

# 小鼠心肌细胞的体外培养\*

刘雨潇, 华进联, 张慧茹, 窦忠英

(西北农林科技大学 陕西省干细胞研究中心, 陕西 杨凌 712100)

**[摘要]** 对采用组织块法和酶消化法体外培养小鼠心肌细胞的结果进行了比较, 并对体外培养心肌细胞的生理活性进行了初步测定。结果表明, 用组织块法分离培养胎、乳鼠心肌可得到自主节律性搏动的心肌细胞; 分别用1 g/L 胶原酶+ 10 g/L BSA, 0.5 g/L 胰酶+ 1 g/L 胶原酶, 1 g/L 胰酶分离培养胎、乳鼠心肌, 均可得到大量心肌细胞, 且细胞活力较好, 能自主搏动20 d以上; 用上述2种方法分离培养成年鼠心肌, 结果均不理想; 在载有自主节律性搏动的小鼠心肌功能性细胞团的培养皿中加入Ca<sup>2+</sup>和肾上腺素后, 细胞团搏动速度加快, 搏动力加强; 加入K<sup>+</sup>后则细胞团搏动速度减缓, 搏动力减弱, 其对钾、钙、肾上腺素的反应与在体内基本一致, 表明体外培养的小鼠心肌细胞具有与在体心肌细胞相似的功能。

**[关键词]** 心肌细胞; 体外培养; 小鼠

**[中图分类号]** S865.1<sup>+</sup>3; Q954.6-33<sup>+</sup>2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9387(2005)01-0005-04

心肌细胞是一种终末分化细胞, 一旦成熟便失去了分裂增殖能力, 故各种原因引起的心肌损伤无法通过细胞增殖进行修复<sup>[1]</sup>。心肌梗死时死亡的心肌细胞, 将由没有收缩功能的疤痕组织代替, 这极可能引起心力衰竭。目前, 对于心肌坏死、心肌梗死等疾病大多采取保守治疗, 即只能控制心肌细胞进一步坏死, 而不能修复已坏死的细胞。具有生物学功能的心肌细胞数目下降是此类疾病患者死亡的根本原因。对治疗心力衰竭来说, 修复死亡或损伤心肌及改善心功能仍面临着极大的挑战<sup>[2]</sup>。近年来的研究<sup>[3]</sup>表明, 将体外培养的心肌细胞移入受损心脏可促进损伤心肌再生, 并改善心脏功能。因此, 体外培养的心肌细胞可代替药物治疗心脏疾病。此外, 体外培养的心肌细胞还可作为心脏病理学及生理学的研究材料, 用以研究心肌的细胞分化、生长及蛋白合成等方面的问题。目前有学者<sup>[4]</sup>报道, 成年动物心肌具有一定的分裂能力, 心脏及心肌细胞的微环境可诱导干细胞向心肌细胞分化。

心肌细胞原代培养的常用方法共有3种: 离体心脏灌注法、消化法和组织块法<sup>[5]</sup>。离体心脏灌注法是心肌细胞分离培养的最常用方法, 但对于小鼠来说, 实施心脏灌注有一定难度。组织块法操作简单、成功率高, 但采用此方法很难在短时间内获得大量

细胞。酶消化法适于培养大量组织, 但细胞对消化酶浓度及作用时间要求严格, 只有采用低浓度分段消化法才能获得活力较好的心肌细胞。本试验采用组织块法和酶消化法分离培养小鼠心肌细胞, 对小鼠心肌细胞原代培养方法的可靠性和稳定性进行了分析比较, 旨在筛选出一种更高效的心肌细胞培养法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 试验动物 由第四军医大学实验动物中心提供的怀孕13~16 d的昆白母鼠及出生1~6 d的乳鼠。

1.1.2 试剂 主要有DMEM, TCM 199(GBCO公司), 犊牛血清(国产), PBS与枸橼酸钠(国产自配), 胰蛋白酶(华美公司分装), EDTA(国产), 胶原酶I(Sigma)。

### 1.2 方法

1.2.1 组织块法 (1)取材。无菌取胎鼠、乳鼠和成年鼠心脏, 放入盛有PBS的无菌培养皿中, 反复清洗去掉血污, 将其移入另一培养皿中。(2)剪碎。用眼科剪将组织块剪成0.5~1 mm<sup>3</sup>的小块, 加入少量培养液, 待其贴壁后再增加适量培养液(DMEM + 100 mL/L 犊牛血清+ 0.1 mmol/mL 双抗+ 0.1

\* [收稿日期] 2003-12-30

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30200137); 国家“863”高技术研究发展计划项目(2002AA 216161)

[作者简介] 刘雨潇(1980-), 女, 陕西汉中, 在读硕士, 主要从事胚胎干细胞研究。

[通讯作者] 窦忠英(1939-), 男, 陕西西平人, 教授, 博士生导师, 主要从事哺乳动物胚胎工程研究。

mmol/L 二巯基乙醇)。(3)培养及形态观察。将培养皿放入37℃,体积分数5% CO<sub>2</sub>和饱和湿度条件下培养,2 d 换培养液1次,每间隔12 h 观察1次细胞生长情况。(4)继代培养。细胞铺满皿后传代培养。先弃去培养液,用PBS(-)清洗2~3次,加入适量2.5 g/L 胰酶轻轻振荡2~3次,并于显微镜下观察细胞消化情况,待细胞收缩、出现空隙时,加入等量细胞培养液终止消化。然后将细胞移入离心管中,1 000 r/min 离心5 min,弃去上清液,加入适量培养液反复吹打,将细胞制成悬液,计数。调整细胞浓度后将其接种到新的培养皿中培养。

1.2.2 酶消化法 (1)取材。同组织块法。(2)用眼科剪将组织剪至淤泥状,分为3份,分别加入1 g/L 胰酶,1 g/L 胶原酶+10 g/L 牛血清蛋白(BSA)和0.5 g/L 胰酶+1 g/L 胶原酶。(3)37℃条件下消化,胎鼠心肌消化8 min 即中止。(4)成年鼠和乳鼠心肌消化5~8 min 后自然沉淀,弃去上清液,在沉淀中加入3~4 mL 消化液,37℃条件下再消化3~5 min,以500 r/min 离心1~2 min 后,收集上清液,并在其中加入与消化液等量的含血清培养液终止消化。重复上述过程直到组织完全消化为止,集中各次所得的消化液。(5)以1 000 r/min 离心5 min,弃去上清液,加入适量培养液将细胞制成悬液,并取少量计数。(6)心肌细胞纯化。将剩余细胞悬液接种培养皿中,置于37℃,体积分数5% CO<sub>2</sub>条件下静置90 min,吸出培养液置于另一皿中。(7)心肌细胞成活率检测。取心肌细胞悬液2滴与台盼蓝混匀,接种于细胞计数板上,于显微镜下观察,着蓝色者为死细胞,活细胞不着色。计算心肌细胞台盼蓝摄取率。

1.2.3 Ca<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>和肾上腺素对心肌细胞搏动性的影响 在载有自主节律性搏动的小鼠心肌细胞团的培养皿中,分别加入1 mg/mL 葡萄糖酸钙,1 mg/mL KCl和1 μg/mL 盐酸肾上腺素,观察其对心肌细胞搏动率和搏动力的影响(共测定5个样本,每个测3次)。加入Ca<sup>2+</sup>后,测定心肌搏动速度变化,每10 min 测1次,每次记数3次。加入K<sup>+</sup>后,测定心肌搏动速度变化,每20 min 测1次,每次记数3次。加入肾上腺素后,测定心肌搏动速度变化,每10 min 测1次,每次记数3次。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同年龄小鼠心肌细胞的组织块法培养结果

2.1.1 胎鼠心肌细胞培养结果 胎鼠心肌细胞培养12 h 后,组织块周边出现向外延伸的透明细胞

突,随后细胞慢慢向外扩展,形态各异,表现为杆状、圆形、多角形或纤维形,折光性较强。皿中有许多跳动样的功能性心肌细胞团,跳动速度20~120次/min不等。从跳动着的细胞团中脱出的细胞多为圆形细胞,体积较大,胞核清晰,胞质丰富,10~20 d 内保持着自主节律搏动性,细胞生长迅速,1周便可铺满培养皿底。

2.1.2 乳鼠心肌细胞培养结果 乳鼠心肌细胞培养1~2 d 后开始脱细胞,细胞形态与乳鼠心肌细胞基本相似,细胞生长比较迅速,皿中少见跳动样细胞团。

2.1.3 成年鼠心肌细胞培养结果 成年鼠心肌细胞组织块培养6~7 d 时,部分细胞开始向外伸展扩增,细胞多为成纤维细胞,细胞生长缓慢,培养1月方可传代。

### 2.2 不同年龄小鼠心肌细胞酶消化法分离结果

2.2.1 胎鼠心肌细胞的消化次数及消化后台盼蓝摄取率 采用1 g/L 胰酶,1 g/L 胶原酶+10 g/L BSA,0.5 g/L 胰酶+1 g/L 胶原酶分段消化胎鼠心肌可得自主搏动的心肌细胞,其台盼蓝摄取率分别为(9.28±3.4)%,(8.72±1.1)%和(9.51±2.1)%。对上述结果进行比较,差异不显著( $P > 0.05$ ),表明低浓度酶单次消化法是较适宜的胎鼠心肌细胞分离方法。

2.2.2 乳鼠心肌细胞消化后台盼蓝摄取率 采用1 g/L 胰酶,1 g/L 胶原酶+10 g/L BSA 消化3~4次,0.5 g/L 胰酶+1 g/L 胶原酶消化2~3次均可得到自主搏动的心肌细胞,其台盼蓝摄取率分别为(8.26±1.36)%,(7.85±3.06)%和(8.36±2.91)%。3组之间差异虽不显著( $P > 0.05$ ),但仍可看出,1 g/L 胶原酶+10 g/L BSA 组心肌细胞存活率高于其他2组,这表明加入10 g/L BSA 有助于提高心肌细胞的存活率。此外,0.5 g/L 胰酶+1 g/L 胶原酶组消化效率最高(消化次数明显少于其他2组),这说明低浓度胶原酶和胰酶混用有助于提高消化效率。

2.2.3 成年鼠心肌细胞的消化结果 用3种消化液多次消化成年鼠心肌细胞的结果均不理想,细胞扩增极少,大部分为细胞碎片,故未测台盼蓝摄取率。

### 2.3 Ca<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>和肾上腺素对自律性搏动的心肌细胞团的影响

2.3.1 Ca<sup>2+</sup>对自律性搏动心肌细胞团的影响 加入Ca<sup>2+</sup>后可观察到心肌细胞团搏动力增强,其搏动

速度变化见表1。

表1  $Ca^{2+}$  对心肌细胞搏动速度的影响

Table 1 Effect of  $Ca^{2+}$  on the beating rate of cardiomyocytes

次/m in

被测样本 Sample	未加 $Ca^{2+}$ No $Ca^{2+}$	添加 $Ca^{2+}$ Adding $Ca^{2+}$				
		10 m in	20 m in	30 m in	40 m in	50 m in
A	36.0 ± 1.26	41.0 ± 3.21	44.0 ± 6.24	46.0 ± 2.38	45.0 ± 1.32	40.0 ± 3.65
B	3.0 ± 2.34	6.0 ± 1.22	9.0 ± 1.05	11.0 ± 3.56	10.0 ± 2.58	5.0 ± 3.32

由表1可看出,加入 $Ca^{2+}$ 后心肌细胞搏动速度明显加快,30~40 m in前后达到峰值。此后,细胞的搏动速度逐渐恢复。由此可见,外源性 $Ca^{2+}$ 可使体外培养的心肌细胞搏动速度加快,搏动力增强。

2.3.2  $K^+$  对自律性搏动心肌细胞团的影响 加入 $K^+$ 后可观察到心肌细胞团搏动力减弱,搏动速度减慢。未加 $K^+$ 的心肌细胞搏动速度为(99.00 ± 3.61)次/m in,添加 $K^+$ 后20 m in时,心肌细胞团的搏动速

度为(77.00 ± 6.24)次/m in,40 m in时为(33.00 ± 4.58)次/m in,加入 $K^+$ 1 h后,心肌细胞团停止搏动。由此可见,外源性 $K^+$ 可使体外培养的心肌细胞搏动速度减慢,搏动力减弱。

2.3.3 肾上腺素对跳动样心肌细胞的影响 加入肾上腺素后可观察到,心肌细胞团搏动力增强,搏动速度变化见表2。

表2 肾上腺素对心肌细胞跳动的影响

Table 2 Effect of adrenaline on the beating rate of cardiomyocytes

次/m in

被测样本 Sample	未加肾上腺素 No adrenaline	添加肾上腺素 Adding adrenaline		
		20 m in	30 m in	40 m in
C	23.30 ± 5.14	28.70 ± 2.51	31.30 ± 3.05	24.00 ± 2.00
D	12.70 ± 2.52	22.00 ± 2.64	25.00 ± 3.00	20.70 ± 2.12

由表2可看出,加入肾上腺素后心肌细胞搏动速度明显加快,约20~30 m in达到峰值。此后,细胞的搏动速度逐渐恢复。由此可见,外源性肾上腺素可使体外培养的心肌细胞搏动速度加快,搏动力增强。

### 3 讨论

#### 3.1 分离方法对心肌细胞体外培养的影响

组织块法主要用来分离培养新生动物心肌细胞,该方法简单易行,可得到较多心肌细胞。但由于心肌组织由多种细胞组成,用组织块法培养时,各种细胞混合生长,难以纯化。相比之下,酶消化法较好的心肌培养方法,自1969年Kono开创性地利用胰蛋白酶和胶原酶成功地分离出心肌细胞以来,人们在实践中不断完善心肌细胞分离技术<sup>[6]</sup>。胰蛋白酶主要用来分离组织间的蛋白质成分<sup>[7]</sup>,胶原酶仅对细胞间质有较强的消化作用,但其消化作用不受血清成分的影响。有文献报道<sup>[8-10]</sup>,采用低浓度胰蛋白酶(加EDTA或不加)或胶原酶分段消化胎鼠和乳鼠心肌可得大量能自主搏动的心肌细胞。本试验对前人的工作进行了总结和改进:单独使用1 g/L胰酶;在1 g/L胶原酶中加入10 g/L BSA,以降低酶对细胞的损伤;混合使用0.5 g/L胰蛋白酶和1 g/L胶原酶以提高消化效率。三者分离心肌细胞均,可得

大量自主搏动性心肌细胞,细胞的成活率大于90%。本试验显示低浓度酶(分段)消化法是理想的(乳)胎鼠心肌细胞分离方法,但2种消化酶混合使用,或在消化酶中加入保护剂效果则更佳。

#### 3.2 年龄对心肌细胞体外培养的影响

试验动物年龄对心肌细胞分离培养具有很大的影响,胎鼠心肌较乳鼠心肌更易分离培养,而成年鼠心肌用组织块法及酶消化法均难以得到能自主搏动的功能性心肌细胞。这表明组织分化程度越高,越难以进行体外培养。目前,培养乳鼠和胎鼠心肌均采用分段消化法。本试验结果表明,胎鼠不需分段,低浓度酶作用8~10 m in即可得到大量节律性搏动的心肌细胞团。

#### 3.3 体外培养心肌细胞对 $Ca^{2+}$ , $K^+$ 和肾上腺素的反应

正常心肌细胞具有自律性、兴奋性和收缩性,能自动发生节律性兴奋,凡能使钙离子内流加速、钾离子内流减速的因素均可使心肌细胞自律性加强、心律加快、收缩力增强。肾上腺素有促进钙内流的作用,使平台电位显著增加,儿茶酚胺通过膜的cAMP产生出来,cAMP通过蛋白激酶系统进行膜蛋白磷酸化,从而促进了钙内流,使心肌细胞收缩力加强,搏动加快。本试验在培养液中加入 $Ca^{2+}$ ,  $K^+$ 和肾上

腺素,并检测心肌细胞的变化情况,结果显示增加了体外培养的心肌细胞外液中的 $\text{Ca}^{2+}$ 和肾上腺素浓度后,搏动样心肌细胞团的跳动速度及强度显著增大,

加入 $\text{K}^+$ 则出现相反的结果。由此初步证明,体外培养的心肌细胞具有与在体心肌细胞相同的生理特性。

### [参考文献]

- [1] 段海峰,钱令嘉 心肌细胞分裂和增殖的研究进展[J]. 细胞生物学杂志, 2001, 23(3): 11- 13
- [2] XIAO Yong-fu. Cardiac application of embryonic stem cells[J]. Acta Physiological Sinica, 2003, 55(5): 493- 504
- [3] Soonpaa M H, Koh G Y, Klung M G, et al Fomation of nascent intercalated disks between grafted fetal cardiomyocytes and host myocardium [J]. Science, 1994, 264: 98- 101.
- [4] WANG Zheng-yu, Kenneth Cohen, Ying Shao, et al Ephrin receptor, EphB4, regulates ES cell differentiation of primitive mammalian hemangioblasts, blood, cardiomyocytes, and blood vessels[J]. Blood, 2004, 103: 100- 109.
- [5] 许秀芳,李温斌 成年大鼠心肌细胞培养方法的建立和形态学观察[J]. 首都医科大学学报, 2003, 2(21): 21- 23
- [6] 商立军,臧益民,臧伟进,等 成熟心肌细胞培养的历史回顾及进展[J]. 心功能杂志, 2000, 12(1): 37- 40
- [7] 司徒镇强,吴军正 细胞培养[M]. 西安:世界图书出版社, 2003 66- 67.
- [8] 王 涛,余志斌,谢满江 新生大鼠心肌细胞培养技术[J]. 第四军医大学学报, 2003, 24(2): 12- 13
- [9] 董 丰,龚开征,张振刚 原代心肌细胞培养方法探讨[J]. 大连医科大学学报, 2001, 23(4): 306- 308
- [10] 杨胜利,何作云,张 华 胎儿心肌细胞培养方法的建立[J]. 生物工程学报, 2003, 5(16): 321- 324

## Mouse cardiomyocytes culture *in vitro*

L IU Yu-xiao, HUA Jin-lian, DOU Zhong-yang

(Shaanxi Sub-center of National Stem Cell Engineering & Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** Two methods of cardiomyocytes culture in mice hearts were designed to evaluate the physiological activities of cultured cardiomyocytes *in vitro*. The results show that cardiomyocytes of ventricular muscle can be isolated by cultivating tissue pieces. The cultured cardiomyocytes were round-shaped or rod-shaped with spontaneous contractility; with  $1 \text{ g/L}$  collagenase+  $10 \text{ g/L}$  BSA,  $0.5 \text{ g/L}$  trypsin +  $1 \text{ g/L}$  collagenase and  $1 \text{ g/L}$  trypsin, a lot of cardiomyocytes having vitality can be obtained and can contract spontaneously, but the culture with digestive fluid is not very suitable for adult mice hearts. Supplement with  $\text{Ca}^{2+}$  and adrenaline in the medium reduced the rate and the power of contract of cardiomyocytes. However the opposite result is obtained after adding  $\text{K}^+$ .

**Key words:** cardiomyocytes; culture *in vitro*; mice