

本文引用: 钟国恒, 曾庆春. 瓣膜间质细胞异质性在钙化性主动脉瓣疾病中的作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2022, 30(10): 829-836. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2022.10.001.

[文章编号] 1007-3949(2022)30-10-0829-08

· 专家论坛 ·

瓣膜间质细胞异质性在钙化性主动脉瓣疾病中的作用

钟国恒, 曾庆春

(南方医科大学南方医院心血管内科, 广东省广州市 510515)

[专家简介] 曾庆春, 博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 博士后合作导师。广东特支计划科技创新青年拔尖人才, 广东省杰出青年医学人才获得者。2010—2014 年曾留美访学。研究方向为钙化性主动脉瓣疾病和心力衰竭, 以第一作者或通信作者在 *Circulation*、*PNAS*、*ATVB*、*Cardiovascular Research*、*Redox Bio* 等国际权威学术期刊发表多篇 SCI 论著。主持国家自然科学基金面上项目 3 项, 广东省自然科学基金项目 1 项, 广东省科技计划项目 2 项, 广州市科技计划项目 2 项。荣获广东省优秀博士学位论文、“羊城好医生”、“抗疫好医生”、“白云好青年”、胡润平安中国好医生等荣誉, 出版学术专著 3 本, 获国家专利 10 项。担任中国医师协会心力衰竭专委会青委常委、广东医师协会心力衰竭专业医师分会委员会常委、广东医师协会心血管医师青年专业组副组长、广东省医疗行业协会心血管疾病管理专委会常委、广东省医学会心脏起搏与电生理学分会基础学组副组长、中华医学会心血管急重症学组委员、中国医师协会心血管内科医师分会代谢性心血管疾病专委会(学组)委员、《EHJ 中文版》青年编委、《中华高血压杂志》编辑部中青年编委、《南方医科大学学报》特邀编委等。



[摘要] 钙化性主动脉瓣疾病(CAVD)是一种表现为主动脉瓣增厚、钙化的疾病, 随病情发展可出现瓣膜硬化, 进而引起一系列血流动力学的异常改变, 最终可导致慢性心力衰竭和死亡。主动脉瓣膜间质细胞是构成主动脉瓣膜的主要细胞亚群, 在 CAVD 的发生发展中起重要的作用。当前, 单细胞测序等技术让研究者对间质细胞的起源、表型和功能异质性有了新的理解。文章对间质细胞的异质性在钙化性主动脉瓣疾病中所起的作用进行综述, 为靶向间质细胞延缓 CAVD 进程提供新的思路。

[关键词] 瓣膜间质细胞; 异质性; 钙化性主动脉瓣疾病; 单细胞测序

[中图分类号] R542.5

[文献标识码] A

Regulatory role of valve interstitial cell heterogeneity in calcific aortic valve disease

ZHONG Guoheng, ZENG Qingchun

(Department of Cardiology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China)

[ABSTRACT] Calcific aortic valve disease (CAVD) is characterized by thickening and calcification of the aortic valve, which can develop into valve sclerosis, and rapidly progress to a series of abnormal hemodynamic changes, and eventually heart failure and death. Aortic valve interstitial cells, as the main cell population of aortic valve, play a key role in the development of CAVD. The development of technologies such as single cell sequencing has improved researchers' understanding of the origin, phenotype and functional heterogeneity of interstitial cells. This article reviews the role of interstitial cell heterogeneity in calcified aortic valve disease, which may provide a new idea for targeting interstitial cells to attenuate CAVD process.

[KEY WORDS] valve interstitial cell; heterogeneity; calcific aortic valve disease; single cell sequencing

[收稿日期] 2021-09-30

[修回日期] 2021-12-17

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81770386, 82070403)

[作者简介] 钟国恒, 硕士研究生, 研究方向为钙化性主动脉瓣疾病, E-mail: 785841774@qq.com。通信作者曾庆春, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为钙化性主动脉瓣疾病, E-mail: z-qch@163.com。

钙化性主动脉瓣疾病 (calcific aortic valve disease, CAVD) 是一类因主动脉瓣膜纤维化及钙盐沉积导致瓣膜僵硬、钙化, 以及由此引发的血流动力学异常改变的心脏瓣膜疾病。在发达国家, 钙化性主动脉瓣狭窄已成为仅次于冠心病和高血压的第三大常见心血管疾病, 在 65 岁以上人群中患病率超过 25%^[1-2]。在中国, 45 岁以上中老年人中经超声心动图检出的钙化性主动脉瓣疾病患病率为 12.8%, 并随着年龄的增长而升高^[3]。然而目前, 尚无有效预防和缓解 CAVD 的药物, 患者只能通过经导管主动脉瓣置换术或外科主动脉瓣置换术来改善生活质量。因此, 提高对该病发病机制的认识, 找到药物治疗的有效靶点具有重要意义。

主动脉瓣膜间质细胞 (aortic valve interstitial cells, AVIC) 是瓣膜小叶内的主要细胞亚群, 分布于瓣膜的三层结构 (纤维层、海绵层和心室层) 中。越来越多的证据表明, 间质细胞是一个异质性群体, 包括成纤维细胞、肌成纤维细胞、成骨样细胞、平滑肌样细胞和干细胞^[4-5]。生理条件下, 瓣膜间质细胞主要负责维持正常的瓣膜结构和功能, 而当受到如脂蛋白 (a)、氧化型低密度脂蛋白、脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 及肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 等各种刺激时, 可发生成骨样或纤维样转化, 从而促进瓣膜钙化。当前, 单细胞测序方兴未艾, 应用单细胞测序技术对主动脉瓣膜间质细胞进行探索可帮助我们更好地了解钙化性主动脉瓣疾病的发病机制, 并提供新的治疗靶点。

1 瓣膜间质细胞的起源异质性

在胚胎发育过程中, 主动脉瓣膜间质细胞具有不同的胚胎来源。首先, 最主要的途径是内皮向间充质细胞转化 (endothelial-to-mesenchymal transition, EMT)。胚胎主动脉瓣形态发生始于心内膜垫。邻近心内膜垫的内皮细胞接受心肌层的信号因子如骨形态发生蛋白 2 (bone morphogenetic protein-2, BMP-2) 等, 通过 EMT 成间质细胞, 随后间质细胞开始增殖并参与瓣膜的重塑^[6-7]。小鼠谱系追踪表明, 大多数成熟的主动脉瓣膜间质细胞来源于流出道心内膜垫中的心内膜, 而另外一部分间质细胞则由神经嵴细胞 (neural crest cell, NCC) 转化而来^[8-10]。除此之外, 血液循环中骨髓来源的造血干细胞被招募到成体瓣膜并成为主动脉瓣膜间质细胞一部分, 其在瓣膜稳态的维持中发挥着重要的作

用^[11-12]。总之, 瓣膜间质细胞在瓣膜形态发育的来源不同。

由于谱系追踪研究范围有限, 一次只能对一个或几个基因标记进行探索, 因此在小鼠模型谱系追踪方法的基础上, 单细胞 RNA 测序的发展为探索间质细胞异质性开拓了新道路。单细胞测序能对单个细胞进行转录组水平分析, 进而根据细胞转录组的相似性进行聚类, 在单细胞层面上揭示细胞的异质性、细胞分化、发育过程中不同生理状态下的变化以及疾病发展等生物学过程^[13]。单细胞转录组测序过程的基本原理是利用含 poly-T 的寡核苷酸来捕获含有 poly-A 尾部的 RNA 分子, 继而反转录成稳定的 cDNA 分子并进行扩增以构建 cDNA 文库^[14]。在建库时, 用 barcodes 标记同一个细胞的转录本, 可以准确区分每一个细胞的转录本信息, 如 STRT-seq、CEL-seq 则采用该方法。而为了降低扩增带来的误差, 人们引入了唯一分子标记 (unique molecular identifier, UMI), 以确定扩增的 mRNA 的来源, 如 CEL-seq2、Drop-seq 则是应用了 UMI 特殊标记的建库方法^[15]。目前研究常用的平台包括 smart-seq^[16] 及其改进版 smart-seq2^[17]、Drop-seq^[18]、10× Genomics^[19] 和 BD Rhapsody^[20] 等平台。

Cui 等^[21] 利用单细胞测序绘制人类胚胎心脏的单细胞图谱, 表明心脏及其周围血管系统由多种细胞类型组成, 包括心肌细胞、成纤维细胞、内皮细胞、血管平滑肌细胞、瓣膜间质细胞和常驻免疫细胞。他们用基因富集 (gene ontology, GO) 发现 22 周和 23 周胚胎的瓣膜间质细胞的凋亡程度较高, 并且免疫荧光显示 22 周的瓣膜间质细胞高表达活化的 Caspase-3, 提示瓣膜间质细胞可能通过凋亡来参与发育时期的重塑。此外, Asp 等^[22] 则利用单细胞转录组结合空间转录组进一步阐明了人类胚胎心脏在发育中的时空调控。他们发现构成心室流出道和瓣膜的成纤维细胞具有较高的异质性, 其中一类成纤维细胞分布于心室流出道根部和瓣膜, 其高表达骨膜素 (periostin, POSTN)、心房钠尿肽前体 (atrial natriuretic peptide precursor A, ANPPA)、受磷蛋白 (phospholamban, PLN); 而另一类成纤维细胞主要集中在心室流出道, 并与其形态发生有关, 其高表达弹性蛋白 (elastin, ELN)、富含酸性和半胱氨酸的分泌蛋白 (secreted protein acidic and cysteine rich, SPARC)、骨甘氨酸 (osteoglycin, OGN)、 α -肌动蛋白 (actin alpha 2, ACTA2)。上述研究表明瓣膜间质细胞在胚胎瓣膜形态发生方面具有异质性。而

针对出生后瓣膜发育的研究, Hulin 等^[23]用单细胞转录组探索小鼠心脏瓣膜在出生后第 7 天和第 30 天细胞外基质(extracellular matrix, ECM)重塑和瓣膜小叶形态发生过程中的异质性, 共鉴定出间质细胞、内皮细胞、免疫细胞和黑色素细胞这四个主要细胞亚群。出生第 7 天瓣叶间质细胞主要表现为较高的胶原和糖胺聚糖表达。而在出生后第 30 天间质细胞则表现为 4 个亚群: 基质纤维细胞, 其高表达纤维调节蛋白(fibromodulin, FMOD)、软骨黏附素(chondroadherin CHAD); 纤维膜细胞, 其高表达微纤维相关蛋白 5(microfibril associated protein 5, MFAP5); TCF12-间质细胞, 其高表达转录因子 12(transcription factor 12, TCF12)、补体 C4B(complement C4B, C4B); 抗原提呈细胞, 其高表达 CD74。总之, 这些研究表明瓣膜间质细胞在发育阶段具有时空异质性。

2 瓣膜间质细胞的功能异质性

正常主动脉瓣叶薄而透明, 表面覆有单层内皮细胞, 瓣膜内部分三层结构: 纤维层、海绵层和心室层, 主要由瓣膜间质细胞和细胞外基质填充, 并由呈一定方向和层次排列的胶原纤维和弹力纤维组成^[24]。瓣膜间质细胞是构成瓣膜小叶的主要细胞亚群, 其功能异质性主要表现为, 瓣膜间质细胞具有不同表型, 且不同表型之间在转录表达谱、细胞表面标志物等方面有着明显差异。以往研究根据瓣膜间质细胞的功能及分子生物学特征, 把间质细胞分为成纤维细胞、肌成纤维样细胞、成骨样细胞、平滑肌样细胞和干细胞。

瓣膜间质细胞在正常瓣膜中表现为静息状态, 维持着瓣膜的正常生理功能。越来越多的研究表明在瓣膜钙化过程中, 静息的瓣膜间质细胞表现出多种动态的表型变化, 一方面向肌成纤维样细胞方向分化, 促进细胞外基质重塑和瓣膜纤维化; 另一方面向成骨表型方向分化, 促进瓣膜骨化^[25-27]。

肌成纤维样细胞是一种高表达 α 平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA) 和波形蛋白(vimentin), 并具有一定分化潜能的瓣膜间质细胞^[25]。肌成纤维样细胞在炎症或长期的机械压力等刺激下, 由成纤维细胞活化形成, 主要参与组织修复重建^[28]。而在病理状态下, 肌成纤维细胞的过度活化则导致细胞外基质成分失衡, 从而引起瓣膜纤维化, 甚至出现瓣膜钙化^[29]。Hutcheson 等^[30]用转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β) 处理猪瓣膜间质细胞后发现肌成纤维细胞激活

和显著的钙化结节形成, 此外还伴随着钙黏蛋白 11 的表达显著增加。

间质细胞向成骨细胞转化是瓣膜钙化的关键一环。导致成骨转化的原因有很多, 包括慢性炎症、血管损伤、低密度脂蛋白堆积、氧化三甲胺、氧化应激、钙/磷水平升高和异常的血流剪应力等^[31-36]。在间质细胞成骨转化的过程中, 早期以炎症反应为主, 表现为细胞间黏附分子 1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) 和血管细胞黏附分子 1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) 等细胞黏附因子的异常升高, 此后诸如 BMP-2、Runt 相关转录因子 2(Runt-related transcription factor 2, Runx2)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP) 等成骨指标异常升高^[37]。我们团队的前期研究也发现炎症反应与瓣膜间质细胞成骨转化密切相关。我们发现在主动脉瓣膜间质细胞中, 应用脂多糖(lipopolysaccharides, LPS) 刺激 Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4) 能促进炎症介质如 ICAM-1 的表达升高, 同时能诱导 Notch1 通路的活化以及核因子 κ B(nuclear transcription factor- κ B, NF- κ B) 磷酸化和核内转位, 并且来自钙化瓣膜组织的细胞对 LPS 的反应最明显^[38]。此外, 我们还发现应用 LPS 刺激 TLR4 不仅能诱导 Notch1 通路活化, 还能诱导成骨标志物如 BMP-2 和 ALP 等表达升高以及钙结节形成。同样, 成骨反应也是源自钙化瓣膜的间质细胞最为严重^[39]。这也在一定程度上反映了非钙化瓣膜组织与钙化瓣膜组织中间质细胞存在明显的功能异质性。类似地, 叶挺等^[40]也应用 LPS 刺激以诱导主动脉间质细胞钙化, 他们发现在 Notch1 活化的同时, 细胞凋亡也增多, 提示 Notch1 可能通过细胞凋亡促进瓣膜钙化。而白细胞介素 37(interleukin-37, IL-37) 作为 IL-1 家族中的一个抗炎因子, 在体内和体外实验中能抑制瓣膜间质细胞的成骨反应。体内实验证实了 IL-37 过表达小鼠的主动脉瓣膜间质细胞对 LPS 刺激的 ICAM-1、BMP-2 表达水平明显低于野生型小鼠, 且主动脉增厚程度也低于野生型小鼠。在体外实验中, 先应用 IL-37 重组蛋白预处理人主动脉瓣膜间质细胞, 再用 LPS 刺激, 结果发现 IL-37 的预处理能明显降低 LPS 诱导的炎症反应和成骨转化, 并且 IL-37 可通过抑制 TLR4 介导的 NF- κ B 和细胞外信号调节激酶 2(extracellular signal-regulated kinase 1/2, ERK1/2) 活化来发挥其抑制炎症反应和成骨转化的作用^[41]。最近, Gee 等^[42]证实了 NF- κ B 信号是诱导 CAVD 发生发展的重要调节因子。他们通过对人的瓣膜组织免疫荧光分析发现

P65 的核转位随着瓣膜钙化程度的增加而增加,而且 P65 的核转位集中在纤维层,并发现了核因子 κ B 抑制物激酶 β (inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase β , IKK β) 的失活可以延缓瓣膜的炎症反应和成骨反应。

间质细胞中也存在着少量的平滑肌样细胞。Cimini 等^[43]对来自人和猪的瓣膜细胞类型进行免疫荧光和免疫印迹分析,发现了主要的 3 种细胞类型:成纤维细胞、肌成纤维细胞和类似平滑肌细胞的细胞,其中平滑肌样细胞表达 α -SMA,并具有收缩特性。除此之外,人们也陆续发现瓣膜间质细胞的前体细胞或祖细胞,并证明其参与了 CAVD 的进程^[44-45]。Huang 等^[46]利用间充质细胞培养基筛选出一种主动脉瓣来源的基质细胞,其高表达间充质干细胞 (mesenchymal stem cells) 标志物 (CD90、CD44 和 CD29) 以及 Runx2,表明该细胞群可能参与瓣膜的钙化。

而随着蛋白质组学等检测技术的发展,瓣膜细胞的异质性以及它们的功能和位置之间的联系得到更全面的研究。Schlotter 等^[47]首次应用时空多组学构建了人类 CAVD 蛋白质组和转录组的完整图谱,对不同病理状态的瓣膜(非病变期、纤维化期和钙化期)及瓣膜的不同层次(纤维层、海绵层、心室层)的蛋白质组和转录组特征进行分析,结果表明 CAVD 发展的不同时期存在分子的表达差异,如非病变期主要表达膜联蛋白 A3 (annexin A3, ANXA3)、骨髓基质细胞抗原 1 (bone marrow stromal cell antigen 1, BST1)、纤维蛋白原样 2 (fibrinogen like 2, FGL2)、白细胞介素 17D (interleukin-17D, IL-17D);纤维化期主要表达软骨中间层蛋白 (cartilage intermediate layer protein, CILP)、软骨酸性蛋白 1 (cartilage acidic protein 1, CRTAC1)、磷脂酶 A2 组 (phospholipase A2 group IIA, PLA2G2A)、蛋白多糖 4 (proteoglycan 4, PRG4);钙化期主要表达 α -2-巨球蛋白 (α -2-macroglobulin, A2M)、造血细胞特异性 Lyn 底物 1 (hematopoietic cell-specific Lyn substrate 1, HCLS1)、Serp 家族成员 1 (Serp family A member 1, SERPINA1)、血管性假血友病因子 (von willebrand factor, vWF)。另外,对钙化瓣膜的分层蛋白质分析显示,纤维层高表达 TIMP 金属肽酶抑制剂 3 (TIMP metalloproteinase inhibitor-3, TIMP-3)、载脂蛋白 E (apolipoprotein E, ApoE)、玻连蛋白 (vitronectin, VTN)、丛生蛋白 (clusterin, CLU)、硫酸酯酶 1 (sulfatase 1, SULF1);海绵层则特异性表达胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP);心室层高

表达肌成纤维细胞激活标志物,比如原肌球蛋白 2 (tropomyosin 2, TPM2)、肌球蛋白重链 11 (myosin heavy chain 11, MYH11)、转凝蛋白 (transgelin, TAGLN)、原肌球蛋白 4 (tropomyosin 4, TPM4) 和肌球蛋白轻链 6 (myosin light chain 6, MYL6)。而 Bouchareb 等^[48]选取了 7 例主动脉瓣置换术患者的主动脉瓣和 8 例接受心脏移植术患者的非钙化的主动脉瓣组织,分别提取纤维化区和钙化区的组织进行蛋白质组学和内分泌组学分析。研究显示,相比于对照组,主动脉瓣钙化组中的基质蛋白 2 (matrilin 2, MATN2) 和 S100 钙结合蛋白 A4 (S100 calcium binding protein A4, S100A4) 含量明显降低,而 SERPINA5、凝血酶敏感蛋白 1 (thrombospondin 1, THBS1) 和 VTN 蛋白含量显著升高;而在纤维化动脉瓣组织中,脂肪细胞增强子结合蛋白 1 (adipocyte enhancer-binding protein 1, AEBP1)、纤连蛋白 III 型结构域 1 (fibronectin type III domain containing 1, FNDC1)、分泌型磷蛋白 1 (secreted phosphoprotein 1, SPP1) 表达增高。

3 单细胞视角下的瓣膜细胞异质性及 CAVD 发病机制

单细胞转录组技术在微观层面为探索间质细胞的异质性和 CAVD 的致病机制开拓了道路^[49-50]。Xu 等^[51]首次利用单细胞测序技术揭示了钙化主动脉瓣的细胞异质性及 CAVD 的发病机制。研究选取 6 例瓣膜组织进行单细胞分析,其中 2 例源于主动脉夹层患者修复置换的非 CAVD 瓣膜组织和 4 例因 CAVD 进行瓣膜置换的钙化瓣膜。他们鉴定出 14 种细胞亚型,包括 3 种瓣膜间质细胞亚群、3 种免疫细胞、2 种瓣膜内皮细胞和 6 种新的主动脉瓣来源的基质细胞 (valve derived stromal cells, VDSC)。3 种间质细胞在正常瓣膜组织的比例较高,它们分别高表达 FOS 原癌基因 AP-1 转录因子亚单位 (fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit, FOS)、热休克蛋白家族 A (HSP70) 成员 6 (heat shock protein family A (HSP70) member 6, HSPA6) 和 SPARC,其中 FOS 和 SPARC 的表达主要分布在海绵层和纤维层,而 HSPA6 的表达则集中在海绵层。而主动脉瓣来源的基质细胞高表达基膜聚糖基因 (lumican, LUM)、SRY 盒转录因子 4 (SRY-box transcription factor 4, SOX4)、金属硫蛋白 1A (metallothionein 1A, MT1A),主要分布在钙化组织的海绵层和纤维层。而他们利用间充质干细胞培养基筛选出的 VDSC 表

现为梭形的成纤维细胞,具有比间质细胞更强的增殖能力,其不仅表达 CD90、CD44 和 CD29 的经典间充质干细胞标志物和 CD163、CD133 和 CD106 的干细胞标志物,还高表达成骨标志物 Runx2。其结果表明 VDSC 可能是一种来源于间质细胞、具有间充质干细胞特性并参与成骨反应的一类新型间质细胞亚群^[46]。

而另一项研究则利用单细胞技术揭示不同器官中成纤维细胞的异质性,并在骨骼肌肌周细胞和心脏瓣膜间质细胞中鉴定出至少 10 个共同富集的基因,包括凝血酶反应蛋白 1 (thrombospondin 1,

THBS1)、软骨寡聚基质蛋白(cartilage oligomeric matrix protein,COMP)和纤维调节蛋白(fibromodulin,FMOD)。同时,该研究还发现肌周细胞与瓣膜间质细胞之间的相似之处可能提示心脏瓣膜钙化与骨骼肌异位骨化具有共同的分子调控机制^[52]。最近,Majumdar 等^[53]将培养的猪瓣膜细胞分成两组:经 NO 供体处理组和未经处理组,然后进行单细胞转录组测序,揭示了经 NO 供体处理的猪瓣膜间质细胞中的肌成纤维细胞标志物 ACTA2、TAGLN、VIM 和 CNN1 的表达受到抑制,表明 NO 可抑制间质细胞向肌成纤维样细胞的转化(表 1)。

表 1. 单细胞测序在主动脉瓣膜间质细胞中的应用
Table 1. Single cell sequencing in aortic valve interstitial cells

样本	单细胞测序方法及平台	细胞亚群	标记基因	主要发现	参考文献
人类胚胎心脏(发育 5 ~ 7 周,9 ~ 17 周,20 ~ 25 周)	STRT-seq	间质细胞	COL1A1、DCN	间质细胞通过增殖和凋亡的动态平衡来参与瓣膜的发育重塑	[21]
人类胚胎心脏(发育 4.5 ~ 5 周,6.5 周,9 周)	10×Genomics、空间转录组	成纤维样细胞(心室流出道根部和瓣膜) 成纤维样细胞(心室流出道)	POSTN、ANPPA、PLN ELN、SPARC、OGN、ACTA2	完善了胚胎心脏基因表达的空间异质性	[22]
小鼠心脏瓣膜(出生后第 7 天和第 30 天)	DropSeq	P7 胶原-间质细胞 糖胺聚糖-间质细胞 P30 基质纤维细胞 纤维膜细胞 TCF21-间质细胞 抗原提呈细胞	COL1A1、SPARC、FMOD FBLN2、LUM、VCAN COMP、FMOD、CHAD、OGN MFAP5 TCF21、C4B CD74、PTN	构建了小鼠出生后瓣膜发育的细胞图谱	[23]
人非钙化主动脉瓣膜与钙化的主动脉瓣膜	10×Genomics	间质细胞 主动脉瓣来源的基质细胞(VDSC)	COL1A1、COL3A1、POSTN、HSPA6、SPARC LUM、SOX4、CC120、MT1A	构建了 CAVD 的细胞图谱,揭示了内皮向间充质转化在 CAVD 发展的重要作用	[51]
人主动脉瓣膜	SmartSeq2	瓣膜间质细胞	THBS1、COMP、FMOD	肌周细胞和瓣膜间质细胞均高表达 THBS1、COMP、FMOD,可能提示心脏瓣膜钙化和骨骼肌异位骨化具有共同的分子调控机制	[53]
培养的猪瓣膜间质细胞(对照组和 NO 供体处理组)	10×Genomics	猪瓣膜间质细胞	ACTA2、TAGLN、VIM、CNN1	NO 可抑制间质细胞向肌成纤维样细胞的转化	[54]

瓣膜内皮细胞作为覆盖在瓣膜表面的单层细胞,可通过缓冲血流剪切力、调控炎症反应等生理功能来保护瓣膜内部结构^[54]。因此,瓣膜内皮细胞的异质性及其对间质细胞的调控也备受关注。Parra-Izquierdo 等^[55]在振动流体剪切力系统中用干扰素 γ (interferon gamma,IFN- γ)和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α ,TNF- α)分别刺激主动脉侧和心室侧内皮细胞,结果显示主动脉侧内皮细胞在多轴流条件下更容易发生由细胞因子介导的单核

细胞黏附,而 IFN 可显著促进内皮细胞的炎症反应,尤其是主动脉侧的内皮细胞,这提示内皮细胞对血流剪切力和炎症刺激的反应存在着空间异质性。在瓣膜内皮细胞和间质细胞的互作研究中,Gee 等^[56]通过构建瓣膜内皮细胞和间质细胞的 3D 共培养,发现内皮细胞通过 EMT 和旁分泌的形式诱导间质细胞重塑与钙化。而在单细胞测序中,Xu 等^[51]在钙化主动脉瓣的单细胞图谱中发现两种瓣膜内皮细胞,其高表达 E 选择素(selectin E)和 SERPINE1。

另外,他们通过拟时序分析发现在主动脉瓣膜钙化过程中存在 EMT 这一现象,并且通路富集分析提示 ECM 受体的相互作用和局部黏附等内皮-间质转化相关的通路高度富集。这提示 EMT 是参与主动脉瓣叶病变增厚的又一重要机制。

4 结 语

CAVD 现已成为老年人最常见的瓣膜疾病,探索该病的发病机制和寻找潜在的靶点对防治 CAVD 意义重大。瓣膜间质细胞是瓣膜小叶最主要的细胞亚群,并且具有复杂的起源和功能异质性。而单细胞 RNA 测序也从单细胞层面精准描绘了主动脉瓣膜的细胞图谱,进一步揭示了间质细胞在分子层面上的异质性。将来,我们可以进一步从单细胞测序中寻找驱动瓣膜纤维化或钙化的独特细胞亚群,并探索其中关键致病基因,这种对间质细胞亚群的精准研究及调控有望成为防治 CAVD 的新方向。

[参考文献]

- [1] 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): 630-634.
- [2] LINDMAN B R, CLAVEL M A, MATHIEU P, et al. Calcific aortic stenosis[J]. Nat Rev Dis Primers, 2016, 2: 16007.
- [3] NGOMERO S, 曾庆春, 许志浩, 等. 基于超声心动图的钙化性主动脉瓣疾病患病情况的回顾性研究[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2014, 16(12): 1287-1289.
NGOMERO S, ZENG Q C, XU Z H, et al. Echocardiography-based retrospective analysis of calcific aortic valve disease[J]. Chin J Geriatr Heart Brain Vess Dis, 2014, 16(12): 1287-1289.
- [4] RAJAMANNAN N M. Calcific aortic valve disease: cellular origins of valve calcification[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011, 31(12): 2777-2778.
- [5] WANG H, LEINWAND L A, ANSETH K S. Cardiac valve cells and their microenvironment: insights from in vitro studies[J]. Nat Rev Cardiol, 2014, 11(12): 715-727.
- [6] MA L, LU M F, SCHWARTZ R J, et al. BMP2 is essential for cardiac cushion epithelial-mesenchymal transition and myocardial patterning[J]. Development, 2005, 132(24): 5601-5611.
- [7] PERSON A D, KLEWER S E, RUNYAN R B. Cell biology of cardiac cushion development[J]. Int Rev Cytol, 2005, 243: 287-335.
- [8] NAKAMURA T, COLBERT M C, ROBBINS J. Neural crest cells retain multipotential characteristics in the developing valves and label the cardiac conduction system[J]. Circ Res, 2006, 98(12): 1547-1554.
- [9] HINTON R B, YUTZEY K. Heart valve structure and function in development and disease[J]. Annu Rev Physiol, 2011, 73: 29-46.
- [10] WU B, WANG Y, XIAO F, et al. Developmental mechanisms of aortic valve malformation and disease[J]. Annu Rev Physiol, 2017, 79: 21-41.
- [11] HAJDU Z, ROMEO S J, FLEMING P A, et al. Recruitment of bone marrow-derived valve interstitial cells is a normal homeostatic process[J]. J Mol Cell Cardiol, 2011, 51(6): 955-965.
- [12] VISCONTI R P, EBIHARA Y, LARUE A C, et al. An in vivo analysis of hematopoietic stem cell potential: hematopoietic origin of cardiac valve interstitial cells[J]. Circ Res, 2006, 98(5): 690-696.
- [13] PAIK D T, CHO S, TIAN L, et al. Single-cell RNA sequencing in cardiovascular development, disease and medicine[J]. Nat Rev Cardiol, 2020, 17(8): 457-473.
- [14] 过冬冬, 孙 芬, 贺轩昂, 等. 单细胞测序技术在肝脏疾病的应用与展望[J]. 生物技术通报, 2021, 37(1): 137-144.
GUO D D, SUN F, HE X A, et al. Application and prospects of single-cell sequencing in liver disease[J]. Biotech Bull, 2021, 37(1): 137-144.
- [15] ZIEGENHAIN C, VIETH B, PAREKH S, et al. Comparative analysis of single-cell RNA sequencing methods[J]. Mol Cell, 2017, 65(4): 631-643. e4.
- [16] RAMSKOLD D, LUO S J, WANG Y C, et al. Full-length mRNA-Seq from single-cell levels of RNA and individual circulating tumor cells[J]. Nat Biotechnol, 2012, 30(8): 777-782.
- [17] PICELLI S, BJORKLUND A K, FARIDANI O R, et al. Smart-seq2 for sensitive full-length transcriptome profiling in single cells[J]. Nat Methods, 2013, 10(11): 1096-1098.
- [18] MACOSKO E Z, BASU A, SATIJA R, et al. Highly parallel genome-wide expression profiling of individual cells using nanoliter droplets[J]. Cell, 2015, 161(5): 1202-1214.
- [19] ZHENG G X, TERRY J M, BELGRADER P, et al. Massively parallel digital transcriptional profiling of single cells[J]. Nat Commun, 2017, 8: 14049.
- [20] SHUM E Y, WALCZAK E M, CHANG C, et al. Quantitation of mRNA transcripts and proteins using the BD rhapsody? single-cell analysis system[J]. Adv Exp Med Biol, 2019, 1129: 63-79.
- [21] CUI Y, ZHENG Y, LIU X, et al. Single-cell transcriptome analysis Maps the developmental track of the human heart

- [J]. *Cell Rep*, 2019, 26(7): 1934-1950.
- [22] ASP M, GIACOMELLO S, LARSSON L, et al. A spatio-temporal organ-wide gene expression and cell Atlas of the developing human heart[J]. *Cell*, 2019, 179(7): 1647-1660. e19.
- [23] HULIN A, HORTELLS L, GOMEZ-STALLONS M V, et al. Maturation of heart valve cell populations during post-natal remodeling[J]. *Development*, 2019, 146(12): dev 173047.
- [24] PEETERS F, MEEUX S, 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): 2618-2624.
- [25] 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): 1407-1418.
- [26] 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.
- [27] RUTKOVSKIY A, MALASHICHEVA A, SULLIVAN G A, et al. Valve interstitial cells: the key to understanding the pathophysiology of heart valve calcification[J]. *J Am Heart Assoc*, 2017, 6(9): e006339.
- [28] 李劫慧, 晏浩, 徐建军. 心脏瓣膜纤维化的病理机制[J]. *南昌大学学报(医学版)*, 2011, 51(1): 99-101, 106.
- LI J H, YAN H, XU J J. Pathological mechanism of cardiac valve fibrosis[J]. *J Nanchang Univ Med Sci*, 2011, 51(1): 99-101, 106.
- [29] BÜTTNER P, FEISTNER L, LURZ P, et al. Dissecting calcific aortic valve disease-the role, etiology, and drivers of valvular fibrosis [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2021, 8: 660797.
- [30] HUTCHESON J D, CHEN J, SEWELL-LOFTIN M K, et al. Cadherin-11 regulates cell-cell tension necessary for calcific nodule formation by valvular myofibroblasts[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(1): 114-120.
- [31] GOMEL M A, LEE R, GRANDE-ALLEN K J. Comparing the role of mechanical forces in vascular and valvular calcification progression [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2018, 5: 197.
- [32] KRALER S, BLASER M C, AIKAWA E, et al. Calcific aortic valve disease: from molecular and cellular mechanisms to medical therapy[J]. *Eur Heart J*, 2022, 43(7): 683-697.
- [33] 解婧, 郝春艳, 解倩. 脂蛋白(a)与钙化性主动脉瓣疾病的研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2021, 29(6): 539-542.
- XIE J, HAO C Y, XIE Q. Research progress of lipoprotein (a) and calcified aortic valve disease[J]. *Chin J Arterioscler*, 2021, 29(6): 539-542.
- [34] LI J, ZENG Q, XIONG Z, et al. Trimethylamine-N-oxide induces osteogenic responses in human aortic valve interstitial cells in vitro and aggravates aortic valve lesions in mice[J]. *Cardiovasc Res*, 2021. DOI: 10.1093/cvr/cvab243.
- [35] CHO K I, SAKUMA I, SOHN I S, et al. Inflammatory and metabolic mechanisms underlying the calcific aortic valve disease[J]. *Atherosclerosis*, 2018, 277: 60-65.
- [36] GREENBERG H, ZHAO G, SHAH A M, et al. Role of oxidative stress in calcific aortic valve disease and its therapeutic implications [J]. *Cardiovasc Res*, 2021. DOI: 10.1093/cvr/cvab142.
- [37] HULIN A, HEGO A, LANCELOTTI P, et al. Advances in pathophysiology of calcific aortic valve disease propose novel molecular therapeutic targets[J]. *Front Cardiovasc Med*, 2018, 5: 21.
- [38] ZENG Q, JIN C, AO L, et al. Cross-talk between the Toll-like receptor 4 and Notch1 pathways augments the inflammatory response in the interstitial cells of stenotic human aortic valves[J]. *Circulation*, 2012, 126(11 Suppl 1): S222-S230.
- [39] ZENG Q, SONG R, AO L, 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(7): 1580-1590.
- [40] 叶挺, 程治源, 凌秋洋, 等. Notch1 蛋白在人心脏瓣膜间质细胞凋亡与钙化关系中的作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2017, 25(2): 122-128.
- YE T, CHENG Z Y, LING Q Y, et al. The role of Notch1 protein in the relationship between apoptosis and calcification of human heart valve interstitial cells [J]. *Chin J Arterioscler*, 2017, 25(2): 122-128.
- [41] ZENG Q, SONG R, FULLERTON D A, et al. Interleukin-37 suppresses the osteogenic responses of human aortic valve interstitial cells in vitro and alleviates valve lesions in mice[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(7): 1631-1636.
- [42] GEE T, FARRAR E, WANG Y, et al. NF κ B (nuclear factor κ -light-chain enhancer of activated B cells) activity regulates cell-type-specific and context-specific susceptibility to calcification in the aortic valve[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2020, 40(3): 638-655.
- [43] CIMINI M, ROGERS K A, BOUGHNER D R. Smoothelin-positive cells in human and porcine semilunar valves[J].

- Histochem Cell Biol, 2003, 120(4): 307-317.
- [44] WANG H, SRIDHAR B, LEINWAND L A, et al. Characterization of cell subpopulations expressing progenitor cell markers in porcine cardiac valves [J]. PLoS One, 2013, 8(7): e69667.
- [45] NOMURA A, SEYA K, YU Z, et al. CD34-negative mesenchymal stem-like cells may act as the cellular origin of human aortic valve calcification [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 440(4): 780-785.
- [46] HUANG Y, XU K, ZHOU T, et al. Comparison of rapidly proliferating, multipotent aortic valve-derived stromal cells and valve interstitial cells in the human aortic valve [J]. Stem Cells Int, 2019. DOI: 10.1155/2019/7671638.
- [47] SCHLOTTER F, HALU A, GOTO S, et al. Spatiotemporal multi-omics mapping generates a molecular Atlas of the aortic valve and reveals networks driving disease [J]. Circulation, 2018, 138(4): 377-393.
- [48] BOUCHAREB R, GUAUQUE-OLARTE S, SNIDER J, et al. Proteomic architecture of valvular extracellular matrix: FNDC1 and MXRA5 are new biomarkers of aortic stenosis [J]. JACC Basic Transl Sci, 2021, 6(1): 25-39.
- [49] IQBAL F, LUPIERI A, AIKAWA M, et al. Harnessing single-cell RNA sequencing to better understand how diseased cells behave the way they do in cardiovascular disease [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2021, 41(2): 585-600.
- [50] BLASER M C, KRALER S, LÜSCHER T F, et al. Multi-omics approaches to define calcific aortic valve disease pathogenesis [J]. Circ Res, 2021, 128(9): 1371-1397.
- [51] XU K, XIE S, HUANG Y, et al. Cell-type transcriptome Atlas of human aortic valves reveal cell heterogeneity and endothelial to mesenchymal transition involved in calcific aortic valve disease [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2020, 40(12): 2910-2921.
- [52] MUHL L, GENOVÉ G, LEPTIDIS S, et al. Single-cell analysis uncovers fibroblast heterogeneity and criteria for fibroblast and mural cell identification and discrimination [J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 3953.
- [53] MAJUMDAR U, MANIVANNAN S, BASU M, et al. Nitric oxide prevents aortic valve calcification by S-nitrosylation of USP9X to activate NOTCH signaling [J]. Sci Adv, 2021, 7(6): eabe3706.
- [54] DRISCOLL K, CRUZ A D, BUTCHER J T. Inflammatory and biomechanical drivers of endothelial-interstitial interactions in calcific aortic valve disease [J]. Circ Res, 2021, 128(9): 1344-1370.
- [55] PARRA-IZQUIERDO I, SÁNCHEZ-BAYUELA T, LÓPEZ J, et al. Interferons are pro-inflammatory cytokines in sheared-stressed human aortic valve endothelial cells [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(19): 10605.
- [56] GEE T W, RICHARDS J M, MAHMUT A, et al. Valve endothelial-interstitial interactions drive emergent complex calcific lesion formation in vitro [J]. Biomaterials, 2021, 269: 120669.
- (此文编辑 许雪梅)