

# 人心房肌细胞的培养与鉴定

张荣庆 程何祥 王海昌 贾国良 郭文怡 周更须 张殿新 王海燕 李雪

【摘要】目的 探索人心房肌细胞的原代及传代培养方法。方法 取心外科手术患者(1.5~6.0岁,平均2.5岁)常规切除的右心耳,利用组织贴块法原代培养心房肌细胞并进行传代培养,对培养细胞(取第3代)进行光镜、透射电镜形态学观察和免疫细胞化学鉴定,并绘制生长曲线。结果 原代培养10 d左右时细胞数目可达 $10^6 \sim 10^7/\text{ml}$ ,此后每4~5 d可传代一次,大多可传至第8代。透射电镜观察到典型心肌细胞的超微结构,免疫细胞化学分析显示90%以上的细胞呈 $\alpha$ -肌动蛋白及心肌特异性肌钙蛋白I抗体染色阳性。细胞生长曲线显示第3代细胞在密度为 $1 \times 10^6 \sim 8 \times 10^6/\text{ml}$ 呈对数生长,倍增时间约24 h。结论 利用组织贴块法成功培养出人心房肌细胞,所得心房肌细胞纯度高并能传代培养,为深入研究人心房肌细胞的病理生理及分子生物学奠定了基础。

【关键词】 细胞培养; 人; 心房肌细胞

**Culture and identification of human atrial myocardial cells** ZHANG Rong-qing\*, CHENG He-xiang, WANG Hai-chang, JIA Guo-liang, GUO Wen-yi, ZHOU Geng-xu, ZHANG Dian-xin, WANG Hai-yan, LI Xue.  
\* Department of Cardiology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China  
Corresponding author: WANG Hai-chang, Email wanghc@fmmu.edu.cn

【Abstract】 **Objective** To explore a method for primary culture and subculture of human atrial myocardial cells. **Methods** Specimens of human right atrial appendage routinely resected during operation were obtained from the hearts of 9 patients (mean age, 2.5 years; range, 1.5 to 6.0 years). Primary human atrial myocardial cells were cultured by tissue block method and were subcultured thereafter. Cells of the third generation were observed by light microscopy and electron microscopy, and identified by immunocytochemical analysis. The cells were counted to draw a growth curve. **Results** After 10 days of primary culture, the number of cells reached  $10^6$  to  $10^7$  per milliliter. Thereafter the cells were passaged every four to five days until the eighth generation in most cases. Typical ultrastructure of myocardial cells were observed under electron microscope. Immunocytochemical analysis showed that over 90 percent of cells were stained positively for  $\alpha$ -actin and troponin I antigen, a factor specific for cardiomyocytes. The growth curve displayed that cells of the third generation grew in logarithm scale during a density of  $1 \times 10^6$  to  $8 \times 10^6$  per milliliter with a double time of 24 hours. **Conclusion** Human atrial myocardial cells were successfully cultured by tissue block method with high purity and could be subcultured thereafter. These results provide the basis for future studies of pathophysiology and molecular biology of human atrial myocardial cells.

【Key words】 Cell culture; Persons; Atrial myocardial cells

对于心房整体及单个心房肌细胞在各种病理生理情况下生物学特性的研究,以往多靠动物模型来完成,动物模型研究的良好结果不能直接推论到人体,直接在人的心房肌细胞上进行研究的结果是最可靠的。建立人心房肌细胞的体外培养方法意义重大<sup>[1]</sup>。本研究旨在探索人心房肌细胞体外培养的新方法。

## 材料与方法

1. 主要材料:DMEM培养基、HEPES、L-谷氨酰胺(均为Gibco公司产品),新生小牛血清(杭州四季青生物制品公司),胰酶(Difco进口分装),羊抗人肌钙蛋白I(TnI, Santa-cruz),鼠抗人非特异性 $\alpha$ -肌动蛋白、平滑肌特异性 $\alpha$ -肌动蛋白(Sigma公司),兔抗羊IgG-FITC、羊抗鼠IgG-CY3(武汉博士德公司分装),SPA-HRP(自标),细胞培养瓶、培养板、培养皿(均为丹麦NUNC公司产品),荧光倒置显微镜(日本Nikon),JEM-1200EX透射电镜(日本),LKB-型超薄切片机(瑞典)。

作者单位 710033 西安,第四军医大学西京医院心内科(张荣庆、程何祥、王海昌、贾国良、郭文怡、张殿新、王海燕、李雪),心外科(周更须)

通讯作者:王海昌,Email wanghc@fmmu.edu.cn

2. 组织取材及细胞培养:心房标本取材于行心外科手术患者常规切除的右心耳,于 5~10 min 内运送到实验室。9 例均为先天性心脏病患儿,其中心房间隔缺损 4 例,心室间隔缺损 5 例。患者年龄 1.5~6.0 岁,平均 2.5 岁,皆无心力衰竭和房性心律失常,标本取材得到第四军医大学伦理委员会批准。用无血清培养基洗涤,无菌条件下用眼科剪将右心耳修剪成 1 mm<sup>3</sup> 大小的肌粒。洗去血细胞后,用弯吸管将肌粒均匀贴于细胞培养瓶内。置于 37℃、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的培养箱中,90 min 后补加 15% 小牛血清的 DMEM 培养基,使肌小粒浸浴于培养液中静止培养。观察并换液(3 d 换液一次),待细胞接近长满瓶底即可传代。

细胞传代方法:至单层细胞铺满近培养瓶底的 80% 以上时即可进行传代。将原代细胞瓶内的培养液倒去,加入 PBS(0.1 mol/L, pH7.2)充分清洗细胞面,倾去 PBS 后加 0.25% 胰酶 1 ml,镜下观察。当细胞成片收缩呈球形时,立即加入含血清培养基终止消化。用弯头吸管反复吹打瓶壁使细胞自瓶壁脱落,1:2 分装接种。先倒置培养瓶,90 min 后翻转培养瓶,以差速贴壁法去除成纤维细胞及其他杂质。细胞接近长满瓶底后(约 5 d)可再传代,取第 3 代细胞片进行鉴定与实验。

3. 光学显微镜观察与摄片:倒置光学显微镜下观察细胞生长情况并摄片。

4. 细胞片标本制备:将盖玻片置于培养皿中,将细胞悬液滴加在盖玻片上。待细胞长好后,用冷丙酮固定 20 min,分别作荧光及免疫组化用。

5. 免疫细胞化学染色:取待用细胞片,0.1 mol/L PBS 洗 3 次,每次 3 min,吹干。以 0.1% BSA 封闭非特异性反应(37℃ 水浴 30 min),1% TritonX-100 打孔,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 封闭(37℃ 水浴 30 min)。加鼠抗人平滑肌  $\alpha$ -肌动蛋白(37℃ 水浴 45 min);PBS 洗 3 min  $\times$  3 次,加 SPA-HRP 标记的二抗(37℃ 水浴 45 min);再 PBS 洗 3 min  $\times$  3 次,加底物 DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(37℃ 水浴 45 min);PBS 洗净,苏木紫衬染 15 min,普通光学显微镜下观察并摄片。

免疫荧光染色:细胞片用 1% TritonX-100 打孔,加羊抗人 TnI、鼠抗人平滑肌  $\alpha$ -肌动蛋白(37℃ 水浴 45 min);PBS 洗 3 min  $\times$  3 次,加兔抗羊 IgG-FITC、羊抗鼠 IgG-CY3(37℃ 水浴 45 min) 荧光显微镜下观察并摄片。

以上免疫细胞化学实验皆设立阴性对照(以 PBS 代替一抗)和阳性对照(正常人心房肌组织)。

6. 透射电镜标本制备与观察:取对数生长期的单层细胞,弃去培养液,用自制橡皮细胞刮刮下单层细胞,用吸管将细胞移入 10 ml 尖底离心管中,加 4℃ 预冷的 PBS,以 2000 r/min 离心 20 min;弃上清液,用吸管沿管壁缓缓加入 2% 戊二醛固定 2 h,1% 四氧化锇再固定 2 h,丙酮逐级脱水,环氧树脂 618 包埋,JKB-V 型超薄切片机切片,醋酸双氧铀、枸橼酸铅双重染色,JEM-1200EX 透射电镜观察。

7. 细胞生长曲线的绘制:取生长状态良好的第 3 代细胞,接种于 24 孔培养板内,每孔  $1 \times 10^5$  个细胞,加入 1 ml DMEM 培养液,置 37℃、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养,每 24 h 任取 3 孔,以 0.25% 的胰蛋白酶消化制成单细胞悬液,计数(每次计数 3 遍,取平均值),待细胞长满时停止计数,绘制生长曲线,计算群体倍增时间(Td),计算公式:  $Td = t \times \log 2 / (\log N_t - \log N_0)$ ,其中 t 代表培养时间, N<sub>0</sub> 及 N<sub>t</sub> 分别代表接种后及培养 t 小时后的细胞数。

8. 统计学处理:实验重复 9 次(共 9 例)。数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 Excel 软件进行统计分析并绘制曲线图。

## 结 果

1. 心房肌细胞的培养及光学显微镜观察:采用组织块培养法贴块 4~5 d 后即可见有细胞从肌小粒(组织块)边缘爬出,细胞呈梭形(图 1)。此后细胞数明显增多,10 d 左右时细胞生长密度可达瓶底的 70%~80%(图 2),其数目可达  $10^6 \sim 10^7$ /ml,此时即可传代。此后每 4~5 d 可传代一次,大多可传 8 代,细胞生长共 1.5 月余。

2. 心房肌细胞的免疫细胞化学鉴定:培养的细胞 90% 以上非特异性  $\alpha$ -肌动蛋白抗体染色阳性(图 3A),平滑肌特异性  $\alpha$ -肌动蛋白抗体染色阴性;心肌特异性 TnI 抗体染色阳性进一步证明培养的细胞为心肌细胞(图 5)。

3. 透射电镜观察:培养 3 代的细胞可见较多微(肌)丝和线粒体,细胞器靠近细胞核,符合典型心房肌细胞的超微结构(图 6)。

4. 细胞生长曲线绘制(图 7):第 3 代人心房肌细胞在密度为  $1 \times 10^6 \sim 8 \times 10^6$ /ml 呈对数生长,倍增时间约 24 h。

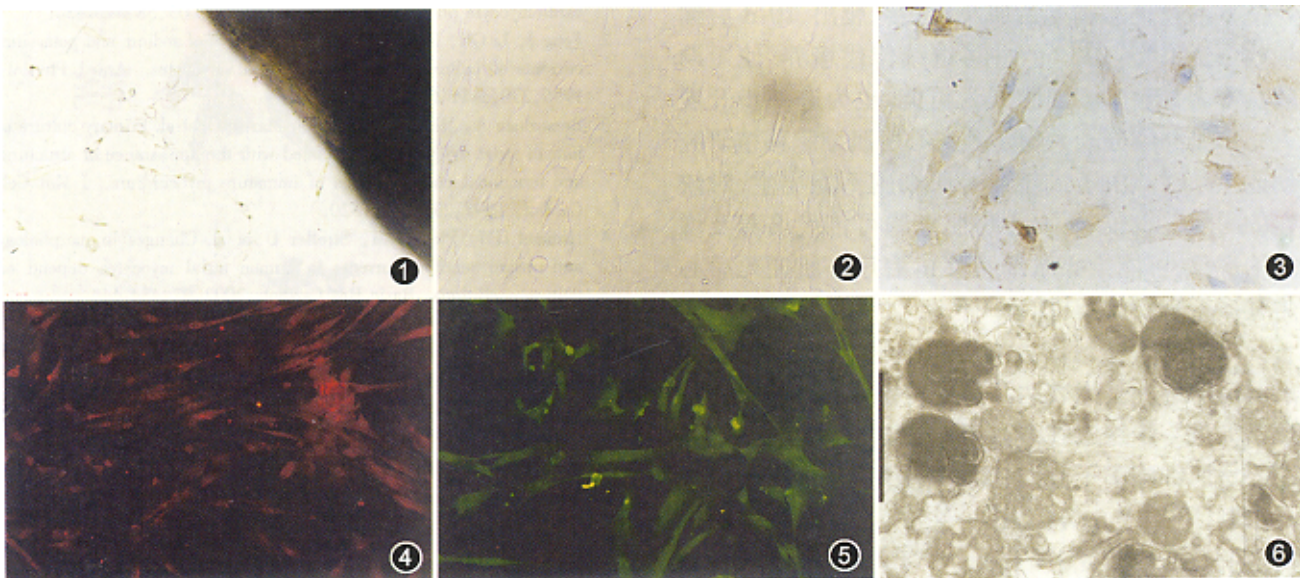


图1 心房肌组织块法培养,贴块4 d后细胞由肌小粒边缘爬出(×200) 图2 组织块法培养的心房肌细胞贴块10 d后,心房肌细胞密集生长(×200) 图3 第3代细胞的免疫细胞化学鉴定,90%以上培养细胞的胞浆中充满棕色颗粒,为α-肌动蛋白抗体染色阳性(×400) 图4 第3代细胞的免疫荧光染色鉴定,90%以上培养细胞的胞浆中充满红色颗粒,为α-肌动蛋白抗体染色阳性(CY3标记法,×400) 图5 第3代细胞的免疫荧光染色鉴定,90%以上培养细胞的胞浆中充满绿色颗粒,为TnI阳性着色,证明所培养细胞的心肌起源(FITC标记法,×200) 图6 第3代细胞的透射电镜照片,细胞内较多微(肌)丝,线粒体清晰可见(×28 500)

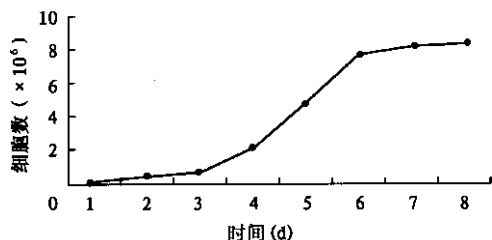


图7 第3代心房肌细胞的生长曲线

### 讨 论

人心肌细胞培养模型综合了急性分离的心肌细胞及在体模型的优点,培养过程中可使分离时受损伤的心肌细胞得以修复;可以排除其他多种干扰因素(如神经体液、血液动力学等),在一种特定环境下从细胞水平研究各种因子对人心肌细胞的影响;另外,人心肌细胞培养模型中可用于研究蛋白和基因的表达,在分子生物学实验中有重要的应用价值。但由于培养条件脱离生理环境,细胞许多“表型”特征会发生变化,如因肌原纤维迅速降解而失去收缩功能等,表明培养细胞同时存在一些缺点<sup>[1]</sup>。

由于受到分离培养技术的限制,人心房肌细胞的研究相对滞后。目前,人心房肌细胞培养主要采用酶消化法<sup>[2-4]</sup>。但成熟人心房肌细胞属终末期细胞,极易受缺血、缺氧、酶消化和机械刺激等因素的

损伤,而且由闰盘和细胞外间质形成强有力的物理连接,因此难于分离;另外,无钙环境下分离的心房肌细胞为不耐钙细胞,当细胞外环境恢复为生理状态下时极易产生瞬间收缩而失去在体的形态,为此人心房肌细胞的分离培养具有相当的难度。最近,国外有研究采用组织贴块法原代培养人心房肌细胞获得成功,细胞在体外培养环境下存活可达3w<sup>[5]</sup>。与消化培养法相比,组织块培养法实用、可行,耗材少、成本低,而且使细胞免受缺氧、酶消化和机械刺激等因素的损伤,具有一定的优越性。

本研究旨在探索人心房肌细胞体外培养的新方法。我们以心外科手术体外循环切下的先心病幼儿心耳为标本,采用组织贴块法进行培养。进一步的形态学观察及免疫细胞化学鉴定显示,培养细胞的透射电镜观察符合典型心房肌细胞的超微结构;90%以上细胞非特异性α-肌动蛋白抗体染色阳性,而平滑肌特异性α-肌动蛋白抗体染色阴性;心肌细胞特异性TnI抗体染色阳性(占90%以上)进一步证明培养的细胞为心肌细胞。另外本研究首次发现,幼年人的心房肌细胞可传代培养。曾有研究发现,小儿的心室肌细胞可传代培养,细胞分裂并发生表型变化,传代24次、长达6个月方失去增殖能力<sup>[6]</sup>。我们采用组织贴块法培养人心房肌细胞,

4~5 d 后可见肌细胞由肌小粒边缘爬出,10 d 后细胞数可达  $10^6 \sim 10^7/\text{ml}$ ,并可继续传代培养,使短期内获得大量心房肌细胞成为可能,也为进一步开展人心房肌细胞分子生物学及人心房肌细胞移植研究创造了条件。由于成年人心肌细胞不能再生,对缺血的耐受性也较弱;人心房肌细胞可传代培养及增殖的现象,可能给心肌细胞移植治疗心肌梗死后心力衰竭带来新的契机。

组织贴块法培养人心房肌细胞方法的建立,为人心房肌细胞基因表达及信号转导的研究奠定了基础。如进一步探索在各种致病因素及药物作用下,人心房肌细胞离子流与基因表达的变化及其信号转导机制,将推进心房扩大、房性心律失常、心房重构的机制及防治研究。

参 考 文 献

1 Bird SD, Doevendans PA, van Rooijen MA, et al. The human adult

cardiomyocyte phenotype. *Cardiovasc Res*, 2003, 58: 423-434.  
 2 Feng J, Li GR, Fermini B, et al. Properties of sodium and potassium currents of cultured adult human atrial myocytes. *Am J Physiol*, 1996, 270(5 Pt 2): H1676- H1686.  
 3 Benardeau A, Hatem 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 Mol Cell Cardiol*, 1997, 29: 1307-1320.  
 4 Himmel HM, Pietsch M, Streller U, et al. Changes in morphology and inward rectifier currents in human atrial myocytes depend on culture conditions. *Basic Res Cardiol*, 2002, 97: 434-444.  
 5 Forini F, Paolicchi A, Pizzorusso T, et al. 3, 5, 3'-Triiodothyronine deprivation affects phenotype and intracellular  $[Ca^{2+}]_i$  of human cardiomyocytes in culture. *Cardiovasc Res*, 2001, 51: 322-330.  
 6 Li RK, Mickle DA, Weisel RD, et al. Human pediatric and adult ventricular cardiomyocytes in culture: assessment of phenotypic changes with passaging. *Cardiovasc Res*, 1996, 32: 362-373.

(收稿日期 2003-11-24)

(本文编辑 徐静)

· 论著摘要 ·

## 益心饮对感染柯萨奇 B3 病毒小鼠心肌组织穿孔素和颗粒酶 B 基因表达的影响

秦志丰 魏晓 魏品康 许玲 郑培勇 尤圣富

本实验在小鼠急性病毒性心肌炎模型上观察了益心饮对心肌穿孔素和颗粒酶 B mRNA 表达水平的影响。

1. 材料与方法 雄性 Balb/c 小鼠, 4~6 周龄、体重(20 ± 2)g, 120 只, 分为正常对照组、病毒模型组、病毒+黄芪对照组、病毒+益心饮低、中、高剂量组, 每组各 20 只。除正常对照组外, 均于实验当日在小鼠腹腔注射柯萨奇 B3 病毒(CVB<sub>3</sub>) 稀释液 0.2 ml 复制病毒性心肌炎动物模型。正常对照组腹腔注射 0.2 ml 不含病毒的稀释液。实验当日在病毒接种 30 min 后, 各组灌胃黄芪注射液 10 g · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>、益心饮 2.5 g · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>、5 g · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>、10 g · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>, 正常组、模型组灌胃同体积的生理盐水, 连续 14 d。于第 7、14 天各组分别处死 6 只, 无菌摘取心脏, 一半置 4% 多聚甲醛固定, 一半置 -70℃ 冷冻。心肌标本常规 HE 染色, 光镜下观察心肌病理变化, 计算心肌病变积分。以 β-肌动蛋白为内参照物, 采用 RT-PCR 法, 计算穿孔素、颗粒酶 B 和 β-肌动蛋白的比值。

2. 结果 感染病毒后第 7、14 天, 所有药物治疗组心肌炎性和坏死等病理改变均明显轻于病毒模型组( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。第 7、14 天各组中 β-肌动蛋白的 mRNA 均有稳定的表达, 正常对照组未见穿孔素和颗粒酶 B mRNA 表达。7 d 时穿孔素/β-肌动蛋白: 病毒+黄芪对照组、病毒+益心饮低、中、高剂量组为 2.58 ± 0.35、1.88 ± 0.30、1.91 ± 0.41、1.57 ± 0.24, 与病毒模型组 3.19 ± 0.52 比有差异( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。14 d 时穿孔素/β-肌动蛋白: 病毒+益心饮中、高剂量组为 1.55 ± 0.22、1.22 ± 0.12, 与病毒模型组 1.87 ± 0.14 比有差异( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。7 d 时颗粒酶 B/β-肌动蛋白: 病毒+黄芪对照组、病毒+益心饮低、中、高剂量组为 1.09 ± 0.15、1.33 ± 0.17、1.22 ± 0.20、0.72 ± 0.23, 与病毒模型组 1.62 ± 0.18 比有差异( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。14 d 时颗粒酶 B/β-肌动蛋白: 病毒+益心饮中、高剂量组为 0.88 ± 0.07、0.63 ± 0.08, 与病毒模型组 1.01 ± 0.09 比有差异( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。

3. 讨论 结果提示益心饮可降低穿孔素和颗粒酶 B 的表达, 尤以中、高剂量组的作用更加明显, 抑制穿孔素和颗粒酶 B 的表达可能有利于病毒性心肌炎的治疗。

(收稿日期 2004-04-20)

(本文编辑 徐静)

基金项目 全军医药卫生科研基金项目(01MA158)

作者单位 200003 上海, 第二军医大学附属长征医院中医科(秦志丰、魏晓、魏品康、许玲); 上海中医药大学附属龙华医院(郑培勇、尤圣富)