠实于原论文,忠实反映首次发表版本的资料及论点,论文的作者顺序不能改动;(5)在二次发表的论文的标题页,请以脚注的形式向读者表明该文已经部分或全文发表过,并注明出处。

欲二次发表稿件的作者如果不能提供上述材料,将按照一稿两投处理。