

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104877959 A

(43) 申请公布日 2015.09.02

(21) 申请号 201510234194.6

(22) 申请日 2015.05.11

(71) 申请人 南通科瑞斯生物医药科技有限公司
地址 226100 江苏省南通市海门市临江镇人民西路 208 号内 6 号房

(72) 发明人 张之颢

(74) 专利代理机构 南京正联知识产权代理有限公司 32243

代理人 卢海洋

(51) Int. Cl.

C12N 5/077(2010.01)

权利要求书1页 说明书3页 附图2页

(54) 发明名称

一种成年豚鼠心肌分离细胞的培养方法

(57) 摘要

本发明公开了一种成年豚鼠心肌分离细胞的培养方法，包括以下步骤：(1)急性细胞分离；(2)铺细胞：取步骤(1)得到的心室肌细胞离心后放入培养基中，用细胞计数器计算出心肌细胞密度，铺在培养皿上的细胞密度应控制小于 10^4 个正常杆状细胞/ cm^{-2} ；(3)更换培养液：在细胞铺后 4 小时之内每隔 30min 慢慢更换培养液，4 小时之后，每 3 天换一次培养液。该方法使用方便且培养的心肌细胞成活率高并具有极好的稳定性，为心脏病研究及新药研发提供了一个重要手段。

1. 一种成年豚鼠心肌分离细胞的培养方法,其特征在于,包括以下步骤:(1) 急性细胞分离:(a) 将成年豚鼠麻醉后快速取出心脏放置于 4 °C° 含钙液中去除心包,找出主动脉然后挂于灌注装置上开始心脏逆向灌注,先用含钙液灌流 2min,然后用无钙 EGTA 液灌流 5min,再用酶解液循环灌流 8–10min,再用酶洗脱液灌流 5min;(b) 剪下心室肌组织放入无菌培养皿并切碎,(c) 将切碎的心室肌组织加入酶洗脱液中,在 37 °C 下用自动摇晃机进行机械性分离 5–10min 得到细胞悬浮液(d) 将细胞悬浮液用 200 目的尼龙纱布过滤,所得滤液中的心室肌细胞准备下一步培养;其中,所述含钙液为:300ml 灌流母液中加入 CaCl₂ 至 Ca²⁺ 浓度为 750 μ mol/L;所述无钙 EGTA 液为:300ml 灌流母液中加入 EGTA 至 EGTA 浓度为 3.3 μ mol/L;所述酶解液为:80ml 灌流母液中加入 CaCl₂、粗胶原酶和蛋白酶,使 Ca²⁺ 浓度为 100 μ mol/L、粗胶原酶浓度为 1mg/ml、蛋白酶的浓度为 0.1 mg/ml;所述酶洗脱液为:220ml 灌流母液中加入 CaCl₂ 至 Ca²⁺ 浓度为 100 μ mol/L;所述灌流母液用超纯水配制,其中含有:130 mmol/L NaCl, 23 mmol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸, 21 mmol/L 葡萄糖, 20 mmol/L 牛磺酸, 5 mmol/L 肌酸, 5 mmol/L MgCl₂, 5 mmol/L 丙酮酸钠, 4.5 mmol/L KCl, 1 mmol/L NaH₂PO₄, pH 为 7.3;(2) 铺细胞:取步骤(1)得到的心室肌细胞离心后放入培养基中,用细胞计数器计算出心肌细胞密度,铺在培养皿上的细胞密度应控制小于 10⁴个正常杆状细胞/cm⁻²;(3) 更换培养液:在细胞铺后 4 小时之内每隔 30 min 慢慢更换培养液,取出死细胞,4 小时之后,每 3 天换一次培养液。

2. 根据权利要求 1 所述的一种成年豚鼠心脏分离细胞的培养方法,其特征在于,步骤(2)所述培养基包括碳酸氢盐缓冲液和通用添加剂,所述碳酸氢盐缓冲液含有 1.8mmol/L CaCl₂, 116 mmol/L NaCl, 0.6 mmol/L 醋酸钠, 1 mmol/L NaHPO₄, 5.3mmol/L KCl, 0.8 mmol/L MgSO₄;所述通用添加剂包括 5 mmol/L 肌酸, 5mmol/L 牛磺酸, 2mmol/L 左旋肉碱, 2.5 mmol/L 丙酮酸, 10⁻⁷ mmol/L 胰岛素和体积浓度是 1% 的胞嘧啶 -β-D- 呋喃阿拉伯糖苷。

3. 根据权利要求 1 所述的一种成年豚鼠心脏分离细胞的培养方法,其特征在于,步骤(2)所述培养皿用层粘连蛋白液覆盖于表面至少 30 分钟,所述层粘连蛋白液用磷酸盐缓冲液稀释至终浓度为 1 – 5 μ g /ml。

一种成年豚鼠心肌分离细胞的培养方法

技术领域

[0001] 本发明涉及细胞的分离和培养技术领域,具体是一种成年豚鼠心肌分离细胞的培养方法。

背景技术

[0002] 用动物胚胎和新生心肌细胞来培养心肌细胞的方法已广泛研究,然而,胚胎细胞与成人细胞不同,研究发现在胚胎和新生儿心肌细胞中离子通道特性及分布和收缩蛋白亚型表达的变化不同于成人心肌细胞,二者之中的动作电位也相差甚远。急性分离的心肌细胞及胚胎心肌细胞的培养已被广泛应用 30 多年,为医学研究及新药研发做出了重要贡献,但是随着近年来分子生物学技术,心脏生理学的不断发展及完善,急性分离的心肌细胞越来越不能满足目前的研究要求。因此成年动物心肌细胞培养将成为越来越重要的技术,可以广泛应用于心脏病动物模型,药物筛选及心律失常的机理研究。

发明内容

[0003] 为解决上述技术问题本发明提供一种成年豚鼠心肌分离细胞的培养方法,该方法使用方便且培养的心肌细胞成活率高并具有极好的稳定性。

[0004] 本发明采用如下技术方案:一种成年豚鼠心肌分离细胞的培养方法,包括以下步骤:(1)急性细胞分离:(a)将成年豚鼠麻醉后快速取出心脏放置于 4 °C 含钙液中去除心包,找出主动脉然后挂于灌注装置上开始心脏逆向灌注,先用含钙液灌流 2min,然后用无钙 EGTA 液灌流 5min,再用酶解液循环灌流 8-10min,再用酶洗脱液灌流 5min;(b)剪下心室肌组织放入无菌培养皿并切碎,(c)将切碎的心室肌组织加入酶洗脱液中,在 37 °C 下用自动摇晃机进行机械性分离 5-10min 得到细胞悬浮液(d)将细胞悬浮液用 200 目的尼龙纱布过滤,所得滤液中的心室肌细胞准备下一步培养;其中,所述含钙液为:300ml 灌流母液中加入 CaCl_2 至 Ca^{2+} 浓度为 750 $\mu\text{mol/L}$;所述无钙 EGTA 液为:300ml 灌流母液中加入 EGTA 至 EGTA 浓度为 3.3 $\mu\text{mol/L}$;所述酶解液为:80ml 灌流母液中加入 CaCl_2 、粗胶原酶和蛋白酶,使 Ca^{2+} 浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 、粗胶原酶浓度为 1mg/ml、蛋白酶的浓度为 0.1 mg/ml;所述酶洗脱液为:220ml 灌流母液中加入 CaCl_2 至 Ca^{2+} 浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$;所述灌流母液用超纯水配制,其中含有:130 mmol/L NaCl,23 mmol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸,21 mmol/L 葡萄糖,20 mmol/L 牛磺酸,5 mmol/L 肌酸,5 mmol/L MgCl_2 ,5 mmol/L 丙酮酸钠,4.5 mmol/L KCl,1 mmol/L NaH_2PO_4 ,pH 为 7.3;

(2)铺细胞:取步骤(1)得到的心室肌细胞离心后放入培养基中,用细胞计数器计算出心肌细胞密度,铺在培养皿上的细胞密度应控制小于 10^4 个正常杆状细胞 / cm^{-2} ;

(3)更换培养液:在细胞铺后 4 小时之内每隔 30 min 慢慢更换培养液,取出死细胞,4 小时之后,每 3 天换一次培养液。

[0005] 步骤(2)所述培养基包括碳酸氢盐缓冲液和通用添加剂,所述碳酸氢盐缓冲液含有 1.8mmol/L CaCl_2 ,116 mmol/L NaCl,0.6 mmol/L 醋酸钠,1 mmol/L NaHPO_4 ,5.3mmol/L

KCl, 0.8 mmol/L MgSO₄; 所述通用添加剂包括 5 mmol/L 肌酸, 5 mmol/L 牛磺酸, 2 mmol/L 左旋肉碱, 2.5 mmol/L 丙酮酸, 10⁻⁷ mmol/L 胰岛素和胞嘧啶-β-D-呋喃阿拉伯糖苷, 胞嘧啶-β-D-呋喃阿拉伯糖苷的最终体积浓度是 1%。

[0006] 步骤(2)所述培养皿用层粘连蛋白液覆盖于表面至少 30 分钟, 所述层粘连蛋白液用磷酸盐缓冲液稀释至终浓度为 1 - 5 μg / ml。

[0007] 本发明具有如下优点: 该方法使用方便且培养的心肌细胞成活率高并具有极好的稳定性, 减小了非心肌细胞的过度生长和可能产生的细菌污染, 为心脏病研究及新药研发提供了一个重要手段。

附图说明

[0008] 图 1 是灌流装置示意图;

图 2 是培养至第五天的豚鼠心肌细胞照片;

图 3 是用全细胞电压钳记录培养至第五天的心肌细胞上内向整流钾电流 I_{K1};

图 4 是用全细胞电压钳记录培养至第五天的心肌细胞上 L 型钙电流 I_{Ca-L};

图 5 是全细胞电压钳记录培养至第五天的心肌细胞上快速钠通道电流 I_{Na}。

具体实施方式

[0009] 下面结合具体实施例对本发明的技术方案作进一步的说明, 但本发明的保护范围不限于此。

[0010] 本发明采用的心肌分离细胞的灌注装置: 如图 1 所示, 该装置包括三个双层可预热的 300 毫升容量的玻璃罐 1、6 和 7, 变速蠕动泵 2、加热套管 3 和循环桶 4, 玻璃罐储有灌流心脏所需要的溶液: 750 μmol/L 的含钙液(玻璃罐 7)、无钙 EGTA 液(玻璃罐 6)和酶解液(玻璃罐 1), 灌流温度设置在 36.5±0.5 °C, 装置中安有开关 5, 有效阻止气泡进入系统而阻断冠状动脉循环。将取出的心脏系在套管 3 上, 溶液流动由变速蠕动泵 2 带动。

[0011] 本发明的成年豚鼠心肌分离细胞的培养方法, 包括以下步骤: (1) 急性细胞分离: (a) 将成年豚鼠麻醉后快速取出心脏放置于 4 °C 750 μmol/L 的含钙液中小心去除心包, 轻轻挤压心脏挤出残留于心脏的淤血, 找出主动脉然后系在套管 3 上开始心脏逆向灌注, 先用含钙液灌流 2min, 然后用无钙 EGTA 液灌流 5min, 再用酶解液循环灌流 8-10min, 再用酶洗脱液灌流 5min; (b) 剪下心室肌组织放入无菌培养皿, 再用小剪刀切碎心室组织, (c) 将切碎的心室肌组织加入到含有 50 毫升 100 μmol/L Ca²⁺ 溶液的摇瓶中, 在 37 °C 下用自动摇晃机进行机械性分离 5-10min 得到细胞悬浮液, (d) 将细胞悬浮液用 200 目(0.45 微米)的尼龙纱布过滤, 所得滤液中的心室肌细胞准备下一步培养; 其中, 所述含钙液为: 300ml 灌流母液中加入 CaCl₂ 至 Ca²⁺ 浓度为 750 μmol/L; 所述无钙 EGTA 液为: 300ml 灌流母液中加入 EGTA 至 EGTA 浓度为 3.3 μmol/L; 所述酶解液为: 80ml 灌流母液中加入 CaCl₂、粗胶原酶和蛋白酶, 使 Ca²⁺ 浓度为 100 μmol/L、粗胶原酶浓度为 1mg/ml、蛋白酶的浓度为 0.1 mg/ml; 所述酶洗脱液为: 220ml 灌流母液中加入 CaCl₂ 至 Ca²⁺ 浓度为 100 μmol/L; 所述灌流母液用超纯水配制, 其中含有: 130 mmol/L NaCl, 23 mmol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸, 21 mmol/L 葡萄糖, 20 mmol/L 牛磺酸, 5 mmol/L 肌酸, 5 mmol/L MgCl₂, 5 mmol/L 丙酮酸钠 4.5 mmol/L KC1, 1 mmol/L NaH₂PO₄, pH 为 7.3。灌流母液需要用孔径为 0.2 μm 的过滤器

(用滤纸加针筒)过滤来去除微生物和微粒。

[0012] (2) 铺细胞: 取适量步骤(1)得到心室肌细胞离心后放入培养基中, 然后用细胞计数器计算出心肌细胞密度, 铺在培养皿的细胞密度应控制小于 10^4 个正常杆状细胞 / cm^{-2} 。正确的细胞密度非常重要因为如果细胞密度太高, 细胞聚集在一起, 会飘起大量细胞在换液过程中丢失。

[0013] (3) 更换培养液: 在细胞铺后 4 小时之内不能过度振动细胞, 可以每隔 30 分钟轻轻地取出死细胞。培养初期心肌细胞对培养液流动非常敏感, 因此必须仔细、慢慢地换培养液。首次换液后(即细胞铺后 4 小时后), 每 3 天换一次培养液。圆形和过度收缩的心肌细胞不能在培养皿底边吸附而在换液中除去, 而 95 % 以上正常杆状型心肌细胞可以保留。此外, 没有血清和谷氨酰胺的心肌细胞培养液使非心肌细胞不能快速分裂, 这样就避免了心肌细胞培养污染的问题。同时在培养基中添加胞嘧啶-β-D-呋喃阿拉伯糖苷, 可以防止非心肌细胞(特别是成纤维细胞)过度生长。

[0014] 步骤(2)使用的培养基包括碳酸氢盐缓冲液和通用添加剂, 所述碳酸氢盐缓冲液含有 1.8 mmol/L CaCl_2 , 116 mmol/L NaCl , 0.6 mmol/L 醋酸钠, 1 mmol/L NaHPO_4 , 5.3 mmol/L KCl , 0.8 mmol/L MgSO_4 ; 所述通用添加剂包括 5 mmol/L 肌酸, 5 mmol/L 牛磺酸, 2 mmol/L 左旋肉碱, 2.5 mmol/L pyruvate 和 10^{-7} mmol/L。为防止细菌感染, 所有的细胞培养基都含有 50 国际单位的青霉素和 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素。在无菌条件下, 通入 5 % 的 CO_2 - 95 % 空气到孵化器中培养细胞, 温度保持在 37 °C。

[0015] 步骤(2)中可以使用高质量塑料(如 Falcon or NUNC 公司产品)或玻璃培养皿。玻璃盖玻片用 70 % 乙醇洗涤, 超纯水漂洗, 高压灭菌处理。高质量塑料或玻璃培养皿用层粘连蛋白覆盖至少 30 分钟(或更长的时间, 如果小于 37 °C 工作), 使用的层粘连蛋白用磷酸盐缓冲液稀释至终浓度为 1 - 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0016] 观察培养心肌细胞的形态: 细胞的形状和形态是同细胞的健康程度及细胞功能有着密切关系, 因此, 观察细胞形态可以更好地预示细胞生理指标的变化。图 2 是一个典型的培养至第五天的豚鼠心肌细胞的照片, 可以看出其典型特征是细胞呈现杆状并且心肌细胞横纹清晰。

[0017] 电生理指标: 图 3 是用全细胞电压钳记录方法记录培养至第五天的心肌细胞上的内向整流钾电流 I_{K1} 。在形成高封全细胞状态后, 先将细胞内电压钳至在 -40 mV, 时间为 50 ms, 然后再用 500 ms 脉冲电压使细胞过极化至 -130 mV, 在 -40 mV 至 -130 mV 的过极化过程中诱发了如图所示的心肌细胞膜上 I_{K1} 的通道。

[0018] 图 4 是用全细胞电压钳记录方法记录培养至第五天的心肌细胞上的 L 型钙电流 ($I_{\text{CA-L}}$)。记录 $I_{\text{CA-L}}$ 采用下列电压脉冲, 为了单独记录 Ca 通道, 必须先将快速 Na 通道用电生理方法抑制, 为了达到这个目的, 将细胞内电压钳至在 -40 mV, 这一过程可以使快速钠通道迅速失活, 然后再用 200 ms 去极化至 20 mV 的电压激活 Ca 通道。

[0019] 图 5 是用全细胞电压钳记录方法记录培养至第五天的心肌细胞上的快速钠通道电流 (I_{Na})。记录 I_{Na} 采用下列电压脉冲, 细胞内电压钳至在 -120 mV 使快速钠通道失活门全部打开再用 20 ms 去极化至 -60 mV 激活 Na 通道。

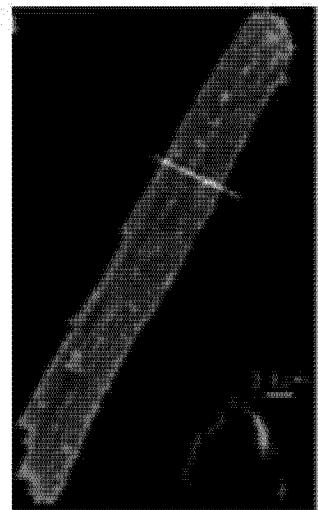
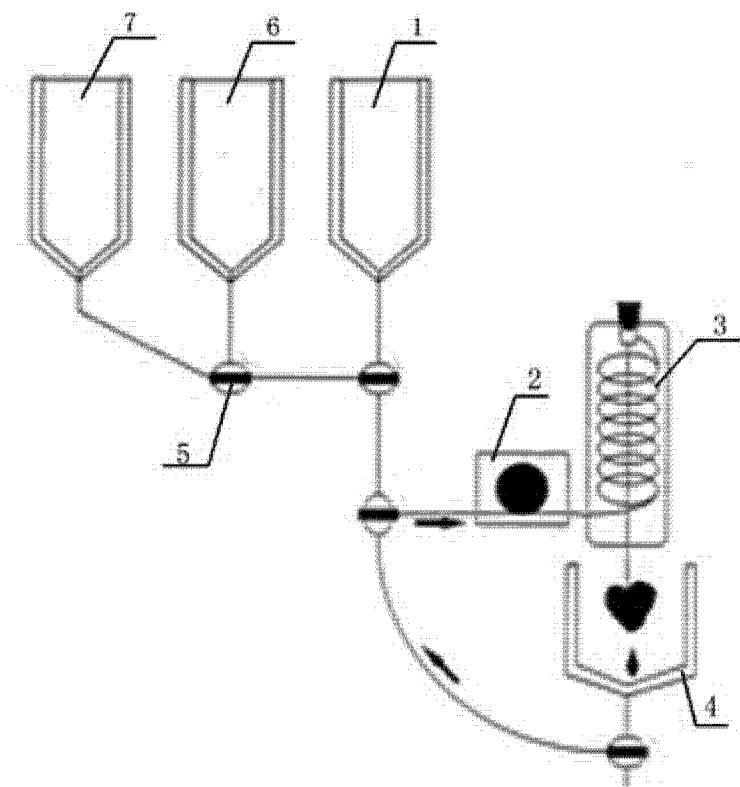


图 2

图 1

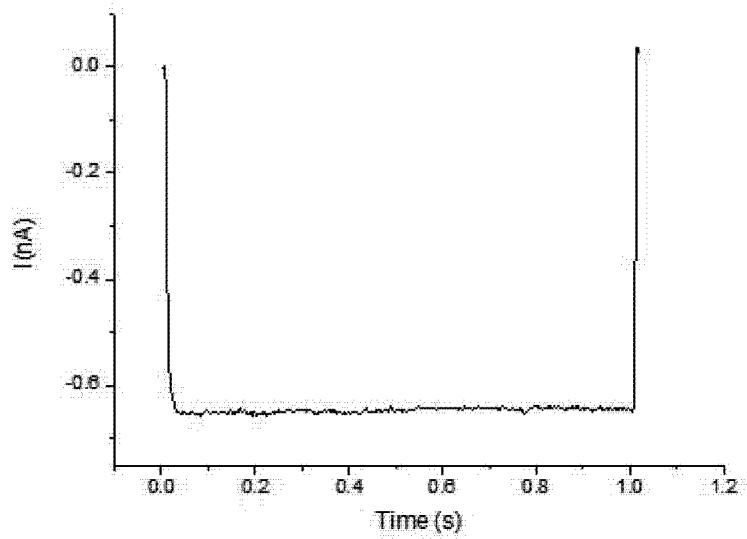


图 3

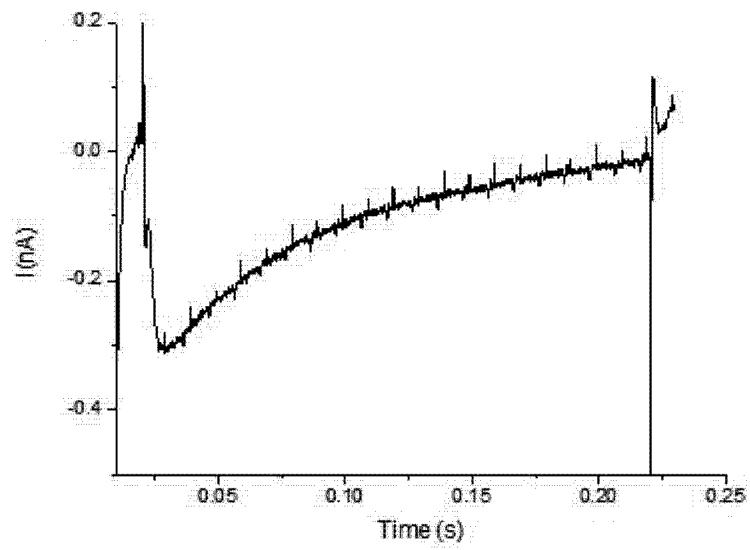


图 4

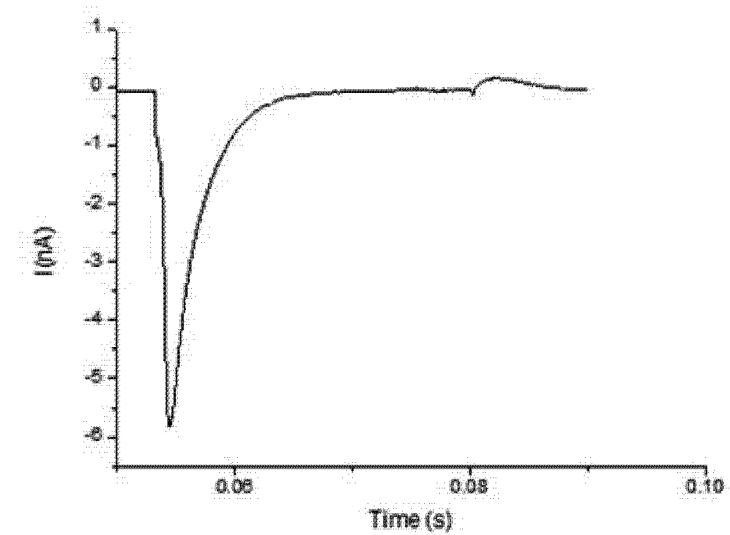


图 5