

# 外泌体介导的辐射旁效应对心肌成纤维细胞的干预及黄芪甲苷的防护作用

顾静<sup>1,2\*</sup> 段依璠<sup>1,3</sup> 舒亚妃<sup>1,4</sup> 韩晓斐<sup>1,3</sup>

(<sup>1</sup>甘肃中医药大学基础医学院生理教研室, 兰州 730000;

<sup>2</sup>甘肃省高校重大疾病分子医学与中医药防治研究省级重点实验室, 兰州 730000;

<sup>3</sup>甘肃省中医药防治慢性疾病重点实验室, 兰州 730000; <sup>4</sup>甘肃省方药挖掘和创新转化实验室, 兰州 730000)

**摘要** 为探讨放射性外泌体介导的辐射旁效应对心肌成纤维细胞(cardiac fibroblasts, CFs)的影响并观察黄芪甲苷(astragaloside IV, AST)的防护效应, 该研究以2 Gy X线辐照大鼠CFs, 48 h后超速离心提取放射性外泌体(X-exo), 进行外泌体形态、浓度和表面标志蛋白鉴定。将CFs分为对照组(Control)、照射组(X-CFs)、CFs与放射性外泌体共培养组(X-exo+CFs)和黄芪甲苷干预组(X-exo+AST-CFs), 采用流式细胞术检测各组细胞周期; 划痕实验检测细胞迁移能力; Western blot检测纤维化相关分子TGF- $\beta$ 1、Col-I的表达情况。结果显示, X-CFs组和X-exo+CFs组在干预后24 h、48 h处于G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期的细胞比例均低于Control组( $P < 0.01$ ), S期和G<sub>2</sub>/M期的细胞比例均高于Control组( $P < 0.01$ ); X-CFs和X-exo+CFs组细胞迁移率在12 h、24 h、48 h时均显著高于Control组( $P < 0.05$ ); 在48 h时X-CFs组和X-exo+CFs组TGF- $\beta$ 1、Col-I蛋白表达量均高于Control组( $P < 0.01$ )。X-exo+AST-CFs组在干预后24 h、48 h时处于G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期的细胞比例高于X-exo+CFs组( $P < 0.01$ ), 处于S期、G<sub>2</sub>/M期的细胞比例均低于X-exo+CFs组( $P < 0.01$ ); 对比X-exo+CFs组, X-exo+AST-CFs组干预后, 12 h、24 h、48 h细胞迁移率分别降低了62.6%、40.6%、41.2%( $P < 0.01$ ), 48 h时TGF- $\beta$ 1、Col-I蛋白表达量分别降低了15%、21.9%( $P < 0.01$ )。这说明X线诱导的外泌体(放射性外泌体)能促进共培养的CFs增殖、迁移、TGF- $\beta$ 1和Col-I高表达, 且AST对这种放射性外泌体通过辐射旁效应引起的促纤维化有一定的抑制效应。

**关键词** 放射性心脏损伤; 心肌成纤维细胞; 外泌体; 黄芪甲苷

## Intervention of Exosome-Mediated Radiation Bystander Effect on Cardiac Fibroblasts and Protection of Astragaloside IV

GU Jing<sup>1,2\*</sup>, DUAN Yifan<sup>1,3</sup>, SHU Yafei<sup>1,4</sup>, HAN Xiaofei<sup>1,3</sup>

(<sup>1</sup>Physiology Teaching and Research Section of Basic Medical College in Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; <sup>2</sup>Provincial Key Laboratory of Molecular Medicine and TCM Prevention and Treatment of Major Diseases in Universities in Gansu Province, Lanzhou 730000, China; <sup>3</sup>Gansu Provincial Key Laboratory of TCM Prevention and Treatment of Chronic Diseases, Lanzhou 730000, China; <sup>4</sup>Gansu Recipe Mining and Innovation Transformation Laboratory, Lanzhou 730000, China)

收稿日期: 2022-06-05 接受日期: 2022-08-23

甘肃省教育厅高等学校青年博士基金(批准号: 2022QB-094)、甘肃省“双一流”科研重点项目(批准号: GSSYLXM-05)、甘肃省自然科学基金(批准号: 21JR1RA262)和甘肃省中医药管理局重点项目(批准号: GZKZ-2020-10)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 18919900336, E-mail: 120233234@qq.com

Received: June 5, 2022 Accepted: August 23, 2022

This work was supported by the Youth Doctor Foundation of Higher Education in Gansu Province (Grant No.2022QB-094), the Gansu Province “Double First-Class” Key Scientific Research Project (Grant No.GSSYLXM-05), the Natural Science Foundation of Gansu Province (Grant No.21JR1RA262), and the Key Project of TCM Administration of Gansu Province (Grant No.GZKZ-2020-10)

\*Corresponding author. Tel: +86-18919900336, E-mail: 120233234@qq.com

**Abstract** To investigate the effects of exosome-mediated radiation bystander on CFs (cardiac fibroblasts) and the intervention of AST (astragaloside IV), X-exo (radioactive exosomes) were extracted by overspeed centrifugation from rat CFs after 2 Gy X-ray irradiation. Then, the identification of exosome morphology, concentration and surface marker proteins was performed. CFs were divided into control group (Control), irradiation group (X-CFs), co-culture group of CFs and radioactive exosomes (X-exo+CFs), and AST intervention group (X-exo+AST-CFs). Flow cytometry was used to detect cell cycle; Scrape assay was used to detect CFs migration ability; Western blot was used to detect the expression of fibrosis-related molecules TGF- $\beta$ 1 and Col-I. The results showed that, compared with the Control group, the proportion of CFs in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase decreased in X-CFs and X-exo+CFs groups ( $P < 0.01$ ) at 24 h and 48 h after intervention, the proportion of cells in S and G<sub>2</sub>/M phases increased ( $P < 0.01$ ); the cell mobility of X-CFs and X-exo+CFs groups increased at 12 h, 24 h, 48 h, respectively ( $P < 0.05$ ); the expression of TGF- $\beta$ 1 and Col-I protein in X-CFs groups and X-exo+CFs groups increased at 48 h ( $P < 0.01$ ). Compared with X-exo+CFs group, the proportion of cells in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase increased at 24 h and 48 h in X-exo+AST-CFs group ( $P < 0.01$ ), while S stage and G<sub>2</sub>/M stage ratio decreased ( $P < 0.01$ ); the cell mobility of X-exo+AST-CFs group decreased by 62.6%, 40.6%, and 41.2% at 12 h, 24 h, and 48 h, respectively ( $P < 0.01$ ); TGF- $\beta$ 1 and Col-I protein expression at 48 h decreased by 15% and 21.9%, respectively ( $P < 0.01$ ). These aforementioned findings indicate that X-ray induced exosomes (radioactive exosomes) can promote the proliferation of CFs, enhance the migration ability of CFs and promote the high expression of fibrosis factors, and AST has some inhibitory effect on the profibrotic effect caused by this exosome-mediated radiation bystander effect.

**Keywords** radiation-induced heart damage; cardiac fibroblasts; exosomes; astragaloside IV

放射性心脏损伤 (radiation-induced heart damage, RIHD) 是胸部肿瘤放疗的常见并发症之一<sup>[1]</sup>, 其主要病理改变是心脏纤维化<sup>[2]</sup>。心肌成纤维细胞 (cardiac fibroblasts, CFs) 是心脏纤维化的主要效应细胞, CFs 在损伤刺激下可增殖活化, 并分泌转化生长因子- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )、Col 等促纤维化因子, 引起组织器官纤维化<sup>[3]</sup>。TGF- $\beta$  与纤维化关系密切, 已有研究证实 TGF- $\beta$ 1/smads 信号通路在放射性心脏纤维化过程中起重要作用<sup>[4-5]</sup>。

肿瘤放疗引起的电离辐射除了直接损伤受照射的细胞外, 也会引起其周围未受照射细胞发生相应的损伤改变, 即辐射旁效应<sup>[6]</sup>。辐射旁效应可能与电离辐射刺激细胞分泌的外泌体有关<sup>[7]</sup>, 研究发现从辐照条件培养基中分离的外泌体与受体细胞共培养后可诱导受体细胞产生相似的辐射损伤效应<sup>[8]</sup>, 即放射性外泌体可介导辐射旁效应。目前, 放射性外泌体介导的辐射旁效应在放射性心肌纤维化损伤中的作用研究较少。

现阶段临床上尚无针对 RIHD 的有效干预措施, 西医只能对已产生放射性心脏损害的患者给予相应的对症治疗, 中医药则在肿瘤放化疗中具有整体调节人体机能、减毒增效的优势。中医认为放疗心脏

毒性反应的主要病机是射线引起的“心气血不足”, 中医药防治应注重“扶养正气、补益心气”。中药黄芪具有益气养元、扶正祛邪(固本)、养心通脉等作用, 常被用于心脏疾病治疗。国内已有个别研究报道黄芪注射液可降低胸部肿瘤放疗时心脏炎症反应发生率, 减少心电图异常情况及胸闷、心悸、胸痛等心脏不适症状的发生率, 且对 RIHD 的纤维化损伤也有良好的临床防治效果<sup>[9]</sup>。研究显示, 黄芪的有效成分对于辐射诱导的心肌细胞损伤的改善效果优于丹参总酮、赤芍总苷等<sup>[10]</sup>, 其中生物活性最好的黄芪甲苷 (astragaloside IV, AST) 可减轻氧化应激对心肌的损伤, 对病毒性心肌炎和心肌损伤有保护作用<sup>[11]</sup>, 也能通过治疗炎症抑制纤维化的发生发展, 且其作用优于黄芪总皂苷<sup>[12]</sup>。故本研究基于外泌体介导的辐射旁效应对心肌成纤维细胞的影响, 探讨黄芪甲苷在放射性心脏损伤中的防护作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞 大鼠 CFs 购自北纳生物科技有限公司。

1.1.2 药物与试剂 无外泌体胎牛血清购自 Biological Industries 公司; 总 RNA 提取试剂盒、实时荧

光定量PCR试剂盒、CCK-8检测试剂盒均购自上海翊圣生物科技有限公司; 大鼠GAPDH单克隆抗体、大鼠I型胶原(Col-I)单克隆抗体、大鼠TGF- $\beta$ 1单克隆抗体均购自GeneTex公司; 细胞周期试剂盒(Cell Cycle Staining Kit)购自联科生物技术有限公司; 黄芪甲苷购自上海源叶生物科技有限公司。

**1.1.3 仪器设备** 生物辐照仪购自美国Precision X-Ray公司; 二氧化碳恒温培养箱购自天津莱玻特瑞仪器设备有限公司; 化学发光成像系统购自美国Azure公司; 美谷Spectra Max酶标检测仪购自上海美谷分子仪器有限公司; 罗氏Light Cycler96 PCR仪购自瑞士Roche公司; 超速离心机和透射电镜购自日本Hitachi公司; NanoFCM纳米流式检测仪购自厦门福流生物科技有限公司。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 细胞培养** 在37°C、5% CO<sub>2</sub>及饱和湿度的条件下, 将CFs细胞于含10%胎牛血清、1%青-链霉素混合液的高糖培养基中进行培养。用胰蛋白酶-EDTA消化液(含0.25%胰酶和0.02% EDTA)消化细胞, 加入完全培养基终止消化, 轻轻吹打混匀细胞后传代培养。

**1.2.2 细胞照射及分组** 细胞照射在甘肃中医药大学生物辐照检测室进行, 用生物辐照仪照射, 放射源中心到细胞照射野中心的距离为48 cm, 剂量率为2 Gy/min, 按照0、1、2、3、4 Gy X线辐射剂量完成照射, 筛选出既不抑制CFs增殖活性又能显著影响细胞其他指标的X线最大照射剂量, 作为本实验的X线干预剂量。

细胞分为四组: (1) 空白对照组(Control); (2) 照射组(X-CFs), 按照预先筛选的X线照射剂量照射细胞; (3) CFs与放射性外泌体共培养组(X-exo+CFs), 将从50 mL细胞上清液中提取的放射性外泌体(X-exo)用100  $\mu$ L PBS重悬, 测得外泌体浓度为 $4.78 \times 10^7$ 个/mL, 加入正常CFs培养基建立共培养体系, 使该体系中外泌体浓度约为 $1 \times 10^5$ 个/mL; (4) 黄芪甲苷干预组(X-exo+AST-CFs), CFs与放射性外泌体共培养前1.5 h, 用不抑制细胞增殖活性的最大浓度AST预处理CFs。

**1.2.3 外泌体的分离及鉴定** 利用超速离心法分离外泌体: 当细胞密度达到70%时, 更换血清为无外泌体血清, 按照筛选出的照射剂量(2 Gy)进行X线照射后继续培养48 h, 收集上清, 将细胞培养上清于4°C依次以300  $\times g$ 离心10 min、3 000  $\times g$ 离心15 min、2 000  $\times g$ 离心30 min、10 000  $\times g$ 离心

45 min, 每次均收集上清液, 用0.45  $\mu$ m滤膜过滤后, 收集过滤液, 于4°C以100 000  $\times g$ 离心70 min后收集沉淀, 以10 mL预冷的PBS重悬后再次用相同转速离心收集沉淀(外泌体), 最后以100  $\mu$ L预冷的PBS重悬外泌体并将其保存于-80°C。

外泌体鉴定: 用透射电镜观察外泌体形态; NTA纳米粒子跟踪分析并检测外泌体的粒径及浓度; 纳米流式细胞仪检测CD9、CD63、CD81等外泌体表面标志性蛋白。

**1.2.4 CCK-8法检测细胞增殖** 用0、1、2、3、4、5 Gy X线照射细胞, 然后分别于照射后6、12、24、48、72 h用CCK-8法检测细胞活性。CCK-8法还被用于CFs与外泌体共培养时间和药物浓度筛选。

**1.2.5 流式细胞术检测细胞周期** 消化各组细胞后, 以1 000  $\times g$ 离心10 min, 用PBS洗涤1次, 离心弃上清, 加入1 mL DNA染色液和10  $\mu$ L通透液, 涡旋振荡5~10 s混匀, 室温避光孵育30 min, 流式细胞仪检测。

**1.2.6 划痕实验检测细胞迁移能力** 用marker笔划线标记6孔板, 每孔内接种约 $5 \times 10^5$ 个细胞, 过夜后细胞贴壁长满达到100%融合, 用移液枪头在每个孔内划一道痕, 然后用PBS清洗去除脱落细胞, 加入无血清培养基(降低细胞增殖对实验结果的影响), 6孔板放入37°C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中, 按0、12、24、48 h时间点取样, 电子显微镜下拍照, 对不同时间点不同组的划痕间距进行分析[说明: 实验中选用丝裂霉素(1  $\mu$ g/mL)处理细胞1 h, 以抑制细胞的分裂从而避免细胞增殖对实验结果的影响]。

**1.2.7 纤维化相关因子表达检测** qRT-PCR: 取0、1、2、3、4 Gy X线照射后48 h的细胞, 提取总RNA, 测定其浓度和纯度, 使用YEASEN逆转录试剂盒反转录得到cDNA, 将其及引物加入PCR扩增体系, 使用罗氏Light Cycler 96实时检测分析PCR产物。具体引物序列如表1。

蛋白免疫印迹: 用RIPA裂解液处理从细胞中提取的蛋白质, 将其煮沸变性后进行BCA蛋白质定量, 然后通过SDS-PAGE凝胶电泳分离蛋白并将其转至PVDF膜上, 转膜后置于一抗(Col-I、TGF- $\beta$ 1、GAPDH; 稀释比例为1:400)中, 于4°C过夜, 随后于室温下进行二抗(稀释比例为1:1 000)孵育1.5 h, 滴加曝光液后将其置于凝胶成像仪曝光, 用ImageJ软件检测曝光后蛋白条带的灰度值并分析。

**1.2.8 统计学方法** 应用SPSS 25.0软件进行统计

分析, 实验结果用均值±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示, 两组间均数比较采用*t*检验, 组间多重比较采用单因素方差分析, 以*P*<0.05为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 CFs照射剂量及观察时间点的确定

2.1.1 细胞增殖活性 在1、2 Gy X线照射CFs后的6 h、12 h时, CFs细胞增殖率显著高于对照组(0 Gy) (*P*<0.01); 随着时间的延长, 1、2 Gy X线促CFs增殖的

作用逐渐减弱, 在2 Gy X线照射CFs后的72 h时, CFs增殖率比对照组低5.9% (*P*<0.05)。3、4 Gy X线照射可抑制CFs增殖。5 Gy X线对受照的CFs有短暂(6 h内)的促增殖作用, 而48、72 h时细胞增殖出现抑制 (*P*<0.01)(表2)。X线照射后CFs的生长曲线如图1所示, 随着细胞培养时间的延长, 对照组(0 Gy)细胞增殖速度变慢。照射后48~72 h, 随着时间延长, 各组曲线逐渐分散, 对照组和各照射组增殖速度差异变大; 不同剂量X线照射细胞, 剂量越大, 细胞增殖速度越慢。

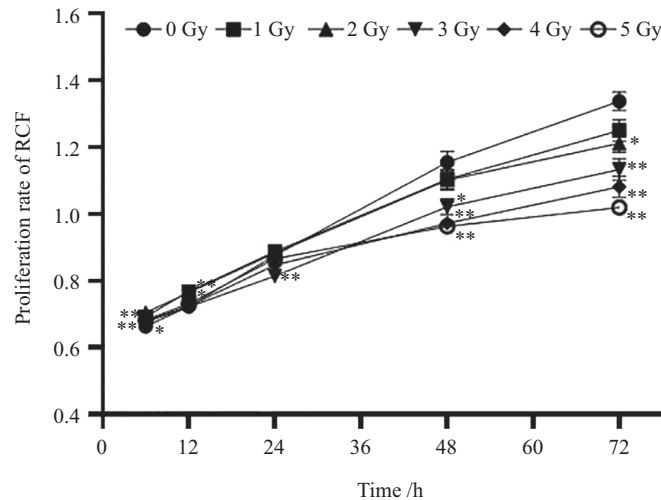
表1 用于qRT-PCR的引物的序列  
Table 1 The sequences of primers used for qRT-PCR

| 引物名称<br>Primer name | 上游引物(5'→3')<br>Forward primer (5'→3') | 下游引物(5'→3')<br>Reverse primer (5'→3') |
|---------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Col-I               | CGT GGA AAC CTG ATG TAT GC            | ACT CCT ATG ACT TCT GCG TCT G         |
| TGF-β1              | CAG AGA TTC AAG TCA ACT GTG G         | GAA AGC CCT GTA TTC CGT C             |
| GAPDH               | GAC ATG CCG CCT GGA GAA AC            | AGC CCA GGA TGC CCT TTA GT            |

表2 X线照射对CFs相对增殖率的影响  
Table 2 Effects of X-ray irradiation on the relative proliferation rate of CFs

| 照射剂量/Gy<br>Irradiation dose /Gy | 照射后时长/h<br>Duration after irradiation /h |        |        |        |        |
|---------------------------------|--|--------|--------|--------|--------|
|                                 | 6  | 12     | 24     | 48     | 72     |
| 0                               | 1.00                                     | 1.00   | 1.00   | 1.00   | 1.00   |
| 1                               | 1.04**                                   | 1.06** | 1.01   | 1.00   | 0.97   |
| 2                               | 1.06**                                   | 1.06*  | 1.01   | 1.00   | 0.94*  |
| 3                               | 1.02                                     | 1.00   | 0.93** | 0.92*  | 0.88** |
| 4                               | 1.02                                     | 1.00   | 0.97   | 0.88** | 0.84** |
| 5                               | 1.03*                                    | 1.01   | 0.99   | 0.87** | 0.79** |

\**P*<0.05, \*\**P*<0.01 vs 0 Gy.



\**P*<0.05, \*\**P*<0.01 vs 0 Gy.

图1 不同剂量射线照射后心肌成纤维细胞在不同观察时间点的增殖率变化

Fig.1 Proliferation rate of cardiac fibroblasts at different observation time points after irradiation with different doses of radiation



结果说明, X线照射在6~12 h可促进CFs增殖, 随着时间延长, 其促增殖作用逐渐减弱, 且3、4、5 Gy等较大照射剂量对细胞增殖能力影响较大。1、2 Gy X线照射初期, 细胞发生明显促增殖效应, 照射后48~72 h, 随着时间延长, 各组曲线逐渐分散, 对照组和各照射组增殖速度差异变大, 在照射后72 h, 2 Gy照射组出现增殖抑制作用, 因此48 h可能是细胞增殖能力的转折点。基于以上实验结果, 本实验初步筛选1、2 Gy为X线照射CFs的剂量, 照射后48 h为指标检测时间点。

**2.1.2 纤维化相关分子表达** 为了验证X线照射对CFs的促纤维化效应, 用0、1、2、3、4 Gy X射线照射CFs后48 h检测纤维化相关分子(*TGF- $\beta$ 1*和*Col-I*)的表达量, 结果显示: 2 Gy照射后*TGF- $\beta$ 1*的mRNA表达量增加了40.0%, 与对照组相比差异具有显著性( $P<0.01$ ), 其余各组与对照组相比差异无统计学意义; *Col-I*的mRNA表达量分别增加了8.7%(1 Gy组)( $P<0.05$ )、33.5%(2 Gy组)( $P<0.01$ ), 与对照组相比差异有统计学意义, 3 Gy组*Col-I*的mRNA表达量与对照组相比差异无统计学意义; 4 Gy照射后, *Col-I*的mRNA表达量与对照组相比降低了11.9%( $P<0.01$ ) (图2)。以上结果证明了2 Gy X线照射细胞有促纤维化效应, 但当照射剂量增加到4 Gy时, *TGF- $\beta$ 1*和*Col-I*的表达量反而减少, 这可能是因为较高剂量的射线严重损伤细胞功能, 导致纤维化分子表达受抑。

通过细胞增殖活性检测和纤维化分子*Col-I*、*TGF- $\beta$ 1*的mRNA表达检测, 本实验证明2 Gy X线照射CFs后的48 h, 细胞发生了明显的纤维化改变。因此, 将“2 Gy X线照射CFs后48 h”作为本实验提取外

泌体的实验条件。

## 2.2 X线诱导的外泌体(放射性外泌体)的提取及鉴定

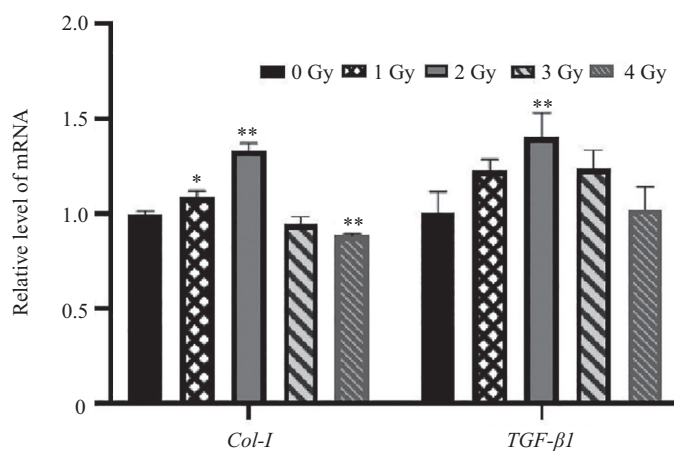
2 Gy X线照射CFs后继续培养48 h, 收集上清, 用超速离心法提取X线诱导的外泌体, 结果显示: 透射电镜下, 负染的大多数外泌体显示为直径50~150 nm的杯状膜泡(图3A); 通过纳米粒子跟踪分析(nanoparticle tracking analysis, NTA)检测X线诱导的外泌体的浓度以及直径分布(图3B), 测得外泌体浓度为 $4.78\times 10^7$ 个/mL, 平均粒径为65.61 nm。通过纳米流式技术检测到提取的外泌体的特征性标志蛋白CD9、CD63和CD81为阳性(图3C)。这些特征与外泌体的特点相符, 故本实验的提取物可被鉴定为外泌体。

## 2.3 X线诱导的外泌体对CFs增殖的影响

将从50 mL受照射细胞培养基中提取的放射性外泌体(X-exo)用100  $\mu$ L PBS重悬, 测得外泌体浓度为 $4.78\times 10^7$ 个/mL, 将含有外泌体的重悬液加入正常CFs培养基中建立共培养体系, 该体系放射性外泌体浓度约为 $1\times 10^5$ 个/mL。分别于24 h、48 h、72 h检测细胞增殖情况, 结果显示: 放射性外泌体与正常CFs共培养24 h后, 与Control组相比, X-exo+CFs组CFs增殖率增加; 48 h后, X-exo+CFs组细胞增殖率与Control组相比差异无统计学意义; 72 h后, 与Control组相比, X-exo+CFs组CFs增殖速率变慢, 降低了7.5%( $P<0.01$ )(图4)。这说明, X线诱导的外泌体对正常CFs有促进增殖的作用, 而随着共培养时间的延长, 这种促增殖作用逐渐减弱, 这可能与培养时间延长时细胞状态变差有关。

## 2.4 黄芪甲苷(AST)干预剂量筛选

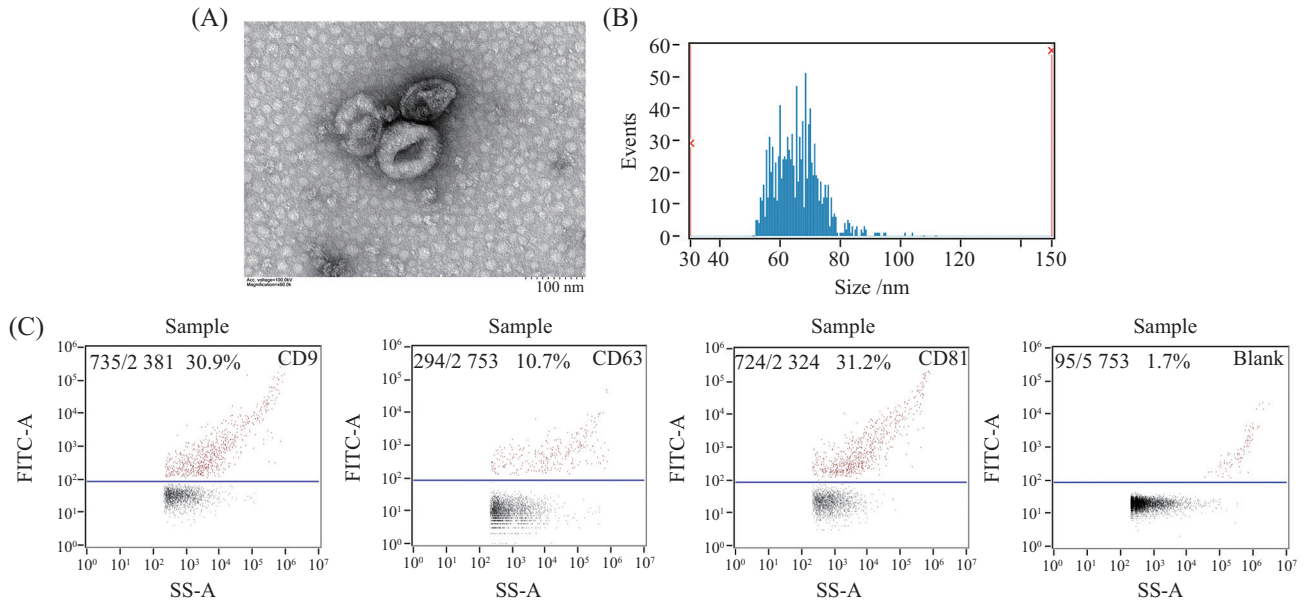
与外泌体共培养前1.5 h用不同浓度(0、2、



\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs 0 Gy.

图2 不同剂量X线照射后心肌纤维细胞中*TGF- $\beta$ 1*和*Col-I* mRNA的表达量变化

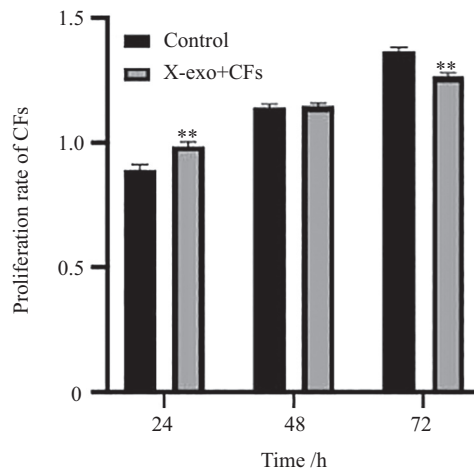
Fig.2 mRNA expression changes of *TGF- $\beta$ 1* and *Col-I* in cardiac fibroblasts after X-ray irradiation at different doses



A: 透射电镜观察2 Gy X射线照射后的外泌体形态; B: NTA检测外泌体粒径和浓度; C: 纳米流式检测外泌体标志蛋白(CD9、CD63、CD81)。  
A: morphology of exosomes observed under transmission electron microscope after 2 Gy X-ray irradiation; B: the particle size and concentration of exosomes detected by NTA; C: exosome marker proteins (CD9, CD63, CD81) detected by nano-flow cytometry.

图3 外泌体鉴定结果

Fig.3 Exosome identification results



\*\* $P < 0.01$  vs Control.

图4 与外泌体共培养的CFs在不同观察时间点的增殖率变化

Fig.4 Proliferation rate changes of CFs co-cultured with exosomes at different observation time points

4、6、8、10  $\mu\text{g/mL}$ )的AST预处理CFs, 实验结果显示24 h和48 h时, 与Control组和0  $\mu\text{g/mL}$  AST组(X-exo+CFs)相比, 6  $\mu\text{g/mL}$ 、8  $\mu\text{g/mL}$ 和10  $\mu\text{g/mL}$  AST预处理组细胞增殖均明显受到抑制: 24 h时, 与Control组相比, 6  $\mu\text{g/mL}$ 、8  $\mu\text{g/mL}$ 和10  $\mu\text{g/mL}$  AST预处理组细胞增殖率分别下降了19.7%、36.2%、51.6% ( $P < 0.01$ ), 与0  $\mu\text{g/mL}$  AST组相比, 增殖率分别下降了27.4%、42.3%、56.2% ( $P < 0.01$ ); 48 h时, 与Control组相比, 增殖率分别下降了26.4%、48.5%、63.8% ( $P < 0.01$ ), 与0  $\mu\text{g/mL}$  AST组相比, 增殖率分别

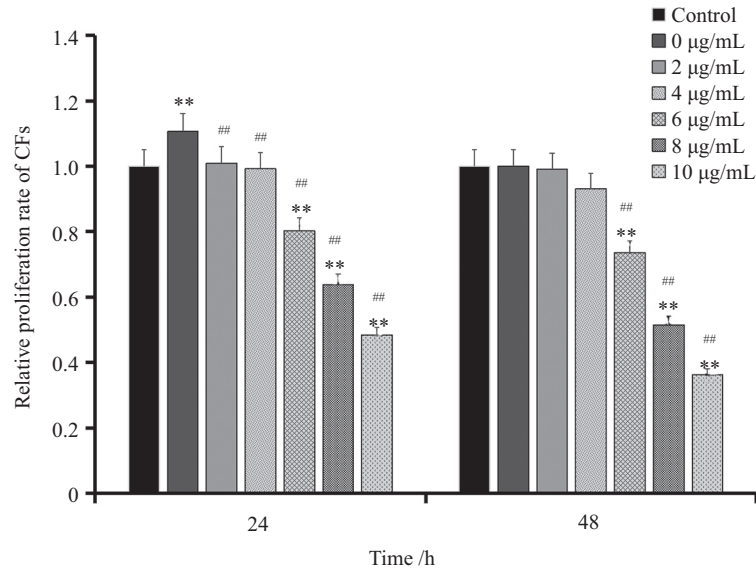
下降了26.4%、48.5%、63.8% ( $P < 0.01$ )。2  $\mu\text{g/mL}$ 和4  $\mu\text{g/mL}$  AST预处理组细胞增殖活性与Control组相比差异无统计学意义, 说明此药物浓度不会明显影响CFs的增殖活性, 而对比0  $\mu\text{g/mL}$  AST(即X-exo+CFs)组, 2  $\mu\text{g/mL}$ 和4  $\mu\text{g/mL}$  AST预处理组的细胞增殖率分别下降了8.8%、10.3% ( $P < 0.01$ ) (图5)。基于此, 2  $\mu\text{g/mL}$ 或4  $\mu\text{g/mL}$ 可作为AST预处理CFs的剂量浓度, 该浓度下的AST能保证CFs的增殖活性不会因药物浓度过高而受到抑制, 为了能更显著地观察到AST对放射性外泌体介导辐射旁效应的干

预作用, 本文后续实验选择的是不抑制细胞增殖活性的较高浓度(4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )进行实验干预。

### 2.5 X线诱导的外泌体对CFs周期的影响及黄芪甲苷的干预

利用流式细胞术检测各组细胞周期(图6): 在24 h时, 与Control组比较, X-CFs组、X-exo+CFs

组处于G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期的细胞比例分别降低了7.3%、12.2%( $P < 0.01$ ), 处于S期的细胞比例分别升高了19.3%、88.5%( $P < 0.01$ ), 处于G<sub>2</sub>/M期的细胞比例分别升高了397.0%、354.1%( $P < 0.01$ ); 与X-exo+CFs组相比, X-exo+AST-CFs组处于G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期的细胞比例升高了11.6%( $P < 0.01$ ), 处于S期、G<sub>2</sub>/M期的细胞比例分别



\*\* $P < 0.01$  vs Control, ## $P < 0.01$  vs 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

图5 不同浓度黄芪甲苷对CFs增殖活性的影响

Fig.5 Effects of different concentrations of astragaloside IV on proliferation activity of CFs

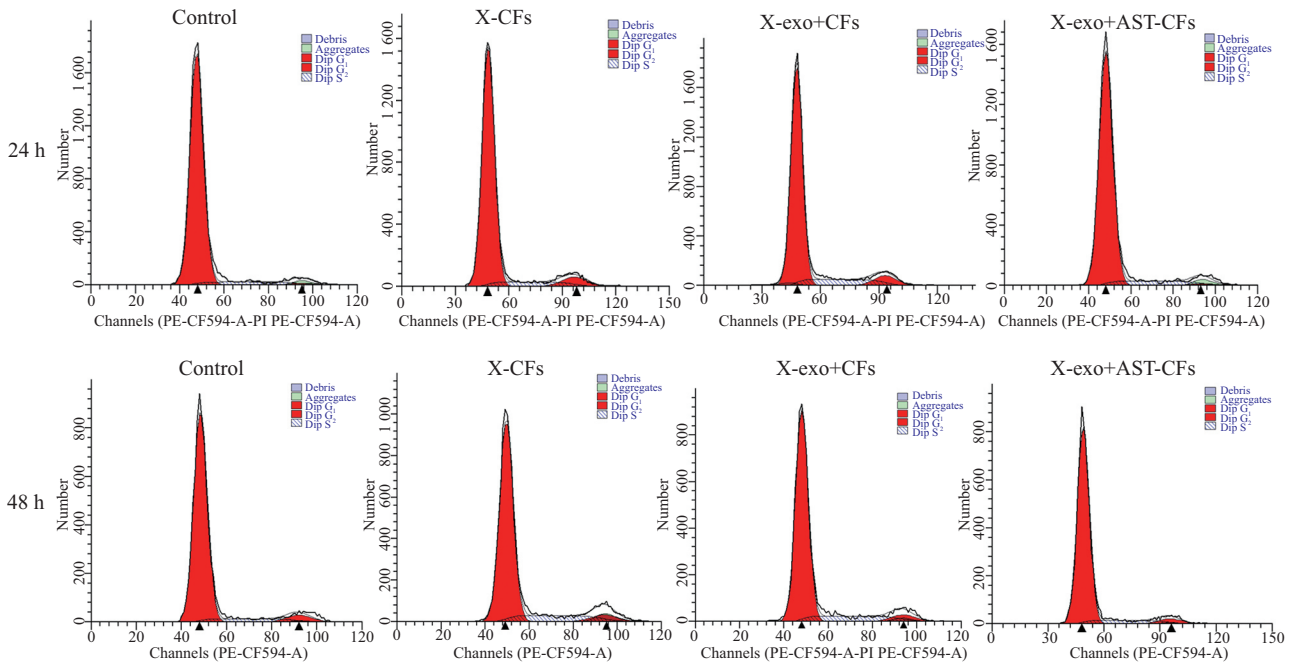


图6 各组CFs细胞周期结果观察

Fig.6 Observation of cell cycle results of CFs in each group

降低了32.0%、77.0%( $P < 0.01$ )。在48 h时,与Control组相比, X-CFs组、 X-exo+CFs组处于G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期的细胞比例分别降低了6.6%、6.0%( $P < 0.01$ ),处于S期的细胞比例分别升高了75.0%、68.2%( $P < 0.01$ ),处于G<sub>2</sub>/M期的细胞比例与Control组相比差异无统计学意义;与X-exo+CFs组相比, X-exo+AST-CFs组处于G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期的细胞比例升高了6.0%( $P < 0.01$ ),S期、G<sub>2</sub>/M期的细胞比例分别降低了32.9%( $P < 0.01$ )、12.2%( $P < 0.05$ )(图6和表3)。结果表明在24 h时, X-CFs组、 X-exo+CFs组大量细胞处于S期、G<sub>2</sub>/M期,AST干预后细胞周期发生改变,与X-exo+CFs组相比,大部分细胞阻滞于G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期,S期、G<sub>2</sub>/M期的细胞比例显著下降;在48 h时, X-CFs组、 X-exo+CFs组细胞S期显著延长,处于G<sub>2</sub>/M期的细胞比例与Control组相比差异无统计学意义。

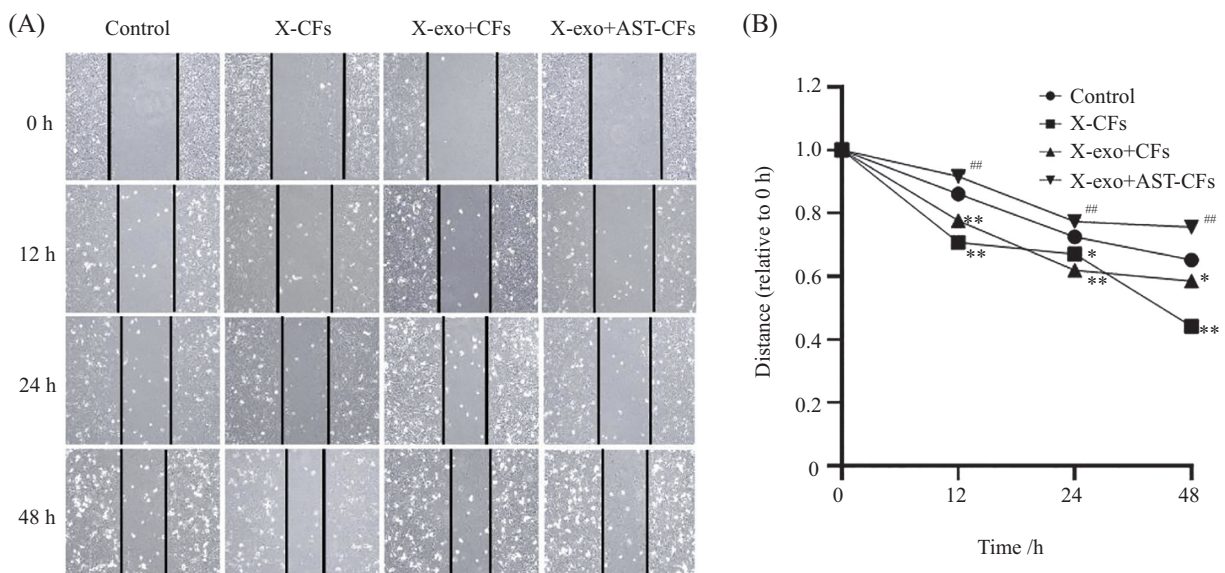
### 2.6 X线诱导的外泌体对CFs迁移能力的影响及黄芪甲苷的干预

细胞划痕后继续培养,用显微镜分别于0、12、24、48 h在相同倍数下拍照。结果表明,在划痕实验12 h以后,Control组细胞划痕区域逐渐变窄,相对于0 h,约迁移了13.92%( $P < 0.01$ ),和Control组相比, X-CFs组与X-exo+CFs组CFs迁移率明显升高,各增加了110.42%和60.85%( $P < 0.01$ );划痕后24 h,与Control组相比, X-CFs组与X-exo+CFs组CFs迁移率分别增加了20.0%( $P < 0.05$ )、15.3%( $P < 0.01$ ),划痕后48 h,两组CFs迁移率分别增加了60.3%( $P < 0.01$ )、19.1%( $P < 0.05$ ); X-exo+AST-CFs组细胞在12~48 h的迁移率均低于X-exo+CFs组,分别降低了62.6%、40.6%、41.2%( $P < 0.01$ )(图7和表4)。X-CFs组和X-exo+CFs组CFs的迁移能力

表3 X线诱导的外泌体对细胞周期的影响  
Table 3 Effect of exosomes induced by X-ray on cell cycle

| 时间/h<br>Time /h | 细胞周期/%<br>Cell cycle /%        | Control    | X-CFs        | X-exo+CFs    | X-exo+AST-CFs           |
|-----------------|--------------------------------|------------|--------------|--------------|-------------------------|
| 24              | G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> | 91.43±0.23 | 84.75±0.03** | 80.31±0.30** | 89.66±0.20 <sup>#</sup> |
|                 | S                              | 7.24±0.03  | 8.64±0.01**  | 13.65±0.23** | 9.28±0.04 <sup>#</sup>  |
|                 | G <sub>2</sub> /M              | 1.33±0.21  | 6.61±0.04**  | 6.04±0.45**  | 1.39±0.19 <sup>#</sup>  |
| 48              | G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> | 87.00±0.10 | 81.24±0.15** | 81.77±0.17** | 86.65±0.21 <sup>#</sup> |
|                 | S                              | 7.63±0.12  | 13.35±0.04** | 12.83±0.06** | 8.61±0.02 <sup>#</sup>  |
|                 | G <sub>2</sub> /M              | 5.37±0.02  | 5.41±0.12    | 5.40±0.18    | 4.74±0.22 <sup>#</sup>  |

\*\* $P < 0.01$  vs Control; <sup>#</sup> $P < 0.05$ , <sup>###</sup> $P < 0.01$  vs X-exo+CFs.



A: 利用划痕实验检测各组CFs迁移能力; B: 各组CFs迁移率随时间变化情况。  
A: scrape assay was used to detect CFs migration ability; B: the mobility of CFs in each group changed over time.

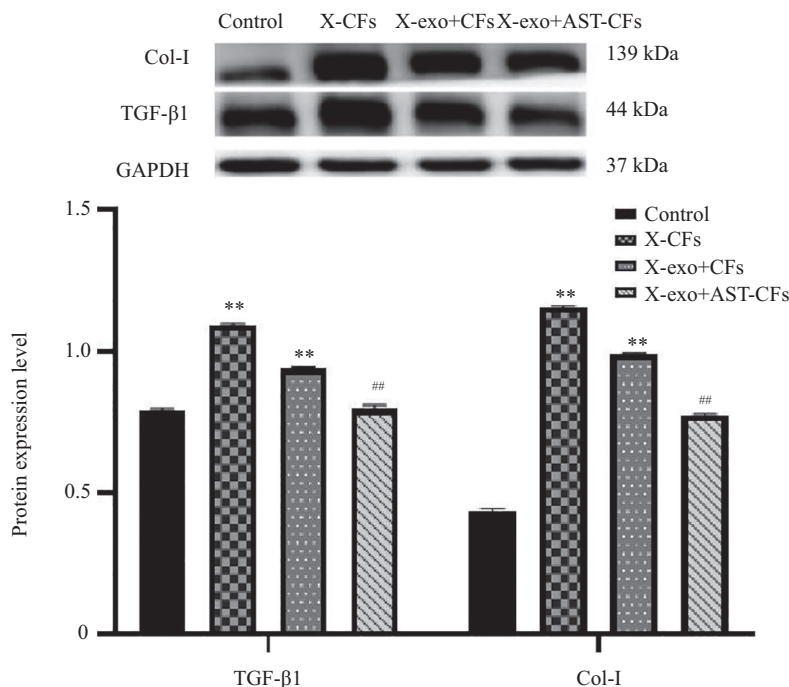
图7 各组CFs的迁移情况  
Fig.7 CFs migration in each group



表4 各处理组对CFs迁移率的影响  
Table 4 Influence of each treatment group on CFs mobility

| 时间/h<br>Time /h | Control    | X-CFs        | X-exo+CFs    | X-exo+AST-CFs |
|-----------------|------------|--------------|--------------|---------------|
| 12              | 13.92±0.69 | 29.29±0.67** | 22.39±1.34** | 8.38±0.64##   |
| 24              | 27.52±0.94 | 33.02±0.27*  | 38.07±0.61** | 22.62±0.50##  |
| 48              | 34.84±1.41 | 55.84±0.26** | 41.51±0.20*  | 24.42±1.00##  |

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs Control; ## $P < 0.01$  vs X-exo+CFs.



\*\* $P < 0.01$  vs Control; ## $P < 0.01$  vs X-exo+CFs.

图8 各组CFs蛋白表达情况  
Fig.8 CFs protein expression in each group

明显增强,这说明X线辐射可能会促进CFs的迁移,而经X线辐射的细胞分泌的外泌体与CFs共培养后,也有同样的促迁移效果,而AST可以抑制这种增强的细胞迁移能力。

### 2.7 X线诱导的外泌体对CFs纤维化相关因子表达的影响及黄芪甲苷的干预

与Control组相比,X-CFs组TGF- $\beta$ 1、Col-I蛋白表达量分别增加了38.1%、167.7% ( $P < 0.01$ ),X-exo+CFs组蛋白表达量分别增加了18.6%、129.7% ( $P < 0.01$ ),说明2 Gy X线能增强CFs的致纤维化能力,经2 Gy X线照射CFs产生的外泌体同样可以引起CFs致纤维化能力增强,这说明X线诱导的外泌体参与电离辐射旁效应引起的促纤维化损伤。与X-exo+CFs组相比,经4  $\mu$ g/mL AST预处理过的CFs与X线诱导的外泌体共培养后TGF- $\beta$ 1、Col-I蛋白表

达量分别降低了15%、21.9% ( $P < 0.01$ ) (图8),这说明AST能防护外泌体介导的辐射旁效应引起的CFs促纤维化损伤。

### 3 讨论

放射性心脏损伤严重影响胸腹部肿瘤放疗患者的健康,并在临床放疗中限制杀死肿瘤细胞所需的放疗剂量和强度<sup>[13]</sup>。放射性心脏损伤尚无有效的干预措施,其主要病理基础是心脏的纤维化病理改变<sup>[2]</sup>,如果能有效阻断其纤维化病变进程,则就有可能改善放射性心脏损伤。

新近研究表明,辐射旁效应可能参与放疗停止后的数月至数年的进展性迟发性损伤效应,射线通过刺激外泌体的分泌,在介导电离辐射旁效应中发挥重要作用<sup>[7]</sup>。细胞在受到射线等外来刺激或应激

时分泌的外泌体通过自分泌、旁分泌、远距离分泌等方式作用于靶细胞发挥生物学效应<sup>[14-15]</sup>。越来越多的研究表明,放射性外泌体参与调节器官纤维化,如:辐射激活的人牙龈成纤维细胞分泌的外泌体参与调节颌骨放射性纤维化骨损伤<sup>[16]</sup>;人脐带间充质干细胞外泌体参与调节放射性肺纤维化等<sup>[17]</sup>。也有证据显示,心肌纤维化的发生可能与外泌体有关<sup>[18]</sup>。本实验通过受照射CFs培养基中的外泌体与正常CFs共培养的方法探讨放射性外泌体是否可以通过电离辐射旁效应促进心肌纤维化损伤的发生发展。

### 3.1 外泌体介导的辐射旁效应对CFs的影响

CFs在正常情况下处于稳定的非活动状态,但在纤维化的发展过程中CFs活化并向肌成纤维细胞转化<sup>[19]</sup>。CFs可合成和分泌TGF- $\beta$ 1,而TGF- $\beta$ 1被认为是纤维化过程中起关键作用的细胞因子之一,TGF- $\beta$ 1可以促进成纤维细胞的增殖及细胞外基质的产生,进而促进纤维化的发展<sup>[20]</sup>。总体来说,放射性心肌纤维化是一个渐进性纤维化过程,主要表现为CFs的活化和过度增殖以及细胞外基质中胶原纤维的过量积聚<sup>[21]</sup>。

**3.1.1 外泌体辐射旁效应对CFs增殖的影响** 已有研究发现,大剂量X线照射会引起细胞损伤进而降低CFs的增殖率,小剂量X线不会引起细胞严重损伤,但却有直接的促纤维化效应<sup>[10]</sup>。本实验进一步证明,小剂量2 Gy X线在照射CFs后6~12 h可以促进细胞的增殖,较高剂量照射则会抑制细胞增殖速率;X线诱导的外泌体与CFs共培养24 h同样可以提高细胞的增殖速率;我们用流式细胞术检测各组细胞周期,发现与Control组比较,X-CFs组、X-exo+CFs组处于G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期的细胞比例降低,S期、G<sub>2</sub>/M期的细胞比例升高( $P < 0.01$ ),这说明X线辐照和X线诱导的外泌体在一定时间内可以促进CFs的增殖,且X线和X-exo可能是通过调节细胞周期分布的机制来实现的。有研究显示,硬膜外纤维化中成纤维细胞大量增殖,流式细胞术检测其细胞周期显示处于S期的细胞比例显著升高<sup>[22]</sup>。还有研究证实,高糖诱导的纤维化中大鼠CFs大量增殖,其处于G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期的细胞比例降低,处于S期、G<sub>2</sub>/M期的细胞比例升高<sup>[23]</sup>。这些研究表明,辐照可能通过调节细胞周期影响细胞的增殖速度,而X线诱导的外泌体可能通过介导辐射旁效应促纤维化效应进而发挥促CFs增殖的作用。

**3.1.2 外泌体辐射旁效应对CFs迁移能力的影响** 研究发现CFs大量存在于间质和血管周围的细胞外基质中,心脏损伤时这些细胞可以迅速动员以应对心脏损伤,CFs迁移到受损的心肌部位,在抗炎和促有丝分裂的微环境作用下转分化为肌成纤维细胞<sup>[24]</sup>,引起纤维化的发生发展。心肌缺氧时的代谢产物也可以诱导CFs的迁移作用<sup>[25]</sup>。本研究细胞划痕实验表明,X-exo+CFs组CFs迁移率和X-CFs组类似,明显升高,进一步表明小剂量X线辐射可增强CFs迁移能力,而X线诱导的外泌体可通过介导电离辐射旁效应达到类似的促CFs迁移效果。本研究在细胞增殖实验中证明小剂量X射线及其诱导的外泌体能促进CFs增殖,而划痕实验涉及细胞增殖和迁移两类事件,且划痕实验检测时间长达48 h,因此划痕缩小可能是细胞迁移和细胞增殖共同作用的结果,而不是单纯由迁移造成的。但实验目的主要是要检测细胞迁移,所以实验中我们不仅使用无血清培养基,也用1  $\mu\text{g/mL}$ 的丝裂霉素抑制细胞分裂,以此尽可能地降低细胞增殖对实验结果的影响。

**3.1.3 外泌体辐射旁效应对纤维化相关因子表达的影响** 促纤维化因子和细胞外基质的增加是纤维化发生发展的病理分子基础<sup>[26-27]</sup>,X线诱导的外泌体与CFs共培养48 h后,可引起促纤维化分子TGF- $\beta$ 1、Col-I表达升高,这从分子病理基础上表明放射性外泌体介导的电离辐射旁效应参与放射性心脏纤维化病变。

综上,外泌体介导的辐射旁效应可以通过促进CFs增殖、迁移、纤维化因子表达等,参与放射性心脏纤维化损伤的发生发展过程。

### 3.2 黄芪甲苷通过调节外泌体介导的辐射旁效应对放射性心脏纤维化的影响

研究显示黄芪具有抗辐射、保心、调节纤维化损伤的作用<sup>[10-12]</sup>。药代动力学研究显示,AST通过鼠尾静脉给药后在大鼠体内的分布较为广泛,但其在各组织中浓度较低且随时间推移呈线性递减趋势,给药20 min后心脏中的AST浓度仅约为肝肺组织中的1/3<sup>[28]</sup>。为了研究中操作方便,AST干预大鼠心脏纤维化的研究多用20~60 mg/kg的AST灌胃给药(连续4周)<sup>[29-30]</sup>,按照上述尾静脉给药的药代动力学特点推测灌胃吸收后到达心脏的药物浓度可能并不是很高,但即便如此AST仍对心脏纤维化有一定的防治效应<sup>[29-30]</sup>,基于此本实验应用筛选出的较低

浓度(4  $\mu\text{g/mL}$ )的AST干预大鼠心肌成纤维细胞理论上符合动物在体实验的实际情况,前人研究与我们的药物剂量接近的是邓鑫梦等<sup>[31]</sup>用5  $\mu\text{g/mL}$ 的AST进行实验干预探讨AST对成纤维细胞功能活性的作用。研究证明,X线诱导的外泌体引起的CFs促纤维化反应会促进CFs的迁移,而经AST预处理后,这种促纤维化引起的CFs迁移能力增强被抑制了,这可能与AST通过抑制TGF- $\beta$ 活性、Smad2/3和NLRP3蛋白表达来抑制细胞迁移有关<sup>[32]</sup>,然而AST对“外泌体辐射旁效应引起的纤维化损伤”是否有保护作用鲜见报道。本实验观察到AST可以抑制放射性外泌体对正常CFs的促增殖效应,与X-exo+CFs组相比,我们用AST预处理可逆转放射性外泌体引起的G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞比例降低。文献表明,边志超等<sup>[33]</sup>的研究与我们上述实验结果一致,他们也观察到AST能通过改变细胞周期使大量成纤维细胞阻滞于G<sub>1</sub>期从而抑制成纤维细胞增殖。同时,本研究还表明AST可抑制外泌体辐射旁效应中的CFs迁移和TGF- $\beta$ 1、Col-I蛋白表达。以上研究证明,AST对放射性外泌体介导辐射旁效应而引起的促纤维化有一定的防护作用。通过文献梳理,发现AST的防护机制可能与包含在外泌体内的miRNAs有关,研究证明外泌体携带的miRNA在心肌纤维化发展过程中起重要作用<sup>[34-36]</sup>。miRNA是一类存在于真核生物中的长约22个核苷酸的内源性非编码小分子RNA<sup>[37]</sup>,通过与特定mRNA的3'端非翻译区结合,引起mRNA的降解或抑制蛋白质的翻译来调控基因表达<sup>[38]</sup>。WEI等<sup>[39]</sup>研究提出,AST可以通过调节miR-135a-TRPM7-TGF- $\beta$ /Smads通路来抑制心脏纤维化。鉴于此,推测AST或可通过调节外泌体miRNA而抑制心脏纤维化病变,发挥RIHD防护效应,本课题组后期将对此进行验证。

### 3.3 小结与展望

本实验证明了X线诱导的外泌体(放射性外泌体)可促进CFs的增殖、增强CFs迁移能力及促纤维化因子高表达,黄芪甲苷对这种放射性外泌体辐射旁效应引起的CFs增殖、迁移、纤维化分子表达能力增强有一定的抑制效应,但其具体机制不清,本课题组后期将重点关注放射性外泌体对CFs转分化激活的影响,并检测X线照射对CFs外泌体miRNA表达谱的影响,然后结合生物信息学及网络药理学探寻黄芪甲苷通过调节放射性外泌体miRNA抑制纤维化病变的可能分子通路,积极开展外泌体辐射旁效

应的在体研究。此外,RIHD的病理变化除了包括以CFs为主要效应细胞的纤维化外,也包括心肌细胞的损伤凋亡,所以在对RIHD进一步的研究中我们也将关注“外泌体辐射旁效应对心肌细胞凋亡的影响”。

### 参考文献 (References)

- [1] 陈犹白,柴密,乌兰哈斯,等.放射性损伤:类型、症状和机制[J].中华损伤与修复杂志(电子版)(CHEN Y B, CHAI M, WU-LAN H S, et al. Radiation-induced injury: classification, manifestation, and mechanism [J]. Chinese Journal of Injury Repair and Wound Healing, Electronic Edition), 2017, 12(3): 203-6.
- [2] DARBY S C, CUTTER D J, BOERMA M, et al. Radiation-related heart disease: current knowledge and future prospects [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2010, 76(3): 656-65.
- [3] BUJAK M, FRANGOIANNIS N G. The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling [J]. Cardiovasc Res, 2007, 74(2): 184-95.
- [4] 杜天幸,李龙,杨继元.放射治疗导致心脏损伤的研究[J].华南国防医学杂志(DU T X, LI L, YANG J Y. Study on heart injury caused by radiation therapy [J]. Military Medical Journal of South China), 2015, 29(3): 246-8.
- [5] 于瑞,王幼平,崔琳,等.心肌纤维化的发病机制及其研究进展[J].中国现代医生(YU R, WANG Y P, CUI L, et al. Pathogenesis and research advancement of myocardial fibrosis [J]. China Modern doctor), 2015, 53(13): 157-60.
- [6] HAZAWA M, TOMIYAMA K, SAOTOME-NAKAMURA A, et al. Radiation increases the cellular uptake of exosomes through CD29/CD81 complex formation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 446(4): 1165-71.
- [7] JELONEK K, WIDLAK P, PIETROWSKA M. The influence of ionizing radiation on exosome composition, secretion and intercellular communication [J]. Protein Pept Lett, 2016, 23(7): 656-63.
- [8] XU S, WANG J, DING N, et al. Exosome-mediated microRNA transfer plays a role in radiation-induced bystander effect [J]. RNA Biol, 2015, 12(12): 1355-63.
- [9] 屈强.黄芪注射液对放射性心脏损伤的保护作用[J].肿瘤基础与临床(QU Q. Protective effect of astragalus injection on radioactive heart injury [J]. Journal of Basic and Clinical Oncology), 2012, 25(4): 356-7.
- [10] 张雪岩.抗辐灵对HPM辐射致心脏损伤的保护作用研究[D].北京:中国人民解放军军事医学科学院,2016.
- [11] 张石在,刘天龙,张铭杰,等.黄芪三萜皂苷通过抑制CVB3诱导的心肌细胞凋亡保护病毒性心肌炎小鼠的心肌损伤[J].中国分子心脏病学杂志(ZHANG S Z, LIU T L, ZHANG M J, et al. Protective effect of AST on viral myocarditis via inhibiting CVB3-induced cardiomyocytes apoptosis [J]. Molecular Cardiology of China), 2019, 19(2): 2856-60.
- [12] 韩佳,徐昌君,黄霖晗,等.黄芪甲苷和黄芪总皂苷对特发性肺纤维化小鼠治疗作用的对比研究[J].辽宁中医杂志(HAN J, XU C J, HUANG M H, et al. Comparative study of therapeutic effects of astragaloside and total saponins of *Astragalus membranaceus* on IPF mice [J]. Liaoning Journal of Traditional Chinese Medicine), 2019, 46(10): 2198-201,2242.
- [13] SPETZ J, MOSLEHI J, SAROSIEK K. Radiation-induced car-



- diovascular toxicity: mechanisms, prevention, and treatment [J]. *Curr Treat Options Cardiovasc Med*, 2018, 20(4): 31.
- [14] XIAO D, BARRY S, KMETZ D, et al. Melanoma cell-derived exosomes promote epithelial-mesenchymal transition in primary melanocytes through paracrine/autocrine signaling in the tumor microenvironment [J]. *Cancer Lett*, 2016, 376(2): 318-27.
- [15] YU Z, ZHAO S, REN L, et al. Pancreatic cancer-derived exosomes promote tumor metastasis and liver pre-metastatic niche formation [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(38): 63461-83.
- [16] ZHUANG X M, ZHOU B. Exosome secreted by human gingival fibroblasts in radiation therapy inhibits osteogenic differentiation of bone mesenchymal stem cells by transferring miR-23a [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 131: 110672.
- [17] 郭冰心. 人脐带间充质干细胞外泌体运输miR-340治疗放射性肺损伤作用机制研究[D]. 新乡: 新乡医学院, 2020.
- [18] KORE R A, WANG X, HENSON J C, et al. Proteomic basis of modulation of postischemic fibrosis by MSC exosomes [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2021, 321(5): R639-R654.
- [19] 朱锦星, 凌望, 程大雁, 等. 中药干预心脏成纤维细胞活化防治心肌纤维化研究进展 [J]. *时珍国医国药* (ZHU J X, LING W, CHENG D Y, et al. Progress of traditional Chinese medicine intervening cardiac fibroblast activation to prevent myocardial fibrosis [J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*), 2018, 29(8): 1971-4.
- [20] ANGELINI A, LI Z, MERICKSKAY M, et al. Regulation of connective tissue growth factor and cardiac fibrosis by an SRF/microRNA-133a axis [J]. *PLoS One*, 2015, 10(10): e139858.
- [21] FURTADO M B, NIM H T, BOYD S E, et al. View from the heart: cardiac fibroblasts in development, scarring and regeneration [J]. *Development*, 2016, 143(3): 387-97.
- [22] 张玉杰, 杨建东, 蔡俊, 等. 低剂量紫杉醇抑制成纤维细胞增殖、迁移及硬膜外纤维化研究 [J]. *中华实验外科杂志* (ZHANG Y J, YANG J D, CAI J, et al. Low-dose paclitaxel inhibited fibroblast proliferation, migration, and epidural fibrosis [J]. *Chinese Journal of Experimental Surgery*), 2021, 38 (7): 1255-9.
- [23] 白杨, 黄婷, 李真真, 等. 变异性浆细胞瘤异位1基因对高糖培养的大鼠心脏成纤维细胞的影响及其机制 [J]. *新乡医学院学报* (BAI Y, HUANG T, LI Z Z, et al. Effect of plasma-cytoma variant translocation 1 gene on cardiac fibroblasts of rats cultured by high glucose and its mechanism [J]. *Journal of Xinxiang Medical University*), 2021, 38 (11): 1017-24.
- [24] CHISTIakov D A, OREKHOV A N, BOBRYshev Y V. The role of cardiac fibroblasts in post-myocardial heart tissue repair [J]. *Exp Mol Pathol*, 2016, 101(2): 231-40.
- [25] 石怀瑞. 缺氧心肌细胞代谢产物对成纤维细胞迁徙的诱导作用 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2013.
- [26] BURSAC N. Cardiac fibroblasts in pressure overload hypertrophy: the enemy within [J]? *J Clin Invest*, 2014, 124(7): 2850-3.
- [27] FURTADO M B, NIM H T, BOYD S E, et al. View from the heart: cardiac fibroblasts in development, scarring and regeneration [J]. *Development*, 2016, 143(3): 387-97.
- [28] 陈宁, 张琪, 杜宇, 等. 黄芪甲苷在大鼠体内的药代动力学和组织分布研究 [J]. *生物加工过程* (CHEN N, ZHANG Q, DU Y, et al. Pharmacokinetics and tissue distribution of astragaloside IV in rats [J]. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*), 2006, 4(3): 67-72.
- [29] 蒋洪强, 张金国. 黄芪甲苷对慢性心力衰竭大鼠心肌纤维化和结缔组织生长因子表达的影响 [J]. *中国循环杂志* (JIANG H Q, ZHANG J G, TAN H Y, et al. Effects of astragaloside IV on myocardial fibrosis and connective tissue growth factor expression in experimental rats with chronic heart failure [J]. *Chinese Circulation Journal*), 2016, 31(2): 165-9.
- [30] 李佳莘, 朱晓雨, 鲁美丽, 等. 黄芪甲苷对大鼠心肌纤维化的影响 [J]. *中药药理与临床* (LI J S, ZHU X Y, LU M L, et al. Influence of astragaloside IV on myocardial fibrosis in rats [J]. *Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica*), 2016, 32(5): 42-5.
- [31] 邓鑫梦, 戴良成, 罗晓春, 等. 黄芪甲苷调节成纤维细胞功能活性的作用研究 [J]. *广东药科大学学报* (DENG X M, DAI L C, LUO X C, et al. Effect of astragaloside IV on the functional activities of fibroblasts *in vitro* [J]. *Journal of Guangdong Pharmaceutical University*), 2019, 35(3): 390-4.
- [32] HOU Y, ZHEN Y, XUE Q, et al. Astragaloside IV attenuates TGF-beta-mediated epithelial-mesenchymal transition of pulmonary fibrosis via suppressing NLRP3 expression *in vitro* [J]. *Pharmazie*, 2021, 76(2): 97-102.
- [33] 边志超, 徐志山, 林时秀, 等. 黄芪甲苷对人增生性瘢痕成纤维细胞生长的影响 [J]. *中国美容整形外科杂志* (BIAN Z C, XU Z S, LIN S X, et al. Effect of astragaloside on the growth of human hypertrophic scar fibroblasts [J]. *Chin J Aesth Plast Surg*), 2019, 30(7): 389-92.
- [34] LANG A, GREther-BECK S, SINGH M, et al. MicroRNA-15b regulates mitochondrial ROS production and the senescence-associated secretory phenotype through sirtuin 4/SIRT4 [J]. *Ageing*, 2016, 8(3): 484-505.
- [35] VICZENCZOVA C, SZEIFFOVA B B, EGAN B T, et al. Myocardial connexin-43 and PKC signalling are involved in adaptation of the heart to irradiation-induced injury: implication of miR-1 and miR-21 [J]. *Gen Physiol Biophys*, 2016, 35(2): 215-22.
- [36] SLEZAK J, KURA B, RAVINGEROVA T, et al. Mechanisms of cardiac radiation injury and potential preventive approaches [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2015, 93(9): 737-53.
- [37] BARTEL D P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions [J]. *Cell*, 2009, 136(2): 215-33.
- [38] LENKALA D, GAMAZON E R, LACROIX B, et al. MicroRNA biogenesis and cellular proliferation [J]. *Transl Res*, 2015, 166(2): 145-51.
- [39] WEI Y, WU Y, FENG K, et al. Astragaloside IV inhibits cardiac fibrosis via miR-135a-TRPM7-TGF-beta/Smads pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 249: 112404.