

· 实验研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2017)25-02-0122-07

Notch1 蛋白在人心脏瓣膜间质细胞凋亡与钙化关系中的作用

叶挺, 程治源, 凌秋洋, 吴婷, 宗刚军

(安徽医科大学无锡临床学院, 江苏省无锡市 214044)

[关键词] 人心脏瓣膜间质细胞; 钙化; 凋亡; Notch1 蛋白

[摘要] 目的 用人心脏瓣膜间质细胞(hVICs)在体外培养并用钙化诱导液建立瓣膜钙化模型,观察 hVICs 钙化过程中 Notch1 蛋白表达及细胞凋亡情况,探讨 Notch1 蛋白在 hVICs 凋亡与钙化关系中的作用。方法 将体外培养的 hVICs 随机分为两组,钙化组用含钙化诱导液的培养基培养,以建立钙化模型,并按 1~7 天分别诱导细胞,观察钙化的动态过程;空白组用正常培养基(I-GRO PLUS)培养。所有 hVICs 均培养 7 天。检测两组细胞钙化结节数目、BMP-4 蛋白、Notch1 蛋白的表达及 hVICs 凋亡率。然后将钙化组中诱导钙化细胞再随机分脂多糖组(LPS)、Notch1 抑制剂组(γ 分泌酶抑制剂, DAPT)、对照组(只加钙化诱导液)体外培养 3 天,检测 BMP-4、Notch1、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3(Caspase3)的表达。结果 与空白组细胞比较,钙化组细胞钙化及 Notch1 蛋白的表达均高于空白组,且随着诱导天数的增加而增加;细胞凋亡率在钙化诱导 3 天时最高,随后逐渐下降。LPS 组与对照组比较,细胞凋亡和钙化均随着 Notch1 蛋白的表达增加而增加;DAPT 组与对照组比较,细胞凋亡和钙化均减少。结论 hVICs 钙化与细胞凋亡有着密切的关系,且 Notch1 蛋白在 hVICs 凋亡与钙化关系中起着重要的作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The role of Notch1 protein in the relationship between apoptosis and calcification of human heart valve interstitial cells

YE Ting, CHENG Zhi-Yuan, LING Qiu-Yang, WU Ting, ZONG Gang-Jun

(Wuxi Clinical College, Anhui Medical University, Wuxi, Jiangsu 214044, China)

[KEY WORDS] hVICs; Calcification; Apoptosis; Notch1

[ABSTRACT] **Aim** To establish valve calcification model, Human heart valve interstitial cells (hVICs) were cultured in vitro and induced by calcification liquid, observing the expression of Notch1 protein, apoptosis in the process of hVICs calcification and revealing the role of Notch1 protein in the relationship between hVICs apoptosis and calcification.

Methods hVICs were randomly divided into two groups, the experimental group were treated with calcification induced liquid (beta glycerol phosphoric acid, ascorbic acid, dexamethasone, recombinant type human bone morphogenetic protein 2) to establish the models of calcification, hVICs were stimulated by calcification liquid for 1day, 3days, 5days, 7days; Control group was cultured with normal culture medium, all hVICs were cultured for 7 days, then detecting the number of calcification nodule, the expression of BMP-4, Notch1 and the Apoptosis rates of hVICs. Calcification induced cells in experimental group were randomly divided into three groups and cultured in vitro for 3 days, the lipopolysaccharide group (LPS), the Notch1 inhibitor group (γ secretase inhibitor, DAPT), and the control group (treated with calcification induced liquid). The expression of BMP-4, Notch1, Cysteiny aspartate specific proteinase 3 (Caspase3) were determined.

Results The expression of Notch1 protein and cell calcification in experimental group were higher than control group and increased along with the induced days. The rate of cell apoptosis was the highest at the third day, then there was a gradual downward trend. Cell apoptosis and calcification in LPS group were aggravated with the increased expression of Notch1 compared with control group. In DAPT group compared with the control, cell apoptosis and calcification were reduced.

Conclusion The relationship between apoptosis and calcification are close, Notch1 protein plays an important role in the relationship between apoptosis and calcification of hVICs.

[收稿日期] 2016-07-15

[修回日期] 2016-10-20

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81371657)

[作者简介] 叶挺, 硕士研究生, 研究方向为心脏瓣膜钙化机制, E-mail 为 1318521707@qq.com。通讯作者宗刚军, 博士, 副主任医师, 研究方向为心脏免疫学, E-mail 为 zonggj@163.com。

主动脉瓣钙化性狭窄是比较常见的心脏瓣膜病^[1-3]。过去认为主动脉瓣钙化是退行性病变,但是随着近年的研究发现,其是一个主动的进行性的病理过程^[4]。有研究表明主动脉瓣的钙化过程与骨形成的钙化过程极其相似,而细胞凋亡在骨形成的钙化过程中起着重要的促进作用^[5]。另有研究发现,在血管平滑肌细胞的钙化过程中,凋亡有着启动整个血管钙化过程的作用^[5-7]。人心脏瓣膜间质细胞(human heart valve interstitial cells, hVICs)作为心脏瓣膜3层结构中最主要的细胞类型,在瓣膜的病变中起最重要的作用,参与瓣膜钙化的全过程^[8]。研究证实 Notch1 信号通路可以促进血管平滑肌细胞钙化^[9],另有研究表明脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)可以活化 Notch1 信号通路表达并促进 hVICs 的钙化^[10]。有关研究还发现 Notch 是一种原癌基因,其表达增加,可以诱导肺癌细胞增殖,同时可以调控肺癌细胞周围间质细胞 Bcl-2 相关 X 蛋白(bcl-2-associated X protein, Bax)的表达,最终活化半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(cysteinyI aspartate specific proteinase, Caspase),促进肺癌细胞旁间质细胞的凋亡^[11]。因此,可以推测 Notch1 蛋白可能诱导 hVICs 凋亡,最终促进了钙化。本研究通过钙化诱导液建立 hVICs 钙化模型^[12],检测 hVICs 钙化过程中不同时间点细胞凋亡及 Notch1 的表达情况。通过 LPS 活化 Notch1 蛋白表达, γ 分泌酶抑制剂(DAPT)抑制 Notch1 蛋白表达,检测细胞凋亡及钙化的变化,从而揭示 hVICs 凋亡与钙化之间的关系及 Notch1 蛋白在 hVICs 凋亡与钙化关系中的重要作用。

1 材料和方法

1.1 材料

从 DV 公司(美国)进口 hVICs(来源于接受人体心脏移植手术受体的心脏正常主动脉瓣膜)。以 hVICs 为研究对象,通过伦理委员会批准和国家有关生物制品进口审批手续。成纤维细胞培养基(I-GRO-002-500)从 DV 公司(美国)进口。重组型人骨形态发生蛋白 2(bone morphogenetic protein 2, BMP-2)和 ELISA 试剂盒从 R&D 公司(美国)进口。L-抗坏血酸、地塞米松、 β -甘油磷酸、胰蛋白酶、LPS(大肠杆菌 0111:B4)从 Sigma 公司(美国)进口。Notch1、BMP-2、BMP-4 抗体及 DAPT 从 Abcam 公司(英国)进口。Von Kossa 染色试剂盒从 Millipore 公司(美国)进口,磷酸酶及蛋白酶抑制剂从罗氏公司(瑞士)进口。Triazol 试剂(Invitrogen)、逆转录试剂盒(TaKaRa)、SYBR green PCR 试剂盒(TaKaRa)从

宝生物工程有限公司(大连)购买,Notch1 引物、ACTIN 引物购自易锦生物技术有限公司(广州),Caspase3 抗体、凋亡检测试剂盒及其他化学品、试剂从赛德生物公司(苏州)购买。

1.2 细胞培养

从干冰中取出冻存的 hVICs 于 37℃ 水浴中搅拌至完全溶解,将细胞悬液移至加有 7 mL 培养基(I-GRO PLUS)的离心管中,4℃ 1 000 rpm 离心 5 min,弃上清,加 3 mL I-GRO PLUS 培养基(含 10% 胎牛血清)重悬细胞然后移入细胞培养瓶中,于 37℃、5%CO₂ 孵箱中培养,每 2 天更换培养液,细胞长至生长表面的 80% 时传代。取传代 3~7 代的 hVICs 用于实验。

1.3 实验分组

将体外培养细胞以 1×10^8 /L 的密度种于 12 孔板内,随机分成两组,空白组细胞每孔加 1 mL I-GRO PLUS 培养基(含 10% 胎牛血清)培养;钙化组加入 200 μ L 钙化诱导液(50 μ g/L 重组型人 BMP-2、100 nmol/L 地塞米松、50 mg/L L-抗坏血酸、5 mmol/L β -甘油磷酸)、800 μ L I-GRO PLUS 培养基(含 10% 胎牛血清)进行诱导培养,分不同天数用钙化诱导液刺激钙化组细胞。由于钙化过程缓慢,检测细胞钙化用诱导 1 天、3 天、5 天、7 天的细胞;钙化诱导 1 天、2 天、3 天、4 天、5 天、6 天、7 天的细胞用来检测钙化过程中细胞凋亡变化。加钙化诱导液之前用正常培养基培养。空白组及钙化组所有细胞均培养 7 天,7 天后统一收取标本,用于检测 hVICs 钙化模型的建立及钙化过程中不同时间点 Notch1 蛋白的表达和细胞凋亡率。

将钙化组诱导钙化细胞再随机分成 3 组。LPS 组:在钙化诱导液的基础上加 0.2 mg/L(4 μ L/孔) Notch1 信号通路的激活剂 LPS 上调 Notch1 蛋白的表达。DAPT 组:在钙化诱导液的基础上加 50 μ mol/L(4 μ L/孔)的 Notch1 信号通路特异性抑制剂 DAPT(γ 分泌酶抑制剂,可抑制 Notch1 转化为其活化形式 NICD)抑制 Notch1 蛋白的表达。对照组:只加钙化诱导液培养。3 组细胞均培养 3 天。然后用 Western blot 检测 Notch1、BMP-4、Caspase3 蛋白的表达,以明确激活/抑制 Notch1 信号通路后 hVICs 钙化及凋亡。

1.4 Western blot 检测

用于分析 Notch1、BMP-4、Caspase3 蛋白和 β -actin 的表达。收集细胞加 100 μ L 细胞裂解液使细胞裂解,14 000 g 离心 10 min 后取上清(蛋白),加

25 μL 上样缓冲液混匀后置于 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热 8 min, 14 000 g 离心 5 min。取制备好的蛋白标本进行电泳、转膜、封闭, 然后敷一抗过夜, 第二天洗膜后再加连接 HRP 的二抗, 孵育结束后加曝光液, 对 PVDF 膜进行曝光, 用 Image J 软件(Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, Md)对条带进行分析。

1.5 酶联免疫吸附试验

收集培养细胞上清标本, 严格按照 ELISA 试剂盒的操作步骤进行, 每组设 3 个复孔, 每孔加 50 μL 样本, 室温孵育 2 h, 洗板 3 次, 每孔加 200 μL BMP-4, 避光室温孵育 2 h, 洗板后加 200 μL 基质溶液, 避光室温孵育 30 min, 加终止液, 30 min 内使用全自动酶标仪(BIORAD680, Hercules, CA)在 450 nm 波长下进行读数并分析, 根据标准曲线, 计算分泌蛋白 BMP-4 的浓度。

1.6 细胞凋亡检测

荧光染色: 弃细胞培养上清, 用冷 PBS 清洗, 弃上清后加入 100 μL 1X ANNXIN 结合液到培养板中, 将细胞密度调整到约 $1 \times 10^9/\text{L}$, 每孔再加 10 μL ANNXIN V 和 2 μL 100 mg/L PI 工作液, 室温孵育 15 min 后, 再加 400 μL 1X ANNXIN 结合液混匀, 立刻用倒置荧光显微镜拍照, 荧光显微镜下早期凋亡细胞为绿色, 中晚期凋亡和死细胞为红色。

流式细胞仪检测: 弃细胞培养上清, 冷 PBS 清洗后, 用胰蛋白酶消化并收集细胞, 离心后加入 100 μL 1X ANNXIN 结合液重悬细胞, 将细胞密度调整到约 $1 \times 10^9/\text{L}$, 再加 5 μL ANNXIN V 和 1 μL 100 mg/L PI 工作液到每组细胞悬液中, 室温孵育 15 min, 再加 400 μL 1X ANNXIN 结合液混匀, 然后用流式细胞仪进行检测。

1.7 Von Kossa 染色

弃培养细胞上清, PBS 清洗 3 遍, 4% 多聚甲醛固定 10 min, 蒸馏水清洗, 加 5% 硝酸银溶液, 避光室温孵育 30 min, 紫外灯照射 1 h, 再次蒸馏水清洗 3 遍, 用 5% 硫代硫酸钠还原 2 min, 蒸馏水清洗 3 遍, 乙醇脱水, 0.1% 核固红复染 5 min, 在倒置相差显微镜下观察拍照。镜下可见细胞质成粉红色, 在胞质内可见黑色颗粒即为钙化结节。

1.8 RNA 提取及实时定量 PCR 检测

收集细胞, Trizol Reagent 提取细胞总 RNA, 按逆转录试剂盒步骤逆转录出 cDNA, 以 cDNA 为模板加入 Notch1 的引物(5'-GAG GCG TGG CAG ACT ATG C-3'), 用 RT-qPCR 法测 Notch1 mRNA 的表达, ACTIN 为内参。Notch1 的扩增条件均为: 95 $^{\circ}\text{C}$

预变性 15 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 15 s, 共 40 个循环, 然后对数据进行分析整理。

1.9 统计学分析

统计分析运用 GraphPad Prism 5.01 软件, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用方差分析和 *t* 检验, 采用双侧检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 心脏瓣膜间质细胞的钙化诱导

空白组 hVICs 种板后约 8 h 开始贴壁, 呈梭形。培养 3 天后可见细胞结构清晰, 培养 1 周后细胞放射状排列; 钙化组细胞镜下可见网状聚集样生长, 交错排列, 细胞核颜色变深, 细胞周围可见颗粒状沉积物分布(图 1)。

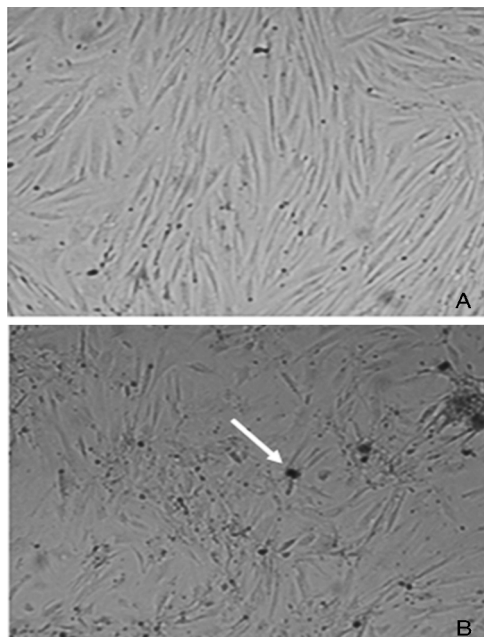


图 1. 培养 1 周后空白组细胞与钙化组细胞的光学显微镜下形态(40 \times) A 为空白组, 细胞形态结构清晰, 呈放射状生长。B 为钙化组, 细胞聚集成网状、结节状, 周围可见颗粒状沉积物(箭头所示)。

Figure 1. The cell morphology of the control group and the experimental group were cultured for one week under the light microscope(40 \times)

2.2 心脏瓣膜间质细胞钙化模型建立及检测

Von Kossa 染色镜下可见, 钙化组细胞形成大小不等的结节, 胞质内的沉积物与细胞结节被染成黑色, 表明有钙质沉积; 空白组细胞形态结构清晰, 仅有数个非特异性黑色颗粒。各组每视野下钙化结节数目钙化组明显多于空白组($P < 0.05$), 并且随着诱导天数的增加钙化结节的数目也随之增加(图 2)。

Western blot 检测细胞内钙化标志蛋白 BMP-4 的表达(图 3),3 天、5 天、7 天 BMP-4 的表达均高于空白组($P<0.05$)。ELISA 法检测细胞外分泌蛋白

BMP-4 的表达(图 4),钙化组分泌蛋白 BMP-4 的表达明显高于空白组($P<0.05$)且随着诱导天数增加而增加。

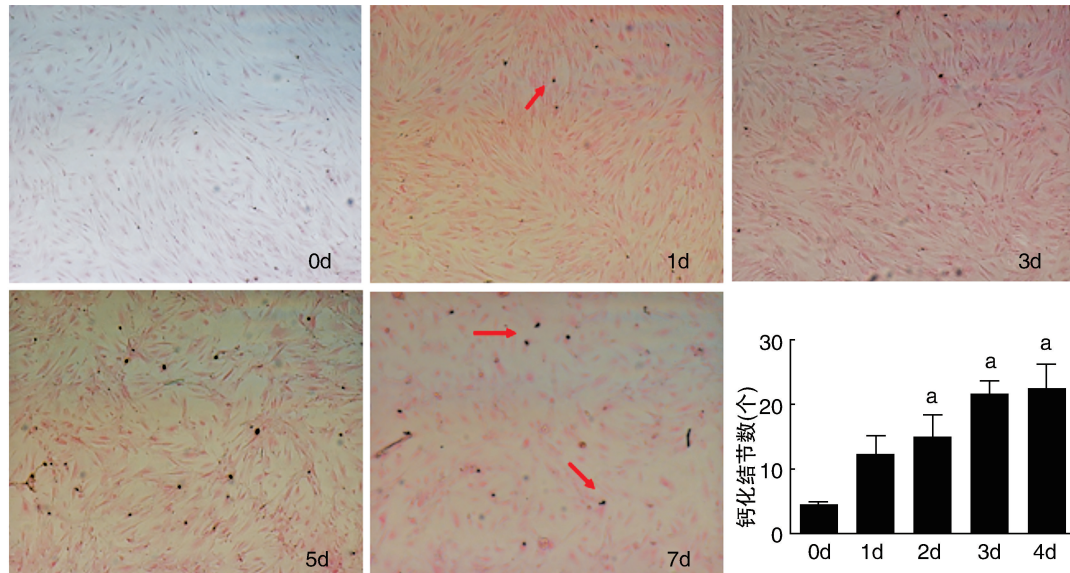


图 2. Von Kossa 染色检测细胞钙化(40×, n=3) 空白组(0d)细胞结构清晰,胞质染成粉红色,无黑色钙化颗粒;钙化组(1、3、5、7 天)细胞胞质中可见被染成黑色的钙化结节(箭头所示)。a 为 $P<0.05$,与对照组比较。

Figure 2. The cell calcification was detected by Von Kossa staining(40×, n=3)

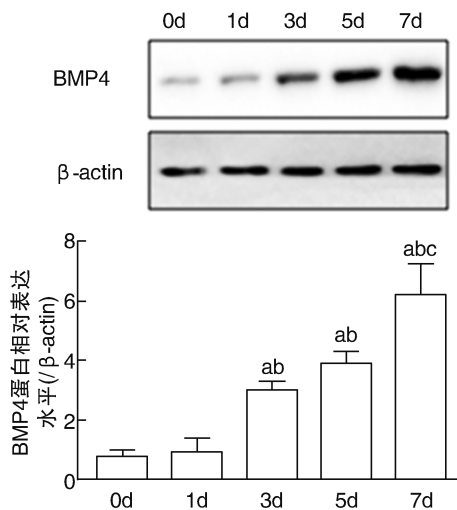


图 3. Western blot 检测钙化过程中细胞内 BMP-4 蛋白的表达(n=3) 0d 组为空白组,1d、3d、5d、7d 为钙化组。a 为 $P<0.05$,与空白组比较;b 为 $P<0.05$,与 1d 组比较;c 为 $P<0.05$,与 3d 组比较。

Figure 3. The expression of BMP-4 protein in the cells calcification process was detected by Western blot(n=3)

2.3 钙化诱导过程中 Notch1 蛋白的测定

Western blot 结果显示诱导 3 天开始 Notch1 蛋白的表达明显高于空白组($P<0.05$,图 5),并且随着

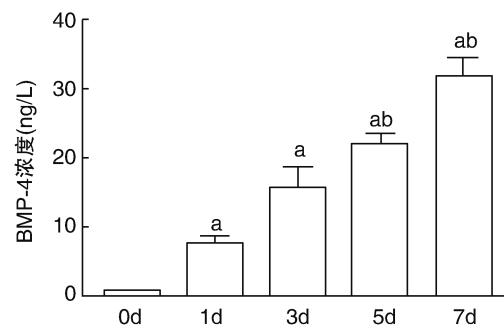


图 4. ELISA 法检测钙化过程中细胞分泌蛋白 BMP-4 表达(n=3) 0d 组为空白组,1d、3d、5d、7d 为钙化组。a 为 $P<0.05$,与空白组比较;b 为 $P<0.05$,与 1d 组比较。

Figure 4. The expression of cell secretory protein BMP-4 in the cells calcification process was detected by ELISA(n=3)

钙化诱导时间的延长 Notch1 蛋白的表达量增加。RT-PCR 结果示钙化组 Notch1 基因的表达较空白组高($P<0.05$,图 6)。

2.4 钙化诱导过程中 hVICs 凋亡情况检测

荧光显微镜下发现在钙化诱导 3 天组细胞凋亡率达到最高,随后有下降趋势(图 7)。流式细胞仪对细胞凋亡情况进行验证。结果发现诱导 3 天组细胞凋亡比例最高达到了 20.78%,是空白组的 3 倍多,之后细胞凋亡率有下降趋势(图 8)。

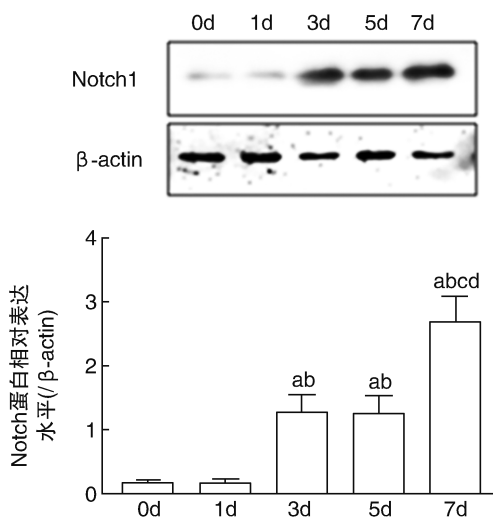


图 5. Western blot 检测钙化过程中细胞内 Notch1 蛋白的表达 ($n=3$) 0d 组为空白组, 1d、3d、5d、7d 为钙化组。a 为 $P<0.05$, 与空白组比较; b 为 $P<0.05$, 与 1d 组比较; c 为 $P<0.05$, 与 3d 组比较; d 为 $P<0.05$, 与 5d 组比较。

Figure 5. The expression of Notch1 protein in the cells calcification process was detected by Western blot ($n=3$)

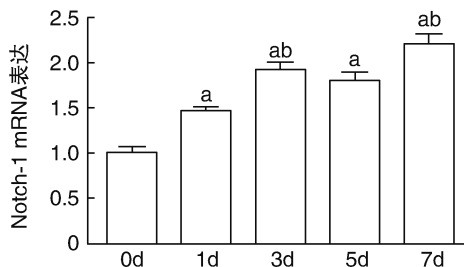


图 6. RT-PCR 检测钙化过程中细胞内 Notch1 mRNA 的表达 ($n=3$) 0d 组为空白组, 1d、3d、5d、7d 为钙化组。a 为 $P<0.05$, 与空白组比较; b 为 $P<0.05$, 与 1d 组比较。

Figure 6. The expression of Notch1 mRNA in the cells calcification process was detected by RT-PCR ($n=3$)

2.5 激活、抑制 Notch1 蛋白的表达后 hVICs 的钙化及凋亡情况检测

上述实验结果表明 hVICs 钙化过程与 Notch1 蛋白的表达及细胞凋亡有关, 且在 hVICs 钙化过程第 3 天时 Notch1 蛋白及细胞凋亡率较对照组明显增高, 因此为了证明 Notch1 蛋白对 hVICs 钙化及凋亡的影响, 所以将 LPS 组、DAPT 组、对照组细胞均培养 3 天。Western blot 检测结果: LPS 组细胞 Notch1 的表达明显高于对照组 ($P<0.05$) 及 DAPT 组 ($P<0.001$), DAPT 组细胞 Notch1 的表达与对照组比较明显下降 ($P<0.05$)。细胞 Caspase3 及 BMP-4 的表达 LPS 组较对照组 ($P<0.05$) 及 DAPT 组均增强 ($P<0.001$)。而 DAPT 组 Caspase3 及 BMP-4 的表达均较对照组减弱 ($P<0.05$; 图 9)。

3 讨论

心血管疾病已经成为危害人类健康的头号杀手, 其中心脏瓣膜病占据了相当一部分的比重^[8]。随着人口老龄化的加剧, 瓣膜钙化成为了瓣膜疾病的最主要发病机制。由于长期以来, 研究者的目光都集中在瓣膜修复和置换上, 而对瓣膜钙化这一原发因素研究甚少, 现有的临床治疗方法均无法从病因上解决根本问题。因此, 探索瓣膜钙化的发病机制并且筛选出抗瓣膜钙化的新靶点对于其防治有重要的意义。

早期有研究发现, 在关节软骨及血管内皮的钙化发病机制中, 凋亡启动了钙化的进程^[13-14]。也有研究证实用 LPS 活化 Notch1 信号通路在 hVICs 钙化过程中起着重要的促进作用^[10], 而在 hVICs 中凋亡与钙化之间的关系及 Notch1 蛋白在 hVICs 凋亡

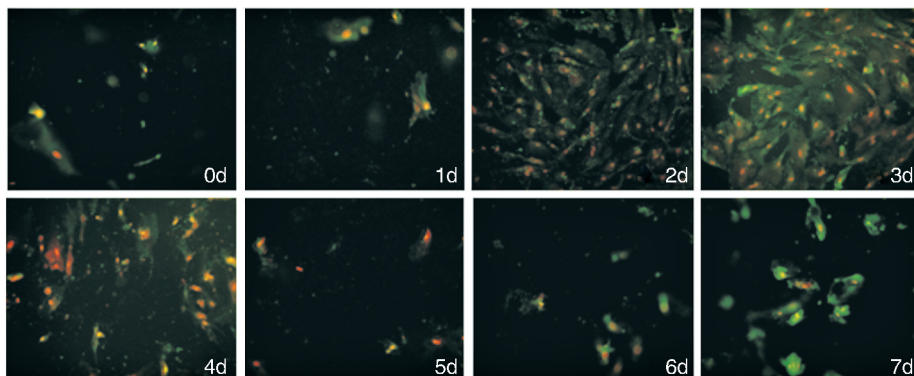


图 7. 荧光显微镜检测细胞凋亡情况 (40×) 0d 组为空白组, 1d、3d、5d、7d 为钙化组。细胞与 FITC 标记的 ANNIN V 结合后为绿色荧光, 表示早期凋亡细胞 (小箭头), 与 PI 结合为红色荧光, 代表中晚期凋亡或死亡细胞 (大箭头)。

Figure 7. Cells apoptosis was detected by fluorescence microscope (40×)

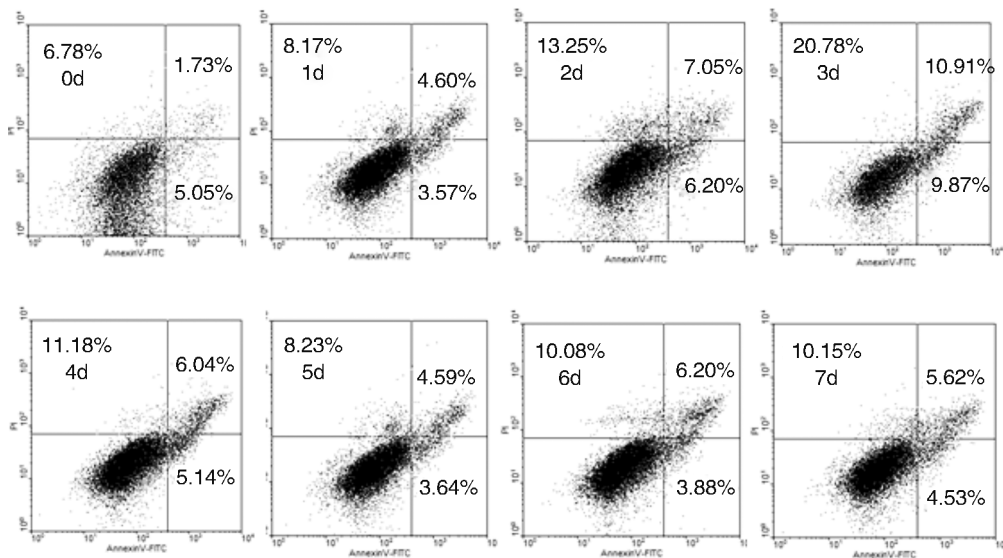


图 8. 流式细胞仪检测细胞凋亡情况 0d 组为空白组,1d、3d、5d、7d 为钙化组。右上象限为早期凋亡细胞比例,右下象限为中晚期凋亡及死亡细胞比例,整个右侧象限为所有凋亡细胞比例。

Figure 8. Cells apoptosis was detected by flow cytometry

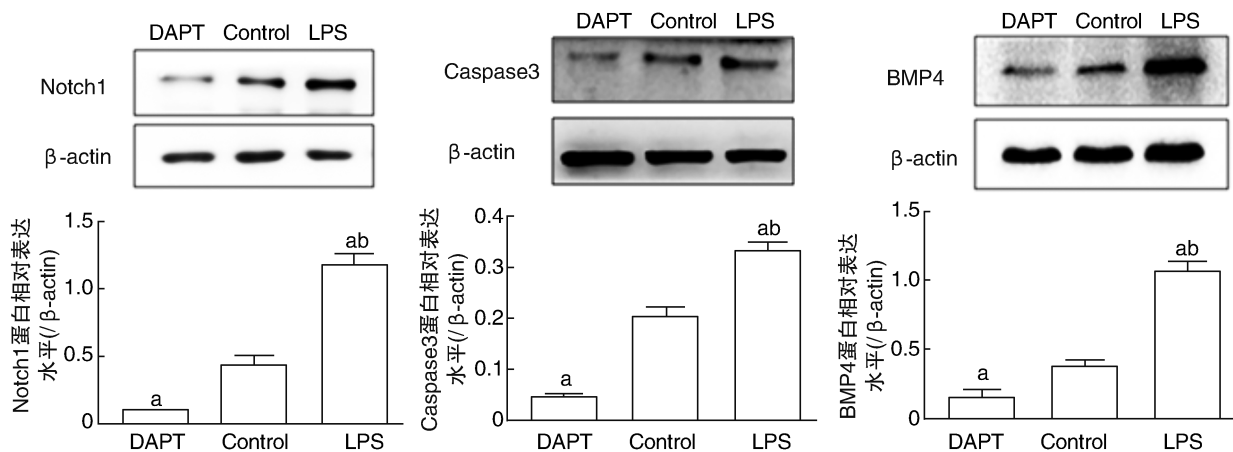


图 9. Western blot 检测细胞内 Notch1、Caspase3 及 BMP-4 蛋白分子表达 (n=3) a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.001$, 与 DAPT 组比较。

Figure 9. The expression of Notch1/Caspase3/BMP-4 protein in the cells was detected by Western blot (n=3)

与钙化关系中的作用未见有相关的报道。本研结果显示,钙化诱导液可以使 hVICs 钙化,在钙化过程早期(3 天)就出现细胞凋亡且达到高峰,随后凋亡率有所下降,而钙化程度加深,提示在 hVICs 中细胞凋亡和钙化有相关性。而激活或抑制 Notch1 蛋白的表达,hVICs 的凋亡和钙化均会随之上调或下调,这说明 Notch1 蛋白在 hVICs 凋亡与钙化的关系中有着重要的调节作用。

瓣膜间质细胞凋亡与钙化以及 Notch1 蛋白对凋亡和钙化的调控机制尚不清楚,有研究指出细胞凋亡及凋亡小体的清除障碍可能是引起心脏瓣膜钙化的机制^[15],Proudfoot 等^[5,7]研究表明,在入血管

平滑肌细胞钙化过程中,膜完整的凋亡小体可以促进钙离子的沉积,从而加重血管钙化。研究指出基质小泡是骨和软骨钙化的最初位点,是细胞外一种 100~700 nm 大小的膜包裹结构,可以产生碱性磷酸酶与钙离子结合形成磷酸盐,促进钙化形成^[16]。而研究发现在人血管钙化部位的钙盐成分也主要以磷酸盐为主,碳酸盐比例很少^[5],另有研究发现基质小泡内含 Bax 蛋白,推测其可能是凋亡细胞的残体即凋亡小体^[16-18]。因此凋亡小体可能是通过产生碱性磷酸酶形成磷酸钙结晶促进血管钙化。Notch 蛋白为一种跨膜蛋白受体,影响细胞正常形态发生的多个过程,包括多能祖细胞的分化、细胞

凋亡、细胞增殖及调节 T 淋巴细胞和巨噬细胞产生细胞因子。研究表明 Notch1 信号转导通路在 BMP 诱导的成骨细胞分化中起重要作用^[9,19],有研究发现,在肿瘤细胞和 B 淋巴细胞中 Notch1 蛋白表达增多可以通过诱导细胞周期停滞(使细胞周期停滞在 G2/M 期)进而导致细胞凋亡^[20-23]。因此可以推测在 hVICs 中 Notch1 蛋白可能会通过诱导细胞凋亡进而加重细胞钙化,但其具体机制是否如此尚待进一步研究。本研究已经证实了 hVICs 凋亡与钙化之间有着显著的相关性,Notch1 蛋白在 hVICs 凋亡与钙化关系中有重要作用,为钙化性瓣膜病的治疗提供了可能的作用新靶点。

[参考文献]

- [1] Cowell SJ, Newby DE, Boon NA, et al. Calcific aortic stenosis: same old story [J]. *Age Ageing*, 2004, 33(6): 538-544.
- [2] Thom T, Haase N, Rosamond W, et al. Heart disease and stroke statistics-2006 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee [J]. *Circulation*, 2006, 113(6): e85-e151.
- [3] Cosmi JE, Kort S, Tunick PA, et al. The risk of the development of aortic stenosis in patients with benign aortic valve thickening [J]. *Arch Intern Med*, 2002, 162(20): 2345-347.
- [4] Khoynzhad A, Jalali Z, Tortolani AJ. A synopsis of research in cardiac apoptosis and its application to congestive heart failure [J]. *Tex Heart Inst J*, 2007, 34(3): 352-359.
- [5] Proudfoot D, Skepper JN, Hegyi L, et al. Apoptosis regulates human vascular calcification in vitro: evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies [J]. *Circ Res*, 2000, 87(11): 1055-062.
- [6] Jian B, Narula N, Li QY, et al. Progression of aortic valve stenosis: TGF- β 1 is present in calcified aortic valve cusps and promotes aortic valve interstitial cell calcification via apoptosis [J]. *Ann Thorac Surg*, 2003, 75(2): 457-465.
- [7] Proudfoot D, Skepper JN, Hegyi L, et al. The role of apoptosis in the initiation of vascular calcification [J]. *Clin Res Card*, 2001, 90: 43-46.
- [8] Akerström F, Barderas MG, Rodríguez-Padial L. Aortic stenosis: a general overview of clinical, pathophysiological and therapeutic aspects [J]. *Expert Rev Card Ther*, 2013, 11(2): 239-250.
- [9] 龚财判, 欧三桃. Notch1 信号通路与血管钙化 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2016, 24(2): 213-216.
- [10] Zeng QC, Song R, Ao LH, et al. Notch1 promotes the pro-osteogenic response of human aortic valve interstitial cells via modulation of ERK1/2 and nuclear factor- κ B activation [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33: 1580-590.
- [11] Allen TD, Rodriguez EM, Jones KD, et al. Activated Notch1 induces lung adenomas in mice and cooperates with Myc in the generation of lung adenocarcinoma [J]. *Cancer Res*, 2011, 71: 6010-018.
- [12] 凌秋洋, 吴婷, 叶挺. 骨形态发生蛋白 2 在人心脏瓣膜间质细胞体外钙化中的作用 [J]. *中华心血管病杂志*, 2015, 43(8): 724-727.
- [13] Zhu Q, Guo R, Liu C, et al. Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis contributing to high glucose-induced vascular smooth muscle cell calcification [J]. *J Vasc Res*, 2016, 52(5): 291-298.
- [14] Lu Y, Bian Y, Wang Y, et al. Globular adiponectin reduces vascular calcification via inhibition of ER-stress-mediated smooth muscle cell apoptosis [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(3): 2545-554.
- [15] Farzaneh-Far A, Proudfoot D, Shanahan C, et al. Vascular and valvar calcification: recent advances [J]. *Heart*, 2001, 85(1): 13-17.
- [16] Hashimoto S, Ochs RL, Rosen F, et al. Chondrocyte-derived apoptotic bodies and calcification of articular cartilage [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(6): 3094-099.
- [17] Hegyi L, Skepper JN, Cary NRB, et al. Foam cell apoptosis and the development of the lipid core of human atherosclerosis [J]. *J Pathol*, 1996, 180(4): 423-429.
- [18] Kockx MM, De Meyer GRY, Muhring J, et al. Apoptosis and related proteins in different stages of human atherosclerotic plaques [J]. *Circulation*, 1998, 97(23): 2307-315.
- [19] Nobta M, Tsukazaki T, Shibata Y, et al. Critical regulation of bone morphogenetic protein-induced osteoblastic differentiation by Delta1/Jagged1-activated Notch1 signaling [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280: 15842-848.
- [20] Karachaliou N, Pilotto S, Lazzari C, et al. The role of miR-100-mediated Notch pathway in apoptosis of gastric tumor cells [J]. *Cell Signal*, 2015, 27(6): 1087-101.
- [21] Morimura T, Goitsuka R, Zhang Y, et al. Cell cycle arrest and apoptosis induced by Notch1 in B cells [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275: 36523-531.
- [22] Zweidler-McKay PA, He Y, Xu L, et al. Notch signaling is a potent inducer of growth arrest and apoptosis in a wide range of B-cell malignancies. *Carpenter* [J]. *Blood*, 2005, 106(12): 3898-906.
- [23] Sriuranpong V, Borges MW, Ravi RK, et al. Notch signaling induces cell cycle arrest in small cell lung cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(7): 2000-205.

(此文编辑 朱雯霞)