XXXX DOI:

miR-101-3p通过抑制DUSP1诱发心力衰竭小鼠心肌细胞铁死亡

孟素艳,张 琳,马 亮
(山西省心血管病医院/山西省心血管病研究所公共卫生科,太原 030027)

【摘 要】目的:探讨微小核糖核酸-101-3p(micro ribonucleic acid-101-3p,miR-101-3p)对心力衰竭(heart failure,HF)小鼠心肌细胞铁死亡的影响及机制。**方法:**采用横向主动脉缩窄(transverse aortic constriction,TAC)术构建HF小鼠模型。将小鼠随机分为6组:假手术组、TAC组(接受TAC手术)、TAC+antagomir-NC组、TAC+antagomir-101-3p组、antagomir-101-3p+sh-NC组、antagomir-101-3p+sh-双特异性磷酸酶1(dual specificity phosphatase 1,DUSP1)组,每组10只。末次干预后,超声心动图检测小鼠心功能;实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time quantitative polymerase chain reaction,qRT-PCR)检测miR-101-3p、DUSP1信使核糖核酸(messenger ribonucleic acid,mRNA)表达;蛋白质印迹检测DUSP1蛋白表达;苏木精-伊红(hematoxylin and eosin,HE)染色观察心肌组织病理损伤;试剂盒检测心肌组织铁死亡标志物Fe^{2+}、丙二醛(malondialdehyde,MDA)、谷胱甘肽(glutathione,GSH)和谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4,GPX4)水平;分离原代心肌细胞进行荧光素酶报告基因实验。**结果:**与假手术组相比,TAC组小鼠心肌组织miR-101-3p的表达明显升高($P<0.05$),左室射血分数(left ventricular ejection fraction,LVEF)、短轴缩短率(fractional shortening,FS)、GSH、GPX4、DUSP1均明显降低($P<0.05$),室间隔(interventricular septum,IVS)、左心室后壁厚度(left ventricular posterior wall,LVPW)、左心室心肌质量/体质量(left ventricular myocardial mass/body weight,LV mass/BW)、心肌组织横截面积百分比以及Fe^{2+}、MDA水平明显升高($P<0.05$)。与TAC+antagomir-NC组相比,TAC+antagomir-101-3p组小鼠心肌组织miR-101-3p表达明显降低($P<0.05$),LVEF、FS、GSH、GPX4、DUSP1明显升高($P<0.05$),IVS、LVPW、LV mass/BW、心肌组织横截面积百分比以及Fe^{2+}、MDA水平明显降低($P<0.05$)。sh-DUSP1部分逆转了antagomir-101-3p对HF小鼠的改善作用($P<0.05$)。荧光素酶报告基因实验显示,miR-101-3p可靶向抑制DUSP1。**结论:**抑制miR-101-3p通过上调心肌组织中DUSP1的表达抑制心肌细胞铁死亡,从而缓解小鼠HF。

【关键词】心力衰竭;铁死亡;心肌纤维化;微小核糖核酸
【中图分类号】R541 **【文献标志码】**A

Micro-ribonucleic acid 101-3p induces ferroptosis in cardiomyocytes of mice with heart failure by inhibiting dual specificity phosphatase 1

MENG Suyan, ZHANG Lin, MA Liang
(*Department of Public Health, Shanxi Cardiovascular Hospital/Shanxi Institute of Cardiovascular Diseases*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect and mechanism of micro-ribonucleic acid 101-3p(miR-101-3p) on ferroptosis in cardiomyocytes of mice with heart failure(HF). ***Methods*:** Transverse aortic constriction(TAC) surgery was performed to establish a mice model of HF. The mice were randomly divided into sham-operation group, TAC group (treated with TAC surgery), TAC+antagomir-NC group, TAC+antagomir-101-3p group, antagomir-101-3p+sh-NC group, and antagomir-101-3p+sh-dual specificity phosphatase 1(DUSP1) group, with 10 mice in each group. After the last intervention, echocardiography was used to assess cardiac function; qRT-PCR was used to measure the mRNA expression levels of miR-101-3p and DUSP1, and Western blot was used to measure the protein expression level of DUSP1; HE staining was used to observe pathological injury in myocardial tissue; kits were used to measure the levels of ferroptosis markers in myocardial tissue, including Fe^{2+}, malondialdehyde(MDA), glutathione(GSH), and glutathione peroxidase 4(GPX4); primary cardiomyocytes were isolated for luciferase reporter assay. ***Results*:** Compared with the sham-operation group, the TAC group had a significant increase in the expression level of miR-101-3p in myocardial tissue and significant reductions in left ventricular ejection fraction(LVEF), fractional shortening(FS), GSH, GPX4, and DUSP1($P<0.05$), as well as significant increases in interventricular septum(IVS), left ventricular posterior wall(LVPW) thickness, left ventricular mass/body weight(LV mass/BW), the per-

作者介绍:孟素艳,Email:kingm321321@163.com,
研究方向:心脑血管疾病相关因素的流行病学与卫生统计研究等。

基金项目:山西省基础研究计划资助项目(编号:202203021222397)。

centage of myocardial cross-sectional area, and the levels of Fe^{2+} and MDA ($P<0.05$). Compared with the TAC+antagomir-NC group, the TAC+antagomir-101-3p group had a significant reduction in the expression level of miR-101-3p in myocardial tissue ($P<0.05$) and significant increases in LVEF, FS, GSH, GPX4, and DUSP1 ($P<0.05$), as well as significant reductions in IVS, LVPW, LV mass/BW, the percentage of myocardial cross-sectional area, and the levels of Fe^{2+} and MDA ($P<0.05$). The results showed that sh-DUSP1 partially reversed the improvement effect of antagomir-101-3p on HF mice ($P<0.05$). Luciferase reporter assay showed that miR-101-3p could target and inhibit DUSP1. ***Conclusion***: Inhibiting miR-101-3p can alleviate HF in mice by upregulating the expression of DUSP1 in myocardial tissue and inhibiting cardiomyocyte ferroptosis.

【Key words】heart failure; ferroptosis; myocardial fibrosis; micro-ribonucleic acid

心力衰竭(heart failure, HF)是一种全球范围内高发病率与高死亡率的终末期疾病[1]。心脏重构被认为是HF发生早期且决定性的因素,其特征是心肌细胞肥大和纤维化[2]。然而,病理性心肌重构及HF的调控机制尚待阐明。尽管不断进步的医疗手段可以改善HF的症状,但其病理进程仍无法阻止或逆转。因此,深入理解目前尚未完全阐明的HF发病机制,对于推动相关治疗策略的开发至关重要。

铁死亡是一种新型的程序性细胞死亡方式,于2012年被首次提出,定义为铁依赖性脂质过氧化物生成和活性氧(reactive oxygen species, ROS)显著增加导致的细胞死亡[3]。在生物化学上,铁死亡表现为铁自由基和氧自由基的累积以及谷胱甘肽的耗竭。越来越多的证据表明,铁死亡在心血管疾病中发挥着重要作用。现有证据表明,在HF中竞争性内源核糖核酸(competing endogenous ribonucleic acid, ceRNA)调控网络与铁死亡相关[4],且抑制铁死亡可减少HF时的心肌细胞死亡[5]。因此,靶向铁死亡可能成为一种有前景的治疗策略。微小RNA(micro ribonucleic acid, miRNA)是一类短链非编码核糖核酸(ribonucleic acid, RNA)分子,对维持心脏稳态具有关键调控作用,并与HF的发病机制密切相关。例如,miR-103/107可通过靶向凋亡和自噬相关通路,加剧HF心肌损伤[6]。此外,包括miR-144-3p和miR-19b-3p在内的等多种miRNA已被证实可作为诊断HF的理想生物标志物[7-8]。近期一项研究显示,在接受心脏再同步化治疗的晚期HF患者中,低水平miR-101-3p与较好的预后相关[9],表明miR-101-3p可能在HF病理过程中发挥重要作用。双特异性磷酸酶1(dual specificity phosphatase 1, DUSP1)可能是miR-101-3p的靶基因。研究显示,miR-101-3p可通过下调DUSP1促进脑缺血再灌注损伤模型中的铁死亡[10]。然而,其在HF中的作用是否涉及铁死亡尚不明确。基于此,本研究通过横向主动脉缩窄(transverse aortic constriction, TAC)术构建了HF小鼠模型,探讨miR-101-3p对HF小鼠心功能损伤的影响,并基于心肌细胞铁死亡初步探讨其机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

C57BL/6小鼠(雄性,8~10周龄,体质量22~25 g)购自山西医科大学实验动物中心,许可证号:SCXK(晋)2023-0009。小鼠饲养于温度(20±2) ℃、12 h光照/黑暗循环、湿度约50%~60%的环境中。本研究经过医院动物实验伦理委员会批准(批准号:2025K0325)。

1.2 主要试剂

miRNA试剂:miR-101-3p抑制剂(antagomir-101-3p)及其乱序对照(antagomir-NC)、miR-101-3p模拟物(miR-101-3p mimic)及其阴性对照(miR-NC)购自上海吉玛制药有限公司。antagomir-101-3p、antagomir-NC分别与线性聚乙烯亚胺(polyethylenimine, PEI)纳米颗粒(美国Sigma-Aldrich公司)混合后用于尾静脉注射。DUSP1 RNA干扰质粒(sh-DUSP1)及其阴性对照(sh-NC)由上海美轩生物科技有限公司构建。TRIzol试剂购自美国Invitrogen公司;TransScript All-in-One第一链互补脱氧核糖核酸(complementary deoxyribonucleic acid, cDNA)合成超预混液[实时定量聚合酶链式反应(real-time quantitative polymerase chain reaction, qPCR)专用一步法基因组DNA去除型]、PerfectStart Green qPCR超预混液(+Dye Ⅱ)购自北京全式金生物技术有限公司;第一链cDNA合成试剂盒(茎环法)、SYBR qPCR预混液购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)(货号5174)、生物素化鼠源免疫球蛋白G(immunoglobulin G, IgG)(H+L)二抗(货号14709)、生物素化兔源IgG(H+L)二抗(货号14708)购自Cell Signaling公司;抗DUSP1抗体(货号ab195261)购自Abcam公司。

1.3 方法

1.3.1 模型构建、分组及处理 将小鼠随机分为6组(每组10只):①假手术组;②TAC组(接受TAC手术);③TAC+antagomir-NC组(TAC小鼠经尾静脉注射5 μL的antagomir-NC);④TAC+antagomir-101-3p组(TAC小鼠经尾静脉注射5 μL的antagomir-101-3p);⑤antagomir-101-3p+sh-NC组(TAC小鼠经尾静脉同时注射5 μL的antagomir-101-3p和sh-NC);⑥antagomir-101-3p+sh-DUSP1组(TAC小鼠经尾

静脉同时注射5 μL的antagomir-101-3p和sh-DUSP1)。为构建HF小鼠模型,小鼠禁食12 h后,剃除胸毛,以2%戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉后,参照文献[11]行TAC术。简而言之,气管插管和机械通气后,经胸骨上缘行部分胸廓切开术暴露横主动脉。分离主动脉弓,以7-0尼龙线环绕27号针头进行结扎,随后移除针头,使主动脉弓形成约60%的环形狭窄。术后关闭胸腔,缝合伤口。假手术组小鼠除主动脉弓不予结扎外,其余步骤相同。术后10周,腹腔注射过量戊巴比妥(100~150 mg/kg)处死小鼠,取心脏组织用于后续实验。

1.3.2 实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time quantitative polymerase chain reaction,qRT-PCR) 取50 mg心肌组织加入1 mL TRIzol试剂,匀浆后4 ℃、12 000×*g*离心15 min提取总RNA,用Nanodrop 8 000定量RNA。采用TransScript All-in-One第一链cDNA合成超预混液(qPCR专用一步法基因组DNA去除型)进行反转录。采用PerfectStart Green qPCR超预混液(+Dye Ⅱ)检测mRNA表达。采用microRNA第一链cDNA合成试剂盒(茎环法)对1 μg总RNA进行反转录。采用microRNA通用SYBR qPCR预混液检测miRNA表达水平。采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法分析qRT-PCR结果。

1.3.3 超声心动图检测心功能 采用VeVo770高分辨率小动物超声系统检测小鼠心脏结构与功能。小鼠吸入2%异氟烷麻醉后,采用深度15 mm、频率30 MHz的探头测量其肢体导联超声心动图。在乳头肌水平,于心尖长轴和短轴切面记录二维引导下的M型超声图像。采用标准公式计算左心室射血分数(left ventricular ejection fraction,LVEF)、左心室缩短分数(fractional shortening,FS)、室间隔(interventricular septum,IVS;d)、左心室后壁厚度(left ventricular posterior wall,LVPW)以及左心室心肌质量/体质量(left ventricular myocardial mass/body weight,LV mass/BW)。所有测量值均取自至少3个心动周期并取平均值。

1.3.4 苏木精-伊红(hematoxylin and eosin,HE)染色 取心脏组织,于4 ℃下用4%多聚甲醛固定,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋并切片(厚度4 μm)。切片进行苏木精染色,流水冲洗,再用1%伊红复染。再次流水冲洗后,切片脱水、透明、中性树胶封片,干燥3 d。最后,在200倍光学显微镜下观察并拍照,对切片中心肌细胞进行形态学分析。

1.3.5 蛋白免疫印迹分析 采用放射免疫沉淀分析(radioimmunoprecipitation assay lysis buffer,RIPA)裂解液从心脏组织中提取总蛋白,二喹啉甲酸法测定蛋白浓度。取等量蛋白经10%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,转至膜上。室温下以含5%脱脂牛奶的封闭液封闭2 h,然后将膜与一抗于4 ℃孵育过夜,以GAPDH(1∶1 000)作为内参。洗涤后,膜与辣根过氧化物酶标记的二抗(1∶200)于室温孵育2 h。采用增强型化学发光试剂盒显影,ChemiDoc™MP系统成像,并用ImageLab™软件分析条带灰度值。目标蛋白表达水平以GAPDH的灰度值进行标准化。

1.3.6 铁死亡相关指标检测 将心肌组织加入磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline,PBS)匀浆,离心后取上清液。采用铁含量测定试剂盒检测Fe^{2+}浓度。采用谷胱甘肽(glutathione,GSH)检测试剂盒测定GSH水平。采用丙二醛(malondialdehyde,MDA)测定试剂盒检测MDA水平。谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4,GPX4)酶联免疫吸附试剂盒用于测定GPX4水平。

1.3.7 原代心肌细胞提取 术后10周处死小鼠(方法同上),浸入70%乙醇中消毒1 min。取出心脏置于PBS中,剪去心房及多余血管组织。心室组织剪碎后移入15 mL离心管。加入含0.125%胰蛋白酶、0.1%Ⅱ型胶原酶和0.05%DNase的消化液。37 ℃消化后,离心收集细胞悬液。重复消化3次。收集的细胞悬液与含10%胎牛血清(fetal bovine serum,FBS)、1%青霉素和1%链霉素的高糖杜氏改良伊格尔(Dulbecco's modified Eagle's medium,DMEM)培养基混合。轻柔吹打后,用230目筛网过滤,采用差速贴壁法(每次60 min)于37 ℃三气培养箱中分离成纤维细胞。收集未贴壁的原代心肌细胞进行荧光素酶报告基因实验。

1.3.8 荧光素酶报告基因实验 为验证miR-101-3p与DUSP1的靶向关系,将包含DUSP1野生型(wild type,WT,DUSP1-WT)或突变型(mutant type,MUT,DUSP1-MUT)3′非翻译区(3′untranslated region,3' UTR)(含有预测的miR-101-3p结合位点)的片段克隆至pmiR-RB-Report载体。将构建的报告质粒与miR-101-3p mimic或miR-NC共转染至心肌细胞中。转染48 h后,采用双荧光素酶报告基因检测系统检测相对萤火虫荧光素酶活性。

1.4 统计学方法

数据采用SPSS 19.0分析,采用Shapiro-Wilk检验数据正态性,数据均符合正态分布,计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。经Levene检验方差齐性,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用LSD-*t*法。检验水准α=0.05。

2 结 果

2.1 miR-101-3p在心力衰竭小鼠心肌组织中表达上调

与假手术组(1.02±0.04)相比,TAC组(4.46±1.09)小鼠心肌组织中miR-101-3p的表达明显升高(t=9.973,P<0.001)。与TAC+antagomir-NC组(4.65±1.31)相比,TAC+antagomir-101-3p组(1.63±0.26)小鼠心肌组织中miR-101-3p的表达明显降低(t=7.151,P<0.001)。

2.2 miR-101-3p下调减轻心力衰竭小鼠心功能损伤

与假手术组相比,TAC组小鼠LVEF、FS均明显降低(t=9.718、6.324,P<0.001),而IVS、LVPW、LV mass/BW均明显升高(t=5.821、6.432、9.083,P<0.001)。与TAC+antagomir-NC组相比,TAC+antagomir-101-3p组小鼠LVEF、FS均明显升高(t=5.707、4.132,P<0.05),而IVS、LVPW、LV mass/BW均明显降低(t=3.947,P=0.001;t=3.487,P=0.003;t=8.101,P<0.001)。见表1。

2.3 miR-101-3p下调改善心力衰竭小鼠心肌病理损伤

HE染色显示,与假手术组相比,TAC组心肌组织横截面积百分比明显增加(t=9.319,P<0.001);与TAC+antagomir-NC组相比,TAC+antagomir-101-3p组心肌组织横截面积百分比明显降低(t=4.705,P<0.001)。见图1、表2。

2.4 miR-101-3p下调改善心力衰竭小鼠心肌细胞铁死亡

与假手术组相比,TAC组小鼠心肌组织Fe^{2+}、MDA水平明显升高(t=17.075、20.400,P<0.001),GSH、GPX4水平明显

表1 各组小鼠心功能相关参数的比较(n=10,$\bar{x}\pm s$)

组别	LVEF(%)	FS(%)	IVS(mm)	LVPW(mm)	LV mass/BW(mg/g)
假手术组	78.36±6.54	37.18±4.11	0.60±0.07	0.59±0.06	4.06±0.46
TAC组	50.41±6.32[a]	26.24±3.61[a]	0.84±0.11[a]	0.81±0.09[a]	5.83±0.41[a]
TAC+antagomir-NC组	51.22±7.17[a]	25.93±4.03[a]	0.85±0.12[a]	0.80±0.11[a]	5.79±0.43[a]
TAC+antagomir-101-3p组	69.75±7.35[bc]	32.77±3.34[bc]	0.67±0.08[bc]	0.65±0.08[bc]	4.32±0.38[bc]

注:a,与假手术组相比,P<0.05;b,与TAC组相比,P<0.05;c,与TAC+antagomir-NC组相比,P<0.05

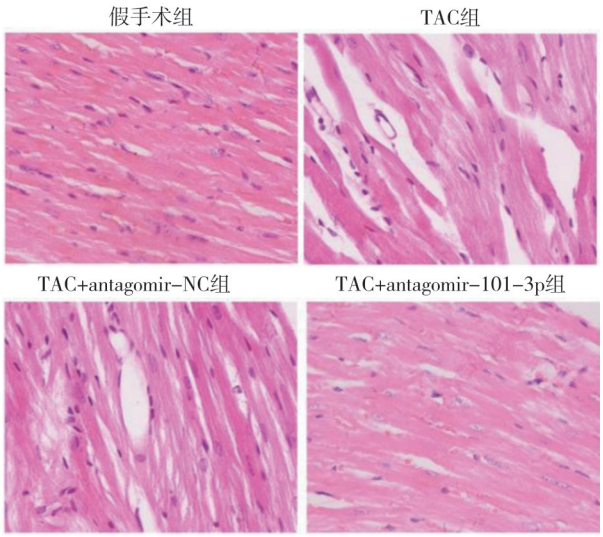


图1 各组小鼠心肌组织HE染色代表性图像(×400)

表2 各组小鼠HE染色定量分析结果比较(n=10,$\bar{x}\pm s$)

组别	心肌组织横截面积百分比(%)
假手术组	224.86±25.75
TAC组	413.57±58.63[a]
TAC+antagomir-NC组	426.85±67.44[a]
TAC+antagomir-101-3p组	306.75±44.36[bc]

注:a,与假手术组相比,P<0.05;b,与TAC组相比,P<0.05;c,与TAC+antagomir-NC组相比,P<0.05

降低(t=11.413、18.513,P<0.05)。与TAC+antagomir-NC组相比,TAC+antagomir-101-3p组小鼠心肌组织Fe^{2+}、MDA水平明显降低(t=14.431、14.345,P<0.001),GSH、GPX4水平明显升高(t=6.974、10.492,P<0.001)。见表3。

2.5 DUSP1是miR-101-3p的靶标

与假手术组相比,TAC组小鼠心肌组织DUSP1 mRNA和蛋白表达明显降低(t=21.187、11.667,P<0.001)。与TAC+antagomir-NC组相比,TAC+antagomir-101-3p组小鼠心肌组织DUSP1 mRNA和蛋白表达明显升高(t=11.642、12.840,P<0.001)。与TAC+antagomir-101-3p+sh-NC组相比,TAC+antagomir-101-3p+sh-DUSP1组小鼠心肌组织DUSP1 mRNA和蛋白表达明显降低(t=15.644、23.335,P<0.001)。见图2、表4。

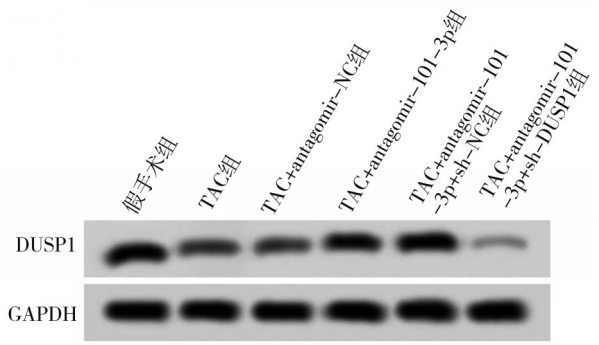


图2 各组小鼠心肌组织DUSP1蛋白表达的免疫印迹分析

接下来,通过Targetscan数据库预测miR-101-3p的潜在靶基因,结果显示miR-101-3p(5'-AGUACUGUA-3')与DUSP1基因的3'非翻译区(3'-UCAUGACAU-5')存在一个推测的结合位点。随后,将含有DUSP1野生型或突变型3'非翻译区的片段,分别与miR-101-3p mimic或阴性对照miR-NC共转染至心肌细胞,进行荧光素酶报告基因检测。结果表明,miR-101-3p mimic显著降低DUSP1野生型3'非翻译区的相对荧光素酶活性(t=10.525,P<0.001),但对DUSP1突变型3'非翻译区未见明显影响(t=0.139,P=0.896)。此外,与miR-NC组相比,miR-101-3p mimic组心肌细胞中DUSP1 mRNA和蛋白表达水平显著降低(t=10.219,P=0.001)。见图3。

2.6 DUSP1敲低逆转miR-101-3p下调对心力衰竭小鼠的保护效应

心功能分析显示,与TAC+antagomir-101-3p+sh-NC组相比,TAC+antagomir-101-3p+sh-DUSP1组小鼠LVEF、FS均明显降低(t=8.915、4.292,P<0.001),而IVS、LVPW、LV mass/BW均明显升高(t=3.151、2.910、4.226,P<0.001)。HE染色显示,与TAC+antagomir-101-3p+sh-NC组相比,TAC+antagomir-101-3p+sh-DUSP1组心肌组织横截面积百分比明显增加(t=4.399,P<0.001)。见图4、表5、表6。

表3 各组小鼠心肌组织中铁死亡相关指标的比较(n=10,$\bar{x}\pm s$)

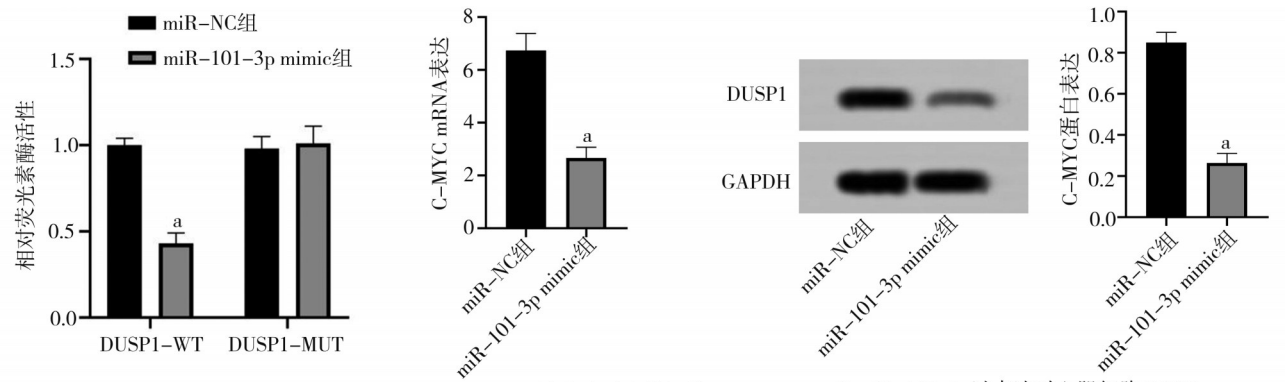
组别	Fe^{2+}(μmol/L)	MDA(nmol/mL)	GSH(μmol/L)	GPX4(pg/mL)
假手术组	41.34±5.57	7.31±1.15	252.35±30.65	136.85±12.71
TAC组	122.73±14.03[a]	18.22±1.24[a]	117.81±21.22[a]	47.17±8.55[a]
TAC+antagomir-NC组	126.85±15.77[a]	17.96±1.21[a]	125.43±25.31[a]	50.44±7.94[a]
TAC+antagomir-101-3p组	45.44±8.34[bc]	10.45±1.13[bc]	203.64±24.84[bc]	107.75±15.34[bc]

注:a,与假手术组相比,P<0.05;b,与TAC组相比,P<0.05;c,与TAC+antagomir-NC组相比,P<0.05

表4 各组小鼠心肌组织DUSP1 mRNA和蛋白表达的比较(n=10,$\bar{x}\pm s$)

组别	DUSP1 mRNA	DUSP1蛋白
假手术组	1.04 ± 0.08	0.54 ± 0.08
TAC组	0.37 ± 0.06[a]	0.21 ± 0.04[a]
TAC+antagomir-NC组	0.38 ± 0.07[a]	0.20 ± 0.04[a]
TAC+antagomir-101-3p组	0.86 ± 0.11[bc]	0.46 ± 0.05[bc]
TAC+antagomir-101-3p+sh-NC组	0.87 ± 0.13[bc]	0.47 ± 0.04[bc]
TAC+antagomir-101-3p+sh-DUSP1组	0.21 ± 0.03[d]	0.14 ± 0.02[d]

注:a,与假手术组相比,P<0.05;b,与TAC组相比,P<0.05;c,与TAC+antagomir-NC组相比,P<0.05;d,与TAC+antagomir-101-3p+sh-NC组相比,P<0.05



A. 荧光素酶报告基因实验结果　B. miR-101-3p过表达对心肌细胞DUSP1 mRNA表达的影响　C. miR-101-3p过表达对心肌细胞DUSP1蛋白表达的影响

注:a,与miR-NC组相比,P<0.05

图3 DUSP1是miR-101-3p的靶标

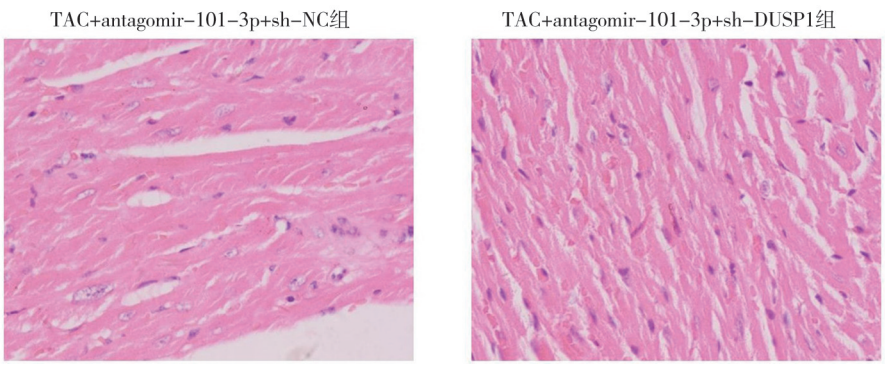


图4 各组小鼠心肌组织HE染色代表性图像(×400)

表5 各组小鼠心功能相关指标的比较(n=10,$\bar{x}\pm s$)

组别	LVEF(%)	FS(%)	IVS(mm)	LVPW(mm)	LV mass/BW(mg/g)
TAC+antagomir-101-3p+sh-NC组	68.17 ± 4.66	33.85 ± 3.92	0.66 ± 0.08	0.64 ± 0.07	4.28 ± 0.62
TAC+antagomir-101-3p+sh-DUSP1组	50.54 ± 4.17	26.22 ± 4.03	0.78 ± 0.09	0.76 ± 0.11	5.57 ± 0.74
t值	8.915	4.292	3.151	2.910	4.226
P值	<0.001	<0.001	0.006	0.009	0.001

表6 各组小鼠HE染色定量分析结果比较(n=10,$\bar{x}\pm s$)

组别	心肌组织横截面积百分比(%)
TAC+antagomir-101-3p+sh-NC组	305.54 ± 40.66
TAC+antagomir-101-3p+sh-DUSP1组	398.28 ± 52.84
t值	4.399
P值	<0.001

2.7 DUSP1敲低逆转miR-101-3p下调对心肌组织心肌细胞铁死亡的抑制效应

与TAC+antagomir-101-3p+sh-NC组相比,TAC+antagomir-101-3p+sh-DUSP1组小鼠心肌组织Fe^{2+}、MDA水平明显增加(t=15.229、4.745,P<0.001),而GSH、GPX4水平明显降低(t=6.430、10.586,P<0.001)。见表7。

表7 各组小鼠心肌组织中铁死亡相关指标的比较(n=10,$\bar{x} \pm s$)

组别	Fe^{2+}(μmol/L)	MDA(nmol/mL)	GSH(μmol/L)	GPX4(pg/mL)
TAC+antagomir-101-3p+sh-NC组	47.34 ± 6.36	10.22 ± 1.12	206.78 ± 25.74	110.89 ± 12.31
TAC+antagomir-101-3p+sh-DUSP1组	103.66 ± 9.75	15.35 ± 3.23	143.39 ± 18.36	62.74 ± 7.44
t值	15.299	4.745	6.430	10.586
P值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

3 讨 论

HF是多种心血管疾病严重的终末阶段,以心脏收缩和/或舒张功能障碍为特征,是多因素恶性循环所致的复杂临床综合征。目前,HF在临床上是无法治愈的,一旦确诊,将给家庭和社会带来沉重的负担[12]。因此,探索HF新的治疗策略及潜在靶点至关重要。在HF的复杂病理进程中,miRNA作为一类重要的转录后调控因子,其表达谱的失调已被广泛证实能够参与心肌重构、细胞凋亡及纤维化等关键环节[13-14]。其中,miR-101-3p作为miRNA家族成员,近年来在心血管疾病领域备受关注。已有研究表明,miR-101-3p在老年心肌梗死患者血清中表达下调[15],而在压力负荷诱导的心脏衰老模型中表达上调,并可增加心肌纤维化和炎症反应,从而加重心肌病[16]。这均说明miR-101-3p可成为治疗心血管疾病的潜在靶点。然而,其在HF中的具体功能尚不明确。本研究通过TAC术建立HF小鼠模型,结果发现,miR-101-3p在HF小鼠心脏组织中显著上调,这可能与miR-101-3p在不同心血管疾病中作用机制差异有关[17]。此外,通过心功能分析发现,抑制miR-101-3p可提高LVEF和FS,降低IVS、LVPW、LV mass/BW,提示抑制miR-101-3p可改善HF小鼠心功能损伤,该途径可能成为HF治疗的有效靶点。

HF的核心病理特征之一是因终末分化心肌细胞的不可逆死亡而导致的心肌细胞数量减少[18]。因此,从细胞死亡的角度探究HF的发病机制至关重要。铁死亡作为一种铁依赖性的新型细胞死亡方式,以脂质过氧化与ROS爆发为特征。心肌细胞中Fe^{2+}异常积聚可催化脂质过氧化,直接损伤细胞结构,最终诱发心肌肥大与心功能障碍[19]。铁死亡的发生受到包括GSH代谢、氧化应激和铁稳态在内的多种途径的调控[20]。其中,GPX4是关键抗氧化酶,其失活是铁死亡的核心事件[21]。MDA则反映机体脂质过氧化损伤程度[22]。本研究结果显示,TAC诱导的HF小鼠心肌组织Fe^{2+}、MDA明显增加,GSH、GPX4下降,提示HF后发生铁死亡。一项基于肺癌的生物信息学分析发现miR-101-3p是参与调控铁死亡相关基因表达的miRNA[23]。在脑缺血再灌注损伤模型中发现,miR-101-3p可通过靶向Piezo1调控神经元铁死亡[24]。本研究还发现,抑制miR-101-3p可减轻TAC诱导的心肌细胞铁死亡,提示miR-101-3p可能通过促进铁死亡参与HF的发展。

为阐明miR-101-3p在HF中介导铁死亡的具体机制,本研究聚焦于其潜在靶点DUSP1。本研究双荧光素酶报告基因实验证实,DUSP1是miR-101-3p的直接靶基因,二者表达呈负相关,这与既往在损伤模型中的发现一致[25]。近来研究也表明,在脓毒症诱导的心肌损伤模型中miR-101-3p下调可通过上调DUSP1的表达来发挥心肌保护作用[26]。DUSP1也被称为丝裂原活化蛋白激酶磷酸酶-1(mitogen-activated protein kinase phosphatase-1,MKP-1),是c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase,JNK)信号通路的关键负调控因子,可参与miRNAs介导的多种疾病进展,对心脏具有明确保护作用[27]。研究表明,DUSP1过表达可改善心功能障碍[28],而降低其表达则会导致心脏线粒体功能失调,加重HF[29]。此外,DUSP1与铁死亡密切相关,可通过抑制脂质过氧化[30]、减少活性氧积累[31]以及调节丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase,MAPK)通路来抑制铁死亡[10]。基于上述依据,推测miR-101-3p可能通过靶向抑制DUSP1来诱发铁死亡。挽救实验结果显示,敲低DUSP1可部分逆转miR-101-3p下调对HF小鼠的心肌保护作用,并重新激活心肌细胞铁死亡。提示抑制miR-101-3p可能通过上调DUSP1的表达抑制HF小鼠的心肌细胞铁死亡。

综上所述,miR-101-3p通过靶向抑制DUSP1促进HF中的铁死亡,提示基于抑制miR-101-3p的干预策略可能成为治疗HF的新途径。但本研究仅探讨了miR-101-3p/DUSP1途径在HF中的作用,后续将结合其上下游通路并结合细胞实验进行更深入研究,为HF的治疗提供新的思路和依据。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突

作者贡献声明 孟素艳:研究方案设计、实施研究、分析数据、论文修改,论文撰写;张琳:数据收集;马亮:实验技术指导

参 考 文 献

[1] Heidenreich PA, Bozkurt B, Aguilar D, et al. 2022 AHA/ACC/HFSA guideline for the management of heart failure: a report of the

American college of cardiology/American heart association joint committee on clinical practice guidelines[J]. Circulation, 2022, 145(18): 895-1032.

[2] Ho JSY, Jou E, Khong PL, et al. Epigenetics in heart failure[J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(22): 12010.

[3] Dixon SJ, Olzmann JA. The cell biology of ferroptosis[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2024, 25(6): 424-442.

[4] Li KY, Liu P, Han LY, et al. Elucidating ferroptosis mechanisms in heart failure through transcriptomics, single-cell sequencing, and experimental validation[J]. Cell Signal, 2024, 124: 111416.

[5] Zheng HY, Shi L, Tong CC, et al. circSnx12 is involved in ferroptosis during heart failure by targeting miR-224-5p[J]. Front Cardiovasc Med, 2021, 8: 656093.

[6] Xue PC, Liu Y, Wang HF, et al. miRNA-103-3p-Hlf regulates apoptosis and autophagy by targeting hepatic leukaemia factor in heart failure[J]. ESC Heart Fail, 2023, 10(5): 3038-3045.

[7] Su Y, Sun YX, Tang YS, et al. Circulating miR-19b-3p as a novel prognostic biomarker for acute heart failure[J]. J Am Heart Assoc, 2021, 10(20): e022304.

[8] Wang RT, Huang K, Feng YH, et al. Exo-miR-144-3p as a promising diagnostic biomarker for depressive symptoms in heart failure[J]. Neurobiol Dis, 2024, 192: 106415.

[9] Wagh V, Nguemo F, Kiseleva Z, et al. Circulating microRNAs and cardiomyocyte proliferation in heart failure patients related to 10 years survival[J]. ESC Heart Fail, 2023, 10(6): 3559-3572.

[10] Ma SY, Zhang XD, Fan JX, et al. Exosomal circ_0093708 as a potential ferroptosis biomarker in cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. Front Neurol, 2025, 16: 1633393.

[11] Luo YT, Deng X, Chen QY, et al. Up-regulation of miR-155 protects against chronic heart failure by inhibiting HIF-1α[J]. Am J Transl Res, 2023, 15(11): 6425-6436.

[12] Wu Y, Song MY, Wu MF, et al. Advances in device-based treatment of heart failure with preserved ejection fraction: evidence from clinical trials[J]. ESC Heart Fail, 2024, 11(1): 13-27.

[13] Liu XJ, Li HB, Hastings MH, et al. miR-222 inhibits pathological cardiac hypertrophy and heart failure[J]. Cardiovasc Res, 2024, 120(3): 262-272.

[14] Luo YS, Gu WJ, Pan Z, et al. MiR-1 alleviates chronic heart failure through HCN2/HCN4 axis *in vitro*[J]. Tissue Cell, 2025, 95: 102921.

[15] 谢田田, 赵春虎, 袁文生, 等. 老年急性ST段抬高型心肌梗死患者血清lnc-MALAT1、miR-101-3p水平与心功能分级及短期预后的相关性[J]. 中国老年学杂志, 2024, 44(16): 3841-3844.

Xie TT, Zhao CH, Yuan WS, et al. Correlation between serum lnc-MALAT1 and miR-101-3p levels and cardiac function classification and short-term prognosis in elderly patients with acute ST-segment elevation myocardial infarction[J]. Chin J Gerontol, 2024, 44(16): 3841-3844.

[16] Das S, Das M, Chakraborty S, et al. MiR-101-3p promotes cardiac senescence and inflammation *via* targeting Tbx20 and Bmp2 to perturb cardiac homeostasis[J]. J Cell Physiol, 2025, 240(12): e70122.

[17] 庞志华, 刘丽美, 姚朱华. miR-101-3p的生物学功能及其在心血管疾病中的研究进展[J]. 天津医药, 2025, 53(11): 1223-1227.

Pang ZH, Liu LM, Yao ZH. Research progress of biological functions of miR-101-3p in cardiovascular diseases[J]. Tianjin Med J, 2025, 53(11): 1223-1227.

[18] Jiang Y, Song SS, Liu JX, et al. Epigenetic regulation of programmed cell death in hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension [J]. Front Immunol, 2023, 14: 1206452.

[19] Wu XG, Li Y, Zhang SC, et al. Ferroptosis as a novel therapeutic target for cardiovascular disease[J]. Theranostics, 2021, 11(7): 3052-3059.

[20] Cheng PP, Wang XT, Liu Q, et al. LuQi formula attenuates Cardiomyocyte ferroptosis *via* activating Nrf2/GPX4 signaling axis in heart failure[J]. Phytomedicine, 2024, 125: 155357.

[21] Xu X, Xu XD, Ma MQ, et al. The mechanisms of ferroptosis and its role in atherosclerosis[J]. Biomed Pharmacother, 2024, 171: 116112.

[22] Pagan LU, Gomes MJ, Martinez PF, et al. Oxidative stress and heart failure: mechanisms, signalling pathways, and therapeutics[J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 9829505.

[23] Jiang XL, Yuan YX, Tang L, et al. Systematic analysis and validation of the prognosis, immunological role and biology function of the ferroptosis-related lncRNA GSEC/miRNA-101-3p/CISD1 axis in lung adenocarcinoma[J]. Front Mol Biosci, 2022, 8: 793732.

[24] 王瑞华. 植物乳杆菌外囊泡通过miR-101a-3p靶向Piezo1调控脑缺血再灌注损伤后神经元铁死亡的作用研究[D]. 贵阳: 贵州医科大学, 2025.

Wang RH. *Lactobacillus* plantarum-derived extracellular vesicles modulate neuronal ferroptosis in cerebral ischemia reperfusion injury by targeting Piezo1 *via* miR-101a-3p[D]. Guiyang: Guizhou Medical University, 2025.

[25] Liu LP, Zhang J, Pu B, et al. Upregulation of JHDM1D-AS1 alleviates neuroinflammation and neuronal injury *via* targeting miR-101-3p-DUSP1 in spinal cord after brachial plexus injury[J]. Int Immunopharmacol, 2020, 89: 106962.

[26] Xin Y, Tang L, Chen J, et al. Inhibition of miR-101-3p protects against sepsis-induced myocardial injury by inhibiting MAPK and NF-κB pathway activation *via* the upregulation of DUSP1[J]. Int J Mol Med, 2021, 47(3): 4853.

[27] Grabarek BO, Dąbala M, Kasela T, et al. Changes in the expression pattern of DUSP1-7 and miRNA regulating their expression in the keratinocytes treated with LPS and adalimumab[J]. Curr Pharm Biotechnol, 2022, 23(6): 873-881.

[28] Li J, Wan T, Liu C, et al. ANGPTL2 aggravates LPS-induced septic cardiomyopathy *via* NLRP3-mediated inflammasome in a DUSP1-dependent pathway[J]. Int Immunopharmacol, 2023, 123: 110701.

[29] Pu XY, Zhang Q, Liu JF, et al. Ginsenoside Rb1 ameliorates heart failure through DUSP-1-TMBIM-6-mediated mitochondrial quality control and gut flora interactions[J]. Phytomedicine, 2024, 132: 155880.

[30] Yu JL, Li H, Huang C, et al. Identification and characterization of ferroptosis-related genes in therapy-resistant gastric cancer[J]. Medicine, 2024, 103(20): e38193.

[31] Hocsak E, Szabo V, Kalman N, et al. PARP inhibition protects mitochondria and reduces ROS production *via* PARP-1-ATF4-MKP-1-MAPK retrograde pathway[J]. Free Radic Biol Med, 2017, 108: 770-784.

(收稿: 2025-12-09; 修回: 2026-03-10; 录用: 2026-03-26)

(责任编辑: 曾 玲)

本文引用格式:

孟素艳, 张琳, 马亮. miR-101-3p通过抑制DUSP1诱发心力衰竭小鼠心肌细胞铁死亡[J]. 重庆医科大学学报, XXXX, XX(XX): 1-7.