

## 25- 羟基胆固醇促进培养的家兔主动脉中膜细胞体外钙化

崔晓暄, 王士雯<sup>1</sup>, 齐 鹏<sup>1</sup>

(中国人民解放军空军总医院内科, 北京市 100853; 1. 解放军总医院老年心血管病研究所)

[主题词] 动脉; 钙化; 25- 羟基胆固醇; 肌, 平滑; 周细胞; 骨钙素

[摘 要] 为研究主动脉中膜细胞体外钙化情况以及 25- 羟基胆固醇对此过程的促进作用, 采用贴块法分离培养主动脉中膜细胞, 并进行 von Kossa 染色以显示钙化, 生物化学检测细胞不溶性钙, 放射免疫法测定培养上清液中骨钙素含量。发现原代细胞有两种生长表现: 一种细胞平行生长, 不形成结节, von Kossa 染色阴性; 另一种易形成结节, von Kossa 染色阳性。对照组传代细胞培养 28 天无结节形成, von Kossa 染色阴性。而实验组, 即 25- 羟基胆固醇处理组有细胞结节形成, von Kossa 染色阳性, 培养上清液中骨钙素增多。由此可见体外培养的主动脉中膜细胞有两种亚型, 一种为平滑肌细胞的表型; 另一种为微血管周细胞型细胞, 能使其细胞外基质钙化。25- 羟基胆固醇可以促进这一体外钙化过程。周细胞型细胞钙化过程中骨钙素合成增多, 推测骨钙素可能参与了主动脉的钙化。

[中图分类号] R54

[文献标识码] A

### 25- Hydroxycholesterol Accelerates in Vitro Calcification of Rabbit Aortic Medial Cells

CUI Xiao- Xuan, WANG Shi- Wen<sup>1</sup>, and QI Peng<sup>1</sup>

(Air Force General Hospital, Beijing 100853, China; 1. Institute of Geriatric Cardiology, General Hospital of PLA)

**MeSH** Aorta; Calcification; 25- Hydroxycholesterol; Muscle, Smooth; Pericyte; Osteocalcin

**ABSTRACT** **Aim** To investigate in vitro calcification of aortic medial cells and the acceleration by 25- hydroxycholesterol. **Methods** Aortic medial cells were obtained by explantation. Von Kossa staining was performed to show calcification. Insoluble calcium of cellular layer was determined by biochemical method. And osteocalcin in the media was analyzed with radioimmunoassay. **Results** Primary cells appeared two different types: cells with the features of parallel growth and negative von Kossa staining, and cells forming nodules with positive von Kossa staining. Passaged cells formed no nodules after 28 days. Cells treated with 25- hydroxycholesterol appeared many cell nodules with positive von Kossa staining. Both insoluble calcium and medium osteocalcin increased significantly. **Conclusions** There are two subgroups of the cultured aortic medial cells: one with the characters of smooth muscle cells; the other like micro vascular pericytes, which can calcify the extracellular matrix. 25- hydroxycholesterol can promote in vitro calcification. Osteocalcin secretion increases during pericyte-like cell calcification, suggesting that osteocalcin may take part in aortic calcification.

动脉钙化不但会增加心肌梗死和心力衰竭的发生风险, 而且显著增加介入性治疗中严重并发症的发生, 研究心血管系统异位钙化的发生机理, 能为动脉钙化的早期预防及临床治疗提供理论基础。本研究对长期培养的原代及传代家兔主动脉中膜细胞体外钙化情况以及 25- 羟基胆固醇对此过程的促进作用进行了观察。

### 1 材料与方法

[基金项目] 国家自然科学基金资助(39770869)

[作者简介] 崔晓暄, 女, 1971 年生, 天津人, 从事血管钙化的机制研究, 在国内外发表论文 6 篇。王士雯, 女, 1933 年生, 山东人, 教授, 中国工程院院士, 从事老年多器官功能衰竭和老年钙化性瓣膜病的发生机制的研究。

#### 1.1 材料

新西兰家兔由中国药品生物制品检定所实验动物繁育场购得。骨钙素测定放射免疫药盒由北京东亚免疫技术研究所购得。Hanks 液(GIBCO- BEL), DMEM 培养基(GIBCO- BEL), 精制胎牛血清(Hyclone)。

#### 1.2 平滑肌细胞的分离和培养

无菌分离出家兔主动脉, 在 Hanks 液中反复冲洗主动脉条, 并用钟表镊撕掉主动脉外膜。纵向剖开, 用消毒棉签擦拭内膜面的内皮细胞。用贴块法分离培养血管平滑肌细胞。将培养瓶置于 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中, 30 min~ 1 h 后取出, 加入含有 20% FBS、100 ku/L 青霉素、100 mg/L 链霉素和 2 mmol/L 谷氨酰胺的 DMEM, 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 培养。每 3 天换一

次液。

### 1.3 实验分组

培养的第5~6代细胞在含有10% FBS、100 ku/L青霉素、100 mg/L链霉素和2 mmol/L谷氨酰胺的DMEM中按 $1.8 \times 10^5$ /孔的密度接种于6孔培养板。25-羟基胆固醇处理组(简称处理组)细胞72 h后更换为添加有1 mg/L 25-羟基胆固醇的上述培养基,而对照组细胞培养基中不添加25-羟基胆固醇。每3天换一次液。

### 1.4 von Kossa 钙染色及钙测定

培养的细胞在0.1%戊二醛中固定30 min。加入5%硝酸银,蔽光、室温孵育30 min。用三蒸水轻轻洗涤细胞后,在紫外光下放置30 min。用0.1%伊红复染30 s。钙沉积染成黑色。

为测定结合于细胞外基质、细胞蛋白和矿物质的不溶性钙,将已生长于6孔培养板的细胞在钙测定前的12 h更换成不含血清的培养基。用PBS冲洗,用胰蛋白酶消化后铲下细胞。加入1.5 mL PBS并收集细胞,38℃下孵育细胞30 min。经过3个冷冻→融解循环后,再次在38℃下孵育30 min。将细胞置于超声波中3 min,使细胞充分破碎。3 000 g离心30 min,沉淀被完全悬浮于250  $\mu$ L 6 mol/L HCl中,100℃孵育30 min,加入250  $\mu$ L 6 mol/L NaOH进行中和。其余步骤按Webster方法<sup>[1]</sup>操作。

### 1.5 骨钙素测定

每个培养孔中加入1.5 mL培养基,孵育72 h后吸出上清液,置于-30℃保存。骨钙素的浓度用<sup>125</sup>I放射免疫法按试剂盒说明进行分析。

### 1.6 统计学处理

所得数据以平均值 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,用 $t$ 检验进行统计学分析,以 $P < 0.05$ 为统计学差异显著。

## 2 结果

### 2.1 培养细胞的生长及 von Kossa 染色特征

原代细胞在培养至21天时,镜下可见两种不同形态的细胞生长。一种为长梭形,平行生长,束状排列,密集与稀疏处相互交错呈“峰-谷”状;另一种为扁而大的星形细胞,即使在稀疏的生长状态下,仍然形成多个细胞结节,细胞生长不能铺满瓶底汇合成单层。用 von Kossa 法对沉积的钙质进行染色,细胞结节被染成黑色显示有钙质沉积。传代培养的细胞,培养至28天,对照组无细胞结节形成, von Kossa 染色阴性(图1A, Figure 1A);而25-羟基胆固醇处

理组的细胞可见多个细胞结节, von Kossa 染色阳性(图1B, Figure 1B)。

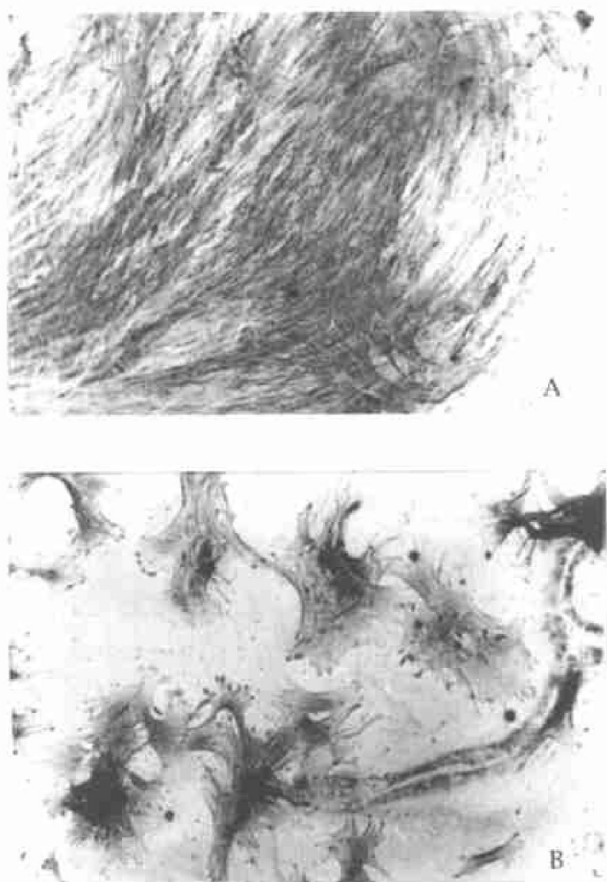


图1 Von Kossa 染色。A: 对照组细胞培养28天,无细胞结节形成, von Kossa 染色为阴性( $\times 100$ ); B: 25-羟基胆固醇处理组细胞培养28天,可见细胞结节形成, von Kossa 染色为阳性( $\times 200$ )

Figure 1 von Kossa stain. A: Cells of control group showed no cellular nodule formation and negative von Kossa stain ( $\times 100$ ); B: Cells treated with 25-hydroxycholesterol showed cellular nodules formation and positive von Kossa stain ( $\times 200$ )

### 2.2 钙测定

25-羟基胆固醇处理组钙含量为 $0.0578 \pm 0.0185$  mg,明显高于对照组 $0.000104 \pm 0.000032$  mg ( $P < 0.001$ )。

### 2.3 骨钙素的测定

25-羟基胆固醇处理组骨钙素为 $0.8863 \pm 0.0625$   $\mu$ g/L,高于对照组 $0.6846 \pm 0.0389$   $\mu$ g/L ( $P < 0.001$ )。

## 3 讨论

### 3.1 主动脉血管壁细胞的钙化

我们用主动脉中膜外植块进行细胞的原代培养,发现从组织块外周长出的细胞表现为两种不同的细胞形态和生长状态。一种细胞为典型的平滑肌细胞的表现,另一种细胞的生长和钙化的特点与微

血管的周细胞(pericytes)十分相似。Schor 等<sup>[2]</sup>对视网膜微血管周细胞的观察发现,即使在稀疏培养中周细胞仍趋向于重叠、聚集,周细胞是通过不断重复着贴壁、伸展、增殖和收缩这个循环而使细胞结节增大。结节的间质内含有胶原纤维和基质小泡,针状的羟基磷灰石在间质内沉积,并逐渐发展为结节的广泛钙化。

由于我们在原代培养中见到平滑肌细胞型和周细胞型两种细胞生长方式,并且在培养 21 天后前者不发生钙化而后者出现明显的钙化,因而我们认为主动脉中膜内存在一种周细胞型的细胞,正是这种细胞在血管壁的钙化过程中起着重要作用。Andreeva 等<sup>[3]</sup>用免疫细胞化学的方法用抗周细胞抗体 3G5 研究了周细胞型细胞在成年人血管床的分布,发现周细胞型细胞分布于大、中、小动脉的内皮下层、中膜外层和外层滋养血管,且为星形。

在我们的实验中,传代培养的细胞在未施加促钙化因素的条件下,其钙化速度明显慢于原代细胞,培养至 28 天时仍未见钙化结节出现。推测其原因可能为周细胞型细胞在原代细胞中所占的比例较少,并且有可能其生长速度慢于平滑肌细胞,因此在连续传代的过程中受到抑制。25- 羟胆固醇存在于粥样斑块之中,它对体外血管壁细胞钙化的促进作用说明它在体内可能作为促进钙化的一个病理因素。

### 3.2 Gla- 蛋白与钙化的关系

在本研究中,对培养 28 天的主动脉壁细胞培养上清液用放射免疫的方法进行骨钙素测定,结果表明,发生钙化的处理组比无钙化的对照组骨钙素含量明显增高。Balica 等<sup>[4]</sup>在研究 17 $\beta$ - 雌二醇对体外牛主动脉平滑肌细胞钙化的促进作用时,用 Western blot 方法检测培养上清液的骨钙素,结果表明随钙化的增多骨钙素的分泌增加,这与本研究的结果一致。

骨钙素(osteopontin)属于 Gla 蛋白家族。Gla(  $\gamma$ - 羧基谷氨酸, gamma carboxyglutamate)这一氨基酸残基具有结合钙的功能, Gla 蛋白与钙离子的结合能力弱,但是 Gla 蛋白与羟基磷灰石有很高的结合力,所以一旦发生钙沉积,它就会结合于沉积的羟基磷灰石。含 Gla 残基的蛋白分两类,一类是由肝脏合成,循环于血浆之中,其作用是调节凝血;另一类 Gla 蛋白由骨组织及小部分软组织合成,已确定的此类蛋白有骨 Gla 蛋白(bone gla protein BGP 或 osteocalcin)、基质 Gla 蛋白(matrix gla protien, MGP)和从

钙化的粥样斑块中分离出的斑块 Gla 蛋白(plaque gla protein, PGP)。

骨钙素最初由骨组织分离出来,后来,在钙化的粥样斑块和瓣膜中亦检测到低水平的骨钙素,而在无钙化的组织中几乎检测不到骨钙素。同时发现钙化组织中其他 Gla 蛋白的含量也显著增高。MGP 在骨组织和主动脉的软组织中都有表达,正常的血管壁中可检测到较高的 MGP mRNA,并且正常人血清 PGP 的水平高于动脉粥样硬化患者的水平,这些均提示正常的动脉壁产生 Gla 蛋白,但是目前的技术尚未能在正常的血管壁中检测到这类蛋白。目前对于 Gla 蛋白与钙化的关系仍然存在诸多的疑点,就本实验得到的培养上清液中骨钙素随钙化而增高这一结果可以做出两种解释:一种可能是局部钙及羟基磷灰石的增多向细胞发出有害信号,细胞分泌更多的骨钙素,以便钙被结合转移,但由于骨钙素与沉积的羟基磷灰石的结合,并且有可能这种结合更加速了矿物质的进一步沉积,由此形成一个正反馈,使得骨钙素的分泌随着钙化增加;另一种可能是在钙化的启动过程中骨钙素的表达和分泌增高,过多的骨钙素与其他因子共同构成了矿物质沉积的有利环境,从而促进钙化。

由本实验可以得出以下结论:体外培养的主动脉中膜细胞有两种亚型,一种为平滑肌细胞的表型;另一种为微血管周细胞型细胞,能够使其细胞外基质钙化,这种周细胞型细胞可能是在病理状态下参与动脉壁钙化的主要细胞。25- 羟基胆固醇可以促进这一体外钙化过程,表明其可能是促进动脉钙化的一个病理因素。骨钙素合成增多表明骨钙素可能参与了这一体外钙化过程。

### 参考文献

- [1] Webster WWJ. A simple microspectrophotometric method for the determination of serum calcium [J]. *Am J Pathol*, 1962, **37**: 330-333
- [2] Schor AM, Allen TD, Canfield AE, et al. Pericytes derived from the retinal microvasculature undergo calcification in Vitro [J]. *J Cell Sci*, 1990, **97**: 449-461
- [3] Andreeva ER, Pugach IM, Gordon D, et al. Continuous subendothelial network formed by pericyte-like cells in human vascular bed [J]. *Tissue Cell*, 1998, **30**: 127-135
- [4] Balica M, Bostrom K, Shin V, et al. Calcifying subpopulation of bovine aortic smooth muscle cells is responsive to 17 $\beta$ - estradiol [J]. *Circulation*, 1997, **95**: 1954-1960

(此文 1999- 12- 21 收到, 2000- 06- 18 修回)

(此文编辑 朱雯霞)