

模拟失重对培养 心肌细胞形态和结构的影响

岳茗 张小铀 汪恭质 丁柏 曾育章 谭映军

(航天医学工程研究所 北京 100094)

摘 要

本实验是利用回转器模拟失重对离体培养大鼠乳鼠的心肌细胞形态和结构的影响。在光学显微镜和荧光显微镜下观察发现,细胞的形态由细长梭形变成椭圆形甚至为圆形,并且通过荧光标记后的细胞骨架的排列由纵形变成辐射状。同时在对细胞进行测量发现,细胞体积缩小近40%,细胞长短径比例减少近70%。上述结果提示模拟失重对培养心肌细胞的形态和结构有显著影响。

关键词 细胞培养—回转器—模拟失重—细胞骨架—显微测量

1 引 言

心血管系统失调是机体对航天环境的一个重要反应,心脏是人体重要的器官之一。在空间飞行的初期阶段,尚未发现心脏受到非常明显的损伤,在一定程度上并没有引起研究人员的重视。但随着航天医学研究的不断深入,心血管问题的研究越来越受到重视。美苏曾在航天飞行后的航天员胸部X-线片中发现,飞行后心脏变小,同时心脏重量稍减轻(比飞行前轻8%),尽管可用血容量减少来解释,但仍旧耽心因失重心脏负荷降低引起的心肌萎缩。在苏联的生物卫星实验中,鼠在失重下18—22天,心肌的磷酸化酶a和b增加,肌浆球蛋白ATP酶活性平均降低44%。苏联在对飞行中意外死亡的3名航天员尸体解剖时,发现心肌病理变化,以及模拟失重的模型中固定不动的猴和兔也表现出心肌病理学的改变,现在尚不能明确航天是否会引起心肌退行性变化。但这些现象中提出,失重有诱发、加速心肌病理变化的可能性。为此,我们利用回转器来模拟失重(让其所受到的重力矢量和为零),通过离体培养乳鼠的心肌细胞,以观察和测试心肌细胞的形态、结构的变化。

2 实 验 材 料 和 方 法

2.1 心肌细胞培养

出生1—4天的Wistar大鼠,用0.05%胶原酶溶液分步消化成游离细胞。培养液用

15% 小牛血清, 1% 双抗 (青霉素 100 单位/ml, 链霉素 100 μ g/ml) 的 MEM Eagle's, 37 $^{\circ}$ C 恒温培养。

2.2 回转器

用中国科学院生物物理研究所研制的回转装置, 把贴壁 7 天的心肌细胞用培养液灌满培养瓶后上回转器, 转速为 30r/min, 使心肌细胞所受到的重力方向连续改变来模拟失重效应。

2.3 光学显微镜检查

消化所得细胞悬液分成二组, 一组为 1g 重力条件下培养; 做为对照, 另一组为上回转器模拟失重的实验组。每瓶含 5×10^5 个细胞, 加入培养液至每瓶总量 5ml, 先在相同条件下培养 7 天待细胞贴半壁后, 实验组将培养液灌满瓶然后上回转器, 对照组仍旧继续培养, 每天取样在光学显微镜下观察细胞的形态变化, 体积大小, 搏动情况, 在回转后第 3 天, 用固定液固定进行显微测量细胞体积。

2.4 显微镜下检查

分组同上, 回转器后连续 4 天每天各取一瓶, 用 pH7.0 PBS 缓冲液洗涤 2 次, 立即用 80% 的预先冷却 -20 $^{\circ}$ C 的乙醇加以固定 30min, 进行常规荧光染色, 标记的抗体 I 抗为抗大鼠的 actin, II 抗为 FITC (异硫氢酸), 从而标记出心肌细胞的细胞骨架来观察微丝的排列和方向, 以判断细胞的形态和内部结构改变情况。

3 结 果

3.1 光学显微镜观察

在显微镜下可观察到, 回转后第 1 天细胞数目明显变少, 但以后几天的细胞数目基本没有改变; 较大的细胞团块和已连成片的细胞基本消失而出现一些较小的细胞团



图 1 $\times 200$ 光镜下的 1g 细胞形态

Fig.1 $\times 200$ cellular morphology with 1g in light microgravity

块,保留下来细胞从失重第1天,形态就开始有了某些不同的变化,原本为正常的细长梭形的细胞有些出现多角的,有些细胞变短变粗近似圆形,而对照组没有类似的变化;回转前排列较紧密而且很有规则,基本上成纵型的细胞团块,回转后不仅变小而且排列松散成放射状;细胞之间连接很松散,接触面很小,有时才几个点的接触(见图1、图2),第1、2天变化比较明显,4天后就处于平稳状态,对照组的细胞与细胞之间的连接紧密,接触面较大。

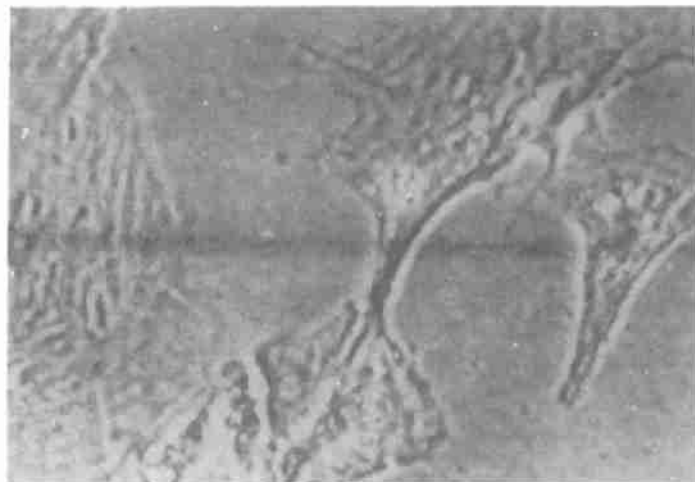


图2 $\times 200$ 光镜下失重后细胞的形态

Fig.2 $\times 200$ cellular morphology after simulation of microgravity in light microscopy

3.2 细胞体积测量

将上回转器3天的细胞和培养相同天数对照组的细胞,同时利用显微镜进行显微测量,计算出细胞的体积及长短径比例(见表1)。

表1 模拟失重对细胞体积及长短径比例的影响

	实验组(n=90)	对照组(n=74)	P 值
细胞体积(μm)	16.00 ± 0.29	25.57 ± 0.42	<0.01
细胞长短径比例	1.53 ± 0.33	5.05 ± 0.92	<0.01

上表可见,回转组细胞体积缩小近40%,与对照组相比有显著变化;长短径比值也发生了显著性改变。

3.3 荧光显微镜观察

将荧光标记肌动蛋白的片子置于荧光显微镜下进行观察,对照组细胞骨架分布均匀,而且走向基本成平行排列有一定方向性,整个细胞为梭形,细胞核呈椭圆且体积较大,细胞之间排列比较紧密没有明显的缝隙;实验组细胞骨架放射状均匀分布细胞呈圆形,细胞核形状变化并不大但体积变小,细胞之间有明显的界限分布弥散,相互接触少(见图3、图4)。

4 讨 论

利用回转器模拟失重状态对心肌细胞形态学观察实验表明,重力对离体培养的细

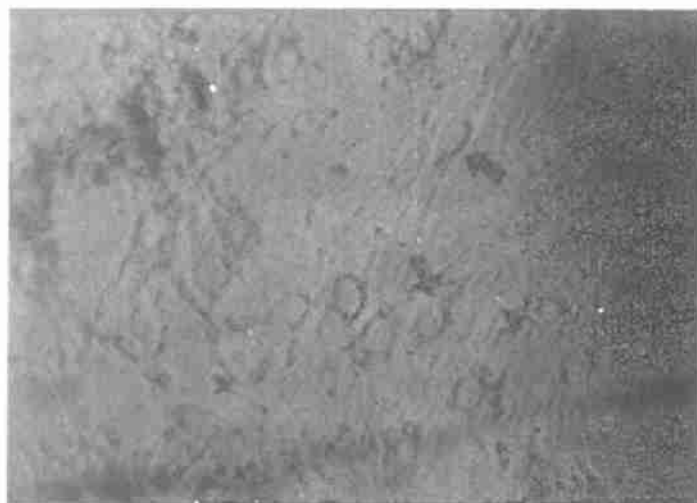


图3 $\times 160$ 荧光镜下 1g 细胞骨架(细胞之间紧密连接)

Fig.3 $\times 160$ cytoskeleton with 1g in fluorescence microscopy



图4 $\times 160$ 荧光镜下失重细胞骨架(细胞之间有明显间隙)

Fig.4 $\times 160$ cytoskeleton after simulation of microgravity in fluorescence microscopy

胞在维持细胞形态、结构上起着十分重要的作用,其作用机理尚不清楚.在光学显微镜下观察上回转器前的细胞,生长旺盛,细胞团块很大,细胞团块之间有许多铺展开的心肌细胞相互连接着,形成一大片,并且有搏动性.上回转器后,仍可观察到细胞具有搏动

性,这说明这种情况下细胞是可以存活的,但是也观察到细胞数目的减少和较大的细胞团块散开现象,细胞团块由大变小,同时一些贴壁不很牢的细胞将会游离于培养基中死亡.上述现象原因有,其一是培养基在回转过程中形成一定的涡流而对细胞造成一定程度的冲刷损伤,这对贴壁不牢的细胞影响会更大,但对贴壁较好的细胞影响较小,本文采取的措施是将培养瓶灌满培养基并排除残留的空气,以减少对细胞的冲刷,但始终没有完全消除该因素的影响.为此我们也做了不同转速的冲刷实验,在光学显微镜下没有发现差别,所以可以认为细胞形态和结构发生的变化并不完全是冲刷所致.其二,不能排除心肌细胞上回转器后,经受不了这种模拟失重的影响而引起细胞死亡的情况.回转后第1天的细胞数目减少较明显,但以后回转期间没有观察到细胞数目的进一步明显减少,从而可以推断出心肌细胞对于这种模拟失重存在着某种程度的适应性.因此,在以后所观察到的细胞形态学的变化并不是由于这种冲刷作用引致.

在光学显微镜下,可以观察到细胞的排列具有一定的规则,呈平行条状,细胞与细胞之间的连接是十分紧密的,接触面积较大,整个细胞团块是很着实的一块.上回转器后的细胞,可以清楚地看到细胞团块不仅变小,而且很松懈,细胞的排列也发生改变,由平行条状变成放射状,细胞与细胞的连接也十分松散,接触面比较小,有时相邻的细胞接触面只是几个点,从中可以知道模拟失重使细胞之间的相互联系和接触大大地减少,可以推断这时细胞与细胞之间的信息传递和物质交换都受到不同程度的抑制和阻碍.细胞新陈代谢的水平较低,说明重力是维持正常代谢和细胞与细胞之间排列的一个重要因素.

通过显微测量,发现细胞长短径的比例有显著地改变,对照组的平均值为5.05,实验组的平均值为1.53.心肌细胞在正常条件下,形态为梭形,长短径的比例相当大.对细胞施加模拟失重时,细胞长短径比例大大减小,细胞形态也变成了多角形、圆柱形、有的甚至为圆形.这种现象与给心肌细胞施加一个外界机械力的作用,心肌细胞的形态在与机械力方向相垂直的方向发生了形变.这都充分地说明力的刺激是维持细胞特异形态的重要作用,这样用回转器模拟失重就是使细胞始终受到一个方向成一定周期性变化的力的刺激.

在显微镜下观察,不仅细胞的形态发生很大改变,而且细胞的体积也有很大变化,实验组的平均值为 $16.09\mu\text{m}$,对照组的平均值 $25.57\mu\text{m}$,缩小了近40%.细胞在1g重力条件下能形成的各种各样形态,而在失重条件下细胞不必对抗重力作用和由于细胞膜表面的张力原因使细胞形成较小的体积和近似圆形.心肌细胞体积变小是否是整个心脏体积变小和心肌萎缩在微观上的一种具体表现,还有待进一步研究.这与一些文献报道的发现宇航员在飞行后心脏体积变小的现象是一致的.

通过荧光染色标记肌动蛋白,在荧光显微镜下观察细胞骨架的位置及走向,微丝走向发生了明显的改变,从纵形分布逐渐分散呈辐射状.这一点和在光学显微镜下细胞的形态变圆及长短径比值变小是相一致的.细胞骨架系统不仅仅是活细胞支撑结构,决定细胞形态,赋予细胞强度,而且是化学能转化为机械能的主要场所.细胞骨架的形态结构在细胞器中具有弥散性,整体性,变化性,在细胞质中始终一直保持不断地解聚与装配,对于外界刺激很快作出反应尤其是力的刺激.细胞骨架的改变充分说明细胞内的各

个细胞器的位置和各个区域的代谢活动都发生了改变,从而使细胞对新的外界环境得到适应.细胞骨架的改变说明了细胞内部的各个代谢区域的改变,同时整个细胞的紧张度也将发生变化.这是否能表明重力将影响到整个心肌在代谢和功能水平上的变化及其细胞内各种膜的通透性的改变,甚至于整个变化机理都有待于进一步研究.

参 考 文 献

- [1] 江丕栋等.在地面进行微重力生物学实验模拟用的回转器.生物化学与生物物理进展,1990,17(2):84—107
- [2] 马学惠等.机械性刺激对体外培养心肌细胞形态的影响.细胞生物学杂志,1993,190—195
- [3] 章静波主编.细胞生物学实用方法与技术.高等教育出版社,1990,53—56
- [4] Levy M N *et al.* Research Opportunities in Cardiovascular Conditioning, NASA CR-170164, 1983, 109—124
- [5] Blomqvist C G. Cardiovascular Adaptation to Weightless. SAE-820830, 1982
- [6] Nicogossian AE. Biomedical Research, NASA CR-3487, 1981. 687—694
- [7] Talbot J M. Research Opportunities in Space Motion Sickness, NASA CR-170165, 1983, 543—549
- [8] Oman C M. Space Motion Sickness and Vestibular Experiments in Spacelab, SAE-820833, 1982
- [9] Matsnev E I *et al.* Space motion sickness: Phenomenology countermeasure and mechanisms. *Aviat. Space Environ. Med.*, 1983, 54(4):312—353
- [10] Djellas Y, John G W, Rich T L. Effects of posture vibration level and frequency. *Aviat. Space Environ. Med.*, 1983, 54(12): 269—276
- [11] Pagoulatos G N, Harrison S M. The body's answer to zero gravity. *Bioscience*, 1982, 32(4):219—243

A SIMULATION STUDY ABOUT EFFECTS OF MICROGRAVITY ON CELLULAR MORPHOLOGY AND STRUCTURE OF RAT'S CARDIAC MUSCLE

YUE Ming ZHANG Xiaoyou WANG Gongzhi

DING Bai ZENG Yuzhang TAN Yingjun

(Institute of Space Medico-Engineering, Beijing 100094)

Abstract

A laboratory simulation is made to show the effects of microgravity on the cellular shape and structure of rat's cardiac muscle. The cell's cultural system is put into a simulated microgravity environment. It is found that cellular morphology changes from slim to round in optical microscope and cytoskeleton changes from columnar morphology to radial morphology through marked Actin in fluorescence microscopy. Cellular area of cardiac muscles becomes significantly decreased by 40% and cellular long-short axes ratio decreased by 70% through micromasurement.

Key words Cell culture, Rotating culture system, Simulation of microgravity, Cytoskeleton, Micromasurement