

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.16.016

[http://www.crter.org]

王慧玲, 李琼, 郭志坤, 孙永琨, Kuboki Y. 胶原支架上体外三维培养成年大鼠心肌细胞[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(16):2961-2967.

胶原支架上体外三维培养成年大鼠心肌细胞***◆○

王慧玲¹, 李琼¹, 郭志坤¹, 孙永琨², Kuboki Y²

1 新乡医学院河南省医用组织再生重点实验室, 河南省新乡市 453003

2 日本北海道大学, 日本

文章亮点:

1 **Atelocollagen** 胶原支架不具有免疫原性, 有很好的应用前景; 心脏自体细胞可作为组织工程的种子细胞。

2 实验拟证明成年大鼠心肌细胞与 **Atelocollagen** 胶原支架具有很好的生物相容性, 验证成年心肌细胞是否可以作为种子细胞用于心肌组织工程的研究。

3 创新之处在于验证了成年心肌细胞可以作为组织工程的种子细胞; 不足之处在于该种子细胞不能产生自律性搏动。

关键词:

生物材料; 细胞外基质材料; 胶原支架; 心肌细胞; 三维培养; 免疫组织化学; 免疫荧光; 成年大鼠; 省级基金

摘要

背景: 前期研究中已经在 **Atelocollagen** 胶原支架培养出了具有收缩功能的乳鼠心肌细胞。

目的: 在 **Atelocollagen** 胶原支架上三维培养成年大鼠心肌细胞。

方法: 将成年 SD 大鼠心肌细胞经消化培养并纯化后, 种植到 **Atelocollagen** 胶原支架上进行三维培养。应用倒置显微镜动态观察心肌细胞在 **Atelocollagen** 胶原支架上的生长状况; 对三维培养的心肌细胞块进行冰冻切片, 分别进行肌钙蛋白免疫组织化学和免疫荧光显色, 对支架上生长的细胞进行鉴定。

结果与结论: 成年 SD 大鼠心肌细胞接种 12 h 开始贴附支架生长, 24 h 与支架汇合、紧密黏附, 但心肌细胞并不产生自律性搏动, 细胞之间夹杂少量崩解的细胞碎片; 48 h 换液后支架网孔中崩解的细胞被换掉, 剩下大部分细胞贴附在支架壁边缘生长。苏木精-伊红染色显示培养 48 h 细胞与支架形成复合体。形态学鉴定证明支架网孔中生长的主要是心肌细胞。免疫组织化学和免疫荧光显色均显示在支架内生长的大部分是心肌细胞, 并且紧贴支架, 生长良好。

王慧玲★, 1985年生, 河南省商丘市人, 汉族, 新乡医学院在读硕士, 主要从事心肌组织工程研究。
mcolourful@126.com

通讯作者: 郭志坤, 博士, 教授, 新乡医学院, 河南省新乡市 453003

中图分类号: R318

文献标识码: B

文章编号: 2095-4344
(2013)16-02961-07

收稿日期: 2012-07-24

修回日期: 2012-09-02

(20120629008/GW·W)

Collagen scaffold facilitates the three-dimensional culture of myocardial cells from adult rats *in vitro*

Wang Hui-ling¹, Li Qiong¹, Guo Zhi-kun¹, Sun Yong-kun², Kuboki Y²

1 Key Laboratory for Medical Tissue Regeneration of Henan Province, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China

2 Hokkaido University, Hokkaido, Japan

Abstract

BACKGROUND: Three-dimensional contractible myocardial cell block of neonatal rats in the Atelocollagen scaffold has been cultured in the previous study.

OBJECTIVE: To perform three-dimensional culture of myocardial cells from adult rats on the Atelocollagen scaffold.

Wang Hui-ling★, Studying for master's degree, Key Laboratory for Medical Tissue Regeneration of Henan Province, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China
mcolourful@126.com

Corresponding author: Guo Zhi-kun, Doctor, Professor, Key Laboratory for Medical Tissue Regeneration of Henan Province, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China

Supported by: the 21 Century Talents of Henan Province, No. 2005HANCET215*; the Tackle Key Program of Henan Province, No. 072102310012*

Received: 2012-07-24
Accepted: 2012-09-02

METHODS: After being cultured and purified, myocardial cells from adult Sprague-Dawley rats were implanted onto the Atelocollagen scaffold for three-dimensional cultures. The growth of myocardial cells on the Atelocollagen scaffold was dynamically observed by inverted microscopy. Myocardial cell blocks were separately tested by hematoxylin-eosin staining, immunohistochemistry and immunofluorescence of troponin after frozen section.

RESULTS AND CONCLUSION: After being implanted, myocardial cells from adult Sprague-Dawley rats began to grow on the Atelocollagen scaffold in 12 hours, showed mutual integration with the scaffold and the integration became more closely 24 hours later. However, the myocardial cells did not have autorhythmic beats at all, and among the cells there were some cell debris. After replaced with the same fresh medium 48 hours later, the cell debris was washed away and most of the rest cells grew on the edge of the Atelocollagen scaffold. After 48 hours, the cells formed a complex with the scaffold tested by hematoxylin-eosin staining, and the cells which grew well and were coalesced with the scaffold meshes were mainly myocardial cells, identified by immunohistochemistry and immunofluorescence.

Key Words: biomaterials; extracellular matrix materials; collagen scaffold; myocardial cells; three-dimensional culture; immunohistochemistry; immunofluorescence; adult rats; provincial grants-supported paper

Wang HL, Li Q, Guo ZK, Sun YK, Kuboki Y. Collagen scaffold facilitates the three-dimensional culture of myocardial cells from adult rats in vitro. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(16): 2961-2967.

0 引言

心肌细胞是增殖能力较低的细胞, 心脏自身修复能力极其有限, 心肌一旦发生不可逆损伤或病变将难以再生修复, 逐渐由纤维组织替代, 最终发展成心力衰竭, 显著增加了死亡概率。目前, 与心肌结构缺失或心肌功能丧失相关的疾病治疗往往只能借助外科手术-心脏移植, 而心脏移植又存在着供体受限或移植排斥的难于逾越的问题, 因此其应用受到了限制, 组织工程技术的出现为治疗此类心肌疾病提供了新的可能。组织工程是研究、开发、修复或改善损伤组织和功能的生物替代物的一门科学^[1]。1987年美国科学基金会在华盛顿举办的生物工程小组会上提出了“组织工程”这个名词, 1988年被定义为“应用生命科学与工程科学的原理和方法, 在可控、可重复的条件下, 通过哺乳动物、人类(包括患者本身)特定细胞在网络构架上的体外培养及体内移植, 形成具有特定功能的组织和生物替代物”。因此, 组织工程是有望从根本上解决组织、器官缺失或失能的医学难题的一门新兴边缘学科。

目前处于研发阶段的组织工程产品很多, 包括人造皮肤、血管、软骨、骨、角膜、气管等。心肌组织工程是利用心肌种子细胞、生物材料以及各种调节因子, 在体外制成具有收缩功能的心肌组织块, 然后将其移植到受损的心脏, 最终达到修复受损心肌的目的^[2]。心肌组织工程的一个不可或缺的要素是理想的种子细胞, 目前种子细胞多为干细胞或幼稚的心肌细胞^[3-4]。如果心脏自体细胞也可以作为心肌组织工程的种子细胞, 那么这种细胞可能会有更大的潜力达到与自体心肌同步收缩。但是, 由于成年哺乳动物的心肌细胞增殖分化能力较低, 在形态和生理功能上均与幼稚的心肌细胞有很大不同。因此, 幼稚心肌细胞的各种研究和应用条件很难等同于成熟心肌细胞。

作者曾经利用幼年心肌细胞成功培养了较为理想的立体心肌组织^[5-6]。原代培养的乳鼠心肌细胞经纯化后, 将细胞悬液接种到胶原纤维支架上, 结果显示: 在接种后第1天形成了细胞-胶原支架复合体, 细胞与支架一起有节律的跳动; 心肌细胞填充于网孔支架周围, 并与支架融合; 在透射电镜及扫描电镜下观察均可看到细胞与支架紧密结合, 融合在一起。实验结果证明了Atelocollagen胶原支架的生物相容性较好, 可以作为三维培养细胞和组织的天然

材料, 适于乳鼠心肌细胞的立体培养。

但目前尚不知道成熟的心肌细胞是否也可以在 Atelocollagen 胶原支架上进行体外三维培养。为此, 实验将成年大鼠心肌细胞种植到该胶原支架上, 让种植的心肌细胞与支架发生融合生长, 旨在进一步开展心肌组织工程研究探索更多的种子细胞来源, 证实成体心肌细胞是否可以作为种子细胞用于心肌组织工程的研究。

1 材料和方法

设计: 细胞学及细胞-材料相容性的体外观察实验。

时间及地点: 于2011年6月至2012年4月在新乡医学院河南省组织再生实验室完成。

材料:

实验动物: 8周龄SD大鼠20只, 体质量200-250g, 雌雄不拘, 由新乡医学院动物实验中心提供。

在 Atelocollagen 胶原支架上体外三维培养成年大鼠心肌细胞实验的主要试剂:

Main reagents:

试剂及仪器	来源
DMEM-F12 培养基、胎牛血清	美国 Gibco 公司
II-型胶原酶、D-hank's 液	美国 Sigma 公司
Atelocollagen 胶原支架	日本 Kocan 公司
肌钙蛋白抗体	美国 abcam 公司
辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG(H+L)	北京中杉金桥生物技术 有限公司
DAPI 及免疫荧光二抗	碧云天生物技术公司

实验方法:

心肌细胞的分离^[6-12]: 取SD大鼠, 腹腔注射5 000 U/kg 的肝素, 10%水合氯醛0.3 mL/kg腹腔注射麻醉。麻醉显效后, 体积分数75%乙醇消毒胸腹部皮肤, 无菌条件下开胸取心脏, 然后将心脏置于4 °C预冷的D-hank's液中, 快速经升主动脉根部插管, 插管完成后, 将灌注装置固定, 开始经主动脉逆行灌注心脏。先灌注D-hank's液, 5 min后换以0.05% II-型胶原酶循环灌注20-40 min, 最后再用完全培养基灌注3-5 min, 此时心脏仍保持大体形态, 变软呈松弛状。取下心脏, 将心肌剪成1 mm³大小的组织块, 加入完全培养基15 mL, 将组织块连同细胞悬液一起置于50 mL离心管中, 放到

37 °C恒温摇床上5 min, 用200目滤网过滤, 即得到细胞悬液。

心肌细胞的纯化与二维培养^[13-21]: 将上述得到的细胞悬液移入培养瓶中, 在37 °C、体积分数5%CO₂培养箱中培养30 min后, 再将细胞悬液移入新的培养瓶, 即采用差速贴壁法去除部分成纤维细胞。将细胞悬液离心(1 000 r/min, 5 min), 弃去上清, 加入DMEM-F12完全培养液, 调整细胞浓度为6×10¹⁰ L⁻¹, 在6孔培养板的孔内均放入处理过的血盖片1个, 在血盖片上均加入上述细胞悬液0.2 mL, 保证细胞悬液不溢出血盖片, 1 h后, 再加入完全培养液(DMEM-F12培养基中加入体积分数10%胎牛血清, 1%青霉素-链霉素混合液)2 mL, 放入培养箱进行培养。培养24 h后, 取细胞爬片做苏木精-伊红染色鉴定心肌细胞: 取细胞爬片, PBS洗3次, 5 min/次; 冷丙酮固定10 min, PBS洗3次, 5 min/次; 苏木精染液室温染色15 min, 自来水洗涤; 1%盐酸乙醇分色数秒, 自来水洗涤; 侵入伊红染液染色3 min, 自来水洗涤; 晾干后中性树胶封固。

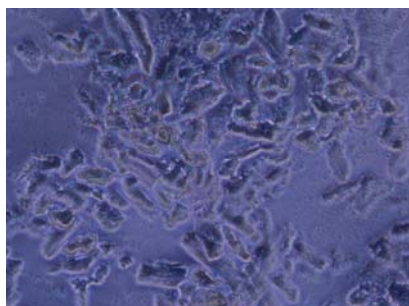
Atelocollagen 胶原支架上三维培养成年大鼠心肌细胞: 取纯化后的细胞悬液, 调整细胞浓度为6×10¹³ L⁻¹, 用微量毛细吸管接种到0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm的 Atelocollagen 胶原支架上, 加入少许DMEM-F12完全培养液, 放入培养箱(37 °C, 体积分数5%CO₂)进行培养。用倒置显微镜动态观察心肌细胞在 Atelocollagen 胶原支架上的生长情况。在支架上培养第5天对三维培养的心肌块进行冰冻切片, 冷丙酮固定5-8 s后, 进行苏木精-伊红染色、肌钙蛋白免疫组织化学染色及肌钙蛋白免疫荧光染色对三维培养的细胞进行鉴定。

三维培养心肌细胞的鉴定: ①免疫组织化学染色: 三维培养的冰冻切片, 用小鼠来源的肌钙蛋白一抗(1:500), 辣根酶标记山羊抗小鼠IgG(H+L) 鉴定心肌细胞。②免疫荧光染色: 三维培养的冰冻切片, 用小鼠来源的肌钙蛋白一抗(1:500), cy3标记的山羊抗小鼠免疫荧光二抗(1:500), 鉴定心肌细胞。

主要观察指标: 在倒置显微镜下观察成年大鼠心肌细胞的形态; 用血细胞计数板进行细胞计数, 计算每个心脏细胞产量, 即镜下细胞密度=细胞数/细胞原液=(4大格细胞数之和/4)×10⁴×稀释倍数; 活细胞评价用0.4%锥虫蓝染色, 计算上述细胞数中锥虫蓝染色呈阴性的杆状细胞占总杆状细胞数的百分比例, 评价心肌细胞存活率。观察二维、三维培养心肌细胞的形态及生长状况。

2 结果

2.1 成年大鼠心室肌细胞的形态特点 成年大鼠心室肌细胞分离后, 大部分呈长杆状或矩形, 见图1, 高倍镜下横纹清晰, 界限分明, 少数呈圆形。其中夹杂一些大小不等的细胞碎片。大部分细胞呈静止状态, 极少数细胞保持自律性收缩。每个心脏细胞产量可达 1×10^7 细胞数。



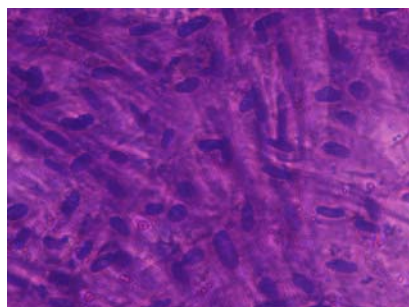
注: 大部分呈长杆状或矩形。

图1 倒置显微镜下观察成年SD大鼠心肌细胞 (标尺=100 μm)

Figure 1 Adult rat myocardial cells showed long-bar shape or rectangle under inverted microscopy (Scale bar=100 μm)

2.2 成年大鼠心肌细胞活性分析 活性细胞的细胞膜完整, 所以锥虫蓝不能进入细胞内而拒染。死亡或受损伤的细胞由于细胞膜的完整性被破坏, 被锥虫蓝染成蓝色, 结果显示80%的心肌细胞锥虫蓝染色阴性。

2.3 二维培养心肌细胞的形态特点 见图2。



注: 心肌细胞细胞核呈椭圆形, 位于细胞中间, 细胞质内存在明显的横纹。

图2 培养5 d时成年SD大鼠心肌细胞细胞形态(苏木精-伊红染色, 标尺=50 μm)

Figure 2 Morphology of adult rat myocardial cells after 5 d of culture (Hematoxylin-eosin staining; Scale bar=50 μm)

接种的心肌细胞加血清培养24-48 h后, 细胞发生形态结构变化^[22-23], 由杆状变成扁平状, 细胞边界逐渐变得圆顿, 部分细胞培养24-48 h后发生贴壁。苏木精-伊红染色可见心肌细胞核呈椭圆形, 位于细胞中间, 细胞质内存在明显的横纹, 见图2。

2.4 三维培养心肌细胞的形态特点 分离纯化的心肌细胞种到Atelocollagen胶原支架后约24 h大部分开始贴支架壁生长, 但是仍然不具有自律性, 见图3, 细胞之间夹杂少量崩解的细胞碎片。



注: 倒置显微镜观察显示, 大鼠心肌细胞充满部分Atelocollagen胶原支架的网孔。

图3 成年SD大鼠心肌细胞在Atelocollagen胶原支架三维培养24 h的形态(标尺=180 μm)

Figure 3 Morphology of myocardial cells of adult rats at 24 h of culture on the Atelocollagen scaffold under inverted microscopy (Scale bar=180 μm)

48 h换液后支架网孔中崩解的细胞被换掉, 剩下大部分细胞贴附在支架壁边缘生长, 见图4。

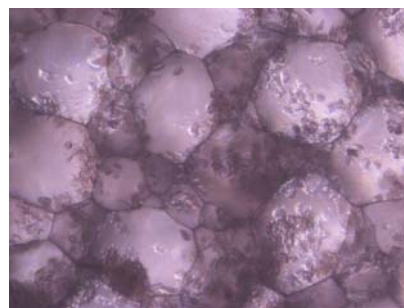
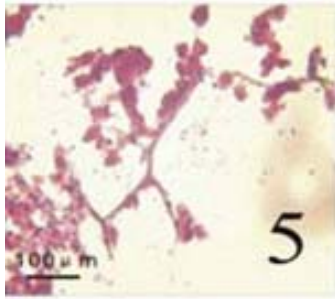


图4 倒置显微镜观察显示, 培养48 h时换液后剩余贴附Atelocollagen胶原支架边缘生长的心肌细胞(标尺=180 μm)

Figure 4 Myocardial cells grew at 48 h of culture adherent to the edge of the Atelocollagen scaffold under inverted microscopy (Scale bar=180 μm)

苏木精-伊红染色显示, 培养48 h的心肌细胞与支架紧密融合, 细胞与支架形成复合体。培养第5天, 心肌细胞核明显, 高倍镜下可见明显的横纹, 见图5。



注: 大鼠心肌细胞与 Atelocollagen 胶原支架紧密融合, 细胞与支架形成复合体, 心肌细胞核明显, 高倍镜下可见明显的横纹。

图 5 成年 SD 大鼠心肌细胞与 Atelocollagen 胶原支架三维培养 5 d 的形态(苏木精-伊红染色, 标尺=100 μm)

Figure 5 Morphology of myocardial cells of adult rats at 5 d of culture on the Atelocollagen scaffold (Scale bar=100 μm)

肌钙蛋白免疫组织化学染色呈棕黄色, 肌钙蛋白阳性表达的细胞为心肌细胞, 见图6。

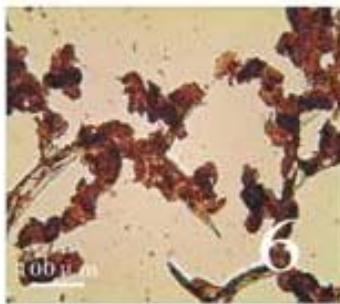
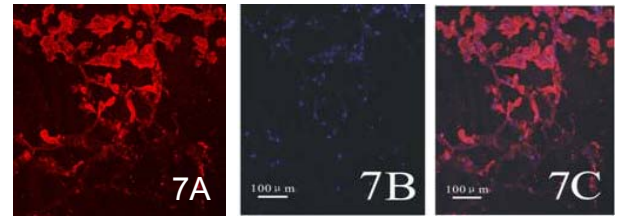


图 6 在 Atelocollagen 胶原支架上培养 5 d 时, 心肌细胞肌钙蛋白免疫组织化学染色呈强阳性反应(DAB 显色, 标尺=100 μm)

Figure 6 Immunohistochemical staining showed myocardial cells were highly positive for troponin at 5 d of culture on the Atelocollagen scaffold (DAB staining; Scale bar=100 μm)

免疫荧光染色显示: cy3显示红色为细胞质, 见图7A, DAPI标记蓝色为细胞核, 见图7B, 将DAPI和cy3标记的图像复合后, 见图7C, 细胞核周围显示红色荧光者为心肌细胞。免疫组织化学和免疫荧光显色均显示在支架内生长的大部分是心肌细胞, 并且紧贴支架,

生长良好。



A: Cy3 显示红色为细胞质; B: DAPI 标记蓝色为细胞核; C: DAPI 与 Cy3 标记图像的复合

图 7 荧光显微镜下观察显示, 培养 5 d 时心肌细胞沿 Atelocollagen 胶原支架边缘生长(标尺=100 μm)

Figure 7 Myocardial cells grew on the edge of the Atelocollagen scaffold at 5 d of culture under fluorescence microscopy (Scale bar=100 μm)

3 讨论

心肌细胞的分离与培养已成为研究心肌结构、功能及各种病理生理机制的基础。目前研究较多的是未成熟心肌细胞的分离培养, 由于心肌细胞在发育过程中, 离子通道和收缩蛋白的形态结构不断地发生变化, 所以很难将胚胎期或新生期心肌细胞的研究结果应用到完全分化的成熟心肌细胞。目前有关成熟心肌细胞的研究大多局限于电生理及分子生物学领域, 在心肌组织工程方面大多用胚胎心肌或幼年心肌细胞作为种子细胞, 很少利用较为成熟的心肌细胞。实验将出生后8周的成熟心肌细胞成功分离并种植到Atelocollagen胶原支架上进行三维培养, 试图为心肌细胞三维培养探讨更加丰富的种子细胞来源, 并与以前研究的幼鼠心肌细胞三维培养的结果进行比较, 寻找在体外培养状态下成熟心肌细胞与幼稚心肌细胞的差异。实验结果显示, 分离的心室肌细胞大多呈杆状或矩形, 横纹清晰, 但90%以上的细胞无自律性搏动。这是成熟心肌细胞与幼稚心肌细胞分离后的最大区别。有研究表明体外培养正常的心房肌细胞可出现低频率的舒缩活动^[24]。综合实验研究结果显示心房和心室肌细胞之间不仅在形态上存在不同^[25], 在功能上也存在差异。目前尚没有足够的证据解释为什么成熟心肌细胞被分离后其自律性消失或下降。

Atelocollagen胶原支架已经被证实具有很好的组织相容性, 已被成功应用于声嘶瘢痕形成的治疗^[26]; Lee等^[27]将骨髓核细胞种植到Atelocollagen胶原支架上为

椎间盘的再生奠定了基础; Ko等^[28]将人的软骨细胞种到Atelocollagen胶原支架上得到了软骨样组织; 作者之前将乳鼠心肌细胞种植到Atelocollagen胶原支架上, 成功培养了可以跳动的心肌组织块并证明了该支架与细胞之间很好的组织相容性^[29]。实验将成年的心肌细胞种到该支架上, 通过免疫组织化学和免疫荧光技术证明了该细胞与Atelocollagen胶原支架也有很好的黏附性。这说明Atelocollagen胶原支架不仅适用于幼稚心肌细胞, 也适于成熟心肌细胞的三维培养, 但成熟心肌细胞可以在支架上生长, 却不具有收缩功能。Akhyari等^[30]研究表明在体外心肌细胞可以重建复杂的三维结构, 但这种方法获得的心肌细胞肌丝排列紊乱, 细胞无收缩功能, 实验结果与之是一致的。如何利用Atelocollagen培养出具有收缩功能的三维心肌, 尚需继续研究。

由于成年心肌细胞个体较大且较脆弱, 对缺氧的耐受性差。因此实验过程中很多因素, 如酶的浓度、pH值、灌注时间等很多因素都会影响细胞的产量及活性。要想获得高产量且活性好的心肌细胞必须把握好实验过程中每一个环节。其中需要特别注意的有: ①尽量缩短实验时程, 这就要求必须熟练掌握操作过程中的每一个环节, 从摘取心脏到开始灌注控制在2 min之内。对于心脏的灌注时间需根据心脏的实际消化程度具体决定。一般当酶流出液稍黏稠, 心脏看起来较松软, 体积变大时即可终止灌注, 消化时间过长会对心肌细胞造成不可逆的损害^[31], 应尽量避免。②消化酶的选择: 大量实验采取联合应用胶原酶和胰蛋白酶^[32], 由于胶原酶是注意解离细胞外基质的胶原蛋白, 重要的是其作用较缓和, 对细胞损伤小, 而胰蛋白酶主要用于分解组织间质中的蛋白成分, 作用较强, 对细胞的损伤较大, 因此, 本实验只采用单一的胶原酶。③灌注液pH值: 由于心肌细胞对酸碱度的变化敏感, 过酸或过碱都会影响心肌细胞的活性, 所以灌注心脏的所有液体最好都用体积分数95%O₂+体积分数5%CO₂混合气体进行氧和, 保持溶液的pH值7.3-7.4。

虽然成功分离的状态较好的心肌细胞可以存活达2周或更久, 但试图长期培养成熟心肌细胞的研究最终皆因得不到理想的结果而告终^[33-34]。分离培养的成年心肌细胞有些在第1周内就会发生崩解死亡^[35-36], 具体的死亡原因或机制尚未阐明清楚, Yamamoto等^[37]提出凋亡可能是其机制之一。因此, 选择既可以保证细胞较好的存活状态又可以保证细胞数量的时间点至关重要。在培养成熟心肌细胞时发现, 该细胞在第1天时为适应培养条件的变化, 其形

态也相应发生改变, 如细胞两端变得圆顿, 长度变短, 横纹变得模糊, 此时T管的密度下降^[38-39], 静息膜电位也随着钾离子电容密度的降低而持续降低^[40]。种植后约第3天细胞才与支架贴附牢固, 而1周时有些细胞发生崩解死亡, 所以实验选择5 d这个时间点来分析成熟心肌细胞与Atelocollagen胶原的支架的组织相容性。

基金资助: 河南省 21 世纪优秀人才支持计划(2005HANCET215); 河南省重点攻关项目(072102310012)资助。

作者贡献: 郭志坤进行实验设计, 实验实施为王慧玲, 实验评估为郭志坤, 资料收集为王慧玲、李琼, 王慧玲成文, 郭志坤审校, 郭志坤对文章负责。

利益冲突: 课题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。

伦理要求: 实验中对动物处置符合动物伦理学要求。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

4 参考文献

- [1] Alcon A, Cagavi BE, Qyang Y. Regenerating functional heart tissue for myocardial repair. *Cell Mol Life Sci*. 2012;69(16): 2635-2656.
- [2] Curtis MW, Russell B. Cardiac tissue engineering. *Cardiovasc Nurs*. 2009; 24(2): 87-92.
- [3] Nunes SS, Song H, Chiang CK, et al. Stem cell-based cardiac tissue engineering. *Cardiovasc Transl Res*. 2011;4(5): 592-602.
- [4] Beitnes JO, Lunde K, Brinchmann JE, et al. Stem cells for cardiac repair in acute myocardial infarction. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2011;9(8): 1015-1025.
- [5] Teng W, Guo ZK, Li Q, et al. *Jiepu Xuebao*. 2010;41(6): 885-890.
滕伟, 郭志坤, 李琼, 等. 在Atelocollagen胶原支架上体外三维培养乳大鼠心肌[J]. *解剖学报*, 2010, 41(6): 885-890.
- [6] Guo Z, Iku S, Zheng X, et al. Three-Dimensional Geometry of Honeycomb Collagen Promotes Higher Beating Rate of Myocardial Cells in Culture. *Artif Organs*. 2012;36(9): 816-819.
- [7] Huang ZB, Xiao JF, Shen JX. *Jiguang Shengwu Xuebao*. 2010; 19(3): 307-313.
黄泽炳, 肖剑锋, 沈建新. 胞外镁离子对SD成年大鼠心肌细胞内钙信号的影响[J]. *激光生物学报*, 2010, 19(3): 307-313.
- [8] Wei LL, Mo SR. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2012; 16(11): 1969-1972.
韦丽兰, 莫书荣. 成年大鼠心肌细胞的急性分离方法[J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(11): 1969-1972.
- [9] Li D, Tang B, Yang DC, et al. *Zhongguo Shiyanshi Dongwu Xuebao*. 2011;19(2): 150-152.
李德, 唐兵, 杨大春, 等. II型胶原酶加压灌注提高成年大鼠心肌细胞分离效率[J]. *中国实验动物学报*, 2011, 19(2): 150-152.

- [10] Liao H, Mi T, Tu ZY, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2009;13(33): 6536-6539.
廖华, 糜涛, 涂志业, 等. 成年大鼠心肌细胞分离方法的改良[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(33): 6536-6539.
- [11] Li H, Xiao YB. Disan Junyi Daxue Xuebao. 2004;26(7): 644-646.
李洪, 肖颖彬. 成年大鼠心室肌细胞的分离、培养与鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(7): 644-646.
- [12] Zhu XX, Niu XL, Zhu XL, et al. Jiefangjun Yixue Zazhi. 2008; 33(9): 1089-1091.
朱肖星, 牛小麟, 朱萧玲, 等. 不同活性的胶原酶对大鼠心肌细胞分离的影响[J]. 解放军医学杂志, 2008, 33(9): 1089-1091.
- [13] Chang H, Zhang L, Yu ZB. Zhongguo Yingyong Shenglixue Zazhi. 2011;27(1): 57-61, 136.
常惠, 张琳, 余志斌. 培养成年大鼠心肌细胞存活的形态标志[J]. 中国应用生理学杂志, 2011, 27(1): 57-61, 136.
- [14] Gong HB, Wang J, Wang L. Zhongguo Weixunhuan. 2009; 13(1): 55-59.
宫海滨, 王洁, 王雷. 不同培养基对成年大鼠心肌细胞形态、存活率、收缩功能的影响[J]. 中国微循环, 2009, 13(1): 55-59.
- [15] Pavlovic D, McLatchie LM, Shattock MJ. The rate of loss of T-tubules in cultured adult ventricular myocytes is species dependent. Exp Physiol. 2010; 95(4): 518-527.
- [16] Smyrniak I, Mair W, Harzheim D, et al. Comparison of the T-tubule system in adult rat ventricular and atrial myocytes, and its role in excitation-contraction coupling and inotropic stimulation. Cell Calcium. 2010; 47(3): 210-223.
- [17] Zhai YJ, Dong XH, Zhou LN, et al. Disan Junyi Daxue Xuebao. 2005;25(8): 705-707.
翟迎九, 董雪红, 周丽诺, 等. 成年SD大鼠心肌细胞的培养[J]. 第四军医大学学报, 2005, 25(8): 705-707.
- [18] Wang T, Fu Y, Fang XS, et al. Lingnan Jizhen Yixue Zazhi. 2007; 12(5): 323-325.
王彤, 符岳, 方向韶, 等. 普通大鼠心肌细胞的分离培养和收缩舒张观察[J]. 岭南急诊医学杂志, 2007, 12(5): 323-325.
- [19] Wang Y, Sun H, Fan YM, et al. Xuzhou Yixueyuan Xuebao. 2005; 25(5): 393-396.
王影, 孙红, 范乐明, 等. 成年大鼠心肌细胞的分离和培养技术[J]. 徐州医学院学报, 2005, 25(5): 393-396.
- [20] Li YG, Shi YK, Chen HW, et al. Huaxi Yixue. 2005;20(2): 308-309.
李勇刚, 石应康, 陈焕文, 等. 成年大鼠心肌细胞的分离和培养[J]. 华西医学, 2005, 20(2): 308-309.
- [21] Xu XF, Li WB, Chen BT, et al. Shoudu Yike Daxue Xuebao. 2000;21(2): 104-107.
许秀芳, 李温斌, 陈宝田, 等. 成年大鼠心肌细胞培养方法的建立和形态学观察[J]. 首都医科大学学报, 2000, 21(2): 104-107.
- [22] Kato S, Takemura G, Maruyama R, et al. Apoptosis, rather than oncosis, is the predominant mode of spontaneous death of isolated adult rat cardiac myocytes in culture. Jpn Circ J. 2001;65(8): 743-748.
- [23] Hein S, Kostin S, Schaper J. Adult rat cardiac myocytes in culture: 'Second-floor' cells and coculture experiments. Exp Clin Cardiol. 2006;11(3): 175-182.
- [24] Bugaisky LB, Zak R. Differentiation of adult rat cardiac myocytes in cell culture. Circ Res. 1989;64(3): 493-500.
- [25] Guo ZK. Beijing: Renmin Junyi Chbanshe. 2005:6.
郭志坤. 正常心脏组织学图谱[M]. 北京: 人民军医出版社, 2005: 6.
- [26] Ohno S, Hirano S, Kanemaru S, et al. Implantation of an atelocollagen sponge with autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for treatment of vocal fold scarring in a canine model. Ann Otol Rhinol Laryngol. 2011;120(6): 401-408.
- [27] Lee KI, Moon SH, Kim H, et al. Tissue engineering of the intervertebral disc with cultured nucleus pulposus cells using atelocollagen scaffold and growth factors. Spine (Phila Pa 1976). 2012;37(6): 452-458.
- [28] Ko EC, Fujihara Y, Ogasawara T, et al. BMP-2 Embedded Atelocollagen Scaffold for Tissue-Engineered Cartilage Cultured in the Medium Containing Insulin and Triiodothyronine-A New Protocol for Three-Dimensional In Vitro Culture of Human Chondrocytes. Tissue Eng Part C Methods. 2012;18(5):374-386.
- [29] Zheng XJ, Guo ZK, Chang KS, et al. Jiepo Xuebao. 2008;39(4): 582-585.
郑先杰, 郭志坤, 常联生, 等. Atelocollagen胶原支架在三维培养大鼠心肌中的生物相容性[J]. 解剖学报, 2008, 39(4): 582-585.
- [30] Akhyari P, Fedak PW, Weisel RD, et al. Mechanical stretch regimen enhances the formation of bioengineered autologous cardiac muscle grafts. Circulation. 2002;106(Suppl 1): I 137- I 142.
- [31] Egorova MV, Afanas'ev SA, Popov SV. A simple method for isolation of cardiomyocytes from adult rat heart. Bull Exp Biol Med. 2005;140(3): 370-373.
- [32] Xu X, Colecraft HM. Primary culture of adult rat heart myocytes. Vis Exp. 2009;(28): pii: 1308.
- [33] Eckel J, van EG, Reinauer H. Adult cardiac myocytes in primary culture: cell characteristics and insulin-receptor interaction. Am J Physiol. 1985;249(2 Pt 2): H212-221.
- [34] Jacobson SL, Piper HM. Cell cultures of adult cardiomyocytes as models of the myocardium. Mol Cell Cardiol. 1986;18(7): 661-678.
- [35] Dubus I, Samuel JL, Marotte F, et al. Beta-adrenergic agonists stimulate the synthesis of noncontractile but not contractile proteins in cultured myocytes isolated from adult rat heart. Circ Res. 1990;66(3): 867-874.
- [36] Schwarzfeld TA, Jacobson SL. Isolation and development in cell culture of myocardial cells of the adult rat. Mol Cell Cardiol. 1981;13(6): 563-575.
- [37] Yamamoto S, Yasui K, Palade PT, et al. Spontaneous death of isolated adult rat cardiocytes in culture in association with internucleosomal cleavage of genomic DNA. Apoptosis. 1997; 2(2): 178-188.
- [38] Louch WE, Bito V, Heinzel FR, et al. Reduced synchrony of Ca²⁺ release with loss of T-tubules—a comparison to Ca²⁺ release in human failing cardiomyocytes. Cardiovasc Res. 2004;62(1): 63-73.
- [39] Leach RN, Desai JC, Orchard CH. Effect of cytoskeleton disruptors on L-type Ca channel distribution in rat ventricular myocytes. Cell Calcium. 2005;38(5): 515-526.
- [40] Jacobson SL, Piper HM. Cell cultures of adult cardiomyocytes as models of the myocardium. Mol Cell Cardiol. 1986;18(7): 661-678.