新生大鼠原代心肌细胞肥大模型的高内涵筛选应用

High-content Screening in Neonatal Rat Ventricular Myocytes (NRVMs) Hypertrophy Model

郭瑞¹, 王毅^{1,2,*}

¹ 药物信息学研究所, 浙江大学药学院, 杭州市, 浙江; ² 浙江大学智能创新药物研究院, 杭州市, 浙江

*通讯作者邮箱: zjuwangyi@zju.edu.cn

引用格式: 郭瑞, 王毅. (2021). 新生大鼠原代心肌细胞肥大模型的高内涵筛选应用. // 高内涵成像及分析实验手册. *Bio-101* e1010853. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010853.

How to cite: Guo, R. and Wang, Y. (2021). High-content Screening in Neonatal Rat Ventricular Myocytes (NRVMs) Hypertrophy Model. // High-Content Imaging and Analysis Protocol eBook. *Bio-101* e1010853. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010853. (in Chinese)

摘要: 心力衰竭作为心脏疾病发展的终末阶段, 是心血管疾病最主要死因之一, 对人类健康的威胁不亚于恶性肿瘤 (Guang *et al.*, 2019)。而心肌肥大启动心力衰竭的病理过程, 是心力衰竭的重要促进因素。其中, 心肌细胞面积增大是心肌肥大最重要的病理变化之一 (Nakamura and Sadoshima, 2018)。新生大鼠心肌细胞由于其相对易得, 与人心肌细胞有相似的生理特点, 是目前用于研究心肌细胞肥大重要细胞模型之一, 也是进行病理性心肌肥大和心力衰竭研究的理想起点 (Glembotski, 2013)。去氧肾上腺素 (Phenylephrine, PE) 是人工合成的拟肾上腺素类药物, 与高血压、心肌肥大、心力衰竭的发生密切相关, 能够直接作用于心肌细胞诱导肥大的发生 (Prasad *et al.*, 2007)。

本研究拟采用去氧肾上腺素诱导建立稳定的新生大鼠心肌细胞肥大模型, 采用双重荧光分别标记细胞骨架和细胞核, 主要通过分析心肌细胞面积变化来考察药物对心肌肥大的作用, 为心肌肥大及心衰的治疗提供新的治疗思路并探究新的作用机制。

关键词: 高内涵筛选, 心肌肥大, 荧光成像

材料与试剂

一、实验动物

新生 SD (Sprague Dawley, SD) 大鼠, 出生 0-3 天, 购于浙江省医学科学院。

二、实验材料

1. 高糖 DMEM 培养基 (Corning, 美国, catalog number: 10-013-CV)
2. 胎牛血清 (FBS) (Corning, 美国, catalog number: 35-081-CV)
3. PBS (江苏凯基生物技术股份有限公司, catalog number: KGB5001)
4. 双抗青链霉素 (sp) (Corning, 美国, catalog number: 25-053-CI)
5. 去氧肾上腺素 (PE) (上海阿拉丁生化科技股份有限公司, catalog number: P106007-10g)
6. 新生鼠心脏组织解离试剂盒 (Miltenyi, 德国, catalog number: 130-098-373)
7. 红细胞裂解液 (Miltenyi, 德国, catalog number: 130-094-183)
8. 70 μm 细胞筛网 (浙江硕华生命科学研究股份有限公司, catalog number: 251200)
9. 0.22 μm 真空滤网 (Millipore, 美国, catalog number: SLGPR33RB)
10. 96 孔黑板 (Corning, 美国, catalog number: #3904)
11. BRDU (5-溴-2'-脱氧尿苷, 溴脲嘧啶苷) (上海阿拉丁生化科技股份有限公司, catalog number: B5002)
12. Alexa Four 488 Phalloidin (Cell Signaling Technology, 美国, catalog number: 8878S)
13. Hoechst 33342 (Cell Signaling Technology, 美国, catalog number: #4082)
14. 4%多聚甲醛 (生工生物工程(上海)股份有限公司, catalog number: E672002-0500)
15. cTnT 兔抗 (proteintech, catalog number: 15513-1-AP)
16. 免疫染色一抗稀释液 (碧云天, catalog number: P0103)
17. TRITC 山羊抗兔 (proteintech, catalog number: SA00007-2)

仪器设备

1. 恒温振荡器 (Eppendorf, 美国, model: ThermoMixer C)
2. 高速冷冻离心机 (Eppendorf, 德国, model: Centrifuge 5810R)
3. Pico 个人型高内涵成像分析系统 (Molecular Devices, 美国, model: ImageXpress®)
4. 超净台 (Thermo, 美国, model: 1300SERIES A2)
5. CO₂ 细胞培养箱 (Thermo, 美国, model: Forma311)

实验步骤

一、新生大鼠心肌细胞的分离与培养

1. 乳鼠酒精消毒—开胸—取心脏放在装有含 sp 的 PBS 培养皿中——重复清洗 2 次到 3 次，剪去血管和心房，留取心室转移至空皿中。
2. 剪碎心脏组织至 1 mm³，加入少许预冷的 PBS 冲洗用吸管转移心脏碎片至 50 ml 管，静置 2 min 后吸去 PBS，加入混合后的消化液，放进 37 °C 恒温振荡器，400 x g，15 min x 3 次，每次间隙用无菌吸管吹打 60 余次。
3. 加入 15 ml 中和液（见溶液配方）终止消化，混匀后通过滤网（70 mm）过滤，并用 3 ml 中和液冲洗滤网。
4. 600 x g，4 °C，离心 5 min，弃上清；加入 10 ml 1x 的红细胞裂解液重悬，静置 2 min，再次 600 x g，4 °C，离心 5 min，弃上清；加入 10 ml 含 Enzyme A 的 PBS 重悬后用再次 600 x g，4 °C，离心 5 min，弃上清。
5. 加入 60 ml 高糖 DMEM 完全培养液重悬细胞，接种于 75 cm² 培养瓶内（每 10 只乳鼠 1 瓶），差速贴壁 30 min。
6. 差速贴壁结束后收集所有培养瓶内的上清液至 50 ml 离心管内，600 x g，4 °C，离心 5 min，弃上清，所得沉淀即为心肌细胞，加入含 0.1% Brdu 的高糖完全培养液重悬细胞，计数，将细胞按照 5,000 个/孔种入 96 孔黑板，培养 48 h。

二、心肌细胞纯度鉴定

1. 取出培养 3 天的细胞，4%多聚甲醛固定 20 min，PBS 洗 3 遍。
2. 0.2% Triton X-100 孵育 10 min，PBS 洗 3 遍。
3. 含 2% BSA 的 PBS 封闭 1 h。吸去封闭液，加入用免疫染色一抗稀释液以 1:100 比例稀释的 cTnT 抗体，4 °C 摇床孵育过夜。其后，PBS 清洗 3 遍，每次 5 min。
4. 加入用 2% BSA 以 1:100 比例稀释的 TRITC 山羊抗兔二抗，室温避光孵育 1 h。PBS 清洗 3 遍，每次 5 min。
5. 1 μg/ml Hoechst 避光染色 10 min 以标记细胞核，PBS 洗 3 遍。

三、心肌细胞肥大模型的建立

1. 原代心肌细胞培养 48 h 后，换液加入含 0.1% Brdu (0.1 mmol/l) 的高糖基础培养基，饥饿 24 h。

2. 实验分为对照组和模型组和给药组。对照组加入含 0.1% Brdu (5-溴脱氧尿嘧啶核苷) 的高糖基础培养基 (100 μ l), 模型组加入含 100 mM 的去氧肾上腺素 (PE) 和 0.1% Brdu 的高糖基础培养基 100 μ l, 给药组相较于模型组再加入相应的药物浓度, 孵育 48 h。

四、细胞固定及染色

1. 造模 48 h 后, 取出铺有原代心肌细胞的 96 孔板, 吸去培养液, PBS 漂洗 3 遍, 5 min/次。每孔加入 500 μ l 多聚甲醛固定 20 min。
2. 吸去多聚甲醛, PBS 漂洗 3 遍, 5 min/次。每孔加入 0.1% Triton X-100 透化 10 min, PBS 漂洗 3 遍, 5 min/次。
3. 避光室温条件下, 每孔加入 100 μ l Alexa Fluor 488 Phalloidin (鬼笔环肽) 染色 10 min, 吸净后每孔加入 100 μ l Hoechst(1 μ g/mL)染色 10 min, 吸净后 PBS 漂洗 3 遍, 10 min/次。
4. 每孔加入适量 PBS 保持细胞湿润, 避光 4 °C 保存, 待用。

五、高内涵成像

将 96 孔板底用擦镜纸拭后, 置于高内涵成像分析设备进行荧光成像及分析, 利用 20x 物镜加绿色, 蓝色成像通道, 选择空白孔, 阳性药孔, 调整曝光时间、激发光强度进行实验拍摄;

结果与分析

一、结果

1. 心肌细胞纯度鉴定结果

采用免疫荧光方法标记心肌细胞纯度, 结果如图 1 所示。

图 1.cTnT 抗体标记的 NRVMs 细胞

（说明：显微镜随机取 6 个不同的视野，cTnT 阳性且 cTnT 呈平行细丝状的细胞为心肌细胞，除以 Hoechst 阳性的总细胞数，计算出心肌细胞纯度为 $(80.06 \pm 3.61)\%$ 。）

2. 荧光标记的心肌细胞肥大模型

采用上述方法检测正常心肌细胞、PE 诱导心肌细胞及诱导后药物干预心肌细胞，所获得的高内涵成像图像如图 2 所示。

图 2. PE 处理的 NRVMs 细胞

二、分析

1. 打开 ImageXpress® Analysis system, 选中本次实验结果, 点击右侧第一个按钮选择相应的双通道分析方法, 操作界面如图 3 所示。

图 3. 分析结果初始界面

2. 设置细胞核蓝色通道参数, 使软件分析准确识别到细胞核, 操作界面如图 4 所示。

图 4. 细胞核染色通道

3. 确定 F-actin 染色的细胞面积的分析范围，调整 Segmentation Parameters，操作界面如图 5 所示。

图 5. 软件识别 F-actin 染色通道

4. 确定好参数以后开始运行分析系统，操作界面如图 6 所示。

图 6. 分析参数及命名

解析：可以看出，经 PE (100 μ M) 造模 48 小时以后，细胞面积增大了约 1.6 倍，该结果表明心肌肥大模型诱导成功。统计结果一般以 Control 组的三复孔面积平均数为基准进行标准化处理，每组至少 3 复孔，组间数据采用方差分析 (one-way ANOVA) 进行统计。

5. 高内涵统计数据分析结果。

采用高内涵分析系统对获得的心肌细胞代表性图片进行分析，得到的分析结果如表 1 所示。

表 1. 高内涵统计数据分析结果

	细胞核个数	阳性细胞*平均面积	相对平均面积(%)
Control	939	918.579	91.17771
	1142	910.621	90.38781
	897	1193.18	118.4345
PE (100 μ M)	1267	1550.35	153.887
	822	1627.15	161.5101
	903	1685.38	167.29
PE(100 μ M)+Drug	1077	996.811	98.94299
	716	797.142	79.12394
	991	1082.93	107.4911

注：阳性细胞：即同时识别到细胞核和细胞质的细胞。

失败经验

1. 对心肌细胞进行饥饿处理前，应使用 PBS 把残余的血清清洗干净，血清的存在可能会干扰细胞状态从而使心肌细胞肥大模型诱导失败。

溶液配方

1. 含 1% 双抗 (sp) 的 PBS:
250 ml PBS + 2.5 ml 双抗混匀备用 (用于洗心脏—预冷)
2. 完全培养液:
90% 高糖/低糖 DMEM + 10% FBS + 1% sp
3. 消化液:
(试剂盒, 每 20 只乳鼠的用量)

表 2. 消化液中不同消化酶配比

Enzyme mix 1 (μl)		Enzyme mix 2 (μl)		
Enzyme P	Buffer X	Enzyme A	Enzyme D	Buffer Y
125	4600	25	200	50

4. 中和液:
20 ml 高糖 DMEM + 5 ml FBS + 0.25 ml sp (80% + 20% + 1%)
5. 裂解液:
1x 红细胞裂解液: 1 ml 10x 裂解液 (消化试剂盒) + 9 ml MiliQ 水 (真空滤网过滤)
6. 裂解后重悬液:
15 μl Enzyme A + 10 ml 含 sp 的 PBS

致谢

感谢浙江大学药物信息学研究所-Molecular Devices 高内涵成像联合实验室的设备

支持。该项目受国家自然科学基金 (项目编号 81822047) 的支持资助。

参考文献

1. Glembotski C. C. (2013). [Classic studies of cultured cardiac myocyte hypertrophy: interview with a transformer.](#) *Circulation research* 113(10): 1112–1116.
2. Guang H, Xin W, Zuo C.(2019). [Prevalence of heart failure and left ventricular dysfunction in China: the China Hypertension Survey, 2012–2015.](#) *Eur J Heart Fail* 21(11): 1329-1337.
3. Nakamura, M. and Sadoshima, J. (2018). [Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy.](#) *Nat Rev Cardiol* 15(7): 387-407.
4. Prasad, A. M., Ma, H., Sumbilla, C., Lee, D. I., Klein, M. G., Inesi, G. (2007). [Phenylephrine hypertrophy, Ca²⁺-ATPase \(SERCA2\), and Ca²⁺ signaling in neonatal rat cardiac myocytes.](#) *American journal of physiology. Cell physiology* 292(6): C2269–C2275.