

DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2022.05.004

# 自噬-溶酶体标记基因 LC3B 和 LAMP2 调控序列变异与退行性心脏瓣膜病的关联性\*

逢淑超<sup>1</sup> 闫波<sup>2△</sup>

(<sup>1</sup> 济宁医学院附属医院,中美转化医学合作研究中心,济宁 272029;<sup>2</sup> 济宁医学院精准医学研究院,济宁 272067)



闫波,我校 1979 级校友,医学博士,教授,博士研究生导师,山东省泰山学者特聘专家,济宁医学院精准医学研究院院长。1996 年获得中国协和医科大学医学分子生物学博士学位,1996-2001 年在美国国立卫生研究院完成博士研究。2002-2011 年起历任美国乔治·华盛顿大学医学院研究员,助理教授和副教授。2012 年起任济宁医学院教授,2015 年被山东省政府聘为“泰山学者海外特聘专家”。长期从事医学分子生物学、医学分子遗传学和发育生物学的基础研究和临床应用基础研究,主要研究方向为心血管疾病的分子遗传学、心肌再生和心脏修复。在 JBC, Dev Biol, Hum Mol Genet 和 Transl Res 等杂志上发表 SCI 论文 100 余篇(其中通讯作者 70 余篇),中文核心论文 20 余篇。主持完成国家自然科学基金项目 5 项,参与完成国家自然科学基金项目 2 项,参与完成科技部国家重点研发计划 2 项,主持完成山东省自然科学基金项目 2 项。参与在研科技部国家重点研发计划 1 项。已培养研究生 20 余名。

**摘要** **目的** 探索自噬-溶酶体标记基因 LC3B 和 LAMP2 调控序列变异与退行性心脏瓣膜病(DHVD)的关联性。**方法** 对 212 例 DHVD 患者组与 390 例健康对照组的自噬-溶酶体系统标记基因 LC3B 和 LAMP2 调控序列(启动子)进行统计分析。采集研究对象的外周静脉血白细胞,提取基因组 DNA,应用聚合酶链反应(PCR)扩增基因 LC3B 和 LAMP2 的启动子序列,Sanger 测序法直接检测序列变异。运用卡方检验对单核苷酸多态性(SNPs)进行分析,TRANSFAC 数据库预测序列变异改变与启动子相结合的转录因子。**结果** 共发现 29 个序列变异,包含 13 个 SNPs。其中,6 个 LC3B 基因启动子序列变异仅发现于 DHVD 患者,1 个 LAMP2 基因启动子序列变异只存在于 DHVD 女性患者,其他序列变异在健康对照组和患者组共有。对 SNPs 的基因型和等位基因进行卡方检验和 logistic 回归分析显示,rs35227715 的等位基因 G 与 DHVD 相关联,是 DHVD 的独立危险因素,致病风险是 1.36 倍;rs42900 基因型 CC 和等位基因 C 与 DHVD 存在关联,两者的致病风险均为 0.56 倍,具有保护性作用。利用 TRANSFAC 数据库预测仅在 DHVD 患者中发现的序列变异位点相结合的转录因子,结果表明序列变异可改变与之结合的转录因子。**结论** 自噬-溶酶体系统标记基因 LC3B 和 LAMP2 启动子序列变异可能影响与之结合的转录因子,改变其表达水平,引起自噬-溶酶体系统的功能失调,从而导致 DHVD 的发病。

**关键词** 自噬-溶酶体;退行性心脏瓣膜病;LC3B 基因;LAMP2 基因;序列变异

中图分类号:R542.5 文献标识码:A 文章编号:1000-9760(2022)10-321-07

## Association between the regulatory sequence variation of autophagy lysosome marker genes LC3B and LAMP2 and degenerative heart valve disease

PANG Shuchao<sup>1</sup>, YAN Bo<sup>2△</sup>

(<sup>1</sup> Sino-USA Cooperation Research Center for translational Medicine, Affiliated Hospital of Jining Medical University, Jining 272029, China; <sup>2</sup> Institute of Precision Medicine, Jining Medical University, Jining 272067, China)

**Abstract: Objective** To identify the relationship between the regulatory sequence variation of autophagy

\* [基金项目] 国家自然科学基金(81870279,81400291)

△[通信作者] 闫波, E-mail: yanbo@mail.jnmc.edu.cn

lysosomal marker genes LC3B and LAMP2 and degenerative heart valve disease (DHVD). **Methods** The promoters of LC3B and LAMP2 were analyzed in 212 patients with DHVD and 390 healthy controls. The peripheral blood leukocytes of the subjects were collected, genomic DNA was extracted, the promoter sequences of LC3B and LAMP2 were amplified by polymerase chain reaction (PCR), and the sequence variation was directly detected by Sanger sequencing. Chi square test was used to analyze single nucleotide polymorphisms (SNPs) and TRANSFAC database was used to predict the transcription factors associated with sequence variation changes and promoters. **Results** 29 sequence variation sites were found, including 13 SNPs. Among them, 6 sequence variations of LC3B were only found in DHVD patients, 1 sequence variation of LAMP2 was only found in DHVD female patients, and other sequence variation sites were shared in the control group and the patient group. Chi square test and logistic regression analysis of genotypes and alleles of SNPs showed that the allele G of rs35227715 was associated with DHVD and was an independent risk factor for DHVD, with a disease risk of 1.36 times; the genotype CC and allele C of rs42900 were associated with DHVD, and the pathogenic risk of both was 0.56 times, with a protective effect. The transcription factors that bind to the sequence variation sites found only in DHVD patients was analyzed with the TRANSFAC database, and the results showed that the sequence variations can change the transcription factors. **Conclusion** The sequence variations of LC3B and LAMP2 promoter may affect the transcription factors that bind to them and change the expression levels of LC3B and LAMP2, causing the dysfunction of autophagy-lysosome system, thus leading to the pathogenesis of DHVD.

**Keywords:** Autophagy-lysosome; Degenerative heart valve disease; LC3B gene; LAMP2 gene; Sequence variation

伴随老龄化社会的发展, 退行性心脏瓣膜病 (Degenerative heart valve disease, DHVD) 已逐渐成为我国老年人心脏瓣膜病最常见类型<sup>[1-2]</sup>, 主要表现为钙化性主动脉瓣狭窄<sup>[3]</sup>。DHVD 与动脉粥样硬化有类似发病危险因素包括高龄、高脂和高血压等, 其病理特点是炎症浸润、脂质沉积、细胞外基质重塑、瓣膜间质细胞转分化及钙化等<sup>[4]</sup>。自噬是细胞利用溶酶体降解长寿命蛋白、老化及受损的细胞器和大分子物质的过程, 主要场所为自噬-溶酶体, 参与调节细胞动态平衡、细胞分化和生存、衰老等过程, 在动脉粥样硬化、心力衰竭和血管老化等疾病中发挥重要作用<sup>[5-6]</sup>。我们前期研究显示冠心病患者自噬-溶酶体标记基因微管相关蛋白轻链 3 (LC3B) 和溶酶体相关蛋白 2 (LAMP2) 表达显著异常, 提示自噬-溶酶体参与动脉粥样硬化的发生<sup>[7-8]</sup>。多项研究显示, 在人的主动脉瓣膜样本中, 自噬-溶酶体相关基因的表达具有差异, 其功能失调严重影响瓣膜钙化程度<sup>[9-11]</sup>。在一些溶酶体贮积病患者中发现主动脉瓣膜增厚和狭窄, 其发病机制可能为炎症反应、钙离子平衡改变和脂质沉积相互作用引起瓣膜退行性改变<sup>[12]</sup>。

目前, DHVD 发病的分子机制尚未清楚, 本文将探究自噬-溶酶体标记基因 LC3B 和 LAMP2 调

控序列是否与 DHVD 发病相关, 通过测序分析其调控序列变异与 DHVD 的关联性, 揭示 DHVD 的分子机制, 为 DHVD 的分子诊断和临床预防及治疗提供可靠的实验基础和理论依据。

## 1 对象和方法

### 1.1 对象

选取 2018-2020 年就诊于济宁医学院附属医院并经临床明确诊断的 247 例 DHVD 患者作为 DHVD 组, 男 135 例, 女 112 例, 年龄 (63.02±11.04) 岁; 同期选取在济宁医学院附属医院健康体检中心体检的健康人群 454 例为对照组, 男 235 例, 女 219 例, 年龄 (51.00±12.00) 岁。DHVD 患者依据以下标准进行临床诊断: 1) 主动脉瓣功能障碍的临床表现; 2) 超声心动图和 CT 检查有典型的主动脉瓣膜钙化; 3) 排除其他原因, 如风湿性心脏病 (病理特征为 Aschoff 小体)、感染性心内膜炎等。本研究已获得济宁医学院附属医院医学伦理学委员会批准, 患者本人或者法定监护人知情同意。

### 1.2 方法

**1.2.1 样本采集及 DNA 提取** 所有研究对象抽取空腹外周血 3mL, 采用密度梯度离心法提取外周血单核细胞。按 DNeasy Blood and Tissue Kit (QIA-

GEN, USA) 说明书操作, 提取单核细胞基因组 DNA, -20℃ 保存。

**1.2.2 PCR 扩增** 参照 GeneBank 中 LAMP2 基因(NG\_007995)和 LC3B 基因(NG\_029030)转录起始点上游序列设计启动子引物, 由上海生工生物公司合成。50 μL PCR 反应体系: 模板 DNA 3 μL, 上游、下游引物 (10 μmol/L) 各 1 μL, PCR Mix 25 μL, ddH<sub>2</sub>O 20 μL。PCR 反应条件: 95℃ 预变性 3min; 95℃ 变性 30s, 退火 40 或 60s, 72℃ 延伸 40s, 共 35 个热循环; 72℃ 延伸 10min。PCR 扩增产物-20℃ 暂时保存。引物序列见表 1。

表 1 启动子引物序列

引物名称	引物序列	产物大小	退火温度
LAMP2-F1	5'-GCAATCTACCCATCTGACAAA-3'	1039bp	57℃
LAMP2-R1	5'-TTCTTGCTTACAGCCAATCTC-3'		
LAMP2-F2	5'-TAGATGACGGGTGATAGGTG-3'	604bp	57℃
LAMP2-R2	5'-CTCGGACCACTCTTTCAGG-3'		
LC3B-F1	5'-CAGGAGATCCCTTGAGCCCAGG-3'	555bp	63℃
LC3B-R1	5'-CGTGCTCCGTGGGTGGCTTCC-3'		
LC3B-F2	5'-CTCGGGACAAAAGCAGTTGCG-3'	672bp	61℃
LC3B-R2	5'-GGCGATAGCCACTTCCCTTGT-3'		

**1.2.3 基因分型** 所有样本扩增完毕送至上海生工生物公司测序, 以 GeneBank 中的启动子序列为野生型参照, 利用 DNAMAN (Lynnon Biosoft, USA) 软件比对测序结果进行基因分型。

**1.3 统计方法**

采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析, 计数资料采用卡方检验, 且理论频数 1 ≤ T < 5 时用卡方检验校正公式, 理论频数 T < 1 时改用 Fisher 确切概率法进行统计分析; 运用 logistic 回归分析 SNPs 与 DHVD 的关联性, 以优势比 (odds ratio, OR) 和 95% 置信区间 (confidence interval, CI) 表示, 同时对 SNPs 进行 Hardy-Weinberg 平衡检验; 利用在线 TRANSFAC2.0 数据库预测转录因子潜在的结合位点。P < 0.05 为差异具有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 LC3B 与 LAMP2 基因启动子序列变异情况**

筛选测序不合格的结果后, LAMP2 基因测序成功的 DHVD 组 201 例 (男性 108 例, 女性 93 例)

和对照组 397 例 (男性 201 例, 女性 196 例); LC3B 基因 DHVD 组 212 例, 对照组 390 例。两组共发现 29 个序列变异位点, 经测序验证确定, LC3B 启动子有 6 个序列变异位点 (g. 4085G>A, g. 4266G>A, g. 4286C>T, g. 4339G>A, g. 4853A>G, g. 4903G>T) 仅发现于 DHVD 组, LAMP2 启动子有 1 个序列变异位点 (g. 4167A>G) 仅存在于 DHVD 女性患者; 在对照组中观察到 11 个序列变异包含 4 个 SNP, DHVD 组未有这些变异; 两组中都存在的序列变异共有 11 个包含 5 个 SNP, 其中 rs42900 中 AA, CC 基因型在 DHVD 男性患者与对照组的差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 5.44, P < 0.02$ )。见图 1, 表 2 和表 3。

表 2 DHVD 组和对照组 LC3B 基因序列变异基因型分析 (n)

变异位点	基因型	位置 <sup>1</sup> (bp)	DHVD 组 (212)	对照组 (390)	$\chi^2$	P
g. 4068G>A (rs552929429)	GA	-933	0	5		—
g. 4085G>A	GA	-916	1	0		—
g. 4106C>T	CT	-895	1	1	0.06	0.81
g. 4175G>C (rs543058021)	GC	-894	0	1		—
g. 4224T>C	TC	-777	0	1		—
g. 4266G>A	GA	-735	1	0		—
g. 4280C>T (rs11117269)	CC	-717	208	385	0.05	0.82
	CT		4	5		
g. 4282C>T (rs532744297)	CC	-719	210	387	0.06	0.81
	CT		2	3		
g. 4286C>T	CT	-715	2	0		—
g. 4339G>A	GA	-662	2	0		—
g. 4433G>A (rs142738317)	GA	-568	0	1		—
g. 4488G>C	GC	-513	0	1		—
g. 4494A>C (rs577616524)	AC	-507	0	1		—
g. 4631C>G (rs35227715)	CC	-370	131	207	5.07	0.08
	CG		77	168		
	GG		4	15		
g. 4744G>A	GA	-257	0	1		—
g. 4853A>G (rs77019223)	AG	-148	1	0		—
g. 4883C>A (rs16944733)	CC	-118	51	107	1.88	0.39
	CA		114	213		
	AA		47	70		
g. 4889C>G	CG	-102	1	1	0.09	0.76
g. 4903G>T	GT	-98	1	0		—
g. 4904C>G	CG	-97	0	1		—
g. 5001A>C	AC	1	0	1		—

注: 1 序列变异位点的上游或下游位置参照基因组 NG\_029030 转录起始位点 5001bp 为 +1

表 3 DHVD 组和对照组 LAMP2 基因序列变异基因型分析(n)

序列变异位点	位置 <sup>1</sup> (bp)	基因型	男性 <sup>2</sup>				女性			
			DHVD 组(108)	对照组 (201)	$\chi^2$	<i>P</i>	DHVD 组(93)	对照组 (196)	$\chi^2$	<i>P</i>
g. 4167A>G	-834	AG					1	0		—
g. 4569A>C(rs42900)	-432	AA	65	154	5.44	0.02	42	81	1.00	0.61
		AC					37	90		
		CC	43	57			14	25		
g. 4620T>C	-381	TC					0	1		—
g. 4760T>G (rs28603270)	-241	TT	103	191	0.02	0.89	88	189	1.49	0.55
		TG					5	6		
		GG	5	10			0	1		
		—/ins					1	1	0.04	0.82
g. 4843_4844 insC	-158	—/ins					1	1	0.04	0.82
g. 5038G>A	+38	AA	0	1			0	0		—
g. 5158_5166delGGCGGCGAC(rs193922648)	+158	—/del					1	0		—
		del/del	0	1						
g. 5166_5167insGGCGGCGAC(rs730880495)	+166	—/ins	0	1						—

注:1. 变异序列的上游或下游位置参照基因组 NG\_007995 转录起始位点 5001bp 为+1。2. 变异序列基因型以半合子存在于男性。



图 1 序列变异的测序色谱图

### 2.2 SNPs 与 DHVD 的关联性分析

选取两组都存在的 SNPs 位点 (rs11117269、rs532744297、rs35227715、rs16944733、rs42900、rs28603270) 进行 HardyWeinberg 平衡检验,均符合 HardyWeinberg 平衡,提示样本来自遗传平衡的群体。

随之对 SNPs 位点进行 logistic 回归分析,结果

发现 rs35227715 中等位基因 G 的致病效应是 C 的 1.36 倍 (95% CI: 1.02 ~ 1.81, *P* = 0.04); DHVD 男性患者中 rs42900 基因型 CC 的致病效应是 AA 的 0.56 倍 (95% CI: 0.34 ~ 0.91, *P* = 0.02), 其等位基因 C 的致病效应同样是 A 的 0.56 倍 (95% CI: 0.40 ~ 0.79, *P* < 0.01)。其余 SNPs 的基因型及等位基因均无相关性 (*P* > 0.05)。见表 4 和表 5。

表 4 LC3B 基因 SNP 与 DHVD 的关联性分析(n/%)

SNP	基因型/ 等位基因	DHVD 组	对照组	$\beta$	OR(95%CI)	P
g. 4280C>T(rs11117269)	CC	208/98.1	385/98.7		1	
	CT	4/1.9	5/1.3	0.39	1.48(0.39~5.57)	
	C	420/99.1	775/99.4	-0.39	0.68(0.18~2.54)	0.56
	T	4/0.9	5/0.6			
g. 4282C>T(rs532744297)	CC	210/99.1	387/99.2		1	1.00
	CT	2/0.9	3/0.8	0.21	1.23(0.20~7.41)	
	C	422/99.5	777/99.6	-0.21	0.82(0.14~4.90)	0.82
	T	2/0.5	3/0.4			
g. 4631C>G(rs35227715)	CC	131/61.8	207/53.1		1	0.08
	CG	77/36.3	168/43.1	-0.32	0.72(0.51~1.03)	
	GG	4/1.9	15/3.8	-0.86	0.42(0.13~1.30)	
	C	339/80.0	582/74.6	0.31	1.36(1.02~1.81)	0.04
	G	85/20.0	198/25.4			
g. 4883C>A(rs16944733)	CC	51/24.1	107/27.5		1	0.39
	CA	114/53.8	213/54.6	0.12	1.12(0.75~1.69)	
	AA	47/22.1	70/17.9	0.34	1.41(0.86~2.32)	
	C	216/50.9	427/54.7	-0.15	0.86(0.68~1.09)	0.21
	A	208/49.1	353/45.3			

表 5 LAMP2 基因 SNP 与 DHVD 的关联性分析(n/%)

SNP	基因型/等位基因	男性					女性				
		DHVD 组	对照组	$\beta$	OR(95%CI)	P	DHVD 组	对照组	$\beta$	OR(95%CI)	P
g. 4569A>C(rs42900)	AA	65/60.2	154/73.0		1	0.02	42/45.2	81/41.3		1	0.61
	AC						37/39.8	90/45.9	-0.23	0.79(0.47~1.35)	
	CC	43/39.8	57/27.0	-0.58	0.56(0.34~0.91)		14/15.1	25/12.8	0.78	1.08(0.51~2.29)	
	A	130/60.2	308/73.0	-0.58	0.56(0.40~0.79)	0.00	121/65.1	252/64.3	0.03	1.03(0.72~1.49)	0.86
	C	86/39.8	114/27.0				65/34.9	140/35.7			
g. 4760T>G(rs28603270)	TT	103/95.4	191/95.0		1	0.89	88/94.6	189/96.4		1	0.55
	TG						5/5.4	6/3.1	0.58	1.79(0.53~6.02)	
	GG	5/4.6	10/5.0	0.08	1.08(0.36~3.24)		0/0.0	1/0.5		—	
	T	206/95.4	382/95.0	0.08	1.08(0.50~2.35)	0.85	181/97.3	384/98.0	-0.28	0.75(0.24~2.34)	0.63
	G	10/4.6	20/5.0				5/2.7	8/2.0			

2.3 预测序列变异位点影响的转录因子

利用在线 TRANSFAC2.0 数据库(<https://portal.genexplain.com/>)分析发现于 DHVD 组的序列变异位点 g. 4085G>A, g. 4266G>A, g. 4286C>T, g.4339G>A, g. 4853A>G, g. 4903G>T, g. 4167A>G, 结果显示序列变异可消除原有转录因子的结合位点或者创建新的转录因子结合位点,包括 SMAD 蛋白家族,CAAT 区/增强子结合蛋白(C/EBP),激活增强子结合蛋白 2(AP-2),通用起始子(General initiator, Inr),性别决定区 Y 框蛋白 10(SOX10)

(见表 6,图 2)。

表 6 预测变异序列影响结合的转录因子

	变异序列	影响方式	转录因子
LC3B	g. 4085G>A	消除	-
		创建	SMAD factor
	g. 4266C>T	消除	SMAD factor
		创建	C/EBP group
g. 4903C>T	消除	AP-2	
	创建	General initiator(Inr)	
LAMP2	g. 4167C>G	消除	SOX10
		创建	-

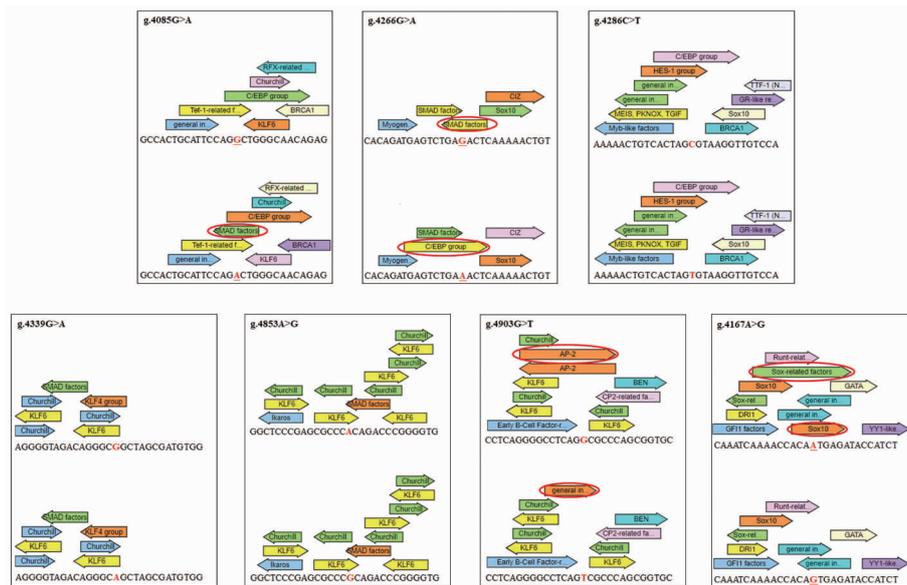


图 2 预测序列变异影响结合的转录因子

### 3 讨论

DHVD 的分子细胞机制本质是瓣膜间质细胞内的动态平衡紊乱, 促使其向成骨样细胞转化<sup>[4]</sup>。自噬是一种高度保守的分解代谢错误折叠蛋白质和受损细胞器的动态循环系统, 以利于细胞的更新和维态<sup>[13]</sup>。LC3 是哺乳动物中酵母细胞 Atg8 的同源物, 是自噬泡形成的标志物, 其含量多少可反映自噬的程度<sup>[14]</sup>。LAMP2 是自噬-溶酶体成熟的关键调节因子, 其基因缺失可引起自噬小体的积聚, 导致细胞自噬功能失调<sup>[15]</sup>。在钙化性瓣膜间质细胞中, LAMP2 基因表达丰富<sup>[16]</sup>。同时也有报道称黏多糖贮积症小鼠模型的心脏瓣膜增厚, LC3 和 LAMP2 的蛋白表达显著升高, 自噬功能失调<sup>[17]</sup>。在人的瓣膜组织中, 检测到 LC3 基因表达上调, 自噬活动增强<sup>[9]</sup>。本文研究了 LC3 和 LAMP2 基因调控序列变异与 DHVD 的关联性, 对阐明 DHVD 发病的分子机制奠定基础。

针对 DHVD 患者和健康对照的调控序列 DNA, 经基因测序分析发现, 共有 29 个序列变异位点, 其中 7 个序列变异位点 (g. 4085G>A, g. 4266G>A, g. 4286C>T, g.4339G>A, g. 4853A>G, g. 4903G>T, g. 4167A>G) 只存在于 DHVD 组。对所获得的 SNP 进行卡方检验分析, 发现 rs42900 在男性患者中有差异 ( $P < 0.05$ ), 而在女性中无影响, 提示 rs42900 与 DHVD 患者性别存在关联。随之进行 logistic 回归分析, 结果显示 rs35227715 的等位基

因 G 与 DHVD 相关联, 是 DHVD 的独立危险因素, 致病风险是 1.36 倍; DHVD 男性患者中 rs42900 基因型 CC 和等位基因 C 与 DHVD 存在关联, 两者的致病风险均为 0.56 倍, 提示其在 DHVD 发病过程中具有保护性作用。在线 TRANSFAC2.0 数据库预测结果显示, 序列变异位点 g. 4085G>A 可创建 SMAD 的结合位点, SMAD 蛋白家族在 TGF- $\beta$  信号转导起着关键的作用, 通过 R-Smad/Co-Smad 形成的异聚体进入细胞核调节靶基因的表达, 其成员 SMAD3 可降低心肌重塑中心肌细胞的凋亡<sup>[18]</sup>, SMAD4 则在心脏中胚层前体细胞的形成中发挥重要作用<sup>[19]</sup>。g. 4266G>A 可创建 C/EBP 的结合位点, C/EBP 是一种含“碱性亮氨酸拉链”结构的转录因子, 其功能是促进和维持细胞的分化状态, 有研究称其在心脏损伤中可调节心外膜的激活, 以改善心脏功能<sup>[20]</sup>。g. 4903G>T 可创建 Inr 结合位点, Inr 作为核心启动子的基本要素之一, 在转录调控过程中有重要的作用<sup>[21]</sup>。g. 4167A>G 仅消除了 SOX10 的结合位点, 而 SOX10 作为一种重要的转录因子, 在脊神经细胞的分化, 早期胚胎发育及心肌再生中发挥重要的作用<sup>[22]</sup>。由此可见, 转录因子结合位点的消除或创建可能会改变启动子的转录活性以致改变其基因表达, 进而影响自噬水平和功能, 从而引起 DHVD 的发病。

综上所述, 调控序列变异的确定能在分子遗传学角度揭示 DHVD 发病机制。本研究基于生物信息学方法预测调控序列变异位点的功能, 下一步我

们将利用序列变异报告基因检测,凝胶电泳迁移实验(EMSA),自噬-溶酶体系统功能改变等多种生物功能学方法,验证预测结果的准确性,进而为DHVD 的发生发展机制提供坚实的遗传学理论。

利益冲突:所有作者均申明不存在利益冲突。

### 参考文献:

- [1] Yang Y, Wang Z, Chen Z, et al. Current status and etiology of valvular heart disease in China: a population-based survey [J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2021, 21(1):339. DOI:10.1186/s12872-021-02154-8.
- [2] 齐喜玲,许海燕,刘庆荣,等. 中国老年退行性心脏瓣膜病住院患者诊疗现状分析[J]. *中国循环杂志*, 2019, 34(8):771-776. DOI:10.3969/j.issn.1000-3614.2019.08.007.
- [3] Baumgartner H, Iung B, Messika-Zeitoun D, et al. The year in cardiovascular medicine 2021: valvular heart disease[J]. *Eur Heart J*, 2022, 3(7):633-640. DOI:10.1093/eurheartj/ehab885.
- [4] Kraler S, Blaser MC, Aikawa E, et al. Calcific aortic valve disease: from molecular and cellular mechanism to medical therapy[J]. *Eur Heart J*, 2022, 43(7):683-697. DOI:10.1093/eurheartj.
- [5] Schiattarella GG, Hill JA. The therapeutic targeting of autophagy in cardiovascular disease[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2016, 95:86-93. DOI:10.1016/j.yjmcc.2015.11.019.
- [6] Abdellatif M, Sedej S, Carmona-Gutierrez D, et al. Autophagy in cardiovascular aging[J]. *Circ Res*, 2018, 123, 803-824. DOI:10.1161/CIRCRESAHA.118.312208.
- [7] Wu G, Wei G, Huang J, et al. Decreased gene expression of LC3 in peripheral leucocytes of patients with coronary artery disease[J]. *Eur J Clin Invest*, 2011, 41(9):958-963. DOI:10.1111/j.1365-2362.2011.02486.x.
- [8] Wu G, Huang J, Wei G, et al. LAMP-2 gene expression in peripheral leukocytes is increased in patients with coronary artery disease[J]. *Clin Cardiol*, 2011, 34(4):239-243. DOI:10.1002/clc.20870.
- [9] Carracedo M, Persson O, Saliba-Gustafsson P, et al. Up-regulated autophagy in calcific aortic valve stenosis confers protection of valvular interstitial cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20:1486. DOI:10.3390/ijms20061486.
- [10] Deng XS, Meng X, Venardos N, et al. Autophagy negatively regulates pro-osteogenic activity in human aortic valve interstitial cells[J]. *J Surg Res*, 2017, 218:285-291. DOI:10.1016/j.jss.2017.05.088.
- [11] Somers P, Knaapen M, Kockx M, et al. Histological evaluation of autophagic cell death in calcified aortic valve stenosis[J]. *J Heart Valve Dis*, 2006, 15, 43-47.
- [12] Bursi F, Osranek M, Seward JB, et al. Mitral and aortic valve thickening associated with galactosialidosis: echocardiographic features of a lysosomal storage disease [J]. *Echocardiography*, 2003, 20:605-606. DOI:10.1046/j.1540-8175.2003.02139.x.
- [13] Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues [J]. *Cell*, 2011, 147(4):728-741. DOI:10.1016/j.cell.2011.10.026.
- [14] Nieto-Torres JL, Leidal AM, Debnath J, et al. Beyond autophagy: The expanding roles of ATG8 proteins [J]. *Trends Biochem Sci*, 2021, 46(8):673-686. DOI:10.1016/j.tibs.2021.01.004.
- [15] Saftig P, Beertsen W, Eskelinen EL. LAMP-2: A control step for phagosome and autophagosome maturation [J]. *Autophagy*, 2008, 4(4):510-512. DOI:10.4161/auto.5724.
- [16] Cui L, Rashdan NA, Zhu D, et al. End stage renal disease-induced hypercalcemia may promote aortic valve calcification via annexin VI enrichment of valve interstitial cell derived-matrix vesicles [J]. *J Cell Physiol*, 2017, 232(11):2985-2995. DOI:10.1002/jcp.25935.
- [17] Schiattarella GG, Cerulo G, De Paquale V, et al. The murine model of mucopolysaccharidosis IIIB develops cardiopathies over time leading to heart failure [J]. *PLoS One*, 2015, 10(7):e0131662. DOI:10.1371/journal.pone.0131662.
- [18] Kong P, Shinde AV, Su Y, et al. Opposing actions of fibroblast and cardiomyocyte smad3 signaling in the infarcted myocardium [J]. *Circulation*, 2018, 137(7):707-724. DOI:10.1161/CIRCULATIONAHA.117.029622.
- [19] Xu J, Gruber PJ, Chien KR. SMAD4 is essential for human cardiac mesodermal precursor cell formation [J]. *Stem Cells*, 2019, 37(2):216-225. DOI:10.1002/stem.2943.
- [20] Huang GN, Thatcher JE, McAnally J, et al. C/EBP transcription factors mediate epicardial activation during heart development and injury [J]. *Science*, 2012, 338(6114):1599-1603. DOI:10.1126/science.1229765.
- [21] Kraus RJ, Murray EE, Wiley SR, et al. Experimentally determined weight matrix definitions of the initiator and TBP binding site elements of promoters [J]. *Nucleic Acids Res*, 1996, 24(8):1531-1539. DOI:10.1093/nar/24.8.1531.
- [22] Sande-Melón M, Marques IJ, Galardi-Castilla M, et al. Adultsox 10+ cardiomyocytes contribute to myocardial regeneration in the zebrafish [J]. *Cell Rep*, 2019, 29(4):1041-1054. e5. DOI:10.1016/j.celrep.2019.09.041.

(收稿日期 2022-09-05)

(本文编辑:石俊强)