

乳鼠窦房结细胞分离纯化及鉴定研究进展

汪艳丽 刘如秀

窦房结(sinoatrial node, SAN)是心脏的正常起搏点,是心脏传导系统的重要组成部分,正常的窦房结功能是心脏泵功能得以实现的先决条件。对窦房结进行基础研究,尤其从细胞水平进行研究,可进一步了解窦房结功能损伤的机制,为治疗提供更好的手段。在最初 SAN 形态与功能的研究中,所用材料主要是在体组织、立体小标本及微小标本,相继有细胞团或单细胞,窦房结细胞数量有限,也不能传代,且传代后细胞活力大大减弱^[1]。在对窦房结单细胞作直接电生理和药理学研究时,体外培养的窦房结单细胞被认为是较前述更为理想的材料。纵观近年来,国内外学者对窦房结的解剖位置、形态结构及细胞分离鉴定技术等研究报道很多,但受研究方法的限制,有关 SAN 的大部分实验尚停留在整体、器官、组织水平,细胞水平的研究报道却较少,尤其对乳鼠窦房结的上述研究相对更加局限。现对国内外近年来对乳鼠窦房结细胞(sinoatrial node cell, SNC)分离和鉴定技术相关研究进展做以如下综述。

早在 1984 年,Marvin 等^[2]曾做了乳鼠 SNC 的分离及电生理鉴定的尝试,而少有开展 SNC 培养技术,可能是由于 SAN 的位置、大小、构造在不同动物之间有较大差异,且又有增龄性变化,给准确取材带来一定困难,还可能由于对窦房结组织细胞光、电镜研究尚未有成熟、完整的资料,使对培养细胞的形态学鉴定无统一的参照标准^[3]。另外 SNC 分离纯化和鉴定方法的不够成熟,成为研究 SNC 的主要障碍,所以乳鼠 SNC 的分离纯化和鉴定成为研究 SNC 的关键所在。

一、SAN 解剖形态及细胞分类

SAN 位于前腔静脉根部,腔静脉窦与右心房交界处的界沟上端,结的长轴与界沟平行,其位置有个体差异。大鼠的窦房结位置靠后,偏于静脉窦侧,大

多数位于界嵴静脉窦侧的心外膜下(83.3%)。结的上端在腔耳角下方,下端终止于界嵴中部。窦房结中心部位较粗大,两端逐渐变细,略呈梭形^[4,5]。SAN 内的心肌细胞有特殊心肌细胞和普通心肌细胞两种,特殊心肌细胞指 P 细胞(形态学上又称“结细胞”,生理学上常称为“起搏细胞”)、T 细胞(又称过渡细胞或移行细胞);普通心肌细胞指心房肌细胞。P 细胞位于 SAN 中央部,在 SNC 总数中占很少的比例,需要综合形态学和细胞电生理学资料才有可能对研究对象是否是真正的 P 细胞做出判断,但在 SAN 起搏活动中却起着重要的作用^[6,7]。因而窦房结 P 细胞的分离和鉴定,在研究 SAN 起搏活动中具有特殊的重要性。Marvin 等^[2]认为培养的乳鼠 SNC 是一种体积小、搏动频率快(185 ± 8 次/分)的梭形细胞。宋治远等^[7]在对培养细胞进行电生理检测时发现,其梭形细胞动作电位的特性与 DiFrancesco 等对分离的窦房结单细胞的记录结果相似^[8]。故认为培养的 SNC 中的梭形细胞就是窦房结起搏细胞。

二、SAN 区的定位(界限)、取材方法

乳鼠 SAN 区的准确定位、取材,是进行 SNC 培养的关键步骤之一,因为取材、定位是否准确,将直接影响培养细胞中 SNC 所占的比例。报道较多的是从兔 SAN 分离 P 细胞,而从大鼠尤其是乳鼠 SAN 中分离 P 细胞的报道相对较少^[9,10]。李澈等^[11]对 SAN 的解剖法如下:于大血管进出心包处切断血管,取出心脏。在静脉窦的后壁沿上、下腔静脉通道走向剪开。然后以剪刀在界沟左下方,与其平行相距 1.0~1.5cm 处剪开,超过右心耳嵴直至其背后,取下一块含有上腔静脉、下腔静脉、静脉窦及右心房、右心耳的上半部组织。纵观近年来有关乳鼠窦房结细胞分离文献发现,乳鼠窦房结取材时的定位范围大致相同,均为于界嵴中部静脉窦侧、前腔静脉根部剪取约 0.7~1.0mm 立方的组织块分离培养窦房结细胞,结果显示所培养的细胞中梭形细胞所占比例均 >60%,与国外文献报道相似,说明取材方法较合理^[2,12~17]。但魏益平等^[15]在定位取材时方法上有所改进,值得后来学者借鉴,

基金项目:北京市自然科学基金资助项目(7102135)

作者单位:100053 北京,中国中医科学院广安门医院心内科

通讯作者:刘如秀,主任医师,博士后指导教师,电子信箱:liurux-

iu1@yahoo.com.cn

他们在 1×12.5 倍解剖显微镜下分别于取 SAN 组织前、后用数码摄像机录像 30s。将录像在计算机上播放,常速播放计数心率,用慢镜头速播放观察心脏起搏点和搏动顺序,并比较切除窦房结组织前、后心室率的变化。于界嵴中部静脉窦侧、前腔静脉根部取 $0.5\text{mm} \times 0.6\text{mm} \times 0.7\text{mm}$ 大小的组织块。术中用显微录像技术,用慢动作放映定位心脏最先搏动的位置可在功能方面确保取材的准确性。通过比较切除 SAN 区前后心率变化以确保窦房结区组织被完全切取。他们在解剖显微镜下用显微手术技术准确切取窦房结组织,避免了过多切取普通心肌细胞以提高 SNC 中起搏细胞比例。无论哪种取材方法,因在实验中未能获取乳鼠 SAN 的具体直径,故而在实际取材中,所取组织边缘不可避免会附带一些上腔静脉和右心耳壁组织,但由于这些细胞所占比例少,对实验结果影响不大,故有时可忽略不计。

三、SNC 的分离、培养与提纯

有关窦房结细胞的分离技术,在国内外研究中,急性分离比较多:多采用成年兔或大鼠为研究对象,运用灌流方式分离窦房结细胞进行研究。而采用乳鼠为研究对象,进行原代分离和培养窦房结细胞的研究相对较多,多采用酶解法分离乳鼠窦房结细胞。各研究者对乳鼠 SNC 分离所用的消化酶、酶作用时间、培养基的选用及具体方法略有不同,但基本原则一致。多将取完的组织块用培养基冲洗后,用浓度为 $0.06\% \sim 0.10\%$ 不等的胰蛋白酶,有的加 0.025% 胶原酶或 0.02% EDTA, 37°C 水浴消化 $5 \sim 8\text{min}$ 不等,第一次消化后弃去上清液,有效清除组织块中混有的杂质,之后的消化取上清液即为细胞悬液,多数研究者采用浓度为 0.08% 的胰蛋白酶。消化后的细胞悬液用等倍含血清的培养基终止消化,过滤后离心、重悬,得到的细胞悬液用含 $10\% \sim 20\%$ 不等的胎牛血清或者新生牛血清的 DMEM 培养基,有的用 1640 培养基,多数研究者采用含 15% 胎牛血清的 DMEM 进行培养^[2, 7, 12-18]。在酶作用的同时,还要随时观察 SAN 组织松散及羽毛状变化的程度,以决定何时终止酶解作用。并且对于不同基础研究,对细胞的要求也不同,例如用于细胞内细胞凋亡或钙离子浓度实验分离的 SNC,不一定适用于膜片钳实验,因为膜片钳实验对所分离细胞膜的状态要求比较高。总之,在遵循各种酶的作用特性,摸索出一个适合各自实验的窦房结细胞分离方法是比较关键的。在进行窦房结细胞培养时,会使培养的窦房结细胞中含有大

量的杂细胞,从而影响实验的可靠性。因此,如何去除杂质细胞、提高窦房结细胞的纯度也至关重要。

已有研究表明,在心肌细胞常规原代培养过程中,因非心肌细胞(主要是成纤维细胞)生长速度快而心肌细胞生长偏慢,非心肌细胞的数量很快会超过心肌细胞,使培养细胞中混杂有大量的非心肌细胞,从而影响心肌细胞培养模型的可靠性。成纤维细胞与心肌细胞相比,其贴壁过程快,大部分成纤维细胞能在短时间内(约 $30 \sim 60\text{min}$)完成贴壁过程;而心肌细胞在时间内不附着或附着不稳定,稍加震荡即浮起,利用此差别可纯化培养细胞。5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-BrdU)可通过竞争取代胸腺嘧啶脱氧核苷,抑制 DNA 复制,显著抑制培养骨骼肌与心肌细胞中的成纤维细胞生长^[18],且对心肌细胞无毒性抑制作用,可使培养细胞中心肌细胞所占比例从 $45\% \sim 50\%$ 提高到 $85\% \sim 90\%$ 。因此,借鉴普通心肌细胞纯化培养方法,为了提高窦房结细胞的纯度,多数研究者在实验中也采用差速贴壁分离技术结合用 5-BrdU(终浓度为 0.1mmol/L)处理方法进行纯化窦房结细胞,可显著提高窦房结细胞比例。很多学者运用此方法可大大减少成纤维细胞,使所培养的窦房结细胞更具有应用价值。综上所述,差速贴壁分离结合 5-BrdU 处理的纯化培养技术是目前培养窦房结细胞的较好方法,虽然该方法不能将取材时附带的心房肌细胞从培养的窦房结细胞中分离出来,但能有效减少培养窦房结细胞中非心肌细胞比例,显著提高培养细胞中窦房结细胞的纯度。

四、SNC 的鉴定

窦房结细胞的鉴定主要从形态学及电生理学两方面进行

1. 形态学鉴定:目前主要根据光镜下活细胞观察、细胞化学染色、免疫染色观察、电镜下细胞亚微结构观察等方法来鉴定。光镜下,鼠窦房结与其他动物的最大不同是结构排列疏松^[2, 13-15];高倍镜下观察窦房结细胞较心房、室肌细胞小,横径 $5 \sim 12\mu\text{m}$,纵径 $15 \sim 30\mu\text{m}$,密而均匀,胞质淡染,具有自律活动,细胞多呈梭形或圆形,核中等偏大而圆,细胞核/胞质比例约 $1/2$,位于胞体中央,基本看不到横纹。刚接种时,细胞多为清亮的圆形,差速贴壁培养 36h 后,可见有细胞搏动,频率不一,多数细胞为小的梭形。3 天后主要有梭形、三角形和多边形 3 种形态。梭形细胞数目最多,达 $(65 \pm 4)\%$,体积较三角形细胞小。梭形细胞最多,所占比例达 60% 左右。故多数认为

窦房结细胞为体积较小的梭形细胞。电镜下 P 细胞多单个存在或少量成群^[14]。幼鼠窦房结的 P 细胞和 T 细胞细胞内存在类似心房间细胞的圆形电子致密颗粒。核仁明显,线粒体少,内质网、高尔基复合体不发达,糖原颗粒不丰富,肌原纤维不发达,仅见微量成束肌微丝于核周散在分布,无肌节,未见电子致密颗粒。

2. 电生理学鉴定:目前常用镜下记录细胞搏动频率和电流钳、电压钳等技术记录窦房结细胞的动作电位及特异性电流等加以鉴定。Marvin 等^[2]、刘如秀等^[13]、管思彬等^[14]记录到所培养的乳鼠 SNC 中梭形细胞搏动频率范围为 155 ~ 185 次/分。多数认为窦房结细胞是体积小、搏动频率快的梭形细胞。窦房结细胞动作电位 (action potential, AP) 形态与工作心肌细胞的具有显著不同,窦房结细胞具有特异性的舒张期自动去极化, Ivabradine (If 电流阻断剂) 能延长动作电位时程,但并不改变其特征, If 是一种超极化激活的内向电流,其激活的程度决定舒张期去极化的速率,因此决定动作电位的产生^[3]。Verkerk 等记录到梭形的具有规律性收缩活动的窦房结细胞的自发性动作电位,其最大舒张点位为 $-63.5 \pm 1.7 \text{ mV}$, 最大上升速率为 $6.6 \pm 1.1 \text{ V/s}$, 动作电位幅值 (action potential amplitude, APA) 约为 75 ~ 80 mV。

曾英明等记录到典型 P 细胞动作电位,最大舒张电位在 $-60 \sim -40 \text{ mV}$ 之间,平均为 -55 mV 。AP 总幅度平均 58 mV,很少达到 70 mV。Song 等^[7]用电流钳技术通过全细胞记录模式记录了培养窦房结细胞中梭形细胞的动作电位,其动作电位有舒张期自动去极化。平均最大舒张电位为 $-50.9 \pm 4.8 \text{ mV}$, AP 幅度为 $62.9 \pm 5.0 \text{ mV}$ 。

五、展 望

成功分离培养乳鼠 SNC 是进一步研究的基础,然而不同实验对细胞要求不尽相同,因此,制备适合于不同实验的合适细胞标本是非常重要的,也是比较困难的,而细胞标本的制备技术正是关键所在。各种技术都有细胞成活率及复钙等方面来保证细胞的正常生理功能。同样运用膜片钳技术进行 SNC 电生理学研究需要制备理想、合适的单个 SNC 作标本。细胞制备的好坏,能否在膜片钳实验中成功形成高阻抗封接以及能否顺利破膜等,直接影响实验的成功率。目前仍然有许多改良的办法不断涌现,人们不断改进分离过程的各个环节,以期制备出理想的标本,但仍不成熟,需要进一步研究探索,以形成一套技术成熟、

重复性好、符合相应实验要求的乳鼠窦房结细胞分离培养技术。

参考文献

- 1 Satoh H. Effects of atp - sensitive K^+ channel openers on pacemaker activity in isolated single rabbit sino - atrial node cells[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 1993, 22(6): 863 - 868
- 2 Marvin WJ, Chittick VL, Rosenthal JK, *et al.* The isolated sinoatrial node cell in primary culture from the newborn rat[J]. Circ Res, 1984, 55(2): 253 - 260
- 3 Monfredi O, Dobrzynski H, Mondal T, *et al.* The anatomy and physiology of the sinoatrial node - a contemporary review[J]. Pacing Clin Electrophysiol, 2010, 33(11): 1392 - 1406
- 4 Christoffels VM, Smits GJ, Kispert A, *et al.* Development of the pacemaker tissues of the heart[J]. Circ Res, 2010, 106(2): 240 - 254
- 5 Liu J, Dobrzynski H, Yanni J, *et al.* Organisation of the mouse sinoatrial node: structure and expression of hcn channels[J]. Cardiovasc Res, 2007, 73(4): 729 - 738
- 6 Lau DH, Roberts - Thomson KC, Sanders P. Sinus node revisited[J]. Curr Opin Cardiol, 2011, 26(1): 55 - 59
- 7 Song Z, Zhong L, Tong S, He G. Primary culture and identification of sinoatrial node cells from newborn rat[J]. Chin Med J (Engl), 2003, 116(3): 465 - 468
- 8 DiFrancesco D, Ferroni A, Mazzanti M, *et al.* Properties of the hyperpolarizing - activated current (if) in cells isolated from the rabbit sino - atrial node[J]. J Physiol, 1986, 377: 61 - 88
- 9 Denyer JC, Brown HF. Rabbit sino - atrial node cells: Isolation and electrophysiological properties[J]. J Physiol, 1990, 428: 405 - 424
- 10 Ye SX, Qu Y, Dan P, *et al.* Isolation and characterization of atrioventricular nodal cells from neonate rabbit heart[J]. Circ Arrhythm Electrophysiol, 2011, 4(6): 936 - 946
- 11 李澈. 窦房结[M]. 北京:北京医科大学出版社, 2001: 1 - 8
- 12 蒋伟, 法宪恩, 李晓召. 乳鼠窦房结细胞的分离纯化与形态学研究[J]. 医学信息(内·外科版), 2009, 22(12): 1075 - 1076, 1082
- 13 Liu RX, Tan S, Liu M, *et al.* Effects of chinese herbal medicine serum on the apoptosis of sinoatrial node cells induced by simulated ischemia - reperfusion[J]. J Tradit Chin Med, 2011, 31(3): 224 - 227
- 14 管思彬, 马爱群, 蒋文慧. 原代培养乳鼠窦房结细胞的形态学及表面抗原研究[J]. 西安交通大学学报:医学版, 2009, 30(3): 288 - 291, 310
- 15 魏益平, 朱进国, 张惠忠, 等. 原代培养乳鼠窦房结细胞的形态和 kir2.1 蛋白表达[J]. 南方医科大学学报, 2007, 27(11): 1701 - 1705
- 16 张炎, 凌凤东. SD 乳鼠窦房结细胞原代分散培养的光电镜研究[J]. 解剖学报, 1999, 14(3): 46 - 49, 107
- 17 钟理, 宋治远. 乳鼠窦房结细胞取材与纯化培养方法的探讨[J]. 中国心脏起搏与心电生理杂志, 2000, 14(3): 47 - 49
- 18 Wan J, Zhong X, Liao B, *et al.* Primary culture of sinoatrial node cells from suckling pigs and its co - culture with col i fiber scaffold. Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi, 2009, 23(8): 980 - 984
(收稿日期: 2012 - 02 - 10)
(修回日期: 2012 - 10 - 15)