

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2021.08.001

❖ 基础研究 ❖

# Relaxin-3 通过抑制 HMGB1 介导的 NLRP3 炎性小体活化抑制 Ang II 诱导的心肌成纤维细胞转分化

翁方中, 胡朝梁, 严骏, 戴伟, 周瑞祥

(武汉市第一医院重症医学科, 湖北 武汉 430022)

**【摘要】目的:** 探究人松弛素 3 (relaxin-3) 对血管紧张素 II (Ang II) 处理心肌成纤维细胞的作用及其可能的作用机制。**方法:** Ang II 处理心肌成纤维细胞, 建立体外心肌纤维化模型, CCK-8 检测细胞活力; EdU 试剂盒检测细胞增殖能力; Western blot 检测细胞中抗  $\alpha$  平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -SMA)、波形蛋白 (vimentin)、I 型胶原 (collagen I)、III 型胶原 (collagen III)、NOD 样受体蛋白 3 (NLRP3)、凋亡相关斑点样蛋白 (ASC)、裂解的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-1 (cleaved caspase-1) 和高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1) 表达; 间接免疫荧光检测细胞中 NLRP3 的表达。**结果:** 与空白对照组相比, Ang II 组细胞活力、EdU 阳性细胞数明显升高 ( $P < 0.05$ ), 细胞中  $\alpha$ -SMA、vimentin、collagen I 和 collagen III 蛋白表达明显升高 ( $P < 0.05$ ), NLRP3 荧光强度和 NLRP3、ASC、cleaved caspase-1、HMGB1 蛋白表达均明显升高 ( $P < 0.05$ ); 与 Ang II 组相比, relaxin-3 组细胞活力、EdU 阳性细胞数明显降低 ( $P < 0.05$ ), 细胞中  $\alpha$ -SMA、vimentin、collagen I 和 collagen III 蛋白表达明显降低 ( $P < 0.05$ ), NLRP3 荧光强度和 NLRP3、ASC、cleaved caspase-1、HMGB1 蛋白表达均明显降低 ( $P < 0.05$ ); relaxin-3 组和 relaxin-3 + oe-NC 组两组间的各项指标比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 与 relaxin-3 + oe-NC 组相比, relaxin-3 + oe-HMGB1 组细胞活力、EdU 阳性细胞数明显升高 ( $P < 0.05$ ), 细胞中  $\alpha$ -SMA、vimentin、collagen I 和 collagen III 蛋白表达明显升高 ( $P < 0.05$ ), NLRP3 荧光强度和 NLRP3、ASC、cleaved caspase-1、HMGB1 蛋白表达均明显升高 ( $P < 0.05$ )。**结论:** relaxin-3 通过下调 HMGB1 的表达抑制 NLRP3 炎性小体活化, 从而抑制 Ang II 诱导的心肌成纤维细胞转分化。

**【关键词】** 心肌纤维化; 人松弛素 3; 心肌成纤维细胞; 血管紧张素 II; 高迁移率族蛋白 B1; NLRP3 炎性小体

**【中图分类号】** R542.2 **【文献标志码】** A

## Relaxin-3 inhibits Ang II -induced cardiac fibroblast transdifferentiation by inhibiting HMGB1-mediated activation of NLRP3 inflammasome

WENG Fang-zhong, HU Chao-liang, YAN Jun, DAI Wei, ZHOU Rui-xiang

(Department of Critical Care Medicine, Wuhan NO. 1 Hospital, Wuhan 430022, Hubei, China)

**【Abstract】 Objective:** To explore the effect of Relaxin-3 on cardiac fibroblasts treated with angiotensin II (Ang II) and its possible mechanism. **Methods:** Ang II was used to process myocardial fibroblasts to establish an vitro myocardial fibrosis model. CCK-8 was used to detect cell viability, EdU detection kit was used to detect the cell proliferation ability, Western blot was used to detect the expression of  $\alpha$ -SMA, vimentin, collagen I, collagen III, NLRP3, ASC, Cleaved caspase-1 and HMGB1 protein in cells. Indirect immunofluorescence was used to detect the expression of NLRP3 in cells. **Results:** Compared with the blank control group, the cell viability and the number of EdU positive cells in the Ang II group were significantly increased ( $P < 0.05$ ), and the expression of  $\alpha$ -SMA, vimentin, collagen I and collagen III protein in the cells was significantly increased ( $P < 0.05$ ), the intensity fluorescence of NLRP3 and expression of NLRP3, ASC, Cleaved caspase-1 and HMGB1 protein were significantly increased ( $P < 0.05$ ). Compared with the Ang II group, the cell viability and the number of EdU-positive cells in the Relaxin-3 group were significantly reduced ( $P < 0.05$ ), the expression of  $\alpha$ -SMA, vimentin, collagen I and collagen III protein in the cells was significantly reduced ( $P < 0.05$ ), and the fluorescence intensity of NLRP3 and the expression of NLRP3, ASC, Cleaved caspase-1, HMGB1 protein were significantly reduced ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference in indicators between the Relaxin-3 group and the Relaxin-3 + oe-NC group ( $P > 0.05$ ). Compared with the Relaxin-3 + oe-NC group, the cell viability and the number of EdU-positive cells in the Relaxin-3 + oe-HMGB1 group were significantly increased ( $P < 0.05$ ), and the expression of  $\alpha$ -SMA, vimentin, collagen I and collagen III protein in the cells was significantly increased ( $P < 0.05$ ), and the expressions of NLRP3, ASC, Cleaved caspase-1 and HMGB1 protein were significantly increased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Relaxin-3 inhibits the activation of NLRP3 inflammasomes by down-regulating the expression of HMGB1, thereby

基金项目: 湖北省武汉市卫健委科研课题 (WX20D92)

作者简介: 翁方中 (1981 -), 男, 主治医师。E-mail: wfdzdoctor1998@163.com

inhibiting the transdifferentiation of cardiac fibroblasts induced by Ang II.

**【Key words】** Myocardial fibrosis; Relaxin-3; Cardiac fibroblasts; Angiotensin II; HMGB1; NLRP3 inflammasome

目前,高血压和心肌梗死等心血管疾病发病率较高,是全球主要的死亡原因。延缓心肌纤维化的发展是降低心血管疾病死亡风险的优化策略<sup>[1]</sup>。心肌成纤维细胞是过量细胞外基质的主要稳态调节器。由于缺氧等病理刺激,心肌成纤维细胞被激活,转化为肌成纤维细胞,后者在心肌纤维化中起着重要作用。肌成纤维细胞分泌过量的细胞外基质,如胶原和基质金属蛋白酶,从而导致心肌僵硬异常、心脏纤维化和心力衰竭<sup>[2]</sup>。NOD 样受体蛋白 3(NOD-like receptor protein 3, NLRP3) 炎症小体由 NLRP3、半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶-1(cysteiny l aspartate-specific proteinase-1, caspase-1) 和凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein, ASC) 组成。NLRP3 炎症小体在一些心脏疾病中被激活,如心肌梗死、主动脉瓣疾病、心肌炎、缺血/再灌注损伤、高血压和动脉粥样硬化,参与心脏疾病进展<sup>[3]</sup>。高迁移率族蛋白 B1(high-mobility group box 1, HMGB1) 是一种广泛存在的核蛋白,可通过诱导 NLRP3 炎症小体的激活,引起急性损伤和炎症<sup>[4]</sup>。人松弛素 3(relaxin-3) 是一种具有类似胰岛素结构的生物活性肽,主要在大脑中表达,可调节觉醒、进食、学习、记忆和中枢对生理应激源的反应<sup>[5]</sup>。外源性 relaxin-3 通过抑制 NLRP3 炎症小体活化,能有效减轻糖尿病大鼠心肌细胞凋亡和心肌纤维化,从而改善糖尿病大鼠心肌损伤<sup>[6]</sup>。但是,关于 relaxin-3 对心肌纤维化的作用机制尚未明确。因此,本研究应用血管紧张素 II(angiotensin II, Ang II) 处理心肌成纤维细胞,建立体外心肌纤维化模型,旨在探究 relaxin-3 是否通过 HMGB1 调控 Ang II 处理的心肌成纤维细胞中 NLRP3 炎症小体的激活,以期明确 relaxin-3 对心肌纤维化的作用机制及开发新的抗纤维化治疗策略提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

大鼠心肌成纤维细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司;重组 relaxin-3 购自美国 Phoenix Pharmaceuticals; Ang II 购自美国 Sigma 公司;过表达载体阴性对照(oe-NC)和 HMGB1 过表达载体(oe-HMGB1)购自武汉金开瑞生物工程有限公司;Lipofectamine 2000 转染试剂购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;细胞计数检测试剂盒(cell counting kit-8, CCK-8)购自美国 MedChemExpress;5-乙炔基-2' 脱氧尿嘧啶核苷(5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU)

检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;兔单克隆抗体抗  $\alpha$  平滑肌肌动蛋白(anti- $\alpha$  smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)、兔单克隆抗体波形蛋白(vimentin)、兔单克隆抗体凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis associated speck like protein, ASC)、兔单克隆抗体裂解的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-1(cleaved caspase-1)购自英国 Abcam 公司;鼠单克隆抗体 I 型胶原(collagen I)、兔多克隆抗体 III 型胶原(collagen III)、兔多克隆 NLRP3 抗体和鼠单克隆 GAPDH 抗体购自美国 GeneTex 公司;兔多克隆 HMGB1 抗体购自美国 Cell Signaling Technology。

### 1.2 细胞培养

大鼠心肌成纤维细胞用含有 10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的杜尔贝科的改良鹰培养基(dulbecco's modified eagle medium, DMEM)培养基培养,其中 DMEM 培养基中含有 100 IU/mL 青霉素和 100  $\mu$ g/mL 链霉素。细胞置于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养,待细胞融合度达到了 80% ~ 90%,胰酶液消化细胞,DMEM 培养基重悬细胞,继续传代培养或进行铺板操作。

### 1.3 细胞给药处理

将对数期生长的大鼠心肌成纤维细胞接种于 6 孔板中,每孔细胞数量为  $1 \times 10^6$  个。细胞继续培养 24 h 后,将细胞随机分为空白对照组、Ang II 组和 relaxin-3 组,Ang II 组细胞添加 2  $\mu$ mol/L Ang II<sup>[7]</sup>,relaxin-3 组细胞添加 2  $\mu$ mol/L Ang II 和 100 ng/mL relaxin-3<sup>[8]</sup>,空白对照组添加等量磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)。细胞继续培养 24 h 后,进行后续实验操作。

### 1.4 细胞转染

将对数期生长的大鼠心肌成纤维细胞接种于 6 孔板中,每孔细胞数量为  $1 \times 10^6$  个。细胞继续培养 24 h 后,将细胞随机分为 Ang II 组、relaxin-3 组、relaxin-3 + oe-NC 组(转染 oe-NC)和 relaxin-3 + oe-HMGB1 组(转染 oe-HMGB1),将细胞培养基更换为新鲜培养基,按照 Lipofectamine 2000 转染试剂说明书进行细胞转染。细胞继续培养 48 h 后,向各组细胞中添加 2  $\mu$ mol/L Ang II,向 relaxin-3 组、relaxin-3 + oe-NC 组和 relaxin-3 + oe-HMGB1 组添加 100 ng/mL relaxin-3。细胞继续培养 24 h 后,进行后续实验操作。

### 1.5 CCK-8 检测细胞活力

胰酶液消化对数期生长的大鼠心肌成纤维细胞,新鲜 DMEM 培养基重悬细胞,取细胞悬液接种

于 96 孔板,每孔  $5 \times 10^3$  个细胞,细胞继续培养 24 h 后,向细胞中添加 CCK-8 溶液 ( $10 \mu\text{L}/\text{孔}$ ),将细胞置于  $37^\circ\text{C}$  下静置孵育 4 h 后,用酶标仪测定每孔在 450 nm 处的光密度 (optical density, OD) 值。Ang II 组细胞活力 (%) =  $\text{OD}_{\text{实验组}}/\text{OD}_{\text{空白对照组}} \times 100\%$ , Relaxin-3 组细胞活力 (%) =  $\text{OD}_{\text{实验组}}/\text{OD}_{\text{Ang II 组}} \times 100\%$ 。

### 1.6 EdU 检测试剂盒检测细胞增殖

向给药处理或者是细胞转染后的大鼠心肌成纤维细胞中添加 EdU 工作液,使其终浓度为  $10 \mu\text{mol}/\text{L}$ ,细胞置于  $37^\circ\text{C}$  下静置孵育 2 h。弃去细胞上清液,4% 多聚甲醛室温固定细胞 15 min。弃去固定液,PBS 洗涤细胞后,添加 0.3% Triton X-100 处理细胞 15 min。去除通透液,PBS 洗涤细胞后,添加 Click-iT™ 细胞反应缓冲液室温避光孵育 30 min,随后添加 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 室温条件下孵育 10 min。PBS 洗涤细胞后,荧光显微镜下观察并拍照。EdU 阳性细胞数 (%) =  $\text{EdU 阳性细胞数}/\text{总细胞数} \times 100\%$ 。

### 1.7 Western blot 检测细胞中 $\alpha$ -SMA、vimentin、collagen I、collagen III、NLRP3、ASC、cleaved caspase-1 和 HMGB1 蛋白表达

收集给药处理或细胞转染后的大鼠心肌成纤维细胞,蛋白裂解液裂解细胞后,收集细胞上清液,BCA 法测定上清液蛋白浓度。取  $30 \mu\text{g}$  蛋白上样,进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 和转膜操作。添加 5% 牛血清白蛋白 (bovine albumin, BSA) 封闭液室温条件下孵育 3 h。向细胞中添加  $\alpha$ -SMA (1:1 000)、vimentin (1:2 000)、collagen I (1:1 000)、collagen III (1:1 000)、NLRP3 (1:2 000)、ASC (1:2 000)、cleaved caspase-1 (1:1 000)、HMGB1 (1:1 000) 和 GAPDH (1:2 000) 抗体稀释液,  $4^\circ\text{C}$

下静置孵育过夜。添加特异性二抗 (1:5 000) 辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记亲和纯化山羊抗小鼠免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG),室温条件下孵育 1 h。滴加电化学发光 (electrochemiluminescence, ECL) 溶液,凝胶成像系统检测蛋白条带,Image J 软件分析各蛋白条带的灰度值。

### 1.8 间接免疫荧光检测细胞中 NLRP3 的表达

弃去给药处理或细胞转染后的大鼠心肌成纤维细胞的培养基,PBS 清洗细胞后,添加 4% 多聚甲醛室温条件下固定细胞 15 min。PBS 清洗细胞,添加 0.3% Triton X-100 处理细胞 15 min。PBS 清洗细胞后,添加 5% BSA 封闭液室温条件下封闭 30 min。弃去封闭液,添加 NLRP3 抗体稀释液 (1:200),  $4^\circ\text{C}$  下静置孵育过夜。添加特异性荧光二抗 (1:5 000) Alexa Fluor® 偶联二抗,室温条件下避光孵育 1 h。滴加 DAPI 室温条件下孵育 10 min。PBS 清洗细胞后,荧光显微镜下观察并拍照。Image J 软件分析各组细胞荧光强度。

### 1.9 统计学分析

采用 SPSS21.0 软件进行统计分析。计量资料以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 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* 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 relaxin-3 对 Ang II 诱导的心肌成纤维细胞增殖的影响

与空白对照组相比,Ang II 组细胞活力明显升高 ( $P < 0.05$ ),EdU 阳性细胞数明显升高 ( $P < 0.05$ );与 Ang II 组相比,Relaxin-3 组细胞活力明显降低 ( $P < 0.05$ ),EdU 阳性细胞数明显降低 ( $P < 0.05$ )。见图 1。

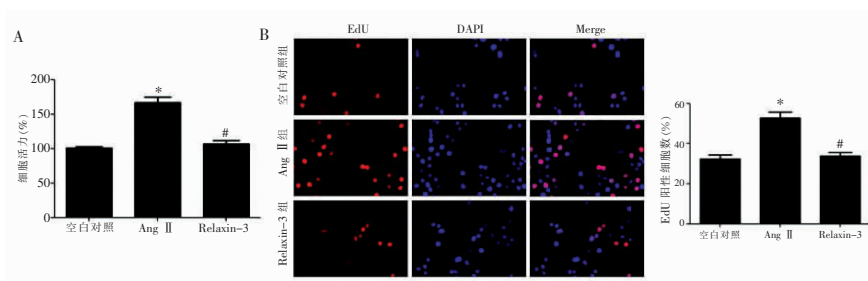


图 1 relaxin-3 对 Ang II 诱导的心肌成纤维细胞增殖的影响

A. CCK-8 检测各组细胞活力;B. EdU 检测各组细胞增殖能力。\* $P < 0.05$ ,与空白对照组比较;# $P < 0.05$ ,与 Ang II 组比较。

### 2.2 relaxin-3 对 Ang II 诱导的心肌成纤维细胞转分化和胶原产生的影响

与空白对照组相比,Ang II 组细胞中  $\alpha$ -SMA、vimentin、collagen I 和 collagen III 蛋白的表达水平明

显升高 ( $P < 0.05$ ); 与 Ang II 组相比, relaxin-3 组细胞中  $\alpha$ -SMA、vimentin、collagen I 和 collagen III 蛋白表达水平却明显下降 ( $P < 0.05$ )。见图 2。

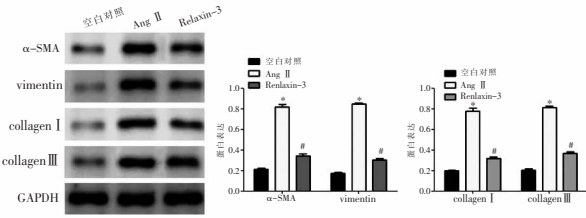


图 2 relaxin-3 对 Ang II 诱导的心肌成纤维细胞转分化和胶原产生的影响

\* $P < 0.05$ , 与空白对照组比较; # $P < 0.05$ , 与 Ang II 组比较。

### 2.3 relaxin-3 对 Ang II 诱导的心肌细胞 NLRP3 炎性小体和 HMGB1 表达的影响

与空白对照组相比, Ang II 组细胞中 NLRP3 荧光强度和 NLRP3、ASC、cleaved caspase-1、HMGB1 蛋白表达均明显增多 ( $P < 0.05$ ); 与 Ang II 组相比, relaxin-3 组细胞中 NLRP3 荧光强度和 NLRP3、ASC、cleaved caspase-1、HMGB1 蛋白表达均明显降低 ( $P < 0.05$ )。见图 3。

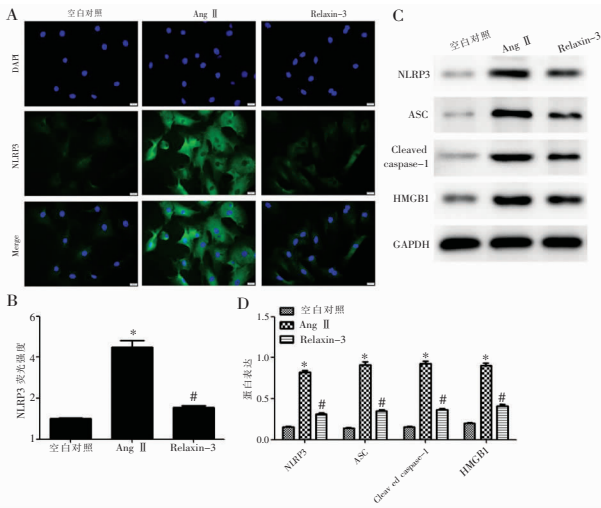


图 3 relaxin-3 对 Ang II 诱导的心肌细胞 NLRP3 炎性小体和 HMGB1 表达的影响

A-B. 间接免疫荧光检测细胞中 NLRP3 表达; C-D. Western blot 检测细胞中 NLRP3、ASC、cleaved caspase-1 和 HMGB1 蛋白表达。\* $P < 0.05$ , 与空白对照组比较; # $P < 0.05$ , 与 Ang II 组比较。

### 2.4 过表达 HMGB1 对 Ang II 诱导的心肌成纤维细胞 NLRP3 炎性小体的影响

与 Ang II 组相比, relaxin-3 组细胞中 NLRP3 荧光强度和 NLRP3、ASC、cleaved caspase-1、HMGB1 蛋白表达均明显降低 ( $P < 0.05$ ); relaxin-3 组和 relaxin-3 + oe-NC 组两组间 NLRP3 荧光强度和 NLRP3、ASC、cleaved caspase-1、HMGB1 蛋白表达差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 与 relaxin-3 + oe-NC 组相比,

relaxin-3 + oe-HMGB1 组细胞中 NLRP3 荧光强度和 NLRP3、ASC、cleaved caspase-1、HMGB1 蛋白表达均明显升高 ( $P < 0.05$ )。见图 4。

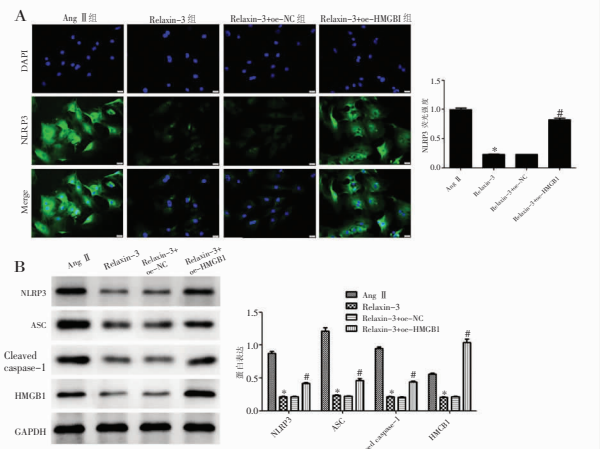


图 4 过表达 HMGB1 对 Ang II 诱导的心肌成纤维细胞 NLRP3 炎性小体的影响

A. 间接免疫荧光检测细胞中 NLRP3 表达; B. Western blot 检测细胞中 NLRP3、ASC、cleaved caspase-1 和 HMGB1 蛋白表达。\* $P < 0.05$ , 与 Ang II 组比较; # $P < 0.05$ , 与 relaxin-3+oe-NC 组比较。

### 2.5 过表达 HMGB1 逆转 relaxin-3 对 Ang II 诱导的心肌成纤维细胞增殖的影响

与 Ang II 组相比, relaxin-3 组细胞活力明显降低 ( $P < 0.05$ ), EdU 阳性细胞数明显降低 ( $P < 0.05$ ); relaxin-3 组和 relaxin-3 + oe-NC 组两组间细胞活力和 EdU 阳性细胞数比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 与 relaxin-3 + oe-NC 组相比, relaxin-3 + oe-HMGB1 组细胞活力明显升高 ( $P < 0.05$ ), EdU 阳性细胞数明显升高 ( $P < 0.05$ )。见图 5。

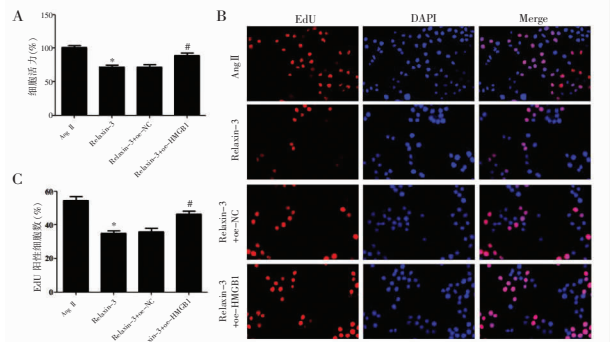


图 5 过表达 HMGB1 逆转 relaxin-3 对 Ang II 诱导的心肌成纤维细胞增殖的影响

A. CCK-8 检测各组细胞活力; B-C. EdU 实验检测各组细胞增殖能力。\* $P < 0.05$ , 与 Ang II 组比较; # $P < 0.05$ , 与 relaxin-3+oe-NC 组比较。

### 2.6 过表达 HMGB1 逆转 relaxin-3 对 Ang II 诱导的心肌成纤维细胞转分化和胶原产生的影响

与 Ang II 组相比, relaxin-3 组细胞中  $\alpha$ -SMA、vi-

mentin、collagen I 和 collagen III 蛋白表达明显降低 ( $P < 0.05$ ); relaxin-3 组和 relaxin-3 + oe-NC 组两组间  $\alpha$ -SMA、vimentin、collagen I 和 collagen III 蛋白表达差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 与 relaxin-3 + oe-NC 组相比, relaxin-3 + oe-HMGB1 组细胞中  $\alpha$ -SMA、vimentin、collagen I 和 collagen III 蛋白表达明显升高 ( $P < 0.05$ )。见图 6。

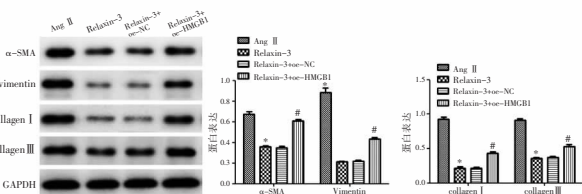


图 6 过表达 HMGB1 逆转 Relaxin-3 对 Ang II 诱导的心肌成纤维细胞转分化和胶原产生的影响

\* $P < 0.05$ , 与 Ang II 组比较; # $P < 0.05$ , 与 relaxin-3+oe-NC 组比较。

### 3 讨论

纤维化疾病的死亡率极高, 每年可导致全球超过 80 万人死亡, 其中大部分是肺和心脏纤维化<sup>[9]</sup>。损伤后生理性细胞外基质重塑是组织再生的一个自然且至关重要的过程。相反, 病理性重塑, 包括纤维性胶原的产生, 会导致非功能性瘢痕和组织功能受损。虽然心脏纤维化的种类已有较明确的分型, 但导致纤维化发生和心脏瘢痕形成过程的致病机制仍未完全清楚<sup>[10]</sup>。在心脏疾病中, 特别是心脏纤维化领域, 迫切需要探究纤维化相关致病机制并开发新的、有效的治疗方法。

心肌成纤维细胞向肌成纤维细胞的转化与 I 型和 III 型胶原的产生有关, 其中 I 型胶原含量最为丰富<sup>[11]</sup>。虽然组织修复过程是对组织损伤的一种重要的短期适应, 但持续、长期产生的细胞外基质蛋白会导致心肌僵硬和顺应性差, 从而导致心功能障碍<sup>[12]</sup>。因此, 靶向抑制心肌成纤维细胞转分化在心肌纤维化过程中起重要作用<sup>[13]</sup>。松弛素家族多肽受体广泛分布于心、脑、肾和生殖系统, relaxin 与其受体结合后可触发抗炎、抗氧化、抗凋亡和抗纤维化途径<sup>[14]</sup>。relaxin-2 是松弛素家族成员之一, 可通过抑制纤维化、瘢痕形成和炎症水平来控制子宫内膜异位病变<sup>[15]</sup>。本研究应用 Ang II 处理心肌成纤维细胞, 建立体外心肌纤维化模型, 随后用 relaxin-3 处理细胞, 结果显示, Ang II 处理可诱导心肌成纤维细胞增殖, 还可上调肌成纤维细胞标志物  $\alpha$ -SMA 和 vimentin 的表达, 以及提高 collagen I 和 collagen III 的表达水平, 而 relaxin-3 处理可明显逆转 Ang II 对心肌成纤维细胞的作用, 抑制心肌成纤维细胞增殖,

下调肌成纤维细胞标志物  $\alpha$ -SMA 和 vimentin 的表达, 且降低 collagen I 和 collagen III 的表达水平。因此, relaxin-3 可在 Ang II 诱导的心肌成纤维细胞中发挥抗纤维化作用。

NLRP3 炎症小体的激活可促进胶原蛋白的产生和细胞因子白介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) 的分泌, 导致肺、肝和肾等器官的纤维化发展<sup>[16]</sup>。Ang II 可促进 NLRP3 炎症小体介导的胶原合成, 导致 caspase-1 活化和 IL-1 $\beta$  分泌, 最终导致小鼠心肌纤维化。然而, NLRP3 基因缺失可减轻线粒体异常、心脏炎症、氧化应激和纤维化, 从而减轻心脏功能紊乱和肥大<sup>[17]</sup>。人皮肤成纤维细胞中 NLRP3 炎症小体激活可诱导细胞向肌成纤维细胞分化 ( $\alpha$ -SMA 表达上调和胶原沉积), relaxin-2 可通过靶向抑制 NLRP3 炎症小体激活逆转上述变化<sup>[18]</sup>。另外, Zhang 等<sup>[19]</sup>指出, 高糖通过激活 NLRP3 炎症小体诱导新生大鼠心肌成纤维细胞胶原合成, 导致 caspase-1 激活、IL-1 $\beta$  和白介素-18 (interleukin-18, IL-18) 分泌。本研究显示, Ang II 处理可诱导心肌成纤维细胞中 NLRP3、ASC 和 cleaved caspase-1 蛋白表达, 而 relaxin-3 处理可明显逆转 Ang II 处理的心肌成纤维细胞中 NLRP3、ASC 和 cleaved caspase-1 蛋白表达, 与 Zhang 等<sup>[19]</sup>的研究结果基本一致, 表明 relaxin-3 可抑制 Ang II 诱导的心肌成纤维细胞中 NLRP3 炎性小体激活。

目前, 关于 relaxin-3 抑制 NLRP3 炎性小体激活的相关机制尚未明确。抑制 HMGB1 可能是治疗组织纤维化的一种治疗方法<sup>[20]</sup>。Zhang 等<sup>[21]</sup>的研究结果表明, HMGB1 与压力超负荷小鼠较高的死亡率、胶原含量及较低的左室射血分数相关, 外源性 HMGB1 在心肌中的过度表达可促进心肌纤维化、加重了压力超负荷引起的左室功能障碍。敲低 HMGB1 还可通过抑制 NLRP3 炎性小体激活在胃溃疡小鼠中发挥抗炎和抗溃疡作用<sup>[22]</sup>。此外, 靶向抑制 HMGB1 依赖的 NLRP3 炎性小体失活可明显减轻脂多糖诱导的乳鼠心肌细胞炎症和凋亡, 减轻细胞损伤<sup>[23]</sup>。本研究显示, Ang II 处理可诱导心肌成纤维细胞中 HMGB1 蛋白表达, 而 relaxin-3 处理可明显抑制 Ang II 处理的心肌成纤维细胞中 HMGB1 蛋白表达, 进而使 relaxin-3 和 Ang II 处理的心肌成纤维细胞中 NLRP3、ASC 和 cleaved caspase-1 蛋白表达上调, 且细胞增殖能力、 $\alpha$ -SMA、vimentin、collagen I 和 collagen III 的表达也均上调。因此, relaxin-3 可通过抑制 HMGB1/NLRP3 炎性小体轴在 Ang II 诱导的心肌成纤维细胞中发挥抗纤维化作用。

综上所述, relaxin-3 可通过抑制 HMGB1 介导的

NLRP3 炎性小体活化,抑制 Ang II 诱导的心肌成纤维细胞增殖以及  $\alpha$ -SMA、vimentin、collagen I 和 collagen III 的表达,从而发挥抗纤维化作用。

参考文献

[1] Sorriento D, Iaccarino G. Inflammation and cardiovascular diseases: The most recent findings[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(16): 3879 - 3887.

[2] Ma ZG, Yuan YP, Wu HM, et al. Cardiac fibrosis: new insights into the pathogenesis [J]. International Journal of Biological Science, 2018, 14(12): 1645 - 1657.

[3] Zhou W, Chen C, Chen Z, et al. NLRP3: A novel mediator in cardiovascular disease [J]. Journal of Immunology Research, 2018, 18(4): 570 - 579.

[4] Duan J, Zhang Q, Hu X, et al. N4-acetylcytidine is required for sustained NLRP3 inflammasome activation via HMGB1 pathway in microglia [J]. Cellular Signalling, 2019, 58(6): 44 - 52.

[5] Lawther AJ, Flavell A, Ma S, et al. Involvement of serotonergic and relaxin-3 neuropeptide systems in the expression of anxiety-like behavior [J]. Neuroscience, 2018, 390(2): 88 - 103.

[6] Zhang X, Pan L, Yang K, et al. H3 relaxin protects against myocardial injury in experimental diabetic cardiomyopathy by inhibiting myocardial apoptosis, fibrosis and inflammation [J]. Cellular Physiology and Biochemistry, 2017, 43(4): 1311 - 1324.

[7] 卓小桢, 刘懿, 李娜, 等. 白藜芦醇通过 TGF- $\beta$ 1/Smad3 信号通路抑制心肌成纤维细胞中 AngII 诱导的 I/III 型胶原合成 [J]. 西安交通大学学报 (医学版), 2018, 39(4): 525 - 529, 557.

[8] Zhang X, Ma X, Zhao M, et al. H2 and H3 relaxin inhibit high glucose-induced apoptosis in neonatal rat ventricular myocytes [J]. Biochimie, 2015, 108(3): 59 - 67.

[9] Hinz B, Lagares D. Evasion of apoptosis by myofibroblasts: a hallmark of fibrotic diseases [J]. Nature Reviews Rheumatology, 2020, 16(1): 11 - 31.

[10] Hinderer S, Schenke-Layland K. Cardiac fibrosis - A short review of causes and therapeutic strategies [J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2019, 146(3): 77 - 82.

[11] Hortells L, Johansen AKZ, Yutzey KE. Cardiac fibroblasts and the extracellular matrix in regenerative and nonregenerative hearts [J]. Journal of Cardiovascular Development and Disease, 2019, 6(3): 29 - 39.

[12] Nguyen-Truong M, Wang Z. Biomechanical properties and mechanobiology of cardiac ECM [J]. Advance in Experimental Medicine

Biology, 2018, 1098(7): 1 - 19.

[13] Liu D, Tian X, Liu Y, et al. CREG ameliorates the phenotypic switching of cardiac fibroblasts after myocardial infarction via modulation of CDC42 [J]. Cell Death & Disease, 2021, 12(4): 355 - 367.

[14] Klonisch T. Editorial to the mini-review series on relaxin, related peptides and receptors? [J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2019, 487(5): 1 - 12.

[15] Yoshino O, Ono Y, Honda M, et al. Relaxin-2 may suppress endometriosis by reducing fibrosis, scar formation, and inflammation [J]. Biomedicine, 2020, 8(11): 467 - 458.

[16] Alyaseer AAA, Lima MHS, Braga TT. The role of NLRP3 inflammasome activation in the epithelial to mesenchymal transition process during the fibrosis [J]. Frontiers in Immunology, 2020, 11: 883.

[17] Chen Y, Zeng M, Zhang Y, et al. Nlrp3 deficiency alleviates angiotensin II-induced cardiomyopathy by inhibiting mitochondrial dysfunction [J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2021, 24(5): 667 - 689.

[18] Pinar AA, Yuferov A, Gaspari TA, et al. Relaxin can mediate its anti-fibrotic effects by targeting the myofibroblast NLRP3 inflammasome at the level of caspase-1 [J]. Frontiers in Pharmacology, 2020, 11(1): 1201 - 1214.

[19] Zhang X, Fu Y, Li H, et al. H3 relaxin inhibits the collagen synthesis via ROS- and P2X7R-mediated NLRP3 inflammasome activation in cardiac fibroblasts under high glucose [J]. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2018, 22(3): 1816 - 1825.

[20] Vicentino ARR, Carneiro VC, Allonso D, et al. Emerging role of HMGB1 in the pathogenesis of schistosomiasis liver fibrosis [J]. Frontiers in Immunology, 2018, 9(6): 1979 - 1988.

[21] Zhang L, Yu Y, Yu P, et al. HMGB1 aggravates pressure overload-induced left ventricular dysfunction by promoting myocardial fibrosis [J]. International Journal of Hypertension, 2020, 45(2): 284 - 297.

[22] Alzokaky AA, Abdelkader EM, El-Dessouki AM, et al. C-phycocyanin protects against ethanol-induced gastric ulcers in rats: Role of HMGB1/NLRP3/NF- $\kappa$ B pathway [J]. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 2020, 127(4): 265 - 277.

[23] Zhao H, Gu Y, Chen H. Propofol ameliorates endotoxin? induced myocardial cell injury by inhibiting inflammation and apoptosis via the PPAR $\gamma$ /HMGB1/NLRP3 axis [J]. Molecular Medicine Reports, 2021, 23(3): 1 - 16.

(收稿日期: 2021 - 03 - 03

修回日期: 2021 - 04 - 12)