

新生 SD 大鼠心肌细胞的原代培养及荧光鉴定

姬婷婷 徐 岩 张建华 赵 勇

摘要 采用单纯胰蛋白酶消化法分离,差速贴壁法纯化新生大鼠心肌细胞。光学显微镜观察心肌细胞基本形态特征,台盼蓝染色检测成活率,肌钙蛋白 I、 α -横纹肌肌动蛋白抗体鉴定心肌细胞。结果显示培养 24 h 后心肌细胞大部分已贴壁,并出现自发搏动现象,48 h 后逐渐伸出伪足相互接触交织成网,72 h 后逐渐形成细胞簇并出现同步搏动;台盼蓝染色法检测细胞成活率达 90% 以上;肌钙蛋白 I 及 α -横纹肌肌动蛋白免疫荧光染色法鉴定心肌细胞纯度达 98% 以上。

关键词 心肌细胞;原代培养;新生大鼠;免疫荧光

中图分类号 R 540.49

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)01-0120-03

心肌细胞原代培养是指在体外适宜的条件下使心肌细胞生长,并保留一定的结构和功能特性。其作为一种体外实验研究模型,已应用于许多研究,如细胞凋亡、缺氧缺血再灌注模型等,培养技术及方法的不同导致新生大鼠心肌细胞原代培养效果差异较大,因此建立一种简单、稳定、有效的培养方法是必要的。该研究参照 Golden et al^[1] 的原代心肌细胞培养方法并加以改进,形成一种简单、稳定、有效的方法,为心肌细胞体外培养提供了有效的技术手段。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 选择 1~3 日龄健康 SD 大鼠 10~15 只,清洁级,雌雄不限,由安徽医科大学实验动物中心提供。

1.1.2 主要试剂 高糖 DMEM、胎牛血清(美国 Hyclone 公司);胰蛋白酶(美国 Invitrogen 公司);兔抗大鼠肌钙蛋白 I 多克隆抗体(英国 Abcam 公司);小鼠抗大鼠 α -Sarcomeric actin 单克隆抗体(北京博士德公司);FITC 标记山羊抗兔 IgG 抗体、FITC 标记山羊抗小鼠 IgG 抗体、山羊封闭血清(北京中杉金桥生物技术有限公司);Triton X-100、台盼蓝(美国 Sigma 公司);DAPI 染色液(碧云天公司);D-Hank

液等自行配置。

1.1.3 实验仪器 ZHJH-C1112B 超净工作台(上海智城公司);SMART Cell CO₂ 培养箱(Heal Force 公司);C-MAG HS7 恒温磁力搅拌器(IKA 公司);XDS-4B 光学显微镜(IC 公司);Nikon ECLIPSE 80i 免疫荧光显微镜(新飞达光学仪器公司);离心机、离心管、吸管、眼科剪、眼科镊等由本实验室提供。

1.2 实验方法

1.2.1 组织消化和细胞分离 配制 0.1% 胰酶 D-Hank 缓冲液,过滤除菌备用;恒温磁力搅拌器预热至 35~37 °C、转速 80~100 r/min;取出生 1~3 日龄健康新生 SD 大鼠,无菌条件下眼科剪剪取乳鼠心室,置于 D-Hank 缓冲液中清洗并剔除心脏上的结缔组织及血块,再用 D-Hank 缓冲液清洗 1 次,去除血细胞;将漂洗后的心肌组织在少量 D-Hank 缓冲液中用眼科剪剪成约 1 mm³ 的小块,转移至 100 ml 无菌锥形瓶中,静置 1 min 弃上清液,然后加入 10 ml 0.1% 的胰酶,吸管将心肌组织打散,放入搅拌子,37 °C 水浴中磁力搅拌器分次消化。首次与第 2 次消化 10 min 后的消化液丢弃(主要含红细胞);重新加入 0.1% 胰酶 15 ml,消化 15 min,随后收集每次消化的细胞悬液,收集的细胞悬液应及时采用含有 10% 胎牛血清的培养基终止胰蛋白酶的作用。重复上述消化、收集细胞、终止消化等步骤 6~7 次,直至组织变白。

1.2.2 心肌细胞纯化和培养 将收集的细胞悬液 800 r/min 离心 5 min,弃上清液,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基重悬细胞,并将细胞悬液过滤后转移至培养瓶中,置于含 5% CO₂ 细胞培养箱中 37 °C 培养 1 h 后,将未贴壁的细胞悬液转移至另一培养瓶,继续培养 1 h 后,将未贴壁的细胞悬液转移至离心管中,台盼蓝染色法检测细胞成活率。细胞计数后,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基将细胞密度调整至 3×10^5 /ml,并接种于 6 孔培养板中,置于含 5% CO₂ 细胞培养箱中 37 °C 培养。24 h 左右光学显微镜下可见心肌细胞节律性收缩,换液去除未贴壁的细胞悬液,更换新鲜培养基。

1.2.3 台盼蓝染色法检测心肌细胞成活率 取 0.5 ml 0.4% 台盼蓝染色液、0.3 ml 磷酸盐缓冲液

2013-07-14 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:040713103)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院心血管内科,合肥 230022

作者简介:姬婷婷,女,硕士研究生;

徐 岩,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail: anyi_xuyan@hotmail.com

(PBS 0.01 mol/L, pH 7.2) 和 0.2 ml 吹打均匀的心肌细胞悬液,充分混匀,混合液放置 5~10 min,吸管滴少量混合液入计数板。显微镜下计数活细胞数。正常细胞不被染色,呈透明、折光性强的细胞,细胞死亡后细胞膜通透性增大,台盼蓝进入细胞内,细胞呈蓝色。细胞成活率(%) = (总细胞数 - 着色细胞数) / 总细胞数 × 100%。

1.2.4 免疫荧光染色法鉴定心肌细胞纯度 取培养 48 h 已爬片心肌细胞,用 PBS 轻轻冲洗 1 次;冷 75% 乙醇溶液固定 15 min, PBS 洗 3 次;加 0.3% Triton X-100 通透 30 min, PBS 洗 3 次;山羊血清室温封闭 60 min;1:200 稀释的兔抗大鼠心肌肌钙蛋白 I 多克隆抗体(1:50 稀释的小鼠抗大鼠 α -Sarcomeric actin 单克隆抗体)于 4℃ 过夜(阴性对照用 PBS 代替),PBS 洗 3 次;1:100 稀释的山羊抗兔 IgG 抗体(1:50 稀释的山羊抗小鼠 IgG)孵育 1 h;加 DAPI 染色液孵育 10 min, PBS 洗 3 次;抗荧光淬灭液封片后立即倒置荧光显微镜下观察,每个盖玻片随机选择 8 个视野,拍照后分析心肌细胞纯度。

2 结果

2.1 心肌细胞形态学观察 普通光学显微镜观察显示,刚分离的心肌细胞呈圆形,培养 3~5 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,变为多边形、不规则等形态;24 h 后细胞基本贴壁,多数贴壁的单个细胞出现自发性搏动,搏动频率和节律不同,细胞生长密度可达到板底的 80%;48 h 后伸出伪足相互接触交织成网,搏动趋于同步性;72 h 后会逐渐形成细胞簇并出现同步搏动,形成功能性合胞体细胞,见图 1。

2.2 心肌细胞成活率检测 台盼蓝染色可见分离细胞成活率达 90% 以上。

2.3 心肌细胞纯度鉴定 培养 48 h 的心肌细胞经肌钙蛋白 I 多克隆抗体、 α -Sarcomeric actin 单克隆抗体免疫荧光染色后,于倒置荧光显微镜下观察可见肌钙蛋白 I 多克隆抗体(绿色荧光,位于细胞质)表达阳性率达 98% 以上, α -Sarcomeric actin 单克隆抗体(绿色荧光,位于细胞质)表达阳性率达 98% 以上,见图 1,DAPI 染色的细胞核呈蓝色荧光,而阴性对照无荧光呈现。

3 讨论

新生大鼠心肌细胞分离以往常采用胰蛋白酶联合胶原酶消化法进行分离^[1-2],但该研究经多次实验发现单用 0.1% 胰蛋白酶(不含 EDTA)消化分离

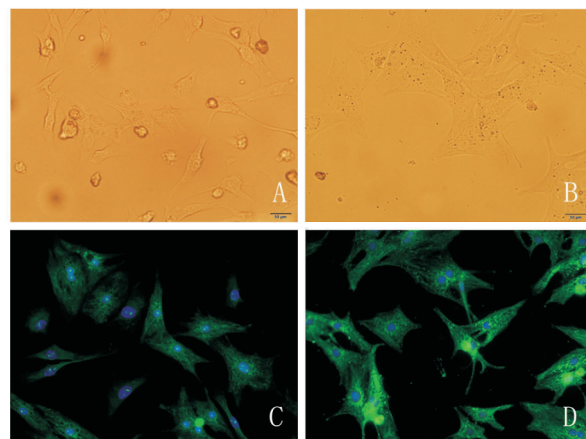


图 1 原代培养的新生 SD 大鼠心肌细胞 ×400

A: 培养 24 h; B: 培养 48 h; C: 培养 48 h 肌钙蛋白 I 多克隆抗体表达(免疫荧光染色); D: 培养 48 h α -Sarcomeric actin 单克隆抗体表达(免疫荧光染色)

细胞,避免用胶原酶消化对心肌细胞造成损伤,使分离细胞的存活率高达 90%,同时降低了实验成本。采用恒温磁力搅拌器分次消化细胞,转速 80~100 r/min,温度 35~36℃,避免既往用吸管反复吹打消化法对心肌细胞造成的机械损伤,提高消化效率,缩短消化时间,降低细胞膜受损程度,提高细胞获得率及存活率。采用两次差速贴壁法纯化心肌细胞,心肌细胞纯化方法有差速贴壁法^[3]和化学试剂抑制法^[4],差速贴壁法是根据心肌细胞和成纤维细胞在培养器皿表面贴壁生长的速度不同而纯化心肌细胞,其对心肌细胞无损伤;化学试剂抑制法是利用特定的化学物质抑制生长活跃的成纤维细胞增殖,即在培养基中加入有丝分裂抑制剂如阿糖胞苷、5-溴脱氧尿苷等抑制心肌成纤维细胞 DNA 合成或蛋白质合成,但有文献^[4]报道认为其对心肌细胞有损伤;两次差速贴壁后培养 48 h,经肌钙蛋白 I 多克隆抗体和 α -Sarcomeric actin 单克隆抗体鉴定,心肌细胞的纯度高达 98%,在不损伤和影响心肌细胞生长的同时,也提高了心肌细胞纯度。细胞接种密度控制在 $2.5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ /ml^[5],培养 24 h 后细胞生长密度可达到板底的 80%,避免细胞接种过多发生营养不良或细胞接种过少导致心肌细胞间无法进行信息交流。此外,取材过程严格无菌操作、移取心脏迅速、熟练掌握实验操作流程等缩短心肌细胞缺氧缺血时间,提高了细胞的存活率。

参考文献

- [1] Golden H B, Gollapudi D, Gerilechaogetu F, et al. Isolation of cardiac myocytes and fibroblasts from neonatal rat pups[J]. Methods Mol Biol 2012 843:205-14.

◇ 经验与体会 ◇

还原型谷胱甘肽联合腺苷蛋氨酸治疗化疗药物性肝损害的临床疗效

时兆燕^{1,2} 汪伟民¹ 邓松华³

摘要 回顾性分析还原型谷胱甘肽(GSH)联合腺苷蛋氨酸治疗化疗药物引起肝损害的临床疗效。83例化疗患者随机分为联合组($n=43$)和对照组($n=40$),在预防性保肝药物应用基础上,对照组予GSH 180 mg 静滴1次/d,联合组在对照组基础上加用腺苷蛋氨酸 1.0 g 静滴1次/d。两组疗程12 d。联合组较对照组疗效更佳,联合组总有效率95.35%,明显高于对照组80.00%($P<0.05$)。联合腺苷蛋氨酸治疗化疗药物性肝损害临床疗效肯定,优于单用。

关键词 还原型谷胱甘肽;腺苷蛋氨酸;化疗药物性肝损害;恶性肿瘤

中图分类号 R 575.3

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)01-0122-03

2013-08-15 接收

基金项目 安徽省教育厅自然科学重点科研项目(编号: KJ2010A177)

作者单位: ¹安徽医科大学第一附属医院呼吸内科,合肥 230022

²安徽省蚌埠市第三人民医院干部内科,蚌埠 233000

³安徽医科大学病理生理学教研室,合肥 230032

作者简介: 时兆燕,女,住院医师,硕士研究生;

邓松华,男,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: desoh@126.com

化疗是恶性肿瘤除手术外的主要治疗方法,随着新的抗肿瘤药物的增多及化疗方案的合理应用,肿瘤化疗的疗效有了一定的提高,但多数化疗药物常见的毒性反应之一就是肝损害,使部分患者不能按期完成化疗而影响疗效,结果可能导致治疗失败,因此有效预防和治疗化疗药物性肝损害在临床工作中有着非常重要的意义。该研究采用还原型谷胱甘肽(reduced glutathione, GSH)联合腺苷蛋氨酸治疗化疗药物性肝损害,观察其疗效。

1 材料与方法

1.1 一般资料

1.1.1 入选标准 选择2010年6月~2011年6月蚌埠市第三人民医院83例肺癌患者作为研究对象,经病理或细胞学确诊为非小细胞肺癌且有化疗的适应证:①经病理或细胞学证实为鳞癌、腺癌、腺鳞癌或大细胞癌但不能手术的Ⅲ期患者;②手术后复发转移者或其他原因不宜再手术的Ⅲ期患者;③经手术探查、病理检查有以下情况之一者:有残留灶、胸

[2] 张乃菊,陈天平,祝晓光. 乳鼠心肌细胞和心脏成纤维细胞的原代培养[J]. 蚌埠医学院学报, 2010, 35(6): 558-61.

[3] Zhang Z Y, Liu X H, Hu W C, et al. The calcineurin-myocyte enhancer factor 2c pathway mediates cardiac hypertrophy induced by endoplasmic reticulum stress in neonatal rat cardiomyocytes[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010, 298(5): H1499-509.

[4] Wu L X, Gu X F, Zhu Y C, et al. Protective effects of novel single compound, Hirsutine on hypoxic neonatal rat cardiomyocytes[J]. Eur J Pharmacol, 2011, 650(1): 290-7.

[5] Prasad A M, Inesi G. Analysis of Calcium transients in cardiac myocytes and assessment of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase contribution[J]. Methods Mol Biol, 2012, 798: 411-21.

Primary culture and identification of cardiomyocytes of neonatal SD rats

Ji Tingting, Xu Yan, Zhang Jianhua, et al

(Dept of Cardiovasology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Neonatal rat myocytes were digested with trypsin and purified by technique of differential anchoring. The cardiomyocytes cultured were observed under light microscope, stained with trypan blue to count the living cells and identified with cTnI and α -Sarcomeric actin. The results showed most of cardiomyocytes adhered to culture plates after 24 hours of culture and a part of cells were jumping synchronously. 48 hours later cells gradually extended pseudopodia, contacted with each other and interwoven into a network. After 72 hours of culture, the cells gradually formed cell clusters and were beating synchronously. Trypan blue staining showed the survival rate of cardiomyocytes was more than 90%. cTnI and α -Sarcomeric actin immunofluorescence staining showed that the purity of cardiomyocytes cultured was more than 98%.

Key words cardiomyocytes; primary culture; neonatal rat; immunofluorescence