

投稿類別：生物類

篇名：

心血管疾病大解密—模擬血管鈣化實驗

作者：

廖翊婷。私立林口康橋國際學校。高二2班

沈佳薇。私立林口康橋國際學校。高二2班

指導老師：

莊喬琪老師

壹、前言

一、摘要


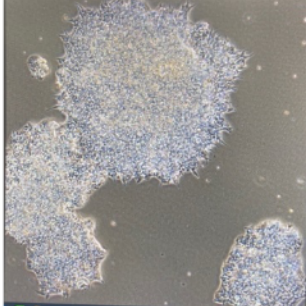
血管鈣化是一種嚴重的心血管疾病，經常發生於高齡族群、患有糖尿病以及不同程度慢性腎臟病的病人。造成心血管疾病的主因是動脈鈣化，而其動脈血管鈣化可因在身體上解剖位置不同，分為動脈血管粥狀硬化 (Atherosclerosis) 與動脈硬化 (Arteriosclerosis)。探究其成因，主要受到代謝不良因素的影響，導致促成鈣化因子的表現量增加，如：磷、鈣、副甲狀腺素等異常，同時，抑制鈣化的因子逐漸減少，如：基質鈣結核醣蛋白 (Matrix Gla Protein)、焦磷酸鹽 (Pyrophosphate) 和骨橋蛋白 (Osteopontin) 下降，結果導致心血管鈣化的狀況出現。本研究藉由培養平滑肌細胞的實驗，模擬心血管疾病血管鈣化的狀態，並且了解不同濃度的磷離子對於細胞鈣化的影響，同時也藉由不同細胞數觀察細胞鈣化的結果。

二、研究目的

- (一) 實驗觀察不同細胞數量的平滑肌細胞在同一濃度磷離子的鈣化程度
- (二) 實驗觀察相同細胞數的平滑肌細胞加入不同濃度的磷離子的鈣化程度

三、研究設備、器材

表一：設備、器材與藥品

實驗器材	微量吸管、細胞計算機、細胞計數器、電子顯微鏡、保溫箱、滴管、水浴槽、細胞培養皿、微量離心管、無菌操作台、塑膠離心管	
藥劑	trypan blue、75%酒精、40mM Alizarin Red S、Human Vascular Smooth Muscle Cell Basal Medium、30mM磷酸根溶液、生理食鹽水	
實驗細胞	冷凍動脈平滑肌細胞(Vascular Smooth Muscle Cell)	
	正常動脈平滑肌細胞 	癌化動脈平滑肌細胞 

貳、文獻探討

根據世界衛生組織(World Health Organization)的統計指出「**心血管疾病是全世界死亡的頭號殺手，每年造成全球約總31%的人數死亡**」，而造成死亡最大主因是血管鈣化所造成的急性心肌梗塞。動脈血管出現鈣過量沉澱的情況，導致血管硬化、管壁狹窄，氧氣與血流無法流通的情形。

動脈血管的鈣化可以依解剖位置不同分為血管內膜(Intima)與血管中層(Media)鈣化。內膜鈣化為動脈血管粥狀硬化(Atherosclerosis)，與內膜沉積斑塊(Lipid-laden-plaque)和內磨損傷有關，導致血管內膜管壁增厚、血管阻塞。血管中層鈣化為動脈硬化(Arteriosclerosis)，中層出現血管纖維化、鈣化並且失去彈性，促成「**動脈中層的增厚，主動脈腔壁變硬，脈壓差(Pulse pressure)大**」(劉文治、盧國城，2014)。

然而，傳統迷思認為吃太多鈣片是導致血管鈣化之主因，但骨骼在鈣離子濃度較低時，即可釋放鈣離子到血液中以維持血鈣平衡。因此就算補充較多的鈣，身體仍會維持血鈣平衡，並不會直接導致血管鈣化(吳新華，2019)。

動脈平滑肌細胞與磷離子所促成的鈣化息息相關。磷在正常人體主要為小腸吸收、有腎臟調理，同時也以不同形式存留在體內。磷的代謝還會受到激素的影響，如維生素D可幫助體內小腸的磷促進吸收。當受到不良因素影響，如：腎臟功能衰退，缺乏調節功能，會促使磷離子在體內累積濃度增加。磷離子會透過Na/pi運輸蛋白進入細胞，而細胞在高血磷的情況下，促動脈平滑肌細胞轉型為造骨細胞，更進一步使血管出現沉積的情況。在血液中的磷逐漸升高時，會使副甲狀腺素(Parathyroid hormone)也升高，帶來骨骼高置換率(high turnover)，同時也造成心血管發炎、血管鈣化等現象。發炎反應的激素也會讓血管鈣化更嚴重，如：腫瘤壞死因子- α (TNF- α)、白血球介素-6(IL-6)等，會促成動脈平滑肌細胞轉型。發炎反應、高血磷與血管帶來負面的鈣化影響(劉文治、盧國城，2014)。

參、研究方法

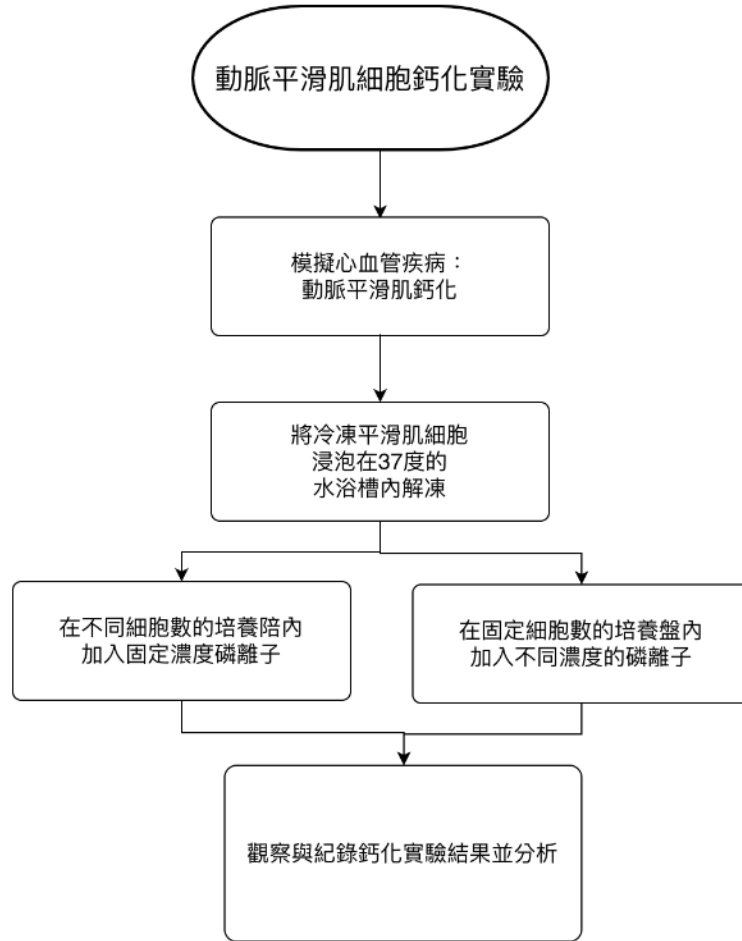
(一) 實驗一：探討不同細胞數的動脈平滑肌細胞在相同濃度磷離子下鈣化的差異性

透過改變動脈平滑肌細胞的方式，觀察在多動脈平滑肌細胞的情況下是否鈣化部分較為明顯，且鈣化程度是否有隨著細胞數改變。

(二) 實驗二：探討相同細胞數的動脈平滑肌細胞在不同濃度磷離子下鈣化的差異性

透過在不同濃度的磷離子環境培養，紀錄動脈平滑肌細胞在高濃度與低濃度的鈣化程度與差異

圖一：實驗流程圖



肆、研究分析與結果

(一) 不同數量的平滑肌細胞鈣化實驗

1、實驗設計：不同數量的平滑肌細胞鈣化實驗變因 (表二)

表二：實驗變因控制

操作變因	平滑肌細胞數量
控制變因	磷離子濃度、溫度、培養天數
應變變因	細胞鈣化結果

2、實驗步驟：

- (1) 將平滑肌細胞和細胞培養液放到37度的水浴槽內解凍
- (2) 將15 μ l細胞懸浮液加入15 μ l trypan blue放入微量離心管中，並且放入細胞計算盤中，再放入細胞計數器中細算細胞數
- (3) 在無菌操作台裡，拿入6個塑膠離心管，分別加入不同比例的細胞與培養液培養(表三)；細胞培養圖示(圖二)：

表三：細胞數量與培養液搭配比例

細胞培養數量(個/ml)	1000	3000	5000	10000	30000	50000
平滑肌細胞懸浮液(μ l)	5	15	25	31	93	150
細胞培養液(μ l)	2.995	2.985	2.975	2.969	2.907	2.850

圖二：細胞培養圖示



(圖片來源：研究者拍照)

- (4) 每一種細胞數分別加入兩格培養盤內，各加1ml平滑肌懸浮液與 Human Vascular Smooth Muscle Cell Basal Medium細胞培養液混合的溶液，再於每格加入1ml 的細胞培養液（每格總共2ml）
- (5) 調配30ml的3mM磷酸根溶液， NaH_2PO_4 與 Na_2HPO_4 以1:2的比例調配(pH=7.4)
- (6) 將細胞培養盤放入二氧化碳培養箱裡，七天後再加入1ml的3mM磷酸根溶液
- (7) 將細胞培養盤內的舊細胞培養液用滴管抽掉，用PBS總共洗三次，再更換新的2ml Human Vascular Smooth Muscle Cell Basal Medium細胞培養液

(8) 電子顯微鏡觀察細胞鈣化的情況

(二) 不同磷離子濃度的鈣化實驗

1、實驗設計：不同磷離子濃度的鈣化實驗 (表四)

表四：實驗變因控制

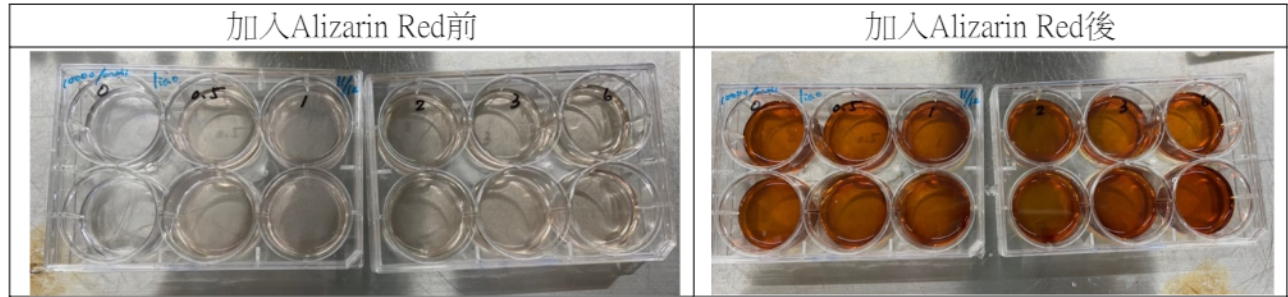
操作變因	磷離子溶液濃度
控制變因	平滑肌細胞數固定為10000(個/ml)、溫度、培養天數
應變變因	細胞鈣化成果

2、實驗步驟：

- (1) 將平滑肌細胞和細胞培養液放到水浴槽裡解凍
- (2) 將15 μ l細胞懸浮液加入15 μ l trypan blue放入微量離心管中，並且放入細胞計算盤中，再放入細胞計數器中細算細胞數
- (3) 在無菌操作台裡，拿入6個塑膠離心管，分別加入5 μ l的平滑肌細胞培養液與2.995ml的細胞培養液
- (4) 在12格培養細胞盤加入各加1ml平滑肌懸浮液與Human Vascular Smooth Muscle Cell Basal Medium細胞培養液混合的溶液，再加入1ml的細胞培養液（每格總共2ml）
- (5) 調配分別為0.1mM、0.5mM、1mM、2mM、3mM、5mM濃度的磷酸根溶液， NaH_2PO_4 與 Na_2HPO_4 以1:2的比例調配 (pH=7.4)
- (6) 加入1ml濃度分別為0.1mM、0.5mM、1mM、2mM、3mM、5mM的磷酸根溶液
- (7) 將細胞培養盤放入二氧化碳培養箱裡，十四天後再加入1ml的3mM磷酸根溶液
- (8) 調配Alizarin Red S staining：
 1. 將細胞培養盤內的舊細胞培養液用滴管抽掉，用PBS總共洗三次
 2. 加入4%的甲醛，靜置在正常室溫中15分鐘
 3. 倒掉甲醛，將細胞用 diH_2O 洗三次

4. 倒掉 diH_2O ，加入1ml 濃度為40mM的Alizarin Red S，靜置並且輕搖於是溫中20-30分鐘
5. 倒掉Alizarin Red S，將細胞用 diH_2O 洗五次 (圖三)
6. 用電子顯微鏡觀察細胞鈣化部分被染色的情況

圖三：加入Alizarin Red前後圖示



(圖片來源：研究者拍照)

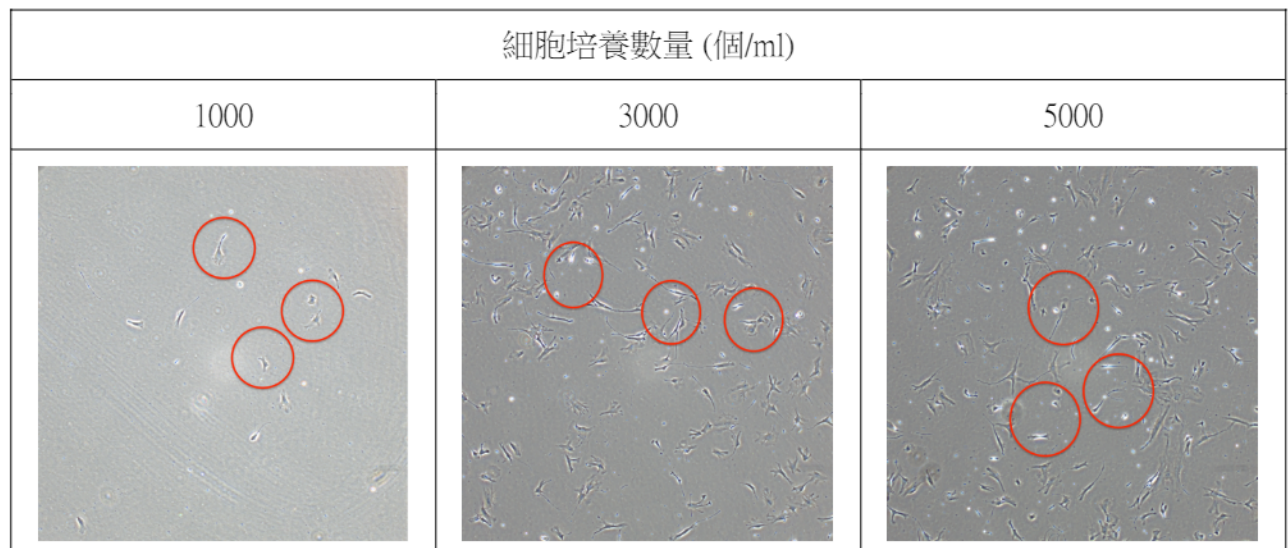
伍、研究結論與建議

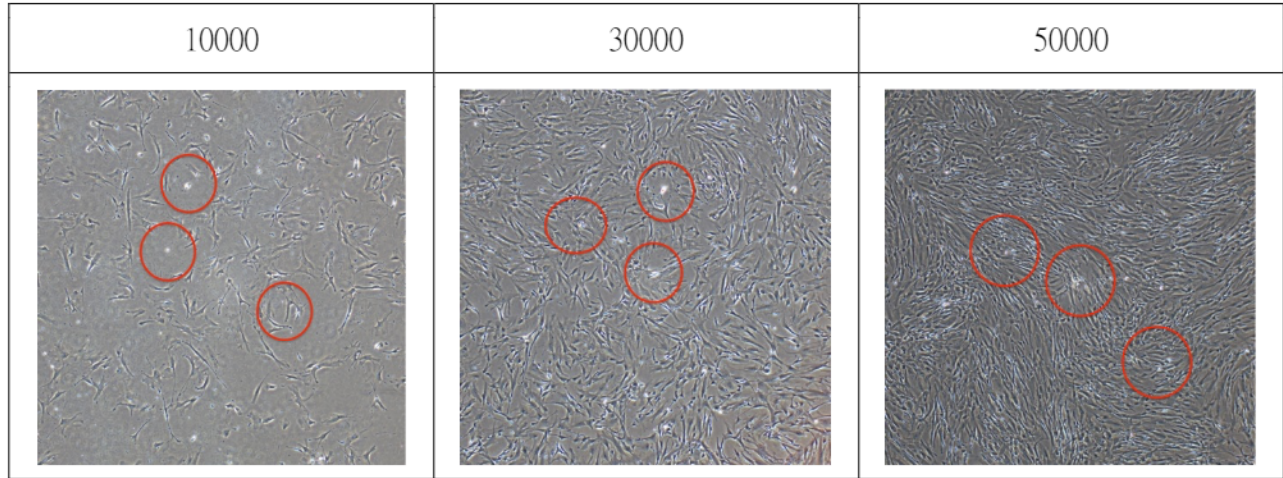
一、研究結論

(一) 不同數量的平滑肌細胞鈣化實驗

在不同細胞數量下，相同濃度之磷離子處理，細胞皆有鈣化之狀況，且動脈平滑肌細胞數較多的培養盤內，鈣化透明結晶程度較細胞數少的成果明顯 (圖四)。但在做實驗過程中要考慮細胞數太多，會造成滿盤，導致動脈平滑肌細胞生長空間的不足。

圖四：細胞鈣化成品圖示 (圈起部分為鈣化結果，其餘白色結晶部分也為細胞鈣化)



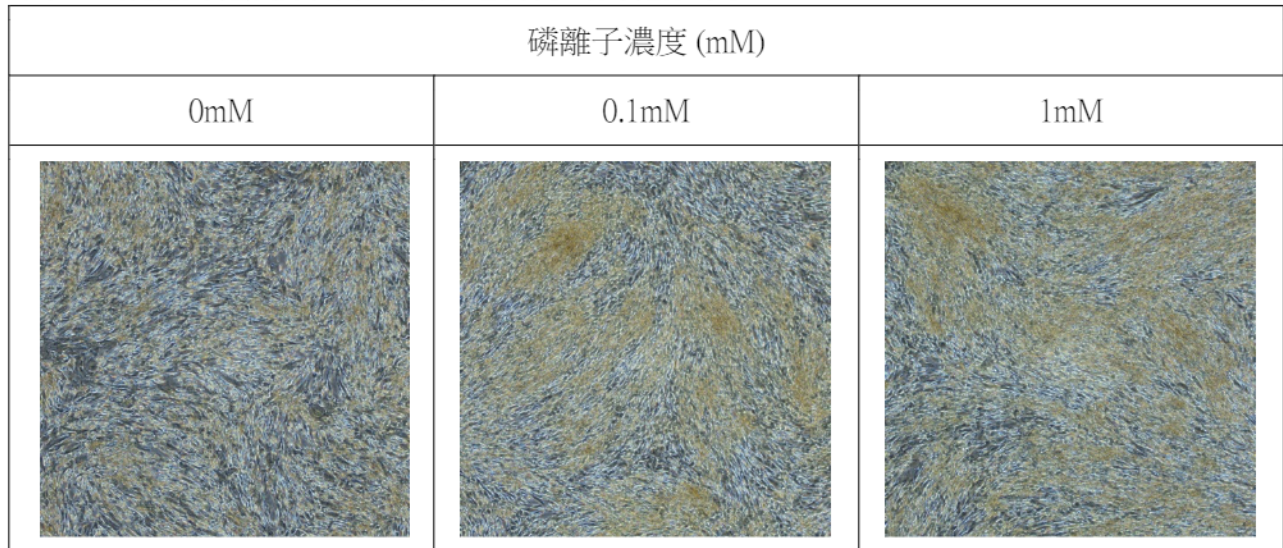


(圖片來源：研究者拍照)

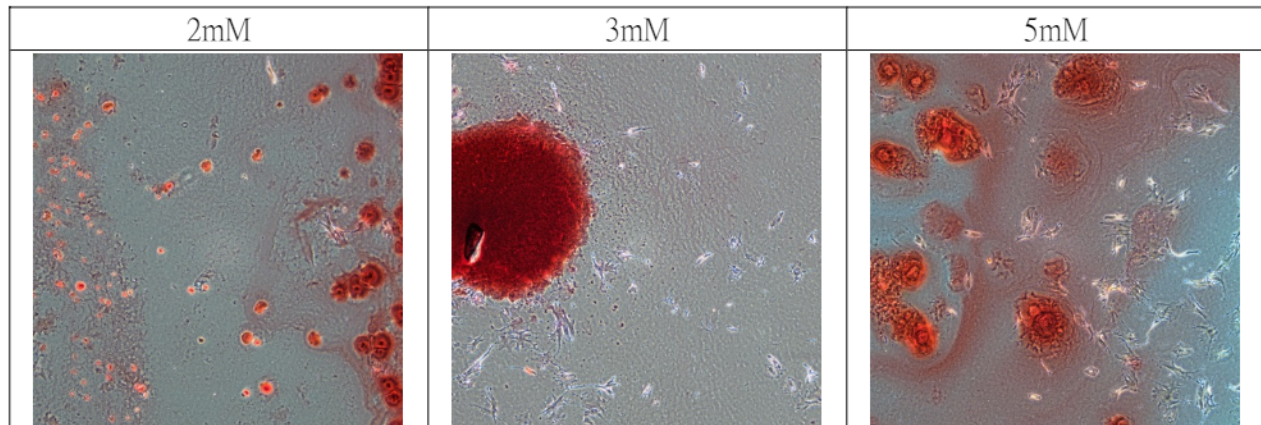
(二) 不同磷離子濃度的鈣化實驗

在高磷濃度下，經過染色的鈣化結晶相較於低濃度較為明顯。經過染色鈣化部分的暎色染劑顏色也相對較為明顯且分佈較廣 (圖五)，可以直接用肉眼區觀察鈣化的結果。結果證明磷離子濃度高低與平滑肌細胞之鈣化程度呈正相關。

圖五：細胞鈣化成品圖示 (染紅色部分為鈣化結果)



(圖片來源：研究者拍照)



(圖片來源：研究者拍照)

二、研究建議

(一) 不同數量的平滑肌細胞鈣化實驗

本實驗成功區別出多細胞數與較少細胞數的鈣化差異。但在實驗的過程中，未考慮到細胞數的狀況，30000到50000個平滑肌細胞養在培養盤內已經爆盤，在短短3、4天內佔據所有盤空間，所以相對於其他細胞數培養解果覺不準確。

(二) 不同磷離子濃度的鈣化實驗

本實驗應證了我們的推測：在高磷環境的動脈平滑肌細胞鈣化遍佈範圍最廣。在實驗過解果觀察細胞，用電子顯微鏡可以準確區分出濃度造成細胞鈣化的差異性，但少了訂定固定範圍內，觀察與紀錄鈣化的面積，並且用數據進行比較。

陸、參考文獻

1. 衛生福利部國民健康署 (2015年9月22日)。「憂！台灣心臟出了問題?!」- 青壯救『心』7行動。
<https://www.hpa.gov.tw/Pages/Detail.aspx?nodeid=1135&pid=2978>
2. 劉文治、盧國城 (2014)。非金屬磷結合劑在慢性腎臟血管鈣化的多重角色。內科學誌。
3. 吳新華 (2019)。冠狀動脈鈣化基礎與臨床。科學出版社。

4. 磷的代謝。全方位健康網。

<http://www.kenkon.com.tw/health.php?act=view&id=420>

5. 余紹華。急性心肌梗塞，生和死一瞬間（2020年10月28日）中國醫藥大學大學附設醫院急症暨外傷中心急診部。

<https://www.cmuh.cmu.edu.tw/NewsInfo/NewsArticle?no=6913>

6. 你的「血管鈣化」了？（2013年7月10日）。早安健康News。 [https://dep.mohw.gov.t
w/docmap/cp-4747-38404-108.html](https://dep.mohw.gov.tw/docmap/cp-4747-38404-108.html)