

· 论 著 ·

新生大鼠原代心房肌细胞钙超载模型的建立^{*}丁 翔, 全识非, 秦 瑶, 宋治远[△]

(第三军医大学西南医院心内科, 重庆 400038)

摘要:目的 探讨建立新生大鼠原代心房肌细胞钙超载模型的方法。方法 用消化法分离新生大鼠心房肌细胞并进行原代培养。纯化后随机分为对照组(C组)、实验组(E1、E2、E3组),依次加入不同浓度(0.5、1.0、2.0 $\mu\text{mol/L}$)伊屋诺霉素(ionomycin),以钙离子指示剂 Fluo-3/AM 负载心房肌细胞,激光扫描共聚焦显微镜检测心房肌细胞游离钙离子浓度($[\text{Ca}^{2+}]_i$),建立新生大鼠心房肌细胞不同程度钙超载模型。结果 (1)培养至第4天,细胞生长密度可以达到瓶底70%左右;免疫组织化学染色鉴定:90%以上培养细胞 α -肌动蛋白抗体染色呈阳性;(2)对照组心房肌细胞活性率为(73.00 \pm 2.37)%,与各实验组心房肌细胞活性率比较,差异无统计学意义($P>0.05$);(3)经不同浓度 ionomycin 处理1h后,各实验组心房肌细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 明显增高,与对照组比较,差异有统计学意义(431.54 \pm 20.97、705.87 \pm 28.34、1305.05 \pm 53.69 vs 257.08 \pm 18.63, $P<0.05$),且各实验组间心房肌细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 水平随 ionomycin 浓度的增加而上升,实验组间比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。光镜下形态学观察表明,随 ionomycin 浓度的增加,荧光强度逐渐加强,呈浓度依赖性。结论 应用钙离子载体 ionomycin 能够建立可靠的心房肌细胞钙超载模型。

关键词:大鼠;伊屋诺霉素;心肌细胞;钙超载;激光共聚焦

中图分类号:R541.7502

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)11-1331-03

The study of calcium overload model with primary atrial myocytes of neonate rats^{*}

DING Xiang, TONG Shi-fei, QIN Yao, et al.

(Department of Cardiology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the modeling of calcium overload with primary atrial myocytes of neonate rats. **Methods** The atrial myocytes were disassociated from neonate rats with digestion method and cultured for 96 hours. Co-incubated with the ionomycin(0, 0.5, 1.0, 2.0 $\mu\text{mol/L}$, respectively), the cells were divided into control group and experiment group(E1, E2 and E3) and loaded with Ca^{2+} indicator Fluo-3 /AM. The levels of intracellular Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) were measured with laser confocal scanning microscope. **Results** (1) More than 90% of cultured cells were positive to α -actin antibody. (2) The activity ratio of cells in control group was (73.00 \pm 2.37)%. Compared with each subgroup of experiment, there was no significant difference($P>0.05$). (3) One hour after treated with different concentrations of ionomycin, the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ of atrial muscle cell was significantly increased in all the experimental groups(431.54 \pm 20.97, 705.87 \pm 28.34, 1305.05 \pm 53.69 vs 257.08 \pm 18.63, respectively, $P<0.05$). There was significant difference between each subset of the experimental group. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ level and the fluorescence intensity of the myocytes increased gradually in a dose-dependent manner with the concentration of ionomycin. **Conclusion** Calcium overload model with primary atrial myocytes of neonate rats can be built by ionomycin.

Key words: rats; ionomycin; atrial myocytes; calcium overload; laser confocal scanning microscopy

心房颤动(房颤)是临床常见的心律失常之一,临床危害严重,其确切的发病机制目前仍不清楚。近年研究表明,房颤的发生和维持与心房肌电重构和结构重构有关,而心房肌细胞内游离钙离子浓度($[\text{Ca}^{2+}]_i$)超载在这些重构中可能起着至关重要的作用^[1-2]。因此,建立稳定、有效的心房肌细胞钙超载模型有助于进一步探讨房颤的发生机制。本实验拟采用钙离子载体——伊屋诺霉素(ionomycin)建立新生大鼠心房肌细胞的钙超载模型,为深入研究房颤的发生机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物及材料 新生SD大鼠2d龄,雌雄不限,由第三军医大学实验动物中心提供。激光共聚焦显微镜(Zeiss LSM 510 META, 德国);DMEM培养基、D-hank's液(Hyclone公司);新生牛血清(PAA公司),胰蛋白酶、I型胶原酶、5-溴

脱氧尿核苷(5-Brdu)、Fluo-3/AM、Pluronic-F127、ionomycin(Sigma公司);小鼠抗大鼠Sarcomeric actin单抗、FITC标记山羊抗小鼠IgG(博士德公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 心房肌细胞的分离及纯化培养 参考 Benardeau 等^[3]的原代心房肌细胞培养方法并加以改良。取新生大鼠心脏置于4℃预冷的D-hank's液中,清洗后取左、右心房,并剪成约1mm³大小的肌粒。加入0.08%胰酶,37℃水浴5min,吹打后加入含血清培养基终止消化,自然沉淀,上清液用200目金属滤网过滤后移入离心管。剩余组织块加入0.08%胶原酶,置于孵箱30min,吹打后吸取上清液,用200目金属滤网过滤后移入离心管。收集的细胞悬液1000r/min离心10min,弃上清液,加入DMEM培养液(含15%新生牛血清),调整细胞数

^{*} 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30700315)。 [△] 通讯作者,电话:023-68765168;E-mail: zysong@public.cta.cq.cn。

至 1.0×10^6 /mL 后接种培养。采用差速贴壁分离技术,纯化培养 96 h 开始试验。并观察细胞形态、大小、生长密度、细胞贴壁时间及单细胞出现搏动时间等。

1.2.2 心房肌细胞免疫荧光染色鉴定 细胞用 4% 多聚甲醛固定 20 min,封闭后加小鼠抗大鼠 α -肌动蛋白 4 °C 过夜,PBS 洗 5 min \times 3 次,加大鼠抗小鼠 IgG-FITC(37 °C,1 h),DAPI 标记细胞核 5 min,激光共聚焦显微镜下观察并摄片。

1.2.3 心房肌细胞钙超载模型的建立

1.2.3.1 实验分组 将纯化培养的心房肌细胞随机分为对照组(C 组)、实验 1 组(E1 组)、实验 2 组(E2 组)及实验 3 组(E3 组)。各组分别加入 ionomycin 0、0.5、1.0、2.0 μ mol/L,并孵育 60 min。

1.2.3.2 心房肌细胞活力检测 收集各组细胞,0.4% 台盼蓝溶液 50 μ L 与等体积心肌细胞悬液混合。随后置于倒置显微镜下进行心肌细胞活性评价。共计数 200 个细胞,蓝色细胞单独计数,计算活性细胞百分比例。活性细胞百分比例=(200—蓝色细胞数)/200 \times 100%。

1.2.3.3 激光扫描共聚焦显微镜检测细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 将 Fluo-3/AM(终浓度为 4 μ mol/L)和 Pluronic-F127(终浓度为 1 μ L/mL)加于培养有心房肌细胞的盖玻片上,然后置于 37 °C 培养箱避光孵育 45 min。负载的心房肌细胞与 ionomycin(0、0.5、1.0、2.0 μ mol/L)作用 60 min 后在 488 nm 波长激光激发下观察并摄片(物镜 \times 40),每张样本取 15~20 个视野,待实验结束后对图像进行数据分析。每组检测 100 个细胞,以平均荧光强度代表细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 。

1.3 统计学方法 采用 SPSS13.0 统计软件,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组比较采用单因素方差分析(计量资料)和 χ^2 检验(计数资料)。

2 结果

2.1 心房肌细胞培养及免疫荧光鉴定 培养至第 4 天,在倒置显微镜下观察到心房肌细胞有多种形态,以梭形、三角形与不规则形为主(见封 3 图 1A),细胞生长密度可以达到瓶底 70% 左右。部分心房肌细胞在贴壁后 24~48 h 开始出现规律搏动,搏动频率为(93 \pm 15)次/分。免疫荧光结果显示 90% 以上培养细胞 α -肌动蛋白抗体染色呈阳性,DAPI 标记细胞核为蓝色圆形或椭圆形,少数为双核(见封 3 图 1B)。

2.2 心房肌细胞钙超载模型

2.2.1 ionomycin 对心房肌细胞活力的影响 不同浓度 ionomycin 孵育细胞 1 h,光镜下观察各组心房肌细胞形态无明显区别。对照组心房肌细胞活性率为(73.00 \pm 2.37)%,E1、2、3 组细胞活性率分别为(71.80 \pm 1.92)%、(70.50 \pm 2.00)%和(72.12 \pm 1.98)%。各组间细胞活性率比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.2.2 ionomycin 对心房肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响 对照组心房肌细胞静息 $[Ca^{2+}]_i$ 为 257.08 \pm 18.63,经过不同浓度 ionomycin(0、0.5、1.0、2.0 μ mol/L)处理 1 h 后,实验各组细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 均明显增高,荧光像素值分别为 431.54 \pm 20.97、705.87 \pm 28.34 和 1305.05 \pm 53.69,与对照组 257.08 \pm 18.63 比较差异有统计学意义($P<0.05$);且 E3 组与 E1、2 组比较差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。形态学观察发现,随着加入 ionomycin 浓度的增加,细胞的荧光强度随之增加,呈浓度依赖性(见封 3 图 2)。

表 1 ionomycin 对心房肌细胞荧光强度的影响

组别	ionomycin(μ mol/L)	荧光像素值($\bar{x} \pm s$)	n(细胞数)
对照组	0	257.08 \pm 18.63	100
E1 组	0.5	431.54 \pm 20.97 ^{abc}	100
E2 组	1.0	705.87 \pm 28.34 ^{ab}	100
E3 组	2.0	1305.05 \pm 53.69 ^a	100

与对照组比较,^a: $P<0.05$;与 E3 组比较,^b: $P<0.05$;与 E2 组比较,^c: $P<0.05$ 。

3 讨论

细胞内钙离子在各种生命现象的信号转导中起重要作用,作为一种重要的第二信使广泛参与多种细胞的生物学功能,如参与介导细胞对外界刺激的应答反应、实现信息的跨膜传导等,也是细胞损伤的重要介导因素^[4-5]。细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的相对稳定对于保持细胞的正常功能具有重要作用。各种原因引起的细胞内钙含量异常升高并导致细胞结构损伤和功能代谢障碍的现象称为钙超载,钙超载可以活化细胞内多种酶,诱发细胞凋亡,也是许多病理生理过程的启动因素^[6-8]。因此,心肌细胞钙超载模型是阐明心脏各种病理生理改变及其机制的重要研究工具。目前,细胞钙超载模型的建立有多种方法,在体法如缺血再灌注模型^[9],如离体法应用去极化液(高浓度的 KCl 溶液)、甲状旁腺素(PTH)及钙离子导入剂等^[10]。

钙离子导入剂从 20 世纪中期就开始用于心房肌细胞的实验研究。已有研究发现钙离子导入剂——A23187 和 ionomycin 有很高的专一性,且 ionomycin 运输钙离子的能力明显优于 A23187^[11]。此外,ionomycin 转运钙离子进入细胞内后可同时从细胞内转运出 2 个氢离子,这样就能使细胞膜内外侧保持等电位^[12]。本研究中各实验组心房肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 均明显增高,与对照组比较,差异有统计学意义($P<0.05$),且各实验组的心房肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 水平随 ionomycin 浓度的增加而上升。提示本文采用的 3 种不同浓度的 ionomycin 均增加了心肌细胞内 $[Ca^{2+}]_i$,造成了原代培养的心房肌细胞钙超负荷,且呈浓度依赖性。本实验采用激光扫描共聚焦显微镜(LSCM)测量 Fluo-3/AM 负载的钙离子荧光值及采集荧光图像,而 Fluo-3/AM 荧光探针作为新一代的长波钙离子荧光探针,能被可见光激发,激发波长为 488 nm,因而减少了紫外光激发时对活细胞的光损伤。Fluo-3 的兴奋峰值位于 560 nm,其钙离子结合式的荧光强度较游离形式高 40~100 倍,因而避免了自发光干扰^[13]。用 Fluo-3/AM 负载胞内钙离子可以高效检测细胞内钙离子的变化,敏感度高,特异性强。

此外,对于培养心房肌细胞钙超载模型,细胞的活性也是实验成功与否的关键。本实验对不同浓度 ionomycin 与心房肌细胞作用后的细胞活性进行了观察,发现对照组心房肌细胞活性率为(73.00 \pm 2.37)%,与各实验组间的细胞活性率相比,差异无统计学意义,提示本文中所采用的钙离子导入剂浓度不会对心房肌细胞活性产生影响。因此,应用 ionomycin 建立原代培养心房肌细胞钙超载模型是可行的,也为今后进一步深入探讨房颤发生机制奠定了一定的实验基础。

参考文献:

[1] Van Petegem F, Minor DL. The structural biology of volt-

- age gated calcium channel function and regulation[J]. Biochem Soc Trans, 2006, 34(5): 887.
- [2] El-Armouche A, Boknik P, Eschenhagen T, et al. Molecular determinants of altered Ca^{2+} handling in human chronic atrial fibrillation[J]. Circulation, 2006, 114(7): 670.
- [3] Benardeau AH, Atem SN, Rucker-Martin C, et al. Primary culture of human atrial myocytes is associated with the appearance of structural and functional characteristics of immature myocardium[J]. J Mol Cell Cardiol, 1997, 29(5): 1307.
- [4] Rousset M, Charnet P, Cens T. Structure of the calcium channel beta subunit; the place of the beta-interaction domain[J]. Med Sci, 2005, 21(3): 279.
- [5] Nattel S, Maguy A, Bouter S, et al. Arrhythmogenic ion-channel remodeling in the heart: heart failure, myocardial infarction, and atrial fibrillation[J]. Physiol Rev, 2007, 87(2): 425.
- [6] Katra RP, Oya T, Hoeker GS, et al. Ryanodine receptor dysfunction and triggered activity in the heart[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007, 292(5): 144.
- [7] Katra RP, Laurita KR. Cellular mechanism of calcium-mediated triggered activity in the heart[J]. Circ Res, 2005, 12(2): 17.
- [8] Ding HL, Zhu HF, Dong JW, et al. Intermittent hypoxia protects the rat heart against ischemia/reperfusion injury by activating protein kinases[J]. Life Sci, 2004, 75(21): 2587.
- [9] 魏宏, 何并文, 黄冰, 等. 前列地尔后处理对大鼠缺血再灌注心肌 Bcl-2、Bax 表达的影响[J]. 广西医学, 2009, 31(6): 786.
- [10] Friehs I, Cao-Dank H, Stamm C, et al. Postnatal increase in insulin-sensitive glucose transporter expression is associated with improved recovery of postischemic myocardial function[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2003, 126(1): 263.
- [11] Liu CM, Herman TE. Characterization of ionomycin as a calcium ionophore[J]. J Biol Chem, 1978, 253(17): 5892.
- [12] Wheeler JJ, Veirol JA, Cullis PR. Ionophore-mediated loading of Ca^{2+} into large unilamellar vesicles in response to transmembrane pH gradients[J]. Mol Membr Boil, 1994, 11(3): 151.
- [13] 韩洁, 李剑利, 贺怀贞, 等. 新型荧光素类细胞钙离子荧光探针 Fluo-3 的设计、合成及表征[J]. 高等学校化学学报, 2008, 29(10): 10.

(收稿日期: 2010-01-22)

(上接第 1330 页)

- K, et al. Achieved platelet aggregation inhibition after different antiplatelet regimens during percutaneous coronary intervention for ST-segment elevation myocardial infarction[J]. J Am Coll Cardiol, 2004, 44: 1187.
- [12] Wamholtz A, Osmond MA, Heitzer T, et al. Effect of tirofiban on percutaneous coronary intervention induced endothelial dysfunction in patients with stable coronary artery disease[J]. Am J Cardiol, 2005, 95: 20.
- [13] Kimmelstiel C, Badar J, Covic L, et al. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the platelet GP II b/III a inhibitor tirofiban in patients undergoing percutaneous coronary intervention; implications for adjustment of tirofiban and clopidogrel dosage[J]. Thromb Res, 2005, 116: 55.
- [14] Alexander KP, Newby LK, Cannon CP, et al. Acute coronary care in the elderly, part I: non-ST-segment-elevation acute coronary syndromes a scientific statement for healthcare professionals from the American heart association council on clinical cardiology, in collaboration with the society of geriatric cardiology[J]. Circulation, 2007, 115: 2549.
- [15] 徐伟, 诸骏仁. 老年退行性瓣膜病的临床表现及诊断[J]. 实用老年医学, 2000, 14(6): 286.
- [16] 王采荣, 张蕾. 老年人群钙化性心脏瓣膜病的超声所见与常规病相关因素分析[J]. 中国超声医学杂志, 2003, 19(8): 631.
- [17] Stenbens WE, Delahunt B, Zuccollo JM. The histopathology of endocardial sclerosis[J]. Cardiovascpathol, 2000, 9(3): 167.
- [18] Chui MC, Newby DE, Panarelli M, et al. Association between calcific aortic stenosis and hypercholesterolemia; is there a need for a randomized controlled trial of cholesterol lowering therapy[J]. Clin Cardiol, 2001, 24(1): 52.
- [19] Pohle K, Mffert R, Ropers D, et al. Progression of aortic valve calcification; association with coronary atherosclerosis and cardiovascular risk factors[J]. Circulation, 2001, 104(16): 1927.
- [20] Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, et al. Seventh report of the joint national committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure; national high blood pressure education program coordinating committee[J]. Hypertension, 2003, 42: 1206.
- [21] Williams MA, Fleg JL, Ades PA, et al. Secondary prevention of coronary heart disease in the elderly (with emphasis on patients 75 years of age); an American heart association scientific statement from the council on clinical cardiology subcommittee on exercise, cardiac rehabilitation, and prevention[J]. Circulation, 2002, 105: 1735.
- [22] Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis and coronary artery disease[J]. N Engl J Med, 2005, 352: 1685.
- [23] 杨丽霞, 张崇德, 崔萍, 等. 心律失常和心肌缺血与冠脉造影的临床对照研究[J]. 中国实用内科杂志, 1998, 18(2): 82.

(收稿日期: 2010-01-25)