

· 基础研究 ·

犬心房肌细胞分离及其 L 型钙通道电流检测的研究

邹 帅, 龙 毅, 范晋奇, 周亚南, 高大中, 殷跃辉[△]
(重庆医科大学附属第二医院心血管内科 400010)

摘要:目的 探讨一种稳定可靠的犬心房肌细胞的分离方法, 提高膜片钳的实验成功率并检测 L 型钙通道电流。方法 采用改良 Langderoff 灌注系统行主动脉逆行灌注, 采用选择性冠状动脉插管的方法, 获得单个心房肌细胞。在显微镜下观察细胞形态, 并应用膜片钳全细胞模式记录 L 型钙通道电流。结果 分离细胞存活率为 70%~80%, 复钙后细胞存活率为 30%~40%, 耐钙细胞形态呈杆状, 折光性强, 横纹清晰, 并能稳定记录 L 型钙通道电流。结论 改良 Langderoff 技术有助于稳定分离出存活率高、具有正常电生理特性的犬心房肌细胞, 能用于心房肌细胞离子通道的研究。

关键词:肌细胞, 心脏; 细胞分离; 膜片钳术; 钙通道, L 型; 犬

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.36.029

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)36-3705-03

A study on separation of canine atrial myocytes and detection of their L-type calcium channel current

Zou Shuai, Long Yi, Fan Jinqi, Zhou Ya'nan, Gao Dazhong, Yin Yuehui[△]
(Department of Cardiovascular Medicine, the Second Affiliated Hospital,
Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective To explore a stable and reliable method of canine atrial myocytes separation for improving the success rate of patch-clamp techniques and detecting the L-type calcium channel current. **Methods** Modified Langderoff perfusion system was adopted to perform retrograde aortic perfusion and selective coronary artery catheterization was used to obtain single atrial myocytes. Microscope was employed to observe the cellular morphology and the L-type calcium channel current was measured by whole-cell patch-clamp recording. **Results** The survival rate of separated cells was 70% to 80%, and it was 30% to 40% after recalcification. A stable L-type calcium channel current could be recorded in calcium-tolerant cells which was rod-shaped with good refraction and clear horizontal stripe. **Conclusion** Modified Langderoff technique contribute to stable separation of canine atrial myocytes with high survival rate and normal electrophysiological properties, and can be used in the research of the iron channel of atrial myocytes.

Key words: myocytes, cardiac; cell separation; patch-clamp techniques; calcium channels, L-type; canine

近年来,随着膜片钳技术日趋成熟,对单个心肌细胞各种离子通道的电流密度、I-V 曲线等电生理特性和通道动力学参数的研究也取得了较大的进展,而获取达到膜片钳检测要求的心肌细胞成为关键所在。1969 年 Kono^[1] 率先采用酶解法成功对成年大鼠心肌细胞进行了分离,酶解法也成了获得单个心肌细胞的主要方法。目前国内外多采用 Langendorff 灌注装置,逆行主动脉灌注酶解法分离小动物的心肌细胞,但此方法对于犬心房部分的灌注效果不佳,获得单个心房肌细胞较为困难。国内分离犬心房肌细胞的文献报道不多,本文将国外的分离方法加以改良,通过选择性冠状动脉回旋支插管的方法,可以获得横纹清晰、表面光滑且耐钙的心房肌细胞。该方法分离的心房肌细胞能满足膜片钳实验的要求,并成功记录 L 型钙通道电流。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物 健康成年杂种犬(普通级)20 只,体质量 10~15 kg,雌雄不限,由重庆医科大学实验动物中心提供。

1.1.2 试剂和溶液配制 台氏液:NaCl 136 mmol/L、KCl 5.4 mmol/L、MgCl₂ 0.8 mmol/L、CaCl₂ 1.8 mmol/L、NaH₂PO₄ 0.33 mmol/L、葡萄糖 10 mmol/L、HEPES 10 mmol/L(NaOH 调至 pH 7.4)。无钙台式液:台式液中去掉 CaCl₂。酶液:无钙台式液成分加胶原酶 II (CLS ID299 U/mg、0.5%牛血清清蛋白(BSA)、CaCl₂ 50 μmol/L(NaOH 调至 pH 7.4)。KB 液:KCl 20

mmol/L、NaH₂PO₄ 10 mmol/L、牛磺酸 10 mmol/L、EGTA 10 mmol/L、L-谷氨酸 70 mmol/L、葡萄糖 10 mmol/L、0.5%BSA (KOH 调至 pH 7.4)。记录钙电流的电极内液:CsCl 120 mmol/L、TEA-Cl 20 mmol/L、MgCl₂ 1.0 mmol/L、EGTA 10 mmol/L、Mg-ATP 5 mmol/L、HEPES 10 mmol/L、Na-GTP 0.1 mmol/L(CsOH 调至 pH 7.4)。记录钙电流的电极外液:TEA-Cl 136 mmol/L、CsCl 5.4 mmol/L、MgCl₂ 1 mmol/L、CaCl₂ 2 mmol/L、NaH₂PO₄ 0.33 mmol/L、葡萄糖 10 mmol/L、4-氨基吡啶(阻断 Ito 电流)2 mmol/L、尼氟酸(阻断 Ca²⁺ 依赖性 Cl⁻ 电流)50 μmol/L。药品和试剂:II 型胶原酶为美国 Worthington 公司产品,BSA、CsCl、TEA-Cl、Na-GTP、CsOH、Mg-ATP、尼氟酸均为 Sigma 公司产品,4-氨基吡啶为德国 Aldrich 公司产品,其余均为国产分析纯。

1.2 方 法

1.2.1 参照 Li 等^[2] 的方法并加以改良 杂种犬用 3%戊巴比妥钠(1 mL/kg)麻醉后,开胸前给予肝素 500 IU/kg 腹腔注射,15~20 min 后,取出犬心脏,迅速把心脏浸入 4℃无钙台式液中(所有用于细胞分离和灌注的溶液均以 100%O₂ 平衡),冲洗心腔内残血。用自制灌注导管于左冠状动脉回旋支插管后,与 Langderoff 灌注系统相连接,用丝线结扎供应左、右心室的主要分支,以保证左心房得到充分灌注。用无钙台式液(37℃,100%O₂ 持续氧饱和)以 20~30 mL/min 恒定流速灌流心肌 5~10 min。当心肌停止收缩、灌流液清亮时改用低钙酶液

[△] 通讯作者, Tel:13594176562; E-mail: ZS810@sohu.com。

(37 °C, 100% O₂ 持续氧饱和)以同样流速持续灌流 35~45 min。当心脏表面呈现黄白色、膨胀疏松且半透明状时,每 5 分钟多部位剪下部分心房肌组织,置于 5 mL KB 液(25 °C)中迅速剪碎成大约 1 mm³ 的组织碎块,用广口吸管轻轻吹打 3~5 min,在低倍显微镜下观察,直到单个细胞充满视野且死亡细胞不多时停止吹打,用 200 目尼龙纱网过滤为细胞悬液,然后室温(20~25 °C)下静置 30 min 后用于膜片钳实验。

1.2.2 膜片钳全细胞记录 取细胞悬液 1~2 滴于倒置显微镜上的自制灌流槽中,使细胞充分贴壁后,以电极外液进行灌流,速度为 1~2 mL/min,以去除杂质和死亡细胞。采用两步法拉制微电极,冲灌电极内液后阻抗 2~5 MQ,将电极固定在电极夹持器上并与 Axon-200B 放大器相连。在镜下找到边界清楚、纹理清晰、大小适中的细胞;缓慢将电极靠近细胞,在电位补偿后利用负压抽吸,形成高阻抗封接;快电容补偿后破膜,慢电容补偿后即可对细胞进行电压钳制,建立全细胞记录模式。刺激脉冲通过 pClamp8.0 软件控制的 D/A 转换器操纵,记录的信号经膜片钳放大器(Axon-200B)A/D 转换及 2 kHz 滤波放大后存入计算机硬盘。记录心肌细胞 L 型钙通道电流及每个细胞电容,计算电流密度(pA/pF)=电流(pA)/电容(pF)。L 型钙通道电流为去极化起始部的内向电流与去极化末端电流的差值。

1.2.3 细胞活性的鉴定 将分离的心肌细胞放于倒置显微镜下进行活性鉴定^[3];用 4 g/L 台盼蓝 1 份、细胞悬液 9 份进行染色,3 min 后用血细胞计数板分别计数活细胞和死细胞,计算活细胞百分比。存活心肌细胞百分比=(长杆状细胞数量/全部细胞数量)×100%。

1.3 统计学处理 采用 pClamp8.0 及 Clamper8.0 软件测量电流,数据进行统计学处理。

2 结 果

2.1 细胞的形态学观察 倒置显微镜下观察可见约 70%~80% 的犬心房肌细胞呈长杆状(封 3 图 1,2),细胞结构的立体感强、边界整齐、表面光滑、无小泡及颗粒、横纹清晰,为存活细胞。将细胞复钙后,约 30%~40% 的细胞很好的附壁于倒置显微镜下的细胞灌流槽中,静止不动,结构及横纹均清晰,细胞膜完整,此为耐钙细胞。约有 30% 的细胞发生持续地自发性收缩,幅度较强,数分钟后细胞横纹变得模糊、消失,细胞挛缩呈团球状,成为死细胞,此即不耐钙细胞。只有复钙后表面清洁、横纹清晰、折光性强、细胞膜完整耐钙的细胞才能用于膜片钳的封接和记录。

2.2 细胞成活率 经台盼蓝染色,死细胞被染成淡蓝色,活细胞拒染,细胞成活率约为 70%~80%,复钙后仍有 30%~40% 的耐钙细胞。

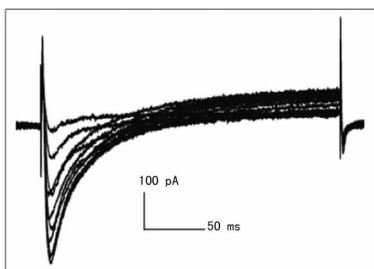


图 3 L 型钙通道电流

2.3 心肌细胞 L 型钙通道电流的记录 刺激模式为钳制电位 -50 mV,以失活钠通道及 T 型钙通道,起始于 -40 mV、终止于 60 mV、5 mV 为跃阶、时长为 200 ms 的电压刺激细胞,刺

激频率 0.2 Hz。以刺激电压为自变量、该电压下的电流大小为因变量作图,即可得到细胞钙电流的 I-V 曲线。从 I-V 曲线可以观察到,电流于 -40 mV 开始激活,在 0~10 mV 时达到峰值(图 3,4)。

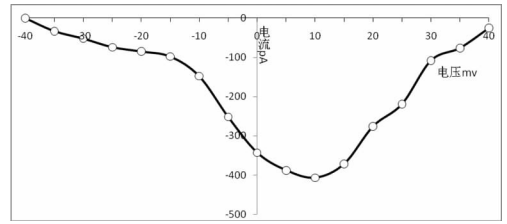


图 4 L 型钙通道电流 I-V 曲线

3 讨 论

获得稳定数量和较高质量的犬心房肌细胞是进行膜片钳检测的基础。由于犬心房血管分布不如心室丰富,使犬心房肌细胞比小动物的难分离,技术难度更大。国内多采用 4 步灌流法:(1)使用台式液灌流,主要目的是排空心肌间和心腔内的血液;(2)无钙台式液灌流,主要是疏松心肌细胞间的桥粒和连接^[4-5];(3)再加酶液灌流,用于降解细胞外基质,使成团的心肌细胞解离成单个心肌细胞;(4)最后使用低钙台式液灌流,清除细胞表面的残留酶液,减少酶对心肌细胞的损伤。本研究结合自身经验,对上述分离方法加以改进并简化为两步:(1)无钙台式液灌流;(2)酶液灌流。同时改良如下操作:(1)开胸取心脏前 30 min 预先给予肝素处理,实验中使犬在体肝素化可以防止冠状动脉内血栓形成,增强后期灌流效果。(2)取心脏迅速,在心脏取出的最初 1~2 min 时,直接使用 4 °C 无钙冰台式液辅助冲洗残血。因为如果使用含钙台式液灌流,将使心脏收缩加强,增加心肌代谢,影响细胞活性。(3)实验采用选择性冠状动脉插管的方法灌注心房,但是由于心房血管分布不如心室丰富,本研究采用结扎主要心室血管分支的办法保证心房灌注。实验中发现,结扎心室分支后灌流效果明显改善。(4)多部位、多时间点取材,可增加细胞产量,提高膜片钳效率,同时选择最佳活性状态的细胞进行检测。同时,本研究还控制了多个影响细胞数量和质量的因素:(1)消化酶。国外文献报道,在急性分离细胞时多采用胶原酶和透明质酸酶联合应用^[6],国内则偏向于用蛋白酶和胶原酶联合运用,但有报道认为蛋白酶对细胞有一定损伤^[7],因此本研究选择单用 Worthington 公司 II 型胶原酶(活性为 299 U/mg),与文献报道的适合活性单位相近^[8],消化时间大约 35~45 min,细胞产量较高,若时间过长可对细胞造成不可逆的损害^[9]。值得注意的是由于不同批号和批次的酶之间的差异较大^[8],推荐使用同一批号的酶,可以加强实验的稳定性。(2)胶原酶激活需要低 Ca²⁺ 浓度。Ca²⁺ 浓度过高会影响胶原酶发挥作用,一般 20~200 μmol/L 效果较理想。(3)灌流方式。本研究采用的是恒流的灌流方式,灌流液速度控制在 20~30 mL/min,高于这个流速,会造成细胞损伤,低于这个流速,获得单个细胞的数量将大幅下降。(4)灌流液。灌流液 pH 值控制在 7.3~7.4,过高或过低都会影响细胞的生理活性。(5)保存液。KB 液可以抑制心肌细胞收缩,利于细胞活性的保持。有研究表明,保存的细胞具有正常的电生理特性^[10]。同时清蛋白具有保护细胞膜的作用,可减轻酶液对细胞的损伤。KB 液保存在室温(20~25 °C)的条件下细胞活性比保存在 4 °C 冰箱里要好^[11],可保存细胞达到 6~8 h。(6)温度。灌流时温度需控制在 36~37 °C,这样既保证了胶原酶的激活,同时又使细胞处在生理状态下。(7)其他。氧气的饱和

一般在 30 min 以上,氧流量 0.2~0.5 L/min。液体均使用超纯水,水质将会对细胞的存活数量有影响,同时有利于维持复钙后细胞的钙耐受性^[12]。此外,系统的清洁也非常重要,可使用双蒸水加 75%乙醇清洗 2~3 次,清除残留酶液和杂质。

灌流后酶解法分离出单个细胞后遇到的最关键问题是复钙时遇到的“钙反常”现象(calcium paradox)^[11],大多数学者认为心肌细胞发生钙反常的机制是由于大量钙离子短暂快速进入细胞内,钠离子外流,导致细胞内钙超载有关。文献多报道采用梯度复钙法,细胞损伤会比较小,存活率较高。但本研究发现采用一步复钙法,虽然得到细胞产量可能稍低(约 30%~40%),但存活细胞状态更好,更利于膜片钳检测。

本研究通过对以往实验环节的改进,结合自身的经验,可以稳定地分离出犬的心房肌细胞,分离得到的心肌细胞结构完整、活性好、耐受性佳,能用于膜片钳研究,并成功的对钙电流进行检测,为电生理研究奠定了良好的实验基础。

参考文献:

- [1] Kono T. Roles of collagenases and other proteolytic enzymes in the dispersal of animal tissues[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1969, 178(2): 397-400.
- [2] Li D, Melnyk P, Feng J, et al. Effects of experimental heart failure on atrial cellular and ionic electrophysiology [J]. *Circulation*, 2000, 101(22): 2631-2638.
- [3] 黄焰,侯月梅. 酶解法分离犬肺静脉肌袖和心房肌细胞 [J]. *新疆医科大学学报*, 2008, 11(3): 1513-1515.
- [4] Mitra R, Morad M. A uniform enzymatic method for dissociation of myocytes from hearts and stomachs of verte-

brates[J]. *Am J Physiol*, 1985, 249(5 Pt 2): 1056-1060.

- [5] 商立军,臧益民,王四望,等. 耐钙心肌细胞的分离及基本电生理特性[J]. *第四军医大学学报*, 2000, 21(6): 247-249.
- [6] Zhou YY, Wang SQ, Zhu WZ, et al. Culture and adenoviral infection of adult mouse cardiac myocytes; methods for cellular genetic physiology[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000, 279(1): 429-436.
- [7] Glick MR, Burns AH, Reddy WJ. Dispersion and isolation of beating cells from adult rat heart[J]. *Anal Biochem*, 1974, 61(1): 32-42.
- [8] 朱肖星,牛小麟,朱萧玲,等. 同活性的胶原酶对大鼠心肌细胞分离的影响[J]. *解放军医学杂志*, 2008, 33(9): 1089-1091.
- [9] Egorova MV, Afanas'ev SA, Popov SV. A simple method for isolation of cardiomyocytes from adult rat heart[J]. *Bull Exp Biol Med*, 2005, 140(3): 370-373.
- [10] Li S, Blaschke M, Heubach JF, et al. Effects of azelastine on contractility, action potentials and L-type Ca⁽²⁺⁾ current in guinea pig cardiac preparations[J]. *Eur J Pharmacol*, 2001, 418(1/2): 7-14.
- [11] Tytgat J. How to isolate cardiac myocytes[J]. *Cardiovasc Res*, 1994, 28(2): 280-283.
- [12] 廖华,糜涛. 成年大鼠心肌细胞分离方法的改良[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 33(13): 6535-6539.

(收稿日期:2011-03-09 修回日期:2011-08-12)

(上接第 3704 页)

HSCT 是当前将白血病完全治愈最有希望的措施。HSCT 前的超大剂量化疗及移植后的免疫活性细胞都能起到清除残留白血病细胞的作用,可有效预防白血病复发,并长期存活。目前对于某些难治复发性白血病患者,特别是第一疗程未缓解者,仅通过化疗随时可能复发,如伴有 BCR/ABL 或 MLL 断裂基因阳性以及高危组的 ALL,仅化疗难以获得长期存活已成为共识^[9]。本组中 13 例患儿行 HSCT,均为难治或复发病例。其中 ALL 5 例(均为高危组患儿),AML 7 例, MAL 1 例,均植入成功并长期存活。因此对于常规化疗难以达到完全缓解和长期生存的难治、复发性白血病患者,选用 HSCT 是一种提高长期存活率的重要手段。

参考文献:

- [1] Coebergh JW, Reedijk AM, de Vries E, et al. Leukaemia incidence and survival in children and adolescents in Europe during 1978-1997. Report from the Automated Childhood Cancer Information System project[J]. *Eur J Cancer*, 2006, 42(13): 2019-2036.
- [2] 张之南,沈悌. 血液病诊断及疗效标准[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2008: 132.
- [3] Mörcke A, Zimmermann M, Reiter A, et al. Prognostic impact of age in children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia: data from the trials ALL-BFM 86,

90, and 95[J]. *Klin Padiatr*, 2005, 217(6): 310-320.

- [4] Pul CH. Childhood leukemia [M]. 2nd. Cambridge: Cambridge University Press, 2006: 3.
- [5] Ribera JM, Ortega JJ, Oriol A, et al. Prognostic value of karyotypic analysis in children and adults with high-risk acute lymphoblastic leukemia included in the PETHEMA ALL-93 trial[J]. *Haematologica*, 2002, 87(2): 154-166.
- [6] 叶任高,陆再英. 内科学[M]. 6 版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 610.
- [7] 高雁群,吴军,王晓红,等. 存活 5 年以上急性白血病 14 例临床分析[J]. *中原医刊*, 2004, 31(16): 19-20.
- [8] Hertzberg H, Huk WJ, Ueberall MA, et al. CNS late effects after ALL therapy in childhood. Part I: Neuro-radiological findings in long-term survivors of childhood ALL--an evaluation of the interferences between morphology and neuropsychological performance. The German Late Effects Working Group[J]. *Med Pediatr Oncol*, 1997, 28(6): 387-400.
- [9] Sanders JE, Im HJ, Hoffmeister PA, et al. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for infants with acute lymphoblastic leukemia[J]. *Blood*, 2005, 105(9): 3749-3756.

(收稿日期:2011-06-17 修回日期:2011-09-25)