



图 9 细胞有丝分裂晚中期图解

含有 Ca^{++} 的广大膜系，位于纺锤体的两极，并沿着着丝点伸入到纺锤体内部

增加，可能激活一个或几个能动的因子，经过一个肌动球蛋白——微丝系统与染色体运动结合在一起，有可能调节着染色体的运动。同时，还由于 ER 所处的位置，能很好地供给有丝分裂器与它周围的细胞质，甚至相邻细胞之间的通讯。因为 ER 的组分能从皮层的细胞质连续地伸展到纺锤体的内部，细胞表面所接受的信号可通过 ER 的潴泡腔传递到有丝分裂器，来

刺激或调节有丝分裂周期。因此，如果要进一步了解有丝分裂全过程的机理，就必须把膜与纺锤体都考虑在内。

参 考 资 料

- [1] Roland, J. C. and B. Vian, 1979. In: "Intern. Rev. of Cytology" Vol. 61, pp. 129-166.
- [2] von Wettstein, D. 1981. In: "Intern. Cell Biology 1980-1981" pp. 250-72. (Schweiger, H. G. ed.) Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York 1981.
- [3] Newcomb, E.H. and S.R. Tandon. 1981. In: "Intern. Cell Biology 1980-1981" pp. 651-6. (Schweiger, H. G. ed.) Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York 1981.
- [4] Helper, P. K., S. M. Wick and S. M. Wolniak. 1981. In: "Intern. Cell Biology 1980-1981" pp. 673-86. (Schweiger, H. G. ed.) Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York 1981.

心肌细胞培养研究的进展

李连达 李映欧

(北京中医研究院西苑医院)

体外培养的心肌细胞可保持其结构及功能上的某些特点，具有自发性节律搏动，已广泛用于生物学及医学研究，近年国外发展较快，为从细胞及分子水平研究心肌的生理、病理、药理以及某些基本理论问题，开辟了一个新的领域，早在 1910 年 Burrows 氏首创鸡胚心肌组织块培养，观察到搏动。两年后 Carrel 维持鸡胚心肌组织块连续搏动达 104 天，并做传代培养。他退休后由 Ebeling 继续培养达 34 年，但所培养的细胞株已转化为心脏成纤维细胞，失去搏动功能。由于鸡胚心肌细胞的生物学特性与人类有较大差异，Harary(1960)^[1]首次用哺乳动物 Wistar 种乳鼠进行心肌细胞

培养，成功地维持自发性节律搏动达 40 天，此后多数学者均采用他的方法，成为心肌细胞培养发展史上的一个重要里程碑。七十年代又从成年动物分离出单个搏动的心肌细胞^[2]，建立一些实验病理模型，开展了心肌细胞生长发育、生理、代谢、病理、药理等基本理论的研究，在培养方法及观察手段上也有了很大的改进，促进了心脏分子细胞学的发展。

培 养 方 法

一般采用胚胎或新生动物的心室组织，经胰蛋白酶消化，分离成单个心肌细胞，制成细胞悬液，37℃下培养。4~12 小时细胞贴壁生

长,各个心肌细胞出现搏动,但速率、节律互不相同,各单个细胞相连成细胞单层或细胞簇后,立即变为同步搏动,培养48小时可用于各种实验研究。原代培养的心肌细胞经胰蛋白酶处理后,可制成新的细胞悬液,进行传代培养。

早年常用鸡胚,尤以7—17天鸡胚最適宜作心肌细胞培养,但与成年动物在位心脏的反应性有些差别。Sperelakis发现它对乙酰胆碱、肾上腺素、阿托品及箭毒的反应较弱;苯妥英钠对鸡胚心肌细胞电生理的实验结果,也与体内不同,说明鸡胚心肌细胞培养有一定局限性。近年用小鼠、大鼠、田鼠、豚鼠、兔及犬等动物的胚胎或新生动物的心肌作细胞培养均已成功。特别是人胚心肌细胞培养有更重要的科学价值,早在1928年Morosow等就进行了人胚心肌组织培养工作,培养的心肌搏动了4~36天;1972年Chang T.D.等^[3]用13周的人胚心肌组织作培养,搏动达18~88天。但这些都是用经典的组织培养方法在血浆凝块上培养出来的。1973年Halbert等^[4]利用两个人胚的心肌细胞在Rose培养小室中培养,形成同步搏动的单层细胞,搏动速率17~77次/分,并且观察到搏动细胞的分裂情况。最近,Thompson^[5]应用妊娠20周的人胚心肌细胞培养,研究了白喉毒素对培养的心肌细胞的损伤作用及引起心肌细胞的形态和功能改变的有关机制。

新生和胚胎心脏与成年心脏有一定差别。以往建立的从成年动物心肌制备细胞悬液的实验方法不够理想,细胞不太完整,并且没有搏动。1970年有三个小组各自独立地报道了从成年大白鼠心脏中制备单个的搏动的心肌细胞的分离方法。Berry利用胶原酶和透明质酸酶作心脏灌流进行分离;Vahouny用心室肌碎块以胰蛋白酶、胶原酶、透明质酸酶消化分离;Bloom则利用机械方法分离,但对细胞膜有一定影响。此后对分离方法的研究很多,但一般认为从成年动物心脏中分离的心肌细胞,仅

能维持2~4小时搏动。最近Jacobson^[6]从成年大白鼠培养的心肌细胞自发性搏动持续了60天,为成年动物心肌细胞培养迈出了可喜的一步。

在细胞培养中,分离心肌细胞多用机械分离和酶分离方法,且多采用胰蛋白酶,一般认为此酶不损伤活细胞、没有毒性,如合用糜蛋白酶、弹力纤维酶及胶原酶,能分离出较多心肌细胞,每个乳鼠心脏约可分离出 8×10^6 个细胞。也有人认为胰蛋白酶能改变细胞特性,使细胞分化能力丧失,细胞膜上的药物受体被灭活或被消化掉。Kasten认为,虽然胰蛋白酶能穿透细胞膜,对肌原纤维有一定的损伤,但在15小时内很快恢复,或长出新的肌原纤维,开始搏动。此外,各种消化酶的纯度和质量与其毒性也有关系。

提高心肌细胞纯度及其他培养方法:经胰蛋白酶消化而得到的细胞悬液,心肌细胞与内皮细胞的比例为60:40。为了提高心肌细胞的比例,利用内皮细胞能更早地贴壁的特点,用贴壁分离法(Differential Attachment Technique),将两种细胞分开,可培养出95%心肌细胞或100%内皮细胞。此外,如增加接种的细胞数,可以培养出含有 10^5 个细胞、直径为2~4毫米的细胞簇(cluster)。利用仙台病毒可把细胞单层融合成巨大的多核心肌细胞^[7]。采用组织重组的方法可培养出心肌细胞的再聚集体(Reaggregation)^[8]、合成的心肌细胞束(Synthetic strand)^[9]、定向生长的纤维束(Growth oriented strand)^[10]等,用于各种实验研究。

心肌细胞培养的某些应用

1. 心肌细胞形态学的观察

应用倒置相差显微镜观察,从7天的鸡胚培养的心肌细胞即具有成年动物心肌细胞的特点。培养的乳鼠心肌细胞开始为圆形,贴壁后呈扁平形、长形、三角形,或伸出伪足成不规则的星形或梭形。心肌细胞长约15微米,宽3

微米, 不规则形细胞的直径约 30 微米。H-E 染色可见心肌细胞胞浆较清亮, 核成球形, 核仁少; 间质细胞胞浆为浅蓝色, 没有红色的内含物, 核较大, 颜色较浅, 有数个核仁。应用 Masson 氏三色染色可把心肌细胞染成深红色, 而非心肌细胞则被染成浅灰蓝色。用透射电子显微镜观察培养的乳鼠心肌细胞, 其超微结构与未经培养的乳鼠心肌细胞基本相同, 但游离的核糖体、糖元, 线粒体特别丰富, 粗面内质网显著可见, 滑面内质网稀少, 细胞连接形成很快, 第二天便可认出闰盘。在扫描电子显微镜下观察, 细胞多为长梭形、球形或卵圆形, 细胞表面有许多细小突起, 细胞周围伸出大量细长突起到达或直接进入邻近细胞, 形成“桥”, 其功能与细胞间连接有关。如诱发心肌细胞搏动节律失常, 特别是发生纤维颤动时, 在扫描电镜下可观察到细胞体及其边缘发生褶皱样起伏、突起与细胞离解、间隙连接发生改变等^[11]。

2. 心肌细胞搏动的观察^[12]

搏动是心肌细胞重要的特征。可将细胞收缩所引起的光密度变化转变为电讯号, 描记下来。这种图象称之为搏动图(Mechanogram), 其速率、节律、幅度及形状等参数可准确地反映心肌细胞收缩情况。培养中单个细胞各自搏动的频率、节律不同, 一旦互相接触形成细胞单层后, 则搏动同步化。心肌细胞间的间隙连接是传导冲动的低电阻联络结构, 与搏动同步化有关。Goshima 等观察到心肌细胞同步化搏动形成并不需要一定存在心肌细胞间的直接接触, 即使夹杂其他细胞, 也能形成同步化搏动。在培养的乳鼠心肌细胞之间, 通过中间细胞株如 FL 细胞或 HeLa 细胞连接时, 亦可发生同步搏动, 并认为是通过细胞内电偶联达到的。FL 细胞表面存在某些成分, 是心肌细胞与 FL 细胞之间形成电偶联所必须的。这种成分受基因控制。

3. 培养心肌细胞的电生理特点^[13]

培养的心肌细胞微电极插入技术难度较

大, 单层细胞微电极插入的成功率为 75.3%, 而游离的单个心肌细胞插入微电极的成功率仅为 8.3%, 经测定单层培养的乳鼠心肌细胞的静息电位为 -64.0 ± 4.3 ($-40 \sim -80$) 毫伏, 动作电位 40~110 毫伏, 超射幅度 21.8 ± 1.8 (0~30) 毫伏, 上升速率 89 ± 13 伏/秒, 动作电位时间 145 ± 13 毫秒, 搏动速率 177 ± 60 (100~260) 次/分, 起搏电位 15 ± 7.3 (8~62) 毫伏/秒, 有平台期。一般认为有下列特点:

(1) 反分化现象, 即心肌细胞经培养后有返回到幼稚水平的倾向。如鸡胚心肌细胞膜电位在正常胚胎发育过程中发生分化 2~4 天的鸡胚心无快钠通道, 其动作电位由慢通道产生, 且对河豚毒素(TTX)不敏感, 至胚胎第 5 天才分化完全。如用 16~18 天的鸡胚培养的心肌细胞, 其电生理特性与未培养的 16~18 天的鸡胚心肌细胞的电生理特性不同, 而与幼稚鸡胚心肌细胞的电生理特性相似, 如静息电位低, 自律性高、起搏电位易变, 动作电位上升速率慢, 超射小、快钠通道丧失, 加入 TTX 不能阻断动作电位, Na-K-ATP 酶活性下降, cAMP 水平升高。这些现象均说明, 培养的心肌细胞发生了反分化, 其电生理特性返回至幼稚阶段。此外, 培养的单层细胞与再聚集体在电子显微镜下能见到一些肌原纤维的走向比较乱, 似 3 天的鸡胚心肌细胞肌原纤维的排列。用较老(18 天)的鸡胚心肌细胞作培养, 其肌原纤维排列仍较紊乱, 有的断裂, 数目减少。可见心肌细胞在培养中从形态学上看也有返回至幼年状态的情况。但最近已对心肌细胞在培养中反分化的概念提出了疑问, 认为培养的鸡胚心肌细胞中存在快钠通道, 还认为在心肌细胞培养中不发生什么反分化, 而上述现象可能与酶的消化及培养中非心肌细胞过度增殖有关系。(2) 培养的单细胞或单层细胞中部分具有自发性搏动节律失常, 主要原因是具有起搏样活性的细胞比例不恒定, 起搏点的发放率不稳定, 以及细胞的传导性异常等。(3) 电生理各参数受培养时间、细胞纯度及培养方法的影

响,解释结果时必须注意。

4. 培养心肌细胞的代谢特点

培养的心肌细胞经过一定时间后停搏,与细胞内部代谢特别是酶活性改变有关。细胞搏动时三磷酸腺苷酶活性一直保持高水平,为搏动提供能量,在搏动即将停止前,该酶的活性降至最低水平。在培养过程中细胞内苹果酸脱氢酶、异柠檬酸脱氢酶、肌酶磷酸激酶(CPK)活性逐渐降低;己糖磷酸激酶水平不变;6-磷酸葡萄糖脱氢酶活性增加。乳酸脱氢酶(LDH)活性缓慢下降,其同工酶型在培养数天后从H亚单位为主变化至M亚单位为主,移向厌氧型亚单位;CPK也从CPK-MM移向CPK-BB。关于引起同工酶改变的原因:(1)有人认为是心肌细胞在缺氧条件下的代谢适应。在培养的乳鼠心肌细胞观察到,培养基氧分压在38mmHg以上时,同工酶没有上述变化,而氧分压降低至0.6mmHg时,LDH同工酶向M型转变。Acosta^[14]观察到缺氧后,LDH及CPK从胞浆中漏出至培养基中,如恢复给氧,LDH及CPK又恢复至正常水平。Laarse^[15]观察到缺氧引起LDH的同工酶- α -羟丁酸脱氢酶(HBDH)的释放,缺氧心肌细胞重新给氧后,反可加速HBDH的释放(氧矛盾现象)。(2)也有人认为引起同工酶改变的原因是由于培养过程中非心肌细胞的迅速增殖引起,这些同工酶在非心肌细胞中含量比较丰富。这一结论与有人在人的肥大心脏中和缺血性肥大心脏中研究酶的变化时所得出的结果相符,即LDH同工酶分布的变化与纤维组织相对比例的增加两者之间的关系较为密切,而与心肌细胞本身的改变之间的关系较不密切。(3)与温度、培养基的成分、pH值及灌流液等影响因素有关。

乳鼠心肌细胞在培养过程中,氧的摄入量下降,非培养的心肌细胞呼吸商为0.81,而培养的心肌细胞高达0.96,说明以糖代谢为主。培养一周后出现Crabtree效应及Pausteur效应,细胞对葡萄糖消耗量较高,更换培

养基6~12小时后,糖就显得缺乏,其消耗量比成年大白鼠心脏灌流中的消耗量高出10~20倍,并且排出大量乳酸,约有1/3的葡萄糖被氧化为乳酸盐,其调节机制目前正在深入研究。

用同位素标记软脂酸盐进行研究,发现培养的心肌细胞能主动地代谢脂肪酸,把¹⁴C-软脂酸盐氧化成¹⁴C-二氧化碳,脂肪酸的氧化与时间及蛋白质浓度有线性关系。加入肉毒硷后,脂肪酸氧化速度增加30~70%。脂肪酸在培养的心肌细胞能稳定地积聚达到50倍之多,脂肪酸的摄取与细胞内ATP含量、pH、膜电位、细胞内膜及其成分、阳离子的电化学梯度、温度等因素均有关系。脂蛋白脂肪酶(LPL)活性则与培养时间有关,在头4天呈稳定水平,然后快速增加,在培养第21天时约增加3~4倍。

目前认为大白鼠在生后第三周心肌DNA多聚酶活性就降至成年鼠的最低水平,心肌细胞就丧失DNA合成、有丝分裂及增殖的能力。在培养的心肌细胞中用³H-胸腺嘧啶核苷(³H-TdR)掺入,发现培养第3~4天,其摄取量达到最高峰,细胞分裂最快,而此时LPL活性却为低水平,说明此时细胞代谢主要以核酸和蛋白质的合成代谢为主;而第5天后,³H-TdR的摄取量下降,LPL活性上升,说明心肌细胞代谢转变为氧化代谢为主,细胞进入永久的G₁期,心肌细胞就逐渐从成肌细胞(Myoblast)变为无分裂能力的肌细胞(Myocyte)。

5. 心肌细胞培养在实验病理学及药理学等方面的应用。

应用培养的心肌细胞,可以造成各种心肌损伤的实验病理模型,如“缺血性”损伤(缺氧及缺葡萄糖引起的损伤、模拟心肌缺血)^[14,15]、免疫性心肌细胞损伤^[16]、心肌病病理损伤,微生物毒素如白喉毒素^[5]、链球菌溶血素、副溶血弧菌毒素、柯萨奇B₃病毒等造成的损伤,以及搏动的节律失常模型等^[17],从细胞及分子水平研究心肌细胞病理变化的机

理。在细胞及分子药理学中, 目前已在培养的心肌细胞证实存在肾上腺素能 α - 和 β -受体、胆碱能 M 受体^[18]、前列腺素受体及组织胺 H₁、H₂ 受体等。培养的心肌细胞也是研究强心甙、抗心律失常药物及保护缺血性心肌损伤的药物, 进行药物筛选的良好工具之一^[18]。

结 语

本文对近年国外心肌细胞培养的研究进展作了概要综述。现已可从人、犬、兔、豚鼠、鼠、鸡等多种动物的胚胎、新生或成年动物的心肌进行细胞培养、形成自发性节律搏动, 利用生物学、形态学、生理、生化等先进手段, 对培养的心肌细胞的生长、发育、代谢、电生理特性以及搏动节律失常、心肌损伤等病理模型进行了深入研究, 为从细胞及分子水平了解心肌的发生、形态、病理及药理等问题, 提供了一个重要的研究工具。

参 考 文 献

- [1] Harary, I. et al., 1960 *Science* 131:1674-1675.
- [2] Vahouny, G. V. et al., 1970 *Science* 167: 1616-1618.
- [3] Chang, T. D. et al., 1972 *Circ Res* 30: 628-633.
- [4] Halbert, S. P. et al., 1973 *Life Science* 13:969-975.
- [5] Thompson, A. et al., 1977 *J Mol Cell Cardiol* 9:945-956.
- [6] Jacobson, S. L. 1977 *Cell Struct Funct* 2:1-9.
- [7] Goshima, K. et al., 1979 *Exp Cell Res* 120: 285-293.
- [8] Mclean, M. J. et al., 1976 *Dev Biol* 50: 134-141.
- [9] Lieberman, M. et al., 1972 *Science* 175: 909-911.
- [10] Horres, C. R. et al., 1977 *J Membrane Biol* 34: 314-329.
- [11] Yoneda, S. et al., 1978 *Cardiovasc Res* 12: 201-211.
- [12] Lieberman, M. et al., eds., 1976 *Developmental and Physiological Correlates of Cardiac Muscle* Reven Press.
- [13] Kobayashi, T. et al. eds., 1978 *Cardiac Adaptation* p. 645-666 University Park Press Baltimore.
- [14] Acosta, D. et al., 1978 *In Vitro* 14: 728-732.
- [15] Laarese, A. V. D. et al., 1979 *Cardiovasc Res* 13: 345-353.
- [16] Friedman, I. et al., 1976 *J Mol Cell Cardiol* 8: 641-650.
- [17] 五岛喜与太 1979 *综合临床* 28: 58-61.
- [18] Lane, M. A. et al., 1977 *Dev Biol* 57: 254-269.
- [19] Acosta, D. et al., 1980 *In Vitro* 16: 93-96.

环核苷酸的免疫细胞化学

林 仲 翔

(北京市肿瘤防治研究所细胞生物学研究室)

一、引 言

环核苷酸免疫细胞化学技术自 1972 年 Wedner 等^[1,2]建立以来, 已有不少进展。它是以 Coons 等^[3]显示组织内抗原定位的免疫细胞化学技术为基础, 用环核苷酸抗体进行定位的方法。这种方法与亚细胞组分的环核苷酸

生化测定互相配合, 更有利于阐明问题的本质。同一组织或细胞内环核苷酸的定位与定量测定结果共同分析, 有助于从结构与功能的关系上探索环核苷酸在生命活动中的重要作用, 对研究环核苷酸在肿瘤生长的调控作用上更有意义。

免疫细胞化学的方法有许多种^[4], 在环核