

· 研究论文 ·

# 心肌梗死后周细胞向致病性成纤维细胞亚群 转分化的谱系示踪研究

顾千瑜 陈海婷 谢峻\*

(南京大学医学院, 南京 210093)

**摘要** 该文基于双转基因谱系示踪技术, 探究心肌梗死后周细胞能否转分化为致病性成纤维细胞F-Act亚群, 以揭示其在心室不良重塑中的作用。利用CRISPR/Cas9技术构建*Cspg4*<sup>CreERT2/+</sup>基因敲入小鼠, 然后将其与*Rosa26*<sup>loxP-tdTomato-loxP-GFP/+</sup>报告小鼠杂交, 建立他莫昔芬诱导的周细胞谱系示踪模型。通过永久性结扎左冠状动脉前降支构建小鼠心肌梗死模型, 分别于术前及术后7、14、28天获取心脏组织, 以CD248作为晚期活化成纤维细胞F-Act亚群特异性标志物, 采用多色免疫荧光染色及共聚焦显微镜观察周细胞衍生细胞的表型特征。基因型鉴定及免疫荧光验证结果显示, 该模型可实现心脏周细胞的高效、特异性谱系标记。心肌梗死后, 梗死边缘区GFP阳性细胞数量呈时间依赖性增加, 且大量GFP阳性细胞与CD248阳性细胞呈现明确共定位, 证实周细胞来源的细胞表达F-Act亚群特征性标志物。该研究表明, 在心肌梗死修复成熟期, 周细胞能够转分化为致病性成纤维细胞F-Act亚群, 该过程可能参与心室不良重塑与慢性纤维化进展, 为阐释心肌梗死后纤维化机制提供了新的细胞来源依据。

**关键词** 心肌梗死; 周细胞; 成纤维细胞; 转分化; 谱系示踪

## Lineage Tracing Evidence of Pericyte Transdifferentiation into a Pathogenic Fibroblast Subpopulation after Myocardial Infarction

GU Qianyu, CHEN Haiting, XIE Jun\*

(Medical School of Nanjing University, Nanjing 210093, China)

**Abstract** This study aims to investigate whether pericytes can transdifferentiate into the pathogenic fibroblast subset F-Act after MI (myocardial infarction) and to elucidate their role in adverse ventricular remodeling using a double transgenic lineage tracing system. *Cspg4*<sup>CreERT2/+</sup> knock-in mice were generated using CRISPR/Cas9 technology and crossed with *Rosa26*<sup>loxP-tdTomato-loxP-GFP/+</sup> reporter mice to establish a tamoxifen-inducible pericyte lineage tracing model. Myocardial infarction was induced by permanent ligation of the left anterior descending coronary artery. Heart tissues were collected before MI and at 7, 14, and 28 days post-MI. Multicolor immunofluorescence staining was performed using CD248 as a specific marker for the late-activated fibroblast subset F-Act, and the phenotypic characteristics of pericyte-derived cells were observed by confocal microscopy. Genotyping and immunofluorescence validation

收稿日期: 2025-10-20

接受日期: 2026-03-11

国家自然科学基金(批准号: 82370305)和国家自然科学基金青年科学基金(批准号: 82500354)资助的课题

\*通信作者。E-mail: xiejun@ahmu.edu.cn

Received: October 20, 2025

Accepted: March 11, 2026

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.82370305) and the National Natural Science Foundation of China Young Scientists Fund (Grant No.82500354)

\*Corresponding author. E-mail: xiejun@ahmu.edu.cn

confirmed that the model achieved efficient and specific lineage labeling of cardiac pericytes. Following MI, a time-dependent increase in GFP<sup>+</sup> cells were observed in the infarct border zone, with a substantial proportion of GFP<sup>+</sup> cells exhibiting clear co-localization with CD248<sup>+</sup> cells, demonstrating that pericyte-derived cells express the characteristic marker of the F-Act subset. This study demonstrates that during the maturation phase of myocardial infarction repair, pericytes can transdifferentiate into the pathogenic fibroblast subset F-Act. This process may contribute to adverse ventricular remodeling and chronic fibrosis progression, providing a novel cellular source for understanding the mechanisms underlying post-MI fibrosis.

**Keywords** myocardial infarction; pericytes; fibroblasts; transdifferentiation; lineage tracing

心肌梗死(myocardial infarction, MI)是我国常见的高致死性心血管疾病, 尽管急诊介入治疗的普及已显著降低急性期死亡率, 但心肌梗死后的组织修复障碍与心室重构仍然是影响患者远期预后的主要因素<sup>[1]</sup>。其中, 心脏纤维化是心室重构的核心病理改变<sup>[2-3]</sup>, 成纤维细胞在这一过程中发挥关键作用。

在心肌梗死后的组织修复过程中, 成纤维细胞经历明显的阶段性表型演变。在炎症期, 成纤维细胞与免疫细胞相互作用, 分泌多种细胞因子与趋化因子, 参与调控炎症反应<sup>[4-6]</sup>; 同时通过表达基质金属蛋白酶介导细胞外基质的降解。在增殖期, 成纤维细胞分化为肌成纤维细胞(myofibroblast, F-MFC), 其特征为高表达成纤维细胞激活标记Periostin和 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA), 获得收缩表型, 并大量合成胶原和细胞外基质成分, 促进修复性纤维化和疤痕形成<sup>[7-8]</sup>。进入成熟期后, 基质逐渐交联稳定, 肌成纤维细胞数量减少<sup>[9]</sup>, 而另一亚群成纤维细胞——晚期活化成纤维细胞亚群(F-Act)——在梗死周围区持续活化并促进胶原沉积。该亚群高表达Periostin, 不表达 $\alpha$ -SMA, 并以CD248(又名TEM1)为其特异性表面标志物, 与心肌梗死后的慢性纤维化进程和病理性重塑密切相关<sup>[10-12]</sup>。然而, F-Act亚群的细胞起源至今仍未明确。

周细胞作为血管微环境中的关键细胞组分, 包绕于毛细血管壁, 并延伸至微静脉及血管外膜, 在维持微血管结构及功能完整性中起重要作用<sup>[13-15]</sup>。多项研究显示, 在肾、肺等器官的纤维化模型中, 周细胞表现出显著的可塑性, 能够转分化为成纤维细胞及肌成纤维细胞, 直接参与纤维化进程<sup>[16-18]</sup>。心脏领域的研究提示, 在心肌梗死早期, 周细胞可获得纤维化表型, 并表达成纤维细胞相关标志物<sup>[19-20]</sup>。然而, 在心肌梗死的增殖期及成熟期, 周细胞是否能够继续分化并最终成为F-Act亚群的一部分, 目前尚不清楚。因此, 系

统探讨周细胞在心肌梗死后的动态分化命运, 对阐释心脏纤维化的细胞机制具有重要科学意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 本研究选用SPF级C57BL/6J背景小鼠, 将其饲养于中国科学院合肥肿瘤医院动物实验中心SPF级动物屏障设施[温度(23±1) °C, 湿度(55±5)%, 12 h光暗循环]中。*Cspg4*<sup>CreERT2/+</sup>(*Cspg4-CreERT2*)基因编辑小鼠(批号: T006187)购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司, 通过CRISPR/Cas9技术将*CreERT2*序列定点整合至小鼠*Cspg4*基因起始密码子ATG下游, 实现周细胞特异性Cre重组酶表达; *Rosa26*<sup>loxP-tdTomato-loxP-GFP/+</sup>(*Rosa26-tdTomato*)荧光报告小鼠(批号: JAX007909)购自上海南方模式生物研究中心。通过杂交*Cspg4-CreERT2*杂合子与*Rosa26-tdTomato*纯合子, 筛选获得双转基因子代(基因型: *Cspg4*<sup>CreERT2/+</sup>; *Rosa26*<sup>loxP-tdTomato-loxP-GFP/+</sup>), 经PCR验证基因型后, 连续7天腹腔注射他莫昔芬(20 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), 诱导Cre重组酶激活绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)荧光标记。实验动物自由摄食灭菌饲料及无菌水。

本研究所有动物实验操作均经中国科学院合肥肿瘤医院实验动物伦理委员会审查批准(批准号: DWLLPF-2024040801), 并严格遵循国家卫生健康委员会《实验动物管理条例》及ARRIVE指南进行。在实验过程中最大限度地减少动物使用数量并减轻其痛苦。

1.1.2 主要试剂 他莫昔芬(货号: 579000)购自美国Sigma公司; OCT冷冻切片包埋剂(货号: 4583)购自日本Sakura公司; 一步法鼠基因型鉴定试剂盒(货号: 24601)、SafeRed核酸染料(货号: 41101)购自上海吐露港生物科技有限公司; 三色预染蛋白

Marker(10~180 kDa)(货号: GF6617)购自上海积福生命科学有限公司; 通用型组织固定液(货号: G1101)、PBS缓冲液(货号: G4202)、蔗糖(货号: GC205014)、高纯度低电渗琼脂糖(货号: GC205013)、50× TAE电泳液(货号: G3001)、DL2000 DNA标记物(货号: G3378)、HRP标记的山羊抗兔IgG(货号: GB23303)、HRP标记的山羊抗小鼠IgG(货号: GB23301)、Tris-甘氨酸SDS-PAGE蛋白电泳缓冲液(货号: G2018)、Tris-甘氨酸转膜缓冲液(货号: G2163)、TBST(Tris-buffered saline with Tween 20)缓冲液(货号: G0004)购自武汉赛维尔生物科技有限公司; DAPI/Hoechst核酸染料(货号: H1399)、SuperSignal West Pico PLUS(货号: 34577)、PDGFR $\beta$ 单克隆抗体(货号: MA5-15143)、Cyanine3标记的山羊抗兔IgG(货号: A10520)、Cyanine3标记的山羊抗小鼠IgG(货号: A10521)购自美国ThermoFisher Scientific公司;  $\alpha$ -tubulin(货号: 2144)购自美国Cell Signaling Technology公司; TEM1抗体(货号: sc-377221)购自美国Santa Cruz公司; NG2抗体(货号: ab129051)购自英国Abcam公司。

**1.1.3 主要设备** 水平电泳槽、垂直电泳槽、电泳仪、转印槽、制胶槽、凝胶成像仪购自美国Bio-Rad公司; 多功能读板机、普通PCR仪购自美国ThermoFisher Scientific公司; 共聚焦显微镜购自德国Zeiss公司; 小动物呼吸机购自上海玉研科学仪器有限公司; 冰冻切片机、组织脱水机、石蜡组织包埋机、石蜡组织切片机购自德国Leica公司; 小动物超声多普勒诊断仪购自苏州飞依诺科技有限公司; 组织匀浆机购自深圳瑞沃德生命科技有限公司; 全自动染色机购自深圳达科为生物科技股份有限公司; 全景玻片扫描仪购自日本Olympus公司。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 基因鉴定** 本研究通过鼠尾基因组DNA提取结合PCR扩增技术进行基因型鉴定。具体流程如下: 实验小鼠经异氟烷吸入麻醉后, 剪取长为2~3 mm的尾尖组织并将其置于1.5 mL离心管中, 加入200  $\mu$ L组织裂解缓冲液及4  $\mu$ L蛋白酶K, 涡旋振荡混匀后于55  $^{\circ}$ C水浴裂解30 min, 95  $^{\circ}$ C金属浴5 min灭活蛋白酶K, 随后于4  $^{\circ}$ C、12 000  $\times$ g离心5 min, 取上清, -20  $^{\circ}$ C保存备用。PCR反应体系(20  $\mu$ L): 10  $\mu$ L 2 $\times$  PCR Mix、7  $\mu$ L DPEC水、10  $\mu$ mol/L特异性引物(表1)各0.5  $\mu$ L、2  $\mu$ L DNA模板。扩增程序: 94  $^{\circ}$ C预变性5 min; 随后进行35个循环的扩

增反应, 循环参数: 94  $^{\circ}$ C变性30 s, 58  $^{\circ}$ C退火30 s, 72  $^{\circ}$ C延伸45 s; 循环结束后于72  $^{\circ}$ C终延伸7 min。将扩增产物用1.5%琼脂糖凝胶(含0.01% GelRed核酸染料)于1 $\times$  TAE缓冲液中电泳(100 V、50 min), 以DL2000 DNA标记物为参照, 通过凝胶成像系统采集条带, 并根据条带大小判定目的基因型。

**1.2.2 心肌梗死模型构建** 本研究选用SPF级C57BL/6J背景双转基因小鼠(*Cspg4<sup>CreERT2/+</sup>*; *Rosa26<sup>loxP-tdTomato-loxP-GFP/+</sup>*), 连续7天腹腔注射他莫昔芬(20 mg/kg, 玉米油:无水乙醇=9:1), 含他莫昔芬的无水乙醇与玉米油的混合液经超声乳化混悬后, 于每日固定时间段腹腔注射以激活Cre重组酶。末次注射48 h后, 使用3%异氟烷麻醉小鼠, 剃除手术区域毛发, 充分暴露操作视野。从左侧第4肋间逐层切开皮肤及肌层, 钝性分离心包膜暴露左前降支, 使用7-0缝线于左心耳下缘1~2 mm处行永久性结扎。以观察到左心室前壁苍白及室壁运动减弱为模型成功标准。术后以6-0丝线缝合肋间肌, 4-0可吸收缝线缝合皮肤。术后, 通过皮下注射布托啡诺(0.1 mg/kg)对小鼠进行镇痛处理, 并将其置于37  $^{\circ}$ C恒温垫上直至其恢复自主呼吸。

**1.2.3 心脏冰冻切片** 断颈处死小鼠后暴露胸腔, PBS灌注心脏去除多余血液及多余组织, 4%多聚甲醛4  $^{\circ}$ C固定2~4 h。用PBS清洗心脏组织3次, 每次5 min, 后置于30%蔗糖溶液中, 4  $^{\circ}$ C脱水过夜。脱水完成后, 用OCT冷冻切片包埋剂包埋心脏组织, 4  $^{\circ}$ C静置2~4 h后, 置于-80  $^{\circ}$ C冷冻保存。切片时, 将组织固定于冰冻切片机上, 调整切片厚度为5  $\mu$ m; 将切片贴附于载玻片后, -20  $^{\circ}$ C保存备用。

**1.2.4 免疫荧光染色** 将冰冻切片置于室温中复温20~30 min, 用PBS清洗多余的OCT冷冻切片包埋剂, 每次5 min, 共3次。用免疫组化笔圈出组织, 在组织表面用10%山羊血清室温封闭1 h。倒掉封闭液, 用10%山羊血清按比例稀释一抗后敷于组织表面, 4  $^{\circ}$ C过夜。PBS清洗一抗孵育后的组织, 共3次, 每次5 min。用PBS稀释荧光二抗(1:1 000)和DAPI(0.1  $\mu$ g/mL)至合适浓度, 将上述混合液敷于组织表面, 室温孵育2 h。随后用PBS清洗二抗, 每次5 min, 共3次。用50%甘油封片, 置于共聚焦显微镜下观察。一抗稀释比例如下: Periostin 1:200, TEM1 1:1 000, NG2 1:1 000, PDGFR $\beta$  1:1 000。

**1.2.5 心脏组织蛋白样品制备** 取小鼠心脏组织, 加入300  $\mu$ L含蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液, 通过预冷

表1 PCR扩增的引物序列

Table 1 Primer sequences for PCR amplification

基因 Gene	引物编号 Primer No.	序列(5'→3') Sequences (5'→3')	条带大小/基因型 Band size/genotype
<i>Cre</i>	T006187-F1A	AAA TCT AAG CGC GGG TCT GGC	Homozygous mutant: 506 bp
	T006187-R1A	CGG ACC GAC GAT GAA GCA TGT	Heterozygous: 506 bp+352 bp
	T006187-F2	AAA TCT AAG CGC GGG TCT GGC	Wild-type: 352 bp
	T006187-R2	GGA CCA TGA GTG CAG TCC CCA TA	
<i>Rosa26-tdTomato</i>	Rosa26-F1A	CTC TGC TGC CTC CTG GCT TCT	Homozygous mutant: 250 bp
	Rosa26-R1A	CGA GGC GGA TCA CAA GCA ATA	Heterozygous: 250 bp+330 bp
	Rosa26-wt-F1	CTC TGC TGC CTC CTG GCT TCT	Wild-type: 330 bp
	Rosa26-wt-R1	TCA ATG GGC GGG GGT CGT T	

的组织匀浆机充分匀浆后,将其置于冰上静置30 min,在4 °C下以8 000 ×g离心15 min,获取上清。采用BCA试剂盒测定样品蛋白浓度后,按比例加入5×上样缓冲液,混匀后于100 °C煮沸5 min,使蛋白变性。

**1.2.6 Western blot** 取含20~30 μg总蛋白的样品于制备好的SDS-PAGE凝胶(浓缩胶: 80 V、40 min; 分离胶: 120 V、1 h)中进行分离。电泳结束后,采用湿法转膜。转膜条件: 恒流(300 mA)转膜120 min,转膜过程在冰浴中进行。转膜结束后,将PVDF膜置于5%脱脂牛奶中室温封闭1~2 h。封闭后,使用稀释后的一抗(稀释比例为1:2 000)于4 °C孵育过夜。次日经过TBST清洗3次后,加入对应的二抗(稀释比例为1:2 000),室温孵育1~2 h。最后经TBST洗涤3次后加入ECL化学发光液,置于凝胶成像系统中采集图像。

**1.2.7 天狼星红染色** 取心脏组织石蜡切片,常规脱蜡后,浸泡于0.1%天狼星红-苦味酸溶液中,室温孵育60 min。染色后以0.5%冰醋酸快速洗涤以去除背景着色,随后经梯度乙醇脱水[70%乙醇处理2 min, 80%乙醇处理2 min, 90%乙醇处理2 min, 100%乙醇处理2 min(2次)]、二甲苯透明(二甲苯处理5 min, 2次)后,采用中性树胶封片。采用全景玻片扫描仪采集图像。

**1.2.8 小鼠超声心动图** 5%异氟烷诱导麻醉后,将小鼠固定在心超平板上,并用1.5%~2.0%异氟烷维持麻醉;去除小鼠胸前区毛发后,用超声探头测量小鼠心脏左室长轴与短轴切面,分别测量收缩期和舒张期的室间隔厚度(interventricular septum, IVS)、左心室内径(left ventricular internal dimension, LVID)、左心室后壁厚度(left ventricular posterior wall thickness, LVPW)、射血分数(ejection fraction, EF)、缩短分数(fractional shortening, FS)。

**1.2.9 数据分析** 所有计量数据均使用GraphPad Prism 9.5软件进行统计分析。数据首先进行Shapiro-Wilk正态性检验。符合正态分布的两组间比较采用非配对 $t$ 检验;多组间比较采用单因素方差分析,若方差齐性,事后多重比较选用Tukey检验。数据以均数±标准误(mean±SEM)表示, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

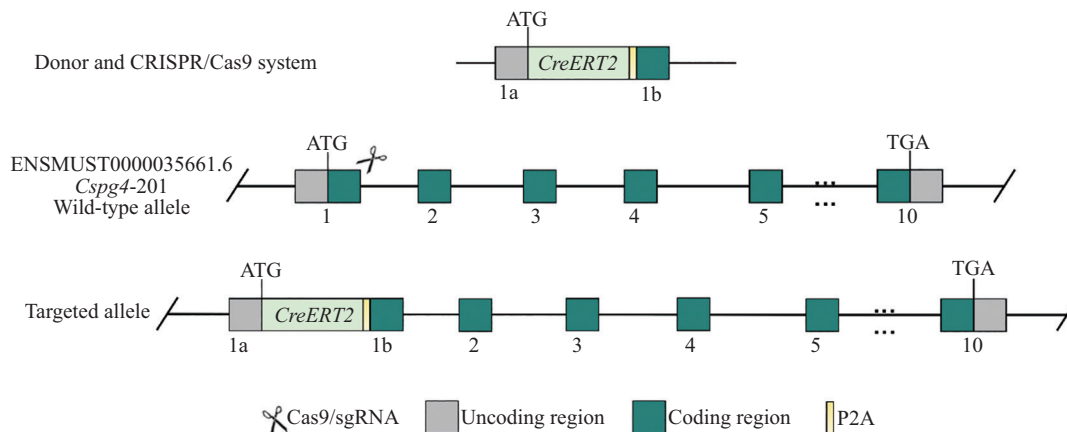
## 2 结果

### 2.1 周细胞谱系示踪小鼠的基因型验证与基础心功能评估

为了探究周细胞在小鼠体内的增殖和分化情况,本研究将*Rosa26-tdTomato*小鼠与*Cspg4-CreERT2*小鼠杂交,构建了*Cspg4-CreERT2;Rosa26-tdTomato*(Cre/LSL)双阳性谱系示踪鼠。通过他莫昔芬诱导,促使Cre剪切酶去除FLOX区域,进而使*Cspg4*<sup>+</sup>细胞特异性表达GFP荧光示踪蛋白(图1)。在本研究中Cre/LSL谱系示踪鼠被选定为研究对象。

为筛选用于后续实验的小鼠,本研究对小鼠基因型实施琼脂糖凝胶电泳予以验证,电泳结果如图2所示,编号3、6、10的样本是*Cspg4-CreERT2*单阳性小鼠,编号5、7的样本为*Rosa26-tdTomato*单阳性小鼠,编号1、2、4、8、9的样本是*Cspg4-CreERT2;Rosa26-tdTomato*双阳性小鼠。因此,编号1、2、4、8、9的小鼠可用于后续实验。

经他莫昔芬诱导后,采用高分辨率超声心动图评估Cre/LSL组小鼠的心脏功能(图3)。检测结果显示,在生理稳态条件下,Cre/LSL组小鼠左心室舒张末期后壁厚度(left ventricular posterior wall thickness at end-diastole, LVPWd)为(0.749±0.022) mm,左心室舒张末期内径(left ventricular internal dimension at end-

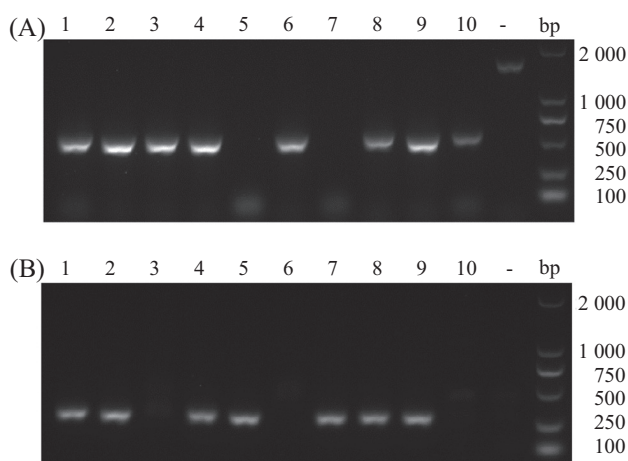


数字1~10代表*Cspg4*基因的外显子; 1a和1b分别代表用于同源重组的1号外显子的5'端和3'端片段(同源臂)。

Numbers 1-10 denote the exons of the wild-type *Cspg4* allele. 1a and 1b denote the 5' and 3' fragments of exon 1 used for homologous recombination (homology arms), respectively.

图1 基因编辑原理图

Fig.1 Schematic diagram of gene editing



A: *Cspg4-CreERT2*基因型鉴定代表图; B: *Rosa26-tdTomato*基因型鉴定代表图。数字1~10代表小鼠编号,“-”代表阴性对照。

A: representative image of *Cspg4-CreERT2* genotyping; B: representative image of *Rosa26-tdTomato* genotyping. Numbers 1-10 indicate individual mouse numbers, and “-” indicates negative control.

图2 Cre/LSL转基因小鼠基因型检测

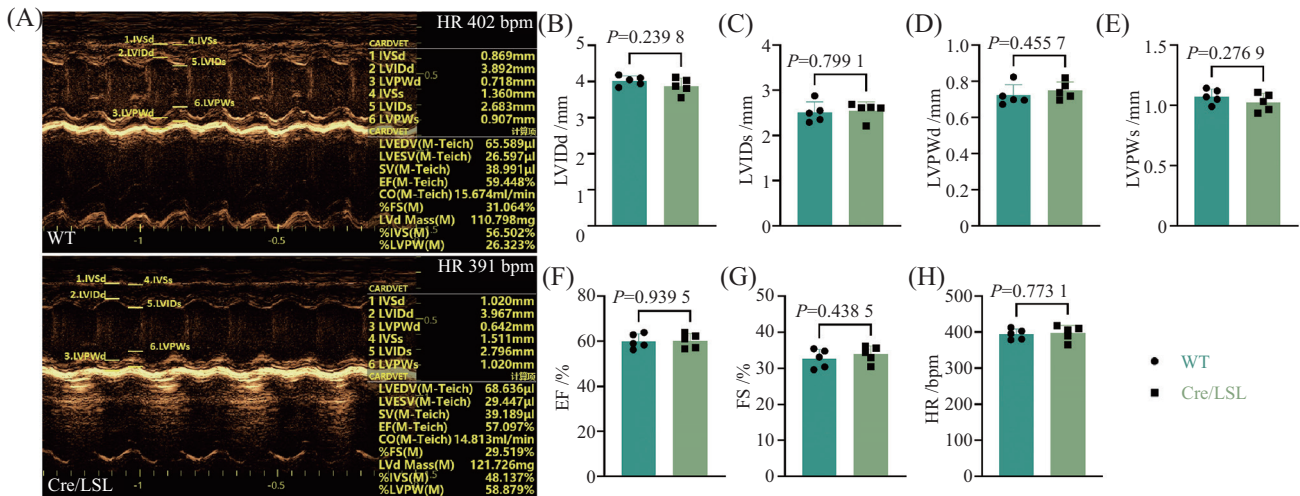
Fig.2 Genotyping of Cre/LSL transgenic mice

diastole, LVIDd)为 $(3.879 \pm 0.098)$  mm, 左心室收缩末期后壁厚度(left ventricular posterior wall thickness at end-systole, LVPWs)为 $(1.025 \pm 0.033)$  mm, 左心室收缩末期左室内径(left ventricular internal dimension at end-systole, LVIDs)为 $(2.549 \pm 0.086)$  mm, 射血分数(EF)为 $(60.210 \pm 1.434)\%$ , 短轴缩短率(FS)为 $(33.910 \pm 1.017)\%$ , 心率(heart rate, HR)为 $(397.800 \pm 20.980)$  bpm。野生型小鼠的LVPWd、LVIDd、LVPWs、LVIDs、EF、FS和HR分别为 $(0.722 \pm 0.027)$  mm、 $(4.025 \pm 0.060)$  mm、 $(1.075 \pm 0.026)$  mm、 $(2.514 \pm 0.102)$  mm、 $(60.050 \pm 1.445)\%$ 、 $(32.650 \pm 1.158)\%$ 及 $(394.400 \pm 14.480)$  bpm。两组间各心

功能参数均无统计学差异,表明在生理状态下,成年周细胞谱系示踪小鼠的心脏功能未受到明显影响(图3)。

## 2.2 周细胞谱系示踪小鼠的标记特异性

为评估周细胞谱系示踪小鼠的标记特异性,我们对Cre/LSL小鼠多个器官组织进行了NG2免疫荧光染色。结果显示,在未经过他莫昔芬诱导的对照小鼠中,仅见DAPI染色,未见明显的GFP阳性信号,排除了非特异性标记的可能(图4A)。与之相对,经他莫昔芬诱导后,Cre/LSL小鼠心、肝、肾、脾中均可见特异性GFP阳性信号(图4B),且GFP与周细胞标志物NG2呈现明确的共定位(图4C~图4F)。定量分



A: 野生型小鼠与Cre/LSL小鼠代表性M型心超图像; B-G: 两组小鼠心功能参数(LVIDd、LVIDs、LVPWd、LVPWs、EF、FS、HR)定量比较。所有数据均以mean±SEM表示,  $n=5$ 。经他莫昔芬诱导后, Cre/LSL组与野生型组各心功能指标均无统计学差异( $P>0.05$ )。

A: representative M-mode echocardiographic images of wild-type and Cre/LSL mice; B-G: quantitative comparison of cardiac function parameters between the two groups (LVIDd, LVIDs, LVPWd, LVPWs, EF, FS, HR). All data are presented as mean±SEM,  $n=5$ . Following tamoxifen induction, no statistically significant differences were observed in any of the cardiac function parameters between the Cre/LSL group and the wild-type group ( $P>0.05$ ).

图3 Cre/LSL转基因小鼠超声心动图检测结果

Fig.3 Echocardiographic assessment of Cre/LSL transgenic mice

析显示, 上述器官的GFP阳性细胞中同时表达NG2的比例( $NG2^+GFP^+/GFP^+$ )均在80%以上(图4G), NG2阳性细胞中同时表达GFP的比例( $NG2^+GFP^+/NG2^+$ )亦均超过80%(图4H), 表明该示踪系统可实现对他莫昔芬诱导后NG2阳性细胞的高效标记。

进一步采用周细胞另一特异性标志物PDGFR $\beta$ 进行免疫荧光染色, 结果显示Cre/LSL小鼠心、肝、脾、肾中GFP阳性信号与PDGFR $\beta$ 阳性信号亦呈现明确的共定位(图5A~图5E)。定量分析表明, GFP阳性细胞中同时表达PDGFR $\beta$ 的比例( $PDGFR\beta^+GFP^+/GFP^+$ )及PDGFR $\beta$ 阳性细胞中同时表达GFP的比例( $PDGFR\beta^+GFP^+/PDGFR\beta^+$ )均达80%以上(图5F和图5G)。

综上所述, 该谱系示踪小鼠可实现对他莫昔芬诱导后周细胞的高效、特异性标记, 为后续周细胞命运追踪研究提供了可靠的动物模型。

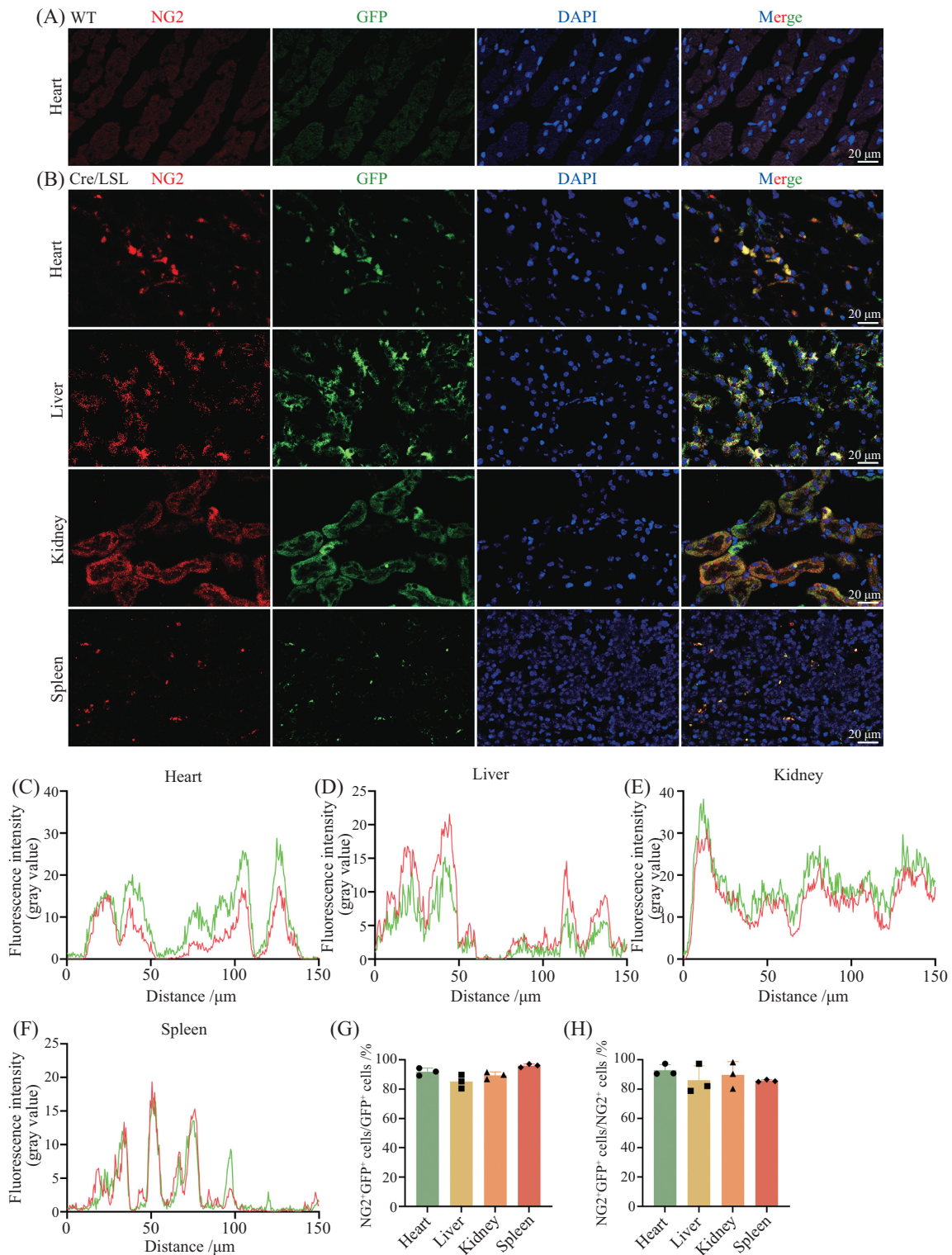
### 2.3 心肌梗死后周细胞的分化命运与时序性分析

通过结扎左冠状动脉前降支成功构建Cre/LSL小鼠心肌梗死模型。梗后28天超声心动图检测结果显示, 模型组小鼠LVPWs、LVPWd、LVIDs、LVIDd、EF及FS分别为(0.673±0.040) mm、(0.589±0.014) mm、(4.298±0.112) mm、(4.339±0.134) mm、(30.510±1.644)%和(14.180±0.907)%, 与假手术组相比均具有显著性差异( $P<0.05$ ); 模型组小鼠HR为(405.800±18.750) bpm,

与假手术组无显著性差异(图6A和图6B)。以上结果表明心肌梗死模型构建成功。

梗后28天获取小鼠心脏组织进行检测, 结果显示: 与假手术组相比, 模型组小鼠心脏组织中CD248蛋白表达量显著增加(图6C); 天狼星红染色可见模型组小鼠左心室室壁明显变薄, 梗死区及周围区有大量红色胶原纤维沉积, 表明心肌梗死后心脏发生了明显的纤维化病理改变(图6D)。

分别于造模前及梗后7天、14天、28天获取小鼠心脏组织进行免疫荧光染色(图7A)。结果显示, 假手术组GFP阳性细胞占视野总细胞数的比例为(0.1369±0.0410)%; 梗后7天、14天和28天, 该比例分别增加至(2.993±0.126)%、(6.330±0.312)%和(6.980±0.554)%, 提示GFP阳性细胞数量随着梗死时间延长而持续增加(图7B)。进一步分析显示, CD248与GFP双阳性细胞在各细胞群中的比例也呈现出时间依赖性升高; 梗后28天, CD248与GFP双阳性细胞占视野总细胞数的比例为(3.75±0.697)%, 占CD248阳性细胞的比例为(23.090±3.920)%, 占GFP阳性细胞的比例为(53.410±5.745)%, 均显著高于术后7天及14天(图7C~图7E)。免疫荧光共定位结果显示, CD248(红色荧光)与GFP(绿色荧光)表达区域高度重叠, 提示两者存在明确的共定位关系(图7F)。上述结果表明,

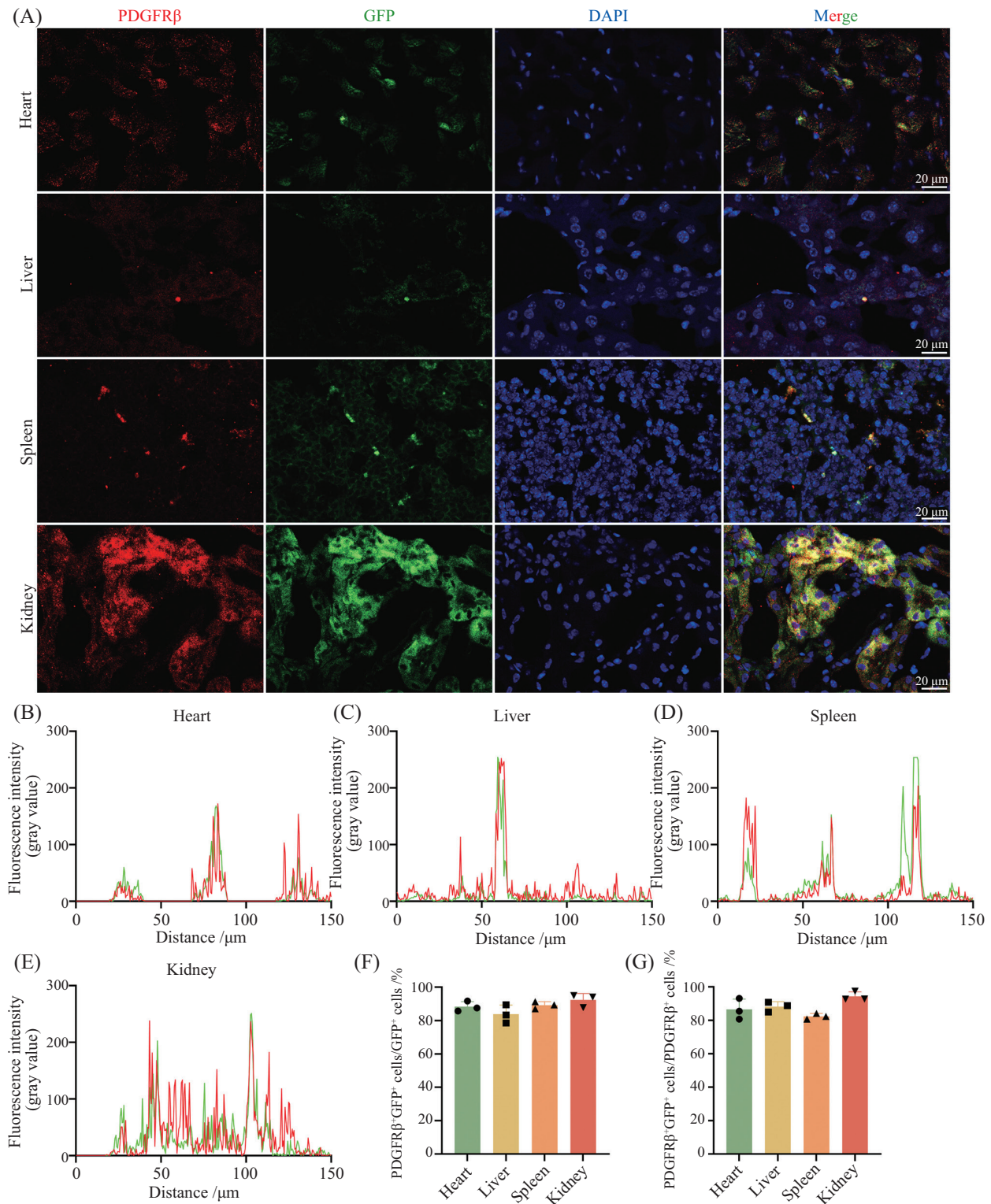


A: 未经他莫昔芬诱导的小鼠DAPI染色对照(无GFP信号); B: Cre/LSL小鼠心、肝、肾、脾中GFP(绿色)与NG2(红色)共定位代表性图像; C~F: Cre/LSL组小鼠心(C)、肝(D)、肾(E)、脾(F)中NG2和GFP荧光信号共定位分析(NG2: 红色; GFP: 绿色); G: 定量分析NG2<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup>比例; H: 定量分析NG2<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>/NG2<sup>+</sup>比例。所有数据均以mean±SEM表示,  $n=3$ 。

A: control mice without tamoxifen induction, stained with DAPI (no GFP signal); B: representative images showing co-localization of GFP (green) and NG2 (red) in the heart, liver, kidney, and spleen of Cre/LSL mice; C-F: co-localization analysis of NG2 (red) and GFP (green) fluorescent signals in the heart (C), liver (D), kidney (E), and spleen (F) of Cre/LSL mice; G: quantitative analysis of the proportion of NG2<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup> cells among GFP<sup>+</sup> cells; H: quantitative analysis of the proportion of NG2<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup> cells among NG2<sup>+</sup> cells. All data are presented as mean±SEM,  $n=3$ .

图4 Cre/LSL小鼠多器官中GFP标记特异性及与NG2共定位分析

Fig.4 Specificity of GFP labeling and co-localization with NG2 in multiple organs of Cre/LSL mice

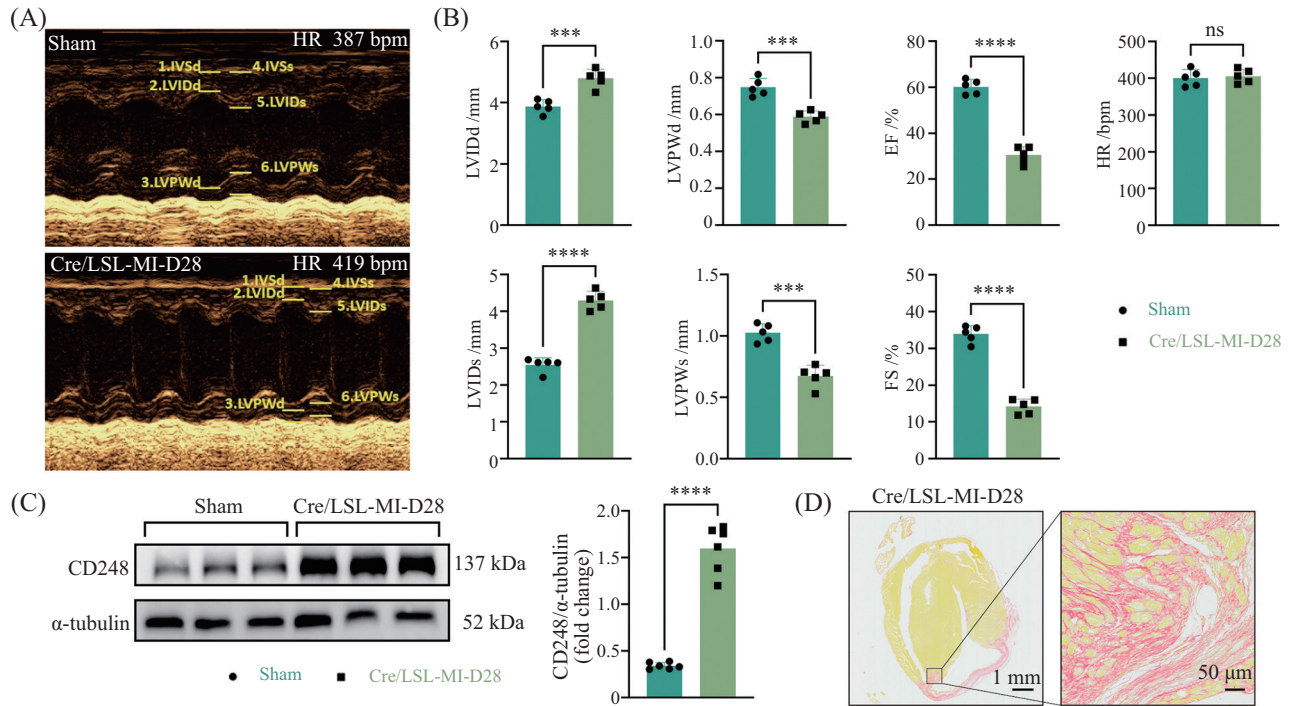


A: Cre/LSL组小鼠心、肝、脾、肾组织中GFP与PDGFR $\beta$ 免疫荧光共定位代表性图像; B~E: Cre/LSL组小鼠心(B)、肝(C)、脾(D)、肾(E)中PDGFR $\beta$ 和GFP荧光信号共定位分析(PDGFR $\beta$ : 红色; GFP: 绿色); F: 多器官中GFP阳性细胞中PDGFR $\beta$ 阳性细胞占比(PDGFR $\beta$ <sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup>)定量分析; G: 多器官中PDGFR $\beta$ 阳性细胞中GFP阳性细胞占比(PDGFR $\beta$ <sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>/PDGFR $\beta$ <sup>+</sup>)的定量分析。所有数据均以mean $\pm$ SEM表示,  $n=3$ 。

A: representative images showing co-localization of GFP and PDGFR $\beta$  in the heart, liver, spleen, and kidney of Cre/LSL mice; B-E: co-localization analysis of PDGFR $\beta$  (red) and GFP (green) fluorescent signals in the heart (B), liver (C), spleen (D), and kidney (E) of Cre/LSL mice; F: quantitative analysis of the proportion of PDGFR $\beta$ <sup>+</sup>GFP<sup>+</sup> cells among GFP<sup>+</sup> cells in multiple organs; G: quantitative analysis of the proportion of PDGFR $\beta$ <sup>+</sup>GFP<sup>+</sup> cells among PDGFR $\beta$ <sup>+</sup> cells in multiple organs. All data are presented as mean $\pm$ SEM,  $n=3$ .

图5 Cre/LSL小鼠多器官中GFP与PDGFR $\beta$ 共定位及标记效率分析

Fig.5 Co-localization of GFP with PDGFR $\beta$  and labeling efficiency analysis in multiple organs of Cre/LSL mice



A: 假手术组与Cre/LSL小鼠梗后28天代表性M型超声心动图; B: 梗后28天心功能参数定量分析(LVIDd、LVPWd、EF、HR、LVIDs、LVPWs、FS)( $n=5$ ); C: 梗后28天心脏组织CD248蛋白表达代表性Western blot条带及定量分析( $n=6$ ); D: 梗后28天心脏组织天狼星红染色代表性图像。所有定量数据均以 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 表示。\*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ , ns: 无显著性差异。

A: representative M-mode echocardiography images of sham-operated and Cre/LSL mice at 28 days post-MI; B: quantitative analysis of cardiac function parameters (LVIDd, LVPWd, EF, HR, LVIDs, LVPWs, FS) at 28 days post-MI ( $n=5$ ); C: representative Western blot bands and quantitative analysis of CD248 protein expression in heart tissues at 28 days post-MI ( $n=6$ ); D: representative images of Sirius red staining of heart tissues at 28 days post-MI. All quantitative data are presented as  $\text{mean} \pm \text{SEM}$ . \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ , ns: not significant.

图6 心肌梗死模型构建

Fig.6 Establishment of myocardial infarction model

大部分GFP阳性细胞可以分化为CD248阳性细胞, 而CD248阳性细胞中部分来源于GFP阳性细胞。作为对照, 对梗后28天的野生型小鼠心脏组织进行同样条件的免疫荧光染色, 结果显示仅见CD248阳性信号, 未见GFP绿色荧光, 排除了梗病理状态下组织自发荧光或抗体非特异性结合所致假阳性的可能(图7A)。

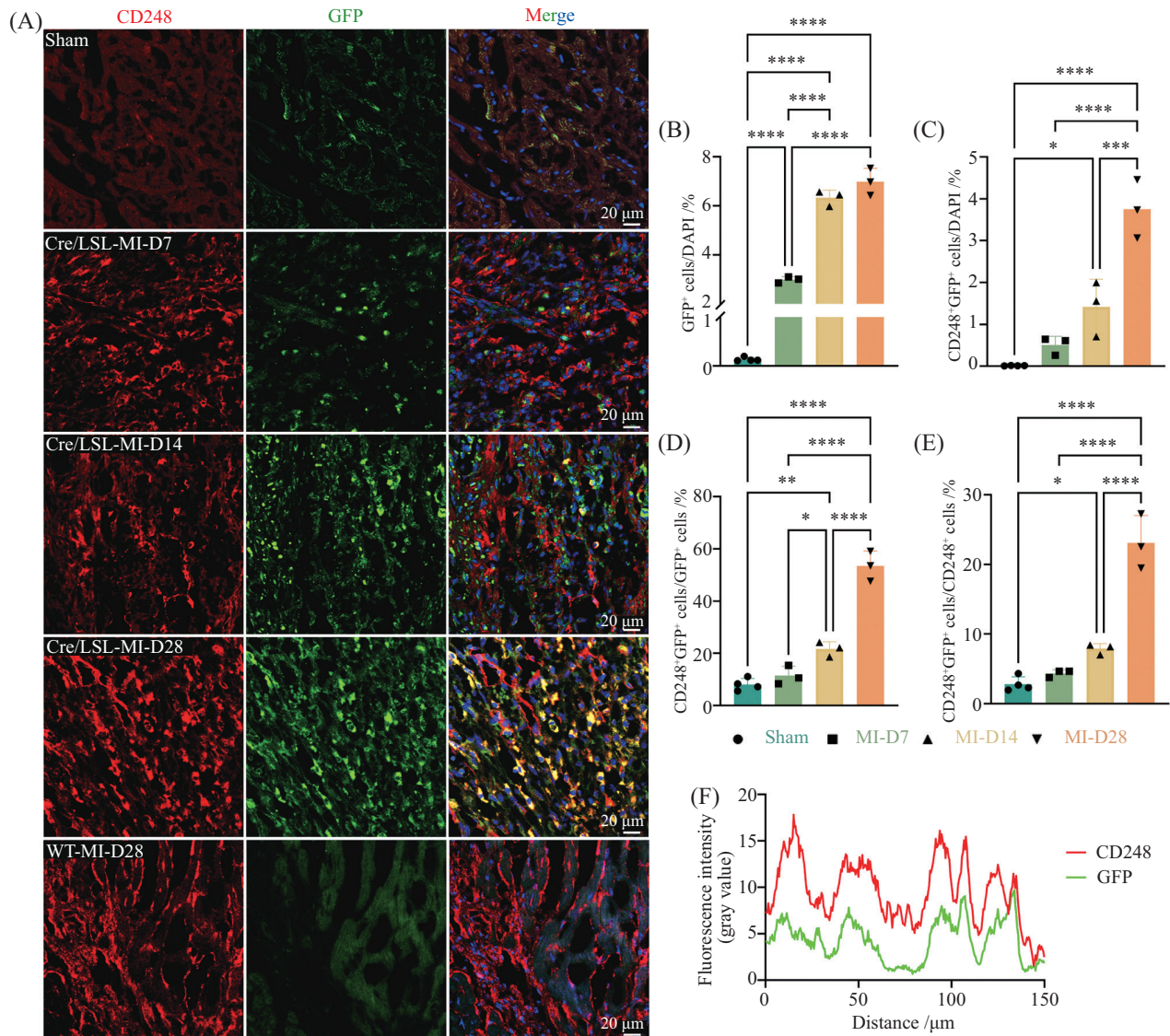
综上, 在心肌梗死修复成熟期(28天), 部分周细胞来源的细胞(GFP标记)表达致病性成纤维细胞亚群(F-Act)标志物CD248, 提示周细胞具有向致病性成纤维细胞亚群转分化的潜能, 可能参与梗后的纤维化进程。

### 3 讨论

成纤维细胞的过度激活是梗后心脏不良重塑的关键驱动因素之一<sup>[21-22]</sup>, 因此, 深入阐明梗后成纤维细胞的来源及其分化途径具有重要的研究价值。既往研究表明, 心肌损伤区域中的成

纤维细胞和肌成纤维细胞的增殖不仅源于周围成纤维细胞的募集和扩增, 还可以通过内皮细胞<sup>[23]</sup>、巨噬细胞<sup>[24]</sup>等非成纤维细胞向成纤维细胞样细胞转分化而来。值得注意的是, 周细胞作为微血管壁的关键组成部分, 在肾纤维化<sup>[25]</sup>及肺纤维化<sup>[26]</sup>中被证实能够转化为活化的成纤维细胞, 进而推动组织纤维化进程, 这一现象进一步揭示了周细胞具备一定的干细胞样分化潜能。

为深入探究周细胞在梗进程中的具体作用, 本研究首先利用CRISPR/Cas9基因编辑技术构建Cspg4-CreERT2小鼠模型, 并使其与Rosa26-tdTomato小鼠繁育, 成功获得周细胞谱系示踪转基因小鼠。Cspg4基因编码的NG2蛋白是目前应用最为广泛的周细胞标志物之一, 其在心脏微血管结构中具有良好的特异性<sup>[19]</sup>。免疫荧光共定位分析显示, GFP阳性信号与周细胞标志物NG2及PDGFR $\beta$ 呈现高度共定位, NG2<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>细胞占GFP<sup>+</sup>细胞比例及PDGFR $\beta$ <sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>细胞占GFP<sup>+</sup>细胞比例均超过80%,



A: Cre/LSL小鼠术前及术后7、14、28天, 以及WT小鼠术后28天, CD248与GFP免疫荧光共定位代表性图像; B: 各时间点GFP<sup>+</sup>细胞占视野总细胞数比例统计图( $n=3$ ); C: 各时间点CD248<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>细胞占视野总细胞数比例统计图( $n=3$ ); D: 各时间点CD248<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>细胞占GFP<sup>+</sup>细胞比例统计图( $n=3$ ); E: 各时间点CD248<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>细胞占CD248<sup>+</sup>细胞比例统计图( $n=3$ ); F: 心梗后28天Cre/LSL小鼠心脏组织CD248(红色)与GFP(绿色)免疫荧光共定位代表性图像。所有定量数据均以 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 表示。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ 。

A: representative images of CD248 and GFP immunofluorescence colocalization in Cre/LSL mice before surgery and at 7, 14, 28 days post-surgery, and in WT mice at 28 days post-surgery; B: statistical analysis of the proportion of GFP<sup>+</sup> cells among total cells per field at indicated time points ( $n=3$ ); C: statistical analysis of the proportion of CD248<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup> cells among total cells per field at indicated time points ( $n=3$ ); D: statistical analysis of the proportion of CD248<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup> cells among GFP<sup>+</sup> cells at indicated time points ( $n=3$ ); E: statistical analysis of the proportion of CD248<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup> cells among CD248<sup>+</sup> cells at indicated time points ( $n=3$ ); F: representative immunofluorescence image showing co-localization of CD248 (red) and GFP (green) in the heart tissue of Cre/LSL mice at 28 days post-MI. All quantitative data are presented as  $\text{mean} \pm \text{SEM}$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ .

图7 Cre/LSL小鼠心脏中GFP<sup>+</sup>细胞动态变化与CD248共定位分析

Fig.7 Analysis of GFP<sup>+</sup> cell dynamics and CD248 co-localization in the hearts of Cre/LSL mice

证实该模型能够有效实现心脏周细胞的在体示踪。虽然 *Cspg4* 基因编码的NG2蛋白在血管平滑肌细胞及部分间充质细胞中亦有少量表达<sup>[27]</sup>, 但通过PDGFR $\beta$ 共染色证实其与GFP具有高共定位比例, 表明该示踪系统在心脏组织中仍具有较高的周细胞标

记特异性。

基于此, 本研究通过永久性结扎左冠状动脉前降支构建心肌梗死模型, 以探究周细胞是否参与心肌梗死后成纤维细胞的转化过程。心梗后28天超声心动图检测证实模型构建成功, 心功能明显受损。

进一步对心梗后不同时间点(7、14、28天)的心脏组织进行免疫荧光染色分析,结果显示:梗死周边区GFP阳性细胞数量呈时间依赖性增加;同时,GFP与F-Act亚群标志物CD248共定位的双阳性细胞数量及其在各细胞群中所占比例亦随梗死时间延长而逐步升高。上述结果表明,心肌梗死后,周细胞不仅发生局部增殖,且部分细胞可向成纤维细胞F-Act亚群分化。

关于F-Act亚群的界定,本研究采用CD248作为其特异性标志物。CD248在心肌梗死后晚期活化成纤维细胞中的特异性表达已被多项研究证实<sup>[11-12]</sup>,其在静息成纤维细胞及其他心肌细胞类型中几乎不表达。成纤维细胞F-Act亚群的持续激活,是导致心肌梗死后组织修复障碍的关键因素之一。在心肌梗死修复的成熟阶段,持续活化的F-Act亚群可导致心脏纤维化扩张和不良心室重塑,最终进展为心力衰竭<sup>[11-12]</sup>。本研究提示,致病性成纤维细胞F-Act亚群可能部分来源于周细胞的转分化。因此,针对周细胞的条件性敲除或其转分化过程的有效干预,可能为减轻心肌梗死后过度纤维化、改善心功能提供潜在的治疗思路。

本研究尚存在若干局限性,需在结果解读时予以审慎考量。第一,关于周细胞示踪模型的标记特异性。*Cspg4*基因编码的NG2蛋白在血管平滑肌细胞及部分间充质细胞中亦有少量表达<sup>[27]</sup>,这是该示踪系统的固有特点。尽管本研究联合PDGFR $\beta$ 标记进行了验证,结果显示PDGFR $\beta$ 与GFP的共定位比例超过80%,但这仍不足以完全排除极少数非周细胞谱系的潜在混杂。后续研究可结合诱导性PDGFR $\beta$ -*CreERT2*等其他周细胞示踪系统进行交叉验证,以进一步确证周细胞的特异性标记。第二,关于CD248作为F-Act亚群标志物的特异性。虽有文献报道巨噬细胞和内皮细胞也有部分可能分化为成纤维细胞<sup>[28]</sup>,然而,基于周细胞谱系示踪及共定位分析,本研究表明CD248<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>细胞主要来源于周细胞向F-Act亚群的转分化,极少数其他CD248<sup>+</sup>细胞类型的混杂可能不影响主要结论。未来研究可结合单细胞测序技术及多重标志物(如PDGFR $\alpha$ 、Periostin)联合标记,以更精确地解析F-Act亚群的异质性及其细胞起源。第三,关于周细胞向F-Act亚群转分化的分子调控机制,本研究仅观察到现象而未对其内在信号通路进行直接检测。在肾纤维化、肺纤维化及肝

纤维化模型中,TGF- $\beta$ /Smad、PDGF及Wnt等信号通路被证实可驱动周细胞向成纤维细胞转分化<sup>[29]</sup>。据此推测,类似的信号通路可能在心肌梗死后调控周细胞命运,但这一推测有待后续通过通路抑制剂干预或周细胞条件性基因敲除模型予以直接验证。第四,关于研究结果的临床转化价值。本研究仅在动物模型中进行验证,周细胞向F-Act亚群转分化这一现象是否存在于人类心肌梗死样本中,尚需通过人源组织样本或人源化动物模型予以证实。

综上所述,本研究揭示了在心肌梗死修复成熟期,部分周细胞能够转分化为致病性成纤维细胞F-Act亚群,并可能由此参与慢性纤维化进程与心室不良重塑的调控。该过程所依赖的关键分子通路及其在损伤不同阶段中的动态变化,仍是未来需要深入探索的重要方向。

### 参考文献 (References)

- [1] JENČA D, MELENOVSKÝ V, STEHLIK J, et al. Heart failure after myocardial infarction: incidence and predictors [J]. *ESC Heart Fail*, 2021, 8(1): 222-37.
- [2] JIANG H Y, FANG T T, CHENG Z Y. Mechanism of heart failure after myocardial infarction [J]. *J Int Med Res*, 2023, 51(10): 3000605231202573.
- [3] YONG J H, TAO J, WANG K Y, et al. Post-myocardial infarction cardiac remodeling: multidimensional mechanisms and clinical prospects of stem cell therapy [J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2025, 21(5): 1369-427.
- [4] PEET C, IVETIC A, BROMAGE D I, et al. Cardiac monocytes and macrophages after myocardial infarction [J]. *Cardiovasc Res*, 2020, 116(6): 1101-12.
- [5] JIAN Y H, ZHOU X, SHAN W J, et al. Crosstalk between macrophages and cardiac cells after myocardial infarction [J]. *Cell Commun Signal*, 2023, 21(1): 109.
- [6] ZHANG H, DHALLA N S. The role of pro-inflammatory cytokines in the pathogenesis of cardiovascular disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(2): 1082.
- [7] VENUGOPAL H, HANNA A, HUMERES C, et al. Properties and functions of fibroblasts and myofibroblasts in myocardial infarction [J]. *Cells*, 2022, 11(9): 1386.
- [8] GIBB A A, LAZAROPOULOS M P, ELROD J W. Myofibroblasts and fibrosis: mitochondrial and metabolic control of cellular differentiation [J]. *Circ Res*, 2020, 127(3): 427-43.
- [9] FU X, KHALIL H, KANISICAK O, et al. Specialized fibroblast differentiated states underlie scar formation in the infarcted mouse heart [J]. *J Clin Invest*, 2018, 128(5): 2127-43.
- [10] FORTE E, SKELLY D A, CHEN M, et al. Dynamic interstitial cell response during myocardial infarction predicts resilience to rupture in genetically diverse mice [J]. *Cell Rep*, 2020, 30(9): 3149-63, e6.
- [11] LI G H, NI C, WANG J C, et al. Dynamic molecular atlas of cardiac fibrosis at single-cell resolution shows CD248 in cardiac

- fibroblasts orchestrates interactions with immune cells [J]. *Nat Cardiovasc Res*, 2025, 4(4): 380-96.
- [12] CHEN H T, HU K, TANG Q, et al. CD248-targeted BBIR-T cell therapy against late-activated fibroblasts in cardiac repair after myocardial infarction [J]. *Nat Commun*, 2025, 16(1): 2895.
- [13] LI P F, FAN H K. Pericyte loss in diseases [J]. *Cells*, 2023, 12(15): 1931.
- [14] ZHANG Z S, ZHOU H N, HE S S, et al. Research advances in pericyte function and their roles in diseases [J]. *Chin J Traumatol*, 2020, 23(2): 89-95.
- [15] STALLCUP W B. The NG2 proteoglycan in pericyte biology [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1109: 5-19.
- [16] GARZA TREVIÑO E N, GONZÁLEZ P D, VALENCIA SALGADO C I, et al. Effects of pericytes and colon cancer stem cells in the tumor microenvironment [J]. *Cancer Cell Int*, 2019, 19: 173.
- [17] TULETA I, FRANGOIANNIS N G. Pericytes in tissue fibrosis [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2025, 329(3): C868-86.
- [18] NICULAE A, GHERGHINA M E, PERIDE I, et al. Pathway from acute kidney injury to chronic kidney disease: molecules involved in renal fibrosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(18): 14019.
- [19] ALEX L, TULETA I, HERNANDEZ S C, et al. Cardiac pericytes acquire a fibrogenic phenotype and contribute to vascular maturation after myocardial infarction [J]. *Circulation*, 2023, 148(11): 882-98.
- [20] AVOLIO E, CAMPAGNOLO P, KATARE R, et al. The role of cardiac pericytes in health and disease: therapeutic targets for myocardial infarction [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2024, 21(2): 106-18.
- [21] HILGENDORF I, FRANTZ S, FRANGOIANNIS N G. Repair of the infarcted heart: cellular effectors, molecular mechanisms and therapeutic opportunities [J]. *Circ Res*, 2024, 134(12): 1718-51.
- [22] JANBANDHU V, TALLAPRAGADA V, PATRICK R, et al. Hif-1a suppresses ROS-induced proliferation of cardiac fibroblasts following myocardial infarction [J]. *Cell Stem Cell*, 2022, 9(2): 281-97, e12.
- [23] ZEISBERG E M, TARNAVSKI O, ZEISBERG M, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis [J]. *Nat Med*, 2007, 13(8): 952-61.
- [24] CIESLIK K A, TRIAL J, ENTMAN M L. Mesenchymal stem cell-derived inflammatory fibroblasts promote monocyte transition into myeloid fibroblasts via an IL-6-dependent mechanism in the aging mouse heart [J]. *FASEB J*, 2015, 29(8): 3160-70.
- [25] DUFFIELD J S. Cellular and molecular mechanisms in kidney fibrosis [J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(6): 2299-306.
- [26] HUNG C, LINN G, CHOW Y H, et al. Role of lung pericytes and resident fibroblasts in the pathogenesis of pulmonary fibrosis [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2013, 188(7): 820-30.
- [27] RIPPE C, MORÉN B, LIU L, et al. NG2/CSPG4, CD146/MCAM and VAP1/AOC3 are regulated by myocardin-related transcription factors in smooth muscle cells [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 5955.
- [28] BUECHLER M B, FU W X, TURLEY S J. Fibroblast-macrophage reciprocal interactions in health, fibrosis, and cancer [J]. *Immunity*, 2021, 54(5): 903-15.
- [29] LEAF I A, NAKAGAWA S, JOHNSON B G, et al. Pericyte MyD88 and IRAK4 control inflammatory and fibrotic responses to tissue injury [J]. *J Clin Invest*, 2021, 131(1): 321-34.