

· 实验研究报道 ·

缺氧缺糖可导致培养的乳鼠心肌细胞凋亡

张晓敏,李昌荣,陈铭珍,谭建新,陆美

(广东医学院附属医院儿科,广东 湛江 524001)

**〔摘要〕** 目的 心肌细胞凋亡是许多心血管疾病发生与演变的细胞学基础,成为心血管疾病研究中的一个热点问题。国内外研究表明心肌缺血后再灌注可导致心肌细胞凋亡,但缺血是否引起心肌细胞凋亡尚有争议。该研究旨在探讨心肌缺氧损伤时是否发生心肌细胞凋亡。**方法** 取2~4 d的新生SD乳鼠心室肌进行心肌细胞培养,采用模拟“缺血模型”,分不同时间段缺氧缺糖组和正常对照组观察,用Annexin V-FITC/PI双染色流式细胞术(Flow cytometry, FCM)、Hoechst/PI荧光染色镜检判断细胞凋亡。用原子吸收法测定细胞内钙、镁含量。**结果** FITC-Annexin V/PI双染色法FCW检测,缺氧11.5、12.5、13.5和14.5 h早期凋亡细胞比例分别为(10.7±0.45)%, (13.7±0.71)%, (15±0.54)%和(17.2±0.67)%,比正常对照组(3.57±0.26)%明显增高,差异有显著性( $P<0.01$ );Hoechst/PI染色计数心肌细胞凋亡指数,缺氧11.5、14.5 h分别为18±2.4、25±3.8高于正常对照组3.75±0.96,差异有显著性( $P<0.01$ );缺氧缺糖各组与对照组相比心肌细胞内钙含量高、而镁含量低,差异有显著性( $P<0.05$ ),但不同时间段缺氧缺糖心肌细胞内钙、镁含量变化差异无显著性( $P>0.05$ )。**结论** 在缺氧缺糖模拟“缺血模型”上发现缺氧缺糖可引起心肌细胞凋亡,细胞内钙超负荷和镁含量下降与凋亡发生有关。

〔中国当代儿科杂志,2004, 6(4): 331—333〕

**〔关键词〕** 培养心肌细胞;缺氧;缺糖;细胞凋亡

**〔中图分类号〕** R—33 **〔文献标识码〕** B **〔文章编号〕** 1008—8830(2004)04—0331—03

缺血缺氧是许多疾病常见的基础病理生理改变和临床常见的急性事件,易引起心肌损伤。过去认为,心肌细胞对凋亡有特殊的抵抗性,不发生细胞凋亡。近年研究证实,病毒性心肌炎等许多心脏疾病都有心肌细胞凋亡现象<sup>[1]</sup>。但心肌缺血缺氧是否引起心肌细胞凋亡尚有争议<sup>[2,3]</sup>。由于受神经体液等因素的影响,在体心肌不能确切地反映某些因子或因素在心肌损伤中的作用,而培养心肌细胞可避免这些因素的影响,成为研究心肌损伤的有用模型<sup>[4]</sup>。因此,我们采用纯化的原代心肌细胞进行缺氧缺糖培养模拟“缺血模型”,观察其对心肌细胞凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用新生2~4 d的Sprague Dawley乳鼠,雌雄不拘,由本院动物中心提供。培养基RPMI—1640(Gibco产品),新生牛血清(杭州四季青公司),ApoALert<sup>+</sup> Annexin V—FITC Apoptosis Kit, K2025—1(CLONTECH产品);胰蛋白酶(1:

250),Propidium Iodide (PI)和Hoechst 33342购自于Sigma公司,其他试剂为国产分析纯级。XLw31240流式细胞仪(Coultyler Eletronies Corp),Olympus BX—60荧光显微镜(Japan)。

1.2 乳鼠心肌细胞培养

无菌条件下取出心脏,立即在无菌D—Hanks液中洗去残血,将心室肌剪成1 mm<sup>3</sup>大小碎块,用0.1%胰蛋白酶(trypsin 1:250)溶液消化,分离心肌细胞,用差速贴壁法纯化,制备成心肌细胞悬液,用5%二氧化碳培养箱(37℃)培养,实验用原代培养96 h的心肌细胞。

1.3 实验分组

分正常对照组和缺氧组。本实验参照Tana-ka<sup>[5]</sup>等研究,并经预实验将缺氧组分为(缺氧11.5、12.5、13.5和14.5 h)4个不同时间段观察心肌细胞凋亡情况。“缺氧损伤”实验模型的复制:参照文献<sup>[6]</sup>,用经高纯氮气(1 L/min)饱和30 min的6%新生牛血清无糖Hanks置换正常培养液,用氮气置换培养瓶内空气,闭瓶培养即缺氧模型。正常对照:用6%新生牛血清含糖、含氧平衡盐溶液,闭瓶培养。

〔收稿日期〕 2003—06—19; 〔修回日期〕 2003—12—21  
〔作者简介〕 张晓敏(1963—),男,硕士研究生,副主任医师。主攻方向:小儿心血管,现工作单位:广东中山市博爱医院儿科(528402)。

平衡盐溶液成分(mmol/L): NaCl 136, CaCl<sub>2</sub> 1.26, MgSO<sub>4</sub> 0.4, MgCl<sub>2</sub> 0.5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.44, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.34, NaHCO<sub>3</sub> 4, KCl 5.37, 酚红 0.03, Hepes 4(pH 7.4)。

1.4 观察指标

1.4.1 细胞存活率计数 采用台盼蓝染色检测。各组取少许细胞混悬液,0.5%台盼蓝混匀 1 min,用血细胞计数板按白细胞计数法在光镜下计数蓝染细胞。细胞存活率=未蓝染细胞/(蓝染细胞+未蓝染细胞)×100%。

1.4.2 Annexin V-FITC/PI 双染色法 FCM 检测凋亡 用 0.125%胰蛋白酶、0.02% EDTA 混合液 1.2 ml 使细胞脱壁,用等量培养液中止消化,离心(128 r/min,5 min,室温),收集各组贴壁和培养上清液中漂浮的细胞,按试剂说明染色<sup>[7]</sup>。设置阴性对照(不加 Annexin V-FITC)做为本底,计数 3.5×10<sup>4</sup> 个细胞,微机根据细胞荧光标记特征进行细胞分类,FITC<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>的细胞为早期凋亡细胞。

1.4.3 Hoechst 33342/PI 双染色荧光镜检 为检测细胞形态变化收集缺氧 11.5,14.5 h 两个时间段和正常对照组的细胞,方法同上,取 3×10<sup>5</sup> 个细胞荧光染色(Ho 33342 终浓度 10 mg/L,PI 终浓度为 50 mg/L),取细胞悬液 15~25 μl 点在载玻片上,加盖玻片。紫外光激发,荧光显微镜下观察细胞形态及颜色改变。凋亡细胞为亮蓝色弱红光,有的细胞体积小,核呈块状荧光<sup>[8]</sup>。数至少 5 个高倍视野,至少 200 个细胞,计数各组细胞凋亡指数:凋亡指数=(阳性细胞数/细胞总数)×100。

1.4.4 细胞钙、镁测定采用原子吸收法 收集 5×10<sup>6</sup> 细胞,用硝酸消化,分别测定钙标准液(10 μg/ml)、镁标准液(1 μg/ml)的吸光度 As、样品吸光度 Ax 和本底吸光度 A<sub>0</sub>。计算 5×10<sup>6</sup> 个细胞钙、镁含量(g)=(Ax-A<sub>0</sub>)/As×标准液浓度×样品体积(ml)×10<sup>-6</sup>。

1.5 统计方法

所有结果用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用用  $\chi^2$  检验,随机设计的方差分析加 *q* 检验。*P* < 0.05 为有统计学意义。

2 结果

细胞存活率:正常对照组(84.61±3.31)%,缺氧组(缺氧11.5,12.5,13.5和14.5 h)分别为(55.46±3.16)%,(52.75±3.37)%,(51.48±4.17)%和(49.26±2.37)%,细胞存活率明显降低,与对照组

比较,差异有显著性(*P* < 0.01)。4 个不同缺氧时间组之间差异无显著性(*P* > 0.05)。

Annexin V-FITC/PI 双染色:正常对照组 Annexin V<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup> 的早期凋亡细胞(3.57±0.26)%,缺氧组(缺氧11.5,12.5,13.5和14.5 h)分别为(10.7±0.45)%,(13.7±0.71)%,(15.0±0.54)%和(17.2±0.67)%,均明显高于对照组(*P* < 0.01)。Hoechst/PI 染色细胞凋亡指数,缺氧 11.5,14.5 h 分别为(18±2.4)和(25±3.8),高于对照组(3.75±0.96),差异有显著性(*P* < 0.01)。从缺氧 11.5 h到缺氧 14.5 h 4 个不同缺氧时间段心肌早期凋亡细胞百分率有所增加,但差异无显著性(*P* > 0.05)。缺氧 11.5,14.5 h 两个时间段比较,心肌细胞凋亡指数差异无显著性(*P* > 0.05)。表明缺氧可引起心肌细胞凋亡,不同缺氧时间对凋亡的影响没有差别。见表 1。

表 1 缺氧对心肌细胞凋亡的影响

|           | Annexin V <sup>+</sup> /PI <sup>-</sup> 凋亡细胞(%) |                        | 细胞凋亡指数 |                       |
|-----------|-------------------------------------------------|------------------------|--------|-----------------------|
|           | 例数                                              | $\bar{x} \pm s$        | 例数     | $\bar{x} \pm s$       |
| 正常对照组     | 5                                               | 3.57±0.26              | 5      | 3.75±0.96             |
| 缺氧 11.5 h | 5                                               | 10.7±0.45 <sup>a</sup> | 5      | 18.0±2.4 <sup>a</sup> |
| 缺氧 12.5 h | 5                                               | 13.7±0.71 <sup>a</sup> | —      | —                     |
| 缺氧 13.5 h | 5                                               | 15.0±0.54 <sup>a</sup> | —      | —                     |
| 缺氧 14.5 h | 5                                               | 17.2±0.67 <sup>a</sup> | 5      | 25.0±3.8 <sup>a</sup> |

注: a 与正常对照组比较 *P* < 0.01

细胞内钙、镁含量:缺氧 11.5,12.5,13.5 和 14.5 h 与正常对照组比较,细胞钙含量高、而镁含量低,差异有显著性(*P* < 0.05)。但 4 个不同缺氧时间段之间心肌细胞内钙、镁含量变化差异无显著性(*P* > 0.05),见表 2。

表 1 各组间5×10<sup>6</sup> 个细胞内钙、镁含量(10<sup>-8</sup> g)

|           | 细胞内钙 |                        | 细胞内镁 |                        |
|-----------|------|------------------------|------|------------------------|
|           | 例数   | $\bar{x} \pm s$        | 例数   | $\bar{x} \pm s$        |
| 正常对照组     | 9    | 6.00±1.34              | 10   | 7.29±1.81              |
| 缺氧 11.5 h | 9    | 7.98±1.25 <sup>a</sup> | 10   | 5.52±1.58 <sup>a</sup> |
| 缺氧 11.5 h | 9    | 8.46±1.53 <sup>a</sup> | 10   | 5.70±0.97 <sup>a</sup> |
| 缺氧 13.5 h | 9    | 8.86±1.43 <sup>a</sup> | 10   | 5.80±0.78 <sup>a</sup> |
| 缺氧 14.5 h | 9    | 9.13±1.52 <sup>a</sup> | 10   | 4.41±0.96 <sup>a</sup> |

注: a 与正常对照组比较 *P* < 0.05

3 讨论

在培养的心肌细胞上,虽然可避免神经体液等

因素对心肌的影响,但通常难以产生真实的缺血状态。由于机体在心肌缺血过程中组织细胞发生缺氧和葡萄糖耗竭等变化,所以,我们利用培养心肌细胞经缺氧缺糖溶液培养制备模拟缺血损伤模型。已有研究证明,这种模型接近整体动物的缺血过程,成为研究心肌损伤的有用模型<sup>[4]</sup>。我们用台盼蓝染色检测细胞存活率发现缺氧组与正常对照组比较均明显降低,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。表明本实验模拟缺血损伤模型的复制是成功的。

本实验用 Annexin V-FITC 检测暴露在凋亡细胞表面的 PS,同时结合使用 PI 拒染法检测细胞膜尚未破裂的早期凋亡细胞, Ho33342/PI 双染色荧光镜检计算凋亡细胞指数,发现不同时间缺氧组的早期凋亡细胞均比正常对照组明显增加,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。表明在培养的心肌细胞模拟“缺血损伤模型”上,缺氧缺糖可引起心肌细胞凋亡,提示在心肌缺血过程中会发生心肌细胞凋亡。与 Chakrabarti 等<sup>[2]</sup>研究结果相一致。说明心肌细胞凋亡是心肌缺血时心肌细胞死亡的重要形式。缺血缺氧能否引起心肌细胞凋亡,缺氧时间长短是关键,不同的实验条件缺氧诱导心肌细胞凋亡所需的时间不同,本资料缺氧 11.5, 12.5, 13.5 和 14.5 h 均有心肌细胞凋亡,4 个不同缺氧时间组之间细胞凋亡率差别无显著性意义( $P > 0.05$ ),表明上述不同缺氧时间对凋亡的影响差别不大,与 Tanaka 等<sup>[5]</sup>研究缺氧 12 h 诱导心肌细胞凋亡相接近。已有研究表明<sup>[9]</sup>,凋亡的早期改变之一是质膜上磷脂分布的不对称性被破坏,使正常位于细胞膜内面的磷脂酰丝氨酸(phosphatidyl serine, PS)暴露在细胞膜外表面,但早期细胞膜保持完整。随后细胞出现特异性的形态学和生化改变。所以,用 Annexin V-FITC/PI 双染色法 FCM 可检测出早期的凋亡细胞,即 Annexin V-FITC<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>的细胞。并与 PI 染色阳性的细胞进行区别。PI 染色阳性的细胞代表坏死的心肌细胞和细胞膜不完整的晚期凋亡的心肌细胞,反映了心肌细胞凋亡检测的可靠性。

已明确,细胞内钙超负荷是导致心肌缺血损伤发病的另一重要机制。DNA 有控降解时核酸内切酶的激活需  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ , 细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  的升高还可以增加氧自由基的合成,激活细胞凋亡调控基因。所以认为  $\text{Ca}^{2+}$  与凋亡发生有关。本实验证实,缺氧使

细胞内钙含量比正常对照增加了近 30%~50%, 镁含量下降了 24%~39%, 差异有显著性( $P < 0.05$ )。表明细胞内钙超负荷与镁含量降低与凋亡发生有关。但心肌细胞凋亡启动是否确实由细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  超载引起还需进一步深入研究。

## 参考文献

- [1] 王述昀, 马沛然, 牟道玉. 病毒性心肌炎小鼠心肌细胞凋亡和坏死的研究 [J]. 中国当代儿科杂志, 2002, 4(1): 5-7.
- [2] Chakrabarti S, Hoque AN, Karmazyn M. A rapid ischemia-induced apoptosis in isolated rat hearts and its attenuation by the sodium-hydrogen exchange inhibitor HOE 642 (cariporide) [J]. J Mol Cell Cardiol, 1997, 29(11): 3169-3174.
- [3] Maulik N, Yoshida T, Das DK. Regulation of cardiomyocyte apoptosis in ischemic reperfused mouse heart by glutathione peroxidase [J]. Mol Cell Biochem, 1999, 196(1-2): 13-21.
- [4] Thandroyen FT, Bellotto D, Katayama A, Hagler HK, Willerson JT, Buja LM. Subcellular electrolyte alterations during progressive hypoxia and following reoxygenation in isolated neonatal rat ventricular myocytes [J]. Circ Res, 1992, 71(1): 106-119.
- [5] Tanaka M, Ito H, Adachi S, Akimoto H, Nishikawa T, Kasajima T, et al. Hypoxia induces apoptosis with enhanced expression of Fas antigen messenger RNA in cultured neonatal rat cardiomyocytes [J]. Circ Res, 1994, 75(3): 426-433.
- [6] Van Der Laarse A, Hollaar L, Van Der Valk LJ. Release of alpha hydroxybutyrate from neonatal rat heart cell cultures exposed to anoxia and reoxygenation: comparison with impairment of structure and function of damaged cardiac cells [J]. Cardiovasc Res, 1979, 13(6): 345-353.
- [7] Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V [J]. J Immunol Methods, 1995, 184(1): 39-51.
- [8] 亓放, 张宝泉, 徐炎. 顺铂诱导的喉癌细胞凋亡及其对细胞周期的影响 [J]. 中华医学杂志, 1999, 79(4): 298-301.
- [9] Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages [J]. J Immunol, 1992, 148(7): 2207-2216.

(本文编辑: 吉耕中)