

·基础研究·

具有序列相似性的家族162成员A抑制心肌成纤维细胞 纤维化表型的作用

周川孟¹, 关佩莹², 吴茹诗², 朱杰宁³, 方俊涛⁴, 刘宇鹏⁴, 方咸宏⁴, 单志新^{1,3}

(1. 南方医科大学附属广东省人民医院//广东省医学科学院, 广东广州 510080; 2. 华南理工大学医学院, 广东广州 510006; 3. 广东省临床药理学重点实验室//南方医科大学附属广东省人民医院//广东省医学科学院, 广东广州 510080; 4. 广东省心血管病研究所//南方医科大学附属广东省人民医院//广东省医学科学院, 广东广州 510080)

摘要:【目的】探讨线粒体内膜蛋白具有序列相似性的家族162成员A(Fam162a)在心肌纤维化中的表达及其对于心肌成纤维细胞纤维化表型的调控作用。【方法】利用心力衰竭(HF)患者的心肌样本、主动脉缩窄手术(TAC)诱导心肌重构的小鼠心肌组织,检测Fam162a蛋白表达水平。分离培养新生小鼠原代心肌成纤维细胞(mCFs),建立血管紧张素II(Ang II)诱导的心肌纤维化细胞模型,检测Fam162a蛋白表达水平。利用重组腺病毒介导在mCFs中过表达Fam162a,利用小干扰RNA(siRNA)进行mCFs中Fam162a的敲降。采用Western blot检测纤维化相关蛋白(包括COL1A1、COL3A1、 α -SMA)表达,EdU染色实验评估细胞增殖能力,划痕和Transwell实验评估细胞的迁移能力,免疫荧光实验检测线粒体膜电位(TMRE)变化,分别检测mCFs内总活性氧(ROS)和活细胞线粒体内ROS水平,检测ATP水平反映细胞整体能量代谢情况。【结果】Western blot结果显示在HF患者、TAC小鼠心肌及Ang II处理的mCFs中COL1A1、COL3A1和 α -SMA表达显著上升,而Fam162a表达显著下降(均 $P<0.05$)。利用腺病毒介导过表达Fam162a可显著抑制Ang II诱导的mCFs中纤维化相关基因表达、抑制mCFs增殖和迁移能力,而通过siRNA敲降Fam162a可加剧Ang II诱导的mCFs纤维化表型。进一步研究发现,在加入线粒体氧化呼吸链阻滞剂鱼藤酮(Rotenone)后,过表达Fam162a抑制Ang II诱导的mCFs纤维化表型的作用被抑制,并且伴随出现线粒体膜电位下降、ROS大量产生而ATP生成不足。【结论】Fam162a通过维持线粒体膜电位,促进ATP生成,降低ROS产生和Smad3信号活化发挥抑制心肌成纤维细胞纤维化表型的作用。

关键词:具有序列相似性的家族162成员;心肌纤维化;心肌成纤维细胞;线粒体功能;氧化磷酸化

中图分类号:R363.2 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2026)02-0238-13

DOI: 10.11714/jssysu.med.YX20250186

Inhibitory Role of Family with Sequence Similarity 162 Member A in the Fibrotic Phenotypes of Cardiac Fibroblasts

ZHOU Chuanmeng¹, GUAN Peiying², WU Rushi², ZHU Jiening³, FANG Juntao⁴, LIU Yupeng⁴,
FANG Xianhong⁴, SHAN Zhixin^{1,3}

(1. Guangdong Provincial People's Hospital//Guangdong Academy of Medical Sciences//Southern Medical University, Guangzhou 510080, China; 2. School of Medicine, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China; 3. Guangdong Provincial Key Laboratory of Clinical Pharmacology//Guangdong Provincial People's Hospital//Guangdong Academy of Medical Sciences//Southern Medical University, Guangzhou 510080, China; 4. Guangdong Cardiovascular Institute//Guangdong Provincial People's Hospital//Guangdong Academy of Medical Sciences//Southern Medical University, Guangzhou 510080, China)

Correspondence to: SHAN Zhixin; E-mail: shanzhixin@gdph.org.cn

收稿日期:2025-12-05

录用日期:2026-02-14

基金项目:国家自然科学基金(92581127, 82570331, 82470253, 82300277);广东省自然科学基金(2026A1515010222, 2025A1515011249, 2025A1515010873);广州市科技局青年医师启航计划项目(2025A04J4716)

作者简介:周川孟,第一作者,研究方向:心肌纤维化的分子机制,E-mail:13541666148@163.com;单志新,通信作者,研究员,博士生导师,研究方向:非编码RNA与心肌重构,E-mail:shanzhixin@gdph.org.cn

Abstract: [Objective] To investigate the expression of family with sequence similarity 162 member A (Fam162a), a mitochondrial inner membrane protein, in the fibrosis of cardiac fibroblasts and its regulatory role in modulating the fibrotic phenotype of cardiac fibroblasts. [Methods] Fam162a protein expression was detected in myocardial samples from patients with heart failure (HF) and mice with transverse aortic constriction (TAC)-induced myocardial remodeling. Primary neonatal mouse cardiac fibroblasts (mCFs) were isolated and cultured, and a cell model of angiotensin II (Ang II)-induced myocardial fibrosis was established to determine Fam162a protein expression. Recombinant adenovirus was used to mediate Fam162a overexpression, while small interfering RNA (si-RNA) was employed for Fam162a knockdown. Western blot was performed to detect the expression of fibrosis-related proteins, including COL1A1, COL3A1, and α -SMA. EdU staining assay was used to evaluate cell proliferation capacity, and scratch assay combined with Transwell assay was conducted to assess cell migration ability. Immunofluorescence assay was applied to measure mitochondrial membrane potential for reflecting mitochondrial dysfunction; reactive oxygen species (ROS) detection was performed to evaluate cellular oxidative stress status; MitoSox assay was used to reflect the degree of mitochondrial oxidative damage; and ATP detection was conducted to assess the overall cellular energy metabolism. [Results] Fam162a expression was significantly downregulated in the myocardium of HF patients and TAC mice, and Ang II-treated mCFs, accompanied by increased expression of COL1A1, COL3A1, and α -SMA (all $P < 0.05$). Adenovirus-mediated overexpression of Fam162a significantly inhibited Ang II-induced upregulation of fibrosis-related genes, as well as cell proliferation and migration. Accordingly, silencing Fam162a aggravated the fibrotic phenotypes of mCFs treated with Ang II. Further studies revealed that the inhibitory effect of Fam162a overexpression on Ang II-induced fibrotic phenotype was suppressed following the addition of rotenone (a mitochondrial oxidative respiratory chain inhibitor), which was accompanied by mitochondrial membrane potential depolarization, excessive ROS production, and insufficient ATP generation. [Conclusion] Fam162a exerts its inhibitory effect on the fibrotic phenotype of cardiac fibroblasts by maintaining mitochondrial membrane potential, promoting ATP production, reducing reactive oxygen species (ROS) generation, and suppressing Smad3 signaling activation.

Key words: Fam162a; myocardial fibrosis; cardiac fibroblast; mitochondrial function; oxidative phosphorylation

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2026, 47(2): 238-250]

心肌纤维化(myocardial fibrosis, MF)是多种心血管疾病进展为心力衰竭与致死性心律失常的核心组织学变化,其典型病理特征为间质成纤维细胞被异常激活,肌成纤维细胞获得特定表型,并且细胞外基质(extracellular matrix, ECM)出现过度沉积现象,这一系列变化最终致使心室顺应性显著降低,心脏电传导发生异常,进而引发一系列严重的心血管事件^[1-2]。目前国内外在心肌纤维化的研究已涵盖病理生理学、细胞表型谱系追踪、信号通路(如TGF- β /Smad、炎症性细胞因子)与干预策略(包括小分子、抗体、核酸疗法及部分中药复方)的广泛探索,但仍缺乏对纤维化细胞代谢、线粒体稳态与细胞特异性分子调控的系统性验证,且有效的临床抗纤维化药物仍非常有限^[3-6]。线粒体功能障碍、氧化应激与缺氧应答在心肌纤维化的发生与维持过程中扮演着重要角色,越来越多的证据对此进行

了有力证明。线粒体作为细胞的“能量工厂”,一旦受到损伤,会通过多种途径加剧心肌细胞损伤并促发炎症微环境。具体而言,线粒体损伤会导致活性氧(ROS)大量释放,线粒体DNA(mtDNA)外泄,同时能量代谢出现紊乱。这些变化不仅直接损伤心肌细胞,还会激活周围的成纤维细胞,促使细胞外基质发生重塑,进而推动心肌纤维化的进展。线粒体相关因子被视为新的抗纤维化潜在靶点,为开发新型抗纤维化药物提供了新的方向^[7-9]。具有序列相似性的家族162成员A(family with sequence similarity 162 member A, Fam162a)是一种线粒体定位的缺氧响应蛋白,早期研究显示其为缺氧诱导因子 α (hypoxia-inducible factor 1 alpha, HIF-1 α)下游的促凋亡分子,在多种细胞类型的缺氧诱导细胞死亡中发挥作用^[10-11]。最近的转录组与蛋白组研究提示Fam162a在心脏组织中表达富集,并在某些

心肌病模型中差异表达,提示其可能在心脏病病理状态包括重构过程中具有功能学意义^[6]。尽管已有工作将Fam162a与缺氧诱导的线粒体凋亡联系起来,但关于其在心肌纤维化,尤其是在心肌成纤维细胞(cardiac fibroblasts, CFs)表型转换与ECM合成调控中的直接作用,国内外报道仍很有限。本文将研究Fam162a在心肌纤维化过程中的表达特征,明确Fam162a对CFs纤维化表型的调节作用,探究其对CFs中纤维化相关基因表达,CFs增殖和迁移能力的影响。

1 材料与方法

1.1 心肌标本

为探究Fam162a表达情况,研究选取心衰患者、健康人的心肌样本,以及接受TAC和Sham手术的C57BL/6小鼠心肌样本展开检测。需说明的是,本研究涉及的所有心肌样本,均已通过广东省人民医院伦理委员会审批(批准号,NO.GDREC2016255H),且全部样本提供者都签署了知情同意书,病例资料与以往报道一致^[12]。

1.2 实验动物

由广东省动物中心提供出生1~3 d的SPF级C57BL/6乳小鼠(雌雄不限),生产许可证号为SCKK(粤)2013-0034,动物实验伦理审查批号为KY-N-2022-066-01。

1.3 主要试剂

DMEM/F12培养基(Gibco, 11320082)、特级澳洲胎牛血清(Bio Ind, 04-001-1A)、1×PBS粉末(博士德, AR0032)、胰蛋白酶(Trypsin-EDTA)(Gibco, 25200072)、胶回收试剂盒(Omega, D2500-02)、RIPA裂解液(碧云天, P0013B)、质粒提取试剂盒(Omega, D6943-02)、BCA蛋白定量试剂盒(Thermo, 23225)、核糖核酸外切酶(Ribonuclease R)(广州吉赛生物)、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒(碧云天, P0012A)、PVDF膜(Whatman, 10485289)、转染试剂Lipofectamine 2000(Invitrogen, 11668019)、 α 1-I型胶原蛋白(Collagen Type I Alpha 1, COL1A1)抗体(Invitrogen, PA5-29569)、 α 1-III型胶原蛋白(Collagen Type III Alpha 1, COL3A1)抗体(Protein

Technology, 22734-1-AP)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)抗体(Abcam, ab5694)、ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel(Sigma, F1804)、Fam16a抗体(Protein Technology, 32034-1-AP)、GAPDH抗体(Protein Technology, 60004-1-Ig)、ECL化学发光检测试剂盒(Millipore, WB-KLS0500)、ATP检测试剂盒(碧云天, S0026)、线粒体膜电位检测试剂盒(碧云天, C1071S)、活性氧检测试剂盒(碧云天, S0033S)、线粒体超氧化物检测试剂盒(碧云天, S0061S)

1.4 实验方法

1.4.1 乳鼠心肌成纤维细胞的原代分离、传代培养 实验选取出生1~3 d的C57BL/6小鼠(雌雄不限),先用医用酒精棉球对其体表进行两次仔细消毒,在严格的无菌条件下,使用眼科剪精准且完整地取出心脏,迅速放置于冰上,以维持心脏组织的活性。接着,仔细去除心脏周围附着的血管以及多余的结缔组织,随后将心脏剪碎成小块。把剪碎的组织块转移至由含酚红的胰蛋白酶-EDTA(浓度为2.5 g/L)与PBS配制而成的消化液中,然后放置在4 °C的摇床上,进行过夜消化,时长约16 h。消化结束后,加入含有适量血清的DMEM/F12培养基,将混合液置于37 °C的水浴中温浴来终止消化过程。随后,运用巴氏吸管以温和轻柔的力度进行吹打操作,以促使组织块得以充分分散。待肉眼无法观测到任何残余组织块时,开展离心步骤(300×g, 5 min),离心结束后,谨慎吸弃上清液,并向细胞沉淀中加入适量的DMEM/F12培养基,使细胞沉淀重新悬浮,而后将细胞悬液接种至T75规格的无菌培养瓶中,置于适宜环境下进行培养。待细胞增殖至完全铺满培养瓶底部后,依照常规实验操作规范,依次进行培养基更换、细胞传代以及细胞铺板等操作,从而为后续各项实验处理创造良好条件、做好充分准备。

1.4.2 蛋白免疫印迹 提前将1.5 mL EP管置于冰上预冷,并做好清晰编号。选取大小约为0.3 cm×0.4 cm的心肌组织,小心置入对应的EP管中。为使后续裂解更为充分,用精细剪刀将组织尽量剪碎,随后加入约400 μ L的RIPA裂解液。接着,使用组织匀浆器对组织进行充分匀浆,确保组织中的

蛋白能够充分释放到裂解液中。待匀浆操作完毕,把盛有组织蛋白样本的EP管置于设定温度为4℃、离心转速为12 000×g的离心机中,进行时长为15~20 min的离心处理。离心程序终止后,使用移液器谨慎吸取上清液,并将其转移至另一洁净EP管内,此上清液即为总蛋白样品,可暂时储存于-80℃的超低温冰箱中,以备后续实验使用。对于细胞样品:用PBS对培养板中的细胞进行轻柔清洗,以去除残留的培养基。待清洗流程结束后,立即将培养板转移至冰面上,向其中添加含有蛋白酶抑制剂与磷酸酶抑制剂的RIPA裂解缓冲液。随后,将培养板置于摇床上,以低速振荡的方式持续处理10~20 min,以确保细胞实现充分裂解。裂解步骤完成后,使用细胞刮沿培养板底部以轻柔的动作刮取细胞,并将含有裂解产物的裂解液转移至EP管中。接下来,将EP管置于离心机中,在4℃、12 000×g的条件下进行离心处理,时长为15~20 min。离心结束后,小心吸取上清液,此即为总蛋白样品。随后,采用BCA蛋白定量试剂盒测定总蛋白浓度,此举旨在保障后续实验中各样品上样量的均一性。依据蛋白浓度测定结果,精确量取每份10~15 μg的蛋白,加入适量的SDS-PAGE上样缓冲液(Loading Buffer),将EP管置于99℃的金属浴装置中,进行10~30 min的变性处理。将完成变性处理的蛋白样品置于SDS-PAGE凝胶体系中,通过电泳技术实现蛋白质的分离。待电泳程序结束后,采用湿转法将凝胶上的蛋白质条带转移至PVDF膜上,完成转印步骤。随后,将载有蛋白质的PVDF膜置于室温环境,使用5%(质量体积比)脱脂奶粉溶液进行封闭处理,封闭时长为1 h,以降低非特异性结合背景。封闭完成后,根据目标蛋白的预期分子量对PVDF膜进行精确裁切,获得包含目标蛋白的膜条带,随后分别向各条带中加入对应的特异性一抗COL1A1(1:2 000~1:5 000)、COL3A1(1:2 000~1:5 000)、α-SMA(1:2 500~1:2 000)、Fam162a(1:1 000)、Flag-M2(1:1 000)及GAPDH(1:5 000),于4℃孵育过夜。次日,将条带置于37℃条件下孵育相应的二抗1~1.5 h。孵育完成后,使用ECL化学发光试剂进行显影,最后利用Image J软件对蛋白条带的灰度值进行精确分析,以此确定目标蛋白的

相对表达水平。

1.4.3 重组腺病毒的构建和包装 按课题组前期报道的方法^[13],将Fam162a-2Flag目的序列精准定向插入腺病毒穿梭载体pAd-Track-CMV的多克隆位点处。之后,把这个带有目的序列的穿梭载体,与腺病毒骨架质粒pAd-Easy-1共同置于BJ5183大肠杆菌内,让它们进行同源重组。完成重组后,挑选出阳性克隆,利用*Pac I*内切酶进行单酶切鉴定。酶切,得到线性化的重组Fam162a腺病毒质粒。接下来,运用转染试剂,把这个线性化质粒转染到生长密度达到约80%~90%的HEK293细胞中,在细胞内部完成腺病毒的包装过程。在适宜的培养条件下培养约8~11 d后,密切观察细胞状态。当看到绿色荧光蛋白充分表达时,这便提示病毒包装已经完成。此时,就可以收集培养上清,从中回收病毒,并进一步开展病毒的扩增工作,为后续实验提供充足的病毒材料。

1.4.4 细胞增殖实验 将P2代mCFs均匀接种于共聚焦培养皿中培养24 h后,向细胞中加入适量病毒进行感染。感染持续12 h,之后添加40 μmol/L的血管紧张素Ⅱ(Ang Ⅱ)诱导细胞。24 h后,更换培养基,换为含有EdU试剂盒中试剂A的培养基,继续孵育4 h,让EdU试剂充分融合至新合成的DNA中。随后,在室温条件下对细胞进行固定12~14 h。固定完成后,小心弃去固定液,用PBS清洗细胞两次,接着加入2 μg/μL的甘氨酸溶液进行中和处理。之后,使用5 g/L Triton X-100对细胞进行通透处理,再加入提前配制好的Apollo染色工作液,染色30 min。染色结束后进行清洗,滴加DAPI染液对细胞核进行染色,最后使用激光共聚焦显微镜观察并拍照分析。

1.4.5 划痕实验 将处于P2代的mCFs接种于6孔细胞培养板中,置于适宜培养条件下进行培养。待细胞生长至融合度约为80%时,实施干预处理:向各孔中加入适量特定病毒以感染细胞,12 h后,向培养体系中添加终浓度为40 μmol/L的Ang Ⅱ以诱导细胞,继续培养24 h。诱导培养结束后,使用无菌移液器枪头在细胞单层表面垂直划出笔直划痕,随后用PBS轻柔冲洗培养孔,以清除划痕处产生的细胞碎片及脱落细胞,并更换为新鲜预温的培养

基。立即于显微镜下拍摄划痕起始时刻(0 h)的细胞图像作为基准。将细胞继续培养24 h后,再次拍摄同一区域的划痕图像以记录细胞迁移情况。最后,运用ImageJ图像分析软件对两次拍摄的划痕区域进行精确的定量分析,通过测量划痕宽度的变化,科学计算细胞的迁移能力,为后续实验研究提供量化数据支持。

1.4.6 细胞迁移实验 将Transwell小室稳妥放置于24孔细胞培养板中,构建细胞迁移实验体系。向上室中接种200 μL 处于P2代的mCFs悬液,同时在下室中加入600 μL 含有适量胎牛血清的完全培养基,置于适宜培养条件下孵育24 h,以使细胞初步适应环境并贴壁生长。培养24 h后,小心弃去上、下室中的原有培养基。随后,分别向上室和下室加入含有腺病毒的无血清培养基,其中上室加入100 μL ,下室加入300 μL ,进行腺病毒感染处理。4 h后,向上、下室中补加等体积的完全培养基,继续培养24 h,以确保腺病毒充分感染细胞并表达目的基因。次日,再次更换培养基,上室更换为无血清培养基,下室更换为含有10% FBS的完全培养基,以此形成血清浓度梯度,模拟体内细胞迁移的化学趋化环境,孵育5 h,诱导细胞迁移。孵育结束后,弃去上、下室中的液体,使用PBS轻柔清洗上、下室各2次,以去除残留的培养基和未贴壁的细胞。随后,向上、下室中加入40 g/L多聚甲醛,固定细胞过夜,使细胞形态得以稳定保存。次日,用PBS洗涤细胞3次,每次5 min,以彻底去除多聚甲醛。之后,加入体积分数30%结晶紫染液,对细胞进行染色过夜,使迁移的细胞清晰可见。染色结束后,再次用PBS清洗细胞,去除未结合的结晶紫染液,然后将小室置于37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温烘箱中烘干。最后,将烘干后的Transwell小室置于倒置显微镜下,观察并拍摄小室内迁移的细胞图像。运用Image J图像分析软件,对拍摄的图像进行精准定量分析,通过计算迁移细胞的数量或迁移距离等指标,科学评估细胞的迁移能力,为后续实验研究提供可靠的量化数据。

1.4.7 ATP检测 将P2代mCFs接种于6孔板中培养,当细胞生长至融合度达到约80%时,实施干预处理操作。待干预处理步骤完成后,使用移液器小

心吸弃各孔中的原有培养基,随后向每孔中精准加入200 μL ATP检测裂解液,确保裂解液充分覆盖细胞表面,以实现细胞的完全裂解。裂解程序结束后,将6孔板转移至离心机中,在4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 $\times g$ 的离心条件下进行离心处理,时长为5 min。离心结束后,小心吸取上清液,转移至洁净的离心管中,用于后续的ATP含量测定。接下来,取用96孔板,向每孔中加入100 μL ATP检测工作液,将96孔板置于室温环境中静置3~5 min。此步骤旨在使工作液中本底性的ATP充分消耗,从而有效降低后续测定过程中的本底干扰,提高检测的准确性。随后,在各检测孔内分别加入20 μL 待测样品或ATP标准品,使用移液器快速且轻柔地混匀孔内液体。混匀后间隔10 s,立即使用微孔板检测仪对各孔的化学发光强度进行测定。最后,根据预先绘制的ATP标准曲线,结合检测得到的样品发光强度值,通过数学计算精确推算出各样品中的ATP浓度。

1.4.8 线粒体膜电位检测实验 将P2代mCFs接种于共聚焦培养皿中培养,待细胞融合度达到约80%后进行干预处理,处理时间一到,小心吸弃培养基,用37 $^{\circ}\text{C}$ 预热的检测缓冲液轻柔冲洗1次,以去除血清残留。因为血清中的蛋白可能会结合探针,进而影响富集效果。接着,向培养皿中加入适量的TMRE工作液,随后将培养皿置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数5% CO_2 的培养箱中,避光孵育15~20 min。孵育结束后,迅速吸弃探针工作液,再用37 $^{\circ}\text{C}$ 预热的检测缓冲液轻柔冲洗2次。之后,向样本中加入Hoechst染料,在室温下避光孵育5~10 min,对细胞核进行染色。染色完成后,用PBS冲洗3次,去除多余的核染料,然后滴加抗荧光淬灭封片剂。最后,将培养皿置于共倾显微镜下观察并拍摄荧光图像,利用Image J软件分析图像,扣除背景荧光后,测量每个视野的平均荧光强度。

1.4.9 ROS检测 将P2代mCFs接种于共聚焦培养皿中培养,待细胞融合度达到约80%后进行干预处理,达到处理时间后吸弃培养基,加入37 $^{\circ}\text{C}$ 预热的无血清F12培养基轻轻冲洗1次。随后,再次吸弃培养基,向培养皿中精准加入500 μL 浓度为10 $\mu\text{mol/L}$ 的DCFH-DA探针工作液。之后,把培养皿放入37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数5% CO_2 的培养箱中,进行避

光孵育,时间控制在20~30 min。孵育结束后,吸弃探针工作液,用37℃预热的PBS轻轻洗涤2次,彻底去除未结合的游离探针,向样本中加入 oechst,室温避光孵育5~10 min;再次用PBS冲洗2次,去除多余核染料,滴加抗荧光淬灭封片剂。最后在共聚焦显微镜下观察并拍摄荧光表达,仔细观察并拍摄荧光表达情况。利用ImageJ软件分析荧光图像,扣除背景荧光干扰后,精准测量每个视野的平均荧光强度,以此反映细胞内ROS的水平。

1.4.10 MitoSox 检测 将P2代mCFs接种于共聚焦培养皿中培养,待细胞融合度达到约80%后进行干预处理,达到处理时间后吸弃培养基,用37℃预热的试剂盒配套HBSS缓冲液轻轻冲洗2次,去除血清残留,防止血清中的蛋白干扰后续检测。接着,吸弃HBSS缓冲液,往皿中加入适量MitoSox Red染色工作液,随后把培养皿置于37℃、体积分数5% CO₂的培养箱中,避光孵育15~20 min,让探针充分进入线粒体。孵育结束后,快速吸弃探针工作液,用37℃预热的HBSS缓冲液轻轻冲洗2次(洗涤时避免剧烈晃动,防止线粒体脱落),彻底去除未进入线粒体的游离探针。向样本中加入Hoechst,室温避光孵育5~10 min;用PBS冲洗2次,去除多余核染料,滴加抗荧光淬灭封片剂。最后在共聚焦显微镜下观察并拍摄荧光图像,利用ImageJ软件分析荧光图像,扣除背景荧光干扰,测量每个视野的平均荧光强度,以此评估线粒体氧化损伤程度。

1.5 统计学分析

实验数据采用ImageJ和GraphPad Prism 9.0.0进行处理与作图,统计分析使用SPSS 21.0。所有实验结果以均数±标准差表示。若各组数据既服从正态分布,又满足方差齐性,那么在两组间比较时,采用独立样本*t*检验,多组间比较则运用单因素方差分析(One-way ANOVA),并使用Bonferroni法开展组间两两比较。若数据不满足正态性或方差齐性,则采用Kruskal-Wallis *H*检验进行多组比较。在统计学判定上,以*P*<0.05作为差异具有统计学意义的判定标准。

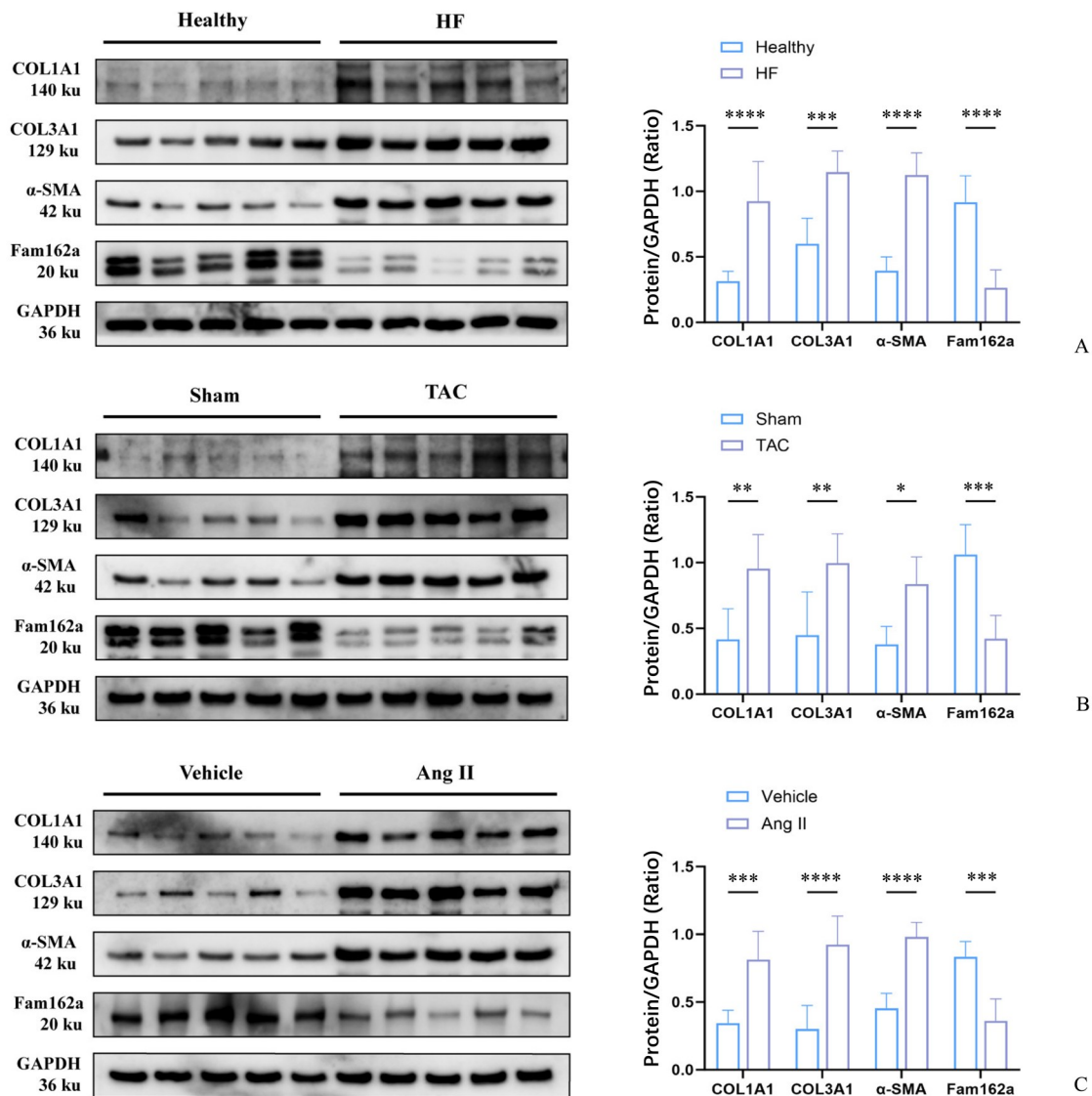
2 结果

2.1 具有序列相似性的家族162成员A蛋白在心衰患者、主动脉缩窄手术后小鼠心肌及血管紧张素Ⅱ处理后的乳小鼠成纤维细胞中表达降低

Western Blot结果显示,相较于健康者,心衰患者心肌中纤维化指标COL1A1(*t*=5.335, *P*<0.000 1)、COL3A1(*t*=4.801, *P*=0.000 1)、 α -SMA(*t*=6.382, *P*=0.000 1)的表达显著上升,同时Fam162a表达降低(*t*=5.711, *P*<0.000 1;图1A)。此外,TAC手术小鼠心肌相较于Sham手术小鼠,COL1A1(*t*=3.694, *P*=0.003 3)、COL3A1(*t*=3.763, *P*=0.002 7)、 α -SMA(*t*=3.132, *P*=0.014 7)表达显著上升,并且Fam162a表达显著降低(*t*=4.390, *P*=0.000 5;图1B)。在经AngⅡ诱导的mCFs细胞也可观察到同样的COL1A1(*t*=4.826, *P*=0.000 1)、COL3A1(*t*=6.380, *P*<0.000 1)、 α -SMA(*t*=5.406, *P*<0.000 1)表达显著上升,并伴随Fam162a表达降低的情况(*t*=4.861, *P*=0.000 1;图1C)。

2.2 具有序列相似性的家族162成员A抑制心肌成纤维细胞的纤维化相关基因表达和成纤维细胞的增殖迁移能力

Western Blot结果显示,经方差分析,COL1A1:组间差异有统计学意义(*F*=191.9, *P*<0.000 1);采用bonferroni法作两两比较,与对照组相比,利用AngⅡ诱导的mCFs中COL1A1(*P*<0.000 1)表达上升;与AngⅡ组相比,过表达Fam162a后加入AngⅡ组COL1A1(*P*<0.000 1)表达下降。COL3A1:组间差异有统计学意义(*F*=237.3, *P*<0.000 1);采用bonferroni法作两两比较,与对照组相比,利用AngⅡ诱导的mCFs中COL3A1(*P*<0.000 1)表达上升;与AngⅡ组相比,过表达Fam162a后加入AngⅡ组COL3A1(*P*<0.000 1)表达下降。 α -SMA:组间差异有统计学意义(*F*=134.7, *P*<0.000 1);采用bonferroni法作两两比较,与对照组相比,利用AngⅡ诱导的mCFs中 α -SMA(*P*<0.000 1)表达上升;与AngⅡ组相比,过表达Fam162a后加入AngⅡ组 α -SMA(*P*<0.000 1)表达下降;p-smad3:组间差异有统计学意义(*F*=166.8, *P*<0.000 1);采用bonferroni法作两两比较,



A: Expression of fibrosis-related proteins and Fam162a in the myocardium of healthy donors and patients with heart failure, $***P < 0.001$, $****P < 0.0001$. B: Expression of fibrotic proteins and Fam162a in mice subjected to sham surgery or transverse aortic constriction (TAC), $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$. C: Expression of fibrosis-related proteins and Fam162a in mCFs following Ang II stimulation, $***P < 0.001$, $****P < 0.0001$. Data are shown as Mean \pm SD. $n=5$.

图1 Fam162a蛋白在心衰患者、TAC手术后小鼠心肌及血管紧张素II处理后的乳小鼠成纤维细胞中表达降低

Fig. 1 Downregulation of Fam162a in patients with heart failure, TAC-operated mice, and neonatal mouse fibroblasts following Ang II treatment

与对照组相比,利用Ang II诱导的mCFs中p-Smad3($P < 0.0001$)表达上升;与Ang II组相比,过表达Fam162a后加入Ang II组p-Smad3($P < 0.0001$)表达下降,提示Fam162能抑制由Ang II诱导的mCFs纤维化(图2A)。

EdU实验显示,经方差分析,组间差异有统计学意义($F=125.8$, $P < 0.0001$);采用bonferroni法作两两比较,与对照组相比,Ang II组mCFs增殖能力

加强($P < 0.0001$);与Ang II组相比,过表达Fam162a后加入Ang II组mCFs增殖能力减弱($P < 0.0001$),提示过表达Fam162a可以抑制由Ang II诱导的mCFs增殖能力变强(图2B)。细胞划痕和Transwell实验显示,经方差分析,组间差异有统计学意义($F=17.39$, $P=0.0007$; $F=29.05$, $P=0.0001$);采用bonferroni法作两两比较,与对照组相比,Ang II组mCFs迁移能力加强($P=0.0013$; $P=0.0005$);

与 Ang II 组相比,过表达 Fam162a 后加入 Ang II 组 mCFs 迁移能力减弱 ($P=0.004\ 2$; $P=0.000\ 7$),提示过表达 Fam162a 可以抑制由 Ang II 诱导的 mCFs 迁移能力提升(图 2C, 2D)。

2.3 敲降具有序列相似性的家族 162 成员 A 可增强心肌成纤维细胞的纤维化相关基因表达和成纤维细胞的增殖迁移能力

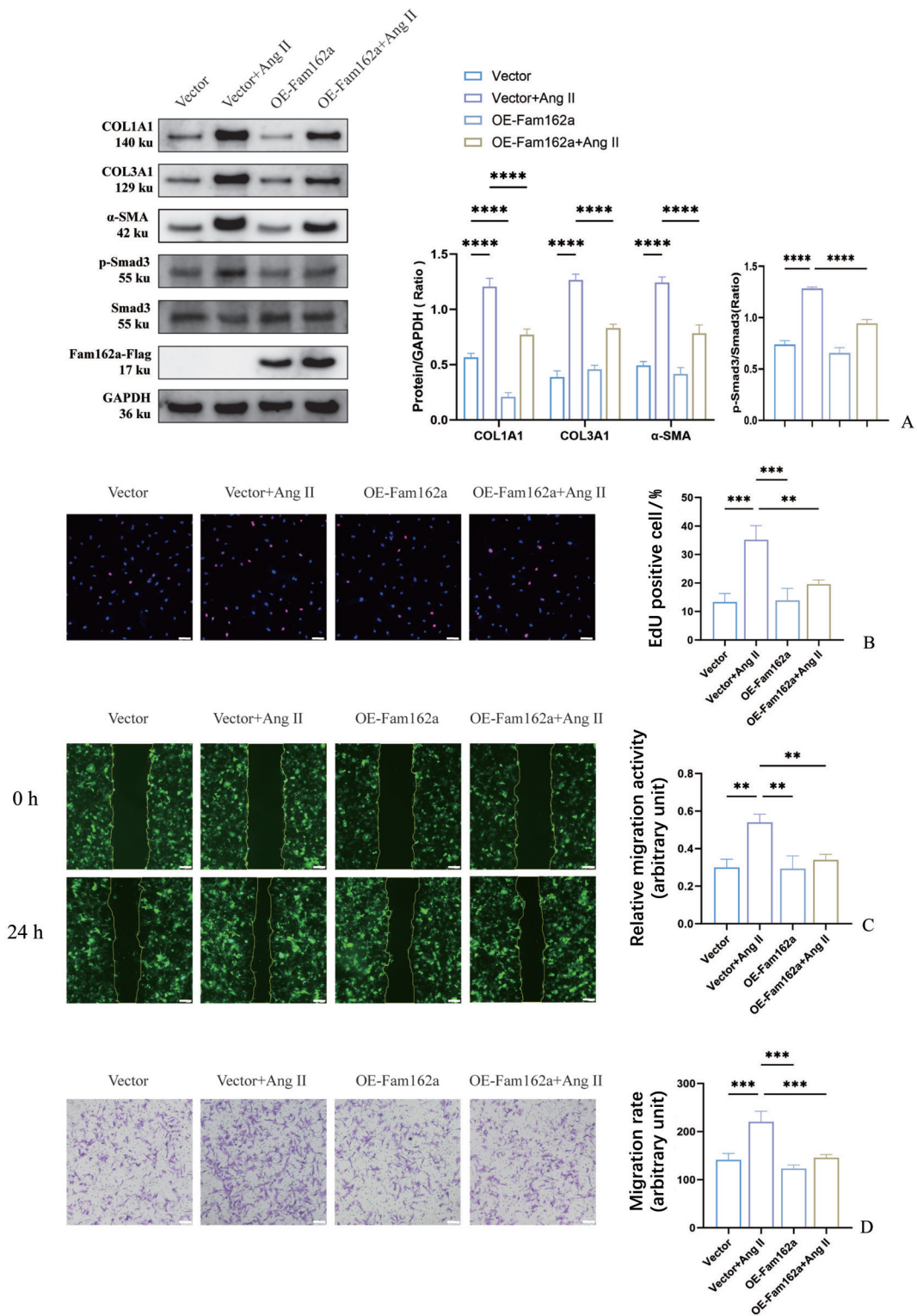
Western Blot 结果显示,经方差分析, COL1A1: 组间差异有统计学意义 ($F=238.2$, $P<0.000\ 1$); 采用 bonferroni 法作两两比较,与对照组相比,利用 Ang II 诱导的 mCFs 中 COL1A1 ($P<0.000\ 1$) 表达上升;与 Ang II 组相比, si-Fam162a 后加入 Ang II 组 COL1A1 ($P<0.000\ 1$) 表达上升; COL3A1: 组间差异有统计学意义 ($F=101.7$, $P<0.000\ 1$); 采用 bonferroni 法作两两比较,与对照组相比,利用 Ang II 诱导的 mCFs 中 COL3A1 ($P<0.000\ 1$) 表达上升;与 Ang II 组相比, si-Fam162a 后加入 Ang II 组 COL3A1 ($P<0.000\ 1$) 表达上升; α -SMA: 组间差异有统计学意义 ($F=274.8$, $P<0.000\ 1$); 采用 bonferroni 法作两两比较,与对照组相比,利用 Ang II 诱导的 mCFs 中 α -SMA ($P<0.000\ 1$) 表达上升;与 Ang II 组相比, si-Fam162a 后加入 Ang II 组 α -SMA ($P<0.000\ 1$) 表达上升; p-Smad3: 组间差异有统计学意义 ($F=80.32$, $P<0.000\ 1$); 采用 bonferroni 法作两两比较,与对照组相比,利用 Ang II 诱导的 mCFs 中 p-Smad3 ($P<0.000\ 1$) 表达上升;与 Ang II 组相比, si-Fam162a 后加入 Ang II 组 p-Smad3 ($P<0.000\ 1$) 表达上升;提示利用 si-RNA 敲降 Fam162a 后可以加剧由 Ang II 诱导的 mCFs 纤维化(图 3A)。

EdU 实验显示,经方差分析,组间差异有统计学意义 ($F=39.91$, $P<0.000\ 1$); 采用 bonferroni 法作两两比较,与对照组相比, Ang II 组 mCFs 增殖能力加强 ($P=0.000\ 3$); 与 si-Fam162a 组相比, si-Fam162a 后加入 Ang II 组 mCFs 增殖能力加强 ($P=0.000\ 4$),提示敲降 Fam162a 可以加剧由 Ang II 诱导的 mCFs 增殖能力变强(图 3B)。细胞划痕和 Transwell 实验显示,经方差分析,组间差异有统计学意义 ($F=74.83$, $P<0.000\ 1$; $F=177.6$, $P<0.000\ 1$); 采用 bonferroni 法作两两比较,与对照组相比, Ang II 组

mCFs 迁移能力加强 ($P<0.000\ 1$; $P<0.000\ 1$); 与 Ang II 组相比, si-Fam162a 后加入 Ang II 组迁移能力加强 ($P=0.010\ 6$),提示敲降 Fam162a 可以加强由 Ang II 诱导的 mCFs 迁移能力提升(图 3C, 3D)。

2.4 具有序列相似性的家族 162 成员 A 通过调节线粒体功能发挥抑制心肌成纤维细胞纤维化表型的作用

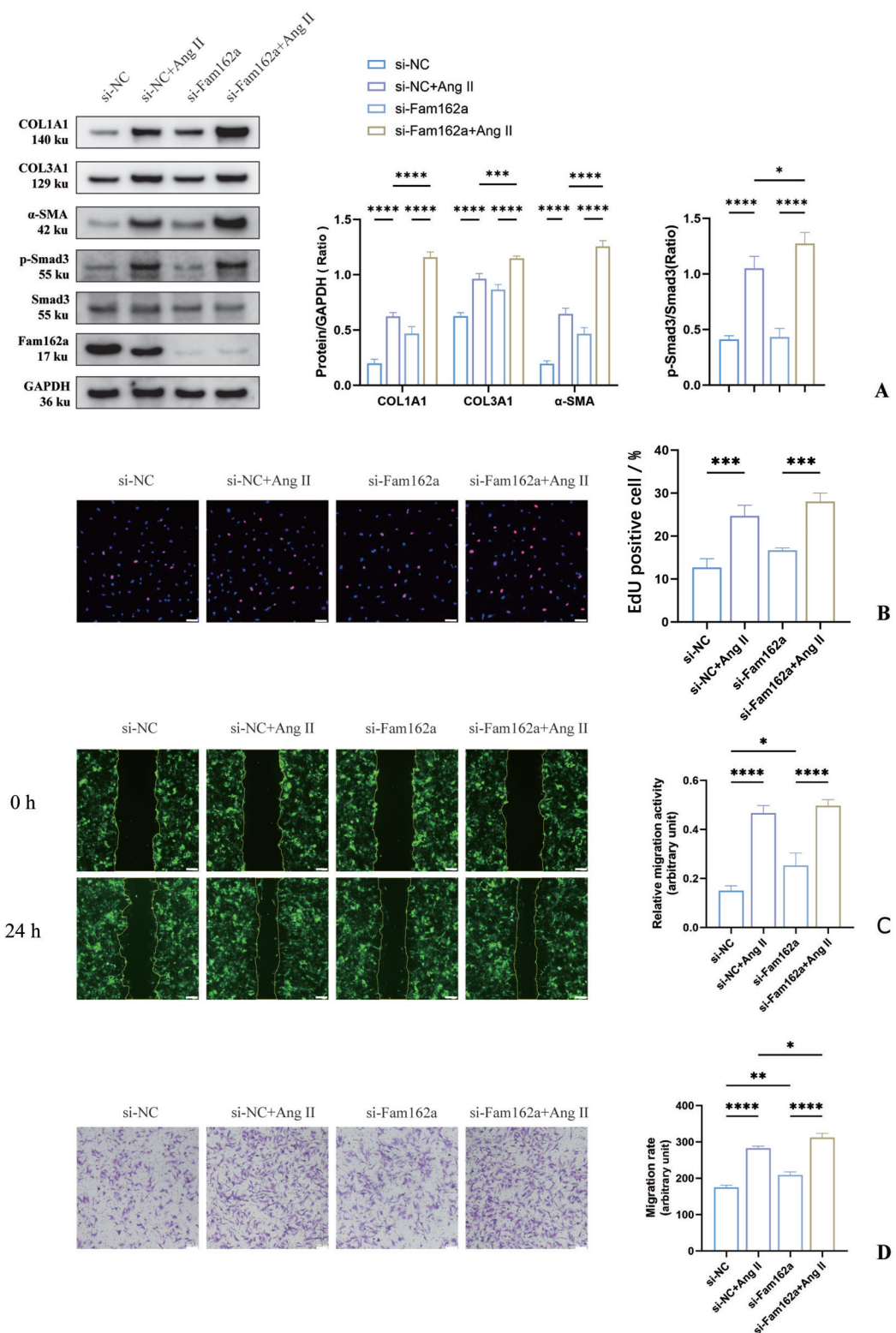
Western Blot 结果显示,经方差分析, COL1A1: 组间差异有统计学意义 ($F=82.16$, $P<0.000\ 1$); 采用 bonferroni 法作两两比较,与对照组相比,利用 Ang II 诱导的 mCFs 中 COL1A1 ($P<0.000\ 1$) 表达上升;与 Ang II 组相比,过表达 Fam162a 后加入 Ang II 组 COL1A1 ($P<0.000\ 1$) 表达下降;与 OE-Fam162a 加 Ang II 组比, OE-Fam162a 加 Ang II 和 Rotenone 组 COL1A1 ($P<0.000\ 1$) 表达上升; COL3A1: 组间差异有统计学意义 ($F=48.05$, $P<0.000\ 1$); 采用 bonferroni 法作两两比较,与对照组相比,利用 Ang II 诱导的 mCFs 中 COL3A1 ($P<0.000\ 1$) 表达上升;与 Ang II 组相比,过表达 Fam162a 后加入 Ang II 组 COL3A1 ($P<0.000\ 1$) 表达下降;与 OE-Fam162a 加 Ang II 组比, OE-Fam162a 加 Ang II 和 Rotenone 组 COL3A1 ($P<0.000\ 1$) 表达上升; α -SMA: 组间差异有统计学意义 ($F=148.7$, $P<0.000\ 1$); 采用 bonferroni 法作两两比较,与对照组相比,利用 Ang II 诱导的 mCFs 中 α -SMA ($P<0.000\ 1$) 表达上升;与 Ang II 组相比,过表达 Fam162a 后加入 Ang II 组 α -SMA ($P<0.000\ 1$) 表达下降;与 OE-Fam162a 加 Ang II 组比, OE-Fam162a 加 Ang II 和 Rotenone 组 α -SMA ($P<0.000\ 1$) 表达上升; p-Smad3: 组间差异有统计学意义 ($F=418.6$, $P<0.000\ 1$); 采用 bonferroni 法作两两比较,与对照组相比,利用 Ang II 诱导的 mCFs 中 p-Smad3 ($P<0.000\ 1$) 表达上升;与 Ang II 组相比,过表达 Fam162a 后加入 Ang II 组 p-Smad3 ($P<0.000\ 1$) 表达下降;与 OE-Fam162a 加 Ang II 组比, OE-Fam162a 加 Ang II 和 Rotenone 组 p-Smad3 ($P<0.000\ 1$) 表达上升,提示过表达 Fam162a 可抑制由 Ang II 诱导的 mCFs 纤维化相关基因 COL1A1、COL3A1、 α -SMA 和 p-Smad3 的表达上升,但在加入 Rotenone 后这种抑制效果被逆转(图 4A)。



A: Expression of fibrosis-related proteins and Fam162a in mCFs with exogenous overexpression of Fam162a under Ang II-induced conditions, $****P < 0.0001$. B: Proliferative activity of mCFs assessed by EdU assay. Scale bar is 100 μm , $**P < 0.01$, $***P < 0.001$. C: Migration ability of mCFs evaluated by scratch assay. Scale bar is 300 μm , $**P < 0.01$. D: Migration ability of mCFs assessed by Transwell migration assay. Scale bar is 100 μm , $***P < 0.001$. Data are shown as Mean \pm SD. $n=3$.

图2 Fam162a抑制心肌成纤维细胞中纤维化相关基因表达和mCFs的增殖迁移能力

Fig. 2 Fam162a inhibits the expression of fibrosis-related genes in cardiac fibroblasts and the proliferation and migration abilities of mCFs



A: Expression of fibrosis-related proteins and Fam162a in mCFs after knockdown of Fam162a under Ang II -induced conditions, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$. B: Proliferative activity of mCFs assessed by EdU assay. scale bar is 100 μm , *** $P < 0.001$. C: Migration ability of mCFs evaluated by scratch assay. Scale bar is 300 μm , * $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$. D: Migration ability of mCFs assessed by Transwell migration assay. Scale bar is 100 μm , ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$. Data are shown as Mean \pm SD. $n=3$.

图3 敲降Fam162a可增强心肌纤维细胞中纤维化相关基因表达和mCFs的增殖迁移能力

Fig. 3 Knockdown of Fam162a exacerbates the expression of fibrosis-related genes and the proliferation and migration capacities of mCFs

ATP检测显示,经方差分析,组间差异有统计学意义($F=66.70, P<0.0001$);采用 bonferroni 法作两两比较,与对照组相比,Ang II 组 ATP 生成减少($P<0.0001$);与 Ang II 组相比,过表达 Fam162a 后加入 Ang II 组 ATP 生成增加($P<0.0001$);与 OE-Fam162a 加 Ang II 组比,OE-Fam162a 加 Ang II 和 Rotenone 组 ATP 生成减少($P=0.0006$);提示过表达 Fam162a 可促进 ATP 生成,而加入 Rotenone 后 mCFs 的 ATP 生成减少(图 4B)。

线粒体膜电位检测显示,经方差分析,组间差异有统计学意义($F=21.04, P=0.0004$);采用 bonferroni 法作两两比较,与对照组相比,Ang II 组线粒体膜电位降低($P=0.0004$);与 Ang II 组相比,过表达 Fam162a 后加入 Ang II 组线粒体膜电位上升($P=0.0124$);与 OE-Fam162a 加 Ang II 组比,OE-Fam162a 加 Ang II 和 Rotenone 组线粒体膜电位降低($P=0.0461$);提示过表达 Fam162a 可保持线粒体膜电位正常,而加入 Rotenone 后线粒体膜电位下降(图 4C)。ROS 和 MitoSox 检测显示,经方差分析,组间差异有统计学意义($F=167.4, P<0.0001$; $F=30.77, P<0.0001$);采用 bonferroni 法作两两比较,与对照组相比,Ang II 组细胞内外活性氧生成增加($P<0.0001$; $P=0.0001$);与 Ang II 组相比,过表达 Fam162a 后加入 Ang II 组细胞内外活性氧生成减少($P<0.0001$; $P=0.0003$);与 OE-Fam162a 加 Ang II 组比,OE-Fam162a 加 Ang II 和 Rotenone 组细胞内外活性氧生成增加($P<0.0001$; $P=0.0122$);提示过表达 Fam162a 可减少 ROS 产生,而加入 Rotenone 后 ROS 大量产生(图 4D, 4E)。

3 讨论

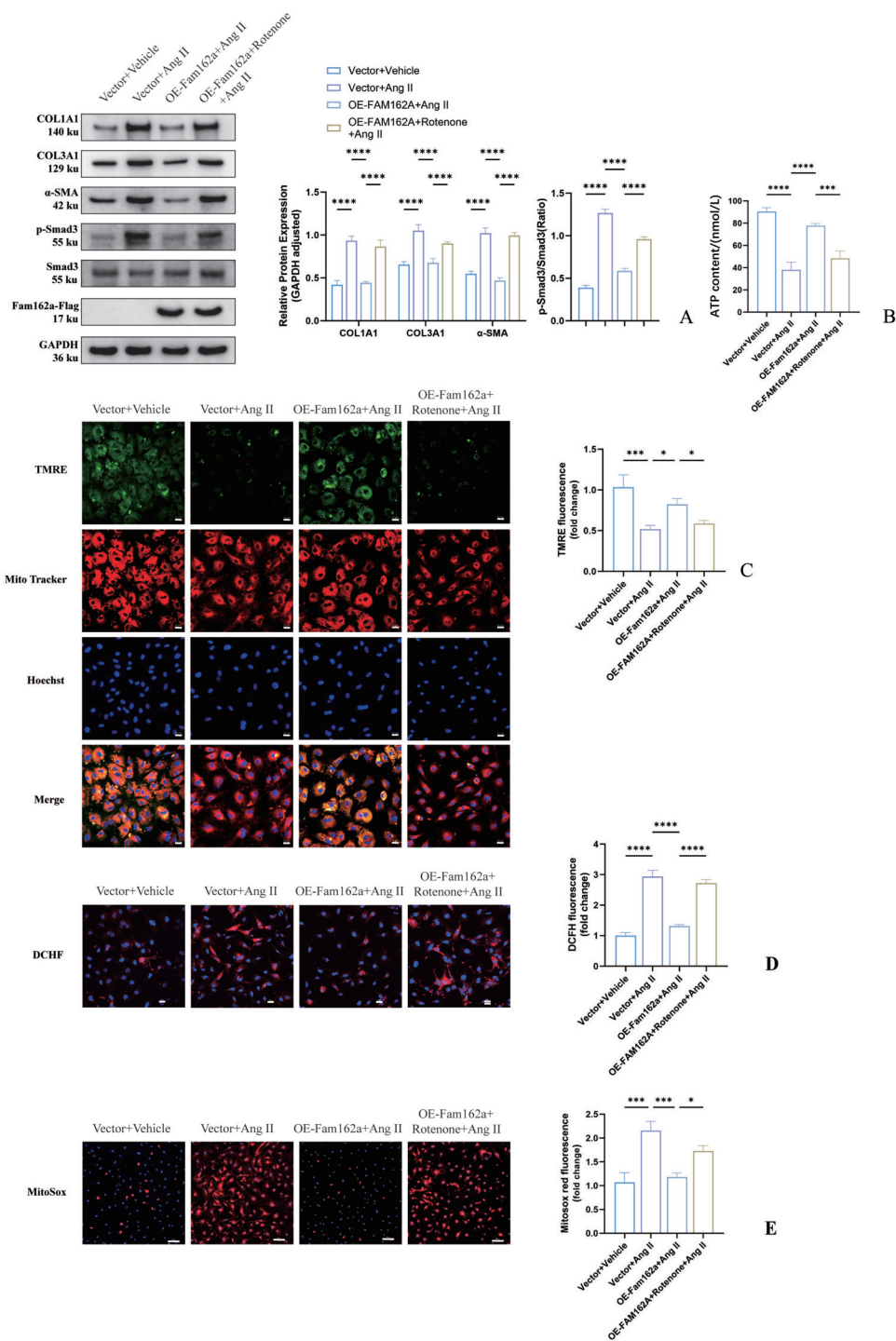
本文发现在人心衰心肌组织、经 TAC 手术小鼠心肌组织,以及用 Ang II 处理过的 mCFs 中, Fam162a 的表达均呈现出下调趋势。与此形成鲜明对比的是,典型的纤维化标志物,如 COL1A1、COL3A1 以及 α -SMA, 它们的表达却均出现了上调,提示 Fam162a 表达的缺失极有可能是推进心肌纤维化进程的一个重要因素。功能学实验结果表明,当对 mCFs 外源性过表达 Fam162a 后,Ang II 诱导的 mCFs 中 COL1A1、COL3A1、 α -SMA 的上调现

象得到了显著抑制,同时细胞的增殖与迁移能力也明显降低,而敲降 Fam162a 加剧 Ang II 诱导的 mCFs 纤维化表型。此外, Fam162a 能够下调 Ang II 诱导的 p-Smad3 表达,提示 Fam162a 很可能通过调控 TGF- β /Smad 信号通路来发挥其作用。

心肌纤维化作为心血管疾病进展为心力衰竭和致死性心律失常的核心病理环节,其本质是心肌成纤维细胞异常活化、增殖迁移及过量细胞外基质沉积,严重破坏心脏结构与功能稳态^[14-16]。线粒体功能障碍、氧化应激与能量代谢紊乱被证实是驱动成纤维细胞活化的关键因素^[17-18],因此靶向线粒体相关调控分子成为抗纤维化研究的重要方向。本文发现 Ang II 刺激会致使心肌成纤维细胞出现线粒体膜电位下降、ROS 过量产生以及 ATP 生成不足等一系列线粒体功能损伤情况,而过表达 Fam162a 能够有效地逆转这些损伤,维持线粒体的稳态。利用线粒体氧化呼吸链阻滞剂鱼藤酮后, Fam162a 的抗纤维化作用被显著抑制,同时线粒体功能损伤进一步加剧。这一结果充分表明, Fam162a 的抗纤维化效应依赖于其对线粒体氧化呼吸链的调控作用,它或许是通过维持线粒体膜电位稳定、减少氧化应激损伤、改善能量代谢供应,进而抑制心肌成纤维细胞的活化与纤维化表型转换。

Fam162a 的已知生物学功能集中于线粒体有关的细胞应激和凋亡调控,其在心肌组织中的表达谱及疾病相关性已有前期报道(蛋白组/转录组数据提示在心肌病中差异表达)^[19],这与本文中心衰组织中 Fam162a 下调并伴纤维化指标增高的发现相互印证。同时,本研究通过将 Fam162a 线粒体功能-心肌成纤维细胞表型相关联,为理解心肌纤维化的代谢调控机制提供了新的视角,鉴于 Fam162a 在心肌纤维化中的显著抗纤维化作用,其有望成为心肌纤维化防治的潜在分子靶点。

为进一步阐明 Fam162a 对心肌纤维化的抑制作用,在后续研究中将通过免疫共沉淀、质谱分析等技术,筛选 Fam162a 在线粒体中的相互作用蛋白,明确其调控线粒体电子呼吸链功能的分子机制;构建心肌特异性过表达 Fam162a 小鼠,结合小鼠心肌纤维化模型,在整体水平研究 Fam162a 对心肌纤维化的抑制和心脏功能的保护作用。



A: The expression of fibrosis-related proteins and Fam162a in mCFs following exogenous overexpression of Fam162a and Rotenone treatment under Ang II-induced conditions, $***P < 0.001$, $****P < 0.0001$. B: Detection of ATP content by using Luminometer in mCFs, $***P < 0.001$, $****P < 0.0001$. C: Representative images of the mitochondrial membrane potential (TMRE) detection assay in mCFs, scale bar is 20 μm , $*P < 0.05$, $***P < 0.001$. D: Representative images of the DCFH staining assay for ROS detection in mCFs, scale bar is 20 μm . $****P < 0.0001$. E: Representative images of the MitoSox staining assay for mitochondrial reactive oxygen species (mtROS) detection in mCFs, scale bar is 100 μm . $*P < 0.05$, $***P < 0.001$. Data are shown as Mean \pm SD. $n=3$.

图4 Fam162a通过调节线粒体功能发挥抑制心肌纤维细胞纤维化表型的作用

Fig. 4 Fam162a inhibits the fibrotic phenotypes of cardiac fibroblasts by regulating mitochondrial function

参考文献

- [1] Maruyama K, Imanaka-Yoshida K. The pathogenesis of cardiac fibrosis: a review of recent progress [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(5):2617.
- [2] Sarohi V, Chakraborty S, Basak T. Exploring the cardiac ECM during fibrosis: a new era with next-gen proteomics [J]. *Front Mol Biosci*, 2022, 9:1030226.
- [3] Liu W, Wu X, Zeng W, et al. Cardiac fibrosis: from mechanisms and models to medicines [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2025, 46(11):1072-1090.
- [4] Li X, Zhang W, Cao Q, et al. Mitochondrial dysfunction in fibrotic diseases [J]. *Cell Death Discov*, 2020, 6:80.
- [5] Li C, Meng X, Wang L, Dai X. Mechanism of action of non-coding RNAs and traditional Chinese medicine in myocardial fibrosis: focus on the TGF- β /Smad signaling pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14:1092148.
- [6] 黄德荣, 文庆, 苏宇辰. 转录因子 E4BP4 通过 AMPK-TGF- β 1/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.
- Huang DR, Wen Q, Su YC. Regulatory effect of transcription factor E4BP4 on pathological myocardial fibrosis through the AMPK-TGF- β 1/SMAD3 signaling pathway [J]. *J Chongqing Med Univ*, 2025, 50(5):640-648.
- [7] Lee SH, Hadipour-Lakmehsari S, Kim DH, et al. Bioinformatic analysis of membrane and associated proteins in murine cardiomyocytes and human myocardium [J]. *Sci Data*, 2020, 7(1):425.
- [8] Ravindran S, Rau CD. The multifaceted role of mitochondria in cardiac function: insights and approaches [J]. *Cell Commun Signal*, 2024, 22(1):525.
- [9] Zhang PH, Li NN, Gu X, et al. Interaction between mitochondrial oxidative stress and myocardial fibrosis in the context of diabetes [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2025, 16:1596436.
- [10] Jin Y, Ren W, Liu J, et al. Identification and validation of potential hypoxia-related genes associated with coronary artery disease [J]. *Front Physiol*, 2023, 14:1181510.
- [11] Lee MJ, Kim JY, Suk K, et al. Identification of the hypoxia-inducible factor 1 alpha-responsive HGTD-P gene as a mediator in the mitochondrial apoptotic pathway [J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(9):3918-3927.
- [12] 温艺红, 杨真祯, 张铭, 等. CircRNA_100395 通过结合 miR-144-3p 抑制心肌成纤维细胞中纤维化相关基因的表达 [J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2020, 41(6):875-883.
- Wen YH, Yang ZZ, Zhang M, et al. CircRNA_100395 inhibits expression of myocardial fibrosis-related genes in human atrial myofibroblasts via sponging miR-144-3p [J]. *J Sun Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2020, 41(6):875-883.
- [13] 丰嘉欣, 郭继深, 梁保等. Circ_0018478 通过编码 HERC4193 发挥抑制心肌成纤维细胞纤维化表型的作用 [J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2022, 43(6):995-1004.
- Feng JX, Guo JS, Liang Y, et al. Circular RNA circ_0018478 inhibits the fibrotic phenotype of cardiac fibroblasts via encoding protein HERC4-193 [J]. *J SUN Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2022, 43(6):995-1004.
- [14] Chalise U, Hale TM. Fibroblasts under pressure: cardiac fibroblast responses to hypertension and antihypertensive therapies [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2024, 326(1):H223-H237.
- [15] Li X, Liu Y, Tang Y, et al. Transformation of macrophages into myofibroblasts in fibrosis-related diseases: emerging biological concepts and potential mechanism [J]. *Front Immunol*, 2024, 15:1474688.
- [16] Aguado-Alvaro LP, Garitano N, Pelacho B. Fibroblast diversity and epigenetic regulation in cardiac fibrosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(11):6004.
- [17] Hoque MM, Gbadegoye JO, Hassan FO, et al. Cardiac fibrogenesis: an immuno-metabolic perspective [J]. *Front Physiol*, 2024, 15:1336551.
- [18] Li L, Lu M, Peng Y, et al. Oxidatively stressed extracellular microenvironment drives fibroblast activation and kidney fibrosis [J]. *Redox Biol*, 2023, 67:102868.
- [19] Fong-McMaster C, McIlroy E, Levesque MM, et al. Complexome profiling identifies changes in mitochondrial supercomplexes in murine heart failure [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2025, 329(2):H330-H339.

(编辑 孙慧兰)