技术方法 文章编号:0253-3626(2009)05-0600-04

新生大鼠心肌细胞原代培养方法的改良

王佳南[1],张晓刚[1],汤为学[2],郑丽娜[1]

(1. 重庆医科大学附属第一医院心内科,重庆 400016;2. 重庆医科大学病理生理学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨更为简便的新生大鼠心肌细胞原代培养的方法,使分离的心肌细胞达到理想的数量、存活率和纯度。方法:用胰蛋白酶和Ⅱ型胶原酶联合消化,分离新生大鼠心肌细胞,进行体外培养,观察心肌细胞形态学变化,并以细胞免疫荧光进行心肌细胞纯度鉴定。结果:心肌细胞分离良好,收获细胞数量及存活率高,可贴壁搏动生长,免疫荧光显示培养的心肌细胞纯度达95%以上。结论:改良的细胞培养技术可获得生长状态良好的心肌细胞。

【关键词】心肌细胞;原代培养;新生大鼠

【中国图书分类法分类号】Q813.11 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-03-14

Improvement of primary culture of cardiac myocytes in neonatal rat

WANG Jia-nan, et al

(*Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To discuss how the more convenient primary culture method of rats' cardiac myocytes to increase the quantity, livability and purity of isolated cells. *Methods*: Neonatal rats' cardiac myocytes were isolated by co-digestion of trypsin and collagenase II, and then cultured in vitro. Morphocytology changes were observed and cell purity was evaluated by immunofluorescence. *Results*: Isolation of cardiomyocytes was with a good quantity and high livability. Cells adhered and impulsed well. Immunofluorescence staining confirmed the cell with purity higher than 95%. *Conclusion*: The modified cell culture method can obtain the Cardiomyocytes with good growth state.

【Key words】Cardiac myocyte; Primary Culture; Neonatal rat

原代培养的心肌细胞具有自发搏动性、可控性好、重复性好等结构与功能特点[1],是研究单一因素对心肌细胞影响的理想模型,可在不受神经体液因素的影响下进行电生理、受体、药理及毒理、分子生物学等方面的研究[2-5],同时也是心肌组织工程种子细胞的主要来源之一。如何尽可能地获得较多的单细胞、较高的细胞存活率,同时尽可能地除去心脏的非心肌细胞(Non-myocardial cell, NMCs)是心肌细胞培养中关键的问题。本文就此进行了研究,参照 Simpson[6],张颖等[7]的方法并加以改良,摸索总结出一套简便、有效的新生大鼠心肌细胞的培养技术。

1 材料和方法

1.1 实验动物

0.5 ~ 1 d 的 SD 大鼠:由重庆医科大学实验动物中心提供。

1.2 主要试剂

D-Hank'S 液(Gbico),胰蛋白酶(Gibco),Ⅱ型胶原酶(Sigma),EMDM-H(Gibco),优等胎牛血清(天津 TBD),DAPI(sigma),cTnT 抗体(武汉博士德公司),台盼蓝(实验室提供)。

1.3 实验方法

1.3.1 分离培养心肌细胞 选用 0.5 ~ 1 dSD 大鼠 6 只,75% 酒精浸泡,碘酊消毒皮肤,在无菌条件下开胸取出心脏,仔细去除心脏相连大血管和心房组织(留心尖部),于 4℃的 D-Hank'S 液中漂洗 3 ~ 4 次,以去除残存血液,眼科剪将心尖部组织剪成 1 mm^3 碎块后,加入 4 ml 的 0.125%胰蛋白酶溶液,于 37℃恒温水浴箱中消化 3 min,然后弃上清。于剩余沉淀中加入混合消化液 5 ml (0.125%胰蛋白酶 +0.1% Ⅱ型胶原酶),置 37℃水浴消化 8 ~ 10 min,其间振荡 2 ~ 3 次,静置后将上清液移入离心管中,加含 10% 胎牛血清预冷的 DMEM-H 培养液终止消化。随后用上述方法反复消化 7 ~ 8 次至组织块基本消化完毕。收集各次上清液并终止消化后,200 目的尼龙网筛过滤去除残留组织块,以 1 000 r/min 速度

作者介绍:王佳南(1983-),男,硕士,
研究方向:心血管疾病病理生理。

通讯作者:张晓刚,男,教授,E-mail:zxg0233@sina.com。

离心 8 min，将所得的细胞与培养液混悬后，采用差速贴壁分离法去除心肌成纤维细胞（其原理是根据成纤维细胞的贴壁速度明显快于心肌细胞的贴壁速度，故可将细胞悬液接种在适当大小的培养瓶中，静置一定时间后轻轻振摇倾出尚未贴壁的心肌细胞重新接种，而原培养瓶中的贴壁细胞几乎全部均为成纤维细胞），每次 2 h，共进行 2 次，将未贴壁的心肌细胞悬液吸出，调整细胞密度接种于培养板中。48 h 首次换液，以后根据情况 2～3 d 换液。

1.3.2 观察指标的测定

1.3.2.1 细胞收获数量及存活率 取分离消化的细胞悬液加等体积台盼蓝，充分混匀后滴入血细胞计数池中，计数单细胞总数及死亡细胞数。收获细胞数量=（血计数池 4 大格计数细胞总数 /4）×2×10^4×毫升数；存活率%=（4 大格细胞数−4 大格死亡细胞数）/ 细胞总数×100%，计数 6 次，求平均值。

1.3.2.2 心肌细胞形态学的观察 将培养 2、8、24、48、72 h 的细胞在倒置相差显微镜下观察心肌细胞形态。

1.3.2.3 心肌细胞纯度检查 采用 DAPI 标记细胞核（含有心肌细胞和成纤维细胞），抗肌钙蛋白（cTnT）抗体的免疫荧光染色对心肌细胞进行纯度鉴定。细胞纯度%=cTnT 阳性细胞染色数 /DAPI 核染细胞总数×100%。

2 结 果

2.1 细胞存活率

将经 2 次差数贴壁后的心肌细胞悬液用台盼蓝染色，滴入细胞计数池中计数，活的心肌细胞不着色，死亡的细胞着蓝色，计算收获细胞总数及心肌细胞存活率。重复 6 次，获得心肌细胞总量达 6×10^6，即刻活细胞存活率平均达到 76.37%（见表 1）。

表 1 心肌细胞即刻存活率测定

实验次数	死亡细胞数	细胞总数	细胞存活率 /%
1	21	109	80.73
2	25	104	75.96
3	23	99	76.77
4	28	108	74.07
5	25	98	84.69
6	27	103	74.29

2.2 心肌细胞形态学的观察

在倒置相差显微镜下观察，刚分离的心肌细胞呈圆形（图 1 红色箭头），培养 2 h 后成纤维细胞基本完全贴壁（图 1 黑色箭头），而少数心肌细胞 8 h 左右开始贴壁，少数贴壁的单个心肌细胞出现了自发性搏动，搏动的频率、节律各不同（图 2）。24 h 后搏动的心肌细胞百分率大约为 50%，搏动频率较分散，约 30~50 次/min（图 3）。至 48 h 视野下细胞呈梭形，板形，三角形或扁平不规则形，折光度较高，细胞中隐约可见细胞核，搏动的心肌细胞百分率大于 90%，搏动频率多集中在 50~80 次/min（图 4），72 h 后细胞充分铺展，贴壁牢固，少数局部呈均一搏动频率，可达 80~100 次/min（图 5）。

2.3 心肌细胞纯度检查

取培养 72 h 的心肌细胞，DAPI 标记细胞核 2 h，PBS 清洗 5~6 遍后换上新鲜培养液，6 h 后进行免疫荧光实验。DAPI 标记细胞核呈蓝光（图 6），荧光显微镜下细胞核的数量代表细胞总数；心肌细胞肌钙蛋白抗原表达呈阳性（图 7），而非心肌细胞呈阴性。因此，肌钙蛋白阳性率反映了心肌细胞纯度（细胞纯度%=cTnT 阳性细胞染色数/DAPI 核染细胞总数×100%），可作为心肌细胞纯度鉴定的指标。镜下任选 6 个视野，每个视野计数 20 个细胞，每次实验



图 1 2 h 贴壁成纤维细胞×200（黑色）
未贴壁心肌细胞×200（红色）

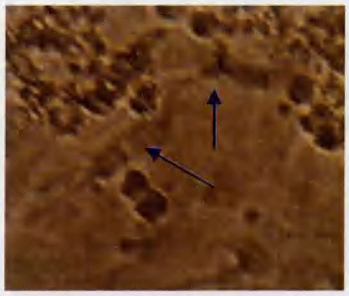


图 2 8 h 贴壁心肌细胞×200

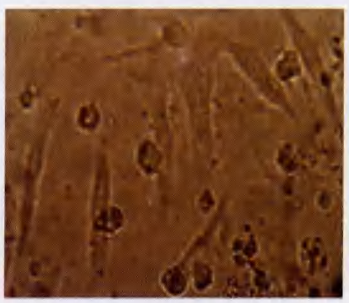


图 3 24 h 心肌细胞×200

共计数 120 个细胞，重复 3 次，阳性细胞的比率分别为 98.33%，94.17%和 96.67%，3 次实验阳性细胞的平均比率为 96.39%（见表 2，图 8）。



图 4 48 h 心肌细胞 ×200

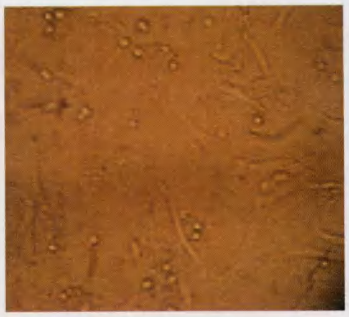


图 5 72 h 心肌细胞×100

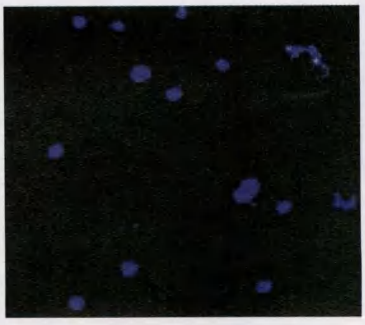


图 6 DAPI 标记细胞核×100



图 7 免疫荧光 cTnT 阳性细胞×100

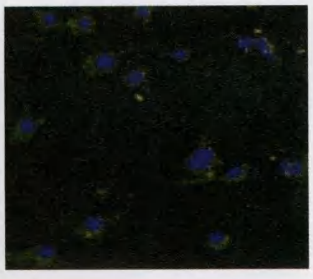


图 8 细胞核 DAPI 荧光染色与 cTnT(+)免疫荧光重叠图片×100

表 2 心肌细胞纯度鉴定（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

实验次数	心肌细胞纯度/%
1	98.33 ± 2.22
2	94.17 ± 1.15
3	96.67 ± 3.33

3 讨 论

自 Mosocona[8]首次用蛋白水解酶从胚胎心脏中分离出单个细胞以来，已陆续建立了一些从胚胎和新生动物的心脏中分离、培养心肌细胞的方法。虽然培养的心肌细胞无法完全取代在体心肌细胞的研究，但可做为在体心肌细胞急性分离的有益补充，同时也可作为研究单一因素对心肌细胞影响的理想模型。

Simpson 法[6]是乳鼠心肌细胞培养的经典方法，其主要的操作过程是采用 0.1%胰酶联合0.002% DNA 酶于 24℃搅拌旋转器下消化，而纯化细胞则是采用差速贴壁 1 次（30 min）的基础上加用溴脱氧尿苷（Brdu），但我们发现用此法操作较为繁琐，而且培养心肌细胞存活率和搏动率均不高。故而对其进行了适当的改良。主要有以下几点：(1)适宜浓度的胰酶和Ⅱ型胶原酶联合使用；(2)采用多次消化，每次消化时间均不超过 10 min；(3)不用磁力搅拌器，直接 37℃恒温水浴消化；(4)2 次差速贴壁 延长贴壁时间。

3.1 分离心肌细胞

使用的酶主要有胰蛋白酶和胶原酶，胰蛋白酶主要分解组织间质的蛋白成分，作用较强，对细胞胞膜具有较大破坏作用。通常其使用浓度为 0.05%~0.25%，浓度过高，心肌细胞容易消化过头，降低心肌细胞的存活率，浓度过低，需要消化的时间较长，同样也会降低心肌细胞的存活率。而胶原酶主要消化细胞间质中的胶原纤维以释放心肌细胞，对心肌细胞损伤较小，但作用缓和，消化的时间需要延长，给实验带来不便。鉴于此，我们采用了适宜浓度胰酶联合Ⅱ型胶原酶（0.125%胰酶，0.1%Ⅱ型胶原酶）分次进行消化，每次最多不超过 10 min，而且随着消化次数及酶对组织块作用累积时间的增加，消化时间也相应逐步较少，减轻胶原酶或胰蛋白酶对已消化下来单细胞的破坏作用，作用总时间约为 60 min。此外不用磁力搅拌器，直接水浴消化，其间间断低频振荡，使操作更加简单，减少了污染的机会。分离、消化后收获的细胞数量及即刻的活细胞率高，培养后细胞生长搏动良好，表明在这样条件下对心肌细胞的损伤较小，分离的效果和质量都较好。

3.2 心脏

由心肌细胞和非心肌细胞组成,心肌细胞约占25%,近75%的细胞则是非心肌细胞成分,如成纤维、内皮、间皮、神经细胞等。而在非心肌细胞中,成纤维细胞占了绝大部分比例,而且成纤维细胞的快速生长及其分泌的某些活性物质将对心肌细胞形态结构和生理功能造成很大影响,因此在体外培养心肌细胞时去除成纤维细胞就显得格外重要。目前国内外常用的纯化分离方法有:化学试剂抑制法和差速贴壁法,化学试剂抑制法如溴脱氧尿苷(Brdu)[9]等干扰成纤维细胞的有丝分裂,达到抑制其增殖的目的,但对心肌细胞或多或少有一定影响,可能不适合药理及毒理学方面的研究;差速贴壁法[10]具有操作简便、对细胞影响小、分离纯度高等优点,但所取贴壁的时间各有不同,为此我们采用了两次差速贴壁 延长贴壁时间,经免疫组织荧光检测纯度达95%以上,适合实验研究的应用。

3.3 此外,我们在心肌细胞培养过程中总结了一些注意事项

3.3.1 鼠龄的选择 一般提倡 1~3 d 的新生鼠用以培养心肌细胞均可,有文献报道以半日龄大鼠心肌细胞培养效果最佳[11],我们在实验中也发现以 0.5~1 d 的效果较好。其原因可能是出生时间越短的含胶原组织较少,消化相对容易。

3.3.2 稳定的 pH 培养液 pH 值一般控制在 7.2~7.4,若 pH 值大于 7.6,大大影响细胞的贴壁,生长也会受到抑制,搏动亦会减弱。目前多采用 $NaHCO_3$ 来调节培养基 pH 值,但 CO_2 容易逸出,特别是在温度较高的开放环境中,造成 pH 值升高,而采用 HEPES(4,2 羟乙基-1-哌嗪乙烷磺酸),一种有较强缓冲能力的氢离子缓冲剂,可以较长时间恒定 pH值,克服上述缺点。

3.3.3 离心 离心时间不宜过长,离心力不宜太大,否则易造成机械性损伤,以 1 000 r/min,5~8 min 为宜。

3.3.4 液体量及换液时间的选择 避免培养液体量过多,浮力过大,影响心肌细胞的贴壁,所加的量不宜过多。心肌细胞贴壁慢,为避免未贴壁活的心肌细胞随换液而被丢弃,应在接种 48 h 左右换培养液。

3.3.5 接种密度 接种细胞数不能太多,也不能太少。细胞数过多,易发生营养不良,细胞数过少,心肌细胞粘附伸展后不能相互接触,细胞之间无法进行信息交流,心肌细胞收缩不易同步,收缩持续时间变短。

3.3.6 包被 采用一些促贴壁的物质如明胶,多聚赖氨酸等包被培养瓶可以促进细胞的贴壁。

4 结 语

改进的新生大鼠心肌细胞培养方法,心肌细胞收获数量多,存活率高,心肌细胞和非心肌细胞分离较彻底,心肌细胞纯度较高。用此法培养的心肌细胞可以满足各种生理生化实验的要求。

参 考 文 献

[1] 郝亚荣.乳鼠心肌细胞培养[J].岭南心血管病杂志,2001,7(2):137-139.

[2] Yamauchi Y,Harada A,Kawahara K.Changes in the fluctuation of interbeat intervals in spontaneously beating cultured cardiac myocytes: experimental and modelingstudies[J]. Biological Cybemeties,2002,86(2):147-154.

[3] Galvez A,Morales M P,Eltit J M,et al. Aratedand strong apoptotic processis triggered by hyperosmotic stress in cultured rat cardiac myocytes [J]. Cell Timue Res,2001,304(2):279-285.

[4] Toshiyuki M,Ryojio,Tetsuyao,et al. Type2 angiotensinilreceptor is down regulated in cardiomyocytes of patients with heartfailure [J]. Cardiovasc Res,2000,46(2):73-81.

[5] Tejal A,Deutsch D J,Motlagh D,et al. Microtextured cell culture platforms:biomirnetic substrates for the growth of cardiac myocytes and fibroblasts[J]. Biomedical Microdevices,1999,2(2):123-129.

[6] Simpson P,Savion S.Differentiation of rat myocytes in single cell culture with and without proliferating nonmyocardial cells[J]. circ Res, 1982,50(1):101-116.

[7] 张 颖,李 慈,郑燕倩,等.新生大鼠心肌细胞培养及电生理特性观察[J].上海交通大报学报(医学版),2007,4(27):398-400.

[8] Mosocona A,Mosocona H,Dzau V J.The drcution and aggregation of cells from organ cardiac of the early chick embryo[J]. Anat,1952,86(3):287-301.

[9] Souren J E,schenijdenberg C,Verkleij A J,et al. Factors controlingng the rhythmic cohtraction Of collagen gels by neonatal heart cells[J]. In Vitro, 1992,28(4):199-204.

[10] Sehroedl N A,Hartzell C R. Myocytes and fibroblast exhibit functional synersm in mixed cultures of nenonatal rat heart cells[J]. Cell Physiol,1983,117(2):326-332.

[11] 刘 霞,王常勇.新生大鼠心肌细胞的分离和培养[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2005,33(6):35-39.

(责任编辑:关蕴良)