

刘维静, 聂宇, 廉虹, 等. 小鼠出生后早期心脏成纤维细胞数量及性状变化研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(5): 28-35.  
Liu WJ, Nie Y, Lian H, et al. Changes of number and characteristics of heart fibroblasts in early postnatal mice [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(5): 28-35.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.05.005

# 小鼠出生后早期心脏成纤维细胞数量及性状变化研究

刘维静<sup>1</sup>, 聂宇<sup>2</sup>, 廉虹<sup>2\*</sup>, 王玉瑶<sup>1\*</sup>

(1.山西医科大学 基础医学院 生物化学与分子生物学教研室, 太原 030001; 2.中国医学科学院 北京协和医学院 国家心血管病中心 阜外医院 心血管疾病国家重点实验室, 北京 100037)

**【摘要】** 目的 心脏成纤维细胞占心脏细胞数量的50%以上,在心脏生理病理过程中发挥重要作用。小鼠出生后7 d是心脏失去再生能力的时间转折点,本研究着眼于研究心脏成纤维细胞在小鼠出生后早期数量及性状的变化情况,为心肌再生机制研究提供基础性实验数据。方法 出生1 d和7 d的C57小鼠进行心尖切除手术(Apex resection, AR),体视镜拍照及HE染色观察心尖处切口,21 d后观察再生情况;分离出生后1 d和7 d的C57小鼠心脏组织,称取心脏湿重比较重量差异,病理切片进行HE染色观察两个时间点的心脏病理结构,免疫荧光染色观察1 d和7 d心脏组织中成纤维细胞数量变化;为了更加准确定量心脏成纤维细胞的数量变化,我们利用成纤维细胞表面标志物胸腺细胞分化抗原1(Thymocyte differentiation antigen 1, Thy1)通过流式分选技术对心脏组织细胞悬液进行心肌成纤维细胞的分选,比较1 d和7 d小鼠心脏组织中心肌成纤维细胞比例;为了验证心脏成纤维细胞性状是否发生变化,我们分离1 d和7 d小鼠心脏成纤维细胞,分析成纤维细胞的特异性标志物Thy1、成纤维细胞特异性蛋白(Fibroblast-specific protein 1, Fsp-1)、骨膜蛋白(Periostin)、血小板衍生生长因子受体 $\alpha$ (platelet-derived growth factor receptor  $\alpha$ , Pdgfra)、I型胶原 $\alpha$ 1(Collagen alpha-1, Col1a1)、转录因子21(Transcription factor 21, Tcf21)在mRNA水平的表达变化情况。结果 出生1 d的小鼠心尖切除手术后21 d可以完全再生(再生率为86.67%),而7 d小鼠手术后不能完全再生(再生率为0);小鼠出生后7 d心脏组织平均比1 d心脏湿重重13.13 mg(3.11倍)(1 d: (6.22±0.19), 7 d: (19.35±0.56),  $P<0.0001$ ;  $n=6$ )。心脏成纤维细胞免疫荧光染色证明,7 d心脏成纤维细胞数量明显高于1 d心脏;流式细胞分选证明小鼠出生后7 d心脏组织中心肌成纤维细胞占总细胞比例比出生后1 d时高2.9%(1.38倍)(1 d: (7.7±0.74), 7 d: (10.6±0.95),  $P=0.029$ ;  $n=3$ );在成纤维细胞转录水平,成纤维细胞标志物Thy1、Fsp-1、Periostin在小鼠出生后7 d表达高于出生后1 d的成纤维细胞(Thy1: 1 d: (1.01±0.12), 7 d: (2.71±0.27),  $P=0.0288$ ; Fsp-1: 1 d: (1.04±0.27), 7 d: (5.28±0.10),  $P=0.0046$ ; Periostin: 1 d: (0.91±0.01), 7 d: (1.13±0.05),  $P=0.0119$ ;  $n=3$ ),而Pdgfra、Col1a1、Tcf21三种成纤维细胞标志蛋白表达则低于出生后1 d的小鼠心脏中的成纤维细胞(Pdgfra: 1 d: (1.09±0.04), 7 d: (0.62±0.01),  $P=0.0068$ ; Col1a1: 1 d: (1.00±0.09), 7 d: (0.57±0.02),  $P=0.0433$ ; Tcf21: 1 d: (1.00±0.03), 7 d: (0.54±0.02),  $P=0.0054$ ;  $n=3$ ),证明出生后1 d到7 d的过程中心脏成纤维细胞性状发生了变化。结论 小鼠出生后早期(1 d和7 d)心脏成纤维细胞的比例和性状均发生了明显变化,为研究哺乳动物心肌再生能力的丢失的机制研究提供一定的线索。

**【关键词】** 小鼠;心脏成纤维细胞;流式细胞分析术;成纤维细胞性状

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021)05-0028-08

**【基金项目】** 国家自然科学基金(81500364);山西省重点研发计划项目(201903D321091)。

**【作者简介】** 刘维静(1996—),女,硕士研究生,研究方向:生物化学与分子生物学。E-mail: liuwjsx001@163.com

**【通信作者】** 王玉瑶(1981—),女,博士,副教授,硕士生导师,研究方向:心血管疾病与心肌再生。E-mail: wyybio@163.com

廉虹(1982—),女,博士,助理研究员,研究方向:心血管疾病与心肌再生。E-mail: lian\_hong1982@163.com

\* 共同通信作者

## Changes of number and characteristics of heart fibroblasts in early postnatal mice

LIU Weijing<sup>1</sup>, NIE Yu<sup>2</sup>, LIAN Hong<sup>2\*</sup>, WANG Yuyao<sup>1\*</sup>

(1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China.

2. State Key Laboratory of Cardiovascular Disease, Fuwai Hospital, National Center for Cardiovascular Disease, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100037)

**[Abstract]** **Objective** Cardiac fibroblasts account for more than 50% of heart cells and play an important role in the physiological and pathological processes of the heart. Seven days of age is an important turning point in mice when the heart loses its ability to regenerate. This study analyzed the changes in the number and characteristics of cardiac fibroblasts in the early postnatal period of mice, and provides basic experimental data for the study of the myocardial regeneration mechanism. **Methods** Apical resection (AR) was performed on 1-day-old and 7-day-old C57 mice. The apex incision was photographed with a stereoscope and stained with hematoxylin and eosin (HE), and regeneration was observed at 21 days post resection. Heart tissues of C57 mice at postnatal day 1 (P1) and P7 were isolated and weighed to compare the wet weight. Cardiac pathological structures at the two time points were observed by HE staining in pathological sections, and fibroblasts were observed by immunofluorescence staining. To accurately quantify the number of cardiac fibroblasts, we used fibroblast surface marker thymocyte differentiation antigen 1 (Thy1) to sort cardiac tissue cell suspensions by flow sorting technology. To investigate changes in cardiac fibroblast characteristics, we isolated mouse cardiac fibroblasts on P1 and P7 and analyzed the mRNA expression of fibroblast marker proteins *Thy1*, fibroblast-specific protein 1 (*Fsp-1*), *Periostin*, platelet-derived growth factor receptor  $\alpha$  (*Pdgfra*), collagen alpha-1 (*Col1a1*), and transcription factor 21 (*Tcf21*). **Results** Heart tissue of 1-day-old mice could regenerate (regeneration rate was 86.67%) 21 days after apical resection, whereas that of 7-day-old mice could not regenerate (regeneration rate was 0). The average wet weight of heart tissue in mice at P7 was 13.13 mg (3.11 times) heavier than that at P1 (P1:  $6.22 \pm 0.19$ , P7:  $19.35 \pm 0.56$ ,  $P < 0.0001$ ;  $n = 6$ ). Immunofluorescence staining indicated that the number of cardiac fibroblasts at P7 was significantly higher than that at P1. Flow cytometry showed that the proportion of cardiac fibroblasts to total cells in heart tissue at P7 was 2.9% (1.38 times) higher than that at P1 (P1:  $7.7 \pm 0.74$ , P7:  $10.6 \pm 0.95$ ,  $P = 0.029$ ;  $n = 3$ ). At the level of fibroblast transcription, *Thy1*, *Fsp-1*, and *Periostin* expression was higher at P7 than at P1 (*Thy1*: P1:  $1.01 \pm 0.12$ , P7:  $2.71 \pm 0.27$ ,  $P = 0.0288$ ; *Fsp-1*: P1:  $1.04 \pm 0.27$ , P7:  $5.28 \pm 0.10$ ,  $P = 0.0046$ ; *Periostin*: P1:  $0.91 \pm 0.01$ , P7:  $1.13 \pm 0.05$ ,  $P = 0.0119$ ;  $n = 3$ ), and *Pdgfra*, *Col1a1*, and *Tcf21* expression was lower at P7 than at P1 (*Pdgfra*: P1:  $1.09 \pm 0.04$ , P7:  $0.62 \pm 0.01$ ,  $P = 0.0068$ ; *Col1a1*: P1:  $1.00 \pm 0.09$ , P7:  $0.57 \pm 0.02$ ,  $P = 0.0433$ ; *Tcf21*: P1:  $1.00 \pm 0.03$ , P7:  $0.54 \pm 0.02$ ,  $P = 0.0054$ ;  $n = 3$ ), which indicated that cardiac fibroblast traits changed during the period from 1 to 7 days after birth. **Conclusions** The proportion and characteristics of cardiac fibroblasts in mice changed significantly during the early postnatal period (1 to 7 days), which provides some clues to the mechanism of the loss of mammalian myocardial regeneration.

**[Keywords]** mice; cardiac fibroblasts; flow cytometry; fibroblasts characters

心血管疾病(心肌梗死、心衰等)最终的结局均会导致心肌细胞的丢失,大量研究表明,成年哺乳动物心肌细胞处于终末期分化状态而不能通过有丝分裂进行增殖,再生能力非常有限<sup>[1-2]</sup>。因此,心肌再生的机制研究一直是心血管疾病领域的研究热点。小鼠是心血管疾病领域研究中使用最为广泛的哺乳动物模型之一<sup>[3]</sup>。2011年, Porrello 课题组在新生小鼠出生后第1天切除约15%的心尖部分,21天后心脏可以完全再生,但在出生后第7天

进行心尖切除后心脏却失去再生能力,只能出现疤痕修复<sup>[4]</sup>。1 d 和 7 d 心脏组织再生能力改变的原因一直是近年来研究的热点<sup>[5-7]</sup>。心脏成纤维细胞占整个心脏组织的50%以上,在心脏中起到分泌胶原和生长因子等作用,是构成细胞外基质的一类重要细胞类型,在维持心脏结构和功能中发挥重要作用<sup>[8]</sup>。近年研究表明,心脏成纤维细胞在心肌再生领域中发挥了重要作用<sup>[9-11]</sup>。本文通过比较小鼠出生后1 d 和 7 d 的心脏组织中成纤维细胞数量的变

化以及对这两个时间点的成纤维细胞标志蛋白在转录水平的分析,探究了小鼠出生 1 d 和 7 d 心肌成纤维细胞的比例和性状变化,为研究心肌成纤维细胞在再生领域的研究提供基础性研究数据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

80 只出生 1 d (1.2~1.5 g, 误差小于 10%) 和 60 只出生 7 d (4.5~4.8 g, 误差小于 10%) 的 SPF 级别 C57BL/6 J 小鼠购买自北京维通利华实验动物技术有限公司 [SCXK(京)2016-0011], 不区分雌雄。小鼠的模型制作以及取材均在中国医学科学院阜外医院国家心血管病中心 E 座屏障设施内进行 [SYXK(京)2017-0015]。动物实验中涉及的动物所有操作程序符合 3R 原则, 已得到中国医学科学院阜外医院实验动物管理和使用委员会的批准 (FW-2019-0005)。

### 1.2 主要试剂与仪器

BD Aria II 流式细胞仪 (FACSAria 2, 美国); 体式显微镜 (Zeiss, 德国); 全自动组织脱水机 (Leica, 德国); 展片机 (Leica, 德国); 烤片机 (Leica, 德国); 荧光共聚焦显微镜 (Zeiss, 德国); 全自动扫片机 (Zeiss, 德国); 普通 PCR 仪 (Bio-Rad, 美国); 实时荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad, 美国); DMEM (Gibco, 美国); 胎牛血清 (Gibco, 美国); 含 EDTA 的胰酶 (Gibco, 美国); Masson 染色试剂盒 (Sigma); anti-sarcomeric alpha actinin (1:200, ab9465, Abcam, 英国), anti-Vimentin (1:100, ab92547, Abcam, 英国); Neonatal Heart Dissociation Kit (Miltenyi 公司, 德国); Gentle MACS Octo Dissociator 仪器 (Miltenyi 公司, 德国); Neonatal Cardiac Fibroblast Isolation Kit (Miltenyi 公司, 德国); SYBR Green qPCR Master Mix (A25742, 美国 Applied Biosystems)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 流式细胞分选

流式细胞仪对细胞进行自动分析和分选, 检测悬浮在液体中的单个分散细胞以及其它微粒信号, 一般先将待测样本荧光染色后制备为悬液标本, 在周围气体压力下待测样本流入流动室, 鞘液从鞘液管中流出, 包裹着待测样本高速流动, 形成鞘流, 待测细胞分开为单个细胞依次通过检测区域, 达到细胞分选的目的<sup>[12]</sup>。

##### (1) 样本制备

##### ① 小鼠心脏的获取

出生 1 d 的小鼠 40 只, 出生 7 d 的小鼠 20 只,

使用 75% 乙醇对小鼠进行消毒, 快速取出心脏, 剪掉连带血管组织, PBS 冲洗 3 次, 将心脏中血液冲洗干净备用, 此过程在冰上操作。

##### ② 剪碎, 消化心脏组织, 收集细胞

将取出的心脏组织置于 10 cm 直径的培养皿中, 剪碎至大约每小块 1 mm<sup>3</sup>, 置于带有自制转子的三角烧瓶中, 加入 10 mL 0.08% 的胰酶的消化液, 放入磁力搅拌的水浴锅中, 调节温度 30℃, 消化 8 min, 弃掉上清 (首次消化除去血细胞)。继续加入 10 mL 0.08% 的胰酶进行消化 8 min, 吸取上清经 40 μm 的筛子过滤后, 置于 10 mL 含 10% FBS 的 DMEM 中, 此过程重复操作 7~8 次后, 组织块成絮状, 说明细胞基本无残留, 终止消化过程, 将收集到的细胞悬液, 室温 1200 r/min, 5 min 离心, 收集细胞。

##### (2) 细胞分选

##### ① 制备上机悬液

将收集好的细胞使用 PBS 冲洗一次, 1×10<sup>6</sup> 细胞量为一个反应, 成纤维细胞表面标志物 Thy1-APC 抗体以 1:100 的比例稀释, 同时做好阴性对照和同型对照 (Isotype control)。混匀后冰浴 30 min, 后 1200 r/min, 5 min 离心, 弃上清, 再次使用 PBS 清洗一次, 最后 40 μm 细胞过滤筛子过滤至流式管中, 待上机。

##### ② 流式上机分选

细胞悬液上机前 5 min 加入活性染料 7-AAD, 混匀, 上机, 收集分选后的心肌成纤维细胞, 分选结束后, 将分选出的阳性细胞管进行回测实验, 验证细胞纯度。所有流式细胞术均在 BD Aria II 流式细胞仪上进行, 分选目的细胞的电压分别为, FSC: 100 V, SSC: 250 V, APC: 181 V。

#### 1.3.2 心尖切除

出生 1 d 和 7 d 的小鼠分别埋于碎冰中冰冻麻醉 2 min 和 5 min, 医用胶带将小鼠四肢固定在预冷的微型金属手术台上, 将其置于体式显微镜下, 75% 乙醇对小鼠胸前皮肤进行消毒。用显微剪于小鼠第 4~5 肋间隙剪开长约 1 cm 的切口, 随后利用眼科镊撑开胸腔, 轻轻撕掉心包膜, 采用显微镊在切口外端轻微按压挤出心脏, 之后使用虹膜剪剪去心脏部分左心室心肌组织, 左心室轻微渗血即可, 随后将心脏送回胸腔。8-0 涤纶线缝合小鼠皮肤后, 将小鼠置于 37℃ 恒温台数分钟, 待小鼠完全恢复呼吸、活动自由后放回母鼠笼中。

#### 1.3.3 组织学检测

对出生 1 d 和 7 d 的小鼠分别进行心尖切除

(AR, Apical resection), 术后 21 d 取完整心脏, 4% 多聚甲醛固定 48 h, 脱水后进行石蜡包埋, 以 5  $\mu\text{m}$  的厚度切片。按照之前研究操作<sup>[13]</sup>, 将石蜡切片放在烤片机上 68 $^{\circ}\text{C}$  烘烤 45 min 防止脱片, 随后将玻片依次放入二甲苯 I、II 各 10 min, 100%、95%、80%、75%、50% 梯度乙醇中各 5 min 进行脱蜡、水化, 之后在重铬酸钾中过夜, 使用 Masson 染色试剂盒进行染色, 根据 Masson 染色方法, 苯胺蓝染液将胶原纤维染为蓝色即为组织纤维化。若心尖处无蓝色纤维化组织则可视作心脏完全再生, 若心尖处存在纤维化组织则为心脏不完全再生, 再生率是指术后完全再生小鼠只数占所有手术小鼠只数百之比。对于 HE 染色, 则需将玻片在烤片机上 68 $^{\circ}\text{C}$  烘烤 45 min 后直接进行染色。

#### 1.3.4 免疫荧光染色

取 1 d 和 7 d 小鼠完整心脏, 4% 多聚甲醛固定 24 h, 脱水后进行石蜡包埋, 以 5  $\mu\text{m}$  的厚度切片。根据之前研究<sup>[13]</sup>, 脱蜡水化之后使用 EDTA 修复法高温修复 2 min, 使用含 Triton-X 100 的山羊血清封闭液封闭 1 h, 在 4 $^{\circ}\text{C}$  孵育一抗过夜: anti-sarcomeric alpha actinin (1:200; ab9465, Abcam, UK), anti-Vimentin (1:100; ab92547, Abcam, UK)。室温复温 1 h, 使用 PBS 将玻片洗涤 5 次, 每次 5 min, 在室温与荧光标记二抗避光孵育 1 h, PBS 洗涤玻片 5 次, 每次 5 min, 然后使用含 DAPI 的封片剂封片。我们使用蔡司 LSM800 共聚焦激光扫描显微镜 (Carl Zeiss, Inc., Jena, Germany) 检测荧光强度。

#### 1.3.5 心脏组织成纤维细胞分离

取 1 d 和 7 d 小鼠完整心脏各 20 只, 剪掉血管连带组织, 在 PBS 缓冲液中冲洗 3 遍, 放入含有酶液 (含酶 A: 12.5  $\mu\text{L}$ 、酶 P: 62.5  $\mu\text{L}$ 、酶 D: 100  $\mu\text{L}$ 、缓冲液 Y: 25  $\mu\text{L}$ 、缓冲液 X: 2300  $\mu\text{L}$ ) 的 C 管中, 利用 Neonatal Heart Dissociation Kit 及 Gentle MACS Octo Dissociator 仪器消化心脏; 消化结束后立即用含 10% 胎牛血清 (FBS) 的 DMEM 终止消化, 70  $\mu\text{m}$  滤网过滤, 1000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 使用红细胞裂解液裂解红细胞, 3 min 后使用 PBS 缓冲液终止裂解, 1000 r/min 离心 5 min; 使用含有稳定剂和 0.05% 叠氮化钠的缓冲液重悬, 30  $\mu\text{m}$  滤网过滤, 使用 Count Star 进行细胞计数, 按照  $5 \times 10^6$  细胞量为一个体系, 使用 Neonatal Cardiac Fibroblast Isolation Kit 分离成纤维细胞。

#### 1.3.6 qRT-PCR

使用 TRIzol 试剂 (Invitrogen) 提取分离的心脏成纤维细胞中的 RNA, 然后使用 PrimeScript RT

Master Mix (TaKaRa, RR036A) 将其转化为 cDNA。使用 SYBR Green qPCR Master Mix 进行 qRT-PCR, 并在 Vii7 Real-Time PCR System 上扩增, 扩增条件为 95 $^{\circ}\text{C}$  预变性 2 min, 后 95 $^{\circ}\text{C}$  运行 15 s 进行变性, 60 $^{\circ}\text{C}$  运行 15 s 进行退火, 72 $^{\circ}\text{C}$  运行 1 min 进行延伸, 变性、退火、延伸过程共进行 40 个循环。下面列出了该反应的所有引物。Thy1 正向: 5'-GGAAGTCTTGGCACCATGAAC-3', 反向: 5'-TTATTCTCATGGCGGCAGTC-3'; Fsp-1 正向: 5'-GGAGGCCCTGGATGTAATTGTG-3', 反向: 5'-CAACTTCATTGTCCCTGTTGCTG-3'; Periostin 正向: 5'-ACTGAATGCCCTTACACAGCCACA-3', 反向: 5'-TCGAGCACAGTTCACAGTGACAA-3'; Pdgfa 正向: 5'-GGCAGGCACATTTACATCTATG-3', 反向: 5'-CATCCTCTCCACGATGACTAA-3'; Col1a1 正向: 5'-TGAACGTGGTGTACAAGGTC-3', 反向: 5'-CCATCTTTACCAGGAGAACCAT-3'; Tcf21 正向: 5'-GCCATGTAGAAGACCTTCAAGA-3', 反向: 5'-GAAGTCCAAACTCCTTGTGG-3'; Gapdh 正向: 5'-GCAGTGGCAAAGTGGAGAATTG-3', 反向: 5'-AGAGATGATGACCCTTTGGCTCC-3'。

#### 1.4 统计学方法

使用 GraphPad Prism (7.0 版, GraphPad 软件) 分析所有结果。所有数据均表示为平均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ )。组间差异通过未配对的 *t* 检验进行评估。显著性水平由 Prism 软件得出, \*  $P < 0.05$  被认为是统计学差异。

## 2 结果

### 2.1 小鼠出生 1 d 和 7 d 心脏组织的变化

按照之前报道的心尖切除操作方法<sup>[14]</sup>, 我们对出生 1 d 和出生 7 d 的小鼠分别进行了 AR (图 1A), 石蜡切片进行 HE 染色观察切口处病理结构 (图 1B), 与之前研究相一致, 术后 21 d 发现出生 1 d 进行 AR 的小鼠可以完全再生 (再生率为 87.67%), 而出生 7 d 进行 AR 的小鼠术后 21 d 无法再生 (再生率为 0) (图 1C、1D)。为了解小鼠出生后 7 d 心脏组织的变化情况, 我们分别取 1 d 和 7 d 小鼠完整心脏, 称取小鼠心脏湿重, 同时对两个时间点小鼠心脏进行拍照比较小鼠心脏大小 (图 1E), 石蜡切片进行 HE 染色观察其病理结构 (图 1F), 发现小鼠出生后 7 d 心脏组织平均比 1 d 心脏湿重重 13.13 mg (3.11 倍) (1 d: (6.22  $\pm$  0.19), 7 d: (19.35  $\pm$  0.56),  $P < 0.0001$ ;  $n=6$ ) (图 1G)。心脏成纤维细胞免疫荧光染色证明, 7 d 心脏成纤维

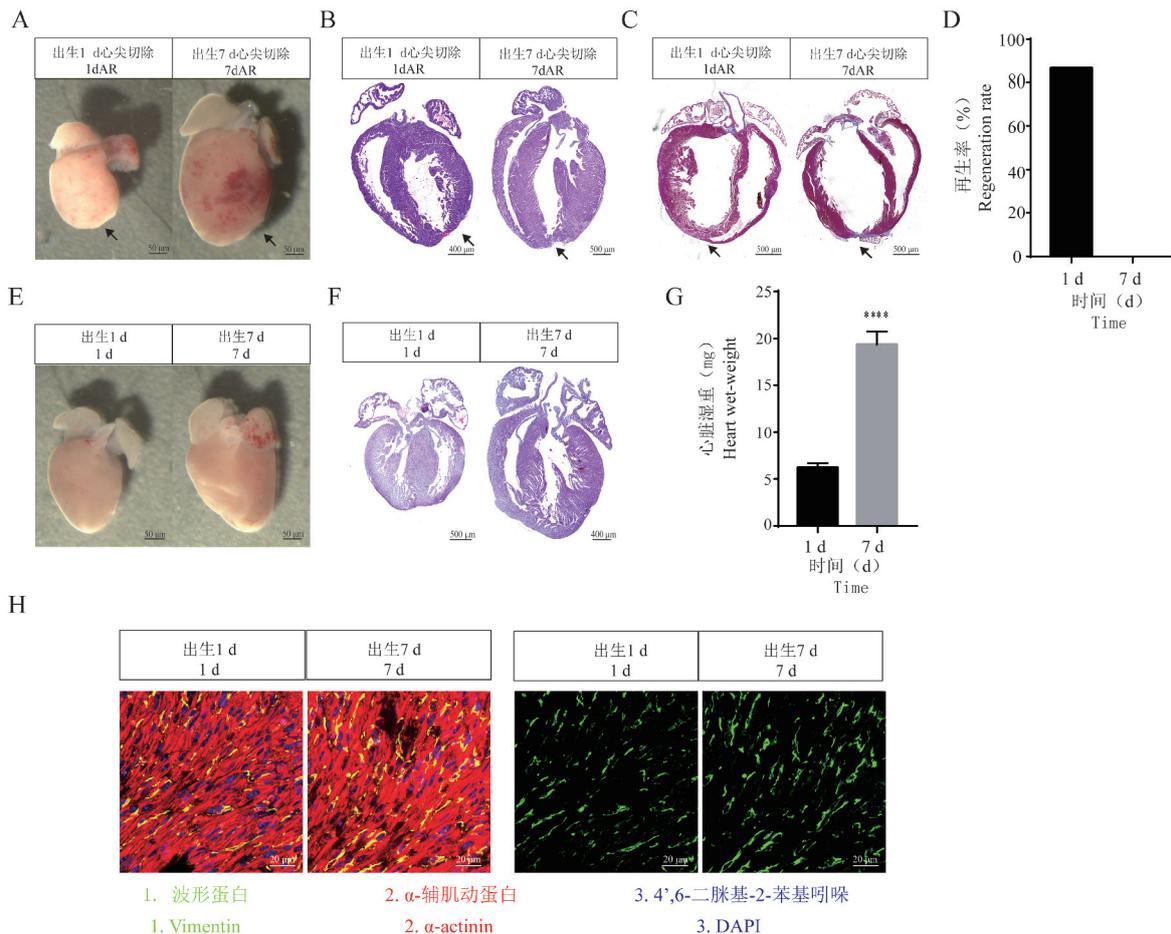
细胞数量明显高于 1 d 心脏(图 1H、1I)。以上结果说明,小鼠出生早期心脏体积随着心脏发育增大的同时,心脏成纤维细胞数量也随之增加。

## 2.2 流式细胞术分选心脏成纤维细胞

### 2.2.1 流式细胞术分选心脏成纤维细胞的圈门策略

为了分析小鼠出生后 7 d 心脏成纤维细胞数量的变化情况,我们使用成纤维细胞表面标志蛋白

Thy1 标记出生 1 d 和 7 d 的小鼠心肌成纤维细胞,通过流式细胞术进行细胞分选。首先,我们通过正向散射(FSC)和侧向散射(SSC)散点图,去除细胞碎片以及黏连细胞圈出 P1 门(图 2A),P1 门中的细胞开展后续分析。为了避免背景荧光及自发荧光的影响,收集分离后未染色的细胞作为空白对照(Blank,图 2B);收集加入无荧光染料的单个抗体的细胞作为同型对照(图 2C),以此判断抗原抗体的



注:A:出生 1 d 和 7 d 小鼠分别进行心尖切除即刻进行拍照;B:出生 1 d 和 7 d 小鼠分别进行心尖切除石蜡切片进行 HE 染色;C:出生 1 d 和 7 d 小鼠分别进行心尖切除,术后 21 d 进行 Masson 染色;D:小鼠出生 1 d 和 7 d 分别进行心尖切除,术后 21 d 统计再生率;E:小鼠出生 1 d 和 7 d 完整心脏进行拍照;F:小鼠出生 1 d 和 7 d 心脏切片进行 HE 染色;G:出生 1 d 和 7 d 小鼠心重比较;H:出生 1 d 和 7 d 小鼠心脏切片心肌细胞与成纤维细胞共染;I:出生 1 d 和 7 d 小鼠心脏切片对成纤维细胞进行免疫荧光染色。

图 1 小鼠出生 1 d 和 7 d 心脏组织的变化

Note, A, Apical resection was performed on day 1 and day 7 mice respectively, the heart was photographed immediately. B, Apical resection was performed on day 1 and day 7 mice respectively, the heart section of the mouse was stained with HE. C, Apical resection was performed on day 1 and day 7 mice respectively, and Masson staining was performed at 21 days after the operation. D, Apical resection was performed on day 1 and day 7 mice, and regeneration rate was counted at 21 day after operation. E, The whole heart of the mouse was photographed on day 1 and day 7. F, The heart section of the mouse was stained with HE on day 1 and day 7. G, The heart weight of the mouse was compared on day 1 and day 7. H, Cardiomyocytes and fibroblasts co-stained in 1 day and 7 days of mouse heart sections. I, Immunofluorescence staining of fibroblasts in 1 day and 7 days of mouse heart sections.

Figure 1 Changes of heart tissue in mice on day 1 and day 7

特异性结合;使用 APC 标记抗体收集所有 APC<sup>+</sup> 细胞(图 2D),最后,加入活性染料 7-AAD,收集 APC<sup>+</sup>、7-AAD<sup>-</sup>的所有细胞即为 Thy1<sup>+</sup>的活的心肌成纤维细胞,即为 Q4(图 2E),收集 Q4 门中的所有细胞,收集 5000 个细胞后记录阳性细胞占总细胞的比例。

2.2.2 小鼠出生 1 d 和 7 d 心肌成纤维细胞比例变化的比较

为明确小鼠出生 1 d 和 7 d 心脏成纤维细胞的比例变化,我们在分选的同时对心脏组织中成纤维细胞所占比例进行了统计。按图 1 所示,收集 Q4 门中细胞,收集 5000 个细胞后记录阳性细胞占总细胞的比例,我们共进行了 3 次重复实验,出生后 1 d 小鼠的心脏组织细胞中,Thy1<sup>+</sup>细胞所占比例分别为 6.9%、7.6%、8.7%,7 d 的小鼠心脏组织细胞中,Thy1<sup>+</sup>细胞所占比例分别为 9.5%、11.8%、10.4%,因此,小鼠出生后 7 d 心脏组织中心肌成纤维细胞占总细胞比例比出生后 1 d 时高 2.9%(1.38 倍)(1 d: (7.7 ± 0.74),7 d: (10.6 ± 0.95)),*P*=0.029,*t*=3.334,差异具有统计学意义(表 1)。

2.3 小鼠出生 1 d 和 7 d 心脏组织中成纤维细胞蛋白标志物的表达变化比较

小鼠出生后 7 d 心脏组织中成纤维细胞比例明显高于出生后 1 d 小鼠心脏组织。为了验证成纤维细胞在小鼠出生后的性状变化,我们分别分离了 1 d 和 7 d 的心脏成纤维细胞,通过 qRT-PCR 检测心脏组织中成纤维细胞标志蛋白 *Thy1*、*Fsp-1*、*Periostin*、*Pdgfra*、*Col1a1*、*Tcf21* 在转录水平上的表达变化。以出生 1 d 小鼠心脏成纤维细胞中标志蛋白的转录水平表达为对照,比较分析出生后 7 d 小鼠心脏成纤维细胞中标志蛋白 *Thy1*、*Fsp-1*、*Periostin*、*Pdgfra*、

*Col1a1*、*Tcf21* 的表达,反映心脏中成纤维细胞的性状变化。结果显示,与出生后 1 d 相比,出生后 7 d 心脏成纤维细胞中 *Thy1*、*Fsp-1*、*Periostin* 的表达显著高于 1 d 成纤维细胞(*Thy1*: 1 d: (1.01 ± 0.12),7 d: (2.71 ± 0.27),*P*=0.0288;*Fsp-1*: 1 d: (1.04 ± 0.27),7 d: (5.28 ± 0.10),*P*=0.0046;*Periostin*: 1 d: (0.91 ± 0.01),7 d: (1.13 ± 0.05),*P*=0.0119;*n*=3)(图 3A、3B、3C);而 *Pdgfra*、*Col1a1*、*Tcf21* 的表达显著低于 1 d 成纤维细胞(*Pdgfra*: 1 d: (1.09 ± 0.04),7 d: (0.62 ± 0.01),*P*=0.0068;*Col1a1*: 1 d: (1.00 ± 0.09),7 d: (0.57 ± 0.02),*P*=0.0433;*Tcf21*: 1 d: (1.00 ± 0.03),7 d: (0.54 ± 0.02),*P*=0.0054;*n*=3)(图 3D、3E、3F),由此证明小鼠出生后 1 d 到 7 d 心脏中成纤维细胞性状发生了改变。

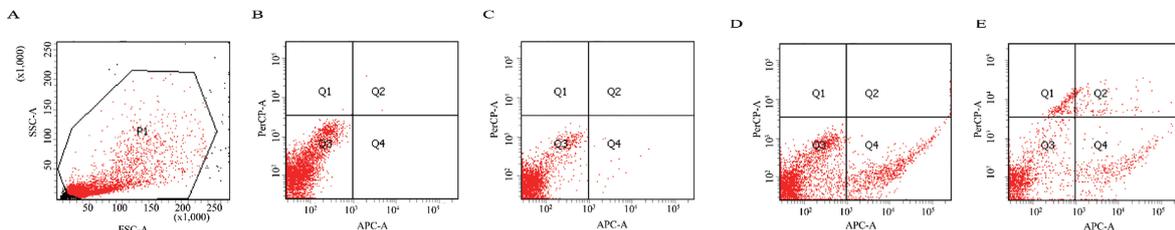
综上所述我们发现:小鼠出生早期(1~7 d)心脏成纤维比例不断增加的同时,成纤维细胞的性状也发生了改变,为心脏再生机制研究提供一定的线索。

3 讨论

成纤维细胞起源于胚胎时期的间充质干细胞,广泛分布于心脏、肾、肝、皮肤等器官间质中,其细

表 1 小鼠出生后 1 d 和 7 d 心肌成纤维细胞比例变化比较  
Table 1 Comparison of the ratio of cardiac fibroblasts in mouse at 1 day and 7 days after birth

实验次数 Experiment time	1 d (%) 1 d	7 d (%) 7 d	<i>P</i>
1	6.9	9.5	0.029
2	7.6	11.8	-
3	8.7	10.4	-
平均值±标准差 ( $\bar{x} \pm s$ )	7.7 ± 0.74	10.6 ± 0.95	-



注:A:P1 为收集的所有细胞;B:Q3 为不加任何染色的空白对照;C:Q3 为仅加无荧光标记抗体的同型对照;D:Q4 为收集的 APC<sup>+</sup> 细胞;E:Q4 为收集的 APC<sup>+</sup>、7-AAD<sup>-</sup>细胞。

图 2 流式细胞术分选心脏成纤维细胞的圈门方法

Note, A, All cells were collected without cell debris and adhesion cells. B, Unstained cells were collected as blank control. C, Cell labeled with single antibody without fluorescent dyes were collected as isotype controls. D, The APC<sup>+</sup> cells among total cells were collected. E, The APC<sup>+</sup>、7-AAD<sup>-</sup> cells among total cells were collected.

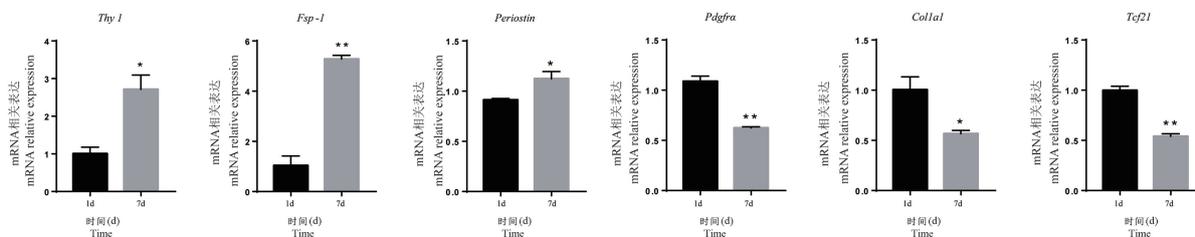
Figure 2 The ring gate method of sorting cardiac fibroblasts by flow cytometry

胞体积大且形态多样多变,随外界微环境改变而改变<sup>[15-16]</sup>。心脏成纤维细胞是心脏的主要组成细胞,占整个心脏组织总细胞的 50% 以上<sup>[12,17-18]</sup>,在心脏中发挥维持心脏结构和功能的作用。本研究主要针对小鼠出生 1 d 和 7 d 两个时间点成纤维细胞的数量及性状的变化情况,发现小鼠出生后 7 d 心脏组织中成纤维细胞比例明显高于出生后 1 d 小鼠心脏组织;在成纤维细胞转录水平,成纤维细胞标志物 *Thy1*、*Fsp-1*、*Periostin* 在小鼠出生后 7 d 表达高于出生后 1 d 的成纤维细胞,而 *Pdgfra*、*Col1a1*、*Tcf21* 三种成纤维细胞标志蛋白表达则低于出生后 1 d 的小鼠心脏中的成纤维细胞,提示在小鼠出生后 7 d 心脏组织中成纤维细胞性状发生了变化。

成纤维细胞具有强大的多向分化潜能<sup>[19-20]</sup>,增殖能力强且代谢旺盛,可体外培养、多次传代<sup>[21-22]</sup>。在未受伤的成年心脏中,成纤维细胞主要作用于营养因子的分泌、ECM 监测、传导系统绝缘、心肌细胞电偶联和血管维护;在损伤的心脏中,成纤维细胞增殖,沉积 ECM,招募炎症细胞,是体外机制探索的重要细胞类型<sup>[23]</sup>。成年哺乳动物心脏受损后丧失心肌细胞增殖能力导致无法进行有意义的自我恢复<sup>[1-2]</sup>,2011 年,Porrello 研究组发现新生小鼠出生后 1 d 切除约 15% 的心尖部分,21 d 后心脏可以完全再生,但在出生后第 7 d 进行心尖切除后只能出现疤痕修复<sup>[4]</sup>,其中的原理机制尚不清楚,但是小鼠出生后 7 d 成为心脏组织是否可以再生的时间转折点是确定的。有研究表明,心脏中成纤维细胞可以重编程为心肌细胞,2010 年 Ieda 等<sup>[24]</sup>将小鼠心肌成纤维细胞直接重编程为心肌样细胞,首次报道了成纤维细胞向心肌细胞的直接重编程。近几年,Qian 等<sup>[10]</sup>、Song<sup>[25]</sup>等在小鼠心肌梗死部位注射 GHMT (*Gata4*、*Hand2*、*Mef2c*、*Tbx5*)也可引起心脏成纤维细胞重编程为心肌细胞,为再生医学研究奠定

了扎实基础。

心脏成纤维细胞异质性很强,没有特异性表达的标志蛋白,在发育过程的不同阶段成纤维细胞表达的蛋白发生变化,因此,目前研究者通常使用多种标志蛋白组合标记的方法对成纤维细胞进行标识。*Thy1* 是目前为止研究最为详细的一种细胞表面糖蛋白,在所有成纤维细胞中均表达,该糖蛋白通过糖基磷脂酰肌醇部分固定在细胞表面,编码的蛋白经过进一步的处理,生成成熟的蛋白,介导细胞与细胞的相互作用,从而触发下游信号通路,参与细胞增殖、细胞凋亡等过程<sup>[26-27]</sup>; *Fsp-1* 为成纤维细胞分泌因子,在体外培养的成纤维细胞中高度表达,对维持细胞生物学功能起着重要作用<sup>[28-29]</sup>; *Periostin* 是肌成纤维细胞分泌的细胞外基质中的非结构性基质蛋白,在正常心脏中几乎不表达,但是在受损的心脏中高度表达,是一种相对较新的潜在标志物,可用于鉴定心肌成纤维细胞,促进肌成纤维细胞的募集并增加胶原蛋白的产生<sup>[30]</sup>。*Col1a1* 是 I 型胶原的主要成分,可用于鉴定心脏成纤维细胞,并与 *pdgfra* 共同表达<sup>[31]</sup>; *pdgfra* 是酪氨酸蛋白激酶家族成员,具有促进细胞趋化分裂增殖、细胞趋化、血管收缩及参与组织器官的生成分化等生物效应;*Tcf21* 在心脏成纤维细胞中表达,与其他标志物一起鉴别心脏成纤维细胞<sup>[32]</sup>。我们的结果显示,小鼠出生后 7 d 成纤维细胞占整个心脏组织的比例较出生后 1 d 心脏组织升高了 2.9%,成纤维细胞的标志物 *Thy1*、*Fsp-1*、*Periostin*、*Pdgfra*、*Col1a1*、*Tcf21* 表达水平也发生了显著改变,提示此过程中成纤维细胞性状发生了一定程度的改变,可能与小鼠出生 7 d 后再生能力丢失相关,进一步探讨小鼠出生 7 d 心脏成纤维细胞的变化与心肌再生关系和机制,有可能为寻找出心肌再生关键的靶点提供新的研究方向。



注:与 1 d 组相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

图 3 小鼠出生 1 d 和 7 d 心脏成纤维细胞标志的变化

Note. Compared with 1 day group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

Figure 3 Changes of cardiac fibroblast markers in mouse at 1 day and 7 days after birth

随着科学界对心肌成纤维细胞功能的不断深入研究,发现心肌成纤维细胞在心脏生理及病理条件下的作用越来越重要,成为心血管领域的重要研究对象。本研究主要着眼于小鼠出生后 1 d 和出生后 7 d 心脏成纤维细胞的数量和心脏成纤维细胞中标志物的表达分析,为心肌再生领域的研究提供一定的实验数据和理论线索。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Zhang Y, Mignone J, MacLellan WR. Cardiac regeneration and stem cells [J]. *Physiol Rev*, 2015, 95(4): 1189-1204.
- [ 2 ] Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, et al. Wound repair and regeneration [J]. *Nature*, 2008, 453(7193): 314-321.
- [ 3 ] Zaragoza C, Gomez-Guerrero C, Martin-Ventura JL, et al. Animal models of cardiovascular diseases [J]. *J Biomed Biotechnol*, 2011, 2011: 497841.
- [ 4 ] Porrello ER, Mahmoud AI, Simpson E, et al. Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart [J]. *Science*, 2011, 331(6020): 1078-1080.
- [ 5 ] Nakada Y, Canseco DC, Thet S, et al. Hypoxia induces heart regeneration in adult mice [J]. *Nature*, 2017, 541(7636): 222-227.
- [ 6 ] Lam NT, Sadek HA. Neonatal heart regeneration; comprehensive literature review [J]. *Circulation*, 2018, 138(4): 412-423.
- [ 7 ] Das S, Goldstone AB, Wang H, et al. A unique collateral artery development program promotes neonatal heart regeneration [J]. *Cell*, 2019, 176(5): 1128-1142.
- [ 8 ] Ma Y, Iyer RP, Jung M, et al. Cardiac fibroblast activation post-myocardial infarction: current knowledge gaps [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2017, 38(5): 448-458.
- [ 9 ] Cao N, Huang Y, Zheng J, et al. Conversion of human fibroblasts into functional cardiomyocytes by small molecules [J]. *Science*, 2016, 352(6290): 1216-1220.
- [ 10 ] Qian L, Huang Y, Spencer CI, et al. *In vivo* reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes [J]. *Nature*, 2012, 485(7400): 593-598.
- [ 11 ] Fu Y, Huang C, Xu X, et al. Direct reprogramming of mouse fibroblasts into cardiomyocytes with chemical cocktails [J]. *Cell Res*, 2015, 25(9): 1013-1024.
- [ 12 ] 刘波. 流式细胞仪及其临床应用 [J]. *中国医疗设备*, 2013, 28(7): 66-69.
- [ 13 ] Han C, Nie Y, Lian H, et al. Acute inflammation stimulates a regenerative response in the neonatal mouse heart [J]. *Cell Res*, 2015, 25(10): 1137-1151.
- [ 14 ] Li Y, Feng J, Li Y, et al. Achieving stable myocardial regeneration after apical resection in neonatal mice [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(11): 6500-6504.
- [ 15 ] Baudino TA, Carver W, Giles W et al. Cardiac fibroblasts: friend or foe? [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, 291(3): H1015-H1026.
- [ 16 ] Alt E, Yan Y, Gehmert S, et al. Fibroblasts share mesenchymal phenotypes with stem cells, but lack their differentiation and colony-forming potential [J]. *Biol Cell*, 2011, 103(4): 197-208.
- [ 17 ] Camelliti P, Borg TK, Kohl P. Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts [J]. *Cardiovasc Res*, 2005, 65(1): 40-51.
- [ 18 ] Snider P, Standley KN, Wang J, et al. Origin of cardiac fibroblasts and the role of periostin [J]. *Circ Res*, 2009, 105(10): 934-947.
- [ 19 ] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors [J]. *Cell*, 2007, 131(5): 861-872.
- [ 20 ] Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells [J]. *Science*, 2007, 318(5858): 1917-1920.
- [ 21 ] Ivey MJ, Kuwabara JT, Pai JT, et al. Resident fibroblast expansion during cardiac growth and remodeling [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2018, 114: 161-174.
- [ 22 ] Ieda M, Tsuchihashi T, Ivey KN, et al. Cardiac fibroblasts regulate myocardial proliferation through beta1 integrin signaling [J]. *Dev cell*, 2009, 16(2): 233-244.
- [ 23 ] Ivey MJ, Tallquist MD. Defining the cardiac fibroblast [J]. *Circ J*, 2016, 80(11): 2269-2276.
- [ 24 ] Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, et al. Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors [J]. *Cell*, 2010, 142(3): 375-386.
- [ 25 ] Song K, Nam YJ, Luo X, et al. Heart repair by reprogramming non-myocytes with cardiac transcription factors [J]. *Nature*, 2012, 485(7400): 599-604.
- [ 26 ] 张明明, 赵洪文. Thy-1 与成纤维细胞异质性 [J]. *国际呼吸杂志*, 2009(14): 864-867.
- [ 27 ] Morris RJ, Ritter MA. Association of thy - 1 cell surface differentiation antigen with certain connective tissues *in vivo* [J]. *Cell Tissue Res*, 1980, 206(3): 459-475.
- [ 28 ] Strutz F, Okada H, Lo CW, et al. Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1 [J]. *J Cell Biol*, 1995, 130: 393.
- [ 29 ] 周钰松. FSP\_1、肾成纤维细胞与肾脏间质纤维化 [J]. *泸州医学院学报*, 2002, 25(6): 544-546.
- [ 30 ] Zhao S, Wu H, Xia W. et al. Periostin expression is upregulated and associated with myocardial fibrosis in human failing hearts [J]. *J Cardiol*, 2014, 63(5): 373-378.
- [ 31 ] Moore-Morris T, Guimarães-Camboa N, Yutzey KE, et al. Cardiac fibroblasts: from development to heart failure [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2015, 93(8): 823-830.
- [ 32 ] Doppler SA, Carvalho C, Lahm H, et al. Cardiac fibroblasts: more than mechanical support [J]. *J Thorac Dis*, 2017, 9: S36-S51.

[ 收稿日期 ] 2020-12-10