

# 转化生长因子 $\beta 1$ 诱导心肌成纤维细胞转分化过程中 Hedgehog 信号通路的作用机制

<https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-4344.3011>

聂慧娟, 黄织春

2095-4344.3011

投稿日期: 2020-05-19

送审日期: 2020-05-21

采用日期: 2020-06-12

在线日期: 2020-08-25

中图分类号:

R453; R541; R318

文章编号:

2095-4344(2021)05-00754-07

文献标识码: B

## 文章快速阅读:

### 文章特点一

△结合体内及体外实验,共同说明了Hedgehog-Gli信号通路参与心肌纤维化的发生和进展过程,今后可能会成为抗心肌纤维化治疗的有效靶点,为新药研发及临床应用提供有用的实验依据。

### 体外实验(原代培养心肌成纤维细胞)

#### 观察:

- (1) 转化生长因子  $\beta 1$  干预后心肌成纤维细胞 Gli1 mRNA 及蛋白表达变化;
- (2) 转化生长因子  $\beta 1$  干预对心肌成纤维细胞上皮间质转分化的影响;
- (3) 阻断 Hedgehog 通路对转化生长因子  $\beta 1$  诱导心肌成纤维细胞 Gli1 表达及上皮间质转分化的影响。

#### 结论:

Hedgehog-Gli 信号通路参与心肌纤维化及心肌成纤维细胞转分化发生发展过程

### 体内实验(C57BL/6小鼠)

#### 左冠状动脉前降支结扎造模

#### 观察:

RT-PCR、Western blot 及免疫荧光定性定量检测 Gli1 及上皮间质转分化标记物 mRNA 及蛋白表达。

## 文题释义:

**上皮间质转分化:** 是人体正常发育过程中或者机体在各种致病因素刺激下, 上皮表型向间质表型转分化的过程, 进而失去正常功能, 组织器官发生纤维化异常增殖。

**Hedgehog信号通路:** 是与人体生长、发育及疾病的发生发展有着密切关系的细胞通路, 参与胚胎发育、器官形成及多种疾病损伤发病过程, 但在心肌纤维化中的相关作用不明确, 此次研究探讨其参与心肌纤维化的作用机制。

## 摘要

**背景:** 近年来越来越多的研究表明Hedgehog信号通路异常活化广泛参与全身多组织器官疾病的损伤修复过程, 但其在心肌纤维化中的相关作用尚不明确。

**目的:** 研究阻断Hedgehog-Gli信号通路对转化生长因子 $\beta 1$ 诱导的心肌成纤维细胞上皮间质转分化过程的影响。

**方法:** ①动物实验: 左冠状动脉结扎法建立小鼠心肌梗死模型, 苏木精-伊红和Masson染色法观察梗死后3、7、14 d心肌组织的病理改变, 用RT-PCR、Western blot和免疫荧光法检测不同时段Gli1 mRNA及蛋白的时空表达, RT-PCR和免疫荧光定量检测加入特异性阻断剂后Gli1的mRNA及蛋白的时空表达变化。②细胞实验: 差速贴壁法原代培养SD乳鼠心肌成纤维细胞, 采用不同质量浓度(0, 1, 5, 10  $\mu\text{g/L}$ )转化生长因子 $\beta 1$ 刺激心肌成纤维细胞, RT-PCR、Western blot检测Gli1 mRNA及蛋白表达, 选用10  $\mu\text{g/L}$ 的转化生长因子 $\beta 1$ 诱导心肌成纤维细胞24 h, 免疫荧光法检测Gli1蛋白时空表达及上皮间质转分化标记物的表达。分别采用GANT61和Cyclopamine特异性阻断Hedgehog信号通路中的Gli1和Smo 24 h后, 加入10  $\mu\text{g/L}$ 转化生长因子 $\beta 1$ , RT-PCR检测Gli1 mRNA表达变化, 荧光免疫法检测Gli1的时空表达以及上皮间质转分化标记物的表达变化。

**结果与结论:** ①动物实验结果: 随着梗死后时间延长, 小鼠心肌Gli1的mRNA和蛋白表达水平逐渐升高, 而加入Hedgehog通路特异性阻断剂后梗死组织中Gli1的mRNA及蛋白表达均有下降。②细胞实验结果: 采用转化生长因子 $\beta 1$ 刺激后, 心肌成纤维细胞上皮间质转化为肌成纤维细胞(特异性标记物 $\alpha$ -SMA阳性); 随着转化生长因子 $\beta 1$ 干预剂量增加, Gli1的mRNA及蛋白表达逐渐增加。采用阻断剂特异性阻断Hedgehog信号通路中的Gli1和Smo 24 h后, Gli1的mRNA和蛋白表达均受抑制, 同时伴有上皮间质转化发生的生物标记物E-Cadherin和Vimentin的表达改变, 证实发生了上皮间质转化。③结合体内及体外实验, 共同证实了Hedgehog-Gli信号通路参与心肌纤维化及心肌成纤维细胞转分化发生发展过程。

**关键词:** 转化生长因子 $\beta 1$ ; 通路; 上皮间质转化; 心肌; 成纤维细胞; 心肌梗死; 人类间质瘤相关致癌基因同源体1

**缩略语:** 转化生长因子 $\beta 1$ : transforming growth factor-beta 1, TGF- $\beta 1$

## The role of Hedgehog signaling pathway in transforming growth factor beta1-induced myofibroblast transdifferentiation

Nie Huijuan, Huang Zhichun

Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010059, Inner Mongolia Autonomous Region, China

Nie Huijuan, MD, Associate chief physician, Associate professor, Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010059, Inner Mongolia Autonomous Region, China

**Corresponding author:** Huang Zhichun, MD, Chief physician, Professor, Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University,

内蒙古医科大学附属医院心血管内科, 内蒙古自治区呼和浩特市 010059

**第一作者:** 聂慧娟, 1983年生, 内蒙古自治区呼和浩特市人, 2018年重庆医科大学毕业, 博士, 副主任医师, 副教授, 主要从事冠心病的基础研究与临床诊疗研究。

**通讯作者:** 黄织春, 博士, 主任医师, 教授, 内蒙古医科大学附属医院心血管内科, 内蒙古自治区呼和浩特市 010059

<https://orcid.org/0000-0001-5878-9882> (聂慧娟)

**基金资助:** 内蒙古自然科学基金面上项目(2016MS(LH)0802), 项目负责人: 聂慧娟

**引用本文:** 聂慧娟, 黄织春. 转化生长因子  $\beta 1$  诱导心肌成纤维细胞转分化过程中 Hedgehog 信号通路的作用机制 [J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(5):754-760.



## Abstract

**BACKGROUND:** In recent years, increasing studies have shown that abnormally activated Hedgehog signaling pathway is widely involved in the injury repair of systemic multi-tissue organ diseases, but its related role in myocardial fibrosis is still unclear.

**OBJECTIVE:** To study the effect of blocking Hedgehog-Gli signaling pathway on epithelial-mesenchymal transition of myocardial fibroblasts induced by transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1).

**METHODS:** (1) Animal experiment: The model of myocardial infarction in mice was established by left coronary artery ligation. The pathological changes of myocardial tissue were observed by hematoxylin-eosin staining and Masson staining at 3, 7, and 14 days after infarction. The mRNA, protein and spatio-temporal expressions of Gli1 at different time points were detected by RT-PCR, western blot and immunofluorescence. The mRNA and protein expression changes of Gli1 before and after adding inhibitor were detected using RT-PCR and immunofluorescence. (2) Cell experiment: The primary cultured myocardial fibroblasts of neonatal Sprague-Dawley rats were cultured by differential adherent method. The cultured myocardial fibroblasts were cultured with 0, 1, 5, and 10  $\mu$ g/L TGF- $\beta$ 1 intervention. The expression of Gli1 mRNA and protein was detected by RT-PCR and western blot, respectively. Myocardial fibroblasts were induced by TGF- $\beta$ 1 of 10  $\mu$ g/L for 24 hours, and the spatio-temporal expression of Gli1 protein and expression of epithelial-mesenchymal transition markers were detected by immunofluorescence. Gli1 and Smo in Hedgehog signaling pathway were specifically blocked by GANT61 and Cyclopamine for 24 hours, respectively, and 10  $\mu$ g/L TGF- $\beta$ 1 was added. The mRNA expression level of Gli1 was detected by RT-PCR, and the spatio-temporal expression of Gli1 and expression of epithelial-mesenchymal transition markers were detected by immunofluorescence.

**RESULTS AND CONCLUSION:** (1) Results of the animal experiment: As the time after infarction prolonged, the mRNA and protein expression levels of Gli1 in the mouse myocardium gradually increased, but the mRNA and protein expressions of Gli1 in the infarcted tissue decreased after addition of the Hedgehog pathway specific blocker. (2) Results of the cell experiment: After stimulation with TGF- $\beta$ 1, the epithelial mesenchyme of myocardial fibroblasts transformed into myofibroblasts (positive for  $\alpha$ -SMA). As the intervention dose of TGF- $\beta$ 1 increased, the mRNA and protein expression of Gli1 gradually increased. After specifically blocking Gli1 and Smo in the Hedgehog signaling pathway for 24 hours, the mRNA and protein expression levels of Gli1 were inhibited, accompanied by the changes in the expression of E-Cadherin and Vimentin during epithelial-mesenchymal transition, indicating the existence of epithelial-mesenchymal transition. By the combination of *in vivo* and *in vitro* experiments, this study confirmed that the Hedgehog-Gli signal pathway is involved in the occurrence and development of myocardial fibrosis and myocardial fibroblast transdifferentiation.

**Key words:** transforming growth factor- $\beta$ 1; pathway; epithelial-mesenchymal transition; myocardium; fibroblast; myocardial infarction; human glioma associated oncogene homolog 1

**Funding:** the Natural Science Foundation of Inner Mongolia Autonomous Region (General Project), No. 2016MS(LH)0802 (to NHJ)

**How to cite this article:** NIE HJ, HUANG ZC. The role of Hedgehog signaling pathway in transforming growth factor beta1-induced myofibroblast transdifferentiation. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2021;25(5):754-760.

## 0 引言 Introduction

急性心肌梗死是临床常见的急危重症，目前经皮冠状动脉介入术和药物治疗等临床治疗手段虽然降低了其死亡率，但无法完全阻止心肌梗死后心室重塑的发生发展。心肌纤维化在心室重构中起着非常重要的作用，逆转心室重构、抗心肌纤维化治疗已经成为众多心血管病治疗的靶标，也是目前心脏病学中最棘手的难点问题之一<sup>[1-3]</sup>。

心肌成纤维细胞是心肌间质细胞的主要组成部分，参与心脏发育、细胞信号传导、电生理功能等过程<sup>[4]</sup>。转化生长因子  $\beta$ 1(transforming growth factor-beta 1, TGF- $\beta$ 1) 是一种多功能的细胞因子，是公认的主要促纤维化因子<sup>[5-6]</sup>，心肌成纤维细胞在 TGF- $\beta$ 1 等刺激因子作用下，发生上皮间质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT) 触发调控上皮细胞功能发生改变为间叶细胞诱导增殖分化为肌成纤维细胞<sup>[7]</sup>，上皮间质转化是纤维化发生的病理基础，心肌成纤维细胞具有较强的分泌胶原蛋白的能力，是心肌组织受损时常见的异常增殖的细胞，是心肌纤维化组织重构的重要表现<sup>[8-9]</sup>。

Hedgehog 基因呈多毛团状，像畏缩成一团的刺猬而得名，由分泌蛋白配体(Hh)、跨膜蛋白受体(Ptch)、跨膜 G 蛋白偶联受体(Smo) 和神经质瘤相关癌基因(Gli) 组成，在哺乳动物中存在 3 种 Hedgehog 同源基因：Sonic Hedgehog(SHH)、Indian Hedgehog(IHH) 和 Desert Hedgehog(DHH)，以 SHH 应用最为广泛，SHH 通路对细胞命运的决定是通过调节多种 Gli 基因表达的组合完成，包括 Gli1、Gli2、Gli3，其中 Gli1 是 Hedgehog 的激活因子也是靶基因<sup>[10-12]</sup>。Hedgehog-Gli(Hh-Gli) 信号转导通路是与人体生长、发育及疾病的发生发展有着密切关系的细胞通路，广泛参与全身多组织器官等的发育及疾病的损伤修复等过程，

如多种肿瘤的发生发展以及神经系统的发育等<sup>[13-15]</sup>。

该研究拟揭示 TGF- $\beta$ 1 在心肌成纤维细胞增殖分化中的作用以及 Hedgehog-Gli 信号通路在心肌纤维化形成发展中的影响，通过体内及体外实验共同探讨 Hedgehog-Gli 信号通路参与心肌纤维化增殖分化中的作用。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 动物建模实验及体外细胞学实验。

1.2 时间及地点 实验于 2016 年 7 月至 2017 年 7 月在重庆医科大学动物实验中心 IVC 动物房完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 雄性健康小鼠 C57BL/6 40 只，生长良好，体质量 (30 $\pm$ 10) g，小鼠全部饲养在重庆医科大学实验动物中心 IVC(Individually Ventilated Cages) 动物房，实验所有的操作均在无菌超净操作台里面进行。选取出生 1-3 d 的 SD 乳鼠，SPF 级别，取材地点：重庆医科大学实验动物中心 2 楼垂直层流超净台，实验动物合格证编号：CQMULA【2010】182。实验方案经内蒙古医科大学动物实验伦理委员会批准，批准号为：YKD2016085。

1.3.2 实验试剂及仪器 TGF- $\beta$ 1 购于美国 PeproTech 公司；兔抗人 Gli1 多克隆抗体、兔抗波形蛋白一抗、荧光标记素羊抗兔二抗购于美国 Abcam 公司；胎牛血清、DMEM(高糖) 培养液购于美国 Gibco 公司；II 型胶原酶、DEPC 水购于美国 Sigma Aldrich 公司；RNA 提取及反转录试剂盒购于上海富衡生物公司；苏木精-伊红及 Masson 染色试剂盒购于上海碧云天公司；肌钙蛋白测试卡条购于上海医疗器械有限公司；Image-pro plus 图像分析软件系统(日本, OLYMPUS 公司)。

1.4 方法

1.4.1 动物体内实验

(1) 分组干预方法: 共 40 只 C57BL/6 小鼠, 随机分为 4 组: 对照组, 心肌梗死组, 心梗 +GANT61 组, 心梗 +Cyclopamine 组, 每组 10 只。后 2 组每日尾静脉给予 10 μmol/L GANT61(Hedgehog 信号通路下游产物 Gli1 的抑制剂) 或 10 μmol/L Cyclopamine(Hedgehog 信号通路下游产物 Smo 的抑制剂), 连续给药 2 周, 之后与心肌梗死组一起进行前降支结扎心肌梗死造模。

(2) 心肌梗死模型的制备: 小鼠称体质量, 10% 水合氯醛按 0.3 mg/g 的剂量腹腔麻醉, 待挣扎不剧烈时, 用固定胶带将小鼠固定, 碘伏消毒胸颈部皮肤备皮, 气管切开插管, 调整好呼吸机参数辅助呼吸, 小鼠取右侧卧位, 横向逐层切开皮肤, 剪开肌肉, 左侧第三、四肋间钝性分离, 充分暴露左心耳及左心室, 吸取两三滴利多卡因注射液轻滴于心脏表面, 体式显微镜下, 用 7-0 带线缝合针结扎左冠状动脉前降支下 1/3 处, 进针深度选取 0.5 mm 为准, 连接心电图机, 观察心室前壁颜色变化, 20 min 左右可见远离梗死区域心肌组织呈深红色, 而结扎区域心肌变为苍白色, 且结扎区域心肌室壁运动明显减弱, 待有自主呼吸, 脱机缝合并再次消毒。术后予肌注青霉素粉针 10×10<sup>4</sup> U/d, 给药 3 d。

动物造模目的、技术方法等相关问题	
造模目的:	建立小鼠心肌梗死模型
借鉴已有标准动物模型造模	参考文献 [16] 方法建立小鼠心肌梗死模型
选择动物的条件:	雄性, 体质量 (30±10) g
模型与所研究疾病的关系:	左冠脉前降支结扎法符合临床心肌梗过程, 齐同性好
动物来源及品系:	C57BL/6 小鼠
造模技术描述:	经典的左冠状动脉结扎法制造心肌梗造模
动物数量及分组方法:	40 只分为 4 组, 对照组, 心肌梗死组, 心梗 + GANT61 组, 心梗 +Cyclopamine 组, 每组 10 只
造模成功评价指标:	心电图 ST-T 抬高, cTNT 阳性
造模后实验观察指标:	苏木精 - 伊红及 Masson 染色进行梗死心肌病理检测
造模过程中动物死亡原因:	感染、肺损伤、麻醉复苏不成功
如何补充造模过程中缺失的动物:	补充同样品系小鼠
伦理委员会批准:	实验方案经内蒙古医科大学动物实验伦理委员会批准 (批准号 YKD2016085)

心肌梗死造模成功的标准: ①术后心电图可见广泛导联 ST 段抬高; ②造模成功 6 h 以后检测肌钙蛋白 (cTNT) 显示为阳性, 肌钙蛋白检测试剂盒阳性标准为: 试剂盒指示标识变为深红色。符合以上 2 条即为心梗造模成功, 见图 1。

(3) 心肌组织病理学检测: 心肌梗死组造模成功后 3, 7, 14 d 取材, 同时取对照组小鼠的正常心肌, 心肌组织石蜡包埋、切片, 行苏木精 - 伊红及 Masson 染色后光镜下观察心肌组织红染, 胶原纤维蓝染, 明显可见纤维化范围。计算机扫描, 采用 Image-pro plus 图像分析软件计算测定心肌胶原面积, 随机切片 5 个视野取平均值。

(4) 实时荧光定量聚合酶链式反应 (RT-PCR) 检测 Gli1 mRNA 表达: 提取 4 组小鼠的新鲜心肌组织 (心肌梗死组 3, 7, 14 d, 对照组及 2 个抑制剂组梗死后 14 d 取材), Invitrogen-Trizol 进行 RNA 提取, 利用 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 比定量检测, 每份 RNA 样本的定量检测采用 One Step RT-PCR 试剂盒 (Tak Kala biological, Tokyo, Japan), 首先进行反转录 (42 °C, 5 min, 5 °C, 10 s), 然后利用 ABI PRISM 7900HT 序列系统检测进行 PCR 反应 (95 °C 反应 5 s, 60 °C 反应 30 s, 40 个循环), 根据目的基因数量计算孔数, 最少 3 个, 外加预留 1 个。将 RNA 反转录为互补 DNA, 设计引物序列, β-actin 为内参, 通过 2<sup>-ΔΔCt</sup> 检测 mRNA 含量, 引物链 (PCR 引物由上海生工有限公司设计合成) 见表 1。

表 1 | 引物序列  
Table 1 | The primer sequences

基因名称	上游引物	下游引物
Gli1	5-CTG CAG CTG CAG ACG GTT ATC-3	3-AGC CTC CTG GAG ATG TGC AT-3
TGF-β1	TAC AGG GCT TTC GCT TCA GTG	TGG AGC TGT GCA GGT GTT GAG
Beta-actin	5- AGT GTG ACG TTG ACA TCC GT-3	5-GCA GCT CAG TAA CAG TCC GC-3

(5) Western blot 法检测 Gli1 的蛋白表达: 提取各组小鼠新鲜心肌组织 (取材时间同 RT-PCR), 利用 NE-PER™ 细胞核和细胞浆提取试剂 (Sigma-Aldrich Corporation, St.Louis, USA) 提取心肌组织总蛋白, 用 BCA 法测定蛋白浓度, 12% SDS-PAGE 凝胶分离蛋白电泳转膜, 2% BSA(Sigma-Aldrich Corporation, St.Louis, USA) 溶于 PBS, 4 °C 冰箱中过夜, 封膜, 后将膜放置于已经稀释好的山羊抗兔二抗中 (1 : 1000), 室温下孵育 2 h, A、B 液试剂按体积等量混合后配置显影剂, 使其与膜蛋白要充分接触。采用增强化学免疫荧光仪检测, Gel-Pro 分析软件检测每个目标泳道分光度, GAPDH 相对光密度比值表示, 最后进行胶片扫描及拍照。

(6) 免疫荧光染色观察 Gli1 时空表达: 取对照组及心肌梗死组 14 d 小鼠离体心脏, 预冷 4 °C 的 PBS 冲洗 5 min×3, 不同浓度蔗糖分别行梯度脱水 (浓度分别为 15% 及 30%), 优化切片温度 OCT 进行包埋制备 5 μm 的切片, 用 0.1% Triton 液破膜, 37 °C 孵育 1 h, 10% 山羊血清一抗 1 : 50 稀释, 4 °C 孵育过夜, 预留其中一管, 予 PBS 作为阴性对照组使用, 用 PBS 在室温下冲洗 10 min×3, 二抗 37 °C 环境下孵育 45 min, 注意操作中要避光, PBS 在室温下冲洗 10 min×3, 最后用甘油封固, 5 min 后镜检观察。

1.4.2 细胞实验

(1) 心肌成纤维细胞培养及鉴定: 颈椎脱臼法处死 SD 乳鼠, 局部消毒, 暴露获取心脏, PBS 反复冲洗, 剪碎组织, 胰酶消化及差速贴壁法原代培养心肌成纤维细胞, 培养于 DMEM 和 EMEM 培养基 (GIBCO 公司, Rockville, MD, USA), 倒置相差显微镜观察 SD 乳鼠心肌成纤维细胞形态及抗波形蛋白抗体免疫荧光鉴定。

(2) TGF-β1 干预对心肌成纤维细胞 Gli1 mRNA 及蛋白表达的影响: 选取传代两三代的心肌成纤维细胞, 用无血清培养基培养, 将细胞接种于 24 孔板, 每孔 100 μL (5×10<sup>5</sup> 细

胞), 置于 37 °C、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 24 h, 完成同步化, 然后选用 4 种不同质量浓度 0, 1, 5, 10 μg/L 的 TGF-β1 进行药物干预, 每组细胞加药物都需要换液, 空白组加 DMSO, 置于 37 °C、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 24 h。通过 RT-PCR、Western Blot、免疫荧光检测 Gli1 mRNA 及蛋白表达。

### (3) TGF-β1 干预对心肌成纤维细胞上皮间质转化的影响:

将传代后的心肌成纤维细胞分为 2 组, 对照组和 TGF-β1 干预组, 将细胞接种于 24 孔板, 每孔 100 μL(5×10<sup>5</sup> 细胞), 根据上一个实验确定的最适 TGF-β1 的质量浓度 (10 μg/L) 进行诱导干预, 置于 37 °C、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 24 h, 免疫荧光法检测肌成纤维细胞特异性标记物 α-SMA 表达。

(4) Hedgehog 通路抑制剂对 TGF-β1 诱导心肌成纤维细胞 Gli1 表达及上皮间质转化的影响: 将传代后的心肌成纤维细胞接种于 24 孔板, 每孔 100 μL(5×10<sup>5</sup> 细胞), 实验分为 3 组: 对照组, GANT61 组 (10 μmol/L GANT61) 及 Cyclopamine 组 (10 μmol/L Cyclopamine), 后 2 组先加相应抑制剂干预 24 h, 之后 3 组均加入 10 μg/L TGF-β1, 培养 24 h 后行 RT-PCR 及荧光免疫检测, 观察 Gli1 的 mRNA 表达变化, 观察 GANT61 对 TGF-β1 刺激的成纤维细胞上皮间质转化标记物表达的影响。

1.5 主要观察指标 ①建模成功后小鼠梗死心肌的病理变化及 Gli1 的 mRNA、蛋白及荧光表达; ② TGF-β1 诱导心肌成纤维细胞, 特异性阻断 Hedgehog-Gli 通路, 定性定量检测 Gli1 及上皮间质转化标记物表达变化。

1.6 统计学分析 全部的实验重复 3 次以上, 应用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析, 结果采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用单因素方差分析 AVOVA 法, 如果方差出现不齐时, Welch 法校正。以  $P < 0.05$  为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

### 2.1 动物实验结果

2.1.1 建模成功率 小鼠共计 40 只, 建模成功 25 只, 建模成功率为 62.5%。分析小鼠主要死亡原因为: 感染、肺损伤及麻醉复苏不成功等。

2.1.2 心肌梗死后心肌纤维化病理变化观察 小鼠经左冠状动脉前降支结扎术, 术后可见结扎的损伤区域心肌收缩幅度明显减弱, 颜色变苍白紫绀缺氧状态, 待术后取标本时发现心肌梗死区域心肌组织被纤维瘢痕组织所代替。心肌病理学染色可见: 心肌纤维红染, 胶原纤维蓝染, 心肌梗死发生后心肌细胞排列逐渐紊乱, 炎症细胞浸润, 心肌纤维断裂, 纤维化形成, 随着时间延长, 纤维化逐渐加重。小鼠心肌梗死组织切片经苏木精-伊红染色处理后, 光学显微镜下观察切片。可见结扎区域梗死部位心肌坏死, 少量心肌细胞存活, 大量炎症细胞浸润, 胶原纤维异常增生堆积, 心肌纤维断裂, 排列结构紊乱, 见图 2。

Masson 染色观察组织切片, 心肌组织中蓝色胶原增多明显, 清晰可见纤维化修复病灶存在。坏死心肌溶解, 纤维

化形成。梗死病灶逐渐扩大。心肌组织红染, 胶原纤维蓝染, 明显可见纤维化范围, 见图 3。

2.1.3 小鼠心肌梗死后 Gli1 mRNA 及蛋白表达 RT-PCR 结果显示: 心梗发生后 Gli1 mRNA 表达水平随着时间延长, 表达逐渐增多。Western Blot 结果显示心梗发生后随着时间延长 Gli1 蛋白的表达也是逐渐升高, 结果同 RT-PCR 一致, 呈时间依赖性表达增加, 见图 4。

2.1.4 小鼠心肌梗死后荧光免疫法显示 Gli1 时空表达 选取正常心肌组织及心肌梗死后 2 周的心肌组织进行荧光免疫法检测, 结果显示心肌梗死发生后 14 d 时 Gli1 含量时空表达显著, 图 5 中红色荧光部分即为阳性表达。

2.1.5 Hedgehog 通路抑制剂抑制小鼠心肌梗死后 Gli1 表达 已经证实心肌梗死后心肌组织中 Gli1 的 mRNA 及蛋白表达增高, 加入 Smo 及 Gli1 的特异性阻断剂 Cyclopamine 和 GANT61 特异性阻断 Hedgehog-Gli 通路, 行 RT-PCR 及免疫荧光检测, 结果显示加入抑制剂后 Gli1 的 mRNA 及蛋白时空表达均下降, 见图 6。

### 2.2 细胞实验结果

2.2.1 SD 乳鼠心肌成纤维细胞鉴定 差速贴壁培养法培养 60-90 min 后, 可见心肌成纤维细胞贴壁, 倒置相差显微镜下观察新生 SD 乳鼠心肌成纤维细胞形态, 多为不规则形, 三角形或星形, 一般含有两三个细胞核, 核较大而且多居中, 细胞核呈卵圆形, 胞质透明 (图 7A)。随着细胞融合度的不断增加, 逐渐变为梭形。波形蛋白 Vimentin 是存在于间质起源细胞中间丝的主要结构蛋白, 是心肌成纤维细胞特异性生物学标记物, 波形蛋白 Vimentin 呈阳性表达, 证实培养的细胞为心肌成纤维细胞, 图 7B 中绿色荧光部分即为阳性表达。

2.2.2 TGF-β1 诱导心肌成纤维细胞 Gli1 呈高表达 心肌成纤维细胞在不同质量浓度的 TGF-β1(0, 1, 5, 10 μg/L) 刺激作用下, 通过 RT-PCR、Western Blot、免疫荧光检测发现, TGF-β1 刺激心肌成纤维细胞后 Hedgehog 信号通路的下游的因子 Gli1 的表达明显增加, 证实了 Gli1 参与心肌纤维化发生发展的过程, 且随着 TGF-β1 质量浓度增加, Gli1 表达量逐渐增加, 呈剂量依赖正相关, 见图 8, 9。选择下面实验的最佳 TGF-β1 质量浓度为 10 μg/L。

2.2.3 TGF-β1 诱导心肌成纤维细胞发生上皮间质转分化 TGF-β1 干预心肌成纤维细胞 24 h 后, 免疫荧光法检测 α-SMA, 与对照组相比, 细胞荧光强度明显增加。证明 TGF-β1 可以诱导心脏成纤维细胞发生上皮间质转化增殖分化为肌成纤维细胞, 表现为肌成纤维细胞特异性标记物 α-SMA 表达, 见图 10。

2.2.4 Hedgehog 通路抑制剂显著抑制 TGF-β1 诱导心肌成纤维细胞 Gli1 的表达 用 Smo 及 Gli1 的抑制剂 Cyclopamine 和 GANT61 特异性阻断 Hedgehog-Gli 通路, 加入 10 μg/L 的 TGF-β1 诱导细胞, 行 RT-PCR 及荧光免疫检测, 结果均显示, 与对照组比较, 加入抑制剂组的 Gli1 表达均有下降, 见图 11。

2.2.5 Hedgehog 通路抑制剂显著抑制 TGF-β1 诱导的心肌成纤维细胞上皮间质转分化 免疫荧光检测发现, 与对照组相比,

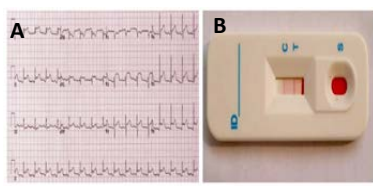
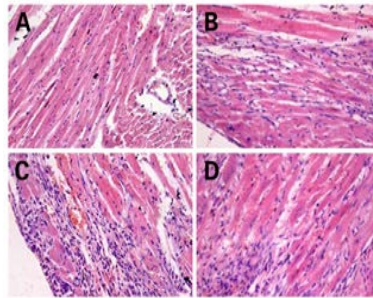
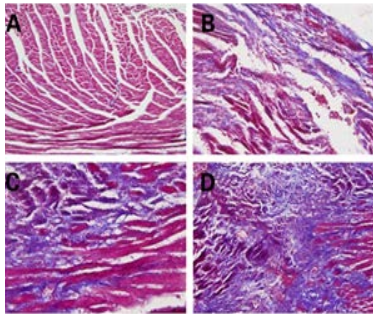


图1 | 心电图 (A) 联合肌钙蛋白检测盒 (B) 判定造模成功  
Figure 1 | Electrocardiogram (A) combined with cardiac troponin test box (B) to determine the success of modeling



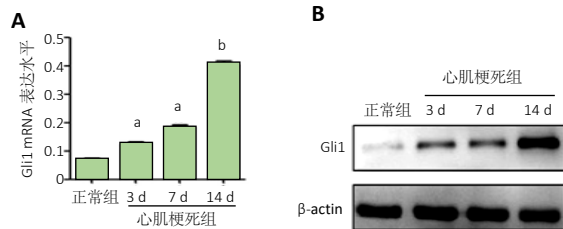
图注: 图 A-D 分别为正常心肌、心肌梗死后 3, 7, 14 d  
图2 | 各组小鼠心肌病理组织学变化 (苏木精-伊红染色,  $\times 100$ )

Figure 2 | Histopathological changes of the mouse myocardium (hematoxylin-eosin staining,  $\times 100$ )



图注: 图 A-D 分别为正常心肌、心肌梗死后 3, 7, 14 d  
图3 | 各组小鼠心肌病理组织学变化 (Masson 染色,  $\times 100$ )

Figure 3 | Histopathological changes of the mouse myocardium (Masson staining,  $\times 100$ )



图注: 正常组及心肌梗死后 3, 7, 14 d Gli1 的 mRNA 及蛋白的表达呈时间依赖性增加。与正常组比较,  $^a P < 0.05$ ,  $^b P < 0.01$

图4 | 小鼠心肌梗死后 Gli1 mRNA (A) 及蛋白 (B) 表达  
Figure 4 | Expression of Gli1 mRNA (A) and protein (B) in mice after myocardial infarction

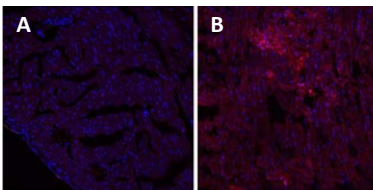
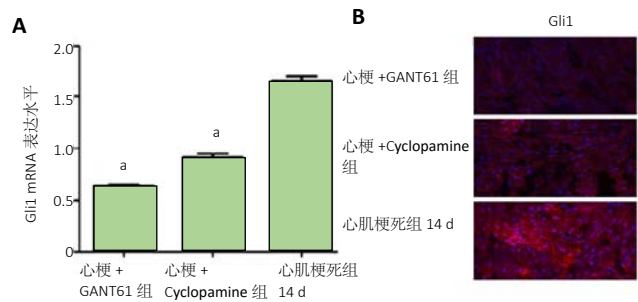


图5 | 正常组 (A) 及心肌梗死后 14 d (B) Gli1 蛋白荧光表达情况 ( $\times 100$ )  
Figure 5 | Immunofluorescence expression of Gli1 protein in normal group (A) and 14 days after myocardial infarction (B) ( $\times 100$ )

药物干预组上皮间质转化发生的生物标记物 E-Cadherin 表达增高, Vimentin 表达降低, 其中 GANT61 干预后 Vimentin 表达下降更为明显, 说明 GANT61 的抗纤维化作用更强。证实 GANT61 可阻断 TGF- $\beta 1$  诱导的上皮间质转化, 可减轻心肌纤维化的发生发展, 见图 12。

### 3 讨论 Discussion

冠心病作为严重威胁人类健康的心血管疾病, 是引起心



图注: 图 A 为 RT-PCR 检测 Gli1 mRNA 表达, 结果显示 2 种抑制剂特异性阻断 Hedgehog-Gli 通路均能降低梗死后小鼠心肌组织 Gli1 mRNA 表达,  $^a P < 0.01$ ; 图 B 为免疫荧光检测 ( $\times 100$ )

图6 | Hedgehog 通路抑制剂对小鼠心肌梗死组织中 Gli1 mRNA 及时空表达影响

Figure 6 | Gli1 mRNA and spatio-temporal expression in the infarcted tissue after intervention with Hedgehog pathway inhibitor

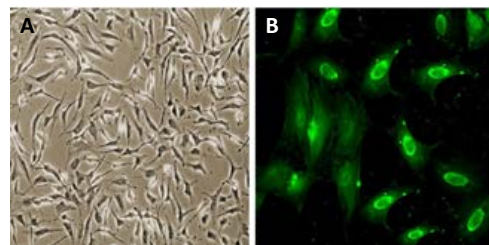
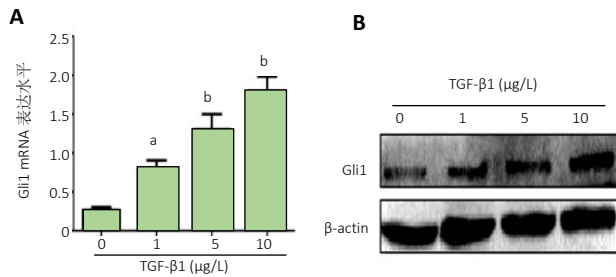


图7 | 倒置相差显微镜观察心肌成纤维细胞形态 (A) 及波形蛋白的免疫荧光 (B) 鉴定 ( $\times 100$ )

Figure 7 | Morphological observation of myocardial fibroblasts under inverted microscope (A) and immunofluorescence characterization of expression of vimentin in myocardial fibroblasts (B) ( $\times 100$ )



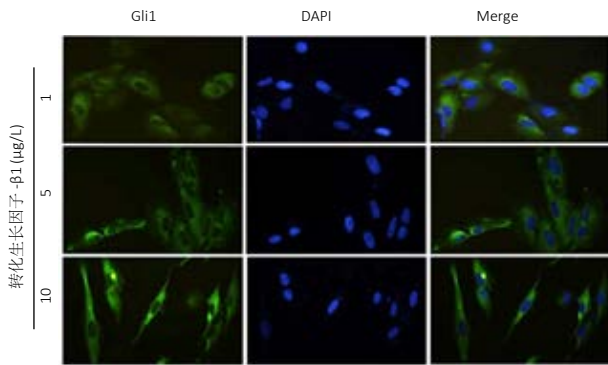
图注: 与 0  $\mu\text{g/L}$  TGF- $\beta 1$  组比较,  $^a P < 0.05$ ,  $^b P < 0.01$

图8 | 转化生长因子  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ) 诱导心肌成纤维细胞中 Gli1 mRNA (A) 和蛋白 (B) 的表达变化

Figure 8 | The mRNA (A) and protein (B) expression of Gli1 in myocardial fibroblasts induced by transforming growth factor- $\beta 1$

肌纤维化的主要病因之一<sup>[17]</sup>, 心肌纤维化是多种心血管疾病发展到一定阶段的共同病理表现, 心肌纤维化发生时心脏成纤维细胞被过度激活, 增殖并向坏死区域迁移, 转化为分泌能力更强的肌成纤维细胞, 从而分泌过量胶原, 修复坏死心肌组织, 引起心脏结构重塑, 目前临床研究的的主要为抗重塑治疗。如果能在心肌纤维化早期发生的阶段即开始进行干预, 可以显著提高患者的生活质量和生存率, 明显缓解功能减退<sup>[18]</sup>。

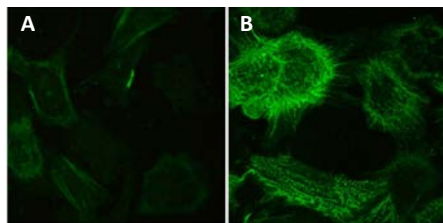
TGF- $\beta 1$  调控诸如生长分化及组织修复等多种过程, 可以参与心肌纤维化发生, 诱导心肌成纤维细胞向肌成纤维细



图注：随着转化生长因子  $\beta 1$  质量浓度增加，Gli1 表达量逐渐增加，呈剂量依赖正相关

图 9 | 荧光免疫法检测转化生长因子  $\beta 1$  诱导心肌成纤维细胞后 Gli1 的时空表达 ( $\times 100$ )

Figure 9 | Immunofluorescence detection of the spatio-temporal expression of Gli1 in myocardial fibroblasts induced by transforming growth factor- $\beta 1$  ( $\times 100$ )



图注：图 A 为对照组，B 为转化生长因子  $\beta 1$  诱导组。可见转化生长因子  $\beta 1$  诱导组有明显肌成纤维细胞特异性标记物 a-SMA 表达

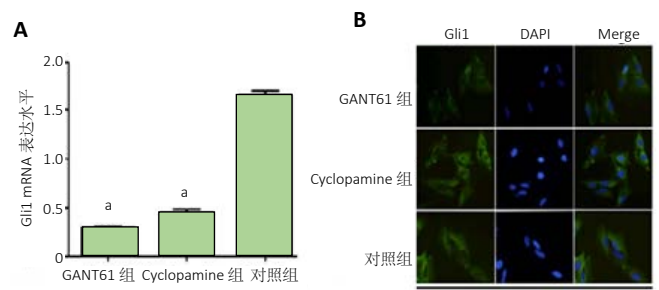
图 10 | 荧光免疫法检测转化生长因子  $\beta 1$  诱导心肌成纤维细胞后 a-SMA 表达 ( $\times 100$ )

Figure 10 | Immunofluorescence detection of the expression of a-SMA in myocardial fibroblasts induced by transforming growth factor- $\beta 1$  ( $\times 100$ )

胞转分化。在心脏受到损伤时，TGF- $\beta$  由炎症因子刺激释放，引起胶原蛋白等分泌增加，使心肌细胞外基质堆积增加，参与器官组织损伤修复<sup>[19]</sup>。上皮间质转分化是人体正常发育过程中或者机体在各种致病因素刺激下，上皮表型向间质表型转分化的过程，进而失去正常功能，组织器官发生纤维化异常增殖<sup>[20]</sup>。

Hedgehog-Gli 信号通路在胚胎发育、器官形成以及形态维持中扮演者重要的角色，性质高度保守，近年来越来越多的研究表明其异常活化广泛参与全身多组织器官疾病的损伤修复过程，其中在肿瘤的进展迁徙中研究较多，ZHANG 等<sup>[21]</sup>在《Oncol Lett》上报道 Hedgehog 信号通路参与胰腺癌细胞上皮间质转化迁徙分化。目前 Hedgehog 信号通路在心肌纤维化中的相关作用尚不明确。

此次研究以心肌梗死小鼠为模型，研究小鼠心肌梗死后纤维化病理过程及纤维化形成的形态学改变过程。通过结扎小鼠的冠状动脉前降支来建立急性心肌梗死模型，这种方法最大的优点是符合临床心梗的病理发生过程，齐同性好。通过苏木精-伊红及 Masson 染色来观察心肌梗死后 3, 7, 14 d 的组织病理改变，随着时间的延长，纤维化渐加重，实验中病理染色观察到心肌梗死 14 d 时心肌纤维化条索形成广泛，炎症反应及纤维化发生明显。行 RT-PCR 及 Western blot 实验证实随着心梗时间的延长，Gli1 的 mRNA 和蛋白的表达



图注：图 A 为 RT-PCR 检测 Gli1 mRNA 表达，结果显示 2 种抑制剂特异性阻断 Hedgehog-Gli 通路后，均能降低转化生长因子  $\beta 1$  诱导心肌成纤维细胞中 Gli1 mRNA 表达 (与对照组比， $^*P < 0.01$ )；图 B 为免疫荧光检测 ( $\times 100$ )

图 11 | Hedgehog 通路抑制剂对转化生长因子  $\beta 1$  诱导心肌成纤维细胞中 Gli1 mRNA 及时空表达影响

Figure 11 | Gli1 mRNA and spatio-temporal expression in myocardial fibroblasts induced by transforming growth factor- $\beta 1$  after intervention with Hedgehog pathway inhibitor

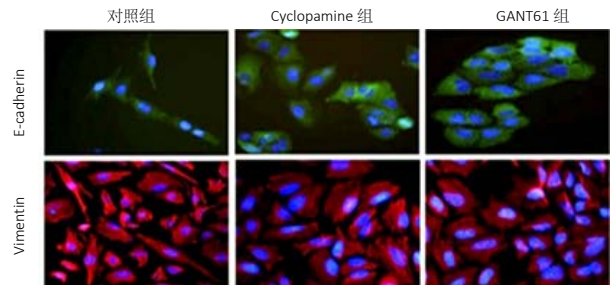


图 12 | Hedgehog 通路抑制剂对转化生长因子  $\beta 1$  诱导心肌成纤维细胞上皮间质转化的抑制作用 (免疫荧光染色,  $\times 100$ )

Figure 12 | Inhibitory effect of Hedgehog pathway inhibitor on epithelial-mesenchymal transition of myocardial fibroblasts induced by transforming growth factor- $\beta 1$  (immunofluorescence staining,  $\times 100$ )

逐渐增加，呈时间依赖性，同时荧光免疫定性测定证实了心肌梗死后 Gli1 时空表达，当特异性阻断 Smo 及 Gli1 信号通路后，荧光定量 PCR 及 Western blot 检测 Gli1 的 mRNA 和蛋白表达均下降，纤维化缓解，从动物体内实验证实了 Gli1 参与心肌纤维化的发生。

此次研究选用出生 1-3 d 的 SD 乳鼠，选用差速贴壁法及胰酶胶原酶消化传代等实验方法进行原代细胞心肌成纤维细胞分离培养及传代，从形态学观察和免疫荧光染色两方面进行心肌成纤维细胞的鉴定。心肌成纤维细胞经过 TGF- $\beta 1$  诱导后，通过荧光定量 PCR 及 Western blot 检测 Gli1 的 mRNA 及蛋白表达，发现 Hedgehog 信号通路下游因子 Gli1 的表达与心肌纤维化形成呈浓度依赖性正相关表达。同时细胞免疫荧光也说明了同样的结果，而当加入了 Smo 及 Gli1 的特异性抑制剂 Cyclopamine 和 GANT61 后，荧光定量 PCR 法及免疫荧光法检测 Gli1 的 mRNA 和蛋白定位表达，均提示加入抑制剂后可有效抑制心肌成纤维细胞细胞中 Gli1 的表达，伴有上皮间质转化发生的生物标记物 E-Cadherin 表达增加及 Vimentin 表达减少，提示加入特异性抑制剂后纤维化缓解，其中 GANT61 抑制纤维化作用最明显，从体外细胞实验

证实 Gli1 通过 Hedgehog 信号通路参与心肌纤维化发生。

该研究结合体内及体外实验，共同说明了 Hedgehog-Gli 信号通路参与心肌纤维化的发生和进展过程，今后可能会成为抗心肌纤维化治疗的有效靶点，为新药研发及临床应用提供有用的实验依据。

**致谢：**感谢各位老师 在实验操作及文章撰写过程中给予的帮助。

**作者贡献：**设计为聂慧娟；实验实施为聂慧娟；评估为黄纪春。黄纪春审核，聂慧娟对文章负责。

**经费支持：**该文章接受了“内蒙古自然科学基金面上项目(2016MS(LH)0802)”的资助。所有作者声明，经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

**利益冲突：**文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**机构伦理问题：**实验方案经内蒙古医科大学动物实验伦理委员会批准，批准号为：YKD2016085。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在戊巴比妥钠麻醉下进行所有的手术，并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

**写作指南：**该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

**文章查重：**文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

**文章外审：**文章经小同行外审专家双盲外审，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

**生物统计学声明：**该文统计学方法已经内蒙古医科大学生物统计学专家审核。

**文章版权：**文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**开放获取声明：**这是一篇开放获取文章，根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款，在合理引用的情况下，允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展，同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献，并为之建立索引，用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

#### 4 参考文献 References

- [1] CHISTIANKOV DA, OREKHOV AN, BOBRYSHV YV. The role of cardiac fibroblasts in post myocardial heart tissue repair. *Exp Mol Pathol.* 2016; 101(2):231-240.
- [2] STEMPIE OTERO A, KIM DH, DAVIS J. Molecular networks underlying myofibroblast fate and fibrosis. *J Mol Cell Cardiol.*2016;97(2):153-161.
- [3] KARAMITSOS TD, ARVANITAKI A, KARVOUNIS H, et al. Myocardial Tissue Characterization and Fibrosis by Imaging. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2020;13(5):1221-1234.
- [4] TRAVERS JG, KAMAL FA, ROBBINS J, et al, Cardiac fibrosis: The fibroblast awakens. *Circ Res.* 2016;118(8):1021-1040.
- [5] MOORE MORRIS T, CATTANEO P, PUCEAT M, et al. Origins of cardiac fibroblasts. *J Mol Cell Cardiol.*2016;91(1):1-5.
- [6] CHAVES AT, MENEZES CAS, COSTA HS, et al. Myocardial fibrosis in chagas disease and molecules related to fibrosis. 2019;41(10):e12663.
- [7] THOMSON TM, BALCELLS C, CASCANTE M. Metabolic Plasticity and Epithelial-Mesenchymal Transition. *J Clin Med.*2019;8(7):967.
- [8] LORENZO-ALMOROS A, TUNON J, OREJAS M, et al. Diagnostic approaches for diabetic cardiomyopathy. *Cardiovasc Diabetol.*2017; 16(6):28-29.
- [9] ZHOU L, LIU JL, OLSON P, et al. Tbx5 and Osr1 interact to regulate posterior second heart field cell cycle progression for cardiac septation. *J Mol Cell Cardiol.*2015;85(3):1-12.
- [10] PERBELLINI F, WATSON SA, SCIGLIANO M, et al. Investigation of cardiac fibroblasts using myocardilices. *Cardiovasc Res.*2018;114(1):77-89.
- [11] ZHANG KK, XIANG ML, ZHOU L, et al. Gene network and familial analyses uncover a gene network involving Tbx5/Osr1/Pcsk6 interaction in the second heart field for atrial septation. *Hum Mol Genet.* 2016; 25(6):1140-1151.
- [12] COELHO LL, PEREIRA IR, DE SOUZA PEREIRA MC, et al. Trypanosoma cruzi activates mouse cardiac fibroblasts in vitro leading to fibroblast myofibroblast transition and increase in expression of extracellular matrix proteins. *Parasit Vectors.* 2018;11(1):72.
- [13] TALLQUIST MD. Developmental Pathways of Cardiac Fibroblasts. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2020;12(4):a037184.
- [14] AHMED-DE-PRADO S, DIAZ-GARCIA S, BAONZA A. JNK and JAK/STAT signalling are required for inducing loss of cell fate specification during imaginal wing discs regeneration in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol.* 2018;441(10):31-41.
- [15] WORLEY MI, ALEXANDER LA, HARIHARAN IK. CtBP impedes JNK and Upd/STAT-driven cell fate misspecifications in regenerating *Drosophila* imaginal discs. *Elife.* 2018;7:e30391.
- [16] 李小群, 高凌志, 张进, 等. 高效建立成年小鼠心肌梗死模型 [J]. *四川动物*, 2012, 31(4):635-638
- [17] HAN H, CHO JW, LEE S, et al. TRRUST v2: an expanded reference database of human and mouse transcriptional regulatory interactions. *Nucleic Acids Res.*2018;46(2):D380-D386.
- [18] PATTERSON M, BARSKE L, VAN HANDEL B, et al. Frequency of mononuclear diploid cardiomyocytes underlies natural variation in heart regeneration. *Nat Genet.* 2017;49(8):1346-1353.
- [19] FOULQUIER S, DASKALOPOULOS EP, LLURI G, et al. WNT signaling in cardiac and vascular disease. *Pharmacol Rev.* 2018;70:68-141.
- [20] Herrera SC, Bach EA. JAK/STAT signaling in stem cells and regeneration: from *Drosophila* to vertebrates. *Development.* 2019; 146(2):dev167643.
- [21] ZHANG J, CUI Y, SUN S, et al. Casticin inhibits the epithelial-mesenchymal transition in ovarian carcinoma via the hedgehog signaling pathway. *Oncol Lett.* 2018;15(4):4495-4502.