

· 基础研究 ·

白藜三醇通过调控 AUF1 抑制心肌成纤维细胞的增殖及胶原分泌

钱云, 魏叶, 张风云, 张尧, 胡晓芹, 李承宗, 张超群, 王志荣*

徐州医科大学附属医院心内科, 江苏 徐州 221002

[摘要] 目的: 研究白藜三醇(resveratrol, Res)对乳鼠心肌成纤维细胞(cardiac fibroblasts, CFs)增殖和胶原分泌的影响, 并探讨其可能的机制。方法: 采用胰酶、I型胶原酶双酶消化法、差速贴壁法和免疫荧光法分离培养及鉴定乳鼠CFs; 将2~3代CFs随机分为Con组(正常对照组)、DMSO组(溶剂对照组)、Ang II组(模型组)、Ang II+Res组(药物干预组)。通过CCK-8及EdU染色法检测细胞增殖; 羟脯氨酸法检测细胞胶原分泌水平; qRT-PCR检测AU碱基富集区RNA结合蛋白1(AU-rich element RNA-binding factor 1, AUF1)、转化生长因子 β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)mRNA的表达; Western blot检测AUF1和TGF- β 1蛋白表达。结果: 成功提取新生大鼠原代CFs且波形蛋白(Vimentin)显著阳性; 与Con组比, Ang II组细胞增殖和胶原分泌增加, AUF1、TGF- β 1 mRNA及蛋白表达水平升高; 经Res干预后, Ang II+Res组细胞增殖和胶原分泌水平较Ang II组降低, AUF1、TGF- β 1 mRNA及蛋白表达减少; 而DMSO组上述指标与Con组相比差异无统计学意义。结论: 白藜三醇对Ang II诱导的乳鼠CFs的增殖和胶原分泌具有抑制作用, 其机制可能与抑制了AUF1和TGF- β 1的表达有关。

[关键词] 白藜三醇; AUF1; Ang II; 心肌纤维化; 心肌成纤维细胞

[中图分类号] R329.26

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2019)08-1118-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20190805

The inhibitory effect of resveratrol on proliferation and collagen secretion of cardiac fibroblasts by regulating AUF1

Qian Yun, Wei Ye, Zhang Fengyun, Zhang Yao, Hu Xiaoqin, Li Chengzong, Zhang Chaoqun, Wang Zhirong*

Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou 221002, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to investigate the effect of resveratrol (Res) on proliferation and collagen secretion in neonatal rat cardiac fibroblasts (CFs) and its possible mechanism. **Methods:** Neonatal rat CFs were isolated and identified by double enzyme digestion method, differential adhesion method and immunofluorescence from Sprague-Dawley rats born 1 day to 3 days. Two to three generations of CFs were randomly divided into four groups: Con (the normal control group), DMSO (the solvent control group), Ang II (the model group), Ang II + Res (the drug intervention group). Then CCK8 and EdU staining kit were both used to detect cellular proliferation. Level of the cellular collagen secretion was measured by Hydroxyproline test kit. Moreover, the mRNA expression of AU-rich element RNA-binding factor 1 (AUF1) and transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) were examined by RT-qPCR, and the protein expression of AUF1 and TGF- β 1 were detected by Western blot. **Results:** CFs were successfully extracted from SD rats and Vimentin was positive obviously. Compared with Con group, cellular proliferation and collagen secretion increased in Ang II group; the mRNA and protein expression of AUF1 and TGF- β 1 increased as well. After the intervention of Res, Ang II + Res group had significantly lower cell proliferation and collagen secretion level than Ang II group; the mRNA and protein expression of AUF1 and TGF- β 1 decreased as well. There was no statistically significant difference between the above indicators in the DMSO group and the Con group. **Conclusion:** Res can inhibit Ang II-induced proliferation and collagen secretion of cardiac fibroblasts, which may be related to the suppression of AUF1 and TGF- β 1 expression.

[Key words] resveratrol; AUF1; Ang II; myocardial fibrosis; cardiac fibroblast

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(08): 1118-1123, 1141]

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金(81700231)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: xzzrw@163.com

目前,越来越多的证据表明在心力衰竭、心律失常和心肌病等心血管疾病中均可以观察到不同程度的心肌纤维化。心脏组织结构出现心肌成纤维细胞(cardiac fibroblasts, CFs)异常增殖,胶原纤维过量沉积,胶原含量增多或各型胶原比例失衡及排列紊乱的病理改变,致使心脏顺应性降低,严重影响心脏舒缩功能^[1]。血管紧张素Ⅱ(angiotensin Ⅱ, Ang Ⅱ)作为肾素-血管紧张素系统中活性最强的效应分子,是心肌纤维化重要的致病因子之一。因此,有效防治 Ang Ⅱ 诱导的心肌纤维化对延缓心血管疾病进展具有重要的临床意义。体外研究 Ang Ⅱ 诱导的 CFs 增殖及胶原分泌机制是探讨心肌纤维化的重要途径。

白藜三醇(resveratrol, Res)是植物在恶劣环境下产生的一种非黄酮类多酚化合物,又被称为“植物雌激素”。大量研究表明,Res具有心血管保护作用,其机制可能涉及抗氧化应激、抗炎、抗细胞凋亡等^[2]。AU碱基富集区RNA结合蛋白1(AU-rich element RNA-binding factor 1, AUF1)结合靶信使RNA(messenger ribonucleic acid, mRNA)3'-非翻译区(3'-UTR)的AU聚集区(AREs),使mRNA去稳定降解,发挥转录后负调控基因表达的作用,成为疾病机制研究的重要切入点。研究报道AUF1的表达与肾间质纤维化有关^[3]。然而关于AUF1在心肌纤维化过程中发挥的作用尚不清楚。本研究使用Ang Ⅱ诱导CFs模拟心肌纤维化的发病机制,建立心肌纤维化细胞培养模型。研究Res对Ang Ⅱ诱导的CFs增殖和胶原分泌的影响,探讨AUF1在心肌纤维化过程中发挥的作用及可能机制,为心肌纤维化的预防和治疗寻找新靶点。

1 材料和方法

1.1 材料

实验用清洁级新生SD大鼠(1~3 d),雌雄不限,由徐州医科大学实验动物中心提供[许可证号:SYXH(su)2002-0038]。

Res(Sigma公司,美国);Ang Ⅱ(MCE公司,美国);DMEM培养基(Hyclone公司,美国);胎牛血清(Clark公司,美国);羟脯氨酸试剂盒(南京建成公司);EdU细胞增殖检测试剂盒(广州锐博公司);Cell Counting Kit-8(CCK-8)购自日本同仁化学研究所;Vimentin抗体、AUF1抗体、GAPDH抗体、山羊抗鼠抗体、山羊抗兔抗体均购自美国Proteintech公司;转化生长因子 β 1(transforming growth factor- β 1, TGF-

β 1)抗体(Affinity公司,美国);AUF1、TGF- β 1、GAPDH引物(上海生工公司);其他化学试剂均为市售分析纯。

1.2 方法

1.2.1 原代大鼠CFs的分离制备与培养

取1~3日龄的SD乳鼠,采用胰酶、I型胶原酶双酶消化法和差速贴壁法分离培养乳鼠原代心肌成纤维细胞。具体操作参考文献并进行改进^[2,4]。CFs生长接近85%~90%融合时,按1:3传代培养,本实验采用2~3代CFs进行后续实验。

实验分为Con组、DMSO组、Ang Ⅱ组、Ang Ⅱ+Res组共4组。Con组为正常培养;DMSO组加入与Ang Ⅱ+Res组等量的DMSO溶剂培养;Ang Ⅱ组加入 1×10^{-6} mol/L Ang Ⅱ及DMSO溶剂处理48 h;Ang Ⅱ+Res组加入 5×10^{-5} mol/L Res预处理30 min后,再加入 1×10^{-6} mol/L Ang Ⅱ共处理48 h。我们前期研究中已证实,Res处理CFs最佳药物浓度及时间分别为 5×10^{-5} mol/L、48 h,即Res无细胞毒性的最大药物剂量以保证药物的安全性和有效性^[4]。所有细胞在分组处理前更换无血清培养基过夜,使细胞处于静止生长(G0/G1)期。

1.2.2 CFs鉴定

将CFs接种到预先放有无菌载玻片的24孔板中,待细胞充分贴壁后,依次进行4%多聚甲醛固定、0.3% TritonX-100透膜、5%山羊血清封闭、Vimentin抗体(1:100)4℃过夜、荧光二抗避光孵育,最后DAPI染核,抗淬灭封片后荧光显微镜(Olympus公司,日本)下观察,计算成纤维细胞纯度。

1.2.3 CCK-8检测CFs的增殖

取2~3代处于对数生长期的CFs,按 1×10^4 个/孔接种96孔板,待细胞生长至70%~80%融合时,根据上述分组处理细胞,每组设5个复孔。避光条件下每孔加入100 μ L含CCK8的培养基(1:10),37℃5%CO₂避光孵育4 h。酶标仪(Bio-Rad公司,美国)测量每孔450 nm波长处的吸光度值,以未接种细胞的培养基调零。细胞增殖率=各干预组吸光度值的平均值/对照组吸光度值的平均值,对照组设为参考值100%,其余各组与之的相对比即为增殖相对比率。

1.2.4 EdU检测CFs的增殖

取2~3代处于对数生长期的CFs,按 1×10^5 个/孔接种于24孔板,待细胞生长至70%~80%融合时,同上述分组处理细胞,按照EdU试剂盒说明书标记EdU阳性的细胞核及非特异性细胞核。在荧光倒置显微镜下观察,计算每组EdU阳性细胞数占细胞总

数的比例与Con组EdU阳性细胞数占细胞总数的比例之比。

1.2.5 羟脯氨酸消化法检测细胞培养液中胶原水平

按照上述实验分组处理细胞后,收集细胞培养液,根据消化法试剂盒说明书进行操作,以双蒸水调零,酶标仪测各组培养液上清550 nm处吸光度值。羟脯氨酸含量($\mu\text{g/mL}$)=(实验组培养液上清的吸光度值-空白管上清吸光度值)/(标准品上清吸光度值-空白管上清吸光度值) \times 标准品浓度($5 \mu\text{g/mL}$) \times 各组样本稀释倍数。

1.2.6 qRT-PCR检测各组CFs中AUF1、TGF- β 1 mRNA水平

按实验分组处理细胞,TRIzol抽提各组细胞总RNA,以DEPC水为空白调零,测各组RNA浓度及纯度。使用FastQuant RT kit(北京天根公司)逆转录成cDNA后,SuperReal Premix Plus(SYBR Green)试剂盒(北京天根公司)以cDNA作为模板进行PCR检测。GAPDH为内参, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算AUF1 mRNA、TGF- β 1 mRNA水平。相关引物序列信息见表1。所有操作均按照说明书进行。

表1 PCR引物序列

Table 1 PCR primer sequences

基因	引物序列(5'→3')
AUF1	F:GCTGATACTGCTCCTTCG
	R:TTGTTGGTGGCCTTTCTC
TGF- β 1	F:TGAAGCGAAAGCCCTGTA
	R:CCCACTGATACGCCTGAG
GAPDH	F:TCTCTGCTCCTCCCTGTTC
	R:ACACCGACCTTCACCATCT

1.2.7 Western blot检测各组CFs中AUF1、TGF- β 1蛋白水平

按实验分组处理细胞,根据细胞生长情况加入适量蛋白裂解液,冰上充分裂解并收集蛋白上清。受热变性的蛋白样本经电泳、电转、封闭后分别进行一抗AUF1(1:500)、TGF- β 1(1:1000)、GAPDH(1:5000)4℃过夜,洗膜,室温孵育二抗(1:10000)。ECL显色,化学发光成像系统观察及拍照,Image J软件分析蛋白条带灰度值,结果以各组目的蛋白与内参GAPDH表达量的比值表示蛋白表达水平。

1.3 统计学方法

采用GraphPad Prism 5.0统计分析软件对实验数据进行分析,计量资料均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组之间的差异比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),两两比较采用 q 检验。 $P \leq 0.05$ 为差

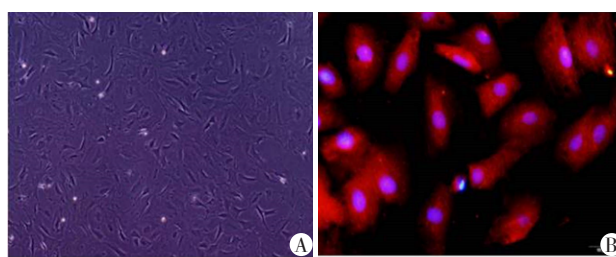
异有统计学意义。

2 结果

2.1 CFs形态特征及鉴定

倒置显微镜下观察,细胞呈贴壁状态且无自发性搏动,2~3 d内即可生长至融合状态。CFs的形态独特,多呈梭形或不规则的多边形,胞体较大,向外伸出突起;细胞核明显,呈卵圆形,轮廓清晰;细胞间排列均匀致密,部分可重叠交叉。所获细胞形态特征与此一致(图1A)。

波形蛋白(Vimentin)作为一种中间纤维,主要存在于间质细胞中,被认为是中胚层起源细胞(如白细胞和成纤维细胞)的特征性标志。在心脏中仅CFs为间质细胞,因此Vimentin可以作为鉴定CFs的标记物。免疫荧光鉴定前述方法培养的CFs,可见围绕细胞核的红色丝状网络状结构,即细胞内Vimentin表达为阳性。蓝色部分为DAPI染核情况。随机计数5个视野,结果显示Vimentin阳性细胞的数量占细胞总数的95%以上,表明所获细胞可用于后续实验(图1B)。



A:倒置显微镜($\times 100$);B:免疫荧光鉴定($\times 400$)。

图1 CFs形态特征及鉴定

Figure 1 Morphology and identification of CFs

2.2 Res对Ang II诱导的CFs增殖的影响

CCK-8检测Ang II及Res对CFs增殖的影响。结果显示,Ang II处理组细胞吸光度值高于正常对照组($P < 0.05$,表2);Ang II+Res组细胞吸光度值则较Ang II处理组降低($P < 0.05$,表2);DMSO溶剂处理后细胞吸光度值与Con组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

EdU染色用于检测各组CFs的增殖情况,在荧光显微镜下观察,视野中的蓝色区域为非特异性细胞核着色,可用于计数视野中的细胞总数;红色部分为EdU标记正在复制的DNA,EdU阳性率可代表细胞增殖率。结果显示,与Con组比较, $1 \times 10^{-6} \text{mol/L}$ Ang II作用48 h后CFs EdU阳性率升高($P < 0.01$,图2);加入 $5 \times 10^{-5} \text{mol/L}$ Res处理后,与Ang II组比较

表2 Res对Ang II诱导的CFs增殖的影响

Table 2 The effect of Res on Ang II -induced proliferation in CFs (n=5, $\bar{x} \pm s$)

组别	吸光度值	细胞增殖率(%)
Con组	0.25 ± 0.02	100.00 ± 8.41
DMSO组	0.26 ± 0.02	102.31 ± 9.39
Ang II组	0.54 ± 0.04*	215.76 ± 15.39*
Ang II +Res组	0.31 ± 0.03#	122.32 ± 10.75#

与Con组比较,*P < 0.05;与Ang II组比较,#P < 0.05。

CFs EdU阳性率明显降低(P < 0.01,图2);并且用溶解Res所需要的等量DMSO溶剂处理CFs,细胞EdU阳性率较Con组差异无统计学意义(P > 0.05)。

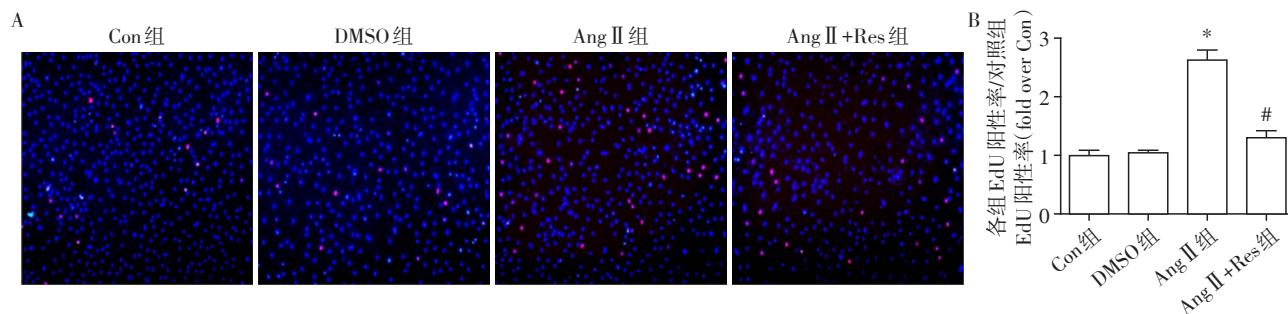
2.3 Res对Ang II诱导的CFs胶原分泌的影响

胶原蛋白中羟脯氨酸约占13.4%,仅有极少量

存在于弹性蛋白中,并且不存在于其他蛋白质中,因此细胞上清液中的羟脯氨酸含量可用于反映CFs胶原分泌水平。结果显示,与Con组相比,Ang II处理组CFs胶原分泌增加(P < 0.01,图3);Res干预后,CFs胶原分泌水平较Ang II组降低(P < 0.01,图3),且DMSO组细胞胶原分泌水平与Con组相比差异无统计学意义(P > 0.05)。

2.4 Res对Ang II诱导的CFs中AUF1表达的影响

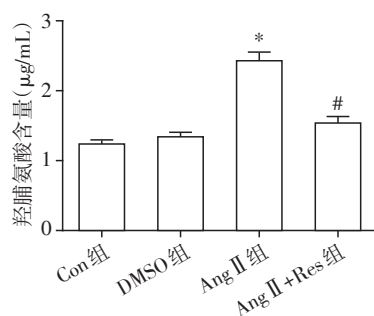
qRT-PCR检测Ang II及Res对CFs中AUF1 mRNA表达的影响(图4A),结果显示,Ang II组AUF1 mRNA水平较Con组升高(P < 0.01),而DMSO组AUF1 mRNA表达量与Con组相比差异无统计学意义(P > 0.05);与Ang II组比较,Ang II +Res组CFs中AUF1 mRNA表达水平下调(P < 0.01)。Western



A: Edu染色结果($\times 100$); B: 各组Edu阳性率比较;与Con组比较,*P < 0.01;与Ang II组比较,#P < 0.01(n=3)。

图2 Res对Ang II诱导的CFs增殖的影响

Figure 2 The effect of Res on Ang II -induced proliferation of CFs



与Con组比较,*P < 0.01;与Ang II组比较,#P < 0.01(n=3)。

图3 Res对Ang II诱导的CFs胶原分泌的影响

Figure 3 The effect of Res on Ang II -induced collagen secretion of CFs

blot检测Ang II及Res对CFs中AUF1蛋白表达的影响(图4B),结果显示,与Con组比较,Ang II组AUF1蛋白表达增加(P < 0.01);Ang II +Res组较Ang II组AUF1蛋白表达降低(P < 0.01);Res的溶剂DMSO处理组与Con组相比,AUF1蛋白表达水平的差异无统计学意义(P > 0.05),排除了等量的DMSO溶剂对实

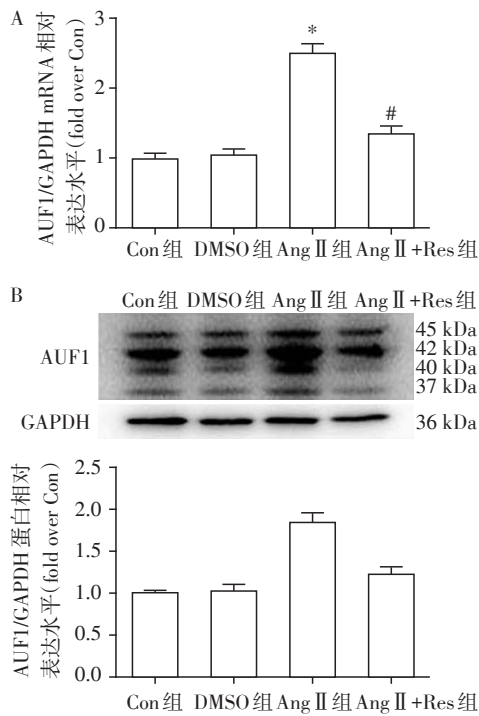
验结果的影响。

2.5 Res对Ang II诱导的CFs中TGF-β1表达的影响

qRT-PCR检测Ang II及Res对CFs中TGF-β1 mRNA表达的影响(图5A)。结果显示,Ang II组较Con组CFs中TGF-β1 mRNA表达增加(P < 0.01);DMSO组TGF-β1 mRNA的表达较Con组差异无统计学意义(P > 0.05);与Ang II组比较,Ang II +Res组CFs中TGF-β1 mRNA的表达减少(P < 0.01)。Western blot检测Ang II及Res对CFs中TGF-β1蛋白表达的影响(图5B)。结果显示,Ang II组CFs中TGF-β1蛋白的表达水平较Con组上调(P < 0.01),并且Ang II +Res组与Ang II组比较,TGF-β1蛋白表达降低(P < 0.01),而DMSO组与Con组相比,CFs中TGF-β1蛋白表达差异无统计学意义(P > 0.05)。

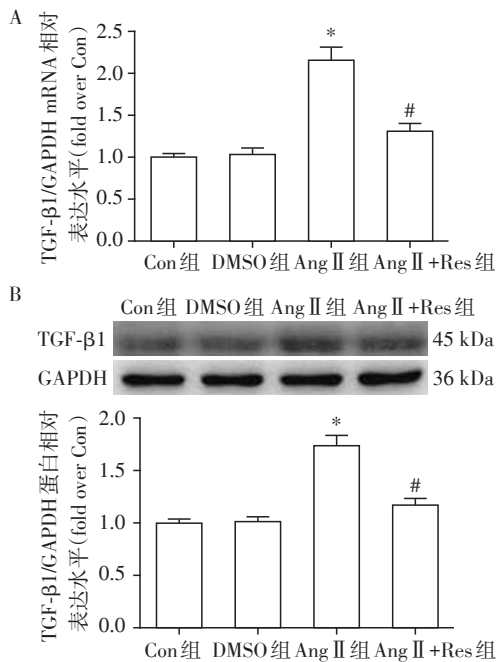
3 讨论

心肌纤维化被认为是心脏损伤修复的重要机



A: qRT-PCR 检测 AUF1 mRNA 的表达,以 GAPDH 为内参;B: Western blot 检测 AUF1 蛋白的表达,以 GAPDH 为内参。与 Con 组比较, * $P < 0.01$; 与 Ang II 组比较, # $P < 0.01$ ($n=3$)。

图 4 Res 对 Ang II 诱导的 CFs 中 AUF1 表达的影响
Figure 4 The effect of Res on AUF1 expression induced by AngII in CFs



A: qRT-PCR 检测 TGF-β1 mRNA 的表达,以 GAPDH 为内参;B: Western Blot 检测 TGF-β1 蛋白的表达,以 GAPDH 为内参。与 Con 组比较, * $P < 0.01$; 与 Ang II 组比较, # $P < 0.01$ ($n=3$)。

图 5 Res 对 Ang II 诱导的 CFs 中 TGF-β1 表达的影响
Figure 5 The effect of Res on TGF-β1 expression induced by Ang II in CFs

制之一,主要表现为 CFs 转分化增殖和细胞外基质合成沉积的增多,形成瘢痕组织以维持完整的心脏结构^[5]。然而,过度的心肌纤维化导致器官功能障碍,是心律失常以及心力衰竭进展的关键因素之一,其调控过程可能会成为防治心律失常和心力衰竭的新方向。

Res 存在于多种植物的茎和叶中,已被证实可以调节脂肪细胞、血小板活性,减轻氧化应激损伤,发挥心血管保护作用。越来越多的证据表明 Ang II 是最重要的致心肌纤维化细胞因子之一^[6]。为了探究 Res 对心肌纤维化的影响,本研究采用 Ang II 处理 CFs 建立心肌纤维化细胞培养模型,发现 Ang II 可以显著诱导 CFs 的增殖和胶原分泌。在培养基中加入 Res 干预后,其逆转了 Ang II 诱导的 CFs 增殖和胶原分泌。结果显示 Res 对于 Ang II 诱导的 CFs 增殖和胶原分泌具有抑制作用。

编码 AUF1 蛋白的基因名为 hnRNP D,属于 4 号常染色体长臂(4q21)基因组的一员,在转录翻译过程中被选择性剪切而产生 4 个亚型,根据分子量大小分别被称为 p37AUF1、p40AUF1、p42AUF1 和 p45AUF1^[7]。AREs 是调控 mRNA 稳定性的最重要的非翻译区序列之一。AUF1 能够与 AREs 特异性识别结合,使目标 mRNA 失稳定降解,进而在转录后水平调控基因表达^[8]。近年来越来越多的研究发现 AUF1 的表达参与了机体多种疾病的发生发展,并且其在心血管疾病中的影响也逐渐受到人们重视。在一项关于肾间质纤维化的研究中发现,AUF1 通过促进 Smad2/3 的负性蛋白 Nedd4L mRNA 降解,从而上调 TGF-β1/Smads 信号转导,促进肾间质纤维化的形成^[3]。然而,AUF1 是否参与了心肌纤维化过程的调控,尚鲜有报道。已证实在心力衰竭和 Ang II 诱导的心肌肥厚模型中 AUF1 的表达均较正常对照组升高^[9],可能与 β-肾上腺素能持续激动有关。在细胞水平的研究中发现,Ang II 诱导的心肌细胞离子通道蛋白的减少与 AUF1/SERCA2a mRNA^[10]、AUF1/Kv4.3 mRNA^[11] 靶向失稳定有关,而该现象能够被 NADPH 氧化酶抑制剂在一定程度上逆转。以上研究结果表明,AUF1 的异常表达可能参与了心脏重构过程(包括结构重构和电重构),并且能够被抗氧化逆转。已被证实抗氧化、减轻氧化应激损伤是 Res 发挥心血管保护作用的主要机制之一^[2]。因此,AUF1 可能也是 Res 发挥生物学效应的重要靶点之一。为了验证这一推测,本研究在 Ang II 刺激 CFs 模型中发现,Ang II 可以显著增加 CFs 中 AUF1 的表

达,同时CFs增殖和胶原分泌增加;Res的干预则降低了Ang II诱导的AUF1的表达水平,CFs增殖和胶原分泌减少。Res抑制CFs增殖和胶原分泌的作用可能与AUF1下调有关。有研究已证实,AUF1通过与转录因子MEF2C及细胞周期调控蛋白相互作用,促进成肌细胞的增殖与分化^[12-13]。另外,基因沉默技术敲低AUF1后细胞增殖与迁移能力均受到抑制^[3,14-15]。因此,AUF1参与了细胞增殖和迁移过程的调控,这对研究增殖相关疾病(如纤维化、动脉硬化)的进展具有重要意义。

心肌纤维化过程中表达失调的AUF1,其潜在机制尚不完全清楚。TGF- β 1是目前已知的导致各种组织器官纤维化的共同细胞因子,可通过下游经典的Smads通路促进成纤维细胞增殖和转分化,与多种增殖性疾病及心血管疾病密切相关。本研究结果显示,AUF1和TGF- β 1在Ang II诱导的CFs模型中表达增加,而Res可能通过抑制AUF1和TGF- β 1的表达来发挥抑制CFs增殖和胶原分泌作用。值得一提的是,一方面有相关研究报道AUF1可通过调控TGF- β 1的表达促进间质上皮转化过程^[16]。Al-Khalaf^[14]发现AUF1能够促进磷酸肌醇依赖性激酶-1(PDK1)mRNA稳定翻译,导致细胞中PDK1蛋白质翻译合成的增加。PDK1作为蛋白激酶C(PKC)活化的关键酶,PKC的激活可以介导随后的TGF- β 1表达水平的升高^[17]。AUF1的直接靶标MEF2C也被证实是上调TGF- β 1的信号分子之一^[18]。因此,根据国内外现有研究报告,结合本实验得到结果我们提出,AUF1可能通过上调TGF- β 1的表达从而导致CFs过度增殖和胶原合成分泌异常增多。另一方面在房颤患者心肌组织中,CFs的提前衰老具有潜在的抗心肌纤维化的作用,而p16^{INK4a}作为主要的衰老指标,表现为p16^{INK4a}/TGF- β 1比值的增加^[19]。有研究报道AUF1能够负向调节p16^{INK4a}表达,同样p16^{INK4a}也可以通过miRNA途径抑制AUF1的表达,即正反馈抑制衰老的过程^[14-16]。衰老基因P21 mRNA的AREs也被AUF1特异性识别,并与之结合使其失稳定降解^[14]。Pont等^[20]发现AUF1缺乏的小鼠中基因端粒侵蚀,并较野生型小鼠提前衰老。因此,Ang II诱导CFs中AUF1表达的增加,其随后抑制CFs的衰老,可能也是CFs过度增殖的潜在机制之一。

综上所述,Res可以减轻Ang II诱导的CFs增殖及胶原分泌水平,其机制可能与抑制AUF1和TGF- β 1的表达有关。这为进一步了解Res在心血管疾病方面的治疗作用提供了新的理论依据和实验支

撑。另外我们提出新的观点,AUF1可能作为上游调控蛋白,通过上调TGF- β 1的表达,同时抑制细胞的衰老,从而在CFs过度增殖和胶原合成分泌异常过程中发挥重要作用,但尚需进一步研究验证。本研究应用Ang II诱导的CFs建立心肌纤维化细胞模型,首次探索Ang II诱导的CFs中AUF1表达的变化。实验发现AUF1参与了心肌纤维化过程,为AUF1作为过度心肌纤维化干预的新靶点提供了实验依据。

[参考文献]

- [1] Schelbert EB. Myocardial scar and fibrosis: the ultimate mediator of outcomes?[J]. *Heart Fail Clin*, 2019, 15(2): 179-189
- [2] Ge L, Li C, Wang Z, et al. Suppression of oxidative stress and apoptosis in electrically stimulated neonatal rat cardiomyocytes by resveratrol and underlying mechanisms [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2017, 70(6): 396-404
- [3] Yan J, Du F, Li SD, et al. AUF1 modulates TGF- β signal in renal tubular epithelial cells via post-transcriptional regulation of Nedd4L expression[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2018, 1865(1): 48-56
- [4] Zhang Y, Lu Y, Ong'achwa MJ, et al. Resveratrol inhibits the TGF- β 1 induced proliferation of cardiac fibroblasts and collagen secretion by downregulating miR-17 in Rat [J]. *Biomed Res Int*, 2018, 2018: 8730593
- [5] 陈世超, 储鑫, 蒋云龙, 等. 丝氨酸通过甘氨酸受体缓解血管紧张素 II 诱导的心肌纤维化[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2017, 37(7): 792-798
- [6] Salah E, Bastacky SI, Jackson EK. 2-Methoxyestradiol attenuates angiotensin II-induced hypertension, cardiovascular remodeling and renal injury [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2019, 73(3): 165-177
- [7] Moore AE, Chenette DM, Larkin LC. Physiological networks and disease functions of RNA-binding protein AUF1 [J]. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2014, 5(4): 549-564
- [8] Min KW, Jo MH, Shin S, et al. AUF1 facilitates microRNA-mediated gene silencing [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(10): 6064-6073
- [9] Blaxall BC, Pellett AC, Wu SC, et al. Purification and characterization of beta-adrenergic receptor mRNA-binding proteins [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(6): 4290-4297
- [10] Blum JL, Samarel AM. Phosphorylation and binding of AUF1 to the 3'-untranslated region of cardiomyocyte SERCA2a mRNA [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 289(6): H2543-2550

(下转第 1141 页)

- Southeast Asia[J]. *BMC Genet*,2014,15:77
- [20] Zhang X, Kumpuansai J, Qi X, et al. An updated phylogeny of the human Y-chromosome lineage O2a-M95 with novel SNPs[J]. *PLoS One*,2014,9(6):e101020
- [21] Yan S, Wang CC, Li H, et al. An updated tree of Y-chromosome haplogroup O and revised phylogenetic positions of mutations P164 and PK4[J]. *Eur J Hum Genet*, 2011,19(9):1013-1015
- [22] Hong SB, Jin HJ, Kwak KD, et al. Y-chromosome haplogroup O3-M122 variation in east Asia and its implications for the peopling of Korea[J]. *Korean Journal of Genetics*,2006,28(1):1-8
- [23] Shi H, Zhong H, Peng Y, et al. Y chromosome evidence of earliest modern human settlement in East Asia and multiple origins of Tibetan and Japanese populations[J]. *BMC Biol*,2008,6(1):45
- [24] Yan S, Wang CC, Zheng HX, et al. Y chromosomes of 40% Chinese descend from three Neolithic super-grandfathers[J]. *PLoS One*,2014,9(8):e105691
- [25] Wang CC, Yan S, Hou Z, et al. Present Y chromosomes reveal the ancestry of Emperor CAO Cao of 1800 years ago[J]. *J Hum Genet*,2012,57(3):216-218
- [26] 王迟早,文少卿,石美森,等. 淮海战役士兵遗骸的Y染色体遗传类型鉴定[J]. *法医学杂志*,2017,33(4):357-362
- [27] Balanovsky O. Toward a consensus on SNP and STR mutation rates on the human Y-chromosome[J]. *Hum Genet*,2017,136(5):575-590
- [28] Kayser M. Forensic use of Y-chromosome DNA: a general overview[J]. *Hum Genet*,2017,136(5):621-635
- [29] 王新杰,许欣,黄磊,等. 山东汉族人群63个Y-STR基因座突变观察及法医学应用[J]. *刑事技术*,2016,41(5):424-428
- [30] Cai X, Qin Z, Wen B, et al. Human migration through bottlenecks from Southeast Asia into East Asia during last glacial maximum revealed by Y chromosomes[J]. *PLoS One*,2011,6(8):e24282
- [31] Qian X, Hou J, Wang Z, et al. Next generation sequencing Plus(NGS+) with Y-chromosomal markers for forensic pedigree searches[J]. *Sci Rep*,2017,7(1):11324
- [32] Jobling MA, Tyler-Smith C. Human Y-chromosome variation in the genome-sequencing era[J]. *Nat Rev Genet*, 2017,18(8):485-497

[收稿日期] 2018-09-30

(上接第1123页)

- [11] Zhou C, Vignere CZ. AUF1 is upregulated by angiotensin II to destabilize cardiac Kv4.3 channel mRNA[J]. *J Mol Cell Cardiol*,2008,45(6):832-838
- [12] Panda AC, Abdelmohsen K, Yoon JH, et al. RNA-binding protein AUF1 promotes myogenesis by regulating MEF2C expression levels[J]. *Mol Cell Biol*,2014,34(16):3106-3119
- [13] Ghosh U, Adhya S. Posttranscriptional regulation of cyclin D1 by ARE-binding proteins AUF1 and HuR in cycling myoblasts[J]. *J Bio Sci*,2018,43(4):685-691
- [14] Al-Khalaf HH. MicroRNA-141 and microRNA-146b-5p inhibit the prometastatic mesenchymal characteristics through the RNA-binding protein AUF1 targeting the transcription factor ZEB1 and the protein kinase AKT[J]. *J Biol Chem*,2014,289(45):31433-31447
- [15] Al-Khalaf HH, Aboussekhra A. p16 induces senescence and inhibits EMT through microRNA-141/microRNA-146b-5p dependent repression of AUF1[J]. *Mol Carcinog*,2017,56(3):985-999
- [16] Al-Ansari MM. miR-146b-5p mediates p16-dependent repression of IL-6 and suppresses paracrine procarcinogenic effects of breast stromal fibroblasts[J]. *Oncotarget*, 2015,6(30):30006-30016
- [17] Gao L, Gao R, Mao W, et al. PTGFR activation promotes the expression of PTGS-2 and growth factors via activation of the PKC signaling pathway in bovine endometrial epithelial cells[J]. *Anim Reprod Sci*,2018,199:30-39
- [18] Yu W, Huang C, Wang Q, et al. MEF2 transcription factors promotes EMT and invasiveness of hepatocellular carcinoma through TGF- β 1 autoregulation circuitry[J]. *Tumour Biol*,2014,35(11):10943-10951
- [19] Xie J, Chen Y, Hu C, et al. Premature senescence of cardiac fibroblasts and atrial fibrosis in patients with atrial fibrillation[J]. *Oncotarget*,2017,8(35):57981-57990
- [20] Pont AR, Sadri N, Hsiao SJ, et al. mRNA decay factor AUF1 maintains normal aging, telomere maintenance, and suppression of senescence by activation of telomerase transcription[J]. *Mol Cell*,2012,47(1):5-15

[收稿日期] 2019-03-03