

# 肌成纤维细胞来源外泌体介导主动脉缩窄后心脏重构的作用

陆佳 蔡利栋 吴晓宇 丁羽 巩超

**【摘要】 目的:**观察肌成纤维细胞来源外泌体对主动脉缩窄后心脏重构的影响。**方法:**利用促纤维化因子转化生长因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 诱导心脏成纤维细胞活化,将原代心肌细胞分为正常组、PBS 组、外泌体组,通过超高速离心分离提取成纤维细胞上清液中的外泌体,并将其与外泌体组心肌细胞共同孵育 48 h。实时定量聚合酶链反应及免疫荧光染色法检测心肌细胞肥厚指标(心房利钠肽、脑钠肽和  $\beta$  肌球蛋白重链)以及心肌细胞表面积。选取 C57 雄性小鼠 32 只,随机分为对照组、假手术组、主动脉缩窄-对照组、主动脉缩窄-外泌体组,每组 8 只。主动脉缩窄组小鼠进行主动脉缩窄模型构建,外泌体组小鼠每日通过尾静脉注射 20  $\mu$ g 外泌体,连续注射 4 周。术后 8 周行心脏超声检测各组小鼠心功能状态,麦胚凝集素(WGA)染色检测小鼠左心室心肌肥厚程度。**结果:**电镜下提取物呈典型杯口状结构,Western blot 显示该物质含有外泌体特有标志物 CD63、TSG101。相对于正常组及 PBS 组,外泌体组心肌细胞心房利钠肽、脑钠肽和  $\beta$  肌球蛋白重链的 mRNA 表达水平均显著升高,心肌细胞表面积显著增加( $P$  均 $<0.05$ )。与对照组、假手术组、主动脉缩窄-对照组相比,主动脉缩窄-外泌体组小鼠射血分数、短轴缩短率均显著下降( $P$  均 $<0.05$ ),左室收缩末期内径、左室舒张末期内径均显著增加,心肌细胞表面积显著增加( $P$  均 $<0.05$ )。**结论:**激活状态下成纤维细胞来源外泌体可以促进心肌细胞病理性肥厚的发生,加速主动脉缩窄后心脏重构的进程。

**【关键词】** 主动脉缩窄;成纤维细胞;心脏重构;外泌体

doi: 10.3969/j.issn.1673-6583.2022.03.010

**Effects of myofibroblasts-derived exosomes on cardiac remodeling post transverse aortic constriction** LU Jia, CAI Lidong, WU Xiaoyu, DING Yu, GONG Chao Department of cardiology, The first people's hospital of Jia shan, Zhejiang 314100

**【Abstract】 Objective:** To explore the role of exosomes derived from myofibroblasts in cardiac remodeling post transverse aortic constriction (TAC). **Methods:** Exosomes isolated from supernatant of cardiac fibroblasts (CFs) stimulated by TGF- $\beta$  were incubated with cardiomyocytes for 48 h. PCR and immunofluorescence assay were used to assess the expression levels of hypertrophic-related gene, atrial natriuretic peptide (ANP), brain natriuretic peptide (BNP),  $\beta$ -myosin heavy chain ( $\beta$ -MHC) and cardiomyocyte cell size. Additionally, thirty-two male mice were divided into 4 groups as control group, sham group, TAC-NC group (mice underwent TAC procedure and injected with PBS through tail vein), and MI+Exos-activated group (mice underwent TAC procedure and injected with exosomes derived from myofibroblasts through tail vein), with 8 mice in each group. After 8 weeks, cardiac function and the extent of cardiac hypertrophy were assessed by echocardiography and WGA-FITC staining. **Results:** Transmission electron microscopic image showed that myofibroblasts-derived exosomes have the characteristic round or cup-shaped delineated by a lipid bilayer. The results of western blot analysis demonstrated the expression of CD63 and tumor susceptibility gene 101 (TSG101) in all exosome

markers. Compared with control and PBS groups, the expression levels of ANP, BNP,  $\beta$ -MHC mRNA were increased significantly, and relative surface was also enlarged in exosome group (all  $P < 0.05$ ). Compared with control group, sham group and MI+Exo-activated group, the ejection fraction and short-axis shortening were significantly decreased in TAC-NC group, while the LVESD and LVEDD were significantly increased (all  $P < 0.05$ ). And the surface of myocardial cell was significantly increased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Activated fibroblast-derived exosomes can promote the occurrence of pathological hypertrophy of cardiomyocytes and accelerate the process of cardiac remodeling after TAC.

**【Keywords】** Transverse aortic constriction; Cardiac fibroblasts; Cardiac remodeling; Exosomes

成纤维细胞与心肌细胞是心脏内 2 种含量最丰富的细胞类型<sup>[1-2]</sup>。正常情况下,成纤维细胞在心肌细胞增殖分化、电信号扩布以及机械应力的传导中发挥重要作用<sup>[3-5]</sup>。然而,在某些疾病状态下,如急性心肌梗死、炎症反应、高血压等,心脏组织内儿茶酚胺类物质及某些促炎性因子如转化生长因子- $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ )、白细胞介素-4 (IL-4)、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 的表达水平异常可以导致心脏内静止状态的心脏成纤维细胞激活,使成纤维细胞的生物学性状发生显著改变<sup>[6-8]</sup>。在这种情况下,心脏内成纤维细胞与心肌细胞之间的生理平衡势必发生改变。外泌体是一种直径为 30~150 nm 的微小囊泡状结构,在细胞间的信号传递中发挥着重要的作用<sup>[9-10]</sup>。本研究拟通过小鼠动物模型,研究成纤维细胞来源外泌体对主动脉缩窄 (TAC) 后心脏重构的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器与试剂

小动物呼吸机 (DW-2000 型) 购自中国上海伟业医疗公司;雷卡倒置荧光显微镜、小动物气体麻醉机购自美国 Leica 公司;小鼠源抗肌动蛋白抗体购自美国 Abcam 公司;鬼笔环肽、外泌体细胞标记荧光染料 PKH67 购自美国 Invitrogen 公司;4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI) 购自中国碧云天公司;AlexaFluor 594 标记的驴抗小鼠二抗购自美国 Life Technologies 公司。

### 1.2 原代细胞获取

将出生 1~3 d C57 乳鼠的心脏组织剪成 1 mm<sup>3</sup> 的组织块,在 37 °C 杂交炉中利用混合酶液 (2.5% 不含 EDTA 的胰酶、0.1% IV 型胶原酶、0.05% DNA 酶混合) 消化组织块,利用血清中和酶液,直至组织块消失,收集消化液,离心、重悬、铺

板,利用成纤维细胞与心肌细胞不同的贴壁时间,将两者分开。

将体外心肌细胞按处理方式不同分为 3 组,即正常组、PBS 组及外泌体组。外泌体组以促炎性因子 TGF- $\beta$  (10 ng/mL) 刺激原代心脏成纤维细胞 48 h,将提取出来的外泌体 (1  $\mu$ g/mL) 与心肌细胞体外孵育 48 h。PBS 组加入等体积 PBS 溶液。正常组不做特殊处理,正常培养。

### 1.3 外泌体提取、预处理与鉴定

外泌体提取:心肌成纤维细胞体外培养至 P2 代, TGF- $\beta$  (10 ng/mL) 刺激原代心脏成纤维细胞 48 h,收集培养基,3 000 g 离心 20 min,收集上清,100 000 g 离心 70 min,收集下层沉淀,加入 15 mL PBS 重悬,100 000 g 离心 1 h,弃上清,收集所得的沉淀即为外泌体。用 400  $\mu$ L PBS 重悬后, -80 °C 保存。

外泌体荧光标记处理:将新鲜提取的外泌体与 PKH67 预混,体积比为 1 000 : 1,孵育 1 h 后,加入 15 mL PBS 重悬,100 000 g 离心 20 min,弃上清,再次加入 15 mL PBS,重复 100 000 g 离心 20 min,以去除多余染料。

外泌体鉴定:(1) 电镜检查。将超高速离心获得的外泌体 6  $\mu$ L 滴至 300 nm 的铜网上,而后加入 8  $\mu$ L 2% 醋酸双氧铀,静置 3 min,通过投射电镜观察外泌体形态及粒径大小。(2) 外泌体表面蛋白标志物检测。Western blot 检测外泌体所特有的分子标记物 TSG101、CD63。

### 1.4 免疫荧光染色

将心肌细胞接种在共聚焦培养皿中,体外培养 24 h 后,按 1.2 处理各组细胞,细胞干预处理后以 4% 多聚甲醛固定,0.3% Triton X-100 通透 10~15 min,封闭后加入小鼠源抗肌动蛋白抗体 4 °C 孵

育过夜, AlexaFluor594 标记的驴抗小鼠二抗室温孵育 2 h, DIPA 标记细胞核, 荧光显微镜下观察, 拍照留存, 并利用 ImageJ 软件计算心肌细胞表面积。

鬼笔环肽 (phalloidin) 染色: 将心肌细胞接种在共聚焦培养皿中, 体外培养或者外泌体干预至相应时间点后, 4% 多聚甲醛固定, PBS 清洗, 加入鬼笔环肽 (1 : 10 000 稀释), 室温孵育 30 min, 去除上清, 加入 DIPA 标记细胞核, 荧光显微镜下观察。

### 1.5 实时定量聚合酶链反应 (PCR)

利用 Trizol 试剂提取心肌细胞 RNA, 通过逆转录试剂盒进行逆转录。引物见表 1, 实时定量 PCR 反应条件如下: 95 °C, 1 min; 55 °C, 1 min; 72 °C, 1 min; 72 °C, 6 min; 连续进行 40 个循环。利用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法计算心房利钠肽 (ANP)、脑钠肽 (BNP) 和  $\beta$  肌球蛋白重链 ( $\beta$ -MHC) mRNA 的相对表达水平。

表1 PCR引物序列

基因名称	位置	序列
ANP	上游	5'-TCTTCCTCGTCTTGCCCTTT-3'
	下游	5'-CCAGGTGGTCTAGCAGGTTC-3'
BNP	上游	5'-TGGGAGGTCACCTCCTATCCT-3'
	下游	5'-GGCCATTCTCCTCCGACTTT-3'
$\beta$ -MHC	上游	5'-CGGACCTTGGAAGACCAGAT-3'
	下游	5'-GACAGCTCCCCATTCTCTGT-3'

### 1.6 实验动物与分组

健康成年雄性 C57 小鼠 32 只, 1 周龄, 体重 22~25 g, 由上海市第一人民医院实验动物中心提供。将实验小鼠随机分为 4 组: 对照组、假手术组、TAC- 对照组及 TAC- 外泌体组, 每组 8 只。

TAC 组小鼠进行 TAC 模型构建。取 C57 小鼠, 术前常规脱毛、禁食、禁水, 异氟烷气体麻醉, 气管插管。设置呼吸机参数, 潮气量为 200  $\mu$ L/ 次, 呼吸频率为 110 次 /min。在腋前线距离胸骨左缘 2 mm 处切口, 钝性分离皮下筋膜, 拨开胸腺及肺组织, 用手术镊取 6.0 手术线从无名和左颈总动脉之间穿过胸主动脉, 连同 8 G 针头一起固定于主动脉弓, 再此基础上撤走针头, 以保证主动脉的缩窄程度同针头大小一致, 关胸缝合。假手术组小鼠在异氟烷气体麻醉、气管插管、开胸后, 不进行主动脉弓缩窄手术, 而是直接关胸。TAC- 外泌体组小鼠自手术第二天开始, 每日通过尾静脉注射 20  $\mu$ g 外泌体, 连续注射 4 周; TAC- 对照组则注射等体积 PBS 溶液。

### 1.7 小鼠心脏超声

术后 8 周, 禁饮、禁食 12 h 后, 利用小动物心脏超声仪评估各组小鼠心功能状态。异氟烷麻醉状态下, 取胸骨旁左室长轴及心尖四腔切面, 连续记录 4 个心动周期中小鼠左室收缩末期内径 (LVESD) 及左室舒张末期内径 (LVEDD) 的平均值, 并计算短轴缩短率 (FS) 及左室射血分数 (LVEF)。

### 1.8 组织切片麦胚凝集素染色

术后 8 周, 处死小鼠, 取出心脏组织, 4% 多聚甲醛固定, 石蜡包埋、切片, 予以麦胚凝集素 (WGA) 染色, 利用荧光显微镜观察各组实验动物心室肥厚程度。

### 1.9 统计学分析

采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析, 计量资料以均数  $\pm$  标准差表示, 组间比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 外泌体鉴定

对小鼠成纤维细胞激活后释放的外泌体进行鉴定。投射电镜下成纤维细胞来源的微小囊泡呈杯口状结构, 直径在 110 nm 左右, 符合典型的外泌体结构特征<sup>[11]</sup>。Western blot 结果显示该微小囊泡状结构表面携带有外泌体形成的特异性分子标记物 CD63 及 TSG101<sup>[12-13]</sup>, 提示本研究中提取的心肌成纤维细胞上清液中的微小囊泡为外泌体。见图 1。

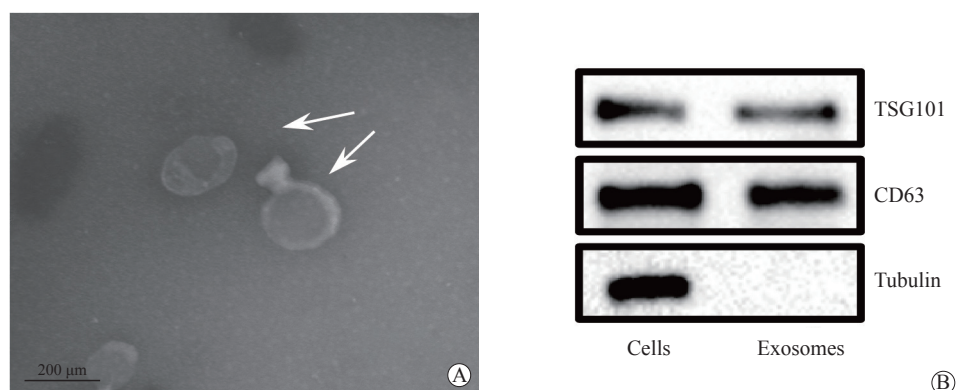
### 2.2 肌成纤维细胞来源外泌体促进心肌细胞病理肥厚

用 PKH67 绿色荧光对外泌体膜进行标记, Phalloidin 红色荧光对原代心肌细胞膜进行标记, 图 2A 示外泌体可以被心肌细胞吞噬。与正常组及 PBS 组相比, 外泌体组心肌细胞肥厚相关基因 ANP、BNP、 $\beta$ -MHC 的 mRNA 表达水平及心肌细胞表面积均显著增加 ( $P$  均  $< 0.05$ )。见图 2B、表 2。

### 2.3 肌成纤维细胞来源外泌体促进 TAC 术后小鼠心脏病理性重构进展

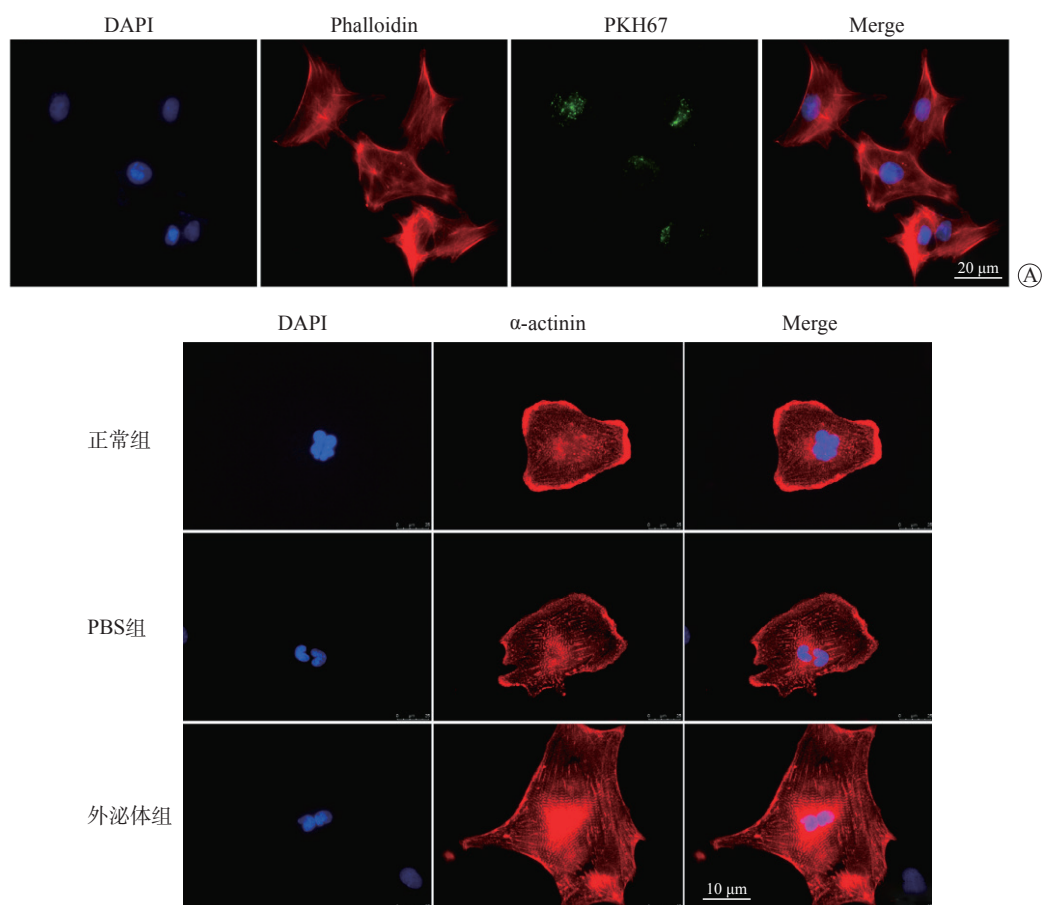
实验动物心脏超声及 WGA 染色检测结果显示, TAC 手术 8 周后, 小鼠 LVEF、FS 均显著下降, LVESD、LVEDD 以及左心室心肌细胞表面积均显著增加 ( $P$  均  $< 0.05$ )。相对于 TAC- 对照组, TAC- 外泌体组小鼠心功能进一步恶化, 表现为小鼠 LVEF、FS 进一步下降, 以及 LVESD、LVEDD、左心室心肌细胞表面积进一步增加, 见表 3、图 3、图 4。





注：A示电镜下外泌体呈典型杯口状；B为Western blot示成纤维细胞来源微小囊泡携带有外泌体分子标记物

图1 成纤维细胞来源外泌体的鉴定



注：A示肌成纤维细胞来源外泌体可以被心肌细胞吞噬，Phalloidin为鬼笔环肽，标记心肌细胞膜，DAPI为4',6-二脒基-2-苯基吲哚，标记细胞核，PKH67标记外泌体膜；B示各组心肌细胞免疫荧光染色结果，α-actinin为心肌细胞肌动蛋白

图2 肌成纤维细胞来源的外泌体促进心肌细胞病理性肥厚

### 3 讨论

研究表明，人体内器官之间、细胞之间通过某些生物活性分子如激素、脂质小分子、非编码RNA等，保持功能上的紧密联系<sup>[14-18]</sup>。人体内生物信号链的有效传递对于正常生理代谢功能的维持具有重要作用，多种疾病的发生，如甲状腺功能亢

进性心肌病、肝肾综合征、心脑综合征等，也与内信号传递的异常存在密切关系<sup>[19-21]</sup>。成纤维细胞是心脏内含量最丰富的细胞类型，正常情况下，成纤维细胞对于心肌细胞电信号与机械应力的传递具有重要作用，可以通过旁分泌机制促进心肌细胞形态及功能的维持<sup>[22-23]</sup>。然而，在某些疾病状态下，

尤其是在急性心肌梗死、风湿性心脏病、高血压等病理状态下,心肌组织内异常升高的促纤维化因子,如 TGF- $\beta$ 、溶血磷脂酸 (LPS)、TNF- $\alpha$  等,可以导致静止状态下的心脏成纤维细胞转为功能状

态活跃的肌成纤维细胞<sup>[24-26]</sup>。

外泌体是细胞信号传递的重要媒介,人体内几乎所有细胞均可以通过释放外泌体完成其在组织器官及细胞间的信号传递。鉴于细胞释放的外泌

表2 各组心肌细胞心肌肥厚相关指标的mRNA表达水平及心肌细胞表面积比较

组别	ANP mRNA表达水平	BNP mRNA表达水平	$\beta$ -MHC mRNA表达水平	心肌细胞表面积
正常组	1.00 $\pm$ 0.12	1.00 $\pm$ 0.16	1.00 $\pm$ 0.08	357.6 $\pm$ 12.28
PBS组	1.02 $\pm$ 0.06	1.12 $\pm$ 0.13	1.07 $\pm$ 0.10	388.0 $\pm$ 10.49
外泌体组	2.14 $\pm$ 0.24 <sup>(1)(2)</sup>	2.73 $\pm$ 0.23 <sup>(1)</sup>	2.26 $\pm$ 0.17 <sup>(1)</sup>	744.8 $\pm$ 18.91 <sup>(1)</sup>

注:与正常组相比,<sup>(1)</sup> $P<0.05$ ;与PBS组相比,<sup>(2)</sup> $P<0.05$

表3 各组小鼠心功能参数及左室心肌细胞表面积比较

组别	LVEF/%	FS/%	LVEDD/%	LVEDS/mm	心肌细胞表面积
对照组	70.65 $\pm$ 8.62	36.80 $\pm$ 5.23	3.31 $\pm$ 1.20	2.10 $\pm$ 0.56	367.5 $\pm$ 12.32
假手术组	70.80 $\pm$ 9.23	36.20 $\pm$ 4.23	3.29 $\pm$ 1.06	2.08 $\pm$ 0.75	376.1 $\pm$ 11.52
TAC-对照组	32.61 $\pm$ 4.12 <sup>(1)(2)</sup>	15.91 $\pm$ 2.30 <sup>(1)(2)</sup>	3.84 $\pm$ 1.43 <sup>(1)(2)</sup>	3.41 $\pm$ 1.02 <sup>(1)(2)</sup>	562.5 $\pm$ 20.21 <sup>(1)(2)</sup>
TAC-外泌体组	12.12 $\pm$ 2.36 <sup>(3)</sup>	6.03 $\pm$ 1.20 <sup>(3)</sup>	4.89 $\pm$ 1.01 <sup>(3)</sup>	4.32 $\pm$ 0.98 <sup>(3)</sup>	762.7 $\pm$ 17.95 <sup>(3)</sup>

注:与对照组相比,<sup>(1)</sup> $P<0.05$ ;与假手术组相比,<sup>(2)</sup> $P<0.05$ ;与TAC-对照组相比,<sup>(3)</sup> $P<0.05$

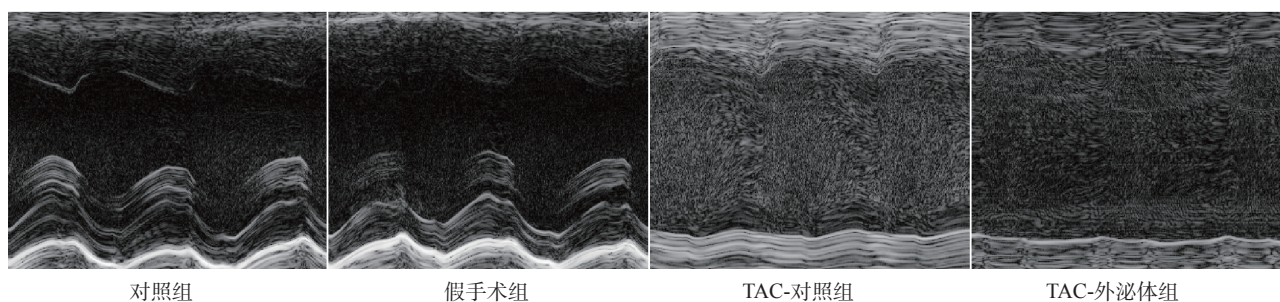


图3 各组小鼠代表性超声心动图

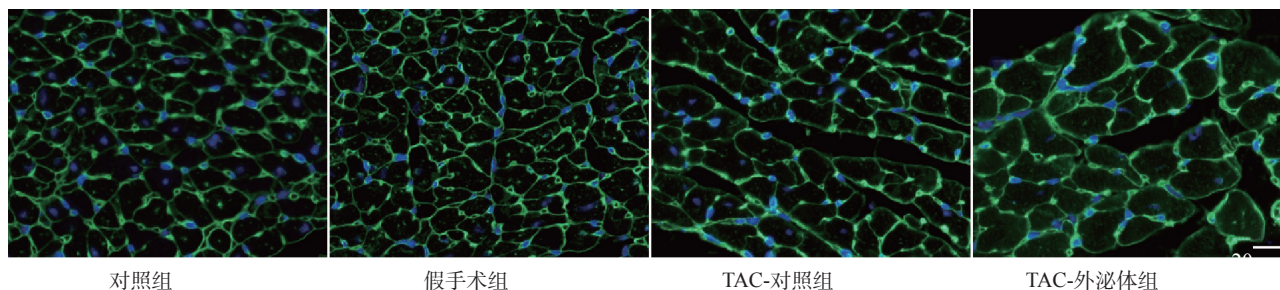


图4 各组小鼠左室麦胚凝集素染色情况 ( $\times 200$ )

体与细胞本身的功能状态存在密切关系,本研究探讨疾病模型中异常激活的成纤维细胞来源的外泌体对心肌细胞生物学功能的影响。利用 TGF- $\beta$  诱导成纤维细胞激活,并将激活状态下成纤维细胞来

源外泌体与心肌细胞共同孵育,结果显示,外泌体干预后的心肌细胞表面积以及肥厚相关基因 ANP、BNP 和  $\beta$ -MHC 的表达显著升高,提示激活状态下成纤维细胞来源外泌体可以显著促进心肌细胞的

病理性肥大。为进一步明确肌成纤维细胞来源外泌体对心肌细胞病理性肥厚的影响,本研究利用尾静脉注射技术,对小鼠予以在体肌成纤维细胞来源外泌体干预,并通过心脏超声、WGA 染色等技术,检测肌成纤维细胞来源外泌体对心肌肥厚的影响,结果显示,激活状态下成纤维细胞来源的外泌体可使小鼠 LVEF、FS 显著降低,LVESD、LVEDD、心肌细胞表面积显著增加,提示成纤维细胞来源的外泌体可以显著促进 TAC 模型小鼠心肌组织的病理性肥厚,加速其心功能恶化,这与之前的研究报道一致<sup>[22]</sup>。

外泌体是细胞膜凹陷形成的囊泡状结构,内含多种生物活性物质,如短肽、信使 RNA、细胞膜受体蛋白等,尤以微小 RNA (miRNA) 含量最为丰富<sup>[27]</sup>。MiRNA 是一种小分子非编码 RNA,通过与 mRNA 的 3'UTR 结合,影响 mRNA 稳定性,进而参与外泌体对细胞功能活性的调控<sup>[28-29]</sup>。由于 miRNA 在外泌体内的丰度远大于其他小分子物质,我们推测 miRNA 很可能是外泌体中介导心肌细胞病理性肥大的效应分子。

综上所述,本研究发现激活状态下的成纤维细胞来源外泌体可以显著促进心肌细胞的病理性肥大,加速心脏重构,提示生物信号链对机体稳态的重要性。本研究为延缓心脏病理性重构提供了新的思路及潜在的干预靶点。

#### 参 考 文 献

- [1] Banerjee I, Fuseler JW, Price RL, et al. Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 293(3):H1883-H1891.
- [2] Tallquist MD, Molkentin JD. Redefining the identity of cardiac fibroblasts[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2017, 14(8):484-491.
- [3] Brilla CG, Maisch B, Weber KT. Myocardial collagen matrix remodelling in arterial hypertension[J]. *Eur Heart J*, 1992, 13(Suppl D):24-32.
- [4] Oyamada M, Kimura H, Oyamada Y, et al. The expression, phosphorylation, and localization of connexin 43 and gap-junctional intercellular communication during the establishment of a synchronized contraction of cultured neonatal rat cardiac myocytes[J]. *Exp Cell Res*, 1994, 212(2):351-358.
- [5] Castaldo C, Di Meglio F, Miraglia R, et al. Cardiac fibroblast-derived extracellular matrix (biomatrix) as a model for the studies of cardiac primitive cell biological properties in normal and pathological adult human heart[J]. *Biomed Res Int*, 2013, 2013:352370.
- [6] Su S, Yang D, Wu Y, et al. EphrinB2 regulates cardiac fibrosis through modulating the interaction of Stat3 and TGF- $\beta$ /Smad3 signaling[J]. *Circ Res*, 2017, 121(6):617-627.
- [7] Peng H, Sarwar Z, Yang XP, et al. Profibrotic role for interleukin-4 in cardiac remodeling and dysfunction[J]. *Hypertension*, 2015, 66(3):582-589.
- [8] Zhang Y, Liu Y, Liu H, et al. Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential[J]. *Cell Biosci*, 2019, 9:19.
- [9] Hazan-Halevy I, Rosenblum D, Weinstein S, et al. Cell-specific uptake of mantle cell lymphoma-derived exosomes by malignant and non-malignant B-lymphocytes[J]. *Cancer Lett*, 2015, 364(1):59-69.
- [10] Felisbino MB, McKinsey T. Epigenetics in cardiac fibrosis: emphasis on inflammation and fibroblast activation[J]. *JACC Basic Transl Sci*, 2018, 3(5):704-715.
- [11] Wei F, Ma C, Zhou T, et al. Exosomes derived from gemcitabine-resistant cells transfer malignant phenotypic traits via delivery of miRNA-222-3p[J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1):132.
- [12] Hessvik NP, Llorente A. Current knowledge on exosome biogenesis and release[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75(2):193-208.
- [13] Gao X, Ran N, Dong X, et al. Anchor peptide captures, targets, and loads exosomes of diverse origins for diagnostics and therapy[J]. *Sci Transl Med*, 2018, 10(444):eaat0195.
- [14] Song E, Ahn J, Oh HS, et al. Sex-dependent association between weight change and thyroid dysfunction: population-level analysis using the Korean National Health and Nutrition Examination Survey[J]. *Eur Thyroid J*, 2019, 8(4):202-207.
- [15] Hammes SR. Rapid signaling and genomic steroid hormone actions in health and disease[J]. *Steroids*, 2018, 133:1.
- [16] Vishnoi A, Rani S. MiRNA biogenesis and regulation of diseases: an overview[J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1509:1-10.
- [17] Ventura AE, Mestre B, Silva LC. Ceramide domains in health and disease: a biophysical perspective[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1159:79-108.
- [18] Satterlee JS, Basanta-Sanchez M, Blanco S, et al. Novel RNA modifications in the nervous system: form and function[J]. *J Neurosci*, 2014, 34(46):15170-15177.
- [19] Osuna PM, Udovcic M, Sharma MD. Hyperthyroidism and the heart[J]. *Methodist Debakey Cardiovasc J*, 2017, 13(2):60-63.
- [20] Amin A, Alabsawy EI, Jalan R, et al. Epidemiology, pathophysiology, and management of hepatorenal syndrome[J]. *Semin Nephrol*, 2019, 39(1):17-30.
- [21] Ronco C, Bellasi A, Di Lullo L. Cardiorenal syndrome: an overview[J]. *Adv Chronic Kidney Dis*, 2018, 25(5):382-390.
- [22] Dell'Era P, Ronca R, Coco L, et al. Fibroblast growth factor receptor-1 is essential for in vitro cardiomyocyte development[J]. *Circ Res*, 2003, 93(5):414-420.
- [23] Civitarese RA, Kapus A, McCulloch CA, et al. Role of integrins in mediating cardiac fibroblast-cardiomyocyte cross talk: a dynamic relationship in cardiac biology and



- pathophysiology[J]. Basic Res Cardiol, 2017, 112(1):6.
- [24] Klier M, Gorressen S, Urbahn MA, et al. Enzymatic activity is not required for phospholipase D mediated TNF- $\alpha$  regulation and myocardial healing[J]. Front Physiol, 2018, 9:1698.
- [25] Fang J, Wang J, Chen F, et al.  $\alpha$ 7nAChR deletion aggravates myocardial infarction and enhances systemic inflammatory reaction via mTOR-signaling-related autophagy[J]. Inflammation, 2019, 42(4):1190-1202.
- [26] Liu Q, Zhu LJ, Waaga-Gasser AM, et al. The axis of local cardiac endogenous Klotho-TGF- $\beta$  1-Wnt signaling mediates cardiac fibrosis in human[J]. J Mol Cell Cardiol, 2019, 136:113-124.
- [27] Shu Z, Tan J, Miao Y, et al. The role of microvesicles containing microRNAs in vascular endothelial dysfunction[J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(12):7933-7945.
- [28] Bernardo BC, Ooi JY, Lin RC, et al. miRNA therapeutics: a new class of drugs with potential therapeutic applications in the heart[J]. Future Med Chem, 2015, 7(13):1771-1792.
- [29] Treiber T, Treiber N, Meister G. Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019, 20(1):5-20.
- ( 收稿:2019-10-14 修回:2022-02-23 )  
( 本文编辑:胡晓静 )

（上接第 168 页）

- [15] Ball DP, Taabazuing CY, Griswold AR, et al. Caspase-1 interdomain linker cleavage is required for pyroptosis[J]. Life Sci Alliance, 2020, 3(3):e202000664.
- [16] Dedja A, Gucciardi A, Giordano G, et al. Lipopolysaccharide-induced chorioamnionitis and postnatal lung injury: the beneficial effects of L-citrulline in newborn rats[J]. Exp Lung Res, 2018, 44(4/5):226-240.
- [17] Azeredo R, Machado M, Fontinha F, et al. Dietary arginine and citrulline supplementation modulates the immune condition and inflammatory response of European seabass[J]. Fish Shellfish Immunol, 2020, 106:451-463.
- [18] Guo X, Hong S, He H, et al. NF $\kappa$ B promotes oxidative stress-induced necrosis and ischemia/reperfusion injury by inhibiting Nrf2-ARE pathway[J]. Free Radic Biol Med, 2020, 159:125-135.
- [19] Tsuboi T, Maeda M, Hayashi T. Administration of L-arginine plus L-citrulline or L-citrulline alone successfully retarded endothelial senescence[J]. PLoS One, 2018, 13(2):e0192252.
- [20] Figueroa A, Wong A, Jaime SJ, et al. Influence of L-citrulline and watermelon supplementation on vascular function and exercise performance[J]. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2017, 20(1):92-98.
- ( 收稿:2021-08-21 修回:2022-03-06 )  
( 本文编辑:胡晓静 )