

李笑汝,姚新叶,刘佳,等. 成年小鼠心肌细胞腺病毒转染及缺氧/复氧诱导损伤模型的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(4): 435-443.

LI X R, YAO X Y, LIU J, et al. Models of adenoviral transfection and hypoxia/reoxygenation-induced injury in AMCMs of adult mouse cardiomyocytes [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(4): 435-443.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.04.003

成年小鼠心肌细胞腺病毒转染及缺氧/复氧诱导损伤模型的建立

李笑汝²,姚新叶^{2,3},刘佳²,张小玉¹,张依曼^{1,2},来宝长²,马强^{1,3},
王一东²,田红燕^{1,3},殷倩^{1,2,3*}

(1. 西安交通大学第一附属医院周围血管科,西安 710061;2. 西安交通大学心血管研究中心,
西安 710061;3. 西安交通大学第一附属医院心血管内科,西安 710061)

【摘要】 目的 采用非 Langendorff 方法分离成年小鼠心肌细胞(adult mouse cardiomyocytes,AMCMs),并建立腺病毒转染及缺氧/复氧诱导细胞损伤模型,为应用 AMCMs 进行心肌缺血体外实验的研究提供便捷、实用、可操作性强的系统方法。**方法** 应用非 Langendorff 方法分离 AMCMs,观察贴壁后 2、24、48 及 72 h 细胞的形态,计算存活率,并应用 α -actinin 免疫荧光染色观察 AMCMs 完整性;应用腺病毒转染 AMCMs,观察并统计转染 36、48 h 后的转染效率;通过缺氧 45 min/复氧 24 h,进行碘化丙啶(propidium iodide,PI)染色,统计 PI 阳性细胞率以明确缺氧/复氧损伤模型的建立。**结果** 与 AMCMs 贴壁后 2 h 相比,贴壁后 24 和 48 h 的细胞存活率无显著下降,贴壁后 72 h 的细胞存活率显著下降;AMCMs 细胞结构完整,可进行腺病毒转染,36 和 48 h 转染效率分别可达 $82.07\% \pm 0.60\%$ 和 $82.84\% \pm 1.18\%$;缺氧/复氧诱导 AMCMs 可成功建立细胞损伤模型,PI 染色阳性细胞达 $42.28\% \pm 3.10\%$ 。**结论** 本研究应用非 Langendorff 方法分离培养的 AMCMs,细胞存活率高,并建立腺病毒转染和缺氧/复氧诱导细胞损伤模型,为体外建立 AMCMs 基因修饰、缺氧/复氧损伤模型提供了简单易行的系统方法。

【关键词】 AMCMs 提取;腺病毒转染;缺氧/复氧

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 04-0435-09

Models of adenoviral transfection and hypoxia/reoxygenation-induced injury in AMCMs of adult mouse cardiomyocytes

LI Xiaoru², YAO Xinye^{2,3}, LIU Jia², ZHANG Xiaoyu¹, ZHANG Yiman^{1,2}, LAI Baochang²,
MA Qiang^{1,3}, WANG Yidong², TIAN Hongyan^{1,3}, YIN Qian^{1,2,3*}

(1. Department of Peripheral Vascular, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China;
2. Cardiovascular Research Center, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China; 3. Department of Cardiovascular
Medicine, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

Corresponding author: YIN Qian. E-mail: yinqian610@xjtu.edu.cn

【基金项目】 国家自然科学基金青年基金(81900256),西安交通大学第一附属医院院基金(2018QN-04)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (81900256), Research and Development Fund of the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University (2018QN-04).

【作者简介】 李笑汝,女,在读硕士研究生,研究方向:细胞生物学。Email:2433467974@qq.com

【通信作者】 殷倩,女,博士,助理研究员,研究方向:缺血及低压低氧诱导心血管损伤的组织修复机制及药物研发。

Email:yinqian610@xjtu.edu.cn

【Abstract】 Objective To construct models of viral transfection and hypoxia/reoxygenation induced cellular injury in adult mouse cardiomyocytes (AMCMs) isolated using a non-Langendorff method. **Methods** AMCMs were isolated, extracted, sedimented, and plated using a non-Langendorff method. The morphology and survival rate of the isolated cells were evaluated 2, 24, 48 and 72 h after plating, and their integrity was observed by immunofluorescence staining for α -actinin. The isolated AMCMs were infected with adenoviruses carrying an RFP-expressing vector and fluorescence images were obtained at 36 and 48 h post-infection and used to calculate transfection efficiency. The cells were cultured under hypoxic conditions for 45 min, reoxygenated for 24 h, and then stained with propidium iodide (PI) to verify establishment of the hypoxia/reoxygenation injury model. **Results** The survival rates of AMCMs at 2, 24 and 48 h after plating were comparable, but survival was significantly reduced at 72 h. The integrity of the AMCMs was good and > 80% of the cells were transfected with adenovirus at 48 h. After hypoxia/reoxygenation treatment, 42% of cells were stained by PI, suggesting successful establishment of the AMCM injury model. **Conclusions** In this study, we developed a non-Langendorff method for the fast and easy isolation of AMCMs with high cell viability. The isolated cells can be efficiently infected with adenovirus and respond to hypoxia/reoxygenation injury. These findings provide a systematic method for isolating AMCMs and for applying gene modification and hypoxia/reoxygenation injury in these cells.

【Keywords】 AMCMs extraction; adenovirus transfection; hypoxia-reoxygenation

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

心肌梗死 (myocardial infarction, MI) 作为危害全球人类生命健康的一类重大疾病,具有高患病率、高致残率及高死亡率的特点,是临床和基础研究致力于攻克的重要方向^[1-4]。符合器官及细胞的生理状态、疾病病理生理进程的在体动物与体外细胞模型对于研究疾病的发病机制、研发新型药物具有重要意义。目前在体动物模型主要以大鼠、小鼠为主建立稳定且认可度较高的 MI 或心肌缺血/再灌注损伤模型^[5-6]。由于心肌细胞不可再生的特性^[7],体外细胞模型的构建仍需要进一步探讨和优化。

心肌细胞系、乳鼠心肌细胞及成年小鼠心肌细胞 (adult mouse cardiomyocytes, AMCMs) 是目前研究中主要应用的细胞类型^[8]。H9C2、AC16 及 HL-1 等心肌细胞系可用于连续传代、不丧失心肌细胞部分表型及生化特性,但其存在一定局限性,缺少正常心肌细胞的节律性搏动,与原代心肌细胞的电生理特性相差较大,在 MI 机制研究和药物研发中的应用具有一定的劣势^[9]。目前应用的乳鼠心肌细胞主要包括乳大鼠心肌细胞 (neonatal rat cardiomyocytes, NRCMs) 和乳小鼠心肌细胞 (neonatal mouse cardiomyocytes, NMCMs), 具有易分离、易培养、存活率高的优点^[7]。分离的细胞可应用于基因修饰、缺氧及缺氧/复氧模型的构建。然而,乳鼠心肌细胞在代谢、钙信号等方面与成年鼠心肌细胞存在差异^[8,10],可导致体内与体外实验结果出现偏差。原代成年鼠心肌细胞为杆状心肌细胞,保留了多数在体心肌细胞的特性,更适用于 MI 等心肌缺血性疾病的体外模型建立。

现有 AMCMs 的分离以 Langendorff 法为主,此方法耗时较长,依赖于 Langendorff 灌流系统且操作复杂需要培训操作者熟练进行挂心脏。同时,分离细胞活力差、量少,用于基因修饰、疾病模型构建等长时程研究较为困难^[8,11]。上述原因导致 Langendorff 法难以推广。2019 年 ACKERS-JOHNSON 等^[12]报道了一种不依赖于 Langendorff 的 AMCMs 分离方法,可获得 80% 的健康杆状 AMCMs。该方法在获得大量 AMCMs 的基础上,具有获得高活力 AMCMs 的潜力。本研究拟在该方法的基础上,优化不依赖于 Langendorff 的 AMCMs 分离方法,并建立体外 AMCMs 基因修饰、缺氧/复氧诱导细胞损伤模型验证细胞活力,为应用 AMCMs 进行 MI 体外实验的研究提供便捷、实用、可操作性强的系统方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

选取 10 只 8 周龄 SPF 级 C57BL/6J 雄性小鼠,体重 20 ~ 25 g,购自浙江维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(浙)2019-0001】。饲养期间,小鼠自由饮水、进食,光照 12 h/12 h 昼夜循环,温度 22 ± 3 °C,湿度恒定 50% ~ 60%,定期更换笼具、垫料,饲养于西安交通大学动物中心 SPF 级屏障【SYXK(陕)2020-0005】。本实验经西安交大学生物医学伦理委员会审查批准后施行(2019-696)。

1.1.2 主要试剂与仪器

NaCl (Sigma-Aldrich, S5886), KCl (Sigma-

Aldrich, P5405), NaH₂PO₄ (VWR LIFESCIENCE, 0511), HEPES (1st Base, BIO-1825), Glucose (Solardio, CAS50-99-7), BDM (Sigma-Aldrich, B0753), Taurine (Sigma-Aldrich, T8691), EDTA (Sigma-Aldrich, EDS), MgCl₂·6H₂O (天力化学生物试剂, 1374248), NaHCO₃ (天津大茂化学试剂, 3510), Sodium lactate (Sigma-Aldrich, 1614308), CaCl₂ (天津大茂化学试剂, 3352); 胶原酶 II (Worthington, LS004176), 胶原酶 IV (Worthington, LS004188), 蛋白酶 IXV (Sigma-Aldrich, P5147), 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (Thermo Scientific, 10270106), M199 (Gibco, 31100019), 青霉素 (VWR LIFESCIENCE, 113-98-4), 链霉素 (Sigma-Aldrich, V900929), 层粘连蛋白 (懋康生物, MX0928), Phosphate buffered saline (Servicebio, G0002), 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) (Sigma-Aldrich, A1470), ITS media supplement (碧云天, Co341), Chemically defined lipid (Thermo Scientific, 11905-031), RFP 腺病毒 (汉恒生物), 碘化丙啶 (propidium iodide, PI) (碧云天, ST511), Hoechst (碧云天, C1011), α-actinin 抗体 (ABclonal Technology, A8939)。倒置显微镜及图像采集系统 (Olympus, 日本), 基恩士一体荧光显微镜 (BZ-X800E, 德国), 二氧化碳培养箱 (Thermo Scientific, 美国), 生物安全柜 (Thermo Scientific, 美国), 共聚焦显微镜 (NIKON, C2)。

1.2 方法

1.2.1 液体准备

(1) EDTA 灌注液: NaCl (130 mmol/L), KCl (5 mmol/L), NaH₂PO₄ (0.5 mmol/L), Glucose (10 mmol/L), BDM (10 mmol/L), Taurine (10 mmol/L), HEPES (10 mmol/L), EDTA (5 mmol/L), 用无菌超纯水配制, NaOH 调节 pH = 7.8。0.22 μm 微孔滤膜过滤后, 4 °C 避光保存 2 周。(2) 灌注液: NaCl (130 mmol/L), KCl (5 mmol/L), NaH₂PO₄ (0.5 mmol/L), Glucose (10 mmol/L), BDM (10 mmol/L), Taurine (10 mmol/L), HEPES (1 mmol/L), MgCl₂·6H₂O (1 mmol/L), 用无菌超纯水配制, NaOH 调节 pH = 7.8。0.22 μm 微孔滤膜过滤后, 4 °C 冰箱避光保存 2 周。(3) 混合酶消化液: 胶原酶 II (0.5 mg/mL), 胶原酶 IV (0.5 mg/mL), 蛋白酶 IXV (0.05 mg/mL), 应用灌注液配制, 每只小鼠约用 30 mL 混合酶消化液, 需用现配。(4) 终止液: 在灌注液的

基础上添加 5% FBS, 每只鼠约 10 mL, 现配现用。(5) 细胞贴壁培养基: M199 培养基添加 5% FBS, 10 mmol/L BDM, 100 U/mL 青霉素和 0.1 mg/mL 链霉素。(6) 心肌细胞培养用培养基: M199 培养基添加 0.1% BSA, 1 × ITS, 10 mmol/L BDM, 1 × Chemically defined lipid, 100 U/mL 青霉素和 0.1 mg/mL 链霉素。(7) 复钙缓冲液总体积为 20 mL, 按表 1 比例进行配制。(8) 层粘连蛋白 (细胞培养皿铺板用): 用 10 μg/mL 的层粘连蛋白包被培养皿或爬片, 于 37 °C 细胞培养箱中放置过夜。(9) 缺氧培养基: NaCl (118 mmol/L), NaHCO₃ (24 mmol/L), NaH₂PO₄ (1 mmol/L), MgCl₂·6H₂O (1.2 mmol/L), KCl (16 mmol/L), Sodium lactate (20 mmol/L), CaCl₂ (2.5 mmol/L), HEPES (250 mmol/L), 注意先加入 ddH₂O, 再按比例加入以上工作液, CaCl₂ 需要最后加入, 定容, 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 37 °C 预热后使用。其中, 溶液采用 0.22 μm 微孔滤器过滤, 可保存于 4 °C 冰箱, 建议现用现配。

表 1 AMCMs 梯度复钙液配制 (mL)

Table 1 AMCMs gradient complex calcium solution preparation (mL)

AMCMs 梯度复钙液 AMCMs gradient recalcium solution	梯度 1 Gradient 1	梯度 2 Gradient 2	梯度 3 Gradient 3
灌注液 Perfusion solution	15	10	5
心肌细胞培养用培养基 Media for cardiomyocyte culture	5	10	15

1.2.2 AMCMs 的分离

AMCMs 分离、培养步骤如图 1。

(1) 消化: ①实验前 1 d 晚上采用 10 μg/mL 层粘连蛋白包被培养皿或爬片, 37 °C 细胞培养箱中放置过夜。②提前配制 30 mL 混合酶消化液, 10 mL 终止液, 置于 37 °C 水浴锅预热; 配置 30 mL EDTA 灌注液, 13 mL 灌注液, 室温放置, 分离心肌细胞备用; 并配置复钙缓冲液、细胞贴壁培养基、心肌细胞培养用培养基, 置于细胞培养箱内进行 CO₂ 平衡, 用于细胞复钙、贴壁及培养。③器械准备: 20 mL 注射器 3 个, 27 G 注射器针头 1 支, 输液针 (0.45 mm × 15 mm) 1 支, 直径 6 cm 无菌培养皿 4 个, 用于放置 10 mL EDTA 缓冲液、10 mL 灌注液、10 mL 混合酶消化液和 3 mL 混合酶消化液, 剪刀 3 把, 弯头止血钳 1 把, 弯头镊子 2 把, 直镊 2 把, 100 目细胞滤器。所有器械采用 75% 乙醇消毒灭菌后用无菌水清洗。④麻醉: 采用异氟烷进行气体麻醉, 使用

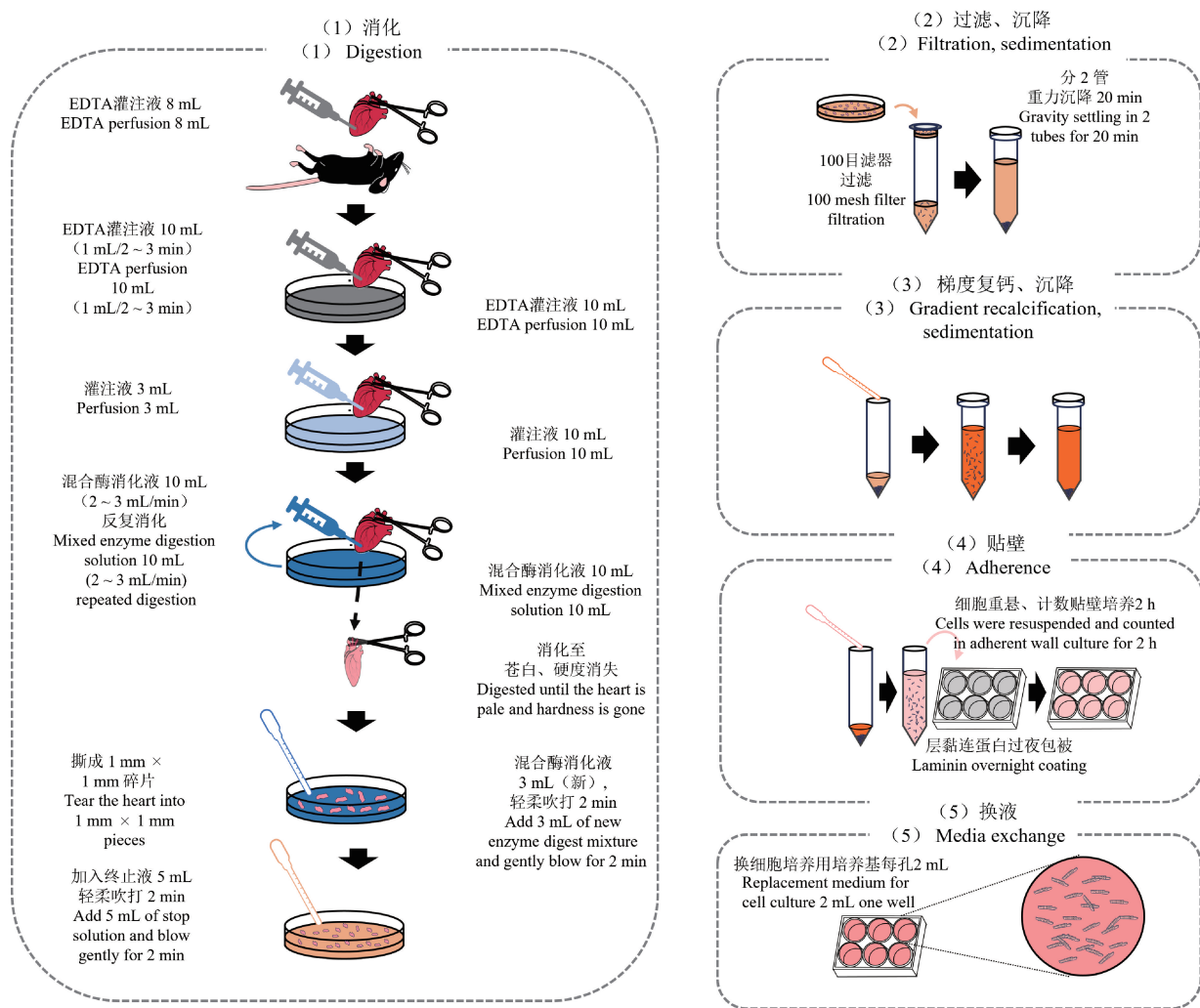


图 1 AMCMs 分离、培养流程图

Figure 1 Flowchart of AMCMs separation and culture

75%乙醇浸没小鼠消毒。开胸,暴露心脏,沿脊柱剪断降主动脉和下腔静脉。采用 27 G 注射针将 8 mL EDTA 灌注液在 1 min 内快速注入右心室。⑤以止血钳夹住升主动脉,将心脏剪下置于直径 6 cm 培养皿中,EDTA 缓冲液浸没心脏。将心脏置于超净台内进行后续操作,采用 0.45 mm 输液针将 10 mL EDTA 灌注液以 1 mL/2 ~ 3 min 的速度灌注左心室。此过程应缓慢灌注,待到心脏表面苍白即可停止灌注。⑥将心脏移至注入 10 mL 灌注液的直径 6 cm 培养皿中,采用 0.45 mm 输液针将 3 mL 灌注液以同一针孔灌注左心室,清除上步残留的 EDTA 灌注液。⑦将心脏移至注入 10 mL 混合酶消化液的直径 6 cm 培养皿中,注射器吸取 10 mL 混合酶消化液,使用 0.45 mm 输液针以同一针孔灌注左心室,灌注速度为 2 ~ 3 mL/min,可反复灌注,直至心脏硬度消失、注射压力降低、外表苍白时停止消化。

⑧剪除心室外多余部分,取下止血钳,将心脏转移至 3 mL 混合酶消化液的 6 cm 培养皿中,应用直镊将组织撕碎,组织块大小约为 1 mm × 1 mm。采用 1 mL 无菌软管(宽口径)轻吹 2 min 分离消化好的细胞。加入 5 mL 终止液终止消化,轻轻吹打 2 min。显微镜下观察杆状心肌细胞数量及细胞状态。

(2) 过滤、沉降:①采用 5 mL 终止液冲洗 100 目细胞筛网,过滤上一步混合酶液分离消化后所得到的细胞悬液以去除细胞碎片。②轻轻吹打混匀已过滤的细胞悬液,将其分装为 15 mL 离心管 2 管,重力沉降 20 min,弃上清,留 1 ~ 2 mL 细胞悬液。

(3) 梯度复钙、沉降:按照表 1 比例进行细胞梯度复钙,每次重力沉降 20 min。最后一次重力沉降结束后,加入 2 mL 心肌细胞培养用培养基重悬,进行细胞计数。

(4) 贴壁:加入细胞贴壁培养基进行稀释,以适

当密度种于包被层粘连蛋白的培养皿中。

(5)换液:贴壁 2 h 后应用心肌细胞培养用培养基进行换液,可进行后续实验。

1.2.3 细胞存活率

分别在细胞贴壁后的 2、24、48 及 72 h 于倒置显微镜下观察计数。每组实验独立重复 6 次,对活细胞和细胞总数进行计数,依次计算细胞存活率:细胞存活率 = 活细胞数(杆状心肌细胞)/细胞总数 × 100%。

1.2.4 AMCMs 免疫荧光染色

将 PBS 和 4%多聚甲醛提前放入 37 ℃ 水浴锅中进行预热,采用预热的 PBS 轻柔洗涤细胞 2 遍,洗去未贴壁的 AMCMs 和漂浮的死细胞。预热的 4%多聚甲醛固定细胞 30 min,0.3% Triton X-100 室温通透 15 min,5% BSA 室温封闭 1 h,一抗 α-actinin 4 ℃ 孵育过夜,绿色荧光标记的二抗室温避光孵育 1 h,DAPI 室温避光复染细胞核 10 min,抗荧光淬灭剂封片,采用激光共聚焦显微镜观察并拍照。

1.2.5 腺病毒转染

将 AMCMs 接种 48 孔板,在细胞贴壁 2 h 后,将仅表达红色荧光蛋白的腺病毒(Ad-RFP)病毒原液滴度稀释为 5 × 10⁷ PFU/mL,弃除孔内培养基,转染孔内依次加入病毒稀释液和心肌细胞培养用培养基,充分混匀,分别于转染后 36、48 h 时使用基恩士一体荧光显微镜观察,每组实验独立重复 5 次,计算病毒转染效率。病毒转染效率 = 带红色荧光的杆状心肌细胞数/杆状心肌细胞总数 × 100%。

1.2.6 AMCMs 缺氧/复氧实验

提前配制缺氧培养基,使用 0.22 μm 微孔滤膜过滤,37 ℃ 预热后使用,需现用现配。缺氧舱进行预平衡,将 O₂ 含量设置为 1%、CO₂ 含量设置为 5%。

置于缺氧舱前将 AMCMs 细胞培养基更换为缺氧培养基,缺氧(1% O₂,5% CO₂)45 min,更换缺氧培养基为心肌细胞培养用培养基,复氧 24 h。每组实验独立重复 6 次,PI 染色和 Hoechst 染色计算 PI 染色阳性细胞比率。

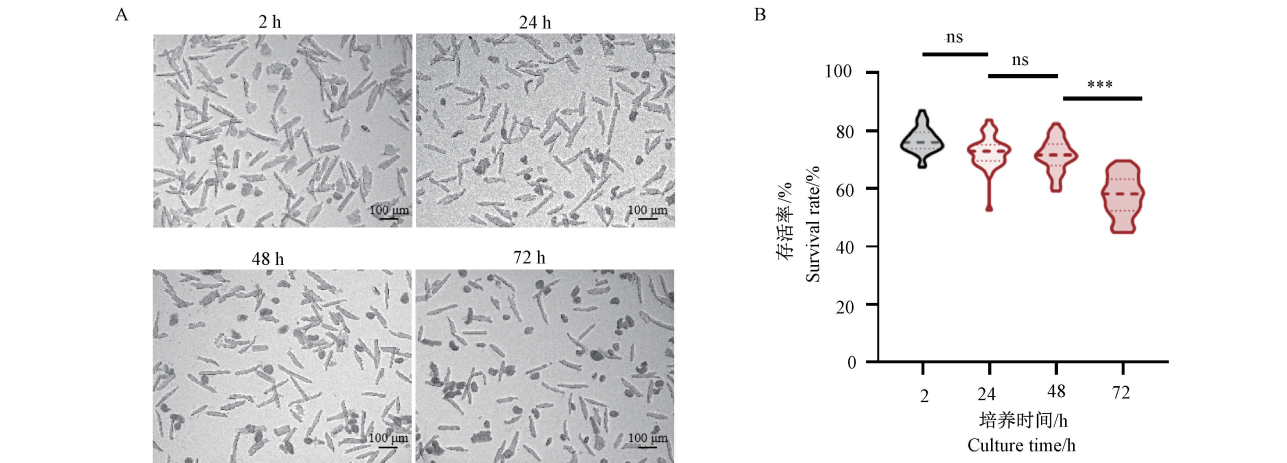
1.3 统计学分析

独立实验重复 5 ~ 6 次,使用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计学分析,应用 *t* 检验或单因素方差分析进行统计,所有实验结果均采用平均值 ± 标准误差($\bar{x} \pm s\bar{x}$)表示,*P* < 0.05 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 AMCMs 的形态学观察及不同时间的存活率变化

AMCMs 贴壁 2 h 后,镜下可见正常的 AMCMs 完全贴壁,呈现长杆状、细胞平直舒展,两端边缘清晰锐利;折光性较强,可见明显横纹且无明显搏动(如图 2A)。死亡的 AMCMs 不贴壁,大多呈边缘模糊的圆形或椭圆形。对细胞存活率进行统计,结果表明贴壁 2 h 后 AMCMs 存活率约为 76.49% ± 0.71%,贴壁 24、48 h 后 AMCMs 存活率分别为 72.42% ± 0.93%、71.27% ± 0.93%,较 2 h 无显著下降;贴壁 72 h 后细胞存活率为 57.51% ± 1.17%,



注:A:倒置显微镜下不同时间点观察分离培养的 AMCMs 数目;B:不同时间点 AMCMs 存活率比较;与 48 h 相比,*** *P* < 0.001。

图 2 AMCMs 培养不同时间细胞存活率分析(*n* = 6)

Note. A. Observe the number of isolated and cultured AMCMs at different time points under an inverted microscope. B. Compared with the survival rate of AMCMs at different time points. Compared with 48 h, *** *P* < 0.001.

Figure 2 Survival analysis of AMCMs cultured for different time(*n* = 6)

较贴壁 2 h 显著下降(如图 2B)。以上结果提示,本方法分离的 AMCMs 可至少存活 72 h,且 48 h 内细胞存活情况良好。

2.2 AMCMs 完整性评价

应用心肌细胞辅肌动蛋白 α -actinin 抗体免疫荧光染色标记显示 AMCMs 的完整性,DAPI 染色标记 AMCMs 细胞核,激光共聚焦显微镜分别在 20 倍及 60 倍镜下观察,结果提示本方法分离的 AMCMs 细胞具有完整的形态结构(见图 3)。

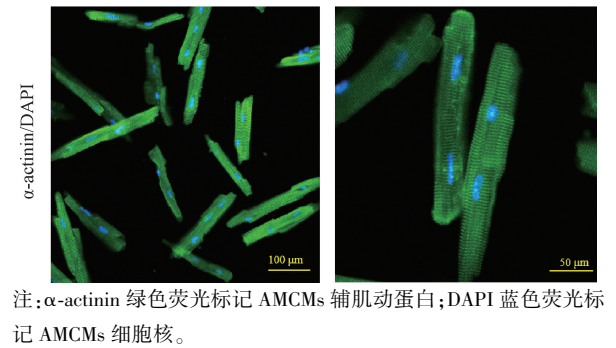


图 3 AMCMs 免疫荧光染色

Note. α -actinin green fluorescence labels AMCMs coactin. DAPI blue fluorescence labels nuclei.

Figure 3 Immunofluorescence staining of AMCMs

2.3 腺病毒转染 AMCMs 的评价

基因修饰为越来越多研究者进行疾病机制、药物靶点等研究的重要手段,本部分为探讨分离的 AMCMs 是否可用于腺病毒转染。RFP 标签的空载腺病毒 36、48 h 的转染效率分别为 $82.07\% \pm 0.60\%$ 和 $82.84\% \pm 1.18\%$ 。以上结果提示,本方法分离的 AMCMs 转染腺病毒后,在 36 ~ 48 h 后稳定表达(见图 4)。

2.4 缺氧/复氧诱导 AMCMs 损伤模型的构建

缺氧/复氧为研究心肌梗死后缺血再灌注损伤的主要体外模型建立方法,本部分为探讨本方法分离的 AMCMs 是否可用于缺氧/复氧损伤模型的建立,应用贴壁 24 h 的 AMCMs 进行缺氧 45 min 和复氧 24 h 处理。活细胞 PI 和 Hoechst 染色结果表明,常氧对照组 PI 阳性细胞率约为 $28.43\% \pm 0.67\%$,即存活率约为 70% 以上,与单纯贴壁 48 h 及腺病毒转染 48 h 细胞存活率相似(见图 5)。缺氧/复氧组 PI 阳性细胞率为 $42.28\% \pm 3.10\%$,显著高于常氧对照组。由于 PI 染色可反映细胞凋亡,以上结果提示本方法分离的 AMCMs 可用于建立体外缺氧/复氧模型。

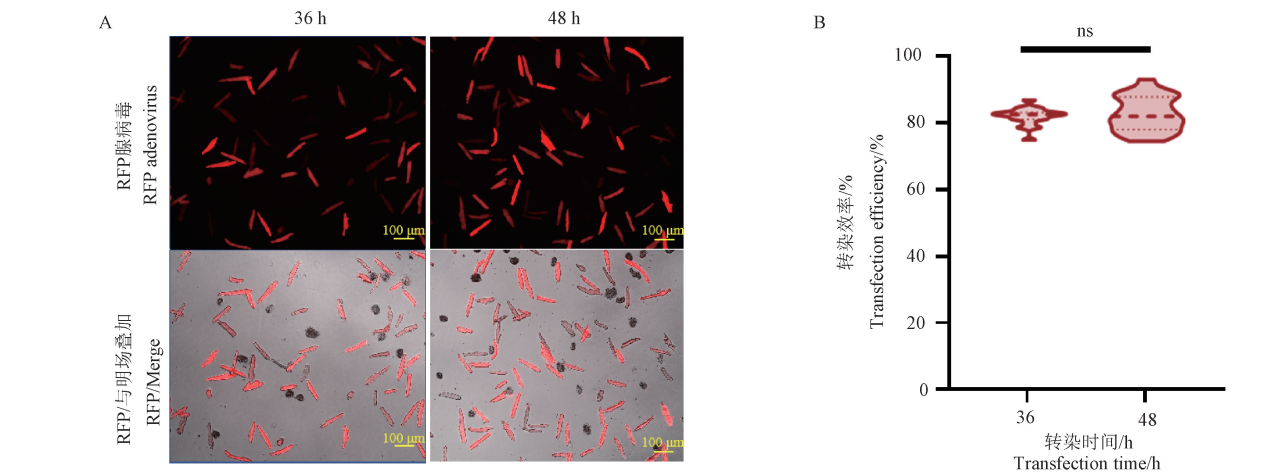


图 4 AMCMs 腺病毒转染效率分析($n = 5$)

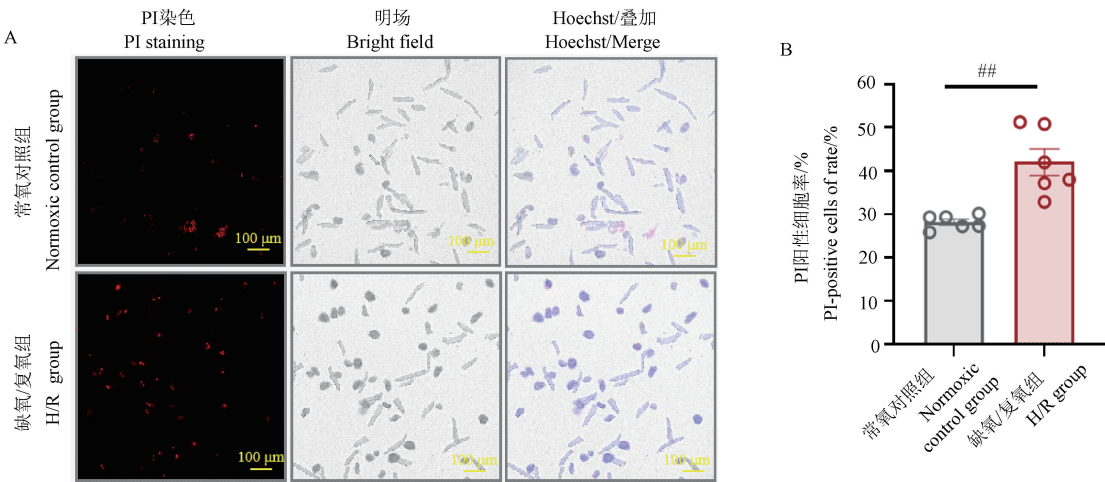
Note. A. Observe the transfection efficiency after RFP-adenovirus transfection. B. Analysis of adenovirus transfection efficiency.

Figure 4 Analysis of adenovirus transfection efficiency in AMCMs($n = 5$)

3 讨论

自 20 世纪原代心肌细胞被成功分离以来,成年心肌细胞的分离和培养技术不断发展。由于成年心肌细胞再生能力极差,浸泡法和贴块法被舍弃。

而离体心脏灌注法则成为目前主流的成年心肌细胞分离方法。这一方法依次通过灌注排除心脏及冠脉内血液、中和钙离子和生物酶消化细胞间质,释放心肌细胞来初步获得成年的心室肌细胞。由于设计多个离体灌注步骤,Langendorff 灌流系统以



注:A:分离培养的 AMCMs 细胞经 PI 染色观察凋亡数目,Hoechst 染色确定细胞总数;B:缺氧复氧组与常氧对照组 PI 阳性细胞率比较;与常氧对照组相比,##*P* < 0. 01。

图 5 缺氧/复氧诱导 AMCMs 损伤模型的评价(*n* = 6)

Note. A. Number of apoptosis cells of isolated and cultured AMCMs was observed by PI staining, and the total number of cells was determined by Hoechst staining. B. Analysis of PI-positive cell rate between hypoxic reoxygenation group and normoxic control group. Compared with normoxic control group, ##*P* < 0. 01.

Figure 5 Analysis of hypoxia/reoxygenation-induced AMCMs injury(*n* = 6)

其可控流速的特点成为目前成年心肌细胞分离的核心仪器。至今仍有改良的 Langendorff 分离 AMCMs 方法被陆续报道^[13-14]。然而,Langendorff 灌流系统却存在如下问题:(1)需主动脉插管,操作具有一定难度,操作不当易导致心肌缺血时间过长,分离心肌细胞活力下降^[15]。(2)灌流时多种液体相互影响。(3)灌流时可能空气不易排尽^[16]。(4)Langendorff 灌流系统反复使用,易出现污染风险^[17]。(5)分离心脏个数受灌流系统数量限制,难以短时间分离多个心脏。因此,尽管 Langendorff 离体心脏灌流法自 1895 年已经诞生,但 AMCMs 在心脏疾病的体外实验中,目前仍未能广泛应用。除此之外,也不断尝试在 Langendorff 离体心脏灌流法的基础上,简化装置或采用非 Langendorff 法分离培养 AMCMs。改良后的 Langendorff 灌注装置,在操作系统上得到一定程度简化,但依旧存在上述问题,如需主动脉插管以及易出现污染风险的弊端^[11,16-17],且分离效率并未得到大幅度提升,对于人员及技术有着一定要求。而非 Langendorff 法分离 AMCMs,常采用酶解法。酶解法在实验器具及操作人员技术层面大幅度降低要求,选用实验室常用手术仪器及设备,降低实验成本及操作难度,可以简便快速地提取心肌细胞,但通常存在如下问题:(1)酶解法省略心脏灌注这一操作,在将心脏洗去表面血液后,切割成小块儿进行消化,简单的表面冲洗,可能会

导致心脏及冠脉内还有血液残留,影响后续操作^[18-19]。(2)酶消化的时间长短会对细胞活性造成一定影响,过度消化可能会对细胞造成损伤,使用酶解法需要短时间多次分批消化,获取心肌细胞数目得到一定限制^[18-19]。(3)分离得到的心肌细胞活性相对较差,存活时间不超过 12 h,不适用于长时间的研究^[18]。本文应用方法可避免上述问题的存在,并且可以提高细胞存活率及存活时间。

进而,本研究探讨的 AMCMs 分离方法为一种不依赖于 Langendorff 灌流系统的体外心脏灌注法,可充分解决 Langendorff 灌流系统和酶解法存在的上述问题:(1)从心尖灌流,避免了主动脉插管可能带来的心肌缺血问题,且心尖灌流可充分去除心脏中残留血液,中和钙离子,充分消化细胞间基质。(2)不同灌流液体应用不同注射器和针头,且通过灌注液过渡,避免 EDTA 灌注液对酶灌注液的影响。(3)注射器及针头灌注前最好排尽空气,避免空气残留对体系带来的影响。(4)所用器械均可高压或一次性使用,减少了污染风险。(5)单人一次性可以分离 2 ~ 3 个心脏的细胞,有助手协助时可短时间内分离 4 ~ 6 个心脏的细胞,对于成年小鼠而言,可一次性获得较大量的细胞以用于实验。此外,由于不依赖于固定的仪器,AMCMs 的分离方法具有较好的普适性。因此,本方法具有操作简便、不易污染、不依赖于仪器和可快速分离大量心肌细胞的

优势。

保持心肌细胞活性是分离成年心肌细胞的另一重点和难点。JUDD 等^[20]报道的分离方法中, AMCMs 贴壁 24 h 细胞活性即出现下降, 至 72 h 基本完全死亡; 石山慧等^[16]报道的分离方法, AMCMs 贴壁 24 h 存活率低于 60%。ZHANG 等^[13]和 LIU 等^[14]报道的分离方法并未提及贴壁后不同时间的细胞存活率。本研究应用的分离方法 48 h 细胞存活率大于 70%, 培养 72 h 后 AMCMs 存活率仍大于 50%, 优于大部分报道的改良方法。

细胞转染受限于细胞本身活性, 是 AMCMs 难以大量应用于体外实验的原因之一。极少有文献对腺病毒转染 AMCMs 进行报道。仅 GRAHAM 等^[21]在 2013 年报道的方法中, 要求在贴壁 AMCMs 时即进行转染, 并在转染 2 h 后换液。换液 24 h 后可见大部分 Ad-GFP 转染细胞呈 GFP 阳性。本研究应用的分离方法转染 Ad-RFP 后, 36 ~ 48 h 转染效率达 80%, 进一步提示本方法分离的 AMCMs 具有良好的活性, 并可用于腺病毒转染及后续实验的操作。

细胞活性与细胞长时间的存活也是疾病模型构建的前提。SHI 等^[22]报道应用这一不依赖于 Langendorff 的方法分离 AMCMs 构建缺氧/复氧细胞焦亡模型, 焦亡培养基孵育时, 大量细胞呈 PI 阳性。本研究应用诱导凋亡的缺氧培养基孵育细胞并构建缺氧/复氧细胞损伤模型时发现, 缺氧/复氧组细胞死亡率上升, 提示本方法分离的 AMCMs 可用于缺氧/复氧诱导的多种细胞损伤模型。

综上, 本研究通过对不依赖于 Langendorff 系统的 AMCMs 法进行系统优化, 可稳定获得产量高、活力高的 AMCMs; 并应用其建立了腺病毒转染和缺氧/复氧模型, 为心肌缺血体外实验研究提供便捷、实用、可操作性强的系统方法。

参 考 文 献 (References)

[1] 孙阳, 乔利杰, 卫靖靖, 等. 不同中药注射液治疗急性心肌梗死后心力衰竭有效性与安全性的网状 Meta 分析 [J]. 中国中药杂志, 2023, 48(21): 5932-5945.
SUN Y, QIAO L J, WEI J J, et al. Network Meta-analysis of efficacy and safety of different traditional Chinese medicine injections in treating post-acute myocardial infarction heart failure [J]. Chin J Chin Mater Med, 2023, 48(21): 5932-5945.

[2] 中国医师协会心血管内科医师分会, 中国心血管健康联盟, 心肌梗死后心力衰竭防治专家共识工作组. 2020 心肌梗死后心力衰竭防治专家共识 [J]. 中国循环杂志, 2020, 35

(12): 1166-1180.

Branch of Cardiovascular Physicians, Chinese Medical Doctor Association; China Cardiovascular Health Alliance; the Expert Consensus Working Group on the Prevention and Treatment of Heart Failure After Myocardial Infarction. 2020 expert consensus on the prevention and treatment of heart failure after myocardial infarction [J]. Chin Circ J, 2020, 35(12): 1166-1180.

[3] AMBROSIO A P, FONAROW G C, BUTLER J, et al. The global health and economic burden of hospitalizations for heart failure: lessons learned from hospitalized heart failure registries [J]. J Am Coll Cardiol, 2014, 63(12): 1123-1133.

[4] SANDOVAL Y, APPLE F S, MAHLER S A, et al. High-sensitivity cardiac troponin and the 2021 AHA/ACC/AASE/CHEST/SAEM/SCCT/SCMR guidelines for the evaluation and diagnosis of acute chest pain [J]. Circulation, 2022, 146(7): 569-581.

[5] FAN Q, TAO R, ZHANG H, et al. Dectin-1 contributes to myocardial ischemia/reperfusion injury by regulating macrophage polarization and neutrophil infiltration [J]. Circulation, 2019, 139(5): 663-678.

[6] 张卫强, 王涛, 张志明, 等. 大鼠心肌缺血再灌注损伤模型的改进与评判 [J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(3): 311-316.
ZHANG W Q, WANG T, ZHANG Z M, et al. Improvement and evaluation of the rat model of myocardial ischemia reperfusion injury [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2018, 26(3): 311-316.

[7] 孟香红, 曾斌, 陈慧玲, 等. 改良法分离培养 SD 新生乳鼠原代心肌细胞 [J]. 中国应用生理学杂志, 2021, 37(6): 699-704.
MENG X H, ZENG B, CHEN H L, et al. An improved method for isolation and culture of primary cardiomyocytes from SD neonatal rats [J]. Chin J Appl Physiol, 2021, 37(6): 699-704.

[8] 张琳, 纵静, 张庆涛. 成年大鼠心肌细胞急性分离方法的探讨 [J]. 徐州医学院学报, 2015, 35(10): 696-699.
ZHANG L, ZONG J, ZHANG Q T. A method of acute isolation of adult rat ventricular cardiomyocytes [J]. Acta Acad Med Xuzhou, 2015, 35(10): 696-699.

[9] 崔常贺, 陈芳, 徐予. H9c2 细胞在心脏离体模型中研究进展 [J]. 中国实用医刊, 2014, 41(1): 92-94.
CUI C H, CHEN F, XU Y. Research progress of H9c2 cells in isolated heart model [J]. J Zunyi Med Univ, 2014, 41(1): 92-94.

[10] 陈齐, 张英, 刘庆. 成年大鼠心肌细胞分离和培养相关研究进展 [J]. 生物技术世界, 2015, 12(9): 4-5.
CHEN Q, ZHANG Y, LIU Q. Research progress in isolation and culture of adult rat cardiomyocytes [J]. Biotech World, 2015, 12(9): 4-5.

[11] 师雷, 金振晓, 谭延振, 等. 简易灌注装置同时提取成年小

鼠心肌细胞和心脏成纤维细胞 [J]. 中国体外循环杂志, 2023, 21(3): 172-178.

SHI L, JIN Z X, TAN Y Z, et al. Simplified perfusion device for simultaneous isolation of adult mouse cardiomyocytes and cardiac fibroblasts [J]. Chin J Extracorpor Circ, 2023, 21(3): 172-178.

[12] ACKERS-JOHNSON M, FOO R S. Langendorff-free isolation and propagation of adult mouse cardiomyocytes [J]. Methods Mol Biol, 2019, 1940: 193-204.

[13] ZHANG H, RABINOVITCH P S. Protocol for isolation of cardiomyocyte from adult mouse and rat [J]. Bio Protoc, 2022, 12(10): e4412.

[14] LIU Y, DOSTAL D E, TONG C W. Isolation of adult mouse cardiomyocytes using langendorff perfusion apparatus [J]. Methods Mol Biol, 2021, 2319: 143-152.

[15] ACKERS-JOHNSON M, LI P Y, HOLMES A P, et al. A simplified, langendorff-free method for concomitant isolation of viable cardiac myocytes and nonmyocytes from the adult mouse heart [J]. Circ Res, 2016, 119(8): 909-920.

[16] 石山慧, 吕定超, 翟旭雯, 等. 改良成年小鼠心室肌细胞分离方法 [J]. 中国心血管病研究, 2016, 14(8): 748-751, 766.

SHI S H, LÜ D C, ZHAI X W, et al. The improvement of adult mouse cardiomyocytes isolation method [J]. Chin J Cardiovasc Res, 2016, 14(8): 748-751, 766.

[17] 张琳, 纵静, 张庆涛. 改良细胞灌流分离装置提高心肌细胞分离效率 [J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(51): 8300-8304.

ZHANG L, ZONG J, ZHANG Q T. Modified cell perfusion appliance for improving the separation efficacy of cardiomyocytes [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2015, 19(51): 8300-8304.

[18] 赵伟, 姚素梅, 王强. 急性提取成年小鼠心肌细胞的方法 [J]. 河南大学学报(医学版), 2007, 26(1): 41-42.

ZHAO W, YAO S M, WANG Q. A method about the acute extraction of mice cardiomyocytes [J]. J Henan Univ(Med Sci), 2007, 26(1): 41-42.

[19] LIU H, BERSELL K, KÜHN B. Isolation and characterization of intact cardiomyocytes from frozen and fresh human myocardium and mouse hearts [J]. Methods Mol Biol, 2021, 2158: 199-210.

[20] JUDD J, LOVAS J, HUANG G N. Isolation, culture and transduction of adult mouse cardiomyocytes [J]. J Vis Exp, 2016, 114: 54012.

[21] GRAHAM E L, BALLA C, FRANCHINO H, et al. Isolation, culture, and functional characterization of adult mouse cardiomyocytes [J]. J Vis Exp, 2013, 79: e50289.

[22] SHI H, GAO Y, DONG Z, et al. GSDMD-mediated cardiomyocyte pyroptosis promotes myocardial I/R injury [J]. Circ Res, 2021, 129(3): 383-396.

[收稿日期] 2023-10-24