

高效和稳定提取原代成年小鼠心脏成纤维细胞的新方法

马小娟^{1*}, 王 好^{1*}, 马学芹², 宋 颖¹, 于佳卉¹, 孙 艳¹, 李艳芳¹, 薛丽香¹, 李显龙¹, 杨建岭^{1△}, 王 艳^{1△}

(1. 北京大学第三医院医学创新研究院, 北京 100191; 2. 济南市第八人民医院内分泌科, 济南 271100)

[摘 要] **目的:** 心脏成纤维细胞 (cardiac fibroblasts, CFs) 在心肌重塑和纤维化进程中发挥核心作用, 其高效获取是开展相关机制研究的先决条件。目前, 提取原代成年小鼠 CFs 的方法存在耗时长、得率低、活性差等问题, 本研究旨在通过优化酶解体系与机械解离参数的协同作用, 建立快速、高产、稳定的成年小鼠 CFs 分离方案。**方法:** 借助全自动组织解离器 (gentleMACS[®] Octo Dissociator with Heaters), 选择不同种类及浓度的胶原酶、胰蛋白酶和核酸酶作为酶解体系, 提取成年小鼠 CFs, 探索更优化的提取条件 (优化组), 并与商品化多组织解离试剂盒 2 (Multi Tissue Dissociation Kit 2, 试剂盒组) 的提取效果进行比较。采用高内涵成像分析系统统计贴壁 72 h 后的每视野细胞数量, 检测细胞得率; 用免疫荧光法标记波形蛋白 (vimentin), 鉴定 CFs 的纯度; 用转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor $\beta 1$, TGF- $\beta 1$) 刺激 CFs, 判断转分化活性。**结果:** 胶原酶、胰蛋白酶和核酸酶三者缺少任意一种都将延长细胞提取时间, 降低细胞得率。优化组比商品化试剂盒组的消化时长缩短 32.2 min, CFs 得率显著提高。在 TGF- $\beta 1$ 处理后, CFs 的增殖能力增强, α -平滑肌肌动蛋白、I 型胶原和纤连蛋白的表达量上调。**结论:** 本研究依托组织解离器, 优化了一种基于胶原酶、胰蛋白酶和核酸酶的混合酶消化法, 能够高效、稳定地提取具有正常分化潜能的成年小鼠 CFs。

[关键词] 小鼠; 心脏成纤维细胞; 原代细胞培养; 组织解离

[中图分类号] R392-33; R542.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1671-167X(2026)03-0658-08

doi: 10.19723/j.issn.1671-167X.2026.03.028

A new method for extracting adult mouse cardiac fibroblasts more efficiently and stably

MA Xiaojuan^{1*}, WANG Hao^{1*}, MA Xueqin², SONG Ying¹, YU Jiahui¹, SUN Yan¹, LI Yanfang¹, XUE Lixiang¹, LI Xianlong¹, YANG Jianling^{1△}, WANG Yan^{1△}

(1. Institute of Medical Innovation and Research, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China; 2. Department of Endocrinology, The Eighth People's Hospital of Jinan, Jinan 271100, China)

ABSTRACT Objective: Cardiac fibroblasts (CFs) play a central role in myocardial remodeling and fibrosis. Efficient isolation of CFs is a prerequisite for investigating related mechanisms. However, current methods for isolating primary adult mouse CFs suffer from prolonged processing time, low yield, and poor viability. This study aims to establish a rapid, high-yield, and stable isolation protocol for adult mouse CFs by optimizing the synergistic effect of enzymatic digestion and mechanical dissociation parameters. **Methods:** Using the gentleMACS[®] Octo Dissociator with Heaters, we selected different types and concentrations of collagenase, trypsin, and nuclease as the enzymatic digestion system for CFs extraction. We explored the optimal extraction conditions and compared the results with the commercial Multi Tissue Dissociation Kit 2. The cell yield was quantified using a high-content imaging analysis system by counting the number of adherent cells per field after 72 h of culture. The CFs purity was assessed using immunofluorescence staining for vimentin. The trans-differentiation activity of the CFs was evaluated with transforming growth factor $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$). **Results:** Omitting any component of the digestion solution (collagenase II/IV, trypsin or DNase I), significantly prolonged extraction time and reduced cell yield. In contrast, the optimized protocol outperformed the commercial kit, reducing digestion time by 32.2 min and significantly increasing cell yield, and with comparable obtained CFs purity. After TGF- $\beta 1$ stimulation, CFs exhibited enhanced proliferative capacity and upregulated expression of α -smooth muscle actin (α -SMA), collagen type I (Col I), and fibronectin (FN), confirming the differentiation potential of CFs isolated via the optimized method. **Conclusion:** This study systematically optimized an enzymatic di-

基金项目: 国家自然科学基金(82471329) Supported by the National Natural Science Foundation of China (82471329)

△ Corresponding author's e-mail, jianlingyang@pku.edu.cn, yanwang2019@bjmu.edu.cn

* These authors contributed equally to this work

网络出版时间: 2026-04-07 20:14:48 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4691.R.20260407.1119.002.html>

gestion method combining collagenase, trypsin, and nuclease in conjunction with mechanical dissociation using a tissue dissociator, leading to the efficient and stable isolation of adult mouse CFs. By fine-tuning enzyme concentrations and digestion conditions, we successfully reduced processing time, improved cell yield, and enhanced cell viability compared with conventional isolation methods. These findings validate the physiological relevance of the isolated CFs and demonstrate that the optimized protocol provides a reliable and reproducible method for studying myocardial fibrosis and remodeling. This protocol can serve as a valuable tool for researchers investigating CFs biology and its role in cardiovascular diseases.

KEY WORDS Mice; Cardiac fibroblasts; Primary cell culture; Tissue dissociation

心脏成纤维细胞(cardiac fibroblasts, CFs)是心脏细胞外基质(extracellular matrix, ECM)沉积和组织纤维化的主要来源^[1-2]。在心肌损伤时,CFs活化为肌成纤维细胞(myofibroblasts, MFs),通过诱导编码 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)的 *actin alpha 2 (Acta2)* 等基因的表达,以及分泌 ECM 成分,使这些细胞在心肌梗死后重塑 ECM 微环境或参与形成瘢痕^[3-5],是心脏纤维化的重要病理过程^[6]。然而,目前针对心脏纤维化仍缺乏有效的治疗方法^[7-8]。

原代小鼠 CFs 是研究心脏纤维化、心脏重构等疾病机制的重要细胞模型^[9]。相对于成年鼠,从新生鼠尤其是低日龄小鼠所得的细胞活力更强^[10],也更容易提取和培养,所以大部分研究用新生鼠来源的细胞开展实验^[11-13],但这种方法也存在缺陷,即低日龄小鼠来源的细胞不能真实反映成年状态的病理生理特性。

近来,有文献报道通过单细胞测序技术发现成年小鼠心脏有着复杂的细胞构成,除血管内皮细胞和心肌细胞外,成纤维细胞居第三大类,占心脏构成细胞总数的 13.46%^[14]。目前,提取成年小鼠 CFs 多用单一消化酶^[9]或联合酶消化法^[15-16],以及灌注联合酶消化法^[17]。以上方法大多用时较长,细胞得率低且操作不便捷。由于 CFs 会自发分化,体外培养的 CFs 应在三代内使用^[15],不能通过持续传代实现扩增,因此,如何从成年小鼠心脏中高效提取出更多可用的 CFs,是目前领域内亟待解决的问题。

本研究依托全自动组织解离器(gentleMACS[®] Octo Dissociator with Heaters)开展,希望通过优化传统方法中不同消化酶的组合和配比,建立一种能够稳定、高效提取成年小鼠 CFs 的方法,为心脏纤维化等疾病的治疗方案提供大量可用的原代细胞资源。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 6 周龄的 C57BL/6 小鼠,雌雄不限,体重相近,无特定病原体(specific pathogen free,

SPF)级别,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,生产许可证:北京百善 SCXK(京)2021-0006。

1.1.2 试剂 胎牛血清(A5669701,澳大利亚)、DMEM 高糖培养液(C11965500BT)、青-链霉素抗生素(15140122)购自 Gibco(美国),磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS, SH30256. 01) 购自 Hyclone(美国),胰蛋白酶(T8150)、胶原酶 II(C8150)、胶原酶 IV(C8160)、Hoechst 33342(C0031)和红细胞裂解液(R1010)购自 Solarbio(中国),DNase I(D5025)购自 LABLEAD(中国),细胞增殖与毒性检测试剂盒 CCK-8(CK04)购自 DOJINDO(日本),Trizol(R401-01)、HiScript III RT SuperMix for qPCR(R323-01)和 Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix(Q712-03)购自 Vazyme(中国),山羊抗兔 Alexa Fluor 488(ZF-0511)、山羊抗兔/小鼠 IgG(H+L)(ZB-2301/ZB-2305)抗体购自中杉金桥生物技术有限公司(中国),抗 α -SMA(ab7817)、I 型胶原(collagen type I, Col I, ab270993)、纤连蛋白(fibronectin, FN, ab45688)、波形蛋白(vimentin)(ab92547)和 β -actin(ab8226)抗体购自 Abcam(美国),转化生长因子 β 1(transforming growth factor β -1, TGF- β 1, CK33)购自近岸科技有限公司(中国),Multi Tissue Dissociation Kit 2(#130-110-203)购自 Miltenyi Biotec(德国),RIPA 裂解液(C1053)、蛋白酶抑制剂(P1265-1)购自普利莱基因技术有限公司(中国)。

1.1.3 仪器与耗材 倒置(荧光)显微镜购自德国徕卡公司,Operetta CLS 高内涵成像分析系统购自 PerkinElmer, gentleMACS[®] Octo Dissociator with Heaters、组织解离管购自 Miltenyi Biotec,细胞培养皿和离心管购自 Corning,玻底培养皿购自无锡耐思(NEST)生命科技股份有限公司。

1.2 组织解离与原代 CFs 提取方法的构建

目前,提取原代成年小鼠 CFs 的方法不一,如胶原酶 II 法^[18],胶原酶 IV 联合胰蛋白酶法^[16],胶原酶 IV 联合中性蛋白酶法^[15],胶原酶 II 联合胰蛋白酶法^[19],胶原酶 II、胶原酶 IV、蛋白酶 X 和 IV 联合灌注法^[17]等,且酶的浓度也有较大差异。除灌注

法外,其他方法在消化中多采用吹打和磁力搅拌器,上述方法大多存在耗时长、费力、获得可用的细胞少、裂解液组分不统一等问题。

本研究在使用组织处理器的条件下,采用不同消化酶组合,通过比较分析,寻找到最优的成年小鼠 CFs 的提取方法。

将 C57BL/6 小鼠脱颈处死,用 75% (体积分数)乙醇充分喷洒体表消毒灭菌,取出心脏后,将其放入无菌预冷的 2% (体积分数)抗生素-PBS 中,反复冲洗心脏 4~5 次,剪碎心脏,如果血液较多,可再用预冷 PBS 清洗。

向组织中加入 2.5 mL 消化酶(由胰蛋白酶、胶原酶 II/IV 及 DNase I 按照一定浓度溶解于无血清高糖 DMEM 中制成),将组织转移到组织解离管中,并将其载入 gentleMACS[®] Octo Dissociator with Heaters。运行提前设置的组织解离程序:(1)37 ℃ on;(2)Ramp 0 r/min, 5 min;(3)Loop ×2;(4)Ramp 200 r/min, 2 s;(5)Ramp -200 r/min, 2 s;(6)End-loop;(7)Loop ×3;(8)Spin ramp -500 r/min, 2 s;(9)Spin ramp 500 r/min, 3 s;(10)Endloop;(11)Loop ×3;(12)Ramp -200 r/min, 2 s;(13)Ramp 200 r/min, 3 s;(14)Endloop;(15)End。程序运行一轮约 5.5 min,待程序运行结束,取下解离管,将上清液转移到 20% (体积分数)FBS-DMEM 培养基中。继续向残余组织中加入新的消化酶,重复以上步骤,直至组织消化完全(消化耗时受消化液配比的影响)。

将收集的细胞悬液 1 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液,之后向细胞沉淀中加入 2~3 mL 红细胞裂解液,孵育 2 min,然后加入 10 mL PBS 进行清洗,1 000 r/min 离心 5 min,此时收集的细胞沉淀即为原代 CFs。用 10% (体积分数)FBS-DMEM 培养基重悬细胞,开始培养,24 h 后换液观察。将每只心脏的细胞悬液平均铺种到六孔板的两个孔中以便比较分析。

1.3 用免疫荧光法鉴定 CFs 的纯度

将 P1 代 CFs 种到玻底培养皿中,24 h 后用 4% (体积分数)多聚甲醛溶液室温固定 20 min,PBS 清洗 3 次,用 0.2% (体积分数)Triton X-100 室温孵育 5 min,PBS 清洗 3 次。用山羊血清室温封闭 1 h 后,加入 anti-vimentin(1:100),4 ℃ 孵育过夜。PBS 清洗 3 次,加入山羊抗兔 Alexa Fluor 488(1:200),室温避光孵育 1 h。PBS 清洗 3 次,加入 DAPI 染核,清洗后加入抗淬灭封片剂,用高内涵成像分析系统拍摄并分析。

1.4 细胞增殖检测

将 P1 代 CFs 以 3 000 个/孔的密度种到 96 孔细胞培养板中,过夜后更换不含血清的低糖 DMEM 培养基,饥饿 24 h,接着加入或不加 TGF-β1(10 μg/L)孵育 48 h。弃掉原培养基,每孔加入含 10% (体积分数)CCK-8 的培养基,继续孵育 2 h,之后用多功能酶标仪检测 450 nm 处的光密度值并比较分析。

1.5 RNA 提取、逆转录和 qPCR

用 Trizol 提取经过 TGF-β1 处理后的 CFs 总 RNA。取 1 μg RNA 用试剂盒 HiScript III RT Super-Mix for qPCR 逆转录成 cDNA,然后用实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR, qPCR)试剂盒 Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix 检测内参基因 GAPDH 和目的基因 α-SMA(Acta2)、Col I(Coll1a1)、FN(Fn1)的 RNA 水平。qPCR 引物序列见表 1。

表 1 qPCR 引物序列
Table 1 Sequences of the primers for qPCR

Name	Primer sequence (5'-3')
GAPDH	Forward: AGGTCGGTGTGAACGGATTTC Reverse: TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCAA
α-SMA	Forward: CTTCCAGCCATCTTTCATTGG Reverse: GTTCTGAGGGGCAATGAT
Col I	Forward: CCTCAGGGTATTGCTGGACAAC Reverse: CAGAAGGACCTTGTTCGCCAGG
FN	Forward: CCGGTGGCTGTCACTCAGA Reverse: CCGTTCCTCCACTGCTGATTATC

qPCR, quantitative real-time PCR; α-SMA, α-smooth muscle actin; Col I, collagen type I; FN, fibronectin.

1.6 Western blot

用含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液裂解经 TGF-β1 处理后 CFs,提取总蛋白,用二喹啉甲酸法定量后,取 30 μg 进行 Western blot 实验。用 10% (体积分数)SDS-PAGE 电泳,利用湿转法转至聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride, PVDF 膜),室温封闭 1 h 后,分别加入一抗[α-SMA(1:3 000)、Col I(1:1 000)、FN(1:1 000)和 β-actin(1:5 000)],4 ℃ 孵育过夜。TBST 漂洗 3 次,加入辣根过氧化物酶偶联的山羊抗兔/小鼠 IgG(H+L)(1:3 000)室温孵育 1 h。TBST 漂洗 3 次。使用 GeneSys ECL 化学发光法系统成像。

1.7 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8 软件进行统计学分析,符合正态分布的数据以均数 ± 标准差表示,非正态分布的计量资料以中位数(最小值,最大值)表示,多组间比较采用单因素方差分析或者非参数检验,

$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胶原酶Ⅱ/Ⅳ、胰蛋白酶和 DNase I 提取成年小鼠 CFs

为建立一套高效的提取方法,本研究在使用全自动组织处理器的前提下,对消化酶配比进行优化。基于需要水解细胞外间质、断开细胞间连接以及减少因细胞破裂释放出的 DNA 导致的粘连,实验将选用胶原酶、胰酶和 DNase I 进行配伍。因为胶原酶Ⅱ和胶原酶Ⅳ均可制备单细胞悬液,故首先区分两种胶原酶的使用效果,实验分组及消化酶配伍见表2。

两种胶原酶的使用效果显示(表3),胶原酶Ⅱ与胶原酶Ⅳ联合消化法的消化时长相同,均为22 min;培养到72 h,待细胞核染色后,用高内涵成像分析系统拍照并统计分析,随机选取13个视野,记录每个视野的细胞个数,发现两种胶原酶联合消化法的

细胞得率差异没有统计学意义[479 (419/653) *vs.* 474 (435/669), $P>0.05$]。因此,本研究选择胶原酶Ⅱ组为优化组,并对处理条件进行分组(表4)。

表2 胶原酶Ⅱ与胶原酶Ⅳ联合消化酶的配伍条件

Enzyme concentrations	Collagenase Ⅱ group	Collagenase Ⅳ group
Collagenase Ⅱ/(g/L)	1.2	—
Collagenase Ⅳ/(g/L)	—	1.2
Trypsin/(g/L)	0.8	0.8
DNase I/(g/L)	0.2	0.2
Red blood cell lysis	+	+

表3 胶原酶Ⅱ与胶原酶Ⅳ联合消化法的效果比较

Group	Digestion time/min	Cell yield (cell number/field), median (minimum, maximum)
Collagenase Ⅱ	22	479 (419, 653)
Collagenase Ⅳ	22	474 (435, 669)

表4 不同组别的处理条件

Table 4 Treatment conditions for different groups

Enzyme concentrations	Optimized group	No collagenase group	No trypsin group	No DNase I group	No red blood cell lysis group
Collagenase Ⅱ/(g/L)	1.2	—	1.2	1.2	1.2
Trypsin/(g/L)	0.8	0.8	—	0.8	0.8
DNase I/(g/L)	0.2	0.2	0.2	—	0.2
Red blood cell lysis	+	+	+	+	—

结果显示,要将一颗6周龄小鼠的心脏解离消化完全,不同处理组之间的消化时长差异有统计学意义($P=0.005$)。优化组的平均消化时长为23.8 min,与各个酶缺失组相比,缩短了5.5~16.5 min(图1A),其中,与无胶原酶组相比缩短了16.5 min,差异有统计学意义。

培养到72 h进行细胞核染色,每组随机选取20~30个视野统计细胞个数(图1B),结果显示,相对于酶缺失组,优化组平均每视野中的细胞数量明显增多,优化组的细胞得率比其他组增加了1.33~10.6倍。另外,优化组变异系数(coefficient of variation, CV)值为0.11,无胶原酶组、无胰蛋白酶组、无核酸酶组的CV值分别为0.62、0.46和0.23,由此可见,优化组的稳定性比较理想。因此,若要满足缩短消化时长并获得较高的细胞得率,胶原酶Ⅱ/Ⅳ、胰蛋白酶和 DNase I 缺一不可。当残余红细胞过多时,则需增加裂解红细胞的步骤。

2.2 酶浓度对消化时长和细胞得率的影响

在确定消化酶的酶种构成后,我们对酶的浓度

进行了探索,分别设立实验分组如表5所示。

表5 各组消化酶浓度及处理条件

Table 5 Concentration of digestive enzymes and treatment condition in each group

Enzyme concentrations	Optimized group	0.5 × concentration group	2 × concentration group
Collagenase Ⅱ/(g/L)	1.2	0.6	2.4
Trypsin/(g/L)	0.8	0.4	1.6
DNase I/(g/L)	0.2	0.1	0.4
Red blood cell lysis	+	+	+

实验结果显示,当酶浓度降至一半(0.5×)时,将一颗小鼠心脏解离消化完全的消化时长由23.8 min延长至29.3 min。当酶浓度提高到2倍(2×)时,消化用时缩短到16.5 min,差异有统计学意义(图2A)。

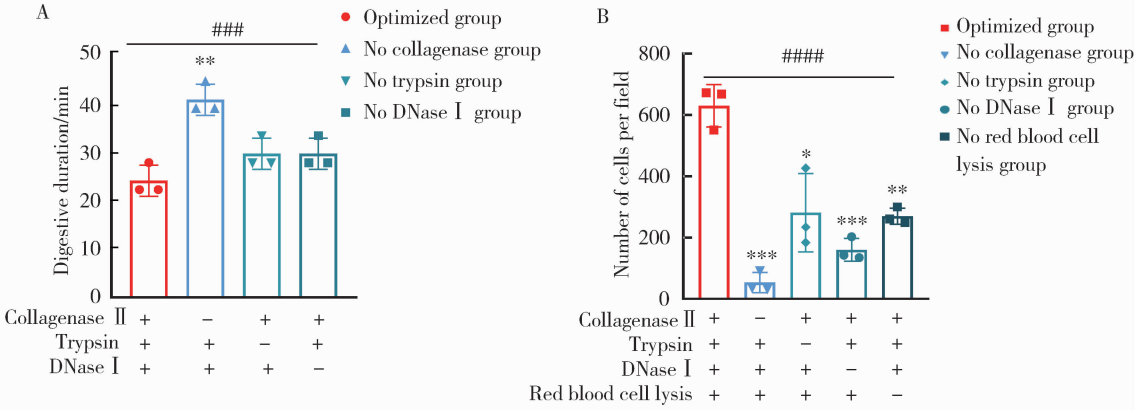
培养72 h后,三组的细胞得率差异有统计学意义,优化组每视野细胞数是0.5×浓度组的3.14倍($P<0.01$),2×浓度组的每视野细胞数比优化组

增多了 35.9% ($P < 0.05$, 图 2B、C, 图 3)。因此, 在优化组的基础上, 要求耗时更短、得率更高时, 可将酶浓度提高至 2 倍。

2.3 优化组酶解方案的消化时间和细胞得率

Multi Tissue Dissociation Kit 2 是市面上广泛使用的高效解离成年小鼠心脏的商品化试剂盒。本研究

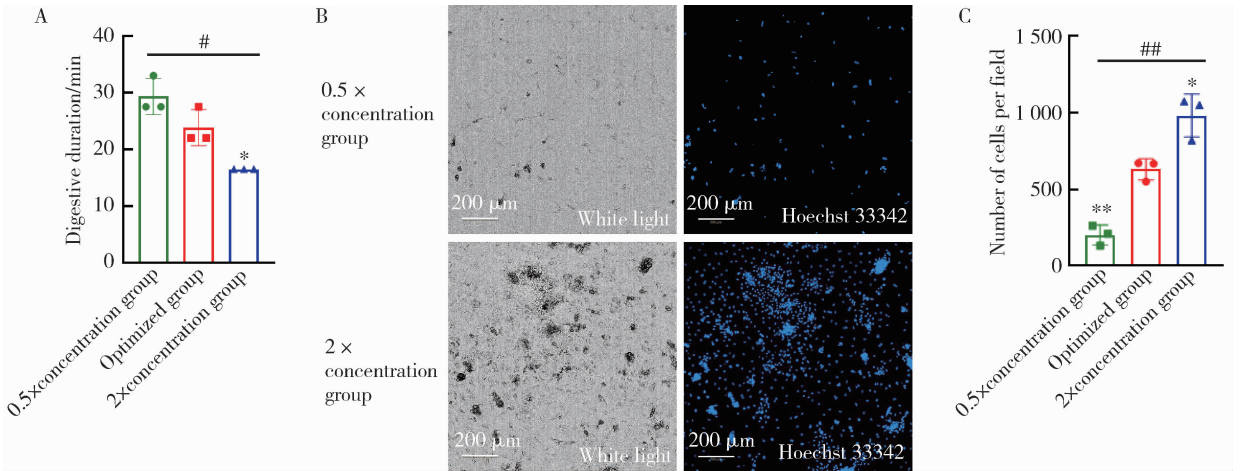
究将优化组酶解方案用于解离一只小鼠心脏, 与该试剂盒法进行比较, 该试剂盒解离流程固定, 需用时 56 min, 本优化组用时缩短了 32.2 min(图 3A)。培养 72 h 后, 优化组每视野细胞数量比试剂盒法增多 54.5% ($P < 0.01$, 图 3B、C), 因此, 本研究方法的提取效果优于 Multi Tissue Dissociation Kit 2。



A, comparison of digestion time among multiple treatment groups ($n = 3$); B, quantification of viable cells isolated using different methods following 72-hour culture ($n = 3$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, optimized group vs. other groups; ### $P < 0.001$, #### $P < 0.0001$, multiple comparisons.

图 1 各组消化用时和细胞得率(细胞数/视野)的比较

Figure 1 Comparison of digestion time and cell yield (cell number/field)



A, comparison of digestion time among the optimized group, 0.5 $\times$ and 2 $\times$ enzyme concentration group ($n = 3$); B and C, after incubation for 72 h, the cells were photographed and analyzed by Operetta CLS High Content Imaging Analysis System ($\times 10$), and the number of cells in each field was counted ($n = 3$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, optimized group vs. other groups; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, multiple comparisons.

图 2 优化组、0.5 $\times$ 浓度组和 2 $\times$ 浓度组消化用时和细胞得率(细胞数/视野)的比较

Figure 2 Comparison of digestion time and cell yield (cell number/field) among the optimized group, 0.5 $\times$ and 2 $\times$ enzyme concentration group

2.4 优化组酶解方案获得的 CFs 纯度

经优化法组织解离并培养 24 h 后, 显微镜下观察发现细胞基本已经贴壁, 处于还未或稍微伸展状态, 贴壁的细胞比较饱满; 72 h 后, 细胞增殖明显并平铺皿底, 形态饱满, 呈星形或多角形。

波形蛋白是 CFs 的特异性标志分子, 本研究通过免疫荧光法检测细胞中波形蛋白的表达, 蓝色荧

光指示细胞核, 绿色荧光指示波形蛋白, 结果显示, 优化组和试剂盒组视野中的细胞均表达波形蛋白, 荧光强度为 5 534(2 436/14 125) vs. 5 670(1 687/16 681), 阳性细胞率为 100.00%(98.88%/100.00%) vs. 100.00%(100.00%/100.00%), 两种方法提取的 CFs 纯度均较高, 差异没有统计学意义(图 4A ~ C)。

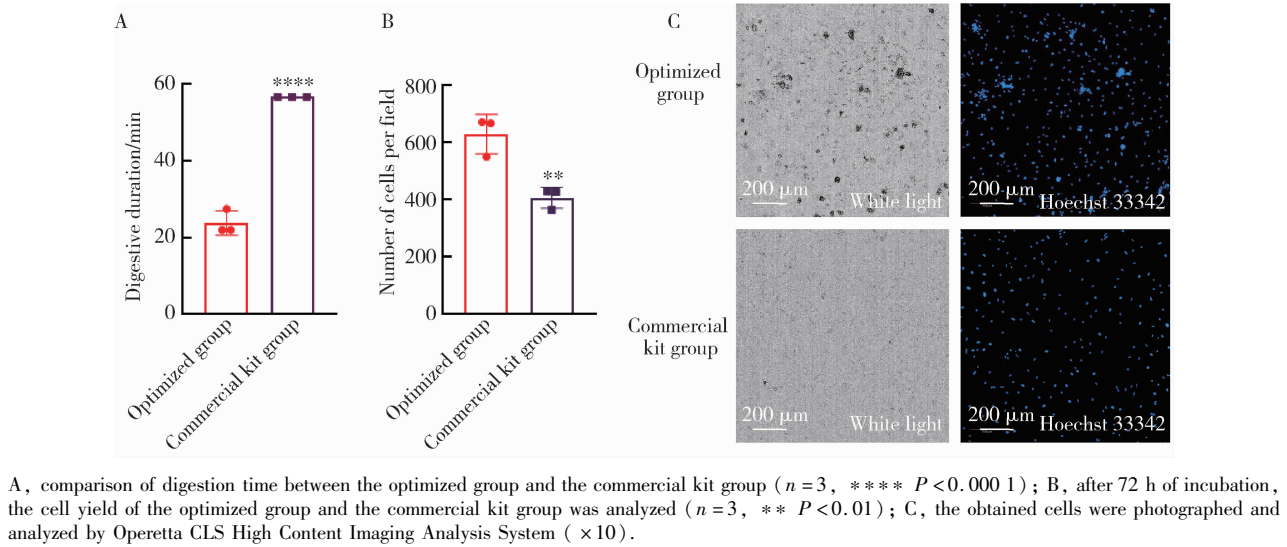


图3 优化组与试剂盒组消化时长和细胞得率(细胞数/视野)的比较

Figure 3 Comparison of digestion time and cell yield (cell number/field) between the optimized group and commercial kit group

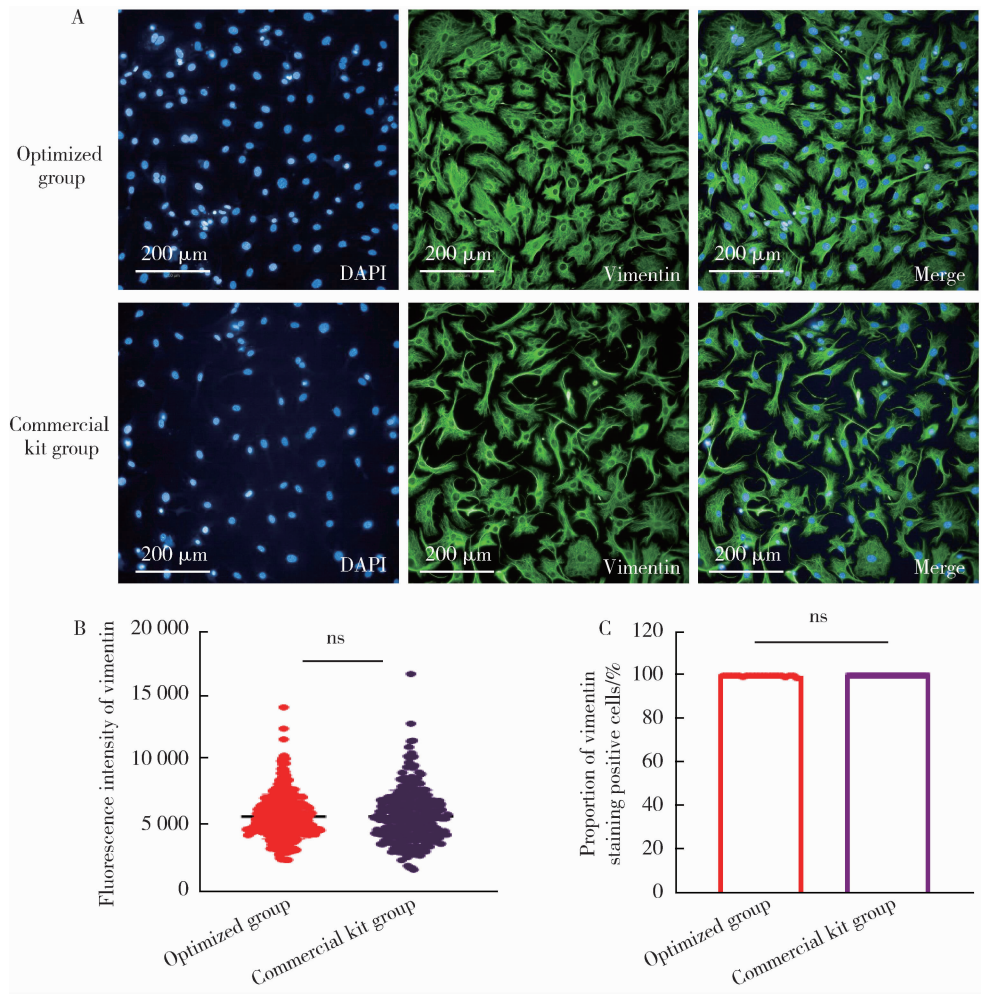


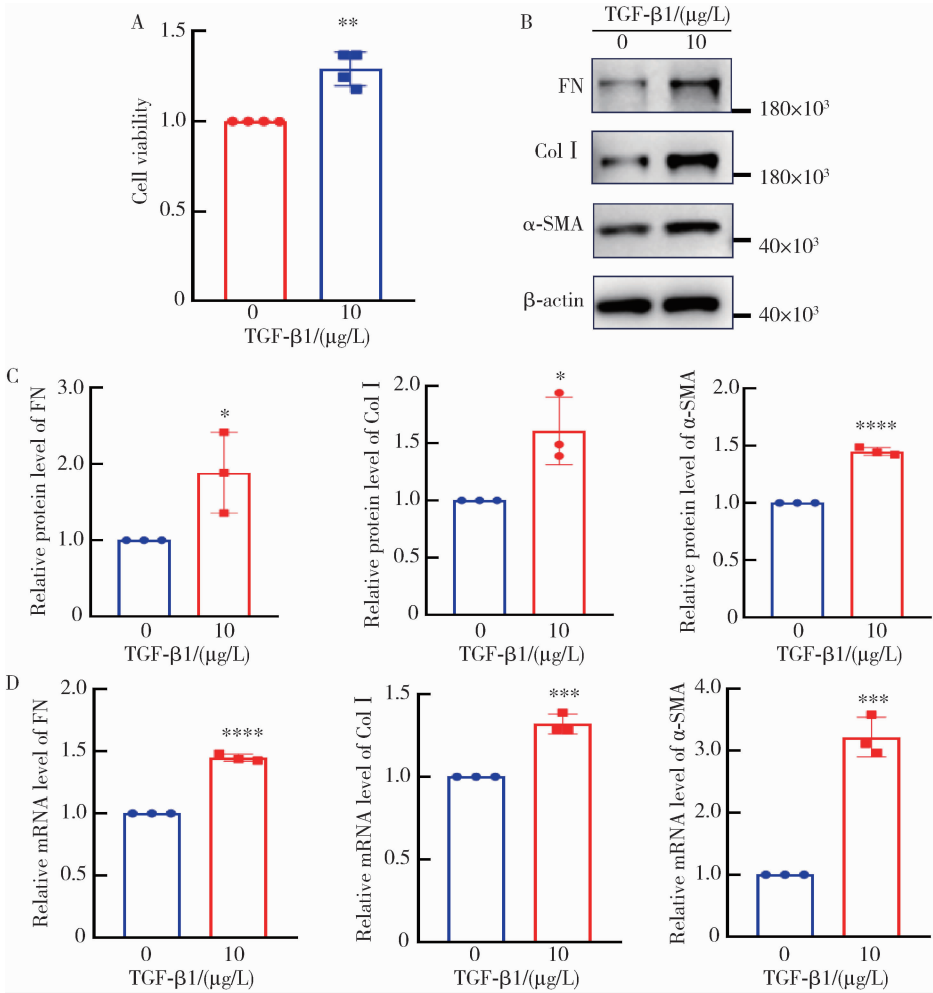
图4 优化组与试剂盒组提取 CFs 的纯度比较

Figure 4 Comparison of CFs purity between the optimized group and the commercial kit group

2.5 TGF-β1 刺激实验检测优化组提取的 CFs 分化潜能

优化组提取的 CFs 经 TGF-β1 刺激 48 h 后,增殖能力明显增强 ($P < 0.01$, 图 5A), α-SMA、Col I 和 FN 在蛋白和 mRNA 水平的表达量均显著升高

(图 5B ~ D),提示 CFs 存有转分化潜能。用本方法提取的 CFs 转分化后,α-SMA、Col I 和 FN 的蛋白表达水平分别提高至原来的 144%、160% 和 188%, RNA 水平分别提高至原来的 322%、132% 和 144%。



A, after stimulation with TGF-β1, the viability of P1 generation CFs was evaluated through the CCK-8 assay ($n = 4$); B and C, the protein expression levels of Col I, α-SMA and FN were analyzed by Western blotting; D, the mRNA levels of Col I, α-SMA and FN were detected by qPCR ($n = 3$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$. CFs, cardiac fibroblasts; TGF-β1, transforming growth factor β1; α-SMA, α-smooth muscle actin; Col I, collagen type I; FN, fibronectin; qPCR, quantitative real-time PCR.

图 5 TGF-β1 处理后 CFs 转分化能力的评估

Figure 5 Evaluation of the trans-differentiation ability of CFs after TGF-β1 treatment

3 讨论

小鼠 CFs 是研究心脏纤维化等疾病的常用实验载体。虽然已有大量研究探索了成年小鼠 CFs 的提取方法^[16-17, 19],但仍然需要进一步改进。本研究借助组织解离器,从酶的种类、浓度、消化时间及细胞得率等方面进行了 CFs 提取方法的探索和优化。

本研究采用了胶原酶 II/IV、胰蛋白酶和 DNase I 三者联合消化法,胶原酶解离组织块中的纤维和基质,胰蛋白酶水解细胞间连接,DNase I 用于切断消化液中的 DNA,防止组织在消化过程中粘

连,促进细胞的释放。本实验发现,胶原酶 IV 与胶原酶 II 有相似的消化速度和细胞得率,两种酶可以相互替换。待组织解离完成,去除细胞悬液中过多的红细胞是非常必要的。

本研究创新性地引入了一种新的细胞得率评估方法,我们将同龄小鼠每颗心脏提取的细胞铺种到相同面积的培养板中,72 h 后,通过高内涵成像分析系统统计每个视野内的平均细胞数量。这种方法更加客观、可靠且快捷,克服了以往采用台盼蓝染色或细胞融合度判断的主观性和局限性。传统方法评估细胞得率时常因细胞数量变化或主观判断差异而

存在较大误差,本方法能更精确地反映细胞提取的实际效果。另外,本实验发现,培养 24 h 后,弃掉的培养上清液中仍有残余的 CFs,这些细胞能够继续在新培养皿中贴壁生长,所以在以获取 CFs 为目的的心脏解离中,不推荐差速贴壁法,以免流失有活性的 CFs。

本研究利用 gentleMACS[®] Octo Dissociator with Heaters,实现了半自动化,消化环境保持在 37 ℃,不需手动吹打或晃动,且整个消化过程在封闭的组织解离管中进行,优化了消化流程,降低了污染概率,使消化过程更加高效和稳定。相较于 Multi Tissue Dissociation Kit 2 试剂盒组,优化组的提取效果更优,且比以往报道的用时更短、细胞得率更高^[16]。

在优化组 2 × 浓度范围内,提高酶浓度后可以缩短消化用时,提升细胞得率。因为消化酶(尤其是胰蛋白酶)的浓度过高或者作用时间过长会严重损伤细胞,降低细胞得率,因此,各酶种的合适配比及消化时间的把控至关重要。若采用本研究所设的消化程序,在一定范围内可以通过提高酶浓度达到缩短消化用时和获得高细胞得率,但酶的饱和浓度仍需进一步的实验探索。

CFs 的活化是心肌纤维化的关键步骤^[20]。CFs 在 TGF-β 的刺激下转分化为肌成纤维细胞后,增殖并合成分泌细胞外基质的能力增强,促进心肌纤维化^[21-22]。α-SMA、Col I 和 FN 表达增多是 CFs 转分化的分子标志^[23]。为排除消化酶可能影响原代 CFs 对药物的反应性等因素,本研究采用 TGF-β1 刺激 P1 代的 CFs,发现优化组提取的 CFs 转分化活性较高,因此,使用本方法可以获得适用于构建心肌纤维化模型的 CFs。

综上所述,本研究成功优化了一种稳定、高效、易操作的原代成年小鼠 CFs 的提取方法,可以为心血管疾病的研究提供大量可用的细胞资源。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突。

作者贡献声明 马小娟:提出研究思路,设计研究方案,收集、分析、整理数据,撰写论文;王好、马学芹:设计研究方案,收集实验数据,审定论文;宋颖、于佳卉、孙艳、李艳芳:收集实验数据;薛丽香、王艳、李显龙、杨建岭:总体把关和审定论文。所有作者均参与论文修改,并对最终文稿进行审读和确认。

参考文献

[1] Frangogiannis NG. Fibroblast: Extracellular matrix interactions in tissue fibrosis [J]. Curr Pathobiol Rep, 2016, 4(1): 11-18.

[2] Khalil H, Kanisicak O, Vagnozzi RJ, et al. Cell-specific ablation

of Hsp47 defines the collagen-producing cells in the injured heart [J]. JCI Insight, 2019, 4(15): e128722.

[3] Davis J, Molkentin JD. Myofibroblasts: Trust your heart and let fate decide [J]. J Mol Cell Cardiol, 2014, 70: 9-18.

[4] Gourdie RG, Dimmeler S, Kohl P. Novel therapeutic strategies targeting fibroblasts and fibrosis in heart disease [J]. Nat Rev Drug Discov, 2016, 15(9): 620-638.

[5] Shinde AV, Frangogiannis NG. Fibroblasts in myocardial infarction: A role in inflammation and repair [J]. J Mol Cell Cardiol, 2014, 70: 74-82.

[6] Li L, Zhao Q, Kong W. Extracellular matrix remodeling and cardiac fibrosis [J]. Matrix Biol, 2018, 68/69: 490-506.

[7] Aghajanian H, Kimura T, Rurik JG, et al. Targeting cardiac fibrosis with engineered T cells [J]. Nature, 2019, 573(7774): 430-433.

[8] Henderson NC, Rieder F, Wynn TA. Fibrosis: From mechanisms to medicines [J]. Nature, 2020, 587(7835): 555-566.

[9] 冯姗,徐文丽,吴济民,等.血管紧张素Ⅱ促进心脏成纤维细胞转分化的实验条件优化[J].中国病理生理杂志,2022,38(1):167-177.

[10] 张毅,孟祥雯.小鼠乳鼠心脏成纤维细胞的原代培养及鉴定[J].细胞与分子免疫学杂志,2020,36(4):344-348.

[11] 张聪聪,王晓,程乃萱,等.原代小鼠心脏成纤维细胞的衰老模型建立[J].心肺血管病杂志,2022,41(7):821-826.

[12] 孙赫,涂彬,宋凯,等.DNMT3A 对高糖环境下小鼠心肌成纤维细胞增殖与迁移的影响[J].中国药理学通报,2023,39(3):555-560.

[13] 陈泽润,李艺,梁俟,等.环状 RNA MYO9A_043 通过下调 CPEB4 表达发挥抑制小鼠心脏成纤维细胞纤维化表型的作用[J].中国病理生理杂志,2023,39(7):1225-1232.

[14] 梁春宝,李立林,蔡冬青.单细胞核测序揭示成年小鼠心脏成细胞的分群及占比[J].暨南大学学报(自然科学与医学版),2023,44(2):124-136.

[15] Almazloum A, Khalil H. Isolation of adult mouse cardiac fibroblasts [J]. Curr Protoc, 2023, 3(7): e840.

[16] 李如君,龚开政,张振刚.成年小鼠心脏成纤维细胞的分离、纯化和原代培养[J].细胞与分子免疫学杂志,2017,33(1):67-71.

[17] 师雷,金振晓,谭延振,等.简易灌注装置同时提取成年小鼠心肌细胞和心脏成纤维细胞[J].中国体外循环杂志,2023,21(3):172-178.

[18] 肖晗,朴成实,陈瑞飞,等.AMPK 激活通过负性调控 C/EBPβ 抑制小鼠心脏成纤维细胞 TGFβ1 表达[J].生理学报,2017,69(2):123-128.

[19] 陈洪群,郑梅,晏曦曦,等.改良联合酶消化法提取成年小鼠原代心脏成纤维细胞[J].山东医药,2019,59(21):38-41.

[20] Leask A. Potential therapeutic targets for cardiac fibrosis: TGF-beta, angiotensin, endothelin, CCN2, and PDGF, partners in fibroblast activation [J]. Circ Res, 2010, 106(11): 1675-1680.

[21] Liu M, López de Juan Abad B, Cheng K. Cardiac fibrosis: Myofibroblast-mediated pathological regulation and drug delivery strategies [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2021, 173: 504-519.

[22] Tallquist MD. Cardiac fibroblast diversity [J]. Annu Rev Physiol, 2020, 82: 63-78.

[23] Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, et al. The myofibroblast: One function, multiple origins [J]. Am J Pathol, 2007, 170(6): 1807-1816.

(2024-11-12 收稿)
(本文编辑:任英慧)