

C57胎鼠、乳鼠及成年小鼠心室肌细胞分离、培养及鉴定**☆

张玲¹, 段明军², 魏琴², 陈华¹, 时利³, 侯月梅¹

Isolation, culture and identification of ventricular cardiomyocytes from embryonal, neonate and adult C57 mice

Zhang Ling¹, Duan Ming-jun², Wei Qin², Chen Hua¹, Shi Li³, Hou Yue-mei¹

Abstract

BACKGROUND: Cultured cardiomyocytes are widely utilized in related researches such as physiological and toxicologic experiments, gene engineering, diseases model, drug screening and so on. How to harvest mouse cardiomyocytes with high activity is a key premise for these studies.

OBJECTIVE: To establish a method to isolate and culture ventricular cardiomyocytes from embryonal, neonate and adult C57 mice.

METHODS: The ventricular myocardium from fetal, neonatal and adult C57 mice were minced and digested in trypsin, the purified ventricular cardiomyocytes were obtained by differential adhesion about 1 hour. The survival rate was assessed by trypan staining. Morphology of ventricular cardiomyocytes was observed through the methods of inverted phase contrast microscope, transmission electron microscope, scanning electron microscope, and the electrophysiological properties were identified through immunocytochemistry and microelectrode array.

RESULTS AND CONCLUSION: The ventricular tissues were almost completely digested through 3-6 times. Trypan staining showed that the survival rate of the cardiocytes cultured was more than 85%. Under the inverted phase contrast microscope, we found that the cells were fusiform or polyhedron and connected to each other and some cells began beat after 12 hours. The cells monolayer formed a network and beat spontaneously at the 30-90 times per minutes. The ventricular cardiomyocytes from embryonal, neonate and adult C57 mice can be obtained with well morphology and spontaneous beating with trypsin digestion.

Zhang L, Duan MJ, Wei Q, Chen H, Shi L, Hou YM. Isolation, culture and identification of ventricular cardiomyocytes from embryonal, neonate and adult C57 mice. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(20): 3683-3687. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 培养的心肌细胞被广泛应用于心肌细胞的生理特性、毒性实验、基因工程、疾病模型和药物筛选等方面的研究。获得纯度较高活性良好的品系小鼠心肌细胞是研究的关键前提。

目的: 分离和培养 C57 小鼠胎鼠、乳鼠及成年小鼠心室肌细胞。

方法: 应用机械切碎心室肌后, 胰蛋白酶消化不同发育阶段的 C57 小鼠心室肌细胞, 差速贴壁 1 h 纯化心室肌细胞, 锥虫蓝染色判定心肌细胞活力, 体外分别培养 48~72 h 后分别行倒置显微镜、扫描及透射电镜观察细胞形态, 微电极阵列评价细胞电生理指标, 免疫组化鉴定。

结果与结论: 经 3~6 次消化后, 心室组织消化完全, 即刻细胞存活率大于 85%。倒置显微镜下观察, 细胞呈梭形、多角形。12 h 有少部分细胞搏动, 48 h 细胞交织成网, 搏动呈同步性, 搏动频率 30~90 次/min。说明用胰蛋白酶组织消化法可以成功地分离、培养, 并获得形态、活力良好的胎鼠、乳鼠及成年 C57 小鼠心室肌细胞。

关键词: 心室肌细胞; 分离培养; 免疫组化; 电镜; 微电极阵列

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.20.018

张玲, 段明军, 魏琴, 陈华, 时利, 侯月梅. C57 胎鼠、乳鼠及成年小鼠心室肌细胞分离、培养及鉴定[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(20):3683-3687. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

培养的心肌细胞被广泛应用于心肌细胞的生理特性、毒性实验、基因工程、疾病模型和药物筛选等方面的研究。C57小鼠是近亲基因高度纯合的品系动物, 其心肌细胞的纯化和鉴定一直是一个难点。

小鼠的心肌细胞离子通道瞬时外向钾电流和心肌细胞内向整流钾通道随发育而变化^[1-3], 通过膜片钳技术对单个小鼠心室肌细胞进行电生理特性的研究, 局限于单个细胞, 不能反映

细胞间电活动传导状况, 且有创、难以长时程检测。

本实验首次采用微电极标测技术(60个位点同步、动态记录)对培养的C57小鼠心室肌细胞从孕13.5 d到成年心室肌细胞的形态及随发育变化的电生理特性进行分析和比较, 为研究小鼠胎鼠心肌细胞的发育、生理特性、毒性实验药物筛选提供手段。

1 材料和方法

设计: 细胞形态学、电镜、细胞免疫组化

¹Arrhythmia VIP Laboratory, ²Section of Laboratory Animal Research, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uighur Autonomous Region, China; ³Department of Tumor, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China

Zhang Ling^{*}, Doctor, Arrhythmia VIP Laboratory, the first affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uighur Autonomous Region, China ydzhangling@126.com

Duan Ming-jun, Section of Laboratory Animal Research, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uighur Autonomous Region, China

Zhang Ling and Duan Ming-jun contributed equally to this paper.

Correspondence to: Hou Yue-mei, Doctor, Professor, Doctoral supervisor, Arrhythmia VIP Laboratory, the first affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uighur Autonomous Region, China houyuemei@sina.com

Correspondence to: Shi Li, Department of Tumor, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China

Supported by: the High Technology Research and Development Program of Xinjiang Uighur Autonomous Region,

No. 201010105*; the Open Subject of Key Laboratory of Angiocardiopathy of Xinjiang Uighur Autonomous Region, No. XJD0903-2009-03*

Received: 2010-12-20
Accepted: 2011-02-19

新疆医科大学第一附属医院¹ 心律失常 VIP 研究室, ² 医学研究中心实验动物科学部, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054; ³ 解放军总医院肿瘤科, 北京市 100853

张玲, 女, 1982 年生, 博士, 主要从事心律失常诊断、治疗及其机制的研究。
ydzhangling@126.com

并列第一作者: 段明军, 主要从事心律失常诊断、治疗及其机制的研究。

通讯作者: 侯月梅, 博士, 教授, 博士生导师, 新疆医科大学第一附属医院心律失常 VIP 研究室, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054
houyuemei@sina.com

并列通讯作者: 时利, 解放军总医院肿瘤科, 北京市 100853

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2011)20-03683-05

收稿日期: 2010-12-20
修回日期: 2011-02-19
(201012202012/YJ - Z)

及电生理实验。

时间及地点: 于 2009-06/2010-05 在新疆医科大学第一附属医院实验动物科学研究部心细胞室完成。

材料:

实验动物: 选取 2 月龄健康 C57 BL/6 孕小鼠 12 只, 孕龄分别为 13.5, 14.5, 15.5, 16.5, 17.5, 18.5 d, 每段孕龄各取 2 只^[4-5], 出生 2 d 龄的 C57 BL/6 乳鼠 6 只及出生 2 个月的成年 C57 BL/6 小鼠 6 只, 均购自新疆医科大学实验动物中心, 动物许可证号: SCXK(新) 2003-0001。实验过程中对动物的处置符合动物伦理学要求。

主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
高糖 DMEM(批号: SH30022.01B)	美国 Hyclone 公司
胎牛血清(批号: 619559), 0.05% 胰蛋白酶(批号: 25300-054)	美国 Gibco 公司
抗兔 α -actin(批号: 010186)	北京博奥森生物技术有限公司
MIC01562 倒置荧光显微镜, AxioVision 4.1 显微照相系统	德国 Zeiss 公司
冷冻干燥仪、离子建设仪、扫描电镜	日本 JEOL 公司

方法:

麻醉和取心: 孕鼠腹腔注射 10% 水合氯醛溶液 0.03 mL/kg, 待孕鼠意识丧失后将其固定于手术台上。体积分数 75% 乙醇消毒全身, 头部以下浸入乙醇 10 s, 暴露腹腔, 取出胎鼠予体积分数 75% 乙醇消毒。

固定胎鼠, 于胸骨近心处行十字切口, 弯镊轻轻挤压, 可见搏动的“桃形”心脏自行跃出。从根部将心脏夹出, 置于含青链霉素的 D-Hanks 液中并挤压心脏中残留的血液, D-Hanks 液清洗^[6-7]。

乳鼠及成年小鼠麻醉消毒步骤同孕鼠, 取心同胎鼠。

心室肌细胞的分离: 修剪心脏, 剪取心室中下 1/3 处。将心室肌移至 DMEM 液中, 无菌手术刀片将其切为 1 mm³ 左右的组织块, 吸去 DEME 液, 用 D-Hanks 液洗 1 遍, 置于 37 °C 体积分数 5% CO₂ 培养箱中, 加入 0.05% 胰蛋白酶 6 mL 消化 11~18 min(消化时间随胎鼠天数增加适当延长)。

用吸管吹打使细胞分散(注意匀速勿吹气), 吸弃上层混悬液。继续消化 11~18 min, 吹打后可见消化液变浑浊, 将上清液移入

50 mL 离心管, 加入等体积生长液终止消化, 轻轻混匀后置于冰中待用。继续消化心肌组织 3~8 次, 直至消化完全或仅余少量絮状物^[8-11]。

心肌细胞的计数和培养: 将收集的细胞悬液予 900 r/min 离心 5 min, 弃上清后, 用生长液混悬, 置于 60 mm 培养皿内, 并于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 饱和湿度的培养箱内 45 min, 差速贴壁法去除成纤维细胞, 吸出上层细胞悬液, 离心后弃去上清, 1.0~2.0 mL 生长液混悬, 锥虫蓝染色计数。

以 5×10⁸ L⁻¹ 的细胞浓接种到 6 孔细胞培养板及 MEA 电极盘中培养 48 h, 观察细胞的形态及自发搏动频率和场电位时程^[12-17]。

心肌细胞一般特性的观察:

用倒置相差显微镜观察: 倒置显微镜分别观察孕第 13.5~18.5 天胎鼠、出生 2 d 龄乳鼠及 2 个月龄小鼠的培养心室肌细胞的形态及自发搏动性。

将培养至 48 h 细胞在倒置显微镜下, 计数 10 个高倍视野中有自发搏动的细胞^[18-21]。

扫描电镜观察: 取孕 14.5 d 培养第 48 小时的心室肌细胞, D-Hanks 液冲洗数次, 4% 戊二醛固定 2 h, PBS 缓冲液清洗 10 min, 10% 四氧化锇固定 1 h, PBS 缓冲液冲洗 10 min, 分别用 50%, 70%, 80%, 90%, 100%, 100% 叔二醇各固定 10 min, 4 °C 冻冰, 冷冻干燥仪中干燥, 离子建设仪中镀金, 扫描电镜观察。

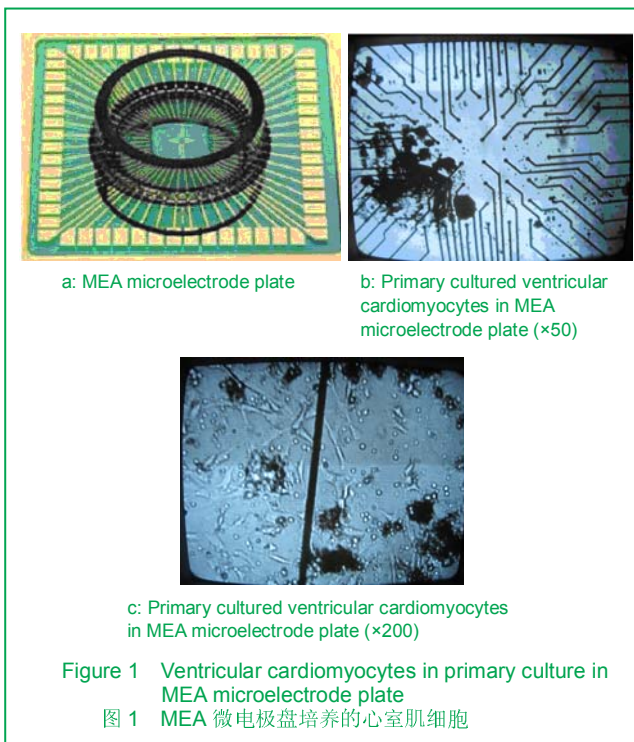
透射电镜观察: 取孕 14.5 d 培养第 48 小时的心室肌细胞用胰蛋白酶消化下来后制成浓度为 5×10⁸ L⁻¹ 单细胞悬液, 以 4% 戊二醛固定 2 h。常规梯度丙酮脱水, 环氧树脂包埋, 超薄切片 (50 nm), 以枸橼酸铅、醋酸铀双重染色后置透射电镜下观察。

细胞鉴定: 取孕 14.5 d 培养 48 小时的心室肌细胞做抗 α -actin 单克隆抗体的免疫组化检测。体积分数 95% 乙醇固定 20 min, 晾干, 蒸馏水冲洗 10 min, 山羊封闭血清室温孵育 15 min, 抗兔 α -actin(1:200) 37 °C 孵育 2 h, PBS 冲洗 10 min, 山羊抗兔 IgG 室温孵育 15 min 冲洗 10 min, 辣根酶标记链酶卵白素工作液 15 min, PBS 冲洗, DAB 显色, 复染。

MEA 记录: 用 MEA 检测技术记录培养 48 h 的小鼠胎鼠, 乳鼠, 成年鼠心室肌细胞场电位信号。

由 60 个微电极同步细胞外记录培养的心室肌细胞局部场电位时程及搏动频率的变化。德国软件 MC-Rack 对场电位信号进行采样及分

析, 见图1。



主要观察指标: 分离的成年大鼠心室肌细胞的形态学、心肌细胞的活力及心肌细胞 α -actin的表达。

统计学分析: 第二作者用SPSS 16.0统计软件进行统计学处理, 计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 所有小鼠均进入结果分析, 无脱失。

2.2 分离的心肌细胞数及细胞活力 单只孕鼠的所有胎鼠、5只乳鼠、1只成年小鼠心脏分别可分离 $4\times 10^5\sim 6\times 10^5$ 个心室肌细胞, 应用锥虫蓝染色计算心肌细胞活力为85%。

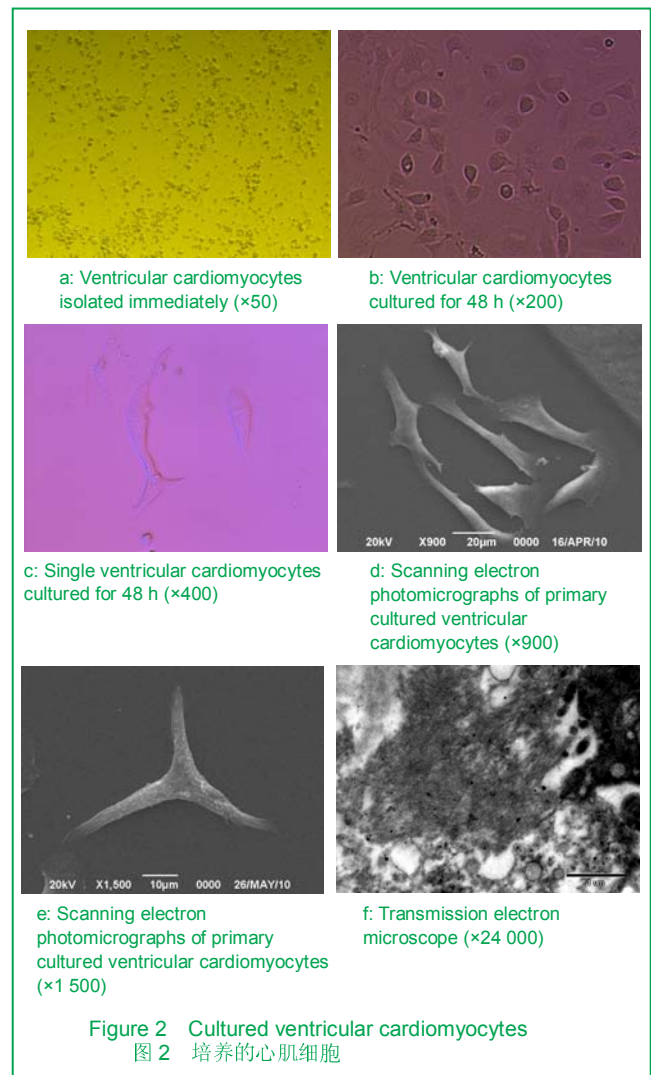
2.3 心肌细胞的一般特征 倒置相差显微镜观察可见消化后的心肌细胞为圆形, 培养1 h后开始贴壁生长, 伸展为梭形及分叉状等。于培养12 h少数贴壁的细胞出现自发搏动, 但搏动频率和节律不同。

培养24 h大部分细胞可生长为单层, 搏动频率为30~90次/min。

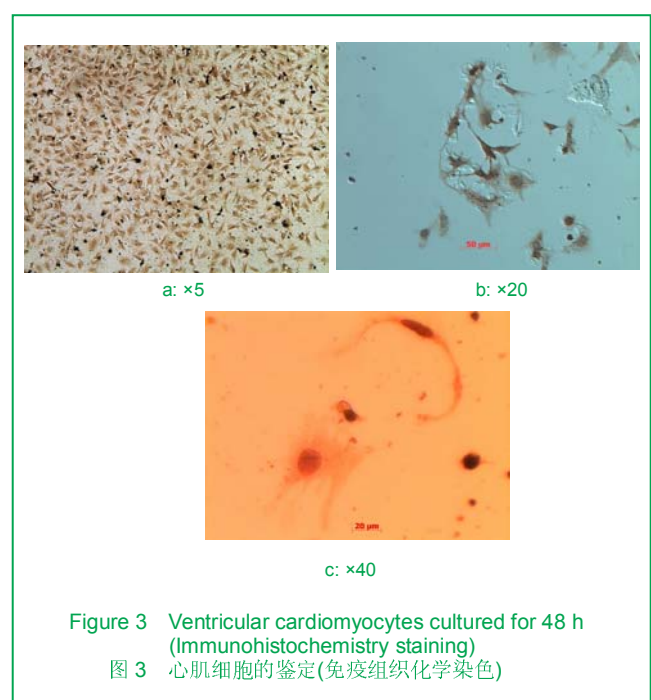
培养48 h后细胞铺展更加明显且伸出伪足相互接触交织成网, 搏动可呈同步性, 形成所谓功能性合体, 收缩明显、有力, 搏动频率30~150次/min, 同一批细胞的搏动频率一致, 日龄越小, 细胞搏动频率相对越快, 见图2a~c。

扫描电镜观察见细胞逐渐伸长相互形成连接, 大多数呈梭形多角形, 见图2d, e。透射电镜观察, 可见培养的心肌细胞肌丝发达, 游离的核糖体、糖原丰富, 见

图2 f。

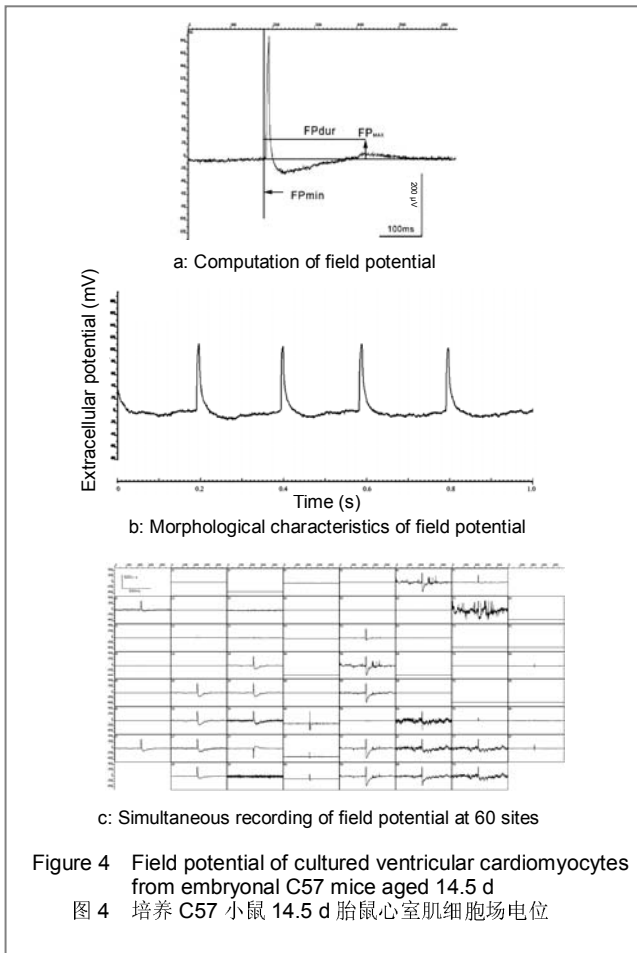


2.4 心肌细胞的鉴定 见图3。



用抗 α -actin单克隆抗体做组织化学检查,可见胞浆呈棕黄色染色,非心肌细胞染色呈阴性。结果显示几乎98%的细胞呈现阳性。说明此时心肌细胞较纯,同时从整体也证明了此细胞是心肌细胞。

2.5 MEA观察 心肌细胞接种并培养于微电极阵列盘内,24 h后开始有散在、不同步的细胞克隆波动和点状场电位信号,48 h后细胞融合开始记录到基本同步的群动和多位点的场电位,培养心肌自发搏动频率平均30~90次/min,见图4。



3 讨论

对于心肌细胞的分离,不同种属和年龄可能需要不同的分离方法。C57小鼠受孕率较低,每胎胎鼠数量较少,为7只左右,胎鼠发育且相对较慢,本次实验取13.5 d胎鼠心脏发育尚不完善,故取14.5 d的胎鼠心肌细胞做电镜和免疫组化鉴定。C57小鼠的心肌细胞比较娇嫩,在剖腹、剖宫及取心过程中务必严格无菌操作,心脏取出后需置于含有青链霉素的D-Hanks液中清洗,心脏最好用手术刀切成1 mm左右的组织块而不用剪,因剪挫力直接造成大量细胞死亡。同时需较充足的营养,最好用体积分数15%血清的高糖DMEM。每次消化后,用吸管吹打,有利于细胞解离,并可避免尚未完全

解离的细胞被再次消化。消化时间随鼠龄递增而逐渐延长,因鼠龄越小,心肌越娇嫩越易解离。实验比较了出生两三天小鼠乳鼠和胎鼠的心肌细胞,从孕13.5 d到生后3 d,日龄越小,细胞越易分离培养、存活,自主搏动的细胞数目越多,在缺氧环境下自发搏动恢复的时间越短。同时细胞的差速贴壁时间较昆明小鼠(1.5 h)和大鼠(2 h)的时间明显缩短,本文用低浓度胰蛋白酶分段消化胎鼠、乳鼠和成年小鼠心肌,可得大量能自主搏动的心肌细胞。实验采用微电极技术记录培养的心肌细胞的各发育阶段的电生理活动,将为胚胎发育生理学建立一种新的模式^[22-25]。

作者所在实验室已成功原代培养小鼠胎鼠的心肌细胞,13.5 d心脏的心房、心室、房室间隔及心脏大血管基本发育完善,但心脏很小,肉眼很难分清房室分界。如全部取下分离,培养的心房、心肌细胞较难鉴别,故在剪取心脏时取靠中下1/3,基本可保证所取的为心肌。作者所在实验室曾在10倍显微操作台下操作,仍只能模糊辨别左右心耳,难以确保分别分离心房心肌细胞的纯度。如能有更高倍数的显微操作台,并能保证无菌操作,可能可以完成心房、心肌细胞的分别培养,甚至可能将左右心房和左右心肌细胞分别培养。另外温度降低、搬动等都会降低心肌细胞的搏动频率。许多文献采用胰蛋白酶+胶原酶消化分离心肌细胞,胶原酶价格昂贵,大鼠心肌细胞多采用Langendorff灌流的方法分离,但小鼠乳鼠和胎鼠的主动脉细小,采用Langendorff灌流不易实施^[26-27]。单用胰蛋白酶消化就可得到形态、状态良好的自发搏动细胞。在培养液中,常温下自发搏动时间可长达数小时至数天,利于电生理指标测定、离子通道检测及药物干预等较长时间的研究,为进一步实验提供了良好的实验方法学平台。如何进一步提高心肌细胞的纯度、存活率和状态尚需进一步的探索。

4 参考文献

- [1] Fijnvandraat AC, Lekanne Deprez RH, Moorman AF. Development of heart muscle-cell diversity: a help or a hindrance for phenotyping embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Cardiovasc Res.* 2003;58(2):303-312.
- [2] An RH, Davies MP, Doevendans PA, et al. Developmental changes in beta-adrenergic modulation of L-type Ca²⁺ channels in embryonic mouse heart. *Circ Res.* 1996;78(3):371-378.
- [3] Wang L, Feng ZP, Kondo CS, et al. Developmental changes in the delayed rectifier K⁺ channels in mouse heart. *Circ Res.* 1996;79(1):79-85.
- [4] Wu XS. Beijing: Science Press. 2006:63-77.
- [5] Moorman AF, Christoffels VM. Cardiac chamber formation: development, genes, and evolution. *Physiol Rev.* 2003;83(4):1223-1267.
- [6] Wang CQ. *Zhongguo Xinzang Qibo yu Xindian Shengli Zazhi.* 2003;17(3):230-232. 汪长华. 心肌细胞的培养及注意事项[J]. *中国心脏起搏与心电生理杂志.* 2003;17(3):230-232.
- [7] Zhang JB. Beijing: People's Medical Press. 2002:111. 章静波. *组织和细胞培养技术[M].* 北京: 人民卫生出版社, 2002: 111.
- [8] Bugaisky LB, Zak R. Differentiation of adult rat cardiac myocytes in cell culture. *Circ Res.* 1989;64(3):493-500.

- [9] Suzuki T, Tsuruda A, Katoh S, et al. Purification of endothelin from a conditioned medium of cardiac fibroblastic cells using beating rate assay of myocytes cultured in a serum-free medium. *J Mol Cell Cardiol.* 1997;29(8):2087-2093.
- [10] Situ ZQ. Xi'an World Publishing Corporation. 1996:58-71. 司徒镇强. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版公司, 1996:58-71.
- [11] Wang LJ, Jia DL, Qi GX. *Zhongguo Shiyen Dongwu Xuebao.* 2009;15(3):175-178. 王丽娟, 贾大林, 齐国先. 成年小鼠心肌细胞的分离培养及鉴定[J]. *中国实验动物学报*, 2009,15(3):175-178.
- [12] Xia JL, Zhu ZA, Zhang XT, et al. *Shengming Kexue Yanjiu.* 2009;13(3):236-239. 夏机良, 朱泽安, 张湘涛, 等. 新生小鼠心肌细胞分离培养的改良及其鉴定[J]. *生命科学研究*, 2009,13(3):236-239.
- [13] Ma FF, Shen XL, Lin LF, et al. *Xinxueguan Kangfu Yixue Zazhi.* 2009;18(2):125-128. 马芳芳, 沈晓丽, 林立芳, 等. 新生大鼠心肌细胞的原代培养[J]. *心血管康复医学杂志*, 2009,18(2):125-128.
- [14] Reppel M, Pillekamp F, Lu ZJ, et al. Microelectrode arrays: a new tool to measure embryonic heart activity. *J Electrocardiol.* 2004;37 Suppl:104-109.
- [15] Bursac N, Parker KK, Iravanian S, et al. Cardiomyocyte cultures with controlled macroscopic anisotropy: a model for functional electrophysiological studies of cardiac muscle. *Circ Res.* 2002;91(12):e45-54.
- [16] Kucera JP, Heuschkel MO, Renaud P, et al. Power-law behavior of beat-rate variability in monolayer cultures of neonatal rat ventricular myocytes. *Circ Res.* 2000;86(11):1140-1145.
- [17] Beeres SL, Atsma DE, van der Laarse A, et al. Human adult bone marrow mesenchymal stem cells repair experimental conduction block in rat cardiomyocyte cultures. *J Am Coll Cardiol.* 2005;46(10):1943-1952.
- [18] Hou YM, Na JN, Reyilan AS. *Zhonghua Xinxueguan Bing Zazhi.* 2008;36(10):944-946. 侯月梅, 娜儿娜, 热依兰·艾沙. 微电极阵芯片技术在整体心脏、心肌组织片和培养心肌中的应用[J]. *中华心血管病杂志*, 2008,36(10):944-946.
- [19] Kucera JP, Heuschkel MO, Renaud P, et al. Power-law behavior of beat-rate variability in monolayer cultures of neonatal rat ventricular myocytes. *Circ Res.* 2000;86(11):1140-1145.
- [20] Habeler W, Pouillot S, Plancheron A, et al. An in vitro beating heart model for long-term assessment of experimental therapeutics. *Cardiovasc Res.* 2009;81(2):253-259.
- [21] Bursac N, Parker KK, Iravanian S, et al. Cardiomyocyte cultures with controlled macroscopic anisotropy: a model for functional electrophysiological studies of cardiac muscle. *Circ Res.* 2002;91(12):e45-54.
- [22] McDermott PJ, Morgan HE. Contraction modulates the capacity for protein synthesis during growth of neonatal heart cells in culture. *Circ Res.* 1989;64(3):542-553.
- [23] Berger HJ, Prasad SK, Davidoff AJ, et al. Continual electric field stimulation preserves contractile function of adult ventricular myocytes in primary culture. *Am J Physiol.* 1994;266(1 Pt 2):H341-349.
- [24] Ravens U. Electrophysiological properties of stem cells. *Herz.* 2006;31(2):123-126.
- [25] Duan YQ, Tang M, Liang HM, et al. *Shengli Xuebao.* 2006;58(1):65-70. 段亚琦, 唐明, 梁华敏, 等. 微电极矩阵研究小鼠胚胎心脏电生理活动[J]. *生理学报*, 2006,58(1):65-70.
- [26] Kaneko T, Tanaka H, Oyama M, et al. Three distinct types of Ca(2+) waves in Langendorff-perfused rat heart revealed by real-time confocal microscopy. *Circ Res.* 2000;86(10):1093-1099.
- [27] Maier LS, Pieske B, Allen DG. Influence of stimulation frequency on [Na⁺]_i and contractile function in Langendorff-perfused rat heart. *Am J Physiol.* 1997;273(3 Pt 2):H1246-1254.

来自本文课题的更多信息—

基金资助: 新疆维吾尔自治区高技术研究发展计划项目(201010105), 皮肤细胞诱导产生干细胞转基因构建心脏生物起搏器的动物实验研究. 新疆维吾尔自治区重点实验室新疆心血管病重点实验室开放课题(XJDX0903-2009-03), 转SERCA2a基因治疗急性心肌梗塞电机械匹配的实验研究。

作者贡献: 侯月梅、时利设计实验, 张玲、段明军、魏琴、陈华实施, 全体作者共同评估, 所有参与实验者均经过系统培训, 未使用盲法评估。其中张玲、段明军为并列第一作者, 侯月梅和时利为并列通讯作者。

致谢: 感谢新疆医科大学第一附属医院实验动物中心的魏琴老师和段明军老师在小鼠配种和细胞分离培养中给予的帮助。感谢新疆医科大学第一附属医院心律失常研究室的孙娟师姐 MEA 指标测定过程中给予的帮助。感谢新疆医科大学第一附属医院心律失常研究室的陈华在资料搜集整理中给予的帮助。

利益冲突: 本文未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理批准: 本实验的设计和实验均经过新疆医科大学第一附属医院伦理委员会审核批准, 审批号是 20091208005。

本文创新性:

提供证据: 作者检索了 highwire, google, pubmed, 中华数据库, 中国期刊全文数据库, 中国学术期刊网络出版总库, 中国博士学位论文全文数据库(新版), 中国优秀硕士学位论文全文数据库(新版), 中国重要会议论文全文数据库, 中国重要报纸全文数据库等数据库 1994 年至今的文献资料, 未发现相关研究。

创新点说明: 国内首次对从心脏四腔刚形成的 13.5 d 胎鼠, 直到出生 18.5 d 的逐日心肌细胞, 及生后 2 d 和成年的心肌细胞形态进行从光镜到电镜的形态学系统分析, 及在国内首次通过 MEA 技术对心肌细胞进行细胞外电生理指标记录和分析, 为小鼠胎鼠心肌细胞的发育、生理特性、毒性实验、药物筛选提供手段。