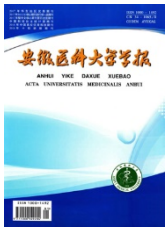

安徽医科大学学报
Acta Universitatis Medicinalis Anhui
ISSN 1000-1492,CN 34-1065/R

《安徽医科大学学报》网络首发论文

题目：LncRNA RMRP 通过调控 miR-766-5p 对氧糖剥夺/再灌注诱导的小鼠 HL-1 心肌细胞铁死亡的影响

作者：何蕾，孙兴兰，吴应兴，许源，彭翔，胡晨恺

网络首发日期：2025-11-13

引用格式：何蕾，孙兴兰，吴应兴，许源，彭翔，胡晨恺．LncRNA RMRP 通过调控 miR-766-5p 对氧糖剥夺/再灌注诱导的小鼠 HL-1 心肌细胞铁死亡的影响[J/OL]．安徽医科大学学报.
https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20251112.1713.020

网络首发时间：2025-11-13 11:10:41　网络首发地址：https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20251112.1713.020

LncRNA RMRP 通过调控 miR-766-5p 对氧糖剥夺/再灌注诱导的小鼠 HL-1 心肌细胞铁死亡的影响

何　蕾[1]，孙兴兰[1]，吴应兴[1]，许　源[2]，彭　翔[3]，胡晨恺[1]

（南昌大学第二附属医院[1]心血管内科、[2]医疗大数据研究中心、[3]信息处，南昌 330006）

摘要 目的 探讨长链非编码 RNA RMRP（LncRNA RMRP）通过调控 miR-766-5p 对氧糖剥夺/再灌注（OGD/R）诱导的小鼠 HL-1 心肌细胞铁死亡的影响及机制。**方法** 体外培养 HL-1 细胞，并构建 OGD/R 模型，qRT-PCR 检测不同再灌注时间点 HL-1 细胞中 LncRNA RMRP 表达水平。将 LncRNA RMRP 小 RNA 干扰片段（si-RMRP）及其阴性对照（si-NC）、miR-766-5p 抑制剂（miR-766-5p inhibitor）及其阴性对照（inhibitor-NC）转染至 HL-1 细胞中，再进行 OGD/R 处理。CCK-8 检测细胞存活率；试剂盒检测细胞上清液中乳酸脱氢酶（LDH）水平及细胞中丙二醛（MDA）、超氧化物歧化酶（SOD）、谷胱甘肽（GSH）和亚铁离子（Fe^{2+}）水平；qRT-PCR 检测细胞中 LncRNA RMRP 和 miR-766-5p 表达水平；Western blot 检测细胞中铁死亡相关蛋白谷胱甘肽过氧化物酶 4（GPX4）、溶质载体家族 7 成员 11（SLC7A11）、铁蛋白重链 1（ferritin FTH1）表达水平；双荧光素酶报告基因实验检测 LncRNA RMRP 与 miR-766-5p 之间的海绵吸附关系。**结果** HL-1 细胞中 LncRNA RMRP 表达水平随着再灌注时间的延长逐渐升高（$P<0.01$）。OGD/R 处理可降低 HL-1 细胞存活率及细胞中 miR-766-5p 表达水平（$P<0.01$）；提高上清液中 LDH 及细胞中 MDA 和 Fe^{2+}含量，抑制细胞中 SOD 和 GSH 活性（$P<0.01$）；同时下调细胞中 GPX4、SLC7A11 和 FTH1 蛋白表达水平（$P<0.01$）。沉默 LncRNA RMRP 可提高 OGD/R 诱导后 HL-1 细胞的存活率及细胞中 miR-766-5p 表达（$P<0.01$）；降低上清液中 LDH 和细胞中 MDA 和 Fe^{2+}含量，增加细胞中 SOD 和 GSH 活性（$P<0.01$）；同时上调细胞中 GPX4、SLC7A11 和 FTH1 蛋白表达水平（$P<0.01$）。双荧光素酶报告基因实验证实，LncRNA RMRP 可海绵吸附调控 miR-766-5p 表达，且抑制 miR-766-5p inhibitor 表达可部分抵消 LncRNA RMRP 沉默对 OGD/R 诱导的 HL-1 细胞铁死亡的改善作用。**结论** 沉默 LncRNA RMRP 可抑制 OGD/R 诱导的 HL-1 细胞铁死亡，其作用机制与海绵吸附调控 miR-766-5p 表达有关。

关键词 氧糖剥夺/再灌注；心肌；HL-1 细胞；铁死亡；长链非编码 RNA RMRP；miR-766-5p

中图分类号　R541

Effect of LncRNA RMRP on ferroptosis induced by oxygen glucose deprivation/reperfusion in mouse HL-1 cardiomyocytes by regulating miR-766-5p

He Lei [1] , Sun Xinglan [1], Wu Yingxing [1], Xu Yuan [2], Peng Xiang [3], Hu Chenkai [1]

([1]*Dept of Cardiology*,[2] *Medical Big Data Research Center*, [3] *Information Dept, The Second Affiliated Hospital, Jiangxi Medical College, Nanchang University, Nanchang* 330006)

基金项目：江西省自然科学基金青年基金项目（编号：20232BAB216008）；中国国家留学基金（编号：202506820050）

作者简介：何　蕾，女，主治医师；

胡晨恺，男，博士，主治医师，通信作者，E-mail：heleincu@163.com

Abstract ***Objective*** To investigate the effect and mechanism of long non-coding RNA RMRP (LncRNA RMRP) on oxygen-glucose deprivation/reperfusion (OGD/R) -induced ferroptosis in mouse HL-1 cardiomyocytes by regulating miR-766-5p. ***Methods*** HL-1 cells were cultured in vitro, and OGD/R models were established. The expression levels of LncRNA RMRP in HL-1 cells at various reperfusion time points were subsequently quantified using qRT-PCR. The LncRNA RMRP small RNA interference fragment (si-RMRP) and its corresponding negative control (si-NC), as well as the miR-766-5p inhibitor and its respective negative control (inhibitor-NC), were transfected into HL-1 cells. Subsequently, the cells were subjected to OGD/R treatment. CCK-8 assay was employed to evaluate cell viability. Assay kits were employed to measure the levels of lactate dehydrogenase (LDH) in the cell supernatant, as well as the intracellular levels of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), glutathione (GSH), and ferrous ion (Fe^{2+}). qRT-PCR analysis was conducted to assess the expression levels of LncRNA RMRP and miR-766-5p. Western blot analysis was conducted to assess the expression levels of proteins associated with ferroptosis including GPX4, SLC7A11, and FTH1. Dual-luciferase reporter assays were performed to investigate the sponge adsorption relationship between LncRNA RMRP and miR-766-5p. ***Results*** As reperfusion time extended, the expression level of LncRNA RMRP in cells progressively increased (P<0.01). Treatment with OGD/R significantly inhibited the viability of HL-1 cells, reduced the expression of miR-766-5p (P<0.01), elevated the levels of LDH in the supernatant, as well as MDA and Fe^{2+} levels within the cells, and decreased the activities of SOD and GSH in cells (P<0.01). Additionally, OGD/R treatment downregulated the protein expression levels of GPX4, SLC7A11, and FTH1(P<0.01). Silencing LncRNA RMRP reversed these effects by enhancing the viability of HL-1 cells, increasing miR-766-5p expression (P<0.01), reducing LDH in the supernatant, as well as MDA and Fe^{2+} levels within the cells, and promoting SOD and GSH activities in cells (P<0.01). Furthermore, silencing LncRNA RMRP upregulated the protein expression levels of GPX4, SLC7A11, and FTH1(P<0.01). The dual-luciferase reporter assay confirmed that LncRNA RMRP could regulate the expression of miR-766-5p through a sponge adsorption mechanism. Partial inhibition of miR-766-5p inhibitor expression could mitigate the improvement effect caused by LncRNA RMRP silencing on OGD/R-induced ferroptosis in HL-1 cells. ***Conclusion*** Silencing LncRNA RMRP inhibits OGD/R-induced ferroptosis in HL-1 cells, potentially through the sponge-mediated regulation of miR-766-5p expression.

Key words oxygen-glucose deprivation/reperfusion; myocardium; HL-1 cells; ferroptosis; long non-coding RNA RMRP; miR-766-5p

Fund program Natural Science Foundation of Jiangxi Province (No. 20232BAB216008), Funding from China Scholarship Council (No. 202506820050)

Corresponding author Hu Chenkai, E-mail: heleincu@163.com

心肌缺血再灌注损伤（myocardial ischemia-reperfusion injury，MIRI）是心肌血供恢复后损伤加剧的过程，严重影响心梗患者预后，其中心肌细胞铁死亡是关键机制之一，涉及铁代谢紊乱、线粒体损伤与活性氧大量释放[1-3]。长链非编码 RNA（long non-coding RNA，LncRNA）在组织分化发育过程中具有明显的表达特异性，可作为 miRNA 的分子海绵，调控表观遗传、细胞周期和细胞分化等多种生命活动[4]。研究发现，LncRNA RMRP 在心肌梗死[5]、心肌纤维化[6]和心肌肥大[7]等相关心脏疾病中发挥致病因子的作用，抑制 LncRNA RMRP 表达对改善心肌细胞损伤有积极影响。此外，某些小分子 RNA(microRNA,miRNA)通过调控相关基因表达在 MIRI 的治疗中发挥积极作用，如 miR-766-5p 可通过调控 CDKN1A 信号通路缓解 MIRI[8]。LncRNA RMRP 已被证明能以分子海绵形式吸附 miR-766-5p 并调控其表达[9]，然而该效应是否通过铁死亡途径参与 MIRI 进程尚不清楚。该研究以 HL-1 小鼠心肌细胞为研究对象，采用氧糖剥夺/再灌注

（oxygen-glucose deprivation/reperfusion，OGD/R）法建立 MIRI 体外模型，旨在探讨 LncRNA RMRP 是否通过调控 miR-766-5p 影响 OGD/R 诱导的心肌细胞铁死亡，为 MIRI 治疗提供潜在靶点。

1 材料与方法

1.1　主要材料　HL-1 小鼠心肌细胞（货号：GNM46）购自中国科学院细胞库；LncRNA RMRP 小 RNA 干扰片段（si-RMRP）及其阴性对照（si-NC）、miR-766-5p 抑制剂（miR-766-5p inhibitor）及其阴性对照（inhibitor-NC）购自山东维真生物科技有限公司。

1.2　主要试剂　DMEM 无糖培养基及 DMEM 高糖完全培养基（货号：PM150270、PM150210B）购自武汉普诺赛生命科技有限公司；谷胱甘肽过氧化物酶 4（glutathione peroxidase 4，GPX4）兔抗、溶质载体家族 7 成员 11（solute carrier family 7 member 11，SLC7A11）兔抗、铁蛋白重链 1（ferritin heavy polypeptide 1，FTH1）兔抗及 GAPDH 兔抗（货号：52455、98051、3998、2118）购自美国 CST 公司；BCA 蛋白浓度测定试剂盒（货号：PC0020）购自北京索莱宝科技有限公司；Opti-MEM 培养基、Lipofectamine 3000 通用型转染试剂、SuperScript™III Platinum™一步法 qRT-PCR 试剂盒（货号：11058021、L3000001、11732088）购自美国 Thermo 公司；乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase，LDH）检测试剂盒（货号：A020）购自南京建成生物工程研究所；CCK-8 增殖试剂盒、丙二醛（malondialdehyde，MDA）、超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）、谷胱甘肽（glutathione，GSH）试剂盒及亚铁离子（Fe^{2+}）检测试剂盒（货号：ml095229、ml094963、ml076328、ml092952、M1217L）购自上海酶联生物科技有限公司；Dual-Lumi™双萤光素酶报告基因检测试剂盒（货号：RG088S）购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.3　主要仪器　三气培养箱（型号：CH-SQ50B）购自杭州川恒实验仪器有限公司；酶标仪、实时荧光定量 PCR 系统（型号：Multiskan™FC、QuantStudio™5）购自美国 ThermoFisher Scientific 公司；全能型凝胶成像仪（型号：ChemiDoc）购自美国 BioRad 公司。

1.4　方法

1.4.1　OGD/R 模型构建　使用 DMEM 无糖培养基于 37 ℃、1% O_2、5% CO_2、94% N_2 的环境下培养 HL-1 细胞 3 h 进行糖氧剥夺处理，再更换为 DMEM 完全培养基于 37 ℃、5% CO_2 的环境下继续培养细胞 12 h 进行再灌注处理，以细胞存活率下降至 40%~60%提示 OGD/R 细胞模型构建成功[10]。此外，本研究将 HL-1 细胞进行糖氧剥夺 3 h 后，分别进行再灌注处理 3、6、12、24 h，以探讨 OGD/R 对 LncRNA RMRP 表达水平的影响。

1.4.2　细胞转染　转染前 1 d 将对数生长期的 HL-1 细胞接种于 6 孔板中，每孔 2×10^5 个细胞，待细胞生长至 80%融合度时，将 Opti-MEM 和 Lipofectamine 3000 分别与 si-RMRP、si-NC、miR-766-5p inhibitor 及 inhibitor-NC 混匀后室温静置 20 min 形成转染复合物，再将转染复合物均匀加入到 HL-1 细胞中共同孵育 8 h 后，再更换新鲜完全培养基继续培养 48 h[10]。

1.4.3　细胞分组与处理　取对数生长期的 HL-1 细胞，将 si-NC、si-RMRP、inhibitor-NC 和 miR-766-5p inhibitor 分别转染至细胞中，再进行 OGD/R 处理，未进行处理的 HL-1 细胞设置为对照组（Control），具体分组处理方法见表 1。

表 1　细胞分组与处理

Tab. 1　Cell grouping and treatment

Group	OGD/R	si-NC	si-RMRP	inhibitor-NC	miR-766-5p inhibitor
Control	−	−	−	−	−
OGD/R	+	−	−	−	−

si-NC	−	+	−	−	−
si-RMRP	−	−	+	−	−
OGD/R+si-NC	+	+	−	−	−
OGD/R+si-RMRP	+	−	+	−	−
OGD/R+si-RMRP+inhibitor-NC	+	−	+	+	−
OGD/R+si-RMRP+inhibitor	+	−	+	−	+

+: denotes operation, −: ndicates no operation.

1.4.4 qRT-PCR 检测 使用 TRIzol 试剂裂解各组细胞，将细胞裂解液转移至无 RNA 酶的 EP 管中，经萃取、沉淀、干燥、溶解后得到总 RNA。使用 SuperScript™III Platinum™试剂盒进行 cDNA 合成，并与上下游引物等混合配制实时定量 PCR 反应体系（引物序列见表 2），于实时荧光定量 PCR 系统上进行 PCR 扩增反应，反应条件：93 ℃、2 min 预变性，再按照 93 ℃、1 min、55 ℃、1 min、72 ℃、1 min 循环 40 次，最后 72 ℃、7 min 延伸。分别以 GAPDH 或 U6 为内参，采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法计算目的基因相对表达量。

表 2 引物序列

Tab. 2 Primer sequences

Gene	Primer sequence (5'-3')
LncRNA RMRP	F: ACTCCAAAGTCCGCCAAGA
	R: TGCGTAACTAGAGGGAGCTGAC
miR-766-5p	F: TCGAGTACTTGAGATGGAGTTTT
	R: GGCCGCGTTGCAGTGAGCCGAG
GAPDH	F: GTCAAGGCTGAGAACGGGAA
	R: AAATGAGCCCCAGCCTTCTC
U6	F: GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT
	R: CGCTTCACGAATTTGCGTGTCAT

1.4.5 CCK-8 检测 取对数生长期 HL-1 细胞接种于 96 孔板中，每孔 3×10^3 个/100 μL，按照分组处理细胞后，向每孔中加入 10 μL CCK-8 试剂，放入培养箱中继续孵育 2 h，于酶标仪 450 nm 波长处检测各孔吸光度（optical density，OD），计算各组细胞存活率。细胞存活率（%）=（$OD_{实验孔}$-$OD_{空白孔}$）/（$OD_{对照孔}$-$OD_{空白孔}$）×100%。

1.4.6 生化检测 取对数生长期 HL-1 细胞，按照分组处理后 4 000 r/min 离心 5 min，分离上清液进行 LDH 酶活性检测；加入裂解液充分裂解细胞沉淀，再次离心后取上清液，检测细胞中 Fe^{2+}、MDA 含量和 SOD、GSH 活性。

1.4.7 Western blot 检测 使用蛋白质裂解缓冲液从各组细胞中提取总蛋白，BCA 法测定蛋白浓度。使用 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白，随后转移至聚偏二氟乙烯膜上，用 5%脱脂奶粉封闭膜 1 h，然后加入一抗稀释液（GPX4、SLC7A11、FTH1、GAPDH 兔抗，1:1 000）在 4 ℃下孵育过夜，PBS 洗膜 3 次，再将膜浸入二抗稀释液（羊抗兔 IgG，1:10 000）在室温下孵育 2 h，最后使用 ECL 试剂使条带可视化，以 GAPDH 为内参，分析目的蛋白灰度值与内参蛋白灰度值的比值即为目的蛋白相对表达量。

1.4.8 双荧光素酶报告基因实验 使用 starBase 数据库（https://www.starbase.info/）预测 miR-766-5p 与

LncRNA RMRP 3’UTR 区的结合位点，构建 LncRNA RMRP 野生型（wild type，WT）和突变型（mutation type，MUT）序列并克隆到 pGL3 荧光素酶报告载体中，将 LncRNA RMRP WT 或 LncRNA RMRP MUT 质粒与 miR-766-5p mimics 或 mimics NC 共转染至 HL-1 细胞中。转染 48 h 后，检测各组荧光素酶活性，结果以萤火虫/海肾荧光素酶活性的比值表示。

1.5　统计学处理　采用 SPSS 26.0 和 GraphPad Prism 8.0 软件分析结果并绘制统计图，数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间数据比较采用单因素方差分析，两组间数据比较采用事后多重 LSD-*t* 检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　OGD/R 诱导对 HL-1 细胞中 LncRNA RMRP 表达及铁死亡的影响　与对照组比较，OGD/R+不同再灌注时间（3、6、12、24 h）组 HL-1 细胞中 LncRNA RMRP 表达水平均升高（均 $P<0.01$），再灌注 12 h 时达到最高，见图 1。与对照组比较，OGD/R 组 HL-1 细胞存活率降低，上清液中 LDH 活性及细胞中 MDA 含量升高，而 SOD 和 GSH 活性降低（均 $P<0.01$），见图 2A-2E。与对照组比较，OGD/R 组 HL-1 细胞中 Fe^{2+}含量升高，而 GPX4、SLC7A11 和 FTH1 等蛋白表达水平降低（均 $P<0.01$），见图 2F、2G。

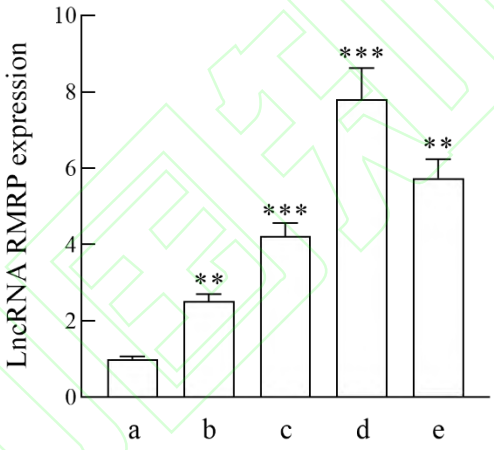

图 1　OGD/R 诱导 HL-1 细胞中 LncRNA RMRP 的表达

Fig. 1　The expression of LncRNA RMRP in HL-1 cells induced by OGD/R

a: Control group; b: OGD/R 3 h group; c: OGD/R 6 h group; d: OGD/R 12 h group; e: OGD/R 24 h group; $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$ *vs* Control group.

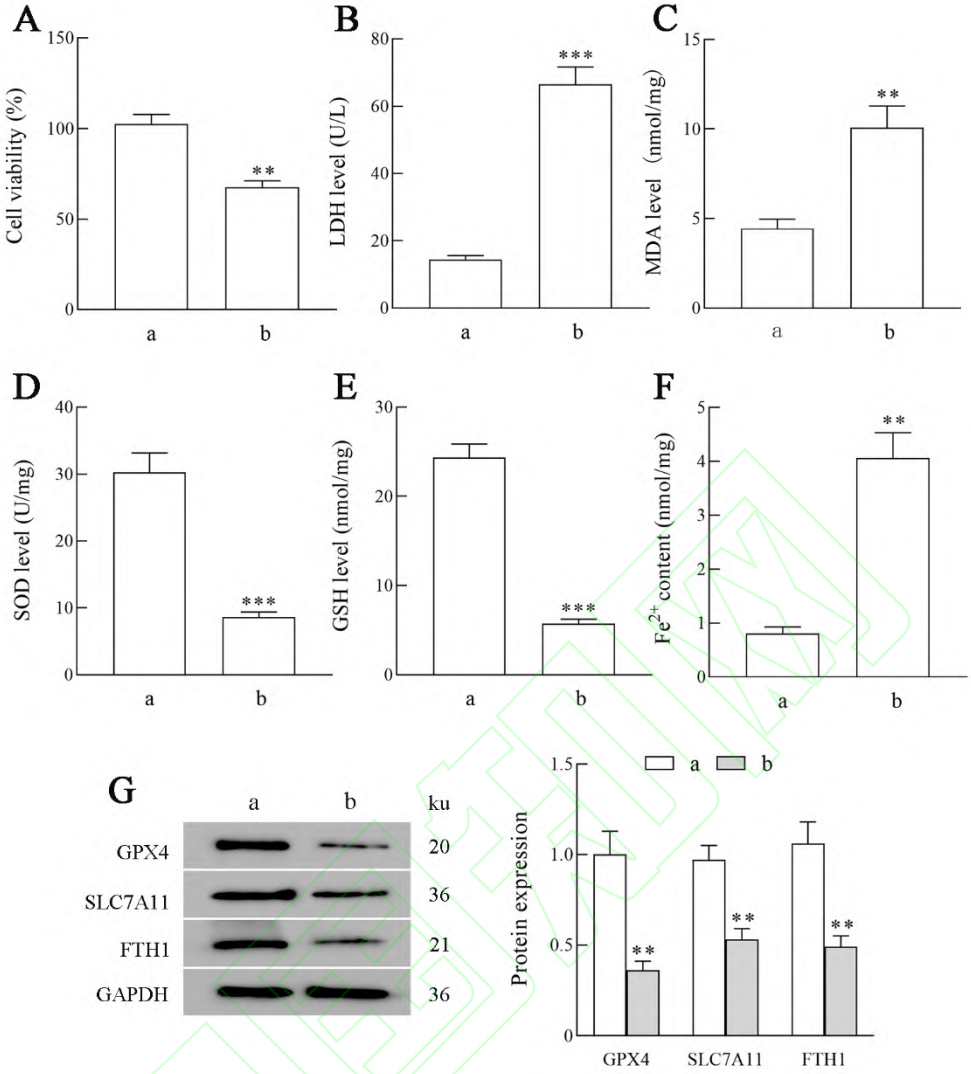

图 2　OGD/R 诱导 HL-1 心肌细胞铁死亡

Fig. 2　OGD/R induced ferroptosis in HL-1 cells

A: Cell viability; B: LDH level in supernatant; C: MDA level in cells; D: SOD level in cells; E: GSH level in cells; F: Fe^{2+} content in cells; G: The expression levels of ferroptosis-related proteins in cells; a: Control group; b: OGD/R group; $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$ *vs* Control group.

2.2　沉默 LncRNA RMRP 对 OGD/R 诱导的 HL-1 细胞铁死亡的影响　与对照组比较，OGD/R 组 HL-1 细胞中 LncRNA RMRP 表达水平升高，细胞存活率降低，上清液中 LDH 活性及细胞中 MDA 含量升高，SOD 和 GSH 活性降低（均 $P<0.001$）；与 OGD/R 组比较，OGD/R+si-RMRP 组细胞中 LncRNA RMRP 表达水平降低，细胞存活率升高，上清液中 LDH 活性和细胞中 MDA 含量降低，SOD 和 GSH 活性升高（均 $P<0.001$）；然而，OGD/R+si-NC 组细胞以上指标与 OGD/R 组比较差异均无统计学意义（$P>0.05$），见图 3A-3F。与对照组比较，OGD/R 组 HL-1 细胞中 Fe^{2+}含量升高，GPX4、SLC7A11 和 FTH1 蛋白表达水平降低（均 $P<0.01$）；与 OGD/R 组比较，OGD/R+si-RMRP 组 HL-1 细胞中 Fe^{2+}含量降低，GPX4、SLC7A11 和 FTH1 蛋白表达水平升高（均 $P<0.01$）；然而，OGD/R+si-NC 组细胞以上指标与 OGD/R 组比较差异均无统计学意义（$P>0.05$），见图 3G、3H。

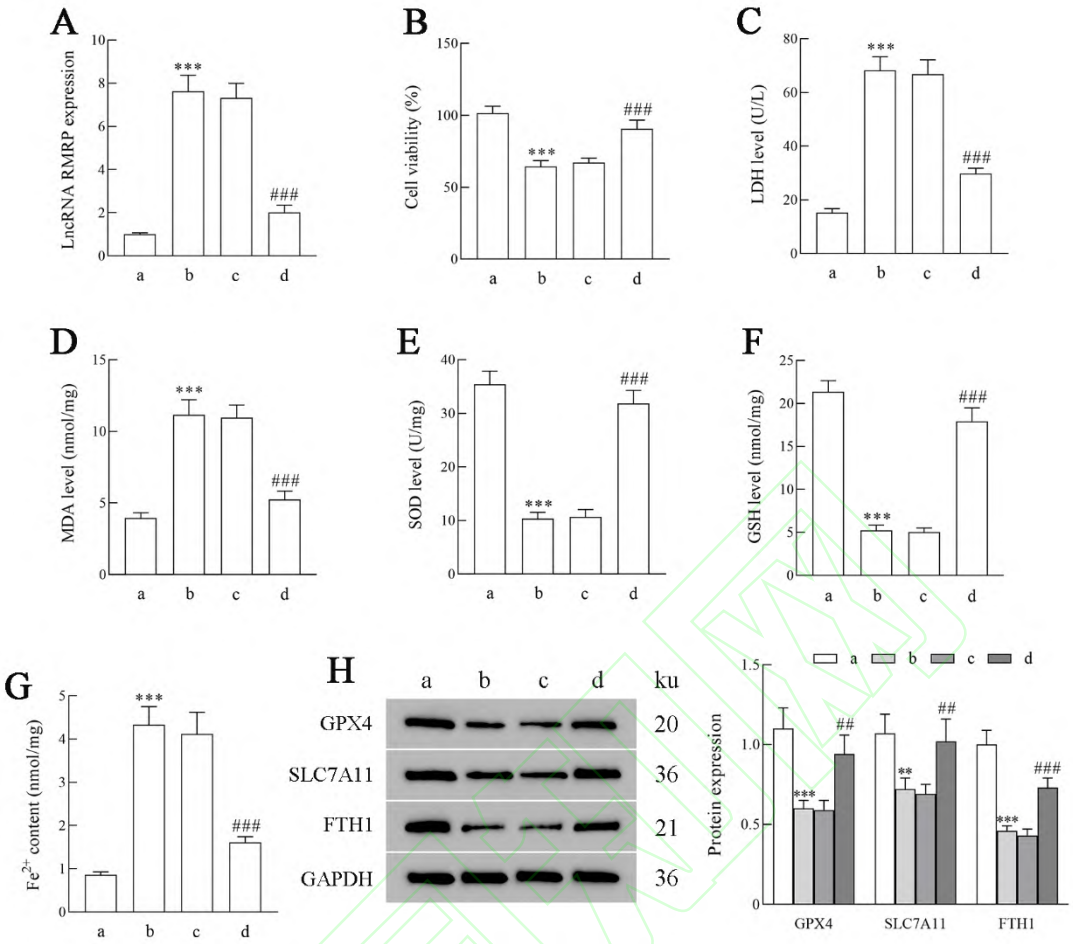

图 3　沉默 LncRNA RMRP 对 OGD/R 诱导的 HL-1 细胞铁死亡的影响

Fig. 3　The effects of silencing LncRNA RMRP on the ferroptosis induced by OGD/R in HL-1 cells

A: LncRNA RMRP expression level in cells; B: Cell viability; C: LDH level in supernatant; D: MDA level in cells; E: SOD level in cells; F: GSH level in cells; G: Fe^{2+} content in cells; H: Expression levels of ferroptosis-related proteins in cells; a: Control group; b: OGD/R group; C: OGD/R+si-NC group; D: OGD/R+si-RMRP group; $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$ *vs* Control group; $^{\#\#}P<0.01$, $^{\#\#\#}P<0.001$ *vs* OGD/R group.

2.3　LncRNA RMRP 对 miR-766-5p 表达的影响　qRT-PCR 检测结果显示，OGD/R 组 HL-1 细胞中 miR-766-5p 表达水平较对照组降低（$P<0.001$），且 LncRNA RMRP 和 miR-766-5p 之间存在海绵吸附结合位点。双荧光素酶报告基因实验结果显示，与 mimics NC 组比较，miR-766-5p mimics 与 LncRNA RMRP-WT 共转染后荧光素酶活性降低（$P<0.001$），同时，与 si-NC 组比较，si-RMRP 组细胞中 miR-766-5p 表达水平升高（$P<0.001$）。见图 4。

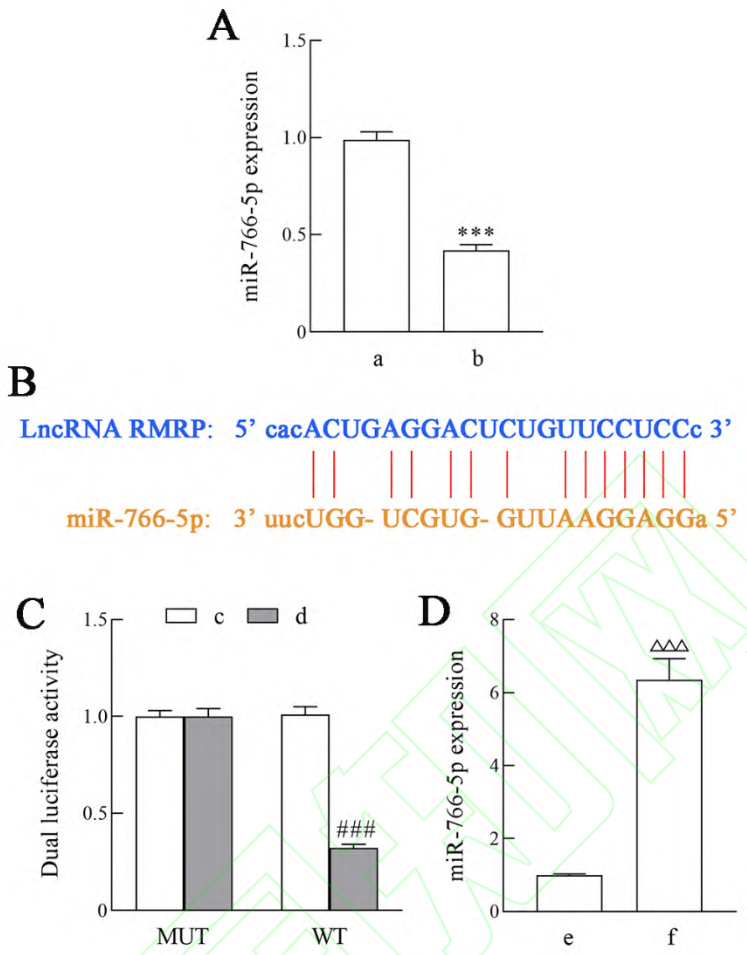

图 4　LncRNA RMRP 可海绵吸附并调控 miR-766-5p 表达

Fig. 4　LncRNA RMRP acted as a molecular sponge to adsorb and regulate the expression of miR-766-5p

A: The expression level of miR-766-5p in cells; B: Sponge adsorption sites between LncRNA RMRP and miR-766-5p; C: Dual luciferase reporter gene assay was used to verify the targeting relationship between LncRNA RMRP and miR-766-5p; D: The expression level of miR-766-5p in cells; a: Control group; b: OGD/R group; c: mimics NC group; d: miR-766-5p mimics group; e: si-NC group; f: si-RMRP group; $^{***}P<0.001$ *vs* Control group; $^{###}P<0.001$ *vs* mimics NC group; $^{△△△}P<0.001$ *vs* si-NC group.

2.4　抑制 miR-766-5p 对 LncRNA RMRP 沉默改善 OGD/R 诱导 HL-1 细胞铁死亡的影响　与 OGD/R 组比较，OGD/R+si-RMRP 组 HL-1 细胞中 miR-766-5p 表达水平和细胞存活率升高，上清液中 LDH 和细胞中 MDA 含量降低，SOD 和 GSH 活性升高（均 $P<0.001$）；与 OGD/R+si-RMRP 组比较，OGD/R+si-RMRP+inhibitor 组 HL-1 细胞中 miR-766-5p 表达水平和细胞存活率降低，上清液中 LDH 和细胞中 MDA 含量升高，SOD 和 GSH 活性降低（均 $P<0.01$）；OGD/R+ si-RMRP+inhibitor-NC 组 HL-1 细胞以上指标与 OGD/R+si-RMRP 组比较差异均无统计学意义（$P>0.05$），见图 5A-5F。与 OGD/R 组比较，OGD/R+si-RMRP 组 HL-1 细胞中 Fe^{2+}含量降低，GPX4、SLC7A11 和 FTH1 蛋白表达水平升高（均 $P<0.001$）；与 OGD/R+si-RMRP 组比较，OGD/R+si-RMRP+inhibitor 组 HL-1 细胞中 Fe^{2+}含量升高，GPX4、SLC7A11 和 FTH1 蛋白表达水平降低（均 $P<0.001$）；而 OGD/R+si-RMRP+inhibitor-NC 组细胞以上指标与 OGD/R+si-RMRP 组比较差异均无统计学意义（$P>0.05$），见图 5G、5H。

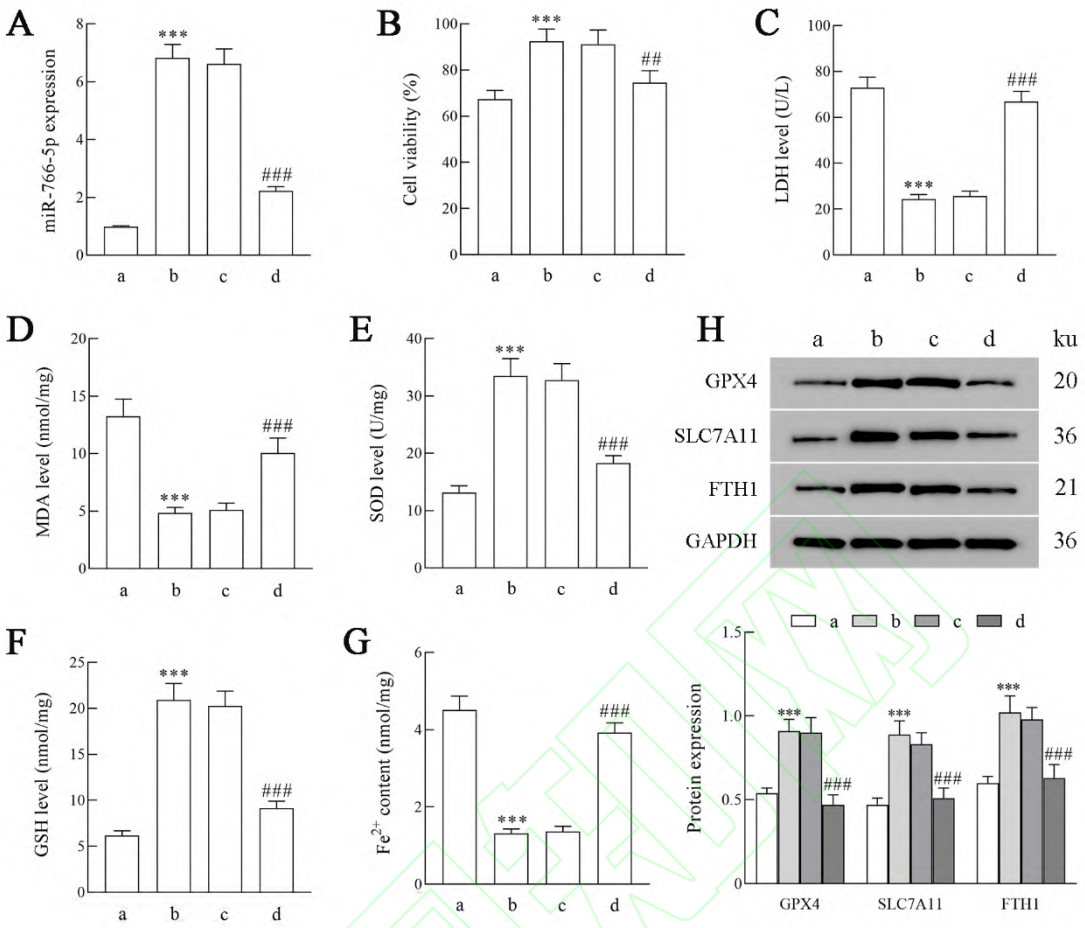

图 5　抑制 miR-766-5p 表达对沉默 LncRNA RMRP 改善 OGD/R 诱导的 HL-1 细胞铁死亡的影响

Fig. 5　The effects of inhibiting miR-766-5p expression on silencing LncRNA RMRP to improve OGD/R induced ferroptosis in HL-1 cells

A: miR-766-5p expression level in cells; B: Cell viability; C: LDH level in supernatant; D: MDA level in cells; E: SOD level in cells; F: GSH level in cells; G: $Fe2^{+}$ content in cells; H: The expression levels of ferroptosis-related proteins in cells; a: OGD/R group; b: OGD/R+si-RMRP group; c: OGD/R+si-RMRP+inhibitor-NC group; d: OGD/R+si-RMRP+inhibitor group; $^{***}P<0.001$ *vs* OGD/R group; $^{\#\#}P<0.01$, $^{\#\#\#}P<0.001$ *vs* OGD/R+si-RMRP group.

3　讨论

铁死亡表现为细胞内谷胱甘肽依赖性抗氧化防御机制的破坏和脂质过氧化物的积累。在缺血和再灌注早期，细胞酸中毒和内部环境不稳定等因素导致含铁和硫簇的酶释放 F^{2+}，通过激活铁介导的芬顿反应产生过量活性氧使细胞抗氧化功能受损，进一步导致心肌细胞氧化应激损伤和铁死亡[11]。以上过程涉及多基因调控，其中 SLC7A11 负责细胞内外胱氨酸和谷氨酸的运输用于后续 GSH 的合成，而 GSH 是 GPX4 发挥作用的重要辅助因子，GPX4 通过还原 GSH 阻止脂质过氧化物扩散并维持细胞膜稳定性[12]。研究[13]报道，激活 SLC7A11/GPX4 轴可在体外抑制 OGD/R 诱导的神经元铁死亡，在体内通过抑制氧化应激和铁死亡改善脑缺血再灌注损伤。另外，细胞对铁的吸收、储存和限制外流功能受损都会导致铁的积累增加，FTH1 是转铁蛋白的重要组成成分，当其表达异常降低时储铁功能受损，使细胞内游离铁增加，进一步促进细胞铁死

亡[14]。本研究结果显示，OGD/R 组细胞存活率较对照组降低，细胞中 LDH 和 MDA 含量升高，SOD 和 GSH 活性降低，同时，细胞中 Fe^{2+}含量升高，而 GPX4、SLC7A11 和 FTH1 蛋白表达水平均降低，说明 OGD/R 诱导下的 HL-1 细胞发生氧化应激损伤和铁死亡。

越来越多的研究报道 LncRNA 在各种生理和病理过程中起着至关重要的作用，例如，LncRNA RMRP 在 OGD/R 诱导的小胶质细胞和神经细胞中均高表达，抑制 LncRNA RMRP 可通过抗炎、抗凋亡、抑制自噬等途径改善 OGD/R 导致的细胞损伤[15-16]。但其是否对 OGD/R 诱导下的心肌细胞铁死亡发挥作用，目前尚不明确。在本研究中，观察到 OGD/R 组细胞中 LncRNA RMRP 表达水平较对照组升高，且呈时间依赖性；沉默 LncRNA RMRP 可提高 OGD/R 诱导下的心肌细胞存活率，抑制氧化应激，同时减少细胞中 Fe^{2+}沉积，并上调 GPX4、SLC7A11、FTH1 等铁死亡相关蛋白表达水平。说明沉默 LncRNA RMRP 可抑制 OGD/R 诱导的 HL-1 心肌细胞铁死亡，但其作用机制还需进行深入探讨。众所周知，LncRNA 常作为分子海绵通过与内源性 miRNA 竞争来调节基因表达，进而参与疾病进程。例如，下调 LncRNA RMRP 通过海绵作用 miR-214-5p 和调节 p53 表达减轻缺氧诱导的心肌细胞损伤[17]；LncRNA RMRP 还通过与 miR-613 竞争性结合抑制 JAK2/STAT3 通路，从而促进小鼠脑缺血再灌注损伤[18]。Dokanehiifard et al[19]研究发现，在人类胚胎干细胞（hESCs）向心肌细胞分化的过程中，内源性 miR-766-5p 表达可抑制 hESCs 凋亡，为维持 hESCs 向心肌细胞分化提供保障。而 LncRNA RMRP 可通过海绵吸附 miR-766-5p 影响细胞增殖和迁移[20]。提示 LncRNA RMRP 可能通过调节 miR-766-5p 表达在 OGD/R 诱导的心肌细胞铁死亡中发挥作用。本研究通过数据库预测 LncRNA RMRP 与 miR-766-5p 之间的海绵吸附位点，双荧光素酶报告基因实验验证了二者的海绵吸附关系；同时，qRT-PCR 检测结果显示，OGD/R 组细胞中 miR-766-5p 表达水平较对照组降低，沉默 lncRNA RMRP 可上调 miR-766-5p 表达水平，且抑制 miR-766-5p 表达可部分抵消 LncRNA RMRP 沉默对 OGD/R 诱导的 HL-1 细胞铁死亡的改善作用。

本研究首次揭示了 LncRNA RMRP 在 OGD/R 诱导的心肌细胞铁死亡中的关键调控作用及其分子机制，即沉默 LncRNA RMRP 通过海绵吸附 miR-766-5p 抑制 OGD/R 诱导的心肌细胞铁死亡。基于此发现，后续研究将深入解析该过程中的其他关键调控因子，通过多组学联合分析及功能实验验证其分子网络互作机制，以期为靶向 LncRNA RMRP 的 MIRI 治疗策略提供更充分的科学依据。

参考文献

[1] Wu Q, Xu R, Zhang K, et al. Characterization of early myocardial inflammation in ischemia-reperfusion injury[J]. Front Immunol, 2022, 13: 1081719. doi: 10.3389/fimmu.2022.1081719.

[2] Zhang C H, Yan Y J, Luo Q. The molecular mechanisms and potential drug targets of ferroptosis in myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. Life Sci, 2024, 340: 122439. doi: 10.1016/j.lfs.2024.122439.

[3] Gao X, Hu W, Qian D, et al. The mechanisms of ferroptosis under hypoxia[J]. Cell Mol Neurobiol, 2023, 43(7): 3329-41. doi: 10.1007/s10571-023-01388-8.

[4] Ballantyne M D, McDonald R A, Baker A H. lncRNA/MicroRNA interactions in the vasculature[J]. Clin Pharmacol Ther, 2016, 99(5): 494-501. doi: 10.1002/cpt.355.

[5] 揭海, 吴源聪, 邢建庞. 长链非编码 RNA RMRP 对急性心肌梗死并发急性心力衰竭的预测价值[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(19):2384-9. doi: 10.3969/j.issn.1673-4130.

Jie H, Wu Y C, Xing J P. Predictive value of long chain non coding RNA RMRP expression level in patients with acute myocardial infarction for complicated acute heart failure[J]. Int J Lab Med, 2021, 42(19):2384-9. doi: 10.3969/j.issn.1673-4130.

[6] Zhang S Y, Huang S H, Gao S X, et al. Upregulation of lncRNA RMRP promotes the activation of cardiac fibroblasts by regulating miR-613[J]. Mol Med Rep, 2019, 20(4): 3849-57. doi: 10.3892/mmr.2019.10634.

[7] Chen J, Li J, Wang X, et al. LincRNA RMRP regulates phenylephrine-induced cardiomyocyte hypertrophy by means of targeting miR-1[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2022, 80(5): 709-17. doi: 10.1097/FJC.0000000000001366.

[8] 徐 杨. circ__0000417/miR-766-5p 轴促进缺血再灌注损伤的机制研究[D]. 苏州：苏州大学,2021. doi: 10.27351/d.cnki.gszhu.2021.004326.

Xu Y. Mechanism of circ_0000417/miR-766-5p axis promoting ischemia-reperfusion injury[D]. Soochow：Soochow University, 2021. doi: 10.27351/d.cnki.gszhu.2021.004326.

[9] Hong H, Xu G, Chen J, et al. LncRNA RMRP contributes to the development and progression of spinal cord injury by regulating miR-766-5p/FAM83A axis[J]. Mol Neurobiol, 2022, 59(10): 6200-10. doi: 10.1007/s12035-022-02968-3.

[10] Ge Y, Liu L, Luo L, et al. MIR22HG aggravates oxygen-glucose deprivation and reoxygenation-induced cardiomyocyte injury through the miR-9-3p/SH2B3 axis[J]. Cardiovasc Ther, 2022, 2022:7332298. doi: 10.1155/2022/7332298.

[11] He J, Liu D, Zhao L, et al. Myocardial ischemia/reperfusion injury: mechanisms of injury and implications for management (review)[J]. Exp Ther Med, 2022, 23(6): 430. doi: 10.3892/etm.2022.11357.

[12] Liu J, Kang R, Tang D. Signaling pathways and defense mechanisms of ferroptosis[J]. FEBS J, 2022, 289(22): 7038-50. doi: 10.1111/febs.16059.

[13] Liu H, Zhang T A, Zhang W Y, et al. Rhein attenuates cerebral ischemia-reperfusion injury *via* inhibition of ferroptosis through NRF2/SLC7A11/GPX4 pathway[J]. Exp Neurol, 2023, 369: 114541. doi: 10.1016/j.expneurol.2023.114541.

[14] Fang Y, Chen X, Tan Q, et al. Inhibiting ferroptosis through disrupting the NCOA4-FTH1 interaction: a new mechanism of action[J]. ACS Cent Sci, 2021, 7(6): 980-9. doi: 10.1021/acscentsci.0c01592.

[15] Bu J, Mahan Y, Zhang Y, et al. RNA sequencing analyses reveal the potential anti-inflammatory mechanisms of acacetin against ODG/R injuries in microglia[J]. J Inflamm Res, 2024, 17: 3641-52. doi: 10.2147/JIR.S465093.

[16] Zhou Z, Xu H, Liu B, et al. Suppression of lncRNA RMRP ameliorates oxygen-glucose deprivation/re-oxygenation-induced neural cells injury by inhibiting autophagy and PI3K/Akt/mTOR-mediated apoptosis[J]. Biosci Rep, 2019, 39(6): BSR20181367. doi: 10.1042/BSR20181367.

[17] Teng Y, Ding M, Wang X, et al. LncRNA RMRP accelerates hypoxia-induced injury by targeting miR-214-5p in H9c2 cells[J]. J Pharmacol Sci, 2020, 142(2): 69-78. doi: 10.1016/j.jphs.2019.07.014.

[18] Wei L, Peng Y, Yang X J, et al. Knockdown of long non-coding RNA RMRP protects cerebral ischemia-reperfusion injury *via* the microRNA-613/ATG3 axis and the JAK2/STAT3 pathway[J]. Kaohsiung J Med Sci, 2021, 37(6): 468-78. doi: 10.1002/kjm2.12362.

[19] Dokanehiifard S, Soltani B M, Ghiasi P, et al. Hsa-miR-766-5p as a new regulator of mitochondrial apoptosis pathway for discriminating of cell death from cardiac differentiation[J]. Gene, 2020, 736: 144448. doi: 10.1016/j.gene.2020.144448.

[20] Zhou L, Yu X, Guo Y, et al. LncRNA RMRP knockdown promotes proliferation and migration of Schwann cells by mediating the miR-766-5p/CAND1 axis[J]. Neurosci Lett, 2022, 770: 136440. doi: 10.1016/j.neulet.2021.136440.