

有机磷酸盐 – 与无机磷酸盐 – 钙化诱导培养基诱导主动脉瓣膜间质细胞钙化效果的对比研究

薛清, 李宁, 褚恒, 刘晓红, 韩林, 徐志云

【摘要】 目的 比较有机磷酸盐 (OP) – 与无机磷酸盐 (IP) – 钙化诱导培养基 (OIM) 诱导主动脉瓣膜间质细胞 (AVICs) 钙化的效果。方法 主动脉瓣膜来源于 2017 年 1—10 月在第二军医大学附属长海医院行心脏移植的患者, 取外观正常的主动脉瓣膜备用, 采用改良的二次胶原酶消化法分离 AVICs 并随机分为 A 组和 B 组, A 组采用普通培养基 +OP-OIM 进行培养, B 组采用普通培养基 +IP-OIM 进行培养。采用茜素红染色检测钙化结节, 采用邻甲酚酞络合酮比色法检测钙含量, 采用实时荧光定量聚合酶链反应检测 Runx2 相关转录因子 2 (RUNX2)、碱性磷酸酶 (ALP) mRNA 相对表达量, 采用蛋白质免疫印迹法检测 RUNX2 蛋白相对表达量, 采用对硝基苯酚比色法检测 ALP 活性。结果 (1) 细胞免疫荧光检测结果显示, 分离得到的细胞 Vimentin 阳性率接近 100%。流式细胞术检测结果显示, 分离得到的细胞 CD31 阳性率为 1.17%。(2) A 组细胞培养 21 d 可见大量橘红色钙化结节, B 组细胞培养 7 d 可见大量橘红色钙化结节。A 组细胞培养 21 d 和 B 组细胞培养 7 d 钙含量比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。(3) 以细胞培养 0 d 作为对照, A 组细胞培养 21 d 与 B 组细胞培养 7 d RUNX2 mRNA 相对表达量比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$); 但 A 组细胞培养 21 d 与 B 组细胞培养 7 d ALP mRNA 相对表达量比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。(4) 两组细胞培养 0 d RUNX2 蛋白相对表达量比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$); A 组细胞培养 21 d 与 B 组细胞培养 7 d RUNX2 蛋白相对表达量比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。(5) 两组细胞培养 0 d ALP 活性比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$); A 组细胞培养 21 d 与 B 组细胞培养 7 d ALP 活性比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。结论 IP-OIM 培养 7 d 与 OP-OIM 培养 21 d 诱导的 AVICs 钙化效果相当, IP-OIM 诱导 AVICs 钙化较 OP-OIM 缩短 14 d, 可替代 OP-OIM 快速有效地建立体外 AVICs 钙化模型。

【关键词】 主动脉瓣膜间质细胞; 钙化; 磷酸盐类, 无机; 磷酸盐类, 有机; 钙化诱导培养基

【中图分类号】 R 542.52 **【文献标识码】** A DOI: 10.3969/j.issn.1008-5971.2018.04.010

薛清, 李宁, 褚恒, 等. 有机磷酸盐 – 与无机磷酸盐 – 钙化诱导培养基诱导主动脉瓣膜间质细胞钙化效果的对比研究 [J]. 实用心脑血管病杂志, 2018, 26 (4): 44-49. [www.syxnf.net]

XUE Q, LI N, CHU H, et al. Comparative study for effect on aortic valve interstitial cells calcification between organic phosphate-and inorganic phosphate-osteogenic induction medium [J]. Practical Journal of Cardiac Cerebral Pneumal and Vascular Disease, 2018, 26 (4): 44-49.

Comparative Study for Effect on Aortic Valve Interstitial Cells Calcification between Organic Phosphate-and Inorganic Phosphate-Osteogenic Induction Medium XUE Qing, LI Ning, CHU Heng, LIU Xiao-hong, HAN Lin, XU Zhi-yun
Department of Cardiovascular Surgery, Changhai Hospital Affiliated to the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

Corresponding author: HAN Lin, E-mail: xq9911310@163.com

【Abstract】 Objective To compare effect on aortic valve interstitial cells (AVICs) calcification between organic phosphate (OP) –and inorganic phosphate (IP) –osteogenic induction medium (OIM). **Methods** Normal-looking aortic valves were collected from patients undergoing heart transplantation in Changhai Hospital Affiliated to the Second Military Medical University from January to October 2017, and AVICs were separated by modified secondary collagenase digestion method; then the AVICs were divided into A group and B group, thereinto AVICs in A group were cultivated in ordinary medium and OP-OIM, while AVICs in B group were cultivated in ordinary medium and IP-OIM. Alizarin red staining method was used to detect the calcified nodules, o-cresolphthalein-complexone colorimetric method was used to detect the calcium content,

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81770383)

200433 上海市, 第二军医大学附属长海医院心血管外科

通信作者: 韩林, E-mail: xq9911310@163.com

real-time fluorescence quantitative PCR was used to detect the relative expression of RUNX2 mRNA and ALP mRNA, Western blotting method was used to detect the relative expression of RUNX2 protein, and p-nitrophenol colorimetric method was used to detect the activity of ALP. **Results** (1) Cell immunofluorescence detection results showed that, positive rate of Vimentin approach to 100%; Flow cytometry test results showed that, positive rate of CD₃₁ was 1.17%. (2) A large number of orange calcified nodules were found in A group 21 days after cultivation and in B group 7 days after cultivation. No statistically significant difference of calcium content was found between A group 21 days after cultivation and B group 7 days after cultivation ($P>0.05$). (3) Taking 0 day after cultivation as control, no statistically significant difference of relative expression of RUNX2 mRNA was found between A group 21 days after cultivation and B group 7 days after cultivation ($P>0.05$), but there was statistically significant difference of relative expression of ALP mRNA between A group 21 days after cultivation and B group 7 days after cultivation ($P<0.05$). (4) No statistically significant difference of relative expression of RUNX2 protein was found between the two groups 0 day after cultivation, nor was relative expression of RUNX2 protein between A group 21 days after cultivation and B group 7 days after cultivation ($P>0.05$). (5) No statistically significant difference of activity of ALP was found between the two groups, nor was activity of ALP between A group 21 days after cultivation and B group 7 days after cultivation ($P>0.05$). **Conclusion** IP-OIM culture for 7 days has similar induced effect on AVICs calcification with OP-OIM culture for 21 days, which shortens for 14 days and may replace OP-OIM to quickly and effectively establish AVICs calcification model in vitro.

【Key words】 Aortic valve interstitial cells; Calcification; Phosphates, inorganic; Phosphates, organic; Osteogenesis-inducing medium

主动脉瓣钙化是临床常见的心脏瓣膜疾病,也是导致主动脉瓣狭窄的常见原因,其发生机制目前尚未完全明确,主要治疗措施为外科手术^[1]。主动脉瓣膜间质细胞(AVICs)是构成主动脉瓣的主要细胞之一,对维持瓣膜正常形态和功能、促进瓣膜疾病发生发展均具有重要作用,被认为是主动脉瓣异位钙化中成骨细胞的主要来源^[2]。有机磷酸盐(OP)-钙化诱导培养基(OIM)诱导AVICs钙化约需要21d,周期较长,且诱导钙化过程易受微生物污染等因素干扰^[3],而OP转化为无机磷酸盐(IP)后才能发挥诱导钙化作用^[4-5]。本研究旨在比较OP-OIM与IP-OIM诱导AVICs钙化的效果,为快速构建体外AVICs钙化模型提供参考依据,现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 标本采集 主动脉瓣膜来源于2017年1—10月在第二军医大学附属长海医院行心脏移植的患者,取外观正常的主动脉瓣膜备用。本研究获得第二军医大学附属长海医院医学伦理委员会审核批准,患者及其家属均签署知情同意书。排除术前伴主动脉瓣膜疾病、冠心病者。

1.2 主要试剂与仪器

1.2.1 主要试剂 人II型胶原酶、 β -甘油磷酸、抗坏血酸、地塞米松购自Sigma-Aldrich公司;DMEM培养基、胎牛血清、青霉素/链霉素双抗液、0.25%胰蛋白酶购自Gibco公司;鼠抗人Vimentin抗体、Alexa Fluor594标记的羊抗鼠IgG、鼠抗人CD₃₁抗体、Alexa Fluor568标记的羊抗鼠IgG、鼠抗人 β -actin抗体购自Santa Cruz公司;二水合磷酸二氢钠、三氯甲烷、异丙醇、甲醇购自国药集团化学试剂有限公司;生物合成人胰岛素注射液购自丹麦诺和诺德公司;Trizol裂解液、SDS

本研究背景:

经典的有机磷酸盐-钙化诱导培养基完成1次细胞钙化约需21d,周期较长,且在培养过程中易受到各种因素干扰,如微生物污染等。笔者所在课题组通过查阅文献发现,有机磷酸盐是在转化为无机磷酸盐后才发挥诱导钙化作用,故提出是否可以直接采用无机磷酸盐-钙化诱导培养基培养细胞钙化的假设,以寻找一种快速有效的钙化诱导方法,为今后基础研究提供便利条件。

蛋白裂解液、苯甲基磺酰氟(PMSF)、BCA蛋白浓度测定试剂盒、彩色预染蛋白质分子量标准、SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(5X)、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒、Western封闭液、Western一抗稀释液、兔抗人Runx2相关转录因子2(RUNX2)抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠IgG、超敏ECL化学发光试剂盒购自Beyotime公司;DEPC处理水购自Solarbio公司;PrimeScript™ RT reagent Kit、SYBR Premix Ex Taq II购自TaKaRa公司;三羟甲基氨基甲烷、十二烷基硫酸钠、甘氨酸购自广东金砂化工厂;茜素红购自上海生工生物工程股份有限公司;钙测定试剂盒(邻甲酚酞络合酮比色法)购自中生北控生物科技股份有限公司。

1.2.2 主要仪器 MP200B电子天平购自上海第二天平衡器厂;IX70激光扫描共聚焦显微镜购自Olympus公司;流式细胞仪、NanoDrop2000分光光度计购自ThermoFisher公司;低温高速离心机购自Eppendorf公司;GeneAmp聚合酶链反应(PCR)扩增仪、ABI Step One实时荧光定量PCR仪购自Applied Biosystems公司;

酶标仪购自普林斯顿公司；蛋白电泳仪、电泳槽、SX-100 凝胶成像分析系统购自 Bio-Rad 公司；PVDF 膜购自 Millipore 公司。

1.3 方法

1.3.1 AVICs 分离和培养 采用改良的二次胶原酶消化法分离 AVICs，具体如下：取正常主动脉瓣膜组织经人 II 型胶原酶消化处理两次后去除组织残渣，剩余液体 1 500 r/min 离心 5 min（离心半径 168 mm），去上清，底部沉淀即为 AVICs。将细胞重悬后接种于培养板，于培养箱中培养，2 d 换液 1 次，至细胞融合度达到 90% ~ 100% 传代，取第 3 ~ 5 代细胞备用。

1.3.2 AVICs 鉴定 (1) 采用细胞免疫荧光法检测 Vimentin，具体如下：AVICs 贴壁生长，当细胞融合度达到 40% ~ 50% 时去除培养基，磷酸盐缓冲液 (PBS) 润洗 1 次；加入免疫染色固定液室温下静置 15 min，去除固定液，PBS 润洗 3 次；加入 0.3% Triton X-100 室温下静置 10 min，去除破膜液，PBS 润洗 3 次；加入免疫染色封闭液室温下静置 10 min，去除封闭液，加入一抗工作液（鼠抗人 Vimentin 抗体：免疫染色一抗稀释液为 1:200）4 °C 过夜，室温下复温 1 h，PBS 润洗 3 次；加入二抗工作液（Alexa Flour594 标记的羊抗鼠 IgG:PBS 为 1:400）室温下避光静置 30 min，PBS 润洗 3 次；加入 DAPI 荧光染色液室温下避光静置 3 min，PBS 润洗 3 次；荧光显微镜下观察并拍照，其中红色荧光为 Vimentin、蓝色荧光为细胞核。(2) 采用流式细胞术检测 CD₃₁，具体如下：AVICs 贴壁生长 2 ~ 3 d，当细胞融合度达到 90% ~ 100% 时去除培养基，PBS 润洗 1 次；加入 0.25% 胰蛋白酶室温下静置 5 min，加入等体积普通培养基（含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基）中和胰蛋白酶，1 200 r/min 离心 5 min（离心半径 168 mm），去除上清液；加入 PBS 重悬细胞，1 200 r/min 离心 5 min（离心半径 168 mm），去除上清液；加入一抗工作液（鼠抗人 CD₃₁ 抗体：免疫染色一抗稀释液为 1:200）室温下静置 1 h，1 200 r/min 离心 5 min（离心半径 168 mm），去除上清液；加入 PBS 重悬细胞，1 200 r/min 离心 5 min（离心半径 168 mm），去除上清液；加入二抗工作液（Alexa Flour568 标记的羊抗鼠 IgG:PBS 为 1:400）室温下避光静置 30 min，1 200 r/min 离心 5 min（离心半径 168 mm），去除上清液；加入 PBS 重悬细胞，1 200 r/min 离心 5 min（离心半径 168 mm），去除上清液；加入 PBS 重悬细胞，上机检测。

1.3.3 实验分组 将备用 AVICs 于 6 孔板中贴壁生长，当细胞融合度达到 40% ~ 50% 时随机分为 A 组与 B 组。A 组采用普通培养基 +OP-OIM 进行培养，每 2 d 换液 1 次；B 组采用普通培养基 +IP-OIM 进行培养，每 2 d 换

液 1 次。OP-OIM: β-甘油磷酸 10 mmol/L、抗坏血酸 10 μg/ml、地塞米松 10 nmol/L; IP-OIM: 二水合磷酸二氢钠 2 mmol/L、抗坏血酸 50 μg/ml、生物合成人胰岛素注射液 100 nmol/L。

1.3.4 茜素红染色 采用茜素红染色观察钙化结节，具体如下：去除 AVICs 培养基，采用 4% 多聚甲醛固定 10 min，95% 乙醇冲洗后采用 1% 茜素红染色 10 min，去除染色液，采用 95% 乙醇冲洗后于显微镜下观察并拍照，其中橘红色结节为钙化结节，以出现钙化结节为 AVICs 钙化模型构建成功。

1.3.5 邻甲酚酞络合酮比色法 采用邻甲酚酞络合酮比色法检测 A 组细胞培养 21 d、B 组细胞培养 7 d 钙含量，具体如下：去除 AVICs 培养基，PBS 润洗后加入 0.6 mol/L 盐酸脱钙 24 h，取上清液，采用邻甲酚酞络合酮比色法检测钙浓度；脱钙后的细胞经 PBS 润洗 3 次，加入 0.1 mol/L 氢氧化钠 (NaOH) 和 0.1% SDS 蛋白裂解液裂解细胞 30 min，采用 BCA 法检测蛋白浓度，并计算钙含量，钙含量 = 钙浓度 / 蛋白浓度。

1.3.6 实时荧光定量 PCR 采用实时荧光定量 PCR 检测 A 组细胞培养 0、21 d 及 B 组细胞培养 0、7 d RUNX2、碱性磷酸酶 (ALP) mRNA 表达情况，具体如下：采用 Trizol 裂解液抽提总 mRNA，逆转录为互补脱氧核糖核酸 (cDNA)，并以 cDNA 为模板行实时荧光定量 PCR。实时荧光定量 PCR 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成，引物序列详见表 1。反应步骤：pre-incubation: 95 °C (30 s)，1 个循环；amplification: 95 °C (10 s)，60 °C (20 s)，40 个循环；Melting Curve: 95 °C (15 s)，60 °C (60 s)，95 °C (60 s)，1 个循环；Cooling: 40 °C (60 s) 1 个循环。以 β-actin 作为内参，采用 ΔΔCT 法计算各样本间目的基因 mRNA 表达的倍比关系即为各样本目的基因 mRNA 相对表达量。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列
Table 1 Primer sequence for RT-qPCR

基因	正向序列	反向序列
RUNX2	5'-GGAGTGGACGAGGCAAGAGTTT-3'	5'-AGCTTCTCTCTGTGCCTTCTGG-3'
ALP	5'-CCCAAAGGCTTCTTCTTG-3'	5'-CTGGTAGTTGTTGTGAGCAT-3'
β-actin	5'-ATTGCCACAGGATGCGAA-3'	5'-ACATCTGCTGGAAGCTGGACAG-3'

注：RUNX2= Runt 相关转录因子 2，ALP= 碱性磷酸酶

1.3.7 蛋白质免疫印迹法 采用蛋白质免疫印迹法检测 A 组细胞培养 0、21 d 及 B 组细胞培养 0、7 d RUNX2 蛋白表达情况，具体如下：抽提总蛋白，经超声破碎仪辅助裂解，采用 BCA 法测定蛋白浓度，并于沸水中煮 10 ~ 15 min 制成蛋白样本；配制 SDS-PAGE 分离胶、

浓缩胶、电泳缓冲液, 每组蛋白样本取 20 μ l 进行电泳, 湿转法转膜后根据目的蛋白分子量裁剪目的条带和内参条带, Western 封闭液封闭 1 h, 将目的条带和内参条带分别浸没在由 Western 一抗稀释液、目的蛋白抗体或内参蛋白抗体配制的一抗工作液中, 4 $^{\circ}$ C 摇床摇晃过夜; 室温下复温 1 h, TBST 清洗 3 次, 10 min/次; 配制二抗工作液并浸没目的条带和内参条带, 摇床摇晃 1 h, TBST 清洗 3 次, 10 min/次; 将目的条带和内参条带分别置于 SX-100 凝胶成像仪中, 滴加化学发光工作液并拍照; 采用 Image J 软件进行图像处理, 以目的条带灰度值与内参条带灰度值的比值作为目的蛋白相对表达量。

1.3.8 对硝基苯酚比色法 采用对硝基苯酚比色法检测 A 组细胞培养 0、21 d 及 B 组细胞培养 0、7 d ALP 活性, 具体如下: 去除 AVICs 培养基, 加入 1 ml GENMED 清理液覆盖细胞表面, 小心吸除清理液, 使用细胞刮脱棒轻柔刮脱细胞; 再次加入 1 ml GENMED 清理液, 混匀后移至预冷的 1.5 ml 离心管中, 1 200 r/min 离心 5 min (离心半径 168 mm), 去除上清液; 加入 200 μ l GENMED 裂解液, 混匀后移至新的预冷的 1.5 ml 离心管中, 震荡 15 s, 冰上孵育 30 min, 13 000 r/min 离心 5 min (离心半径 47 mm); 移取 500 μ l 上清液至新的预冷的 1.5 ml 离心管中, 采用 BCA 法检测蛋白浓度; 96 孔板依次加入 220 μ l GENMED 缓冲液、25 μ l GENMED 反应液, 37 $^{\circ}$ C 孵育 3 min, 分别加入 5 μ l GENMED 清理液或待测样本, 放入酶标仪中检测 405 nm 波长时 0、5 min 读数, 并计算 ALP 活性, $ALP \text{ 活性} = [(\text{待测样本读数} - \text{对照样本读数}) \times \text{样本稀释倍数} \times 0.25] \times (0.005 \times 18.5 \times 0.6 \times 5)^{-1} \times \text{待测样本蛋白浓度}^{-1}$ 。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据处理, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组比较采用两独立样本 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AVICs 鉴定结果 Vimentin 是间叶源性细胞标志物, 细胞免疫荧光检测结果显示, 分离得到的细胞 Vimentin 阳性率接近 100%, 见图 1。CD₃₁ 是内皮细胞标志物, 流式细胞术检测结果显示, 分离得到的细胞 CD₃₁ 阳性率为 1.17%, 见图 2。

2.2 钙化结节和钙含量 A 组细胞培养 21 d 可见大量橘红色钙化结节, B 组细胞培养 7 d 可见大量橘红色钙化结节, 见图 3。A 组细胞培养 21 d 钙含量为 (0.107 \pm 0.007) mg/mg 蛋白, B 组细胞培养 7 d 钙含量为 (0.105 \pm 0.011) mg/mg 蛋白。A 组细胞培养 21 d 和 B 组细胞培养 7 d 钙含量比较, 差异无统计学意义 ($t=0.266$, $P=0.804$)。

2.3 RUNX2 和 ALP mRNA 相对表达量 以细胞培养

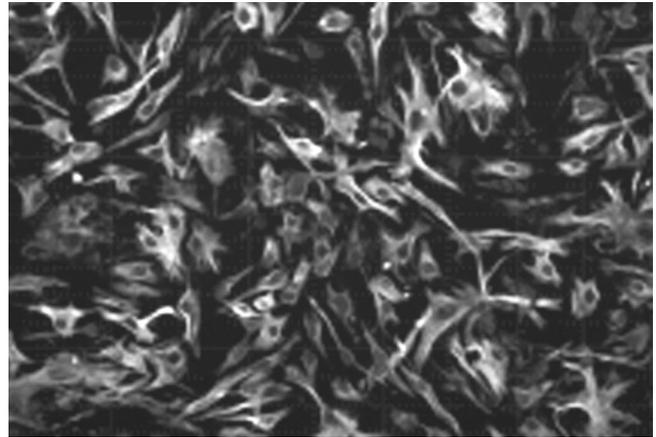


图 1 细胞免疫荧光法检测结果 (DAPI 复染, $\times 200$)

Figure 1 Cell immunofluorescence detection results

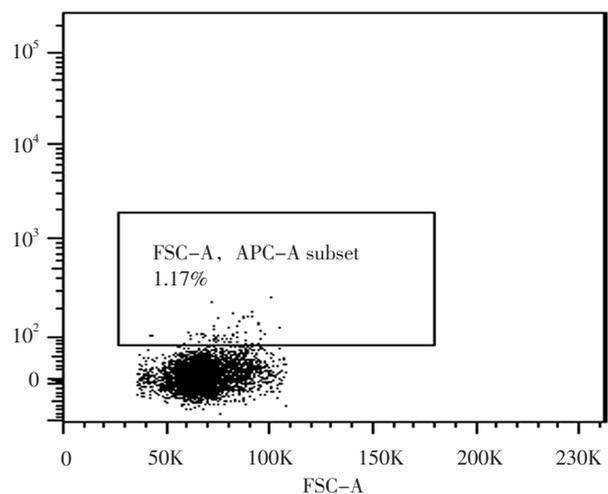
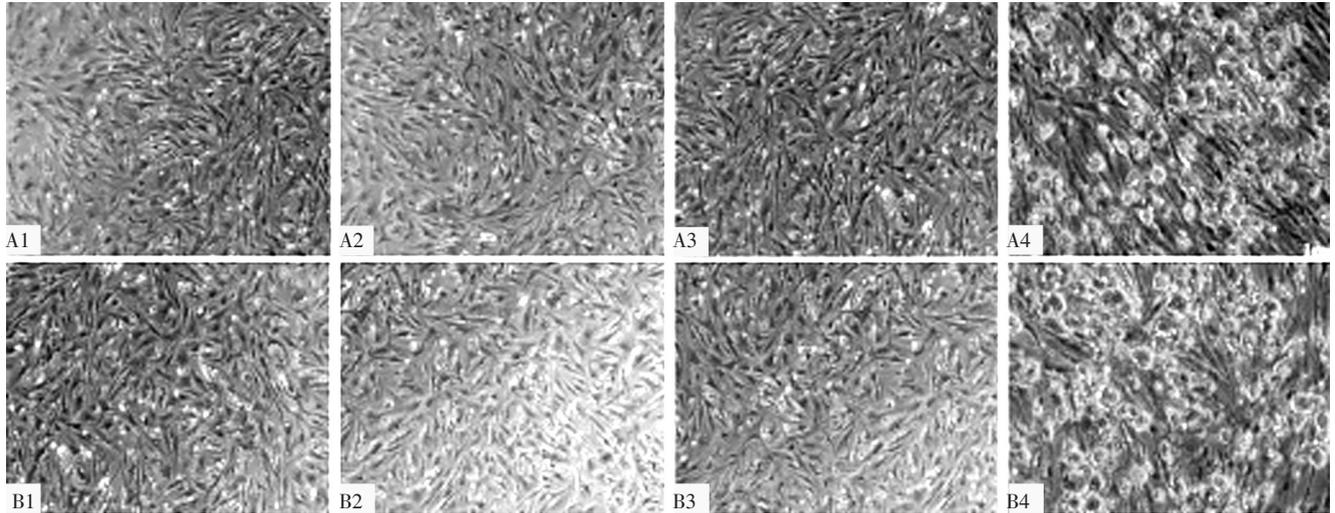


图 2 流式细胞术检测结果

Figure 2 Flow cytometry test results

0 d 作为对照, A 组细胞培养 21 d RUNX2 mRNA 相对表达量为 (1.568 \pm 0.302), ALP mRNA 相对表达量为 (1.345 \pm 0.118); B 组细胞培养 7 d RUNX2 mRNA 相对表达量为 (1.907 \pm 0.214), ALP mRNA 相对表达量为 (2.171 \pm 0.178)。A 组细胞培养 21 d 与 B 组细胞培养 7 d RUNX2 mRNA 相对表达量比较, 差异无统计学意义 ($t=1.586$, $P=0.188$); 但 A 组细胞培养 21 d 与 B 组细胞培养 7 d ALP mRNA 相对表达量比较, 差异有统计学意义 ($t=6.699$, $P=0.003$)。

2.4 RUNX2 蛋白相对表达量 A 组细胞培养 0 d RUNX2 蛋白相对表达量为 (0.218 \pm 0.015), 培养 21 d 为 (1.031 \pm 0.024); B 组细胞培养 0 d RUNX2 蛋白相对表达量为 (0.197 \pm 0.014), 培养 7 d 为 (0.991 \pm 0.032)。两组细胞培养 0 d RUNX2 蛋白相对表达量比较, 差异无统计学意义 ($t=1.773$, $P=0.151$); A 组细胞培养 21 d 与 B 组细胞培养 7 d RUNX2 蛋白相对表达量比较, 差异无统计学意义 ($t=1.732$, $P=0.158$)。



注：A1、A2、A3、A4 分别为 A 组培养 0 d、7 d、14 d、21 d；B1、B2、B3、B4 分别为 B 组培养 0 d、3 d、5 d、7 d

图 3 两组细胞培养不同时间点钙化结节(茜素红染色, ×100)

Figure 3 Calcified nodes in the two groups at different time points of cultivation

2.5 ALP 活性 A 组细胞培养 0 d ALP 活性为 (0.011 ± 0.002) U/mg 蛋白, 培养 21 d 为 (0.185 ± 0.019) U/mg 蛋白; B 组细胞培养 0 d ALP 活性为 (0.012 ± 0.003) U/mg 蛋白, 培养 7 d 为 (0.196 ± 0.024) U/mg 蛋白。两组细胞培养 0 d ALP 活性比较, 差异无统计学意义 ($t=0.480, P=0.656$); A 组细胞培养 21 d 与 B 组细胞培养 7 d ALP 活性比较, 差异无统计学意义 ($t=1.732, P=0.158$)。

3 讨论

主动脉瓣钙化类似于成骨, 是一个主动的可逆的病理过程^[6], 涉及瓣膜间质细胞和内皮细胞转分化、细胞外基质重塑、新生血管形成、血流机械应力改变、脂质浸润、钙磷代谢紊乱、炎性刺激等^[7-8]。主动脉瓣钙化可引起主动脉瓣狭窄、关闭不全等, 已成为临床研究热点。AVICs 是构成主动脉瓣膜的主要细胞之一, 也是主动脉瓣异位钙化中成骨细胞的主要来源。因此获取优质的 AVICs 是建立体外钙化模型的前体条件, 本研究采用改良的二次胶原酶消化法分离 AVICs, 结果显示, 分离得到的细胞 Vimentin 阳性率接近 100%, CD₃₁ 阳性率为 1.17%, 提示采用改良的二次胶原酶消化法分离得到的 AVICs 纯度较高, 符合细胞实验要求。

OIM 是建立体外 AVICs 钙化模型的关键, 目前常用的 OP-OIM 主要由 β -甘油磷酸、抗坏血酸、地塞米松组成^[9], 其中 β -甘油磷酸被认为是最重要的钙化诱导因素之一, 其经 ALP 分解后可产生 IP, 进而诱导钙化^[10]; 抗坏血酸能促进软骨细胞成熟, 提高软骨细胞中 ALP 含量, 进而加速钙化^[11]。但 OP-OIM 诱导 AVICs 钙化周期较长, 约为 21 d, 且诱导钙化过程

易受到多种因素干扰而导致建模失败^[12]。因此, 寻找一种培养周期较短、易操作的 OIM 具有重要的研究价值。李寰等^[13]研究结果显示, β -甘油磷酸诱导细胞钙化无浓度依赖性, 12 mmol/L 时效果最佳; >100 nmol/L 地塞米松对细胞生长、增殖均具有抑制作用, 而 100 nmol/L 地塞米松有利于细胞成骨化^[14]。近年研究结果显示, 碱性环境、炎性因子、骨形态发生蛋白 2 等均可与 β -甘油磷酸协同诱导钙化, 但其对缩短钙化时间均无明显作用^[15-18]。鉴于 OP 是转化为 IP 后才发挥钙化诱导作用, 本研究分别采用 OP-OIM 与 IP-OIM 培养 AVICs, 并比较两种 OIM 对 AVICs 钙化的影响。

本研究结果显示, A 组细胞培养 21 d、B 组细胞培养 7 d 可见大量橘红色钙化结节, 提示 A 组细胞培养 21 d 时成功建立 AVICs 钙化模型, B 组细胞培养 7 d 时成功建立 AVICs 钙化模型。钙含量可直观地反映钙化程度, RUNX2 和 ALP 是 AVICs 向成骨细胞转分化的标志物, 亦可有效评估钙化程度。本研究结果显示, A 组细胞培养 21 d 与 B 组细胞培养 7 d 钙含量间无差异, A 组细胞培养 21 d 与 B 组细胞培养 7 d RUNX2 mRNA 相对表达量、RUNX2 蛋白相对表达量、ALP 活性间均无差异, 但 A 组细胞培养 21 d 与 B 组细胞培养 7 d ALP mRNA 相对表达量间有统计学差异, 提示 A 组细胞培养 21 d 与 B 组细胞培养 7 d AVICs 钙化效果相当; 虽然 A 组细胞培养 21 d 与 B 组细胞培养 7 d ALP mRNA 相对表达量间有统计学差异, 但 A 组细胞培养 21 d 与 B 组细胞培养 7 d ALP 活性间无差异, 故对评价钙化效果无影响。

综上所述, IP-OIM 培养 7 d 与 OP-OIM 培养 21 d

诱导的 AVICs 钙化效果相当, IP-OIM 诱导 AVICs 钙化较 OP-OIM 缩短 14 d, 可替代 OP-OIM 快速有效地建立体外 AVICs 钙化模型。

作者贡献: 薛清、刘晓红、韩林、徐志云进行文章的构思与设计; 薛清、李宁、褚恒、刘晓红进行研究的实施与可行性分析, 进行结果分析与解释; 薛清、李宁、褚恒进行数据收集、整理、分析, 负责撰写论文; 韩林、徐志云负责文章的质量控制及审校; 韩林对文章整体负责, 监督管理。

本文无利益冲突。

参考文献

- [1] LSKOVA J, HADRABA D, FILOVA E, et al. Valve interstitial cell culture: Production of mature type I collagen and precise detection [J]. *Microsc Res Tech*, 2017, 80 (8): 936-942. DOI: 10.1002/jemt.22886.
- [2] SÁDABA J R, MARTÍNEZ-MARTÍNEZ E, ARRIETA V, et al. Role for Galectin-3 in calcific aortic valve stenosis [J]. *J Am Heart Assoc*, 2016, 5 (11). pii: e004360. DOI: 10.1161/JAHA.116.004360.
- [3] YU C, LI L, XIE F, et al. LncRNA TUG1 sponges miR-204-5p to promote psteoblast differentiation through upregulating RUNX2 in aortic valve calcification [J]. *Cardiovasc Res*, 2018, 114 (1): 168-179. DOI: 10.1093/cvr/cvx180.
- [4] BAI Y, ZHANG J, XU J, et al. Magnesium prevents β -glycerophosphate-induced calcification in rat aortic vascular smooth muscle cells [J]. *Biomed Rep*, 2015, 3 (4): 593-597. DOI: 10.3892/br.2015.473.
- [5] HE C, TANG H, MEI Z, et al. Human interstitial cellular model in therapeutics of heart valve calcification [J]. *Amino Acids*, 2017, 49 (12): 1981-1997. DOI: 10.1007/s00726-017-2432-3.
- [6] BOWLER M A, MERRYMAN W D. In vitro models of aortic valve calcification: solidifying a system [J]. *Cardiovasc Pathol*, 2015, 24 (1): 1-10. DOI: 10.1016/j.carpath.2014.08.003.
- [7] PAWADE T A, NEWBY D E, DWECK M R. Calcification in Aortic Stenosis: The Skeleton Key [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2015, 66 (5): 561-577. DOI: 10.1016/j.jacc.2015.05.066.
- [8] SIDER K L, ZHU C, KWONG A V, et al. Evaluation of a porcine model of early aortic valve sclerosis [J]. *Cardiovasc Pathol*, 2014, 23 (5): 289-297. DOI: 10.1016/j.carpath.2014.05.004.
- [9] YEANG C, COTTER B, TSIMIKAS S. Experimental Animal Models Evaluating the Causal Role of Lipoprotein (a) in Atherosclerosis and Aortic Stenosis [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2016, 30 (1): 75-85. DOI: 10.1007/s10557-015-6634-1.
- [10] SUNG D C, BOWEN C J, VAIDYA K A, et al. Cadherin-11 Overexpression Induces Extracellular Matrix Remodeling and Calcification in Mature Aortic Valves [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2016, 36 (8): 1627-1637. DOI: 10.1161/ATVBAHA.116.307812.
- [11] TORRE M, HWANG D H, PADERA R F, et al. Osseous and chondromatous metaplasia in calcific aortic valve stenosis [J]. *Cardiovasc Pathol*, 2016, 25 (1): 18-24. DOI: 10.1016/j.carpath.2015.08.008.
- [12] CHEN H, CUI W, HU H, et al. Isolation and culture of rat aortic valve interstitial cells [J]. *Anatol J Cardiol*, 2015, 15 (11): 893-896. DOI: 10.5152/akd.2014.5817.
- [13] 李寰, 贾国良, 张荣庆, 等. β -磷酸甘油诱导体外培养大鼠主动脉平滑肌细胞的钙化 [J]. *心脏杂志*, 2005, 17 (3): 238-240. DOI: 10.3969/j.issn.1009-7236.2005.03.012.
- [14] 黎洪棉, 高建华, 鲁峰, 等. 地塞米松在家兔脂肪基质干细胞定向诱导为成骨细胞的作用 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, 11 (20): 3896-3899. DOI: 10.3321/j.issn: 1673-8225.2007.20.009.
- [15] COFFEY S, COX B, WILLIAMS M J. The prevalence, incidence, progression, and risks of aortic valve sclerosis: a systematic review and meta-analysis [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2014, 63: 2852-2861. DOI: 10.1016/j.jacc.2014.04.018.
- [16] QIU YANG L, TING W, TING Y, et al. Effect of bone morphogenetic protein-2 on human heart valve interstitial cells calcification in vitro [J]. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi*, 2015, 43 (8): 724-727.
- [17] ARZANI A, MOFRAD M R K. A strain-based finite element model for calcification progression in aortic valves [J]. *J Biomech*, 2017, 65: 216-220. DOI: 10.1016/j.jbiomech.2017.10.014.
- [18] VAN ENGELAND N C A, BERTAZZO S, SARATHCHANDRA P, et al. Aortic calcified particles modulate valvular endothelial and interstitial cells [J]. *Cardiovasc Pathol*, 2017, 28: 36-45. DOI: 10.1016/j.carpath.2017.02.006.

(收稿日期: 2018-01-04; 修回日期: 2018-04-15)

(本文编辑: 李洁晨)