

## 基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.003187

## BMP9 诱导可逆永生小鼠瓣膜间质细胞成骨能力研究

张汝益<sup>1</sup>, 叶紫芊<sup>2</sup>, 左国伟<sup>2</sup>, 宫茂源<sup>3</sup>, 陈芳<sup>1</sup>, 严树涓<sup>4</sup>

(1. 贵州中医药大学第一附属医院产科优生中心, 贵阳 550001; 2. 重庆医科大学检验医学院, 重庆 400016;

3. 贵阳市第二人民医院检验科, 贵阳 550081; 4. 贵州省人民医院产前诊断中心, 贵阳 550499)

**【摘要】目的:**建立具有快速增殖能力的可逆永生主动瓣膜间质细胞系。**方法:**体视显微镜下利用弹簧剪夹取瓣膜组织, 胶原酶消化后加入逆转录永生病毒, 利用免疫荧光鉴定细胞是否属于间质细胞, 显微镜观察细胞形态, 结晶紫、CCK-8 和流式细胞周期技术检测细胞增殖能力, 碱性磷酸酶染色和茜素红钙盐沉积实验检测细胞成骨能力, q-PCR 及 Western blot 检测细胞成骨标志物。**结果:**经光镜观察和免疫荧光鉴定, 成功取到瓣膜间质细胞。加入永生病毒后, 经光镜观察和免疫荧光确认瓣膜间质细胞未发生表型改变, 且在永生化的细胞中能够检测到大量 SV40T ( $P < 0.001$ )。结晶紫染色、CCK-8 ( $P < 0.001$ ) 和流式细胞周期结果提示永生化后的瓣膜间质细胞增殖速度变快。加入成骨诱导因子骨形态发生蛋白-9 (bone morphogenetic protein 9, BMP9) 后永生瓣膜间质细胞表现出较好的成骨能力, 多数成骨标志物在分子层面的 RNA 和蛋白水平明显升高。去永生化后瓣膜间质细胞形态无明显改变, q-PCR 结果显示 SV40T 明显降低 ( $P < 0.001$ ), 细胞增殖能力明显下降, 且细胞周期被阻滞在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期。在 BMP9 诱导下去永生瓣膜间质细胞同样具有成骨分化能力, 且绝大多数成骨标志物都明显上升。**结论:**本研究成功建立可逆永生瓣膜间质细胞系, BMP9 可诱导其成骨分化, 用于后续钙化性主动瓣膜疾病研究。

**【关键词】**钙化性主动瓣膜疾病; 瓣膜间质细胞; 永生化; 骨形态发生蛋白**【中图分类号】**R542.5**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2022-09-21

## Osteogenic ability of reversibly immortalized valve mesenchymal cells induced by BMP9 in mice

Zhang Ruyi<sup>1</sup>, Ye Ziqian<sup>2</sup>, Zuo Guowei<sup>2</sup>, Gong Maoyuan<sup>3</sup>, Chen Fang<sup>1</sup>, Yan Shujuan<sup>4</sup>

(1. Eugenics Center of Obstetrics, First Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine;

2. College of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University; 3. Department of Clinical Laboratory,

Guiyang Second People's Hospital; 4. Prenatal Diagnosis Center, Guizhou Provincial People's Hospital,

The Affiliated Hospital of Guizhou University)

**【Abstract】Objective:** To establish a reversibly immortalized aortic valve mesenchymal cell line with rapid proliferation. **Methods:** Valve tissue was clamped with spring scissors under stereomicroscope, and the valve tissue was digested with collagenase and affected with immortalized retrovirus. The cell proliferation ability was detected by crystal violet, CCK-8 and flow cytometry. The osteogenic ability of the cells was detected by ALP staining and alizarin red calcium salt deposition assay. The osteogenic markers were detected by q-PCR and Western blot. **Results:** By light microscopy and immunofluorescence identification, we confirmed that the mesenchymal cells were successfully obtained. After affected with immortalized virus, light microscopy and immunofluorescence confirmed that there was no phenotypic change in valve mesenchymal cells, and a large amount of SV40T could be detected in immortalized cells ( $P < 0.001$ ). The results of crystal violet staining, CCK-8 ( $P < 0.001$ ) and flow cytometry showed that the proliferation rate of valve mesenchymal cells was faster after immortalization. After addition of osteogenic inducible factors BMP9, immortalized valve mesenchymal cells showed better osteogenic ability, and the most of osteogenic markers were significantly increased at the molecular level. There was no significant change in the morphology of valve mesenchymal cells after deimmortalization, and q-PCR results showed that SV40T was significantly reduced ( $P < 0.001$ ). Cell proliferation was significantly decreased, and the cell cycle was arrested in the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase. Deimmortalization valve mesenchymal cells induced by BMP9 also had osteogenic differentiation ability, and most osteogenic markers

**作者介绍:**张汝益, Email: zcosta@aliyun.com,

研究方向: 分子诊断。

**通信作者:**严树涓, Email: shujian@aliyun.com。**基金项目:**国家自然科学基金资助项目 (编号: 82060388); 贵州省科技厅科技计划资助项目 (编号: 黔科合基础[2020]1Y424、黔科合基础-ZK[2021]一般396); 贵州省教育厅高校科学研究青年资助项目 (编号: 黔教计[2022]204号); 贵州省卫生健康委科学技术基金资助项目 (编号: gzwjkj2019-1-192)。**优先出版:** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20230309.1622.002.html> (2023-03-14)

were significantly increased. **Conclusion:** We have successfully established reversibly immortalized valve mesenchymal cell lines, which can be induced by BMP9 for osteogenic differentiation and can be used for subsequent studies of calcified aortic valve disease.

**[Key words]** calcific aortic valve disease; valve mesenchymal cell; immortalization; bone morphogenetic protein

钙化性主动脉瓣膜疾病 (calcific aortic valve disease, CAVD) 是主动脉瓣膜钙化后影响瓣叶正常开合、改变人体血流动力的一类疾病, 严重危害人类健康<sup>[1]</sup>。流行病学研究结果表明, 60 岁以上老年人中 30% 的人群受 CAVD 影响, 75 岁以上老年人中一半以上受 CAVD 影响<sup>[2]</sup>。

目前没有很好的预防和治疗药物来控制 CAVD, 患者只有在血流动力学出现明显改变时接受换瓣手术。随之而来的抗凝治疗和外源性瓣膜老化又成为降低患者生活质量、威胁患者生命的问题<sup>[3]</sup>。深入研究 CAVD 的发病机制, 为开发相关药物提供理论基础成为 CAVD 研究的首要问题。早前人们认为 CAVD 是一种退行性疾病。随着研究深入, 越来越多的证据表明 CAVD 发病过程中各种大小分子的黏附、浸润才是关键。首先, 内皮细胞功能紊乱、受损; 接着, 低密度脂蛋白沉积于瓣膜, 在氧化应激压力、炎性细胞因子共同刺激下, 先天性和适应性免疫细胞浸润, 瓣膜内皮细胞 (valve endothelial cells, VEC) 转化和瓣膜间质细胞 (valve interstitial cells, VIC) 激活, 导致主动脉瓣微环境复杂化, 钙盐开始沉积, 最终主动脉瓣膜钙化<sup>[4]</sup>。

VIC 是主动脉瓣中的主要细胞类型, 在 CAVD 进展中起重要作用<sup>[5]</sup>。CAVD 的潜在发病机制与生理性骨形成有许多相似之处<sup>[6]</sup>。VIC 被认为在 CAVD 后期会获得成骨能力, 持续加重病情。许多研究均证实 VIC 具有成骨分化和钙化能力。比如, 巨噬细胞分别通过白细胞介素-6 (interleukin 6, IL-6) 和钙黏蛋白-11 (cadherin 11, CDH11) 分子与 VIC 通信, 引起 VIC 成骨分化<sup>[7-8]</sup>。将 VIC 单独培养或与 VEC 共培养发现, 独立培养的培养基中成骨标志物 (RUNX2 和  $\alpha$ SMA) 表达升高<sup>[9]</sup>。尽管人们已经认识到这些问题, 但是 CAVD 的发生发展机制仍不清楚, 需要更深入的研究来阐明疾病的发生发展机制。

现代疾病研究中必不可少的一个研究工具是模式细胞。模式细胞经济、简便, 能够加快疾病模拟的速度, 深受科学家和制药公司等青睐<sup>[10]</sup>。然而对于 CAVD 来说, 目前还没有一种理想的模式细胞。使用最多的是来源比较广泛的猪瓣膜细胞<sup>[11]</sup>。但是, 对猪的研究和对人类的研究深度不整齐, 很多

使用猪瓣膜细胞造模后产生的结果不能得到很好的解释, 甚至找不到合适的研究工具和材料来进行下一步研究。因此, 必须建立一种更合适的模式细胞来支持 CAVD 研究。鉴于此, 本研究利用小鼠心脏瓣膜建立了一种可逆永生化 VIC, 这将对后续 CAVD 发病机制研究带来极大的便利。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 动物 本研究符合贵州中医药大学第一附属医院动物伦理委员会制定的动物伦理学标准。4 周龄 C57BL/6J 小鼠购于重庆医科大学动物实验中心, 共 20 只, 均为雄性。将小鼠饲养于 20 °C、12 h 光照/12 h 黑暗环境中, 自由进食、饮水。1 周后小鼠适应新环境, 处死、取材。

1.1.2 试剂 IV 型胶原酶购于美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 青霉素-链霉素溶液、胰酶、BCIP/NBT 碱性磷酸酯酶显色试剂盒购于碧云天公司; DMEM 高糖细胞培养基购于 Gibco 公司; 胎牛血清购于 LONSERA 公司; 辣根酶标记山羊抗兔 IgG (H+L)、辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG (H+L) 购于中杉金桥公司; 2 × SYBR Green qPCR Master Mix 购于 Bimake 公司。Anti-CEBP Beta antibody、Anti-SMAD1/5/9 antibody 购于 Abcam 公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 VIC 提取 脱颈法处死小鼠, 快速暴露胸腔, 取出小鼠心脏, 生理盐水清洗 2~3 次。将洗净的心脏浸泡于新鲜生理盐水培养皿中, 置于体视显微镜物镜下方, 调整显微镜焦距, 目镜下清晰显示心脏。识别小鼠心脏的解剖位置, 利用弹簧剪剪开左心室, 充分暴露主动脉瓣。细心剪下主动脉瓣, 放入装有 100  $\mu$ L IV 型胶原酶的 EP 管中, 消化过夜。第 2 天将装有主动脉瓣膜的胶原酶溶液使用 2 mL DMEM 培养基吹打、稀释后, 放入 6 cm 培养皿中, 继续培养 2~3 d, 待 VIC 爬出、贴壁。继续培养 5~7 d, 一部分细胞直接用于永生; 一部分细胞进行传代 1 次, 然后进行细胞冻存, 备用。

1.2.2 VIC 永生化 该部分采用 SSR-69 逆转录病毒载体对小鼠 VIC 进行永生化, 该质粒的特点在于在永生化元件 SV40T 两头加装 FRT 和 Loxp 重组酶位点, 在有需要时可以对细胞进行去永生化, 还原细胞原本的特性。按照逆转录病毒制备标准操作流程进行逆转录病毒培养基的制备。准备 VIC, 细胞使用胰酶消化后采用合适的浓度接种于 6 cm 培养皿中, 4~6 h 后待细胞贴壁, 将培养基更换为载有 SSR-69 质粒的逆转录病毒培养基, 继续培养细胞、传代。

1.2.3 CCK-8 检测细胞活性 细胞消化、重悬, 然后按照

$1 \times 10^4$  个/孔的量接种至 96 孔板中, 每种细胞设置 3 个复孔。放入培养箱中继续培养, 分别于第 1、2、3、4、5、6、7 天对细胞进行 CCK-8 检测。检测前 3 h, 在即将检测的 96 孔板孔中加入  $10 \mu\text{L}$  CCK-8 溶液, 加样的过程尽量不产生气泡, 放入孵育箱继续培养, 到时间后用酶标仪测定 96 孔板 450 nm 处的吸光度 (absorbance, A) 值。

**1.2.4 结晶紫染色** 细胞消化、重悬后接种于 6 cm 培养皿中, 加入含有 FBS 的培养基, 使 FBS 最终浓度为 5%。摇匀细胞后放入孵育箱进行培养, 4 d 后取出培养皿, 弃培养基, 生理盐水轻柔冲洗 3 次培养皿, 将死细胞冲洗走, 室温晾干, 每孔加入适量 0.1% 结晶紫染液, 覆盖孔板底部即可。染色 10~15 min, 回收结晶紫染液, 流水下冲洗培养皿, 将多余结晶紫冲洗掉。将培养皿倒扣于实验台面, 室温晾干。

**1.2.5 q-PCR 检测基因表达** 采用 10 cm 培养皿培养细胞并进行相应处理, 到时间点后取出培养皿, PBS 轻柔细胞 3 次, 加入 1 mL TRIzol 进行细胞裂解, 经离心、萃取、沉淀得到总 RNA。每个样本取样  $2 \mu\text{L}$  进行琼脂糖凝胶电泳, 检验 RNA 质量。合格后采用逆转录试剂盒对 RNA 进行逆转录,  $42^\circ\text{C}$  孵育 40 min,  $85^\circ\text{C}$  加热 5 min, 从 PCR 扩增仪中取出放入  $-20^\circ\text{C}$  冰箱保存备用。q-PCR 扩增时, 将扩增试剂 ( $10 \mu\text{L}$ )、引物 ( $0.8 \mu\text{L}$ )、模板 ( $2 \mu\text{L}$ ) 和水 ( $7.2 \mu\text{L}$ ) 按试剂盒说明书依次添加。混匀后的扩增样本放入 q-PCR 扩增仪, 按照预设的程序进行扩增 (预变性  $95^\circ\text{C}$ , 300 s; 变性  $95^\circ\text{C}$ , 20 s; 退火  $55^\circ\text{C}$ , 20 s; 延伸  $72^\circ\text{C}$ , 20 s)。主要扩增基因引物见表 1。

表 1 引物列表

| 基因名称         | 引物序列                      |
|--------------|---------------------------|
| <i>Runx2</i> | 正向 GGTGAACTCTTGCCCTCGTC   |
| <i>Runx2</i> | 反向 AGTCCCACTTCCTGTGCT     |
| <i>OCN</i>   | 正向 TCTGACAAAGCCTTCATGTCC  |
| <i>OCN</i>   | 反向 AAATAGTGATACCGTAGATGCG |
| <i>OPN</i>   | 正向 ATCTCACCATTCCGATGAGTCT |
| <i>OPN</i>   | 反向 TGTAGGGACGATTGGAGTGAAA |
| <i>GAPDH</i> | 正向 GGCTGCCCAGAACATCAT     |
| <i>GAPDH</i> | 反向 CGGACACATTGGGGGTAG     |

**1.2.6 免疫荧光** 细胞接种于预铺了爬片的 24 孔板, 让细胞生长于爬片上, 方便后续处理。对细胞进行干扰因素处理后用 PBS 轻柔冲洗爬片, 加入多聚甲醛固定细胞 15 min。取出爬片, 将爬片放置于预制的蜡板上, 进行封闭、一抗过夜、二抗显色、封片, 置于荧光共聚焦显微镜下观察荧光。

**1.2.7 碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 染色** 对数期生长细胞接种于 24 孔板, 细胞贴壁后进行相应处理。到时间点后培养板取出, PBS 轻柔洗涤 3 次。染色时, 加入按照试剂盒说明书提前配置好的 ALP 染色试剂,  $500 \mu\text{L}$ /孔。3~6 min 在显微镜下观察染色情况, 待显色充分后丢弃染液, 加入水冲洗干净, 显微镜下观察、分析。

### 1.3 统计学处理

利用 SPSS 22.0 统计学软件对数据进行分析。计量资料使用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 所有试验均重复 3 次。采用独立样本 *t* 检验进行组间比较。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 可逆永生 VIC 的建立

4 周龄小鼠心脏较小, 每只小鼠能取到的心脏瓣膜组织很少, 因此准备了 20 只小鼠进行取材。在体视显微镜下锁定瓣膜后用弹簧剪夹取组织放入 EP 管中进行消化 (图 1A)。由于取材困难, 因此将取到的组织分作 2 份进行独立操作, 分别命名为 VIC1 和 VIC2。为明确取到的细胞是否属于 VIC, 挑选间质细胞的标志物进行免疫荧光检测, 结果显示属于间质细胞的  $\alpha$ -SMA、N-cadherin (N-Ca) 和 Vimentin 均有明显的荧光出现, 而内皮标志物 CD31、E-cadherin (E-Ca) 看不到荧光 (图 1D)。原代 VIC 培养第 1 代后即开始进行永生操作, 永生后的 VIC 命名为 iVIC。对比永生化前后 VIC 形态没有明显改变 (图 1B), 提取 VIC 和 iVIC DNA 进行 SV40T 扩增, 结果显示 SV40T 均整合到独立操作的 iVIC1 和 iVIC2 基因组中 ( $P<0.001$ )。免疫荧光结果显示永生化后的 iVIC 间质细胞标志没有丢失 (图 1D)。

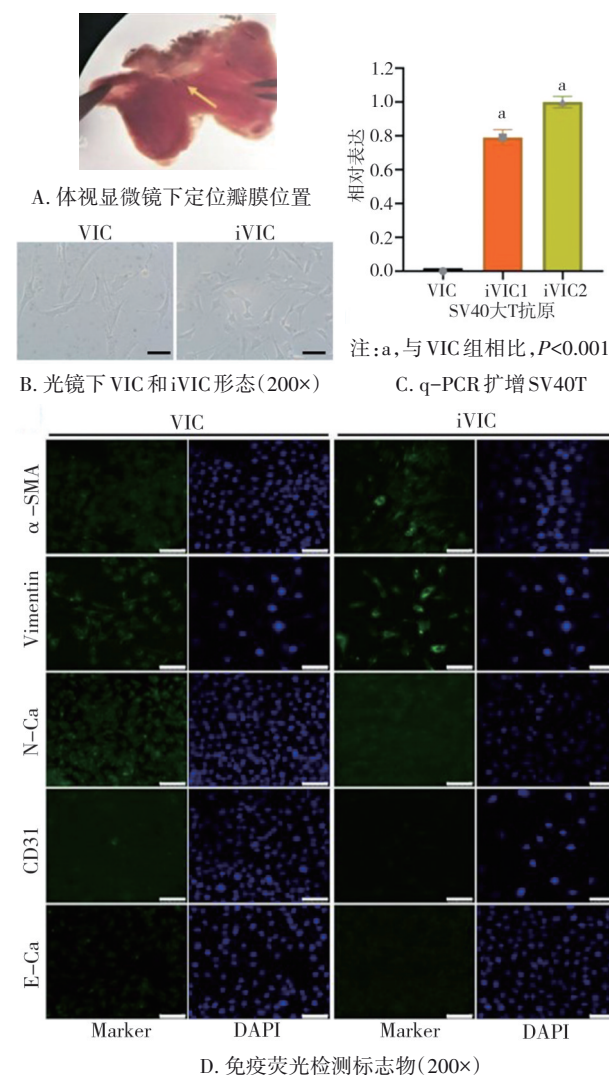


图 1 提取 VIC



## 2.2 永生化 VIC 增殖能力鉴定

增殖能力增强是细胞永生化后的一个显著特点。将 VIC 和 iVIC 培养至 7 d, 在不同的时间点用不同的方法检测其增殖能力。结晶紫染色显示从第 3 天开始 iVIC 数量明显多于 VIC, CCK-8 曲线图也可以观察到第 1、2 天检测点无明显差异, 从第 3 天开始 iVIC 活力明显高于 VIC ( $P<0.001$ )。接种细胞 48 h 后, 流式细胞周期结果显示 VIC 和 iVIC 各期的细胞占比没有明显区别 ( $G_0/G_1$ ,  $P=0.250$ ;  $S$ ,  $P=0.833$ ;  $G_2/M$ ,  $P=0.066$ ) (图 2)。

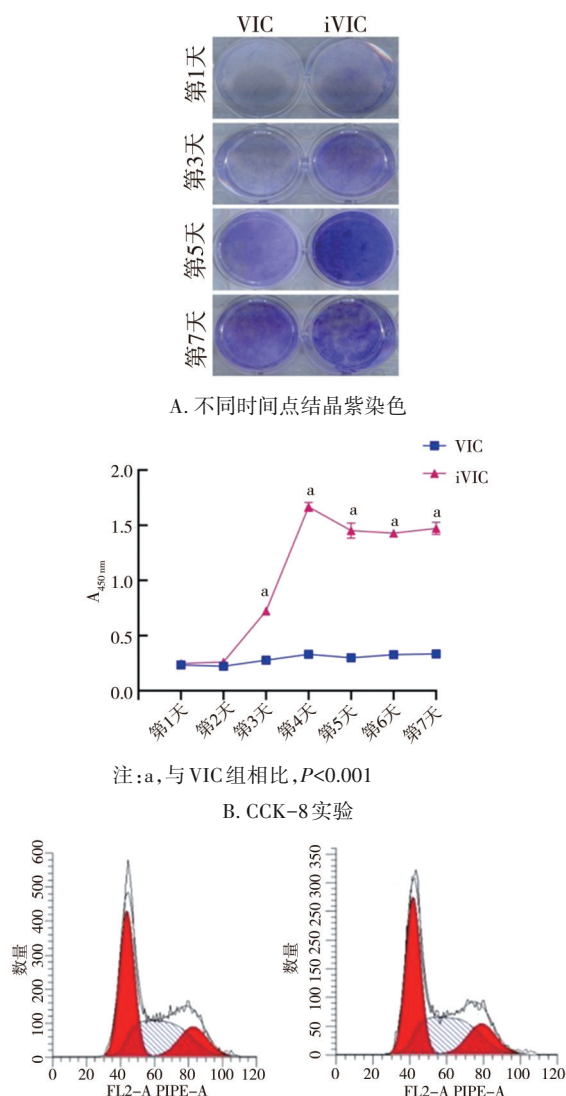


图2 VIC 和 iVIC 增殖能力研究

## 2.3 永生化 VIC 成骨能力鉴定

CAVD 的最终结局是瓣膜组织钙化, 因此该部分探究在 BMP9 诱导下 iVIC 的成骨能力。ALP 染色结果显示在 BMP9 诱导下 iVIC 染色变深 (图 3A、B); 茜素红染色也同样变深 (图 3C、D)。说明 iVIC 具有较好的成骨分化能力。提取细胞 RNA, 利用 q-PCR 进行成骨标志物检测, 结果显示在 BMP9 诱导下 OPN、PPAR $\gamma$ 、CEBP $\alpha$ 、CEBP $\beta$  表达升高 ( $P<0.001$ ), Runx2、OCN 和 OSX 表达降低 ( $P<0.001$ ) (图 3E)。与此同时, 利用 Western blot 在蛋白层面检测成骨标志物, 结果显示经 BMP9 诱导后 iVIC 中的 OPN、Runx2、SMAD1/5/9 表达升高, PPAR $\gamma$ 、CEBP $\beta$  表达降低 (图 3F)。

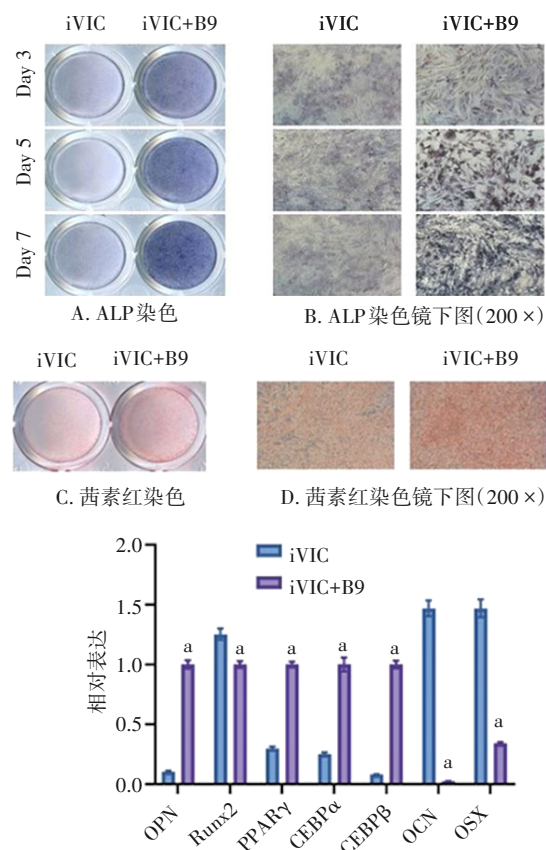


图3 iVIC 成骨能力验证

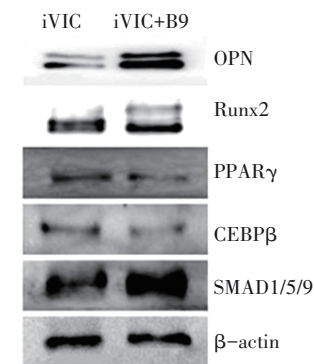


图3 iVIC 成骨能力验证

## 2.4 去永生化后 VIC 增殖能力观察

本研究的目的是提供一种稳定的 VIC 细胞系用于 CAVD 研究,但是按已经报道的文献来看 SV40T 的存在会影响某些细胞表型,因此本研究利用装在 SV40T 两端的 FRT 位点将 SV40T 切割去除。加入 FLP 后 SV40T 在 VIC 中的表达明显降低(图 4B),且形态未发生明显变化(图 4A)。结晶紫染色结果提示加入 FLP 后 VIC 数量在同样的时间点明显少于 iVIC;不过 CCK-8 实验并没有观察到二者的差异(图 4D)。流式细胞周期结果显示在去除 SV40T 后 iVIC 细胞周期被阻滞在  $G_0/G_1$  期( $G_0/G_1$ ,  $P<0.001$ ; S,  $P<0.001$ ;  $G_2/M$ ,  $P<0.001$ )(图 4E、F)。

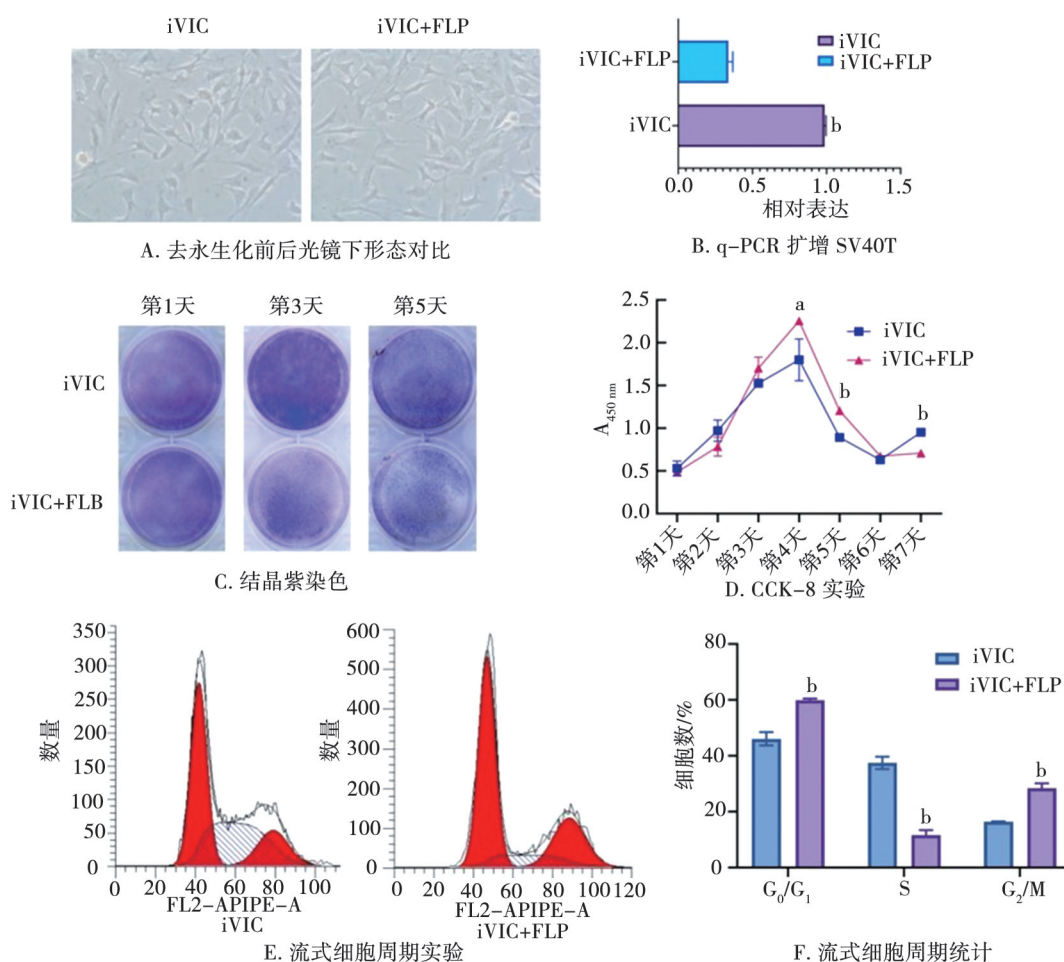
## 2.5 BMP9 诱导下去永生化 iVIC 成骨能力鉴定

在去永生化的 iVIC 中加入 BMP9 进行成骨诱导实验,观察去永生化后 iVIC 的成骨能力。无论是 ALP 染色还是茜素红钙盐沉积实验都显示去永生化后的 iVIC 同样具有较好的成骨分化能力(图 5)。q-PCR 结果显示在检测的所有成骨指标中除 OPN 外, BMP9 组明显升高( $P<0.001$ )(图 6A); Western blot 实验中所有成骨指标在 BMP9 组明显升高( $P<$

0.001)(图 6B)。

## 3 讨论

CAVD 已经成为大多数老年人健康的重要威胁,加快研究其背后的发病机制为研发针对性的药物或替代品成为卫生事业的一个紧迫任务<sup>[1,12]</sup>。目前常用于研究的猪或鼠瓣膜细胞均为原代细胞。原代细胞可以真实反映细胞状态,但是也有明显缺陷,即几次传代后细胞就会快速老化、代谢改变、生长变慢,失去作为模式细胞的价值。猪瓣膜的来源比较困难,不容易取到;小鼠的瓣膜比较小,每次都需要处死多只小鼠才能满足实验需求,加剧经费开支。人类来源的瓣膜细胞最为理想,但囿于伦理准则,基本上不能取到正常的人类来源瓣膜。因此,只能寻找其他动物的瓣膜来进行试验研究。小鼠作为模式动物,实验中所涉及的材料、耗材均容易



注:a,与 iVIC 组相比,  $P<0.005$ ; b:与 iVIC 组相比,  $P<0.001$

图4 去永生化后 VIC 增殖能力研究

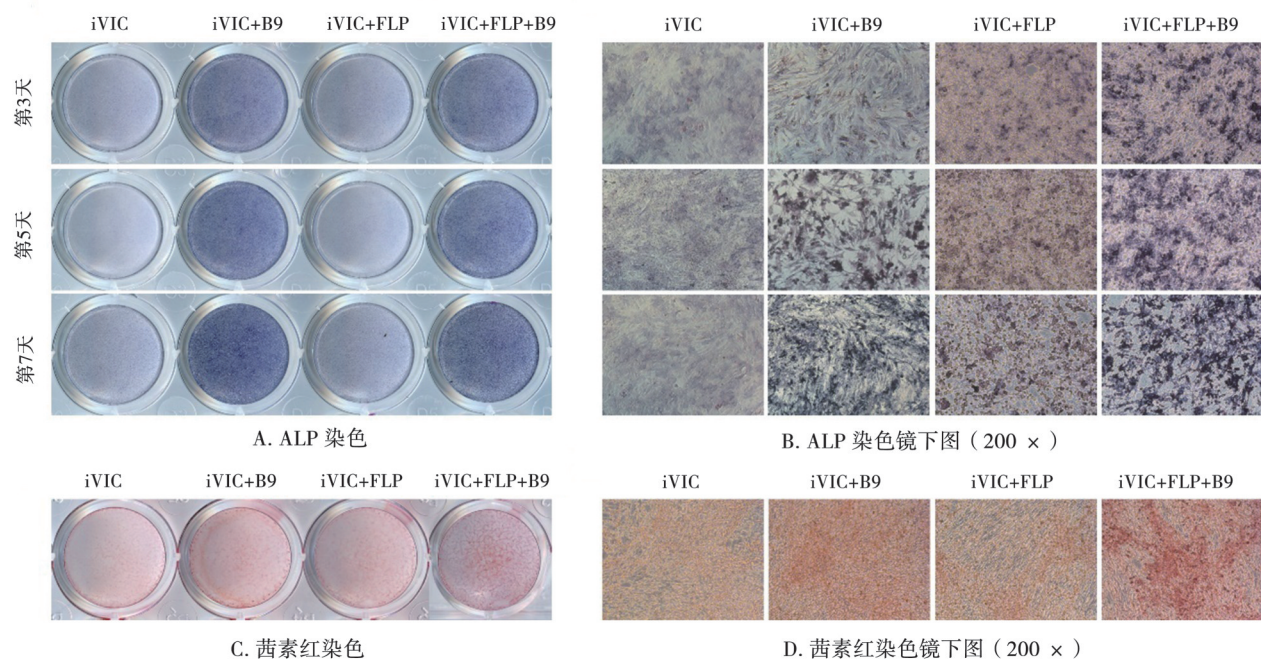
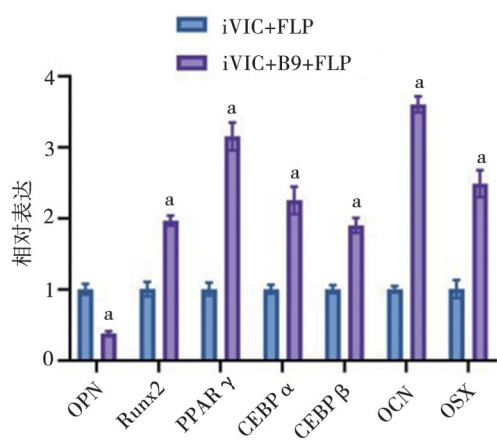
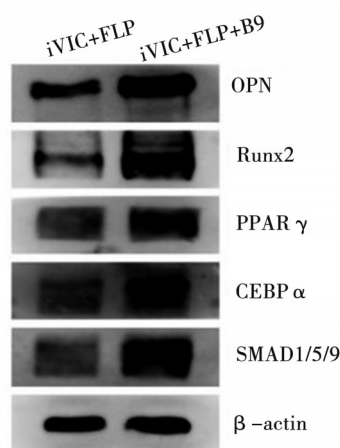


图5 BMP9 诱导下的去永生化后 iVIC 成骨能力验证

注:a, 与 iVIC+FLP 组相比,  $P < 0.001$ 

A. q-PCR 检测成骨标志



B. Western blot 检测成骨标志

图6 去永生化后 iVIC 成骨能力验证

获得,因此本研究将小鼠瓣膜细胞进行可逆永生化来保障后续实验的顺利进行。

细胞永生化是指细胞获得持续生长、增殖能力,永生化后细胞具有无限增殖生长性,可长期传代<sup>[13]</sup>。目前常用的细胞永生化方法主要有病毒感染细胞、细胞中导入端粒酶激活因子、细胞中导入原癌基因等,其中以导入细胞中端粒酶激活因子最为广泛<sup>[14]</sup>。细胞永生化后其生物学特性会发生一定的改变,失去原代细胞的部分特点,比如增殖能力增

强,变得具有侵袭性<sup>[15]</sup>。在永生化基础上,人们在永生化因子两端加入同源重组修复酶 Cre/LoxP 或 FLP/FRT 系统<sup>[16]</sup>。该系统的引入,可以在正式实验前在永生化细胞中加入 Cre/LoxP 或 FLP/FRT 重组酶进行预处理,永生化因子就可以被重组酶从宿主细胞基因组中清除,从而实现永生化逆转,永生化细胞还原为原代细胞状态,便于下一步实验。本实验引入的是 SSR-69 质粒,该质粒永生化元件两端连接的是 FRT 识别位点<sup>[17]</sup>。将小鼠 VIC 永生化后就



能解决实验细胞供给这一大问题,为后续实验的顺利进行提供极大的保障。

在选取小鼠周龄时特意选择 4 周龄小鼠,这个时期的小鼠各器官还未进入衰退阶段,同时又避免了因小鼠周龄太小导致心脏体积过小而取材困难的挑战。在培养皿中成功培养原代 VIC 后先对这些细胞的来源进行鉴定,以确定取到的细胞就是间质细胞。选取 VIC 特异性标志物进行免疫荧光实验,结果显示  $\alpha$ -SMA、N-cadherin 和 Vimentin 均显示出荧光,而内皮标志物 CD31、E-cadherin 看不到明显荧光。结合光镜下间质细胞的长梭形形态,确认正确取到 VIC。转入 SSR-69 质粒后,继续培养细胞 3 代,逐步清除残留在培养基和胞质中未与细胞基因组整合的病毒,最后提取细胞的基因组 DNA,接着利用特异性引物扩增 SV40 抗原,结果显示永生化元件成功导入 VIC 基因组中,而原代 VIC 和永生化后的 VIC 在形态上并无明显变化。一般来说细胞被永生化后细胞增殖速度变快,采用结晶紫染色、CCK-8 和流式细胞周期技术从不同角度观察 VIC 永生化后的细胞增殖情况。综合看来,二者在 48 h 检测的流式细胞周期无明显差异,但是 3 d 后的结晶紫染色和 CCK-8 实验能看出 iVIC 的增殖能力明显增强。由于培养皿的空间限制,iVIC 在观察的第 5~7 天细胞数量达到最多,之后细胞数量达到平台期并慢慢下降。多数细胞如肿瘤细胞获得永生化能力后,细胞周期会发生改变,但本研究中将 VIC 永生化后却没有观察到明显的细胞周期改变,推测主要原因是选取的小鼠为 4 周龄,该时期的小鼠各器官细胞分裂潜力较强,因此原代瓣膜细胞具有不错的增殖能力,导致在接种后的 48 h 时间点检测的细胞周期、CCK-8 不能观察到 VIC 和 iVIC 的明显差异。随着培养时间延长,iVIC 的增殖能力逐渐与 VIC 拉开差距。对比目前正在进行的其他研究中取到的成人 VIC,成人 VIC 增殖能力显著减慢,同样的细胞密度接种细胞,成人 VIC 将近 20 d 才能长满培养皿,而 4 周龄小鼠 VIC 只需要 5 d 左右。因此在流式细胞周期层面看不到 VIC 和 iVIC 的明显差异,但是直接反映细胞增殖的结晶紫染色和 CCK-8 能观察到它们的差异。

BMPs 家族是诱导干细胞细胞成骨能力很强的

因子,本课题组前期发现 BMP9 诱导干细胞成骨能力远远强于其他 BMPs,尚未见 BMP9 对 VIC 的作用研究。将 BMP9 运用于 VIC 成骨能力实验中,其一是验证永生化和去永生化的 VIC 成骨能力是否有明显改变;其二是观察 BMP9 在 VIC 成骨过程中的作用。加入 BMP9 后,ALP 染色和茜素红结果均提示 VIC 成骨能力明显增强。采用 q-PCR 技术检测 VIC 经成骨诱导后的成骨标志物,其中 OPN、PPAR $\gamma$ 、CEBP $\alpha$ 、CEBP $\beta$  在 BMP9 诱导后明显升高,但是 Runx2、OCN 和 OSX 降低。蛋白表达层面,OPN、SMAD1/5/9、Runx2 在 BMP9 诱导后明显升高,PPAR $\gamma$ 、CEBP $\beta$  则在 BMP9 诱导后显著降低。出现这样的结果推测是由于 VIC 在成骨过程中存在一些独特的分子通路和表观调控,这些有待进一步的深入研究。

SV40T 会影响某些细胞表型,人们在永生化的基础上引入基因编辑类重组位点,借助基因编辑将 SV40T 去除,还原原代 VIC 状态。本研究使用的 SSR-69 质粒在 SV40T 两端装载了 FRT 位点,在培养的 iVIC 中加入 FLP 重组酶即可将 SV40T 去除。为了验证去除效果,首先观察了细胞形态,结果显示去除前后 iVIC 形态并无明显差别。提取细胞基因组进行 SV40T 扩增,可以观察到加入 FLP 后 SV40T 明显下降。结晶紫染色显示去永生化的 VIC 数量明显降低;但是 CCK-8 结果却没观察到明显差异;流式细胞周期结果显示去永生化的 VIC 被阻滞在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期。说明去永生化的 VIC 增殖速度减慢。此外,结合前期永生化时 CCK-8 和流式细胞周期数据来看,在 48 h 时间检测点,VIC 永生化前后 CCK-8、流式细胞周期均无明显变化;而去永生化的前后,CCK-8 无明显变化,流式细胞周期出现明显差异。本课题组认为这些结果并不相悖。因为 4 周龄小鼠的原代瓣膜细胞具有很强的增殖能力;同时,进行流式细胞周期检测时间点为细胞接种后 48 h,此时的细胞处于对数生长期,细胞的线粒体功能和核酸合成能力处于最佳状态,采用 CCK-8 和流式细胞周期检测可能观测不到 VIC 和 iVIC 的明显差异。而去永生化的 FLP 起作用需要一些时间,具有一定滞后性,因此加入 FLP 的 iVIC 在短期内还可以保持一定的增殖能力;另外,即使 SV40T 被清除后,去永生化的 iVIC

线粒体还保持着相当的活性,因此反映线粒体内脱氢酶活性的 CCK-8 实验可能观察不到明显差异。而流式细胞检测中使用的碘化丙啶是与核酸结合,iVIC 去永生化后,细胞核酸合成速度会大大降低,残留的快速增殖细胞合成的核酸量不足以掩盖去永生化细胞下降的量,出现了流式细胞周期结果显示的去永生化后 iVIC 细胞周期被阻滞在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期表象。随着检测时间点的延长,iVIC 数量逐渐多于去永生化的 iVIC 数量。此外,FLP 重组酶的切割作用并不是 100%,从 PCR 结果也可以看到同样的结果,因此后续将去永生化 VIC 用于其他实验时要注意这一点,也许残存的 SV40T 会对某些结果产生影响,可能需要多维度来验证相关结果。

为了观察去永生化后 VIC 的成骨能力,在去永生化的 VIC 中加入 BMP9 进行成骨诱导。结果提示 BMP9 可以诱导去永生化后的 VIC 成骨,并且去永生化后除了基因水平的 OPN 在实验组中降低,其余成骨指标无论在基因层面还是蛋白水平均升高。这说明去永生化后 VIC 的成骨表型不会受影响,可用于相关实验研究。

综上所述,本研究提供了一种可逆永生化的 VIC,解决了长期以来 CAVD 相关研究细胞短缺的问题,并且初步探讨了 BMP9 对 VIC 成骨能力的影响,证明本研究建立的可逆永生化的 VIC 可用于成骨诱导相关研究。

## 参 考 文 献

- [1] Kraler S, Blaser MC, Aikawa E, et al. Calcific aortic valve disease: from molecular and cellular mechanisms to medical therapy[J]. Eur Heart J, 2022, 43(7): 683–697.
- [2] Driscoll K, Cruz AD, Butcher JT. Inflammatory and biomechanical drivers of endothelial–interstitial interactions in calcific aortic valve disease[J]. Circ Res, 2021, 128(9): 1344–1370.
- [3] Kaltoft M, Langsted A, Afzal S, et al. Lipoprotein (a) and body mass compound the risk of calcific aortic valve disease[J]. J Am Coll Cardiol, 2022, 79(6): 545–558.
- [4] Blaser MC, Kraler S, Lüscher TF, et al. Multi-omics approaches to define calcific aortic valve disease pathogenesis[J]. Circ Res, 2021, 128(9): 1371–1397.
- [5] Gendron N, Rosa M, Blandinieres A, et al. Human aortic valve interstitial cells display proangiogenic properties during calcific aortic valve disease[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2021, 41(1): 415–429.
- [6] Zhou YZ, Li JM, Zhou K, et al. The methylation of Notch1 promoter mediates the osteogenesis differentiation in human aortic valve interstitial cells through Wnt/β-catenin signaling[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(11): 20366–20376.
- [7] El Hussein D, Boulanger MC, Mahmut A, et al. P2Y2 receptor represses IL-6 expression by valve interstitial cells through Akt: implication for calcific aortic valve disease[J]. J Mol Cell Cardiol, 2014, 72: 146–156.
- [8] Hadji F, Boulanger MC, Guay SP, et al. Altered DNA methylation of long noncoding RNA H19 in calcific aortic valve disease promotes mineralization by silencing NOTCH1[J]. Circulation, 2016, 134(23): 1848–1862.
- [9] Éva Sikura K, Combi Z, Potor L, et al. Hydrogen sulfide inhibits aortic valve calcification in heart via regulating RUNX2 by NF-κB, a link between inflammation and mineralization[J]. J Adv Res, 2021, 27: 165–176.
- [10] Paley M, Aboudi J. Micromechanical analysis of composites by the generalized cells model[J]. Mech Mater, 1992, 14(2): 127–139.
- [11] Gould ST, Srigunapalan S, Simmons CA, et al. Hemodynamic and cellular response feedback in calcific aortic valve disease[J]. Circ Res, 2013, 113(2): 186–197.
- [12] Greenberg HZE, Zhao GA, Shah AM, et al. Role of oxidative stress in calcific aortic valve disease and its therapeutic implications[J]. Cardiovasc Res, 2022, 118(6): 1433–1451.
- [13] Shay JW, Wright WE, Werbin H. Defining the molecular mechanisms of human cell immortalization[J]. Biochim Biophys Acta BBA Rev Cancer, 1991, 1072(1): 1–7.
- [14] Ni CW, Kumar S, Ankeny CJ, et al. Development of immortalized mouse aortic endothelial cell lines[J]. Vasc Cell, 2014, 6(1): 7.
- [15] Li XB, Zhang SC, Zhang ZR, et al. Development of immortalized Hertwig's epithelial root sheath cell lines for cementum and dentin regeneration[J]. Stem Cell Res Ther, 2019, 10(1): 3.
- [16] Fang SY, Hu CQ, Liu MN, et al. Reversibly immortalized hepatic progenitor cell line containing double suicide genes[J]. Int J Mol Med, 2018, 42(4): 1977–1986.
- [17] Matsumura T, Takesue M, Westerman KA, et al. Establishment of an immortalized human–liver endothelial cell line with SV40T and hTERT[J]. Transplantation, 2004, 77(9): 1357–1365.

(责任编辑:周一青)