

本文引用: 阮焕钧, 肖子杰, 吴家栋, 等. 山楂来源外泌体样纳米囊泡通过调控 SOX9 信号通路抑制 Ang II 和 TGF- β 诱导的心脏成纤维细胞活化[J]. 中国动脉硬化杂志, 2026, 34(6): 544-552. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2026.06.007.

· 实验研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2026)34-06-0544-09

山楂来源外泌体样纳米囊泡通过调控 SOX9 信号通路抑制 Ang II 和 TGF- β 诱导的心脏成纤维细胞活化

阮焕钧¹, 肖子杰², 吴家栋³, 陈俊羽¹, 黄于朗², 林璐萍⁴, 王小庆¹, 柯晓¹

1. 中国医学科学院阜外医院深圳医院心内科, 广东省深圳市 518057; 2. 深圳市前海蛇口自贸区医院心内科, 广东省深圳市 518067; 3. 深圳大学总医院病案管理与统计科, 广东省深圳市 518060; 4. 中国医学科学院阜外医院深圳医院心血管疾病重点实验室, 广东省深圳市 518057

[摘要] **[目的]** 研究山楂来源外泌体样纳米囊泡(HDELN)抑制血管紧张素 II (Ang II) 和转化生长因子 β (TGF- β) 诱导的大鼠心脏成纤维细胞(RCF)活化的作用机制。**[方法]** 体外提取并培养原代 RCF, 使用 Ang II 和 TGF- β 诱导 RCF 活化, 通过 CCK-8 法测定细胞存活率, 采用 Western blot 检测蛋白表达水平, 采用 RT-qPCR 检测 mRNA 表达水平, 利用细胞划痕实验检测细胞迁移能力, 利用 siRNA 转染 RCF 构建 SOX9 低表达细胞模型。**[结果]** CCK-8 法检测结果显示, Ang II 和 TGF- β 可显著提升 RCF 的细胞活力 ($P < 0.05$)。RT-qPCR 结果显示, Ang II 和 TGF- β 可上调 RCF 中 I 型胶原蛋白 $\alpha 1$ (COL1A1)、III 型胶原蛋白 $\alpha 1$ (COL3A1)、 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA)、骨膜蛋白 (Postn)、Runt 相关转录因子 2 (RUNX2) 的 mRNA 表达水平 ($P < 0.05$)。Western blot 结果显示, Ang II 和 TGF- β 可上调 RCF 中 COL1A1、COL3A1 和 α -SMA 的蛋白表达水平 ($P < 0.05$)。细胞划痕实验结果表明, Ang II 和 TGF- β 可显著提高 RCF 的迁移能力 ($P < 0.05$)。差速离心法和蔗糖梯度密度离心法提取 HDELN。加入 HDELN 后, Ang II 和 TGF- β 诱导的 RCF 活化现象被显著逆转 ($P < 0.05$)。Western blot 和 RT-qPCR 结果显示, Ang II 和 TGF- β 可上调 RCF 中 SOX9 的表达水平, 而 HDELN 则下调其表达水平 ($P < 0.05$)。构建 SOX9 低表达细胞模型后, 实验结果显示, 低表达 SOX9 的 RCF 活化水平显著低于正常 RCF ($P < 0.05$)。**[结论]** HDELN 可通过抑制 SOX9 信号通路, 进而抑制由 Ang II 和 TGF- β 诱导的 RCF 活化。

[关键词] 山楂来源外泌体样纳米囊泡; 心脏成纤维细胞; SOX9 转录因子; 血管紧张素 II; 转化生长因子 β

[中图分类号] R5; R363

[文献标识码] A

Hawthorn-derived exosome-like nanovesicles inhibit Ang II - and TGF- β -induced cardiac fibroblast activation by regulating the SOX9 signaling pathway

RUAN Huanjun¹, XIAO Zijie², WU Jiadong³, CHEN Junyu¹, HUANG Yulang², LIN Luping⁴, WANG Xiaoqing¹, KE Xiao¹

1. Department of Cardiology, Fuwai Shenzhen Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Shenzhen, Guangdong 518057, China; 2. Department of Cardiology, Shenzhen Qianhai Shekou Free Trade Zone Hospital, Shenzhen, Guangdong 518067, China; 3. Department of Medical Records and Statistics, Shenzhen University General Hospital, Shenzhen, Guangdong 518060, China; 4. Shenzhen Key Laboratory of Cardiovascular Disease, Fuwai Shenzhen Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Shenzhen, Guangdong 518057, China

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the mechanism by which hawthorn-derived exosome-like nanovesicles (HDELN) on inhibiting the activation of rat cardiac fibroblasts (RCF) induced by angiotensin II (Ang II) and transforming growth factor- β (TGF- β). **Methods** Primary RCF was extracted and cultured *in vitro*. RCF activation was induced by Ang II and TGF- β , and the cell viability was detected by CCK-8 assay. Western blot was used to detect protein expres-

[收稿日期] 2025-10-24

[修回日期] 2026-04-02

[基金项目] 深圳市科技计划项目 (JCYJ20230807150802005, JCYJ20230807150803007); 深圳市南山区卫生科技计划项目 (NS2024060, NSZD2025027); 广东省自然科学基金面上项目 (2021A1515010178); 深圳市高水平医院建设专项经费 (GSP-QNPY-B202501)

[作者简介] 阮焕钧, 硕士, 主治医师, 研究方向为心血管疾病的诊断与治疗, E-mail: 812794705@qq.com. 通信作者柯晓, 博士, 主任医师, 研究方向为动脉粥样硬化和心肌梗死的分子调控机制, E-mail: xiaokehospital@126.com.

sion levels. RT-qPCR was used to detect the mRNA expression levels. Cell scratch assay was used to detect cell migration ability. siRNA was transfected into RCF to construct a cell model with low expression of SRY-box transcription factor 9 (SOX9) low expression cell model. **Results** CCK-8 results showed that Ang II and TGF- β could enhance the cell viability of RCF ($P<0.05$). RT-qPCR results showed that Ang II and TGF- β upregulated the mRNA expression of type I collagen $\alpha 1$ (COL1A1), type III collagen $\alpha 1$ (COL3A1), α -smooth muscle actin (α -SMA), periostin (Postn), Runt-related transcription factor 2 (RUNX2) in RCF ($P<0.05$). Western blot results showed that Ang II and TGF- β upregulated the protein expression levels of COL1A1, COL3A1, and α -SMA in RCF ($P<0.05$). The results of cell scratch assay showed that Ang II and TGF- β markedly promoted the migration ability of RCF ($P<0.05$). HDELN was extracted by differential centrifugation and sucrose gradient density centrifugation. The activation of RCF induced by Ang II and TGF- β was reversed by the addition of HDELN ($P<0.05$). Western blot and RT-qPCR results showed that Ang II and TGF- β upregulated the expression levels of SOX9 in RCF, while HDELN downregulated its expression ($P<0.05$). After constructing a cell model with low expression of SOX9, the experimental results showed that the activation level of RCF with low expression of SOX9 was significantly lower than that of normal RCF ($P<0.05$). **Conclusion** HDELN can inhibit the activation of RCF induced by Ang II and TGF- β via suppressing the SOX9 signaling pathway.

[**KEY WORDS**] hawthorn-derived exosome-like nanovesicles; cardiac fibroblasts; SRY-box transcription factor 9; angiotensin II; transforming growth factor- β

心肌纤维化是胶原蛋白和细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 过度沉积的病理状态。心脏成纤维细胞在维持心脏稳态中发挥着关键作用^[1-2]。当心脏长期处于高血压状态或发生急性缺血性损伤时,大鼠心脏成纤维细胞 (rat cardiac fibroblasts, RCF) 会过度活化为肌成纤维细胞 (myofibroblast, MF)。MF 虽能维持受损心脏的腔室结构完整性,却缺乏收缩能力,无法发挥心肌细胞的功能,进而引发心肌纤维化,最终导致心力衰竭^[3-4]。因此,抑制 RCF 向 MF 活化以及从活化状态中恢复,对心血管疾病的防治具有重要意义。血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 和转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β) 是成纤维细胞转化为 MF 的强诱导剂。TGF- β 可通过激活 Smad2/3 信号通路引发心肌纤维化^[5], Ang II 和 TGF- β 可通过瞬时受体电位经典通道 6 促进 RCF 向 MF 转化^[6]。长期使用抗纤维化药物治疗可能会引起不良反应^[7-9]。因此,抗纤维化药物的研发是一项极具挑战性的任务。

植物来源外泌体样纳米囊泡 (plant-derived exosome-like nanovesicle, PDELN) 富含多种生物活性脂质、蛋白质、RNA 及其他药理活性分子,作为天然纳米载体具有独特的形态与组成特征。PDELN 免疫原性和细胞毒性较低,生物利用度远高于合成药物。PDELN 不含人畜共患病原体,因而成为一类安全且可持续的药物载体^[10-11]。山楂是一种药食同源的植物。中医认为,山楂性微温,味酸甘,入脾、胃、肝经,具有消食健胃、活血化瘀和收敛止痢的功效,其花、叶、茎、根富含多酚、类黄酮及有机酸,具备多种药用特性,包括强心、利尿、抗动脉粥样硬化

及抗高血压等作用^[12]。山楂富含维生素 C、类黄酮、多酚等多种抗氧化剂,这些成分能够帮助中和自由基、降低氧化应激水平,进而减轻炎症反应。山楂提取物的抗炎作用在保护肠道、心脏、骨骼及关节方面表现尤为突出,其醇提取物 WS® 1442 已获纽约心脏协会推荐,用于充血性心力衰竭的治疗^[13]。本研究以 Ang II 和 TGF- β 诱导 RCF 活化,采用差速离心法与蔗糖梯度离心法提取山楂来源外泌体样纳米囊泡 (hawthorn-derived exosome-like nanovesicles, HDELN),初步探究 HDELN 对 Ang II 和 TGF- β 介导的 RCF 活化的调控作用及相关机制,以期为心肌纤维化的防治提供新的策略与思路。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

II 型胶原酶 (Yeasten); Ang II (TargetMol)、TGF- $\beta 1$ (MCE); 青霉素-链霉素溶液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒及 4% 多聚甲醛 (Biosharp); CCK-8、5 $\times$ SDS-PAGE 蛋白上样缓冲溶液及 BSA Fraction V (Beyotime); TBS 缓冲液、10% PAGE 胶快速制备试剂盒、RIPA 裂解液、蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氟及磷酸化蛋白酶抑制剂 (Servicebio); ECL 发光液、PageRuler 预染蛋白 Marker (Thermo Scientific); BD 脱脂奶粉 (BD); 细胞计数板 (Invitrogen)。

1.2 细胞培养

SD 乳鼠购自广州锐格生物科技有限公司,许可证号: SCXK (粤) 2023-0059。乳鼠经处死后取心脏,去除心耳、血管和肺组织等,用 II 型胶原酶和胰酶

于 37 ℃ 消化,终止消化后用完全培养基重悬培养,利用免疫荧光鉴定结果。RCF 用含 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 DMEM 培养基培养,细胞培养箱设定为 37 ℃ 恒温、5% CO₂ 的环境。当细胞融合度超过 80% 时按 1:2 的比例进行传代培养。在后续实验研究中,将细胞传至第 2 代后进行铺板,随后随机分为对照组、模型组(Ang II 组或 TGF-β 组)及 Ang II/TGF-β+HDELN 组。

1.3 CCK-8 法评估细胞活力

将 RCF 经胰蛋白酶消化为单细胞悬液后,以每孔 2×10^4 个细胞的密度接种于 96 孔板;药物处理 24 h 后,采用 CCK-8 法检测细胞活力:每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,置于恒温培养箱中反应 2 h,随后使用酶标仪测定 450 nm 波长处的吸光度。

1.4 Western blot 检测蛋白表达水平

在 6 cm 细胞培养皿中接种 2×10^6 个细胞。药物干预 24 h 后,采用胰酶消化法收集细胞,离心后用 PBS 缓冲液洗涤 3 次。随后,每孔加入 250 μL 裂解液,于冰上裂解 30 min,期间每隔 5~10 min 吹打混匀;4 ℃ 离心,收集上清液,通过 BCA 试剂盒检测各样本的蛋白质浓度,并用裂解液将所有样本调整至相同浓度,加入 5×Loading buffer 充分混匀后,100 ℃ 变性 10 min,随后置于 -80 ℃ 冰箱保存。SDS-PAGE 电泳时,每泳道上样量为 10~15 μg。电泳结束后,将蛋白转印至 PVDF 膜,用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h,一抗于 4 ℃ 孵育过夜,二抗以 1:10 000 稀释后于室温孵育 1 h,最后进行显影成像。

1.5 RT-qPCR 检测 mRNA 水平

6 孔板每孔接种 1×10^6 个细胞。加药处理 24 h 后,用预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次,提取细胞 RNA;通过 Nano Drop 对 RNA 进行定量,采用 Evo M-MLV 反转录预混型试剂盒进行反转录;将反转录产物 cDNA 应用 SYBR Green Pro Taq HS 预混型 qPCR 试剂盒对靶基因进行定量检测。实验以 GAPDH 作为内参,mRNA 表达量依据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式计算。引物序列:I 型胶原蛋白 α1(type I collagen α1,COL1A1) 正向:5'-CCCAGCGGTGTTATGACTT-3',反向:5'-CGGCCACCATCTTGAGACTT-3';III 型胶原蛋白 α1(type III collagen α1,COL3A1) 正向:5'-AGAGGCTTTGATGGACGCAA-3',反向:5'-GGTCCAACCTCACCTTAGC-3';α-平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle actin,α-SMA) 正向:5'-ACCATCGGGAATGAACGCTT-3',反向:5'-CTGTCAGCAATGCCTGGGTA-3';骨膜蛋白(perioestin,Postn) 正向:5'-TGCAAAAAGACACACCTGC

AA-3',反向:5'-GGCCTTCTCTTGATCGCCTT-3';Runt 相关转录因子 2(Runt-related transcription factor 2,RUNX2) 正向:5'-GCCTTCAAGTTGTAGCCCT-3',反向:5'-TGAACCTGGCCACTTGGTTT-3';SRY 盒转录因子 9(SRY-box transcription factor 9,SOX9) 正向:5'-TCCCCGCAACAGATCTCCTA-3',反向:5'-TCTGGTGGTCGGTGTAGTCA-3';GAPDH 正向:5'-AGGTCCGTGTGAACGGATTTG-3',反向:5'-GGGGTCGTGATGGCAACA-3'。

1.6 细胞划痕实验

6 孔板每孔接种 1×10^6 个细胞。加药处理 24 h 后,用枪头垂直于培养皿划痕,光学显微镜下拍摄图片。

1.7 差速离心法和蔗糖密度梯度离心法提取外泌体

取 250 g 新鲜山楂,去除果柄与果核后,用超纯水多次浸泡以去除杂质,再用剪刀剪碎,加入预冷的 PBS 后通过破壁机破壁;经滤网过滤去除残渣,将滤液分装至 50 mL 离心管中,于 4 ℃、300 g 离心 10 min,取上清液;4 ℃、2 000 g 离心 20 min,再次取上清液;将上清液转移至超速离心管,4 ℃、10 000 g 离心 30 min,取上清液并用 0.22 μm 过滤器过滤,接着于 4 ℃、135 000 g 离心 70 min,去除上清液后,用适量 PBS 重悬沉淀。使用 20 mmol/L Tris-HCl 溶液配制 8%、20%、30% 和 50% 的蔗糖溶液,于 4 ℃、150 000 g 离心 120 min,抽取各分层区域的液体,加入适量 PBS 稀释后,于 4 ℃、135 000 g 离心 70 min,弃上清液,沉淀用适量 PBS 重悬,于 -80 ℃ 保存。

1.8 siRNA 转染

当细胞融合度达 50%~60% 时,将培养基更换为 Opti-MEM;培养 2 h 后,加入终浓度为 30 nmol/L siRNA,继续培养 2~3 h,随后更换为正常完全培养基;继续培养 48~72 h,即可用于后续实验。

1.9 统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行数据可视化与统计分析。两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,进一步比较采用 LSD-*t* 检验。以双侧 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Ang II 和 TGF-β 可诱导 RCF 向 MF 活化

RCF 经 1 μmol/L Ang II 或 10 μg/L TGF-β 处理 24 h 后,CCK-8 结果显示细胞活力分别升高

12.13% 和 6.10% ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); RT-qPCR 结果显示 RCF 中 COL1A1、COL3A1、 α -SMA、Postn 及 RUNX2 的 mRNA 表达水平显著升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); Western blot 结果显示 Ang II 和 TGF- β 可

使 RCF 中 COL1A1、COL3A1 及 α -SMA 的蛋白表达水平显著升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 细胞划痕实验结果表明, Ang II 和 TGF- β 可显著提高 RCF 的迁移能力 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$; 图 1)。

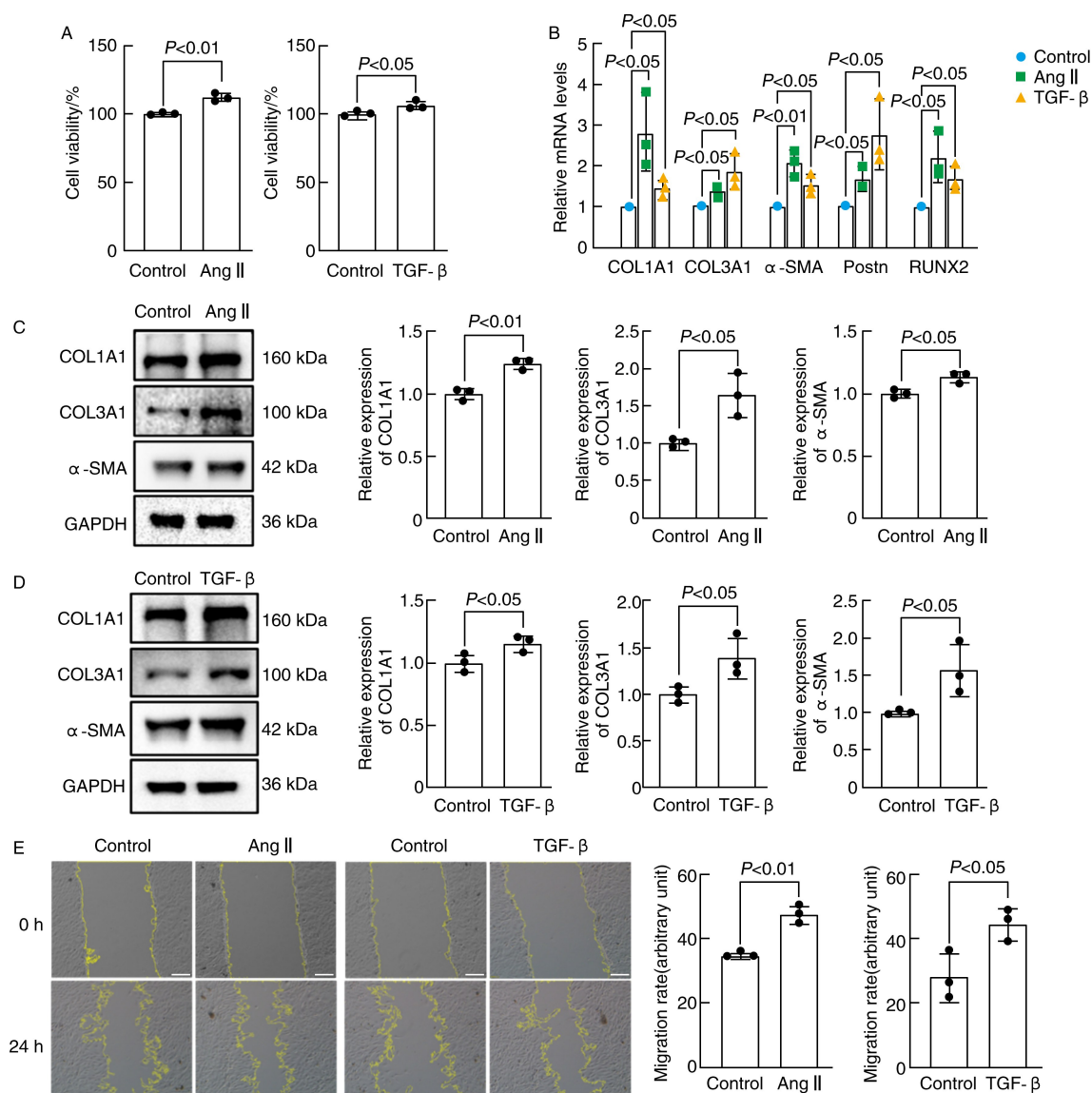


图 1. Ang II 和 TGF- β 诱导 RCF 向 MF 活化

A 为 CCK-8 检测 Ang II 和 TGF- β 处理后 RCF 活力的变化; B 为 RT-qPCR 检测 Ang II 和 TGF- β 处理后 RCF 中 COL1A1、COL3A1、 α -SMA、Postn 及 RUNX2 mRNA 表达; C、D 为 Western blot 检测 Ang II 和 TGF- β 处理后 RCF 中 COL1A1、COL3A1 及 α -SMA 蛋白表达; E 为细胞划痕实验检测 Ang II 和 TGF- β 处理后 RCF 迁移能力的变化。Bar=200 μ m, $n=3$ 。

Figure 1. Ang II and TGF- β induce RCF activation into MF

2.2 HDELN 的分离、提纯、鉴定与浓度筛选

采用差速离心法结合蔗糖密度梯度离心法从山楂中提取外泌体, 通过透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 观察其表面形貌, 可见 HDELN 呈典型的茶托型双层囊泡状 (图 2A); 利用纳米颗粒跟踪分析技术 (nanoparticle tracking analysis,

NTA) 检测 HDELN 的粒径并定量, 结果显示其颗粒大小较为均一, 主要分布在 50 ~ 200 nm 区间, 每 250 g 山楂可提取获得剂量为 10^{11} particles/mL 的 HDELN (图 2B)。Western blot 可检测出 HDELN 中的外泌体标志性蛋白 HSP70 和 TSG101 条带 (图 2C)。综上, HDELN 是一种大小均一、具有双层膜

结构的外泌体样纳米囊泡。用不同剂量 (10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 及 10^{11} particles/mL) 的 HDELN 处理 RCF 24 h 后, CCK-8 结果显示: 随着 HDELN 剂量增加, 细胞活力呈先上升后下降趋势, 其中 10^7 particles/mL 剂量可使细胞活力提升 18.17% ($P < 0.001$)。因此后续实验选取 10^7 particles/mL 的 HDELN 进行(图 2D)。

2.3 HDELN 可抑制 Ang II 或 TGF- β 诱导的 RCF 活化

RT-qPCR 结果显示, Ang II 或 TGF- β 可显著上调

RCF 中 COL1A1、COL3A1、 α -SMA、Postn 及 RUNX2 的 mRNA 表达水平, 而 HDELN 能有效降低上述基因的 mRNA 表达水平 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); Western blot 结果显示, Ang II 或 TGF- β 诱导后, RCF 中 COL1A1、COL3A1 和 α -SMA 的蛋白表达水平升高, HDELN 则可使上述蛋白的表达水平降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。细胞划痕实验结果表明, Ang II 或 TGF- β 诱导后 RCF 的迁移能力增强, 而 HDELN 能抑制其迁移能力 ($P < 0.05$; 图 3 和图 4)。

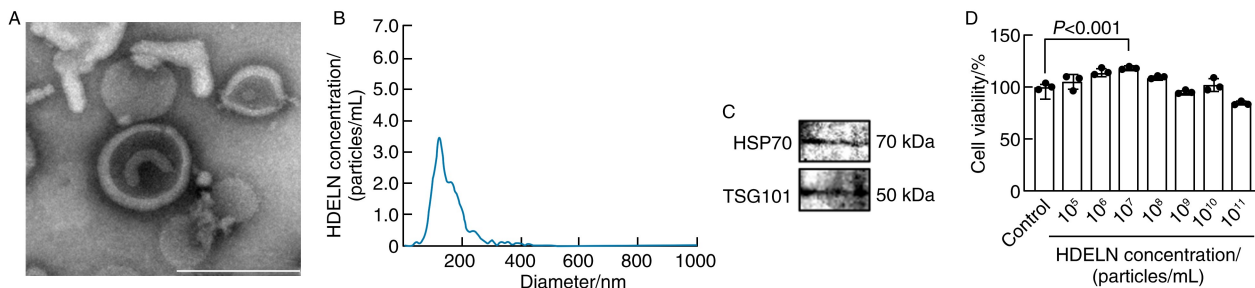


图 2. HDELN 的分离、提纯、鉴定与浓度筛选

A 为电镜下 HDELN 的双层囊泡状形态; B 为 NTA 检测 HDELN 的粒径; C 为 Western blot 检测 HDELN 的外泌体标志性蛋白; D 为 CCK-8 检测不同剂量的 HDELN 对细胞活力的影响。Bar = 200 μ m, $n = 3$ 。

Figure 2. Isolation, purification, identification and concentration screening of HDELN

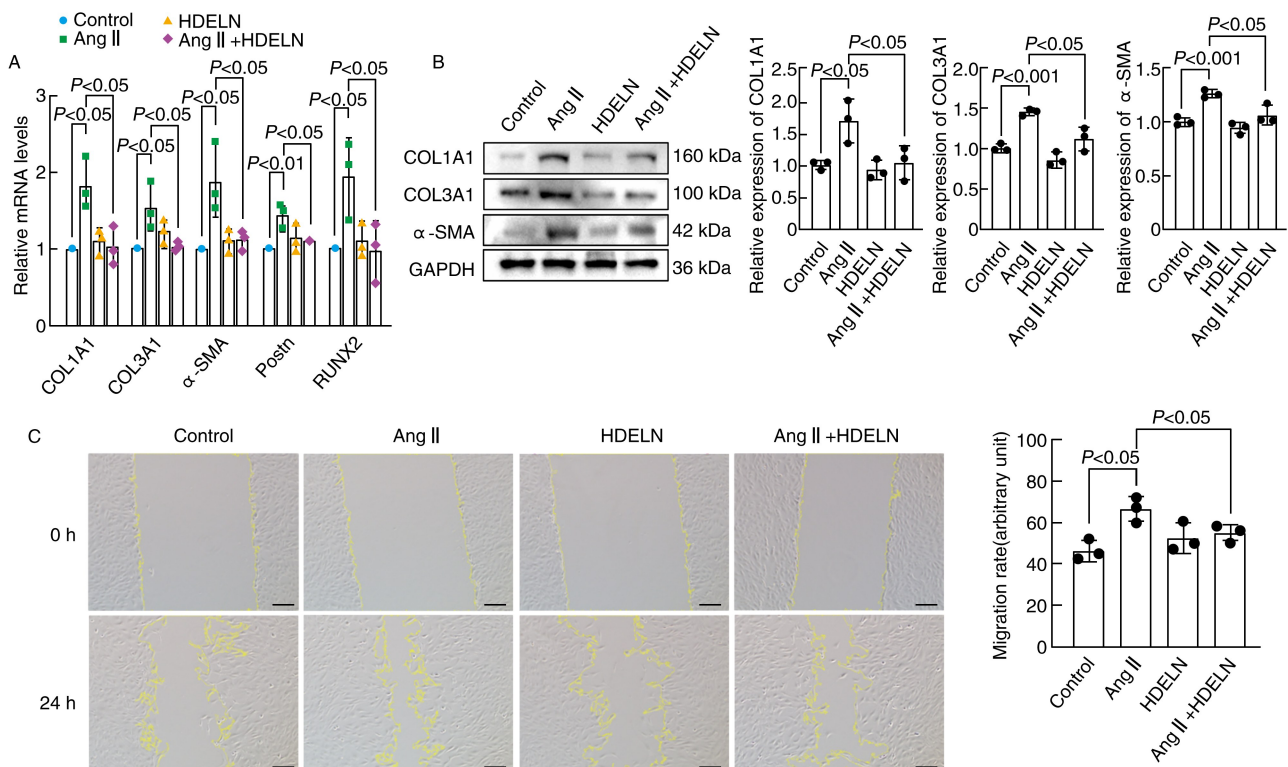


图 3. HDELN 可抑制 Ang II 诱导的 RCF 活化

A 为 RT-qPCR 检测 COL1A1、COL3A1、 α -SMA、Postn 及 RUNX2 mRNA 表达; B 为 Western blot 检测 COL1A1、COL3A1 和 α -SMA 蛋白表达; C 为细胞划痕实验检测 RCF 的迁移能力。Bar = 200 μ m, $n = 3$ 。

Figure 3. HDELN can inhibit Ang II-induced RCF activation

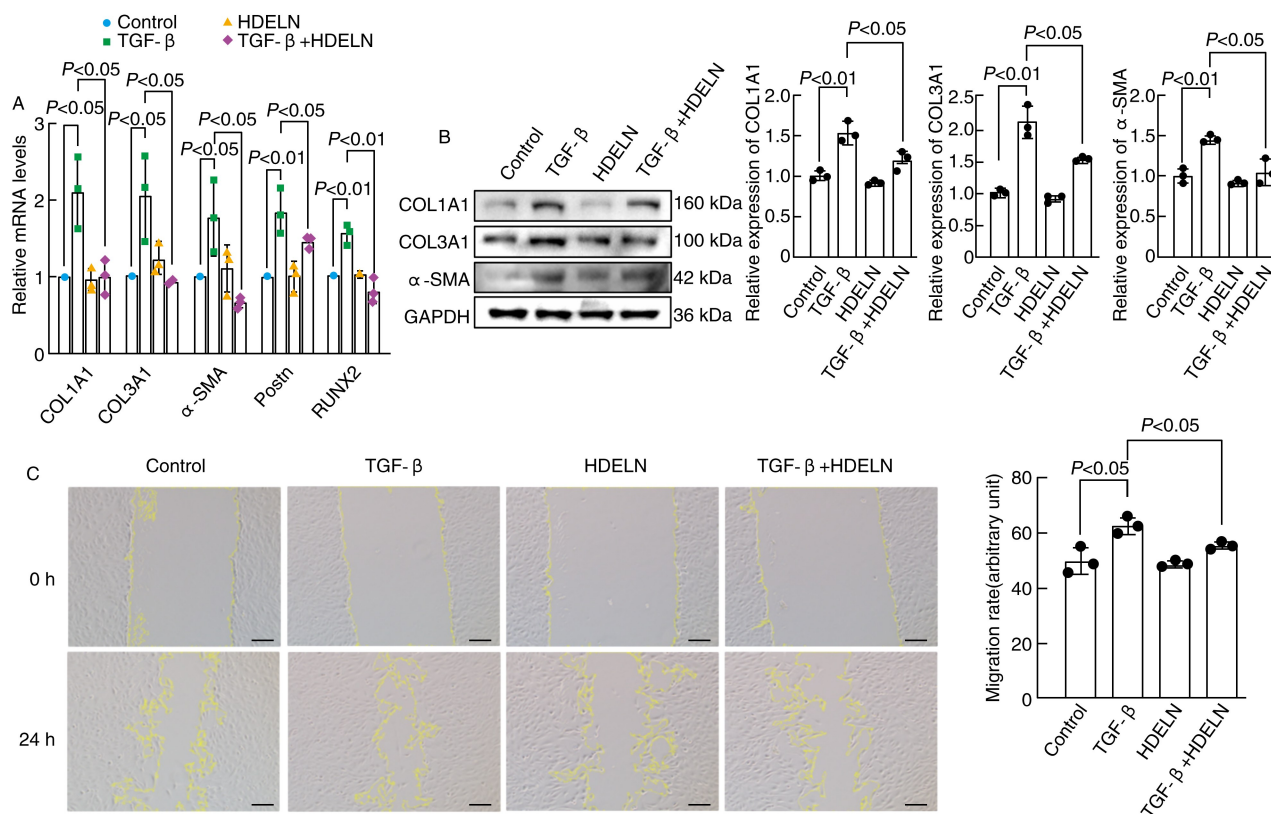


图 4. HDELN 可抑制 TGF-β 诱导的 RCF 活化

A 为 RT-qPCR 检测 COL1A1、COL3A1、α-SMA、Postn 及 RUNX2 mRNA 表达;B 为 Western blot 检测 COL1A1、COL3A1 和 α-SMA 蛋白表达;C 为细胞划痕实验检测 RCF 的迁移能力。Bar=200 μm, n=3。

Figure 4. HDELN can inhibit TGF-β-induced RCF activation

2.4 HDELN 的抑制效果可能涉及 SOX9 信号通路

Western blot 结果显示,经 Ang II 或 TGF-β 诱导 RCF 活化后,Ang II 使 RCF 中 SOX9 蛋白表达水平升高 125.11%,而 HDELN 则使其降低 105.82%;TGF-β 使 RCF 中 SOX9 蛋白表达水平升高 85.68%,而 HDELN 则使其降低 53.26% ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。同样地,RT-qPCR 结果显示,HDELN 能抑制 Ang II 和

TGF-β 引起的 SOX9 mRNA 表达水平升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。采用 3 个 si-SOX9 序列转染 RCF 后,通过 RT-qPCR 和 Western blot 验证转染效果,结果显示:阴性对照组 SOX9 表达无明显变化;经 si-481 序列转染后,RCF 中 SOX9 的 mRNA 表达水平降低 43.61%,蛋白表达水平降低 57.75% ($P<0.01$ 或 $P<0.0001$;图 5)。后续实验选用经 si-481 转染的 RCF 进行。

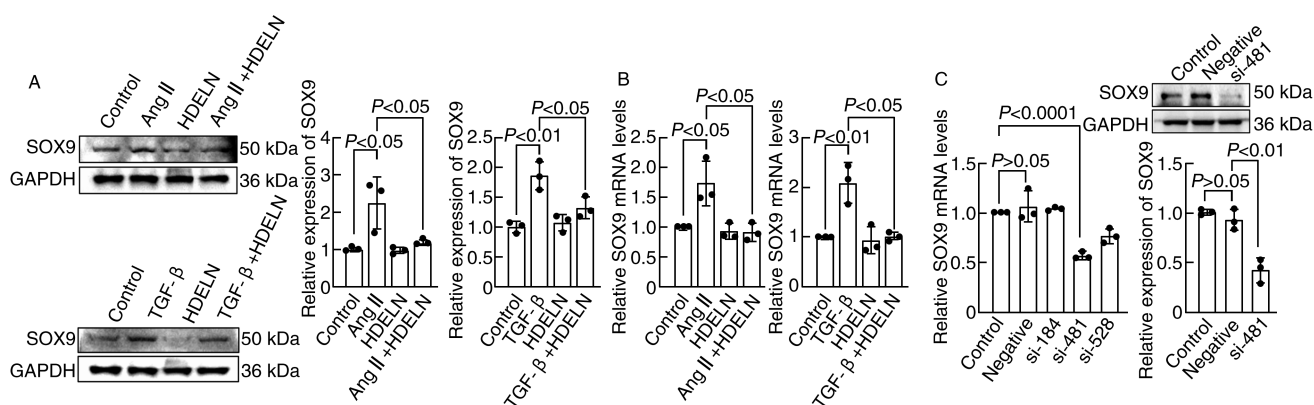


图 5. HDELN 的抑制效果可能涉及 SOX9 信号通路

A 为 Western blot 检测 RCF 中 SOX9 蛋白表达;B 为 RT-qPCR 检测 RCF 中 SOX9 mRNA 表达;C 为 RT-qPCR 和 Western blot 验证 siRNA 的转染效果。n=3。

Figure 5. The inhibitory effect of HDELN may involve the SOX9 signaling pathway

2.5 HDELN 通过抑制 SOX9 信号通路抑制 Ang II 或 TGF- β 诱导的 RCF 活化

RT-qPCR 结果显示,低表达 SOX9 的 RCF 中 COL1A1、COL3A1、 α -SMA、Postn 及 RUNX2 的 mRNA 表达水平显著低于正常 RCF; Ang II 或 TGF- β 可上调 si-SOX9-RCF 中上述活化相关基因的表达,而 HDELN 能抑制 Ang II 或 TGF- β 诱导的活化相关基因表达水平升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。细胞划痕实验结果表明,低表达 SOX9 的 RCF 迁移能力显著弱于正常 RCF;

Ang II 或 TGF- β 可增强 si-SOX9-RCF 的迁移能力,而 HDELN 能抑制 Ang II 或 TGF- β 诱导的迁移能力提升($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。Western blot 结果显示,低表达 SOX9 的 RCF 中 COL1A1、COL3A1 和 α -SMA 的蛋白表达水平显著低于正常 RCF; Ang II 或 TGF- β 可上调 si-SOX9-RCF 中上述活化相关蛋白的表达水平,而 HDELN 能抑制 Ang II 或 TGF- β 诱导的活化相关蛋白表达水平升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$;图 6 和图 7)。

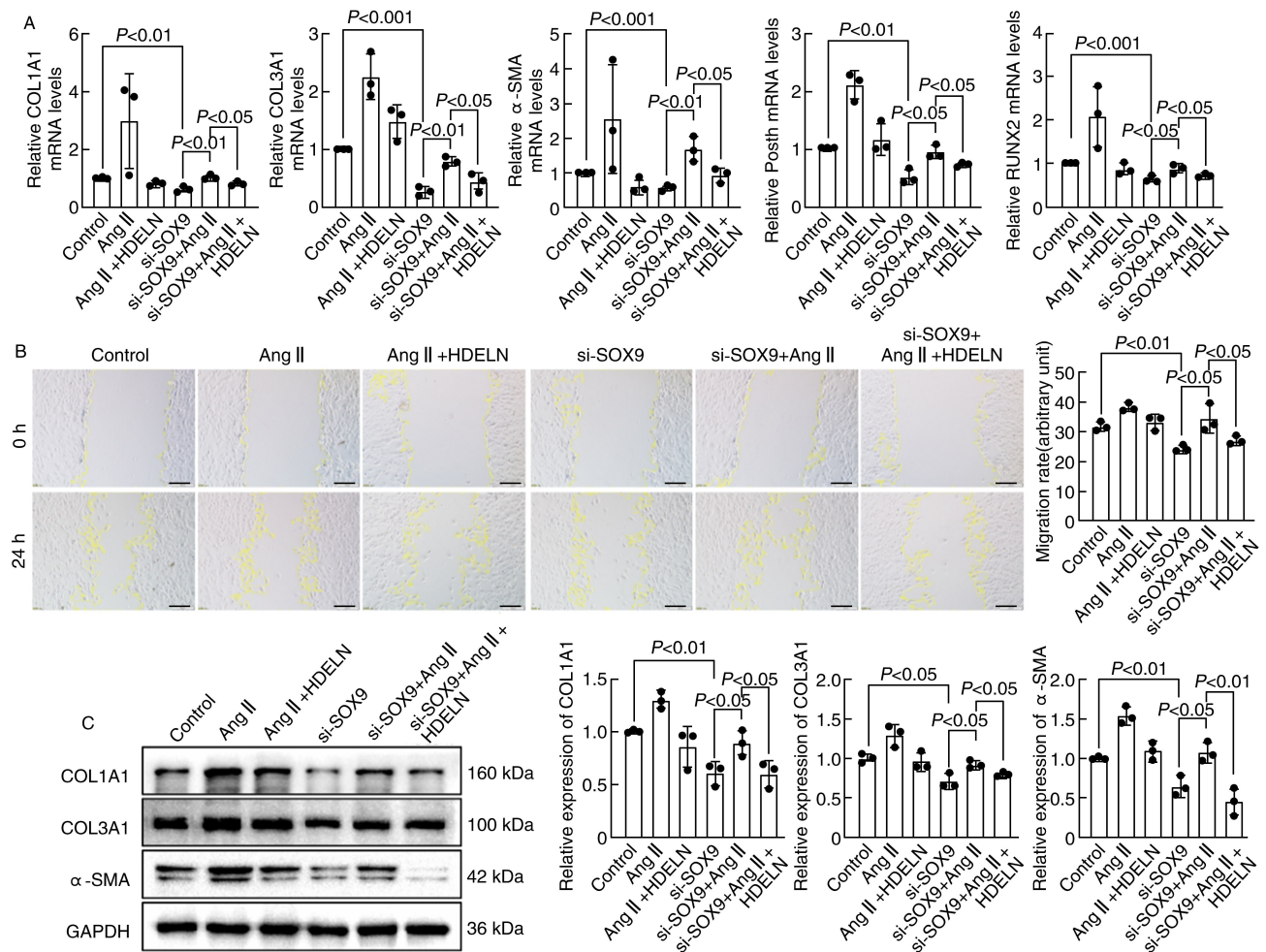


图 6. HDELN 通过抑制 SOX9 信号通路抑制 Ang II 诱导的 RCF 活化

A 为 RT-qPCR 检测活化相关基因的表达; B 为细胞划痕实验检测细胞迁移能力;

C 为 Western blot 检测细胞中活化相关蛋白的表达。Bar = 200 μ m, $n=3$ 。

Figure 6. HDELN inhibited Ang II-induced RCF activation by inhibiting the SOX9 signaling pathway

3 讨论

在心脏中,除心肌细胞外,通常还包含成纤维细胞、内皮细胞、巨噬细胞、肥大细胞及淋巴细胞等多种细胞,这些细胞间的相互作用共同维持着心脏的稳态。研究表明,Ang II 和 TGF- β 可通过刺激心

脏成纤维细胞增殖、抑制其凋亡、促进细胞迁移、诱导整合素表达、推动成纤维细胞向 MF 转化,并显著增加结构性 ECM 蛋白的合成,最终导致进行性心力衰竭的发生^[14]。I 型胶原蛋白和 III 型胶原蛋白的分泌是心肌纤维化的典型标志。I 型胶原蛋白与 III 型胶原蛋白的相对比例可能对心肌机械性能的

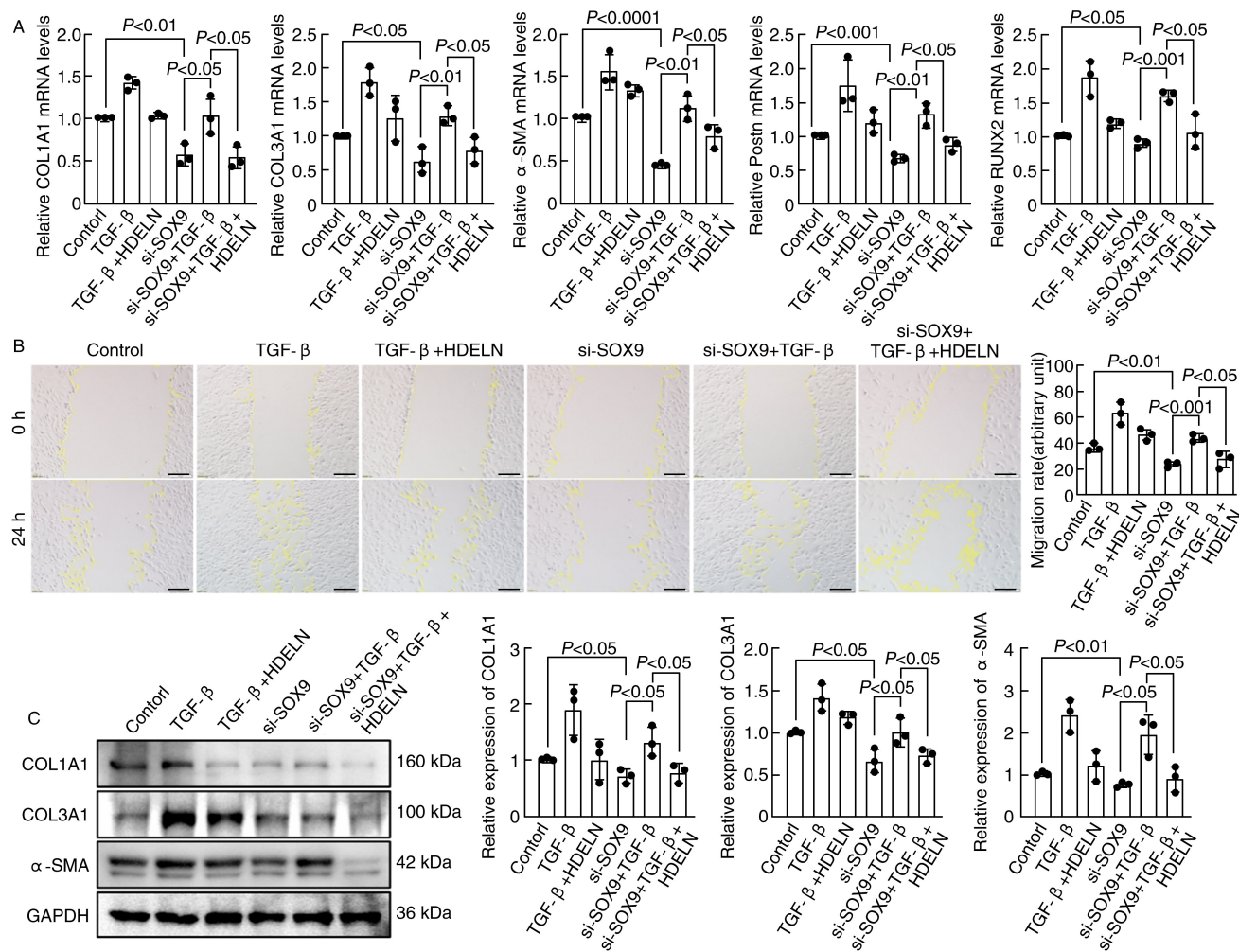


图 7. HDELN 通过抑制 SOX9 信号通路抑制 TGF-β 诱导的 RCF 活化

A 为 RT-qPCR 检测活化相关基因的表达;B 为细胞划痕实验检测细胞的迁移能力;

C 为 Western blot 检测细胞中活化相关蛋白的表达。Bar=200 μm, n=3。

Figure 7. HDELN inhibited TGF-β-induced RCF activation by inhibiting the SOX9 signaling pathway

调节具有重要作用。高血压心脏中 I 型胶原蛋白的持续加剧和长期上调被认为会增加心肌硬度^[15]。此外,扩张型心肌病患者 ECM 中 I 型胶原蛋白和 III 型胶原蛋白的富集,与心室顺应性降低密切相关^[16]。本研究通过 Ang II 或 TGF-β 处理 RCF 发现,这两种因子可显著上调 RCF 中 COL1A1、COL3A1、α-SMA、Postn 及 RUNX2 的表达,并增强其迁移能力。

目前临床上针对心肌纤维化的治疗方法多样,包括干细胞移植、免疫疗法以及血管紧张素受体抑制剂等药物治疗。然而,这些方法中的大多数需在临床前阶段进行极早期的干预,这对于已出现晚期纤维化病变的心力衰竭患者而言并不现实^[17]。因此,寻找能更有效抑制甚至逆转 RCF 活化的药物,仍是未来亟待解决的重要难题。山楂因其抗氧化、抗肿瘤、免疫调节等广泛的药用价值,一直备受关注^[18]。He 等^[19]研究表明,山楂提取物可凭借其抗

氧化与抗炎特性,减轻三甲胺-N-氧化物诱导的小鼠动脉粥样硬化进展。Kim 等^[20]研究发现,从山楂中提取的原花青素能通过一氧化氮途径降低高血压大鼠的血压。Kim 等^[21]证实,山楂中的金丝桃苷可通过激活 NF-κB 信号通路发挥抗炎作用。由此可见,山楂在心血管疾病治疗领域具有重要的研究价值。本研究发现, HDELN 可通过抑制 RCF 中 COL1A1、COL3A1、α-SMA、Postn 及 RUNX2 的表达,同时降低细胞迁移能力,从而抑制 RCF 的活化。SOX9 可调控软骨生成及睾丸、胆管与心脏的发育,在胚胎发育过程中发挥着至关重要的作用^[22]。SOX9 可调控 II 型胶原蛋白的转录,与多种器官纤维化的发生密切相关^[23]。研究发现,过表达 SOX9 的内皮细胞可引发包括心脏在内的多个器官发生纤维化并出现功能障碍^[24]。本研究发现, Ang II 和 TGF-β 可上调 RCF 中 SOX9 表达,而 HDELN 能够抑制这一由

Ang II 和 TGF- β 介导的 SOX9 表达上调。因此推测, HDELN 对 RCF 活化的抑制作用可能与 SOX9 信号通路有关。为了验证这个猜想, 本研究团队构建了 SOX9 低表达的 RCF 模型, 结果显示: 与正常 RCF 相比, SOX9 低表达 RCF 中活化相关基因及蛋白的表达水平均显著降低, 细胞迁移能力也明显减弱; Ang II 和 TGF- β 可重新诱导 SOX9 低表达 RCF 的活化, 而 HDELN 能够有效抑制这一活化过程。由此可见, HDELN 可通过抑制 SOX9 信号通路, 进而抑制 Ang II 和 TGF- β 诱导的 RCF 活化。

成纤维细胞活化兼具重要的保护与修复功能, 长期靶向此类通路可能存在安全性隐患, 完全抑制该反应或引发重大风险。因此, 如何将 HDELN 靶向递送至 RCF, 在抑制其活化的同时保障心脏结构完整, 是当前研究的难点之一。本研究团队后续计划在动物体内开展 HDELN 相关实验, 探索其在心肌梗死等心血管疾病全程发展中的作用及机制。

[参考文献]

- [1] KLEINBONGARD P, SENYO S E, LINDSEY M L, et al. Cardiac fibroblasts: answering the call [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2024, 327(3): H681-H686.
- [2] XU Z, ZHAO Y. Advances in targeting myocardial fibrosis: integrating mechanisms and therapeutics [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2026, 13: 1769016.
- [3] SHAMEEM M, OLSON S L, MARRON FERNANDEZ DE VELASCO E, et al. Cardiac fibroblasts: helping or hurting [J]. *Genes (Basel)*, 2025, 16(4): 381.
- [4] 努尔柯孜·阿卜杜合力力, 张莎, 吴弘. 血管壁细胞在动脉粥样硬化中的作用研究进展 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2025, 33(1): 85-92.
- [5] NUERKEZI A, ZHANG S, WU H. Research progress of vascular wall cells in atherosclerosis [J]. *Chin J Arterioscler*, 2025, 33(1): 85-92.
- [6] TURNER N A. Inflammatory and fibrotic responses of cardiac fibroblasts to myocardial damage associated molecular patterns (DAMPs) [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2016, 94: 189-200.
- [7] DAVIS J, BURR A R, DAVIS G F, et al. A TRPC6-dependent pathway for myofibroblast transdifferentiation and wound healing *in vivo* [J]. *Dev Cell*, 2012, 23(4): 705-715.
- [8] OSORIO J M, ESPINOZA-PÉREZ C, RIMASSA-TARÉ C, et al. Senescent cardiac fibroblasts: a key role in cardiac fibrosis [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2023, 1869(4): 166642.
- [9] MONTIEL V, BELLA R, MICHEL L Y M, et al. Inhibition of aquaporin-1 prevents myocardial remodeling by blocking the transmembrane transport of hydrogen peroxide [J]. *Sci Transl Med*, 2020, 12(564): eaay2176.
- [10] PARK H, PARK B, KIM K S, et al. Effects of proton therapy on cardiac fibrosis, calcium homeostasis, and AQP4 expression in hypergravity-exposed rats [J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(13): 6326.
- [11] ZUO Y, ZHANG J, WANG X, et al. Plant-derived exosome-like nanovesicles: dual-function platforms for anticancer therapy and drug delivery [J]. *J Transl Med*, 2026, 24(1): 77.
- [12] BAI C, LIU J, ZHANG X, et al. Research status and challenges of plant-derived exosome-like nanoparticles [J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 174: 116543.
- [13] KEPINSKA-PACELIK J, BIEL W. Hawthorn (*Crataegus monogyna Jacq.*): a review of therapeutic potential and applications [J]. *Molecules*, 2026, 31(2): 226.
- [14] FENG Y C, GAO S, ZHU T, et al. Hawthorn fruit acid consumption attenuates hyperlipidemia-associated oxidative damage in rats [J]. *Front Nutr*, 2022, 9: 936229.
- [15] PEIKERT A, FONTANA M, SOLOMON S D, et al. Left ventricular hypertrophy and myocardial fibrosis in heart failure with preserved ejection fraction: mechanisms and treatment [J]. *Eur Heart J*, 2026, 47(1): 37-53.
- [16] CHEN W, LIU L, TANG M, et al. Type I collagen-targeted liposome delivery of Serca2a modulates myocardium calcium homeostasis and reduces cardiac fibrosis induced by myocardial infarction [J]. *Mater Today Bio*, 2024, 28: 101162.
- [17] ZHAO L, LIU H, GAO R, et al. Brown adipose stem cell-loaded resilin elastic hydrogel rebuilds cardiac function after myocardial infarction via collagen I/III reorganisation [J]. *Gels*, 2024, 10(9): 568.
- [18] KAN H, WANG P, YANG Y, et al. Apigenin inhibits proliferation and differentiation of cardiac fibroblasts through AKT/GSK3 β signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 334: 118518.
- [19] CUI M, CHENG L, ZHOU Z, et al. Traditional uses, phytochemistry, pharmacology, and safety concerns of hawthorn (*Crataegus genus*): a comprehensive review [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 319 (Part 2): 117229.
- [20] HE Z, KWEK E, HAO W, et al. Hawthorn fruit extract reduced trimethylamine-N-oxide (TMAO)-exacerbated atherogenesis in mice via anti-inflammation and anti-oxidation [J]. *Nutr Metab (Lond)*, 2021, 18(1): 6.
- [21] KIM S H, KANG K W, KIM K W, et al. Procyanidins in crataegus extract evoke endothelium-dependent vasorelaxation in rat aorta [J]. *Life Sci*, 2000, 67(2): 121-131.
- [22] KIM S J, UM J Y, LEE J Y. Anti-inflammatory activity of hyperoside through the suppression of nuclear factor- κ B activation in mouse peritoneal macrophages [J]. *Am J Chin Med*, 2011, 39(1): 171-181.
- [23] MOLIN A N, CONTENTIN R, ANGELOZZI M, et al. Skeletal growth is enhanced by a shared role for SOX8 and SOX9 in promoting reserve chondrocyte commitment to columnar proliferation [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2024, 121(8): e2316969121.
- [24] BELL D M, LEUNG K K, WHEATLEY S C, et al. SOX9 directly regulates the type-II collagen gene [J]. *Nat Genet*, 1997, 16(2): 174-178.
- [25] TROGISCHE F A, ABOUJISSA A, KELES M, et al. Endothelial cells drive organ fibrosis in mice by inducing expression of the transcription factor SOX9 [J]. *Sci Transl Med*, 2024, 16(736): eabq4581.

(此文编辑 文玉珊)