

[8] Imai Y, Murakami T, Yoshida S, et al. Superparamagnetic iron oxide- enhanced magnetic resonance imaging of hepatocellular carcinoma correlation with histological grading [J]. *Hepatology*, 2000, 32(2): 205- 212.

[9] 张雪辉, 梁碧玲, 黄穗乔. 原发性肝癌 SPIO 增强 MRI 与组织学分级的相关性研究[J]. *癌症*, 2003, 22(7): 734 - 738.

[10] 张利宁. 肿瘤免疫[A]. 见: 孙汶生, 王福庆 主编. 医学免疫学[M]. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2002. 156- 157.

[11] 李兰英, 田国才. 激活的巨噬细胞在抗肿瘤免疫治疗中的意义[J]. *内蒙古医学院学报*, 1997, 19(3): 65- 74.

[12] 张 彩, 田志刚. 肿瘤免疫逃避机制的研究进展[J]. *国外医学: 肿瘤学分册*, 2000, 27(2): 77- 79.

中国病理生理杂志 Chinese Journal of Pathophysiology 2005, 21(4): 742-771

[文章编号] 1000- 4718(2005)04- 0742- 02

豚鼠心室肌细胞急性分离法中的要则

张培华, 马季骅, 陈 波, 王宪沛

(武汉科技大学医学院心电生理研究室, 湖北 武汉 430080)

[摘要] 目的: 探讨酶解分离豚鼠心室肌细胞过程中容易忽视的因素及应予重视的要求。方法: 采用 Langendorff 灌流, 先用无钙液灌流 4- 5 min, 再用含胶原酶 I 0.1 g/L、蛋白酶 E 0.01 g/L、BSA 0.5 g/L 的无钙液灌流 8- 10 min, 接着用 KB 液冲洗 4- 5 min 后剪下心室肌, 剪碎, 过滤, 静置后复钙进行膜片钳实验。结果: 通过仔细调整和控制细胞分离过程中的各种问题和影响因素, 得到结构完整、长杆状、耐钙的心室肌细胞。结论: 积极探索和总结细胞分离过程中的关键问题, 可顺利得到适于膜片钳记录的单个心室肌细胞。

[关键词] 细胞分离; 豚鼠; 心肌 **[KEY WORDS]** Cell separation; Quinea pig; Myocardium

[中图分类号] R319 **[文献标识码]** A

膜片钳技术作为一种电生理学常用的手段, 于医学各个领域广泛使用, 作为膜片钳实验技术的重中之重, 制备出形态完整、折光率良好的杆状心室肌细胞是实验的关键。

本文参照文献并结合了长期实验的经验, 经过不断努力, 其中也走过不少弯路, 终于摸索出一套几乎“百发百中”的豚鼠心室肌细胞急性酶解分离术, 使单个心室肌细胞的制备从“偶然”走向了“必然”。为了广大初涉此领域的研究者少走弯路, 特总结出此文以供同行们参考。

材 料 和 方 法

1 实验动物

豚鼠体重 250- 350 g, 由武汉科技大学医学院动物实验中心提供。

要则: 雌雄不拘, 小于 250 g 的豚鼠分离出的心肌细胞易死亡, 大于 350 g 的豚鼠分离出的心肌细胞过大, 不易封接破膜^[1]。豚鼠状态很重要, 最好在室温下(22 ℃左右) 饲养, 饲养场所应洁净, 防止疾病相互感染。

2 采用 Langendorff 装置灌流。操作要点如下:

2.1 灌进心脏的液体必须保持(36.5 ± 0.5) ℃的恒温

要点: 最易犯的错误是通过测量恒温泵浴槽内的温度就误认为是灌进冠脉的温度。事实上当室温较低时(如冬日), 流速不高的状态下, 灌进心脏的液体温度远低于浴槽内温度。应以测灌流液出口的温度为准, 出口处的温度应保持在 36.5- 37.0 ℃, 此时酶的消化作用最佳, 离体的心脏在此温度下, 很快恢复心跳, 有利于较快的排空心肌间和心腔内残存

的血液。如果实际温度低于 34 ℃, 必定无法得到较好的实验结果。

2.2 灌流系统全程无气泡

要点: Langendorff 装置的设计一定要合理, 不能在各相邻管道系统间出现残留的小气泡, 否则一旦栓塞较大的冠脉, 灌流液无法通行, 造成心肌缺氧, 酶消化后, 心脏呈苍白, 分离出的细胞膜破坏较大, 横纹也不清楚, 从而影响实验。

2.3 灌流系统应洁净, 内无污物

要则: 每次实验前必须用三蒸水冲洗 2- 3 次, 实验后应用自来水先冲洗 2- 3 次, 再用三蒸水冲洗 2- 3 次, 最后在整个灌流装置中充满三蒸水, 这样可以将灌流装置中残存的离子及酶液彻底冲洗干净, 抑制霉菌的滋生, 避免灌流时霉菌脱落, 从而阻塞冠脉。

2.4 灌流液产生的水柱压应保持在 65- 70 cmH₂O

要则: 灌流液最高液面到达心尖的垂直距离应控制在 65 - 70 cm 之间^[3]。如过高则水柱压太大, 过低则压力不够, 原则是利用重力作用, 产生类似于豚鼠体内正常压力值的灌流压, 从而使灌流液在离体的心脏内正常地循环。

3 溶液的制备

3.1 正常台式液(mmol/L) NaCl 135, KCl 5.4, MgCl₂ 1.0, NaH₂PO₄ 0.33, HEPES 10, 葡萄糖 10, CaCl₂ 1.8。无钙台式液去除其中的 CaCl₂, 低钙液中含 0.2 mmol 的 CaCl₂。在 37 ℃状态下用 NaOH 调 pH 值到 7.30。

(下转第 771 页)

[收稿日期] 2003- 10- 20 [修回日期] 2003- 12- 16

* [基金项目] 湖北省自然科学基金项目(No. 2003ABA89); 湖北省教育厅科学研究基金项目(No. 2002A01011) 资助

272.

[12] Loos B, Kger R, Egelberg J. An evaluation of basic perir-

odontal therapy using sonic and ultrasonic scalers [J]. J Clin Periodontol, 1987, 14(1): 29-33.

(上接第 742 页)

要则: 此配方中使用了大量 HEPES 来替代 NaH_2PO_4 的缓冲对, 好处在于免除了含 NaHCO_3 缓冲液不断向大气释放 CO_2 导致的溶液中 HCO_3^- 的减少, 避免了溶液 pH 值偏碱, 从而影响细胞分离的结果。在台氏液及无钙台氏液的配制中, 为了防止钙的沉淀, 我们将台氏液中的 CaCl_2 单独配制, 使其在使用前不让 Ca^{2+} 与 PO_4^{2-} 和 CO_3^{2-} 接触, 以免产生不溶解的 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 和 CaCO_3 ; 我们采取配制母液的方法, 有效的避免了存放过程受各种因素的影响, 从而使 pH 值始终保持不变。

另外所有试剂都必须在 37°C 水浴槽中调配 pH 值, 否则随着环境温度的改变, pH 值也会大幅改变。

3.2 KB 液 (mmol/L) KOH 70, KCl 40, KH_2PO_4 20, EGTA 0.5, L- 谷氨酸 50, 牛磺酸 20, HEPES 10, 葡萄糖 10, MgCl_2 3, 牛血清白蛋白 (BSA) 20 mg。在 37°C 状态下用 KOH 调 pH 值至 7.30。

要则: KB 营养液易被微生物污染, 必须用小口瓶保存在 4°C 冰箱中, 不超过 3 d。如放在 -10°C 冷冻室中可保存 1 周。

3.3 酶解液 本实验采用双酶体系。称取胶原酶 I (Gibco, 222 U/mg) 4 mg, 蛋白酶 E (Sigma) 0.4 mg, BSA 20 mg 溶于 40 mL 无钙台式液中。

3.4 分离后细胞的保存

要则: 分离后的细胞放置于 KB 液 (含 BSA 50 mmol/L) 中静置 20 min, 待细胞沉淀下来后, 吸去上清液, 残留 5 mL 的 KB 液, 并加入低钙溶液 15 mL (钙 0.2 mmol/L, 牛磺酸 20 mmol/L, BSA 0.5 mmol/L) 中静置 20 min 待细胞沉淀后, 再吸去上清液, 留存 5 mL 的低钙液, 并加入梯度低钙溶液 15 mL (钙 1.8 mmol/L, 牛磺酸 20 mmol/L, BSA 0.5 mmol/L) 中静置 20 min, 此时细胞膜较差的细胞在收缩 1-2 min 后, 因不耐钙而死亡。留下的细胞活性好, 耐钙能力强, 膜折光度好, 横纹清楚透亮, 用此细胞封接破膜率高^[5]。为了使分离的细胞使用时间延长, 避免细胞因细菌感染而死亡, 我们采用了“三抗”溶液, 青霉素 (钠盐) 100 万单位、链霉素 (双氢) 1 g、庆大霉素 16 万单位溶于无菌三蒸水 100 mL, 使用时在 99 mL 细胞保存液 (KB 液) 中加 1 mL “三抗”溶液, 即可有效地抑制细菌的生长, 使细胞存活时间延长。

细胞分离程序

选豚鼠, 体重 250-350 g, 2 000 U 肝素腹腔注射, 20 min 后乌拉坦 (20%) 2-3 mL 腹腔麻醉。麻醉后迅速固定, 开胸取心, 置于 4°C 无钙台式液中稍作修剪, 游离出主动脉根部。用镊子钳起主动脉一端, 将插管插入主动脉根部并用动脉夹固定, 接上 Langendorff 装置^[2]的主动脉套管, 立即用无钙台氏液灌流, 同时不断用吸管吸取 37°C 的无钙台氏液淋浴心脏, 使心脏迅速恢复搏动, 从开胸至开始灌流全过程应在 30 s 之内完成。

接着用丝线快速进一步固定主动脉, 以免灌流液从主动脉套管与主动脉之间的缝隙漏出, 使灌流液的压力减小。无钙台氏液的灌流时间一般为 4-5 min, 以基本冲洗净残血且心室完全停跳为准。换用酶液灌流, 流速约为 4-5 mL/min, 1.5-2 min 之间流出的灌流液开始出现“拉丝”现象。从拉丝出现开始通常 2 min 左右就可结束酶解, 此时心脏体积明显

大于灌流初始, 整体呈现半透明状, 局部呈细密蜂窝状改变。换用 KB (KB 中应按 0.5 g/L 的比例加入 BAS) 灌流 4-5 min, 可见心脏进一步增大, 半透明状改变更甚, 呈“雨花石”状。如酶解过程无误, 心脏整体应呈浅粉红色, 不能出现局部泛白的现象。此时取下心脏, 将心室部分分离出来, 浸泡入 37°C 氧饱和 KB 液中, 初剪为 10 余块, 立即用微孔滤膜 (200 目) 过滤 1 次, 以冲洗残酶。将洗过的心室肌块浸泡入新鲜的氧饱和 37°C KB 液中, 用剪刀细细剪碎, 动作要轻柔^[4], 然后滤出第 2 杯。如此数次可滤得第 3 杯、第 4 杯。通常第 1 杯因含残酶较高, 后期对心肌细胞膜的损坏较大, 因此弃去不用。高倍镜下细胞呈杵状, 膜表面干净无斑点, 边界完整, 横纹清晰, 折光性强。

要则: 在细胞分离的全过程, 应保持氧的灌注; 分离后的心室肌细胞必须置入 10°C 冰箱静置保存, 20 min 后复钙, 先用含 CaCl_2 0.2 mmol/L 的低钙台式液复钙 20 min, 再换用正常台式液, 可明显提高复钙细胞的存活率。

讨论

本方法较好解决了膜片钳实验室因季节室温变化影响心肌分离的难题, 可常年得到丰富、完好的单个豚鼠心室肌细胞用于实验。我们认为最常犯的错误及须注意的要点如下: ①动物的品种与健康状态。②灌流液的 pH 值应在温度为 37°C 时调配至 pH 7.30。③灌进冠脉的液体温度必须保持在 $(37 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 。④预先排净灌流系统中滞留的小气泡及滤过杂质。⑤灌流液氧饱和必须充分。⑥手术过程要快, 我们记录过, 从开胸到将游离的心脏挂上 Langendorff 装置, 全过程应在 30 s 以内完成。⑦无钙液冲洗, 包括无钙酶液灌流整个过程要控制在 10 min 以内, 过长的无钙环境会损伤细胞。⑧第 1 杯 KB 液浸洗心室肌大碎块很重要, 这一步骤可明显降低残酶含量, 有利于后几杯获得状态良好的细胞。⑨先用低钙 (0.2 mmol/L) 台式液复钙 20 min 以上, 再换用正常台式液复钙有利于提高复钙存活率。⑩封接前包括细胞内外液在内都必须用微孔滤膜过滤, 这是高阻抗封接及破膜成功的关键。且浴槽液温度应在室温 (20°C) 以上, 低于室温的环境会使细胞膜脂质双分子层的流动性大大降低, 不利于实验。

[参考文献]

- [1] Tytgat J. How to isolate cardiac myocytes [J]. Cardiovasc Res, 1994, 28(2): 280-283.
- [2] Suleiman MS, Chapman RA. Changes in the principal free intracellular amino acid in the Langendorff perfused guinea pig heart during arrest with calcium free or high potassium media [J]. Cardiovasc Res, 1993, 27(10): 1810-1814.
- [3] Bkaily G, Sperelakis N, Doane J. A new method for preparation of isolated single adult myocytes [J]. Am J Physiol, 1984, 247(6 Pt 2): H1018-H1026.
- [4] 刘恭鑫, 顾全堡, 郭棋, 等. 大鼠、豚鼠心肌细胞的简单快速分离 [J]. 中国应用生理学杂志, 1997, 13(4): 361-362.
- [5] 牛拴成, 张轩萍, 梁宏亮, 等. 大鼠心肌细胞急性分离方法 [J]. 山西医科大学学报, 2002, 33(2): 173-174