

研究论文

FGF20抑制BMP4改善异丙肾上腺素诱导的 心肌细胞肥大的作用研究

梅淋¹ 王旭² 陈慧楠² 周旋^{3*} 陈云杰^{3*}¹厦门医学院药理学系, 厦门 361000; ²温州医科大学药学院, 温州 325035;³宁波大学附属第一医院药学部, 宁波 315010)

摘要 成纤维细胞生长因子20(fibroblast growth factor 20, FGF20)在心肌肥大中具有保护作用,但其作用机制尚未明确。因此,该研究旨在探究FGF20改善心肌细胞肥大的分子作用机制。该研究使用10 $\mu\text{mol/L}$ 异丙肾上腺素(isoproterenol, ISO)刺激原代心肌细胞NRCMs 48 h,构建心肌细胞肥大模型,并同时给NRCMs分别给予100 ng/mL重组蛋白FGF20以及50 ng/mL重组蛋白骨形态发生蛋白4 (bone morphogenetic protein 4, BMP4)共处理48 h,并借助转录组测序分析FGF20处理前后的差异表达基因(differential expression genes, DEGs),再对其进行GO和KEGG富集分析以及PPI网络构建。使用机器学习算法LASSO和Random Forest筛选得出核心差异基因(Core-DEGs),并对其进行ROC分析。最后,使用蛋白质免疫印迹以及RT-qPCR验证核心差异基因的表达, TUNEL染色实验检测心肌细胞凋亡情况。结果表明, FGF20可抑制ISO诱导的心肌肥大指标ANP、BNP表达上调,证实FGF20具有心肌细胞肥大保护作用。转录组测序分析发现,与ISO组相比, FGF20处理后共鉴定出42个差异表达基因。GO和KEGG富集分析结果表明,差异表达基因主要富集在多个免疫调控以及凋亡信号通路。2种机器学习算法联合筛选后发现Bmp4为Core-DEGs,且其AUC为1。实验结果表明, FGF20可抑制ISO诱导的BMP4表达上调以及心肌细胞凋亡;而BMP4激活后FGF20心肌细胞肥大保护作用被明显削弱,并伴随ANP、BNP蛋白水平上调以及心肌细胞凋亡增多。总之, FGF20通过抑制BMP4缓解心肌细胞凋亡进而改善心肌细胞肥大。

关键词 FGF20; 心肌细胞肥大; BMP4; 凋亡; 转录组; 机器学习算法

FGF20 Protecting Against Isoproterenol Induced Cardiomyocyte Hypertrophy by Inhibiting BMP4

MEI Lin¹, WANG Xu², CHEN Huinan², ZHOU Xuan^{3*}, CHEN Yunjie^{3*}

¹Department of Pharmacy, Xiamen Medical College, Xiamen 361000, China; ²School of Pharmaceutical Science, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China; ³Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Ningbo University, Ningbo 315010, China)

收稿日期: 2024-05-16 接受日期: 2024-06-25

浙江省自然科学基金(批准号: LQ24H020001)、国家自然科学基金(批准号: 82170365)、厦门市自然科学基金(批准号: 3502Z202372061)和宁波市自然科学基金(批准号: 2022J223)资助的课题

*通信作者。Tel: 0574-87089146, E-mail: carbonlamp@126.com; Tel: 0574-87089123, E-mail: cyj960621@163.com

Received: May 16, 2024 Accepted: June 25, 2024

This work was supported by the Zhejiang Provincial Natural Science Foundation (Grant No.LQ24H020001), the National Natural Science Foundation of China (Grant No.82170365), the Natural Science Foundation of Xiamen (Grant No.3502Z202372061) and the Natural Science Foundation of Ningbo (Grant No.2022J223)

*Corresponding authors. Tel: +86-574-87089146, E-mail: carbonlamp@126.com; Tel: +86-574-87089123, E-mail: cyj960621@163.com

Abstract FGF20 (fibroblast growth factor 20) has a protective role in cardiac hypertrophy, but its molecular mechanism still unclear. Therefore, this study is aimed to explore the molecular mechanisms of FGF20 protecting against cardiomyocyte hypertrophy. NRCMs (neonatal rat cardiomyocytes) were stimulated with 10 $\mu\text{mol/L}$ ISO (isoproterenol) for 48 h to establish a cardiomyocyte hypertrophy model, and then co-treated with 100 ng/mL recombinant protein FGF20 or 50 ng/mL recombinant protein BMP4 (bone morphogenetic protein 4) for 48 h. Transcriptome was performed to identify DEGs (differential expression genes) between ISO group and ISO+FGF20 group. DEGs were subjected to GO, KEGG enrichment analysis and PPI (protein-protein interaction) network construction. Machine learning algorithms were employed to identify Core-DEGs (core differentially expressed genes), followed by ROC (receiver operating characteristic) analysis. Finally, the expression of Core-DEGs was validated by Western blot and RT-qPCR analysis, and TUNEL staining was employed to detect cardiomyocyte apoptosis. The result showed that FGF20 alleviated ISO-induced cardiomyocyte hypertrophy, evidenced by decreased levels of ANP and BNP proteins. Transcriptome analysis identified 42 DEGs after FGF20 treatment compared to ISO stimulation. GO and KEGG enrichment analyses revealed that 42 DEGs were associated with multiple immune regulation and apoptosis signaling pathways. Notably, *Bmp4* was identified as the Core-DEG by two classic machine learning algorithms (LASSO and Random Forest) and its AUC value was 1. Furthermore, FGF20 inhibited BMP4 expression and cardiomyocyte apoptosis induced by ISO. However, activation of BMP4 counteracted the protection of FGF20 against myocardial hypertrophy, resulting in increased levels of ANP and BNP proteins and cardiomyocyte apoptosis. In summary, FGF20 exerts a protective effect on cardiomyocyte hypertrophy by suppressing apoptosis through the inhibition of BMP4

Keywords FGF20; cardiomyocyte hypertrophy; BMP4; apoptosis; transcriptome; machine learning algorithms

随着不健康生活方式的流行,我国居民患心血管疾病的人数高达3.3亿,心血管疾病已成为城乡居民死亡的首要危险因素^[1]。心肌肥大是众多心血管疾病的共同病理进程,也是导致心血管疾病高发率和高死亡率的重要因素^[2]。心肌肥大最初是心脏为应对外界压力超负荷而发展出的一种短期代偿性心肌组织重构,但持续性的超负荷将导致心脏功能失代偿并诱发心肌细胞凋亡、心肌重塑以及心脏收缩舒张功能紊乱,最终导致心脏衰竭甚至死亡^[3-4]。由于心肌肥大的发病机制及病理进程复杂,目前临床治疗过程中仍缺乏心肌肥大的针对性防治药物。因此,对心肌肥大的发病机制进行深入研究并探索有效的治疗靶点及药物,已成为临床治疗亟需解决的科学问题。

成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factors, FGFs)是一类广泛参与胚胎发育、组织损伤修复等生理病理进程的多功能调节因子^[5-6]。此外,大量研究证实,FGFs是改善心肌肥大的潜在治疗因子。例如,FGF18和FGF21均能有效缓解心肌肥大,改善心脏收缩和舒张功能,进而发挥心肌保护作用^[7-8]。FGF20

是从非洲爪蟾胚胎中鉴定出来的,与FGF9和FGF16共同组成FGF9亚家族^[9]。FGF20最初被发现在脑组织中具有较高表达,故FGF20的研究主要聚焦在神经系统性疾病,如帕金森病、创伤性脑损伤^[10-11]。但随着研究的深入,FGF20被证实在耳蜗发育、毛发生长、胶质肿瘤以及结肠炎等多种疾病中也具有重要的调控作用^[12-14]。值得注意的是,FGF20在心脏中也具有一定表达,并且可调节胚胎期心脏发育和心肌再生^[15]。然而,FGF20在心肌肥大中的作用却鲜有报道。课题组前期研究发现,在压力超负荷诱导的心肌肥大中FGF20具有重要的保护作用^[16],但其具体分子机制尚不明确。

本研究首先使用ISO刺激原代心肌细胞NRCMs(neonatal rat cardiomyocytes)以构建经典的心肌细胞肥大模型,随后使用转录组测序探究潜在的差异基因及作用机制,并借助机器学习算法筛选出关键基因,最后进行相应的实验验证(图1)。因此,本研究旨在探究FGF20改善心肌细胞肥大的分子作用机制,以期FGF20防治心肌肥大提供科学理论依据。

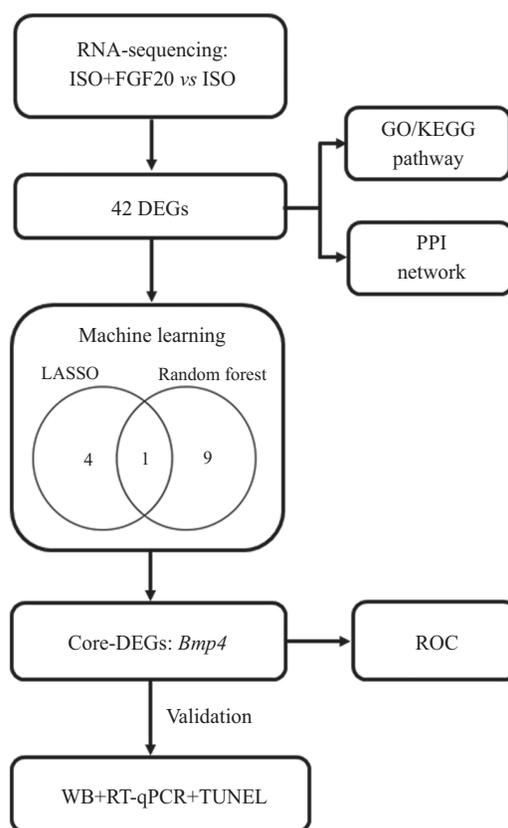


图1 本研究的实验流程图

Fig.1 Flow chart of this study

1 材料和方法

1.1 材料

异丙肾上腺素(货号: I5627)购于美国Sigma-Aldrich公司; FGF20重组蛋白(货号: 2547-FG-025)购于美国Novus公司; BMP4重组蛋白(货号: HY-P7007A)购于美国MCE公司; DMEM(Dulbecco's modified eagle medium)高糖培养基(货号: 11995065)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(货号: 10270106)、胰蛋白酶(货号: 25200072)、磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer solution, PBS)(货号: 20012027)购于美国Gibco公司; 青-链霉素混合液(货号: P1400)、高效RIPA裂解液(货号: R0010)购于北京索莱宝科技有限公司; RNA提取试剂盒(货号: R701)购于南京挪威赞生物科技股份有限公司; PVDF膜(货号: ISEQ00010)购于美国Millipore公司; 脱脂牛奶(货号: BD232100)购于美国BD公司; ECL曝光液(货号: K-12045)购于美国Advanta公司; 5×蛋白上样缓冲液(货号: P0015)、DAPI染色液(货号: C1005)购于上海碧云天生物技术有限公司; TUNEL试剂盒(货号: G3250)购于美国Promega公司; ANP抗体(货号: sc-515701; 1:100)购于美国Santa

Cruz公司; BNP抗体(货号: DF6902; 1:1 000)购于江苏亲科生物研究中心有限公司; Bcl-2抗体(货号: 68103-1-Ig; 1:1 000)、BMP4抗体(货号: 12492-1-AP; 1:1 000)购于武汉三鹰生物技术有限公司; GAPDH抗体(货号: ab9485; 1:1 000)、BAX抗体(货号: 2772; 1:1 000)、BAX抗体(货号: 2772; 1:1 000)购于美国CST公司; 兔抗HRP anti-rabbit IgG(货号: HS101; 1:10 000)和鼠抗HRP anti-mouse IgG(货号: HS201; 1:10 000)、BCA蛋白定量试剂盒(货号: DQ111-01)购于北京全式金生物技术有限公司。

1.2 实验动物

出生1~3天的SPF级SD(sprague-dawley)大鼠乳鼠, 由吴氏实验动物提供, 动物福利和实验过程均遵循厦门医学院医学伦理委员会的规定(批准号: 20230424002)。

1.3 原代心肌细胞(NRCMs)提取、培养及实验处理

将1~3天新生大鼠乳鼠置于75%乙醇中浸泡消毒后, 在无菌条件下剪取乳鼠的心室并去除心腔内血污, 然后剪成约1 mm×1 mm×1 mm大小的组织肉块, 在0.08%胰酶缓冲液中于37 °C恒温磁力搅拌器上分

次消化至组织块消化完全(大约8次); 2 500 r/min室温离心5 min后收集细胞, 加入完全培养基(含10% FBS、1%青-链霉素)轻轻吹打均匀, 过200目筛后置于37 °C、5% CO₂细胞培养箱中贴壁60 min以除去心肌成纤维细胞; 取培养皿上清液, 离心收集细胞沉淀, 再用新培养基重悬为心肌细胞悬液, 调整至适当密度接种于培养皿中; 24 h后更换培养基为不含BrdU的新鲜培养基, 再进行后续的实验。

NRCMs心肌细胞培养于DMEM培养基(含10%血清、1%青-链霉素)中, 再置于37 °C、5% CO₂恒温培养箱中。待NRCMs心肌细胞生长至60%~70%, 使用10 μmol/L ISO刺激48 h以构建经典的心肌细胞肥大模型, 并同时给NRCMs分别给予100 ng/mL重组蛋白FGF20以及50 ng/mL重组蛋白BMP4共处理48 h。

1.4 蛋白质免疫印迹(Western blot)

实验结束后, 吸去培养基后用提前预冷的PBS润洗, 加入高效RIPA裂解液提取细胞总蛋白。BCA试剂盒进行蛋白定量测定, 后加入蛋白上样缓冲液95 °C煮10 min使蛋白变性。取等量(30 μg)蛋白进行SDS-PAGE电泳分离后, 再使用湿转法将蛋白转移至PVDF膜上; 5%脱脂牛奶室温封闭2 h; 加入相应的一抗(稀释比例1:1 000)4 °C条件下孵育过夜; TBST洗3次; 再加入对应的二抗(稀释比例1:10 000)室温孵育2 h。TBST洗3次后, 将PVDF置于ECL曝光液(A液和B液按1:1比例充分混匀)中室温孵育约60 s, 再使用化学发光成像系统采集目的蛋白条带图像并进行分析。

1.5 实时荧光定量PCR(real time qPCR, RT-qPCR)

实验处理结束后, 吸去培养基后用提前预冷的PBS润洗, 加入约2 mL RNA-easy Isolation覆盖细胞表面, 用移液枪将细胞吹打下来并将其转移至离心管中, 再反复吹打使细胞完全裂解, 上下颠倒至乳白色悬液出现后再静置10 min。4 °C、12 000 r/min离心15 min, 取上层澄清液, 再加入等量的异丙醇, 上下颠倒使其充分混匀后静置15 min。4 °C、12 000 r/min离心15 min, 弃上清液即得RNA沉淀。加入提前预冷的75%乙醇, 轻弹管底使RNA沉淀悬浮起来, 再4 °C、8 000 r/min离心5 min(此步骤重复2次)。室温晾干, 加入适量的RNase-free ddH₂O后涡旋1 min使RNA沉淀充分溶解, 即得到总RNA。总RNA经过除DNA后, 再逆转录为cDNA模板。加入1 μg的cDNA

模板、10 μL SYBR及0.4 μL对应引物(10 μmol/L)、灭菌水制备成20 μL扩增体系, 设置适当的循环体系并进行荧光定量PCR。根据Ct值计算得出基因表达量。引物序列如下。*Bmp4*(rat): forward, 5'-GGG AGG AGG AGG AAG AAG AG-3', reverse, 5'-TGG GAT GCT GCT GAG GTT-3'; *GAPDH*(rat): forward, 5'-GGC AGC CCA GAA CAT CAT CC-3', reverse, 5'-GCC AGC CCC AGC ATC AAA G-3'

1.6 原位末端转移酶标记技术(terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling, TUNEL)

实验处理结束, 吸去培养基后用PBS润洗, 加入4%多聚甲醛室温固定25 min, PBS洗3次。加入100 μL蛋白酶K溶液(10 mg/mL), 室温下孵育10 min后PBS洗3次。加入100 μL的平衡溶液, 室温避光条件下孵育10 min, 然后加入适量的反应体系液(由1 μL rTdT酶、5 μL核苷混合物和45 μL平衡缓冲液混合而成), 在37 °C避光条件下孵育60 min。去除反应体系液, 加入20× SSC室温避光条件孵育15 min停止反应, PBS洗3次。加入DAPI染色料室温孵育30 min以标记细胞核, PBS清洗3次。滴加适量的抗荧光淬灭剂封片后, 使用激光共聚焦显微镜进行观察, 并利用ImageJ图像分析系统对NRCMs凋亡情况进行分析。

1.7 转录组测序

首先使用NanoDrop ND-1000对NRCMs总RNA的纯度与含量进行质控, 再通过Bioanalyzer 2100对RNA的完整性进行检测并使用琼脂糖电泳进一步验证。使用oligo(dT)磁珠特异性捕获带有PolyA(多聚腺苷酸)的mRNA, 并将其在高温条件下利用镁离子打断试剂盒进行片段化, 再在逆转录酶的作用下合成双链cDNA。再通过PCR构建片段大小为300 bp±50 bp的cDNA文库, 最后使用illumina Novaseq™ 6000测序平台进行高通量测序, 得到FASTQ格式的原始数据(Raw data)。使用FASTQ软件(<https://github.com/OpenGene/fastp>)对原始数据进行质控(包括去除接头、重复序列和低质量序列), 使用HISAT2(<https://ccb.jhu.edu/software/hisat2>)将测序数据比对到大鼠物种(*Rattus norvegicus*)基因组, 得到bam文件格式, 使用StringTie软件(<https://ccb.jhu.edu/software/hisat2>)对基因或转录本进行组装并用FPKM(fragments per kilobase million)进行

定量。转录组测序分析委托杭州联川生物技术公司完成。

1.8 差异基因表达分析

使用R软件(版本4.3.0)将FPKM数据转为TPM(transcripts per million)格式并进行 \log_2 转换,再使用Limma包进行差异分析,筛选出差异表达基因(differential expression genes, DEGs)。将排序靠前的结果进行可视化分析,再分别使用Pheatmap包和ggplot2包制作差异基因的热图和火山图。

1.9 GO、KEGG集富分析及PPI网络构建

通过R软件用clusterProfiler包对DEGs进行基因本体论(Gene Ontology, GO)功能富集和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路富集分析,并将结果进行可视化分析。

将DEGs导入STRING在线数据库(<https://www.string-db.org/>)中,对其进行蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络分析,删除孤立的蛋白,得到PPI数据并保存为TSV格式文件,利用Cytoscape 3.9.1软件将构建的PPI网络进行可视化。

1.10 机器学习及ROC曲线分析

使用glmnet包对DEGs进行LASSO回归分析,包括模型拟合、数据预测交叉验证和提取模型系数;随后使用Random Forest包构建随机森林模型,对变量重要性进行排序,选取前10的基因作为最优特征集,取2种算法特征集的交集为核心差异基因。使用pROC包对核心差异基因进行(receiver operating characteristic, ROC)分析以识别其诊断效能。

1.11 统计分析

使用GraphPad Prism 8.0软件进行统计分析,实验数据以平均值 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)形式表示,使用ANOVA(analysis of variance)对多组间差异进行单因素方差分析, $P<0.05$ 则表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 FGF20可缓解ISO诱导的心肌细胞肥大

为了探究FGF20在心肌细胞肥大中的作用,本研究首先分别对NRCMs给予ISO以及ISO合并FGF20刺激48 h,随后使用Western blot检测心肌肥大指标心房钠尿肽(atrial natriuretic peptide, ANP/NPPA)和脑钠肽(brain natriuretic peptide, BNP/NPPB)的蛋

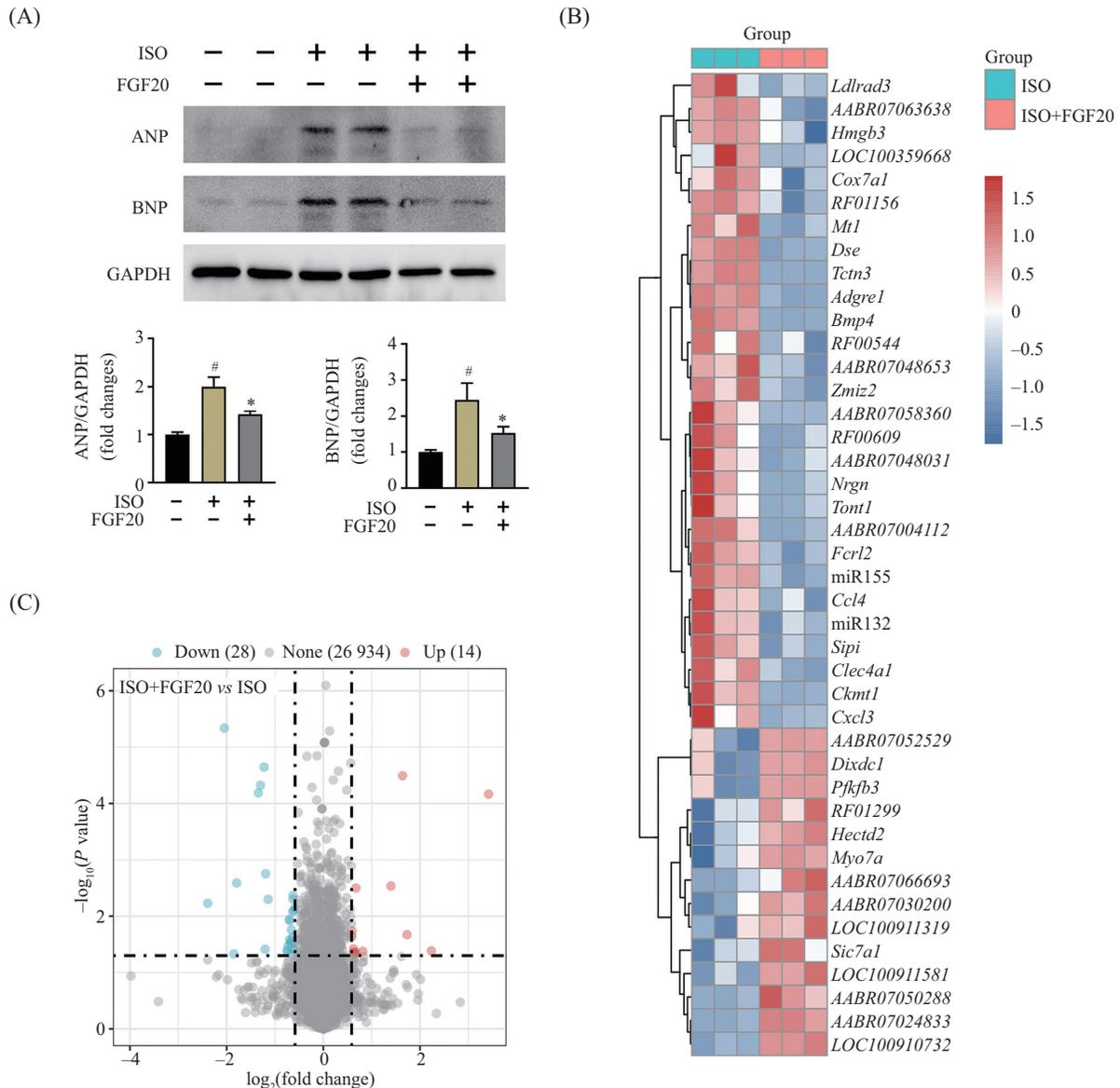
白水平。如图2A所示,ISO可显著上调ANP和BNP的蛋白水平,而FGF20处理则可明显抑制ANP和BNP的蛋白水平。以上结果表明,FGF20可改善心肌细胞肥大。

随后,本研究对ISO+FGF20组以及ISO组进行转录组测序。以 $|\log_2(\text{fold change})|>0.585$ 、 $P<0.05$ 为条件,共筛选得到42个DEGs,其中包括28个下调基因和14个上调基因(ISO+FGF20 vs ISO)(图2B和图2C)。

2.2 FGF20调控的DEGs的GO、KEGG集富分析及PPI网络构建

紧接着,本研究对42个DEGs进行GO和KEGG富集分析。GO分析结果显示,与ISO组相比,FGF20处理后DEGs主要富集在微小RNA(microRNA, miRNA)介导的基因沉默、趋化因子反应、白细胞分化过程的负向调控、中性粒细胞迁移、成纤维细胞凋亡过程的负向调控、应激激活的MAPK级联反应的正向调控、心脏形态建成的调控、未成熟T细胞增殖的调控、SMAD蛋白信号转导的调控和凋亡信号通路的负向调控等生物过程(biological process, BP)上,并且与*Dixdc1*、*Hmgb3*、*Ccl4*、*Cxcl3*、miR132、miR155和*Bmp4*等基因相关;DEGs的细胞组分(cell component, CC)主要富集在顶端质膜、线粒体内膜、质膜外侧、细胞器内膜、肌动蛋白细胞骨架、突触后特化区、肌原纤维、线粒体呼吸链复合体IV、呼吸链复合体IV和细胞外膜结合的细胞器等;DEGs的分子功能(molecular function, MF)主要富集在受体配体活性、信号受体激活剂活性、钙调蛋白结合、mRNA碱基配对的翻译抑制活性、类泛素蛋白连接酶活性、SUMO连接酶活性、BMP受体结合、CXCR趋化因子受体结合和生长因子活性等上(图3A和图3B)。

此外,KEGG分析结果表明,FGF20处理后DEGs主要富集在矿物质吸收、细胞因子与细胞因子受体的相互作用、病毒蛋白与细胞因子及其受体的相互作用、NF- κ B信号通路、趋化因子信号通路、运动蛋白、糖胺聚糖生物合成-硫酸软骨素/硫酸皮肤素、果糖和甘露糖代谢、癌症中的microRNAs和铁死亡等通路,并且与*Slc7a1*、miR155、*Pfkfb3*、*Dse*、*Myo7a*、*Tnnt1*、*Ccl4*、*Cxcl3*、*Bmp4*和*LOC100359668*等基因相关(图3C和图3D)。进一步分析发现,FGF20调控的DEGs富集在多条与免疫



A: Western blot检测肥大基因ANP和BNP蛋白表达及其定量分析; # $P < 0.05$, 与CON组相比; * $P < 0.05$, 与ISO组相比。B: ISO+FGF20组和ISO组两组间的DEGs的热图。C: ISO+FGF20组和ISO组两组间的DEGs的火山图。

A: Western blot and quantitative analysis of the protein levels of hypertrophic genes (ANP and BNP), # $P < 0.05$ vs CON group, * $P < 0.05$ vs ISO group. B: heatmap of DEGs between ISO+FGF20 group and ISO group. C: volcano plot of DEGs between ISO+FGF20 group and ISO group.

图2 FGF20抑制ISO诱导的心肌细胞肥大

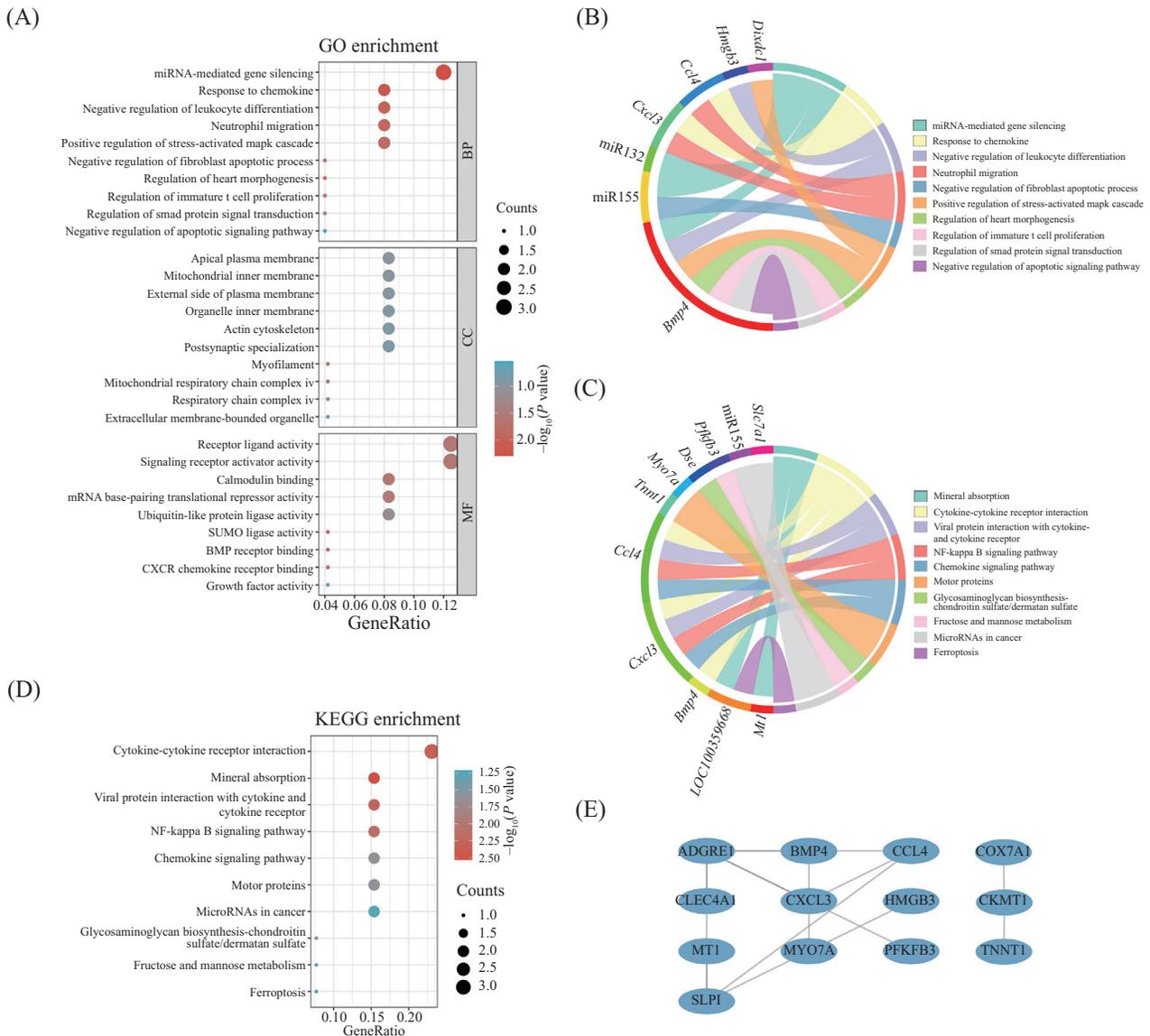
Fig.2 FGF20 inhibited ISO induced cardiomyocyte hypertrophy

(如白细胞分化的负向调控、趋化因子信号通路)以及细胞凋亡(如成纤维细胞凋亡过程的负向调控、凋亡信号通路的负向调控)相关的生物过程及信号通路上,提示FGF20心肌细胞肥大保护作用可能与其调控免疫与细胞凋亡密切相关。与此同时,本研究将42个DEGs导入STRING数据库并利用Cytoscape可视化后得到PPI网络图(图3E)。

2.3 *Bmp4*是FGF20改善心肌细胞肥大的核心基因

采用套索回归(LASSO regression)和随机森

林(random forest) 2种经典的机器学习算法对42个DEGs进行联合筛选,以识别出核心差异基因(Core-DEGs)。LASSO选择lambda.min后筛选得到5个特征基因,分别为*AABR07024833*、*Adgre1*、*Bmp4*、*LOC100910732*、*Tctn3*(图4A)。随机森林取前10个特征基因,分别为*Dse*、*AABR07066693*、*Mt1*、*Fcrl2*、*Bmp4*、*Ccl4*、*Hmgb3*、*AABR07052529*、*LOC100910732*和*LOC100911319*(图4C)。两者取交集后得到一个核心差异基因*Bmp4*(图4B)。进一步分



A: GO富集分析的气泡图。B: GO分析中富集生物过程(BP)的弦图。C: KEGG富集分析的弦图。D: KEGG富集分析的气泡图。E: DEGs的PPI网络图。

A: bubble plot of enriched GO terms. B: chord diagram of the enriched BP (biological processes) in GO analysis. C: chord diagram of enriched KEGG terms. D: bubble plot of enriched KEGG terms. E: PPI network of DEGs.

图3 DEGs的GO、KEGG分析以及PPI网络构建

Fig.3 GO and KEGG analyses and PPI network of DEGs

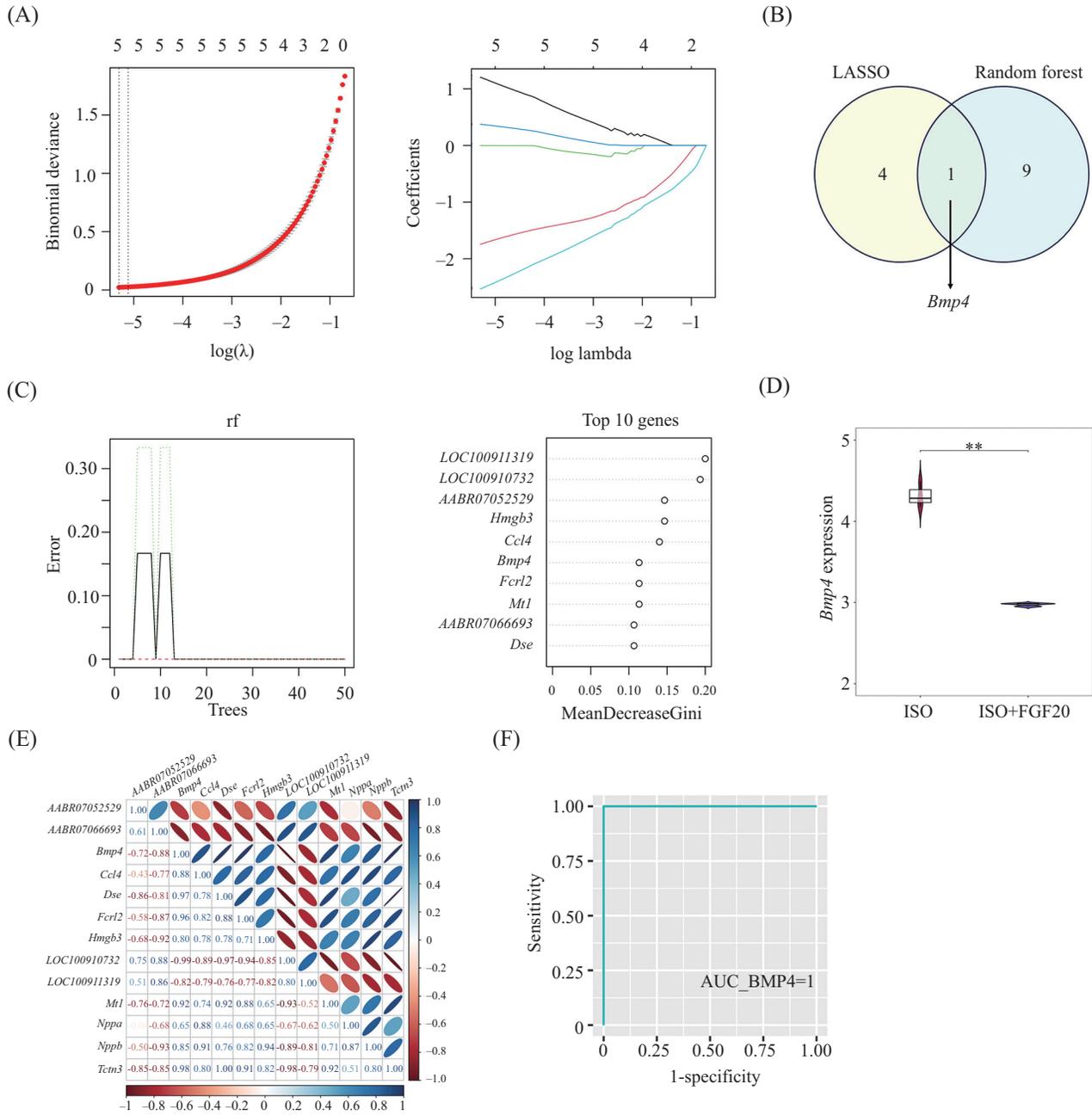
析发现, FGF20可显著抑制BMP4表达, 并且与心肌细胞肥大指标NPPA(又称ANP)、NPPB(又称BNP)呈正相关(图4D和图4E)。此外, 对BMP4在本研究的数据集中进行ROC分析后发现, 其曲线下面积(area under curve, AUC)为1(图4F)。因此, 以上研究结果表明, *Bmp4*是FGF20发挥心肌细胞肥大保护作用的核心基因。

2.4 核心差异基因的实验验证

随后, 本研究使用Western blot和RT-qPCR对核心差异基因BMP4进行验证。结果显示, ISO可以显

著上调BMP4的mRNA和蛋白表达水平, 而FGF20处理则可显著下调BMP4的mRNA和蛋白表达水平(图5A~图5C)。富集分析结果提示FGF20调控下的DEGs富集于细胞凋亡, 因此本研究还检测了心肌细胞的凋亡情况。结果显示, FGF20可抑制ISO诱导的凋亡指标BAX/Bcl-2值上调(图5F)。与此同时, TUNEL实验结果表明, FGF20可抑制ISO诱导的心肌细胞凋亡(图5D和图5E)。

为了进一步验证BMP4是否参与介导FGF20的



A: LASSO逻辑回归算法中的回归系数路径图和交叉验证曲线。B: 两种机器学习算法识别基因的维恩图。C: 基于随机森林的特征重要性识别。D: *Bmp4*表达的小提琴图。E: BMP4与ANP、BNP的相关性分析。F: BMP4的ROC曲线分析。

A: regression coefficient path diagram and cross-validation curves in LASSO logistic regression algorithm. B: the Venn diagram of genes identified by the two machine learning algorithms. C: the identification of feature importance based on random forests (rf). D: violin diagram of *Bmp4* expression. E: correlations between BMP4 and ANP, BNP. F: the ROC curve of BMP4.

图4 *Bmp4*是FGF20改善心肌细胞肥大的核心基因

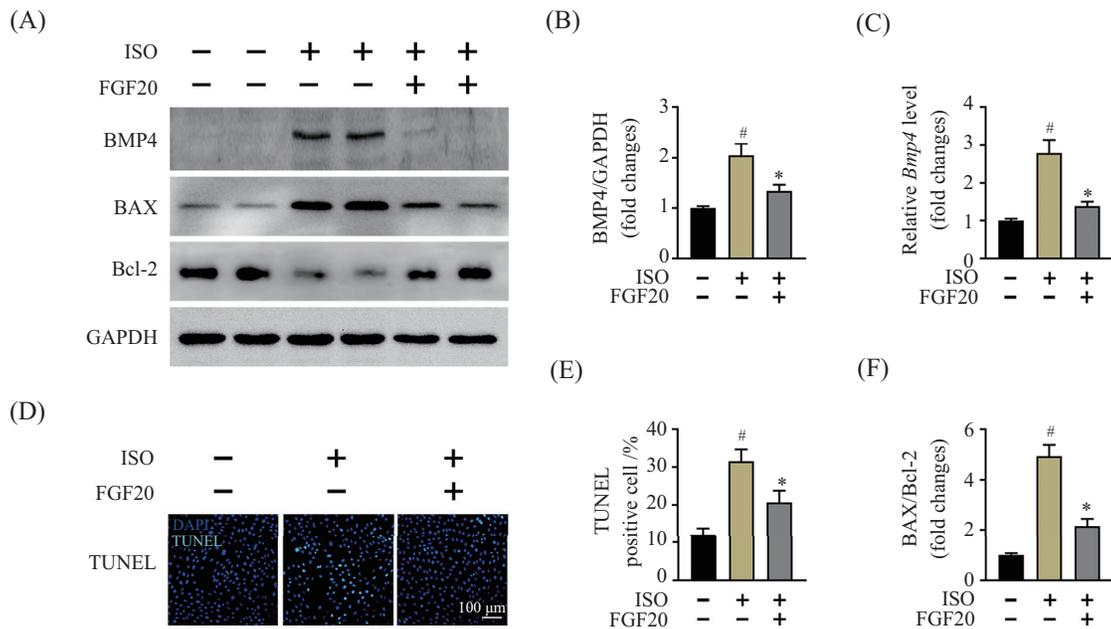
Fig.4 *Bmp4* was identified as the Core-DEGs of the protection of FGF20 in cardiomyocyte hypertrophy

心肌细胞肥大保护作用, 本研究对NRCMs使用BMP4重组蛋白以激活BMP4。结果发现, 与FGF20组相比, BMP4重组蛋白处理后ANP和BNP蛋白水平再次上调(图6A~图6C)。此外, 激活BMP4后心肌细胞凋亡水平也随之增加(图6D~图6F)。以上结果进一步表明,

FGF20通过抑制BMP4进而发挥心肌细胞肥大保护作用。

3 讨论

近年来, 随着FGF9亚家族成员——FGF9和

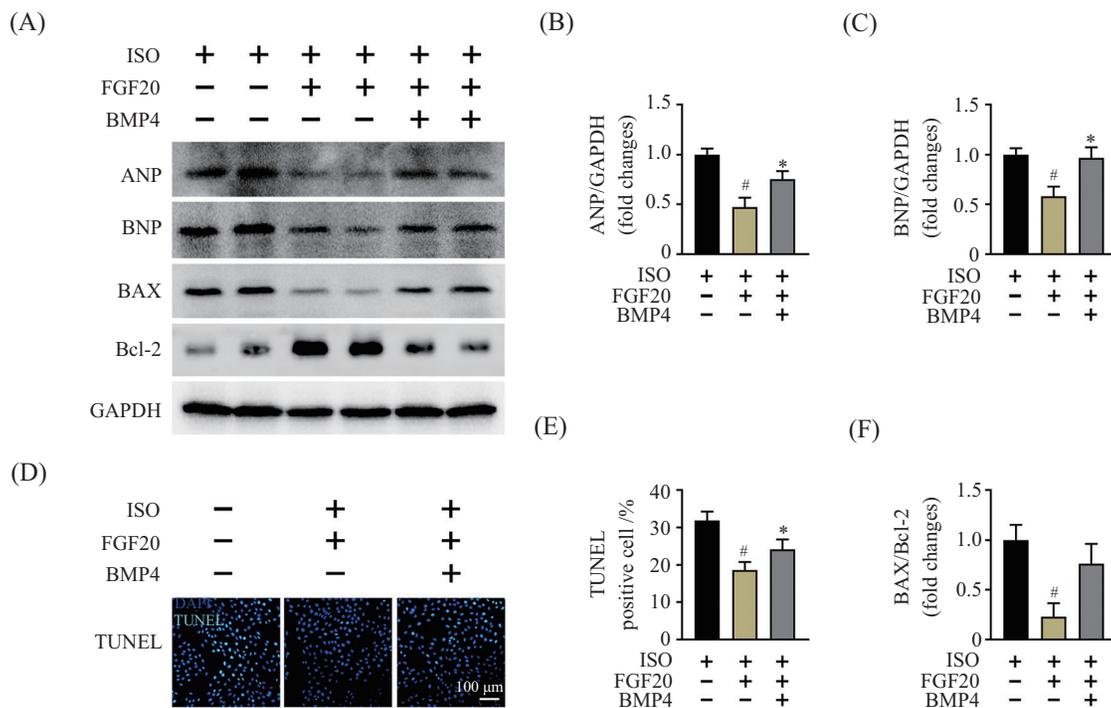


A: Western blot检测BMP4、BAX和Bcl-2的蛋白表达。B: BMP4蛋白表达的定量分析。C: RT-qPCR检测*Bmp4*的mRNA水平。D、E: TUNEL染色图和定量分析。F: BAX/Bcl-2值的定量分析。[#]*P*<0.05, 与CON组相比; ^{*}*P*<0.05, 与ISO组相比。

A: Western blot of BMP4, BAX and Bcl-2. B: quantification of protein expression of BMP4. C: RT-qPCR analysis of the mRNA levels of *Bmp4*. D,E: representative images and quantitative analysis of TUNEL staining. F: quantification of BAX/Bcl-2 ratio. [#]*P*<0.05 vs CON group, ^{*}*P*<0.05 vs ISO group.

图5 FGF20抑制ISO诱导的BMP4表达和心肌细胞凋亡

Fig.5 FGF20 inhibited BMP4 expression and cardioamyocyte apoptosis induced by ISO stimulation



A: Western blot检测ANP、BNP、BAX和Bcl-2的蛋白表达。B: ANP蛋白表达的定量分析。C: BNP蛋白表达的定量分析。D、E: TUNEL染色图和定量分析。F: BAX/Bcl-2值的定量分析。[#]*P*<0.05, 与ISO组相比; ^{*}*P*<0.05, 与ISO+FGF20组相比。

A: Western blot of ANP, BNP, BAX and Bcl-2. B: quantification of protein expression of ANP. C: quantification of protein expression of BNP. D,E: representative images and quantitative analysis of TUNEL staining. F: quantification of BAX/Bcl-2 ratio. [#]*P*<0.05 vs ISO group, ^{*}*P*<0.05 vs ISO+FGF20 group.

图6 激活BMP4逆转FGF20的心肌细胞肥大保护作用

Fig.6 Activation of BMP4 reversed the protective effect of FGF20 in hypertrophic NRCMs

FGF16在改善心肌肥大中的作用被陆续揭示^[17-18], FGF20在心肌肥大中的作用也备受关注^[19]。本课题组前期研究发现,在心肌肥大体内外模型中FGF20均可有效缓解心肌肥大损伤^[16],但FGF20发挥保护作用的分子机制尚不明确。因此,本研究旨在探究FGF20发挥心肌细胞肥大保护作用的分子机制。本研究通过转录组测序、机器学习算法以及实验验证后发现,FGF20可通过抑制BMP4缓解心肌细胞凋亡,进而发挥心肌细胞肥大的保护作用。

本研究首先采用ISO刺激原代心肌细胞NRCMs以构建经典的心肌细胞肥大模型,并成功验证FGF20可抑制肥大指标ANP、BNP蛋白表达进而发挥心肌细胞肥大保护作用后,再进行转录组测序分析。结果显示,与ISO组相比,FGF20处理后共得到42个DEGs。随后,将筛选得到的42个DEGs进行GO和KEGG富集分析以及PPI网络构建。值得注意的是,心肌肥大模型中FGF20调控的DEGs富集在多条与免疫以及细胞凋亡相关的生物过程及信号通路上。研究证实,免疫与细胞凋亡是诱发和加剧心肌肥大的重要的病理机制,因此这也是探索心肌肥大防治策略的重要方向^[20-21]。因此,FGF20心肌细胞肥大保护作用可能与其调控免疫与细胞凋亡密切相关。

LASSO和随机森林是机器学习算法中两种经典的模型,被广泛运用于核心基因的识别^[22]。因此,本研究借助LASSO和随机森林算法联合识别出42个DEGs中的核心差异基因(Core-DEGs),取2种算法结果的交集后共得到一个核心差异基因——*Bmp4*。进一步分析发现,在肥大心肌细胞中FGF20可抑制BMP4表达,且与心肌肥大指标ANP和BNP的表达呈正相关。此外,ROC分析发现BMP4的AUC值为1,进一步提示*Bmp4*可能是FGF20发挥心肌细胞肥大保护作用的核心基因。研究证实,BMP4是TGF- β 超家族(transforming growth factor- β superfamily)成员之一,在胚胎发育、骨骼形成以及组织修复中均发挥重要作用^[23]。后续研究证实,BMP4也参与调节心肌细胞肥大的病理过程^[24]。SUN等^[25]发现,BMP4在心肌肥大的体内外模型中表达水平上升,而BMP4抑制剂则可明显改善心肌肥大损伤。值得注意的是,左心室肥大患者以及心衰患者血清中BMP4含量均显著增加^[25-26],进一步提示BMP4可作为心肌肥大临床诊治的重要靶点。与前期研究结果一致,本研究也发现ISO诱导的肥大心肌细胞中BMP4表达水平

显著上升,而FGF20可显著抑制BMP4表达。随后,本研究使用BMP4重组蛋白激活NRCMs中的BMP4,以进一步探究BMP4是否参与介导FGF20的保护作用。结果显示,BMP4激活后心肌肥大指标ANP、BNP表达水平上调,表明激活BMP4可削弱FGF20的心肌细胞肥大保护作用。因此,FGF20可通过抑制核心基因*Bmp4*进而缓解心肌细胞肥大。

值得注意的是。本研究GO富集分析结果表明BMP4与白细胞分化的负向调控、未成熟T细胞增殖的调控和凋亡信号通路的负向调控密切相关。前期文献报道,BMP4可通过激活细胞凋亡促进心肌细胞肥大^[27]。此外,FGF20被证实具有良好的抗凋亡活性。例如,FGF20也可抑制神经细胞凋亡进而发挥神经保护作用^[28-29]。本研究发现,FGF20在抑制BMP4表达的同时也可抑制心肌细胞凋亡,而激活BMP4后FGF20抑制心肌细胞凋亡的作用被明显削弱。因此,本研究认为FGF20可通过抑制BMP4缓解心肌细胞凋亡进而改善心肌细胞肥大。前期文献指出,BMP4在免疫调节中发挥重要作用。例如,BMP4可促进白细胞的黏附以及CD4阳性T细胞的激活^[30-31]。此外,FGF20与巨噬细胞M1和T细胞CD4记忆激活密切相关^[32]。虽然FGF20与BMP4均可参与免疫调节,但心肌肥大疾病模型中FGF20是否可通过影响BMP4介导的免疫调节进而发挥保护作用仍需要大量的体内外实验进一步证实。

虽然本研究在原代心肌细胞NRCMs中揭示FGF20通过抑制BMP4改善心肌细胞肥大的作用机制,但仍存在值得深入探讨的科学问题。首先,该机制仍需在动物模型中进一步证实。其次,心肌细胞形态学变化作为心肌细胞肥大的重要指标,然而本研究却未进行检测,因此这也是本研究的缺陷之处。此外,FGF20抑制BMP4后减轻心肌细胞凋亡的具体机制尚未被阐明,前期报道指出BMP4可通过经典的Smad信号通路以及非经典的MAPK信号通路调控细胞凋亡^[24],并且本研究也发现FGF20也可调控Smad和MAPK通路,因此FGF20对Smad和MAPK通路的调控可能是未来的研究方向之一。miRNA是治疗心肌肥大的潜在药物靶点^[33]。本研究发现FGF20也可抑制miR132和miR155表达,而研究表明miR132和miR155可促进心肌肥大^[34-35],因此miR132和miR155也可能是FGF20保护心肌细胞肥大的潜在靶点。最后,FGF20作为一种分泌性生物多肽蛋白^[36],

心肌肥大疾病进程中其是否可通过减轻心脏组织中的成纤维细胞以及内皮细胞损伤发挥保护作用也值得深入探究。

综上所述, 本研究发现FGF20通过下调BMP4表达抑制心肌细胞凋亡进而改善心肌肥大, 为FGF20治疗心肌肥大提供了实验依据。

参考文献 (References)

- [1] 马丽媛, 王增武, 樊静, 等. 《中国心血管健康与疾病报告2022》要点解读[J]. 中国全科医学(MA L Y, WANG Z W, FAN J, et al. Interpretation of report on cardiovascular health and diseases in China 2022 [J]. Chinese General Practice), 2023, 6(32): 3975-94.
- [2] MARTIN T G, JUARROS M A, LEINWAND L A. Regression of cardiac hypertrophy in health and disease: mechanisms and therapeutic potential [J]. Nat Rev Cardiol, 2023, 20(5): 347-63.
- [3] NAKAMURA M, SADOSHIMA J. Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy [J]. Nat Rev Cardiol, 2018, 15(7): 387-407.
- [4] 陈云杰, 周旋, 张元斌, 等. ErbB2在心脏疾病中作用的研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学(CHEN Y J, ZHOU X, ZHANG Y B, et al. Reseach progress on the role of ErbB2 in cardiac disease [J]. Chin J Clin Pharmacol Ther), 2022, 27(10): 1182-9.
- [5] CHEN L, FU L, SUN J, et al. Structural basis for FGF hormone signalling [J]. Nature, 2023, 618(7966): 862-70.
- [6] KHOSRAVI F, AHMADVAND N, BELLUSCI S, et al. The multifunctional contribution of fgf signaling to cardiac development, homeostasis, disease and repair [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 672935.
- [7] CHEN G, AN N, SHEN J, et al. Fibroblast growth factor 18 alleviates stress-induced pathological cardiac hypertrophy in male mice [J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 1235.
- [8] LI S, ZHU Z, XUE M, et al. Fibroblast growth factor 21 protects the heart from angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and dysfunction via SIRT1 [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2019, 1865(6): 1241-52.
- [9] KOGA C, ADATI N, NAKATA K, et al. Characterization of a novel member of the FGF family, XFGF-20, in *Xenopus laevis* [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 261(3): 756-65.
- [10] CHEN J, WANG X, HU J, et al. FGF20 protected against BBB disruption after traumatic brain injury by upregulating junction protein expression and inhibiting the inflammatory response [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 590669.
- [11] WANG S, LI Y, JIANG C, et al. Fibroblast growth factor 9 subfamily and the heart [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2018, 102(2): 605-13.
- [12] BIGGS L C, MÄKELÄ O J, MYLLYMÄKI S M, et al. Hair follicle dermal condensation forms via Fgf20 primed cell cycle exit, cell motility, and aggregation [J]. eLife, 2018, 7: e36468.
- [13] SU Y, YANG L M, ORNITZ D M. FGF20-FGFR1 signaling through MAPK and PI3K controls sensory progenitor differentiation in the organ of Corti [J]. Dev Dyn, 2021, 250(2): 134-44.
- [14] JEFFERS M, MCDONALD W F, CHILLAKURU R A, et al. A novel human fibroblast growth factor treats experimental intestinal inflammation [J]. Gastroenterology, 2002, 123(4): 1151-62.
- [15] LAVINE K J, YU K, WHITE A C, et al. Endocardial and epicardial derived FGF signals regulate myocardial proliferation and differentiation *in vivo* [J]. Dev Cell, 2005, 8(1): 85-95.
- [16] CHEN Y, AN N, ZHOU X, et al. Fibroblast growth factor 20 attenuates pathological cardiac hypertrophy by activating the SIRT1 signaling pathway [J]. Cell Death Dis, 2022, 13(3): 276.
- [17] KORF-KLINGEBIEL M, KEMPF T, SCHLÜTER K D, et al. Conditional transgenic expression of fibroblast growth factor 9 in the adult mouse heart reduces heart failure mortality after myocardial infarction [J]. Circulation, 2011, 123(5): 504-14.
- [18] MATSUMOTO E, SASAKI S, KINOSHITA H, et al. Angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and fibrosis are promoted in mice lacking Fgf16 [J]. Genes Cells, 2013, 18(7): 544-53.
- [19] VAN GREENEN J D, HOCKMAN D. FGF20 [J]. Differentiation, 2023: 100737.
- [20] FRIELER R A, MORTENSEN R M. Immune cell and other non-cardiomyocyte regulation of cardiac hypertrophy and remodeling [J]. Circulation, 2015, 131(11): 1019-30.
- [21] RITTERHOFF J, TIAN R. Metabolic mechanisms in physiological and pathological cardiac hypertrophy: new paradigms and challenges [J]. Nat Rev Cardiol, 2023, 20(12): 812-29.
- [22] YANG Y Y, GAO Z X, MAO Z H, et al. Identification of ULK1 as a novel mitophagy-related gene in diabetic nephropathy [J]. Front Endocrinol, 2022, 13: 1079465.
- [23] PAN Y, JIANG Z, YE Y, et al. Role and mechanism of BMP4 in regenerative medicine and tissue engineering [J]. Ann Biomed Eng, 2023, 51(7): 1374-89.
- [24] GUO W T, DONG D L. Bone morphogenetic protein-4: a novel therapeutic target for pathological cardiac hypertrophy/heart failure [J]. Heart Fail Rev, 2014, 19(6): 781-8.
- [25] SUN B, HUO R, SHENG Y, et al. Bone morphogenetic protein-4 mediates cardiac hypertrophy, apoptosis, and fibrosis in experimentally pathological cardiac hypertrophy [J]. Hypertension, 2013, 61(2): 352-60.
- [26] GU G L, YANG Q Y, ZENG R L, et al. The association between BMP4 gene polymorphism and its serum level with the incidence of LVH in hypertensive patients [J]. J Transl Med, 2015, 13: 14.
- [27] XING Y, YANG D, LU J, et al. Insulin prevents bone morphogenetic protein-4 induced cardiomyocyte apoptosis through activating Akt [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 456(2): 605-9.
- [28] TIAN H, ZHAO Y, CHEN N, et al. High production in *E. coli* of biologically active recombinant human fibroblast growth factor 20 and its neuroprotective effects [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2016, 100(7): 3023-34.
- [29] CORREIA A S, ANISIMOV S V, ROYBON L, et al. Fibroblast growth factor-20 increases the yield of midbrain dopaminergic neurons derived from human embryonic stem cells [J]. Front Neuroanat, 2007, 1: 4.
- [30] VALENCIA J, M FERNÁNDEZ-SEVILLA L, FRAILE-RAMOS A, et al. Acute lymphoblastic leukaemia cells impair dendritic cell and macrophage differentiation: role of BMP4 [J]. Cells, 2019, 8(7): 722.
- [31] HUANG F, HU L, ZHANG Y, et al. BMP4 moderates glycolysis and regulates activation and interferon-gamma production in CD4⁺ T Cells [J]. Front Immunol, 2021, 12: 702211.
- [32] XIE D, CHEN X, WU H, et al. Prediction of diagnostic gene biomarkers associated with immune infiltration for basal cell car-

- cinoma [J]. *Clin Cosmet Investig Dermatol*, 2022, 15: 2657-73.
- [33] WEHBE N, NASSER S A, PINTUS G, et al. MicroRNAs in cardiac hypertrophy [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(19): 4714.
- [34] UCAR A, GUPTA S K, FIEDLER J, et al. The miRNA-212/132 family regulates both cardiac hypertrophy and cardiomyocyte autophagy [J]. *Nat Commun*, 2012, 3: 1078.
- [35] SEOK H Y, CHEN J, KATAOKA M, et al. Loss of MicroRNA-155 protects the heart from pathological cardiac hypertrophy [J]. *Circ Res*, 2014, 114(10): 1585-95.
- [36] CAI X, TAO W, LI L. Glioma cell-derived FGF20 suppresses macrophage function by activating β -catenin [J]. *Cell Signal*, 2022, 89: 110181.