

- [11] Klimpel, G. R., 1982, *J. Immunol.*, 129: 76-80.
- [12] Palacios, R., 1984, *Proc. Natl. Acad. USA.*, 81: 1208-1211.
- [13] Pepersack, L., 1980, *J. Immunol.*, 124: 279-285.
- [14] Ohara, J., 1985, *J. Immunol.*, 135: 2518-2523.
- [15] Howard, M., *J. Exp. Med.*, 155: 914-923.
- [16] Benjamin, W. R., 1985, *Investigation Of Cell-mediated Immunity* pp. 165-172.

体外培养心肌细胞的纯化方法及其应用

孙 红

(中国中医研究院西苑医院基础研究室)

心肌组织由多种细胞构成,在体外培养的特殊环境中,这些不同种类的细胞在形态、功能及分裂速度等许多方面都有很大差别。我室自1978年建立体外培养心肌细胞方法并用于中医药研究获得成功^[1],体外培养的心肌细胞已应用于许多研究领域。目前国内大部分的实验报道均用混合培养的心肌细胞,给心肌细胞代谢、心肌细胞药理、病理及细胞生物学等方面的问题的分析和研究带来很大干扰,因此分离去除其它细胞,而保留心肌细胞并维持其正常生长及生理功能,对于深入细致的研究有着重要的意义,是当前国内外该项研究中颇为重视的一个问题。

体外培养的心肌细胞中通常存在两类细胞:心肌细胞(myocardial cells,简称M细胞)和成纤维样细胞(fibroblast-like cells,简称F细胞)。后者主要来自心脏组织中的内皮细胞、心内膜细胞、血管平滑肌细胞等,又称之为间质细胞(mesenchymal cells)^[2,3]。培养的M细胞具有以下生物学特征:(1)原代培养的细胞大多具有收缩功能,在适宜条件下可自发地搏动;(2)含糖原和肌原纤维;(3)有较长的有丝分裂期和传代时间;(4)贴附培养器皿表面较慢,而F细胞的特征相反^[4]。新生动物心肌M细胞和F细胞在培养前其数量的比值约为6:4,由于F细胞增殖迅速,培养3—5天后在

本文得到李连达和李映欧老师指导,谨致谢意。

数目上可大大超过M细胞^[5],占有很大的培养面积,对M细胞的生长及收缩功能有很大影响^[6,7],对于观察M细胞的形态、功能及代谢也带来一定困难,因此介绍国外常用的几种纯化分离M细胞的方法,可供我们参考和借鉴。

一、差速贴壁分离法

差速贴壁分离法(Differential Attachment Technique)的原理即根据心肌M细胞和F细胞在培养器皿表面贴壁生长的速度不同而进行分离的方法。用胰蛋白酶消化心肌组织所得的混合细胞悬液,接种在适当大小的培养瓶中,37℃静置90分钟,轻轻振摇后倾出尚未贴壁的M细胞,重新接种,可得纯度大于95%的M细胞,而原培养瓶中的贴壁细胞几乎全部均为F细胞^[5]。显微镜下观察,刚接种的M细胞呈圆形,而F细胞呈短棒状。也有报道用此法得M细胞95%,而F细胞93%^[7]。所取贴壁的时间各有不同,短至20分钟^[8],长至3小时^[9,9],通常以60—90分钟多用^[6,10],实验操作也略有差异,有直接倾出,也有振摇、旋转、平皿翻转等不同方法,这些对细胞分离纯度都有很大影响。另外,动物的年龄、细胞接种量及操作熟练程度等对控制各类细胞数也有很大关系。差速贴壁分离法具有操作简便、用时短、对细胞影响小、分离纯度高等优点,国外有关实验室大多采用该方法。Wenzel等人发现,纯化后培养的M细胞较混合培养的搏动

时间长, 这些M细胞开始搏动的时间提前, 易形成同步, 且收缩力增强^[7]。用该法收集到的纯度很高的F细胞, 也可用于多种实验研究^[5,9]。差速贴壁分离法也有不足之处, 即不适用于心肌细胞长期培养的实验, 如最初为95%纯度的M细胞, 经培养4—5天后, M细胞与F细胞之比就可达3:2^[5], 所以仍存在F细胞干扰的问题。

二、化学试剂抑制法

有些化学物质对某一种细胞生长有抑制作用, 而对另一种细胞无明显影响, 因此可利用这些物质破坏一种细胞或抑制其生长, 从而得以观察另一种细胞的行为活动。Clark的实验发现, 在培养基中不加谷氨酰胺, 可维持鸡胚M细胞占总细胞数约64%, 此比例至少可稳定30天, 培养6个月后可见收缩活性。加入谷氨酰胺(292 $\mu\text{g}/\text{ml}$)后, 则刺激F细胞大量增生, 而M细胞生长率无明显变化。Clark认为, 外源性谷氨酰胺是F细胞增生的刺激因子, 而M细胞则可能通过其它途径调节其生长^[11]。Kaneko和Goshima通过几种试剂的比较研究, 发现钙离子载体(Ca^{++} ionophore) A 23187有选择性地溶解F细胞的作用。培养一天以上的心肌混合细胞, 用A 23187作短暂处理(10分钟)后, F细胞出现核皱缩、胞浆固缩及空泡形成, 而M细胞保持正常形态, 但出现一过性收缩节律失常, 去除A 23187能很快恢复正常节律。实验要求必须在培养温度25 $^{\circ}\text{C}$ 时加入A 23187, 若在37 $^{\circ}\text{C}$ 则M细胞也受损伤。该方法用时较短, 可在培养的不同时期反复进行。A 23187诱发的F细胞形态学变化可能是由于F细胞摄入过量钙离子所致^[12]。其它还有用BrdU、nicotine及CO等试剂^[6,7], 主要作用在于抑制F细胞的DNA合成或蛋白合成, 达到抑制F细胞增生的目的。化学试剂法能在细胞已经贴壁生长或分裂之后消除F细胞, 可用于培养时间较长、两种细胞已生长并融汇成单层的实验, 与差速贴壁分离法比较有其优点, 但加入或减少某一种物质, 对M细胞

或多或少有一定影响, 是其不足之处。

三、其它方法

心肌细胞的纯化方法还有离心法、无血清培养法及调节温度法^[3,11,14], 均因抑制F细胞生长的同时也影响M细胞的生长和收缩功能而实验室少用。另有方法将心房心室肌细胞分别分离, 将其中一种染色后混入另一种细胞中共同培养, 观察比较两种不同来源细胞的生长状况及细胞形态和功能上的差异^[15]。

四、纯化细胞的应用

纯化分离后的心肌细胞可用于多方面的研究。Schroedl和Hartzell观察了混合培养与M和F细胞单独培养时糖、脂肪酸和蛋白质代谢的情况, 结果发现, 混合培养比单独培养消耗更多的葡萄糖。混合培养11天后细胞蛋白含量增加100%, 而分别单独培养时M细胞仅增加33%, F细胞蛋白增加21%。对脂肪酸的利用无明显不同。作者认为混合培养在代谢上显示出功能的协同作用, 因而更能抵抗“饥饿”的影响^[8]。

不同类型的心肌细胞对缺血反应不同, 体外培养的M和F细胞对缺氧缺糖所致“缺血”样损伤模型的反应也不一样。M细胞较敏感, 通常在缺氧缺糖4—6小时即出现胞浆乳酸脱氢酶(LDH)和磷酸肌酸激酶(CPK)大量溢出, 收缩活性降低, 细胞形态也发生改变。当恢复给氧给糖后, 细胞损伤继续加重, 出现不可逆性损伤^[9,13,16]。用同样方法, Acosta观察纯化分离的F细胞, 结果表明, F细胞能耐受更长时间的缺血, 缺氧缺糖4—24小时测定结果, 细胞活度、总蛋白含量、细胞形态等均无明显改变, 而LDH溢出量有明显增加, 但重新给氧给糖后, LDH又恢复正常值, 表明F细胞并未出现致死性的不可逆损伤^[9]。心内膜和血管内皮通透性大小及细胞的完整对维护缺血时心肌的损伤起着重要作用, Acosta的实验在细胞水平证实了这点。

分离纯化的心肌细胞已用于本学科一些前沿问题的研究。例如Goshima等最近进行了小

鼠心肌细胞与鹌鹑心肌细胞及其它非心肌细胞的融合实验。M细胞由HVJ(Hemagglutinating Virus of Japan)介导分别与M细胞、神经母细胞瘤细胞和非兴奋性细胞(如KB细胞)进行融合。由多个M细胞融合形成的同核体为一巨大心肌细胞,与其它非心肌细胞形成杂核体,这些杂核体细胞均保留了M细胞的收缩特征,但收缩活性(包括收缩强度和时 间)都 小于同核体,原因是与非心肌细胞融合后破坏了原M细胞肌原纤维的结构^[17]。

心肌细胞的纯化,主要是为了收获M细胞,用于一些较深入细致的研究。如M细胞离子通道的研究^[18];肌动蛋白、肌球蛋白等收缩成分的研究^[19];受体的研究^[20]及缺血损伤再灌注时“氧矛盾”和“钙矛盾”现象的研究^[21]等等。在美国和日本一些实验,纯化方法已成为心肌细胞培养过程中的一个常规手段。

纯化分离方法为我们观察、分析心肌细胞的形态、功能和代谢及与其它细胞的相互关系等带来极大的方便。这些方法中,以差速贴壁分离法最为简单,收获细胞的纯度高,对细胞影响小,因此国外及本实验室多采用此法。用该方法分离培养的M细胞进行实验,发现M细胞收缩活性增强,形成同步收缩的时间早、范围大,生化测定指标稳定,数据波动小,实验重复性较好,并且实验结果能更客观地反映M细胞状况。对于长时间培养的实验或临时处理,也可考虑加入化学试剂以调节或控制不同类型细胞的数目。

摘 要

心肌组织由多种细胞构成,在体外培养条件下,各种细胞混杂生长。本文着重介绍了国外近年来常用的几种心肌细胞纯化分离方法:差速贴壁分离法、化学试剂抑制法等,并结合我们自己实验经验,对这几 种方法 进行了比

较,对这些方法的应用,本文也做了一些简单介绍。

参 考 文 献

- [1] 李连达等:1980, 中医杂志, 21 (6): 468—470.
- [2] Polinger, I. S., 1970, *Exp. Cell. Res.*, 63: 78—82.
- [3] Blondel, B. et al., 1971, *Experientia*, 27: 356—358.
- [4] Polinger, I. S., 1973, *Exp. Cell. Res.*, 76: 243—252.
- [5] Kruse, P. E. et al., 1973, *Tissue Culture—Methods and Applications*, Academic Press. pp. 72—81. New York.
- [6] Brenner, G. M. et al., 1972, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 23: 251—262.
- [7] Wenzel, D. G. et al., 1970, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 17: 774—785.
- [8] Schroedl, N. A. et al., 1983, *J. Cell. Physiol.*, 117: 326—332.
- [9] Acosta, D., 1979, *In Vitro*, 15 (11): 929—934.
- [10] Laarse, A. V. D. et al., 1979, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 11: 501—510.
- [11] Clark, W. A. JR, 1976, *Dev. Biol.*, 52: 263—282.
- [12] Kaneko, H. et al., 1982, *Exp. Cell. Res.*, 142: 407—416.
- [13] Acosta, D. et al., 1978, *In Vitro*, 14 (8): 728—732.
- [14] Pretlow, T. G. et al., 1972, *Am. J. Pathol.*, 67 (2): 216—224.
- [15] Goshima, K., 1974, *Exp. Cell. Res.*, 84: 223—234.
- [16] Laarse, A. V. D. et al., 1979, *Clinica Chimica Acta*, 91: 47—52.
- [17] Goshima, K. et al., 1984, *Exp. Cell. Res.*, 151: 148—159.
- [18] Cachelin, A. B. et al., 1983, *J. Physiol.*, 340: 389—401.
- [19] Lemanshi, L. F. et al., 1983, *Dev. Biol.*, 97: 338—348.
- [20] Galper, J. B. et al., 1980, *J. Biol. Chem.*, 255 (20): 9571—9579.
- [21] Acosta, D. et al., 1984, *In Vitro*, 20(8): 642—646.