

# 跳动心肌细胞微型培养模型的建立及应用

蔡海江<sup>+</sup> J. R. Kateley<sup>++</sup>

自 Harary<sup>[1]</sup>最初报告了培养的心肌细胞能够继续跳动以来,跳动心肌细胞培养模型已被广泛应用于心肌功能、代谢及结构的研究,并取得了不少成绩。跳动心肌细胞培养还可用于检测血清或其制品中是否存在影响心肌收缩、代谢或具有心肌毒性物质。我国中医研究院西苑医院基础研究室<sup>[2]</sup>应用此模型进行中药研究亦获成效。但以往国内、外工作大都是在培养瓶或在培养皿中进行培养,作者等所建立的微型跳动心肌细胞培养模型,是将消化分离的心肌细胞直接种植于72孔的微孔培养板上。其优点为需要细胞数量少,条件容易控制稳定,可以同时平行检测多数标本,特别适用于被检测血清或其制品量少而贵重的情况。作者等还在此微型跳动心肌细胞培养上建立了细胞毒性(<sup>51</sup>Cr 释放法)、生长速率及跳动频率等三个指标,检测了某些药物及生物制品、以及某些疾病患者血清的影响。现以阿霉素与人白细胞干扰素的作用为例,说明此模型的实际应用。

## 材 料 和 方 法

**心肌细胞的制备与培养** 新生1—2日之 Sprague-Dawley 大鼠心脏以无菌手术取下后,冲洗血液并浸于无钙、镁 Hank 氏液中。心肌组织剪碎成1—2 mm 碎块,加0.1%胰蛋白酶(DIFCO 公司产品)溶液10毫升,在37℃搅拌15分钟(搅拌速度为100 rpm)。以上操作程序共重复7次。最初两次所得的细胞悬液由于含血液及组织碎块故弃去之。以后5次的细胞悬液在374 rpm 离心5分钟后弃去上清液,细胞沉淀物合并混悬于5毫升生长液(CGM, Complete Growth Medium, 各组份均购自 Grand Island Biological Company, 内含20%胎牛血清)中。然后进行细胞计数,用台盼蓝染色检测存活率。根据需要调整细胞密度后,以每孔200微升(μl)细胞悬液的容积接种于72

孔的微孔培养板,培养于含5%CO<sub>2</sub>、高湿度的培养箱中。每48小时换培养液一次。

**心肌细胞毒检测法** 制备好的心肌细胞悬液(3 × 10<sup>6</sup>/ml) 1 ml 与 <sup>51</sup>Cr (Na<sub>2</sub><sup>51</sup>CrO<sub>4</sub>, New England Nuclear, 1 mc/ml) 100—150 μc 共同在37℃孵育60分钟。已被 <sup>51</sup>Cr 标记的细胞用 CGM 洗三次后,再混悬于 CGM 中使其细胞密度成为 2.5 × 10<sup>5</sup>/ml, 每孔加入 200 μl 后培养48小时供试验用。试验前每个微孔先用 CGM 洗3次,然后每孔加入待测的制品 200 μl, 再培养15小时。15小时后培养板在1700 rpm 离心15分钟,然后自每孔中取上清液 100 μl, 测释放的 <sup>51</sup>Cr 的脉冲数。按以下公式计算该制品对心肌细胞毒性。

$$\text{特异性细胞毒性率(\%)} = \frac{\text{试验孔 cpm} - \text{自发性 cpm}}{\text{完全 cpm} - \text{自发性 cpm}} \times 100$$

\*公式中 cpm 系 <sup>51</sup>Cr 释放脉冲数

自发性 <sup>51</sup>Cr 释放脉冲数系指微孔中所加溶液为 CGM 200 μl。 <sup>51</sup>Cr 完全释放脉冲数系指微孔中加1%十二烷基磺酸钠(SDS)溶液 200 μl, 使细胞完全破坏。

**DNA 合成速率检测法** 每微孔中加入制备好的心肌细胞混悬液,细胞密度为 10<sup>5</sup> 细胞/孔。培养48小时后,除去 CGM, 代之以内含 25 μl <sup>3</sup>H-Tdr(0.01 Ci/ml, New England Nuclear)及待测血清或制品的 CGM。24小时后细胞用0.25%胰酶溶液 50 μl 消化,5分钟后应用半微量多头细胞样品收集器将细胞吸至玻璃纤维滤纸上,加闪烁液用 β-计数器测脉冲数求得细胞中 <sup>3</sup>H-Tdr 的参入率。

血清取自健康人及 Sparrow 医院住院患者。干扰素(IFN-α)系按 Cantell 等方法制备<sup>[3]</sup>。大鼠血清购自 Pel-Freeze Biologicals。统计分析应用 Student t 检验法。

## 结 果

培养细胞贴壁后胞体伸长或呈星状突起,

<sup>+</sup> 南京医学院病理生理教研室。

<sup>++</sup> 美国密执安州 Sparrow 医院免疫研究室。

可区分为心肌细胞及内皮样细胞,形态与在培养瓶中培养者所见相同。如果每孔细胞数为 $10^5$ ,在培养后15—24小时心肌细胞即开始搏动。开始时不规律,但在48小时后,整个微孔内的细胞皆呈同步化及有节奏的规律搏动,每分钟约60—80次(随室温而有变化)。以同样方法培养于 $25\text{ cm}^2$ 的组织培养瓶或 $35\times 10\text{ mm}$ 培养皿中的心肌细胞搏动数较高,但所需之细胞数要多20—100倍。见表1。

表1 大鼠心肌细胞在不同培养器皿中之搏动率

培养器皿	细胞密度( $\times 10^6/\text{ml}$ )	搏动率 <sup>*</sup> (次/分)
组织培养瓶 $25\text{ cm}^2$	10	130—160
培养皿 $35\times 10\text{ mm}$	2	100—120
微孔培养板	0.1	60—80

\* 三个平行复瓶或微孔之平均值,以下诸表均同

#### 细胞密度对搏动率的影响

细胞密度过稀不能迅速形成细胞间连接,则同步化搏动不易发生。细胞生长过密后搏动频率即变慢。我们曾用4种不同的细胞密度(自 $0.5-2\times 10^5$ 细胞/孔),观察其在6天中的搏动情况。结果见表2。

表2 大鼠心肌细胞培养在不同密度、不同时间的搏动率

培养天数	微孔培养板上每孔细胞数( $\times 10^5$ )			
	0.5	1.0	1.5	2.0
2	80	80	77	49
3	104	60	56	35
4	61	52	44	28
5	52	36	20	13
6	25	16	5	2

细胞密度在 $0.5\times 10^5$ 细胞/孔时,搏动数最高,随着密度增加,搏动数变慢。但如果每孔细胞数多于 $0.5\times 10^5$ ,由于不能迅速形成细胞间连接,直至第5天仍不能计算同步化搏动数,因此在我们的实验中一般均采用细胞密度

为 $0.5-1\times 10^5$ 细胞/孔。在种植后第2—4日进行实验。

#### 细胞生长情况

应用 $^3\text{H-Tdr}$ 掺入法观察上述4种细胞浓度在6日内的生长情况,结果见表3。

表3 大鼠心肌细胞在不同细胞密度、不同时间细胞 $^3\text{H-TdR}$ 掺入率(cpm)

培养天数	微孔培养板上每孔细胞数( $\times 10^5$ )			
	0.5	1.0	1.5	2.0
1	4,905*	7,033	10,571	11,114
2	6,381	12,125	10,479	10,105
3	31,424	39,952	38,460	31,328
4	25,088	36,842	32,352	30,847
5	40,692	45,928	44,359	41,639
6	38,976	42,042	38,018	37,754

\*  $^3\text{H-TdR}$ 掺入大鼠心肌细胞的cpm数,表中每个数值均为三个培养孔的平均值

6日内每种浓度的细胞都是不断生长的。只是在第1—2日密度低的细胞分裂较快,密度高的细胞分裂较慢;第3日时分裂最快,第4日普遍发生生长停滞;至第5日又分裂,第6日又停滞。这种现象的发生原因不明。我们研究对生长影响的实验一般在第3日进行。

#### 正常人血清的影响

我们发现异种的人血清对大鼠心肌细胞有细胞毒现象,且随血清浓度自5%增加至60%而逐渐增加,细胞毒性率最高可达20%。但血清如在 $56^\circ\text{C}$ 、30分钟灭活,或者用大鼠肝或肾细胞在 $4^\circ\text{C}$ 吸附30分钟则细胞毒现象被消除。去 $\gamma$ -球蛋白人血清或大鼠血清在此浓度范围内无细胞毒现象。我们还观察到正常人血清浓度如超过20%,则有抑制大鼠心肌细胞合成DNA的作用。例如当血清浓度为30%时 $^3\text{H-Tdr}$ 掺入率只有正常的90%,当血清浓度达到60%,只有正常的50%。如果将其灭活或用大鼠血清则此种抑制作用可被消除。有趣的是,未灭活的人血清对大鼠心肌细胞搏动率是有刺

表4 人或鼠血清对大鼠心肌细胞搏动率的影响

血清来源	血清浓度							
	CGM	5%	10%	20%	30%	40%	50%	60%
人	45±3 <sup>+</sup>	45±2	55±3	68±1	75±2	82±4	87±4	95±7
大鼠	45±3	94±8	110±2	147±8	148±1	133±2	128±5	125±4

+ 均值±SE, 3次实验, 9个微孔的平均值

表5 阿霉素对大鼠心肌细胞毒性、生长及搏动率的影响

	阿霉素浓度(μg/ml)			
	0	1	10	20
细胞毒性( <sup>51</sup> Cr 释放率%)	6.9±0.9 <sup>+</sup>	7.8±1.4	8.3±1.9	19.6±3.1*
DNA合成(CG M对照的%)	100	90.7±1.2	62.6±4.7**	7.1±1.2**
搏动率(次/分)	59±3	62±3	55±4	2±2**

+ 均值±SE 3次实验, 9个微孔的平均值。

\* P<0.01。

\*\* P<0.001。

表6 用阿霉素治疗的肿瘤患者血清对大鼠心肌细胞培养的影响

血清来源	例数	细胞毒性 <sup>51</sup> Cr 释放率%	DNA合成 CGM对照的%	搏动率(次/分)
阿霉素治疗者	12	7.4±1.0 <sup>+</sup>	95.6±2.3	37±3
正常人	10	10.6±1.6	97.2±1.8	48±4

+ 均值±SE。

激作用的, 随浓度而递增。而大鼠血清的刺激作用约为人血清的一倍(表4)。上述结果提示如果异体的人血清所含物质作为检测对象时, 血清需要灭活; 如该物质不耐热, 则血清浓度不得超过10%。

#### 阿霉素的作用

阿霉素是抗肿瘤药物, 但对心肌有抑制作用。我们应用此微型大鼠跳动心肌细胞模型以及已建立的三个指标, 观察此药物的作用。试验结果表明: 当药物浓度低于1μg/ml时, 对三个指标均无影响; 当>10μg/ml时, 对DNA合成率即有明显的抑制作用; 而当浓度>20μg/ml时, 则有明显的细胞毒现象, 以及明显的抑制DNA合成及抑制细胞搏动作用(表5)。我们又选择了12名正在用阿霉素治疗的肿瘤患者, 将其血清用CGM稀释至10%以检测上

述三个指标的变化, 未发现有细胞毒现象, 亦无明显的抑制DNA合成及抑制心肌细胞搏动作用。根据计算, 这些患者血液中阿霉素的浓度均不超过1μg/ml(表6)。

#### 人白细胞干扰素的作用

当制备好的心肌细胞悬液种植至微孔培养板上时, 立即同时加各种浓度的人白细胞干扰素(IFN-α)。在24小时、40小时及48小时后分别测其细胞毒、对DNA合成及搏动率的影响。结果发现在24小时内, 对照孔中只有少数细胞有不规则的搏动, 但加IFN-α者则绝大多数细胞均贴壁并同步化搏动, 且搏动频率随IFN-α浓度升高而增加(表7)。

同时观察到IFN-α对DNA合成有抑制作用, 亦呈剂量效应关系。但未观察到有细胞毒现象(表8)。

表 7 人白细胞干扰素对大鼠心肌细胞搏动率的影响<sup>+</sup>

干扰素浓度 ( $\times 10^2$ U/ml)	培 养 时 间		
	24 小时	40 小时	48 小时
0	偶见	5 $\pm$ 2	16 $\pm$ 1
37.5	6 $\pm$ 1*	17 $\pm$ 2*	44 $\pm$ 1*
75.0	22 $\pm$ 1*	35 $\pm$ 4*	61 $\pm$ 2*
150.0	51 $\pm$ 2*	48 $\pm$ 4*	73 $\pm$ 1*

<sup>+</sup> 4次实验的平均值, 每次实验3个微孔。

\*  $P < 0.01$  (与对照相比较)。

表 8 人白细胞干扰素对培养大鼠心肌细胞 DNA 合成的影响

干扰素浓度 ( $\times 10^2$ U/ml)	DNA 合成(培养第3日) (CGM 对照的%) <sup>+</sup>
0.375	100.0 $\pm$ 1.5
3.75	92.8 $\pm$ 3.1
37.5	81.9 $\pm$ 1.7
75.0	60.8 $\pm$ 2.5*
150.0	63.5 $\pm$ 4.2*

<sup>+</sup> 均值 $\pm$ SE, 4次实验平均值, 每次实验3个微孔。

\* 与对照比较,  $P < 0.01$ 。

## 讨 论

应用微型跳动心肌细胞培养, 所需细胞数量、被检测或研究的制品用量可以大大减少。一个72微孔的微孔培养板只需要  $7.2 \times 10^6$  个细胞, 即可同时在相同条件下检测24个样品, 且每个样品均有三个平行复孔。样品用量仅需300 $\mu$ l。此模型还具有条件一致、操作方便等优点。研究者可根据自己的研究目的建立各项指标。从我们建立的三个指标来看, 虽然心肌细胞是贴壁细胞, 但其灵敏度、准确性、稳定性都是很好的。但要注意细胞混悬液中不得含血球或组织碎屑, 植入数量要准确, 密度要适宜。细胞跳动次数虽较在培养瓶中者为低, 且维持时间较短, 但60—80次/分已可满足实际应用; 实验在培养后2—4日内进行可以获得良好的效果。需要注意的是细胞搏动频率受室温影响较大, 应在具有恒温装置的显微镜下观察。我们的实验当时限于条件, 在室温较低时所得的

搏动频率即较低。不过由于对照孔及试验孔均在同一微孔培养板上, 所得结果仍可用于比较。

在检测人血清中所含物质时, 应注意当血清浓度超过10%时有细胞毒作用。这种毒性可能是由补体介导的抗体所引起的, 因为加热灭活或去 $\gamma$ -球蛋白血清则失去这种作用。当血清浓度超过20%时对DNA合成有抑制作用。Frelin等<sup>[4]</sup>曾观察到跳动心肌细胞用人或胎牛血清培养时, DNA及蛋白合成率随血清量增加而增长, 但当血清浓度超过20%时, 则蛋白质合成不再增加。他们认为血清中的异亮氨酸、脂肪酸等对于细胞生长、自主性节律搏动是重要的物质。在我们的实验(表4)中, 人及大鼠血清明显刺激心肌细胞搏动频率, 其本质如何值得进一步研究。

IFN- $\alpha$ 对微型大鼠跳动心肌细胞增殖有抑制作用, 与其他学者在不同种族、各类细胞上观察到的结果一致<sup>[5]</sup>。最近注意到IFN- $\alpha$ 给病人注射时有短时间加快心率的作用<sup>[6]</sup>。Blalock等<sup>[7]</sup>曾报告过小鼠纤维母细胞干扰素(IFN- $\beta$ )可使胎鼠心肌细胞搏动频率立即增加。但是也有的学者观察到人IFN- $\alpha$  (640 $\mu$ /ml)对大鼠心肌细胞跳动率无影响。我们的实验结果支持Blalock等, 但所用浓度较大。此作用的机理及意义有待进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] Harary, I., et al., 1963, *Exp Cell Res* 29: 451—465.
- [2] 中医研究院西苑医院基础研究室等, 1981, *中华心血管病杂志*, 9:216—218.
- [3] Cantell, K., et al., 1981, in: *Methods in Enzymology*, edited by Pestka, S., Academic Press, New York, pp. 29—38.
- [4] Frelin, C., et al., 1976, *Biochem* 58: 953—959.
- [5] Stewart, W. E., 1979, in: *Interferon*, edited by Gresser, I., Academic Press, New York, pp. 29—51.
- [6] Tyrell, D., et al., 1981, *Second Annual International Congress for Interferon Research (Abstract)*, p. 23.
- [7] Blalock, J. E., et al., 1980, *Nature* 283: 406—408.