

• 基础研究 •

高迁移率族蛋白1通过调控自噬因子P62调节心肌细胞纤维化

聂雅琴 乌日娜 金慧 张广平 李永明 智利 薛仕焯 娜日格乐

【摘要】目的:探究高迁移率族蛋白1(HMGB1)通过调控自噬活性对心肌纤维化的影响及作用机制。**方法:**将人心肌细胞AC16培养于DMEM培养基中,用不同浓度的HMGB1(0、4、20、100 μg/L)干预AC16细胞6 h,免疫荧光染色检测心脏成纤维细胞活化的标志性蛋白α平滑肌肌动蛋白(α-SMA)的表达水平,Western blot法检测心肌自噬相关蛋白哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)、磷酸化mTOR(p-mTOR)、微管相关蛋白1轻链3(LC3)、磷酸肌醇-3-激酶3(PIK3C3)、可溶性及不可溶性P62、α-SMA、I型胶原蛋白(Collagen I)在AC16中的表达水平。免疫共沉淀检测α-SMA与P62之间的相互作用。**结果:**不同浓度的HMGB1刺激AC16细胞,AC16细胞中心肌纤维化标志蛋白Collagen I与α-SMA的表达水平呈浓度依赖性升高,自噬蛋白PIK3C3、不可溶性P62的蛋白表达水平,p-mTOR与mTOR的比值,LC3-II与LC3-I的比值呈浓度依赖性升高,可溶性P62的蛋白表达水平呈浓度依赖性降低。各组间的差异均有统计学意义($P < 0.01$)。免疫共沉淀实验显示P62与α-SMA存在相互作用。**结论:**外源性HMGB1可抑制AC16细胞中的自噬流,诱导AC16细胞纤维化。

【关键词】高迁移率族蛋白1;AC16细胞;自噬;心肌纤维化

doi: 10.3969/j.issn.1673-6583.2024.02.012

HMGB1 induces myocardial fibrosis by regulating autophagy factor P62 NIE Yaqin¹, WU Rina², JIN Hui², ZHANG Guangping², LI Yongming², ZHI Li², XUE Shixuan², NARI Gele². 1.Baotou Medical College Center Clinical Medical College, Baotou 014040; 2.Cardiovascular Department of Baotou Central Hospital, Baotou 014040, China

【Abstract】 Objective: To explore the effect of high mobility group box protein 1 (HMGB1) on myocardial fibrosis by regulating autophagy activity of human cardiomyocytes (AC16) and its possible mechanism. **Methods:** AC16 cells were cultured in DMEM medium and treated with different concentrations of HMGB1 (0, 4, 20, 100 μg/L) for 6 h. The expression of α-smooth muscle actin (α-SMA), a marker protein of cardiac fibroblast activation, was detected by immunofluorescence staining. Western blot was used to determine the expression levels of myocardial autophagy-related proteins mammalian target of rapamycin (mTOR), phosphorylated mTOR (p-mTOR), light chain 3 (LC3), phosphoinositide-3-kinase 3 (PIK3C3), soluble and insoluble p62, α-SMA, and collagen I (Collagen I) in AC16. The interaction between α-SMA and p62 was assessed by co-immunoprecipitation. **Results:** The expression levels of myocardial fibrosis marker protein (collagen I and α-SMA), autophagy protein PIK3C3, insoluble p62, P-mTOR/mTOR ratio, LC3-II/LC3-I ratio were increased in a dose-dependent manner. In contrast, the expression level of soluble p62 was decreased in a dose-dependent manner. The differences between groups were statistically significant (all $P < 0.01$). There was an interaction between p62 and α-SMA. **Conclusion:** Exogenous HMGB1 inhibits autophagic flux in AC16 cells

基金项目:内蒙古医科大学科技百万工程联合项目[YKD2020KJBW(LH)065]

作者单位:014040 包头医学院中心临床医学院(聂雅琴);014040 包头市中心医院心血管内科(乌日娜,金慧,张广平,李永明,智利,薛仕焯,娜日格乐)

通信作者:乌日娜, E-mail:46505898@qq.com

and induces myocardial fibrosis.

【Key words】 High mobility group protein; AC16 cells; Autophagy; Myocardial fibrosis

心肌纤维化是多种心脏疾病、进展的重要环节,心肌细胞代谢异常、心肌肥厚、冠状动脉硬化等因素均可导致心脏受损,引起心肌纤维化,造成心脏功能障碍,甚至威胁生命。心肌纤维化主要表现为心肌中胶原纤维过度沉积,胶原浓度和体积分数显著升高,胶原类型不均衡及排列紊乱^[1]。心肌纤维化参与各种心血管疾病的发生、进展过程,如充血性心力衰竭、高血压性心脏病、心肌梗死、扩张型心肌病等。此外,在代谢性疾病中也可见到不同程度的心肌纤维化^[2]。研究表明,自噬与心肌纤维化密切相关。自噬是溶酶体降解蛋白质的高度保守过程,对机体的生存、分化、发育和稳态至关重要^[3]。高迁移率族蛋白 1 (HMGB1) 为高度保守的核蛋白,广泛分布于哺乳动物细胞中且含量丰富,平均 10~15 个核小体中含有 1 个 HMGB1 分子^[4]。HMGB1 可促进促炎症因子产生,参与细胞增殖、分化、侵袭和自噬等过程^[5]。本研究探讨 HMGB1 通过调控自噬对心肌纤维化产生作用,以期为心肌纤维化的预防及临床诊治提供新方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料

人心肌细胞 AC16 购于同派生物科技股份有限公司细胞库。 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 抗体、I 型胶原蛋白 (Collagen I) 抗体购于英国 Abcam 公司。HMGB1、微管相关蛋白 1 轻链 3 (LC3) - II /LC3- I、P62 抗体、磷酸肌醇-3-激酶 3 (PIK3C3) 抗体购于美国 Sigma 公司。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR)、磷酸化 mTOR (p-mTOR) 抗体购于美国 Cell Signaling Technology 公司。

1.2 细胞培养

AC16 细胞使用含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素的 DMEM 培养基 (完全培养液) 培养,置于 37 °C、5%CO₂ 恒温培养箱中,湿度为 70%~80%。取生长良好的对数生长期细胞用于实验。

1.3 免疫荧光染色检测 AC16 细胞 α -SMA 的表达水平

将 AC16 细胞接种于 12 孔板上,待细胞贴壁后,加入不同浓度的 HMGB1 (0、4、20、100 μ g/L),继续培养 6 h。每孔加入 4% 多聚甲醛室温固定 10

min 后,加入 0.5% Triton X-100 室温静置 10 min。3% 牛血清蛋白封闭 1 h 后,加入 α -SMA 一抗 (稀释比例 1 : 100), 4 °C 孵育过夜,加入山羊抗兔 IgG 二抗 (稀释比例 1 : 200),避光室温孵育 1 h。4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI) 封片后置于激光共聚焦显微镜下观察并拍照。

1.4 Western blot 法检测 AC16 细胞自噬信号通路蛋白及纤维化因子表达水平

取 AC16 细胞, RIPA 裂解液提取蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。取蛋白进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, PVDF 转膜,加入 LC3、P62、 α -SMA、Collagen I、p-mTOR、mTOR 一抗, 4 °C 孵育过夜,加入羊抗兔 IgG 二抗,室温孵育 2 h。ECL 显影,采用 Gel-Pro3.0 软件分析蛋白的相对表达水平。

1.5 免疫共沉淀法检测 P62 与 α -SMA 的作用关系

将细胞培养皿中的培养基丢弃,加入 Co-IP 裂解液, 4 °C、10 000 \times g 离心 30 min,取上清液。按说明书进行操作,将变性后的 Input 和 IP 液进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,采用免疫共沉淀法检测 P62 与 α -SMA 之间是否存在相互作用。

1.6 统计学分析

应用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析,计量资料以均数 \pm 标准差表示。多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 AC16 细胞中 Collagen I 和 α -SMA 的表达水平比较

Western blot 检测显示,用不同浓度的 HMGB1 刺激 AC16 细胞,AC16 细胞中 Collagen I 与 α -SMA 的蛋白表达水平呈浓度依赖性升高。组间两两比较显示,各组间 Collagen I 与 α -SMA 的蛋白表达水平的差异均有统计学意义 (P 均 < 0.01)。见表 1、图 1。

免疫荧光染色显示, HMGB1 (100 μ g/L) 作用于 AC16 细胞后, α -SMA 的表达水平升高。见图 2。

表1 不同浓度HMGB1作用于AC16细胞后Collagen I和α-SMA的蛋白表达水平比较

组别	Collagen I	α-SMA
HMGB1 0 μg/L组	0.55±0.33	0.93±0.30
HMGB1 4 μg/L组	0.76±0.45 ⁽¹⁾	1.19±0.15 ⁽¹⁾
HMGB1 20 μg/L组	0.97±0.51 ⁽²⁾	1.30±0.14 ⁽²⁾
HMGB1 100 μg/L组	1.19±0.48 ⁽³⁾	1.61±0.14 ⁽³⁾

注：与HMGB1 0 μg/L组相比，⁽¹⁾*P*<0.01；与HMGB1 4 μg/L组相比，⁽²⁾*P*<0.01；与HMGB1 20 μg/L组相比，⁽³⁾*P*<0.01

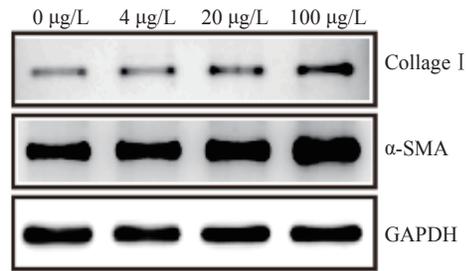


图1 不同浓度HMGB1作用于AC16细胞后Collagen I和α-SMA蛋白表达情况

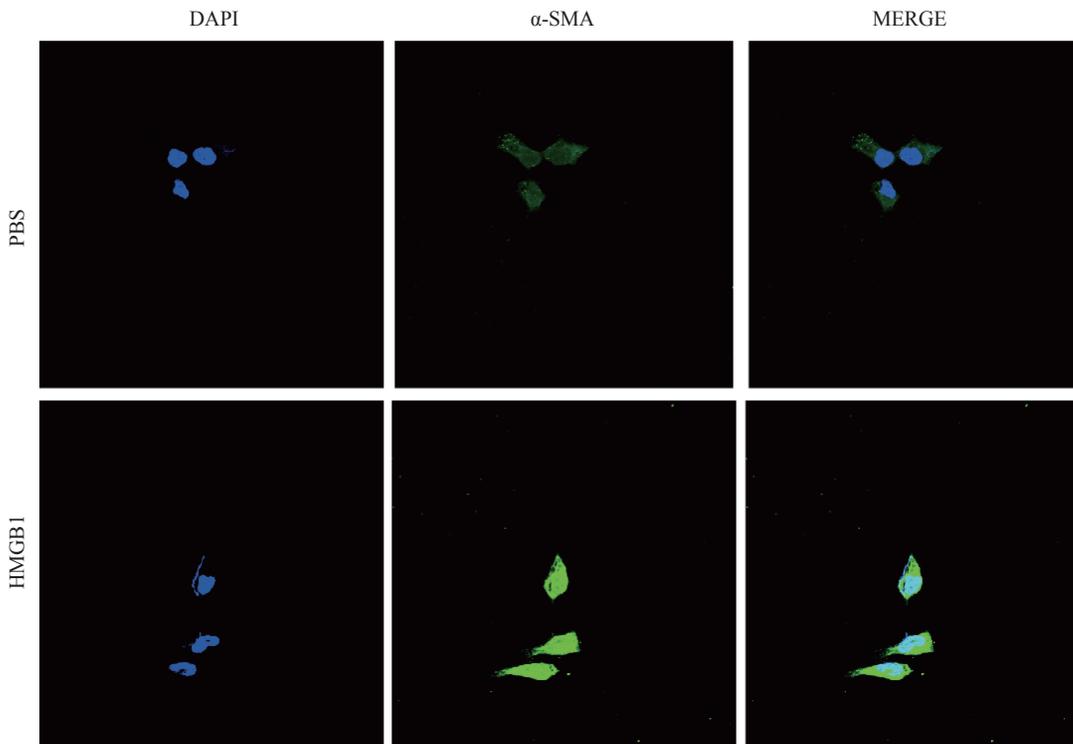


图2 免疫荧光染色检测100 μg/L HMGB1作用于AC16细胞后α-SMA的蛋白表达情况

2.2 各组AC16细胞中自噬相关蛋白的表达水平比较

Western blot 检测显示，用不同浓度的 HMGB1 刺激 AC16 细胞，AC16 细胞 p-mTOR 与 mTOR 的比值 (p-mTOR/mTOR)，PIK3C3、不可溶性 P62 的蛋白表达水平，LC3- II 与 LC3- I 的比值 (LC3- II /LC3- I) 呈浓度依赖性升高，可溶性 P62 的蛋白表达水平呈浓度依赖性降低。组间两两比较显示，各组间 p-mTOR/mTOR，PIK3C3、不可溶性 P62 的蛋白表达水平，LC3 II /LC3 I 的差异均有统计学意义 (*P* 均<0.01)。见表 2、图 3。

2.3 P62与α-SMA的关系

免疫共沉淀实验显示，P62 与 α-SMA 存在相

互作用。见图 4。

3 讨论

心肌纤维化是以细胞外基质 (ECM) 成纤维细胞异常增殖，胶原过度沉积及异常分布为特征的病理现象。急性心肌缺血及慢性心脏疾病均可导致心脏压力负荷增加，进而促进心肌纤维化的进展^[6]。心脏成纤维细胞 (CFB) 在心肌纤维化中起重要作用。当机体处于稳态时，CFB 通过调节 ECM 的产生维持心脏结构的完整性。在病理条件下，CFB 激活、增殖，并分泌过量的 ECM 蛋白，导致心肌纤维化，引起心律失常、心脏室壁运动减低及心脏重构^[7-8]。延缓心肌纤维化有助于改善心血管疾病的预后^[9-11]，但目前尚无有效预防及治疗方案。

表2 不同浓度HMGB1作用于AC16细胞后自噬相关蛋白的表达水平比较

组别	p-mTOR/mTOR	PI3KC	可溶性P62	不可溶性P62	LC3- II /LC3- I
HMGB1 0 μg/L组	0.33±0.02	0.14±0.35	1.55±0.32	0.22±0.09	0.10±0.18
HMGB1 4 μg/L组	0.38±0.07 ⁽¹⁾	0.26±0.51 ⁽¹⁾	1.38±0.37 ⁽¹⁾	0.43±0.33 ⁽¹⁾	0.09±0.01 ⁽¹⁾
HMGB1 20 μg/L组	0.70±0.16 ⁽²⁾	0.42±0.08 ⁽²⁾	1.21±0.29 ⁽²⁾	0.65±0.30 ⁽²⁾	0.21±0.01 ⁽²⁾
HMGB1 100 μg/L组	1.35±0.45 ⁽³⁾	0.48±0.06 ⁽³⁾	0.92±0.23 ⁽³⁾	0.89±0.29 ⁽³⁾	0.37±0.02 ⁽³⁾

注：与HMGB1 0 μg/L组相比，⁽¹⁾P<0.01；与HMGB1 4 μg/L组相比，⁽²⁾P<0.01；与HMGB1 20 μg/L组相比，⁽³⁾P<0.01

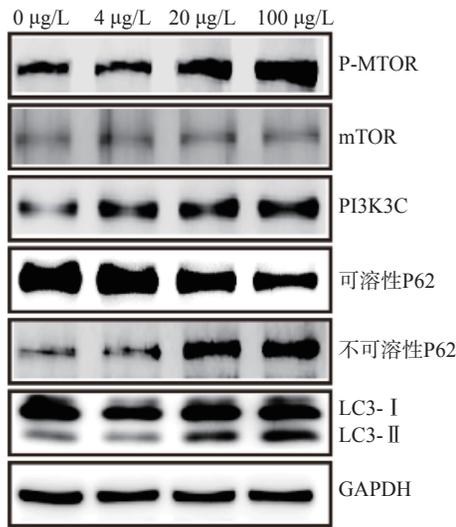


图3 不同浓度HMGB1作用于AC16细胞后自噬相关蛋白的表达情况

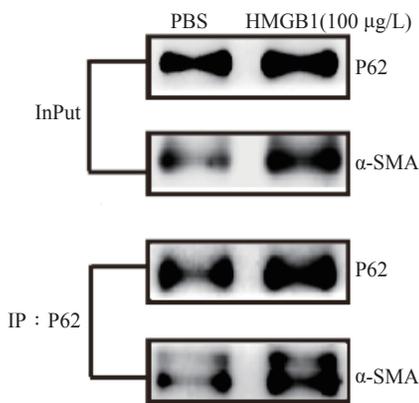


图4 AC16细胞中p62与α-SMA的相互作用

HMGB1 为高度保守的核蛋白，在感染或无菌炎症时可从细胞中释放。研究显示，心肌纤维细胞在高糖高脂（HGHL）干预后，HMGB1 的表达水平显著增加，提示 HMGB1 参与 HGHL 促心脏纤维化过程^[12]。张妍等^[13]研究发现，阻断 HMGB1 可减轻大鼠心肌梗死导致的纤维化。在急性血吸虫病导致的肝纤维化中，抑制 HMGB1 可显著降低肝

纤维化水平^[14]。上述研究提示，抑制 HMGB1 可能是治疗组织纤维化的有效途径。为了明确 HMGB1 对心肌纤维化的作用，我们前期研究用不同浓度 HMGB1 作用于小鼠原代心肌成纤维细胞，发现 HMGB1 导致的 Collagen I 和 α-SMA 表达水平升高呈浓度依赖性^[15]。基于此结果，本研究用不同浓度的外源性 HMGB1 作用于 AC16 细胞，结果提示随着外源性 HMGB1 浓度的增加，AC16 细胞中心肌纤维化标志蛋白 Collagen I 和 α-SMA 表达水平逐渐升高。

有研究发现，改变自噬水平可以改善心肌纤维化^[16]。自噬见于多种心血管疾病，如心肌慢性缺血、心肌纤维化、心脏重构等。自噬可抑制细胞凋亡，减轻组织损伤^[17]，但过度自噬则导致细胞死亡。因此，只有当自噬活性保持在最佳平衡水平时，才可以保持正常的心血管功能^[18]。P62 为致癌蛋白，定位于细胞核，当细胞发生自噬时，细胞质中的 P62 与泛素化蛋白结合，随后与自噬小体内膜上的 LC3- II 蛋白结合形成复合物，并在自噬溶酶体中降解^[19]。当自噬受到抑制时，P62 的表达水平会明显增加^[20]，所以 P62 蛋白是自噬发生的重要标志蛋白。在自噬发生时，胞浆型 LC3 即 LC3- I 会酶解掉一小段多肽，转变为膜型 LC3 即 LC3- II，因此，LC3- II /LC3- I 可反映自噬水平的高低。为了评估自噬在 AC16 细胞纤维化中的作用，本研究检测 AC16 细胞中自噬标志性蛋白的表达水平，结果显示 LC3- II /LC3- I 增大，提示自噬被激活，LC3- II 的增加可能是由于自噬溶酶体降解过程受阻。同时，p-mTOR/mTOR、PIK3C3 的表达水平显著增加，提示自噬受抑制；可溶性 P62 的表达水平降低，不可溶性 P62 的表达水平升高，无论 LC3 是否发生由 I 型向 II 型的转化，均代表自噬流受到抑制。以上实验结果表明，在高浓度 HMGB1 作用下，即使 AC16 细胞中存在更多的 LC3- II，细胞内的自噬流

依然受到抑制。

HMGB1 可在不同生理条件下从细胞中释放,参与调节心肌细胞自噬及心肌纤维化^[21-22]。Du 等^[23]研究发现阿霉素可通过促进 HMGB1 表达,使心肌细胞自噬和凋亡增加,引起心脏损伤。Hu 等^[24]发现,心肌细胞在缺氧/复氧时,会出现自噬活性的改变,这可能与 HMGB1 的释放有关。本课题组前期通过免疫荧光共定位和免疫共沉淀实验发现,在 HMGB1 的作用下,小鼠原代心肌成纤维细胞内 α -SMA 与 P62 之间存在相互作用。本研究通过免疫共沉淀实验验证,AC16 细胞中内源性的 P62 与 α -SMA 之间存在相互作用,可能导致 α -SMA 在细胞内堆积,并引起自噬流受阻。

本研究证实,外源性 HMGB1 可抑制 AC16 细胞中的自噬流,诱导 AC16 细胞纤维化。抑制 HMGB1 对心肌细胞的作用,有望成为预防与治疗心肌纤维化的新方法。

参 考 文 献

- [1] Lu C, Yang Y, Zhu Y, et al. An intervention target for myocardial fibrosis: autophagy[J]. *Biomed Res Int*, 2018, 2018:6215916.
- [2] 洪子, 杨巍. 心肌纤维化发病机制及治疗的研究进展[J]. *临床与病理杂志*, 2022, 42(1):220-225.
- [3] Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease[J]. *Cell*, 2008, 132(1):27-42.
- [4] Pellegrini L, Foglio E, Pontemuzzo E, et al. HMGB1 and repair: focus on the heart[J]. *Pharmacol Ther*, 2019, 196:160-182.
- [5] Lotze MT, Tracey KJ. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal[J]. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5(4):331-342.
- [6] Park S, Ranjbarvaziri S, Zhao P, et al. Cardiac fibrosis is associated with decreased circulating levels of full-length CILP in heart failure[J]. *JACC Basic Transl Sci*, 2020, 5(5):432-443.
- [7] Fan D, Takawale A, Lee J, et al. Cardiac fibroblasts, fibrosis and extracellular matrix remodeling in heart disease[J]. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 2012, 5(1):15.
- [8] Travers JG, Kamal FA, Robbins J, et al. Cardiac fibrosis: the fibroblast awakens[J]. *Circ Res*, 2016, 118(6):1021-1040.
- [9] Parim B, Sathibabu Uddandrao VV, Saravanan G. Diabetic cardiomyopathy: molecular mechanisms, detrimental effects of conventional treatment, and beneficial effects of natural therapy[J]. *Heart Fail Rev*, 2019, 24(2):279-299.
- [10] Yun W, Qian L, Yuan R, et al. Periplocymarin protects against myocardial fibrosis induced by β -adrenergic activation in mice[J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 139:111562.
- [11] Li Y, Liu M, Song X, et al. Exogenous hydrogen sulfide ameliorates diabetic myocardial fibrosis by inhibiting cell aging through SIRT6/AMPK autophagy[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11:1150.
- [12] 林晓欣, 王振华. miR-29a/HMGB1 信号通路在高糖高脂诱导的心肌细胞纤维化中的作用[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2020, 25(11):1223-1232.
- [13] 张妍, 田立群, 冯莹, 等. 抑制 HMGB1 对心肌梗死大鼠模型心肌纤维化的影响及机制研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2021, 37(8):927-930.
- [14] Vicentino ARR, Carneiro VC, Allonso D, et al. Emerging role of HMGB1 in the pathogenesis of schistosomiasis liver fibrosis[J]. *Front Immunol*, 2018, 9:1979.
- [15] Wu RN, Yu TY, Zhou JC, et al. Targeting HMGB1 ameliorates cardiac fibrosis through restoring TLR2-mediated autophagy suppression in myocardial fibroblasts[J]. *Int J Cardiol*, 2018, 267:156-162.
- [16] Ackermann MA. Links between mTOR and the immunoproteasome: therapeutic targets for cardiac hypertrophy?[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2015, 89(Pt B):113-115.
- [17] Yan L, Vatner DE, Kim SJ, et al. Autophagy in chronically ischemic myocardium[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(39):13807-13812.
- [18] Kheloufi M, Rautou PE, Boulanger CM. Autophagy in the cardiovascular system[J]. *Med Sci (Paris)*, 2017, 33(3):283-289.
- [19] Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, et al. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(33):24131-24145.
- [20] Mathew R, Karp CM, Beaudoin B, et al. Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62[J]. *Cell*, 2009, 137(6):1062-1075.
- [21] Tang D, Kang R, Zeh HJ, et al. High-mobility group box 1, oxidative stress, and disease[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 14(7):1315-1335.
- [22] Wu CZ, Zheng JJ, Bai YH, et al. HMGB1/RAGE axis mediates the apoptosis, invasion, autophagy, and angiogenesis of the renal cell carcinoma[J]. *Onco Targets Ther*, 2018, 11:4501-4510.
- [23] Du Y, Liu G, Zhao L, et al. Protective effect of miR-204 on doxorubicin-induced cardiomyocyte injury via HMGB1[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020:8819771.
- [24] Hu X, Zhang K, Chen Z, et al. The HMGB1-IL-17A axis contributes to hypoxia/reoxygenation injury via regulation of cardiomyocyte apoptosis and autophagy[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(1):336-341.

(收稿:2023-02-08 修回:2023-12-07)

(本文编辑:胡晓静)