

· 基础研究 ·

萆茛明碱抑制 BMP2/pSmad1/5 信号减轻高钙高磷诱导的主动脉瓣膜间质细胞钙化

唐 诗, 孙 伟, 孔祥清, 盛燕辉*

南京医科大学第一附属医院心血管内科, 江苏 南京 210029

[摘要] 目的:探究萆茛明碱对高钙高磷诱导的主动脉瓣膜间质细胞(aortic valve interstitial cell, AVIC)钙化的保护作用及其机制。方法:体外培养原代猪 AVIC,通过高钙高磷诱导钙化并给予不同浓度萆茛明碱处理 16 h后,流式细胞仪分析检测凋亡水平;AVIC在高钙高磷条件下,以 2.5 mmol/L 萆茛明碱或 100 ng/mL 骨形态发生蛋白 2(bone morphogenetic protein 2, BMP2)处理,通过检测钙浓度、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性、茜素红染色反映钙化程度;Western blot、real-time PCR 检测成骨相关蛋白和 mRNA 的表达。结果:①流式细胞分析发现,高钙高磷条件下,萆茛明碱低于 5 mmol/L 无明显促凋亡作用;②钙浓度、ALP 活性、茜素红染色显示,2.5 mmol/L 萆茛明碱显著抑制高钙高磷诱导的 AVIC 钙化;③Western blot、real-time PCR 显示,2.5 mmol/L 萆茛明碱抑制 BMP2、pSmad1/5、RUNX2 蛋白和 mRNA 的表达;④外源性重组 BMP2 可逆转萆茛明碱抗钙化的作用。结论:萆茛明碱通过抑制 BMP2/pSmad1/5/RUNX2 信号,减轻高钙高磷诱导的 AVIC 钙化。

[关键词] 萆茛明碱;瓣膜钙化;瓣膜间质细胞

[中图分类号] R542.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2020)04-509-07

doi:10.7655/NYDXBNS20200409

Piperlongumine attenuates high calcium/phosphate - induced calcification of aortic valve interstitial cells by inhibiting BMP2/pSmad1/5 signaling

TANG Shi, SUN Wei, KONG Xiangqing, SHENG Yanhui*

Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** To explore the role and mechanism of piperlongumine in high calcium/phosphate - induced calcification of aortic valve interstitial cells (AVICs). **Methods:** Porcine AVICs were isolated and cultured *in vitro*. AVICs were treated inductively with high calcium/phosphate medium and piperlongumine of different concentrations for 16 hours. Flow cytometry was then performed to measure cell apoptosis. AVICs were treated with 2.5 mmol/L piperlongumine or 100 ng/mL bone morphogenetic protein 2 (BMP2) under the condition of high calcium/phosphate. The effect of piperlongumine on calcification was measured using calcium quantification, alkaline phosphatase activity and alizarin red staining. The protein and mRNA levels of osteogenic markers were determined by Western blot and real-time PCR. **Results:** ① Flow cytometry showed that piperlongumine under 5 mmol/L had no obvious effect on AVICs apoptosis treated with high calcium/phosphate medium. ② Calcium quantification, alkaline phosphatase activity and alizarin red staining showed that 2.5 mmol/L piperlongumine attenuated the calcification of AVICs induced by high calcium/phosphate medium. ③ Western blot, real-time PCR showed that 2.5 mmol/L piperlongumine inhibited the protein and mRNA expression of osteogenic markers including BMP2, phosphorylated Smad1/5 and RUNX2. ④ Exogenous recombinant BMP2 may reverse the effect of piperlongumine *in vitro*. **Conclusion:** Piperlongumine attenuates high calcium/phosphate - induced AVICs calcification by inhibiting BMP2/pSmad1/5 signaling.

[Key words] piperlongumine; valve calcification; valve interstitial cells

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(04): 509-514, 569]

[基金项目] 国家自然科学基金(81270298, 81570247)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: yhsheng@njmu.edu.cn

主动脉瓣钙化性疾病影响超过2%的中老年人群^[1],老化及各种心血管高危因素参与其中,相互作用,加速瓣膜的组织损伤,进而影响心脏功能^[2]。现阶段,主动脉瓣钙化性疾病主要通过主动脉瓣置换术进行治疗^[3]。但置换瓣膜寿命短,未达70岁的患者面临二次手术风险,而高龄患者二次手术收益甚微。目前尚无有效药物可以延缓瓣膜钙化的进展^[4]。

萘苡明碱是从胡椒科植物萘苡中提取出的天然小分子,已证明其具有抗肿瘤^[5]、抗炎^[6]等作用,其对肿瘤细胞的相对选择性引起了研究者的广泛关注。既往研究认为它主要通过增加活性氧簇的产生^[7],调节凋亡、自噬相关通路,增加BCL2磷酸化^[8]及激活JAK-STAT、NF- κ B和PI3K/AKT/mTOR等信号通路发挥作用^[9]。

瓣膜间质细胞是心脏瓣膜中的主要细胞成分之一。除支撑作用外,在瓣膜的生理及病理发生发展过程中也发挥着重要作用^[10]。主动脉瓣钙化是多种因素参与的主动性过程,其中主动脉瓣膜间质细胞(aortic valve interstitial cell, AVIC)发生骨分化发挥重要作用。利用天然分子化合物干预AVIC钙化可能为临床治疗瓣膜钙化提供新的思路和方法。本研究采用高钙高磷诱导AVIC钙化,观察萘苡明碱对AVIC钙化的影响及其主要作用机制^[11]。

1 材料和方法

1.1 材料

雄性家猪5头,体重20 kg,来自句容市杨海生猪养殖专业合作社,动物处理符合3R原则,并经实验动物伦理委员会批准。高钙高磷钙化培养基、DMEM高糖培养基(含HEPES)、胎牛血清、青/链霉素/两性霉素、磷酸盐(Pi)、氯化钙、萘苡明碱(Sigma-Aldrich公司,美国);BCA蛋白定量试剂盒(Thermo Scientific Pierce公司,美国);钙分析试剂盒(DICA-500, QuantiChrom公司,美国);碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)检测试剂盒(WAKO公司,日本);重组人骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein 2, BMP2)(R&D SYSTEM,美国);GAPDH抗体(#5174)、Smad1/5抗体(#6944)、RUNX2抗体(#12556)、OPN抗体(#1264)、BMP2抗体(#14933)、BMPR-II抗体(#393304)、pSmad1/5抗体(#9516)、HRP标记的羊抗兔二抗(Cell Signaling Technology公司,美国);显影液(SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate, Thermo公司,美国);ChemiDocXRS成像系统(Bio-Rad公司,美国);流式

细胞仪(BD Biosciences公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 猪AVIC的获取和培养

雄性家猪麻醉后,将部分主动脉与心脏一起取出。沿主动脉前室间沟剪开左心室,在主动脉根部将主动脉三叶瓣膜剪下,放入预冷无菌PBS中,经14.0%、7.0%、3.5%、1.4%青/链霉素/两性霉素梯度清洗后1 200 U/mL胶原酶消化液37℃消化15 min。用细胞刮刮去瓣膜上皮细胞,将瓣膜充分剪碎后转入加了胶原酶的消化液中,放入摇床(37℃,转速200 r/min)消化3 h。离心弃上清,加新鲜完全培养基(DMEM高糖培养基,含20%胎牛血清、1.4%青/链霉素/两性霉素、2 mmol/L L型谷氨酰胺),用100 μ m滤网过滤后转入25 cm²培养瓶中37℃,5% CO₂培养箱中培养。48 h观察贴壁情况,换培养基。细胞进行传代培养,后续实验将选取第3~5代的细胞进行。实验室前期研究通过免疫荧光方法标记AVIC特异表达的波形蛋白进行鉴定,结果表明我们提取的猪AVIC纯度超过90%^[12]。

1.2.2 流式细胞仪检测细胞凋亡

AVIC以 1×10^5 个/孔的密度接种于12孔板中,分为空白对照组(Ctrl组,DMEM培养)、高磷高钙组(Hca组,高磷高钙培养)、不同浓度萘苡明碱处理组(PLG+Hca组,PLG+高磷高钙培养),每组3个复孔,培养16 h后,胰酶消化收集细胞。4℃450 g离心5 min后PBS清洗2遍。重悬于100 μ L Annexin V binding buffer中,细胞在5 μ L Annexin V-FITC和5 μ L PI室温避光孵育15 min,加入400 μ L Annexin V binding buffer,立即用流式细胞仪检测细胞凋亡。早期凋亡细胞(Annexin V-FITC阳性,PI阴性)位于右下象限;晚期凋亡细胞(Annexin V-FITC阳性,PI阳性)位于右上象限;正常细胞(Annexin V-FITC阴性,PI阴性)位于左下象限。结果以Annexin V-FITC阳性染色细胞即早期凋亡和晚期凋亡数总和占所有细胞的百分比形式呈现。

1.2.3 细胞钙浓度测定

AVIC以 1×10^5 个/孔的密度接种于12孔板中,分别以高磷高钙和/或2.5 mmol/L萘苡明碱、100 ng/mL BMP2处理16 h后,用PBS清洗3次,每孔加入500 μ L 0.6 mol/L HCl,4℃摇床24 h。使用钙分析试剂盒,每个样品取5 μ L加入96孔板,加入200 μ L工作液,室温振荡3 min。使用Synergy™ 2 microplate reader (BioTek公司,美国)读取612 nm处吸光度。将12孔板中液体吸净,预冷PBS冲洗3次后加入0.1 mol/L

NaOH/0.1% SDS。将每孔细胞刮下,4 ℃ 13 000 *g* 离心 20 min,取上清使用 BCA 法测蛋白浓度。钙浓度值计算:标准化钙浓度($\mu\text{g}/\text{mg protein}$)=绝对钙浓度/蛋白浓度。

1.2.4 ALP 活性测定

将 12 孔板中培养的 AVIC 同 1.2.3 处理后,用 PBS 清洗 3 次,各孔添加 250 μL 0.05% 的曲拉通 X-100,进行反复 3 次冻融操作。收集每孔中液体,4 ℃ 15 000 *g* 离心 15 min 处理,将上清液移到新的 EP 管中,并以此作为样品,使用 ALP 检测试剂盒进行检测:在 96 孔板内添加 100 μL 底物缓冲液和 20 μL 样品,在微孔板震荡器上充分振荡 1 min,37 ℃ 孵育 15 min 后添加 80 μL 反应终止液。在微孔板震荡器上充分振荡 1 min,用 Synergy™ 2 microplate reader 测量 405 nm 处的吸光值。同样方法进行空白(蒸馏水)对照和标准品的检测,做标准曲线。BCA 法检测样品的总蛋白浓度,计算 ALP 活性。ALP 活性($\text{U}/\mu\text{g}$)=(实验组吸光值-空白组吸光值) \times 稀释倍数/反应时间。

1.2.5 茜素红染色

将 12 孔板中 AVIC 同 1.2.3 处理后,吸净培养基,PBS 漂洗 3 次。用 4% 甲醛溶液室温固定 10 min 后 PBS 漂洗 3 次,95% 乙醇室温固定细胞 20~30 min。去离子水漂洗 3 遍。2% 茜素红 S 染色 1~5 min,镜下观察有橘红色结节出现时终止染色。用去离子水漂洗数次,以洗净非特异性染色,使用扫描仪扫描图像。

1.2.6 Western blot 检测蛋白表达

AVIC 细胞同 1.2.3 处理后使用 Cytoplasmic Extraction Reagents(Thermo 公司,美国)按试剂盒说明提取蛋白,10%~15%的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳后转移到 PVDF 膜(Roche 公司,瑞士)上,用 5% BSA 溶液封闭,目标蛋白孵育一抗过夜,使用的一抗如下: GAPDH 抗体(1:1 000)、Smad1/5 抗体(1:1 000)、RUNX2 抗体(1:1 000)、OPN 抗体(1:1 000)、BMP2 抗体(1:1 000)、pSmad1/5 抗体(1:1 000)、BMPR- II 抗体(1:200),后孵育相对应 HRP 标记的羊抗鼠二抗、羊抗兔二抗(1:5 000 稀释)。使用显影液反应 1 min 后,在 ChemiDoc XRS 成像系统下曝光。Image Lab™ 软件用于条带灰度分析。

1.2.7 实时荧光定量 PCR

AVIC 细胞同 1.2.3 处理后使用 RNeasy RNA isolation kit(Qiagen 公司,美国)提取总 RNA,使用 PrimeScript RT™ reagent Kit(TaKaRa 公司,日本)进行逆转录。实时荧光定量 PCR 使用 Prism 7900(ABI 公

司,美国)系统,实时反应检测。引物序列详见表 1。所有荧光定量 PCR 反应均重复 3 次,以 GAPDH 为内参照,按照 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算各处理组基因的相对表达量。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 The primer sequences for PCR

基因名	引物序列(5'→3')
RUNX2	F:CCTCCTCTTAGTCTGGCTCG
	R:ATCTGAGTTCCAGCGTCGAT
OPN	F:GCCACAGAGGAAGACCTCAC
	R:ATGCTCATTGCTCCCATCAT
BMP2	F:AAACCTGCAACAGCCAACTC
	R:AGACCTGCTAATCCGCACAT
GAPDH	F:CGTCAAGCTCATTTCTGGT
	R:TGGGATGGAACTGGAAGTC

1.3 统计学方法

所有测量数据都表示为均数 \pm 标准误($\bar{x} \pm s_x$)。使用 GraphPad Prism 7.0 软件比较处理组与对照组数值。多组数据比较采用单因素方差分析, Bonferroni 法进行多重比较; $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 萘苡明碱对高钙高磷诱导 AVIC 凋亡的影响

流式细胞结果显示,高钙高磷处理组与对照组相比,显著诱导了 AVIC 的凋亡。萘苡明碱浓度低于 5 mmol/L 时对高钙高磷处理所诱导的 AVIC 凋亡无明显作用,高于 5 mmol/L 时,其促凋亡作用明显(图 1)。参考有关萘苡明碱研究的相关文章^[8,13],结合本实验结果,最终选取 2.5 mmol/L 萘苡明碱用于后续的抗钙化作用研究。

2.2 萘苡明碱抑制高钙高磷诱导的 AVIC 钙化

细胞内钙含量测定、ALP 活性检测及茜素红染色结果显示,高钙高磷处理组与对照组相比显著诱导了 AVIC 钙化。2.5 mmol/L 萘苡明碱处理后,AVIC 钙化得到明显抑制。以上结果说明 2.5 mmol/L 萘苡明碱对高钙高磷诱导的 AVIC 钙化具有保护作用(图 2)。

2.3 萘苡明碱抑制高钙高磷诱导的 AVIC 成骨分化

Western blot 结果显示,在高钙高磷培养基中加入 2.5 mmol/L 萘苡明碱处理抑制了成骨分化标志蛋白 RUNX2、OPN、BMP2 和 BMPR 的表达,以及成骨分化通路关键蛋白 Smad1/5 的磷酸化,抑制了 AVIC 的成骨分化(图 3A、B)。Real-time PCR 检测 RUNX2、OPN 及 BMP2 等成骨分化指标的 mRNA 水平,结果显示 2.5 mmol/L 萘苡明碱抑制高钙高磷诱

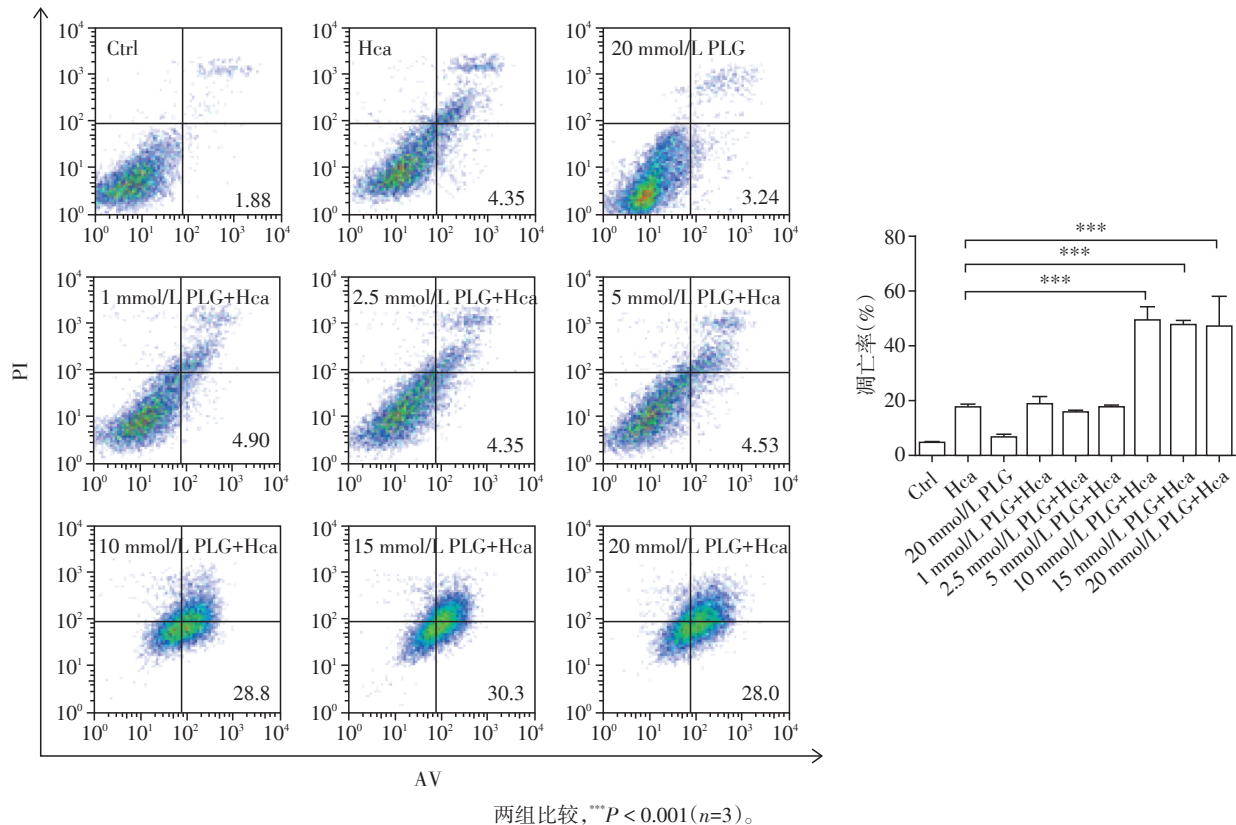
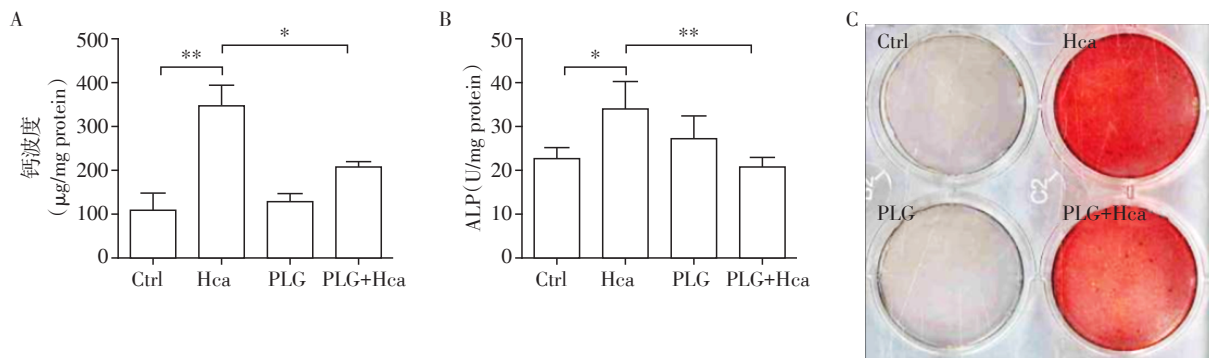


图1 不同浓度茛菪明碱对高钙高磷诱导的AVIC凋亡的影响

Figure 1 The effect of piperlongumine on AVICs apoptosis treated with high calcium/phosphate medium



A:细胞内钙含量测定;B:细胞内ALP活性测定;两组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ ($n=6$);C:茜素红染色结果。

图2 茛菪明碱抑制高钙高磷诱导的AVIC钙化

Figure 2 Piperlongumine attenuates high calcium/phosphate induced AVICs calcification

导的AVIC成骨分化指标mRNA的表达水平(图3C~E)。

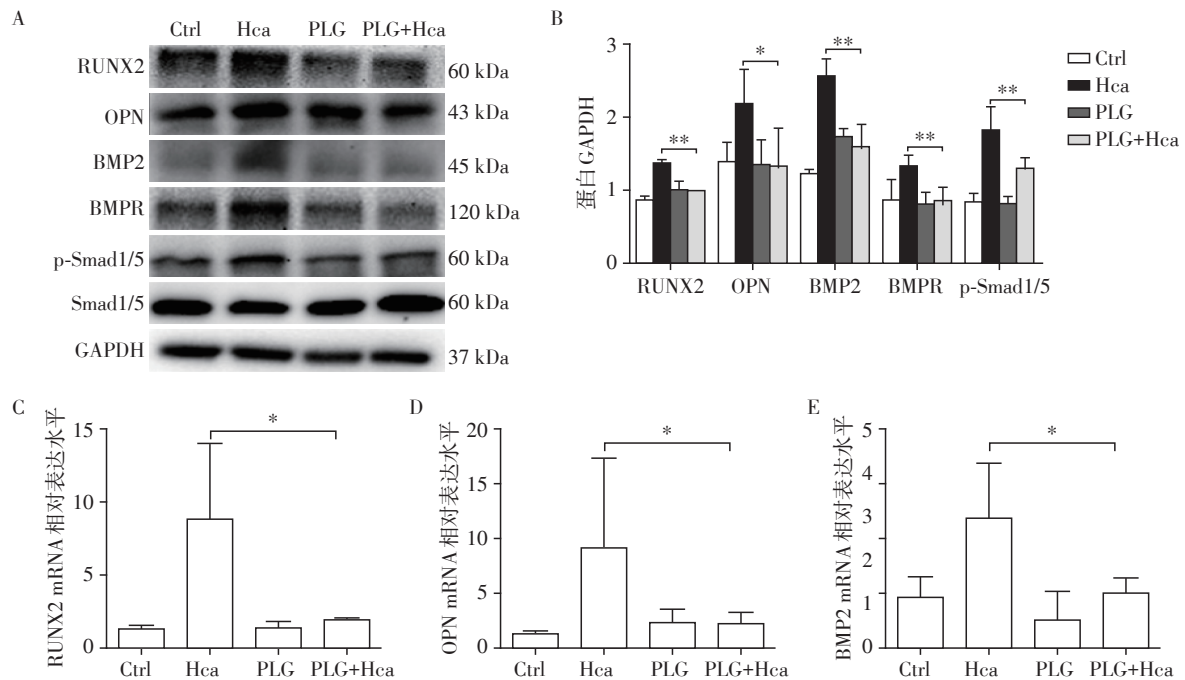
2.4 茛菪明碱通过抑制BMP2/pSmad1/5通路发挥抗钙化作用

为了进一步证明茛菪明碱的作用是否依赖BMP2信号通路,我们在高钙高磷培养基中加入重组BMP2处理AVIC,与在高钙高磷培养基中同时加入重组BMP2、2.5 mmol/L茛菪明碱组相比,外源给予重组BMP2组升高钙含量、ALP活性、茜素红水平

(图4A~C),诱导成骨分化相关蛋白RUNX2、OPN、BMP2和BMPR表达(图4D、E),增加成骨相关指标mRNA的表达(图4F~H)。提示外源性重组BMP2阻断茛菪明碱的抗钙化作用。

3 讨论

主动脉瓣疾病是由多种病因导致瓣膜结缔组织发生变性和重塑,主要表现为瓣叶增厚、基质重塑及钙盐沉积,最终导致瓣膜狭窄和/或关闭不全,



A: Western blot 检测成骨分化蛋白; B: Western blot 统计分析结果 ($n=6$); C: RUNX2 mRNA 表达水平; D: OPN mRNA 表达水平; E: BMP2 mRNA 表达水平 ($n=12$); 两组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图3 萆苈明碱对 AVIC 成骨分化的抑制作用

Figure 3 The inhibition of piperlongumine on osteogenic differentiation of AVICs

严重损害心功能;瓣膜钙化对血管钙化有一定的提示作用^[14]。瓣膜钙化多见于老年患者,个体差异大,同时缺乏有效的抗钙化治疗药物^[15]。既往研究表明,瓣膜间质细胞在瓣膜钙化发生发展中起核心作用,心脏瓣膜钙化与血管平滑肌钙化的过程类似,都是异位骨形成和羟基磷灰石沉积的过程^[16]。细胞凋亡、基质小泡形成、ALP活性增加以及炎症等多机制共同参与该过程^[17]。有研究显示在血管平滑肌钙化早期即可观测到细胞发生凋亡。钙化结晶的形成则显著迟于细胞凋亡的发生,证明细胞凋亡可能是异位骨形成的诱因之一^[18]。

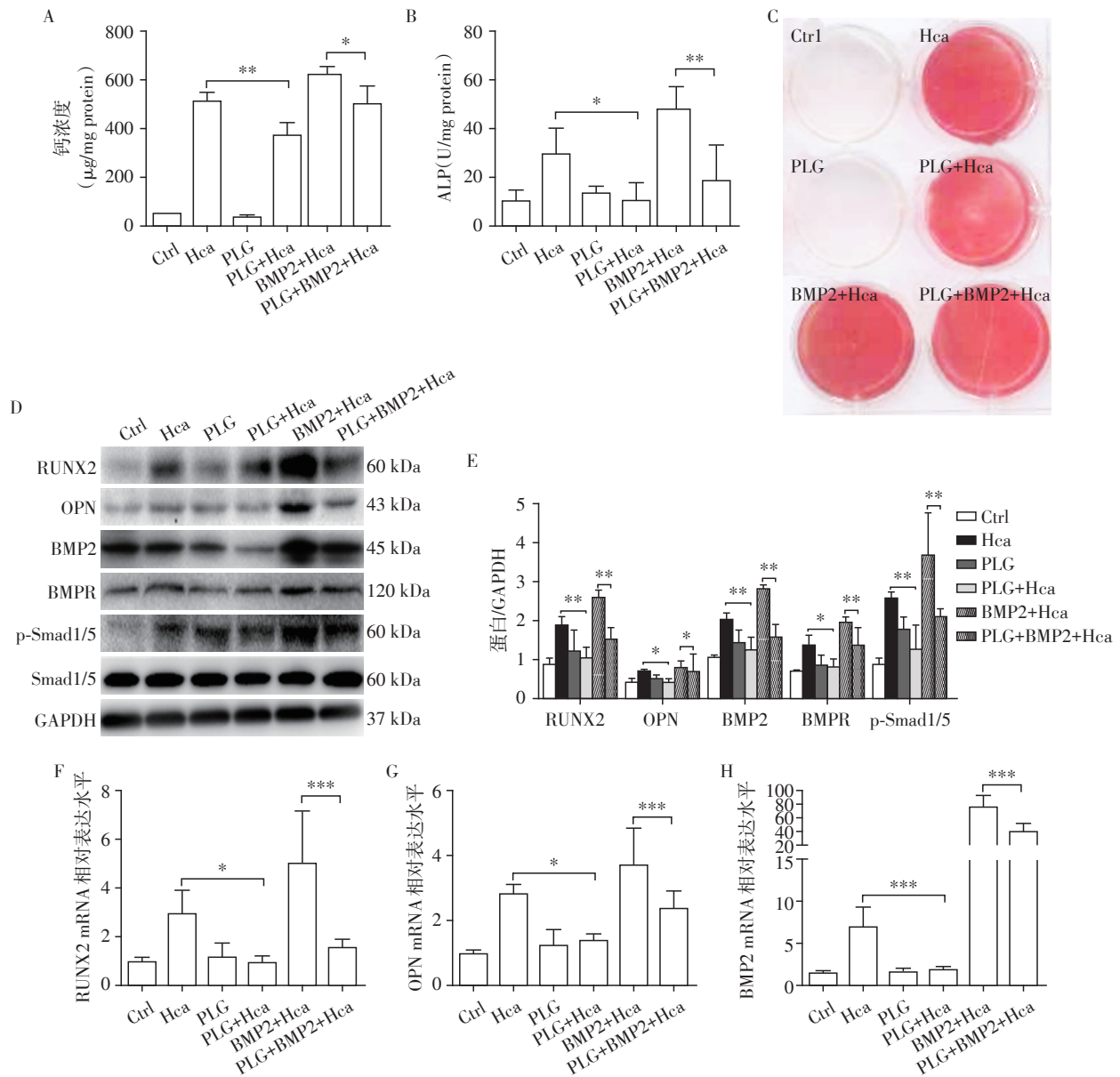
萆苈明碱是从胡椒科植物萆苈中提取出的天然小分子,被证明具有显著的抗肿瘤和抗炎作用^[19]。肿瘤也是老年人中最常见的疾病之一,由于抗钙化治疗可能是一个较为长期的过程,因此理想的抗钙化药物不能存在潜在的致肿瘤作用,从具有抗癌作用的中药单体中寻找可能的抗钙化药物是一种可行的选择。本文研究了萆苈明碱的抗瓣膜钙化作用,结果表明:在接受高钙高磷处理后的猪 AVIC 中,萆苈明碱仅在大于 5 mmol/L 剂量才促进猪凋亡,而低于 5 mmol/L 时对细胞凋亡无促进作用,提示萆苈明碱可以用于抗 AVIC 钙化的研究。

在高钙高磷培养基中加入 2.5 mmol/L 萆苈明碱

处理 AVIC,我们发现萆苈明碱能够显著抑制高钙高磷诱导的 AVIC 钙化,抑制成骨标志物 ALP 的活性和减少了钙盐的沉积。对成骨分化标志基因的 real-time PCR 分析显示:萆苈明碱显著抑制了 RUNX2、OPN、BMP2 等基因的表达。

既往研究表明,BMP2/pSmad1/5 信号通路是促进机体成骨分化和正常骨形成的关键通路,该通路的激活也是主动脉瓣膜钙化发生发展的主要机制之一^[20]。在本研究中,我们着重分析了萆苈明碱对该信号通路的作用,结果提示萆苈明碱可以显著下调 BMP2 的表达水平,并抑制 Smad1/5 的磷酸化。进一步在高钙高磷处理的同时加入重组 BMP2 与萆苈明碱,结果表明重组 BMP2 能够显著阻断萆苈明碱的抗钙化作用。综上所述,萆苈明碱显著减少了高钙高磷诱导的 BMP2 表达。同时 BMP II 型受体 (BMPR- II) 的表达减少,最终减少了 Smad1/5 的磷酸化,抑制了成骨分化信号通路的激活。萆苈明碱抑制高钙高磷诱导的 BMP2 表达的具体机制还需要进一步深入研究。

综上所述,本研究首次证明萆苈明碱可以显著抑制高钙高磷诱导的 AVIC 钙化。其抗钙化作用主要是通过抑制 BMP2 通路激活,从而抑制了瓣膜间质细胞的成骨分化。本研究将为临床开发新的抗



A: 细胞内钙含量的测定; B: 细胞内 ALP 活性的测定; C: 茜素红染色结果; D: Western blot 检测成骨分化水平; E: Western blot 统计结果 (n=6); F: RUNX2 的 mRNA 表达水平; G: OPN 的 mRNA 表达水平; H: BMP2 的 mRNA 表达水平 (n=12); 两组比较, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001。

图4 BMP2 阻断萜荜明碱的抗钙化作用

Figure 4 BMP2 reverses the anti-calcification effect of piperlongumine

瓣膜钙化治疗提供理论依据。

[参考文献]

[1] HUK D J, AUSTIN B F, HORNE T E, et al. Valve endothelial cell-derived TGFβ1 signaling promotes nuclear localization of Sox9 in interstitial cells associated with attenuated calcification [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2016, 36(2): 328-338

[2] CHO K I, SAKUMA I, SOHN I S, et al. Inflammatory and metabolic mechanisms underlying the calcific aortic valve disease [J]. *Atherosclerosis*, 2018, 277(8): 60-65

[3] BONOW R O, LEON M B, DOSHI D, et al. Management

strategies and future challenges for aortic valve disease [J]. *Lancet*, 2016, 387(125): 1312-1323

[4] PEETERS F E, MEEX S J, 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

[5] ALCÂNTARA - CONTESSOTO A N, CARUSO Í P, BEZERRA D P, et al. An investigation into the interaction between piplartine (piperlongumine) and human serum albumin [J]. *Spectrochim Acta A*, 2019, 220(4): 117084

[6] KIM N, DO J, BAE J S, et al. Piperlongumine inhibits neu-

(下转第 569 页)

- system by functional electrical stimulation [C]. 2015 International Seminar on Intelligent Technology and Its Applications (ISITIA), IEEE, 2015: 131-136
- [5] GARRAGHTY P E, LACHICA E A, KAAS J H. Injury-induced reorganization of somatosensory cortex is accompanied by reductions in GABA staining[J]. *Somatosens Mot Res*, 1991, 8(4): 347-354
- [6] 高 润, 葛剑青, 管青山. 急性脑梗死患者踝关节功能康复的fMRI研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2011, 31(12): 1797-1801
- [7] STRAUSS E, KOSAKA B, WADA J. The neurobiological basis of lateralized cerebral function. A review [J]. *Hum Neurobiol*, 1983, 2(3): 115-127
- [8] 龙建军, 陈文生, 刘铨权, 等. 卒中中偏瘫患者膝关节运动控制训练对步态的影响[J]. *深圳中西医结合杂志*, 2018, 28(5): 1-3
- [9] 伦亿禧, 王 强, 张永祥. 功能性电刺激与踝足矫形器改善卒中中偏瘫患者步行功能的疗效对比[J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2014, 36(5): 357-360
- [10] 卢 战, 唐 艳, 胡凤丹. 触发式功能性电刺激训练结合肌内效贴对卒中中偏瘫足下垂患者步行能力的影响[J]. *中国康复医学杂志*, 2018, 33(9): 1102-1104
- [11] CRAMER S C, NELLES G, BENSON R R, et al. A functional MRI study of subjects recovered from hemiparetic stroke[J]. *Stroke*, 1997, 28(12): 2518-2527
- [12] 陈自谦, 倪 萍, 肖 慧, 等. 脑缺血性卒中患者运动功能康复的功能性磁共振成像研究[J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2006(12): 838-843
- [13] ADCOCK J E, WISE R G, OXBURY J M, et al. Quantitative fMRI assessment of the differences in lateralization of language-related brain activation in patients with temporal lobe epilepsy [J]. *Neuroimage*, 2003, 18(2): 423-438
- [收稿日期] 2019-05-14

(上接第514页)

- roinflammation via regulating NF- κ B signaling pathways in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia cells[J]. *J Pharmacol Sci*, 2018, 137(2): 195-201
- [7] ADAMS D J, DAI M J, PELLEGRINO G, et al. Synthesis, cellular evaluation, and mechanism of action of piperlongumine analogs[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(38): 15115-15120
- [8] LIU J, LIU W, LU Y, et al. Piperlongumine restores the balance of autophagy and apoptosis by increasing BCL2 phosphorylation in rotenone-induced Parkinson disease models[J]. *Autophagy*, 2018, 14(5): 845-861
- [9] FAROOQI A A, ATTAR R, YAYLIM I, et al. Piperlongumine as anticancer agent: The story so far about killing many birds with one stone [J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2018, 64(11): 102-107
- [10] 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
- [11] TOITA R, OTANI K, KAWANO T, et al. Protein kinase A (PKA) inhibition reduces human aortic smooth muscle cell calcification stimulated by inflammatory response and inorganic phosphate[J]. *Life Sci*, 2018, 209: 466-471
- [12] GAO L, JI Y, LU Y, et al. Low-level overexpression of p53 promotes warfarin-induced calcification of porcine aortic valve interstitial cells by activating Slug gene transcription [J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(10): 3780-3792
- [13] PISKA K, GUNIA-KRZYŻAK A, KOCZURKIEWICZ P, et al. Piperlongumine (piplartine) as a lead compound for anticancer agents - synthesis and properties of analogues: A mini-review[J]. *Eur J Med Chem*, 2018, 156: 13-20
- [14] 罗 明, 郑 蕤, 孙浩亮, 等. 左室后壁厚度用于评估主动脉瓣狭窄患者瓣膜钙化情况的研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2019, 39(6): 894-898
- [15] BRE L P, MCCARTHY R, WANG W. Prevention of bioprosthetic heart valve calcification: strategies and outcomes[J]. *Curr Med Chem*, 2014, 21(22): 2553-2564
- [16] YIP C Y, CHEN J H, ZHAO R, et al. Calcification by valve interstitial cells is regulated by the stiffness of the extracellular matrix [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29(6): 936-942
- [17] PAWADE T A, NEWBY D E, DWECK M R. Calcification in aortic stenosis: the skeleton key [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2015, 66(5): 561-577
- [18] PROUDFOOT D, SKEPPER J N, 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): 1055-1062
- [19] PRASAD S, TYAGI A K. Historical spice as a future drug: therapeutic potential of piperlongumine [J]. *Curr Pharm Des*, 2016, 22(27): 4151-4159
- [20] WANG S S, HU S W, WANG J, et al. Conditioned medium from bone marrow-derived mesenchymal stem cells inhibits vascular calcification through blockade of the BMP2-Smad1/5/8 signaling pathway [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(38): 160
- [收稿日期] 2019-05-21