

# 心肌細胞培养

李连达 李映欣

高凤辉 张金妹 刘志云

中医研究院西苑医院

1980年12月

物理研究所及动物研究所协助拍摄透射及扫描电子显微镜照片，北京师范大学生物系协助拍摄倒置显微镜电影等，谨志谢意。

限于水平，书中缺点及错误在所难免，欢迎批评指正。

中医研究院西苑医院

基础研究室

1980年12月

# 目 录

<b>第一章 绪论</b> .....	( 1 ~ 6 )
一、心肌细胞培养的发展简史	
二、心肌细胞培养的基本原理	
三、心肌细胞培养的优缺点	
<b>第二章 实验设备及准备工作</b> .....	( 7 ~ 25 )
一、培养器械	
二、常用溶液	
三、无菌操作常规	
<b>第三章 培养方法</b> .....	( 26 ~ 43 )
一、心肌组织的选择	
二、原代心肌细胞单层培养方法	
三、提高心肌细胞纯度的方法	
四、传代培养方法	
五、培养方法的某些进展	
六、成年动物的搏动心肌细胞的制备	
<b>第四章 观测方法</b> .....	( 44 ~ 63 )
一、一般观察	
二、形态学观察	
三、搏动的观察	
四、培养心肌细胞的某些电生理特性	
五、培养心肌细胞代谢的某些特点	
<b>第五章 环核苷酸对培养心肌细胞的作用</b> .....	( 64 ~ 74 )

**第六章 心肌细胞损伤的研究**…………… (75~88)

- 一、缺血性损伤
- 二、微生物及毒素的损伤
- 三、免疫性心肌损伤
- 四、心肌病病理损伤
- 五、其它

**第七章 心肌细胞培养在药理学研究中的应用**…(89~103)

- 一、受体的研究
- 二、搏动节律失常模型的建立
- 三、强心甙的研究
- 四、毒理学的研究
- 五、中医中药方面的研究

**附录**…………… (104~151)

- 一、附子 I 号 (消旋去甲乌药硷) 对体外培养心肌细胞的影响
- 二、秃毛冬青 II 号 (3,4-二羟基苯乙酮) 对乳鼠心肌细胞培养的影响
- 三、原代培养心肌细胞连续搏动 106 天的观察 (功能、形态及药物反应)
- 四、体外培养心肌细胞及不同鼠龄的心脏胆硷能神经末梢的比较研究
- 五、人胚心肌细胞体外培养的初步研究

# 第一章 绪 论

随着分子生物学及细胞生物学的飞速发展，对各种心血管疾病的基础理论研究，不能仅仅停留在整体动物、离体器官和组织水平上，人们日益认识到，从分子和细胞水平，尤其从活细胞的角度研究心肌细胞的形态和功能，研究各种心脏的病因、发病因素、病理变化及治疗等问题，具有非常重要的意义。目前在心血管疾病研究的一些领域内，为了阐明其内在机理，已深入到细胞及分子水平。新兴的分子及细胞心脏病学（Molecular and Cellular Cardiology）就是这方面的重要进展之一。心肌细胞培养则为这门科学提供了方便有用的工具。体外培养的心肌细胞能维持正常心肌细胞所具有的结构和功能特点，利用它可从活细胞水平，进一步从分子水平，研究心肌的结构、功能及能量代谢等；可以建立实验病理模型以研究疾病发生发展的规律，以及心肌细胞药理学等。心肌细胞培养技术的不断发展、应用范围日益扩大，对各种心脏病基础理论的研究将有很大的促进。

## 一、心肌细胞培养的发展简史<sup>(8·10)</sup>

心肌细胞培养是一门新兴的科学技术，它的发生、发展与其它组织培养技术一样，是与现代科学技术的发展有密切关系的。自1906年Harrison建立了组织培养技术的悬滴培养法观察神经元的培养后，1910年Burrows观察到血浆凝块上培养的鸡胚心肌组织块的搏动，1912年他又观察到单个心肌细胞的搏动，这是当时对心脏搏动肌原性理论的直接证明。

同年Carrel为了证明细胞在体外能长期生存，并且能保持一定的功能，他用外科无菌操作方法，在沒有抗菌素的情况下，将七天的鸡胚心脏组织块培养在血浆和鸡胚提取液的混合物内，观察到搏动达104天，并把原代细胞培养进行了长期传代培养，他于1939年退休后由Ebeling继续这项工作，并于1964年退休，就这样，细胞培养维持了94年。但这种长期培养的细胞株是不能搏动的心脏成纤维细胞，其来源未弄清是由于心肌细胞反分化（dedifferentiation）而来，还是当初即混有的成纤维细胞和上皮细胞而来的，也有人怀疑他们经常加入新鲜的胚胎浸出物带入了新的细胞。

Leviliti等1918年就开始试验拍摄培养的心肌细胞搏动的电影，但直至1931年Gross才报道体外培养心肌细胞搏动的电影记录。这在相差显微镜仍未应用，培养方法还未达到最佳水平的时候是不容易的。

早年Burrows的方法一直被其它研究者用于研究心肌的生长晕（outgrowth），但缺点是组织培养中分化的这种心肌细胞迁移很小，发展慢。1955年Cavanaugh首次报告用胰蛋白酶消化鸡胚心肌组织，分离出单个心肌细胞，遂成功地进行了单细胞培养，这是心肌细胞培养发展中的一个重要里程碑。

1960年Harary<sup>(14)</sup>等首创用哺乳类动物大白鼠乳鼠的心脏进行心肌细胞单层培养，其自发节律性搏动维持了40天。这是心肌细胞培养发展中的又一个重要进展。此后，他们对培养的心肌细胞的形态、功能、生化、电生理及药理等方面进行了大量的研究工作，作出了重要贡献。

从七十年代开始，Vahouny等人又成功地从成年动物的

心脏分离出单个搏动的心肌细胞，使这一工作又前进了一步。近年来，不但在培养方法、观测手段有了显著的改进，而且建立了一些实验细胞病理模型，对分子细胞心脏病学及心肌细胞药理学研究，起了很大的促进作用。

国内这方面工作尚未广泛开展，中医研究院西苑医院基础研究室自1978年初开始心肌细胞培养后，对培养方法、观测手段及一些中药有效成分进行了研究（详见附录），并拍摄电影、电子显微镜及扫描电子显微镜照片等。乳鼠心肌细胞原代培养已可连续搏动106天，最近又用人胚进行体外心肌细胞培养获得成功，这些工作引起有关方面的注意，有些单位也相继开展了这方面工作。心肌细胞培养的研究工作将为我国心脏生理、病理及药理，特别是中医中药研究，提供一个新的领域。

## 二、心肌细胞培养的基本原理

心肌细胞培养是把心肌组织碎块用酶消化分离成单个心肌细胞，用培养基制成细胞悬液，在体外适宜的条件下使其生长繁殖，并保留其一定的结构和功能特性。它与组织培养和器官培养的主要不同点在于开始培养的组织对象不同，细胞培养是用单个心肌细胞悬液；组织培养所使用的是组织块（ $1\text{ mm}^3$ ）或薄片（ $0.2\text{ mm}$ ）；而器官培养是用整个胚胎器官。其相互关系如图1所示。从动物心脏分离的细胞，进行培养叫做原代培养（Primary culture），培养出的细胞为原代心肌细胞；原代细胞在培养一周时，再次用胰蛋白酶消化分离成单细胞悬液，转种（transfer）培养，叫作传代（passage, Subculture）。原代细胞首次传代以后，可称为细胞系（Cell line），原代培养或细胞系用一般或特殊的选择

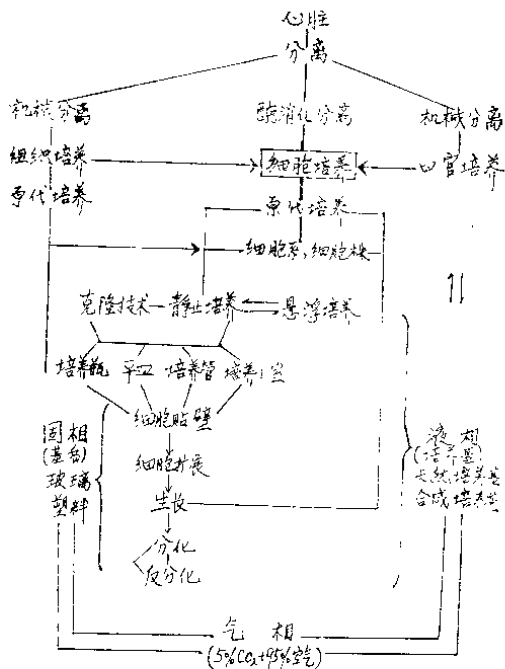


图1 心肌细胞培养方法及原理简图

方法选出一个或一群具有某些特性或标记，而且能在后代中保持下去的叫作细胞株 (Cell strain)。细胞株的特性一般指有固定不变的染色体组型、同功酶、对病毒的敏感性及生



化特性等等。虽然传代细胞仍可见到搏动，但目前还未建立可搏动的心肌细胞株以供应用。一般认为搏动的心肌细胞传代培养是有限度的，迟早要调换成带有肌原纤维的增殖性细胞，当心肌细胞无选择地进行传代培养，就会形成这种增殖细胞群，即所谓心脏成纤维细胞 (heart fibroblasts) 或上皮样细胞 (epithelial-like)，如目前广泛应用的从41岁男性右心耳培养的 Girardi 心细胞株，其细胞类型就是上皮样细胞。搏动的原代心肌细胞经传代后，因在长期传代过程中，细胞染色体组型 (Karyotype) 发生了明显的改变，细胞不具有自律性及收缩性，所以不能再把它们认为是心肌细胞 (heart muscle cells)。

文献报导，这样的心肌细胞系有：HH (人心)、SCH (犬面猴心)、PCH (犬面猴心)、CMRG (恒河猴心)、RHF-1 (家兔心)、LLC-M<sub>3</sub> (小鼠胚胎心)、JTC-4 (Wistar 大鼠心)、JTC-4D (Wistar 大鼠心)。

美国模式培养收藏库 (American Type Culture Collection repository, ATCC) 收藏的心细胞系列表如下<sup>(12)</sup>：

细胞系名称	组织来源	细胞类型	染色体数	ATCC 编号
Girardi Heart	人 心	上皮样细胞	81 (55~86)	CCL27
TH-1	海 龟 心	上皮样细胞	48 (46~90)	CC150
IgH-2	大蜥蜴心	上皮样细胞	35 (30~64)	CC1108
VII-2	蝮 蛇 心	成纤维细胞	35 (22~64)	CC1140

### 三、心肌细胞培养的优缺点<sup>(9,15)</sup>

培养的心肌细胞与其它心肌组织制备相比，具有下列优点：

1. 可排除神经体液因素的影响及肝肾解毒功能的干扰，观察某些因素及药物对心肌细胞的直接作用。

2. 可解决心肌组织中细胞间隙渗透延缓 (diffusion lag) 问题，特别适用于细胞内外离子运转的研究。

3. 可得到心肌细胞的纯培养，在心肌组织中心肌细胞约占50%，其他非心肌细胞占50%，而在心肌细胞培养中，心肌细胞可达95%以上，使实验不受其他细胞的干扰。

4. 可直接观察到活细胞的动态过程，利用拍摄电影可发现一些肉眼观察不到的现象，应用在细胞水平的其它现代化的仪器和方法，如放射自显影、荧光显微镜、细胞化学等，均可在心肌细胞上应用，且便于观察及对比。

5. 可用人的心肌细胞作实验，排除种属差异。

6. 减少实验动物数量、节约时间、实验的重复性好，可得到较多的实验样本，使结果更加可靠，更有价值。

这种方法也不可避免地存在一些局限性：

1. 体外心肌细胞培养失去了体内正常的细胞比例及相互关系，也失去整体的调节作用。

2. 培养方法对细胞的形态和功能有一定的影响，如胰蛋白酶可破坏细胞表面物质如受体、酶及抗原等。

3. 培养条件下，影响因素较多，必须严格控制实验条件。

## 第二章 实验设备及准备工作

### 一、培养器械

#### (一)、仪器

1. 超净工作台(或无菌操作箱或无菌室): 为细胞培养提供一个无菌工作环境, 带有紫外光灯(可作空气消毒)及过滤层流空气装置, 被过滤的空气可以保证没有或很少空气污染。

2. 恒温培养箱: 用于密闭系统的培养或孵鸡卵用。

3. 二氧化碳培养箱: 通入 5% CO<sub>2</sub> + 95% 空气用于开放系统的培养。

4. 倒置显微镜: 适用于观察平皿、玻璃或塑料培养瓶底的细胞。如载物台上带有恒温操作室及连续摄影装置的相差倒置显微镜则更为理想。如无生物用倒置显微镜, 可用重庆光学仪器厂的XJB-1型立式金相显微镜代替。

5. 离心机: 一般用800~1500rpm的低速离心机即可, 如需进一步开展分子生物学的研究, 则需备有超速离心机。离心机的转速一般以每分转速(rpm)表示, 近年来主张用相对离心力(RCF)表示, 比较合理。相对离心力(g)与每分转速的关系, 可用下列公式计算:

$$RCF(g) = 1.18 \times 10^{-5} \times (R) \times (rpm)^2$$

$g$  = 离心力,  $R$  = 离心半径(厘米)为离心机轴心至沉淀管底的距离, 为方便起见, 可在专门的图表上查得。

6. 蒸馏器: 配液必须用重蒸或三蒸水, 要求水中的离

子量减少到最低限度，电阻测量值应达到50万欧姆以上（一般自来水的电阻约4万欧姆）。以玻璃蒸馏器效果最好。有人认为还氧树脂柱制造的无离子水虽然电阻值很高，但是树脂对不电离的有机杂质不能吸附，已吸附的又有可能脱离下来，故主张无离子水也要重蒸一遍。

7. 冰箱：平衡盐溶液及培养基保存于4℃中，胰蛋白酶及小牛血清应保存于-20℃中。

8. 电热鼓风干燥箱：供消毒玻璃器材和金属器材使用，一般用150℃保持40分钟即可。

9. 高压蒸汽消毒器。

10. 电磁搅拌器及带玻璃外衣的搅棒：消化分离细胞用。

11. 恒温水浴锅：

12. pH测定仪：测定培养基、各种溶液及试剂的pH，（或用标准比色管代替）。

13. 真空泵（或用自来水抽气法）：辅助溶液过滤灭菌用。

14. 分析天平及普通天平

15. 血球计数室：作细胞悬液计数用。

16. 普通显微镜。

## （二）、玻璃器皿

1. 培养瓶：常用的有 Earle 氏设计的T瓶及 Carrel 氏设计的D瓶，目前市面上供应的  $6 \times 3 \times 2.3 \text{cm}^3$  的方形玻璃培养瓶很为适用。有些玻璃所含的物质对细胞有很大的毒性，例如铅和砷，这种有害物质由于培养基的微碱性而慢慢地渗入到溶液中去，成为细胞中毒根源。一般认为硼硅玻璃及钠玻璃比较满意。

## 2. 培养皿:

一般用玻璃培养皿,近年来由于塑料工业的发展,有些培养容器采用聚苯乙烯及类似性质的塑料制作,制成各种不同大小的平皿、培养瓶及Rose室等,透明度好,无毒,细胞能贴壁生长。培养皿(瓶)的选择很重要,皿底或瓶壁应薄而平,便于在倒置显微镜上观察。此外,所谓组织培养的固相,主要指细胞或组织附着的固体基质,也就是瓶底或皿底,可以是玻璃,也可以是塑料,还可以在上面涂以各种胶元、琼脂、血浆凝块等,基质不同,对细胞的生长,超微结构及搏动均有影响。

## 3. 滤菌器: 常用的有:

1)、玻璃滤菌器: 由玻璃细纱加热熔合成细孔的滤板,嵌镶在玻璃漏斗中做成过滤漏斗。 $G_3$ 号孔径 $60\sim 80\mu\text{m}$ ,过滤澄清用; $G_4$ 号孔径 $25\sim 30\mu\text{m}$ ,过滤澄清用; $G_5$ 号孔径 $2\sim 5\mu\text{m}$ ,滤除一般较大细菌; $G_6$ 号孔径 $< 2\mu\text{m}$ ,滤除较小细菌。

2)、赛(Seitz)氏滤菌器: 用石棉压缩成滤板,嵌夹于金属漏斗中,便于取出更换。 $K$ 或 $FCB$ 级,孔径大,过滤澄清用; $EK$ 或 $GS$ 级,孔径小,滤除细菌; $EK-S$ 或 $SB$ 级,孔径更小,滤除细菌。

3)、微孔滤菌膜: 用醋酸纤维素或火棉胶溶于一定量的异戊醇或丙酮中,放在温处凉干后制成薄膜,用时夹在漏斗中过滤。1号及2号膜,孔径稍大,过滤澄清用;3号膜孔径 $0.7\mu\text{m}$ ,滤除细菌;4号及5号膜,孔径更小,滤除细菌。

## 4. 其它如白(Beikefled)氏滤菌器或张(hamber-

land) 氏滤菌器均可应用。

4. 抽滤瓶: 250、500、1000ml。

5. 三角烧瓶: 25、50、100、250ml, 用于消化分离细胞或旋转培养。

6. 吸管

7. 量筒

8. 容量瓶

9. 试管

10. 烧杯

11. 漏斗

12. 注射器

13. 离心管

14. 盖玻片

#### (三) 金属器材:

1. 外科剪

2. 虹膜剪

3. 虹膜镊

4. 解剖镊

5. 止血钳

6. 试管架

#### (四) 其它器材

1. 瓶架、吸管架

2. 乳鼠固定板

3. 搪瓷长方形盘或木盘

4. 酒精灯

5. 橡皮塞

6. 橡皮帽

7. 特种铅笔

### (五) 器械的洗涤与灭菌

在细胞培养中，细菌污染是一个最大的威胁。防止污染有两种方法：一是灭菌，除去已经存在的细菌；二是无菌操作，防止已消毒的材料被污染。但是，防止有毒化学物质的污染也几乎同等重要，所以，一切应用器材在消毒之前都必须清洗，以去除有毒物质，尤其是细胞贴壁生长的培养瓶(皿)更应清洗干净。

#### 1. 玻璃器皿：

未用过的玻璃器皿须先浸入清水、洗净，再用高级洗衣粉浸泡、毛刷刷洗，流水冲洗干净。

用过的玻璃器皿应立即浸入清水中，避免且白质干后贴附于玻璃上而难以清洗，然后用洗衣粉洗刷干净，流水冲净。

经上述初步清洗后的器皿，在洗涤液中浸泡 1~2 天（注意瓶子中不要残留气泡）。然后取出在自来水下至少冲洗10次，且应猛力摇晃，再用单蒸水冲洗三次，最后用双蒸水及三蒸水分别冲洗三遍、烘干后包装、准备消毒。

目前，一般实验室常用的洗涤液是重铬酸钾溶液（氧化性酸性清洗液）。配方如下：

重铬酸钾	1000g
蒸馏水	10000ml

加温溶化后，缓慢地加入粗制浓硫酸1000ml。

注意：这种洗液有高度腐蚀性，操作时必须戴厚的耐酸橡皮手套。络硫酸为黄褐色，如变成绿色，表明已失去氧化能

力而失效，需要重新配制。

玻璃器皿的消毒方法可用（1）干热消毒， $150^{\circ}\text{C}$ 、40分钟，（2）高压蒸汽消毒，15磅、 $120^{\circ}\text{C}$ 、30分钟。

## 2. 玻璃滤器

新滤器以清水洗净，浸入热硫酸内（加少许硝酸钠）24小时，取出后通过蒸馏水一次，再通过1N NaOH直至滤液呈中性时为止（加入酚红作指示剂），再通过双蒸水一次，烘干包装消毒。

用过的滤器需用蒸馏水500ml通过一次，然后浸泡清洁剂若干小时，取出后，先用流水冲洗，再通过300ml蒸馏水，500ml双蒸水，烘干高压消毒（15磅15分钟）。

## 3. 新橡皮塞的处理

先用0.1M NaOH及0.1M HCl分别煮沸20分钟，每次煮过之后，用自来水及蒸馏水清洗多次，烤干、装管、高压蒸汽消毒。用过的橡皮塞要泡、洗、煮、刷、烘干、高压灭菌。

## 4. 金属器材的清洗与消毒

用过后可用70%酒精纱布擦洗干净、烘干、消毒方法用（1）干热消毒、（2）高压蒸汽消毒、（3）临时急用可煮沸消毒（放入1%NaHCO<sub>3</sub>水中煮沸15分）或在70%酒精中浸泡1小时。

## 二、常用溶液

### （一）平衡盐溶液

以无机盐类及葡萄糖配成保持生理状态的渗透压和pH值的溶液叫平衡盐溶液（Balanced Salt Solution）。所有用于细胞培养的培养基都是以此作为基础配成的。其中的无机离子可以模拟血清的渗透压。磷酸缓冲液调整及保持一定



的pH；加入碳酸氢钠则模仿血中带有少许CO<sub>2</sub>成分；Mg<sup>++</sup>、Ca<sup>++</sup>、Na<sup>+</sup>作为酶的金属激活剂。平衡盐溶液的种类繁多，其主要不同点在于NaCl及其他离子的浓度和缓冲液系的种类。常用的有生理盐水、Ringer氏液、Tyrode氏液、Locke氏液、Cev氏液，Hank氏液，Earle氏液等（其成分可参阅一般组织培养专著）。又以Hank氏液及Earle氏液较常用，前者NaHCO<sub>3</sub>的含量较低，为250mg/L，是考虑到在普通空气条件下达到平衡，Eagles培养基即以此液为基础配成；Earle氏液含高浓度的NaHCO<sub>3</sub>（1.2~2g/L），是考虑到在含有5%CO<sub>2</sub>的空气中，亦即在二氧化碳培养箱中达到平衡，199培养基即以此液为基础配制而成。

配制平衡盐溶液应注意（1）必须使用双蒸水或三蒸水，（2）所用的试剂必须为化学纯（CP）或分析纯（AR）

（3）试剂所示的水化物都有一定符号，配制时如果水化物的符号不符，则可查表找出它的相当的等值来代替，（4）配制时应按配法顺序进行、避免出现沉淀。

常用的平衡盐溶液的配方如下：

1. 磷酸缓冲盐溶液（P、B、S）

NaCl	8.0g
KCl	0.2g
CaCl <sub>2</sub>	0.1g
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.1g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.15g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2g
溶于双蒸水	1000ml

以玻璃滤器滤过灭菌，保存4℃备用。