DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.06.025

风湿性心脏病人心瓣膜成纤维细胞的体外培养及其胶原合成

杨军民* 宋 玲** 张宝仁*** 朱家麟*** (第三军医大学附属西南医院胸心外科)重庆, 400038

提 要 目的: 观察风湿性心脏病人瓣膜成纤维细胞的胶原合成,为研究风湿性心脏病瓣膜纤维化的发病机制建立基础。方法: 采用消化组织块培养法建立人二尖瓣和主脉瓣成纤维细胞体外培养方法,对 5例风湿性心脏病人和 5例尸检中除外心血管疾病和胶原系统疾病的二尖瓣和主动脉瓣成纤维细胞进行了体外培养,并用^{3}H-脯氨酸测定瓣膜成纤维细胞的胶原合成。结果: 二尖瓣和主动脉瓣的瓣膜成纤维细胞其形态、生长方式及胶原合成差异均不明显,风湿性心脏病瓣膜成纤维细胞的胶原合成明显高于对照组。结论: 体外培养的风湿性心脏病人瓣膜成纤维细胞胶原合成明显增加。

关键词 风湿性心脏病;心脏瓣膜;细胞培养;胶原合成

中图法分类号 R541.2

由于缺乏实验动物模型,因而对风湿性心脏病(风心病)瓣膜纤维化的发病机制缺乏深入的研究,并因此而影响到对风心病的预防和治疗效果。为此,我们建立了瓣膜成纤维细胞体外培养方法,并测定了风心病人二尖瓣和主动脉瓣成纤维细胞的胶原合成,为进一步探讨风心病瓣膜纤维化的发病机制提供了研究手段。

1 材料与方法

1.1 瓣膜来源

患风心病二尖瓣狭窄伴关闭不全、主动脉瓣狭窄伴关闭不全行二尖瓣和主动脉瓣双瓣置换术者 5例(男 3例,女 2例),年龄 28~35岁。对照为尸检中除外心血管疾病和胶原系统疾病者 5例,均为男性,年龄 24~42岁。所取二尖瓣和主动脉瓣置冷 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco公司)中,30 min内使用。

1.2 瓣膜成纤维细胞的体外培养

将新鲜瓣膜组织用 DMEM洗尽表面血迹,在瓣膜各部位均匀取材,细切至约 1 mm×1 mm×1 mm大小,用 0.1%胶原酶Ⅰ型(Sigma) 260 u/mg于 37℃消化 40 min,用 D-Hank液洗涤后以 50块/瓶均匀贴于 50 ml培养瓶中。倒置培养瓶,使贴有组织块的一面朝上,于 37℃孵育 2 h,翻转培养瓶,加入含 10%胎牛血清、100 U/ml青霉素、100 μg/ml链霉素、15 mmol/L HEPES(Sigma)的 DMEM 5 ml,置于 37℃、5% CO_2培养箱中培养,3 d换液 1次。细胞生长至融合后用 0.25%胰蛋白酶(华美公司)消化,经 150目不锈钢网过滤,1 500 r/min离心 10 min,细胞沉淀用 D-Hank液洗涤 2次,用上述 DMEM培养液悬浮细胞,以 1∶3传代培养于 50 ml的培养瓶中。

1.3 瓣膜成纤维细胞的鉴定

培养细胞用鼠抗人 Desmin、Vimentin、α-smooth actin单克隆抗体以标记卵白素-生物素法(LAB法)行免疫组化染色鉴定,主要试剂均为 Dako公司产品。

1.4 瓣膜成纤维细胞胶原合成的测定[1,2]

将培养的第 3代细胞用 0.25%的胰蛋白酶消化,重悬于 DMEM培养液中,以约 1×10^{5}个细胞/孔接种于 6孔培养板中,3 d换液 1次,待细胞生长至融合后进行实验。实验前 1 d更换培养液,实验当天换入含 0.1 mmol/L抗坏血酸钠(Fluka公司)的无血清 DMEM 1 ml, 37℃培养 30 min后,加入 5 μCi(2,3-^{3}H)脯氨酸(Sigma公司),继续培养 3 h。每孔计细胞总数后分别收集细胞和培养液于玻璃纤维素滤纸上,80℃烤 2 h。将滤纸置于 10 ml闪烁瓶内,加入 5 ml闪烁液(每升甲苯中溶解 5 g PPO、100 mg POPOP),12 h后行液闪计数。每一样本做三管测定。

1.5 统计方法

数据以 $\bar{x}\pm s$表示,采用 t检验。

2 结果

2.1 瓣膜成纤维细胞的培养

贴壁培养的第 3天即可见细胞开始从组织块边缘长出,经 3周左右长至融合,以 1∶3传代后,5~7 d即融合。二尖瓣和主动脉瓣来源的细胞形态无明显差异,细胞呈梭形或不规则三角形,核为卵圆形。免疫组化染色显示细胞 Desmin和 Vimentin染色阳性、α-smooth actin染色阴性,表明培养的细胞是成纤维细胞[3]。

2.2 成纤维细胞的胶原合成

对照者的二尖瓣和主动脉瓣成纤维细胞的胶原合无明显差异,风心病患者的二尖瓣和主动脉瓣的成纤维细胞的胶原合成也无明显差异,但风心病患者的二尖瓣和主动脉瓣成纤维细胞的胶原合成与对照组相比有明显升高,见表 1。

* 杨军民,男,33岁,讲师,博士

** 基础医学部病理生理学教研室 *** 第二军医大学附属长海医院胸心外科 上海, 200000

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1 风湿性心脏病人瓣膜成纤维细胞胶原合成的改变 (0.06 Bq/cells)

Tab 1 Changes of collagen synthesis by valvular fibroblasts of rheumatic heart disease patients (0.06 Bq/cells)

Group	n	Mitral valve		Aortic valve	
		Cells	Supernant	Cells	Supernant
Control	5	13.30± 1.94	6.86± 1.31	12.19± 2.52	6.73± 2.41
Patient	5	20.57± 3.87	11.45± 3.24*	20.33± 4.78*	12.82± 3.81

*: $P < 0.01$,**: $P < 0.05$ *vs* control

3 讨论

风心病的病理基础是由于受累的瓣膜发生弥漫性纤维化,导致瓣膜狭窄和 或关闭不全,从而引起血流动力学紊乱[4]。最常受累的瓣膜为二尖瓣和主动脉瓣。由于缺乏风心病的实验动物模型,国内外对瓣膜纤维化的发病机制缺乏较深入的研究,并由此影响到对风心病的预防和治疗效果。本研究利用风心病患者行瓣膜置换术时所得的二尖瓣和主动脉瓣,建立了人瓣膜成纤维细胞体外培养方法,并对其胶原合成进行了测定。该方法可用以观察致病因子和治疗药物对瓣膜成纤维细胞胶原代谢的影响,从而为瓣膜纤维化的发病机制和预防的研究提供了一个新的有效手段。

人心脏瓣膜中的成纤维细胞数量虽然不少,但很难从瓣膜胶原中分离出来,所以,瓣膜成纤维细胞培养的关键问题是细胞的分离。我们用胶原酶较长时间消化瓣膜后分离得到瓣膜成纤维细胞,但酶的用量大,细胞损伤重且得率低。用组织块直接培养法则瓣膜成纤维细胞几乎不能生长。经探索,我们结合了消化法和组织块法[5],将消化的组织贴壁培养,在瓣膜胶原被消化松解开的情况下,瓣膜成纤维细胞得以从周边长出。来源于二尖瓣和主动脉瓣的瓣膜成纤维细胞其形态、生长方式及胶原合成差异均不明显,提示瓣膜成纤维细胞在两种瓣膜可能有的病理或发病学的差异中不起主要作用。

胶原是细胞外基质的主要成分,瓣膜胶质蛋白主要由瓣膜成纤维细胞生成,我们曾用生化方法对风心病人瓣膜的胶原含量进行定量,发现风心病人二尖瓣和主动脉瓣的胶原含量明显增加[6]。用 ^{3}H-脯氨酸测定培养的瓣膜成纤维细胞的胶原合成,发现来源于风心病人二尖瓣和主动脉瓣的成纤维细胞的胶原合成明显增加,提示瓣膜胶原含量增加、纤维化是由于成纤维细胞胶原合成增加所致,导致病变瓣膜成纤维细胞胶原合成增加的机制有待进一步研究。

参考文献

1 李玉瑞 主编.细胞外间质的生物化学及研究方法.北京: 人民卫生出版社,1982. 216~ 223

2 永井裕,藤本大三郎 编著.刘 平 译.胶原蛋白实验方法.上海: 上海中医学院出版社,1992. 199~ 218

3 Osborn M, Weber K. Intermediate filaments: cell type-specific marker in differentiation and pathology. Cell, 1982, 31(1): 303

4 顾复生,祝希媛.风湿病的病因学和发病机理.中华心血管病杂志,1982, 10(1): 65

5 鄂 征 主编.组织细胞培养技术.第 2版.北京: 人民卫生出版社,1993. 105~ 112

6 杨军民,张宝仁,朱家麟,等.风湿性心脏病患者二尖瓣和主动脉瓣胶原含量和胶原Ⅰ/Ⅲ比值的变化.第二军医大学学报,1996, 17(1): 37

(收稿: 1997-07-11;修回: 1998-06-29)

(编辑 冯崇英)

Culture and collagen synthesis of the cardiac valve fibroblast from patients with rheumatic heart disease

Yang Junmin, Song Ling, Zhang Baoren, Zhu Jialin (Department of Thoracic Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To observe the collagen synthesis of cultured cardiac valve fibroblast from patients with rheumatic heart disease to lay the foundation for further studies on the mechanism of fibrosis of the rheumatic cardiac valves. Methods: Using enzyme digestion, the mitral and aortic valve fibroblasts from 5 patients with rheumatic heart disease and other 5 confirmed by autopsy that they did not die of cardiovascular disease and collagen system disease were cultured *in vitro*. The collagen synthesis was determined with ^{3}H-proline incorporation. Results: There was no difference in cell shape, proliferation and collagen synthesis between the mitral valve fibroblast and aortic valve fibroblast. Collagen synthesis of the rheumatic valvular fibroblasts was significantly higher in 5 patients with rheumatic heart disease than in the other 5. Conclusion: Collagen synthesis of the rheumatic cardiac valvular fibroblasts cultured *in vitro* is increased.

Key words rheumatic heart disease; cardiac valve; cell culture

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net