

本文引用: 张群吉, 黄琼惠, 侯经远, 等. 钙化性主动脉瓣疾病中 m^6A 甲基化谱及表观调控机制[J]. 中国动脉硬化杂志, 2026, 34(6): 553-562. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2026.06.008.

[文章编号] 1007-3949(2026)34-06-0553-10

• 实验研究 •

钙化性主动脉瓣疾病中 m^6A 甲基化谱及表观调控机制

张群吉^{1,2}, 黄琼惠^{1,2}, 侯经远^{1,2}, 袁群凯³, 钟 炜^{1,2,3}

1. 梅州市人民医院心血管病研究所, 2. 广东省心血管病分子诊断工程技术研究中心,
3. 梅州市人民医院心血管内科, 广东省梅州市 514031

[摘要] **[目的]** 构建钙化性主动脉瓣疾病(CAVD)的首个 m^6A 甲基化谱,揭示 m^6A 修饰在瓣膜钙化过程中的表观调控机制。**[方法]** 通过 RNA 甲基化测序(MeRIP-seq)技术获取 CAVD 患者瓣膜组织的 m^6A 甲基化谱,运用生物信息学方法进行差异甲基化分析、GO 功能注释及 KEGG 通路富集分析,筛选关键信号通路,以转化生长因子 β (TGF- β)信号通路富集最显著;利用主动脉瓣膜间质细胞(AVIC)构建体外细胞钙化模型,采用 RT-qPCR 及 Western blot 检测肾母细胞瘤 1 相关蛋白(WTAP)、甲基转移酶样蛋白 3(METTL3)、脂肪量和肥胖相关蛋白(FTO)、烷基化碱基修复蛋白同源物 5(ALKBH5)、YTH 结构域家族蛋白 1/2(YTHDF1/2)等 m^6A 甲基化关键酶,筛选核心调节因子;采用 siRNA 技术敲低 ALKBH5,检测 ALKBH5 缺失对 AVIC 钙化及 TGF- β 信号通路的作用,并通过 ALKBH5 过表达实验进行双向验证,明确 ALKBH5 的作用;通过 MeRIP-RT-qPCR 对 m^6A 修饰的具体通路靶基因 SMAD 家族成员 2(SMAD2)进行甲基化验证。**[结果]** 通过 MeRIP-seq 成功获得了 CAVD 的首个 m^6A 甲基化谱,发现钙化瓣膜组织 m^6A 甲基化修饰水平显著升高($P<0.01$),并识别出 7 412 个 m^6A 差异甲基化峰及 TGF- β 、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)、自噬等大量钙化相关的关键信号通路。体外 AVIC 钙化、ALKBH5 敲低及过表达等实验证实,钙化 AVIC 中去甲基化酶 ALKBH5 表达下调($P<0.05$),ALKBH5 敲低可以促进 AVIC 钙化,过表达则抑制其钙化。进一步机制研究发现,ALKBH5 敲低后,钙化 AVIC 细胞中 TGF- β II 型受体(TGFR2)蛋白表达及 SMAD2 的磷酸化(p-SMAD2)水平均上调(均 $P<0.05$),TGF- β 信号通路激活;另外,ALKBH5 敲低后,SMAD2 基因的 m^6A 甲基化水平升高($P<0.05$)。**[结论]** m^6A 甲基化修饰参与 CAVD 瓣膜钙化进程,去甲基化酶 ALKBH5 表达下调可能通过激活 TGF- β 信号通路,促进瓣膜间质细胞钙化。

[关键词] 钙化性主动脉瓣疾病; m^6A 甲基化谱; 主动脉瓣膜间质细胞; TGF- β 信号通路

[中图分类号] R5;R363

[文献标识码] A

The m^6A methylation profile and epigenetic regulatory mechanism in calcific aortic valve disease

ZHANG Qunji^{1,2}, HUANG Qionghui^{1,2}, HOU Jingyuan^{1,2}, YUAN Qunkai³, ZHONG Wei^{1,2,3}

1. Cardiovascular Diseases Institute, Meizhou People's Hospital, 2. Guangdong Engineering Technology Research Center for Molecular Diagnostics of Cardiovascular Diseases, 3. Department of Cardiovascular Medicine, Meizhou People's Hospital, Meizhou, Guangdong 514031, China

[ABSTRACT] **Aim** To establish the first m^6A methylation profile for calcific aortic valve disease (CAVD) and elucidate the epigenetic regulatory mechanism of m^6A modification during the process of valve calcification. **Methods** The m^6A methylation profile of the valve tissues from CAVD patients was obtained through RNA methylation sequencing (MeRIP-seq). Differential methylation analysis, GO functional annotation, and KEGG pathway enrichment analysis were performed using bioinformatics methods to identify key signaling pathways, with the transforming growth factor- β (TGF- β) pathway showing the most significant enrichment. An *in vitro* calcification model using aortic valve interstitial cells (AVIC) was established, and RT-qPCR and Western blot analysis were employed to detect key m^6A methylation enzymes,

[收稿日期] 2026-02-26

[修回日期] 2026-05-12

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(82505068);广东省医学科学技术研究基金项目(B2026586);梅州市社会发展科技计划项目(2025C0301012)

[作者简介] 张群吉,硕士,助理研究员,主要从事动脉粥样硬化及瓣膜钙化机制研究,E-mail:zhangqunji@163.com。通信作者钟炜,硕士,主任医师,硕士研究生导师,主要从事动脉粥样硬化及瓣膜钙化临床及机制研究,E-mail:zhwei89@163.com。

including Wilms' tumor 1-associating protein (WTAP), methyltransferase-like 3 (METTL3), fat mass and obesity-associated protein (FTO), alkylated base repair protein homolog 5 (ALKBH5), and YTH domain family proteins 1/2 (YTH-DF1/2), to identify core regulatory factors. siRNA technology was used to knock down ALKBH5, and the effects of ALKBH5 deficiency on AVIC calcification and the TGF- β signaling pathway were detected. The results were further verified through ALKBH5 overexpression experiments, clearly demonstrating the role of ALKBH5. The methylation of specific pathway target gene mothers against decapentaplegic homolog 2 (SMAD2) was verified through MeRIP-RT-qPCR. **Re-**

sults The first m⁶A methylation profile of CAVD was successfully obtained through MeRIP-seq. It was found that the m⁶A methylation modification level in calcified valve tissues was significantly increased ($P < 0.01$), and 7 412 m⁶A differentially methylated peaks and a large number of key signaling pathways related to calcification, such as TGF- β , mitogen-activated protein kinase (MAPK), and autophagy, were identified. *In vitro* experiments on AVIC calcification, ALKBH5 knockdown, and overexpression confirmed that the expression of the demethylase ALKBH5 was downregulated in calcified AVIC ($P < 0.05$). ALKBH5 knockdown promoted AVIC calcification, while overexpression inhibited it. Further mechanism studies revealed that after ALKBH5 knockdown, the expression of TGF- β type II receptor (TGFR2) protein and the phosphorylation level of SMAD2 (p-SMAD2) in calcified AVIC were both upregulated (both $P < 0.05$), and the TGF- β signaling pathway was activated. Additionally, after ALKBH5 knockdown, the m⁶A methylation level of the SMAD2 gene increased ($P < 0.05$).

Conclusions The m⁶A methylation modification is involved in the calcification process of CAVD valve. The downregulation of the demethylase ALKBH5 may promote the calcification of valve interstitial cells by activating the TGF- β signaling pathway.

[**KEY WORDS**] calcific aortic valve disease; m⁶A methylation profile; aortic valve interstitial cell; TGF- β signaling pathway

钙化性主动脉瓣疾病(calcific aortic valve disease, CAVD)是导致主动脉瓣狭窄和关闭不全的主要原因,其病理特征表现为主动脉瓣膜间质细胞(aortic valve interstitial cell, AVIC)成骨样转化、胶原基质重塑及羟基磷灰石沉积,最终导致瓣膜增厚、钙化和活动受限^[1-2]。随着人口老龄化加剧,CAVD 发病率显著上升,已成为全球心血管疾病发病和死亡的主要原因之一^[3-4]。流行病学数据显示,65 岁以上老年人 CAVD 的患病率为 20% ~ 30%,而 85 岁以上患者上升至 48% ~ 57%,造成严重的社会公共卫生负担^[5]。临床研究表明,一旦出现狭窄症状,患者 5 年生存率不足 20%,而瓣膜置换术是目前唯一有效的治疗手段,尚缺乏有效的药物预防和治疗措施。但现有治疗策略仅能缓解症状,无法逆转或阻止瓣膜钙化进程,且术后并发症(如瓣膜血栓、退行性病变)仍存在显著风险^[6-7]。因此,深入解析 CAVD 的分子机制,尤其是表观遗传调控网络,对于开发早期干预靶点、延缓疾病进展具有重要意义。

N⁶-甲基腺苷(N⁶-methyladenosine, m⁶A)是真核生物 mRNA 中最丰富的表观遗传修饰,受甲基化酶、去甲基化酶及甲基化阅读蛋白的共同调节,构成精密的“写”“读”“擦”动态调控网络,通过调控 RNA 的剪接、稳定性、翻译效率等,在心血管疾病发生发展中发挥关键作用^[8]。近年来越来越多的研究表明,m⁶A 甲基化酶和去甲基化酶的异常表达可

影响血管平滑肌细胞钙化过程^[9-11]。然而,m⁶A 甲基化在 CAVD 瓣膜钙化中的作用及机制尚缺乏系统研究。本研究旨在通过构建 CAVD 的 m⁶A 甲基化谱,系统揭示其 m⁶A 甲基化特征,初步探讨 m⁶A 修饰在瓣膜钙化中的潜在功能角色,为理解 CAVD 发病机制提供新的表观遗传学视角。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

人原代 AVIC 购自合肥万物生物科技有限公司;DMEM 培养基、胎牛血清、青链霉素混合液均购自美国 Thermo Fisher 科技公司; β -甘油磷酸钠、地塞米松、抗坏血酸为经典成骨诱导三联剂,均购自美国 Sigma-Aldrich 公司;4% 多聚甲醛固定液、茜素红 S 染色液、DAPI 染色液、细胞裂解液均购自碧云天生物技术有限公司;PAGE 凝胶快速制备试剂盒购自上海雅酶生物医药科技有限公司;ECL 试剂购自中国 Biosharp 公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 二抗购自美国 Thermo Fisher 科技公司;GAPDH、骨桥蛋白(osteopontin, OPN)、烷基化碱基修复蛋白同源物 5(alkylation repair homolog protein 5, ALKBH5)、脂肪量和肥胖相关蛋白(fat mass and obesity-associated protein, FTO)、SMAD 家族成员 2(mothers against decapentaplegic homolog 2, SMAD2)、

磷酸化 SMAD 家族成员 2 (phosphorylated mothers against decapentaplegic homolog 2, p-SMAD2)、转化生长因子 β 受体 2 (transforming growth factor beta receptor 2, TGFBR2) 等抗体均购自 Proteintech 公司, MeRIP-RT-qPCR 试剂盒购自艾维缔科技怀来有限公司, siRNA 及过表达质粒构建由上海吉玛制药有限公司完成, LipofectamineTM RNAiMAX 转染试剂购自美国 Thermo Fisher 科技公司; 超高灵敏度成像系统 (型号: ChemDocMP) 购自美国 Bio-Rad 公司; CO₂ 细胞培养箱 (型号: 3111) 购自美国 Thermo Fisher 科技公司。

1.2 样本采集、m⁶A 测序及生物信息学分析

所有组织样本的采集和处理均严格遵循伦理准则, 并获得医院伦理委员会批准和患者的知情同意 (审批号: 2025-C-261)。m⁶A 测序使用的瓣膜样本取自因患有严重 CAVD 而接受手术瓣膜置换术患者的主动脉瓣膜组织; 分离显著钙化及未钙化主动脉瓣组织, 显著钙化部位为钙化组 (Cal, $n=5$), 将肉眼和病理检查均未见钙化灶的非钙化主动脉瓣组织设为对照组 (Ctr, $n=5$)。所有取下的瓣膜组织立即置于预冷的无菌 PBS 中, 经 PBS 短暂清洗后, 部分组织立即置于液氮中速冻, 随后转入 -80 °C 超低温冰箱保存, 用于 RNA 提取及后续的 m⁶A 测序。

m⁶A 测序服务由 LC-Bio 技术有限公司 (中国杭州) 提供, 旨在构建并解析 CAVD 瓣膜组织的甲基化图谱。m⁶A 甲基化峰识别与差异分析: 使用 R 包 exomePeak 2 对测序数据进行分析, 识别并量化每个样本中的 m⁶A 甲基化峰; 采用 R 包 DESeq2 对钙化组与对照组进行差异甲基化峰分析 [差异标准: $|\log_2(\text{钙化组}/\text{对照组})| > 1, P < 0.05$]。功能富集分析: 利用 ChIPseeker 等工具对差异 m⁶A 峰相关的基因进行注释和归类。随后, 对这些基因进行基因本体 (gene ontology, GO) 和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genome, KEGG) 富集分析, 筛选出与瓣膜钙化密切相关的关键生物学过程和信号通路。

1.3 细胞培养与转染

AVIC 购自合肥万物生物科技有限公司。(1) AVIC 细胞培养: 基础培养基为 DMEM, 含 10% 胎牛血清 + 1% PS (青霉素-链霉素)。将细胞置于 DMEM 培养基, 37 °C、5% CO₂ 条件下常规培养, 待其生长融合至约 70% ~ 80% 时, 以 0.25% 胰蛋白酶消化, 按 1:3 比例传代培养。siRNA (siALKBH5 和 siNC) 及过表达质粒 (OE-ALKBH5 和 OE-NC) 由上海吉玛

制药技术有限公司设计合成。(2) 敲低转染: 转染前将细胞种植于 6 孔板中, 当融合度达到约 70% 时, 使用脂质体转染试剂将 siALKBH5 及阴性对照 siNC 分别转染至细胞。转染后继续培养 48 h, 构建 ALKBH5 基因敲低模型, 并进行敲低验证。(3) 过表达转染: 转染前将 AVIC 种植于 6 孔板中, 当细胞生长达到 50% 汇合时, 分别将过表达质粒 (OE-ALKBH5) 和阴性对照质粒 (OE-NC) 分别转染至细胞, 48 h 后倒置荧光显微镜下观察转染情况, 当转染率达 95% 以上, 收集细胞用于后续实验。

1.4 钙化诱导及染色鉴定

通过 CAVD 的体外细胞钙化模型, 探究瓣膜钙化的表观调控机制。钙化诱导前将细胞种植于 12 孔板爬片, 在其融合度达 60% 左右时, 更换为成骨诱导培养基进行诱导培养。对照组 (Ctr): 常规完全培养基培养。钙化组 (Cal): 使用含有 β -甘油磷酸钠 (10 mmol/L)、地塞米松 (0.1 μ mol/L) 和抗坏血酸 (50 mg/L) 的成骨诱导培养基, 每 2 ~ 3 天更换一次培养基维持诱导因子活性, 连续培养 21 天。通过茜素红 S 染色结合成骨标志物 OPN 表达进行钙化程度的鉴定, 通过正置显微镜观察钙化结节, 并进行多视野统计分析。

1.5 RT-qPCR 检测

使用 TRIzol 试剂从钙化组及对照组 AVIC 中提取总 RNA, 用 PrimeScript RT 试剂盒去除基因组 DNA 并反转录为 cDNA, 使用 SYBR Green 法进行 RT-qPCR, 检测基因包括肾母细胞瘤 1 相关蛋白 (Wilms' tumor 1-associating protein, WTAP)、甲基转移酶样蛋白 3 (methyltransferase like 3, METTL3)、ALKBH5、FTO、YTH 结构域家族蛋白 1/2 (YTH domain family protein 1/2, YTHDF1/2) 及钙化标志物 OPN 的 mRNA。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各目的基因 mRNA 相对表达量。各基因引物序列见表 1。

1.6 Western blot 检测

从 AVIC 提取细胞总蛋白, BCA 法进行蛋白定量, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白, 随后将蛋白转印至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h。根据目标条带大小裁膜后, 使用相应抗体 4 °C 孵育过夜。次日, 用辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 1 h, 最后使用 ECL 发光液显影曝光, 最后采用 Image J 软件对条带进行定量分析。

1.7 免疫荧光

将 AVIC 接种于共聚焦培养皿中培养, 弃上清 1×PBS 洗 3 遍, 加入 4% 多聚甲醛室温固定 30 min, 固定结束后 1×PBS 洗 3 遍, 加入 0.1% TritonX-100,

室温通透 10 min,1%牛血清白蛋白封闭 1 h,使用相应一抗 4 ℃ 孵育过夜,次日用荧光标记的二抗避光孵育 1 h,并加入 DAPI 对细胞核进行复染,最后在荧光共聚焦显微镜下采集图像,并进行多视野统计分析。

表 1. 引物序列
Table 1. Primer sequences

基因名称	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')
GAPDH	ATGACATCAAGAAGGTGCTG	CATACCAGGAAATGAGCTTG
WTAP	GCTTCTGCCTGGAGAGGATT	GTGTACTTGGCCCTCCAAAGC
METTL3	GTGATCGTAGCTGAGGTTCTG	GGGTTGCACATTGTGTGGTC
ALKBH5	TCAAGCCTATTTCGGGTGTCTG	AGCAGCATATCCACTGAGCA
FTO	ATTCTATCAGCACTGGCAGC	GGATGCGAGATACCGGAGTG
YTHDF1	CGTGGACACCCAGAGAACAA	TAGCTGGACAGGTAGGGGCTC
YTHDF2	AGCCTCTTGGAGCAGTACAAA	GCATTATTGGGCCTTGCCTG
OPN	AGCAGCTTTACAACAAATACCCAG	TTACTTGAAGGCTCTGTGGG

1.8 MeRIP-RT-qPCR

实验操作严格根据 MeRIP-RT-qPCR 试剂盒,进行免疫捕获和裂解,富集 RNA 的释放和回收,IP-m⁶A 反转录及 qPCR 检测。实验组和对照组片段化后的总 RNA 均为 21 μg。分别取其中 20 μg 的 RNA 用于 IP 实验,剩下 1 μg 的 RNA 用做 Input 样品。对 IP 后的 RNA 样品及 Input RNA 进行反转录,得到以下 Ct 值后计算 IP 占 Input 的百分比。

1.9 统计学分析

采用 GraphPad Prism 9 软件进行数据统计分析与作图。所有数据都通过正态性检验(Shapiro-Wilk 检验)和方差齐性检验(如 Levene 检验),服从正态分布且方差齐则采用 *t* 检验进行比较;不服从正态分布则采用 *U* 检验,服从正态分布但方差不齐则采用校正 *t* 检验进行比较。以双侧 *P*<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 钙化瓣膜组织 m⁶A 甲基化增强,钙化相关功能和通路显著富集

m⁶A 甲基化是指腺嘌呤 6 位氮原子的甲基化修饰过程,受甲基化酶、去甲基化酶及甲基化阅读蛋白的共同调控(图 1A)。首先分离钙化及非钙化主动脉瓣膜组织并进行茜素红染色鉴定,结果显示钙化瓣膜呈暗红色,提示显著钙盐沉积;非钙化主动脉瓣膜组织肉眼和病理检查均未见钙化灶,作为对照组(图 1B)。

首先,通过 m⁶A-seq 及生物信息学分析,揭示疾病的整体 m⁶A 甲基化概况。整体 m⁶A 甲基化分析

结果显示,与对照瓣膜组织相比,钙化瓣膜组织的整体 m⁶A 甲基化修饰存在显著差异,其中钙化组共测得 44 024 个 m⁶A 甲基化峰,对照组共测得 37 410 个 m⁶A 甲基化峰,其中两组相同的位点仅 13 571 个(图 1C)。小提琴图显示,与对照组相比,钙化瓣膜的 m⁶A 甲基化修饰水平升高 10% (*P*<0.01;图 1D)。基序分析显示,两组在 m⁶A 峰区均存在一致保守的 GGAC 基序序列,此为 m⁶A 甲基化的经典序列,这一发现证明增强了测序数据的可信度(图 1E)。此外,还分析了 m⁶A 修饰在转录本的分布,结果显示 m⁶A 峰主要分布在编码区(coding sequence, CDS)和 3'非翻译区(3'-untranslated region,3'UTR)(图 1F),5'非翻译区(5'-untranslated region,5'UTR)和 CDS 区域 m⁶A 峰密度明显增加,3'UTR 分布密度降低(图 1G)。

其次,识别差异 m⁶A 甲基化位点并进行功能通路分析。差异 m⁶A 甲基化峰与功能通路分析结果显示,在钙化组与对照组组织中,共筛选出 7 412 个差异 m⁶A 甲基化峰,其中 2 095 个显著上调、5 317 个显著下调,两组间甲基化水平差异具有统计学意义(图 2A、2B);随后,对这些差异甲基化位点开展 GO 功能分析,结果表明转录调控、细胞内信号转导、蛋白质磷酸化等功能条目显著富集(图 2C),且这些功能均与瓣膜间质细胞钙化过程密切相关。具体而言:转录调控方面,CAVD 中 AVIC 会向成骨样细胞转化,若此类转录调控相关功能出现异常,将导致成骨基因表达失衡,直接推动间质细胞的成骨转分化,进而促进钙盐沉积;细胞内信号转导方面,CAVD 中转化生长因子 β(transforming growth factor-β,TGF-β)、丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-ac-

tivated protein kinase, MAPK) 等信号通路异常激活, 其信号传递依赖蛋白质磷酸化过程, 以此调控间质细胞的增殖、分化与凋亡。如 TGF- β 通路激活后, 会通过 SMAD 蛋白的磷酸化调控下游成骨基因的表达, 而蛋白质磷酸化异常会放大这一促钙化信

号。KEGG 富集分析显示, TGF- β 信号通路、MAPK 信号通路及自噬相关信号通路显著富集(图 2D), 其中 TGF- β 通路的富集程度最高, 其在 CAVD 中发挥核心调控作用, 异常激活可促进瓣膜间质细胞向成骨样细胞转化, 驱动瓣膜钙化进程。

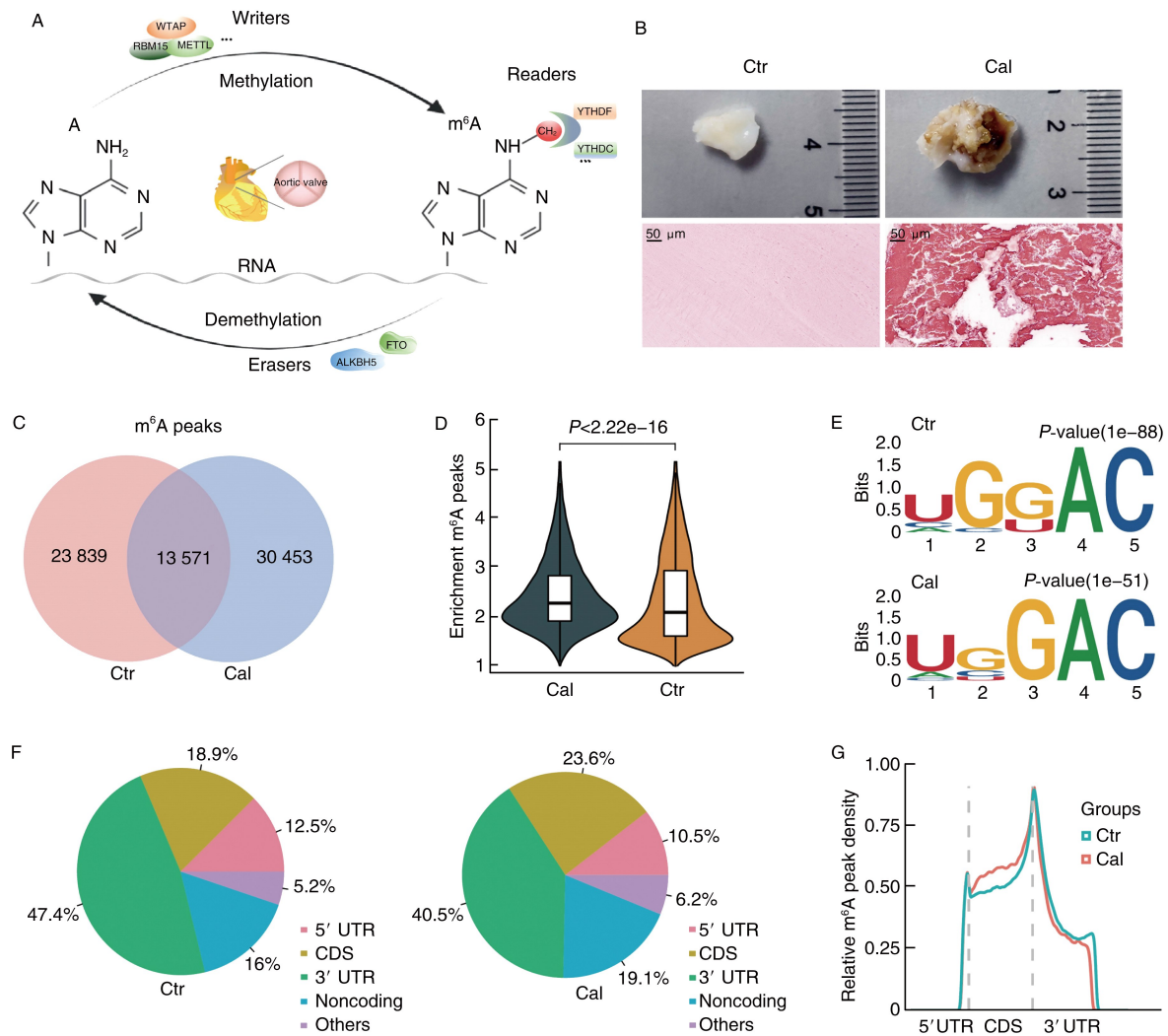


图 1. 钙化瓣膜整体 m⁶A 甲基化修饰增强

A 为 m⁶A 甲基化修饰过程示意图; B 为钙化组和对照组肉眼和茜素红染色差异, 钙化瓣膜呈暗红色、显著钙盐沉积, 对照瓣膜肉眼和病理检查均未见钙化灶; C 为两组 m⁶A 甲基化峰整体情况, 钙化组测得更多的 m⁶A 甲基化位点; D 为两组 m⁶A 修饰水平差异, 钙化组 m⁶A 甲基化修饰水平较高; E 为测序获得的 m⁶A 甲基化修饰的经典序列; F、G 为 m⁶A 修饰在转录本的分布情况。

Figure 1. Increased global m⁶A methylation in calcified valves

2.2 成功构建主动脉瓣膜间质细胞钙化模型

上述 m⁶A 甲基化测序结果显示, 钙化瓣膜组织中甲基化修饰增强, 钙化相关信号通路明显富集, 尤其 TGF- β 富集最显著。但具体的甲基化调节因子及信号通路等有待进一步的研究, 这里通过 AVIC 钙化模型用于体外功能机制研究, 对 AVIC 给予含 β -甘油磷酸钠 (10 mmol/L)、地塞米

松 (0.1 μ mol/L) 和抗坏血酸 (50 mg/L) 的成骨诱导培养基, 连续培养 21 天。茜素红染色发现, AVIC 大量钙盐沉积, 多视野 ($n=5$) 统计分析具有明显统计学差异 ($P<0.01$; 图 3A)。Western blot 结果显示, AVIC 中钙化标志物 OPN 蛋白表达上调 1.08 倍 ($P<0.01$; 图 3B)。

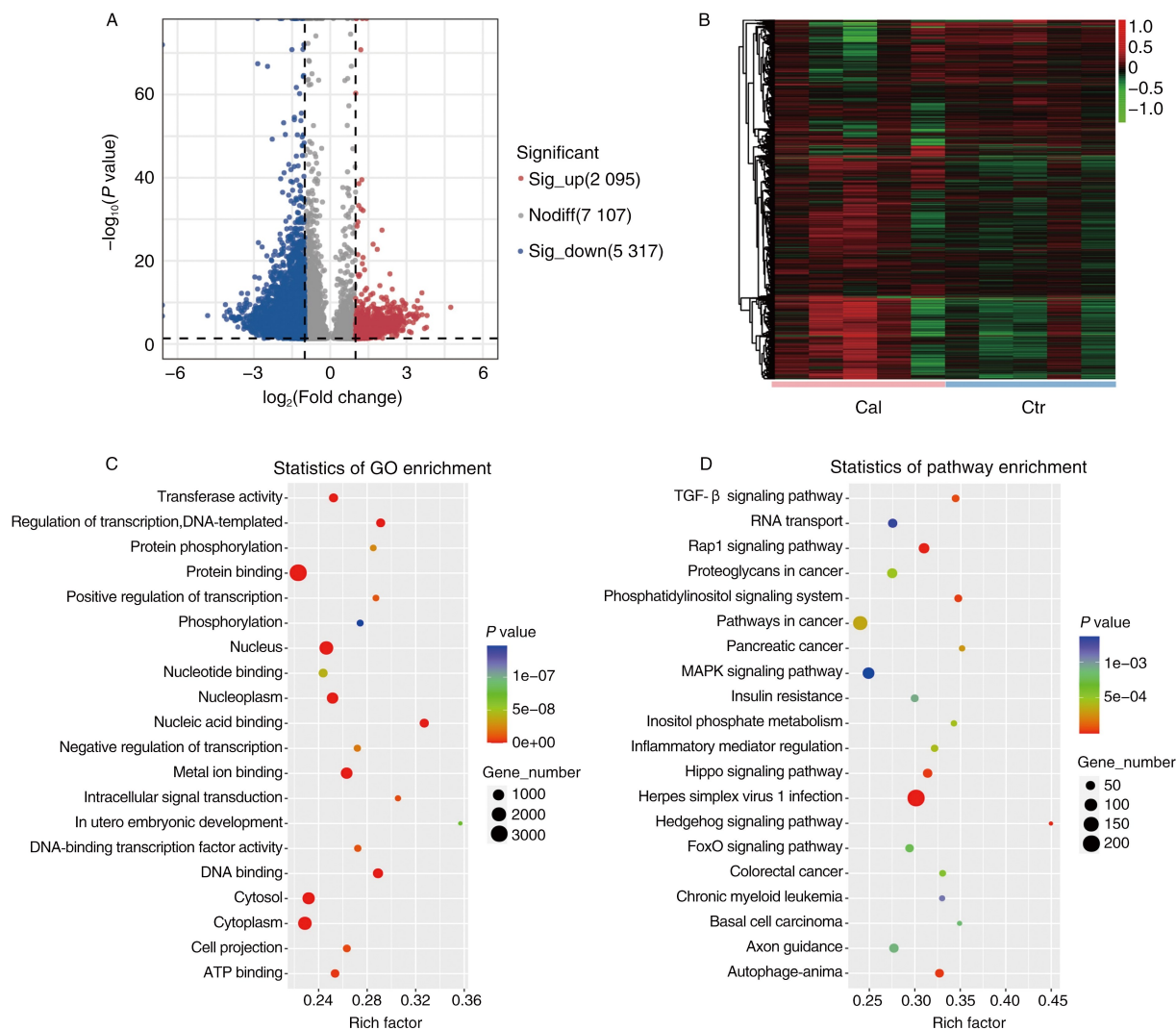


图 2. 差异 m⁶A 甲基化峰与功能通路分析

A 为火山图,显示钙化组与对照组差异甲基化峰数量,Sig_up 表示上调,Sig_down 表示下调,NoDiff 表示无差异;
B 为热图,显示两组甲基化水平存在明显差异,能够较好区分;C 为 GO 功能富集结果,显示富集最显著的前 20 个条目;
D 为 KEGG 信号通路富集结果,显示富集最显著的前 20 个条目。

Figure 2. Analysis of differential m⁶A peaks and functional pathways

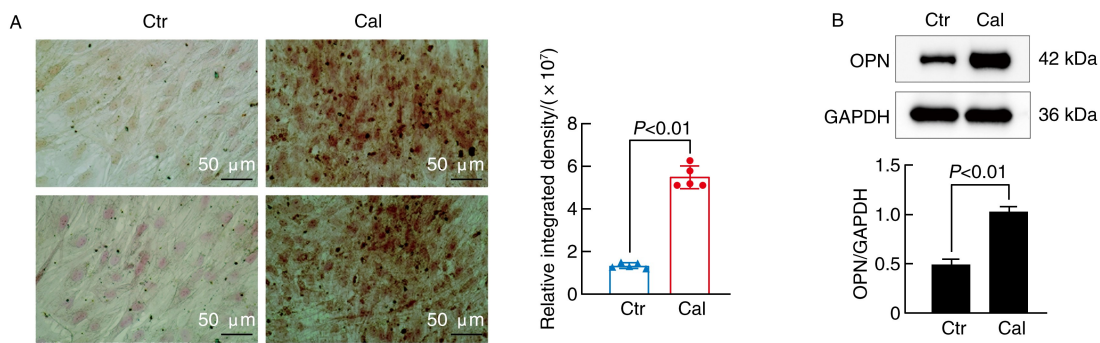


图 3. 成功构建瓣膜间质细胞钙化模型

A 为 AVIC 经钙化培养基诱导培养 21 天后,茜素红染色结果及多视野统计分析(n=5);B 为钙化诱导 AVIC 21 天后,
Western blot 检测 AVIC 钙化标志物 OPN 蛋白表达水平及统计分析结果(n=3)。

Figure 3. Successful construction of the AVIC calcification model

2.3 钙化瓣膜间质细胞中去甲基化酶 ALKBH5 表达下调

RT-qPCR 结果显示,与正常细胞(对照组)比,钙化的 AVIC 中钙化标志物 OPN mRNA 的表达水平上调 1.79 倍($P<0.01$),去甲基化酶 ALKBH5 mRNA 的表达水平降低 38.3% ($P<0.01$),FTO mRNA 的表达水平下调 24.2% ($P<0.05$),而其他 m⁶A 调节因子 WTAP、METTL3、YTHDF1/2 的 mRNA 表达水平差异无显著性($P>0.05$,图 4A)。Western blot(图 4B)及荧光结果(图 4C)从蛋白水平进一步

证实,钙化 AVIC 中 ALKBH5 表达分别降低 37.9% 和 25.0% (均 $P<0.05$)。

2.4 ALKBH5 蛋白敲低及鉴定

利用 siRNA 将 siALKBH5 转染至 AVIC,以检测 ALKBH5 蛋白表达。Western blot 结果显示,与 siNC 组相比,siALKBH5 转染组 ALKBH5 蛋白表达水平降低 32.9% ($P<0.05$;图 5A);荧光结果也显示 siALKBH5 转染后蛋白表达水平降低 46.0%,且主要分布在细胞核($P<0.01$;图 5B)。

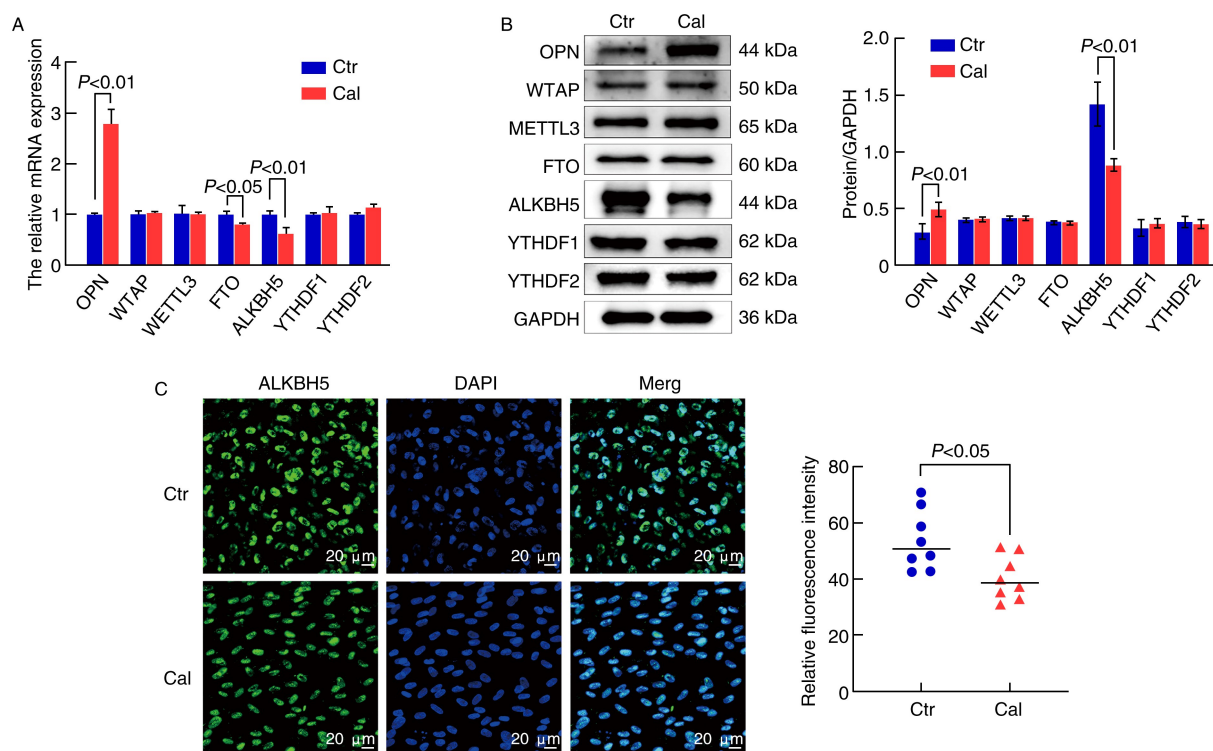


图 4. 钙化主动脉瓣膜间质细胞中去甲基化酶 ALKBH5 表达降低

A 为钙化 AVIC 中多种甲基化关键酶的 mRNA 表达水平($n=3$);B 为去甲基化酶 ALKBH5 及 FTO 蛋白表达($n=3$);

C 为荧光共聚焦拍摄及多视野统计结果($n=8$)。

Figure 4. Reduced expression of demethylase ALKBH5 in calcified AVIC

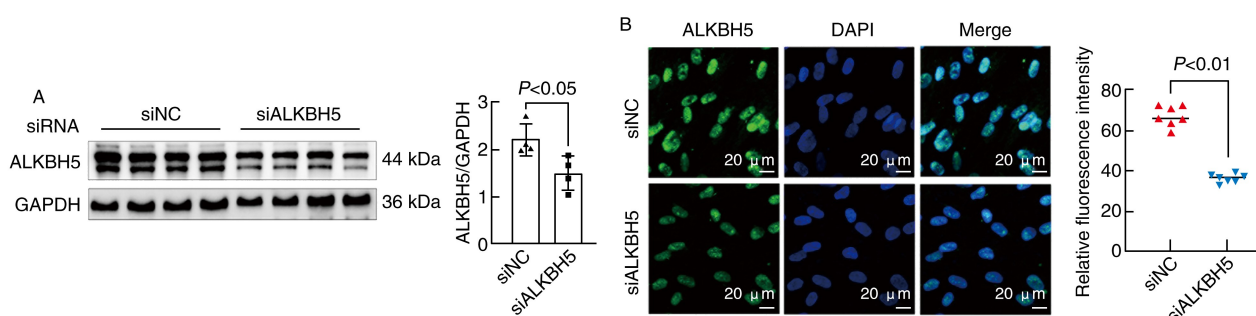


图 5. 主动脉瓣膜间质细胞 ALKBH5 敲低模型

A 为 Western blot 检测 ALKBH5 蛋白敲低水平及统计分析结果($n=3$);B 为荧光共聚焦拍摄及多视野统计结果($n=7$)。

Figure 5. ALKBH5 knockdown model of AVIC

2.5 ALKBH5 敲低促进 AVIC 钙化和 TGF- β 信号通路活化

茜素红染色结果显示,与 siNC 组相比,siALKBH5 组 AVIC 钙化上调 38.4% ($P < 0.05$; 图 6A)。Western blot 分析进一步证实,ALKBH5 敲低后,钙化 AVIC 中 TGFBR2 的蛋白表达水平及

SMAD2 的磷酸化(p-SMAD2)水平分别上调 54.4% 和 43.1% (均 $P < 0.05$; 图 6B)。上述结果表明,去甲基化酶 ALKBH5 可能通过负向调控 TGF- β 信号通路抑制瓣膜钙化进程;反之,ALKBH5 表达下调可能通过激活 TGF- β /SMAD2 信号轴,促进 AVIC 钙化。

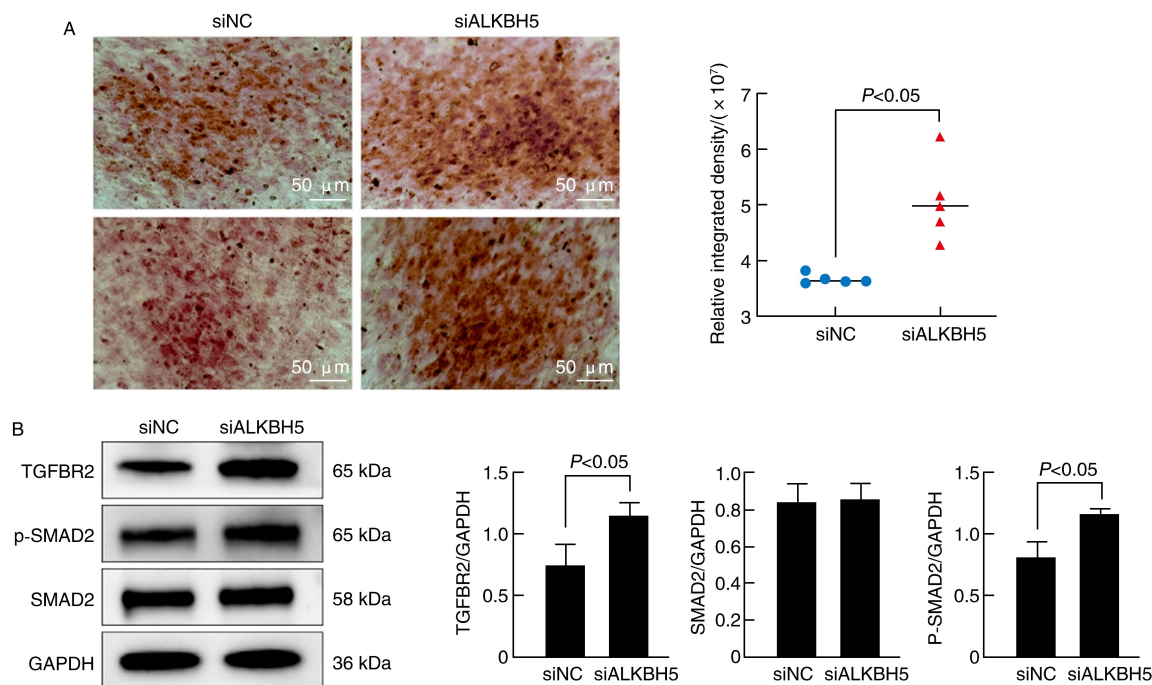


图 6. ALKBH5 敲低促进 AVIC 钙化和 TGF- β 信号通路活化

A 为茜素红染色结果及多视野统计分析 ($n=4$); B 为 ALKBH5 敲低后, Western blot 检测钙化细胞 TGF- β /SMAD2 信号轴 ($n=3$)。

Figure 6. ALKBH5 knockdown promotes AVIC calcification and activates TGF- β signaling pathway

2.6 ALKBH5 过表达抑制 AVIC 钙化和 TGF- β 信号通路活化

利用过表达质粒 OE-ALKBH5 转染 AVIC 实现体外过表达 ALKBH5。Western blot 结果显示,与转染 OE-NC 组相比,转染 OE-ALKBH5 质粒 48 h 后,AVIC 内 ALKBH5 蛋白表达水平升高 28.8% ($P < 0.05$; 图 7A)。对细胞进行钙化诱导培养,检测 ALKBH5 过表达对 AVIC 钙化的影响,茜素红染色结果显示,与 OE-NC 组相比,OE-ALKBH5 组 AVIC 钙化减轻 29.0% ($P < 0.01$; 图 7B)。另外,ALKBH5 过表达后,钙化 AVIC 中 TGFBR2 的蛋白表达水平下调 53.8%, p-SMAD2 水平下调 40.7% (均 $P < 0.05$; 图 7C)。上述结果表明,过表达 ALKBH5 可能通过抑制 TGF- β 信号通路减轻 AVIC 钙化。

2.7 ALKBH5 敲低后 SMAD2 mRNA m⁶A 修饰增强

虽然上述研究表明,ALKBH5 表达下调可能通过激活 TGF- β /SMAD2 信号轴,促进瓣膜间质细胞

钙化,但 m⁶A 修饰的具体靶基因并未明确。在 ALKBH5 敲低和对照钙化 AVIC 中,通过 MeRIP-RT-qPCR 直接检测信号通路核心分子 TGFBR2、SMAD2 mRNA 上的 m⁶A 修饰水平。结果显示,与 siNC 组相比,siALKBH5 组 SMAD2 基因的 m⁶A 甲基化水平升高 3.35 倍 ($P < 0.05$; 图 8A),TGFBR2 基因的 m⁶A 甲基化水平无明显差异 (图 8B)。这一结果提示,去甲基化酶 ALKBH5 敲低可能通过增强 SMAD2 基因的 m⁶A 甲基化水平,激活 TGF- β /SMAD2 信号轴,促进 AVIC 钙化。

3 讨论

CAVD 作为老年人群心血管死亡的主要原因,其发病机制复杂,目前尚缺乏有效的药物治疗手段,探寻其发生发展的潜在分子机制、开发其早期诊断及潜在治疗靶点至关重要^[12-13]。本研究通过

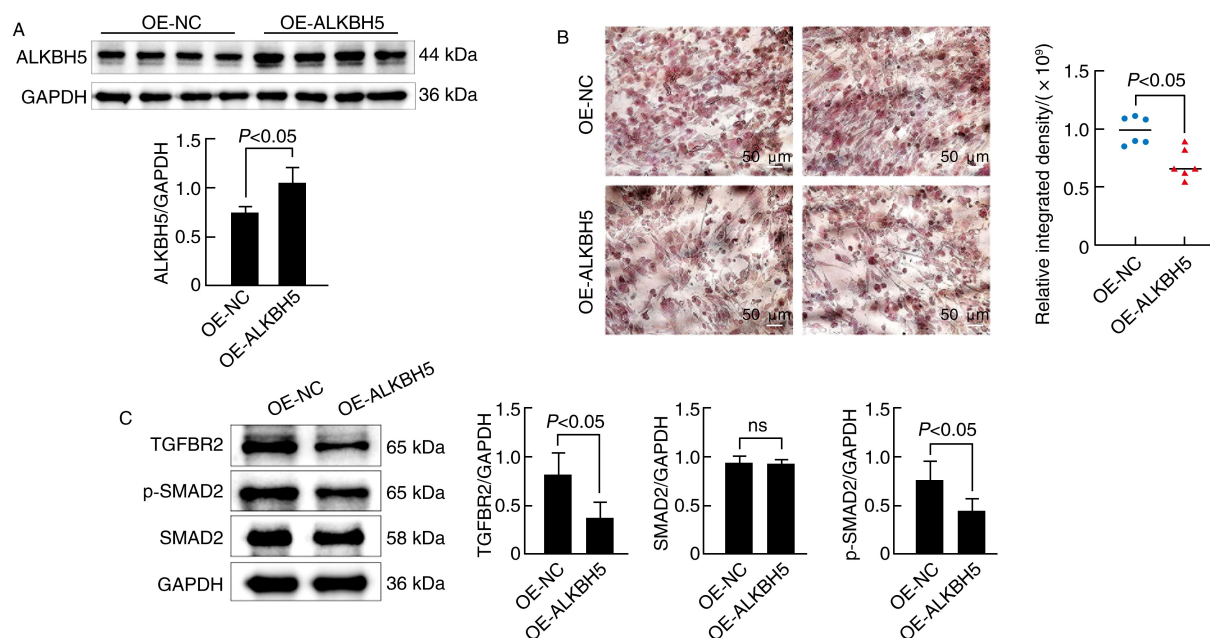


图 7. ALKBH5 过表达抑制 AVIC 钙化和 TGF- β 信号通路活化

A 为 Western blot 检测 ALKBH5 过表达水平及统计分析结果 ($n=3$); B 为茜素红染色检测 ALKBH5 过表达对 AVIC 钙化的影响及多视野统计分析结果 ($n=6$); C 为 ALKBH5 过表达抑制对 TGF- β /SMAD2 信号通路的作用 ($n=3$)。

Figure 7. ALKBH5 overexpression inhibits calcification of AVIC and activation of TGF- β signaling pathway

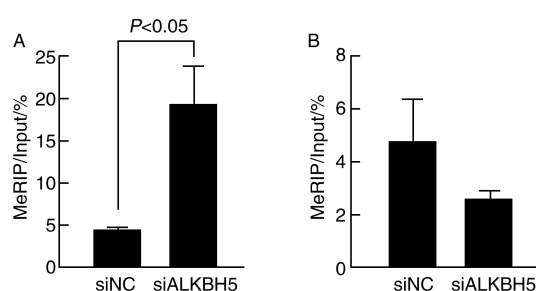


图 8. ALKBH5 敲低促进 SMAD2 mRNA 的 m⁶A 修饰

A 为 MeRIP-RT-qPCR 检测 SMAD2 mRNA 上的 m⁶A 修饰水平; B 为 MeRIP-RT-qPCR 检测 TGFB2 mRNA 上的 m⁶A 修饰水平。纵坐标代表甲基化修饰占总输入 DNA 的比例。

Figure 8. ALKBH5 knockdown increases m⁶A modification of SMAD2 mRNA

m⁶A 甲基化测序技术,成功构建了 CAVD 患者瓣膜组织的首个 m⁶A 甲基化谱。数据显示,钙化组与对照组的 m⁶A 甲基化峰数量及分布均存在显著差异,钙化瓣膜 m⁶A 修饰总体水平显著高于未钙化组。m⁶A 峰主要富集于转录本的 CDS 区和 3'UTR 区,且在钙化组织中的分布模式发生变化,提示 m⁶A 修饰的动态平衡可能与 CAVD 的瓣膜钙化密切相关。从诊断角度看,差异甲基化谱或特异的 m⁶A 修饰模式有望开发为 CAVD 的早期诊断标志物。从治疗视角看,针对异常的 m⁶A 修饰酶,恢复其稳态,可能

成为干预 CAVD 进展的新靶点。本图谱的建立,填补了该领域在表观转录组学层面的空白。

在 m⁶A 的动态调控网络中,m⁶A 修饰的动态平衡受甲基化酶、去甲基化酶及甲基化阅读蛋白的共同调控,尤其“书写”与“擦除”的平衡至关重要^[14-16]。本研究发现,在众多的 m⁶A 调节因子中,只有去甲基化酶 ALKBH5 在钙化 AVIC 中其 mRNA 和蛋白水平下调,其他关键酶如甲基转移酶复合成员 WTAP、METTL3 以及去甲基化酶 FTO 的表达变化并不显著,或仅轻微差异。这表明,在 CAVD 的钙化微环境中,m⁶A 甲基化水平的升高可能并非由于“书写者”活性增强,而主要源于“擦除者”ALKBH5 的功能失活或表达抑制,导致甲基化修饰的累积。这为靶向干预提供了一个潜在的、更为精准的切入点。

进一步的生物信息学分析提示,差异 m⁶A 修饰的基因显著富集于 TGF- β 信号通路。这一发现与体外细胞实验结果相互印证:当敲低 ALKBH5 后,AVIC 的钙化程度加剧,TGF- β 通路的两个关键节点 TGFB2 的表达和 SMAD2 的磷酸化水平均显著上调;而 ALKBH5 过表达后 AVIC 钙化程度减轻,TGFB2 的表达和 SMAD2 的磷酸化水平明显下调。TGF- β 信号通路在组织纤维化、炎症和成骨转化中均发挥核心作用,已有研究证实其异常激活是驱动

AVIC 向成骨样细胞转化和瓣膜钙化的重要驱动力^[17-20]。因此,我们推断 ALKBH5 的下调可能通过解除对 TGF- β 通路关键信号分子的 m⁶A 修饰与稳定性抑制,导致该通路过度激活,最终驱动 AVIC 的病理性钙化。另外,这种 m⁶A 修饰调控模式可能具有一定的细胞类型依赖性。研究发现,在血管平滑肌细胞钙化中,甲基转移酶 METTL3 的上调常被报道为关键驱动因素:高磷血症等病理刺激可诱导 METTL3 表达上调,通过 m⁶A-YTHDF2 通路加速钙化相关转录因子 mRNA 降解的负反馈机制失衡,或激活磷酸酶与张力蛋白同源物 (phosphatase and tensin homolog, PTEN)/蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB/Akt) 信号通路促进平滑肌细胞成骨转化^[11]。而本研究发现,在 AVIC 钙化进程中,去甲基化酶 ALKBH5 的表达下调是更显著的特征,并通过激活 TGF- β /SMAD2 信号轴促进钙化,靶向 ALKBH5 或 TGF- β 信号可能为 CAVD 的治疗提供新策略。

尽管本研究通过体外功能实验发现,敲低 ALKBH5 可通过激活 TGF- β /SMAD2 信号通路促进 AVIC 钙化;且 MeRIP-RT-qPCR 实验证实 SMAD2 mRNA 的 m⁶A 修饰水平显著上调,这已为 ALKBH5 作为瓣膜钙化进程的潜在负调控因子提供了初步证据。但为进一步强化该功能结论并探索其治疗转化潜力,未来仍需构建疾病动物模型,在活体水平验证其在瓣膜钙化发生发展中的作用,并评估其作为治疗靶点的可行性。

综上所述,本研究从 CAVD 患者组织层面揭示了 m⁶A 甲基化谱特征,识别出大量差异甲基化位点及钙化相关功能通路;并通过体外细胞钙化模型证实了 m⁶A 甲基化在瓣膜钙化中的作用和潜在机制,为理解 CAVD 的发病机制提供了新的表观遗传学视角。

[参考文献]

- [1] BIAN W, WANG Z, SUN C, et al. Pathogenesis and molecular immune mechanism of calcified aortic valve disease[J]. *Front Cardiovasc Med*, 2021, 8: 765419.
- [2] MATHIEU P, BOULANGER M C. Basic mechanisms of calcific aortic valve disease[J]. *Can J Cardiol*, 2014, 30(9): 982-993.
- [3] HUTCHESON J D, AIKAWA E, MERRYMAN W D. Potential drug targets for calcific aortic valve disease[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2014, 11(4): 218-231.
- [4] TSAO C W, ADAY A W, ALMARZOOQ Z I, et al. Heart disease and stroke statistics-2022 update: a report from the American heart association[J]. *Circulation*, 2022, 145(8): e153-e639.
- [5] FURUKAWA K I. Recent advances in research on human aortic valve calcification[J]. *J Pharmacol Sci*, 2014, 124(2): 129-137.
- [6] OTTO C M, NEWBY D E, HILLIS G S. Calcific aortic stenosis: a review[J]. *JAMA*, 2024, 332(23): 2014-2026.
- [7] NKOMO V T, GARDIN J M, SKELTON T N, et al. Burden of valvular heart diseases: a population-based study[J]. *Lancet*, 2006, 368(9540): 1005-1011.
- [8] ZACCARA S, RIES R J, JAFFREY S R. Reading, writing and erasing mRNA methylation[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(10): 608-624.
- [9] LI Y, LI J, ZHANG Y, et al. m⁶A methyltransferase METTL3 promotes vascular smooth muscle cell calcification by upregulating Runx2 mRNA stability[J]. *Cardiovasc Res*, 2025, 121(3): 712-726.
- [10] SHAN S K, LIN X, WU F, et al. Vascular wall microenvironment: endothelial cells original exosomes mediated melatonin-suppressed vascular calcification and vascular ageing in a m⁶A methylation dependent manner[J]. *Bioact Mater*, 2024, 42: 52-67.
- [11] CHENG M, JIN J, ZHANG D, et al. METTL3 obstructs vascular smooth muscle cells osteogenic reprogramming by methylating Runx2 in chronic kidney disease[J]. *Commun Biol*, 2025, 8(1): 582.
- [12] BLASER M C, BÄCK M, LÜSCHER T F, et al. Calcific aortic stenosis: omics-based target discovery and therapy development[J]. *Eur Heart J*, 2025, 46(7): 620-634.
- [13] 林湘杰, 曾庆春. 先天性免疫在钙化性主动脉瓣疾病中的作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2024, 32(6): 461-465.
LIN X J, ZENG Q C. The role of innate immunity in calcific aortic valve disease[J]. *Chin J Arterioscler*, 2024, 32(6): 461-465.
- [14] SHI H L, WEI J B, HE C, et al. Where, when, and how: context-dependent functions of RNA methylation writers, readers, and erasers[J]. *Mol Cell*, 2019, 74(4): 640-650.
- [15] DONG Y, ZHANG W, USLU V V. mRNA methylation at the crossroads of translation, transport, and decay in plant development and stress responses[J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2026, 89: 102851.
- [16] FU Y, DOMINISINI D, RECHAVI G, et al. Gene expression regulation mediated through reversible m⁶A RNA methylation[J]. *Nat Rev Genet*, 2014, 15(5): 293-306.
- [17] ZHENG R, ZHU P, GU J, et al. Transcription factor Sp2 promotes TGF β -mediated interstitial cell osteogenic differentiation in bicuspid aortic valves through a SMAD-dependent pathway[J]. *Exp Cell Res*, 2022, 411(1): 112972.
- [18] LIU Z, WANG Y, LIU F, et al. Long noncoding TSI attenuates aortic valve calcification by suppressing TGF- β 1-induced osteoblastic differentiation of valve interstitial cells[J]. *Metabolism*, 2023, 138: 155337.
- [19] MORIKAWA M, DERYNCK R, MIYAZONO K. TGF- β and the TGF- β family: context-dependent roles in cell and tissue physiology[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2016, 8(5): a021873.
- [20] VERRECCHIA F, MAUVIEL A. Transforming growth factor-beta and fibrosis[J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(22): 3056-3062.

(此文编辑 许雪梅)