

显著减轻二甲苯导致耳廓肿胀；显著抑制大鼠蛋清性足跖肿胀；使溃疡面积显著减小，加快溃疡愈合，明显改善受损组织病理变化；且相同剂量不同品种间的作用无差异性，提示不同品种大黄的抗炎、减轻局部炎症、改善皮肤受损，促进创面肉芽及皮肤生长的作用一致。

对于外用中药促创面愈合的使用机理，中医有“去腐生肌，煨脓长肉”之说^[9]。是指在疮面愈合的后期阶段，运用外敷中草药膏(散)，经皮肤和创面对药物的吸收，促进局部的气血通畅，增强其防御能力，使创口脓液渗出增多，载邪外出，从而达到促进创面生长的目的。此法一是提脓祛腐拔毒，增加局部脓液的渗出；二是渗出的脓液有助于创面肉芽、皮肤的生长，祛腐生肌。在创面愈合中期，此种脓液越多，则创面愈合越快。又经查询中药功能-临床应用-药理作用数据库可知治疗下肢溃疡内服功能主要是清热解毒、散结止痛、活血消肿、敛疮生肌等。皮肤溃疡是中医外科常见病、多发病，是以皮肤溃疡为主要临床表现长期不能愈合为临床特征，皮肤组织缺损液化坏死的一种体表疾病，本实验证明大黄油糊能显著减少溃疡面积，加快溃疡愈合，提示大黄治疗溃疡的关键在于收敛生肌。大黄外用也可用于冻疮溃烂、化脓性中耳炎、烫伤、糖尿病并发下肢溃疡、口腔溃疡等的治疗，这与大黄的外用收敛生肌功能是一致的。本实验为临床皮肤溃疡提

供了一种简便的救治方法，为大黄外用具有收敛生肌的作用提供了实验依据。

REFERENCES

- [1] YING W X, CHEN H, LI R Z. Effects of combination therapy of rehin and pioglitazone on rats with nonalcoholic steatohepatitis [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2012, 29(7): 578-583.
- [2] DAI D S, CUI S Z. Rhubarb for external use status and progress [J]. Guangming J Chin Med(光明中医), 2006, 21(11): 57-58.
- [3] YANG Q F, MENG Q G. Inflammation animal models to agent [J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学杂志), 2008, 26(3): 516.
- [4] HAN X M, LUO Y H, Shi Y F. Experimental study on the treatment of chronic ulcer of skin sore model [J]. J Liaoning Univ TCM(辽宁中医药大学学报), 2009, 11(5): 207-209.
- [5] QIAN P C, SHI H. Hemorrhoids animal model making method research progress [J]. Chin J Comp Med(中国比较医学杂志), 2007, 17(2): 119-122.
- [6] MA Z G, JIANG N, YU M Y. Research progress of hemorrhoids model [J]. Acta Lab Anim Sci Sin(中国实验动物学报), 2010, 18(5): 446-450.
- [7] MIAO M S. Legal Chinese Medicine Pharmacology and Clinical(法定中药药理与临床) [M]. Xi'an: World Publishing Corporation, 1998: 445.
- [8] JIANG G P, YANG L Y, ZHANG J. Joint compound loose hot oil fractions paste the curative effect of the treatment of chronic eczema observation [J]. Abstr Chin Med(中国医学文摘), 2009, 26(6): 355-357.
- [9] ZHU H D, YANG Y R, GAO F X. Toxicity study on major pharmacodynamic of Kezhi suppository [J]. China Pharm(中国药师), 2005, 8(7): 44-46.

收稿日期: 2012-02-21

昆明小鼠心肌细胞分离方法及动作电位、L 型钙通道电流记录

李映新^a, 黄媛恒^b, 林兴^c, 黄仁彬^{a*} (广西医科大学, a.药学院; b.基础医学院实验生理学科学实验中心; c.医学科学实验中心, 南宁 530021)

摘要: 目的 探讨耐钙昆明小鼠心肌细胞的急性分离方法及动作电位、L 型钙通道电流的记录。方法 采用三步灌流法, 首先灌流无钙台氏液, 再换成含Ⅱ型胶原酶 $0.1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、胰蛋白酶 $0.01\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、牛血清白蛋白 $0.2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的无钙台氏液灌流, 消化液灌流期间, 每隔 5 min 加入 $20\text{ }\mu\text{L}$ 的 $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ CaCl}_2$, 以观察流出液是否有单个心肌细胞来判断消化终点, 最后灌流含 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 牛血清白蛋白的 KB 液, 采用全细胞膜片钳记录方式记录动作电位及 L 型钙通道电流。结果 获得 $80\%\sim 90\%$ 杆状心肌细胞, 复钙后, 仍有 60% 细胞保持静止, 细胞表面干净整洁, 折光性强, 边缘和横纹清晰, 立体感强, 获得 60% 左右的耐钙心肌细胞, 并记录到典型的动作电位、L 型钙通道电流。结论 该分离方法分

基金项目: 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科攻 0630002-2A); 广西中医药科技专项课题(GZKZ10-122); 2011 年广西研究生创新计划项目(2011105981002D26)

作者简介: 李映新, 女, 博士生, 讲师 Tel: 13768275697 E-mail: marchimoro@yeah.net *通讯作者: 黄仁彬, 男, 博士, 教授, 博导 Tel: (0771)5358272 E-mail: huangrenbin518@163.com

离的细胞具有耐钙性和正常电生理特性。

关键词: 昆明小鼠; 心肌细胞; 膜片钳; 动作电位; L 型钙电流

中图分类号: R331.3

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2013)06-0581-06

Isolation of Calcium-tolerant Cardiomyocytes from KM Mouse and Recording of Action Potential and the Currents of L-type Calcium Channels

LI Yingxin^a, HUANG Yuanheng^b, LIN Xing^c, HUANG Renbin^{a*} (Guangxi Medical University, a.Pharmacological School; b.Experimental Physiological Science Experiment Center; c.Medical Scientific Research Center, Nanning 530021, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore and establish simple and reliable method of isolating single calcium-tolerant ventricular myocytes of KM mouse for patch clamping and recording of action potential and the currents of L-type calcium channels. **METHODS** The three-step enzymatic dissociation method was used to isolate myocytes from ventricular tissue by the Langendorff apparatus. Hearts were perfused retrogradely with Ca^{2+} free Tyrode's solution initially, and then with Ca^{2+} free Tyrode's solution contained $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ collagenase II, $0.01 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ trypsin and $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ bovine serum albumin. During the perfusions, $20 \mu\text{L}$ $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ of CaCl_2 was added to the digestive juice every 5 minutes. The terminal of digestion was judged by observing the existence of single myocyte in the efflux solution. KB solution contained $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ bovine serum albumin was ultimately used. The action potential and the currents of L-type calcium channels were recorded by patch clamp in the entire cell mode. **RESULTS** The 80%–90% cells obtained were rod-shaped myocytes. After the recalcification, 60% cells stayed still, and the action potentials and L-type calcium channel currents could be successfully recorded. **CONCLUSION** The method is economical and effective, the myocytes obtained in this way are suitable for the recording of patch clamp technique. **KEY WORDS:** KM mouse; ventricular myocyte; patch clamp technique; action potentials; L-type calcium channel currents

目前,膜片钳技术已成为研究细胞膜离子通道和药物作用机制的重要手段,而获得高质量的细胞标本是膜片钳实验成功的最为关键因素。1952年 Moscona A 和 Moscona H^[1]利用蛋白酶,成功地从胚胎期心脏分离出单个的心肌细胞。1969年 Kono^[2]利用胰蛋白酶和胶原酶从成年大鼠分离出单个心肌细胞,酶解法分离心肌细胞应用于电生理研究广泛开展。

昆明(KM)小鼠是我国生产量、使用量最大的远交群小鼠,它在我国生物医学动物实验中的占有率约为 70%,昆明小鼠繁殖能力强及遗传差异大的特点使得其有着广泛的应用前景^[3],其低廉的价格使得实验的成本大大降低,探讨一种酶解灌流方法分离昆明小鼠心室肌细胞对实际工作具有一定指导意义。

笔者对以往的研究^[4-6]进行了改良,采用恒流 Langendorff 逆行主动脉灌流模型,对成年昆明小鼠心脏进行灌流酶解,摸索出耐钙成年昆明小鼠心肌细胞急性分离方法,并记录到动作电位(AP)和 L 型钙通道电流。

1 材料

1.1 动物与试剂

健康成年 SPF 级昆明小鼠, $(18 \pm 2) \text{g}$, ♀ ♂ 兼

用,实验动物合格证号: SCXK(桂)2009-0002,由广西医科大学实验动物中心提供; II 型胶原酶(Sigma)、胰蛋白酶(Amresco)、BSA(Sigma)、EGTA(Sigma)、HEPPS(Amresco)、NMG(Fluka),其余试剂为国产分析纯。

1.2 溶液配制

无钙台氏液: NaCl $136 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 KCl $5.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $0.33 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 HEPES $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 Glucose $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,用 NaOH 调 pH 7.35; 消化液为含 II 型胶原酶 5 mg 、胰蛋白酶(trypsin) 0.5 mg 、牛血清白蛋白(BSA) 10 mg 的 50 mL 无钙台氏液; 细胞保存液为 KB 液: KOH $70 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 KCl $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 KH_2PO_4 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ $3.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 HEPES $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 Taurine $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 EGTA $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 L-glutamic acid $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 Glucose $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,用 KOH 调 pH 7.35; 记录钙电流的电极外液: N-乙酰-D-葡萄糖胺(NMG) $140 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 4-AP $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 CsCl $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 CaCl_2 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 MgCl_2 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 HEPES $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 Glucose $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,用 HCl 调 pH 7.35; 记录钙电流的电极内液: CsCl $125 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 TEA-Cl $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 EGTA $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 Na_2ATP

4 mmol·L⁻¹、HEPES 10 mmol·L⁻¹，用 CsOH 调 pH 7.2。

2 方法

2.1 昆明小鼠心肌细胞的分离

分离前，Langendorff 灌流装置先用 75%酒精冲洗灌流管道 10 min，再用去离子水冲洗 10 min。分离所需的所有灌流液均预先通 20 min 以上纯度为 100%氧气，灌流装置通过恒温水浴箱循环装置保持灌流液(37±0.5)℃恒温。将 5 号针头制作的动脉套管套在注射器上，注射器充满无钙台氏液并排空气泡。

行小鼠颈部脱臼，在剑突下沿肋缘剪开一 2 cm 左右的横行切口，沿肋缘剪开膈肌，向上剪开两侧肋骨，呈“U”形向上翻起，暴露胸腔。见到心脏及主动脉后，迅速剪断主动脉取出心脏，将心脏放入含肝素(1 000 U·mL⁻¹)并预先氧饱和的-4℃无钙台氏液中，进行简单修饰，将主动脉插到已经准备好的动脉套管，用特制的小鼠动脉夹固定后再用线固定，松开动脉夹，迅速把动脉套管从注射器取下，接到 Langendorff 灌流装置进行灌流。灌流采用三步灌流法，即先灌流无钙台氏液至心脏停止搏动且流出液变澄清，此过程大概 3~5 min，再改用酶液循环灌流，酶液灌流过程中，每隔 5 min 加入 20 μL 浓度为 20 mmol·L⁻¹ CaCl₂，酶消化 10 min 后，每隔 2 min 取几滴从心室流出的灌流液至显微镜观察，当观察到有单个心肌细胞时可以停止消化，改用含有 1 mg·mL⁻¹ BSA 的 KB 液灌流 3 min。整个灌流过程灌流液始终保持通 O₂，灌流液由蠕动泵驱动，流速为 2 mL·min⁻¹。灌流结束后，剪取心室部分，并放在装有 KB 液的培养皿中用镊子轻轻撕扯，使细胞脱离出来，200 目钢筛过滤，残余组织块放入 37℃水浴 5 min，用吸管轻轻吹打，取上清液过滤，滤液合并后静置 10 min，弃去上清，重新加入 KB 液重悬后放入 4℃冰箱保存，1 h 后可用于进行膜片钳实验。

2.2 AP 和 Ica-L 的记录

取几滴富含心肌细胞的悬液滴入 35 mm 培养皿中，待贴壁后，用记录钙电流的细胞外液小心灌流冲洗，流速为 1.5 mL·min⁻¹。电极由 Sutter P-97 控制仪三步控制而成，充灌电极内液后电极电阻为 2~5 MΩ，用 EPC10 放大器采用全细胞模式记录 Ica-L：通过微操纵器(MP-285)将电极轻压细胞表面，此时电阻升高，至测试脉冲波形下降约 1/3

时给予负压吸引直至形成 GΩ以上高阻封接，待稳定后继续给予负压破膜，补偿后在电流钳模式下记录 AP，在电压钳模式下记录 Ica-L。整个记录过程在 Pulse 软件控制下进行，Pulsefit 进行数据的转换输出，数据处理采用 Sigmaplot 10.0 软件。

3 结果

3.1 细胞形态学观察

刚分离出来的细胞有 80%~90%呈杆状，有明显横纹，为活的心肌细胞，其余成团为死亡细胞。KB 液放置 1 h 后，约剩 80%~70%左右心肌细胞成活。在镜下观察可见好的心肌细胞表面干净整洁，折光性强，边缘和横纹清晰，立体感强，结果见图 1。电极外液复钙后，部分细胞开始发生地自律性收缩并挛缩成团至死亡，但仍有 60%左右状态好的细胞保持静止或数分钟 1 次的自律性收缩，为可用于膜片钳实验的耐钙细胞。该方法所分离的细胞在 KB 液 4℃保存，24 h 后仍有活性，可供 2 d 实验使用。

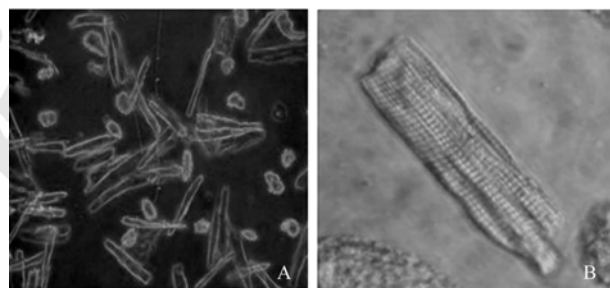


图 1 耐钙的昆明小鼠心肌细胞

A—分离即刻的 KM 小鼠心肌细胞(100×); B—典型的 KM 小鼠心肌细胞(400×)

Fig 1 Calcium tolerant ventricular myocytes of KM mice

A—light micrograph of isolated cardiocytes from KM mouse ventricle(100×); B—typical appearance of individual cardiocytes(400×)

3.2 AP 的记录

在电流钳模式下给予脉宽 5 ms、电流 1 nA 刺激，记录 AP，得到小鼠心肌细胞 AP，小鼠心肌细胞 AP 有明显的 1 相，复极较快，平台期不明显，使 AP 外形表现为尖峰状，见图 2。APD₂₀ 为(6.9±0.8)ms，APD₅₀ 为(9±1.7)ms，APD₉₀ 为(20±2.6)ms，APA 为(112±4.7)mV，RMP 为(73±5.8)mV(n=10)，与文献报道接近^[7]。

3.3 Ica-L 的记录

记录 Ica-L 的刺激方案为：钳制电压-40 mV，从-40 mV 起以 10 mV 台阶逐步去极化至+60 mV，电压刺激时程为 250 ms，用该刺激方案可引出一缓慢失活的内向电流，其激活和失活过程均呈电

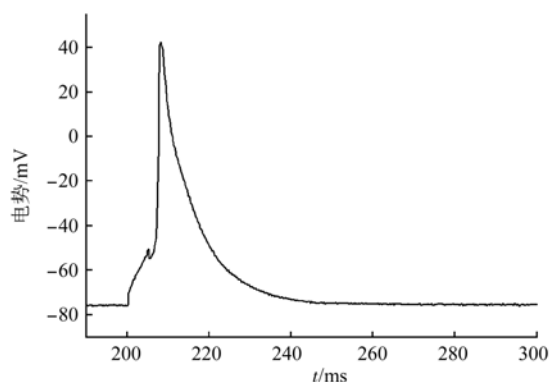


图2 昆明小鼠心室肌细胞动作电位

Fig 2 Action potential of ventricular myocytes of KM mice

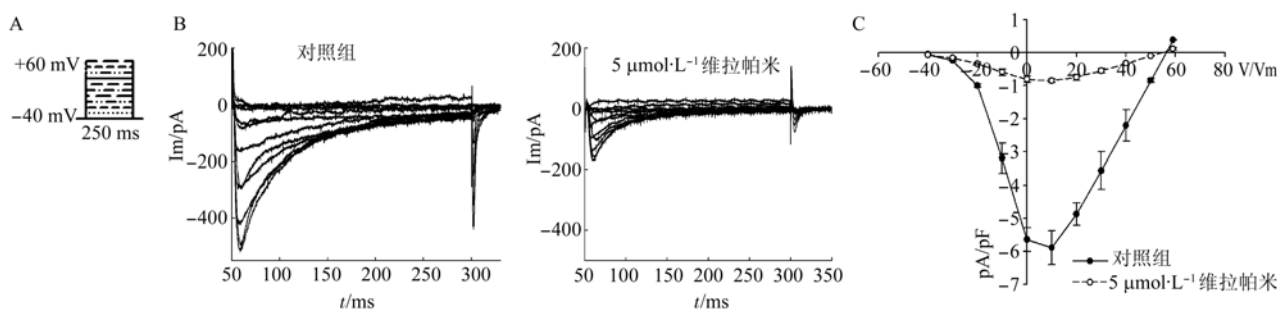


图3 昆明小鼠心室肌细胞 L 型钙通道电流及维拉帕米的阻断作用

A-刺激方案; B-L 型钙通道电流及维拉帕米的阻断作用; C-电流-电压关系曲线($n=10$)

Fig 3 Record of L-type calcium current in ventricular myocytes of KM mouse and the blocking effect of verapamil

A-stimulating protocol; B-the current of L-type calcium and the blocking effect of verapamin; C-I-V relation of $ICa-L$ ($n=10$)

4 讨论

膜片钳技术对实验室环境、实验设备、人员技术和标本质量的要求很高,成功率低,尤其要稳定地获得高数量和高质量的心肌细胞实验标本比较困难。

虽然从胚胎期或幼年动物分离出心肌细胞进行培养的技术已经很成熟,但是胚胎期和幼年心肌细胞为非成熟细胞,其离子通道尚处于分化过程,和成熟心肌细胞在数量、结构和功能上存在很大差异^[9]。

急性分离法是一种分离哺乳动物成熟细胞或神经元常用的方法,该法分离的细胞具有已经分化成熟,远离对它可能产生影响的环境,电生理记录结果比培养的细胞更接近生理状态的优点。目前心肌细胞的急性分离大多沿用 Langendorff 较早建立的主动脉逆行灌流模型。但是该法一直存在“钙反常”现象,分得的细胞质量不高,往往在复钙后发生细胞死亡^[10],所谓“钙反常”现象,即心肌细胞一旦从无钙或低钙环境重新进入生理钙浓度溶液,由于细胞膜通透性增加,当 Ca^{2+} 再

压和时间依赖性,以各脉冲下峰密度(pA/pF)对相应膜电位做图,可得到 I-V 曲线,从 I-V 曲线看,该电流从 -30 mV 左右开始激活,0~+10 mV 左右达到峰值,翻转电位在 +50~+60 mV,与文献报道的 L 型钙电流的特征符合^[8],维拉帕米可使该电流幅值减小,说明维拉帕米可阻断该电流,本实验电极外液不含 Na^+ ,且在钳制电压 -40 mV 下,钠通道和 T 型钙通道失活,这排除了钠通道和 T 型钙通道的干扰;内、外液有 4-AP、CsCl、TEA-Cl 等阻断 K^+ 电流, K^+ 电流的干扰也可以排除。证明所记录电流为 L 型钙电流。结果见图 3。

进入细胞后,诱发细胞内质网中的 Ca^{2+} 释放,使胞浆内 Ca^{2+} 的浓度增高,抑制了舒张过程所必需的 Ca 和肌钙蛋白的解离,从而导致细胞的挛缩,有序结构被破坏和死亡^[11]。自 Powell 等^[12]于 1976 年首先成功分离出单个钙耐受成熟心肌细胞以来,几十年来研究者一直为提高良好心肌细胞获得率和减低细胞的钙异常而不懈探索。人们主要通过改进实验装置,改变灌流液成分,加入保护剂等来改善分离条件,虽然分离的主要原则大致相同,但在操作细节,灌流液体的种类和配制成分及剂量选择等方面仍有一定差异,至今仍无统一的方法可循。

本实验采用采用三步灌流法进行恒流灌注,通过观察流出液来判断消化终点,同时针对 Langendorff 灌流酶解法存在“钙反常”现象,改变酶消化过程中钙离子浓度,得到的耐钙小鼠心室肌细胞得率与以往报道的方法相当^[4-6],对其进行膜片钳实验,能记录出正常的 AP 和 L 型钙电流,说明有正常心肌细胞的电生理特征,可用于电生理实验研究。本实验做了以下几方面改进。

第一为灌流步骤选择。

本实验采用三步灌流法,即无钙台氏液-酶液-KB液,省去传统灌流法中灌流有钙台氏液一步,因在实际操作中,只要取心和挂心的时间够短,灌流无钙台氏液后,1 min内心脏仍可自行搏动,足于清除残血,且可以减少搏动,降低耗氧量从而保护心肌细胞。而灌流无钙的台式液目的是使心肌细胞之间的桥粒连接松散,为下一步的消化分离作准备。灌流酶液是消化组织中连接部分使其成为单个心肌细胞,消化结束后改灌流含有 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ BSA的KB液,KB液为高钾溶液,可保护停搏的心肌细胞,减少其能量的损耗,有研究表明^[13-14]用高钾溶液保存心肌细胞可以大大提高细胞的存活率和耐钙,保存其中的心肌细胞具有正常电生理特征,而加入BSA对已经消化出来的细胞膜有保护作用,使其免于酶液的进一步消化。

第二为酶液成分的选择和剂量。

在酶的选择上,II型胶原酶消化作用比较温和,不容易损伤细胞膜。根据文献报道^[15],使用混合酶比单纯酶的效果好,蛋白酶能够去除细胞表面的蛋白,使细胞表面干净整洁,更易于封接。一般常用胶原酶+蛋白酶E,但笔者发现虽然胰蛋白酶对细胞损伤大,但只要和胶原酶的配比适当 $1:10\sim 1:8$,也能达到很好的分离效果,且价格比蛋白酶E低廉得多,可代替蛋白酶E。牛血清白蛋白(BSA)对细胞膜有保护作用,急性分离的心肌细胞经过长时间的消化,对细胞膜的损伤很大,如果在酶液中加入一定量的BSA能起到保护作用,但BSA加入太多又会影响酶的消化能力,采用II型胶原酶和BSA的比例 $1:1\sim 1:2$ 既能保护细胞又能达到较好分离效果。因此在酶液配方上,本实验于50 mL的无钙台氏液加入II型胶原酶5 mg、胰蛋白酶0.5 mg、BSA 10 mg对昆明小鼠心脏进行消化,降低的酶浓度能够在不明显延长消化时间的前提下防止消化过度,提高耐钙细胞的比例,在室温为 $(22\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 条件下15 min左右即可达到满意的分离效果。

第三为梯度增加消化液中 Ca^{2+} 。

心肌细胞要在无钙或微钙的环境下进行分离,而酶活性的充分发挥,需要一定的钙离子存在,虽然消化过程中心肌细胞也释放内源性钙,但不足以充分激发酶的活性。本实验采用在酶消化过程中梯度增加消化液钙离子的方法,为的是

一方面激活酶的活性,缩短消化时间,而增加的钙离子浓度又不至于引起消化心肌细胞的损伤;另一方面使得心肌细胞从无钙环境逐步过渡到有钙环境,避免突然重新处于生理钙浓度环境时出现钙反常现象。

最后进行消化终点的判断。

Langendorff酶解灌流难于得到质量和产量稳定的心肌细胞,其消化终止时间不容易判断是主要原因之一。消化时间过短,杆状细胞得率低,消化时间过长可造成细胞膜不可逆的损伤,得到肿胀、横纹模糊的杆状细胞,不能形成高阻封接。按以往的方法^[4-5]虽然可以对灌注压变化进行监控,根据压力大小判断终点,但这需要压力传感及信号采集设备,实际上,很多实验室是根据经验判断,目前很多报道^[16-18]都以心脏心内膜红色消失,变膨大松软作为终点的判断标准,但是这些标准主观性强,难以掌握,且不同个体的心脏有所差别。本实验方法观察灌流流出液,当在显微镜下发现灌流流出液有单个心肌细胞时终止消化,可以比较稳定的获得高质量和高数量的心肌细胞,具体做法:消化10 min后,每隔2 min轻轻挤压心室使细胞更易于脱离,取几滴流出液镜下观察,当发现有杆状细胞即可停止消化。

其他影响因素有:小鼠心脏体积小,主动脉细,因此要选择合适型号的针头,同时注意挂心脏的位置一般以右心房上缘约1.5 mm,不超过主动脉瓣口为宜;配试剂的所有水要用达到双蒸水以上水质的高纯水或去离子水;注意灌流液的温度以出口处温度为准;灌流液的pH值,转换灌流液时避免空气进入管道以及手术的熟练程度等。影响细胞分离的因素很多,其中每个步骤都是可以调节和控制的,在分离时每一细节都要谨慎认真。

小鼠由于主动脉细,难于插管;插管深度不易把握,容易造成心肌缺血缺氧;小鼠心脏体积小消化时间也不好判断等,实验难度较大,目前对小鼠心肌细胞分离的研究不多。此成年昆明小鼠心室肌细胞急性分离方法省去经典方法中灌流台氏液一步,采用胰蛋白酶代替蛋白酶E和II型胶原酶以一定配比混合进行消化,胶原酶用量少;在灌流过程梯度增加 Ca^{2+} ,减少细胞钙超载;不需监控压力而是通过观察流出液判断消化终点,最后用含牛血清白蛋白的KB液灌流冲洗残酶和保存心肌细胞,实验操作步骤简单,可操作性强,

易于被初学者掌握, 所得细胞耐钙且有正常的电生理特性可供膜片钳实验使用。

REFERENCES

- [1] GASPARDONE A, GRETA F, VERSACI F, et al. Predictive value of C-reactive protein after successful coronary artery stenting in patients with stable angina [J]. *Am J Cardiol*, 1998, 82(4): 515-518.
- [2] BLAKE G J, RIDKER P M. Novel clinical markers of vascular wall in inflammation [J]. *Circ Res*, 2001, 89(9): 763-771.
- [3] ZHANG G B, YAO G H. The genetic background survey of KM mice in China [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*(中国实验动物学报), 1997, 4(7): 246-251.
- [4] ZHANG R, YU Z B, WANG Y Y. Isolation of cardiomyocytes from the adult mouse heart [J]. *Acta Physiol Sin*(生理学报), 2004, 56(5): 656-660.
- [5] CHANG C X, GU S K, ZHOU X, et al. Isolation of cardiomyocytes from KM mice and L-type Ca^{2+} current of observation [J]. *J Tianjin Med Univ*(天津医科大学学报), 2011, 19(1): 117-119.
- [6] FANG Z, LU C Y, LI Y. An improved method for mouse ventricular myocardioid isolation and the recording of potassium currents [J]. *Chin J Cardiac Pacing Electrophysiol*(中国心脏起搏与电生理), 2011, 25(6): 532-535.
- [7] SUN Z J, DONE D L, YANG B F. Characterization of potassium currents and action potential in mouse ventricular myocytes [J]. *J Harbin Med Univ*(河北医科大学学报), 2003, 37(3): 189-191.
- [8] WEI W, WU X M, LI Y J. Experimental Methodology of Pharmacology(药理实验方法学) [M]. Vol 4. Beijing: People's Health Press, 2011: 973-975.
- [9] LIAO H, MI T, TU Z Y, et al. A modified method for isolation of adult rat cardiomyocytes [J]. *J Clin Rehabil Tiss Eng Res* (中国组织工程研究与临床康复), 2009, 33(13): 6536-6539.
- [10] LIUZZO G, BIASUCCI L M, GAUINORE J R, et al. The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid A protein in severe unstable angina [J]. *N Engl J Med*, 1994, 331(7): 417-404.
- [11] DOW O W, HARDING N G L, POWELL T. Isolated cardiac myocytes [J]. *Cardiovasc Res*, 1981, 15(9): 483-514.
- [12] MITCHESON J S, HANCOX J C, LEVI A J. Cultured adult cardiac myocytes: future applications, culture methods, morphological and electrophysiological properties [J]. *Cardiovasc Res*, 1998, 39(2): 280-300.
- [13] LI S, BLASCHKE M, HEUBACH J F, et al. Effects of azelastine on contractility, action potentials and L-type Ca^{2+} current in guinea pig cardiac preparations [J]. *Eur J Pharmacol*, 2001, 418(1/2): 7-14.
- [14] ZHAO M M, ZHAO J S, GAO Q H. Isolation of guinea-pig ventricular myocytes and observation of its electrophysiological characteristics [J]. *J China Med Univ*(中国医科大学学报), 2010, 39(4): 248-254.
- [15] YAAZAWA K, KAIBARA M, OHARA M, et al. An improved method for isolating cardiac myocytes useful for patch clamp studies [J]. *Jpn J Physiol*, 1990, 40(1): 157-163.
- [16] WANG R X, JIANG W P. Isolation method and experience of normal calcium-tolerant ventricular myocytes of Sprague-Dawley rat [J]. *Chin J Cardiac Pacing Electrophysiol*(中国心脏起搏与电生理), 2007, 21(1): 59-63.
- [17] YU J Q, GAO E, HAN H R, et al. Isolation of calcium-tolerant cardiomyocytes from rats [J]. *J China Pharm*(中国药房), 2009, 20(4): 254-255.
- [18] WEI L L, MO S R. Emergent isolation of myocardial cells from adult rats [J]. *Chin J Tiss Eng Res*(中国组织工程研究), 2012, 11(16): 1969-1972.

收稿日期: 2013-01-10

反复重度低血糖对糖尿病大鼠海马 PKA/PKC/CaMK II 磷酸化信号通路的影响

项迎春¹, 廖美华², 田允², 黄继云², 陶蓉蓉²(1.浙江医院药剂科, 杭州 310013; 2.浙江大学药学院, 药理毒理与生化药学研究所, 杭州 310058)

摘要: 目的 观察 2 型糖尿病大鼠在诱发反复重度低血糖时海马组织中蛋白激酶 A(PKA)、蛋白激酶 C(PKC)、钙调素依赖蛋白激酶 II (CaMK II) 磷酸化信号通路相关蛋白水平变化, 探讨其在认知功能损害中的作用。方法 将大鼠随机分为 4 组: 对照组、糖尿病组、反复重度低血糖组和糖尿病反复重度低血糖组。采用链脲佐菌素(STZ)建立 2 型糖尿病大鼠模型; 对照组、糖尿病组给予生理盐水, 反复重度低血糖组和糖尿病反复重度低血糖组给予普通胰岛素连续注射 4 d 使呈反复重度低血糖状态($<2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)。Western blot 法检测各组大鼠海马组织 PKA/PKC/CaMK II 磷酸化信号通路相关蛋白翻译后磷酸化的表达水平。结果 与正常组相比, 糖尿病反复重度低血糖组大鼠海马区磷酸化 PKA 蛋白表达水平增高($P<0.05$), 其上游 ERK 磷酸化水平也增高($P<0.05$); 而 PKC、CaMK II 信号通路的相关蛋白表达, 差异无统计学意义

基金项目: 浙江省药学会(2011ZYY06); 浙江省医药卫生科技项目(2012KYA006)

作者简介: 项迎春, 女, 硕士生, 副主任药师 Tel: (0571)87987373-6120 E-mail: xych999@126.com