

原代乳小鼠心肌细胞的分离培养及鉴定*

程阔菊, 黄河, 杜智勇, 李洪, 杨天德[△]

(第三军医大学新桥医院麻醉科, 重庆 400037)

摘要:目的 建立原代乳小鼠心肌细胞的培养方法, 评价心肌细胞的存活状况并鉴定心肌细胞纯度。方法 应用胰酶联合胶原酶共同消化 3 d 内 C57 乳小鼠心脏, 台盼蓝染色判断心肌细胞存活率, α -actin 免疫荧光染色鉴定心肌细胞纯度。结果 利用 3 d 内乳小鼠心脏可成功培养原代小鼠心肌细胞, 台盼蓝染色显示细胞存活率大于 95%, α -actin 免疫荧光染色显示心肌细胞纯度达 95% 以上。结论 严格控制实验条件, 可成功培养高存活率和高纯度的小鼠心肌细胞。

关键词:乳小鼠; 心肌细胞; 分离; 纯化; 培养; 鉴定

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2013.22.026

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)22-2638-03

Isolation, culture and identification of neonatal mouse cardiomyocytes*

Cheng Kuoju, Huang He, Du Zhiyong, Li Hong, Yang Tiande[△]

(Department of Anesthesiology, Xinqiao Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To establish a method to isolate, culture and identify cardiomyocytes from neonatal mouse, estimate the cardiomyocytes survival rate, and identify the purity of cardiomyocytes. **Methods** Neonatal C57 mouse heart (within 3 days) was digested using trypsin and collagenase. Cardiomyocytes survival rate was estimated by trypan blue staining, and cardiomyocytes purity was identified by α -actin immunofluorescence staining. **Results** Mouse cardiomyocytes could be successfully isolated and cultured using neonatal mouse within 3 days. Trypan blue staining showed cardiomyocytes survival rate was $>95\%$, and cardiomyocytes purity was more than 95% demonstrated by α -actin immunofluorescence staining. **Conclusion** Under the strict experimental conditions, mouse cardiomyocytes can be successfully isolated and cultured with high survival rate and high purity.

Key words: neonatal mouse; cardiomyocytes; separation; purification; culture; identification

各种基因敲除及转基因小鼠已广泛应用于心血管疾病动物模型的建立, 已为心血管疾病机制的研究作出了巨大贡献。体外心肌细胞培养作为一种体外实验研究模型, 可以排除神经、体液的干扰而独立地从细胞和分子水平研究心血管疾病的发生、发展机制, 但由于小鼠心肌细胞的分离和培养比较困难, 所以一直限制了医学科研工作者在细胞生物学水平上对心血管疾病方面的深入研究。本实验室在以往的经验基础上, 摸索出了一套成熟可行、简单可靠的小鼠心肌细胞培养方法, 获得的心肌细胞存活率高且纯度高。本文对此培养方法做一简单介绍, 并对其中的关键影响因素做详细的探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 1~3 d 龄野生型 C57 新生乳鼠, SPF 级, 由第三军医大学实验动物中心提供, 合格证号: SCXK(渝) 2007-0003。

1.1.2 主要仪器与试剂 显微镜用镊、眼科剪、显微镊、显微剪(上海医疗器械有限公司), 器械使用前清洗干净并经高压灭菌(121 °C, 20 min)。二氧化碳培养箱、倒置显微镜(OLYMPUS)、超净工作台(苏净安泰)、低温台式离心机(Sigma)。小牛血清、DMEM/F12、胰酶、胶原酶 II (GIBCO), BrdU-溴脱氧尿苷(Sigma), 青霉素、链霉素(华美生物工程公司), anti- α -actinin (Millipore), 组织固定液(Alphelys), Triton X-100 (Amresco), SlowFade Gold antifade reagent with DAPI (Invitrogen),

Alexa goat anti-mouse IgG(H+L)(Invitrogen)。

1.2 方法

1.2.1 心肌细胞培养方法 乳鼠 75% 乙醇全身消毒, 眼科剪沿剑突处正中中线开胸, 轻轻挤出心脏, 迅速用弯显微镊取下心脏, 放入盛有冷 DMEM/F12 培养液的平皿中。用眼科剪剪掉两心耳, 轻柔清洗残留血液后心脏转入另一盛有冷 DMEM/F12 培养液的培养皿中, 将心脏均匀剪成约 1 mm³ 的碎片。将心脏脆片组织转入无菌离心管中, 加入约 10 倍体积的消化液(胰酶 0.125%, 胶原酶 II 0.125%), 将离心管放入 37 °C 温水中, 不时振荡以保持心肌碎片始终处于悬浮状态。首次消化 10 min, 自然沉降, 弃上清液。再加约 10 倍沉淀体积的消化液继续消化 15 min(不时振荡以保持心肌碎片始终处于悬浮状态, 后同), 自然沉降, 吸取上清液转移至另一离心管, 加 1 倍体积含 20% 血清的完全培养液终止消化。剩下的心肌碎片补加消化液直至消化完全。合并上清液, 400 g 离心 8 min, 弃去上清液, 加入适量培养基, 轻柔吹打重悬细胞。将细胞悬液经 40 μ m 细胞过滤网过滤, 以滤去细胞团块, 将细胞接种于 100 mm 培养皿中进行差时贴壁 90 min, 以除去心肌成纤维细胞和血管细胞等非心肌细胞。轻轻吸出上清液, 40 μ m 滤网过滤, 加入溴脱氧尿苷(BrdU), 使其培养液终浓度为 0.1 mmol/L, 轻柔混匀之后, 种植到包被好明胶的 6 孔板中。37 °C 5% CO₂ 孵育 48 h 后用无血清 DMEM/F12 清洗 1 次, 更换完全培养液, 以后每隔 24 h 更换 1 次完全培养液, 完全培养液含 0.1 mmol/

* 基金项目: 国家自然科学基金面上项目(30871061)。 作者简介: 程阔菊(1984~), 药师, 硕士研究生, 主要从事心肌保护方面的研究。

[△] 通讯作者, Tel: (023)68755634; E-mail: 31011@sina.com。

L BrdU 终浓度。

1.2.2 心肌细胞存活率测定 心肌细胞差时贴壁后接种前,吸取 100 mL 细胞悬液与 100 mL 台盼蓝染色液均匀混合,染色 3 min 后吸取少量经染色的细胞混合液,用血细胞计数板计数,至少数 500 个细胞,数出蓝色细胞和细胞的总数,蓝色细胞为死亡细胞,未着色细胞为活细胞,计算细胞存活率。细胞存活率=(细胞总数-蓝色细胞数)/细胞总数 \times 100%。

1.2.3 心肌细胞形态学观察 心肌细胞接种于 35 mm 小皿中培养贴壁后,倒置显微镜下观察心肌细胞形态并拍照。

1.2.4 心肌细胞纯度鉴定(α -actin 染色) 心肌细胞接种于 35 mm 培养皿中培养。贴壁后,吸去培养液,PBS 液轻柔漂洗细胞爬片后于 CO₂ 培养箱中孵育 45 min。取出,弃去 PBS 液,加组织固定液室温固定 12 min。吸去固定液,加 PBS 液轻柔漂洗 5 min \times 3 次。弃 PBS 液,0.2% Triton X-100 室温打孔通透 5 min,吸去通透液,加 PBS 液漂洗 5 min \times 3 次。5%羊血清室温封闭 2 h,吸去封闭液,滴加 1:100 稀释(稀释液 1%羊血清)的 rat anti-mouse α -actin 抗体,用封口膜盖好,4 ℃过夜。取下封口膜,用自制针头小钩取出细胞爬片,PBS 液漂洗 5 min \times 6 次,滴加二抗(goat anti-rat IgG,按 1:200 稀释),封口膜盖好,37 ℃避光孵育 1.5 h。取下封口膜,吸去二抗,PBS 液漂洗 5 min \times 4 次,取出爬片,蒸馏水漂洗,DAPI 封片。荧光镜下观察,拍照,免疫荧光染色阳性者为心肌细胞,同一视野下普通光下观察、拍照、计数肌细胞总数,计算心肌细胞纯度。

2 结 果

2.1 细胞存活率测定 台盼蓝染色观察显示细胞存活率达 95%以上。

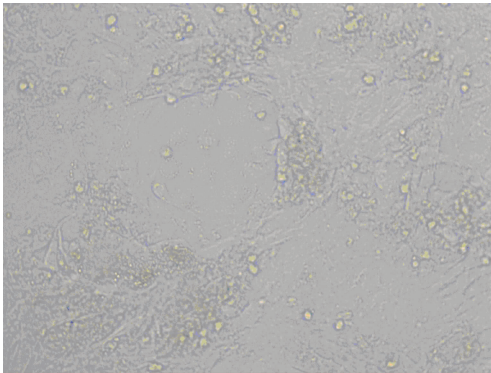


图 1 培养 3 d 的心肌细胞

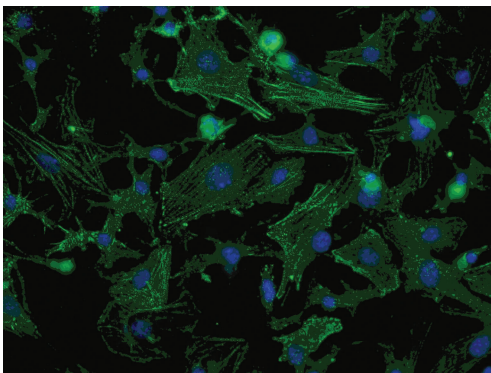


图 2 心肌细胞的 anti- α -actin 染色鉴定

2.2 心肌细胞形态学观察 心肌细胞未贴壁悬浮于培养液中时形状为椭圆形或圆形。1 d 左右,心肌细胞开始长出伪足;2 d 左右,伪足在镜下成纤维条索状,此时心肌细胞则已完全贴

壁,细胞胞体呈不规则形状,如梭形、菱形或多角形,细胞开始聚集生长(图 1)。3 d 左右出现同步自发性搏动,每分钟约 100 次。

2.3 心肌细胞纯度鉴定 心肌细胞 anti- α -actin 染色呈阳性(图 2),可见明显的心肌特异性横纹肌结构,细胞核周围可见棕黄色颗粒,心肌细胞阳性率大于 95%。

3 讨 论

鼠心肌细胞培养包括大鼠心肌细胞培养和小鼠心肌细胞培养,大鼠心肌细胞培养技术已相对成熟,已广泛应用于心血管疾病的研究,而小鼠心肌细胞的培养技术则难度较大,目前应用受限。小鼠心肌细胞的培养又包括成年小鼠和乳小鼠心肌细胞的培养,由于成年小鼠心肌细胞已失去增殖分化能力,培养难度则更大,在此文中仅讨论乳小鼠的心肌细胞培养技术。心肌细胞在培养过程中易受各种处理因素和操作水平的影响,其存活率、搏动效果和纯度均是影响后续实验的主要因素,也是该技术的瓶颈问题。因此,本文对心肌细胞培养过程中影响心肌细胞存活率、搏动效果和纯度的影响因素进行重点讨论。

3.1 鼠龄选择 小鼠心肌细胞随年龄的增长,其增殖分化能力逐渐减弱,新生 3 d 内,尚具有部分增殖分化能力^[1-2],而成年小鼠心肌细胞则不具备增殖能力成为终末分化细胞。因此,在选择鼠龄时,应尽量选择 1~3 d 鼠龄的乳鼠,这样的心肌细胞成活率及贴壁率较高。根据作者的经验,半日龄内乳鼠最为理想。

3.2 心肌细胞消化 消化过程是影响心肌细胞存活率的重要因素,其主要影响因素有消化酶、消化温度和振荡力度。用于心肌细胞消化的酶主要有胰酶和胶原酶,胰酶不仅可分解组织间质蛋白成分,同时对肌细胞膜蛋白亦起较强的破坏作用^[3-4],因此,对心肌细胞损伤较大,但消化彻底。胶原酶主要作用于细胞间质的胶原纤维^[5],故作用缓和,对细胞损伤也较小,但消化时间长且不彻底。本实验室的经验为胰酶联合胶原酶同时使用,以降低胰酶对细胞的损伤,同时又不影响心肌细胞的彻底消化。不同浓度配比的胰酶和胶原酶混合消化液对心肌细胞的作用时间也是有影响的。本实验室应用的胰酶和胶原酶的比例为 1:1(0.125%:0.125%),消化温度为 36.5 ℃~37 ℃,振荡频率及力度以达到使心肌碎片处于均匀悬浮状态即可,除首次消化外每次消化 15 min。首次消化下来的细胞主要为一些血细胞和从组织边缘消化下来的坏死心肌细胞及其细胞碎屑,应弃去。使心肌碎片始终处于悬浮状态是为了保证心肌碎片与消化液充分接触,达到同步消化。小鼠心肌细胞比较脆弱,振荡力度不宜过大且建议不使用搅拌子进行搅拌消化。

3.3 防止污染 防止细胞污染是心肌细胞成功培养的另一重要因素。细胞培养过程中污染来源主要有以下几条途径:(1)不洁的动物组织标本:取材时动物消毒不彻底或操作不小心导致心脏组织污染;(2)清洗消毒:培养用物品、材料洗刷不净,引入微生物和有毒物质;(3)操作:操作者未戴口罩、帽子,或操作不当心、操作不规范将无菌器具碰到了污染的物品;(4)空气:空气中含有大量的微生物也是导致细胞污染的主要原因,常见的有细菌、真菌、支原体等;(5)血清:市售血清灭菌不彻底,潜在病毒和支原体污染。

3.4 细胞纯化 心脏组织消化下来的细胞主要包括心肌细胞(约 80%)和成纤维细胞,另外有少部分血管细胞等^[6]。尽管

成纤维细胞在数量上不及心肌细胞,但成纤维细胞具有增殖分化能力,生长迅速,且贴壁较心肌细胞早,若不加以控制,则会生长成为优势细胞,严重影响心肌细胞的纯度和生长状态。在此,可以利用成纤维细胞较心肌细胞贴壁早的特点,在培养 60~90 min 时,大部分成纤维细胞已贴壁而心肌细胞尚未贴壁。采用差速贴壁的方法可除去大部分成纤维细胞。差速贴壁剩下的少量成纤维细胞可通过在培养基中加入溴脱氧尿苷(BrdU)以抑制成纤维细胞的 DNA 和蛋白质合成^[7]加以控制。本实验室经过差速贴壁和 BrdU 处理后,心肌细胞的纯度一般可达 95%以上,完全可用于后续试验。另外,小鼠心肌细胞比较脆弱,在各操作步骤中若时间与力度控制不是很准确时,则会遇到心肌细胞贴壁不好的情况。根据作者的经验,此时可用 1%明胶包被培养皿则可良好贴壁。

3.5 接种密度 心肌细胞接种密度不仅可影响细胞间的相互接触,并且会影响细胞长期培养的成活率^[8]。接种细胞的密度应根据实验观测目的而定。一般而言,若需单个心肌细胞贴壁生长,如作形态学观测,6 孔板中每孔的接种细胞数量应控制在 $(1\sim2)\times10^5$ 个;若需心肌细胞形成单层细胞或多层细胞,或形成细胞簇,如收获心肌细胞作 mRNA 或蛋白表达水平的观测时,则每孔的接种密度可增加到 $(5\sim6)\times10^5$ 个。

3.6 其他 其他影响因素包括培养液的 pH 值,pH 值为 7.0~7.2 时更利于细胞的生长^[9],且培养液随着放置时间的延长 pH 值逐渐升高,因此,最好现配现用。若操作技术娴熟,培养液里可不加抗菌药物。本实验发现培养液里不加抗菌药物时,心肌细胞生长状态更为良好;换液时间太短或太长均不利于心肌细胞生长,以肉眼可见培养液颜色改变即 pH 值改变时换液即可。

4 结 语

小鼠心肌细胞在培养技术上还存在着一定的难度,如何简化分离、纯化步骤、提高心肌细胞存活率和纯度仍是小鼠心肌细胞培养技术的关键。随着各种基因敲除和转基因小鼠在心血管疾病机制研究中的广泛应用,相信与之相对应的小鼠心肌细胞体外模型会将心血管疾病的机制研究在细胞和分子水平上推向一个新的高度。

参考文献:

[1] Brand NJ, Lara-Pezzi E, Rosenthal N, et al. Analysis of cardiac myocyte biology in transgenic mice; a protocol for preparation of neonatal mouse cardiac myocyte cultures [J]. *Methods Mol Biol*, 2010, 633: 113-124.

[2] Jones BW, Brunet S, Gilbert ML, et al. Cardiomyocytes from AKAP7 knockout mice respond normally to adrenergic stimulation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109 (42): 17099.

[3] Sreejita P, Kumara S, Vermaa RS, et al. An improved protocol for primary culture of cardiomyocyte from neonatal mice[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal*, 2008, 44(3&4): 45.

[4] Liao R, Jain M. Isolation, culture, and functional analysis of adult mouse cardiomyocytes [J]. *Methods Mol Med*, 2007, 139: 251-262.

[5] Wyatt KE, Bourne JW, Torzilli PA. Deformation-dependent enzyme mechanokinetic cleavage of type I collagen[J]. *J Biomech Eng*, 2009, 131(5): 051004.

[6] 阳海鹰, 丁巍, 丁爱石, 等. 新生小鼠心肌细胞培养模型的建立及其在毒性评价研究中的应用[J]. *军事医学科学院院刊*, 2010, 34(1): 30-33.

[7] 李琳, 龙超良, 汪海. 埃他卡林对心肌细胞损伤保护作用的药理学特征[J]. *中国药理学通报*, 2011, 27(4): 497-500.

[8] Gissel C, Doss MX, Altenburg RH, et al. Generation and characterization of cardiomyocytes under serum-free conditions[J]. *Methods Mol Biol*, 2006, 330: 191-219.

[9] Bers DM, Barry WH, Despa S. Intracellular Na⁺ regulation in cardiac myocytes[J]. *Cardiovasc Res*, 2003, 57(4): 897-912.

(收稿日期: 2013-01-23 修回日期: 2013-04-22)

(上接第 2637 页)

认可指南[M]. 北京: 中国计量出版社, 2004: 72-75.

[8] 毕波, 吕元. 定量检测方法学性能验证的系统设计[J]. *中华检验医学杂志*, 2007, 30(2): 143-145.

[9] NCCLS. EP5-A2; Evaluation of precision performance of quantative measurement methods; approved guideline-second edition[S]. Wayne, PA, NCCLS; 2004.

[10] NCCLS. EP9-A2; Method comparison and bias estimation using patient samples; approved guideline-second edition [S]. Wayne, PA, NCCLS; 2002.

[11] NCCLS. EP6-A2; Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures; a statistical approach; approved guideline[S]. Wayne, PA, NCCLS; 2003.

[12] NCCLS. C28-A2; LHow to define and determine reference

intervals in the clinical laboratory; approved guideline-second edition[S]. Wayne, PA, NCCLS; 2000.

[13] Bailey LB. Folate in health and disease[M]. 2Ed. Boca Raton, FL; CRC Press, 2010, 6: 90-94.

[14] 王华, 李敏, 吕莉, 等. 天津市新婚人群血清叶酸水平现况调查及正常参考值[J]. *中国妇幼保健*, 2011, 26(30): 4698-4702.

[15] Ford ES, Bowman BA. Serum and red blood cell folate concentrations, race, and education; findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey [J]. *Am J Clin Nutr*, 1999, 69(3): 476-482.

(收稿日期: 2013-02-16 修回日期: 2013-05-24)