

# LPS通过上调BMP4促进猪主动脉瓣膜间质细胞成骨样分化

朱梦颖 施琼 安利钦 刘艳 翁亚光\*

(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** 该文主要探究了LPS通过上调骨形态发生蛋白4(bone morphogenetic protein 4, BMP4)促进猪主动脉瓣膜间质细胞(valve interstitial cells, VICs)成骨样分化的作用及机制, 为钙化性主动脉瓣膜病(calcific aortic valve disease, CAVD)的干预及治疗提供理论依据。采用免疫组化法检测非CAVD组和CAVD组瓣膜组织中Runx2和BMP4的表达, Western blot检测Runx2和BMP4的蛋白表达; 采用胶原酶(I型)消化瓣膜后分离猪VICs, 用免疫荧光染色进行表型鉴定; 采用LPS和重组人BMP4腺病毒处理VICs; 用ALP染色、茜素红S染色、qRT-PCR和Western blot法检测细胞的早期和晚期成骨能力、Smad1/5/8和ERK1/2的磷酸化水平。结果显示, BMP4和Runx2蛋白在CAVD组中的表达水平明显高于non-CAVD组。原代猪VICs分离成功, 其中 $\alpha$ -SMA和Vimentin呈阳性, CD31呈阴性。LPS可使VICs ALP活性增强、钙盐沉积增多、钙化指标上升和BMP4增加; BMP4可使VICs ALP活性增强、钙盐沉积增多、钙化指标上升, 且使Smad1/5/8和ERK1/2的磷酸化水平升高。提示LPS可以上调BMP4的表达进而促进VICs的成骨样分化, Smad1/5/8与ERK1/2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; LPS; BMP4; 成骨样分化

## LPS Facilitates Osteogenic Differentiation of Porcine Aortic Valve Interstitial Cells by Upregulating BMP4

ZHU Mengying, SHI Qiong, AN Liqin, LIU Yan, WENG Yaguang\*

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

**Abstract** This study aimed to investigate the effect and mechanism of LPS on osteogenic differentiation of porcine aortic VICs (valve interstitial cells) by upregulating BMP4 (bone morphogenetic protein 4), which could provide a theoretical basis for the intervention and treatment of CAVD (calcific aortic valve disease). The expression of BMP4 and Runx2 in the non-CAVD group and CAVD group were detected by immunohistochemistry and Western blot. The porcine VICs were isolated by collagenase (type I) after the digestion of the valve, and the phenotype was identified by immunofluorescence staining. VICs were treated with LPS and recombinant human BMP4 adenovirus. ALP (alkaline phosphatase) staining, alizarin red S staining, qRT-PCR, and Western blot were used to

收稿日期: 2020-09-19

接受日期: 2020-11-18

国家自然科学基金(批准号: 81672103)和重庆市科委民生项目(批准号: cstc2018jscx-msybX0113)资助的课题

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

Received: September 19, 2020

Accepted: November 18, 2020

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81672103) and the Science and Technology Commission Livelihood Project of Chongqing (Grant No.cstc2018jscx-msybX0113)

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

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5452>

detect the early and late osteogenic differentiation abilities of cells. The protein levels of p-Smad1/5/8 and p-ERK1/2 were measured by Western blot. The results showed that the expression of BMP4 and Runx2 in the CAVD group was significantly higher than that in the non-CAVD group. The porcine primary VICs were successfully isolated. The staining of  $\alpha$ -SMA and Vimentin were positive, while the staining of CD31 was negative. LPS significantly increased the ALP activity and the deposition of calcium salts in VICs. The mRNA and protein levels of calcification markers and BMP4 were increased. Besides, BMP4 also increased the ALP activity, the deposition of calcium salts, and the mRNA and protein levels of calcification makers. Meanwhile, the protein levels of p-Smad1/5/8 and p-ERK1/2 were increased by BMP4. In conclusion, LPS promotes osteoblastic differentiation of aortic valve cells by upregulating BMP4. The Smad1/5/8 and ERK1/2 signaling pathways may play important roles in these processes.

**Keywords** calcific aortic valve disease; valve interstitial cells; LPS; BMP4; osteogenic differentiation

钙化性主动脉瓣膜病(calcific aortic valve disease, CAVD)是一类以主动脉瓣病理性增厚和钙化为特点,引起主动脉瓣狭窄并最终导致慢性心力衰竭的瓣膜疾病<sup>[1]</sup>。在国外,CAVD是最常见的瓣膜疾病,在 $\geq 65$ 岁患者中流行<sup>[2]</sup>,而且随着人口老龄化,患该病的人数可能会进一步增加<sup>[3]</sup>。目前,CAVD的发生被认为是一个多步骤的过程,包括内皮功能损伤、脂质沉积、炎症、细胞外基质的过度产生和降解沉积等,最终会导致不可逆的瓣膜钙化<sup>[4-5]</sup>。临床上缺乏治疗CAVD的有效药物,CAVD患者只能通过主动脉瓣膜置换术进行治疗<sup>[6-7]</sup>。因此,需要对CAVD的致病机制进行研究,以便发现该疾病的早期诊断标志物和新的药物治疗靶点。

近年来发现,炎症在CAVD的发生发展中起到了关键作用。其中内皮损伤与高浓度的氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, oxLDL)引起的中性粒细胞和巨噬细胞等炎症细胞浸润是瓣膜发生损伤的一个始动原因<sup>[8-9]</sup>。在钙化性瓣膜组织中,炎症因子白介素-6(interleukin-6, IL-6)、白介素-8(interleukin-8, IL-8)和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )表达增加;并伴有NF- $\kappa$ B(nuclear factor-kappa B)和MyD88(myeloid differentiation factor 88)信号通路的激活<sup>[10-11]</sup>。其中,主动脉瓣膜分为三层:纤维层、松质层和心室肌层,瓣膜间质细胞(valve interstitial cells, VICs)在三层结构中均存在,且可发生表型转化,主要参与CAVD的发生过程<sup>[12-13]</sup>。

骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs)又称骨形成蛋白,是一组具有类似结构的高度保守的功能蛋白,属于转化生长因子超家族<sup>[14]</sup>,可以调节骨骼的生成、细胞的增殖凋亡和器官的形成。在临床上,重组的人BMPs已被作为骨诱导剂用于修

复骨缺损<sup>[15]</sup>。在CAVD的发生发展中, VICs会呈成骨样分化,在分化过程中碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、骨形态发生蛋白2(bone morphogenetic protein 2, BMP2)、骨调素(osteopontin, OPN)、骨钙蛋白(osteocalcin, OCN)的表达增加。在钙化性瓣膜组织中, BMP2的表达增加,且在体外实验中, BMP2可以使VICs中的ALP升高,但其具体作用机制不明<sup>[16]</sup>。其中, BMP4与BMP2均有很强的促成骨能力。在动脉粥样硬化中, BMP4可驱动局部动脉粥样硬化的发生,还可通过调节同源框蛋白B9(homeobox B9, HoxB9)的表达作用于TNF从而介导炎症与钙化的发生<sup>[17]</sup>。在CAVD中, BMP4的具体作用与机制尚且不明。

本文拟通过LPS作用于BMP4来探讨炎症与VICs成骨样表型转化的关系。本研究发现, Runt相关转录因子2(Runt-related transcription factor 2, Runx2)和BMP4在钙化性瓣膜组织中存在高表达现象,以猪VICs作为研究对象,探究LPS是否通过BMP4对VICs成骨样分化发挥作用的科学问题,为CAVD的靶向药开发提供新思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 人瓣膜组织和猪VICs的来源 于重庆医科大学附属第一医院心胸外科收集主动脉瓣膜组织。其中主动脉夹层排除其他瓣膜病变的患者为非CAVD组;主动脉严重狭窄或反流的患者为CAVD组。以上组别的患者及家属均签署知情同意书。用磷酸盐缓冲液漂洗术后取下的主动脉瓣膜,其中一部分用4%的多聚甲醛固定,用于切片染色。另一部分放入液氮保存,收集到一定数量后,提取组织蛋白

进行下一步实验。于重庆市璧山区动物检疫定点屠宰场收集猪主动脉瓣膜。选取8~10月龄的健康家猪10只, 体重100~150 kg, 取没有钙化或纤维化的猪主动脉瓣膜。本文涉及的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。

**1.1.2 试剂** 主要试剂包括: I型胶原酶、LPS(美国Sigma公司),  $\beta$ -磷酸甘油、维生素C、地塞米松、胰蛋白胨、苏木素、茜素红染料(北京索莱宝生物科技有限公司), M199培养基(美国Hyclone公司), 澳洲胎牛血清(赛澳美细胞技术有限公司), 重组人BMP4腺病毒(美国芝加哥大学骨科分子肿瘤实验室), 兔抗人BMP4、兔抗人OPN和兔抗人Vimentin(沈阳万类生物科技有限公司), 鼠抗人GAPDH(武汉三鹰生物科技有限公司), 鼠抗人Runx2、兔抗人Smad1/5/8和羊抗人p-Smad1/5/8(美国SantaCruz公司), 兔抗人ERK1/2和兔抗人p-ERK1/2(美国CST公司), 兔抗人 $\alpha$ -SMA和兔抗人CD3(英国Abcam公司), 山羊抗鼠、山羊抗兔和兔抗山羊二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司), 荧光兔二抗(北京博奥森生物技术有限公司), 化学发光试剂盒、聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜(Milipore公司), Trizol试剂、逆转录试剂盒(TaKaRa公司), 2 $\times$  SYBR Green(美国Bimake公司), qRT-PCR引物合成于深圳华大基因股份有限公司, 碱性磷酸酶(ALP)染色试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)。其他试剂均为进口分装或国产分析纯。

## 1.2 方法

**1.2.1 猪VICs的分离与培养** 在重庆市璧山区动物检疫定点屠宰场处死家猪后, 立即取主动脉瓣膜于含1%青霉素/链霉素的PBS中漂洗3次, 然后放入无抗生素无血清的M199中保存, 整个过程在20 min内完成。回到实验室后, 立即在超净台中再次用含1%青霉素/链霉素的PBS洗3次, 同时将I型胶原酶(2 mg/mL)于37 °C孵育30 min。然后用无菌棉签轻轻擦拭瓣膜表面, 以去除内皮细胞, 并将瓣膜剪成1 mm $\times$ 1 mm的小块组织, 放入胶原酶中消化, 待小块组织有60%消化成絮状物, 胶原酶溶液浑浊后, 终止消化。1 000 r/min离心3 min, 用含10% FBS、1%青霉素/链霉素的M199培养基重悬, 置于培养皿中生长。细胞培养条件为37 °C、5% CO<sub>2</sub>, 3天换液1次; 细胞生长密度达到80%左右时传代, 取第3~8代VICs用于后续实验。

**1.2.2 免疫组织化学染色** 石蜡切片: 56 °C烘片3 h,

二甲苯脱蜡; 100%、95%、80%、70%酒精脱洗, 枸橼酸钠缓冲液微波加热进行抗原修复, 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>封闭内源性过氧化物酶15 min, 山羊血清室温封闭20 min, 去除非特异性背景, 相应的一抗4 °C孵育过夜。第二天滴加生物素标记的二抗, 湿片盒内放置20 min, 然后滴加辣根过氧化物酶, DAB显色, 镜下观察染色情况适时终止, 苏木素复染, 脱水, 透明, 封片。

**1.2.3 免疫荧光鉴定细胞表型** 猪VICs接种于24孔板的爬片, 约50%细胞密度时用4%多聚甲醛固定30 min; 0.5% Triton-X100破膜处理20 min; 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理内源性过氧化氢酶15 min; 室温下山羊血清封闭30 min; 加入1:50稀释的一抗(兔抗人 $\alpha$ -SMA、CD31和Vimentin抗体) 4 °C孵育过夜; 加入1:200稀释的二抗(荧光染料标记的羊抗兔IgG抗体)室温避光孵育2 h; DAPI复染细胞核; 于荧光显微镜下观察 $\alpha$ -SMA、CD31、Vimentin表达情况。

**1.2.4 VICs的成骨分化诱导** 加入10 mmol/L  $\beta$ -甘油磷酸钠、50  $\mu$ g/mL维生素C、100 nmol/L地塞米松于M199培养基中作为钙盐诱导培养基, 用于诱导VICs的成骨分化。细胞贴壁后密度达到约50%时, 进行处理。

**1.2.5 LPS、BMP4处理** 取对数生长期的细胞传代, 细胞密度达到50%~60%后, 加入浓度为4  $\mu$ g/mL的LPS处理36 h, qRT-PCR检测提取的细胞总RNA; 处理48 h, Western blot检测提取的细胞总蛋白。细胞密度达到60%~70%后, 转染重组人BMP4腺病毒, GFP腺病毒作为空载对照, 12 h后换液, 24 h后观察荧光感染情况。感染36 h和72 h时, 提取细胞总RNA, 用于后续qRT-PCR检测; 感染48 h和96 h时, 提取细胞总蛋白, 用于后续的Western blot检测。将实验分为3组: (1) Blank组, 即未经任何处理的VICs细胞; (2) GFP组, 即经空载绿色荧光的腺病毒处理的VICs细胞; (3) BMP4组, 即经重组人BMP4腺病毒处理的VICs细胞。

**1.2.6 qRT-PCR法检测VICs中BMP4以及相关成骨指标的mRNA表达** 用PBS冲洗处理后的细胞3次, Trizol法提取各组细胞的总RNA, 两步法将RNA逆转录成cDNA后进行qRT-PCR扩增。其中内参选用GAPDH, 检测各组细胞中BMP4、Runx2和OPN的表达水平。qRT-PCR反应体系为10  $\mu$ 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。重复实验3次, 引物序列见表1。

**1.2.7 Western blot检测VICs中BMP4以及相关成骨**

表1 qRT-PCR用到的引物序列  
Table 1 The sequences of primers for qRT-PCR

基因 Genes	引物序列(5'→3') Primer sequences (5'→3')
<i>BMP4</i> (human)	F: GGT GGG AAA CTT TTG ATG TGA G R: TTG AGG TAA CGA TCG GCT AAT C
<i>BMP4</i> (pig)	F: TGT GAG CCC TGC GGT CCT TC R: TGG TGG GTC CGT GTC TGA TGG
<i>Runx2</i> (pig)	F: GCA CTA CCC AGC CAC CTT TA R: TAT GGA GTG CTG CTG GTC TG
<i>OPN</i> (pig)	F: GAG CAA ACA GAC GAT GTG GA R: GAC CAG CTC ATC GGA TTC AT
<i>GAPDH</i> (pig)	F: GGT GAA GGT CGG AGT GAA CG R: CGT GGG TGG AAT CAT ACT GGA

指标的蛋白表达 提取各组细胞的总蛋白,加入5×蛋白上样缓冲液,煮沸10 min至蛋白变性。用BCA法测蛋白浓度,SDS-PAGE分离目的蛋白,恒流湿转至PVDF膜,5%脱脂奶粉室温封闭2 h,用一抗4 °C孵育过夜(稀释比例BMP4、Runx2、p-Smad1/5/8、Smad1/5/8均为1:500,OPN、p-ERK1/2、ERK1/2均为1:1 000,GAPDH为1:2 000),洗膜,二抗37 °C孵育1 h(稀释比例为1:5 000),洗膜,显影成像。用Image-lab软件分析各条带的灰度值,以内参GAPDH的灰度值为对照,计算出各组的蛋白表达量,重复实验3次。

1.2.8 ALP染色 将VICs细胞接种于24孔板后,待细胞密度达到50%后加入不同的处理,12 h后换液,同时加入钙盐培养基培养7天,之后弃去培养基用PBS冲洗3次,4%多聚甲醛室温固定20 min,弃多聚甲醛后,每孔加入大约200 μL的染液进行ALP染色,避光30 min后观察染色结果。

1.2.9 茜素红S染色 将VICs细胞接种于24孔板,细胞融合度达到50%时给予不同的处理,12 h后换液,同时加入钙盐培养基培养14天,弃去培养基用PBS冲洗3次,4%多聚甲醛室温固定20 min,弃多聚甲醛后加入0.4%茜素红S染液,染色5 min,弃去染液并用去离子水洗涤以终止反应,显微镜下观察钙盐沉积情况。

1.2.10 统计学处理 实验数据的统计分析均采用GraphPad Prism 5软件。计量资料用均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示。两组间比较用 $t$ 检验,多组间比较用单因素方差分析。 $P<0.05$ 表示结果具有显著统计学差异。

## 2 结果

### 2.1 BMP4和Runx2在CAVD组中表达明显升高

收集主动脉夹层瓣膜、钙化性瓣膜疾病患者主

动脉瓣膜,免疫组织化学染色结果显示,CAVD瓣膜组织中BMP4和Runx2的蛋白水平明显升高(图1A);Western blot结果也显示,CAVD组中BMP4和Runx2的蛋白表达水平较non-CAVD组显著升高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ,  $P<0.001$ ,图1B和图1C)。结果提示,BMP4可能是促进瓣膜钙化的指标,且在CAVD的发生发展中有重要作用。

### 2.2 原代猪VICs的形态特征及表型鉴定

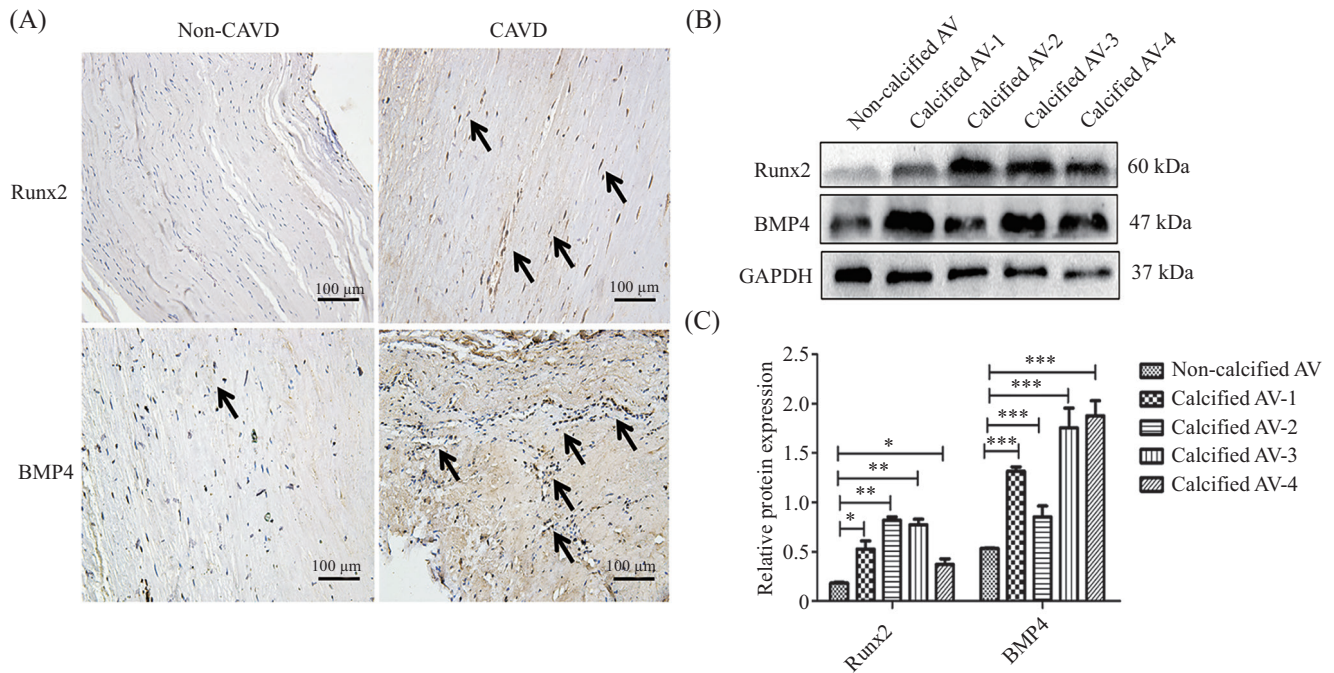
VICs接种于24孔板24 h后贴壁,细胞呈现梭形(图2A);免疫荧光染色显示,在所培养细胞的细胞质中,间质细胞特异性蛋白标志物 $\alpha$ -SMA阳性表达(图2B)、Vimentin阳性表达(图2C);而内皮细胞特异性标志物CD31无表达(图2D)。结果表明,原代猪VICs分离成功。

### 2.3 LPS促进猪VICs的BMP4表达和成骨分化

将细胞接种于培养皿,细胞密度达到60%后,用LPS(4 μg/mL)处理36 h,然后提取细胞总RNA,qRT-PCR结果显示,BMP4、Runx2和OPN基因水平较空白组显著升高( $P<0.05$ ,图3A);同时用LPS处理48 h后,提取细胞总蛋白,Western blot结果显示,BMP4、Runx2和OPN蛋白水平较空白组显著升高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ,图3B和图3C)。同空白组相比,LPS处理VICs 7天能明显增强ALP染色(图3D),处理14天钙盐沉积明显增加(图3E)。结果显示,LPS能促进猪VICs的成骨指标升高和BMP4的表达增加,同时促进VICs的早期和晚期成骨样表型转化。

### 2.4 BMP4促进猪VICs的成骨分化

细胞密度达到70%后,转染Ad-BMP4、Ad-GFP,提取细胞总RNA。qRT-PCR结果显示,BMP4过表达成功,BMP4组Runx2和OPN基因水平分别在36 h和

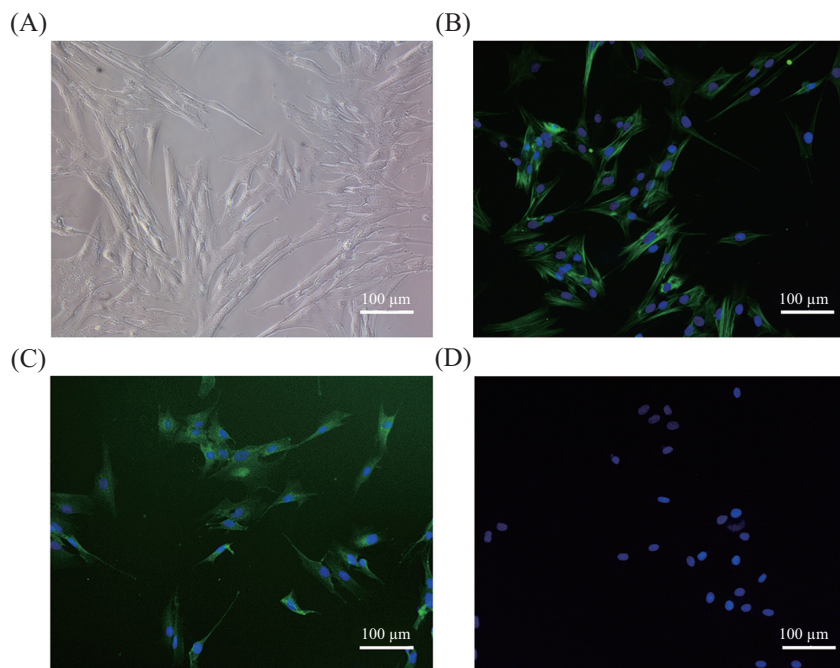


A: 免疫组化检测non-CAVD与CAVD瓣膜组织中Runx2和BMP4的表达, 其中箭头所指为阳性部位; B、C: Western blot检测Runx2和BMP4的蛋白表达水平。\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ 。

A: the expression of BMP4 and Runx2 in non-CAVD group and CAVD group were detected by immunohistochemistry. The arrows indicate the positive areas; B,C: the protein expression levels of Runx2 and BMP4 were detected by Western blot. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ .

图1 Runx2和BMP4蛋白在CAVD组中明显高表达

Fig.1 The protein expression levels of Runx2 and BMP4 in CAVD group were significantly higher

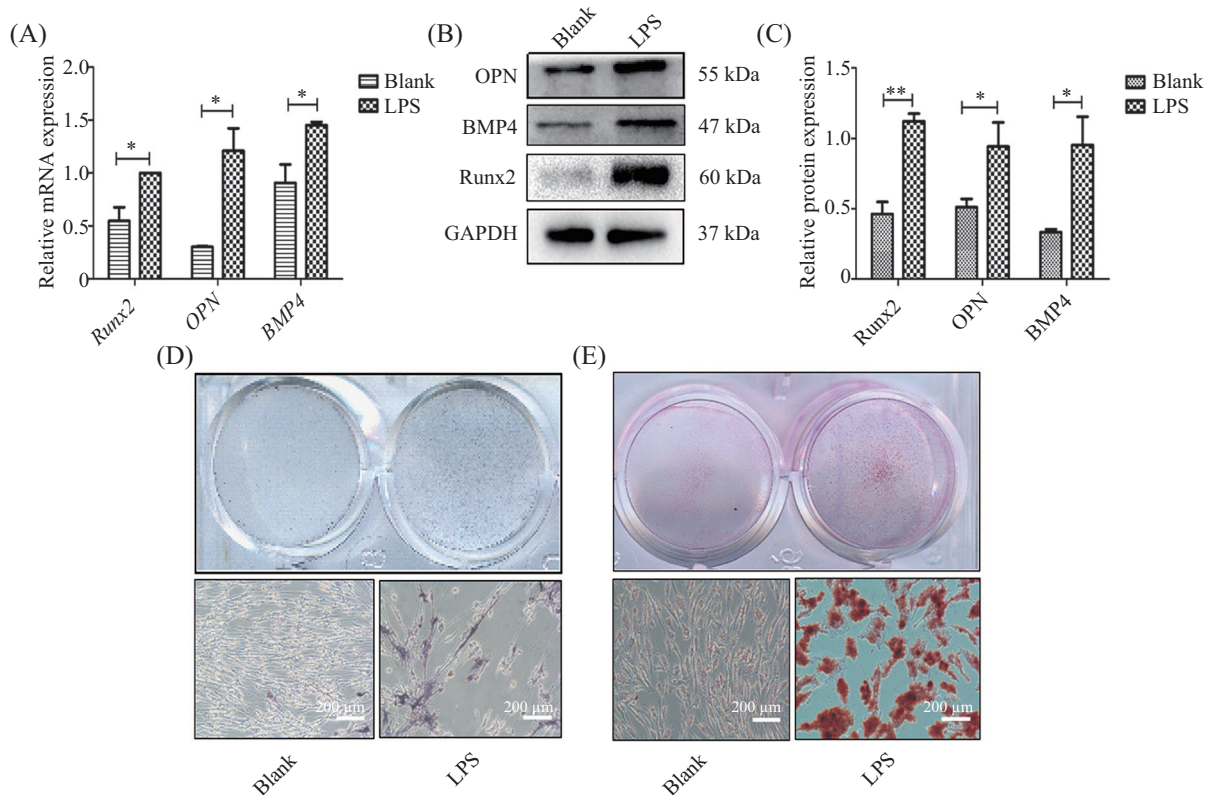


A: 光学显微镜下VICs形态; B: α-SMA免疫荧光染色; C: Vimentin免疫荧光染色; D: CD31免疫荧光染色。

A: light microscopy image of VICs; B: immunofluorescence staining of α-SMA; C: immunofluorescence staining of Vimentin; D: immunofluorescence staining of CD31.

图2 猪VICs形态及表型鉴定

Fig.2 Morphological and phenotypic characterization of porcine aortic VICs



A: 加入LPS(4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )检测Runx2、OPN、BMP4的mRNA水平; B、C: 加入LPS(4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )检测Runx2、OPN、BMP4的蛋白水平; D: ALP染色检测VICs的早期成骨分化能力; E: 茜素红染色检测VICs的晚期成骨分化能力。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

A: the mRNA expression levels of Runx2, OPN, and BMP4 were detected by adding LPS (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); B,C: the protein expression levels of Runx2, OPN, and BMP4 were detected by adding LPS (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); D: the cell early osteogenic differentiation ability was measured by ALP staining; E: the cell late osteogenic differentiation ability was measured by alizarin red S staining. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

图3 LPS促进猪VICs的BMP4表达和成骨分化

Fig.3 LPS promotes BMP4 expression and the osteogenic differentiation of porcine aortic VICs

72 h较Blank组、GFP组显著升高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ , 图4A); 提取细胞总蛋白后, Western blot结果显示, BMP4组Runx2和OPN蛋白水平分别在48 h和96 h较Blank组、GFP组显著升高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ , 图4B~图4E)。同空白组相比, BMP4处理VICs 7天ALP染色增加(图4F), 处理14天钙盐沉积增加(图4G)。结果显示, BMP4能促进VICs的早期和晚期成骨样表型转化并使得成骨指标升高。

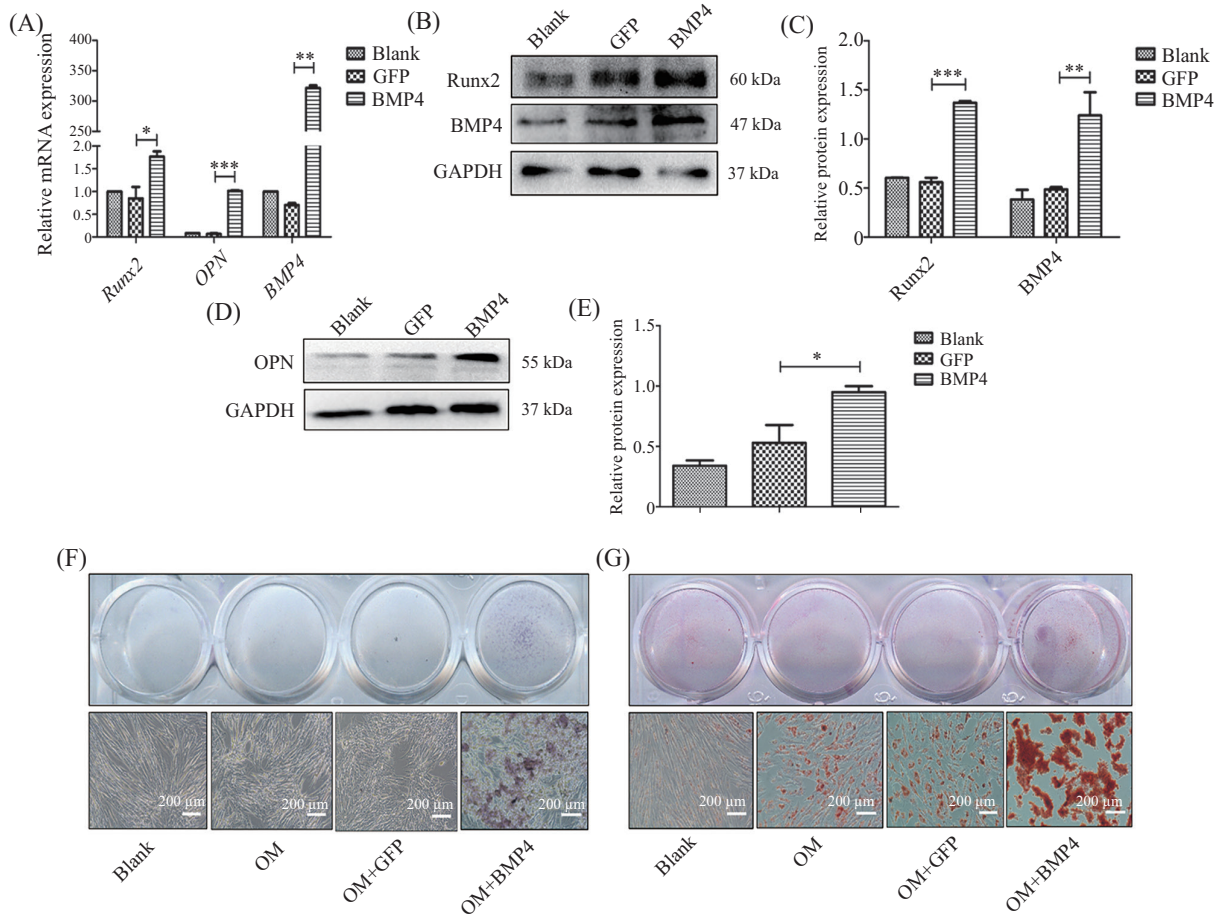
### 2.5 猪VICs中BMP4的过表达对Smad1/5/8通路和ERK1/2通路的影响

转染Ad-BMP4、Ad-GFP至VICs 24 h后, 用Western blot检测Smad1/5/8和ERK1/2信号通路的蛋白变化。同Blank组、GFP组相比, BMP4组中p-Smad1/5/8通路和p-ERK1/2通路被激活( $P < 0.05$ , 图5A~图5F), 但总的Smad1/5/8和ERK1/2蛋白表达水平在三组间没有显著差异( $P > 0.05$ , 图5A~图5F)。结果显示, BMP4可能通过Smad1/5/8和ERK1/2信号通

路来调节VICs细胞的成骨样分化。

## 3 讨论

CAVD的发生与年龄相关, 因此CAVD被认为是一种被动的退行性疾病; 然而, 最新研究发现CAVD是一种活跃的、细胞驱动的过程<sup>[15]</sup>。在成人健康瓣膜中, 留驻的VICs保持静止, 维持成纤维细胞样特征, 但在CAVD中VICs会向成骨样表型分化, 伴有Runx2、OPN、OCN、ALP和BMP2的表达升高<sup>[18-19]</sup>。炎症刺激也能促进VICs的成骨样表型转化。LPS刺激VICs, 使得IL-6、IL-8、TLR2、TLR4的表达增加, 促进炎症因子的分泌, 激活NF- $\kappa$ B和MAPK信号通路, 进一步促进VICs的成骨样表型转化。我们在研究中发现, LPS促进VICs成骨分化过程中伴有成骨指标Runx2和OPN的表达升高并伴有BMP4表达增加, 早期钙化指标ALP染色加深, 晚期钙化指标钙盐沉积增加。在此过程中, BMP4水平升高, 推



A: 加入Ad-BMP4, 检测*Runx2*、*OPN*、*BMP4*的mRNA水平; B、C: 加入Ad-BMP4 48 h, 检测*Runx2*、*BMP4*的蛋白水平; D、E: 加入Ad-BMP4 72 h, 检测*OPN*的蛋白水平; F: ALP染色检测VICs的早期成骨分化能力; G: 茜素红染色检测VICs的晚期成骨分化能力。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

A: the mRNA expression levels of *Runx2*, *OPN*, *BMP4* were measured after adding Ad-BMP4; B,C: the protein expression levels of *Runx2*, *BMP4* were measured after adding Ad-BMP4 for 48 h; D,E: the protein expression of *OPN* was measured after adding Ad-BMP4 for 72 h; F: the early osteogenic differentiation ability of VICs was measured by ALP staining; G: the late osteogenic differentiation ability of VICs was measured by alizarin red S staining. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

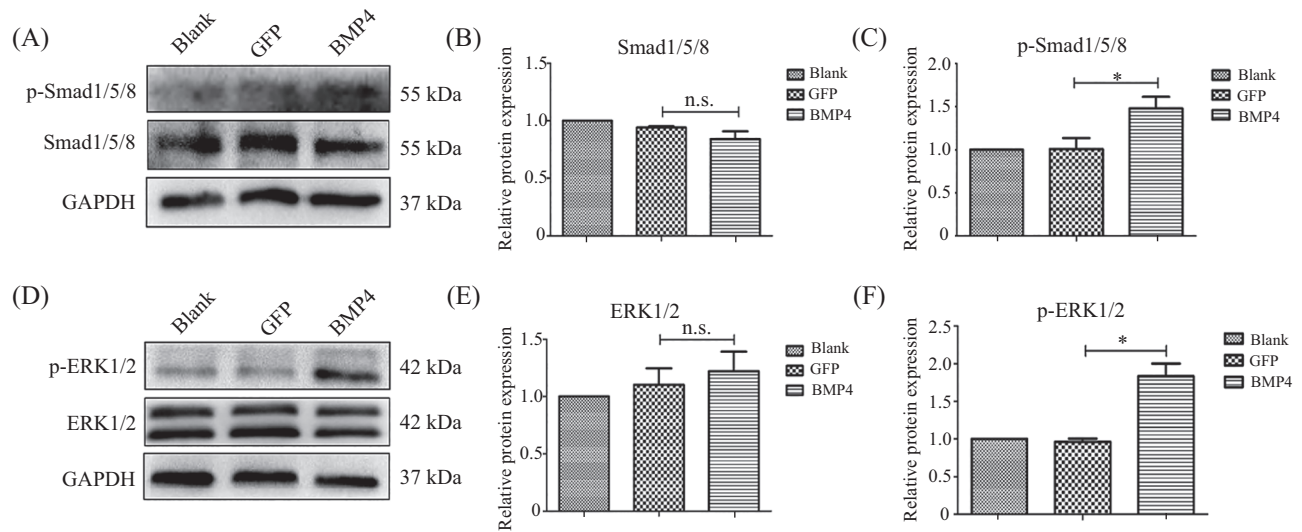
图4 BMP4促进猪VICs的成骨分化

Fig.4 BMP4 promotes the osteogenic differentiation of porcine aortic VICs

测其可能作为LPS作用的下游基因参与VICs的成骨分化。

BMPs在心脏瓣膜发育和骨形成过程中有重要作用<sup>[20]</sup>。在钙化性主动脉瓣中发现BMP2配体高表达,同时伴有p-Smad1/5/8增加<sup>[18-19,21-22]</sup>,这表明BMPs家族和其经典信号通路Smad1/5/8在瓣膜钙化中发挥了重要作用。有文献报道,BMP2和BMP4被认为是钙化中较为常见的BMPs,然而相对于BMP2直接诱导钙化,同家族的BMP4更多的是与内皮病变进程相关<sup>[23]</sup>。瓣膜的钙化过程中会出现瓣膜内皮细胞的损伤和内皮向间质转化<sup>[24]</sup>,最终表现为VICs的表型转化。有研究证实,BMP4可以诱导血管内皮细胞产

生血管细胞黏附分子-1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)和细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)引起血管炎症进而驱动局部的动脉粥样硬化<sup>[17]</sup>;而且BMP4和Wnt3a可以在体外诱导血管平滑肌细胞的钙化<sup>[25]</sup>,这表明了BMP4在心血管钙化中可能具有重要作用。在实验中我们发现,BMP4在瓣膜的钙化过程中能通过p-Smad1/5/8发挥促钙化作用。ERK通路在细胞表面和细胞核之间控制不同的细胞功能,包括细胞的增殖、迁移和存活<sup>[26]</sup>。有研究发现,机械压力可以通过ERK1/2信号通路促进二尖瓣VICs的纤维化<sup>[27]</sup>;牙龈卟啉单胞菌外膜囊泡可以通过ERK1/2-RUNX2促



A~C: Western blot检测Smad1/5/8的磷酸化水平; D~F: Western blot检测ERK1/2的磷酸化水平。n.s.: 无显著差异。\* $P < 0.05$ 。

A-C: the phosphorylation levels of Smad1/5/8 were detected by Western blot; D-F: the phosphorylation levels of ERK1/2 were detected by Western blot. n.s.: without significant difference. \* $P < 0.05$ .

图5 BMP4对Smad1/5/8通路和ERK1/2通路的影响

Fig.5 The effects of BMP4 on Smad1/5/8 signaling pathway and ERK1/2 signaling pathway

进血管平滑肌细胞的钙化<sup>[28]</sup>。本实验证实, BMP4能通过ERK1/2信号通路发挥促钙化作用。

本研究证实, BMP4蛋白在人钙化性瓣膜组织中高表达, 由此推测BMP4可能在瓣膜钙化过程中发挥重要作用。因正常人主动脉瓣来源十分有限, 从钙化性瓣膜组织分离原代VICs极其困难, 故我们选取了与人BMP4蛋白的氨基酸序列同源性高达98%的猪VICs作为研究对象。在用LPS处理VICs后, 发现成骨指标Runx2、OPN的表达增加, 并伴有BMP4的升高, 同时ALP染色加深, 钙盐沉积增多; 过表达BMP4后, 发现成骨指标Runx2、OPN升高, ALP染色阳性, 钙盐沉积阳性, 说明LPS能通过BMP4促进VICs的成骨样分化。同时, Western blot结果显示, BMP4能激活Smad1/5/8和ERK1/2信号通路, 说明BMP4可能是通过Smad1/5/8和ERK1/2信号通路发挥促钙化作用的。本研究证实, 炎症刺激VICs后BMP4增加, 促进VICs的成骨样表型转化。其中, BMP4在促VICs钙化中发挥了重要作用, 探究其是否可以作为CAVD的早期诊断标志物或药物治疗靶点显得尤为重要。不足之处在于, 所用细胞为猪VICs而非人VICs, BMP4蛋白表达的氨基酸序列与人相比有微小差异; 同时应检测正常人与CAVD患者外周血中BMP4的表达水平, 以验证其是否可以作为CAVD的早期诊断标志物。

综上所述, 本研究证实了LPS能通过上调BMP4的表达进而促进VICs的成骨样分化, 这一作用机制可能与Smad1/5/8和ERK1/2的激活有关。这一发现为挖掘CAVD的治疗靶点提供了新的思路。然而LPS调控BMP4的具体机制还有待进一步研究。

## 参考文献 (References)

- [1] LINDMAN B R, CLAVEL M A, MATHIEU P, et al. Calcific aortic stenosis [J]. Nat Rev Dis Primers, 2016, 27(5): 581.
- [2] VAHANIAN A, ALFIERI O, ANDREOTTI F, et al. Guidelines on the management of valvular heart disease (version 2012): the joint task force on the management of valvular heart disease of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS) [J]. Eur Heart J, 2012, 33(19): 2451-96.
- [3] D'ARCY J L, PRENDERGAST B D, CHAMBERS J B, et al. Valvular heart disease: the next cardiac epidemic [J]. Heart, 2011, 97(2): 91-3.
- [4] AKAT K, BORGGREFE M, KADEN J J. Aortic valve calcification: basic science to clinical practice [J]. Heart, 2009, 95(8): 616-23.
- [5] LI C, XU S, GOTLIEB A I. The response to valve injury. A paradigm to understand the pathogenesis of heart valve disease [J]. Cardiovasc Pathol, 2011, 20(3): 183-90.
- [6] LINDMAN B R, BONOW R O, OTTO C M. Current management of calcific aortic stenosis [J]. Circ Res, 2013, 113(2): 223-37.
- [7] MARQUIS-GRAVEL G, REDFORS B, LEON M B, et al. Medical treatment of aortic stenosis [J]. Circulation, 2016, 134: 1766-84.



- [8] MAHMUT A, BOULANGER M C, FOURNIER D, et al. Lipoprotein lipase in aortic valve stenosis is associated with lipid retention and remodeling [J]. *Eur J Clin Invest*, 2013, 43(6): 570-8.
- [9] IEDWARDS I J, GOLDBERG I J, PARKS J S, et al. Lipoprotein lipase enhances the interaction of low density lipoproteins with artery-derived extracellular matrix proteoglycans [J]. *J Lipid Res*, 1993, 34(7): 1155-63.
- [10] MENG X, AO L, SONG Y, et al. Expression of functional Toll-like receptors 2 and 4 in human aortic valve interstitial cells: potential roles in aortic valve inflammation and stenosis [J]. *Am J Phys Cell Phys*, 2008, 294(1): C29.
- [11] YANG X, FULLERTON D A, SU X, et al. Pro-osteogenic phenotype of human aortic valve interstitial cells is associated with higher levels of Toll-like receptors 2 and 4 and enhanced expression of bone morphogenetic protein 2 [J]. *Am Coll Cardiol*, 2009, 53(6): 491-500.
- [12] SALAS M J, SANTANA O, ESCOLAR E, et al. Medical therapy for calcific aortic stenosis [J]. *Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2012, 17(2): 133-8.
- [13] SCHOEN F J. Evolving concepts of cardiac valve dynamics: the continuum of development, functional structure, pathobiology, and tissue engineering [J]. *Circulation*, 2008, 118(18): 1864-80.
- [14] CARABELLO B A, PAULUS W J. Aortic stenosis [J]. *Lancet*, 2009, 373(9667): 956-66.
- [15] 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.
- [16] REUSTLE A, TORZEWSKI M. Role of p38 MAPK in atherosclerosis and aortic valve sclerosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(12): 3761-81.
- [17] SOUILHOL C, GAUCI I, FENG S, et al. Homeobox B9 integrates bone morphogenic protein 4 with inflammation at atheroprone sites [J]. *Cardiovasc Res*, 2020, 116(7): 1300-10.
- [18] RAJAMANNAN N M, SUBRAMANIAM M, RICKARD D, et al. Human aortic valve calcification is associated with an osteoblast phenotype [J]. *Circulation*, 2003, 107(17): 2181-4.
- [19] WIRRIE E E, HINTON R B, YUTZEY K E. Differential expression of cartilage and bone-related proteins in pediatric and adult diseased aortic valves [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2011, 50(3): 561-9.
- [20] COMBS M D, YUTZEY K E. Heart valve development: regulatory networks in development and disease [J]. *Circ Res*, 2009, 105(5): 408-21.
- [21] MOHLER E R, GANNON F, REYNOLDS C, et al. Bone formation and inflammation in cardiac valves [J]. *Circulation*, 2001, 103(11): 1522-8.
- [22] ANKENY R F, THOURANI V H, WEISS D, et al. Preferential activation of SMAD1/5/8 on the fibrosa endothelium in calcified human aortic valves—association with low BMP antagonists and SMAD6 [J]. *PLoS One*, 2011, 6(6): e20969.
- [23] YAO Y, BENNETT B J, WANG X, et al. Inhibition of bone morphogenetic proteins protects against atherosclerosis and vascular calcification [J]. *Circ Res*, 2010 107(4): 485-94.
- [24] ZHANG X, LI Y, YANG P, et al. Trimethylamine-N-oxide promotes vascular calcification through activation of NLRP3 (nucleotide-binding domain, leucine-rich-containing family, Pyrin domain-containing-3) inflammasome and NF-kappaB (nuclear factor kappaB) signals [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2020, 40: 751-65.
- [25] MIKHAYLOVA L, MALMQUIST J, NURMINSKAYA M. Regulation of *in vitro* vascular calcification by BMP4, VEGF and Wnt3a [J]. *Calcif Tissue Int*, 2007, 81(5): 372-81.
- [26] SHAUL Y D, SEGER R. The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1773: 1213-26.
- [27] BLOMME B, DEROANNE C, HULIN A, et al. Mechanical strain induces a pro-fibrotic phenotype in human mitral valvular interstitial cells through RhoC/ROCK/MRTF-A and Erk1/2 signaling pathways [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2019, 135: 149-59.
- [28] YANG W W, GUO B, JIA W Y, et al. Porphyromonas gingivalis-derived outer membrane vesicles promote calcification of vascular smooth muscle cells through ERK1/2-RUNX2 [J]. *FEBS Open Bio*, 2016, 6: 1310-9.