基础研究 文章编号:0253-3626(2011)08-0910-03

急性分离大鼠心房肌细胞方法的改进及对钾、钠、钙电流的记录

龙 毅,周亚南,殷跃辉
(重庆医科大学附属第二医院心血管内科,重庆 400010)

【摘 要】目的:介绍 1 种改进的成年 SD 大鼠心房肌细胞分离方法。方法:SD 大鼠麻醉后,快速取出心脏,将主动脉结扎在 Langendorff 灌流装置上,无钙台式液灌流 5 min 后换用酶液灌流 10~12 min,剪取心耳组织于 KB 液中剪碎并吹打,200 目细胞筛网过滤,将细胞滤液 500 r 离心 2 min,梯度复钙后将细胞悬液置于 4℃冰箱中静置 1 h,应用全细胞膜片钳技术记录大鼠心房肌细胞瞬时外向钾电流(I_{to})、快钠电流(I_{Na})以及 L 型钙电流(I_{Ca-L})。结果:本方法分离出的心房肌细胞存活率高,结构完整,具有良好的耐钙性,可成功记录出 I_{to}、I_{Na}、I_{Ca-L}。结论:改进的实验方法可获得大量耐钙心肌细胞,并具有正常的电生理特性。

【关键词】膜片钳;心肌细胞;瞬时外向钾电流;钠电流;L 型钙电流;细胞分离
【中国图书分类法分类号】R331.3+8 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-01-01

A modified method for isolation of rat cardiomyocytes and recording of potassium, sodium and calium current

LONG Yi, ZHOU Ya-nan, YIN Yue-hui
(*Department of Cardiology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To introduce a modified isolation method for acquiring rat atrial myocytes. *Methods*: The heart of adult sprague-dawley(SD) rat was rapidly excised after successful anesthesia and mounted on a Langendorff apparatus. It was perfused retrogradely via the aorta for five minutes with Ca^{2+}-free Tyrode's solution and then perfused with collagenase dissolved in Tyrode's solution for ten to twelve minutes, and then the atrial appendage was sheared and stored in a kraftbruhe(KB) solution. Thereafter tissue was minced and filtrated. After being centrifuged at 500 r for 2 min, the isolated myocytes were performed gradient calcium reintroduction and allowed to pellet via gravity for 1 hour in refrigerator, then the transient outward potassium current, sodium current and L-tpye calium current were recorded by the use of patch clamp whole cell recording technique. *Results*: The survival rate of atrial myocytes was high and the morphous and construction of atrial myocytes were fine and the property of calcium-tolerance was

作者介绍:龙 毅(1983-),男,硕士,
研究方向:心脏电生理与心律失常。
通信作者:殷跃辉,男,教授,Email:yinyuehui63@yahoo.com.cn。
基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30871075)。

(4):1255-1265.
[2] Small P M.Tuberculosis:a new vision for the 21st century[J]. Kekkaku,2009,84(11):721-726.
[3] Mustafa A S,Al-Attiyah R,Hanif S N,et al.Efficient testing of large pools of Mycobacterium tuberculosis RD1 peptides and identification of major antigens and immunodominant peptides recognized by human Th1 cells[J].Clin Vaccine Immunol,2008,15(6):916-924.
[4] Yang C,He Y L,Xu L,et al. GLS/IL-12-modified Mycobacterium smegmatis as a novel anti-tuberculosis immunotherapeutic vaccine [J].Int J Tuberc Lung Dis,2009,13(11):1360-1366.
[5] Majlessi L,Brldin P,Brosch R,et al.Influence of ESAT-6 secretion system 1(RD1) of Mycobacterium tuberculosis on the interaction between mycobacteria and the host immune system[J].Immune system.J Immunol,2005,174(6):3570-3579.
[6] Brldin P,Majlessi L,Marsollier L,et al.Dissection of ESAT-6 system 1 of Mycobacterium tuberculosis and impact on immunogenicity and virulence[J].Bottai Infect Immun,2006,74(1):88-98.
[7] Demangel C,Brodin P,Cockle P J,et al.Cell envelope protein PPE68 contributes to Mycobacterium tuberculosis RD1 immunogenicity independently of a 10-kilodalton culture filtrate protein and ESAT-6 [J].Infect Immun,2004,72(4):2170-2176.
[8] Okkels L M,Follmann F.PPE protein(Rv3873)from DNA segment RD1 of Mycobacterium tuberculosis:strong recognition of both specific T-cell epitopes and epitopes conserved with the PPE family[J]. Infect Immun,2003,71:6116-6123.
[9] Liu X Q,Dosanjh D,Varia H,et al.Evalution of T-cell response to novel RD1-and RD2-encoded Mycobacterium tuberculosis gene products for specific detection of human tuberculosis infection[J].Infect Immun,2004,72:2574-2581.
[10] Girard M P,Fruth U,Kieny M P.A review of vaccine research and development: tuberculosis[J].Vaccine,2005,23(50):5725-5731.
[11] Hernandez-Pando R,Castanon M,Espitia C,et al.Recombinant BCG vaccine candidates[J].Curr Mol Med,2007,7(4):365-372.

(责任编辑:张学颖)

good.The transient outward potassium current, sodium current and L-tpye calium current were recorded successfully. *Conclusion*: The modified isolation method can produce large numbers of single calcium-tolerance myocardial cells and normal electrophysiological properties.

【Key words】 patch clamp; atrial myocytes; transient outward potassium current; sodium current; L-type calium current; cell isolation

自从 Kono 和 Powel 先后采用酶解法急性分离成年大鼠心肌细胞以来，该技术已被国内外实验室广泛采用。近年来，随着心脏电生理基础研究和膜片钳技术的广泛开展，急性分离单个耐钙心肌细胞的方法显得尤其重要。本研究在分析以往实验方法的同时[1-4]，结合自身在实践中探索的经验，建立了一种快捷、有效的耐钙心肌细胞分离方法，并通过全细胞膜片钳记录了瞬时外向钾电流、快钠电流以及 L 型钙通道电流，证实本方法分离的心肌细胞具有良好的电生理学特性，能满足膜片钳实验的要求。

1 材料和方法

1.1 实验动物

成年健康 SD 大鼠 20 只，雌雄不拘，体重 200 ± 20 g，由重庆医科大学动物实验中心提供。

1.2 试剂

牛血清白蛋白(Albumin)、N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸(HEPES)、氯化铯(CsC1)、氢氧化铯(CsOH)、氯化四乙胺(TEA-C1)、三磷酸腺苷镁(MgATP)均购于 Sigma 公司；Ⅱ型胶原酶(Collagenase Ⅱ)购于 Warshington 公司；其余试剂均为国产分析纯。

1.3 溶液(mmol/L)

无钙台式液：NaCl 137、KCl 5.4、$MgCl_2$ 1.0、NaH_2PO_4 0.33、HEPES 10、Glucose 10，用 NaOH 滴定 pH 至 7.4；酶液：将Ⅱ型胶原酶(0.3 mg/ml)、Taurine(1 mg/ml)、Albumin(1 mg/ml)、$CaCl_2$(20 μmol/L)加入 50 ml 无钙台式液中，用 NaOH 滴定 pH 至 7.4；KB 液：KOH 85、KCl 30、KH_2PO_4 30、$MgCl_2$ 1.0、Glucose 10、Albumin 1.0、Glutamic acid 50、Taurine 20、HEPES 10、EGTA 0.5，用 KOH 滴定 pH 至 7.4；I_{to} 电极外液：NaCl 140、KCl 4、$CaCl_2$ 1.5、$MgCl_2$ 1.0、$CdCl_2$ 0.5、HEPES 5.0、Glucose 10，用 KOH 滴定 pH 至 7.4；I_{to} 电极内液：KCl 140、$MgCl_2$ 1.0、KH_2PO_4 5、HEPES 10、EGTA 5，用 KOH 滴定 pH 至 7.4；I_{Na} 电极外液：NaCl 30、TEA-C1 110、KCl 5.4、$CaCl_2$ 0.1、$MgCl_2$ 1.0、NaH_2PO_4 0.33、HEPES 10.0；I_{Na} 电极内液：CsCl 120、$CaCl_2$ 1.0、$MgCl_2$ 5.0、MgATP 5.0、EGTA 11、HEPES 10、Glucose 10；I_{Ca-L} 电极外液：TEA-C1 136、$CaCl_2$ 2.0、$MgC1_2$ 1.0、HEPES 10、Glucose 10，pH 用 CsOH 调至 7.4；I_{Ca-L} 电极内液：CsCl 130、$MgCl_2$ 2.0、HEPES 10、EGTA 15、MgATP 3.0、Glucose 10，pH 用 CsOH 调至 7.2。

1.4 具体步骤

(1)提前将无钙台式液、KB 液、酶液用 100%O_2 饱和 30 min，37℃预热灌流系统，超纯水重复冲洗灌流装置 5 min；(2)大鼠腹腔注射肝素 200 U/kg，20 min 后，腹腔注射水合氯醛(0.3 ml/100 g)待充分麻醉后，迅速开胸取出心脏置于 4℃无钙台式液中，待心脏自主搏动数次排出心腔内残血，迅速修剪主动脉以及多余组织；(3)将心脏以主动脉逆行悬挂于 Langendorff 装置上以恒压模式灌流，先用无钙台式液灌流 5 min，待流出液为清亮无色，换用酶液循环灌流 8~10 min；(4)心脏变得柔软松弛，颜色变为淡黄略带红润时停止灌流，剪取左右心耳于 KB 液中，剪成约 1 mm^3 大小的组织块，大头吸管吹打分散，用 200 目细胞筛过滤，将细胞悬液低速离心(500 r/min)2 min，弃上清；(5)将心肌细胞收集于 KB 液中，梯度复钙至 1.5 mmol/L，温室下静置 1 h。灌流全过程均在室温下进行，并以 100%O_2 持续饱和灌流液和 KB 液。

1.5 膜片钳全细胞记录方法

吸取含细胞的 KB 液于自制灌流槽中，静置 20 min 待细胞贴壁，用纯 O_2 饱和的电极外液灌流 5~10 min，流速 2~3 ml/min，冲去细胞残片。玻璃毛坯经微电极拉制器分两步拉制成尖端直径约 1 μm 的微电极，入水后阻抗控制在 2~4 MΩ，并自动补偿液接电位。调节三维液压操纵器将电极尖端接触目标细胞，通过负压系统给出适当的负压使封接达到 GΩ后，自动补偿快电容，破膜形成全细胞模式并自动补偿慢电容和串联电阻，稳定 2 min 后记录 I_{to}、I_{Na}、I_{Ca-L}。

2 结 果

2.1 心肌细胞形态学观察

在倒置显微镜下可观察到急性分离的大鼠心房肌细胞成活率在 75%以上，梯度复钙后耐钙心肌细胞数量在 50%以上，耐钙细胞呈静止状，偶可见轻微收缩，形态呈长杆状，细胞膜完整光滑，横纹清晰，立体感强，折光性好，细胞表面无“涂泡”现象(见图 1、2)。



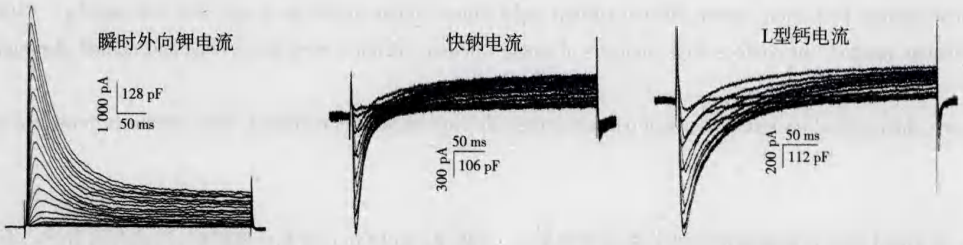
图 1 200 倍镜下大鼠心房肌细胞



图 2 400 倍镜下大鼠心房肌细胞

2.2 记录大鼠心房肌细胞 I_{to}、I_{Na}、I_{Ca-L}

I_{to} 的刺激方案：钳制电压在-40 mV 失活快钠通道，以 5 mV 步阶从-40 mV 去极化到+60 mV，刺激波宽 300 ms，刺激频率 0.2 Hz，可引出具有时间和电压依赖性的外向电流(图 3A)，其失活和激活均较快；I_{Na} 的刺激方案：细胞破膜后钳制电压在-120 mV，测试电压从-80 mV 去极化至+20 mV，阶跃



A. 瞬时外向钾电流　　B. 快钠电流　　C. L 型钙离子电流

图 3　大鼠心房肌细胞 I_{to}、I_{Na}、I_{Ca-L}

为 10 mV，刺激频率 0.2 Hz，时程 250 ms，可记录到快速激活、快速失活的尖峰状内向电流（图 3B）；I_{Ca-L} 的刺激方案：钳制电压-40 mV，测试电压从-40 mV 开始，以 5 mV 跃阶刺激至+60 mV，时程 250 ms，刺激频率 0.2 Hz，可引出具有时间和电压依赖性的内向电流（图 3C），失活相对缓慢。

3　讨　论

急性分离心肌细胞是膜片钳实验中获得单个高质量心肌细胞的主要方法，但分离过程中诸多因素（如：温度、酶量、灌流时间、水质、pH 值、操作熟练度等）均可影响细胞数量和质量。本实验在总结以往方法的同时，结合自身经验，摸索出一种快捷高效的分离方法。

国内外实验室通常采用 Langendorff 4 步酶解法分离心肌细胞，简述为：(1)台式液灌流；(2)无钙台式液灌流；(3)无钙酶液灌流；(4)无钙或低钙台式液灌流。本实验通过改进采用 Langendorff 2 步酶解法分离心肌细胞，即：(1)无钙台式液灌流；(2)低钙酶液灌流。该方法最大优势在于较大限度地缩短心脏灌流时间，减轻心肌缺血缺氧，简化了操作步骤，具体细节详述如下。

第一步用无钙台式液灌流，能有效解离心肌细胞间桥粒和闰盘，增大细胞间的空隙，为胶原酶消化做好准备。以往方法采用台式液灌流，目的是通过台式液中钙离子可加强心脏收缩以排出心腔和冠脉内残血，防止冠脉内微血栓形成。理论上，灌流过程中心脏持续跳动，会增加细胞氧耗，降低细胞活性。实践也发现用台式液灌流，心肌在短时间内常易部分或全部出现苍白，难以分离出耐钙细胞。实验中只要摘取大鼠心脏动作娴熟和预先肝素化，一般在 20 s 内心脏仍可通过自主收缩排出残血，故细胞分离的第一步最好使用无钙台式液灌流。此外，无钙台式液灌流可增加细胞膜通透性，当下一步含钙酶液灌流时，易引起钙超载，导致细胞的剧烈收缩甚至挛缩死亡，因此需把握好液灌流时间，一般不宜超过 5 min。

第二步采用低钙酶液灌流，Ⅱ型胶原酶活性依赖于溶液中的 Ca^{2+} 浓度，但高浓度的 Ca^{2+} 浓度又会减弱酶活性；此外，酶液中加入低浓度 Ca^{2+} 可在分离过程中维持一定的细胞外钙浓度，为细胞下一步直接进入高 Ca^{2+} 环境形成缓冲。

以往方法多采用再次灌流无钙台式液以终止酶液消化，但灌流时间延长可明显破坏细胞膜上糖蛋白以加速 Na^+ 内流，使后期复钙时易发生钙超载。故本实验采用低速离心（500 r/min，2 min）的方法终止酶液对细胞的继续消化，该方法的优势在于：(1) 能迅速使细胞表面的残存酶液和细胞分离；(2)进一步缩短灌流时间，减轻细胞膜糖蛋白的破坏和细胞内氨基酸、蛋白质的丢失，使细胞能长时间保持活性状态。

本实验采用梯度复钙法复钙。该法：(1)补偿因无钙台式液灌流造成胞内 Ca^{2+} 丢失；(2)使心肌细胞逐步适应直至生理状态的 Ca^{2+} 浓度；(3)降低因钙浓度突升到生理浓度引起心肌细胞钙超载的概率。因此，通过梯度复钙法恢复钙库内的 Ca^{2+} 存储量，对于膜片钳记录 L 型钙离子通道电流以及共聚焦扫描心肌细胞“钙火花”尤为重要。

本实验注意点总结如下：(1)严格控制实验大鼠的体重，心脏大小直接影响灌流时间和所需酶量；(2)分离细胞所用的液体均需使用超纯水配制；(3)酶采用 Worthington 公司的Ⅱ型胶原酶（出厂批号最好相同）；(4)心肌细胞对酸碱度敏感，灌流液的 pH 值控制在 7.35~7.40；(5)开胸摘取大鼠心脏时，注意升主动脉根部保留的长度，一般应在 5 mm 以上，以保证灌流管在左右冠脉口以上，太短会影响冠脉灌流，甚至出现冠脉内无灌流。(6)确保离体心脏在灌流装置的悬挂端温度是 37℃，便于充分发挥酶活性，心肌细胞的贮存以 4℃为宜；(7)当心脏灌流到颜色淡黄略带红润时，为剪取组织最好时机，一旦颜色变为苍白，几乎难以获得单个耐钙细胞。(8)膜片钳实验中如未形成兆级封接前细胞容易破膜，提示酶液消化过度以致膜脆性增加。相反，如果细胞在兆级封接后出现难破膜，细胞韧性大，提示酶消化时间不够。最后，心肌细胞分离的每一步均很重要，实验条件需反复摸索，每个细节都要认真仔细，操作熟练，手法得当，否则均可影响细胞急性分离的效果。

参　考　文　献

[1] 于继强，高　尔，韩慧蓉.钙耐受大鼠心肌细胞分离方法研究[J].中国药房，2009，20(4)：224-225.

[2] 刘恭鑫，顾全堡，郭　棋，等.大鼠、豚鼠心肌细胞的简单、快速分离[J].中国应用生理学杂志，1997，13(4)：361-362.

[3] 熊寿贵，余更生.成年大鼠心肌细胞急性分离方法探讨[J].重庆医科大学学报，2008，33(7)：865-867.

[4] 王如兴，蒋文平.正常耐钙 Spraque-Dawley 大鼠心室肌细胞分离方法及体会[J].中国心脏起搏与心电生理杂志，2007，21(1)：59-62.

（责任编辑：冉明会）