

乳鼠心肌细胞和心脏成纤维细胞的原代培养

张乃菊¹, 陈天平², 祝晓光¹

[摘要]目的:探讨一种简便、可靠的乳鼠心肌细胞和心肌成纤维细胞培养方法。方法:以组织块酶消化法分离细胞,通过差速贴壁分离法收集、培养乳鼠心肌细胞和成纤维细胞。普通光学显微镜观察心肌细胞和成纤维细胞的基本特征及生长特性的变化。结果:心肌细胞 12 h 基本贴壁,1~3 天形成细胞簇并出现同步搏动,心肌细胞纯度为 93%;心肌成纤维细胞第 3~6 代细胞生长良好,纯度达 98% 以上。结论:建立的乳鼠心肌细胞和心肌成纤维细胞体外培养方法是成熟、可靠的。

[关键词] 细胞人工培养;心肌细胞;心肌成纤维细胞;原代培养;乳鼠

[中国图书资料分类法分类号] R 394.26 **[文献标识码]** A

心肌细胞和心脏成纤维细胞作为一种体外实验研究模型,已应用于许多研究,如缺血缺氧再灌注模型、细胞移植、细胞凋亡等,但心肌细胞和心脏成纤维细胞培养常存在污染、消化不良和纯度不够等现象。为此,我们参照 Simpson 等^[1]的培养方法并作了改进,摸索出一种简便、可靠,且同时能培养出心肌细胞和心脏成纤维细胞的方法,为心肌细胞和心脏成纤维细胞的体外研究提供了更有效的技术手段,现作报道。

1 材料与方 法

1.1 试剂及配制 高糖 DMEM (Dubecco 改进的 Eagle 培养基)、I 型胶原酶、0.1% 胰蛋白酶 (Sigma 公司)、胎牛血清、新生牛血清 (杭州四季青公司)、 α -横纹肌肌动蛋白单克隆抗体 (α -sarcomeric actin, α -SA) (武汉博士德生物工程有限公司)。苏木精-伊红染色液:由蚌埠医学院第一附属医院病理科配制。基础培养液:DMEM 培养基 (GIBCO) 10.4 g, HEPES 2.38 g, 加膜去离子水 1 000 ml 溶解,调整 pH 7.2~7.4, 搅拌,0.22 μ m 孔径的微孔滤膜过滤除菌后 4 $^{\circ}$ C 保存。2 周内使用。临用前,加入 10% 胎牛血清为接种培养液,加入 10% 新生牛血清为交换培养液。酶消化液:将胰蛋白酶溶于 PBS 缓冲液 (pH 7.2~7.4) 中,配成 0.1% 胰蛋白酶消化液;将 I 型胶原酶溶于 PBS 缓冲液 (pH 7.2~7.4) 中,配成 0.08% 的胶原酶消化液。0.1% 胰蛋白酶及 0.08% I 型胶原酶以 2:1 混合,现配现用。

1.2 实验动物 1~3 日龄 SD 大鼠 10~25 只,由本院实验动物中心提供。

1.3 实验仪器 超净工作台 (上海浦东物理光学仪器厂)、CO₂ 培养箱 (美国 SHELL LAB 公司)、普通光学显微镜 (日本 Olympus)、离心机 (意大利 ALC 公司) 等。

1.4 方 法

1.4.1 组织消化和分离细胞 将乳鼠于 75% 乙醇缸中浸泡 5 s,转移至超净台。用大头针将其固定于无菌的泡沫板上,用聚维酮碘消毒胸、腹部皮肤。取 2 把弯镊子撕开皮肤,充分撕拉开,再用乙醇棉签消毒。用眼科虹膜剪在剑突处正中中线稍偏左向上开胸后用剪子压住胸骨右缘,使心脏自然跳出,用弯镊子勾住心脏根部,取出心脏,置于盛预冷 PBS 液的培养皿中。将鼠心脏全部取出后,剪去心房、剔除心脏上结缔组织、脂肪及血管,预冷 PBS 液清洗 3 次,去除血污。将心脏剪成约 1 mm \times 1 mm \times 1 mm 的组织块,刮入加有搅拌子的锥形瓶中,酶消化液冲洗剪刀及培养皿,转移至锥形瓶中。加入孵育过的酶消化液为心肌组织的 5 倍,37 $^{\circ}$ C 水浴,打开磁力搅拌器,60 r/min 搅拌 10 min,吸管轻轻吹打组织块 1 min 分散细胞,自然沉降 2 min 后遗弃上清液。再次加入消化酶液 8~15 ml 消化 8 min。

1.4.2 培养细胞 (1) 吸取上清液入离心管,加入预冷培养液 2 ml,吹打均匀后,1 200 r/min 离心 4 min,弃上清,细胞沉淀加预冷的培养液吹打后用封口膜封口放于冰中备用。(2) 剩余组织块重复上述过程若干次,直到组织块消失,分次收获细胞。(3) 将分次收获的细胞悬液集中离心 1 次,将所有细胞沉淀集中于一个离心管加适量培养液再离心 1 次。(4) 弃上清液加 10 ml 接种培养液吹打几次以散开所有的细胞团接种于培养瓶中,在 5% CO₂、95% 空气、37 $^{\circ}$ C 培养箱中放置 1.5 h。(5) 用预温至 37 $^{\circ}$ C 的接种培养液轻轻洗刷培养瓶后收集培养液 (内含心肌细胞) 于有刻度的试管中 (差速贴壁分离法),量取总体积 (ml) 数。吹打均匀用台盼蓝染色细胞记数调整细胞浓度,根据不同实验目的用接种

[收稿日期] 2009-06-30

[作者单位] 1. 蚌埠医学院 药理学教研室,安徽 蚌埠 233030;2. 蚌埠医学院第一附属医院 心血管内科,安徽 蚌埠 233004

[作者简介] 张乃菊 (1981-),女,硕士研究生。

[通讯作者] 祝晓光,研究生导师,教授。

培养液调整细胞浓度为 $(1 \sim 5) \times 10^5/\text{ml}$, 接种于相应的培养器皿中, 37°C 、95% 空气、5% 体积分数 CO_2 孵箱培养。第 2 天部分心肌细胞能跳动, 用预温至 37°C 的 PBS 洗刷以冲洗死细胞及悬浮物后换为交换培养液培养并加入有丝分裂抑制剂 5-溴脱氧尿苷 (BrdU) 0.1 mmol/L , 继续温育。每 2 ~ 3 天换液 1 次。前 3 天加入 0.1 mmol/L BrdU 抑制成纤维细胞生长。取培养 72 h 的单层细胞进行实验。(6) 留下的贴壁细胞 (主要含心肌成纤维细胞) 加入含胎牛血清的培养液 10 ml 继续培养, 每 2 天换液 1 次。培养的心肌成纤维细胞 2 ~ 3 天约 80% ~ 90% 细胞融合, 用 0.25% 胰蛋白酶消化液按 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 细胞密度接种传代培养 (约 1:3)。

1.5 细胞质量评价

1.5.1 台盼蓝染色检测心肌细胞成活率 接种前取吹打均匀的心肌细胞悬液 0.9 ml 加入 0.1 ml 0.4% 台盼蓝液, 吹打混匀, 在室温下放置 3 ~ 5 min, 滴少量混合液入计数板。于倒置相差显微镜下鉴定心肌细胞存活率。正常心肌细胞为透明、折光性强的圆形细胞, 死亡细胞被染成蓝色。细胞成活率 (%) = $[(\text{总细胞数} - \text{着色细胞数}) / \text{总细胞数} \times 100\%]$ 。

1.5.2 形态学观察 (1) 光学显微镜观察: 在普通光学显微镜下观察培养液色泽变化; 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, 以判断心肌细胞培养是否成功和细胞生长是否良好。并在高倍视野下计数有自发搏动的细胞个数, 进行摄像并记录搏动频率。(2) 苏木精 - 伊红染色观察: 95% 乙醇固定细胞爬片 20 min, 流水洗 2 min, 蒸馏水洗 1 min; 哈里斯苏木紫染 5 ~ 7 min, 水洗 2 min; 0.5% 盐酸分化至细胞核染色清晰, 水洗, 并浸于水中至核变蓝; 伊红液染色 3 min, 水洗 30 s ~ 1 min; 80% 乙醇浸洗 7 s, 90% 乙醇、无水乙醇 I、无水乙醇 II 浸洗 1 min; 二甲苯浸洗 5 min。中性树胶封片。(3) 心肌细胞和心肌成纤维细胞纯度鉴定: 根据心肌细胞中所含有的各种蛋白特性, 将其特有的 $\alpha\text{-SA}$ 作为检测鉴定指标。同时, 心脏成纤维细胞的鉴定缺乏一种比较理想的特异性抗原, 而是多用排除法, 即排除心肌成纤维细胞中混杂有心肌细胞, 采用心肌细胞中所特有的 $\alpha\text{-SA}$ 作为检测鉴定指标, 即心肌细胞和心肌成纤维细胞以 $1.0 \times 10^5/\text{cm}^2$ 密度培养在带有载玻片的 6 孔培养板上, 即用 $\alpha\text{-SA}$ 单克隆抗体作为一抗, S-P 法 DAB 显色免疫细胞化学染色, 于无菌条件下, 取培养第 3 天已爬片的心肌细胞和心肌成纤维细胞用磷酸盐缓冲液 (PBS) ($\text{pH} = 7.15$) 轻轻

冲洗 3 次, 冷甲醇固定 30 min; PBS 洗 3 次后用 $\alpha\text{-SA}$ 作免疫细胞化学法进行纯度鉴定。

2 结果

2.1 心肌细胞成活率检查 心肌细胞存活率约为 93%。

2.2 细胞形态学观察

2.2.1 普通光学显微镜观察 (1) 心肌细胞: 培养液呈桃红色。由于生物酶及机械作用的破坏, 刚分离的心肌细胞呈圆形, 培养 2 ~ 4 h 细胞开始贴壁生长, 呈圆形, 后变为梭形, 细胞逐渐展开, 伸出伪足, 变为三角形、星形、多边形等形态, 培养 12 h 细胞基本贴壁, 少数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 72 h 后细胞伸出的伪足相互接触交织成网, 逐渐形成细胞簇, 呈放射状排列的同心圆状, 搏动呈同步性, 收缩明显而有力, 形成功能性合胞体细胞 (见图 1A), 但各个细胞簇搏动的频率仍不相同, 以 40 ~ 90 次/分多见。第 7 ~ 10 天搏动频率达高峰, 可达 200 次/分, 细胞密集相互接触, 交织成网, 形成细胞单层或细胞簇, 其搏动趋向同步化; 以后搏动的比例稳定在 85% 左右, 频率为 20 ~ 150 次/分, 大多数集中在 50 ~ 70 次/分。单个细胞搏动没有成团生长的细胞搏动明显, 且节律不太规则, 同一瓶细胞搏动频率可以不同, 同一簇细胞也可有多个搏动中心。第 11 天细胞搏动频率随培养时间的延长而逐渐减慢。第 21 天时部分细胞停止搏动, 形态发生很大变化, 心肌细胞的胞质出现空泡和粗大颗粒样物质, 细胞皱缩、脱落。(2) 心脏成纤维细胞: 心肌成纤维细胞刚分离时呈圆形, 折光性良好, 悬浮于培养基中。30 min 后大多数已贴壁, 其中部分开始伸出伪足, 表现为小的突起。90 min 后基本贴壁完全, 细胞伸展成梭形, 胞核清晰, 分布较均匀, 散在生长, 不聚集成团。心肌成纤维细胞生长迅速, 2 ~ 3 天即呈融合状态, 细胞排列紧密, 有的交叉重叠生长, 平坦、胞体较大, 细胞质透明, 显得很薄, 细胞核较大, 呈椭圆形, 颜色淡, 通常含 2 ~ 3 个核, 无自发性搏动 (见图 1B)。

2.2.2 苏木精 - 伊红染色观察 功能性合胞体心肌细胞呈放射状排列的同心圆状。细胞核染成蓝色; 细胞质染成淡红色, 核膜较为清晰。中央细胞核质比例大, 核染色质丰富, 生长活跃, 分裂能力强; 中间部分细胞体积增大, 核染色质较大, 胞质丰富, 形状为梭型、球形、星形、菱形等多角形; 最外层细胞体积明显增大, 形状以梭形、长方形为主, 核质比例减小, 胞质丰富 (见图 1C)。而心肌成纤维细胞细胞核染成蓝色; 胞质染成淡红色、核膜较为清晰, 平坦、胞

体较大,胞质透明,显得很薄,细胞核较大,呈椭圆

形,颜色淡(见图1D)。

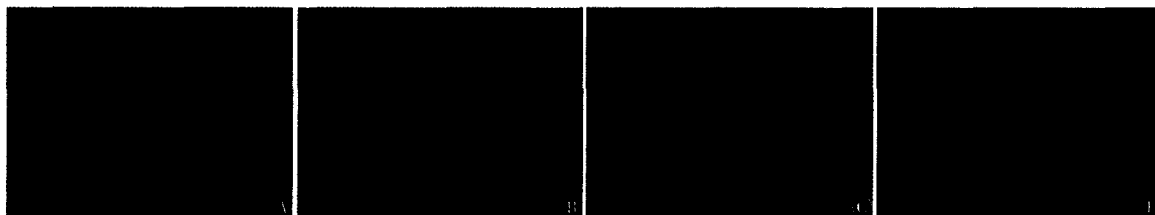


图1 A 成熟的心肌细胞(光镜) 图1 B 心脏成纤维细胞(光镜) 图1 C 功能性合胞体心肌细胞(苏木精-伊红染色) 图1 D 心脏成纤维细胞(苏木精-伊红染色)

2.3 纯度鉴定 培养的心肌细胞中 α -SA抗原表达阳性,呈棕黄色,位于胞质(见图2A),阳性细胞率为92%;心肌成纤维细胞中 α -SA抗原表达阴性(见图2B),阴性细胞率为98%。

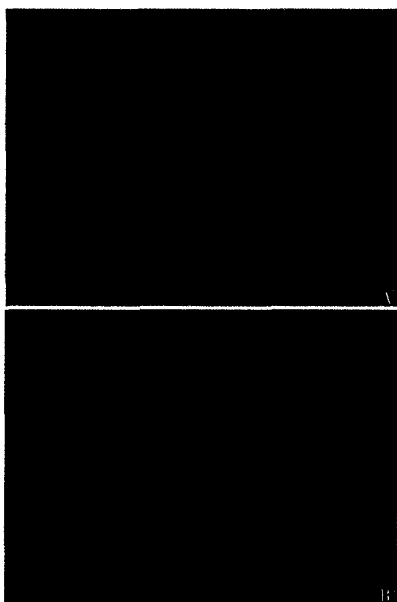


图2 A α -SA在心肌细胞中的阳性表达(S-P法)

图2 B α -SA在心脏成纤维细胞中的阴性表达(S-P法)

3 讨论

乳鼠心肌细胞和心脏成纤维细胞培养过程纷繁复杂,我们认为影响乳鼠心肌细胞和心肌成纤维细胞培养成功的关键因素首先是无菌操作。手术器械均高压灭菌;玻璃器皿用强酸浸泡过夜,流水冲洗20次,去离子水冲洗3次,双蒸水冲洗3次,烤干后高压灭菌备用。相关液体灭菌后分装并用牛皮纸扎口保存在4℃冰箱中;紫外线灯管和超净工作台均用75%乙醇消毒,地面1:100的84消毒液擦洗,空气用臭氧消毒30 min。操作前开鼓风机,用紫外线照射超净工作台30 min,然后吹至实验结束。手术者术前严格洗手,戴无菌帽、口罩,穿无菌手术衣。手术操作过程严格无菌操作,动作迅速,尽量缩短心肌缺血缺氧时间。开胸前乳鼠用乙醇浸泡再用聚维

酮碘消毒,因聚维酮碘是高效消毒剂,对有害细菌及繁殖体等具有较强的杀灭作用,不会像碘酒造成污染,可自行吸收不用脱碘,也比乙醇消毒更彻底。开胸时从剑突下偏左入口,向上剪开胸廓,不打开腹腔,因此不会造成腹腔污染现象。培养过程中每一步操作都应严格遵循实验原则和无菌要求。另外,心肌细胞的观察、照相时间不可过长,次数不可太多,以每天不超过2次,每次不超过5 min为宜,否则可增加污染几率。

其次是消化酶的联合应用。胰酶主要用于分解组织间质的蛋白质,作用强,对细胞膜有较强的破坏作用,因此单纯应用胰蛋白酶消化液对细胞的存活率有负面影响。心肌组织中存在大量的胶原,应用胶原酶可以消化细胞间质中的胶原纤维,此作用缓和,对细胞损伤小。在新生大鼠心肌组织中以胶原I为主,故我们在实验中采用0.1%胰蛋白酶(低浓度)及0.08% I型胶原酶(即所谓的双酶消化)以2:1混合,从而降低对细胞的损伤作用,提高消化的效率和细胞的活力。

最后是细胞的纯化。我们在实验中采用差速贴壁分离、化学试剂抑制和更换不同血清相结合进行纯化的方法。成纤维细胞培养1~1.5 h后基本贴壁完全,而心肌细胞贴壁较慢,因此利用这种贴壁时间的差异性进行分离,就可同步获得心肌细胞和成纤维细胞。本实验采用差速贴壁90 min分离纯化的心肌细胞,纯度达到90%以上;而该法收集到的成纤维细胞需要进行传代,因为其传代后基本保留了原代培养的特点,且贴壁和伸展速率更快,并能进一步提高其纯度及获得大量细胞^[2]。但心肌成纤维细胞传到第6代后,生长开始变慢,形状也发生变化,因此实验大多采用第3~6代。化学试剂抑制法,其原理是根据一些化学物质对一种细胞无明显影响,而对另一种细胞有抑制作用,从而可以分离出一种细胞,例如溴脱氧尿苷、阿糖胞苷、丝裂霉素C等可以抑制成纤维细胞的DNA或蛋白质的合成,从而抑制成纤维细胞的生长^[1,3-6]。因此,本研究在心

肌细胞培养中选用 0.1 mmol/L BrdU 于培养前 3 天在培养基中加入能满足实验需要。本实验在心肌细胞培养中还采取不同时期在培养液中添加不同血清以降低成纤维细胞的繁殖速度也能提高心肌细胞的收缩性能,效果显著^[7]。

本研究用比较简单的试剂和器材,花费较少的人力、物力,成功地进行了新生大鼠心肌细胞和心肌成纤维细胞的分离培养,且心肌细胞存活率高,细胞贴壁快,搏动早,心肌细胞和心肌成纤维细胞的纯度高,且操作简便,重复性好,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,可以满足心血管疾病发生、发展机制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]

- [1] Simpson P, Savion S. Differentiation of rat myocytes in single 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] 陈勇兵, 陈如坤, 陈力, 等. 乳鼠心肌成纤维细胞培养方法的改进 [J]. *江苏医药*, 2005, 31(3): 189 - 190.
 - [3] Miki N, Hamamori Y, Hirata K, *et al.* Transforming growth factor- β 1 potentiated α 1-adrenergic and stretch-induced c-fos mRNA expression in rat myocardial cells [J]. *Circ Res*, 1994, 75(1): 8 - 14.
 - [4] Souren JE, Schenijdenberg C, Verkleij AJ, *et al.* Factors controlling the rhythmic contraction of collagen gels by neonatal heart cells [J]. *In Vitro Cell Dev Biol*, 1992, 28A (3 Pt 1): 199 - 204.
 - [5] Bartoli M, Claycomb WC. Transfer of macromolecules into living adult cardiomyocytes by microinjection [J]. *Mol Cell Biochem*, 1997, 172(1/2): 103 - 109.
 - [6] Clark WA, Decker ML, Janes DM, *et al.* Cell contact as an independent factor modulating cardiac myocytes hypertrophy and survival in longterm primary culture [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1998, 30(1): 139 - 155.
 - [7] 周正任, 金红, 张卓然. 啮齿类动物细胞培养 [M] // 张卓然. 培养细胞学与细胞培养技术. 上海: 上海科学技术出版社, 2004: 65 - 76.
-
- (上接第 557 页)解 GRP78, 导致协调抗肿瘤作用^[10]。
- 体外研究^[11]显示, GRP78 与肿瘤关系密切, 肿瘤细胞恶性程度性地合成 GRP78 维持内环境的稳定, 构筑自身防御机制, 保护肿瘤细胞逃避化疗药物的杀伤作用。可见, ADR 上调 GRP78 的表达是人乳腺癌 SK-BR-3 细胞对 ADR 诱导细胞凋亡敏感性下降的原因之一。利用 siRNA 干扰技术抑制 GRP78 的表达, 可以明显增高 ADR 诱导 SK-BR-3 细胞的凋亡率, 从而达到化疗增敏的目的。
- 综上所述, GRP78 的高表达是乳腺癌化疗耐药的重要原因之一, 抑制 GRP78 的合成可明显提高乳腺癌细胞的凋亡敏感性, 在其他方法不能地解决肿瘤抗药性及其转移问题的情况下, GRP78 的研究可为肿瘤化疗提供新的思路。
- #### [参 考 文 献]
- [1] Ortiz C, Cardemil L. Heat-shock response in two leguminous plants; a comparative study [J]. *Exp Bot*, 2001, 52 (361): 1711 - 1719.
 - [2] Arap MA, Lahdenranta J, Mintz PJ, *et al.* Cell surface expression of the stress response chaperone GRP78 enables tumor targeting by circulating ligands [J]. *Cancer Cell*, 2004, 6(3): 275 - 284.
 - [3] Lee AS. GRP78 induction in cancer; therapeutic and prognostic implications [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(8): 3496 - 3499.
 - [4] Gazit G, Lu J, Lee AS. Deregulation of GRP stress protein expression in human breast cancer cell lines [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 1999, 54(2): 135 - 146.
 - [5] Fernandez PM, Tabbara SO, Jacobs LK, *et al.* Overexpression of the glucose-regulated stress gene GRP78 in malignant but not benign human breast lesions [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2000, 59(1): 15 - 26.
 - [6] Jamora C, Dennert G, Lee AS. Inhibition of tumor progression by suppression of stress protein GRP78/Bip induction in fibrosarcoma B/C 10ME [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93 (15): 7690 - 7694.
 - [7] Xing X, Lai M, Wang Y, *et al.* Overexpression of glucose-regulated protein78 in colon cancer [J]. *Clin Chim Acta*, 2006, 364(1/2): 308 - 315.
 - [8] Tchounwou PB, Wilson BA, Ishaque AB, *et al.* Atrazine potentiation of arsenic trioxide-induced cytotoxicity and gene expression in human liver carcinoma cells (HepG2) [J]. *Mol Cell Biochem*, 2001, 222 (112): 49 - 59.
 - [9] Zhou Y, Lee AS. Mechanism for the suppression of the mammalian stress response by genistein, an anticancer phytoestrogen from soy [J]. *Natl Cancer Inst*, 1998, 90(5): 381 - 388.
 - [10] Reddy RK, Lu J, Lee AS. The endoplasmic reticulum chaperone glycoprotein GRP94 with Ca^{2+} -binding and antiapoptotic properties is a novel proteolytic target of calpain during etoposide-induced apoptosis [J]. *Biol Chem*, 1999, 274 (40): 28476 - 28483.
 - [11] 蒋志文, Le Bourhis X, Hondermarch H. 肿瘤细胞的进行性增殖和 Bip/GRP78 的合成 [J]. *中国药理学通报*, 2002, 18(1): 79 - 83.