

乳鼠心肌细胞的体外三维培养

刘霞¹, 史明艳², 欧阳五庆³

(1 延安大学 生命科学学院, 陕西 延安 716000; 2 洛阳师范学院 生命科学系, 河南 洛阳 471022;

3 西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨凌 712100)

【摘要】 **【目的】** 探讨应用 PLGA 泡沫支架材料, 在体外建造组织工程化心肌组织的可行性。**【方法】** 采用顺序消化及差速贴壁法分离纯化乳鼠心肌细胞, 将分离所得的心肌细胞接种于 PLGA 多孔支架材料上, 观测复合体内心肌细胞的生长状况、超微结构、细胞代谢率及细胞组分的变化, 并将其与正常心肌和二维培养的心肌细胞进行比较。**【结果】** 复合体内的细胞具有心肌细胞的特殊超微结构, 免疫组化显示其中的 α -横纹肌肌动蛋白染色呈强阳性, 与二维培养的细胞相比, 细胞代谢更加旺盛。**【结论】** 采用组织工程技术有可能在体外培育出组织工程化心肌组织。

【关键词】 大鼠; 心肌细胞; PLGA 支架材料; 三维培养

【中图分类号】 Q813.1

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2009)03-0066-05

Three dimensional culture of neonatal rat cardiac cells *in vitro*

LIU Xia¹, SHI Ming-yan², OUYANG Wu-qing³

(1 College of Life Science, Yan'an University, Yan'an, Shaanxi 716000, China;

2 Life Science Department, Luoyang Normal University, Luoyang, Henan 471022, China;

3 College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】** This study investigates construction of cardiac muscle cell-porous PLGA scaffold complex so as to unveil the possibility of generating 3-dimensional cardiac muscle tissue *in vitro*. **【Method】** 1 day old neonatal rat cardiac muscle cells were isolated by sequential digestion and pre-plating methods, then seeded onto porous PLGA scaffold, and incubated for 7 days. Cells cultured in plates and native cardiac muscle served as control. Morphological changes of the cells in constructs were detected by light microscope and metabolic rate was recorded. Ultrastructure of the cells growing in porous PLGA was observed by transmission electron microscopy. Content of total DNA and protein in the newly-formed tissue were analyzed. H-E and anti-sarcomeric α -actin stains were performed in comparison with native cardiac muscle. **【Result】** When incubated for 7 days, cell-PLGA constructs formed a continuous outer tissue layer containing cells aligned with each other. The cell population in the interior part of the construct was less in density than the outer part. Transmission electron microscopy demonstrated subcellular elements characteristic of cardiac myocytes in the outermost layer of the constructs. Strongly positive stains of anti-sarcomeric α -actin suggested presence of cell population of differentiated cardiac myocytes in these constructs. Construct biomass was not significantly different from that in neonatal rat ventricle. Metabolic activity of cells in constructs was higher than that in plates. **【Conclusion】** It was possible to form cardiac muscle cells-porous PLGA scaffold constructs with structural and functional features resembling those of native cardiac tissue *in vitro*.

Key words: rat; cardiac myocyte; PLGA scaffold; three dimension culture

* [收稿日期] 2008-05-07

[基金项目] 延安大学科研基金资助项目(KYQD200653)

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

心脏在人体健康中的作用至关重要,由于心肌组织自身修复能力有限,因此,如何对损伤的心肌组织进行修复,一直是医学界研究的热点之一。

组织工程学的兴起,为临床上修复各种原因导致的心肌缺损带来了希望。国外的科研人员应用可生物降解聚合物作为支架,成功地在体外培育出组织工程化的心肌组织^[1],并已证明工程化心肌组织在移植到大鼠模型的腹膜下后,可以存活并发生血管化^[2],而国内关于这方面的研究报道较少。本试验对乳鼠心肌细胞进行分离,并尝试以可生物降解的 PLGA 为支架进行心肌组织的三维培养,研究了细胞-支架复合体的形态结构特征,以期为今后组织工程化心肌组织的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验动物

1日龄 SD 乳鼠 100 只,成年 SD 大鼠 10 只,均由军事医学科学院组织工程研究中心提供。

1.2 试剂和仪器

H-DMEM 培养基和胶原酶 I, Gibco 公司生产;小牛血清,购自天津川页生化制品有限公司;HEPES、Hoechst33258、5-溴脱氧尿苷和小牛胸腺 DNA,均为 Sigma 公司产品;PLGA 多孔聚合物支架材料(相对分子质量 1.0×10^5 ,孔径 180~350 μm ,孔隙率 85%,厚度 4 mm),中国科学院化学研究所生产;鼠抗人 α -横纹肌肌动蛋白单克隆抗体和牛血清白蛋白,购自北京中山生物技术有限公司;葡萄糖浓度和乳酸浓度测定试剂盒,购自北京中生物生物工程高技术公司;透射电镜(CM120), Philips 公司生产。

1.3 乳鼠心肌细胞的分离与二维培养

采用顺序消化及差速贴壁法^[3]分离纯化心肌细胞。在无菌条件下切取 1 日龄乳鼠的心室肌,无钙 Hanks'液充分洗净残血,用眼科剪将其剪成大小约 1 mm^3 的组织块,然后用 0.8 g/L 的胶原酶 I (现用现配)对其进行顺序消化。收集各次消化所得的单细胞悬液,在 1 000 r/min 条件下离心 5 min,之后将细胞团用含体积分数 10% 小牛血清的 H-DMEM 培养基重悬,置于 6 孔培养板中,在 CO_2 培养箱中静置 1 h;吸出细胞悬液,将其移入另一培养板中静置 1 h;再次吸出细胞悬液,移至一个新培养板中,培养 20 h 后,更换含 0.1 mmol/L 5-溴脱氧尿苷(BrdU)的培养液。在体积分数 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 、饱和湿度条件下常规培养,隔日换液,并在倒置相差显微镜

下观察细胞生长状况,进行形态学、免疫组化分析及细胞代谢率测定。试验所用培养液为含体积分数 10% 小牛血清的 H-DMEM,并添加 100 U/mL 青霉素、链霉素,10 mmol/L HEPES,2 mmol/L L-谷氨酰胺。

1.4 乳鼠心肌细胞-PLGA 复合体的培养

将无菌 PLGA 膜放于 96 孔板中,每孔 1 片,每片 PLGA 的大小与孔底面积基本一致,以 $5.5 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ 的密度接种细胞,形成心肌细胞-PLGA 复合体。复合体 24 h 后转于 6 孔培养板中,然后置于体积分数 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 、饱和湿度条件下培养。2~3 d 换液 1 次,定期测定培养液中的葡萄糖和乳酸浓度。7 d 后取出复合体,对其进行组织结构分析及 DNA 和蛋白质含量的测定。

1.5 复合体的组织学和免疫组化分析

复合体在体积分数 10% 中性福尔马林中固定 24 h,经酒精(体积分数 80% \times 2 次,90% \times 2 次,95% \times 2 次,100% \times 2 次)梯度脱水后,在二甲苯中透明 2 次,每次 1 h,随后将其浸入石蜡中,1 h \times 2 次,最后进行石蜡包埋,制成石蜡块以备切片。染色时,将制得的石蜡切片脱蜡至水,然后在 PBS 中洗 2 次,每次 1 min;之后浸入苏木素染液染色,5 min 后用自来水浸洗,若背景深,需在稀盐酸酒精溶液中进行分色,数秒钟即可,再用自来水浸洗;随后浸入淡氨水中 3~5 min,使胞核蓝化,用自来水浸洗;然后浸入伊红染液染色,5~10 min 后用自来水浸洗,并经体积分数 70%,80%,90% 酒精各 1 次,95% 酒精 2 次和 100% 酒精 3 次逐级脱水,每次 1 min,再通过二甲苯透明 3 次,每次 1 min,最后在载玻片上滴加中性树脂胶进行封固,即可在显微镜下观察并照相。阳性结果为心肌细胞核被染为兰色,胞浆染为粉红色。

细胞爬片用 PBS 缓冲液(pH 7.4~7.6)清洗 2 次后,用体积分数 95% 酒精固定 15 min,再用 PBS 洗涤 2 次,每次 3 min,然后用含体积分数 0.1% triton x-100(100 μL)的 0.3% (体积分数) H_2O_2 -甲醇(1 mL)室温浸泡 10 min,以消除内源性过氧化物酶;之后用蒸馏水冲洗,PBS 浸泡 5 min;再用体积分数 10% 山羊血清工作液室温下孵育 15 min,倾去血清;然后用鼠抗人 α -横纹肌肌动蛋白单克隆抗体以 1:50 稀释后滴加于载玻片上,将细胞爬片置于湿盒中 4 $^\circ\text{C}$ 过夜;次日 PBS 冲洗 5 min \times 3 次,再滴加生物素标记二抗工作液,37 $^\circ\text{C}$ 孵育 15 min 后,用 PBS 冲洗 5 min \times 3 次;再滴加辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素工作液,37 $^\circ\text{C}$ 孵育 15 min 后,用 PBS

冲洗 3 次,每次 5 min;然后滴加 DAB 显色,同时在显微镜下观察,当呈现咖啡色时即可用自来水冲洗终止;用自来水洗后以苏木素衬染 30 s,以盐酸酒精分化,自来水返蓝;最后常规脱水、二甲苯透明、中性树胶封固;显微镜观察并拍照。阳性细胞为棕色。同时设空白对照组,其一抗为 PBS,其余处理方法同试验组。正常成年大鼠心肌组织及复合体石蜡切片的免疫组化方法同细胞爬片。

1.6 复合体的透射电镜观察

将复合体切成 1 mm^3 小块,在体积分数 3% 戊二醛中前固定 2 h,体积分数 1% 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。

1.7 乳鼠心肌细胞和复合体代谢率的测定

根据试剂盒的说明,分别在复合体和心肌细胞培养 3,5,7 d 时,测定培养液中葡萄糖和乳酸浓度,并计算消耗单位葡萄糖的乳酸产率。

1.8 心肌组织和复合体中 DNA 及蛋白质含量的测定

分别测定乳鼠和成熟心肌组织及复合体中的 DNA 和蛋白质含量,并比较测定结果。DNA 含量测定采用荧光法,蛋白质含量测定采用考马斯亮兰法^[4]。

1.9 统计学处理

对测定结果进行方差分析,以“均值±标准差”来表示。

2 结果与分析

2.1 乳鼠心肌细胞的分离与二维培养

细胞接种后的 4~24 h,在倒置相差显微镜下即可观察到有细胞开始贴壁伸展,初为圆形,后为梭形,并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,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,为 80 次/min;随后下降,此收缩一直可持续 30 余天。镜下观察可见自主搏动细胞在 90% 以上。

2.2 复合体的形态学及免疫组化分析

培养 7 d 后,复合体的 HE 染色及免疫组化染色表明,复合体外层区域细胞较致密,细胞间相互接触,形成连续的三维组织样结构,复合体的中心区域细胞较少(图 1A,1B)。多数细胞表达 α -横纹肌肌动蛋白,细胞浆呈棕色,且与常规培养的细胞和正常心肌组织(图 1C,1D)无明显区别。空白对照的细胞浆无色,结果为阴性(图 1E),表明二抗与大鼠心肌细胞无交叉反应。

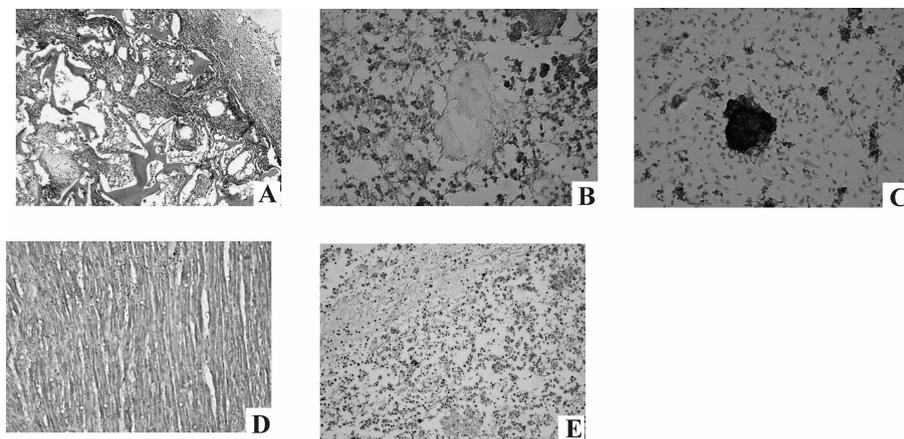


图 1 乳鼠心肌细胞-PLGA 复合体的 HE 染色与免疫组化染色($\times 100$)

A. 乳鼠心肌细胞-PLGA 复合体的 HE 染色;B. 乳鼠心肌细胞-PLGA 复合体的免疫组化染色;C. 常规培养的乳鼠心肌细胞的免疫组化染色;D. 成年大鼠心肌组织的免疫组化染色;E. 空白对照的免疫组化染色

Fig. 1 HE and immunohistochemistry of constructs and native ventricles($\times 100$)

A. HE stain of constructs;B. Strongly positive stain of sarcomeric α -actin of constructs;C. Positive stain of sarcomeric α -actin of cells in plates;D. Positive stain of sarcomeric α -actin of adult ventricle;E. Negative control of sarcomeric α -actin

2.3 复合体的透射电镜观察

透射电镜观察(图 2)显示,复合体外层区域细胞中的亚显微结构中包括肌丝、Z 线、大量的糖原颗

粒及线粒体。

2.4 乳鼠心肌细胞代谢率的测定

图 3 表明,常规培养的细胞消耗单位葡萄糖的

乳酸产率高于复合体内的细胞(图 3),且二者差异显著($P < 0.05$)。

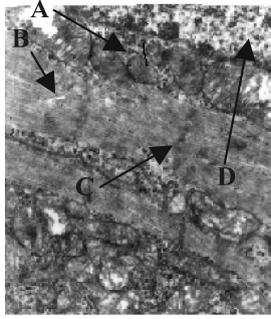


图 2 乳鼠心肌细胞-PLGA 复合体内细胞的超微结构($\times 22\ 000$)
A. 线粒体;B. 肌丝;C. Z-线;D. 糖原颗粒

Fig. 2 Ultrastructure of cells in an construct($\times 22\ 000$)

A. Mitochondria;B. Myofilaments;C. Z-lines;D. Glycogen granules

2.5 心肌组织和复合体中 DNA 及蛋白质含量的测定

成熟和乳鼠心肌细胞内的 DNA 含量均比复合体内的 DNA 含量高($P < 0.01$,图 4A)。成熟心肌

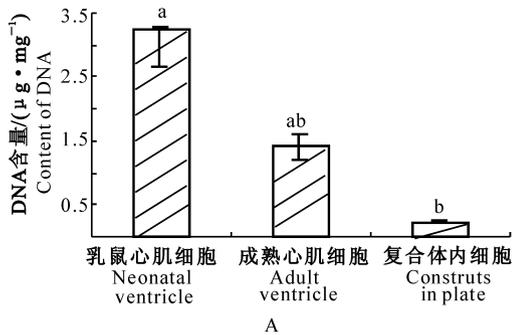


图 4 乳鼠心肌组织和复合体的 DNA 含量(A)及细胞大小参数(B)

图中不同小写字母表示差异极显著($P < 0.01$)

Fig. 4 Content of DNA and cell hypertrophy index in ventricles and constructs

Data with small letters indicate the difference is significant($P < 0.01$)

3 讨论

常规二维培养的原代心肌细胞,作为一种主要的生理学和药理学研究模型,被广泛应用于心血管研究中。在这种二维培养体系中,细胞附着在平面载体上,分化、增殖成单层细胞,有利于细胞的气体交换和营养物质的摄取,但不利于细胞在体外形成具有三维结构的组织或器官,因此,传统的二维培养方法不适宜开展机体组织体外再造研究。组织工程学的诞生,为体外再造各种有功能的组织或器官带来了希望,因而已成为医学领域研究的热点。近年来,国外心肌组织工程研究已取得了一定进展^[5-15],

细胞内的总蛋白与 DNA 含量的比率则明显高于乳鼠心肌细胞和复合体内二者的比率($P < 0.01$,图 4B)。

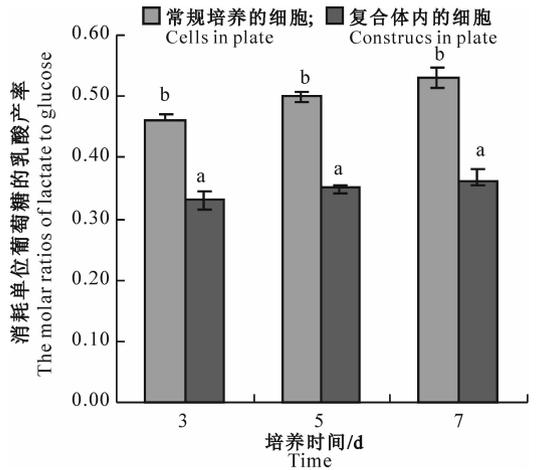
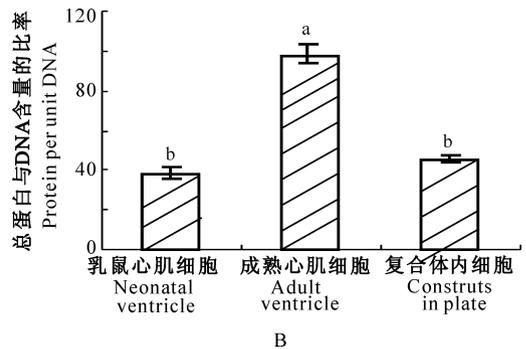


图 3 乳鼠心肌细胞的乳酸产率

图中不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)

Fig. 3 Molar ratios of lactate produced to glucose consumed of cardiac muscle cells

Data with small letters indicate the difference is significant($P < 0.05$)



而国内心肌组织工程研究尚处于起步阶段,因此进行心肌组织工程的研究具有重要的现实和理论意义。

本试验对心肌细胞-PLGA 复合体进行体外培养,并将其与常规培养进行了比较。免疫组化、电镜及组织检测结果均表明,复合体内的细胞具有心肌细胞的典型特征,且代谢较旺盛,但未见有肌小管形成,其中的细胞仍不具有终末分化的形态学特征;细胞代谢率测定结果显示,二维培养和三维培养的心肌细胞,乳酸与葡萄糖的物质的量之比均小于 1,表明均属需氧代谢^[16],但后者对葡萄糖的利用率较高,说明其细胞代谢更加旺盛。

乳鼠心肌细胞在出生后 3 d 内具有部分增殖能力,成年大鼠心肌细胞则为终末分化细胞,不再具有分裂增殖能力^[17-18]。因此,大鼠出生时间越短,其心肌细胞分离后成活率越高,越容易贴壁生长。大鼠出生后心脏质量的增加并非由于心脏细胞数变多,而是由于细胞个体体积扩张^[19]。本试验对蛋白质与 DNA 含量的测定结果也进一步证明了这一点,因为成熟心肌细胞(总蛋白与 DNA 含量的比率高)比复合体细胞及新生心肌细胞大,而其 DNA 含量却未明显增加。

本试验在体外以 PLGA 为支架,虽未培养成具有完整生理功能的心肌组织,但已证明心肌细胞可以在支架上存活并形成一连续的组织样结构,说明该方法在心肌组织工程的研究中具有一定的应用前景。

[参考文献]

- [1] Fink C, Ergun S, Kralisch D, et al. Chronic stretch of engineered heart tissue induces hypertrophy and functional improvement [J]. *FASEB J*, 2000, 14: 669-679.
- [2] Eschenhagen T, Didie M, Munzel F, et al. 3D engineered heart tissue for replacement therapy [J]. *Bas Res Cardiol*, 2002, 97 (Suppl. 1): I 146- I 152.
- [3] Papadaki M, Bursac N, Langer R, et al. Tissue engineering of functional cardiac muscle: molecular, structural, and electrophysiological studies [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001, 280: H168-H178.
- [4] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养 [M]. 西安: 世界图书出版西安公司, 1996: 188-193.
Situ Z Q, Wu J Z. Cell culture [M]. Xi'an: World Books Xi'an Press, 1996: 188-193. (in Chinese)
- [5] Leor J, Aboulafia-Etzion S, Dar A, et al. Bioengineered cardiac grafts: a new approach to repair the infarcted myocardium? [J]. *Circulation*, 2000, 102(Suppl): III 56-61.
- [6] Li R K, Jia Z Q, Weisel R D, et al. Survival and function of bioengineered cardiac grafts [J]. *Circulation*, 1999, 100(Suppl): II 63-69.
- [7] Li R K, Yau T M, Weisel R D, et al. Construction of a bioengineered cardiac graft [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2000, 119: 368-375.
- [8] Li R K, Weisel R D, Mickle D A, et al. Autologous porcine heart cell transplantation improved heart function after a myocardial infarction [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2000, 119: 62-68.
- [9] Freed L E, Vunjak-novakovic G. Microgravity tissue engineering [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 1997, 33: 381-385.
- [10] Akins R E, Schroedl N A, Gonda S R, et al. Neonatal rat heart cells cultured in simulated microgravity [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 1997, 33: 337-343.
- [11] Carrier R L, Papadaki M, Rupnick M, et al. Cardiac tissue engineering: cell seeding, cultivation parameters, and tissue construct characterization [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1999, 64(5): 580-589.
- [12] Shachar M, S Cohen M. Cardiac tissue engineering, ex-vivo: design principles in biomaterials and bioreactors [J]. *Heart Failure Reviews*, 2003, 8(3): 271-276.
- [13] Wolfram-Hubertus Z, Thomas E. Cardiac tissue engineering for replacement therapy [J]. *Heart Failure Reviews*, 2003, 8(3): 259-269.
- [14] Yen-Chih H, Luda K, Ravi K Birla. Modulating the functional performance of bioengineered heart muscle using growth factor stimulation [J]. *Annals of Biomedical Engineering*, 2008, 36(8): 1372-1382.
- [15] Karen M, Frederick J Schoen. Heart valve tissue engineering: concepts, approaches, progress, and challenges [J]. *Annals of Biomedical Engineering*, 2006, 34(12): 1799-1819.
- [16] Rebecca L Carrier, Maria Papadaki, Maria Rupnick, et al. Cardiac tissue engineering: cell seeding, cultivation parameters, and tissue construct characterization [J]. *Biotechnol Bioeng*, 1999, 64(5): 580-589.
- [17] Taylor D A, Atkins B Z, Hungspreugs P, et al. Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation [J]. *Nat Med*, 1998, 4: 929-933.
- [18] Dorfman J, Duong M, Zibaitis A, et al. Myocardial tissue engineering with autologous myoblast implantation [J]. *J Thorac Cardiovasc surg*, 1998, 116: 744-751.
- [19] D L 斯佩克特, R D 戈德曼, L A 莱因万德. 细胞实验指南 [M]. 黄培堂, 译. 北京: 科学出版社, 2001: 79.
Spector D L, Goldman R D, Leinwind L A. Cell laboratory manual [M]. Huang P T, translation. Beijing: Science Press, 2001: 79. (in Chinese)