

5' tRF-LysCTT 对小鼠心肌细胞铁死亡的调控作用及其机制

赵炎 王凯 程雪丽 王昆

(青岛大学转化医学研究院, 山东 青岛 266021)

[摘要] 目的 探究 tRNA 衍生的小 RNA (tsRNA) 对小鼠心肌细胞铁死亡的调控作用及其机制。方法 采用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 检测 8 周龄 C57BL/6J 小鼠心脏、肝脏、脾脏、肾脏、大脑、肌肉中 5' tRF-LysCTT 的相对表达水平。将原代心肌细胞分为 A~D 组, A 组细胞使用完全培养基培养 60 h, B 组先使用完全培养基培养 24 h, 再依次进行饥饿处理 12 h, H/R 处理 24 h, C 组和 D 组细胞分别转染 antagomir-NC 和 antagomir-5' tRF-LysCTT, 并于转染 24 h 后再依次进行饥饿 (12 h) 和 H/R 处理 (12 h); 将原代心肌细胞分为 E~G 组, E 组细胞使用完全培养基培养 24 h, F 组细胞转染 agomir-NC 24 h, G 组心肌细胞转染 agomir-5' tRF-LysCTT 24 h。采用 RT-qPCR 检测 A~G 组小鼠心肌细胞中 5' tRF-LysCTT 和 *Ptgs2*、*Gpx4*、*Slc7a11* 的相对表达水平, 分别采用亚铁离子比色法试剂盒、脂质活性氧 (ROS) 染色、CCK8 试剂盒检测 A~G 组小鼠心肌细胞内亚铁离子相对水平、ROS 水平及心肌细胞的存活率, 采用普鲁士蓝染色试剂盒观察 A~G 组小鼠心肌细胞内铁离子沉积情况。结果 RT-qPCR 检测结果显示, 与肝脏、脾脏、肾脏、大脑、肌肉中相比较, 小鼠心脏中 5' tRF-LysCTT 表达水平最高 ($F = 16.21, t = 3.81 \sim 7.93, P < 0.05$)。D 组与 B 组相比, 心肌细胞内 5' tRF-LysCTT 和 *Ptgs2* 相对表达水平降低, *Gpx4* 以及 *Slc7a11* 相对表达水平升高、亚铁离子相对水平和 ROS 水平降低, 心肌细胞的细胞存活率升高 ($t = 3.26 \sim 15.61, P < 0.05$), 细胞内铁离子沉积明显增多, 而 C 组与 B 组相比, 细胞内的上述指标的水平差异无显著性 ($P > 0.05$)。G 组与 E 组相比, 心肌细胞内 5' tRF-LysCTT 和 *Ptgs2* 相对表达水平升高, *Gpx4* 和 *Slc7a11* 相对表达水平降低、亚铁离子相对水平和 ROS 水平升高, 心肌细胞的细胞存活率降低 ($t = 3.57 \sim 91.84, P < 0.05$), 细胞内铁离子沉积明显减少, 而 F 组与 E 组相比, 细胞内的上述指标的水平比较差异无显著性 ($P > 0.05$)。结论 5' tRF-LysCTT 对于小鼠心肌细胞铁死亡具有调控作用, 敲低细胞内 5' tRF-LysCTT 可以抑制 H/R 诱导的心肌细胞铁死亡, 而过表达 5' tRF-LysCTT 可促进心肌细胞铁死亡的发生。

[关键词] RNA, 转移; RNA, 非翻译小片段; 低氧; 心肌再灌注损伤; 肌细胞, 心脏; 铁死亡

[中图分类号] R329.2; R542.2 **[文献标志码]** A

Regulatory effect of 5' tRF-LysCTT on ferroptosis in mouse cardiomyocytes and its mechanism ZHAO Yan, WANG Kai, CHENG Xueli, WANG Kun (Institute of Translational Medicine, Qingdao University, Qingdao 266021, China)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the regulatory effect of tRNA-derived small RNA (tsRNA) on ferroptosis in mouse cardiomyocytes and its mechanism. **Methods** RT-qPCR was used to measure the relative expression level of 5' tRF-LysCTT in the heart, liver, spleen, kidney, brain, and muscle of C57BL/6J mice aged 8 weeks. Primary cultured cardiomyocytes were divided into groups A, B, C, and D; the cardiomyocytes in group A were cultured in a complete medium for 60 h; those in group B were cultured in a complete medium for 24 h, followed by starvation treatment for 12 h and H/R treatment for 24 h; those in groups C and D were transfected with antagomir-NC and antagomir-5' tRF-LysCTT, respectively, and were given starvation treatment (12 h) and H/R treatment (12 h) after 24 h of transfection. Primary cultured cardiomyocytes were divided into groups E, F, and G; the cardiomyocytes in group E were cultured in a complete medium for 24 h; those in group F were transfected with agomir-NC for 24 h; those in group G were transfected with agomir-5' tRF-LysCTT for 24 h. RT-qPCR was used to measure the relative expression levels of 5' tRF-LysCTT, *Ptgs2*, *Gpx4*, and *Slc7a11* in mouse cardiomyocytes of groups A~G; ferrous ion colorimetric test kit, lipid reactive oxygen species (ROS) staining, and CCK8 assay kit were used to measure the relative content of ferrous ions, ROS level, and the survival rate of cardiomyocytes in groups A~G; Prussian blue staining was used to observe iron ion deposition in cardiomyocytes. **Results** RT-qPCR showed that the expression level of 5' tRF-LysCTT in heart was significantly higher than that in the liver, spleen, kidney, brain, and muscle ($F = 16.21, t = 3.81 \sim 7.93, P < 0.05$). Compared with group B, group D had significant reductions in the relative expression levels of 5' tRF-LysCTT and *Ptgs2*, significant increases in the relative expression levels of *Gpx4* and *Slc7a11*, significant reductions in the relative content of ferrous ions and ROS level, and a significant increase in the survival rate of cardiomyocytes ($t = 3.26 \sim 15.61, P < 0.05$), as well as a significant increase in iron ion deposition in cardiomyocytes, while there were no significant differences in the above

[收稿日期] 2023-11-27; **[修订日期]** 2024-02-09

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目 (82070313)

[通讯作者] 王昆, Email: wangk696@qdu.edu.cn

increase in the survival rate of cardiomyocytes ($t = 3.26 \sim 15.61, P < 0.05$), as well as a significant increase in iron ion deposition in cardiomyocytes, while there were no significant differences in the above

indicators between group C and group B ($P>0.05$). Compared with group E, group G had significant increases in the relative expression levels of 5'tRF-LysCTT and *Ptgs2*, significant reductions in the relative expression levels of *Gpx4* and *Slc7a11*, significant increases in the relative content of ferrous ions and ROS level, and a significant reduction in the survival rate of cardiomyocytes ($t=3.57-91.84, P<0.05$), as well as a significant reduction in iron ion deposition in cardiomyocytes, while there were no significant differences in the above indicators between group F and group E ($P>0.05$). **Conclusion** 5'tRF-LysCTT can regulate ferroptosis in mouse cardiomyocytes, and knockdown of 5'tRF-LysCTT can inhibit cardiomyocyte ferroptosis induced by H/R, while overexpression of 5'tRF-LysCTT can promote cardiomyocyte ferroptosis.

[KEY WORDS] RNA, transfer; RNA, small untranslated; Hypoxia; Myocardial reperfusion injury; Myocytes, cardiac; Ferroptosis

缺血性心脏病是一种死亡率很高的心血管疾病^[1],临床常用的治疗方式是再灌注治疗,但可能会引起心肌细胞的缺血再灌注损伤,这也是目前临床中亟待解决的难题。研究发现,心肌细胞中 tRNA 衍生的小 RNA(tsRNA)与心血管疾病息息相关,通过调节 RNA 结合蛋白^[2]、诱导表观遗传修饰^[3]等方式参与各种心血管疾病的发生。作为一种新型 tsRNA,研究发现 5'tRF-LysCTT 在心肌缺血大鼠心肌细胞中表达上调,推测其参与心肌缺血性损伤的机制可能与大分子代谢有关^[4],提示 tsRNA 也许可以成为心血管疾病的潜在诊断标志物。

铁死亡由 DIXON 等^[5]于 2012 年首次提出,是一种铁依赖性脂质过氧化的细胞死亡过程。心肌细胞缺血再灌注损伤发生时与心肌细胞铁死亡发生时的特征一致^[6]。目前研究表明,心力衰竭时 *GPX4* 下调也会引起心肌细胞的铁死亡^[7],而 tsRNA 可能会影响 *GPX4*、*SLC7A11* 等与铁死亡相关的蛋白合成^[8],但目前有关 tsRNA 在心肌细胞铁死亡过程中的调控作用及其具体机制尚不明确。本研究通过敲低和过表达原代心肌细胞中的 5'tRF-LysCTT,探究 5'tRF-LysCTT 对缺氧/复氧(H/R)诱导的心肌细胞铁死亡的调控作用,为心肌细胞缺血再灌注损伤的治疗提供理论参考。

1 材料与方 法

1.1 材料来源

1~3 日龄乳鼠(青岛大任富城畜牧有限公司),8 周龄 C57BL/6J 小鼠(济南朋悦实验动物繁育有限公司),实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)试剂盒(上海翌圣生物科技股份有限公司),特异性 antagomir/agomir 以及其阴性对照(NC)(上海吉玛制药技术有限公司),亚铁离子比色法试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司),C11 BODIPY 581/591 脂质过氧化荧光探针(武汉爱博泰克生物科技股份有限公司),普鲁士蓝染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司),CCK8 试剂盒及其试剂(上海陶术生物科技有

限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 原代心肌细胞和小鼠组织的获取 乳鼠断颈处死后,无菌条件下取出心脏,PBS 洗涤 3 次。剪碎心脏组织置于锥形瓶中,用含胶原酶和胰液素的消化液(现用现配)37 °C 下消化至无明显组织块。收集含细胞的消化液以 1 000 r/min 离心 5 min,用 DMEM-F12 完全培养基重悬细胞沉淀。过滤细胞混悬液至培养皿,在细胞培养箱内静置 1.5 h 后,以 1 000 r/min 离心 5 min,用 DMEM-F12 完全培养基重悬细胞沉淀,接种至新的细胞培养皿培养。

将 3 只 8 周龄 C57BL/6J 小鼠以乙醚气雾麻醉后,断颈处死,剥离出心脏、肝脏、脾脏、肾脏、大脑、肌肉等组织器官,于-80 °C 保存备用。

1.2.2 细胞培养与分组处理 将原代心肌细胞接种于细胞 6 孔板、24 孔板、96 孔板、10 cm 培养皿中,用 DMEM-F12 完全培养基(含 5% FBS 和 1% 双抗)于 37 °C 含体积分数 0.05 CO₂ 细胞培养箱内培养 24 h。待细胞密度约达 60% 时分为 A~D 组, A 组细胞使用 DMEM-F12 完全培养基培养 60 h; B 组细胞先使用 DMEM-F12 完全培养基培养 24 h, C、D 组参照 Lipo8000 说明书分别转染 antagomir-NC、antagomir-5'tRF-LysCTT 24 h,后 B~D 组更换为无糖无血清培养基继续培养 12 h,置于厌氧培养箱中缺氧处理 18 h,再更换为 DMEM-F12 完全培养基复氧培养 6 h。将细胞密度约达 60% 时的原代心肌细胞分为 E~G 组, E 组用 DMEM-F12 完全培养基培养 24 h, F 组转染 agomir-NC 24 h, G 组转染 agomir-5'tRF-LysCTT 24 h。

1.2.3 RT-qPCR 检测小鼠各器官组织中 5'tRF-LysCTT 的相对表达水平以及心肌细胞中 5'tRF-LysCTT、*Ptgs2*、*Gpx4*、*Slc7a11* 的相对表达水平 将接种于 6 孔板中处理结束后的 A~G 组细胞,使用 Trizol 试剂提取细胞中的 RNA。将细胞中提取的 RNA 按照反转录试剂盒说明书的要求进行反转录。以 cDNA 为模板,进行 RT-qPCR。每组设置 3

个复孔,实验重复 3 次,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算心肌细胞中 5' tRF-LysCTT (U6 作为内参) 及 *Ptgs2*、*Gpx4*、*Slc7a11* (GAPDH 为内参) 的相对表达水平。取各组小鼠的内脏器官组织置于 EP 管中,加入组织研磨珠及 Trizol 试剂,研磨以后提取组织中的 RNA,按照上面的方法,检测各器官组织中 5' tRF-LysCTT 的相对表达水平。引物名称及序列见表 1。

表 1 引物名称及其序列

名称	序列	长度 (bp)
5' tRF-LysCTT-F	5'-GGCCCGCTAGCTCAGT-3'	17
5' tRF-LysCTT-R	5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTATT-3'	20
Ptgs2-F	5'-TGGGGGAAGAAATGTGCCAA-3'	20
Ptgs2-R	5'-CAGCCATTTCTTCTCTCCTGT-3'	22
Gpx4-F	5'-GCCTGGATAAGTACAGGGGTT-3'	21
Gpx4-R	5'-CATGCAGATCGACTAGCTGAG-3'	21
Slc7a11-F	5'-GGCACCGTCATCGGATCAG-3'	19
Slc7a11-R	5'-CTCCACAGGCAGACCAGAAAA-3'	21
U6-F	5'-CTTCGGCAGCACATATACTAA-3'	21
U6-R	5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'	20
GAPDH-F	5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTTG-3'	21
GAPDH-R	5'-TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA-3'	23

1.2.4 心肌细胞中亚铁离子相对水平检测 将接种于直径 10 cm 培养皿中处理结束后的 A~G 组细胞收集于 EP 管中,加入裂解液冰浴裂解细胞,取上清液和显色液混合,于 37 °C 下水浴 10 min 后,以 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液按照说明书要求的步骤,检测各组细胞中亚铁离子相对水平。实验重复 3 次,结果取均值。

1.2.5 心肌细胞中 ROS 水平检测 将接种于 24 孔板中处理结束后的 A~G 组细胞,用 PBS 洗涤 3 次后,每孔中加入 C11 BODIPY 581/591 探针染液 100 μ L,染色 1 h,吸出染液,用 PBS 洗涤 3 次;加入 100 μ L DAPI 染色 5 min,用 PBS 洗涤 3 次后封片。使用普通荧光显微镜采集相关图像,用 Image J 软件测量计算相对荧光强度。以相对荧光强度表示细胞中 ROS 水平。实验重复 3 次,结果取均值。

1.2.6 CCK8 检测心肌细胞的细胞存活率 将接种于 96 孔板中处理结束后的 A~G 组细胞,吸除培养基,按照 1 : 9 的比例配制 CCK8 试剂与 DMEM-F12 培养基的混合培养液,取 100 μ L 混合培养液加入各孔中,37 °C 下培养 2~4 h,用酶标仪检测波长 450 nm 处吸光度,计算细胞存活率。细胞存活率 = (实验组吸光度均值 - 空白组吸光度均值) / (对照组吸光度均值 - 空白组吸光度均值) \times 100%。

1.2.7 普鲁士蓝染色观察心肌细胞内铁离子的沉

积情况 将接种于 10 cm 培养皿中处理结束后的 A~G 组细胞,用 PBS 洗涤 3 次,以 4% 多聚甲醛固定 10~20 min,普鲁士蓝染色液染色 30 min,核固红染色液染色 5 min。在梯度乙醇和二甲苯中各浸泡 10 s 后,滴加中性树脂封片,待树脂凝固后于显微镜下观察并拍照。

1.3 统计学分析

使用 Graphpad Prism 软件进行统计学分析,计量结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间差异比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 小鼠各器官组织中 5' tRF-LysCTT 表达情况

RT-qPCR 检测结果显示,小鼠心脏、肝脏、脾脏、肾脏、大脑、肌肉组织当中的 5' tRF-LysCTT 相对表达水平分别为 1.01 ± 0.18 、 0.28 ± 0.13 、 0.18 ± 0.03 、 0.19 ± 0.05 、 0.01 ± 0.01 、 0.53 ± 0.29 , 5' tRF-LysCTT 在心脏组织中的表达最高 ($F = 16.21$, $t = 3.81 \sim 7.93$, $P < 0.05$)。

2.2 敲低 5' tRF-LysCTT 对 H/R 诱导的心肌细胞铁死亡的影响

A~D 组原代心肌细胞中 5' tRF-LysCTT、*Ptgs2*、*Gpx4*、*Slc7a11* 的相对表达水平,亚铁离子相对水平,ROS 水平及细胞存活率比较,均有显著性差异 ($F = 15.50 \sim 368.70$, $P < 0.05$)。与 B、C 组相比,D 组细胞中 5' tRF-LysCTT、*Ptgs2* 相对表达水平明显下调,*Gpx4*、*Slc7a11* 相对表达水平明显上调,亚铁离子相对水平、ROS 水平显著下降,细胞存活率显著升高 ($t = 2.73 \sim 15.61$, $P < 0.05$); 与 B 组相比,A 组细胞的上述指标差异显著 ($t = 5.30 \sim 28.96$, $P < 0.05$),而 C 组细胞上述指标差异无显著性 ($P > 0.05$)。见表 2。与 B 组相比较,D 组细胞内铁离子沉积明显减少(图 1),图中箭头所指的蓝点即为染色的铁离子。

2.3 过表达 5' tRF-LysCTT 对心肌细胞铁死亡的影响

E~G 组原代心肌细胞当中 5' tRF-LysCTT、*Ptgs2*、*Gpx4*、*Slc7a11* 的相对表达水平,亚铁离子相对水平,ROS 水平及细胞存活率比较,有显著性差异 ($F = 9.99 \sim 5\ 329.00$, $P < 0.05$)。与 E、F 组相比,G 组细胞中 5' tRF-LysCTT、*Ptgs2* 相对表达水平明显上调,*Gpx4*、*Slc7a11* 相对表达水平明显下调,亚铁离子相对水平、ROS 水平显著上升,细胞存

活率明显降低($t = 3.57 \sim 91.84, P < 0.05$); 与 E 组相比, F 组细胞上述指标差异无显著性($P > 0.05$)。

见表 3。与 E 组相比, G 组细胞内铁离子沉积明显增多(图 2), 图中箭头所指蓝点即为染色的铁离子。

表 2 A~D 组心肌细胞 5'tRF-LysCTT 等相对表达水平及铁死亡相关指标等的比较 ($n = 3, x \pm s$)

组别	5'tRF-LysCTT 水平	<i>Ptgs2</i> 水平	<i>Gpx4</i> 水平	<i>Slc7a11</i> 水平	亚铁离子水平	ROS 水平	细胞存活率 (%)
A 组	1.00±0.13	1.00±0.19	1.00±0.04	1.00±0.13	0.96±0.06	1.00±0.12	98.71±1.02
B 组	2.86±0.17	2.40±0.41	0.34±0.02	0.43±0.01	3.70±0.16	14.73±1.41	64.52±2.23
C 组	2.51±0.19	2.27±0.33	0.21±0.02	0.47±0.02	3.56±0.11	16.61±3.52	68.89±1.48
D 组	1.44±0.19	1.13±0.31	0.68±0.11	0.63±0.05	2.22±0.09	7.52±0.89	80.85±1.82

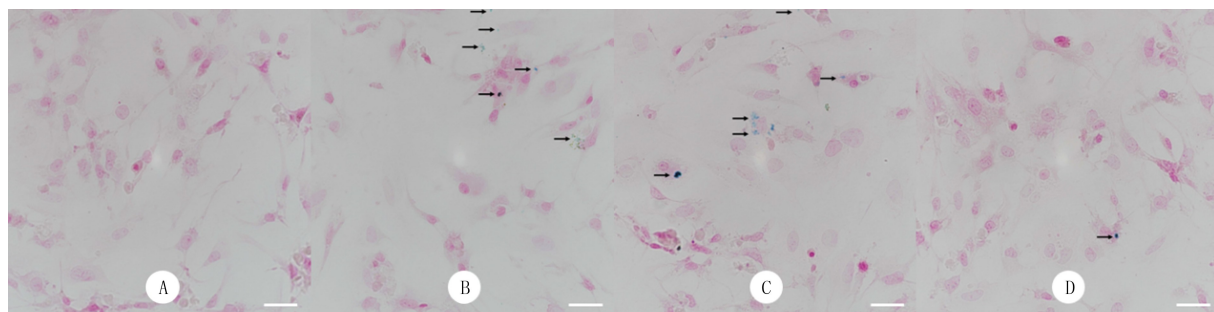


图 1 A~D 组原代心肌细胞普鲁士蓝染色结果(400 倍)

表 3 E~G 组心肌细胞 5'tRF-LysCTT 等相对表达水平及铁死亡相关指标等的比较 ($n = 3, x \pm s$)

组别	5'tRF-LysCTT 水平	<i>Ptgs2</i> 水平	<i>Gpx4</i> 水平	<i>Slc7a11</i> 水平	亚铁离子水平	ROS 水平	细胞存活率 (%)
E 组	1.02±0.21	1.00±0.08	1.00±0.05	1.00±0.16	1.00±0.01	1.00±0.08	98.82±0.54
F 组	1.03±0.36	0.79±0.12	0.94±0.08	1.08±0.20	0.89±0.01	0.92±0.03	96.81±0.63
G 组	2.91±0.53	3.09±0.50	0.69±0.03	0.52±0.12	2.23±0.08	9.65±1.26	62.96±0.06

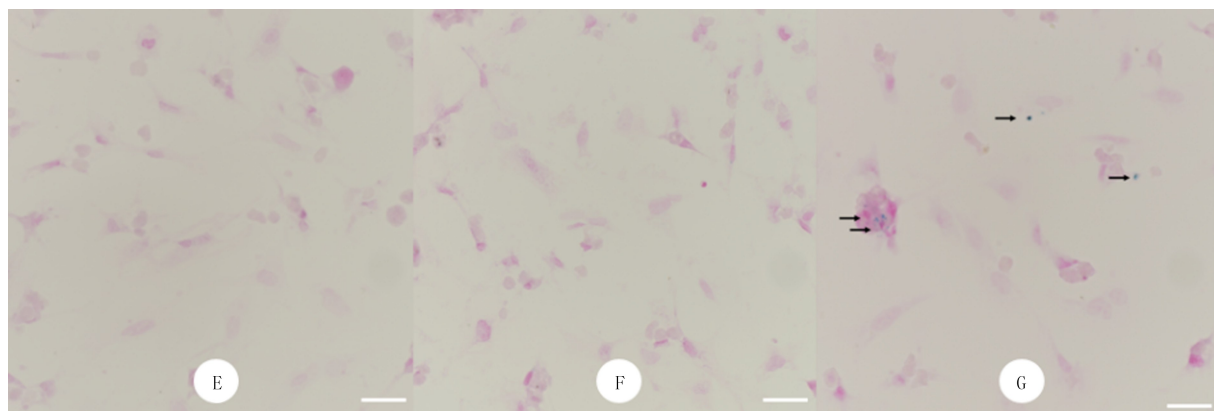


图 2 E~G 组原代心肌细胞普鲁士蓝染色结果(400 倍)

3 讨 论

在我国缺血性心脏病患病率较高, 并呈逐年上升和年轻化趋势, 及时预防和治疗, 对患者生活质量的保障及寿命的延长至关重要^[9], 建立有效的预防和治疗机制是降低心血管疾病发生的重要措施^[10]。血液供应不足的心肌组织, 再灌注恢复血液后^[11], 会引发心肌细胞坏死^[1]、凋亡^[12]、铁死亡^[13], 导致大量心肌细胞死亡。

tsRNA 作为新型非编码小 RNA, 分为 tiRNA

和 tRF 两类^[14], 对细胞增殖^[15]、凋亡^[16]及细胞内蛋白质翻译^[17]等均有影响, 参与肿瘤^[18]、神经疾病^[19]等多种疾病的发生和发展。机体的衰老、代谢紊乱等都可能诱导 tsRNA 的产生^[20]。tsRNA 在心肌肥大^[21]、动脉粥样硬化^[22]、主动脉夹层^[23]等疾病发生过程中发挥调控作用。SHEN 等^[21]研究发现, 在异丙肾上腺素诱导的大鼠心脏肥大模型中, 心脏组织中 tRF 会发生特异性分裂, 促进心肌细胞的心钠素、脑钠肽、 β -肌球蛋白重链的表达。在皮下注射异丙肾上腺素致心肌肥大模型大鼠中, 心肌细胞内的

tRF 表达显著增高,其子代小鼠的心脏组织中也同样高表达 tRF,同时子代大鼠还伴有心肌细胞凋亡、心肌纤维断裂、心脏组织内肥大基因表达水平升高等情况^[21]。以上研究表明,tsRNA 在心肌细胞铁死亡过程中发挥着关键性作用,但具体机制尚不明确。本研究通过预实验发现,在小鼠心脏缺血再灌注损伤模型中,有多个显著差异表达的 tsRNA,但是 5'tRF-LysCTT 异常表达程度较高。以此为基础,本研究通过检测 5'tRF-LysCTT 在正常小鼠不同组织中的表达水平,发现与肝脏、脾脏、肾脏、大脑、肌肉组织相比,5'tRF-LysCTT 在心脏组织中表达峰度最高,进一步表明 5'tRF-LysCTT 可能与心肌细胞存在一定的关联。

铁死亡是一种程序性细胞死亡,主要特点为细胞内铁离子稳态失衡,细胞内的 ROS 和脂质过氧化物显著增多^[24]。心肌细胞铁死亡时会产生过量的游离铁离子,这些铁离子能通过芬顿反应增加羟基自由基的产生,引起心肌细胞内 ROS 水平升高,对心肌细胞造成氧化损伤^[25]。正常情况下,胱氨酸可通过胱氨酸/谷氨酸逆向转运系统(由 SLC7A11 和 SLC3A2 两种亚基组成)转移至细胞内合成谷胱甘肽,GPX-4(谷胱甘肽依赖酶)可将谷胱甘肽转化为氧化型谷胱甘肽,进而清除细胞呼吸和代谢过程中产生的过量过氧化物和羟自由基^[26]。在心肌细胞内,谷胱甘肽的耗竭和 GPX4 活性降低,使脂质过氧化物不能通过 GPX4 转化为脂醇,致心肌细胞内产生过多的铁蛋白和 ROS,从而导致心肌细胞发生铁死亡^[27]。心肌细胞缺血再灌注损伤发生时与心肌细胞铁死亡发生时的特征一致,即均存在 ROS 水平升高及游离铁离子增多^[28],由此可以推测心肌细胞缺血再灌注损伤时也发生了铁死亡。为了验证心肌缺血再灌注损伤会诱导铁死亡的发生,本研究通过 H/R 处理原代心肌细胞以模拟心肌缺血再灌注损伤,结果显示,与 A 组细胞相比,B 组心肌细胞中亚铁离子含量明显上调,ROS 水平明显增强,铁离子沉积明显增多,细胞存活率下降,表明 H/R 处理后原代心肌细胞发生铁死亡。同时本研究还发现,经 H/R 处理后的心肌细胞中 *Ptgs2* 相对表达水平明显上调,*Gpx4* 和 *Slc7a11* 相对表达水平明显下调。研究显示,对心脏缺血再灌注小鼠采用利普洛司他汀-1(铁死亡抑制剂)处理,发现小鼠心脏组织中的 GPX4 蛋白水平较处理前显著升高,心肌细胞线粒体中 ROS 也较处理前显著降低^[29],说明利普洛司他汀-1 通过抑制心肌细胞铁死亡,提升了心肌细胞

中 GPX4 蛋白水平,保护心肌细胞免受缺血再灌注损伤。有研究对 C75BL/6 小鼠的心脏进行缺血再灌注(30 min/24 h)手术后,提取小鼠心脏组织中的 RNA,发现与假手术组相比,手术组小鼠心脏组织中 *Ptgs2* 表达水平明显升高;如果小鼠术前 24 h 或 2 h 分别给予铁蛋白抑制剂或铁螯合剂预处理后再进行缺血再灌注手术,结果显示与手术组小鼠相比,术前预处理组小鼠的心肌梗死面积显著减少^[30]。本研究的结果与上述文献报道结果一致,说明心肌细胞铁在死亡发生时,其细胞内的 *Ptgs2* 表达水平会出现明显上调,*Gpx4* 和 *Slc7a11* 表达水平明显下调。

为进一步探讨 5'tRF-LysCTT 在 H/R 诱导心肌细胞发生铁死亡过程中的生物学功能,本研究通过转染 antagomir-5'tRF-LysCTT,以敲低心肌细胞中 5'tRF-LysCTT 的水平,结果显示,敲低心肌细胞中的 5'tRF-LysCTT 后,与 B、C 组相比,D 组心肌细胞中亚铁离子含量下调,ROS 水平降低,铁离子沉积明显减少,*Ptgs2* 相对表达水平下调,*Gpx4* 和 *Slc7a11* 相对表达水平上调,细胞存活率升高。然后本研究又通过转染 agomir-5'tRF-LysCTT,以过表达心肌细胞中的 5'tRF-LysCTT 水平,结果显示,与 E、F 组相比,G 组心肌细胞中亚铁离子含量明显上调,ROS 水平明显升高,铁离子沉积增多,*Ptgs2* 相对表达水平明显上调,*Gpx4* 和 *Slc7a11* 相对表达水平明显下调,细胞存活率降低。提示 5'tRF-LysCTT 可能对心肌细胞的铁死亡具有调控作用。

综上所述,H/R 会诱导心肌细胞发生铁死亡,敲低 5'tRF-LysCTT 会抑制 H/R 诱导的心肌细胞铁死亡,过表达 5'tRF-LysCTT 能促进心肌细胞发生铁死亡,5'tRF-LysCTT 可能对心肌细胞的铁死亡具有调控作用,由此可以推测,5'tRF-LysCTT 或许可以成为治疗心肌缺血再灌注损伤的新靶点。后续将通过质谱分析寻找 5'tRF-LysCTT 的下游靶点,探索 5'tRF-LysCTT 与下游靶分子共同调控心肌细胞铁死亡的作用及其机制,为临床研究提供参考依据。

伦理批准和动物权利声明:本研究涉及的所有实验均已通过青岛大学实验动物福利伦理委员会的审核批准(文件号 20220305C5790-20240601003)。所有实验过程均遵照《实验动物福利伦理原则》的条例进行。

作者声明:赵炎、王凯、程雪雨参与了研究设计;赵炎、王昆参与了论文的写作和修改。所有作者均阅读并同意发表该论文,且均声明不存在利益冲突。

[参考文献]

- [1] ADAMEOVA A, HORVATH C, ABDUL-GHANI S, et al. Interplay of oxidative stress and necrosis-like cell death in cardiac ischemia/reperfusion injury: A focus on necroptosis[J]. *Biomedicines*, 2022,10(1):127.
- [2] KIM H K, FUCHS G, WANG S C, et al. A transfer-RNA-derived small RNA regulates ribosome biogenesis[J]. *Nature*, 2017,552(7683):57-62.
- [3] CHEN Q, YAN M H, CAO Z H, et al. Sperm tsRNAs contribute to intergenerational inheritance of an acquired metabolic disorder[J]. *Science*, 2016,351(6271):397-400.
- [4] LIU W J, LIU Y, PAN Z H, et al. Systematic analysis of tRNA-derived small RNAs discloses new therapeutic targets of caloric restriction in myocardial ischemic rats[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020,8:568116.
- [5] DIXON S J, LEMBERG K M, LAMPRECHT M R, et al. Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death[J]. *Cell*, 2012,149(5):1060-1072.
- [6] PAN Y H, WANG X K, LIU X W, et al. Targeting ferroptosis as a promising therapeutic strategy for ischemia-reperfusion injury[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2022,11(11):2196.
- [7] PARK T J, PARK J H, LEE G S, et al. Quantitative proteomic analyses reveal that GPX4 downregulation during myocardial infarction contributes to ferroptosis in cardiomyocytes[J]. *Cell Death Dis*, 2019,10(11):835.
- [8] ZHANG X F, WANG L L, LI H X, et al. Crosstalk between noncoding RNAs and ferroptosis: New dawn for overcoming cancer progression[J]. *Cell Death Dis*, 2020,11(7):580.
- [9] MA L Y, CHEN W W, GAO R L, et al. China cardiovascular diseases report 2018:An updated summary[J]. *J Geriatr Cardiol*, 2020,17(1):1-8.
- [10] ZHAO D, LIU J, WANG M, et al. Epidemiology of cardiovascular disease in China: Current features and implications[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2019,16(4):203-212.
- [11] CHEN Y Q, FAN H Y, WANG S J, et al. Ferroptosis: A novel therapeutic target for ischemia-reperfusion injury[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021,9:688605.
- [12] DING H S, HUANG Y, QU J F, et al. Panaxynol ameliorates cardiac ischemia/reperfusion injury by suppressing NLRP3-induced pyroptosis and apoptosis via HMGB1/TLR4/NF- κ B axis[J]. *Int Immunopharmacol*, 2023,121:110222.
- [13] MA S X, SUN L Y, WU W H, et al. USP22 protects against myocardial ischemia-reperfusion injury via the SIRT1-p53/SLC7A11-dependent inhibition of ferroptosis-induced cardiomyocyte death[J]. *Front Physiol*, 2020,11:551318.
- [14] ANDERSON P, IVANOV P. tRNA fragments in human health and disease[J]. *FEBS Lett*, 2014,588(23):4297-4304.
- [15] KRISHNA S, YIM D G, LAKSHMANAN V, et al. Dynamic expression of tRNA-derived small RNAs define cellular states[J]. *EMBO Rep*, 2019,20(7):e47789.
- [16] SAIKIA M, JOBAVA R, PARI SIEN M, et al. Angiogenin-cleaved tRNA halves interact with cytochrome c, protecting cells from apoptosis during osmotic stress[J]. *Mol Cell Biol*, 2014,34(13):2450-2463.
- [17] IVANOV P, EMARA M M, VILLEN J, et al. Angiogenin-induced tRNA fragments inhibit translation initiation[J]. *Mol Cell*, 2011,43(4):613-623.
- [18] YU M Q, LU B J, ZHANG J S, et al. tRNA-derived RNA fragments in cancer: Current status and future perspectives[J]. *J Hematol Oncol*, 2020,13(1):121.
- [19] BURGESS R W, STORKEBAUM E. tRNA dysregulation in neurodevelopmental and neurodegenerative diseases[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2023,39:223-252.
- [20] CAO J, COWAN D B, WANG D Z. tRNA-derived small RNAs and their potential roles in cardiac hypertrophy[J]. *Front Pharmacol*, 2020,11:572941.
- [21] SHEN L Y, GAN M L, TAN Z D, et al. A novel class of tRNA-derived small non-coding RNAs respond to myocardial hypertrophy and contribute to intergenerational inheritance[J]. *Biomolecules*, 2018,8(3):54.
- [22] HE X Q, YANG Y Y, WANG Q, et al. Expression profiles and potential roles of transfer RNA-derived small RNAs in atherosclerosis[J]. *J Cell Mol Med*, 2021,25(14):7052-7065.
- [23] FU X X, HE X Q, YANG Y Y, et al. Identification of transfer RNA-derived fragments and their potential roles in aortic dissection[J]. *Genomics*, 2021,113(5):3039-3049.
- [24] TANG D L, CHEN X, KANG R, et al. Ferroptosis: Molecular mechanisms and health implications[J]. *Cell Res*, 2021,31(2):107-125.
- [25] VALKO M, JOMOVA K, RHODES C J, et al. Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease[J]. *Arch Toxicol*, 2016,90(1):1-37.
- [26] ZHAO W K, ZHOU Y, XU T T, et al. Ferroptosis: Opportunities and challenges in myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021,2021:9929687.
- [27] ZHANG Y, XIN L Y, XIANG M, et al. The molecular mechanisms of ferroptosis and its role in cardiovascular disease[J]. *Biomed Pharmacother*, 2022,145:112423.
- [28] ZHOU L X, HAN S T, GUO J Y, et al. Ferroptosis——a new dawn in the treatment of organ ischemia-reperfusion injury[J]. *Cells*, 2022,11(22):3653.
- [29] FENG Y S, MADUNGWE N B, IMAM ALIAGAN A D, et al. Liproxstatin-1 protects the mouse myocardium against ischemia/reperfusion injury by decreasing VDAC1 levels and restoring GPX4 levels[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019,520(3):606-611.
- [30] FANG X X, WANG H, HAN D, et al. Ferroptosis as a target for protection against cardiomyopathy[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019,116(7):2672-2680.