

## 苦参总黄酮通过抗增殖蛋白抑制高糖诱导的心肌成纤维细胞增殖

崔晓丽<sup>1</sup>, 沈泽<sup>2</sup>, 宋春垚<sup>2</sup>, 蒋济南<sup>3</sup>, 周佳旭<sup>3</sup>, 刘志荣<sup>3</sup>, 王艳春<sup>1\*</sup>

(吉林医药学院 1. 基础医学院, 2. 临床医学院, 3. 药学院, 吉林 吉林 132013)

**摘要:** 探讨苦参总黄酮 (sophoral flavones, SF) 改善高糖诱导心肌成纤维细胞 (cardiac fibroblasts, CFb) 增殖的作用及其相关机制。以 25 mmol·L<sup>-1</sup> D-葡萄糖培养 CFb 48 h 构建细胞增殖模型, 作为模型组; SF (12.5、25 和 50 mg·L<sup>-1</sup>) 作为干预组。采用 MTT 法检测细胞活力; ELISA 检测转化生长因子- $\beta_1$  (transforming growth factor- $\beta_1$ , TGF- $\beta_1$ )、基质金属蛋白酶-2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2)、I 型胶原蛋白 (collagen I) 和 III 型胶原蛋白 (collagen III) 含量; 流式细胞术检测细胞周期变化; Western blot 法和免疫荧光法检测抗增殖蛋白 (prohibitin, PHB) 的表达和定位。动物处置方案经吉林医药学院伦理审查委员会批准。结果表明, 25 mmol·L<sup>-1</sup> 葡萄糖可促进 CFb 增殖; 模型组的 TGF- $\beta_1$ 、MMP-2、collagen I 和 collagen III 含量高于对照组 ( $P < 0.05$ ); 高糖条件下处于 S 期和 G<sub>2</sub> 期的细胞数量增加。与对照组相比, 模型组的 PHB 在 6 h 出现核转位, 在 48 h 蛋白表达下降 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 12.5~50 mg·L<sup>-1</sup> 苦参总黄酮可降低 TGF- $\beta_1$ 、MMP-2、collagen I 和 collagen III 的含量, 增加了 G<sub>1</sub> 期细胞数量, 在 48 h 增加了 PHB 的蛋白表达 ( $P < 0.05$ ), 但未观察到 SF 对 PHB 核转位的影响。以上结果表明, SF 可以改善高糖诱导的 CFb 增殖, 其作用与促进 PHB 表达相关。

**关键词:** 糖尿病性心肌病; 苦参总黄酮; 高糖; 心肌成纤维细胞; 增殖; 抗增殖蛋白

中图分类号: R285 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)11-1903-06

## Sophoral flavones inhibit proliferation of cardiac fibroblasts via regulating the expression of prohibitin

CUI Xiao-li<sup>1</sup>, SHEN Ze<sup>2</sup>, SONG Chun-yao<sup>2</sup>, JIANG Ji-nan<sup>3</sup>, ZHOU Jia-xu<sup>3</sup>, LIU Zhi-rong<sup>3</sup>,  
WANG Yan-chun<sup>1\*</sup>

(1. Basic Medicine of Jilin Medical University, 2. The Clinical Medicine of Jilin Medical University,  
3. The Pharmacy College of Jilin Medical University, Jilin 132013, China)

**Abstract:** The aim of the present study was to investigate the effect of Sophoral flavones on proliferation of cardiac fibroblasts (CFb) induced by high glucose and its underlying mechanism. Cardiac fibroblasts were exposed to different concentration of D-glucose (15, 25 and 35 mmol·L<sup>-1</sup>) at different time point (24, 48 and 72 h) in order to determine cell proliferation, and the model group was established by culturing CFb with 25 mmol·L<sup>-1</sup> D-glucose for 48 h. Sophoral flavones (12.5, 25 and 50 mg·L<sup>-1</sup>) were employed for intervention. The cell viability was measured by MTT assay, and the levels of transforming growth factor- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ), matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), collagen I and collagen III were measured by ELISA. In addition, flow cytometry was employed to detect the cell cycle; while the protein expression of prohibitin (PHB) was observed via immunocytochemistry and Western blot. This animal experiment had been approved by Jilin Medical University Experiment Animal Ethics Review Committee. The results showed that 25 mmol·L<sup>-1</sup> glucose could promote the proliferation of CFb; and the contents of TGF- $\beta_1$ , MMP-2, collagen I and collagen III in the model group were higher than that of control

收稿日期: 2019-04-17; 修回日期: 2019-06-04.

基金项目: 吉林省卫生厅资助项目 (2012Z060); 国家级大学生创新创业训练计划资助项目 (201613706021).

\*通讯作者 Tel / Fax: 86-432-4560023, E-mail: wangyanchun1972@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0286

( $P < 0.05$ ). The number of cells in S and G<sub>2</sub> phase increased under high glucose condition. In the model group, PHB translocation occurred at 6 h and protein expression decreased at 48 h ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, 12.5-50 mg·L<sup>-1</sup> Sophoral flavones reduced the contents of TGF- $\beta_1$ , MMP-2, collagen I and collagen III, increased the number of G<sub>1</sub> phase cells, and increased the expression of PHB protein at 48 h ( $P < 0.05$ ), with no effect on the nuclear translocation of PHB. These results indicated that Sophoral flavones could prevent the proliferation of CFb induced by high glucose, the mechanism of which may be related to increasing the expression of PHB protein.

**Key words:** diabetic cardiomyopathy; Sophoral flavones; high glucose; myocardial fibrosis; proliferation; prohibitin

在糖尿病引起的多系统并发症中,糖尿病性心脏病最为严重。其中,心肌成纤维细胞(cardiac fibroblasts, CFb)过度增殖所致的心肌纤维化是糖尿病心脏病(diabetic cardiomyopathy, DCM)的早期病理变化<sup>[1]</sup>,可影响心脏的收缩和舒张功能<sup>[2,3]</sup>。因此,在细胞水平研究高糖(high glucose, HG)对CFb的影响,以确定有效靶点,对改善DCM具有重要意义。苦参总黄酮(Sophoral flavones, SF)是苦参中最具生物活性的化合物之一,具有广泛的生理活性,包括抗菌作用、抗氧化作用及抗炎作用等<sup>[4-7]</sup>。本研究团队前期研究发现,在糖尿病大鼠模型上,观察到SF有降低血糖的倾向,与卡托普利联合用药,降血糖的作用更加明显;SF单用或与卡托普利联合应用均可以改善糖尿病所致的心肌纤维化及心肌损伤<sup>[8]</sup>。在前期工作的基础上,本研究进一步观察SF对高糖诱导CFb增殖的影响及其机制。

## 材料与方法

**动物** 采用1~3日龄SD大鼠乳鼠,SPF级雌雄不限,购自辽宁长生生物技术股份有限公司,动物合格证号:SCXK(辽)2015-0001。实验过程中对动物处置方案经吉林医药学院伦理审查委员会批准。

**试剂** SF(纯度>80%,西安草翠芯生物科技有限公司)溶于改良型DMEM高糖培养基(上海源培生物科技股份有限公司),并用高糖培养基进一步稀释至所需质量浓度(12.5、25和50 mg·L<sup>-1</sup>);转化生长因子- $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)、I和III型胶原蛋白(collagen I和III)ELISA试剂盒(语纯生物科技股份有限公司); $\beta$ -Actin、抗增殖蛋白(PHB)等多克隆抗体(美国Abcam公司);Triton X-100、BCA蛋白浓度测定试剂盒(BCA Protein Assay Kit)、细胞周期试剂盒和BeyoECL Moon(极超敏ECL化学发光试剂盒)(碧云天公司)。

**CFb的原代培养** 取1~3日龄SD大鼠乳鼠,无菌消毒后开胸取心脏,制备成1 mm<sup>3</sup>左右的组织于预冷磷酸盐缓冲液(PBS)中;0.125%胰酶反复消化。收集消化液,离心(1 000 r·min<sup>-1</sup>, 5 min),弃上清,加入含10%

血清的DMEM培养液重悬细胞,差速贴壁120 min后获得CFb。本实验采用2~4代CFb。

**细胞活性检测** 将CFb分为对照组(含葡萄糖5 mmol·L<sup>-1</sup>)、高糖模型组(25 mmol·L<sup>-1</sup>葡萄糖)和3个用药组(高糖25 mmol·L<sup>-1</sup>+SF 12.5、25或50 mg·L<sup>-1</sup>)。各条件孵育48 h,保留上清液,用含10% MTT培养基作用4 h。二甲基亚砜(DMSO)150  $\mu$ L溶解甲瓚结晶,450 nm测定吸光度值。

**TGF- $\beta_1$ 、MMP-2、collagen I和collagen III含量检测** 根据ELISA试剂盒说明,加入标准品50  $\mu$ L,样品10  $\mu$ L。然后将辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)偶联剂100  $\mu$ L加入各孔中,胶条覆盖,37  $^{\circ}$ C孵育60 min,冲洗后在每孔中加入溶液A和溶液B各50  $\mu$ L。轻轻混合并在37  $^{\circ}$ C恒温孵育箱中孵育15 min。最后,在每孔中加入终止溶液50  $\mu$ L。在15 min内于450 nm处读取吸光度值,检测各组TGF- $\beta_1$ 、MMP-2、collagen I和collagen III的含量。

**细胞周期检测** 收集各组细胞,置于预冷的PBS中洗涤两次,70%冰乙醇固定,4  $^{\circ}$ C过夜。用含50  $\mu$ L RNase和25  $\mu$ L碘化丙啶的染料缓冲液(535  $\mu$ L)重悬样品。37  $^{\circ}$ C避光孵育30 min,过滤,在流式细胞仪上检测。

**免疫荧光染色检测 PHB核转移** 将细胞置于24孔板中,每孔 $1 \times 10^4$ 个细胞,按实验分组处理后,用4%多聚甲醛固定30 min,用0.1% Triton X-100渗透10 min,5%山羊血清阻断非特异性结合。随后,FITC结合的山羊抗兔PHB多克隆抗体检测PHB,并用BX51荧光显微镜对染色细胞进行可视化。

**PHB蛋白表达分析** 预冷PBS洗涤细胞样品两次,裂解。BCA蛋白检测试剂盒测定蛋白质浓度。蛋白(每孔30  $\mu$ g)在100 V电压下分离20 min,200 V电压下分离50 min,转膜120 min,5%脱脂奶封闭1 h,抗体孵育,用化学发光法对膜进行扫描处理,测定总蛋白/ $\beta$ -actin的吸光度值。

**统计学分析** 所有数据均以均值 $\pm$ 标准差表示,统计分析使用SPSS 16.0软件和GraphPad 5.0软件分

析处理, 各组比较采用方差分析和  $t$  检验,  $P < 0.05$  被认为具有统计学差异。

## 结果

### 1 高浓度葡萄糖对 CFb 活性的影响

**1.1 不同浓度葡萄糖对 CFb 活性的影响** 选取 15、25 和 35 mmol·L<sup>-1</sup> 葡萄糖分别与 CFb 孵育 48 h。结果显示, 与对照组相比, 25 和 35 mmol·L<sup>-1</sup> 葡萄糖可提高 CFb 活力 ( $P < 0.01$ )。后续实验采用 25 mmol·L<sup>-1</sup> 葡萄糖作用 CFb 制备增殖模型 (图 1A)。

**1.2 葡萄糖作用不同时间对 CFb 活性的影响** 采用 25 mmol·L<sup>-1</sup> 葡萄糖分别处理 CFb 24、48 和 72 h。结果显示, 与对照组 24 h 比较, 对照组细胞在 48 h 条件下有增殖 ( $P < 0.05$ ), 72 h 增殖无统计学差异 ( $P > 0.05$ ), 高糖组在 24 和 48 h 均有增殖 ( $P < 0.01$ ) (图 1B)。因此, 采用

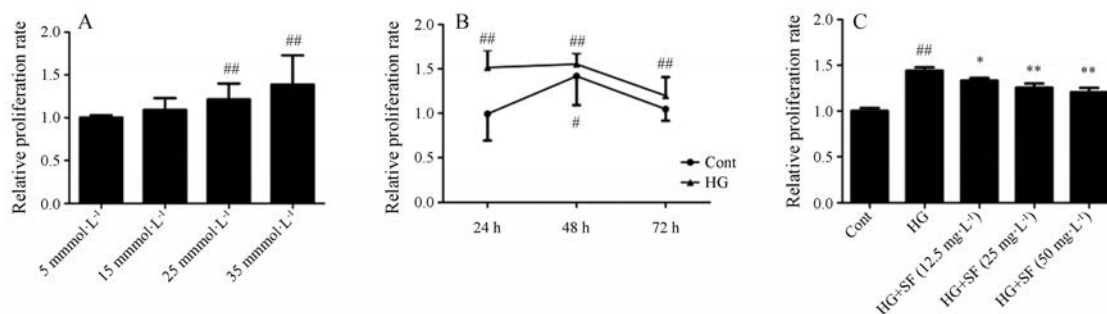
25 mmol·L<sup>-1</sup> 葡萄糖作用 CFb 48 h 制备 CFb 增殖模型, 作为高糖 (HG) 模型组。

### 2 SF 对 CFb 活性的影响

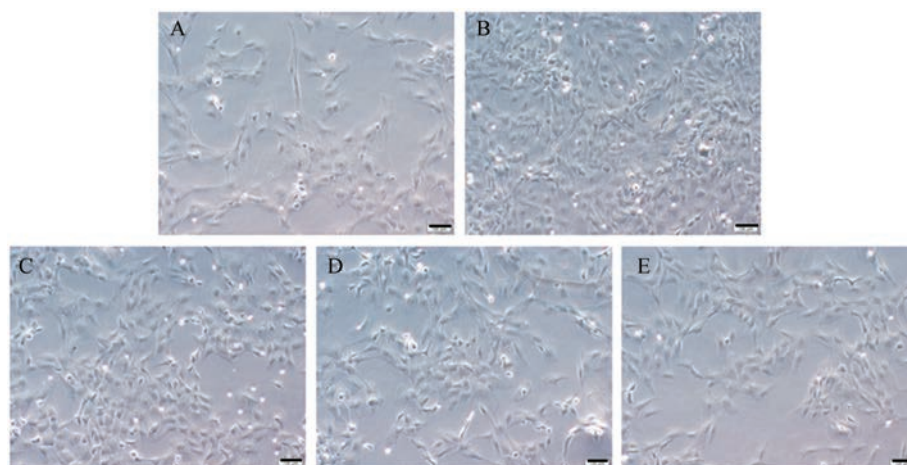
与 HG 模型组相比, SF (12.5~50 mg·L<sup>-1</sup>) 处理 48 h, CFb 的活力显著降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 且随 SF 剂量的增加, 改善 CFb 增殖作用增强 (图 1C)。结果表明, SF (12.5~50 mg·L<sup>-1</sup>) 可改善 CFb 增殖。因此, 采用 12.5~50 mg·L<sup>-1</sup> SF 用于后续机制研究。

### 3 SF 对 CFb 形态变化的影响

将细胞分别培养 48 h 后, 用倒置相差显微镜观察各组细胞形态。结果可见, 对照组细胞较大, 胞浆丰富 (图 2A); HG 模型组细胞生长密集, 细胞体积较小, 增生活跃, 呈火焰状 (图 2B); 与 HG 模型组比较, SF (12.5~50 mg·L<sup>-1</sup>) 组细胞数量减少, 且随浓度增加, 药物抑制细胞增殖的作用增强 (图 2C~E)。



**Figure 1** A: Effects of different concentrations of glucose on relative proliferation of cardiac fibroblasts (CFb). Following the incubation of CFb with normal (5 mmol·L<sup>-1</sup>) and high (15, 25, 35 mmol·L<sup>-1</sup>) D-glucose concentrations for 48 h. B: The effect of high glucose (HG) on the proliferation of CFb at different time points. The CFb were incubated with normal (5 mmol·L<sup>-1</sup>) and high (25 mmol·L<sup>-1</sup>) D-glucose concentrations for 24, 48 and 72 h, respectively. C: The effect of SF on the relative proliferation of CFb. Cells were incubated with normal (5 mmol·L<sup>-1</sup>), high (25 mmol·L<sup>-1</sup>) D-glucose concentrations and HG + (12.5, 25, 50 mg·L<sup>-1</sup>) Sophora flavones (SF) for 48 h.  $n = 10$ ,  $\bar{x} \pm s$ . # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  vs Cont (control) group; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs HG (model) group



**Figure 2** Effect of SF on high glucose-induced morphological changes in CFb. Phase-contrast microscopy images are presented, showing the morphology of CFb following exposure to normal glucose (control, A), HG (model, 25 mmol·L<sup>-1</sup>, B), HG + 12.5 mg·L<sup>-1</sup> SF (C), HG + 25 mg·L<sup>-1</sup> SF (D), HG + 50 mg·L<sup>-1</sup> SF (E). Magnification,  $\times 200$ ; bar = 100  $\mu\text{m}$

#### 4 SF对TGF-β<sub>1</sub>、MMP-2、collagen I和collagen III含量的影响

与对照组比较, HG模型组的TGF-β<sub>1</sub>含量增加 ( $P < 0.01$ ); MMP-2含量在24和48 h增加 ( $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$ ); collagen I分泌增加 ( $P < 0.01$ ); collagen III在24和48 h分泌增多 ( $P < 0.01$ ) (表1)。此结果验证了HG作用48 h可成功制备增殖模型。与HG模型组比较, 12.5~50 mg·L<sup>-1</sup> SF可抑制MMP-2和collagen III分泌 ( $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$ ); 25和50 mg·L<sup>-1</sup> SF组可抑制TGF-β<sub>1</sub>和collagen I分

泌 ( $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$ ) (表2)。结果表明, 12.5~50 mg·L<sup>-1</sup> SF可通过改善细胞外基质含量而改善CFb增殖。

#### 5 SF对细胞周期的影响

25 mmol·L<sup>-1</sup>葡萄糖可显著增加S期和G<sub>2</sub>期细胞数量, 减少G<sub>1</sub>期细胞数量。与HG模型组相比, SF组中G<sub>1</sub>期细胞数量明显增加, S期降低, 提示SF可使细胞周期阻滞在G<sub>1</sub>期(图3A~F)。

#### 6 SF对PHB表达的影响

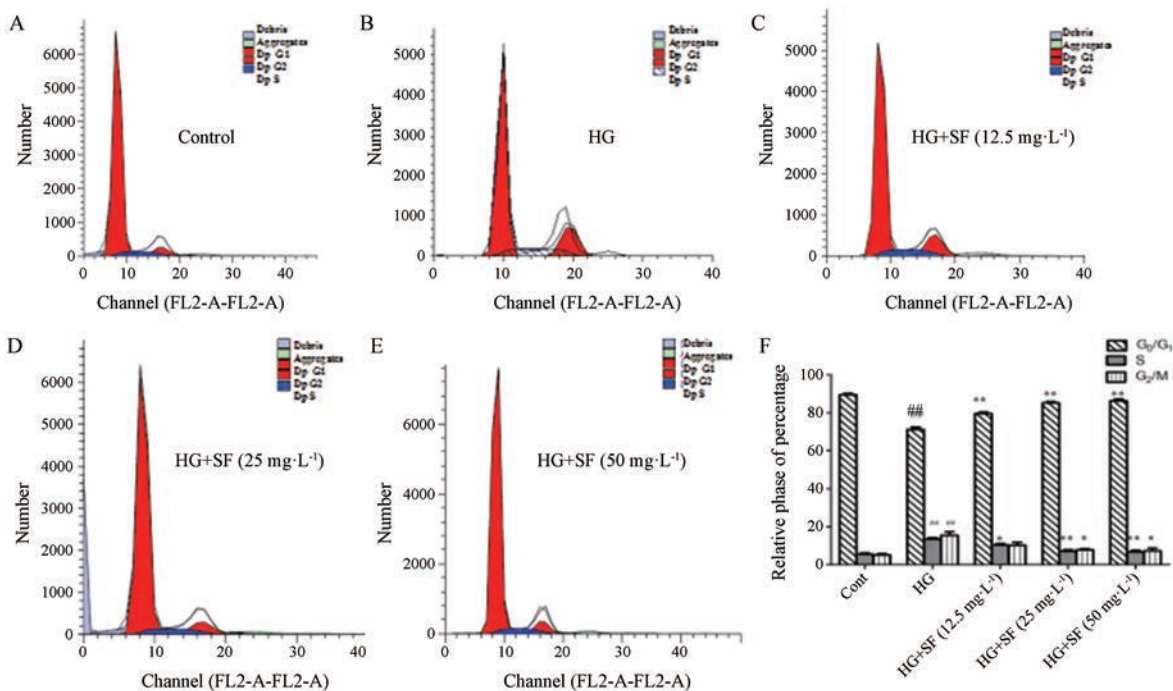
免疫荧光结果显示, 与对照组相比, HG模型组

**Table 1** Effect of HG on transforming growth factor-β<sub>1</sub> (TGF-β<sub>1</sub>), matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), collagen I and collagen III content in CFb at different time points.  $n = 10$ ,  $\bar{x} \pm s$ . #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  vs control group at same time

Group	TGF-β <sub>1</sub> /pg·mL <sup>-1</sup>	MMP-2/ng·mL <sup>-1</sup>	Collagen I/ng·mL <sup>-1</sup>	Collagen III/ng·mL <sup>-1</sup>
Control				
24 h	5.58 ± 0.41	0.074 ± 0.01	0.159 ± 0.017	7.42 ± 0.520
48 h	6.11 ± 0.21	0.095 ± 0.009	0.150 ± 0.006	8.06 ± 0.630
72 h	6.52 ± 0.10	0.088 ± 0.013	0.145 ± 0.013	9.90 ± 1.26
HG (25 mmol·L <sup>-1</sup> )				
24 h	6.55 ± 0.18 <sup>##</sup>	0.103 ± 0.004 <sup>##</sup>	0.208 ± 0.019 <sup>##</sup>	9.26 ± 0.700 <sup>##</sup>
48 h	7.23 ± 0.18 <sup>#</sup>	0.091 ± 0.004	0.209 ± 0.014 <sup>##</sup>	11.80 ± 0.730 <sup>##</sup>
72 h	8.05 ± 0.48 <sup>##</sup>	0.108 ± 0.005 <sup>#</sup>	0.194 ± 0.016 <sup>##</sup>	11.70 ± 1.82

**Table 2** Effect of SF on TGF-β<sub>1</sub>, MMP-2, collagen I and collagen III content in CFb induced by high glucose at 48 h.  $n = 4$ ,  $\bar{x} \pm s$ . ##  $P < 0.01$  vs control group; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs model group

Group	TGF-β <sub>1</sub> /pg·mL <sup>-1</sup>	MMP-2/ng·mL <sup>-1</sup>	Collagen I /ng·mL <sup>-1</sup>	Collagen III/ng·mL <sup>-1</sup>
Control	6.59 ± 0.335	0.081 ± 0.005	0.169 ± 0.006	9.261 ± 0.485
HG (25 mmol·L <sup>-1</sup> )	7.56 ± 0.060 <sup>##</sup>	0.101 ± 0.004 <sup>##</sup>	0.222 ± 0.007 <sup>##</sup>	13.56 ± 1.028 <sup>##</sup>
HG+SF (12.5 mg·L <sup>-1</sup> )	7.46 ± 0.079	0.091 ± 0.005 <sup>*</sup>	0.220 ± 0.005	12.66 ± 0.534 <sup>*</sup>
HG+SF (25 mg·L <sup>-1</sup> )	7.19 ± 0.240 <sup>*</sup>	0.088 ± 0.009 <sup>*</sup>	0.198 ± 0.006 <sup>**</sup>	9.453 ± 0.478 <sup>**</sup>
HG+SF (50 mg·L <sup>-1</sup> )	6.77 ± 0.197 <sup>**</sup>	0.085 ± 0.006 <sup>**</sup>	0.177 ± 0.005 <sup>**</sup>	8.684 ± 0.221 <sup>**</sup>



**Figure 3** Cell cycle charts at different stages. A: Control group; B: HG model group; C: HG + 12.5 mg·L<sup>-1</sup> SF; D: HG + 25 mg·L<sup>-1</sup> SF; E: HG + 50 mg·L<sup>-1</sup> SF; F: Statistical analysis results.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . ##  $P < 0.01$  vs control group; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs model group

PHB 在 6、12 和 24 h 表达增多, 48 h 时 PHB 表达量减少。在 25 mmol·L<sup>-1</sup> 葡萄糖作用 6 h 后 PHB 从胞浆向胞核内转移, 胞核中 PHB 表达量增多 (图 4A)。与 HG 模型组比较, 25 mg·L<sup>-1</sup> SF 作用细胞 48 h 可以促进 PHB 的表达, 但没有阻断 PHB 向核内转移 (图 4B)。Western blot 结果显示: 与对照组比较, HG 模型组 PHB 在 12 和 24 h 表达有升高趋势, 但无统计学差异, 48 h 蛋白表达量降低 ( $P < 0.01$ ) (图 4C、D), 故在 HG 作用 48 h 条件下观察 SF 的作用; 与 HG 模型组比较, SF 可促进 PHB 的表达, 随 SF 浓度增加, PHB 表达量增多 ( $P < 0.01$ , 图 4E、F)。

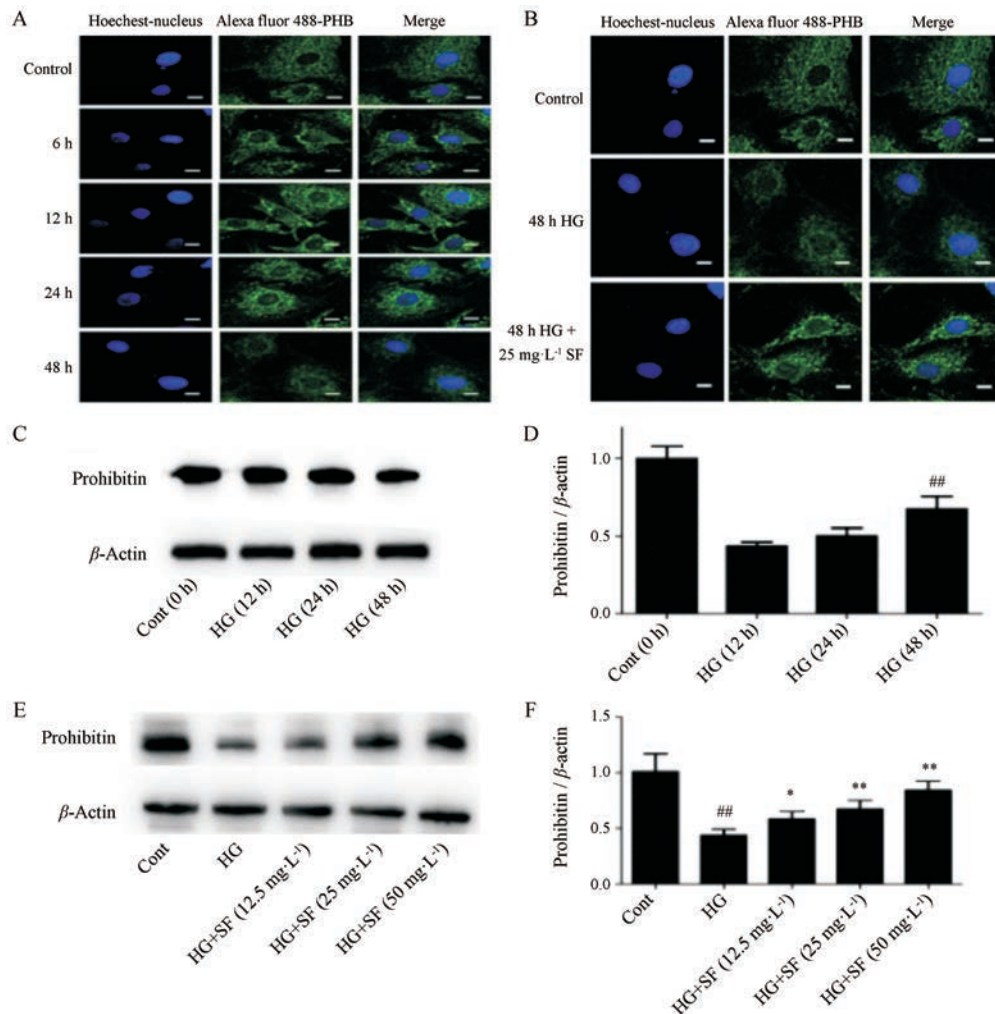
## 讨论

糖尿病性心肌病发生于糖尿病患者, 排除高血压性心脏病、冠状动脉粥样硬化性心脏病及其他心脏病

变的心肌疾病, 最终可发展为心力衰竭。心肌纤维化是糖尿病心肌病发展到一定阶段出现的病理现象, 主要表现为 CFb 过度增殖及细胞外基质 (ECM) 的过度沉积。本研究团队前期工作也证实, 在糖尿病大鼠模型上, 随着时间延长, 伴有心肌胶原含量增加, 心肌组织结构紊乱, 心脏功能受到抑制<sup>[8]</sup>。

本研究以 5 mmol·L<sup>-1</sup> 葡萄糖 (即常规培养基中所含葡萄糖浓度) 作为对照组, 观察不同浓度葡萄糖 (15、25 和 35 mmol·L<sup>-1</sup>) 在不同时间对 CFb 的影响。MTT 结果表明, 15、25 和 35 mmol·L<sup>-1</sup> 葡萄糖在 48 h 呈现出促进 CFb 增殖的趋势, 其中 25 和 35 mmol·L<sup>-1</sup> 的作用具有统计学意义。在作用持续时间方面, 高糖作用 24、48 和 72 h 都有促进 CFb 增殖作用。因此, 选取 25 mmol·L<sup>-1</sup> 葡萄糖作用于 CFb 48 h 为模型组。

机体内的 TGF- $\beta$  主要有 3 种类型, 其中 TGF- $\beta_1$  不



**Figure 4** Prohibitin (PHB) expression and metastasis under high glucose at different time points (A). Effect of SF on PHB expression and metastasis under HG 48 h (B). PHB proteins are shown in green; Hoechst-labeled nucleus are shown in blue. Bar = 20  $\mu$ m. Magnification,  $\times 1\ 200$ . The effect of HG on the expression of PHB at different time points (C, D). The effect of SF on the expression of PHB under HG at 48 h (E, F).  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ .  $^{##}P < 0.01$  vs control group;  $^*P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$  vs model group

仅参与人体内多种器官的创伤与修复,还通过激活成纤维细胞促使其分泌大量的ECM<sup>[9-11]</sup>,是主要的促纤维化因子<sup>[12]</sup>。研究表明,高糖是诱导TGF- $\beta_1$ 表达和活化的主要因素<sup>[9]</sup>。胶原是ECM的最重要成分,在心脏内主要是I型和III型胶原蛋白。胶原蛋白的降解需要MMP-2的存在。在正常心脏结构中,MMP的表达和功能都受到严格的调控,但在病理状态下,MMP的表达和活性增加会导致ECM失衡,从而影响心脏的收缩、舒张功能<sup>[13]</sup>。研究中观察到25 mmol·L<sup>-1</sup>葡萄糖可促进TGF- $\beta_1$ 、MMP-2的增多和细胞外基质I型胶原蛋白、III型胶原蛋白的过度分泌,表明增殖模型建立成功。SF在12.5~50 mg·L<sup>-1</sup>内可抑制CFb增殖,同时对以上指标均有改善作用,细胞增殖周期也证实SF能够通过G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>阻滞改善高糖诱导的CFb增殖。

PHB家族是一种高度保守的多功能蛋白,在酵母、植物、蠕虫、果蝇和哺乳动物中均有表达<sup>[14,15]</sup>,其参与了细胞增殖、细胞凋亡、转录调控、发育及线粒体生物合成等过程<sup>[16]</sup>。PHB主要定位在线粒体中,在细胞核及细胞质中也有表达,其在不同位置的表达及其含量与其功能密切相关<sup>[17]</sup>。以往的研究表明,PHB表达的变化与ECM的沉积有关,PHB表达上调可有效缓解肺纤维化,成为治疗组织纤维化的新靶点<sup>[18,19]</sup>。本研究结果显示,PHB在CFb的胞浆及胞核中均有表达,在高糖作用于CFb 6 h后PHB从胞浆向胞核内转移,48 h整体表达量降低,此结果与Western blot结果一致,表明在高糖诱导CFb增殖过程中,PHB参与了调控。25 mg·L<sup>-1</sup> SF可以促进PHB的表达,提示在SF改善心肌纤维化过程中PHB参与其中,但尚未观察到其对PHB核转移的影响。

综上所述,本研究以高糖建立CFb增殖模型,SF具有改善细胞增殖的作用。在CFb增殖的过程中,各靶点的变化时间是不一致的,它们之间的关系是本研究下一步关注的内容。

## References

- [1] Yi X, Li XY, Zhou YL, et al. Hepatocyte growth factor regulates the TGF- $\beta_1$ -induced proliferation, differentiation and secretory function of cardiac fibroblasts [J]. *Int J Mol Med*, 2014, 34: 381-390.
- [2] Travers JG, Kamal FA, Robbins J, et al. Cardiac fibrosis: the fibroblast awakens [J]. *Circ Res*, 2016, 118: 1021-1040.
- [3] Zhou YM, Li MJ, Zhou YL, et al. Growth differentiation factor-15 (GDF-15), novel biomarker for assessing atrial fibrosis in patients with atrial fibrillation and rheumatic heart disease [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8: 21201-21207.
- [4] Chong ES, Hwang GB, Nho CW, et al. Antimicrobial durability of air filters coated with airborne *Sophora flavescens* nanoparticles [J]. *Sci Total Environ*, 2013, 444: 110-114.
- [5] Zhang L, Ravipati AS, Koyyalamudi SR, et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of selected medicinal plants containing phenolic and flavonoid compounds [J]. *Agric Food Chem*, 2011, 59: 12361-12367.
- [6] Jung HA, Jeong DM, Chung HY, et al. Re-evaluation of the antioxidant prenylated flavonoids from the roots of *Sophora flavescens* [J]. *Biol Pharm Bull*, 2008, 31: 908-915.
- [7] Jin JH, Kim JS, Kang SS, et al. Anti-inflammatory and anti-arthritis activity of total flavonoids of the roots of *Sophora flavescens* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 127: 589-595.
- [8] Chang Y, Lu Q, Wang Y, et al. Improvement effect of Sophora flavones combined with captopril on diabetic cardiomyopathy of rats [J]. *J Jilin Univ (Med Ed) (吉林大学学报 (医学版))*, 2016, 42: 721-724.
- [9] Biernacka A, Dobaczewski M, Frangogiannis NG, et al. TGF- $\beta$  signaling in fibrosis [J]. *Growth Factors*, 2011, 29: 196-202.
- [10] Yang H, Feng AY, Lin SD, et al. Fibroblast growth factor-21 prevents diabetic cardiomyopathy via AMPK-mediated antioxidant and lipid-lowering effects in the heart [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9: 227.
- [11] Niu WX, Chen MH, Zhang N, et al. Pepstatin Pr show anti-fibrosis effect related to YAP-TGF $\beta$ -Smad pathway [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2019, 54: 89-94.
- [12] Nuell MJ, Stewart DA, Walker L, et al. Prohibitin, an evolutionarily conserved intracellular protein that blocks DNA synthesis in normal fibroblasts and HeLa cells [J]. *Mol Cell Biol*, 1991, 11: 1372-1381.
- [13] Owczarczyk-Saczonek A, Drozdowski M, Maciejewska-Radomska A, et al. The effect of subcutaneous methotrexate on markers of metabolic syndrome in psoriatic patients-preliminary report [J]. *Postepy Dermatol Alergol*, 2018, 35: 53-59.
- [14] Dong WQ, Chao M, Lu QH, et al. Prohibitin overexpression improves myocardial function in diabetic cardiomyopathy [J]. *Oncotarget*, 2016, 7: 66-80.
- [15] Anderson CJ, Kahl A, Qian LP, et al. Prohibitin is a positive modulator of mitochondrial function in PC12 cells under oxidative stress [J]. *J Neurochem*, 2018, 146: 235-250.
- [16] Yang J, Li B, He QY. Significance of prohibitin domain family in tumorigenesis and its implication in cancer diagnosis and treatment [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9: 580.
- [17] Djehal A, Krayem M, Najem A, et al. Targeting prohibitin with small molecules to promote melanogenesis and apoptosis in melanoma cells [J]. *Eur J Med Chem*, 2018, 155: 880-888.
- [18] Yuan C, Chen WX, Zhu JS, et al. IL-10 treatment is associated with prohibitin expression in the Crohn's disease intestinal fibrosis mouse model [J]. *Mediat Inflamm*, 2013, 2013: 617145.
- [19] Zhang F, Fan D, Mo XN. Prohibitin and the extracellular matrix are upregulated in murine alveolar epithelial cells with LPS-induced acute injury [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17: 7769-7773.