

NOX4-siRNA 转染对 Ang II 诱导的心肌成纤维细胞增殖和胶原合成影响

何兆辉, 王志谦, 王国良, 郑先杰, 滕伟

(河南大学第一附属医院心血管内科, 河南 开封 475000)

[摘要] 目的 探讨转染 NADPH 氧化酶 4 (NOX4) 小干扰 RNA (siRNA) 对血管紧张素 II (Ang II) 诱导的心肌成纤维细胞 (CFs) 增殖和胶原合成的影响及其机制。方法 分离乳鼠 CFs, 将 CFs 分为对照组 (正常培养)、Ang II 组 (加入 10^{-6} mol/L Ang II)、Ang II + siNOX4 组 (转染 NOX4-siRNA 后加入 10^{-6} mol/L Ang II) 和 Ang II + siNC 组 (转染 NC-siRNA 后加入 10^{-6} mol/L Ang II)。用免疫印迹法检测各组 NOX4、Collagen I、Collagen III、p-p38MAPK、p38MAPK 的表达, CCK-8 法检测细胞增殖。结果 与对照组相比, Ang II 刺激后 NOX4、Collagen I、Collagen III 和 p-p38MAPK 蛋白的表达水平和细胞增殖活力均明显升高 ($F = 140.134 \sim 349.556$, $q = 17.963 \sim 25.587$, $P < 0.05$); 转染 NOX4-siRNA 后 Ang II 刺激引起上述变化明显减弱 ($q = 15.839 \sim 36.742$, $P < 0.05$)。结论 沉默 NOX4 可通过阻碍 p38MAPK 信号通路活化抑制 Ang II 诱导的 CFs 增殖和胶原合成。

[关键词] 肌细胞, 心脏; 肌成纤维细胞; 血管紧张素 II; NADPH 氧化酶 4; 细胞增殖; 胶原 III 型

[中图分类号] R329.411; R345.4

[文献标志码] A

[文章编号] 2096-5532(2021)05-0742-04



doi:10.11712/jms.2096-5532.2021.57.170

[开放科学(资源服务)标识码(OSID)]

[网络出版] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/37.1517.R.20211029.1735.007.html>; 2021-11-01 16:47:01

EFFECT OF NOX4-SIRNA TRANSFECTION ON CARDIAC FIBROBLAST PROLIFERATION AND COLLAGEN SYNTHESIS INDUCED BY ANG II HE Zhaohui, WANG Zhiqian, WANG Guoliang, ZHENG Xianjie, TENG Wei (Department of Cardiology, First Affiliated Hospital of Henan University, Kaifeng 475000, China)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the effect of transfection with NADPH oxidase 4 (NOX4) small interfering RNA (siRNA) on the proliferation of cardiac fibroblasts (CFs) and collagen synthesis induced by angiotensin II (Ang II) and its mechanism. **Methods** CFs were isolated from neonatal mice and divided into control group (normal culture), Ang II group (adding 10^{-6} mol/L Ang II), Ang II + siNox4 group (adding 10^{-6} mol/L Ang II after transfection with NOX4 siRNA), and Ang II + siNC group (adding 10^{-6} mol/L Ang II after transfection with NC siRNA). Western blot was used to determine the expression of NOX4, collagen I, collagen III, phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase (p-p38MAPK), and p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK). Cell Counting Kit-8 assay was used to determine the cell proliferation. **Results** Compared with the control group, the Ang II group had significantly increased expression levels of NOX4, Collagen I, Collagen III, and p-p38MAPK proteins and cell proliferation activity ($F = 140.134 \sim 349.556$, $q = 17.963 \sim 25.587$, $P < 0.05$); the changes induced by Ang II were significantly decreased after transfection with NOX4 siRNA ($q = 15.839 \sim 36.742$, $P < 0.05$). **Conclusion** Silencing NOX4 can inhibit the proliferation of CFs and collagen synthesis induced by Ang II by blocking activation of the p38MAPK signaling pathway.

[KEY WORDS] myocytes, cardiac; myofibroblasts; angiotensin II; NADPH oxidase 4; cell proliferation; collagen type III

心肌纤维化是心血管疾病终末期共同的生理病理过程^[1]。心肌成纤维细胞(CFs)异常增殖和胶原蛋白合成增多是心肌纤维化的重要表现, 研究影响 CFs 增殖和胶原蛋白合成的分子机制, 寻找有效的干预靶点对心血管疾病的治疗具有重要意义。还原型烟酰胺腺嘌呤双核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶非吞噬细胞氧化酶 4 (NOX4) 是 NADPH NOX 家族

成员, 在成纤维细胞、内皮细胞和平滑肌细胞等中广泛表达, 与肺、肾、肝和心脏等多种组织纤维化过程密切相关^[2-3]。本研究通过观察转染 NOX4 小干扰 RNA (siRNA) 对血管紧张素 II (Ang II) 诱导的 CFs 增殖和胶原蛋白的影响, 揭示 NOX4 在心肌纤维化过程中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

出生 2 d 雄性清洁级 SD 乳鼠 (河南省实验动物中心)。Ang II (美国 Sigma), 胎牛血清和胰蛋白

[收稿日期] 2019-12-03; **[修订日期]** 2021-08-19

[基金项目] 河南省医学科技攻关计划项目 (2018020314)

[第一作者] 何兆辉 (1975-), 男, 硕士, 主治医师。

[通信作者] 郑先杰 (1974-), 男, 硕士, 主任医师。E-mail: zhengxianjie201206@163.com。

酶(美国 Hyclone),青霉素-链霉素(青链霉)双抗和 DMEM 培养基(美国 Gibico 公司),转染试剂 Lipofectine™2000(美国 Invitrogen 公司),RIPA 裂解液和 SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒(碧云天生物技术研究社),CCK-8 试剂盒(日本同仁化学研究所),ECL 化学发光剂和 BCA 蛋白浓度测定试剂盒(索莱宝生物公司),Collagen I、Collagen III 抗体(武汉博士德生物公司),GAPDH、p38MAPK、p-p38MAPK 和 NOX4 抗体(美国 CST 公司),HRP 标记山羊抗鼠 IgG(天津三箭生物公司)。CO₂ 培养箱、酶标仪和凝胶成像分析系统(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 CFs 分离与培养 无菌条件下取 SD 乳鼠的心肌组织并剪碎后,加入 1.25 g/L 胰蛋白酶消化,收集上清液,加入含体积分数 0.01 青链霉双抗和体积分数 0.10 胎牛血清的 DMEM 培养基,置于 37 ℃ 含体积分数 0.05 CO₂ 培养箱中培养。根据 CFs 比心肌细胞贴壁速度快的特点采用差速贴壁法贴壁培养 2 h。除去未贴壁的细胞,获得的贴壁的细胞多数为 CFs,并采用波形蛋白免疫荧光法鉴定为 CFs(纯度达 98%)。培养达 80%融合度时,胰蛋白酶消化并按 1:2 传代,收集第 3~5 代对数生长期细胞进行实验。

1.2.2 实验分组与转染 本实验分为如下 4 组。①对照组(A 组):正常培养;②Ang II 组(B 组):加 10⁻⁶ mol/L Ang II 刺激 48 h;③Ang II + siNC 组(C 组):阴性对照 NC-siRNA 转染 CFs 后加 10⁻⁶ mol/L Ang II 刺激 48 h;④Ang II + siNOX4 组(D 组):采用 NOX4 干扰序列 NOX4-siRNA 转染 CFs 后,加入 10⁻⁶ mol/L Ang II 刺激 48 h。每组设 3 个重复。将对数生长期的 CFs 以每孔 10⁶ 个接种至 6 孔细胞板上,置于 37 ℃、含有体积分数 0.05 CO₂ 培养箱,培养至达 70%融合时进行瞬时转染。其中,NOX4-siRNA 和 NC-siRNA 由上海吉玛公司合成。NOX4-siRNA 和 NC-siRNA 的 RNA 序列见表 1。参照转染试剂 Lipofectine™2000 说明书,根据实验分组将 NC-siRNA 和 NOX4-siRNA 转染至 CFs 中。转染 5 h 后更换新鲜培养液,继续培养 48 h。

1.2.3 NOX4 蛋白表达的检测 采用免疫印迹法检测。收集 Ang II 刺激 48 h 的 Ang II 组、Ang II + siNC 组、Ang II + siNOX4 组和正常培养的对照组 CFs,加入 RIPA 裂解液抽提各组细胞总蛋白后,参照 BCA 蛋白检测试剂盒说明书检测总蛋白的浓度。

将热变性处理后的蛋白样品以每孔 70 μg 上样至 SDS-PAGE 凝胶中进行电泳分离,待分离结束后转膜。使用 50 g/L 脱脂奶粉封闭处理 2 h 后,NOX4 抗体(1:500)、GAPDH 抗体(1:1 000)4 ℃ 孵育过夜。次日,再以 HRP 标记山羊抗鼠 IgG 抗体(1:2 000)室温孵育 2 h。以 ECL 在暗室内显影后,将 GAPDH 作为内参照,采用凝胶成像系统扫描分析。实验重复 3 次。

表 1 NOX4-siRNA 和 NC-siRNA 的 RNA 序列

siRNA	方向	序列(5' → 3')
NOX4-siRNA	正义链	CCAGUGGUUUGCAGAUUUUATT
	反义链	UAAAUCUGCAAACCACUGGTT
NC-siRNA	正义链	UAAAUCUGCAAACCACUGGTT
	反义链	ACGUGACACGUUCGGAGAATT

1.2.4 细胞增殖活力检测 采用 CCK-8 法检测。将 Ang II 处理结束后的 CFs 和正常培养的对照组 CFs 以每孔 10⁴ 个接种至 96 孔细胞板,在 37 ℃、含体积分数 0.05 CO₂ 培养箱中常规培养 48 h 后,参照 CCK-8 试剂盒说明书检测各组细胞在 450 nm 波长处的光密度值。光密度值越大代表细胞增殖越活跃。实验重复 3 次。

1.2.5 Collagen I、Collagen III、p-p38MAPK 和 p38MAPK 蛋白表达的检测 采用免疫印迹法检测。详细步骤可参照 1.2.3。其中,在脱脂奶粉封闭后,分别采用 Collagen I 抗体(1:1 000)、Collagen III 抗体(1:1 000)、p-p38MAPK 抗体(1:800)和 p38MAPK 抗体(1:800)孵育。

1.3 统计学方法

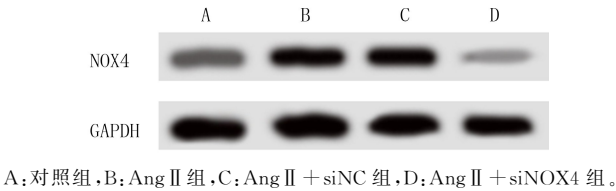
采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析。计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示,多组间比较使用单因素方差分析,组间多重比较采用 SNK-*q* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 转染 NOX4-siRNA 对 CFs 中 NOX4 蛋白表达的影响

免疫印迹法检测的结果表明,对照组、Ang II 组、Ang II + siNC 组和 Ang II + siNOX4 组细胞中 NOX4 蛋白的表达水平分别为 0.35 ± 0.03、0.57 ± 0.04、0.62 ± 0.05 和 0.12 ± 0.02,各组间 NOX4 蛋白的表达水平之间存在明显差异($F = 349.556, P < 0.001$)。见图 1。两两比较结果显示,与对照组相比,Ang II 组细胞中 NOX4 蛋白表达水平明显升高

($q=17.963, P<0.05$); 与 Ang II 组比较, Ang II + siNC 组 NOX4 蛋白表达无明显改变($P>0.05$), 但 Ang II + siNOX4 组 NOX4 蛋白表达水平明显降低($q=36.742, P<0.05$)。

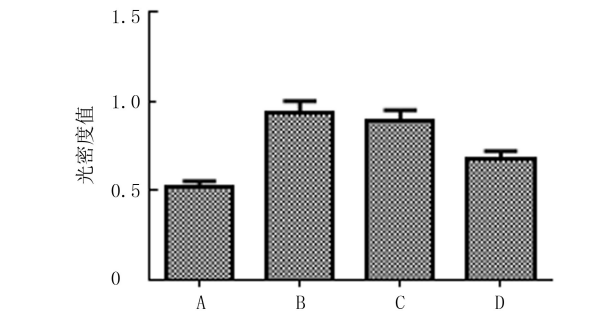


A: 对照组, B: Ang II 组, C: Ang II + siNC 组, D: Ang II + siNOX4 组。

图 1 免疫印迹法检测 NOX4 蛋白的表达

2.2 转染 NOX4-siRNA 对 CFs 增殖的影响

CCK-8 实验检测结果表明, 对照组、Ang II 组、Ang II + siNC 组和 Ang II + siNOX4 组细胞增殖活力存在明显差异($F=140.134, P<0.001$)。两两比较结果显示, 与对照组相比, Ang II 刺激明显促进了 CFs 增殖活力($q=25.587, P<0.05$); 与 Ang II 组相比, NOX4-siRNA 转染后 CFs 增殖活力明显降低($q=15.839, P<0.05$), 而转染 NC-siRNA 对 CFs 增殖活力无明显影响($P>0.05$)。见图 2。



A: 对照组, B: Ang II 组, C: Ang II + siNC 组, D: Ang II + siNOX4 组。

图 2 转染 NOX4-siRNA 对 CFs 增殖的影响

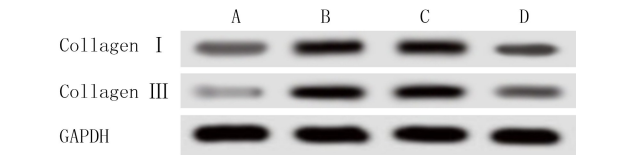
2.3 转染 NOX4-siRNA 对 CFs 胶原蛋白合成影响

免疫印迹法检测各组细胞中胶原蛋白 Collagen I 和 Collagen III 的表达结果表明, 与对照组相比, Ang II 刺激可引起 Collagen I 和 Collagen III 蛋白的表达水平升高($F=142.742/404.800, P<0.001$)。与 Ang II 组相比, 转染 NC-siRNA 后 CFs 中 Collagen I 和 Collagen III 蛋白的表达无明显变化($P>0.05$), 但转染 NOX4-siRNA 可使 CFs 中 Collagen I 和 Collagen III 蛋白的表达水平明显降低($q=17.242/27.727, P<0.05$)。见图 3 和表 2。

2.4 转染 NOX4-siRNA 对 CFs 中 p38MAPK 信号通路相关蛋白表达的影响

免疫印迹法检测各组细胞中 p38MAPK 信号通路相关蛋白 p-p38MAPK 和 p38MAPK 的表达结果显示, 各组细胞中 p38MAPK 蛋白的表达水平无

明显差异, 但 Ang II 刺激后 CFs 中 p-p38MAPK 蛋白的表达水平较对照组明显升高($F=182.909, P<0.001$); 转染 NOX4-siRNA 组 p-p38MAPK 蛋白的表达水平明显降低($q=18.434, P<0.05$), 而转染 NC-siRNA 组 p-p38MAPK 蛋白的表达无明显变化($P>0.05$)。见图 4 和表 3。



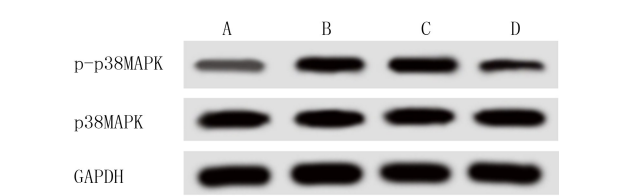
A: 对照组, B: Ang II 组, C: Ang II + siNC 组, D: Ang II + siNOX4 组。

图 3 免疫印迹法检测 Collagen I 和 Collagen III 蛋白的表达

表 2 各组细胞中 Collagen I 和 Collagen III 蛋白表达的比较 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	Collagen I	Collagen III
A 组	0.25±0.02	0.10±0.02
B 组	0.48±0.03 *	0.53±0.04 *
C 组	0.46±0.03 *	0.55±0.04 *
D 组	0.32±0.03 *△	0.22±0.03 *△

注: 多组比较, $F=142.742/404.800, P<0.001$ 。与 A 组相比, * $q=10.733\sim15.087, P<0.05$; 与 B 组相比较, △ $q=17.242/27.727, P<0.05$ 。



A: 对照组, B: Ang II 组, C: Ang II + siNC 组, D: Ang II + siNOX4 组。

图 4 免疫印迹法检测 p38MAPK 信号通路相关蛋白的表达

表 3 各组细胞中 p38MAPK 信号通路相关蛋白表达的比较 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	p-p38MAPK	p38MAPK
A 组	0.28±0.03	0.75±0.06
B 组	0.62±0.05 *	0.73±0.05
C 组	0.65±0.04 *	0.71±0.05
D 组	0.37±0.04 *△	0.78±0.06

注: p-p38MAPK 多组比较, $F=182.909, P<0.001$ 。与 A 组相比, * $q=6.647\sim25.111, P<0.05$; 与 B 组相比, △ $q=18.434, P<0.05$ 。

3 讨 论

Ang II 是经典的肾素-血管紧张素系统的重要活性成分, 可刺激 CFs 增生和胶原蛋白的分泌等, 在心肌的纤维化过程中发挥着重要作用, 常被用来作为体外研究心肌纤维化的诱导因子^[4-5]。本研究参照文献的方法^[6]选用浓度为 10^{-6} mol/L Ang II 刺

激体外培养的 CFs 构建心肌纤维化细胞模型。结果显示,Ang II 刺激后 CFs 增殖活力和胶原蛋白 Collagen I、Collagen III 表达水平均明显升高。这表明本研究中 10^{-6} mol/L Ang II 可诱导 CFs 增殖和胶原蛋白合成,心肌纤维化细胞模型构建成功。

NOX4 是一种与肝组织发生纤维化密切相关的 NADPH 氧化酶,可以通过 ROS 信号通路在细胞的增殖、分化和凋亡等过程中发挥着重要作用;抑制 NOX4 信号通路可以减弱结核性胸膜纤维化^[7-8]。NOX4 在非小细胞肺癌细胞增殖过程中发挥着重要的促进作用,siRNA 抑制 NOX4 表达可通过 PI3K/Akt 信号传导抑制人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞增殖^[9]。此外,NOX4 抑制剂可以逆转 TGF- β 1 诱导的肺癌细胞胶原蛋白 Collagen I 的表达;靶向干扰 NOX4 可抑制 TGF- β 1 诱导 CFs 胶原合成^[10-11]。本研究结果显示,Ang II 可诱导 CFs 中 NOX4 蛋白表达上调。这提示 NOX4 在 Ang II 诱导的 CFs 纤维化过程中发挥着重要作用。转染 NOX4-siRNA 后 Ang II 诱导 CFs 增殖和胶原蛋白 Collagen I、Collagen III 的表达明显受到抑制。这提示,NOX4 在 Ang II 诱导的 CFs 增殖和胶原合成过程中发挥着重要的促进作用。

p38MAPK 信号通路是 MAPK 通路的重要分支,可通过磷酸化作用影响相关基因的表达,在细胞增殖、分化和发育等过程中发挥重要作用^[12]。研究显示,在 Ang II 诱导的 CFs 增殖和胶原合成过程中 p38MAPK 信号通路发挥着重要的促进作用^[13-14]。已有研究指出,沉默 NOX4 表达可抑制胰腺癌细胞中 p38MAPK 信号通路活化^[15]。为了探讨 NOX4 调控 CFs 增殖和胶原合成的分子机制,本研究进一步检测结果表明,转染 NOX4-siRNA 后 Ang II 诱导 p38MAPK 磷酸化水平明显降低,p38MAPK 信号通路的活化明显受到抑制。结果表明,在 Ang II 诱导的 CFs 中 NOX4 可调控 p38MAPK 信号通路。这提示 NOX4 介导的 CFs 增殖和胶原合成可能与 p38MAPK 信号通路的活化有关。

综上所述,NOX4-siRNA 转染可抑制 Ang II 诱导的 CFs 增殖和胶原合成,其作用机制可能与抑制 p38MAPK 信号通路活化有关。该研究结果进一步阐述了心肌纤维化发生发展的分子机制,也为以 NOX4 为靶点预防和改善心肌纤维化提供了新的参考依据。然而,本研究未涉及体内实验探究 NOX4 对心肌纤维化的影响尚显不足,后续研究将通过

动物模型对此进行补充和探究。

[参考文献]

- [1] 韩巍,韩艳丛,邱拥华,等. 高血压合并左心室肥厚患者血清 miRNA-29a-3p 水平与心肌纤维化的相关性[J]. 河北医科大学学报, 2019,40(7):773-776,793.
- [2] TSUBOUCHI K, ARAYA J, MINAGAWA S, et al. Azithromycin attenuates myofibroblast differentiation and lung fibrosis development through proteasomal degradation of NOX4[J]. *Autophagy*, 2017,13(8):1420-1434.
- [3] 吴龙龙,申风俊. NOX4 与肝纤维化关系的研究进展[J]. 国际消化病杂志, 2016,36(6):333-335,359.
- [4] 杨丽红,刘瑞涛,魏庆民,等. CXCR4 siRNA 对 Ang II 诱导的 H9c2 心肌细胞凋亡的影响[J]. 郑州大学学报(医学版), 2019,54(4):583-586.
- [5] 李泽,孟哲,李宇娜,等. 丹参酮 II A 磺酸钠对血管紧张素 II 诱导的大鼠心肌纤维化的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2018,28(12):17-23.
- [6] 李文杰,郭冰冰,路明. siRNA 抑制 HMGB1 表达对 Ang II 诱导的 CFs 增殖及胶原分泌的影响[J]. 徐州医学院学报, 2015(8):517-520.
- [7] 薛腾,赫欣,任亚南,等. NOX4 在 BEAS-2B 细胞上皮间质转化过程中的作用[J]. 郑州大学学报(医学版), 2018,53(3):316-319.
- [8] KIM Y, PARK S Y, JUNG H, et al. Inhibition of NADPH oxidase 4 (NOX4) signaling attenuates tuberculous pleural fibrosis[J]. *J Clin Med*, 2019,8(1):E116.
- [9] YU T, LI L, LIU W Y, et al. Silencing of NADPH oxidase 4 attenuates hypoxia resistance in neuroblastoma cells SH-SY5Y by inhibiting PI3K/Akt-dependent glycolysis[J]. *Oncol Res*, 2019,27(5):525-532.
- [10] 董年,余妮妮,吴登敏,等. NOX-4 调控 PI3K 信号通路参与 TGF- β 1 诱导肺癌细胞表达 I 型胶原蛋白[J]. 中国病理生理杂志, 2018,34(6):58-63.
- [11] CHAN E C, PESHAVARIYA H M, LIU G S, et al. Nox4 modulates collagen production stimulated by transforming growth factor β 1 in vivo and in vitro[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013,430(3):918-925.
- [12] 张频捷,朱立新,耿小平. p38 MAPK 信号传导通路及其抑制剂的研发现状[J]. 安徽医药, 2010,14(5):596-598.
- [13] 辛博,陈力,万丽丽,等. 野黄芩苷对血管紧张素 II 诱导的新生大鼠心肌成纤维细胞的增殖及 ERK1/2、p38 MAPK 信号通路的影响[J]. 中国药房, 2018,29(5):629-633.
- [14] CHEN Z, DING H S, GUO X, et al. MiR-33 promotes myocardial fibrosis by inhibiting MMP16 and stimulating p38 MAPK signaling[J]. *Oncotarget*, 2018,9(31):22047-22057.
- [15] WITTE D, BARTSCHT T, KAUFMANN R, et al. TGF- β 1-induced cell migration in pancreatic carcinoma cells is RAC1 and NOX4-dependent and requires RAC1 and NOX4-dependent activation of p38MAPK[J]. *Oncology Reports*, 2017,38(6):3693-3701.

(本文编辑 于国艺)