

本文引用: 庞志华, 任颖, 钟志清, 等. miR-101-3p 通过抑制 RAC1/PAK1 介导的 EndMT 改善小鼠心肌梗死后心肌纤维化及心功能[J]. 中国动脉硬化杂志, 2026, 34(4): 297-307. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2026.04.003.

[文章编号] 1007-3949(2026)34-04-0297-11

· 实验研究 ·

miR-101-3p 通过抑制 RAC1/PAK1 介导的 EndMT 改善小鼠心肌梗死后心肌纤维化及心功能

庞志华^{1,3}, 任颖¹, 钟志清¹, 李雄风¹, 庄洁³, 田亚平^{2,3}

1. 南开大学第一附属医院 天津市人民医院心内科, 天津市 300121; 2. 中国人民解放军总医院医学创新研究部, 北京市 100853; 3. 南开大学医学院, 天津市 300071

[摘要] **[目的]** 探讨 miR-101-3p 对冠状动脉左前降支(LAD)结扎引起的小鼠心肌梗死后心肌纤维化及心功能的影响,并从 Ras 相关 C3 肉毒杆菌毒素底物 1/p21 激活激酶 1(RAC1/PAK1)信号介导的内皮-间质转化(EndMT)探讨其作用机制。**[方法]** 采用 LAD 结扎建立心肌梗死后心力衰竭小鼠模型,随机分为假手术组、模型组、miR-101-3p agomir(miR-101-3p-Ago)组、RAC1 抑制剂(NSC23766)组、联合干预组及阳性对照组。术后 4 周行超声心动图评估左心室射血分数(LVEF)、短轴缩短率(FS)、左心室舒张/收缩期末内径(LVEDD/LVESD)及室壁厚度等心功能指标;采用 HE、Masson 及 WGA 染色评价心肌结构重塑与纤维化程度;免疫荧光双染分析 VE-钙黏蛋白/ α 平滑肌肌动蛋白(VE-cadherin/ α -SMA)和 CD31/波形蛋白(Vimentin)共表达情况;Western blot 检测 RAC1、PAK1 及 EndMT 相关蛋白表达;透射电镜(TEM)观察心肌超微结构改变。**[结果]** 与假手术组相比,模型组小鼠心功能(LVEF、FS)显著下降、心室重塑及心肌纤维化加重(均 $P < 0.05$)。同时心肌组织中 RAC1/PAK1 通路被激活,EndMT 相关表型显著增强(均 $P < 0.01$)。单独使用 miR-101-3p-Ago 及 RAC1 抑制剂干预均可显著改善心功能、抑制 RAC1/PAK1 活化并减轻 EndMT 相关异常($P < 0.05$)。联合干预组展现出最强的保护效应,能将心肌纤维化面积降低超过 60%,并使 LVEF 等功能指标得到显著恢复($P < 0.01$),且其抗纤维化及改善心功能的关键指标显著优于单药组($P < 0.05$),体现了明确的协同作用。TEM 结果提示联合干预可部分改善心肌超微结构损伤。**[结论]** miR-101-3p 通过抑制 RAC1/PAK1 介导的 EndMT 改善小鼠心肌梗死后心肌纤维化及心功能,有望成为心肌梗死后抗纤维化治疗的潜在分子靶点。

[关键词] 心肌梗死; 心肌纤维化; miR-101-3p; RAC1/PAK1 信号通路; 内皮-间质转化

[中图分类号] R5;R363

[文献标识码] A

MiR-101-3p improves cardiac function and attenuates myocardial fibrosis after myocardial infarction in mice by inhibiting RAC1/PAK1-mediated EndMT

PANG Zhihua^{1,3}, REN Ying¹, ZHONG Zhiqing¹, LI Xiongfeng¹, ZHUANG Jie³, TIAN Yaping^{2,3}

1. Department of Cardiology, Tianjin Union Medical Center, the First Affiliated Hospital of Nankai University, Tianjin 300121, China; 2. Medical Innovation Research Division of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China;

3. School of Medicine, Nankai University, Tianjin 300071, China

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the role of microRNA-101-3p (miR-101-3p) in a mouse model of heart failure after left anterior descending branch (LAD) coronary artery ligation-induced myocardial infarction (MI), and to analyze its association with Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1/p21 activated kinase 1 (RAC1/PAK1) signaling, endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT), and myocardial fibrosis. **Methods** Heart failure after MI was induced by LAD ligation in mice, which were then randomly assigned to the sham, MI model, miR-101-3p agomir (miR-101-3p-Ago) treatment, RAC1 inhibitor (NSC23766) treatment, combined treatment, and metoprolol positive-control groups. Four weeks

[收稿日期] 2026-01-03

[修回日期] 2026-03-13

[基金项目] 天津市科技计划项目(22JCYBJC00580)

[作者简介] 庞志华,副主任医师,硕士研究生导师,研究方向为心脏介入、心力衰竭和心肌纤维化,E-mail:HZ1126@126.com。通信作者田亚平,主任医师,教授,博士研究生导师,主要从事重大疾病生物标志物研究,E-mail:tianyp@301hospital.com.cn。

after surgery, transthoracic echocardiography was performed to assess left ventricular ejection fraction (LVEF), fractional shortening (FS), left ventricular end-diastolic/systolic diameter (LVEDD/LVESD), and wall thickness. Hematoxylin-eosin, Masson and wheat germ agglutinin (WGA) staining were used to evaluate myocardial structural remodeling and fibrosis. Immunofluorescence co-staining for VE-cadherin/ α -smooth muscle actin (α -SMA) and CD31/vimentin was performed to assess EndMT-related phenotypes. Western blot was used to detect the expression of RAC1, PAK1 and EndMT-related proteins. Transmission electron microscopy (TEM) was employed to observe myocardial ultrastructural changes in cardiomyocytes. **Results** Compared with the Sham group, cardiac function (LVEF, FS) in the model group was significantly decreased, and ventricular remodeling and myocardial fibrosis were aggravated (all $P < 0.05$). Meanwhile, the RAC1/PAK1 pathway was activated in myocardial tissue, accompanied by significantly enhanced EndMT-related phenotypes (all $P < 0.01$). Treatment with either miR-101-3p-Ago or the RAC1 inhibitor alone significantly improved cardiac function, suppressed RAC1/PAK1 activation, and attenuated EndMT-related abnormalities ($P < 0.05$). The combined intervention exerted the strongest protective effect, reducing the myocardial fibrotic area by more than 60% and significantly restoring functional indices such as LVEF ($P < 0.01$). Moreover, its anti-fibrotic and cardioprotective effects on key parameters were significantly superior to those of either monotherapy ($P < 0.05$), indicating a clear synergistic benefit. TEM findings further suggested that the combined intervention partially ameliorated myocardial ultrastructural injury. **Conclusion** miR-101-3p agomir improves myocardial fibrosis and cardiac function in mice after myocardial infarction by inhibiting RAC1/PAK1 mediated EndMT, suggesting that it may serve as a potential molecular target for anti-fibrotic therapy after myocardial infarction.

[**KEY WORDS**] myocardial infarction; myocardial fibrosis; miR-101-3p; RAC1/PAK1 signaling pathway; endothelial-to-mesenchymal transition

心力衰竭(heart failure, HF)是全球范围内主要的心血管死亡原因之一,其发病率和死亡率在人口老龄化背景下持续攀升,给公共卫生带来沉重负担^[1-2]。HF的典型病理特征包括心肌重塑、纤维化以及心室腔扩大或心肌肥厚等改变,其中心肌纤维化被认为是心功能持续恶化的关键驱动因素之一,常伴心肌顺应性下降和临床症状加重^[1,3-4]。心肌纤维化主要表现为心肌细胞外基质的过度沉积,这一过程涉及多种细胞类型和分子信号网络,与HF患者的不良预后密切相关^[5-7]。传统观点多聚焦于成纤维细胞/肌成纤维细胞的增殖与活化,但心脏成纤维细胞群体高度异质,缺乏绝对特异标志物,其数量与表型变化往往受到上游血管功能障碍、炎症反应及多细胞互作的共同驱动,仅从终末成纤维细胞活化的角度,难以全面解释纤维化的起始和持续加重机制^[8]。近年来的研究发现,心肌内皮-间质转化(endothelial-to-mesenchymal transition, EndMT)在多种心脏疾病模型中参与了纤维化进程,为连接内皮损伤/微血管功能障碍与纤维化重塑提供了机制框架和潜在的可干预窗口^[9-10]。在EndMT过程中,内皮细胞失去细胞间连接与屏障功能,获得迁移和分泌能力,并呈现出间质样表型。这不仅为纤维化效应细胞提供了部分来源,还深度参与微血管-间质耦联的病理调控。因此,从EndMT视角解析心肌纤维化,有助于弥补既往理论的不足。

微小RNA(microRNA, miRNA)属于一类小分子非编码RNA,其能够通过靶向特定mRNA来抑制其翻译过程或促进其降解,进而广泛调节基因的表达,并参与包括心肌肥厚、心肌纤维化以及HF在内的多种心血管疾病的发生和发展进程^[11-12]。已有研究报道,miR-21、miR-451等多种miRNA与心肌纤维化密切相关,在不同病理条件下可呈现出促进或抑制纤维化的双向作用^[13-14]。miR-101-3p在肝脏、肺部等器官纤维化过程中已展现出抗纤维化功效,然而,其在缺血性HF中是否具备类似的保护作用,以及是否能够通过EndMT等机制对心肌纤维化重塑进行调控,目前仍缺乏系统的研究^[15-17]。从机制层面而言,EndMT的发生依赖于内皮细胞连接的解体、细胞骨架的重组以及迁移能力的增强等一系列变化,受到Rho家族小GTP酶及其下游激酶通路的精细调控。Rho家族小GTP酶Ras相关C3肉毒杆菌毒素底物1(Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1, RAC1)可通过调节细胞骨架重塑、黏附连接、氧化应激及炎症信号等环节,对内皮稳态产生影响,其下游效应分子p21激活激酶1(p21 activated kinase 1, PAK1)在细胞迁移、肌动蛋白聚合及收缩功能调节中发挥着核心作用^[18-19]。现有研究表明,RAC1/PAK1信号与心肌细胞的病理改变以及纤维化进展密切相关^[19],然而,其在EndMT介导的心肌纤维化进程中的具体作用尚未得到充分阐释。

在此基础上,本课题组前期进行的体外实验进一步观察发现,miR-101-3p 过表达能够对 RAC1 表达产生负向调控作用,这表明 RAC1 可能是 miR-101-3p 介导抗纤维化作用的关键下游靶点之一。结合 RAC1/PAK1 轴在细胞骨架/迁移及血管相关重塑中的重要作用,我们据此提出假设:miR-101-3p 可能通过靶向抑制 RAC1/PAK1 信号,干预梗死后心肌微血管相关的 EndMT 程序,从而减轻慢性期心肌纤维化与不良重塑。基于此,本研究在冠状动脉左前降支(left anterior descending branch, LAD)结扎诱导的 HF 小鼠模型中,通过补充 miR-101-3p agomir(miR-101-3p-Ago, miRNA 模拟物)及 RAC1 抑制剂干预,系统评估 miR-101-3p-RAC1-PAK1 轴对心功能、心肌纤维化及 EndMT 的影响,旨在从“miRNA-靶基因-EndMT”通路,探讨其在缺血性 HF 抗纤维化治疗中的机制与靶向价值。

1 材料和方法

1.1 实验动物和分组

SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 60 只(6~8 周龄,体重 20~25 g),由北京斯贝福生物技术有限公司实验动物中心提供。饲养条件:(22±2)℃,湿度 55%,12 h 光暗交替,自由取食饮水。所有操作遵循动物实验伦理要求并经中新华科伦理委员会批准(批准号:ZXHK-DWLL-2025-0120)。

除假手术组外,其余小鼠均采用 LAD 结扎建立心肌梗死后心力衰竭模型。造模过程中共使用 60 只小鼠,术后 48 h 因急性心源性死亡等原因死亡 7 只,最终完成随访及终点评估的小鼠共 53 只。

根据不同处理方式将小鼠随机分为 7 组:①假手术组(Sham 组),仅开胸穿线不结扎;②模型组, LAD 结扎但不给予药物干预;③阳性对照组(PC 组,美托洛尔临床用药阳性对照);④miR-101-3p-Ago 组;⑤RAC1 抑制剂组(NSC23766);⑥联合干预组(miR-101-3p-Ago+RAC1 抑制剂联合干预);⑦Ago-NC 组(miR-101-3p 阴性对照寡核苷酸)。各组实际纳入小鼠数根据造模成功及随访完成情况略有差异,具体样本数见结果部分。

1.2 心肌梗死模型建立

采用 LAD 结扎法建立小鼠心肌梗死模型^[20-21]。小鼠麻醉后沿左胸第四肋间切口暴露心脏,在冠状动脉 LAD 起始段下方约 1~2 mm 处用 7-0 缝线结扎,心尖变白且搏动减弱视为结扎成功。假手术组

仅在相同位置穿线不结扎。术后所有小鼠均给予青霉素抗感染处理并保温复苏。

为确认模型建立及心功能变化,分别于术后 48 h 及 4 周在 VINNO 6 LAB 超声心动图仪(飞依诺)上进行心功能检测,术后 48 h 数据用于模型成功与基线评估,术后 4 周数据用于终点评估。

1.3 干预方案

造模后第 14 天开始给药,持续 2 周。①阳性对照组:自造模后第 14 天起经灌胃给予美托洛尔 5.14 mg/(kg·d),连续 14 天;②miR-101-3p-Ago 组:尾静脉注射 miR-101-3p-Ago 100 μL(含有 20 nmol),每周 1 次,共 2 次;③Ago-NC 组:按同样方案尾静脉注射等量阴性对照寡核苷酸;④RAC1 抑制剂组:腹腔注射 NSC23766 2.5 mg/(kg·d),每日 1 次,共 14 天^[22-23];⑤联合干预组:在同一时间窗内同时给予 miR-101-3p-Ago(尾静脉注射)与 NSC23766(腹腔注射),剂量与频次同上;⑥假手术组和模型组:分别灌胃或注射等体积生理盐水。

其中,miR-101-3p-Ago 为苏州金唯智生物科技有限公司合成的化学修饰双链 RNA 寡核苷酸,正义链序列为 5'-UACAGUACUGUGUAACUGAA-3'(hsa-miR-101-3p mature sequence),按厂家说明书溶解配制后用于体内给药。

造模后第 28 天(即给药结束时)进行终点评估,包括超声心动图检查后取材,用于后续组织学、免疫荧光、Western blot 及电镜分析。

1.4 超声心动图分析

检测时将麻醉小鼠仰卧固定于恒温台上,维持体温稳定,并调整麻醉深度使心率控制在 400~450 次/min。利用高频探头获取左心室乳头肌水平短轴图像,并切换至 M 型模式测量各项心功能指标,包括左心室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)、短轴缩短率(fractional shortening, FS)、室间隔舒张/收缩期厚度(interventricular septal thickness in diastole/systole, IVSd/IVSs)、左心室舒张/收缩期末内径(left ventricular end-diastolic/systolic diameter, LVEDD/LVESD)以及左心室后壁舒张/收缩期厚度(left ventricular posterior wall thickness in diastole/systole, LVPWd/LVPWs)等。所有参数由超声心动图仪自带分析软件自动计算并经人工核对,综合评估各组在随访过程中的心功能变化及不同干预措施的效果。

1.5 组织学检查与透射电镜观察

实验结束后,小鼠麻醉深度达标后处死,经磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline, PBS)心脏灌

流充分去血。取左心室中段横断面,梗死模型各组自左心室梗死周边区取材,假手术组取相应解剖部位。部分组织固定于4%多聚甲醛,常规石蜡包埋,制备4 μm 连续切片,采用苏木精-伊红染色法(hematoxylin-eosin, HE)染色观察心肌结构,Masson染色评估胶原纤维沉积与纤维化程度。

另取约1 mm^3 左心室梗死周边区心肌组织块置于2.5%戊二醛固定,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。样品经0.1 mol/L磷酸缓冲液冲洗后在1%四氧化锇中后固定,乙醇梯度脱水、丙酮透化后嵌入环氧树脂。超薄切片经醋酸铀和柠檬酸铅双染色,在透射电镜(Hitachi HT7800, 日本)下观察并拍照,主要评价肌原纤维排列、Z线完整性及线粒体形态与嵴结构等超微结构改变。

1.6 小麦胚芽凝集素荧光染色

将左心室中段梗死周边区心肌组织制备为8 μm 冰冻切片,室温风干后以PBS清洗。切片在10 mg/L Alexa Fluor 594标记的小麦胚芽凝集素(wheat germ agglutinin, WGA)工作液中避光室温孵育30 min, PBS洗涤后以DAPI复染细胞核,抗淬灭封片。采用荧光显微镜(Leica DMi8, 德国)下观察并采集图像^[24]。心肌细胞横截面积使用Image J软件(NIH, USA)测量,每组随机选取多视野并测量足够数量的细胞,取平均值用于统计分析。

1.7 免疫荧光双染检测

心脏石蜡切片经二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化后,按试剂说明进行抗原修复。室温下以5%牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)封闭30 min后,分别孵育以下一抗(4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜):VE-钙黏蛋白(VE-cadherin)、 α 平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)、CD31(稀释比例均为1:400,且均购自Abways)及波形蛋白(Vimentin, 1:100, Abways)。PBS漂洗后,加入相应荧光二抗于室温避光孵育1 h: CoraLite[®] 488标记的山羊抗兔IgG(H+L)或CoraLite[®] Plus 594标记的重组山羊抗小鼠IgG(H+L)(稀释比例均为1:200)。再次PBS洗涤后,使用DAPI复染细胞核。抗淬灭封片剂进行封片。所有切片在激光共聚焦显微镜(NIKON Eclipse Ti, 日本)下观察并采集图像。

1.8 Western blot

取左心室梗死周边区心肌组织,加入RIPA裂解液(含PMSF及蛋白磷酸酶抑制剂),冰浴裂解30 min后12 000 r/min离心10 min,取上清采用BCA法测定蛋白浓度。每份样品30 μg 蛋白经SDS-PAGE分离并转膜至PVDF膜。以含5%脱脂

奶粉的TBST封闭后,于4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育一抗过夜:RAC1(1:1 000, 武汉三鹰)、PAK1(1:3 000, 武汉三鹰)、 α -SMA(1:6 000, 武汉三鹰)、Vimentin(1:20 000, 华安生物)、VE-cadherin(1:2 000, 华安生物)、CD31(1:1 000, 华安生物)以及 β -actin(1:40 000, 华安生物)。次日孵育辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记二抗(1:5 000)1 h, TBST洗膜后采用ECL显色,使用上海培清成像仪获取条带图像,用Image J软件分析灰度值, β -actin作为内参进行归一化处理。

1.9 统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),事后采用Bonferroni多重比较检验;两组间比较采用独立样本 t 检验。统计分析使用GraphPad Prism 9.0软件(GraphPad Software, USA)完成。 $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LAD结扎成功建立小鼠心肌梗死后心力衰竭模型

通过LAD成功建立小鼠心肌梗死后心力衰竭模型,具体实验流程见图1。于术后48 h和4周分别行超声心动图检查,结果显示,与假手术组相比,模型组小鼠在术后48 h即出现明显收缩功能受损,LVEF下降了49.5%($P<0.05$),FS下降了59.4%($P<0.01$),IVSs及LVPWs分别减少了27.2%和24.6%($P<0.01$),LVESD则增加了69.5%($P<0.01$),提示早期已发生心室重塑和收缩功能不全;此时IVSd、LVEDD和LVPWd与假手术组相比差异无显著性($P>0.05$;图2)。

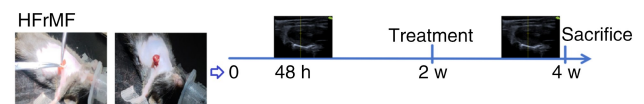


图1. LAD结扎建立小鼠心肌梗死后心力衰竭模型及干预流程示意图

Figure 1. Schematic of the LAD ligation-induced post-myocardial infarction heart failure model and intervention protocol in mice

术后4周,模型组小鼠LVEF和FS进一步降低,LVEF较术后48 h降低45.7%($P<0.05$),FS降低60.7%($P<0.01$);IVSs进一步减小,较术后48 h下降60.8%($P<0.01$),LVEDD较术后48 h时增加49.9%($P<0.01$),而LVESD增加76.5%($P<$

0.01),提示左心室扩张和收缩功能恶化持续进展。模型组 IVSd 在术后 4 周时显著减小,较假手术组下降 54.6% ($P<0.05$),较术后 48 h 下降 57.7% ($P<0.01$),LVPWd 在各时间点差异均无统计学意义,LVPWs 虽显著低于假手术组 ($P<0.05$),但与术后 48 h 相比未见进一步变化(图 2)。本研究采用 LAD 结扎建立模型,在标准短轴 M 型测量条件下,

IVSd、LVEDD 在术后 48 h 内及 LVPWd/LVPWs 的变化幅度相对有限,未出现与 LVEF、FS、IVSs、LVESD 相当的统计学差异,提示上述壁厚指标在此模型及观察时间窗内对重塑变化敏感性较低,但不影响心力衰竭模型构建成功与否及整体重塑趋势的判断。

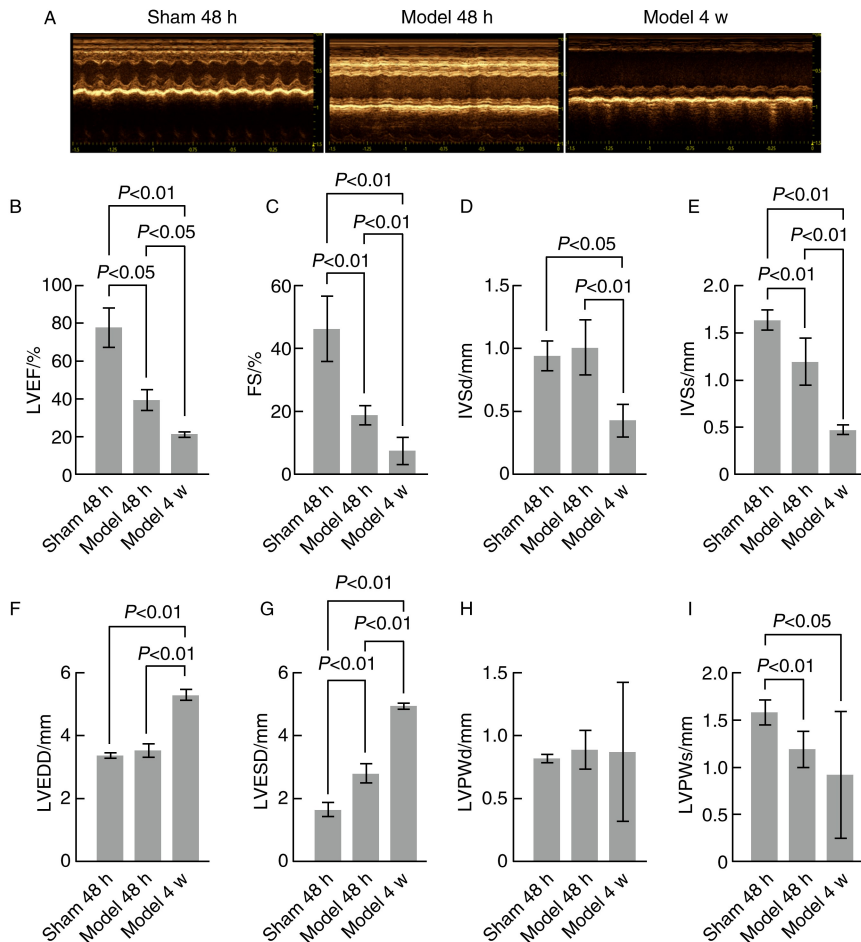


图 2. LAD 结扎建立小鼠心肌梗死心力衰竭模型心功能的超声心动图评价

A 为假手术组术后 48 h 及模型组术后 48 h、4 周的 M 型超声代表图像;B~I 为心功能参数定量分析($n=6$)。

Figure 2. Echocardiographic assessment of cardiac function in mice after LAD ligation

2.2 miR-101-3p 及 RAC1 抑制对心功能的影响

术后 2 周,对 LAD 结扎的小鼠按组分别给予 Ago-NC、miR-101-3p-Ago、RAC1 抑制剂 NSC23766、miR-101-3p-Ago 与 RAC1 抑制剂联合干预或阳性对照药物美托洛尔,持续 2 周,术后 4 周时行超声心动图评估心功能(图 3)。与假手术组相比,模型组 LVEF 和 FS 分别下降 77.6% 和 81.7% (均 $P<0.01$),LVEDD 和 LVESD 分别增加 51.0% ($P<0.01$) 和 134.9% ($P<0.01$),提示心功能受损、左心室扩张;阳性对照组上述指标部分逆转了这一变

化。与模型组相比,各干预组均显示出不同程度的心功能改善及心室重塑减轻。在收缩功能方面,miR-101-3p-Ago 组与 RAC1 抑制剂组 LVEF 值分别回升 120.9% 和 110.6% (均 $P<0.05$),FS 值同步提升 130.6% 和 117.4% (均 $P<0.05$);而在左室内径方面,上述两组 LVEDD 略有下降,但差异无统计学意义,而两组 LVESD 均显著减小(分别减小 20.6% 和 26.9%,均 $P<0.05$),表明补充 miR-101-3p 或抑制 RAC1 能在一定程度上减轻心室重塑。值得关注的是,联合干预组的效果最为显著,其 LVEF 和

FS 的改善幅度高达 270.8% 和 323.3% (均 $P < 0.01$), 同时 LVEDD 和 LVESD 分别下降 30.3% ($P < 0.01$) 和 48.9% ($P < 0.01$)。更重要的是, 联合干预组在 LVEF、FS 及 LVESD 等关键指标上的改善程度均显著优于单独使用 miR-101-3p-Ago ($P < 0.05$), 提示二者联合应用具有协同增效作用。阴性对照

Ago-NC 组各指标与模型组相比差异无统计学意义, 提示干预效果具有特异性。关于室壁厚度, 各干预对 LVPWd、LVPWs 无显著影响, 但阳性对照组和联合干预组 IVSd 和 IVSs 显著增加 (均 $P < 0.05$), 提示其对改善室间隔重塑有积极作用 (图 3)。

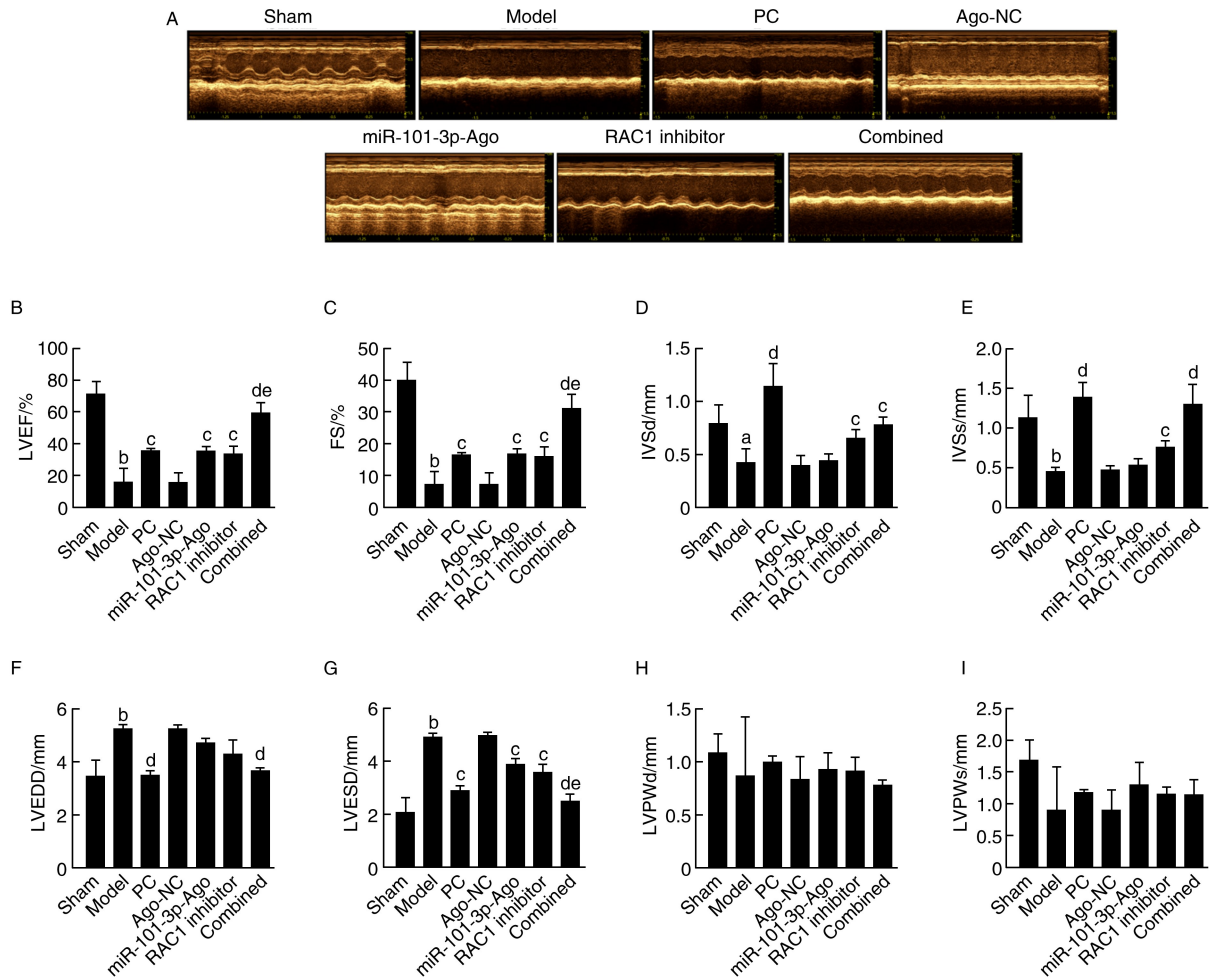


图 3. miR-101-3p 与 RAC1 抑制剂对小鼠心功能的影响

A 为各组小鼠术后 4 周 M 型超声心动图代表图像。B ~ I 为心功能主要参数定量分析 ($n=6$)。

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与假手术组比较; c 为 $P < 0.05$, d 为 $P < 0.01$, 与模型组比较; e 为 $P < 0.05$, 与 miR-101-3p-Ago 组比较。

Figure 3. Effects of miR-101-3p and RAC1 inhibition on cardiac function in mice

2.3 miR-101-3p 及 RAC1 抑制对 RAC1/PAK1 信号通路及 EndMT 的影响

Western blot 结果显示, 与假手术组相比, 模型组心肌组织中 RAC1 和 PAK1 的蛋白表达升高了 2.49 倍和 1.86 倍 (均 $P < 0.01$), 提示 RAC1/PAK1 通路被激活。给予各种干预后, 与模型组相比, 单独使用 miR-101-3p-Ago 或 RAC1 抑制剂均能显著下调 RAC1 和 PAK1 的表达 (均 $P < 0.01$), 而联合干预组抑制效果最为显著, 其 RAC1 和 PAK1 的表达水平较模型组分别下降 61.8% 和 46.1% (均 $P < 0.01$), 并

且该抑制效果显著强于单独使用 miR-101-3p-Ago (均 $P < 0.01$), 提示二者存在协同抑制作用 (图 4)。同时, EndMT 相关标志物也发生了改变。模型组中 α -SMA 和 Vimentin 表达上调至假手术组的 3.33 倍和 3.18 倍 (均 $P < 0.01$), 而 VE-cadherin 和 CD31 表达分别降低至假手术组的 16.4% 和 19.7% (均 $P < 0.01$), 表明心肌梗死后发生了显著的 EndMT (图 4)。与模型组相比, 各干预组 Vimentin 和 α -SMA 的表达均显著降低, 同时 CD31 和 VE-cadherin 的表达显著升高 (均 $P < 0.01$)。联合干预组在恢复内皮表

型方面的效果尤为突出,其 α -SMA 和 Vimentin 分别降低 56.1% 和 53.5%, VE-cadherin 和 CD31 分别回升 2.75 倍和 3.63 倍(均 $P < 0.01$),且在改善 VE-cadherin 和 CD31 表达方面显著优于单独使用 miR-

101-3p-Ago(均 $P < 0.01$),各项指标均接近阳性对照组水平(图 4)。这些结果提示,miR-101-3p 上调和 RAC1 抑制可协同抑制 RAC1/PAK1 信号通路,并进而更有效地逆转 EndMT 过程。

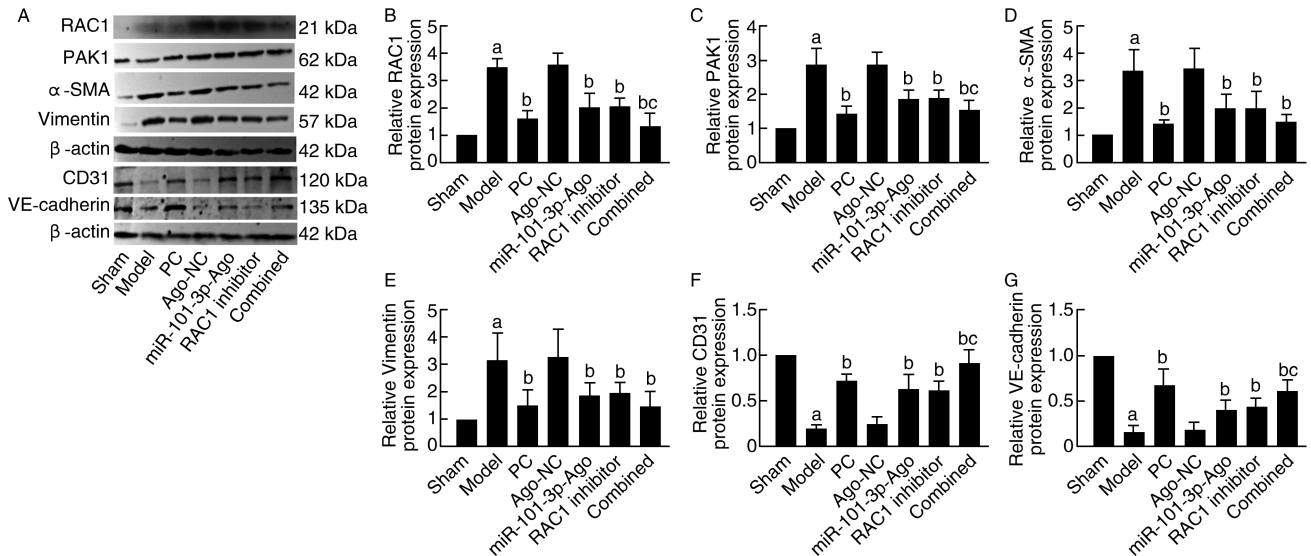


图 4. miR-101-3p 和 RAC1 抑制剂对 RAC1/PAK1 通路和 EndMT 相关蛋白表达的影响

A 为 Western blot 检测各组心肌组织中 RAC1、PAK1、 α -SMA、Vimentin、VE-cadherin 和 CD31 蛋白表达;B~G 为相应蛋白表达灰度定量分析($n=4$)。a 为 $P < 0.01$,与假手术组比较;b 为 $P < 0.01$,与模型组比较;c 为 $P < 0.01$,与 miR-101-3p-Ago 组比较。

Figure 4. Effects of miR-101-3p and RAC1 inhibition on RAC1/PAK1 signaling and EndMT-related protein expression

2.4 miR-101-3p 及 RAC1 抑制对心肌纤维化、肥厚和超微结构的影响

HE 和 Masson 染色结果显示,与假手术组相比,模型组左心室梗死边缘区及间质出现广泛的心肌纤维排列紊乱和胶原沉积增多,提示存在显著纤维化和结构重塑(图 5)。经 miR-101-3p-Ago 或 RAC1 抑制剂干预后,纤维化面积/胶原容积分数(collagen volume fraction, CVF)较模型组显著降低,其中 miR-101-3p-Ago 组降低 54.7%, RAC1 抑制剂组降低 44.7%(均 $P < 0.01$)。尤为突出的是,联合干预组 CVF 降幅达 66.2%($P < 0.01$),且较 miR-101-3p 组降低 25.4%($P < 0.05$),提示两者联用在抗纤维化方面具有协同作用(图 5)。WGA 荧光染色进一步反映了心肌细胞肥厚情况。模型组横截面心肌细胞面积显著增加,达假手术组的 6.89 倍($P < 0.01$),而 miR-101-3p-Ago 组、RAC1 抑制剂组及联合干预组均能不同程度减小细胞横截面积,其中联合干预组减幅高达 83.3%($P < 0.01$),且较 miR-101-3p 组进一步减小 61.0%($P < 0.05$;图 5),提示 miR-101-3p 上调及 RAC1 抑制不仅减轻纤维化,也有助于抑制肥厚性重塑。透射电镜观察中发现,模型组心肌细

胞可见肌原纤维排列紊乱、断裂,线粒体明显肿胀、嵴结构模糊甚至断裂。miR-101-3p-Ago 组和 RAC1 抑制剂组上述超微结构损伤有所减轻,而联合干预组肌节结构较规整、线粒体形态更为接近假手术组(图 5),与功能和病理学结果相一致。

2.5 免疫荧光双染色显示 miR-101-3p 与 RAC1 抑制剂联合抑制梗死周边区 EndMT

为进一步评估梗死后 EndMT 及干预的影响,我们对左心室梗死周边区组织行免疫荧光双染检测,并采用激光共聚焦显微镜采集图像。结果显示,与假手术组相比,模型组内皮标志 VE-cadherin 和 CD31 荧光信号明显减弱,而间质/肌成纤维标志 α -SMA 与 Vimentin 信号显著增强;在 Merge 图中可见内皮标志与间质标志在同一血管结构周围相邻或部分重叠的区域增多,提示损伤心肌内 EndMT 过程被激活。定量分析结果显示,模型组中发生 EndMT 的内皮细胞比例显著升高:其中 α -SMA⁺VE-cad⁺ 双阳性细胞占 VE-cad⁺ 内皮细胞的比例升高至假手术组的 7.26 倍($P < 0.01$),Vim⁺CD31⁺ 双阳性细胞占 CD31⁺ 内皮细胞的比例提高至假手术组的 17.53 倍($P < 0.01$),表明梗死周边区大量内皮细胞发生间质转

化(图6)。

经 miR-101-3p-Ago 或 RAC1 抑制剂干预后, EndMT 进程均受到显著抑制。与模型组相比, miR-101-3p-Ago 组 α -SMA⁺ VE-cad⁺/VE-cad⁺ 比例降低 69.4% ($P < 0.01$), Vim⁺ CD31⁺/CD31⁺ 比例降低 60.9% ($P < 0.01$); RAC1 抑制剂组上述比例分别降低 73.6% ($P < 0.01$) 和 62.0% ($P < 0.01$)。联合干预组的抑制效果最为显著,与模型组相比, α -SMA⁺ VE-cad⁺/VE-cad⁺ 比例降低 85.9%, Vim⁺ CD31⁺/CD31⁺ 比例

降低 77.6%。进一步分析显示,联合干预组上述两项指标较 miR-101-3p 组分别下降 54.0% 和 42.6% (均 $P < 0.05$),提示两者联用对抑制 EndMT 具有协同作用(图6)。综合来看,免疫荧光双染色结果与 Western blot 检测的内皮/间质标志及 RAC1/PAK1 通路变化趋势高度一致,从组织形态学层面为 miR-101-3p 上调及 RAC1 抑制能够有效减轻梗死后心肌 EndMT 提供了直接证据,联合干预在此基础上展现出更强的保护效应。

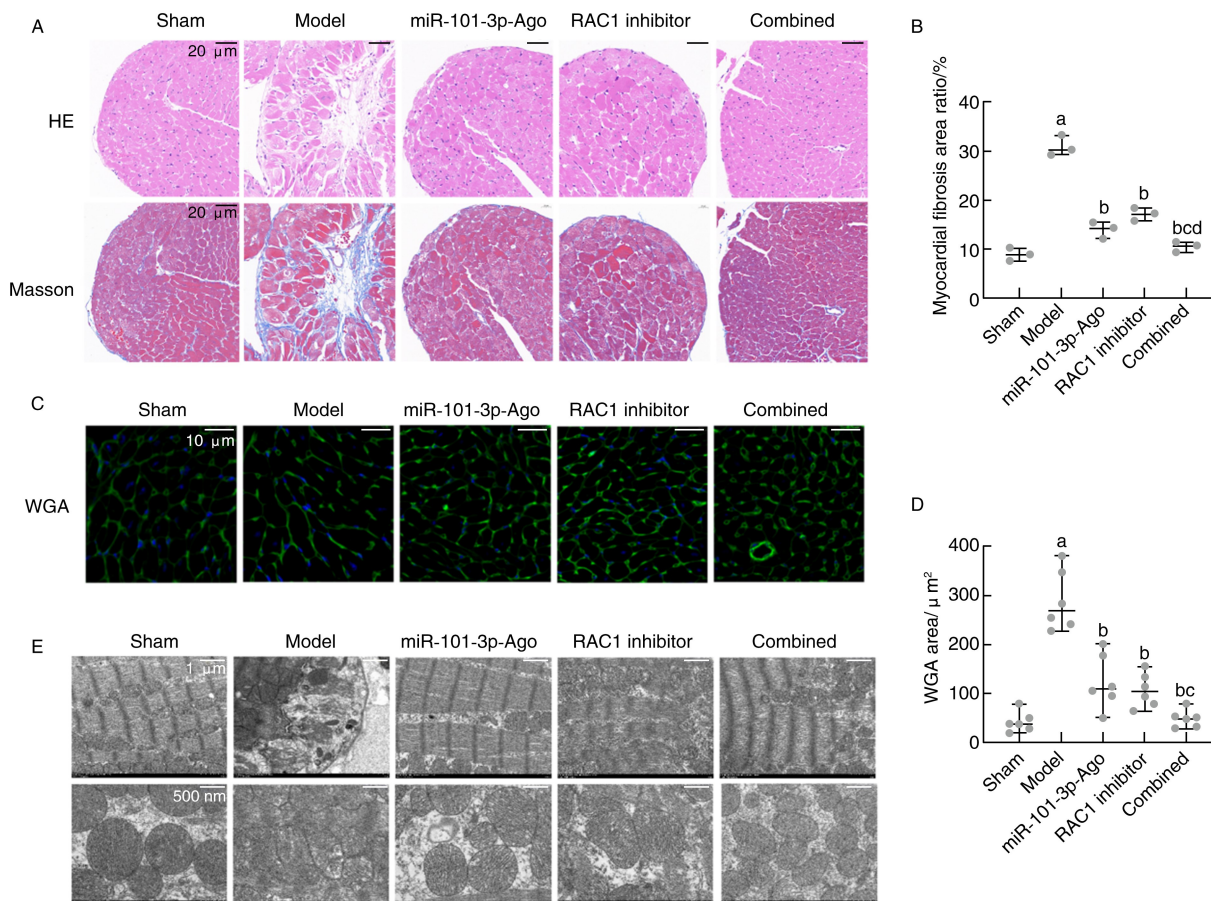


图5. miR-101-3p 与 RAC1 抑制剂对心肌纤维化、肥厚及超微结构的影响

A 为 HE 及 Masson 三色染色显示各组左心室梗死边缘区及间质组织形态和胶原沉积情况, Masson 染色中蓝色区域代表胶原纤维。

B 为心肌纤维化面积定量分析, 每只小鼠随机选取 6 个视野进行测量并取平均值 ($n=3$)。C 为 WGA 荧光染色显示心肌细胞横截面积变化。D 为心肌细胞横截面积定量分析 ($n=6$)。E 为 TEM 观察各组心肌超微结构代表图, 显示肌原纤维排列及线粒体形态。a 为 $P < 0.01$, 与假手术组比较; b 为 $P < 0.01$, 与模型组比较; c 为 $P < 0.05$, 与 miR-101-3p-Ago 组比较; d 为 $P < 0.01$, 与 RAC1 抑制剂组比较。

Figure 5. Effects of miR-101-3p and RAC1 inhibition on myocardial fibrosis, hypertrophy and ultrastructural changes

3 讨论

本研究以 LAD 结扎诱导的缺血性心力衰竭小鼠为基础, 在同一模型中综合评估了 miR-101-3p 上调及 RAC1 抑制对心功能、心肌纤维化、EndMT 表型以及超微结构的影响。结果表明, miR-101-3p-

Ago 与 RAC1 抑制剂 NSC23766 单药干预均可改善左心室收缩功能, 减轻胶原沉积和肥厚, 并伴随 RAC1/PAK1 信号下调及 EndMT 相关分子表型减弱; 联合干预组在多数指标上的改善幅度更为明显。这些发现提示, miR-101-3p 上调和 RAC1/PAK1 信号通路抑制, 与梗死后心肌纤维化及心室

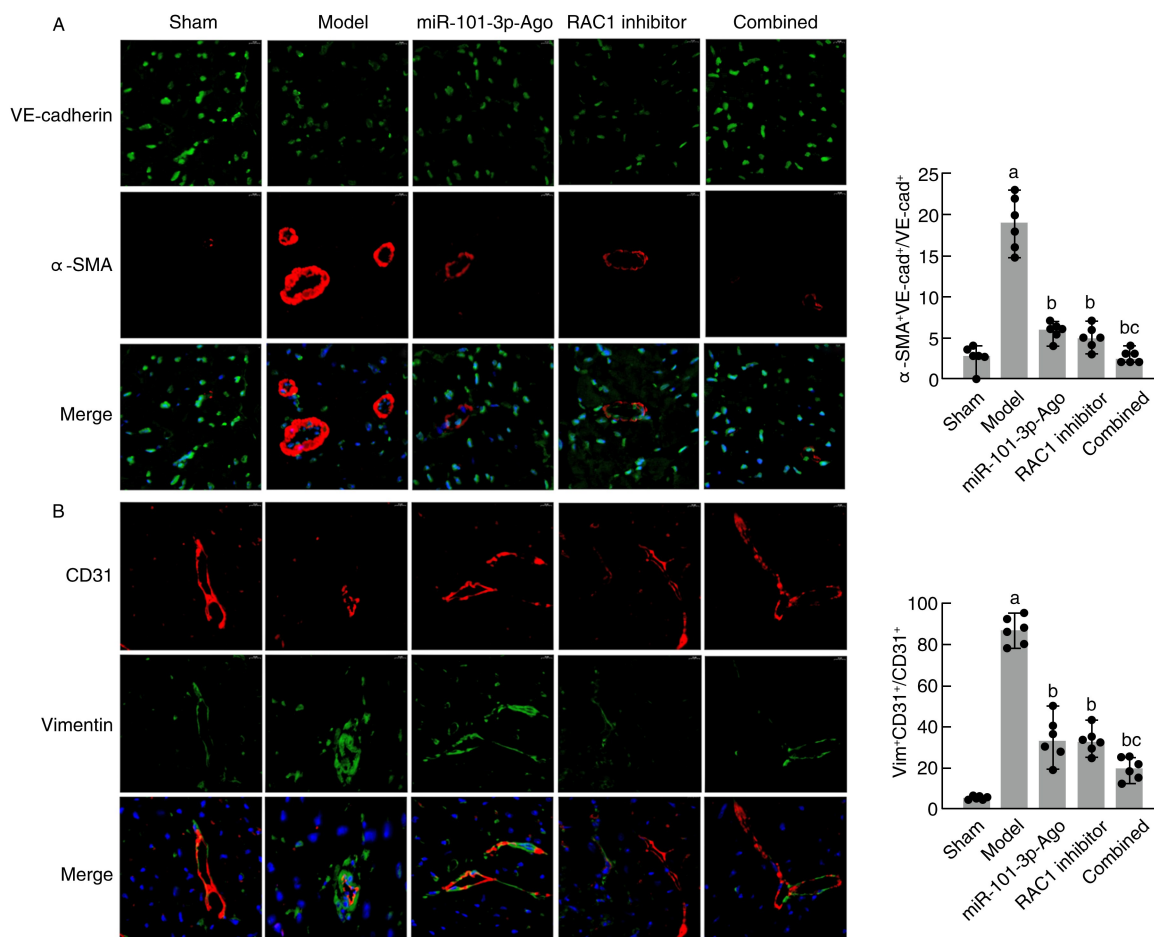


图 6. miR-101-3p 与 RAC1 抑制剂对心肌组织 EndMT 的影响

A 为 VE-cadherin/α-SMA 免疫荧光双染色及半定量结果 ($n=6$) ; B 为 CD31/Vimentin 双染色及半定量结果 ($n=6$) 。

a 为 $P<0.01$, 与假手术组比较; b 为 $P<0.01$, 与模型组比较; c 为 $P<0.05$, 与 miR-101-3p-Ago 组比较。

Figure 6. Effects of miR-101-3p and RAC1 inhibition on EndMT in myocardial tissue

重塑进程密切相关,二者还可能通过调控 EndMT 进程发挥部分心肌保护作用。

本研究将 EndMT 作为连接缺血损伤与纤维化进展的关键枢纽加以验证。共聚焦免疫荧光双染色结果显示,与假手术组相比,模型组内皮标志 VE-cadherin 和 CD31 信号减弱,而间质/肌成纤维标志 α-SMA 和 Vimentin 增强,并在梗死周边区出现更多内皮标志与间质标志相邻或部分重叠的区域,提示内皮表型丢失与间质表型获得共存,EndMT 过程被激活。miR-101-3p-Ago 或 RAC1 抑制剂干预后,上述改变出现逆转,联合干预组最为显著,与 Western blot 的分子结果一致,支持抑制 EndMT 是其减轻纤维化效应的重要细胞学基础之一。在缺血再灌注或持续缺血应激背景下,RAC1 过度激活可能促使内皮连接解体和细胞迁移增强,推动 EndMT 及纤维化效应细胞积聚。本研究中,模型组左心室梗死边缘区 RAC1、PAK1 表达上调,并伴随 α-SMA、Vimentin

升高及 VE-cadherin、CD31 下调;miR-101-3p 上调和 RAC1 抑制均可使上述分子谱向“低 RAC1/PAK1、低间质标志、高内皮标志”的方向回调,联合干预更为显著。这一“分子图谱-组织表型”的同向改变,为 miR-101-3p-RAC1/PAK1-EndMT 轴参与梗死后纤维化重塑提供了在体证据。超微结构与细胞形态学的观察进一步为上述推断提供了支持。TEM 结果进一步显示,模型组心肌细胞存在肌原纤维排列紊乱、断裂及线粒体明显肿胀、嵴结构模糊等典型损伤,而 miR-101-3p-Ago 及 RAC1 抑制剂均可在不同程度上改善肌节连续性和线粒体形态,联合干预组超微结构最接近假手术组。结合 WGA 染色所示心肌细胞横截面积的恢复,可以推测 miR-101-3p 及 RAC1 抑制不仅减轻了纤维化终末表型,也在一定程度上改善了持续应激状态下的细胞亚结构稳态和肥厚性重塑,从而为心功能恢复提供结构基础。

miRNA 调控具有“网络式”特征,往往可同时影

响多个与纤维化相关的转录/翻译节点。本研究中,miR-101-3p上调和RAC1抑制剂单药干预均可改善心力衰竭小鼠的心功能指标,减轻心肌纤维化,与既往关于miRNA参与心肌纤维化调控、通过多靶点网络介入重塑进程的报道基本一致^[25-27],进一步支持非编码RNA调控网络在心力衰竭病理机制中的重要作用。NSC23766作为相对特异的RAC1抑制剂,可主要限制RAC1的激活状态,而miR-101-3p通过负向调控RAC1表达水平,二者合用在逻辑上相当于在“表达水平和激活状态”两个层面同时施加限制,从而更充分地压低RAC1/PAK1轴的信号强度,这也可解释联合干预组在心功能、纤维化负荷及EndMT表型上的更优表现。EndMT过程在心肌纤维化进展中的作用已在多种模型中得到证实,其可促使内皮细胞向纤维化效应细胞转化,并促进异常基质沉积,进一步削弱心脏功能^[10,28-29],本研究结果与之相呼应,为miRNA治疗与小分子抑制剂联合抗纤维化策略提供了动物模型证据。

从干预策略角度看,本研究在同一模型中设置了两类不同层面的阳性对照。一方面,选择临床指南中已被广泛证实可改善缺血性心力衰竭预后的 β 受体阻滞剂美托洛尔作为临床用药阳性对照,提供接近标准药物治疗背景下心功能与重塑改善程度的参照,有助于评估miR-101-3p及RAC1抑制在整体效应上的相对贡献。另一方面,本研究同时设置RAC1抑制剂NSC23766单药组与miR-101-3p-Ago+NSC23766联合干预组,用以开展靶向RAC1/PAK1-EndMT通路的机制对照研究。本研究将miR-101-3p-Ago与RAC1抑制剂的给药起始时间统一设定为LAD结扎后第14天。在心脏超声明确证实收缩功能受损、心脏结构发生重塑的基础上,旨在评估慢性病理重塑背景下,靶向干预对纤维化及心功能的逆转作用。该时间窗在可较好模拟临床多数心肌梗死患者进入慢性心力衰竭管理阶段后接受长期药物治疗的情境。

需要指出的是,本研究在时间窗设定、机制深度和模型层面仍存在若干局限。一方面,本研究仅在术后第14天起给予miR-101-3p-Ago和RAC1抑制剂干预,并未系统比较不同干预起始时间(如术后即刻、1周等)的疗效,因而尚不能回答更早干预是否可获得额外获益的问题。此外,本研究采用常规二维超声短轴M型测量评估室间隔及后壁厚度,该方法主要反映整体重塑趋势,对局灶性壁变薄及不同节段间重塑差异的分辨能力有限,因此IVSd、

LVPWd等参数在本模型和时间窗内未呈现显著变化。未来可结合三维超声或心脏磁共振成像(cardiac magnetic resonance imaging, MRI)等手段,对不同节段壁厚和纤维化负荷进行更精细的量化分析。另一方面,在机制验证方面,本研究主要通过miR-101-3p过表达及NSC23766的功能性干预,并结合RAC1/PAK1与EndMT相关分子表型变化,提示miR-101-3p-RAC1/PAK1-EndMT轴参与梗死后心肌纤维化与重塑过程,尚未在本研究中完成RAC1 3'非翻译区(3' untranslated region, 3' UTR)双荧光素酶报告实验,也未在同一体系内开展miR-101-3p抑制剂、RAC1过表达或激活型RAC1的“救援”验证,EndMT在纤维化区域中的定量贡献率(如双阳性细胞占比)及超微结构损伤的量化分析亦未系统展开,因此当前结果更适合作为因果链条的在体支持,而非终结性证据。此外,本研究基于在体小鼠心肌梗死模型,无法完全排除不同细胞类型间信号交叉对话以及神经体液等全身因素的影响;同时尚未通过原代内皮细胞或共培养体系,对miR-101-3p靶基因网络及其多细胞信号互作机制开展精细化验证与解析。本研究结论主要适用于缺血性心肌纤维化,对于非缺血性心力衰竭类型的外推仍需谨慎。

综上,在小鼠心肌梗死后慢性心力衰竭模型中,我们观察到miR-101-3p上调及RAC1抑制均可改善心功能、减轻心肌纤维化和心肌细胞肥大,该效应与RAC1/PAK1信号抑制及梗死周边区EndMT表型减弱相伴,相较于单一干预,miR-101-3p与RAC1抑制剂联合干预在心功能、组织病理及超微结构层面的改善效果更优,提示miR-101-3p-RAC1/PAK1-EndMT轴可能成为梗死后心肌纤维化重塑中的一条重要调控通路。后续仍需依托过表达、抑制、报告基因、细胞模型等多维度实验体系,进一步精准验证该调控轴因果调控关系。即便存在上述局限,本研究已为缺血性心力衰竭慢性期通过联合靶向miRNA与小分子药物、干预RAC1/PAK1-EndMT轴以阻滞纤维化,提供了有价值的在体实验证据与理论参考。

[参考文献]

- [1] XU L, CHEN C, WANG K, et al. Reprogramming heart failure: physiological orchestration and mechanistic decoding of exercise benefits[J]. BMC Cardiovasc Disord, 2025, 26(1): 52.
- [2] HUNG C Y, LEE W L, SHEU W H, et al. Higher hemoglobin is associated with better survival in coronary artery disease, heart failure with reduced ejection fraction, and chronic kidney disease

- [J]. *Am Heart J Plus*, 2025, 61: 100685.
- [3] ADHIKARI S, IBRAHIM D, KOTHAKAPA S L, et al. A narrative review on endomyocardial fibrosis: unraveling an under-recognized tropical heart disease[J]. *Cureus*, 2025, 17(11): e96651.
- [4] HUA X, SUN Z, LIANG Z, et al. Engineered T cell therapy for the treatment of cardiac fibrosis during chronic phase of myocarditis[J]. *Theranostics*, 2026, 16(4): 2037-2051.
- [5] LEE Y, WU X, NARAYANAN A, et al. Exercise training ameliorates myocardial dysfunction through fibronectin-mediated mechanotransduction in a swine model of ischemic heart disease[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2026, 330(1): H31-H45.
- [6] HARDY S A, LIESINGER L, PATRICK R, et al. Extracellular matrix protein-1 as a mediator of inflammation-induced fibrosis after myocardial infarction[J]. *JACC Basic Transl Sci*, 2023, 8(12): 1539-1554.
- [7] ANGELI E, JORDAN M, OTTO M, et al. The role of fibrosis in cardiomyopathies: an opportunity to develop novel biomarkers of disease activity[J]. *Matrix Biol*, 2024, 128: 65-78.
- [8] 杨启娟, 苏晓灵. 炎症因子与急性心肌梗死的研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2023, 31(7): 639-644.
- YANG Q J, SU X L. Research progress on inflammatory factor and acute myocardial infarction[J]. *Chin J Arterioscler*, 2023, 31(7): 639-644.
- [9] ZHANG M, LIANG P, WU L, et al. Replacing cholesterol in liposomes by an astragaloside IV derivative prolongs the circulation time and improves drug delivery to the fibrotic heart[J]. *J Control Release*, 2026, 389: 114486.
- [10] GUO Z, LI L, LUO J, et al. The Ets2 super-enhancer modulates endothelial-mesenchymal transition during cardiac aging[J]. *Cardiovasc Res*, 2026, 121(18): 2892-2908.
- [11] 刘欣, 唐红悦, 张明明. 急性心肌梗死演进过程中 miRNA 的作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2023, 31(11): 1001-1006.
- LIU X, TANG H Y, ZHANG M M. Research progress on the involvement of miRNA in the regulation of the whole process of acute myocardial infarction[J]. *Chin J Arterioscler*, 2023, 31(11): 1001-1006.
- [12] DING H, YAO J, XIE H, et al. MicroRNA-195-5p downregulation inhibits endothelial mesenchymal transition and myocardial fibrosis in diabetic cardiomyopathy by targeting Smad7 and inhibiting transforming growth factor beta 1-smads-snail pathway[J]. *Front Physiol*, 2021, 12: 709123.
- [13] LIANG C, GAO L, LIU Y, et al. MiR-451 antagonist protects against cardiac fibrosis in streptozotocin-induced diabetic mouse heart[J]. *Life Sci*, 2019, 224: 12-22.
- [14] CHEN M, WU Y, CHEN C. Extracellular vesicles as emerging regulators in ischemic and hypertrophic cardiovascular diseases: a review of pathogenesis and therapeutics [J]. *Med Sci Monit*, 2025, 31: e948948.
- [15] LI C, XIA J, YAO W, et al. Mechanism of lncRNA XIST/miR-101-3p/ZEB1 axis in EMT associated with silicosis[J]. *Toxicol Lett*, 2022, 360: 11-19.
- [16] LI P, LI J, CHEN T, et al. Expression analysis of serum microRNAs in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Int J Mol Med*, 2014, 33(6): 1554-1562.
- [17] MERONI M, LONGO M, ERCONI V, et al. MiR-101-3p downregulation promotes fibrogenesis by facilitating hepatic stellate cell transdifferentiation during insulin resistance[J]. *Nutrients*, 2019, 11(11): 2597.
- [18] WU X, TU X, JOENG K S, et al. Rac1 activation controls nuclear localization of beta-catenin during canonical Wnt signaling[J]. *Cell*, 2008, 133(2): 340-353.
- [19] TEUBER J P, SCISSORS R E, BRODY M J. Cardiomyocyte Rac1 signaling in hypertrophy, arrhythmia, and cardiac stress adaptation [J]. *J Mol Cell Cardiol Plus*, 2025, 14: 100826.
- [20] KOLK M V, MEYBERG D, DEUSE T, et al. LAD-ligation: a murine model of myocardial infarction[J]. *J Vis Exp*, 2009(32): e1438.
- [21] LINDSEY M L, BRUNT K R, KIRK J A, et al. Guidelines for *in vivo* mouse models of myocardial infarction[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2021, 321(6): H1056-H1073.
- [22] DU X Y, XIANG D C, GAO P, et al. Inhibition of (pro) renin receptor-mediated oxidative stress alleviates doxorubicin-induced heart failure[J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 874852.
- [23] SHEN E, LI Y, LI Y, et al. Rac1 is required for cardiomyocyte apoptosis during hyperglycemia [J]. *Diabetes*, 2009, 58(10): 2386-2395.
- [24] BAGEGHNI S A, FRENTZOU G A, DRINKHILL M J, et al. Cardiomyocyte-specific expression of the nuclear matrix protein, CIZ1, stimulates production of mono-nucleated cells with an extended window of proliferation in the postnatal mouse heart [J]. *Biol Open*, 2017, 6(1): 92-99.
- [25] WANG Y, YU J, OU C, et al. miRNA-146a-5p inhibits hypoxia-induced myocardial fibrosis through EndMT [J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2024, 24(2): 133-145.
- [26] WANG J, LI H, LV Z, et al. The miR-214-3p/c-Ski axis modulates endothelial-mesenchymal transition in human coronary artery endothelial cells *in vitro* and in mice model *in vivo*[J]. *Hum Cell*, 2022, 35(2): 486-497.
- [27] REVENTUN P, SÁNCHEZ-ESTEBAN S, COOK-CALVETE A, et al. Endothelial ILK induces cardioprotection by preventing coronary microvascular dysfunction and endothelial-to-mesenchymal transition [J]. *Basic Res Cardiol*, 2023, 118(1): 28.
- [28] CHENG W, LI X, LIU D, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition: role in cardiac fibrosis[J]. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2021, 26(1): 3-11.
- [29] SUN Q, WANG M, LIU L, et al. PM2.5 induce endothelial-mesenchymal transition and cardiac fibrosis via the NCOA4-mediated ferritinophagy[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2025, 12(45): e07536.
- (此文编辑 许雪梅)