

· 技术与方法 ·

小鼠结肠平滑肌细胞的原代培养与优化

吴静文 肖长芳 姚一博*

(上海中医药大学附属龙华医院, 肛肠科, 上海 200032)

摘要 小鼠结肠平滑肌细胞在肠动力障碍疾病的研究中具有重要作用, 然而目前尚未建立一套简便可靠的体外原代培养体系。该文旨在建立并优化小鼠结肠平滑肌细胞原代培养的方法。采用酶消化法联合组织块贴壁法分离和培养小鼠原代结肠平滑肌细胞, 并对培养条件(小鼠年龄、培养皿规格、血清浓度)进行优化。通过差速贴壁法纯化细胞, 免疫荧光检测细胞纯度, 并利用CCK-8法测定小鼠原代结肠平滑肌细胞增殖能力。进一步构建三维胶原凝胶培养模型, 验证结肠平滑肌细胞的自主收缩功能。与组织块贴壁法相比, 酶消化法联合组织块贴壁法显著缩短细胞贴壁和融合时间, 且细胞纯度更高($94.52\% \pm 1.76\%$ vs $87.87\% \pm 2.48\%$, $P < 0.05$)。8周龄小鼠的结肠平滑肌细胞增殖速度更快, 细胞排列整齐; 在6孔板和15%胎牛血清完全培养基的培养条件下细胞的生长速度显著提升。CCK-8法测定结果显示, 小鼠原代结肠平滑肌细胞的生长活性良好, 生长曲线呈“S”型。三维胶原凝胶实验显示, 空白对照组的胶原收缩率显著高于2,3-丁二酮单肼(BDM)抑制组($31.57\% \pm 5.32\%$ vs $11.96\% \pm 4.09\%$, $P < 0.05$), 证实结肠平滑肌细胞具有自主收缩功能。该研究成功建立了一套小鼠结肠平滑肌细胞的原代培养体系, 通过优化培养方法和条件, 显著提高了细胞的纯度和生长速度, 并验证了其功能特性。

关键词 小鼠结肠平滑肌细胞; 原代培养; 酶消化法联合组织块贴壁法; 差速贴壁法纯化; 三维培养模型; 细胞收缩

Primary Culture and Optimization of Mouse Colonic Smooth Muscle Cells

WU Jingwen, XIAO Changfang, YAO Yibo*

(Department of Anorectal Surgery, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China)

收稿日期: 2025-09-12 接受日期: 2025-11-14

国家自然科学基金(批准号: 82174373、82305235)、上海市级医院诊疗技术推广及优化管理项目(批准号: SHDC12024135)、上海市级医院中医外科临床能力促进与提升专科联盟(批准号: SHDC22024306)、上海市肛肠疾病研究中心项目(批准号: 2023ZZ02003)、第七批全国名老中医药专家学术经验继承人项目(批准号: 国中医药人教函(2022) 76号)、国家中医药管理局高水平中医药重点学科—中医肛肠病学项目(批准号: zyyzdxk-2023064)、中医药流派发展高地建设—海派中医流派传承延伸计划(批准号: ZY[2021-2023-0209])、浦东新区中医药传承创新发展示范试点项目建设—高水平研究型中医医院建设(批准号: YC-2023-0901)、上海市临床重点专科项目(批准号: shslczdk04301)、全国中医学学术流派传承工作室第二轮建设项目(批准号: 国中医药人教函(2019) 62号)、上海市启明星项目扬帆专项(批准号: 23YF1448000)和中国科协生命科学学会联合体—第十届青年人才托举工程资助的课题

*通信作者。Tel: 021-64385700, E-mail: elevenzoe@163.com

Received: September 12, 2025 Accepted: November 14, 2025

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.82174373, 82305235), the Shanghai Hospital Development Center Foundation (Grant No.SHDC12024135), the Shanghai Municipal Hospital Clinical Ability Promotion and Promotion of Traditional Chinese Medicine Surgery Specialist Alliance (Grant No.SHDC22024306), the Shanghai Sinus Fistula Disease Research Center (Grant No.2023ZZ02003), the Seventh Batch of Chinese Medicine Experts Academic Experience Successor Project (Grant No.Guozhongyiyao Renjiao Han (2022) 76), the National Administration of Traditional Chinese Medicine High Level Key Discipline of Traditional Chinese Medicine—Traditional Chinese Medicine Anorectal Diseases (Grant No.zyyzdxk-2023064), the Development Highland Construction of TCM—the Inheritance and Extension Plan of Traditional Chinese Medicine School in Shanghai (Grant No.ZY[2021-2023-0209]), the Construction of Traditional Chinese Medicine Inheritance and Innovation Development Demonstration Pilot Projects in Pudong New Area-High-Level Research-Oriented Traditional Chinese Medicine Hospital Construction (Grant No.YC-2023-0901), the Shanghai Key Clinical Specialty (Grant No.shslczdk04301), the Second Round of Construction Project of the National Traditional Chinese Medicine Academic School Inheritance Studio (Grant No.Guozhongyiyao Renjiao Han (2019) 62), the Yangfan Project of Shanghai Science and Technology Commission (Grant No.23YF1448000), and the 10th Young Talent Support Project by the Life Science Society Consortium of China Association for Science and Technology (CAST)

*Corresponding author. Tel: +86-21-64385700, E-mail: elevenzoe@163.com

Abstract Mouse colonic smooth muscle cells play an important role in the study of intestinal motility disorders. However, there is currently no simple and reliable *in vitro* primary culture system established for these cells. This study aims to establish and optimize a primary culture method for mouse colonic smooth muscle cells. Mouse colonic smooth muscle cells were isolated and cultured using enzyme digestion combined with tissue explant adherence. Optimization of culture conditions, including mouse age, dish size, and serum concentration, was performed. Cells were purified via differential adhesion, purity was verified by immunofluorescence, and proliferative capacity was assessed with the CCK-8 assay. A 3D collagen gel culture model was used to verify the autonomous contraction ability of colonic smooth muscle cells. Compared to tissue explant adherence alone, the combination of enzyme digestion and tissue explant adherence significantly reduced cell adherence and fusion time and achieved higher cell purity ($94.52\% \pm 1.76\%$ vs $87.87\% \pm 2.48\%$, $P < 0.05$). Colonic smooth muscle cells from 8-week-old mice exhibited the highest proliferation rate and the most organized arrangement. Under the culture conditions of a 6-well plate and 15% fetal bovine serum medium, the cell growth rate is significantly improved. CCK-8 assays revealed robust proliferative activity of mouse primary colonic smooth muscle cells, yielding a classic S-shaped growth curve. The 3D collagen gel experiment showed that the collagen contraction rate in the blank control group was significantly higher than that in the BDM (2,3-butanedione monoxime) inhibitor group ($31.57\% \pm 5.32\%$ vs $11.96\% \pm 4.09\%$, $P < 0.05$), confirming the autonomous contraction ability of colonic smooth muscle cells. This study successfully established a primary culture system for mouse colonic smooth muscle cells. By optimizing culture methods and conditions, cell purity and activity were significantly improved, and their functional characteristics were verified.

Keywords mouse colonic smooth muscle cells; primary culture; enzyme digestion combined with tissue explant adherence; differential adherence purification; 3D culture model; cell contraction

肠道吸收液体、储存和排出内容物的协调运动对人类的生活至关重要^[1]。影响肠道动力的常见效应器是纵向和环形排列的平滑肌细胞^[2]。结肠的运动模式相比其他管状平滑肌器官更为丰富多样,其生理运动的关键在于平滑肌收缩与舒张在时间和空间上的协调^[3]。肠道平滑肌的运动一般涉及肠道神经系统(enteric nervous system, ENS)、Cajal间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)和平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)^[4]。其中,结肠平滑肌细胞作为肠道运动的最终执行者,能够响应ICC产生的慢波,这种慢波是肠道蠕动的基^[5-6]。结肠平滑肌细胞通过电压依赖性离子通道的激活,将慢波转化为机械性收缩,从而推动结肠内容物的移动^[7]。结肠平滑肌细胞的收缩功能受到多种神经递质和激素(例如乙酰胆碱和5-羟色胺等)的调节,这些物质通过与平滑肌细胞表面的受体结合,调节肠道的蠕动频率和强度^[8]。此外,结肠平滑肌细胞还参与肠道的屏障功能,其正常收缩有助于维持肠道黏膜的完整性,防止有害物质的侵入^[9]。因此,结肠平滑肌细胞在调控肠道动力中扮演着关键性的作用。

结肠平滑肌细胞的功能异常往往是肠动力障碍疾病发生的关键病理机制之一^[5,10]。在慢传输型便秘中,结肠平滑肌细胞的收缩力会显著减弱,导致肠道蠕动减慢,使得内容物滞留时间延长^[11]。此外,若其结构与功能发生异常改变,也可引发肠道蠕动障碍,严重时甚至可能导致肠道狭窄、梗阻等更为严重的病理症状^[12]。因此,深入研究结肠平滑肌细胞的功能及其在肠动力障碍中的作用,对于理解疾病机制和开发新的治疗方法具有重要意义。

目前对于肠道动力障碍疾病的研究层次已从动物实验、离体机电生理研究逐步深入到细胞分子生物学层面^[13]。原代结肠平滑肌细胞作为分子水平研究肠道疾病发病机制及治疗方法的重要体外模型,其分离过程能否简单、快速地获得足够数量且高纯度的细胞,对后续研究至关重要^[14]。当前关于结肠平滑肌细胞原代培养的研究较少,且未形成系统、可重复性的细胞培养方法^[15]。因此,需建立一套系统、稳定且可重复的原代结肠平滑肌细胞培养方法,优化酶解、纯化等关键参数,从而减少实验变量,确保细胞纯度与活性稳定,为后续结肠动力相关研究提供可靠的基础方法。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康C57BL/6J小鼠, SPF级, 4~24周龄, 雌雄不拘, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。动物生产许可证号: SCXK(沪) 2022-0004; 动物使用许可证号: SYXK(沪) 2020-0009。小鼠饲养在上海中医药大学附属龙华医院动物房。常规饲养, 温度(20~26) °C, 相对湿度控制在40%~70%, 明暗交替12 h。该动物实验方案经上海中医药大学实验动物伦理委员会审核通过(伦理审批号: PZSHUTCM220725034)。

1.1.2 实验试剂 试剂包括: 戊巴比妥钠(美国Sigma-Aldrich公司)、D-Hank's溶液(北京索莱宝科技有限公司)、0.25%胰蛋白酶-EDTA(trypsin-EDTA)(德国Merck公司)、II型胶原酶(collagenase II)(美国Sigma-Aldrich公司)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(美国Corning公司)、高糖DMEM培养基(美国Hyclone公司)、青/链霉素双抗(北京索莱宝科技有限公司)、4%多聚甲醛(上海碧云天生物技术股份有限公司)、0.3% Triton X-100(上海生工生物工程股份有限公司)、anti- α -SMA(anti-alpha smooth muscle actin)(英国Abcam公司)、抗波形蛋白抗体(vimentin polyclonal antibody, 美国Proteintech公司)、Alexa Fluor® 488 Phalloidin(美国CST公司)、Alexa Fluor® 555 Phalloidin(美国CST公司)、抗荧光淬灭封片剂(含DAPI)(上海碧云天生物技术股份有限公司)、锥虫蓝染色细胞存活率检测试剂盒(上海碧云天生物技术股份有限公司)、细胞收缩检测试剂盒(美国Cell Biolabs公司)。

1.1.3 实验仪器 仪器包括: 超净工作台(上海博迅医疗生物仪器股份有限公司)、CO₂培养箱(新加坡ESCO公司)、低速离心机(北京大龙兴创实验仪器股份有限公司)、倒置生物显微镜(日本Olympus公司)、荧光显微镜(美国LYCRA公司)、酶标仪(美国Bio Tek公司)、凝胶成像系统(金斯瑞生物科技有限公司)。

1.1.4 工作液配制 组织清洗液: 99% D-Hank's溶液+1%双抗, 4 °C预冷备用。不同浓度的完全培养基, 10%: 10% FBS+1%双抗+89%高糖DMEM; 15%: 15% FBS+1%双抗+84%高糖DMEM; 20%: 20% FBS+1%双抗+79%高糖DMEM。

1.2 方法

1.2.1 获取小鼠结肠组织 小鼠禁食12 h, 1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉处死后, 将小鼠在75%酒精中浸泡2 min。无菌条件下, 沿腹中线自上而下切开皮肤、

肌肉, 充分暴露腹腔, 快速自小鼠肛门上缘2 cm处, 截取结肠8~10 cm。用5 mL注射器辅助, 使用生理盐水反复灌肠, 冲洗结肠内部残余粪便。用镊子夹取肠段的一角, 纵行剖开, 将其转移到组织清洗液中, 将大便清洗干净后, 冰上静置浸泡15 min, 转入超净台, 具体的培养方法见图1。

1.2.2 分离结肠平滑肌 一手用镊子夹住肠段的一端, 另一手拿弯镊轻柔剥离和刮除黏膜层和浆膜层, 仔细剥离黏膜层, 翻转至外侧, 小心地撕去肠系膜, 再仔细刮去浆膜层, 反复用镊子侧脚刮肠段的内外层, 直至观察到肠段呈透明的一层为止。剥离出平滑肌层, 将剥离的平滑肌层转入组织清洗液中进行清洗3~5次, 直至溶液清澈。在6 cm培养皿中用眼科剪将组织段剪成1 mm×1 mm×1 mm或更小的组织块。

1.2.3 酶消化法联合组织块贴壁法培养小鼠原代结肠平滑肌细胞 先用3 mL 0.2% II型胶原酶溶液消化结肠组织块, 并轻柔吹打混匀后于37 °C、5% CO₂培养箱中消化45 min, 消化后再次吹打, 加入6 mL 15%完全培养基终止反应, 转移至15 mL离心管, 1 000 r/min室温离心5 min, 弃上清。沉淀加入2 mL 0.25%胰蛋白酶-EDTA重悬, 转移至6 cm培养皿中继续消化(37 °C) 15 min, 吹打后补充4 mL 15%完全培养基, 转移至15 mL离心管, 1 000 r/min室温离心5 min, 弃上清。沉淀用3 mL 15%完全培养基重悬, 混合未消化组织与单细胞悬液, 将液体平均分为3~6份, 接种至6孔板中混合贴壁培养。

2~3天后换液, 贴壁吸弃原培养基的1/2, 补充1~2 mL 15%完全培养基继续培养, 待细胞融合度达80%时, 使用0.25%胰蛋白酶-EDTA在37 °C、5% CO₂培养箱中消化2 min, 后加入两倍体积的15%完全培养基终止消化, 1 000 r/min室温离心5 min, 弃上清, 使用15%完全培养基重悬, 通过分盘将未完全解离的组织悬液分开。未解离的组织继续贴壁培养; 细胞悬液继续传代培养, 待细胞融合达到90%时, 进行纯化。

1.2.4 组织块贴壁法培养小鼠原代结肠平滑肌细胞 将结肠平滑肌剥离出来, 使用组织清洗液清洗干净, 在15%完全培养基中将组织剪成1 mm×1 mm×1 mm的组织块, 转入15 mL离心管, 1 000 r/min室温离心5 min, 吸弃上清。加入2 mL胎牛血清重悬, 平均分为3份, 转入培养瓶中, 轻轻摇匀, 静置2 min, 吸取部分多余的血清, 在37 °C、5% CO₂培养箱中倒置孵育6 h, 后加入2 mL 15%完全培养基, 覆盖住组织表面。放在37 °C、5%

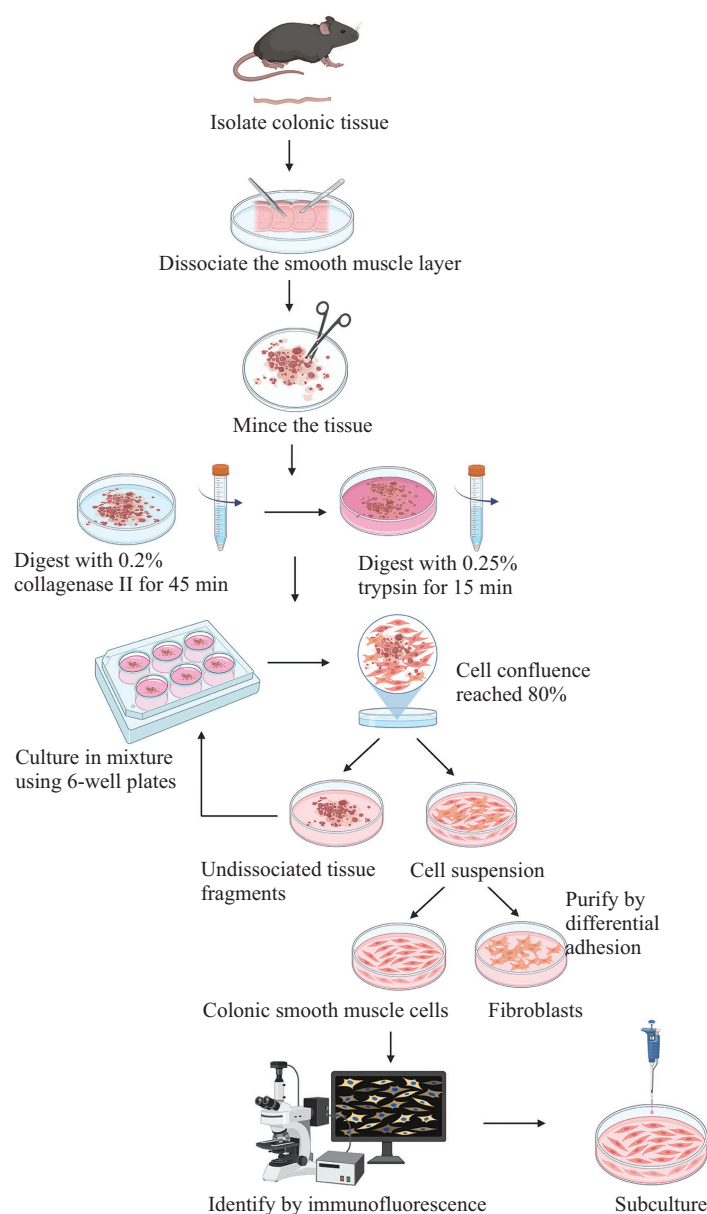


图1 分离培养小鼠原代结肠平滑肌细胞的技术路线图(图片使用BioRender进行绘制)

Fig.1 Technical flowchart for the isolation and culture of primary colonic smooth muscle cells from mice (the image was drawn using BioRender)

CO₂培养箱中继续孵育,静置培养,直到细胞达80%融合。使用0.25%胰蛋白酶-EDTA在37℃、5% CO₂培养箱中消化2 min,后加入两倍体积的15%完全培养基终止消化,1 000 r/min室温离心5 min,弃上清,使用15%完全培养基重悬后,分离沉淀和细胞悬液,分别转入6 cm的培养皿中,继续培养。细胞悬液继续传代培养,待细胞融合达到90%时,进行纯化。

1.2.5 小鼠原代结肠平滑肌细胞的纯化与免疫荧光鉴定 利用成纤维细胞与结肠平滑肌细胞贴壁时间差异进行差速贴壁纯化。使用0.25%胰蛋白酶-EDTA于37℃消化2 min后,加入15%完全培养基终止消化,室

温离心(1 000 r/min、5 min)并弃上清,使用15%完全培养基将细胞重悬后接种至10 cm培养皿中,于30 min后吸取上清液并将其转移至新培养皿,弃原皿中贴壁的成纤维细胞,重复3次。纯化后的平滑肌细胞继续培养达80%融合时,加入2 mL的0.25%胰蛋白酶-EDTA,在37℃、5% CO₂培养箱中消化2 min,加入两倍体积的15%完全培养基终止消化,1 000 r/min室温离心5 min,弃上清,使用15%完全培养基重悬,再用细胞计数板计数。将22 mm×22 mm盖玻片放入6孔板中,按1×10⁵/孔的密度接种细胞,培养24 h至80%融合,依次进行磷酸盐缓冲盐水(phosphate-buffered saline, PBS)漂洗(3次,每

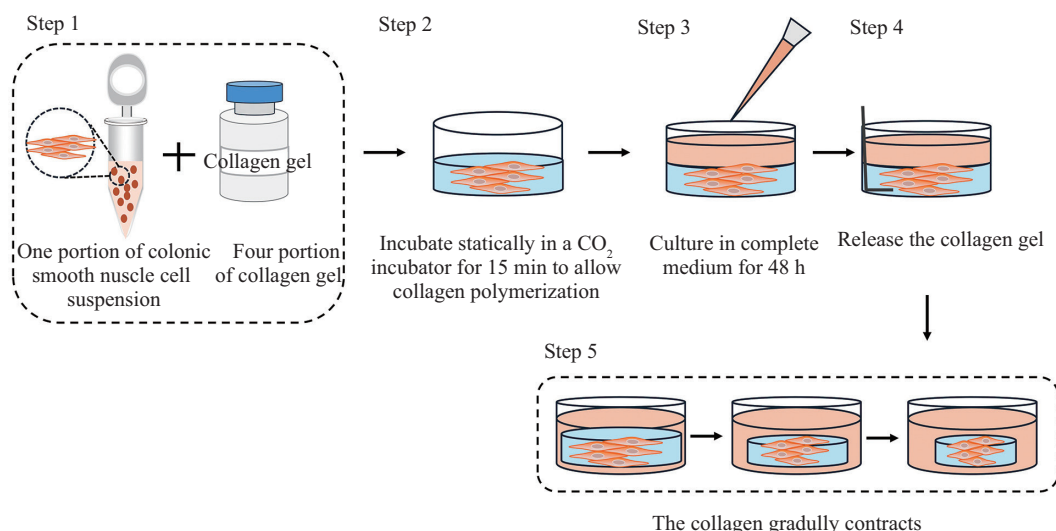


图2 构建结肠平滑肌细胞三维培养模型的示意图

Fig.2 Schematic diagram for constructing a 3D culture model of colonic smooth muscle cells

次5 min)、4%多聚甲醛室温固定20 min、0.3% Triton X-100室温透化20 min、5%牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)室温封闭30 min, 分别加入 α -SMA(1:200)及波形蛋白(vimentin)(1:200)一抗4 °C孵育过夜, PBS漂洗后用对应Alexa555(抗鼠)与Alexa488(抗兔)二抗(均为1:1 000)避光室温孵育2 h, 漂洗后用抗淬灭封片剂封片, 倒置荧光显微镜观察。

1.2.6 锥虫蓝染色实验检测消化后小鼠原代结肠平滑肌细胞的存活率 制备单细胞悬液, 将得到的小鼠结肠平滑肌细胞稀释至 $5 \times 10^5/\text{mL}$, 按照细胞悬液:锥虫蓝染液=1:1的比例混合, 在室温下孵育3 min, 用移液器吸取约10 μL 混合液, 加到计数板中, 将计数板放在显微镜载物台上, 在10倍物镜下观察。观察细胞形态, 活细胞通常呈小而圆、明亮、不着色的形态, 并具有折光性; 而死细胞往往被染成蓝色, 体积可能稍大, 且缺乏折光性。计数染色和未染色的细胞100个, 重复计数3次。细胞存活率=[(总细胞数-死细胞数)/总细胞数] $\times 100\%$ 。

1.2.7 CCK-8法检测小鼠原代结肠平滑肌细胞的活力 将纯化后的细胞贴壁培养, 待融合度达90%后, 使用0.25%胰蛋白酶-EDTA在37 °C、5% CO₂培养箱中消化2 min, 然后加入两倍体积的15%完全培养基终止消化, 1 000 r/min室温离心5 min, 弃上清, 并计数, 将得到的细胞悬液稀释至 $2 \times 10^4/\text{mL}$, 接种到96孔板中, 每孔100 μL , 共设置8个组别, 每组6个复孔, 后放置在37 °C、5% CO₂培养箱中培养24 h, 待细胞贴壁。弃去原培养基, 每孔避光加入90 μL 15%完全培养基

和10 mL CCK-8溶液, 在37 °C、5% CO₂培养箱中孵育2 h, 在450 nm波长处测定吸光度(D)值。连续测定8天, 取6个孔的平均值, 以时间为横坐标, D值为纵坐标, 绘制细胞生长曲线。

1.2.8 细胞三维培养验证小鼠原代结肠平滑肌细胞的功能 构建小鼠结肠平滑肌细胞三维培养模型(图2)。将得到的结肠平滑肌细胞分为阴性对照组[加入10 mmol/L细胞收缩抑制剂BDM(2,3-butanedione monoxime)]^[16]和空白组(加入15%完全培养基), 将各组结肠平滑肌细胞稀释至 $2.5 \times 10^6/\text{mL}$ 。将细胞悬液和冷胶原凝胶工作液按照1:4的比例混合制备胶原晶格, 在24孔板中每孔加入0.5 mL细胞-胶原蛋白混合物, 37 °C孵育1 h。胶原聚合后, 每孔加入1 mL 15%完全培养基。在细胞培养箱中培养48 h后, 进行换液, 同时用无菌抹刀从培养皿的侧面轻轻地剥离胶原蛋白凝胶。最后使用凝胶成像系统拍照记录胶原蛋白凝胶大小在不同时间的变化。

1.3 统计学分析

所有实验均至少进行3次重复, 使用ImageJ软件进行荧光图片分析, GraphPad Prism 10软件进行数据分析, *t*检验进行两组间比较。 $P < 0.05$ 表示结果差异显著, 数据以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

2 结果

2.1 对比不同培养方法和培养条件对小鼠原代结肠平滑肌细胞融合速度的影响

2.1.1 不同培养方法 对比酶消化法联合组织块贴

壁法和组织块贴壁法两种培养方法对细胞爬出与融合速度的影响,发现使用酶消化法联合组织块贴壁法所用的时间更短,在经过两种酶消化之后,接种到培养皿中的细胞处于两种状态,一种是离散的圆形结肠平滑肌细胞,另一种是结肠组织块;第一次换液(第3天)时,发现部分细胞贴壁呈现梭形、三角形、四边形等不规则形状,结肠组织块开始贴壁(图3A);培养至第6天,散落的细胞已完全变成梭形,同时开始增殖,有细胞开始从组织块边缘爬出(图3B);培养至第9天,发现组织块边缘有大量细胞爬出,并呈放射性生长,细胞密度增加(图3C)。对于组织块贴壁法,在培养的第3天,结肠组织开始贴壁,并有圆形细胞开始爬出(图3D);第6天,少量细胞爬出,呈梭形、三角形等(图3E);培养至第9天,组织块边缘有大量细胞爬出,但是细胞生长密度不均匀,同时细胞主要集中在组织边缘,无法向四周迁移,细胞生长严重受限(图3F)。

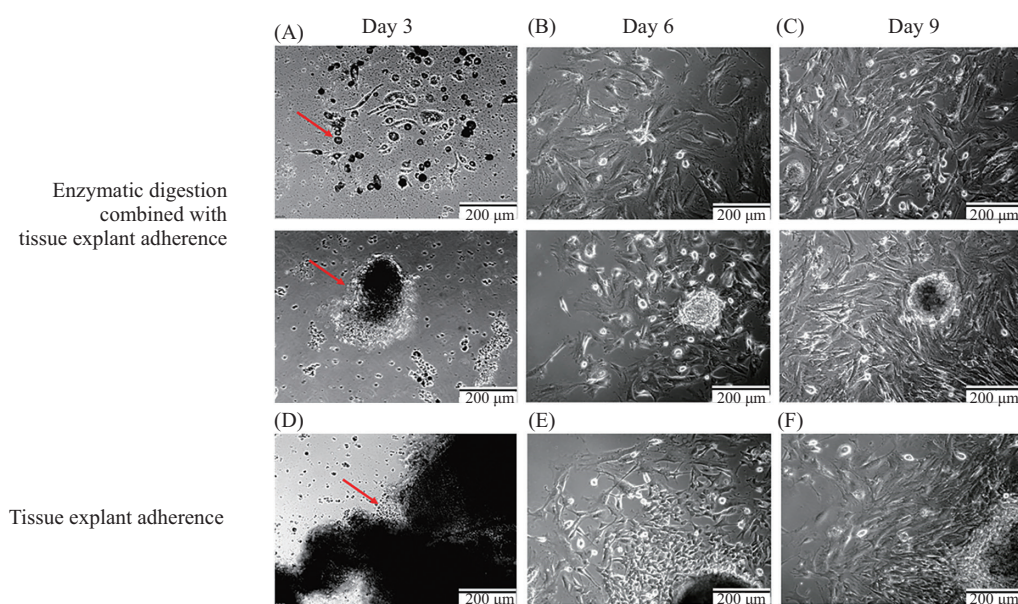
2.1.2 不同培养条件 通过优化小鼠原代结肠平滑肌细胞培养条件发现,不同年龄小鼠的细胞生长特性存在显著差异:4周龄、8周龄和24周龄小鼠在第6天均有细胞从组织块中爬出,在第9天,8周龄组细胞密度最高,细胞排列整齐且呈放射状生长;4周龄和

24周龄组细胞生长缓慢,且密度不均(图4)。进一步实验显示培养容器规格对细胞行为具有重要影响:较小培养皿(如6孔板)显著加快组织块贴壁和细胞融合进程,较之10 cm培养皿细胞爬出较慢(图5)。血清浓度梯度实验证实15%和20% FBS培养基能显著提升细胞增殖速率,相较于10% FBS组表现出更优的平滑肌细胞扩增效果,且细胞大多呈梭形(图6)。

2.1.3 不同酶消化时间对小鼠原代结肠平滑肌细胞存活率的影响 为了筛选出合适的酶消化时间,将酶消化时间分为30 min胶原酶+30 min胰蛋白酶、15 min胶原酶+45 min胰蛋白酶、45 min胶原酶+15 min胰蛋白酶、60 min胶原酶、60 min胰蛋白酶,对得到的结肠平滑肌细胞进行锥虫蓝染色实验,检测各组细胞的细胞存活率。结果发现,45 min胶原酶+15 min胰蛋白酶消化所得到的细胞存活率为 $93.33\% \pm 0.58\%$,明显高于其他四组的细胞存活率(图7)。

2.2 小鼠原代结肠平滑肌细胞的纯化与鉴定

2.2.1 细胞纯化 由于成纤维细胞和平滑肌细胞的贴壁时间不同,成纤维细胞的贴壁时间一般在10~30 min,平滑肌细胞的贴壁时间一般在1~4 h^[17]。

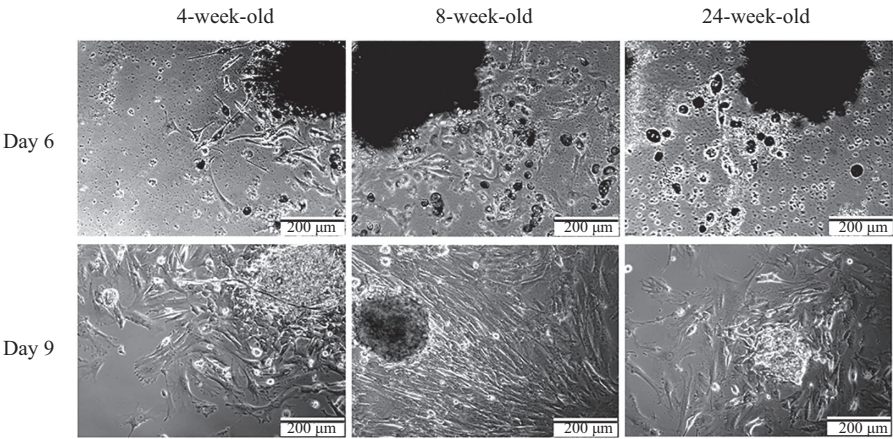


A~C: 酶消化法联合组织块贴壁法培养的小鼠原代结肠平滑肌细胞从第3天到第9天的生长状态,箭头所指的是平滑肌细胞; D~F: 组织块贴壁法培养的小鼠原代结肠平滑肌细胞从第3天到第9天的生长状态,箭头所指的是刚爬出的平滑肌细胞。

A~C: growth status of mouse primary colonic smooth muscle cells cultured by the enzyme digestion combined with tissue explant adherence from day 3 to day 9, with arrows indicating smooth muscle cells; D~F: growth status of mouse primary colonic smooth muscle cells cultured by the tissue explant method from day 3 to day 9, with arrows indicating newly migrated smooth muscle cells.

图3 不同培养方法下的小鼠原代结肠平滑肌细胞生长状态

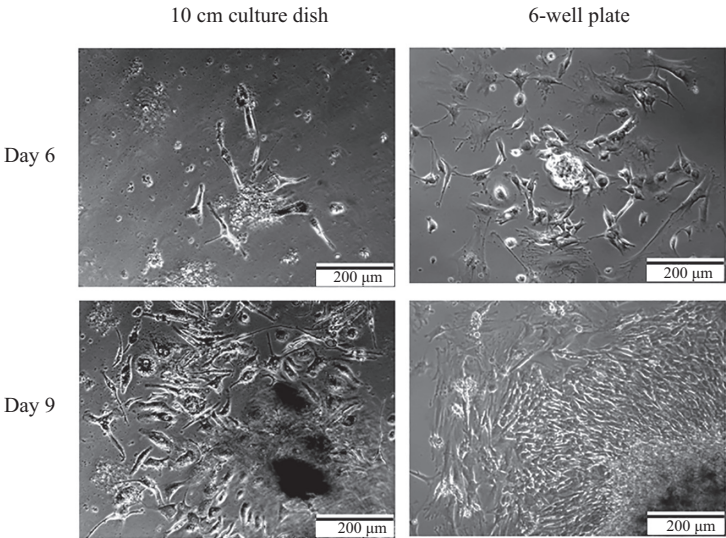
Fig.3 Growth status of primary mouse colonic smooth muscle cells under different culture methods



比较4周龄、8周龄和24周龄小鼠的平滑肌细胞融合速度与状态。
A comparison was conducted to evaluate the confluence rate and morphological status of smooth muscle cells from 4-, 8-, and 24-week-old mice.

图4 不同年龄小鼠的原代结肠平滑肌细胞

Fig.4 Primary colonic smooth muscle cells from mice of different ages



比较在不同规格的培养皿中平滑肌细胞的融合速度和状态。
The confluence rate and morphological status of smooth muscle cells cultured in culture dishes of different specifications were compared.

图5 小鼠原代结肠平滑肌细胞在不同规格培养皿中的生长状态

Fig.5 Growth status of primary mouse colonic smooth muscle cells cultured in culture dishes of different specifications

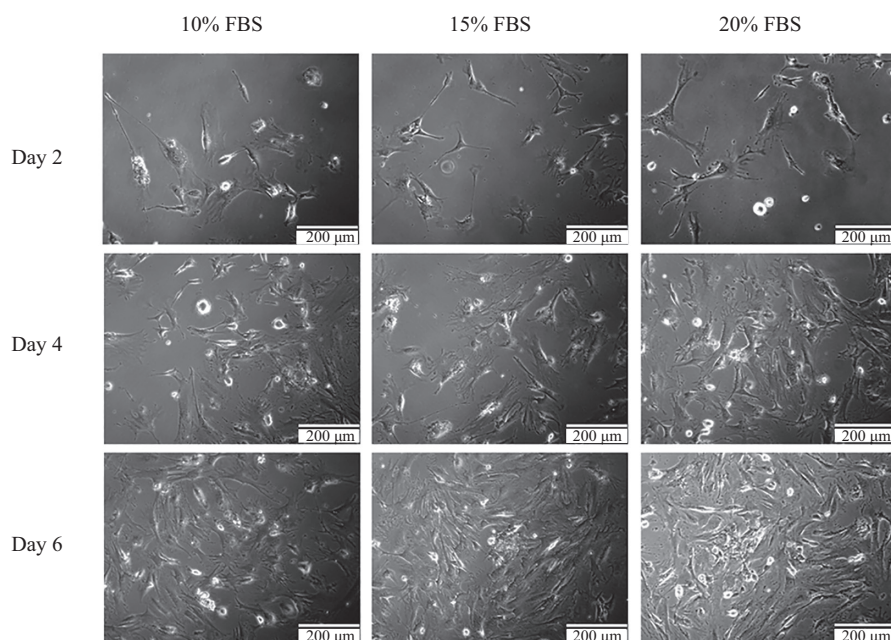
所以利用两者的贴壁时间差来纯化结肠平滑肌细胞。结肠平滑肌细胞与成纤维细胞的主要区别在于平滑肌细胞表达 α -SMA, 不表达或弱表达 vimentin, 但是成纤维细胞只表达 vimentin, 不表达 α -SMA^[18]。所以, 利用免疫荧光检测两种蛋白的表达对其纯度进行鉴定(图8)。

2.2.2 不同培养方法下的小鼠结肠平滑肌细胞的纯度鉴定 使用免疫荧光法对利用两种不同培养方法得到的结肠平滑肌细胞进行纯度鉴定, 随机选择3个不同的视野, 其中蓝色荧光为细胞核, 结肠平滑肌

细胞表现出绿色荧光; 分别计数每个视野中的蓝色荧光和绿色荧光的细胞数量, 细胞的纯度为(绿色荧光的细胞数量/蓝色荧光的细胞数量) $\times 100\%$ 。结果发现酶消化法联合组织块贴壁法的细胞纯度明显高于组织块贴壁法(94.52% $\pm 1.76\%$ vs 87.87% $\pm 2.48\%$, $P < 0.05$, 图9)。

2.3 小鼠原代结肠平滑肌细胞活力的测定

使用 CCK-8 法对纯化后的小鼠原代结肠平滑肌细胞的活力进行测定, 连续检测8天后绘制生长曲线, 结果显示, 随着时间的延长, 结肠平滑肌细胞的

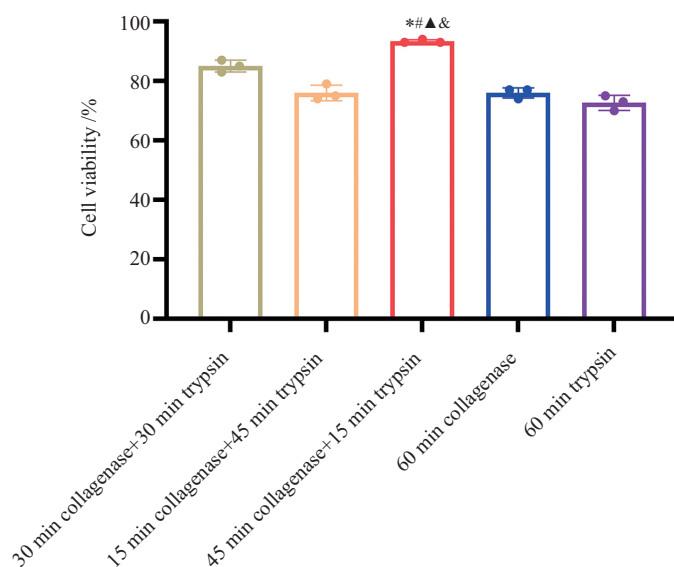


比较小鼠原代结肠平滑肌细胞在不同浓度FBS完全培养基中的融合速度。

A comparison was performed to evaluate the confluence rate of smooth muscle cells cultured in media with different concentrations of FBS.

图6 细胞在不同浓度培养基中的生长状态

Fig.6 Cell growth status in media of varying concentrations



利用锥虫蓝染色实验测定不同酶消化时间对小鼠结肠平滑肌细胞存活率的影响。平均值±标准差, * $P<0.05$, 与30 min胶原酶+30 min胰蛋白酶组相比; # $P<0.05$, 与15 min胶原酶+45 min胰蛋白酶组相比; Δ $P<0.05$, 与60 min胶原酶组相比; & $P<0.05$, 与60 min胰蛋白酶组相比。

Viability of mouse colonic smooth muscle cells after different enzymatic digestion treatments was determined by trypan blue staining. $\bar{x} \pm s$, * $P<0.05$ vs 30 min collagenase+30 min trypsin group; # $P<0.05$ vs 15 min collagenase+45 min trypsin group; Δ $P<0.05$ vs 60 min collagenase group; & $P<0.05$ vs 60 min trypsin group.

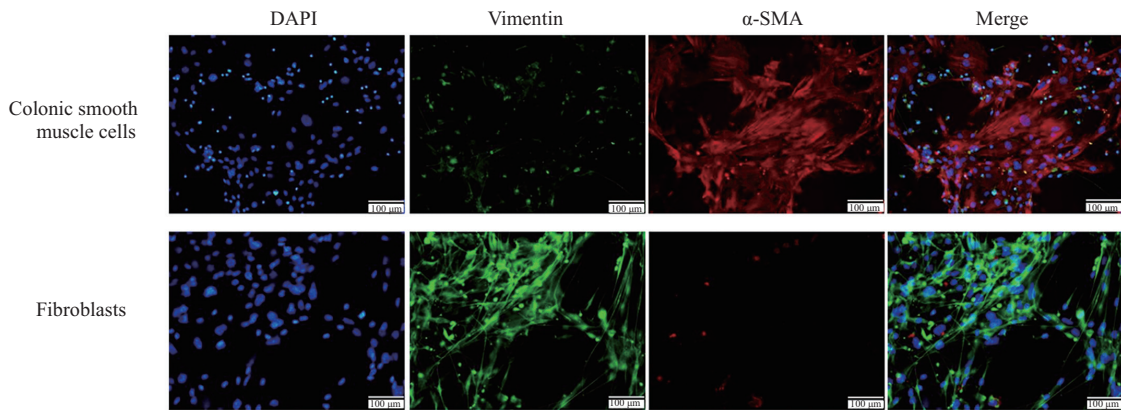
图7 不同消化方式下的小鼠结肠平滑肌细胞存活率

Fig.7 Survival rate of mouse colonic smooth muscle cells under different digestion methods

活力逐渐增加,直到第8天,细胞生长进入平缓期(图10)。这说明分离培养的小鼠原代结肠平滑肌细胞具有良好的增殖能力。

2.4 小鼠原代结肠平滑肌细胞功能的检测

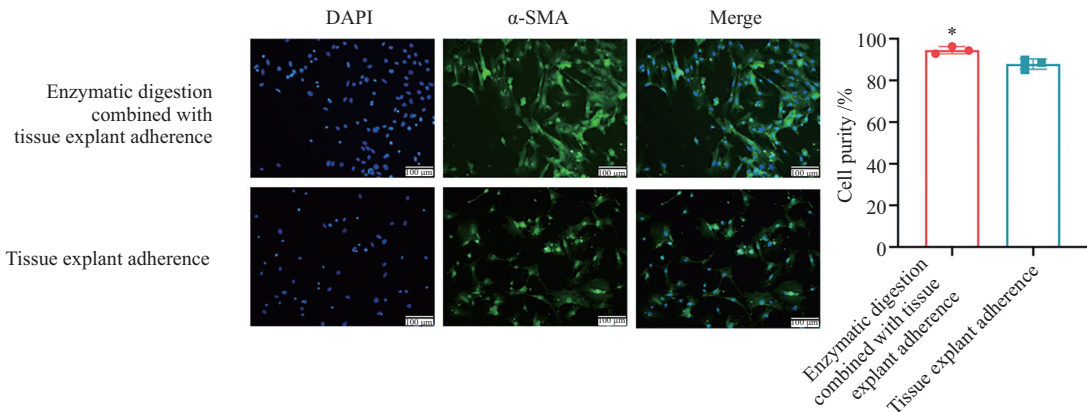
使用胶原凝胶构建小鼠结肠平滑细胞三维培养模型,待胶原凝固后,在 CO_2 培养箱中继续培养



免疫荧光法鉴定结肠平滑肌细胞和成纤维细胞中的 α -SMA和vimentin的表达。细胞核为蓝色荧光(DAPI); vimentin为绿色荧光; α -SMA为红色荧光。Immunofluorescence was performed to detect the expression of α -SMA and vimentin in colonic smooth muscle cells and fibroblasts. The cell nuclei are colored blue (DAPI); vimentin shows green fluorescence; α -SMA presents red fluorescence.

图8 结肠平滑肌细胞与成纤维细胞的鉴定

Fig.8 Identification of colonic smooth muscle cells and fibroblasts

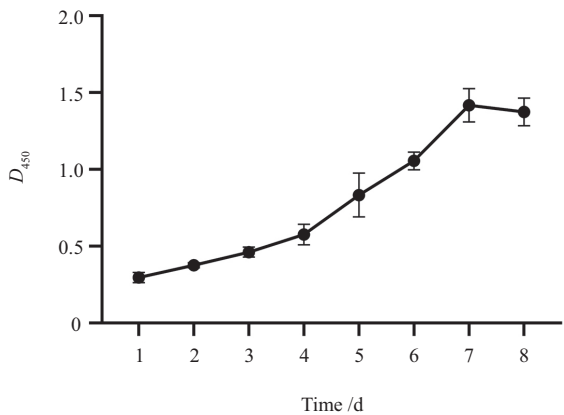


免疫荧光法鉴定在不同培养方法下培养出的结肠平滑肌细胞在纯化后的 α -SMA表达情况。细胞核为蓝色荧光(DAPI); α -SMA为绿色荧光。平均值 $\pm$ 标准差, * $P < 0.05$, 与组织贴壁法组相比。

Immunofluorescence was performed to identify and compare α -SMA expression in colonic smooth muscle cells following purification and culture with different methods. The cell nuclei are colored blue (DAPI); α -SMA shows green fluorescence. $\bar{x} \pm s$, * $P < 0.05$ compared with the tissue explant adherence group.

图9 不同培养方法下的小鼠原代结肠平滑肌细胞的纯度鉴定

Fig.9 Purity assessment of primary mouse colonic smooth muscle cells under different culture methods

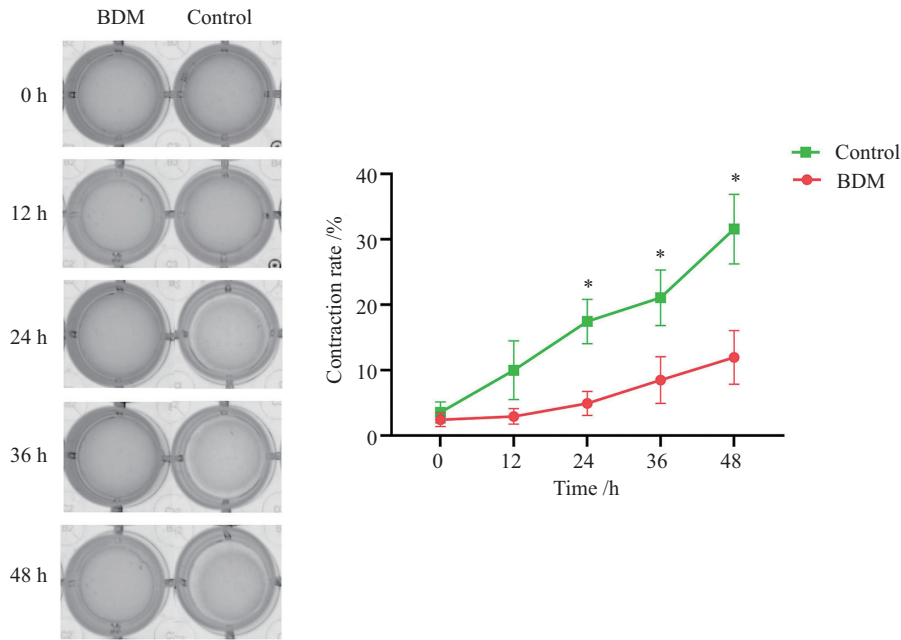


CCK-8法鉴定小鼠纯化后的小鼠结肠平滑肌细胞活力。

The CCK-8 assay was employed to assess the viability of purified mouse colonic smooth muscle cells.

图10 小鼠原代结肠平滑肌细胞的生长曲线

Fig.10 Growth curve of primary colonic smooth muscle cells in mice



胶原收缩实验比较BDM组和正常组的结肠平滑肌细胞收缩能力。平均数±标准差, * $P < 0.05$, 与BDM组相比。

A collagen contraction assay was performed to compare the contractility of colonic smooth muscle cells between the BDM group and the normal group. $\bar{x} \pm s$, * $P < 0.05$ compared with the BDM group.

图11 小鼠原代结肠平滑肌细胞的胶原收缩实验

Fig.11 Collagen contraction assay of mouse primary colonic smooth muscle cells

48 h, 在此期间, 结肠平滑肌细胞贴壁生长并逐渐产生机械负荷, 随后将细胞-胶原蛋白混合物与24孔板培养皿内壁分离, 开始悬浮培养, 此时细胞在无外部机械负荷和纤维应力的作用下进行收缩, 随着时间的延长, 正常对照组相较于BDM组, 胶原面积逐渐缩小, 在48 h的时候, 正常对照组能显著增强结肠平滑肌细胞的收缩能力($31.57\% \pm 5.32\%$ vs $11.96\% \pm 4.09\%$, $P < 0.05$, 图11)。

3 讨论

原代结肠平滑肌细胞的提取是细胞或分子技术研究的基础, 是研究细胞功能以及相应的细胞信号转导机制的基础, 对于深入理解结肠动力的生理机制以及相关疾病的病理机制具有重要意义^[14]。文献中关于结肠平滑肌细胞的原代培养研究较少, 且一般多选择大鼠进行细胞的提取和培养, 原因可能是小鼠的结肠组织较为脆弱, 在剥离平滑肌时, 组织极易因撕扯而破裂, 导致细胞受损^[19]。对于结肠平滑肌的分离与提取, 经常采用的是在显微镜下进行分离, 此方法虽能清楚观察到肌层, 但由于操作复杂且受限于实验室条件, 因此在实际应用中存在较大局限^[20]。所以, 本研究采用简单且有效的分离方法, 只

使用镊子对黏膜层和浆膜层刮除和剥离, 方法简单有效。目前提取原代结肠平滑肌细胞的培养方法主要是酶消化法或组织块贴壁法^[21]。两种方法各有其不足, 酶消化法操作步骤繁琐, 若消化时间控制不当易对细胞造成损伤, 使结肠平滑肌细胞体外功能维持困难; 同时得到的细胞数量较少, 容易影响实验进程^[22]。组织块贴壁法培养时间长, 细胞纯度低, 易造成成纤维细胞污染; 同时大多数细胞生长在组织块附近, 细胞生长易受到抑制^[23]。与血管平滑肌细胞和气道平滑肌细胞的原代培养相比, 结肠作为贮存粪便的场所, 在细胞培养中极易受到污染, 导致细胞提取失败^[24]。因此, 本文对现有的原代结肠平滑肌细胞提取方法加以改进, 建立了一套方便可行的培养方法, 为研究结肠平滑肌相关的病理生理及药物作用提供了细胞模型。

在细胞提取方法上, 本文主要采用酶消化法联合贴壁法, 主要使用的是胶原酶和胰蛋白酶。胶原酶可以特异性降解胶原蛋白(I、III、IV型)和部分弹性蛋白, 保留细胞间连接, 通过分解细胞外基质释放细胞^[25]。胰蛋白酶是一种丝氨酸蛋白酶, 可以特异性切割赖氨酸和精氨酸羧基端的肽键, 主要分解细胞间连接蛋白, 破坏细胞-细胞间连接^[26]。先使用胶

原酶消化, 胶原酶比较温和, 对细胞膜的损害较小, 并且先分解细胞外基质, 可以降低成纤维细胞的污染; 后使用胰蛋白酶进一步解离细胞团^[27-28]。将消化后得到的混合物同时进行培养, 未被解离的组织块可以使用贴壁法, 两个方法结合能够使得细胞的贴壁和生长速度更快, 同时明显加快细胞爬出速度, 提高结肠组织的利用率。利用差速贴壁法进行纯化后, 发现酶消化法联合组织块贴壁法比单纯的组织块贴壁法获取的细胞纯度显著提高。

小鼠的年龄与平滑肌细胞的活性相关, 随着年龄的增长, 平滑肌细胞的活性逐渐降低^[29]。在衰老的平滑肌细胞中肌纤维蛋白的表达发生改变, α -肌动蛋白和肌球蛋白表达水平下降, 肌动蛋白表达水平增加, 这种改变可能导致平滑肌收缩能力下降^[30]。4周龄小鼠的结肠平滑肌细胞虽然体外扩增能力较好, 但是结肠壁较薄, 提取原代细胞时要注意消化时间, 避免对细胞造成损伤^[31]。8周龄小鼠的结肠平滑肌细胞已完全分化, 收缩功能稳定, 对消化酶(如胶原酶、胰蛋白酶)的耐受性较好, 分离存活率高^[32-33]。所以, 为了进行后续实验, 可以优先选择8周龄的成年小鼠进行原代结肠平滑肌细胞的提取。此外, 为了提高细胞的生长速度, 又对实验所需的培养皿和血清浓度进行优化, 发现细胞在6孔板中的融合速度要比在10 cm的培养皿中快; 不同血清浓度的培养基对细胞的繁殖也有影响, 在含10% FBS的培养基中, 细胞生长缓慢, 在含20% FBS的培养基中细胞生长速度较快, 但是细胞培养环境容易被污染, 在含15% FBS的培养基中, 细胞增长速度稳定且不易被污染。通过免疫荧光鉴定和功能鉴定, 可以确认我们的小鼠原代结肠平滑肌细胞的培养方法是成功且可靠的。

本方法创新性地将酶消化法和贴壁法进行结合, 分别对离散的细胞和消化后的组织块同时进行培养, 增加小鼠原代结肠平滑肌细胞的数量, 减少结肠组织的消耗, 提高细胞纯度。本研究从小鼠年龄、细胞培养皿的规格和细胞培养基的血清浓度等方面优化小鼠原代结肠平滑肌细胞的培养条件, 建立了一套完备的小鼠原代结肠平滑肌细胞培养体系。

参考文献 (References)

[1] WANG Q, WANG J, TOKHTAEVA E, et al. An engineered living intestinal muscle patch produces macroscopic contractions

that can mix and break down artificial intestinal contents [J]. *Adv Mater*, 2023, 35: e2207255.

[2] SASIDHARAN A, PEETHAMBAR B A, KUMAR K S, et al. Advancing peristalsis deciphering in mouse small intestine by multi-parameter tracking [J]. *Commun Biol*, 2023, 6: 1237.

[3] 梁浩杰, 钱海华, 陈丹. 番泻叶治疗便秘作用机制的研究进展 [J]. 齐齐哈尔医学院学报(LIANG H J, QIAN H H, CHEN D. Research progress on the mechanism of Semen Cassiae in the treatment of constipation [J]. *Journal of Qiqihar Medical University*), 2023, 44: 1946-50.

[4] LU C, ZHU H, LU H, et al. Colonic dysmotility regulated by downregulation of PDGFR α cells/SK3 channel in DSS-induced colitis mice [J]. *PLoS One*, 2024, 19: e0312413.

[5] 李艳秋, 姚俊鹏, 鄢香芸, 等. 针刺治疗功能性便秘的机制研究进展 [J]. 针刺研究(LI Y Q, YAO J P, YAN X Y, et al. Research progress on the mechanism of acupuncture in treating functional constipation [J]. *Acupuncture Research*), 2024, 49: 79-87.

[6] SANDERS K M, DRUMM B T, COBINE C A, et al. Ca^{2+} dynamics in interstitial cells: foundational mechanisms for the motor patterns in the gastrointestinal tract [J]. *Physiol Rev*, 2024, 104: 329-98.

[7] YANG H, HOU C, XIAO W, et al. The role of mechanosensitive ion channels in the gastrointestinal tract [J]. *Front Physiol*, 2022, 13: 904203.

[8] WU Z, WANG Q, YANG F, et al. Functional and transcriptomic characterization of postnatal maturation of ENS and SIP syncytium in mice colon [J]. *Biomolecules*, 2023, 13(12): 1688.

[9] LIU D, MAO M, LIU W, et al. The role of the TRPV4 channel in intestinal physiology and pathology [J]. *J Inflamm Res*, 2024, 17: 9307-17.

[10] DALZIEL J E, SPENCER N J, YOUNG W. Microbial signaling in colonic motility [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2021, 134: 105963.

[11] WEN J, ZHAO Y, HUANG C, et al. Estrogen inhibits colonic smooth muscle contractions by regulating BK β 1 signaling [J]. *PLoS One*, 2023, 18: e0294249.

[12] LI K, WU J, XU S, et al. Rosmarinic acid alleviates intestinal inflammatory damage and inhibits endoplasmic reticulum stress and smooth muscle contraction abnormalities in intestinal tissues by regulating gut microbiota [J]. *Microbiol Spectr*, 2023, 11: e0191423.

[13] KACMAZ H, ALTO A, KNUTSON K, et al. A simple automated approach to measure mouse whole gut transit [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2021, 33: e13994.

[14] YU T, ZHANG L, WANG Y, et al. Effect of visfatin on K_{ATP} channel upregulation in colonic smooth muscle cells in diabetic colon dysmotility [J]. *Aging*, 2022, 14: 1292-306.

[15] LIU Q, LIU Z, GU H, et al. Comparative study of differentiating human pluripotent stem cells into vascular smooth muscle cells in hydrogel-based culture methods [J]. *Regen Ther*, 2023, 22: 39-49.

[16] BHARADWAJ A, SHARMA J, SINGH J, et al. Musculoskeletal defects associated with myosin heavy chain-embryonic loss of function are mediated by the YAP signaling pathway [J]. *EMBO Mol Med*, 2023, 15: e17187.

[17] 赵爱玲, 姚冬. 改良组织块贴壁法培养小鼠气道平滑肌细胞及鉴定 [J]. 医学研究与战创伤救治(ZHAO A L, YAO D. Cul-

- tivation and identification of mouse airway smooth muscle cells using modified tissue explant adherence method [J]. *Journal of Medical Research and Combat Trauma Care*, 2023, 36: 225-30.
- [18] DERHAMBKSH S, MOHAMMADI J, SHOKRGOZAR M A, et al. Investigation of electrical stimulation on phenotypic vascular smooth muscle cells differentiation in tissue-engineered small-diameter vascular graft [J]. *Tissue Cell*, 2023, 81: 101996.
- [19] SOKOL L, GELDHOF V, GARCÍA-CABALLERO M, et al. Protocols for endothelial cell isolation from mouse tissues: small intestine, colon, heart, and liver [J]. *STAR Protoc*, 2021, 2: 100489.
- [20] 任晓洁, 贾冰涵, 李金钊, 等. μ 阿片受体在大鼠结肠平滑肌细胞中的表达[J]. *安徽医科大学学报*(REN X J, JIA B H, LI J Z, et al. Expression of μ -opioid receptor in rat colonic smooth muscle cells [J]. *Journal of Anhui Medical University*), 2023, 58: 772-9.
- [21] 于朋鑫, 韩禹秋, 郭丽娜, 等. 大鼠肠道平滑肌胶原条构建及周期性拉伸培养的体外评价[J]. *中国组织工程研究*(YU P X, HAN Y Q, GUO L N, et al. Construction of collagen strips from rat intestinal smooth muscle and *in vitro* evaluation under cyclic stretch culture [J]. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*), 2024, 28: 5630-5.
- [22] GARCÍA-MUÑOZ E, VIVES J. Towards the standardization of methods of tissue processing for the isolation of mesenchymal stromal cells for clinical use [J]. *Cytotechnology*, 2021, 73: 513-22.
- [23] YI X, CHEN F, LIU F, et al. Comparative separation methods and biological characteristics of human placental and umbilical cord mesenchymal stem cells in serum-free culture conditions [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11: 183.
- [24] HECKING I, STEGEMANN L N, STAHLKE S, et al. Methods to study the myenteric plexus of rat small intestine [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2023, 43: 315-25.
- [25] VILLEGAS M R, BAEZA A, USATEGUI A, et al. Collagenase nanocapsules: an approach to fibrosis treatment. [J]. *Acta Biomater*, 2018, 74: 430-8.
- [26] 冯贤驹, 陈辉, 贾永宏, 等. 秦川牛成纤维细胞的分离培养体系优化[J]. *生物学杂志*(FENG X Z, CHEN H, JIA Y H, et al. Optimization of the isolation and culture system for fibroblasts from Qinchuan cattle [J]. *Journal of Biology*), 2024, 41: 110-5.
- [27] 宋易航, 王楚浩, 方柏山. 胶原酶研究进展与应用[J]. *化工学报*(SONG Y H, WANG C H, FANG B S. Research progress and applications of collagenase [J]. *Journal of Chemical Industry*), 2019, 70: 3213-27.
- [28] 王仕宇, 李博通, 刘佳玮, 等. 原代奶牛子宫内膜上皮细胞体外培养方法的改进[J]. *中国畜牧兽医*(WANG S Y, LI B T, LIU J W, et al. Improvement of the *in vitro* culture method for primary dairy cow endometrial epithelial cells [J]. *Chinese Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*), 2020, 47: 958-64.
- [29] QIU L, LIU X, XIA H, et al. Downregulation of P300/CBP-associated factor protects from vascular aging via Nrf2 signal pathway activation [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(20): 12574.
- [30] NAGAYAMA K, NOGAMI K, SUGANO S, et al. Dedifferentiation- and aging-induced loss of mechanical contractility and polarity in vascular smooth muscle cells: Heterogeneous changes in macroscopic and microscopic behavior of cells in serial passage culture [J]. *J Mech Behav Biomed Mater*, 2024, 160: 106744.
- [31] 刘晓东, 彭利兰, 龙征荣, 等. 日龄对小鼠结肠组织形态和杯状细胞数量的影响研究[J]. *四川畜牧兽医*(LIU X D, PENG L L, LONG Z R, et al. Effect of age on the histomorphology and goblet cell number in the mouse colon [J]. *Sichuan Animal Science and Veterinary Medicine*), 2021, 48: 25-6,31.
- [32] 杨梦, 陆红丽, 黄旭, 等. 白藜芦醇对小鼠结肠运动的抑制作用和机制研究[J]. *上海交通大学学报(医学版)*(YANG M, LU H L, HUANG X, et al. Inhibitory effect and mechanism of resveratrol on colonic motility in mice [J]. *Journal of Shanghai Jiao Tong University, Medical Edition*), 2020, 40: 180-7.
- [33] MUHL L, MOCCI G, PIETILÄ R, et al. A single-cell transcriptomic inventory of murine smooth muscle cells [J]. *Dev Cell*, 2022, 57: 2426-43,e6.