

# 过表达Atg5通过上调细胞自噬水平抑制瓣膜间质细胞成骨样分化

陈彬 张盟浩 范梦恬 吴静红 王玥 黄琴 施琼\*  
(重庆医科大学检验医学院临床诊断教育部重点实验室, 重庆 400016)

**摘要** 该文的主要目的是探究过表达自噬相关蛋白Atg5对主动脉瓣膜间质细胞自噬水平以及成骨样分化能力的影响, 为钙化性主动脉瓣膜疾病的研究提供新方法和新思路。从猪主动脉瓣上分离原代瓣膜间质细胞, 细胞免疫荧光进行表型鉴定后, 采用成骨培养基诱导瓣膜间质细胞成骨分化, 并用Western blot检测细胞成骨指标Runx2、OPN与自噬指标p62和LC3B-II/I的蛋白表达水平; 构建重组质粒pAdTrack-ATG5并通过脂质体转染瓣膜间质细胞, 采用Q-PCR、Western blot以及免疫荧光染色检测转染后细胞Atg5的表达水平和细胞自噬水平的变化情况; 对成骨诱导培养的主动脉瓣膜间质细胞分别转染空载质粒和过表达Atg5质粒, 利用Western blot检测72 h后瓣膜间质细胞早期成骨指标Runx2、OPN的表达, 并用碱性磷酸酶染色和茜素红S染色方法检测瓣膜间质细胞晚期成骨样分化能力。结果显示, 原代分离培养的瓣膜间质细胞的间质细胞标志物 $\alpha$ -SMA和vimentin的染色结果呈阳性, 内皮细胞标志物vWF的染色结果呈阴性; 与对照组比较, 用成骨培养基培养的瓣膜间质细胞Runx2、OPN和p62的蛋白表达水平显著上调, LC3B-II/I的比值显著下调; 测序结果显示, 过表达质粒pAdTrack-ATG5构建成功; 在转染pAdTrack-ATG5后, 细胞Atg5的基因表达水平和蛋白表达水平均显著上调, 自噬指标p62蛋白表达水平显著下调, LC3B-II/I比值显著上调, 免疫荧光染色显示, LC3B聚集增加; 与转染空载质粒组相比, 转染pAdTrack-ATG5组细胞在成骨培养基培养72 h后成骨指标Runx2、OPN的蛋白表达水平显著下降, 转染pAdTrack-ATG5组碱性磷酸酶染色和茜素红S染色结果的阳性程度均弱于转染空载质粒组。综上所述, 过表达Atg5能上调细胞自噬水平, 并抑制瓣膜间质细胞成骨样分化。

**关键词** 钙化性主动脉瓣膜病; 瓣膜间质细胞; 自噬; ATG5; 重组质粒

## Overexpression of Atg5 Inhibits Osteogenic Differentiation of VICs by Upregulating Autophagy Levels

CHEN Bin, ZHANG Menghao, FAN Mengtian, WU Jinghong, WANG Yue, HUANG Qin, SHI Qiong\*

(Key Laboratory of Clinical Laboratory Diagnostics, Ministry of Education, College of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**Abstract** Our study was to investigate the effect of autophagy-related protein Atg5 on autophagy and osteogenic differentiation of aortic valve interstitial cells, which was order to provide new methods and ideas for

收稿日期: 2019-11-13 接收日期: 2020-01-21

重庆市技术创新与应用示范项目(社会民生类一般项目)(批准号: Cstc2018jsex-msybx0007)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 17784311308, E-mail: shiqiong@cqmu.edu.cn

Received: November 13, 2019 Accepted: January 21, 2020

This work was supported by Chongqing Technological Innovation and Application Demonstration Project (General Project of Social Livelihood) (Grant No.Cstc2018jsex-msybx0007)

\*Corresponding author. Tel: +86-17784311308, E-mail: shiqiong@cqmu.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5194>

the study of the calcified aortic valve disease. Primary valve interstitial cells were isolated from the porcine aortic valve. Cells phenotype identification was used by immunofluorescent staining. The expression of Runx2, OPN, p62 and LC3B-I/II was detected by Western blot to identified the relationship between autophagy and osteogenesis in valvular interstitial cells. The plasmid pAdTrack-ATG5 overexpressing Atg5 was constructed and transfected into VICs. After transfecting with control plasmid or pAdTrack-ATG5, the VICs were cultured with osteogenic medium. The osteogenic differentiation ability of valve interstitial cells was detected by Western blot, alkaline phosphatase staining and alizarin red S staining. For immunofluorescent staining, Alpha -SMA and Vimentin were positive and vWF was negative in VICs. Compared with the CM group, the expression of Runx2, OPN and p62 protein in the OM group was increased but LC3B-II/I decreased. The expression of Atg5 and LC3B-II/I in cells transfected with pAdTrack- ATG5 was raised but p62 was decreased compared with the negative control. The expression level of Runx2 and OPN in the OM+Atg5 group was lower than that in the OM+NC group. Alkaline phosphatase staining and alizarin red S staining were also showed that the osteogenic differentiation ability in the OM+Atg5 group was weaker than the OM+NC group. Take together, overexpression of Atg5 inhibits osteogenic differentiation of valvular interstitial cells by upregulating autophagic activity.

**Keywords** calcified aortic valve disease; valve interstitial cell; autophagy; ATG5; recombinant plasmid

近年来, 钙化性主动脉瓣膜疾病(calcific aortic valve disease, CAVD)已成为一种常见的瓣膜疾病。美国心脏协会的调查表明, 随着年龄的增长, CAVD的发病率呈上升趋势<sup>[1]</sup>。然而, 目前临床上缺乏有效治疗CAVD的药物, 唯一有效的治疗方法主动脉瓣置换术也因为术中风险高、术后需终身抗凝以及可能需要再次手术等问题而不适合所有患者<sup>[2]</sup>。因此, 深入研究CAVD的发病机制具有重要的意义。

CAVD的病理进程涉及炎症浸润、细胞外基质重塑和瓣膜间质细胞(valve interstitial cells, VICs)的转分化<sup>[3]</sup>。VICs是主动脉瓣中最丰富的细胞类型, 目前研究认为, VICs的纤维化或者成骨样分化是瓣膜增厚并最终导致CAVD的重要过程<sup>[4]</sup>。因此, 抑制VICs的纤维化和成骨分化是治疗CAVD的关键步骤。

自噬 (autophagy)是一种通过降解长寿蛋白和功能冗余或受损的胞内细胞器实现细胞内稳态的进化保守过程, 其中涉及到一系列由自噬相关基因 (autophagy related gene, ATG)表达的蛋白, 如Atg5、Atg7、Atg10等<sup>[5]</sup>。研究表明, 自噬在细胞生长、细胞分化和发育、免疫反应、癌症、神经变性、感染和代谢综合征等多种生理病理过程中发挥重要作用<sup>[6-7]</sup>。最近, MIGUEL等<sup>[8]</sup>发现, 在病变主动脉瓣组织的钙化区 *BECN1*、*ATG3*、*ATG5*、*ATG7*、and *ATG12*等自噬相关基因表达上升, 而利用巴弗洛霉素抑制自噬后 VICs的细胞活力受到抑制, 这表

明, 自噬可能在CAVD中起保护作用, 然而自噬在CAVD中的具体作用尚未明确。此外, 在CAVD的研究中常用饥饿处理或雷帕霉素药物处理激活细胞自噬, 基于基因水平诱导自噬的方法较少, 因此本研究试图利用基因工程方法从基因水平调控细胞的自噬。Atg5又被称为APG5 (autophagy protein 5)、APG5L (autophagy 5 like protein)、ASP (apoptosis-specific protein)等, Atg5蛋白在自噬过程中参与ATG5-ATG10-ATG16L复合体形成, 进而招募LC3B形成完整的自噬小体。PYO等<sup>[9]</sup>利用转基因小鼠成功在小鼠体内证明, Atg5能上调自噬水平并延长小鼠的寿命, 然而, 过表达Atg5是否同样能在VICs中激活自噬尚不明确。因此, 本文通过分子克隆技术构建过表达Atg5的重组质粒探讨Atg5的过表达对VICs自噬水平的影响以及Atg5对VICs成骨分化能力的调控机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

空载质粒pAdTrack-TOX由本课题组保存; 限制性内切酶*BamH* I和*Hind* III购自赛默飞世尔科技公司; 实时定量PCR与半定量PCR试剂盒、高保真酶、逆转录酶和TRIZol均购自TaKaRa公司; 引物合成购自华大基因科技有限公司; I型胶原酶购自Sigma公司; M199培养基购自Hyclone公司; 胎牛血清购自美国Gibco公司;  $\beta$ -甘油磷酸、维生素C、茜素红、胰

蛋白酶购自北京索莱宝科技有限公司; Lipo2000购自美国Invitrogen公司; 兔抗人 $\alpha$ -SMA单克隆抗体购自美国Abcam公司; 兔抗人LC3B单克隆抗体、兔抗人p62单克隆抗体购自美国CST公司; 兔抗人OPN单克隆抗体、兔抗人Vimentin单克隆抗体和兔抗人ATG5抗体购自万类生物科技有限公司; 兔抗人Runx2抗体、鼠抗人vWF单克隆抗体购自SantaCruz公司; 抗 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)抗体及辣根过氧化物酶标记的羊抗兔和羊抗鼠IgG购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 蛋白质裂解液和Western blot检测相关试剂均购自碧云天生物技术有限公司; 聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜和化学发光试剂盒购自美国Millipore公司; DAPI、抗荧光猝灭剂购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 主动脉瓣膜间质细胞的分离与培养** 猪主动脉瓣分离自重庆市璧山区动物检疫定点屠宰场处死的家猪。主动脉瓣经无菌手术离体后用含青霉素/链霉素的PBS清洗, 然后放置于2 mg/mL的I型胶原酶中于37 °C孵育30 min, 随后取出用无菌棉签轻轻擦拭瓣膜表面以去除内皮细胞。用无菌手术剪将主动脉瓣剪成2 mm $\times$ 2 mm的小块组织, 再次置于胶原酶中37 °C孵育3~5 h, 每0.5 h振荡一次, 直至组织块消化成絮状, 随后经离心重悬种植于100 mm培养皿中。用含10%胎牛血清的M199培养基培养猪原代瓣膜间质细胞, 并添加1%青霉素/链霉素, 成骨诱导培养时普通培养基中补加10 mmol/L  $\beta$ -甘油磷酸钠、50  $\mu$ g/mL维生素C, 细胞培养箱条件为37 °C、5% CO<sub>2</sub>, 每48 h更换培养液。待细胞密度达到80%后传代。经鉴定明确的第3~8代细胞用于后续实验。

**1.2.2 重组质粒构建** 从猪主动脉瓣膜间质细胞的cDNA文库中扩增ATG5的基因全长, 所用上游引物为: 5'CGC GGA TCC ACC ATG ACA GAT GAC AAA GAT GTG CT3', 下游引物为: 5'CCC AAG CTT TCA ATC TGT TGG TTG CGG GA3'。克隆后的片段经DNA连接酶插入过表达质粒pAdTrack-TOX(卡那霉素抗性)的BamH I和Hind III酶切位点。重组质粒通过电转导入DH10B工程菌。使用含卡那霉素的琼脂糖平板筛选阳性克隆, 并经菌落PCR和双酶切鉴定进一步筛选阳性克隆, 最后经基因测序验证。

**1.2.3 质粒DNA转染** 细胞贴壁24 h后将

pAdTrack-TOX或空载质粒用Lipo2000试剂转染到瓣膜间质细胞中, 质粒与转染试剂的比例为1  $\mu$ g:1  $\mu$ L, 用DMEM双无培养基混匀。37 °C孵育30 min, 然后加入种植有VICs的培养皿中, 转染时间4~6 h。转染48 h后, 在荧光显微镜下观察。

**1.2.4 免疫荧光染色** 原代主动脉瓣膜间质细胞消化后重新铺于放有爬片的24孔板, 待细胞长到50%时弃去培养基, 经PBS清洗后用4%多聚甲醛固定30 min, 然后用0.5% Triton X-100处理20 min, 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>孵育15 min, 室温下山羊血清封闭30 min, 随后在爬片上覆盖 $\alpha$ -SMA、vimentin、vWF、LC3B抗体, 4 °C孵育过夜。第2天加入1:100稀释的荧光二抗, 室温避光孵育2 h, DAPI复染细胞核, 荧光显微镜下观察拍照。

**1.2.5 定量PCR检测VICs中ATG5的过表达** 转染过表达ATG5质粒24 h后收集主动脉瓣膜间质细胞, 按试剂说明书利用TRIzol法提取细胞的RNA, 两步法逆转录成cDNA后上样检测ATG5的表达水平, 上下游引物分别为5'TCG TCC TGT GGC TTC AGA TG3', 5'GCC ACT GCA AAG GTG TTT CC3', 实验重复3次, BioRad CFX Manager软件统计分析表达量。

**1.2.6 Western Blot** 利用蛋白裂解液提取主动脉瓣膜间质细胞总蛋白质后, 加入蛋白质上样缓冲液后沸水煮10 min。15% SDS-PAGE分离蛋白质, 湿转至PVDF膜, 5%牛血清白蛋白37 °C封闭2 h, 一抗4 °C孵育过夜, 二抗37 °C孵育1 h, 美国Bio-Rad公司成像仪显影, Image-lab软件计算各泳带灰度值, 并与内参 $\beta$ -actin的灰度值比较, 得出各蛋白质的表达水平, 实验重复3次。

**1.2.7 ALP染色** 24孔板中VICs成骨培养基培养7天后, 弃去培养基, PBS清洗3次, 4 °C 100%乙醇固定1 h, 每孔加入NBT/BCIP溶液200  $\mu$ L后避光30 min, 观察染色结果并拍照。

**1.2.8 茜素红染色** 24孔板中VICs成骨培养基培养14天后, 弃去培养基, PBS清洗3次, 4%多聚甲醛室温固定30 min, 每孔加入200  $\mu$ L 0.4%茜素红S染液, 镜下观察红色结节出现后自来水终止染色。

**1.2.9 统计学处理** 采用GraphPad Prism 5软件对实验数据进行统计分析。计量资料用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示。采用t检验进行两组间比较, 多组间比较采用单因素方差分析。P<0.05为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 猪VICs的表型鉴定

猪VICs成功贴壁后, 通过细胞免疫荧光进行表型鉴定。结果显示, 间质细胞特异性标志物 $\alpha$ -SMA和vimentin表达阳性, 而内皮细胞特异性标志物vWF表达阴性(图1), 猪VICs分离成功。

### 2.2 细胞自噬水平在成骨分化的VICs中低于正常VICs

转录因子Runx2(runt related transcription factor 2)和骨桥蛋白(osteopontin, OPN)是VICs成骨分化过程中的特异性蛋白标志物, 是检测细胞成骨分化水平的重要指标。LC3B(microtubule associated protein 1 light chain 3 beta, MAP1LC3B)从可溶性形式(LC3B-I)向成熟型(LC3B-II)的转化和P62蛋白(也被称为sequestosome, SQSTM1)的降解是自噬激活增加的重要标志物<sup>[10-12]</sup>。Western blot结果显示, 经成骨培养基培养的VICs(OM组) Runx2蛋白表达

水平在第1天高于正常培养基培养的VICs(CM组)( $P<0.01$ ), OPN和p62的蛋白表达水平在第3天高于CM组( $P<0.05$ ), II型LC3B与I型LC3B的比值在第1天和第3天均低于CM组( $P<0.001$ )(图2A和图2B), 这提示成骨分化的瓣膜间质细胞自噬水平呈下降趋势。

### 2.3 重组质粒pAdTrack-ATG5的构建

我们将ATG5基因全长序列插入质粒pAdTrack-TOX的BamH I和Hind III位点, 经菌落PCR(图3A)我们挑选2号质粒进行双酶切验证(图3B), b泳道显示重组质粒经双酶切后可见一826 bp的条带(a为2号原质粒)。基因测序结果证明, 重组质粒pAdTrack-ATG5构建成功。利用Lipo2000试剂将重组质粒pAdTrack-ATG5转染VICs, 荧光显微镜观察, 结果显示, 带有绿色荧光标记蛋白的质粒成功转入细胞(图3C)。

### 2.4 过表达ATG5上调VICs自噬水平

Q-PCR结果(图4A)显示, 转染4  $\mu$ g和8  $\mu$ g重组

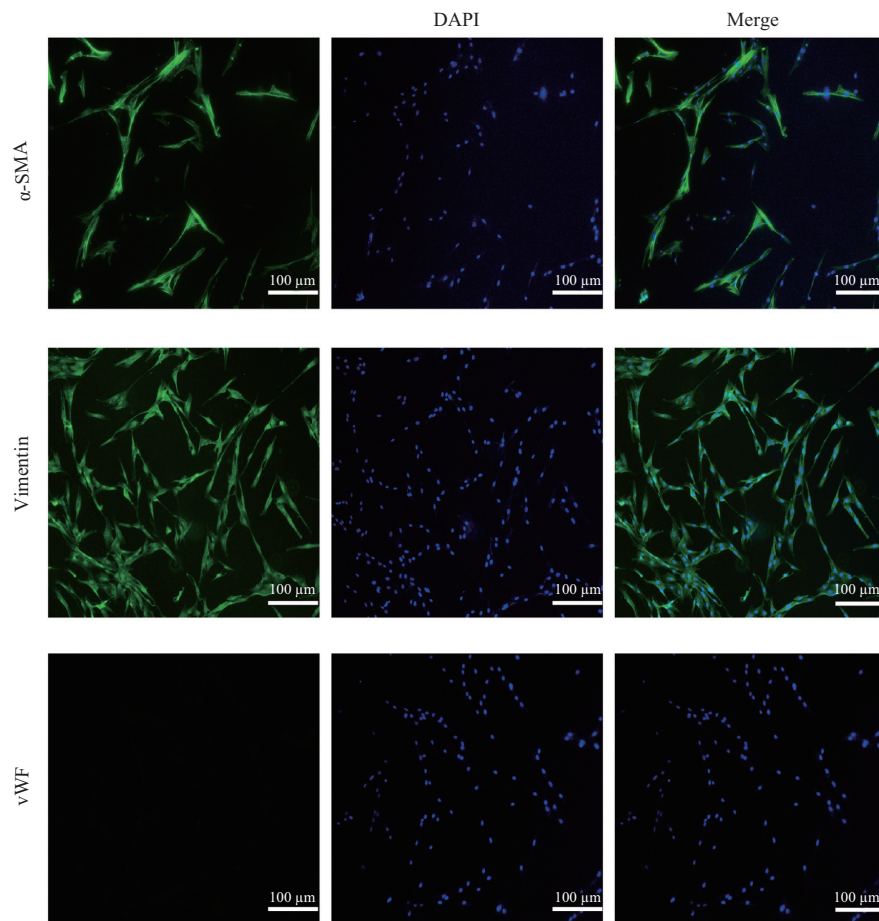
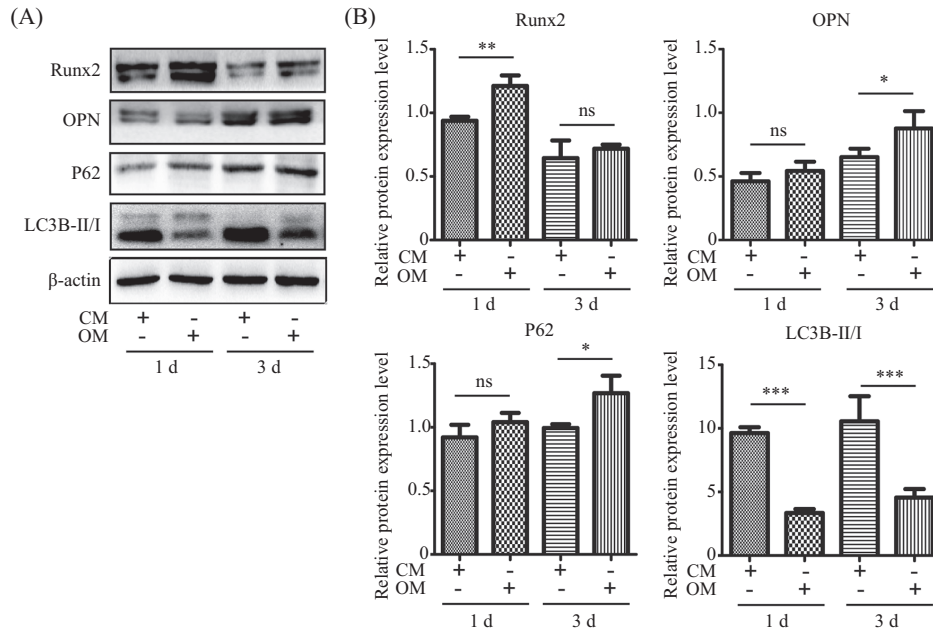


图1 猪主动脉瓣膜间质细胞的表型鉴定

Fig.1 Phenotypic identification of porcine aortic valve interstitial cells

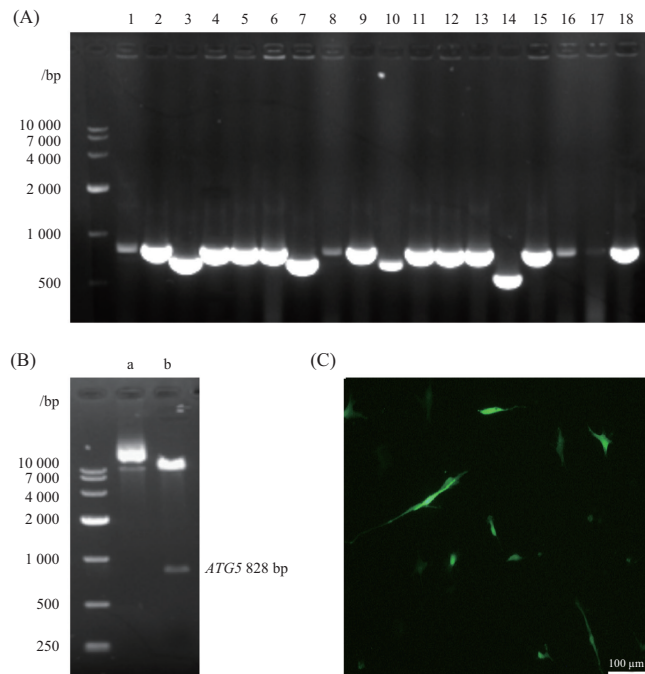


A: Western blot检测成骨培养基培养的瓣膜间质细胞Runx2、OPN、p62、LC3B-II/I蛋白表达水平的变化; B: 对结果A的条带进行灰度值分析。 $n=3$ ; \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ ; ns: 无统计学意义。

A: protein expression levels of Runx2, OPN, p62, LC3B-II/I were measured by Western blot; B: quantitation of Western blot shown in A.  $n=3$ ; \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ ; ns shown no statistical significance.

图2 自噬水平在瓣膜钙化模型中的检测

Fig.2 Detection of autophagic level in valve interstitial cells



A: 琼脂糖凝胶电泳检测菌落PCR产物, 1~18为挑选的单克隆菌落; B: 琼脂糖凝胶电泳检测质粒pAdTrack-ATG5经*Bam*H I and *Hind* III双酶切后产物, 条带大小如图所示, a为2号单克隆菌落提取的质粒, b为a质粒经双酶切后产物; C: 荧光显微镜检测转染质粒pAdTrack-ATG5 24 h后VICs荧光强度。

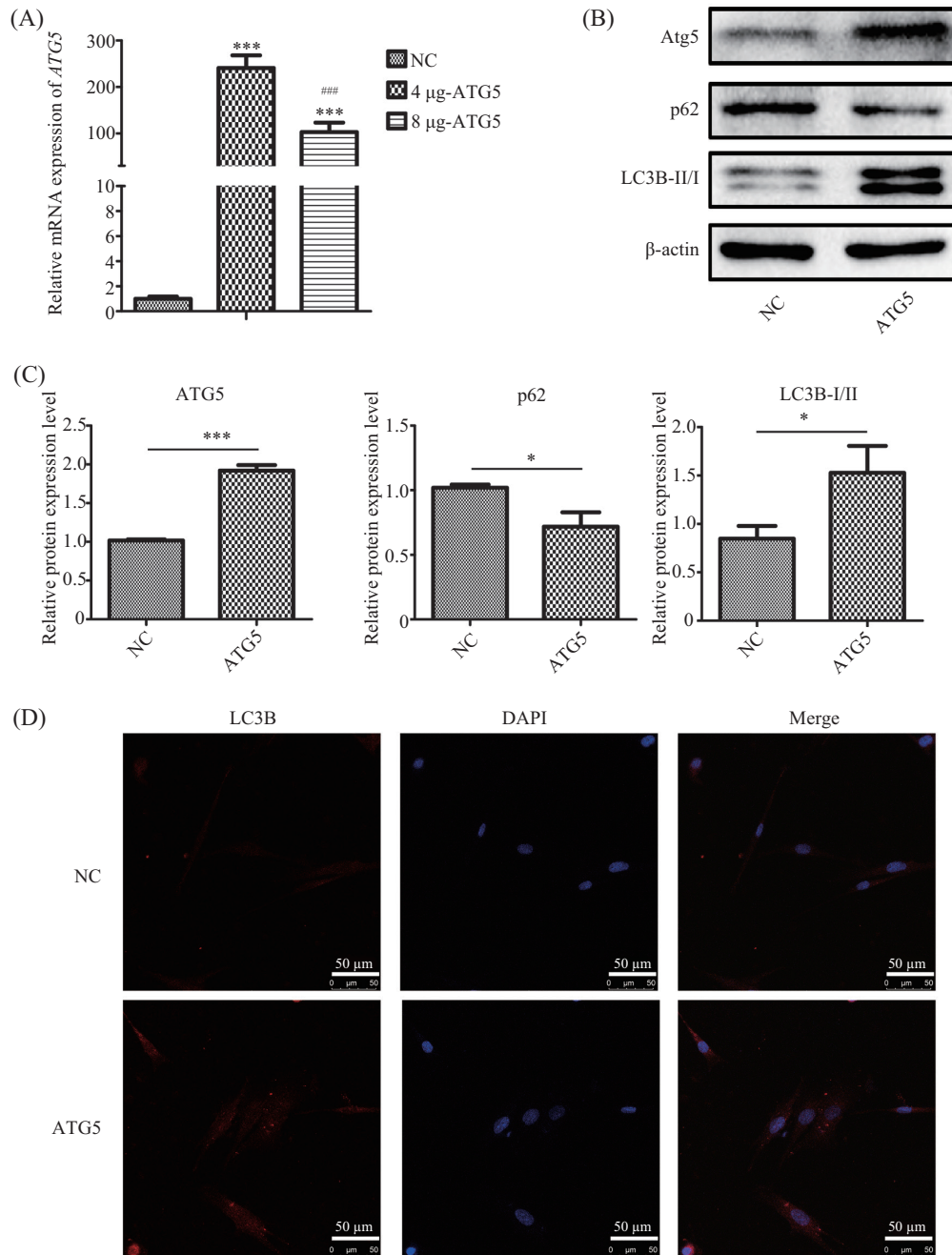
A: agarose gel electrophoresis of colony PCR, 1-18 are selected monoclonal colonies; B: agarose gel electrophoresis of pAdTrack-ATG5 after digesting with *Bam*H I and *Hind* III. Molecular marker sizes are shown. a shown the plasmid derived from No.2 monoclonal colony, b shown the plasmid after double enzyme digesting; C: photomicrograph of VICs after transfecting with pAdTrack-ATG5 for 24 h using fluorescence microscopy.

图3 质粒pAdTrack-ATG5的构建及鉴定

Fig.3 Construction and identification of the plasmid pAdTrack-ATG5

质粒pAdTrack-ATG5 24 h后, 瓣膜间质细胞*ATG5*的 mRNA表达水平显著高于NC组( $P<0.001$ ,  $P<0.001$ ), 转染4  $\mu\text{g}$ 重组质粒后VICs的mRNA水平高于8  $\mu\text{g}$ 组( $P<0.001$ )。Western blot结果(图4B和图4C)显示, 在转染48 h后, 过表达Atg5组中Atg5的蛋白表达水平

显著高于NC组( $P<0.001$ ), II型LC3B与I型LC3B的比值也显著高于NC组( $P<0.05$ ), p62的蛋白表达水平则显著低于NC组( $P<0.05$ )。免疫荧光结果(图4D)也先表明, 过表达Atg5后LC3B的聚集增多, 以上结果显示, 过表达Atg5蛋白能显著上调细胞自噬水平。

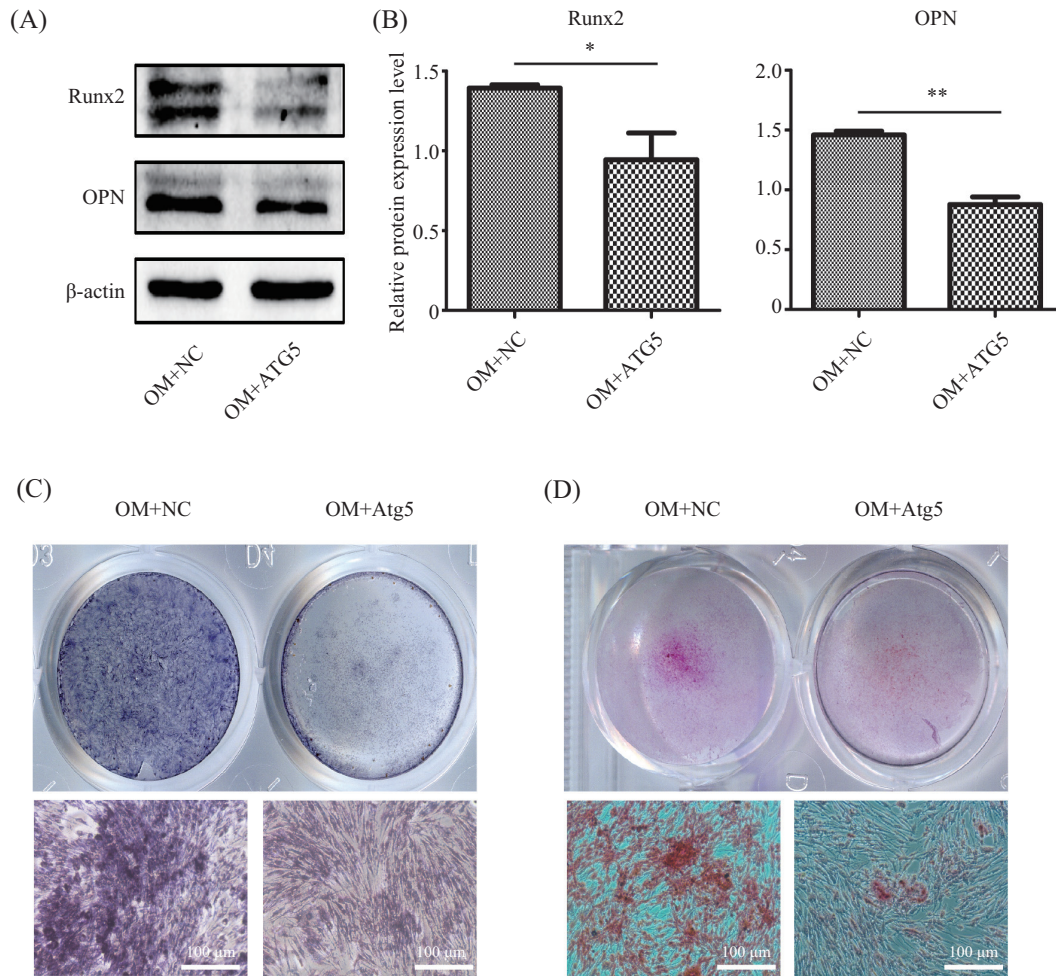


A: Q-PCR检测转染质粒24 h后*ATG5*在VICs中的mRNA表达水平; B: Western blot 检测转染质粒48 h后VICs的Atg5、p62、LC3B-I/II蛋白表达水平; C: 对结果B的条带进行灰度值分析; D: 免疫荧光染色检测转染质粒48 h后VICs的LC3B表达。n=3; \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ , 与NC组相比; #### $P<0.001$ , 与4  $\mu\text{g}$ -ATG5组相比。

A: mRNA expression levels of *ATG5* were measured by Q-PCR; B: protein expression levels of ATG5, p62, LC3B-I/II were measured by Western blot; C: quantitation of Western blot shown in B; D: immunofluorescence of LC3B in pVICs after overexpressing ATG5. n=3; \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$  vs NC group; #### $P<0.001$  vs 4  $\mu\text{g}$ -ATG5 group.

图4 Atg5的过表达验证

Fig.4 Demonstration of overexpression of Atg5



A: Western blot检测细胞Runx2、OPN的蛋白表达水平; B: 对结果A的条带进行灰度值分析; C: 碱性磷酸酶染色检测成骨培养基培养的VICs在7天后的碱性磷酸酶表达情况; D: 茜素红染色检测细胞在14天后的钙盐沉积情况。n=3; \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , 与OM+NC组相比。

A: protein expression levels of Runx2, OPN were measured by Western blot; B: quantitation of Western blot shown in A; C: photomicrograph of ALP staining after 7-days; D: alizarin red S staining after 14-days. n=3; \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs OM+NC group.

图5 Atg5对VICs成骨样分化的影响

Fig.5 The effect of Atg5 on the osteogenic differentiation abilities of the VICs

## 2.5 过表达Atg5抑制VICs成骨样分化

使用成骨培养基诱导瓣膜间质细胞成骨分化72 h后, 过表达Atg5组(OM+Atg5组)成骨相关指标Runx2、OPN蛋白表达水平显著低于对照组(OM+NC组)( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )(图5A和图5B)。碱性磷酸酶染色结果显示, OM+Atg5组细胞的碱性磷酸酶含量少于OM+NC组, 茜素红S染色结果同样显示, 与OM+NC组相比, OM+Atg5组瓣膜间质细胞的钙盐沉积显著减少(图5C和图5D), 这提示过表达Atg5能抑制VICs的成骨样分化。

## 3 讨论

年龄增长是钙化性主动脉瓣疾病的重要危险因素<sup>[13]</sup>, 随着我国老龄人口的增长, CAVD的发病人数也

将会不断上升。CAVD的发生会导致主动脉瓣狭窄以及关闭不全, 进而引起左室流出道功能受损, 最终导致心衰的发生。CAVD的病理过程包括主动脉瓣的炎症浸润、纤维增厚以及成骨样改变<sup>[14-15]</sup>。虽然CAVD在炎症浸润以及脂质沉积方面与动脉粥样硬化有相似之处, 但是动脉粥样硬化的有效治疗药物(他汀类降胆固醇药)并不能抑制CAVD的进展<sup>[16-17]</sup>。目前临床上治疗CAVD的有效方法为主动脉瓣置换术, 然而CAVD患者大多为老年人, 许多患者的身体状况不允许接受手术治疗, 此外, 即使成功接受了换瓣手术, 患者仍然存在需要终生抗凝甚至二次手术的问题<sup>[18]</sup>。

自噬是进化上高度保守的自我消化过程, 广泛存在于人体各种细胞。自噬在包括动脉粥样硬化在

内的不同疾病中被认为是一种细胞保护机制<sup>[19-20]</sup>。最近, 自噬也被认为与血管钙化有关, 特别是作为一种保护血管平滑肌细胞免受高磷血症的机制<sup>[21]</sup>。然而随着年龄的增长, 人体内自噬水平呈下降趋势<sup>[22]</sup>。有趣的是, CAVD的发病人群多为老年人, 然而自噬在CAVD中的作用尚不明确。由于人主动脉瓣的来源有限, 我们采用与人结构相似的猪主动脉瓣进行实验。本研究利用成骨培养基诱导猪VICs成骨分化发现, 与CM组相比, OM组VICs的早期成骨指标Runx2的表达水平在第1天显著上升, 晚期成骨指标OPN则在第3天显著升高。在肝星状细胞系中, OPN基因的启动子上含有Runx2的直接结合序列, Runx2通过结合该序列发挥调控OPN表达的作用<sup>[23]</sup>, 在本文中, OPN的上升时间晚于Runx2, 表明OPN的表达可能受Runx2的调控。同时自噬标志物LC3B-II则在第1天和第3天均显著减少, 而受自噬降解的p62蛋白水平上升, 这表明, 在诱导VICs钙化的过程中细胞的自噬水平呈下降趋势。相似的是, DENG等<sup>[24]</sup>的研究发现, 分离自正常主动脉瓣膜组织的VICs细胞自噬水平显著高于分离自钙化组织的VICs。自噬小体与溶酶体结合是自噬的最终过程, 在该过程中LC3B-II会随着自噬小体一同被降解。我们发现, 随着培养时间的延长, 第3天OM组的LC3B-II蛋白水平显著高于第1天的OM组( $P < 0.05$ ), 这可能与细胞自噬小体降解受阻有关。自噬小体的形成依赖Atg5参与ATG5-ATG10-ATG16L复合体的形成, 本研究首次利用重组质粒pAdTrack-ATG5成功在瓣膜间质细胞内成功过表达Atg5。Western blot结果显示, 过表达Atg5能显著提高细胞LC3B-II/LC3B-I的比值, 而p62的蛋白水平显著减少。同时, 免疫荧光结果也显示, 过表达ATG5后LC3B的聚集增加。这些结果表明, 过表达Atg5能促进细胞发生自噬。此外, 在成骨培养基诱导VICs成骨分化的同时过表达Atg5, Western blot结果证明, Atg5的过表达能显著抑制VICs成骨指标Runx2和OPN的表达, 同时, 碱性磷酸酶染色和茜素红染色结果同样证明, Atg5过表达能抑制VICs的成骨分化能力。目前认为, CAVD的发生形式主要有两种: 营养不良性钙化与成骨样分化<sup>[25-27]</sup>。本研究发现, Atg5上调细胞自噬水平能抑制VICs的成骨分化能力, 然而Atg5对VICs细胞活性的影响还有待研究。

综上所述, 本研究成功构建了过表达Atg5的重组质粒, 并证实了Atg5的过表达能显著上调VICs的

细胞自噬水平, 并能减少瓣膜间质细胞成骨关键蛋白Runx2和p62的表达, 进而有效地抑制VICs的成骨分化能力, 为研究CAVD提供了新的方法。

### 参考文献 (References)

- [1] EMELIA J, PAUL M, ALVARO A, et al. Heart disease and stroke statistics-2013 update: a report from the American Heart Association [J]. *Circulation*, 2013, 127(1): e6-245.
- [2] JOSHUA D, HUTCHESON, Elena A, et al. Potential drug targets for calcific aortic valve disease [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2014, 11(4): 218-31.
- [3] HINTON R, YUTZEY K. Heart valve structure and function in development and disease [J]. *Annu Rev Physiol*, 2011, 73: 29-46.
- [4] YUTZEY K, DEMER L, BODY S, et al. Calcific aortic valve disease: a consensus summary from the alliance of investigators on calcific aortic valve disease [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, 34(11): 2387-93.
- [5] DORIA A, GATTO M, PUNZI L. Autophagy in human health and disease [J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(19): 1845-6.
- [6] MAGNE J, GUSTAFSSON P, JIN H, et al. ATG16L1 expression in carotid atherosclerotic plaques is associated with plaque vulnerability [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015, 35(5): 1226-35.
- [7] RABINOWITZ J, WHITE E. Autophagy and metabolism [J]. *Science*, 2010, 330: 1344-8.
- [8] MIGUEL C, OSCAR P, PETER S, et al. Upregulated autophagy in calcific aortic valve stenosis confers protection of valvular interstitial cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(6): 1486-94.
- [9] PYO J, YOO S, Ahn HH, et al. Overexpression of Atg5 in mice activates autophagy and extends lifespan [J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 2300-9.
- [10] YAN Q, LI B, YUAN Y, et al. Autophagy activation is associated with neuroprotection in diabetes-associated cognitive decline [J]. *Aging and Disease*, 2019, 10(6): 1233-45.
- [11] XIE Y, KANG R, SUN X, et al. Posttranslational modification of autophagy-related proteins in macroautophagy [J]. *Autophagy*, 2015, 11(1): 28-45.
- [12] TUNG Y, WANG B, HU M, et al. Autophagy: a double-edged sword in Alzheimer's disease [J]. *J Biosciences*, 2012, 37(1): 157-65.
- [13] AKINSEYE O, PATHAK A, IBEBUOGU U. Aortic valve regurgitation: a comprehensive review [J]. *Curr Prob Cardiol*, 2018, 43(8): 315-34.
- [14] SIDER K, BLASER M, SIMMONS C. Animal models of calcific aortic valve disease [J]. *Int J Inflam*, 2011, 2011: 364-70.
- [15] DWECK M, BOON N, NEWBY D. Calcific aortic stenosis: a disease of the valve and the myocardium [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2012, 60(19): 1854-63.
- [16] DWECK M, KHAW H, SNG G, et al. Aortic stenosis, atherosclerosis, and skeletal bone: is there a common link with calcification and inflammation [J]? *Eur Heart J*, 2013, 34(21): 1567-74.
- [17] ROSSEBO A, PEDERSEN T, BOMAN K, et al. Intensive lipid lowering with simvastatin and ezetimibe in aortic stenosis [J]. *N Engl J Med*, 2008, 359(13): 1343-56.
- [18] LI C, XU S, GOTLIEB A. The progression of calcific aortic valvedisease through injury, cell dysfunction, and disruptive bio-



- logic and physical force feedback loops [J]. *Cardiovasc Pathol*, 2013, 22(1): 1-8.
- [19] CLEMENT M, RAFFORT J, LAREYRE F et al. Impaired autophagy in CD11b dendritic cells expands CD4 regulatory T cells and limits atherosclerosis in mice [J]. *Circ Res*, 2019, 125(11): 1019-34.
- [20] MARTINET W, MEYER G. Autophagy in atherosclerosis: A cell survival and death phenomenon with therapeutic potential [J]. *Circ Res*, 2009, 104(3): 304-17.
- [21] DAI X, ZHAO M, CAI Y, et al. Phosphate-induced autophagy counteracts vascular calcification by reducing matrix vesicle release [J]. *Kidney Int*, 2013, 83(6): 1042-51.
- [22] MURPHY K, BAGGETT B, COOPER L, et al. Enhancing autophagy diminishes aberrant Ca homeostasis and arrhythmogenesis in aging rabbit hearts[J]. *Front Physiol*, 2019, 10: 1277-90.
- [23] 王睿, 萧笑, 王红红, 等. TGF- $\beta$ 1通过RUNX2调控人肝星状细胞系LX-2中骨桥蛋白表达[J]. 现代生物医学进展(WANG R, XIAO X, WANG H H, et al. TGF- $\beta$ 1 regulates osteopontin expression in human hepatic stellate cell line LX-2 through RUNX2 signaling [J]. *Progress in Modern Biomedicine*), 2013, 13(35): 6801-5.
- [24] DENG X, MENG X, VENARDOS N, et al. Autophagy negatively regulates pro-osteogenic activity in human aortic valve interstitial cells [J]. *J Surg Res*, 2017, 218: 285-91.
- [25] CHEN J, RYZHOVA L, SEWELL-LOFTIN M, et al. Notch1 mutation leads to valvular calcification through enhanced myofibroblast mechanotransduction [J]. *ATVB*, 2017, 35(7): 1597-605.
- [26] CHEN J, SIMMONS C. Cell-matrix interactions in the pathobiology of calcific aortic valve disease: critical roles for matricellular, matricrine, and matrix mechanics cues [J]. *Circ Res*, 2011, 108(12): 1510-24.
- [27] BENTON J, KERN H, LEINWAND L, et al. Statins block calcific nodule formation of valvular interstitial cells by inhibiting alpha-smooth muscle actin expression [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29(11): 1950-7.