

# 心脏高表达基因 hhole 通过 ERK 结合位点抑制心肌肥厚信号分子 ANF 的转录活性

周军媚<sup>1</sup>, 姚峰<sup>2</sup>, 吴秀山<sup>3</sup>, 王跃群<sup>3</sup>, 姜志胜<sup>1</sup>

(南华大学 1. 基础医学博士后流动站 心血管疾病研究所 动脉硬化湖南省重点实验室 动脉硬化性疾病

湖南省国际科技合作创新基地, 2. 实验动物学部, 湖南省衡阳市 421001; 3. 湖南师范大学省部共建

淡水鱼类发育生物学国家重点实验室 心脏发育研究中心, 湖南省长沙市 410081)

[关键词] hhole; 心肌肥厚; ANF; 突变体; ERK

[摘要] **目的** 探讨心脏高表达基因 hhole 调控心肌肥厚信号分子 ANF 的转录活性的分子机制。**方法** 利用生物信息学在线软件分析 hhole 蛋白的分子结构。利用酶切法和环状诱变技术突变得 hhole 基因的突变体重组质粒。将突变体和野生型的重组质粒分别转染 HEK293 细胞系, 测定荧光素酶报告基因 ANF 的转录活性。**结果** 生物信息学分析发现 hhole 蛋白含有 ERK 结合位点和多聚脯氨酸序列。利用酶切法构建了 4 个截短突变体重组质粒, 环状质粒定点诱变的方法构建了 3 个定点突变的突变体。荧光报告系统分析发现 pCMV-tag2B-TD 与 pCMV-tag2B-hhole 全长均能强烈地抑制 ANF 的转录活性。**结论** hhole 蛋白主要通过其 ERK 结合位点抑制心肌肥厚信号分子 ANF 的转录活性。

[中图分类号] R5; Q78

[文献标识码] A

## Heart high-expressing gene hhole regulated the transcriptional activity of cardiac hypertrophic signaling molecule ANF by its ERK binding site

ZHOU Junmei<sup>1</sup>, YAO Feng<sup>2</sup>, WU Xiushan<sup>3</sup>, WANG Yuequn<sup>3</sup>, JIANG Zhisheng<sup>1</sup>

(1. Post-doctoral Mobile Stations for Basic Medicine & Institute of Cardiovascular Disease & Key Laboratory for Arteriosclerosis of Hunan Province & Hunan International Scientific and Technological Cooperation Base of Arteriosclerotic Disease, 2. Department of Laboratory Animal Science, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China; 3. State Key Laboratory of Development Biology of Freshwater Fish & the Center for Heart Development, College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha, Hunan 410081, China)

[KEY WORDS] hhole; cardiac hypertrophy; ANF; mutant; ERK

[ABSTRACT] **Aim** To study the molecular mechanism of heart high-expressing gene hhole on regulating the transcriptional activity of cardiac hypertrophic signaling molecule ANF. **Methods** Bioinformatics online software was used to analyse the molecular structure of hhole protein. Several mutants of the recombinant plasmid pCMV-tag2B-hhole were constructed by restriction digestion and site-directed mutagenesis. The mutant and wild-type recombinant plasmids were transfected into HEK293 cell line respectively to determine the transcriptional activity of luciferase reporter gene ANF.

**Results** The bioinformatics analysis reveals that hhole protein contains a binding site of ERK (D-domain) and proline-rich SH3 binding motifs. Four mutants of the recombinant plasmid pCMV-tag2B-hhole have been constructed by restriction digestion and three mutants have been constructed by site-directed mutagenesis. The report assay showed that recombinant plasmids pCMV-tag2B-TD and pCMV-tag2B-hhole could suppress strongly the transcriptional activities of ANF. **Conclusion** The binding site of ERK-D-domain of hhole protein played a crucial role in inhibiting the tran-

[收稿日期] 2019-05-06

[修回日期] 2019-05-25

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(31872315, 31572349); 湖南省自然科学基金(2016JJ6130)

[作者简介] 周军媚, 博士研究生, 讲师, 主要从事心血管疾病基因调控的机制研究, E-mail 为 junmeizhou@outlook.com。通信作者姜志胜, 教授, 博士研究生导师, 主要研究方向为动脉粥样硬化和缺血性心肌损伤的发病机制及其防治的研究, E-mail 为 z\_sjiang@126.com。通信作者王跃群, 教授, 博士研究生导师, 主要研究方向为心脏发育基因调控和心脏疾病发生的分子机制研究, E-mail 为 yuequnwang@hunnu.edu.cn。

scriptional activities of hypertrophic signal molecule ANF.

人类 hole 基因 (human hole, hhole) 又名 TMEM121, 位于人类 14 号染色体 14q32.33, 编码一个具有 6 个跨膜区的蛋白。最早的 hole 基因是在鸡胚心脏中发现的<sup>[1]</sup>。人类的 hhole 基因全长是利用鸡 hole 基因序列在人类 EST 数据库中搜索得到相互重叠的 EST 然后以人类胚胎心脏 cDNA 文库为模板进行 PCR 克隆得到的<sup>[2]</sup>。我们的前期研究发现 hhole 基因在人的心脏组织中表达也很强烈, 过表达 hhole 蛋白能够强烈抑制 MAPK 信号途径中下游信号分子 SRE 和 AP-1 的转录活性<sup>[3]</sup>。2010 年 Zhang 等<sup>[4-5]</sup> 发现广东贵州两地汉族人群中存在 hhole 基因 SNP rs10569304 的插入/缺失 (GCC/-) 的多态性, 其中携带缺失型纯合子基因型的个体罹患先天性心脏病的风险系数明显增加。2016 年我们课题组<sup>[6]</sup> 在异丙肾上腺素诱导的小鼠病理性心肌肥厚模型中发现相对于对照组, 实验组小鼠心脏组织中 hole 基因表达明显上调, 心脏组织特异性过表达 hhole 蛋白能够抑制细胞外信号调节激酶 ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase, ERK) 的表达, 抑制异丙肾上腺素诱导的心肌肥厚的发生, 但其调控机制尚不清楚。

本研究利用生物信息学分析 hhole 蛋白的分子结构, 发现其 N' 端含有 6 个跨膜区, 其 C' 端含有 ERK 的结合位点和结合 SH3 结构域的多聚脯氨酸序列。我们利用酶切法和环状质粒的定点诱变方法构建了 hhole 蛋白的 7 个突变体, 将突变体和心肌肥厚信号分子 ANF 的荧光素酶报告基因 ANF-LUC 共同转染 HEK293 细胞, 通过测试 ANF-LUC 的转录活性来探究 hhole 蛋白抑制心肌肥厚发生的分子机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、HEK293 细胞为本实验室保存; 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNA 凝胶回收试剂盒购自 TaKaRa 公司; DNA Marker 购自 MBI 公司; DNA 引物由上海生物工程技术服务有限公司合成; DMEM 培养基和胎牛血清购自 Gibco 公司; 梭华-Sofast<sup>TM</sup> 基因转染试剂购自厦门太阳马公司; Luciferase assay system 试剂盒购自 Promega 公司; Invitrogen UNIQ-200 质粒大量抽提试剂盒购自上海生物工程技术服务有限公司。

### 1.2 hhole 重组突变体的构建

**1.2.1 构建 4 个截短突变体质粒** 利用 NEBcutter V2.0 在线软件分析 hhole 基因的酶切位点, 发现由于 hhole 基因在 975 bp 处含有 1 个 PstI 酶切位点, 刚好可以将 hhole 的 ERK 结合区 (DD) 和 C' 端的多聚脯氨酸序列 (PP) 分开。于是我们利用酶切方法, 分别得到含有 6 个跨膜区和 ERK 结合区的截短突变质粒 pCMV-tag2B-TD 和只含有多聚脯氨酸序列的截短突变质粒 pCMV-tag2B-PP。为了得到只含有 ERK 结合区的重组质粒, 我们合成了 ERK 结合区的引物 hhole-DD, 上游引物序列为 5'-CGC-CGCCTGCGCTATCACTGGAGCTGCAGCCGC-3', 下游引物序列为 5'-GCGGCTGCAGCTCCAGTGATAGCG-CAGGCGGCG-3' 和突变 ERK 结合区的突变引物 hhole-MDD, 上游引物序列为 5'-CGCCGCTGCGG-CAGAGGCAGAGCTGCAGCCGC-3', 下游引物序列为 5'-GCGGCTGCAGCTCTGCCTCTGCCGAGGCGGCG-3', 其中下划线标注的是突变的碱基。将这两对引物分别退火形成双链然后与 pCMV-tag2B 相连, 得到只含有 ERK 结合区的质粒 pCMV-tag2B-DD 和只含有突变的 ERK 结合区的质粒 pCMV-tag2B-MDD。

**1.2.2 环状质粒的定点诱变法构建 3 个定点突变重组质粒** 将 hhole 编码结合 SH3 结合域的多聚脯氨酸序列的 DNA 序列突变, 设计突变引物。突变多聚脯氨酸序列的引物命名为 hhole-MP, 其上游引物序列为 5'-CCGCCACCCCGGCAGCGCAACTCG-GTGCAGGACACGCGCCGCCGC-3', 下游引物序列为 5'-GCGGCGGCGGCGCTGTCTCTGCACCGAGTTGCCGCTGCCGGGCTGGCGG-3', 其中下划线标注的是突变的碱基。PCR 循环的参数设置为: 95 °C 1 min, 1 个循环; 95 °C 40 s, 60 °C 1 min, 68 °C 6 min (根据质粒的长度, 按照 1 kb/min 计算), 19 个循环; 72 °C, 延伸 10 min, 最后 4 °C 保存。PCR 反应后, 直接在 PCR 反应体系中加入 1  $\mu$ L Dpn I, 混匀后 37 °C 孵育 1 h。Dpn I 消化完毕后可以用于转化, 或者 -20 °C 保存备用。按照相同的方法, 我们得到突变 ERK 的结合位点的 pCMV-tag2B-hole-MD, 突变 C 端的多聚脯氨酸序列的 pCMV-tag2B-hole-MP, 同时突变 ERK 的结合位点和 C 端的多聚脯氨酸序列的 pCMV-tag2B-hole-MDP。测序鉴定突变成功与否。

### 1.3 荧光素酶报告系统分析

利用心肌肥大相关的信号分子作为报告基因, 研究 hhole 蛋白对这些信号分子的转录是否产生影

响。瞬时共转染中利用 LacZ 来测试转染效率。转染前一天将 HEK293 细胞接种于 24 孔板,细胞密度约为  $1 \times 10^5$  个细胞/孔。按照梭华-Sofast™ 基因转染试剂说明书进行转染。转染 48 h 后收获细胞,按照 Promega 公司的 Luciferase assay system 试剂盒的说明书进行细胞裂解和荧光的检测。首先用 PBS 洗涤两次,每孔加 50  $\mu$ L Lysis buffer 裂解细胞之后室温静置 15 min,  $-80^\circ\text{C}$  10 min, 然后  $37^\circ\text{C}$  10 min, 此步骤的目的是让细胞反复冻融,利于细胞裂解。然后刮取细胞,在  $4^\circ\text{C}$  条件下 12 000 r/min 离心 5 min,吸取上清到新的 EP 管,吸取 15  $\mu$ L 至 EP 管进行实验(其余置  $-80^\circ\text{C}$  冻存备用),加入 15  $\mu$ L 的邻硝基苯- $\beta$ -D-半乳糖苷(ONPG),  $37^\circ\text{C}$  恒温培养箱反应 30 min,此时可以看到 EP 管中的溶液呈现黄色,加入 50  $\mu$ L 1 mol/L 的 Trisbase 终止反应。每管加入 300  $\mu$ L 的 ddH<sub>2</sub>O 稀释后,用分光光度计测 420 nm 的吸光值,根据吸光值计算并吸取每管需要的蛋白量入新 EP 以确保每个反应加入的蛋白量是等量的。每管加蛋白体积等量的荧光素酶底物(以保证

荧光素底物是过量的)混匀检测荧光强度,根据所测数据比较其转录活性。实验重复 3 次,每次重复 3 孔。

## 2 结果

### 2.1 生物信息学分析 hhole 蛋白的分子结构

利用在线分析网站 <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/> 分析 hhole 编码的氨基酸序列暗示 hhole 蛋白含有 6 个跨膜区,第一个跨膜起始位置在第 13 氨基酸残基(amino acid, aa)即 13aa 处。6 个跨膜区的位置分别位于 13aa-30aa、40aa-62aa、75aa-97aa、112aa-131aa、182aa-201aa 和 214aa-236aa,其 C'端和 N'端都位于膜内(图 1)。hhole 蛋白的 motifscan 分析网站分析暗示 hhole 蛋白在 272aa-281aa 有 1 个 ERK 的结合位点,其序列为 RDFPP-PALSL,在 284aa-303aa 有一个 SH3(Src homology 3)的结合位点多聚脯氨酸序列,其序列为 QPPPPQRNSVPPPPPLHGP。

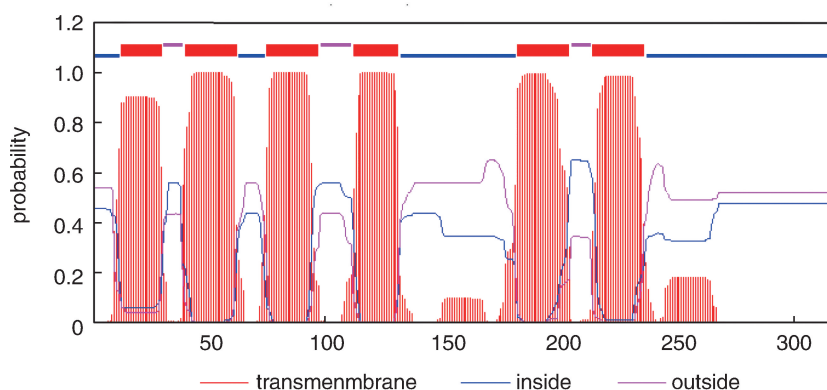


图 1. hhole 蛋白的结构示意图

Figure 1. The molecular structure of hhole protein

### 2.2 hhole 蛋白过表达抑制心肌肥大信号分子 ANF 和 NFAT 的转录活性

转基因动物实验发现心肌细胞特异性过表达 hhole 能抑制异丙肾上腺素诱导的心肌肥厚的发生<sup>[6]</sup>。心房利钠因子(atrial natriuretic factor, ANF)是心肌肥厚的标记基因,ANF 的激活是判断病理性心肌肥厚的重要指标之一<sup>[7]</sup>,活化的 T 细胞核因子(nuclear factor of activated T cells, NFAT)能直接被细胞内的信号激活,激活的 NFAT 能介导心肌细胞中心肌肥厚相关基因的表达<sup>[8]</sup>。为了进一步研究 hhole 基因在心肌肥厚发生过程中的分子机制,选用心肌肥大信号分子 ANF 和 NFAT 作为荧光素酶报

告基因进行研究。将 hhole 过表达真核载体分别与 ANF-LUC 和 NFAT-LUC 共转染 HEK293 细胞,分析实验结果发现 hhole 蛋白在 HEK293 细胞中过度表达,强烈抑制 ANF 和 NFAT 的转录活性(图 2),均抑制了报告基因大约 90% 的转录活性。

### 2.3 hhole 蛋白的突变体在调控 ANF 转录活性中的作用

生物信息学分析 hhole 蛋白的分子结构发现, hhole 蛋白除了含有 6 个跨膜区之外,还含有 ERK 结合区(DD)和多聚脯氨酸序列(PP)。为了进一步测试到底是哪个位点在抑制心肌肥大信号分子的转录活性中起重要作用,我们利用 NEBcutter V2.0

在线软件分析 hhole 基因的酶切位点,发现由于 hhole 基因在 975 bp 处含有 1 个 Pst I 酶切位点,即在 hhole 蛋白的 284 氨基酸处,而在 pCMV-tag2B 的载体上的多克隆位点也有一个 Pst I 酶切位点,所以重组质粒 pCMV-tag2B-hhole 进行 Pst I 酶切后,刚好将 hhole 的 ERK 结合区(DD)和 C'端的多聚脯氨酸序列(PP)分开。于是我们利用酶切方法,分别得到含有 6 个跨膜区和 ERK 结合区的截短突变质粒 pCMV-tag2B-TD 和只含有多聚脯氨酸序列的截短突变质粒 pCMV-tag2B-PP。为了得到只含有 ERK 结

合区的重组质粒,将 ERK 结合区的引物和突变 ERK 结合区的引物分别退火形成双链,形成的双链引物是平末端,于是我们选用平末端切口的 EcoRV 限制性内切酶将 pCMV-tag2B 载体进行酶切,酶切后对线性化载体去磷酸化,以防止其自连,再与退火的引物连接转化,得到只含有 ERK 结合区的质粒 pCMV-tag2B-DD 和只含有突变的 ERK 结合区的质粒 pCMV-tag2B-MDD。突变体质粒构建示意图如图 3,突变质粒通过酶切检测并送生物工程公司测序确定。

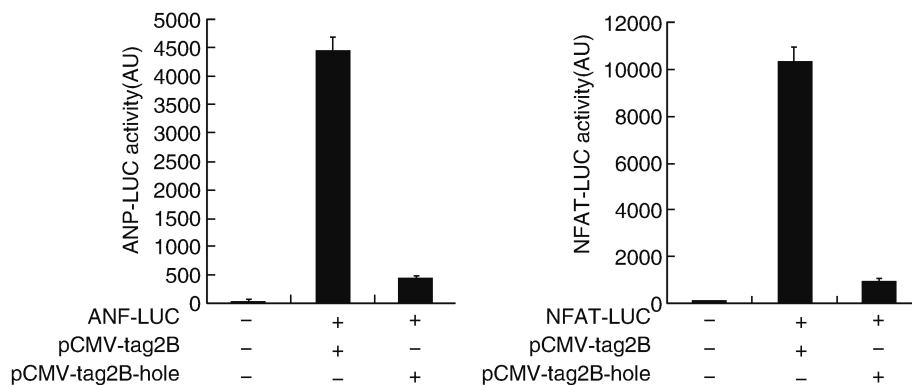


图 2. hhole 明显地抑制 ANF-LUC(左图)和 NFAT-LUC(右图)的转录活性

Figure 2. hhole inhibited strongly the transcriptional activity of ANF( left ) and NFAT( right )

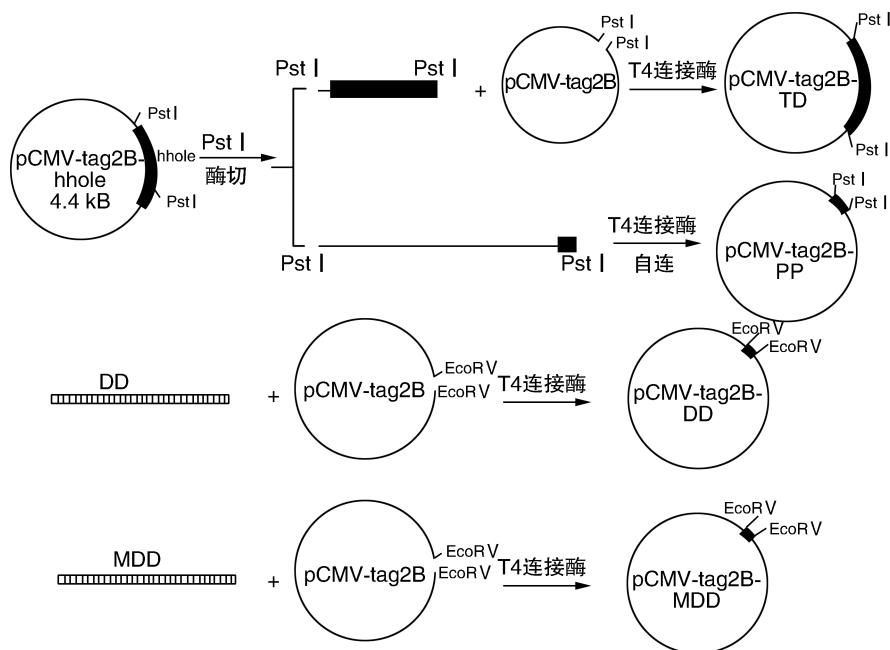


图 3. hhole 蛋白 4 个截短突变体构建示意图

Figure 3. Schematic diagram for construction of truncated mutants of hhole plasmid

将 hhole 蛋白的 4 个突变体质粒和野生型质粒 pCMV-tag2B-hhole 分别与 ANF-LUC 质粒共同转染

HEK293 细胞,结果表明在仅带有 ERK 结合区(DD)或者突变的 ERK 结合区(MDD)和 C'端的多



聚脯氨酸序列(PP)对 ANF-LUC 的转录活性均没有明显的影响,而带有跨膜区和 ERK 结合区的结合位点的截短突变质粒 pCMV-tag2B-TD 和野生型质粒 pCMV-tag2B-hhole 均强烈地抑制了 ANF-LUC 的转录活性(图 4)。

为了进一步研究 hhole 蛋白的 ERK 结合区和多聚脯氨酸序列(PP)抑制 ANF 转录活性的作用,我们决定利用环状质粒定点诱变的方法,设计构建突

变 ERK 结合的重组突变质粒 pCMV-tag2B-hhole-MD,多聚脯氨酸结合位点的几个保守氨基酸的突变重组质粒 pCMV-tag2B-hhole-MP 和同时突变 ERK 结合位点与多聚脯氨酸结合位点的 pCMV-tag2B-hhole-MDP,其他的氨基酸序列均不改变。构建的定点突变质粒送至生物工程公司测序,测序结果显示突变质粒构建成功(图 5)。

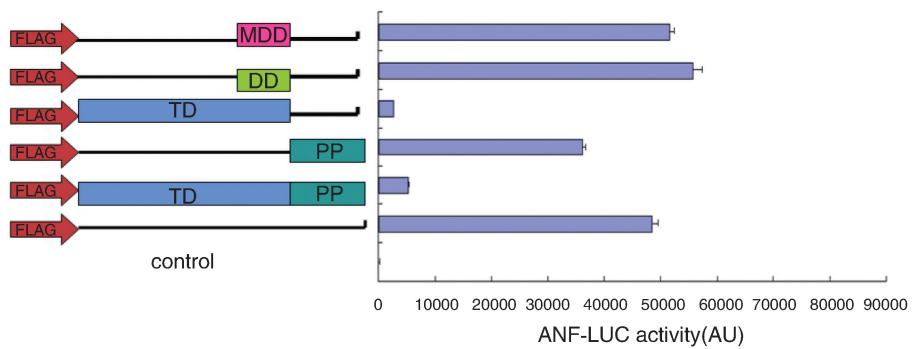


图 4. hhole 蛋白及其截短突变体对 ANF-LUC 转录活性的调控作用

Figure 4. hhole protein and its truncated mutants regulated the transcriptional activity of luciferase reporter gene ANF

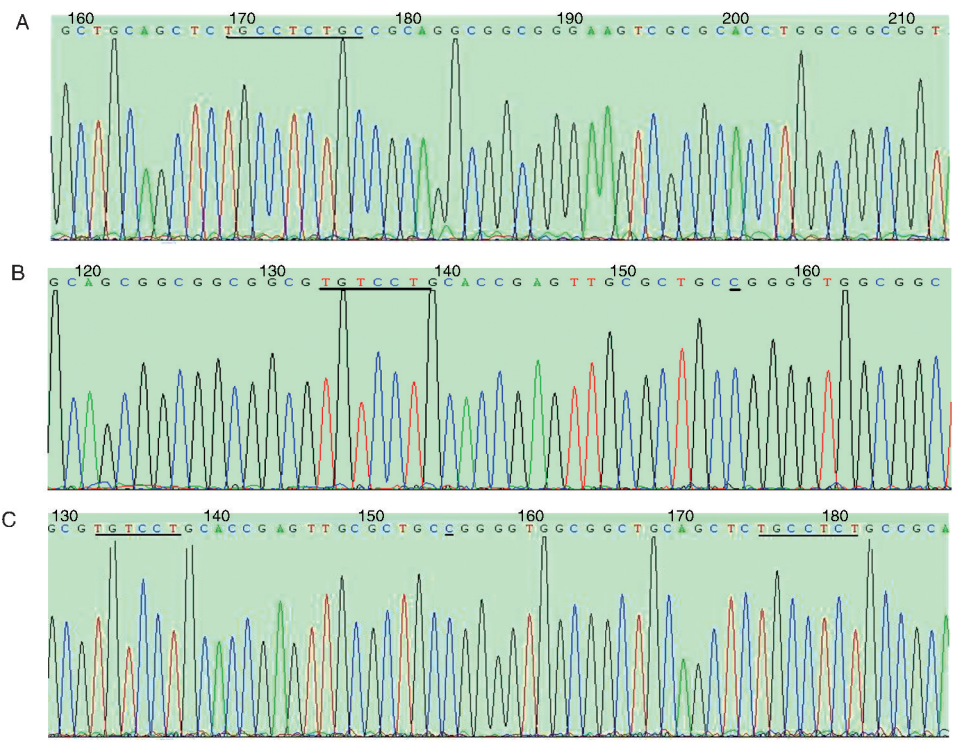


图 5. hhole 的 3 个定点突变体的部分测序结果 A 为 pCMV-tag2B-hhole-MD 的测序结果;B 为 pCMV-tag2B-hhole-MP 的测序结果;C 为 pCMV-tag2B-hhole-MDP 的测序结果;突变的碱基用下划线表示。

Figure 5. Sequencing results of three site-directed mutants

同样利用报告基因 ANF-LUC 的转录活性分析这几个定点突变体的作用,结果发现在转染了

pCMV-tag2B-hhole-MD 质粒的细胞中 ANF-LUC 的转录活性明显得到提高,较野生型 pCMV-tag2B-

hhole 相比,提高了大约 6 倍,突变多聚脯氨酸序列的 pCMV-tag2B-hhole-MP 仅提高了 ANF-LUC 的转录活性大约 1.7 倍(图 6)。结果暗示 hhole 蛋白主要通过其 ERK 结合位点抑制心肌肥厚信号分子 ANF 的转录活性。

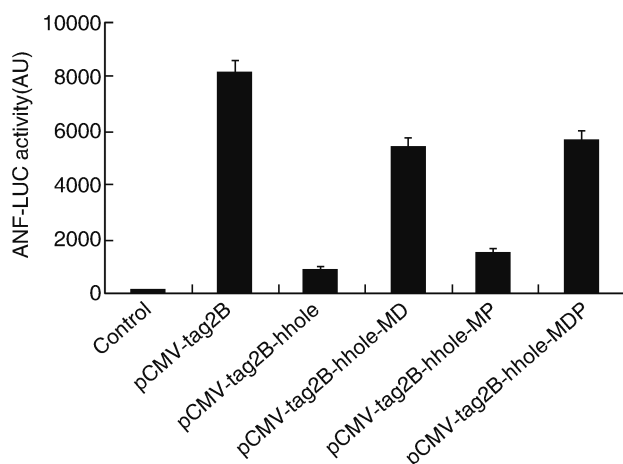


图 6. hhole 蛋白及其定点突变体对 ANF-LUC 转录活性的调控作用

Figure 6. hhole protein and its site-directed mutants regulated the transcriptional activity of luciferase reporter gene ANF

### 3 讨论

胞外信号调节激酶(ERK)将信号从细胞表面受体传导至细胞核,是传递丝裂原信号的信号转导蛋白。ERK 的激活是诱导病理性心肌肥厚发生的经典信号,胞外肥大信号通过 G 蛋白偶联受体激活 RAF-MEK1-ERK1/2 级联信号反应,使正常定位在胞质的 ERK1/2 磷酸化并转位入核,调控核内与心肌肥厚相关的转录因子的表达<sup>[9-10]</sup>。ERK1/2 蛋白的表达下调常抑制心肌肥厚的发生<sup>[11]</sup>。ERK 结合位点是蛋白底物与 ERK 蛋白结合的关键位点,通常由 6~11 个氨基酸残基组成,其保守结构为精氨酸(Arg, R)/赖氨酸(Lys, D)<sub>1-2</sub>-(X)<sub>2-6</sub>-Ø-X-Ø,其中 Ø 通常为亮氨酸(Leu, L)、异亮氨酸(Ile, I)或者缬氨酸(Val, V)等疏水性氨基酸残基,而 X 则表示任何氨基酸残基<sup>[12-13]</sup>。有研究发现 Ephrin-B3 蛋白通过其 ERK 结合位点直接与 ERK1/2 相互作用抑制突触后的 Ras/MAPK 信号进而调控突触密度,敲减 Ephrin-B3 蛋白的表达导致细胞核内 ERK1/2 蛋白磷酸化明显增加<sup>[14]</sup>。2016 年 Wang 等<sup>[15]</sup>发现富亮氨酸重复蛋白 4 (leucine-rich repeat-containing protein 4, LRRC4)通过其 ERK 结合位点与 MEK 竞

争与 ERK1/2 直接相互作用,锚定 ERK1/2 使之定位于胞质,阻止其转位入核,从而抑制 ERK 的活性。

环状定点诱变是分子生物学研究中修饰 DNA 的重要手段,该方法以 PCR 为基础,可以在长度位于 4~12 kb 之间的质粒中构建多个碱基突变的重组突变质粒<sup>[16]</sup>。本研究以 pCMV-tag2B-hhole 质粒为模板,用合成的突变引物进行扩增,用高保真 Pfu 酶进行 PCR 反应,循环数不超过 20 个循环,以保证不发生新的突变。将 PCR 产物用 Dpn I 酶消化 1 h,以消除产物中残留的模板质粒,以保证产物中仅留突变的质粒。消化后可以直接转化大肠杆菌,利用测序的方法判断定点突变是否成功。利用 PCR 反应得到的环状突变质粒往往有相对高的错误率,可以通过 2 个方法将错误率降到最低,如减少扩增的循环数至不超过 20 个循环,引物扩增的循环数越多,出现错配的概率越大;应用热稳定的 DNA 高保真聚合酶 Pfu, Pfu 聚合酶具有 5'-3'聚合酶活性和 3'-5'外切核酸酶活性,能纠正在 PCR 扩增反应过程中纠正错误掺入的碱基,起到校正作用,保真性很高<sup>[17]</sup>。hhole 蛋白的 ERK 结合位点的序列为 RD-FPPPALSLLELQ,保守的两个疏水性氨基酸残基均为亮氨酸,其保守位点为 R<sub>1</sub>-(X)<sub>6</sub>-L-X-L。我们将 hhole 蛋白的保守结合位点 L-S-L 中的亮氨酸突变成疏水蛋白丙氨酸(Ala, A)即 A-E-A 时,发现其抑制 ANF 的转录活性的能力大大降低了。

本研究首先通过生物信息学分析 hhole 发现该蛋白含有与 ERK 结合位点序列和与 SH3 结构域结合的多聚脯氨酸序列。利用酶切法和定点突变方法构建了 hhole 基因的 7 个突变质粒,然后利用 Reporter assay 分析不同的突变体对心肌肥厚信号分子 ANF-LUC 转录活性的影响,进而发现 hhole 蛋白主要通过 ERK 结合位点来调控 ANF 的转录活性,这为研究 hhole 蛋白在病理性心肌肥厚发生过程中的作用提供了强有力的依据。hhole 蛋白是否通过 ERK 结合位点直接与 ERK 蛋白相互作用,改变 ERK 的亚细胞定位来调控 ERK 的活性进而调控心肌肥厚的发生,这还有待于进一步的研究证明。

### [参考文献]

- [1] Nessel AL, Bader DM. Hole is a novel gene product expressed in the developing heart and brain[J]. Mech Dev, 2002, 117(2): 347-350.
- [2] Zhou J, Li Y, Liang P, et al. A novel six-transmembrane protein hhole functions as a suppressor in MAPK signaling pathways[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 333

- (2): 344-352.
- [3] 周军媚, 吴秀山. 人心脏发育候选基因 hole 在 MAPK 信号传导途径中的作用[J]. 科技导报, 2005, 23(9): 23-25.
- [4] 张亚莉, 徐琳, 蒙仕仁, 等. HOLE 基因外显子 2 区 SNP 与先天性心脏病的关联研究[J]. 实用医学杂志, 2010, 26(19): 3511-3533.
- [5] Zhang Y, Xu L, Qiu J, et al. Association between SNP rs10569304 on the second expressed region of hole gene and the congenital heart disease[J]. J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci, 2010, 30(4): 430-436.
- [6] Xu W, Wang Y, Zhou J, et al. Cardiac specific overexpression of hHole attenuates isoproterenol-induced hypertrophic remodeling through inhibition of extracellular signal-regulated kinases (ERKs) signalling[J]. Curr Mol Med, 2016, 16(5): 515-523.
- [7] Vikstrom KL, Bohlmeier T, Factor SM, et al. Hypertrophy, pathology, and molecular markers of cardiac pathogenesis[J]. Circ Res, 1998, 82(7): 773-778.
- [8] Liu Q, Chen Y, Auger-Messier M, et al. Interaction between NF $\kappa$ B and NFAT coordinates cardiac hypertrophy and pathological remodeling[J]. Circ Res, 2012, 110(8): 1077-1086.
- [9] Gallo S, Vitacolonna A, Bonzano A, et al. ERK: A key player in the pathophysiology of cardiac hypertrophy[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(9): 2164.
- [10] 许研, 刘海梅, 徐进文, 等. ERK1/2 蛋白在 17 $\beta$ -雌二醇抑制睾酮诱导的心肌细胞肥大反应中的作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2012, 20(10): 876-880.
- [11] Liu S, Sun JP, Zhou B, et al. Structural basis of docking interactions between ERK2 and MAP kinase phosphatase 3[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(14): 5326-5331.
- [12] Ellison GM, Waring CD, Vicinanza C, et al. Physiological cardiac remodelling in response to endurance exercise training: cellular and molecular mechanisms[J]. Heart, 2012, 98(1): 5-10.
- [13] Lorenz K, Schmitt JP, Schmitteckert EM, et al. A new type of ERKs1/2 autophosphorylation causes cardiac hypertrophy[J]. Nat Med, 2009, 15(1): 75-83.
- [14] McClelland AC, Hruska M, Coenen AJ, et al. Trans-synaptic EphB2-ephrin-B3 interaction regulates excitatory synapse density by inhibition of postsynaptic MAPK signaling[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(19): 8830-8835.
- [15] Wang Z, Guo Q, Wang R, et al. The D domain of LRRC4 anchors ERK1/2 in the cytoplasm and competitively inhibits MEK/ERK activation in glioma cells[J]. J Hematol Oncol, 2016, 9(1): 130.
- [16] Zheng L, Baumann U, Reymond JL. An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol[J]. Nucl Acids Res, 2004, 32(14): e115.
- [17] 陈凡, 傅一勤, 林梅西, 等. 基于 PCR 的质粒快速定点诱变方法建立与评价[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2018, 34(1): 61-68.
- (此文编辑 许雪梅)