

凋亡微环境促瓣膜间质细胞钙化的机制

张伯尧 徐志云

【摘要】 随着对主动脉瓣膜钙化过程的不断深入研究,发现主动脉瓣膜间质细胞的凋亡对其组织重构的病理性过程有着重要的作用。而外力应变等物理因素及体内一系列生物机制的改变都会造成细胞凋亡,从而形成凋亡微环境。在瓣膜间质细胞启动凋亡的过程中,产生凋亡小体、基质小泡等能够聚集钙离子沉积、产生矿化作用的因素。该文对凋亡微环境促使瓣膜间质细胞钙化的机制及研究进展作一综述。

【关键词】 钙化性主动脉瓣膜病;间质细胞;凋亡微环境;凋亡小体;基质小泡

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2013.01.014

钙化性主动脉瓣疾病(CAVD)是老年人最常见的心脏瓣膜疾病,在西方国家发病率高达 2.5%^[1]。CAVD 不仅会引起瓣膜功能异常,还可能导致心律失常、心力衰竭、心肌梗死、心源性猝死等发生。钙化是其最常见的病理学特征,其发生率为 53%,瓣膜钙化是导致瓣膜僵硬、关闭不全、狭窄的主要因素,瓣膜钙化过程是一个主动过程^[2]。钙化的瓣膜间质细胞中也发现了凋亡细胞,经研究证实瓣膜间质细胞的凋亡参与许多心血管疾病及其组织重构的病理性过程并有着重要的作用^[3]。

1 细胞凋亡

细胞凋亡是机体调控发育、维护内环境的稳定并由基因控制的一种细胞主动死亡过程,又称程序性细胞死亡^[4]。启动凋亡的细胞萎缩并丧失与周边细胞接触,染色质固缩于核膜附近,细胞骨架崩解,核膜消失, DNA 出现断裂片段,泡状胞膜,最终导致细胞解体为由胞膜包裹的多个凋亡小体,并被周围正常细胞或吞噬细胞所吞噬。细胞凋亡作为细胞对所处环境中某些特定信息(包括信息传导、基因表达、蛋白合成等多个环节)的一种应答反应,具有复杂的分子调控机制,并可被多种生理性、病理性刺激诱发。目前公认参与凋亡的 3 条通路:死亡受体通路、线粒体通路、内质网通路。在胚胎发育、机体内环境稳态及多细胞生物防御、内外环境因子的伤害等方面均起着重要的作用。细胞凋亡过程可分为 3 个阶段:起始期,细胞通过不同途径接收到多种与凋亡有关的信号;整合期,多种起始信号在此

整合,细胞作出生存或死亡决定;执行期,一旦作出死亡决定,即将进入一个不可逆过程。

2 凋亡微环境对瓣膜钙化的影响

心脏瓣膜钙化机制与血管钙化相似,是一个异位钙化的过程,其中细胞凋亡、基质小泡、碱性磷酸酶、脂质以及炎性细胞均参与了心脏瓣膜钙化过程。虽然瓣膜钙化的机制至今仍未完全研究清楚,但是细胞凋亡作为瓣膜钙化过程的起始部分已经得到确认。

2.1 细胞凋亡与钙化的相关性

Matsumoto 等^[5]发现,在钙化瓣膜组织中内皮功能受损、caspase-3 活性明显增高,而 caspase-3 在引起细胞凋亡的级联反应中具有重要意义。因此推测经过某些途径导致瓣膜内皮细胞功能受损,受损的内皮细胞内钙离子升高,触发了凋亡级联反应导致内皮细胞凋亡,从而破坏内皮的完整性,最终形成凋亡微环境。同时,成纤维细胞完整性的破坏也是细胞凋亡的结果之一,其形成的细胞碎片为心脏瓣膜组织提供大量钙结合物质。通过 Von Kossa 染色可以发现凋亡细胞或即将凋亡的细胞附着明显的钙盐沉积。

Proudfoot 等^[6]的实验证明凋亡在血管钙化过程的起始作用。瓣膜发生钙化的机制与血管壁发生钙化的机制相似^[2,7]。凋亡发生在血管平滑肌钙化过程的早期,培养 7 d 即可出现凋亡细胞,但钙化结晶沉积直到第 28 天才出现(Von Kossa 染色)。通过观察发现凋亡早于钙化结晶沉积,但是如果凋亡可以引起钙化,那么它的作用在整个过程的早期被延迟了。继而,可以知道细胞结节钙化过程是一

个可控过程。Lynch 等^[8]指出,在 小鼠颅骨成骨细胞培养中发现凋亡是成骨细胞分化及钙化的一部分。那么凋亡是否是钙化发生的必要条件? 凋亡可以被 caspase 抑制剂 ZVAD. fmk 抑制,茜素红染色及钙化定量分析可以清晰显示 ZVAD. fmk 抑制血管平滑肌细胞,同时其他实验也显示 ZVAD. fmk 可以抑制凋亡形成。这些研究都表明凋亡在钙化过程中具有不可缺少的作用。

2.2 外力应变与细胞凋亡

Kim 等^[9]在牛心脏瓣膜的结缔组织中发现,经受物理损害,如牵拉、缺氧、冷冻等外力应变的细胞发生钙化,而未受损害的细胞则无明显钙化发生。在人体内主动脉瓣膜处于高压环境,易受到机械性损伤,内皮细胞受到物理性损伤,破坏内皮的完整性,钙盐可以通过受损的内皮细胞层进入间叶组织深层并沉积,从而使瓣膜增厚钙化。电镜观察 10 例老年主动脉瓣膜组织,在钙化的瓣膜组织中可见凋亡小体和纤维细胞,并且凋亡小体的改变发生在内皮细胞核部位。严重的内皮细胞损害与纤维细胞中凋亡小体改变有关,凋亡小体产生的细胞碎片中可见钙沉积。目前认为凋亡小体改变了内皮完整性,从而使滤过的钙增加并沉积到心脏瓣膜组织深层。由于在瓣膜组织钙化过程中凋亡小体提供了钙结合的基础部位,所以出现了细胞衰老产物和死亡细胞的细胞器外突。在血管钙化和活体心脏瓣膜钙化中,钙化生发中心被认为是由细胞产生的,观察经戊二醛处理的猪心脏瓣膜时发现,戊二醛固定可以导致发生迅速、持久、严重的细胞内钙化,而且经戊二醛处理隔离了过度沉积的钙之后仍然观察到了作为磷灰石生发中心的分子小泡,这种分子小泡结果与基质小泡相似,故细胞死亡在生物瓣膜钙化中发挥了重要作用^[9]。Farzaneh-Far 等^[10]认为,细胞凋亡伴随凋亡小体的清除障碍是心脏瓣膜钙化发生的机制之一,这一观点得到了许多学者的支持^[11,12]。

2.3 钙离子沉积与凋亡微环境

为了证明血管平滑肌产生的凋亡小体是否能够以一种方式将钙离子沉积在软骨细胞的凋亡小体和细胞外基质中,Proudfoot 等^[6]将人主动脉血管平滑肌细胞培养在钙化培养基中,观察到凋亡小体可以将培养基中的钙离子聚集。但是预先将凋亡小体以 NP-40 处理后则无法将钙离子聚集。这项研究表明,凋亡小体在其膜保持完整性的情况下具

有聚集钙离子的作用。Hutcheson 等^[13]认为细胞内钙离子的增加与主动脉瓣间质细胞凋亡有关。他们培养猪主动脉瓣,通过 REAL-TIME 钙离子测量细胞内钙离子在主动脉瓣膜间质细胞中的变化,发现在经过外力应变后的主动脉瓣膜间质细胞中,钙离子在短时间内即出现大量增多。钙离子在细胞内积累被认为是成核作用及细胞结节形成的重要因素^[9,14]。而体内钙离子稳态的失衡则是多种细胞凋亡的诱导因素^[15]。Zayzafoon 等^[16]指出,细胞内钙离子的缓慢积累正是成骨细胞在骨骼重塑过程中不可或缺的激活阶段。因此,外力应变(物理损伤)及早期分子机制事件的改变可能导致主动脉瓣膜钙化。有文献提出钙化过程都伴随着凋亡^[16],认为较为坚硬的基质可能会通过凋亡促进钙化^[17]。然而,基质钙化只在暴露于钙化培养液中的主动脉瓣膜间质细胞才会发生,因此基质硬化程度并不足以导致钙化发生,而是与可溶性因素相互协同促进主动脉瓣膜间质细胞的分化及钙化。

虽然瓣膜间质细胞在坚硬的基质中可以在较低水平就表达出成骨细胞相关的标志物,并且可以观察到有显著的钙沉积形成。电镜下的形态学分析提示瓣膜间质细胞在硬度不同的基质中培养时,细胞的分布与形状有明显的差异。Jian 等^[18]认为无论是在体内还是体外,钙化的发生都是通过涉及细胞凋亡的一个过程,因此对聚集细胞的活性进行测定。在普通基质中,聚集的活性细胞中几乎看不到凋亡细胞。钙黄素 AM 染色的阳性表达并非因为钙化,而福尔马林染色的钙化聚集细胞表达阴性。相反,在坚硬基质中聚集的瓣膜间质细胞则发生细胞凋亡与死亡。

2.4 基质小泡与细胞凋亡

基质小泡是一种源于成骨细胞的小泡结构,存在于细胞外基质中,在人体的成骨分化过程及病理性矿化中起着重要作用。基质小泡在其磷酸酶的控制下可以形成初期羟基磷灰石结晶,之后形成的羟基磷灰石结晶在基质小泡膜破裂的同时释放,羟基磷灰石结晶不断聚集并扩大,最终形成矿化产物。在正常生理环境下的血管平滑肌及瓣膜组织中的基质小泡释放并未产生明显的钙化性病损,而长期暴露于钙盐与磷酸化培养基的环境中,即出现了钙化性改变。基质小泡钙化过程的发展可能是因为基质小泡中钙化抑制因素的受损或缺失所导致。

研究表明瓣膜组织内皮细胞凋亡导致细胞死亡,从而破坏了内皮的完整性。基质小泡的膜是正常生物发生钙化的启动部位,基质小泡可能是凋亡细胞的残体。因此内皮细胞的病理性改变是生物瓣膜钙化的始动因素。细胞凋亡破坏了成纤维细胞的完整性,凋亡的成纤维细胞产生的细胞碎片是瓣膜组织中钙结合的主要物质,死亡的成纤维细胞产生的退化产物和细胞器中可见大量的钙沉积。内皮细胞发生细胞凋亡,细胞凋亡破坏了内皮的完整性,增加了钙沉积到瓣膜组织的机会,内皮损伤的严重程度与成纤维细胞的退行性变有关。基质小泡可产生碱性磷酸酶,因此对基质小泡的抑制可以导致临床上的病理性钙化^[19]。

3 展望

钙化性主动脉瓣疾病的发病机制与治疗是心脏外科的研究热点。凋亡微环境作为钙化过程的起始部分影响瓣膜钙化。由外力应变、分子机制改变等因素导致的凋亡微环境通过多种途径最终引起瓣膜钙化,其机制仍有待进一步研究。现今对钙化性主动脉瓣的治疗方案主要是外科手术治疗即瓣膜置换术,通过对凋亡微环境的改变是否可以抑制瓣膜钙化的发生从而达到临床治疗效果也是我们今后研究的方向。

参 考 文 献

[1] Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM, et al. Executive summary: heart disease and stroke statistics--2010 update; a report from the American Heart Association[J]. *Circulation*, 2010, 121 (7): e46-e215.

[2] Khoynezhad A, Jalali Z, Tortolani AJ. A synopsis of research in cardiac apoptosis and its application to congestive heart failure[J]. *Tex Heart Inst J*, 2007, 34 (3): 352-359.

[3] Mohler ER 3rd. Mechanisms of aortic valve calcification[J]. *Am J Cardiol*, 2004, 94 (11): 1396-1402.

[4] Wu C, Zhang Y, Sun Z, et al. Molecular evolution of Cide family proteins; novel domain formation in early vertebrates and the subsequent divergence[J]. *BMC Evol Biol*, 2008, 8:159.

[5] Matsumoto Y, Adams V, Walther C, et al. Reduced number and function of endothelial progenitor cells in patients with aortic valve stenosis: a novel concept for valvular endothelial cell repair[J]. *Eur Heart J*, 2009, 30 (3): 346-355.

[6] Proudfoot D, Skepper JN, Hegyi L, et al. Apoptosis regulates

human vascular calcification in vitro: evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies[J]. *Circ Res*, 2000, 87 (11): 1055-1062.

[7] Speer MY, Giachelli CM. Regulation of cardiovascular calcification[J]. *Cardiovasc Pathol*, 2004, 13 (2): 63-70.

[8] Lynch MP, Capparelli C, Stein JL, et al. Apoptosis during bone-like tissue development in vitro[J]. *J Cell Biochem*, 1998, 68 (1): 31-49.

[9] Kim KM, Herrera GA, Battarbee HD. Role of glutaraldehyde in calcification of porcine aortic valve fibroblasts[J]. *Am J Pathol*, 1999, 154 (3): 843-852.

[10] Farzaneh-Far A, Proudfoot D, Shanahan C, et al. Vascular and valvar calcification: recent advances[J]. *Heart*, 2001, 85(1):13-17.

[11] Proudfoot D, Skepper JN, Hegyi L, et al. Role of apoptosis in the initiation of vascular calcification[J]. *Z Kardiol*, 2001, 3: 43-46.

[12] Knight RL, Wilcox HE, Korossis SA, et al. The use of acellular matrices for the tissue engineering of cardiac valves[J]. *Proc Inst Mech Eng H*, 2008, 222 (1), 129-143.

[13] Hutcheson JD, Venkataraman R, Baudenbacher FJ, et al. Intracellular Ca⁽²⁺⁾ accumulation is strain-dependent and correlates with apoptosis in aortic valve fibroblasts[J]. *J Biomech*, 2012, 45 (5): 888-894.

[14] Schoen FJ, Levy RJ. Calcification of tissue heart valve substitutes: progress toward understanding and prevention[J]. *Ann Thorac Surg*, 2005, 79 (3): 1072-1080.

[15] Balachandran K, Sucosky P, Jo H, et al. Elevated cyclic stretch induces aortic valve calcification in a bone morphogenic protein-dependent manner[J]. *Am J Pathol*, 2010, 177 (1): 49-57.

[16] Zayzafoon M. Calcium/calmodulin signaling controls osteoblast growth and differentiation[J]. *J Cell Biochem*, 2006, 97 (1): 56-70.

[17] Hashimoto S, Ochs RL, Rosen F, et al. Chondrocyte-derived apoptotic bodies and calcification of articular cartilage[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95 (6): 3094-3099.

[18] Jian B, Narula N, Li QY, et al. Progression of aortic valve stenosis: TGF-beta1 is present in calcified aortic valve cusps and promotes aortic valve interstitial cell calcification via apoptosis[J]. *Ann Thorac Surg*, 2003, 75 (2): 457-465.

[19] Yip CY, Chen JH, Zhao R, et al. Calcification by valve interstitial cells is regulated by the stiffness of the extracellular matrix[J]. *Arterioscler Thrombosis Vascu Biol*, 2009, 29 (6): 936-942.

(收稿:2012-06-21 修回:2012-08-03)

(本文编辑:金谷英)