

· 全健康 ·

DOI: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20240049



主持人:刘萌萌,韩 谦

## 五指山猪二尖瓣间质细胞的分离、培养与鉴定

陈淑敏,陈 宇,赵源杰,刘萌萌

(海南大学 热带农林学院/农业农村学院/乡村振兴学院,海口 570228)

**摘要:**黏液瘤样二尖瓣疾病(MMVD)是哺乳动物最常见的心脏病之一,临床上可引发心力衰竭和猝死,目前该病的发病机制尚不完全明确。在MMVD发生发展进程中,二尖瓣间质细胞(MVICs)活化引起的细胞外基质重塑是本病的关键病理变化。因此本研究拟通过建立五指山猪原代MVICs分离、培养体系,获得可稳定培养的MVICs,为MMVD相关研究提供体外研究细胞材料。结果表明,用目前方法分离得到的五指山猪二尖瓣细胞呈CD31阴性、Vimentin阳性,符合MVICs特点。对比添加不同浓度血清的培养基,含10%胎牛血清(FBS)的完全培养基对MVICs细胞增殖活力更有利,可支持MVICs在体外稳定培养至少20代。本研究获得的五指山猪原代MVICs可为二尖瓣疾病病理机制研究与进一步的靶向药物开发提供体外研究平台。

**关键词:**黏液瘤样二尖瓣疾病;二尖瓣间质细胞; $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白;五指山猪

**中图分类号:**S858 **文献标志码:**A **文章编号:**1674-7054(2024)06-0764-06

陈淑敏,陈宇,赵源杰,等.五指山猪二尖瓣间质细胞的分离、培养与鉴定[J].热带生物学报,2024,15(6):764-769. doi:10.15886/j.cnki.rdswwb.20240049

黏液瘤样二尖瓣疾病(myxomatous mitral valve disease, MMVD)又称退行性二尖瓣疾病(degenerative mitral valve disease, DMVD),是最常见的心脏瓣膜病<sup>[1]</sup>,影响全球约1.7亿人口<sup>[2]</sup>。二尖瓣是位于心脏左心房与左心室之间的重要解剖结构。正常生理状况下,二尖瓣可保证血流按单一方向从左心室流入左心房。发生MMVD后,瓣膜小叶增厚、脱垂、连枷以及瓣叶边缘结节形成,腱索过度伸长甚至断裂,从而引起血液返流,最终可导致心力衰竭甚至死亡的严重后果<sup>[3]</sup>。目前临床上缺乏MMVD靶向治疗药物<sup>[4-5]</sup>,亟需开发新型药物以减缓或逆转疾病进程。既往研究结果<sup>[3]</sup>表明,发生MMVD时,二尖瓣间质细胞(mitral valve interstitial cells, MVICs)的激活起到了关键作用。发生表型改变的静止MVICs(qMVICs)转变为活化MVICs

(aMVICs),aMVICs以高表达 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白(alpha smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)为特征,活化的MVICs可引起I型胶原、蛋白聚糖、基质金属蛋白酶等在内的细胞外基质与调节蛋白产生与降解异常<sup>[6-7]</sup>,导致细胞外基质重塑,从而造成了二尖瓣的黏液瘤样病变<sup>[3-8]</sup>。但关于MVICs活化及MMVD的具体发病机制尚不完全明确,需要进一步探究。由于二尖瓣临床样本难以获得,且市场上缺乏商品化MVICs,因此极大限制了MVICs与MMVD的相关研究。五指山猪作为海南省特色猪种,是我国一种体型最小、体质量最轻的猪种,具有抗逆性强、遗传稳定性好等特性<sup>[9]</sup>。因猪的心脏解剖结构、生理功能与人类极其相似的特点,五指山猪被认为是良好的心血管疾病动物模型,适用于瓣膜疾病的比较医学研究<sup>[10-11]</sup>。因此本研究拟构建五

收稿日期:2024-03-22 修回日期:2024-04-08

基金项目:海南大学高层次人才科研启动基金项目(RZ2100003061);瑞鹏公益基金会高校青年教师(小动物临床)科研基金项目(RH2100005094)

第一作者:陈淑敏(1998-),女,硕士。研究方向:临床兽医学、五指山猪二尖瓣疾病研究。E-mail: minshuchen@163.com

通信作者:刘萌萌(1985-),女,博士,特聘教授,博士生导师。研究方向:临床兽医学、犬猫心脏病、比较医学的研究。E-mail: 994428@hainanu.edu.cn

指山猪心脏 MVICs 原代细胞培养体系,获得可在体外稳定传代的 MVICs,为进一步研究 MMVD 发病机制及探索药物靶点奠定细胞学基础,提供体外研究平台。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

**1.1.1 组织样本** 本研究所用五指山猪购于海南农乡牧生态农业开发有限公司。研究期间共收集7例五指山猪新鲜二尖瓣组织样本,试验操作符合海南大学动物伦理操作规范。

**1.1.2 主要试剂耗材** Advanced DMEM/F-12 (12634010)、新西兰特级胎牛血清(16210064)、II型胶原酶(17101-015)、青霉素-链霉素(15140122)、L-谷氨酰胺(25030081)和 TrypLE™ Express 酶(12604013)均购自 Gibco;兔源抗 CD31 多克隆抗体(bs-0195R)购自 Bioss;鼠源抗 Vimentin 多克隆抗体(V6839)和鼠源抗  $\alpha$ -SMA 多克隆抗体(A2547)均购自 Sigma; Alexa Fluor™ 568 的山羊抗兔 IgG (A11011)、Alexa Fluor™ 488 的山羊抗鼠 IgG (A10667)、HRP 标记的山羊抗兔 IgG (A16069)和 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG (A16066)均购自 Invitrogen; CCK-8 溶液(GK10001)购自 Glpbio; 75 cm<sup>2</sup> 培养瓶购自 Corning; Western 专用一抗二抗稀释液(AR1017)购自 Boster。

**1.1.3 主要仪器** 台式高速冷冻离心机(德国 Eppendorf);全波长酶标仪(瑞士 Tecan);立式压力蒸汽灭菌锅(鸡西辰丰医疗);蛋白电泳仪(北京君意);全自动化学发光系统(上海天能);超净工作台(天津泰斯特);二氧化碳培养箱(上海力申);倒置显微镜(无阳光学);Agilent BioTek Cytation 1(奥恒生物)。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 五指山猪原代 MVICs 的分离与培养** 从安乐死后的半月龄健康五指山猪中迅速采集心脏二尖瓣样本,预冷灭菌生理盐水冲洗样本表面血液,之后将样本转至无菌预冷 PBS 中,尽快转至细胞间分离 MVICs。MVICs 分离培养方法参考之前用胶原酶消化分离犬 MVICs 的方式<sup>[12]</sup>。在超净台上用无菌手术器械分离二尖瓣前叶,将二尖瓣前叶置于 125 U·mL<sup>-1</sup> II 型胶原酶溶液,37 °C 消化 10 min。无菌拭子剥离瓣膜表面内皮细胞后,将其余瓣膜组织

切碎为糜状置于 II 型胶原酶溶液,37 °C 下消化组织 18 h。随后将组织完全吹散,在 1 500 r·min<sup>-1</sup> 条件下离心 5 min,弃上清后使用 AF-12 完全培养基重悬,随后在 1 000 r·min<sup>-1</sup> 条件下离心 5 min,使用 10 mL 完全培养基重悬,移入 T75 培养瓶,置于 37 °C,5% 二氧化碳培养箱培养。每 48 h 更换 1 次培养液,在细胞达到 80% 融合度时进行传代培养。弃上清,加入 TrypLE™ Express 酶,37 °C 条件下消化 8 min。使用 AF-12 完全培养基中止消化,将细胞悬液置于离心管 1 000 r·min<sup>-1</sup> 室温离心 5 min 后弃上清,以 1:2 或 1:3 的比例接种于新的培养瓶中继续培养。

**1.2.2 免疫荧光法** 使用免疫荧光法对五指山猪 MVICs 进行表型鉴定。将传代至第四代的细胞在达到 90% 以上融合度时进行消化,将细胞以密度为 1×10<sup>4</sup> 个/孔的方式种于 8 孔腔室载玻片中。24 h 后从样品孔中吸除培养液,用 1×PBS 洗涤细胞 3 次,5 min·次。用丙酮溶液在 -20 °C 条件下固定 10 min,用 1×PBS 洗涤细胞 3 次,5 min·次。用 10% 山羊血清/0.5% Tween20/PBS 室温封闭 1 h。使用 Image-iT™ FX 信号增强剂室温孵育 30 min。将  $\alpha$ -SMA(1:400)、Vimentin(1:1 600)、CD31(1:100)按比例于 1% 山羊血清/0.5% Tween20/PBS 抗体稀释液中稀释,4 °C 过夜孵育。次日用 1×PBS 洗涤细胞 3 次,5 min·次。使用 Alexa Fluor 568 标记的山羊抗兔检测 CD31; Alexa Fluor 488 标记的山羊抗鼠检测  $\alpha$ -SMA、Vimentin。二抗均以 1:500 的比例进行稀释。荧光二抗在室温下避光孵育 1 h。拆除腔室隔板,在载玻片上滴加含 DAPI 的防荧光淬灭剂,封片后用 BioTek Cytation 1 荧光显微镜观察。

**1.2.3 CCK-8 试验** 将含 2% 胎牛血清(FBS)和 10% FBS 的 AF-12 培养基分别培养出来的 MVICs 细胞以细胞密度为 3×10<sup>3</sup> 个/孔的方式在 96 孔板中培养,每组 6 个复孔。将细胞在 CO<sub>2</sub> 培养箱中于 37 °C 培养 24 h。用移液枪向板的每个孔中加入 10  $\mu$ L CCK8 溶液。将 96 孔板在培养箱中孵育 1.5 h。振荡轻轻混合 1 min 后使用酶标仪测定 A<sub>450</sub>。

**1.2.4 MVICs 总蛋白的提取** 使用 NP40 裂解液提取细胞中的蛋白。向 NP40 中提前加入蛋白酶抑制剂。取蛋白标准品配制蛋白标准溶液。根据样品数量,按 50 体积 BCA 试剂 A 加 1 体积 BCA 试剂 B

(50:1)配制适量BCA工作液,充分混匀。将20  $\mu$ L样品加入96孔板的样品孔中。各孔加入200  $\mu$ L BCA工作液,37  $^{\circ}$ C反应20~30 min。用酶标仪测定 $A_{562}$ 。根据标准曲线和使用的样品稀释倍数计算样品的蛋白浓度。根据蛋白浓度计算蛋白上样体积,用适量5 $\times$ loading buffer与样本混匀,使用金属浴在100  $^{\circ}$ C下反应15 min对蛋白进行变性处理。

**1.2.5 免疫印迹反应** 将10  $\mu$ g蛋白样品用10%的分离凝胶进行SDS-PAGE分离。将蛋白转移到PVDF膜上(ISEQ00010, MERCK),并在室温下以Tris-buffered saline (TBS)在5%脱脂牛奶(Sangon Biotech, Shanghai, China)中封闭2 h。在4  $^{\circ}$ C下,将 $\alpha$ -SMA(1:1 500)、Vimentin(1:2 000)、CD31(1:500)和GAPDH(1:10 000)按比例于一抗稀释液中,4  $^{\circ}$ C孵育膜过夜。在TBST中洗涤3次,5 min $\cdot$ 次,在室温下用相应种属二抗室温孵育1 h, TBST洗膜5次,5 min $\cdot$ 次。将ECL化学发光液均匀滴加在PVDF膜上进行显影,使用Image J进行可视化分析。

**1.2.6 数据统计与分析** 数据以平均值 $\pm$ SEM表示。采用GraphPad Prism 8.0进行统计学分析。采用*t*检验确定两组间的显著性。统计学显著差异均定义为 $P < 0.05$ 。

## 2 结果与分析

**2.1 MVICs形态特点观察** 从半月龄五指山猪二尖瓣组织分离的MVICs在悬浮状态下呈圆形,约2 h后细胞逐渐展开贴壁。MVICs约24 h后开始增殖,第7天细胞融合度达到80%。倒置光学显微镜下可见MVICs呈现梭形和多角形,结构清晰(图1)。细胞可稳定传代至第23代,生长状态良好。



图1 五指山猪原代MVICs形态。  
B为A的放大倍数图。

Fig. 1 Morphology of primary MVICs from Wuzhishan pigs.  
B is the magnification of A.

**2.2 MVICs表型的鉴定** 通过免疫荧光检测 $\alpha$ -SMA、Vimentin和内皮细胞标志物CD31在MVICs表达情况。结果表明,所有细胞呈Vimentin阳性、CD31阴性,极少数细胞呈 $\alpha$ -SMA阳性(图2),由此可确认所分离纯化的细胞为MVICs,且未受VECs污染。

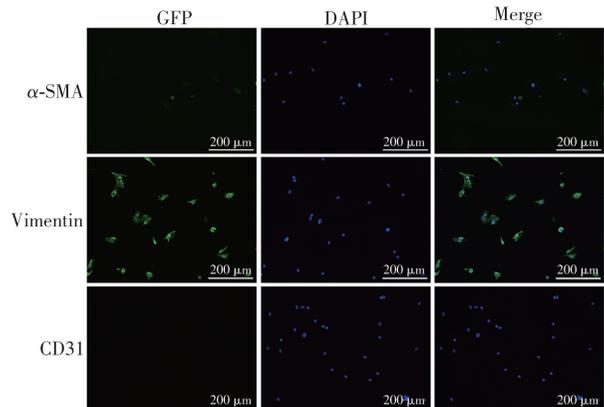


图2 五指山猪二尖瓣间质细胞表型的鉴定

绿色:绿色荧光蛋白,GFP一般文中只写DAPI;蓝色:DAPI(4',6-二脒基-2-苯基吡啶)。

Fig. 2 Identification of the phenotype of MVICs in Wuzhishan piglets.  
Green:GFP; Blue:DAPI.

**2.3 MVICs培养基在不同血清浓度条件下对VICs活化的影响**

**2.3.1 不同血清浓度培养下细胞形态及活化水平** 先前研究表明低血清培养基能维持犬MVICs的静止表型<sup>[13]</sup>,为探究培养基不同血清浓度对猪MVICs的影响,将含2% FBS与含10% FBS的完全培养基培养的MVICs进行对比。结果显示,两组细胞主要形态皆为梭形,无明显差异(图3)。

**2.3.2 不同血清浓度培养下的细胞活化程度** 利用细胞免疫荧光技术检测不同血清浓度培养基培养下MVICs的 $\alpha$ -SMA与Vimentin表达情况。结果显示,10% FBS与2% FBS培养条件下MVICs均高表达Vimentin,少量活化VICs表达 $\alpha$ -SMA(图4-A)。随后利用Western Blot检测MVICs中 $\alpha$ -SMA与Vimentin表达水平变化,结果表明两组无显著差异。综上,本研究判断不同血清浓度培养对MVICs的活化无显著影响(图4-B、C)。

**2.3.3 不同血清浓度培养下的细胞活性** 为了进一步探究血清浓度对MVICs活性影响,将两组细

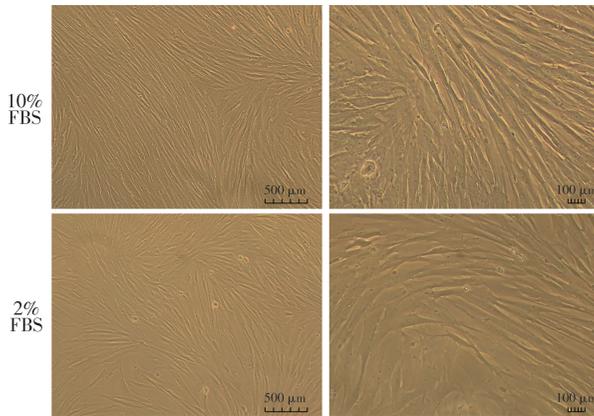


图 3 不同血清浓度培养条件下 MVICs 形态。

Fig. 3 Morphology of MVICs under culture conditions with different serum concentrations.

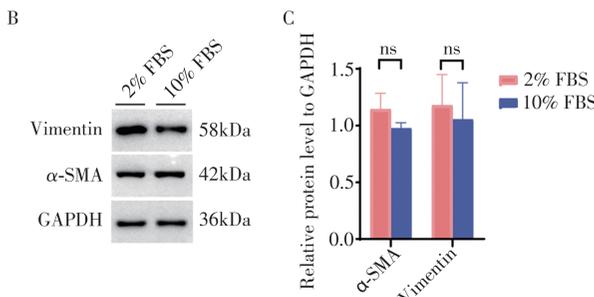
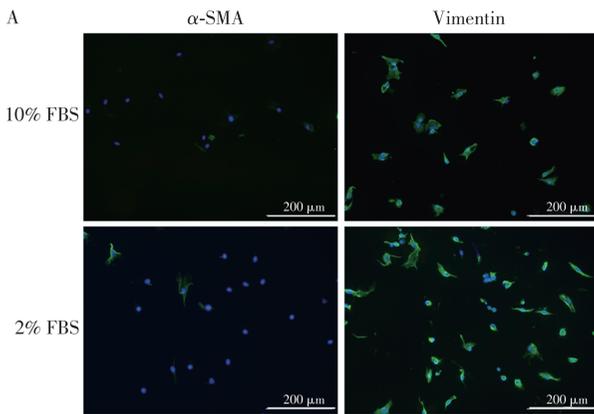


图 4 不同血清浓度培养下 MVICs 活化水平。

A: 免疫荧光检测不同血清浓度培养下 MVICs 中  $\alpha$ -SMA 与 Vimentin 含量, B-C: 免疫印迹检测不同血清浓度培养下 MVICs 中  $\alpha$ -SMA 与 Vimentin 表达水平变化。

Fig. 4 Activation levels of MVICs in different serum concentrations.

A: Immunofluorescence detection of  $\alpha$ -SMA and Vimentin content in MVICs cultured with different serum concentrations; B-C: WB detection of  $\alpha$ -SMA and Vimentin expression levels in MVICs cultured with different serum concentrations.

胞同时培养 120 h, 使用 CCK8 对两组细胞活性进行监测。结果表明, 两组细胞生长活性具有显著差异。10% FBS 培养条件下, 细胞 0 ~ 48 h 为缓慢

增长期, 48 ~ 96 h 为快速增长期, 96 ~ 120 h 为平台期; 2% FBS 培养条件下, 细胞 0 ~ 24 h 为快速增长期, 24 ~ 120 h 为缓慢增长期, 120 h 时细胞数量显著低于含 10% FBS 培养基组(图 5)。综上, 10% FBS 培养条件下的细胞生长速度及活性显著优于 2% FBS 培养条件下的细胞。

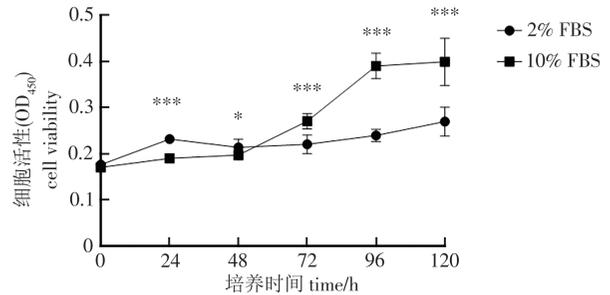


图 5 不同血清浓度培养条件下 MVICs 细胞的活性。

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

Fig. 5 MVICs cell activity under culture conditions with different serum concentrations.

### 3 讨论

本试验采用 II 型胶原酶消化法分离半月龄五指山猪心脏 MVICs, 经鉴定和传代对其进行纯化。MMVD 过程中, qVICs 转变为 aVICs,  $\alpha$ -SMA 表达增多、I 型胶原等间充质产物表达异常<sup>[14]</sup>, 进而引发 ECM 沉积与重塑<sup>[15-16]</sup>。目前人类二尖瓣疾病多采用手术修复和置换等治疗方法, 该方法具有侵入性, 费用昂贵且可能导致严重的并发症<sup>[17]</sup>。亟需利用体外模型研究其发病机制及新药开发。原代细胞具有保留细胞在体内的生理功能的特点, 同时其体外培养可操作性与复制性强, 有利于研究细胞功能与生命活动<sup>[18]</sup>。获取天然的人类二尖瓣组织非常困难, 经研究表明, 猪和人类二尖瓣的解剖结构非常相似, 且被用于体外二尖瓣疾病研究<sup>[19-20]</sup>。因此, 本研究分离和纯化猪 MVICs 并建立体外猪 MVICs 培养体系是目前探索二尖瓣疾病发病机理及开发靶向药物的重要条件, 为开展相关试验提供研究基础。

既往研究中对 MVICs 的分离培养主要采用组织块贴壁法<sup>[18]</sup>和酶消化法<sup>[12]</sup>。本试验采用半月龄五指山猪心脏二尖瓣作为原材料, 使用 II 型胶原酶消化法提取猪 MVICs, 经鉴定和传代对其进行纯化。为验证本试验提取的猪 MVICs 纯度, 采用免

疫荧光法鉴定内皮/间质标志物。CD31为内皮细胞标志物;Vimentin为间质细胞骨架构成成分<sup>[21]</sup>。结果显示分离的原代细胞中CD31阴性,Vimentin阳性,表明分离出的细胞为MVICs,且未出现VECs污染。 $\alpha$ -SMA为平滑肌肌动蛋白,在活化的aVICs中高表达<sup>[21]</sup>。为进一步分析原代MVICs的活化程度,免疫荧光法鉴定 $\alpha$ -SMA为低表达,表明分离的MVICs未发生明显的活化。综上,本研究分离出的MVICs纯度较高、细胞形态较好且能进行连续传代,可以作为良好的体外模型。VICs具有多种表型,在二尖瓣疾病状态下为aVICs状态,在健康状态下为qVICs(在前文有提到为静止的MVICs)<sup>[22]</sup>。有研究表明离体培养极易使VICs发生活化<sup>[23]</sup>,为使MVICs体外培养体系能够成为研究二尖瓣疾病的体外模型,本试验探索是否能通过优化培养条件使体外培养MVICs达到qVICs的水平,探究血清浓度是否影响VICs活化。本研究随后采用2% FBS与10% FBS的AF-12培养基培养MVICs。2% FBS与10% FBS的培养基所培养的MVICs主要形态皆为梭形,无明显差异。两组细胞皆可稳定传代,生长状态良好。利用CCK8实验比较不同培养时间下两组细胞的细胞活性,结果显示,10% FBS组生长速度高于2% FBS组。这表明血清浓度对于细胞活性及细胞生长速度有很大影响,较高浓度的血清能使细胞活性更高,生长速度更快。免疫荧光和Western Blot检测两组 $\alpha$ -SMA与Vimentin表达水平以检测MVICs活化水平变化的结果显示,2% FBS组细胞的活化水平较10% FBS组无显著变化。以上结果表明,血清浓度影响MVICs的细胞活性和生长速度,且可能影响细胞的活化水平。

#### 4 结论

综上所述,本研究成功利用酶消化法分离出五指山猪MVICs,建立可稳定传代的猪MVICs离体培养模型。随后筛选不同浓度血清培养基,结果表明含10% FBS的AF-12培养基能更好的维持MVICs增殖活力,实现体外稳定传代培养。本研究为MMVD体外疾病模型的构建提供技术基础,为深入探究MMVD的发病机制提供体外研究平台,具有重要的理论和现实意义。

#### 参考文献:

- [1] O'BRIEN M J, BEIJERINK N J, WADE C M. Genetics of canine myxomatous mitral valve disease [J]. *Anim Genet*, 2021, 52(4): 409-421.
- [2] DELLING F N, VASAN R S. Epidemiology and pathophysiology of mitral valve prolapse: new insights into disease progression, genetics, and molecular basis [J]. *Circulation*, 2014, 129(21): 2158-2170.
- [3] FOX P R. Pathology of myxomatous mitral valve disease in the dog [J]. *J Vet Cardiol*, 2012, 14(1): 103-126.
- [4] KEENE B W, ATKINS C E, BONAGURA J D, et al. ACVIM consensus guidelines for the diagnosis and treatment of myxomatous mitral valve disease in dogs [J]. *J Vet Intern Med*, 2019, 33(3): 1127-1140.
- [5] 宋光远, 刘然, 卢志南, 等. 功能性二尖瓣反流的治疗策略[J]. *临床心血管病杂志*, 2022, 38(6): 433-438.
- [6] TANG Q, MCNAIR A J, PHADWAL K, et al. The Role of Transforming Growth Factor-beta Signaling in Myxomatous Mitral Valve Degeneration [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2022, 9: 872288.
- [7] PIERA-VELAZQUEZ S, LI Z, JIMENEZ S A. Role of endothelial-mesenchymal transition (EndoMT) in the pathogenesis of fibrotic disorders [J]. *The American journal of pathology*, 2011, 179(3): 1074-1080.
- [8] MARKBY G, SUMMERS K M, MACRAE V E, et al. Myxomatous Degeneration of the Canine Mitral Valve: From Gross Changes to Molecular Events [J]. *J Comp Pathol*, 2017, 156(4): 371-383.
- [9] 王希龙, 欧江涛, 黄礼光, 等. 海南五指山猪遗传多样性的微卫星分析 [J]. *生物多样性*, 2005, 13(1): 20-26.
- [10] CAMACHO P, FAN H, LIU Z, et al. Large mammalian animal models of heart disease [J]. *Journal of cardiovascular development and disease*, 2016, 3(4): 30.
- [11] ZHAO Y, XIANG L, LIU Y, et al. Atherosclerosis induced by a high-cholesterol and high-fat diet in the inbred strain of the Wuzhishan miniature pig [J]. *Animal biotechnology*, 2018, 29(2): 110-118.
- [12] LIU M M, FLANAGAN T, LU C C, et al. Culture and characterisation of canine mitral valve interstitial and endothelial cells [J]. *The Veterinary Journal*, 2015, 204(1): 32-39.
- [13] TAN K, MARKBY G, MUIRHEAD R, et al. Evaluation of canine 2D cell cultures as models of myxomatous mitral valve degeneration [J]. *PLoS One*, 2019, 14(8): e0221126.
- [14] WATABE T, TAKAHASHI K, PIETRAS K, et al. Roles of TGF-beta signals in tumor microenvironment via regulation of the formation and plasticity of vascular system [J]. *Semin Cancer Biol*, 2023, 92: 130-138.
- [15] LI Y, LUI K O, ZHOU B. Reassessing endothelial-to-mesenchymal transition in cardiovascular diseases [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2018, 15(8): 445-456.

- [16] BISCHOFF J. Endothelial-to-Mesenchymal Transition [J]. *Circ Res*, 2019, 124(8): 1163–1165.
- [17] TANG Q, MARKBY G R, MACNAIR A J, et al. TGF-beta-induced PI3K/AKT/mTOR pathway controls myofibroblast differentiation and secretory phenotype of valvular interstitial cells through the modulation of cellular senescence in a naturally occurring in vitro canine model of myxomatous mitral valve disease [J]. *Cell Prolif*, 2023, 56(6): e13435.
- [18] HEANEY A M, BULMER B J, ROSS C R, et al. A technique for in vitro culture of canine valvular interstitial cells [J]. *Journal of Veterinary Cardiology*, 2009, 11(1): 1–7.
- [19] SCHROEDER M E, GONZALEZ RODRIGUEZ A, SPECKL K F, et al. Collagen networks within 3D PEG hydrogels support valvular interstitial cell matrix mineralization [J]. *Acta Biomater*, 2021, 119: 197–210.
- [20] WU S, LI Y, ZHANG C, et al. Tri-Layered and Gel-Like Nanofibrous Scaffolds with Anisotropic Features for Engineering Heart Valve Leaflets [J]. *Adv Healthc Mater*, 2022, 11(10): e2200053.
- [21] BLEVINS T L, CARROLL J L, RAZA A M, et al. Phenotypic characterization of isolated valvular interstitial cell subpopulations [J]. *The Journal of heart valve disease*, 2006, 15(6): 815–822.
- [22] CONNELL P S, HAN R I, GRANDE-ALLEN K J. Differentiating the aging of the mitral valve from human and canine myxomatous degeneration [J]. *J Vet Cardiol*, 2012, 14(1): 31–45.
- [23] LIU A C, JOAG V R, GOTLIEB A I. The emerging role of valve interstitial cell phenotypes in regulating heart valve pathobiology [J]. *Am J Pathol*, 2007, 171(5): 1407–1418.

## Isolation, culture and identification of mitral valve interstitial cells from Wuzhishan pig

CHEN Shumin, CHEN Yu, ZHAO Yuanjie, LIU Mengmeng

(School of Tropical Agriculture and Forestry/SARA/SRR, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

**Abstract:** Myxomatous mitral valve disease (MMVD) is one of the most common heart diseases in mammals, which can lead to heart failure and sudden death in clinical practice. The extracellular matrix remodeling caused by mitral stromal cells (MVICs) activation is the key pathological change in the development of MMVD. Therefore, this study intended to establish a separation and culture system for primary MVICs of Wuzhishan pig to obtain stable cultured MVICs, providing cell materials for in vitro research on MMVD. The results showed that the mitral valve cells of Wuzhishan pig isolated by the present method were CD31 negative and Vimentin positive, which were consistent with the characteristics of MVIC. Compared with the medium with different serum concentrations, the complete medium containing 10% FBS serum was more favorable to the proliferation activity of MVICs cells, and could support the stable culture of MVICs in vitro for at least 20 generations. The primary MVICs of Wuzhishan pig obtained in this study can provide an in vitro research platform for the study of the pathological mechanism of mitral valve disease and the further development of targeted drugs.

**Keywords:** myxomatous mitral valve disease; Mitral valve interstitial cells;  $\alpha$ -smooth muscle actin; Wuzhishan pig

(责任编辑:叶 静)