

DOI:10.3724/SP.J.1008.2015.00001

· 论 著 ·

过氧化氢介导人瓣膜间质细胞产生氧化应激细胞模型的建立

熊普熹, 韩林*, 刘晓红, 龚德军, 潘卫军, 徐志云

第二军医大学长海医院胸心外科, 上海 200433

[摘要] **目的** 建立过氧化氢(hydrogen peroxide, H₂O₂)介导的瓣膜间质细胞(valve interstitial cells, VICs)氧化应激模型, 为心脏瓣膜病始发机制的研究以及未来抗氧化治疗药物筛选提供细胞学模型。 **方法** 将分离培养的原代人主动脉瓣VICs随机分为对照组和处理组, 分别以含10%胎牛血清的DMEM培养液和普通培养液+不同浓度梯度(0、50、100、300、500、800、1 000 μmol/L)的H₂O₂进行培养。采用H-E染色、MTT比色法、Annexin V/PI双染流式细胞术检测细胞生存能力和凋亡的发生。 **结果** 处理24 h后, MTT结果显示各组VICs细胞存活率差异有统计学意义($P < 0.01$), H₂O₂浓度在50、100 μmol/L时细胞存活率与对照组相比升高($P < 0.05$), 随后细胞存活率随H₂O₂浓度升高开始下降, 在800 μmol/L时出现快速降低的拐点, 此时细胞存活率为(69.8 ± 8.3)%, 1 000 μmol/L时细胞存活率降为(14.3 ± 11.0)%。H-E染色显示在800 μmol/L时VICs形态皱缩, 胞核固缩。流式细胞检测则进一步证实800 μmol/L时VICs出现明显凋亡, 此时多为中晚期凋亡。

结论 H₂O₂最佳作用浓度为800 μmol/L, 作用时间为24 h, 在该条件下可成功建立氧化应激细胞模型。

[关键词] 过氧化氢; 人瓣膜间质细胞; 氧化性应激; 细胞模型

[中图分类号] R 542.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2015)01-0001-05

Establishment of oxidative stress model with human valve interstitial cells mediated by H₂O₂

XIONG Pu-xi, HAN Lin*, LIU Xiao-hong, GONG De-jun, PAN Wei-jun, XU Zhi-yun

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

[Abstract] **Objective** To establish an oxidative stress model of human valve interstitial cells (VICs) mediated by hydrogen peroxide (H₂O₂), so as to provide cytology model for research on pathogenesis of valvular heart diseases and screening anti-oxidant drugs. **Methods** The isolated and cultivated primary human VICs were divided into different groups randomly: control group containing DMEM culture medium with 10% FBS, experimental groups were treated with different concentrations (0, 50, 100, 300, 500, 800, and 1 000 μmol/L) of H₂O₂. H-E staining was used to observe cell morphology, MTT assay was used to estimate cell viability, and Annexin V/PI flow cytometer was employed to evaluate the apoptosis of VICs. **Results** MTT assay showed that the survival rates of VICs were significantly different 24 h after exposure to different concentrations of H₂O₂ ($P < 0.01$), with those in 50 and 100 μmol/L groups being significantly higher than that of control group ($P < 0.05$), and the cell survival rate began to decrease with the increase of H₂O₂ concentrations; the decrease became quicker when H₂O₂ concentrations was 800 μmol/L, with a survival rate of (69.8 ± 8.3)%; and the survival rate decreased to (14.3 ± 11.0)% when the concentration reached 1 000 μmol/L. H-E staining showed that at 800 μmol/L, H₂O₂ resulted in crimple and karyopyknosis of the VICs. Flow cytometer results confirmed apparent apoptosis of VICs at the concentration of 800 μmol/L, with the apoptosis already in the middle and advanced stages. **Conclusion** Oxidative stress model of VICs can be successfully established with H₂O₂, with the optimum concentration of H₂O₂ being 800 μmol/L and the expose period being 24 h.

[Key words] hydrogen peroxide; human valve interstitial cells; oxidative stress; cell model

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2015, 36(1): 1-5]

瓣膜间质细胞(valve interstitial cells, VICs)是瓣膜组织最主要的细胞成分, 其生物学行为改变是导致瓣膜纤维化、钙化的细胞学基础^[1-2]。过氧化氢

(hydrogen peroxide, H₂O₂)是产生氧化应激的主要诱导剂, Miller等^[3]发现纤维化及钙化的主动脉瓣组织中H₂O₂含量较正常瓣膜组织明显升高, 提示

[收稿日期] 2014-06-12 **[接受日期]** 2014-11-02

[基金项目] 国家自然科学基金(81370471, 81370335). Supported by National Natural Science Foundation of China (81370471, 81370335).

[作者简介] 熊普熹, 硕士生. E-mail: xpxjt2007@126.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-31161755, E-mail: sh_hanlin@hotmail.com

H_2O_2 介导的氧化应激在瓣膜纤维化、钙化进展过程中可能发挥着重要作用。

细胞模型是研究单一因素调控机制的重要方式,本研究以人 VICs 为模型细胞,通过给予不同浓度 H_2O_2 处理,建立 H_2O_2 诱导的 VICs 氧化应激细胞模型,为心脏瓣膜病发病机制研究提供基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料 按照伦理学要求并遵循知情同意原则,搜集长海医院行手术切除的瓣膜标本。DMEM 培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS) 购自 Gibco 公司,30% H_2O_2 购自 Sigma 公司,MTT 试剂盒、二甲亚砜(DMSO) 购自美国 Amresco 公司,Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒为凯基生物公司产品。配制不同浓度梯度(0、50、100、300、500、800、1 000 $\mu\text{mol/L}$)的 H_2O_2 培养基封口后备用。

1.2 原代人 VICs 培养 修剪瓣膜组织为 3 mm×3 mm 大小,置于 2 mg/mL II 型胶原酶中 37℃ 下孵育 30 min,用 PBS 冲洗去除内皮细胞;将瓣膜组织尽可能剪碎,再次置于 2 mg/mL II 型胶原酶中 37℃ 下孵育 2 h,离心去上清后重悬细胞,置于 37℃、5% CO_2 环境下孵育。

1.3 H-E 染色观察 VICs 生长活性 细胞爬片后用不同浓度 H_2O_2 处理 24 h,经固定、H-E 染色、返蓝、脱水、透明、封片后,镜下观察细胞形态。

1.4 MTT 法检测 VICs 相对存活率 将消化后的细胞种入 96 孔板,用不同浓度 H_2O_2 处理 24 h 后,每孔加入 30 μL MTT 试剂孵育 4 h,每孔加入 150 μL DMSO,振荡后静置 10~15 min,1 h 后于 570 nm 波长下测定各孔光密度值,计算细胞存活率并绘制细胞生长曲线。

1.5 Annexin V/PI 双染流式细胞术检测 VICs 凋亡率 将细胞加入不同浓度 H_2O_2 处理 24 h 后,胰酶悬起细胞,PBS 洗涤后离心(2 000 r/min×5 min),弃上清,加入 100 μL 结合缓冲液后,再加入 5 μL Annexin V-FITC,混匀后避光静置 15 min,再加入 150 μL 结合缓冲液,上机检测前加入 5 μL PI 试剂,检测后进行数据处理及图像制作。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 18.0 统计软件进行统计学分析,组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 分离培养的 VICs 形态学观察 刚消化分离的 VICs 呈散在球状,6 h 后即开始贴壁生长,24 h 后基

本完全贴壁。初代细胞培养至第 3 天时,细胞多呈球状或短杆状,可见稍有伪足向外伸出(图 1A);初代细胞培养至第 8 天时,细胞呈星状或梭形,多量伪足明显向外延伸并且相互接触汇合,铺满培养皿底部的细胞镜下观察类似铺路石样(图 1B);传代至第 2 代时,细胞仍呈星状,大量伪足伸出并相互接触融合(图 1C);传代至第 5 代时,细胞形态与上一代基本一致(图 1D)。

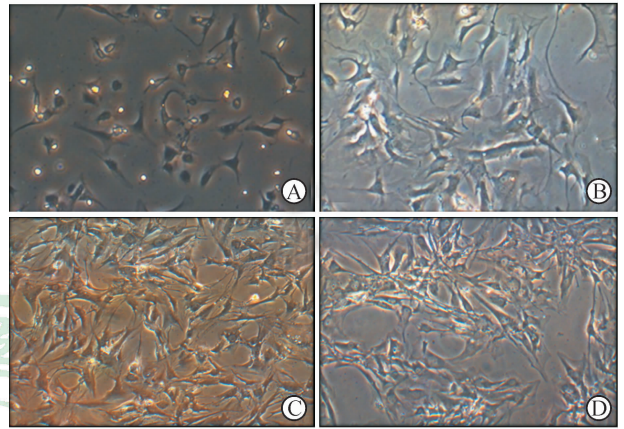


图 1 人瓣膜间质细胞(VICs)镜下形态

Fig 1 Morphology of human valve interstitial cells (VICs) under optical microscope

A: Primary VICs cultured for 3 days; B: Primary VICs cultured for 8 days; C: The second passage cells; D: The fifth passage cells. Original magnification: $\times 100$

2.2 H_2O_2 处理后的 VICs 形态学观察 对照组细胞伸出多量伪足,胞质丰富、染为淡红色,边界清楚,细胞核淡蓝染,核仁清晰可见(图 2A),50、100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理后的细胞形态与对照组基本一致;300、500 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理组 H-E 染色镜下形态与 0~100 $\mu\text{mol/L}$ 处理组相比差异不大,仅见少量细胞变小,胞质染色稍加深(图 2B); H_2O_2 浓度为 800 $\mu\text{mol/L}$ 时,可见胞质浓缩、染色加深,伸出的伪足减少、变细,细胞核固缩、染为蓝黑色,核仁不可辨认,部分细胞脱落坏死(图 2C); H_2O_2 浓度达 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 时,大片细胞坏死脱落,胞质进一步皱缩,伪足基本消失,部分细胞核破碎,形成凋亡小体(图 2D)。

2.3 H_2O_2 处理对 VICs 生存能力的影响 图 3 为 H_2O_2 浓度与细胞存活率曲线,各组浓度 H_2O_2 对细胞存活率的影响有统计学意义($P<0.01$),在 50、100 $\mu\text{mol/L}$ 范围细胞存活率与对照组相比有所升高($P<0.05$),然后开始平缓下降, H_2O_2 浓度在 800 $\mu\text{mol/L}$ 时,出现明显拐点,此时细胞存活率为 $(69.8\pm 8.3)\%$ ($n=6$);当浓度达到 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞存活率迅速降为 $(14.3\pm 11.0)\%$ ($n=6$)。

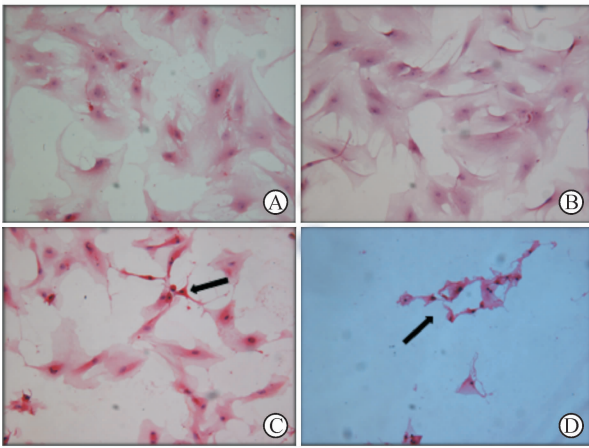


图2 H₂O₂处理后人瓣膜间质细胞(VICs)形态

Fig 2 Morphology of human valve interstitial cells (VICs) after exposure to H₂O₂

A: Control group; B: 500 μmol/L H₂O₂ treatment group; C: 800 μmol/L H₂O₂ treatment group; D: 1 000 μmol/L H₂O₂ treatment group. Arrows indicate the apoptotic cells. H-E staining, original magnification: ×200

2.4 H₂O₂处理对VICs凋亡的影响 图4为 Annexin V/PI 双染流式细胞术检测VICs凋亡结果。对照组细胞凋亡率为(2.85±0.69)%, H₂O₂处理浓度为300 μmol/L时细胞凋亡率为(6.04±0.17)%,

较对照组明显升高($P < 0.01$); 500 μmol/L组凋亡率为(6.85±0.50)%,也较对照组明显升高($P < 0.01$),但与300 μmol/L组大致相当,说明在300~500 μmol/L范围H₂O₂诱导凋亡的作用相对温和;当H₂O₂浓度达800 μmol/L时细胞出现明显凋亡,总凋亡率为(22.76±0.94)%,较对照组明显升高($P < 0.01$),较其他处理组也明显升高($P < 0.01$),且以中晚期凋亡为主。

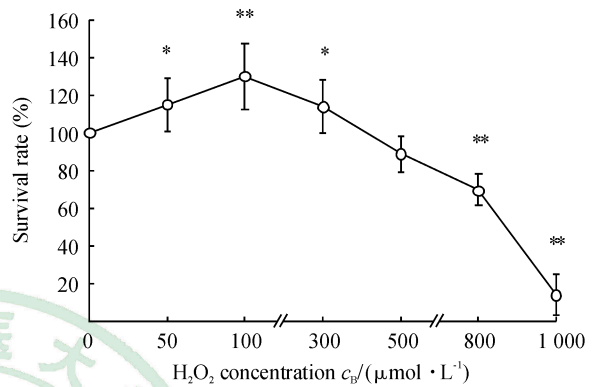


图3 H₂O₂处理后人瓣膜间质细胞(VICs)存活率曲线

Fig 3 Concentration-course effect of H₂O₂ on survival rate of human valve interstitial cells

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group. $n = 6, \bar{x} \pm s$

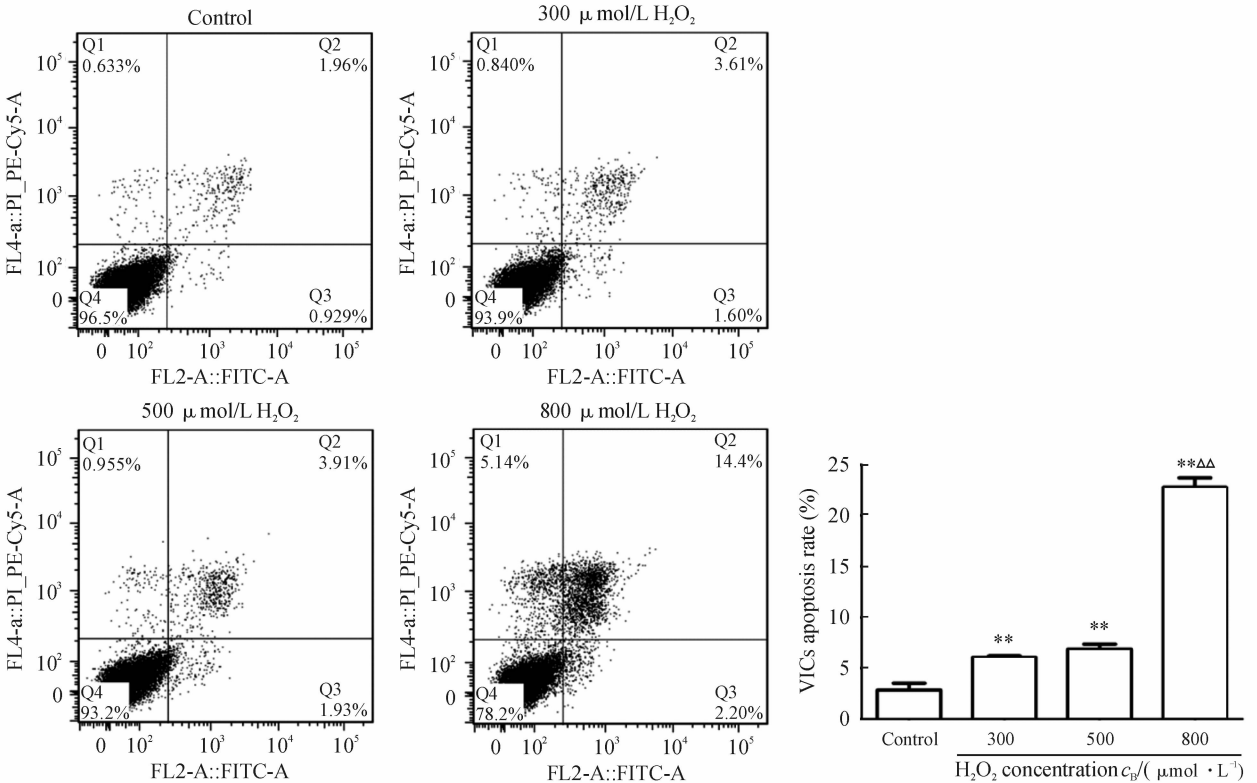


图4 流式细胞仪检测H₂O₂处理后的人瓣膜间质细胞(VICs)凋亡情况

Fig 4 Apoptosis of human valve interstitial cells (VICs) detected by Flow Cytometer after exposed to H₂O₂

** $P < 0.01$ vs control group; ΔΔ $P < 0.01$ vs 300 and 500 μmol/L group

3 讨论

退行性钙化性心脏瓣膜病是常见的心血管疾病之一,在欧美国家其发病率仅次于高血压和冠心病^[4],在我国其发病率逐年升高,已有取代风湿性心脏病成为最常见的心脏瓣膜疾病的趋势^[5]。VICs是瓣膜组织的主要细胞成分,研究显示正常的VICs并不是单一的细胞种类,根据其形态和表型不同大致可以分为成纤维细胞、肌成纤维细胞和平滑肌细胞^[6-7]。在正常的瓣膜组织中,成纤维细胞所占比例约为75%,只有大约2.5%为肌成纤维细胞^[8]。在功能上,成纤维细胞为静息状态细胞,激活后转化为肌成纤维细胞。肌成纤维细胞特异性表达平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA),既具有收缩和迁移能力,又可以分泌多种细胞外基质蛋白,调控瓣膜自我修复,在维持瓣膜正常形态和生理功能上起重要作用;平滑肌细胞表达肌球蛋白和肌间线蛋白,具有收缩能力^[9-10]。还有研究显示,几乎所有瓣膜间质细胞均能表达脯氨酰 4-羟化酶,该酶被认为是维持胶原蛋白三螺旋结构稳定所必需的^[11]。在前期实验中我们采用免疫荧光和流式细胞仪鉴定VICs结果显示其 α -SMA表达率为40%,波形蛋白(vimentin)表达率为96%^[12],该表型结果与其生理功能相符合。VICs生物学行为改变是导致瓣膜钙化的最主要原因,早期研究显示VICs的凋亡与瓣膜钙化密切相关^[2],进一步研究显示瓣膜钙化与细胞凋亡时释放的凋亡小体密切相关,凋亡小体具有促进钙盐被动性沉积于瓣膜组织的作用^[13]。近年研究显示VICs向成骨细胞表型转化是导致瓣膜钙化的另一重要机制^[14-15]。氧化应激是指体内活性氧生成清除机制失衡过度蓄积的活性氧成分导致细胞损伤及功能障碍^[3]。氧化应激损伤是退行性瓣膜疾病的重要发病机制之一^[16],研究显示导致氧化应激损伤的活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)不仅能诱导VICs发生凋亡^[17],还能激活VICs,活化后的VICs具有表型转化的潜能^[18]。H₂O₂是ROS的一种,也是体内导致氧化应激损伤的主要效应分子,Miller等^[3]发现纤维化及钙化的主动脉瓣组织中H₂O₂含量较正常瓣膜组织明显升高,提示H₂O₂介导的氧化应激在退行性瓣膜病进展过程中可能发挥着重要作用。但目前国内外针对H₂O₂介导的氧化应激对VICs尤其是对具有人种特异性的VICs生物学行为影响在参与退行性瓣膜病发病机制中的研究结果非常有限,而体内代谢环境复杂,为阐明单一H₂O₂介导的氧化应激因素的具体作用机

制,有必要建立H₂O₂诱导的人VICs氧化应激细胞模型。尤其是随着基因治疗技术的快速发展,能够尽可能模拟体内环境的体外模型在分子机制研究及靶向药物干预治疗的研究中越来越重要。本研究从细胞损伤和细胞反应两种角度探讨了H₂O₂对VICs的作用,试图建立具有模拟性的、可控的、特异的VICs氧化应激模型,通过观察细胞功能形态和功能改变,从而揭示可能的氧化损伤途径。

本实验采用0~1 000 μ mol/L的H₂O₂构建VICs氧化应激模型,并以细胞凋亡作为细胞损伤评价指标,以细胞生存能力作为细胞反应能力评价指标。结果表明H₂O₂浓度在0~100 μ mol/L时细胞存活率轻度升高,300~800 μ mol/L时缓慢下降,超过800 μ mol/L后快速下降。这提示低浓度H₂O₂(0~100 μ mol/L)具有增强细胞活性、提高细胞生存能力的作用,中等浓度H₂O₂(300~800 μ mol/L)对细胞造成的细胞反应和损伤相对缓和,而高浓度的H₂O₂(>800 μ mol/L)时是一个快速诱导过程,细胞损伤及反应更为强烈。根据文献报道,建立氧化应激模型时,细胞存活率通常应小于70%,且大于50%^[19]。若细胞存活率过低(小于50%),则表明大量细胞已死亡,造成不可逆损伤,不利于研究氧化应激对细胞生物学行为改变影响的研究;若细胞存活率过高(大于70%),对细胞损伤不够,不利于后续干预研究。按此标准本实验中当H₂O₂浓度达到800 μ mol/L时细胞存活率降低至(69.8 ± 8.3)%,既造成VICs氧化应激损伤,同时细胞又保持较高的存活率,是造模的理想浓度。

有文献报道,100 μ mol/L H₂O₂处理心肌细胞2 h,细胞已出现凋亡,存活率降至50%^[20]。Jiang等^[21]发现500 μ mol/L H₂O₂处理血管内皮细胞24 h细胞出现明显凋亡现象,凋亡率达55%。而本VICs模型H₂O₂处理浓度需达800 μ mol/L时才能达到类似效果,这表明H₂O₂对每种细胞的作用效能不同,因而应建立细胞特异性的损伤模型。

一个好的模型须具备特异性、模拟性和可控性,在本模型建立过程中,我们采用人主动脉瓣VICs,能充分代表人类的特异性;本模型的突出优点在于培养的VICs具有完善的代谢功能,避免了全身神经体液、激素及不同细胞的影响,模拟了单一的H₂O₂诱导的氧化应激过程;在观察VICs生长过程中我们发现VICs形态均一性较好,生长特性稳定,可连续传代并保持形态学稳定,并且对H₂O₂反应一致性较好,具有较强的可控性。本实验结果表

明,当 H_2O_2 作用浓度在 $800 \mu\text{mol/L}$,作用时间 24 h,可成功构建以 H_2O_2 为氧化应激诱导剂的 VICs 细胞体外氧化应激损伤模型,而进一步研究 H_2O_2 对 VICs 功能影响则应选择低于 $800 \mu\text{mol/L}$ 的亚致死浓度。该模型的建立为揭示氧化应激机制以及研究和筛选抗氧化药物奠定了实验基础。

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] Han L, Gotlieb A I. Fibroblast growth factor-2 promotes *in vitro* heart valve interstitial cell repair through the Akt1 pathway[J]. *Cardiovasc Pathol*, 2012, 21: 382-389.
- [2] Hutcheson J D, Venkataraman R, Baudenbacher F J, Merryman W D. Intracellular Ca^{2+} accumulation is strain-dependent and correlates with apoptosis in aortic valve fibroblasts[J]. *J Biomech*, 2012, 45: 888-894.
- [3] Miller J D, Chu Y, Brooks R M, Richenbacher W E, Peña-Silva R, Heistad D D. Dysregulation of antioxidant mechanisms contributes to increased oxidative stress in calcific aortic valvular stenosis in humans[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2008, 52: 843-850.
- [4] Otto C M. Calcific aortic stenosis—time to look more closely at the valve[J]. *N Engl J Med*, 2008, 359: 1395-1398.
- [5] 韩林,张宝仁,徐志云,邹良建,梅举.老年性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.
- [6] Della Rocca F, Sartore S, Guidolin D, Bertiplaglia B, Gerosa G, Casarotto D, et al. Cell composition of the human pulmonary valve: a comparative study with the aortic valve—the VESALIO project[J]. *Ann Thorac Surg*, 2000, 70: 1594-1600.
- [7] Messier R H Jr, Bass B L, Aly H M, Jones J L, Domkowski P W, Wallace R B, et al. Dual structural and functional phenotypes of the porcine aortic valve interstitial population: characteristics of the leaflet myofibroblast[J]. *J Surg Res*, 1994, 57: 1-21.
- [8] Rabkin-Aikawa E, Farber M, Aikawa M, Schoen F J. Dynamic and reversible changes of interstitial cell phenotype during remodeling of cardiac valves[J]. *J Heart Valve Dis*, 2004, 13: 841-847.
- [9] 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.
- [10] Taylor P M, Allen S P, Dreger S A, Yacoub M H. Human cardiac valve interstitial cells in collagen sponge: a biological three-dimensional matrix for tissue engineering[J]. *J Heart Valve Dis*, 2002, 11: 298-306.
- [11] 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.
- [12] Zhang M, Liu X, Zhang X, Song Z, Han L, He Y, et al. MicroRNA-30b is a multifunctional regulator of aortic valve interstitial cells[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2014, 147: 1073-1080.
- [13] Proudfoot D, Skepper J N, Hegyi L, Bennett M R, Shanahan C M, Weissberg P L. Apoptosis regulates human vascular calcification *in vitro*: evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies[J]. *Circ Res*, 2000, 87: 1055-1062.
- [14] Tanaka K, Sata M, Fukuda D, Suematsu Y, Motomura N, Takamoto S, et al. Age-associated aortic stenosis in apolipoprotein E-deficient mice[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2005, 46: 134-141.
- [15] 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.
- [16] O'Brien K D. Pathogenesis of calcific aortic valve disease: a disease process comes of age (and a good deal more)[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26: 1721-1728.
- [17] Li P F, Dietz R, von Harsdorf R. Differential effect of hydrogen peroxide and superoxide anion on apoptosis and proliferation of vascular smooth muscle cells[J]. *Circulation*, 1997, 96: 3602-3609.
- [18] Branchetti E, Sainger R, Poggio P, Grau J B, Patterson-Fortin J, Bavaria J E, et al. Antioxidant enzymes reduce DNA damage and early activation of valvular interstitial cells in aortic valve sclerosis[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33: e66-e74.
- [19] Zhao X C, Zhang L, Yu H X, Sun Z, Lin X F, Tan C, et al. Curcumin protects mouse neuroblastoma Neuro-2A cells against hydrogen-peroxide-induced oxidative stress[J]. *Food Chem*, 2011, 129: 387-394.
- [20] Park K J, Kim Y J, Kim J, Kim S M, Lee S Y, Bae J W, et al. Protective effects of peroxiredoxin on hydrogen peroxide induced oxidative stress and apoptosis in cardiomyocytes[J]. *Korean Circ J*, 2012, 42: 23-32.
- [21] Jiang B, Liang P, Zhang B, Song J, Huang X, Xiao X. Role of PPAR-beta in hydrogen peroxide-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells[J]. *Atherosclerosis*, 2009, 204: 353-358.