· 基础研究 ·

DOI：10.13498/j.cnki.chin.j.ecc.2022.01.10

补体 1q/肿瘤坏死因子相关蛋白 9 抑制心肌成纤维细胞的激活和迁移

李香敏,谭延振,张　冰,赵　荣,金振晓,易定华,孙　阳,易　蔚,张　平

[摘要]:**目的**　探究补体 1q/肿瘤坏死因子相关蛋白 9(CTRP9)对抑制心肌成纤维细胞(CFs)活性的作用及其分子机制。**方法**　应用 MTS 法检测 SD 仔鼠左心室 CFs 增殖活性,应用免疫荧光染色及 Western Blotting 检测 α-SMA 表达评估 CFs 向肌成纤维细胞转化,应用细胞划痕实验及 Transwell 实验检测 CFs 迁徙能力,Western Blotting 检测 CFs 胶原蛋白Ⅰ、胶原蛋白Ⅲ、结缔组织生长因子(CTGF)的表达。**结果**　CTRP9 显著抑制转化生长因子(TGF)-β1 诱导的 CFs 增殖活性升高($P<0.001$)、向肌成纤维细胞转化($P<0.01$)、迁徙能力增强($P<0.001$)、胶原蛋白Ⅰ、胶原蛋白Ⅲ及 CTGF 表达水平显著升高($P<0.001$),蛋白激酶 A(PKA)抑制剂 H-89 可阻断 CTRP9 的这些抑制作用($P<0.001$, $P\leqslant0.05$, $P<0.001$, $P<0.001$)。**结论**　CTRP9 可以通过 PKA 信号通路降低 TGF-β1 诱导的 CFs 的增殖活性、向肌成纤维细胞转化、迁徙、纤维化相关蛋白表达来发挥抗纤维化作用。

[关键词]:　补体 1q/肿瘤坏死因子相关蛋白 9;心肌成纤维细胞;转化生长因子 β1;蛋白激酶 A

CTRP9 inhibits the activation and migration of cardiac fibroblasts

Li Xiangmin, Tan Yanzhen, Zhang Bing, Zhao Rong, Jin Zhenxiao, Yi Dinghua, Sun Yang, Yi Wei, Zhang Ping

Department of Cardiovascular Surgery, the First Affiliated Hospital, Air Force Medical University, Shaanxi Xi'an 710032, *China*

Corresponding author: *Zhang Ping*, *Email*: *zhangping*420@163.*com*

[**Abstract**]: **Objective**　To investigate the effect and molecular mechanism of CTRP9 on reducing the activation and migration of cardiac fibroblasts (CFs). **Methods**　The cell proliferation activity of CFs were detected by MTS kit. The expression of α-SMA was detected by immunofluorescence staining and western blotting to evaluate CFs-to-myofibroblast transformation. Wound healing assay and transwell test were used to test the migration ability of CFs. Western blotting was used to detect collagen Ⅰ, Ⅲ and CTGF. **Results**　CTRP9 significantly inhibited the increase of TGF-β1-induced CFs proliferation ($P<0.001$), transformation to myofibroblasts ($P<0.01$), but enhanced migration ability ($P<0.001$), and the expression of collagen I, collagen III, and CTGF ($P<0.001$). PKA inhibitor H-89 blocked those inhibitions of CTRP9 ($P<0.001$, $P\leqslant0.05$, $P<0.001$, $P<0.001$). **Conclusion**　CTRP9 reduces TGF-β1-induced proliferation, transformation to myofibroblasts, migration and the expression of fibrosis-related proteins of cardiac fibroblasts via PKA to exert anti-fibrosis effects.

[**Key words**]: Complement 1q/ tumor necrosis factor related protein 9; Cardiac fibroblasts; Transforming growth factor beta 1; Protein kinase A

心肌梗死后心力衰竭的发病过程中抗心肌纤维化研究探索一直是心血管领域研究的热点,但是尚未研究出确实有效的治疗靶点和方法。心肌成纤维细胞(cardiac fibroblasts, CFs)在心肌梗死后慢性心力衰竭的发病机制中起着关键作用。补体 1q/肿瘤坏死因子相关蛋白 9(complement 1q/ tumor necrosis factor related protein 9,CTRP9)作为一种分泌糖蛋白在心脏高度表达,在心血管疾病的保护中发挥重要的作用。转化生长因子 β(transforming growth factor-β,TGF-β)家族是当前研究最多的纤维反应调节

基金项目:国家自然科学基金(81770345,51837011);陕西省重点研发计划(2019ZDLSF01-01-02,2020SF-250)

作者单位:710038 西安,空军军医大学第二附属医院肾脏内科(李香敏);710032 西安,空军军医大学第一附属医院心血管外科(谭延振、张　冰、赵　荣、易定华、易　蔚、张　平),老年病科(孙　阳)

通讯作者:张　平,Email: zhangping420@163.com

因子之一,控制多种细胞过程,它在心肌损伤后的适应不良和重塑中起着中心作用。蛋白激酶 A(protein kinase A,PKA)底物的磷酸化对细胞的代谢、分化、突触传递、离子通道活性、生长发育等多种功能至关重要。

本研究应用 SD 仔鼠原代 CFs 从细胞水平及蛋白分子水平研究介导 CTRP9 抗心肌纤维化作用及分子信号通路,从而研究出 CTPR9 通过 PKA 抑制 CFs 活性从而发挥抗心肌纤维化的作用及分子机理。

1 资料与方法

1.1 材料 出生 1~3 天 SD 仔鼠由空军军医大学实验动物中心提供,实验条件严格按照国家科学技术委员会颁布的《实验动物管理条例》进行。抗-CD31 抗体、抗-胶原蛋白(Collagen)Ⅰ抗体、抗-Collagen Ⅲ抗体、抗-波形蛋白抗体购于 abcam 公司,CellTiter 96© Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay(MTS)购于 Promega 公司,细胞培养基(dulbecco´s modified eagle medium,DMEM)低糖液体培养基购于 HyClone 公司,胎牛血清(fetal bovine serum,FBS)购于 gibco 公司,H-89(dihydrochloride)购于 MedChemExpress 公司,磷酸-PKA C(Thr197)(D45D3)兔单克隆抗体、PKA RI-α(D54D9)兔单克隆抗体购于 CST 公司,rCTRP9 由本实验室合成,Ⅱ型胶原酶购于 Solarbio 公司。

1.2 方法

1.2.1 原代 CFs 分离培养及纯度鉴定 采用酶消化联合差速贴壁方法分离 SD 仔鼠左心室 CFs。采用光镜观察及免疫荧光染色鉴定分离的 CFs 纯度。方法参考文章《原代 SD 仔鼠 CFs 分离培养方法改进》。CFs 纯度可达 95%以上,满足实验需要。

1.2.2 CFs 增殖检测 MTS 法检测 CFs 相对数量。

1.2.3 CFs 向肌成纤维细胞转化实验 应用免疫荧光染色及 Western Blotting 检测 CFs α-平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle actin,α-SMA)表达变化评估 CFs 向肌成纤维细胞转化。

1.2.4 细胞迁徙能力检测 应用细胞划痕实验及 Transwell 实验检测 CFs 迁徙能力变化。

1.2.5 CFs 纤维化相关蛋白表达变化检测 Western Blotting 检测细胞 Collagen Ⅰ、Collagen Ⅲ、结缔组织生长因子(connective tissue growth factor,CTGF)表达水平变化,应用 Image Lab 4.0.1 软件对结果进行分析。

1.3 统计学分析 文中和图中的所有数值均以 n 个独立实验的平均值±标准误(standard error of mean,SEM)表示。数据用 Graph Pad Prism-5 统计软件进行分析。对多组数据首先对所有实验组进行单向方差分析,然后进行 Bonferroni´s 多重比较检验。P 值≤0.05(双侧)认为具有统计学意义。

2 结 果

2.1 CTRP9 通过 PKA 通路抑制 TGF-β1 诱导 CFs 的增殖活性作用 应用 MTS 法检测 CFs 相对数量,TGF-β1 可诱导 CFs 的增殖活性,CTRP9 可抑制 TGF-β1 诱导的 CFs 增殖活性的作用,PKA 抑制剂 H-89 可阻断 CTRP9 抑制 TGF-β1 诱导的 CFs 增殖活性的作用,且 CTRP9+H-89 及 H-89 对 CFs 增殖活性无影响。见图 1。

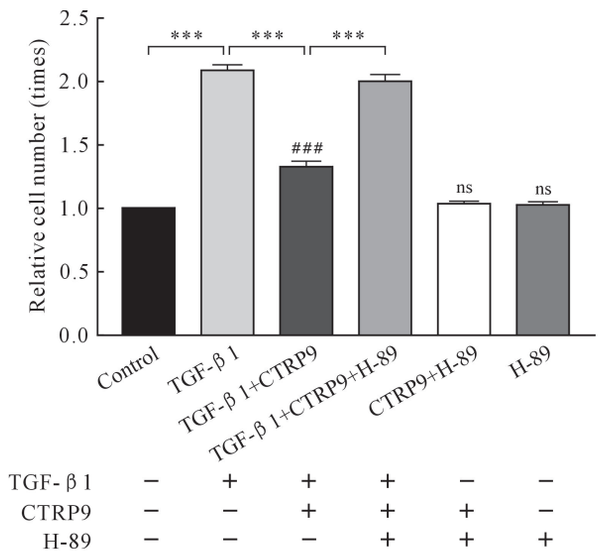

图 1 CTRP9 通过 PKA 通路抑制 TGF-β1 诱导 CFs 的增殖活性作用

注:与 Control 组比较 ns P>0.05;各组之间比较*** P<0.001;TGF-β1 终浓度 10 μg/L、rCTRP9 终浓度 2.5 mg/L、H-89 终浓度 10 μM;TGF-β1:生长因子 β1;CTRP9:补体 1q/肿瘤坏死因子相关蛋白 9;Relative cell number (times):相对细胞数量(倍数)

2.2 CTRP9 通过 PKA 抑制 TGF-β1 诱导 CFs 向肌成纤维细胞转化 应用免疫荧光染色研究 CFs α-SMA 蛋白表达变化:无干预的 Control 组 CFs 表达很少的 α-SMA 蛋白,应用 TGF-β1 刺激诱导后,CFs 大量表达 α-SMA 蛋白,细胞表型向肌成纤维细胞转变,应用 rCTRP9 处理后可抑制 TGF-β1 刺激诱导的 α-SMA 蛋白表达,而应用 PKA 抑制剂 H-89 后 rCTRP9 抑制 TGF-β1 诱导的 α-SMA 蛋白大量表达的作用减弱,rCTRP9 联合 H-89 及单用 H-89 对 CFs 表达 α-SMA 蛋白基本无影响;应用 Western

Blotting 研究得到相同结果:TGF-β1 可诱导 CFs 表达 α-SMA 蛋白向肌成纤维细胞转化,CTRP9 可抑制 TGF-β1 诱导的 CFs 表达 α-SMA 蛋白,抑制其向肌成纤维细胞转化,而 PKA 抑制剂 H-89 可阻断 CTRP9 抑制 TGF-β1 诱导 CFs 表达 α-SMA 蛋白的作用,且 CTRP9+H-89 及 H-89 对 CFs 表达 α-SMA 蛋白无影响。见图 2。

2.3 CTRP9 通过 PKA 抑制 TGF-β1 诱导的 CFs 迁徙 应用细胞划痕实验和 Transwell 实验检测 rCTRP9 及 PKA 抑制剂 H-89 不同干预处理对 TGF-β1 诱导 CFs 迁徙影响:TGF-β1 可刺激诱导 CFs 迁徙,CTRP9 可抑制 TGF-β1 诱导的 CFs 迁徙,而 PKA 抑制剂 H-89 可阻断 CTRP9 的抑制 TGF-β1 诱导 CFs 迁徙的作用,且 CTRP9+H-89 及 H-89 对 CFs 迁徙无影响。见图 3。

2.4 CTRP9 通过 PKA 抑制 TGF-β1 诱导 CFs 纤维化相关蛋白表达 应用 Western Blotting 检测 rCTRP9 及 PKA 抑制剂 H-89 不同干预处理对 TGF-β1 诱导 CFs 表达 Collagen Ⅰ、Collagen Ⅲ、CTGF 三种纤维化相关蛋白影响:TGF-β1 可诱导 CFs Collagen Ⅰ、

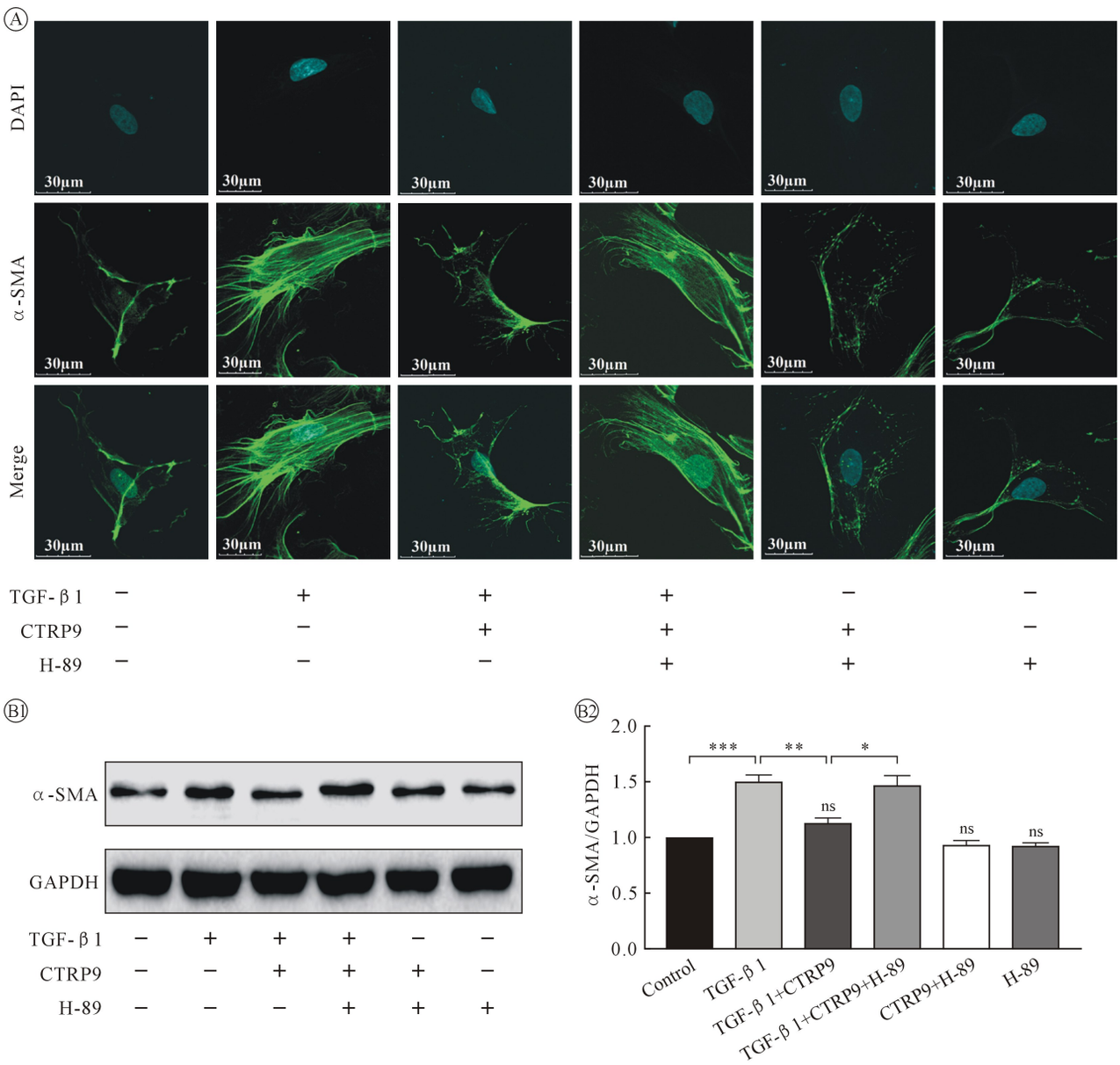

图 2 TGF-β1 诱导 CFs α-SMA 表达免疫荧光染色图像及 Western Blotting 图像及统计结果

注:与 Control 组比较 ns $P>0.05$;各组之间比较 * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$;TGF-β1 终浓度 10 μg/L、rCTRP9 终浓度 2.5 mg/L、H-89 终浓度 10 μM;TGF-β1:生长因子 β1;CFs:心肌成纤维细胞;α-SMA:平滑肌肌动蛋白;CTRP9:补体 1q/肿瘤坏死因子相关蛋白 9;GAPDH:磷酸甘油醛脱氢酶

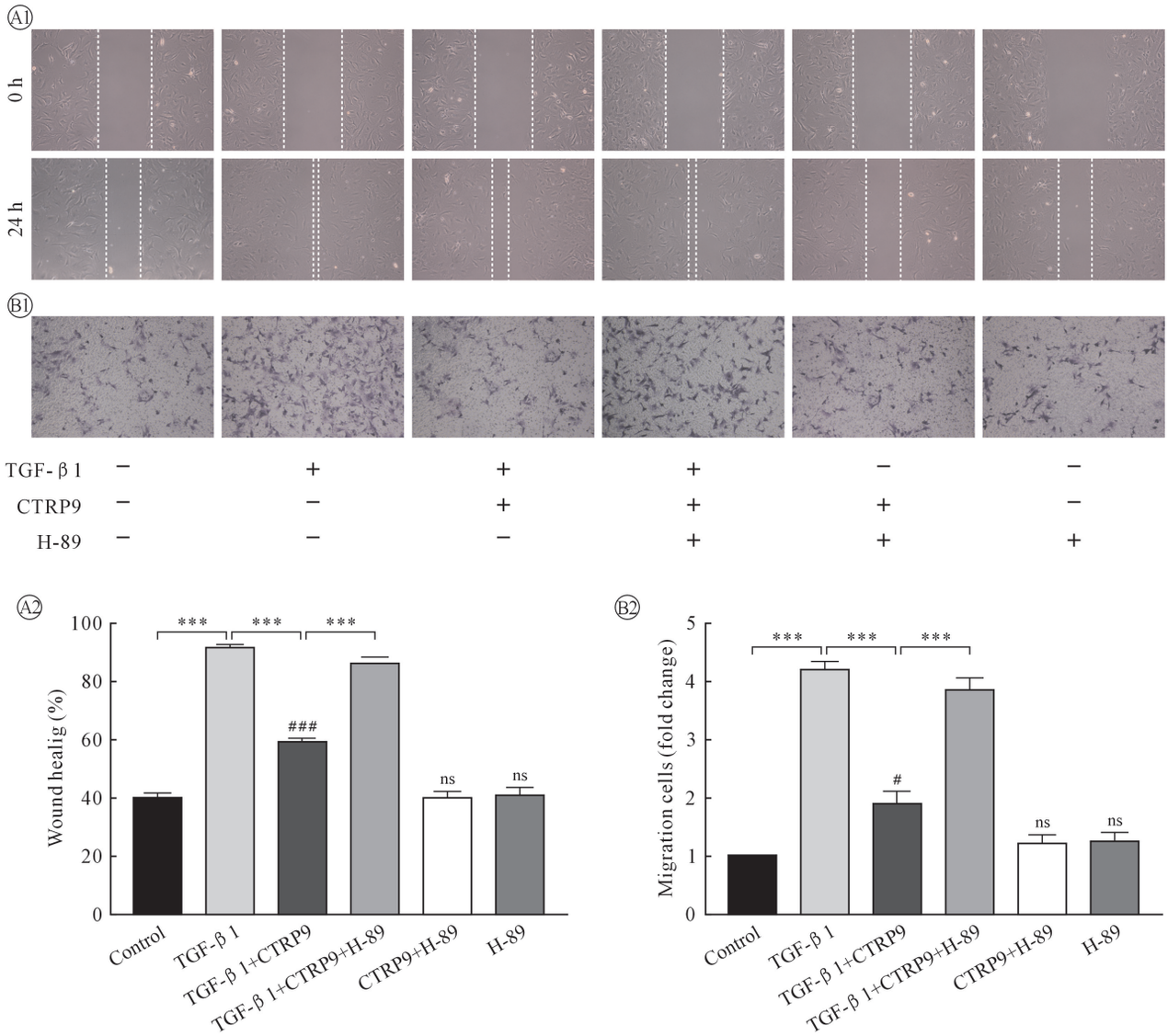

图 3 生长因子 β1 诱导的心肌成纤维细胞迁徙试验图像及统计结果

注:与 Contral 组比较 ns $P>0.05$,$^{###}P<0.001$;$^{\#}P\leqslant0.05$;各组之间比较$^{***}P<0.001$;TGF-β1 终浓度 10 μg/L、rCTRP9 终浓度 2.5 mg/L、H-89 终浓度 10 μM;TGF-β1:生长因子 β1;CTRP9:补体 1q/肿瘤坏死因子相关蛋白 9;Wound healig:划痕实验;Migration cells(fold change):迁移细胞数(倍数)

Collagen Ⅲ、CTGF 三种常用的纤维化相关蛋白表达水平增高,rCTRP9 可抑制 TGF-β1 诱导的 CFs Collagen Ⅰ、Collagen Ⅲ、CTGF 表达增多,而 PKA 抑制剂 H-89 可阻断 CTRP9 抑制 TGF-β1 诱导的 CFs Collagen Ⅰ、Collagen Ⅲ、CTGF 表达增多的作用。见图 4。

3 讨 论

成纤维细胞是心肌纤维化过程中最直接的参与细胞,在心脏修复期,常驻的 CFs 群被激活[1-2],通过合成 α-SMA 向肌成纤维细胞转化,并分泌大量结构细胞外基质蛋白[3-5]。心肌组织中 TGF-β 的表达在心肌梗死和心衰的动物实验模型中均显著增加[6-7],以 TGF-β 信号通路作为抑制纤维化治疗的目标被长期探索[8-10]。本研究应用胶原酶消化联合差速贴壁的方法分离出原代 SD 仔鼠 CFs 作为细胞模型,应用在心肌损伤后的适应和重塑中起着重要作用的 TGF-β1[6,11],在细胞水平研究 CTRP9 抗纤维化的作用及分子机理。

心脏损伤后成纤维细胞的扩张和激活对心肌修复很重要,但也可能导致纤维化、重塑和功能障碍[5]。非梗死区成纤维细胞持续增殖激活是过度纤维化的发展一个重要方面,表达 α-SMA 是成纤维细胞激活的标志。TGF-β1 可刺激诱导 SD 仔鼠 CFs 增殖激活。本团队研究发现应用 CTRP9 可明显降低 TGF-β1 诱导 CFs 的增殖活性,但未完全阻断 CFs 增殖活性。

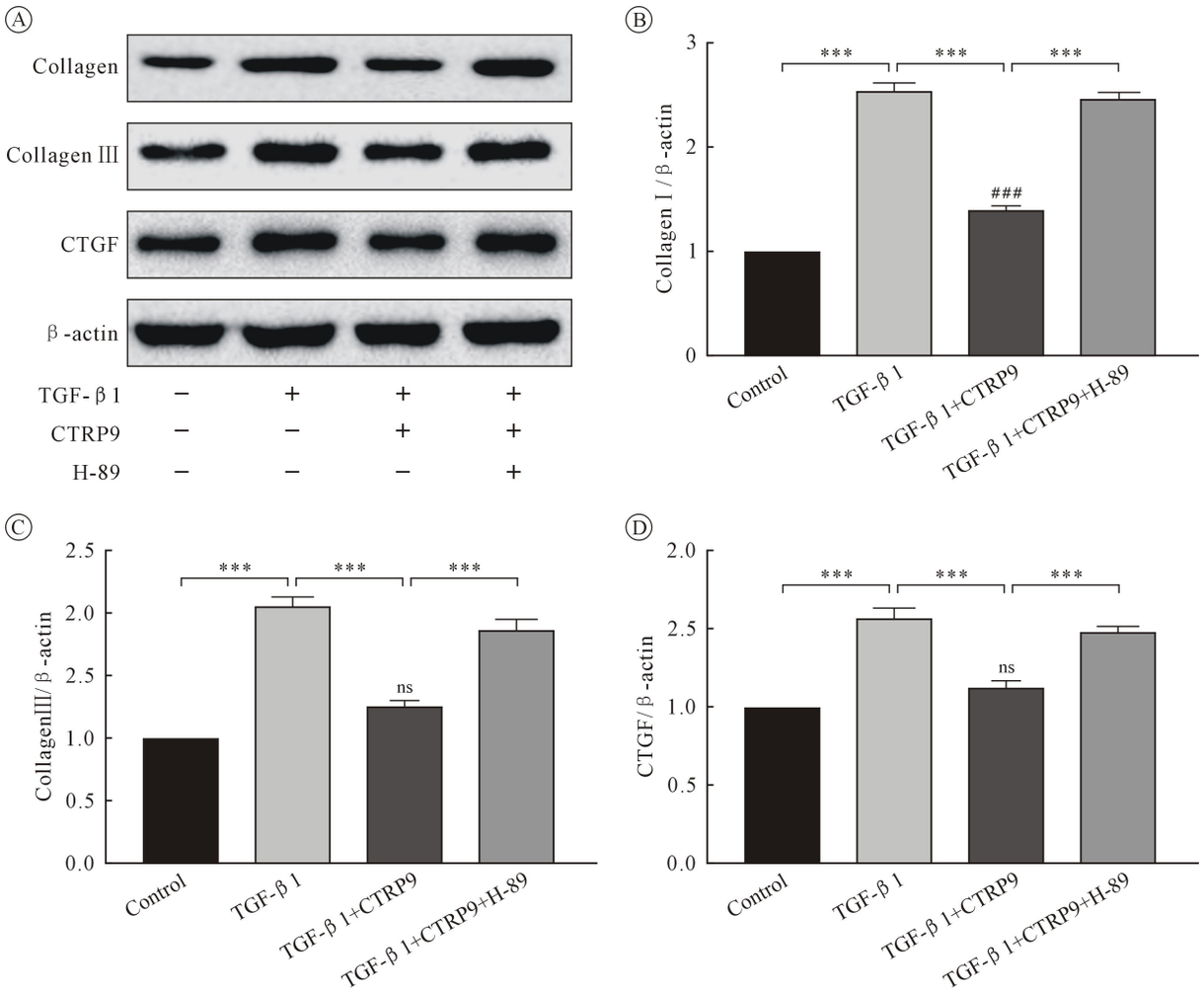

图 4 不同干预处理对 TGF-β1 诱导 CFs 表达纤维化相关蛋白的影响 Western Blotting 图片及统计结果

注:与 Contral 组比较 ns $P>0.05$,$^{###}P<0.001$;各组之间比较 $^{***}P<0.001$;TGF-β1 终浓度 10 μg/L、rCTRP9 终浓度 2 mg/L、H-89 终浓度 10 μM;TGF-β1:生长因子 β1;CTRP9:补体 1q/肿瘤坏死因子相关蛋白 9;collagen:胶原;β-actin:β-肌动蛋白;CTGF:结缔组织生长因子

TGF-β1 可诱导 CFs 表达 α-SMA,促使其向肌成纤维细胞转化。本团队进一步研究发现 CTRP9 可明显降低 TGF-β1 刺激诱导的 SD 仔鼠 CFs 表达 α-SMA,应用 PKA 抑制剂 H-89 后 CTRP9 的这种作用消失;CTRP9 激活的促生存信号分子 PKA 不仅从抗心肌细胞凋亡方面减轻心肌重塑[12],还可以通过抑制 CFs 过度增殖激活参与抗心肌纤维化作用。

心肌梗死后 CFs 迁徙能力增强也是心肌纤维化的一个重要原因,本课题应用细胞划痕实验及 Transwell 实验研究发现应用刺激 TGF-β1 诱导的 CFs 迁徙能力增强可被 CTRP9 明显减弱,CTRP9 的这种作用需要通过 PKA 通路,通过减弱 CFs 的迁徙能力,可减轻心肌梗死后成纤维细胞的过多聚集,发挥抗纤维化作用。

Collagen Ⅰ和Ⅲ是最常见的细胞外基质成分,它们分别占心脏细胞外基质胶原的 85%~90% 和 5%~11%[13]。大多数心脏病都会导致细胞外基质中胶原沉积增加和重排,这些变化是组织修复和纤维化的一种形式[14-15]。在心脏损伤或 TGF-β 刺激后 CTGF 表达上调,分泌储存在细胞外基质中,作为一种基质细胞蛋白[16],是一个纤维化效应因子[17-18]。本实验证实 CTRP9 对 TGF-β1 诱导的 CFs 分泌 Collagen Ⅰ、Ⅲ及 CTGF 功能具有明显抑制作用,且这种抑制作用可被 PKA 抑制剂 H-89 阻断。

本研究发现 CTRP9 通过 PKA 通路可以降低 TGF-β1 诱导的 CFs 的增殖活性、向肌成纤维细胞转化及迁徙的作用,从而减低纤维化相关蛋白表达来发挥抗纤维化作用。对筛选心肌梗死后纤维化的治疗靶点具有很重要的意义。

参考文献：

[1] Kanisicak O, Khalil H, Ivey MJ, *et al*. Genetic lineage tracing defines myofibroblast origin and function in the injured heart[J]. Nat Commun, 2016, 7: 12260.

[2] Ruiz-Villalba A, Simon AM, Pogontke C, *et al*. Interacting resident epicardium-derived fibroblasts and recruited bone marrow cells form myocardial infarction scar[J]. J Am Coll Cardiol, 2015, 65(19): 2057-2066.

[3] Shinde AV, Frangogiannis NG. Fibroblasts in myocardial infarction: a role in inflammation and repair[J]. J Mol Cell Cardiol, 2014, 70: 74-82.

[4] Shinde AV, Frangogiannis NG. Mechanisms offibroblast activation in the remodeling myocardium[J]. Curr Pathobiol Rep, 2017, 5(2): 145-152.

[5] Humeres C, Frangogiannis NG. Fibroblasts in theinfarcted, remodeling, and failing heart[J]. JACC Basic Transl Sci, 2019, 4(3): 449-467.

[6] Yue Y, Meng K, Pu Y, *et al*. Transforming growth factor beta (TGF-β) mediates cardiac fibrosis and induces diabetic cardiomyopathy[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2017, 133: 124-130.

[7] Khan S, Joyce J, Margulies KB, *et al*. Enhanced bioactive myocardial transforming growth factor-β in advanced human heart failure[J]. Circ J, 2014, 78(11): 2711-2718.

[8] Walton KL, Johnson KE, Harrison CA. Targeting TGF-β mediated SMAD signaling for the prevention of fibrosis[J]. Front Pharmacol, 2017, 8: 461.

[9] Fang L, Murphy AJ, Dart AM. Aclinical perspective of anti-fibrotic therapies for cardiovascular disease[J]. Front Pharmacol, 2017, 8: 186.

[10] 马晓媛,俞瑾,马海平,等. 转化生长因子-β1 预处理调控缺氧诱导因子-1α 蛋白表达水平对心肌细胞缺氧/复氧损伤的影响[J]. 中国体外循环杂志,2017,15(1):51-55.

[11] Meng XM, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. TGF-β: the master regulator of fibrosis[J]. Nat Rev Nephrol, 2016, 12(6): 325-338.

[12] Sun Y, Yi W, Yuan Y, *et al*. C1q/tumor necrosis factor-related protein-9, a novel adipocyte-derived cytokine, attenuates adverse remodeling in the ischemic mouse heart via protein kinase A activation[J]. Circulation, 2013, 128(11 Suppl 1): S113-S120.

[13] Frangogiannis NG. The extracellular matrix in myocardial injury, repair, and remodeling[J]. J Clin Invest, 2017, 127(5): 1600-1612.

[14] Caorsi V, Toepfer C, Sikkel MB, *et al*. Non-linear optical microscopy sheds light on cardiovascular disease[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e56136.

[15] de Haas HJ, Arbustini E, Fuster V, *et al*. Molecular imaging of the cardiac extracellular matrix[J]. Circ Res, 2014, 114(5): 903-915.

[16] Leask A, Abraham DJ. All in the CCN family: essential matricellular signaling modulators emerge from the bunker[J]. J Cell Sci, 2006, 119(Pt 23): 4803-4810.

[17] Accornero F, van Berlo JH, Correll RN, *et al*. Geneticanalysis of connective tissue growth factor as an effector of transforming growth factor βsignaling and cardiac remodeling[J]. Mol Cell Biol, 2015, 35(12): 2154-2164.

[18] Dorn LE, Petrosino JM, Wright P, *et al*. CTGF/CCN2 is an autocrine regulator of cardiac fibrosis[J]. J Mol Cell Cardiol, 2018, 121: 205-211.

(收稿日期:2021-05-13)
(修订日期:2021-07-14)

(上接第 29 页)

[5] Gaies MG, Jeffries HE, Niebler RA, *et al*. Vasoactive-inotropic score is associated with outcome after infant cardiac surgery: an analysis from the pediatric cardiac critical care consortium and virtual PICU system registries[J]. Pediatr Crit Care Med, 2014, 15(6): 529-537.

[6] Wang X, Luo Y, Wang Y, *et al*. Comparison of associations of outcomes after stroke with estimated GFR using Chinese modifications of the MDRD study and CKD-EPI creatinine equations: results from the China national stroke registry[J]. Am J Kidney Dis, 2014, 63(1): 59-67.

[7] Ostermann M, Joannidis M, Pani A, *et al*. Patient selection and timing of continuous renal replacement therapy[J]. Blood Purif, 2016, 42(3): 224-237.

[8] Vanmassenhove J, Kielstein J, Jorres A, *et al*. Management of patients at risk of acute kidney injury[J]. Lancet, 2017, 389(10084): 2139-2151.

[9] 侯克龙,李静,穆心苇. 心血管外科术后急性肾损伤的诊疗进展[J]. 中国心血管杂志,2020,25(1):92-95.

[10] Palomba H, Castro I, Yu L, *et al*. The duration of acute kidney injury after cardiac surgery increases the risk of long-term chronic kidney disease[J]. J Nephrol, 2017, 30(4): 567-572.

[11] 张慧,张涛元,王淼,等. 联合瓣膜置换术后急性肾损伤发生的相关危险因素研究[J]. 中国体外循环杂志,2017,15(3):148-152.

[12] Evans RG, Lankadeva YR, Cochrane AD, *et al*. Renal haemodynamics and oxygenation during and after cardiac surgery and cardiopulmonary bypass[J]. Acta Physiol (Oxf), 2018, 222(3).

[13] Darby PJ, Kim N, Hare GM, *et al*. Anemia increases the risk of renal cortical andmedullary hypoxia during cardiopulmonary bypass[J]. Perfusion, 2013, 28(6): 504-511.

[14] Pozzoli S, Simonini M, and Manunta P. Predicting acute kidney injury: current status and future challenges[J]. J Nephrol, 2018, 31(2): 209-223.

[15] 林倩,谢恺庆,周红卫,等. 术前高尿酸血症是体外循环心脏手术后急性肾损伤的独立危险因素[J]. 中华肾脏病杂志,2019,35(2): 94-99.

(收稿日期:2021-02-18)
(修订日期:2021-04-31)