

PTEN 过表达对小鼠心脏成纤维细胞自噬的影响

何缓缓¹, 江舜祥¹, 陶 辉², 曹 炜¹

(安徽医科大学第二附属医院¹ 胸外科、² 麻醉与围手术期医学科, 合肥 230601)

摘要 **目的** 探讨磷酸酯酶与张力蛋白同源物(*PTEN*)过表达对小鼠原代心脏成纤维细胞自噬的影响。**方法** 购入1~3 d小鼠乳鼠,行手术对心脏取材,消化后分离心脏成纤维细胞进行培养。细胞贴壁生长后使用雷帕霉素(Rapa)刺激构建心脏成纤维细胞自噬模型,模型构建成功后,向细胞转染*PTEN*过表达质粒(*PTEN*过表达组)和空载质粒(空载组),培养24~48 h。通过Western blot、RT-qPCR的方法在分子层面对*PTEN*、自噬相关蛋白微管相关蛋白轻链3(LC3 II/I)、苅青素1(Beclin1)和纤维化标志物胶原蛋白I(Collagen I)的表达进行检测;通过mCherry-GFP-LC3荧光染色测定自噬过程,检测心脏成纤维细胞自噬活性的变化。最后,通过透射电镜观察心脏成纤维细胞自噬体的变化。**结果** 在Rapa刺激构建的心脏成纤维细胞自噬模型中,相较于对照组,模型组的*PTEN*蛋白及mRNA水平下降($P<0.05$),自噬相关蛋白LC3 II/I、Beclin1和纤维化标志物Collagen I蛋白及mRNA表达升高($P<0.05$)。另外,过表达组心脏成纤维细胞中LC3 II/I、Beclin1和Collagen I蛋白及mRNA的表达水平相较于空载组下降($P<0.05$)。mCherry-GFP-LC3荧光染色实验表明,*PTEN*过表达组心脏成纤维细胞自噬活性较空载组明显下降($P<0.05$)。透射电镜结果表明,*PTEN*过表达组心脏成纤维细胞自噬体较空载组减少($P<0.05$)。**结论** 过表达*PTEN*能够抑制心脏成纤维细胞的自噬,提示*PTEN*可能是参与调控心脏成纤维细胞自噬的关键基因。

关键词 *PTEN*;自噬;LC3 II/I;Beclin1;心脏成纤维细胞;心肌纤维化

中图分类号 R 331.3; R 322.1; R 361

文献标志码 A

心肌纤维化是一种慢性间质性心脏病,几乎是所有类型心脏病的终末期特征^[1],并是各类心血管疾病共同病理生理过程之一,其主要表现为细胞外基质的成分增加和分布不均^[2]。心脏成纤维细胞是心脏细胞外基质蛋白的主要分泌细胞,在心肌纤维化发生发展的过程中起核心作用,其凋亡、自噬、增殖活化是心肌纤维化的重要环节^[3]。自噬是一种高度保守的溶酶体降解途径,对维持细胞稳态至关重要^[4]。自噬在感染、肿瘤及心血管疾病等疾病过程中都起着重要的作用^[5]。近年来,随着对自噬研究的增加,研究人员逐渐意识到自噬与心肌纤维化之间的特定关联^[6]。磷酸酯酶与张力蛋白同源物(phosphatase and tensin homolog, *PTEN*)是一种肿瘤抑制因子,与衰老和自噬密切相关^[7]。有研究^[8]表明,抑制自噬会增加*PTEN*,而诱导自噬则降低*PTEN*水平。Bueno et al^[9]发现,敲除肺泡上皮细胞中的*PTEN*基因后,肺纤维化程度加重。在Huang

et al^[10]发现,*PTEN*过表达可下调肝纤维化和自噬水平。这些结果表明*PTEN*在肝纤维化中通过调节多种细胞的自噬活性发挥作用。然而,*PTEN*在心肌纤维化中是否影响心脏成纤维细胞的自噬尚不明确。本研究应用雷帕霉素(rapamycin, Rapa)刺激构建心脏成纤维细胞自噬模型,并转染*PTEN*质粒,检测其对细胞分子水平及自噬活性的影响,探究*PTEN*在心脏成纤维细胞自噬中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 从安徽医科大学实验动物中心购入50只SPF级C57BL/6小鼠乳鼠(雄性,1~3 d,2.0~3.0 g),将小鼠安置在动物房的通风笼中,饲养环境为12 h光照和12 h黑暗周期,用以完成心脏成纤维细胞的提取分离及培养。伦理编号为LLSC20232157。

1.1.2 主要试剂 II型胶原酶(货号:C917426)购自上海麦克林公司;胎牛血清、DMEM高糖培养基(货号:10270106、11965118)购自美国Gibco公司;Rapa(货号:HY-10219)购自美国MCE公司;胰蛋白酶(货号:325-041-EL)购自加拿大WISSENT公司;TRIzol(货号:15596018)购自美国Invitrogen公司;

2025-02-05 接收

基金项目:安徽省重点研究与开发项目(编号:202104j07020037)

作者简介:何缓缓,女,硕士研究生;

曹 炜,男,主任医师,硕士生导师,通信作者, E-mail: 13514964858@qq.com

逆转录和 RT-qPCR(货号:AG11721)试剂盒购自长沙艾科瑞公司;蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氟(phenyl methane sulfonyl fluoride,PMSF)、细胞裂解液 RIPA、蛋白浓度测定 BCA 试剂盒、胰酶细胞消化液、抗荧光淬灭封片液(含 DAPI)(货号:ST506、P0013B、P0012、C0201、P0131)购自上海碧云天公司; β -actin 一抗、PTEN 一抗、骨膜素(perioestin, POSTN)一抗、自噬相关蛋白微管相关蛋白轻链 3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3 II/I)一抗、苜蓿素 1(Beclin1)一抗和纤维化标志物胶原蛋白 I(Collagen I)一抗(货号:66009-1-Ig、29246-1-AP、19899-1-AP、14600-1-AP、11306-1-AP、67288-1-Ig)均购自武汉 Protein-tech 公司;兔源二抗及鼠源二抗(货号:ab205718、ab205719)购自美国 Abcam 公司;mCherry-GFP-LC3 质粒(货号:D2816)购自美国 Gimagen 公司;戊二醇固定液、4%多聚甲醛固定液、无菌 PBS 缓冲液(货号:BL911A、BL539、BL302A)购自合肥白鲨公司;钼酸(货号:115355)购自长沙艾科试剂公司;牛血清白蛋白 BSA、Triton X-100(货号:A8010、T8200)购自北京索莱宝公司;PTEN 过表达质粒和空载质粒购自上海吉玛基因有限公司;相关 qPCR 引物由上海生工公司合成提供(表 1)。

表 1 引物序列

Tab.1 Primer sequences

Target	Primer sequences (5'-3')
PTEN	Forward: ACAATTCCCAGTCAGAGGCC
	Reverse: CAGTGCCACGGGTCTGTAAT
LC3	Forward: ATCATCGAGCGCTACAAGGG
	Reverse: AGATGTCAGCGATGGGTGTG
Beclin1	Forward: AGCAGCTGGAGTTGGATGAC
	Reverse: CCAGATGTGGAAGGTGGCAT
Collagen I	Forward: CGATGGATTCCCCTTCGAGT
	Reverse: GAGGCCTCGGTGGACATTAG
β -actin	Forward: CCACCATGTACCCAGGCATT
	Reverse: CGGACTCATCGTACTCTCTGC

1.1.3 实验仪器 细胞培养箱(型号:BB150)、Varioskan LUX 酶标仪(型号:VLBL0TGD2)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;低温离心机(型号:Centrifuge 5430/5430R,德国 Eppendorf 公司);实时荧光定量 PCR 仪(型号:CFX96,美国 Bio-Rad 公司);激光共聚焦显微镜、透射电子显微镜(型号:LSM700 Supra 5,德国 Carl Zeiss 公司)。

1.2 方法

1.2.1 心脏成纤维细胞的提取分离与培养 将购买的 1~3 d 的小鼠乳鼠用吸入麻醉(异氟烷)的方

法麻醉后,用酒精棉球仔细消毒体表 3 次后置于已消毒的细胞台,使用高压灭菌后的手术器械逐层解剖乳鼠胸腔直至暴露心脏。将心底部大血管游离并结扎后小心剪取完整的心脏组织,使用预冷的无菌 PBS 清洗心脏表面及心腔内残余的血液,使用精细程度较高的眼科剪将心脏组织破碎成直径约 1 mm 的小块,加入提前准备好的消化液(2 ml 胰蛋白酶与 1 ml II 型胶原酶的混合物),之后使用 37 ℃ 恒温水浴锅消化心脏组织,时长约 15 min,重复消化 3 次;对含有心脏组织的消化液使用 200 目滤网进行过滤,最后向滤液中加入含有血清的培养基终止其消化。1 400 r/min 离心 6 min,弃去上清液,使用适量的培养基将离心管中的细胞重悬,转移至细胞培养瓶中进行培养。依据细胞差速贴壁原理,对培养 4 h 的细胞进行换液,此时贴壁的细胞即为心脏成纤维细胞。

1.2.2 心脏成纤维细胞染色 细胞培养瓶中的心脏成纤维细胞消化后对细胞进行计数,将细胞以每孔 4 000 个的数量接种于 24 孔板的细胞爬片上,加入培养基孵育 24~48 h 后使用无菌 PBS 清洗细胞;在室温下使用 4%多聚甲醛固定液对细胞固定 20 min,随后使用无菌 PBS 清洗细胞;用 0.5% TritonX-100 通透 20 min 后,再次使用无菌 PBS 清洗细胞;用 5% BSA 封闭 1 h,随后 4 ℃ 孵育目的蛋白 POSTN(1:4 000)的一抗过夜、无菌 PBS 清洗 3 次(每次 5 min)、37 ℃ 烘箱避光孵育相应的鼠二抗(1:1 000)1 h、再次使用无菌 PBS 清洗 3 次(每次 5 min),随后将细胞爬片取出,使用抗荧光淬灭封片液(含 DAPI)封片。最后使用激光共聚焦显微镜观察细胞。

1.2.3 实验分组和处理 分组:① 空白对照组(Control 组):不进行任何处理。② 模型组(Rapa 组):将细胞培养瓶中的心脏成纤维细胞消化后接种于无菌 6 孔细胞培养板中,培养 3~4 h 至细胞完全贴壁后,换用含有 Rapa 的培养基继续培养 48 h。③ 质粒过表达组(Rapa + OE-PTEN 组):Rapa 刺激 48 h 后转染 PTEN 过表达质粒,首先消化细胞,使用细胞计数仪对细胞准确计数,接着将细胞等量接种于 6 孔细胞培养板中,细胞密度约占 50% 时,然后取两个洁净无菌离心管,分别加入不含血清的培养基,其中一个无菌离心管按照说明书上的比例将转染试剂 Lipofectamine 2000 稀释于培养基中,另一个无菌离心管按照 110:1 的稀释比例稀释质粒,稀释液准备好后,将两者混合均匀,静置 15 min 形成转染复合物。随后将转染复合物均匀滴加到 6 孔细胞

培养板中轻轻混匀。等待转染试剂处理细胞 24 ~ 48 h 后对各组细胞进行换液培养,随后将细胞应用于进一步实验。④ 质粒空载组 (Rapa + Vector 组): Rapa 刺激 48 h 后转染空载质粒,除了另一个无菌离心管按照 110 : 1 的稀释比例稀释空载质粒外,其他转染步骤同 Rapa + OE-PTEN 组。

1.2.4 细胞总 RNA 提取和逆转录 将细胞培养液弃去,使用预冷的 PBS 清洗细胞 3 次;使用购买的 TRIzol 试剂对细胞总 RNA 进行抽提。然后根据购入的逆转录试剂盒说明书将 RNA 进行逆转录为 cDNA。

1.2.5 RT-qPCR 检测各组细胞 PTEN、LC3 II / I、Beclin1 和 Collagen I 的 mRNA 表达 取各组 cDNA,根据购买的试剂盒说明配制反应体系并使用 RT-qPCR 仪进行扩增。将 β -actin 作为内参,使用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算各组 mRNA 的相对表达量。

1.2.6 Western blot 检测各组细胞 PTEN、LC3 II / I、Beclin1 和 Collagen I 的蛋白表达 收集各组细胞标本,使用 PMSF 与 RIPA (1 : 100) 的混合液对细胞进行裂解处理,获取总蛋白后使用蛋白浓度测定试剂盒对各组蛋白进行定量。加入合适体积的上样缓冲液后将蛋白置于 100 °C 的金属加热架加热 10 min。完成变性的蛋白用于后续实验:SDS-PAGE 电泳、转膜、使用脱脂牛奶封闭 3 h、TBST 清洗 3 次 (每次 10 min)、4 °C 孵育目的蛋白 PTEN (1 : 2 000)、LC3 II / I (1 : 1 000)、Beclin1 (1 : 2 500)、Collagen I (1 : 5 000) 和 β -actin (1 : 5 000) 的一抗过夜, TBST 清洗 3 次 (每次 10 min)、室温孵育相应的兔和鼠二抗 90 min (1 : 1 000)、再次用 TBST 清洗后使用 ECL 法对条带进行显影。对显影结果使用 ImageJ 进行定量分析,通过灰度值的差异计算各蛋白的相对表达量。

1.2.7 mCherry-GFP-LC3 荧光染色检测心脏成纤维细胞自噬活性 将处理后的各组心脏成纤维细胞接种于 24 孔培养皿中,放置过夜。使用 lip6000 将 mCherry-GFP-LC3 转染细胞。用 4% 多聚甲醛固定液固定心脏成纤维细胞 30 min,随后用 PBS 洗涤心脏成纤维细胞。最后在倒置显微镜下观察。

1.2.8 透射电镜观察心脏成纤维细胞自噬体 将各组细胞处理 48 h 后弃培养基,加入胰酶细胞消化液消化 10 ~ 20 s,培养基终止消化,用移液枪把细胞吹打下来;悬浮细胞置于 5 ml 离心管,1 200 r/min 离心 3 min;弃上清液,加入 2.5% 的常温戊二醛固定液,把细胞团轻轻挑起,悬浮于固定液中,室温固

定 30 min;然后用 1% 的锇酸固定,用不同梯度的乙醇浸泡脱水,每次 15 ~ 20 min,以及浸泡在丙酮和包埋剂中。然后置于 37 °C 烘箱中过夜,45 °C 烘箱 12 h,60 °C 烘箱 24 h 依次固化,之后切成 50 ~ 70 nm 的薄片;最后染色,在透射电子显微镜下观察。

1.2.9 统计学处理 所有数据采用 GraphPad-Prism8.0 进行分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,所有实验均独立重复 3 次以上,两组间差异比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 成功提取、分离与培养心脏成纤维细胞 按照上述方法提取、分离心脏成纤维细胞。依据细胞差速贴壁原理,对培养 4 h 的细胞进行换液,此时贴壁的细胞即为心脏成纤维细胞。如图 1 所示,倒置显微镜下,可见心脏成纤维细胞生长状态良好,呈网状分布。在荧光显微镜下,乳鼠心脏成纤维细胞分离后心脏成纤维细胞标志蛋白 POSTN 染色阳性。

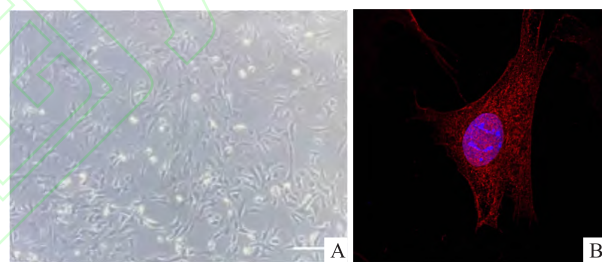


图 1 CFs 在显微镜下的观察与鉴别

Fig. 1 Observation and identification of CFs under microscope

A: Phase contrast microscope $\times 100$; B: Fluorescence microscope $\times 2 500$.

2.2 Rapa 刺激后心脏成纤维细胞自噬相关蛋白、纤维化标志物蛋白和 mRNA 表达情况 如图 2 所示,PTEN 的 mRNA 水平 ($t = 6.559, P < 0.05$) 和蛋白表达水平 ($t = 5.972, P < 0.05$) 在模型组中均下降,表明 Rapa 刺激成功构建了心脏成纤维细胞自噬模型。使用 Rapa 作用于细胞 48 h 后,提取细胞总蛋白及总 RNA 进行相关实验。RT-qPCR 检测显示,模型组 (Rapa 组) 的 LC3 II / I、Beclin1 和 Collagen I 的 mRNA 相对表达量较对照组升高 ($t = 10.280、7.543、7.717$, 均 $P < 0.05$) (图 2A)。Western blot 检测结果显示 (图 2B),模型组 (Rapa 组) 的 LC3 II / I、Beclin1 和 Collagen I 蛋白表达量较对照组 (Control 组) 升高 ($t = 10.930、9.718、5.758, P < 0.05$)。提示 PTEN 的降低可能在心脏成纤维细胞自噬过程中发挥作用。

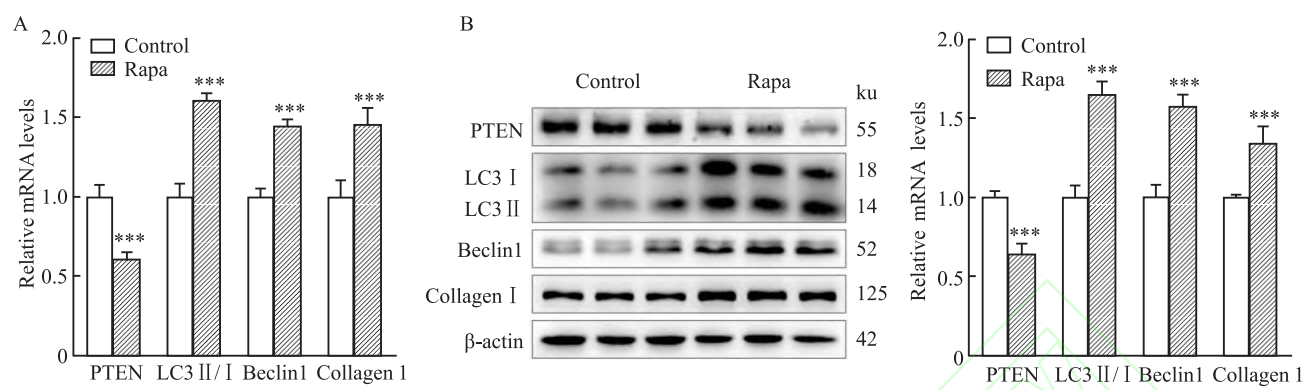


图2 Rapa 处理后相关基因在蛋白及 mRNA 水平中的表达差异 ($n=3$)

Fig. 2 After the treatment with Rapa, the differential expression of related genes was observed at both the protein and mRNA levels ($n=3$)

A: RT-qPCR method was used to detect changes in mRNA levels in each group; B: Western blot method was used to detect changes in protein levels in each group; *** $P < 0.001$ vs Control group.

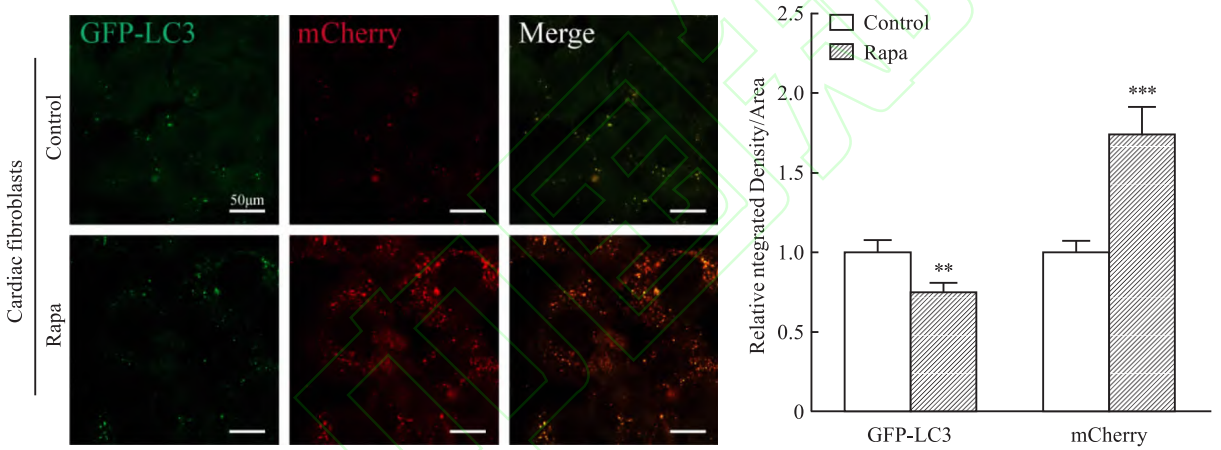


图3 Rapa 处理后细胞自噬活性的变化

Fig. 3 Changes in autophagy activity after Rapa treatment

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Control group.

2.3 mCherry-GFP-LC3 荧光染色和透射电镜检测心脏成纤维细胞模型组自噬活性情况 使用 mCherry-GFP-LC3 荧光染色对各组细胞自噬活性进行检测,结果如图 3 所示,相较于对照组,模型组 (Rapa 组) 出现了红色荧光增强 ($t = 8.773$, $P < 0.001$) 而绿色荧光减弱 ($t = 2.939$, $P < 0.0$) 的情况,说明经 Rapa 刺激后,心脏成纤维细胞自噬活性升高。如图 4 所示,在经过 Rapa 处理后,模型组的心脏成纤维细胞自噬体增多。

2.4 转染 PTEN 过表达质粒后心脏成纤维细胞自噬相关分子的表达变化 对完成转染的细胞进行 Western blot 和 RT-qPCR 实验检测 PTEN 的蛋白和 mRNA 的表达差异,结果见图 5,质粒过表达组 (Rapa + OE-PTEN 组) PTEN 的蛋白和 mRNA 表达量

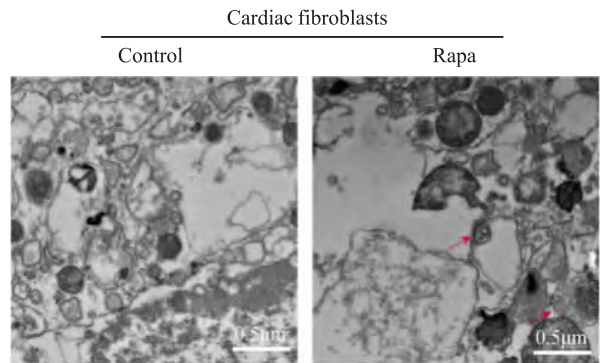


图4 Rapa 处理后细胞自噬体的变化 (红色箭头代表自噬体)

Fig. 4 Changes in autophagosomes in cells after Rapa treatment (Red arrows indicate autophagosomes)

($t = 9.376$, 15.190 , 均 $P < 0.001$) 较质粒空载组

(Rapa + Vector 组) 均增加, 证实 *PTEN* 过表达质粒转染成功。进一步检测各组细胞 LC3 II / I、Beclin1 和纤维化标志物 Collagen I 的蛋白和 mRNA 表达差异, 结果提示, 相较于 Rapa + Vector 组, 质粒过表达组自噬相关分子 LC3 II / I、Beclin1 ($t = 5.615$ 、 8.094 , 均 $P < 0.05$) 和纤维化标志物 Collagen I ($t = 5.887$, $P < 0.05$) 的蛋白表达均下降 ($P < 0.05$); 同时 LC3 II / I、Beclin1 和 Collagen I ($t = 9.901$ 、 12.570 、 12.160 , $P < 0.05$) 的 mRNA 表达也出现下降趋势, 表明过表达 *PTEN* 可能有效抑制心脏成纤维细胞的自噬。

2.5 过表达 *PTEN* 后心脏成纤维细胞的自噬能力变化 使用 mCherry-GFP-LC3 荧光染色对各组细胞自噬活性进行检测, 结果如图 6 所示, 与质粒空载组相比, 质粒过表达组 (Rapa + OE-*PTEN* 组) 细胞出现

了不同程度的红色荧光减弱 ($t = 11.380$, $P < 0.001$) 而绿色荧光增强 ($t = 12.290$, $P < 0.001$) 的情况, 说明在过表达 *PTEN* 后, 心脏成纤维细胞的自噬活性下降。同时使用透射电镜观察各组细胞自噬活性的变化, 结果如图 7 所示, 质粒过表达组 (Rapa + OE-*PTEN* 组) 细胞自噬体较质粒空载组 (Rapa + Vector 组) 减少, 也说明在过表达 *PTEN* 后, 心脏成纤维细胞的自噬活性下降。

3 讨论

心肌纤维化是各种心脏病终末期的特征性变化^[11], 在心血管疾病领域仍然是一个具有挑战性的问题, 发现新靶点、提供治疗新思路是近年来针对心肌纤维化基础研究的重中之重。近年来, 单细胞基因组学的应用使临床在纤维化组织生物学和疾病机

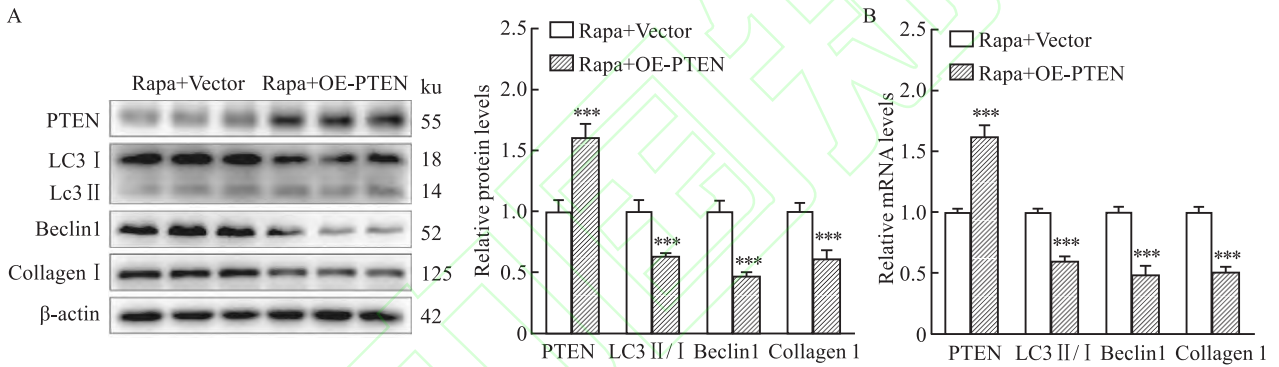


图5 质粒过表达 *PTEN* 后相关基因在蛋白及 mRNA 水平中的表达差异 ($n = 3$)

Fig.5 Differential expression of related genes at protein and mRNA levels after the overexpression of *PTEN* in plasmids ($n = 3$)

A: RT-qPCR method was used to detect changes in mRNA levels in each group; B: Western blot method was used to detect changes in protein levels in each group; *** $P < 0.001$ vs Rapa + Vector group.

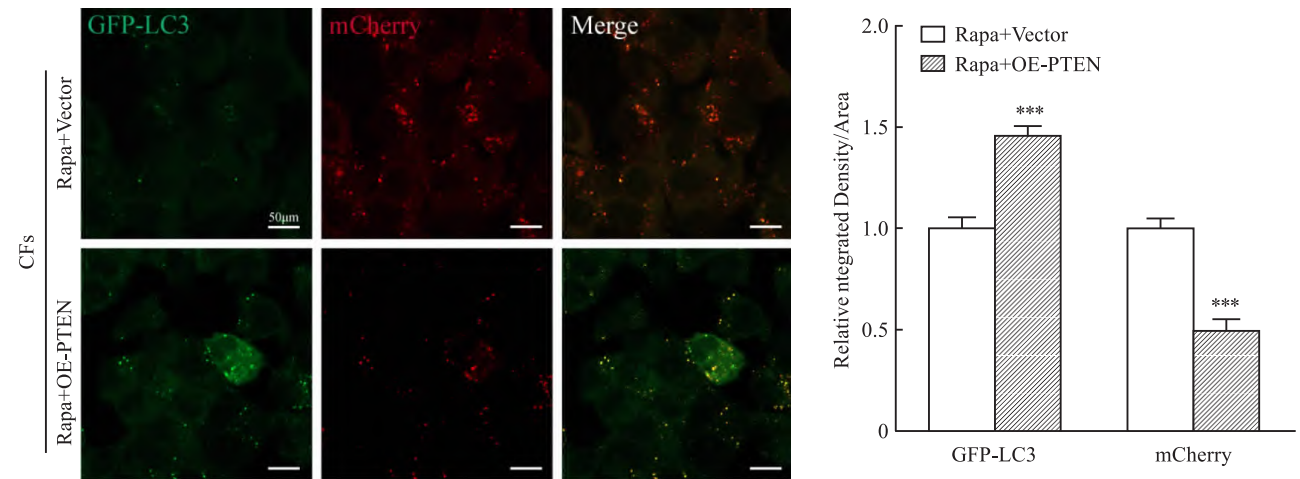


图6 质粒过表达 *PTEN* 后细胞自噬活性的变化

Fig.6 Changes in cellular autophagy activity after the overexpression of *PTEN* by plasmids

*** $P < 0.001$ vs Rapa + OE-*PTEN* group.

CFs

Rapa+Vector group

Rapa+OE-PTEN group

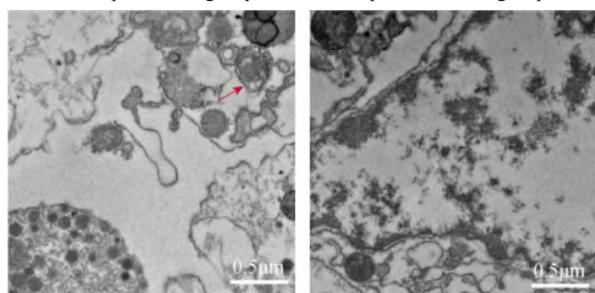


图7 质粒过表达 PTEN 后细胞自噬体的变化
(红色箭头代表自噬体)

Fig. 7 Changes in autophagosomes after plasmid-mediated the overexpression of PTEN (Red arrows indicate autophagosomes)

制的探索方面有了新的见解,国内外越来越多的相关研究表明自噬在纤维化中发挥了重要作用,这为发现治疗纤维化的自噬靶点、研究针对性的有效治疗药物提供了重要证据^[12]。自噬可经多种方式调节心肌细胞重构和物质代谢,是维持细胞稳态的重要过程^[13]。有研究^[14]发现,抑制自噬可减轻心肌纤维化。

PTEN 被广泛认为是一种肿瘤抑制因子,在多种人类癌症中通常失活^[15]。PTEN 水平异常在许多癌症中发生,PTEN 的突变或缺失总是影响肿瘤的进展^[16]。现在越来越多的研究表明,PTEN 在自噬和纤维化的过程中也发挥重要的作用。Huang et al^[10]的研究表明,在亚砷酸钠诱导小鼠肝纤维化过程中,PTEN 的异常表达与自噬有关,在造血干细胞中也发现了类似的结果,其中 PTEN 的过表达减少了自噬的发生并减缓了肝纤维化。本研究结果显示,与对照组相比,Rapa 刺激心脏成纤维细胞后,PTEN 的表达降低,心脏成纤维细胞自噬相关蛋白 LC3 II/I、Beclin1 和纤维化标志物 Collagen I 的表达明显升高,这提示 PTEN 可能参与了心脏成纤维细胞的自噬过程。为了进一步探究 PTEN 可能发挥的作用,本研究使用 PTEN 过表达质粒转染心脏成纤维细胞,进而观察转染后心脏成纤维细胞分子水平及细胞自噬活性发生的变化。在确认转染成功后,本研究实验显示 PTEN 过表达组心脏成纤维细胞自噬活性相关指标和纤维化标志物在蛋白及转录水平均出现了不同程度的下降,通过 mCherry-GFP-LC3 荧光染色实验显示,PTEN 过表达组心脏成纤维细胞的自噬活性降低。

综上所述,本研究表明 PTEN 参与调控心脏成纤维细胞的自噬活性,并且可能是影响心肌纤维化

的关键因素之一。该研究成果将有利于从新的方向探究心肌纤维化发展的机制,从而为心肌纤维化的临床治疗提供新的理论依据和新的作用靶点。

参考文献

- [1] Czubryt M P, Hale T M. Cardiac fibrosis: pathobiology and therapeutic targets [J]. Cell Signal, 2021, 85: 110066. doi: 10.1016/j.cellsig.2021.110066.
- [2] Christensen G, Herum K M, Lunde I G. Sweet, yet underappreciated: proteoglycans and extracellular matrix remodeling in heart disease [J]. Matrix Biol, 2019, 75-76: 286-99. doi: 10.1016/j.matbio.2018.01.001.
- [3] Seidenberg J, Stellato M, Hukara A, et al. The AP-1 transcription factor fosl-2 regulates autophagy in cardiac fibroblasts during myocardial fibrogenesis [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(4): 1861. doi: 10.3390/ijms22041861.
- [4] Fujioka Y, Noda N N. Biomolecular condensates in autophagy regulation [J]. Curr Opin Cell Biol, 2021, 69: 23-9. doi: 10.1016/j.ccb.2020.12.011.
- [5] Deretic V. Autophagy in inflammation, infection, and immunometabolism [J]. Immunity, 2021, 54(3): 437-53. doi: 10.1016/j.immuni.2021.01.018.
- [6] Lu C, Yang Y, Zhu Y, et al. An intervention target for myocardial fibrosis: autophagy [J]. Biomed Res Int, 2018, 2018: 6215916. doi: 10.1155/2018/6215916.
- [7] Sharma A, Almasan A. Autophagy and PTEN in DNA damage-induced senescence [J]. Adv Cancer Res, 2021, 150: 249-84. doi: 10.1016/bs.acr.2021.01.006.
- [8] Aquila S, Santoro M, Caputo A, et al. The tumor suppressor PTEN as molecular switch node regulating cell metabolism and autophagy: implications in immune system and tumor microenvironment [J]. Cells, 2020, 9(7): 1725. doi: 10.3390/cells9071725.
- [9] Bueno M, Lai Y C, Romero Y, et al. PINK1 deficiency impairs mitochondrial homeostasis and promotes lung fibrosis [J]. J Clin Invest, 2015, 125(2): 521-38. doi: 10.1172/JCI74942.
- [10] Huang F, Ding G, Yuan Y, et al. PTEN overexpression alters autophagy levels and slows sodium arsenite-induced hepatic stellate cell fibrosis [J]. Toxics, 2023, 11(7): 578. doi: 10.3390/toxics11070578.
- [11] 林丽婵, 刘芷言, 刘震宇, 等. SIRT2 对 Ang II 诱导的小鼠心肌成纤维细胞增殖与迁移影响的研究 [J/OL]. 安徽医科大学学报, 2025(4): 589-95, 603. doi: org/10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.04.001.
- [12] Lin L C, Liu Z Y, Liu Z Y, et al. Effect of SIRT2 on proliferation and migration of mouse cardiac fibroblasts induced by Ang II [J/OL]. Acta Universitatis Medicinalis Anhui, 2025, (4): 589-95, 603. doi: org/10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.04.001.
- [12] 聂萍, 李虎, 朱宏涛, 等. 自噬在纤维化疾病中的研究进展 [J]. 重庆医学, 2024, 53(9): 1406-11. doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2024.09.023.

- [12] Nie P, Li H, Zhu H T, et al. Research progress of autophagy in fibrotic diseases[J]. *Chongqing Med J*, 2024, 53(9): 1406 – 11. doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2024.09.023.
- [13] 陈 稳, 叶 强. 自噬与心房颤动关系的研究进展[J]. *心血管病学进展*, 2022, 43(3): 218 – 21. doi: 10.16806/j.cnki.issn.1004-3934.2022.03.007.
- [13] Chen W, Ye Q. The relationship between autophagy and atrial fibrillation[J]. *Adv Cardiovasc Dis*, 2022, 43(3): 218 – 21. doi: 10.16806/j.cnki.issn.1004-3934.2022.03.007.
- [14] Liu W, Sun J, Guo Y, et al. Calhex231 ameliorates myocardial fibrosis post myocardial infarction in rats through the autophagy-NLRP3 inflammasome pathway in macrophages[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(22): 13440 – 53. doi: 10.1111/jcmm.15969.
- [15] Benitez J A, Finlay D, Castanza A, et al. PTEN deficiency leads to proteasome addiction; a novel vulnerability in glioblastoma[J]. *Neuro Oncol*, 2021, 23(7): 1072 – 86. doi: 10.1093/neuonc/noab001.
- [16] Ellert-Miklaszewska A, Ciechomska I A, Kaminska B. Synthetic cannabinoids induce autophagy and mitochondrial apoptotic pathways in human glioblastoma cells independently of deficiency in TP53 or PTEN tumor suppressors[J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(3): 419. doi: 10.3390/cancers13030419.

The effect of *PTEN* overexpression on autophagy of mouse cardiac fibroblasts

He Huanhuan¹, Jiang Shunxiang¹, Tao Hui², Cao Wei¹

(¹*Dept of Thoracic Surgery*, ²*Dept of Anesthesiology and Perioperative Medicine*,
Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract **Objective** To investigate the effect of phosphatase and tensin homolog (*PTEN*) overexpression on autophagy in mouse primary cardiac fibroblasts. **Methods** Neonatal mice (1 – 3 days old) were purchased and subjected to cardiac tissue harvesting. Cardiac fibroblasts were isolated through enzymatic digestion and cultured. After cellular adhesion, rapamycin (Rapa)-treated cardiac fibroblasts were used to establish an autophagy model. Following successful model construction, cells were transfected with either *PTEN*-overexpressing plasmid (*PTEN* overexpression group) or empty vector (control group), followed by 24 – 48 h incubation. The molecular expressions of *PTEN*, autophagy-related proteins (microtubule-associated protein light chain 3 [LC3 II / I], Beclin1), and fibrotic marker collagen I were detected by Western blot and RT-qPCR. Autophagic flux was assessed using mCherry-GFP-LC3 fluorescence staining to evaluate changes in autophagic activity. Finally, transmission electron microscopy (TEM) was employed to observe autophagosome formation in cardiac fibroblasts. **Results** In the Rapa-induced cardiac fibroblast autophagy model, compared with the control group, the protein and mRNA levels of *PTEN* significantly decreased ($P < 0.05$), while the expression of autophagy-related proteins (LC3 II / I, Beclin1) and fibrotic marker Collagen I was upregulated at both protein and mRNA levels ($P < 0.05$). Additionally, in *PTEN*-overexpressing cardiac fibroblasts, the expression levels of LC3 II / I, Beclin1, and Collagen I were markedly reduced compared to the empty vector group ($P < 0.05$). mCherry-GFP-LC3 fluorescence staining demonstrated that autophagic activity was significantly attenuated in the *PTEN* overexpression group versus the empty vector group ($P < 0.05$). TEM further revealed a decreased number of autophagosomes in *PTEN*-overexpressing cardiac fibroblasts ($P < 0.05$). **Conclusion** The overexpression of *PTEN* significantly inhibits autophagy in cardiac fibroblasts, suggesting that *PTEN* may be a key gene involved in regulating autophagy in cardiac fibroblasts.

Key words *PTEN*; autophagy; LC3 II / I; Beclin1; cardiac fibroblasts; cardiac fibrosis

Fund program Key Research and Development Projects of Anhui Province (No 202104j07020037)

Corresponding author Cao Wei, E-mail: 13514964858@qq.com