

以胶原膜为支架的心肌细胞体外三维培养

刘兴茂 刘 红 熊福银 陈昭烈*

(军事医学科学院生物工程研究所,北京 100071)

摘 要 将从新生乳鼠心室肌组织获取的心肌细胞接种于鼠尾胶原膜三维支架和组织培养板,以细胞形态、细胞搏动、葡萄糖比消耗率(q_{glu})、乳酸比产率(q_{lac})、乳酸转化率($Y_{lac/glucose}$)、肌酸激酶及乳酸脱氢酶的活力为观察指标,比较心肌细胞在鼠尾胶原膜中三维(3D)培养和组织培养板中二维(2D)培养的差异。培养于鼠尾胶原膜的乳鼠心肌细胞在第5天形成闰盘连接,形成面积约为80mm²、肉眼可见自律性同步收缩的心肌细胞3D培养物。3D培养体系中乳鼠心肌细胞的 q_{glu} 、 q_{lac} 和 $Y_{lac/glucose}$ 的均值分别为7.37 $\mu\text{mol}/10^6$ cells/d、2.92 $\mu\text{mol}/10^6$ cells/d和0.38 $\mu\text{mol}/\mu\text{mol}$ 。2D培养体系中乳鼠心肌细胞的 q_{glu} 、 q_{lac} 和 $Y_{lac/glucose}$ 的均值分别为7.59 $\mu\text{mol}/10^6$ cells/d、3.83 $\mu\text{mol}/10^6$ cells/d和0.51 $\mu\text{mol}/\mu\text{mol}$ 。两种培养体系中乳鼠心肌细胞的肌酸激酶及乳酸脱氢酶的活力无明显差别。实验结果表明,培养于鼠尾胶原膜的心肌细胞保持正常心肌细胞的代谢活力和收缩功能。

关键词 心肌细胞 胶原 支架 三维 培养

中图分类号 Q813.1 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)04-0484-05

心肌细胞是缺乏增殖能力的终末分化细胞,心脏自身的修复能力极其有限,心肌一旦发生不可逆的病变或遭到不可逆损伤,将难以再生修复^[1-2]。目前,与心肌结构缺失或心肌功能丧失相关的疾病的治疗往往只能借助心脏移植,而心脏移植又存在着供体受限和移植排斥的难于逾越的问题^[3]。

组织工程技术的出现为治疗此类心肌疾病提供了新的可能。由于目前的心肌细胞的体外培养及相关研究主要沿用二维(2D)培养模式,心肌细胞的体外三维(3D)培养及相关研究还处于探索研究阶段^[4]。我们以天然可吸收材料鼠尾胶原膜为乳鼠心肌细胞体外3D培养支架,培养出具有正常心肌组织结构和自律性同步收缩特性的心肌细胞3D培养物,以心肌细胞在2D培养模式为参照,观察心肌细胞在3D培养模式下的细胞形态、搏动和代谢。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物 1日龄 Wistar 大鼠和体重为250 g左右的 Wistar 大鼠由军事医学科学院实验动物中心提供。

1.1.2 培养基和生化试剂 DMEM 培养基和胰蛋白酶为 Gibco RBL 公司产品;加强型小牛血清(Cosmic calf serum)购自 HyClone 公司;5-溴脱氧尿苷(BrdU)和 α -肌原纤维肌动蛋白单

克隆抗体为 Sigma 公司产品;FITC 标记羊抗鼠 IgG、葡萄糖检测盒及乳酸检测盒购自北京中山生物制品公司;肌酸激酶检测盒和乳酸脱氢酶检测盒购自北京中生生物技术公司。

1.2 方 法

1.2.1 心肌细胞的分离 取1日龄 Wistar 大鼠,在无菌条件下取出心室肌组织,经无Ca²⁺的 Hank's 液充分洗净残血,用眼科剪将心室肌组织剪成大小约为1 mm³的组织块,加入0.1%胰蛋白酶37℃恒温震荡消化10 min,吸出细胞悬液,用含10%(V/V)小牛血清的 DMEM 培养液终止消化,沉淀组织块再加入消化液继续消化。如此重复3~5次,直至组织块完全消化。细胞悬液用200目钢网过滤,1000 r/min 离心10 min,收集细胞。用含10%加强型小牛血清的 DMEM 培养液重新悬浮细胞,移入培养瓶置于5% CO₂、37℃培养箱2 h,吸出尚未贴壁的细胞悬液,移入培养瓶培养16 h后,更换含0.1 mmol/L 5-溴脱氧尿苷(BrdU)的培养液,5% CO₂、37℃培养3 d。

1.2.2 心肌细胞比例的测定 从1日龄乳鼠心室肌组织分离所得的细胞体外培养3 d后,经鼠抗 α -肌原纤维肌动蛋白单克隆抗体和 FITC-羊抗鼠二抗标记后,用流式细胞仪(FACS-Scan, Becton Dickinson)测定其中的心肌细胞的比例。

1.2.3 免疫荧光细胞化学 将浓度适中的心肌细胞接种于

收稿日期 2003-01-10, 修回日期 2003-04-16。

基金项目 国家高技术研究发展与计划项目资助(No. 2001AA215461)。

* 通讯作者。 Tel: 86-10-63841526; Fax: 86-10-63833521; E-mail: chenlz23@hotmail.com

35 mm 培养皿中培养 3 d,弃培养上清, PBS 充分洗涤附着于培养皿的细胞后,用 4% (V/V) 多聚甲醛磷酸缓冲液(PBS, 0.1 mol/L, pH 7.4)固定 15 min。经 PBS 冲洗、含 25% 小牛血清的 PBS 于 37℃ 封闭 2 h 后,加入鼠抗 α -肌原纤维肌动蛋白单克隆抗体(1:600),37℃ 湿盒中震荡孵育 60 min,然后加入 FITC-羊抗鼠 IgG(1:50)于湿盒中震荡孵育 40 min, PBS 充分洗涤后在荧光倒置显微镜下观察(TE300, Nikon)。

1.2.4 鼠尾胶原膜的制备:剪取体重大约为 250 g Wistar 大鼠的鼠尾,于 75% 乙醇溶液中浸泡 20 min;无菌条件下抽出尾腱并将其剪碎,置无菌的 0.1% 的醋酸溶液(50 mL/尾),4℃ 条件下缓慢搅拌 48 h,4000 r/min 离心 10 min,收集上清胶原溶液。将胶原溶液(190 mg/mL)与含 10% 加强型小牛血清的 DMEM 培养液按 1:2 (V/V) 均匀混和,加入组织培养板,室温静置 10 min,即可形成多孔网状胶原膜。

1.2.5 心肌细胞 2D 培养与 3D 培养:心肌细胞以 3.74×10^5 cells/cm²、 1.26×10^6 cells/cm² 的密度分别接种于 24 孔板中及铺有胶原膜的板孔中,10% 小牛血清的 DMEM 培养基,37℃、5% CO₂ 培养 14 d,隔天更换培养液。

1.2.6 扫描电镜观察:样品经 2% (V/V) 戊二醛 4℃ 固定 2 h,用 PBS 清洗 3 次,1% 锇酸(V/V)固定 2 h,4℃ 条件下酒精梯度脱水,乙酸异戊酯置换 1 h 或放置过夜,经六甲基二硅胺干燥样品,用日本 EIKOIB-S 离子射仪喷金处理,扫描电镜观察细胞形态并照相(S-450, Hitachi)。

1.2.7 葡萄糖浓度和葡萄糖比消耗率(q_{glu})的检测:培养基中葡萄糖浓度用 GOD-PAP 法测定。葡萄糖浓度由公式 $C = A_{\text{样品}} / A_{\text{标准}}$ (mg/mL) 算出。将培养前的培养基中的葡萄糖总量减去培养后培养基中的葡萄糖含量,即为心肌细胞的葡萄糖消耗的克数($C_{\text{消耗}}$),心肌细胞的葡萄糖比消耗率按公式: $q_{glu} = C_{\text{消耗}} / (180 \times \text{细胞密度})$ 推算。

1.2.8 乳酸浓度和乳酸比产率(q_{lac})的检测:培养基中乳酸浓度的测定采用 LACTATE-PAP 法。样品中乳酸浓度由公式 $C_{lac} = A_{\text{样品}} / A_{\text{标准}} \times 0.3$ (mg/mL) 算出。心肌细胞的乳酸比产率按公式: $q_{lac} = C_{lac} / (90 \times \text{细胞密度})$ 推算。

1.2.9 乳酸转化率($Y_{lac/glu}$)的检测:乳酸转化率由公式: $Y_{lac/glu} = Y_{lac} / C_{glu}$ ($\mu\text{mol} / \mu\text{mol}$) 求出。乳酸的产生量由公式 $Y_{lac} = C_{lac} / 90$ (μmol) 算出,葡萄糖的消耗量由公式 $C_{glu} = C_{\text{消耗}} / 180$ (μmol) 计算。

1.2.10 肌酸激酶及乳酸脱氢酶活性的测定:心肌细胞中肌酸激酶及乳酸脱氢酶活性的测定分别采用肌酸激酶试剂盒和乳酸脱氢酶试剂盒测定。

1.2.11 心肌细胞搏动强度的观察和搏动频率的测定:用倒置显微镜观察心肌细胞搏动强度和频率,用计时器定期计数一定时段内观察到的心肌细胞搏动次数。

2 结果

2.1 心肌细胞分离和免疫组化鉴定

以 1 d 龄乳鼠的心室肌组织为心肌细胞的来源,采用胰酶消化和细胞差速贴壁法分离心肌细胞。1 只乳鼠的心室

肌组织经胰酶消化后可获得的细胞总数约为 1.8×10^6 ,经差速贴壁去除大部分成纤维细胞,可获得的细胞数约为 1.3×10^6 ,所得细胞用含 0.1 mmol/L Brdu 的 DMEM 培养,抑制残余成纤维细胞的增殖,通过换液去除未贴壁的细胞,所获得贴壁的细胞数为 7.7×10^5 。将培养 3 d 的细胞吹打成悬液,经鼠抗 α -肌原纤维肌动蛋白单克隆抗体和 FITC-羊抗鼠 IgG 二抗标记,用流式细胞仪测定其中心肌细胞占细胞总数的比例约为 80% (图 1)。采用鼠抗 α -肌原纤维肌动蛋白单克隆抗体和 FITC-羊抗鼠 IgG 对经 Brdu 处理的心肌细胞标记,进行免疫组化鉴定,心肌细胞呈阳性反应,心肌细胞的比例在 85% 左右(图 2),与流式细胞仪的测定结果大体一致。

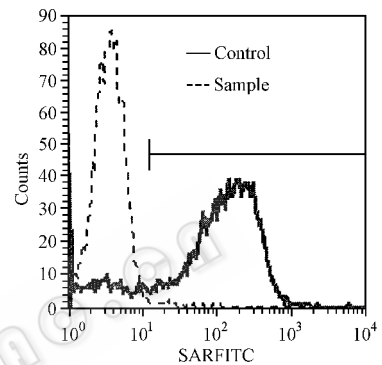


图 1 流式细胞仪显示心肌细胞所占比例

Fig.1 Flowing cytometry showing the percentage of cardiac cells

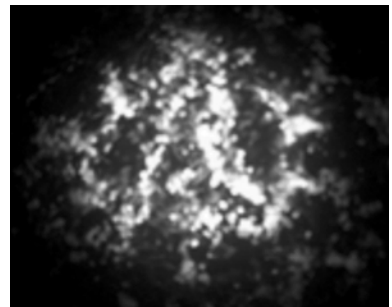


图 2 α -Sarcomeric actin 免疫组化阳性心肌细胞 (荧光倒置显微镜, $\times 100$)

Fig.2 Immunofluorescent image of cardiac cells stained by α -Sarcomeric actin monoclonal antibody($\times 100$)

2.2 心肌细胞的 2D 培养

用胰蛋白酶消化法分离 1 d 龄 Wistar 大鼠心室肌组织的心肌细胞,初分离的心肌细胞呈短杆状或圆形(图 3A),培养 4 h 后心肌细胞开始贴壁伸展,20 h 后部分细胞出现自主搏动,24 h 后细胞形态变为梭形或不规则扁平状,并伸出伪足(图 3B),3 d 后细胞呈现自聚集现象,并向周围伸出放射状突起,相互连接形成呈同步收缩的细胞簇,并可见心肌细胞的区域性同步收缩(图 3C)。

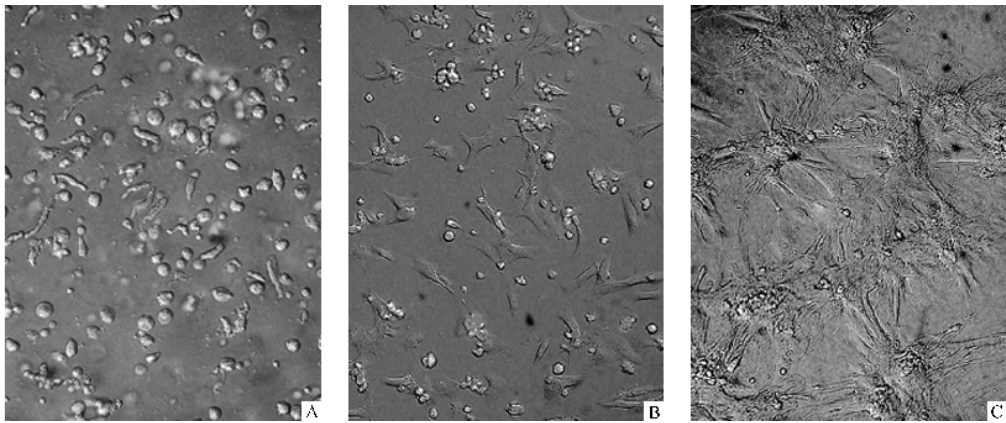


图3 在组织培养板二维培养的乳鼠心肌细胞(倒置显微镜, $\times 200$)

Fig.3 The morphology of neonatal rat cardiac cells cultured on tissue plates in 2D mode ($\times 200$)

A. Fresh separated cells ;B. Cardiac cells cultured 24 h ;C. Cardiac cells cultured 3 days

2.3 心肌细胞的3D培养

培养于鼠尾胶原膜上的心肌细胞在倒置显微镜下的大体形态与2D培养的心肌细胞基本相同。3D培养心肌细胞出现搏动的时间迟于2D培养,培养36 h后始见心肌细胞搏动。3D培养的心肌细胞出现区域性同步收缩的时间早于2D培养,培养48 h后即可见心肌细胞的区域性同步收缩,心肌细胞的波动幅度也比2D培养的心肌细胞大。3 d后倒置显微镜可观察到的作为心肌细胞3D固定化培养支架的胶原膜有出现整张膜的节律性同步收缩,随着培养时间的延长,胶原

膜上区域性同步收缩的面积逐步扩大,同步收缩强度逐步加强。5 d后出现肉眼可见胶原膜上面积达 80 mm^3 的心肌细胞的自律性同步收缩。肉眼可见的自律性同步收缩维持3 d后,收缩强度趋于减弱,培养10 d后,肉眼可见的自律性同步收缩消失。扫描电镜观察鼠尾胶原膜呈多孔网状结构(图4 A),生长于鼠尾胶原膜上的心肌细胞接种之初呈圆形(图4 B),5 d后伸展为梭形、柱状或不规则状,并可见细胞间盘连接(图4 C),8 d后细胞相互连接成网(图4 D)。

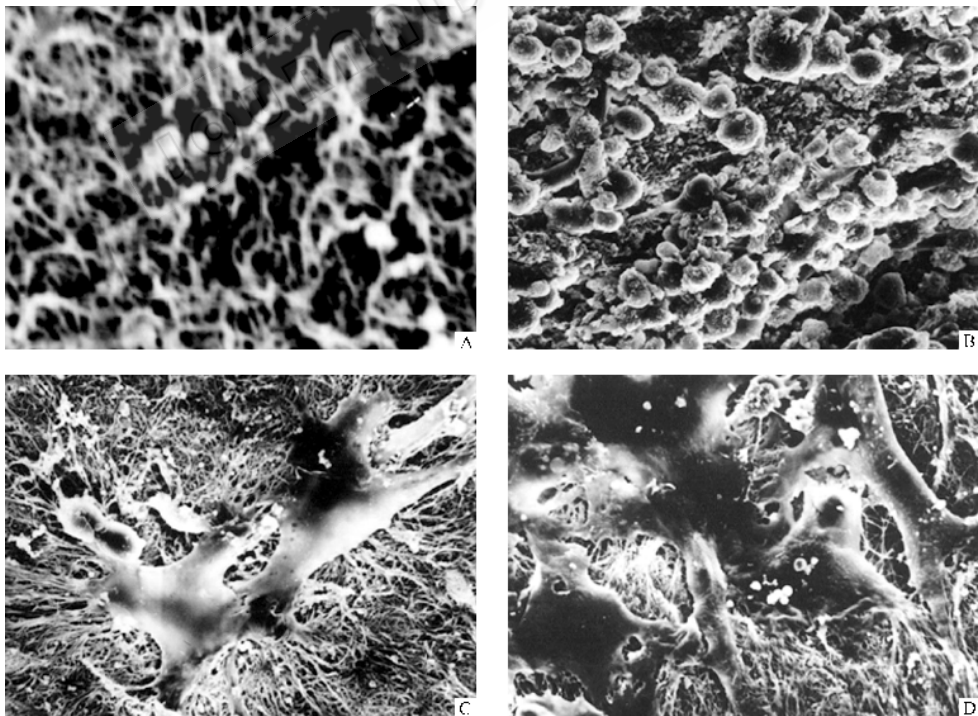


图4 扫描电镜下的鼠尾胶原膜及培养在其上的心肌细胞

Fig.4 Scanning electron micrographs of collagen membrane and cardiac cells cultured on collagen membrane in 3D mode

A. Collagen membran($300 \times$ magnification); B. Cardiac cells culture 1 days($400 \times$ magnification);

C. Cardiac cells culture 5 days($650 \times$ magnification); D. Cardiac cells culture 8 days($650 \times$ magnification)

2.4 2D 和 3D 培养模式下心肌细胞的代谢活力

在整个培养过程中, 2D 和 3D 培养条件下心肌细胞的 q_{glu} 均值为分别为 $7.59 \mu\text{mol}/10^6 \text{ cells/d}$ 和 $7.37 \mu\text{mol}/10^6 \text{ cells/d}$, 且 q_{glu} 均呈现中间高、两头低的变化趋势(图 5)。 q_{glu} 的变化基本上与心肌细胞的搏动状况相一致。2D 培养条件下心肌细胞 q_{lac} 及 $Y_{\text{lac}/\text{glu}}$ 在整个培养过程中分别稳定维持在 $3.83 \mu\text{mol}/10^6 \text{ cells/d}$ 和 $0.51 \mu\text{mol}/\mu\text{mol}$ 。3D 培养条件下心肌细胞 q_{lac} 及 $Y_{\text{lac}/\text{glu}}$ 在培养 7 d 内呈逐步增高趋势, 分别由第 3 天的

$1.34 \mu\text{mol}/10^6 \text{ cells/d}$ 和 $0.19 \mu\text{mol}/\mu\text{mol}$ 提高到第 7 天的 $3.52 \mu\text{mol}/10^6 \text{ cells/d}$ 和 $0.46 \mu\text{mol}/\mu\text{mol}$; 整个培养过程中心肌细胞的 q_{lac} 及 $Y_{\text{lac}/\text{glu}}$ 均值分别为 $2.92 \mu\text{mol}/10^6 \text{ cells/d}$ 和 $0.38 \mu\text{mol}/\mu\text{mol}$, 低于 2D 培养条件下心肌细胞的 q_{lac} 及 $Y_{\text{lac}/\text{glu}}$ 均值(图 5)。两种培养体系下心肌细胞肌酸激酶的活力及乳酸脱氢酶的活力没有显著性差异(图 6, $P > 0.05$)。实验结果表明: 3D 培养于鼠尾胶原膜的心肌细胞不存在明显的传质限制, 保持着与 2D 培养心肌细胞相同的代谢活力。

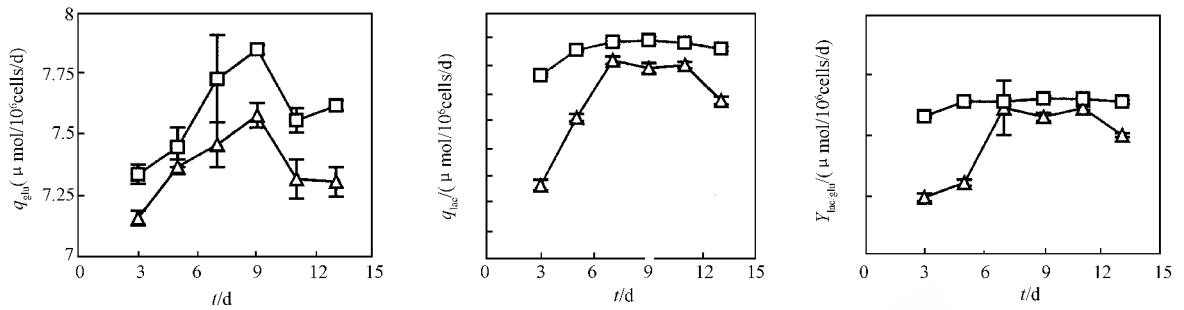


图 5 2D 与 3D 培养条件下心肌细胞的葡萄糖和乳酸代谢

Fig.5 The metabolism of glucose and lactate of cardiac cells in 2D and 3D culture mode

□ : Monolayer culture ; △ : Three-dimensional culture ; Data are averages \pm S.D. ($n = 3$)

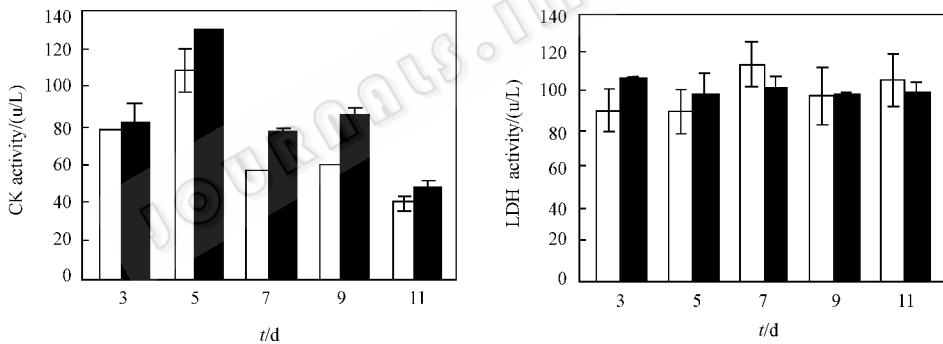


图 6 2D 与 3D 培养条件下心肌细胞的肌酸激酶和乳酸脱氢酶活力

Fig.6 Creatine and lactate dehydrogenase activities of cardiac cells in 2D and 3D culture mode

■ : Monolayer culture ; □ : Three-dimensional culture ; Data are averages \pm S.D. ($n = 3$)

3 讨论

细胞与材料的相互作用是工程心肌组织体外三维构建研究的主要领域之一, 理想的支架材料不仅可以减少细胞的流失和死亡, 还可促进细胞的迁移、分化及增殖^[5,6]。胶原作为细胞外基质的主要成分, 具有连结和支持细胞和组织的作用。同时由于胶原具有良好的生物相容性、可降解性和可塑性, 胶原被广泛用于各类组织工程的研究中^[7,8]。Eschenhagen 等将鸡胚胎心肌细胞接种到胶原凝胶上, 观察到心肌细胞在体外形成了可以收缩的心肌网络结构^[9]。

由于胶原的种类和来源复杂, 不同批次产品的质量差异大, 应根据不同的研究对象和实验目的选用适宜的胶原材料作为细胞体外培养的支架。我们采用同类大鼠的鼠尾胶原

为原料制备的膜状三维支架培养乳鼠心肌细胞, 5 d 后心肌细胞形成紧密的闰盘连接, 并且肉眼可见自律性同步收缩范围达 80 mm^3 。以二维培养体系心肌细胞的葡萄糖比消耗率、乳酸比产率、乳酸转化率、肌酸激酶及乳酸脱氢酶的活力为参照, 三维培养乳鼠心肌细胞的有关代谢参数和变化趋势与二维培养基本相同, 表明培养于鼠尾胶原膜的心肌细胞不存在明显的传质限制, 保持着与二维培养心肌细胞相同的代谢活力。以上结果表明: 采用同类动物来源的胶原作为三维支架材料具有良好的生物相容性, 并有利于细胞和支架材料间相互作用。

以鼠尾胶原为支架材料用于心肌细胞的体外培养, 由于胶原支架材料的机械强度不足、固形能力低, 在培养过程中随着心肌细胞自律性同步收缩幅度的逐渐加强, 出现一定程

度的皱缩、卷曲。同时,胶原三维支架的空隙也在一定程度上限制着心肌细胞均匀地高密度接种。这些问题需要通过细胞三维培养支架材料的深入研究和材料加工方法的改进而加以解决。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Bulter R. Evidence for a regenerative capacity in adult mammalian cardiac myocytes. *Am J Physiol*, 1989, **256**:797-800
- [2] McMahon J T, Ratliff N B. Regeneration of adult human myocardium after acute heart transplant rejection. *J Heart Transplant*, 1990, **9**:554-567
- [3] Stevenson L W, Warner S L, Steimle A E *et al.* The impending crisis awaiting cardiac transplantation Modeling a solution based on selection. *Circulation*, 1994, **89**:450-457
- [4] Schroedl N A, Hartell C R. Myocytes and fibroblasts exhibit functional synergism in mixed cultures of neonatal rat heart cells. *Cell Physi-*

ol, 1983, **117**:326-332

- [5] Boyan B D, Hummert T W, Dean D D *et al.* Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials*, 1996, **17**:137-146
- [6] Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A *et al.* Treatment of defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *New Engl J Med*, 1994, **331**:889-895
- [7] Kim B S, Putnam A J, Kuet T J *et al.* Optimizing seeding and culture methods to engineer smooth muscle tissue on biodegradable polymer matrices. *Biotechnology and Bioengineering*, 1998, **57**:46-54
- [8] Grande D A, Halberstadt C, Naughton G *et al.* Evaluation of matrix scaffolds for tissue engineering of articular cartilage grafts. *J Biomed Mat Res*, 1997, **34**:211-220
- [9] Eschenhagen T, Fink C, Remmers U *et al.* Three-dimensional reconstruction of embryonic cardiomyocytes in a collagen matrix: A new heart model system. *FASEB*, 1997, **11**:683-694

Collagen Membrane as Scaffold for the Three-dimensional Cultivation of Cardiac Cells *in vitro*

LIU Xing-Mao LIU Hong XIONG Fu-Yin CHEN Zhao-Lie*

(*Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China*)

Abstract The objective of this study was to develop research of cardiac cells to reestablish 3D tissue architecture *in vitro*, we performed studies using collagen membrane as three-dimensional scaffold for cardiac cells culture with the principles and methods of tissue engineering. The polymer scaffold provides a 3-D substrate for cell attachment and tissue formation. Cardiac cells isolated by enzymatic digestion from 1d old neonatal rats were seeded to three-dimensional collagen scaffolds and tissue culture plates. The morphology, beating rate and the metabolic indexes, including specific consumption rate of glucose (q_{glu}), specific production rate of lactate (q_{lac}), lactate transform rate ($Y_{lac/glu}$), specific creatine kinase (CK) and lactate dehydrogenase (LDH) activities of cardiac cells cultured on three-dimensional collagen membrane and tissue culture plates were compared. It was found that cells shape and cells' CK and LDH activity was no differences between 3D and 2D cultures and cell beat rate on cell culture cluster was slower than those cells cultured on collagen membrane, However the cell glucose consumption and lactate yield rate of cells cultured on cluster was higher than those cells cultured on collagen membrane. After 5 days of cultivation, cardiac cells cultured on collagen membrane scaffolds organized into three-dimensional (3D) aggregates as opposed to the two-dimensional (2D) aggregates mosaic pattern seen in tissue culture plates, and spontaneous and rhythmical contractile 3D cultures in unison were visible to the naked eye and the area of synchronous contract three-dimensional (3D) aggregates reaches 80cm^2 . The mean value of q_{glu} , q_{lac} and $Y_{lac/glu}$ of cultured on three-dimensional collagen scaffold was $7.37 \mu\text{mol}/10^6 \text{ cells/d}$, $2.92 \mu\text{mol}/10^6 \text{ cells/d}$ and $0.38 \mu\text{mol}/\mu\text{mol}$, versus $7.59 \mu\text{mol}/10^6 \text{ cells/d}$, $3.83 \mu\text{mol}/10^6 \text{ cells/d}$ and $0.51 \mu\text{mol}/\mu\text{mol}$ in tissue culture plates. These results demonstrate that cardiac cells immobilized on collagen membrane in 3D cultures maintain similar metabolic activity and contractile function when compared with native cardiac cells. The above results support the idea that engineered cardiac tissue can be used as a model of native tissue for studies of tissue development and function *in vitro* and eventually for tissue repair *in vivo*.

Key words cardiac cells, collagen, scaffold, three-dimension, culture

Received: 01-10-2003

This work was supported by Grant from Project of Chinese National Programs for High Technology Research and Development (No. 2001AA215461).

* Corresponding author. Tel: 86-10-63841526; Fax: 86-10-63833521; E-mail: chenizl23@hotmail.com

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>