

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

李晓东 黄跃生 张家平

【摘要】 目的 探讨机械牵张对缺血缺氧心肌细胞肌球蛋白重链(MHC)mRNA 表达的影响。
方法 建立离体培养的 SD 乳鼠心肌细胞机械牵张模型,并施加无糖缺氧刺激因素,模拟烧伤后缺血缺氧损害。实验分 10% 牵张组、缺血缺氧培养组、10% 牵张 + 缺血缺氧培养组,每组每时相点 3 皿细胞。各组分别在刺激前和刺激后 1、3、6、12 h 时相点进行观察。采用二步法逆转录聚合酶链反应检测心肌细胞 MHC mRNA 表达的变化,并用凝胶软件进行分析。
结果 与刺激前比较,10% 牵张组 α 、 β 型 MHC mRNA 表达均增加,但以 β 型增加为主 ($P < 0.01$)。缺血缺氧培养组 α -MHC mRNA 向 β -MHC mRNA 转化加速,且缺氧 12 h 后心肌细胞 α -MHC mRNA 下调明显 ($P < 0.05$); β -MHC mRNA 表达先升后降,6 h 表达最强 ($P < 0.05$)。10% 牵张 + 缺血缺氧培养组 α -MHC mRNA 向 β -MHC mRNA 转化明显,随机械刺激时间的延长转化加剧;12 h 后 α 、 β 型 MHC mRNA 表达均下调 ($P < 0.05$)。
结论 机械牵张进一步加剧缺血缺氧对 MHC mRNA 表达的下调,可能是严重烧伤后早期心肌功能降低的原因之一。

【关键词】 肌球蛋白重链; RNA,信使; 心肌缺血; 缺氧; 机械牵张

Influence of mechanical stretch on the expression of myosin heavy chain mRNA in cardiomyocyte subjected to ischemia and hypoxia LI Xiao-dong, HUANG Yue-sheng, ZHANG jia-ping. Institute of Burn Research, Southwest Hospital, State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the influence of mechanical stretch on the expression of myosin heavy chain (MHC) mRNA in cardiomyocyte subjected to ischemia and hypoxia. **Methods** Mechanical stretch model of in vitro cultured cardiomyocyte was established for the study. The cells were processed by non-sugar hypoxic stimuli to simulate postburn ischemic and/or hypoxic injuries. The cells were then divided into normal control (N), 10% stretch (S), ischemic and hypoxic culture (IHC), 10% stretch with ischemia and hypoxia (SIHC) groups. The changes in MHC mRNA expression were observed at 1, 3, 6 and 12 post treatment hours (PTHs) by RT-PCR and were statistically analyzed with gel image analysis software. **Results** The expression of both α and β MHC mRNA increased in 10% stretch group, especially of β MHC mRNA ($P < 0.01$). The transformation of α MHC mRNA to β MHC mRNA was accelerated in IHC group, and α MHC mRNA expression was decreased at 12 PTH. The expression of β MHC mRNA was increased after ischemia and hypoxia, peaked at 6 PTH, and decreased thereafter ($P < 0.05$). The transformation of α MHC mRNA to β MHC mRNA was more obvious in SIHC group, and which was intensified along with the elapse of stimulation time. The expression of both α and β MHC mRNA were down-regulated at 12 PTH ($P < 0.05$). **Conclusion** Down regulation of MHC mRNA expression by ischemia and hypoxia could be aggravated by mechanical stretch, indicating that mechanical stretch might be a possible cause for cardiac dysfunction.

【Key words】 Myosin heavy chain; RNA, messenger; Myocardial ischemia; Hypoxia; Mechanical stretch

细胞的机械转导、机械感受功能是近年来的研究热点,机械刺激可以调节其生长、分化、迁移、基因表达、蛋白质合成和凋亡等^[1]。严重烧伤后机体有缺血缺氧性损伤,而心肌细胞的机械转导对心肌的

结构和功能影响少见报道。严重烧伤后早期发生“休克心”表明存在器质性心肌损害^[2],此时大量快速的补液迅速加重心脏的前负荷,对心肌产生机械牵拉作用。本研究旨在探讨心肌细胞在缺血缺氧条件下接受机械牵张刺激时肌球蛋白重链(myosin heavy chain, MHC) mRNA 表达的情况,为研究烧伤后早期心肌损害的机制及其防治提供新思路。

材料与 方法

1. 主要试剂与仪器:DMEM/F12 培养基(美国

基金项目:国家杰出青年科学基金资助项目(30125040);国家重点基础研究发展规划资助项目(G199054202);创伤烧伤复合伤国家重点实验室开放课题基金资助项目(200304)

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

Gibco 公司), 标准胎牛血清(美国 Hyclone 公司), 5-溴-2-尿嘧啶脱氧核苷(美国 Sigma 公司), 二步法逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒(日本 TaKaRa 公司), PCR 反应扩增仪(美国 Gene 公司, AmpPCR System 9600 型)。

2. 心肌细胞原代分离与培养: 取出生 1~2 d 的 SD 乳鼠 30 只(本校实验动物中心), 无菌条件下取其心脏, 去除心房后剪碎心室组织, 并用质量浓度 0.125% 胰蛋白酶消化成单细胞悬液。细胞经离心、洗涤后加入含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基中, 37℃、体积分数 5% CO₂ 孵育 1 h。去除间质细胞, 将未贴壁的心肌细胞按 1 × 10⁶/ml 接种于预先以胎牛血清裱衬的硅酮膜上, 置于培养皿中, 24 h 后换液。此后每隔 2 d 及实验前换液。

3. 实验分组及处理: 实验分 10% 牵张组、缺血缺氧培养组、10% 牵张 + 缺血缺氧培养组, 分别在刺激前(0 h)和刺激后 1、3、6、12 h 4 个时相点进行观察, 每组每时相点 3 皿细胞。(1) 参照文献[3], 对 10% 牵张组心肌细胞施加牵张刺激, 刺激强度以拉长硅酮膜 10% 作为标准。(2) 缺血缺氧培养组细胞培养液换成无糖 DMEM/F12 培养液, 模拟缺血环境^[4]; 缺氧是在密闭容器中以 10 L/min 流量充入配制好的混合气体(体积分数 95% N₂、5% CO₂), 持续 10 min 后关闭进、出气口, 测氧仪测得容器内 O₂ 最终体积分数为 1%。(3) 10% 牵张 + 缺血缺氧培养组细胞同时进行上述两种处理。

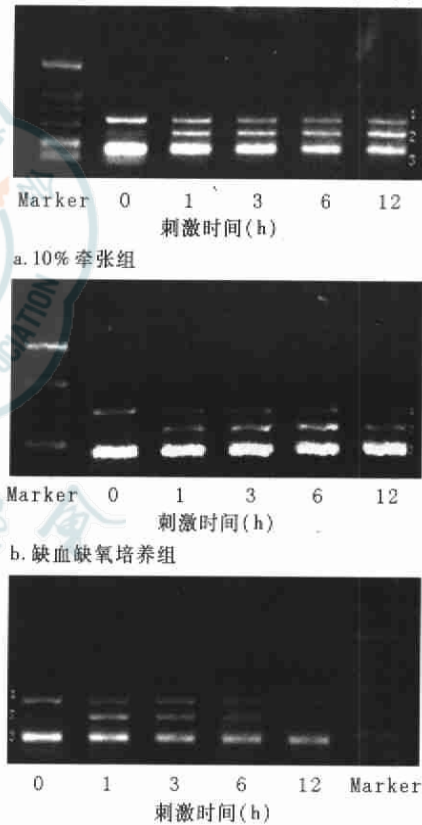
4. MHC mRNA 的 RT-PCR 分析: 按 Tripure 试剂使用说明提取各组乳鼠心肌细胞总 RNA 并计算其浓度。引物序列: 内参照 β-actin 5'-CAGTAACAGT-CCGCCTAGAA-3' (上游), 5'-GATTACTGCTCTG-GCTCCTA-3' (下游), 片段长度 175 bp; β-MHC 5'-GTGGACGTTTATTGACTTCGG-3' (上游), 5'-TTCTTTGCTTTGCCTTTC-3' (下游), 片段长度 399 bp; α-MHC 5'-AAACCTGAGGACCACCCAT-3' (上游), 5'-TCTTTGACTCGCCCGAACT-3' (下游), 片段长度 603 bp。按 RT-PCR 试剂盒说明用 25 μl 反应体系加样, 样品置于 PCR 反应扩增仪, 逆转录条件为 60℃ 30 min, 94℃ 变性 4 min, 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 68℃ 延伸 45 s (35 次循环), 最后 68℃ 延伸 7 min。产物检测: 取 15 μl PCR 产物与 1 μl 上样缓冲液均匀混合行电泳, 凝胶照相后, 用 Gel Doc 2000 凝胶图像分析系统进行扫描, Quantity One V4.4 凝胶图像分析扫描结果, 分别测定目的基因条带 α-MHC、β-MHC 与 β-actin 带的光密度值。

用目的条带光密度值/β-actin 光密度值的比值反映目的基因的相对表达量。

5. 统计学处理: 采用 SPSS 10.0 统计软件进行单因素方差分析, 用 LSD 法比较各组均值。

结 果

1. RT-PCR 分析 MHC mRNA: 各组心肌细胞刺激前(0 h) β-MHC mRNA 表达较弱, α-MHC mRNA 表达较强。10% 牵张组 α、β 型 MHC mRNA 的表达随刺激时间延长逐渐增强, 以 β 型增强为主。缺血缺氧培养组 β-MHC mRNA 表达先升后降, 6 h 表达最强; α-MHC mRNA 随刺激时间延长呈下降趋势。10% 牵张 + 缺血缺氧培养组 β-MHC mRNA 表达峰提前至 3 h, 6、12 h 下降明显; α-MHC mRNA 亦下降。见图 1。

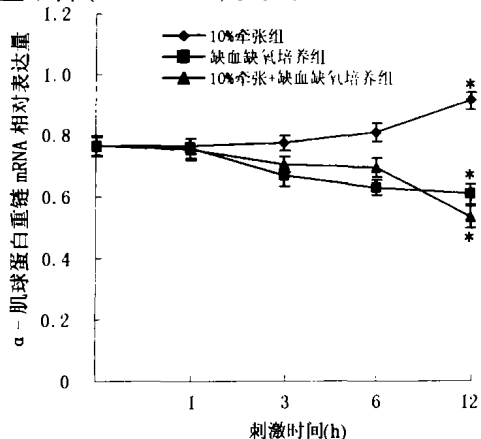


注: 1. α-肌球蛋白重链; 2. β-肌球蛋白的重链; 3. β-actin
图 1 3 组心肌细胞肌球蛋白重链 mRNA 的表达

Fig 1 Effects of mechanical stretch in combination with ischemia and hypoxia on MHC mRNA expression

2. 不同刺激条件下 MHC mRNA 相对表达量分析: 与刺激前比较, 10% 牵张组 α-MHC mRNA 表达缓慢增加, 12 h 明显升高 ($P < 0.05$); 缺血缺氧培养组 α-MHC mRNA 表达持续下降, 12 h 下降最明显 ($P < 0.05$); 10% 牵张 + 缺血缺氧培养组 α-MHC mRNA 下降较晚 (图 2)。与刺激前相比, 10% 牵张组 β-MHC mRNA 明显升高 ($P < 0.05 \sim 0.01$); 缺血缺氧培养组其表达增加缓慢 ($P <$

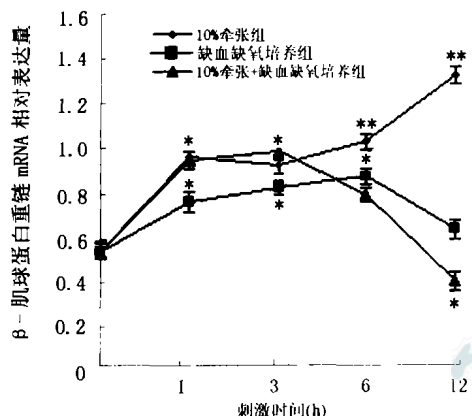
0.05), 随后下降, 12 h 与刺激前比较, 差异无显著性意义 ($P > 0.05$); 10% 牵张 + 缺血缺氧培养组的 β -MHC mRNA 在 3 h 即达高峰, 其后迅速降低, 12 h 明显下降 ($P < 0.05$)。见图 3。



注:与刺激前(0 h)比较, * $P < 0.05$

图 2 不同刺激因素作用下 3 组心肌细胞 α -肌球蛋白重链 mRNA 的表达

Fig 2 The expression of α -MHC mRNA under different stimuli



注:与刺激前(0 h)比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图 3 不同刺激因素作用下 3 组心肌细胞 β -肌球蛋白重链 mRNA 的表达

Fig 3 The expression of β -MHC mRNA under different stimuli in three groups

讨 论

心脏表达的 MHC 有 α 、 β 两种亚型, α 型 ATP 酶活性较 β 型高 3 ~ 4 倍, 心脏在 α 型表达较多时有较快的收缩速度^[5]。 α 型向 β 型转换可作为衰竭心肌的分子生物学标志。长期超负荷和慢性缺氧刺激可诱导左心室 β -MHC mRNA 表达^[6]。本研究中, 在 10% 牵张刺激时, α 、 β -MHC mRNA 均增加, 但以 β 型增加为主, 提示随刺激时间延长心肌细胞向肥大方向发展。缺血缺氧培养时 α -MHC mRNA 向 β -MHC mRNA 的转换明显, α -MHC mRNA 持续性下降, β -MHC mRNA 缓慢升高后下降, 可能与细胞自身的代偿机制有关: 缺氧初期细胞受损较轻, 代偿机制尚完善, MHC mRNA 由 α 型向 β 型转换; 随着刺激

时间的延长, 缺氧加重, 细胞损伤超过自身代偿功能, 致使 β -MHC mRNA 的表达下调。10% 牵张 + 缺血缺氧刺激时, β -MHC mRNA 有一过性增高, 3 h 达到高峰; 其后缺氧为主导因素, MHC mRNA 均表现为下降; 刺激 12 h 后 β -MHC mRNA 表达量低于缺血缺氧培养组, 表明机械牵张加剧了 12 h 时缺血缺氧对心肌细胞 β -MHC mRNA 表达的下调作用。

烧伤后“休克心”的机制较为复杂, 缺血缺氧与炎症反应失控是“休克心”的主要因素^[7]。伤后早期大量、快速补液引起的心脏容量负荷迅速增加, 是否在“休克心”的发生中起作用鲜见报道。本实验中, 细胞水平机械牵张 + 缺血缺氧损伤模型正是模拟了此现象。结果表明, 缺血缺氧条件下机械牵张导致 α 、 β -MHC mRNA 12 h 后明显下降, 表现出与单纯牵张刺激及缺血缺氧刺激不同的变化规律。由于 MHC mRNA 表达水平与细胞收缩功能联系的一致性, 可以认为, 其 mRNA 表达水平代表心肌细胞的收缩功能。因此, 机械牵张加剧缺血缺氧时心肌细胞 MHC mRNA 表达的下调, 提示机械牵张可加剧缺血缺氧对心肌收缩功能的损害, 进一步导致严重烧伤早期器质性心肌损害即“休克心”的发生。

本实验仅对不同刺激条件下 MHC mRNA 表达进行了初步的研究, 但其改变的原因尚不明确。由于细胞骨架在信号转导、特别是机械信号传导中的重要作用, 笔者推测其可能在 MHC mRNA 表型转换中发挥了作用, 其机制尚需进一步深入研究。

参 考 文 献

- Meyer CJ, Alenghat FJ, Rim P. Mechanical control of cyclic AMP signaling and gene transcription through integrins. *Nat Cell Biol*, 2000, 2: 666 - 668.
- 黄跃生. 烧伤后“休克心”的研究. *中华烧伤杂志*, 2000, 5: 275 - 278.
- Sadoshima JI, Lothar J, Toshiyuki T. Molecular characterization of the stretch-induced adaptation of cultured cardiac cells. *Biolog Chem*, 1992, 267: 10551 - 10560.
- Katrina M, Daria MR. Arachidonic acid protects neonatal rat cardiac myocytes from ischaemic injury through ϵ protein kinase C. *Cardiovascular Research*, 2001, 50: 65 - 74.
- Carol ET, Mathew PD. Regulation of myosin heavy chain expression during rat skeletal muscle development in vitro. *Molecular Bio Cell*, 2001, 12: 1499 - 1508.
- Pissarek M, Bigard X, Mateo P. Adaptation of cardiac myosin and creatine kinase to chronic hypoxia: role of anorexia and hypertension. *Am J Physiol*, 1997, 272: 1690.
- Huang YS, Li ZQ, Yang ZC. Roles of ischemia and hypoxia and the molecular pathogenesis of post-burn cardiac shock. *Burns*, 2003, 29: 828 - 833.

(收稿日期: 2004 - 02 - 04)
(本文编辑: 苟学萍)