

DOI: 10.14188/j.1671-8852.2025.0224

文章编号 1671-8852(2026)05-0603-05

石蒜碱改善原代心肌成纤维细胞纤维化

乔海森 曹登威 熊晓奇 李昊翔 董哲 周元

武汉大学中南医院心血管外科/心脏大血管外科微创诊疗湖北省工程研究中心/武汉市结构性心脏病微创诊疗临床医学研究中心 湖北 武汉 430071

摘要 目的:通过建立体外心肌成纤维细胞的纤维化模型,探究石蒜碱对大鼠心肌成纤维细胞纤维化影响。方法:通过体外提取及培养大鼠原代心肌成纤维细胞,使用血管紧张素 II (Ang II) 在 0、6、12、24、36 h 在不同时间段诱导大鼠原代心肌成纤维细胞,探究最佳刺激时间,建立细胞纤维化模型;石蒜碱与大鼠原代心肌成纤维细胞共同培养,Western Blot 检测 COL1A1、 α -SMA 纤维化相关标志物及 Wnt3A、 β -catenin 水平。结果:Ang II 对大鼠原代心肌成纤维细胞水平影响随作用时间的增加而增大,在 24 h 后达到峰值;石蒜碱可改善 Ang II 诱导大鼠原代心肌成纤维细胞纤维化水平, COL1A1、 α -SMA 纤维化相关标志物及 Wnt3A、 β -catenin 表达显著降低。结论:石蒜碱可通过 Wnt1/ β -catenin 信号通路改善 Ang II 诱导大鼠原代心肌成纤维细胞纤维化。

关键词 石蒜碱;原代心肌成纤维细胞;心肌纤维化;Wnt/ β -catenin 信号通路;治疗

中图分类号 R542.2

文献标志码 A

Lycorine attenuates fibrosis in primary cardiac fibroblasts

QIAO Haisen, CAO Dengwei, XIONG Xiaoqi, LI Haoxiang, DONG Zhe, ZHOU Yuan

Department of Cardiovascular Surgery, Zhongnan Hospital of Wuhan University; Hubei Provincial Engineering Research Center of Minimally Invasive Cardiovascular Surgery; & Wuhan Clinical Research Center for Minimally Invasive Treatment of Structural Heart Disease, Wuhan 430071, Hubei, China

Abstract

Objective: To investigate the effects of lycorine on cardiac fibroblast fibrosis by establishing an *in vitro* myocardial fibrosis model. **Methods:** Primary rat cardiac fibroblasts were isolated and cultured *in vitro*. Angiotensin II (Ang II) was applied for different times (0, 6, 12, 24, and 36 hours) to determine the optimal stimulation duration for fibrosis induction. Subsequently, lycorine was co-cultured with the fibroblasts. Western Blot was performed to assess the expression levels of fibrosis-related markers (COL1A1 and α -SMA) and key components of the Wnt/ β -catenin pathway (Wnt3A and β -catenin). **Results:** The profibrotic effects of Ang II increased in a time-dependent manner, peaking at 24 hours. Lycorine significantly attenuated Ang II-induced fibrosis, as evidenced by significantly reduced expression of COL1A1, α -SMA, Wnt3A, and β -catenin. **Conclusion:** Lycorine ameliorates Ang II-induced fibrosis in rat primary cardiac fibroblasts via the Wnt/ β -catenin signaling pathway.

Key Words Lycorine; Primary Cardiac Fibroblasts; Myocardial Fibrosis; Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway; Therapy

课题来源:湖北省自然科学基金资助项目(编号:WJ2023M061)。

作者简介:乔海森,男,2000—,医学硕士生,主要从事心血管疾病研究,E-mail:1131434193@qq.com;曹登威,男,1996—,医学博士生,主要从事心血管疾病研究,E-mail:caodengwei@whu.edu.cn。乔海森、曹登威为本文共同第一作者。

通信作者:周元,E-mail:yuan_zh@126.com。

心肌纤维化(myocardial fibrosis, MF)是心肌成纤维细胞过度增殖,并向肌成纤维细胞转化,使包括胶原在内的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)在心肌间质大量沉积,致使心肌僵硬度增加、顺应性下降、心肌收缩力降低的一种病理重构^[1-2]。研究^[3-4]表明,心肌纤维化可导致房颤、心律失常、心衰等多种心血管疾病发生,是心脏疾病发生、心脏功能恶化的重要病理基础。当前针对心肌纤维化治疗主要聚焦于肾素-血管紧张素-醛固酮系统(renin-angiotensin-aldosterone system, RAAS)抑制剂、钠-葡萄糖协同转运蛋白 2(sodium-dependent glucose transporters 2, SGLT2)抑制剂等药物控制病因方面,多为广谱抗纤维化,缺乏特异性靶点和个体化靶向治疗^[5]。探寻有效控制心肌纤维化的治疗手段,突破靶点特异性不足及逆转成熟纤维化等瓶颈,对心脏疾病的防治及患者生活质量提高具有重要意义,是目前研究热点^[6]。石蒜碱(lycorine, LYC)是一种从天然药物石蒜属植物鳞茎中分离得到的一种异喹啉生物碱^[7]。2020 年, SCHIMMEL 等^[8]的文章中,石蒜碱首次被提出可能对心肌纤维化起作用,但是该文章并未对其抗纤维化及作用及机制作具体研究。既往研究^[9]表明, Wnt/ β -catenin 信号通路是心肌纤维化病理进程中的关键调控轴,参与心肌纤维化的进展。本研究通过建立血管紧张素 II(angiotensin II, Ang II)诱导大鼠原代心肌成纤维细胞纤维化模型,初步探究石蒜碱对大鼠原代心肌成纤维细胞纤维化的影响以及对 Wnt/ β -Catenin 信号通路的调控机制。

1 材料与方法

1.1 实验药物及试剂 石蒜碱(S-103,成都瑞芬思德丹生物科技有限公司)、Wnt3A 重组蛋白(HY-P70453A,美国 MedChemexpress 生物科技公司)、Ang II (A9525,美国 Sigma-Aldrich 公司)均按标准保存;一抗胶原蛋白 I (COL1A1, 72076)、Wnt3A (C64F2)、 β -catenin (9562)均购自美国 Cell Signaling Technology 公司; α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA, A17910)、GAPDH (A19056)、二抗 HRP 标记山羊抗兔 IgG (AS014)均购自武汉 ABclonal 公司;RIPA 强裂解液(P0013B)、一抗稀释液(P0023A)、ECL 化学发光试剂盒(P0018AM)均购自上海碧云天生物技术公司。

1.2 实验仪器及耗材 超净工作台(苏州净化设

备有限公司);BX51 正置光学显微镜(日本 Olympus 公司);蛋白分析系统(含垂直电泳仪、电转槽及化学发光成像仪,美国 BIO-RAD 公司);恒温 CO₂ 细胞培养箱(德国 Binder 公司);细胞培养皿/板(美国康宁公司)。

1.3 实验原代心肌成纤维细胞提取 取 1~3 日龄 SPF 级 SD 乳鼠(湖北省实验动物研究中心),75% 乙醇浸泡消毒 1 min 后处死。取心脏组织,预冷磷酸盐缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)漂洗 3 次清除残留血细胞及结缔组织。转移至无菌培养皿,剪切成 1 mm³ 组织块, PBS 轻柔吹打后静置 1 min,洗涤 2~3 次去除红细胞。加入 0.25% 胰蛋白酶,37 °C 恒温水浴锅中消化 15 min,10% FBS-DMEM 培养基终止消化。细胞悬液经 1 000 g 离心 5 min,完全培养基重悬后依次过 150 μ m、75 μ m 细胞筛,离心后接种于多聚赖氨酸包被培养瓶,37 °C、5% CO₂ 培养箱预培养 1~2 h。通过差速贴壁法弃悬浮心肌细胞,保留贴壁成纤维细胞并换液继续培养。

1.4 纤维化细胞模型建立及分组 提取原代心肌成纤维细胞后,取第 2~3 代原代心肌成纤维细胞,饥饿 12 h 后,加入 10 μ mol·L⁻¹ Ang II 诱导,分别于 0、6、12、24、36 h 后收集细胞样本,通过 Western Blot 检测纤维化相关蛋白表达水平确定最佳刺激时间;在成功摸索最佳时间及建立纤维化模型基础上,设置 0、0.25、0.5、1、5 μ mol·L⁻¹ 不同浓度梯度 LYC 刺激细胞 24 h 后进行蛋白和 RNA 提取,检测纤维化水平变化,确定最佳作用浓度;血管紧张素 II 和 LYC 采用最适作用浓度,使用 Wnt3A 重组蛋白共刺激原代心肌成纤维细胞,检测纤维化通路蛋白水平变化。

1.5 蛋白免疫印迹 Western Blot 检测 实验细胞中加入预冷 RIPA 强裂解液,冰上裂解收集上清。经 BCA 法定量,以 5 $\times$ SDS 上样缓冲液等体积稀释,95 °C 金属浴变性,进行电泳、转膜、5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h,加入实验一抗,4 °C 孵育过夜;TBST 漂洗后,加入 HRP 标记二抗室温孵育 1 h 后,ECL 显影,ImageJ 1.53 软件分析条带灰度值(目标蛋白/GADPH 灰度比值标准化),计算蛋白相对表达量。

1.6 实时荧光定量 PCR 检测 使用 TRIzol 试剂提取心脏成纤维细胞 RNA,超微量分光光度计检测 RNA 浓度与纯度。取 1 μ g 总 RNA 反转录合成 cDNA。使用合成 cDNA 加入引物进行 qRT-PCR 扩增反应。目的基因 mRNA 相对表达量以 2^{- $\Delta\Delta C_T$} 法

计算,经内参基因GAPDH标准化。

1.7 统计学方法 使用GraphPad Prism 9.0分析实验数据。实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,经Shapiro-Wilk检验确认数据符合正态分布后,采用单因素方差分析(One-way ANOVA)及Tukey's多重比较检验评估组间差异,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Ang II 诱导大鼠原代成纤维细胞纤维化 结果显示,Ang II干预后,COL1A1及 α -SMA蛋白表达量升高,24 h较0 h组显著升高($P < 0.01$),提示Ang II诱导大鼠原代成纤维细胞纤维化且24 h刺激效果最佳(图1)。

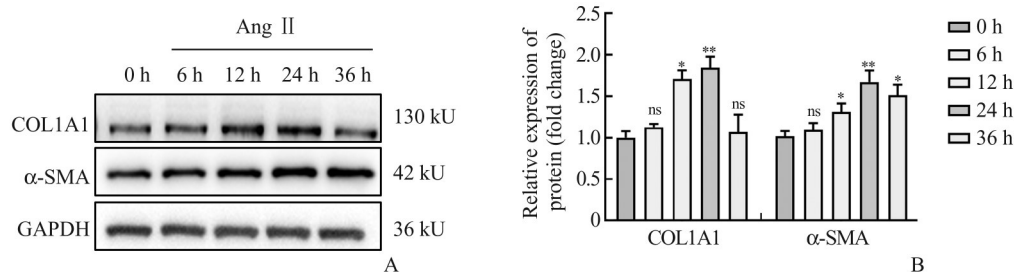


图1 Ang II诱导心脏成纤维细胞纤维化模型
A. $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Ang II刺激不同时间后COL1A1及 α -SMA蛋白水平变化;B. 蛋白表达水平定量分析,与0 h组相比,ns. 无统计学意义,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

2.2 LYC缓解纤维化相关COL1A1及 α -SMA蛋白下调 使用最佳刺激浓度Ang II ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)构建纤维化模型的纤维化模型,Ang II和LYC共同

培养细胞24 h后,免疫印迹分析结果显示,加入 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ LYC培养细胞24 h后,蛋白COL1A1及 α -SMA的表达改善最明显($P < 0.01$)(图2A、2B)。

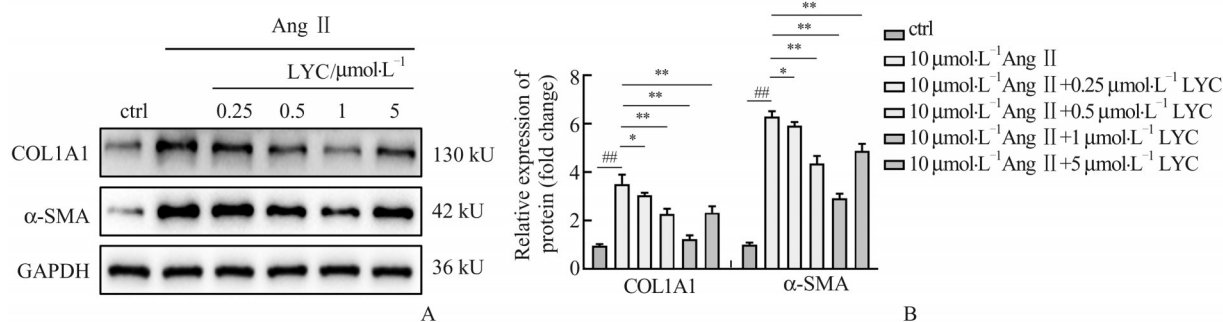


图2 不同浓度LYC对Ang II诱导的细胞纤维化的影响
A. 在 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Ang II和不同浓度LYC刺激下COL1A1及 α -SMA蛋白水平变化;B. 蛋白表达水平定量分析,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。

2.3 LYC可缓解纤维化相关COL1A1及 α -SMA mRNA下调 使用最佳刺激浓度Ang II ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)构建纤维化模型的纤维化模型后加入LYC ($1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)共同培养细胞24 h后,提取RNA做免疫印迹分析。结果显示,LYC能够有效抑制细胞纤维化指标(COL1A1及 α -SMA mRNA)上调($P < 0.01$)(图3)。

2.4 LYC可抑制Wnt/ β -catenin信号通路 结果显示,Ang II刺激显著激活心肌成纤维细胞Wnt/ β -catenin信号轴:Wnt3A、 β -catenin表达较对照组显著升高($P < 0.05$)。加入LYC干预可显著逆转上

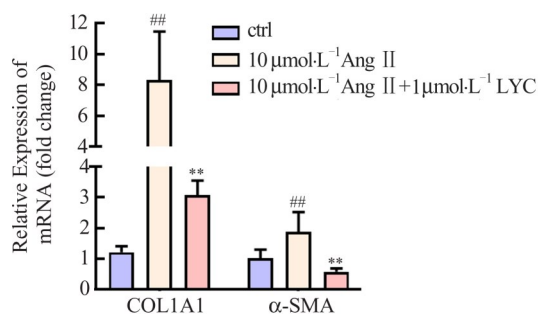
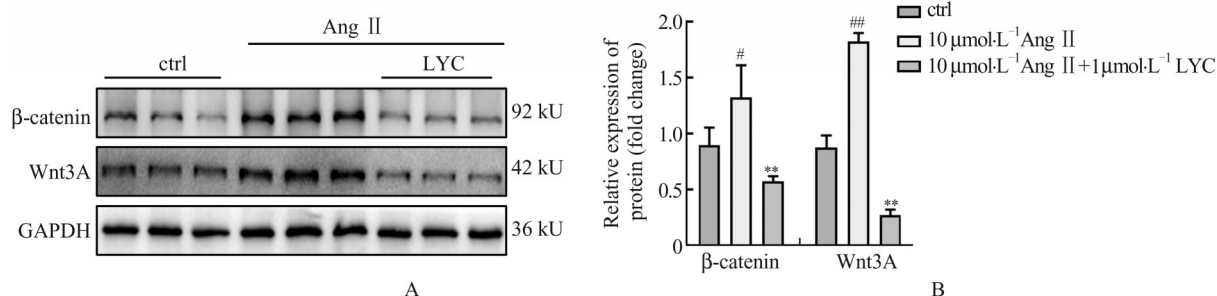


图3 LYC对Ang II诱导的纤维化COL1A1及 α -SMA mRNA的影响

注:LYC刺激细胞检测COL1A1及 α -SMA mRNAs水平;与 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Ang II组比较,** $P < 0.01$;与对照(ctrl)组比较,*** $P < 0.001$ 。

述效应, Wnt3A、 β -catenin 蛋白与 Ang II 刺激组相比显著下调($P<0.01$)。以上研究表明, LYC 可抑

制 Wnt/ β -catenin 通路激活, 见图 4。

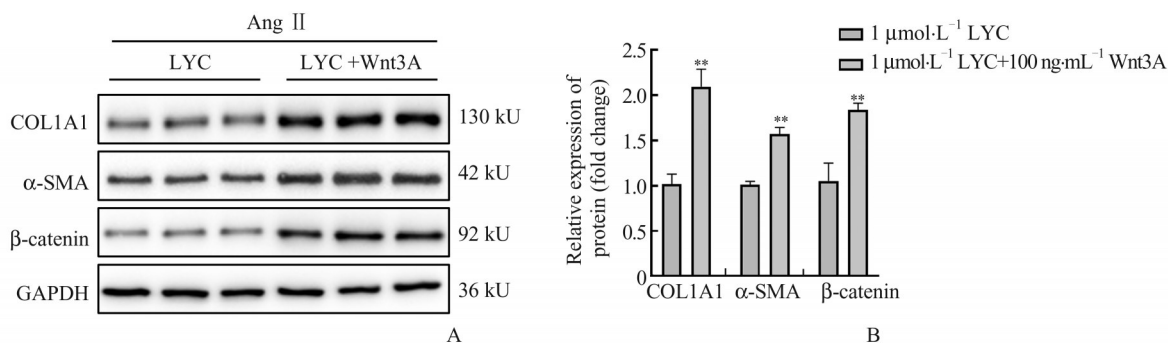


A. Wnt/ β -catenin 信号通路蛋白 β -catenin、Wnt3A 蛋白表达; B. 图 A 免疫印迹定量分析; 与 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ang II 组比较, ** $P<0.01$; 与对照(ctrl)组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

图 4 LYC 抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路

2.5 Wnt3A 重组蛋白激活 Wnt/ β -catenin 信号通路减弱石蒜碱的治疗作用 结果显示, Wnt3A 重组蛋白($100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)刺激可激活 Wnt 下游 β -catenin 表达上调, 较对照组显著升高($P<0.01$), 且蛋白

COL1A1 及 α -SMA 的表达上调。以上研究表明, Wnt3A 重组蛋白激活 Wnt/ β -catenin 信号通路减弱石蒜碱的治疗作用, 见图 5。



A. β -catenin、COL1A1 及 α -SMA 蛋白表达; B. 免疫印迹定量分析; 与 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LYC 组比, ** $P<0.01$ 。

图 5 Wnt3A 重组蛋白可消除 LYC 的治疗作用

3 讨论

心肌纤维化作为病理性心脏重构的核心驱动因素, 与心力衰竭及恶性心律失常的发生发展密切相关^[10]。临床队列研究^[11]证实, 心肌纤维化程度与患者不良预后显著正相关。近年来, 基于促纤维化分子机制研究的突破, 新型靶向治疗策略快速发展, 涵盖小分子抑制剂、RNA 干扰技术及细胞疗法^[12]。上述疗法目前仍处于临床前研究或早期临床试验阶段, 在长期安全性及逆转成熟纤维化的有效性方面存在一定局限性^[13]。因此, 探究具有多靶点调控特性的中药及其活性成分成为抗纤维化药物研发的新焦点。

石蒜碱($\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{NO}_4$)是一种异喹啉类生物碱, 主要存在于石蒜科植物(如石蒜、水仙)的鳞茎中, 具有广泛的药理活性, 尤其在抗肿瘤、抗病毒、抗炎和

神经系统调节方面备受关注^[14]。本研究通过构建 Ang II 诱导的大鼠原代心肌成纤维细胞纤维化模型, 研究结果显示 LYC 可明显下调纤维化指标 COL1A1 及 α -SMA 蛋白表达, 证明 LYC 可发挥抗纤维化作用。

Wnt/ β -catenin 通路是调控心肌纤维化的核心信号轴之一, 在此过程中扮演关键角色^[15]。已有研究^[16]证实, Ang II 可通过激活 Wnt 配体促进 β -catenin 核转位, 驱动成纤维细胞向肌成纤维细胞表型转化。本研究表明, Ang II 刺激可显著激活心肌成纤维细胞中 Wnt/ β -catenin 信号轴, 促进纤维化标志物 COL1A1 和 α -SMA 的表达, 而 LYC 可抑制上述效应, 降低 Wnt1A、 β -catenin 相关蛋白表达。使用 Wnt3A 重组蛋白可逆转 LYC 对 β -catenin、COL1A1 及 α -SMA 蛋白下调作用, 激活 Wnt/

β -catenin 信号通路,消除LYC的治疗作用。

综上所述,LYC可改善Ang II诱导的心肌成纤维细胞纤维化,可能与靶向抑制Wnt/ β -catenin信号通路密切相关。这一发现可能为心肌纤维化的分子机制研究提供了新证据及开发高选择性抗纤维化药物提供了新策略。但LYC其临床转化及应用面临多重挑战(如毒性风险、药代动力学缺陷、多靶点效应复杂性),未来将重点进行结构修饰、精准递送系统相关研究,通过跨学科策略优化以平衡疗效与安全性。



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

参考文献

- [1] LÓPEZ B, RAVASSA S, MORENO M U, et al. Diffuse myocardial fibrosis: Mechanisms, diagnosis and therapeutic approaches[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2021, 18 (7): 479-498.
- [2] MATSUSHITA K, TERASAKA K, HIBI K. Early intervention in patients with asymptomatic severe aortic stenosis and myocardial fibrosis[J]. *JAMA*, 2025, 333 (3):213-221.
- [3] NAGALINGAM R S, CHATTOPADHYAYA S, AL-HATTAB D S, et al. Scleraxis and fibrosis in the pressure-overloaded heart[J]. *Eur Heart J*, 2022, 43 (45): 4739-4750.
- [4] NAUFFAL V, DI ACHILLE P, KLARQVIST M D R, et al. Genetics of myocardial interstitial fibrosis in the human heart and association with disease[J]. *Nat Genet*, 2023, 55(5): 777-786.
- [5] ZHANG H, THAI P N, SHIVNARAIN R V, et al. Multiscale drug screening for cardiac fibrosis identifies MD2 as a therapeutic target[J]. *Cell*, 2024, 187 (25): 7143-7163. e22.
- [6] ZHANG Z Y, YANG Z H, WANG S, et al. Targeting MAPK-ERK/JNK pathway: A potential intervention mechanism of myocardial fibrosis in heart failure [J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 173: 116413.
- [7] TUO P P, ZHAO R S, LI N, et al. Lycorine inhibits Ang II-induced heart remodeling and inflammation by suppressing the PI3K-AKT/NF- κ B pathway[J]. *Phyto-medicine*, 2024, 128: 155464.
- [8] SCHIMMEL K, JUNG M, FOINQUINOS A, et al. Natural compound library screening identifies new molecules for the treatment of cardiac fibrosis and diastolic dysfunction[J]. *Circulation*, 2020, 141(9): 751-767.
- [9] YUAN M, SHI H J, WANG B, et al. Targeting SOCS₂ alleviates myocardial fibrosis by reducing nuclear translocation of β -catenin[J]. *Biochim Biophys Acta BBA Mol Cell Res*, 2024, 1871(7): 119804.
- [10] DE BOER R A, HULOT J S, TOCCHETTI C G, et al. Common mechanistic pathways in cancer and heart failure. A scientific roadmap on behalf of the Translational Research Committee of the Heart Failure Association (HFA) of the European Society of Cardiology (ESC)[J]. *Eur J Heart Fail*, 2020, 22(12): 2272-2289.
- [11] SHANBHAG S M, GREVE A M, ASPELUND T, et al. Prevalence and prognosis of ischaemic and non-ischaemic myocardial fibrosis in older adults[J]. *Eur Heart J*, 2019, 40(6): 529-538.
- [12] RURIK J G, TOMBÁČZ I, YADEGARI A, et al. CAR T cells produced *in vivo* to treat cardiac injury[J]. *Science*, 2022, 375(6576): 91-96.
- [13] PENG F, LIAO M R, JIN W K, et al. 2-APQC, a small-molecule activator of Sirtuin-3 (SIRT3), alleviates myocardial hypertrophy and fibrosis by regulating mitochondrial homeostasis[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2024, 9(1): 133.
- [14] XIAO H X, XU X Z, DU L Y, et al. Lycorine and organ protection: Review of its potential effects and molecular mechanisms[J]. *Phytomedicine*, 2022, 104: 154266.
- [15] BLYSZCZUK P, MÜLLER-EDENBORN B, VALENTA T, et al. Transforming growth factor- β -dependent Wnt secretion controls myofibroblast formation and myocardial fibrosis progression in experimental autoimmune myocarditis[J]. *Eur Heart J*, 2017, 38(18): 1413-1425.
- [16] CZEPIEL M, DIVIANI D, JAŻWA-KUSIOR A, et al. Angiotensin II receptor 1 controls profibrotic Wnt/ β -catenin signalling in experimental autoimmune myocarditis[J]. *Cardiovasc Res*, 2022, 118(2): 573-584.

(2025-03-14 收稿)

编辑 沈建国