

新生小鼠心肌细胞分离培养的改良及其鉴定

夏机良, 朱泽安, 张湘涛, 王跃群, 吴秀山*

(湖南师范大学 生命科学学院 心脏发育研究中心, 中国湖南 长沙 410081)

摘要: 通过改进新生小鼠心肌分离及其原代培养方法, 提高心肌细胞的活性和纯度, 构建了新生小鼠心肌细胞分离及原代培养实验平台。采用低浓度的胰酶和 型胶原酶反复消化心脏组织 5~6 次, 然后差速贴壁 30 min 分离纯化心肌细胞, 得到的心肌细胞存活率和纯度高, 细胞搏动率高, 持续时间长。

关键词: 原代培养; 心肌细胞; 分离

中图分类号: Q955

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2009)03-0236-04

The Improvement for Isolation , Culture of Cadiocyte from Neonatal Mice and Identification

XIA Ji-liang , ZHU Ze-an , ZHANG Xiang-tao , WANG Yue-qun , WU Xiu-shan*

(Research Center of Cardiac Development , College of Life Sciences , Hunan Normal University , Changsha 410081 , Hunan , China)

Abstract : Through improve the method of isolating and culturing cadiocyte from neonatal mouse , increasing the liveness and purity coefficient of cadiocyte and establishing a platform to isolate , culture cadiocyte from neonatal mouse. With low density pancreatic enzyme and collagenase to digest the heart tissue 5~6 times , myocardial cells were isolated and cultured with the technique of differential anchoring velocity for once with 30 min , increased survival rate and good quality of myocardial cells , which had a high and lasting pulsation rate were obtained.

Key words : primary culture ; cadiocyte ; isolation

(Life Science Research 2009 ,13(3) 236~239)

体外培养的原代心肌细胞具有自发节律性和收缩性特征, 能够保持其在体内原有的许多结构和功能, 同时排除了神经、体液等因素的干扰, 可以从细胞、分子水平阐明一些心脏发育及疾病发生的基本理论, 在心肌细胞生长发育、生理、代谢、病理等研究中具有重要作用。为了更好的以小鼠为模型研究心脏疾病, 构建一个新生小鼠心肌细胞分离及其原代培养实验平台非常必要。由于心肌细胞再生能力低, 存活率低, 易被非心肌细胞污染, 因此原代心肌细胞的培养仍存在一

定的困难。我们在已有的方法^[1,2]基础上, 通过胰酶和胶原酶组合消化替代单一胰酶消化提高消化效率, 并结合 30 min 差速贴壁和培养基添加 BrdU 抑制残留的成纤维细胞增殖, 从而提高了心肌细胞存活率和纯度, 为研究心脏疾病提供了理想的实验模型。

1 材料与方法

1.1 实验动物

出生 0~3 d 的清洁级 SD 新生小鼠, 雌雄不

收稿日期: 2009-03-12; 修回日期: 2009-05-07

基金项目: 国家自然科学基金(30771146)资助项目

作者简介: 夏机良(1983-), 男, 湖南省益阳市人, 硕士研究生, 主要从事细胞信号传导研究; * 通讯作者: 吴秀山(1952-), 男, 湖南衡阳人, 湖南师范大学特聘教授, 博士生导师, 主要从事心脏发育研究

限,于中南大学湘雅医学院动物学部购买。

1.2 主要的实验仪器和试剂

胰酶(美国 Sigma 公司); 型胶原酶(美国 Sigma 公司); 5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)(美国 Sigma 公司); 肌球蛋白重链蛋白(MF-20)单克隆抗体(武汉博士德公司); 羊抗鼠 Cy3 标记二抗(Santa 公司); Hoechst(美国 Sigma 公司); CO₂ 恒温箱(美国 Thermo 公司); 倒置显微镜 XDS-1B(广州粤显光学仪器有限公司); Nikon-E440 荧光显微镜(日本尼康)。

1.3 心肌细胞分离和培养

1.3.1 心肌细胞分离

取 0~3 d 的 SD 小鼠 10 只,酒精擦洗消毒,用剪刀从最下端肋骨处开始剪开胸腔,找到心脏后,剪取心尖心室部分^[3],立即放入预冷的 ADS 缓冲液(116 mmol/L NaCl, 20 mmol/L HEPES, 0.012% NaH₂PO₄·2H₂O, 0.1% Glucose, 0.04% KCl, 0.01% MgSO₄·7H₂O)中漂洗 3 次,然后将心室组织拿到超净工作台中,剪成 0.5~1 mm³ 大小的组织块^[2],再用 4 °C 预冷的 ADS 缓冲液漂洗 2 次以去除血细胞及漂浮的结缔组织,加入用 ADS 缓冲液配制的消化酶 8 mL(0.05 型胶原蛋白酶和 0.06% 胰蛋白酶),然后将消化酶和组织的混合液吸入到 50 mL 的离心管中,置于 37 °C 恒温水浴摇床中,37 °C 恒温振荡 10 min. 重新加入 8 mL 消化酶,恒温振荡 8 min,小心吸取上清到一个加有 400 μL 胎牛血清的 15 mL 离心管中,混匀,1 000 r/min 离心 5 min,去掉上清,可看到离心管底部有淡黄色的细胞沉淀,加入 37 °C 预热的培养基 3 mL(72% DMEM, 18% M199, 10% 胎牛血清),吸打混匀,然后放到 CO₂ 培养箱(5% CO₂, 37 °C)中培养,培养过程中注意离心管盖子不能拧的太紧,几分钟后要拿出来颠倒混匀几次. 重复消化 4~5 次,直到组织全部消化完。

1.3.2 心肌细胞纯化及原代培养

待组织消化完以后,将收集到的细胞全部吸到一个细胞培养皿中,然后差速贴壁,即将细胞放到培养箱中让其贴壁 30 min,因为心肌成纤维细胞比心肌细胞贴壁快,所以可将心肌成纤维细胞与心肌细胞分离,然后将培养液吸到一个 15 mL 离心管中 1 000 r/min 离心 6 min,同时加入 5 mL 新鲜培养基到培养皿中继续培养心肌成纤维细胞. 将离心后得到的上清吸到另一 15 mL

离心管中,1 000 r/min 再次离心 5 min,将得到的所有细胞沉淀用培养基(含 0.1 mmol BrdU)^[4]吸打混匀 20~50 次,吸到培养皿中,放入 CO₂ 恒温箱中培养。

1.4 细胞存活率计算方法

取相同量的 0.4% 苔芬蓝液与细胞悬液混匀,静置 3~10 min,然后取适量混合液滴于细胞计数板上,计数总细胞数及未染成蓝色的活细胞数. 计数 10 次,取平均值. 细胞存活率(%) = 活细胞数 / 细胞总数(活细胞数 + 死细胞数) × 100%^[4]。

1.5 心肌细胞观察与鉴定

1.5.1 光镜检查

培养 48 h 后,在倒置显微镜下观察心肌细胞,分析用不同的分离培养方法所得到的心肌细胞的质量,并拍照^[5]。

1.5.2 心肌细胞鉴定

将心肌细胞和心肌成纤维细胞接种到盖玻片上面,取培养 48 h 的心肌细胞以及在差速贴壁中获得的心肌成纤维细胞作为阴性对照,吸去培养基,用 PBS 洗两次,用 4% 多聚甲醛固定 30 min,用 PBS 洗一次,用封闭液(1% 的胎牛血清, 5% 的小牛血清, 10% 的山羊血清, 0.05% 的 Triton X-100) 室温封闭 1 h,用 PBS 洗一次,取 100 μL 肌球蛋白重链蛋白(MF-20)单克隆抗体(1:100)滴到接种有心肌细胞的盖玻片上,同时在接种有心肌成纤维细胞的盖玻片上滴 100 μL PBS,室温孵育 1.5 h,用 PBS 洗 3 次,1:500 羊抗鼠 Cy3 标记二抗室温避光孵育 1 h,用 PBS 洗 3 次,最后用 1:1 000 hoechst 染核,室温避光孵育 15 min, PBS 洗一次,在荧光显微镜下观察细胞,并拍照^[6]。

2 实验结果

2.1 心肌细胞活力测定结果

台盼蓝染色,死细胞被染成蓝色,用细胞计数板计数,统计 3 次试验各 4 个视野的细胞数,细胞存活率 ≥ 95%。

2.2 心肌细胞形态学观察与比较

心肌细胞颜色较深,能清楚的分别出细胞形态,心肌组织消化后所有细胞均呈圆形,贴壁刚开始细胞呈圆形,后变为梭形,24 h 后细胞逐渐伸展开,伸出伪足,变成三角形、多边形等不规则形态. 心肌成纤维细胞呈半透明状,其细胞形态不是很清晰. 通过在显微镜下比较传统胰蛋白

酶法和改进的胰蛋白酶+胶原蛋白酶法所分离得到的心肌细胞，发现用改进的方法所得到的心肌细胞要明显多于传统的方法，如图 1 所示。通过比较差速贴壁 20 min，差速贴壁 30 min 并加入

BrdU 和差速贴壁 30 min 且不加入 BrdU 这 3 种方法所得到的心肌细胞，差速贴壁 30 min 并加入 BrdU 所得到的心肌细胞几乎没有心肌成纤维细胞污染，而其他两种方法都有心肌成纤维细胞污

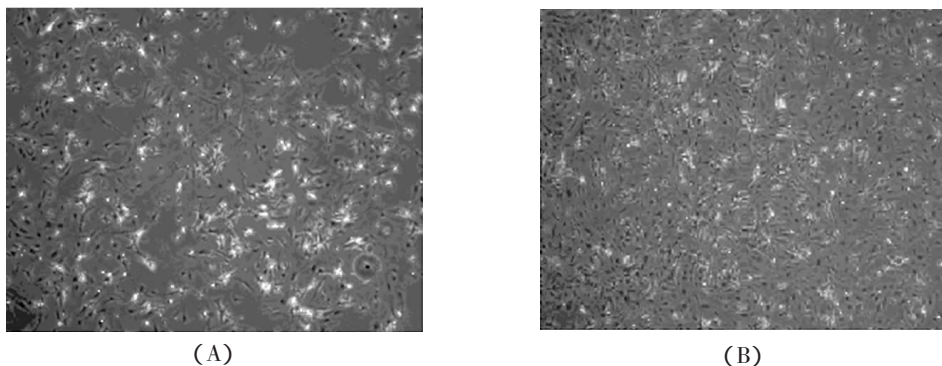


图 1 培养 48 h 心肌细胞(×50)
(A) 传统方法分离得到的心肌细胞；(B) 胰蛋白酶加胶原蛋白酶 分离得到的心肌细胞。

Fig.1 Cardiocytes cultured for 48 hours (×50)

(A) Cardiac myocytes isolated by traditional method ;(B) Cardiac myocytes isolated by trypsinase and Collagenase .

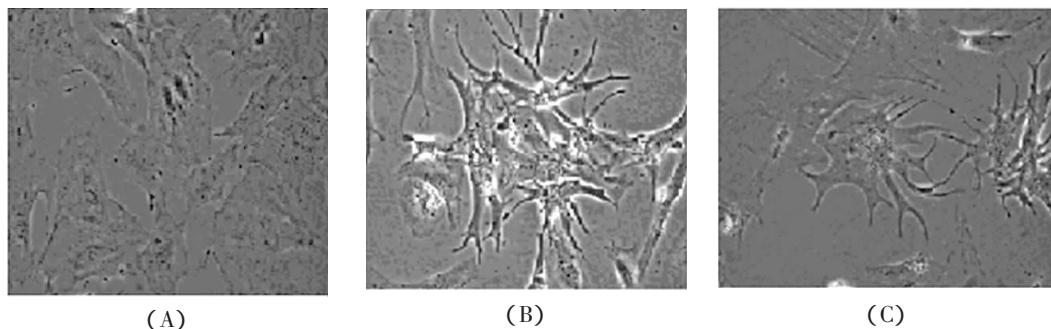


图 2 培养 48 h 心肌细胞(×400)
(A) 差速贴壁 20 min；(B) 差速贴壁 30 min 且加入 0.1 mmol BrdU；(C) 差速贴壁 30 min 但不加入 BrdU.

Fig.2 Cardiocytes cultured for 48 hours(×400)

(A) Differential anchoring velocity for 20 min ; (B) Differential anchoring velocity for 30 min and add 0.1 mmol BrdU ; (C) Differential anchoring velocity for 30 min but do not add BrdU.

染，如图 2 所示。

2.3 心肌细胞鉴定

MF-20 是心肌特异性蛋白，因此 MF-20 只能

识别心肌细胞，在荧光显微镜下可以清晰的看到心肌细胞发出红色荧光，而心肌成纤维细胞不发出荧光. 结果如图 3 所示。

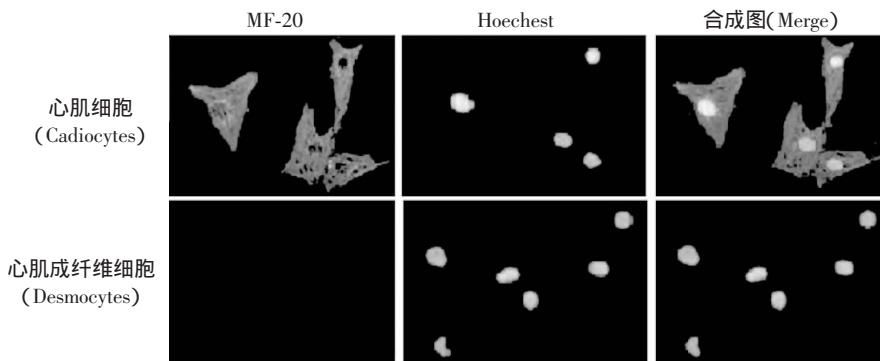


图 3 培养 48 h 的心肌细胞和成纤维细胞免疫荧光实验结果(×400)

Fig.3 The immunofluorescence analysis of cardiocytes and desmocytes cultured for 48 hours (×400)

3 讨论

分离心肌细胞的方法有酶消化法和机械收集法,用吸管反复吹打的机械分离方法,吹打不易控制,极易损伤心肌细胞,成活细胞率较低.胰酶主要用于分解组织间质的蛋白质,作用强,但对细胞膜也有较强的破坏作用,而且组织经过胰酶处理后会释放出大量的胶原蛋白,胶原蛋白呈絮状,使上清很难分离开来,影响心肌细胞获得率.而胶原酶作用缓和,主要用于消化细胞间质中的胶原纤维以释放心肌细胞,因此我们用较低浓度的胰酶和较高浓度的胶原酶的混合消化酶消化心肌组织,既能很快的将心肌细胞分离下来不损害心肌细胞,又能很好的收集心肌细胞.消化酶作用时间对心肌细胞的获得影响很大,消化时间过长,胰酶对心肌细胞损害增加,消化时间过短,胶原酶起不到消化作用.我们通过长时间的摸索,发现消化酶多次消化,每次消化 8 min 所得到的心肌细胞数量最多,活力最好.为了得到纯度高的心肌细胞,差速贴壁是必不可少的实验步骤,因为心肌成纤维细胞贴壁速度很快,而心肌细胞相对较慢,所以通过差速贴壁可以比较有效地去除心肌成纤维细胞.但是差速贴壁的时间不好控制,有文献报道对心肌成纤维细胞和心肌细胞的分离所采用的贴壁时间是不同的,短的为 20 min,长到 3 h,我们通过多次实验发现贴壁 30 min 效果最好,这样既可以去除大部分心肌成纤维细胞又可以不损失心肌细胞.心肌细胞贴壁 48 h 后要换液,新的培养基要改用无血清培养基,而且培养基中要加入 0.1 mmol BrdU, BrdU 能有效地抑制残留的心肌成纤维细胞增殖.培养基的 pH 值也很重要,心肌细胞最适 pH 值在 7.0~7.4 之间^[7].

本研究通过用改良的新生小鼠心肌细胞培养方法,心肌细胞存活率高,心肌细胞和非心肌细胞分离较彻底,细胞贴壁快、搏动早、纯度高,且操作简便,重复性好,是一种较为理想的心肌细胞原代培养方法,可以满足心血管疾病发生、发展机理及心血管药物和心脏组织工程学的研究及多种生理生化实验的要求.

参考文献 (References):

- [1] SIMP SON P, SAVION S. Differentiation of rat myocytes in singly cell cultures with and without proliferating nonmyocardial cells cross striations, ultrastructure, and chronotropic response to isoproterenol[J]. *Circ Res*, 1982, 50 (1):101-116.
- [2] 葛建军,周正春,汪学龙. 原代培养小鼠心肌细胞的观察与鉴定[J]. *中国药理学通报*(GE Jian-jun, ZHOU Zheng-chun, WANG Xue-long. Observation and identification of primarily cultured neonate mice cardiomyocytes[J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*), 2005, 21(11):1402-1433.
- [3] 刘丹,陈和平,何明. 新生大鼠心肌细胞分离与原代培养[J]. *江西医学院学报*(LIU Dan, CHEN He-ping, HE Ming. Separation and primary culture of neonate rattus cardiocyte[J]. *Acta Academiae Medicinae Jiangxi*), 2005, 45(5):53-55.
- [4] 张琳,李东野,王志荣,等. 新生大鼠心肌细胞原代培养方法的改良[J]. *徐州医学院学报*(ZHANG Lin, LI Dong-ye, WANG Zhi-rong, *et al.* An improved method for primary culture of neonate rat myocardial cell[J]. *Acta Academic Medicinae Xuzhou*), 2008, 28(5):343-345.
- [5] 中医研究院西苑医院基础研究所. 心肌细胞的培养及其形态学的初步观察[J]. *中华心血管病杂志*(The Institution of West Park Hospital. Culture and morphonogic initial observation of cardiocyte[J]. *Journal of China Angiocardiopathy*), 1981, 9:216-218.
- [6] KI HYUN KIM, TAE GYUN KIM, BRUCE K, *et al.* Dynamic expression patterns of leucine-rich repeat containing protein 10 in the heart[J]. *Dev Dyn*, 2007, 236:2225-2234.
- [7] 王涛,余志斌,谢满江,等. 新生大鼠心肌细胞培养技巧[J]. *第四军医大学学报*(WANG Tao, YU Zhi-bing, XIE Man-jiang, *et al.* An skill of culture of neonatal rat cardiocyte[J]. *J Fourth Mil Med Univ*), 2003, 24(2):1000-1003.