

论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.11.003

网络首发 [http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200227.0954.002.html\(2020-02-27\)](http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200227.0954.002.html(2020-02-27))

高迁移率族蛋白 B1 在血管紧张素 II 诱导的内皮-间充质转变过程中的作用

李文杰¹,刘运翠¹,路明^{1△},惠洪亮²

(1.徐州医科大学附属医院儿科,江苏徐州 221000;

2.徐州医科大学附属丰县人民医院心胸外科,江苏徐州 221700)

[摘要] **目的** 探讨高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)在血管紧张素 II(Ang II)诱导的内皮-间充质转变(EndMT)过程中的作用。**方法** 将培养的人脐静脉内皮细胞(HUVECs)分为空白对照组、Ang II组、Ang II + siHMGB1组、Ang II + 阴性对照组。各组给予相应处理 5 d 后,倒置显微镜观察内皮细胞形态的变化;Western blot 检测 HMGB1、CD31、VE-cadherin、成纤维细胞特异性蛋白 1(FSP1)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)表达水平。**结果** 与空白对照组相比,Ang II 组细胞由鹅卵石样形态逐渐转变为梭形状态, HMGB1、FSP1、 α -SMA 表达水平均明显升高,CD31、VE-cadherin 表达水平明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与 Ang II 组比较,干扰 HMGB1 表达后细胞形态基本稳定, HMGB1、FSP1、 α -SMA 表达降低,CD31、VE-cadherin 表达升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。Ang II 组和 Ang II + 阴性对照组细胞形态均变为梭形状态,各蛋白表达变化趋势一致,差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** HMGB1 参与了 Ang II 诱导的内皮细胞 EndMT 过程。

[关键词] 高迁移率族蛋白质类;血管紧张素 II;内皮-间充质转变;心肌纤维化**[中图法分类号]** R364.5**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2020)11-1733-04

Role of high mobility group protein B1 in endothelial-mesenchymal transition induced by angiotensin II

LI Wenjie¹, LIU Yuncui¹, LU Ming^{1△}, HUI Hongliang²

(1. Department of Pediatrics, the Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu 221000, China; 2. Department of Thoracicsurgery, Fengxian People's Hospital Affiliated to Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu 221700, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the role of high mobility group protein B1 (HMGB1) in endothelial-mesenchymal transition (EndMT) induced by angiotensin II (Ang II). **Methods** Cultured human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were randomly divided into four groups, as the blank control group, the Ang II group, the Ang II + siHMGB1 group and the Ang II + negative control group. After 5 days of treatment, the morphological changes of endothelial cells were observed by inverted microscope. Western blot was used to test the expressions of HMGB1, CD31, VE-cadherin, fibroblast specific protein 1 (FSP1) and α -smooth muscle actin (SMA) protein. **Results** Compared with the blank control group, the cells in the Ang II group changed from cobblestone to shuttle morphology, and the expressions of HMGB1, FSP1 and α -SMA increased significantly, while the expressions of CD31 and VE-cadherin decreased. The differences were statistically significant ($P < 0.05$). Compared with the Ang II group, expression of HMGB1, FSP1, α -SMA decreased and CD31, VE-cadherin expression increased after interfering HMGB1 expression. The differences were statistically significant ($P < 0.05$). The cell morphology all changed into shuttle morphology in the Ang II group and the Ang II + negative control group, and the variation trends of protein expression were same, there was no significant difference ($P > 0.05$). **Conclusion** HMGB1 is involved in EndMT induced by Ang II in endothelial cells.

[Key words] high mobility group proteins; angiotensin II; endothelial-mesenchymal transition; myocardial fibrosis

心肌纤维化是各种疾病因素致使心室收缩或舒张功能障碍的综合征,可最终导致心力衰竭。各种促

纤维化因素作用于心脏,促使心室壁肌成纤维细胞数量增加、增殖后分泌胶原等细胞外基质,导致心肌间质成分增多,心室壁僵硬增加,顺应性降低,心肌收缩、舒张障碍,最终导致心肌纤维化^[1]。在该过程中,肌成纤维细胞为主要的效应细胞,过去认为原位心脏成纤维细胞(CFs)经炎症因子、缺氧等因素刺激后活化为肌成纤维细胞为其主要来源,近年来研究发现与纤维化相关的心脏肌成纤维细胞(CMFs)主要由内皮细胞通过内皮-间质细胞转变(endothelial-mesenchymal transition, EndMT)过程转化而来^[2-4],寻找能抑制 EndMT 的有效物质,可能为预防或治疗心肌纤维化及心力衰竭提供新的治疗措施。高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)作为晚期炎症因子,在多个脏器炎症反应及纤维化过程中起到关键作用,因而成为近年来研究的热点。研究表明 HMGB1 与人体多种器官的纤维化密切相关^[5],然而其是否参与心脏内皮细胞 EndMT 过程导致的纤维化尚未见报道。本研究通过血管紧张素 II(Ang II)在体外诱导内皮细胞 EndMT,同时沉默 HMGB1 表达,观察 HMGB1 在其过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验细胞及主要试剂

原代人脐静脉内皮细胞(HUVECs)及内皮细胞培养基 ECM(美国 Scien Cell Research Laboratories 公司);Ang II(美国 Sigma 公司);HMGB1 抗体(美国 Santa Cruz 公司);CD31、VE-cadherin、成纤维细胞特异性蛋白 1(FSP1)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)抗体(英国 Abcam 公司); β -actin 抗体(美国 Cell Signaling 公司),siRNA、RNAiMax(上海吉玛公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组及转染

实验分为 4 组。空白对照组:不加药物处理;Ang II 组:细胞培养液中加入 Ang II;Ang II + siHMGB1 组:Ang II + 靶向 HMGB1 siRNA;Ang II + 阴性对照组:Ang II + 非特异阴性 siRNA。其中 Ang II 浓度最

终调整为 1×10^{-6} mol/L。转染内皮细胞在 5% CO₂、培养基 ECM 中常规培养,选取对数生长期的内皮细胞,0.25% 的胰酶消化后加入培养基 ECM,调整细胞浓度为 5×10^5 /mL,传代接种至六孔板中,待细胞生长达 50% ~ 60% 融合时进行转染。HMGB1 siRNA:正义链 5'-GGCUUUCACUUAAGAACU-UTF-3',反义链 5'-AAGUUCUUAAGUGAAAGC-CTF-3';阴性对照 siRNA:正义链 5'-UUCUC-CGAACGUGUCACGUTT-3',反义链 5'-ACGUGA-CACGUUCGGAGAATY-3'。按照转染试剂 RNAiMax 说明操作,最终阴性对照 siRNA 和 HMGB1 siRNA 的浓度为 60 nmol/L。siRNA 干扰 6 h 后换加有 Ang II 的培养基。所有实验重复 3 次。

1.2.2 显微镜下细胞形态变化

转染完成后各组细胞每 24 小时更换新的培养液,5 d 后采用倒置显微镜观察各组细胞形态学变化并拍照。

1.2.3 Western blot 检测 HMGB1、CD31、VE-cadherin、FSP1、 α -SMA 表达情况

各组细胞培养 5 d 后收集细胞,蛋白提取后测定浓度,按上样量 50 μ g 计算出上样体积,行聚丙烯酰胺凝胶电泳,电转移至硝酸纤维素膜、封闭,分别加入 HMGB1、CD31、VE-cadherin、FSP1、 α -SMA 等一抗体。4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,洗涤后加入辣根过氧化物酶标记的二抗,通过化学发光法检测蛋白条带。

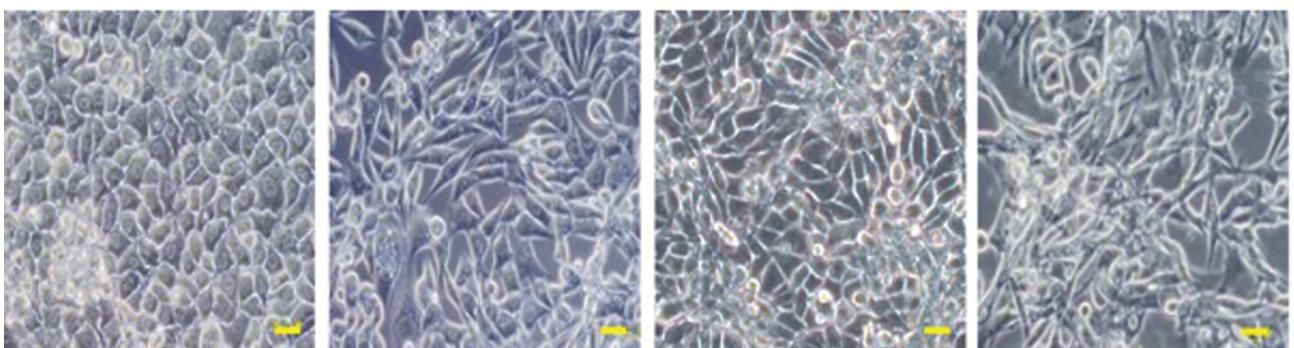
1.3 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞形态的变化

Ang II 可以诱导内皮细胞形态向肌成纤维细胞形态发生变化,Ang II 诱导的同时沉默 HMGB1 的内皮细胞形态基本稳定,见图 1。



空白对照组

Ang II 组

Ang II + siHMGB1 组

Ang II + 阴性对照组

图 1 各组细胞形态变化

2.2 各组细胞 HMGB1 表达

正常内皮细胞表达少量 HMGB1, Ang II 处理后内皮细胞 HMGB1 表达水平与空白对照组相比明显升高 ($P < 0.01$), Ang II 处理的同时沉默 HMGB1 后内皮细胞 HMGB1 的表达水平和 Ang II 组相比明显降低 ($P < 0.05$), Ang II + 阴性对照组 HMGB1 表达水平和 Ang II 组相比无明显变化 ($P > 0.05$), 见图 2。

2.3 各组细胞 CD31、VE-cadherin、 α -SMA 和 FSP1 表达情况

正常内皮细胞表达 CD31 和 VE-cadherin, Ang II 处理后 CD31 和 VE-cadherin 表达水平较空白对照组明显降低 ($P < 0.01$), Ang II 处理的同时沉默 HMGB1 后 CD31 和 VE-cadherin 表达水平较 Ang II 组升高 ($P < 0.05$), Ang II + 阴性对照组和 Ang II 组相比无明显变化 ($P > 0.05$), 见图 3。正常内皮细胞不表达 FSP1 和 α -SMA, Ang II 处理后 FSP1 和 α -SMA 表达水平较空白对照组明显升高 ($P < 0.01$),

Ang II 处理的同时沉默 HMGB1 后 FSP1 和 α -SMA 表达水平较 Ang II 组降低 ($P < 0.05$), Ang II + 阴性对照组和 Ang II 组相比无明显变化 ($P > 0.05$), 见图 3。

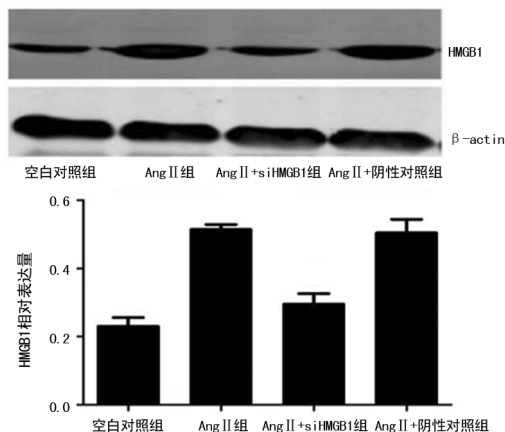


图 2 各组细胞 HMGB1 表达情况分析

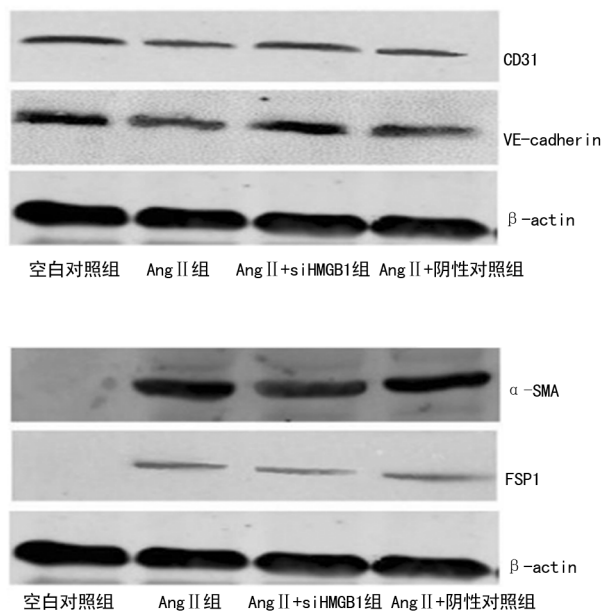


图 3 各组细胞 CD31、VE-cadherin、 α -SMA 和 FSP1 表达

3 讨 论

EndMT 是指内皮细胞逐渐丧失原有的内皮细胞特异性标志物, 如 VE-cadherin、CD31 等, 逐渐表达间质细胞标志物, 如 α -SMA、FSP1 等^[3,6], 最终转化为间质细胞, 并具备间质细胞形态、表型及功能。在心肌纤维化过程中, 心脏内皮细胞发生 EndMT, 逐渐转化为 CMFs, 细胞间的连接减弱, 极性消失, 细胞运动能力增强, 逐渐从血管床脱离后迁移至血管外, 增殖、合成并分泌大量胶原蛋白等物质^[7-8], 引起间质成分增多, 心室壁僵硬, 最终引起心力衰竭, 是心肌纤维化过程中的主要效应细胞, 因此减少 CMFs 的生成成为

抑制心肌纤维化治疗的关键。近年来研究发现与纤维化相关的 CMFs 高达 75% 来自内皮细胞^[3-4,9], 内皮细胞在各种致纤维化因子作用下发生 EndMT 为 CMFs 的主要来源, 因此 EndMT 过程受到越来越多的关注。

除血流动力学影响外, 多种神经体液激素系统尤其是肾素-血管紧张素-醛固酮系统 (rennin-angiotensin-aldosterone system, RAAS) 的激活可致心肌纤维化, Ang II 是其主要效应分子。本实验采用体外培养的方法将 Ang II 直接作用于内皮细胞, 构建 EndMT 体外细胞模型, 避开了以往动物实验中各种未知复杂

因素的影响。本研究结果表明 Ang II 作用于 HU-VECs 后,细胞形态发生转变,细胞连接疏松,由鹅卵石样转变为长梭形,内皮细胞标记蛋白 CD31、VE-cadherin 表达水平降低,肌成纤维细胞标记蛋白 α -SMA、FSP1 表达水平升高,说明 Ang II 诱导内皮细胞发生了 EndMT,这与 MURDOCH 等^[7]的研究结果相一致。

HMGB1 是高迁移率族蛋白家族的成员之一,普遍存在于人体和动物细胞内。细胞核内的 HMGB1 作为 DNA 结合蛋白参与核小体的构成和稳定及调解基因的转录,在受到特定因素刺激活化后释放到细胞质或细胞外,作为一种重要的炎症因子,引起一系列信号通路传导^[10],从而延长、放大一系列炎症反应。在高血压、糖尿病、心肌梗死导致心肌纤维化及心室重塑过程中起到重要作用^[11]。然而其是否参与异常 EndMT 导致的纤维化尚不明确。本实验研究发现,Ang II 诱导内皮细胞发生 EndMT 过程中 HMGB1 表达水平明显升高,提示 Ang II 的作用与 HMGB1 相关。运用 RNA 干扰技术沉默 HMGB1 基因表达后发现 Ang II 诱导的内皮细胞 EndMT 过程中,细胞形态及细胞间的连接稳定,同时 CD31、VE-cadherin 表达水平降低表现减弱,肌成纤维细胞标志物 α -SMA、FSP1 表达水平升高表现减弱,表明干扰 HMGB1 表达后,Ang II 诱导内皮细胞 EndMT 的作用明显减弱。这些结果表明,HMGB1 介导了 Ang II 诱导的内皮细胞 EndMT 过程。同时 Ang II + siHMGB1 组与空白对照组比较,细胞形态及 CD31、VE-cadherin、 α -SMA、FSP1 表达仍有明显差异,这表明沉默 HMGB1 表达尚无法完全阻断 Ang II 诱导的内皮细胞 EndMT 过程,其不仅仅依赖 HMGB1,还有另外信号通路参与其中。

综上所述,HMGB1 参与了 Ang II 诱导的内皮细胞 EndMT 过程,这可能为将来 HMGB1 的进一步研究及临床应用提供理论依据。

参考文献

[1] CAI W,ZHONG S,ZHENG F,et al. Angiotensin II confers resistance to apoptosis in cardiac myofibroblasts through the AT1/ERK1/2/RSK1 pathway[J]. *IUBMB Life*, 2019, 71(2): 261-276.

[2] MORINE K J,QIAO X,YORK S,et al. Bone morphogenetic protein 9 reduces cardiac fibro-

sis and improves cardiac function in heart failure[J]. *Circulation*, 2018, 138(5): 513-526.

- [3] LIU Y,GAO L,ZHAO X,et al. Saikosaponin a protects from pressure overload-induced cardiac fibrosis via inhibiting fibroblast activation or endothelial cell endmt[J]. *Int J Biol Sci*, 2018, 14(13): 1923-1934.
- [4] ZEISBERG E M,KALLURI R. Origins of cardiac fibroblasts[J]. *Circ Res*, 2010, 107(11): 1304-1312.
- [5] 尹晶平,苏兆亮,许化溪. 高迁移率族蛋白 B1 (HMGB-1)与器官纤维化研究进展[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2013, 29(2): 213-215.
- [6] HONG L,DU X,LI W,et al. EndMT: A promising and controversial field[J]. *Eur J Cell Biol*, 2018, 97(7): 493-500.
- [7] MURDOCH C E,CHAUBEY S,ZENG L,et al. Endothelial NADPH oxidase-2 promotes interstitial cardiac fibrosis and diastolic dysfunction through proinflammatory effects and endothelial-mesenchymal transition [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2014, 63(24): 2734-2741.
- [8] CHARYTAN D M,PADERA R,HELFA N A M,et al. Increased concentration of circulating angiogenesis and nitric oxide inhibitors induces endothelial to mesenchymal transition and myocardial fibrosis in patients with chronic kidney disease[J]. *Int J Cardiol*, 2014, 176(1): 99-109.
- [9] MA K L,LIU J,NI J,et al. Inflammatory stress exacerbates the progression of cardiac fibrosis in high-fat-fed apolipoprotein E knockout mice via endothelial-mesenchymal transition[J]. *Int J Med Sci*, 2013, 10(4): 420-426.
- [10] VALDÉS-FERRER S I,PAPPOIN J,DANCHO M E,et al. HMGB1 mediates anemia of inflammation in murine sepsis survivors [J]. *Mol Med*, 2015, 21(1): 951-958.
- [11] XU X,FRIEHS I,ZHONG HU T,et al. Endocardial fibroelastosis is caused by aberrant endothelial to mesenchymal transition [J]. *Circ Res*, 2015, 116(5): 857-866.