

实验技术

密度梯度离心法同时分离新生大鼠原代心肌细胞与成纤维细胞

陈希¹, 许瑞¹, 蒋易楠², 祝伟娜¹, 王耀辉^{1,*}

¹抗体药物河南省工程实验室, 河南省抗体药物国际联合实验室, 河南大学医学院细胞与分子免疫重点实验室, 开封 475004; ²郑州大学基础医学院, 郑州 450001

摘要: 本文旨在探讨一种改良的同时分离新生大鼠原代心肌细胞和成纤维细胞的方法, 以建立良好的原代心肌细胞及成纤维细胞研究模型。无菌状态下取Wistar乳鼠(出生不超过2天)心室, 用II型胶原酶消化, 控制消化时间及次数、搅拌速度、离心次数和速度等, 结合Percoll密度梯度离心法分离心肌细胞及成纤维细胞, 进行体外培养, 观察细胞形态, 继而后用0.2%台盼蓝染色检测细胞存活率, 免疫荧光染色法检测心肌肌钙蛋白I (cardiac troponin I, cTnI)、波形蛋白(Vimentin)及 α 平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)的表达, 分别用于鉴定心肌细胞和成纤维细胞纯度。结果显示, 本方法5次分离的心肌细胞平均存活率达92%, 纯度达95%以上, 细胞生长状态良好, 可见贴壁自发搏动; 成纤维细胞平均存活率达96%, 纯度达94%。本方法能同时获得新生大鼠原代心肌细胞和成纤维细胞, 具有很高的产量、存活率及纯度, 且操作简便, 耗时短, 重复性好, 是一种较为理想的原代细胞分离、培养方法, 可满足各种后续实验要求。

关键词: 心肌细胞; 成纤维细胞; 原代培养; 新生大鼠; Percoll分离

中图分类号: R332

Simultaneous separation of primary cardiomyocytes and cardiac fibroblasts from neonatal rats with density gradient centrifugation

CHEN Xi¹, XU Rui¹, JIANG Yi-Nan², ZHU Wei-Na¹, WANG Yao-Hui^{1,*}

¹Henan Key Laboratory of Engineering Antibody Medicine, Henan International United Laboratory of Antibody Medicine, Key Laboratory of Cellular and Molecular Immunology, Medical College of Henan University, Kaifeng 475004, China; ²Basic Medical College of Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China

Abstract: To improve a fast and high-quality isolation method for culturing the primary cardiomyocyte and fibroblast *in vitro*, the neonatal Wistar rats were decapitated accordingly and left ventricles were isolated under the sterile condition. The ventricles were chopped and digested in the enzyme solution containing 0.5 mg/mL type II collagenase. During this process, the digesting time, frequency and stirring speed, centrifuging frequency and speed were strictly controlled. The cardiomyocytes were separated from the cardiac fibroblast by using the Percoll density gradient centrifugation. The cell viability was tested by staining with 0.2% trypan blue. The purity of cardiomyocytes and fibroblasts were determined by immunofluorescent staining with anti-cTnI, anti-Vimentin and anti- α -SMA antibodies. The results indicated that with this protocol, the viability and purity of cardiomyocytes were 92% and 95%. The automobile pulse of the adhered cardiomyocyte was visible. For fibroblasts, the cell viability and purity were 96% and 94%. Our results demonstrate that this advanced isolation method is reproducible, and can simultaneously produce high-quality primary cardiomyocytes and fibroblasts for the future study.

Key words: cardiomyocyte; cardiac fibroblast; primary culture; neonatal rats; Percoll isolation

Received 2015-02-09 Accepted 2015-05-07

This work was supported by the Joint Funds of the National Natural Science Foundation of China and Henan Province, China (No. U1404801).

*Corresponding author. Tel: +86-371-23880398; Fax: +86-371-23880398; E-mail: wangyaohui2001@sina.com

心脏是维持人体生命活动正常进行的主要器官之一, 心血管系统疾病如冠心病、心律失常、心肌缺血-再灌注损伤等是人类健康的严重威胁^[1-3], 因此建立理想的动物模型是研究疾病发生发展的重要环节。然而, 由于血流动力学、激素、神经反射等因素的影响, 在体的心肌损伤模型往往不能准确反映某些因子或因素在心肌损伤中的作用, 进而影响到该类疾病研究数据的准确性和可靠性^[2]。体外培养的原代心肌细胞可以弥补在体心脏研究时的某些不足, 对研究病理状态下心肌细胞的各种变化及相关分子机制提供了理想的模型^[4]。

人心脏由心肌细胞(约占心肌组织总细胞数的60%)和非心肌细胞(成纤维细胞、血管内皮细胞及淋巴细胞等)组成^[5], 其中成纤维细胞数量占非心肌细胞的90%以上。心肌细胞具有自动节律性、传导性、兴奋性和收缩性等生理特性, 这些特性取决于其结构特征。成纤维细胞不仅能调节心脏的正常功能, 而且还参与了心肌纤维化和心室重塑等心脏相关疾病的病理过程^[6]。与心肌细胞系相比, 原代心肌细胞既保持了体内原有的自发节律性和收缩性, 同时又排除了神经、体液因素的影响, 更真实地反映在体心肌细胞的性状及功能^[7,8]。近年来, 大鼠原代心肌细胞和成纤维细胞已广泛应用于各种相关细胞损伤模型的建立及药物保护在心血管疾病中的研究, 并从分子水平阐明药物的作用机制^[9-11]。然而, 目前分离大鼠原代心肌细胞和成纤维细胞普遍采用差速贴壁法进行, 因心肌组织成分复杂, 差速贴壁较难同时保证两种细胞的纯度, 有时需要两次差速贴壁或需加入特殊试剂, 费时较长^[12-14]。因此, 提高原代细胞产量, 获得较高纯度和活力的心肌细胞及成纤维细胞, 是心脏相关疾病实验研究的首要条件。本研究结合国内外现有的新生大鼠原代心肌细胞和成纤维细胞的分离方法^[15-17], 对相关技术参数进行优化及改进, 摸索并建立了一种操作简便、成本较低、重复性及稳定性较好, 并可同时分离获取新生大鼠原代心肌细胞及成纤维细胞的方法, 为研究心脏相关疾病提供理想的体外实验体系。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 Wistar 大鼠乳鼠(出生不超过2天), 10只/次, 雌雄不限; 由河南大学实验动物中心提供, 饲养环境为清洁级。

1.2 主要试剂 Percoll (GE); II型胶原酶, I型

胶原, 阿糖胞苷(arabinofuranosyl, Ara-C), 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS), 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI), 台盼蓝, 波形蛋白(Vimentin)单克隆抗体(Sigma); DMEM培养基, M199培养基(Gibco); CaCl₂, 乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA), HEPES钠盐, 磷酸盐缓冲溶液(PBS)(中杉金桥), 心肌肌钙蛋白I(cardiac troponin I, cTnI)抗体(Santa Cruz), α 平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)抗体(Sigma), FITC标记兔抗羊IgG抗体(博士德), Alexa Fluor R594标记山羊抗兔IgG抗体(Life)。

1.3 设备和器材 恒温二氧化碳培养箱和超净工作台(Thermo), 倒置相差光学显微镜(Motic), 荧光倒置显微镜(Olympus), Countstar自动细胞计数仪(上海睿钰生物), 高速自动平衡离心机(Eppendorf)。

1.4 改良型实验方法分离新生大鼠原代心肌细胞及成纤维细胞(在无菌条件下操作)

细胞悬液的制备: 取1窝新生Wistar大鼠乳鼠(10只, 出生不超过2天), 在安静环境中瞬时断头处死(参照美国兽医委员会章程执行, 并获得河南大学伦理委员会批准), 无菌条件下开胸获取心脏, 立即将心室组织(去除大血管和心房等组织)放入预冷的DS(Disassociation)缓冲液(提前配制)中, 于超净工作台内剪成1 mm³碎块(冰上操作)。随后将组织转移到三角烧瓶, 加入0.05% II型胶原酶(正式消化所需酶浓度的一半, 目的是尽量去除血细胞及其他易消化细胞), 置于37℃恒温水浴摇床中消化14 min, 转速220 r/min。弃上清液, 继而加入0.1% II型胶原酶液全酶消化液继续消化, 消化体积控制在每个心脏1 mL II型胶原酶, 每次消化液收集, 都有一个严格的12 min + 4 min的消化步骤(先消化12 min, 取出轻柔吹打10次, 继续消化4 min)。然后, 将消化好的细胞悬液通过细胞滤网过滤至一个含有等量重悬缓冲液的50 mL Falcon管中, 充分混匀, 200 g离心5 min, 弃上清, 用3~5 mL过夜培养基(DMEM、M199按4:1混合, 加入15% FBS和双抗)重悬细胞沉淀, 置于培养箱备用。紧接着加入消化液到烧瓶中进行下一轮消化, 并用过夜培养基重悬获得的细胞沉淀, 操作与第一次完全一样, 共三轮。最后, 将三轮处理获得的细胞重悬液合并, 进行后续分离操作。

利用Percoll分离新生大鼠原代心肌及成纤维细

胞：分别配制高密度（密度为 1.017 g/mL）和低密度（密度为 0.407 g/mL）Percoll，并将低密度 Percoll 缓慢铺到高密度 Percoll 上面。将合并好的细胞重悬液计数后缓慢加到 Percoll 上面，1 700 g 离心 30 min（加速度为 1，无刹车），即可获得 2 层分界清楚的悬液（图 1）。按照图 1 所示，分别收集上层细胞液及下层细胞液，并依次标记为成纤维细胞和心肌细胞。用预热的含 10% FBS 的 DMEM 完全培养基洗涤细胞两次，第一次 600 g 离心 5 min，第二次 250 g 离心 5 min。用过夜培养基重悬细胞沉淀并进行细胞计数，之后转移至适当的培养皿中，37 °C、5% CO₂ 培养过夜。次日，将培养液更换为相应的专用培养基持续培养，每天观察心肌细胞及成纤维细胞的形态和生长状况。

1.5 心肌细胞及成纤维细胞的鉴定 每次获得的新生大鼠原代心肌细胞及成纤维细胞的检测主要包括以下几方面（细胞搏动率仅针对心肌细胞）：

(1) 细胞数量及存活率检测：将 20 μL 获取的心肌细胞或成纤维细胞悬液与等体积 0.2% 台盼蓝充分混匀后，取 20 μL 滴入细胞计数板中，利用细胞计数仪计算细胞总数、活细胞数及死细胞数。每次分离细胞均进行计数，每次监测 5 个视野，取平均值。细胞存活率 (%) = 活细胞数 / 总细胞数 × 100%

(2) 细胞形态学观察：在倒置显微镜下，每天观察并记录培养基颜色变化、心肌细胞及成纤维细胞生长状态以及形态变化。

(3) 心肌细胞搏动率观察：从培养第 1 天起至第

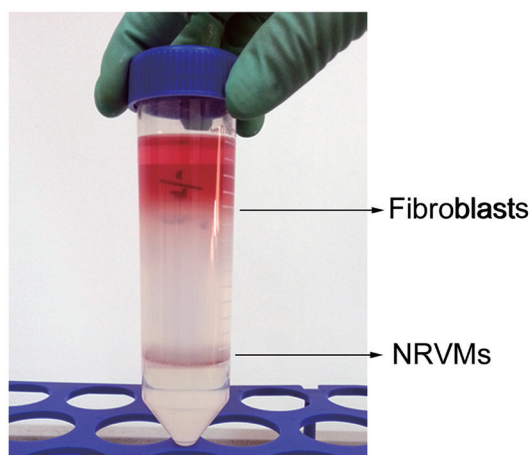


图 1. 新生大鼠原代心肌细胞及成纤维细胞分离结果示意图
Fig. 1. Schematic diagram of isolated neonatal rat ventricular myocytes (NRVMs) and fibroblasts.

15 天，每天分别统计 10 个 40 倍物镜视野有自发搏动的细胞个数，同时记录心肌细胞搏动的频率、节律、强度及范围，以此判断心肌细胞培养是否成功及细胞生长是否良好。细胞搏动率 (%) = 搏动细胞数 / 细胞总数 × 100%

(4) 心肌细胞及成纤维细胞纯度鉴定：将分离的心肌细胞或成纤维细胞分别接种于已加有细胞爬片的 6 孔板中，37 °C、5% CO₂ 条件下培养 48 h。取出细胞爬片，PBS 洗涤两次。4% 多聚甲醛溶液固定 15 min，经 PBS 洗涤之后用 0.3% Triton-X 100 处理 3 min。加入相应一抗 [心肌细胞：兔抗 cTnI 抗体 (1:200)；成纤维细胞：羊抗 Vimentin 抗体 (1:100)，兔抗 α-SMA 抗体 (1:200)] 4 °C 孵育过夜，然后分别加入 Alexa Fluor 594 标记的羊抗兔 IgG 抗体或 FITC 标记兔抗羊 IgG 抗体，室温孵育 1 h，用含 DAPI 的封片剂封片，最后利用荧光显微镜进行观测拍照并分析心肌细胞及成纤维细胞的纯度。细胞纯度 (%) = 阳性细胞数 / DAPI 核染细胞总数 × 100%。

2 结果

2.1 新生大鼠原代心肌细胞的数量及存活率检测

通过台盼蓝染色观测分离的新生大鼠原代心肌细胞总数量及活细胞数量。结果显示，在 5 次分离过程中，每次均可获得约 2×10^7 个总细胞，其中未被台盼蓝着色的活细胞约占 92%（即心肌细胞存活率）。

2.2 新生大鼠原代心肌细胞形态学观察

倒置显微镜监测显示，刚分离的心肌细胞呈球形，悬浮于培养基中，过夜培养后开始贴壁，并出现自发性搏动；24~48 h 后，大部分细胞已经贴壁，成三角形或不规则形状，收缩明显有力；72 h 后细胞体积变大，细胞伸出伪足并交织成网，搏动节律较一致；一周内细胞形态和细胞活力良好；两周后细胞活力开始下降，细胞呈长条状，但死亡细胞极少，说明培养过程中 Percoll 对细胞的毒性损害很小（图 2）。此外，培养 24 h 后的新生大鼠原代心肌细胞搏动频率约为 30~50 次/min，48 h 时多集中在 50~80 次/min，72 h 时可达 80~150 次/min，一周后搏动次数逐渐减少。

2.3 新生大鼠原代心肌细胞纯度鉴定

细胞爬片的免疫荧光检测显示，培养 48 h 后的新生大鼠原代心肌细胞特异性表达 cTnI，且定位于

细胞质中 (图 3)。通过随机记录 5 个视野中 cTnI 阳性细胞数量 (绿色荧光标记) 和细胞总数 (蓝色荧

光标记), 并计算 cTnI 阳性细胞率, 即新生大鼠原代心肌细胞的纯度, 结果显示 5 次分离的新生大鼠

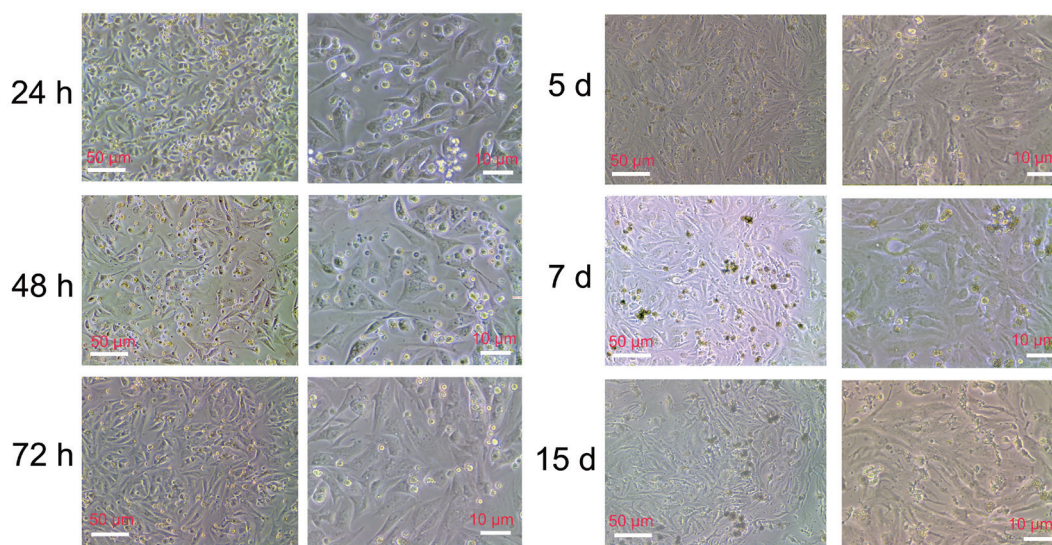


图 2. 培养不同时间(24 h~15 d)的新生大鼠原代心肌细胞的形态学监测

Fig. 2. Morphological monitoring of primary cultured neonatal rat ventricular myocytes (NRVMs) from 24 h to 15 d. Scale bar, 50 or 10 μm .

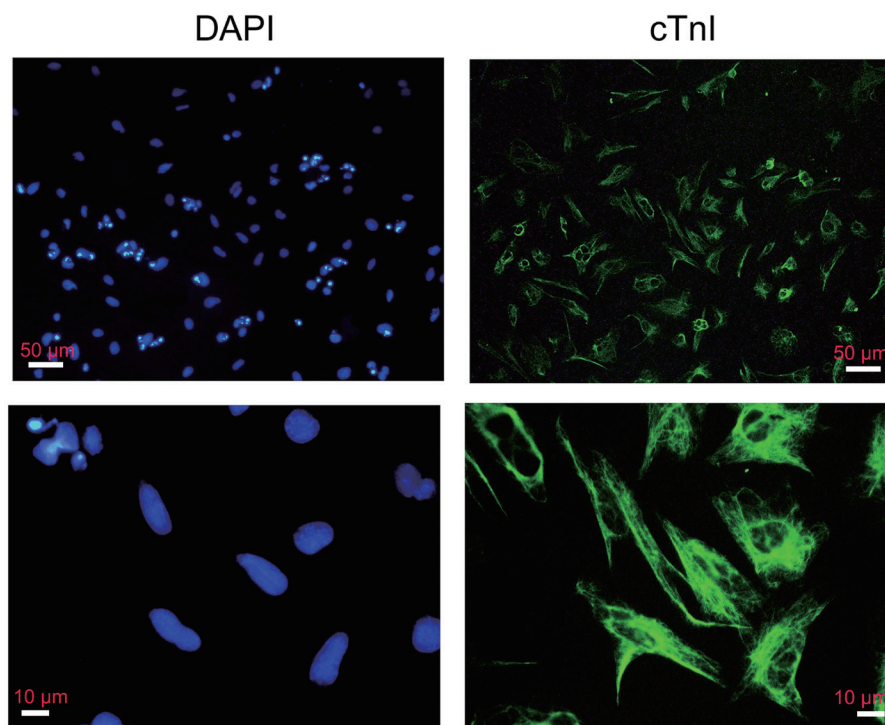


图 3. 新生大鼠原代心肌细胞表达cTnI

Fig. 3. Primary cultured neonatal rat ventricular myocytes (NRVMs) expressed cTnI. The isolated NRVMs were cultured in NRVM culture medium for 48 h. cTnI positive NRVMs were presented in green color, and blue color (DAPI) represented the total living cells. Scale bar, 50 or 10 μm .

原代心肌细胞纯度很高且稳定，均不低于 95%。

2.4 新生大鼠原代成纤维细胞的数量检测及形态学观察

与新生大鼠原代心肌细胞相似，经改良的方法

每次可获得约 6×10^7 个成纤维细胞，其细胞存活率可达 96%。倒置显微镜监测显示 (图 4)，刚分离的原代成纤维细胞呈圆形，具有良好的折光性，悬浮生长于培养基中。此外，细胞生长迅速，2~3 天

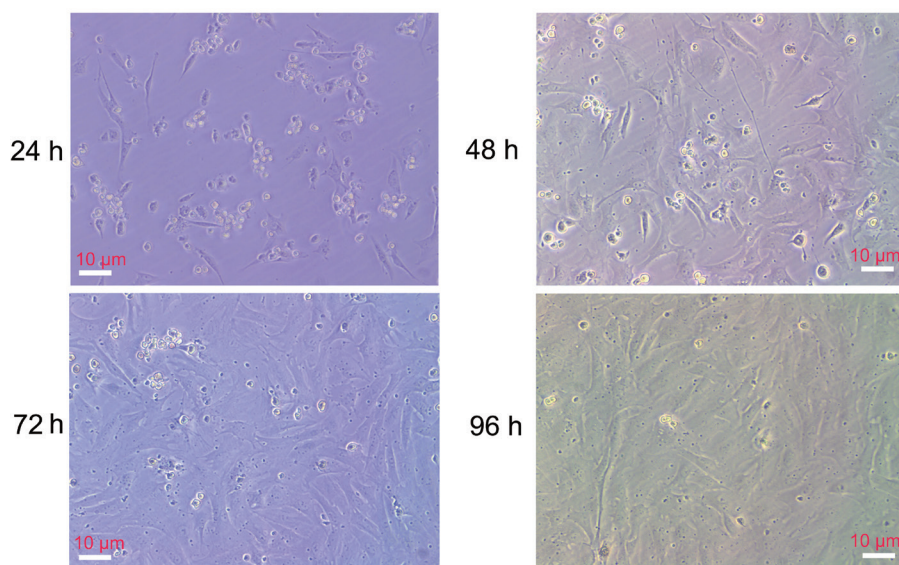


图 4. 培养不同时间(24~96 h)的新生大鼠原代成纤维细胞的形态学监测

Fig. 4. Morphological monitoring of primary cultured rat fibroblasts from 24 h to 96 h. Scale bar, 10 μm.

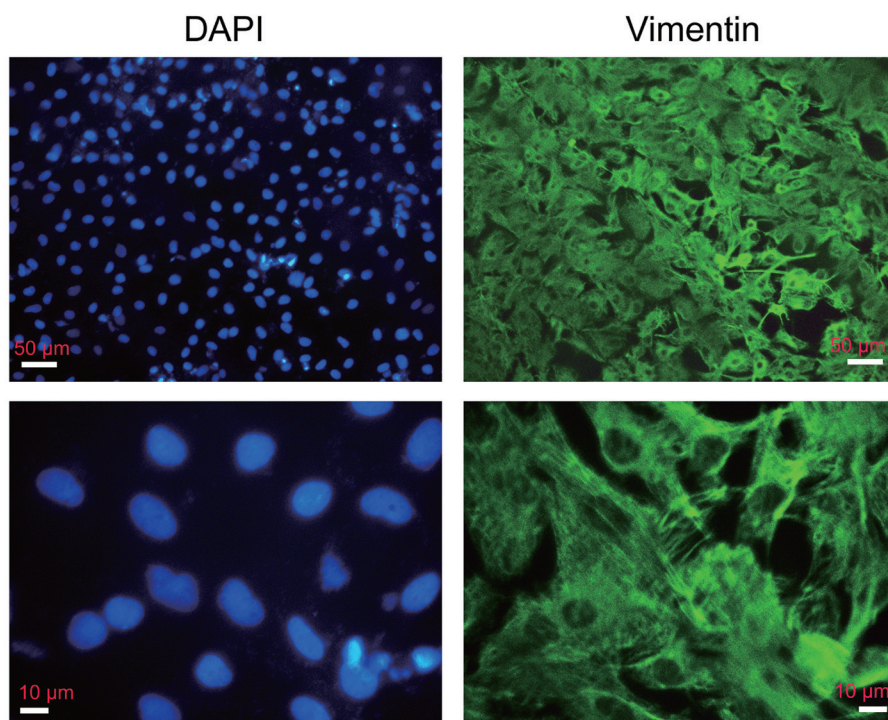


图 5. 新生大鼠原代培养成纤维细胞表达Vimentin

Fig. 5. Primary cultured rat fibroblasts expressed Vimentin. The isolated rat fibroblasts were cultured in DMEM medium for 48 h. Vimentin positive fibroblast were presented in green color, and blue color (DAPI) represented the total living cells. Scale bar, 50 or 10 μm.

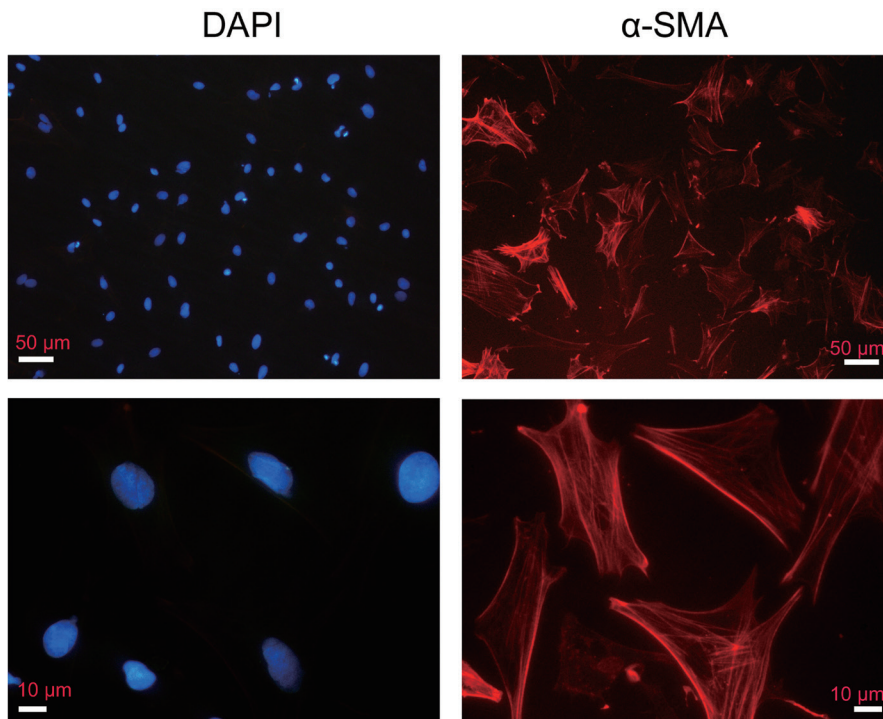


图 6. 新生大鼠原代培养成纤维细胞表达 α -SMA

Fig. 6. Primary cultured rat fibroblasts expressed α -SMA. The isolated rat fibroblasts were cultured in DMEM medium for 48 h. α -SMA positive fibroblast were presented in red color, and blue color (DAPI) represented the total living cells. Scale bar, 50 or 10 μ m.

即呈融合状态，细胞排列紧密，无自发性搏动。

2.5 新生大鼠原代成纤维细胞纯度鉴定

细胞爬片的免疫荧光检测显示，分离的成纤维细胞培养 48 h 后，细胞质中特异性表达 Vimentin (图 5)。进一步的分析显示每次分离的 Vimentin 阳性细胞 (绿色荧光标记) 约占总细胞 (蓝色荧光标记) 的 94%，即成纤维细胞的纯度。此外， α -SMA 辅助性免疫荧光检测显示，分离的成纤维细胞细胞质也表达 α -SMA，其阳性率约为 91% (图 6)。

3 讨论

作为体外实验研究的模型基础，原代心肌细胞和成纤维细胞已被应用于多种相关疾病研究，如缺血缺氧 - 再灌注模型、细胞凋亡及移植、心血管疾病机制及药物的开发等^[18–20]。差速贴壁法是利用成纤维细胞与心肌细胞贴壁速度不同而将它们分开的方法，也是目前分离原代心肌细胞和成纤维细胞经常采用的方法。差速贴壁法受消化过程影响较大，若消化不好，会影响成纤维细胞贴壁速度和质量，以致贴壁时间很难掌握，收集到的心肌细胞纯度也

不够，有时需要两次差速贴壁或加入特殊试剂抑制成纤维细胞生长，且不利于长期培养。Percoll 是一种包有乙烯吡咯烷酮的硅胶颗粒，其扩散常数低，密度梯度稳定，且对细胞无毒害，已被用于心肌细胞、间充质干细胞、神经突触小体、脑组织等的分离^[21–24]，国内尚无利用 Percoll 分离原代心肌细胞的报道。本研究在已有操作步骤基础上进一步改良，利用 Percoll 密度梯度离心快速将成纤维细胞与心肌细胞分离，消化完成后，后续分离时间控制在 1 h 以内；另外，其他非心肌细胞也因密度不同出现在其他区域 (见图 1) 被弃去，分离出的细胞纯度较高。本实验通过摸索组织处理及细胞分离过程中的相关参数，建立了一种改良的新生大鼠原代心肌细胞和成纤维细胞分离方法，此方法获得的目的细胞产量和纯度较高，活力较强，为体外实验研究的开展提供了保障。

原代心肌细胞增殖能力很低，提高分离获取的心肌细胞存活率和纯度是心肌细胞培养成功的关键^[25–27]。主要注意以下几点：(1) 鼠龄的选择，一般建议 1~3 d 的新生大鼠，出生后时间越短，其心

肌细胞分离后存活率越高, 越容易贴壁生长。我们在多次长期实验中也发现 2 d 以内的效果较好。(2) 消化酶的选择, 传统的分离消化多用胰蛋白酶, 作用较强, 容易造成心肌细胞损伤; 而 II 型胶原酶作用缓和, 主要作用对象是心肌细胞间质胶原, 对心肌细胞几乎没有损伤作用。我们消化时只采用 II 型胶原酶而不用胰蛋白酶, 避免了其对心肌细胞的损害作用, 而且初次消化使用浓度减半的酶以去除血细胞及其他易消化细胞。(3) 消化时间及次数, 严格的 12 min + 4 min 的消化时间, 中间增加一次轻柔吹打, 使消化更彻底。若心肌块已经逐渐变为絮状透明丝状, 即停止消化, 以减少心肌细胞损伤, 这种絮状透明物多为间质胶原成分, 心肌细胞含量不多。消化次数也由 6 次减为 4 次 (一次半酶消化和三次正式消化), 节约了分离时间。(4) 细胞的接种密度, 约 $1.5 \times 10^6 \sim 2.0 \times 10^6$ 个 / 3.5 cm 培养皿, 细胞数如果过少, 心肌细胞粘附伸展后不能相互接触, 细胞之间无法进行信息交流, 心肌细胞收缩不易同步, 收缩持续时间变短^[28]。(5) 换液与培养时间, 接种 24 h, 待其贴壁后首次换液, 一般在培养后 48 h 开始实验研究。本研究方法对现有的新生大鼠原代心肌细胞的分离方法改善后不仅时间上缩短 2 h 以上, 获得的细胞数量及质量也较高。

近年来, 越来越多的研究表明, 心肌成纤维细胞不仅对心肌细胞有保护作用, 而且还能影响心肌细胞的结构和生理功能。因此, 对心肌成纤维细胞的生理学研究也成为心血管疾病研究的热点^[29-32]。在本实验中, 我们可以同时分离获得原代心肌细胞和成纤维细胞。获得的成纤维细胞较心肌细胞更容易贴壁且具有分裂增殖能力, 存活率很高, 经 Vimentin 免疫荧光染色鉴定, 纯度达 94% 以上, 可用于心肌纤维化等相关实验研究。

综上所述, 本文介绍的采用改良的 II 型胶原酶消化结合 Percoll 分离法, 分离获取的新生大鼠原代心肌细胞和成纤维细胞, 纯度和活力很高, 且分离耗时短, 产量高, 是一种理想的原代心肌细胞及成纤维细胞分离获取方法。

参考文献

- 1 Cataldo S, Stuart AG. Coronary artery problems and disease in adults with congenital heart disease: how to evaluate, how to prevent, how to treat. *Minerva Pediatr* 2014; 66(5): 441-452.
- 2 Trayanova NA, Boyle PM. Advances in modeling ventricular arrhythmias: from mechanisms to the clinic. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2014; 6(2): 209-224.
- 3 Sattur S, Brener SJ, Stone GW. Pharmacologic therapy for reducing myocardial infarct size in clinical trials: failed and promising approaches. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2015; 20(1): 21-35.
- 4 Gerilechaogetu F, Feng H, Golden HB, Nizamutdinov D, Foster DM, Glaser S, Dostal DE. Production of spontaneously beating neonatal rat heart tissue for calcium and contractile studies. *Methods Mol Biol* 2013; 1066: 45-56.
- 5 Golden HB, Gollapudi D, Gerilechaogetu F, Li J, Cristales RJ, Peng X, Dostal DE. Isolation of cardiac myocytes and fibroblasts from neonatal rat pups. *Methods Mol Biol* 2012; 843: 205-214.
- 6 Porter KE, Turner NA. Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling. *Pharmacol Ther* 2009; 123(2): 255-278.
- 7 Yamauchi Y, Harada A, Kawahara K. Changes in the fluctuation of interbeat intervals in spontaneously beating cultured cardiac myocytes: experimental and modeling studies. *Biol Cybern* 2002; 86(2): 147-154.
- 8 Galvez A, Morales MP, Eltit JM, Ocaranza P, Carrasco L, Campos X, Sapag-Hagar M, Diaz-Araya G, Lavandero S. A rapid and strong apoptotic process is triggered by hyperosmotic stress in cultured rat cardiac myocytes. *Cell Tissue Res* 2001; 304(2): 279-285.
- 9 Snopko RM, Aromolaran AS, Karko KL, Ramos-Franco J, Blatter LA, Mejia-Alvarez R. Cell culture modifies Ca^{2+} signaling during excitation-contraction coupling in neonate cardiac myocytes. *Cell Calcium* 2007; 41(1): 13-25.
- 10 Hafizovic S, Heer F, Ugniwenko T, Frey U, Blau A, Ziegler C, Hierlemann A. A CMOS-based microelectrode array for interaction with neuronal cultures. *J Neurosci Methods* 2007; 164(1): 93-106.
- 11 Adamcova M, Simunek T, Kaiserova H, Popelova O, Sterba M, Potacova A, Vavrova J, Malakova J, Gersl V. *In vitro* and *in vivo* examination of cardiac troponins as biochemical markers of drug-induced cardiotoxicity. *Toxicology* 2007; 237(1-3): 218-228.
- 12 Zhu XL (朱晓丽), Wang L, Ma YT, Yang YN, Chen BD, Ma MM. Optimize the method of isolation and culture neonatal rat cardiomyocytes and cardiac fibroblasts *in vitro*. *Chin J Arterioscler (中国动脉硬化杂志)* 2015; 23(1): 90-93 (Chinese, English abstract).
- 13 Xin Y (辛毅), Xu XF, Huang YM, Zhang Y, Li WB. Isolation, primary culture and identification of cardiac fibroblasts and cardiac myocytes of neonatal mouse. *J Xinxiang Med Coll (新乡医学院学报)* 2011; 28(5): 541-547 (Chinese, English abstract).

- 14 Shi YL (施雨露), Li XY, Cao MN, Yu SY, Wang P. Simultaneous isolation of myocardial cells and cardiac fibroblasts from neonatal rats. *Chin J Tiss Eng Res (中国组织工程研究)* 2013; 17(24): 4414–4420 (Chinese, English abstract).
- 15 Louch WE, Sheehan KA, Wolska BM. Methods in cardiomyocyte isolation, culture, and gene transfer. *J Mol Cell Cardiol* 2011; 51(3): 288–298.
- 16 Louch WE, Hake J, Jolle GF, Mork HK, Sjaastad I, Lines GT, Sejersted OM. Control of Ca^{2+} release by action potential configuration in normal and failing murine cardiomyocytes. *Biophys J* 2010; 99(5): 1377–1386.
- 17 Wang M (王梅), Li YJ, Liu Sy, Zhang H, Yang R, Liu JM, Miao CL, Wang YL, Jin X. Establishment of insulin resistance cardiocytes model. *J Chin Physician (中国医师杂志)* 2013; 15(2): 182–185 (Chinese, English abstract).
- 18 Leung KP, Qu YH, Qiao DF, Xie WB, Li DR, Xu JT, Wang HJ, Yue X. Critical role of insulin-like growth factor binding protein5 in methamphetamine-induced apoptosis in cardiomyocytes. *Mol Med Rep* 2014; 10(5): 2306–2312.
- 19 Zhang L, He Q, Wang Q, Zhang B, Wang B, Xu F, Wang T, Xiao L, Zhang L. Intracellular Ca^{2+} overload induced by extracellular Ca^{2+} entry plays an important role in acute heart dysfunction by tentacle extract from the jellyfish *Cyanea capillata*. *Cardiovasc Toxicol* 2014; 14(3): 260–274.
- 20 Zhao X, Ding EY, Yu OM, Xiang SY, Tan-Sah VP, Yung BS, Hedgpeth J, Neubig RR, Lau LF, Brown JH, Miyamoto S. Induction of the matricellular protein CCN1 through RhoA and MRTF-A contributes to ischemic cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol* 2014; 75: 152–161.
- 21 Golden HB, Gollapudi D, Gerilechaogetu F, Li J, Cristales RJ, Peng X, Dostal DE. Isolation of cardiac myocytes and fibroblasts from neonatal rat pups. *Methods Mol Biol* 2012; 843: 205–214.
- 22 Chang Y, Hsieh PH, Chao CC. The efficiency of Percoll and Ficoll density gradient media in the isolation of marrow derived human mesenchymal stem cells with osteogenic potential. *Chang Gung Med J* 2009; 32(3): 264–275.
- 23 Dunkley PR, Jarvie PE, Robinson PJ. A rapid Percoll gradient procedure for preparation of synaptosomes. *Nat Protoc* 2008; 3(11): 1718–1728.
- 24 Juan WS, Lin HW, Chen YH, Chen HY, Hung YC, Tai SH, Huang SY, Chen TY, Lee EJ. Optimal Percoll concentration facilitates flow cytometric analysis for annexin V/propidium iodine-stained ischemic brain tissues. *Cytometry A* 2012; 81(5): 400–408.
- 25 Li ZG (李兆钢), Wang GX, Liu SS, Li RF, Li F. Protective effects of α -lipoic acid on high glucose induced cardiac myocytes hypertrophy in neonatal rats. *Chin J Public Health (中国公共卫生)* 2013; 29(1): 69–71 (Chinese, English abstract).
- 26 Hua Y (花颖), Xu B. A review of current research in cardiomyocyte regeneration and stem cell transplantation. *Adv Cardiovasc Dis (心血管病学进展)* 2012; 33(6): 748–750 (Chinese, English abstract).
- 27 Lu Y, Kong LC, Zhang ZH. Baicalein protects rat cardiac myocytes from hypoxia/reoxygenation induced apoptosis via antioxidant and modulation of intracellular calcium concentration. *Chin J Tiss Eng Res (中国组织工程研究)* 2012; 16(50): 9425–9430.
- 28 Zhang L (张琳), Li DY, Wang ZR, Xia Y, Zhu H, Pan DF, Zhang ZQ, Yang Y. An improved method for primary culture of neonate rat myocardial cell. *Acta Acad Med Xuzhou (徐州医学院学报)* 2008; 28(5): 303–306 (Chinese, English abstract).
- 29 Guo W, Kamiya K, Kada K, Kodama I, Toyama J. Regulation of cardiac Kv1.5 K^+ channel expression by cardiac fibroblasts and mechanical load in cultured newborn rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30(1): 157–166.
- 30 Yu H, Gallagher AM, Garfin PM, Printz MP. Prostacyclin release by rat cardiac fibroblasts: inhibition of collagen expression. *Hypertension* 1997; 30(5): 1047–1053.
- 31 Nam YJ, Lubczyk C, Bhakta M, Zang T, Fernandez-Perez A, McAnally J, Bassel-Duby R, Olson EN, Munshi NV. Induction of diverse cardiac cell types by reprogramming fibroblasts with cardiac transcription factors. *Development* 2014; 141(22): 4267–4278.
- 32 Abrial M, Da Silva CC, Pillot B, Augeul L, Ivanes F, Teixeira G, Cartier R, Angoulvant D, Ovize M, Ferrera R. Cardiac fibroblasts protect cardiomyocytes against lethal ischemia-reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 2014; 68: 56–65.