

本文引用: 肖冰, 戴天医, 刘飒, 等. 酶联合消化法分离犬心房肌成纤维细胞及其生物学特性的研究[J]. 新乡医学院学报 2014, 31(2): 81-86.

【基础研究】

## 酶联合消化法分离犬心房肌成纤维细胞及其生物学特性的研究

肖冰<sup>1</sup>, 戴天医<sup>1</sup>, 刘飒<sup>2</sup>, 罗太阳<sup>1</sup>, 刘小慧<sup>1</sup>

(1. 首都医科大学附属北京安贞医院心内科, 北京 100029; 2. 北京市心肺血管疾病研究所实验中心, 北京 100029)

**摘要:** 目的 探讨适用于犬心房肌成纤维细胞(CAF)体外分离培养及鉴定的技术方法。方法 无菌手术取犬左心耳,应用木瓜蛋白酶、I型胶原酶联合消化法分离心房肌成纤维细胞并进行体外培养。在倒置显微镜下观察原代心房肌成纤维细胞生长特点;苏木精-伊红(HE)染色观察细胞形态,并对细胞进行纤维连接蛋白、波形蛋白、盘状结构域受体2蛋白免疫荧光染色;通过绘制生长曲线法、2-(2-甲氧基-4-硝基苯基)-3-(4-硝基苯基)-5-(2,4-二磺基苯)-2-四唑单钠盐(WST-8)法观察细胞的增殖情况;流式细胞仪分析比较各代细胞DNA周期特点;观察不同培养体系对第3代(P<sub>3</sub>)CAF生长的影响。结果 酶联合消化法分离培养的细胞1 d后,可见细胞贴壁呈长椭圆形生长,3 d后生长迅速呈长梭形,7 d后细胞排列成单层,连接紧密;HE染色显示细胞长梭形呈螺旋状排列;免疫荧光检测纤维连接蛋白、波形蛋白、盘状结构域受体2表达阳性;P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub>、P<sub>3</sub>细胞生长曲线近似“S”形,WST-8法显示P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub>、P<sub>3</sub>细胞生长于第3天至第5天光密度值变化较明显,增殖迅速;P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub>、P<sub>3</sub> G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>的百分率分别为(56.83 ± 1.72)%、(68.10 ± 1.33)%、(68.23 ± 1.33)%,各代之间G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>的百分率比较差异无统计学意义(P > 0.05);P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub>、P<sub>3</sub> (S + G<sub>2</sub>)/M的百分率分别为(43.17 ± 1.72)%、(31.90 ± 1.33)%、(31.77 ± 1.33)%,各代之间(S + G<sub>2</sub>)/M的百分率比较差异无统计学意义(P > 0.05);杜尔伯克改良伊格/IF12培养基培养的P<sub>3</sub>细胞增殖力明显高于RPMI-1640培养基培养的细胞,差异有统计学意义(P < 0.05)。结论 酶联合消化法可以高效快速分离和稳定培养CAF,为研究犬心房纤维化提供了充足的种子细胞。

**关键词:** 心房肌成纤维细胞;分离;培养;鉴定;酶联合消化法;犬

中图分类号: R392.12 文献标志码: A 文章编号: 1004-7239(2014)02-0081-06

### Combined enzymatic digestion method used on primary culture and biological characteristic identification of atrial fibroblasts of canine

XIAO Bing<sup>1</sup>, DAI Tian-yi<sup>1</sup>, LIU Sa<sup>2</sup>, LUO Tai-yang<sup>1</sup>, LIU Xiao-hui<sup>1</sup>

(1. Department of Cardiac Internal Medicine, Capital Medical University Affiliated to Beijing Anzhen Hospital, Beijing 100029, China; 2. Experimental Center, Beijing Institute of Heart Lung and Blood Vessel Diseases, Beijing 100029, China)

**Abstract:** **Objective** To explore and set up the methodology of isolation, cultivation and identification of canine atrial fibroblasts(CAF) *in vitro*. **Methods** The left auricle of canine was derived from aseptic operation. Atrial fibroblasts were isolated using papain together with type I collagen enzyme and cultured *in vitro*. The growing states of primary atrial fibroblast were observed under the inverted phase-contrast microscope; cellular morphology was observed after hematoxylin-eosin staining; fibroblasts were stained by immunofluorescence with fibronectin, vimentin and discoidin domain receptor 2. The CAF proliferation profile was analyzed by curve of growth and WST-8 assay. Characteristic of DNA cell cycle was analyzed by flow cytometry. The influences of different culture medium on the growth of P<sub>3</sub> fibroblasts were observed. **Results** It was observed oblong cells growing with adherence one day after the atrial fibroblasts isolated and cultured using enzyme digestion method, atrial fibroblasts grew with long fusiform shape quickly after 3 days and the fibroblasts remained monolayer and arranged closely after 7 days; cells arranged a long spindle spiraling after HE staining. The expressions of fibronectin, vimentin and discoidin domain receptor 2 were positive after immunofluorescence staining. The cell growth curves of P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub> were like S-types, cells in the optical density value changed significantly from the third day to the fifth day. The rates of G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase cells of P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub> were (56.83 ± 1.72)%, (68.10 ± 1.33)%, (68.23 ± 1.33)% respectively and there was no variances in cells of P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub> (P > 0.05); the rates of (S + G<sub>2</sub>)/M phase cells of P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub> were (43.17 ± 1.72)%, (31.90 ± 1.33)%, (31.77 ± 1.33)% respectively and there was no variances in cells of P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub> (P > 0.05). The proliferation of P<sub>3</sub> was higher in dulbecco modified

DOI: 10.7683/xyxyxb.2014.02.001

收稿日期: 2013-12-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81170169)

作者简介: 肖冰(1987-),男,河南许昌人,硕士研究生在读,研究方向: 心房颤动机制的研究。

通信作者: 刘小慧(1959-),女,北京人,学士,主任医师,硕士研究生导师,研究方向: 冠状动脉粥样硬化性心脏病及心律失常的基础与临床研究。

eagle/Nutrient Mixture F-12 medium than that in RPMI-1640 medium ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** CAF can be isolated quickly and cultured stably by enzyme digestion method which can supply plenty of seed cells for studying CAF.

**Key words:** atrial fibroblasts; isolation; culture; identification; combined enzymatic digestion method; canine

心房肌成纤维细胞 (atrial fibroblasts, AF) 在心房纤维化中起到了重要作用<sup>[1]</sup>。心房颤动是临床上最常见的快速性心律失常,而心房纤维化是心房颤动患者心脏结构重塑的显著特征<sup>[2-3]</sup>。心房纤维化与心房颤动发生和维持有密切关系,干预心房纤维化将可改善或逆转心房颤动发生的基质。建立一种高效、便捷的 AF 体外培养方法,对心房纤维化的研究将有重要意义。目前,国内已广泛开展鼠类及人心成纤维细胞的原代培养,但是尚未报道对犬 AF (canine AF, CAF) 培养技术的研究。如何建立一种比较简单、快速有效的方法,尽可能地获得较高活力及存活率的细胞,仍是细胞培养的关键。本研究借鉴国内外的技术方法<sup>[4]</sup>,并加以改进,摸索出一种简便、可靠、稳定的方法,即应用 I 型胶原酶和木瓜蛋白酶联合消化酶分离 CAF,培养出纯度较高、活力较强的 CAF,为进一步阐明心房纤维化与心房颤动发病机制,提供了较理想的靶细胞模型,并为今后临床治疗工作提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 犬,雄性,杂交后代,出生 15 ~ 18 个月,体质量 20 ~ 30 kg,来源于北京海淀区兴隆实验养殖场 [SCXK(京) 2006-0007]。无菌手术在北京大学第一医院动物实验手术室进行 [SYXK(京) 2009-0013]。

**1.1.2 主要试剂** 杜尔伯克改良伊格尔/F12 培养基 (dulbecco modified eagle/nutrient mixture F-12 medium, DMEM/F12, 1:1)、RPMI-1640 培养基、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、青霉素、链霉素均为美国 Gibco 公司产品, I 型胶原酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、牛血清白蛋白 (bovine serum albumin fraction V, BSA) 均为美国 Sigma 公司产品。2-(2-甲氧基-4-硝基苯基)-3-(4-硝基苯基)-5-(2,4-二硝基苯)-2H-四唑单钠盐 (water soluble tetrazolium-8, WST-8) 为北京纽因华信科技发展有限公司产品,兔抗小鼠纤维连接蛋白 (fibronectin, FN) 为美国 ABCAM 公司产品,异硫氰酸罗丹明 (tetraethyl rhodamine isothiocyanate, TRITC) 标记羊抗兔 IgG (二抗) 为美国 Jackson 公司产品,波形蛋白兔抗小鼠 vimentin (一抗) 为美国 Santa Cruz 公司产品,兔抗小鼠盘状结构域受体 2 (discoidin domain receptor 2, DDR2) 为美国 ABCAM

公司产品,羊抗鼠  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA) 和 TRITC 标记兔抗羊二抗均为美国 Santa Cruz 公司。

**1.1.3 主要仪器** 荧光倒置显微镜 (德国 Leica 公司 4000B 型)、荧光正置显微镜 (日本 Nikon 公司 NI-E)、CO<sub>2</sub> 细胞培养箱 (美国热电公司产品)、酶标检测仪 (德国 Beckman 公司)、超净工作台 (北京昌平长城净化空气仪器厂)、离心机 (上海安亭科学仪器厂 TGL-16C)。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 取材** 以质量分数 5% 戊巴比妥钠后肢静脉注射麻醉犬,并行气管插管及机械通气。由第 4 肋间处开胸,逐层分离皮肤、皮下组织、肌肉、胸膜等,打开心包,暴露左心耳,缝线结扎左心耳后剪取左心耳组织 1.0 cm × 1.0 cm × 1.0 cm,加质量分数 2% 抗生素 (青霉素和链霉素) 浸泡。

#### 1.2.2 联合酶消化分离 CAF

**1.2.2.1 实验前配制酶联合消化液** 二硫苏糖醇 (DL-dithiothreitol, DTT) 0.15 mg, BSA 2 mg, I 型胶原酶 8.6 mg, 木瓜蛋白酶 0.2 mg 溶于 1 mL D-Hank 平衡盐缓冲液。

**1.2.2.2 联合酶消化组织法** 将心耳组织剪成小碎块,放入 50 mL 离心管中,再加入酶联合消化液,为组织块体积的 5 ~ 10 倍。置于 37 °C 水浴摇床, 100 r · min<sup>-1</sup> 消化,每 10 ~ 15 min 观察 1 次并轻轻摇动,消化时间约 30 min,待组织碎块消化成絮状物时,以 1 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 7 min,弃去上清液。加入 3 mL 含有体积分数 10% FBS DMEM/F12 培养液,充分吹打混匀后置于 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶,于体积分数 5% CO<sub>2</sub>、体积分数 95% 空气、37 °C 饱和湿度条件下培养。每隔 1 d 换液 1 次。

**1.2.3 CAF 传代及纯化** CAF 生长成致密单层后,用 2.5 g · L<sup>-1</sup> 胰蛋白酶消化,待大部分细胞变圆时,加体积分数 10% FBS DMEM/F12 完全培养基终止消化,反复轻轻吹打,1:3 传代。

#### 1.2.4 CAF 细胞形态学观察

**1.2.4.1 倒置光学显微镜观察** 倒置光学显微镜观察 CAF 生长状态、形态学变化。

**1.2.4.2 苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色观察** 取第 3 代 (P<sub>3</sub>) CAF 以 1 × 10<sup>5</sup> 个接种于放有无菌盖玻片的 24 孔板,2 ~ 3 d 后用 0.01 mmol · L<sup>-1</sup> 磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffered solution, PBS)

洗3次,每次2 min; 40 g · L<sup>-1</sup>多聚甲醛固定20 min 0.01 mmol · L<sup>-1</sup> PBS洗3次,每次2 min; 苏木精染色2~5 min,水洗2 min; 质量分数0.5%盐酸分化至细胞核染色清晰,水洗,并浸于水中至核变蓝;伊红液染色1~2 min,水洗2 min; 体积分数80%乙醇浸洗1 min,体积分数90%乙醇、无水乙醇浸洗1 min;二甲苯浸洗5 min,取出盖玻片后中性树脂封片并在显微镜下观察。

**1.2.5 CAF免疫荧光法鉴定** 取P<sub>3</sub> CAF以2 × 10<sup>5</sup>个接种于放有无菌盖玻片的24孔板,3 d后取出爬片,PBS洗3次;40 g · L<sup>-1</sup>多聚甲醛固定60 min,PBS洗3次;2 g · L<sup>-1</sup> Triton X-100室温封闭1 h,PBS洗3次;200 μL FBS室温封闭2 h,弃去;分别滴加1:100稀释200 μL兔抗鼠vimentin及羊抗鼠α-SMA一抗,4℃过夜,PBS洗3次;分别滴加200 μL 1:100 FITC标记的羊抗兔IgG及兔抗羊IgG二抗,室温避光孵育1 h,PBS洗3次;4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole,DAPI)染核,室温避光孵育15 min;同时做同型对照,不加一抗,余步骤同前,在荧光显微镜下观察,统计阳性细胞数。

**1.2.6 CAF生长曲线的测定** 获得的P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub>、P<sub>3</sub>细胞,按2 × 10<sup>7</sup> L<sup>-1</sup>接种于24孔培养板,每孔接种1 mL。从接种时间算起,每隔24 h计数3孔内的细胞密度,算出平均值,共记7 d。以培养时间为横坐标,细胞密度为纵坐标作生长曲线。

**1.2.7 WST-8测定CAF增殖活力** 取P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub>、P<sub>3</sub>处于生长期的细胞,以每孔约2 × 10<sup>4</sup>个细胞等量接种于96孔板中,每孔加入100 μL培养液,置37℃、体积分数5% CO<sub>2</sub>细胞培养箱内孵育。每24 h向其中5孔加入10 μL的WST-8溶液,置于37℃、体积分数5% CO<sub>2</sub>孵育3 h后,用酶标仪在450 nm波长处测定各孔的光密度值(A<sub>450</sub>),每日测5孔,连续测7 d。设立平行对照孔(加入培养液,不加细胞)并调零,测定细胞增殖及存活能力。

**1.2.8 CAF周期的测定** 获得达到70%~80%融合的P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub>、P<sub>3</sub>细胞,消化、洗涤并计数2 × 10<sup>8</sup> L<sup>-1</sup>,体积分数70%冰乙醇固定24 h后,PBS洗涤2次,加200 μL RNaseA(1 g · L<sup>-1</sup>) 37℃水浴30 min,再加PI染色液(50 mg · L<sup>-1</sup>)避光反应30 min,BDFACS Calibur流式细胞仪检测,Multicycle软件分析。

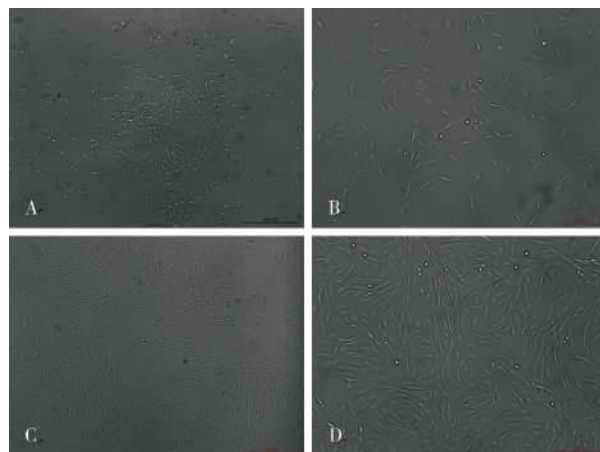
**1.2.9 不同培养体系对P<sub>3</sub>细胞生长速度的影响** 获得的P<sub>3</sub> CAF以每孔2 × 10<sup>4</sup>个细胞等量接种于96孔板中,3孔均加入100 μL体积分数10% FBS DMEM/F12培养基,另3孔均加入100 μL体积分数10% FBS RPMI-1640培养基,置体积分数5% CO<sub>2</sub>、

37℃细胞培养箱内孵育,每隔1 d向其中6孔各加入10 μL的WST-8溶液,设立平行对照孔调零,孵育4 h后,用酶标仪在450 nm波长处测定各孔的光密度值(A<sub>450</sub>),连续7 d测定不同培养基对CAF增殖能力的影响。

**1.3 统计学处理** 应用SPSS 11.0统计软件进行统计学分析,计量资料以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,2组间比较采用t检验,多组间比较采用方差分析,P < 0.05为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 酶消化法分离培养CAF** 用联合消化酶消化组织块,可以得到较多的单个游离细胞,接种到培养皿里,24 h后可贴壁,3 d后形状由圆形逐渐变成长梭形,向四周伸展(图1A、1B);4 d后细胞已开始生长,且分布均匀;第7天,贴壁的细胞不断生长,细胞排列成单层,细胞生长形状变得不规则,相互之间紧密相连(图1C、1D),铺满平皿底部就可传代,此后每隔3~5 d传代1次。细胞呈贴壁样生长,在光镜下透亮,胞体呈梭形,尾足极长。长满瓶壁后细胞相互致密融合,细胞间几无空隙。



A: 第3天(×50); B: 第3天(×100); C: 第7天(×50); D: 第7天(×100)。

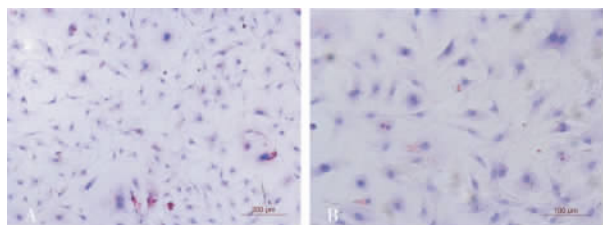
图1 酶消化法培养的原代CAF

Fig. 1 Primary CAF cultured enzymatic digestion method

**2.2 HE染色观察CAF** P<sub>3</sub> CAF HE染色结果观察到细胞呈梭形生长,细胞核较大,细胞质较多,着粉红色,细胞质近中央处有圆形或椭圆形的细胞核,细胞核着蓝紫色,当细胞密度较大,达到80%~90%融合时,细胞互相平行排列,生长区域呈漩涡状,细胞界限清楚(图2)。

**2.3 CAF特异性标记染色** P<sub>3</sub> CAF在荧光显微镜下观察FN、波形蛋白、DDR2荧光染色阳性率分别为(91.2 ± 5.6)%、(86.7 ± 2.5)%和(82.3 ± 2.8)% α-SMA阴性表达(图3)。

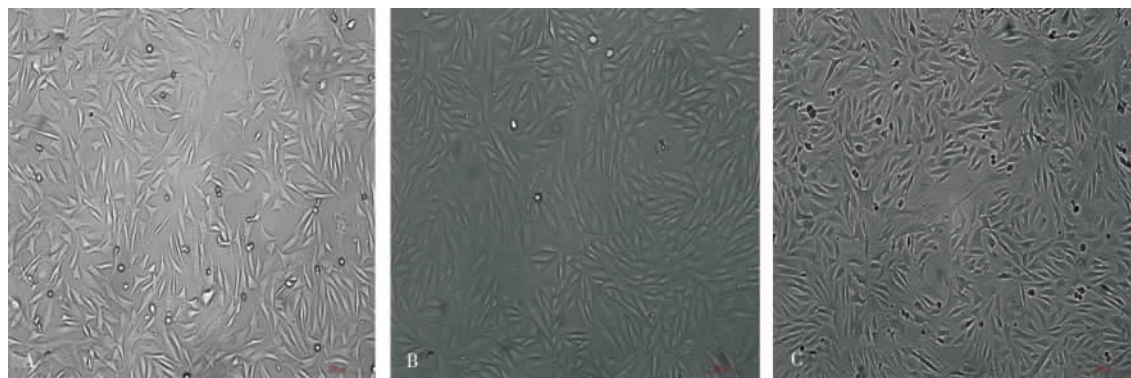
**2.4 CAF 传代及纯化特点** 细胞生长至 70% ~ 80% 即可传代,质量分数 0.25% 胰蛋白酶消化后,细胞呈单个,亮而圆,1 d 后,细胞贴壁,单层生长,呈散在的长梭形,3 d 后细胞呈密集单层生长,有细胞集落出现,融合率约为 80%,可形成致密的单层;细胞体外培养时,从细胞开始生长 3 ~ 5 d 传代 1 次。分别记为  $P_1$ 、 $P_2$ 、 $P_3$  细胞(图 4),细胞呈长梭形生长,排列规则。



A:  $\times 100$ ; B:  $\times 200$ 。

图 2  $P_3$  CAF HE 染色

Fig. 2 HE staining of CAF in  $P_3$



A:  $P_1$ ; B:  $P_2$ ; C:  $P_3$ 。

图 4  $P_1$ 、 $P_2$ 、 $P_3$  CAF ( $\times 100$ )

Fig. 4 CAF of  $P_1$ ,  $P_2$  and  $P_3$  ( $\times 100$ )

**2.5 CAF 生长曲线** 7 d 连续测定的  $P_1$ 、 $P_2$ 、 $P_3$  生长曲线显示,接种 24 h 后,细胞数明显增加,2 ~ 5 d 为对数生长期,5 d 后细胞数量减少,细胞呈现“潜伏期-对数生长期-平台期”的生长模式,细胞生长曲线近似“S”形(图 5)。

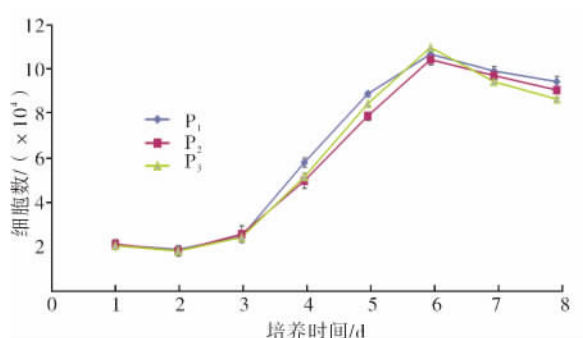
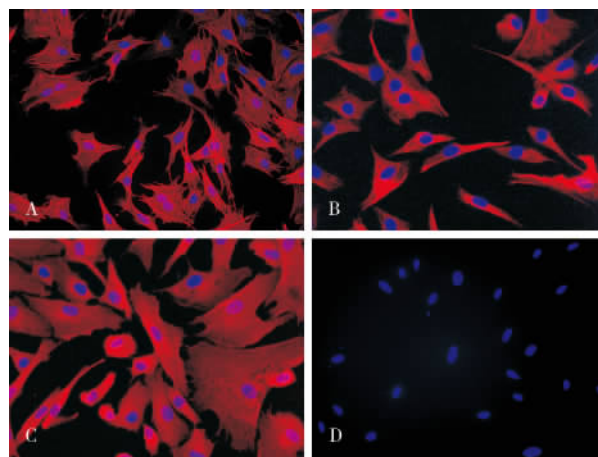


图 5  $P_1$ 、 $P_2$ 、 $P_3$  CAF 生长曲线

Fig. 5 Growth curves of CAF in  $P_1$ ,  $P_2$  and  $P_3$

**2.6 WST-8 法测定增殖活力** 结果见表 1。 $P_1$ 、 $P_2$



A: FN; B: 波形蛋白; C: DDR2; D:  $\alpha$ -SMA。

图 3  $P_3$  CAF 免疫荧光鉴定 ( $\times 400$ )

Fig. 3 Immunofluorescence identification of CAF in  $P_3$  ( $\times 400$ )

与  $P_3$  比较,CAF 生长前 2 d 无明显增殖,提示此段时间内细胞增殖能力较弱;3 ~ 5 d 变化比较 2 d 显著,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),提示此段时间内细胞出现增殖;6 ~ 7 d 变化与 3 ~ 5 d 比较,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),提示此段时间内细胞出现衰老,与 CAF 生长曲线结果相一致,故认为培养的 CAF 于第 3 天至第 5 天传代为最佳时机。

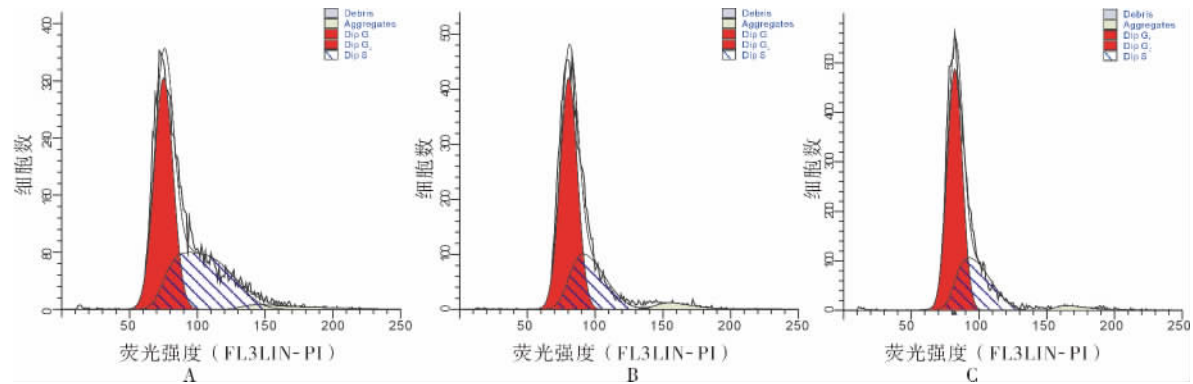
**2.7 CAF 周期分析** 流式细胞检测显示,  $P_1$ 、 $P_2$ 、 $P_3$   $G_0/G_1$  的百分率分别为 ( $56.83 \pm 1.72$ ) %、( $68.10 \pm 1.33$ ) %、( $68.23 \pm 1.33$ ) % (图 6),各代之间  $G_0/G_1$  的百分率比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ );  $P_1$ 、 $P_2$ 、 $P_3$  ( $S + G_2$ ) /M 的百分率分别为 ( $43.17 \pm 1.72$ ) %、( $31.90 \pm 1.33$ ) %、( $31.77 \pm 1.33$ ) %,各代之间比较 ( $S + G_2$ ) /M 的百分率比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。但各代  $G_0/G_1$  的百分率显著高于 ( $S + G_2$ ) /M 的百分率,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。



表 1 P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub>、P<sub>3</sub> CAF 增殖活力测定

Tab. 1 Vitality test of CAF in P <sub>1</sub> P <sub>2</sub> P <sub>3</sub> <span style="float:right">(x̄ ± s n=3)</span>							
不同代次	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天	第 7 天
P <sub>1</sub>	1.862 ± 0.186	2.124 ± 0.211	2.298 ± 0.117 <sup>a</sup>	2.639 ± 0.196 <sup>a</sup>	2.409 ± 0.154 <sup>a</sup>	2.056 ± 0.242	1.964 ± 0.192
P <sub>2</sub>	1.824 ± 0.167	1.927 ± 0.141	2.264 ± 0.196 <sup>a</sup>	2.631 ± 0.266 <sup>a</sup>	2.415 ± 0.174 <sup>a</sup>	2.017 ± 0.227	1.957 ± 0.214
P <sub>3</sub>	1.803 ± 0.203	1.813 ± 0.118	2.123 ± 0.281 <sup>a</sup>	2.594 ± 0.216 <sup>a</sup>	2.434 ± 0.176 <sup>a</sup>	2.056 ± 0.115	1.878 ± 0.221

注:与同代第 1、2、6、7 天比较<sup>a</sup>P<0.05。



A: P<sub>1</sub> 细胞 DNA 周期; B: P<sub>2</sub> 细胞 DNA 周期; C: P<sub>3</sub> 细胞 DNA 周期。

图 6 P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub>、P<sub>3</sub> CAF 的细胞周期分析

Fig. 6 Cell DNA cycle analysis of P<sub>1</sub> P<sub>2</sub> P<sub>3</sub> CAF

2.8 不同培养体系对 P<sub>3</sub> CAF 细胞生长速度的影响 结果见表 2。比较 2 种培养基培养的 P<sub>3</sub> CAF 增殖能力,连续 7 d 测定吸光度值(A<sub>450</sub>)。DMEM/F12 组第 1 天至第 2 天光密度值变化较小;第 3 天至第 5 天与前 2 d 比较差异有统计学意义(P<0.05),提示此段时间内细胞迅速增殖;第 6 天至第 7 天光密度值明显下降,差异有统计学意义(P<0.05),提示细胞增殖能力减弱。RPMI-1640 组第 1

表 2 不同培养体系培养 CAF 活力测定

Tab. 2 Vitality test of CAF in different cultivation system <span style="float:right">(x̄ ± s n=3)</span>							
不同培养基(A <sub>450</sub> )	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天	第 7 天
DMEM/F12 组	1.288 ± 0.104	1.417 ± 0.976	1.913 ± 0.116 <sup>a</sup>	2.339 ± 0.131 <sup>a</sup>	2.762 ± 0.467 <sup>a</sup>	1.724 ± 0.015	1.658 ± 0.755
RPMI-1640 组	1.196 ± 0.121	1.243 ± 0.237	1.374 ± 0.588	1.763 ± 0.541	1.818 ± 0.104	1.453 ± 0.083	1.443 ± 0.237

注:与 RPMI-1640 组比较<sup>a</sup>P<0.05。

### 3 讨论

心脏成纤维细胞约占正常心肌组织细胞总数的 60%~70%,包绕心肌细胞,连接心肌细胞间质,其与心脏发育、结构、细胞信号系统、电机械功能等密切相关<sup>[5-6]</sup>。近年来研究显示成纤维细胞参与了高血压左心室肥厚、缺血性心脏病、扩张型心肌病、充血性心力衰竭等许多心血管疾病的病理过程,在心房颤动的发生和维持及心房纤维化过程中发挥着重要作用<sup>[7-8]</sup>。绝大多数实验室采用动物心室组织作为组织来源,而本研究首次采用犬左心耳分离培养成纤维细胞。由于心耳组织承受的机械刺激较心室肌小,从生物学角度推测心耳组织中有可能存在未进

入终末分化期且具有潜在增殖再生能力的组织细胞<sup>[9]</sup>。目前,犬慢性心房颤动模型作为研究心房颤动机制较好的动物模型,利用犬心耳组织分离培养 AF 对于研究心脏纤维化及心房颤动机制有重要的意义。

心肌成纤维细胞的组织块贴壁细胞培养法所需的时间较长,上皮细胞和成纤维细胞同时出现,混杂生长。本研究应用 I 型胶原酶和木瓜蛋白酶联合消化法,胶原酶特异作用于结缔组织的胶原,减轻了对细胞的损伤程度,更使其内的细胞容易迁出<sup>[10]</sup>;而木瓜蛋白酶是一种半胱氨酸蛋白酶,使细胞更容易游离出组织,为了维持酶的稳定性及活性,在联合酶消化液中加入 DTT,可用于阻止蛋白质中的半胱氨

酸之间所形成的蛋白质分子内或分子间二硫键,能够保护正常晶体蛋白所含的半胱氨酸等成分不受氧化修饰,减少其变性可能性;加入 BSA 辅助于稳定酶的活性,防止酶失活。本研究利用 I 型胶原酶与木瓜蛋白酶联合消化酶并添加 DTT 及 BSA 辅助试剂,可获得数量较多的细胞,且减轻了对细胞的损伤程度,细胞接种后活力好,生长增殖能力较强,建立细胞系所需的时间相对短一些,细胞产量高。本研究中,采用酶联合消化法代替单一酶消化法获得数量较多、活力较强的 AF。

CAF 在体外培养时呈多形性贴壁、类层状伸展趋势,有 1 或 2 个椭圆形核仁特征。在细胞形态学鉴定的前提下, FN 是一种糖蛋白,是由相对分子质量约  $2 \times 10^5$  的 2 个亚基所组成的二聚体,亚基之间以二硫键相连。细胞型 FN 主要由成纤维细胞合成,为不溶性,可根据抗 FN 表达阳性来鉴定心肌成纤维细胞。抗波形蛋白抗体是一种可靠的成纤维细胞标志物,是间质细胞中最主要的中间纤维,它存在于中胚层起源的细胞中,并与微管、微丝共同形成了一个细胞支架网络而维持细胞完整性,可以根据其阳性表达鉴定心肌成纤维细胞<sup>[11]</sup>;另一种特异性标志物是 DDR2。DDR 是一种新的受体酪氨酸激酶,能介导纤维性胶原对细胞的作用,DDR2 在大鼠和小鼠的心脏均有表达<sup>[12-13]</sup>。实验表明可根据抗 FN、波形蛋白、DDR2 表达阳性来鉴定 CAF。

本研究通过细胞计数法绘制细胞生长曲线,结果显示  $P_1$ 、 $P_2$ 、 $P_3$  CAF 生长曲线近似“S”形;2~5 d 为对数生长期,可用于实验研究;用 WST-8 法检测细胞增殖结果显示,光密度值( $A_{450}$ ) 在细胞传代后 3~5 d 变化较快,表明此时间内 CAF 增殖活力较高;细胞周期内有 2 个阶段最为重要<sup>[14]</sup>:  $G_1$  到 S 和  $G_2$  到 M;从光学显微镜下可看到  $G_1$  期细胞最小,细胞扁平而光滑,随着向  $S \rightarrow G_2 \rightarrow M$  期的发展细胞逐渐增大,从扁平变成球形,本研究体外培养的 CAF 70% 处于  $G_0/G_1$  期,只有接近 30% 的细胞处于( $S + G_2$ )/M 期,提示细胞具有较强的增殖能力,体外传代培养的细胞增殖潜力基本一致。DMEM/F12 组测得的细胞增殖活力明显高于 RPMI 1640 组,可见 DMEM/F12 更有利于 CAF 体外增殖。

综上所述,本实验首次建立了 I 型胶原酶和木瓜蛋白酶联合消化原代培养 CAF 的方法,为心房颤

动心脏纤维化的体外研究提供大量种子细胞,从细胞分子水平研究心脏疾病病因、机制和防治提供实验基础。

#### 参考文献:

- [1] Dawson K, Wu C T, Qi X Y *et al.* Congestive heart failure effects on atrial fibroblast phenotype: differences between freshly-isolated and cultured cells [J]. *PLoS One* 2012, 7(12): e52032.
- [2] Jalife J. Mechanisms of persistent atrial fibrillation [J]. *Curr Opin Cardiol* 2014, 29(1): 20-27.
- [3] Burstein B, Qi X Y, Yeh Y H *et al.* Atrial cardiomyocyte tachycardia alters cardiac fibroblast function: a novel consideration in atrial remodeling [J]. *Cardiovasc Res* 2007, 76(3): 442-452.
- [4] 辛毅, 许秀芳, 黄益民, 等. 乳小鼠心肌成纤维细胞和心肌细胞的分离培养及荧光鉴定 [J]. 新乡医学院学报, 2011, 28(5): 541-547.
- [5] Harada M, Luo X, Qi X Y *et al.* Transient receptor potential canonical-3 channel-dependent fibroblast regulation in atrial fibrillation [J]. *Circulation* 2012, 126(17): 2051-2064.
- [6] Parthasarathy A, Gopi V, Umadevi S *et al.* Suppression of atrial natriuretic peptide/natriuretic peptide receptor-A-mediated signaling upregulates angiotensin-II-induced collagen synthesis in adult cardiac fibroblasts [J]. *Mol Cell Biochem* 2013, 378(1/2): 217-228.
- [7] Xie X, Liu Y, Gao S *et al.* Possible involvement of fibrocytes in atrial fibrosis in patients with chronic atrial fibrillation [J]. *Circ J*, 2013, [Epub ahead of print].
- [8] 郭金蕾, 贾岩岩, 陈少锐, 等. 心脏成纤维细胞及其参与心房颤动发生的研究进展 [J]. 心血管病学进展, 2013, 34(3): 360-363.
- [9] 张建成, 黄宇坚. 人心房成纤维细胞体外组织块贴壁培养与鉴定 [J]. 莆田学院学报, 2010, 17(2): 40-42.
- [10] Kim K H, Kim T G, Bruce K *et al.* Dynamic expression patterns of leucine-rich repeat containing protein 10 in the heart [J]. *Dev Dyn* 2007, 236(8): 2225-2234.
- [11] 杨波, 谭利国, 张蕾, 等. PEP-4-SOD1 融合蛋白抑制血管紧张素 II 诱导的大鼠心脏成纤维细胞 I 型胶原的合成 [J]. 新乡医学院学报, 2013, 30(8): 613-618.
- [12] Camelliti P, Green C R, LeGrice L *et al.* Fibroblast network in rabbit sinoatrial node: structural and functional identification of homogeneous and heterogeneous cell coupling [J]. *Circ Res*, 2004, 94(6): 828-835.
- [13] Goldsmith E C, Hoffman A, Morales M O *et al.* Organization of fibroblasts in the heart [J]. *Dev Dyn* 2004, 230(4): 787-794.
- [14] 刘飒, 崔巍, 王晓波, 等. 流式细胞术检测细胞周期分析软件比较 [J]. 新乡医学院学报, 2012, 29(11): 870-873.

(本文编辑: 徐刚珍 英文编辑: 杨 博)