DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.07.036

3 讨论

甾体的羟基结构是选择衍生化的基础,三氟醋酸酐、五氟丙醛酐、七氟丁酸酐是此类化合物最常用的衍生试剂。甾体衍生化后可以降低极性,提高挥发性和热稳定性,这些条件对于气相色谱至关重要。本实验以七氟丁酸酐作为衍生试剂,采用EI检测模式,通过这类衍生化,EI质谱可以获得丰富的高质量的离子质谱。

由于大鼠和人血清中均含有待测定神经甾体,因此不适合作为空白对照。牛血清白蛋白不含有待测定神经甾体,同时白蛋白是血清中主要的蛋白及甾体结合蛋白,因此以6%牛血清白蛋白水溶液作为空白对照,此方法在以前的气相色谱/质谱测定血清神经甾体时亦有报道[6]。

虽然以前对甾体的测定多采用RIA方法,但研究证实RIA方法有一定的局限性,缺乏抗体特异性且不能同时测定几种神经甾体。GC-MS方法敏感度高,特异性强,此方法已成为目前同时定量几种神经甾体的最好方法之一[9]。本方法可以同时测定血清中非结合型神经甾体及结合型神经甾体,且处理方法简单,样品测定前不需要进行HPLC纯化。线性范围、准确度、精密度实验显示本方法本方法适合同时测定血清中神经甾体的含量,为实验研究和临床检测生理或病理情况下神经甾体的变化提供帮助。

关键词:神经甾体;气相色谱-质谱;大鼠;血清
中图法分类号:R446.11 文献标识码:B

参考文献:

[1] Mensah-Nyagan A G, Do-Rego J L, Beaujean D, *et al*. Neurosteroids: Expression of steroidogenic enzymes and regulation of steroid biosynthesis in the central nervous system[J]. J Pharmacol Exp Ther, 1999, 51(1): 63-81.
[2] Zwain I H, Yen S S C. Dehydroepiandrosterone: Biosynthesis and metabolism in the brain[J]. Endocrinology, 1999, 140(2): 880-887.
[3] Flood J F, Morley J E, Roberts E. Pregnenolone sulfate enhances post-training memory processes when injected in very low doses into limbic system structures: The amygdala is by far the most sensitive[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(23): 10806-10810.
[4] Liere P, Akwa Y, Weill-Engerer S, *et al*. Validation of an analytical procedure to measure trace amounts of neurosteroids in brain tissue by gas chromatography-mass spectrometry[J]. J Chromatogr B, 2000, 739(2): 301-312.
[5] Yan C Z, Hou Y N. Determination of neurosteroids in rat brain by gas chromatography/mass spectrometry[J]. Chinese J Chromatogr, 2004, 22(1): 12-15.
[6] Kimoto T, Tsurugizawa T, Ohta Y, *et al*. Neurosteroid synthesis by cytochrome P450-containing systems localized in the rat brain hippocampal neurons: N-Methyl-D-aspartate and calcium-dependent synthesis[J]. Endocrinology, 2001, 142(8): 3578-3589.
[7] Corpéchot C, Young J, Calvel M, *et al*. Neurosteroids: 3α-hydroxy-5α-pregnan-20-one and its precursors in the brain, plasma, and steroidogenic glands of male and female rats[J]. Endocrinology, 1993, 133(3): 1003-1009.
[8] Concas A, Porcu P, Sogliano C, *et al*. Caffeine-induced increases in the brain and plasma concentrations of neuroactive steroids in the rat[J]. Pharmacol Biochem Behav, 2000, 66(1): 39-45.
[9] Appelblad P, Irgum K. Separation and detection of neuroactive steroids from biological matrices[J]. J Chromatogr A, 2002, 955(2): 151-182.

(编辑 刘洪娥)

技术方法

文章编号:1000-5404(2004)07-0644-03

成年大鼠心室肌细胞的分离、培养与鉴定

Isolation, culture and identification of adult rat ventricular myocytes

李 洪,肖颖彬 (第三军医大学新桥医院心血管外科,重庆 400037)

提 要:目的 探讨成年大鼠心肌细胞的分离、培养方法。方法 麻醉后取成年Wistar大鼠心脏连接于Langendorff装置上进行0.1%胶原酶+0.1%透明质酸酶灌注消化分离心肌细胞,纯化后培养于DMEM培养基。用免疫荧光染色方法鉴定心肌细胞,并在倒置显微镜、电镜下观察细胞的形态结构。结果 本方法分离、培养的心肌细胞纯度为98%,细胞活性为92%,杆状细胞率为82%。结论 该方法简单有效,为深入研究成年心肌细胞打下了基础。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30200089)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30200089)
作者简介:李 洪(1970-),男,重庆市人,博士研究生,主治医师,讲师,主要从事心肌保护、麻醉学临床与基础等方面的研究,发表论文10篇。
电话:(023)68755607;E-mail:lihong881@vip.sina.com
收稿日期:2003-07-30;修回日期:2003-12-15

培养的成熟心肌细胞已成为一种非常有用的实验标本,是在体心肌模型的重要补充。由于在心肌细胞的发育过程中,离子通道和收缩蛋白异型体的表达可能发生变化。所以,很难将胚胎期和新生期心肌细胞培养的研究结果应用到完全分化的成熟心肌细胞,因

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

而成熟心肌细胞的分离、培养备受重视, 对其方法的研究也日渐增多。我们在总结国内外实验室分离、培养成熟心肌细胞方法的基础上, 摸索出一套比较简单有效的成年大鼠心室肌细胞分离和培养方法, 并进行了形态学观察。

1　材料与方法

1.1　材料

实验动物为 Wistar 大鼠 3 只(体质量 200 ~ 250 g), 由本校实验动物中心提供。透明质酸酶、胰蛋白酶均为 Gibco 公司产品; DMEM 培养液、胶原酶、牛血清白蛋白(BSA)购自美国 Sigma 公司; 优等胎牛血清 Hyclone 产品; 小鼠抗大鼠 Sarcomeric actin 单抗(博士德); FITC 标记山羊抗小鼠 IgG(中山公司); 95% O_2 + 5% CO_2 混合气由重庆朝阳气体公司提供, 其他试剂均为分析纯。

1.2　液体配制

灌流液Ⅰ: 无钙 K-H(Krebs-Henseleit)缓冲液(NaCl 119 mmol/L, KCl 4.7 mmol/L, $MgSO_4$ 1.2 mmol/L, KH_2PO_4 1.2 mmol/L, $NaHCO_3$ 25 mmol/L)中加入葡萄糖 11 mmol/L, 牛黄酸 5 mmol/L, 肌酸 5 mmol/L, pH 7.4。

灌流液Ⅱ: 灌流液 I 中加入 $CaCl_2$ 0.2 mmol/L, pH 7.4。

消化酶溶液Ⅰ: 100 ml 氧合的灌流液 II 中加入 II 型胶原酶 100 mg、透明质酸酶 100 mg。

消化酶溶液Ⅱ: 100 ml 消化酶溶液 I 中加入胰蛋白酶 200 mg。

洗涤培养液Ⅰ: 7.5 ml 氧合的灌流液 + 2.5 ml 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基。

洗涤培养液Ⅱ: 5 ml 氧合的灌流液 + 5 ml 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基。

洗涤培养液Ⅲ: 2.5 ml 氧合的灌流液 + 7.5 ml 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基。

6% BSA: 100 ml DMEM 培养基中加入 BSA6g, 过滤分装为 5 ml/小瓶。

所有液体均用 0.2 μm 滤膜过滤除菌。

1.3　方法

1.3.1　心肌细胞的分离和培养　　参照文献[1 ~ 4]介绍的方法并加以改进。Wistar 大鼠麻醉后用 75% 乙醇消毒, 开胸暴露主动脉, 经主动脉远端向根部插管并用蚊式血管钳固定, 打开灌流开关开始灌流, 摘下心脏将其固定在 langendorff 灌注架上, 用 95% O_2 + 5% CO_2 混合气氧合的冷灌流液Ⅰ灌注(灌注压 70 ~ 100 cm H_2O), 按下列步骤进行实验。

①氧合的冷灌流液Ⅰ非循环灌注 5 min。②用 100 ml 消化酶溶液Ⅰ 37 ℃循环灌注消化 30 min; ③取下心脏, 放入装有 10 ml 冷灌流液Ⅱ的 90 mm 培养皿中, 用眼科剪剪去心包、心房、大血管及其它结缔组织, 然后用压舌板稍加挤压, 此时心肌组织变得松软, 稍加抖动, 单个细胞及细胞团就脱落下来; ④把剩下的心肌组织剪成小块, 连同细胞悬液一起放入 50 ml 锥形瓶中, 加入消化酶溶液Ⅱ 20 ml, 37 ℃震荡消化 5 min; ⑤稍加吹打, 加入 20 ml 洗涤培养液Ⅰ, 用装有 80 目尼龙滤网的滤器过滤细胞悬液; ⑥50× g 离心 2 min, 弃上清, 用 10 ml 洗涤培养液Ⅱ重悬细胞沉淀; ⑦让细胞沉降 20 min, 弃上清, 用 10 ml 洗涤培养液Ⅱ重悬细胞沉淀; ⑧让细胞沉降 20 min, 弃上清, 用 10 ml 含 10% 胎牛血清的培养液重悬细胞沉淀; ⑨让细胞沉降 20 min, 弃上清, 加入 5 ml 含 10% 胎牛血清的 EMDM 培养液重悬细胞沉淀; ⑩重悬后的细胞小心铺放在 5ml 的 6% BSA 上层, 让细胞沉降 10 ~ 15 min, 弃上清, 加入含 10% 胎牛血清的 EMDM 培养液重悬细胞, 细胞计数后将装有心肌细胞的培养皿放入 5% CO_2 细胞培养箱中培养。

1.3.2　心肌细胞的形态学观察　　①在倒置显微镜下观察: 把分离出来的细胞涂片, 在倒置显微镜下观察心肌细胞的形态结构; ②透射电镜下观察: 把用于培养的心肌细胞(约 1× 106) 50× g 离心 5 min, 弃上清, 用 3% 戊二醛固定 18 h, 脱水、包埋、切片后在透射电镜下观察细胞超微结构。

1.3.3　心肌细胞活性检测　　①台盼蓝染色法检测细胞活性: 吸取 180 μl 细胞悬液, 加入 20 μl 0.4% 台盼蓝溶液混匀, 在 3 min 内用血细胞计数板计数台盼蓝染色阳性细胞率。②计数杆状细胞的比例: 用血细胞计数板计数杆状细胞占总细胞数的比例。

1.3.4　免疫荧光染色　　按蔡文琴[5]方法进行。培养 2 h 后, 贴壁于盖玻片上的心肌细胞冷丙酮固定 10 min, 正常山羊血清封闭 30 min, 一抗小鼠抗大鼠 α-Sarcomeric actin(1∶100) 4 ℃孵育过夜, 二抗 FITC 标记山羊抗小鼠 IgG(1∶60) 37 ℃避光孵育 1 h, 碘化丙啶(PI)染色 10 min, PBS 清洗后荧光显微镜下观察, 并计数随机选择的 10 个视野内双染细胞数的比例。阴性对照不加一抗。

2　结果

2.1　心肌细胞的形态结构

倒置显微镜下可见细胞主要有 2 种形态, 多数呈杆状, 长宽之比约为(3 ~ 6)∶1。少数呈圆形, 体积较大。个别杆状细胞可见舒缩活动, 节律为 3 ~ 10 次/min 不等。高倍镜下可见明显的横纹, 见图 1。电镜照片, 心肌细胞横断面肌丝排列整齐; 纵切面可见明显的 Z 带, 见图 2。

2.2　心肌细胞的活性

每个心脏细胞产量可达 1× 10^7 细胞数, 约有 82% 的细胞呈杆状, 92% 的细胞台盼蓝染色阴性。

2.3　心肌细胞的免疫荧光染色

有 98% 的细胞胞浆被 α-肌动蛋白单抗(anti-Sarcomeric actin)染成绿色荧光, 细胞核被 PI 染成红色荧光, 见图 3。

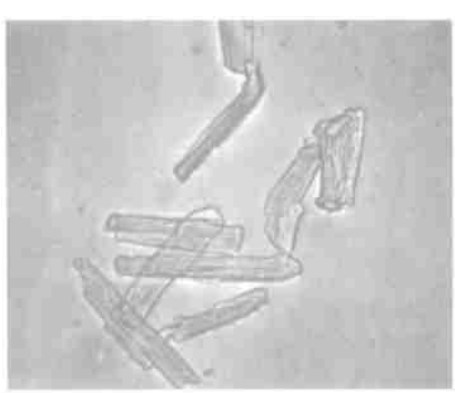


图 1　倒置显微镜下的成年大鼠心肌细胞

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net



图 2 成年大鼠心肌细胞的超微结构 (TEM× 14 000)

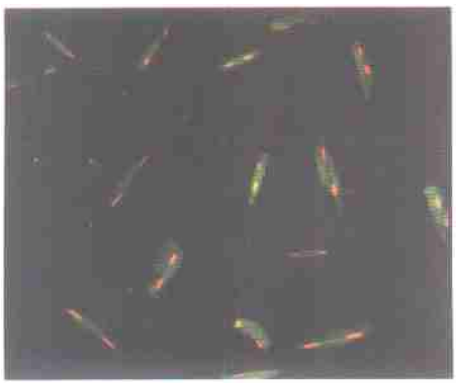


图 3 荧光显微镜下心肌细胞与 **anti** α-**Sarcomeric actin** 和 **PI** 结合的情况 (× 200)

3 讨论

目前成年心肌细胞的分离主要有 3 种方法,即离体心脏灌注消化法、心肌组织浸泡消化法和组织块培养法。对动物而言,离体心脏生物酶灌注消化法分离出的成熟心肌细胞具有活性高、数量多等优点。国内仅有少数单位分离培养成功成年大鼠心肌细胞[1]。采用本实验介绍的灌注消化法分离得到的心肌细胞产量高、活性好,能满足几乎所有离体实验的需要。与其它方法不同的是,我们在心脏灌注的初期采用了冷灌流液灌注,这有利于缓解主动脉插管过程中心肌细胞的缺血损伤。此外,对分离下来的心肌细胞采用了分步"复钙",使 Ca^{2+} 浓度由 0 mmol/L,分 4 步逐渐恢复至 1.0 mmol/L,防止了因"复钙"过快对心肌细胞造成的损伤。

由于成年大鼠心肌细胞个体大而脆弱,因此消化过程中的很多因素如缺氧、消化酶、pH 改变等很容易引起心肌细胞的损伤,最终影响细胞的活性和产量。要想分离得到产量高、活性好的心肌细胞,就必须把握好消化过程中的每一个环节。其中值得重视的环节主要有:①灌流液及消化液的 pH 值:心肌细胞对酸碱度的变化比较敏感,过酸或过碱都会影响心肌细胞的活性。由于灌注消化所用的液体都要用 95%O_2 + 5%CO_2 混合气进行氧合,因此液体的 pH 值可能会降低。要控制好氧合的时间,防止 pH 值过低。溶液的 pH 值最好控制在 7.3 ~ 7.4。②缺血、缺氧损伤:心肌细胞对灌注消化过程中的缺血、缺氧损伤反应非常敏感,后者是影响心肌细胞活性和产量的主要因素。主动脉插管时最容易出现心肌缺血、缺氧,应当尽量缩短此时心肌的缺血时间,一般要求从暴露主动脉到插管完成并开始灌注的时间应少于 2 min。此外,还应注意避免麻醉过深,防止因呼吸抑制时间过长而引起心肌缺氧,最好在比较浅的麻醉状态下开胸灌注。③消化酶的选择:通常认为胶原酶对心肌细胞的损伤比胰蛋白酶小,一般常用 II 型胶原酶。由于心脏胶原纤维表面有一层糖蛋白,因此单纯使用胶原酶消化效果不好。我们采用 0.1% II 型胶原酶和 0.1%透明质酸酶的混合消化液,经过 20 ~ 30 min 灌注消化取得了很好的效果。文献报道的消化酶浓度也有所不同,胶原酶和透明质酸酶的浓度一般为 0.1%。但需要根据消化酶的活性进行调整。若采用低浓度可适当延长消化时间。④离心强度的选择:对成年大鼠心肌细胞的沉降不需要太大的离心力。一方面心肌细胞对过度离心损伤比较敏感;另一方面,由于心肌细胞质量大,很容易沉降。文献报道的离心力一般为 (20 ~ 50)× g 离心 30 s 至 2 min。我们在后期心肌细胞的清洗、"复钙"和纯化过程中采用了自然沉降的方法,这主要有利于得到高纯度的杆状心肌细胞,减轻心肌细胞的损伤。⑤其他方面:如最后消化酶的清除和中和、"复钙"的速度等方面都应特别注意。

从实验结果可以看出,本实验采用的灌注消化法分离大鼠心室肌细胞是简单、可行的,并能分离出高纯度、活性好的心肌细胞。

关键词:成年大鼠心肌细胞;分离技术
中图法分类号:R322.11;R329.2 文献标识码:B

参考文献:

[1] 许秀芳,李温斌,陈宝田,等. 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,2001,21(2):104-107.
[2] D. L. 斯佩克特, L. A. 莱因万德, R. D. 戈德曼著. 黄培堂 等译. 细胞实验指南[M]. 上册. 北京:科学出版社,2001. 83-89.
[3] 薛庆善. 体外细胞培养的原理与技术[M]. 北京:科学出版社,2001. 618-636.
[4] Zaugg M, Lucchinetti E, Spahn D R, *et al*. Volatile anesthetics mimic cardiac preconditioning by priming the activation of mitochondrial K(ATP) channels via multiple signaling pathways[J]. Anesthesiology, 2002, 97(1):4-14.
[5] 蔡文琴,王伯弥云. 免疫组织化学和核酸分子杂交技术[M]. 成都:四川科学技术出版社,1994. 61-66.

(编辑 栾 嘉)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net