论 著

新生与成年大鼠心脏成纤维细胞来源外泌体蛋白质组学差异分析

高小平，倪　潇，周　文，李　畅，李　光
西南医科大学心血管医学研究所，医学电生理学教育部重点实验室，医学电生理四川省重点实验室，
四川省心血管疾病防治协同创新中心（泸州 646000）

【摘　要】目的 幼体心脏具有再生修复功能，通过分析新生大鼠与成年大鼠心脏成纤维细胞来源外泌体的差异蛋白，从分子水平上探讨心肌受损后可能的治疗靶点。 **方法** 分别从新生和成年大鼠心脏成纤维细胞中分离出外泌体，并提取蛋白质进行高效液相色谱法（high performance liquid chromatography，HPLC）和液相色谱串联质谱法（liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry，LC-MS/MS）分析，鉴定差异表达的蛋白质。使用DAVID数据库对差异表达蛋白基因进行基因本体论（Gene Ontology，GO）和京都基因与基因组百科全书（kyoto encyclopedia of genes and genomes，KEGG）通路分析。并进一步使用STRING数据库和Cytoscape软件进行蛋白质相互作用网络（protein-protein interaction，PPI）分析，以筛选出关键基因。 **结果** 在新生大鼠中共发现241个差异表达蛋白，其中上调表达的蛋白有117个，下调表达的蛋白有124个。GO分析显示上调表达基因主要涉及整合素介导的信号通路和对缺氧的反应，而对内肽酶活性负调控的基因下调表达。KEGG分析结果表明上调表达基因主要富集于Hippo信号通路，而下调表达基因主要涉及细胞外基质与受体相互作用。通过PPI分析得出有6个关键基因（*Lamc1*、*Agrn*、*Itih3*、*Tfrc*、*Bgn*和*Atp5pd*）下调，有1个关键基因（*Rp17a*）上调。 **结论** 通过蛋白组学和生物信息学方法，筛选出了新生大鼠和成年大鼠心脏成纤维细胞来源外泌体的差异蛋白，以及相关的信号通路和关键基因，为心肌受损精准治疗提供了潜在的靶点。

【关键词】新生大鼠；心脏成纤维细胞；外泌体；蛋白质组学
【中图分类号】R394　　**文献标志码**　A　　DOI：10.3969/j.issn.2096-3351.2024.02.007

Differential proteomic analysis of cardiac fibroblast-derived exosomes in neonatal and adult rats

GAO Xiaoping，NI Xiao，ZHOU Wen，LI Chang，LI Guang
Key Laboratory of Medical Electrophysiology of Ministry of Education，Medical Electrophysiological Key Laboratory of Sichuan Province，Collaborative Innovation Center for Prevention of Cardiovascular Disease，Institute of Cardiovascular Research，Southwest Medical University，Luzhou 646000，China

【Abstract】Objective This study investigated the regenerative repair function of the juvenile heart by analyzing differential proteins found in cardiac fibroblast-derived exosomes in neonatal rats and adult rats. The aim of this research was to identify possible therapeutic targets at the molecular level following myocardial damage. **Methods** We isolated exosomes from neonatal and adult rat cardiac fibroblasts and extracted proteins for analysis using HPLC and LC-MS/MS. We identified differentially expressed proteins and further analyzed their gene ontology（GO）and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes（KEGG）pathways using the DAVID database. To identify key genes，we conducted a protein interaction network（PPI）analysis using the STRING database and Cytoscape software. **Results** In neonatal rats，a total of 241 differentially expressed proteins were identified，with 117 up-regulated and 124 down-regulated. The GO analysis showed that the up-regulated genes were mostly involved in integrin-mediated signalling pathways and responses to hypoxia. On the other hand，the down-regulated genes were involved in negative regulation of endopeptidase activity. The KEGG analysis indicated that the up-regulated genes were mainly enriched in the Hippo signaling pathway，while the down-regulated genes were primarily involved in ECM-receptor interaction. PPI analysis revealed that one key gene（*Rp17a*）was up-regulated，while six key genes（*Lamc1*，*Agrn*，*Itih3*，*Tfrc*，*Bgn* and *Atp5pd*）were down-regulated. **Conclusions** In this study，proteomics and bioinformatics techniques were employed to identify differential proteins in exosomes derived from cardiac fibroblasts of neonatal and adult rats. The study also investigated the associated signaling pathways and key genes，which could serve as potential targets for precise treatment of myocardial damage.

【Key words】Neonatal rats；Cardiac fibroblasts；Exosomes；Proteomics

基金项目：国家自然科学基金（81870261）；四川省青年科技创新团队（2020JDTD0024）；西南医科大学自然科学青年基金（2019ZQN023）
通信作者：李　光，E-mail：liguang@swmu.edu.cn
引用本文：高小平，倪潇，周文，等. 新生与成年大鼠心脏成纤维细胞来源外泌体蛋白质组学差异分析[J]. 西南医科大学学报，2024，47(2)：130-135.DOI：10.3969/j.issn.2096-3351.2024.02.007

心脏损伤是一个全球性的重大健康挑战，每年导致上千万人死亡[1]，而心脏受损后的修复过程对于恢复功能至关重要[2]。心肌再生早期仅在鱼和两栖动物中发现，后来发现哺乳动物中新生小鼠的心脏也可再生[3-4]，并且人类在婴儿期也短暂保留了心脏再生修复的能力[5-6]。那么对于成年人，在心肌受损后能否实现再生修复呢？

外泌体（extracellular vesicles，EVs）是一种直径在30～150 nm的囊泡，作为一种新型的细胞间通讯工具，可以由多种类型的细胞分泌[7]。研究发现，外泌体在心肌损伤修复中发挥着重要作用[8-10]。心脏成纤维细胞（cardiac fibroblasts，CFs）是心脏中最丰富的细胞类型，约占心脏细胞总数的50%～60%[11]。研究表明，当心肌发生损伤时，CFs被激活并高度增殖，是支撑心室壁的关键组分[12]。CFs还可以分泌炎症因子、生长因子和细胞外基质蛋白等生物活性物质，参与心肌损伤修复过程[13-14]。然而，对于CFs来源的外泌体在心肌损伤修复中的作用机理目前尚有许多未知。因此，我们在本研究中探索新生大鼠与成年大鼠心脏成纤维细胞来源外泌体的蛋白质差异，寻找潜在的靶点，将有助于为心肌损伤修复提供新的治疗方法。

1 材料与方法

1.1 心脏成纤维细胞获取

选用的20只出生1～3 d的SPF级新生SD大鼠和10只3月龄SPF级成年SD大鼠，均购于西南医科大学实验动物中心。将大鼠安乐死后取心脏组织分别剪成1 mm^3的小块，使用含有2.5%胰酶（不含EDTA）、0.1% Ⅳ型胶原酶和0.05% DNA酶的混合酶液进行37 ℃消化。当组织块消失时，用血清中和混合酶液，然后收集消化液并离心、重悬和铺板。利用成纤维细胞和心肌细胞贴壁时间的不同，将这两种细胞分离开来。本研究经西南医科大学动物伦理委员会审核批准（审批号：20180309－017）。

1.2 外泌体提取

将心肌成纤维细胞体外培养至P2代，当细胞生长密度达到80%后更换培养基，并进行48 h的培养。随后收集培养基，并在3 000 g离心20 min后收集上清液。将上清液在100 000 g离心70 min，收集下层沉淀。接着加入15 mL PBS重悬沉淀，并在100 000 g离心1 h。弃上清，收集所得的沉淀即为外泌体。最后，用400 μL PBS进行重悬，并将其置于-80 ℃保存。

1.3 蛋白质提取

将外泌体转移到裂解缓冲液[8 M Urea，2 mM EDTA，10 mM DTT，0.5% NP40，1% Cocktail β]中，在冰上保存30 min。将样品超声处理3 min，并在4 ℃下以13 000 g离心10 min以除去碎片。用冷的15%三氯乙酸在20 ℃下沉淀蛋白质2 h。在4 ℃下以16 000 g离心5 min后，弃去上清液，剩余的沉淀物用冷丙酮洗涤三次。将蛋白质重新悬浮在缓冲液[8 M Urea，100 mM TEAB，0.5%NP40，PH8.0]中，用Bradford试剂盒（C503041，Sangon Biotec，Shanghai，China）测定蛋白质浓度。

1.4 高效液相色谱法分析

将来自各个外泌体样本的等量蛋白质在37 ℃下用终浓度为10 mM的DTT还原45 min，随后用终浓度为25 mM的IAM避光烷基化55 min。再用100 mM TEAB稀释蛋白样品。以1∶50的胰蛋白酶-蛋白质质量比加入胰蛋白酶进行第一次消化过夜，随后以1∶100的胰蛋白酶-蛋白质质量比消化4 h。将胰蛋白酶和蛋白质按照1∶50的质量比混合后，进行第一次消化过夜。之后再将胰蛋白酶和蛋白质按照1∶100的比例混合，继续消化4 h。用Strata X SPE脱盐柱（phenomenex，torrance，CA，USA）对蛋白质消化液进行脱盐，并将多肽以流速0.7 mL/min注入Waters HPLC e2695/2998系统的高pH值C18 RP柱（4.6 × 250 mm，3.5 μm，130Å）。多肽用梯度从5%到30%的溶剂B洗脱超过55 min（溶剂A：2% CAN [pH 10]；溶剂B：98% CAN [pH 10]）。从7 min到54 min，每分钟收集48个馏分，将多肽合并为5个馏分，并通过真空离心法进行干燥。使用Ziptip C18（Merck Millipore，Billerica，MA，USA）对多肽馏分进行脱盐，并真空干燥后储存在-20 ℃。

1.5 液相色谱串联质谱法分析

干燥后的肽段经过液相色谱流动相溶剂A（2% ACN，0.1% FA）溶解后使用Easy-nLC1000超高效液相系统完成分离。液相梯度设置：0～60 min，0%～35%溶剂B [98% ACN，0.1% FA]，流速设置为300 nL/min。肽段经由超高效液相系统分离后被注入NSI离子源中进行电离然后进Thermo LTQ Orbitrap Elite质谱进行分析。得到的MS/MS原始数据使用Mascot软件进行数据库搜索，根据伪发现率（FDR）< 0.01的标准筛选蛋白质数据。

1.6 差异蛋白质分析

根据p-value与Fold change两个参数值，绘制火山图展示两组样本的蛋白质表达差异。在火山图中，纵坐标显示-log10（p-value）值，横坐标则显示log2（Fold change）值。将满足Fold change > 1.2倍和p-value < 0.05的上调表达蛋白质用红色正三角表示，下调表达蛋白质用绿色倒三角表示，其他的蛋白质用灰色圆点表示。

1.7 基因本体和京都基因与基因组百科全书分析

对筛选出的差异表达蛋白基因，使用DAVID（https://david.ncifcrf.gov）在线分析软件进行基因本体（gene oncology，GO）分析以及京都基因与基因组百科

全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes，KEGG)通路富集分析。$P < 0.05$为差异具有统计学意义。GO分析从生物过程、细胞组分和分子功能3个方面对差异基因进行功能注释，分别选取基因富集最显著的10个条目绘制barplot图。在KEGG分析中选取基因富集最显著的15个条目绘制dotplot图。

1.8 差异基因的蛋白质相互作用网络分析

将差异基因上传至String(https://cn.string-db.org)在线平台进行蛋白质相互作用(protein-protein interaction，PPI)分析，限定研究物种为“大鼠”(Rattus norvegicus)，设置置信度大于0.4，其余参数设置保持默认，导出PPI网络。将结果导入Cytoscape软件补充基因高低表达信息绘制PPI网络图，并使用Cytoscape软件中的MCODE插件识别PPI网络中的显著模块。

2 结果

2.1 蛋白质差异表达分析

新生和成年大鼠两组经过蛋白质组测序富集到613个蛋白，根据Fold change > 1.2倍和p-value < 0.05，筛选得到241个差异表达蛋白。其中新生大鼠组相比成年大鼠组上调表达的蛋白有117个，下调表达的蛋白有124个，并用火山图可视化处理差异蛋白(图1)。火山图直接反映出差异蛋白的表达情况，红色正三角表示上调表达蛋白，绿色倒三角表示下调表达蛋白。

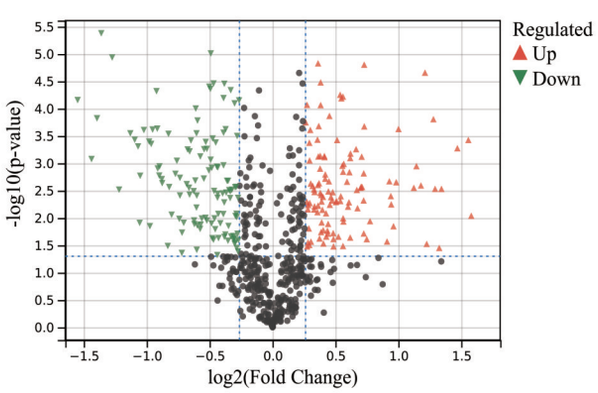


图1 差异表达蛋白质的火山图

Figure 1 Volcano Plot of DEPs

2.2 差异表达基因的GO分析

将筛选出的差异表达蛋白基因用DAVID进行GO分析，获得了生物过程、细胞组分和分子功能3个部分的结果(图2)。在生物学过程中，差异基因主要涉及细胞粘附、心脏发育、胞外基质组装、内肽酶活性的负调控、整合素介导的信号通路和对缺氧的反应，其中新生大鼠上调表达基因主要涉及整合素介导的信号通路和对缺氧的反应，而对内肽酶活性负调控的基因下调表达。细胞组分的差异基因主要涉及细胞质、细胞膜域和细胞外隙，其中新生大鼠的细胞质相关基因上调表达，而细胞外隙相关基因下调表达。在分子功能中差异基因主要富集到蛋白结合、大分子配合物结合和钙离子结合，其中新生大鼠的蛋白结合基因上调表达，而钙离子结合基因下调表达。

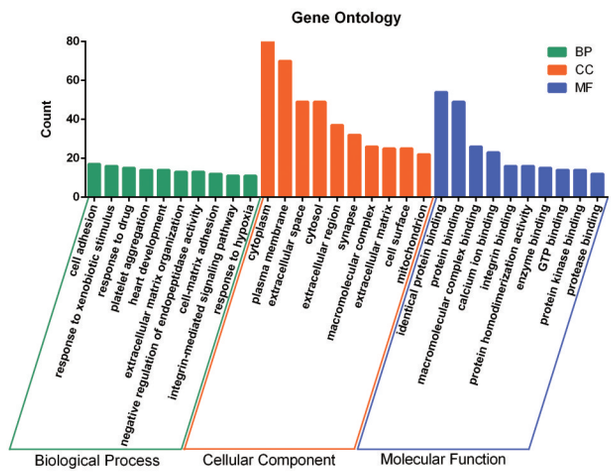


图2 差异基因GO分析

Figure 2 GO analysis

2.3 差异表达基因的KEGG分析

根据KEGG分析结果，差异基因主要富集到粘着斑，PI3K-Akt信号通路，细胞外基质与受体相互作用和Hippo信号通路(图3)。其中新生大鼠上调表达基因主要富集于Hippo信号通路，而下调表达基因主要涉及细胞外基质与受体相互作用。

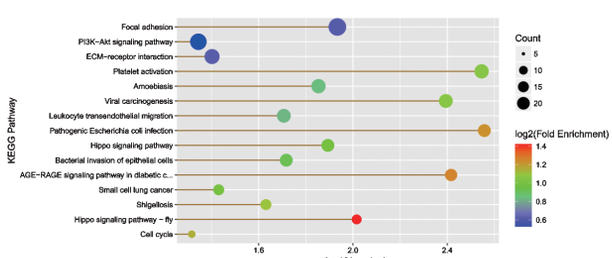


图3 差异基因KEGG分析

Figure 3 KEGG analysis

2.4 差异表达基因的PPI网络图

以差异表达蛋白基因构建PPI网络图，在新生大鼠中上调表达基因(红色菱形)有93个，下调表达基因(蓝色椭圆形)有98个(图4A)。通过Cyoscape软件的MCODE插件筛选出7个显著模块，其关键Seed基因分别为*Rp17a*、*Lamc1*、*Agrn*、*Itih3*、*Tfrc*、*Bgn*和*Atp5pd*，其中下调表达基因为*Lamc1*、*Agrn*、*Itih3*、*Tfrc*、*Bgn*和*Atp5pd*，上调表达基因为*Rp17a*。显著性排名前三模块的Seed基因分别为*Rp17a*、*Lamc1*和*Agrn*(图4B，C，D)。

3 讨论

细胞之间在功能上有着紧密的联系，可经过蛋白、非编码RNA、脂质小分子等活性分子进行通信[15-17]。CFs是心脏里面最丰富的细胞类型，参与心肌细胞电信号和机械应力的传递，可由旁分泌途径促进心肌细胞

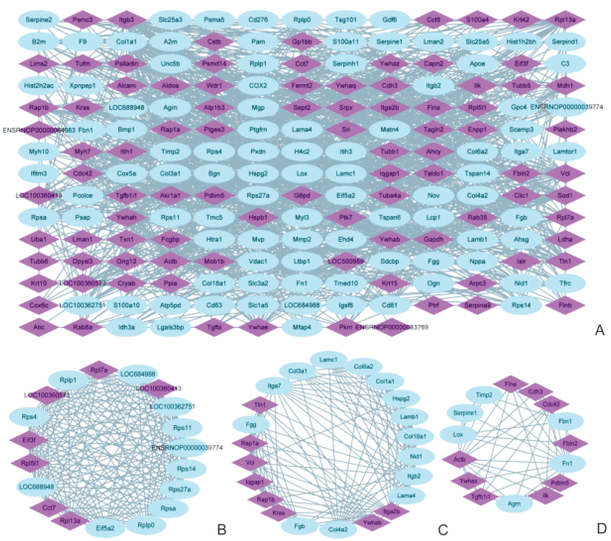


图4 差异蛋白互作网络图(A)和显著模块(B,C,D)

Figure 4 PPI network (A) and the significant module (B,C,D)

维持其形态和功能[18-19]。但在一些病理状态下，促纤维化因子异常升高，CFs可以从静止状态转变为功能活跃的状态[20-22]。人体中外泌体的存在十分广泛，几乎所有细胞都可经过外泌体进行细胞间的通信。外泌体可以通过蛋白、非编码RNA和脂质等参与抗凋亡、促血管生成和改善心脏功能等过程[23]。由此可知，CFs也通过外泌体与心肌细胞进行着密切的交流，特别是在心肌损伤修复状态时。

GO分析显示新生大鼠中涉及整合素介导的信号通路和对缺氧反应的基因上调表达。整合素是一类跨膜受体蛋白，参与细胞间的粘附和信号传导，对心脏损伤修复具有重要意义[24]。整合素可以促进心肌细胞生存和增殖，而心肌细胞的生存和增殖是心脏损伤修复的基础[25-27]。整合素通过与细胞外基质(ECM)相互作用，调控细胞生存和增殖信号通路，如PI3K/Akt通路[28]。研究发现，整合素β3在缺氧性心脏损伤中，通过激活Akt信号通路，促进心肌细胞生存[29]。整合素也可以调控心脏纤维化。心脏纤维化是心脏损伤修复过程中的一个重要环节，影响心脏功能恢复[30]。整合素通过影响心脏成纤维细胞的迁移、增殖和分泌功能，调控心脏纤维化[31]。例如，整合素αvβ3在心脏损伤修复中，抑制成纤维细胞的迁移和增殖，从而减轻心脏纤维化[32]。整合素还能促进心脏血管再生。心脏损伤后，心脏血管再生对于提供营养和氧气至关重要[33]。研究发现，整合素α5在心肌梗死后，通过促进内皮细胞迁移和增殖，加速心脏血管再生[34]。由此可知，整合素对于心脏损伤修复具有重要作用。

研究发现，移植缺氧预处理的间充质干细胞可以有效促进心肌梗死的修复[35]。缺氧反应基因的表达受到缺氧诱导因子(hypoxia-inducible factors，HIFs)的调控，HIFs是一类在低氧条件下表达上调的转录因子，它们在心脏损伤修复中发挥重要作用。HIFs通过调控多种基因的表达，如生长因子、细胞因子和凋亡相关因子，从而参与心脏损伤修复过程[36]。HIFs主要包括HIF-1和HIF-2两个亚型，HIF-1主要参与心肌细胞的缺氧适应和心肌梗死后的炎症反应[37]，而HIF-2则主要参与心脏的血管生成和心肌细胞增殖[38]。HIF-1可通过上调*VEGF*和基质金属蛋白酶(*MMPs*)等基因的表达，促进心肌梗死后的血管生成和基质重塑[39]。此外，HIF-1还可通过调控炎症相关因子(如IL-1β和TNF-α)的表达，影响心肌梗死后的炎症反应[40]。HIF-2通过上调*VEGF*和*PDGF*等基因的表达，促进心肌梗死后的血管生成[41]。此外，HIF-2还可通过调控心肌细胞周期相关因子(如cyclin D1)的表达，促进心肌细胞增殖，从而有助于心脏损伤修复[42]。HIFs的激活可促进心肌细胞的缺氧适应、血管生成、基质重塑和炎症反应等过程[43]。由此可知，缺氧基因激活与心脏损伤修复有着重要作用，且主要通过HIFs来调控。

通过KEGG路径富集分析显示，新生大鼠Hippo信号通路的基因上调表达。在心肌梗死后，Hippo信号通路的活化可以调控心肌细胞的生长和凋亡，从而影响心脏组织的修复和重建[44-46]。研究表明，Hippo信号通路中的关键蛋白YAP在心肌梗死后被激活，其表达水平与心肌损伤程度呈正相关[47]。YAP可以促进心肌细胞的增殖和抗凋亡，从而有助于受损心脏组织的修复[48]。此外，Hippo信号通路还与心脏纤维化密切相关。心脏纤维化是心肌梗死后常见的病理过程，它会导致心脏结构和功能的改变，进而影响心肌受损修复[49]。Hippo信号通路的活化可以调控心脏纤维母细胞的增殖和分化，从而影响心脏纤维化的发生和发展[50]。未来的研究可继续探讨Hippo信号通路在心肌受损修复中的作用和调控机制，为心肌梗死的治疗提供新的靶点。

蛋白互作网络分析发现新生大鼠中*Lamc1*、*Itih3*和*Bgn*基因下调。研究发现心脏成纤维细胞是促进心肌细胞成熟的微环境中的关键组成成分，小鼠从初生到成年过程中成纤维细胞亚型的转变驱动了心肌细胞的成熟。延迟新生鼠心肌细胞的成熟，能够显著增强心肌细胞的增殖能力，改善梗死心肌的功能。而编码潜在成熟促进蛋白的*Lamc1*基因在成纤维细胞中的表达随着时间的推移逐渐增加，由此可见抑制*Lamc1*基因的表达对心肌再生可能有重要作用[51]。*Itih3*在心血管疾病炎症中表达上调，参与调控血管损伤引起的血小板活化[52]。*Itih3*基因下调表达可以减轻心脏炎症反应，有利于心脏修复。研究发现，在COVID-19重症患者的血清中，幸存者中ITIH3的含量低于非幸存者中的含量。说明抑制*Itih3*基因表达对新冠患者心脏的保护也有重要作用[53]。Bgn在心脏成纤维细胞的表型控制

中起着关键作用，参与病理性心脏重塑，促进心肌成纤维细胞分化和增殖。*Bgn*基因下调表达可以减轻心肌纤维化，促进心脏修复[54]。关键基因的发现，为心肌损伤修复的深入机制研究提供了有潜力的候选目标。

4 结论

本研究通过对新生大鼠和成年大鼠心脏成纤维细胞来源外泌体的蛋白质组学数据进行深入挖掘与生物信息学分析，初步明确了调控心脏成纤维细胞的信号通路和关键基因，为心脏损伤的精准治疗提供了潜在靶点，但其关键基因的作用机制仍需进一步的研究和证实。

5 参考文献

[1] SAGLIETTO A, MANFREDI R, ELIA E, *et al*. Cardiovascular disease burden: Italian and global perspectives[J]. Minerva Cardiol Angiol, 2021, 69(3): 231-240.
[2] FRANGOGIANNIS NG. The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling[J]. Nat Rev Cardiol, 2014, 11(5): 255-265.
[3] PORRELLO ER, MAHMOUD AI, SIMPSON E, *et al*. Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart[J]. Science, 2011, 331(6020): 1078-1080.
[4] PORRELLO ER, MAHMOUD AI, SIMPSON E, *et al*. Regulation of neonatal and adult mammalian heart regeneration by the miR-15 family[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(1): 187-192.
[5] HAUBNER BJ, SCHNEIDER J, SCHWEIGMANN U, *et al*. Functional recovery of a human neonatal heart after severe myocardial infarction[J]. Circ Res, 2016, 118(2): 216-221.
[6] TSANG V, YACOUB M, SRIDHARAN S, *et al*. Late donor cardiectomy after paediatric heterotopic cardiac transplantation[J]. Lancet, 2009, 374(9687): 387-392.
[7] YÁÑEZ-MÓ M, SILJANDER PRM, ANDREU Z, *et al*. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions[J]. J Extracell Vesicles, 2015, 4: 27066.
[8] ARSLAN F, LAI RC, SMEETS MB, *et al*. Mesenchymal stem cell-derived exosomes increase ATP levels, decrease oxidative stress and activate PI3K/Akt pathway to enhance myocardial viability and prevent adverse remodeling after myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. Stem Cell Res, 2013, 10(3): 301-312.
[9] VICENCIO JM, YELLON DM, SIVARAMAN V, *et al*. Plasma exosomes protect the myocardium from ischemia-reperfusion injury[J]. J Am Coll Cardiol, 2015, 65(15): 1525-1536.
[10] DE COUTO G, GALLET R, CAMBIER L, *et al*. Exosomal microRNA transfer into macrophages mediates cellular postconditioning[J]. Circulation, 2017, 136(2): 200-214.
[11] SOUDERS CA, BOWERS SLK, BAUDINO TA. Cardiac fibroblast: the renaissance cell[J]. Circ Res, 2009, 105(12): 1164-1176.
[12] JUGDUTT BI. Ventricular remodeling after infarction and the extracellular collagen matrix: when is enough enough[J]. Circulation, 2003, 108(11): 1395-1403.
[13] TURNER NA. Inflammatory and fibrotic responses of cardiac fibroblasts to myocardial damage associated molecular patterns (DAMPs)[J]. J Mol Cell Cardiol, 2016, 94: 189-200.
[14] PORTER KE, TURNER NA. Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling[J]. Pharmacol Ther, 2009, 123(2): 255-278.
[15] HAMMES SR. Rapid signaling and genomic steroid hormone actions in health and disease[J]. Steroids, 2018, 133: 1.
[16] VISHNOI A, RANI S. miRNA biogenesis and regulation of diseases: an updated overview[J]. Methods Mol Biol, 2023, 2595: 1-12.
[17] 叶强，查克岚，杨锐雪，等. 沙库巴曲缬沙坦对心肌梗死后心力衰竭大鼠室性心律失常的影响及其机制[J]. 西南医科大学学报，2023，46(2)：135-140.
[18] DELL'ERA P, RONCA R, COCO L, *et al*. Fibroblast growth factor receptor-1 is essential for in vitro cardiomyocyte development[J]. Circ Res, 2003, 93(5): 414-420.
[19] VALUSSI M, BESSER J, WYSTUB-LIS K, *et al*. Repression of Osmr and Fgfr1 by miR-1/133a prevents cardiomyocyte dedifferentiation and cell cycle entry in the adult heart[J]. Sci Adv, 2021, 7(42): eabi6648.
[20] KLIER M, GORRESSEN S, URBAHN MA, *et al*. Enzymatic activity is not required for phospholipase D mediated TNF-α regulation and myocardial healing[J]. Front Physiol, 2018, 9: 1698.
[21] FANG JY, WANG JW, CHEN FH, *et al*. α7nAChR deletion aggravates myocardial infarction and enhances systemic inflammatory reaction via mTOR-signaling-related autophagy[J]. Inflammation, 2019, 42(4): 1190-1202.
[22] LIU QH, ZHU LJ, WAAGA-GASSER AM, *et al*. The axis of local cardiac endogenous Klotho-TGF-β1-Wnt signaling mediates cardiac fibrosis in human[J]. J Mol Cell Cardiol, 2019, 136: 113-124.
[23] 蔡珍，陈灿. 外泌体在心肌梗死中作用机制的研究进展[J]. 医学综述，2021，27(22)：4423-4427.
[24] WANG BX, KANE C, NICASTRO L, *et al*. Integrins increase sarcoplasmic reticulum activity for excitation-contraction coupling in human stem cell-derived cardiomyocytes[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(18): 10940.
[25] BERGMANN O, BHARDWAJ RD, BERNARD S, *et al*. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans[J]. Science, 2009, 324(5923): 98-102.
[26] Feng J, Li Y, Li Y, *et al*. Versican Promotes Cardiomyocyte Proliferation and Cardiac Repair. Circulation. Published online October 27, 2023.
[27] 王静，毋江波. 鸢尾素通过整合素αV受体对衰竭心脏的保护作用[J]. 中国组织工程研究，2021，25(20)：3219-3225.
[28] HU GQ, DING XJ, GAO F, *et al*. Calcium and integrin binding protein 1 (CIB1) induces myocardial fibrosis in myocardial infarction via regulating the PI3K/Akt pathway[J]. Exp Anim, 2022, 71(1): 1-13.
[29] WEI LJ, ZHOU QQ, TIAN H, *et al*. Integrin β3 promotes cardiomyocyte proliferation and attenuates hypoxia-induced apoptosis via regulating the PTEN/Akt/mTOR and ERK1/2 pathways[J]. Int J Biol Sci, 2020, 16(4): 644-654.
[30] 程培培，丰明会，李赞，等. 整合素αV在应力刺激促心脏成纤维细胞活化中的作用机制研究[J]. 中国病理生理杂志，2022，38(8)：1345-1353.
[31] NIU LL, CHENG B, HUANG GY, *et al*. A positive mechanobiological feedback loop controls bistable switching of cardiac fibroblast phenotype[J]. Cell Discov, 2022, 8(1): 84.
[32] WANG XF, LI Q, SUN X, *et al*. Calcitriol suppressed isoproterenol-induced proliferation of cardiac fibroblasts via integrin β3/FAK/akt pathway[J]. Curr Med Sci, 2023, 43(1): 48-57.
[33] 侯建同. 整合素连接激酶在低氧诱导肺血管重塑中的作用机制研究[D]. 南京：东南大学，2020.
[34] VAN DER FLIER A, BADU-NKANSAH K, WHITTAKER CA, *et al*. Endothelial alpha5 and alphav integrins cooperate in remodeling of the vasculature during development[J]. Development, 2010, 137(14): 2439-2449.
[35] Xiong Y,Tang R,Xu J, *et al*. 缺氧和通心络联合预处理的外泌体和间充质干细胞序贯移植有效促进心脏修复[C]//中华中医药学会,世界中医药学会联合会,中国老年医学学会,中国农村卫生协会.第十九届国际络病学大会论文集.2023:47-48.
[36] HU YQ, LU H, LI H, *et al*. Molecular basis and clinical implica-

tions of HIFs in cardiovascular diseases[J]. Trends Mol Med, 2022,28(11): 916-938.
[37] NOLLY MB, VARGAS LA, CORREA MV, *et al*. Carbonic anhydrase IX and hypoxia-inducible factor 1 attenuate cardiac dysfunction after myocardial infarction[J]. Pflugers Arch, 2021, 473(8): 1273-1285.
[38] QIN YW, ZHANG J, BABAPOOR-FARROKHRAN S, *et al*. PAI-1 is a vascular cell-specific HIF-2-dependent angiogenic factor that promotes retinal neovascularization in diabetic patients[J]. Sci Adv, 2022, 8(9): eabm1896.
[39] CARMELIET P, JAIN RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis[J]. Nature, 2011, 473(7347): 298-307.
[40] TOLDO S, ABBATE A. The NLRP3 inflammasome in acute myocardial infarction[J]. Nat Rev Cardiol, 2018, 15(4): 203-214.
[41] SKULI N, SIMON MC. HIF-1alpha versus HIF-2alpha in endothelial cells and vascular functions: is there a master in angiogenesis regulation[J]. Cell Cycle, 2009, 8(20): 3252-3253.
[42] NAKADA Y, CANSECO DC, THET S, *et al*. Hypoxia induces heart regeneration in adult mice[J]. Nature, 2017, 541(7636): 222-227.
[43] KNUTSON AK, WILLIAMS AL, BOISVERT WA, *et al*. HIF in the heart: development, metabolism, ischemia, and atherosclerosis[J]. J Clin Invest, 2021, 131(17): e137557.
[44] WANG J, LIU SJ, HEALLEN T, *et al*. The Hippo pathway in the heart: pivotal roles in development, disease, and regeneration[J]. Nat Rev Cardiol, 2018, 15(11): 672-684.
[45] 王兴,高爱宝,刘洪波. Hippo通路抑制剂HY-101275对心脏压力超负荷大鼠模型的心脏保护作用及机制[J]. 心肺血管病杂志,2020,39(11): 1388-1395.
[46] 赵南南,张洪亮. HIPPO信号通路在心脏发育及疾病发生过程中的作用[J]. 医学理论与实践,2021,34(11): 1826-1829.
[47] XIN M, KIM Y, SUTHERLAND LB, *et al*. Hippo pathway effector Yap promotes cardiac regeneration[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(34): 13839-13844.
[48] MIA MM, CIBI DM, ABDUL GHANI SAB, *et al*. YAP/TAZ deficiency reprograms macrophage phenotype and improves infarct healing and cardiac function after myocardial infarction[J]. PLoS Biol, 2020, 18(12): e3000941.
[49] LANDRY NM, RATTAN SG, FILOMENO KL, *et al*. SKI activates the Hippo pathway via LIMD1 to inhibit cardiac fibroblast activation[J]. Basic Res Cardiol, 2021, 116(1): 25.
[50] LI TY, SU W, LI LL, *et al*. Critical role of PAFR/YAP1 positive feedback loop in cardiac fibrosis[J]. Acta Pharmacol Sin, 2022, 43(11): 2862-2872.
[51] WANG Y, YAO F, WANG LP, *et al*. Single-cell analysis of murine fibroblasts identifies neonatal to adult switching that regulates cardiomyocyte maturation[J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 2585.
[52] CHEN H, TESIC M, NIKOLIC VN, *et al*. Systemic biomarkers and unique pathways in different phenotypes of heart failure with preserved ejection fraction[J]. Biomolecules, 2022, 12(10): 1419.
[53] VÖLLMY F, VAN DEN TOORN H, ZENEZINI CHIOZZI R, *et al*. A serum proteome signature to predict mortality in severe COVID-19 patients[J]. Life Sci Alliance, 2021, 4(9): e202101099.
[54] SCURUCHI M, MANNINO F, IMBESI C, *et al*. Biglycan involvement in heart fibrosis: modulation of adenosine 2A receptor improves damage in immortalized cardiac fibroblasts[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(2): 1784.

(利益冲突:无)

(收稿日期:2023-04-28;修回日期:2023-08-02)

(上接第122页)

[61] GOFFIN KE, JONIAU S, TENKE P, *et al*. Phase 2 study of (99m)Tc-trofolastat SPECT/CT to identify and localize prostate cancer in intermediate- and high-risk patients undergoing radical prostatectomy and extended pelvic LN dissection[J]. J Nucl Med, 2017, 58(9): 1408-1413.
[62] DIETLEIN F, KOBE C, VÁZQUEZ SM, *et al*. An ^{89}Zr-labeled PSMA tracer for PET/CT imaging of prostate cancer patients[J]. J Nucl Med, 2022, 63(4): 573-583.
[63] EPPARD E, DE LA FUENTE A, BENEŠOVÁ M, *et al*. Clinical translation and first In-human use of [^{44}Sc]Sc-PSMA-617 for PET imaging of metastasized castrate-resistant prostate cancer[J]. Theranostics, 2017, 7(18): 4359-4369.
[64] GHIANI S, HAWALA I, SZIKRA D, *et al*. Synthesis, radiolabeling, and pre-clinical evaluation of [^{44}Sc]Sc-AAZTA conjugate PSMA inhibitor, a new tracer for high-efficiency imaging of prostate cancer[J]. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2021, 48(8): 2351-2362.
[65] MANAFI-FARID R, RANJBAR S, JAMSHIDI ARAGHI Z, *et al*. Molecular imaging in primary staging of prostate cancer patients: current aspects and future trends[J]. Cancers, 2021, 13(21): 5360.
[66] AL JALALI V, WASINGER G, RASUL S, *et al*. Consecutive prostate-specific membrane antigen (PSMA) and antigen receptor (AR) PET imaging shows positive correlation with AR and PSMA protein expression in primary hormone-Naïve prostate cancer[J]. J Nucl Med, 2023, 64(6): 863-868.
[67] MITRAN B, VARASTEH Z, ABOUZAYED A, *et al*. Bispecific GRPR-antagonistic anti-PSMA/GRPR heterodimer for PET and SPECT diagnostic imaging of prostate cancer[J]. Cancers, 2019, 11(9): 1371.
[68] LUNDMARK F, ABOUZAYED A, MITRAN B, *et al*. Heterodimeric radiotracer targeting PSMA and GRPR for imaging of prostate cancer-optimization of the affinity towards PSMA by linker modification in murine model[J]. Pharmaceutics, 2020, 12(7): 614.
[69] MITRAN B, RINNE SS, KONIJNENBERG MW, *et al*. Trastuzumab cotreatment improves survival of mice with PC-3 prostate cancer xenografts treated with the GRPR antagonist (177) Lu-DOTAGA-PEG(2)-RM26[J]. Int J Cancer, 2019, 145(12): 3347-3358.
[70] FOX JJ, GAVANE SC, BLANC-AUTRAN E, *et al*. Positron emission tomography/computed tomography-based assessments of androgen receptor expression and glycolytic activity as a prognostic biomarker for metastatic castration-resistant prostate cancer[J]. JAMA Oncol, 2018, 4(2): 217-224.
[71] CHENG SY, LANG LX, WANG ZT, *et al*. Positron emission tomography imaging of prostate cancer with Ga-68-labeled gastrin-releasing peptide receptor agonist BBN_{7-14} and antagonist RM26[J]. Bioconjugate Chem, 2018, 29(2): 410-419.
[72] ABOUZAYED A, TANO H, NAGY Á, *et al*. Preclinical evaluation of the GRPR-targeting antagonist RM26 conjugated to the albumin-binding domain for GRPR-targeting therapy of cancer[J]. Pharmaceutics, 2020, 12(10): 977.
[73] DALM SU, BAKKER IL, DE BLOIS E, *et al*. ^{68}Ga/^{177}Lu-NeoBOMB1, a novel radiolabeled GRPR antagonist for theranostic use in oncology[J]. J Nucl Med, 2017, 58(2): 293-299.

(利益冲突:无)

(收稿日期:2023-11-24;修回日期:2023-12-26)