

活性氧自由基对心肌细胞损伤效应研究*

林灼锋¹ 李校坤^{1,2**} 孟娟²

(1 暨南大学药学院生物制药教研室 广州 510632 2 暨南大学医药生物研究开发中心 广州 510632)

摘要 为探讨活性氧自由基对心肌细胞的影响,采用胰蛋白酶酶消化法分离SD乳鼠心肌细胞,培养于适当的条件并观察其形态学和生理学方面的特征;加入H₂O₂活性氧刺激心肌细胞,模拟氧自由基损伤心肌细胞方式,构建心肌细胞缺血再灌注损伤的模型并了解H₂O₂对心肌细胞的损伤作用。结果表明胰蛋白酶消化分离的心肌细胞能够在体外完好生长,并能够在一段时间内维持其原有的生理特性;MTT检测结果和形态学观察结果表明H₂O₂对心肌细胞的损伤与其浓度和作用时间呈正比关系,TUNEL和DNA凝胶电泳分析结果显示,H₂O₂在心肌细胞中的积累是造成细胞凋亡的主要因素之一。

关键词 心肌细胞培养 H₂O₂ 氧自由基 心肌细胞损伤

1953年Durrows和Moscona首次成功地应用生物酶分离出鸡胚心肌细胞后^[1],其分离培养技术不断发展,围绕着心肌细胞的质量和数量两方面,形成了多种多样的方法,其中包括离体心脏灌注法、心肌细胞酶浸泡消化法和贴块培养法。对新生幼年动物而言,酶浸泡消化法无论在分离心肌细胞的质量和数量方面,还是在操作方面均为研究人员的首选方案。心肌细胞在体外的成功培养对心肌细胞进行生物学特性的研究,建立一些实验病理模型^[2],已成为心脏病研究的重要手段之一。本文采用胰蛋白酶酶消化法分离SD乳鼠的心肌细胞进行体外培养,观察其形态学和生理学方面的特征,并用活性反应氧H₂O₂模拟氧自由基刺激心肌细胞,建立氧自由基损伤心肌细胞的模型,从细胞形态学及其它方面观察H₂O₂对心肌细胞的损伤效应,借此了解心肌细胞在缺血再灌注损伤过程中的损伤状况,为研究相关的抗氧自由基新药提供适当的细胞模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞培养材料 Trypsin II、Dulbeccos'

Minimum Essential Medium (DMEM)、Fatal Bovine Serum(Gibico BRL), SABC 免疫细胞化学染色试剂盒、anti- α sarcomeric actin 抗体、DAB 染料(武汉博士德生物公司),细胞培养板(Corning),MTT、BrdU (Sigma)。

1.1.2 实验动物 新生(1~3d)SD乳鼠,雌雄不限,由中山大学医学院动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 新生原代心肌细胞的分离、提纯和培养 从15只新生乳鼠(出生3d内)采用无菌操作的方式取出心脏,放入4℃D-Hanks缓冲液中清洗几次以除去血液。将乳鼠心脏移至另一个无菌的平皿中,用眼科小剪刀剪成1~2mm²大小的快状,加入0.08%的胰蛋白酶II消化液中,置37℃培养箱孵化5~10min,将上层液体转至10ml离心管中,1000g/min离心3~5min,去上清,用生长培养基重悬细胞,保存于37℃CO₂培养箱。将未消化完的心肌组织块加入消化液,重复上述步骤,直至所有心肌组织消化完毕为止。将所得的心肌细胞转至70ml的细胞培养瓶中,37℃CO₂培养箱培养60~90min,吸取上层细胞悬液至新的培养瓶中,计数后按 0.8×10^5 个/cm²平板将细胞加至24孔细胞培养板,同时加入BrdU并使其终浓度为0.1mmol/L,置5%CO₂~95%O₂的培养箱37℃培养,次日将细胞换液,继续培养,同时观察和记录心肌细胞的生长状况。

收稿日期:2004-02-25 修回日期:2004-04-19

* 国家“863”计划项目(2001AA215131)和国家“十五”创新药物重大专项基金资助项目

** 通讯作者,电子信箱:zlfyf@sohu.com

1.2.2 免疫细胞化学方法对心肌细胞进行鉴定
将分离的心肌细胞按 $1 \times 10^5/\text{cm}^2$ 的密度接种于 6 孔细胞培养板, 培养 3d 后用 95% 的乙醇固定, 采用鼠抗兔 α -sarcomeric actin antibody 及 SABC 免疫组化染色试剂盒对心肌细胞中的特有的横纹肌肌动蛋白进行定位, 对心肌细胞鉴定, 同时确定心肌细胞的纯度。

1.2.3 缺血再灌注心肌细胞损伤模型的建立
将分离好的心肌细胞接种到培养板中, 置 5% $\text{CO}_2 \sim 95\% \text{O}_2$ 的培养箱 37°C 培养。当细胞培养至融合状态时, 加入一定量的 H_2O_2 -DMEM 刺激细胞, 采用 H_2O_2 活性氧代替氧自由基的形式, 模拟缺血再灌注时氧自由基对心肌细胞的损伤状况, 观察心肌细胞的损伤状况。

1.2.4 H_2O_2 对心肌细胞形态学和存活率的影响
将分离的心肌细胞按 $5 \times 10^4/\text{孔}$ 接种于 96 孔细胞培养板, 培养 3d 后改用含有不同 H_2O_2 浓度(0.4、0.2、0.1、0.05mmol/L) 的 DMEM 无血清培养基, 培养 3h 之后换为无血清 DMEM 培养基, 同时在倒置显微镜下观察和记录其形态学的变化, 然后加入

MTT 检测心肌细胞的存活率。

1.2.5 H_2O_2 与心肌细胞凋亡 将分离的心肌细胞按 $3 \times 10^5/\text{孔}$ 接种于 6 孔细胞培养板, 培养 3d 后加入含有 0.625、1.25、2.5、5.0mmol/L 的 H_2O_2 -DMEM 培养液, 设立正常对照组, 37°C 继续培养 3h, 观察细胞形态学变化, 并收集细胞, 提取细胞基因组, 采用 1% 琼脂糖凝胶电泳分离并观察其基因组的变化。同时将培养了 3d 的细胞加入浓度为 0.05 和 0.1mmol/L H_2O_2 的 DMEM 培养基刺激细胞, 连续培养 24h, 采用 TUNEL 法检测细胞凋亡的状况, 观察 H_2O_2 与凋亡的关系。

2 结 果

2.1 原代 SD 乳鼠心肌细胞培养

新生大鼠心肌细胞刚分离出来时呈圆形或椭圆形, 培养了 24h 呈椭圆形分散生长, 大部分细胞出现搏动, 随着培养的时间增加, 细胞细胞之间出现网状一样的细胞伪足, 从而形成一簇一簇的呈同步搏动细胞团(图 1)。这种搏动现象在维持到一定的时间后, 心肌细胞的搏动便逐渐减慢, 最终停

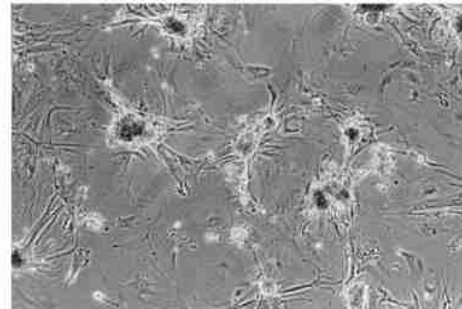
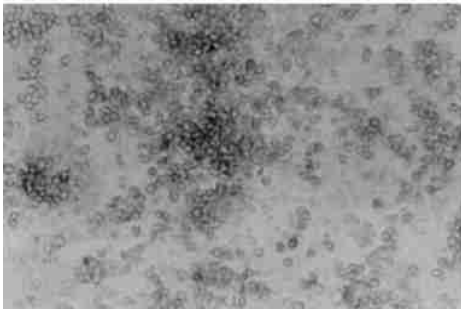


图 1 新生 SD 乳鼠心肌细胞体外培养 1d 和 10d 的细胞形态($\times 10, \times 40$)

Fig.1 The primary culture cardiomyocytes morphology of neonatal SD mouse
(observed under a reverse microscope, magnify 10 times and 40 times)

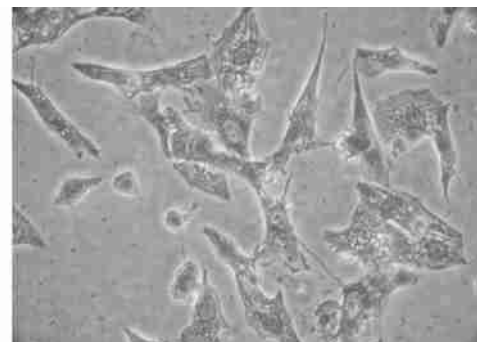
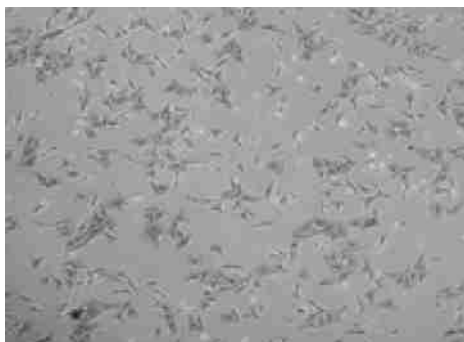


图 2 心肌细胞免疫细胞化学鉴定图($\times 40, \times 200$)

Fig.2 Identified cardiac myocytes by immunocytochemical assay. After culture 3 days, cardiac myocytes were identify by its' specific alpha sarcomeric actin. The positive cells were stained yellow brown color(DAB straining, $\times 40, \times 200$)

止。本次实验观察结果表明, 在培养了 10d 之后, 心肌细胞的搏动便开始减弱, 但有相当部分细胞在培养了 45d 之后仍然维持缓慢的搏动状况。

2.2 心肌细胞的鉴定

采用胰蛋白酶酶消化法分离 SD 乳鼠心肌细胞, 培养 3d 后, 根据心肌细胞中所含有的各种蛋白质特性, 我们将其特有的横纹肌肌动蛋白 (α -sarcimeric actin) 作为检测鉴定指标, 采用免疫细胞化学法对所培养的心肌细胞进行鉴定。根据检测结果(见图 2), 在培养的细胞中, 凡被 DAB 染上棕黄色的细胞均为心肌细胞, 随机对 5 个显微镜视野中细胞总数和心肌细胞数量进行计算, 采用本文所述的细胞分离、纯化和培养的方法所得的心肌细胞纯度可达到 95% 左右。

2.3 H₂O₂ 对心肌细胞的影响

不同浓度的 H₂O₂ 对心肌细胞形态学方面的影响存在显著的差异。形态学观察表明, 0.05 ~ 0.1mmol/L 的 H₂O₂ 作用于心肌细胞 3h 之后, 心肌细胞形态变化并不明显。但当 H₂O₂ 的浓度超过 1mmol/L 时, 心肌细胞的形态变化明显加剧, 在倒置显微镜下已经可以观察到心肌细胞形态学方面的变化, 细胞核与细胞膜均开始收缩, 核内的染色体紧缩; 当 H₂O₂ 浓度达到 5mmol/L 时, 倒置象差显微镜观察发现, 细胞体积缩小, 细胞核浓缩, 部分细胞核已经开始出现溶解的现象, 细胞间的轮角已经变得相当模糊, 细胞处于死亡状态(图 3)。

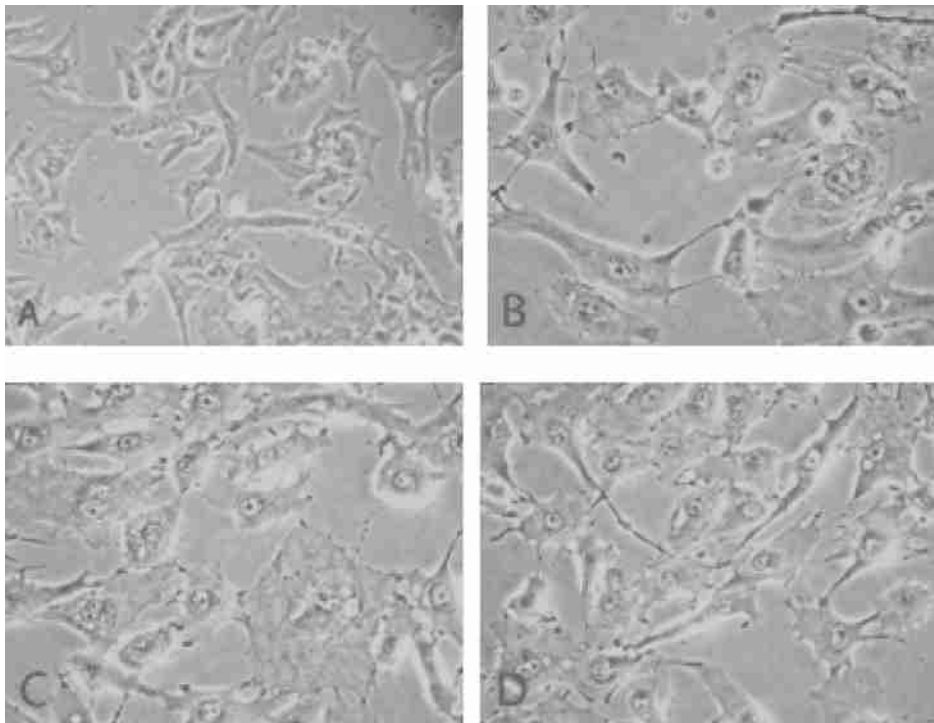


图 3 不同浓度 H₂O₂ 对心肌细胞形态学的影响(倒置显微镜观察、拍照记录)

Fig.3 The influence of cardiomyocytes morphology (observing in reverse microscope) after exposing in different concentration hydrogen peroxide for 3 hours

A: normal control group (magnify × 100); B: exposing in 1.25mmol/L H₂O₂(magnify × 200);
C: exposing in 2.5mmol/L H₂O₂(magnify × 200); D: exposing in 5mmol/L H₂O₂(magnify × 200)

心肌细胞在含有不同浓度 H₂O₂ (0.05、0.1、0.2 和 0.4mmol/L) 的 DMEM 培养基中培养了 3.5h 之后, 采用 MTT 法检测细胞存活率。如表 1 所示, 心肌细胞在不同浓度的 H₂O₂ 活性氧直接作用下, 大量的细胞死亡。0.1mmol/L H₂O₂ 浓度直接作用

3.5h, 超过 10% 的细胞死亡; 当 H₂O₂ 浓度达到 0.4mmol/L 时, 接近 50% 的细胞死亡。

图 4 所示, H₂O₂ 与细胞凋亡存在浓度依赖关系。0.625 mmol/L H₂O₂ 作用 3h, 凝胶电泳分析未见有 DNA 小片段, 这说明细胞基因组染色体仍然

保持其完整的状态,但随着 H₂O₂ 浓度提高到 1.25 mmol/L 时,电泳检测出现了许多 DNA 小片段,这说明细胞相当部分细胞已经处在凋亡阶段;而当 H₂O₂ 浓度达到 5 mmol/L 时,只出现了弥散的泳带,这说明相当部分染色体 DNA 已经被降解,而 H₂O₂ 浓度达到 10mmol/L 时,总 DNA 的量也变得更少了。由此可见,心肌细胞在 H₂O₂ 的作用下,细胞的凋亡与 H₂O₂ 的浓度相关。此外, TUNEL 的检测结果表明,0.1mmol/L H₂O₂ 所造成的心肌细胞凋亡远远要比 0.05mmol/L 的 H₂O₂ 严重得多(图 5)。

Table 1 The cardiomyocyte viability treated with H ₂ O ₂ was measured by MTT method		
Group	The concentration of H ₂ O ₂ /(mmol/L)	A _{570 nm} (x ± s)
Normal control	0	0.162±0.007
1	0.05	0.153±0.016
2	0.1	0.141±0.017
3	0.2	0.108±0.012 ^{a)}
4	0.4	0.0898±0.006 ^{b)}

Table 1 the cardiomyocytes viability was measured by MTT method. The cardiomyocytes were exposed in H₂O₂ for 3.5 hours, and detected the absorb volume of A_{570 nm} in auto equipment a) *p* < 0.01 compare with the normal control group; b) *p* < 0.001 compared with the normal control group.

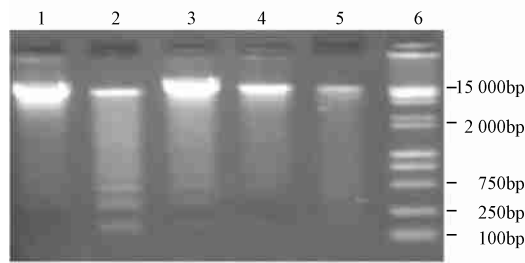


图 4 不同浓度的 H₂O₂ 与心肌细胞凋亡的状况(作用 5h)
Fig. 4 Electrophoresis analysis of DNA extracted from culture cultured myocytes. Cardiac myocytes were exposed in different concentration of H₂O₂ for 5 hours, extracted the genome DNA and electrophoresis analysis
Lane 1: 0.6125mmol/L H₂O₂ for 5 hours; lane 2: 1.25 mmol/L H₂O₂ for 5 hours; lane 3: 2.5 mmol/L H₂O₂ for 5 hours; lane 4: 5 mmol/L H₂O₂ for 5 hours; lane 5: 10 mmol/L H₂O₂ for 5 hours; lane 6: DNA marker.

3 讨论

本实验成功培养了新生 SD 乳鼠的心肌细胞,

细胞形态变化及搏动规律基本与早期相关文献报道的结果相符^[2]。由于采用了差速贴壁分离技术,根据搏动细胞的比例表明心肌细胞的纯度达到 95%,同时采用免疫细胞化学法对心肌细胞进行鉴定的结果也得出了同样的结果,这说明酶消化法是分离培养心肌细胞简单有效的方法之一。关瑞锦等^[3]的实验研究结果显示,心肌细胞搏动与细胞内部代谢特别是酶活性改变有关,心肌酶学的变化反映了培养心肌细胞的代谢情况。本实验研究过程中,在对心肌细胞连续观察的过程中发现,心肌细胞在体外培养了 10d 之后,其搏动频率开始逐渐下降,这说明体外培养过程中,细胞内部的某些代谢平衡被破坏,从而导致搏动频率下降,最终完全停止。

细胞凋亡是真核细胞最基本的生命过程之一,通过激活细胞内源性的自杀机制及时清除生理上不需要的、严重受损的和有潜在危险的细胞。最近研究表明,发生心肌疾病时,如缺血/再灌注损伤、心肌梗塞、心力衰竭等,在人或动物的心脏中,均存在心肌细胞凋亡性死亡^[4,5],细胞凋亡是心肌细胞死亡的一个重要机制,在心脏重塑、心脏功能障碍进一步发展过程中有着重要的作用。导致细胞凋亡的许多刺激因素均能造成细胞内活性氧的产生,另将外源性氧化剂作用于细胞也可以诱导细胞凋亡^[6],因此活性氧的产生可能直接参与细胞凋亡过程。

自由基引起脂质过氧化反应在心肌缺血再灌注损伤中起着重要的作用,活性氧自由基是心脏疾病发生及诱导心肌细胞死亡的主要因素之一^[7]。为了更好的了解 H₂O₂ 对心肌细胞的影响,本实验建立了 H₂O₂ 氧化损伤心肌细胞的模型,观察 H₂O₂ 对心肌细胞影响。H₂O₂ 是体内氧化代谢的中间产物,同时又是一种活性氧。H₂O₂ 浓度积累到一定程度对机体细胞产生损伤作用。本实验的研究结果表明,低浓度的 H₂O₂ 对心肌细胞的损伤在形态学方面并不显著,对细胞的生命不存在直接的威胁,同时,细胞凋亡检测结果显示,0.1mmol/L 浓度的 H₂O₂ 作用心肌细胞 24h,发生凋亡的细胞数量要比 0.05mmol/L 多得多,但没有发生坏死性死亡;然而,当 H₂O₂ 浓度达到 5 mmol/L 时,只要作用 3h,心肌细胞便出现严重的坏死性死亡。这说明 H₂O₂ 对心肌细胞的损伤具有浓度和时间的依赖

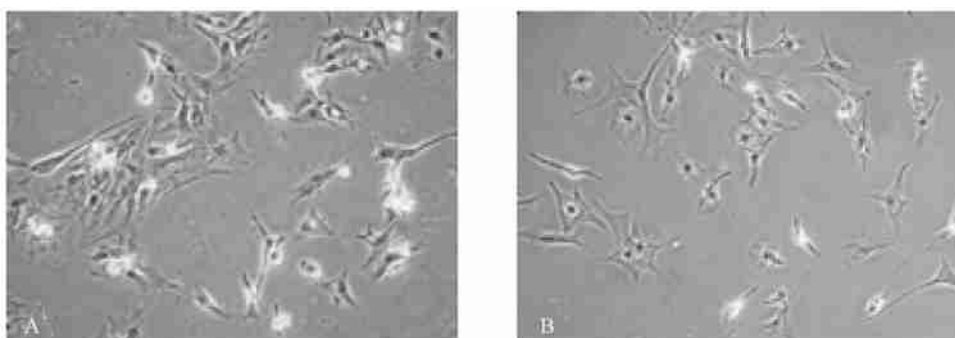


图5 H_2O_2 浓度与细胞凋亡效应检测图(TUNEL)

Fig. 5 The apoptosis concentration relationship of cardiomyocytes exposed in different concentration of H_2O_2 . Cardiomyocytes were exposed in 0.05 mmol/L (A) and 0.10 mmol/L (B) H_2O_2 DMEM medium after incubating for 24 hours, two types of specimen was examined by TUNEL method

关系。由此可见, 建立 H_2O_2 氧化损伤心肌细胞的模型有助于对抗氧自由基药物的研究, 为研究新药提供相关的方式。

参考文献

- [1] Poper H M, Gerrit L. Isolated adult cardiomyocytes. Raton: CRC Press Inc N. W. Boca, 1989. 44~ 80
- [2] Wang GW, Dale A. Schuschke, et al. Metallothionein overexpressing neonatal mouse cardiomyocytes are resistant to H_2O_2 toxicity. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 1999; 276: H167~ 175
- [3] 关瑞锦, 朱理安, 胡锡衷, 等. 心肌细胞培养与病毒性心肌炎实验模型的建立. 福建医学 (Medicine of Fujian), 2000, 22 (1): 208~ 209
- [4] Fliss H, Gattinger G. Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium. Circ Res, 1996, 79: 949~ 956
- [5] Ito G, Tamura J, Suzuki M, et al. DNA fragmentation of human infarcted myocardial cells demonstrated by the nick end labeling method and DNA agarose gel electrophoresis. Am J Pathol, 1995, 146: 1325~ 1333
- [6] Olivetti G, Abbi R, Quaini F. Apoptosis in the failing human heart. N Engl J Med, 1997, 336: 1331~ 1341
- [7] Ferrari G, Agnoletti L, Comini L, et al. Oxidative stress during myocardial ischemia and heart failure. Eur Heart J, 1998, 19 (suppl B): B2~ B11.

The Cardiomyocytes Injury Efficiency Induced by Hydrogen Peroxide

LIN Zhuo-feng¹ LI Xiao-kun^{1, 2} MENG Juan²

(1. Biopharmacy Department of Jinan University, Guangzhou 510632, China

2. Biopharmaceutical Research & Development Center, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract To study the cardiomyocytes injury efficiency induced by hydrogen peroxide, isolated the SD neonatal rat cardiac myocytes by trypsin enzyme digestion method, and cultured in suitable medium, observed the physiological character of cardiomyocytes, add some different concentration hydrogen peroxide to induce them, the change of cellular morphology were observed by reverse microscopy, viability were measure by MTT method and the rate of cardiomyocytes apoptosis were detected terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) and DNA agarose gel electrophoresis analysis. The results indicated that there is a positive relation between the cardiomyocytes injury and the concentration of H_2O_2 the same as the stimulation times by H_2O_2 ; H_2O_2 is one of important factor to the cardiomyocytes apoptosis.

Key words Cardiomyocyte Hydrogen peroxide Oxygen free radicals Cardiac myocytes injury