

成年大鼠心肌细胞分离培养及兴奋-收缩耦联表征

孙 敏, 于海奕, 张幼怡, 吕志珍, 高 炜, 李子健

(北京大学第三医院心内科血管医学研究所, 卫生部心血管分子生物学与调节肽重点实验室,
分子心血管学教育部重点实验室, 心血管受体研究北京市重点实验室, 北京 100191)

【摘要】 目的 比较两种细胞分离液分离成年大鼠心肌细胞, 进一步表征成年大鼠心肌细胞兴奋-收缩耦联。**方法** Langendorff 装置进行主动脉逆流灌流, 分别用两种细胞分离液分离成年大鼠心肌细胞, 无血清培养并进行腺病毒感染。显微镜下观察单个心肌细胞的形态学特点, 荧光显微镜下检测病毒感染。采用 IonOptix 仪器检测心肌细胞肌节收缩-舒张指标以及心肌细胞钙离子摄入-排出指标。**结果** 两种分离液均可获得 70% 横纹清晰的长杆状心肌细胞, 培养可存活 7 d 以上。腺病毒感染 48 h, 绿色荧光蛋白持续表达 7 d 以上。分离液一获得的心肌细胞不能很好地随电场刺激产生收缩, 分离液二获得的细胞可用于检测兴奋-收缩耦联特性, 心肌细胞肌节缩短分数为 $11.61\% \pm 2.15\%$, 舒张时间为 (0.177 ± 0.031) s, 钙瞬变幅度为 $30.79\% \pm 9.74\%$, 钙瞬变衰减时间为 (0.300 ± 0.074) s。**结论** 两种分离液均可用于分离和培养成年大鼠心肌细胞, 并用于腺病毒转染等长时程研究。分离液二更适用于检测成年大鼠心肌细胞的兴奋-收缩耦联特性。

【关键词】 心肌细胞; 成年大鼠; 分离; 培养; 兴奋-收缩耦联

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 03-0001-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.003.001

Isolation and culture of adult rat cardiomyocytes and characteristics of excitation-contraction coupling

SUN Min, YU Hai-yi, ZHANG You-yi, LV Zhi-zhen, GAO Wei, LI Zi-jian

(Department of Cardiology, Peking University Third Hospital, Key Laboratory of Cardiovascular Molecular Biology and Regulatory Peptides, Ministry of Health, Key Laboratory of Molecular Cardiovascular Sciences, Ministry of Education, Beijing 100191, China)

【Abstract】 Objective To compare two separation medium of isolation of adult rat cardiomyocytes, and to observe the characteristics of excitation-contraction coupling of cardiomyocytes. **Methods** The isolated adult rat heart was hanged on to the Langendorff apparatus for aortic counter-current perfusion and collagenase digestion using two different separation medium. The single cardiomyocytes were cultured and infected with adenovirus. The morphological features of cardiomyocytes were observed with microscope and fluorescent microscope. The shortening-re-lengthening features of sarcomere and the intake-discharge features of calcium were simultaneously recorded by IonOptix equipment. **Results** 70% rod-shaped with clear-striation adult rat cardiomyocytes could be obtained with the stated two separation medium and cultured in serum-free medium for more than 7 days. GFP could express more than 7 days when the cardiomyocytes were infected with adenovirus. Cardiomyocytes obtained by the first separation medium could not contract with the electrical stimulation, while cardiomyocytes obtained by the second separation medium could be used for the detection of excitation-

【基金项目】 国家自然科学基金 (81100164、81070078、81270157); 高等学校博士学科点专项科研基金 (20100001110101、20110001120015)。

【作者简介】 孙敏 (1988 -), 女, 硕士生。E-mail: sunmin0602@163.com。

【通讯作者】 李子健 (1970 -), 男, 副研究员, 硕士生导师, 从事心血管基础研究。E-mail: lizijian@bjmu.edu.cn。

contraction coupling. The shortening fraction of sarcomere was $11.61\% \pm 2.15\%$ and the relaxing time was (0.177 ± 0.031) s. The amplitude of calcium transient was $30.79\% \pm 9.74\%$ and the decaying time of calcium transient was (0.300 ± 0.074) s. **Conclusion** With the stated two separation medium, adult rat cardiomyocytes can be well isolated, cultured and infected with adenovirus. The second separation medium can be used for the detection of excitation-contraction coupling characteristics.

【Key words】 Cardiomyocyte; Adult rat; Isolation; Culture; Excitation-contraction coupling

目前,心肌细胞是心脏疾病研究主要应用的细胞模型,乳鼠心肌细胞分离和培养的技术方法非常成熟并被广泛接受。但是乳鼠心肌细胞与成体心肌细胞相比,其结构和功能都存在极大的差异,尤其是利用乳鼠心肌细胞培养来研究心肌细胞电生理存在着很大的局限性,因此人们开始探索成体心肌细胞的分离培养。

自 1976 年 Powell T 和 Twist VW^[1]首次建立了单个成年心肌细胞分离方法后,成年心肌细胞被广泛地用于心肌细胞兴奋-收缩耦联、钙信号变化、力学特性、药物干预、基因治疗等研究中^[2]。但成熟心肌细胞分离和培养的技术、条件要求较高,使得成熟心肌细胞的分离培养成功率极低。酶解法用于成年大鼠的心肌细胞分离已有近 40 年的历史,但至今仍无统一的细胞产率高、活性好的简便的方法,进而制约了成年心肌细胞在细胞生物学和分子生物学领域的应用。

为此,本研究通过比较目前常用的两种成年大鼠心肌细胞分离方法在心肌细胞兴奋-收缩耦联检测中的应用,拟建立一套细胞产率高、钙耐受性好的成年大鼠心肌细胞快速分离及培养方法,可进行稳定的腺病毒感染,并对成年大鼠心肌细胞的兴奋-收缩耦联进行表征。本研究为深入理解心肌细胞力学特性和相关心血管疾病(如心衰等)提供了基础数据。

1 材料和方法

1.1 实验动物与试剂

6~8 周龄 SPF 级 SD 雄性大鼠,180~200 g,6 只,来源于北京大学医学部实验动物中心【生产许可证号:SCXK(京)2012-0001;使用许可证号:SYXK(京)2011-0039】。主要试剂:II 型胶原酶、Fura-2、层粘连蛋白(Laminin):Invitrogen 公司;蛋白酶 2、3-丁二酮一肟(BDM)、Medium 199:Sigma 公司。

心肌细胞分离液一^[3]:200 mL 无钙台式液:NaCl 1.601 g, KCl 0.081 g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.037 g, Glucose $\cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.396 g, Taurine 0.250 g, Hepes

0.953 g, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.049 g,超纯水定容至 200 mL,NaOH(2 mol/L)调 pH 值在 7.20~7.30 范围内。酶液 I:台式液 15 mL,BSA 15 mg,BDM 15 mg, Taurine 15 mg,胶原酶 II 8.1 mg,蛋白酶 1.3 mg。酶液 II:台式液 10 mL,BSA 10 mg,BDM 10 mg, Taurine 10 mg,胶原酶 II 5.4 mg。酶液 III:台式液 10 mL, BSA 10 mg, BDM 10 mg, Taurine 10 mg, 胶原酶 II 5.4 mg。心肌细胞分离液二^[4]:200 mL 无钙台式液:NaCl 1.403 g, KCl 0.082 g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.010 g, Glucose $\cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.871 g, Taurine 0.248 g, Hepes 1.192 g, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.020 g,超纯水定容至 200 mL,NaOH(2 mol/L)调 pH 值在 7.20~7.30 范围内。酶 I:无钙台式液 35 mL,胶原酶 II 30 mg,蛋白酶 3 mg, CaCl_2 (0.2 mol/L) 8.75 μL 。酶 II:酶 I 15 mL, CaCl_2 (0.2 mol/L) 18.75 μL 。酶 III:酶 I 15 mL, CaCl_2 (0.2 mol/L) 48.75 μL , BSA 30 mg。Buffer A:无钙台式液 85 mL, EGTA (0.4 mol/L) 85 μL 。Buffer B:无钙台式液 80 mL, CaCl_2 (0.2 mol/L) 400 μL , BSA 160 mg。所有灌流液需用 0.22 μm 无菌滤膜过滤除菌,经纯氧饱和 30 min 后使用。

1.2 实验方法

1.2.1 心肌细胞的分离:取 SD 大鼠,腹腔注射肝素 1000 U/kg,30 min 后戊巴比妥钠腹腔麻醉(50 mg/kg)。参照文献的方法进行分离^[5],迅速开胸,于主动脉根部处取心脏悬挂。Buffer A 灌流 3 min,换酶 I 灌流。酶 I 灌流完毕换酶 II 灌流,同时开始酶液循环灌流。至心肌组织变软时结束消化,将组织剪下置于酶 III 中,剪碎,酶 III 消化-离心(500 r/min,1 min)-Buffer B 重悬,重复这一过程,直至组织处理完成。用 200 目滤网过滤去除残余组织块,静置 10 min,细胞自然沉降,弃上清,再加入 Buffer B 液自然沉降。吸弃上清,取 10 mL Buffer B 液,加入 CaCl_2 (0.2 mol/L) 25 μL ,自然沉降 10 min。吸弃上清,取 10 mL Buffer B 液,加入 CaCl_2 (0.2 mol/L) 40 μL ,自然沉降 10 min。使梯度复钙最终浓度为 1.8 mmol/L,置于室温 2 h 备用。

1.2.3 大鼠心室肌细胞兴奋-收缩耦联检测:DMSO

溶解 Fura-2 粉末,终浓度 1 mmol/L。取 1 mL 细胞悬液于 EP 管内,锡箔纸包裹避光,加入 Fura-2 溶液 1 μ L。室温静置孵育 20 min。EP 管底部可见小块沉淀,吸弃上清,加入新鲜台式液 1 mL,混匀。室温静置 5 min 后重复洗涤一次。静置 20 min 后上机检测。使用 IonOptix (IonOptixCo, USA) 系统检测心肌细胞兴奋-收缩耦联表征。给予细胞 1 Hz, 4 ms 波宽,幅度 15 V 的电场刺激。实时采集并记录心肌细胞肌节收缩-舒张指标以及心肌细胞钙离子摄入-排出指标。

2 结果

2.1 两种分离液获得的心肌细胞形态学观察

本研究采用的两种心肌细胞分离液均可分离出单个成年大鼠心肌细胞,且分离出的心肌细胞数量与形态相当。每个大鼠心脏可获得 1×10^7 个细胞,细胞的杆状率达 70%。倒置显微镜下可见钙耐受细胞为长杆状或矩形,横纹清晰,排列规则,边缘锐利,折光性好,大部分为静息状态(图 1)。

2.2 心肌细胞培养时间及病毒转染效率鉴定

将两种分离液获得的单个心肌细胞接种到 Laminin 包被的培养皿中,心肌细胞均能贴壁生长,存活长达 14 d(彩插 1 图 2)。

为进一步验证获得的成年大鼠心肌细胞能否用于长时程分子生物学实验,心肌细胞接种到 Laminin 包被的培养皿 1 h 后换液,进行病毒感染。本研究发现,感染携带绿色荧光蛋白基因的复制缺陷型腺病毒载体 (AdGFP) 24 h 后可见荧光显微镜下绿色荧光蛋白表达,荧光强度低。感染 48 h 后绿色荧光蛋白表达率达 90%,荧光强度高。培养 7 d

后仍能检测到绿色荧光蛋白表达(彩插 1 图 2)。

2.3 两种分离液获得成年大鼠心室肌细胞兴奋-收缩耦联表征的比较

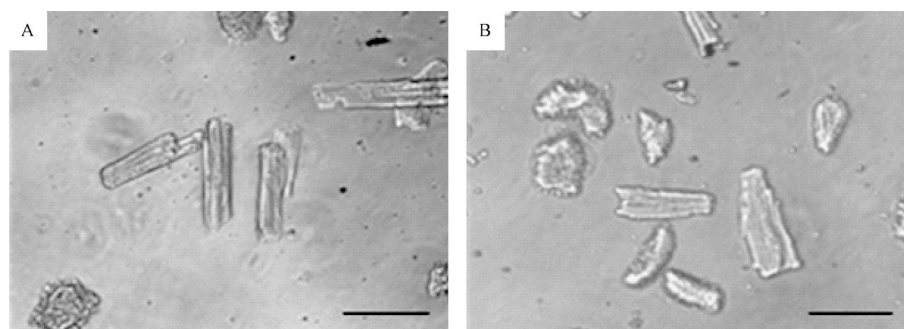
在给予 1 Hz, 4 ms 波宽,幅度 15 V 的电场刺激下,心肌细胞分离液一分离出的心肌细胞不能随电刺激的频率发生节律性收缩, IonOptix 仪器记录的肌节舒缩和钙信号图形为围绕基线产生的噪音信号,表明心肌细胞失去兴奋收缩耦联特性(图 3 A)。心肌细胞分离液二分离出的心肌细胞能够随电刺激的频率发生节律性收缩, IonOptix 仪器可实时检测和记录成年心肌细胞肌节舒缩和钙信号图形(图 3 B)。

统计 6 只大鼠、15 个心肌细胞肌节收缩-舒张指标以及心肌细胞钙离子摄入-排出指标,反映心室肌细胞兴奋-收缩耦联表征,发现单个成年大鼠心肌细胞肌节缩短分数为 $11.61\% \pm 2.15\%$,舒张时间为 (0.177 ± 0.031) s,钙瞬变幅度为 $30.79\% \pm 9.74\%$,钙瞬变衰减时间为 (0.300 ± 0.074) s。

3 讨论

目前,成年心肌细胞的分离主要为 Langendorff 逆行主动脉生物酶灌流消化方法。不同实验室采用的分离液不尽相同,且分离出的细胞是否适合兴奋-收缩耦联特性的检测尚无统一标准。本研究比较了文献报道中主要采用的分离液一以及分离液二,发现两种分离液在细胞产量及活性方面无明显差异。分离液二的操作更简单、快速,且获得的心肌细胞适于进行兴奋-收缩耦联特征的检测。

两种成年大鼠心肌细胞分离液最大的不同在于消化酶中是否含有 BDM(butanedione monoxime)。



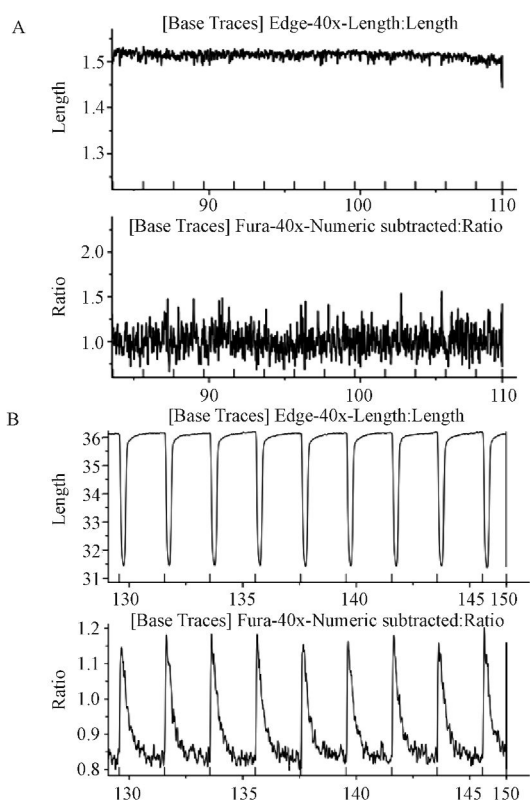
注:A,分离液一获得成年大鼠心肌细胞;B,分离液二获得成年大鼠心肌细胞;标尺=200 μ m。

图 1 两种分离液获得成年大鼠心肌细胞的形态

Note: A, The morphological features of cardiomyocytes obtained by the first separation medium;

B, The morphological features of cardiomyocytes obtained by the second separation medium; bar = 200 μ m.

Fig. 1 The morphological features of cardiomyocytes obtained by two different separation medium



注:A,分离液一获得心肌细胞肌节舒缩变化和钙信号改变图形;
B,分离液二获得心肌细胞肌节舒缩变化和钙信号改变图形。

图3 IonOptix 仪器检测和记录成年大鼠心肌细胞肌节舒缩变化和钙信号改变

Note: A, The figure of the shortening-re-lengthening features of sarcomere and the intake-discharge features of calcium of cardiomyocytes isolated by the first separation medium; B, The figure of the shortening-re-lengthening features of sarcomere and the intake-discharge features of calcium of cardiomyocytes isolated by the second separation medium.

Fig. 3 The shortening-re-lengthening features of sarcomere and the intake-discharge features of calcium of adult rat cardiomyocytes isolated by two different separation medium

本研究发现,两种分离液获得心肌细胞的数量和质量并无明显差异,但含有 BDM 的消化酶分离的心肌细胞对电刺激的反应性不良,甚至无反应,不会随电刺激的频率发生节律性收缩。BDM 是肌球蛋白 ATP 酶抑制剂,能够抑制横桥的形成,进而抑制肌丝的收缩和能量代谢。以往研究在酶液中加入高浓度 BDM,用以抑制分离过程中心脏过度收缩、减轻缺血再灌注损伤以及维持心脏低能量代谢状态,进而提高心肌细胞产量^[6]。但是 BDM 能够影响细胞膜离子通道活性及相关信号传递^[7-9]、以及细胞缝隙连接^[10],从而阻碍心肌细胞兴奋-收缩耦联的形成,因此建议进行心肌细胞兴奋收缩耦联特征检

测的实验心肌细胞的分离消化液中应不加 BDM。

本研究总结出在成年大鼠心肌细胞分离过程中应注意以下事项:①灌流液的 pH 值在 7.20 ~ 7.30 范围内:本研究方法用纯氧进行灌流液氧饱和。而部分文献报道灌流液的 pH 值为 7.40,配以体积分数为 95% O₂ + 5% CO₂ 混合气体进行氧合,但此法不好控制 pH 值与氧饱和时间的平衡,易使溶液 pH 值过低;②灌流液流出端口温度保持在 37 °C:由于恒温水浴泵显示的温度为水槽内的温度,经过 Langendorff 管路后实际温度低于 37 °C,降低酶的效力,因此应根据出口端的温度调整恒温水浴泵的温度,保证进入心脏的酶的效力;③酶液浓度:目前广泛用于解离细胞间结缔组织的消化酶是 II 型胶原酶。胰蛋白酶主要用于分解组织间质的蛋白成分,同时对心肌细胞膜蛋白有破坏作用。因此本实验采用较低的蛋白酶浓度(0.086 g/L)和较高的胶原酶浓度(0.86 g/L)进行快速消化,酶消化总时间为 20 min,减少了酶对细胞的破坏,提高细胞产率;④其他:取下心脏到开始主动脉逆行灌流的时间不应超过 1 min,所有液体均采用超纯水配制,换液体灌流时注意要暂停恒流泵以防灌流液中产生气泡,全过程液体流速控制在 6 mL/min,整个操作(尤其是吹打)过程动作应轻柔。

本研究进一步通过心肌细胞培养和病毒感染验证获得的心肌细胞能否适用于实验研究。成年心肌细胞培养的关键在于是否能分离出高比例的长杆状钙耐受细胞。有些文章用台盼蓝染色来检测细胞的存活率^[11],但这一方法有一定的局限性。因为急性分离过程中受到应激的细胞能够使台盼蓝进入细胞内,在培养的过程中,这些细胞有可能从应激中恢复并很好地存活^[12]。判断细胞活性最可靠的指标是光镜下可见四角锐利、横纹清晰、长杆状,并能对电刺激产生收缩反应^[13]。本研究采用的两种分离液均能稳定地获取高产率、高活性的成年大鼠心肌细胞,并能进行长时间培养。培养的细胞可以稳定地感染腺病毒,感染效率达 90%,因此两种分离液获得的成年大鼠心肌细胞均可用于进行目的基因的过表达或敲减,进而研究目的基因对于心肌细胞功能的影响。

在一次兴奋-收缩耦联的过程中,心肌细胞的肌节随电刺激有规律地收缩和舒张,同时伴随细胞内钙离子浓度的改变^[14]。IonOptix 仪器可以同步记录单个成年大鼠心肌细胞肌节舒缩活动和钙信号

变化。本研究采用单细胞动缘技术,用 $bl\% peak h$ 和 $\sin exp tau$ 两个指标进行分析。 $peak h$ 代表心肌细胞的收缩幅度,由于细胞本身大小有差异,收缩幅度也不同,因此为排除细胞大小造成收缩力的差异,本研究采取心肌细胞收缩幅度与单个心肌细胞长度的百分比($bl\% peak h$)进行校正,更准确地反映心肌细胞的收缩能力。 $\sin exp tau$ 代表细胞某一功能呈指数衰减所需的时间,在一次兴奋-收缩耦联过程中,反映肌节舒张和肌浆网钙离子再摄取的速度。

总之,本研究通过两种分离液的比较,建立了一套稳定、高产率且适用于兴奋-收缩耦联检测的成年大鼠心肌细胞分离方法。并经过心肌细胞培养和病毒感染的验证,证明此方法培养的成年大鼠心肌细胞可用于常规的分子生物学实验和功能研究。同时,本实验采用 IonOptix 仪器对分离的成年大鼠心肌细胞的单细胞兴奋-收缩耦联的表征进行了检测,为今后成年心肌细胞用于心脏电生理研究和分子生物学研究提供了实验基础。

参考文献:

- [1] Powell T, Twist V W. A rapid technique for the isolation and purification of adult cardiac muscle cells having respiratory control and a tolerance to calcium[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1976, 72(1): 327 - 333.
- [2] Louch W E, Sheehan K A, Wolska B M. Methods in cardiomyocyte isolation, culture, and gene transfer[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2011, 51(3): 288 - 298.
- [3] Tytgat J. How to isolate cardiac myocytes[J]. *Cardiovasc Res*, 1994, 28(2): 280 - 283.
- [4] 马元良,黎荣昌,吴昊迪,等. Junctophilin-2 表达下调介导心肌细胞兴奋-收缩耦联结构与功能的重塑[J]. *中国分子心脏病学杂志*, 2013(03): 543 - 547.
- [5] Gorelik J, Yang L Q, Zhang Y, et al. A novel Z-groove index characterizing myocardial surface structure[J]. *Cardiovasc Res*, 2006, 72(3): 422 - 429.
- [6] Balasubramaniam R, Chawla S, Grace A A, et al. Caffeine-induced arrhythmias in murine hearts parallel changes in cellular Ca^{2+} homeostasis[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 289(4): H1584 - H1593.
- [7] Lou Q, Li W, Efimov I R. The role of dynamic instability and wavelength in arrhythmia maintenance as revealed by panoramic imaging with blebbistatin vs. 2,3 - butanedione monoxime[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2012, 302(1): H262 - H269.
- [8] Cheng Y, Li L, Nikolski V, et al. Shock-induced arrhythmogenesis is enhanced by 2,3 - butanedione monoxime compared with cytochalasin D[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004, 286(1): H310 - H318.
- [9] Maesako M, Araki J, Lee S, et al. 2,3 - Butanedione monoxime suppresses primarily total calcium handling in canine heart[J]. *Jpn J Physiol*, 2000, 50(5): 543 - 551.
- [10] Miura M, Wakayama Y, Endoh H, et al. Spatial non-uniformity of excitation-contraction coupling can enhance arrhythmogenic-delayed afterdepolarizations in rat cardiac muscle[J]. *Cardiovasc Res*, 2008, 80(1): 55 - 61.
- [11] Glick M R, Burns A H, Reddy W J. Dispersion and isolation of beating cells from adult rat heart[J]. *Anal Biochem*, 1974, 61(1): 32 - 42.
- [12] Cheung J Y, Leaf A, Bonventre J V. Determination of isolated myocyte viability: staining methods and functional criteria[J]. *Basic Res Cardiol*, 1985, 80 Suppl 1: 23 - 29.
- [13] Piper H M, Probst I, Schwartz P, et al. Culturing of calcium stable adult cardiac myocytes[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1982, 14(7): 397 - 412.
- [14] 王世强,杨华乾. 心肌细胞兴奋收缩耦联的分子机制[J]. *中国科学:生命科学*, 2013(10): 833 - 841.

[修回日期]2014-01-15