

网络出版时间: 2021-7-28 11:39 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210728.1014.014.html>

## 抑制 PCSK9 对人主动脉内皮细胞钙化的保护作用

靳天慧<sup>1</sup> 陈亮<sup>1,2</sup> 刘叶红<sup>1</sup> 盛瑛<sup>1,2</sup> 宗刚军<sup>1,2</sup>

**摘要** 目的 探讨抑制前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 (PCSK9) 对地塞米松联合 L-抗坏血酸和  $\beta$  甘油磷酸诱导的人主动脉内皮细胞 (HAEC) 钙化的影响。方法 使用不同浓度 (0、10、30、50 mmol/L)  $\beta$  甘油磷酸 + 50  $\mu$ g/ml L-抗坏血酸 + 100 nmol/L 地塞米松刺激 HAEC, 筛选出诱导细胞钙化的最佳浓度, 并验证 HAEC 钙化时, PCSK9 的 mRNA 和蛋白表达。采用小干扰 RNA (siRNA) 敲低 HAEC 中 PCSK9 的表达, 采用相同条件诱导细胞钙化, 检测敲低 PCSK9 后 HAEC 中 PCSK9 及主要钙化指标的表达变化。茜素红 S 染色观察细胞内的钙化沉积。结果 ① 当  $\beta$  甘油磷酸浓度为

30 mmol/L 时, HAEC 中主要钙化指标骨形态发生蛋白 (BMP) 2、BMP4 和 Runt 相关转录因子 2 (RUNX2) 的 mRNA 和蛋白表达水平达到峰值, 诱导钙化效果最佳; ② 诱导 HAEC 钙化后细胞内 PCSK9 的 mRNA 和蛋白表达水平明显升高; ③ 敲低细胞内 PCSK9 的表达能够抑制体外诱导的 HAEC 钙化, 钙化相关基因和蛋白的表达降低, 细胞内钙盐沉积明显减少。结论 PCSK9 的表达与 HAEC 钙化水平相关, 敲低 PCSK9 可抑制地塞米松联合抗坏血酸和  $\beta$  甘油磷酸诱导的 HAEC 钙化。

**关键词** 前蛋白转化酶枯草溶菌素 9; 血管钙化; 血管内皮细胞

中图分类号 R 543

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)08-1246-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.08.015

2020-09-09 接收

基金项目: 江苏省青年医学重点人才基金项目 (编号: QNRC2016883); 无锡市医疗与公众健康技术创新应用项目 (编号: N20192007)

作者单位: <sup>1</sup> 安徽医科大学无锡临床学院心血管内科, 无锡 214044  
<sup>2</sup> 中国人民解放军联勤保障部队第 904 医院心血管内科, 无锡 214044

作者简介: 靳天慧, 女, 硕士研究生;

宗刚军, 男, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: zonggj@163.com

血管钙化在动脉粥样硬化性心脑血管疾病以及肾功能衰竭的患者中非常普遍。内皮细胞和血管平滑肌细胞的衰老, 细胞外基质沉积以及血管周围脂肪组织的炎症反应等机制都参与了血管钙化的发生和发展<sup>[1]</sup>。前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 (proprotein

via the downregulation of Yes-related proteins in patient-derived gastric cancer cells. **Methods** Patient-derived gastric cancer cells were obtained via the trypsin digestion of clinical gastric cancer tissues and incubation. The cells were divided into normal group, low glucose control group and WZB117 treatment group. Afterwards, qRT-PCR was used to detect the expression levels of stemness-related genes (Nanog, oct-4 and sox-2), invasion-related genes matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), and apoptosis-related genes (Bcl-2, bax and Cyt-C). Western blot was applied to determine the expression levels of YAP, metabolism-related proteins hexokinase 2 (HK2) and pyruvate kinase M2 subtype (PKM2) and activated cysteine-containing aspartate proteolytic enzyme 3 (Cleaved Caspase-3). Thiazolyl blue (MTT), plate clone, scratch test, Transwell and kit were performed to measure the cell proliferation, clone formation, migration, invasion, and content of adenosine triphosphate (ATP) and lactic acid, respectively. **Results** After WZB117 cultured cells, the YAP expression level was significantly lower than that of the normal group and the low glucose control group ( $P < 0.05$ ), and that of stemness-related genes (Nanog, oct-4 and sox-2) and cell proliferation, clone formation, invasion, and migration were also lower ( $P < 0.05$ ). The levels of Cleaved Caspase-3 and apoptosis in group treated by WZB117 were higher than those in control groups ( $P < 0.05$ ), and the expression level of Bcl-2 decreased with the increase of WZB117 concentration ( $P < 0.05$ ), and the expression levels of Bax and CYT-C increased with the increase of WZB117 concentration ( $P < 0.05$ ). The content of ATP and lactic acid in supernatant and the protein expression levels of HK2 and PKM2 were lower than those in control groups. **Conclusion** WZB117 can down regulate the expression of Yap, HK2 and PKM2 in gastric cancer cells, inhibit glycolysis and reduce ATP level.

**Key words** WZB117; gastric cancer; Yes-related protein; cancer cell stemness; glycolysis

convertase subtilisin kexin type 9 (PCSK9) 由参与动脉粥样硬化的多种细胞(如内皮细胞、平滑肌细胞和巨噬细胞)表达,并在人的动脉粥样硬化斑块内被检测到<sup>[2]</sup>。PCSK9 通过激活巨噬细胞,释放促炎细胞因子,来调节炎症,这是钙化的关键因素<sup>[3]</sup>。单次注射获得功能突变的 PCSK9 腺相关病毒载体,可在没有基因修饰的小鼠中诱发心血管钙化<sup>[4]</sup>。因此,PCSK9 有可能成为新的预防和治疗血管钙化性疾病方法的潜在分子靶点。该研究旨在探讨抑制 PCSK9 对人主动脉内皮细胞(human aortic endothelial cells, HAEC)钙化的保护作用。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** HAEC 购于美国 ATCC 细胞库。DMEM 高糖培养基、胎牛血清购于美国 Gibco 公司;胰酶细胞消化液、Western 及 IP 细胞裂解液购于上海碧云天生物技术有限公司;RNA 快速提取试剂盒购于上海奕彬生物科技有限公司。一抗骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP) 2、BMP4 购于美国 Abcam 公司;一抗 PCSK9 购于美国 Abways 公司;LipofectamineTM 3000 购于美国 ThermoFisher 公司;引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;小干扰 RNA si-PCSK9 购于北京擎科生物科技有限公司;HiScript Reverse Transcriptase、ChamQ SYBR qPCR Master Mix 购于南京诺唯赞生物科技有限公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养与分组** HAEC 在含有 10% 胎牛血清 + 1% 双抗(青霉素和链霉素)的 DMEM 高糖培养基中培养,置于 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 培养箱中。① 磷酸盐在血管钙化中起着核心作用<sup>[5]</sup>,分别使用(0、10、30、50 mmol/L)  $\beta$  甘油磷酸 + 50  $\mu$ g/ml L-抗坏血酸 + 100 nmol/L 地塞米松刺激 HAEC 10 d,筛选出诱导细胞钙化的最佳浓度并检测 PCSK9 的表达。② 将生长状态良好的 HAEC 接种至 12 孔板,随机分为阴性对照组(siNC)及 PCSK9 抑制组(siPCSK9-1、siPCSK9-2、siPCSK9-3),待细胞密度达到 90%,用 LipofectamineTM 3000 进行 siRNA 转染 48 h 后验证转染效率。③ 将对数生长期 HAEC 接种于 12 孔板,随机分为对照、钙化、钙化 + siNC、钙化 + siPCSK9 组。待细胞汇合度大于 70%,钙化 + siNC 组、钙化 + siPCSK9 组用 LipofectamineTM 3000 进行 siRNA 转染 48 h 后钙化、钙化 + siNC、钙化 + siPCSK9 组用 30 mmol/L  $\beta$  甘油磷酸 + 50  $\mu$ g/ml L-抗坏血酸 +

100 nmol/L 地塞米松诱导 HAEC 钙化。

**1.2.2 qRT-PCR 检测 BMP2、BMP4、RUNX2、PCSK9 的 mRNA 表达情况** 采用 RNA 快速提取试剂盒提取总 RNA,用分光光度计检测 RNA 纯度和浓度。使用诺唯赞逆转录试剂将总 RNA 反转录为 cDNA。按照 SYBR 说明进行引物扩增。引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 目的基因的引物及 siRNA 的序列

基因名称	引物序列(5'-3')	
GAPDH	F: CAGGAGGCATTGCTGATGAT	R: GAAGGCTGGGGCTCATTT
BMP2	F: GACGTGGTCAACTCTGTTAAC	R: GTCAAGGTACAGCATCGAGATA
BMP4	F: GGTGGGAAACTTTTGATGTGAG	R: TTGAGGTAACGATCGGCTAATC
RUNX2	F: ACCACAGAACCACAAGTGGC	R: CTGCTAGTGACCTGCGGAGA
PCSK9	F: CACGGAACCACAGCCACCTTC	R: TCTCTCTTCAGCACCACCAC
siPCSK9-1	F: CCAAGAUCUGCAUGUCUUTT	R: AAGACAUGCAGGAUCUUGGTT
siPCSK9-2	F: GGUCACCGACUUCGAGAAUTT	R: AUUCUCGAGUCCGUGACCTT
siPCSK9-3	F: CCUCAUAGGCCUGGAGUUUTT	R: AAACUCCAGGCCUUAUGAGGTT

**1.2.3 Western blot 法检测 BMP2、BMP4、PCSK9 的蛋白表达情况** 用细胞裂解液提取总蛋白。通过 12% 的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离等量的蛋白质,并将其转移到 PVDF 膜上。用 5% BSA 在摇床上封闭 1h,一抗在 4 °C 下孵育过夜。用 TBST 洗涤 3 次后,将 PVDF 膜与相应的二抗室温孵育 1h。再次用 TBST 洗涤 3 次,使用发光液分析条带强度。

**1.2.4 茜素红 S 染色观察细胞内的钙化沉积** 去除培养液后,用 PBS 溶液洗细胞。将细胞在 4% 多聚甲醛中室温固定 30 min。随后,用 PBS 洗涤细胞 3 次,每次 5 min。加入茜素红 S 染液(1% pH 4.2)浸染 8 min,用 PBS 快速冲洗,显微镜下观察钙化沉积。

**1.3 统计学处理** 每项实验重复至少 3 次,用 SPSS16.0 软件进行统计分析。数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,  $t$  检验比较两组间的差异,采用单因素方差分析评估多组数据。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 筛选诱导 HAEC 钙化的最佳浓度** 使用地塞米松联合 L-抗坏血酸和  $\beta$  甘油磷酸的方法诱导 HAEC 钙化,保持地塞米松(100 nmol/L)和 L-抗坏血酸(50  $\mu$ g/ml)浓度不变,分别加入 0、10、30、50 mmol/L 的  $\beta$  甘油磷酸处理细胞。qRT-PCR 结果显示,诱导 HAEC 钙化 10 d 后,  $\beta$  甘油磷酸浓度为 30 mmol/L 时,主要钙化指标 BMP2( $t = -12.83$ ,  $P <$

0.001)、BMP4( $t = -4.54, P < 0.05$ )、RUNX2( $t = -5.60, P < 0.05$ )的基因表达水平明显高于0 mmol/L,见图1。Western blot结果显示,当 $\beta$ 甘油磷酸浓度为30 mmol/L时,BMP2、BMP4的蛋白水平升高最明显,见图2。因此选取浓度为30 mmol/L的 $\beta$ 甘油磷酸进行后续实验。

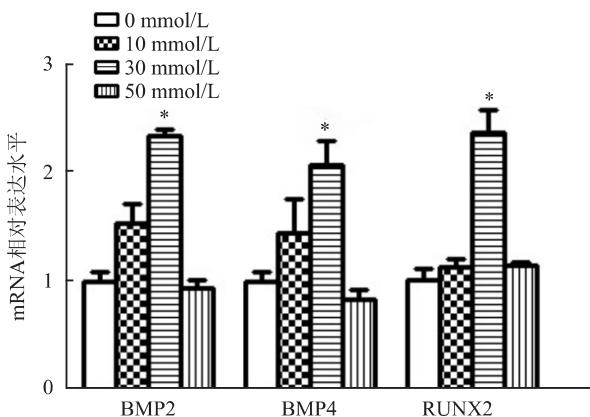


图1 qRT-PCR检测不同浓度 $\beta$ 甘油磷酸处理后HAEC的BMP2、BMP4、RUNX2基因表达水平  
与0 mmol/L比较: \*  $P < 0.05$

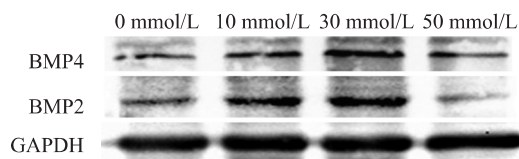


图2 Western blot检测不同浓度 $\beta$ 甘油磷酸处理后HAEC的BMP2、BMP4蛋白表达水平

**2.2 HAEC钙化时PCSK9的表达水平升高** 选用 $\beta$ 甘油磷酸(30 mmol/L)联合地塞米松(100 nmol/L)和L-抗坏血酸(50  $\mu$ g/ml)诱导HAEC钙化,10 d后收取细胞,设置为钙化组。同期以PBS处理的细胞为对照组。qRT-PCR结果提示在诱导HAEC发生钙化后,细胞内PCSK9的mRNA表达水平增加( $2.35 \pm 1.39$ )倍( $t = -3.16, P < 0.05$ )。此外,Western blot结果也显示,在体外诱导HAEC钙化后,细胞内PCSK9的蛋白表达水平也明显高于对照组,见图3。

**2.3 小干扰RNA(siRNA)对HAEC中PCSK9的敲低验证** 根据不同设计序列分别采用3种siRNA转染HAEC,提取RNA并反转录后采用qRT-PCR检测细胞内PCSK9的表达。结果显示,siPCSK9-2对HAEC中PCSK9表达的抑制作用最为明显,较阴性对照组下调( $48.36 \pm 14.41$ )%,抑制效果最佳( $t = 4.32, P < 0.05$ ),见图4。Western blot结果显示,转

染3种siRNA后,siPCSK9-2的蛋白表达水平明显低于阴性对照组,见图5。因此选取siPCSK9-2作为敲低PCSK9的工具进行后续试验。

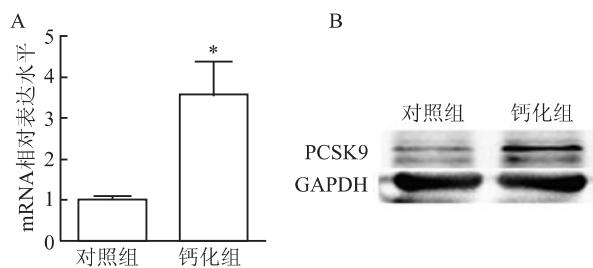


图3 qRT-PCR与Western blot检测HAEC的PCSK9基因和蛋白表达水平

A: qRT-PCR; B: Western blot; 与对照组比较: \*  $P < 0.05$

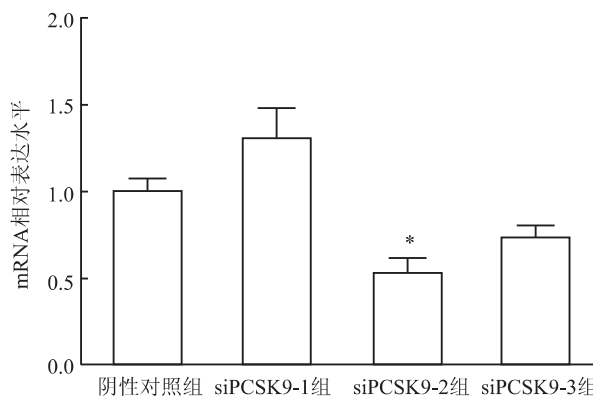


图4 qRT-PCR检测HAEC的PCSK9基因表达水平  
与阴性对照组比较: \*  $P < 0.05$

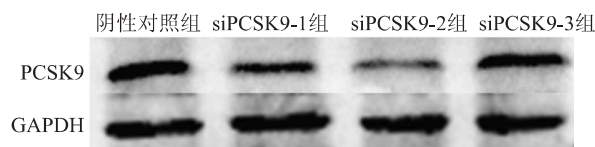


图5 Western blot检测HAEC的PCSK9蛋白表达水平

**2.4 抑制PCSK9对HAEC钙化的影响** 采用siPCSK9-2转染细胞后,以同样的方法诱导HAEC钙化,观察PCSK9敲低后对HAEC钙化的影响。qRT-PCR结果显示,在相同钙化诱导条件下,敲低PCSK9(钙化+siPCSK9组)抑制了细胞内BMP2( $t = 10.45, P < 0.001$ )、RUNX2( $t = 10.78, P < 0.001$ )的基因表达水平(与钙化组相比),见图6。进一步通过Western blot检测细胞内主要钙化指标的蛋白表达水平,结果显示在同等诱导钙化的条件下,敲低PCSK9抑制了细胞内BMP2、BMP4的蛋白表达水平,见图7。茜素红S染色观察细胞内钙盐沉积的形态学改变,结果显示敲低PCSK9后细胞内的钙盐沉积较正常钙化组减少,见图8。

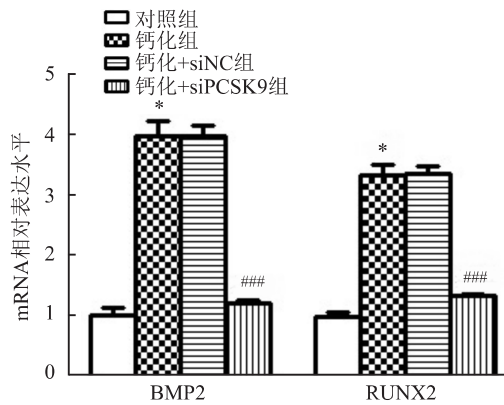


图6 qRT-PCR检测HAEC的BMP2、Runx2基因表达水平  
与对照组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与钙化组比较: ###  $P < 0.001$

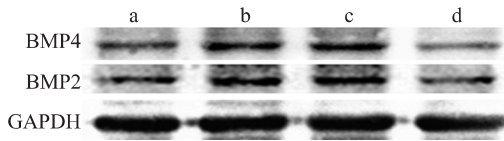


图7 Western blot检测HAEC的BMP2、BMP4蛋白表达水平  
a: 对照组; b: 钙化组; c: 钙化 + siNC 组; d: 钙化 + siPCSK9 组

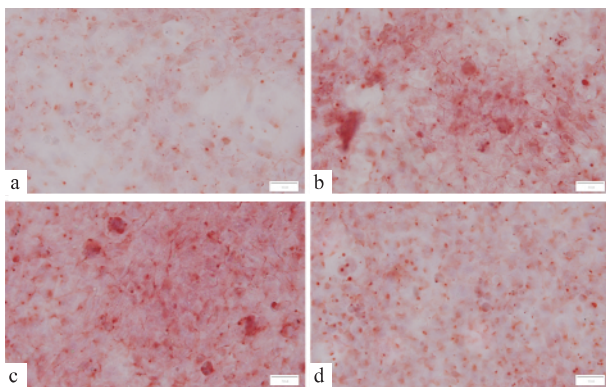


图8 茜素红 S 染色检测HAEC的钙化沉积  $\times 200$   
a: 对照组; b: 钙化组; c: 钙化 + siNC 组; d: 钙化 + siPCSK9 组

### 3 讨论

血管钙化是血管疾病的常见和严重并发症,其增加了糖尿病和动脉粥样硬化的发病率和病死率,并与充血性心力衰竭、心肌梗死、全身性高血压和慢性肾脏疾病的风险增加有关。以前被认为是不受控制的矿物质沉淀的最终过程,现在确定它是一种多方面的疾病,受其血管位置、钙化细胞起源和许多调节途径的特性影响<sup>[6]</sup>。起初,由于钙化主要见于中膜,所有焦点都集中在内侧细胞,包括血管平滑肌细胞和周细胞。然后病灶扩大,包括所有血管层的细胞,包括外膜和内皮<sup>[7]</sup>。内皮在维持血管稳态方面起着重要作用,并参与许多生理功能,包括调节血压、促进血管生成和控制凝血过程。内皮细胞通过

内皮间质转化有助于血管钙化<sup>[8]</sup>。研究<sup>[9]</sup>表明 100 nmol/L 地塞米松、50  $\mu\text{g/ml}$  L-抗坏血酸和 10 mmol/L  $\beta$  甘油磷酸可诱导人血管平滑肌细胞成骨分化。高浓度的  $\beta$  甘油磷酸、地塞米松和 L-抗坏血酸可以诱导 HAEC 钙化<sup>[10]</sup>。矿物质稳态的破坏和高磷酸盐水平被认为是慢性肾脏病中血管钙化的主要决定因素。即使肾功能正常,血清中磷酸盐的增加也与心血管病死率和冠状动脉钙化有关,提示磷酸盐在血管钙化的病理生理中起重要作用。因此,课题组分别用 0、10、30、50 mmol/L 的  $\beta$  甘油磷酸处理细胞,筛选诱导 HAEC 钙化的最佳浓度。

PCSK9 是前蛋白转化酶家族的第 9 个成员,已成为开发新的降胆固醇药物和干预动脉粥样硬化治疗的热门靶点。PCSK9 可能通过独立于低密度脂蛋白受体的机制促进炎症、内皮功能障碍和高血压,从而加速动脉粥样硬化。因此,抑制 PCSK9 是一种有前途的治疗方法<sup>[11]</sup>。使用 PCSK9 抑制剂进行治疗的目的是降低循环中 PCSK9 水平。治疗方法包括结合循环 PCSK9 (单克隆抗体和修饰的结合蛋白) 或减少该蛋白在肝脏的生成 (siRNA)<sup>[12]</sup>。有研究<sup>[13]</sup>表明,与对照组相比,钙化性主动脉瓣狭窄患者主动脉瓣中 PCSK9 表达较高。用成骨培养基处理人瓣膜间质细胞,PCSK9 水平升高,而 PCSK9 中和抗体减少钙积累。多甘烷醇可降低循环 PCSK9 水平,抑制钙化标志物,并减轻主动脉钙化,表明多甘烷醇可部分通过抑制 PCSK9 的表达而发挥抗钙化作用<sup>[14]</sup>。除肝脏外,PCSK9 在其他组织中也高水平表达,其功能尚不清楚,可能是内皮调节预防或治疗血管钙化的有用靶点。需要进一步的研究来了解 PCSK9 在血管钙化的发病机制中的潜在新作用。

本研究采用不同浓度的  $\beta$  甘油磷酸联合 L-抗坏血酸和地塞米松诱导 HAEC 钙化,筛选出最适合体外诱导 HAEC 钙化的药物浓度。观察显示体外诱导 HAEC 钙化时细胞内 PCSK9 的表达水平升高。进一步通过 siRNA 敲低细胞内 PCSK9 的表达,采用同样方法诱导 HAEC 钙化后观察到,敲低 PCSK9 抑制了 HAEC 中主要钙化指标的表达以及钙盐沉积。上述结果提示 PCSK9 参与了 HAEC 钙化的发生发展,可能作为影响血管钙化的表观遗传因子发挥重要的调控作用,对于进一步研究 PCSK9 调节血管钙化的分子机制具有重要意义。

### 参考文献

- [1] Lu C L, Liao M T, Hou Y C, et al. Sirtuin-1 and its relevance in

- vascular calcification[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(5): 1593.
- [2] Karagiannis A D, Liu M, Toth P P, et al. Pleiotropic anti-atherosclerotic effects of PCSK9 inhibitors from molecular biology to clinical translation[J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2018, 20(4): 20.
- [3] Leopold J A. PCSK9 and calcific aortic valve stenosis: moving beyond lipids[J]. *JACC Basic Transl Sci*, 2020, 5(7): 662–4.
- [4] Goettsch C, Hutcheson J D, Hagita S, et al. A single injection of gain-of-function mutant PCSK9 adeno-associated virus vector induces cardiovascular calcification in mice with no genetic modification[J]. *Atherosclerosis*, 2016, 251: 109–18.
- [5] Cozzolino M, Ciceri P, Galassi A, et al. The key role of phosphate on vascular calcification[J]. *Toxins (Basel)*, 2019, 11(4): 213.
- [6] Boström K I. Where do we stand on vascular calcification[J]. *Vascul Pharmacol*, 2016, 84: 8–14.
- [7] Leopold J A. Vascular calcification: Mechanisms of vascular smooth muscle cell calcification[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2015, 25(4): 267–74.
- [8] Yao J, Guihard P J, Blazquez-Medela A M, et al. Serine protease activation essential for endothelial-mesenchymal transition in vascular calcification[J]. *Circ Res*, 2015, 117(9): 758–69.
- [9] Kakutani Y, Shioi A, Shoji T, et al. Oncostatin M promotes osteoblastic differentiation of human vascular smooth muscle cells through JAK3-STAT3 pathway[J]. *J Cell Biochem*, 2015, 116(7): 1325–33.
- [10] 盛 瑛, 张宸铭, 陈 亮, 等. 外源 GDF11 对人主动脉内皮细胞钙化的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2020, 55(11): 1689–94.
- [11] Wang W, Liu C, Cong H. Hypothesis: new PCSK9 inhibitors may impact calcific aortic valve disease[J]. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2017, 22(1): 56–64.
- [12] Preiss D, Mafham M. PCSK9 inhibition: the dawn of a new age in cholesterol lowering[J]. *Diabetologia*, 2017, 60(3): 381–9.
- [13] Perrot N, Valerio V, Moschetta D, et al. Genetic and *in vitro* inhibition of PCSK9 and calcific aortic valve stenosis[J]. *JACC Basic Transl Sci*, 2020, 5(7): 649–61.
- [14] Elseweidy M M, Mohamed H E, Elrashidy R A, et al. Inhibition of aortic calcification by policosanol in dyslipidemic rabbits is enhanced by pentoxifylline: potential role of PCSK9[J]. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2018, 23(6): 551–60.

## The protective effect of inhibiting PCSK9 on calcification of human aortic endothelial cells

Jin Tianhui<sup>1</sup>, Chen Liang<sup>1,2</sup>, Liu Yehong<sup>1</sup>, et al

(<sup>1</sup>Dept of Cardiology, Wuxi Clinical College, Anhui Medical University, Wuxi 214044;

<sup>2</sup>Dept of Cardiology, No. 904 Hospital of The PLA Joint Logistic Support Force, Wuxi 214044)

**Abstract Objective** To investigate the effect of inhibiting proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) on the calcification of human aortic endothelial cells (HAEC) induced by dexamethasone combined with L-ascorbic acid and  $\beta$ -glycerophosphate. **Methods** Different concentrations (0, 10, 30, 50 mmol/L)  $\beta$  glycerophosphate + 50  $\mu$ g/ml L-ascorbic acid + 100 nmol/L dexamethasone were used to stimulate HAEC, and the optimal concentration was selected to induce cellular calcification. The mRNA and protein expression of PCSK9 in HAEC was verified. Small interfering RNA (siRNA) was used to knock down the expression of PCSK9 in HAEC, and cell calcification was induced by the same conditions, and the expression changes of PCSK9 and major calcification indexes in HAEC were detected after PCSK9 knockdown. Alizarin red S staining was used to observe the calcification deposition in the cells. **Results** ① When the  $\beta$  glycerophosphate concentration was 30 mmol/L, the mRNA and protein expression levels of the main calcification indicators bone morphogenetic protein (BMP) 2, BMP4 and Runx-related transcription factor 2 (RUNX2) in HAEC reached the peak, and the effect of inducing calcification was the best; ② The mRNA and protein expression levels of PCSK9 significantly increased after HAEC calcification was induced; ③ Knockdown of PCSK9 expression in cells could significantly inhibit HAEC calcification induced *in vitro*, the expression of calcification-related genes and proteins significantly reduced, and the intracellular calcium salt deposition significantly reduced. **Conclusion** The expression of PCSK9 is related to the calcification level of HAEC. Knockdown of PCSK9 can inhibit the calcification of HAEC induced by dexamethasone combined with ascorbic acid and  $\beta$ -glycerophosphate.

**Key words** PCSK9; vascular calcification; vascular endothelial cells