·论著·

FoxP1 通过激活自噬抑制内皮细胞内皮 - 间充质转化的作用机制研究

窦媛媛　胡晓咏　张玥　祖努然·拜克里　唐瑞　王欢　李红建

【摘要】 目的　探讨叉头盒转录因子 P1（FoxP1）介导自噬途径调控转化生长因子 -β1（TGF-β1）诱导的内皮 - 间充质转化（EndMT）过程的作用机制。**方法**　将人脐静脉内皮细胞分成对照、TGF-β1 诱导 EndMT 模型组（TGF-β1）、干扰 RNA 阴性对照组（TGF-β1+si-NC）、FoxP1 干扰 RNA 组（TGF-β1+si-FoxP1）、过表达空质粒阴性对照组（TGF-β1+oe-NC）、FoxP1 过表达组（TGF-β1+oe-FoxP1）、FoxP1 过表达联合自噬抑制剂组（TGF-β1+oe-FoxP1+3-MA）。Western blot 检测内皮、间充质标志物及胶原蛋白表达；应用 mCherry-EGFP-LC3 双荧光系统检测自噬；通过划痕实验评估细胞迁移能力。两组间比较采用独立样本 *t* 检验，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。**结果**　Western blot 结果显示，与对照比较，TGF-β1 组内皮标志物 VE-cadherin、CD31 表达降低，间充质标志物 α-SMA、Vimentin 表达升高，胶原蛋白 Collagen Ⅰ（3.08 ± 0.09 比 1.00 ± 0.08）、Collagen Ⅲ表达（3.14 ± 0.10 比 1.00 ± 0.05）升高，细胞迁移能力［（75.20 ± 4.30）% 比（36.80 ± 2.60）%］、p62 表达（2.24 ± 0.07 比 1.00 ± 0.07）增强，Beclin-1（0.49 ± 0.03 比 1.00 ± 0.02）、LC3 Ⅱ/Ⅰ表达水平（0.17 ± 0.01 比 1.00 ± 0.08）降低（*P* 均 < 0.01）；与 TGF-β1+oe-NC 组相比，TGF-β1+oe-FoxP1 组 VE-cadherin 和 CD31 表达上调，α-SMA、Vimentin 表达下降，胶原蛋白 Collagen Ⅰ（2.08 ± 0.10 比 4.38 ± 0.15）、Collagen Ⅲ表达（1.86 ± 0.07 比 3.60 ± 0.14）、细胞迁移能力［（46.66 ± 5.15）% 比（77.56 ± 7.30）%］、p62 表达（1.77 ± 0.09 比 2.24 ± 0.08）降低，Beclin-1（0.82 ± 0.01 比 0.49 ± 0.03）、LC3 Ⅱ/Ⅰ表达水平（0.55 ± 0.02 比 0.20 ± 0.01）升高（*P* 均 < 0.01）。与 TGF-β1+oe-FoxP1 组相比，TGF-β1+oe-FoxP1+3-MA 组 Beclin-1（1.60 ± 0.03 比 1.96 ± 0.02）、LC3 Ⅱ/Ⅰ表达（2.20 ± 0.04 比 3.88 ± 0.16）下降，p62（0.70 ± 0.02 比 0.49 ± 0.05）、Collagen Ⅰ（0.80 ± 0.02 比 0.51 ± 0.03）、Collagen Ⅲ表达（0.70 ± 0.01 比 0.29 ± 0.02）升高（*P* 均 < 0.01），E-cadherin 和 CD31 的表达均下调，α-SMA、Vimentin 表达上调，细胞迁移能力［（58.63 ± 6.19）% 比（40.84 ± 5.27）%］增强（*P* 均 < 0.01）。**结论**　FoxP1 过表达可激活自噬途径抑制 TGF-β1 诱导的 EndMT 过程，旨在为心肌纤维化的机制研究与治疗提供新的细胞学视角。

【关键词】 心力衰竭；　内皮 - 间充质转化；　FoxP1；　自噬

The mechanism of FoxP1 inhibits endothelial-mesenchymal transition in endothelial cells via autophagy activation

Dou Yuanyuan, Hu Xiaoyong, Zhang Yue, Zunuran·Baikeli, Tang Rui, Wang Huan, Li Hongjian. Department of Hypertension, the Fifth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China

Corresponding author: Li Hongjian, Email: lhjdoctor_109@126.com

【Abstract】 Objective　To explore the mechanismof forkhead box p1（FoxP1）, a forkhead box transcription factor, mediates the autophagy pathway to regulate the process of transforming growth factor-β1（TGF-β1）-induced endothelial to mesenchymal transition（EndMT）. **Methods**　The human umbilical vein endothelial cells were divided into the following groups: control group（Blank）, TGF-β1-induced EndMT model group（TGF-β1）, small interfering RNA negative control group（TGF-β1+si-NC）, FoxP1 small interfering RNA group（TGF-β1+si-

DOI：10.3877/cma.j.issn.2095-1221.2026.01.002

基金项目：新疆维吾尔自治区自然科学基金（2022D01C576）；新疆“天山英才”医药卫生高层次领军人才培养计划（TSYC202301A057）

作者单位：830000 乌鲁木齐，新疆医科大学第五附属医院高血压科

通信作者：李红建，Email：lhjdoctor_109@126.com

FoxP1), overexpressing RNA negative control group (TGF-β1+oe-NC), FoxP1 overexpressing group (TGF-β1+oe-FoxP1), and FoxP1 overexpression combined with an autophagy inhibitor group (TGF-β1+oe-FoxP1+3-MA). Western blot were used to detect the expression of endothelial、mesenchymal markers and collagen. The mCherry-EGFP-LC3 dual fluorescence system was used to detect autophagy status. Cell migration ability was assessed through scratch assay. The independent samples *t*-test was used for the comparisons between two groups, while for comparisons among multiple groups, one-way analysis of variance (ANOVA) was employed, and the LSD-*t* method was used for pairwise comparisons. **Results** Western blot results showed that, compared to the control group, the expression of endothelial markers VE-cadherin and CD31 were decreased in the TGF-β1 group, while the expression of mesenchymal markers α-SMA,Vimentin and collagen proteins Collagen Ⅰ(3.08 ± 0.09 *vs* 1.00 ± 0.08), Collagen Ⅲ(3.14 ± 0.10 *vs* 1.00 ± 0.05) were increased. In addition, the cell migration ability [(75.20 ± 4.30)% *vs* (36.80 ± 2.60)%] and the expression of p62 (2.24 ± 0.07 *vs* 1.00 ± 0.07) were increased in TGF-β1 group when compared to control group, while the expression levels of Beclin-1 (0.49 ± 0.03 比 1.00 ± 0.02) and LC3 Ⅱ/Ⅰ (0.17 ± 0.01 *vs* 1.00 ± 0.08) were decreased (all $P < 0.01$). Compared to the TGF-β1+oe-NC group, the expression of VE-cadherin, CD31 and Beclin-1 (0.82 ± 0.01 *vs* 0.49 ± 0.03), LC3 Ⅱ/Ⅰ(0.55 ± 0.02 *vs* 0.20 ± 0.01) (all $P < 0.01$) were increased in the TGF-β1+oe-FoxP1 group, while the expression of α-SMA, Vimentin and collagen proteins Collagen Ⅰ (2.08 ± 0.10 *vs* 4.38 ± 0.15), Collagen Ⅲ (1.86 ± 0.07 *vs* 3.60 ± 0.14) as well as p62 (1.77 ± 0.09 *vs* 2.24 ± 0.08), were decreased, along with areduced cell migration ability [(46.66 ± 5.15)% 比 (77.56 ± 7.30)%] (all $P < 0.01$). Compared to the TGF-β1+oe-FoxP1 group, the expression of Beclin-1 (1.60 ± 0.03 *vs* 1.96 ± 0.02), LC3 Ⅱ/Ⅰ (2.20 ± 0.04 *vs* 3.88 ± 0.16) and E-cadherin, CD31 were decreased in the TGF-β1+oe-FoxP1+3-MA group, while the expression of p62 (0.70 ± 0.02 *vs* 0.49 ± 0.05), Collagen I (0.80 ± 0.02 *vs* 0.51 ± 0.03), Collagen Ⅲ (0.70 ± 0.01 *vs* 0.29 ± 0.02) and α-SMA, Vimentin were increased, along with the enhanced cell migration ability [(58.63 ± 6.19)% 比 (40.84 ± 5.27)%] (all $P < 0.01$). **Conclusion** Overexpression of FoxP1 can activate the autophagy pathway to inhibit the TGF-β1-induced EndMT process,while could provide a novel cytological perspective for the mechanistic research and therapeutic approaches to myocardial fibrosis.

【Key words】 Heart failure; Endothelial-to-mesenchymal transition; FoxP1; Autophagy

心力衰竭（heart failure，HF）是众多心血管疾病的终末阶段，其发生发展与病理性心脏重塑，特别是心肌纤维化密切相关[1-2]。在纤维化进程中，除成纤维细胞活化外，内皮 - 间充质转化（endothelial to mesenchymal transition，EndMT）已被证实是病理性肌成纤维细胞的重要来源[3]。EndMT 是指内皮细胞在转化生长因子 -β（transforming growth factor-β，TGF-β）等因子刺激下丧失细胞连接特性，获得迁移、浸润及分泌细胞外基质的能力，转化为间充质表型细胞的过程[4-6]。因此，深入探索 EndMT 的调控机制，对防治心肌纤维化具有重要意义。

自噬作为维持细胞内环境稳态的关键机制，近年被发现在 EndMT 进程中可能起调节作用[7]。研究表明，自噬并非仅是一种细胞应激下的生存策略，它积极参与精细的细胞信号调控[6]。自噬可能通过干预 TGF-β/Smad、Wnt/β-catenin 等信号转导途径抑制 EndMT 发生[8]。临床研究发现，自噬活性常呈失代偿状态，且与纤维化程度呈负相关[9]，这些发现提示靶向自噬可能成为抑制 EndMT、延缓心肌纤维化的新策略。叉头盒转录因子 P1（forkhead box P1，FoxP1）是内皮细胞中高表达的一种转录因子。研究表明，FoxP1 能够抑制 TGF-β1 信号通路的过度激活，有效阻遏成纤维细胞的过度增殖与表型转化，从而延缓心脏纤维化的进展[10]。FoxP1 在多种细胞类型中具有促进自噬活性的功能[11-12]。然而，FoxP1 在内皮细胞中是否具有同样的促自噬功能，该功能是否参与其对抗 EndMT 和心肌纤维化的过程，目前尚属未知领域，这一科学问题的阐明对于理解 FoxP1 的心脏保护机制至关重要。为此，本研究旨在利用 TGF-β1 诱导的人脐静脉内皮细胞（human umbilical vein endothelial cells，HUVECs）EndMT 模型，探究转录因子 FoxP1 及其下游的自噬通路在这一过程中的具体作用和分子机制，为理解 FoxP1 在心肌纤维化中的潜在保护作用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞及主要试剂

HUVECs（货号 PCS-100-013，美国菌种保藏中心）；DMEM 培养基（货号 KGM12800NH，江苏凯基生物技术股份有限公司）；TGF-β1（货号 10804，北京义翘神州科技股份有限公司）；磷酸盐缓冲液（货号 G4202，武汉赛维尔生物科技有限公司）；胰蛋白酶 -EDTA 消化液（货号 c125c1）、双抗（青霉素 - 链霉素溶液）（货号 c125c5）、TRIzol（货号 M5101）、超敏 ECL 化学发光试剂盒（货号 P10100，苏州新赛美生物科技有限公司）；胎牛血清（货号 FSP500，苏州依科赛生物科技股份有限公司）；无内毒素质粒小提中量试剂盒（货号 DP118-02，北京天根生化科技有限公司）；逆转录试剂盒（货号 A234）、2×RealStar Fast SYBR qPCR Mix（货号 A301-01，江苏康润生物科技有限公司）；RIPA 裂解液（货号 P0013B）、BCA 蛋白浓度测定试剂盒（货号 P0010S）、mCherry-EGFP-LC3 质粒（货号 D2816，上海碧云天生物技术有限公司）；一抗：VE-cadherin（货号 AF6265）、CD31（货号 AF6191）、Beclin-1（货号 AF5128）、FoxP1（货号 DF7250）（江苏亲科生物研究中心有限公司）；α-SMA（货号 14395-1-AP）、Vimentin（货号 10366-1-AP）、p62（货号 18420-1-AP）、LC3（货号 14600-1-AP）、GAPDH（货号 60004-1-IG）、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG（H+L）（货号 SA00001-2）（武汉三鹰生物技术有限公司）；4 % 多聚甲醛（货号 df0135，北京雷根生物技术有限公司）；Goat Anti-Rabbit IgG H&L（Alexa Fluor® 488）（货号 ab150077，英国 abcam 公司），DAPI 染液（货号 C0065，北京索莱宝科技有限公司）；3-MA（货号 HY-19312，美国 MCE 公司）；Lipofectamine 3000 转染试剂（货号 L3000015，美国 Invitrogen 公司）。

1.1.2 仪器

共聚焦显微镜（型号 LSM 880，德国 Zeiss 公司）；倒置荧光显微镜（型号 IX83，日本 Olympus 公司）；实时荧光定量 PCR 仪（型号 QuantStudio 5，美国赛默飞公司）。

1.2 方法

1.2.1 EndMT 模型构建

将 HUVECs 细胞置于 10 % 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和链霉素的 DEME 培养基中培养，37℃、5 % CO_2 细胞培养箱中经过血清饥饿过夜后，使用 20 ng/mL TGF-β1 刺激 HUVECs 细胞 24 h 建立 EndMT 模型 [13]。

1.2.2 细胞分组及干预

将 HUVECs 细胞分成对照组、EndMT 模型组（TGF-β1），干扰 RNA 阴性对照组（TGF-β1+si-NC）、FoxP1 干扰 RNA 组（TGF-β1+si-FoxP1）、过表达空质粒阴性对照组（TGF-β1+oe-NC）、FoxP1 过表达组（TGF-β1+oe-FoxP1）、FoxP1 过表达联合自噬抑制剂组（TGF-β1+oe-FoxP1+3-MA），除对照外，其余各组均采用 TGF-β1 诱导 EndMT 细胞模型，TGF-β1+si-FoxP1 组和 TGF-β1+oe-FoxP1 组分别转染 FoxP1 siRNA 或 FoxP1 过表达质粒，TGF-β1+si-NC 组和 TGF-β1+oe-NC 分别转染对照 siRNA 或对照质粒；TGF-β1+oe-FoxP1+3-MA 组构建 EndMT 细胞模型前 2 h，转染 FoxP1 过表达质粒，转染 6 h 后更换为完全培养基，培养 24 h 后根据文献 [14] 报道加入 10 mmol/L 自噬抑制剂 3-MA 进行预处理，继续培养 24 h 后进行后续实验。FoxP1 过表达质粒及 siRNA 由上海吉玛制药技术有限公司合成，siFoxP1 序列为：UAAUCCACUAACUUGCUGCTT，siRNA-NC 序列为：ACGUGACACGUUCGGAGAATT。采用 Lipofectamine 3000 转染试剂按照说明书进行转染操作。

1.2.3 免疫荧光检测 EndMT 标志物

提前在对应的孔板中铺入对应的细胞爬片，对细胞进行相应的干预处理后，将爬片用 4 % 多聚甲醛固定 15 min，0.1 % Triton X-100 透膜 10 min，5 % BSA 封闭 30 min；一抗孵育，anti-VE-cadherin（1∶200）、anti-α-SMA（1∶100），4℃过夜；对应种属的 Alexa Fluor 488/594 二抗（1∶200），室温避光 1 h，DAPI 染核 5 min。共聚焦显微镜观察、采集图像。

1.2.4 RT-qPCR 检测 FoxP1 mRNA 表达

按照 RNA 提取试剂盒说明提取细胞总 RNA，按照试剂盒的说明书进行逆转录，配置逆转录反应体系（10 μL 体系），使用对应上下游引物进行实时 PCR 扩增（20 μL 体系），使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算得到基因表达量。扩增流程如下：预变性阶段 95℃ 2 min，随后进行循环反应，每循环包括 95℃变性 10 s，60℃退火 30 s，总计 40 个循环，每组均设置 3 个复孔，均进行 3 次重复实验，具体引物序列见表 1。

1.2.5 Western blot 检测 EndMT 及自噬相关蛋白

使用 RIPA 缓冲液在冰上裂解细胞 30 min，离心取上清液，BCA 检测试剂盒对总蛋白浓度定量后

按比例加入 SDS 上样缓冲液，95℃煮沸 10 min 制成 Western blot 样本。10 % SDS-PAGE 胶电泳 1 ~ 2 h，冰浴条件下进行转膜 60 ~ 90 min（湿转）；5 % 脱脂牛奶封闭 1 h；一抗孵育，FoxP1（1∶1 000）、VE-cadherin（1∶1 000）、CD31（1∶1 000）、α-SMA（1∶2 000）、Vimentin（1∶3 000）、Beclin-1（1∶1 000）、p62（1∶5 000）、LC3（1∶2 000）、GAPDH（1∶50 000），4℃过夜；TBST 洗 3 次，孵育辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG（H+L）（1∶10 000），室温摇床孵育 1 h；TBST 再次洗涤 3 次后，ECL 法显影，化学发光仪检测条带，ImageJ 定量分析。所有实验均独立重复 3 次。

表 1　引物序列信息

基因	引物序列（5' → 3'）	预期扩增长度（bp）
FoxP1	上游 TGGCATCTCATAAACCATCAGC	134
	下游 GGTCCACTCATCTTCGTCTCAG	
GAPDH	上游 ACAGCCTCAAGATCATCAGC	104
	下游 GGTCATGAGTCCTTCCACGAT	

1.2.6　划痕实验检测细胞迁移

在 6 孔板背后用黑色记号笔每隔 1 cm 画上直线，消化细胞转移到 6 孔板，培养细胞至 80 %融合，用 200 μL 枪头垂直于记号线划直线，PBS 洗去漂浮细胞；进行相应干预处理后，0 h、48 h 在对应位置拍照采集图像，ImageJ 计算划痕面积愈合率。每组设置 3 个复孔。

1.2.7　mCherry-EGFP-LC3 检测自噬共转染

将细胞接种于 12 孔板，感染前 1 d，每孔加入 0.5 mL 完全培养液，使第 2 天病毒感染时密度达到约 70 % ~ 80 %，加入 mCherry-EGFP-LC3，感染 4 h 后补加 250 μL 完全培养液，24 h 后初步在荧光显微镜下观察感染效率。此时继续转染 oe-FoxP1/oe-NC 质粒，感染 72 h 后通过倒置荧光显微镜在随机视野采集图像；黄色斑点（EGFP+mCherry）为自噬体，红色斑点（仅 mCherry）为自噬溶酶体，计算红 / 黄斑点比值评估自噬水平。

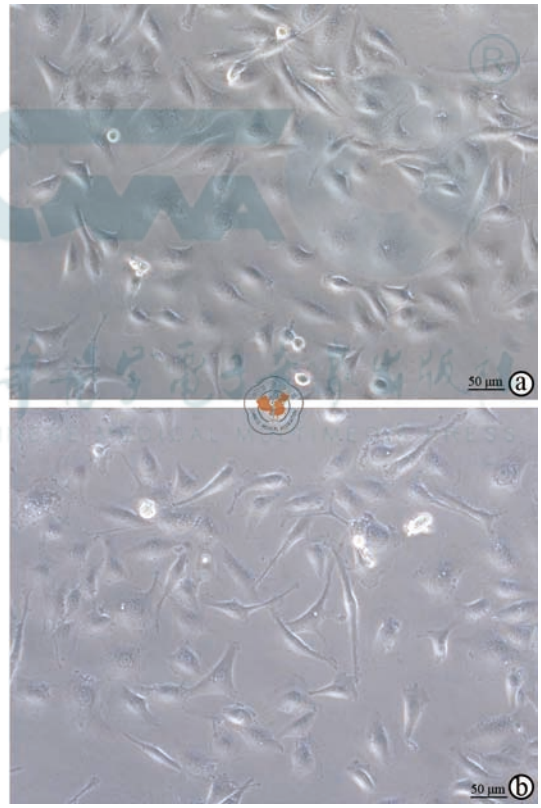
1.3　统计学分析方法

采用 GraphPad Prism 9 进行统计学分析。VE-cadherin、CD31、α-SMA、Vimentin、FoXP1 表达水平、细胞迁移率以 $\bar{x} \pm s$ 表示，两组间比较采用独立样本 *t* 检验，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较使用 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　TGF-β1 诱导的血管内皮细胞 EndMT

显微镜观察结果显示，对照内皮细胞呈现典型的鹅卵石状形态，细胞间连接紧密，排列整齐；与对照相比，TGF-β1 组细胞形态改变，多数细胞转变为纺锤形，细胞间连接明显松散，间隙增大，表现出间充质细胞的典型特征（图 1）。Western blot 结果显示，与对照相比，TGF-β1 组内皮细胞标志物 VE-cadherin 和 CD31 表达降低，间充质细胞标志物 α-SMA、Vimentin 表达上调，胶原蛋白 Collagen Ⅰ（3.08 ± 0.09 比 1.00 ± 0.08）和 Collagen Ⅲ表达（3.14 ± 0.10 比 1.00 ± 0.05）增加（$P < 0.01$，图 2）。划痕结果显示，与对照相比，TGF-β1 组细胞的迁移能力增强［（75.20 ± 4.30）% 比（36.80 ± 2.60）%］（$P < 0.01$，图 3）。



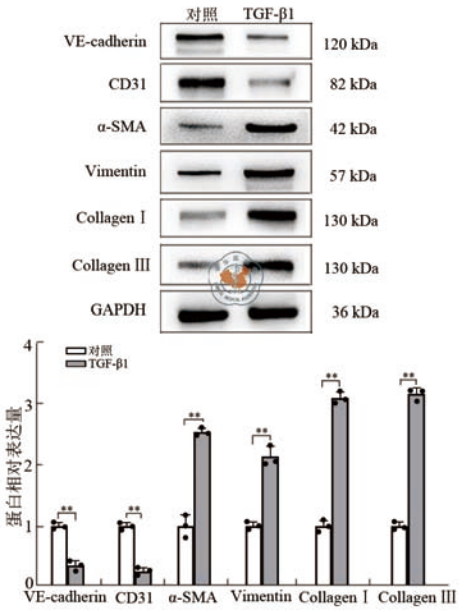
注：a 图为对照组诱导后内皮细胞形态；b 图为 TGF-β1 诱导后内皮细胞形态改变

图 1　光学显微镜下观察对照和 TGF-β1 诱导后内皮细胞形态（×200）

2.2　FoxP1 表达对 TGF-β1 诱导的内皮细胞 EndMT 的影响

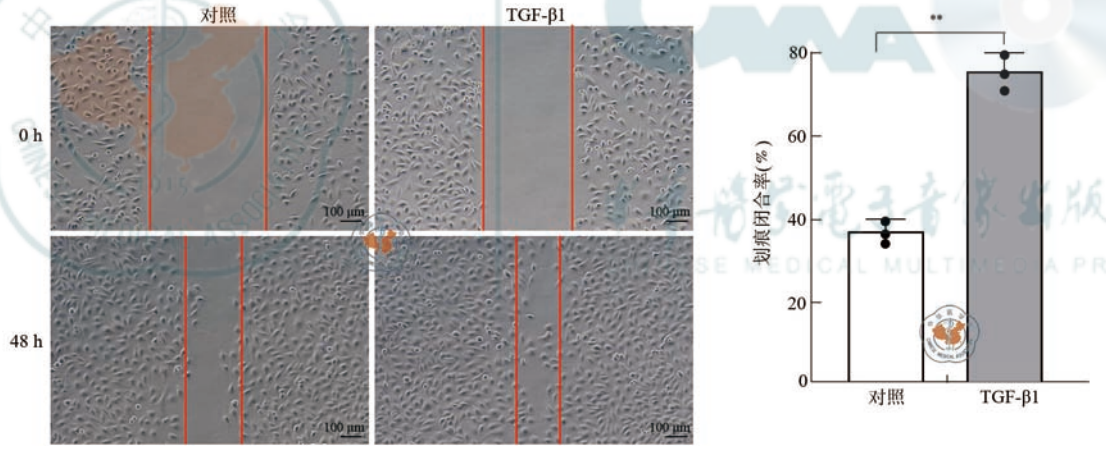
与 oe-NC 组相比，oe-FoxP1 组 FoxP1 mRNA（2.86 ± 0.27 比 1.00 ± 0.05）和蛋白水平（2.64 ± 0.03 比 1.00 ± 0.07）均上调；与 si-NC 组相比，si-

FoxP1 组的 FoxP1 mRNA（0.39 ± 0.03 比 1.00 ± 0.12）和蛋白表达水平（0.10 ± 0.01 比 1.00 ± 0.04）均下调（*P* 均 < 0.01，图 4）。Western blot 检测结果显示，与 TGF-β1+oe-NC 组相比，TGF-β1+oe-FoxP1 组 VE-cadherin 和 CD31 的表达上调，α-SMA、Vimentin、Collagen Ⅰ（2.08 ± 0.10 比 4.38 ± 0.15）、Collagen Ⅲ表达（1.86 ± 0.07 比 3.60 ± 0.14）下调；与 TGF-β1+ si-NC 组相比，TGF-β1+si-FoxP1 组 VE-cadherin 和 CD31 表达下调，α-SMA、Vimentin、Collagen Ⅰ（3.57 ± 0.31 比 2.79 ± 0.21）、Collagen Ⅲ表达（3.53 ± 0.10 比 1.65 ± 0.09）上调（*P* 均 < 0.01，图 5）。划痕结果显示，与 TGF-β1+oe-NC 组相比，TGF-β1+oe-FoxP1 组细胞迁移能力［（46.66 ± 5.15）% 比（77.56 ± 7.30）%］减弱（*P* < 0.01）；与 TGF-β1+si-NC 组相比，TGF-β1+si-FoxP1 组细胞迁移能力［（93.30 ± 7.10）% 比（75.40 ± 4.80）%］增强（*P* < 0.01，图 6）。



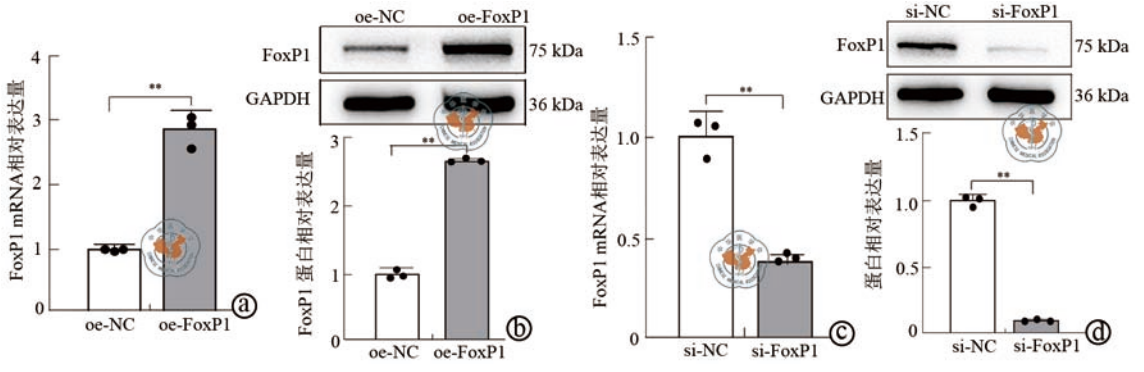
注：$^{**}P < 0.01$，$n = 3$

图 2 Western blot 检测内皮标志物 VE-cadherin、CD31 和成纤维细胞标志物 α-SMA、Vimentin、胶原蛋白 Collagen Ⅰ / Ⅲ的表达



注：TGF-β1 组细胞迁移能力增强；$^{**}P < 0.01$，$n = 3$

图 3 倒置显微镜下观察对照和 TGF-β1 诱导后细胞迁移能力（×200）



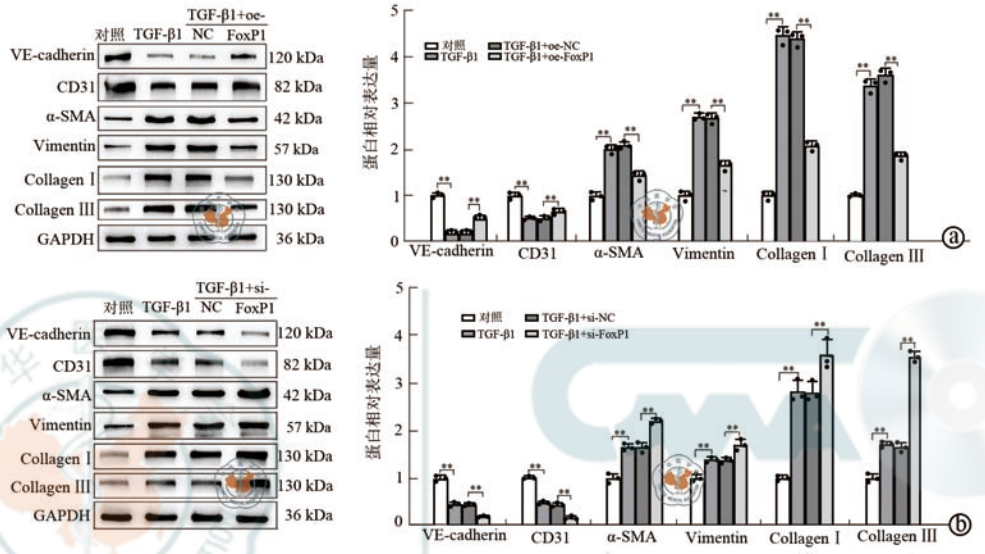
注：a 图为 RT-qPCR 检测 FoxP1 过表达效率；b 图为 Western blot 检测 FoxP1 过表达效率；c 图为 RT-qPCR 检测 FoxP1 敲低效率；d 图为 Western blot 检测 FoxP1 敲低效率；$^{**}P < 0.01$，$n = 3$

图 4 FoXP1 过表达或敲低效率验证

2.3　FoxP1 表达对内皮细胞自噬的影响

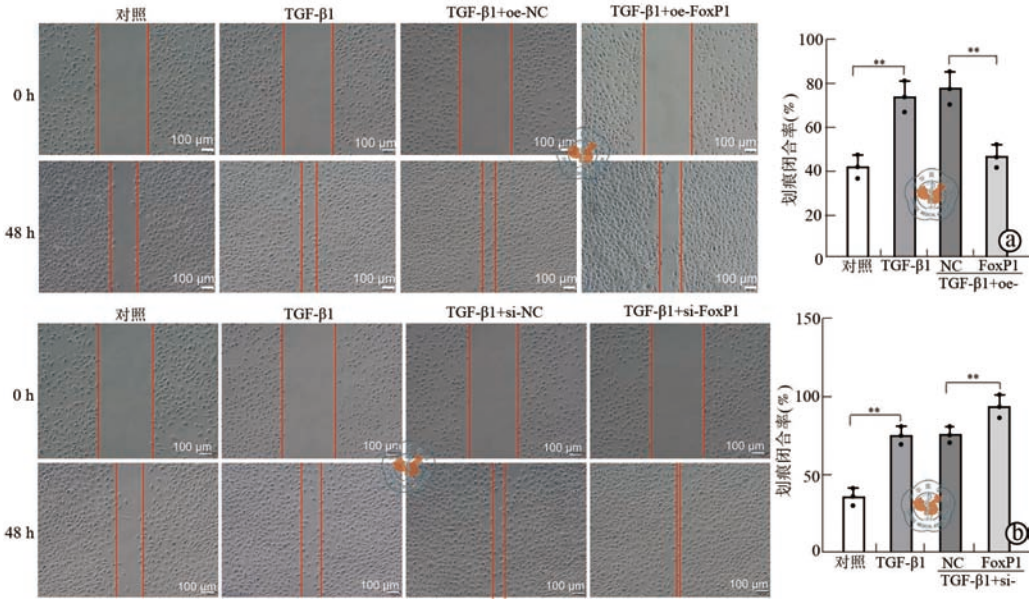
Western blot 结果显示，与对照相比，TGF-β1 组 Beclin-1表达（0.49 ± 0.03 比 1.00 ± 0.02）和 LC3 Ⅱ/LC3 Ⅰ比值（0.17 ± 0.01 比 1.00 ± 0.08）下降，p62 蛋白表达（2.24 ± 0.07 比 1.00 ± 0.07）上调（*P* 均 < 0.01）。与 TGF-β1+oe-NC 组相比，TGF-β1+oe-FoxP1 组 Beclin-1 表达（0.82 ± 0.01 比 0.49 ± 0.03）和 LC3 Ⅱ/LC3 Ⅰ比值（0.55 ± 0.02 比 0.20 ± 0.01）上调，p62 表达（1.77 ± 0.09 比 2.24 ± 0.08）下调（*P* 均 < 0.01）。mCherry-EGFP-LC3 双荧光标记显示，与 TGF-β1+oe-NC 组相比，TGF-β1+oe-FoxP1 组黄色荧光（自噬体）减弱，红色荧光（自噬溶酶体）斑点增多。（图 7）

Western blot 结果显示，与 TGF-β1+si-NC 组相比，TGF-β1+si-FoxP1 组 Beclin-1 表达（0.43 ± 0.03 比 0.65 ± 0.04）、LC3 Ⅱ/LC3 Ⅰ（0.33 ± 0.03 比 0.71 ± 0.04）下调，p62 表达（3.71 ± 0.04 比 2.62 ± 0.08）上调（*P* < 0.01）；荧光实验中几乎无斑点。（图 8）



注：a、b 图分别为 Western blot 检测过表达 FoXP1 及敲低 FoXP1 对内皮标志物 VE-cadherin、CD31 和成纤维细胞标志物 α-SMA、Vimentin 表达的影响；$^{**}P < 0.01$，$n = 3$

图 5　Western blot 检测内皮标志物 VE-cadherin、CD31 和成纤维细胞标志物 α-SMA、Vimentin 的表达

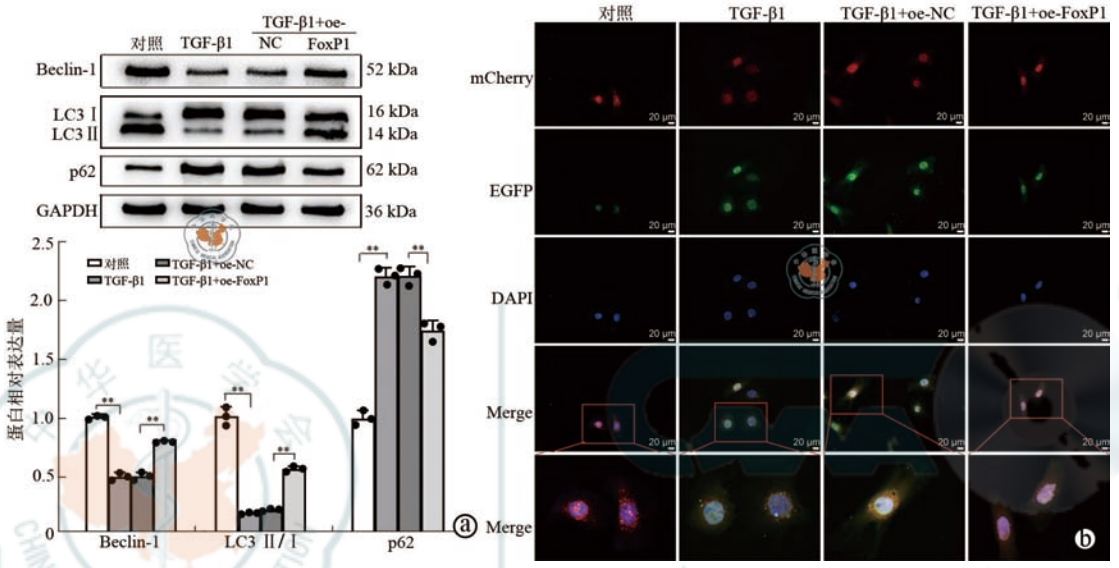


注：a 图为过表达 FoXP1 对细胞迁移的影响，可见 TGF-β1+oe-FoxP1 组细胞迁移能力减弱；b 图为敲低 FoXP1 对细胞迁移的影响，可见 TGF-β1+si-FoxP1 组细胞迁移能力增强；$^{**}P < 0.01$，$n = 3$

图 6　倒置显微镜下观察过表达 FoXP1 和敲低 FoXP1 后各组细胞迁移能力（×200）

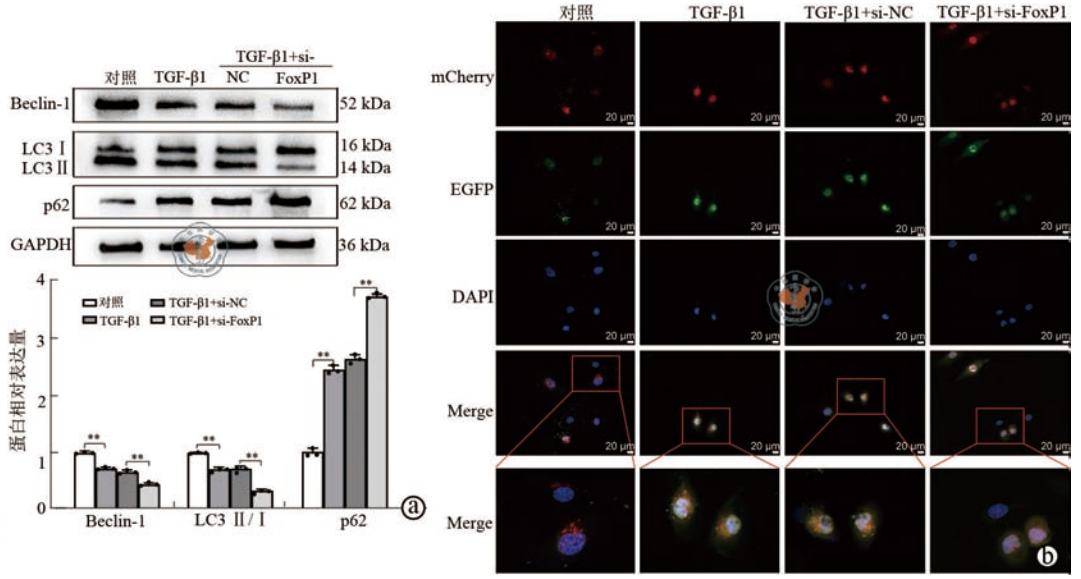
2.4 抑制自噬能够部分消除过表达FoxP1对EndMT的抑制作用

Western blot结果显示，与TGF-β1+oe-FoxP1组相比，TGF-β1+oe-FoxP1+3-MA组Beclin-1表达（1.60 ± 0.03 比 1.96 ± 0.02）、LC3 Ⅱ/ LC3 Ⅰ（2.20 ± 0.04 比 3.88 ± 0.16）下调，p62（0.70 ± 0.02 比 0.49 ± 0.05）、Collagen Ⅰ（0.80 ± 0.02 比 0.51 ± 0.03）、Collagen Ⅲ的表达（0.70 ± 0.01 比 0.29 ± 0.02）上调（$P < 0.05$）；Western blot结果显示，TGF-β1+oe-FoxP1+3-MA组VE-cadherin和CD31的表达下调，α-SMA、Vimentin表达上调（图9）。mCherry-EGFP-LC3双荧光标记显示，与TGF-β1+oe-FoxP1组相比，TGF-β1+oe-FoxP1+3-MA组黄色荧光斑点增多，红色荧光斑点减少（图10）。划痕结果显示，与TGF-β1+oe-FoxP1组相比，TGF-β1+oe-FoxP1+3-MA组细胞迁移能力[（58.63 ± 6.19）% 比（40.84 ± 5.27）%]增强（$P < 0.01$）（图11）。



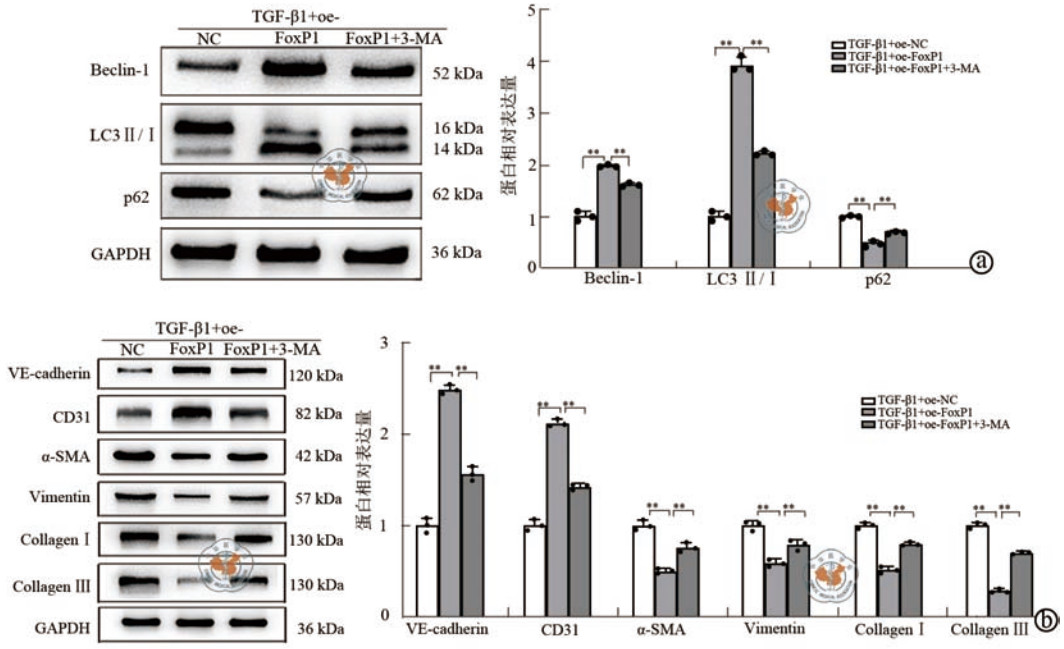
注：a图为Western blot检测自噬标志蛋白Beclin-1、p62及LC3 Ⅱ / Ⅰ表达水平，$^{**}P < 0.01$，$n = 3$；b图为倒置荧光显微镜观察mCherry-EGFP-LC3共转染后各组细胞自噬结果（×400）

图7 FoxP1过表达通过促进自噬抑制TGF-β1诱导的EndMT



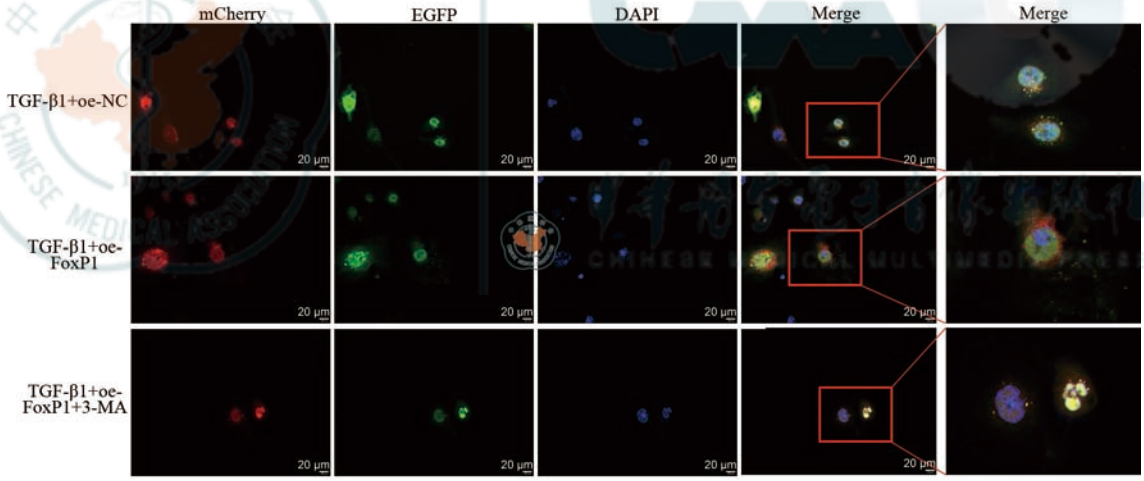
注：a图为Western blot检测自噬标志蛋白Beclin-1、p62及LC3 Ⅱ / Ⅰ的表达水平；b图为倒置荧光显微镜观察mCherry-EGFP-LC3共转染后各组细胞自噬结果（×400）；$^{**}P < 0.01$，$n = 3$

图8 干扰FoxP1通过抑制自噬促进TGF-β1诱导的EndMT



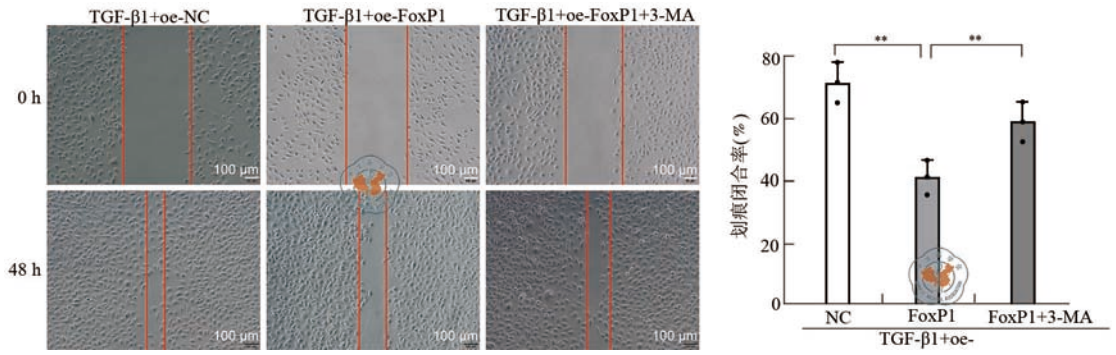
注：a 图为自噬相关蛋白 Beclin-1、LC3 Ⅱ/Ⅰ、p62 水平；b 图为内皮标志物 VE-cadherin、CD31、成纤维细胞标志物 α-SMA、Vimentin 和胶原蛋白 Collagen Ⅰ、Collagen Ⅲ 的蛋白水平；$^{**}P < 0.01$，$n = 3$

图 9　Western blot 检测自噬相关蛋白、内皮标志物、成纤维细胞标志物和胶原蛋白表达水平



注：与 TGF-β1+oe-FoxP1 组相比，TGF-β1+oe-FoxP1+3-MA 组黄色荧光斑点增多，红色荧光斑点减少

图 10　倒置荧光显微镜观察 mCherry-EGFP-LC3 共转染后各组细胞自噬结果（× 400）



注：与 TGF-β1+oe-FoxP1 组相比，TGF-β1+oe-FoxP1+3-MA 组细胞迁移能力增强；$^{**}P < 0.01$，$n = 3$

图 11　倒置显微镜下观察各组细胞迁移能力（× 200）

3 讨论

近年来多项研究逐步揭示 EndMT 在心肌纤维化中的关键作用，如人类纤维化心脏组织中可检测到 EndMT 特异性转录谱的表达升高[15]；而抑制 EndMT 则可有效改善异丙肾上腺素诱导的心肌纤维化[16]。临床病理分析显示，人衰竭心脏组织中存在 EndMT 特征性标志物的异常表达，且其表达量与纤维化严重程度呈正相关[17]。这些证据不仅确立 EndMT 作为心肌间质纤维化的重要发生机制，更凸显针对该过程开发靶向干预策略的潜在临床价值，为 HF 的病理机制研究与治疗探索提供新方向[18]。

既往研究表明，TGF-β1 是 EndMT 的关键诱导因子，且病理条件下可激活 Smad 经典通路及磷脂酰肌醇 3- 激酶 / 蛋白激酶 B（phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B，PI3K/Akt）等非经典通路[19]。近年研究发现，激活自噬可抑制 TGF-β1/Smad 信号通路阻断 EndMT 进程，但其具体机制亟待深入解析[20]。自噬作为维持细胞内环境稳态的关键机制，在心血管疾病中发挥重要作用。在压力负荷或心肌梗死等病理状态下，自噬活性下降可导致异常蛋白聚集和线粒体功能障碍，进而促进成纤维细胞活化及胶原沉积，而适度激活自噬有助于清除受损细胞器并抑制过度纤维化反应，对维持心肌组织稳态具有保护作用[21]。FoxP1 作为内皮细胞中特异性表达的转录因子，可抑制 TGF-β1 信号通路减缓纤维化[10]，且有研究提示其可能参与调控自噬[12]。基于此，本研究提出 FoxP1 可能通过激活自噬抑制 EndMT，从而缓解心肌纤维化。

为验证该假设，本研究采用 TGF-β1 诱导 EndMT 细胞模型。实验显示，TGF-β1 可引起内皮细胞形态改变，下调 VE-cadherin 和 CD31 表达，上调 α-SMA 和 Vimentin 表达，证实 EndMT 表型建立，并提示其为纤维化心肌中肌成纤维细胞的来源。此外，TGF-β1 可增强内皮细胞迁移能力，为理解成纤维细胞在纤维化心肌组织中的迁移扩散行为提供新的实验依据。进一步研究表明，过表达 FoxP1 可有效逆转 TGF-β1 诱导的 EndMT 表型，恢复 VE-cadherin 和 CD31 表达，抑制 α-SMA、Vimentin 表达和 Collagen Ⅰ、Collagen Ⅲ的释放。该结果与 Liu 等[10] 提出的 FoxP1 具有抑制成纤维细胞活化的作用相呼应。进一步研究发现 FoxP1 过表达抑制 TGF-β1 诱导的细胞迁移能力，而干扰 FoxP1 则增强该迁移效应。以上表明 FoxP1 可通过抑制 EndMT 过程，阻止内皮细胞向促纤维化细胞类型的转化，从而减少潜在的肌成纤维细胞来源，提示其在缓解心肌纤维化中的潜在作用。

在机制方面，本研究显示 FoxP1 可能通过激活自噬发挥保护作用。TGF-β1 抑制细胞自噬，表现为 Beclin-1 表达、LC3 Ⅱ /LC3 Ⅰ比值下降和 p62 积累。FoxP1 过表达可有效改善上述指标，恢复自噬活性，而干扰 FoxP1 则加剧自噬抑制。作为转录因子，FoxP1 激活自噬的作用机制可能与其他 Fox 家族成员，如 FoxO1 和 FoxO3 相似，通过直接结合自噬核心基因 Beclin1、LC3、Atg12 等的启动子区域，促进其转录[4-5]，从而增强自噬流。另一方面，FoxP1 也可能通过蛋白质修饰间接调控自噬起始复合物如 ULK1 复合物，影响其磷酸化状态或稳定性，进而启动自噬[22]。

深入研究自噬精准调控 EndMT 的机制发现，自噬能通过降解关键信号转导蛋白，如磷酸化的 Smad2/3 蛋白或 β-catenin，从而直接中断相关 EndMT 信号通路传导[23]。或通过自噬，特别是线粒体自噬，清除功能失调的线粒体，减少活性氧产生，维持细胞能量稳态，从而创造抑制 EndMT 发生的细胞内环境[23]。此外，自噬还可能参与细胞连接蛋白 VE-cadherin 和细胞骨架蛋白的降解与再循环，调控细胞黏附与骨架蛋白周转发挥作用。本研究通过 mCherry-EGFP-LC3 双荧光系统观察到 FoxP1 能够促进自噬体 - 溶酶体融合，而自噬抑制剂 3-MA 可部分逆转 FoxP1 对 EndMT 的抑制，证实自噬在 FoxP1 功能中的关键作用。这些结果与既往研究中自噬对心血管系统的保护作用相吻合[20]，本研究首次建立 FoxP1 与自噬激活之间的功能关联。然而，自噬抑制剂 3-MA 存在一定的局限性，研究发现其作为Ⅰ型 PI3K 的非特异性抑制剂只阻断早期自噬体的形成[24]，此外其可能通过脱靶效应，造成 DNA 损伤，进而影响凋亡等非自噬途径，可能对实验结果造成误差[25]。

传统的观点认为，TGF-β1 通过 Smad 依赖性和 PI3K/Akt 等非依赖性通路直接驱动纤维化[26]。本研究提示，FoxP1 介导的自噬激活构成一个内在的负反馈调节环路，用以对抗过度活化的 TGF-β1 信号。这与近期关于自噬作为“细胞内质量监控”系统维持组织稳态的观点相吻合[27]。本研究揭示 FoxP1 通过激活自噬抑制 TGF-β1 诱导 EndMT 的分子机制，建立的“FoxP1- 自噬 -EndMT”调控轴为理解心脏纤维化的分子基础提供新视角，并展现出作为 HF 治疗新靶点的潜力。

然而，本研究也存在一定的局限性。首先研究的结论主要基于体外细胞模型，且使用的是HUVECs，虽其是研究内皮功能的经典细胞系，但并非心脏来源的微血管内皮细胞，无法完全模拟心脏病理状态下的复杂微环境，如细胞外基质、压力负荷和免疫信号等构成的网络体系；其次在体内的功能尚未得到验证，未来研究需利用内皮细胞特异性FoxP1基因敲除小鼠模型，在压力超负荷或心肌梗死等动物模型中，进一步验证该通路的体内功能及其临床意义。此外，FoxP1调控自噬的具体下游分子机制尚未完全阐明。未来的研究可聚焦于探讨FoxP1是否通过拮抗PI3K/Akt信号解除对自噬的抑制以及FoxP1是否特异性调控线粒体自噬等特定类型的自噬。这些探索将有助于更精确地阐明该调控轴的作用机制，为HF的治疗提供新策略。

参 考 文 献

1 Kang M, Jia H, Feng M, et al. Cardiac macrophages in maintaining heart homeostasis and regulating ventricular remodeling of heart diseases[J]. Front Immunol, 2024, 15: 1467089.
2 Martin TG, Juarros MA, Leinwand LA. Regression of cardiac hypertrophy in health and disease: Mechanisms and therapeutic potential[J]. Nat Rev Cardiol, 2023, 20(5): 347-363.
3 Xu Z, Zhang S, Han T, et al. Continuous genetic monitoring of transient mesenchymal gene activities in distal tubule and collecting duct epithelial cells during renal fibrosis[J]. J Cell Biochem, 2024, 125(4): e30541.
4 Livingston MJ, Shu S, Fan Y, et al. Tubular cells produce FGF2 via autophagy after acute kidney injury leading to fibroblast activation and renal fibrosis[J]. Autophagy, 2023, 19(1): 256-277.
5 Zhao C, Li X, Sun G, et al. CircFOXO3 protects against osteoarthritis by targeting its parental gene FOXO3 and activating PI3K/AKT-mediated autophagy[J]. Cell Death Dis, 2022, 13(11): 932.
6 Singh A, Bhatt KS, Nguyen HC, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition in cardiovascular pathophysiology[J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(11): 6180.
7 Lei Y, Klionsky DJ. The emerging roles of autophagy in human diseases[J]. Biomedicines, 2021, 9(11): 1651.
8 Debnath P, Huirem RS, Dutta P, et al. Epithelial-mesenchymal transition and its transcription factors[J]. Biosci Rep, 2022, 42(1):BSR20211754.
9 Corsetti G, Chen-Scarabelli C, Romano C, et al. Autophagy and oncosis/necroptosis are enhanced in cardiomyocytes from heart failure patients[J]. Med Sci Monit Basic Res, 2019, 25: 33-44.
10 Liu J, Zhuang T, Pi J, et al. Endothelial forkhead box transcription factor P1 regulates pathological cardiac remodeling through transforming growth factor-β1-Endothelin-1 signal pathway[J]. Circulation, 2019, 140(8): 665-680.
11 Xia X, Li Z, Li Y, et al. Lnc RNA XIST promotes carboplatin resistance of ovarian cancer through activating autophagy via targeting mir-506-3p/FOXP1 axis[J]. J Gynecol Oncol, 2022, 33(6): e81.
12 Wang C, Tan C, Wen Y, et al. FOXP1-induced lncRNA CLRN1-AS1 acts as a tumor suppressor in pituitary prolactinoma by repressing the autophagy via inactivating Wnt/β-catenin signaling pathway[J]. Cell Death Dis, 2019, 10(7): 499.
13 Ma J, van der Zon G, Sanchez-Duffhues G, et al. TGF-β-mediated endothelial to mesenchymal transition (EndMT) and the functional assessment of endmt effectors using CRISPR/Cas9 gene editing[J]. J Vis Exp, 2021, 26: (168).
14 Takagaki Y, Lee SM, Dongqing Z, et al. Endothelial autophagy deficiency induces IL6-dependent endothelial mesenchymal transition and organ fibrosis[J]. Autophagy, 2020, 16(10): 1905-1914.
15 Li Z, Wang S, Yin X, et al. Identification and validation of diagnostic model based on angiogenesis- and epithelial mesenchymal transition-related genes in myocardial infarction[J]. Int J Gen Med, 2024, 17: 3239-3255.
16 Wilhelmi T, Xu X, Tan X, et al. Serelaxin alleviates cardiac fibrosis through inhibiting endothelial-to-mesenchymal transition via RXFP1[J]. Theranostics, 2020, 10(9): 3905-3924.
17 Alvandi Z, Bischoff J. Endothelial-mesenchymal transition in cardiovascular disease[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2021, 41(9): 2357-2369.
18 Pan JA, Zhang H, Lin H, et al. Irisin ameliorates doxorubicin-induced cardiac perivascular fibrosis through inhibiting endothelial-to-mesenchymal transition by regulating ROS accumulation and autophagy disorder in endothelial cells[J]. Redox Biol, 2021, 46: 102120.
19 Peng D, Fu M, Wang M, et al. Targeting TGF-β signal transduction for fibrosis and cancer therapy[J]. Mol Cancer, 2022, 21(1): 104.
20 Hu J, Kong S, Dong T, et al. Autophagy modulates mesenchymal-to-endothelial transition via p53[J]. Aging (Albany NY), 2020, 12(21): 22112-22121.
21 Zheng RH, Zhang WW, Ji YN, et al. Exogenous supplement of glucagon like peptide-1 protects the heart against aortic banding induced myocardial fibrosis and dysfunction through inhibiting mTOR/p70S6K signaling and promoting autophagy[J]. Eur J Pharmacol, 2020, 883: 173318.
22 Zeng Y, Feng Q. ULK1 methylation promotes TGF-β1-induced endometrial fibrosis via the FOXP1/DNMT1 axis[J]. Kaohsiung J Med Sci, 2025, 41(1): e12915.
23 Trelford CB, Di Guglielmo GM. Autophagy regulates transforming growth factor β signaling and receptor trafficking[J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2022, 1869(9): 119284.
24 Feng Q, Sun L, Sualeh MJ, et al. Hernandezine promotes cancer cell apoptosis and disrupts the lysosomal acidic environment and cathepsin D maturation[J]. Chin J Nat Med, 2024, 22(5): 387-401.
25 Chicote J, Yuste VJ, Boix J, et al. Cell death triggered by the autophagy inhibitory drug 3-methyladenine in growing conditions proceeds with DNA damage[J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 580343.
26 Song C, Tang Q, Liu L, et al. CDK inhibitor R547 attenuates pressure overload-induced cardiac hypertrophy via PI3K/AKT and TGF-β/Smad3 signaling pathways[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2025, 86(6): 557-564.
27 Mameli E, Martello A, Caporali A. Autophagy at the interface of endothelial cell homeostasis and vascular disease[J]. Febs j, 2022, 289(11): 2976-2991.

（收稿日期：2025-08-30）
（本文编辑：蔡晓珍）

窦媛媛，胡晓咏，张玥，等 . FoxP1通过激活自噬抑制内皮细胞内皮 - 间充质转化的作用机制研究[J/OL]. 中华细胞与干细胞杂志(电子版)，2026，16（1）: 13-22.