

新生大鼠心肌细胞的分离和培养*

刘霞^{1,2}, 王常勇³

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100;

2 延安大学 生命科学学院, 陕西 延安 716000;

3 军事医学科学院 组织工程研究中心, 北京 100850)

[摘要] 为获得高纯度和高存活率的心肌细胞, 探索心肌细胞大量培养的条件, 并为进一步研究心肌细胞的细胞生物学特性奠定基础, 同时为生理学和药理学研究提供细胞来源, 试验采用胰蛋白酶顺序消化法及差速贴壁法, 从1~2 d龄新生大鼠的心肌组织中分离心肌细胞, 观测心肌细胞的形态、结构、搏动状态和反映心肌细胞代谢状况的生化参数。结果表明, 分离所得的心肌细胞纯度高, 培养第3天就开始自发搏动, 后连接成片, 进而同步收缩; 心肌细胞的亚显微结构包括肌丝、Z线、线粒体和大量糖原颗粒, 葡萄糖比消耗率为7.44 mmol/(个·d), 乳酸比产率为3.83 mmol/(个·d), 乳酸转化率为51%, 细胞代谢非常旺盛, 说明试验培养条件有利于心肌细胞的气体交换和营养物质的摄取, 从而有利于心肌细胞的生长。

[关键词] 心肌细胞; 细胞分离; 细胞培养; 大鼠

[中图分类号] Q813.1⁺1; R318.11 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9387(2005)06-0035-05

哺乳动物心脏由多种类型的细胞组成, 近75%的细胞是非心肌细胞, 如成纤维细胞和血红细胞等, 心肌细胞占其余心脏细胞的25%, 因此心肌细胞体外培养时极易被成纤维细胞污染, 并可能影响到心肌细胞的分化^[1]。此外, 新生大鼠心肌细胞体外培养时只能利用原代培养物, 而心肌细胞的分离易受处理条件及培养技术水平的影响^[2], 且心肌细胞培养物的伸缩性和细胞间的接触有关, 所以形成一个融合成片的单层心肌培养物极其困难。

基于此, 本试验对新生大鼠的心肌细胞进行了分离和培养, 以期探索心肌细胞的培养条件, 并为心肌细胞细胞生物学特性的进一步研究奠定基础, 同时为生理学和药理学研究提供细胞来源。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 1~2 d龄新生大鼠由军事医学科学院实验动物中心提供。

1.1.2 生化试剂 H-DMEM培养基和胰蛋白酶来自美国的Gibco公司; 胎牛血清(FBS)产自天津川页生化制品有限公司; HEPES, Hoechst33258和小牛胸腺DNA, L-谷氨酰胺(L-Glu)为美国Sigma

产品; 鼠抗人 α -横纹肌肌动蛋白单克隆抗体、牛血清白蛋白及免疫组化试剂盒, 由北京中山生物技术有限公司提供; 葡萄糖浓度和乳酸浓度测定试剂盒由北京中生物生物工程高技术公司提供。

1.1.3 培养液 H-DMEM中补加200 mL/L FBS, 100 U/mL青霉素, 100 U/mL链霉素, 10 mmol/L HEPES和2 mmol/L L-谷氨酰胺。

1.2 方法

1.2.1 新生大鼠心肌细胞的分离、纯化及原代培养

采用1 g/L胰蛋白酶顺序消化及差速贴壁法^[3], 在无菌条件下分离纯化心肌细胞。取1~2 d龄新生大鼠, 在无菌条件下切取其心室肌组织, 无钙Hanks'液充分洗净残血, 用眼科剪将其剪成大小约为1 mm³的组织块, 加入1 g/L胰蛋白酶于37℃孵箱中孵育或反复吹打消化3~4 min, 吸取上清消化液, 弃去; 然后在剩余组织块中加入1 g/L胰蛋白酶, 于37℃孵箱中孵育或反复吹打消化3~4 min, 吸取上清消化液, 用含FBS的H-DMEM培养液终止消化, 沉淀组织块再加入消化液继续消化。如此重复3~5次, 直至组织块完全消化。

将各次所得消化液在1 000 r/min下离心4

* [收稿日期] 2004-09-09

[基金项目] 国家863高技术研究与发展计划航天领域项目(2002AA744064)。

[作者简介] 刘霞(1970-), 女, 陕西绥德人, 讲师, 在读博士, 主要从事基础兽医学研究。E-mail: liuxiayidan@126.com

min, 弃上清, 用含 200 mL/L FBS 的 H-DMEM 重悬细胞, 移入培养板并置于 37℃, 饱和湿度和体积分数 5% CO₂ 的孵箱内, 75 min 后吸出尚未贴壁的细胞悬液, 移入培养板或培养板内的盖玻片(细胞爬片)上静置培养, 1 d 后换液去除未贴壁细胞, 此后隔日换液, 并在倒置相差显微镜下观察细胞形态及生长情况, 每天对细胞的自发收缩进行计数并照相(每孔任选 6 个视野, 每个视野约 0.3 mm × 0.4 mm)。

1.2.2 HE 染色 于细胞的对数生长期, 即在培养 5~7 d 后取出盖玻片, PBS 冲洗后用体积分数 95% 乙醇固定 15 min, 常规 HE 染色, 封片后光镜下观察并照相。

1.2.3 抗 α-横纹肌肌动蛋白单克隆抗体免疫组织化学染色 采用 SP 法。细胞爬片用 PBS 缓冲液(pH 7.4~7.6)清洗后, 在体积分数 95% 乙醇中固定 15 min, 用含 0.1% (体积分数) triton x-100 的 0.3% (体积分数) H₂O₂-甲醇室温作用 10 min, 以消除内源性过氧化物酶, 经 PBS 冲洗浸泡后, 再用体积分数 10% 的山羊血清室温下孵育 15 min, 加入鼠抗人 α-横纹肌肌动蛋白单克隆抗体(1:50), 湿盒中 4℃ 过夜, 然后加入生物素标记二抗, 37℃ 孵育 15 min, PBS 充分洗涤后滴加辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素, 37℃ 孵育 15 min, 再滴加 DAB 显色, 显微镜下观察结果并拍照。

同时, 以大鼠心肌组织石蜡切片为阳性对照, 用 PBS 代替一抗作为空白对照。

1.2.4 心肌细胞的台盼蓝排斥试验 培养 7 d 后, 用胰蛋白酶消化并计数, 制备单个心肌细胞悬液, 并作适当稀释(10⁶/mL), 取 9 滴细胞悬液移入小试管中, 加 1 滴 4 g/L 台盼蓝溶液, 混匀, 在 3 min 内, 用血球计数板分别计数活细胞和死细胞。

1.2.5 心肌细胞代谢率测定 培养 3, 5, 7 d 后, 分别取少许培养液以测定其中葡萄糖含量及乳酸含量。

(1) 葡萄糖浓度和葡萄糖比消耗率。培养液中葡萄糖浓度测定采用 GOD-PA P 法。样品中葡萄糖浓度 C 按下式计算

$$C = (A_{\text{样品}}/A_{\text{标准}}) \times C_{\text{标准}} (\text{mg/L})$$

式中, $A_{\text{标准}}$ 及 $A_{\text{样品}}$ 分别表示葡萄糖标准液及样品在波长 505 nm 处的吸光度; $C_{\text{标准}}$ 表示葡萄糖标准液的

浓度。用未培养前培养液中的葡萄糖含量减去培养后培养上清液中的葡萄糖含量, 即为细胞的消耗量 C_{glu} 。心肌细胞的葡萄糖比消耗率 $Q_{\text{glu}} = C_{\text{glu}}/(180 \times \text{细胞密度})$ 。

(2) 乳酸浓度和乳酸比产率。培养液中乳酸浓度测定采用 LACTATE-PA P 法。样品中乳酸浓度 C_{lac} 为

$$C_{\text{lac}} = (A_{\text{样品}}/A_{\text{标准}}) \times 30 (\text{mg/L})$$

式中, $A_{\text{标准}}$ 及 $A_{\text{样品}}$ 分别表示乳酸标准液及样品在波长 546 nm 处的吸光度。心肌细胞的乳酸比产率 $Q_{\text{lac}} = C_{\text{lac}}/(90 \times \text{细胞密度})$ 。

(3) 乳酸转化率。乳酸转化率 Y_{lac} 为

$$Y_{\text{lac}}/C_{\text{glu}} = C_{\text{lac}}/C_{\text{glu}}$$

式中, C_{lac} 为乳酸的产生量; C_{glu} 为葡萄糖的消耗量。

1.2.6 透射电镜观察 将样品在体积分数 3% 的戊二醛中前固定 2 h, 体积分数 1% 的锇酸中后固定, 于乙醇中梯度脱水, 然后浸透, Epon812 包埋, 切片, 用醋酸铀染液避光染色 10 min, 柠檬酸铅染色 10 min, 在 80 kV 下观察并照相。

2 结果与分析

2.1 心肌细胞的分离

以 1~2 d 龄新生大鼠的心室肌组织为心肌细胞的来源, 采用胰酶顺序消化和差速贴壁法分离心肌细胞。经胰酶消化后, 1 只乳鼠的心室肌组织可获得的细胞总数约为 1.7×10^6 , 经差速贴壁去除大部分成纤维细胞后, 可获得的细胞数约为 1.2×10^6 。

2.2 心肌细胞的贴壁生长情况

刚分离出来的心肌细胞呈球形, 接种后 4 h 有细胞开始贴壁, 12 h 后细胞形态变为梭形或不规则扁平状, 24 h 后即可看到单个细胞的自发收缩, 继而细胞逐渐铺展伸出伪足, 形成不规则的星形。到第 3~4 天, 细胞相互接触交织成网, 形成细胞单层或细胞簇, 搏动呈现同步化, 5 d 后细胞簇面积逐渐增大(图 1), 搏动频率 13~47 次/min 不等, 收缩率随培养时间的延长而增加。第 6~8 天时, 收缩率达到最高, 可至 65 次/min, 随后下降, 此收缩可持续 20 余天, 最长可达 40 余天, 镜下观察可见自主搏动细胞在 80% 以上, 用台盼蓝排斥法检测的细胞成活率约为 90%。

细胞 HE 染色(图 2)显示心肌细胞形态正常。



图 1 单层培养的心肌细胞 (×200)
A. 心肌细胞间相互连接; B. 成簇的心肌细胞; C. 连接成片的心肌细胞

Fig 1 Layered cardiomyocytes (×200)

A. Connecting between cardiomyocytes; B. Clustered cardiomyocytes; C. Connecting flaky cardiomyocytes

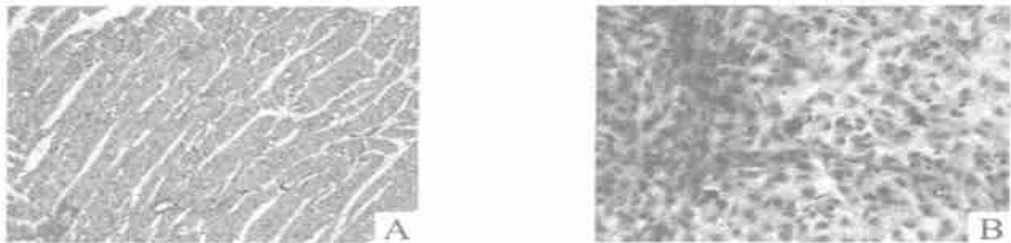


图 2 HE 染色结果

A. 成年大鼠心肌组织 (×100); B. 心肌细胞爬片 (×200)

Fig 2 H & E staining

A. Cardiac muscle tissue of adult rat (×100); B. Cultured cardiac muscle cells of neonatal rat (×200)

2 3 心肌细胞的免疫组化染色

以鼠抗 α -横纹肌肌动蛋白单克隆抗体为一抗, 标记心肌细胞进行免疫组化鉴定。结果可见细胞浆

呈棕色, 表明细胞对 α -横纹肌肌动蛋白的表达呈阳性, 心肌细胞的比例在 85% 左右 (图 3)。

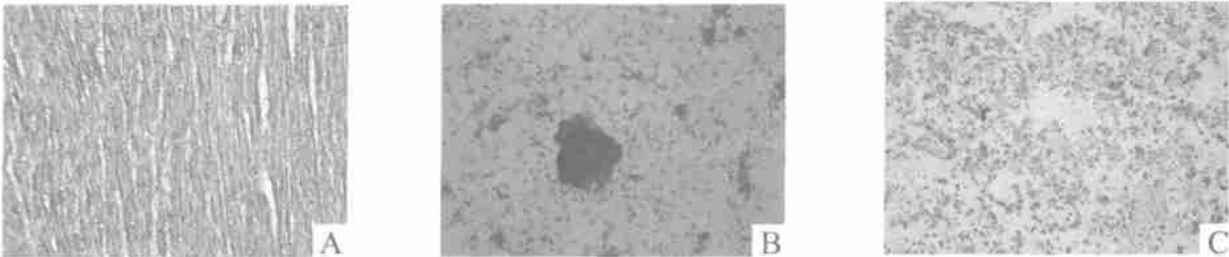


图 3 α -横纹肌肌动蛋白染色 (×100)

A. 成年大鼠心肌组织; B. 心肌细胞爬片; C. 免疫组化空白对照

Fig 3 Expression of sarcomeric α -actin (×100)

A. A dult rat cardiac tissue; B. Cultured cardiac muscle cells; C. Blank control

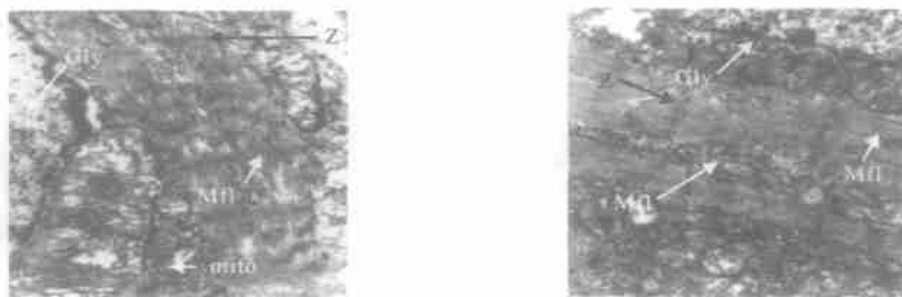
2 4 心肌细胞代谢率的测定

静止培养时, 心肌细胞 Q_{glu} 的均值为 7.44 nmol/(个·d), 培养期内呈现出中间高、两头低的变化趋势, Q_{glu} 的变化基本与心肌细胞的搏动状况一致, Q_{lac} 的均值为 3.83 nmol/(个·d), $Y_{lac/glu}$ 的均值

为 51%。

2 5 透射电镜观察

透射电镜观察结果显示, 心肌细胞中的亚显微结构清晰, 包括肌丝 (M fl)、Z 线 (Z)、大量糖原颗粒 (Gly) 及线粒体 (M ito) (图 4)。

图 4 透射电镜显示的心肌细胞超微结构 ($\times 22\ 000$)Fig. 4 Transmission electron micrograph of an cardiac myocyte ($\times 22\ 000$)

3 讨 论

心脏疾病是目前对人类危害最大、死亡人数最多的疾病之一,一直是医学界研究的热点和难点。心肌细胞是心脏的基本组成单位,是进行生理学和药理学研究的主要细胞来源,同时也是心肌组织工程种子细胞的主要来源之一。分离、培养并获得高纯度心肌细胞,既是心肌细胞体外成功培养的重要内容之一,也是在体外复制出工程化心肌组织的前提之一。

本研究应用胰蛋白酶顺序消化及差速贴壁相结合的方法分离纯化心肌细胞,取得了较好的效果。胰蛋白酶的质量浓度及作用时间直接影响心肌细胞的活性。仅用质量浓度为 1 g/L 的胰酶反复多次顺序消化(每次 5 min)乳鼠心肌组织,目的是减少胰酶对心肌细胞的损伤,从而获得存活率较高的心肌细胞。有研究^[4]表明,初分离获得的心肌细胞在生理浓度的钙离子溶液中易丧失收缩活性,为了保持心肌细胞的收缩功能,在分离的过程中应采用 4 mmol/L 的无钙离子 Hanks' 缓冲液浸泡和冲洗心肌组织。心肌细胞钙离子耐受性的建立,也是心肌细胞能否在体外培养中保持其收缩功能的影响因素之一。若分离的心肌细胞不能及时复钙,随着时间的延长,细胞的兴奋性及收缩性将会下降。在消化的上清液中加入含 20% FBS 的 DM EM 培养液,既可终止胰酶的消化作用,又能使心肌细胞及时复钙,从而获得存活率较

高的钙耐受心肌细胞。

心脏由心肌细胞和非心肌细胞组成,其中成纤维细胞约占非心肌细胞的 70% 左右^[5]。因此,为了避免体外培养时由于非心肌细胞的快速生长及其分泌的某些活性物质对心肌细胞形态结构和生理功能造成的不利影响^[6~8],本试验根据成纤维细胞贴壁速度明显快于心肌细胞的特点,采用差速贴壁法去除细胞悬液中的成纤维细胞,从而获得了较高纯度的心肌细胞。在倒置相差显微镜下观察,可见自主搏动的心肌细胞达到细胞总数的 80% 以上,与文献^[9]报道的结果基本一致。

心肌细胞的鉴定可采用免疫组织化学方法,即可通过肌动蛋白抗体或肌球蛋白抗体与心肌细胞反应,将心肌细胞中的心肌细胞和其他细胞区分开。本研究所用抗体为抗 α -横纹肌肌动蛋白单克隆抗体,免疫组化显示, α -肌动蛋白染色呈强阳性。

新生大鼠心肌细胞在体外适宜条件下可以维持其代谢活性。形态学观察结果表明,心肌细胞可以连接成片,自主搏动长达 40 余天,说明其代谢非常旺盛;电镜观察结果表明,心肌细胞具有肌丝、Z 线及大量糖原颗粒和线粒体,说明其具有心肌细胞的正常结构;细胞代谢率测定结果表明,培养液中乳酸和葡萄糖的物质的量之比小于 1 ,表明属需氧代谢^[10],且细胞代谢旺盛,说明本试验的培养条件有利于心肌细胞的气体交换和营养物质的摄取。

[参考文献]

- [1] Simpson P, Savion S. Differentiation of rat myocytes in single cell cultures with and without proliferating nonmyocardial cells[J]. Circ Res, 1982, 50: 101- 116
- [2] Speicher D, McCarl R L. Pancreatic enzyme requirements for the dissociation of rat heart in culture[J]. In V itro, 1974, 10: 30- 41.
- [3] Boyan B D. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response[J]. Biomaterials, 1996, 17: 137- 144
- [4] Wittenberg B A, White R L, Ginzberg R D, et al. Effect of calcium on the dissociation of the mature rat heart into individual and paired

- myocytes: electrical properties of cell pairs[J]. *Circ Res*, 1986, 58: 143
- [5] Toshiyuki M, Ryoji O, Tetsuya O, *et al* Type 2 angiotensin II receptor is down regulated in cardiomyocytes of patients with heart failure [J]. *Cardiovasc Res*, 2000, 46: 73- 81.
- [6] Guo W N, Kamiya K, Kada K J, *et al* Regulation of cardiac Kv 1.5K⁺ channel expression by cardiac fibroblasts and mechanical load in cultured newborn rat ventricular myocytes[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1998, 30: 157- 166
- [7] Harada M, Itoh H, Nakagawa O, *et al* Significance of ventricular myocytes and nonmyocytes interaction during cardiocyte hypertrophy [J]. *Circulation*, 1997, 96: 3737- 3744
- [8] Suzuki T, Tsuruda A, Katoh S H, *et al* Purification of endothelin from a conditioned medium of cardiac fibroblastic cells using beating rat assay of myocytes cultured in a serum-free medium [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1997, 29: 2087- 2091.
- [9] Simpson P, Savion S Myocyte hypertrophy in neonatal rat heart cultures and its regulation by serum and by catecholamines[J]. *Circ Res*, 1982, 51: 787- 801.
- [10] Rebecca L Carrier, Maria Papadaki, Maria Rupnick, *et al* Cardiac tissue engineering: cell seeding, cultivation parameters, and tissue construct characterization[J]. *Bioengineering*, 1999, 64(5): 580- 589

Isolating and culturing of neonatal rat cardiac myocytes

L IU Xia^{1,2}, WANG Chang-yong³

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 College of Life Sciences, Yan'an University, Yan'an, Shaanxi 716000, China;

3 Tissue Engineering Research Center, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract: This study investigated conditions of isolating and culturing of cardiac myocytes so as to obtain lots of pure cardiac muscle cells and supply a cardiac myocytes model for physiological and pharmacological studies *in vitro*. 1- 2-day-old neonatal rat cardiac muscle cells were isolated with enzyme by sequential digestion and pre-plating methods, and the acquired cells were cultured in H-DMEM containing 20% fetal bovine serum. The cell type was identified by H-E and anti-sarcomeric α -actin stains. Cardiac myocytes beating and metabolic indexes, including specific consumption rate of glucose, specific production rate of lactate, lactate transform rate were primarily confirmed. The isolated cardiac myocytes adhered to the bottom of the flasks 24 hours after plating and began to contract spontaneously and by day 3- 4 formed synchronously contracting networks. The molar ratios of glucose consumed and lactate produced were 7.44 mmol/(cell · day) and 3.83 mmol/(cell · day) respectively. The molar ratio of glucose consumed to lactate produced was 0.51 mmol/mmol. These demonstrated that metabolic activity of cells was very high and the conditions of culturing were good for cardiac myocytes cultured.

Key words: cardiac myocyte; cell isolation; culture; rat