论著·基础医学

S1P/S1PR2信号轴通过阻断自噬流促进心肌成纤维细胞活化与胶原分泌而恢复自噬流可逆转纤维化

刘 佳,玛依热·阿吉,谢耀慧,王旭敏 新疆医科大学第六附属医院心血管内科,新疆乌鲁木齐

[**摘要**] **目的** 心肌成纤维细胞(cardiac fibroblasts,CFs)异常活化及胶原过度沉积是心肌纤维化发生发展的关键病理环节。本研究旨在探讨1-磷酸鞘氨醇(sphingosine-1-phosphate,S1P)/1-磷酸鞘氨醇受体2(sphingosine-1-phosphate receptor 2,S1PR2)信号轴对CFs胶原分泌及纤维化表型的调控作用,并从自噬流角度阐明其分子机制。**方法** 选取健康清洁级SD大鼠乳鼠3只(出生1~3 d,雌雄不限,体质量5~8 g),采用差速贴壁法分离培养大鼠原代CFs,通过波形蛋白(Vimentin)免疫荧光染色进行纯度鉴定。①探讨S1P/S1PR2信号轴对CFs活化与胶原分泌的影响,将CFs分为Control组、S1P组、S1P+S1PR2特异性拮抗剂(JTE-013)组、S1P+小干扰RNA阴性对照(small interfering RNA negative control,si-NC)组及S1P+敲低S1PR2小干扰RNA(small interfering RNA targeting S1PR2,si-S1PR2)组,采用CCK-8法检测细胞活性,划痕实验检测细胞迁移能力,ELISA法检测细胞培养上清液中Ⅰ型胶原(collagen type Ⅰ,Col Ⅰ)及Ⅲ型胶原(collagen type Ⅲ,Col Ⅲ)含量,免疫荧光染色及Western blotting检测细胞中α-平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle actin,α-SMA)、S1PR2及鞘氨醇激酶1(sphingosine kinase 1,SphK1)的表达。②探究自噬流在S1P/S1PR2信号轴中的调控作用,将CFs分为Control组、S1P组、S1P+JTE-013组、S1P+自噬诱导剂雷帕霉素(rapamycin,Rapa)组和S1P+自噬流阻断剂巴弗洛霉素A1(bafilomycin A1,Baf A1)组,采用mRFP-GFP-LC3双荧光腺病毒转染观察自噬流变化,Western blotting检测自噬相关蛋白[微管相关蛋白1轻链3(microtubule-associated protein 1 light chain 3,LC3)-Ⅱ/LC3-Ⅰ、p62、组织蛋白酶D(cathepsin D,Cath D)]及α-SMA的表达水平。**结果** 原代培养的大鼠CFs生长状态良好且形态典型,经Vimentin免疫荧光鉴定阳性率达95%以上,纯度符合实验要求。①与Control组比较,S1P组CFs的活性与迁移能力显著增强,Col Ⅰ、Col Ⅲ分泌量显著增加,α-SMA荧光染色强度及α-SMA、S1PR2、SphK1蛋白表达显著上调(P<0.05)。与S1P组比较,S1P+JTE-013组CFs的活性与迁移能力显著降低,Col Ⅰ、Col Ⅲ分泌量显著减少,α-SMA荧光染色强度及α-SMA、S1PR2、SphK1蛋白表达显著下调(P<0.05)。与S1P+si-NC组比较,S1P+si-S1PR2组CFs的活性与迁移能力显著降低,Col Ⅰ、Col Ⅲ分泌量显著减少,α-SMA荧光染色强度及α-SMA、S1PR2、SphK1蛋白表达显著下调(P<0.05)。②与Control组比较,S1P组细胞内黄色荧光斑点大量积聚,LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ比值及p62蛋白表达显著上调,而Cath D蛋白表达显著下调(P<0.05)。与S1P组比较,S1P+JTE-013组和S1P+Rapa组红色荧光斑点数显著增加,黄色斑点数显著减少,p62蛋白表达显著下调,Cath D蛋白表达显著上调(P<0.05)。此外,与S1P组比较,S1P+JTE-013组中LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ比值显著降低,S1P+Rapa组中LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ比值显著升高(P<0.05);而与S1P组比较,S1P+Baf A1组自噬流进一步受阻,表现为红色斑点数显著减少、黄色斑点数显著增加,LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ比值显著升高,p62和α-SMA蛋白表达显著上调,Cath D蛋白表达显著下调,且Col Ⅰ、Col Ⅲ分泌量显著增加(P<0.05)。**结论** S1P/S1PR2信号轴通过阻断自噬流降解,促进心肌成纤维细胞活化与胶原分泌,而恢复自噬流可有效逆转S1P诱导的CFs纤维化表型。

[**基金项目**] 新疆维吾尔自治区自然科学基金面上项目(2021D01C457,2024D01C146)

[**通信作者**] 王旭敏,E-mail:wangxuminsparky@163.com

2097-0927/Copyright © 2026, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

引用格式:刘佳,玛依热·阿吉,谢耀慧,等. S1P/S1PR2信号轴通过阻断自噬流促进心肌成纤维细胞活化与胶原分泌而恢复自噬流可逆转纤维化[J]. 陆军军医大学学报,2026,48(20):2908-2919. DOI:10.16016/j.2097-0927.202608001.

Citation:Liu J,Aji M Y R,Xie Y H,*et al*. S1P/S1PR2 axis promotes cardiac fibroblast activation and collagen secretion by blocking autophagic flux, while restoring autophagic flux reverses fibrosis[J]. J Army Med Univ,2026,48(20):2908-2919. DOI:10.16016/j.2097-0927.202608001.

［关键词］ 1-磷酸鞘氨醇;1-磷酸鞘氨醇受体2;心肌纤维化;成纤维细胞;自噬
［中图法分类号］ R322.11;R329.26;R363.21 ［文献标志码］ A

S1P/S1PR2 axis promotes cardiac fibroblast activation and collagen secretion by blocking autophagic flux, while restoring autophagic flux reverses fibrosis

Liu Jia, Aji Mayire, Xie Yaohui, Wang Xumin Department of Cardiovascular Medicine, Sixth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, China

［**Abstract**］ **Objective** Abnormal activation of cardiac fibroblasts (CFs) and excessive collagen deposition are critical pathological events in the development of myocardial fibrosis. This study aimed to investigate the regulatory role of the sphingosine-1-phosphate (S1P)/sphingosine-1-phosphate receptor 2 (S1PR2) signaling axis in collagen secretion and the fibrotic phenotype of CFs, and to elucidate the molecular mechanisms from the perspective of autophagic flux. **Methods** Three healthy clean-grade neonatal SD rats (aged 1 to 3 d, weighing 5 to 8 g, either sex) were selected, primary rat CFs were isolated and cultured using differential adhesion method, and their purity was confirmed by Vimentin immunofluorescence staining. ① To investigate the effects of the S1P/S1PR2 signaling axis on CF activation and collagen secretion, CFs were divided into Control group, S1P group, S1P+S1PR2 specific antagonist (JTE-013) group, S1P+small interfering RNA negative control transfection (si-NC) group, and S1P+S1PR2 knockdown (si-S1PR2) group. Cell viability and migration were detected using CCK-8 assay and scratch wound assay, and the contents of type Ⅰ collagen (Col Ⅰ) and type Ⅲ collagen (Col Ⅲ) in cell culture supernatant was measured with ELISA. The expression of α-smooth muscle actin (α-SMA), S1PR2, and sphingosine kinase 1 (SphK1) was detected by immunofluorescence staining and Western blotting. ② To explore the regulatory role of autophagic flux in the S1P/S1PR2 signaling axis, CFs were divided into Control group, S1P group, S1P + JTE-013 group, S1P + autophagy inducer rapamycin (Rapa) group, and S1P + bafilomycin A1 (Baf A1, autophagic flux inhibitor) group. Changes in autophagic flux were observed using mRFP-GFP-LC3 dual-fluorescence adenovirus transfection, and the expression levels of autophagy-related proteins [microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ), p62, and cathepsin D (Cath D)] and α-SMA were detected by Western blotting. **Results** Primary cultured rat CFs exhibited robust growth with typical morphology, and the positive rate of Vimentin immunofluorescence identification was over 95%, meeting the experimental purity requirement. ① Compared with the Control group, the S1P group showed significantly enhanced CF proliferation and migration abilities, increased Col Ⅰ and Col Ⅲ secretion, enhanced α-SMA fluorescence staining intensity, and upregulated protein expression levels of α-SMA, S1PR2, and SphK1 ($P<0.05$). Compared with the S1P group, CF viability and migration capacity were significantly decreased, Col Ⅰ and Col Ⅲ secretion was significantly reduced, and α-SMA fluorescence intensity along with α-SMA, S1PR2, and SphK1 protein expression were significantly decreased in the S1P+JTE-013 group ($P<0.05$); similarly, compared with the S1P+si-NC group, all the aforementioned parameters were significantly reduced in the S1P+si-S1PR2 group ($P<0.05$). ② Compared with the Control group, the S1P group exhibited significant accumulation of yellow fluorescent puncta, higher LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ ratio, and upregulated p62 expression, while downregulated Cath D expression ($P<0.05$). Compared with the S1P group, the S1P+JTE-013 and S1P+Rapa groups showed significantly increased number of red fluorescent puncta, decreased number of yellow puncta, downregulated p62 and upregulated Cath D expression ($P<0.05$). Additionally, compared with the S1P group, the LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ ratio was significantly decreased in the S1P+JTE-013 group, whereas increased in the S1P+Rapa group ($P<0.05$). In contrast, compared with the S1P group, the S1P+Baf A1 group showed further blocked

autophagic flux, manifested as significantly reduced number of red puncta and increased number of yellow puncta, increased LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ ratio, upregulated expression of p62 and α-SMA while downregulated Cath D, and enhanced secretion of Col Ⅰ and Col Ⅲ ($P<0.05$). **Conclusion** The S1P/S1PR2 signaling axis promotes cardiac fibroblast activation and collagen secretion by blocking autophagic flux degradation, and restoring autophagic flux can effectively reverse the S1P-induced fibrotic phenotype in CFs.

[**Key words**] sphingosine-1-phosphate; sphingosine-1-phosphate receptor 2; myocardial fibrosis; fibroblasts; autophagy

Supported by the General Project of Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region (2021D01C457, 2024D01C146). Corresponding author: Wang Xumin, E-mail: wangxuminsparky@163.com

心肌纤维化是包括高血压、心肌梗死及心力衰竭在内的多种终末期心血管疾病共同的典型病理改变。其主要特征为心肌成纤维细胞(cardiac fibroblasts, CFs)的过度活化和增殖,以及由表型转化诱导的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)过度沉积[1]。一旦心肌细胞受损,CFs被激活并转化为肌成纤维细胞,通过分泌Ⅰ型胶原(type Ⅰ collagen, Col Ⅰ)、Ⅲ型胶原(type Ⅲ collagen, Col Ⅲ)等ECM成分,诱发间质胶原纤维堆积及肥厚性瘢痕形成,进而导致心肌顺应性下降及心室舒缩功能障碍,是诱发恶性心律失常甚至心源性猝死的重要诱因[2-3]。因此,深入探究调控CFs活化的关键分子机制,对于防治心肌纤维化及改善心脏预后具有重要意义。

1-磷酸鞘氨醇(sphingosine-1-phosphate, S1P)作为一种具有高度生物活性的鞘脂类信号分子,通过与其细胞膜上的G蛋白偶联受体家族成员——1-磷酸鞘氨醇受体(sphingosine-1-phosphate receptors, S1PRs)结合,在心血管系统的发育及生理病理演变中发挥关键作用[4]。既往研究发现,在压力超负荷或心肌缺血等病理状态下,心肌内鞘氨醇激酶1(sphingosine kinase 1, SphK1)活性显著增强,导致内源性S1P水平升高[5-6]。尽管S1P的促纤维化作用已得到广泛证实,但其受体亚型在不同组织中的效应具有复杂多样性[7]。1-磷酸鞘氨醇受体2(sphingosine-1-phosphate receptor 2, S1PR2)作为S1P的主要受体亚型之一,与细胞增殖及迁移密切相关[8]。然而,S1P/S1PR2信号轴是否参与CFs活化及其介导心肌纤维化的具体分子机制,目前尚不完全明确。

自噬是真核细胞内通过溶酶体降解受损细胞器及长寿命蛋白的进化保守过程,对维持心肌细胞稳态至关重要。自噬流则是一个涵盖自噬体形成、转运及与溶酶体融合降解的完整动态过程[9]。近年来研究显示,自噬功能失调与纤维化疾病的发生发展密切相关[10-11]。适度自噬有助于清除受损蛋白从而减轻纤维化,而自噬流的受阻——即自噬体无法顺利转化为自噬溶酶体,会导致自噬底物p62及促纤维化因子在胞内蓄积,进而诱导CFs活化并加剧胶原分泌,进一步促进心肌纤维化[12]。目前尚缺乏直接证据表明S1P/S1PR2信号轴是否通过干扰自噬流这一关键环节来调控CFs的表型转化。本研究通过体外培养原代大鼠CFs,利用S1PR2拮抗剂JTE-013及siRNA干扰技术,观察S1P/S1PR2信号轴对CFs活性、迁移及胶原分泌的影响,并探讨其是否通过阻断自噬流来诱导纤维化表型。本研究旨在揭示心肌纤维化发生的分子新机制,并为开发抗纤维化药物提供潜在靶点与实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与主要试剂

1.1.1 实验动物 选取健康清洁级SD大鼠乳鼠3只,出生1~3 d,雌雄不限,体质量5~8 g,由新疆医科大学实验动物中心提供,实验动物生产许可证号:SCXK(新)2024-0015。母鼠及其乳鼠饲养于新疆医科大学实验动物中心SPF级屏障系统实验室的独立送风笼具内,实验室内维持环境温度(23±2)℃,相对湿度45%~55%,光/暗周期为12 h光照/12 h黑暗循环(08:00开灯,20:00关灯)。笼内铺设高温高压灭菌垫料并定期更换,母鼠自由进食及饮水。本研究所有动物实验程序严格遵照国家《实验动物福利伦理审查指南》,并通过新疆医科大学实验动物伦理委员会审核批准(IACUC-JT-20250527-58)。实验期间,由专人每天于09:00、17:00监测动物健康状态,观察母鼠哺乳与护仔行为、乳鼠腹部乳斑充盈度、皮肤色泽及活动力度等。本实验预设的人道终点为:乳鼠出现严重脱水、体温无法维持、对物理刺激完全丧失反应或出现严重濒死征象。实验全过程中未发生母鼠弃仔、异常感染或意外死亡等不良事件。为最大程度减少动物疼痛、恐惧与应激,取材前严格控制母婴分离时间(<15 min),操作环境保持避光与低噪音;参照《AVMA实验动物安乐死指南》,鉴于新生乳鼠(≤3 d)神经发

育特点与保持心肌组织活性的需求,乳鼠经冰上浅低温镇痛诱导后,由实验技术人员迅速实施断头处死,立即在无菌冰冷PBS中剥离心脏、分离原代CFs。

1.1.2 主要试剂 S1P、S1PR2特异性拮抗剂JTE-013、自噬诱导剂雷帕霉素(rapamycin,Rapa)、自噬流阻断剂巴弗洛霉素A1(bafilomycin A1,Baf A1)均购自美国Sigma-Aldrich公司;细胞培养相关试剂包括DMEM/F12培养基、胎牛血清及Opti-MEM培养液均购自美国Gibco公司;细胞转染实验Lipofectamine 3000试剂购自美国Thermo Fisher Scientific公司。mRFP-GFP-LC3双荧光自噬指示腺病毒购自上海汉恒生物科技有限公司;敲低S1PR2小干扰RNA(small interfering RNA targeting S1PR2,si-S1PR2)及小干扰RNA阴性对照(small interfering RNA negative control,si-NC)由广州锐博生物科技有限公司设计合成;大鼠Col Ⅰ与Col Ⅲ ELISA检测试剂盒购自美国R&D Systems公司;CCK-8试剂盒、二喹啉甲酸(bicinchoninic acid,BCA)蛋白测定试剂盒、放射免疫沉淀法(radioimmunoprecipitation assay,RIPA)细胞裂解液以及含4',6-二氨基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole,DAPI)的抗荧光淬灭封片剂均购自上海碧云天生物技术有限公司;增强型化学发光(enhanced chemiluminescence,ECL)检测试剂购自上海雅酶生物医药科技有限公司。兔抗大鼠S1PR2、SphK1、波形蛋白(Vimentin)、α-平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle actin,α-SMA)、p62、组织蛋白酶D(cathepsin D,Cath D)单克隆抗体及GAPDH内参抗体均购自美国Abcam公司;兔抗大鼠微管相关蛋白1轻链3(microtubule-associated protein 1 light chain 3,LC3)(Ⅱ/Ⅰ)单克隆抗体购自美国CST公司;兔抗大鼠Col Ⅰ和Col Ⅲ单克隆抗体购自美国Proteintech公司;辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase,HRP)标记羊抗兔免疫球蛋白G(immunoglobulin G,IgG)二抗及Alexa Fluor 594标记荧光二抗均由北京中杉金桥生物技术有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 大鼠CFs分离 选取出生1~3 d的健康SD大鼠,经冰上浅低温镇痛诱导后迅速断头处死,置于75%乙醇中浸泡消毒,在无菌条件下迅速开胸摘取心脏,将心室组织剪碎至约1 mm^3大小,置于离心管中,采用含0.125%胰酶和0.1%Ⅱ型胶原酶的混合消化液对组织进行消化处理,并置于37 ℃恒温水浴摇床中进行充分消化。收集不同时间段产生的细胞悬液,加入含10%胎牛血清的DMEM/F12完全培养基进行终止消化处理。所得细胞悬液经200目细胞筛网过滤,于4 ℃下以1 000 r/min离心5 min,弃去上清液后重新悬浮细胞,调整细胞浓度并接种至培养瓶中进行后续培养。采用差速贴壁法分离出CFs,于接种90 min后弃去未贴壁细胞,加入新鲜完全培养基,置于37 ℃、5%CO_2培养箱中培养,置于倒置显微镜下观察细胞贴壁、生长状态及形态学变化。待细胞长至80%~90%融合时进行传代,采用第2~3代细胞进行后续实验。

1.2.2 免疫荧光染色观察细胞内Vimentin与α-SMA的表达 将CFs接种于置有爬片的24孔板中,密度为3×10^4个/孔,待细胞贴壁后,滴入4%多聚甲醛固定15 min后,采用0.5%Triton X-100进行细胞膜通透处理20 min,加入5%BSA于室温条件下封闭1 h以降低非特异性结合。加入Vimentin(1∶200)或α-SMA(1∶200)一抗,于4 ℃中孵育过夜。次日加入相应荧光标记二抗,在避光条件下孵育1 h,随后滴加DAPI进行细胞核染色。染色完成后,置于荧光显微镜下随机选取5个视野进行图像采集与分析,计算Vimentin阳性细胞占比,确保纯度达95%以上,即鉴定为CFs[13]。并采用ImageJ软件分析α-SMA的荧光强度。

1.2.3 实验分组与处理 当CFs培养至50%~70%融合度时进行siRNA转染,将si-S1PR2或si-NC与Lipofectamine 3000转染试剂分别稀释于Opti-MEM无血清培养液中,室温孵育5 min后混合,继续孵育15 min形成转染复合物,加入孔板中,转染6 h后,更换为含10%FBS的完全培养基培养48 h,给药干预前,细胞经无血清培养基饥饿处理12 h。

实验一将细胞分为:①Control组,常规培养;②S1P组,加入终浓度10 μmol/L S1P处理24 h;③S1P+JTE-013组,先加入终浓度10 μmol/L JTE-013预处理1 h,再加入终浓度10 μmol/L S1P处理24 h;④S1P+si-NC组,细胞转染si-NC 48 h后,加入终浓度10 μmol/L S1P处理24 h;⑤S1P+si-S1PR2组,细胞转染si-S1PR2 48 h后,加入终浓度10 μmol/L S1P处理24 h。

为进一步明确S1PR2介导上述效应的下游机制,基于实验一结果设立实验二,并将细胞分为:①Control组,常规培养;②S1P组,加入终浓度10 μmol/L S1P处理24 h;③S1P+JTE-013组,先加入终浓度10 μmol/L JTE-013预处理1 h,再加入终浓度10 μmol/L S1P孵育24 h;④S1P+Rapa组,先加入终浓度100 nmol/L的自噬诱导剂Rapa预处理2 h,再加入终浓度10 μmol/L S1P孵育24 h;⑤S1P+Baf A1组,先加入终浓度100 nmol/L的自噬流阻断剂Baf A1预处理1 h,再加入终浓度10 μmol/L S1P孵育24 h。

1.2.4 Western blotting检测SphK1、S1PR2、α-SMA、p62、Cath D蛋白表达及LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ比值 收集

各实验组处理后的CFs,加入含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的RIPA裂解液,于冰上充分裂解30 min。裂解完成后,将样品于4 ℃下以12 000 r/min离心15 min,收集上清液以获得总蛋白提取物。采用BCA蛋白定量法检测蛋白浓度,并取等量蛋白样品30 μg进行SDS-PAGE电泳分离,随后转移至PVDF膜。经5%脱脂奶粉室温封闭2 h后,分别加入SphK1、S1PR2、α-SMA、LC3、p62、Cath D及GAPDH一抗(1∶1 000),置于4 ℃下孵育过夜。次日使用TBST充分洗涤膜片,加入HRP标记的相应二抗,于室温避光孵育1 h,采用ECL试剂进行信号检测,并通过化学发光成像系统采集蛋白条带图像。利用ImageJ软件测定目的蛋白条带与GAPDH内参条带的灰度值,并计算二者比值进行半定量分析。

1.2.5 CCK-8检测细胞活性 将CFs按照5×10^{3}个/孔的接种密度均匀铺于96孔培养板中,待细胞贴壁后按照实验设计进行相应处理。处理24 h后,向各检测孔中加入10 μL CCK-8检测试剂,并置于细胞培养箱内避光孵育2 h后,使用酶标仪测量各孔在450 nm波长处的光密度[*OD*(450)]值。

1.2.6 划痕实验检测CFs迁移能力 在6孔板背部垂直划平行线,将CFs接种于板内,待细胞融合达100%后,使用200 μL枪头垂直于划线方向,在细胞层表面制造划痕。PBS冲洗以除去悬浮细胞,加入无血清培养基及相应药物处理,分别于划痕后0 h和24 h在倒置显微镜下拍照,采用ImageJ软件测量并计算划痕愈合率。

1.2.7 ELISA法检测细胞培养上清液中Col Ⅰ和Col Ⅲ含量 收集各处理后的细胞培养上清液,于4 ℃下以3 000 r/min离心10 min以除去细胞碎片,按照大鼠Col Ⅰ和Col Ⅲ的ELISA试剂盒说明书要求,依次加入标准品和稀释后的待测样本,经过温育、洗涤、加酶标试剂、显色及终止反应等步骤后,测定对应孔的*OD*值,并根据标准曲线计算Col Ⅰ和Col Ⅲ的浓度。

1.2.8 mRFP-GFP-LC3双荧光腺病毒检测自噬流 将CFs以4×10^{4}个/孔的密度接种于24孔板的爬片上,待细胞生长至60%~80%融合时,加入mRFP-GFP-LC3腺病毒感染24 h,MOI设置为50,更换新鲜培养基并给予相应的药物分组处理。处理结束后,用4%多聚甲醛固定细胞,于荧光显微镜下观察,GFP(绿色荧光)对酸性环境敏感,mRFP(红色荧光)在溶酶体中较稳定;胞内呈现黄色斑点(绿红合并)代表自噬体积聚,自噬流受阻;仅呈现红色斑点则代表自噬溶酶体形成,自噬流通畅。计数细胞中两种色点的数量并进行统计分析。

1.3 统计学分析

统计分析采用SPSS 26.0及GraphPad Prism 9.0软件完成。所有实验至少独立重复3次,所得数据采用$\bar{x}\pm s$表示。对于多组间数据比较,采用单因素方差分析(one-way ANOVA)进行总体差异检验,组间两两比较采用LSD-*t*检验。$P<0.05$表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 原代大鼠CFs成功分离培养且Vimentin呈高纯度阳性表达

通过倒置显微镜观察到,CFs贴壁生长良好,呈典型的梭形或多角形,细胞边界清晰;荧光显微镜下,CFs可见强烈的红色荧光表达,呈特征性的丝状网结构,胞核呈DAPI蓝色荧光,Vimentin染色阳性率超过95%(图1)。

2.2 S1P诱导CFs中S1PR2与SphK1表达升高且靶向干预可抑制其表达

Western blotting结果显示,使用S1P刺激后,S1P组CFs中S1PR2和SphK1的蛋白相对表达量均较Control组显著上调($P<0.05$)。而与S1P组比较,S1P+

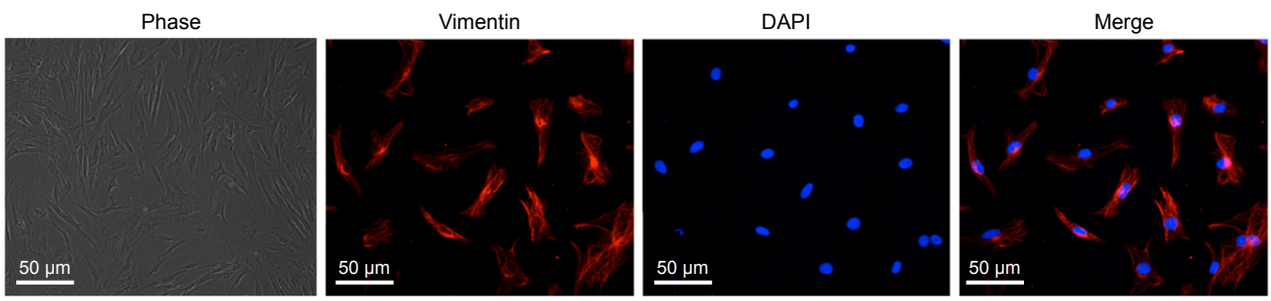
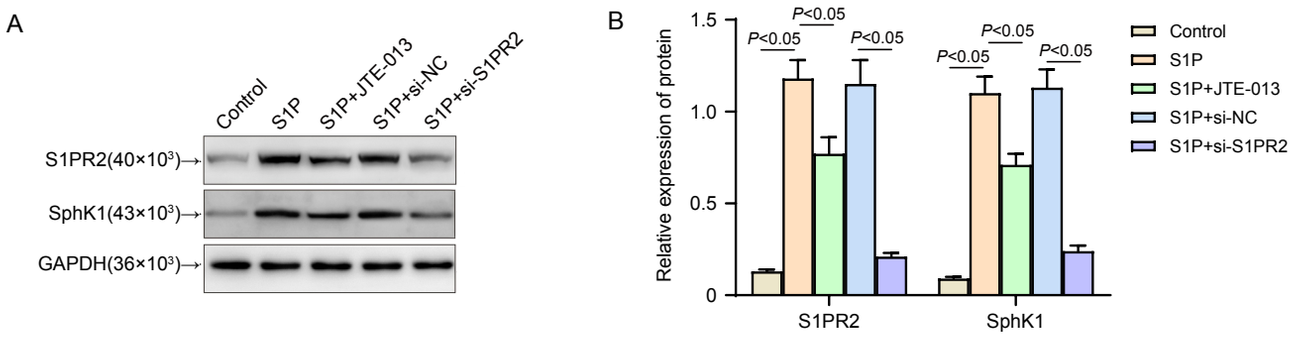


图1 CFs形态及Vimentin免疫荧光染色结果

Figure 1 Morphology of cardiac fibroblasts (CFs) and results of Vimentin immunofluorescence staining



A: Representative images of Western blotting bands of S1PR2 and SphK1 in CFs; B: Statistical analysis of S1PR2 and SphK1 protein expression in CFs

图2 各组CFs中S1PR2和SphK1的蛋白表达比较

Figure 2 Comparison of S1PR2 and SphK1 expression in CFs across groups

JTE-013组中S1PR2和SphK1蛋白相对表达量均显著下调(P<0.05)。而S1P+si-NC组中以上2种蛋白表达较S1P组均未发生显著变化;而与S1P+si-NC组比较,S1P+si-S1PR2组中S1PR2和SphK1的蛋白相对表达量均显著下调(P<0.05,图2)。

2.3 阻断S1P/S1PR2信号轴抑制S1P诱导的CFs活性与迁移能力

CCK-8法检测结果显示,与Control组比较,S1P组CFs活性显著升高(P<0.05)。与S1P组比较,S1P+JTE-013组中CFs活性均显著降低(P<0.05),S1P+si-NC组细胞活性未发生显著变化。而与S1P+si-NC组比较,S1P+si-S1PR2组中细胞活性显著降低(P<0.05,图3)。

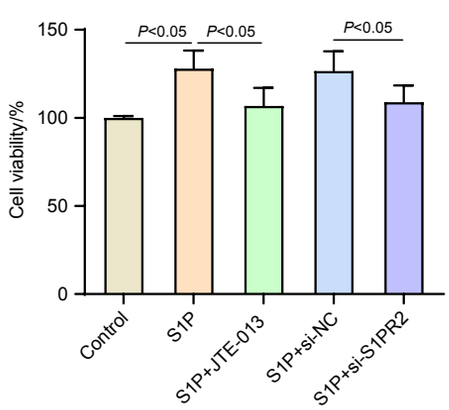


图3 各组CFs活性比较

Figure 3 Comparison of CFs viability across groups

划痕实验分析结果显示,S1P组划痕愈合率较Control组显著升高(P<0.05)。与S1P组比较,S1P+JTE-013组划痕愈合率显著降低(P<0.05),S1P+si-NC组划痕愈合率未发生显著变化。与S1P+si-NC组比较,S1P+si-S1PR2组中划痕愈合率显著降低(P<0.05,图4)。

2.4 阻断S1P/S1PR2信号轴抑制CFs向肌成纤维细胞表型转化并减少胶原分泌

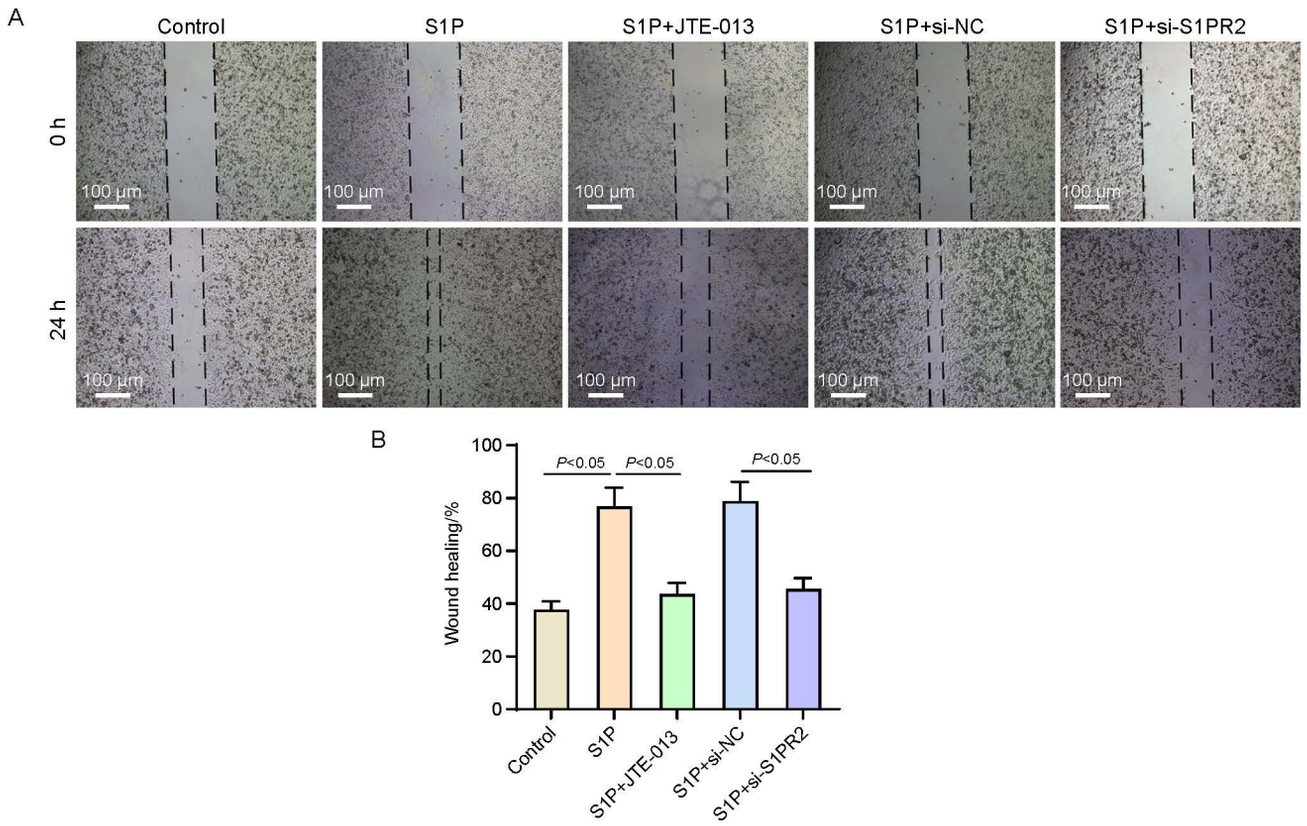
ELISA测定结果显示,S1P组CFs中Col Ⅰ和Col Ⅲ分泌较Control组显著增加(P<0.05)。与S1P组比较,S1P+JTE-013组中Col Ⅰ和Col Ⅲ分泌显著减少(P<0.05),S1P+si-NC组中Col Ⅰ和Col Ⅲ分泌未发生显著变化。与S1P+si-NC组比较,S1P+si-S1PR2组中Col Ⅰ和Col Ⅲ分泌显著降低(P<0.05,图5)。

对各组CFs中α-SMA进行免疫荧光染色发现,与Control组比较,S1P组CFs中α-SMA的荧光染色强度显著升高(P<0.05)。与S1P组比较,S1P+JTE-013组中α-SMA的荧光染色强度显著下降(P<0.05),S1P+si-NC组中α-SMA的荧光染色强度未发生显著变化。与S1P+si-NC组比较,S1P+si-S1PR2组中α-SMA的荧光染色强度显著下降(P<0.05,图6)。

Western blotting结果显示,S1P刺激可显著促进CFs中α-SMA蛋白表达,S1P组α-SMA相对表达量较Control组显著升高(P<0.05)。采用S1PR2药理学抑制剂JTE-013干预后,S1P+JTE-013组α-SMA表达水平较S1P组显著降低(P<0.05),同时,S1P+si-NC组与S1P组的α-SMA蛋白表达量之间无显著差异。而敲低S1PR2后,S1P+si-S1PR2组α-SMA蛋白表达量较S1P+si-NC组显著下降(P<0.05,图7)。

2.5 S1P/S1PR2信号轴抑制CFs自噬溶酶体降解并导致自噬流受阻

免疫荧光染色及定量分析结果显示,与Control组比较,S1P组细胞内红色斑点数和黄色斑点数显著增加(P<0.05),黄色斑点聚集,说明自噬流发生受阻。



A: Scratch images of CFs in each group at 0 and 24 h; B: Analysis results of scratch healing rates of CFs

图4 各组CFs划痕愈合情况比较

Figure 4 Comparison of wound scratch assay results in CFs across groups

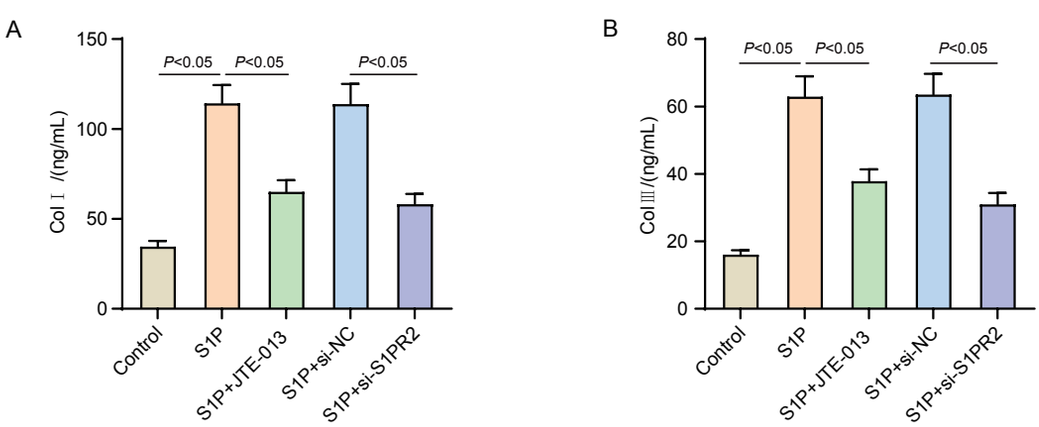


图5 各组CFs中Col Ⅰ(A)和Col Ⅲ(B)分泌水平比较

Figure 5 Comparison of Col Ⅰ (A) and Col Ⅲ (B) secretion levels in CFs across groups

与S1P组比较,S1P+JTE-013组细胞内红色斑点数显著增加,黄色斑点数量显著减少(P<0.05),说明促进了自噬体向自噬溶酶体的转化;同时,S1P+Rapa组细胞内红色斑点数显著增加,黄色斑点数显著降低(P<0.05),说明Rapa强效诱导了自噬流。与S1P组比较,S1P+Baf A1组内红色斑点数显著减少,而黄色斑点数显著增加(P<0.05,图8),黄色斑点大量积聚,说明自噬流受阻。

2.6 恢复自噬流可减轻S1P诱导的CFs向肌成纤维细胞表型转化与胶原分泌

与Control组比较,S1P组CFs中LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ比值显著升高,且p62和α-SMA蛋白相对表达量显著上

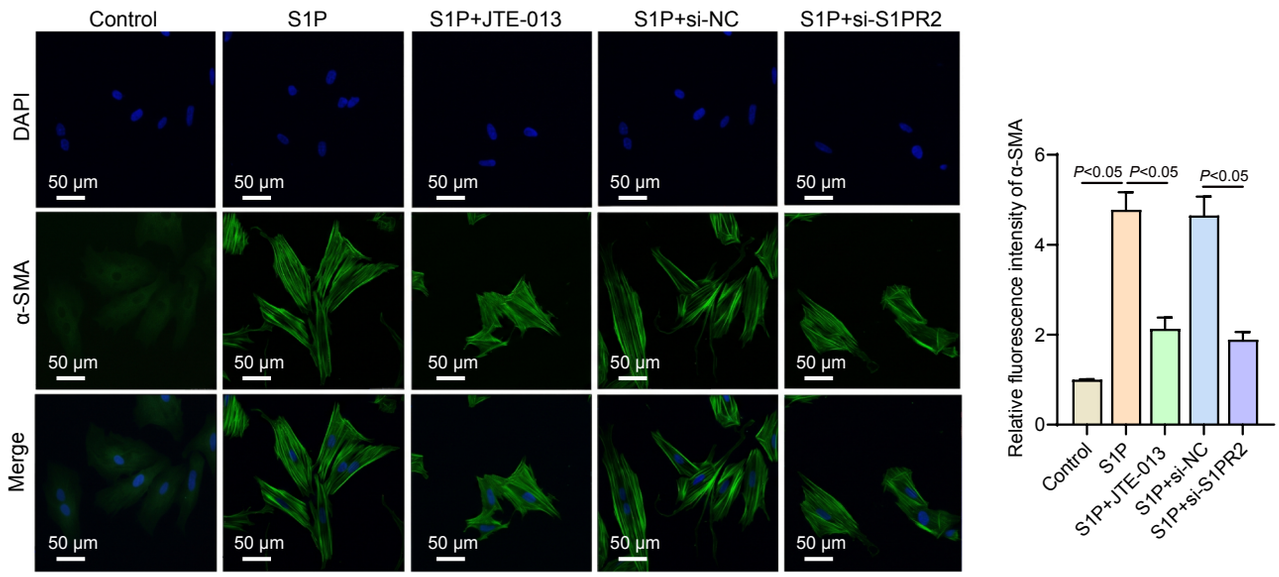
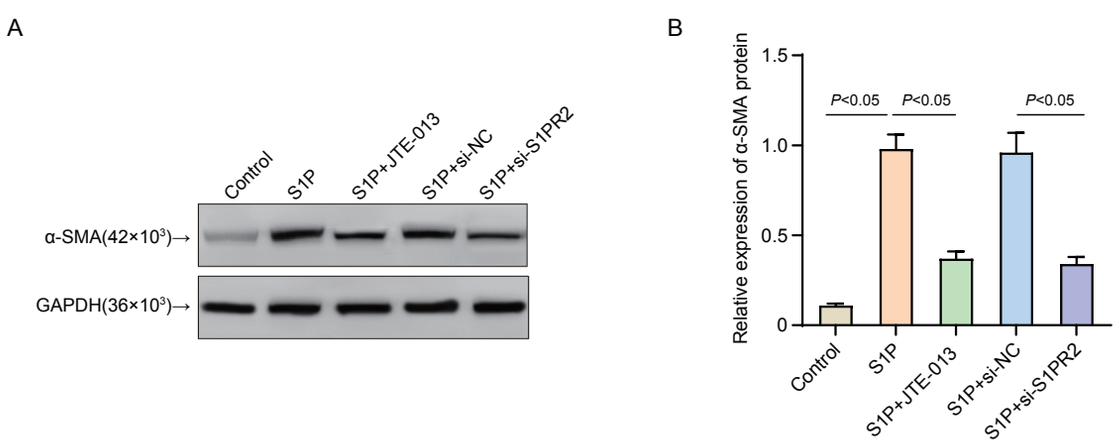


图6 各组CFs中α-SMA免疫荧光染色结果及分析

Figure 6 Results and analysis of α-SMA immunofluorescence staining in CFs from each group



A: Representative image of Western blotting bands of α-SMA in CFs; B: Statistical analysis of α-SMA protein expression in CFs

图7 各组CFs中α-SMA蛋白表达比较

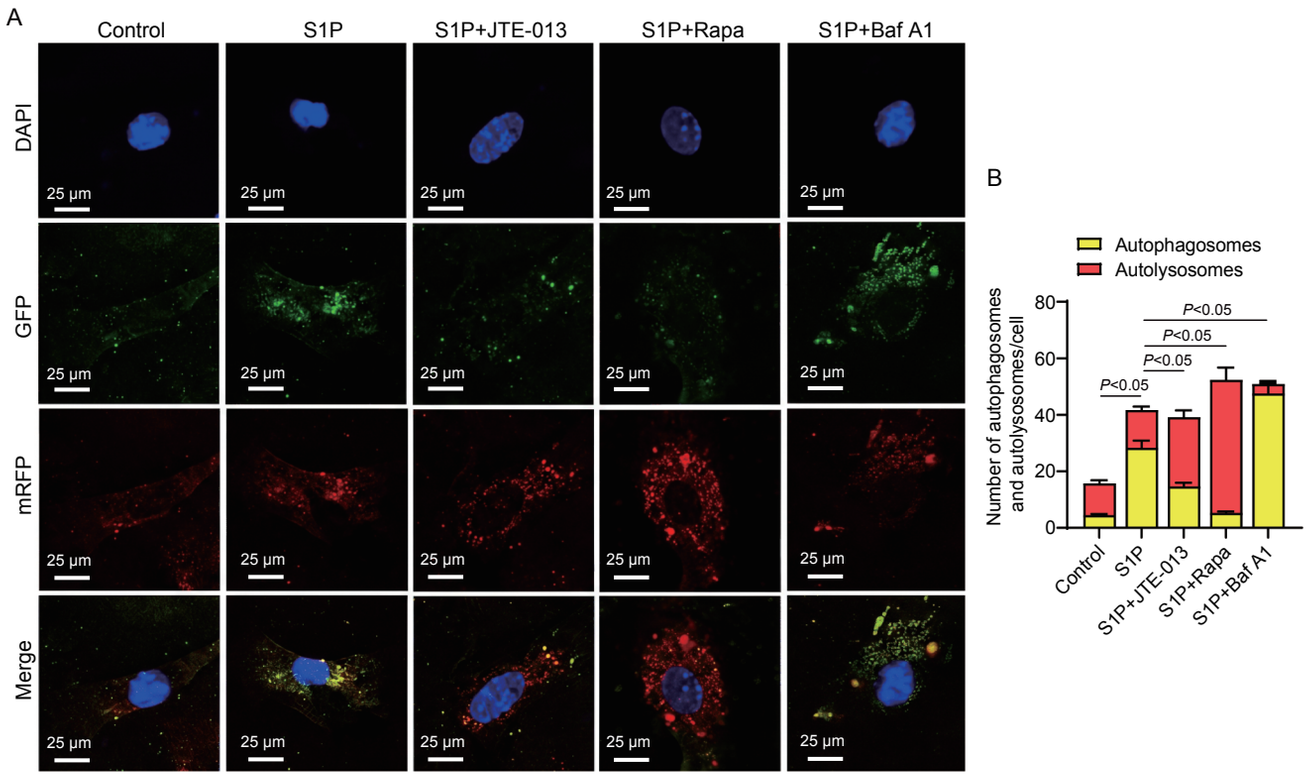
Figure 7 Comparison of α-SMA protein expression in CFs across groups

调,Cath D蛋白相对表达量显著下调(P<0.05)。与S1P组比较,S1P+JTE-013组中LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ比值显著降低(P<0.05),S1P+Rapa组中LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ比值显著升高(P<0.05);同时,与S1P组比较,S1P+JTE-013组和S1P+Rapa组中p62和α-SMA蛋白相对表达量显著下调,Cath D蛋白相对表达量显著上调(P<0.05)。与S1P组比较,S1P+Baf A1组中LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ比值显著升高,p62和α-SMA蛋白相对表达量显著上调,且Cath D蛋白相对表达量显著下调(P<0.05,图9)。

与Control组比较,S1P组CFs中Col Ⅰ和Col Ⅲ分泌显著升高(P<0.05)。与S1P组比较,S1P+JTE-013组中Col Ⅰ和Col Ⅲ分泌显著降低(P<0.05),S1P+Rapa组中Col Ⅰ和Col Ⅲ分泌也显著降低(P<0.05)。与S1P组比较,S1P+Baf A1组中Col Ⅰ和Col Ⅲ分泌显著升高(P<0.05,图10)。

3 讨论

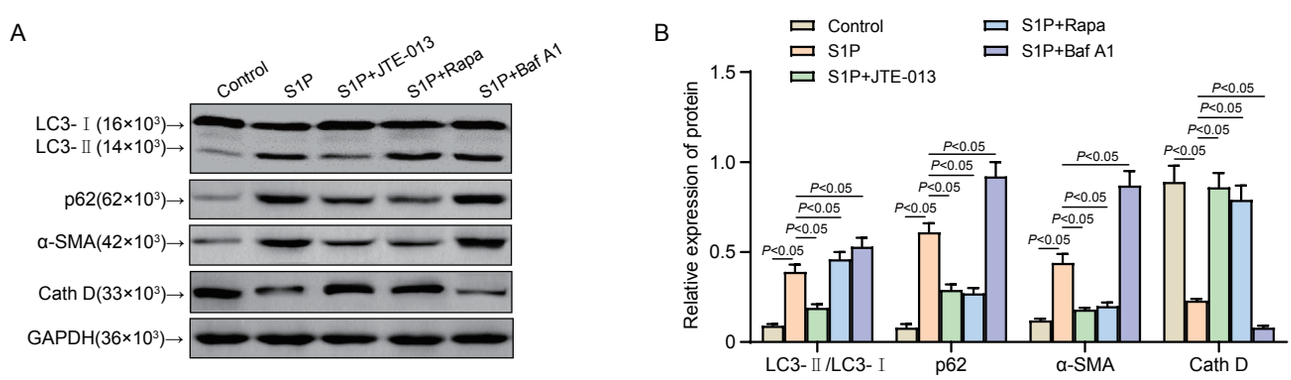
研究表明,许多刺激因素可以启动心肌纤维化,例如心肌损伤、炎症以及压力或容量负荷过重等[14]。心肌组织在病理性重构过程中,其力学性能发生显著改变,具体表现为僵硬度上升、顺应性下降以及收缩功能减退,上述改变共同构成了心功能恶化的结构基



A: Representative images of mRFP-GFP-LC3 staining; B: Quantification of intracellular red and yellow puncta

图8 各组CFs的mRFP-GFP-LC3染色结果及分析

Figure 8 mRFP-GFP-LC3 staining results and analysis for CFs in each group



A: Representative images of Western blotting bands of LC3-Ⅰ, LC3-Ⅱ, p62, α-SMA, and Cath D in CFs; B: Statistical analysis of LC3-Ⅰ, LC3-Ⅱ, p62, α-SMA, and Cath D protein expression in CFs

图9 各组心肌成纤维细胞中自噬相关蛋白及α-SMA蛋白表达比较

Figure 9 Comparison of the expression of autophagy-related proteins and α-SMA protein in cardiac fibroblasts across groups

础,并进一步促进收缩期或舒张期心衰的发生发展。在这一病理演进中,CFs是关键的靶细胞,对心脏纤维化具有重要影响。生理条件下,静息态CFs主要负责维持ECM稳态、心脏结构和心脏电生理传导。然而,在心肌缺血性损伤和心肌梗死等情况下,CFs被激活并转化为肌成纤维细胞,过度分泌ECM导致纤维瘢痕形成[15]。因此,阐明调控CFs活化的分子通路并寻找有效的干预靶点,对于延缓心衰进程具有重要的临床价值。本研究通过分离培养原代CFs,证实了S1P/S1PR2信号轴对CFs纤维化表型的调控作用,并揭示了自噬流阻断在这一过程中的介导机制。

3.1 S1P/S1PR2信号轴是驱动CFs活化与胶原分泌的关键轴

S1P作为一种强效的生物活性脂质,由SphK1催

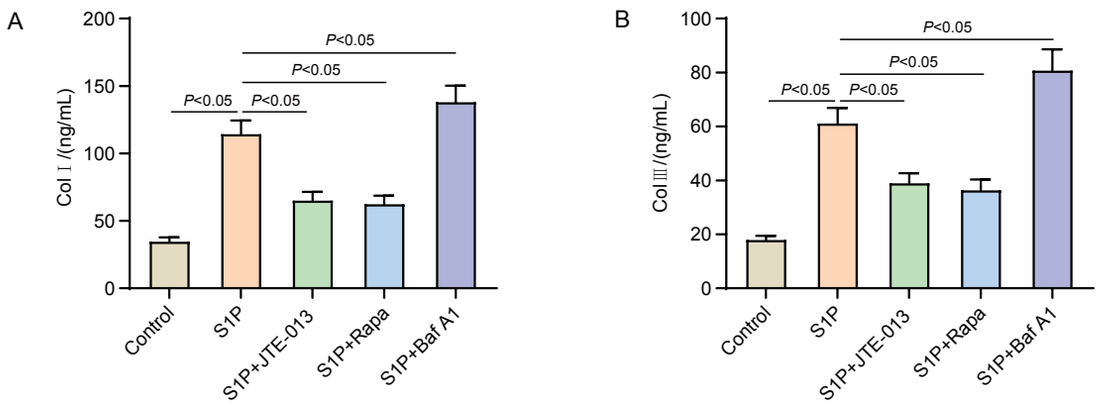


图10　各组心肌成纤维细胞中Col Ⅰ(A)和Col Ⅲ(B)分泌水平比较

Figure 10　Comparison of Col Ⅰ (A) and Col Ⅲ (B) secretion levels in cardiac fibroblasts across groups

化鞘氨醇磷酸化生成,通过5种G蛋白偶联受体发挥调节作用。其促纤维化效应在胰腺、肝及肾脏等多种组织中已被广泛报道[16]。既往研究发现,S1P通过与其受体S1PR2结合后激活Hippo-YAP通路,进而上调肝星状细胞中胶原蛋白和α-SMA的表达,促进肝纤维化[17]。此外,S1P/S1PR2信号轴能够通过促进炎症反应与ECM沉积,促进肺纤维化[18]。α-SMA作为肌成纤维细胞转化的标志物,其表达水平显著反映了CFs的活化程度;而Col Ⅰ和Col Ⅲ作为ECM的主要结构组分,其异常沉积是纤维化的直接结果[19]。JTE-013是一种高度选择性的S1PR2竞争性拮抗剂,通过特异性地结合并占据受体胞外区的活性位点,从而有效阻断内源性配体S1P与受体的结合[20]。本研究显示,S1P刺激显著上调了CFs中S1PR2和SphK1的表达,并诱导α-SMA及Col Ⅰ、Col Ⅲ的大量合成与分泌;而应用JTE-013或siRNA沉默S1PR2后,CFs的活性和迁移能力降低,α-SMA蛋白表达及Col Ⅰ、Col Ⅲ分泌量受到显著抑制。这表明S1PR2是介导S1P促纤维化效应的关键亚型,阻断该信号轴可有效逆转CFs活化。

3.2　S1P/S1PR2轴通过特异性阻断自噬流降解环节诱导CFs纤维化表型

自噬作为一种进化保守的胞内稳态维持机制,是细胞应对各类病理性应激的关键适应性反应。越来越多的证据表明,自噬功能紊乱与包括特发性肺纤维化、肝纤维化及肾纤维化在内的多种组织纤维化疾病密切相关[21-22]。在心肌组织中,自噬流的通畅性对于维持CFs的静息状态至关重要。当自噬通量受损时,细胞内促纤维化相关信号分子的降解受到抑制,进而诱导CFs的表型活化与ECM的异常沉积。既往研究证实,通过药物或基因手段恢复自噬功能可显著减轻心肌纤维化程度[23]。例如,抑制去泛素化酶OTUD4可通过增加自噬通量并抑制心肌细胞凋亡来抵御缺血再灌注损伤,从而发挥抗纤维化作用[24];此外,液泡膜蛋白1能够增强自噬通路,抑制CFs向肌成纤维细胞的转化[25]。LC3B是目前研究最为广泛的自噬标志蛋白。当自噬体形成时,胞质形式的LC3B-Ⅰ通过脂化作用转化为LC3B-Ⅱ并结合在自噬体膜上,因此LC3-II/LC3-I的比值常被用于评估自噬体的生成[26]。然而,自噬体的积累未必意味着自噬活性的升高,也可能是下游降解受阻所致。此时,作为自噬底物及降解指标的p62显得尤为重要,其通常结合泛素化蛋白进入自噬溶酶体进行降解。若p62出现病理性堆积,则明确提示自噬降解途径受损[27]。此外,Cath D作为溶酶体内的关键天冬氨酸蛋白酶,其表达水平直接反映了溶酶体的水解效能[28]。本研究结果显示,在S1P处理后,CFs内LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ比值显著升高,同时伴随自噬底物p62的显著堆积及Cath D蛋白表达的下调,结合mRFP-GFP-LC3双荧光探针显示的黄色斑点大量积聚,这有力地表明S1P/S1PR2信号轴主要特异性作用于自噬体与溶酶体的融合及溶酶体的降解环节,导致自噬溶酶体降解途径受阻,使得促纤维化相关蛋白无法通过溶酶体途径有效降解,从而促进了CFs向活化态肌成纤维细胞表型的转换。

3.3　恢复自噬流通畅性可靶向逆转S1P/S1PR2轴介导的CFs活化

为进一步验证自噬流受阻与CFs向促纤维化表型转化之间的关系,本研究采用了功能恢复与功能模拟的双向研究策略。Rapa作为经典的mTOR抑制剂,可有效启动自噬并增强自噬流灌注[29]。Baf A1通过抑制V-ATPase阻断溶酶体酸化及融合,是公认的自噬流

降解环节的阻断剂[30]。实验结果显示,应用Rapa强化自噬流后,能够显著拮抗S1P诱导的α-SMA蛋白表达及Col Ⅰ、Col Ⅲ分泌,说明恢复自噬流的通畅性可抑制CFs的纤维化转化。相反,应用Baf A1在S1P基础上模拟阻断自噬流后期降解环节后,CFs的纤维表型进一步加重,α-SMA蛋白表达及Col Ⅰ、Col Ⅲ分泌量较S1P单独处理进一步显著增加。这一对比实验充分证明,自噬溶酶体降解环节受阻是S1P/S1PR2轴发挥作用的关键下游事件,也是驱动CFs活化及心肌纤维化发生的关键因素。

然而,本研究仍存在一定的局限性:①实验主要基于离体原代CFs进行,尚未在动物体内模型中验证该信号轴的具体作用;②对于S1PR2干扰自噬体与溶酶体融合及溶酶体功能的精确分子靶点仍需进一步探究。未来的研究将进一步结合体内动物模型,深入解析S1P/S1PR2调控自噬体-溶酶体融合的关键衔接分子,以期全面阐明该信号网络在心肌纤维化中的病理调控机制。

综上所述,本研究表明S1P/S1PR2信号轴通过阻断自噬流,造成胞内稳态失衡,进而促进大鼠CFs活化与胶原分泌。这一发现阐明了S1P调控心肌纤维化的新分子机制,为开发靶向S1P/S1PR2信号轴或恢复自噬流的抗纤维化药物提供了实验依据。

利益冲突 本文所有作者声明不存在利益冲突

参考文献:

[1] Chimenti I, Pagano F, Cozzolino C, *et al*. The role of cardiac fibroblast heterogeneity in myocardial fibrosis and its novel therapeutic potential[J]. Int J Mol Sci, 2025, 26(12): 5882. DOI:10.3390/ijms26125882.

[2] Song M, Choi D B, Im J S, *et al*. Modeling acute myocardial infarction and cardiac fibrosis using human induced pluripotent stem cell-derived multi-cellular heart organoids [J]. Cell Death Dis, 2024, 15(5): 308. DOI: 10.1038/s41419-024-06703-9.

[3] Ghazal R, Wang M, Liu D, *et al*. Cardiac fibrosis in the multi-omics era: implications for heart failure[J]. Circ Res, 2025, 136(7): 773-802. DOI:10.1161/CIRCRESAHA. 124. 325402.

[4] Benkhoff M, Polzin A. Lipoprotection in cardiovascular diseases [J]. Pharmacol Ther, 2024, 264: 108747. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2024.108747.

[5] Wang N, Li J Y, Zeng B, *et al*. Sphingosine-1-phosphate signaling in cardiovascular diseases[J]. Biomolecules, 2023, 13(5): 818. DOI:10.3390/biom13050818.

[6] Zhao M, Bian R T, Xu X G, *et al*. Sphingolipid metabolism and signalling pathways in heart failure: from molecular mechanism to therapeutic potential [J]. J Inflamm Res, 2025, 18: 5477-5498. DOI:10.2147/JIR.S515757.

[7] Donati C, Cencetti F, Bernacchioni C, *et al*. Role of sphingosine 1-phosphate signalling in tissue fibrosis[J]. Cell Signal, 2021, 78: 109861. DOI: 10.1016/j. cellsig. 2020. 109861.

[8] Ouyang J, Long H J, Chen S H, *et al*. S1PR2 mediates smooth muscle cell proliferation and endothelial cell permeability *via* Akt/mTOR and RhoA/ROCK1 in atherosclerosis[J]. J Biochem Mol Toxicol, 2025, 39(6): e70351. DOI:10.1002/jbt.70351.

[9] Sawai T, Nakamura Y, Arawaka S. Secretory autophagy mediates lysosomal and autophagic degradation for α-synuclein proteostasis[J]. J Biol Chem, 2025, 301(8): 110474. DOI:10.1016/j.jbc.2025.110474.

[10] 余辉, 王先敏, 藏登, 等. 基于m6A激活自噬探讨糖肾灌肠方对糖尿病肾病肾纤维化的改善作用[J]. 中成药, 2025, 47(10): 3473-3479. DOI: 10.3969/j. issn. 1001-1528.2025.10.045.
Yu H, Wang X M, Zang D, *et al*. Based on M6A-activated autophagy, the improvement effect of Tangshen *Enema* recipe on renal fibrosis in diabetic nephropathy was discussed[J]. Chin Tradit Pat Med, 2025, 47(10): 3473-3479. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.10.045.

[11] Assi M, Wang R H, Kawaler E A, *et al*. Extracellular matrix sensing regulates intratumoral heterogeneity of autophagic flux[J]. Cell, 2026, 189(6): 1731-1747.e25. DOI:10.1016/j.cell.2025.12.053.

[12] Li Y Y, Meng F L, Zhou S Y, *et al*. CDX1 improves nicotine induced cardiac fibroblasts activation and cardiomyocyte hypertrophy by alleviating autophagic flux impairment through modulation of LAPTM4B[J]. Sci Rep, 2025, 15(1): 9985. DOI:10.1038/s41598-025-94160-5.

[13] Song C P, Wang S W, Guo X L, *et al*. Myocardial bridging in obstructive hypertrophic cardiomyopathy: a risk factor for myocardial fibrosis[J]. BMC Med, 2024, 22(1): 86. DOI: 10.1186/s12916-024-03301-6.

[14] Feng Y T, Chen Z S, Gao Y H, *et al*. CKAP4 promotes atrial fibrosis and enhances atrial fibrillation vulnerability *via* WNT/β-catenin activation [J]. Circ Arrhythm Electrophysiol, 2025, 18(11): e014217. DOI: 10.1161/CIRCEP.125.014217.

[15] Kleinbongard P, Senyo S E, Lindsey M L, *et al*. Cardiac fibroblasts: answering the call[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2024, 327(3): H681-H686. DOI: 10.1152/ajpheart.00478.2024.

[16] El-Maadawy W H, Amer M, Mostafa A, *et al*. Ticagrelor attenuates cholestasis-induced liver fibrosis by inhibiting S1PR2-dependent Akt/ERK signaling, NLRP3 inflammasome activation[J]. Int Immunopharmacol, 2026, 168: 115834. DOI:10.1016/j.intimp.2025.115834.

[17] Park S, Kim J, Yang S, *et al*. Exogenous S1P *via* S1P receptor 2 induces CTGF expression through Src-RhoA-ROCK-YAP pathway in hepatic stellate cells[J]. Mol Biol Rep, 2024, 51(1): 950. DOI: 10.1007/s11033-024-09868-w.

[18] Wang X M, Liu C, Li X R, *et al*. JTE-013 reduces inflammation and improves pulmonary fibrosis by regulating the TRAF2/NF-κB/IGF-1 signaling pathway and macrophage polarization[J]. Int Immunopharmacol, 2025, 167: 115727. DOI:10.1016/j.intimp.2025.115727.

[19] Venugopal H, Hanna A, Humeres C, *et al*. Properties and functions of fibroblasts and myofibroblasts in myocardial infarction[J]. Cells, 2022, 11(9): 1386. DOI: 10.3390/cells11091386.

[20] Pitman M R, Lewis A C, Davies L T, *et al*. The sphingosine 1-phosphate receptor 2/4 antagonist JTE-013 elicits off-target effects on sphingolipid metabolism[J]. Sci Rep, 2022, 12(1): 454. DOI:10.1038/s41598-021-04009-w.

[21] 李辉, 孟丽红, 薛晓明, 等. 基于自噬探讨养阴益气方干预博来霉素诱导的大鼠特发性肺纤维化作用机制[J]. 中国中医药信息杂志, 2026, 33(1): 64-69. DOI:10.19879/j.cnki.1005-5304.202506411.
Li H, Meng L H, Xue X M, *et al*. Exploration on the mechanism of Yangyin Yiqi prescription in bleomycin-induced idiopathic pulmonary fibrosis in rats based on autophagy[J]. Chin J Inf Tradit Chin Med, 2026, 33(1): 64-69. DOI:10.19879/j.cnki.1005-5304.202506411.

[22] Wang C X, Zeng X J, Yang P F, *et al*. Augmenter of liver regeneration inhibits renal fibrosis during acute kidney injury to chronic kidney disease transition by regulating autophagic flux[J]. Arch Biochem Biophys, 2025, 764: 110218. DOI:10.1016/j.abb.2024.110218.

[23] 赵晓彬, 靳文芳, 张海峰, 等. 线粒体质量控制在心肌纤维化中的研究进展[J]. 中国药理学通报, 2025, 41(8): 1419-1423. DOI:10.12360/CPB202408079.
Zhao X B, Jin W F, Zhang H F, *et al*. Research progress of mitochondrial quality control in myocardial fibrosis[J]. Chin Pharmacol Bull, 2025, 41(8): 1419-1423. DOI:10.12360/CPB202408079.

[24] Sun X X, Qi L, Dai M J, *et al*. Suppression of OTUD4 protects against myocardial ischemia-reperfusion injury by increasing autophagic flux and inhibiting apoptosis in cardiomyocytes[J]. J Mol Med, 2025, 103(11): 1567-1582. DOI:10.1007/s00109-025-02605-1.

[25] Li Y, Feng C N, Zu Y G, *et al*. VMP1 enhances autophagy to mitigate cardiac fibroblast activation and reduce post-ischemia-reperfusion fibrosis[J]. Cell Signal, 2025, 136: 112105. DOI:10.1016/j.cellsig.2025.112105.

[26] Ito S I, Tanaka Y. Evaluation of LC3-Ⅱ release *via* extracellular vesicles in relation to the accumulation of intracellular LC3-positive vesicles[J]. JoVE, 2024(212): e67385. DOI:10.3791/67385.

[27] Lee S J, Kim H Y, Lee M J, *et al*. Characterization and chemical modulation of p62/SQSTM1/Sequestosome-1 as an autophagic N-recognin[J]. Methods Enzymol, 2023: 235-265. DOI:10.1016/bs.mie.2023.02.005.

[28] Mijanovic O, Petushkova A I, Brankovic A, *et al*. Cathepsin D-managing the delicate balance[J]. Pharmaceutics, 2021, 13(6): 837. DOI: 10.3390/pharmaceutics13060837.

[29] Cheng A F, Tse K H, Chow H M, *et al*. ATM loss disrupts the autophagy-lysosomal pathway[J]. Autophagy, 2021, 17(8): 1998-2010. DOI:10.1080/15548627.2020.1805860.

[30] Bailus B J, Scheeler S M, Simons J, *et al*. Modulating FKBP5/FKBP51 and autophagy lowers HTT (huntingtin) levels[J]. Autophagy, 2021, 17(12): 4119-4140. DOI: 10.1080/15548627.2021.1904489.

(**收稿**:2026-08-02;**修回**:2026-09-07)
(编辑 汤锦波)