DOI:10.16016/j.1000-5404.202001152

LPS 诱导主动脉瓣膜间质细胞成骨分化的作用及机制研究

冯 昊[1],施 琼[2],蒋迎九[1] 400016 重庆,重庆医科大学:附属第一医院胸心外科[1],检验医学院[2]

[摘要] **目的** 探讨转化生长因子-β1(transforming growth factor-β,TGF-β1)、细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases,ERK)在脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)诱导猪主动脉瓣膜间质细胞(porcine aortic valve interstitial cells,PVICs)成骨分化过程中的作用与机制。**方法** 体外分离并培养 PVICs。应用 LPS 诱导 PVICs 成骨分化,ALP 染色和茜素红 S 染色检测细胞成骨分化能力;RT-qPCR 法检测细胞成骨相关基因及蛋白 Runt 相关转录因子 2(runt-related transcription factor 2,Runx2)、骨桥蛋白(osteopontin,OPN)和骨钙蛋白(osteocalcin,OCN)的转录水平。Western blot 法检测 TGF-β1、TGF-βR、Bax、Smad2/3 和 ERK1/2 的蛋白表达水平。同时应用 ERK 特异性抑制剂 PD98059 处理,观察 ERK、Bax、Runx2 蛋白表达水平。**结果** ①LPS(4 μg/mL)处理可以使 PVICs 的碱性磷酸酶活性明显升高,钙盐沉积明显增强。②RT-qPCR 检测结果显示:LPS(4 μg/mL)处理后可以明显上调 Runx2、OPN 和 OCN 的 mRNA 转录水平($P<0.01$)。③Western blot 检测结果显示:LPS(4 μg/mL)处理后 TGF-β1、TGF-βR、Smad2/3 及 ERK1/2 蛋白水平显著升高($P<0.05$);ERK 特异性抑制剂 PD98059 可以减弱 LPS 对 ERK、Bax、Runx2 的促表达作用($P<0.05$)。**结论** LPS 可能通过激活 TGF-β1/Smads 和 ERK 信号通路诱导主动脉瓣膜间质细胞成骨分化。

[关键词] 钙化性主动脉瓣膜病;瓣膜间质细胞;成骨分化;转化生长因子-β1;细胞外调节蛋白激酶
[中图法分类号] R322.121; R329.21; R329.24 [文献标志码] A

Role of transforming growth factor-β and extracellular regulated protein kinases in lipopolysaccharide-induced osteoblastic differentiation of porcine aortic valve interstitial cells

FENG Hao[1], SHI Qiong[2], JIANG Yingjiu[1] [1]Department of Cardiothoracic Surgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University; [2]College of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the role of transforming growth factor-β (TGF-β1) and extracellular regulated protein kinases (ERK) in lipopolysaccharide (LPS)-induced osteoblastic differentiation of porcine aortic valve interstitial cells (PVICs). **Methods** *In vitro* cultured PVICs were treated with LPS (4 μg/mL) to induce their osteogenic differentiation, and early and late osteogenic differentiation abilities of the cells were assessed using alkaline phosphatase (ALP) staining and Alizarin red S staining. The expression levels of Runx2, OPN and OCN mRNAs in the cells were detected using RT-qPCR, and those of TGF-β1, TGF-βR, Bax, Smad2/3 and ERK1/2 proteins were determined using Western blotting. **Results** In cultured PVICs, LPS treatment significantly increased alkaline phosphatase activity, deposition of calcium salts, and the expression levels of Runx2, OPN and OCN mRNA ($P<0.01$). In addition to the increase of the expression of osteoblastic differentiation markers, the protein expression of TGF-β1, TGF-βR, Smad2/3 and ERK1/2 were also significantly increased in LPS-treated PVICs ($P<0.05$); treatment with PD98059, a specific ERK1/2 inhibitor, significantly abolished LPS-induced increase in the protein expression of ERK1/2, Bax, and Runx2 ($P<0.05$). **Conclusion** LPS induces osteoblastic differentiation of PVICs probably by activating TGF-β1/Smads and ERK signaling pathways.

[通信作者] 蒋迎九, E-mail: jiangyinjiu@aliyun.com

[**Key words**] calcific aortic valve disease; valve interstitial cells; osteogenic differentiation; transforming growth factor-β1; extracellular regulated protein kinases

Comesponding author: JIANG Yingjiu, E-mail: jiangyinjiu@aliyun.com

钙化性主动脉瓣膜疾病(Calcific aortic valve disease, CAVD)是一种退行性心脏瓣膜疾病,该病已经成为仅次于冠心病和高血压的第三大心血管疾病。瓣膜退行性变引起主动脉瓣狭窄是 CAVD 发病的主要原因,现在尚没有有效的药物进行治疗与预防,对主动脉瓣狭窄仍主要依赖于外科换瓣手术[1-2],加强主动脉瓣钙化及其机制的研究一直是临床与基础研究的主要热点。

早期研究认为瓣膜钙化是钙盐被动沉积的结果[3],然而随着研究不断深入,人们逐渐认识到 CAVD 是一个涉及慢性炎症、内皮损伤、基质重塑、新生血管形成及进展性钙化等复杂变化的主动过程[4-5],炎症性浸润与主动脉瓣组织中的成骨化生变化密切相关[4],并且在主动脉钙化中起重要作用。

主动脉瓣膜钙化过程中显示有主动脉瓣膜间质细胞(VICs)向肌成纤维细胞分化并继发弥漫性钙化或成骨样分化,且伴有大量凋亡小泡的形成。有研究显示在钙化的主动脉瓣膜中不但有 TGF-β1(transforming growth factor-β1)表达显著升高[6],并且外源性 TGF-β1 也可以诱导 VICs 中骨钙蛋白(OCN)、骨桥蛋白(OPN)、骨唾液蛋白等骨基质蛋白的表达升高[6-7]。ERK(extracellular regulated protein kinases)作为传递丝裂原信号的信号转导蛋白,是细胞外调节蛋白激酶,包括 ERK1 和 ERK2。其可以将信号从细胞表面受体传导至细胞核;在 VICs 中受到炎症刺激后 ERK 信号通路激活倾向于正向调节细胞的成骨分化作用[8-10]。

我们采用 LPS 诱导猪主动脉瓣膜间质细胞(PVICs)的钙化模型,观察 TGF-β1 及 ERK 在 LPS 诱导主动脉瓣膜间质细胞钙化过程中的表达及其意义,从而初步探讨 TGF-β1、ERK 在 LPS 诱导主动脉瓣膜间质细胞钙化过程中的可能机制,以期为临床治疗 CAVD 的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 猪主动脉瓣膜间质细胞 猪主动脉瓣膜获自重庆市璧山区动物检疫定点屠宰场,现场获取 8 头 8~10 月龄雌雄不限的健康家猪,体质量 100~120 kg。处死后,30 min 内于无菌条件取下健康的主动脉瓣叶,立即保存在 4 ℃的新鲜培养基中(M199),50 min 内带回实验室进行下步操作。

1.1.2 主要试剂 脂多糖(LPS)、茜素红、Ⅱ型胶原酶(美国 Sigma)、M199 培养基(Hyclone)、澳洲优级胎牛血清(CellMax);兔抗人 T-Smad2/3、TGF-β1、OPN(沈阳万类);兔抗人 Runx2(SantaCruz);兔抗人 p-Smad2/3、TGF-β1R、Bax(北京博奥森);兔抗人 p-ERK(1/2)(CST);鼠抗人 GAPDH(武汉三鹰);辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠/兔 IgG 试剂盒(北京中杉金桥);聚偏二氟乙烯(PVDF)膜、化学发光试剂盒(Millipore);Trizol 试剂、反转录试剂盒(TaKaRa)、qPCR 引物由深圳华大基因公司合成。碱性磷酸酶(ALP)染色试剂盒(碧云天生物科技)。

1.2 方法

1.2.1 主动脉瓣膜间质细胞的分离、培养 取出瓣膜,PBS 清洗后无菌棉签刮除瓣膜表面内皮细胞,剪碎后转入Ⅱ型胶原酶中消化,后加入新鲜 M199 培养基(含 1%双抗和 10%优级胎牛血清)重悬,铺于培养皿中使其贴壁,细胞生长融合至约 80%密度时传代。后续实验选用经鉴定明确的第 3~6 代主动脉瓣膜间质细胞[11]。

1.2.2 LPS 诱导 PVICs 成骨分化及实验分组 取对数生长期的瓣膜间质细胞置于标准培养基中进行培养,待细胞密度至 30%~50%时加入 4 μg/mL LPS 处理,诱导细胞成骨分化。实验分组如下:对照组以常规培养基处理;实验组分别加入 4 μg/mL 的 LPS 分别持续刺激 0、24、48 h,检测 LPS 对瓣膜间质细胞成骨分化诱导效果。

1.2.3 qPCR 检测 Runx2,OPN OCN mRNA 表达

Trizol 法提取细胞总 RNA,两步法反转录成 cDNA 后进行 qPCR 扩增。引物设计与合成:Runx2 上游引物:5′-GCACTACCCAGCCACCTTTA-3′;下游引物:5′-TATGGAGTGCTGCTGGTCTG-3′;OPN 上游引物:5′-GAGCAAACAGACGATGTGGA-3′;下游引物:5′-GACCAGCTCATCGGATTCAT-3′;OCN 上游引物:5′-TCACACTGCTTGCCCTACTG-3′;下游引物:5′-CTA-TGCCATAGAAGCGCCGA-3′;内参 GAPDH 上游引物:5′-GGTGAAGGTCGGAGTGAACG-3′;下游引物:5′-CGTTCACTCCGACCTTCACC-3′。以 GAPDH 为内参,Q-PCR 体系为 10 μL,反应条件:95 ℃预变性 10 min,95 ℃变性 20 s,55 ℃退火 10 s,70 ℃延伸 1 s,循环 36 次,最后 PCR 扩增检测 OPN,Runx2 mRNA 水平表达,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法统计分析相对表达量,实验重复 3 次。

1.2.4　Western blot 检测 Runx2,OPN,TGF-β1 等相关蛋白表达　　提取细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。以 250 μg 为标准计算蛋白上样体积。10% SDS-PAGE 电泳,蛋白湿转至 PVDF 膜,封闭,加入一抗(稀释比例 Runx2:1∶500,OPN:1∶500,α-SMA:1∶1 000,GAPDH:1∶1 000),4 ℃过夜;孵育二抗,显影,ImageLab 软件计算出各电泳条带的灰度值,GAPDH 作为内参对照,以目的蛋白条带灰度值比对内参条带灰度值代表目的蛋白的表达水平,实验重复 3 次。

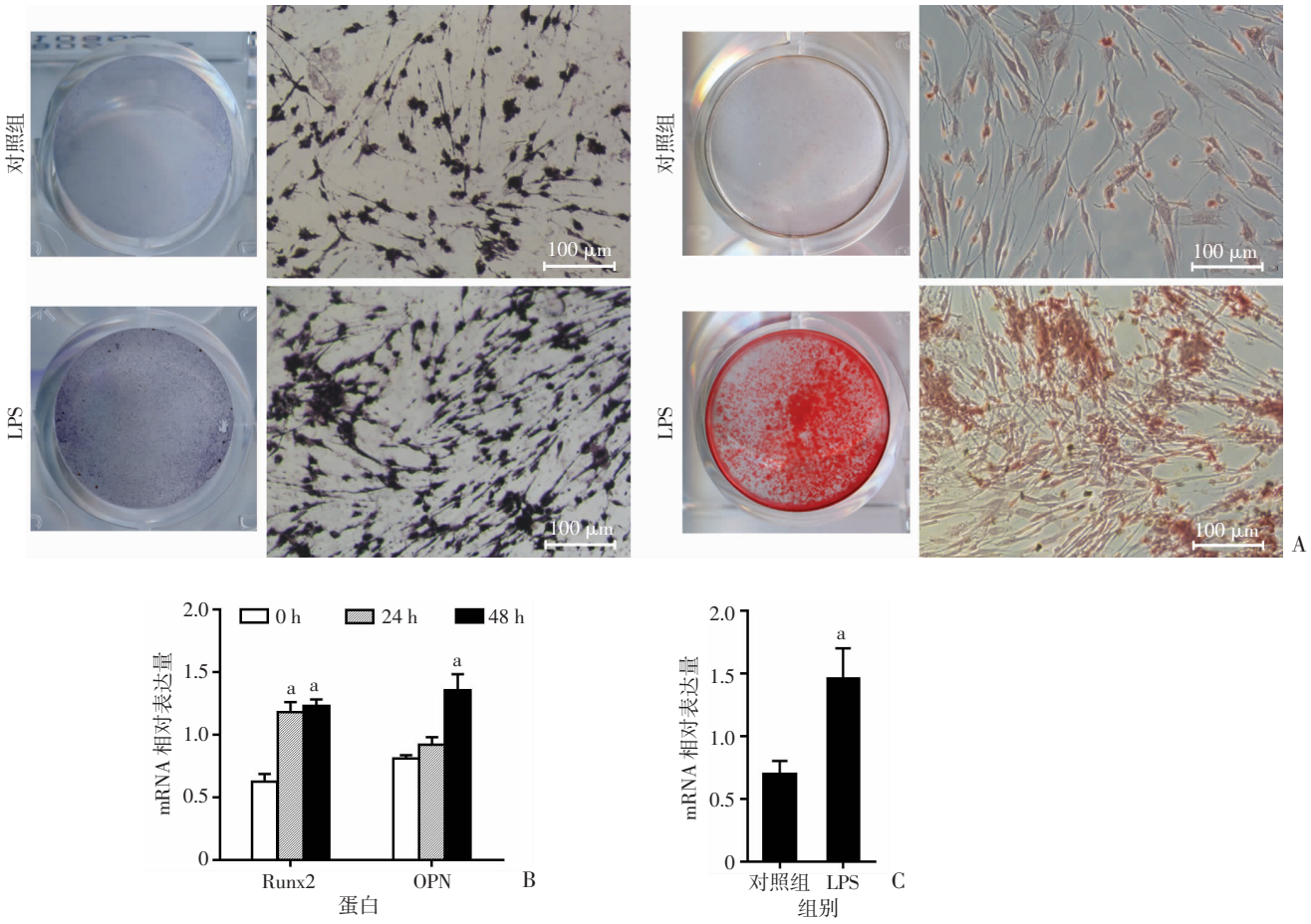
1.2.5　ALP 染色检测瓣膜间质细胞碱性磷酸酶活性　　取对数期生长的细胞种植于 24 孔板,融合至 30%密度时加入不同处理;5%血清常规培养基培养 7 d,PBS 清洗,200 μLNBT/BCIP 工作液染色,双蒸水终止反应,观察染色结果,室温晾干、拍照。

1.2.6　茜素红 S 染色检测瓣膜间质细胞钙盐沉积　　取对数期生长的瓣膜间质细胞种植于 24 孔板,融合至 20%密度时加处理;2%血清常规培养基继续培养 14 d,PBS 清洗,加入 0.4%的茜素红染液,显微镜下观察,待出现红色颗粒物质时,吸弃染色液后清洗,显微镜下观察、拍照。

1.3　统计学分析　　采用 SPSS20.0 统计软件对实验数据进行单因素方差(ANOVA)分析,所有实验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,各组之间差异的两两比较用 LSD-t 检验。

2　结果

2.1　LPS 对 PVICs 成骨分化的影响　　4 μg/mL LPS 诱导 PVICs 成骨分化 7 d,与空白对照组相比,LPS 组碱性磷酸酶活性显著升高;诱导 PVICs 成骨分化 14 d,与空白对照组相比,LPS 组见明显钙盐沉积(图 1A);qPCR 检测结果显示:LPS 浓度为 4 μg/mL 时,成骨相关基因 Runx2 和 OPN 的表达水平较空白对照组显著升高($P<0.001$,图 1B);4 μg/mL LPS 诱导 PVICs 成骨分化 7 d,晚期成骨相关基因 OCN 的表达水平较空白对照组亦显著升高($P<0.01$,图 1C)。

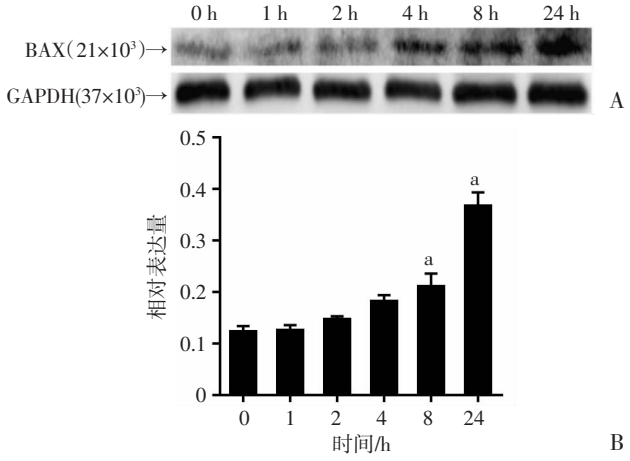


A:碱性磷酸酶染色及茜素红 S 染色检测 PVICs 早期和晚期成骨分化能力(×100);B:qPCR 检测 Runx2、OPN 表达($n=3$, $\bar{x}\pm s$) a:$P<0.001$,与 0 h 比较;C:qPCR 检测 OCN 表达($n=3$, $\bar{x}\pm s$) a:$P<0.01$,与对照组比较

图 1　LPS 对 PVICs 成骨分化的影响

2.2 LPS 对 PVICs 凋亡水平的影响

4 μg/mL LPS 诱导 PVICs 成骨分化,检测 PVICs 凋亡水平,Western blot 结果显示:与 0 h 相比,在诱导 8 h 细胞凋亡标志性蛋白 Bax 表达水平升高,诱导 24 h Bax 表达水平升高显著($P<0.05$,图 2)。



A:Western blot 检测 Bax 表达;B:定量分析($n=3$, $\bar{x}\pm s$)
a:$P<0.05$,与 0 h 比较

图 2 LPS 对 PVICs 凋亡水平的影响

2.3 LPS 对信号通路 TGF-β1-Smad2/3 的影响

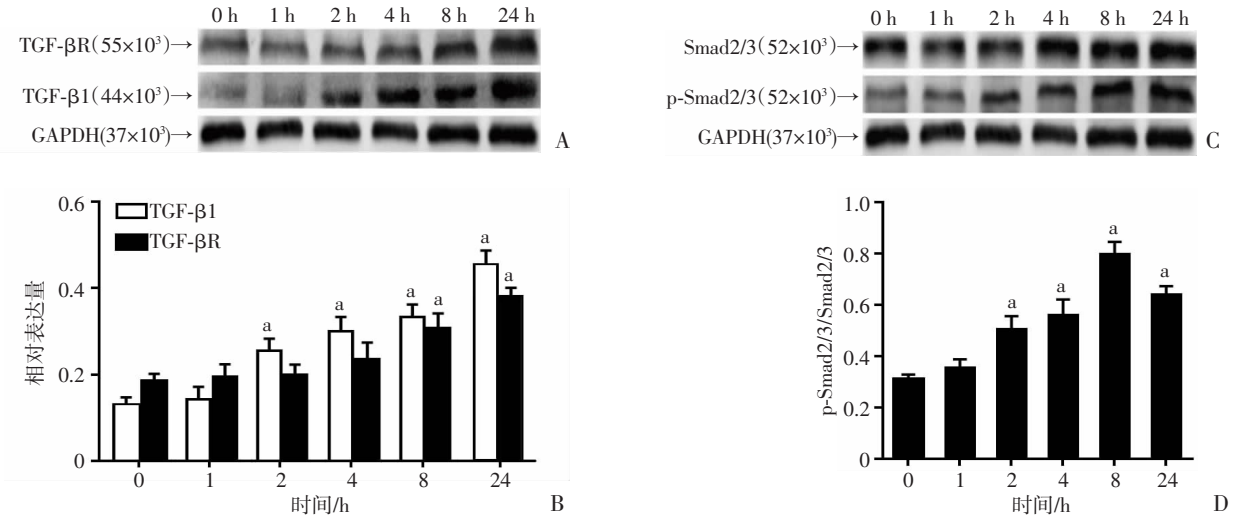
用 4 μg/mL LPS 诱导 PVICs 细胞成骨分化,Western blot 检测 TGF-β1 及 TGF-βR 蛋白表达水平,结果显示:与空白对照组相比,在诱导 2 hTGF-β1 的蛋白表达水平显著升高($P<0.05$),诱导 8 和 24 h TGF-β1 和 TGF-βR 的蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$,图 3A、B);Western blot 检测 p-Smad2/3 蛋白表达水平,结果显示:与空白对照组相比,p-Smad2/3 从 2 h 起蛋白水平逐渐升高,8 h 升高最为显著($P<0.01$),但 24 h 出现下降趋势,而细胞的总 Smad2/3 蛋白表达量没有明显变化(图 3C、D)。

2.4 LPS 对信号通路 ERK 的影响

4 μg/mL LPS 诱导 PVICs 细胞成骨分化 Western blot 检测 p-ERK 蛋白表达水平,结果显示:与空白对照组相比,p-ERK 蛋白成升高水平,并且在诱导第 8 h 升高最显著,而细胞的总 ERK 蛋白表达量没有明显变化($P<0.01$,图 4)。

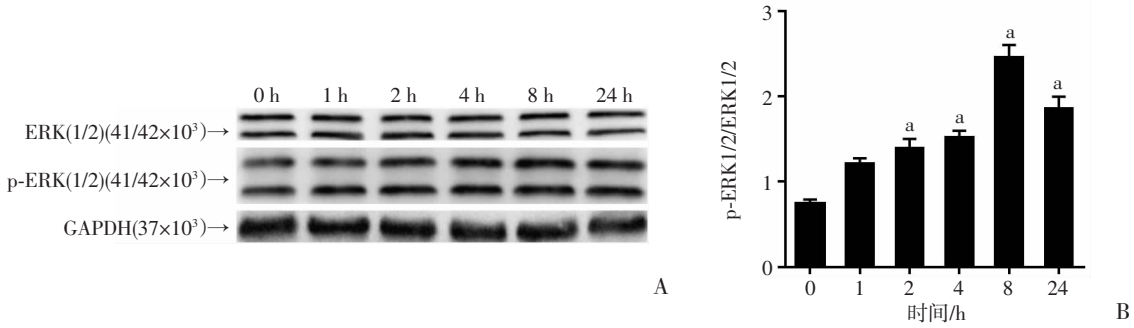
2.5 ERK 抑制剂对 LPS 促进 PVICs 成骨分化的影响

4 μg/mL LPS 诱导 PVICs 成骨分化 7 d,与 DMSO 对照组相比,LPS 组碱性磷酸酶活性显著升高;采用 ERK 信号通路抑制剂(PD98059)预处理 30 min 后再与 LPS 同时处理 PVICs 成骨分化 7 d,与 LPS 组对比,LPS+PD98059 组碱性磷酸酶活性显著降低(图 5A);同样,PD98059 预处理 30 min 后再与 4 μg/mL LPS 共同处理 PVICs 细胞成骨分化 2 d,Western blot 检测蛋白表达水平,结果显示:与 DMSO 对照组相比,LPS 组 Bax、Runx2 和 p-ERK 蛋白水平升高($P<0.05$),与 LPS 组相比,LPS+PD98059 组 Bax、Runx2 和 p-ERK 蛋白表达水平明显降低($P<0.05$,图 5B、C)。



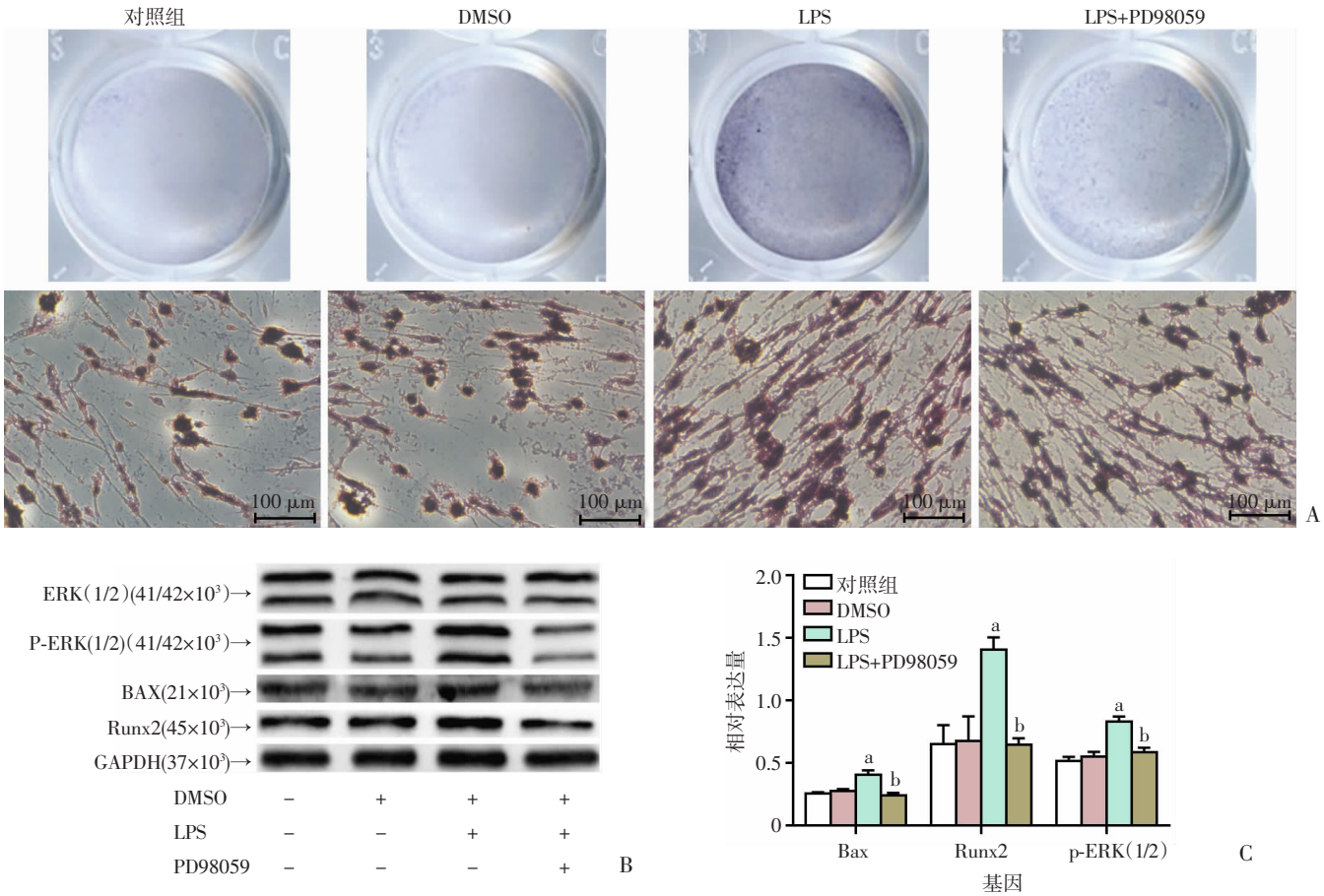
A:Western blot 检测 TGF-β1、TGF-βR 表达;B:定量分析 a:$P<0.05$ 与 0 h 比较;C:Western blot 检测 p-Smad2/3、T-Smad2/3 表达;D:定量分析 a:$P<0.01$,与 0 h 比较

图 3 LPS 对信号通路 TGF-β1-Smad2/3 的影响 ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)



A:Western blot 检测 p-ERK1/2、ERK1/2 表达;B:定量分析($n=3$, $\bar{x}\pm s$)　a:$P<0.05$,与 0 h 比较

图 4　LPS 对信号通路 ERK 的影响



A:碱性磷酸酶染色检测 PVICs 成骨分化能力;B:Western blot 检测 Bax、Runx2、p-ERK1/2 表达;C:定量分析($n=3$, $\bar{x}\pm s$)　a:$P<0.05$,与 DMSO 组比较; b:$P<0.05$,与 LPS 组比较

图 5　ERK 抑制剂对 LPS 促进 PVICs 成骨分化的影响

3　讨论

目前随着人口逐渐老龄化,CAVD 已经成为主要的心血管疾病之一,但是由于对该疾病发病机制的研究尚不清楚,目前除外科手术治疗外尚无有效的治疗药物,因此对该疾病的病生机制和治疗靶点的探索则尤为重要。

瓣膜间质细胞是构成主动脉瓣膜的主要细胞,大量研究表明 VICs 在主动脉瓣膜退行性变和钙化过程中发挥着重要作用[10,12];目前研究发现,包括慢性炎症在内的多种刺激因素可以诱导 VICs 逐渐向肌成纤维样细胞和成骨细胞分化,并最终出现钙盐沉积致使瓣膜发生钙化;同样,也有报道指出在主动脉瓣膜钙化早期瓣膜中凋亡水平明显增加[6],但其机制尚不完全

明确。LPS 是革兰氏阴性细菌细胞壁最外层的类脂多糖类物质,作为慢性炎症中代表物,其可以通过多种途径促进炎症的发生并最终导致瓣膜钙化。研究显示,LPS 刺激后导致钙化瓣膜中 Runx2、BMP-2 水平升高[13],BABU 等[14]人的研究也发现 LPS 可以通过增加细胞因子、趋化因子及黏附因子等来刺激 VICs 出现早期炎症及晚期成骨样改变。目前有研究指出,TGF-β1-Smad2/3、MAP 激酶(MAPK)、ERK1/2 等信号通路参与了 VICs 细胞在炎性刺激下发生的营养不良变化,凋亡,乃至钙化[10],所以在 LPS 诱导 VICs 成骨分化过程中,有关 TGF-β1-Smads 信号通路和 ERK 信号通路影响的研究值得探讨。

以猪主动脉瓣膜间质细胞(PVICs)作为研究对象的原因是猪主动脉瓣膜间质细胞与人主动脉瓣膜间质细胞的同源性最高。4 μg/mL 浓度的 LPS 诱导 PVICs 成骨分化,通过观察不同时间点细胞碱性磷酸酶活性、钙盐沉积情况以及 Runx2、OPN 和 OCN 转录水平的变化,结果发现 4 μg/mL 浓度的 LPS 可以使 PVICs 的碱性磷酸酶活性明显升高、钙盐沉积明显增强,并且显著升高成骨相关基因 Runx2、OPN 和 OCN 的转录表达水平;提示通过 LPS 诱导成功构建瓣膜间质细胞成骨分化模型。与传统使用钙盐培养基构建 PVICs 成骨分化模型所不同的是,LPS 可以在体外模拟慢性炎症环境对 PVICs 的影响。

我们的实验结果提示在 LPS 诱导 PVICs 成骨分化过程中可能有 TGF-β1-Smads 信号通路的参与。固定 LPS 浓度为 4 μg/mL、不同的时限刺激 PVICs,检测 TGF-β1 信号通路标志物,发现 LPS 诱导瓣膜间质细胞成骨分化过程中 TGF-β1 和 TGF-βR 的蛋白表达水平也逐渐升高,在第 24 h 表达最高;p-Smad2/3 在刺激时限为 2 h 即可被观察到,8 h 达到高峰,此过程同时伴有 Bax 水平逐渐上升。然而随着刺激时间延长,p-Smad2/3 活性并不继续增强,而是呈下降趋势,结果提示 LPS 诱导 PVICs 成骨分化过程中可能有 TGF-β1、p-Smad2/3 信号通路的激活,并且其参与过程是与 LPS 刺激作用的时间相互关联,较长时间的刺激可能会存在细胞自身负反馈的调节从而抑制 p-Smad2/3 的表达。凋亡标志物 Bax 的增加提示慢性炎症的刺激可能也通过增加细胞的凋亡水平来进一步促进瓣膜钙化。在其他细胞系中,有文献报道了 LPS 与 TGF-β1 存在着相类似的联系。有研究发现在心脏成纤维细胞中,TGF-β1 同样可以促进 TLR4 的表达增加[15];SUN[16]也在研究中指出,LPS 在小鼠胰腺星形细胞中也可以促进 TGF-β1 的表达。

我们的研究结果还提示在 LPS 诱导瓣膜间质细胞成骨分化过程中不仅激活 TGF-β1-Smad2/3,还可能通过激活 ERK 信号通路参与炎症诱导的瓣膜间质细胞成骨分化的过程。结果显示,p-ERK1/2 蛋白水平 2 h 开始升高,8 h 达到高峰,24 h 略呈下降趋势;加入 ERK 信号通路抑制剂 PD98059(10 nmol)后 p-ERK1/2、Bax、Runx2 的表达水平有所下降,并且可以使 PVICs 组碱性磷酸酶活性明显降低,这些结果表明 LPS 亦有可能通过激活 p-ERK1/2 促进 PVICs 的成骨分化。目前 ERK 已被证明可以通过激活 Runx2 / CBFa-1(核心结合因子-1)转录因子来调节各种成骨细胞和成骨细胞前体细胞类型中的成骨分化[17-18]。

综上所述,我们认为 LPS 诱导主动脉瓣膜间质细胞成骨分化可能是通过上调 TGF-β/Smads 和 ERK 两个信号通路实现的,并且对此过程的影响除了有 LPS 的浓度效应外,在刺激时限因素中还有细胞的自身反馈调节参与。然而,由于本研究中瓣膜间质细胞是猪来源的,没有使用人主动脉瓣膜间质细胞,因此现有结果还无法说明 4 μg/mL LPS 作用浓度及刺激时间是否适用于人体组织细胞;再者未对 LPS 调节的 TGF-β1-Smad2/3 和 ERK 信号通路的上/下游分子机制进行研究,后续还将继续深入探讨,完善 LPS 对主动脉瓣膜间质细胞成骨分化的具体机制。

参考文献:

[1] PEETERS F E C M, MEEX S J R, DWECK M R, *et al*. Calcific aortic valve stenosis: hard disease in the heart: abiomolecular approach towards diagnosis and treatment[J]. Eur Heart J, 2018, 39(28): 2618-2624. DOI: 10.1093/eurheartj/ehx653.

[2] SRITHAREN Y, ENRIQUEZ-SARANO M, SCHAFF H V, *et al*. Pathophysiology of aortic valve Stenosis: is it bothfibrocalcific and sex specific? [J]. Physiology (Bethesda), 2017, 32(3): 182-196. DOI: 10.1152/physiol.00025.2016.

[3] BOWLER M A, MERRYMAN W D. *In vitro* models of aortic valve calcification: solidifying asystem [J]. Cardiovasc Pathol, 2015, 24: 1-10. DOI: 10.1016/j.carpath.2014.08.003

[4] GARCÍA-RODRÍGUEZ C, PARRA-IZQUIERDO I, CASTAÑOS-MOLLOR I, *et al*. Toll-like receptors, inflammation, and calcific aortic valvedisease[J]. Front Physiol, 2018, 9: 201. DOI: 10.3389/fphys.2018.00201.

[5] CHO K I, SAKUMA I, SOHN I S, *et al*. Inflammatory and metabolic mechanisms underlying the calcific aortic valvedisease[J]. Atherosclerosis, 2018, 277: 60-65. DOI: 10.

1016/j.atherosclerosis.2018.08.029.

[6] JIAN B, NARULA N, LI Q Y, *et al*. Progression of aortic valve Stenosis: TGF-beta1 is present in calcified aortic valve cusps and promotes aortic valve interstitial cell calcification viaapoptosis[J]. Ann Thorac Surg, 2003, 75(2): 457-465; discussion 465-6. DOI: 10.1016/s0003-4975(02)04312-6.

[7] OSMAN L, YACOUB M H, LATIF N, *et al*. Role of human valve interstitial cells in valve calcification and their response to atorvastatin[J]. Circulation, 2006, 114(1Suppl): I547-I552. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.001115.

[8] HUTCHESON J D, CHEN J, SEWELL-LOFTIN M K, *et al*. Cadherin-11 regulates cell-cell tension necessary for calcific nodule formation byvalvular myofibroblasts[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013, 33(1): 114-120. DOI: 10.1161/ATVBAHA.112.300278.

[9] PARRA-IZQUIERDO I, CASTAÑOS-MOLLOR I, LÓPEZ J, *et al*. Lipopolysaccharide and interferon-γ team up to activate HIF-1α via STAT1 innormoxia and exhibit sex differences in human aortic valve interstitial cells[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2019, 1865(9): 2168-2179. DOI: 10.1016/j.bbadis.2019.04.014.

[10] RUTKOVSKIY A, MALASHICHEVA A, SULLIVAN G, *et al*. Valve interstitial cells: the key to understanding the pathophysiology of heart valvecalcification[J]. J Am Heart Assoc, 2017, 6(9): e006339. DOI: 10.1161/JAHA.117.006339.

[11] SUNG D C, BOWEN C J, VAIDYA K A, *et al*. Cadherin-11 overexpression induces extracellular matrix remodeling and calcification in mature aorticvalves[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2016, 36(8): 1627-1637. DOI: 10.1161/ATVBAHA.116.307812.

[12] KOSTYUNIN A E, YUZHALIN A E, OVCHARENKO E A, *et al*. Development of calcific aortic valve disease: Do we know enough for new clinical trials? [J]. J Mol Cell Cardiol, 2019, 132: 189-209. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2019.05.016.

[13] ZHENG D D, ZANG Y, XU H X, *et al*. MicroRNA-214 promotes the calcification of human aortic valve interstitial cells through the acceleration of inflammatory reactions with activated MyD88/NF-κB signaling[J]. Clin Res Cardiol, 2019, 108(6): 691-702. DOI: 10.1007/s00392-018-1398-9.

[14] BABU A N, MENG X Z, ZOU N, *et al*. Lipopolysaccharide stimulation of human aortic valve interstitial cells activates inflammation andosteogenesis[J]. Ann Thorac Surg, 2008, 86(1): 71-76. DOI: 10.1016/j.athoracsur.2008.03.008.

[15] LIU F, WEN Y, KANG J Y, *et al*. Regulation of TLR4 expression mediates the attenuating effect of erythropoietin on inflammation and myocardial fibrosis in rat heart[J]. Int J Mol Med, 2018, 42(3): 1436-1444. DOI: 10.3892/ijmm.2018.3707.

[16] SUN L, XIU M, WANG S H, *et al*. Lipopolysaccharide enhances TGF-β1signalling pathway and rat pancreatic fibrosis[J]. J Cell Mol Med, 2018, 22(4): 2346-2356. DOI: 10.1111/jcmm.13526.

[17] OH S H, KIM J W, KIM Y, *et al*. The extracellular matrix protein Edil3 stimulates osteoblast differentiation through the integrin α5β1/ERK/Runx2pathway[J]. PLoS ONE, 2017, 12(11): e0188749. DOI: 10.1371/journal.pone.0188749.

[18] MURAKAMI J, ISHII M, SUEHIRO F, *et al*. Vascular endothelial growth factor-C inducesosteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells through the ERK and RUNX2 pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 484(3): 710-718. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.02.001.

(**收稿**:2020-01-06;**修回**:2020-03-02)

(编辑 邓强庭)