

大鼠心肌细胞体外培养特性研究^{*}

刘俊平^{1,2}, 曹鸿国¹, 安志兴¹, 赵慧英¹, 温叶飞¹, 张 涌¹

(1 西北农林科技大学 生物工程研究所, 陕西 杨凌 712100;

2 内蒙农业大学 动物科技学院, 内蒙古 呼和浩特 010018)

[摘 要] 对采用组织块法分离培养的大鼠心肌细胞进行了鉴定及相关的生物学特性研究, 以进一步用于心脏细胞工程、组织工程的种子细胞及其他方面的研究。结果显示, 分离培养出的心肌细胞呈多种形态, 整体形如铺路石样, 生长中的心肌细胞常伸出伪足, 形状为星形, 培养至第4天的心肌细胞常可相互交织形成细胞簇, 出现节律性的搏动; 心肌细胞的PAS糖原染色呈阳性, 胞浆内大量的糖原颗粒被染成红色; 细胞凋亡-Hoechst检测试剂盒荧光染色显示, 心肌细胞核内荧光物质分布均匀一致, 没有出现细胞凋亡时所特有的荧光致密浓染或碎块状致密浓染现象; 对第1代和第6代心肌细胞生长曲线测定显示, 心肌细胞生长曲线呈“S”型, 2代心肌细胞生长曲线趋于一致; 心肌细胞 α -sarcomeric actin (α -SA)免疫组化鉴定显示, 心肌细胞呈强阳性且具有较高纯度。上述结果表明, 利用该方法培养的心肌细胞具有较高的增殖能力和纯度, 可作为种子细胞用于心脏的细胞工程和组织工程及其他方面的研究。

[关键词] SD大鼠; 心肌细胞; 生物学特性

[中图分类号] S865.1⁺2; Q954.6-33⁺2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9387(2005)01-0009-04

心肌细胞除广泛用于生理、药理及病理学研究外, 还能分泌多种细胞因子。有研究^[1]表明, 大鼠心肌细胞能分泌抑制胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES)分化的因子, 心肌细胞的分离培养已成为重要而基本的技术。国内董世山等^[2]2003年报道了鸡心肌细胞的组织块培养及免疫组化鉴定; 韩嵘等^[1]和孟国良等^[3]利用大鼠心肌细胞条件培养液进行了小鼠ES细胞的分离培养。心肌细胞作为心脏细胞工程及组织工程的种子细胞, 已成为当今医学研究的热点。在心肌细胞的细胞工程与组织工程研究中, 大鼠和小鼠的心脏最为常用^[4]。目前, 国内外大多数实验室常采用心脏灌注法或酶消化法分离心肌细胞, 但大量酶的使用会影响心肌细胞的生长特性^[5], 而组织块培养法可以避免这些缺陷, 但国内尚未见组织块培养法分离的大鼠心肌细胞纯度及其生物学特性方面的研究报道。

本次试验采用组织块培养法分离培养大鼠心肌细胞, 并对其体外生物学特性进行了详细研究, 以期心脏的细胞工程、组织工程及ES细胞的深入研究等奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

2~3周龄Sprague-Dawley (SD)大鼠, 购自第四军医大学实验动物中心; α -SA单抗, SABC免疫组化试剂盒, DAB显色试剂盒, 购自武汉博士德公司; DMEM高糖培养基购自Gibco公司; FBS购自北京鼎国生物技术发展中心; 多聚赖氨酸为Sigma公司产品; 细胞凋亡-Hoechst染色试剂盒购自碧云天生物公司。

1.2 心肌细胞的培养

将2~3周龄SD大鼠颈部脱臼致死, 无菌条件下立即打开胸腔, 取出心脏, 用PBS液洗去心脏周围及心脏房室腔内的血液或血凝块, 去除心房部分, 将心室肌剪碎成1~2 mm³的组织块, 用小镊子摆放在培养皿中, 在37℃培养箱中培养。组织块贴附约2~3 h后, 补加DMEM培养液继续培养, 每天观察记录。待组织块周围的心肌细胞铺满培养皿时, 用胰酶消化传代。

1.3 心肌细胞的PAS糖原染色法

取事先经多聚赖氨酸处理的干净盖玻片, 放入

^{*} [收稿日期] 2004-02-13

[基金项目] 国家“863”高技术研究发展计划项目(2001AA213081)

[作者简介] 刘俊平(1963-), 男, 内蒙古呼和浩特人, 副教授, 在读博士, 主要从事动物胚胎工程和发育生物学研究。

E-mail: LiuJP8539@126.com

处理好的培养皿中,然后接种传代的心肌细胞,待细胞铺满整个盖玻片后,用小镊子从培养皿中轻轻取出心肌细胞爬片。浸泡盖玻片于固定液中,固定10 min,1% 过碘酸氧化5 min,蒸馏水洗数次, Schiff 试剂染色10 min,流水冲洗15 min,用苏木精染细胞核3 min,蒸馏水洗,梯度酒精脱水,二甲苯透明,树脂封固,显微镜下观察记录。取另1张大鼠心肌细胞的细胞爬片,在1%的淀粉酶中于37℃ 消化1 h,设为阴性对照。

1.4 细胞凋亡-Hoechst 荧光染色试剂盒检测

将事先经多聚赖氨酸处理的干净盖玻片置于培养皿内,接种心肌细胞。待细胞铺满培养皿时,取出细胞爬片,在细胞爬片上滴加0.5 mL 固定液,固定10 min。去除固定液,用PBS液洗2次,每次3 min,洗涤时晃动数次。吸尽液体,加入0.5 mL Hoechst 33258 染色液,染色5 min,晃动数次。滴1滴抗荧光淬灭封片液于载玻片上,盖上贴有细胞的盖玻片,使细胞接触封片液,切勿弄反。荧光显微镜下观察记录。

1.5 心肌细胞生长曲线的测定

将原代心肌细胞和经冻存复苏传至第6代的心肌细胞用胰酶消化传代并进行计数。按 1×10^4 /mL 接种心肌细胞于24孔培养板中,每间隔24 h 计数1次,每次3孔,每孔计数3次,连续计数3 d,求其平均值。

1.6 心肌细胞肌动蛋白的免疫组化及纯度鉴定

盖玻片事先经多聚赖氨酸处理,待心肌细胞接种前放入培养皿中,按 1×10^5 /mL 接种心肌细胞,待心肌细胞铺满盖玻片后,小心取出盖玻片,按免疫组化试剂盒操作说明进行心肌细胞鉴定。取SD大鼠的新鲜心肌冰冻切片用作阳性对照。在显微镜下任意选取整个视野下相邻的100个细胞进行阳性细胞计数,计算出阳性细胞所占比率。

2 结 果

2.1 心肌细胞的形态学观察

采用组织块培养法,原代心肌细胞一般在24 h 后会自动从组织块周围迁出。刚开始从组织块中迁出时,心肌细胞呈现梭形,伴随着迁出细胞的增多,组织块周围的心肌细胞呈现出不规则的圆形、三角形。细胞间紧密连接,整体形如铺路石样(图1),一般心肌细胞核内有1个或多个核仁。传代的心肌细胞一般铺展状况明显,常伸出伪足,形成不规则的星形(图2)。随着细胞生长密度的不断增加,细胞间伸出

的伪足会交织成网状。有时一些细胞紧密结合形成细胞簇,呈现出放射状或同心圆状,经过4~5 d 的培养,这些细胞簇会自发地搏动(图3)。



图1 SD大鼠的原代心肌细胞($\times 200$)

Fig 1 Primary cardiomyocytes of SD rat ($\times 200$)

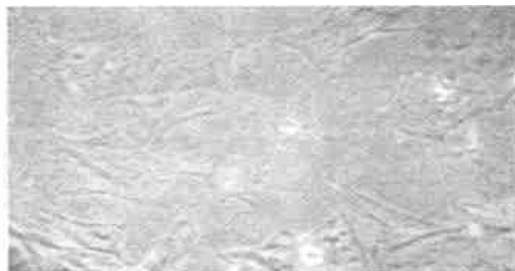


图2 SD大鼠传代生长中的心肌细胞($\times 200$)

Fig 2 Passaged cardiomyocytes of SD rat in growing ($\times 200$)

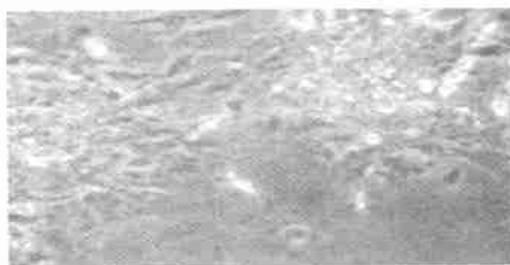


图3 SD大鼠的心肌细胞簇($\times 200$)

Fig 3 Clusters of SD rat cardiomyocytes in growing ($\times 200$)

2.2 心肌细胞的PAS糖原染色鉴定

心肌细胞经PAS糖原染色法鉴定(图4),结果显示被检测的心肌细胞呈现阳性,在心肌细胞胞浆中大量的糖原颗粒被染成粉红色,心肌细胞核呈现蓝色,非心肌细胞则不呈现粉红色。经1%淀粉酶处理的心肌细胞爬片显示为阴性。

2.3 细胞凋亡-Hoechst 染色试剂盒检测

细胞凋亡-Hoechst 染色试剂盒检测显示,细胞爬片上的心肌细胞核荧光物质分布均匀一致,没有出现细胞凋亡时表现的荧光致密浓染或碎块状致密浓染(图5)。在心肌细胞爬片上心肌细胞密度较疏的

部位,常可以观察到心肌细胞的核分裂相,表明心肌细胞处于较强的分裂增殖状态。心肌细胞有丝分裂

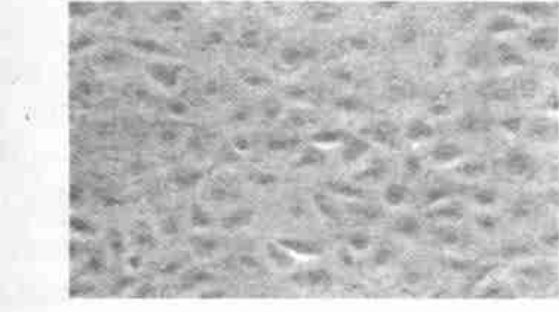


图4 SD 大鼠心肌细胞的PAS 糖原染色(×200)
Fig 4 PAS glucogen staining of cardiomyocytes of SD rat (×200)

2 4 心肌细胞生长曲线的测定

经过连续7 d 不间断的心肌细胞计数,绘制的心肌细胞生长曲线如图6所示,表明心肌细胞与机体的其他一些细胞一样,具有相似的分裂增殖状态,同样经历适应期、对数期、稳定期和衰退期4个阶段。第1代心肌细胞的生长曲线与第6代心肌细胞的生长曲线总体上具有相似的生长趋势,差异不显著。

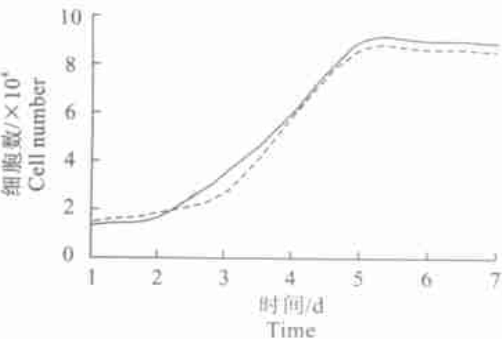


图6 心肌细胞生长曲线
——. 第1代生长曲线; ---. 第6代生长曲线
Fig 6 The growth curves of cardiomyocytes
——. 1st passage growth curve;
---. 6th passage growth curve

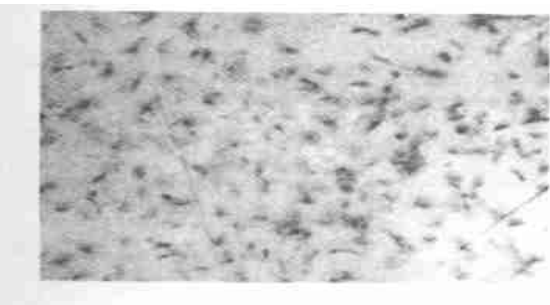


图7 SD 大鼠心肌细胞的α-SA 免疫组化鉴定(×200)
Fig 7 α-SA identification of rat cardiomyocytes (×200)

时形成的纺锤体荧光染色清晰可见,越是在心肌细胞密度较少的地方,这种现象就越多。

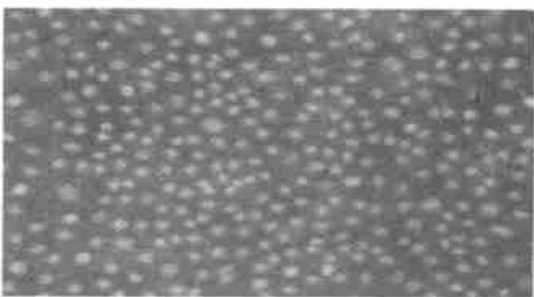


图5 SD 大鼠心肌细胞的Hoechst 染色(×200)
Fig 5 Hoechst staining of cardiomyocytes of SD rat (×200)

2 5 心肌细胞肌动蛋白的α-SA 免疫组化鉴定

经免疫组化染色后,细胞爬片上圆形、星形及三角形等多种形态心肌细胞的胞浆内可见到大量棕黄色颗粒,细胞核被染成蓝色(图7)。显微镜下随意选取4个视野,阳性心肌细胞平均为94.75%(表1)。阳性心肌细胞以胞浆中有大量棕黄色颗粒为特征。

表1 SD 大鼠心肌细胞的纯度

Table 1 Purity of SD rat cardiomyocytes				
分组 Group	总细胞数 Total cells	阳性 细胞数 Positive cells	阴性 细胞数 Negative cells	阳性 比率/% Positive rate
1	100	93	7	93
2	100	96	4	96
3	100	95	5	95
4	100	95	5	95

3 讨 论

3 1 组织块培养法用于心肌细胞分离培养的优点

目前,国内外多数研究人员在心肌细胞的分离中采用了心脏灌注法或酶消化法,这些方法存在着一些明显的缺点。如心肌灌流液的温度过高会增加心肌细胞的耗氧量和代谢率,影响心肌细胞功能;过低则会降低消化酶的活性,延长消化时间。另外在主动脉逆行灌流分离心肌细胞时,常因心脏体积小,主动脉插管困难及插管深度无法把握,引起离体心脏缺氧时间延长,分离的心肌细胞成活率低,电生理活性差。同时,由于需要多种不同钙浓度的灌流液和消化液共同作用,增加了实验难度和污染几率。Kono^[6]和Powell等^[7]较早报道了使用胶原酶分离细胞。采用酶消化法分离心肌细胞时,消化液中大量酶的利用使消化时间和程度不易控制,同时也使分离培养的心肌细胞易发生“钙反常”现象^[5]。曹春梅

等^[8]研究发现,早期分离的心肌细胞置于正常钙浓度溶液中,会因发生钙反常而死亡。相反,心肌细胞的组织块培养法则简化了操作流程,降低了实验成本,提高了实验效果,并可有效避免这些问题的干扰。

3.2 组织块培养法与心肌细胞的增殖活力

一般认为在成熟个体中,心肌属于最终分化细胞^[9]。本次试验对培养的心肌细胞进行了生长曲线测定及细胞凋亡检测试剂盒检测,结果显示离体培养的大鼠心肌细胞具有较强的分裂增殖能力,心肌细胞的凋亡现象较难见到。细胞凋亡(Apoptosis)是生物体细胞的一种自然衰亡现象^[10],形态上表现为胞浆浓缩、核染色质浓缩、细胞膜发泡、内陷和凋亡小体形成等变化^[10,11]。Hoechst 33258 荧光染料通过对心肌细胞核的荧光染色,可反映出心肌细胞的

增殖能力。

3.3 组织块培养法与心肌细胞的纯度

本次试验通过对心肌细胞的糖原染色与 α -SA免疫组化鉴定,检测了分离培养的心肌细胞的纯度。鉴定结果显示,采用此种方法分离培养的心肌细胞具有较高的纯度,可作为种子细胞用于心肌的细胞工程、组织工程及其他方面的研究。研究表明,在心肌梗死区移植活体心肌细胞,可以明显改善心脏功能^[12,13]。近年来,国外已成功地在体外复制了组织工程化心肌组织^[14,15]。Eschenhagen 等^[16]将鸡胚胎心肌细胞接种在组织支架上,在体外形成了具有收缩功能的心肌网络结构,这无疑是心肌组织工程成功的开端。通过将分离培养的心肌细胞接种到心脏病变部位或组织支架上,可以进行心肌细胞工程与组织工程等方面的深入研究。

【参考文献】

- [1] 韩 嵘,柴桂萱,尚克刚.小鼠心肌细胞条件培养基对形成小鼠胚胎干细胞集落的影响[J].北京大学学报(自然科学版),1997,33: 185-188
- [2] 董世山,乔 健,赵立红,等.鸡心肌细胞培养及免疫组化鉴定[J].中国兽医杂志,2003,39(3): 14- 15
- [3] 孟国良,滕 路,薛友纺,等.BALB/C 小鼠胚胎干细胞系建立的方法学探讨[J].遗传学报,2002,29(7): 565- 570
- [4] Leor J, Patterson M, Quinones M J, et al Transplantation of fetal myocardial tissue into the infarcted myocardium of rat A potential method for repair of infarcted myocardium? [J]. Circulation, 1996, 94(Suppl II): 332- 336
- [5] Dow J W, Harding N G, Powell T. Isolated cardiomyocytes I. Preparation of adult myocytes and their homology with the intact tissue[J]. Cardiovasc Res, 1981, 15(9): 483- 514
- [6] Kono T. Roles of collagenases and other proteolytic enzymes in the dispersal of animal tissues[J]. Biochim Biophys Acta, 1969, 178(2): 397- 400
- [7] Powell T, Twist V W. A rapid technique for the isolation and purification of adult cardiac muscle cells having respiratory control and a tolerance to calcium [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1976, 72(1): 327- 333
- [8] 曹春梅,张 雄,陈莹莹,等.不同用途的心室肌细胞的分离[J].浙江大学学报(医学版),2003,32(1): 51- 55
- [9] Bax J J, Visser F C. Time course of function recovery of stunned and hibernating segments after surgical revascularization [J]. Circulation, 2001, 104(12): 314- 318
- [10] Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, et al Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis [J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 1999, 15: 269- 290
- [11] Liao W T, Yang Y, Wu X F. Expression and function analysis of an inhibitor of apoptosis protein from Trichoplusia ni [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 293(2): 675- 679
- [12] Atkins B Z, Lew C W, Kraus W E, et al Intracardiac transplantation of skeletal myoblasts yields two populations of striated cells in situ [J]. Ann Thorac Surg, 1999, 67(1): 124- 129
- [13] Etzion S, Chiu R C, Zibaitis A, et al Influence of embryonic cardiomyocyte transplantation on the progression of heart failure in a rat model of extensive myocardial infarction [J]. Mol Cell Cardiol, 2001, 33(7): 1321- 1330
- [14] Zimmermann W H, Schneiderbanger K, Schuhert P, et al Tissue engineering of a differentiated cardiac muscle construct [J]. Circ Res, 2002, 90(2): 223- 230
- [15] Eschenhagen T, Didi M, Münzel F, et al 3D engineered heart tissue for replacement therapy [J]. Basic Res Cardiol, 2002, 97(Suppl 1): 1146- 1152
- [16] Eschenhagen T, Fink C, Remmers U, et al Three-dimensional reconstitution of embryonic cardiomyocytes in a collagen matrix: a new heart model system [J]. FASEB, 1997, 11: 683- 694

(下转第17页)

appearance of these cells were studied by light microscope. The results are as follows: The fibroblast cell and the bovine mammary epithelial cells grow in different areas. The bovine mammary epithelial cells were cultured *in vitro* through single-cell afloat, which formed island monolayer aggregates, then the cells propagated and formed dome-like construction. The cell nucleus is circular or oval with 2-4 cores. In the culture medium with estrogen, the nucleus type changed. The mammary epithelial cells can be developed into many cell types, the majority of which are short shuttle-like or guboidal. The cells connected with each other properly and formed net-like construction.

Key words: *in vitro* culture; mammary epithelial cell; the appearance of cells

(上接第12页)

Abstract ID: 1671-9387(2005)01-0009-EA

Study on culture characteristics of rat cardiomyocytes *in vitro*

LIU Jun-ping^{1,2}, CAO Hong-guo¹, AN Zhi-xing¹,
ZHAO Hui-yang¹, WEN Ye-fei¹, ZHANG Yong¹

(1 Institute of Bio-engineering, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 College of Animal Science and Animal Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, Inner Mongolia 010018, China)

Abstract: Rat cardiomyocytes were isolated to obtain cultured cardiomyocytes by means of tissue culture, which were cultivated and identified to study their biological characteristics so as to be used in heart cell engineering, seed cells tissue engineering and other research fields. Results indicated that cardiomyocytes isolated and cultivated had many shapes, most of which are like slabstone. Cardiomyocytes with pseudopod became star-like in their growth. Cardiomyocytes in culture on 4th day can interlace one another and became cell clusters with rhythmical beats; PAS glucogen staining of cardiomyocytes was positive, glucogen in cytoplasm were stained to purple; cardiomyocytes were negative with Hoechst cell apoptosis assay kit; Growth curve of 1st and 6th passage cardiomyocytes were S-shaped; Cardiomyocytes were strong positive and had high purity with α -sarcomeric actin (α -SA) immunohistochemistry assay. Above all, cardiomyocytes can be used in heart cell engineering and tissue engineering and in other fields as feed cells.

Key words: SD rat; cardiomyocytes; biological characteristics