

一氧化碳诱导 H9c2 细胞中毒性损伤模型的建立

刘安平¹ 刘玉泠² 卢敏¹ 何婧¹ 段海真¹ 喻安永¹

¹遵义医科大学附属医院急诊科,遵义 563003; ²遵义医科大学科技学院,遵义 563003

通信作者:喻安永, Email: anyongyu@163.com

【摘要】 目的 观察一氧化碳对心脏源性 H9c2 细胞的影响,确定一氧化碳引起 H9c2 细胞损伤的合适浓度和中毒时间。方法 体外培养 H9c2 细胞,待细胞进入对数生长期后传代,并根据实验要求给予不同的培养条件。① 采用一氧化碳荧光探针定性检测 H9c2 细胞内一氧化碳。通过不同浓度 (1×10^{-3} 、 2×10^{-3} 、 3×10^{-3} 、 4×10^{-3}) 一氧化碳刺激 H9c2 细胞 3 h,采用细胞计数试剂盒-8 (CCK-8) 检测细胞存活率;选择浓度为 3×10^{-3} 的一氧化碳刺激 H9c2 细胞 1、2、3、4、6 h,采用 CCK-8 检测细胞存活率。根据筛选结果进行后续实验。② 将 H9c2 细胞分为空白对照组和一氧化碳中毒组。空白对照组在常规条件下培养;一氧化碳中毒组在一氧化碳浓度为 3×10^{-3} 的便携式细胞培养装置中培养 3 h。复氧 21 h 后,倒置相差显微镜下观察 H9c2 细胞形态学变化;倒置荧光显微镜下观察细胞活性氧 (ROS) 发生情况;采用 JC-1 荧光染色法检测细胞线粒体损伤情况;采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测细胞上清液中肌酸激酶同工酶 (CK-MB)、心肌肌钙蛋白 T (cTnT) 水平。结果 ① 定性检测结果显示,一氧化碳可进入 H9c2 细胞。 3×10^{-3} 一氧化碳处理组细胞存活率降低至约 50%,且低于空白对照组 [(52.27 ± 4.29)% 比 (99.42 ± 0.49)%, $P < 0.05$];当一氧化碳浓度为 1×10^{-3} 时,细胞存活率轻度降低,而一氧化碳浓度为 4×10^{-3} 时,细胞活性过度抑制。与空白对照组比较, 3×10^{-3} 一氧化碳作用 3 h 时细胞存活率下降 [(52.81 ± 5.28)% 比 100%, $P < 0.05$],作用不超过 2 h 时细胞存活率仅轻度上升,而作用 4 h 后细胞存活率过度抑制。因此选择浓度为 3×10^{-3} 的一氧化碳刺激 H9c2 细胞 3 h 作为一氧化碳损伤心肌细胞条件进行后续实验。② 与空白对照组比较,一氧化碳中毒组细胞形态固缩,细胞膜粗糙,细胞贴壁性较差,死细胞增多,细胞内 ROS 水平升高 (荧光强度:195.97 ± 5.16 比 98.53 ± 4.08, $P < 0.05$),说明一氧化碳可诱发氧化应激反应增强,细胞死亡增加。一氧化碳中毒组细胞 MMP 较空白对照组降低 (红色/绿色荧光强度比值:0.92 ± 0.02 比 1.13 ± 0.08, $P < 0.05$),说明一氧化碳损伤了 H9c2 细胞线粒体。与空白对照组比较,一氧化碳刺激后 H9c2 细胞上清液中心肌损伤标志物 CK-MB 及 cTnT 含量均升高 [CK-MB ($\mu\text{g/L}$): 33.26 ± 1.93 比 20.05 ± 1.43, cTnT (ng/L): 131.18 ± 4.87 比 66.40 ± 3.57, 均 $P < 0.05$],说明一氧化碳诱导了 H9c2 细胞损伤。结论 一氧化碳浓度为 3×10^{-3} 刺激 H9c2 细胞 3 h 可建立一氧化碳中毒性心肌损伤模型。

【关键词】 中毒性心肌损伤; 一氧化碳; 中毒; H9c2 细胞

基金项目:贵州省科技计划项目(黔科合平台 LCZX [2025]004)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20250701-00639

Establishment of a toxic injury model induced by carbon monoxide in H9c2 cells

Liu Anping¹, Liu Yuling², Lu Min¹, He Jing¹, Duan Haizhen¹, Yu Anyong¹

¹Department of Emergency, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563003, China; ²College of Science and Technology, Zunyi Medical University, Zunyi 563003, China

Corresponding author: Yu Anyong, Email: anyongyu@163.com

【Abstract】 **Objective** To observe the effect of carbon monoxide on cardiac H9c2 cells and determine the appropriate concentration and exposure time for carbon monoxide-induced injury in H9c2 cells. **Methods** H9c2 cells were cultured *in vitro*, passaged upon reaching the logarithmic growth phase, and subjected to different culture conditions according to the experimental requirements. 1) Carbon monoxide fluorescence probe was used for qualitative detection of carbon monoxide in H9c2 cells. H9c2 cells were exposed to different concentrations (1×10^{-3} , 2×10^{-3} , 3×10^{-3} , 4×10^{-3}) of carbon monoxide for 3 hours, and cell viability was detected by cell counting kit-8 (CCK-8). H9c2 cells were exposed to carbon monoxide at a concentration of 3×10^{-3} for 1, 2, 3, 4, 6 hours, and cell viability was detected by CCK-8. Subsequent experiments were performed based on the screening results. 2) H9c2 cells were divided into a blank control group and a carbon monoxide poisoning group. The blank control group was cultured under conventional conditions, while the carbon monoxide poisoning group was cultured in a portable cell culture device with a carbon monoxide concentration of 3×10^{-3} for 3 hours. After 21 hours of reoxygenation, morphological changes of H9c2 cells were observed under inverted phase contrast microscope. The occurrence of reactive oxygen species (ROS) was observed under inverted fluorescence microscope. Mitochondrial damage was detected by JC-1 fluorescence staining method. The levels of MB isoenzyme of creatine kinase (CK-MB) and cardiac troponin T (cTnT) in H9c2 cells supernatant were

detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** 1) Qualitative detection results showed that carbon monoxide could enter H9c2 cells. Cell viability in the 3×10^{-3} carbon monoxide treatment group was reduced to approximately 50%, and lower than that in the blank control group [(52.27 ± 4.29)% vs. (99.42 ± 0.49)%, $P < 0.05$]. Cell viability was slightly decreased at a carbon monoxide concentration of 1×10^{-3} , while it was excessively inhibited at a carbon monoxide concentration of 4×10^{-3} . Compared with the blank control group, cell viability was decreased after 3 hours of 3×10^{-3} carbon monoxide exposure [(52.81 ± 5.28)% vs. 100%, $P < 0.05$], slightly increased before 2 hours, and excessively inhibited after 4 hours. Therefore, exposure of H9c2 cells to carbon monoxide at a concentration of 3×10^{-3} for 3 hours was selected as the condition for establishing carbon monoxide-induced myocardial cell injury in subsequent experiments. 2) Compared with the blank control group, cells in the carbon monoxide poisoning group showed morphological changes (pyknosis, rough cell membrane, poor adherence, and increased dead cells), and intracellular ROS levels were increased (fluorescence intensity: 195.97 ± 5.16 vs. 98.53 ± 4.08 , $P < 0.05$), indicating that carbon monoxide could enhance oxidative stress and increase cell death. MMP in the carbon monoxide poisoning group was decreased as compared with the blank control group (ratio of red/green fluorescence intensity: 0.92 ± 0.02 vs. 1.13 ± 0.08 , $P < 0.05$), indicating that carbon monoxide damaged mitochondria in H9c2 cells. Compared with the blank control group, the levels of myocardial injury markers CK-MB and cTnT in H9c2 cells supernatant were increased after carbon monoxide stimulation [CK-MB ($\mu\text{g/L}$): 33.26 ± 1.93 vs. 20.05 ± 1.43 , cTnT (ng/L): 131.18 ± 4.87 vs. 66.40 ± 3.57 , both $P < 0.05$], indicating that carbon monoxide induced H9c2 cells injury. **Conclusion** A model of carbon monoxide-induced toxic myocardial injury can be established by stimulating H9c2 cells with a carbon monoxide concentration of 3×10^{-3} for 3 hours.

【Key words】 Toxic myocardial injury; Carbon monoxide; Poisoning; H9c2 cell

Fund program: Guizhou Provincial Science and Technology Plan Project (Qin Ke He Pingtai LCZX[2025]004)

DOI: 10.3760/ema.j.cn121430-20250701-00639

一项全球流行病学数据分析显示,急性一氧化碳中毒(acute carbon monoxide poisoning, ACMP)是气体中毒致死的主要原因之一^[1]。据统计,美国每年急诊科因一氧化碳中毒就诊的人数超过 5 万人^[2],而全球范围内一氧化碳中毒的累计发病率及病死率约为 137/100 万和 4.6/100 万^[1],其中生活性中毒是主要的中毒原因^[3],严重威胁着人类的健康,已经成为日益严重的公共卫生问题。中毒后,一氧化碳通过肺迅速弥散入血,与血红蛋白结合形成碳氧血红蛋白,从而引起低氧血症,而心脏是人体中对缺氧最为敏感的器官之一。研究表明,大约 1/3 的中度至重度一氧化碳中毒患者会出现心功能障碍,包括心律失常、左心室收缩功能障碍和心肌梗死;中度至重度 ACMP 致心肌损伤患者的长期病死率显著增加^[4-5]。因此,研究一氧化碳对心肌细胞的影响是预防和治疗中毒性心肌损伤的关键。本研究利用混合气体培养法建立心脏源性 H9c2 细胞损伤模型,通过筛选一氧化碳气体浓度、中毒时间确定最佳制模条件,并通过观察该条件下细胞的形态,测定细胞培养基中肌酸激酶同工酶(MB isoenzyme of creatine kinase, CK-MB)、心肌肌钙蛋白 T(cardiac troponin T, cTnT)和细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)、线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP)水平,对中毒性心肌细胞损伤模型进行验证,以期为一氧化碳中毒致心肌损伤研究建立一种稳定可靠的细胞模型。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞株来源及伦理: H9c2 细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司。本研究不涉及人体或活体动物实验,经遵义医科大学附属医院实验动物福利伦理委员会审查,根据《涉及人的生物医学研究伦理审查办法》及相关规定,认定本研究符合伦理豁免条件,免于伦理审查。

1.1.2 主要设备: 超净工作台(型号:HR40-IIA2)、-20 °C 冰箱(型号:HYCD-205)购自青岛海尔生物医疗股份有限公司;CO₂ 细胞培养箱(型号:4111)、-80 °C 超低温冰箱(型号:902-ULTS)、全波长酶标仪(型号:MultiskanskyHigh)购自美国赛默飞世尔科技有限公司;自制便携式细胞培养装置;高压灭菌器(型号:CT90B)购自上海伯能仪器有限公司;倒置荧光显微镜(型号:DM500+ICC50、DMi8)、倒置相差显微镜(型号:DMi1+C1)购自德国徕卡显微系统公司;电子分析天平(型号:Secura224-1CN)购自北京赛多利斯科学仪器有限公司;高速冷冻离心机(型号:CHT210R)购自湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;制冰机(型号:SIM-F140)购自日本松下控股株式会社。

1.1.3 主要试剂: 高糖培养基购自武汉普诺赛生命科技有限公司;胎牛血清、青霉素-链霉素-胰蛋白酶购自美国赛默飞世尔科技有限公司;一氧化碳、细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8, CCK-8)购自

苏州新赛美生物科技有限公司; CheKine™ ROS 检测试剂盒、MMP 分析试剂盒购自武汉亚科因生物技术有限公司; 一氧化碳荧光探针 FL-CO-1 (型号: CAY-10732) 购自北京范德生物科技公司; CK-MB 和 cTnT 酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测试剂盒购自江苏酶免实业有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养: H9c2 细胞用含有 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素溶液的 DMEM 在 37 °C 加湿空气 (5% CO₂) 中培养 24 h, H9c2 细胞进入对数生长期后传代, 以 5 000 个/孔的密度接种于不同的孔板中, 24 h 后更换培养液, 并根据实验要求给予不同的培养条件。

1.2 实验参数筛选

1.2.1 一氧化碳浓度筛选: 首先将 H9c2 细胞密度调整为 5 000 个/孔, 以每孔 100 μL 平行接种到 5 个 96 孔板中, 每个 96 孔板设置 6 个复孔。将细胞置于含有 5% CO₂ 及 37 °C 的三气培养箱中培养过夜。随后将 5 个 96 孔板分为空白对照组和不同浓度一氧化碳处理组。空白对照组继续在相同的三气培养箱条件下培养; 一氧化碳处理组则被移至自制便携式细胞培养装置中, 通过管道向装置内充入一氧化碳气体, 通过一氧化碳浓度测定仪确保最终的一氧化碳浓度分别为 1×10^{-3} 、 2×10^{-3} 、 3×10^{-3} 、 4×10^{-3} , 并将细胞培养装置移至 37 °C 培养箱中培养 3 h。最后, 采用 CCK-8 检测各组细胞存活率, 选择细胞存活率降至约 50% 的一氧化碳浓度用于后续实验。

1.2.2 一氧化碳制模时间筛选: 根据 1.2.1 中描述的方法, 将 H9c2 细胞均匀接种到 6 块 96 孔板中。在正常条件下培养 24 h 后, 将细胞分为空白对照组和不同暴露时间的一氧化碳处理组 (一氧化碳浓度为 3×10^{-3})。空白对照组继续在常规条件下培养; 一氧化碳处理组转移至自制简易密封箱中, 向密封箱中充入一氧化碳气体, 使一氧化碳浓度达到 3×10^{-3} , 并分别培养 1、2、3、4、6 h。采用 CCK-8 测定各组细胞存活率, 选择细胞存活率降至约 50% 的时间点用于后续实验。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 细胞活性分析: 使用 CCK-8 检测细胞活性。将制备好的细胞悬液 ($5 \times 10^4/\mu\text{L}$) 加到 96 孔板, 并置于含 95% O₂、5% CO₂ 的 37 °C 培养箱中培养 24 h, 将 96 孔板放入含有不同浓度一氧化碳便携式细胞

培养装置中孵育 3 h, 最后在每孔中加入 CCK-8 溶液 10 μL, 培养 1.5 h。采用酶标仪测定 450 nm 波长处吸光度值, 并计算细胞存活率, 细胞存活率 (%) = (实验组吸光度值 - 空白吸光度值) / (空白对照组吸光度值 - 空白吸光度值) × 100%。

1.3.2 细胞内一氧化碳定性检测: 采用一氧化碳荧光探针 FL-CO-1 检测 H9c2 细胞内一氧化碳水平。该探针检测原理基于一氧化碳的强还原性, 即可将 Pd²⁺ 还原为 Pd⁰, 诱导钯催化的烯丙基化反应 (Tsuji-Trost 反应) 并释放绿色荧光团^[6]。实验分为 4 组: FL-CO-1 组仅加入探针; FL-CO-1+PdCl₂ 组加入探针和 PdCl₂; FL-CO-1+PdCl₂+一氧化碳释放分子 3 (carbon monoxide-releasing molecule-3, CROM-3) 组加入探针、PdCl₂、CROM-3; CO+FL-CO-1+PdCl₂ 组将细胞置于含一氧化碳的便携式细胞培养装置中培养 3 h, 再加入探针和 PdCl₂。各组细胞处理结束后, 于倒置相差显微镜下观察细胞形态变化, 并于倒置荧光显微镜下观察并采集图像。

1.3.3 光镜下观察 H9c2 细胞形态: 将 H9c2 细胞以 $5 \times 10^4/\text{mL}$ 密度接种于 24 孔板培养 24 h, 待细胞完全贴壁后, 分为空白对照组和一氧化碳中毒组。空白对照组在常规条件下培养; 一氧化碳中毒组在一氧化碳浓度为 3×10^{-3} 的便携式细胞培养装置中培养 3 h, 复氧 21 h 后倒置相差显微镜下拍照, 观察一氧化碳对 H9c2 细胞形态的影响。

1.3.4 CK-MB 和 cTnT 含量检测: 按照试剂盒说明书, 采用 ELISA 检测 H9c2 细胞上清液中 CK-MB 和 cTnT 含量。

1.3.5 ROS 水平测定: 按照 CheKine™ ROS 检测试剂盒说明书处理 H9c2 细胞, 然后与 10 μmol/L 2', 7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯 (2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA; 用无血清 DMEM 稀释) 装载, 37 °C 避光孵育 40 min。用无血清 DMEM 洗涤细胞 3 次, 倒置荧光显微镜下观察细胞并收集图像, 结果以荧光强度表示。

1.3.6 MMP 检测: 根据 MMP JC-1 荧光染色检测试剂盒说明书, 将 H9c2 细胞与 JC-1 试剂 37 °C 避光孵育 30 min 后, 应用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 洗涤 3 次, 通过倒置荧光显微镜观察细胞并收集图像。当 MMP 较高时, JC-1 在线粒体基质中聚集形成聚合物, 产生红色荧光 ($\lambda_{\text{ex}}=525 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=590 \text{ nm}$); 当 MMP 较低时, JC-1 会以单体形式在线粒体基质中积累, 产生绿色荧光 ($\lambda_{\text{ex}}=490 \text{ nm}$,

$\lambda_{em}=530\text{ nm}$)。以倒置荧光显微镜下红色 / 绿色荧光强度比值表示 MMP。

1.4 统计学方法：分别使用 GraphPad Prism 10.0.2 和 SPSS 29.0 软件进行图表绘制与数据统计分析。数据基于 Shapiro-Wilk 正态性检验均呈正态分布,以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 Student *t* 检验完成两组间的比较。检验水准 α 值取双侧 0.05。

2 结果

2.1 H9c2 细胞内一氧化碳定性：为验证便携式细胞培养装置中的一氧化碳能否进入 H9c2 细胞,采用 FL-CO-1 荧光探针进行定性检测,并观察细胞形态。倒置相差显微镜下显示 (图 1A ~ 1D),FL-CO-1 组和 FL-CO-1+PdCl₂ 组细胞形态完好,呈长梭形或纺锤形,胞质均匀、细胞核清晰;FL-CO-1+PdCl₂+CROM-3

组细胞出现皱缩、胞质空泡增多、细胞核固缩等损伤表现;CO+FL-CO-1+PdCl₂ 组细胞损伤最为严重,胞体皱缩为圆形,胞质高度空泡化,细胞核固缩或碎裂。倒置荧光显微镜下显示 (图 1E ~ 1H),FL-CO-1 组和 FL-CO-1+PdCl₂ 组均未见绿色荧光;FL-CO-1+PdCl₂+CROM-3 组有少量绿色荧光;CO+FL-CO-1+PdCl₂ 组绿色荧光强度显著增强。上述结果证实,便携式细胞培养装置中的一氧化碳可进入 H9c2 细胞。

2.2 一氧化碳刺激对 H9c2 细胞活性的影响 (图 2)：通过不同浓度 (1×10^{-3} 、 2×10^{-3} 、 3×10^{-3} 、 4×10^{-3}) 一氧化碳刺激 H9c2 细胞 3 h 后发现, 3×10^{-3} 一氧化碳处理组细胞存活率降低至约 50%,且低于空白对照组 ($P < 0.05$)；当一氧化碳浓度为 1×10^{-3} 时,细胞存活率仅轻度降低,而当一氧化碳浓度为 4×10^{-3}

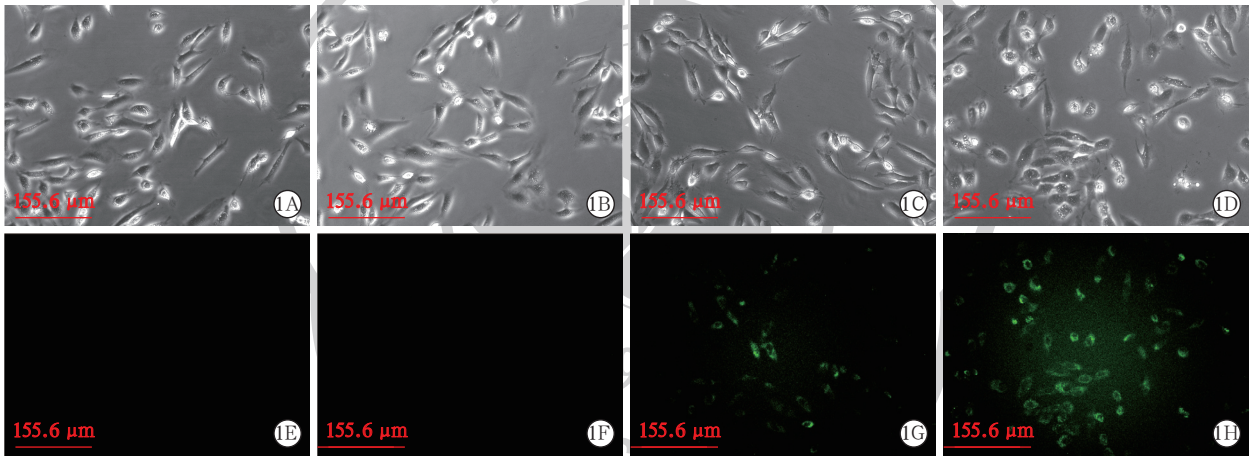
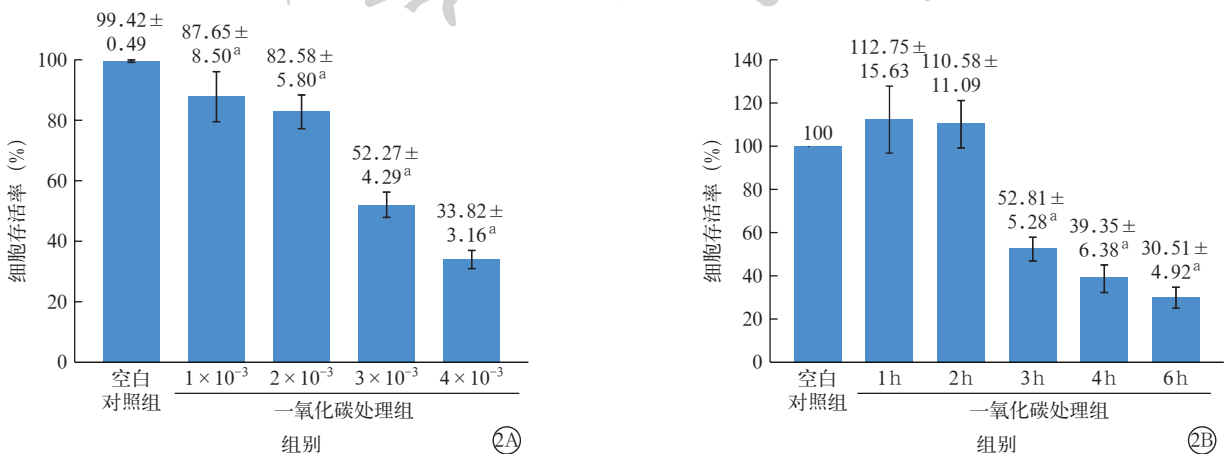


图 1 各组心脏源性 H9c2 细胞形态学变化及一氧化碳进入细胞情况 倒置相差显微镜下显示,一氧化碳荧光探针 FL-CO-1 组(A)和 FL-CO-1+PdCl₂ 组(B)细胞形态完好,呈长梭形或纺锤形,胞质均匀透亮,细胞核轮廓清晰,细胞立体感佳,无明显胞体皱缩、肿胀或空泡化改变;FL-CO-1+PdCl₂+一氧化碳释放分子 3(CROM-3)组(C)细胞形态发生明显改变,胞体由长梭形转为短梭形或不规则多边形,胞体皱缩、边缘模糊,胞质空泡增多增大,细胞核固缩,细胞立体感显著减弱;CO+FL-CO-1+PdCl₂ 组(D)细胞损伤进一步加重,大量胞体皱缩呈圆形或类圆形,体积缩小,边缘界限模糊,胞质高度空泡化且反光性增强,细胞核固缩或碎裂,细胞立体感完全消失。倒置荧光显微镜下显示,FL-CO-1 组(E)和 FL-CO-1+PdCl₂ 组(F)细胞内均未观察到绿色荧光,无特异性 FL-CO-1 染色信号;FL-CO-1+PdCl₂+CROM-3 组(G)细胞内出现少量绿色荧光分布,提示存在微量一氧化碳探针结合信号;CO+FL-CO-1+PdCl₂ 组(H)细胞内绿色荧光信号强度显著高于 FL-CO-1+PdCl₂+CROM-3 组,荧光分布广泛且亮度明显增强 FL-CO-1 荧光探针染色,高倍放大



注：与空白对照组比较, ^a $P < 0.05$

图 2 以不同浓度一氧化碳刺激 3 h (A) 及以 3×10^{-3} 浓度一氧化碳刺激不同时间点 (B) 心脏源性 H9c2 细胞存活率比较

时,细胞活性过度抑制。采用浓度为 3×10^{-3} 的一氧化碳刺激 H9c2 细胞 1、2、3、4、6 h 后发现,当一氧化碳作用 3 h 时细胞存活率下降至约 50%,且低于空白对照组 ($P < 0.05$);作用不超过 2 h 时细胞存活率轻度上升,而作用 4 h 后细胞存活率过度抑制。因此,选择浓度为 3×10^{-3} 的一氧化碳刺激 H9c2 细胞 3 h 作为一氧化碳损伤心肌细胞条件进行后续实验。

2.3 一氧化碳刺激对 H9c2 细胞 ROS 水平的影响:与空白对照组比较,一氧化碳刺激后细胞形态固缩,细胞膜粗糙,细胞贴壁性较差,死细胞增多(图 3),且细胞内绿色荧光增多(图 4),定量分析显示 ROS 水平升高(荧光强度: 195.97 ± 5.16 比 98.53 ± 4.08 , $P < 0.05$)。表明一氧化碳可诱发氧化应激反应增强,细胞死亡增加。

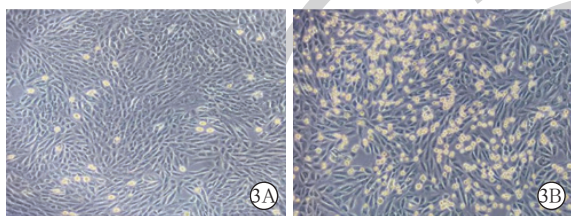


图 3 倒置相差显微镜下观察两组心脏源性 H9c2 细胞形态学变化 空白对照组(A)细胞贴壁生长状态良好,边缘清晰可见,呈梭形状态;一氧化碳中毒组(B)细胞形态固缩,细胞膜较粗糙,细胞贴壁性较差,死细胞增多 低倍放大

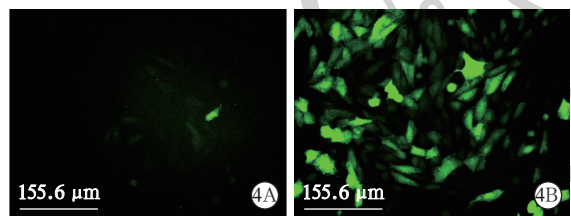


图 4 倒置荧光显微镜下观察两组心脏源性 H9c2 细胞内活性氧(ROS)表达 空白对照组(A)细胞内可见少量绿色荧光;一氧化碳中毒组(B)细胞内绿色荧光信号显著增强,且分布广泛 2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)荧光探针染色 高倍放大

2.4 一氧化碳刺激对 H9c2 细胞 MMP 的影响:空白对照组主要以红色荧光聚合物的形式存在; 3×10^{-3} 一氧化碳刺激 H9c2 细胞 3 h 后,绿色荧光增多,红色荧光聚合物减少(图 5)。定量分析显示,一氧化碳中毒组细胞 MMP 较空白对照组降低(红色/绿色荧光强度比值: 0.92 ± 0.02 比 1.13 ± 0.08 , $P < 0.05$)。表明一氧化碳可损伤 H9c2 细胞中的线粒体。

2.5 一氧化碳刺激对 H9c2 细胞 CK-MB 及 cTnT 含量的影响(表 1):与空白对照组比较,一氧化碳刺激后 H9c2 细胞上清液中心肌损伤标志物 CK-MB 及 cTnT 含量均升高(均 $P < 0.05$)。表明一氧化碳诱导了 H9c2 细胞损伤。

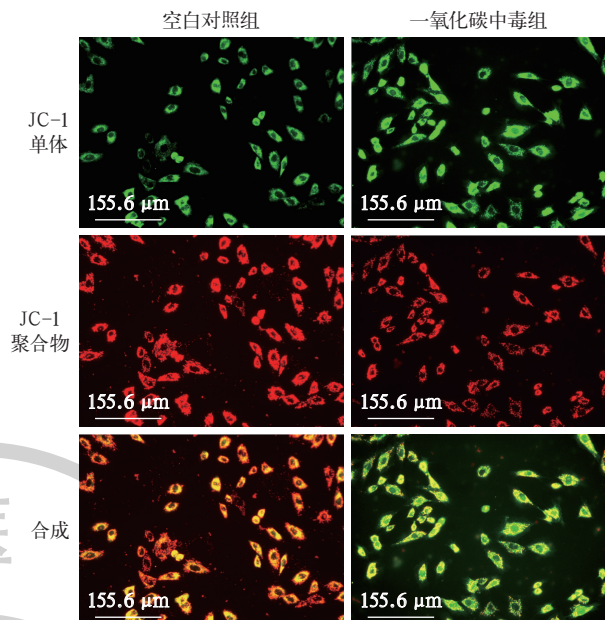


图 5 倒置荧光显微镜下观察两组心脏源性 H9c2 细胞线粒体膜电位变化 空白对照组细胞内以红色荧光(JC-1 聚合物,高膜电位)为主;一氧化碳中毒组细胞内绿色荧光(JC-1 单体,低膜电位)显著增强,提示一氧化碳中毒可导致 H9c2 细胞线粒体膜电位下降 JC-1 荧光染色 高倍放大

表 1 两组心脏源性 H9c2 细胞上清液中 CK-MB 及 cTnT 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	孔数(个)	CK-MB($\mu\text{g/L}$)	cTnT(ng/L)
空白对照组	6	20.05 ± 1.43	66.40 ± 3.57
一氧化碳中毒组	6	33.26 ± 1.93^a	131.18 ± 4.87^a

注:CK-MB 为肌酸激酶同工酶, cTnT 为心肌肌钙蛋白 T;与空白对照组比较, $^a P < 0.05$

3 讨论

一氧化碳是人体内重要的内源性气体信号分子,主要由血红素加氧酶催化亚铁血红素分解产生,对维持生物体的正常功能起重要作用。但当机体发生病理改变致内源性一氧化碳产生增多或者外源性吸入一氧化碳时,与炎症^[7]、心脏毒性^[8]、糖尿病^[9]等多种疾病的发生发展密切相关。大量研究表明,一氧化碳可诱导患者及大鼠心肌细胞损伤,导致心脏功能受损^[10-13]。ACMP 可通过缺氧和氧化应激导致心肌损伤,而铁死亡在其中的作用机制尚不明确,深入研究可为相关防治策略提供理论基础^[14]。

相对于动物实验或临床试验而言,细胞培养具有多种优势,包括容易获取、实验条件可人为调控、样本具有高度一致性及便于单独观察特定变量^[15]。尽管原代细胞更接近在体状态,但原代培养成功率低、成本高、操作困难,且在细胞培养过程中容易自然老化,从而导致无法持续传代。H9c2 细胞源于胚胎 BD1X 大鼠心脏组织的原始克隆细胞株的亚克

隆,在形态、生理、生化功能等方面具有骨骼肌的许多特性。该细胞株可用于心血管疾病的研究,具有易获得、生长迅速、稳定复制等优点,已成为研究心脏生物学和疾病较理想的工具细胞。

研究一氧化碳中毒对 H9c2 细胞的损伤作用,对于探索一氧化碳中毒诱导心肌损伤的机制具有重要意义。目前用于研究一氧化碳中毒的模型主要以在体动物模型为主,缺乏体外细胞模型。研究表明,物理性缺氧模型是目前较为常用的体外缺氧实验模型之一^[16],而缺氧也是一氧化碳中毒的主要机制。因此,本研究主要参照物理性缺氧模型建立一氧化碳中毒模型,采用混合气体培养法,即利用增加培养环境中的一氧化碳气体比例,从而模拟细胞一氧化碳中毒损伤过程。本研究应用自制便携式细胞培养装置对细胞进行一氧化碳中毒处理,制备细胞模型,旨在为一氧化碳中毒致心肌损伤的机制研究提供可靠的细胞模型。

本研究中一氧化碳定性检测结果显示,采用一氧化碳及 CROM-3 处理 H9c2 细胞后均可在细胞内观察到绿色荧光,以一氧化碳处理后绿色荧光增多更明显,说明一氧化碳可通过上述方法进入 H9c2 细胞;CCK-8 检测结果显示,一氧化碳浓度为 3×10^{-3} 条件下培养 3 h 即可造成 H9c2 细胞损伤。一氧化碳进入体内竞争性与血红蛋白结合,形成不易解离的碳氧血红蛋白,导致机体缺氧。氧是心肌细胞进行能量代谢的重要原料,缺氧会影响心肌细胞代谢,产生大量的氧自由基及 ROS,使心肌细胞氧化与抗氧化功能打破正常工作状态,产生氧化应激损伤。本研究表明,一氧化碳处理后细胞形态改变,多数细胞呈圆形,细胞膜较粗糙,细胞贴壁性较差,死细胞增多,ROS 水平较空白对照组升高;此外,与空白对照组比较,一氧化碳中毒组细胞中 JC-1 染色绿色荧光减少,红色荧光增多。上述结果表明,一氧化碳处理后细胞内 ROS 增多, MMP 降低,加重了细胞损伤。同时,本研究 ELISA 检测结果显示,一氧化碳中毒组细胞上清液中 CK-MB、cTnT 含量较空白对照组升高,说明一氧化碳处理可导致 H9c2 细胞损伤。

综上所述, H9c2 细胞在 3×10^{-3} 一氧化碳浓度条件下培养 3 h 可以建立中毒性心肌损伤模型。该模型操作方便、可重复性强,自制便携式细胞培养装置更加贴近于生活中发生中毒的环境,为深入研究体外心肌细胞一氧化碳中毒致心肌损伤提供了便利条件。然而,一氧化碳中毒影响因素复杂,除引起

组织缺氧及线粒体功能障碍外,还可导致炎症免疫及自身免疫反应,后续研究将深入考察相关因素对细胞损伤的影响,以便建立更合理的细胞模型。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突

作者贡献声明 刘安平: 酝酿和设计实验、实施研究、采集数据、分析/解释数据、起草文章、修改定稿;刘玉玲: 实施研究、采集数据、分析/解释数据;卢敏: 统计分析、实验技术及材料支持;何婧: 实验结果可视化与图表制作、参考文献整理与格式规范、校对修改文章内容;段海真: 分析/解释数据、提供理论指导与技术建议、研究设计优化、对文章的知识性内容作批评性审阅;喻安永: 指导研究整体设计与技术路线,获取研究经费,行政、技术或材料支持,全面审阅修订文章,通讯与学术把关

参考文献

- [1] Mattiuzzi C, Lippi G. Worldwide epidemiology of carbon monoxide poisoning[J]. Hum Exp Toxicol, 2020, 39(4): 387–392. DOI: 10.1177/0960327119891214.
- [2] Kinoshita H, Türkan H, Vucinic S, et al. Carbon monoxide poisoning[J]. Toxicol Rep, 2020, 7: 169–173. DOI: 10.1016/j.toxrep.2020.01.005.
- [3] 刘勇林, 肖卫民, 吴志强, 等. 急性一氧化碳中毒迟发性脑病的危险因素分析[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2018, 21(14): 1552–1556. DOI: 10.12083/SYSJ.2018.14.360.
- [4] Henry CR, Satran D, Lindgren B, et al. Myocardial injury and long-term mortality following moderate to severe carbon monoxide poisoning[J]. JAMA, 2006, 295(4): 398–402. DOI: 10.1001/jama.295.4.398.
- [5] Baydin A, Amanvermez R, Çelebi HE, et al. Pentraxin 3, ischemia-modified albumin, and myeloperoxidase in predicting a cardiac damage in acute carbon monoxide poisoning[J]. Am J Emerg Med, 2016, 34(10): 1927–1930. DOI: 10.1016/j.ajem.2016.05.043.
- [6] Xie C, Luo K, Tan LB, et al. A review for *in vitro* and *in vivo* detection and imaging of gaseous signal molecule carbon monoxide by fluorescent probes[J]. Molecules, 2022, 27(24): 8842. DOI: 10.3390/molecules27248842.
- [7] Li WX, Li R, Chen R, et al. Activatable photoacoustic probe for in situ imaging of endogenous carbon monoxide in the murine inflammation model[J/OL]. Anal Chem, 2021 (2021–06–15) [2025–06–11]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34130460. DOI: 10.1021/acs.analchem.1c01568. [published online ahead of print].
- [8] Marius-Nunez AL. Myocardial infarction with normal coronary arteries after acute exposure to carbon monoxide[J]. Chest, 1990, 97(2): 491–494. DOI: 10.1378/chest.97.2.491.
- [9] Zhang C, Peng SY, Hong S, et al. Biomimetic carbon monoxide nanogenerator ameliorates streptozotocin induced type 1 diabetes in mice[J]. Biomaterials, 2020, 245: 119986. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2020.119986.
- [10] Balzan MV, Cacciottolo JM, Mifsud S. Unstable angina and exposure to carbon monoxide[J]. Postgrad Med J, 1994, 70(828): 699–702. DOI: 10.1136/pgmj.70.828.699.
- [11] Davies DM, Smith DJ. Electrocardiographic changes in healthy men during continuous low-level carbon monoxide exposure[J]. Environ Res, 1980, 21(1): 197–206. DOI: 10.1016/0013-9351(80)90022-5.
- [12] Rezaee MA, Mohammadpour AH, Imenshahidi M, et al. Protective effect of erythropoietin on myocardial apoptosis in rats exposed to carbon monoxide[J]. Life Sci, 2016, 148: 118–124. DOI: 10.1016/j.lfs.2016.02.007.
- [13] 曹双清, 高珣, 刘倩, 等. 急性一氧化碳中毒性心脏病预后影响因素分析[J]. 中华急诊医学杂志, 2020, 29(8): 1093–1098. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2020.08.013.
- [14] 刘安平, 姜树恒, 孙田静, 等. 铁死亡: 急性一氧化碳中毒致心肌损伤的潜在治疗新靶点[J]. 中华危重病急救医学, 2025, 37(4): 407–412. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20241021-00862.
- [15] 陈建, 黄斌, 高钰琪, 等. 预缺氧对 PC12 细胞缺氧后细胞内游离 Ca^{2+} 的影响[J]. 西北国防医学杂志, 2008, 29(4): 250–253. DOI: 10.16021/j.cnki.1007-8622.2008.04.008.
- [16] 张冬梅, 曹琪璐, 景临林, 等. PC12 细胞低压性缺氧损伤模型的建立[J]. 浙江大学学报(医学版), 2021, 50(5): 614–620. DOI: 10.37274/zdxbyxb-2021-0343.

(收稿日期: 2025-07-01)

(本文编辑: 孙茜)