

# 房颤患者心房肌细胞的原代培养与应用

卞誉豪<sup>1,2</sup>, 张 飞<sup>1\*</sup>

(1. 深圳市南山区人民医院 心胸外科, 中国广东 深圳 518057; 2. 广州医科大学 研究生学院, 中国广东 广州 511436)

**摘要:**探索成功培养房颤(atrial fibrillation, AF)患者原代心房肌细胞的方法, 能够为房颤发病机制的研究奠定实验基础。取心胸外科行迷宫手术患者的左心耳, 利用I型胶原蛋白酶消化法培养房颤患者的原代心房肌细胞, 通过免疫组化进行鉴定, 同时对培养的心房肌细胞进行初步研究。与动物实验相反, 房颤患者心房肌细胞缝隙连接蛋白40(connexin40, Cx40)及Kv1.5钾离子通道蛋白的表达量均降低。由此可见直接研究成人房颤患者的心房肌细胞具有更高的可靠性, 同时也证明了房颤患者心房肌细胞的培养是研究其发病机制的基础。

**关键词:**心房颤动(AF); 心房肌细胞; 细胞培养; 缝隙连接蛋白40(Cx40); 钾离子通道(Kv1.5)

中图分类号: Q2-33, R318.11, R541.75

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2017)01-0051-04

## Primary Culture and Application of Atrial Myocytes from Patients with Atrial Fibrillation

BIAN Yu-hao<sup>1,2</sup>, ZHANG Fei<sup>1\*</sup>

(1. Department of Cardiothoracic Surgery, Shenzhen Nanshan Hospital, Shenzhen 518057, Guangdong, China; 2. Graduate School, Guangzhou Medical University, Guangzhou 511436, Guangdong, China)

**Abstract:** Exploring the methods for primary culture of atrial myocytes from patients with atrial fibrillation (AF) can provide practical methods for research about AF. Here, the left atrial appendage specimens were obtained from patients with AF during cardiac surgery. Then, primary atrial myocytes, which were isolated from the specimens by collagenase digestion method, were identified through immunohistochemistry and analyzed simultaneously. In contrast with some animal experiments, low expressions of connexin40 (Cx40) and Kv1.5 channel protein were found in AF patients. The results showed that studying atrial myocytes of AF patients will be more reliable. Meanwhile, atrial myocyte culture from AF patients is the basis for research on the pathogenesis of AF.

**Key words:** atrial fibrillation (AF); atrial myocytes; cell culture; connexin40 (Cx40); K<sup>+</sup> channel (Kv1.5)

(*Life Science Research*, 2017, 21(1): 051-054)

心房颤动(atrial fibrillation, AF)是临床上常见的心律失常疾病,也是中风等缺血性疾病的危险因素<sup>[1,2]</sup>。房颤发病机制的尚不明确是其治疗效果差强人意的的主要原因。近年来有许多动物实验研究显示,缝隙连接蛋白40(connexin40, Cx40)和Kv1.5通道蛋白的改变在房颤的发生中都起着重要作用<sup>[3-5]</sup>。虽然目前国内外进行了许多关于房颤发病机制的动物实验研究<sup>[6-8]</sup>,但是动物和人在种族、生理及病理改变等方面均存在差异,故动物实验的

研究结果仍有一定的局限性。以往研究往往采用组织贴壁法或胰蛋白酶+胶原酶消化法对小鼠或小儿心肌组织进行细胞培养<sup>[9,10]</sup>,而本实验单独采用I型胶原酶消化法对房颤患者的心房组织进行原代细胞培养。此外,房颤的发病人群多为成人,因此为了更好地研究房颤的发病机制,培养成人房颤患者的心房肌细胞具有重要意义。本研究旨在探索成功培养成人房颤患者原代心房肌细胞的方法,并对所培养细胞中Cx40和Kv1.5的表达

收稿日期:2016-04-05;修回日期:2016-08-30

基金项目:深圳市科创委2013年度知识创新计划-基础研究项目(JCYJ20130322154529556);深圳市南山区2012年度科技计划项目(南科研卫2012003号)

作者简介:卞誉豪(1991-),男,江苏启东人,硕士研究生,主要从事心血管外科疾病临床与基础研究;\*通讯作者:张飞(1971-),男,安徽灵璧人,博士,主任医师,副教授,主要从事心血管外科疾病临床与基础研究, Tel: 0755-26553111-31535, E-mail: fei.zhang263@163.com。

量进行检测,观察两者的表达量是否与动物实验结果有所差异,以期能够为后续房颤发病机制的基础研究提供支持。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 主要材料

5 mL 容积西林瓶;DMEM 培养基(Thermo 公司,美国);进口胎牛血清(Gibco 公司,美国);Plasmocin treatment、TRIzol (Invivogen 公司,美国);I 型胶原酶(200 iu/mL) (Sigma 公司,美国);TaKaRa SYBR Green PCR Kit、PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa 公司,日本);ABI 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems 公司,美国);RIPA 细胞裂解液、loading buffer、SDS-PAGE 凝胶均购于上海碧云天生物技术有限公司;PVDF 膜(Millipore 公司,美国);鼠抗人肌钙蛋白或二型胶原蛋白抗体、SPA2-HRP 标记的二抗、兔 Cx40 多克隆抗体、兔 KCNA5 多克隆抗体、兔 GAPDH 多克隆抗体、山羊抗兔多克隆二抗 IgG (Abcam 公司,美国);Pierce ECL Western 试剂盒 (Life Technologies 公司,美国);ChemiDocXRS (Bio-Rad 公司,美国)。

### 1.2 取材及培养

左心耳标本均取自中南大学湘雅二医院心胸外科行迷宫手术的患者。该实验得到中南大学湘雅二医院伦理委员会的批准。将手术中切除的左心耳标本置于 100 mm×20 mm 的培养皿中,经含双抗的 PBS 缓冲液反复冲洗 3 次后,用眼科剪小心地分离心肌组织和脂肪组织,并将心肌组织剪成 1 mm<sup>3</sup> 体积的小块。将剪碎的心肌组织移入容积为 5 mL 的西林瓶中,加入 200 iu/mL 的 I 型胶原酶,置于 220 r/min 的摇床中 37 ℃消化 6 h。加入少量含血清培养基终止消化,并用 15 mL 离心管收集,800 r/min 离心 5 min。沉淀物用 DMEM 培养基洗涤一次后移入 75 cm<sup>2</sup> 的培养瓶中,加入 10 mL 含 20% 进口胎牛血清的 DMEM 培养基培养,每周换液一次。

### 1.3 心肌细胞免疫组化鉴定及光学显微镜摄片

取第 3 代的心肌细胞消化离心,按 1×10<sup>5</sup> 的细胞密度接种于置有盖片的 6 孔板中,在 5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中 37 ℃培养 24 h 后,用 4% 多聚甲醛固定 30 min。PBS 缓冲液洗 5 min×3 次,以 0.2% Triton-100 通透细胞膜 5 min,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温孵育 10 min。10% 正常山羊血清封闭(室温孵育 15 min),

加鼠抗人肌钙蛋白或二型胶原蛋白抗体 (4 ℃过夜),次日恢复至室温后用 PBS 缓冲液洗 3 min×3 次,加 SPA2-HRP 标记的二抗 (室温 30 min),再用 PBS 缓冲液洗 3 min×3 次,加底物 DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,PBS 缓冲液洗净。苏木素染核 1 min,在普通光学显微镜下进行观察,并拍照。

### 1.4 qPCR 检测 Cx40 及 Kv1.5 mRNA 的表达水平

收集第 3 代细胞,根据说明用 TRIzol 抽提细胞中的总 RNA,并使用 UV 型紫外分析仪测定 mRNA 的浓度。采用 PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 试剂盒制备 cDNA,最后根据 TaKaRa SYBR Green PCR Kit 试剂盒说明进行 PCR。实验中使用 Primer Express Software 2.0.0 进行引物设计,Cx40 上游引物:5'-CCGGCCCACAGAGAAGAATGT-3';下游引物:5'-TCTGACCTTGCTTGCTGCTG-3',KCNA5 上游引物:5'-CAGAGTCTCCAAGCAGAAGG-3';下游引物:5'-CCAGGTGTGGCTTATCTTCG-3',GAPDH 上游引物:5'-ACTCTGGCAAAGTGATATTGTC-G-3';下游引物:5'-CAGCATCACCCCATTTGA-TG-3'。基因的相对表达量通过计算 2<sup>-ΔΔCt</sup> 得出。

### 1.5 Western-blot 检测 Cx40 及 Kv1.5 通道蛋白的表达量

收集第 3 代细胞,使用 RIPA 细胞裂解液提取蛋白质,加入 loading buffer 高温变性后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。PVDF 膜转膜后封闭液封闭 30 min,加入一抗 4 ℃摇床过夜。一抗为兔 Cx40 多克隆抗体(1:500 稀释)、兔 KCNA5 多克隆抗体(1:500 稀释)、兔 GAPDH 多克隆抗体(1:1 000 稀释)。次日 PBST 洗净,山羊抗兔多克隆二抗 IgG (1:2 000 稀释)室温孵育后用 Pierce ECL Western 发光试剂盒显影。蛋白质表达水平使用 Image-Pro Plus 快速 6.0 软件进行分析。

### 1.6 统计学方法

所有数据用平均值±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 *t* 检验方法对结果进行统计分析,结果由 SPSS 17.0 输出,*P*<0.05 具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 原代心房肌细胞的显微观察

原代心房细胞分离 24 h 后可见少量圆形细胞贴壁,72 h 后可见分离的大部分心肌细胞贴壁,贴壁的细胞成团生长,并呈长梭形(图 1A),5 d 左

右细胞可以长满瓶底(图 1B), 以后每周传代一次。从细胞形态及贴壁情况可知, 胶原酶消化具有细胞损伤小、贴壁率高等优点。同时实验发现, 消化 6 h 的细胞生长情况明显优于 4 h (图 1C, D)。由此可见组织的消化程度对于细胞的贴壁生长具有直接影响。

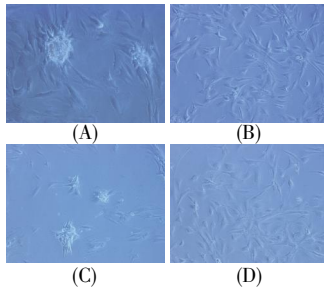


图 1 心房肌细胞的原代培养

(A) 72 h 后贴壁的细胞成团生长( $\times 200$ ); (B) 5 d 后贴壁的细胞基本长满瓶底( $\times 100$ ); (C) 胶原酶消化 4 h ( $\times 100$ ); (D) 胶原酶消化 6 h ( $\times 100$ )。

### Fig.1 Primary culture of atrial myocytes

(A) The adherent cells grew into groups after 72 h ( $\times 200$ ); (B) Most of the cells covered the bottom within 5 d ( $\times 100$ ); (C) Digestion with collagenase for 4 h ( $\times 100$ ); (D) Digestion with collagenase for 6 h ( $\times 100$ ).

## 2.2 原代培养细胞的免疫鉴定

培养的原代细胞经肌钙蛋白或二型胶原蛋白抗体反应后进行特异性染色, 结果显示 90% 的细胞胞浆中肌钙蛋白或二型胶原蛋白均呈棕黄色, 由此可以证明培养的细胞为心肌细胞(图 2)。

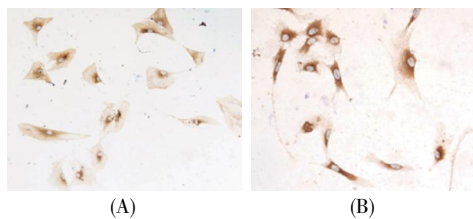


图 2 原代培养细胞的免疫组化鉴定

(A) 肌钙蛋白抗体染色阳性( $\times 200$ ); (B) 二型胶原蛋白抗体染色阳性( $\times 200$ )。

### Fig.2 Immunohistochemical identification for primary culture cells

(A) Stained positive by troponin antibody ( $\times 200$ ); (B) Stained positive by type II collagen antibody ( $\times 200$ ).

## 2.3 房颤患者心房肌细胞 Cx40 及 Kv1.5 的表达量降低

为了明确本实验与以往相关动物实验是否有差异, 我们通过 qPCR 和 Western-blot 方法检测了 30 例房颤患者心房肌细胞和 30 例正常心房肌细胞中 Cx40 及 Kv1.5 通道蛋白的含量。qPCR 检测结果显示, 房颤患者心房肌细胞中 Cx40 及 Kv1.5 的 mRNA 含量均明显低于对照组, 差异具有统计

学意义( $P < 0.01$ ) (图 3A); 同时 Western-blot 结果也显示, 与对照组相比, 实验组中 Cx40 及 Kv1.5 的表达量显著降低, 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ) (图 3B)。上述实验结果说明 Cx40 及 Kv1.5 通道蛋白的降低确实与房颤的发展和维持有关联, 而且我们的检测结果与相关动物实验<sup>[11, 12]</sup>存在一定的差异。

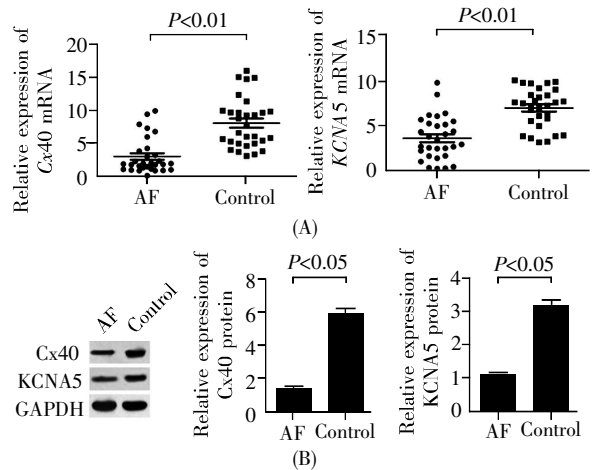


图 3 qPCR 和 Western-blot 检测 Cx40 及 Kv1.5 的表达量  
Fig.3 Expression levels of Cx40 and Kv1.5 detected by qPCR and Western-blot.

## 3 讨论

房颤发病机制的研究一直是心血管领域的热门话题, 许多学者通过动物实验对房颤的发病机制进行了探索。van der Velden 等<sup>[11]</sup>通过 RT-PCR 方法在山羊房颤模型的动物实验中证实, 房颤初期 Cx40 的 mRNA 表达水平升高。Yamashita 等<sup>[12]</sup>在大鼠阵发性房性心动过速模型中检测到, Kv1.5 通道蛋白 mRNA 的表达量迅速增加。与上述结果相反, 我们对房颤患者心房肌细胞的研究表明, Cx40 及 Kv1.5 通道蛋白的表达量均明显降低。由此可见, 动物实验与房颤患者心肌细胞实验存在差异。因此, 成功培养房颤患者的心房肌细胞能够更好地研究其发病机制。

相关研究表明随着年龄的增加心肌细胞的更新能力将大大降低<sup>[13]</sup>, 所以成人心房肌细胞的培养具有一定的难度。以往研究采用组织贴壁法或胰蛋白酶+胶原酶消化法培养原代细胞, 而我们尝试单独使用胶原酶消化法, 并成功培养出了房颤患者的心房肌细胞。在原代细胞的培养中需要注意以下几点: 1) 收取标本时务必注意无菌, 避免标本的污染, 否则后期培养过程中容易产生支原体和霉菌污染。而且, 取得标本后应放入含有 PBS 缓冲液的无菌容器中并尽快进行分离培养, 若无

条件及时处理可放入 4 ℃冰箱中保存,但时间不宜超过 24 h; 2) 标本用含有双抗的 PBS 缓冲液洗净残余的血液,处理组织块时应尽量将脂肪组织剪去以避免培养出过多的杂细胞; 3) 组织块应尽可能的剪小,以便能够充分消化。同时,消化酶应选用作用较温和的胶原蛋白酶,并且组织块在西林瓶中消化时需用封口膜密封瓶口,尽量避免细胞的污染; 4) 消化时间可以根据胶原酶的浓度以及组织块的消化效果来决定,以最终消化液呈絮状为宜; 5) 为了避免细胞污染的发生,在培养时可预先加入适量的 Plasmocin treatment、大扶康和双抗; 6) 原代培养过程中如若发现培养瓶背景出现散在黑点,则可能是支原体污染,可以将细胞消化离心(500 r/min 离心 5 min),重新接种于新的培养瓶并加入少量 Plasmocin treatment 抗支原体污染。

综上所述,直接对房颤患者心房肌细胞进行研究具有更高的可信性。下一步我们将以 Cx40 及 Kv1.5 为靶点做进一步的研究,探索两者在房颤的发生发展中是否具有一定的协同作用,同时也期望能够研发出相关药物,为房颤的预防和治疗带来新的方向。

#### 参考文献(References):

- [1] Hu D, Sun Y. Epidemiology, risk factors for stroke, and management of atrial fibrillation in China[J]. *Journal of the American College of Cardiology*, 2008, 52(10): 865–868.
- [2] Li Y, Wu Y F, Chen K P, *et al.* Prevalence of atrial fibrillation in China and its risk factors[J]. *Biomedical and Environmental Sciences*, 2013, 26(9): 709–716.
- [3] Leaf D E, Feig J E, Vasquez C, *et al.* Connexin40 imparts conduction heterogeneity to atrial tissue[J]. *Circulation Research*, 2008, 103(9): 1001–1008.
- [4] Lübkemeier I, Andrié R, Lickfett L, *et al.* The Connexin40A96S mutation from a patient with atrial fibrillation causes decreased atrial conduction velocities and sustained episodes of induced atrial fibrillation in mice[J]. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2013, 65: 19–32.
- [5] Burashnikov A, Antzelevitch C. Can inhibition of  $I_{Kur}$  promote atrial fibrillation?[J]. *Heart Rhythm*, 2008, 5(9): 1304–1309.
- [6] Ji Q, Liu H, Mei Y, *et al.* Expression changes of ionic channels in early phase of cultured rat atrial myocytes induced by rapid pacing[J]. *Journal of Cardiothoracic Surgery*, 2013, 8: 194.
- [7] Shin S Y, Jo W M, Min T J, *et al.* Gap junction remodeling by chronic pressure overload is related to the increased susceptibility to atrial fibrillation in rat heart[J]. *Europace*, 2015, 17(4): 655–663.
- [8] Qi X Y, Huang H, Ordog B, *et al.* Fibroblast inward-rectifier potassium current upregulation in profibrillatory atrial remodeling[J]. *Circulation Research*, 2015, 116(5): 836–845.
- [9] 刘雄涛, 苏菲菲, 尚福军, 等. 人类心房肌细胞的原代培养与鉴定[J]. *科学技术与工程(Liu Xiong-tao, Su Fei-fei, Shang Fu-jun, et al. Primary culture and identification of human atrial myocytes[J]. Science Technology and Engineering)*, 2014, 14(2): 5–7.
- [10] 张荣庆, 程何祥, 王海昌, 等. 人心房肌细胞的培养与鉴定[J]. *中华心血管病杂志(Zhang Rong-qing, Cheng He-xiang, Wang Hai-chang, et al. Cell culture and identification of human atrial myocytes[J]. Chinese Journal of Cardiology)*, 2004, 32(9): 837–840.
- [11] Van Der Velden H M, Ausma J, Rook M B, *et al.* Gap junctional remodeling in relation to stabilization of atrial fibrillation in the goat[J]. *Cardiovascular Research*, 2000, 46(3): 476–486.
- [12] Yamashita T, Murakawa Y, Hayami N, *et al.* Short-term effects of rapid pacing on mRNA level of voltage-dependent K(+) channels in rat atrium: electrical remodeling in paroxysmal atrial tachycardia[J]. *Circulation*, 2000, 101(16): 2007–2014.
- [13] Jezierska-Wozniak K, Mystkowska D, Tutas A, *et al.* Stem cells as therapy for cardiac disease—a review[J]. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 2011, 49(1): 13–25.
- [8] Williams J S, Hopkins P N, Jeunemaitre X, *et al.* CYP4A11 T8590C polymorphism, salt-sensitive hypertension, and renal blood flow[J]. *Journal of Hypertension*, 2011, 29(10): 1913–1918.
- [9] Zhang R, Lu J, Hu C, *et al.* A common polymorphism of CYP4A11 is associated with blood pressure in a Chinese population[J]. *Hypertension Research*, 2011, 34(5): 645–648.
- [10] Wu C C, Mei S, Cheng J, *et al.* Androgen-sensitive hypertension associates with upregulated vascular CYP4A12–20–HETE synthase[J]. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2013, 24(8): 1288–1296.
- [11] Elsasser S J, Noh K M, Diaz N, *et al.* Histone H3.3 is required for endogenous retroviral element silencing in embryonic stem cells[J]. *Nature*, 2015, 522(7555): 240–244.
- [12] Nasser S A, El-Mas M M. Endothelin ETA receptor antagonism in cardiovascular disease[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2014, 737: 210–213.
- [13] Deshotels M R, Xia H, Sriramula S, *et al.* Angiotensin II mediates angiotensin converting enzyme type 2 internalization and degradation through an angiotensin II type I receptor-dependent mechanism[J]. *Hypertension*, 2014, 64(6): 1368–1375.
- [14] Luo Z, Aslam S, Welch W J, *et al.* Activation of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 coordinates dimethylarginine dimethylaminohydrolase/PPAR-gamma/endothelial nitric oxide synthase pathways that enhance nitric oxide generation in human glomerular endothelial cells[J]. *Hypertension*, 2015, 65(4): 896–902.

(上接第 45 页)