

成肌细胞培养的重复肌块法

陈松林, 张为西, 刘晓蓉, 张成

(中山大学附属第一医院神经内科, 广东广州 510080)

摘要:【目的】改进体外成肌细胞培养方法。【方法】取20只小鼠分4组, 取股骨肌用肌块法进行成肌细胞原代培养, 并重复利用肌块6次。对培养的成肌细胞进行生长状态观察及免疫组化鉴定。【结果】重复6次使用肌块培养的成肌细胞生长、分化良好; 一次差速贴壁纯化后, 经免疫组化方法鉴定, 96%以上的细胞呈肌细胞特异抗体阳性反应。【结论】重复肌块法培养成肌细胞, 省略了重复组织获取、消化等烦琐步骤, 培养效率明显提高, 并可获得高纯度的成肌细胞。

关键词: 成肌细胞; 细胞培养; 重复肌块法

中图分类号: R329.2; R746.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-257X(2002)05-0339-02

Better Method in Myoblast Cell Culture with Small Muscle Pieces Reuse CHEN Song-lin, ZHANG Wei-xi, LIU Xiao-rong, ZHANG Cheng. (Neurological Department, First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract 【Objective】To improve the method of myoblast cell culture *in vitro*. 【Methods】20 mice were equally divided into 4 groups. Myoblast cells were primary cultured with method of femur-muscle pieces. These muscle pieces were reused for 6 times. The cultured cells were observed in growth state and by immunohistochemistry methods. 【Results】The cultured myoblast cells used six times muscle pieces were differentiated and grew well. 96% myoblast cells after purified one time with the method of different speed stick wall, were positively reacted to muscular particular antibody with immunohistochemistry method. 【Conclusion】Myoblast culture with reused muscle pieces have the advantage of avoiding troubling procedures of acquiring and digesting muscle tissue, which can strikingly enhance the culture efficiency, and highly purified myoblast cells can be harvested by the method.

Key words: myoblast cell; cell culture; reuse muscular pieces

常规的肌块法原代成肌细胞培养, 肌块使用一次即遗弃, 成本高、工作量大。我们在细胞培养时, 摸索出肌块重复使用的方法: 6次重复使用后, 仍然可培养出原代成肌细胞; 并经形态学、免疫荧光及免疫组化证实其为高纯度的成肌细胞。同时, 我们还简化了贴壁处理的方法, 这使成肌细胞培养效率显著提高。现具体报道如下。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

D-Hanks 液自备; DMEM 培养基购于 Gibco-BRL 公司; 胎牛血清购于浙江杭州四季青生物制品公司; 青、链霉素, 国产; 结蛋白 (desmin) 抗体、免疫组化试剂合购于福州迈新公司; SABC-FITC 免疫荧光试剂合购于武汉博士德公司; Dystrophin 单克隆抗体购于深圳晶美公司; 蛋白酶: 购于 Sigma 公司; C57 新生鼠 (3~7 d) 20 只, 购于原中山大学实验动物中心。

1.2 肌块法成肌细胞的原代培养

20 只新生鼠分 4 次, 每次 5 只, 引颈法杀死小鼠, 剥皮解离后肢, 剔除肌腱、骨骼等非肌肉组织。将获取的肌肉组织在 D-Hanks 液中清洗、剪碎成 1 mm³ 左右肌块, 均分移入 6 孔培养板的 2 个孔内, 移去 D-Hanks 液, 放入正常工作的培养箱干燥 20 min, 使肌块贴下壁。然后缓缓加入含 150 mL/L 血清的培养液 2 mL, 置入体积分数 5%、37 °C、饱和湿度的二氧化碳 (正常工作状态) 培养箱静置培养、动态观察。

1.3 肌块的重复使用

待成肌细胞长满后, 用抽吸或针挑等物理方法, 将肌块移入新的 6 孔培养板中, 按上述方法静置培养。重复上述操作, 共 6 次。每次培养记录其梭变时间及肌管形成时间。

1.4 成肌细胞免疫组织化学鉴定

消化法取第 1、第 6 次使用肌块培养的成肌细胞, 差速贴壁纯化后, 以 3×10^6 /mL 的浓度, 放入 6

收稿日期: 2002-04-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30170337); 卫生部临床学科重点基金资助项目(97040229; 2001321); 教育部骨干教师基金资助项目(20002349); 广东省卫生厅科研基金资助项目(A2000149)

作者简介: 陈松林(1965-), 男, 安徽合肥人, 博士生, 张成, 项目负责人。

孔培养板培养 2 mL, 培养板的底部放入无菌的盖玻片, 生长 1~3 d 后, 取出盖玻片, 经 4 °C D-hanks 液冲洗 1 次, 40 mL/L 的多聚甲醛固定, 按常规 SP 染色方法进行 Desmin 染色的检测。同样取第 1、6 次使用肌块培养的原代成肌细胞, 按上述标本处理后, 用常规 SABC-FITC 法, 对其行抗肌萎缩蛋白单克隆抗体免疫荧光检测。

1.5 数据处理

组间比较用单因素方差分析, 数据用 SPSS 10.0 软件包处理。

2 结果

2.1 培养的细胞成活形态观察

初次使用肌块培养的第 2~3 天, 肉眼可见培养液颜色明显变淡, 几乎失去红色, 提示组织代谢旺盛; 第 2~3 天, 镜下可见贴壁的肌块周围梭状成肌细胞以肌块为中心密度由高到低放射布状分布; 非贴壁肌块培养孔内可见均匀散布的梭状成肌细胞。第 5~7 天贴壁肌块周围细胞肌管形成; 散落的成肌细胞肌管形成时间在第 6~7 天。重复第 6 次使用肌块培养, 可观察到同样的结果。对第 1、6 次培养出的成肌细胞以差速贴壁法 (20~30 min) 纯化后培养, 第 2 天即可见梭形、三角形等均匀一致的成肌细胞 (图 1)。

对第 1、3、6 次使用肌块法培养出的成肌细胞生长时间及肌管形成时间比较, 结果见表 1。结果表明 3 组间无统计学差异。

表 1 不同次数使用肌块培养的成肌细胞生长情况比较

Table 1 The comparison of growth status of mouse myoblast cultured by different time used muscle piece

Used times	n	Cell growth time(d)	Cell fuse time(d)
1st	12	2.67±0.65	7.0±0.74
3rd	12	2.68±0.63	6.9±1.0
6th	12	2.90±0.51	6.8±0.89

F-Test, $P > 0.05$ among three groups

2.2 Desmin 免疫细胞化学染色

取第 1、6 次使用肌块培养的原代成肌细胞, 培养 3~4 天, 用 desmin 抗体进行 SP 法间接免疫组化染色, 结果有 96% 以上的成肌细胞胞浆呈棕黄色的阳性反应, 胞核呈浅黄色反应 (图 2)。

取第 1、6 次使用肌块培养的原代成肌细胞, 培

养 3~4 天, 用常规 SABC-FITC 法对其行抗肌萎缩蛋白单克隆抗体免疫荧光检测, 结果有 96% 以上的成肌细胞单克隆抗体免疫荧光着色 (图 3)。

3 讨论

成肌细胞原代培养有组织块法和消化法。组织块法方法简单易行, 但存在组织和细胞碎片混杂问题; 组织和细胞碎片含有毒性物质, 易影响细胞的生长^[1]。组织块法首次培养时确有组织、细胞碎块混杂问题; 因组织、细胞碎块无粘壁能力, 可以在次日换液时, 用 D-Hanks 液冲起、移去; 再用一次性注射器针尖挑选肌肉组织块继续培养。第 2 次使用组织块培养时, 可用吸管将肌肉组织块吸回培养板内。这样, 细胞、组织碎块混杂问题就基本消除了。

原代培养的细胞具有体内生物学特性, 基因保真性强^[2]。肌块法原代培养成肌细胞不难, 但动物的获取、组织的采集、培养器械的反复清洗、消毒非常消耗人力物力。如何高效地培养原代成肌细胞, 是科研工作者感兴趣的问题。通常认为, 肌块法培养的成肌细胞是从肌块中爬出的, 肌块在一次培养使用后便被弃去^[3]。我们在培养成肌细胞时发现, 在隔日换液的条件下, 肌块生长状况良好, 有连续 6 次的重复繁殖成肌细胞能力。许多组织能在培养液中持续良好生长; 组织培养是研究其生理、病理特性的常用手段^[4,5]。肌肉组织在连续培养的同时, 成肌细胞不断增殖, 脱离原组织, 贴伏在培养板下壁生长。由于省去了重复组织获取、组织细胞消化等烦琐步骤, 避免了消化时间的控制问题, 一次获取组织块可重复使用 6 次以上, 使得成肌细胞培养大大简化, 效率明显提高。同时, 我们还发现非贴壁处理的肌块亦可培养成肌细胞, 但需要时间稍长, 培养液营养状态要求也高。对原代培养成肌细胞连续观察, 证实不同次数使用肌块培养的细胞生长、分化时间并无差异。本实验方法与消化法成肌细胞培养^[6]相比, 除了提高了组织块的使用效率, 尚省去了酶消化时间和消化程度等影响细胞生长的问题, 培养效率明显提高。需要注意的是, 组织培养营养需求明显大于细胞, 应隔日更换培养液, 否则影响细胞增殖。

细胞培养的纯度是人们关注的问题。Desmin 是横纹肌特有的中间丝成分, 具有高度的组织特异

(下转第 344 页 to page 344)

水转移速度明显下降^[6]; ③在某些肺脏疾病的动物模型中, AQP5 的表达异常可能与肺水肿的发生有关^[7]。

本研究证实充血性心力衰竭中肺组织 AQP4、AQP5 mRNA 表达下降; 并与左心室舒张末压呈负相关, 与肺脏的相对质量(肺脏质量与体质量的比例)呈负相关。其结果提示, AQP4、AQP5 在心力衰竭肺水肿的形成或消散中起着一定的作用。AQP4、AQP5 在细胞膜上的分布具有一定的特点, AQP4 主要分布于小气道上皮细胞的顶质膜, AQP5 主要分布于肺泡 I 型上皮细胞的顶质膜, 而在细胞的基底膜和侧膜上并不存在^[1]。根据这种分布特点, 我们推测, 在充血性心力衰竭中肺组织 AQP4、AQP5 的表达下降, 可能导致小气道和肺泡上皮对肺泡内水分的清除功能下降, 从而使肺泡内水肿加重, 而这种变化对水分由肺间质向肺泡的转移并不产生明显的影响。

内皮素对心力衰竭的发生与发展起重要的作用。大量的研究显示拮抗内皮素的治疗可改善心衰的症状和预后。本研究中, 选择性 ETA 受体拮抗剂 FR139317 明显改善心衰大鼠的血液动力学, 降低血浆内皮素-1 浓度, 减轻肺质量, 显示其治疗心衰有良好疗效。本研究结果显示, FR139317 使心力衰竭大鼠肺组织 AQP4 和 AQP5 的表达上升,

提示内皮素系统对心衰肺组织 AQP5 表达起一定的调节作用。

参考文献:

- [1] Beitz E, Schultz J E. The mammalian aquaporin water channel family: a promising new drug target[J]. *Curr Med Chem*, 1999, 6(6): 457.
- [2] Chen X C, Zhang X M, Luo N S, *et al*. Effects of ETA antagonist FR139317 on rats with congestive heart failure[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2001, 22(10): 896.
- [3] Pfeffer M A, Pfeffer J M, Fishbein M C, *et al*. Myocardial infarction size and ventricular function in rats[J]. *Cir Res*, 1979, 44(2): 503.
- [4] Donald B H, Norman B. A technique to estimate the quantity of infarcted myocardium post mortem[J]. *Am J Clin Pathol*, 1974, 61(2): 242.
- [5] Ruddy M K, Drazen J M, Pitkanen O M, *et al*. Modulation of aquaporin 4 and the amiloride-inhibitable sodium channel in perinatal rat lung epithelial cells[J]. *Am J Physiol*, 1998, 274(6 Pt 1): L1066.
- [6] Song Y, Ma T, Matthay M A, *et al*. Role of aquaporin-4 in airspace-to-capillary water permeability in intact mouse lung measured by a novel gravimetric method[J]. *J Gen Physiol*, 2000, 115(1): 17.
- [7] Towne J E, Harrod K S, Krane C M, *et al*. Decreased expression of aquaporin (AQP)1 and AQP5 in mouse lung after acute viral infection[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2000, 22(1): 34.

(编辑 刘清海)

(上接第 340 页 from page 340)

性^[7], 是鉴定成肌细胞有效的方法; 抗肌萎缩蛋白是骨骼肌细胞膜的特异框架蛋白^[8]。实验通过对第 1、6 次培养的成肌细胞, 在差速贴壁纯化后, 进行鉴定, 见有 96% 以上的细胞 desmin 免疫染色呈阳性, 同时有 96% 以上的细胞抗肌萎缩蛋白单克隆抗体荧光反应阳性, 提示多重肌块法培养成肌细胞纯度高, 是高效的细胞培养方法, 为进一步研究肌营养不良和其他疾病的治疗研究以及成肌细胞特性研究提供了简便途径。

(本文图 1~3 见封 2. Fig. 1~3 Shown in inside front cover)

参考文献:

- [1] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版公司, 1996. 62~72.
- [2] 鄂征. 组织培养和分子细胞学技术[M]. 北京: 北京出版社,

1995. 92~93.

- [3] 周菲, 秦永文, 荆清, 等. 成年大鼠成肌细胞的原代培养[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2001, 3(1): 43.
- [4] Snyder K A, Costantini L C, Graber D J. Development of striatal patchy matrix organization in organotypic co-cultures of perinatal striatum, cortex and substantia nigra[J]. *Neuroscience*, 2001, 103(1): 97.
- [5] 张烁, 邱良秀, 沈远平. 各类滴眼剂对角膜上皮细胞的毒性组织培养法研究[J]. *眼科新进展*, 1999, 19(3): 158.
- [6] 王训, 张成, 刘焯霖, 等. 小鼠成肌细胞的培养纯化和鉴定方法[J]. *中山医科大学学报*, 2000, 21(1): 6.
- [7] Fishchman D A. Monoclonal antibodies to desmin; evidence for stage dependent intermediate filament immunoreactivity during cardiac and skeletal muscle development[J]. *Ann NY Acad Sci*, 1985, 455(2): 167.
- [8] Koenig M, Monaco A P, Kunkel L M. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein[J]. *Cell*, 1988, 53(2): 219.

(编辑 刘清海)

成肌细胞培养的重复肌块法 (正文见第 339 页)

Better Method in Myoblast Cell Culture with Small Muscle Pieces Reuse (Text in page 339)



图 1 重复使用肌块培养的成肌细胞

图 2 重复使用肌块培养的成肌细胞 desmin 免疫组化染色(100 倍)

图 3 重复肌块培养的成肌细胞 dystrophin 免疫荧光染色

Fig. 1 The myoblast cells cultured with the reused muscle pieces(100 ×)

Left: the first time used cells; Right: the 6th time used cells

Fig. 2 Immunohistochemical stain of desmin of the myoblast cells cultured by the reused muscle pieces (100 ×)

Left: the first time used cells; Right: the 6th time used cells

Fig. 3 Immunofluorescence stain of dystrophin of the myoblast cells cultured with the reused muscle pieces (100 ×)

Left: the first time used cells; Right: the 6th time used cells

HSV-TK/GCV 系统治疗口腔鳞癌移植瘤的研究 (正文见第 372 页)

The Therapeutic Efficacy of AdCMVHSV-TK/GCV System on the Treatment of Oral Squamous Carcinoma Xenografts (Text in page 372)

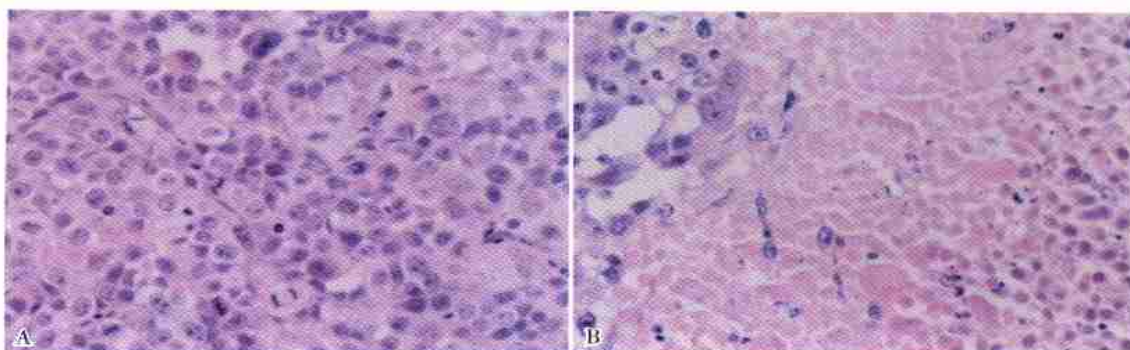


图 2 AdCMVHSV-TK/GCV 系统治疗口腔鳞癌移植瘤后组织病理学改变

Fig. 2 Histopathological changes of xenografts after treated with AdCMVHSV-TK/GCV system

A: Control; B: HSV-TK/GCV treated group (HE, × 100).