



inhibitor 组、PVT1 siRNA + miR-93-5p inhibitor 组、PVT1 NC + miR-93-5p NC 组细胞中 TGF-β<sub>1</sub>、Col I 蛋白相对表达量显著高于 PVT1 siRNA + miR-93-5p NC 组,Smad7 蛋白相对表达量显著低于 PVT1 siRNA + miR-93-5p NC 组( $P < 0.05$ ); PVT1 siRNA + miR-93-5p inhibitor 组、PVT1 NC + miR-93-5p NC 组细胞中 TGF-β<sub>1</sub>、Col I 蛋白相对表达量显著低于 PVT1 NC + miR-93-5p inhibitor 组,Smad7 蛋白相对表达量显著高于 PVT1 NC + miR-93-5p inhibitor 组( $P < 0.05$ );PVT1 siRNA + miR-93-5p inhibitor 组与 PVT1 NC + miR-93-5pNC 组细胞中 TGF-β<sub>1</sub>、Smad7、Col I 蛋白相对表达量比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论 PVT1 基因沉默可促进 miR-93-5p/Smad7 通路活化,抑制 TGF-β<sub>1</sub>/Smad 通路激活,进而抑制高糖培养的 CF 纤维化进程。

关键词: 心脏成纤维细胞;高糖;变异性浆细胞瘤异位 1 基因;微 RNA-93-5p;转化生长因子-β<sub>1</sub>

中图分类号: R541 文献标志码: A 文章编号: 1004-7239(2021)11-1017-08

Effect of plasma-cytoma variant translocation 1 gene on cardiac fibroblasts of rats cultured by high glucose and its mechanism

BAI Yang<sup>1</sup>,HUANG Ting<sup>1</sup>,LI Zhenzhen<sup>1</sup>,WANG Yan<sup>2</sup>

(1. Department of Endocrinology,the 7<sup>th</sup> People's Hospital of Zhengzhou,Zhengzhou 450016,Henan Province,China;2. Department of Cardiology,the 7<sup>th</sup> People's Hospital of Zhengzhou,Zhengzhou 450016,Henan Province,China)

**Abstract: Objective** To explore the effect of plasma-cytoma variant translocation 1 (PVT1) gene on rat cardiac fibroblast (CF) cultured by high glucose and its mechanism. **Methods** The CFs in logarithmic growth phase were taken and randomly divided into blank control group,high glucose group,PVT1 small interfering RNA(siRNA) group and PVT1 siRNA negative control(NC) group (PVT1 siRNA NC group). The cells in the blank control group and high glucose group were not transfected,the cells in the PVT1 siRNA group and PVT1 siRNA NC group were transfected with PVT1 siRNA and PVT1 siRNA NC reagents,respectively;after transfection for 24 h,the cells in the high glucose group,PVT1 siRNA group and PVT1 siRNA NC group were cultured with a medium containing 25 mmol · L<sup>-1</sup> glucose to simulate high-glucose culture conditions,the cells in the blank control group were not treated. After transfection for 24 h,cells in the five groups were treated with a medium containing 25 mmol · L<sup>-1</sup> glucose to simulate high-glucose culture conditions. The collagenous fiber deposition of cells treated with high-glucose for 24 h in the 4 groups was observed by the sirius scarlet staining method. The cell cycle distribution of cells in the four groups after 24 h of high glucose treatment was detected by flow cytometry. The expressions of PVT1,transforming growth factor-β<sub>1</sub> (TGF-β<sub>1</sub>) mRNA and microRNA(miRNA)-93-5p of cells in the four groups after 24 h of high glucose treatment were detected by real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction method. The expressions of TGF-β<sub>1</sub>,Smad2/3,phosphorylation (p-Smad2/3),Smad7,p21,α-smooth muscle actin (α-SMA),type I collagenous (Col I) of cells in the four groups after 24 h of high glucose treatment were detected by Western blot. In addition,the CFs in the logarithmic growth phase were taken and randomly divided into untransfected group,PVT1 siRNA + miR-93-5p inhibitor group,PVT1 siRNA + miR-93-5p NC group,PVT1 NC + miR-93-5p inhibitor group,PVT1 NC + miR-93-5p NC group. The cells in the untransfected group were not transfected,the cells in the PVT1 siRNA + miR-93-5p inhibitor group were transfected with PVT1 siRNA and miR-93-5p inhibitor,the cells in the PVT1 siRNA + miR-93-5p NC group were transfected with PVT1 siRNA and miR-93-5p NC,the cells in the PVT1 NC + miR-93-5p inhibitor group were transfected with PVT1 NC and miR-93-5p inhibitor,the cells in the PVT1 NC + miR-93-5p NC group were transfected with PVT1 NC and miR-93-5p NC. The expressions of TGF-β<sub>1</sub>,Smad7,Col I protein of cells in the five groups after 24 h of high glucose treatment were detected by Western blot. **Results** Compared with the blank control group,the number of cells in the high glucose group was increased,and the deposition of red collagenous fibers was increased;compared with the high glucose group,the intercellular spaces of cells in the PVT1 siRNA group became larger and the deposition of red collagenous fibers were decreased;the deposition of red collagenous fibers of cells in the PVT1 siRNA NC group was similar to the high glucose group. The proportion of cells in the G<sub>0</sub> + G<sub>1</sub> phase in the high glucose group,PVT1 siRNA group and PVT1 siRNA NC group was significantly lower than that in the blank control group,and the proportion of cells in the S + G<sub>2</sub> + M phase was significantly higher than that in the blank control group ( $P < 0.05$ );the proportion of cells in the G<sub>0</sub> + G<sub>1</sub> phase in the PVT1 siRNA group was significantly higher than that in the high glucose group,and the proportion of cells in the S + G<sub>2</sub> + M phase was significantly lower than that in the high glucose group ( $P < 0.05$ );the proportion of cells in the G<sub>0</sub> + G<sub>1</sub> phase in the PVT1 siRNA NC group was significantly lower than that in the PVT1 siRNA group,and the proportion of cells in the S + G<sub>2</sub> + M phase was significantly higher than that in the PVT1 siRNA group ( $P < 0.05$ );there was no significant difference in the proportion of cells in the G<sub>0</sub> + G<sub>1</sub> phase and the proportion in the S + G<sub>2</sub> + M phase between the high glucose group and the PVT1 siRNA NC group ( $P > 0.05$ ). The relative expression levels of

PVT1 and TGF- $\beta_1$  mRNA in the high glucose group,PVT1 siRNA group and PVT1 siRNA NC group were significantly higher than those in the blank control group,and the relative expression level of miR-93-5p was significantly lower than that in the blank control group ( $P < 0.05$ );the relative expression levels of PVT1 and TGF- $\beta_1$  mRNA in the PVT1 siRNA group were significantly lower than those in the high glucose group,and the relative expression level of miR-93-5p was significantly higher than that in the high glucose group ( $P < 0.05$ );the relative expression levels of PVT1 and TGF- $\beta_1$  mRNA in the PVT1 siRNA NC group were significantly higher than those in the PVT1 siRNA group,and the relative expression level of miR-93-5p was significantly lower than that in the PVT1 siRNA group ( $P < 0.05$ );there was no significant difference in the relative expression of PVT1,TGF- $\beta_1$  mRNA and miR-93-5p between the high glucose group and the PVT1 siRNA NC group ( $P > 0.05$ ). The relative expression levels of  $\alpha$ -SMA,Col I ,TGF- $\beta_1$  protein and (p-Smad2/3)/(Smad2/3) in the high glucose group,PVT1 siRNA group and PVT1 siRNA NC group were significantly higher than those in the blank control group,while the relative expression levels of p21 and Smad7 proteins were significantly lower than those in the blank control group ( $P < 0.05$ );the relative expression levels of  $\alpha$ -SMA,Col I ,TGF- $\beta_1$  protein and (p-Smad2/3)/(Smad2/3) in the PVT1 siRNA group were significantly lower than those in the high glucose group,and the relative expression levels of p21 and Smad7 protein were significantly higher than those in the high glucose group ( $P < 0.05$ );the relative expression levels of  $\alpha$ -SMA,Col I ,TGF- $\beta_1$  protein and (p-Smad2/3)/(Smad2/3) in the PVT1 siRNA NC group were significantly higher than those in the PVT1 siRNA group,and the relative expression levels of p21 and Smad7 protein were significantly lower than those in the PVT1 siRNA group ( $P < 0.05$ );there was no significant difference in the relative expression of  $\alpha$ -SMA,Col I ,p21,TGF- $\beta_1$  ,Smad7 protein and (p-Smad2/3)/(Smad2/3) between the high glucose group and PVT1 siRNA NC group ( $P > 0.05$ ). The relative expression levels of TGF- $\beta_1$  and Col I protein in the PVT1 siRNA + miR-93-5p NC group were significantly lower than those in the untransfected group,and the relative expression level of Smad7 protein was significantly higher than that in the untransfected group ( $P < 0.05$ );the relative expression levels of TGF- $\beta_1$  and Col I protein in the PVT1 NC + miR-93-5p inhibitor group were significantly higher than those in the untransfected group,and the relative expression level of Smad7 protein was significantly lower than that in the untransfected group( $P < 0.05$ );there was no significant difference in the relative expression levels of TGF- $\beta_1$  ,Smad7 and Col I protein between the untransfected group and PVT1 NC + miR-93-5p NC group,PVT1 siRNA + miR-93-5p inhibitor group ( $P > 0.05$ ). The relative expression levels of TGF- $\beta_1$  and Col I protein in the PVT1 NC + miR-93-5p inhibitor group,PVT1 siRNA + miR-93-5p inhibitor group,PVT1 NC + miR-93-5p NC group were significantly higher than those in the PVT1 siRNA + miR-93-5p NC group,and the relative expression level of Smad7 protein was significantly lower than that in the PVT1 siRNA + miR-93-5p NC group ( $P < 0.05$ );the relative expression levels of TGF- $\beta_1$  and Col I protein in PVT1 NC + miR-93-5p inhibitor group,PVT1 siRNA + miR-93-5p inhibitor group,PVT1 NC + miR-93-5p NC group were significantly higher than those in the PVT1 siRNA + miR-93-5p NC group,and the relative expression level of Smad7 protein was significantly lower than that in the PVT1 siRNA + miR-93-5p NC group ( $P < 0.05$ );there was no significant difference in the relative expression levels of TGF- $\beta_1$  , Smad7,Col I protein between the PVT1 siRNA + miR-93-5p inhibitor group and the PVT1 NC + miR-93-5p NC group ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** The PVT1 gene silencing can promote the activation of miR-93-5p/Smad7 pathway and inhibit the activation of TGF- $\beta_1$ /Smad pathway,thereby inhibiting the fibrosis process of CF cultured by high glucose.

**Key words:** cardiac fibroblast;high glucose;plasma-cytoma variant translocation 1 gene;microRNA-93-5p;transforming growth factor- $\beta_1$

糖尿病是一种常见的代谢障碍疾病,其发病率呈逐年增长的趋势,据世界流行病学统计,预计到 2035 年将有 5.92 亿人患糖尿病<sup>[1]</sup>。糖尿病心肌病(diabetic cardiomyopathy,DCM)是导致糖尿病患者死亡的主要原因之一<sup>[2]</sup>。有研究发现,高糖条件下,心脏成纤维细胞(cardiac fibroblast,CF)过度增殖、胶原纤维过量积聚是导致糖尿病患者心室重构、心肌肥厚及纤维化的重要机制<sup>[3]</sup>。因此,探讨 CF 增殖及胶原纤维化进程中的分子生物学机制,对防治 DCM 及缓解糖尿病心肌纤维化进程具有潜在的临床意义。高嘉梦等<sup>[4]</sup>研究发现,转化生长因子- $\beta_1$

(transforming growth factor- $\beta_1$ ,TGF- $\beta_1$ )可使 DCM 患者 CF 中 I 型胶原蛋白(type I collagen,Col I)、Ⅲ型胶原蛋白(type Ⅲ collagen,Col Ⅲ)产生和分泌增加,是诱导心肌向纤维化过程发展的重要细胞因子。有研究发现,微 RNA(microRNA,miRNA)可通过不同机制调控心肌纤维化的发生、发展<sup>[5]</sup>。张伟峰等<sup>[6]</sup>研究证实,miRNA-93-5p 可下调 Col I、Col Ⅲ 表达并抑制心肌梗死小鼠 CF 的纤维化进程。但目前还不明确 miR-93-5p 与 TGF- $\beta_1$  是否通过某种联系调控心肌纤维化进程。变异性浆细胞瘤异位 1(plasma-cytoma variant translocation 1,PVT1)基因被

发现于人类衰老的成纤维细胞中,其水平降低可触发增殖性 CF 的衰老凋亡<sup>[7]</sup>,PVT1 可能在 CF 增殖及纤维化过程中扮演重要角色。然而,目前关于 PVT1 在心脏纤维化进程中的调控机制研究较少。本研究旨在探讨 PVT1 基因表达对高糖培养的大鼠 CF 的影响及其作用机制,以期阐明 CF 增殖及纤维化进程中的复杂机制,为糖尿病心肌纤维化及 DCM 的治疗提供理论参考。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞、主要试剂与仪器** 大鼠永生化 CF 购自天津阿尔法生物科技有限公司;胎牛血清、达尔伯克改良伊格尔培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium,DMEM)购自美国 Gibco 公司,Lipfeclamine 3000 转染试剂盒购自美国 Thermo Fisher 公司,PVT1 小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA)及其阴性对照(PVT1 siRNA NC)试剂购自美国 System Biosciences 公司,miR-93-5p inhibitor 及其阴性对照试剂(miR-93-5p inhibitor NC)购自上海振誉生物科技有限公司,二喹啉甲酸(bicinchoninic acid,BCA)蛋白定量检测试剂盒购自上海齐源生物科技有限公司,TGF- $\beta_1$ 、Smad2/3、磷酸化 Smad2/3 (phosphorylation Smad2/3, p-Smad2/3)、Smad7、细胞周期抑制因子 p21、Col I、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白(alpha-smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)抗体购自美国 Abcam 公司,天狼猩红染色试剂盒购自上海钰博生物科技有限公司,细胞周期检测试剂盒购自北京拜尔迪生物技术有限公司,逆转录试剂盒购自北京索莱宝生物科技有限公司;倒置显微镜购自埃克森(北京)科技有限公司,流式细胞仪购自上海佐明机械设备贸易有限公司,实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)仪购自大龙兴创实验仪器(北京)股份有限公司,化学发光成像分析系统购自上海信裕生物科技有限公司;PVT1、TGF- $\beta_1$  及 miR-93-5p 引物序列由大连宝生物工程有限公司合成。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 细胞培养** 取液氮中保存的 CFs,常规复苏后,接种至含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 中,于 37℃、含体积分数 5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度的细胞培养箱中传代培养至第 3 代后收集细胞进行后续实验。

**1.2.2 细胞转染及分组** 收集对数生长期的 CFs,胰蛋白酶消化后,用培养液重悬,以每孔  $5 \times 10^4$  个细胞接种至 96 孔板中,并随机分为空白对照组、高糖组、PVT1 siRNA 组、PVT1 siRNA NC 组,每组设置 6 个复孔。空白对照组和高糖组细胞不进行转染,PVT1 siRNA 组及 PVT1 siRNA NC 组细胞分别转染

PVT1 siRNA、PVT1 siRNA NC,转染操作按照 Lipfeclamine 3000 转染试剂盒说明书进行。转染 24 h 后,高糖组、PVT1 siRNA 组、PVT1 siRNA NC 组细胞用含 25 mmol·L<sup>-1</sup> 葡萄糖的 DMEM 培养,模拟高糖培养条件<sup>[8]</sup>;空白对照组细胞不作处理。

另取对数生长期 CFs,胰蛋白酶消化后,用培养液重悬,以每孔  $5 \times 10^4$  个细胞接种至 96 孔板上,并随机分为未转染组、PVT1 siRNA + miR-93-5p inhibitor 组、PVT1 siRNA + miR-93-5p NC 组、PVT1 NC + miR-93-5p inhibitor 组、PVT1 NC + miR-93-5p NC 组,每组设置 6 个复孔。未转染组不进行转染,PVT1 siRNA + miR-93-5p inhibitor 组细胞转染 PVT1 siRNA 和 miR-93-5p inhibitor,PVT1 siRNA + miR-93-5p NC 组细胞转染 PVT1 siRNA 和 miR-93-5p NC,PVT1 NC + miR-93-5p inhibitor 组细胞转染 PVT1 NC 和 miR-93-5p inhibitor,PVT1 NC + miR-93-5p NC 组细胞转染 PVT1 NC 和 miR-93-5p NC,转染操作按照 Lipfeclamine 3000 转染试剂盒说明书进行。转染 24 h 后,用含 25 mmol·L<sup>-1</sup> 葡萄糖的 DMEM 处理未转染组、PVT1 siRNA + miR-93-5p inhibitor 组、PVT1 siRNA + miR-93-5p NC 组、PVT1 NC + miR-93-5p inhibitor 组、PVT1 NC + miR-93-5p NC 组细胞,模拟高糖培养条件。

**1.2.3 天狼猩红染色法观察 4 组细胞胶原纤维沉积情况** 高糖处理 24 h 后,取空白对照组、高糖组、PVT1 siRNA 组、PVT1 siRNA NC 组细胞,胰蛋白酶消化离心后,用磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered saline, PBS)洗涤细胞 3 次,加入 40 g·L<sup>-1</sup> 多聚甲醛室温固定 15 min, PBS 洗涤 3 次,加入体积分数 0.5% 的聚乙二醇辛基苯基醚处理 20 min,滴加天狼猩红染液染色 1 h,胶原纤维被染成粉红色,置于倒置显微镜下观察并拍照。

**1.2.4 流式细胞术检测 4 组细胞细胞周期** 高糖处理 24 h 后,取空白对照组、高糖组、PVT1 siRNA 组、PVT1 siRNA NC 组细胞,胰蛋白酶消化离心后,用 PBS 洗涤细胞 1 次,加入预冷体积分数 70% 乙醇重悬细胞,4℃ 固定 24 h,3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min 收集各组细胞,按照细胞周期检测试剂盒说明书染色处理后,使用流式细胞仪检测各组细胞细胞周期分布。实验重复 6 次,取平均值。

**1.2.5 qRT-PCR 法检测 4 组细胞中 PVT1、TGF- $\beta_1$  mRNA 及 miR-93-5p 的表达** 收集高糖处理 24 h 后的各组细胞,用 TRIzol 试剂盒提取总 RNA,取 1  $\mu$ g RNA 反转录合成单链 cDNA 后,将 cDNA 作为模板进行 qRT-PCR。PVT1 上游引物序列为 5'-GTCTTGCTGCTCTGTGTTTC-3',下游引物序列为

5'-CCCGTTATTCTGTCCTTCT-3'; TGF- $\beta_1$  上游引物序列为 5'-ACGCCTGAGTGGCTGTCTTTTGAC-3',下游引物序列为 5'-GGGCTGATCCCGTTGATTTCCACG-3'; miR-93-5p 上游引物: 5'-GCCATGTAAACATCTCG-GACTG-3',下游引物序列为 5'-CAATGCGTGTGGTG-GAGGAG-3';内参甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,GAPDH)上游引物序列为 5'-CTTTGGTATCGTGAAGGACTC-3',下游引物序列为 5'-GTAGAGGCAGGGATGATGTTCT-3'。反应体系(25.0  $\mu$ L):SYBR Primix Ex Taq 12.5  $\mu$ L,上下游引物各 1.0  $\mu$ L,cDNA 2.0  $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 8.5  $\mu$ L。反应条件:95  $^{\circ}$ C 120 s(1 个循环);95  $^{\circ}$ C 30 s,55 ~ 60  $^{\circ}$ C 30 s,72  $^{\circ}$ C 30 s(40 个循环);72  $^{\circ}$ C 300 s(1 个循环)。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 PVT1、TGF- $\beta_1$  mRNA 及 miR-93-5p 相对表达量。实验重复 6 次,取平均值。

**1.2.6 Western blot 法检测 4 组细胞中 TGF- $\beta_1$ 、Smad2/3、p-Smad2/3、Smad7、p21、 $\alpha$ -SMA、Col I 蛋白表达** 收集高糖处理 24 h 后的各组细胞,加入细胞裂解液抽提总蛋白,使用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。取 50  $\mu$ g 蛋白样品行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,以半干法转至聚偏氟乙烯膜上,脱脂奶粉封闭 2 h,加入 TGF- $\beta_1$ 、Smad2/3、p-Smad2/3、Smad7、p21、Col I、 $\alpha$ -SMA 一抗(稀释度均为 1 : 1 000),4  $^{\circ}$ C 孵育过夜,加入羊抗兔辣根过氧

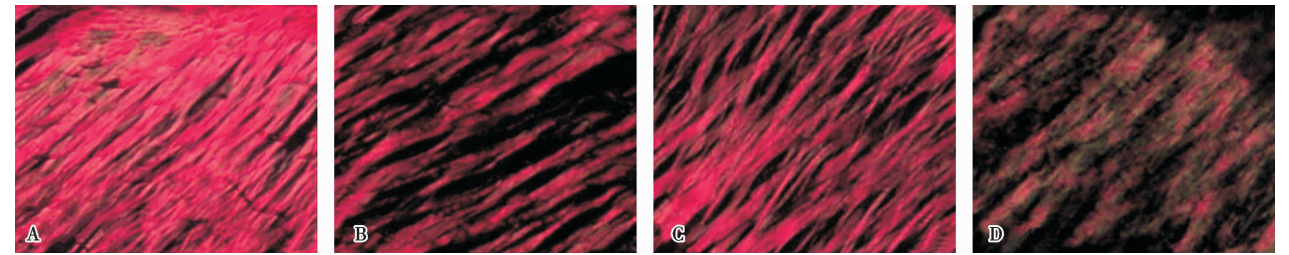
化物酶二抗(1 : 5 000),室温孵育 1 h。化学发光法显影曝光后,应用化学发光成像分析系统拍照并分析各条带灰度值,以 GAPDH 为内参,以目的蛋白条带灰度值与 GAPDH 灰度值比值表示目的蛋白相对表达量。实验重复 6 次,取平均值。

**1.2.7 Western blot 法检测 5 组细胞中 TGF- $\beta_1$ 、Smad7、Col I 蛋白表达** 高糖处理后 24 h,收集未转染组、PVT1 siRNA + miR-93-5p inhibitor 组、PVT1 siRNA + miR-93-5p NC 组、PVT1 NC + miR-93-5p inhibitor 组、PVT1 NC + miR-93-5p NC 组细胞,按“1.2.6 项”方法检测 5 组细胞中 TGF- $\beta_1$ 、Smad7、Col I 蛋白相对表达量。实验重复 6 次,取平均值。

**1.3 统计学处理** 应用 SPSS 24.0 软件进行数据统计与分析。计量资料以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析,2 组间比较采用  $t$  检验,进一步两两比较采用 SNK- $q$  检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

**2.1 4 组细胞胶原纤维沉积情况** 结果见图 1。与空白对照组比较,高糖组细胞数量增多,红色胶原纤维沉积增加。与高糖组比较,PVT1 siRNA 组细胞间隙变大,红色胶原纤维沉积减小;PVT1 siRNA NC 组细胞红色胶原纤维沉积与高糖组相近。



A:空白对照组;B:高糖组;C:PVT1 siRNA 组;D:PVT1 siRNA NC 组。  
图 1 4 组细胞胶原纤维沉积情况(天狼猩红染色,  $\times 200$ )

Fig.1 Collagen fiber deposition of cells in four groups (sirius red staining,  $\times 200$ )

**2.2 4 组细胞细胞周期比较** 结果见表 1 和图 2。高糖组、PVT1 siRNA 组、PVT1 siRNA NC 组  $G_0 + G_1$  期细胞比例显著低于空白对照组, $S + G_2 + M$  期细胞比例显著高于空白对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。PVT1 siRNA 组  $G_0 + G_1$  期细胞比例显著高于高糖组, $S + G_2 + M$  期细胞比例显著低于高糖组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。PVT1 siRNA NC 组  $G_0 + G_1$  期细胞比例显著低于 PVT1 siRNA 组, $S + G_2 + M$  期细胞比例显著高于 PVT1 siRNA 组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。高糖组和 PVT1

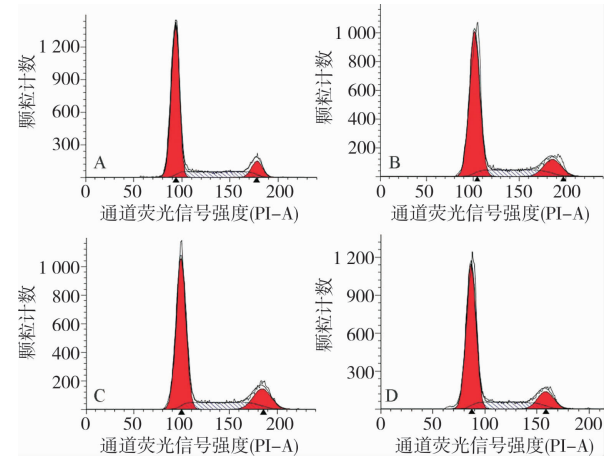
siRNA NC 组  $G_0 + G_1$  期细胞比例、 $S + G_2 + M$  期细胞比例比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

表 1 4 组细胞细胞周期比较

Tab.1 Comparison of cell cycle among the four groups			
( $\bar{x} \pm s$ )			
组别	<i>n</i>	$G_0 + G_1 / \%$	$S + G_2 + M / \%$
空白对照组	6	94.90 $\pm$ 0.60	5.10 $\pm$ 0.42
高糖组	6	82.46 $\pm$ 0.43 <sup>a</sup>	17.54 $\pm$ 0.72 <sup>a</sup>
PVT1 siRNA 组	6	88.89 $\pm$ 0.55 <sup>ab</sup>	11.11 $\pm$ 0.59 <sup>ab</sup>
PVT1 siRNA NC 组	6	82.56 $\pm$ 0.46 <sup>ac</sup>	17.44 $\pm$ 0.62 <sup>ac</sup>

注:与空白对照组比较<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与高糖组比较<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与 PVT1 siRNA 组比较<sup>c</sup> $P < 0.05$ 。





A:空白对照组;B:高糖组;C:PVT1 siRNA 组;D:PVT1 siRNA NC 组。

图 2 4 组细胞细胞周期分布

Fig.2 Distribution of cell cycle in the four groups

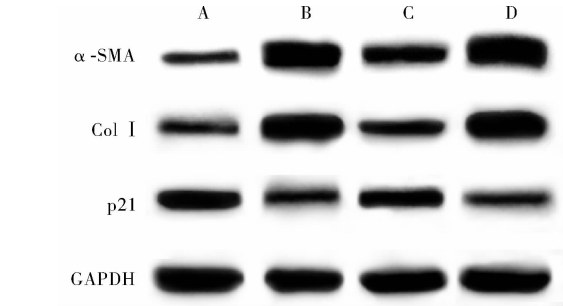
**2.3 4 组细胞中 PVT1、TGF-β<sub>1</sub> mRNA 及 miR-93-5p 相对表达量比较** 结果见表 2。高糖组、PVT1 siRNA 组、PVT1 siRNA NC 组细胞中 PVT1、TGF-β<sub>1</sub> mRNA 相对表达量均显著高于空白对照组,miR-93-5p 相对表达量显著低于空白对照组,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。PVT1 siRNA 组细胞中 PVT1、TGF-β<sub>1</sub> mRNA 相对表达量显著低于高糖组,miR-93-5p 相对表达量显著高于高糖组,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。PVT1 siRNA NC 组细胞中 PVT1、TGF-β<sub>1</sub> mRNA 相对表达量均显著高于 PVT1 siRNA 组,miR-93-5p 相对表达量显著低于 PVT1 siRNA 组,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。高糖组与 PVT1 siRNA NC 组细胞 PVT1、TGF-β<sub>1</sub> mRNA 及 miR-93-5p 相对表达量比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

表 3 4 组细胞中 α-SMA、Col I、p21、TGF-β<sub>1</sub>、Smad7 蛋白相对表达量及 (p-Smad2/3)/(Smad2/3) 比较

Tab.3 Comparison of relative expression levels of α-SMA, Col I, p21, TGF-β<sub>1</sub>, Smad7 protein and (p-Smad2/3)/(Smad2/3) of cells among the four groups

(x̄ ± s)							
组别	n	α-SMA	Col I	p21	TGF-β <sub>1</sub>	Smad7	(p-Smad2/3)/(Smad2/3)
空白对照组	6	0.31 ± 0.06	0.39 ± 0.08	1.04 ± 0.11	0.32 ± 0.08	1.06 ± 0.10	0.36 ± 0.09
高糖组	6	1.32 ± 0.13 <sup>a</sup>	1.33 ± 0.11 <sup>a</sup>	0.39 ± 0.08 <sup>a</sup>	1.30 ± 0.13 <sup>a</sup>	0.35 ± 0.08 <sup>a</sup>	1.36 ± 0.11 <sup>a</sup>
PVT1 siRNA 组	6	0.80 ± 0.11 <sup>ab</sup>	0.75 ± 0.08 <sup>ab</sup>	0.76 ± 0.10 <sup>ab</sup>	0.83 ± 0.10 <sup>ab</sup>	0.75 ± 0.15 <sup>ab</sup>	0.71 ± 0.09 <sup>ab</sup>
PVT1 siRNA NC 组	6	1.34 ± 0.11 <sup>ac</sup>	1.35 ± 0.13 <sup>ac</sup>	0.38 ± 0.08 <sup>ac</sup>	1.31 ± 0.12 <sup>ac</sup>	0.39 ± 0.09 <sup>ac</sup>	1.36 ± 0.11 <sup>ac</sup>

注:与空白对照组比较<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与高糖组比较<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与 PVT1 siRNA 组比较<sup>c</sup> $P < 0.05$ 。



A:空白对照组;B:高糖组;C:PVT1 siRNA 组;D:PVT1 siRNA NC 组。

图 3 4 组细胞中 α-SMA、Col I、p21 蛋白表达

Fig.3 Expression of α-SMA, Col I and p21 protein of cells in the four groups

表 2 4 组细胞中 PVT1、TGF-β<sub>1</sub> mRNA 及 miR-93-5p 相对表达量比较

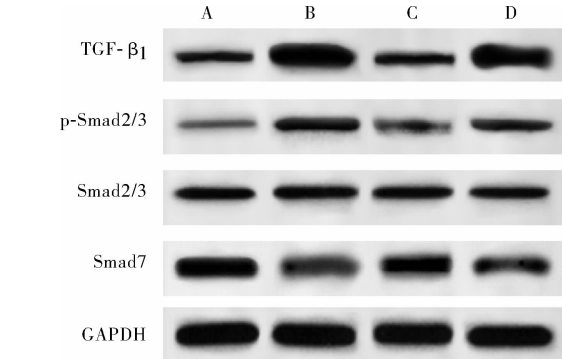
Tab.2 Comparison of relative expression of PVT1, TGF-β<sub>1</sub> mRNA and miR-93-5p of cells among the four groups

(x̄ ± s)				
组别	n	PVT1 mRNA	TGF-β <sub>1</sub> mRNA	miR-93-5p
空白对照组	6	0.21 ± 0.10	0.26 ± 0.09	1.16 ± 0.12
高糖组	6	1.36 ± 0.13 <sup>a</sup>	1.35 ± 0.14 <sup>a</sup>	0.35 ± 0.08 <sup>a</sup>
PVT1 siRNA 组	6	0.69 ± 0.14 <sup>ab</sup>	0.65 ± 0.13 <sup>ab</sup>	0.83 ± 0.10 <sup>ab</sup>
PVT1 siRNA NC 组	6	1.35 ± 0.17 <sup>ac</sup>	1.34 ± 0.15 <sup>ac</sup>	0.34 ± 0.08 <sup>ac</sup>

注:与空白对照组比较<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与高糖组比较<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与 PVT1 siRNA 组比较<sup>c</sup> $P < 0.05$ 。

**2.4 4 组细胞中 α-SMA、Col I、p21、TGF-β<sub>1</sub>、Smad7 蛋白相对表达量及 (p-Smad2/3)/(Smad2/3) 比较**

结果见表 3、图 3 和图 4。高糖组、PVT1 siRNA 组、PVT1 siRNA NC 组细胞中 α-SMA、Col I、TGF-β<sub>1</sub> 蛋白相对表达量及 (p-Smad2/3)/(Smad2/3) 显著高于空白对照组,p21、Smad7 蛋白相对表达量显著低于空白对照组,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。PVT1 siRNA 组细胞中 α-SMA、Col I、TGF-β<sub>1</sub> 蛋白相对表达量及 (p-Smad2/3)/(Smad2/3) 显著低于高糖组,p21、Smad7 蛋白相对表达量显著高于高糖组,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。PVT1 siRNA NC 组细胞中 α-SMA、Col I、TGF-β<sub>1</sub> 蛋白相对表达量及 (p-Smad2/3)/(Smad2/3) 显著高于 PVT1 siRNA 组,p21、Smad7 蛋白相对表达量显著低于 PVT1 siRNA 组,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。高糖组与 PVT1 siRNA NC 组细胞中 α-SMA、Col I、p21、TGF-β<sub>1</sub>、Smad7 蛋白相对表达量及 (p-Smad2/3)/(Smad2/3) 比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。



A:空白对照组;B:高糖组;C:PVT1 siRNA 组;D:PVT1 siRNA NC 组。

图 4 4 组细胞中 TGF-β<sub>1</sub>、p-Smad2/3、Smad2/3、Smad7 蛋白表达

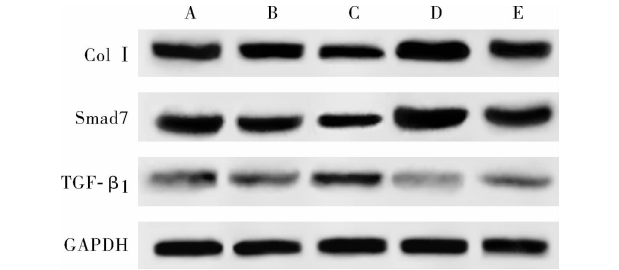
Fig.4 Expression of TGF-β<sub>1</sub>, p-Smad2/3, Smad2/3 and Smad7 protein of cells in the four groups

**2.5 5 组细胞中 TGF-β<sub>1</sub>、Smad7、Col I 蛋白相对表达量比较** 结果见表 4 和图 5。PVT1 siRNA + miR-93-5p NC 组细胞中 TGF-β<sub>1</sub>、Col I 蛋白相对表达量显著低于未转染组,Smad7 蛋白相对表达量显著高于未转染组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。PVT1 NC + miR-93-5p inhibitor 组细胞中 TGF-β<sub>1</sub>、Col I 蛋白相对表达量显著高于未转染组,Smad7 蛋白相对表达量显著低于未转染组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。未转染组细胞中 TGF-β<sub>1</sub>、Smad7、Col I 蛋白相对表达量与 PVT1 NC + miR-93-5p NC 组、PVT1 siRNA + miR-93-5p inhibitor 组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。PVT1 NC + miR-93-5p inhibitor 组、PVT1 siRNA + miR-93-5p inhibitor 组、PVT1 NC + miR-93-5p NC 组细胞中 TGF-β<sub>1</sub>、Col I 蛋白相对表达量显著高于 PVT1 siRNA + miR-93-5p NC 组,Smad7 蛋白相对表达量显著低于 PVT1 siRNA + miR-93-5p NC 组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。PVT1 siRNA + miR-93-5p inhibitor 组、PVT1 NC + miR-93-5p NC 组细胞中 TGF-β<sub>1</sub>、Col I 蛋白相对表达量显著低于 PVT1 NC + miR-93-5p inhibitor 组,Smad7 蛋白相对表达量显著高于 PVT1 NC + miR-93-5p inhibitor 组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。PVT1 siRNA + miR-93-5p inhibitor 组与 PVT1 NC + miR-93-5p NC 组细胞中 TGF-β<sub>1</sub>、Smad7、Col I 蛋白相对表达量比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

表 4 5 组细胞中 TGF-β<sub>1</sub>、Smad7、Col I 蛋白相对表达量比较  
Tab.4 Comparison of relative expression levels of TGF-β<sub>1</sub>, Smad7 and Col I protein of the cells among the five groups  
( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	TGF-β <sub>1</sub>	Col I	Smad7
未转染组	6	1.35 ± 0.13	1.37 ± 0.11	0.36 ± 0.07
PVT1 siRNA + miR-93-5p NC 组	6	0.81 ± 0.11 <sup>a</sup>	0.73 ± 0.09 <sup>a</sup>	0.76 ± 0.14 <sup>a</sup>
PVT1 NC + miR-93-5p inhibitor 组	6	1.71 ± 0.12 <sup>ab</sup>	1.79 ± 0.13 <sup>ab</sup>	0.11 ± 0.06 <sup>ab</sup>
PVT1 siRNA + miR-93-5p inhibitor 组	6	1.31 ± 0.11 <sup>bc</sup>	1.33 ± 0.12 <sup>bc</sup>	0.33 ± 0.08 <sup>bc</sup>
PVT1 NC + miR-93-5p NC 组	6	1.33 ± 0.12 <sup>bc</sup>	1.32 ± 0.11 <sup>bc</sup>	0.35 ± 0.08 <sup>bc</sup>

注:与未转染组比较<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 PVT1 siRNA + miR-93-5p NC 组比较<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与 PVT1 NC + miR-93-5p inhibitor 组比较<sup>c</sup> $P < 0.05$ 。



A:未转染组;B:PVT1 NC + miR-93-5p NC 组;C:PVT1 siRNA + miR-93-5p NC 组;D:PVT1 NC + miR-93-5p inhibitor 组;E:PVT1 siRNA + miR-93-5p inhibitor 组。

图 5 5 组细胞中 TGF-β<sub>1</sub>、Smad7、Col I 蛋白表达  
Fig.5 Expression of TGF-β<sub>1</sub>, Smad7, Col I protein of cells in the five groups

3 讨论

心肌纤维化是心肌重塑及慢性心力衰竭发生的主要原因,CF 是心肌纤维化的最终效应细胞<sup>[9]</sup>,高血糖条件下 CF 增殖可使细胞外基质降解受阻、胶原蛋白合成增加,从而导致心肌间质纤维化<sup>[10]</sup>。故探究 CF 纤维化的分子生物学机制,对抑制 DCM 的发展具有重要意义。

TGF-β<sub>1</sub> 和 Smad 在 CF 增殖及纤维化过程中扮演重要角色<sup>[11]</sup>。有研究证实,细胞外 TGF-β<sub>1</sub> 可特异性识别 Smad2/3 使其磷酸化形成 p-Smad2/3,并与 Smad 4 形成异三聚体复合物转运至细胞核中,从而促进纤维化相关靶基因如 Col I 和 Col III 的表达及沉积,导致心肌纤维化发生、发展<sup>[12-13]</sup>。α-SMA 水平可反映胶原沉积及纤维化严重程度<sup>[14]</sup>。本研究中高糖组、PVT1 siRNA 组、PVT1 siRNA NC 组的 CF 用 25 mmol · L<sup>-1</sup>葡萄糖高糖培养 24 h 后,细胞中胶原纤维沉积严重,TGF-β<sub>1</sub> mRNA、TGF-β<sub>1</sub> 蛋白、Col I 蛋白、α-SMA 蛋白相对表达量及 (p-Smad2/3)/ (Smad2/3) 均显著高于空白对照组,提示 TGF-β<sub>1</sub>/Smad 通路参与 CF 的纤维化过程,但 TGF-β<sub>1</sub>/Smad 通路活化的基因调控机制还不甚明确。

miR-93-5p 是近 2 a 来在心肌梗死患者中新发现的失调的 miRNA 之一<sup>[15]</sup>。miR-93-5p 与 TGF-β<sub>1</sub> 之间可通过共同的靶标分子 Smad7 参与细胞纤维化进程<sup>[16]</sup>。已有研究证实,miR-93-5p 与 TGF-β<sub>1</sub> 之间可通过共同的靶标分子 Smad7 来抑制肺癌细胞 TGF-β<sub>1</sub> 信号传导。LIANG 等<sup>[17]</sup>研究证实,Smad7 是 TGF-β<sub>1</sub> 信号通路的负反馈调节因子,TGF-β<sub>1</sub> 不仅可抑制 Smad7 表达,还可通过募集 Smad 泛素连接酶蛋白 2 使 TGF-β<sub>1</sub> 配体泛素化降解,从而阻断 TGF-β<sub>1</sub>/Smad 促纤维化通路激活。本研究结果显示,高糖组、PVT1 siRNA 组、PVT1 siRNA NC 组细胞中 miR-93-5p 及 Smad7 蛋白相对表达量显著低于空白对照组,说明高糖诱导可使 TGF-β<sub>1</sub>/Smad 通路被激活的同时,伴随 miR-93-5p 表达及 Smad7 蛋白表达的降低,提示高糖诱导可抑制 miR-93-5p/Smad7 信号轴,导致 TGF-β<sub>1</sub>/Smad 促纤维化通路活化。但 CF 纤维化进程中的生物调控机制,不仅仅是靠单一的 miRNA 调节来完成的,还可能与其他因子有关,本研究对此进行继续探究。

PVT1 是一种与 CF 衰老有关的调节因子<sup>[18]</sup>。有研究证实,PVT1 是一种抗凋亡基因,沉默 PVT1 表达可促进 CF 的凋亡<sup>[7]</sup>。CAO 等<sup>[19]</sup>通过体内体外实验证实,PVT1 过表达可促进 CF 的增殖、胶原蛋白的产生及 TGF-β<sub>1</sub>/Smad 信号通路的激活,而沉默 PVT1 后则产生相反的作用,提示干预 PVT1 mRNA 表达,可能对抑制 CF 增殖及纤维化进程具有

重要意义。本研究结果发现,高糖组、PVT1 siRNA 组、PVT1 siRNA NC 组细胞中 PVT1 mRNA 相对表达量均显著高于空白对照组,细胞有丝分裂阻滞期 G<sub>0</sub> + G<sub>1</sub> 期细胞比例显著低于空白对照组,细胞增长及有丝分裂期 S + G<sub>2</sub> + M 期细胞比例显著高于空白对照组,且细胞周期抑制因子 p21 相对表达量显著低于空白对照组,提示高糖诱导可促进 PVT1 表达,从而促进 CF 胶原纤维沉积及增殖分裂,可能与抑制 miR-93-5p/Smad7 信号轴表达,促进 TGF-β<sub>1</sub>/Smad 轴信号激活有关。为进一步验证这一推测,本研究在沉默 PVT1 的基础上抑制 miR-93-5p 表达,结果发现, PVT1 siRNA + miR-93-5p inhibitor 组、PVT1 NC + miR-93-5p NC 组细胞中 TGF-β<sub>1</sub>、Col I 蛋白相对表达量显著低于 PVT1 NC + miR-93-5p inhibitor 组,Smad7 蛋白相对表达量显著高于 PVT1 NC + miR-93-5p inhibitor 组;PVT1 siRNA + miR-93-5p inhibitor 组与 PVT1 NC + miR-93-5pNC 组细胞中 TGF-β<sub>1</sub>、Smad7、Col I 蛋白相对表达量比较差异无统计学意义,提示 PVT1 沉默可抑制 TGF-β<sub>1</sub>/Smad 通路激活,促进 miR-93-5p/Smad7 通路活化,进而发挥促纤维化作用。

综上所述,大鼠 PVT1 基因沉默可促进 miR-93-5p/Smad7 通路活化,抑制 TGF-β<sub>1</sub>/Smad 通路激活,进而抑制高糖诱导的 CF 纤维化进程,为阐明 CF 纤维化进程的机制提供一定参考。但本研究还存在一定的不足,PVT1 与 miR-93-5p 之间的调控机制复杂,PVT1 与 miR-93-5p/Smad7-TGF-β<sub>1</sub>/Smad 通路的靶向调控关系还有待进一步验证。

参考文献:

[1] GUARIGUATA L, LINNENKAMP U, BEAGLEY J, *et al.* Global estimates of the prevalence of hyperglycaemia in pregnancy [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2014, 103 (2) : 176-185.

[2] ZHONG T, TANG R, GONG S, *et al.* The remission phase in type 1 diabetes: changing epidemiology, definitions, and emerging immuno-metabolic mechanisms [J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2020, 36 (2) : 3207-3216.

[3] ANSARI M, KURIAN G A. Mechanism of hydrogen sulfide preconditioning-associated protection against ischemia-reperfusion injury differs in diabetic heart that develops myopathy [J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2020, 20 (2) : 155-167.

[4] 高嘉梦, 胡兵, 申愕. 心肌成纤维细胞转分化与糖尿病心肌病的研究进展 [J]. 中华心血管病杂志, 2020, 48 (10) : 885-889.

[5] ZHANG W, WANG Q, FENG Y, *et al.* MicroRNA-26a protects the

heart against hypertension-induced myocardial fibrosis [J]. *J Am Heart Assoc*, 2020, 9 (18) : 179-197.

[6] 张伟峰, 雷素扬, 赵俊涛, 等. miR-93-5p 对心脏成纤维细胞纤维化的影响 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12 (5) : 656-660.

[7] PANDA A C, GRAMMATIKAKIS I, KIM K M, *et al.* Identification of senescence-associated circular RNAs (SAC-RNAs) reveals senescence suppressor CircPVT1 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45 (7) : 4021-4035.

[8] 王娜, 隋海娟, 符丽娟, 等. 丹酚酸 B 对高糖诱导心肌成纤维细胞增殖及转分化的作用研究 [J]. 中国药理学通报, 2020, 36 (3) : 414-419.

[9] MENG L, UZUI H, GUO H, *et al.* Role of SGLT1 in high glucose level-induced MMP-2 expression in human cardiac fibroblasts [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17 (5) : 6887-6892.

[10] LEVICK S P, WIDIAPRADJA A. The diabetic cardiac fibroblast: mechanisms underlying phenotype and function [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (3) : 970-978.

[11] 尚娜, 周毅. TGF-β/Smad 信号通路与心肌纤维化及蒺环类心脏毒性关系的研究进展 [J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2020, 34 (5) : 101-104.

[12] LUO K. Signaling cross talk between TGF-β/Smad and other signaling pathways [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2017, 9 (1) : 221-237.

[13] TRAN B H, YU Y, CHANG L, *et al.* A novel liposomal S-propargyl-cysteine: a sustained release of hydrogen sulfide reducing myocardial fibrosis via TGF-β<sub>1</sub>/Smad pathway [J]. *Int J Nanomedicine*, 2019, 24 (14) : 10061-10077.

[14] BAI L, LI A, GONG C, *et al.* Protective effect of rutin against bleomycin induced lung fibrosis: involvement of TGF-β<sub>1</sub>/α-SMA/Col I and III pathway [J]. *Biofactors*, 2020, 46 (4) : 637-644.

[15] HU B, MAO Z, DU Q, *et al.* miR-93-5p targets Smad7 to regulate the transforming growth factor-β<sub>1</sub>/Smad3 pathway and mediate fibrosis in drug-resistant prolactinoma [J]. *Brain Res Bull*, 2019, 149 (1) : 21-31.

[16] HUANG W, YANG Y, WU J, *et al.* Circular RNA cESRP1 sensitises small cell lung cancer cells to chemotherapy by sponging miR-93-5p to inhibit TGF-β signalling [J]. *Cell Death Differ*, 2020, 27 (5) : 1709-1727.

[17] LIANG H, WANG Q, WANG D, *et al.* RGFP966, a histone deacetylase 3 inhibitor, promotes glioma stem cell differentiation by blocking TGF-β signaling via SMAD7 [J]. *Biochem Pharmacol*, 2020, 180 (1) : 1141-1148.

[18] 朱永翔, 李烽, 张耀庭, 等. MicroRNA 在心肌纤维化中的研究进展 [J]. 心血管病学进展, 2018, 39 (6) : 903-906.

[19] CAO F, LI Z, DING W M, *et al.* LncRNA PVT1 regulates atrial fibrosis via miR-128-3p-Sp1-TGF-β<sub>1</sub>-Smad axis in atrial fibrillation [J]. *Mol Med*, 2019, 25 (1) : 1186-1195.

( 本文编辑: 郭 潇 )