

C-18 新生大鼠心肌细胞的体外培养和工程化心肌组织的初步构建

郭勇, 张西正, 魏严, 张永红
(军事医学科学院卫生装备研究所)

心肌细胞培养作为一种体外实验研究模型,可以更方便地从细胞和分子水平研究心血管疾病的发病机制,成为心血管疾病研究的一项主要手段和基本技术。如何使心肌细胞培养的方法更为简单并且使分离的心肌细胞达到理想的存活率和纯度,是体外培养心肌细胞模型的关键问题。近年来心肌组织工程研究进展迅速,构建的组织工程化心肌可作为心脏疾病研究的体外模型,也可以将来用于临床修复受损心肌组织。心室肌细胞是心肌组织工程重要的种子细胞来源之一,大量分离培养心肌细胞也是开展心肌组织工程研究的前提和基础。为此我们实验室开展了新生乳鼠心室肌细胞的体外培养的研究。

取出生 72h 内 Wister 大鼠,无菌条件下小心剪取心室组织,用冷 D-Hanks 液清洗干净后,将组织反复剪成 1mm³ 的小块,再用 D-Hanks 液清洗去血细胞,然后加入 0.1%胰酶置于 37℃摇床中 130rpm 消 58min,轻轻吹打组织,吸取上清,加入胎牛血清终止消化。剩余组织重复以上操作,直到组织消化完全(第一次消化下的细胞悬液弃去)。用 200 目不锈钢网过滤收集上清,离心收集细胞,加完全培养基,即 15%FBS 的高糖 DMEM 培养基培养,每两天换液一次。(培养第三天换上含有含有 0.1mmol/L Brdu 培养液,以后仍用普通培养液)培养到第三天发现有细胞搏动,以后搏动的细胞越来越多,搏动频率的和幅度也逐渐增大,培养一个月后,细胞搏动逐渐缓慢以至于停止,持续搏动达 50d。培养过程中有的心肌细胞连成片或一簇搏动。通过免疫细胞化学检测,心肌细胞表达肌节型 α 肌动蛋白和连接蛋白 Cx43,这两种蛋白在培养种表达增加。这说明在体外二维培养条件下,新生大鼠心肌细胞也在生长发育,变得更成熟。

我们以纤维蛋白生物胶为支架,以刚分离出来的新生心室肌细胞为种子细胞,初步构建出了工程化心肌,体外培养四天后,在显微镜下看到心肌细胞搏动,以后心肌构建物在显微镜下的搏动频率的和幅度也逐渐增大,培养一个月仍然保持搏动,但肉眼未能观察到心肌构建物的搏动。(基金项目:天津市自然科学基金重点项目(06YFJZJC02000),全军医药卫生科研基金面上项目(06MA344))

参考文献:

- [1] 薛庆善. 体外培养的原理与技术. 北京: 科学出版社, 2001. 618—636.
- [2] Suzuki T, Ohta M, Hoshi H. Serum free chemically defined medium to evaluate the direct effects of growth factors and inhibitors on proliferation and function of neonatal rat cardiac muscle in culture. *In vitro Cell Dev Biol*, 1989, 25 (7): 601—606.
- [3] 王涛,余志斌,谢满江等,新生大鼠心肌细胞培养技巧. 第四军医大学学报. 2003; 24 (2): 封 2-01

C-19 L-选择素水解断裂对选择素-配体反应动力学的影响

贾满凌, 龙勉

(中国科学院力学研究所, 国家微重力实验室 / 生物力学与生物工程中心, 北京 100080)

水解断裂 (shedding) 是指 L-选择素受到炎症刺激因子或趋化因子激活后,被存在于膜内的金属蛋白酶水解,从细胞外近膜端断裂,形成游离在体液中和镶嵌在膜上的部分^[1,2]。水解断裂是 L-选择素特有的生物学现象,对于调控其生理功能具有重要意义。目前,对水解断裂影响 L-选择素结构、反应动力学和生理功能等方面的了解仍不清楚。例如:水解断裂是否会导致 L-选择素的结构发生变化,是否与 L-选择素快速动力学反应特点有关,等等^[3]。

本文以人淋巴瘤细胞 Jurkat T cell 为细胞模型,采用微管吸吮技术和小概率动力学模型,对刺激因子(如佛波醇 PMA)诱导 L-选择素全部和部分水解断裂、阻断剂(如 TAPI-0)全部和部分阻断 L-选择素水解断裂条件下,L-选择素与其配体 PSGL-1 的二维反应动力学进行了研究,对上述不同条件下 L-选择素/PSGL-1 作用的反应动力学参数进行了比较。初步实验结果(图 1)显示:与正常情况相比,随水解断裂的程度不同,L-选择素的负反应率有不同程度的降低而有效反应亲和性有不同程度的升高。由此提示:1. 水解断裂并不是 L-选择素负反应率高的原因;2. 伴随水解断裂,L-选择素的结构发生变化。上述结果为深化认识生理条件下 L-选择素的功能提供了新的信息。(致谢:本文得到国家自然科学基金项目(10332060/30225027)、中国科学院知识创新工程项目(KJ CX2-SW-L06)和海外杰出学者基金(2005-1-16),以及中国科学院力学所创新领域前沿项目的支持。)

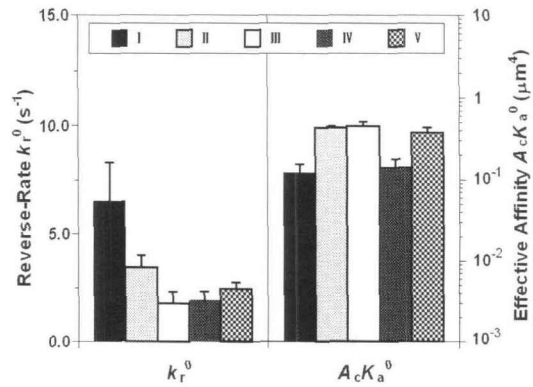


图 1 不同条件下 L-选择素/PSGL-1 作用的反应动力学参数比较。I.正常;II.全部水解断裂;III.部分水解断裂;IV.全部阻断水解断裂;V.部分阻断水解断裂。

参考文献:

- [1] Anjun Chen, Pablo Engel, and Thomas F. Tedder 1995. Structural Requirements Regulate Endoproteolytic Release of the L-Selectin (CD62L) Adhesion Receptor from the Cell Surface of Leukocytes. *J. Exp. Med.* 182: 519-530.
- [2] Gillian Borland, Gillian Murphy, and Ann Ager 1999. Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-3 Inhibits Shedding of L-selectin from Leukocytes. *J. Biol. Chem.* 274: 2810-2815.
- [3] Minh-Chau Phong, Paul Gutwein, Stephanie Kadel, Klaus Hexel, Peter Altevogt, Otwin Linderkamp, and Birgit Brennera, 2003. Molecular mechanisms of L-selectin-induced co-localization rafts and shedding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300: 563-569.

C-20 力学应变对去卵巢骨质疏松大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化能力的影响

井燕¹, 李良^{1,2}, 刘小菁², 陈孟诗³, 李毅¹, 陈槐卿^{1,2}

(1.四川大学 华西基础医学与法医学院 生物医学工程研究室,成都 610041;

2.2(四川大学 华西医院 心血管疾病研究室;3.四川大学 建筑与环境学院,成都 610065)

引言:骨质疏松是一种全身性的、代谢性的骨骼系统疾病。由于成骨细胞的功能活性降低和破骨细胞的功能活性增高,致使骨形成和骨吸收失衡,导致净骨量丢失,易于骨折。成骨细胞来源于多潜能骨髓间充质干细胞(Mesenchymal stem cells, MSCs)。成骨细胞功能活性的改变除了与成骨细胞数量、成骨细胞本身存活期有关外,其前体成骨细胞数量与功能活性也起到重要作用。力学负荷可促进骨组织生长发育,维持骨结构的完整性和功能。因此,我们假设力学刺激可以促进 MSCs 的成骨分化能力。

目的:观察力学应变刺激对去卵巢骨质疏松(ovariectomized osteoporosis, OVX)大鼠与正常大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化的影响,为骨质疏松症发生的细胞学机制提供新的佐证。

方法:分别从正常雌性大鼠和去卵巢骨质疏松大鼠股骨、胫骨中提取骨髓,采用常规梯度离心法分离 MSC。体外培养 MSC 传至第三代,以 1×10^5 的浓度接种于双轴力学应变系统培养小室,选取 4000 μ strain 对细胞加载,频率为 1 赫兹。每天加载 3 次,每次 2 h,间隔 2 h。力学实验分为:(1)加力 1d 组;(2)加力 3d 组;(3)对照 1d 组;(4)对照 3d 组;对照组均不给予力学刺激。采用 RT-PCR 法检测:骨桥蛋白(OPN),碱性磷酸