

本文引用: 韦天文, 杜冲, 孙嘉腾, 等. MNK2 通过激活 cAMP/PKA-CREB 通路促进小鼠心肌缺血再灌注损伤后修复功能及机制[J]. 中国动脉硬化杂志, 2022, 30(5): 386-394.

· 实验研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2022)30-05-0386-09

MNK2 通过激活 cAMP/PKA-CREB 通路促进小鼠心肌缺血再灌注损伤后修复功能及机制

韦天文, 杜冲, 孙嘉腾, 单天凯, 杨彤彤, 王昊, 顾凌峰, 孔祥清, 王连生

(南京医科大学第一附属医院心内科, 江苏省南京市 210009)

[关键词] 心肌细胞; 心脏; 细胞凋亡; MNK2 蛋白激酶; 缺氧复氧; cAMP/PKA-CREB 通路

[摘要] 目的 探讨丝裂原活化蛋白激酶相互作用激酶 2(MNK2)是否能够抑制缺氧复氧诱导的小鼠心肌细胞凋亡并促进心脏修复, 以及其相关机制。方法 构建心肌细胞缺氧复氧(H/R)体外模型, 实验分为:H/R+空载体组、H/R+MNK2 过表达组和 H/R+siRNA-MNK2 组。建成成年小鼠心脏缺血再灌注(I/R)损伤模型, 实验分为:I/R+空载体组、I/R+MNK2 过表达组。Western blot 检测各组 MNK2、p-MNK2 以及 Bax、Bcl-2 等凋亡指标蛋白表达; TUNEL 染色法检测心肌细胞凋亡水平; 心脏超声检测心脏功能差异。后续对 H/R+MNK2 过表达组和 H/R+空载体组的原代心肌细胞进行 RNA 测序分析(RNA-seq), 通过差异基因富集及京都基因与基因组百科全书(KEGG)分析 MNK2 抗凋亡作用的相关机制, 并验证筛选出 cAMP/PKA-CREB 信号通路的调控关系。结果 体外 H/R 模型及体内 I/R 模型中 p-MNK2 表达水平较对照组显著升高。体外实验中, MNK2 过表达腺病毒转染显著增加心肌细胞中 MNK2 和 p-MNK2 蛋白表达水平, 凋亡指标蛋白 Bcl-2 表达增加, Bax 表达减少, 心肌细胞凋亡水平下降 69.16% (P < 0.05); siRNA-MNK2 转染后 Bcl-2 表达减少, Bax 表达增加。体内实验中, 与 I/R+空载体组比较, I/R+MNK2 过表达组心功能 I/R 术后 1 h 无统计学差异, I/R 术后 3 天明显恢复, 其中射血分数提高了 36.24%, 短轴缩短率提高了 46.19% (P < 0.05); TUNEL 染色显示 I/R+MNK2 过表达组心肌细胞凋亡明显减少了 28.65% (P < 0.05)。RNA-seq、生物信息分析及相关实验验证, 明确了 cAMP 信号通路的参与。实验显示过表达 MNK2 激活了 cAMP/PKA-CREB 信号通路, 以及抑制 PKA 会阻碍 MNK2 过表达对心肌细胞凋亡的抑制效应。结论 过表达 MNK2 可以抑制小鼠心肌细胞缺氧复氧后的凋亡及心功能损伤。其潜在机制可能是通过激活 cAMP/PKA-CREB 信号通路来发挥以上作用的。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

The function and mechanism research of mitogen-activated protein kinase-interacting kinase-2 in promoting cardiac repair after ischemia/reperfusion injury in mice by activating cAMP/PKA-CREB pathway

WEI Tianwen, DU Chong, SUN Jiateng, SHAN Tiankai, YANG Tongtong, WANG Hao, GU Lingfeng, KONG Xiangqing, WANG Liansheng

(Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210009, China)

[KEY WORDS] cardiomyocytes; cardiac; cell apoptosis; MNK2 protein kinase; hypoxia/reoxygenation; cAMP/PKA-CREB pathway

[ABSTRACT] Aim To explore whether mitogen-activated protein kinase-interacting kinase-2 (MNK2) facilitates cardiac repair by inhibiting cardiomyocyte apoptosis induced by hypoxia and reoxygenation in mice and its underlying molecular mechanisms. Methods The cardiomyocyte hypoxia/reoxygenation (H/R) model was induced *in vitro*. The experimental groups were H/R+virus vector group, H/R+MNK2 overexpression adenovirus group and H/R+siRNA-MNK2

[收稿日期] 2021-09-13

[修回日期] 2022-01-07

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81770361, 82070367)

[作者简介] 韦天文, 博士研究生, 主要研究方向为心脏损伤后心肌修复的相关分子机制研究, E-mail 为 tianwenwei@njmu.edu.cn。通信作者王连生, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为缺血性心脏病再生治疗相关研究, E-mail 为 drlswang@njmu.edu.cn。

knockdown adenovirus group. Adult mouse heart ischemia/reperfusion (I/R) injury model was induced *in vivo*. The experimental groups were I/R+virus vector group and I/R+MNK2 overexpression adenovirus group. Western blot was used to detect the expressions of MNK2, p-MNK2, B lymphoma 2 related protein (Bax) and B lymphoma 2 (Bcl-2); Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling (TUNEL) was used to detect the level of cardiomyocyte apoptosis; Echocardiography was used to detect cardiac function. Subsequently, the primary cardiomyocytes of H/R+MNK2 overexpression adenovirus group and H/R+virus vector group were used to perform RNA sequencing (RNA-seq). Differential gene enrichment and Kyoto Encyclopedia of genes and genomes (KEGG) were used to analyze the mechanism of anti-apoptotic effect of MNK2. The related cAMP signal pathway was found. Finally, the regulatory relationship between MNK2 and cAMP/PKA-CREB signal pathway was explored through rescue experiments. **Results** The expression level of p-MNK2 was significantly increased in H/R model group and I/R model group than that in the control group. *In vitro*, overexpression of MNK2 significantly increased the levels of MNK2 and p-MNK2 expression in cardiomyocytes. At the same time, it was found that the expression of apoptosis index protein Bcl-2 increased, Bax decreased, and the number of apoptotic cardiomyocytes reduced by 69.16% (all $P < 0.05$); Transfection of siRNA-MNK2 decreased the expression of Bcl-2, increased the expression of Bax significantly; *In vivo*, compared with the I/R+virus vector group, the cardiac function of the I/R+MNK2 overexpression adenovirus group showed no significant difference at 1 hour after I/R, while recovered significantly at 3 days after operation, in which the ejection fraction increased by 36.24% and the short axis shortening rate increased by 46.19% (all $P < 0.05$); TUNEL staining showed that myocardial apoptosis in I/R+MNK2 overexpression group decreased significantly by 28.65% ($P < 0.05$). Subsequently, the involvement of cAMP signaling pathway was confirmed by RNA-seq, bioinformatics analysis and relevant experimental verification. Experiments showed that overexpression of MNK2 activated cAMP/PKA-CREB signal pathway and the inhibition of PKA would enhance cardiomyocyte apoptosis inhibited by the overexpression of MNK2. **Conclusion** Overexpression of MNK2 can significantly inhibit apoptosis of mouse cardiomyocytes after H/R and improve cardiac function by activating cAMP/PKA-CREB signaling pathway.

急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 是心脏冠状动脉血流突然中断引起的心肌缺血性坏死。随着早期诊断、有效溶栓及急诊介入治疗技术的飞速发展, 缺血心肌得以迅速恢复血液灌注, 这极大地降低了 AMI 的死亡率^[1-2]。然而, 这种快速恢复的血液供应可能进一步导致心肌细胞死亡及心肌损害, 并与额外的并发症风险增加有关, 称为心肌缺血再灌注 (ischemia/reperfusion, I/R) 损伤^[3-4]。心肌 I/R 的机制涉及多种因素, 目前的研究热点包括细胞凋亡、氧化应激、炎症、钙超载等^[5]。

凋亡是细胞遭受损伤因素时, 在一系列凋亡相关基因的调控下进行的复杂的程序性细胞死亡过程。多种蛋白激酶能够通过磷酸化下游靶蛋白调控细胞凋亡过程^[6-7]。有丝分裂原活化蛋白激酶相互作用激酶 (mitogen-activated protein kinase-interacting kinase, MNK) 由两种结构相似的丝氨酸/苏氨酸激酶 MNK1 和 MNK2 组成^[8]。MNK 的 N 端富含碱性氨基酸, 碱性氨基酸决定其在细胞内的定位, 中间部分是包含保守 MAPK 磷酸化位点的催化结构域, C 端包含 MAPK 结合结构域^[9]。MNK2 参与调控细胞增殖、凋亡及生存, 与多种肿瘤的发生和发展相关^[10]。Marzec 等人^[11]的研究表明联合抑制雷帕霉素复合物 1 靶点 (mammalian target of rapamycin complex-1,

mTORC1) 和 MNK 可诱导皮肤 T 细胞淋巴瘤 (cutaneous T-cell lymphoma, CTCL) 细胞凋亡, 有助于 CTCL 和其他恶性肿瘤的治疗。Teo 等人^[12]发现急性髓性白血病 (acute myeloid leukemia, AML) 细胞中选择性抑制 MNK2 激酶导致 G1 细胞周期阻滞, 进而诱导细胞凋亡效应。然而 MNK2 激酶是否在心脏急性损伤后的心肌细胞凋亡过程中发挥作用尚未见报道。本研究拟建立心肌细胞缺氧复氧 (hypoxia/reoxygenation, H/R) 的体外模型及成年小鼠心脏 I/R 的体内模型, 通过调控心脏细胞中 MNK2 的表达水平, 研究 MNK2 对缺氧复氧诱导的心肌细胞凋亡的影响, 并探讨其机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

DMEM、胎牛血清、马血清均购自 Gibco 公司; 胰酶粉末、Gelatin solution 购自 Sigma 公司; 一抗稀释液、二抗稀释液、一抗洗脱液均购自上海碧云天生物技术有限公司; 反转录试剂盒和 qRT-PCR 试剂盒购自 Thermo 公司。

1.2 新生小鼠原代心肌细胞的提取和培养

每次提取心肌细胞约需 100 只 1~3 天龄的美国癌症研究所 (institute of cancer research, ICR) 小

鼠,常规心脏取材后迅速放入预冷的 1 * ADS 溶液中。用眼科剪剪碎心肌组织后加入 20 mL 预热的心肌组织消化液(每 100 mL 消化液含 120 mg 胰酶和 80 mg 胶原酶)于 37 °C 摆床消化 6 min。取上清液于无菌 50 mL 离心管随即加入 10% 马血清原液终止消化。重复上述酶消化步骤直至心肌组织全部消化完全为细胞悬液,收集悬液利用差速离心法去除成纤维细胞。使用 Percoll 密度梯度离心法分离细胞悬液,小心吸取中层的心肌细胞进行计数、布板及后续培养。

1.3 缺氧复氧模型的构建

提取新生小鼠原代心肌细胞并采用完全培养基培养,待细胞贴壁后,将培养基替换为无糖、无血清 DMEM 培养基继续培养 8 h (95% N₂, 5% CO₂),而后替换回原先的完全培养基在 5% CO₂, 95% 空气,37 °C 的正常培养箱内继续培养 12 h。

1.4 细胞转染及分组

为探索 MNK2 过表达对 H/R 后心肌细胞的影响,将贴壁的原代心肌细胞分为两组,即 H/R+空载体组、H/R+MNK2 过表达组;为探索 MNK2 敲低对 H/R 后心肌细胞的影响,将贴壁的原代心肌细胞分为两组,即 H/R+空载体组、H/R+siRNA-MNK2 组。分别使用合适滴度的空载体腺病毒、携带 MNK2 过表达基因的腺病毒、siRNA-MNK2 腺病毒转染贴壁的心肌细胞 48 h,并且同时依据显微镜下的 GFP 荧光亮度确认病毒成功转染进入细胞,而后接受无糖、无血清 DMEM 培养基培养 8 h (95% N₂, 5% CO₂)。而后,替换回完全培养基在 5% CO₂, 95% 空气,37 °C 的正常培养箱内继续培养 12 h。

1.5 成年小鼠心脏缺血再灌注模型的构建及分组

自南京医科大学动物实验中心购买 SPF 级 56 天龄 ICR 成年雄性小鼠 20 只,随机分为 I/R+空载体组、I/R+MNK2 过表达组,每组 10 只。腹腔注射 1.2% (200 μL/10 g) 阿弗丁至充分麻醉。给予气管插管连接小动物呼吸机进行辅助通气。剔除心前区毛发并消毒后,在心前区左侧 3~4 肋间剪开肋间隙皮肤,分离皮下组织暴露胸腔和心脏,使用带 7-0 缝线的缝合针在冠状动脉左前降支(left anterior descending, LAD) 中段部位左侧穿过心肌层。随后,将 PE10 导管放置在心脏表面,与 LAD 平行后使用活结结扎缝线,提起心脏,结扎部位下方心肌呈现苍白区域提示造模成功。而后,由助手使用带 36G 针头的显微注射器,在苍白区域边界的左侧、右侧和上方分别进行心肌内病毒注射,每个点注射的过表

达腺病毒滴度为 1×10^7 pfu。然后使用带 3-0 缝线的缝合针逐层缝合皮下组织和皮肤,并在缺血 45 min 后解开活结,抽出 PE10 管实现再灌注。最后,拔出气管插管,并置于恒温台上待其完全清醒并完全恢复正常活动后放回鼠笼。

1.6 心脏超声

由南京医科大学动物实验中心专业技术人员操作。采用双盲法,对 I/R+空载体组、I/R+MNK2 过表达组所有小鼠进行心脏功能评估。将小鼠依次吸入麻醉,然后利用小动物心脏超声仪器检测各组小鼠射血分数(ejection fraction, EF)、左心室短轴缩短率(fractional shortening, FS)、左心室收缩/舒张期后室壁厚度(left ventricular posterior wall, LVPW)、左心室收缩/舒张期内径和室间隔收缩/舒张期末厚度(interventricular septum thickness, IVS)、左心室舒张早期和舒张晚期内径(left ventricular diameter, LVD) 等心功能参数,重复测量 2 次取平均值。

1.7 心脏组织取材

使用 1.2% 三溴乙醇充分麻醉小鼠后,迅速开胸取出心脏,于 PBS 内挤出心脏内残余血液;眼科镊小心去除心脏表面粘连组织。用于免疫荧光染色实验的组织放置于 4% 多聚甲醛溶液中固定。用于 RNA 和蛋白质提取的组织用滤纸吸取组织表面水滴后,放入液氮中保存。

1.8 TUNEL 染色

常规心脏组织取材后行石蜡切片,然后依次进行水化、抗原修复、封闭步骤后,使用 PBS 浸泡切片 5 min,之后按 1:100 比例,用 PBS 稀释 2 g/L 的 Proteinase K 溶液使其最终质量浓度为 20 mg/L,接着用组化笔画好圈,在每个组织滴加 100 μL proteinase K 溶液于室温下孵育 20 min,接着再用 PBS 洗 2~3 次,每次 5 min,然后按 1:5 的比例,使用去离子水稀释 5×Equilibration buffer(20 μg 5×Equilibration buffer+80 μL 去离子水),稀释后为 1×Equilibration buffer,每个组织使用 100 μL 的 1×Equilibration buffer,室温 20 min。在此同时在冰上解冻 bright red labeling mix,配好 TdT 溶液。甩掉 Equilibration buffer 后加 TdT,37 °C, 60 min,再用 PBS 洗 3 次(每次 5 min),洗好后 1:1 000, Hoechst 染核 5 min,上述步骤结束后封片。

1.9 Western blot 检测

常规提取各组心脏组织蛋白并测定浓度,然后加入 5× Loading Buffer 缓冲液 95 °C 水浴 10 min。按照 SDS-PAGE 胶说明书配置浓缩胶和分离胶,然后依次进行电泳、转膜、抗体孵育等步骤。

1.10 qRT-PCR

常规提取各组心脏组织加入 TRIzol 常规提取 RNA, 然后进行反转录反应生成 cDNA, 以 cDNA 为模板进行实时荧光定量 PCR 扩增, 从而比较各样本间目的 RNA 表达水平。

1.11 统计学方法

所有统计数据均使用 SPSS 22.0 (IBM Corp., Armonk, USA) 进行分析, 并使用 GraphPad Prism 8.0 软件 (La Jolla, CA, USA) 进行 $\bar{x} \pm s$ 统计。当 $P < 0.05$ 时, 被认为差异具有统计学意义。

1.12 RNA 测序及分析

对 H/R+空载体组和 H/R+MNK2 过表达组的原代心肌细胞进行 RNA 测序。用 TRIzol 试剂从原代心肌细胞中提取总 RNA。根据制造商提供的步骤, 利用 RNA 建库试剂盒 (Illumina) 从非核糖体 RNA 中制备 RNA 测序库。差异表达分析使用 DESeq21.12.4(24) 版本进行, 差异基因需同时满足 $|\log_2(\text{fold change})| \geq 1$ 和错误发现率 (false discovery rate, FDR) 调整后的 P 值 < 0.05 , 方可确定统计学意义。

1.13 KEGG 通路富集分析

使用 PANTHER Classification System 6 以蛋白质分类为基础对 H/R+空载体组和 H/R+MNK2 过表达组心肌细胞的基因表达特征进行分类, 为了研究基因是否具有相似的生物学功能, 我们使用 DAVID7 在 KEGG 通路中搜索过度代表性。文中展示

了基因的显著富集情况, P 值经 Benjamini-Hochberg 方法多次检测校正, $P < 0.01$ 和 Benjamini Hochberg FDR < 0.05 被认为有统计学意义。

1.14 PKA 抑制剂使用方法

将购买好的商品化 PKA 抑制剂 (DMSO 中 10 mol/L) 用无菌 PBS 稀释 10 倍后, 浓度为 1 mol/L, 细胞培养过程中 1 mL 培养基中加入 1 μ L 的 PKA 抑制剂稀释液。

2 结 果

2.1 心肌缺血再灌注损伤后, MNK2 蛋白激酶表达明显升高

我们首先构建了 56 天龄 ICR 小鼠 L/R 模型, 采用心脏超声评估心肌损伤情况, 结果显示与对照组相比, L/R 模型小鼠射血分数下降 ($P < 0.05$), 短轴缩短率下降 ($P < 0.05$), 提示 L/R 模型构建成功 (图 1A)。进一步, Western blot 结果显示 L/R 损伤的心肌组织内 p-MNK2 的表达水平显著高于对照组 ($P < 0.05$; 图 1B)。此外, 我们还在体外诱导原代小鼠心肌细胞 (neonatal mouse cardiomyocyte, NMCM) 的 H/R 模型上进行验证, TUNEL 染色结果表明 H/R 处理后心肌细胞凋亡率增加了 2.64 倍 ($P < 0.05$; 图 1C); Western blot 结果显示 H/R 处理后心肌细胞中 p-MNK2 的表达水平明显升高 ($P < 0.05$; 图 1D)。

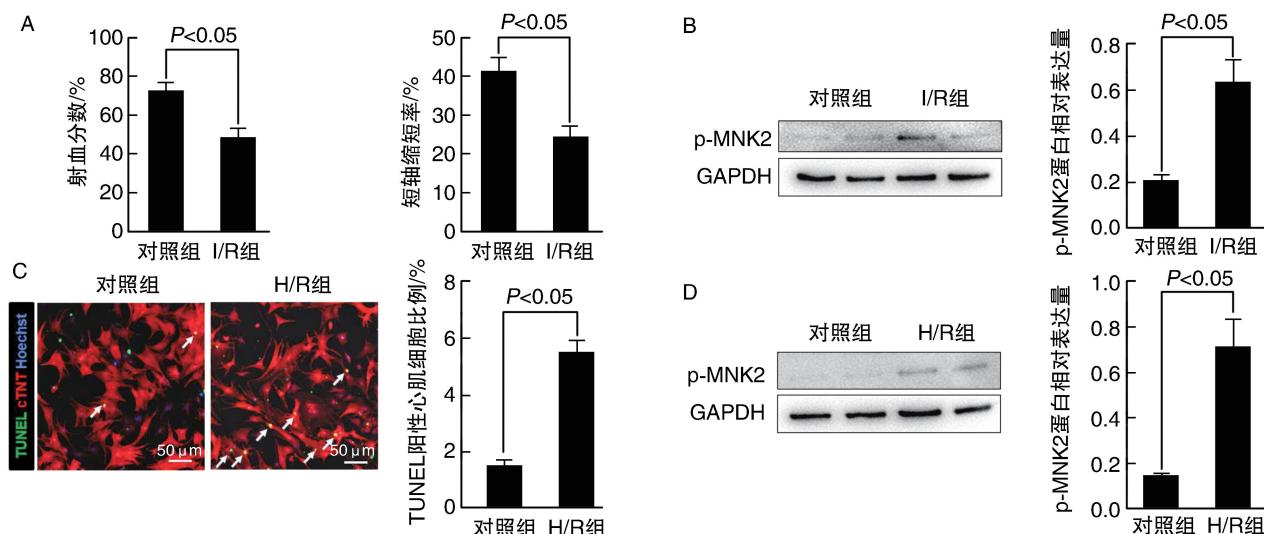


图 1. MNK2 蛋白激酶在体内 L/R 模型和体外 H/R 模型中均被激活

A 为超声检测 L/R 模型组和对照组小鼠术后 3 天的心功能差异 ($n=3$); B 为 Western blot 检测小鼠 L/R 术后 3 天心肌细胞中 p-MNK2 蛋白表达水平 ($n=3$); C 为 TUNEL 及免疫荧光染色检测原代小鼠心肌细胞凋亡情况 (蓝色代表细胞核, 红色代表心肌细胞, 绿色代表 TUNEL 阳性的细胞核) ($n=3$); D 为 Western blot 检测原代心肌细胞中 p-MNK2 蛋白表达水平。

Figure 1. The expression level of p-MNK2 was activated in H/R model *in vitro* and L/R model *in vivo*

2.2 MNK2 蛋白激酶可抑制 H/R 损伤后心肌细胞的凋亡

为了进一步验证 MNK2 激酶对心肌细胞抗凋亡的影响,构建原代新生小鼠心肌细胞 H/R 模型,分为 H/R+空载体组和 H/R+MNK2 过表达组;Western blot 结果提示 H/R+MNK2 过表达组 MNK2、p-MNK2 水平明显升高($P<0.05$;图 2A),凋亡相关标记蛋白 Bcl-2 表达水平明显升高、Bax 蛋白表达水平明显降低;TUNEL 染色结果显示 H/R+

MNK2 过表达组心肌细胞凋亡水平下降 69.16% ($P<0.05$;图 2B)。进一步设立 H/R+空载体组和 H/R+siRNA-MNK2 组,Western blot 结果显示 H/R+siRNA-MNK2 组 MNK2、p-MNK2 被明显抑制, Bcl-2 表达水平降低,Bax 表达水平升高($P<0.05$;图 2C)。上述结果表明在体外原代心肌细胞中过表达 MNK2 激酶可抑制 H/R 损伤后心肌细胞的凋亡,而抑制 MNK2 激酶后会增加 H/R 损伤模型中心肌细胞的凋亡。

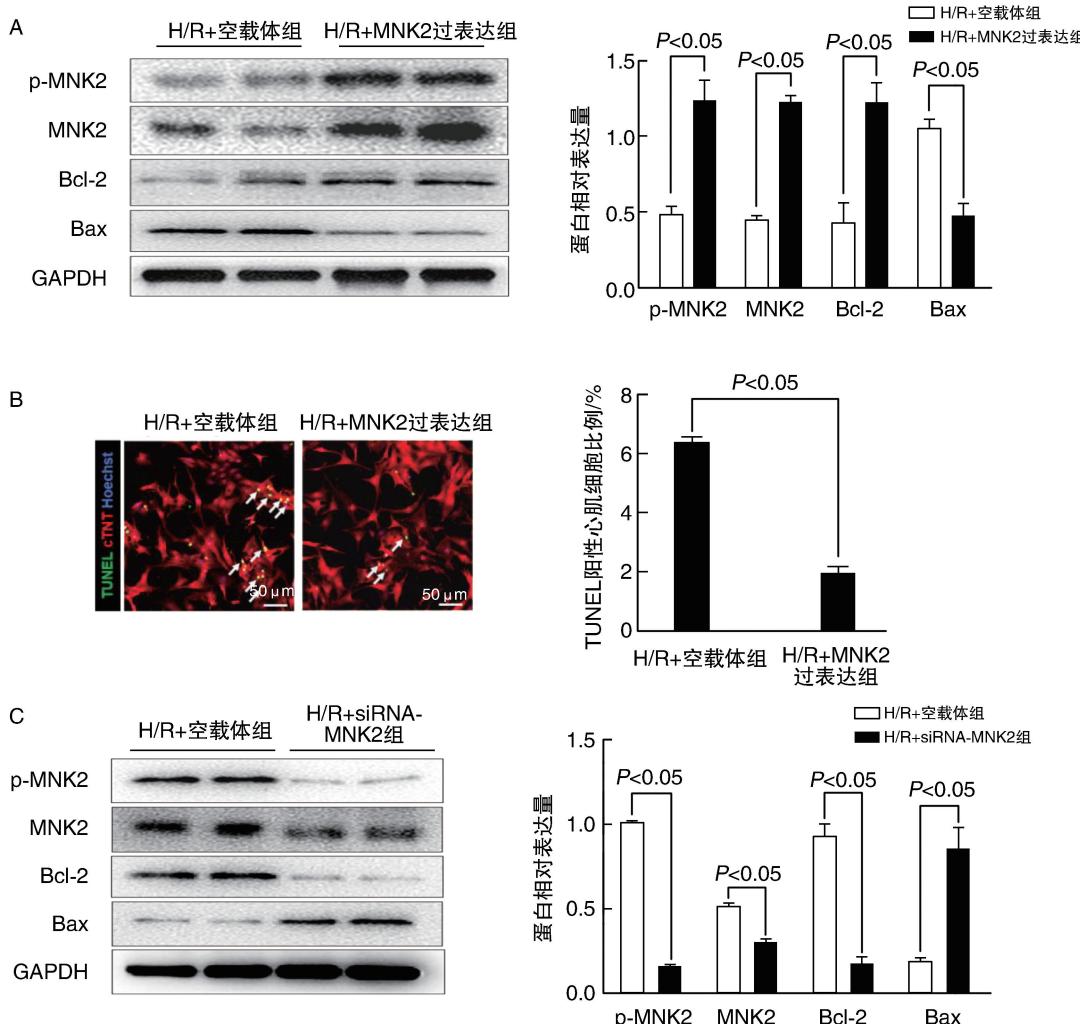


图 2. 体外乳鼠原代心肌细胞 H/R 模型中过表达、敲低 MNK2 对凋亡指标的影响

A 为 H/R+空载体组和 H/R+MNK2 过表达组 p-MNK2、MNK2、Bcl-2、Bax 的 Western blot 验证;B 为 TUNEL 免疫荧光染色鉴定 H/R+空载体组和 H/R+MNK2 过表达组心肌细胞的凋亡水平(蓝色代表细胞核,红色代表心肌细胞,绿色代表 TUNEL 阳性的细胞核)($n=3$);C 为 H/R+空载体组和 H/R+siRNA-MNK2 组中 p-MNK2、MNK2、Bcl-2、Bax 蛋白表达水平的 Western blot 验证。

Figure 2. Effects of MNK2 overexpression and knockdown on apoptosis in H/R model of neonatal myocardial cells *in vitro*

2.3 心脏原位注射 MNK2 腺病毒可改善 L/R 损伤后心脏急性期心功能

前面一系列实验结果显示在体外原代心肌细胞中,过表达 MNK2 激酶可抑制 H/R 模型心肌细胞

的凋亡。为了能够进一步观察 MNK2 是否能在体内通过抗凋亡作用改善心脏功能,我们采用成年小鼠进行 L/R 模型的构建并在术中原位注射 MNK2 过表达/空载体腺病毒,设立 L/R+空载体组和 L/R+

MNK2 过表达组。比较两组之间的心脏功能和凋亡指标,从而明确过表达 MNK2 激酶是否可以对成年小鼠心脏缺血再灌注损伤起到保护作用(图 3A),结果显示心肌损伤区域注射携带 MNK2 基因的过表达腺病毒后 p-MNK2 和 MNK2 水平明显升高($P<0.05$;图 3B)。然后分别在术后 1 h 和 3 天对两组小鼠进行了超声心功能检查,发现再灌注后 1 h I/R+MNK2 过表达组小鼠与 I/R+空载体组相比心功能没有明显变化(腺病毒起效时间为 24 h) ($P>0.05$;图 3C 和 3D)。但在再灌注后 3 天,心肌损伤区域

MNK2 过表达腺病毒表达高峰时,相比于 I/R+空载体组,I/R+MNK2 过表达组小鼠心功能(EF 和 FS)均有明显的改善,其中射血分数提高了 36.24%,短轴缩短率提高了 46.19% ($P<0.05$;图 3C 和 3D)。TUNEL 染色结果表明 I/R+MNK2 过表达组小鼠心肌细胞凋亡水平明显被抑制,与 I/R+空载体组相比下降了 28.65% ($P<0.05$;图 3E)。以上结果表明,在成年小鼠中,心肌损伤区域注射携带 MNK2 过表达腺病毒能够显著抑制 I/R 后心肌细胞凋亡,改善心肌 I/R 损伤后心功能的恢复。

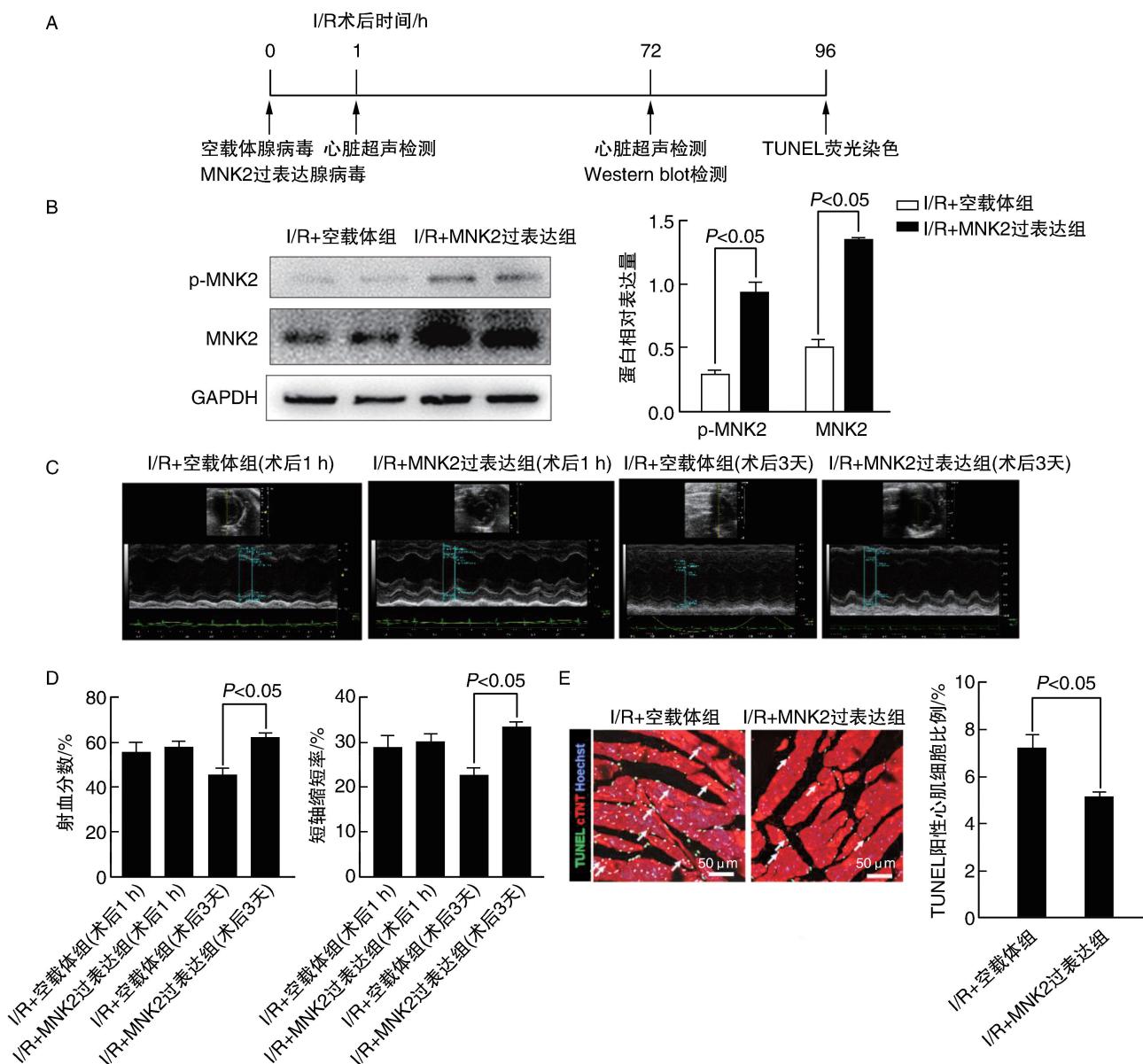


图 3. 成年小鼠体内 I/R 模型中过表达 MNK2 对凋亡指标和心功能的影响

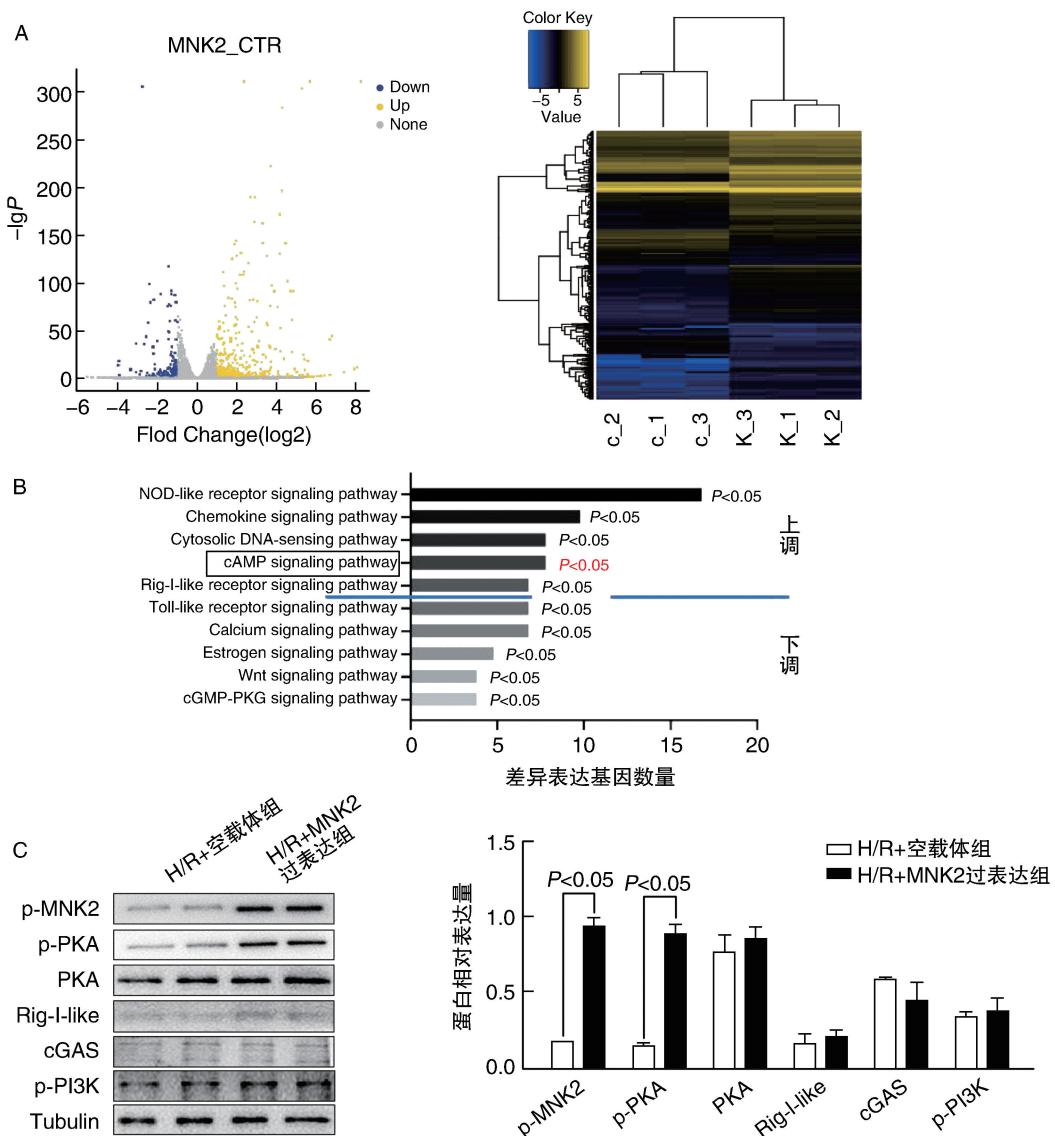
A 为小鼠 I/R 模型构建及实验验证策略;B 为 Western blot 实验检测在小鼠 I/R 模型中心肌损伤区域分别注射空载体腺病毒、携带 MNK2 过表达腺病毒后 p-MNK2 和 MNK2 的蛋白表达水平;C 和 D 为超声检测 I/R+空载体组和 I/R+MNK2 过表达组小鼠术后 1 h 和 3 天后的
心功能差异($n=5$);E 为 TUNEL 免疫荧光染色检测 I/R+空载体组和 I/R+MNK2 过表达组小鼠心肌细胞凋亡情况
(蓝色代表细胞核,红色代表心肌细胞,绿色代表 TUNEL 阳性的细胞)($n=3$)。

Figure 3. Effects of MNK2 overexpression on apoptosis and cardiac function in I/R model of adult mice

2.4 MNK2 激酶通过激活 cAMP/PKA-CREB 通路发挥抗心肌细胞凋亡的作用

基于上述结果,为进一步揭示过表达 MNK2 通过抑制心肌细胞凋亡改善 I/R 损伤后心功能的分子机制,我们对原代心肌细胞 H/R+空载体组和 H/R+MNK2 过表达组进行了 RNA-seq 分析。显著性差异分析(图 4A)、qPCR 实验验证和 KEGG 通路富集分析(图 4B)发现,MNK2 过表达出现的差异基因明显富集在 cAMP 信号通路上。Western blot 结果发现 MNK2 过表达组的 p-PKA、p-CREB 水平显著升高,

而总 PKA、Rig-I-like、cGAS 和 p-PI3K 的表达并无明显差异(图 4C、图 5A)。接着,我们在体外原代新生小鼠心肌细胞中使用 PKA 抑制剂抑制 PKA 激酶活性后,MNK2 表达水平和磷酸化活性无明显变化(图 5B)。通过组合实验进一步发现,体外原代心肌细胞中抑制 p-PKA 的活性可以显著削弱过表达 MNK2 具备的抗凋亡能力,使其凋亡水平增加了 2.18 倍($P < 0.05$;图 5C)。以上实验结果表明过表达 MNK2 可以通过激活 cAMP/PKA-CREB 信号通路发挥抗心肌细胞凋亡的作用。



A 为 H/R+MNK2 过表达组和 H/R+空载体组心肌细胞的 RNA-seq 热图分析;B 为 H/R+MNK2 过表达组和 H/R+空载体组差异表达基因的 KEGG 通路富集分析;C 为 H/R+MNK2 过表达组和 H/R+空载体组 p-MNK2、p-PKA、PKA、Rig-I-like、cGAS、p-PI3K 的 Western blot 验证。

Figure 4. RNA-seq sequencing analysis verified related genes of MNK2 in H/R model

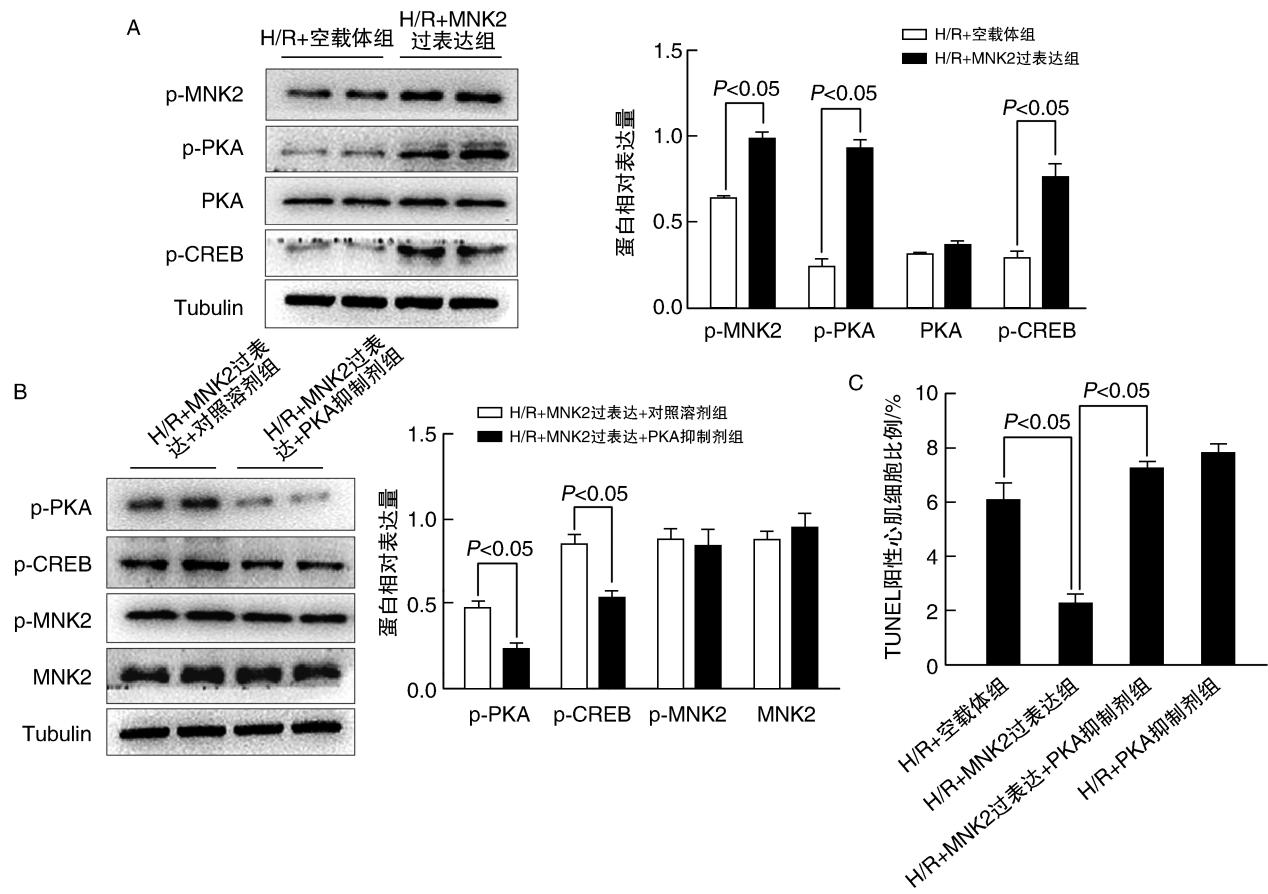


图 5. 组合实验证明过表达 MNK2 可以通过激活 cAMP/PKA-CREB 信号通路来抑制 H/R 模型小鼠心肌细胞凋亡

A 为 H/R+空载体组和 H/R+MNK2 过表达组 p-MNK2、p-PKA、PKA、p-CREB 的 Western blot 验证; B 为 H/R+MNK2 过表达+对照溶剂组和 H/R+MNK2 过表达+PKA 抑制剂组 p-PKA、p-CREB、p-MNK2、MNK2 蛋白表达水平的 Western blot 验证; C 为 TUNEL 免疫荧光染色检测 H/R+空载体组、H/R+MNK2 过表达组、H/R+PKA 抑制剂组、H/R+MNK2 过表达+PKA 抑制剂组心肌细胞凋亡情况 ($n=3$)。

Figure 5. Combination experiments demonstrated that MNK2 overexpression inhibited cardiomyocyte apoptosis in H/R model mice by activating cAMP/PKA-CREB signaling pathway

3 讨 论

AMI 后早期, 抑制心肌细胞凋亡可有效避免心肌细胞的丢失、心功能下降及随后的不良心室重构和心力衰竭。因此, 调节缺血再灌注后心肌细胞凋亡可能成为改善心肌梗死患者预后的有效靶点^[13]。

MNK2 蛋白激酶为细胞外信号调节激酶和 p38 丝裂原活化蛋白激酶通路的靶点^[14]。MNK2 被报道可通过 eIF4E、4E-BP1、CDK4 及 Cyclin D3 等多种下游靶点参与到多种肿瘤细胞凋亡的调节^[11-12]。然而 MNK2 对心肌细胞凋亡的调节作用和机制却尚未见报道。

本研究中我们首先发现 MNK2 在体外缺氧复氧及体内 I/R 模型中磷酸化水平升高, 明显被激活。接着通过实验证明过表达 MNK2 抑制心肌细胞凋亡, 遏制 I/R 后心功能的恶化; 反之, 抑制 MNK2 其生物学效应相反。后续我们基于缺氧复氧状态下

的心肌细胞, 通过 RNA-seq 及相关实验证实了 MNK2 过表达激活了 cAMP/PKA-CREB 通路抑制心肌细胞凋亡, 实现心肌保护作用。而 Rig-I-like、cGAS 和 p-PI3K 的表达并无明显差异。cAMP 信号通路是通过测序分析筛选富集出的具有表达差异的通路, 该通路中主要功能基因 PKA 的蛋白水平及 mRNA 水平提示, 过表达 MNK2 后 p-PKA、p-CREB 有显著的提高, 提示 MNK2 激酶可能通过磷酸化 PKA 抑制 I/R 后心肌细胞的凋亡。接着进一步通过 PKA 抑制剂和 MNK2 过表达的组合实验, 证明了 PKA 这一节点的干预抑制了 p-CREB 的表达, 并逆转了 MNK2 对心肌细胞凋亡的保护功能。

PKA 是由两个催化亚基和两个调节亚基组成的四聚体复合物, 它通过将 ATP 上的磷酸基团转移到特定蛋白的丝氨酸或苏氨酸残基上, 进而磷酸化调节靶蛋白的活性^[15]。cAMP/PKA 作为经典信号通路, 通过调控多种下游分子参与细胞代谢、生长、

分化及凋亡等一系列过程,研究表明cAMP/PKA信号通路的活化可以抑制胰岛 β 细胞的凋亡^[16],在心脏领域中,研究报道cAMP/PKA通路的活化可保护心肌,改善缺血再灌注后左心室的收缩功能^[17-18]。PKA和cAMP结合释放活性催化亚基,并转运至细胞核激活磷酸化转录因子如cAMP应答元件结合蛋白(CREB)的表达^[19]。最近,也有研究证明CREB的激活可以减轻因各种理化因素导致的心肌细胞凋亡^[20-21]。既往研究表明三个由GR结合和一个由CREB占据的CRE样元件存在于MNK2的启动子序列,并通过实验证明MNK2表达通过cAMP和GR信号传导发挥调控功能^[22]。

因此在L/R损伤刺激的心肌细胞中,过表达的MNK2可以通过偶联结合活化型G蛋白(stimulatory G protein, Gs)实现cAMP的转化,当cAMP与PKA的调节亚基结合后,激活的PKA催化下游效应因子CREB第133位丝氨酸的磷酸化,调控Bcl-2、Bax等相关靶基因的表达,实现抑制心肌细胞凋亡的生物学效应。

本研究成功揭示出MNK2通过激活cAMP/PKA-CREB通路发挥抗凋亡作用。然而本文存在一定的不足,目前尚缺乏使用心肌细胞靶向性的MNK2过表达病毒,因此小鼠体内损伤心肌局部过表达MNK2是否通过其他细胞的作用,或协同释放其他效应因子以发挥抗凋亡作用却不得而知,未来需要进一步的研究以弥补这一不足。

综上,MNK2具有充分的物种保守性,且未见在心脏领域中研究报道。过表达MNK2激酶可以通过cAMP/PKA-CREB信号通路改善心脏缺血再灌注后心脏损伤,抑制心肌细胞凋亡,改善心功能。本研究为L/R等心血管疾病的分子生物学治疗提供了新的研究靶点,为临床心肌梗死再通后的损伤修复提供新的治疗思路及策略。

[参考文献]

- [1] DU C, FAN Y, YF L, et al. Research progress on myocardial regeneration: what is new? [J]. Chin Med J (Engl), 2020, 133(6): 716-723.
- [2] SIA C H, KO J, ZHENG H, et al. Association between smoking status and outcomes in myocardial infarction patients undergoing percutaneous coronary intervention [J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 6466.
- [3] SILVIS M, KAFFKA G S, ODILLE C A, et al. Damage-associated molecular patterns in myocardial infarction and heart transplantation: the road to translational success [J]. Front Immunol, 2020, 11: 599511.
- [4] 蔡婵娟,徐章伦,汪莲开.左旋卡尼汀联合CrkL降低缺氧复氧诱导的心肌细胞损伤[J].中国动脉硬化杂志,2021,29(3): 232-239.
- [5] 刘丹勇,夏正远,韩荣辉,等.心肌缺血再灌注损伤机制研究的回顾与展望[J].中国动脉硬化杂志,2020,28(12): 1013-1019.
- [6] WANG P, WANG M, HU Y, et al. Isorhapontigemine protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity via increasing YAP1 expression [J]. Acta Pharm Sin B, 2021, 11(3): 680-693.
- [7] LI C, WAN W, YE T, et al. Pinocembrin alleviates lipopolysaccharide-induced myocardial injury and cardiac dysfunction in rats by inhibiting p38/JNK MAPK pathway [J]. Life Sci, 2021, 277: 119418.
- [8] DREAS A, MIKULSKI M, MILIK M, et al. Mitogen-activated protein kinase (MAPK) interacting kinases 1 and 2 (MNK1 and MNK2) as targets for cancer therapy: recent progress in the development of MNK inhibitors [J]. Curr Med Chem, 2017, 24(28): 3025-3053.
- [9] BARTISH M, TONG D, PAN Y, et al. MNK2 governs the macrophage antiinflammatory phenotype [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020, 117(44): 27556-27565.
- [10] KE X Y, CHEN Y, THAM V Y, et al. MNK1 and MNK2 enforce expression of E2F1, FOXM1, and WEE1 to drive soft tissue sarcoma [J]. Oncogene, 2021, 40(10): 1851-1867.
- [11] MARZEC M, LIU X, WYSOCKA M, et al. Simultaneous inhibition of mTOR-containing complex 1 (mTORC1) and MNK induces apoptosis of cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) cells [J]. PLoS One, 2011, 6(9): e24849.
- [12] TEO T, LAM F, YU M, et al. Pharmacologic inhibition of MNKs in acute myeloid leukemia [J]. Mol Pharmacol, 2015, 88(2): 380-389.
- [13] 钟小兰,班努·库肯,景江新.过表达Bax抑制剂1通过抑制线粒体通透性转换孔开放及细胞凋亡减轻心肌缺血再灌注损伤[J].中国动脉硬化杂志,2021,29(3): 222-231.
- [14] MOGILEVSKY M, SHIMSHON O, KUMAR S, et al. Modulation of MNK2 alternative splicing by splice-switching oligonucleotides as a novel approach for glioblastoma treatment [J]. Nucleic Acids Res, 2018, 46(21): 11396-11404.
- [15] BOSSIS I, STRATAKIS C A. Minireview: PRKARIA: normal and abnormal functions [J]. Endocrinology, 2004, 145(12): 5452-5458.
- [16] LI Y, WANG Y, ZHANG L, et al. ι -Carrageenan tetrasaccharide from iota-Carrageenan inhibits islet β cell apoptosis via the upregulation of GLP-1 to inhibit the mitochondrial apoptosis pathway [J]. J Agric Food Chem, 2021, 69(1): 212-222.
- [17] LI X D, YANG Y J, CHENG Y T, et al. Protein kinase A-mediated cardioprotection of Tongxinluo relates to the inhibition of myocardial inflammation, apoptosis, and edema in reperfused swine hearts [J]. Chin Med J (Engl), 2013, 126(8): 1469-1479.
- [18] 陈倩,李查兵,康路.七氟醚后处理调控cAMP/PKA信号通路减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤的机制研究[J].广西医科大学学报,2021,38(1): 55-60.
- [19] BAUMAN A L, SCOTT J D. Kinase-and phosphatase-anchoring proteins: harnessing the dynamic duo [J]. Nat Cell Biol, 2002, 4(8): E203-E206.
- [20] LIN W T, NITHIYANANTHAM S, HSIEH D J, et al. Bioactive peptides attenuate cardiac apoptosis in spontaneously hypertensive rat hearts through activation of autophagy and mitochondrial biogenesis pathway [J]. Environ Toxicol, 2020, 35(7): 804-810.
- [21] LI C, TIAN J, LI G, et al. Asperosaponin VI protects cardiac myocytes from hypoxia-induced apoptosis via activation of the PI3K/Akt and CREB pathways [J]. Eur J Pharmacol, 2010, 649(1/3): 100-107.
- [22] MERRETT J E, BO T, PSALTIS P J, et al. Identification of DNA response elements regulating expression of CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) β and δ and MAP kinase-interacting kinases during early adipogenesis [J]. Adipocyte, 2020, 9(1): 427-442.

(本文编辑 许雪梅)