

· 论 著 ·

多柔比星诱导体外培养心肌细胞损伤模型的建立

郭俊芳, 张赢予, 莫亚宏, 王罗卿, 张国辉[△]

(江苏大学附属人民医院心内科, 江苏镇江 212002)

摘要:目的 探讨建立多柔比星(DOX)损伤心肌细胞模型的方法和可行性。方法 原代培养 4d 的 SD 乳鼠心肌细胞, 用不同浓度的 DOX 进行处理, MTT 法测定不同时间点的心肌细胞存活率, 倒置显微镜下观察心肌细胞搏动频率, 比色法检测上清液中乳酸脱氢酶(LDH)和天门冬氨酸氨基转移酶(AST)的含量, Hoechst 33258 荧光染色检测心肌细胞的凋亡情况。结果 不同浓度的 DOX 对心肌细胞均有损伤。当 DOX 浓度大于 1.0mg/L 时, 心肌细胞存活率明显下降。随着 DOX 浓度的增加, 心肌细胞搏动频率减慢, LDH 及 AST 明显增高, 细胞凋亡增加, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。而随着 DOX 作用时间的延长, 心肌细胞存活率亦显著降低。结论 DOX 对体外培养心肌细胞损伤程度呈浓度和时间依赖性, 1.0mg/L 的浓度作用 4h 可建立可靠的心肌细胞毒性损伤模型。

关键词: 多柔比星; 心肌细胞; 凋亡

中图分类号: R365.541

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2009)24-3132-03

Establishment of toxic cardiomyocytes model induced by doxorubicin in vitro

GUO Jun-fang, ZHANG Ying-yu, MO Ya-hong, et al.

(Department of Cardiology, Affiliated People's Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212002, China)

Abstract: Objective To investigate the methods and feasibility to establish experimental model of toxic cardiomyocytes induced by doxorubicin(DOX). **Methods** The primarily cultured neonatal SD rat cardiomyocytes were exposed to different concentrations of DOX and analyzed at different post-treatment durations after having been cultured for 4d. The cardiomyocytes viability was determined by MTT assay. The beating rate of cardiomyocytes was detected by inverted microscope. The activity of lactic dehydrogenase (LDH) and aspartate aminotransferase (AST) in superior fluid were measured by colorimetry. The cardiomyocyte apoptosis was detected by Hoechst 33258 staining. **Results** DOX had injury effect on cardiomyocytes with different concentration. The survival rate decreased significantly when the concentration was above 1.0mg/L. Accompanied with the DOX concentration increased, the beating rate of cardiomyocytes decreased, and the activity of LDH and AST increased, the apoptosis rate increased significantly, compared with the control group ($P < 0.05$). Meantime, the longer the time DOX contacted with cardiomyocytes, the lower the survival rate was. **Conclusion** The damage on cardiomyocytes induced by DOX is dose-dependent and time-dependent. The toxic cardiomyocytes model can be established when primary cultured cardiomyocytes are exposed to 1.0mg/L doxorubicin for 4h.

Key words: doxorubicin; cardiomyocytes; apoptosis

多柔比星(doxorubicin, DOX)是一种蒽环类抗肿瘤药物, 因其存在着心脏毒性, 长期使用可导致充血性心力衰竭^[1], 常被用于制造心力衰竭的动物模型。动物模型存在全身神经、体液以及其他组织细胞对心肌细胞的影响, 而体外培养的心肌细胞既可排除这些因素的影响, 又保存了其结构及功能上的某些特点, 可以更方便地从细胞和分子水平研究心血管疾病的发病机制。本实验通过 DOX 体外诱导乳鼠心肌细胞损伤, 探讨建立体外心肌细胞损伤模型的可靠方法, 并从细胞水平讨论其可能的作用机制。

1 材料与方

1.1 材料 1~3 日龄新生 SD 大鼠 30 只(由江苏大学实验动物中心提供), 新生牛血清(Hy-clone 公司), DMEM 干粉培养基(GIBCO 公司), 1:250 胰蛋白酶(Sigma 公司), I 型胶原酶(Sigma 公司), 甲基四唑蓝(MTT, Sigma 公司), 多聚赖氨酸(北京中杉金桥生物技术有限公司), α -横纹肌肌动蛋白抗体免疫组化试剂盒(α -SA, 武汉博士德生物技术有限公司), DOX(浙江海正药业有限公司), 5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-BrdU, Sigma 公司)。Hoechst 33258 试剂盒(南京凯基生物技术公司)。

1.2 心肌细胞的分离和培养 参考 Spector 等的方法并加以改进。无菌取乳鼠心脏, 用眼科剪将组织块剪成 1mm³ 的小块, 加入 5 倍体积的 0.08% 胰蛋白酶溶液, 37℃ 恒温震荡消化 10min, 自然沉淀后弃去上清液。在剩余组织中加入消化酶混合液 5mL(0.08% 胰蛋白酶和 0.05% I 型胶原酶等量混合), 37℃ 水浴下消化 3~5min, 吸出上清液, 并加入 2 倍体积的含 20% 新生牛血清培养基终止消化, 共消化 5~6 次, 至组织完全消化为止, 收集各次消化的上清液并过滤, 1 000r/min 离心 10min, 弃去上清液后将细胞重悬于含 20% 新生牛血清的 DMEM 培养液中, 然后接种于 90mm 培养皿, 置 CO₂ 培养箱(37℃, 5% CO₂ 饱和湿度)中培养 2h, 差速贴壁法去除成纤维细胞, 纯化心肌细胞。

1.3 心肌细胞存活率检测和计数 取心肌细胞悬液 0.5mL 与等量 0.3% 台盼蓝液混匀, 接种于细胞计数板上, 显微镜下观察, 着蓝色者为死细胞, 活细胞不着色。计算细胞悬液中的活细胞数, 调整细胞浓度至 3×10^5 个/mL。

1.4 心肌细胞的鉴定 多聚赖氨酸包被盖玻片, 置入 6 孔培养板, 每孔加入 3mL 心肌细胞悬液, 并加入 0.1mmol/L 5-Br-

[△] 通讯作者, E-mail: 13338812776@e165.com。

du,以抑制残存成纤维细胞的生长,72h 后取出细胞爬片,按照 α -SA 免疫组化试剂盒的说明进行细胞染色,并进行细胞纯度鉴定。

1.5 DOX 损伤心肌细胞模型的建立

1.5.1 MTT 法检测心肌细胞存活率 细胞悬液接种于 96 孔培养板(200 μ L/孔),置 CO₂ 培养箱(37 $^{\circ}$ C,5%CO₂ 饱和湿度)中培养,24h 后首次换液,以后每 2 天换液 1 次,培养第 4 天用于实验。分为对照组 15 孔,DOX 组 60 孔。DOX 组给予不同浓度的 DOX(0.5、1.0、2.0、4.0mg/L)处理,对照组则给予含 20%新生牛血清的 DMEM 培养液。观察时间分别为 1、2、4、24、48h,然后吸去上清液,每孔加入 100 μ L 无血清培养基,再加入 MTT(5g/L)20 μ L,继续培养 4h 后吸去上清液,每孔加入二甲亚砷(DMSO)150 μ L,震荡 10min,使结晶物完全溶解。酶标仪检测各孔光密度(OD)值(波长 490nm)。存活率=药物组平均 OD 值/对照组平均 OD 值 \times 100%。

1.5.2 DOX 对心肌细胞搏动频率、心肌酶谱及心肌细胞凋亡的影响 取 48 孔培养板,每孔加入上述浓度的心肌细胞悬液 1mL,共 30 孔,培养 4d 后用于实验,随机分为 5 个组,每组均为 6 孔。分为空白对照组,给予含 20%新生牛血清的 DMEM 培养基;DOX 处理组,DOX 浓度分别为 0.5、1.0、2.0、4.0mg/L。4h 后在倒置显微镜下观察细胞形态,每孔随机选择 3 个搏动的心肌细胞簇,观察心肌细胞的搏动频率,并计算其平均值。血生化自动分析仪比色法测定细胞培养上清液中的乳酸脱氢酶(LDH)及天门冬氨酸氨基转移酶(AST)的浓度。Hoechst 33258 染色试剂盒检测心肌细胞的凋亡,荧光倒置显微镜下每孔任选 5 个视野观察,计数凋亡细胞和总细胞数,并计算凋亡指数。

1.6 统计学方法 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS11.5 统计软件进行处理,多组均数间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 新生 SD 大鼠心肌细胞的培养 差速培养后的心肌细胞呈圆形,培养 4h 细胞开始贴壁生长,逐渐变为梭形、三角形、多边形等形态,12h 细胞基本贴壁,出现自发性搏动,搏动的频率、节律不同;第 3 天细胞伸出的伪足相互接触交织成网,逐渐形成细胞簇或细胞单层,搏动呈同步性,收缩明显而有力,搏动频率为 80~150 次/分。0.3%台盼蓝染色显示心肌细胞存活率大于 90%。 α -SA 免疫组化染色显示胞质肌动蛋白染色阳性细胞大于 95%。

2.2 DOX 对乳鼠心肌细胞存活率的影响 实验结果表明,不同浓度 DOX 均可引起心肌细胞存活率的下降,0.5~1.0mg/L 浓度的 DOX 作用 4h 以上时心肌细胞存活率明显下降,2.0~4.0mg/L 浓度的 DOX 作用超过 1h,心肌细胞存活率即显著下降。心肌细胞存活率下降程度与 DOX 浓度及作用时间呈正相关(图 1)。

2.3 不同浓度 DOX 对乳鼠心肌细胞搏动频率、心肌酶谱的影响 见表 1。结果显示,随着 DOX 浓度的增加,心肌细胞搏动频率下降,LDH 及 AST 增高,与对照组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.4 不同浓度 DOX 对乳鼠心肌细胞凋亡的影响 Hoechst 33258 染色后用荧光倒置显微镜观察,正常细胞核边界规则、整齐,染色均匀并呈淡染,凋亡细胞核则表现为致密浓染、皱缩或碎裂状(彩插 IV 图 14,箭头所示)。结果显示正常对照组心

肌细胞凋亡较少,而 DOX 处理组心肌细胞凋亡率增加,DOX 浓度在 1.0~4.0mg/L 时,细胞凋亡率明显增加,且与药物浓度呈正相关,与对照组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$)(图 2)。

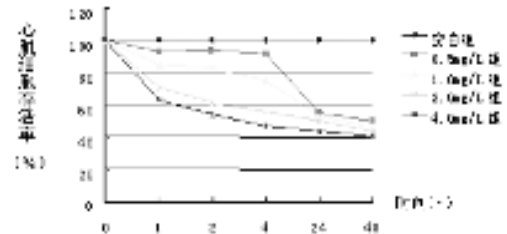
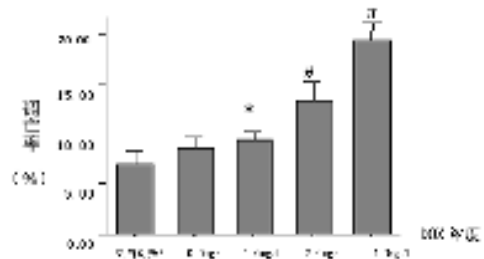


图 1 DOX 对心肌细胞存活率的影响

表 1 DOX 对乳鼠心肌细胞搏动频率、心肌酶谱的影响

组别	心肌细胞搏动频率(次/分)	LDH (u/L)	AST(u/L)
空白对照组	99.83 \pm 6.46	76.33 \pm 1.36	12.33 \pm 1.03
0.5mg/L DOX	94.00 \pm 3.10	79.50 \pm 2.42	13.00 \pm 1.41
1.0mg/L DOX	64.50 \pm 6.28 Δ	98.50 \pm 3.67 Δ	19.17 \pm 2.85 Δ
2.0mg/L DOX	56.67 \pm 4.27 \star	128.17 \pm 3.25 \star	41.67 \pm 3.20 \star
4.0mg/L DOX	48.83 \pm 4.22 \star	142.50 \pm 3.33 \star	51.67 \pm 3.72 \star

与空白对照组相比, Δ : $P < 0.05$; \star : $P < 0.01$ 。



与空白对照组比较,*: $P < 0.05$;#: $P < 0.01$ 。

图 2 DOX 对心肌细胞凋亡率的影响

3 讨 论

DOX 是临床常用的化疗药物,与心肌细胞有特殊的亲和力,容易在心脏内特异性蓄积并产生心脏毒性,长期用药可引起剂量依赖性的充血性心力衰竭,当 DOX 的累积剂量大于 600mg/m² 时,心力衰竭的发病率可高达 36%^[2]。DOX 的心脏毒性作用一直是药理学研究热点,但相关研究多集中在其诱导的心肌病动物模型上^[3-4],对原代培养心肌细胞的毒性作用以及建立理想的体外心肌细胞损伤模型的研究较少。

DOX 引起心肌损伤的确切机制不十分清楚,自由基理论为多数研究者所接受。自由基具有抗癌活性,但它同时又会加重对心肌组织的损伤。DOX 的心脏毒性主要与其产生活性氧自由基(ROS)引起脂质过氧化有关^[5],可导致细胞膜和细胞器膜的损伤,抑制心肌细胞的腺苷酸环化酶活性,使心肌细胞的有氧代谢能力下降,能量供应不足,严重影响心肌的收缩和舒张功能。

活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性的 MTT 还原为难溶性的蓝紫色结晶并沉积在细胞中,用二甲亚砷使其溶解后,检测其吸光度值,既可反映心肌细胞内线粒体琥珀酸脱氢酶活性,又能间接反映心肌细胞的生长情况^[6]。LDH 是存在于心肌细胞的胞质酶,而 AST 主要存在于线粒体中,当细

胞受到损伤时,细胞膜和线粒体破裂,通透性增加,胞内大量的 LDH、AST 漏出胞外,检测心肌细胞 LDH 和 AST 的漏出率,可判断 DOX 对细胞的损伤程度^[7]。因本实验为心肌细胞的体外研究,不存在其他组织细胞的影响,所选择检测指标仅需考虑敏感性,而不需考虑其特异性,因此,本院仅检测了细胞培养上清液中 LDH 和 AST 的浓度,未进行其他心肌坏死标志物的检测。细胞凋亡是一种程序性细胞死亡方式,在机体生命活动过程中,细胞凋亡过多或过少都会诱发疾病,而病理性细胞凋亡是心肌细胞丧失的形式之一,是心血管疾病发生和发展的基础^[8]。本研究结果提示,一定浓度的 DOX 对乳鼠心肌细胞有明显的抑制作用,可使心肌细胞的存活率下降,这种抑制作用与 DOX 的浓度以及作用时间呈正相关;同时,DOX 对心肌细胞膜和线粒体膜产生了不可逆的损伤,导致 LDH 和 AST 释放增加,线粒体功能紊乱,心肌细胞收缩力下降,并激活了心肌细胞的凋亡途径,这种损伤作用呈浓度依赖性。

建立合适的损伤心肌细胞模型是研究 DOX 毒性作用的关键所在,DOX 浓度过低,对心肌细胞损伤不足,DOX 浓度过高,则过度损伤心肌细胞,对实验观察均不利。本研究数据表明,DOX 对体外培养心肌细胞的毒性作用与其介导的氧化损伤及促凋亡作用有关,1.0mg/L 的浓度作用 4h 可建立可靠的心肌细胞毒性损伤模型,为 DOX 心脏毒性作用机制的研究奠定了一定的实验基础。

参考文献:

[1] Takemura G, Fujiwara H. Doxorubicin-induced cardiomy-

opathy: from the cardiotoxic mechanisms to management [J]. *Prog Cardiovasc Dis*, 2007, 49(5): 330.

[2] Singal PK, Iliskovic N. Doxorubicin-induced cardiomyopathy [J]. *N Engl J Med*, 1998, 339(13): 900.

[3] 白永虹,田杰,江德勤,等.大鼠心肌病模型的建立及彩色超声心动图监测的研究[J]. *重庆医学*, 2005, 34(2): 168.

[4] Michiko I, Shinji T, Takeshi N, et al. Bone marrow mononuclear cell transplantation had beneficial effects on doxorubicin-induced cardiomyopathy [J]. *Heart Lung Transplant*, 2004, 23(4): 436.

[5] Lou H, Kaur K, Sharma AK, et al. Adriamycin-induced oxidative stress, activation of MAP kinases and apoptosis in isolated cardiomyocytes [J]. *Pathophysiology*, 2006, 7(13): 103.

[6] Lobo AO, Antunes EF, Machado AHA, et al. Cell viability and adhesion on as grown multi-wall carbon nanotube films [J]. *Mater Sci Eng*, 2008, 28(2): 264.

[7] 王秀丽,董解菊,蒲晓允,等.天门冬氨酸转氨酶同工酶测定对心、肝疾病诊断的临床意义[J]. *重庆医学*, 2007, 36(10): 917.

[8] Lockshin RA. Programmed cell death: history and future of a concept [J]. *Soc Biol*, 2005, 199(3): 169.

(收稿日期:2009-07-15)

(上接第 3131 页)

胞等多种细胞产生。IL-1 β 在生物学活性上,可以使嗜碱性及中性粒细胞脱颗粒。已有研究显示,TNF- α 是 SAP 发病后较早产生的细胞因子,可激活 PMN 促进多种炎症介质的释放,在 SAP 发病及其全身并发症发生过程中起着重要作用,TNF- α 可以增加肺微循环的通透性,促进 PMN 在肺内的黏附和聚集、诱导中性粒细胞释放 NE 等。同时,IL-1 β 和 IL-6 在胰腺炎患者中亦明显升高。早期检测 TNF- α 和 IL-6 不仅能反映 SAP 严重程度,同时有助于预测肺损伤发生及其严重程度。另外,3 种细胞因子又相互作用,共同促进炎症的产生,TNF- α 作为重要的始发因子在细胞和亚细胞水平上发生一系列的级联反应,诱导 IL-1 β 、IL-6 及其自身的产生;TNF- α 和 IL-1 β 可刺激单核细胞和内皮细胞产生 IL-6^[7]。本研究结果显示,上述 3 种细胞因子的水平与 NF- κ B 的表达密切相关,己酮可可碱通过调控 NF- κ B 相关的细胞信号传导通路,从而控制了细胞因子所致炎症级联放大效应,达到减轻肺损伤的作用。

综上所述,己酮可可碱主要是通过抑制肺组织中 NF- κ B p65 mRNA 的表达,从而抑制促炎细胞因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的产生而发挥其抗炎作用,己酮可可碱有望成为治疗 ALI 的药物之一。

参考文献:

[1] 高冬娜,张璇.急性肺损伤研究进展[J]. *中国急救医学*, 2008, 28(1): 72.

[2] Pozsar J, Berger Z, Simon K, et al. Biphasic effect of prostaglandin E1 on the severity of acute pancreatitis induced by a closed duodenal loop in rats [J]. *Pancreas*, 1996, 12(2): 159.

[3] Hofbauer B, Saluja AK, Bhatia M, et al. Effect of recombinant platelet-activating factor acetylhydrolase on two models of experiment acute pancreatitis [J]. *Gastroenterology*, 1998, 115(5): 1238.

[4] Rakonczay ZJR, Hegyi P, Takács T, et al. The role of NF-kappaB activation in the pathogenesis of acute pancreatitis [J]. *Gut*, 2008, 57(2): 259.

[5] De Campos T, Deree J, Martins JO, et al. Pentoxifylline attenuates pulmonary inflammation and neutrophil activation in experimental acute pancreatitis [J]. *Pancreas*, 2008, 37(1): 42.

[6] Deree J, Martins J, De Campos T, et al. Pentoxifylline attenuates lung injury and modulates transcription factor activity in hemorrhagic shock [J]. *J Surg Res*, 2007, 143(1): 99.

[7] 陆海华,史忠,刘波,等.急性胰腺炎相关性肺损伤患者早期血清 TNF- α 、IL-1、IL-6 的变化及其临床意义[J]. *重庆医学*, 2007, 36(18): 1818.

(收稿日期:2009-03-28 修回日期:2009-06-05)