

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00617

钙化性主动脉瓣疾病瓣膜间质细胞的生物学特征分析

刘延玲, 刘晓红, 龚德军, 袁 扬, 陶 婧, 黄盛东, 韩 林*

第二军医大学长海医院胸心外科, 上海 200433

[摘要] **目的** 初步分析钙化性主动脉瓣疾病(calcific aortic valve disease,CAVD)瓣膜间质细胞的生物学特征,为后续研究奠定基础。**方法** 采用组织块接种和免疫磁珠法分选正常主动脉瓣和CAVD瓣膜间质细胞,观察其形态学和行为学特征。通过免疫细胞化学染色和流式细胞术分析CAVD瓣膜间质细胞免疫表型的改变。**结果** 与正常主动脉瓣瓣膜间质细胞相比,CAVD瓣膜间质细胞呈肌纤维母细胞和成骨细胞形态,当细胞达到一定密度后细胞自发性收缩、聚集样生长并形成钙化结节。体外培养的CAVD瓣膜间质细胞表达肌纤维母细胞标志物 α -SMA和成骨细胞标志物碱性磷酸酶(ALP)。**结论** CAVD瓣膜间质细胞生物学特征的改变可能是导致主动脉瓣增厚、钙化和交界融合的重要因素。

[关键词] 钙化性主动脉瓣疾病;瓣膜间质细胞; α -平滑肌动蛋白;碱性磷酸酶;成骨细胞

[中图分类号] R 542.52 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)06-0617-04

Biological characteristics of valvular interstitial cells in calcific aortic valve disease

LIU Yan-ling, LIU Xiao-hong, GONG De-jun, YUAN Yang, TAO Jing, HUANG Sheng-dong, HAN Lin*

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

[Abstract] **Objective** To observe the biological characteristics of valvular interstitial cells in calcific aortic valve disease (CAVD), so as to lay a foundation for future study. **Methods** Tissue culture inoculation and immunomagnetic bead separation method were used to isolate the valvular interstitial cells from the normal aortic valves and CAVD valves. The morphological and behavioral characteristics of the isolated valvular interstitial cells were observed. Immunocytochemistry and flow cytometry analysis were employed to determine cellular immunophenotype. **Results** Compared to normal valvular interstitial cells, CAVD valvular interstitial cells displayed a myofibroblast- and osteoblast-like morphology. When the cell density reached a certain level, they spontaneously retracted from the neighboring areas and grouped into aggregates, forming calcific nodules. Furthermore, CAVD valvular interstitial cells cultured *in vitro* were positive for myofibroblast marker α -SMA and osteoblast marker alkaline phosphatase. **Conclusion** Biological characteristic change of CAVD valvular interstitial cells might be the major reason for the thickening, calcification, and commissural fusion in CAVD valvular samples.

[Key words] calcific aortic valve disease; valvular interstitial cells; α -smooth muscle actin; alkaline phosphatase; osteoblasts
[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(6):617-620]

钙化性主动脉瓣疾病(calcific aortic valve disease,CAVD)又称退行性心脏瓣膜疾病,是老年人最常见的心脏瓣膜疾病^[1-2]。除外科手术换瓣治疗外,目前尚缺乏有效的药物防治方法,严重影响老年人的生活质量及寿命。随着我国逐步步入老龄化社会,这一问题将日渐突出。瓣膜间质细胞的生理意义及其在CAVD中的生物学特征的改变引起越来越多的国内外学者的关注^[3],对其研究有可能揭示CAVD的病理机制。因此,本研究体外分离培养CAVD瓣膜间质细胞,观察其生物学特征,初步分析

其免疫学表型,为从细胞水平揭示CAVD的发生、发展规律奠定基础。

1 材料和方法

1.1 标本来源及处理 选取2010年5月至2010年12月,在第二军医大学长海医院胸心外科行手术切除的CAVD主动脉瓣新鲜标本(22例),患者平均年龄(58±10)岁,男女性别比14/8。同时选取5例非心源性和结缔组织疾病死亡的尸检患者主动脉瓣作为正常对照。部分标本经3.7%中性甲醛固定24h后包

[收稿日期] 2011-03-24 **[接受日期]** 2011-06-06

[基金项目] 上海市科委科技基金(2R1438000)。Supported by Fund from Shanghai Committee of Science and Technology, China(2R1438000)。

[作者简介] 刘延玲,副主任技师。E-mail: yanling3369@126.com

* 通信作者(Corresponding author)。Tel: 021-81873439, E-mail: sh_banlin@163.com

埋切片;部分标本用于瓣膜间质细胞的分离培养。

1.2 苏木精-伊红(Hematoxylin and Eosin, H-E)染色 石蜡包埋组织切片(4~5 μm)常规脱蜡至水,苏木精染色 8 min,自来水冲洗;盐酸乙醇分化 30 s;自来水浸泡返蓝 10 min 或温水(约 50 $^{\circ}\text{C}$)浸泡 5 min;置伊红液 2 min;梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封固。

1.3 苦味酸酸性复红-维多利亚蓝染色 石蜡包埋组织切片(4~5 μm)常规脱蜡至水,蒸馏水洗,入 70%乙醇浸洗 2 min,将切片浸入盛有维多利亚蓝的染液中染色 1~2 h,直接入 95%乙醇中分色 5 s,蒸馏水洗 2 min。van Gieson 液染色 2~3 min,直接用无水乙醇冲洗脱水 2 次,二甲苯透明,中性树胶封固。

1.4 瓣膜间质细胞的分离及培养 取手术切除的正常心包采用组织块接种法培养瓣膜间质细胞,并采用免疫磁珠阴性分选的方法去除 CD31 阳性的内皮细胞。即收集处于对数生长期的细胞,加入鼠抗人 CD31(Santa Cruz 公司),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min;用 PBS 洗细胞 2 次,离心去上清;再加 PBS(1 $\times 10^8$ 细胞/ml)充分混悬细胞后,加入羊抗小鼠 IgG(二抗)的免疫磁珠(Invitrogen 公司,美国)混匀;4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min;利用磁极(Invitrogen 公司,美国)分别分选出 CD31 阳性细胞和 CD31 阴性细胞。分选出瓣膜间质细胞常规接种在含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中。

1.5 免疫细胞化学染色 瓣膜间质细胞制备成单细胞悬液后,接种到载玻片,放置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO₂ 培养箱中培养 18 h 后行免疫细胞化学染色。即 PBS 洗 3 次,Triton X-100 破膜 30 min,PBS 洗 3 次,细胞与鼠单克隆抗体在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,PBS 洗 3 次,随后加入 FITC 标记的兔抗鼠的二抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,PBS 洗 3 次,荧光共聚焦显微镜拍照。所用一抗为:Vimentin(Santa Cruz 公司,工作浓度 1:50)、 α -SMA(Abcam 公司,工作浓度 1:50)和碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, ALP; Abcam 公司,工作浓度 1:50)抗体。

1.6 流式细胞术分析细胞免疫表型 收集 2 $\times 10^5$ 细胞,预冷 PBS 洗 2 次,各管细胞中加入一抗 5 μl ,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min;PBS 洗涤 3 遍,加入 FITC 标记的二抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min;PBS 洗涤 3 遍,用流式细胞仪进行检测。

1.7 钙盐染色(von Kossa 染色法) 培养细胞添加钙化结节诱导培养基(DMEM 培养基,10 ng/ml TGF- β_1 ,0.5% FBS,10 mmol/L β -甘油磷酸和 1.5 mmol/L CaCl₂)培养 21 d 后用 PBS 洗 2 遍,3.7% 中性甲醛固定 10 min;蒸馏水洗 3 次,浸入 5%硝酸

银水溶液中紫外线下染色 1 h;蒸馏水洗 3 次,5%硫代硫酸钠还原 2 min,蒸馏水洗 3 次,梯度乙醇脱水,镜下观察。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 10.0 统计软件,分类变量用百分比表示,统计学处理采用 *t* 检验。检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 CAVD 瓣膜组织学特征 H-E 染色可见:CAVD 主动脉瓣瓣膜内大量钙盐沉积(图 1A),大部分瓣叶纤维组织增生,胶原纤维嗜伊红变性、透明变性(图 1B),部分区域血管增生。苦味酸酸性复红-维多利亚蓝染色显示胶原纤维明显增生,弹力纤维断裂或消失(图 1C)。

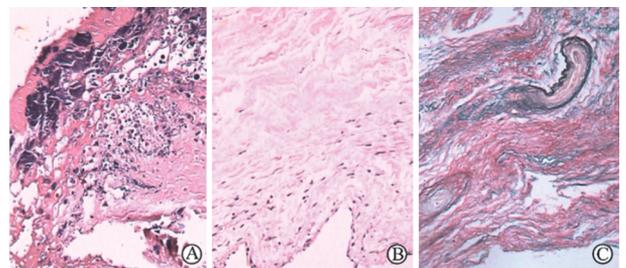


图 1 CAVD 瓣膜的组织学特征

Fig 1 Histology of CAVD valves

A: H-E staining showing calcification; B: H-E staining showing fibrosis; C: Victoria blue-van Gieson staining showing collagen deposition and elastin disruption. Original magnification: $\times 200$

2.2 CAVD 瓣膜间质细胞的形态学特征 正常瓣膜间质细胞呈梭形、成纤维细胞样,无特殊的生长形态;而 CAVD 的瓣膜间质细胞更为扁平、多角形,呈肌纤维母细胞和成骨细胞形态(图 2)。

2.3 CAVD 瓣膜间质细胞的体外行为学特征 正常瓣膜间质细胞多呈片状生长,无融合现象;而 CAVD 的瓣膜间质细胞达到一定密度后细胞自发性收缩并聚集生长(图 3)。在含钙培养基培养下,结节内更容易有钙盐沉积,此时 von Kossa 染色阳性,结节呈棕褐色。

2.4 瓣膜间质细胞的免疫表型 正常瓣膜间质细胞同源表达 Vimentin,不表达肌纤维母细胞标志物 α -SMA 和成骨标志物 ALP;但 CAVD 瓣膜间质细胞不仅表达 Vimentin,而且还表达 α -SMA、ALP(图 4A)。流式细胞术分析表明:CAVD 瓣膜间质细胞 α -SMA 和 ALP 阳性表达率超过 90%(图 4B),与正常瓣膜间质细胞相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。虽然正常瓣膜间质细胞也表达 Vimentin,但均不表达 α -SMA 和 ALP(图 5)。

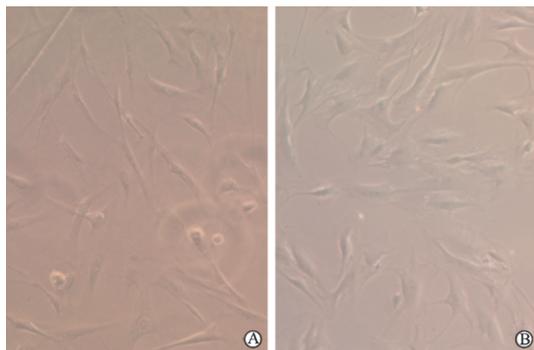


图 2 正常(A)和 CAVD(B)瓣膜间质细胞的形态学特征

Fig 2 Morphology of normal (A) and CAVD(B) interstitial cells

Original magnification: ×200

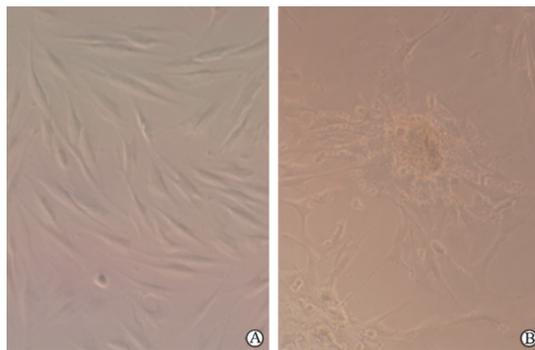


图 3 正常(A)和 CAVD(B)瓣膜间质细胞体外生长

Fig 3 Normal(A) and CAVD(B) interstitial cell growth *in vitro*

Original magnification: ×200

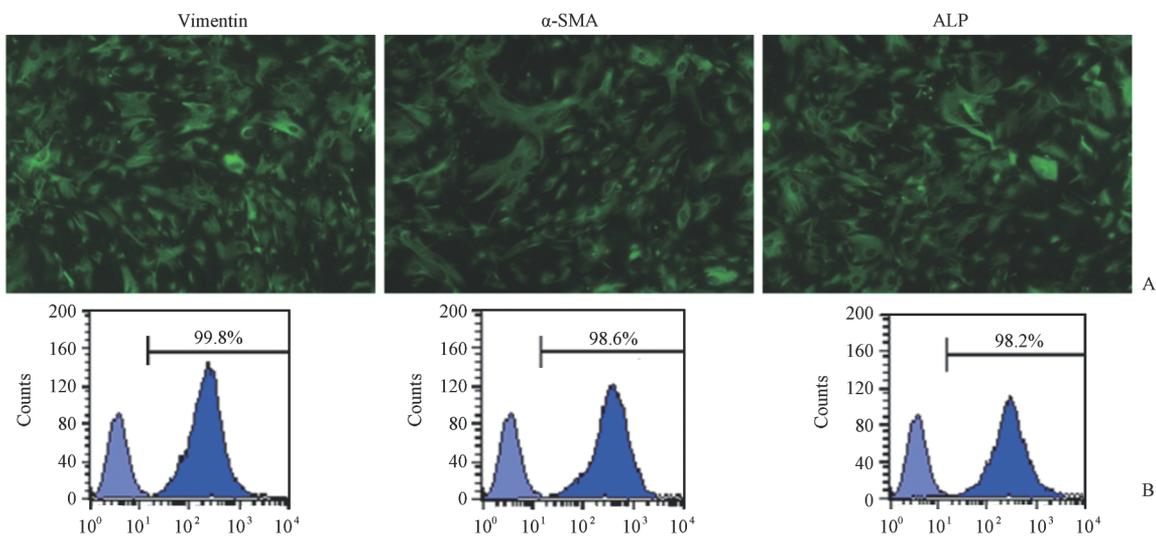


图 4 CAVD 瓣膜间质细胞的免疫表型分析

Fig 4 Immunophenotypes of CAVD interstitial cells

A: Immunocytochemical staining showing expression of Vimentin, α-SMA, and ALP. Original magnification: ×200. B: Flow cytometry showing the percentage of Vimentin, α-SMA, and ALP positive cells

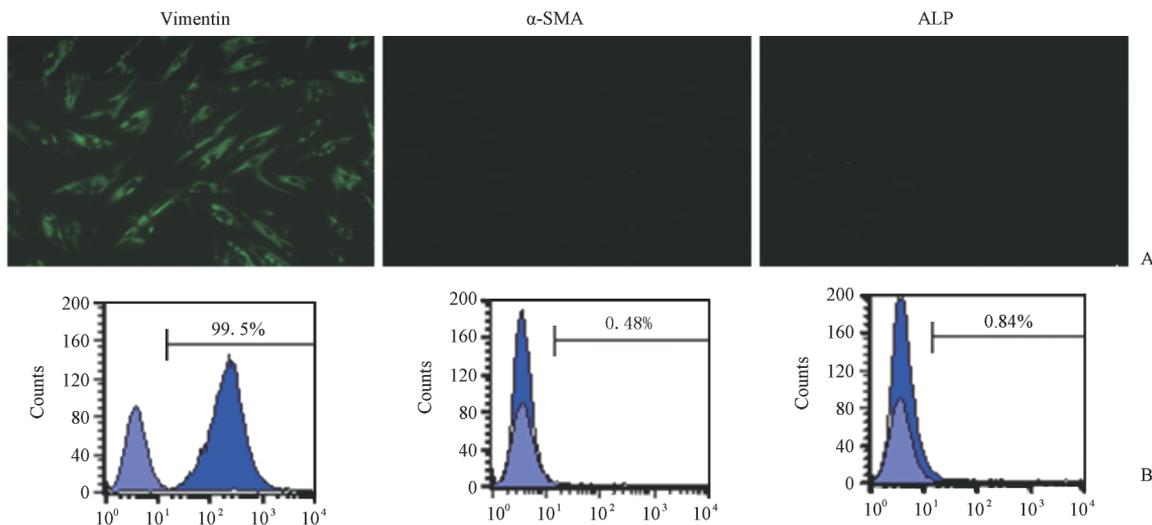


图 5 正常主动脉瓣瓣膜间质细胞的免疫表型分析

Fig 5 Immunophenotypes of normal aortic valve interstitial cells

A: Immunocytochemical staining showing expression of Vimentin, α-SMA, and ALP. Original magnification: ×200. B: Flow cytometry showing the percentage of Vimentin, α-SMA, and ALP positive cells

3 讨论

CAVD早期以脂质沉积、致粥样硬化特征性的泡沫样巨噬细胞及少量T淋巴细胞浸润为主要病理特征;病变进展期表现为主动脉瓣膜增厚、僵硬和显微镜下钙盐沉积,患者瓣膜功能在此阶段正常或接近正常;但随着瓣膜内钙盐沉积量增多,逐渐演变为瓣膜狭窄和(或)关闭不全,患者出现血流动力学紊乱和临床症状,严重影响患者预后。这提示主动脉瓣的纤维钙化是CAVD病变进展的关键环节^[1,4]。

本组CAVD病例的主要组织学特征为瓣叶增厚纤维化、钙化,交界粘连融合,H-E染色和苦味酸酸性复红-维多利亚蓝染色证实不同程度的胶原纤维增生和大量钙盐沉积是导致瓣叶增厚纤维化、钙化的主要原因。 α -SMA是导致组织收缩的主要结构蛋白^[5]。本研究证实CAVD瓣膜间质细胞大量表达肌纤维母细胞标志物 α -SMA,体外培养实验进一步表明表达 α -SMA的瓣膜间质细胞具有收缩能力,可自发性收缩并聚集生长。因此,本研究结果提示瓣膜间质细胞在致病因素的作用下向着肌纤维母细胞分化,并逐渐具有收缩能力,CAVD瓣膜间质细胞的这种生物学特征的改变可能是导致瓣叶增厚纤维化、交界融合的主要病变基础。

作为慢性疾病的一个重要表现,瓣膜钙化是CAVD最常见的症状之一,是围手术期死亡的一个重要因素^[6],与疾病的进展密切相关。过去,作为一种营养不良性改变,钙化都被简单地认为是钙盐在死亡或变性组织上的异常沉积。但越来越多的证据表明钙化是一种主动过程^[7-10]。同样,本研究也证实瓣膜钙化不仅是一种被动过程,瓣膜间质细胞生物学特征的改变可能是导致瓣膜钙化的主要因素:CAVD瓣膜间质细胞具有成骨细胞免疫表型并表达ALP。ALP常作为钙化的分子标志^[10],其活性被认为是矿物质沉积过程中羟基磷灰石形成的关键^[11]。最后,细胞培养研究进一步表明CAVD瓣膜间质细胞能聚集生长从而形成钙化结节。

综上所述,本研究表明在CAVD发展的过程中,瓣膜间质细胞生物学特征的改变可能是导致瓣

叶增厚、纤维化、钙化和交界融合的主要因素,因此以瓣膜间质细胞为靶标进行靶向治疗有可能延缓该病的进展。

[参考文献]

- [1] Otto C M. Calcific aortic stenosis—time to look more closely at the valve[J]. *N Engl J Med*, 2008, 359: 1395-1398.
- [2] 韩林,张宝仁,徐志云,邹良建,梅举.老年钙化性主动脉瓣病变的临床特点和外科治疗[J]. *中华心血管病杂志*, 2004, 32: 434-435.
- [3] 陈思,董念国,史嘉伟.主动脉瓣膜间质细胞体外诱导钙化的实验研究[J]. *中国胸心血管外科临床杂志*, 2010, 17: 385-389.
- [4] Freeman R V, Otto C M. Spectrum of calcific aortic valve disease: pathogenesis, disease progression, and treatment strategies[J]. *Circulation*, 2005, 111: 3316-3326.
- [5] El Kahi C G, Atiyeh B S, Abdallah Hajj Hussein I, Jurjus R, Dibbo S A, Jurjus A, et al. Modulation of wound contracture alpha-smooth muscle actin and multispecific vitronectin receptor integrin alphavbeta3 in the rabbit's experimental model[J]. *Int Wound J*, 2009, 6: 214-224.
- [6] Baoren Z. Heart valve surgery in China: yesterday and today[J]. *Heart Lung Circ*, 2001, 10: A11-A16.
- [7] Nigam V, Srivastava D. Notch1 represses osteogenic pathways in aortic valve cells[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2009, 47: 828-834.
- [8] Yang X, Meng X, Su X, Mauchley D C, Ao L, Cleveland J C Jr, et al. Bone morphogenic protein 2 induces Runx2 and osteopontin expression in human aortic valve interstitial cells: role of Smad1 and extracellular signal-regulated kinase 1/2[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2009, 138: 1008-1015.
- [9] Gu X, Masters K S. Role of the MAPK/ERK pathway in valvular interstitial cell calcification[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009, 296: H1748-H1757.
- [10] 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.
- [11] 郝伟,姜明,钱淑琴,何帆,孟庆溪,张云昌,等.脂肪干细胞/I型胶原凝胶/聚乳酸聚乙醇酸- β -磷酸三钙骨组织工程复合体的构建及其异位成骨研究[J]. *中华实验外科杂志*, 2008, 25: 691-693.
- [12] Xu Y, Pritzker K P, Cruz T F. Characterization of chondrocyte alkaline phosphatase as a potential mediator in the dissolution of calcium pyrophosphate dihydrate crystals[J]. *J Rheumatol*, 1994, 21: 912-919.

[本文编辑] 贾泽军