

骨髓间充质干细胞来源外泌体对异丙肾上腺素诱导的大鼠心肌纤维化的影响及其作用机制

魏俊萍¹, 符达佳², 孟庆雯¹, 林道飞¹, 林燕仔¹

(1. 海南医学院第一附属医院心血管内一科, 海南 海口 570102; 2. 海南医学院第一附属医院心电图室, 海南 海口 570102)

[摘要] **目的:** 探讨骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 来源外泌体 (Exo) 对异丙肾上腺素 (ISO) 诱导的大鼠心肌纤维化的影响, 并初步阐明其作用机制。**方法:** 从BMSCs中分离提取Exo, 采用透射电子显微镜、纳米颗粒跟踪分析仪和Western blotting法对Exo进行分析鉴定。将40只SD大鼠分为对照组、模型组、BMSCs-Exo组和BMSCs-Exo+铁死亡激活剂(Erastin)组, 每组10只。除对照组外, 其余3组大鼠均皮下注射ISO建立心肌纤维化模型, BMSCs-Exo组和BMSCs-Exo+Erastin组大鼠尾静脉注射BMSCs-Exo, 且BMSCs-Exo+Erastin组大鼠再腹腔注射Erastin。4周后, 超声心动图检测各组大鼠左心室射血分数(LVEF)、左心室短轴缩短率(LVFS)、左心室舒张末期内径(LVEDD)和左心室收缩末期内径(LVESD), HE染色观察各组大鼠心肌组织病理形态表现, Masson染色观察各组大鼠心肌组织纤维化程度, 免疫组织化学染色检测各组大鼠心肌组织中 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、I型胶原(COL-I)和III型胶原(COL-III)阳性表达率, 比色法测定各组大鼠心肌组织中铁离子(Fe^{2+})水平, Western blotting法检测各组大鼠心肌组织中酰基辅酶A合成酶长链家族成员4(ACSL4)、铁蛋白重链1(FTH1)、谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)和溶质载体家族7成员11(SLC7A11)蛋白表达水平。**结果:** 从BMSCs中分离的颗粒物具有典型的脂质双分子层, 粒径大多分布在波长100 nm处, CD63、CD9、肿瘤易感基因101(TSG101)和热休克蛋白70(HSP70)蛋白均高表达, 由此判定为Exo。与对照组比较, 模型组大鼠LVEF和LVFS明显降低($P<0.05$), LVEDD和LVESD明显升高($P<0.05$), 心肌细胞排列紊乱, 部分细胞核皱缩和坏死, 胶原容积分数(CVF)明显升高($P<0.05$), α -SMA、COL-I和COL-III阳性表达率明显升高($P<0.05$), 心肌组织中 Fe^{2+} 水平明显升高($P<0.05$), ACSL4蛋白表达水平明显升高($P<0.05$), FTH1、GPX4和SLC7A11蛋白表达水平明显降低($P<0.05$)。与模型组比较, BMSCs-Exo组大鼠LVEF和LVFS明显升高($P<0.05$), LVEDD和LVESD明显降低($P<0.05$), 心肌组织损伤明显减轻, CVF明显降低($P<0.05$), α -SMA、COL-I和COL-III阳性表达率明显降低($P<0.05$), 心肌组织中 Fe^{2+} 水平明显降低($P<0.05$), ACSL4蛋白表达水平明显降低($P<0.05$), FTH1、GPX4和SLC7A11蛋白表达水平明显升高($P<0.05$)。与BMSCs-Exo组比较, BMSCs-Exo+Erastin组大鼠LVEF和LVFS明显降低($P<0.05$), LVEDD和LVESD明显升高($P<0.05$), 心肌细胞出现水肿和坏死, CVF明显升高($P<0.05$), α -SMA、COL-I及COL-III阳性表达率明显升高($P<0.05$), 心肌组织中 Fe^{2+} 水平明显升高($P<0.05$), ACSL4蛋白表达水平明显升高($P<0.05$), FTH1、GPX4和SLC7A11蛋白表达水平明显降低($P<0.05$)。**结论:** BMSCs来源Exo能够改善ISO诱导的大鼠心肌纤维化, 该机制可能与抑制铁死亡有关。

[关键词] 心肌纤维化; 异丙肾上腺素; 骨髓间充质干细胞; 外泌体; 铁死亡

[收稿日期] 2023-09-05

[基金项目] 海南省卫健委卫生健康行业科研项目(22A200151); 海南省科技厅自然科学基金青年项目(821QN401); 海南医学院第一附属医院青年培育基金(HYYFYFY202020)

[作者简介] 魏俊萍(1987-), 女, 海南省海口市人, 主治医师, 主要从事心力衰竭、高血压和冠心病的进展及心脏康复方面的研究。

[通信作者] 孟庆雯, 副主任医师(E-mail: 443130019@qq.com)

[中图分类号] R542.2 [文献标志码] A

Effect of bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes on myocardial fibrosis in rats induced by isoproterenol and its mechanism

WEI Junping¹, FU Dajia², MENG Qingwen¹, LIN Daoifei¹, LIN Yanzai¹

(1. Department of Cardiovascular, First Affiliated Hospital, Hainan Medical College, Haikou 570102, China; 2. Echocardiography Room, First Affiliated Hospital, Hainan Medical College, Haikou 570102, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the effect of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs)-derived exosomes (Exo) on isoproterenol (ISO)-induced myocardial fibrosis in the rats, and to clarify its mechanism. **Methods:** The Exo was isolated from the BMSCs and characterized by transmission electron microscope, nanoparticle tracking analysis, and Western blotting methods. Forty SD rats were divided into control group, model group, BMSCs-Exo group, and BMSCs-Exo+ferroptosis activator (Erastin) group, and there were 10 rats in each group. The myocardial fibrosis models were established by subcutaneous injection of ISO in all the rats except control group. The rats in BMSCs-Exo and BMSCs-Exo+Erastin groups were given BMSCs-Exo, and the rats in BMSCs-Exo+Erastin group were additionally injected with Erastin intraperitoneally. After 4 weeks, echocardiography was used to detect the left ventricular ejection fraction (LVEF), left ventricular fractional shortening (LVFS), left ventricular end diastolic diameter (LVEDD), and left ventricular end systolic diameter (LVESD) of the rats in various groups; HE staining was used to observe the pathomorphology of myocardium tissue of the rats in various groups; Masson staining was used to observe the fibrosis degrees of myocardium tissue of the rats in various groups; immunohistochemistry was used to detect the positive expression rates of α -smooth muscle actin (α -SMA), type I collagen (COL-I), and type III collagen (COL-III) in myocardium tissue of the rats in various groups; colorimetry was used to detect the Fe^{2+} level in myocardium tissue of the rats in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of acyl-CoA synthetase long chain family member 4 (ACSL4), ferritin heavy chain 1 (FTH1), glutathione peroxidase 4 (GPX4), and solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11) proteins in myocardium tissue of the rats in various groups. **Results:** The particles isolated from BMSCs had a typical lipid bilayer structure, and most particle sizes distributed around 100 nm. High expression levels of CD63, CD9, tumor susceptibility gene 101 (TSG101), and heat shock protein 70 (HSP70) proteins confirmed the particles as Exo. Compared with control group, the LVEF and LVFS of the rats in model group were significantly decreased ($P < 0.05$), LVEDD and LVESD were increased ($P < 0.05$), the myocardial cell arrangement was disordered, some nuclear shrinkage and necrosis were seen, the collagen volume fraction (CVF) was significantly increased ($P < 0.05$), the positive expression rates of α -SMA, COL-I, and COL-III were significantly increased ($P < 0.05$), the Fe^{2+} level in myocardium tissue was significantly increased ($P < 0.05$), the expression level of ACSL4 protein was significantly increased ($P < 0.05$), and the expression levels of FTH1, GPX4, and SLC7A11 proteins were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with model group, the LVEF and LVFS of the rats in BMSCs-Exo group were significantly increased ($P < 0.05$), the LVEDD and LVESD were significantly decreased ($P < 0.05$), the myocardial tissue damage was significantly alleviated, the CVF was significantly decreased ($P < 0.05$), the positive expression rates of α -SMA, COL-I, and COL-III were significantly decreased ($P < 0.05$), the Fe^{2+} level in myocardium tissue was significantly

decreased ($P < 0.05$), the expression level of ACSL4 protein was significantly decreased ($P < 0.05$), and the expression levels of FTH1, GPX4, and SLC7A11 proteins were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with BMSCs-Exo group, the LVEF and LVFS of the rats in BMSCs-Exo+Erastin group were significantly decreased ($P < 0.05$), the LVEDD and LVESD were significantly increased ($P < 0.05$), the myocardial cell edema and necrosis were seen, the CVF was significantly increased ($P < 0.05$), the positive expression rates of α -SMA, COL-I, and COL-III were significantly increased ($P < 0.05$), the Fe^{2+} level in myocardium tissue was significantly increased ($P < 0.05$), the expression level of ACSL4 protein was significantly increased ($P < 0.05$), and the expression levels of FTH1, GPX4, and SLC7A11 proteins were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion:** BMSC-derived Exo can improve the myocardial fibrosis in the rats induced by ISO, and its mechanism may be related to the inhibition of ferroptosis.

KEYWORDS Myocardial fibrosis; Isoproterenol; Bone marrow mesenchymal stem cell; Exosome; Ferroptosis

心肌纤维化是大多数心血管疾病中常见的病理生理过程, 主要特征是胶原蛋白和其他细胞外基质蛋白的过度交联及沉积。在多种损伤和刺激条件下, 如心肌缺氧、压力超负荷、病原体感染、代谢功能障碍和衰老等, 成纤维细胞过度活化, 导致心肌重塑和间质胶原沉积^[1-2]。心肌细胞周围胶原异常增加导致左心室舒张功能障碍、心律失常和心肌氧供应受损, 甚至引发终末期心力衰竭^[3]。然而, 目前尚无特定的治疗方法可以有效缓解各种因素引起的心肌纤维化。因此, 积极探讨有效策略来缓解心肌纤维化是降低患者发生心力衰竭风险的关键环节。

骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 是典型的干细胞, 在不同的生理条件下可以分化为不同类型的细胞, 并能够选择性地募集到损伤部位, 有助于血管生成和组织修复^[4]。研究^[5-6]显示: BMSCs的作用可能由细胞外囊泡所介导, 其中外泌体 (exosome, Exo) 是一种主要亚型, Exo是一种纳米级颗粒, 以外囊泡的形式从质膜释放出来, 是免疫调节、细胞增殖、细胞衰老和分化的重要介质, 通过将各种生物活性物质如 mRNA、微小 RNA (microRNA, miRNA)、蛋白质和脂质等从一个细胞转移至另一个细胞, 发挥细胞间通讯作用^[7]。既往研究^[8-10]显示: BMSCs来源的Exo可以通过转移内源性分子来调节心肌血管生成、心肌炎症、心肌细胞凋亡和心肌纤维化, 从而发挥心肌保护作用, 但其对心肌纤维化的作用机制尚未完全明确。本研究通过皮下注射异丙肾上腺素 (isoproterenol, ISO) 建立大鼠心肌纤维化模型, 观察 BMSCs来

源的Exo对大鼠心肌纤维化的治疗效果及其作用机制, 为 BMSCs来源的Exo在心肌纤维化临床治疗中的应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 40只健康雄性SD大鼠, 8周龄, 购自海南药物研究所有限责任公司, 动物生产许可证号: SCXK(琼)2020-0007。在无特定病原体级动物房内适应性喂养7d, 温度为23℃~25℃, 相对湿度为50%, 12h光照、黑暗交替, 实验期间大鼠自由进食和饮水。本研究获得本院伦理委员会批准 (伦理审批号: HNM20220081)。

1.2 主要试剂 ISO购于美国Sigma-Aldrich公司, 铁死亡激活剂Erastin购于美国TargetMol公司, BMSCs购于上海沪震实业有限公司, Exo提取试剂盒购于武汉华美生物工程有限公司, 蛋白裂解液和增强型化学发光试剂 (enhanced chemiluminescence, ECL) 购于上海碧云天生物技术研究所, 二辛可宁酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白质定量试剂盒购于北京天根生化科技有限公司, 聚偏氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜购于美国Millipore公司, 组织固定液、HE染色试剂盒及Masson染色试剂盒购于北京索莱宝科技有限公司, 铁离子 (Fe^{2+}) 浓度检测试剂盒购于北京盒子生工科技有限公司, 增强型3, 3-二氨基苯联胺 (diaminobenzidine, DAB) 显色试剂盒购于北京伊塔生物科技有限公司, 抗体CD63、CD9、肿瘤易感基因101 (tumor susceptibility gene 101, TSG101)、热休克蛋白70 (heat shock protein 70, HSP70)、 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth

muscle actin, α -SMA)、I型胶原 (type I collagen, COL-I)、III型胶原 (type III collagen, COL-III)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、酰基辅酶A合成酶长链家族成员4 (acyl CoA synthetase long chain family member 4, ACSL4)、铁蛋白重链1 (ferritin heavy chain 1, FTH1)、谷胱甘肽过氧化物酶4 (glutathione peroxidase 4, GPX4)、溶质载体家族7成员11 (solute carrier family 7 member 11, SLC7A11) 及辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG均购于英国Abcam公司。

1.3 BMSCs来源Exo的分离和鉴定 将对数生长期的BMSCs收集于离心管, 4℃条件下分别以4 500 r·min⁻¹离心15 min、12 000 r·min⁻¹离心20 min, 去除细胞碎片, 收集上清, 吸取Exo提取液A加入上清中, 涡旋混匀, 4℃条件下静置过夜。4℃、12 000 r·min⁻¹离心60 min, 弃上清、留沉淀, 吸取适量保存液B将沉淀重悬, 获得Exo悬液, -20℃条件下保存。透射电子显微镜观察Exo形态表现, 采用纳米颗粒跟踪分析仪检测Exo的直径分布。Western blotting法检测Exo表面标志蛋白CD63、CD9、TSG101和HSP70蛋白条带的表达情况。

1.4 动物分组、造模和给药 40只大鼠随机分为对照组、模型组、BMSC-Exo组和BMSCs-Exo+Erastin组, 每组10只。模型组、BMSCs-Exo组和BMSCs-Exo+Erastin组大鼠均通过背部皮下注射5 mg·kg⁻¹ ISO, 每日1次, 连续10 d, 建立心肌纤维化模型^[1], 对照组大鼠同时注射等体积生理盐水。造模后, BMSCs-Exo组和BMSCs-Exo+Erastin组大鼠均尾静脉注射100 μ L BMSCs来源的Exo, BMSCs-Exo+Erastin组大鼠再通过腹腔注射20 mg·kg⁻¹ Erastin。处理结束后, 各组大鼠继续常规喂养4周, 进行后续实验。

1.5 超声心动图检测各组大鼠心功能指标 腹腔注射30 mg·kg⁻¹戊巴比妥钠麻醉大鼠, 将其仰卧位固定于操作台上, 采用超声心动图检测各组大鼠左心室射血分数 (left ventricular ejection fraction, LVEF)、左心室短轴缩短率 (left ventricular fractional shortening, LVFS)、左心室舒张末期内径 (left ventricular end diastolic dimension, LVEDD) 和左心室收缩末期内径 (left ventricular end systolic diameter, LVESD)。

1.6 HE染色观察各组大鼠心肌组织病理形态表现 将大鼠心肌组织置于4%多聚甲醛固定, 常规脱水和透明, 石蜡包埋, 制备厚度约为5 μ m的切片, HE染色, 滴加中性树胶封固, 常温晾干, 采用光学显微镜观察并采集图像。

1.7 Masson染色观察各组大鼠心肌组织纤维化程度 取制备好的大鼠心肌组织石蜡切片, 脱蜡至水, 置于Weigert铁苏木素中浸染5 min, 自来水冲洗, 丽春红酸性品红浸泡8 min, 蒸馏水漂洗, 磷钼酸水溶液处理5 min, 苯胺蓝染液染色3 min, 1%冰醋酸浸洗1 min。脱水和透明后, 滴加中性树胶封固, 常温晾干, 通过光学显微镜观察并采集图像, 并采用Image J软件分析胶原沉积情况, 计算心肌组织中胶原容积分数 (collagen volume fraction, CVF)。CVF=胶原阳性染色面积/组织总面积×100%。

1.8 免疫组织化学染色检测各组大鼠心肌组织中 α -SMA、COL-I和COL-III表达情况 大鼠心肌组织切片脱蜡至水, 浸入柠檬酸钠溶液中, 微波炉加热煮沸10 min, 置于3%过氧化氢常温孵育10 min。采用10%山羊血清常温封闭30 min, 在切片上滴加 α -SMA抗体 (1:40)、COL-I抗体 (1:100) 和COL-III抗体 (1:100), 4℃孵育过夜。次日, PBS缓冲液冲洗切片, 滴加对应二抗 (1:200), 室温孵育1 h, PBS缓冲液再次冲洗切片, DAB避光显色, 滴加中性树胶封固, 常温晾干, 光学显微镜观察并采集图像, 采用Image J软件分析大鼠心肌组织中蛋白阳性表达情况, 计算各目的蛋白阳性表达率。目的蛋白阳性表达率=目的蛋白阳性染色面积/心肌组织总面积×100%。

1.9 各组大鼠心肌组织中Fe²⁺水平测定 取100 mg大鼠心肌组织, 加入1 mL提取液, 冰浴匀浆, 在4℃、12 000 r·min⁻¹离心10 min, 获得上清, 按照Fe²⁺浓度检测试剂盒说明书步骤进行操作, 计算心肌组织中Fe²⁺水平。

1.10 Western blotting法检测各组大鼠心肌组织中ACSL4、FTH1、GPX4和SLC7A11蛋白表达水平 在Exo或研磨后的大鼠心肌组织中加入蛋白裂解缓冲液提取总蛋白, BCA法定量。蛋白煮沸变形后, 上样等量40 μ g进行电泳分离, 转至PVDF膜上, 浸入5%脱脂奶粉中封闭。在Exo鉴定中, 以CD63、CD9、TSG101和HSP70抗体 (按照1:1 000稀释) 作为一抗, 4℃条件下与膜

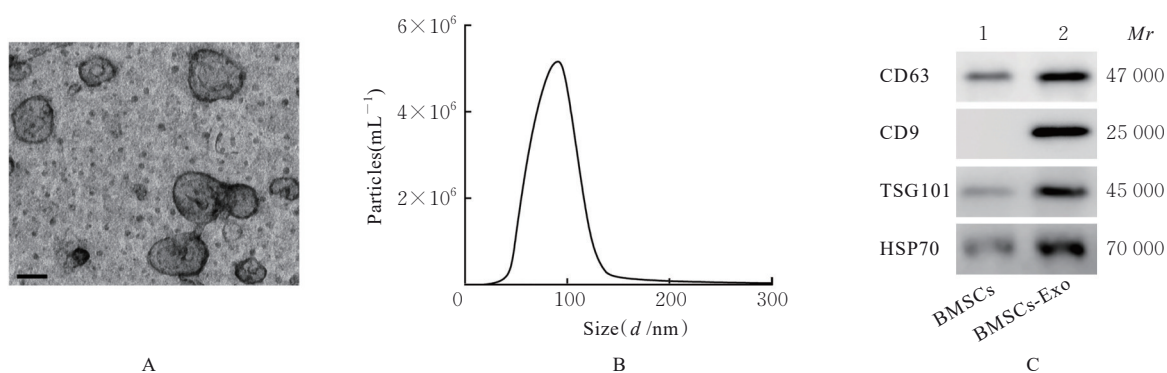
共孵育过夜;进行大鼠心肌组织中Fe²⁺相关蛋白检测:以ACSL4、FTH1、GPX4和SLC7A11抗体(按照1:1000稀释)作为一抗,4℃条件下与膜共孵育过夜。次日,TBST洗膜,在膜上加入相应的二抗(按照1:5000稀释),室温孵育2h。TBST洗膜,ECL显影,拍照,采用Image J软件分析蛋白条带灰度值,以GAPDH作为内参,计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/内参蛋白条带灰度值。

1.11 统计学分析 采用GraphPad Prism 7.0统计软件进行统计学分析。各组大鼠LVEF、LVFS、LVEDD、LVESD和CVF,各组大鼠心肌组织中 α -SMA、COL-I及COL-III阳性表达率,心肌组

织中Fe²⁺水平及ACSL4、FTH1、GPX4和SLC7A11蛋白表达水平均符合正态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间样本均数两两比较采用LSD-*t*检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BMSCs来源Exo的鉴定 透射电子显微镜观察,从BMSCs分离得到的颗粒物呈椭圆形,具有典型的脂质双分子层,纳米颗粒跟踪分析仪测定其直径大多分布在100 nm处,见图1A和1B。Western blotting法检测结果显示:Exo表面标志蛋白CD63、CD9、TSG101及HSP70蛋白条带均明显,见图1C。



A: Morphology of Exo observed by transmission electron microscope ($\times 20\ 000$); B: Diameter distribution of Exo detected by nanoparticle tracking analyzer; C: Electrophoregram of expressions of Exo surface marker proteins detected by Western blotting method (Lane 1: BMSCs; Lane 2: BMSCs-Exo).

图1 BMSCs来源Exo的鉴定结果

Fig. 1 Identification results of Exo derived from BMSCs

2.2 各组大鼠心功能指标 超声心动图检测结果显示:与对照组比较,模型组大鼠LVEF和LVFS明显降低($P<0.05$),LVEDD和LVESD明显升高($P<0.05$);与模型组比较,BMSCs-Exo组大鼠LVEF和LVFS明显升高($P<0.05$),LVEDD

和LVESD明显降低($P<0.05$);与BMSCs-Exo组比较,BMSCs-Exo+Erastin组大鼠LVEF和LVFS明显降低($P<0.05$),LVEDD和LVESD明显升高($P<0.05$)。见表1。

表1 各组大鼠LVEF、LVFS、LVEDD和LVESD
Tab. 1 LVEF, LVFS, LVEDD, and LVESD of rats in various groups

($n=10, \bar{x}\pm s$)

Group	LVEF($\eta/\%$)	LVFS($\eta/\%$)	LVEDD(l/mm)	LVESD(l/mm)
Control	92.10 \pm 9.25	63.67 \pm 6.74	5.28 \pm 0.54	2.34 \pm 0.25
Model	67.45 \pm 6.94*	35.21 \pm 3.77*	7.09 \pm 0.72*	5.03 \pm 0.49*
BMSCs-Exo	83.78 \pm 8.53 Δ	54.20 \pm 5.29 Δ	5.55 \pm 0.58 Δ	2.89 \pm 0.31 Δ
BMSCs-Exo+Erastin	69.54 \pm 7.12 $\#$	37.33 \pm 3.82 $\#$	7.10 \pm 0.73 $\#$	4.92 \pm 0.52 $\#$

* $P<0.05$ compared with control group; $\Delta P<0.05$ compared with model group; $\# P<0.05$ compared with BMSCs-Exo group.

2.3 各组大鼠心肌组织病理形态表现 HE染色和Masson染色结果显示:与对照组比较,模型组大鼠心肌细胞排列紊乱,部分细胞核皱缩和坏死,心肌间质胶原沉积较多,CVF明显升高($P<0.05$);与模型组比较,BMSCs-Exo组大鼠心肌细胞排列

趋于整齐,结构较为清晰,心肌间质胶原沉积减少,CVF明显降低($P<0.05$);与BMSCs-Exo组比较,BMSCs-Exo+Erastin组大鼠心肌细胞水肿和坏死,心肌间质胶原沉积明显变多,CVF明显升高($P<0.05$)。见图2和3。

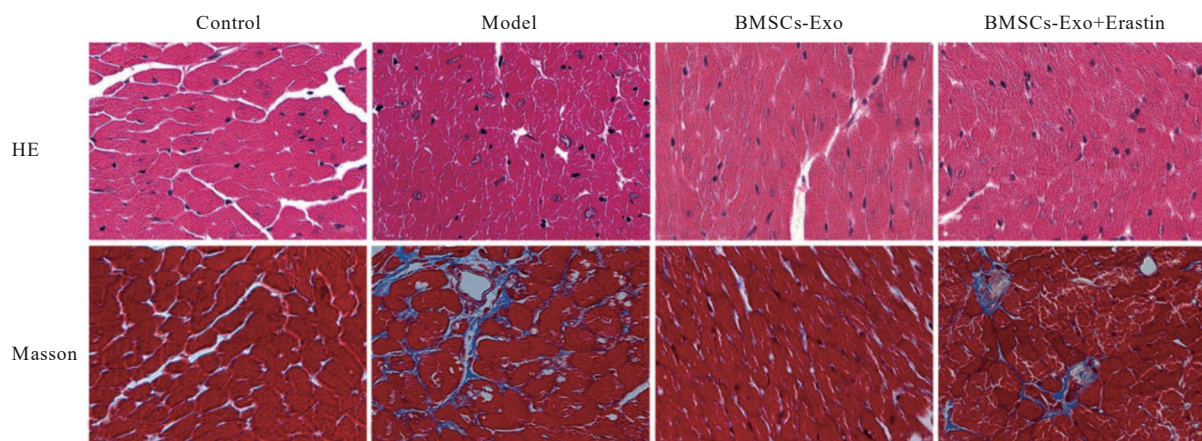
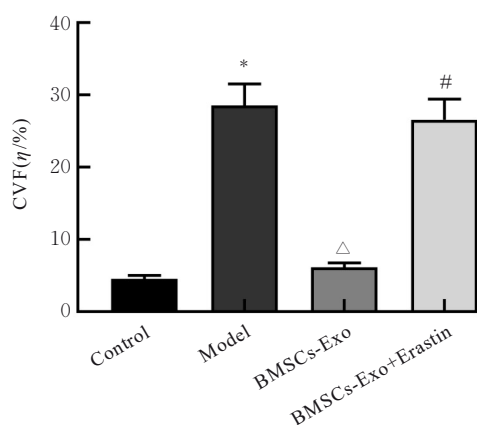


图2 各组大鼠心肌组织病理形态表现($\times 100$)

Fig. 2 Pathomorphology of myocardium tissue of rats in various groups ($\times 100$)



* $P<0.05$ compared with control group; ^Δ $P<0.05$ compared with model group; [#] $P<0.05$ compared with BMSCs-Exo group.

图3 各组大鼠心肌组织中CVF

Fig. 3 CVF in myocardium tissue of rats in various groups

2.4 各组大鼠心肌组织中 α -SMA、COL-I及COL-III阳性表达率 免疫组织化学染色结果显示:与对照组比较,模型组大鼠心肌组织中 α -SMA、COL-I和COL-III阳性表达率均明显升高($P<0.05$);与模型组比较,BMSCs-Exo组大鼠心肌组织中 α -SMA、COL-I和COL-III阳性表达率均明显降低($P<0.05$);与BMSCs-Exo组比较,BMSCs-Exo+Erastin组大鼠心肌组织中 α -SMA、COL-I和COL-III阳性表达率明显升高($P<$

0.05)。见图4和5。

2.5 各组大鼠心肌组织中 Fe^{2+} 水平 与对照组 [$(5.13\pm 0.54)\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$]比较,模型组大鼠心肌组织中 Fe^{2+} 水平 [$(16.59\pm 1.75)\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$]明显升高($P<0.05$);与模型组比较,BMSCs-Exo组大鼠心肌组织中 Fe^{2+} 水平 [$(8.28\pm 0.84)\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$]明显降低($P<0.05$);与BMSCs-Exo组比较,BMSCs-Exo+Erastin组大鼠心肌组织中 Fe^{2+} 水平 [$(13.87\pm 1.45)\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$]明显升高($P<0.05$)。

2.6 各组大鼠心肌组织中ACSL4、FTH1、GPX4和SLC7A11蛋白表达水平 与对照组比较,模型组大鼠心肌组织中ACSL4蛋白表达水平明显升高($P<0.05$),FTH1、GPX4和SLC7A11蛋白表达水平明显降低($P<0.05$);与模型组比较,BMSCs-Exo组大鼠心肌组织中ACSL4蛋白表达水平明显降低($P<0.05$),FTH1、GPX4和SLC7A11蛋白表达水平明显升高($P<0.05$);与BMSCs-Exo组比较,BMSCs-Exo+Erastin组大鼠心肌组织中ACSL4蛋白表达水平明显升高($P<0.05$),FTH1、GPX4、SLC7A11蛋白表达水平明显降低($P<0.05$)。见图6。

3 讨论

心肌纤维化是各种心血管疾病在一定阶段的常

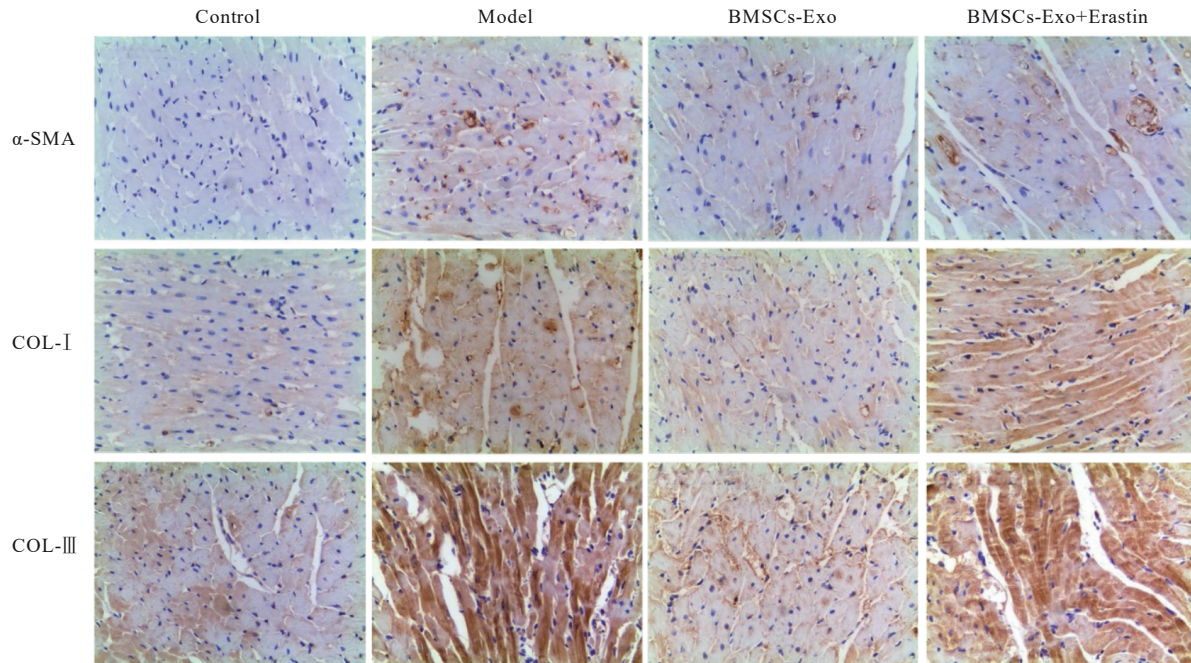
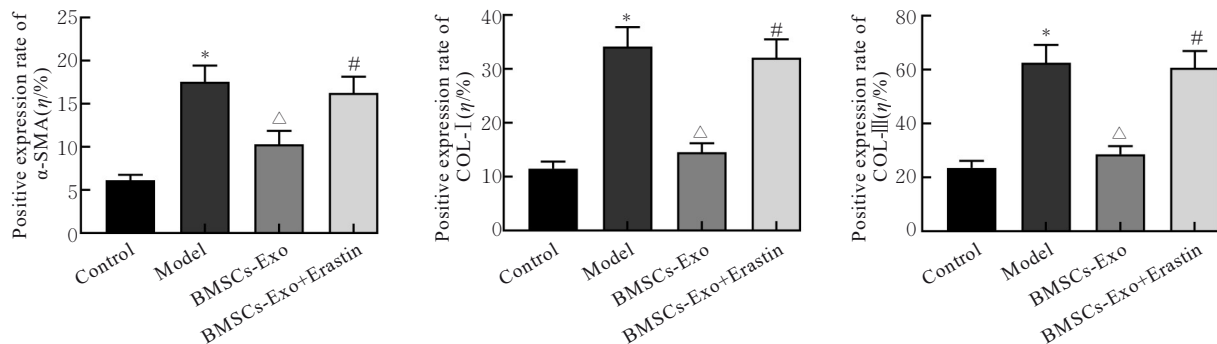


图4 各组大鼠心肌组织中 α -SMA、COL-I和COL-III表达情况(免疫组织化学, $\times 100$)

Fig. 4 Expressions of α -SMA, COL-I, and COL-III in myocardium tissue of rats in various groups (Immunohistochemistry, $\times 100$)



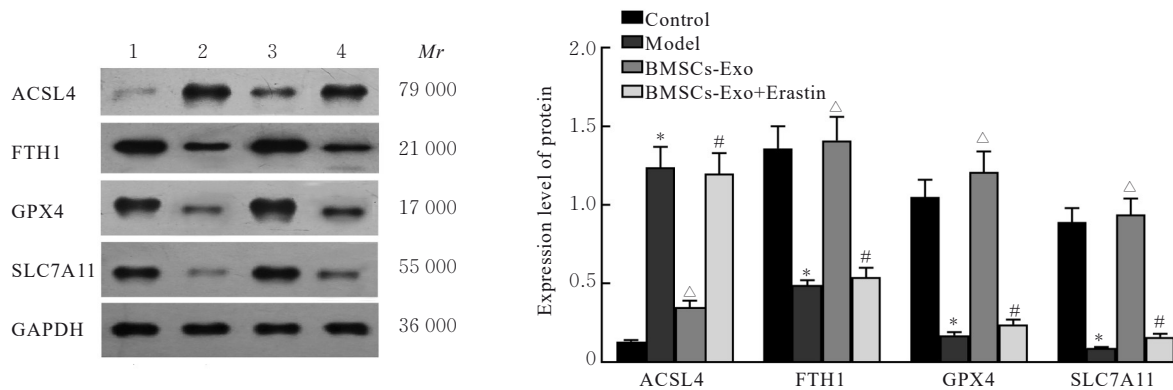
* $P < 0.05$ compared with control group; $\Delta P < 0.05$ compared with model group; # $P < 0.05$ compared with BMSCs-Exo group.

图5 各组大鼠心肌组织中 α -SMA、COL-I和COL-III阳性表达率

Fig. 5 Positive expression rates of α -SMA, COL-I, and COL-III in myocardium tissue of rats in various groups

见病理表现,可破坏心肌结构,导致心肌紊乱和血管舒缩功能障碍,促进心力衰竭进展。探讨心肌纤维化的病理生理机制可以为寻找其有效治疗策略奠定基础。开发新型抗纤维化策略的主旨是逆转进行性纤维化并恢复正常的组织结构。目前,临床实践中侧重于通过药物阻断肾素-血管紧张素-醛固酮系统激活来抑制心肌纤维化,包括肾素抑制剂、血管紧张素转换酶抑制剂、血管紧张素受体阻滞剂和醛固酮拮抗剂等^[12],虽然在一定程度上其可抑制心肌纤维化并改善心功能,但不能从根本上逆转纤维化组织,且存在不良反应,不宜长期使用。

BMSCs具有组织修复、免疫调节和抗炎等作用,现已广泛应用于再生医学和各种疾病治疗研究中。与BMSCs比较,BMSCs来源的Exo具有体积小、便于储存与生产、无肿瘤形成风险和免疫原性低等优点,在疾病治疗中比亲本细胞更具潜力^[13]。BMSCs来源的Exo在各种心脏损伤修复中发挥重要作用,LIU等^[14]将BMSCs来源的Exo注射至心肌梗死大鼠模型中发现:大鼠心功能明显恢复,心脏重塑受到抑制,心肌细胞线粒体碎裂与凋亡也明显减少;WEN等^[15]研究显示:BMSCs来源的Exo通过将微小RNA-144 (microRNA-144, miR-144)



Lane 1: Control group; Lane 2: Model group; Lane 3: BMSCs-Exo group; Lane 4: BMSCs-Exo+Erastin group. * $P < 0.05$ compared with control group; [△] $P < 0.05$ compared with model group; # $P < 0.05$ compared with BMSCs-Exo group.

图6 各组大鼠心肌组织中ACSL4、FTH1、GPX4和SLC7A11蛋白表达电泳图(A)及直条图(B)

Fig. 6 Electrophoregram(A) and histogram(B) of expressions of ACSL4, FTH1, GPX4, and LC7A11 proteins in myocardium tissue of rats in various groups

递送到心肌细胞中,抑制缺氧条件下心肌细胞凋亡与损伤,从而发挥心肌保护作用;REN等^[16]研究显示:BMSCs来源的Exo在血管紧张素II诱导的心肌细胞肥大模型中通过Hippo-YAP信号通路失活来缓解心肌细胞凋亡,抑制炎症反应。本研究将BMSCs来源的Exo注射到ISO诱导的心肌纤维化大鼠模型中,结果显示:大鼠LVEF和LVFS升高,LVEDD和LVESD降低,心肌组织损伤明显减轻,说明BMSCs来源的Exo能有效改善ISO诱导的大鼠心功能障碍。心肌纤维化的特征是细胞外基质产生和降解不平衡,导致疤痕组织积聚。各种原因引发的心脏损伤都会引起持续的纤维化反应,从而引起心功能障碍。COL-I和COL-III过度沉积会降低心肌弹性,导致心脏收缩能力和舒张能力紊乱,最终出现心力衰竭^[17]。此外,在心脏损伤愈合过程中产生的胶原纤维能够破坏相邻肌细胞链之间的电耦合,引起心律失常^[18]。 α -SMA是心肌成纤维细胞活化的标志物,其活化后能够分泌大量胶原蛋白进而促进心肌纤维化^[19]。本研究结果显示:BMSCs来源的Exo作用后,心肌纤维化大鼠模型心肌组织中 α -SMA、COL-I及COL-III阳性表达率明显降低,心肌间质胶原沉积明显减少,表明BMSCs来源的Exo可抑制ISO诱导的大鼠心肌纤维化,减少胶原蛋白沉积。

铁死亡是一种独特而普遍的细胞死亡调节形式,由铁依赖性脂质过氧化作用驱动,由细胞代谢紊乱和氧化还原稳态不平衡引起,并受到各种细胞代谢途径的调节^[20]。铁死亡和心肌纤维化之间关

系密切,心力衰竭小鼠模型心肌呈明显纤维化和 Fe^{2+} 蓄积^[21],由铁死亡结合自噬介导的细胞死亡通过Toll样受体4/烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶家族NOX4途径促进心力衰竭进展^[22],此外,在慢性心力衰竭晚期阶段,混合性谱系激酶3通过心肌细胞中c-Jun氨基末端激酶/p53信号通路诱导铁死亡进而引起心肌纤维化^[23]。因此,推测靶向铁死亡可能是减少或抑制心肌纤维化形成的有效策略。ACSL4是长链酰基辅酶A合酶家族成员,在脂肪酸代谢中必不可少,可以催化花生四烯酰和肾上腺素酰酯化为磷脂酰乙醇胺,诱导铁死亡^[24]。FTH1、GPX4及SLC7A11是铁死亡的关键调节因子,降低FTH1表达会增加铁蛋白降解并促进铁死亡^[25];GPX4可利用还原型谷胱甘肽将脂质氢过氧化物转化为脂质醇,从而减轻脂质过氧化并抑制铁死亡^[26];SLC7A11通过转运细胞外半胱氨酸调节铁死亡,抑制其水平会减少胱氨酸摄取,导致胱氨酸依赖性谷胱甘肽过氧化物酶失活,增强细胞中脂质过氧化和铁死亡^[27]。本研究结果显示:BMSCs来源的Exo作用后,心肌纤维化大鼠心肌组织中 Fe^{2+} 水平降低,ACSL4蛋白表达水平降低,FTH1、GPX4和SLC7A11蛋白表达水平升高,推测BMSCs来源的Exo改善大鼠心肌纤维化的作用可能与抑制铁死亡途径有关。为了进一步验证该推测,在BMSCs来源的Exo治疗下采用铁死亡经典激活剂Erastin以激活铁死亡途径,结果显示:大鼠心功能未得到改善,心肌组织中 α -SMA、COL-I和COL-III阳性表达率较高,心肌组织损伤及心肌

纤维化现象仍较为明显。

综上所述, BMSCs来源的Exo能够保护ISO诱导的心肌纤维化模型大鼠的心功能, 减轻心肌组织损伤, 抑制心肌组织中 α -SMA、COL-I和COL-III表达, 进而改善心肌纤维化, 该作用可能是通过抑制铁死亡途径实现的。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

魏俊萍参与实验设计和论文撰写, 符达佳参与实验研究和数据采集, 孟庆雯参与实验操作, 林道飞参与实验操作和材料整理, 林燕仔参与数据分析、文章审阅和统计学分析。

[参考文献]

- [1] LEE H J, LEE H, KIM S M, et al. Diffuse myocardial fibrosis and diastolic function in aortic stenosis [J]. *JACC Cardiovasc Imaging*, 2020, 13(12): 2561-2572.
- [2] KARAMITSOS T D, ARVANITAKI A, KARVOUNIS H, et al. Myocardial tissue characterization and fibrosis by imaging [J]. *JACC Cardiovasc Imaging*, 2020, 13(5): 1221-1234.
- [3] HERON C, DUMESNIL A, HOUSSARI M, et al. Regulation and impact of cardiac lymphangiogenesis in pressure-overload-induced heart failure [J]. *Cardiovasc Res*, 2023, 119(2): 492-505.
- [4] HOANG D M, PHAM P T, BACH T Q, et al. Stem cell-based therapy for human diseases [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 272.
- [5] MATSUZAKA Y, YASHIRO R. Therapeutic strategy of mesenchymal-stem-cell-derived extracellular vesicles as regenerative medicine[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(12): 6480.
- [6] HA D H, KIM H K, LEE J, et al. Mesenchymal stem/stromal cell-derived exosomes for immunomodulatory therapeutics and skin regeneration[J]. *Cells*, 2020, 9(5): 1157.
- [7] KALLURI R, LEBLEU V S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes [J]. *Science*, 2020, 367(6478): eaau6977.
- [8] XU R Q, ZHANG F C, CHAI R J, et al. Exosomes derived from pro-inflammatory bone marrow-derived mesenchymal stem cells reduce inflammation and myocardial injury via mediating macrophage polarization[J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(11): 7617-7631.
- [9] ZHANG L Y, WEI Q X, LIU X M, et al. Exosomal microRNA-98-5p from hypoxic bone marrow mesenchymal stem cells inhibits myocardial ischemia-reperfusion injury by reducing TLR4 and activating the PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 101(Pt B): 107592.
- [10] CHEN F, LI X L, ZHAO J X, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes attenuate cardiac hypertrophy and fibrosis in pressure overload induced remodeling [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2020, 56(7): 567-576.
- [11] 程 阳, 葛晨亮, 范奕好, 等. 薯蓣皂苷对异丙肾上腺素诱导的大鼠心肌纤维化的作用及机制研究[J]. *广西医科大学学报*, 2022, 39(4): 526-532.
- [12] 张 双, 刘淑华, 刘立杰, 等. 增强型体外反搏治疗急性心肌梗塞的疗效及其对肾素-血管紧张素-醛固酮系统的影响[J]. *川北医学院学报*, 2022, 37(1): 39-42.
- [13] FANG J C, ZHANG Y X, CHEN D L, et al. Exosomes and exosomal cargos: a promising world for ventricular remodeling following myocardial infarction[J]. *Int J Nanomedicine*, 2022, 17: 4699-4719.
- [14] LIU X L, LI X, ZHU W W, et al. Exosomes from mesenchymal stem cells overexpressing MIF enhance myocardial repair[J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(11): 8010-8022.
- [15] WEN Z Z, MAI Z, ZHU X L, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes ameliorate cardiomyocyte apoptosis in hypoxic conditions through microRNA144 by targeting the PTEN/AKT pathway [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1): 36.
- [16] REN Y, WU Y, HE W S, et al. Exosomes secreted from bone marrow mesenchymal stem cells suppress cardiomyocyte hypertrophy through Hippo-YAP pathway in heart failure[J]. *Genet Mol Biol*, 2023, 46(1): e20220221.
- [17] STAAB-WEIJNITZ C A. Fighting the fiber: targeting collagen in lung fibrosis[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2022, 66(4): 363-381.
- [18] PERETTO G, MAZZONE P. Arrhythmogenic cardiomyopathy: one, none and a hundred thousand diseases[J]. *J Pers Med*, 2022, 12(8): 1256.
- [19] ASSAR D H, MOKHBATLY A A, GHAZY E W, et al. Silver nanoparticles induced hepatotoxicity via the apoptotic/antiapoptotic pathway with activation of TGF β -1 and α -SMA triggered liver fibrosis in Sprague Dawley rats[J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2022, 29(53): 80448-80465.
- [20] JIANG X J, STOCKWELL B R, CONRAD M.

- Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22(4): 266-282.
- [21] ZHENG H Y, SHI L, TONG C C, et al. circSnx12 is involved in ferroptosis during heart failure by targeting miR-224-5p[J]. *Front Cardiovasc Med*, 2021, 8: 656093.
- [22] CHEN X Q, XU S D, ZHAO C X, et al. Role of TLR4/NADPH oxidase 4 pathway in promoting cell death through autophagy and ferroptosis during heart failure[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 516(1): 37-43.
- [23] WANG J Y, DENG B, LIU Q, et al. Pyroptosis and ferroptosis induced by mixed lineage kinase 3 (MLK3) signaling in cardiomyocytes are essential for myocardial fibrosis in response to pressure overload[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(7): 574.
- [24] ZHANG H L, HU B X, LI Z L, et al. PKC β II phosphorylates ACSL4 to amplify lipid peroxidation to induce ferroptosis[J]. *Nat Cell Biol*, 2022, 24(1): 88-98.
- [25] FANG Y Y, CHEN X C, TAN Q Y, et al. Inhibiting ferroptosis through disrupting the NCOA4-FTH1 interaction: a new mechanism of action[J]. *ACS Cent Sci*, 2021, 7(6): 980-989.
- [26] WANG Y, ZHENG L X, SHANG W J, et al. Wnt/beta-catenin signaling confers ferroptosis resistance by targeting GPX4 in gastric cancer [J]. *Cell Death Differ*, 2022, 29(11): 2190-2202.
- [27] YE Y Z, CHEN A, LI L, et al. Repression of the antiporter SLC7A11/glutathione/glutathione peroxidase 4 axis drives ferroptosis of vascular smooth muscle cells to facilitate vascular calcification[J]. *Kidney Int*, 2022, 102(6): 1259-1275.