

· 基础研究 ·

DOI: 10.13498/j.cnki.chin.j.ecc.2020.05.13

不同类型心脏停搏液对 小鼠未成熟心肌细胞增殖能力的影响

刘怀普, 梁彦锴, 吴柯叶, 郑丰楠, 谭小莉, 孟保英

[摘要]:目的 观察不同类型心脏停搏液对离体新生小鼠未成熟心肌细胞增殖能力的影响。方法 体外分离培养新生小鼠心肌细胞,随机分为 5 组,分别给予复方电解质液、改良圣托马斯液(STH)、HTK 液以及仿 del Nido 液干预 2 h 后,继续培养 24~72 h,分别采用 EdU 荧光染色、Ki-67 荧光染色及 MTT 比色法观察细胞增殖情况;采用 Western Blot 免疫印迹法检测 YAP1 蛋白表达水平。结果 EdU 荧光染色和 Ki-67 免疫组织化学染色阳性细胞计数:HTK 液组最高,改良 STH 液组次之,仿 del Nido 液组最低;MTT 法检测 OD 值:HTK 液组最高,改良 STH 液组次之,仿 del Nido 液组高于复方电解质液组;YAP1 Western Blot 灰度值:HTK 液组高于其他各组。结论 HTK 液和改良 STH 液对离体小鼠未成熟心肌增殖能力具有明显的保护作用。

[关键词]: 心脏停搏液;未成熟心肌细胞;细胞增殖;心肌保护;小鼠

Effects of different types of cardioplegia on the proliferation of immature cardiomyocytes of newborn mice

Liu Huaipu, Liang Yankai, Wu Keye, Zheng Fengnan, Tan Xiaoli, Meng Baoying

Department of Cardiothoracic Surgery, Shenzhen Children's Hospital, Shenzhen 518038, China

Corresponding author: Meng Baoying, Email: szmengbaoying@163.com

[Abstract]: Objective To observe the effects of different types of cardioplegia on the proliferation of immature cardiomyocytes of newborn mice in vitro. **Methods** Cardiomyocytes of newborn mice were isolated and cultured in vitro and randomly divided into 5 groups. After 2 hours intervention with compound electrolyte solution, cardiomyocytes were further cultured for 24–72 hours. The proliferation of cardiomyocytes was observed by technique of EdU fluorescence staining, Ki-67 fluorescence staining and MTT colorimetry. The expression of YAP1 protein was detected by Western blot. **Results** EdU staining and Ki-67 immunopositive cell count: The HTK group was the highest, followed by the modified STH group, and the del Nido analogue group was lower than the compound electrolyte group. OD value detected by MTT method: The HTK group was the highest, followed by the modified STH, and the del Nido analogue group was higher than the compound electrolyte group. YAP1 western blot gray value of HTK group was higher than other groups. **Conclusion** HTK solution and modified STH solution have significant protective effects on the proliferation of immature cardiomyocytes of newborn mice in vitro.

[Key words]: Cardioplegia; Immature cardiomyocytes; Proliferation; Cardioprotection; Mice

心内直视手术过程中,由于缺血/再灌注损伤、溶血、中性粒细胞活化等因素的影响,会产生大量的活性氧,未成熟心肌细胞在结构、代谢和功能方面有明显差别,其更容易受到活性氧的损害^[1]。研究表明,生后≤7 d 的小鼠和≤3 个月的人类心肌细胞具有较强的增殖能力^[2-3],而活性氧造成的 DNA 损

伤,是导致心肌细胞增殖能力下降的关键因素之一^[4]。目前用于未成熟心肌细胞保护的心脏停搏液种类繁多,何为最佳方案仍有争议,因此,本研究从细胞增殖的角度,比较不同类型心脏停搏液对小鼠未成熟心肌细胞的保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 C57/BL 新生小鼠(生后 3 d 内),其母鼠购自深圳大学实验动物中心。

1.2 主要试剂和仪器 EdU-488 细胞增殖检测试剂盒 (BeyoClick™)、Anti-Rabbit HRP (AB6721)、

基金项目: 深圳市科创委基础研究自由探索项目 (JCYJ2017030315567876)

作者单位: 518038 深圳,深圳市儿童医院心胸外科 [梁彦锴 (研究生)]

通讯作者: 孟保英, Email: szmengbaoying@163.com

Anti-Ki-67 (AB15580)、0.25% Trypsin-EDTA (GIBCO 25200-026)、FBS (GIBCO 10091-148)、马血清(蕊特生物 W9010-05)、DMEM/F12(1:1)培养基(GIBCO 11320-033)、Collagenase Type II (GIBCO 17101-015)、MTT 细胞增殖检测试剂盒(C0009)、倒置荧光显微镜(Olympus IX71)、二氧化碳培养箱(hf151uv Heal Force)、全波长酶标仪(Multiskan GO1 510)等。

1.3 新生小鼠心肌细胞培养 生后 3 d 内新生 C57/BL 小鼠 10 只,以 75%乙醇消毒后,固定于无菌台,沿胸骨中线剪开胸腔,迅速切取心脏,至于 4℃ 缓冲液中[20 mmol/L HEPES-NaOH (pH 7.6), 130 mmol/L NaCl, 1 mmol/L NaH₂PO₄, 4 mmol/L 葡萄糖, 3 mmol/L KCl],洗净心腔内血液后,去除心房和大血管组织,将心室组织剪成 1~3 mm³大小的碎块,并移入盛有青霉素溶液的无菌瓶中。向无菌瓶加入 2 ml 0.08%胰酶-0.1% II 型胶原酶的 1:1 混合液,磁力搅拌消化(转速 20~30 r/min, 37℃)。首次消化 6 min,弃上清,之后每次消化 5 min,将消化液转移到 15 ml 离心管中,其内包含 1 ml 20%胎牛血清 DMEM-F12 培养基,以终止胰酶作用,并于 4℃ 冷藏保存,按照以上步骤,共消化 7~8 次。然后将上述消化液混合后于离心(1 100 r/min, 10 min),弃上清,以含 20%胎牛血清和 5%马血清的 DMEM-F12 培养基重悬,200 目孔径不锈钢网虑除未消化的大块组织。将过滤后的细胞液转移到培养皿中,置于 5%CO₂、37℃ 条件下培养,1.5 h 后去除尚未贴壁的细胞悬液后,转入另一块培养皿中,继续培养。

1.4 实验分组 将新生小鼠心肌细胞培养 48 h 后,通过随机数字法分为 5 组:空白对照组(A组)、复方电解质液组(B组)、改良圣托马斯液(St. Thomas's, STH)组(C组)、组氨酸-色氨酸-酮戊二酸盐液(Histidine-Tryptophan-Ketoglutarate solution, HTK)组(D组)以及仿 del Nido 液组(E组)。其中仿 del Nido 液以培养基代替血液与晶体按 1:4 比例混合。将 B、C、D、E 四组的培养基分别换成 4℃ 的复方电解质液、改良 STH 液、HTK 液和仿 del Nido 液,然后将五组细胞在室温培养箱外无菌环境下放置 2 h,更换至正常培养基,继续 5%CO₂、37℃ 条件下置于培养 24~72 h。

1.5 观察指标

1.5.1 5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(5-Ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU)荧光染色 将停搏液处理后的各组心肌细胞更换至正常培养基后,加入预先配制好的 EdU 溶液,在 5%CO₂、37℃ 条件下培养 24 h,然

后进行细胞固定与 Edu 染色标记,计数 EdU 阳性心肌细胞百分比。

1.5.2 Ki-67 荧光染色阳性细胞计数 Ki-67 是一种与细胞增殖状态相关的核心蛋白,对停搏液干预后继续培养 48 h 的 5 组细胞进行 Ki-67 免疫荧光检测,计数方法为:荧光显微镜 40× 目镜下随机计数 3 个视野,计算阳性细胞百分比,其中阳性细胞指有 Ki-67 阳性产物并有细胞核染色的细胞。

1.5.3 MTT 比色法检测心肌细胞增殖 停搏液干预后的五组细胞继续培养 24 h、48 h、72 h,采用 MTT 法检测细胞存活和生长,使用全波长酶标仪(Multiskan GO1 510)在波长 570 nm 处检测心肌细胞的吸光度值。

1.5.4 Yes 相关蛋白 1 (Yes-associated protein 1, YAP1)表达 YAP1 是 Hippo 信号转导通路下 YES 相关蛋白,在细胞增殖和分化过程中起关键作用。采用 Western Blot 技术检测停搏液干预后继续培养 48 h 的细胞中 YAP1 蛋白的表达情况。

1.6 统计分析 采用 SPSS 23.0 统计学软件进行统计分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,计量资料采用率的形式表示,组间均数比较采用单因素方差分析(ANOVA)方法,方差齐性检验采用 Bartlett's 检验,组间率的比较采用卡方检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 新生小鼠心肌细胞形态观察 将分离培养 48 h 后的心肌细胞放置光镜下观察其形态,可见未贴壁心肌细胞为圆形、发亮,已贴壁的心肌细胞伸展为梭形、棒状、星状及分叉状等(见图 1)。

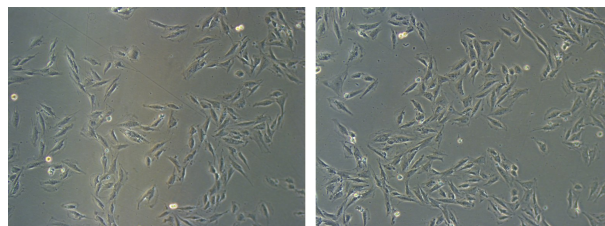
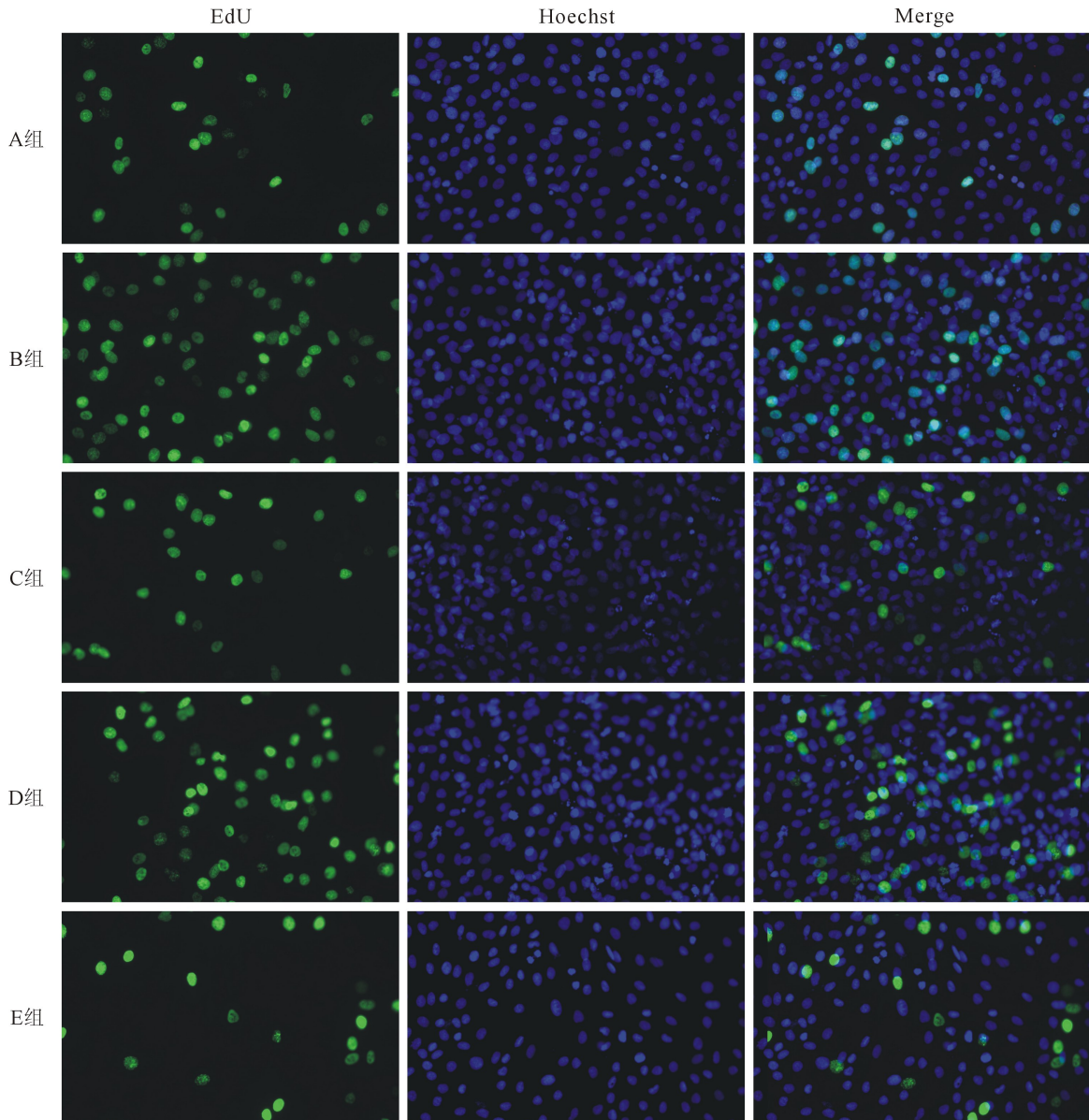


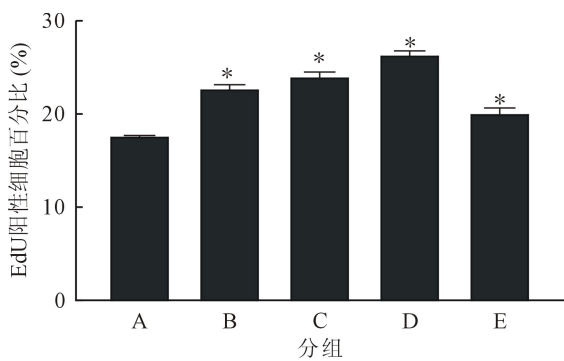
图 1 光镜下新生小鼠心肌细胞形态(100X)

2.2 EdU 荧光染色观察细胞增殖情况 绿色代表增殖细胞核,蓝色代表全部细胞核。与 A 组相比, B、C、D、E 组细胞明显增多(图 2)。B、C、D、E 组的细胞增殖率明显高于 A 组($P < 0.001$),其中 D 组最高, C 组次之, E 组小于 B 组,即 HTK 液组 > 改良 STH 液组 > 复方电解质液组 > 仿 del Nido 液组 > 对照组。见图 3。



注:增殖细胞核染绿色,全部细胞核染蓝色。

图2 EdU 标记增殖的心肌细胞(200X)



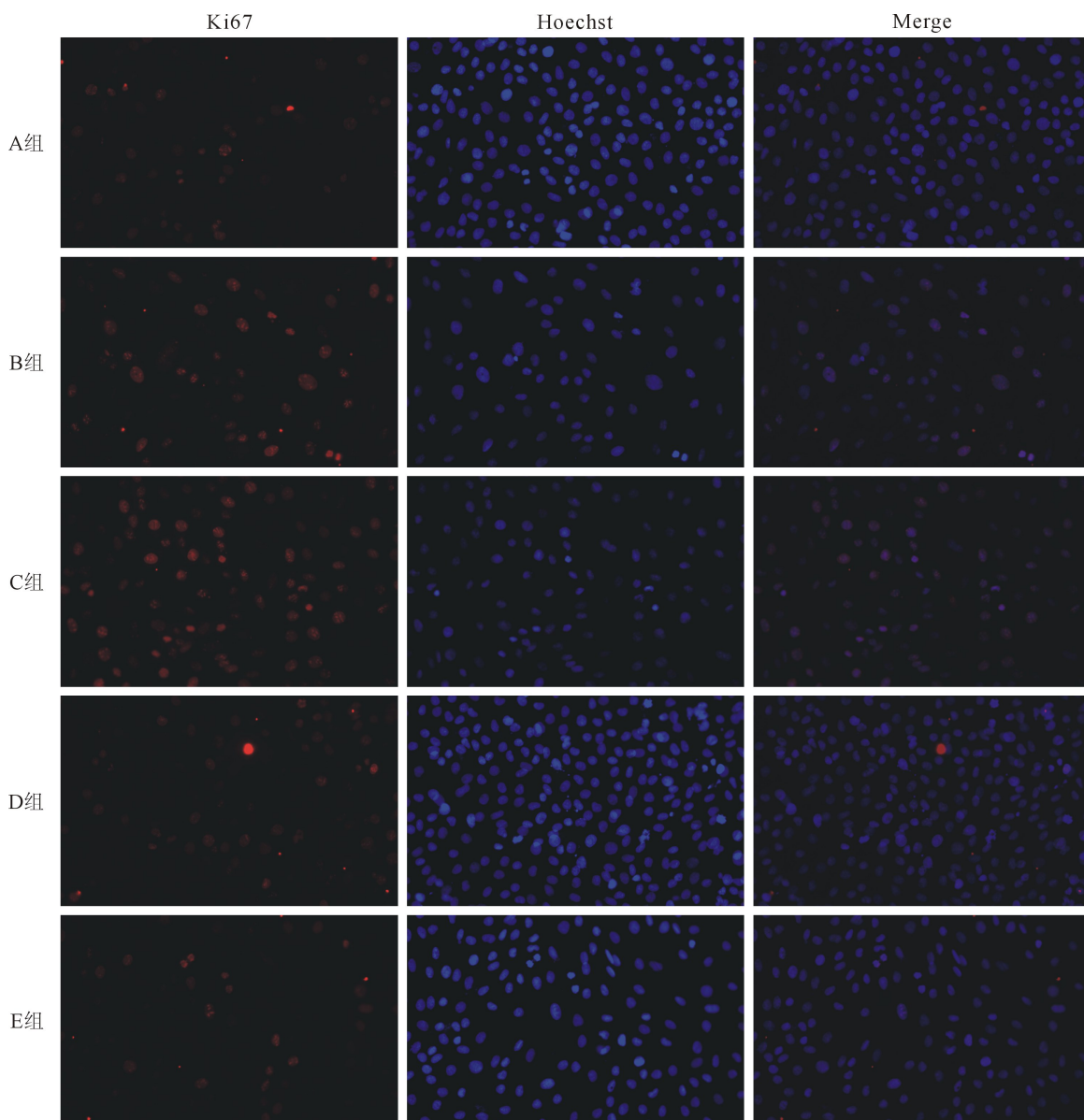
注:随机选取3个视野,统计增殖细胞百分比,实验数据以平均值±标准差的形式表示(n=3);*与A组相比P<0.001。

图3 EdU 免疫染色阳性心肌细胞百分比

2.3 Ki-67 免疫阳性细胞计数 红色代表 Ki-67 免疫阳性细胞核,蓝色代表全部细胞核,与 A 组相比,B、C、D、E 组细胞明显增多(见图 4)。B、C、D、E 组的细胞增殖率明显高于 A 组($P < 0.001$),其中 D 组最高,C 组次之,E 组小于 B 组,即 HTK 液组(15.8%)>改良 STH 液组(12.6%)>复方电解质液组(12.3%)>仿 del Nido 液组(9.0%)>对照组(8.0%)。见图 5。

2.4 MTT 比色法检测心肌细胞增殖 酶标仪在波长 570 nm 处检测 OD 值结果(表 1):D(HTK 液)组>C(改良 STH 液)组>E(仿 Del Nido 液)组>B(复方电解质液)组>A(对照)组。

2.5 YAP1 蛋白表达 采用 Western Blot 技术检测



注:Ki-67 阳性细胞核染红色,全部细胞核染蓝色。

图 4 Ki-67 标记增殖心肌细胞(200X)

表 1 5 组心肌细胞 OD 值结果($n=18, \bar{x} \pm s$)

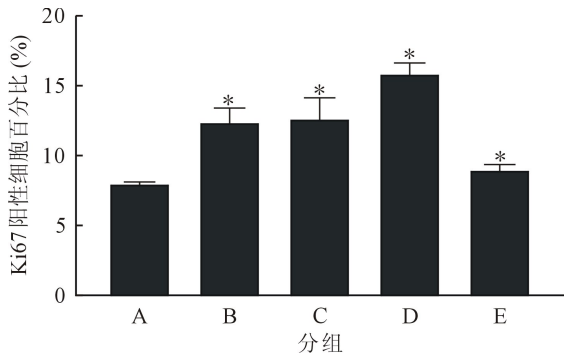
项目	A 组	B 组	C 组	D 组	E 组	F 值	P 值
24 h	0.157±0.005	0.178±0.006	0.204±0.004	0.300±0.005	0.164±0.005	805.701	<0.001
48 h	0.181±0.001	0.210±0.006	0.303±0.002	0.443±0.010	0.233±0.002	2635.756	<0.001
72 h	0.254±0.002	0.322±0.002	0.451±0.010	0.614±0.010	0.377±0.003	2677.488	<0.001

5 组心肌细胞 YAP1 蛋白的表达水平,用 β -actin 作为内参对照,D 组 YAP1 蛋白表达高于其他各组,A、B、C 和 E 组间无明显差异(图 6)。

3 讨论

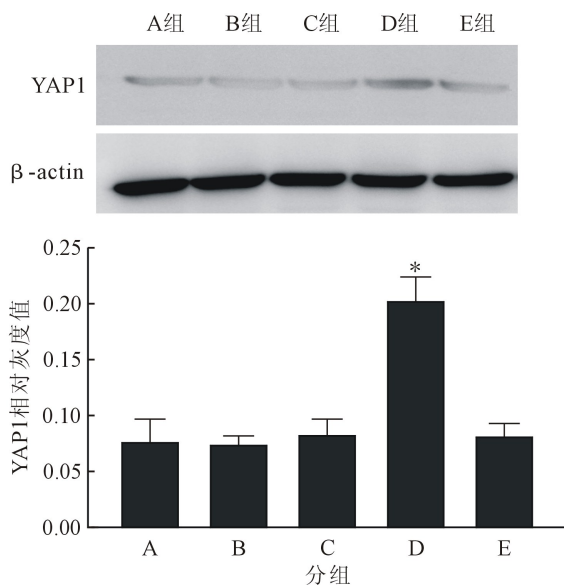
心脏停搏液在先天性心脏病矫治术中的应用已有 40 多年的历史,其与低温技术相结合,依然是预

防心肌缺血/再灌注损伤的主要方法。目前,心脏停搏液种类繁多,但孰优孰劣仍有争议,且研究内容主要集中于心肌标志物、炎症指标、血管活性药物需求及 ICU 停留时间等。而研究表明:未成熟心肌不同于成熟心肌,其具有较强的增殖能力^[2-3]。故本研究以心肌细胞增殖为观察指标,比较 3 种常用心脏停搏液对未成熟心肌的保护作用。在本研究中,为比较改



注:随机选取 3 个视野,统计增殖细胞百分比,实验数据以平均值±标准差的形式表示(n=3),*与 A 组相比 P<0.001。

图 5 Ki-67 免疫阳性心肌细胞百分比



注:与各组相比较 * P<0.001。

图 6 心肌细胞 YAP1 蛋白的表达情况

良 STH 液、HTK 液和仿 del Nido 液对新生小鼠心肌细胞增殖能力的影响,采用 3 种不同的实验方法观察了 3 种反应细胞增殖能力的指标,最终结果均表明 HTK 液保护心肌细胞增殖能力最好,改良 STH 液次之。

测量细胞增殖能力最准确的方法是直接测量 DNA 合成,EdU(5-乙炔基-2' 脱氧尿苷)是胸苷的类似物,能在 DNA 合成过程中加入其中^[5]。本研究提示 HTK 液组 DNA 合成最为活跃,对照组 DNA 合成活动最低,证明 HTK 液组处于增殖状态的心肌细胞比例最高。Ki-67 蛋白是一种位于细胞核内的大分子蛋白,是细胞增殖必不可少的非组蛋白,其功能与染色质和细胞有丝分裂有关,是辨认细胞群中增殖细胞的优异标志^[6-7]。本研究中 Ki-67 免疫荧光检查结果与 EdU 免疫染色结果类似,提示 HTK 组染

色体复制和有丝分裂最活跃,亦证明 HTK 液组处于增殖状态的心肌细胞比例最高。采用 MTT 比色法检测细胞增殖,具有灵敏、稳定、准确度高等优点,本研究中随着时间的延长,各组 OD 值均呈线性上升,其中 HTK 液组上升幅度最大,对照组曲线相对平直,与前两种方法检测结果不同的是,该法测得的仿 del Nido 液细胞增殖率明显高于复方电解质液组。

YAP1 为一种 YES 相关蛋白,是 Hippo 信号转导通路的主要效应物,通过与相关转录因子相互作用,调节细胞增殖^[7]。HTK 液组 YAP1 的表达高于其他各组,提示 HTK 液对心肌增殖能力的保护作用的机制可能与 Hippo 信号转导通路有关。HTK 液成分仿细胞内液,能够使心肌在低钾、低钠、无钙环境下舒张期停搏,以组氨酸/组氨酸盐缓冲对作为酸碱平衡系统,并添加色氨酸和 α-酮戊二酸作为能量底物,其被认为是心脏移植手术中器官保存的“金标准”^[8-9]。其对未成熟心肌增殖能力保护作用的其他机制可能是:①组氨酸/组氨酸盐缓冲对具有强大的酸碱缓冲能力;②甘露醇和色氨酸能够稳定细胞膜和维持细胞膜渗透压调节;③添加 α-酮戊二酸作为底物,能改善高能 ATP 合成。改良 STH 液是一种典型的细胞外液型高钾停搏液^[10],其在本研究中对心肌细胞增殖能力的保护作用仅次于 HTK 液,表明其是一种优良的未成熟心肌晶体停搏液。单纯采用 4℃ 复方电解质液处理,结果亦显示出明显的保护作用,其机制可能与低温对心肌细胞的保护作用有关。del Nido 液是公认的优质未成熟心肌停搏液^[11],然而本研究中仿 del Nido 液组 EdU 免疫阳性细胞百分比(20.0% vs.22.5%)和 Ki-67 阳性细胞百分比(9.0% vs. 8.0%)均低于复方电解质液组(P<0.001),可能是本研究中的仿 del Nido 液与临床使用的正规 del Nido 液差距较大所致,这也是本研究的局限性之一。

综上所述,HTK 液和改良 STH 液对离体新生小鼠心肌细胞增殖具有明显的保护作用,其中前者的保护作用更优。

参考文献:

[1] Fudulu D, Angelini G. Oxidative stress after surgery on the immature heart[J]. Oxid Med Cell Longev, 2016, 2016: 1971452.
 [2] Ye L, Qiu L, Zhang H, et al. Cardiomyocytes in young infants with congenital heart disease: a three-month window of proliferation[J]. Sci Rep, 2016, 6: 23188.
 [3] Notari M, Ventura-Rubio A, Bedford-Guaus SJ, et al. The local microenvironment limits the regenerative potential of the mouse neonatal heart[J]. Sci Adv, 2018, 4(5): eaao5553.