维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)07-0864-04

成年大鼠心肌细胞的急性分离方法探讨

熊寿贵,余更生

(重庆医科大学附属儿童医院心内科,重庆 400014)

【摘 要】目的:介绍一种可以稳定地获得高活性心肌细胞的急性分离方法,以便更有利于心肌细胞电生理研究和分子生物学研究。方法:用正常 SD 大鼠,麻醉成功后迅速取出心脏,以主动脉逆挂于 Langendorff 灌流装置上,先以无钙台氏液灌流 5min 然后换以酶液灌流 20min,分次采集心肌组织获取心肌细胞并保存于 KB 液中。结果:获得大量高活性(78% ± 7.5%)的心肌细胞,杆状,轮廓和横纹清晰,折光性好。结论:本文介绍的方法稳定性好,获得的心肌细胞数量多,活性好,适合用于心肌细胞电生理和分子生物学研究。

【关键词】心肌电生理;心肌细胞;细胞活性;分离

【中国图书分类法分类号】R329.2+4;R331.3+8 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-08-24

Emergent isolation method for adult rats myocytes

XIONG Shou-gui, et al

(*Department of Cardiology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To introduce an emergent isolation method for acquiring adult rats myocytes stably to favor the study on myocardial electrophysiology and molecular biology. *Methods*: The heart of Sprague-Dawley(SD) adult 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 nominally Ca^{2+}-free Tyrode's solution for twenty minutes, then the rat ventricular cells were isolated by seperate times and stored in a Kraftbruhe(KB) solution. *Results*: A large amount of rat ventricular cells in high activity(78% ± 7.5%)were acquired, they were in good shaps and their cross-veins were clear. *Conclusion*: The introduced isolation method is with good stability and can acquire a large mount of myocardial cells in high activity, which are applicable for the study on myocardial electrophsiology and molecular biology.

【Key words】 Myocardial electrophysiology; Myocyte; Cytoactive; Isolation

目前心肌电生理学研究和分子生物学研究发展迅速,尤其是膜片钳实验技术的发展,要求获得高活性的单个心肌细胞标本用于实验研究。成年大鼠心肌细胞由于对细胞外环境要求高,在体外不易存活,再生能力差,且分离成年大鼠心肌细胞方法复杂影响因素多,因此作膜片钳实验研究时,要稳定地获得高质量的心肌细胞标本比较困难,这也成为制约膜片钳技术和心肌电生理发展的重要因素之一[1]。笔者曾在心肌电生理课题研究中经过多次尝试成功分离出高活性的成年大鼠心肌细胞,完全适用于心肌细胞电生理研究,而且步骤简单,心肌细胞存活时间长(最长达 72h)。笔者现将分离方法步骤及体会阐述如下。

作者介绍:熊寿贵(1974-),男,主治医师,硕士,研究方向:儿童心血管病学。

通讯作者:余更生,男,教授,E-mail:yugengsheng@163.com。

1 材料与方法

1.1 实验动物

20 只 SD 成年大鼠,雌雄不限,WT:200 ~ 250g(均来自重庆医科大学实验动物中心)。分为 2 组:(1)实验组(10 只)采用两步灌流分离法 + 分次采集心肌组织;(2)对照组(10 只)采用两步灌流分离法 + 一次采集心肌组织。

1.2 实验试剂

胶原酶Ⅱ购自 Warshington 公司,Albumin、Taurine、EGTA、HEPES 均购自 Sigma 公司,其余普通试剂均为国产。

1.2.1 实验溶液(mmol/L)均以三蒸水或超纯水配制。

1.2.1.1 无钙台氏液(台氏液中去除 $CaCl_2$ 即为无钙台氏液)

NaCl 135、KCl 5.4、$MgCl_2$ 1.0、NaH_2PO_4 0.33、HEPES 5.0、glucose 5.0,用 NaOH 滴定 pH 至 7.4。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.2.1.2 KB液 KCl 20,KH_2PO_4 10,glucose 25,mannitol 5,albumin 1,K^+-Glutamic acid 70,B-hydroxybutyrate 10,taurine10,EGTA 10,用KOH滴定pH至7.4。

1.2.1.3 酶液 将胶原酶Ⅱ以0.6mg/ml加入无钙台氏液中,用NaOH滴定pH至7.4。

1.3 方法

均采用Langendorff灌流装置进行主动脉逆行灌流酶消化法,实验组采用两步灌流分离法+分次采集心肌组织,对照组采用两步灌流分离法+一次采集心肌组织。

1.4 步骤

1.4.1 实验组

(1)将无钙台氏液,KB液和酶液分别用95%O_2+5%CO_2饱和30min,37℃预热灌流系统,用蒸馏水冲洗灌流装置的管道系统10min。

(2)取其氧合后无钙台氏液约30ml放置于4℃冰箱中冷藏。

(3)用2%戊巴比妥钠(2ml/100g)对SD大鼠作腹腔注射,麻醉成功后,打开大鼠胸腔,迅速取出心脏置于4℃无钙台氏液中,待心脏自主搏动数次排出心腔内血液。

(4)迅速游离主动脉,将心脏以主动脉逆行悬挂于灌流装置上,先用无钙台氏液灌流主动脉,流速8ml/min,约5 min左右(流出液为清亮无色)。再换用酶液以8ml/min灌流约10min左右。然后以每间隔1min取一小块约1mm×1mm×1mm心室组织(以心尖部为主)分装于盛有KB液的小瓶中,共取10次(注意避免剪破心腔以免影响灌流),在灌流全过程均要用95%O_2+5%CO_2饱和灌流液。

(5)用巴氏管将小瓶中的心肌组织块轻轻吹散后,分别取1滴细胞混悬液滴于载玻片上在倒置显微镜下观察,选取细胞活性最好的1瓶或数瓶作为心肌细胞标本,于4℃的KB液中静置约0.5h即可用于膜片钳实验。

1.4.2 对照组

(1)(2)(3)步骤均与实验组(1)(2)(3)相同。

(4)迅速游离主动脉,将心脏以主动脉逆行悬挂于灌流装置上,先用无钙台氏液灌流主动脉,流速8ml/min,约5min左右(流出液为清亮无色)。然后换用酶液以8ml/min灌流约20min左右。

(5)停止灌流,剪下全部心室组织置于KB液中,剪碎成约1mm×1mm大小的心肌组织块,用巴氏管将其轻轻吹散,用200目的滤网过滤去除残余组织块,细胞液于4℃静置约0.5h即用于膜片钳实验。

1.5 心肌细胞的形态学观察

倒置显微镜下观察:分别将两组分离出来的心肌细胞涂片,在倒置显微镜下观察心肌细胞的形态结构。

1.6 心肌细胞活性检测

在细胞群体中总有一些因各种原因而死亡的细胞,总细胞中活细胞所占的百分比叫做细胞活性,也叫细胞活力。本实验采用台盼蓝染色法对两组细胞进行细胞活性测定:吸取180μl细胞悬液,加入20μl 0.4%台盼蓝溶液混匀,在3min内用血细胞计数板计数,被台酚蓝染色的细胞为死亡细胞,台盼蓝拒染的细胞为活的心肌细胞。心肌细胞活性=台盼蓝拒染的细胞数量/全部检测细胞的数量×100%。

1.7 统计学处理

所用数据用SPSS11.0软件包处理,结果以$\bar{x} \pm s$表示,两组间比较采用t检验,以$P<0.05$为显著性差异的标准。

2 结 果

2.1 心肌细胞的形态结构

两组细胞镜下的均大致呈两种形态:一种细胞呈杆状或矩形,轮廓分明,折光性好;长约70~160μm,宽约10~50μm;横纹清晰、细胞膜表面干净,为活的心肌细胞。这种细胞即为心肌细胞电生理和分子生物学研究的良好标本。另一种细胞挛缩呈圆形或椭圆形、细胞溶解并有胞浆漏出的细胞为死亡的心肌细胞(见图1、2),不能作为实验标本。

2.2 心肌细胞的活性

经台盼蓝染色法检测发现,杆状,轮廓及横纹清晰,折光性好的心肌细胞拒染,挛缩呈圆形或椭圆形、有胞浆漏出的细胞全部染色。经检测实验组心肌细胞的细胞活性平均为78%±7.5%,明显高于对照组($P<0.05$),本实验方法获得了高活性的心肌细胞(见表1)。

3 讨 论

国内外关于分离成年大鼠心肌细胞方法已有文献报道,虽然分离的主要原则大致相同,但在操作细节,灌流液体的种类和配制成分及剂量选择等方面仍有一定差异,故目前尚无统一的分离操作方

表1 实验组与对照组大鼠心肌细胞活性比较(%)

动物序号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	$\bar{x} \pm s$
实验组	75.2	82.7	90.1	85.6	69.3	76.9	83.7	65.4	81.5	78.2	78.9±7.5*
对照组	62.5	53.8	46.1	71.2	61.4	65.9	58.1	55.3	60.8	67.4	60.3±7.3

*与对照组比较$P<0.05$。

维普资讯 http://www.cqvip.com



图 1 成年 SD 大鼠心肌细胞(×200)(箭头所指)



图 2 成年 SD 大鼠心肌细胞(×400)

法。该类实验影响因素很多,如:溶液配制和 pH 值,溶液氧和浓度和时间,水质,温度,灌流速度,以及从取心到悬挂的时间,酶浓度和消化时间等等,因此获得的心肌细胞的活性存在较大差异。这也是单个心肌细胞标本很难获取的主要原因。

笔者通过使用本试验方法成功获得大量高活性单个心肌细胞,经验和体会主要有以下几个方面。

3.1 试剂的使用

试剂制作工艺不同以及生产批号的不同都可以导致试剂作用效果的差异,这一点尤其对消化酶很重要[2,3],笔者曾试用过 Sigma,Gibco 以及 Warshington 等公司的胶原酶Ⅰ,胶原酶Ⅱ以及 Hyclone 的胰酶,以消化强弱来看胰酶的消化作用较强,但它对细胞和细胞间纤维连接组织消化选择性较胶原酶差,对细胞损伤大,对于成年动物心肌细胞不宜采用。胶原酶Ⅰ作用较胶原酶Ⅱ略强,但两者都可用于心肌细胞的消化,从生产厂家看,笔者以为 Warshington 公司的胶原酶Ⅱ效果较好,同时由于消化作用强弱不同,则使用的酶浓度以及消化的时间都不同。另外动物的种属和大小,都可以影响到酶的用量和浓度。这都需要实验者在实验过程中不断的摸索实验条件。笔者采用 0.6mg/ml Warshington 公司的胶原酶Ⅱ消化 20min,可获得高活性的心肌细胞。

3.2 灌流问题

一般文献都要求灌流温度要保持 37℃,但大都没有明确说明是液体在灌流系统管道中的温度还是流入心脏时的最终温度。准确的说应该是灌流液流入心脏时的温度为 37℃。故恒温器在设置温度时应考虑到管道系统的散热因素。心肌细胞保存在 KB 液中的温度以 4℃为宜,可减少细胞的能量代谢和氧耗。对于灌流液的灌流顺序传统方法是四步法[2,4](正常台氏液、无钙台氏液、酶液、低钙台氏液或保护液),现多采用二步法[3](无钙台氏液、酶液)或三步法(无钙台氏液、酶液、低钙台氏液或保护液),笔者以为二步法既可达到很好的效果又可以缩短灌流时间,有利于细胞活性的保护。因为酶的种类、酶的作用强弱、灌流速度(一般为 6 ~ 10ml/min)不同,故酶液灌流的时间不定。笔者以为尽量缩短灌流时间对细胞的活性保持有利。灌流过程中对灌流情况的监测是选择流速监测还是压力监测,笔者以为选择流速监测较方便可靠。由于实验动物的个体差异,心脏组织密度有差异,不同动物在相同灌流速下灌流压力相差很大。

3.3 “钙反常”现象[2,5]

“钙反常”现象就是将在无钙溶液中分离的心肌细胞重新进入生理浓度的钙溶液中时,细胞发生收缩,并迅速失去原有有序结构和收缩功能,最后溶解死亡变成圆形或椭圆形的现象。“钙反常”现象也是心肌细胞急性分离的难点之一。心肌细胞的活性状态是直接导致“钙反常”的根本原因,实验的每一步骤都可能影响到心肌细胞的状态[6]。笔者体会到,若是形态好,横纹清晰,折光好的心肌细胞即使直接置于正常细胞外液中亦不会出现“钙反常”现象,否则即使采用梯度复钙也同样会出现“钙反常”现象。笔者采用本实验分离方法获得的心肌细胞只需滴于干净盖玻片上静置 0.5h 即可贴壁,不需梯度复钙即可直接用于膜片钳实验。

3.4 采集心肌组织的方式

本实验对照组采集心肌细胞的方法是在消化一定时间后在某一时间点一次性剪取整个心室组

维普资讯 http://www.cqvip.com

织,这是目前大多文献采用的方法。而本实验中的实验组则是按照每隔 1min 为一个时间点剪取心肌组织(以心尖部为主),取 10 个时间点,切记注意不要剪破心腔以免影响灌流。即使一小块心肌组织(1mm × 1mm) 也可分离出大量状态很好的心肌细胞。本实验结果显示实验组的心肌细胞活性明显较对照组高($P<0.05$)。由于成年大鼠心肌细胞分离操作复杂、影响因素多,且各实验室实验条件不同、实验者对成年大鼠心肌细胞急性分离技术掌握的熟练程度不同,故很难获得高质量又高数量的心肌细胞。分多个时间点多个部位有选择性采集心肌组织可以保证心脏能稳定地获得高质量高数量的心肌细胞,这为膜片钳实验的成功提供了良好的标本。

以上是笔者经过本实验的个人体会,现总结如下:(1)消化酶采用 Warshington 公司的胶原酶Ⅱ对心肌细胞分离效果较好,酶浓度为 0.6mg/ml。(2)确保离体心脏在灌流装置的悬挂端的温度是 37℃,心肌细胞的贮存温度以 4℃为宜。(3)形态好,横纹清晰,折光好的心肌细胞不需梯度复钙,可直接置于细胞外液中进行下一步实验。(4)按照每隔 1min 为一个时间点,分多个时间点采集心肌组织(以心尖部为主),可较稳定地获得高质量高数量的心肌细胞。最后,心肌细胞分离的每一步都很重要,在实验中要认真仔细,手法得当,否则都可能影响到心肌细胞的获得。

参 考 文 献

[1] Li YG,Shi YK,Chen HW,et al. Isolation and culture of adult rat ventricular cardiomyocytes[J]. West China Medical Journal,2005;20(2):308-309.

[2] Tytgat J.How to isolate cardiac myocytes[J]. Cardiovasse Res,1994;28(2):280-286.

[3] 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.

[4] Wolska BM,Solaro RJ.Method for isolation of adult mouse myosytes for studies for contraction and microfluorimentrey[J]. Am J Physiol,1996;271(3):1250-1255.

[5] Dow JW,Harding NG,Powell T.Isolated cardiacmy-ocytes.I. Preparation of adlt myocytes and their homology with the intact tissue[J]. CardiovascRes,1981;15(9):483-514.

[6] Xu H,Tao J,Chen J,et al. Isolation of Ca^{2+} tolerant cardiomyocytes from a adult rats for patch clamp studies[J]. J Nanjing Med Univ,2004;18(1):4-6.

(责任编辑:关蕴良)

(上接第 863 页)

回收率,结果平均回收率为 98.3%,RSD=0.23%。由结果可知回收率较好,方法可行。

2.10 凝胶中雷公藤甲素的含量测定

分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液 20μl,注入高效液相色谱仪,依法测定,3 批雷公藤甲素外用凝胶的含量测定结果见表 1。

表 1 雷公藤甲素外用凝胶中雷公藤甲素的含量

批次	含量 mg/(g 凝胶)	平均值 mg/(g 凝胶)
20070701	0.027 9	
20070702	0.027 8	0.027 8
20070703	0.027 8	

3 讨 论

笔者曾用文献报道的高效液相色谱条件[2-4]行制剂中的雷公藤甲素的分离测定,发现雷公藤甲素的色谱峰不能与杂质峰很好的分离,分离度不符合要求。通过实验,从甲醇 - 水的 40:60,45:55,46:54,55:45,60:40 比例中最后确定 46:54 的甲醇 - 水为流动相,使雷公藤甲素色谱峰与其它杂质峰可以得到很好的分离,且保留时间合适。

参 考 文 献

[1] 韦登明,黄光照.雷公藤及其单体的药理和毒理病理学进展[J]. 中药材,2003;26(12):894-897.

[2] 申 琳,邹爱英.HPLC 法测定雷公藤粗制品中雷公藤甲素的含量[J]. 天津药学,2005;17(4):28-29.

[3] 王 琳,蔡宝昌,王曙东,等.RP-HPLC 法测定雷公藤甲素缓释片的释放度[J]. 中国新药志,2005;14(12):1438-1440.

[4] 婧 会,赵惠茹,张宇洁,等.RP-HPLC 法测定雷公藤甲素脂质体中雷公藤甲素的含量[J]. 陕西中医学院学报,2006;29(1):57-58.

(责任编辑:冉明会)