

人主动脉瓣间质细胞原代培养及体外钙化模型的建立

张 米, 刘晓红, 张伯尧, 韩 林, 陆方林, 张锡武, 龚德军, 徐志云*

第二军医大学长海医院胸心外科, 上海 200433

[摘要] **目的** 原代培养人主动脉瓣间质细胞并建立体外瓣膜细胞钙化模型, 诱导人主动脉瓣间质细胞向成骨细胞分化, 并观察其表型变化。 **方法** 采用胶原酶两次消化法原代培养人主动脉瓣间质细胞, 取传代 3~7 代间质细胞, 随机分为 2 组, 实验组以钙化诱导培养基培养, 对照组以标准培养基培养。1 周后, 行 von Kossa 染色观察钙化结节形成情况, 分光光度计测定碱性磷酸酶活性, 免疫荧光染色检测瓣膜间质细胞表型蛋白, real-time PCR 及蛋白质印迹分析检测成骨相关因子的表达, 评价模型建立情况。 **结果** 培养 1 周后实验组出现钙化结节, 每孔钙化结节数量 $[51.20 \pm 14.31]$ 个高于对照组 $[3.60 \pm 1.82]$ 个, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 同时实验组碱性磷酸酶活性较对照组升高 (约上升 4 倍, $P < 0.05$), 细胞收缩表型平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 增高。Real-time PCR 及蛋白质印迹分析提示, 实验组中成骨相关因子 Runx2、osteocalcin 及 osteopontin 在 mRNA 及蛋白水平均较对照组升高, 磷酸化 Smad1/5/8 蛋白表达也同时升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。 **结论** 成功建立了人主动脉瓣间质细胞体外诱导钙化模型, 诱导后间质细胞呈现相对激活状态, 表型向收缩表型和成骨表型转化, 为今后实验提供了可靠的细胞模型。

[关键词] 主动脉瓣; 间质细胞; 细胞培养技术; 细胞表型

[中图分类号] R 329.29

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2013)05-0488-05

Primary culture and *in vitro* calcification model establishment of human aortic valve interstitial cells

ZHANG Mi, LIU Xiao-hong, ZHANG Bo-yao, HAN Lin, LU Fang-lin, ZHANG Xi-wu, GONG De-jun, XU Zhi-yun*

Department of Cardiothoracic Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To primary culture human aortic valvular interstitial cells (hVICs), establish their *in vitro* calcification model, and to induce hVICs differentiation to osteogenesis and to observe the phenotype changes. **Methods** hVICs were digested from native valves and used for experiments after 3-7 passages. The cells were cultured in osteogenic media or in normal media. One week later the calcified nodules were stained and measured by von Kossa. The activity of alkaline phosphatase (ALP) was examined by spectrophotometer, immunofluorescence staining was used to detect the phenotype protein of hVICs, and real-time PCR and Western blotting analysis were used to examine the osteogenesis associated factors to assess the calcification model of hVICs. **Results** The calcified nodules were found 7 days after osteogenic induction. The calcified nodules in the experimental group were significantly more than that in the control group ($51.20 \pm 14.31/\text{well}$ vs $3.60 \pm 1.82/\text{well}$, $P < 0.05$). The activity of ALP was significantly increased after osteogenic induction compared with the control group (increased by about 4 folds, $P < 0.05$), with increased contractile phenotype α -smooth muscle actin (α -SMA). Real-time PCR and Western blotting results indicated that the expressions of Runx2, osteocalcin, and osteopontin in the experiment group were significantly higher than those in the control group ($P < 0.05$), so was the expression of phosphorylated Smad1/5/8 ($P < 0.05$). **Conclusion** We have successfully established the *in vitro* calcification model of hVICs, with hVICs in an activated state; and the phenotype shifts to contraction and ossification, which provide a reliable cell model for the future study.

[Key words] aortic valve; stromal cells; cell culture techniques; phenotype

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(5):488-492]

既往认为钙化性主动脉瓣疾病 (calcific aortic valve disease, CAVD) 为不可调控的退行性改变, 但近年来临床研究发现, 瓣膜钙化是类似成骨样分化

的主动过程, 并涉及多个成骨相关因子的调节^[1]。瓣膜间质细胞 (valve interstitial cells, VICs) 向成骨细胞样细胞表型的主动转化是主动脉瓣钙化病理改

[收稿日期] 2013-03-11

[接受日期] 2013-03-29

[基金项目] 上海市基础研究重点项目 (11JC1415900)。Supported by the Key Basic Research Foundation of Shanghai (11JC1415900)。

[作者简介] 张 米, 博士生。E-mail: markzhmi@gmail.com

* 通信作者 (Corresponding author)。Tel: 021-31161762, E-mail: zhiyunx@hotmail.com

变的基础之一^[2]。VICs 是主动脉瓣中的主要细胞,起着维持瓣膜正常生理功能的重要作用,在疾病条件如感染、自身炎症反应等情况下,VICs 可能发生功能受损乃至表型转化,从而导致异常瓣膜病变的发生^[3-5]。为了深入研究主动脉瓣病理生理改变的细胞学基础,有必要体外分离和培养 VICs 并建立瓣膜病理形态发生的体外细胞实验模型。但因瓣膜钙化的发病机制尚未明确,国内对人瓣膜间质细胞(hVICs)体外分离、培养的方法尚报道不多。本研究以酶消化法为基础,总结一种方便、快捷、重复性高的 hVICs 分离、培养方法并进一步建立体外钙化诱导模型,从而为瓣膜细胞学体外研究奠定基础。

1 材料和方法

- 1.1 标本收集 人主动脉瓣来源于 2011 年 6 月至 2012 年 12 月期间在第二军医大学长海医院行尸检及心脏移植的患者,本实验经患者或其直系亲属同意。排除所有心源性死亡及生前被诊断有动脉粥样硬化及先天性心脏瓣膜疾病的患者。瓣膜切除后进一步排除肉眼观察到有瓣膜增厚的标本。
- 1.2 原代 hVICs 分离和培养 将主动脉瓣叶浸于 2 mg/mL II 型胶原酶(Sigma,美国)溶液中,37℃培养箱孵育 40 min 后取出置于无菌操作台,以无菌棉签轻轻擦拭瓣膜表面,刮擦下内皮细胞层。之后将瓣膜小心剪成 3 mm×3 mm 的小片,再次置于 II 型胶原酶溶液中,于 37℃培养箱孵育 120 min 后取出。滤去瓣膜残渣,重悬混匀,移入培养皿,常规培养。
- 1.3 实验分组 取传代 3~7 代的 hVICs,以 1×10⁵/mL 的密度种植于 6 孔板内,随机分为对照组和

- 实验组。对照组以细胞培养基(DMEM)+10%胎牛血清(FBS)培养。实验组间质细胞接受钙化诱导培养:0.1% FBS,50 ng/mL 骨形态发生蛋白 2(BMP-2),100 nmol/L 地塞米松,50 μg/mL 抗坏血酸,5 mmol/L β-甘油磷酸(Sigma,美国)。隔 2 d 换液 1 次,培养 7 d。
- 1.4 直接荧光标记法检测 hVICs 表型蛋白 100 μL 细胞悬液中加入异硫氰酸荧光素(FITC)标记的平滑肌肌动蛋白(α-SMA)单抗(Abcam,美国)和波形蛋白(Vimentin)单抗(Santa Cruz,美国) 5 μL,混匀,同时做 FITC 标记的 Ig 同型对照,37℃避光孵育 30 min,PBS 洗涤细胞 2 次,加入 200 μL PBS,混匀,以(BD,美国)检测其上标记的荧光素被激发后发出的荧光。
- 1.5 von Kossa 染色 除去培养基,PBS 洗 3 次,4%多聚甲醛固定 10 min,蒸馏水洗 3 次,浸入新配制的 5%硝酸银溶液中,紫外灯照射 1 h,蒸馏水洗 3 次,5%硫代硫酸钠还原 2 min,蒸馏水洗 3 次,梯度浓度乙醇脱水,镜下观察,记录钙化结节数。
- 1.6 Real-time PCR 检测成骨相关因子 *Runx2*、*osteocalcin*、*Smad1* 和 *osteopontin* mRNA 的表达 常规提取 mRNA,反转录为 cDNA 后,SYBR Green 嵌合荧光定量 real-time PCR(One Step SYBR Prime-Script RT-PCR Kit II)检测 *Runx2*、*osteocalcin*、*Smad1* 和 *osteopontin* mRNA 表达。PCR 引物设计见表 1。反应条件:94℃预变性 30 s;94℃变性 5 s,60℃退火 30 s,40 个循环。以 *βactin* 为内参,根据 2^{-ΔΔCt} 法计算 *Runx2*、*osteocalcin*、*Smad1* 和 *osteopontin* mRNA 表达量。设对照组的表达量为 1,计算实验组中各个因子的相对表达量。

表 1 Real-time PCR 引物序列
Tab 1 Primers for real-time PCR

Gene	Forward	Reverse
<i>βactin</i>	5'-AACAGCCGCCTAGAAAGCAC-3'	5'-CGTTGACATCCGTAAAGACC-3'
<i>Runx2</i>	5'-AGCTTCTGTCTGTGCCCTTCTGG-3'	5'-GGAGTAGAGAGGCAAGAGTTT-3'
<i>Smad1</i>	5'-TTCCATGCCTCTCCACAAG-3'	5'-AGGCATTTCGCATACACCTC-3'
<i>Osteopontin</i>	5'- TTCCAAGTAAGTCCAACGAAAG-3'	5'-GTGACCAGTTCATCAGATTCAT-3'
<i>Osteocalcin</i>	5'-CTTTGTGTCCAAGCAGGA-3'	5'-CTGAAAGCCGATGTGGTCAG-3'

1.7 成骨相关蛋白的蛋白质印迹检测 提取 hVICs 中总蛋白,将含抑制剂的预冷蛋白抽提试剂加入获得的 hVICs 中(2×10⁶ 细胞中加入 30 μL 抽提试剂)。经蛋白含量测定后,凝胶电泳,Runx2、osteocalcin、Smad1、osteopontin、磷酸化 Smad1/5/8

(p-Smad1/5/8)一抗(Santa Cruz,美国)及二抗(Protein Tech,美国)依次孵育,以 β-actin(Protein Tech,美国)为内参照,凝胶成像分析系统分析结果。

1.8 碱性磷酸酶(ALP)活性测定 每组设 5 个样本,收集细胞后,以 PBS 洗涤 3 次,加入细胞裂解

液,震荡 30 s。按照试剂盒(碧云天生物技术有限公司,中国)说明操作: 1 mL 缓冲液 37℃ 孵育 3 min 后加入样品 20 μ L,混匀并保温孵育 30 s,加入 250 μ L 底物液,混匀并保温孵育 30 s,分光光度计读取 405 nm 波长处 2 min 内光密度(D)值变化,根据标准曲线计算 ALP 活性。考马斯亮蓝法测定样本中蛋白含量,ALP 活性用蛋白含量标定。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 11.0 软件进行统计分析,所有连续变量以 $\bar{x}\pm s$ 表示,若符合正态分布,则采用单因素方差分析;如不符合正态分布,则采用非参数检验。检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 hVICs 的形态与表型鉴定 原代培养的间质细胞在约 12 h 时开始贴壁,初呈圆形,形态完整,之后伸展呈梭形,并开始分裂增殖。瓶中还可可见部分尚未消

化完全的瓣膜间质成分。换液 1~2 次后得到纯净背景的单层间质细胞,界限清楚,1 周左右即可形成连续细胞单层,间质细胞呈梭形或纺锤形,生长排列呈放射状或漩涡状走行(图 1A),经成骨细胞分化诱导培养后,hVICs 密度增高,互相重叠生长并表现出明显的聚集样生长趋势(图 1B)。细胞表型鉴定见原代主动脉瓣 hVICs 中 α -SMA 阳性细胞约占 40.7%(图 1C),Vimentin 阳性细胞约占 99.0%(图 1D)。经钙化诱导培养 1 周后,再次行 α -SMA、Vimentin 荧光标记,检测发现, α -SMA 阳性细胞增多(约占 50.7%,图 1E),Vimentin 阳性细胞稍减少(约占 95.2%,图 1F)。

2.2 hVICs 的钙化情况 经钙化诱导培养 7 d 后,von Kossa 染色可见 hVICs 的胞外基质中有钙化结节形成(图 2),随机在实验组与对照组中各抽取 5 孔计数比较,实验组钙化结节数增多(51.20 ± 14.31 vs 3.60 ± 1.82 , $P<0.05$)。

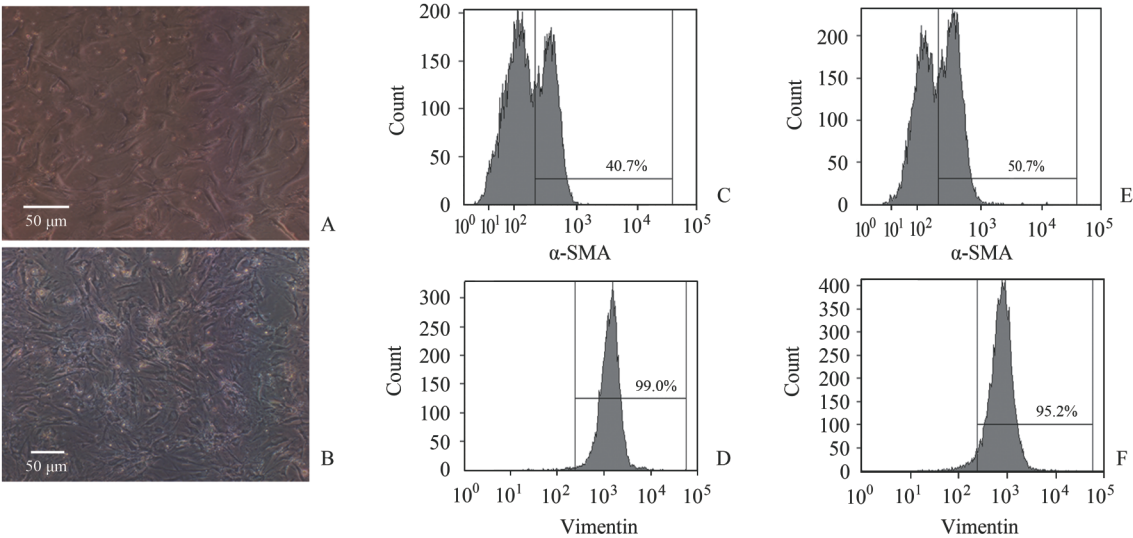


图 1 原代培养 hVICs 经成骨细胞分化诱导后细胞形态学观察
Fig 1 Morphology of hVICs after osteogenic induction

hVICs: Human valve interstitial cells; α -SMA: α -smooth muscle actin. A: Morphological features of hVICs under optical microscope; B: Nodule formation in hVICs 1 week after stimulation; C: α -SMA positive hVICs in culture medium; D: Vimentin positive hVICs in culture medium; E: α -SMA positive hVICs in osteogenesis medium; F: Vimentin positive hVICs in osteogenesis medium

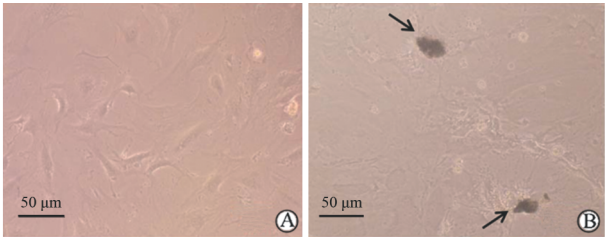


图 2 Von Kossa 染色结果
Fig 2 Von Kossa staining

A: Human valve interstitial cells (hVICs) in growth medium; B: Calcium deposits of hVICs in osteogenesis medium

2.3 hVICs 中成骨相关因子 mRNA 的表达 Real-time PCR 结果表明,实验组细胞中 *Runx2* (2.38 ± 0.12)、*osteocalcin* (1.70 ± 0.16)、*osteopontin* (1.74 ± 0.34)的 mRNA 表达与对照组相比均升高,差异有统计学意义($P<0.05$);*Smad1* mRNA (1.14 ± 0.10)在两组间未见明显变化(图 3)。

2.4 hVICs 中成骨相关蛋白的表达 蛋白质印迹分析结果显示,实验组中 *Runx2*、*osteocalcin* 和 *osteopontin* 蛋白表达均较对照组升高,p-*Smad1/5/8* 表达也同

时上升(图 4),差异有统计学意义($P<0.05$)。

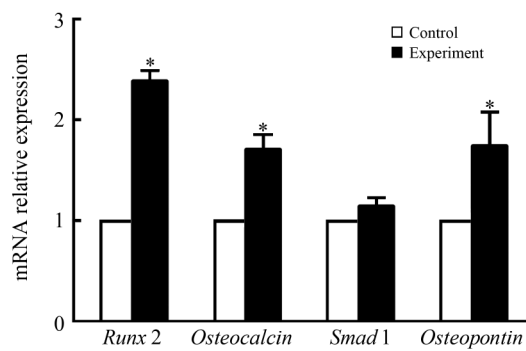


图 3 钙化相关基因 mRNA 表达

Fig 3 Relative expression of osteogenesis-related genes
* $P<0.05$ vs the control group

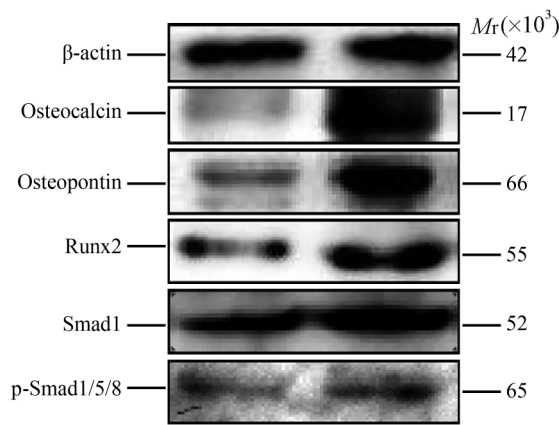


图 4 钙化诱导刺激后钙化相关蛋白表达

Fig 4 Changes in osteogenesis related proteins
measured by Western blotting analysis

2.5 hVICs 中 ALP 活性 实验组 ALP 活性较对照组升高[(0.11 ± 0.017) U/ μ g 蛋白 vs (0.03 ± 0.004) U/ μ g 蛋白, $P<0.05$),提示经过 7 d 培养实验组成熟的成骨细胞活性增高。

3 讨论

手术是目前治疗 CAVD 唯一行之有效的方法。为了减轻该病对患者家庭及整个社会带来的沉重负担,探讨主动脉瓣瓣膜钙化的机制,研究阻断其病理进程的可能性已经成为近年来心脏外科医师关注的热点之一。

近年来的研究证实,退行性主动脉瓣膜疾病中瓣叶钙沉积和骨形成是一项主动调控过程,包含有炎症反应,VICs 表型转化、凋亡,新生血管形成及矿物质沉积等多种病理改变^[6-9]。成骨细胞特异性转录因子 Runx2 等多个成骨细胞和骨组织标记物表达上升,提示主动脉瓣钙化是有钙化相关因子参与的

主动调控过程^[8, 10-11],而 VICs 向成骨细胞表型的转化被认为是这一过程的细胞学基础^[12]。VICs 是构成主动脉瓣的主要成分,广泛分布于主动脉瓣各层结构,可以在环境因子调控下保持不同的生理功能,表现不同的表型特征^[12]。目前认为,静息型 VICs 被激活后向成骨细胞型转化是 CAVD 的发病关键。因此,建立简易、有效、稳定的体外瓣膜钙化模型尤其是 hVICs 的体外钙化模型非常必要。

本研究采用胶原酶两次梯度消化法从人主动脉瓣中分离并体外培养 hVICs,以含有 BMP-2 的钙化诱导培养基诱导钙化,从而实现瓣膜细胞体外对 hVICs 的钙化诱导培养。其中,BMP-2/Smads/Runx2 信号通路是骨组织形成过程中间充质细胞分化为成骨细胞及骨细胞外基质合成、分泌所必需的^[13]; β -磷酸甘油属于有机磷类,是 ALP 的作用底物,分解后能产生磷酸盐,供给体外钙化所必需的磷离子,从而促进细胞钙沉积;抗坏血酸能促进软骨细胞的成熟化,也是胶原合成所必需;地塞米松则可能是通过提高靶细胞对其他因子的敏感性来促进钙化作用^[14-15]。我们以此钙化培养基体外诱导 7 d,镜下可见 hVICs 开始呈聚集样生长,细胞个体也较刺激前增大,细胞呈多角样,细胞核颜色变深,且免疫荧光提示 hVICs 开始表达更多的肌成纤维细胞表型(表现为 Vimentin 的表达降低而 α -SMA 表达增高),表明本实验成功刺激 hVICs 向成骨细胞开始分化。本实验采用 real-time PCR 及蛋白质印迹检测发现:成骨相关因子 Runx2、osteocalcin、Smad1 及 osteopontin 活性均较对照组升高。其中,Smad1 家族是 BMPs 的胞内信号转导蛋白,被 BMP-2 激活磷酸化后诱导一系列下游因子,如 Runx2 等的表达^[13];Runx2 是成骨细胞发生和分化必需的特异性转录因子,被激活后能诱导多潜能间充质干细胞向成骨细胞表型分化,并激活多个下游成骨基因转录,是成骨细胞分化、骨发育的重要调节因素^[16-18];osteocalcin、osteopontin 及 ALP 则被认为是矿物质累积过程中形成羟基磷石灰的关键,也是成熟成骨细胞的重要表型标志^[15, 19-20]。因而本实验所得结果可证实 hVICs 在 BMP-2 相关信号通路激活后,已经转化成为具有活性的成骨细胞样细胞。

目前,国内外采用原代 hVICs 为观察对象直接探讨瓣膜钙化机制研究尚属少见。由于瓣膜功能的特殊性,寻找适当的体外细胞病理模型一直是研究 CAVD 的关键。相较于以往多采用的猪或鼠的

VICs,本实验所采用的来源于人的原代培养 VICs 更接近于病变在患者体内发生时的实际情况,更利于观察人内皮细胞对间质细胞表型转化的调控作用。本实验体外诱导 hVICs 钙化并观察其表型变化,结果证实瓣膜钙化与骨组织钙化类似,为主动可调控过程,针对 hVICs 表型转化中关键作用基因进行针对性干预可能是未来瓣膜病治疗的方向。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Zigelman C Z, Edelstein P M. Aortic valve stenosis[J]. *Anesthesiol Clin*, 2009, 27: 519-532.
- [2] Rajamannan N M, Subramaniam M, Rickard D, Stock S R, Donovan J, Springett M, et al. Human aortic valve calcification is associated with an osteoblast phenotype [J]. *Circulation*, 2003, 107: 2181-2184.
- [3] Yip C Y, Chen J H, Zhao R, Simmons C A. Calcification by valve interstitial cells is regulated by the stiffness of the extracellular matrix[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29: 936-942.
- [4] Taylor P M, Batten P, Brand N J, Thomas P S, Yacoub M H. The cardiac valve interstitial cell[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2003, 35: 113-118.
- [5] Mathieu P, Voisine P, Pépin A, Shetty R, Savard N, Dagenais F. Calcification of human valve interstitial cells is dependent on alkaline phosphatase activity[J]. *J Heart Valve Dis*, 2005, 14: 353-357.
- [6] Mohler E R 3rd, Gannon F, Reynolds C, Zimmerman R, Keane M G, Kaplan F S. Bone formation and inflammation in cardiac valves [J]. *Circulation*, 2001, 103: 1522-1528.
- [7] Merryman W D, Liao J, Parekh A, Candiello J E, Lin H, Sacks M S. Differences in tissue-remodeling potential of aortic and pulmonary heart valve interstitial cells[J]. *Tissue Eng*, 2007, 13: 2281-2289.
- [8] Miller J D, Weiss R M, Heistad D D. Calcific aortic valve stenosis: methods, models, and mechanisms[J]. *Circ Res*, 2011, 108: 1392-1412.
- [9] Kim K M. Apoptosis and calcification [J]. *Scanning Microsc*, 1995, 9: 1137-1175.
- [10] Leopold J A. Cellular mechanisms of aortic valve calcification[J]. *Circ Cardiovasc Interv*, 2012, 5: 605-614.
- [11] Clark-Greuel J N, Connolly J M, Sorichillo E, Narula N R, Rapoport H S, Mohler E R 3rd, et al. Transforming growth factor-beta1 mechanisms in aortic valve calcification: increased alkaline phosphatase and related events[J]. *Ann Thorac Surg*, 2007, 83: 946-953.
- [12] 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: 1407-1418.
- [13] Matsubara T, Kida K, Yamaguchi A, Hata K, Ichida F, Meguro H, et al. BMP2 regulates Osterix through Msx2 and Runx2 during osteoblast differentiation[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283: 29119-29125.
- [14] Ichikawa J. Serum-free medium with osteogenic supplements induces adipogenesis in rat bone marrow stromal cells [J]. *Cell Biol Int*, 2010, 34: 615-620.
- [15] Yu H, Tay C Y, Leong W S, Tan S C, Liao K, Tan L P. Mechanical behavior of human mesenchymal stem cells during adipogenic and osteogenic differentiation[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 393: 150-155.
- [16] Pan K, Yan S, Ge S, Li S, Zhao Y, Yang P. Effects of core binding factor alpha1 or bone morphogenetic protein-2 overexpression on osteoblast/cementoblast-related gene expressions in NIH3T3 mouse cells and dental follicle cells [J]. *Cell Prolif*, 2009, 42: 364-372.
- [17] Zhang Y W, Yasui N, Ito K, Huang G, Fujii M, Hanai J, et al. A RUNX2/PEBP2alpha A/CBFA1 mutation displaying impaired transactivation and Smad interaction in cleidocranial dysplasia[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97: 10549-10554.
- [18] Jeon E J, Lee K Y, Choi N S, Lee M H, Kim H N, Jin Y H, et al. Bone morphogenetic protein-2 stimulates Runx2 acetylation[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281: 16502-16511.
- [19] Chen J H, Yip C Y, Sone E D, Simmons C A. Identification and characterization of aortic valve mesenchymal progenitor cells with robust osteogenic calcification potential[J]. *Am J Pathol*, 2009, 174: 1109-1119.
- [20] Beck G R Jr, Sullivan E C, Moran E, Zerler B. Relationship between alkaline phosphatase levels, osteopontin expression, and mineralization in differentiating MC3T3-E1 osteoblasts[J]. *J Cell Biochem*, 1998, 68: 269-280.

[本文编辑] 周燕娟, 孙岩