

乳鼠心肌细胞和心肌成纤维细胞体外分离培养方法的优化

朱晓丽¹, 王丽¹, 马依彤², 杨毅宁², 陈邦党², 马苗苗²

(1. 新疆石河子大学医学院第一附属医院心内科, 新疆石河子市 832008;

2. 新疆医科大学第一附属医院心脏中心, 新疆乌鲁木齐市 830054)

[关键词] 心肌细胞; 心肌成纤维细胞; 原代培养

[摘要] **目的** 优化SD乳鼠心肌细胞和心肌成纤维细胞的体外分离培养的条件和方法。**方法** 分别用胰酶、Ⅱ型胶原酶依次消化分离心肌组织, 再通过两次差速贴壁分离法分别收集、培养乳鼠心肌细胞和心肌成纤维细胞。光学显微镜下分别观察心肌细胞和心肌成纤维细胞的基本形态特征的变化, 原代心肌细胞行心肌肌钙蛋白免疫荧光鉴定, 而心肌成纤维细胞则用第2代行波形蛋白免疫荧光鉴定。**结果** 心肌细胞在2~4 h开始贴壁生长, 12~24 h贴壁速率大幅增加, 并出现自发性搏动, 48~72 h心肌细胞粘合成簇, 细胞成活率, 纯度均达95%以上; 心肌成纤维细胞第2~4代细胞生长良好, 纯度高达98%以上。**结论** 此种方法可得到产量大, 纯度高, 活力好的心肌细胞和心肌成纤维细胞, 为心血管疾病的基础与临床研究提供了理想的实验模型。

[中图分类号] Q2-33

[文献标识码] A

Optimize the Method of Isolation and Culture Neonatal Rat Cardiomyocytes and Cardiac Fibroblasts in Vitro

ZHU Xiao-Li¹, WANG Li¹, MA Yi-Tong², YANG Yi-Ning², CHEN Bang-Dang², and MA Miao-Miao²

(1. Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital, School of Medicine, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832008, China; 2. Heart Centre, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830054, China)

[KEY WORDS] Cardiomyocytes; Cardiac Fibroblasts; Primary Cell Culture

[ABSTRACT] **Aim** To optimize the conditions and methods of SD rat cardiomyocytes and cardiac fibroblasts in vitro culture. **Method** Digested ventricular tissue with trypsin first, and then collagenase II. Collected and cultured neonatal rat cardiac myocytes and fibroblasts through the way of differential adhesion for two times. The basic shape change of cardiac myocytes and cardiac fibroblasts were observed under the optical microscope. Cardiac myocytes were assayed by cardiac troponin immunofluorescence and the second generation cardiac fibroblasts were assayed by vimentin immunofluorescence. **Results** Cardiomyocytes began to adhere and grow after 2~4 hours; The adherent rate increased substantially and the cells beated spontaneously after 12~24 hours; 48~72 hours later cardiomyocytes adhered to be clustered; Both of the cells' survival rate and purity reached more than 95%. The second generation to the fourth generation cardiac fibroblasts grew well and its purity was as high as 98%. **Conclusion** A great quantity, purity and high survival rate of cardiocytes and cardiac fibroblasts can be effectively cultured by this method. And it provides an ideal experimental model for the cardiovascular disease and clinical studies.

体外培养心肌细胞及心肌成纤维细胞,可在不受神经、内分泌等其他因素的影响下模拟多种病理模型^[1,2],是心血管疾病基础研究的基本方法之一,

有着广阔的应用前景。但目前体外培养心肌细胞及心肌成纤维细胞仍存在细胞成活率低,活力及纯度不够的现象,尤其是心肌细胞。本次实验参照文

[收稿日期] 2014-02-13

[修回日期] 2014-05-08

[基金项目] 国家自然科学基金-地区科学基金项目(81260028);石河子大学科学技术研究发展计划“自然科学与技术创新”团队创新项目(2011ZRKXTD-07)

[作者简介] 朱晓丽,硕士研究生,研究方向为冠心病基础与临床研究,E-mail为411121834@qq.com。通讯作者王丽,博士,主任医师,副教授,硕士研究生导师,研究方向为冠心病基础与临床,E-mail为mcmwl@163.com。马依彤,博士,主任医师,教授,博士研究生导师,研究方向为冠心病基础与临床,E-mail为myt-xj@163.com。

献[3,4]方法进行部分改进,得到生长状态良好、纯度较高的心肌细胞及心肌成纤维细胞,现将具体实验方法和经验予以报道。

1 材料和方法

1.1 材料

出生 1~3 天 SD 乳鼠,雌雄不限,由新疆医科大学第一附属医院实验动物中心提供。CO₂ 培养箱购自 Thermo Forma 公司;恒温离心机、超净工作台、荧光倒置显微镜购自 Leica 公司;眼科手术器械三套;胎牛血清、高糖达氏改良伊格尔(DMEM)培养基购自 Gibco 公司;双抗购自 HyClone 公司;谷氨酰胺、D-Hanks、胰酶、40 g/L 多聚甲醛、2.5 mL/L Triton X-100、0.4% 台盼蓝、5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)均购自 Sigma 公司;II 型胶原酶购自 Worthington 公司;正常驴血清、DyLight594 标记的驴抗小鼠 IgG、FITC 标记的驴抗兔 IgG、1 mg/L DAPI 购自 ImmunoReagents, Inc. 公司;小鼠抗心肌肌钙蛋白 T 抗体购自 Abcam 公司;兔抗波形蛋白单克隆抗体购自 Cell Signaling 公司。

1.2 试剂配制

配制含有 100 mL/L 胎牛血清,100 kU/L 青霉素、100 mg/L 氯霉素,10 g/L 谷氨酰胺,10 g/L 非必需氨基酸的高糖 DMEM 完全培养液,用 D-Hanks 溶液配制 1 g/L 胰酶,0.8 g/L II 型胶原酶,以上液体均需调整 pH 值在 7.0~7.2 之间。

1.3 组织消化和分离细胞

取乳鼠 8 只,无菌条件下开胸取出心脏,剔除大血管等组织,留取心尖部心室组织,沿其纵轴剪 3~4 下,使其呈花瓣状,放入装有 1 g/L 的胰酶瓶子中,置于摇床上以最小往复速度,4℃ 冰箱消化过夜。第 2 天弃去大部分胰酶,加入等量完全培养液终止消化,弃上清。加入浓度为 0.8 g/L II 型胶原酶置 37℃ 水浴箱震荡消化 8~10 min,收集上清,置于加有等体积培养液的离心管中。重复上述步骤 3~4 次,直到组织块基本消化完为止。收集各次消化的液体,以 1 200 r/min 离心 5 min,弃上清,用完全培养基重悬,接种于第 1 个 100 cm² 培养皿中,放入 37℃ 50 mL/L CO₂ 培养箱中孵育 50 min(第 1 次差速贴壁)。吸出尚未贴壁的细胞悬液置于第 2 个 100 cm² 的皿中,同样条件下再培养 35 min(第 2 次差速贴壁),收集细胞悬液,台盼蓝染色计数,根据不同实验目的用完全培养液调整细胞密度为 1 ×

10⁸/L,并加入 BrdU 以抑制非心肌细胞增殖,接种于相应的培养器皿中。在 2 次差速贴壁的第 1 和第 2 个 100 cm² 皿中(主要含心肌成纤维细胞)加入完全培养基继续培养。

1.4 心肌细胞成活率检测

用台盼蓝法检测心肌细胞存活率。正常心肌细胞为透明、折光性强的圆形细胞,未染色,死亡细胞呈蓝色。细胞成活率(%)=[(总细胞数-着色细胞数)/总细胞数×100%]。

1.5 心肌细胞搏动及形态学观察

倒置显微镜下观察心肌细胞和心肌成纤维细胞生长状态、形态变化;观察心肌细胞搏动的频率、节律、强度及范围,以判断心肌细胞生长状态。

1.6 心肌细胞和心肌成纤维细胞的免疫荧光法鉴定

取原代心肌细胞以 3 × 10⁸/L 接种于放有无菌盖玻片的 6 孔板内制作细胞爬片,48 h 后取出爬片,40 g/L 多聚甲醛固定 15 min,2.5 mL/L Triton X-100 透化 10 min,驴血清室温封闭 30 min,加入小鼠抗心肌肌钙蛋白 T 抗体,室温孵育 1 h,加入荧光二抗 DyLight594 标记的驴抗小鼠 IgG,避光室温孵育 1 h。避光加入 DAPI 染色 1 min,倒置荧光显微镜下拍照记录。心肌成纤维细胞则用传至第 2 代的细胞行波形蛋白抗体鉴定,一抗加入兔抗波形蛋白单克隆抗体,二抗加入 FITC 标记的驴抗兔 IgG,方法同上。

2 结果

2.1 心肌细胞的存活率及产量

台盼蓝染色计数 200 个细胞,10 个细胞染色阳性,细胞存活率 95%。由公式:均数 × 2 × 10⁷ = cells/L,算出每升细胞悬液中所含心肌细胞数量,再粗略推算 1 只乳鼠心肌细胞的产量 = 均数 × 2 × 10⁷ × 总细胞悬液量/乳鼠心脏总量,约为 3.1 × 10⁶ 个细胞。

2.2 心肌细胞的形态学特征

刚分离的心肌细胞呈圆形或椭圆形,培养 2 h~4 h 细胞开始贴壁生长,逐渐变为梭形、三角形、星形、多边形等形态,立体感明显,折光性强。培养 24 h 后细胞贴壁完全且分布均匀,可见部分贴壁的单个细胞出现自发性搏动,搏动的频率和节律不同;培养 48 h 后细胞伸出的伪足相互形成交联,偶有菊形的细胞团形成,搏动频率 50~150 次/min 不等。培养 72 h 后细胞伪足相互接触交织成密集的网,形成放射状排列的细胞簇,可见岛屿样搏动,呈同步

性, 搏动频率 80 ~ 150 次/min, 细胞搏动率可达到 90% 以上(图 1)。

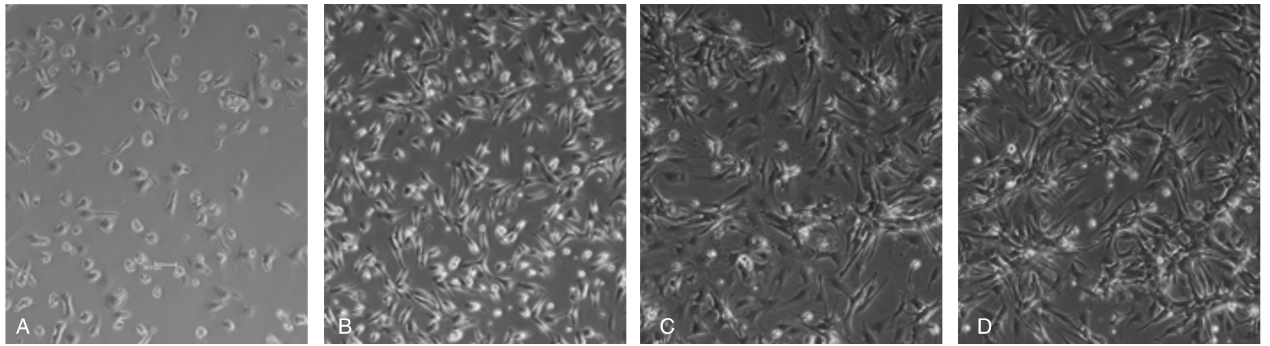


图 1. 普通光学显微镜下心肌细胞($\times 100$) A 为传统方法所得 24 h 后心肌细胞, B 为改良方法所得 24 h 后心肌细胞, C 为改良方法所得 48 h 后心肌细胞, D 为改良方法所得 72 h 后心肌细胞。

Figure 1. Myocardial cells under light microscope($\times 100$)

2.3 心肌成纤维细胞的形态学特征

心肌成纤维细胞在培养 30 ~ 50 min 后大多数细胞已贴壁, 其中部分开始伸出伪足, 伸展成梭形, 多边形, 胞体较大, 立体感不强, 胞核清晰且大, 通常含 1 ~ 3 个核呈椭圆形, 胞质透明, 呈薄片状, 无自发性搏动(图 2A)。心肌成纤维细胞生长迅速, 2 ~ 3 天即可铺满皿的 80% ~ 90%, 细胞排列紧密(图 2B)。

2.4 心肌细胞的免疫荧光鉴定

倒置荧光显微镜下观察, 红色为抗心肌肌钙蛋白 T 抗体特异性染色, 蓝色为 DAPI 染色的细胞核, 计数后, 改良后心肌细胞的纯度可达到 95% 以上, 而传统方法所得心肌细胞的纯度只达 75% 左右(图 3)。

2.5 心肌成纤维细胞的免疫荧光鉴定

倒置荧光显微镜下观察, 绿色为波形蛋白特异

性染色, 蓝色为 DAPI 染色的细胞核(图 4), 计数后, 心肌成纤维细胞的纯度可达到 98% 以上。

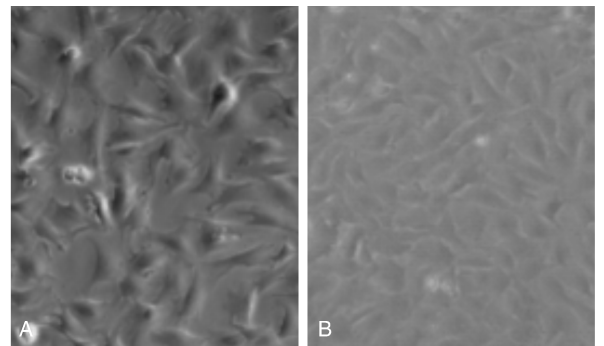


图 2. 普通光学显微镜下心肌成纤维细胞($\times 100$) A 为第一代心肌成纤维细胞, B 为第二代心肌成纤维细胞。

Figure 2. Cardiac fibroblasts under light microscope($\times 100$)

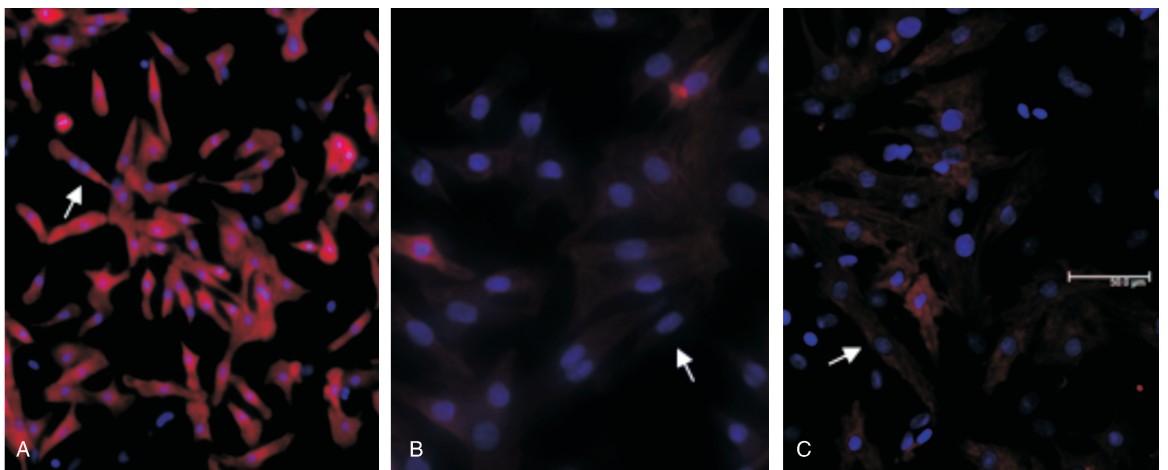


图 3. 心肌细胞的免疫荧光鉴定 箭头所指红色为抗心肌肌钙蛋白 T 抗体特异性染色, 蓝色为 DAPI 染色的细胞核。A 为改良后心肌细胞荧光鉴定($\times 200$); B 为改良后心肌细胞荧光鉴定($\times 400$); C 为传统方法心肌细胞荧光鉴定。

Figure 3. Immunofluorescence identification of myocardial cells

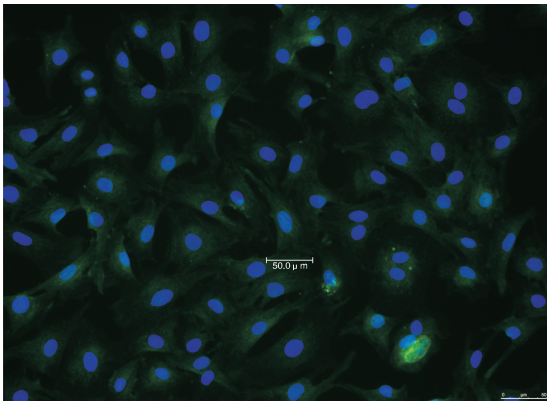


图 4. 成纤维细胞的免疫荧光鉴定 箭头所指绿色为波形蛋白特异性染色, 蓝色为 DAPI 染色的细胞核。

Figure 4. Immunofluorescence identification of cardiac fibroblasts

3 讨论

体外培养的心肌细胞和心肌成纤维细胞具有定量、重复性和可控性好以及不受神经体液因素影响等特点, 利用体外培养的心肌细胞研究非血流动力学因素所致的心肌肥厚及其他心血管疾病的发病机制日益受到生物医学界的广泛关注。如何成功培养高纯度心肌细胞和心肌成纤维细胞是基础研究心血管疾病的前提。

3.1 心室肌组织的剪切

不同于以往实验中将心室肌组织切成 1 mm^3 的碎片^[5], 选择纵向将心室肌组织剪成花瓣状, 不仅可以使心肌组织更充分的和胰酶接触, 而且避免了剪切过程中心肌中所释放出来的毒素, 同时也方便消化收集细胞, 极大程度上避免了心肌组织块的误吸。

3.2 平衡盐溶液及培养基 pH 值

心肌细胞对 pH 值十分敏感, 最适 pH 为 7.0 ~ 7.2 左右, 过酸、过碱均会严重影响心肌细胞的生长和生理功能, 所以严格要求、调整培养液和平衡盐溶液的 pH 值尤为重要。配制及使用培养液时应注意: ①pH 值会在过滤后上升 0.1 ~ 0.3; ②每次配好的培养液尽量在 2 周内用完, 否则其中的 CO_2 会溢出, 导致 pH 上升。使用前应补充谷氨酰胺和 NaHCO_3 。

3.3 消化酶的选择

胰酶的主要作用是分解组织间质的蛋白成分, 对细胞膜蛋白也具有较强的破坏作用。胶原酶作用缓和, 能特异性地水解细胞间质中的胶原纤维, 而

不损伤其它蛋白质和组织。本次实验不同于以往单一胰酶^[3]或胰酶和胶原酶同时联合运用^[4]消化心肌组织的方法, 首先用浓度为 1 g/L 的胰酶 4℃ 过夜消化心肌组织, 不但避免胰酶对细胞膜的破坏, 而且有效的分解了心肌组织间质的蛋白成分, 使心肌组织变松散, 次日用 0.8 g/L II 型胶原酶多次重复消化, 注意控制消化时间。此种消化方法能够保证心肌细胞的数量和活力, 并且完整的保存了心肌细胞的结构和功能特点。

3.4 差速贴壁法及 5-溴脱氧尿苷纯化心肌细胞

差速贴壁纯化法是根据心肌细胞和心肌成纤维细胞贴壁速度的不同而进行的方法, 单次差速贴壁很难去除干净心肌细胞中成纤维细胞。本实验采取两次差速贴壁, 并在心肌细胞培养液中加入 5-溴脱氧尿苷, 从而抑制非心肌细胞的增殖, 联合两种方法来提高心肌细胞和心肌成纤维细胞的纯度。

总之, 此次研究通过长时间的实验证实, 利用胰蛋白酶与胶原酶依次消化心脏组织, 通过两次差速贴壁联合 5-溴脱氧尿苷的使用能较好的分离纯化心肌细胞和心肌成纤维细胞, 其纯度高、活性好、细胞结构保存完整, 是一种较为理想的心肌细胞和心肌成纤维细胞原代培养方法, 可用于多种心血管疾病病理模型的建立。

[参考文献]

- [1] Hadad I, Veithen A, Springael JY, et al. Stroma cell-derived factor-lalpha signaling enhances calcium transients and beating frequency in rat neonatal cardiomyocytes [J]. Plos One, 2013, 8 (2): e56 007.
- [2] Nguyen PD, Hsiao ST, Sivakumaran P, et al. Enrichment of neonatal rat cardiomyocytes in primary culture facilitates long-term maintenance of contractility in vitro[J]. Am J Ph, 2012, 303 (12): C1 220-228.
- [3] Louch WE, Sheehan KA, Wolska BM. Methods in cardiomyocyte enisolation, culture, and gene transfer [J]. J Mol Cell Cardiol, 2011, 51(3): 288-298.
- [4] 辛毅, 许秀芳, 黄益民, 等. 乳小鼠心肌成纤维细胞和心肌细胞的分离培养及荧光鉴定 [J]. 新乡医学院学报, 2011, 28 (5): 541-546.
- [5] 马芳芳, 沈晓丽, 林立芳, 等. 新生大鼠心肌细胞的原代培养 [J]. 心血管康复医学杂志, 2009, 18(2): 125-128.
- [6] 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): 36-39.
- [7] 施雨露, 李晓轶, 曹美娜, 等. 新生大鼠心肌细胞和心肌成纤维细胞的同时分离 [J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(24): 4 414-420.

(此文编辑 李小玲)