

RGS14通过抑制TAK1改善急性心肌梗死的作用及机制研究



吴清华^{1, 2}, 段绍锋^{2, 3}, 谈重愿^{2, 3}, 张丽荣^{2, 3}, 张家兴^{2, 3}, 胡宇峰^{2, 3}, 折志刚^{1, 2, 3}, 李红良^{1, 2, 3}

1. 武汉大学人民医院心血管内科 (武汉 430060)
2. 重大疾病新药靶发现及新药创制全国重点实验室 (江西赣州 341000)
3. 赣南医科大学赣南创新与转化医学研究院 (江西赣州 341000)

【摘要】目的 探究 RGS14 蛋白在急性心肌梗死 (AMI) 中的作用及其机制。**方法** 选取 RGS14 敲除品系小鼠, 构建 AMI 模型, 收集造模 24 h 后的小鼠心脏组织和血清, 采用免疫组化实验分析心脏组织炎症浸润程度, 生化分析仪检测血清生化指标。体外构建过表达和敲低的腺病毒并转染原代大鼠心肌细胞, 采用 RT-qPCR 和 Western blot 检测 RGS14、炎症及凋亡相关标志物 mRNA 和蛋白的表达, TUNEL 染色分析心脏组织凋亡情况。**结果** AMI 模型小鼠心肌细胞 RGS14 的表达下调, 体外敲低 RGS14 加剧原代大鼠心肌细胞内炎症及细胞凋亡。与野生型小鼠相比, RGS14 敲除小鼠表现出 AMI 诱导的心脏功能障碍、炎症反应和凋亡增加。反之, 体外过表达 RGS14 抑制了心肌细胞凋亡。RGS14 对 AMI 损伤的保护作用与其抑制 TAK1-JNK/p38 信号通路的激活作用密切相关, 抑制 TAK1 可缓解敲低 RGS14 对 AMI 的不利影响。**结论** RGS14 在 AMI 后的炎症和凋亡反应过程中发挥保护作用, 并通过抑制 TAK1 的激活来缓解心脏功能障碍, 有望成为 AMI 治疗的新靶点。

【关键词】 RGS14; 急性心肌梗死; 炎症; 细胞凋亡; TAK1

【中图分类号】 R542.2+2 **【文献标识码】** A

Role and mechanism of RGS14 in improving acute myocardial infarction by inhibiting TAK1 activation

WU Qinghua^{1,2}, DUAN Shaofeng^{2,3}, TAN Chongyuan^{2,3}, ZHANG Lirong^{2,3}, ZHANG Jiaying^{2,3}, HU Yufeng^{2,3}, SHE Zhigang^{1,2,3}, LI Hongliang^{1,2,3}

1. Department of Cardiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China
2. State Key Laboratory of New Targets Discovery and Drug Development for Major Diseases, Ganzhou 341000, Jiangxi Province, China
3. Gannan Innovation and Translational Medicine Research Institute, Gannan Medical University, Ganzhou 341000, Jiangxi Province, China

Corresponding author: LI Hongliang, Email: lihl@whu.edu.cn

【Abstract】Objective This study aims to investigate the role and mechanism of regulator of G-protein signaling 14 (RGS14) protein in acute myocardial infarction (AMI). **Methods** The RGS14 knockout mice were selected to construct AMI model. The cardiac tissue and serum of mice were collected 24 h after modeling, the degree of inflammatory infiltration in the cardiac tissue was analyzed by immunohistochemical analysis, and biochemical analyzer detects serum biochemical

DOI: 10.12173/j.issn.1004-5511.202511095

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82570452, 82270390); 江西省自然科学基金重大项目 (20252BAC270001)

通信作者: 李红良, 博士, 教授, 博士研究生导师, Email: lihl@whu.edu.cn

indicators. Overexpression and knockdown adenovirus were constructed *in vitro* and transfected into primary rat cardiomyocytes. RT-qPCR and Western blot were used to detect the expression of RGS14, inflammation and apoptosis related markers mRNA and protein. TUNEL staining was used to analyze the apoptosis of heart tissue. **Results** The expression of RGS14 in myocardial cells of AMI model mouse was downregulated. Compared with wild-type mice, RGS14 knockout mice exhibited increased AMI induced cardiac dysfunction, inflammatory response, and apoptosis. Conversely, overexpression of RGS14 inhibited cardiomyocyte apoptosis *in vitro*. The protective effect of RGS14 on AMI injury is closely related to its inhibition of TAK1-JNK/p38 signaling pathway activation. Inhibition of TAK1 alleviates the adverse effects of RGS14 knockdown on AMI *in vitro*. **Conclusion** RGS14 exerts a protective function in the process of inflammation and apoptosis after AMI, and alleviates cardiac dysfunction by inhibiting the activation of TAK1, which provides a new potential for the treatment of AMI.

【Keywords】 Regulator of G-protein signaling 14; Acute myocardial infarction; Inflammation; Apoptosis; TAK1

心肌梗死 (myocardial infarction, MI) 是由于冠状动脉内血栓形成或持续性血管闭塞导致心肌急性、持续性缺血缺氧而引起的心肌坏死, 该心血管疾病在全球范围内具有高发病率和高病死率的特点, 构成严重的健康威胁^[1]。急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 导致心肌细胞死亡后, 会引发炎症浸润、间质纤维化及替代性胶原瘢痕等复杂的分子与细胞级联反应^[2-4]。在持续缺血状态下, 过度的炎症反应可直接诱发心肌细胞凋亡, 进一步扩大心肌损伤范围^[5]。这些病理改变共同导致心脏泵血功能进行性恶化、左心室重塑、心室扩张、心脏功能障碍, 最终发展为心力衰竭和死亡^[6]。近几十年来, 由于冠状动脉介入治疗和药物治疗, AMI 患者的发病率和死亡率显著降低, 但 MI 及再灌注期间大量心肌细胞死亡导致继发性心力衰竭患者增加, 且治疗结果不佳, 死亡率仍较高^[7-8]。因此, 进一步研究 AMI 的分子病理生理机制, 探索新的抗炎和抗凋亡治疗策略, 对于预防和治疗早期 MI 及其继发性心力衰竭至关重要。

G 蛋白信号传递调节蛋白 (regulator of G protein signaling, RGS) 含有 120 个氨基酸, 主要作为鸟苷三磷酸酶 (GTP 酶) 激活蛋白, 负责调控信号转导^[9-10]。心肌细胞和成纤维细胞中已鉴定出至少 20 种 RGS 蛋白, 与心律失常、心力衰竭和高血压等多种心脏相关病理生理过程有关^[11-13]。作为 RGS 家族的重要成员, RGS14 具有多种信号调节元件, 包括 RGS 结构域、GoLoco/G 蛋白调节基序和两个串联的 Ras/Rap 结合结构

域^[14]。既往研究表明, RGS14 可以通过调节趋化因子受体的表达, 介导趋化蛋白向淋巴细胞募集, 从而影响淋巴细胞的黏附和迁移^[15]。在肝脏缺血再灌注模型中, RGS14 参与抑制肝脏炎症和凋亡^[15]。RGS14 可通过调节 MEK-ERK1/2 信号通路抑制病理性心脏重塑^[16]。然而, 尚未有研究阐明 RGS14 是否在 AMI 中发挥作用。基于此, 本研究探究 RGS14 在 AMI 中的生物学功能及其作用机制, 旨在为 AMI 的治疗提供新的潜在靶点和策略。

1 材料和方法

1.1 实验动物

实验用 C57BL/6J 小鼠购自北京华阜康生物科技股份有限公司, 新生大鼠鼠婴 (1~2 d) 购于湖北贝恩特生物公司。构建 RGS14 敲除品系 (RGS14 KO) 小鼠^[15], 与同窝阴性对照 (WT) 小鼠均饲养于武汉大学人民医院动物实验中心, 其中 SPF 级小鼠饲料购自北京华阜康生物科技股份有限公司。小鼠饲养环境温度保持在 22~24 °C、湿度保持在 40%~70%, 明暗交替各 12 h, 自由摄食饮水。本研究动物手术按照 ARRIVE (动物研究: 体内实验报告) 指南 2.0^[17] 进行, 已获得武汉大学人民医院动物伦理委员会审批 [批号: WDRM 动 (福) 第 20230408B 号]。

1.2 主要试剂和仪器

BCA 蛋白定量试剂盒购自赛默飞世尔科技公司; 兔源一抗 RGS14、I κ B α 购自武汉三鹰生物技术有限公司; 兔源一抗 Bax、Bcl2、ERK、p-p38

MAPK、IKK β 购自爱博泰克生物科技有限公司；兔源一抗 p65、p-p65 购自武汉赛维尔生物科技有限公司；兔源一抗 TAK1、p-TAK1、p-ERK、JNK、p-JNK、p38、GAPDH、p-IKK β 和鼠源一抗 P-IkBa 购自 Cell Signaling Technolog 生物技术有限公司；蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂均购自罗氏公司；DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司；DMEM/F12 培养基购自武汉赛维尔生物科技有限公司；5-溴脱氧尿苷购自 Sigma 公司；电泳仪和 ChemiDoc MP 成像系统购自美国 BioRad 公司；切片扫描仪购自 Leica 公司；荧光显微镜购自 Olympus 公司；DAPI 购自深圳欣博盛生物科技有限公司；CD11b 一抗购自美国 Boster 公司；Ly6G 一抗购自武汉赛维尔生物科技有限公司；免疫组织化学鼠源两步检测试剂盒和 Trizol 试剂盒购自江西惠康生物科技有限公司；TUNEL 试剂盒购自武汉赛维尔生物科技有限公司；反转录试剂盒和 SYBR 试剂盒均购自诺唯赞公司；5Z-7-Oxozeanol 化合物购自 MedChemExpress 公司。腺病毒质粒 pENTR-CMV-RGS14-flag-T2A-GFP、pENTR-U6-shRGS14-CMV-flag-T2A-EGFP 购自淼灵生物科技有限公司，pAd/PL-DEST 购自 Addgene 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养

人胚肾细胞 293A 细胞系购于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库，培养于 37 °C、5% CO₂ 的恒温培养箱中，完全培养基成分为 DMEM 培养基混合 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素。

1.3.2 动物模型构建和分组

选用 20 只 8~10 周龄雄性 RGS14 敲除 (KO) 小鼠与 20 只雄性 WT 小鼠，体重约为 23.5~27.5 g。将小鼠随机分为 4 组：WT-AMI 组、RGS14 KO-AMI 组、WT-Sham 组和 RGS14 KO-Sham 组，每组 10 只。其中 AMI 组采用左前降支结扎术构建 AMI 模型^[18]；Sham 组为只切口缝线不结扎前降支的假手术组。24 h 后采集小鼠心脏和血液样本。心脏置于 20 倍体积的 4% 多聚甲醛液中固定；梗死心肌组织置于液氮快速冷冻后存放于 -80 °C 冰箱中。

1.3.3 原代心肌细胞分离、OGD模型构建和分组

分离新生大鼠 (1~2 d) 的心脏，并将其置于

含有预冷 DMEM 完全培养基的培养皿中。在显微镜下分离心脏、结缔组织和血管。然后，将心脏切成 1~2 mm³ 的组织块，用 0.125% 胰蛋白酶消化。用含有 10% 胎牛血清、1% 青霉素/链霉素和 5-溴脱氧尿苷 (0.1 mM) 的 F12 培养基培养 24 h。为了模拟心肌细胞的缺氧状态，对细胞进行氧葡萄糖剥夺 (OGD) 处理，换用不含血清、葡萄糖和丙酮酸钠的 DMEM 无糖培养基，然后将细胞在含有 95% N₂ 和 5% CO₂ 的三气培养箱中培养 24 h。

1.3.4 腺病毒载体构建

设计靶向 RGS14 基因的 rat-RGS14 过表达质粒，上调大鼠原代心肌细胞中 RGS14 的表达，携带 GFP 编码基因的腺病毒用作对照 (AdGFP)。设计靶向 RGS14 基因的 rat-shRGS14 敲除质粒来构建 AdshRGS14，以下调大鼠原代心肌细胞中 RGS14 的表达，AdshRNA 作为对照，所有质粒均通过 DNA 测序验证。将质粒与 pAdEasy 骨架载体重组，并在 PacI 线性化后转染到 293A 细胞中。腺病毒使用 Adeasy 腺病毒包装系统获得，重组腺病毒的滴度为 10¹⁰ PFU/mL。AdRGS14 过表达序列为：F-5'-GGCTAGCGATATCGGATCCATGCCA GGAAGCCCAAGCACTTGGG-3'；R-5'-CGTCCT TGTAATCACTAGTTGGTGGAGCCTCCTGAGAACC TGGTCTTTG-3'。AdshRGS14 序列为：F-5'-CCG GAGCAGCTTCAGATCTTCAATTCTCGAGAATTGA AGATCTGAAGCTGCTTTTTTG-3'；R-5'-AATTCA AAAAAGCAGCTTCAGATCTTCAATTCTCGAGAAT TGAAGATCTGAAGCTGCT-3'。

1.3.5 逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR)

通过 Trizol 裂解和氯仿提取获得组织或细胞的总 RNA，然后通过逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA。用设计的靶基因引物以 cDNA 为模板进行 RT-qPCR。鼠源 IL-6 上游引物 5'-ACTTGCCTTCTGGGACTGA-3'，下游引物 5'-TCCACGATTTCCAGAGAAC-3'；鼠源 TNF- α 上游引物 5'-CATCTTCTCAAAA TTCGAGTGACAA-3'，下游引物 5'-TGGGAG TAGACAAGGTAC AACCC-3'；鼠源 IL-1 β 上游引物 5'-AGCTTCAGGAAGGCAGTGTG-3'，下游引物 5'-TCAGACAGCACGAGGCATTT-3'。鼠源 GAPDH 上游引物 5'-AGGTCGGTGTGAACGG ATTTG-3'，下游引物 5'-GGGGTTCGTTGATGG CAACA-3'。鼠源 Bax 上游引物 GCGAATTGGCC

ATGAACTGG, 下游引物 TGTCCAGCCCA
TGATGGTTC。鼠源 *Bcl2* 上游引物 5'-GGGA
TGACTTCTCTCGTCGC-3', 下游引物 5'-CTCT
CCACACACATGACCCC-3'。鼠源 *RGS14* 上游引物
5'-CCAGACCAAGGACAGTCACC-3', 下游引物
5'-ATGTCGCAGGTCTGTCGTTT-3'。

1.3.6 Western blot

用含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解物 (65 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 0.5% 脱氧胆酸钠和 0.1% SDS) 处理细胞或组织。用超声波粉碎裂解物, 12 000 rpm 离心 10 min 后分离上清液, 得到总蛋白。通过 BCA 试剂盒测定蛋白质浓度。将与加载缓冲液混合的相同质量的蛋白质通过 8%~12% SDS-PAGE 电泳分离, 然后转移到 0.45 μm PVDF 膜上。随后, 在室温下用 5% 脱脂奶粉封闭 PVDF 膜约 1 h。用 TBST 洗涤三次, 每次 5 min。加入一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。加入相应物种的二抗, 用 TBST 洗涤后在室温下孵育 1 h。用 ChemiDoc MP 凝胶成像系统获取图像。

1.3.7 免疫组织化学分析

用 EDTA 修复石蜡切片, 随后 4 $^{\circ}\text{C}$ 下与抗 CD11b 或 Ly6G 抗体孵育过夜。用 PBS 洗涤后, 将二抗在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 30 min。然后使用 DAB 进行显色, 并使用苏木精进行细胞核染色。通过 Leica 病理切片扫描仪获取染色图像。

1.3.8 血清生化指标检测

采用日立 3110 全自动生化分析仪检测血清中天冬氨酸氨基转移酶 (AST)、乳酸脱氢酶 (LDH)、肌酸激酶 (CK)、肌酸酶同工酶 (CK-MB) 和 α -羟丁酸脱氢酶 (HBDH) 的含量。

1.3.9 末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记

进行末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记 (TUNEL), 将取材获得的组织经过固定、石蜡包埋, 将其切成 5 μm 的切片, 并按照 TUNEL 染色试剂盒说明书染色, 细胞核用 DAPI 染色。在 Olympus 荧光显微镜下观察图像, 并用 Image Pro Plus 6.0 软件进行分析。

1.3.10 免疫共沉淀

用 AdRGS14 腺病毒感染心肌细胞 24 h 后用 IP 裂解缓冲液 (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40 裂解液) 裂解细

胞。12 000 rpm 离心 10 min 取上清, 并在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下用 Flag 抗体和 G 蛋白琼脂糖珠免疫沉淀蛋白质过夜。将珠粒在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下以 3 000 rpm 的速度离心, 用含有 150 mM 或 300 mM NaCl 的缓冲液洗涤约 3 次, 用 2 \times SDS 负载缓冲液重悬, 在 95 $^{\circ}\text{C}$ 下加热 5~10 min, 然后通过 Western blot 检测和分析。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 27.0 软件进行分析。本研究所有体外实验均进行了至少三次独立的重复实验, 动物实验数据来源于每组至少三只独立的动物样本 ($n \geq 3$)。所有数据以均数和标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组比较采用独立样本 t 检验, 多组比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 体内外AMI模型中RGS14的表达情况

采用 RT-qPCR 检测接受缺血手术小鼠心脏中凋亡相关标志物 Bax、Bcl2 和 RGS14 的表达。结果显示, 缺血手术 24 h 后, Bax 的 mRNA 水平升高, Bcl2 降低, 表明 AMI 模型成功建立 (图 1-A)。RT-PCR 和 Western blot 证明 RGS14 的 mRNA 和蛋白质表达下调 (图 1-A 至 1-B)。免疫组织化学结果显示, RGS14 表达减少 (图 1-C)。从新生大鼠中分离出原代心肌细胞, OGD 刺激 24 h 后 RGS14 表达显著下调 (图 1-D 至 1-E)。以上结果提示 RGS14 可能参与 AMI 的发生和发展。

2.2 RGS14抑制OGD刺激诱导的心肌细胞凋亡

为研究 RGS14 对心肌细胞凋亡的调节作用, 分离原代新生大鼠心肌细胞, AdshRGS14 腺病毒感染以敲低 RGS14。RT-qPCR 和 Western blot 结果显示 AdshRGS14 显著降低心肌细胞中 RGS14 的表达 (图 2-A 至 2-B)。AdshRGS14 感染的心肌细胞在 OGD 刺激后 Bax 表达水平显著升高, Bcl2 表达水平显著降低 (图 2-C 至 2-D)。同时, 使用 AdRGS14 腺病毒和对照 AdGFP 病毒感染心肌细胞, 研究 RGS14 过表达对 OGD 诱导的心肌细胞凋亡的影响。RT-PCR 和 Western blot 证实 RGS14 过表达成功 (图 2-E 至 2-F)。RGS14 过表达可以抑制 Bax 并促进 Bcl2 的表达 (图 2-G 至 2-H)。上述结果表明, RGS14 可以抑制 OGD 刺激原代心肌细胞引起的细胞凋亡。

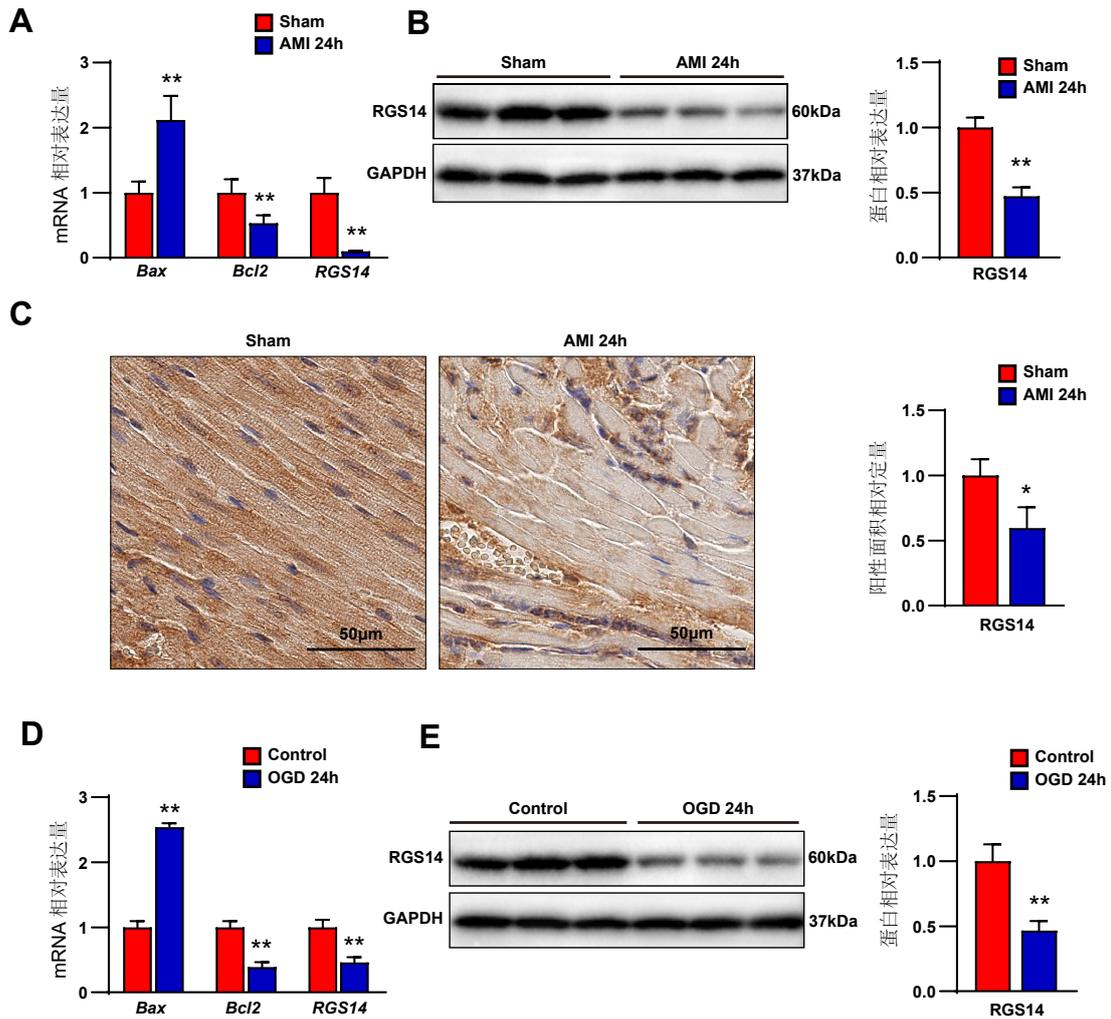


图1 RGS14在AMI体内外模型中的表达情况

Figure 1. RGS14 expression *in vivo* and *in vitro* models of AMI

注：A.小鼠心脏组织中凋亡相关基因和RGS14 mRNA表达情况；B.小鼠心脏组织中RGS14蛋白表达情况及定量分析；C.小鼠心脏组织RGS14免疫组织化学染色结果及定量分析；D.心肌细胞凋亡相关基因和RGS14 mRNA表达情况；E.心肌细胞RGS14蛋白表达情况及定量分析；标尺,50 μm；* $P < 0.05$ ；** $P < 0.01$ 。

2.3 敲除RGS14加剧AMI后心肌损伤和细胞凋亡

为进一步研究RGS14对AMI的影响，使用RGS14 KO小鼠及WT小鼠构建AMI模型。Western blot分析证明KO小鼠心脏组织中RGS14被成功敲除(图3-A)。收集各组小鼠的血清进行生化指标检测，结果表明，相较于WT-AMI组，RGS14 KO-AMI组AST、LDH、CK、CK-MB和HBDH的血清酶活性显著升高(图3-B至3-F)，表明RGS14的缺失会促进MI期间的心脏损伤。TUNEL免疫荧光结果显示，AMI后RGS14-KO组的阳性细胞数量显著高于WT组(图3-G)，表明RGS14缺失促进了AMI期间的细胞凋亡。RT-PCR和Western

blot结果显示，与WT组相比，RGS14 KO促进了Bax的表达，下调了Bcl2的表达(图3-H至3-I)。上述结果证明RGS14敲除促进AMI期间的细胞凋亡。

2.4 RGS14缓解AMI期间的心脏炎症

炎症反应是与AMI相关的重要生物学过程。本研究对心脏组织进行CD11b和Ly6G免疫组织化学染色以观察炎症细胞的浸润情况。MI后24h，RGS14-KO小鼠心脏中CD11b阳性巨噬细胞和Ly6G阳性中性粒细胞浸润程度显著高于WT小鼠(图4-A至4-B)。MI后24h，RGS14-KO组小鼠心脏组织磷酸化Ikkβ(p-Ikkβ)和磷酸化p65(p-p65)蛋白水平升高，但Ikkβ和p65总蛋白

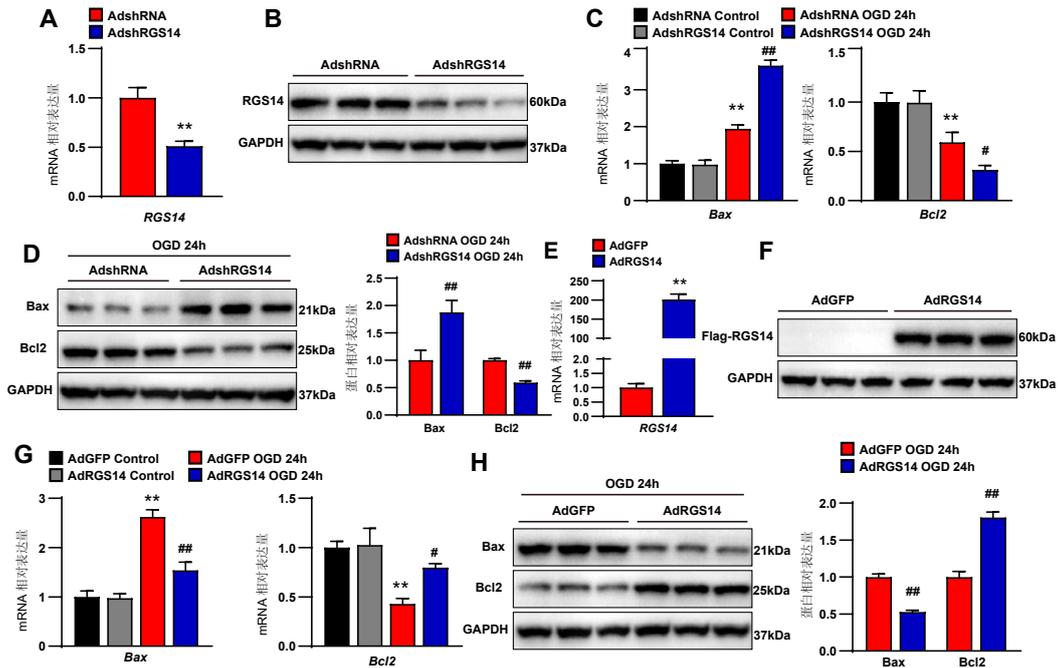


图2 RGS14对OGD刺激后的心肌细胞凋亡的影响

Figure 2. The impact of RGS14 on cardiomyocyte apoptosis following OGD stimulation

注: A.PCR验证RGS14敲低效果; B.Western blot验证RGS14敲低效果; C.RGS14敲低后凋亡相关基因mRNA表达水平; D.RGS14敲低后凋亡相关基因蛋白表达情况; E.PCR验证RGS14过表达效果; F.Western blot验证RGS14过表达效果; G.RGS14过表达后凋亡相关基因mRNA表达水平; H.RGS14过表达后凋亡相关基因蛋白表达情况; 与AdshRNA组或AdGFP组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与AdshRNA OGD组或AdGFP OGD组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

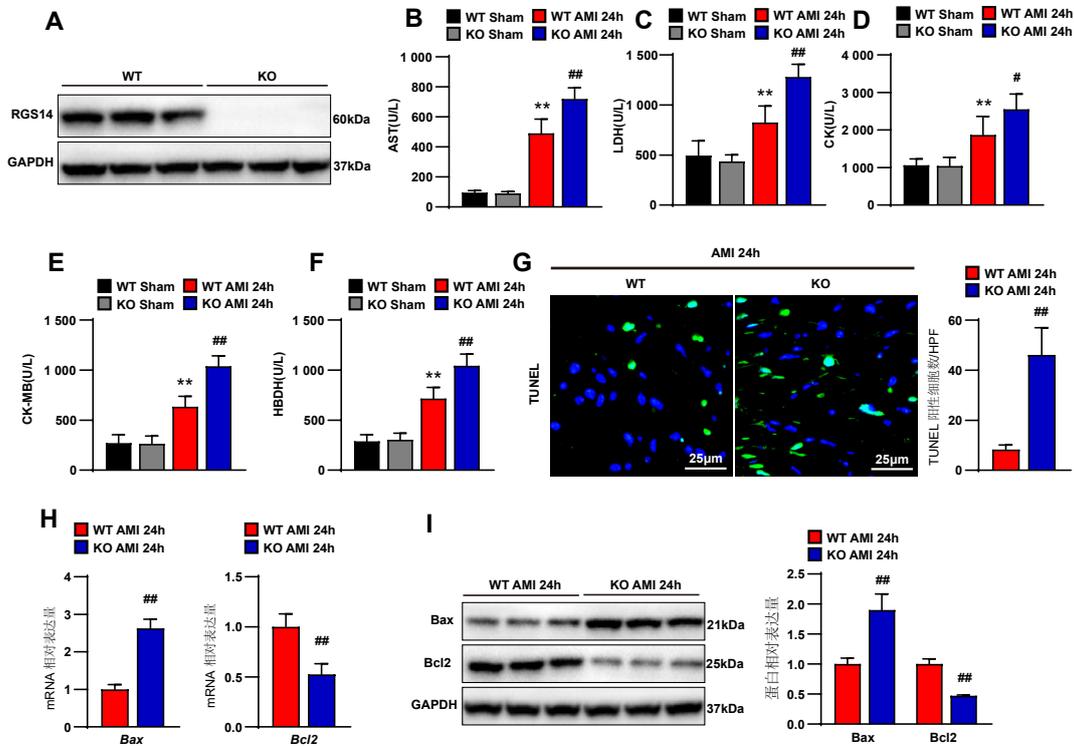


图3 RGS14敲除对AMI后心肌损伤和细胞凋亡的影响

Figure 3. RGS14 knockout affects cardiac injury and apoptosis following AMI

注: A.RGS14敲除品系小鼠鉴定免疫印迹代表图; B-F.小鼠血清酶活性检测; G.小鼠心脏组织切片TUNEL染色代表性图片及其统计结果; H.凋亡相关基因mRNA表达情况; I.凋亡相关基因蛋白表达情况; 标尺: 25 μm; 与WT Sham组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与KO Sham组或WT AMI 24 h组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

水平无明显变化(图4-C)。RT-qPCR结果显示,与WT组相比,RGS14-KO组MI后心脏组织中TNF- α 、IL-1b和IL-6炎症细胞因子的表达增加(图4-D)。在原代心肌细胞OGD模型中敲低RGS14显著增加了NF- κ B通路p-p65和磷酸化I κ B α (p-I κ B α)蛋白的表达,表明其对NF- κ B通路具有抑制作用,而过表达RGS14则相反(图4-E至4-F)。上述结果表明RGS14可缓解AMI背景下的心脏损伤和炎症反应。

2.5 RGS14与TAK1相互作用并调节TAK1-JNK/p38信号通路

为探索RGS14是否通过TAK1-JNK/p38信号通路来调节AMI的发展进程,使用Western blot检测MI手术或OGD刺激后TAK1、ERK、JNK和p38的总水平和磷酸化水平。结果显示与相应的对照组相比,RGS14缺陷小鼠心脏组织和RGS14敲除心肌细胞中TAK1、JNK和p38磷酸化水平显著升高,而磷酸化ERK和总TAK1、

ERK、JNK及p38无明显变化(图5-A至5-B)。RGS14过表达对心肌细胞的影响则相反(图5-C)。为进一步研究RGS14是否可以与心肌细胞中的TAK1相互作用,在心肌细胞中过表达Flag标记的RGS14,用Flag抗体筛选蛋白质并检测TAK1。结果表明,RGS14可以与心肌细胞中TAK1相互作用(图5-D)。以上结果表明,RGS14可以与TAK1相互作用,并在AMI期间抑制TAK1-JNK/p38信号通路。

2.6 RGS14通过抑制TAK1磷酸化缓解AMI

为研究RGS14是否通过TAK1磷酸化发挥其调节作用,采用TAK1抑制剂5z-7-ox处理原代心肌细胞。结果显示,RGS14敲低诱导的TAK1、JNK和p38s磷酸化水平升高被5z-7-ox逆转(图6-A)。并且,TAK1抑制剂逆转了RGS14敲低引起的Bax上调和Bcl2下调(图6-B至6-C)。以上结果证明,RGS14通过抑制TAK1磷酸化来缓解AMI。

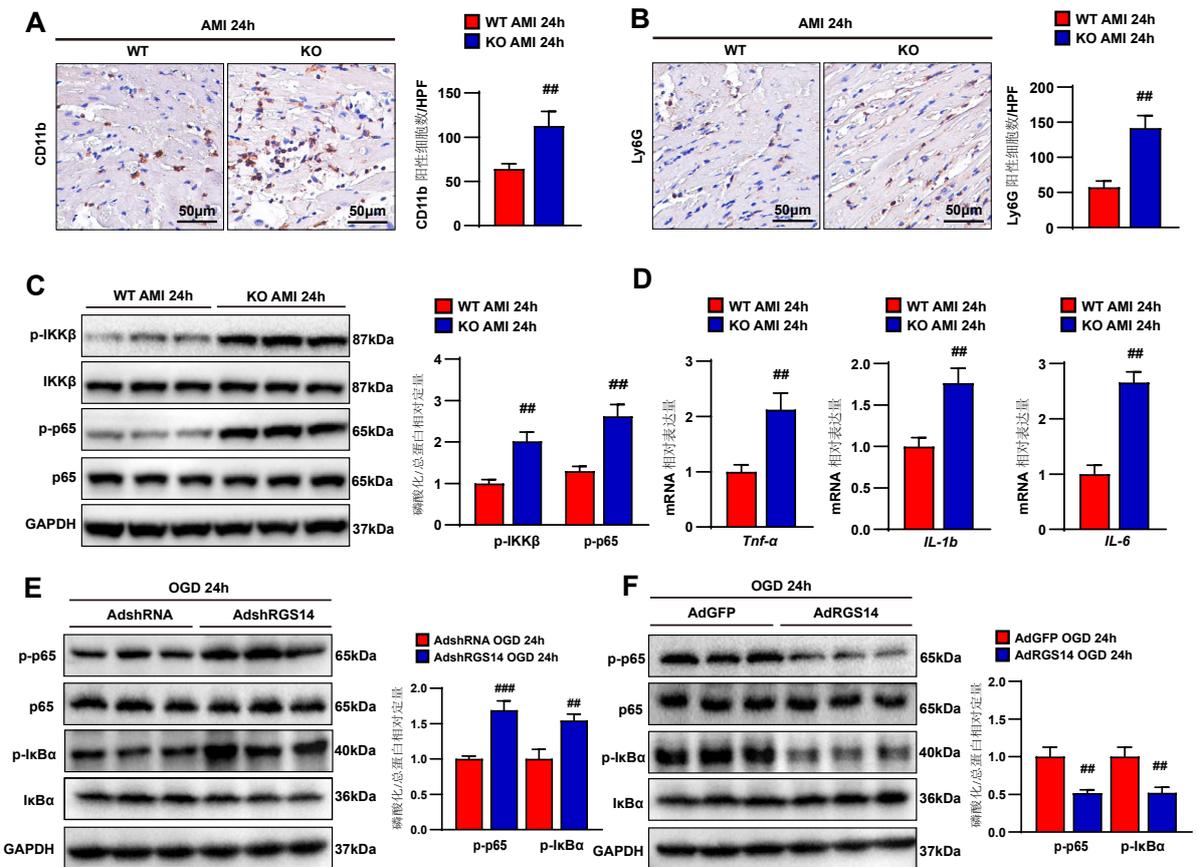


图4 RGS14对AMI期间心脏炎症的影响

Figure 4. Effect of RGS14 on cardiac inflammation during AMI

注: A.心脏组织CD11b免疫组化染色代表图及定量分析; B.心脏组织Ly6G免疫组化染色代表图及定量分析; C.心脏组织NF- κ B信号通路相关蛋白表达情况; D.心脏组织炎症相关因子mRNA表达情况; E.RGS14敲低后原代心肌细胞NF- κ B信号通路相关蛋白表达情况; F.RGS14过表达后原代心肌细胞NF- κ B信号通路相关蛋白表达情况; 标尺:50 μ m; ## P <0.01, ### P <0.001。

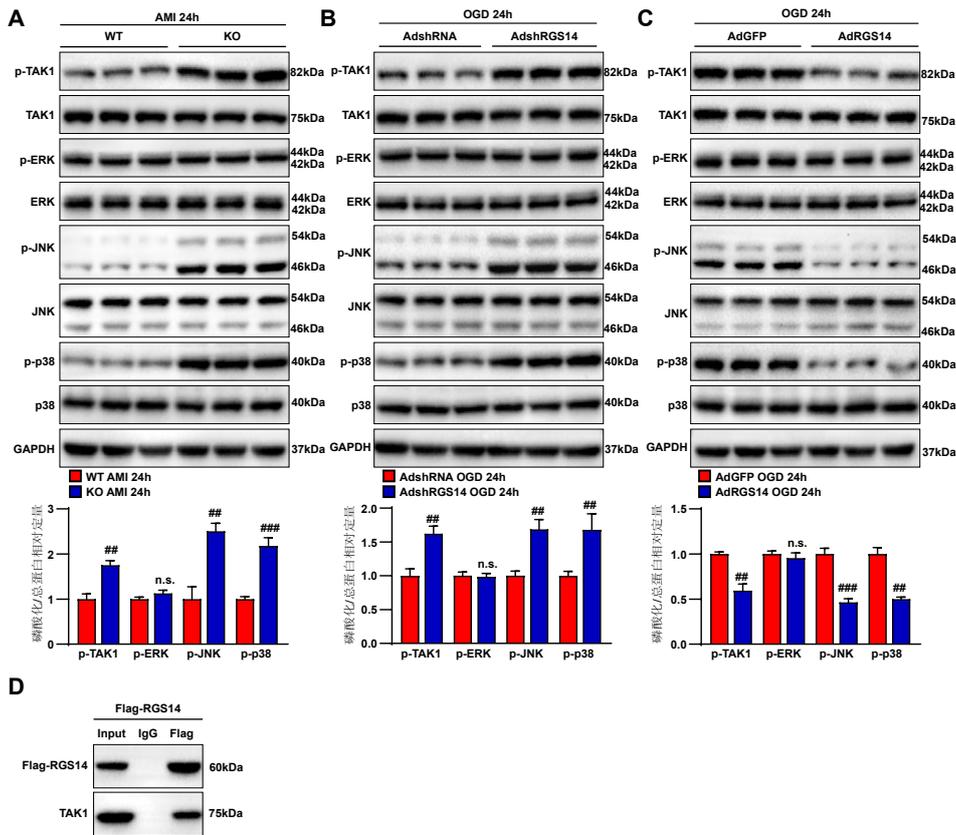


图5 RGS14和TAK1相互作用情况与对TAK1-JNK/p38信号通路的影响

Figure 5. RGS14 can interact with TAK1 and impact TAK1-JNK/p38 signaling pathway

注: A.心脏组织TAK1、JNK、ERK、p38总蛋白及磷酸化蛋白表达情况及定量分析; B.RGS14敲低后原代心肌细胞TAK1、JNK、ERK、p38总蛋白及磷酸化蛋白表达情况及定量分析; C.RGS14过表达后原代心肌细胞TAK1、JNK、ERK、p38总蛋白及磷酸化蛋白表达情况及定量分析; D.原代心肌细胞Flag-RGS14与TAK1半内源性Co-IP; n.s.无统计学意义, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

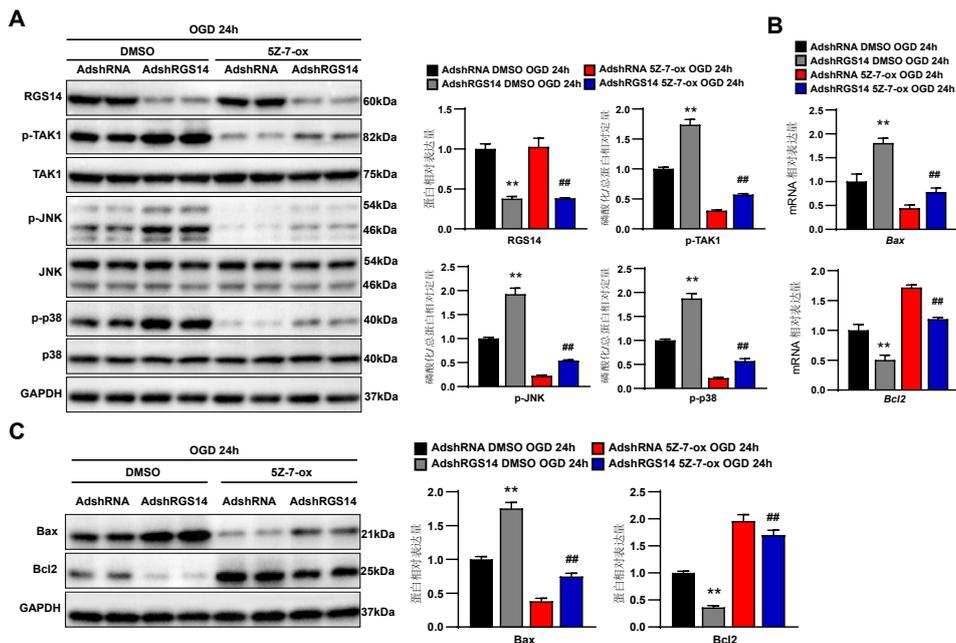


图6 RGS14通过抑制TAK1磷酸化激活缓解MI

Figure 6. RGS14 alleviates MI by inhibiting TAK1 phosphorylation activation

注: A.原代心肌细胞RGS14和TAK1、JNK和p38总蛋白及磷酸化蛋白表达情况; B.原代心肌细胞凋亡相关基因mRNA表达情况; C.原代心肌细胞凋亡相关基因蛋白表达情况; **与AdshRNA DMSO OGD 24 h组相比, $P < 0.01$; **与AdshRGS14 DMSO OGD 24 h组相比, $P < 0.01$ 。

3 讨论

RGS14 是一种复杂的多功能支架蛋白，在海马 CA2 区的锥体细胞中高度富集，具有调节突触可塑性、学习和记忆方面的作用^[19]。既往研究表明 RGS14 可保护周围神经损伤和肝脏缺血再灌注损伤，并通过抑制 MEK-ERK1/2 信号通路减轻压力过载所致的心脏重塑，但其在 AMI 中的作用尚未完全阐明^[16, 20]。本研究表明，RGS14 缺失促进了 AMI 期间的心脏损伤、炎症反应和细胞凋亡，而 RGS14 过表达则保护了 OGD 诱导的心肌细胞凋亡，揭示了 RGS14 在 AMI 中通过调控 TAK1-JNK/p38 通路抑制炎症与凋亡的新机制，进一步拓展了 RGS14 在不同心脏病理场景下的多效保护作用。

心肌细胞凋亡是贯穿 MI 病程始终、影响心脏功能的关键因素。MI 后心肌细胞死亡的模式包括坏死和凋亡，凋亡是一个可以调节的主动死亡过程^[21]。因此，减少心肌细胞凋亡被视为减轻缺氧与缺血所致心肌损伤的重要治疗策略^[22]。MI 后引发心肌细胞凋亡的根本原因在于促凋亡蛋白和抗凋亡蛋白之间平衡的破坏^[23]。调节蛋白质之间平衡来干预细胞凋亡进程的策略已被证明能有效抑制 MI 诱导的心肌细胞凋亡^[24]。据报道，RGS 家族中 RGS5、RGS6 和 RGS19 等其他蛋白质，在调节细胞凋亡中起着重要作用^[25-27]。本研究结果表明，RGS14 缺失可促进 AMI 后细胞凋亡。在心肌细胞中，RGS14 敲除可以促进促凋亡因子 Bax 的表达，抑制抗凋亡因子 Bcl2 的表达，并且 RGS14 过表达具有相反的效果，表明 RGS14 可通过抑制心肌细胞凋亡来缓解 AMI。

MI 后心肌组织激活损伤相关分子模式，导致中性粒细胞和巨噬细胞等炎性细胞浸润^[3, 28-29]，并促进 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 等炎性因子的分泌^[30]。既往研究表明，NF- κ B 信号通路激活会调节心脏损伤期间的炎症反应，抑制炎症反应可以有效缓解 MI 后的心脏损伤^[31]。本研究结果发现，RGS14 缺乏通过促进 NF- κ B 信号通路导致炎症反应增强，而 RGS14 过表达则抑制了 NF- κ B 信号通路的激活，表明 RGS14 可以通过影响炎症反应来调节心脏损伤。

TAK1 是丝裂原活化蛋白激酶激酶激酶 (MAP3K) 家族的成员，已被确定为 MAPK 和

NF- κ B 信号通路的关键调控成分^[32]。TAK1 已被证明参与炎症级联和细胞凋亡的调节，并在 MI 中起着重要的调节作用^[33]。既往研究通过免疫共沉淀与 GST-pulldown 实验发现 RGS14 与 TAK1 互作并抑制 TAK1-JNK/p38 通路^[15]，本研究进一步在心肌细胞中证实了该结合作用，并观察到 RGS14 可抑制 TAK1 磷酸化及其下游 JNK/p38 信号激活，进而发挥心脏保护作用。

本研究仍存在一定的局限性。首先，本研究主要聚焦于 MI 急性期 (24 h) 内 RGS14 的作用及其分子机制，尚未对 RGS14 在心肌纤维化、瘢痕成熟及远期心功能方面的作用进行评估。其次，本研究对 RGS14 在 AMI 中的机制探索仍停留在较浅的层面。RGS14 是否通过结合 TAB1 等 TAK1 辅助因子抑制其激活，将在后续研究中进一步完善。未来可通过蛋白质组学及结构生物学等技术，系统性地阐明 RGS14 如何调控 TAK1，为相关治疗策略的开发提供坚实的理论基础。

综上所述，本研究发现 RGS14 在 MI 急性期通过调节 TAK1 磷酸化减轻心肌炎症和凋亡，为干预 MI 急性损伤的潜在靶点提供了实验依据，并为其后续长期疗效的研究奠定了重要基础。

伦理声明：本研究已获得武汉大学人民医院动物伦理委员会审批[批号：WDRM动(福)第20230408B号]

作者贡献：研究设计：吴清华、胡宇峰、折志刚；实验操作与数据采集：吴清华、段绍锋、谈重愿；数据分析：吴清华、谈重愿、张丽荣；论文撰写：吴清华、段绍锋；论文审定：李红良、折志刚、胡宇峰、张家兴；经费支持：折志刚、李红良

数据获取：本研究中使用和(或)分析的数据可联系通信作者获取

利益冲突声明：无

致谢：不适用

参考文献

- 1 Yap J, Irei J, Lozano-Gerona J, et al. Macrophages in cardiac remodelling after myocardial infarction[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2023, 20(6): 373-385.
- 2 Zhang Q, Wang L, Wang S, et al. Signaling pathways and targeted therapy for myocardial infarction[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 78.
- 3 Prabhu SD, Frangogiannis NG. The biological basis for cardiac repair after myocardial infarction: from inflammation to fibrosis[J]. *Circ Res*, 2016, 119(1): 91-112.
- 4 Zurek M, Johansson E, Palmer M, et al. Neuregulin-1 induces cardiac hypertrophy and impairs cardiac performance in post-myocardial infarction rats[J]. *Circulation*, 2020, 142(13): 1308-1311.
- 5 Li J, Zhang Y, Li C, et al. HSPA12B attenuates cardiac dysfunction and remodelling after myocardial infarction through an eNOS-dependent mechanism[J]. *Cardiovasc Res*, 2013, 99(4): 674-684.

- 6 Zhou X, Zhang C, Wu X, et al. Dusp6 deficiency attenuates neutrophil-mediated cardiac damage in the acute inflammatory phase of myocardial infarction[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 6672.
- 7 Saito Y, Oyama K, Tsujita K, et al. Treatment strategies of acute myocardial infarction: updates on revascularization, pharmacological therapy, and beyond[J]. *J Cardiol*, 2023, 81(2): 168–178.
- 8 董丹, 孙艳秋, 燕燕. 中国居民 2002–2021 年急性心肌梗死死亡趋势年龄-时期-队列模型分析[J]. *数理医药学杂志*, 2023, 36(10): 721–726. [Dong D, Sun YQ, Yan Y. Acute myocardial infarction mortality among Chinese residents from 2002 to 2021: an age-period-cohort model analysis[J]. *Journal of Mathematical Medicine*, 2023, 36(10): 721–726.]
- 9 Koelle MR. A new family of G-protein regulators—the RGS proteins[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 1997, 9(2): 143–147.
- 10 Watson N, Linder ME, Druey KM, et al. RGS family members: GTPase-activating proteins for heterotrimeric G-protein α -subunits[J]. *Nature*, 1996, 383(6596): 172–175.
- 11 Zhang P, Mende U. Regulators of G-protein signaling in the heart and their potential as therapeutic targets[J]. *Circ Res*, 2011, 109(3): 320–333.
- 12 胡哲夫, 唐其柱. RGS 与心血管系统的研究进展[J]. *医学研究杂志*, 2018, 47(11): 7–10. [Hu ZF, Tang QZ. Advances in research on RGS and the cardiovascular system[J]. *Journal of Medical Research*, 2018, 47(11): 7–10.]
- 13 Romero M, Jiménez R, Toral M, et al. Vascular and central activation of peroxisome proliferator-activated receptor-attenuates angiotensin II-induced hypertension: role of RGS-5[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2016, 358(1): 151–163.
- 14 Evans PR, Lee SE, Smith Y, et al. Postnatal developmental expression of regulator of G protein signaling 14 (RGS14) in the mouse brain[J]. *J Comp Neurol*, 2014, 522(1): 186–203.
- 15 Zhang JK, Ding MJ, Liu H, et al. Regulator of G-protein signaling 14 protects the liver from ischemia-reperfusion injury by suppressing TGF- β -activated kinase 1 activation[J]. *Hepatology*, 2022, 75(2): 338–352.
- 16 Li Y, Tang X, Li X, et al. Regulator of G protein signalling 14 attenuates cardiac remodelling through the MEK-ERK1/2 signalling pathway[J]. *Basic Res Cardiol*, 2016, 111(4): 47.
- 17 Percie du Sert N, Hurst V, Ahluwalia A, et al. The ARRIVE guidelines 2.0: updated guidelines for reporting animal research[J]. *Br J Pharmacol*, 2020, 177(16): 3617–3624.
- 18 Bao MW, Cai Z, Zhang XJ, et al. Dickkopf-3 protects against cardiac dysfunction and ventricular remodelling following myocardial infarction[J]. *Basic Res Cardiol*, 2015, 110(3): 25.
- 19 Harbin NH, Bramlett SN, Montanez-Miranda C, et al. RGS14 regulation of post-synaptic signaling and spine plasticity in brain[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(13): 6823.
- 20 Hatanpaa KJ, Raisanen JM, Herndon E, et al. Hippocampal sclerosis in dementia, epilepsy, and ischemic injury: differential vulnerability of hippocampal subfields[J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2014, 73(2): 136–142.
- 21 Wu X, Iroegbu CD, Peng J, et al. Cell death and exosomes regulation after myocardial infarction and ischemia-reperfusion[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 673677.
- 22 Meeran MFN, Azimullah S, Adeghate E, et al. Nootkatone attenuates myocardial oxidative damage, inflammation, and apoptosis in isoproterenol-induced myocardial infarction in rats[J]. *Phytomedicine*, 2021, 84: 153405.
- 23 Dhingra R, Rabinovich-Nikitin I, Rothman S, et al. Proteasomal degradation of TRAF2 mediates mitochondrial dysfunction in doxorubicin-cardiomyopathy[J]. *Circulation*, 2022, 146(12): 934–954.
- 24 Li HL, Zhuo ML, Wang D, et al. Targeted cardiac overexpression of A20 improves left ventricular performance and reduces compensatory hypertrophy after myocardial infarction[J]. *Circulation*, 2007, 115(14): 1885–1894.
- 25 Sohn WJ, Ji YR, Kim HS, et al. Rgs19 regulates mouse palatal fusion by modulating cell proliferation and apoptosis in the MEE[J]. *Mech Dev*, 2012, 129(9–12): 244–254.
- 26 Huang J, Stewart A, Maity B, et al. RGS6 suppresses Ras-induced cellular transformation by facilitating Tip60-mediated Dnmt1 degradation and promoting apoptosis[J]. *Oncogene*, 2014, 33(27): 3604–3611.
- 27 Wang Z, Huang HE, He W, et al. Regulator of G-protein signaling 5 protects cardiomyocytes against apoptosis during in vitro cardiac ischemia-reperfusion in mice by inhibiting both JNK1/2 and P38 signaling pathways[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 473(2): 551–557.
- 28 黄会慧, 蔡永祥, 都欢, 等. 水凝胶调控巨噬细胞促进心肌梗死后心肌修复的研究进展[J]. *医学新知*, 2024, 34(5): 572–581. [Huang HH, Cai YX, Dou H, et al. Hydrogel modulate macrophages to promote myocardial repair after myocardial infarction[J]. *Yixue Xinzhi Zazhi*, 2024, 34(5): 572–581.]
- 29 Cai S, Zhao M, Zhou B, et al. Mitochondrial dysfunction in macrophages promotes inflammation and suppresses repair after myocardial infarction[J]. *J Clin Invest*, 2023, 133(4): e159498.
- 30 Wang X, Guo Z, Ding Z, et al. Inflammation, autophagy, and apoptosis after myocardial infarction[J]. *J Am Heart Assoc*, 2018, 7(9): e008024.
- 31 Jung M, Dodsworth M, Thum T. Inflammatory cells and their non-coding RNAs as targets for treating myocardial infarction[J]. *Basic Res Cardiol*, 2019, 114(1): 4.
- 32 Wang L, Zhang X, Lin ZB, et al. Tripartite motif 16 ameliorates nonalcoholic steatohepatitis by promoting the degradation of phospho-TAK1[J]. *Cell Metab*, 2021, 33(7): 1372–1388. e7.
- 33 Bai B, Ji Z, Wang F, et al. CTRP12 ameliorates post-myocardial infarction heart failure through down-regulation of cardiac apoptosis, oxidative stress and inflammation by influencing the TAK1-p38 MAPK/JNK pathway[J]. *Inflamm Res*, 2023, 72(7): 1375–1390.

收稿日期: 2025年11月18日 修回日期: 2026年01月08日
本文编辑: 杨室淤 曹越

引用本文: 吴清华, 段绍锋, 谈重愿, 等. RGS14通过抑制TAK1改善急性心肌梗死的作用及机制研究[J]. *医学新知*, 2026, 36(2): 169–178. DOI: 10.12173/j.issn.1004-5511.202511095.

Wu QH, Duan SF, Tan CY, et al. Role and mechanism of RGS14 in improving acute myocardial infarction by inhibiting TAK1 activation[J]. *Yixue Xinzhi Zazhi*, 2026, 36(2): 169–178. DOI: 10.12173/j.issn.1004-5511.202511095.