

去甲乌药碱调控 METTL3/TFEB 通路抗异丙肾上腺素诱导大鼠心肌梗死

谢保平^{1,2}, 郭奕鑫³, 叶曼仪¹, 黄旭灿³, 李旭平¹, 钟沛成¹, 王大伟⁴,
刘中秋^{1,4*}, 程媛媛^{1,4*}

(1. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 511400; 2. 赣南医学院心脑血管疾病防治教育部重点实验室, 江西 赣州 341000; 3. 广州中医药大学基础医学院, 广东 广州 511400; 4. 广州中医药大学顺德医院, 广东 佛山 528333)

摘要: 本研究探讨了去甲乌药碱 (higenamine, HG) 抗异丙肾上腺素 (isoproterenol, ISO) 诱导心肌梗死的药理作用和分子机制。动物实验遵循广州中医药大学实验动物福利与伦理相关规定。采用 ISO 处理 H9c2 细胞和诱导大鼠心肌梗死模型, 用 ELISA、超声心动、HE 染色、Western blot 和 TUNEL 染色等方法评价 HG 对心肌梗死大鼠心脏功能指标和病理形态学的影响, 以及细胞凋亡、自噬和甲基转移酶样 3 (methyltransferase-like 3, METTL3)/转录因子 EB (transcription factor EB, TFEB) 信号通路相关蛋白的表达, 并用分子对接技术阐明 HG 与 METTL3 之间的相互作用。结果表明: HG 可显著改善 ISO 诱导的心肌梗死大鼠心脏组织病理形态学, 上调左室射血分数和左室短轴缩短率, 抑制肌酸激酶同工酶 CK-MB (creatinase Mb) 和 CK (creatinase), 以及乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 水平。同时, HG 可显著提高 ISO 诱导 H9c2 细胞存活率和抑制 H9c2 细胞凋亡。机制研究发现, HG 可抑制凋亡相关蛋白 (Bax/Bcl2、caspase3、cleaved-caspase3) 表达, 上调 Bcl2 结合蛋白 Beclin1 的表达, 上调细胞自噬通量, 降低自噬微管相关蛋白轻链 3B (light chain 3B, LC-3B)-I/LC-3B-II 的比值。进一步研究发现, HG 上调自噬调节转录因子 TFEB 的表达, 抑制其上游靶点 METTL3 的表达, 且分子对接结果显示 HG 与 METTL3 有良好的相互作用。本研究表明, HG 具有良好的抗心肌细胞凋亡、改善心肌梗死的作用, 其机制可能与调控 METTL3/TFEB 信号通路介导心肌细胞自噬有关。

关键词: 去甲乌药碱; 心肌梗死; 凋亡; 自噬; 甲基转移酶样 3

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)10-3106-09

Higenamine attenuates isoproterenol-induced myocardial infarction via regulating METTL3/TFEB pathway

XIE Bao-ping^{1,2}, GUO Yi-xin³, YE Man-yi¹, HUANG Xu-can³, LI Xu-ping¹, ZHONG Pei-cheng¹,
WANG Da-wei⁴, LIU Zhong-qiu^{1,4*}, CHENG Yuan-yuan^{1,4*}

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 511400, China; 2. Key Laboratory of Prevention and Treatment of Cardiovascular and Cerebrovascular Diseases of Ministry of Education, Gannan Medical University, Ganzhou 341000, China; 3. School of Basic Medical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 511400, China; 4. Shunde Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Foshan 528333, China)

Abstract: In this study, we investigated the pharmacological effect and possible molecular mechanism of higenamine (HG) in isoproterenol (ISO)-induced myocardial infarction (MI). All procedures were approved by the

收稿日期: 2022-04-18; 修回日期: 2022-07-15.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82074053, 82174156); 广东省重点领域研发计划“岭南中医药现代化”重点专项项目 (2020B1111100004); 广东省大学生创新训练项目 (S202110572124); 赣南医学院心脑血管疾病防治教育部重点实验室开放基金 (XN202025).

*通讯作者 Tel: 86-20-39358061, E-mail: liuzq@gzucm.edu.cn;

Tel: 86-20-39358701, E-mail: chengyuanyuan@gzucm.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-0435

Institutional Animal Care and Use Committee of the Guangzhou University of Chinese Medicine. ISO was used to induce MI model in rats and H9c2 cells. The effects of HG on biomarkers and cardiac function in MI rats were evaluated by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), echocardiography and hematoxylin-eosin staining (HE). The expression of apoptosis and autophagy related proteins were detected by Western blot in myocardial tissue and H9c2 cells, as well as methyltransferase-like 3 (METTL3) and transcription factor EB (TFEB) protein expression. Molecular docking was used to evaluate the interaction between HG and METTL3. The results showed that HG significantly improved cardiac function and pathologic changes in ISO-induced MI, and inhibited the levels of MI-related biomarkers such as creatine kinase Mb (CK-MB), creatine kinase (CK) and lactate dehydrogenase (LDH). Mechanism studies showed that HG inhibited the expression of apoptosis-related proteins (Bax/Bcl2, caspase3, cleaved-caspase3). Interestingly, HG up-regulated the expression of autophagy related protein Beclin1, promoted autophagy flux, and decreased the ratio of light chain 3B-I/light chain 3B-II (LC-3B-I/LC-3B-II). Further studies found that HG increased the autophagy regulator TFEB and inhibited METTL3 expression. Molecular docking results showed that HG had a good interaction with METTL3. Taken together, HG has a potential anti-MI effect *via* regulating METTL3/TFEB signaling pathway-mediated autophagy.

Key words: higenamine; myocardial infarction; apoptosis; autophagy; methyltransferase-like 3

心肌梗死是一种常见的心血管疾病,常伴有心律失常、心力衰竭和心肌纤维化等症状,其患病率和死亡率保持总体上升趋势^[1]。目前临床上对于急性心肌梗死的治疗常采用溶栓药物和介入治疗。然而,该方法往往会造成心肌缺血再灌注损伤,从而增加心力衰竭的风险^[2]。因此,探讨心肌梗死的发病机制及有效治疗药物具有十分重要的临床意义。

去甲乌药碱 (higenamine, HG, 图 1) 是从附子中分离出的一种苜蓿基异喹啉类生物碱,具有强心、改善心率过缓、抗心肌纤维化、舒张血管和减轻心肌缺血-再灌注损伤的作用^[3]。HG 化学结构与儿茶酚胺相似,可激活 β -肾上腺素能受体 (β -adrenergic receptors, β -AR) 产生正性变时和正性变力作用,并通过激活 β 2-AR/phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K)/protein kinase 信号通路保护缺血再灌注诱导的心肌损伤和心肌凋亡^[4-6]。然而, HG 在 ISO 诱导的心肌梗死上的药理作用机制尚未阐明。

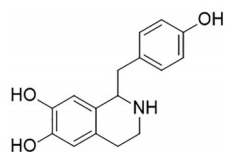


Figure 1 The chemical structure of higenamine (HG)

近年来,有研究表明^[7], RNA m6A 修饰与心血管疾病的发生发展相关,而甲基转化酶样 3 (methyltransferase-like 3, METTL3) 和转录因子 EB (transcription factor EB, TFEB) 对缺血性心脏疾病的心肌细胞保护发挥重要作用。TFEB 是 METTL3 下游的关键靶基因, METTL3 可通过催化 TFEB pre-mRNA 的 m6A 甲基化,促进心肌细胞中 RNA 结合蛋白异质核糖核蛋白

(HNRNPD) 与 TFEB pre-mRNA 的结合,从而降低 TFEB mRNA 表达,促进心肌细胞凋亡^[8]。与此同时, METTL3 的上调抑制了细胞自噬通量,并促进了经缺氧/再灌注 (H/R) 处理的心肌细胞的凋亡,提示 METTL3 是自噬的负调节因子^[8]。

本研究采用 ISO 诱导 H9c2 细胞和大鼠心肌梗死模型,评价了 HG 对 ISO 诱导的心肌梗死大鼠心脏功能的影响,以及 HG 对心肌细胞凋亡、自噬相关蛋白表达和自噬通量的影响,以阐明 HG 通过 METTL3/TFEB 调控心肌细胞自噬,抑制心肌细胞凋亡发挥抗心肌梗死的作用机制。

材料与方法

试剂与耗材 HG (批号 M0701A, 纯度 $\geq 99\%$, 美仑生物科技有限公司); ISO (批号 CK030004, 纯度 $\geq 99\%$, 安耐吉化学公司); 缬沙坦 (valsartan, 批号 FY18E7052, 纯度 $\geq 95\%$, 飞宇生物科技有限公司); 抗体 anti-caspase3 (货号 9662s)、anti-Beclin1 (货号 3495T) (美国 CST 公司); 抗体 anti-cleaved-caspase3 (货号 AF7022, Affinity 公司); 抗体 anti-LC-3B (light chain 3B) (货号 bs-2912R, Bioss 公司); 抗体 anti-Bcl2 (货号 A00040-1)、anti-Bax (货号 BM3964) (博士德生物科技有限公司); 抗体 anti-METTL3 (货号 k005791p)、考马斯亮蓝 (货号 PC0015)、青/链霉素混合液 (货号 P1400) (北京索莱宝生物科技有限公司); 抗体 anti-TFEB (货号 AF8130, 碧云天公司); 抗体 anti- β -tubulin (货号 GB11017)、RIPA 裂解液 (货号 G2002) (赛维尔生物公司); 乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH, 货号 BYE20042)、肌酸激酶同工酶 CK-MB (creatin kinase Mb, 货号 BYE20043) 和 CK (creatin kinase, 货号 BYE20781) 的 ELISA 试剂盒 (上

海邦奕生物技术有限公司); CCK-8 (cell counting kit-8, 批号 GK10001, 美国 GLP BIO 公司); 一步法 Western blot 制胶试剂盒 (货号 PG212, 上海雅酶生物科技有限公司); 超灵敏化学发光液 (货号 G3308, 广州捷倍斯生物科技有限公司); TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling) 染色试剂盒 (货号 FA201, 全式金生物技术有限公司); pREF-GFP-hLC3 质粒 (货号 V2153, 长沙优宝生物公司); Lipofectamine 2000 转染试剂 (2067563, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司); DMEM (C11995500BT)、胎牛血清 (10270-106) (美国 Gibco 公司); 牛血清白蛋白 (BS114)、激光共聚焦小皿 (BS-15-GJM) (Biosharp 公司)。

动物与细胞 雄性 SD (Sprague Dawley) 大鼠, 12 周龄, 体重 220~250 g, 购自南方医科大学, 实验动物许可证编号 SCXK (粤) 2016-0041, 动物实验获得广州中医药大学实验动物伦理委员会的批准 (编号 ZYD-2020-142)。H9c2 细胞和 HEK-293T 细胞来自 ATCC 细胞库。

仪器 酶标仪 (型号 Varioskan Lux, 美国赛默飞公司); 高速冷冻离心机 (型号 H1605R, 湖南湘仪公司); 恒温金属浴 (型号 TU-10, 上海一恒科技有限公司); 电泳仪 (型号 EPS600, 中国天能公司); 超高分辨率小动物超声影像系统 (型号 vevo2100, 美国 Visualsonics 公司); 激光共聚焦显微镜 (型号 SP8, 德国徕卡公司)。

动物实验 用 ISO (100 mg·kg⁻¹) 诱导 SD 大鼠心肌梗死模型。实验分为对照组、造模组、HG (10 mg·kg⁻¹) 组、HG (20 mg·kg⁻¹) 组、HG (40 mg·kg⁻¹) 组和缬沙坦 (valsartan, 10 mg·kg⁻¹) 组。HG 和缬沙坦用生理盐水:丙二醇 (1:1) 溶解, ISO 用生理盐水为溶剂, HG 组和缬沙坦组灌胃相应剂量药物, 模型组和对照组给予等体积的生理盐水:丙二醇 (1:1) 溶剂, 每天灌胃 1 次, 连续预给药 5 天, 在第 6 天和第 7 天灌胃给药 6 h 后, 模型组和给药组皮下注射 ISO, 对照组给予等体积生理盐水。第 8 天采用超高分辨率小动物超声影像系统对大鼠心脏进行超声检测, 检测左室短轴缩短率 (left ventricular fractional shortening, LVFS) 和左室射血分数 (left ventricular ejection fraction, LVEF); 同时取大鼠血清, 分装保存于 -80 °C, 用于后续 ELISA 检测。大鼠心脏用于 HE 染色和 Western blot 检测。

细胞培养 将 H9c2 细胞和 HEK-293T 细胞培养于含 10% 或 15% 胎牛血清、1% 青/链霉素的 DMEM 高糖培养基中, 在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养, 取传代培养 3 代的细胞用于后续实验。

CCK-8 检测 将 H9c2 细胞种于 96 孔板, 5×10³ 个/孔, 分为如下组别: 溶剂组、对照组、HG (0.612 5、1.25、2.5、5、10、20、40、80、100 μmol·L⁻¹) 组; 或对照组、ISO (9.375、18.75、37.5、75、150、300、600、1 200 μmol·L⁻¹) 组; 或对照组、模型组、模型组 + HG (1.25、2.5、5、10、20、40、80、100 μmol·L⁻¹) 组。细胞贴壁后, 用相应的含药培养基刺激 24 h, 去除原培养基, 加入含 ISO (300 μmol·L⁻¹) 的培养基培养 24 h。每孔加入 10 μL CCK-8 试剂, 37 °C 避光孵育 2 h 后, 采用酶标仪在 450 nm 波长下检测各孔光密度 (*A*) 值并计算细胞增殖率 [细胞增殖率 = (*A*_{实验组} - *A*_{溶剂组}) / (*A*_{对照组} - *A*_{溶剂组}) × 100%]。

ELISA 检测 将大鼠血清从 -80 °C 取出, 按 ELISA 试剂盒说明书所示操作, 每个标准品和样品重复 3 个复孔, 在 450 nm 波长下测各组 *A* 值, 并根据标准曲线方程式计算各组指标浓度。

HE (hematoxylin-eosin) 染色 心脏超声检测完成后, 立即处死大鼠, 分离左心室组织, 4% 多聚甲醛固定过夜, 脱水、透化、浸蜡、包埋和切片。取切片脱蜡, 复水后, 分别用苏木精和伊红进行染色, 脱水后, 用加拿大树脂进行封片, 风干后于显微镜下观察组织情况。

TUNEL 染色 将 H9c2 细胞种于 24 孔板, 1×10⁴ 个/孔, 实验分为对照组、模型组、HG (2.5、5、10 μmol·L⁻¹) 组和缬沙坦组 (10 μmol·L⁻¹), 细胞贴壁 24 h 后, 用相应的含药培养基刺激 24 h, 去除原培养基, 加入含 ISO (300 μmol·L⁻¹) 的培养基培养 24 h, 细胞用 4% 多聚甲醛固定 30 min, 按试剂盒说明书进行 TUNEL 染色和 DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) 染核, 在显微镜下观察, TUNEL 染色为绿色荧光, DAPI 染色为蓝色, 并拍照保存。

Western blot 实验 将上述分组的 H9c2 细胞和心肌组织匀浆用 RIPA 裂解液在冰上裂解 30 min, 并用 Bradford 法测各组蛋白浓度, 每组取 160 μg 蛋白在 95 °C 下变性 10 min, 并置于 -20 °C 保存备用。蛋白样品经电泳后转印至 PVDF 膜, 用 5% 牛血清白蛋白室温封闭 1.5 h; 用 caspase3、cleaved-caspase3、LC-3B、Bcl2、Bax、Beclin1、METTL3、TFEB、β-tubulin 的一抗, 4 °C 孵育过夜; 用 TBST 清洗 3 次, 每次 15 min, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗于室温孵育 1 h; TBST 洗 3 次, 每次 15 min, 加入超灵敏化学发光液化学发光显色底物, 化学发光成像系统中成像, 然后采用 Image J (v1.8.0) 软件测定各蛋白条带的灰度值, 以目的蛋白和内参 β-tubulin 蛋白条带的灰度值表示目的蛋白的表达水平。

质粒转染 将状态良好的 293T 细胞种于激光共

聚焦小皿, 每孔 1×10^5 个, 贴壁24 h后, 转染pREF-GFP-hLC3质粒, 按试剂盒说明书操作, 转染6 h后更换新鲜的含HG ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)的培养基预处理24 h, 用ISO ($300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)处理24 h, 4%多聚甲醛固定20 min, 用磷酸盐缓冲液洗3次, 每次5 min, 0.3% Triton X-100通透细胞膜5 min, 用DAPI染细胞核5 min, 并用激光共聚焦显微镜观察HG对293T细胞自噬的影响。

分子对接 通过PubChem数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 获取HG的2D化学结构, 在PDB数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 中查找METTL3蛋白3D结构 (PDB: 5IL2), 通过Autodock 4.0软件对蛋白和小分子进行加氢加电荷等对接前处理, 并进行分子对接, 获取结合能最高的位点, 最后通过PyMOL (2.3.0) 软件进行可视化处理。

统计学分析 本实验数据采用平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 所有实验均在3次及以上重复。采用GraphPad Prism 8.0软件, 单因素方差分析(one-way ANOVA)进行统计分析, $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。

结果

1 HG可改善心肌梗死大鼠心脏功能指标和心脏组织病理形态学

ISO是心肌梗死动物模型的经典造模药物, 在ISO模型大鼠中心脏左室射血分数(ejection fraction, EF)值与左室短轴缩短率(fractional shortening, FS)值显著降低, 反映了左心室收缩功能下降, 但给予HG处理可提高EF与FS值(图2A), 增强该模型大鼠左心室收缩功能。此外, 模型组血清中CK、CK-MB和LDH水平显著升高, 给予HG预处理可显著降低血清中CK、CK-MB和LDH水平(图2B); 同时模型组心肌细胞结构异常, 间隙较大, 细胞排列紊乱; 缬沙坦组心肌细胞结构较为正常, 细胞排列整齐, HG各组随着药物剂量的升高, 心肌细胞结构及间隙趋于完整, 表明HG可减少心脏组织炎性浸润和心肌细胞排列紊乱(图2C), 提示HG具有良好的抗ISO诱导的大鼠心肌梗死作用。

2 HG可显著抑制ISO诱导的H9c2心肌细胞损伤

为了进一步阐明HG对ISO诱导的心肌梗死的影响, 用ISO处理H9c2细胞。如图3A所示, HG在 $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 及更低浓度时, 对H9c2细胞活力无影响; 在 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 显示出一定毒性($P < 0.05$)。随后, 筛选了ISO造模浓度, 如图3B所示, ISO可显著抑制H9c2细胞活力($P < 0.01$)。根据其抑制效果, 选用 $300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的ISO处理H9c2细胞。如图3C所示, HG可显著提高H9c2细胞存活率, 但从 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 开始随着HG剂量

的增高, 活性并未增加, 这可能是高剂量的HG和ISO共同作用对细胞产生了抑制作用。结果表明, HG在浓度为2.5、5和 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 可剂量依赖性地提高H9c2活性($P < 0.001$)。因此, 选用这3个浓度用于后续细胞实验。

3 HG可抑制ISO诱导的心肌凋亡相关蛋白的表达

在ISO处理的H9c2和大鼠心肌梗死中常伴随着心肌细胞凋亡, 特别是在急性心肌梗死的缺血区^[9]。因此, 进一步检测了HG对凋亡相关蛋白的影响。结果表明, 在动物水平上, 模型组Bcl2/Bax的比值降低, 而caspase3、cleaved-caspase3的表达显著升高($P < 0.01$); HG可剂量依赖性地上调Bcl2/Bax比值, 且高剂量组($40 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)与阳性药缬沙坦($10 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)效果相当(图4A), 同时中剂量HG($20 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)可抑制caspase3、cleaved-caspase3的表达和caspase3/cleaved-caspase3的比值。在细胞水平上, HG同样可剂量依赖性地上调Bcl2/Bax比值, 并抑制caspase3、cleaved-caspase3的表达和caspase3/cleaved-caspase3的比值(图4B)。此外, 用TUNEL染色进一步验证HG对ISO诱导的H9c2凋亡的影响, 结果表明各浓度的HG可显著抑制ISO诱导的心肌细胞凋亡, 并具有剂量依赖性(图4C)。

4 HG可上调自噬相关蛋白的表达, 激活心肌细胞自噬

自噬是一种进化保守的细胞内降解过程, 通过清除受损蛋白质和细胞器维持细胞内稳态, 通常激活心肌细胞自噬在心肌梗死的早期阶段具有保护作用, 抑制心肌细胞自噬可能加速心脏老化^[10,11]。因此, 进一步检测了HG对自噬标志物LC-3B-I/LC-3B-II和Beclin1表达的影响。结果表明, 中、高剂量HG($20, 40 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)显著上调ISO诱导的大鼠心肌组织中Beclin1的表达, 且中剂量HG($20 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)显著降低LC-3B-I/LC-3B-II的比值(图5A)。在ISO处理的H9c2细胞中(图5B), 各浓度的HG均可增加Beclin1的表达, 降低LC-3B-I/LC-3B-II的比值, 并具有剂量依赖性。同时, 用pREF-GFP-hLC3质粒转染293T细胞, 用激光共聚焦显微镜观察HG对293T细胞自噬通量的影响。结果表明, HG组($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)绿色荧光显著降低, 红色荧光增强(图5C), 提示自噬小体与溶酶体融合形成了自噬溶酶体, 即HG可能会促进ISO诱导的心肌自噬和自噬通量。

5 HG对METTL3/TFEB信号通路的调控

TFEB作为重要的转录因子, 能通过驱动自噬和溶酶体基因的表达来协调自噬过程, METTL3是TFEB的上游靶点, METTL3可通过催化TFEB pre-mRNA的m6A甲基化, 抑制TFEB的表达。本研究检测了HG对ISO诱导的大鼠心肌梗死和H9c2细胞中METTL3

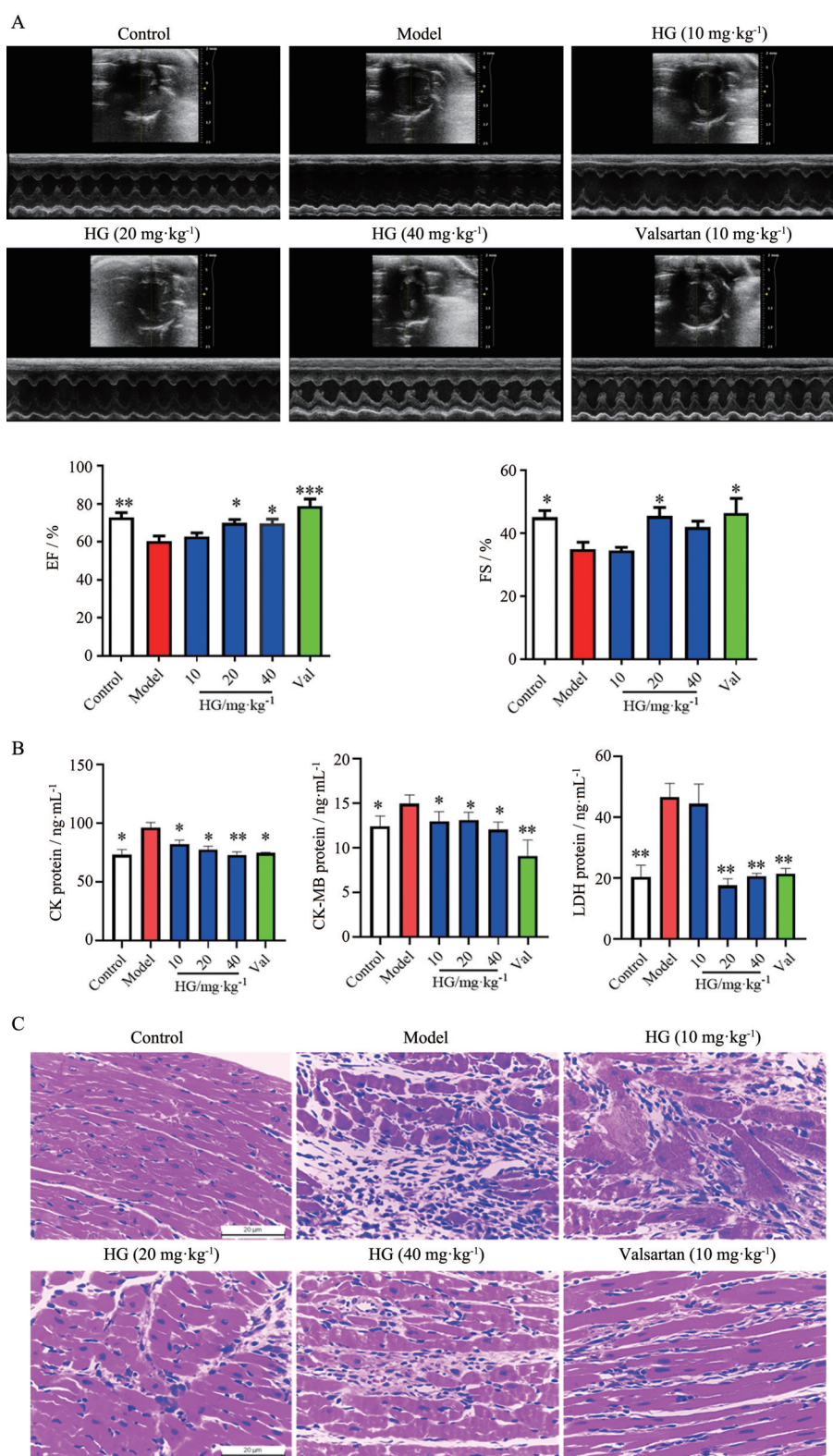


Figure 2 HG improves cardiac function and histopathology in isoproterenol (ISO)-induced myocardial infarction (MI) rats. A: Evaluation of ventricular ejection fraction and systolic function by echocardiography in rats with MI. FS: Fractional shortening; EF: Ejection fraction; Val: Valsartan; B: The levels of creatine kinase (CK), creatine kinase Mb (CK-MB) and lactate dehydrogenase (LDH) in serum were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA); C: Hematoxylin-eosin (HE) staining of myocardial tissue. Scale bar: 20 μ m. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs model

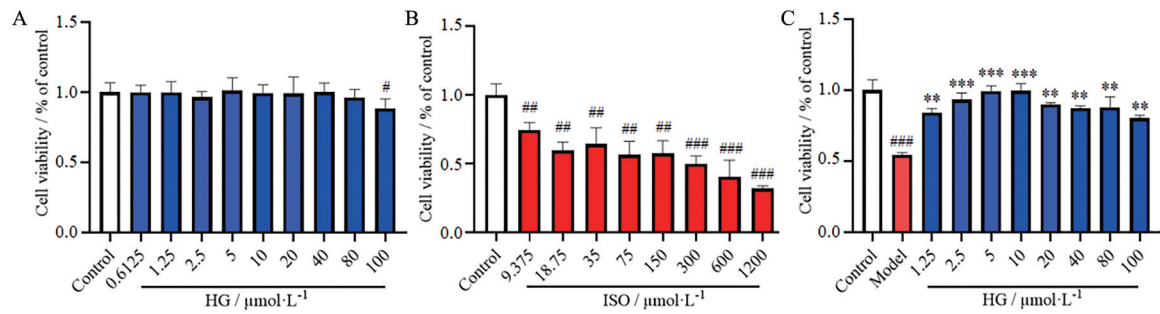


Figure 3 Effect of HG on ISO-induced H9c2 cells. A: The cytotoxicity of HG on H9c2 cells was detected by cell counting kit-8 (CCK-8); B: The effect of ISO on H9c2 cells was detected by CCK-8; C: The effect of HG on ISO-induced H9c2 cells was detected by CCK-8. $n = 4$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs model; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs control

和TFEB的表达。结果表明,在动物的心肌组织中(图6A),ISO可上调METTL3的表达并抑制TFEB的表达,中、高剂量的HG(20、40 mg·kg⁻¹)和缬沙坦(10 mg·kg⁻¹)均可抑制METTL3表达,并剂量依赖性地上调TFEB的表达;在H9c2细胞中(图6B),HG剂量依赖性抑制METTL3的表达并上调TFEB的表达。这些结果表明HG可能通过METTL3/TFEB通路介导心肌细胞自噬而发挥抗心肌梗死作用。

6 分子对接验证HG与METTL3之间的相互作用

用Autodock 4.1软件将HG与METTL3模拟对接,结果表明,HG与METTL3在酪氨酸(406)、脯氨酸(397)和苯丙氨酸(534)等位点的氨基酸残基具有 π - π 共轭作用,与天冬酰胺(549)和天冬氨酸(395)有氢键相互作用,其结合能为-7.9 kcal·mol⁻¹(图7),提示HG与METTL3有良好的相互作用。

讨论

ISO是非选择性 β_1 、 β_2 受体激动剂,高剂量的ISO过度激活心脏 β 受体,使心率加快、心肌收缩力和心肌耗氧量增加,从而导致氧化应激、血小板聚集、心肌细胞钙超载、氧自由基增加,最终导致心肌梗死^[12]。因此,ISO刺激是造心肌梗死模型的经典方法,与其他心肌梗死造模方法相比,用ISO造模具有快速、简单、无创、死亡率低和成模率高的特点,并能产生与人类急性心肌梗死类似的心肌损伤,更适合于心脏保护药物的评价^[13]。本研究通过ISO建立心肌梗死大鼠模型,并用不同浓度的HG预处理模型大鼠,结果显示,HG可显著改善心肌梗死大鼠左室EF和FS水平,提示HG预处理可提高心肌梗死大鼠心脏功能及血流动力学。此外,HG不良反应轻、耐受性好,HG作为冠状动脉疾病(CADs)的候选药物在我国完成了III期临床试验^[14],因此,其体内安全性和有效性得到充分的验证。

当机体出现缺血-再灌注损伤、心肌梗死和缺血性

心肌病时,常导致线粒体及细胞膜损伤,增加细胞膜的通透性,促进CK、CK-MB、LDH释放入血^[15]。因此,临床上将CK-MB、LDH和CK等作为评估心肌损伤指标之一^[2]。此外,心肌缺血、缺氧等均可诱导心肌细胞凋亡,且在心肌梗死区域中心的心肌细胞的凋亡率明显升高,减少心肌细胞凋亡可减少心肌梗死面积,并延缓心室重构^[16]。有效减少心肌细胞凋亡成为治疗心肌梗死的主要途径。HG可显著抑制缺血-再灌注诱导的心肌损伤和凋亡的作用^[4-6]。本研究证实HG可显著降低ISO诱导的心肌梗死模型大鼠血清中CK-MB、LDH和CK含量,减少心肌组织炎症浸润,抑制心肌细胞凋亡相关生物标志物的表达,具有良好的抗心肌梗死的作用。

自噬发生时,隔离膜延伸并包裹封闭胞浆成分以形成双层膜结构的自噬小体,其与溶酶体融合形成自噬溶酶体,其中包裹的胞质成分最终在溶酶体酶的作用下被降解利用。本研究发现HG显著上调自噬标志物Beclin1的表达,降低LC-3B-I/LC-3B-II比值。同时,用双荧光标记的LC3质粒转染HEK-293T细胞,结果显示,HG可上调ISO诱导的HEK-293T细胞的自噬通量,提示HG可能通过介导ISO诱导的心肌细胞自噬调节心肌梗死的作用。

m6A甲基化是真核生物中普遍存在的发生在腺嘌呤第6位N原子上的甲基化修饰。m6A在m6A甲基转移酶、m6A去甲基化酶和甲基化识别蛋白共同调节下影响着mRNA的剪接、转录、翻译和降解,进而参与调节细胞分化、胚胎发育和疾病发生的功能^[17,18]。心脏m6A甲基化是动态过程,METTL3是调节心脏m6A甲基化的关键甲基化酶,研究表明^[8,19],心脏特异性METTL3敲除小鼠会表现出衰老和应激引起的心力衰竭征兆,且METTL3在心肌梗死患者和缺血再灌注小鼠的心肌组织中表达显著上调。转录因子TFEB通过驱动自噬和溶酶体基因的表达来协调自噬过

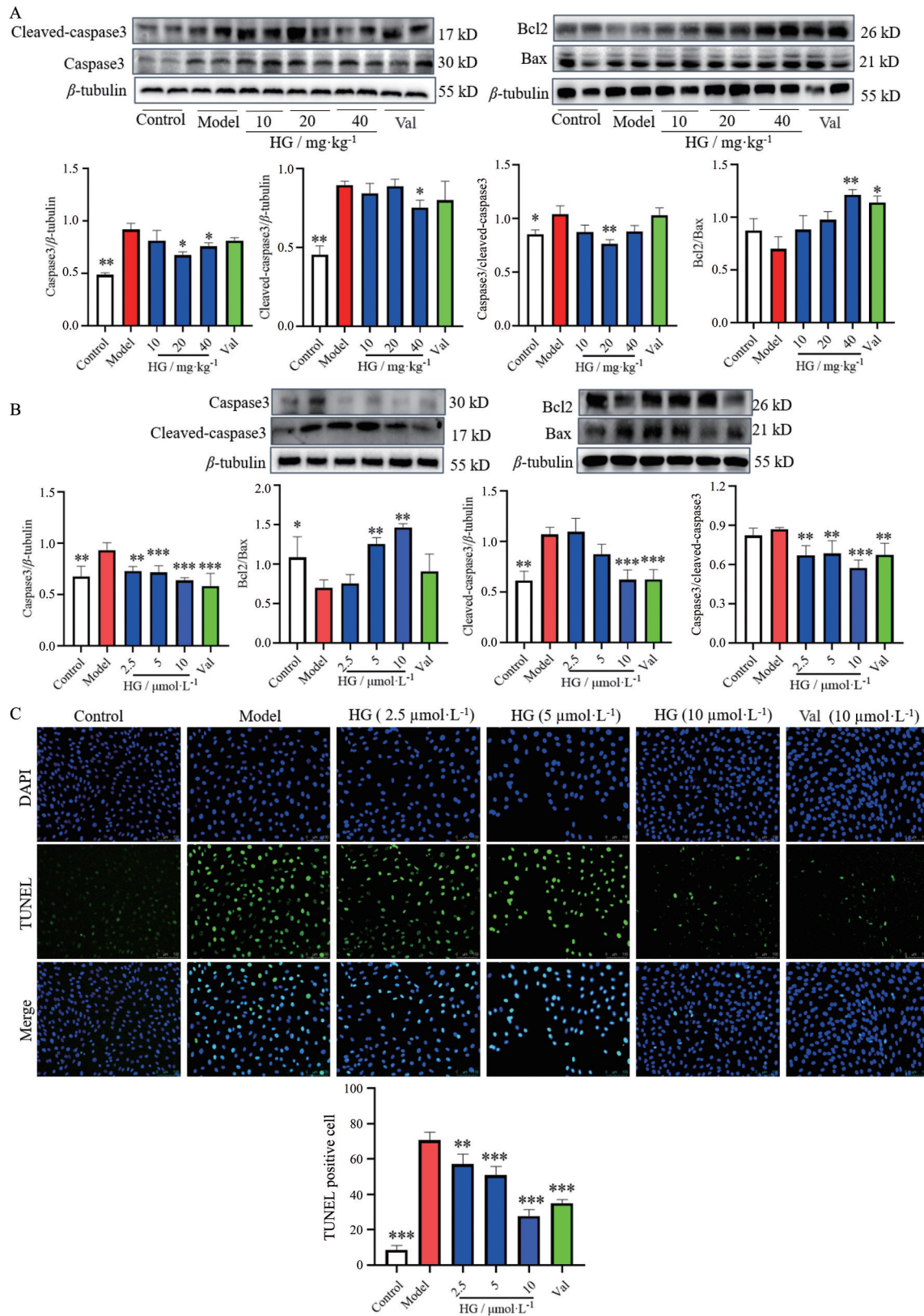


Figure 4 The effect of HG on H9c2 apoptosis. A: HG up-regulated the expression of Bcl2/Bax and inhibited the expression of caspase3 and cleaved-caspase3 in rats with MI ($n = 6$); B: HG up-regulated the expression of Bcl2/Bax and inhibited the expression of caspase3 and cleaved-caspase3 in H9c2 cells ($n = 3$); C: Apoptosis of H9c2 cells was detected by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) staining ($n = 3$). Scale bar: 100 μ m. $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs model. DAPI: 4',6-Di-amidino-2-phenylindole

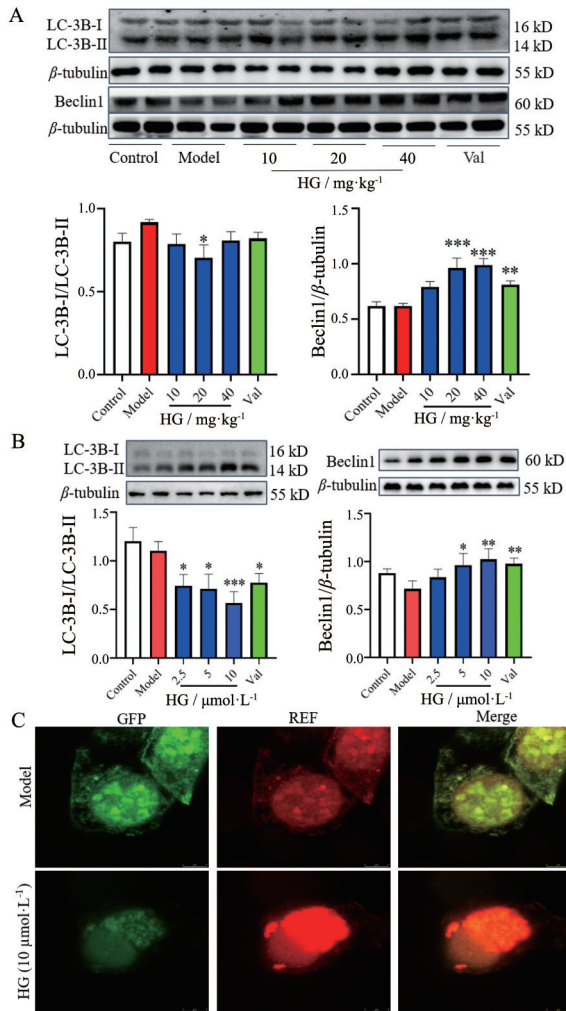


Figure 5 The effect of HG on autophagy. A: HG up-regulated the expression of Beclin1 and reduced the ratio of light chain 3B (LC-3B)-I/LC-3B-II in myocardial tissue induced by ISO. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$; B: HG up-regulated the expression of Beclin1 and reduced the ratio of LC-3B-I/LC-3B-II in ISO-induced H9c2 cells. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$; C: HG ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) up-regulated the autophagy flux in ISO-induced 293T cells. Scale bar: $5 \mu\text{m}$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs model. GFP: Green fluorescent protein; REF: Red fluorescence

程^[20], 且 TFEB 是 METTL3 下游的关键靶点, METTL3 可通过催化 TFEB pre-mRNA 的 m6A 甲基化, 降低 TFEB mRNA 表达并促进心肌细胞凋亡^[8]。本研究发现 ISO 可上调 METTL3 的表达, 抑制自噬相关蛋白的表达, 给予 HG 预处理后, TFEB 的表达显著上调, 而 METTL3 的表达被抑制, 提示 HG 通过调控 METTL3/TFEB 信号通路介导心肌细胞自噬发挥抗心肌梗死的作用。此外, 用分子对接方式证实 HG 与 METTL3 在酪氨酸 (406)、脯氨酸 (397) 和苯丙氨酸 (534) 等多个位点上有良好的相互作用。

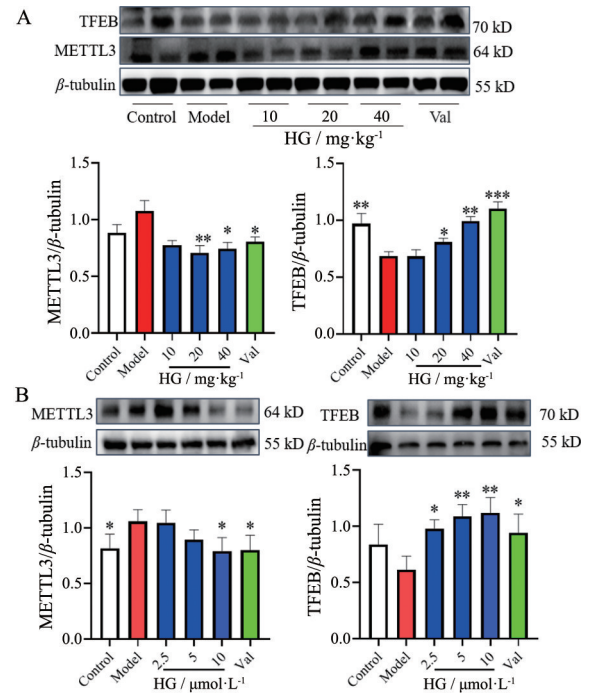


Figure 6 The effect of HG on the expression of methyltransferase-like 3 (METTL3) and transcription factor EB (TFEB) in ISO-treated myocardial tissue and H9c2 cells. A: Expression of METTL3 and TFEB in myocardial tissue induced by ISO. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$; B: Expression of METTL3 and TFEB in H9c2 cells induced by ISO. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs model

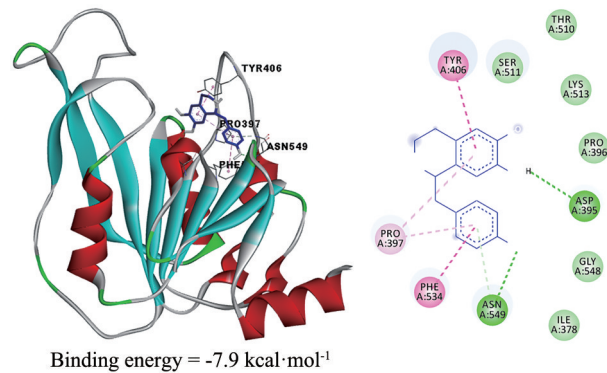


Figure 7 Molecular docking of HG and METTL3 (PDB: 5IL2)

综上, 本研究表明 HG 可改善心肌梗死情况及心功能指标, 抑制心肌细胞凋亡, 具有良好的抗心肌梗死作用, 其分子作用机制可能与调控 METTL3/TFEB 信号通路介导心肌细胞自噬有关。

作者贡献: 刘中秋、程媛媛、王大伟负责实验设计、指导论文撰写和修改; 郭奕鑫、叶曼仪、黄旭灿、李旭平、钟沛成负责动物实验造模、取材、HE 染色和超声心动图等; 谢保平负责 Western blot、TUNEL 染色、ELISA 等分子生物学实验, 以及论文撰写和数据分析。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] The Writing Committee of the Report on Cardiovascular Health and Diseases in China. Report on cardiovascular health and diseases burden in China: an updated summary of 2020 [J]. *J Chin Circ (中国循环杂志)*, 2021, 36: 521-546.
- [2] Wang YJ, Zhang JT, Fu XQ, et al. Effects of shikonin on cardiac function and MAPK/ERK1/2 pathway in rats with myocardial infarction [J]. *J Chin Med Mater (中药材)*, 2021, 44: 2947-2951.
- [3] Wang YH, Li C, Jiang S, et al. Advances in pharmacological effects of higenamine on cardiovascular system [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 392-397.
- [4] Chen YL, Zhuang XD, Xu ZW, et al. Higenamine combined with [6]-gingerol suppresses doxorubicin-triggered oxidative stress and apoptosis in cardiomyocytes *via* upregulation of PI3K/Akt pathway [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 2013: 970490.
- [5] Wang Y, Geng J, Jiang M, et al. The cardiac electrophysiology effects of higenamine in guinea pig heart [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 2348-2356.
- [6] Wu MP, Zhang YS, Zhou QM, et al. Higenamine protects ischemia/reperfusion induced cardiac injury and myocyte apoptosis through activation of β 2-AR/PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Pharmacol Res*, 2016, 104: 115-123.
- [7] Li T, Zhuang Y, Yang W, et al. Silencing of METTL3 attenuates cardiac fibrosis induced by myocardial infarction *via* inhibiting the activation of cardiac fibroblasts [J]. *FASEB J*, 2021, 35: e21162.
- [8] Song H, Feng X, Zhang H, et al. METTL3 and ALKBH5 oppositely regulate m⁶A modification of TFEB mRNA, which dictates the fate of hypoxia/reoxygenation-treated cardiomyocytes [J]. *Autophagy*, 2019, 15: 1419-1437.
- [9] Del Re DP, Amgalan D, Linkermann A, et al. Fundamental mechanisms of regulated cell death and implications for heart disease [J]. *Physiol Rev*. 2019, 99: 1765-1817.
- [10] Abdellatif M, Sedej S, Carmona-Gutierrez D, et al. Autophagy in cardiovascular aging [J]. *Circ Res*, 2018, 123: 803-824.
- [11] Wang X, Guo Z, Ding Z, et al. Inflammation, autophagy, and apoptosis after myocardial infarction [J]. *J Am Heart Assoc*, 2018, 7: e008024.
- [12] Wong ZW, Thanikachalam PV, Ramamurthy S. Molecular understanding of the protective role of natural products on isoproterenol-induced myocardial infarction: a review [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 94: 1145-1166.
- [13] Allawadhi P, Khurana A, Sayed N, et al. Isoproterenol-induced cardiac ischemia and fibrosis: plant-based approaches for intervention [J]. *Phytother Res*, 2018, 32: 1908-1932.
- [14] Hudzik TJ, Patel M, Brown A. β 2-Adrenoceptor agonist activity of higenamine [J]. *Drug Test Anal*, 2021, 13: 261-267.
- [15] Wang JX, Zheng R, Lv RG, et al. Effects of ferricimidone on myocardial enzymes, apoptosis and blood viscosity after myocardial ischemia and reperfusion in rats [J]. *Chin J Lab Diagn (中国实验诊断学)*, 2016, 20: 896-897.
- [16] Wang J, Hong BZ, Zhang XJ, et al. Effect of Chinese polysaccharide from Yam on cardiomyocyte apoptosis and its mechanism after acute myocardial infarction in rats [J]. *J Chin Gerontol (中国老年学杂志)*, 2020, 40: 1707-1712.
- [17] Dixit D, Prager BC, Gimple RC, et al. The RNA m6A reader YTHDF2 maintains oncogene expression and is a targetable dependency in glioblastoma stem cells [J]. *Cancer Discov*, 2021, 11: 480-499.
- [18] Zhao YL, Liu YH, Wu RF, et al. Understanding m6A function through uncovering the diversity roles of YTH domain-containing proteins [J]. *Mol Biotechnol*, 2019, 61: 355-364.
- [19] Dorn LE, Lasman L, Chen J, et al. The N⁶-methyladenosine mRNA methylase METTL3 controls cardiac homeostasis and hypertrophy [J]. *Circulation*, 2019, 139: 533-545.
- [20] Liu X, Zheng X, Lu Y, et al. TFEB dependent autophagy-lysosomal pathway: an emerging pharmacological target in sepsis [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 794298.