

颗粒蛋白前体抑制钙盐诱导主动脉瓣膜 间质细胞成骨分化

皇改改 施琼 安利钦 范梦恬 朱梦颖 翁亚光*

(重庆医科大学检验医学院, 临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016)

摘要 该文主要研究颗粒蛋白前体(progranulin, PGRN)对猪主动脉瓣膜间质细胞(valve interstitial cells, VICs)成骨分化的影响及机制, 为钙化性主动脉瓣膜病(calcific aortic valve disease, CAVD)的早期干预及治疗提供理论依据。采用免疫组化检测正常组和CAVD组中Runx2、OPN的表达, Western blot检测PGRN、纤维化指标 α -SMA、钙化指标(Runx2、OPN)的表达以及AKT磷酸化水平。采用胶原酶连续消化法分离VICs, 并用免疫荧光染色行表型鉴定。体外实验加入人PGRN重组蛋白, 采用ALP染色、茜素红S染色、qPCR和Western blot检测细胞早期及晚期成骨分化能力以及AKT的磷酸化水平; 并加入AKT的激活剂SC-79进行反向验证。结果表明, 与正常组织相比, CAVD瓣膜组织中PGRN明显降低, α -SMA、Runx2、OPN和p-AKT在CAVD组中表达均明显高于正常组。成功分离出原代VICs, α -SMA和vimentin阳性, vWF阴性。PGRN可使VICs的ALP活性降低、钙盐沉积明显减少; PGRN可下调纤维化/钙化指标, 且AKT的磷酸化水平降低; SC-79可减弱PGRN对纤维化/钙化指标的下调作用。提示PGRN能够抑制静止的VIC向肌纤维母细胞样的活化VIC乃至成骨样VIC进行转化, AKT信号通路可能在该过程中发挥重要作用。

关键词 钙化性主动脉瓣膜病; 瓣膜间质细胞; PGRN; 纤维化; 成骨分化

PGRN Inhibits Osteogenic Differentiation of Aortic Valve Interstitial Cells Induced by Osteogenic Induction Medium

HUANG Gaigai, SHI Qiong, AN Liqin, FAN Mengtian, ZHU Mengying, WENG Yaguang*

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

Abstract The aim of this study was to investigate the effect and mechanism of PGRN (progranulin) on osteogenic differentiation of porcine aortic VICs (valve interstitial cells), which could provide theoretical basis for early intervention and treatment of CAVD (calcific aortic valve disease). The expression levels of Runx2 and OPN in the Normal group and CAVD group were tested by immunohistochemistry. The expression levels of PGRN, fibrosis markers (α -SMA)/calcification markers (Runx2, OPN) and p-AKT were detected by Western blot. VICs were isolated by continuous collagenase digestion, their morphological characteristics were observed and the phenotypes were identified by immunofluorescence staining. VICs were treated by increasing concentration of PGRN. ALP

收稿日期: 2019-07-31 接受日期: 2019-10-17

国家自然科学基金(批准号: 8167081181)和重庆市科委民生项目(批准号: cstc2018jcsx-msybX0113)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-68485938, E-mail: yaguangweng@cqmu.edu.cn

Received: July 31, 2019 Accepted: October 17, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.8167081181) and Science and Technology Commission Livelihood Project of Chongqing (Grant No.cstc2018jcsx-msybX0113)

*Corresponding author. Tel: +86-23-68485938, E-mail: yaguangweng@cqmu.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5152>

(alkaline phosphatase) staining, Alizarin red S staining, qPCR, Western blot were used to evaluate the cell early and late osteogenic differentiation abilities. The protein level of p-AKT was determined by Western blot. SC-79, an activator of the AKT, was used for reverse verification. The results showed that fibrosis/calcification markers in CAVD group were significantly higher than that in Normal group. However, the expression of PGRN remarkably decreased. VICs were successfully isolated, the staining of α -SMA and vimentin were positive, the staining of vWF was negative. The ALP activity and deposition of calcium salts of VICs were significantly decreased by PGRN. The mRNA and protein levels of fibrosis/calcification markers were reduced. Meanwhile, the phosphorylation level of AKT was down-regulated. The down-regulation of PGRN on fibrosis/calcification markers was attenuated by SC-79. We concluded that PGRN could inhibit the conversion of quiescent VICs to activated myofibroblast-like VICs and even osteogenesis-like VICs. The AKT signaling pathways may play an important role in these processes.

Keywords calcific aortic valve disease; valve interstitial cell; PGRN; fibrosis; osteogenic differentiation

钙化性主动脉瓣膜病(calcific aortic valve disease, CAVD)是一种常见的成人心脏瓣膜疾病, 其在总体人群中的患病率为29%, 但在65岁以上人口中却高达37%, 已经成为仅次于冠心病和高血压的第三大心血管疾病^[1-2]。然而目前外科主动脉瓣置换术仍是唯一有效的治疗措施, 且有近1/3患者不能接受外科手术^[3]。因此探讨CAVD发生发展的机制, 从而找出早期干预的手段显得尤为重要。

随着研究的不断深入, 人们逐渐认识到, CAVD是一个涉及慢性炎症、内皮损伤、纤维化及进展性钙化等复杂变化的主动过程。其中炎症启动了瓣膜的钙化, 并且贯穿整个CAVD发展过程^[4-5]。

颗粒蛋白前体(progranulin, PGRN)是一种炎症调控因子, 由GRN基因编码, 含593个氨基酸残基的外分泌蛋白, 分子量约为68 kDa^[6]。PGRN广泛表达于瓣膜组织、脂肪组织、上皮细胞及巨噬细胞等多种组织和细胞中, 在抗炎、癌症和骨组织再生中发挥着重要的作用^[7-8]。近年来有研究表明, 血管内皮细胞中的PGRN可以通过抑制炎症相关因子的分泌来发挥减轻动脉粥样硬化的作用^[9]。KAWASE等^[10]则发现, PGRN敲除小鼠更容易发生动脉粥样硬化。钙化性主动脉瓣膜疾病与动脉粥样硬化的发病机理有很多相似之处^[11-12], 但目前PGRN在CAVD中的作用及其具体机制尚未见报道。本研究发现, 在临床病变瓣膜组织中PGRN存在异常表达, 我们推测, PGRN可能能够发挥抑制瓣膜钙化的保护作用。为此, 我们以猪主动脉瓣膜间质细胞(valve interstitial cells, VICs)为主要研究对象, 探讨PGRN对VICs成骨分化的影响及其分子机制, 为CAVD的干预及治疗提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 人瓣膜组织与猪瓣膜间质细胞来源

1例正常瓣膜组织(Normal组)取自重庆医科大学附属第一医院器官移植的患者, 排除心脏瓣膜病和瓣膜组织纤维性增厚。3例CAVD瓣膜组织(CAVD组)取自因钙化性主动脉瓣狭窄而行主动脉瓣膜置换术的患者。以上组别的患者及家属均签订知情同意书, 并排除其他严重肝病、恶性肿瘤以及激素或者免疫抑制剂使用者。术中取下的主动脉瓣用生理盐水漂洗数次, 观察瓣膜形态, 并取一部分组织于多聚甲醛中固定, 用于瓣膜形态学检验, 其余立刻置于液氮保存, 用于后期实验。

猪主动脉瓣获自重庆市璧山区动物检疫定点屠宰场, 选取体质量为100~120 kg的8~10月龄健康猪, 共6只, 于无菌条件下取主动脉瓣膜。

本文涉及所有实验均通过重庆医科大学附属第一医院科研伦理委员会批准。

1.2 主要试剂

主要试剂包括: I型胶原酶、 β -磷酸甘油、链霉素、青霉素、茜素红S染料、维生素C、胰蛋白酶、二甲基亚砜(DMSO)(美国Sigma公司), M199培养基(Hyclone公司), 澳洲胎牛血清(CellMax公司), 兔抗人 α -SMA(Abcam公司), 兔抗人vWF(von Willebrand factor)、骨调素(osteopontin, OPN)及鼠抗人vimentin(沈阳万类生物科技有限公司), 山羊抗兔IgG、山羊抗鼠IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司), 兔抗人p-AKT和AKT(CST公司), 兔抗人Runx2和骨钙蛋白(osteocalcin, OCN)(SantaCruz公司), 鼠抗人GAPDH(武汉三鹰生物技术有限公司), 聚偏二

氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜、化学发光试剂盒(Milipore公司), Trizol试剂、逆转录试剂盒(TaKaRa公司), SYBRGreen II(Bimake公司), 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)染色试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)。qPCR引物由深圳华大基因公司合成。其他试剂均为进口分装或国产分析纯。

1.3 免疫组化

石蜡切片: 56 °C烘片3 h, 二甲苯脱; 100%、95%、90%、80%、70%酒精梯度水化, 枸橼酸钠缓冲液微波抗原修复, 滴加3%过氧化氢去除内源性过氧化物酶, 山羊血清室温封闭1 h; 去除非特异性背景, 相应的一抗4 °C过夜, 第2天滴加生物素标记的二抗, 37 °C、30 min; 然后滴加辣根过氧化物酶, DAB显色, 染色程度适中立即终止反应; 苏木素复染, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 树脂封片。

1.4 主动脉瓣膜间质细胞分离与培养

检疫定点屠宰场无菌条件下摘取的主动脉瓣叶, 立即置于含1%青霉素/链霉素的M199培养基中保存。迅速带回实验室, 无菌PBS清洗3次, 无菌棉签轻柔擦拭刮除瓣膜表面内皮细胞, 使用眼科剪将瓣膜剪成1 mm×1 mm小块组织, 置于2 mg/mL I型胶原酶中消化7~8 h; 最后离心除去胶原酶, 并加入新鲜的M199培养基重悬, 铺于培养皿中培养使其贴壁。常规培养基为含10% FBS、1%青霉素/链霉素的M199培养基, 细胞培养箱条件为37 °C、5% CO₂, 隔日换液; 待细胞密度达至约80%融合进行细胞传代。经鉴定明确的第3~6代主动脉瓣膜间质细胞用于后续实验。

1.5 免疫荧光染色鉴定细胞表型

原代主动脉瓣膜间质细胞于预先放置爬片的

24孔板种植培养, 待密度达至约50%融合度; PBS清洗后室温下4%多聚甲醛固定30 min; 0.5% Triton X100破膜20 min; 3% H₂O₂去除内源性过氧化氢酶15 min; 室温下山羊血清封闭非特异性抗原30 min; 加入相应的一抗(稀释比例 α -SMA 1:200, vWF 1:100, vimentin 1:100), 4 °C过夜; 加入1:100稀释的二抗(荧光染料标记的羊抗兔、羊抗鼠IgG抗体), 室温避光2 h; 最后加入Hochest复染细胞核; 荧光显微镜下观察 α -SMA、vimentin、vWF表达情况。

1.6 瓣膜间质细胞的成骨分化诱导

取对数生长期的瓣膜间质细胞置于钙盐诱导培养基中进行培养, 待细胞密度至30%~50%进行其他处理。钙盐诱导培养基中加入10 mmol/L β -甘油磷酸钠、50 μ g/mL维生素C, 作为条件培养基诱导细胞成骨分化。

1.7 人PGRN重组蛋白处理及实验分组

选择对数生长期的VICs细胞, 当细胞融合达60%时, 加入人PGRN重组蛋白, 以BLANK组和OM组分别作为空白对照和阳性对照。处理12~24 h后, 提取细胞总RNA, 用于后续qPCR检测; 48~72 h后, 提取细胞总蛋白, 用于后续的Western blot检测。实验分3组: (1)Blank组, 即空白对照组; (2)OM组, 即钙盐培养基对照组; (3)OM+PGRN组, 即加入了人PGRN重组蛋白实验组。

1.8 qPCR法检测细胞中纤维化/钙化指标的mRNA表达

TRizol法提取各组细胞的总RNA, 两步法逆转录成cDNA后进行qPCR实验。引物序列见表1。以GAPDH为内参对照, 检测各组细胞 α -SMA和Collage I的表达水平, qPCR反应体系为10 μ L, 反应条件为: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 40个循环; 72 °C 30 s,

表1 引物序列(猪)

Table 1 The sequence of primers for PCR (pig)

基因	序列(5'→3')
Gene	Sequence (5'→3')
α -SMA	F: AAG AAG AGG ACA GCA CTG CC R: TCC CAG TTG GTG ATG ATG CC
Collage I	F: TTC AGC TTT GTG GAC CTC CG R: GTG GTT TCC TGG TCG GTG G
TNF- α	F: TCT TCA AGG GAC AAG GCT GC R: CTC CAA AGT AGA CCT GCC CG
GAPDH	F: GGT GAA GGT CGG AGT GAA CG R: CGT GGG TGG AAT CAT ACT GGA

实验重复3次。

1.9 Western blot法检测相关纤维化/钙化指标的表达

提取各组细胞的总蛋白, BCA法测定蛋白浓度。蛋白的上样量均为250 μg , 计算出蛋白上样体积。SDS-PAGE分离目的蛋白, 恒流(210 mA)电转至PVDF膜, 5% BSA或脱脂牛奶封闭2 h, 一抗4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜(稀释比例 α -SMA 1:1 000, Runx2 1:500, OCN 1:500, OPN 1:500, p-AKT 1:1 000, AKT 1:1 000, GAPDH 1:1 000), TBST洗膜, 二抗37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h(稀释比例为1:5 000), 洗膜, 化学发光显影, ImageJ软件计算出各电泳条带的灰度值, 并与内参GAPDH的灰度值相比, 得出各蛋白的表达水平, 实验重复3次。

1.10 ALP染色

将VICs细胞接种于24孔板后, 待细胞密度达到40%时进行PGRN重组蛋白处理, 钙盐条件培养基培养7天后, 弃去旧培养基用PBS冲洗2次, 每孔加入NBT/BCIP工作液200 μL 进行ALP染色, 避光60 min后观察染色结果。

1.11 茜素红S染色

VICs细胞传代铺于24孔板, 融合达到30%时进行PGRN重组蛋白处理, 6 h后换液, 同时加入工作浓度50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的维生素C、10 mmol/L的 β -磷酸甘油, 继续培养14天进行茜素红S染色, PBS冲洗后用4 $^{\circ}\text{C}$ 、0.05%戊二醛避光固定10 min, 去离子水洗3次后加入0.4%茜素红S染液, 显微镜下观察, 待出现红色钙盐物质沉积时, 立即用去离子水终止反应并洗涤。

1.12 统计学处理

采用SPSS 20.0和GraphPad Prism 5软件对实验数据进行统计分析。数据用均数 $\pm$ 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。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PGRN在CAVD瓣膜组织中表达明显低于正常组织

免疫组化结果显示, CAVD瓣膜组织中钙化指标Runx2、OPN表达明显增加(图1A); Western blot结果进一步显示, CAVD瓣膜组织中PGRN显著降低, 纤维化指标 α -SMA、钙化指标Runx2和OPN以及AKT的磷酸化水平均明显升高($P<0.01$, $P<0.001$, 图1B~图1D)。结果提示, PGRN可能参与了主动脉瓣膜钙化的发生发展。

2.2 原代猪主动脉VICs的形态特征及表型鉴定

原代猪主动脉VICs培养24 h贴壁, 细胞呈梭形或纺锤形, 放射状走行, 5天左右融合达80%(图2A); 细胞免疫荧光染色显示, 成功分离的VICs特异性蛋白标志物 α -SMA阳性(图2B); vimentin阳性(图2C); 而内皮细胞特异性标志物vWF阴性(图2D)。

2.3 PGRN可抑制静止的VIC向肌纤维母细胞样的活化VIC进行转化

钙盐培养基培养VICs, 加入0~800 ng/mL梯度浓度的人PGRN重组蛋白处理24 h, Western blot结果显示, PGRN在800 ng/mL的工作浓度下, OM+PGRN组VIC细胞中 α -SMA的蛋白表达与OM对照组相比明显减少($P<0.01$, 图3A); qPCR结果显示, OM+PGRN(800 ng/mL)组VICs中*Collage I*和 α -SMA的mRNA水平显著降低($P<0.01$, $P<0.001$, 图3B); 这些结果表明, PGRN能够抑制静止的VICs向肌纤维母细胞样的活化VICs进行转化。

2.4 PGRN可抑制VICs细胞的早期及晚期成骨分化能力

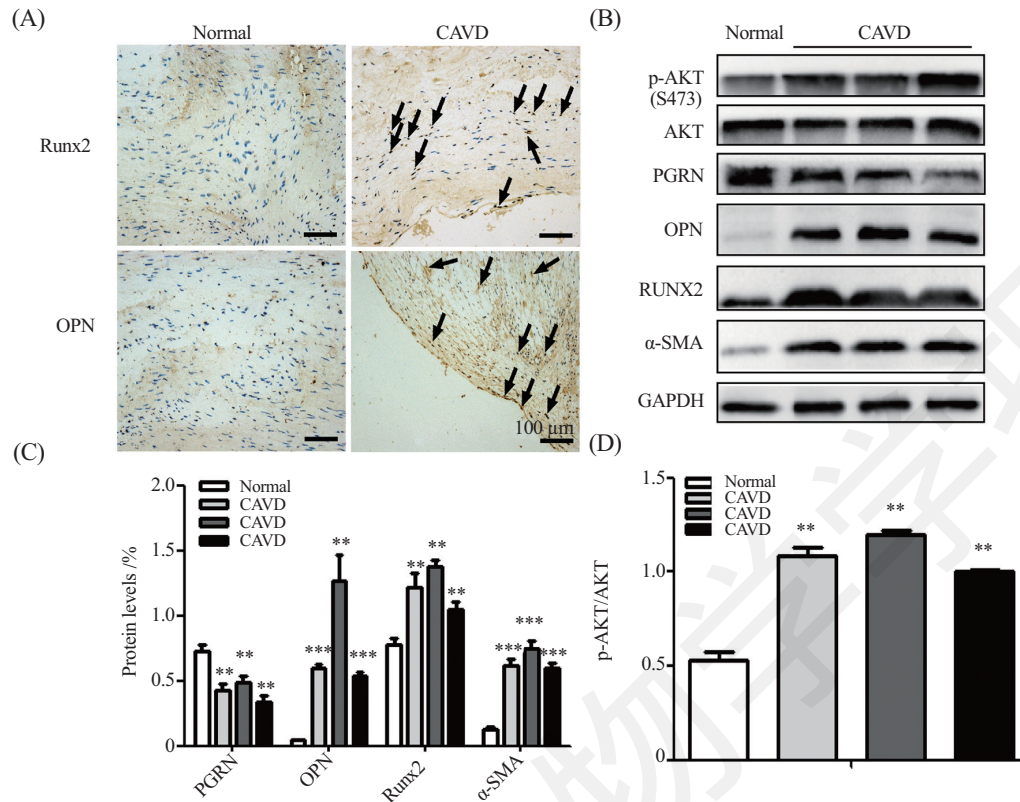
在钙盐培养基诱导VICs细胞成骨分化的过程中, 加入800 ng/mL PGRN继续培养7天, 与OM对照组相比, OM+PGRN组可显著减弱VICs细胞的碱性磷酸酶活性(图4A); 加入800 ng/mL PGRN并用钙盐培养基诱导VICs细胞成骨分化14天, 茜素红S染色检测发现与OM对照组相比, OM+PGRN组细胞的钙盐沉积明显减少(图4B)。

2.5 PGRN可抑制静止的VICs向成骨样VICs进行转化

在钙盐培养基的基础上, 0~800 ng/mL梯度浓度的PGRN处理VICs 24 h, 同样地, OM+PGRN(800 ng/mL)组中早期钙化指标Runx2较OM对照组表达明显减少($P<0.01$, 图5A); 晚期钙化指标OCN、OPN的表达水平均较OM对照组显著降低($P<0.05$, $P<0.05$, 图5B)。

2.6 PGRN对AKT信号通路的影响

钙盐培养基培养VICs, PGRN处理时间梯度1 h、2 h、4 h、8 h, Western blot检测p-AKT的蛋白表达水平, 结果显示, 在8 h, PGRN可以使AKT的磷酸化水平明显降低($P<0.05$), 而细胞的总AKT表达量没有明显变化(图6A); 加入AKT信号通路的激活剂SC-79(10 mmol/L)处理24 h, Western blot结果显示, 与OM+PGRN+DMSO组相比, OM+PGRN+SC-79

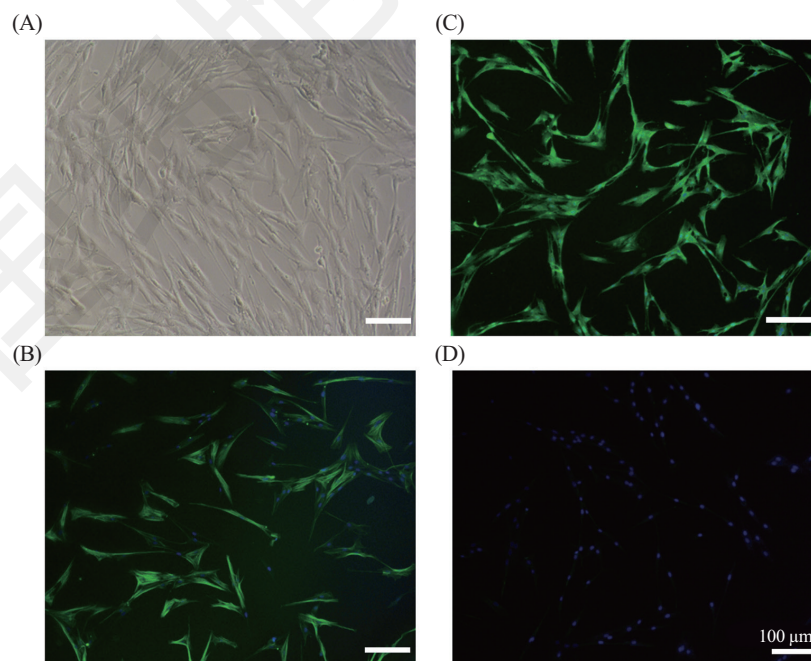


A: 免疫组化检测正常和CAVD瓣膜组织中Runx2和OPN的表达, 箭头指的是其阳性部位; B~D: Western blot检测PGRN、OPN、Runx2、α-SMA以及p-AKT的蛋白水平。** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与正常组比较。

A: the expression of Runx2 and OPN in CAVD group and Normal group were detected by immunohistochemistry. The arrows indicate the positive area. B-D: the expression of PGRN, OPN, Runx2, α-SMA and p-AKT were detected by Western blot. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Normal group.

图1 PGRN在CAVD组中表达明显低于正常组

Fig.1 The expression of PGRN in CAVD group was significantly lower than that in Normal group

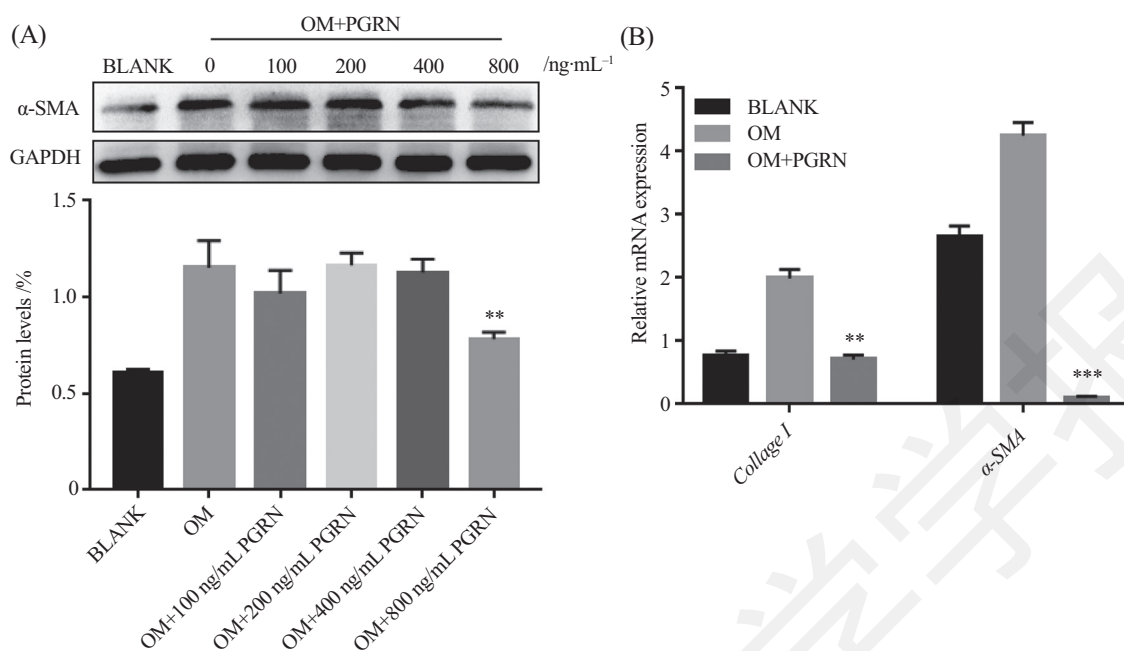


A: 光学显微镜下VICs形态; B: α-SMA免疫荧光染色; C: vimentin免疫荧光染色; D: vWF免疫荧光染色。

A: light microscopy image of VICs; B: immunofluorescence staining of α-SMA; C: immunofluorescence staining of vimentin; D: immunofluorescence staining of vWF.

图2 猪主动脉VICs形态及表型鉴定

Fig.2 Morphological and phenotypic characterization of porcine aortic VICs

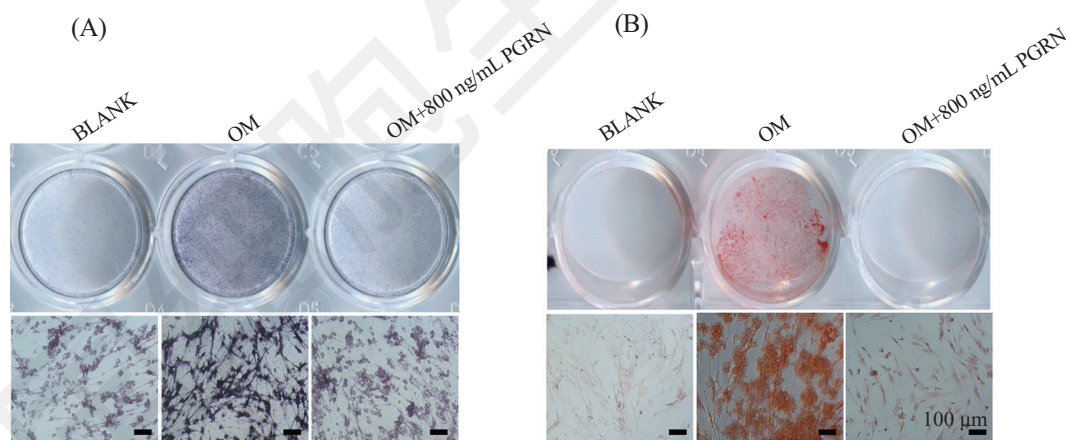


A: 加入0~800 ng/mL梯度浓度的人PGRN重组蛋白, VICs中 α -SMA的蛋白表达; B: PGRN(800 ng/mL)处理VICs, α -SMA和Collage I的mRNA水平。 ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与OM组比较。

A: protein expression of α -SMA in VICs stimulated by different concentrations of PGRN (0-800 ng/mL); B: mRNA expression of α -SMA and Collage I in VICs treated with 800 ng/mL PGRN. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs OM group.

图3 PGRN可降低VICs中 α -SMA和Collage I的表达水平

Fig.3 The expression of α -SMA, Collage I were reduced by PGRN in VICs



A: ALP染色检测细胞的早期成骨分化能力; B: 茜素红染色检测细胞的晚期成骨分化能力。

A: the cell early osteogenic differentiation ability was measured by ALP staining; B: the cell late osteogenic differentiation ability was measured by Alizarin red S staining.

图4 PGRN可抑制VICs的早期及晚期成骨分化能力

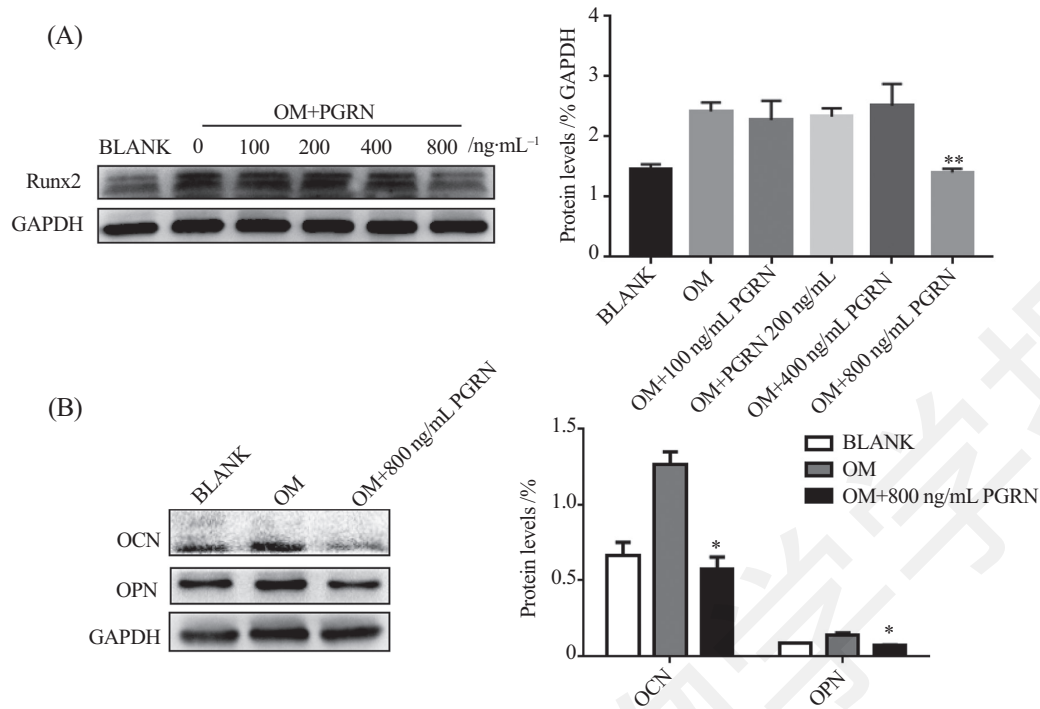
Fig.4 The early and late osteogenic differentiation abilities of the VICs were suppressed by PGRN

组 α -SMA和Runx2的蛋白表达明显增加($P < 0.001$ 、 $P < 0.01$)(图6B), 提示PGRN可能通过抑制AKT信号通路的激活来调节VICs的成骨分化。

3 讨论

主动脉瓣膜钙化的病理特征主要表现为瓣膜

结缔组织的纤维化、退行性变和钙化^[13-14]。我们研究发现, 与正常组织相比, 临床病变组织中纤维化指标、钙化指标均是升高的, 这与文献报道关于钙化组织的观点是一致的。VICs是形成瓣膜结构的骨架, 参与瓣膜纤维化、钙化全过程^[15]。近年来, 随着研究的不断深入, 指出瓣膜钙化主要是: 静止的

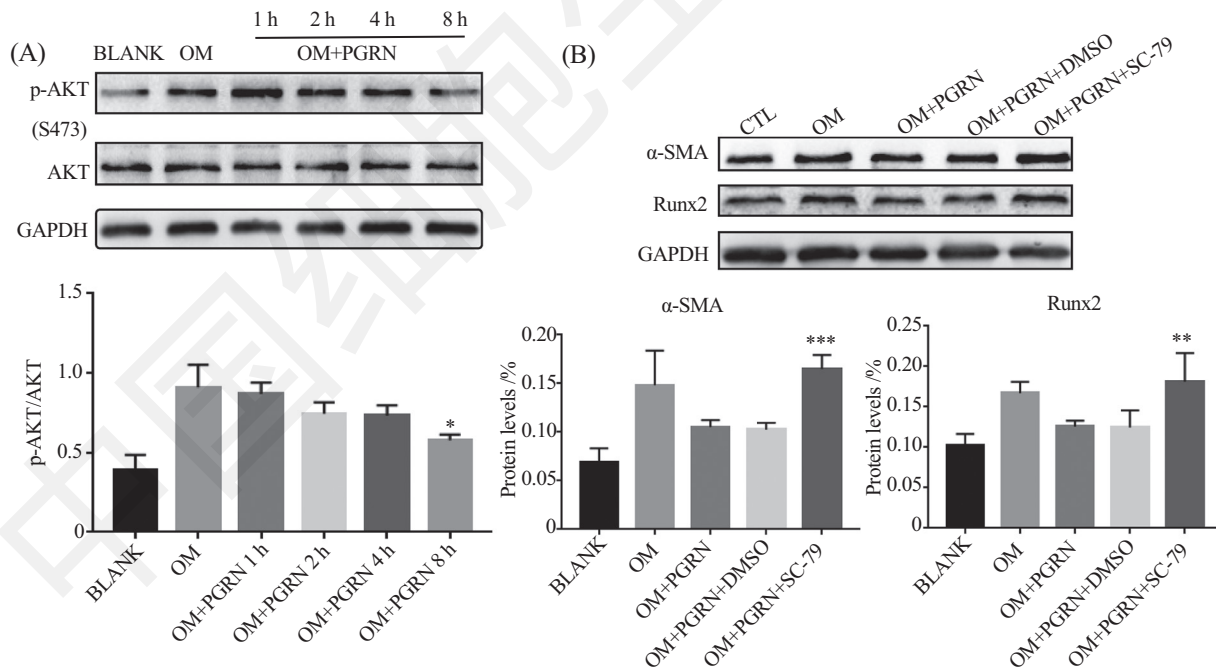


A, B: Western blot检测Runx2、OCN和OPN的蛋白表达水平。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与OM组比较。

A,B: the protein expression of Runx2, OCN and OPN was detected by Western blot. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs OM group.

图5 PGRN可抑制VIC成骨相关指标的蛋白表达

Fig.5 The expression of osteoblast-related proteins in VICs were down-loaded by PGRN



A: Western blot测定AKT的磷酸化水平; * $P < 0.05$ 与OM组比较。B: 加入SC-79(10 mmol/L), Western blot检测α-SMA和Runx2的蛋白表达水平; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与OM+PGRN+DMSO组比较。

A: the expression and activation of AKT protein was detected by Western blot. * $P < 0.05$ vs OM group. B: the expression of α-SMA and Runx2 treated with 100 mmol/L SC-79 was detected by Western blot. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs OM+PGRN+DMSO group.

图6 PGRN对AKT信号通路的影响

Fig.6 The effect of PGRN on AKT signaling pathway

VICs向肌纤维母细胞样的活化VICs, 乃至成骨样VICs进行转化, 并在瓣膜中发生类似成骨的反应, 不断推进钙化进程, 最终导致瓣膜功能异常^[16]。我们在诱导VICs成骨分化的过程中, 也检测到与钙化指标Runx2、OPN、OCN相比, 纤维化标志物 α -SMA、Collage I升高。故有研究认为, α -SMA可以作为瓣膜纤维化转变的一个标志^[9]。

颗粒蛋白前体PGRN是一种多效性因子, MATSUBARA等^[18]的研究发现, PGRN可以浓度梯度依赖地拮抗TNF- α 的促炎效应, 抑制多种动物模型中TNF- α 导致的关节炎, 并且在猪的前脂肪细胞中, PGRN有抑制脂肪形成的作用^[17]。在小鼠下丘脑区给予PGRN可以显著抑制禁食诱导后的进食, 减少剂量依赖性的体质量增加^[18]。以上说明, PGRN在抗炎和抗成脂分化中有着很大的潜力, 而本研究首次发现, PGRN在钙化瓣膜组织中表达明显低于正常组织, 我们推测, PGRN可能与CAVD的发生发展有密切联系。一方面, 有文献报道, PGRN^{-/-}鼠的血清中TNF- α 、IL-6等促炎因子显著增多, 并且TNF- α 、IL-6与瓣膜钙化共定位^[19], 提示CAVD瓣膜组织中PGRN明显降低可能与促炎因子增多有关。另一方面, PGRN可以被基质金属蛋白酶等降解成GRN(granulin)多肽, 对CAVD病理标本的研究发现, 基质金属蛋白酶的高表达与瓣膜组织结构的改变有关^[20], 我们猜测, 蛋白酶的高表达可能也是PGRN降低的一个诱导因素。然而, 目前PGRN降低的原因尚无定论, 仍需进一步的研究探讨。

由于正常人主动脉VICs来源有限, 我们选择了与人同源性最高的猪主动脉VICs作为替代实验。在钙盐培养基的基础上, 加入人PGRN重组蛋白, ALP染色、茜素红S染色以及Western blot结果表明, PGRN能够抑制VICs的早期及晚期成骨分化能力。研究报道, PGRN可以通过AKT信号通路影响肿瘤细胞的增殖、间充质干细胞的成骨分化等^[21-22], 同时AKT信号通路在CAVD的发展过程中也是一条重要的钙化通路^[23]。在我们的研究中发现, PGRN能够显著降低AKT的磷酸化水平; AKT的激活剂SC-79可以逆转PGRN对VICs成骨分化的抑制作用, 说明AKT信号通路可能参与了PGRN调节CAVD发生发展的过程。

综上所述, 本实验证实, PGRN能够抑制静止的VICs向肌纤维母细胞样的活化VICs, 乃至成骨样

VICs进行转化, 这一作用机制可能与AKT信号通路有关。本实验为CAVD的临床治疗提供了一个新的潜在靶点。但PGRN的具体作用机制还有待于进一步探讨。

参考文献 (References)

- [1] PEETERS F, MEEUX S J R, DWECK M R, et al. Calcific aortic valve stenosis: hard disease in the heart: a biomolecular approach towards diagnosis and treatment [J]. *Eur Heart J*, 2018, 39(28): 2618-24.
- [2] STEWART B F, SISCOVICK D, LIND B K, et al. Clinical factors associated with calcific aortic valve disease. *Cardiovascular Health Study* [J]. *J Am Coll Cardiol*, 1997, 29(3): 630-4.
- [3] HORNE A, J R, 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.
- [4] GARCIA-RODRIGUEZ C, PARRA-IZQUIERDO I, CASTANOS-MOLLOR I, et al. Toll-like receptors, inflammation, and calcific aortic valve disease [J]. *Frontiers Physiol*, 2018, 9: 201.
- [5] MAZZONE A, EPISTOLATO M C, GIANETTI J, et al. Biological features (inflammation and neoangiogenesis) and atherosclerotic risk factors in carotid plaques and calcified aortic valve stenosis: two different sites of the same disease? [J]. *Am J Clin-Pathol*, 2006, 126(4): 494-502.
- [6] WEI J, HETTINGHOUSE A, LIU C. The role of progranulin in arthritis [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2016, 1383(1): 5-20.
- [7] ZHAO Y P, LIU B, TIAN Q Y, et al. Progranulin protects against osteoarthritis through interacting with TNF-alpha and beta-Catenin signalling [J]. *Ann Rheum Dis*, 2015, 74(12): 2244-53.
- [8] UNGURS M J, SINDEN N J, STOCKLEY R A. Progranulin is a substrate for neutrophil-elastase and proteinase-3 in the airway and its concentration correlates with mediators of airway inflammation in COPD [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2014, 306(1): L80-7.
- [9] KESSENBRICK K, FROHLICH L, SIXT M, et al. Proteinase 3 and neutrophil elastase enhance inflammation in mice by inactivating antiinflammatory progranulin [J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(7): 2438-47.
- [10] KAWASE R, OHAMA T, MATSUYAMA A, et al. Deletion of progranulin exacerbates atherosclerosis in ApoE knockout mice [J]. *Cardiovasc Res*, 2013, 100(1): 125-33.
- [11] ABELLA V, PINO J, SCOTECCE M, et al. Progranulin as a biomarker and potential therapeutic agent [J]. *Drug Discov Today*, 2017, 22(10): 1557-64.
- [12] YAN W, DING A. Progranulin controls sepsis via C/EBPalpha-regulated Il10 transcription and ubiquitin ligase/proteasome-mediated protein degradation [J]. 2016, 197(8): 3393-405.
- [13] ZHU J, NATHAN C, JIN W, et al. Conversion of proepithelin to epithelins: roles of SLPI and elastase in host defense and wound repair [J]. *Cell*, 2002, 111(6): 867-78.
- [14] MATHIEU P, ARSENAULT B J, BOULANGER M C, et al. Pathobiology of Lp(a) in calcific aortic valve disease [J]. *Expert Rev Cardiova Therapy*, 2017, 15(10): 797-807.
- [15] HE C, TANG H, MEI Z, et al. Human interstitial cellular model

- in therapeutics of heart valve calcification [J]. *Amino acids*, 2017, 49(12): 1981-97.
- [16] MOSCH J, GLEISSNER C A, BODY S, et al. Histopathological assessment of calcification and inflammation of calcific aortic valves from patients with and without diabetes mellitus [J]. *Histology and histopathology*, 2017, 32(3): 293-306.
- [17] YANG H, CHENG J, SONG Z, et al. The anti-adipogenic effect of PGRN on porcine preadipocytes involves ERK1,2 mediated PPARgamma phosphorylation [J]. *Mol Biol Rep*, 2013, 40(12): 6863-72.
- [18] MATSUBARA T, MITA A, MINAMI K, et al. PGRN is a key adipokine mediating high fat diet-induced insulin resistance and obesity through IL-6 in adipose tissue [J]. *Cell Metab*, 2012, 15(1): 38-50.
- [19] ZOU S, LUO Q, SONG Z, et al. Contribution of progranulin to protective lung immunity during bacterial pneumonia [J]. *J Infect Diseases*, 2017, 215(11): 1764-73.
- [20] PERROTTA I, SCIANGULA A, AQUILA S, et al. Matrix metalloproteinase-9 expression in calcified human aortic valves: a histopathologic, immunohistochemical, and ultrastructural study [J]. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2016, 24(2): 128-37.
- [21] LI G, DONG T, YANG D, et al. Progranulin promotes lymphangiogenesis through VEGF-C and is an independent risk factor in human esophageal cancers [J]. *Human Pathol*, 2018, 75: 116-24.
- [22] HU S Y, TAI C C, LI Y H, et al. Progranulin compensates for blocked IGF-1 signaling to promote myotube hypertrophy in C2C12 myoblasts via the PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. *FEBS Letters*, 2012, 586(19): 3485-92.
- [23] YAO Q, SONG R, AO L, et al. Neurotrophin 3 upregulates proliferation and collagen production in human aortic valve interstitial cells: a potential role in aortic valve sclerosis [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2017, 312(6): C697-706.