

人源瓣膜间质细胞体外成骨诱导方法比较

邢凯, 郑强, 孙金书, 刘晓林, 王正军

(山东第一医科大学附属省立医院心脏大血管外科, 山东 济南 250021)

摘要:目的 探究不同成骨诱导方法对人源瓣膜间质细胞(human valvular interstitial cells, hVICs)成骨分化及钙化的影响。方法 选取常用的5种体外成骨诱导瓣膜间质细胞方法对hVICs进行成骨诱导分化:① 2 mmol/L 无机磷酸盐+50 μ g/mL 维生素 C(2 mmol/L Pi+VC);② 2.6 mmol/L 无机磷酸盐(2.6 mmol/L Pi);③ 2.5 mmol/L 无机磷酸盐+2.7 mmol/L 氯化钙+50 μ g/mL 维生素 C(2.5 mmol/L Pi+Ca+VC);④ 10 mmol/L β -磷酸甘油+10 nmol/L 地塞米松+8 mmol/L 氯化钙+4 μ g/mL 维生素 D3(β -GP+DXM+Ca+VD3);⑤ 10 mmol/L β -磷酸甘油+10 nmol/L 地塞米松+50 μ g/mL 维生素 C(β -GP+DXM+VC)。通过茜素红染色、RT-qPCR 和 Western blotting 分别对钙化沉积和成骨标志物的表达进行评估。结果 通过比较5种诱导方法在成骨诱导第4、7、10、14 d 的钙沉积面积,发现 2 mmol/L Pi+VC、 β -GP+DXM+Ca+VD3 和 β -GP+DXM+VC 在前10 d 几乎没有钙化,而 2.6 mmol/L Pi 在第7天出现明显钙化,2.5 mmol/L Pi+Ca+VC 在诱导第4天便出现明显钙化,且在第7天时几乎全部发生钙化。在第14天时,除2 mmol/L Pi+VC 钙化较少外,其余方法均发生明显钙化。成骨标志物检测显示,碱性磷酸酶在 2 mmol/L Pi+VC、2.6 mmol/L Pi 和 β -GP+DXM+VC 诱导第7天时显著上调($P<0.05$);而骨桥蛋白在诱导第7天时均显著上调($P<0.001$)。随后对 2.5 mmol/L Pi+Ca+VC 中的3种组分两两组合进行钙化诱导,发现 Pi+Ca 和 Pi+Ca+VC 在诱导第7天时钙化面积显著多于 Pi+VC 和 Ca+VC,但 ALP 表达显著低于 Pi+VC 和 Ca+VC,提示这种钙沉积可能是由于无机磷酸盐与氯化钙发生反应生成了磷酸钙沉淀。结论 2.6 mmol/L Pi 和 β -GP+DXM+VC 诱导 hVICs 成骨分化的效果最佳。

关键词:瓣膜间质细胞;成骨诱导;成骨分化;钙化;无机磷酸盐; β -磷酸甘油

中图分类号:R331

文献标志码:A

Comparison of osteogenic induction methods for human valve interstitial cells *in vitro*

XING Kai, ZHENG Qiang, SUN Jinshu, LIU Xiaolin, WANG Zhengjun

(Department of Cardiovascular Surgery, Shandong Provincial Hospital Affiliated to Shandong First Medical University, Jinan 250021, Shandong, China)

Abstract: Objective To explore the effects of different osteogenic induction methods on the osteogenic differentiation and calcification of human valvular interstitial cells (hVICs). **Methods** Five commonly used *in vitro* osteogenic induction methods for valvular interstitial cells were selected from the literature: ① 2 mmol/L inorganic phosphate+50 μ g/mL vitamin C (2 mmol/L Pi + VC); ② 2.6 mmol/L inorganic phosphate (2.6 mmol/L Pi); ③ 2.5 mmol/L inorganic phosphate+2.7 mmol/L calcium chloride+50 μ g/mL vitamin C (2.5 mmol/L Pi + Ca + VC); ④ 10 mmol/L β -glycerophosphate+10 nmol/L dexamethasone+8 mmol/L calcium chloride+4 μ g/mL vitamin D3 (β -GP+DXM+Ca+VD3); ⑤ 10 mmol/L β -glycerophosphate+10 nmol/L dexamethasone+50 μ g/mL vitamin C (β -GP+DXM+VC). Alizarin red staining, RT-qPCR and Western blotting were used to assess calcium deposition and the expression of osteogenic markers, respectively. **Results** By comparing the calcium deposition areas on day 4, 7, 10, and 14 induced

by five different induction methods, it was found that there was almost no calcification within the first 10 days with 2 mmol/L Pi+VC, β -GP+DXM+Ca+VD₃, and β -GP+DXM+VC. In contrast, significant calcification appeared on day 7 with 2.6 mmol/L Pi, 2.5 mmol/L Pi+Ca+VC showed significant calcification on day 4 and almost all calcification on day 7. On day 14, except for the relatively low calcification with 2 mmol/L Pi+VC, all other methods showed significant calcification. Osteogenic marker detection indicated that alkaline phosphatase was significantly upregulated on day 7 with 2 mmol/L Pi+VC, 2.6 mmol/L Pi, and β -GP+DXM+VC ($P<0.05$), while osteopontin showed significant upregulation on day 7 in all methods ($P<0.001$). Subsequently, calcium induction was performed with pairwise combinations of the three components in 2.5 mmol/L Pi+Ca+VC. It was found that the calcium deposition areas were significantly larger with Pi+Ca and Pi+Ca+VC on day 7 compared to Pi+VC and Ca+VC, but ALP expression was significantly lower in Pi+Ca and Pi+Ca+VC, suggesting that this calcium deposition might be due to the reaction between inorganic phosphate and calcium chloride forming calcium phosphate precipitates. **Conclusion** The optimal effect of inducing osteogenic differentiation in hVICs was achieved with 2.6 mmol/L Pi and β -GP+DXM+VC.

Key words: Valvular interstitial cell; Osteogenic induction; Osteogenic differentiation; Calcification; Inorganic phosphate; β -glycerophosphate

钙化性主动脉瓣疾病(calcific aortic valve disease, CAVD)是一种主要影响老年人的心脏瓣膜疾病^[1-2],其特征是主动脉瓣逐渐发生硬化和钙化,最终导致瓣膜功能障碍。目前尚无有效的药物能够预防或逆转瓣膜钙化,最有效的方式依然是外科手术或经导管主动脉瓣置换术^[3],但手术治疗的过程不仅对患者身体造成创伤,而且人工瓣膜昂贵的费用也给患者的家庭带来负担^[4-6]。因此,研究CAVD发病的分子机制,寻找有效的分子靶点对CAVD的临床治疗具有重要的意义。

CAVD涉及瓣膜间质细胞(valvular interstitial cells, VICs)的成骨分化,体外诱导VICs的成骨分化是研究CAVD发病机制的重要手段。以往的文献中,诱导VICs成骨分化的方法众多,不同方法对VICs成骨分化及钙化的影响尚需进一步研究。VICs的成骨诱导方法通常分为两大类,一类是无机磷酸盐诱导,通过向培养基中加入pH=7.4的磷酸二氢钠(NaH₂PO₃)和磷酸氢二钠(Na₂HPO₃)的混合物进行成骨诱导,这种方法往往诱导时间较短,钙化效果较好;另一类是用有机磷酸盐 β -磷酸甘油(β -glycerophosphate, β -GP),该方法诱导时间较长,但成骨标志物表达更为显著,是应用最为广泛的VICs成骨诱导方法^[7]。

基于这两大类成骨诱导方法,本研究选取文献中较为常用的5种方法对VICs进行成骨诱导分化:
① 2 mmol/L 无机磷酸盐+50 μ g/mL 维生素 C^[8-10];
② 2.6 mmol/L 无机磷酸盐^[11-13];
③ 2.5 mmol/L 无机磷酸盐+2.7 mmol/L 氯化钙+50 μ g/mL 维生素 C^[14];
④ 10 mmol/L β -磷酸甘油+10 nmol/L 地塞米松+8 mmol/L 氯化钙+4 μ g/mL 维生素 D₃^[15-17];
⑤ 10 mmol/L β -磷酸甘油+10 nmol/L 地塞米松+

50 μ g/mL 维生素 C^[18-21]。通过评估钙化情况和成骨标志物的表达情况,对5种体外诱导方法的效果进行比较,为未来选择VICs体外诱导方法提供指导。

1 资料与方法

1.1 资料

1.1.1 资料来源

取自3例急性A型主动脉夹层患者的未钙化的主动脉瓣叶,由山东第一医科大学附属省立医院心脏大血管外科提供。本研究获得山东第一医科大学附属省立医院伦理委员会批准(No. SD NSFC 2021-0088)。本研究已取得患者知情同意。

1.1.2 主要试剂

胶原酶 I 购自 Biosharp 生物科技有限公司, DMEM 高糖培养基、PBS 缓冲液购自上海源培生物科技有限公司,胎牛血清、0.25% 胰酶、青霉素-链霉素购自美国赛默飞公司,磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、氯化钙、维生素 D₃ 购自上海生工生物工程有限公司, β -磷酸甘油、地塞米松、蛋白裂解液、蛋白上样缓冲液、一抗稀释液、脱脂奶粉等购自上海碧云天生物有限公司,维生素 C 购自美国 MCE 公司, RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、SYBR Green qPCR Mix 购自山东思科捷生物技术有限公司,蛋白定量试剂盒、ECL 化学发光检测试剂盒购自南京诺唯赞生物有限公司,2% 茜素红染液购自武汉塞维尔生物公司,GAPDH 抗体、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)抗体和骨桥蛋白(osteopontin, OPN)抗体购自武汉 Proteintech 有限公司,二抗购自山东思科捷生物技术有限公司。

1.1.3 主要仪器

CX23 型显微镜(日本 OLYMPUS 公司);酶标仪(瑞士 Tecan 公司)电泳仪、电泳槽、转膜槽(北京鸿基公司);化学发光仪(美国 BIO-RAD 公司);EVOS M7000 全自动 3D 数字共聚焦分析系统(美国赛默飞公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养方法

将未钙化的主动脉瓣叶置于胶原酶 I 中,在 37 °C 培养箱中消化 12 h,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,使用含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素的 DMEM 培养基重悬,然后铺板,在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养,待细胞长至培养皿的 85% 时即可进行传代。6 孔板铺 5×10⁵ 细胞/孔,用于后续 Western blotting 实验,12 孔板铺 2×10⁵ 细胞/孔,用于后续茜素红染色和 RT-qPCR 实验。实验用的细胞代数在第 2 代至第 5 代。

1.2.2 成骨诱导方法

将细胞分别用 5 种成骨诱导培养基进行培养:
① 2 mmol/L 无机磷酸盐 + 50 μg/mL 维生素 C (2 mmol/L Pi + VC); ② 2.6 mmol/L 无机磷酸盐 (2.6 mmol/L Pi); ③ 2.5 mmol/L 无机磷酸盐 + 2.7 mmol/L 氯化钙 + 50 μg/mL 维生素 C (2.5 mmol/L Pi + Ca + VC); ④ 10 mmol/L β-磷酸甘油 + 10 nmol/L 地塞米松 + 8 mmol/L 氯化钙 + 4 μg/mL 维生素 D3

(β-GP+DXM+Ca+VD3); ⑤ 10 mmol/L β-磷酸甘油 + 10 nmol/L 地塞米松 + 50 μg/mL 维生素 C (β-GP+DXM+VC)。在培养 4、7、10、14 d 后采用茜素红染色法检测钙沉积面积,在培养 5、7 d 后,分别采用 RT-qPCR 和 Western blotting 法检测成骨标志物 ALP 和 OPN 的表达。以未诱导细胞作为对照。

1.2.3 茜素红染色检测钙沉积

VICs 用 PBS 洗涤两次,在 4% 多聚甲醛中固定 15 min;加入 2% 茜素红染液孵育 30 min 后,超纯水洗涤去除多余的染料;随后,染色的细胞使用 EVOS M7000 共聚焦分析系统成像拍照。使用 ImageJ 1.54 h 软件计算钙化面积阳性率。每个孔统计 6 个视野进行后续的分析。

1.2.4 采用 RT-qPCR 法检测 ALP 和 SPP1 的 mRNA 表达

细胞总 RNA 用 RNA 试剂盒提取,用反转录试剂盒按照说明书进行反转录,得到 cDNA,使用 SYBR Green 核酸凝胶染料 (SYBR Green Nucleic Acid Gel Stain) 进行 RT-qPCR。检测 ALP 和分泌型磷蛋白 1 (secreted phosphoprotein 1, SPP1, 编码 OPN) 的表达,反应条件为:95 °C、30 s,预变性;95 °C 变性 10 s,60 °C 退火 30 s,40 个循环;GAPDH 作为内参,每个样品重复 3 次实验。根据平均 CT 值计算相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 RT-qPCR 引物序列
Table 1 Primer sequences for RT-qPCR

引物	引物序列
ALP	F: ACTGGTACTCAGACAACGAGAT R: ACGTCAATGTCCCTGATGTTATG
SPP1	F: GAAGTTTCGACAGACCTGACAT R: GTATGCACCATTCAACTCCTCG
GAPDH	F: CTGGGCTACACTGAGCACC R: AAGTGGTCGTTGAGGGCAATG

1.2.5 采用 Western blotting 法检测 ALP 和 OPN 的蛋白表达

将细胞刮下,用含有苯甲基磺酰氟 (phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF) 的放射免疫沉淀分析缓冲液 (radioimmunoprecipitation assay buffer, RIPA) 裂解细胞。蛋白浓度采用 BCA 蛋白测定法测定,按照 20 μg/20 μL 体系对蛋白样品变性。使用 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离等量的蛋白质,并将其转移到聚偏氟乙烯膜 (polyvinylidene fluoride membrane, PVDF) 上。脱脂牛奶封闭 1 h 后,用特异性一抗 4 °C 孵育过夜。二抗室温孵育 1 h,使用 Bio-Rad 成像系统检测蛋白表达。实验重复 3 次,使用 ImageJ 软件对条带进行灰度分析。

1.3 统计学处理

采用 GraphPad Prism 9.5 软件。对数据进行正态分布检验,符合正态分布以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较

采用单因素方差分析,两两比较采用 Dunnett *t* 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 钙沉积面积检测

分别用 5 种成骨诱导方式诱导 hVICs 0、4、7、10、14 d,采用茜素红染色法检测各组细胞的钙沉积面积。结果显示,2 mmol/L Pi + VC、β-GP + DXM + Ca + VD3 和 β-GP + DXM + VC 在前 10 天几乎没有钙化,而 2.6 mmol/L Pi 在第 7 天出现明显钙化 ($P < 0.01$),2.5 mmol/L Pi + Ca + VC 最快在诱导第 4 天便出现明显钙化 ($P < 0.001$),且在第 7 天时几乎全部发生钙化 ($P < 0.001$)。第 14 天时,除 2 mmol/L Pi + VC 钙化较少外,其他方法均发生明显钙化 ($P < 0.001$),见图 1。

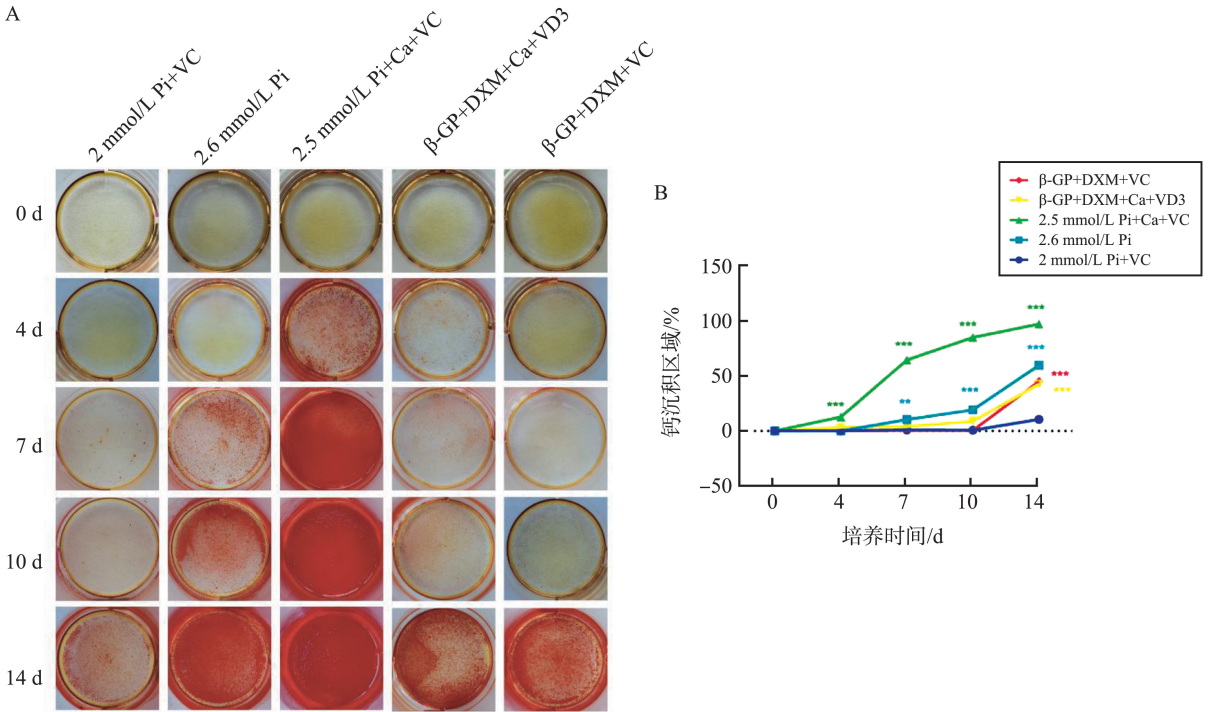


图1 不同时间5种成骨诱导方法的茜素红染色及钙化沉积区域统计 (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. 第0天)
A: 茜素红染色; B: 钙沉积区域统计。

Figure 1 Alizarin red staining and calcification deposition area statistics for 5 osteogenic induction methods in different days (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. day 0)

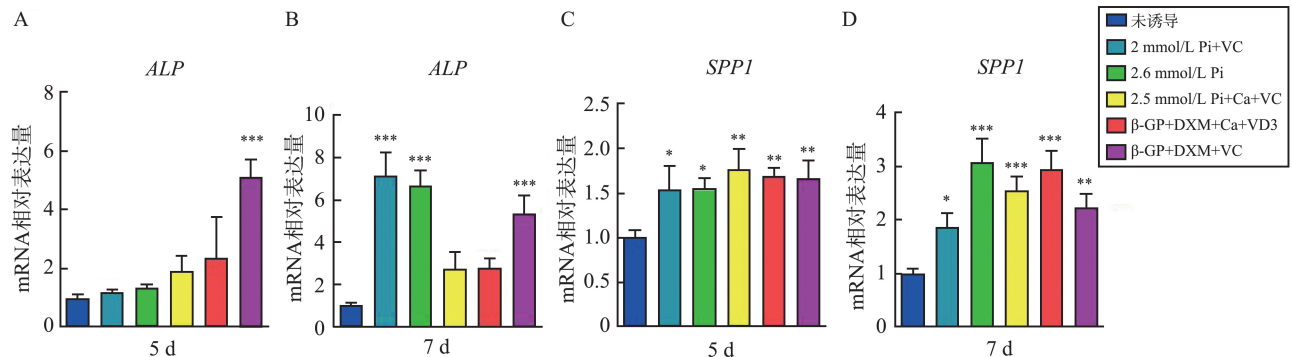
A: Alizarin red staining; B: Calcium deposition area statistics.

2.2 成骨标志物的检测

用 RT-qPCR 检测 ALP 和 SPP1 mRNA 表达。单因素分析结果显示, 总体差异有统计学意义 ($F_{ALP\ 5d} = 15.28, P_{ALP\ 5d} < 0.001; F_{ALP\ 7d} = 32.49, P_{ALP\ 7d} < 0.001; F_{SPP1\ 5d} = 6.92, P_{SPP1\ 5d} = 0.003; F_{SPP1\ 7d} = 17.52, P_{SPP1\ 7d} < 0.001$)。与未诱导组相比, ALP 在 β -GP+DXM+VC 组诱导第 5 天时显著上调 ($P < 0.001$), Pi+VC、Pi 和 β -GP+DXM+VC 组诱导第 7 天时显著上调 ($P < 0.001$)。而 SPP1 在所有诱导组别诱导第 5 天和第 7 天时均显著上调 ($P < 0.05$), 见图 2A~D。

采用 Western blotting 法检测 ALP 和 OPN 的蛋白水平表达。单因素分析结果显示, 总体差异有统

计学意义 ($F_{ALP\ 5d} = 26.46, P_{ALP\ 5d} < 0.001; F_{ALP\ 7d} = 119.85, P_{ALP\ 7d} < 0.001; F_{OPN\ 5d} = 19.28, P_{OPN\ 5d} < 0.001; F_{OPN\ 7d} = 19.51, P_{OPN\ 7d} < 0.001$)。与未诱导组相比, ALP 在 2 mmol/L Pi+VC、2.6 mmol/L Pi 和 β -GP+DXM+VC 组诱导第 7 天时显著上调 ($P < 0.001$); OPN 在诱导第 7 天时所有诱导组均显著上调 ($P < 0.001$), 见图 2E~I。另外, 2.5 mmol/L Pi+Ca+VC 组在茜素红染色的结果中诱导钙化的效果最为显著, 在诱导第 4 天时便出现了明显的钙化, 但该组 ALP 的表达与 2 mmol/L Pi+VC、2.6 mmol/L Pi 和 β -GP+DXM+VC 组相比较低, 与茜素红染色的结果不符, 见图 2E、G。



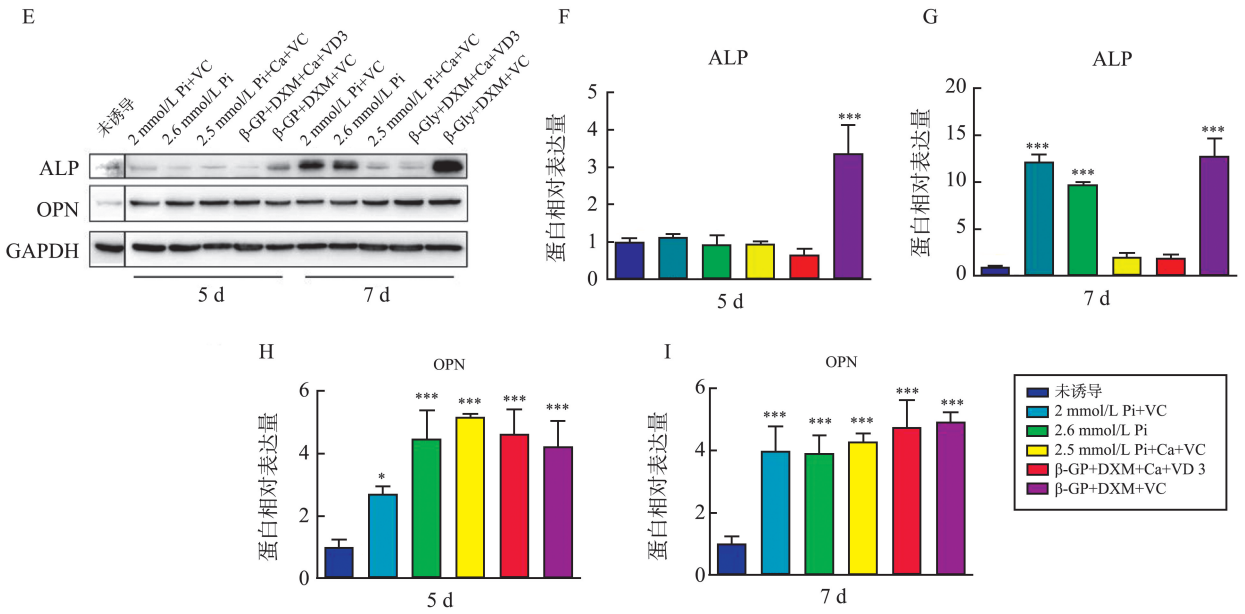


图2 5种方法诱导的hVICs在第5天和第7天成骨标志物的mRNA水平和蛋白水平表达(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. 未诱导)

A, B: 诱导第5天和第7天时ALP的mRNA表达; C, D: 诱导第5天和第7天时SPP1的mRNA表达; E: 诱导第5天和第7天时ALP和OPN的蛋白水平表达; F, G: 诱导第5天和第7天时ALP的蛋白相对表达量的灰度分析值; H, I: 诱导第5天和第7天时OPN的蛋白相对表达量的灰度分析值。

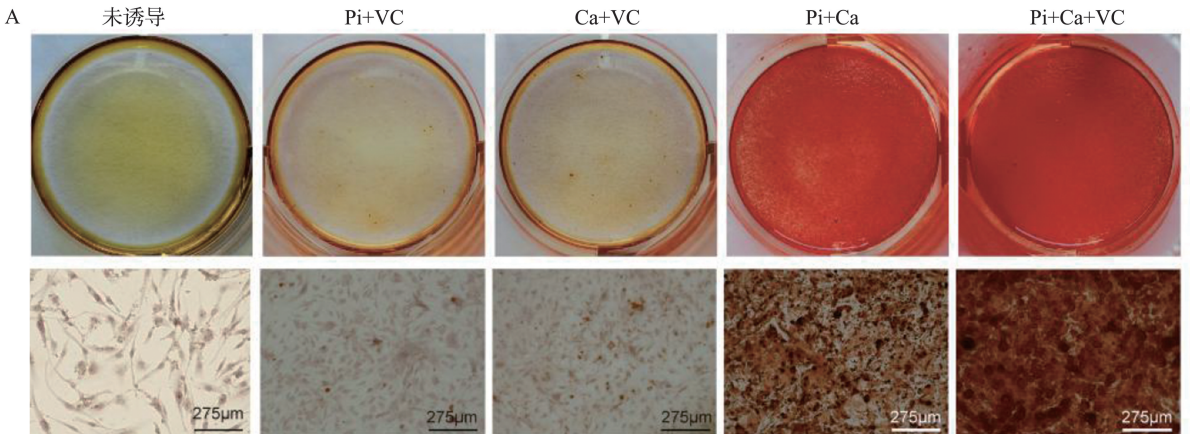
Figure 2 The mRNA and protein expression of osteogenic markers in hVICs induced by 5 methods on day 5 and day 7 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. uninduced group)

A, B: The mRNA expression of ALP induced on day 5 and day 7; C, D: The mRNA expression of SPP1 induced on day 5 and day 7; E: The protein expression of ALP and OPN induced on day 5 and day 7; F, G: Gray-scale analysis of the relative protein expression of ALP induced on day 5 and day 7; H, I: Gray-scale analysis of the relative protein expression of OPN induced on day 5 and day 7.

2.3 2.5 mmol/L Pi+Ca+VC 组的钙化是产生磷酸钙沉淀的结果

为了探究造成 2.5 mmol/L Pi+Ca+VC 钙化面积与 ALP 表达结果不符的原因, 对 2.5 mmol/L Pi+Ca+VC 中的 3 种组分两两组合进行钙化诱导。用 RT-qPCR 检测 ALP 和 SPP1 mRNA 表达。单因素分析结果显示, 总体差异有统计学意义 ($F_{ALP} = 11.78, P_{ALP} = 0.001$; $F_{SPP1} = 8.52, P_{SPP1} = 0.003$)。用 Western blotting 检测 ALP 和 OPN 的蛋白水平表

达。单因素分析结果显示, ALP 总体差异有统计学意义, 而 OPN 总体差异无统计学意义 ($F_{ALP} = 60.88, P_{ALP} < 0.001$; $F_{OPN} = 2.44, P_{OPN} = 0.12$)。结果表明, Pi+Ca 组和 Pi+Ca+VC 组的钙沉积面积显著高于未诱导组 ($P < 0.001$), 而 Pi+VC 组和 Ca+VC 组与未诱导组相比无显著差异 ($P > 0.05$)。而 ALP 在 Pi+VC 组和 Ca+VC 组的表达反而更高 ($P < 0.05$), 表明 Pi+Ca+VC 组的钙化是由于产生了磷酸钙沉淀, 见图 3。



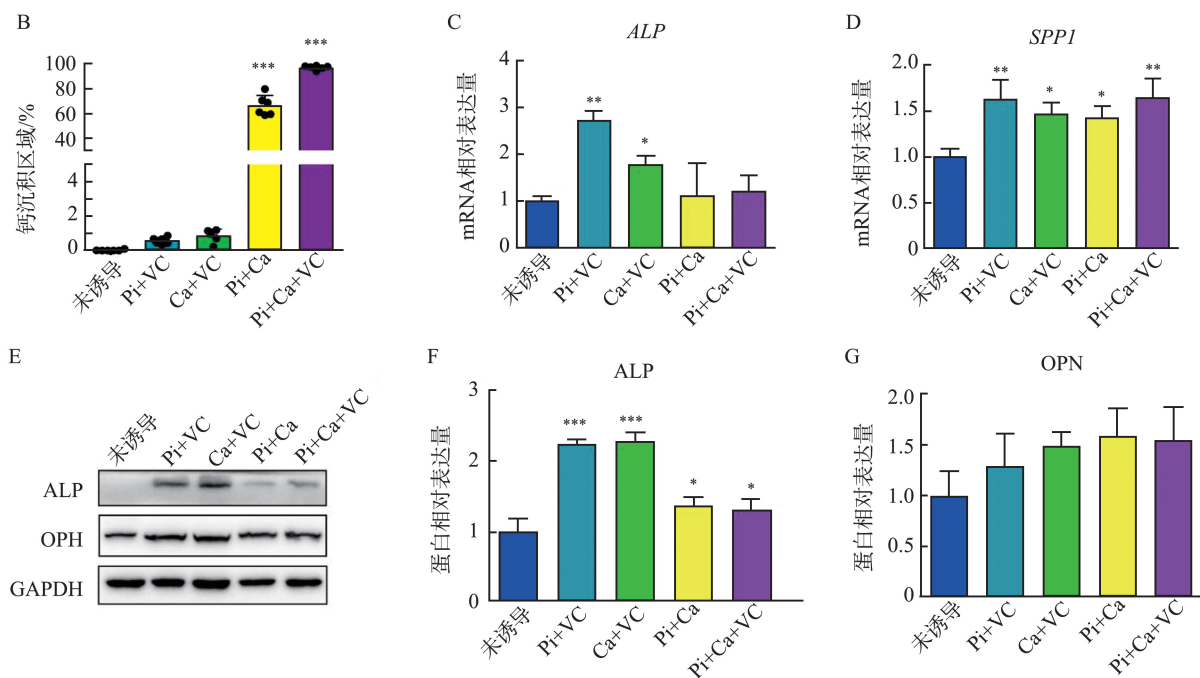


图3 Pi、Ca和VC两两组合诱导hVICs成骨分化检测钙沉积区域及成骨标志物的表达(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. 未诱导)

A: 茜素红染色($\times 40$); B: 钙沉积区域统计; C: ALP在mRNA水平的表达; D: SPP1在mRNA水平的表达; E: ALP和OPN在蛋白水平的表达; F: ALP的蛋白相对表达量的灰度分析值; G: OPN的蛋白相对表达量的灰度分析值。

Figure 3 Pi, Ca, and VC were paired to induce osteogenic differentiation of hVICs, detecting calcium-deposited regions and the expression of osteogenic markers(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. uninduced group)

A: Alizarin red staining ($\times 40$); B: Statistics of calcium deposition areas; C: The mRNA expressions of ALP; D: The mRNA expressions of SPP1; E: The protein expression of ALP and OPN; F: Gray-scale analysis of the relative protein expression of ALP; G: Gray-scale analysis of the relative protein expression of OPN.

3 讨论

随着人口的老龄化,CAVD已成为老年人最常见的心脏瓣膜疾病,其患病率随年龄增加而升高。65岁以上人群中,约2%~7%患有明显的CAVD。其主要特征是主动脉瓣的硬化、纤维化和钙化,最终引起主动脉瓣狭窄,导致左室射血受阻和心脏负荷增加^[22-23]。CAVD发病的原因目前尚不明确,多数研究认为是hVICs经历了一系列复杂的细胞和分子事件引起的,包括表型转变、信号通路激活、细胞外基质重塑和矿物质沉积^[24-26]。这些过程共同作用,最终导致主动脉瓣的钙化和功能障碍^[27]。目前尚无有效的药物能有效缓解或逆转CAVD,首选的治疗方式仍然是外科主动脉瓣置换和经导管主动脉瓣植入术。但可以肯定的是,通过探索CAVD的发病机制将有助于寻找新的干预靶点,从而延长患者生命,改善患者的预后,提高其生活质量。

hVICs是主动脉瓣中最主要的细胞类型。研究表明,正常情况下,hVICs主要以静止的成纤维细胞表型存在,维持瓣膜的结构完整性和基质稳态。

当受到炎症因子、氧化应激、机械应力或脂质沉积的刺激时,hVICs开始变得活跃,启动增殖和凋亡程序,转变为活化的肌成纤维细胞,分泌过多的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)导致主动脉瓣硬化。这一转变伴随着成骨相关基因的上调表达,这些基因调控钙盐沉积和钙化过程。成骨分化的hVICs还能分泌富含磷酸钙的微囊泡,这些微囊泡作为钙化结节的初始位点,直接促进瓣膜小叶的钙化。此外,通过激活骨形态发生蛋白信号通路和Wnt信号通路,进一步促进成骨分化,加速细胞外基质的矿化和瓣膜组织的硬化^[28]。这是CAVD晚期钙化特征的直接原因,与疾病的不可逆进展密切相关,由此可见,hVICs的成骨分化是主动脉瓣钙化的中心环节。

hVICs的成骨诱导是体外研究CAVD的主要模型。其诱导方法在不同的课题组之间存在较大差异。最常见的两大类是无机磷酸盐诱导和有机磷酸盐 β -磷酸甘油诱导,前者诱导时间较短,钙化效果较好,后者诱导时间较长,但成骨标志物表达更为显著^[7]。本研究结果表明2.5 mmol/L Pi+Ca+VC和2.6 mmol/L Pi能够在较短的时间内达到钙沉积的

效果,这与以往研究中无机磷酸盐诱导时间短、钙化效果好的结论相一致^[11-13]。

ALP 的表达活性是成骨细胞分化的典型特征。成骨细胞大量合成 ALP,其活性水平与骨形成速率呈正相关,常用于评估骨代谢状态。焦磷酸盐是骨矿化的天然抑制剂,ALP 可将其水解为无机磷酸盐,解除抑制作用,促进羟基磷灰石结晶的形成。ALP 催化产生的磷酸根与钙离子结合,形成骨矿化所需的磷酸钙盐,沉积于骨胶原纤维间隙,增强钙沉积^[29]。OPN 由 SPP1 基因编码,是一种高度糖基化和磷酸化的酸性分泌型糖蛋白,属于细胞外基质蛋白家族。OPN 可作为羟基磷灰石结晶的成核位点,促进钙磷盐沉积;此外 OPN 通过整合素受体(如 $\alpha v\beta 3$)和 CD44 激活下游信号通路,进而调控成骨细胞的增殖、分化和存活等^[30]。因此,ALP 和 OPN 往往作为标志物来评估成骨分化的水平。

成骨标志物往往在 hVICs 诱导第 3 天就开始表达上调,因此研究者通常在第 3~7 天检测成骨标志物的表达。尽管 OPN 在所有组别中均明显上调,但 ALP 在 β -GP+DXM+VC 组上调最为显著,这也解释了为什么该方法可以作为现在 hVICs 诱导成骨分化的主流方法。由于在第 7 天时 2.5 mmol/L Pi+Ca+VC 组茜素红染色高钙化与 ALP 低表达的差异,怀疑钙沉积是由于无机磷酸盐与氯化钙发生反应生成了磷酸钙沉淀而导致。

为了探究造成 2.5 mmol/L Pi+Ca+VC 组钙化面积与 ALP 表达结果不符的原因,本研究进行了进一步的实验,结果显示该组的钙沉积是由于产生了磷酸钙沉淀。因此,该组在第 7 天时的茜素红染色结果为假阳性,并不能代表成骨诱导的真实效果,该方法并不适用于 hVICs 的体外成骨诱导。在今后的诱导实验中也应该避免无机磷酸盐与氯化钙的连用。

本研究所采用的 3 种无机磷酸盐诱导方法中,分别用到了 3 中不同的 Pi 浓度,除了 2.5 mmol/L Pi+Ca+VC 发生了磷酸钙沉淀,另外两种方法所产生的钙沉积面积也不相同,其中 2.6 mmol/L Pi 产生的钙沉积面积显著高于 2 mmol/L Pi+VC。尽管加入了 VC,也未能弥补由于浓度差而导致的钙化效果的差异。因此,无机磷酸盐的浓度对 hVICs 成骨诱导效果也是至关重要的。

探究不同方法对 hVICs 钙化诱导效果的影响,有助于建立多样的体外实验模型,从而更精确地再现体内复杂的病理环境,提升实验数据的可靠性和可重复性。通过系统比较各诱导方法的效果,可筛选出最有效的钙化诱导条件,优化实验设计,进一步提高研究

效率。此外,不同钙化诱导策略可能揭示独特的分子调控机制及关键信号通路,识别这些核心调控节点将为开发靶向治疗药物提供理论依据,以干预或逆转钙化进程。同时,基于多种诱导方法构建的实验体系,能够全面评估药物在不同病理环境下的药效与安全性,为药物研发进程提供强有力的支持。本研究表明,无机磷酸盐诱导策略 2.6 mmol/L Pi 和有机磷酸盐诱导策略 β -GP+DXM+VC 具有较好的成骨诱导效果。

然而,体外诱导瓣膜间质细胞钙化的方法也有一定的局限性。体外培养的 hVICs 与体内环境存在差异,如缺乏血流动力学剪切应力、免疫细胞等多重影响因素,可能导致研究结果与体内实际情况不完全一致。体外研究通常简化了复杂的生物系统,可能忽略了多个细胞类型和信号通路之间的交互作用。因此,CAVD 的研究往往需要体外与体内实验相结合,互相印证和补充,以增加实验数据的可靠性。

参考文献:

- [1] Bogdanova M, Zahirnyk A, Malashicheva A, et al. Models and techniques to study aortic valve calcification *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo*. an overview[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 835825. doi:10.3389/fphar.2022.835825
- [2] Coffey S, Roberts-Thomson R, Brown A, et al. Global epidemiology of valvular heart disease[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2021, 18(12): 853-864.
- [3] Pinto G, Fragasso G. Aortic valve stenosis: drivers of disease progression and drug targets for therapeutic opportunities[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2022, 26(7): 633-644.
- [4] de Oliveira S MPB, Cavalcanti LRP, Perazzo  M, et al. Calcific aortic valve stenosis and atherosclerotic calcification[J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2020, 22(2): 2. doi:10.1007/s11883-020-0821-7
- [5] Goody PR, Hosen MR, Christmann D, et al. Aortic valve stenosis[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2020, 40(4): 885-900.
- [6] Moncla LM, Briend M, Boss Y, et al. Calcific aortic valve disease: mechanisms, prevention and treatment[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2023, 20(8): 546-559.
- [7] 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. XUE Qing, LI Ning, CHU Heng, 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.

- [8] Niepmann ST, Willemsen N, Boucher AS, et al. Toll-like receptor-3 contributes to the development of aortic valve stenosis[J]. *Basic Res Cardiol*, 2023, 118(1): 6. doi:10.1007/s00395-023-00980-9
- [9] Zheng KH, Tsimikas S, Pawade T, et al. Lipoprotein(a) and oxidized phospholipids promote valve calcification in patients with aortic stenosis [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2019, 73(17): 2150-2162.
- [10] Qiao E, Huang ZP, Wang YT, et al. Metformin alleviates the calcification of aortic valve interstitial cells through activating the PI3K/AKT pathway in an AMPK dependent way[J]. *Mol Med*, 2021, 27(1): 156. doi:10.1186/s10020-021-00416-x
- [11] Éva Sikura K, Combi Z, Potor L, et al. Hydrogen sulfide inhibits aortic valve calcification in heart via regulating RUNX2 by NF- κ B, a link between inflammation and mineralization[J]. *J Adv Res*, 2020, 27: 165-176. doi:10.1016/j.jare.2020.07.005
- [12] Jover E, Matilla L, Martín-Núñez E, et al. Sex-dependent expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in aortic stenosis[J]. *Biol Sex Differ*, 2022, 13(1): 71. doi:10.1186/s13293-022-00480-w
- [13] Artiach G, Carracedo M, Plunde O, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids decrease aortic valve disease through the resolvin E1 and ChemR23 axis[J]. *Circulation*, 2020, 142(8): 776-789.
- [14] Chen Z, Gordillo-Martinez F, Jiang L, et al. Zinc ameliorates human aortic valve calcification through GPR39 mediated ERK1/2 signalling pathway [J]. *Cardiovasc Res*, 2021, 117(3): 820-835.
- [15] Liu Z, Dong N, Hui H, et al. Endothelial cell-derived tetrahydrobiopterin prevents aortic valve calcification [J]. *Eur Heart J*, 2022, 43(17): 1652-1664.
- [16] Zhong GH, Su SW, Li JC, et al. Activation of Piezo1 promotes osteogenic differentiation of aortic valve interstitial cell through YAP-dependent glutaminolysis [J]. *Sci Adv*, 2023, 9(22): eadg0478. doi:10.1126/sciadv.adg0478
- [17] Li SY, Luo ZC, Su SW, et al. Targeted inhibition of PTPN22 is a novel approach to alleviate osteogenic responses in aortic valve interstitial cells and aortic valve lesions in mice [J]. *BMC Med*, 2023, 21(1): 252. doi:10.1186/s12916-023-02888-6
- [18] Iqbal F, Schlotter F, Becker-Greene D, et al. Sortilin enhances fibrosis and calcification in aortic valve disease by inducing interstitial cell heterogeneity [J]. *Eur Heart J*, 2023, 44(10): 885-898.
- [19] Grim JC, Aguado BA, Vogt BJ, et al. Secreted factors from proinflammatory macrophages promote an osteo-blast-like phenotype in valvular interstitial cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2020, 40(11): e296-e308.
- [20] Sánchez-Esteban S, Castro-Pinto M, Cook-Calvete A, et al. Integrin-linked kinase expression in human valve endothelial cells plays a protective role in calcific aortic valve disease [J]. *Antioxidants*, 2022, 11(9): 1736. doi:10.3390/antiox11091736
- [21] Liu F, Chen J, Hu W, et al. PTP1B inhibition improves mitochondrial dynamics to alleviate calcific aortic valve disease via regulating OPA1 homeostasis [J]. *JACC Basic Transl Sci*, 2022, 7(7): 697-712.
- [22] Shu L, Yuan Z, Li F, et al. Oxidative stress and valvular endothelial cells in aortic valve calcification [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 163: 114775. doi:10.1016/j.biopha.2023.114775
- [23] Sud K, Narula N, Aikawa E, et al. The contribution of amyloid deposition in the aortic valve to calcification and aortic stenosis [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2023, 20(6): 418-428.
- [24] Summerhill VI, Moschetta D, Orekhov AN, et al. Sex-specific features of calcific aortic valve disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(16): E5620. doi:10.3390/ijms21165620
- [25] Ternacle J, Krapf L, Mohty D, et al. Aortic stenosis and cardiac amyloidosis [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2019, 74(21): 2638-2651.
- [26] Villa-Bellosta R. Vascular calcification: key roles of phosphate and pyrophosphate [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(24): 13536. doi:10.3390/ijms222413536
- [27] Alushi B, Curini L, Christopher MR, et al. Calcific aortic valve disease-natural history and future therapeutic strategies [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 685. doi:10.3389/fphar.2020.00685
- [28] Leopold JA. Cellular mechanisms of aortic valve calcification [J]. *Circulation: Cardiovascular Interventions*, 2012, 5(4): 605-614.
- [29] Wehner C, Lettner S, Moritz A, et al. Effect of bisphosphonate treatment of titanium surfaces on alkaline phosphatase activity in osteoblasts: a systematic review and meta-analysis [J]. *BMC Oral Health*, 2020, 20(1): 125. doi:10.1186/s12903-020-01089-4
- [30] Chatakun P, Núñez-Toldrà R, Díaz López EJ, et al. The effect of five proteins on stem cells used for osteoblast differentiation and proliferation: a current review of the literature [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2014, 71(1): 113-142.