基础研究 DOI：10.13406/j.cnki.cyxb.003762

转录因子E4BP4通过AMPK-TGF-β1/SMAD3信号转导途径调控病理性心肌纤维化

黄德荣，文　庆，苏宇辰
（遵义医科大学附属医院心脏大血管外科，遵义　563000）

【摘　要】目的：探讨转录因子腺病毒E4启动子结合蛋白（adenovirus E4 promoter-binding protein，E4BP4）通过腺苷酸活化蛋白激酶（adenosine monophosphate-activated protein kinase，AMPK）-转化生长因子（transforming growth factor，TGF）-β1/SMAD同源物3（Smad homolog 3，SMAD3）通路在调控病理性心肌纤维化的作用。**方法：**建立小鼠心脏纤维化模型，分别于模型组和假手术组中检测E4BP4的表达差异。分离和培养原代心脏成纤维细胞，血管紧张素Ⅱ（angiotensin Ⅱ，Ang Ⅱ）刺激增殖活化，分别转染E4BP4过表达质粒（Ang Ⅱ+E4BP4组）、E4BP4干扰质粒（Ang Ⅱ+siE4BP4组）、Ang Ⅱ组和未经Ang Ⅱ处理的对照组。免疫荧光检测α-肌动蛋白（α-smooth muscle actin，α-SMA）荧光强度，细胞增殖检测试剂盒测定细胞活力，聚合酶链式反应检测E4BP4、α-SMA、Ⅰ型胶原蛋白（collagen type Ⅰ，Collagen Ⅰ）和Ⅲ型胶原蛋白（collagen type Ⅲ，Collagen Ⅲ）的表达，蛋白质印迹检测TGF-β1、AMPK和SMAD3的蛋白表达。**结果：**与假手术组比较，模型组心肌纤维化程度（38.46 ± 1.21 vs. 3.39 ± 0.39，t=-78.564，P=0.000）、E4BP4蛋白表达量（0.96 ± 0.03 vs. 0.75 ± 0.03，t=-11.480，P=0.000）均明显增加。体外实验发现，与Ang Ⅱ+E4BP4组比较，Ang Ⅱ+siE4BP4组在平均荧光强度（0.05 ± 0.01 vs. 0.42 ± 0.03，F=677.591，P=0.000）、细胞活力（91.30 ± 2.39 vs. 123.74 ± 2.60，F=132.696，P=0.000）、α-SMA（1.26 ± 0.09 vs. 3.59 ± 0.86，F=52.274，P=0.000）、Collagen Ⅰ（1.16 ± 0.11 vs. 3.79 ± 0.89，F=55.336，P=0.000）、Collagen Ⅲ（1.23 ± 0.13 vs. 2.92 ± 0.36，F=119.929，P=0.000）、TGF-β1（0.66 ± 0.04 vs. 0.96 ± 0.02，F=142.954，P=0.000）和p-SMAD3/SMAD3（0.81 ± 0.03 vs. 1.37 ± 0.02，F=739.609，P=0.000）的水平明显降低，而p-AMPK/AMPK的表达量在Ang Ⅱ+siE4BP4组明显高于Ang Ⅱ+E4BP4组（0.89 ± 0.01 vs. 0.58 ± 0.02，F=284.541，P=0.000）。**结论：**E4BP4是纤维化调控的关键因子，抑制其表达可通过激活AMPK进而抑制TGF-β1/SMAD3通路发挥抗纤维化作用。

【关键词】心肌纤维化；转录因子腺病毒E4启动子结合蛋白；腺苷酸活化蛋白激酶；转化生长因子-β；SMAD同源物3
【中图分类号】R542.2+3　　**【文献标志码】**A　　**【收稿日期】**2024-10-24

Regulatory effect of transcription factor E4BP4 on pathological myocardial fibrosis through the AMPK-TGF-β1/SMAD3 signaling pathway

Huang Derong，*Wen Qing*，*Su Yuchen*
（*Department of Cardiovascular Surgery*，*Affiliated Hospital of Zunyi Medical University*）

【Abstract】*Objective*： To explore the effects of transcription factor adenovirus E4 promoter-binding protein（E4BP4）in regulating pathological myocardial fibrosis through the adenosine monophosphate-activated protein kinase（AMPK）-transforming growth factor（TGF）-β1/Smad homolog 3（SMAD3）pathway. ***Methods*：** A mouse model of myocardial fibrosis was established，and the expression of E4BP4 was determined in the model group and the sham-operation group. Primary cardiac fibroblasts were isolated，cultured，activated by angiotensin Ⅱ（Ang Ⅱ），and divided into the following groups：Ang Ⅱ+E4BP4 group（transfected with E4BP4 overexpression plasmids），Ang Ⅱ+siE4BP4 group（transfected with E4BP4 interfering plasmids），Ang Ⅱ group，and control group（without Ang Ⅱ treatment）. The fluorescence intensity of α-smooth muscle actin（α-SMA）was determined by the immunofluorescence assay，the cell viability by the cell counting kit，the expression of E4BP4，α-SMA，collagen type Ⅰ（collagen Ⅰ），and collagen type Ⅲ（collagen Ⅲ）by polymerase chain reaction，and the protein expression of TGF-β1，AMPK，and SMAD3 by Western blot. ***Results*：** Compared with the sham-operation group，the model group showed significantly increased myocardial fibrosis degree（38.46 ± 1.21 vs. 3.39 ± 0.39，t=-78.564，P=0.000）and E4BP4 protein expression（0.96 ± 0.03 vs. 0.75 ± 0.03，t=-11.480，P=0.000）. *In vitro* experiments found that the mean fluorescence intensity（0.05 ± 0.01 vs. 0.42 ± 0.03，F=677.591，P=0.000），cell viability（91.30 ± 2.39 vs. 123.74 ± 2.60，F=132.696，P=0.000），and the levels of α-SMA（1.26 ± 0.09 vs.

作者介绍：黄德荣，Email：hdr110828@163.com，
研究方向：病理性心肌肥厚和纤维化。

基金项目：贵州省科技计划资助项目[编号：黔科合基础-ZK（2024）一般327]；遵义市科技计划资助项目[编号：遵市科合HZ字（2023）245号]；遵义医科大学博士科研启动基金资助项目[编号：院字（2022）6号]。
优先出版：https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20250217.1510.012（2025-02-18）

3.59 ± 0.86, F=52.274, P=0.000), collagen Ⅰ (1.16 ± 0.11 vs. 3.79 ± 0.89, F=55.336, P=0.000), collagen Ⅲ (1.23 ± 0.13 vs. 2.92 ± 0.36, F=119.929, P=0.000), TGF-β1 (0.66 ± 0.04 vs. 0.96 ± 0.02, F=142.954, P=0.000), and p-SMAD3/SMAD3 (0.81 ± 0.03 vs. 1.37 ± 0.02, F=739.609, P=0.000) in the Ang Ⅱ+siE4BP4 group were significantly lower than those in the Ang Ⅱ+E4BP4 group. The expression of p-AMPK/AMPK in the Ang Ⅱ+siE4BP4 group was significantly higher than that in the Ang Ⅱ+E4BP4 group (0.89 ± 0.01 vs. 0.58 ± 0.02, F=284.541, P=0.000). ***Conclusion***: E4BP4 plays a crucial role in the regulation of fibrosis. Inhibition of E4BP4 expression exerts an anti-fibrotic effect by activating AMPK and inhibiting TGF-β1/SMAD3 pathway.

【Key words】myocardial fibrosis; adenovirus E4 promoter-binding protein; adenosine monophosphate-activated protein kinase; transforming growth factor-β; Smad homolog 3

心肌纤维化是心功能衰竭发生和发展的重要病因，是心脏针对各种慢性损伤包括炎症、压力负荷过重、各种心肌病、心肌缺血等病理生理过程的必然结果[1]，其机制是肌成纤维细胞的增殖引起的胶原基质在心肌中的过度积聚。这些异常积聚的细胞外基质（extracellular matrix，ECM）干扰了正常心肌细胞的功能，导致心肌组织硬度增加和弹性降低，扰乱了正常的心肌兴奋-收缩过程，使收缩和舒张功能受损，导致心功能衰竭的进展[2]，也增加了心律失常的发生率和疾病的死亡率[3]。纤维化是1个复杂和动态的组织转化过程，包括异质性的效应细胞、各种信号通路和ECM组成的紧密联系的分子网络的参与[4]，并受非编码RNA、转录因子、细胞因子等多种因素的共同调控。尽管目前对纤维化机制有了广泛的了解，但具体调控机制尚不完全清楚，仍缺乏针对心脏纤维化的特异性和高效的治疗方法。

腺病毒E4启动子结合蛋白（adenovirus E4 promoter-binding protein，E4BP4），又被称为核因子白细胞介素-3（nuclear-factor interleukin 3，NFIL3），是1种转录因子，可通过结合并抑制含有激活转录因子共识位点的E4启动子序列来调控下游基因的转录。有研究表明，E4BP4可在巨噬细胞、T细胞、B细胞和NK细胞等多种细胞中表达，在平滑肌细胞钙信号转导、细胞因子产生调控、胰岛素样生长因子Ⅱ受体信号转导、细胞死亡-存活调控等方面发挥重要作用，广泛参与了脑卒中、梗死、肺动脉高压、心功能衰竭和缺血再灌注损伤等心脏和血管疾病的过程[5-6]，是心力衰竭、动脉硬化等疾病的潜在的靶点[7-8]。有研究发现，E4BP4可抑制磷酸腺苷活化的蛋白激酶（adenosine monophosphate-activated protein kinase，AMPK）的活化参与非乙醇性脂肪肝中的脂质累积[9]。AMPK是由催化亚基α、调节亚基β和γ组成的异三聚体蛋白复合物，是细胞能量代谢的关键分子[10]。AMPK活化后可抑制纤维化转导通路如转化生长因子（transforming growth factor，TGF）-β/SMAD同源物3重组蛋白（Smad homolog 3，SMAD3）通路发挥抗肾、肝等器官纤维化作用[11]，另外，AMPK的激活可以抑制成纤维细胞增殖和ECM积累，抑制纤维化进展[12]。但其在病理性心肌纤维化的作用和机制尚不清楚，本研究通过体内和体外实验，进一步探讨在病理性心脏纤维化发展过程中的作用和机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康SPF级C57BL6/J小鼠（体质量20~25 g），购买于遵义医科大学动物实验室[动物许可证编号：SYXK（贵2023-0001）]，动物购买后适应性喂养3 d，饲养在SPF级环境中（温度：22~26 ℃）进行纤维化模型手术；本研究得到遵义医科大学实验动物伦理委员会的审查批准（审批号：ZYFY-an-2023-0243）。

1.1.2 主要试剂 Trizol RNA分离试剂（Life，美国）；细胞蛋白提取试剂盒（上海碧云天）；二喹啉甲酸（bicinchoninic acid，BCA）蛋白浓度测定试剂盒（上海碧云天，P0010S）；聚偏二氟乙烯膜（上海碧云天，FFP24）；Masson三色染色试剂盒（南京森贝伽生物科技有限公司）；细胞增殖检测试剂盒（cell counting kit，CCK）-8（KGA317-2，江苏凯基生物）；逆转录试剂盒（Qiagen 218161，深圳）；riboSCRIPTTM mRNA/lncRNA聚合酶链式反应（polymerase chain reaction，PCR）Starter Kit试剂盒（广州锐博）；Uni-Reverse primer（广州锐博）；miRs Forward primer（广州锐博）；Ang Ⅱ（HY-13948，MCE，美国）；pcDNA3.1-E4BP4、siE4BP4（权阳生物，上海）；封闭专用脱脂奶粉（P1622，北京普利莱基因技术有限公司），牛血清白蛋白（A8020，北京索莱宝），超敏发光液（RJ239676，赛默飞，美国），抗体：p-SMAD3（ab63402，英国abcam），p-AMPK-α1和α2（ab133448，英国abcam），TGF-β1（ab215715，英国abcam），E4BP4（ab309508，abcam）；AMPK-α1，2（ab207442，abcam）；甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydro-genase，GAPDH）（ab181602，英国

abcam）；二抗：羊抗鼠 HRP IgG（H+L）（GB23303，武汉 Servicebio，1/2 000）；免疫荧光抗体：vimentin（兔来源，德国 CST，5741）；α-肌动蛋白（α-smooth muscle actin，α-SMA）（小鼠来源，英国 abcam，ab7817）；异硫氰酸荧光素标记山羊抗兔 IgG（北京中杉金桥，ZF-0311）；Rhodamine 标记山羊抗小鼠 IgG（北京中杉金桥，ZF-0313）。

1.1.3 主要仪器 冰冻切片机和石蜡切片机（德国莱卡分司）；RNA 逆转录仪（美国 Bio-Rad 公司）；全视野细胞扫描分析仪（美国 Nexcelom）；BIO-RAD CFX96 q-PCR system（美国 Bio-Rad 公司）；小动物超声系统（Vevo z100，加拿大，Visual Sonics）；CO_2 培养箱（BPN-80CW，上海一恒科学仪器有限公司）；倒置荧光显微镜（MF53 广州市明美光电有限公司）；洁净工作台（BBS-SDC，BIOBASE，山东）；医用离心机（TD4A，长沙英泰仪器有限公司）；全自动酶标仪（WD-2120B，北京六一生物科技）。

1.2 *方法*

1.2.1 动物分组和模型建立 将小鼠用随机数字法分为假手术组、模型组，每组 10 只。先建立动物模型，过程如下：小鼠术前禁食 12 h，不禁水。将小鼠麻醉后，正中开腹，分离腹主动脉和下腔静脉，在肾动脉上方用直径约 0.6 mm 注射器针头贴紧腹主动脉壁（与腹主动脉平行放置），与腹主动脉用丝线扎紧，抽出针头后，关腹。假手术组只打开腹腔后关腹。术后 8 周，通过超声检测，若模型小鼠存在收缩功能障碍和左心室变大，则处死动物。取心肌组织样本用于检测。

1.2.2 心脏超声检测 建模 8 周后，取小鼠予 1.5% 异氟烷麻醉后，置于检查平台上，用小动脉超声检测仪测量左心室射血分数（left ventricular ejection fraction，LVEF）、左心室收缩末期内径（left ventricular end-systolic diameter，LVESD）、左心室舒张末期内径（left ventricular end-diastolic dimension，LVEDD）并记录。

1.2.3 心肌组织 Masson 染色与纤维化程度检测 取小鼠左心室心肌组织，分为 2 部分，一部分放入液氮内，用于 RNAs、蛋白提取和检测。另一部分行 Masson 染色，步骤如下：将其剪切成厚度<5 mm、长度<1 cm 长方体状，甲醛固定，石蜡包埋，按说明书进行三色染色。经染色后胶原纤维染成蓝色，肌纤维染成红色，使用 Image-pro-plus 6.0 分析测量胶原纤维面积得出胶原容积分数（collagen volume fraction，CVF）（%）。每个切片测量 2 次，误差<3%。

1.2.4 心肌组织 RNA 提取及 mRNA 表达量检测 使用 TRIzoL 法提取心肌组织中总 RNA。取 100 g 组织磨成粉末状，加入 1 mL Trizol 液，摇匀；使用酚氯仿法抽取总 RNAs. 测量浓度后，取 1 μg 总 RNAs 配制成 10 μL 体系进行逆转录，所得 cDNAs 放入-20 ℃冰箱保存。引物设计如下：Ⅰ型胶原蛋白（collagen type Ⅰ，collagen Ⅰ）：上游引物 5'-TAAGGGTCCCCAATGGTGAGA-3'，下游引物 5'-GGGTCCCTCGACTCCTACAT-3'；Ⅲ型胶原蛋白（collagen type Ⅲ，collagen Ⅲ）：上游引物 5'-CTGTAACATGGAAACTGGGGAAA-3'，下游引物 5'-CCATAGCTGAACTGAAAACCACC-3'；α-SMA：上游引物 5'-CCCAGACATCAGGGAGTAATGG-3'，下游引物 5'-TCTATCGGATACTTCAGCGTCA-3'；E4BP4：上游引物 5'CTTTCAGGACTACCAGACATCCAA-3'，下游引物 5'-GATGCAACTTCCGGCTACCA-3'；GAPDH：上游引物 5'-GAGAAGGCTGGGGCTCAC-3'，下游引物 5'-GTTGTC ATGGATGACCTTGGC-3'根据试剂盒说明书配制成 20 μL 体系，反应条件为：95 ℃ 10 min 预变性，95 ℃ 5 s 变性，60 ℃ 30 s 退火和 72 ℃ 30 s 延伸，共计 40 个循环后，绘制溶解曲线。按下述方法计算相对表达量。CQ 值定义即 PCR 扩增过程中荧光信号强度达到阈值所需要的循环数。表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Cq}$ 法的计算。$\Delta Cq = Cq_{目的基因} - Cq_{内参基因}$，$\Delta\Delta Cq = \Delta Cq_{实验组} - \Delta Cq_{对照组}$，相对表达量 $= 2^{-\Delta\Delta Cq}$。

1.2.5 心肌组织蛋白提取和蛋白质印迹检测 新鲜冷冻心脏组织 200 mg，4 ℃解冻后机械粉碎得匀浆液，根据蛋白提取盒说明书所示，加入放射免疫沉淀分析（radioimmunoprecipitation assay，RIPA）裂解液，提取总蛋白。根据 BCA 试剂盒进行蛋白定量，加十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis，SDS-PAGE）上样缓冲液煮沸 10 min，取 80 μg 蛋白样品上样，10% SDS-PAGE 电泳（80 V，30 min，然后 100 V，60 min）；放入 4 ℃层析柜中。转膜（电流 150 mA，12% 胶转 50 min，8% 胶转 90 min）；5% 脱脂牛奶 50 mL 室温封闭 1 h；加一抗兔抗鼠 E4BP4 IgG 抗体（1∶1 000）、兔抗鼠 AMPK-α1，2 IgG 抗体（1∶720）、兔抗鼠 p-AMPK-α1（磷酸化 T183）和 α2（磷酸化 T172）IgG 抗体（1∶720）、兔抗鼠 TGF-β1 IgG 抗体（1∶900）、兔抗鼠 p-SMAD3（磷酸化 S204）IgG 抗体（1∶900）、兔抗鼠 SMAD3 IgG 抗体（1∶900）、内参兔抗鼠 GAPDH IgG 抗体（1∶1 000），4 ℃孵育过夜，辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG（H+L）二抗（1∶5 000）室温孵育 2 h，配显影液（按说明书按 A∶B∶C=1∶1∶1 比例混合），与蛋白膜反应后 15 s，在凝胶成像系统中曝光并采集图像；用 Image lab 软件进行蛋白条带分析，用目标蛋白条带灰度值与 GAPDH 条带灰度值比较计算相对表达量。

1.2.6 心脏成纤维细胞的分离、培养、活化、转染 SD 大鼠乳鼠（0~1 d），断颈处死后固定于操作台，全程在无菌条件下获取左心室心尖组织，剪碎呈约 1~2 mm^3 立方体状，加入 4 mL 消化酶液消化 3 min，收集消化悬液，使用差速贴壁法分离成纤维细胞，经免疫荧光鉴定纯度，加入 7 mL 10% 胎牛血清（fetal bovine serum，FBS）杜尔贝科改良 Eagle 培养基（Dulbecco's modified eagle medium，DMEM），37 ℃ 5% CO_2 孵箱中培养，待细胞密度至 80%～90% 时需对细胞进行传代，当细胞密度达 70% 时，准备转染。根据其是否使用血管紧张素Ⅱ（angiotensin Ⅱ，Ang Ⅱ）刺激和转染质粒不同进行分组，未经处理者为对照组，转染 E4BP4 干扰质粒（siE4BP4）（50 nm）者为 siE4BP4 组，先使用 Ang Ⅱ（200 nm，37 ℃ 5% CO_2 孵箱中培养 48 h）后按说明书分别转染 E4BP4 高表达质粒（pcDNA3.1-E4BP4）（250 ng/mL）者定义为（Ang Ⅱ+E4BP4 组）、转染 siE4BP4（50 nm）者为（Ang Ⅱ+siE4BP4 组）和加入

转染试剂者为Ang Ⅱ组。转染6 h后在6孔板中加入血清含量为10%的完全培养基1 mL；48 h后收集细胞进行后续检测。

转染率测定：细胞铺板，96孔板，1×10^4个/孔，混匀后于37 ℃ 5% CO_2培养24 h；在3个1.5 mL EP管中各加入25 μL无血清DMEM，分别加入100 ng/mL、250 ng/mL、500 ng/mL pcDNA3.1-GFP质粒，混匀；取另一1.5 mL EP管，加入75 μL无血清DMEM，加入1.5 μL GP-transfect-Mate转染试剂，充分混匀，室温放置5 min后均分到前面含有质粒的3个EP管，充分混合，室温放置20 min；吸去96孔板中的培养液，每孔加入50 μL无血清的DMEM；将转染混合物逐滴加入96孔板中，混匀后，在培养箱中温育4～6 h后换成100 μL含10% FBS的DMEM高糖培养液。37 ℃，5% CO_2继续培养，24 h后观察并拍照，使用Image-pro-plus 6.0计算转染率。转染率=发出荧光的细胞数/观察到的细胞总数×100%。结果显示250 ng/mL时转染效率70%，每孔500 ng/mL时转染效率并未有明显提高，所以选择250 ng/mL来进行后续实验。

1.2.7 免疫荧光检测α-SMA平均荧光强度和CCK-8检测成纤维细胞活力 ①免疫荧光鉴定：将各组细胞铺板爬片，待细胞在爬片上生长至70%左右，取出爬片，磷酸盐缓冲盐水（phosphate buffered saline，PBS）预热；予2.4%多聚甲醛固定爬片；0.5% triton-X100（PBS配制）室温通透3 min，浸洗后用4.1% BSA封闭30 min，吸走封闭液，滴加稀释好的一抗vimentin（1∶100）、α-SMA（1∶200），4 ℃过夜孵育；吸走一抗，PBS浸洗后滴加二抗（1∶100），37 ℃孵育1 h，避光；吸走二抗，PBS浸洗，染核：4′，6-二氨基-2-苯基吲哚（5 μg/mL），5 min，PBS浸洗后再用PBS浸泡采图。使用Image pro plus 6.0软件定量分析得出IOD值，平均光密度值=IOD值除以目标分布区域面积。②CCK-8检测：将转染后的细胞铺96孔板，每孔1×10^4个细胞，换成相同的培养基，每孔100 μL；每孔加入10 μL CCK-8试剂，置于培养箱中孵育2 h，酶标仪在450 nm波长处检测每孔的吸光值。将测试孔吸光值减去空白吸光值即为该孔吸光值，吸光值越高，代表细胞存活率越高，细胞增殖能力越强。细胞存活率%=（加药孔吸光值-空白吸光值）/（对照孔吸光值-空白吸光值）×100。

1.2.8 细胞蛋白提取和蛋白质印迹检测 根据蛋白提取盒说明书所示，在细胞培养皿中加入RIPA裂解液，提取总蛋白。根据BCA试剂盒进行蛋白定量，按上述1.2.5方法检测E4BP4、AMPK、p-AMPK、TGF-β1、p-SMAD和SMAD的蛋白表达量，并以GAPDH作为内参计算相对表达量。

1.2.9 细胞总RNAs的提取和表达量检测 将细胞加入氯仿（1 mL Trizol/0.2 mL氯仿）充分乳化后，取上清液加入等体积异丙醇，离心后弃上清液，加入75%无水乙醇（1 mL Trizol/1 mL无水乙醇）漂洗，干燥，加入RNase-Free water 20 μL溶解，以提取细胞中总RNAs。测量浓度后，取1 μg总RNAs按1.2.4方法计算E4BP4、Collagen Ⅰ、Collagen Ⅲ和α-SMA表达量。

1.3 统计学方法

采用SPSS 22.0统计软件进行处理。计量资料采用均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，符合正态分布者使用独立样本t检验，非正态数据的计量资料应用中位数（四分位间距）[M_d（P_{25}，P_{75}）]，两样本比较采用秩和检验；计数资料采用率表示，2组间比较采用卡方检验；多组间计量资料采用单因数方差分析，事后采用LSD检验或Dunnett's $T3$检验进行组间两两比较。检验水准α=0.05。

2 结 果

2.1 模型组小鼠心脏左心室扩大，心功能下降

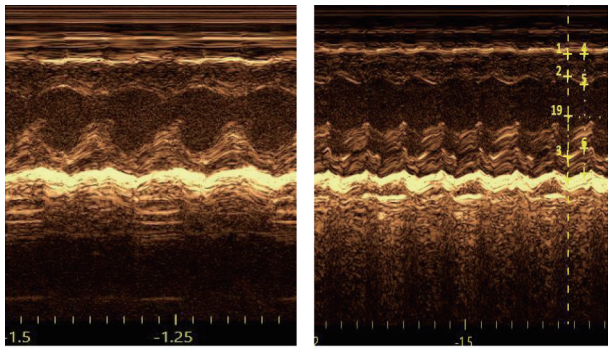
建模8周，实验组死亡2只，分别于建模型后40 d和45 d，假手术组未死亡，存活小鼠经心脏彩超检查发现，模型组小鼠左心室增大，心功能降低。模型组LVEDD和LVESD值均大于假手术组，而LVEF值小于假手术组，差异有统计学意义（表1，图1A）；取左心室心肌组织行Masson染色发现：模型组心肌纤维排列紊乱，细胞空泡化增多，间质见大量蓝染的纤维组织沉积，而假手术组心肌组织排列整齐，细胞未见空泡表现，间质内见少量纤维组织（图1B）。分别计算2组CVF值发现，模型组CVF明显高于假手术组，差异有统计学意义（表1）。

表1 2组心脏彩超测值和心肌组织胶原容积分数比较（$\bar{x}\pm s$）

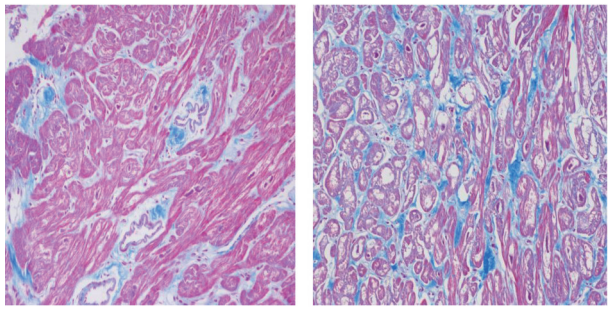
组别	LVEED（mm）	LVESD（mm）	LVEF（%）	CVF（%）
假手术组（n=10）	3.54±0.21	2.20±0.17	68.78±4.59	3.39±0.39
模型组（n=8）	3.79±0.13	2.80±0.18	49.77±5.04	38.46±1.21
t值	−3.053	−7.336	8.262	−78.564
P值	0.008	<0.001	<0.001	<0.001

2.2 模型组E4BP4和纤维化标志物表达量明显增加

首先，在2组左心室心肌组织测量了纤维化标志物α-SMA、collagen Ⅰ、collagen Ⅲ的mRNA表达水平，结果显示，以对照组的表达量（1.00±0.00）为参考，α-SMA、collagen Ⅰ和collagen Ⅲ在模型组表达量分别为3.20±0.43（t=−14.513，P<0.001）、4.78±0.93（t=−11.480，P<0.001）和2.25±0.46（t=−7.735，P<0.001），明显高于假手术组（图2A）；为了明确E4BP4的表达情况，分别用PCR和免疫印迹方法测量了E4BP4在2组中的表达，结果表明：模型组E4BP4的mRNA表达量为假手术组的（2.13±0.36）倍，较假手术组明显增加（t=−15.348，P<0.001）（图2B）；在蛋白表达方面，E4BP4在假手术组和模型组的表达量分别是（0.75±0.03 vs. 0.96±0.03），模型组明显高于假手术组（t=−11.480，P<0.001）（图2C、D）。

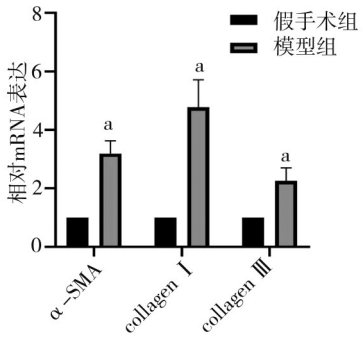


A. 2 组小鼠心脏彩超检查

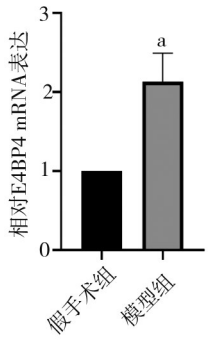


B. 左心室心肌组织Masson染色（200×）

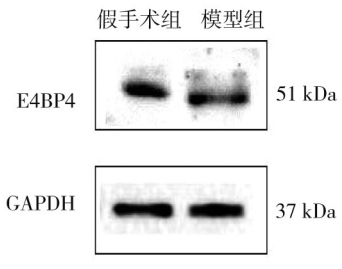
图1　2组小鼠心脏彩超检查和心肌组织Masson染色图片



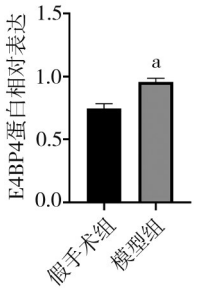
A. 心肌组织α-SMA、collagen Ⅰ和collagen Ⅲ mRNA水平



B. 心肌组织中E4BP4 mRNA表达水平



C. 蛋白质印迹检测心肌组织E4BP4蛋白表达



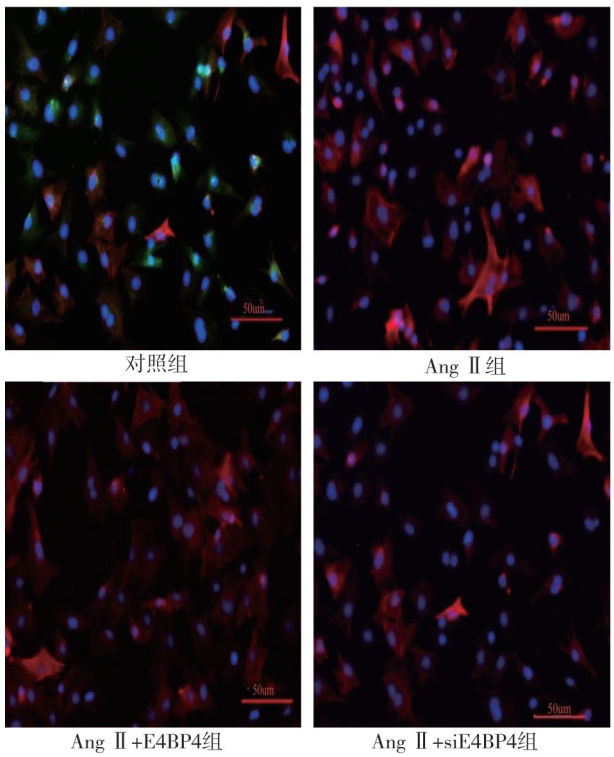
D. 心肌组织E4BP4蛋白相对表达

注：a，与假手术组相比，$P<0.05$

图2　2组心肌组织E4BP4、α-SMA、collagen Ⅰ和collagen Ⅲ的表达情况

2.3　抑制E4BP4表达可逆转Ang Ⅱ诱导的心脏成纤维细胞活化

α-SMA的高表达被认为是成纤维细胞活化后转分为肌成纤维细胞的标志。首先，本研究通过免疫荧光检测α-SMA阳性染性情况，可见，对照组细胞排列稀疏，细胞α-SMA染色少，使用Ang Ⅱ刺激后，细胞排列致密，α-SMA染色增加；过表达E4BP4后，α-SMA染色进一步增加，而干扰E4BP4表达后，情况改善（图3）；通过测量平均荧光强度发现，Ang Ⅱ组荧光强度明显高于对照组，Ang Ⅱ+E4BP4组荧光强度明显高于Ang Ⅱ组，抑制E4BP4表达后，Ang Ⅱ+siE4BP4组的荧光强度明显低于Ang Ⅱ组和Ang Ⅱ+E4BP4组，差异均有统计学意义（$F=677.591$，$P<0.001$）（表2）。随后，本研究通过CCK-8试验检测了各组成纤维细胞的活力，结果发现，与对照组相比，Ang Ⅱ组成纤维细胞活力明显增加，过表达E4BP4后，与Ang Ⅱ组比较，Ang Ⅱ+E4BP4组成纤维细胞活力明显增加，抑制E4BP4表达后，与Ang Ⅱ+E4BP4组和Ang Ⅱ组比较，Ang Ⅱ+siE4BP4组的细胞活力明显下降，差异均有统计学意义（$F=132.696$，$P<0.001$）（表2）。



注：红色为α-SMA；标尺=50 μm

图3　免疫荧光检测各组成纤维细胞α-SMA染色情况

2.4　抑制E4BP4表达可降低纤维化标志物的表达水平

首先本研究在各组细胞中检测了E4BP4 mRNA表达水平，结果发现：E4BP4 mRNA的表达量在Ang Ⅱ组较对照组明显升高，在Ang Ⅱ+E4BP4组较Ang Ⅱ组明显升高，转染siE4BP4后，E4BP4 mRNA在Ang Ⅱ+siE4BP4组的表达量较Ang Ⅱ+E4BP4组和Ang Ⅱ组均明显下降，差异有统计学意义（$F=55.810$，$P<0.001$），证明转染成功（表3）。

为了明确E4BP4对纤维化标志物表达的影响，本研究进一步在成纤维细胞中检测了纤维化相关标志物（α-SMA、

表2 各组平均荧光强度和成纤维细胞活力比较（$\bar{x}\pm s$；n=5）

组别	平均荧光强度	细胞活力（%）
对照组	0.05 ± 0.01	100.00 ± 2.05
Ang Ⅱ组	0.13 ± 0.01[a]	117.04 ± 4.13[a]
Ang Ⅱ+E4BP4组	0.42 ± 0.01[b]	123.74 ± 2.60[b]
Ang Ⅱ+siE4BP4组	0.05 ± 0.01[bc]	91.30 ± 2.39[bc]
F值	677.591	132.696
P值	<0.001	<0.001

注：a，与对照组比较，P<0.05；b，与Ang Ⅱ组比较，P<0.05；c，与Ang Ⅱ+E4BP4组比较，P<0.05

collagen Ⅰ和collagen Ⅲ）的表达情况，结果发现，与对照组比较，Ang Ⅱ组α-SMA、collagen Ⅰ和collagen Ⅲ的mRNA表达水平均明显升高；过表达E4BP4后，与Ang Ⅱ组比较，Ang Ⅱ+E4BP4组α-SMA、collagen Ⅰ和collagen Ⅲ的mRNA表达水平明显升高，而抑制E4BP4表达后，与Ang Ⅱ+E4BP4组和Ang Ⅱ组比较，Ang Ⅱ+siE4BP4组α-SMA、collagen Ⅰ和collagen Ⅲ的mRNA表达量均明显下降（F=52.274、55.336、119.929，P<0.001）（表3）。

2.5 各组细胞中信号通路相关蛋白的表达变化

为明确TGF-β1/SMAD3通路是否参与了该过程的调节以及它与AMPK的关系，本研究对相关通路关键蛋白表达情况进行了检测，结果发现：心脏成纤维细胞通过转染siE4BP4抑制E4BP4表达后，与对照组比较，siE4BP4组TGF-β1、p-SMAD3/SMAD3的蛋白表达量明显下降，p-AMPK/AMPK的表达水平明显升高。另外，心脏成纤维细胞受Ang Ⅱ刺激活化后，与对照组比较，Ang Ⅱ组和Ang Ⅱ+E4BP4组TGF-β1、p-SMAD3/SMAD3的蛋白表达量明显升高，p-AMPK/AMPK的表达水平明显降低；Ang Ⅱ+E4BP4组TGF-β1、p-SMAD/SMAD的表达水平较Ang Ⅱ组明显升高，而p-AMPK/AMPK表达水平降低；Ang Ⅱ+siE4BP4组TGF-β1、p-SMAD/SMAD的蛋白表达水平较Ang Ⅱ组和Ang Ⅱ+E4BP4组均明显降低，p-AMPK/AMPK表达水平较Ang Ⅱ组和Ang Ⅱ+E4BP4组都明显升高（F=142.954、739.609、284.541，P<0.001）（表4，图4）。

3 讨 论

心脏纤维化可发生在几乎所有类型的心脏病中[13]。进行性的心脏纤维化可严重破坏心脏结构，导致心脏收缩和舒张功能进行性下降，出现恶性心律失常、心功能衰竭甚至死亡的严重后果。目前针对心脏纤维化尚无高效特异的治疗方案[1]。E4BP4是碱性亮氨酸拉链转录因子家族成员之一[8,14]，可通过结合特定的DNA序列D-box来调节基因转录。研究表明，E4BP4在患病的心脏组织中高表达，参与了多种心血管病的发生和心衰的进展[8,15]，但在心脏纤维化过程的调控机制仍不清楚。本研究通过体内和体外实验发现E4BP4在纤维化的小鼠心肌组织和经Ang Ⅱ诱导活化心脏成纤维细胞中表达明显升高，进一步通过体内实验发现，过表达E4BP4可抑制AMPK的活化，并激活TGF-β1/SMAD3通路加重纤维化反应，而抑制E4BP4可激活AMPK，抑制TGF-β1/SMAD3活化发挥抗纤维化作

表3 各组细胞中 *E4BP4*、*α-SMA*、*collagen* Ⅰ和 *collagen* Ⅲ mRNAs表达水平比较（$\bar{x}\pm s$；n=5）

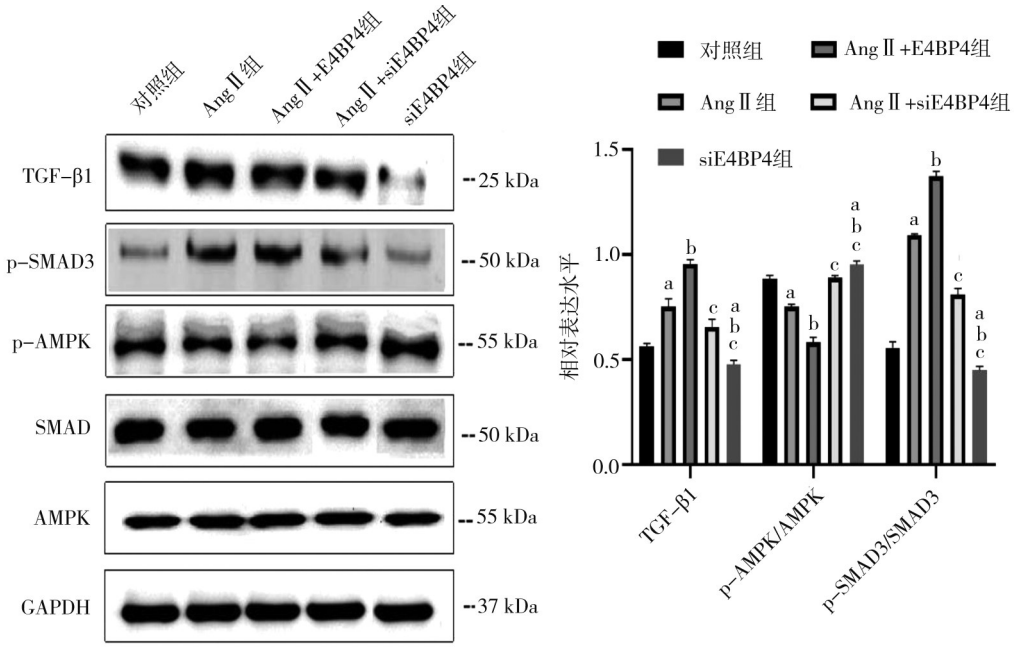
组别	*E4BP4*	*α-SMA*	*collagen* Ⅰ	*collagen* Ⅲ
对照组	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.10
Ang Ⅱ组	2.12 ± 0.28[a]	2.01 ± 0.42[a]	2.58 ± 0.54[a]	1.76 ± 0.25[a]
Ang Ⅱ+E4BP4组	4.39 ± 1.37[b]	3.59 ± 0.86[b]	3.79 ± 0.89[b]	2.92 ± 0.36[b]
Ang Ⅱ+siE4BP4组	0.47 ± 0.08[bc]	1.26 ± 0.09[bc]	1.16 ± 0.11[bc]	1.23 ± 0.13[bc]
F值	55.810	52.274	55.336	119.929
P值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注：a，与对照组比较，P<0.05；b，与Ang Ⅱ组比较，P<0.05；c，与Ang Ⅱ+E4BP4组比较，P<0.05

表4 各组细胞中信号通路关键蛋白表达水平比较（$\bar{x}\pm s$；n=5）

组别	TGF-β1	p-AMPK/AMPK	p-SMAD/SMAD
对照组	0.56 ± 0.02	0.88 ± 0.01	0.56 ± 0.03
Ang Ⅱ组	0.75 ± 0.04[a]	0.75 ± 0.01[a]	1.09 ± 0.01[a]
Ang Ⅱ+E4BP4组	0.96 ± 0.02[b]	0.58 ± 0.02[b]	1.37 ± 0.02[b]
Ang Ⅱ+siE4BP4组	0.66 ± 0.04[bc]	0.89 ± 0.01[bc]	0.81 ± 0.03[bc]
siE4BP4组	0.48 ± 0.02[abc]	0.95 ± 0.02[abc]	0.45 ± 0.02[abc]
F值	142.954	284.541	739.609
P值	<0.001	<0.001	<0.001

注：a，与对照组比较，P<0.05；b，与Ang Ⅱ组比较，P<0.05；c，与Ang Ⅱ+E4BP4组比较，P<0.05



A. 蛋白质印迹检测各组细胞中TGF-β1、p-SMAD3、SMAD3、p-AMPK和AMPK的表达

B. 各组细胞中TGF-β1、p-SMAD3、SMAD3、p-AMPK和AMPK的表达量比较

注：a，与对照组比较，$P<0.05$；b，与 Ang Ⅱ组比较，$P<0.05$；c，与 Ang Ⅱ+E4BP4 组比较，$P<0.05$；磷酸化位点，p-AMPK-α1（T183）和α2（T172）；p-SMAD3，S204

图4　各组成纤维细胞中 TGF-β、p-SMAD3、SMAD3、p-AMPK 和 AMPK 的表达水平

用。可见，E4BP4 是心肌纤维化的关键调节因子，可通过 AMPK-TGF-β1/SMAD3 通路调控病理性心肌纤维化过程。

抑制 E4BP4 可逆转 Ang Ⅱ诱导的心脏成纤维细胞的活化和纤维化反应。心脏成纤维化细胞是心肌纤维化的主要效应细胞。其不仅是正常心脏 ECM 的来源，更是心脏病理变化的关键中介细胞，在损伤过程中，心脏成纤维细胞被激活，并转分化为肌成纤维细胞，高表达 α-SMA 是肌成纤维细胞分化成熟的标志。肌成纤维细胞具有增殖和侵袭特性，不仅参与 ECM 的合成和沉积，还可分泌降解细胞外基质的金属蛋白酶和增加胶原周转来重塑间质，导致胶原网形成[16]。另外，肌成纤维细胞还可通过自分泌信号形成正反馈进一步诱导成纤维细胞的活化[17]。Ang Ⅱ是心肌肥厚、纤维化和心衰的重要危险因素，可调节心肌细胞、心脏成纤维细胞等多种细胞类型，通过激活 1 型血管紧张素受体增强胶原合成[18]。本实验使用 Ang Ⅱ诱导心脏成纤维细胞发生纤维化反应，通过免疫荧光对 α-SMA 染色和 CCK-8 细胞活性检测发现，Ang Ⅱ组细胞成纤维细胞活性增加，E4BP4 的蛋白表达明显增加，且 α-SMA、collagen Ⅰ和 collagen Ⅲ型蛋白 mRNA 表达也明显增加。通过转染 pcDNA3.1-E4BP4 过表达 E4BP4 后，纤维化蛋白标志物（α-SMA、collagen Ⅰ和 collagen Ⅲ）的表达水平较 Ang Ⅱ组明显增加，而转染 siE4BP4 下调 E4BP4 表达后，纤维化蛋白标志物表达明显下降，α-SMA 平均荧光强度减弱，细胞活力下降，可见成纤维细胞的纤维化反应受到抑制。体内实验也发现，建模 8 周后，模型组小鼠左心室较假手术组增大，左心功能降低，心肌组织切片示纤维化程度明显增加，心肌组织中 E4BP4 的表达较假手术组明显增加，证明 E4BP4 参与了心脏纤维化过程。既往研究也发现，E4BP4 在心、肝、肠、肾等多种组织中广泛表达，参与昼夜节律、免疫细胞分化、神经再生和能量代谢等的调节。在肿瘤中的研究发现，E4BP4 诱导结直肠癌细胞上皮-间质转化促进了其侵袭和转移[19]。最近的研究也发现，E4BP4 在三阴乳腺癌组织中的表达水平明显高于正常乳腺组织[20]；另外，E4BP4 还参与炎症反应过程，可视为神经退行性疾病和炎症性疾病等的生物标志物[21]。此外，E4BP4 还参与信号通路的调节。据报道，E4BP4 可通过核因子 κb、活性氧途径与肿瘤坏死因子-α 信号通路相关[22]。在心血管病中，E4BP4 与细胞凋亡和衰老有关，免疫组织化学显示，与健康心脏组织相比，病

变心脏组织中E4BP4蛋白过表达[8]，参与心血管疾病的发生[23]。Wang YT等[15]的研究也发现，E4BP4可干扰人参皂苷RH4的抗纤维化反应，这与本研究相合，证明E4BP4是纤维化的重要调控因子，参与了纤维化过程，但具体的调控机制尚不清楚。

E4BP4可调节AMPK活性，下调E4BP4可激活AMPK抑制纤维化反应。AMPK是调控能量代谢关键蛋白，其机制是通过感知能量状态来维持细胞能量平稳，广泛参与了炎症、氧化应激、细胞自噬和线粒体功能等过程的调节。AMPK也可作为关键蛋白参与多种信号通路的调节。既往研究发现，激活AMPK/SirT1信号通路是改善肝炎症和缓解肝纤维化进展的有效途径之一[24]。虫草菌丝通过激活AMPK/ SirT 1信号通路提高了抗炎能力，从而抑制四氧化碳诱导的小鼠肝纤维化反应[25]。本研究也发现，过表达E4BP4后AMPK受到抑制，p-AMPK/AMPK表达下调，心脏成纤维化细胞活化，纤维化标志物表达增加。下调E4BP4表达后，AMPK发生磷酸化激活，纤维化反应受到抑制。可见，E4BP4可介导AMPK的活性进而调控心脏纤维反应，下调E4BP4表达可抑制Ang Ⅱ诱导纤维化反应。

TGF-β1/SMAD3信号通路参与了纤维化过程。本研究发现，过表达E4BP4后，TGF-β1在Ang Ⅱ+E4BP4组中的表达较Ang Ⅱ组明显增加，而抑制E4BP4表达后，TGF-β1的表达受到明显抑制，由此可见，E4BP4可激活TGF-β1表达，调节纤维化过程。TGF-β1是重要的促纤维化因子之一，它可由心脏成纤维细胞、心肌细胞、内皮细胞等产生，与其1-型受体相互作用，促进SMAD2和SMAD3的磷酸化，并与SMAD4形成复合物转运到细胞核中引起一系列反应，包括成纤维细胞的增殖和激活、胶原合成和过度的细胞外基质沉积[26]。另外，TGF-β1可诱导结缔组织生长因子的表达，并介导心脏中的多种下游促纤维化作用[13]。既往研究发现，体外抑制TGF-β1受体活性可导致肌成纤维细胞去分化，并减少细胞中编码纤维化蛋白的基因表达[27]；体内抑制TGF-β1受体可减少压力过载小鼠心肌胶原沉积[20]，减轻纤维化程度[28]。最近的1项研究发现：毛蕊异黄酮在体外实验中可通过抑制TGF-β1信号通路抑制成纤维细胞的增殖和胶原沉积[29]。这与本研究相符，证明TGF-β1/SMAD3信号通路在心肌纤维化过程中发挥着重要的调控作用。

AMPK与TGF-β1/SMAD3信号通路相关，E4BP4可通过AMPK调控TGF-β1/SMAD3信号通路影响纤维化过程。既往研究发现：AMPK可抑制TGF-β1的表达，进而抑制了SMAD3的磷酸化抑制了胃癌的进展[30]；在纤维化方面：生长分化因子15可通过激活AMPK减弱TGF-β1/SMAD3通路，抑制肝脏糖异生和纤维化[31]；TGF-β1/SMAD3通过调控程序化细胞死亡分子5抑制心肌梗死后心肌纤维化和心功能障碍[32]；另一研究也发现，齐墩果酸可能通过激活SIRT3/AMPK通路，抑制TGF-β/SMAD3通路，抑制心肌组织炎症、凋亡和纤维化反应[33]。在本研究也发现，过表达E4BP4后，AMPK的磷酸化受到抑制，TGF-β1、p-SMAD3表达增加，心脏成纤维细胞中纤维化标志物表达增加，而抑制E4BP4表达后，AMPK发生磷酸化被激活，TGF-β/p-SMAD3通路受到抑制，纤维化反应减弱。由此可证明，E4BP4通过抑制AMPK的活化，进而激活TGF-β1/SMAD3通路，延缓病理性心脏纤维化。

总之，本研究揭示E4BP4参与病理性心肌纤维化过程，抑制它的表达，可通过激活AMPK，进而抑制TGF-β1/SMAD3信号通路抑制成纤维化细胞的增殖活化，降低纤维化相关蛋白（α-SMA、collagen Ⅰ和collagen Ⅲ）表达，发挥抗心脏纤维化作用。由此可见，E4BP4可作为调控靶点，为延缓心肌纤维化提供治疗策略。

参 考 文 献

[1] de Boer RA, De Keulenaer G, Bauersachs J, et al. Towards better definition, quantification and treatment of fibrosis in heart failure. A scientific roadmap by the Committee of Translational Research of the Heart Failure Association（HFA）of the European Society of Cardiology[J]. Eur J Heart Fail, 2019, 21(3): 272-285.

[2] Banks TE, Rajapaksha M, Zhang LH, et al. Suppression of angiotensin Ⅱ-activated NOX4/NADPH oxidase and mitochondrial dysfunction by preserving glucagon-like peptide-1 attenuates myocardial fibrosis and hypertension[J]. Eur J Pharmacol, 2022, 927: 175048.

[3] Stacey RB, Hundley WG. Integrating measures of myocardial fibrosis in the transition from hypertensive heart disease to heart failure[J]. Curr Hypertens Rep, 2021, 23(4): 22.

[4] Henderson NC, Rieder F, Wynn TA. Fibrosis: from mechanisms to medicines[J]. Nature, 2020, 587(7835): 555-566.

[5] Wang X, Wang Q, Wang K, et al. Is immune suppression involved in the ischemic stroke? A study based on computational biology[J]. Front Aging Neurosci, 2022, 14: 830494.

[6] Hou SQ, Chen DD, Liu J, et al. Profiling and molecular mechanism analysis of long non-coding RNAs and mRNAs in pulmonary arterial hypertension rat models[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 709816.

[7] Velmurugan BK, Chang RL, Marthandam Asokan S, et al. A mini-review of E4BP4/NFIL3 in heart failure[J]. J Cell Physiol, 2018, 233(11): 8458-8466.

[8] Zeng GG, Zhou J, Jiang WL, et al. A potential role of NFIL3 in atherosclerosis[J]. Curr Probl Cardiol, 2024, 49(1 Pt B): 102096.

[9] Yang MC, Zhang DQ, Zhao ZF, et al. Hepatic E4BP4 induction promotes lipid accumulation by suppressing AMPK signaling in response to chemical or diet-induced ER stress[J]. FASEBJ, 2020, 34(10): 13533-13547.

[10] Ai YL, Wang WJ, Liu FJ, et al. Mannose antagonizes GSDME-mediated pyroptosis through AMPK activated by metabolite GlcNAc-6P[J]. Cell Res, 2023, 33(12): 904-922.

[11] Jiang YX, Li W, Wang J, et al. Cardiac dysfunction is attenuated by ginkgolide B via reducing oxidative stress and fibrosis in diabetic rats[J]. Iran J Basic Med Sci, 2020, 23(8): 1078-1084.

[12] Zhao YQ, Sun DJ, Chen YM, et al. Si-Miao-Yong-An Decoction attenuates isoprenaline-induced myocardial fibrosis in AMPK-driven Akt/mTOR and TGF-β/SMAD3 pathways[J]. Biomedecine Pharmacother, 2020, 130: 110522.

[13] Liu MR, de Juan Abad BL, Cheng K. Cardiac fibrosis: Myofibroblast-mediated pathological regulation and drug delivery strategies[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2021, 173: 504-519.

[14] Ren SJ, Sun GH, Wu ZP, et al. Mmu-miR-199a-5p regulates CYP2B10 through repression of E4BP4 in mouse AML-12 hepatocytes[J]. Xenobiotica, 2021, 51(10): 1101-1109.

[15] Wang YT, An XB, Wang F, et al. Ginsenoside RH4 inhibits Ang Ⅱ-induced myocardial remodeling by interfering with NFIL3[J]. Biomed Pharmacother, 2024, 172: 116253.

[16] Jellis C, Martin J, Narula J, et al. Assessment of nonischemic myocardial fibrosis[J]. J Am Coll Cardiol, 2010, 56(2): 89-97.

[17] Bomb R, Heckle MR, Sun Y, et al. Myofibroblast secretome and its auto-/ paracrine signaling[J]. Expert Rev Cardiovasc Ther, 2016, 14(5): 591-598.

[18] Villapol S, Janatpour ZC, Affram KO, et al. The renin angiotensin system as a therapeutic target in traumatic brain injury[J]. Neurotherapeutics, 2023, 20(6): 1565-1591.

[19] Qi JJ, Yu Y, Akilli Öztürk Ö, et al. New Wnt/β-catenin target genes promote experimental metastasis and migration of colorectal cancer cells through different signals[J]. Gut, 2016, 65(10): 1690-1701.

[20] Yang WW, Li J, Zhang MH, et al. Elevated expression of the rhythm gene *NFIL3* promotes the progression of TNBC by activating NF-κB signaling through suppression of NFKBIA transcription[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2022, 41(1): 67.

[21] Tang HH, Tan CY, Cao X, et al. NFIL3 facilitates neutrophil autophagy, neutrophil extracellular trap formation and inflammation during gout *via* REDD1-dependent mTOR inactivation[J]. Front Med, 2021, 8: 692781.

[22] Cao JG, Ding H, Shang J, et al. Weighted gene co-expression network analysis reveals specific modules and hub genes related to immune infiltration of osteoarthritis[J]. Ann Transl Med, 2021, 9(20): 1525.

[23] Li Y, Liu XP, Du AL, et al. miR-203 accelerates apoptosis and inflammation induced by LPS via targeting NFIL3 in cardiomyocytes[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(4): 6605-6613.

[24] Ruderman NB, Xu XJ, Nelson L, et al. AMPK and SIRT1: a long-standing partnership?[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2010, 298(4): 751-760.

[25] 杨 钊, 闫阮玉, 吴洪雨, 等. 虫草菌丝调节 AMPK/SirT1 信号通路对四氯化碳诱导肝纤维化小鼠的作用[J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(5): 630-637.

Yang Z, Yan RY, Wu HY, et al. Effects of cultured *Mycelium Cordyceps sinensis* on carbon tetrachloride-induced liver fibrosis mice by regulating AMPK/SirT1 signaling pathway[J]. Acta Lab Animalis Sci Sin, 2024, 32(5): 630-637.

[26] Travers JG, Tharp CA, Rubino M, et al. Therapeutic targets for cardiac fibrosis: from old school to next-gen[J]. J Clin Invest, 2022, 132(5): e148554.

[27] Nagaraju CK, Robinson EL, Abdesselem M, et al. Myofibroblast phenotype and reversibility of fibrosis in patients with end-stage heart failure[J]. J Am Coll Cardiol, 2019, 73(18): 2267-2282.

[28] Liu CH, Lim ST, Teo MHY, et al. Collaborative regulation of LRG1 by TGF-β1 and PPAR-β/δ modulates chronic pressure overload-induced cardiac fibrosis[J]. Circ Heart Fail, 2019, 12(12): e005962.

[29] Chen GH, Xu HL, Xu T, et al. Calycosin reduces myocardial fibrosis and improves cardiac function in post-myocardial infarction mice by suppressing TGFBR1 signaling pathways[J]. Phytomedicine, 2022, 104: 154277.

[30] Zou JR, Li C, Jiang SS, et al. AMPK inhibits Smad3-mediated autoinduction of TGF-β1 in gastric cancer cells[J]. J Cell Mol Med, 2021, 25(6): 2806-2815.

[31] Jurado-Aguilar J, Barroso E, Bernard M, et al. GDF15 activates AMPK and inhibits gluconeogenesis and fibrosis in the liver by attenuating the TGF-β1/SMAD3 pathway[J]. Metabolism, 2024, 152: 155772.

[32] Weng L, Ye JJ, Yang FH, et al. TGF-β1/SMAD3 regulates programmed cell death 5 that suppresses cardiac fibrosis post-myocardial infarction by inhibiting HDAC3[J]. Circ Res, 2023, 133(3): 237-251.

[33] 杨丽霞, 徐丹桂, 陈 琦, 等. 基于SIRT3/AMPK通路探讨齐墩果酸对病毒性心肌炎小鼠炎症及纤维化损伤的影响[J]. 中成药, 2024, 46(7): 2389-2395.

Yang LX, Xu DG, Chen Q, et al. Effects of oleanolic acid on inflammation and fibrosis in mice with viral myocarditis based on SIRT3/AMPK pathway[J]. Chin Tradit Pat Med, 2024, 46(7): 2389-2395.

（责任编辑：曾 玲）

本文引用格式：

黄德荣, 文 庆, 苏宇辰. 转录因子 E4BP4 通过 AMPK-TGF-β1/SMAD3 信号转导途径调控病理性心肌纤维化[J]. 重庆医科大学学报, 2025, 50(5): 640-648.