

• 基础研究 •

新生SD大鼠心房肌细胞的原代培养及改良

汪尊冬 李蔚 曾臻 胡永胜 刘维琴

【摘要】 目的:探讨新生 SD 大鼠心房肌细胞的原代培养及鉴定,并对其中部分步骤进行改良。**方法:**采用出生 1~3 d 的 SD 乳鼠,运用“两步法”提取心房肌细胞,利用心房肌细胞与成纤维细胞贴壁时间不同和 Brd U 能抑制成纤维细胞繁殖进行心房肌细胞纯化,并运用双色免疫荧光进行鉴定。**结果:**36 h 后镜下可见细胞已经贴壁,并可见少数细胞出现自发搏动,72 h 后细胞铺满瓶底 90%,经双色免疫荧光鉴定超过 95% 为心房肌细胞。**结论:**“两步法”可缩短胰酶消化时间,Ⅱ型胶原酶+BSA 联合消化可以更有效地培养出原代心房肌细胞。

【关键词】 新生 SD 大鼠;心房肌细胞;原代培养;免疫荧光

doi: 10.3969/j.issn.1673-6583.2022.06.012

Improved primary culture of atrial myocytes in neonatal SD rats

WANG Zundong, LI Wei, ZENG Zhen, HU Yongsheng, LIU Weiqin Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 500025, China

【Abstract】 Objective: To study primary culture and identification of atrial myocytes in neonatal SD rat, and to improve part of the procedures. **Methods:** A two-step method was used to extract atrial myocytes from SD rats aged 1 to 3 days. Based on difference in adherent time between atrial myocytes and fibroblasts and inhibition of fibroblasts proliferation by Brd U, we purified atrial myocytes. Then, two-color immunofluorescence was performed to identify these myocytes. **Results:** Microscopic examination showed that these cells were adhered at 36 hours, with a few of them having spontaneous pulsation. After 72 hours, 90% of the cells covered the bottom of the bottle, and more than 95% were identified to be atrial myocytes by two-color immunofluorescence. **Conclusion:** The "two-step" method shortens trypsin digestion time, and cell culture with combination of type II collagenase and BSA is an effective way for primary atrial myocytes.

【Key words】 Newborn SD rat; Atrial myocyte; Primary culture; Immunofluorescence

在心血管疾病的基础研究中,常用的动物模型包括动脉粥样硬化模型^[1]、心房颤动模型^[2]、心肌缺血模型^[3]等。除动物模型外,细胞模型可以排除动物体液、神经等因素对实验的干扰,能更直观地展示疾病对心血管组织的影响。心肌细胞可分为心房肌细胞与心室肌细胞,目前被大多数学者所认可的永生型心室肌细胞为 H9C2^[4],心房肌细胞系为 HL-1^[5],但是 HL-1 培养条件复杂,在国内市场销售

较少,且售价昂贵。本研究旨在探索并改良体外原代培养心房肌细胞的方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物

出生 1~3 d 的 SD 乳鼠 15 只,雌雄不拘,由贵州中医药大学动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 心房肌细胞的提取及纯化 所有操作均在超净台进行。(1)取 1~3 d 的 SD 乳鼠,用 75% 酒精浸泡约 10 s;(2)采用“三指法”提捏乳鼠,用眼科剪从胸骨旁剪出约 1 cm 切口,挤出心脏,放于提前预冷的 D-Hank's 溶液中;(3)清洗至溶液澄

基金项目:国家自然科学基金(81760910);贵州省科技计划(黔科合支撑[2018]2770);贵州中医药大学院内项目(贵中医科院内[2019]55号)
作者单位:500025 贵阳,贵州中医药大学
通信作者:刘维琴, E-mail:652453911@qq.com

清,并去除血凝块;(4)在体视显微镜下剪除左右心耳、结缔组织、大血管及心室,保留心房组织;(5)将心房组织移入培养皿中,用 0.25% 胰酶覆盖心房组织,然后用封口膜将培养皿封闭,将培养皿放于 4℃ 冷库消化 5~6 h;(6)5~6 h 后用与 0.25% 胰酶消化液等体积的含 10% 胎牛血清的培养基终止消化,将组织剪碎成 1 mm³ 大小;(7)将组织碎块倒入 15 mL 离心管中,加入终浓度为 0.1% II 型胶原酶+0.5%BSA 消化液 4 mL,放于 37.5℃ 恒温水浴锅中,消化 2~3 次可将组织碎块消化干净,每次 12 min,并收集上清;(8)将含细胞的消化液用等体积含 10% 胎牛血清的培养基终止消化,并用 200 目过滤网滤除组织碎块,收集上清;(9)将收集到的含细胞上清液离心,1 000 转/min,5 min;(10)离心后去除上清,用含 10% 胎牛血清的培养基吹散细胞沉淀,将含细胞的培养基移入直径 60 mm 的培养皿中,差速贴壁 90 min;(11)90 min 后将含细胞的培养基移入 50 mL 离心管中,使用细胞计数板计数,以 1×10⁶/mL 种植细胞,种植前加入 Brd U,使 Brd U 终浓度为 0.1 mmol/L,以抑制成纤维细胞生长;(12)36~48 h 后更换为不含 Brd U 的正常含血清培养基,显微镜下观察。

1.2.2 免疫荧光鉴定 72 h 后细胞铺满细胞爬片约 80%,将细胞爬片取出。用 PBS 清洗细胞爬片后,4% 多聚甲醛固定爬片 15 min;然后用 0.5% Triton X-100 室温通透细胞爬片,用山羊血清封闭细胞爬片 30 min;孵育一抗(小鼠抗大鼠 α -actin 1:100;兔抗大鼠肌钙蛋白 T 1:100),4℃ 孵育过夜。第二天用 PBS 清洗细胞爬片,加入荧光二抗(FITC-羊抗小鼠 IgG 1:100;CoraLite594 conjugate-羊抗兔 IgG 1:100),37℃ 孵育 1 h;复染细胞核,滴加 DAPI 避光孵育 5 min(从滴加荧光二抗开始,后续步骤均要避光操作);最后滴加抗荧光淬灭剂,用倒置荧光显微镜观察并采集图像。

2 结果

36 h 后镜下可见细胞已经贴壁,贴壁细胞形状不一,有梭形、三角形,还有一部分形状不规则(见图 1),少数细胞出现自发搏动;72 h 细胞聚合成片,细胞搏动逐渐同步。72 h 后细胞铺满细胞爬片约 90%,可用于免疫荧光鉴定与 HE 染色观察细胞形态(见图 2)。阳性细胞(心房肌细胞)可表达 α -actin 蛋白与心肌肌钙蛋白 T,同时用 DAPI 复染细胞核,可观察阳性细胞占总细胞的百分比,结果表明心房

肌细胞占总细胞数超过 95%(见图 3)。

目前多数文献采用“两步法”提取心肌细胞^[6-7],使用 0.25% 胰酶 4℃ 消化心肌组织过夜,第二天继续用胶原酶消化细胞。本研究也尝试分别使用 0.25% 以及 0.125% 胰酶消化心肌组织过夜,但是过夜时间难以控制。实验结果显示,72 h 后镜下见过夜消化的心肌细胞较使用 0.25% 胰酶 4℃ 消化 5~6 h 所获得的心肌细胞明显减少(见图 4)。

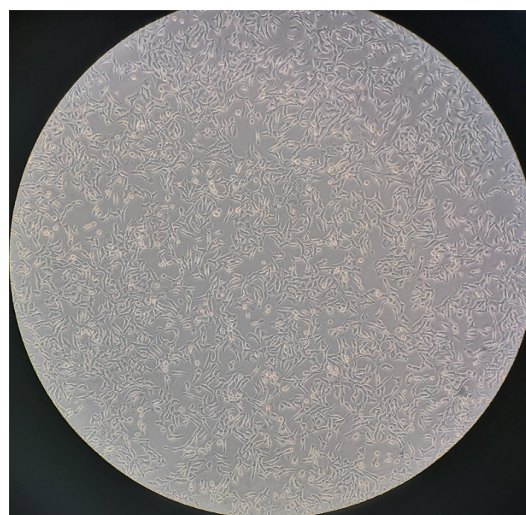


图1 心房肌细胞培养36 h (×100)

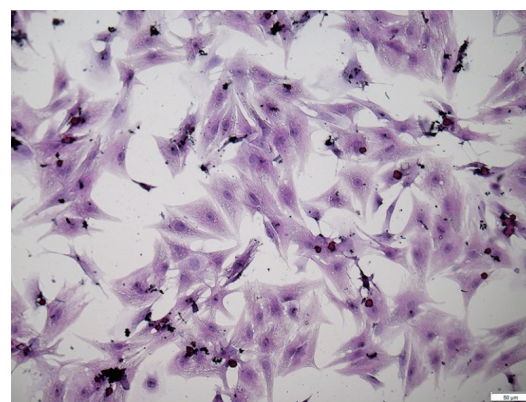
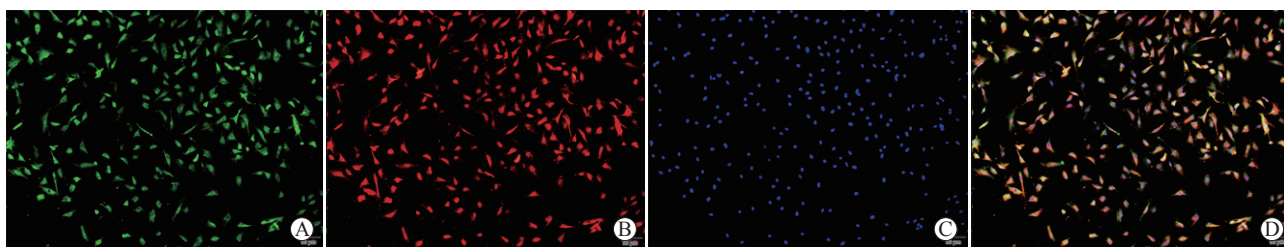


图2 心房肌细胞培养72 h后HE染色 (×200)

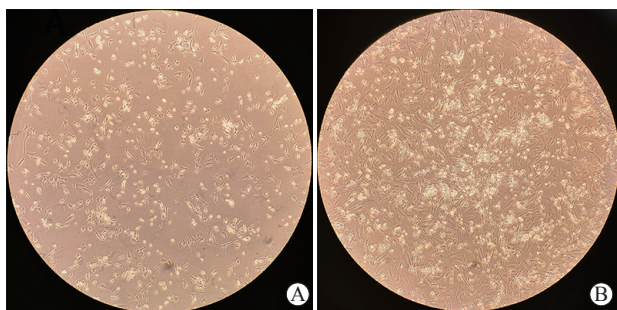
3 讨论

心肌细胞的体外培养是心血管疾病研究的基本技术,市场上虽有 H9C2、HL-1 出售,但是永生细胞的某些生理特性与原代提取的心肌细胞存在差异。在研究心肌细胞的电生理、信号转导以及药物毒性等,通常需要原代培养的纯度较高、活力较好心肌细胞。本研究(两步法提取原代心肌细胞)在现有文献方法的基础上加以改进,明显提高了细胞的收获率。



注：A为 α -actin蛋白染色；B为肌钙蛋白T染色；C为DSPI细胞核染色；D为前3图组合

图3 培养细胞免疫荧光鉴定（ $\times 100$ ）



注：A为0.125%胰酶消化过夜（约10 h）；B为0.25%胰酶消化5 h

图4 不同消化法消化后心房肌细胞培养72 h（ $\times 100$ ）

本研究的创新点在于将胰酶联合胶原酶同时消化心肌组织（一步法）改为“两步法”，同时提高胰酶浓度而缩短胰酶消化时间。目前较多的文献采用“一步法”提取心肌细胞^[8-10]。当使用胰酶和（或）Ⅱ型胶原酶混合同时进行消化时，消化时间难以掌握，若消化过度则容易使细胞中的DNA与胶原混合，形成黏液状物质，使含细胞的上清液难以从消化体系中分离，细胞量明显减少而影响细胞收获率。而使用“两步法”提取原代心肌细胞则可明显减少黏液状物质，当将心房组织放置于4℃环境中消化时，0.25%的胰酶可以缓慢消化组织，使得心房组织变得疏松，再使用Ⅱ型胶原酶消化时可以迅速消化细胞间的胶原纤维，大大提高细胞收获率。王伟等^[10]采用两次差速贴壁（45 min/次）分离成纤维细胞。本研究初期使用两次差速贴壁，发现第二次差速贴壁所获得的成纤维细胞甚少，故采用90 min差速贴壁分离成纤维细胞^[10]。一次差速贴壁联合0.1 mmol/L Brd U可明显减少成纤维细胞的含量，较两次差速贴壁明显降低了提取成本。

本研究的另一个创新点是Ⅱ型胶原酶与BSA的联合使用，BSA可以降低消化酶对细胞的损伤，

提高细胞的活性。此外，可以先将Brd U配制成10 mmol/L溶液，待差速贴壁完成后，按1 mL含细胞培养基加10 μ L Brd U，可以减少离心次数，降低细胞损伤，提高细胞活力。鉴定方面，大多数研究只采用 α -actin蛋白荧光染色鉴定^[9-11]，Burstein等^[12]在实验中发现，有95%首代的成纤维细胞表达 α -actin蛋白，故本研究采用 α -actin蛋白联合心肌肌钙蛋白T的双荧光法鉴定。

综上所述，采用“两步法”（使用0.25%胰酶4℃消化心房肌组织5~6 h，然后用0.1%Ⅱ型胶原酶+0.5%BSA消化液消化心房组织）可更有效地培养原代心房肌细胞。

参考文献

- [1] 刘鹏, 王广新, 苏国海. 兔动脉粥样硬化模型建立方法的研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(4):150-154.
- [2] 伍柏灵, 王飞清, 唐瑛, 等. 大果木姜子油对心房颤动大鼠的治疗作用[J]. 时珍国医国药, 2019, 30(9):2128-2130.
- [3] 王平安, 杨珂伟, 王静, 等. 大鼠心肌缺血再灌注损伤模型建立的改良方法[J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(1):104-108.
- [4] Kimes BW, Brandt BL. Properties of a clonal muscle cell line from rat heart[J]. Exp Cell Res, 1976, 98(2):367-381.
- [5] Claycomb WC, Lanson NA Jr, Stallworth BS, et al. HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(6):2979-2984.
- [6] 黄绍代, 陈鹏, 吴超, 等. 乳鼠心肌细胞可成片生长的分离和培养方法[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(24): 3875-3880.
- [7] 吴丹, 冯健, 莫显刚, 等. 改良的乳小鼠心肌细胞原代培养方法[J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(4):62-67.
- [8] 黄礼杰, 陈耀旭, 杨莹莹, 等. 改良的乳鼠心肌细胞分离与培养新方法[J]. 广东药学院学报, 2015, 31(3):388-392.
- [9] 闫东霞, 赵越, 李耕慧, 等. 改良的乳鼠原代心房肌细胞的培养及鉴定方法[J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(3):442-444.
- [10] 王伟, 程伟, 肖颖彬. 新生大鼠心房肌细胞的原代培养和快速电场起搏模型的建立[J]. 实用医学杂志, 2009, 25(21): 3563-3565.
- [11] 赵勇, 刘晓伟, 林治宇, 等. 新生SD大鼠心肌细胞的原代培养[J]. 黑龙江医药科学, 2017, 40(6):1-2.

- (上接第 358 页)

- [29] Lin G, Huang J, Chen Q, et al. MiR-146a-5p mediates intermittent hypoxia-induced injury in H9c2 cells by targeting XIAP[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019:6581217. sleep reduces CD1D and RAB20 expressions that are reversed by CPAP therapy[J]. *EBioMedicine*, 2020, 56:102803. (收稿:2022-01-09 修回:2022-09-12)
- [30] Sofer T, Li R, Joehanes R, et al. Low oxygen saturation during (本文编辑:王雨婷)