

· 实验研究 ·

七氟醚处理后的低温缺氧-复氧心脏成纤维细胞培养液对心肌细胞的影响

牛振瑛 王贵龙 高鸿 冯玉蓉 刘艳秋 何幼芹 曹莹

【摘要】 目的 观察七氟醚对低温缺氧-复氧心脏成纤维细胞(CFs)培养液中心肌细胞搏动及缝隙连接蛋白 43(Cx43)表达的影响。方法 培养 4 d 的正常原代 CFs 随机分为三组:对照组(C组)、缺氧-复氧损伤组(IR组)和七氟醚组(Sev组),每组约 5×10^5 个细胞。C组 CFs 持续培养 5 h; IR组和 Sev组 CFs 低温缺氧 1 h(4°C , $95\% \text{N}_2 + 5\% \text{CO}_2$), 复氧(37°C , $5\% \text{CO}_2 + 95\%$ 空气) 4 h, Sev组复氧过程中加入含 2.5%七氟醚的培养液培养。培养结束时分别收集各组培养液,加入正常心肌细胞培养 16 h。免疫细胞化学 SP 染色法鉴定 CFs 与心肌细胞;HE 染色观察 CFs 与心肌细胞形态;磁带式录像机观察并记录心肌细胞搏动频率;台盼蓝染色法测心肌细胞死亡率;Western blot 法测定 Cx43 蛋白及 p-Cx43 蛋白相对含量。**结果** 与 C组比较,IR组心肌细胞搏动频率明显减慢,IR组和 Sev组心肌细胞死亡率明显升高,Cx43 蛋白和 p-Cx43 蛋白相对含量明显降低($P < 0.05$)。与 IR组比较,Sev组心肌细胞搏动频率明显加快,心肌细胞死亡率明显降低,Cx43 蛋白和 p-Cx43 蛋白相对含量明显升高($P < 0.05$)。**结论** 七氟醚可加快低温缺氧-复氧 CFs 培养液中心肌细胞搏动频率,上调 Cx43 和 p-Cx43 蛋白表达,降低心肌细胞死亡率,增强心肌细胞活性。

【关键词】 七氟醚;缺氧-复氧损伤;成纤维细胞;心肌细胞;缝隙连接蛋白 43

Effects of hypothermic hypoxia-reoxygenation fibroblast culture medium treated with sevoflurane on cardiomyocytes NIU Zhenying, WANG Guilong, GAO Hong, FENG Yurong, LIU Yanqiu, HE Youqin, CAO Ying. School of Anesthesiology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China
Corresponding author: GAO Hong, Email: 2169617@qq.com

【Abstract】 Objective To observe the effects of sevoflurane on cardiomyocytes pulsation and Connexin 43 (Cx43) expression in hypothermic hypoxia-reoxygenation fibroblasts culture medium. **Methods** Normal primary fibroblasts (CFs) cultured for 4 days were randomly divided into three groups: control group (group C), hypoxia-reoxygenation group (group IR) and sevoflurane group (group Sev), each group has 5×10^5 cells. CFs in group C continued to be cultured for 5 hours. CFs under hypothermia hypoxia (4°C , $95\% \text{N}_2 + 5\% \text{CO}_2$) for 1 hour and reoxygenation (37°C , $5\% \text{CO}_2 + 95\%$ air) for 4 hours in group IR and group Sev, and 2.5% sevoflurane was added to the culture medium during reoxygenation in group Sev. At the end of culture, the culture media of each group were collected and cultured with normal cardiomyocytes for 16 hours. Immunocytochemical SP staining was used to identify fibroblasts and cardiomyocytes. HE staining was used to observe the morphology of fibroblasts and cardiomyocytes. Tape recorder was used to observe and record the beating frequency of cardiomyocytes. Trypan blue staining was used to determine the mortality of cardiomyocyte. Western blot was used to determine the relative expression of Cx43 and p-Cx43. **Results** Compared with group C, the beating frequency of cardiomyocytes in group IR was significantly decreased, and the mortality of cardiomyocyte was significantly higher in group IR and group Sev, the relative expression of Cx43 protein and p-Cx43 protein in group IR and group Sev was significantly lower ($P < 0.05$). Compared with group IR, the beating frequency of cardiomyocytes in group Sev was significantly increased, the mortality of cardiomyocyte in group Sev was significantly decreased, and the relative expression of Cx43 and p-Cx43 in group Sev was significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Sevoflurane can increase the beating frequency of myocytes in hypothermic hypoxia-reoxygenation fibroblast culture medium, up-regulate the expression of Cx43 and p-Cx43, reduce the mortality of cardiomyocytes and enhance the activity of cardiomyocytes.

【Key words】 Sevoflurane; Hypoxia-reoxygenation injury; Fibroblasts; Cardiomyocytes; Connexin 43

DOI:10.12089/jca.2021.01.016

作者单位:550004 贵阳市,贵州医科大学麻醉学院(牛振瑛、冯玉蓉、何幼芹、曹莹);织金县人民医院麻醉科(王贵龙);贵州医科大学第三附属医院(高鸿);贵阳市第四人民医院麻醉科(刘艳秋)

通信作者:高鸿,Email: 2169617@qq.com

再灌注心律失常 (reperfusion arrhythmia, RA) 是心肌缺血-再灌注损伤的特征性表现,其中以室性心律失常最为常见^[1]。本课题组前期研究表明,七氟醚可改善低温、全心缺血-再灌注引起的大鼠离体心脏电生理的不稳定性,且这一影响与心肌缝隙连接蛋白 43 (connexin 43, Cx43) 表达下调和分布紊乱有关^[2-3]。心脏成纤维细胞 (cardiac fibroblasts, CFs) 在心律失常、心脏纤维化等病理变化中的重要作用日益显现, Dostal 等^[4] 研究表明, CFs 可通过多种机制影响心脏电生理。七氟醚改善低温、全心缺血-再灌注心脏电生理不稳定性的作用是否与 CFs 有关尚不明确。本研究采用缺氧-复氧 CFs 培养液培养正常心肌细胞,探讨七氟醚对低温缺氧-复氧 CFs 培养液中心肌细胞的影响。

材料与方法

实验动物 健康 SD 乳鼠 18 只,雌雄不限,新生 2~3 d,体重 10~15 g,由贵州医科大学动物实验中心提供,实验动物生产许可证号 [SYXK (黔) 2018-0001]。

原代 CFs 和心肌细胞的获取 乳鼠颈椎脱臼法处死后酒精浸泡消毒,胸部向上固定,剪开胸腔暴露并挤出心脏,剪下左心室放入干净烧杯中,磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 冲洗 3 次,青霉素-链霉素溶液 (PS 液) 清洗 1 次,继续用 PBS 冲洗干净,剪碎心脏组织,加入适量 0.125% 胰蛋白酶,4 ℃ 冰箱中过夜。次日用适量 0.08% 胰蛋白酶消化 3~5 次。每次消化后取上清液 (含有细胞),加入与上清液等量的含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基充分混合终止消化。消化结束后用细胞过滤筛过滤含细胞的混合液,过滤后的细胞悬液离心 (半径 15 cm, 1 000 r/min, 5 min),收集沉淀后将沉淀用培养液重新悬浮,接种于培养皿中放入培养箱 (37 ℃, 5% CO₂) 培养。1.5 h 后,CFs 已贴于培养皿壁,吸出细胞悬液。取新的培养皿将细胞悬液 (含心肌细胞) 放入继续培养,每天观察心肌细胞生长情况。24 h 后第一次换液。调整细胞浓度,以 1×10⁵ 个/ml 的密度接种到细胞培养瓶中。

免疫细胞化学 SP 染色法鉴定 CFs 与心肌细胞 (1) 标本的制备:取培养 d4 的细胞用于鉴定。PBS 洗涤细胞 2 遍后用 4% 多聚甲醛固定,将细胞液浸于 0.01 mol/L pH 7.4 的 PBS 中洗涤 3 次,每次 3 min; 0.1% Triton X-100 1 ml 浸润破膜,0.01 mol/L pH 7.4 的 PBS 洗涤 2~3 次,每次 3 min。(2) 免疫

细胞化学 SP 法染色,按照兔 Streptavidin-HRP 试剂盒说明书操作,心肌细胞鉴定所用一抗为兔抗鼠 α -actin 抗体及 cTnT 抗体 (稀释度 1:200); CFs 鉴定所用抗体为波形蛋白 (Vimentin) 抗体;所用二抗均为羊抗兔 IgG-Biotin (稀释度 1:200)。(3) DAB 显色。(4) 苏木素复染。(5) 脱水透明。(6) 中性树胶封片,晾干后拍照并保存。

HE 染色观察 CFs 与心肌细胞形态 (1) 取出正常培养至 d4 的细胞 6 孔板 (含细胞爬片)。(2) 弃上清, PBS 洗涤 3 次,每次 3 min。(3) 4% 多聚甲醛固定 15 min。(4) PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。(5) 滴加苏木素染液,染色 5~15 min,自来水冲洗。(6) 浸入 1% 盐酸酒精分色,3 s 后自来水冲洗。(7) 滴加 0.5% 水溶性伊红染液,染色 5 min,自来水冲洗。(8) 自然晾干,倒置显微镜下观察结果并拍照。(9) 中性树胶封片并保存拍片记录。

实验分组与方法 取正常培养 4 d 的 CFs 随机分为三组:对照组 (C 组)、缺氧-复氧组 (IR 组) 和七氟醚组 (Sev 组),每组约 5×10⁵ 个细胞。C 组 CFs 更换新培养液后继续正常培养 5 h; IR 组及 Sev 组参照 Louch 等^[5] 研究中的方法使用含 95% N₂ + 5% CO₂ 混合气体的培养液替换原培养液,置于缺氧装置中,以 5 L/min 的速度持续吹入 95% N₂ + 5% CO₂ 的混合气体 15 min,关闭进出气口,放入 4 ℃ 冰箱中低温缺氧培养 1 h,缺氧完成后从缺氧装置中取出细胞培养瓶放入 37 ℃ 培养箱中复氧 (5% CO₂ + 95% 空气) 4 h; Sev 组在复氧即刻培养瓶连接 Vapor 2000 (麻醉气体挥发器) 持续充入 2.5% 七氟醚 10 min。培养结束后收集各组培养液,随机取 3 瓶正常心肌细胞分别加入上述处理后的 CFs 培养液培养 16 h。

磁带式录像机观察并记录心肌细胞搏动频率 连接相差显微镜与磁带式录像机在高倍镜下随机选取 10 个有自发搏动的心肌细胞观察并记录搏动频率,重复 3 次。

台盼蓝染色法测心肌细胞死亡率 取生长良好的细胞悬液与 4 g/L 的台盼蓝溶液 (按体积比 9:1) 混合均匀,滴加细胞悬液使计数板和盖玻片之间无气泡。随机选取 3 个视野观察,死亡细胞染为蓝色,计算死亡细胞和存活细胞数量,按计算公式计算细胞死亡率,细胞死亡率 (%) = 死细胞数 ÷ (死细胞数 + 活细胞数) × 100%。

Western blot 法测定 Cx43、p-Cx43 相对含量 按总蛋白提取试剂盒说明书对三组蛋白相对含量进行测定,用细胞刮刮取心肌细胞,在 4 ℃ 条件下,半

径 15 cm、12 000 r/min 离心 10 min 获取总蛋白。每组细胞分别按说明加入适量细胞裂解液及蛋白酶抑制剂,冰上混匀,采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒定量。根据蛋白分子量大小制备分离胶和浓缩胶,上层电压 80 V,下层电压 120 V 电泳,200 mA 恒定电流进行 2 h 转膜,封闭液封闭 2 h 后,在 4 ℃ 条件下分别孵育抗大鼠 Cx43 一抗(1:800)或 p-Cx43 一抗(1:1 000)过夜,加入羊抗兔二抗(1:10 000,已用辣根过氧化物酶标记)室温下孵育 1 h。ECL 显色后曝光、显影。以内参 GAPDH 蛋白条带灰度值作为标准,用 Image J 软件计算相应蛋白的相对含量。

统计分析 采用 SPSS 22.0 统计学软件进行统计分析。正态分布计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD、SNK 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

免疫细胞化学染色鉴定及 HE 染色形态 400 倍光镜下观察,CFs 在离心后培养 1.5 h 时基本贴壁,细胞似梭形,均匀散在分布,3 d 时呈融合状态,无自发性的搏动。心肌细胞为圆形或椭圆形,未贴壁;48 h 后心肌细胞基本贴壁,形态不一,似梭形、三角形或不规则形,有自发性的规律搏动(图 1—2)。



注:A,波形蛋白;B,肌动蛋白;C,肌钙蛋白

图 1 CFs 与心肌细胞特异性蛋白免疫细胞化学染色镜图($\times 400$)

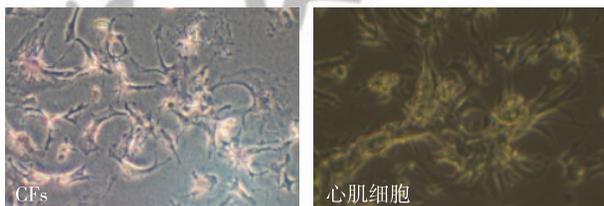


图 2 CFs 与心肌细胞 HE 染色镜图($\times 400$)

心肌细胞搏动频率和死亡率 与 C 组比较,IR 组心肌细胞的搏动频率明显减慢,IR 组和 Sev 组心肌细胞死亡率明显升高($P < 0.05$)。与 IR 组比较,Sev 组心肌细胞搏动频率明显加快,心肌细胞死亡

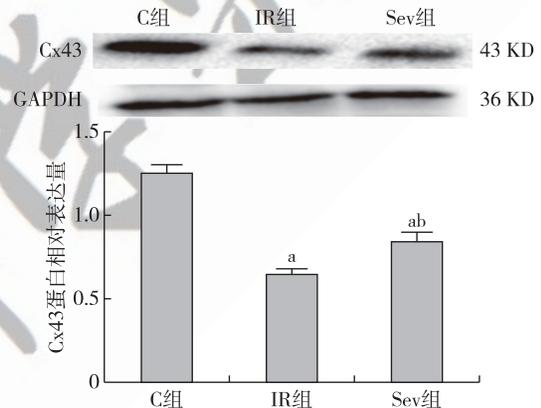
率明显降低($P < 0.05$)。Sev 组与 C 组心肌细胞搏动频率差异无统计学意义(表 1)。

表 1 三组心肌细胞搏动频率和死亡率的比较

组别	搏动频率 (次/分)	心肌细胞死亡率 (100%)
C 组	118.3±3.2	0.097±0.011
IR 组	97.0±3.6 ^a	0.526±0.020 ^a
Sev 组	116.3±3.2 ^b	0.356±0.085 ^{ab}

注:与 C 组比较,^a $P < 0.05$;与 IR 组比较,^b $P < 0.05$

心肌细胞 Cx43 相对含量 与 C 组比较,IR 组和 Sev 组 Cx43 相对含量明显降低($P < 0.05$)。与 IR 组比较,Sev 组心肌细胞 Cx43 蛋白相对含量明显升高($P < 0.05$)(图 3)。



注:与 C 组比较,^a $P < 0.05$;与 IR 组比较,^b $P < 0.05$

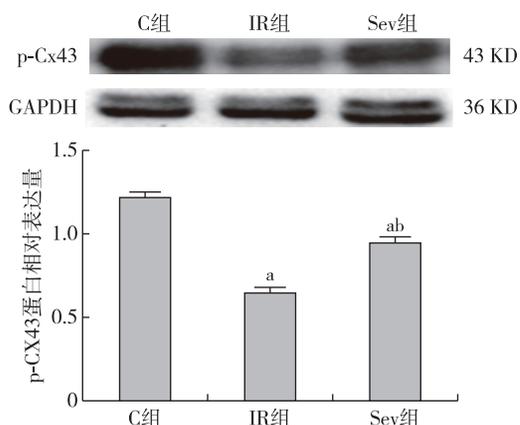
图 3 三组心肌细胞 Cx43 蛋白相对含量的比较

心肌细胞 p-Cx43 相对含量 与 C 组比较,IR 组和 Sev 组 p-Cx43 蛋白相对含量明显降低($P < 0.05$)。与 IR 组比较,Sev 组 p-Cx43 蛋白相对含量明显升高($P < 0.05$)(图 4)。

讨 论

CFs 在心律失常、心肌肥大、心脏纤维化中的重要作用日益显现,研究表明 CFs 可通过多种机制影响心脏电生理,包括旁分泌、细胞外基质沉积以及与心肌细胞的直接电偶联,其中与心律失常相关的旁分泌介质主要有 TGF- β 1、血管紧张素 II、白细胞介素和 Wnt 信号通路,而电偶联则主要为缝隙连接^[4,6-7]。

本研究建立 CFs 缺氧-复氧模型,排除了缺氧-复氧损伤对心肌细胞的直接影响,验证缺血-再灌



注:与 C 组比较,^a $P < 0.05$;与 IR 组比较,^b $P < 0.05$

图 4 三组心肌细胞 p-Cx43 蛋白相对含量的比较

注损伤过程中 CFs 对心肌细胞的间接影响。本研究结果显示,低温缺氧-复氧 CFs 培养液可减慢心肌细胞搏动频率,提示缺氧-复氧的 CFs 可能释放化学介质到培养液中,对心肌细胞产生影响。

缝隙连接是 CFs 与心肌细胞以及相邻心肌细胞间发挥电传导作用的重要结构,组成心室肌细胞缝隙连接的通道蛋白主要是 Cx43,主要以磷酸化的形式^[8-9]发挥作用。Cx43 的磷酸化水平升高可以减少心律失常的发生^[10]。本课题组前期研究表明七氟醚可抑制低温诱导的心室肌细胞 Cx43 表达下调及分布紊乱,含七氟醚的组氨酸-色氨酸-酮戊二酸盐液对抗低温缺血-再灌注性心律失常的作用与 Cx43 丝氨酸 368 磷酸化有关。本研究结果显示,经七氟醚处理的缺氧-复氧 CFs 培养液培养的心肌细胞,其 Cx43 和 p-Cx43 相对表达量均升高,证明 CFs 在七氟醚调控 Cx43、p-Cx43 蛋白表达从而抑制再灌注心律失常的机制中发挥着作用。

CFs 可被炎症激活,Sandstedt 等^[11]研究表明,心脏衰竭时缺氧 CFs 脂氧合酶花生四烯酸 15 的表达升高,而七氟醚具有抗炎、减轻氧化应激和减轻线粒体损伤的作用^[12],故推断七氟醚对 CFs 的影响与抑制低温缺氧-复氧损伤后 CFs 的炎症反应有关。目前尚无相关研究证明 SD 乳鼠性别可能对心肌细胞活性及功能产生影响,因此本实验所用乳鼠雌雄不限,乳鼠性别对实验结果的影响有待进一步研究。

本研究不足之处在于:因实验室条件有限,未能对处理后的 3 组心肌细胞进行电镜观察。此外,

尚需对培养液中具体介质进行进一步提取验证。

综上所述,七氟醚可加快低温缺氧-复氧 CFs 培养液中心肌细胞搏动频率,升高 Cx43 和 p-Cx43 相对含量,降低心肌细胞死亡率,增强心肌细胞活性。

参 考 文 献

- [1] Soltani G, Jahanbakhsh S, Tashnizi MA, et al. Effects of dexmedetomidine on heart arrhythmia prevention in off-pump coronary artery bypass surgery: a randomized clinical trial. *Electron Physician*, 2017, 9(10): 5578-5587.
- [2] Li WC, Gao H, Gao J, et al. Antiarrhythmic effect of sevoflurane as an additive to HTK solution on reperfusion arrhythmias induced by hypothermia and ischaemia is associated with the phosphorylation of connexin 43 at serine 368. *BMC Anesthesiol*, 2019, 19(1): 5.
- [3] 王贵龙, 高鸿, 王子君, 等. 七氟醚对大鼠离体心脏全心缺血-再灌注心律失常及电生理的影响. *临床麻醉学杂志*, 2018, 34(12): 1223-1226.
- [4] Dostal D, Glaser S, Baudino TA. Cardiac fibroblast physiology and pathology. *Compr Physiol*, 2015, 5(2): 887-909.
- [5] Louch WE, Sheehan KA, Wolska BM. Methods in cardiomyocyte isolation, culture, and gene transfer. *J Mol Cell Cardiol*, 2011, 51(3): 288-298.
- [6] Vasquez C, Mohandas P, Louie KL, et al. Enhanced fibroblast-myocyte interactions in response to cardiac injury. *Circ Res*, 2010, 107(8): 1011-1020.
- [7] Pellman J, Zhang J, Sheikh F. Myocyte-fibroblast communication in cardiac fibrosis and arrhythmias: mechanisms and model systems. *J Mol Cell Cardiol*, 2016, 94: 22-31.
- [8] Xue J, Yan X, Yang Y, et al. Connexin 43 dephosphorylation contributes to arrhythmias and cardiomyocyte apoptosis in ischemia/reperfusion hearts. *Basic Res Cardiol*, 2019, 114(5): 40.
- [9] 张凯强, 高鸿, 刘军, 等. 缝隙连接 Cx43 在右美托咪定预防缺血-再灌注离体兔心复灌性心律失常中的作用. *临床麻醉学杂志*, 2017, 33(4): 369-373.
- [10] Véghe A, Gönczi M, Miskolczi G, et al. Regulation of gap junctions by nitric oxide influences the generation of arrhythmias resulting from acute ischemia and reperfusion in vivo. *Front Pharmacol*, 2013, 4: 76.
- [11] Sandstedt M, Rotter Sopasakis V, Lundqvist A, et al. Hypoxic cardiac fibroblasts from failing human hearts decrease cardiomyocyte beating frequency in an ALOX15 dependent manner. *PLoS One*, 2018, 13(8): e0202693.
- [12] 万子琳, 李亚雄, 王小燕, 等. 全程吸入不同浓度七氟烷对冠状动脉旁路移植术患者心肌保护作用及炎症细胞因子的影响. *实用医学杂志*, 2020, 36(8): 1096-1101.

(收稿日期:2020-03-17)