

大鼠心肌细胞的分离技术和电生理鉴定

王 腾, 唐其柱, 甘文云, 王 蕾, 周 恒, 田 青

武汉大学人民医院心内科, 武汉 430060

摘要 采用酶消化法分离单个心肌细胞, 应用膜片钳全细胞记录技术记录钙电流, 探索大鼠心肌细胞分离方法并进行电生理鉴定。结果显示, 本方法分离所得心肌细胞横纹清晰, 可获得 90%~95% 耐钙细胞, 并具有正常电生活动性, 易于形成高阻封接, 可用于钙电流记录。本实验所采用的分离方法经济、简便、成功率高, 并通过全细胞膜片钳记录证实该分离方法得到的细胞有正常的电生理特性。

关键词 大鼠; 心肌细胞; 分离; 膜片钳技术

中图分类号 R329.2⁺7

文献标识码 A

文章编号 1000-7857(2009)03-0080-03

Isolation and Electrophysiological Characterization of Cardiomyocytes in Mouse Heart

WANG Teng, TANG Qizhu, GAN Wenyun,
WANG Lei, ZHOU Heng, TIAN Qing

Department of Cardiology, Renmin Hospital, Wuhan University,
Wuhan 430060, China

Abstract The methods of isolating cardiomyocytes in mouse heart and the electrophysiological characterization are studied in this paper. Enzyme digestion method was used to isolate single ventricular myocytes and whole cell patch clamp technique was used to record action potential and calcium current. The results show that 90%~95% pachyntic calcium tolerant ventricular myocytes can be obtained regularly, with a typical current of calcium channel recorded. The established method of isolation is simple, stable, effective and reliable. The electrophysiological recording of calcium current will provide a useful method for exploring the electrophysiological characteristics.

Keywords mouse; myocardial cell; isolation; patch clamp technology

自 1969 年 Kono 开展心肌细胞分离^[1]以来, 为获得良好的心肌细胞, 各个实验室对分离心肌细胞的方法进行了研究, 但获得适合于做膜片钳的心肌细胞百分数并不稳定。本课题在实验中, 综合国内外有关的实验方法^[2-4], 并不断改进、

完善, 形成了一套大鼠心肌细胞分离的方法。其特点是简单、易行、经济, 并通过膜片钳全细胞记录模式, 记录证实该分离方法得到的细胞有正常的电生理特性。

1 材料与方法

1.1 材料

健康大鼠(武汉大学医学院实验动物中心), I 型胶原酶, 蛋白酶 E, Na₂ATP, MgATP (Sigma 公司), 其余均为国产分析纯。无钙 Tyrode 液 (mmol/L): NaCl 135, KCl 5.4, MgCl₂ 1, NaH₂PO₄ 0.33, Glucose 20, HEPES 10; 正常 Tyrode 液 (mmol/L): 无钙台氏液中加入 CaCl₂ 1.8; 酶液 (mmol/L): 无钙 Tyrode 液中加入 I 型胶原酶 0.25 mg/mL, 蛋白酶 E 0.05 mg/mL, BSA 0.5 mg/L; 细胞保存液 (mmol/L): 无钙台氏液中加入 BSA 1 mg/L。以上液体均用 NaOH 调节 pH 值至 7.38; 记录钙电流的电极外液 (mmol/L): NaCl 37, Choline Chloride 100, CaCl₂ 1.8, MgCl₂ 0.5, HEPES 10, Glucose 10, CsCl 4.6, pH 7.3 (CsOH 调节); 记录钙电流的电极内液 (mmol/L): CsCl 120, CaCl₂ 1.0, MgCl₂ 5, Na₂ATP 5, EGTA 11, HEPES 10, Glucose 1, pH 7.4 (CsOH 调节)。

1.2 方法

1.2.1 单个心肌细胞的分离

大鼠腹腔注射肝素 500 U/kg, 5 min 后脱臼晕厥, 用剪刀剪开大鼠胸腔, 充分暴露心脏并将其剪下, 置于 4℃ 的生理盐水中清洗, 然后用自制开发的离体灌流装置(专利申请号: 200820191402.4)进行主动脉逆行插管灌流, 灌流速度 9~10 mL/min, 并用缝线扎紧, 迅速置于预热至 37℃ 并以 100% 氧饱和度的灌流架上行主动脉逆行灌流。先用正常 Tyrode 液灌流 4~5 min (使心脏复跳以充分冲洗冠脉内残血), 再用无钙 Tyrode 液灌流 4~5 min, 然后用酶液灌注约 30~45 min。最后

收稿日期: 2008-11-10

作者简介: 王腾, 主管技师, 研究方向为心脏电生理, 电子信箱: tengwang71@hotmail.com

将心脏从灌流装置上取下,剪下心室于保存液中剪碎,静置复钙后在室温保存约 1 h 备用。

1.2.2 耐钙心室肌细胞计数方法

将室温保存约 1 h 后的心室肌细胞置于正常生理浓度钙中,每个高倍或低倍视野下杆状细胞总数除以杆状细胞总数+球形细胞总数。耐钙心肌细胞标准是:细胞呈长杆状,边缘锐利清晰,表面纹理清晰,细胞膜上无空泡,静止,无自发性收缩。

1.2.3 膜片钳全细胞记录

取几滴复钙后的细胞悬液置于倒置显微镜(日本 Olympus 公司)上的自制开发的灌流槽(专利申请号:200820191403.9)中,待细胞贴壁后于室温($22\pm 2^{\circ}\text{C}$)下用记录钙电流。利用三维操纵器移动电极,并轻压在细胞表面。轻轻施加负压,最后形成 $5\sim 10\ \Omega$ 水平的高阻封接。膜片破碎后,补偿电容电流和电极串联电阻后,形成全细胞记录形式。信

号经 Ag/AgCl 电极引导,由膜片钳放大器(EPC-9)放大,玻璃微电极由日本 Narishige 公司拉制而成,由计算机通过 Heka 软件经数模和模数转换卡进行脉冲发放和数据采集,数据存放于硬盘并进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 分离细胞的形态学

良好的单个分离心肌细胞成杆状,细胞直径 $10\sim 40\ \mu\text{m}$,长度 $60\sim 160\ \mu\text{m}$;横纹清晰,边缘透亮。在分离过程中,如果整个心脏始终保持红润,则心肌杆状细胞数量均在 90% 以上(图 1)。存活细胞于室温细胞保存液中可成活 $12\sim 24\ \text{h}$ 以上,并具有良好的生理活性,并可以完成膜片钳高阻封接(图 2)。如果在分离过程中心脏局部出现苍白或者发青乃至整个心脏苍白,则分离出的耐钙细胞百分比有很大差异,差异程度因苍白程度不同而不同。



图 1 心肌细胞
Fig. 1 Myocardiac cell



图 2 心肌细胞
Fig. 2 Myocardiac cell

2.2 分离细胞的动作电位和钙电流

在电流钳模式下测得 10 个细胞静息电位平均值($73.2\pm 8.5\ \text{mV}$),动作电位幅值($108.9\pm 7.8\ \text{mV}$)(图 3)。在电压钳模式下以 $10\ \text{mV}$ 的步长使心室肌细胞由 $-40\ \text{mV}$ 的钳位电位逐步去极化至 $+50\ \text{mV}$,刺激持续 $250\ \text{ms}$,记录到一个缓慢失

活的内向电流(图 4)。在此条件下,钠通道和 T 型钙通道几乎被完全抑制,电极内液中又加入了 Cs 离子,可以消除钾通道电流的影响。在灌流的外液中加入 $10\ \mu\text{mol/L}$ 的 verapamil 几乎可以完全阻断上述的电流,进一步证实为慢钙电流。

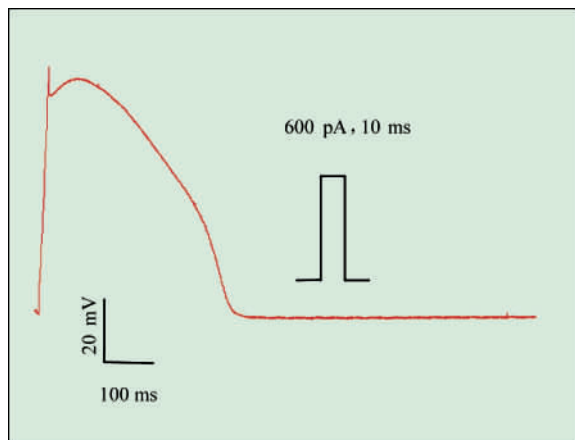


图 3 动作电位
Fig. 3 Action potential

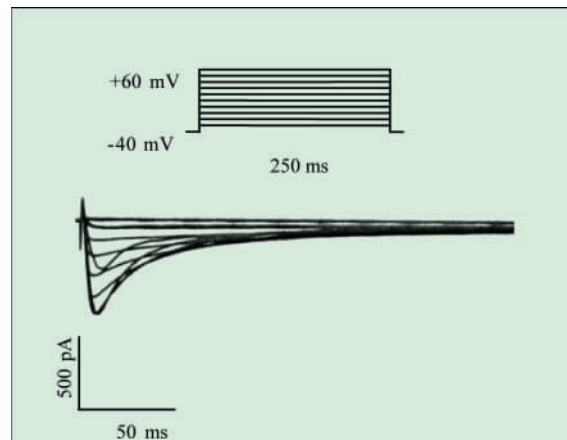


图 4 钙电流
Fig. 4 Calcium current

3 讨论

心肌细胞电生理学的发展有两个方面,即记录技术的改进和标本的制作。膜片钳技术中的吉欧姆封接是记录技术改进的一次革命,而标本制作(细胞的制备)的好坏,直接影响实验的成功率。目前分离心肌细胞的方法主要有酶消化法和机械收集法。文献报道最多的是 Langendorff 逆行主动脉灌注酶溶液消化的方法,但由于技术条件要求较高,收获细胞的质和量差异较大,故欲获得稳定数量和较高质量的心肌细胞是一件困难的事。

3.1 水是影响分离细胞成功率的基本性因素

在分离的过程中,水中如含有杂质或其他一些离子则会影 响消化。本实验室使用超纯水系统制备超纯水进行心肌细胞分离,其水的电导在 $1\ \mu\text{S}/\text{cm}$ 以下,对成功分离心肌细胞起很大的促进作用。

3.2 酶是影响分离细胞成功率的关键因素

消化酶的选择和剂量也是获得耐钙心肌细胞的重要环节之一。分离细胞时使用两种消化酶比一种消化酶好,而且可以减少昂贵的胶原酶用量。酶量过多使细胞本身的结构遭到破坏,得到的细胞体积膨大、结构模糊、横纹消失,在复钙过程中会有大量细胞死亡,存活的少量细胞在高阻封接未达到前即破膜,不能进行膜片钳实验。酶量过少细胞间的连接未被消化,在吹打时剪下的小块心肌组织不易分散呈絮状,用力吹打,则细胞碎片较多,死细胞多,而长杆状结构清晰的活细胞几乎没有。用量多少合适,需要在实践中不断摸索。

3.3 温度和氧气是影响分离细胞成功率的重要因素

取出心脏时立即置于 4°C 冰冷的生理盐水中,可减弱心肌组织的代谢,保护心肌组织;在灌流过程中温度最好维持在 $36\sim 37^\circ\text{C}$ (在液体流出口测) 之间,这样既可保证胶原酶和蛋白酶的充分激活,细胞又处于正常生理温度中。分离时温度过高或过低,细胞数量将有很大的区别。氧气要打破成细小碎泡,氧流量 $0.3\sim 0.5\ \text{L}/\text{min}$,一定要保证氧气流量的均匀。

3.4 减少钙反常

酶法分离心肌细胞遇到的最大问题是“钙反常”,即当在无钙溶液中分离的心肌细胞再次进入生理浓度的钙溶液中时,细胞会不停地收缩,逐渐变圆,并迅速失去原有的有序结构和收缩功能,直至最后溶解死亡。钙反常发生的准确机理尚不完全清楚^[6],多数学者认为,心肌细胞发生钙反常的机理是由于大量钙离子短暂、快速进入细胞内,钠离子外流,导致细胞内钙负载有关。本实验室的分离方法可最大程度减少钙反常的发生。

3.5 其他影响因素

摘取心脏,挂心脏的速度要快,最好控制在 $3\sim 4\ \text{min}$ 之内,有利于得到好细胞。灌流管中须排净气泡,若气泡在灌流过程中堵塞冠状动脉,就会使该部位的心肌组织发生梗死,细胞将缺氧并酶液灌流不良。本实验室改进的灌流装置很方便排除气泡,很容易分到状态很好的细胞。缺氧的细胞看上去结构尚好,但不能进行封接,电极帖上细胞即收缩而死。

以上均为影响细胞收获量的因素,本研究需要特别强调的是灌流方式。国内一般采用恒压灌流方式,该方式需要实验者不停地循环倒液体以保持压力的恒定,所以液体稍微损失就会严重影响实验结果,造成实验者心力憔悴;而且对灌流流速的监测较困难,很难判断消化的终止点,一般是观测心脏在灌流过程中颜色的变化,然后凭经验终止消化,因而细胞的收获量不稳定,质量亦难以保证。本实验室采用恒流灌流分离大鼠心肌细胞,用水泵方便地监测灌流速度,确保灌流压力和心脏的充盈恒定,明显减少缺氧和机械的损伤。

4 结论

影响细胞收获量的因素很多,在分离细胞时,每一个步骤都要认真仔细,哪一处有纰漏都会影响分离细胞的成功率,直接影响膜片钳实验的进行。本研究特别强调的是恒流灌流分离大鼠心肌细胞独到的优点。此方法分离的心肌细胞容易获得高阻抗封接,动作电位和钙电流测定都表明该方法分离的心肌细胞具有正常的电生理特征,适宜于电生理特性研究,而且这套方法操作简便,重复性强,也适合其他动物细胞分离的实验室,是一种值得采纳的方法。

参考文献 (References)

- [1] Horn R, Marty A. Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole cell recording method[J]. *J Gen Physiol*, 1988, 92: 145-159.
- [2] Thompson M, Kliever A, Maass D, et al. Increased cardiomyocyte intracellular calcium during endotoxin-induced cardiac dysfunction in guinea pigs[J]. *Psdiatr Res*, 2000, 47(5): 669-676.
- [3] Zaugg M, Lucchinetti E, Spahn D R, et al. Volatile anesthetic mimic cardiac preconditioning by priming the activation of mitochondrial K (ATP) channels via multiple signaling pathways[J]. *Anesthesiology*, 2002, 97(1): 4-14.
- [4] Westfall M V, Rust E M, Albayya F, et al. A denovirus-mediated myofilament gene transfer into cardiac myocytes [J]. *Methods Cell Biol*, 1998, 52: 307-322.
- [5] Pugsley M K, Walker M J A, Saint D A. Block of Na and K currents in rat ventricular myocytes by Quinacainol and Quinidine [J]. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 2005, 32: 60-65.
- [6] Gallego M, Setién R, Puebla L, et al. α_1 -Adrenoceptors stimulate a gas protein and reduce the transient outward K^+ current via a cAMP/PKA mediated pathway in the rat heart [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2005, 28: 577-580.

(责任编辑 李慧政)

《科技导报》“学术争鸣”栏目征稿

科学研究需要争鸣和探索。《科技导报》设立“学术争鸣”栏目,旨在活跃学术气氛,开展学术讨论,促进学科的深入研究。本栏目欢迎对已发表的学术论文观点进行质疑,也欢迎广大作者对各个领域的科技问题进行开创性的学术探索。本栏目欢迎广大一线科技工作者投稿。投稿网址:www.kjdb.org;投稿信箱:kjdbbjb@cast.org.cn。