

自噬负性调节LPS诱导的猪主动脉瓣瓣膜间质 细胞成骨样表型转换

张盟浩 范梦恬 安利钦 陈彬 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 该文主要研究自噬对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的瓣膜间质细胞成骨样表型转换的影响与机制。免疫组化检测钙化(3例)与正常人(3例)主动脉瓣膜标本中成骨、炎症、自噬相关指标的表达情况。LPS处理猪原代主动脉瓣膜间质细胞(porcine aortic valvular interstitial cells, pAVICs)(2~6代), Western blot检测成骨、炎症、自噬指标水平变化。自噬激动剂、抑制剂联合LPS处理pAVICs, Western blot检测自噬、成骨、炎症水平变化, 转染GFP-LC3病毒以观察自噬激活水平。NF- κ B抑制剂联合LPS处理pAVICs, Western blot检测炎症、成骨水平变化。结果显示, 成骨指标(RUNX2、OPN)、炎症指标(p-NF- κ B)、自噬指标(LC3、Beclin 1)在病变主动脉瓣膜标本中, 表达水平皆高于正常对照组; Western blot显示, LPS处理可引起pAVICs的成骨、炎症、自噬水平上调; 自噬抑制剂对LPS诱导的自噬激活有抑制作用, 对LPS诱导的成骨水平上调有促进作用; 自噬激动剂对LPS诱导的自噬激活有促进作用, 可明显抑制LPS诱导的成骨水平上调; NF- κ B抑制剂可抑制LPS诱导的炎症, 成骨水平上调; 自噬激动剂、抑制剂可分别抑制与促进LPS诱导的炎症水平上调。结果表明, 自噬负性调节炎症刺激因素LPS诱导的瓣膜间质细胞成骨样表型转换, 可能是通过抑制炎症通路NF- κ B发挥调节作用。

关键词 自噬; 炎症; 钙化性主动脉瓣膜疾病; 成骨样表型转换

Autophagy Negatively Regulates Osteogenic Phenotype Transformation of Porcine Aortic Valvular Interstitial Cells Induced by LPS

ZHANG Menghao, FAN Mengtian, AN Liqin, CHEN Bin, 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 This article mainly investigated the effect and mechanism of autophagy on osteogenic phenotype transformation of valvular interstitial cells induced by LPS (lipopolysaccharide). The expression level of osteogenesis, inflammation and autophagy in calcific (3 cases) and normal (3 cases) aortic valve samples were detected by immunohistochemistry. LPS was used to treat pAVICs (porcine aortic valvular interstitial cells) (2-6 generations), and the protein levels of osteogenesis, inflammation and autophagy were detected using Western blot. Autophagy agonists and antagonists were combined with LPS to treat the primary pAVICs, and the changes of autophagy, osteogenesis and inflammation were detected by Western blot. Autophagy activation was detected by

收稿日期: 2019-11-06 接收日期: 2020-01-07

国家自然科学基金(批准号: 81672103)资助的课题

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

Received: November 6, 2019 Accepted: January 7, 2020

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81672103)

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

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5197>

transfecting GFP-LC3. NF- κ B antagonists combined with LPS to treat pAVICs, and the changes of inflammation and osteogenesis were detected by Western blot. Autophagy agonists and antagonists were combined with LPS to treat the primary pAVICs, and levels of inflammation were detected by Western blot. The results showed that the expression of the osteogenic index (RUNX2, OPN), inflammatory index (p-NF- κ B) and autophagy index (LC3) in the lesion aortic valve specimens were higher than those in the normal control group. Western blot results showed an up-regulation of osteogenesis, inflammation and autophagy in primary pAVICs treated by LPS. Autophagy antagonists can inhibit autophagy activation and promote the up-regulation of osteogenesis induced by LPS. Autophagy agonists can promote autophagy activation and significantly inhibit the up-regulation of osteogenesis induced by LPS. NF- κ B antagonists can inhibit inflammation and osteogenesis induced by LPS. Autophagy agonists and antagonists can inhibit and promote the up-regulation of inflammation induced by LPS, respectively. It is possible that autophagy negatively regulates the osteogenic phenotype transformation of VICs induced by LPS, which may play a regulatory role by inhibiting the inflammatory pathway, NF- κ B.

Keywords autophagy; inflammation; calcific aortic valve disease; osteogenic phenotype transformation

钙化性主动脉瓣膜疾病(calcific aortic valve disease, CAVD)是老龄人群中最为常见的一种瓣膜病^[1]。主动脉瓣膜的钙化会缩小瓣口面积,导致瓣膜狭窄,从而引起血流动力学障碍、左心功能不足,严重影响老年人生命健康。随着人口老龄化,CAVD在发达国家已经成为仅次于冠心病和高血压的第三大心血管系统疾病^[2];在我国,CAVD的发病率正在逐年上升,已成为老年化社会的一个重大健康问题,现已引起基础医学和临床医学研究的广泛关注。目前,该疾病唯一有效的治疗手段为瓣膜置换术,然而,受术者多为老年人,耐受性差,且手术费用昂贵,因此深入研究该疾病发生发展机制,寻找有效的药物治疗靶点,丰富临床治疗手段显得尤为重要^[3-4]。

炎症是诱导钙化性主动脉瓣膜疾病的重要因素,内皮损伤引起的炎症细胞与因子浸润被视为该疾病发生的始动因素,且伴随疾病进展的全过程^[5-6]。九十年代初期,O'BRIEN等学者^[7]在研究钙化的主动脉瓣膜时,就用定量PCR的方法检测到炎症通路相关基因TLR4(Toll-like receptor4)、MyD88(myeloid differentiation factor88)、NF- κ B(nuclear factor kappa-B)的表达量明显上调,提示炎症与主动脉瓣膜钙化密切相关。主动脉瓣膜在结构上分为纤维层、疏松层和心室层,三层结构中皆存在AVICs(aortic valvular interstitial cells),且数量最多,可发生表型转化以及钙化^[1,8-9]。在钙化的瓣膜组织中,AVICs高表达TLRs(Toll-like receptors),其中TLR4是最丰富的亚型^[10]。为进一步探索炎症在

CAVD发生发展过程中促进疾病进展的具体机制,本研究将以TLR4的经典配体LPS(lipopolysaccharide)为刺激因素,诱导主动脉瓣膜间质细胞发生炎症反应,研究细胞发生表型转换的相关机制。

自噬作为一种高度保守的细胞内降解途径,被证明是炎症反应的反馈调节机制之一,其功能缺陷将破坏炎症反应平衡^[11]。研究表明,自噬发生障碍的可能性随年龄增长而增加,自噬缺陷将引起细胞内一系列代谢失衡,从而引起各系统生理状态改变、疾病发生,如神经系统、心血管系统等^[12]。据此,我们推测自噬作为炎症反应的一种反馈调节机制,对于炎症诱发的钙化性主动脉瓣膜疾病来说,可能是一种保护平衡机制。故本实验通过检测病变标本中自噬水平的变化,以及激活、抑制自噬对LPS诱导的主动脉瓣膜间质细胞表型转换的影响,研究自噬对炎症诱导的瓣膜间质细胞成骨样表型转换的影响。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

1.1.1 主动脉瓣膜标本 病变标本取自重庆医科大学附属第一医院外科手术切除的主动脉瓣、瓣叶增厚、可触及钙化结节,排除感染性心内膜炎、先天性主动脉瓣膜疾病(例如先天性二叶主动脉瓣畸形)、风湿性心脏瓣膜病。正常主动脉瓣膜标本取自于因主动脉夹层进行外科手术的患者。瓣膜标本进行石蜡包埋,切片用于研究。所有组织均在患者与家属知情同意的情况下收集,并且通过重庆医科

大学附属第一医院伦理委员会审查批准。

1.1.2 猪原代主动脉瓣膜间质细胞 猪主动脉瓣取自重庆市璧山区动物检疫定点屠宰场, 分离原代。

1.1.3 主要试剂 I型胶原酶、链霉素、青霉素、胰蛋白酶、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)均购自美国Sigma-Aldrich公司。M199培养基购自美国HyClone公司。澳洲胎牛血清购自赛澳美细胞技术有限公司(Cellmax)公司。一抗RUNX2购自Santa Cruz Biotechnology公司。OPN、p65(NF- κ B p65)、Beclin 1购自万类生物科技有限公司。LC3购自Cell Signaling Technology公司。p-P65(p-NF- κ B ser536)购自Arigo biolaboratories公司。GAPDH购自武汉三鹰生物技术有限公司。辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠和山羊抗兔IgG、免疫组化试剂均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。蛋白裂解液、Western blot相关缓冲液购自Beyotime Biotechnology公司。聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜、化学发光试剂盒均购自Merck Millipore公司。雷帕霉素(rapamycin, Rapa)、3-MA(3-methyladenine)、BAY(BAY 11-7082)、Baf A1(bafilomycin A1)购自MedChemExpress公司。GFP-LC3购自genepharma公司。DAPI、抗荧光猝灭剂购自sangon biotech公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞分离与培养 快速、无菌获取猪主动脉瓣膜, 含双抗(链霉素、青霉素)PBS漂洗3次后, 置于M199培养基中, 冰上保存并迅速带回实验室。棉签去除表面内皮细胞, 剪成1~2 mm碎块, 消化于含2 mg/mL I型胶原酶的M199培养基中, 数箱培养条件为37 °C、5% CO₂, 待组织分散为细胞后, 离心取下层细胞并分散于含10%胎牛血清、1%双抗的M199中贴壁培养, 每1~2天换液, 待细胞融合度达80%~90%后传代, 实验所用细胞为2~6代。

1.2.2 免疫组化 组织标本进行石蜡包埋, 切片, 二甲苯脱蜡后梯度乙醇水化, 微波法修复抗原, 过氧化氢去除内源性过氧化物酶, 5% BSA于37 °C封闭1 h后加一抗4 °C过夜, 再加酶标二抗, 室温孵育30 min, DAB显色, 苏木素复染, 脱水, 透明, 封片。

1.2.3 Western blot RIPA(加蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂)试剂提取细胞总蛋白, BCA法测量蛋白质浓度, 5× SDS-Buffer稀释蛋白, 煮沸变性后于-20 °C冰箱储存。上样量200 μg, 10%或12% SDS-PAGE胶分离蛋白质, 250 mA恒流湿转蛋白于PVDF膜, 5%牛

奶37 °C封闭1 h, 一抗(5% BSA稀释) 4 °C孵育过夜, TBST洗膜后二抗37 °C孵育1 h, TBST洗膜后ECL显影。

1.2.4 GFP-LC3转染 pAVICs铺板(24孔板)、爬片, 待细胞融合度达40%左右转染GFP-LC3病毒, 约16 h后更换培养基, 加入试剂处理, 6 h后PBS清洗细胞, 多聚甲醛固定, DAPI染核20 min, 封片, 荧光显微共聚焦拍摄。

1.3 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±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。采用*t*检验进行两组间比较, 单因素方差分析进行多组间比较。以*P*<0.05表示差异具有统计学意义。

2 结果

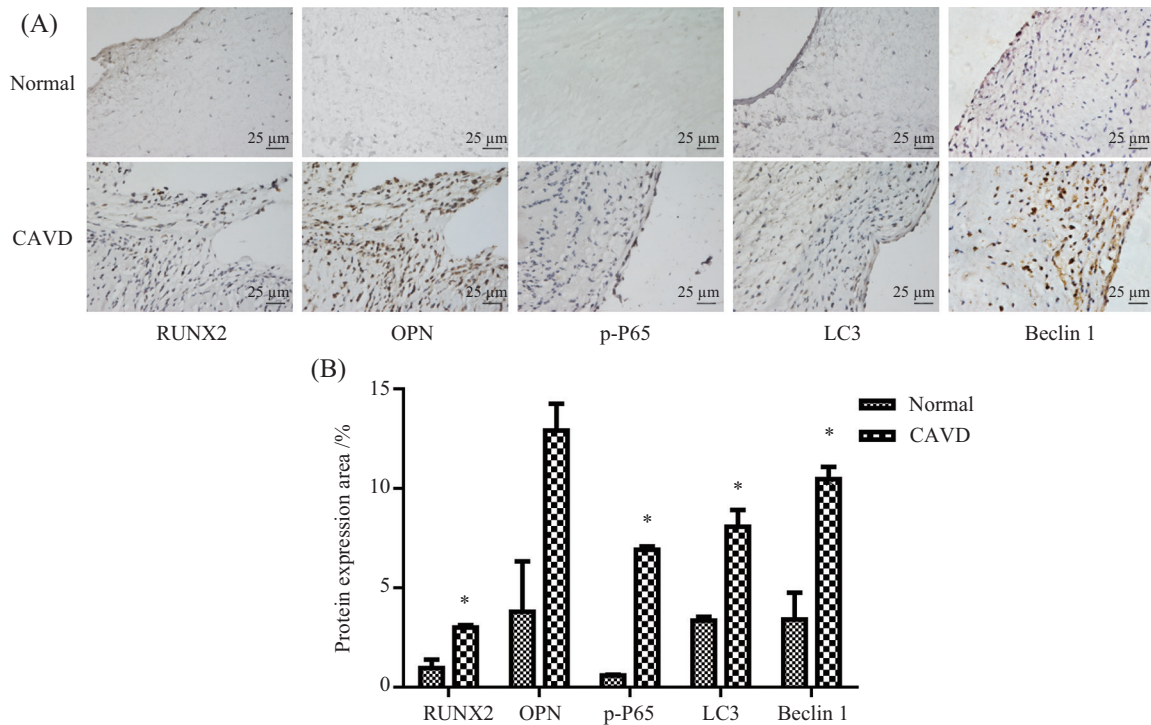
2.1 成骨、炎症、自噬相关蛋白在钙化性主动脉瓣膜标本中的表达情况

免疫组化方法检测成骨相关蛋白RUNX2(Runt-related transcription factor 2)、OPN(osteopontin), 炎症指标p-NF- κ B(phosphorylated nuclear factor kappa-B), 自噬相关蛋白LC3(light chain 3)、Beclin 1在钙化性主动脉瓣膜标本中的表达情况(图1A)。与正常对照组相比, 钙化组成骨、炎症、自噬相关蛋白明显高于对照组(*P*<0.05), 提示自噬、炎症很可能与主动脉瓣钙化相关(图1B)。

2.2 LPS刺激猪主动脉瓣膜间质细胞可诱导成骨样表型转换、激活自噬

2.2.1 LPS刺激猪主动脉瓣膜间质细胞可诱导成骨样表型转换 4 μg/mL LPS处理pAVICs 0、24、48、72 h, Western blot检测对应时间点成骨指标RUNX2和OPN水平(图2A)。与0 h组相比, RUNX2在24 h上调具有统计学意义(*P*<0.05), OPN在24 h和48 h上调具有统计学意义(*P*<0.05和*P*<0.01), 提示LPS刺激pAVICs可诱导细胞发生成骨样表型转换(图2B)。

2.2.2 LPS刺激猪主动脉瓣膜间质细胞可激活自噬 4 μg/mL LPS处理pAVICs 0、24、48、72 h, Western blot检测LC3表达情况(图3A)。LC3II/I于24、48 h水平上调, 差异具有统计学意义(*P*<0.05, 图3B)。为排除LC3II/I上调是由于自噬溶酶体降解受阻引起的积累增加, 设置自噬溶酶体抑制剂Baf A1联合处理后, 检测LC3II/I水平变化(图3C)。Baf A1联合LPS处理组与LPS处理组相比, LC3II/I水平进一步上调, 差异

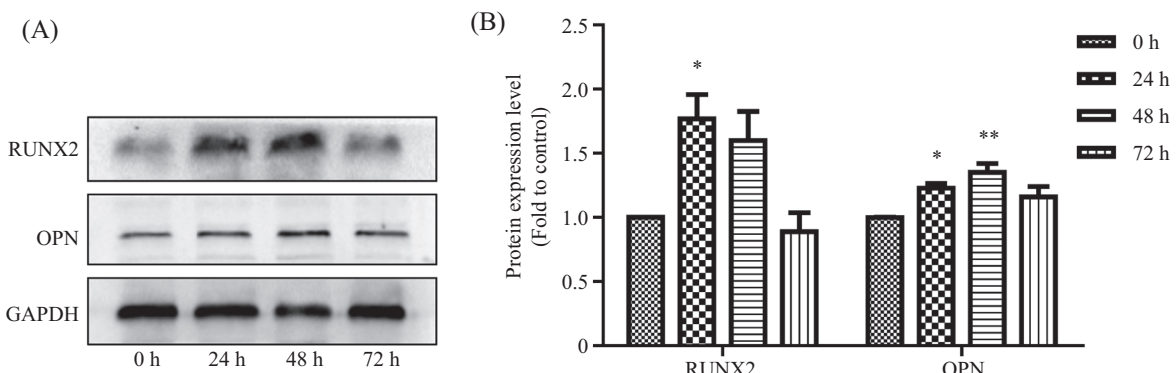


A: 免疫组化检测人主动脉瓣膜标本成骨、炎症、自噬相关蛋白; B: 定量图, $*P < 0.05$, 与正常组相比。

A: immunohistochemistry was used to detect osteogenesis, inflammation and autophagy-related proteins in human aortic valve specimens; B: quantitative figure, $*P < 0.05$ vs normal group.

图1 成骨、炎症、自噬相关蛋白在钙化性主动脉瓣膜标本中的表达

Fig.1 Expression of osteogenesis, inflammation and autophagy related proteins in CAVD specimens



A: Western blot检测LPS处理不同时间, 成骨指标变化; B: 定量图, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, 与0 h组相比较。

A: Western blot was used to detect the changes of osteogenic indexes in different time lengths of LPS treatment; B: quantitative figure, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ vs 0 h group.

图2 LPS刺激猪主动脉瓣膜间质细胞可诱导成骨样表型转换

Fig.2 Treat pAVICs with LPS can induce osteogenic phenotype transformation of pAVICs

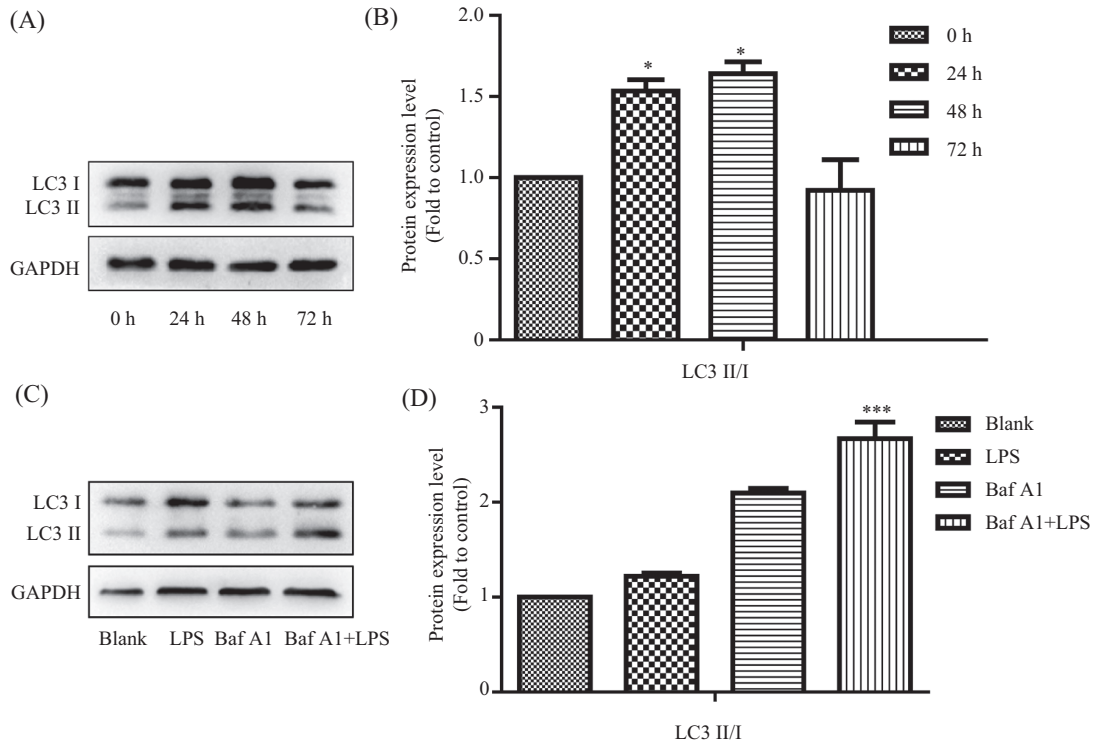
具有统计学意义($P < 0.05$), 提示LPS刺激pAVICs可以激活自噬小体形成(图3D)。

2.3 自噬对LPS诱导的猪主动脉瓣膜间质细胞成骨样表型转换的影响

2.3.1 激活自噬对LPS诱导的pAVICs成骨样表型转换的影响 4 mmol/L Rapa处理pAVICs 1 h后, 加入4 $\mu\text{g/mL}$ LPS处理48 h, Western blot检测LC3、

RUNX2、OPN表达情况(图4A), 转染GFP-LC3以观察绿色荧光分布状态(图4C)。Rapa处理组绿色荧光点、块状聚集明显(图4C), 提示自噬激活成功。与LPS单独处理组相比, Rapa联合LPS处理组RUNX2、OPN表达下调($P < 0.01$ 和 $P < 0.001$), 提示激活自噬可抑制LPS诱导的pAVICs成骨样表型转换(图4B)。

2.3.2 抑制自噬对LPS诱导的pAVICs成骨样表型

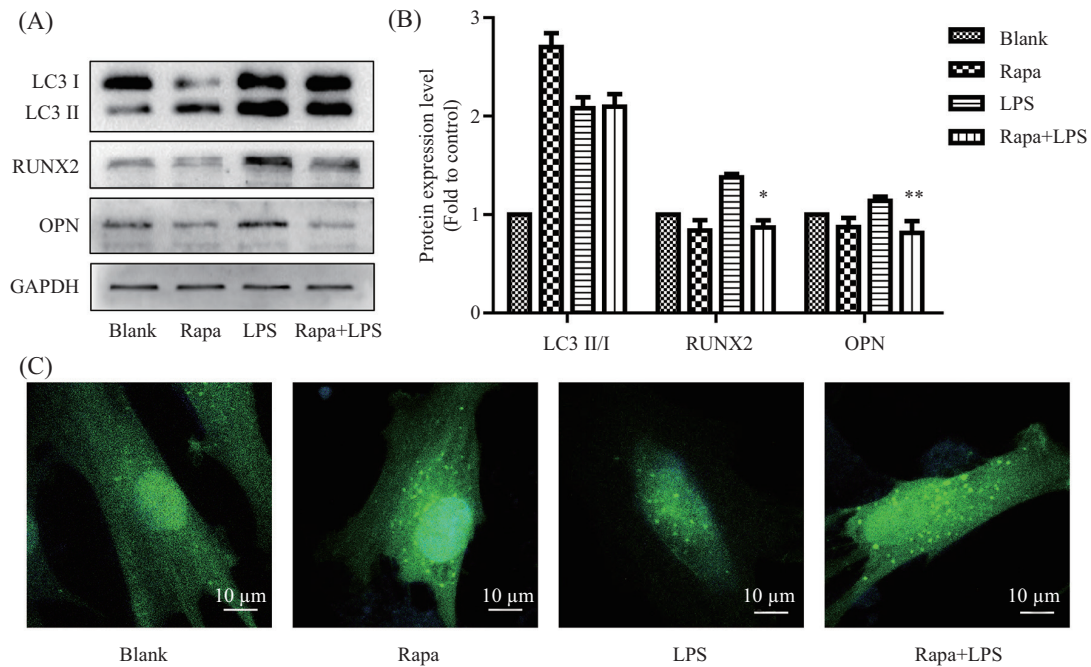


A: Western blot检测经LPS处理不同时间后LC3的变化情况; B: 定量图, * $P < 0.05$, 与0 h相比较; C: Western blot检测Baf A1处理后LC3变化; D: 定量图, *** $P < 0.001$, 与LPS组相比较。

A: Western blot was used to detect the changes of LC3 in different time lengths of LPS treatment; B: quantitative figure, * $P < 0.05$ vs 0 h group; C: Western blot was used to detect the changes of LC3 treated with Baf A1; D: quantitative figure, *** $P < 0.001$ vs LPS group.

图3 LPS刺激猪主动脉瓣膜间质细胞可激活自噬

Fig.3 Treat pAVICs with LPS can activate autophagy



A: Western blot检测Rapa处理后LC3、成骨指标变化; B: 定量图, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与LPS组相比较; C: 免疫荧光检测GFP-LC3分布状态。

A: Western blot was used to detect the changes of LC3 and osteogenesis indexes treated with Rapa; B: quantitative figure, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs LPS group; C: immunofluorescence was performed to observe the distribution of GFP-LC3.

图4 激活自噬对LPS诱导的pAVICs成骨样表型转换的影响

Fig.4 Effect of autophagy activation on osteogenic phenotype transformation of pAVICs induced by LPS

转换的影响 3 mmol/L 3-MA处理pAVICs 1 h后,加入4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS处理48 h, Western blot检测LC3、RUNX2、OPN表达情况(图5A),转染GFP-LC3以观察绿色荧光分布状态(图5C)。3-MA处理组绿色荧光点块状聚集(图5C),提示自噬抑制成功。与LPS单独处理组相比,3-MA联合LPS处理组RUNX2、OPN表达上调($P<0.05$ 和 $P<0.01$),提示抑制自噬对LPS诱导的pAVICs成骨样表型转换有促进作用(图5B)。

2.4 LPS通过NF- κ B通路促进猪主动脉瓣膜间质细胞发生成骨样表型转换

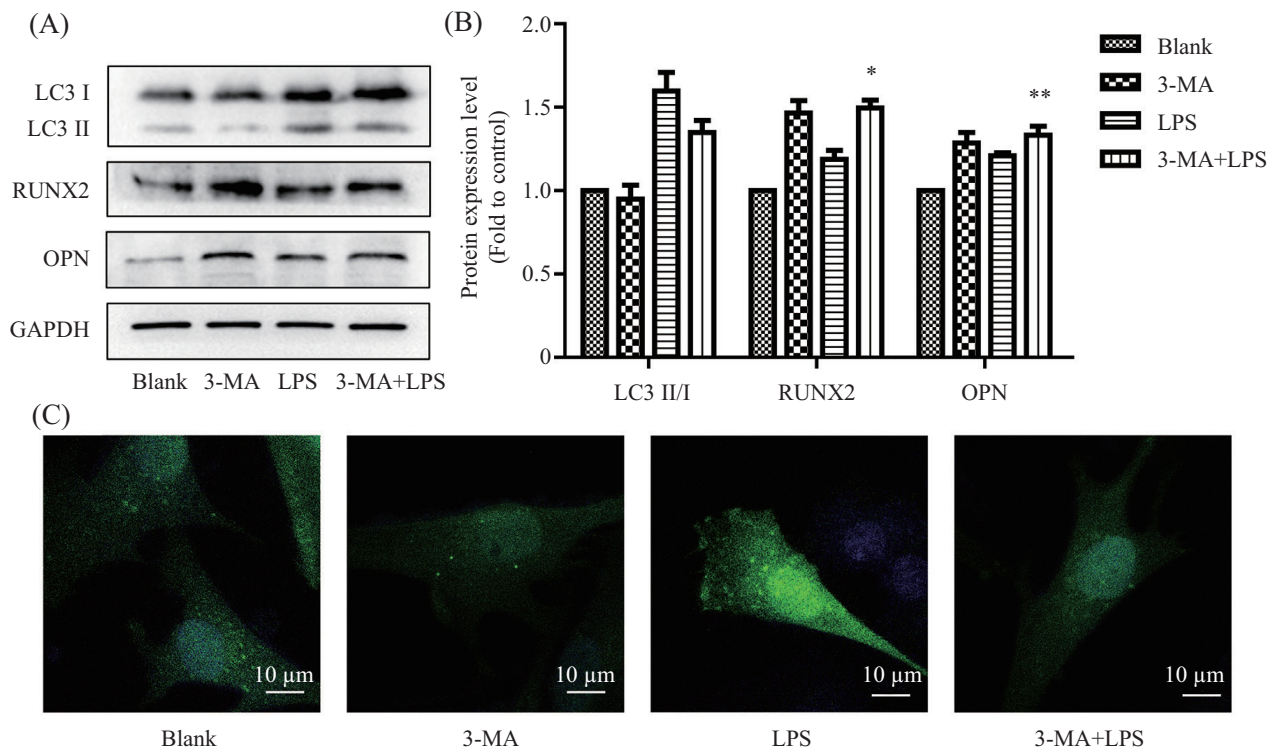
4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS处理pAVICs 0、24、48、72 h, Western blot检测p-P65、P65表达水平(图6A)。p-P65于24、48 h表达上调,差异具有统计学意义($P<0.01$ 和 $P<0.05$),提示LPS刺激pAVICs可激活NF- κ B,诱导炎症反应(图6B)。3 mmol/L BAY(NF- κ B抑制剂)处理pAVICs 1 h后加入4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS处理48 h, Western blot检测成骨指标变化(图6C)。BAY联合LPS处理组相比于LPS单独处理组,成骨指标RUNX2、OPN表达量下调($P<0.01$),提示LPS是通过NF- κ B促进pAVICs发生成骨样表型转换的(图6D)。

2.5 自噬通过抑制NF- κ B活性缓解LPS诱导的猪主动脉瓣膜间质细胞成骨样表型转换

4 mmol/L Rapa处理pAVICs 1 h后,加入4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS处理48 h, Western blot检测p-P65、P65表达水平(图7A)。与LPS单独处理组相比,Rapa联合LPS处理组p-p65表达量下调($P<0.05$),提示激活自噬可以抑制NF- κ B激活,从而抑制pAVICs发生表型转换(图7B)。3 mmol/L 3-MA处理pAVICs 1 h后,加入4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS处理48 h, Western blot检测p-P65、P65表达水平(图7C)。与LPS单独处理组相比,3-MA联合LPS处理组p-p65表达量上调($P<0.001$),提示抑制自噬可以促进NF- κ B激活,从而促进pAVICs发生表型转换(图7D)。

3 讨论

CAVD是老年人常见的一种慢性病,其发病病理特点与动脉粥样硬化类似,皆始于内皮损伤,引起炎症、脂质细胞在内皮下沉积,诱导间质细胞发生表型转换,促进细胞外基质钙盐沉积^[13]。在CAVD中发生表型转换的为AVICs,包括肌成纤维样、成骨样表型转换,而动脉粥样硬化中发生表型转换的细胞为血管

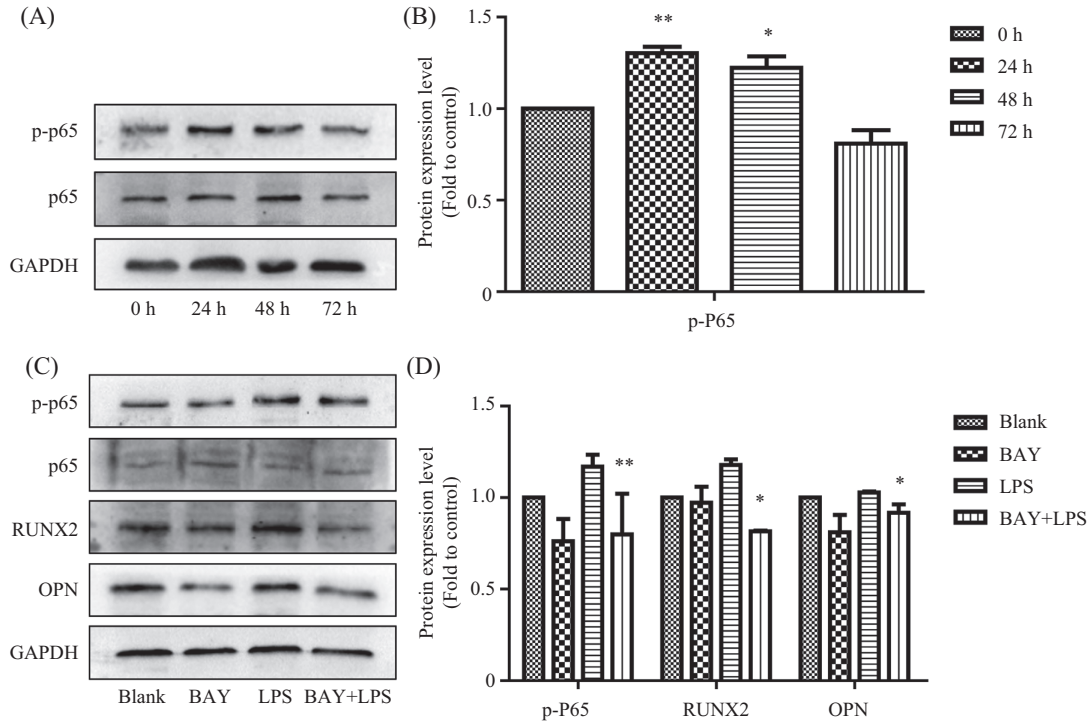


A: Western blot检测3-MA处理后LC3和成骨指标变化; B: 定量图, $*P<0.05$, $**P<0.01$, 与LPS组相比较; C: 免疫荧光观察GFP-LC3分布状态。

A: Western blot was used to detect the changes of LC3 and osteogenesis indexes treated with 3-MA; B: quantitative figure, $*P<0.05$, $**P<0.01$ vs LPS group; C: immunofluorescence was performed to observe the distribution of GFP-LC3.

图5 抑制自噬对LPS诱导的pAVICs成骨样表型转换的影响

Fig.5 Effect of autophagy inhibition on osteogenic phenotype transformation of pAVICs induced by LPS

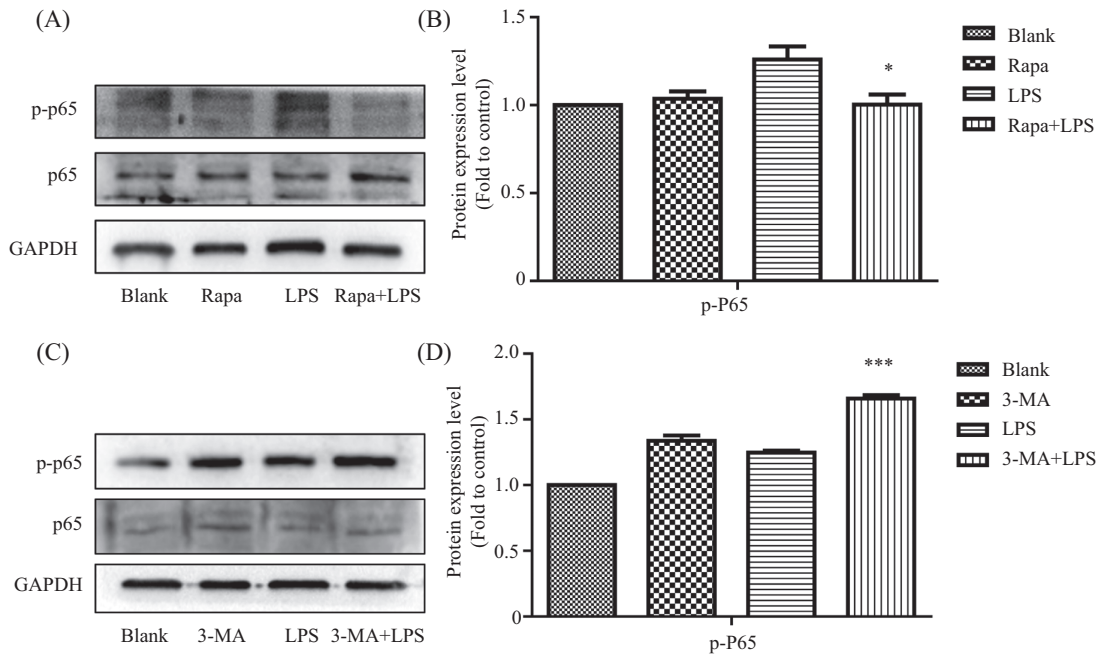


A: LPS处理不同时间对p-P65的表达影响; B: p-P65定量图, $*P<0.05$, $**P<0.01$, 与0 h组相比较; C: BAY对LPS诱导pAVICs成骨样表型转换的影响; D: 定量图, $*P<0.05$, $**P<0.01$, 与LPS组相比较。

A: effects of different lengths of LPS treatment time on expression of p-P65; B: quantitative figure, $*P<0.05$, $**P<0.01$ vs 0 h group; C: effects of BAY on osteogenic phenotype transformation of pAVICs induced by LPS; D: quantitative figure, $*P<0.05$, $**P<0.01$ vs LPS group.

图6 LPS通过NF- κ B通路促进猪主动脉瓣膜间质细胞发生成骨样表型转换

Fig.6 LPS promotes osteogenic phenotype transformation of pAVICs through NF- κ B pathway



A: 激活自噬对p-p65表达的影响; B: 定量图, $*P<0.05$, 与LPS组相比较; C: 抑制自噬对p-p65表达的影响; D: 定量图, $***P<0.001$, 与LPS组相比较。

A: effects of autophagy activation on expression of p-p65; B: quantitative figure, $*P<0.05$ vs LPS group; C: effects of autophagy inhibition on expression of p-p65; D: quantitative figure, $***P<0.001$ vs LPS group.

图7 自噬通过抑制NF- κ B活性缓解LPS诱导的猪主动脉瓣膜间质细胞成骨样表型转换

Fig.7 Autophagy alleviates osteogenic phenotype transformation of p- κ B activity

平滑肌细胞。尽管存在相似的危险因素、病理特点,但是对动脉粥样硬化治疗有效的药物,如他汀类降脂药、ACEI等,对缓解CAVD的发生发展并未得到有效的证明,因此深入研究CAVD发生发展的病理机制,寻找其治疗新靶点,丰富临床治疗手段十分重要^[14]。

自噬是一种广泛存在的、十分保守的细胞内降解过程,生理状态下维持一定水平以保证细胞代谢平衡^[15]。发挥完整的自噬功能需经历自噬小体形成、自噬溶酶体形成和自噬溶酶体降解这一系列过程,其中任何环节发生障碍都将影响自噬降解功能。老年人易发生自噬关键蛋白缺陷或自噬功能不足,这会引机体发生一系列病理改变,而自噬又是炎症反应的一种反馈平衡机制,通过激活自噬可以限制炎症水平持续升高,避免对机体造成损伤^[16]。由此我们推测,老年人如存在自噬功能不足,不能有效限制炎症水平,则持续存在的高水平炎症反应将促进主动脉瓣膜发生钙化。

针对上述推测,我们检测了钙化主动脉瓣膜标本中炎症、自噬、成骨相关蛋白的水平,发现RUNX2、OPN、p-P65、LC3、Beclin 1皆明显高于正常对照组,说明钙化可能与炎症、自噬相关。细胞实验中发现,LPS刺激可导致LC3II/I水平上调,而自噬溶酶体抑制剂Baf A1联合LPS处理组的LC3II/I水平上调更为明显,且LPS处理组GFP-LC3成点、块状分布,提示LPS刺激pAVICs可激活自噬;另外RUNX2、OPN、p-P65水平上调,提示LPS刺激可诱发炎症反应,促进细胞发生成骨样表型转换。而NF- κ B抑制剂联合处理可抑制LPS引起炎症、成骨水平上调,提示LPS刺激可通过NF- κ B激活促进AVICs发生成骨样表型转换。另外,药物激活自噬可促进GFP-LC3呈现点、块状聚集,对p-P65、RUNX2、OPN的上调有抑制作用;自噬抑制剂可抑制GFP-LC3点、块状分布,对p-P65、RUNX2、OPN的上调有促进作用,提示激活自噬可缓解LPS诱导的AVICs炎症反应、表型转换,即自噬可通过限制炎症反应,对CAVD的发生发展起保护作用。由于LC3II/I水平变化,Baf A1抑制溶酶体降解联合检测,以及GFP-LC3分布状态的变化只能反应自噬小体是否形成,自噬是否激活,尚不能提示自噬流是否完整,所以针对病变标本中自噬流是否完整,即自噬在病人主动脉瓣中是否发挥降解作用,以及细胞实验中自噬流完整性检测等问题,尚需要深入研究,以验证CAVD患者可能是由于自噬功能不足,从而不足以有效抑制炎症反应而加速疾病进展的这一假设。

综上所述,药物激活自噬可抑制NF- κ B激活,缓解AVICs发生表型转换,提示自噬可通过限制炎症水平,缓解CAVD的发生发展,即自噬对CAVD的发生发展起保护作用,为CAVD的药物治疗手段提供新的靶点。

参考文献 (References)

- [1] RAJAMANNAN N M, EVANS F J, AIKAWA E, et al. Calcific aortic valve disease: not simply a degenerative process: A review and agenda for research from the National Heart and Lung and Blood Institute Aortic Stenosis Working Group. Executive summary: Calcific aortic valve disease-2011 update [J]. *Circulation*, 2011, 124(16): 1783-91.
- [2] PELTONEN T, OHUKAINEN P, RUSKOaho H, et al. Targeting vasoactive peptides for managing calcific aortic valve disease [J]. *Ann Med*, 2017, 49(1): 63-74.
- [3] LI C, XU S, GOTLIEB A I. The progression of calcific aortic valve disease through injury, cell dysfunction, and disruptive biologic and physical force feedback loops [J]. *Cardiovasc Pathol*, 2013, 22(1): 1-8.
- [4] HORNE A J, REINECK E A, HASAN R K, et al. Transcatheter aortic valve replacement: historical perspectives, current evidence, and future directions [J]. *Am Heart J*, 2014, 168(4): 414-23.
- [5] KOSTYUNIN A E, YUZHALLIN 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.
- [6] MATHIEU P, BOUCHAREB R, BOULANGER M C. Innate and adaptive immunity in calcific aortic valve Disease [J]. *J Immunol Res*, 2015, 2015: 851945.
- [7] O'BRIEN K D. Pathogenesis of calcific aortic valve disease: a disease process comes of age (and a good deal more) [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26(8): 1721-8.
- [8] WU B, WANG Y, XIAO F, et al. Developmental mechanisms of aortic valve malformation and disease [J]. *Annu Rev Physiol*, 2017, 79: 21-41.
- [9] LIU A C, JOAG V R, GOTLIEB A I. The emerging role of valve interstitial cell phenotypes in regulating heart valve pathobiology [J]. *Am J Pathol*, 2007, 171(5): 1407-18.
- [10] GARCIA-RODRIGUEZ C, PARRA-IZQUIERDO I, CASTANOS-MOLLOR I, et al. Toll-like receptors, inflammation, and calcific aortic valve disease [J]. *Front Physiol*, 2018, 9: 201.
- [11] CADWELL K. Crosstalk between autophagy and inflammatory signalling pathways: balancing defence and homeostasis [J]. *Nat Rev Immunol*, 2016, 16(11): 661-75.
- [12] LEVINE B, KROEMER G. Autophagy in the pathogenesis of disease [J]. *Cell*, 2008, 132(1): 27-42.
- [13] MYASOEDOVA V A, RAVANI A L, FRIGERIO B, et al. Novel pharmacological targets for calcific aortic valve disease: Prevention and treatments [J]. *Pharmacol Res*, 2018, 136: 74-82.
- [14] CAPOULADE R, CHAN K L, YEANG C, et al. Oxidized phospholipids, lipoprotein(a), and progression of calcific aortic valve stenosis [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2015, 66(11): 1236-46.
- [15] PARZYCH K R, KLIONSKY D J. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20(3): 460-73.
- [16] KROEMER G. Autophagy: a druggable process that is deregulated in aging and human disease [J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(1): 1-4.