

猕猴肺成纤维细胞的不同分离培养方法及鉴定比较

许振, 蒋海峰, 张磊, 刘潇一, 董婷玉, 檀学文, 严尚学, 常艳, 魏伟

摘要 目的 比较不同方法提取猕猴肺成纤维细胞的效率及对细胞相关功能的影响,为获得类似人肺成纤维细胞提供有效方法。方法 采用两种猕猴肺成纤维细胞的提取方法,组织块黏附法和胶原酶联合消化+组织黏附法。倒置显微镜观察细胞形态,免疫荧光鉴定猕猴肺成纤维细胞,CCK-8检测细胞活力,流式细胞仪检测肺成纤维细胞标志物 α -SMA的表达,凋亡试剂盒检测细胞凋亡,Western blot检测细胞 α -SMA蛋白水平表达。结果 组织黏附法贴壁的组织块72 h后可见小而亮的细胞爬出,4~5 d后细胞小范围爬出,呈长梭形;7 d后可见细胞大范围爬出,形成单层细胞,传代后细胞均呈长梭形。用胶原酶联合消化+组织黏附法处理后24 h即可见小而亮的细胞从组织块中爬出,48 h后可见细胞大范围爬出,细胞呈长梭形;4~5 d后可形成单层细胞,传代后的细胞均呈长梭形,用免疫荧光鉴定均表达 α -SMA。实验结果显示胶原酶联合消化+组织黏附法提取的肺成纤维细胞的活力明显高于组织黏附法所得细胞活力。TGF- β 1刺激肺成纤维细胞后,胶原酶联合消化+组织黏附法提取的细胞增殖更快, α -SMA蛋白表达更高。结论 两种方法均能体外分离出猕猴肺成纤维细胞,胶原酶消化法提取猕猴肺成纤维细胞所需的时间较短且状态较好,TGF- β 1刺激后相关蛋白水平表达更稳定,是获得猕猴肺成纤维细胞的有效方法,也是获得接近人原代肺成纤维细胞的有效方法。

关键词 猕猴;肺;原代培养;肺成纤维细胞

中图分类号 R 563.9

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)07-1041-07
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.07.006

肺部疾病是常见疾病,其中肺纤维化(pulmonary fibrosis, PF)和类风湿关节炎合并间质性肺病(rheumatoid arthritis with interstitial lung disease, RA-ILD)是难治疾病^[1-2],其特征是成纤维细胞异常增

殖,细胞外基质过度积累,炎症损伤和组织结构破坏,最终导致肺瘢痕形成、肺功能不全和呼吸衰竭,严重影响呼吸系统功能及呼吸能力。成纤维细胞是肺间质中最丰富的细胞类型,产生胶原蛋白、基质金属蛋白酶等细胞外基质。在维持肺结构和功能方面起着关键作用。成纤维细胞在损伤和炎症部位的增多对于组织修复至关重要, α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)是成纤维细胞的特征蛋白,肺成纤维细胞受促纤维化细胞因子TGF- β 1的刺激后, α -SMA的表达水平会明显升高^[3-5]。猕猴是最接近人的非人灵长类动物,其疾病发生的病理机制等相对于其他动物更接近于人,相比于小鼠、兔等实验动物能更直接地反映疾病发生和发展的病理过程,因此分离得到的原代猕猴肺成纤维细胞对于研究肺纤维化、类风湿关节炎合并间质性肺病等的病理机制至关重要^[6-7]。该研究对两种用于分离猕猴肺成纤维细胞的方法进行了比较。第一种使用胶原酶联合消化+组织黏附法(后统称为胶原酶消化法),第二种是组织黏附法。此两种方法均可用于从肺组织中分离成纤维细胞。通过比较这两种方法,试图摸索出猕猴肺成纤维细胞的最佳分离方法及条件,为进一步在猕猴肺成纤维细胞的体外模型中开展实验提供更好的研究手段,为获得更接近人的原代肺成纤维细胞提供方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选取3~5岁普通级实验猕猴,饲养于安徽医科大学临床药理研究所实验动物中心。温度20~26℃;日温差 \leq 4℃;相对湿度40%~70%。昼夜交替满足猕猴作息时间,饲料、水不受限制,通过瓜果蔬菜补充营养,定时为猕猴播放音乐及视频,严格遵守动物福利标准。实验动物购自旌德县皖南猕猴驯养繁殖基地,生产许可证号:SCXK(皖)2020-001;实验动物使用许可证号:SYXK(皖)2020-001。该实验过程得到安徽医科大学临床药理研究所动物伦理委员会批准(伦理批号:PT-2020-001)。

1.1 主要实验试剂及仪器 青链霉素溶液(100 \times)、0.125%胰蛋白酶(含EDTA)、DAPI染色液、

2022-05-18 接收

基金项目:安徽高校重点科研平台协同创新项目(编号:GXXT-2020-065)

作者单位:安徽医科大学临床药理研究所,合肥 230032

作者简介:许振,男,硕士研究生;

常艳,女,博士,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: yychang@ahmu.edu.cn;

魏伟,男,博士,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: wwei@ahmu.edu.cn

抗荧光猝灭封片液购自上海 Beyotime 公司; DMEM 培养基、RPMI-1640 培养基和胎牛血清(fetal bovine serum, FBS) 购自以色列 Biological Industries 公司; 凋亡试剂盒(AP105-60-kit, 购自杭州联科生物公司); CCK-8(BS350A, 购自合肥兰杰柯科技有限公司); α -SMA(兔抗单克隆抗体, ab32575, 购自英国 abcam 公司)、GAPDH(兔抗单克隆抗体, 美国 Pro-teintech 公司); BIO-RAD powerpack164-5070 电泳仪(美国 BIO-RAD 公司); Image Quant 化学发光成像系统(美国 GE 公司); 倒置显微镜购自美国 GE Healthcare Life Sciences 公司; 实时荧光定量 PCR 仪购自美国 Applied Biosystems 公司; 十色流式细胞分析仪购自美国 Beckman Coulter 公司。

1.2 猕猴肺成纤维细胞分离培养方法

1.2.1 取材 获得猕猴肺组织后,取 0.5 cm³ 体积的肺组织块放于预冷的无菌 0.9% 氯化钠溶液中,洗除血块、表面结缔组织和包膜后放于无菌 EP 管中,用无菌剪刀剪碎成小于 1 mm³ 的组织块,将剪碎的组织块移至无菌的 15 ml 离心管中。

1.2.2 组织黏附法 将剪碎的组织块放于 15 ml 离心管中,直接用(含 20% FBS, 1% 青霉素 G 钠盐, 10 mg/ml 硫酸链霉素)高糖 DMEM 重悬组织块后用巴氏吸管将重悬的组织块均匀黏附在无菌细胞瓶中,注意黏附的组织块间隔大约 1~2 mm。黏附组织块的细胞瓶中加入 2 ml 20% DMEM 后垂直放于 37 °C 培养箱中。4 h 后缓慢将细胞瓶放倒培养。

1.2.3 胶原酶联合消化 + 组织黏附法 在装有剪碎组织块的 15 ml 离心管中加入 2 ml 的胶原酶(1 mg/ml I 型胶原酶 + 0.01 mg/ml Dnase1 + RPMI-1640 培养基)和 2 ml 的 0.125% 胰酶消化液,并吹打 3~4 次后放于 37 °C 恒温箱中震荡 20 min,取出后静置 5 min,尽量用无菌吸管吸出胶原酶后加入(含 20% FBS, 1% 青霉素 G 钠盐, 10 mg/ml 硫酸链霉素)高糖 DMEM 培养基,用上述相同方法将组织均匀黏附在无菌细胞瓶中。放于培养箱中 4 h 后加入 2 ml 20% 血清的 DMEM 培养基培养。

1.2.3 细胞培养及传代 两种方法在细胞瓶中将组织黏附后,待培养至第 3 天将培养基吸出,重新加入 3 ml(含 20% FBS, 1% 青霉素 G 钠盐, 10 mg/ml 硫酸链霉素)高糖 DMEM。组织黏附法黏附的组织块在第 9~10 天可得到单层细胞,在超净台中吸出培养基,用无菌 PBS 洗两遍尽量吹掉组织块,加入 0.125% 胰酶消化 1 min 后加入含有血清的 DMEM 培养基,反复吹打 9~10 次将细胞吹下,将收集的细

胞悬液过滤后以 1 500 r/min 离心 5 min,弃上清液加入 20% 血清的 DMEM 培养基重悬细胞转移至新细胞瓶中,在 37 °C 培养箱中培养 4~5 d 可生长至 70%~80%。胶原酶消化法在第 6 天,用上述方法消化过滤得到细胞,过滤后的细胞在 37 °C 培养箱中培养 3~4 d 即可生长至 70%~80%。

1.3 肺成纤维细胞形态观察与鉴定

1.3.1 形态学观察 倒置显微镜下观察细胞形态和生长状况。

1.3.2 免疫荧光法检测 α -SMA 的表达 收集培养至第 3 代的细胞于 24 孔板中爬片 24 h,室温固定封闭,100 μ l PBS 稀释 α -SMA 抗体 4 °C 孵育一晚,第 2 天 PBS 洗三遍后加入荧光通道二抗孵育 2 h, PBS 洗三遍后加入 DAPI 室温孵育 8 min,最后取出爬片滴加抗荧光猝灭剂固定在载玻片上,用激光共聚焦显微镜观察 α -SMA 蛋白的表达。

1.3.3 流式检测细胞的纯度 消化收集第 3 代的肺成纤维细胞置 1.5 ml EP 管中,用 PBS 洗一遍后以 50 μ l PBS 重悬细胞并加入 α -SMA 抗体孵育 40 min,离心弃上清后 50 μ l PBS 重悬加入通道二抗孵育 30 min,离心去除上清后加入 200 μ l PBS 在流式分析细胞仪中检测肺成纤维细胞的比例。

1.3.4 CCK-8 检测细胞活力 收集培养至第 3 代的细胞 1×10^5 个/孔接种于 96 孔板中。37 °C 培养 24 h 后加入刺激剂 TGF- β 1 6 h 后 96 孔板中加入刺激剂的组和未加入刺激剂的组加入 10 μ l/孔 CCK-8 试剂,培养 1 h 后酶标仪检测波长为 450 nm 处的吸光度值。

1.3.5 Western blot 检测细胞 α -SMA、IL-6 和 MMP-9 的表达 收集细胞提取蛋白。配制 10% 的 SDS-PAGE 凝胶,上样电泳,转移至 PVDF 膜上,用含 0.05% 吐温 20 的 PBS 配制的 5% 脱脂牛奶 37 °C 摇床封闭 2 h,孵育一抗 4 °C 过夜,洗去一抗后 37 °C 孵育二抗后 2 h,洗去二抗,化学发光成像系统显影。采用 Image J 图像分析软件进行结果分析,测得条带的灰度值,计算各组的条带和内参 GAPDH 的比值以反映目的蛋白表达水平,比较各组间的差异。

1.3.6 qPCR 检测 IL-6、MMP-9 的表达 收集细胞,提取细胞 RNA,逆转录得到 cDNA 后检测 IL-6 和 MMP-9 的表达。GAPDH(Rhesus monkey) F: 5'-TGACAACAGCCTCAAGATCG-3', R: 5'-TGTGGTCA TGAGTCCTTCCA-3'; IL-6(Rhesus monkey) F: 5'-CTC AGCCCTGAGAAAGGAGA-3', R: 5'-ACCAGGCAAGT GTCCTCATT-3'; MMP-9(Rhesus monkey) F: 5'-GAC

AAGAAGTGGGGCTTCTG-3', R: 5'-CCGGCACTGAGG TATGATCT-3'.

1.4 流式检测细胞凋亡 待细胞培养至第3代时,用胰酶将细胞消化至EP管中,将上清培养液与胰酶消化下来的细胞用凋亡试剂盒在流式分析仪上检测细胞凋亡。

1.5 统计学处理 采用SPSS 26.0软件进行数据分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间差异比较采用单因素方差分析。GraphPad Prism 6.0软件绘制统计图,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同方法提取原代猕猴肺成纤维细胞的形态学观察

2.1.1 组织黏附法分离出的猕猴肺成纤维细胞的形态学观察 组织黏附法培养24 h后(图1A),组织块周围未见细胞爬出。72 h后,组织块周围逐渐爬出少量小圆形发亮的细胞。第4天(图1B),组织块周围细胞逐渐变成梭形,但细胞呈零星分布。第7天,爬出的细胞逐渐范围扩大,细胞开始汇合生长,细胞开始全部变成长梭形,呈线性纺锤状。培养10天左右,细胞基本上长满单层,占80%~90%,细胞大多数呈长梭形,少数呈多边形细胞。传代后的细胞接种于细胞瓶中48 h即可进入指数生长期,72 h后处于指数生长期,96 h生长可达到高峰。

2.1.2 胶原酶消化法分离出的猕猴肺成纤维细胞的形态学观察 胶原酶消化法黏附的组织块培养24 h后,组织块周围逐渐爬出发亮的小圆形细胞(图1E)。培养48 h后,组织块周围小圆形细胞开始逐渐变为长梭形或三角形的细胞。72 h时组织

块周围爬出的细胞几乎全部变成长梭形的细胞,爬出的细胞范围逐渐扩大。第4天时爬出的细胞基本上单层融合(图1F),多数细胞可见核分裂现象并聚集成团生长。第6天时细胞快速生长汇合,约占细胞瓶的80%~90%,细胞连接紧密变得细长类似纺锤体,胰酶消化传代后的细胞接种于细胞瓶中30 min贴壁,24 h即可进入指数生长期,48 h后处于指数生长期,72 h生长可达到生长高峰。

2.2 不同方法提取的原代猕猴肺成纤维细胞的鉴定

2.2.1 流式检测 α -SMA表达水平 细胞用分析流式标记 α -SMA,结果显示两种方法提取的猕猴肺成纤维细胞表达 α -SMA的比例均为11%左右,见图2A。

2.2.2 免疫荧光检测 α -SMA表达水平及分布情况 分离的原代猕猴肺成纤维细胞用免疫荧光标记 α -SMA鉴定细胞,免疫荧光结果显示胶原酶消化提取的细胞表达 α -SMA,主要分布在细胞质中;而组织黏附法提取的细胞 α -SMA表达呈强阳性,同样也分布在细胞质中。给予TGF- β 1刺激后,胶原酶联合消化的细胞 α -SMA表达升高,而组织黏附法的细胞 α -SMA表达变化不明显,见图2B。

2.2.3 凋亡试剂盒检测细胞凋亡率 收集不同传代周期点的细胞用凋亡试剂盒检测结果表明(图3),两种方法分离的细胞第2代和第3代的细胞凋亡率都在1%以下,第5代和第7代的凋亡率在2%左右。整体来看,两种方法提取的猕猴肺成纤维细胞第1代到第8代都没有明显早期凋亡(第四象限)和凋亡(第一象限),但是在第5代之后培养过程中死亡的细胞比较多(第二象限)。

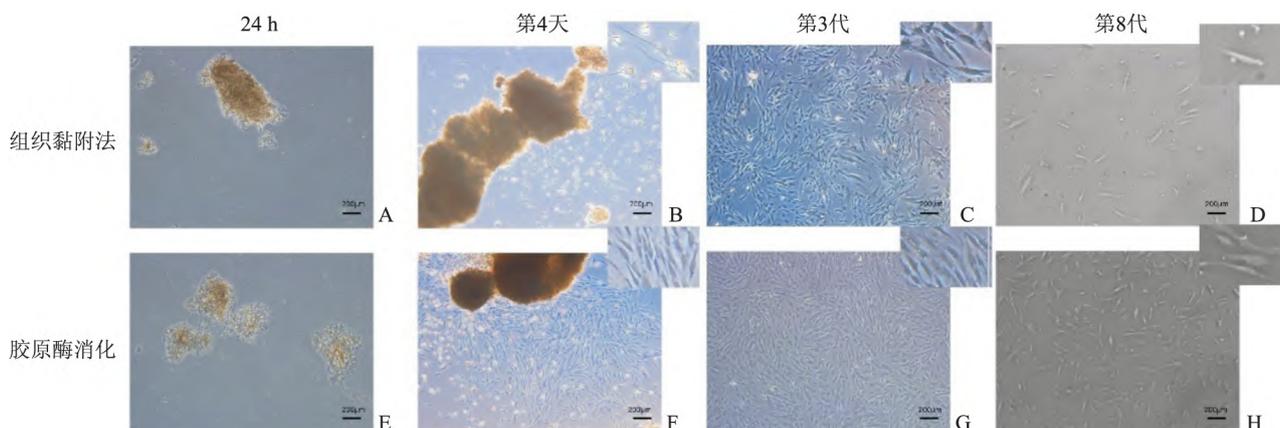


图1 组织黏附法和胶原酶消化法24 h、第4天、第3代、第8代培养猕猴肺成纤维细胞的形态学观察 $\times 10$

A: 组织黏附法提取的猕猴肺成纤维细胞24 h细胞形态; B: 4 d细胞形态; C: 第3代细胞形态; D: 第8代细胞形态; E: 胶原酶消化提取的猕猴肺成纤维细胞24 h细胞形态; F: 4 d细胞形态; G: 第3代细胞形态; H: 第8代细胞形态

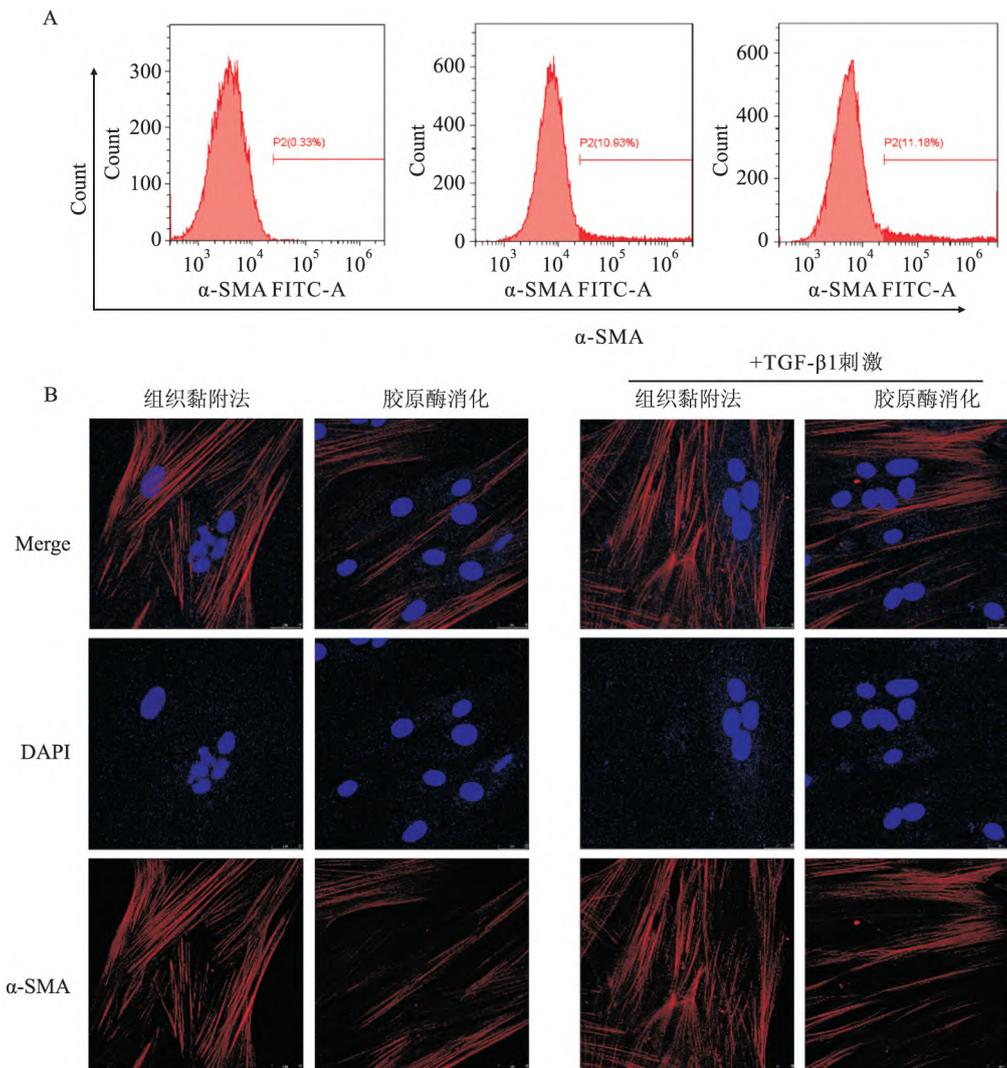


图2 肺成纤维细胞 α-SMA 表达水平

A: 肺成纤维细胞间标流式标记 α-SMA 抗体; B: 肺成纤维细胞免疫荧光 α-SMA 蛋白荧光观察

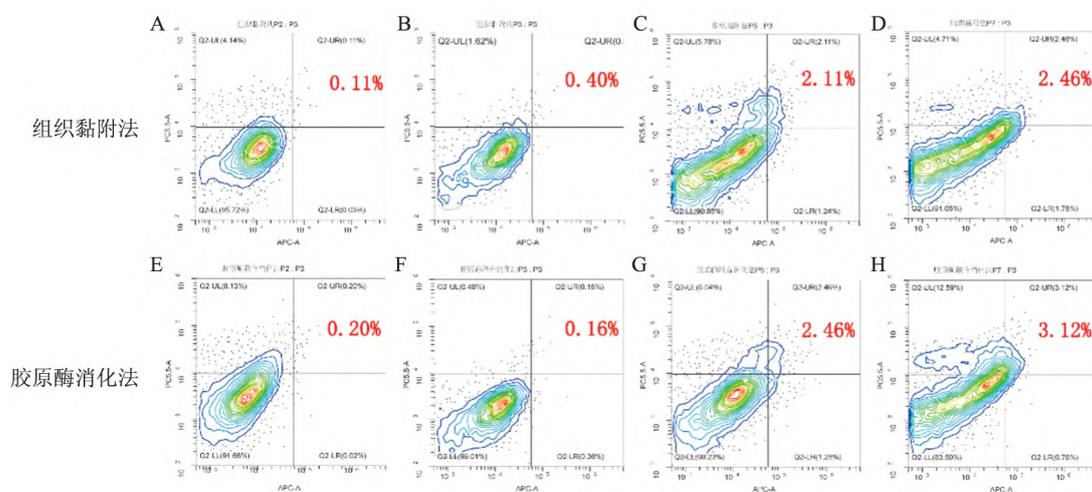


图3 肺成纤维细胞凋亡率检测

A: 组织黏附法提取的猕猴肺成纤维细胞第2代细胞凋亡率; B: 第3代细胞凋亡率; C: 第5代细胞凋亡率; D: 第8代细胞凋亡率; E: 胶原酶消化法提取的猕猴肺成纤维细胞第2代细胞凋亡率; F: 第3代细胞凋亡率; G: 第五代细胞凋亡率; H: 第8代细胞凋亡率

2.2.4 CCK-8 检测猕猴肺成纤维细胞的细胞活力

收集培养至第3代的细胞用CCK-8检测细胞活力。结果表明,胶原酶消化提取细胞的细胞活力高于组织黏附法提取的细胞。细胞同时加了TGF-β1刺激剂后,组织黏附法组的细胞加了刺激剂后细胞活力升高($F < 13.556$ $P < 0.05$)。而胶原酶消化组的细胞活力与不加刺激剂组比较,细胞活力升高($F < 15.007$ $P < 0.01$),见图4。

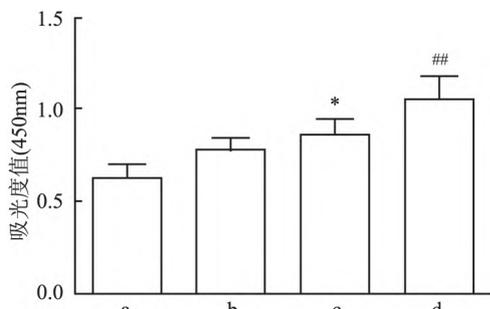


图4 肺成纤维细胞的细胞活力检测

a: 组织黏附法提取的肺成纤维细胞; b: 胶原酶消化提取的肺成纤维细胞; c: a组细胞加入TGF-β1刺激; d: b组细胞加入TGF-β1刺激; 与a组比较: * $P < 0.05$; 与b组比较: ## $P < 0.01$

2.5 Western blot 检测猕猴肺成纤维细胞的α-SMA 的表达

提取出的细胞加入TGF-β1刺激,检测α-SMA蛋白的表达水平。结果显示,两种方法提取的细胞给予TGF-β1刺激后,与未加刺激的细胞相比,α-SMA蛋白表达上升,胶原酶消化得到的细胞与加入刺激后相比具有统计学意义($P < 0.05$),见图5B。

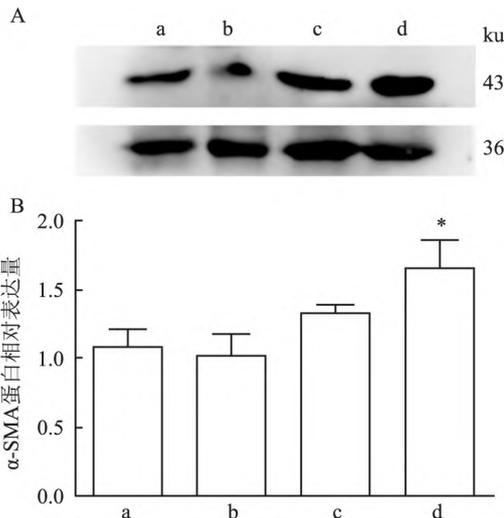


图5 猕猴肺成纤维细胞α-SMA蛋白表达

A: α-SMA和GAPDH条带图; B: α-SMA蛋白水平的比较; a: 组织黏附法提取的肺成纤维细胞; b: 胶原酶消化提取的肺成纤维细胞; c: a组细胞加入TGF-β1刺激; d: b组细胞加入TGF-β1刺激; 与b组比较: * $P < 0.05$

2.6 qPCR 检测猕猴肺成纤维细胞MMP-9、IL-6 基因表达

提取两种细胞的总RNA,qPCR检测了MMP-9、IL-6 mRNA的表达,结果显示,两种方法提取的细胞都表达MMP-9和IL-6。胶原酶消化提取的细胞和组织黏附法提取的细胞MMP-9 mRNA表达水平基本无变化,IL-6 mRNA表达水平同样无明显差异。Western blot结果和PCR结果一致,两种蛋白在细胞上都有表达且无明显差异。

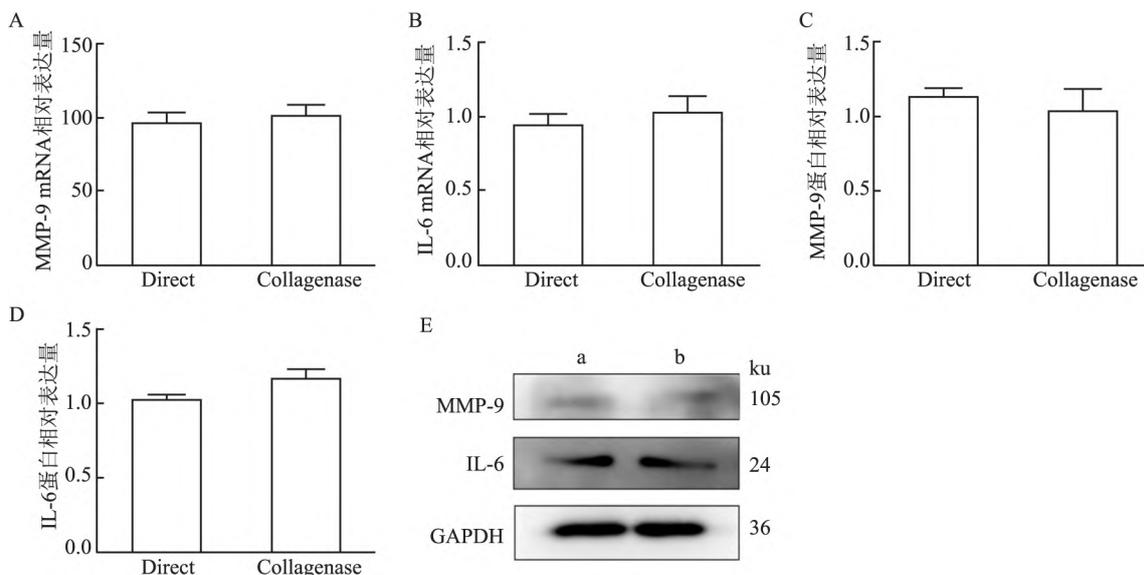


图6 猕猴肺成纤维细胞MMP-9、IL-6表达

A: MMP-9基因水平的表达; B: IL-6的基因水平的表达; C: MMP-9蛋白水平的表达; D: IL-6蛋白水平的表达; E: MMP-9和IL-6条带图; a: 组织黏附法提取的肺成纤维细胞; b: 胶原酶消化提取的肺成纤维细胞

3 讨论

人的肺组织结构复杂,分为五个肺叶,肺实质由许多不同的细胞组成,其中肺成纤维细胞是肺间质中最丰富的细胞类型^[8]。成纤维细胞主要功能是产生 I 型胶原蛋白和基质金属蛋白酶等细胞外基质。因此它们在维持肺结构和功能方面起着关键作用。肺部损伤和炎症部位的成纤维细胞对于组织修复至关重要。然而,成纤维细胞的增多会导致组织功能异常,并可能导致包括肺纤维化、慢性阻塞性肺病和哮喘在内的疾病。一直以来,动物疾病模型是我们研究间质性肺病诊断、机制及药物治疗必要手段,由于小鼠等实验动物与人的肺在大小、结构及分子水平的差异,迫切需要开发与人类相接近的肺模型。而猕猴是最接近人的非人灵长类动物,在许多疾病发生发展的病理机制中与人类具有很多相似之处,相较于大小鼠等动物具有更好的临床意义^[9-10]。目前关于肺成纤维细胞功能的大部分知识都来自于从肺组织中分离出原代成纤维细胞的研究,如何在猕猴身上提取肺组织中的成纤维细胞对于今后在体外模型上开展相关实验具有重要意义。

前期查询了关于提取小鼠肺成纤维细胞的方法,但小鼠肺成纤维细胞在数量、功能和酶含量等与人存在异质性^[11]。猕猴肺成纤维细胞可以较好的在体外实验中代替人肺成纤维细胞。本实验总结了两种方法提取猕猴肺组织中的成纤维细胞并对此两种方法加以比较,试图为选择出更好的提取猕猴肺成纤维细胞的方法提供依据。组织黏附法是一种相对简单的方法,组织不加处理直接剪碎后黏附贴壁,但需要大约 10 d 才可得到单层细胞,由于细胞从组织中爬出时间较长,组织在长期培养中存在易污染、传代后细胞生长周期相对过长、生存代数少等缺点。胶原酶消化法是一种先胶原酶消化后再贴壁的方法,在 6 d 左右即可得到单层细胞,消化传代后得到的细胞生长迅速,传代周期长(可传代 8~9 代)。但是需注意胶原酶消化过程中时间不宜太长,一般消化 20~30 min 即可,消化时间过长或浓度过高等因素都有可能损伤细胞,使组织块难以贴壁或细胞难以爬出。 α -SMA 是肺成纤维细胞的标志性蛋白,也是检测肺成纤维细胞功能性实验的主要手段。本文利用免疫荧光和 Western blot 实验结果表明组织黏附法得到的细胞 α -SMA 阳性表达更多,在 TGF- β 1 刺激后 α -SMA 的表达同胶原酶消化得到的细胞刺激后相比上升趋势不明显。组织黏附法得到的细

胞传代到第 5 代左右细胞体积变大、细胞状态差,细胞活力低。肺组织中 MMP-9 升高能够参与肺内炎症修复和加速纤维化,另外 IL-6 水平下降后在小鼠模型中也可以加速肺部纤维化的发展^[12],实验结果显示两种方法提取的细胞都有表达 MMP-9 和 IL-6,且表达无明显差异。胶原酶消化后得到的细胞表达 α -SMA, TGF- β 1 刺激后 α -SMA 表达呈强阳性,是一种典型成纤维细胞形态特征,且提取出的猕猴肺成纤维细胞活性较好。

综上所述,本实验确立了两种可以分离出猕猴肺成纤维细胞的方法,分别是组织黏附法和胶原酶联合消化后组织块黏附法。通过多种研究方法比较相关的细胞特性,明确了胶原酶联合消化后组织黏附法分离出的猕猴肺成纤维细胞具有典型的形态特征和成纤维细胞的功能,并且用此法分离出的细胞活性更好,是一种较为可靠快速提取原代猕猴肺成纤维细胞的方法,为今后研究肺疾病获得更接近人的原代肺成纤维细胞提供方法,有助于为阐明人类肺部发育和疾病的潜在机制提供手段。

参考文献

- [1] Selman M, King T E, Pardo A, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy [J]. *Ann Intern Med*, 2001, 134(2): 136-51.
- [2] Zamora-Legoff J A, Krause M L, et al. Patterns of interstitial lung disease and mortality in rheumatoid arthritis [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2017, 56(3): 344-50.
- [3] Kuang P P, Lucey E, Rishikof D C, et al. Engraftment of neonatal lung fibroblasts into the normal and elastase-injured lung [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2005, 33(4): 371-7.
- [4] Lu F, Sun X, Xu X, et al. SILAC-based proteomic profiling of the suppression of TGF- β 1-induced lung fibroblast-to-myofibroblast differentiation by trehalose [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2020, 391: 114916.
- [5] Bellaye P S, Yanagihara T, Granton E, et al. Macitentan reduces progression of TGF- β 1-induced pulmonary fibrosis and pulmonary hypertension [J]. *Eur Respir J*, 2018, 52(2): 1701857.
- [6] Plopper C G, Joad J P, Miller L A, et al. Lung effects of inhaled corticosteroids in a rhesus monkey model of childhood asthma [J]. *Clin Exp Allergy*, 2012, 42(7): 1104-18.
- [7] 安云霞, 张晓菊, 汪铮, 等. 淫羊藿苷对肺纤维化大鼠模型的影响及其机制 [J]. *安徽医科大学学报*, 2020, 55(12): 1840-44.
- [8] Peyser R, MacDonnell S, Gao Y, et al. Defining the activated fibroblast population in lung fibrosis using single-cell sequencing [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2019, 61(1): 74-85.
- [9] Plopper C G, Joad J P, Miller L A, et al. Lung effects of inhaled

- corticosteroids in a rhesus monkey model of childhood asthma[J]. *Clin Exp Allergy*, 2012, 42(7): 1104–18.
- [10] Danopoulos S, Thornton M E, Grubbs B H, et al. Discordant roles for FGF ligands in lung branching morphogenesis between human and mouse[J]. *J Pathol*, 2019, 247(2): 254–65.
- [11] Kamati S, Baumgart-Vogt E. Peroxisomes in mouse and human lung: their involvement in pulmonary lipid metabolism[J]. *Histochem Cell Biol*, 2008, 130(4): 719–40.
- [12] Kobayashi T, Tanaka K, Fujita T, et al. Bidirectional role of IL-6 signal in pathogenesis of lung fibrosis[J]. *Respir Res*, 2015, 16(1): 99–113.

Comparison of different isolation and culture methods and identification of rhesus monkey lung fibroblasts

Xu Zhen, Jiang Haifeng, Zhang Lei, Liu Xiaoyi, Dong Tingyu, Tan Xuewen, Yan Shangxue, Chang Yan, Wei Wei

(*Institute of Clinical Pharmacology, Anhui Medical University, Key Lab of Anti-inflammatory and Immune Medicine, Ministry of Education, Anhui Collaborative Innovation Center of Anhui-inflammatory and Immune Medicine, Hefei 230032*)

Abstract Objective To compare the efficiency of different methods for extracting rhesus monkey lung fibroblasts and their effects on functions, so as to provide a method for obtaining primary lung fibroblasts that are closer to human fibroblasts. **Methods** Two extraction methods for rhesus monkey lung fibroblasts were used, direct tissue block adhesion method and collagenase combined digestion with tissue block adhesion method. The cell morphology was observed with the inverted microscope, the purity of isolated rhesus monkey lung fibroblasts was identified by immunofluorescence, cell viability was detected by CCK-8, the expression of α -SMA was detected by flow cytometry and the effect of long-term in vitro culture on cell apoptosis was detected by apoptosis kit. Western blot was used to detect the expression of α -SMA protein. **Results** The combined digestion with collagenase and tissue block adhesion method could see small and bright cells crawling out in 24 hours, and cells could be seen crawling out in a large area after 48 hours. The cells were in a long spindle shape, after 4 days to 5 days, a single layer of cells could be formed. Identified by immunofluorescence, all cells expressed α -SMA. Tissue adhesion method showed small and bright cells crawling out after 72 hours. After 4 days to 5 days, the cells crawled out in a small area and showed a long spindle shape. After a week, the cells crawled out in a large area and formed a single layer of cells and the cells are all expressed α -SMA by immunofluorescence. The experimental results showed that the cell viability of the cells crawled out by the collagenase digestion method was significantly higher than that of the tissue adhesion method. After TGF- β 1 stimulates the cells, the cells extracted by collagenase digestion method proliferated faster and expressed α -SMA more obviously. **Conclusion** Both methods can isolate rhesus monkey lung fibroblasts in vitro, but the collagenase digestion method extracts cells in a shorter time and in better condition. The expression of related proteins is more stable after stimulation by stimulants, which is an effective method to obtain rhesus monkey lung fibroblasts, and it is also an effective method to obtain primary lung fibroblasts that are closer to human.

Key words rhesus monkey; lung; primary culture; lung fibroblast