

基于二硫键蛋白质组学揭示NR4A2 在心肌梗死后功能重编程

魏东升^{1,2} 李涵^{1,2} 刘孝生^{1,2} 曹慧敏^{1,2} 马艺鑫^{1,2} 刘雨婷^{1,2} 齐佳杰^{1,2} 张哲^{1,2,3*}

(¹辽宁中医药大学第一临床学院, 沈阳 110847; ²辽宁中医药大学中医脏象理论及应用教育部重点实验室, 沈阳 110847; ³辽宁中医药大学附属医院痰瘀论治血脉病国家中管局重点研究室, 沈阳 110032)

摘要 心肌梗死(MI)后, 心肌细胞氧化应激及炎症反应显著增强, 其分子机制尚未完全明确。该研究旨在基于二硫键蛋白质组学揭示MI后蛋白二硫键修饰的动态变化, 并探讨转录因子NR4A2在功能重编程中的作用。采用左冠状动脉结扎建立大鼠MI模型, 于术后第3天和第5天取材, 行HE染色评估心肌损伤。应用二硫键蛋白质组学筛选差异二硫键蛋白(DSBPs), 并进行GO、KEGG及PPI分析。通过免疫共沉淀和还原/非还原SDS-PAGE检测NR4A2二硫键修饰形式。细胞实验中建立缺氧/缺糖(OGD)模型, 结合CCK8筛选4-PBA安全浓度, 并检测ER应激相关蛋白及NR4A2二硫键修饰变化, 同时检测IL-10、NF- κ B、CXCL10、IL-1 β 和IL-6的mRNA及蛋白水平。HE染色显示, MI后心肌组织结构明显受损, 3天时可见散在炎症浸润, 5天时坏死区扩大并伴大量炎症细胞聚集。二硫键蛋白质组学结果显示, MI后心肌组织二硫键修饰谱显著改变, NR4A2在3天时二硫键修饰及表达水平均上调, 并与RXR、PPAR等核受体形成复合体; 5天时修饰水平及互作减弱。SDS-PAGE证实NR4A2二硫键修饰具有可逆性。OGD模型中NR4A2二硫键形成受损并伴随ER应激增强; 4-PBA干预可显著缓解ER应激、恢复NR4A2二硫键构象及降低ROS水平。炎症指标检测显示, OGD诱导IL-10与NF- κ B下调, 导致CXCL10、IL-1 β 与IL-6上调, 而4-PBA可部分逆转该变化。该研究揭示MI早期NR4A2发生二硫键依赖的结构与功能重编程, 内质网应激在其中发挥关键调控作用。NR4A2二硫键修饰的动态变化可能通过炎症转录网络影响心肌损伤, 为心肌梗死后治疗提供新靶点。

关键词 心肌梗死; NR4A2; 二硫键蛋白质组学; 内质网应激; 炎症重编程

Disulfide-Bond Proteomics Reveals Functional Reprogramming of NR4A2 after Myocardial Infarction

WEI Dongsheng^{1,2}, LI Han^{1,2}, LIU Xiaosheng^{1,2}, CAO Huimin^{1,2}, MA Yixin^{1,2}, LIU Yuting^{1,2}, QI Jiajie^{1,2}, ZHANG Zhe^{1,2,3*}

(¹First Clinical College, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China;

²Key Laboratory of Viscera-State Theory and Applications of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China;

³Key Research Laboratory of Phlegm-Blood Stasis Syndrome in Vascular Diseases, National Administration of Traditional Chinese Medicine, Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China)

收稿日期: 2025-09-20 接受日期: 2025-10-29

辽宁省科学技术厅中药1.1类创新药开发项目(批准号: 2023JH1/11300001)和国家中医药管理局青年岐黄学者支持项目(批准号: 国中医药人教函〔2020〕218号)资助的课题

*通信作者。Tel: 18102459155, E-mail: pedtrainzhzh7676@163.com

Received: September 20, 2025

Accepted: October 29, 2025

This work was supported by the Department of Science and Technology of Liaoning Province-Development of Class 1.1 Innovative Traditional Chinese Medicine (Grant No.2023JH1/11300001), and the Qihuang Scholar Support Program for Young Scholars of the National Administration of Traditional Chinese Medicine (Grant No.NTCM-HR (2020) 218)

*Corresponding author. Tel: +86-18102459155, E-mail: pedtrainzhzh7676@163.com

Abstract MI (myocardial infarction) is characterized by enhanced oxidative stress and inflammatory responses in cardiomyocytes, while the underlying molecular mechanisms remain incompletely understood. This study aimed to investigate the dynamic changes of protein disulfide-bond modifications after MI based on disulfide-bond proteomics and to explore the functional reprogramming of the transcription factor NR4A2. A rat MI model was established by left anterior descending coronary artery ligation, and myocardial tissues were collected at 3 and 5 days post-surgery. HE (hematoxylin-eosin) staining was performed to evaluate myocardial injury. DSBPs (differentially modified disulfide-bond proteins) were identified by disulfide-bond proteomics followed by GO, KEGG, and PPI analyses. NR4A2 disulfide modification was examined by immunoprecipitation and non-reducing/reducing SDS-PAGE. *In vitro*, an OGD (oxygen-glucose deprivation) model was constructed, and CCK8 assay was used to determine the safe concentration of 4-PBA. ER stress-related proteins and NR4A2 disulfide configuration were analyzed, along with the mRNA and protein expression of inflammatory markers IL-10, NF- κ B, CXCL10, IL-1 β , and IL-6. HE staining showed that myocardial structure was markedly damaged after MI, with scattered inflammatory infiltration at day 3 and extensive necrosis and inflammatory cell aggregation at day 5. Disulfide-bond proteomics revealed significant alterations in the myocardial disulfide modification profile after MI. NR4A2 exhibited increased disulfide modification and expression at day 3, forming complexes with RXR and PPAR, while both the modification level and interaction weakened at day 5. SDS-PAGE confirmed the reversibility of NR4A2 disulfide modification. In the OGD model, NR4A2 disulfide bonding was impaired and accompanied by enhanced ER stress. Treatment with 4-PBA effectively alleviated ER stress, restored NR4A2 disulfide configuration, and reduced ROS levels. Inflammatory analysis showed that OGD downregulated IL-10 and NF- κ B while upregulating CXCL10, IL-1 β , and IL-6, which were partially reversed by 4-PBA intervention. This study reveals that NR4A2 undergoes disulfide bond-dependent structural and functional reprogramming during the early stage of MI, in which ER stress plays a key regulatory role. The dynamic changes in NR4A2 disulfide modification may affect myocardial injury through inflammatory transcriptional networks, providing a potential therapeutic target for post-MI treatment.

Keywords myocardial infarction; NR4A2; disulfide proteomics; endoplasmic reticulum stress; inflammatory reprogramming

心肌梗死(myocardial infarction, MI)是冠心病最严重的类型之一,其病理过程涉及心肌急性缺血坏死以及继发的炎症反应、细胞死亡与心肌重构^[1-2]。尽管近年来再灌注治疗和药物干预显著提升了患者的急性救治率,但MI后心肌细胞损伤与功能障碍依然严重威胁患者的长期预后^[3]。因此,深入阐明MI后的分子调控机制,对于寻找新的干预靶点、改善心肌修复与重构具有重要意义。

在MI进展过程中,氧化应激是关键环节^[4]。缺血缺氧条件下活性氧(reactive oxygen species, ROS)的大量生成,会导致细胞内氧化还原稳态破坏,并直接影响蛋白质的构象与功能^[5-6]。二硫键是蛋白质折叠和结构稳定性的重要翻译后修饰形式,其形成和断裂对蛋白质三级与四级结构的维持至关重要^[7]。已有研究表明,在缺血再灌注、神经退行性疾病及代谢紊乱等疾病中,异常的二硫键修饰可引起蛋

白质聚集、功能丧失或错误互作,进而加剧细胞损伤^[8-9]。然而在MI发生时,二硫键修饰的系统性变化及其对关键转录因子功能的影响仍鲜有报道。

近年来许多研究发现二硫键修饰不仅维持蛋白质空间构象稳定,还可受氧化还原调控并调节核受体活性。既往研究证实了氧化应激可诱导RXR、PPAR γ 等核受体关键半胱氨酸残基形成或断裂二硫键,从而改变其DNA结合能力、共激活子/共抑制子招募及异源二聚体的稳定性,最终影响下游代谢及炎症相关基因的转录活性^[10-11]。NR4A2(nuclear receptor subfamily 4 group A member 2),又称Nurr1,作为孤儿核受体超家族成员之一能够快速响应氧化应激与炎症刺激^[12]。

NR4A2作为氧化应激与炎症刺激的快速应答基因,在神经发育、代谢稳态及炎症调控中具有重要作用^[13-14]。然而,目前关于NR4A2在MI后早期作用

的研究有限,尤其是其翻译后修饰在蛋白功能调节中的意义尚不清楚。既往研究表示NR4A2蛋白中含有多个半胱氨酸残基,理论上具备形成二硫键的潜力^[15-16]。因此,二硫键修饰可能成为影响NR4A2构象稳定性、蛋白-蛋白互作及转录调控活性的关键因素。在MI后氧化应激与内质网应激显著增强的条件下,NR4A2的二硫键修饰状态极可能发生动态变化,从而改变炎症信号通路的调控效应。这不仅有助于阐明MI后炎症反应的分子机制,也为探索NR4A2作为潜在治疗靶点提供了新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF级SD雄性大鼠,6~8周龄,体质量180~220g,购自辽宁长生生物科技有限公司,动物许可证号SCXK(辽)2020-0001;饲养于辽宁中医药大学SPF级动物房。本研究获得辽宁中医药大学动物伦理委员会的批准(伦理编号:21000042023021)。

1.1.2 试剂 蛋白酶抑制剂混合液、磷酸酶抑制剂混合液、BCA蛋白定量试剂盒、PAGE凝胶快速制备试剂盒(10%)、封闭用BSA、10×转膜缓冲液、10×电泳缓冲液、10×TBST、彩色预染Marker、ECL发光试剂盒、10×PBS缓冲液、GAPDH、Protein A/G磁珠(货号:PC101、GRF101、GRF102、PG111、PS113、PS105、PS109、PS103、WJ101、SQ201、PS110S、LF206、YJ003)购自上海雅酶生物医药科技有限公司;NR4A2抗体(货号:sc-376984)购自美国Santa公司;IL-10、NF-κBIA、CXCL10、IL-1β、IL-6抗体(货号:60269-1-Ig、10268-1-AP、10937-1-AP、16806-1-AP、21865-1-AP)购自武汉三鹰生物科技有限公司;CCK8、ROS试剂盒(货号:C0037、S0034S)购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 心肌梗死模型 28只SD大鼠按照随机数字表法分为对照组7只,造模组21只。对照组仅开胸不做结扎处理。适应喂养7天后,第8天行腹腔戊巴比妥钠麻醉下冠状动脉左前降支结扎术。术后连续3天肌肉注射青霉素抗感染。经冠脉结扎后共有14只造模成功,按照随机数字法将14只大鼠分为3天组7只,5天组7只。分别在MI后第3天、第5天经腹腔麻醉下采大鼠腹主动脉血,待大鼠死亡后,摘除心脏。

1.2.2 二硫键蛋白质组学分析 心肌组织样本经RIPA裂解,超声匀浆,4℃下,12 500 r/min、15 min离心取上清,定量后取等量蛋白。蛋白在碘乙酰胺(iodoacetamide, IAM)作用下烷基化以封闭巯基,随后经超滤管纯化,并依次用胰蛋白酶和Glu-C按比例双酶切割,过夜反应后获得肽段。酶切产物经脱盐纯化、真空干燥后上样,利用Easy-nLC 1000液相系统与Orbitrap Exploris 240高分辨质谱联用进行LC-MS/MS分析。质谱采集数据以pLink软件进行数据库检索,设定可变修饰为N-ethylmaleimide (C),交联类型为二硫键(S-S),并控制一级和二级质谱误差在20×10⁶以内。最终通过肽段序列比对与峰面积分析,获得二硫键修饰位点及其相对丰度信息。

1.2.3 二硫键蛋白质组学分析 经LC-MS/MS采集的原始数据导入专业数据库进行质谱检索,筛选条件设定为满足 $P < 0.05$ 且 $|\log_2 \text{fold change}| > 0$ 。筛选后获得差异蛋白(differentially expressed proteins, DEPs)以及差异二硫键蛋白(disulfide-bond proteins, DSBPs),随后进行六组间差异蛋白交集分析。进一步进行交集蛋白的GO及KEGG富集分析。最后使用STRING数据库构建蛋白互作网络(protein-protein interaction, PPI),并在Cytoscape软件中调用cytoNCA插件计算各蛋白的中介中心性,以反映蛋白在网络拓扑结构中的关键程度。

1.2.4 HE染色(hematoxylin-eosin staining) 取各组大鼠心脏标本,经生理盐水冲洗去血后,按照试剂盒说明书进行固定、乙醇脱水、二甲苯透明,石蜡浸蜡并包埋。将石蜡块切成厚度约4 μm的连续切片,切片经苏木精(hematoxylin)染5~10 min,再用伊红(eosin)染1~3 min,最后中性树胶封片,并于显微镜下观察心肌组织结构改变。

1.2.5 免疫共沉淀与SDS-PAGE检测 取心肌组织或细胞样本裂解液,加入预先结合特异性抗体的Protein A/G磁珠,于4℃下旋转孵育以形成免疫复合物。经多次洗涤去除非特异性结合后,免疫沉淀物用上样缓冲液洗脱。样品分别在非还原(non-reducing, NR),即-DTT/TCEP[-dithiothreitol/tris (2-carboxyethyl) phosphine]和还原(reducing, R),即+DTT/TCEP[+dithiothreitol/tris (2-carboxyethyl) phosphine]条件下制备,随后进行SDS-PAGE电泳分离。电泳结束后结合免疫印迹检测目标蛋白及其分子形式。

表1 RT-qPCR引物序列
Table 1 Sequences of primers for RT-qPCR

mRNA	引物序列(5'→3') Primer sequences (5'→3')
<i>IL-10</i>	Forward: TGC CTT CAG TCA AGT GAA GAC T Reverse: GCT CCA CTG CCT TGC TCT T
<i>NF-κBIA</i>	Forward: ATG TTT CCT GGC AGC ACT TGG Reverse: TCT GTG AAC TCC GTG CTG TTG
<i>CXCL10</i>	Forward: GCT CTA CTG AGG TGC TAT GAG G Reverse: TCT TGA TGG CCT TCG ATT CTG G
<i>IL-1β</i>	Forward: GAA ATG CCA CCT TTT GAC AGT G Reverse: TGG ATG CTC TCA TCA GGA CAG
<i>GAPDH</i>	Forward: TCT CTG CTC CTC CCT GTT CT Reverse: TAC GGC CAA ATC CGT TCA CA
<i>IL-6</i>	Forward: TCC AGT TGC CTT CTT GGG AC Reverse: GTG TAA TTA AGC CTC CGA CTT GT

1.2.6 蛋白免疫印迹 取心肌组织或细胞样本, 经RIPA裂解液裂解并超声匀浆, 4 °C下, 12 500 r/min、15 min离心取上清, BCA法定量。取等量蛋白加上样缓冲液, 95 °C加热10 min变性后进行SDS-PAGE电泳分离, 并转移至PVDF膜。膜以5%脱脂奶粉或BSA室温封闭1 h, 分别加入一抗(1:8 000)于4 °C孵育过夜。洗涤后加入HRP标记二抗(1:10 000), 室温孵育1 h。经TBST洗涤后使用ECL化学发光试剂显影并成像。以GAPDH作为内参, 使用ImageJ软件对条带进行灰度值分析, 以比较不同组间蛋白表达水平的差异。

1.2.7 细胞培养、OGD模型与给药 H9C2细胞于含10%胎牛血清和1%青/链霉素的DMEM高糖培养基中, 再将其置于37 °C、5% CO₂恒温培养箱内常规培养。细胞状态良好并达70%~80%融合时传代或用于实验。建立缺氧/缺糖(oxygen-glucose deprivation, OGD)模型时, 弃去常规培养基, 改为无糖DMEM, 并将细胞置于缺氧培养箱(1% O₂、5% CO₂、94% N₂)中孵育设定时间, 以模拟缺血缺氧环境。对照组细胞维持于常规条件下培养。为探究ER应激在NR4A2二硫键修饰异常中的作用, 于OGD模型建立前1 h加入内质网应激抑制剂4-苯基丁酸(4-phenylbutyric acid, 4-PBA)进行干预。4-PBA是一种低分子量化学伴侣分子, 能够促进蛋白正确折叠, 减少内质网内错误折叠蛋白的聚集, 从而缓解ER应激^[17]。实验结束后收集细胞, 用于后续蛋白检测或分子生物学实验。

1.2.8 CCK8 将H9C2细胞按5×10³/孔接种于96孔板

中, 待贴壁后按分组给予不同处理。处理结束后, 每孔加入10 μL CCK8试剂, 于37 °C孵育1~2 h。使用酶标仪在450 nm波长下测定吸光度值, 计算细胞活力变化。

1.2.9 ROS流式 将各组H9C2细胞经PBS洗涤后加入DCFH-DA工作液, 37 °C孵育30 min, 轻轻混匀以保证染料充分进入细胞。孵育结束后用PBS洗涤3次, 悬浮于1 mL PBS中。使用流式细胞仪检测荧光强度, 以反映细胞ROS水平。

1.2.10 实时定量PCR检测 取H9C2细胞样本, 使用TRIzol试剂提取总RNA, 检测纯度及浓度后, 按试剂盒说明逆转录合成cDNA。以cDNA模板, 采用SYBR Green法在实时荧光定量PCR仪上进行扩增, 反应体系包括模板、引物、SYBR Premix Ex Taq及无核酸酶水(引物序列见表1)。扩增条件一般为: 95 °C预变性30 s; 随后进行40个循环的扩增反应, 每个循环包括95 °C变性5 s, 60 °C退火30 s, 72 °C延伸1 min。设立熔解曲线以验证扩增特异性。以GAPDH作为内参, 采用2^{-ΔΔCt}法计算。

1.2.11 统计学分析 使用SPSS 22.0及Graph-Pad Prism 7软件进行实验数据统计, 数据均采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。多组间比较用单因素方差分析(one-factor analysis of variance, ANOVA), $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果
2.1 三组间HE染色结果

Control组心肌细胞形态规则、心肌纤维排列

整齐、结构完整,肌纤维横纹清晰(图1)。3天组心肌细胞排列紊乱、部分心肌纤维断裂,伴随炎症细胞浸润,提示心肌组织出现早期炎症反应及细胞损伤;5天组出现明显大片心肌坏死,心肌纤维结构严重破坏,心肌组织间质宽度显著增大,大量炎症细胞浸润并伴局灶性出血和细胞碎片形成,提示炎症反应进一步加剧并进入坏死阶段。

2.2 三组间二硫键蛋白质组学变化

为揭示MI后不同时期心肌组织中二硫键修饰的动态变化,本研究对对照组、3天组及5天组样本进行二硫键蛋白质组学分析。PCA结果显示,三组样本在整体二硫键蛋白谱上呈现明显分离,提示MI发生后心肌组织二硫键水平出现重塑。差异分析结果表明:在蛋白质表达水平方面,对照组与3天组比较共鉴定出346个差异蛋白,其中上调152个,下调194个(图2A);3天与5天组比较则检出877个差异蛋白,其中上调302个,下调575个(图2B)。进一步对二硫键修饰水平进行比较发现:对照组与3天组间共有662个差异二硫键修饰位点蛋白,其中上调294个,下调368个(图2C);3天与5天组间共检测到566个差异二硫键位点蛋白,其中上调239个,下调327个(图2D)。热图聚类分析进一步显示,差异蛋白及差异二硫键在三组间具有清晰的时相分布特征(图2E)。通过对三组间差异蛋白与差异二硫键进行交集分析,共筛选出44个交集蛋白(图2F)。

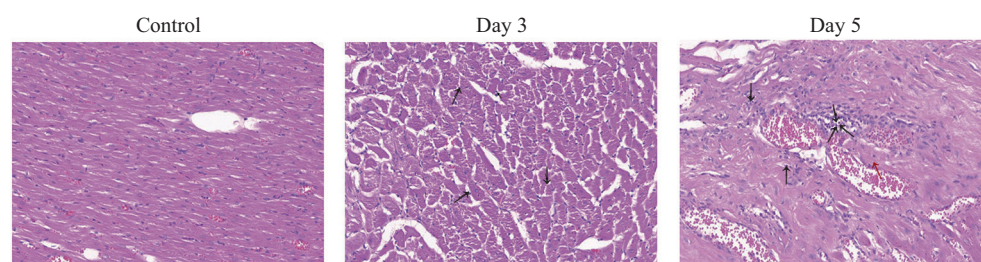
2.3 差异蛋白富集分析

为进一步阐明差异二硫键蛋白的生物学意义,对44个交集蛋白进行了PPI网络构建及功能富集分析。PPI网络显示,蛋白之间存在紧密的相互作用,形成多个高度关联的亚模块(图3A)。其中,NR4A2位于网络的关键节点位置,与RXR、PPAR、LXR等多种核受体及炎症相关分子存在潜在联系。GO功

能富集分析结果表明,差异蛋白主要富集于细胞对氧化应激反应、内质网应激反应、线粒体相关凋亡过程及转录调控等生物学过程;在细胞组分水平上,差异蛋白显著富集于内质网周围区、线粒体外膜、NADPH氧化酶复合物等结构;在分子功能方面,差异蛋白则集中于氧化还原酶活性、谷胱甘肽过氧化物酶活性、伴侣蛋白结合和蛋白磷酸酶结合等(图3B和图3C)。KEGG通路分析进一步显示,差异二硫键蛋白显著富集于多条与MI病理密切相关的信号通路,包括PPAR信号通路、TNF信号通路、NF- κ B信号通路、PI3K-Akt信号通路和MAPK信号通路,同时涉及内质网蛋白加工、自噬、铁死亡等过程(图3C和图3D)。综上,PPI网络及GO、KEGG富集结果提示,MI后早期心肌组织中二硫键修饰蛋白主要与内质网应激、氧化应激、炎症信号及细胞死亡途径密切相关。

2.4 NR4A2二硫键数量与位置的动态变化

在进一步分析中,本研究基于二硫键蛋白质组学技术,利用高分辨液相色谱-串联质谱结合pLink交联分析软件,对NR4A2蛋白的内部及跨蛋白二硫键进行了分组比较与定量分析。通过提取离子流峰面积(XIC area)计算二硫键修饰程度。结果显示,在对照组中,NR4A2仅检测到少量稳定存在的内源性二硫键,总数为5个。在3天组中,NR4A2内部二硫键数量显著增加,由对照组的5个扩展至13个,包括新增的多个位点,提示MI早期应激状态下NR4A2发生了明显的二硫键重塑。进一步对对照组与3天组中共同的5个二硫键位点进行XIC area分析发现,60—364、72—329、79—359、90—389、29—329二硫键的相对峰面积在3天组中显著升高($P<0.05$),提示不仅二硫键数量增加,而且其修饰程度显著增强及连接面积显著增加(表2)。与此同时,NR4A2与其他蛋白之间的二硫键互作显著增强,除继续与NR4A1保

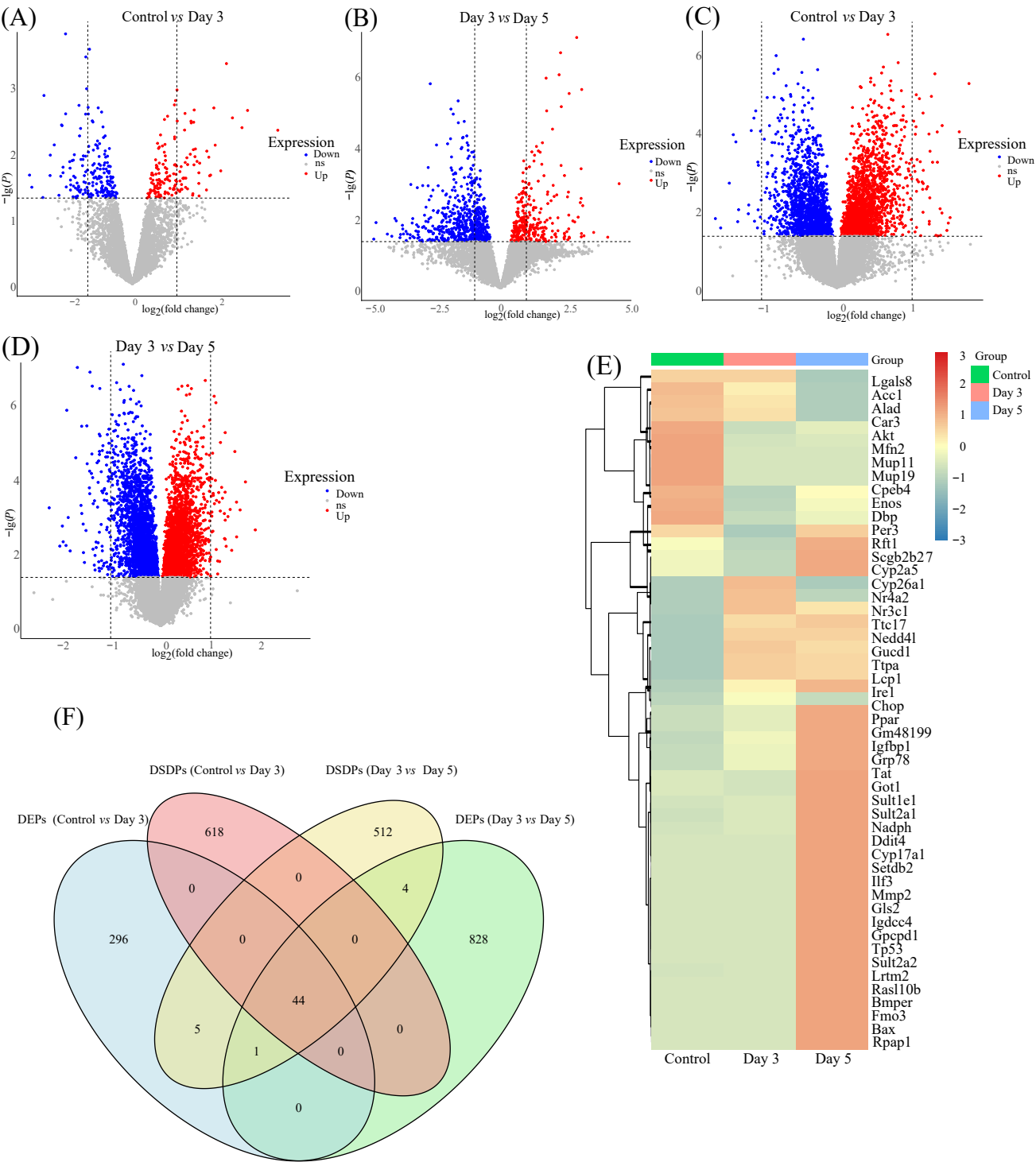


黑色箭头表示炎症细胞;红色箭头表示坏死。

Black arrows indicate inflammatory cell infiltration; red arrows indicate myocardial necrosis.

图1 三组大鼠心肌组织HE染色

Fig.1 HE staining of myocardial tissues in the three groups of rats



A: 对照组与3天组差异蛋白火山图; B: 3天组与5天组差异蛋白火山图; C: 对照组与3天组二硫键差异修饰位点火山图; D: 3天组与5天组二硫键差异修饰位点火山图; E: 三组间排名前50位差异修饰蛋白热图; F: 6组间差异修饰蛋白韦恩图。
A: volcano plot of differentially expressed proteins between the control and Day 3 groups; B: volcano plot of differentially expressed proteins between the Day 3 and Day 5 groups; C: volcano plot of differentially modified disulfide-bond sites between the control and Day 3 groups; D: volcano plot of differentially modified disulfide-bond sites between the Day 3 and Day 5 groups; E: heatmap of the top 50 differentially modified proteins among the three groups; F: venn diagram of differentially modified proteins among the six comparisons.

图2 三组大鼠心肌组织蛋白质组及二硫键组生物信息学分析

Fig.2 Bioinformatic analysis of myocardial tissue proteomics and disulfide-bond proteomics among the three groups of rats



A: 交集蛋白PPI网络图; B、C: 交集蛋白GO富集分析柱状图和气泡图; D、E: 交集蛋白KEGG富集分析柱状图和气泡图。

A: PPI network of intersecting proteins; B,C: bar chart and bubble plot of GO enrichment analysis for intersecting proteins; D,E: bar chart and bubble plot of KEGG enrichment analysis for intersecting proteins.

图3 六组间差异修饰蛋白富集分析

Fig.3 Enrichment analysis of differentially modified proteins among the six groups

持相互作用外, 还新出现与RXR、PPAR α 及PPAR γ 的二硫键连接, 显示NR4A2在MI早期通过二硫键介导的方式与多种核受体形成复合体, 可能增强其转录调控功能。然而, 在5天组中, NR4A2内部二硫键

数量减少至5个, 相较于3天明显下降, 同时与RXR、PPAR α 、PPAR γ 等蛋白的二硫键连接消失(表3)。该结果提示, NR4A2在MI后早期经历了一个由二硫键快速增加并促进核受体互作到二硫键减少和错配,

表2 三组间NR4A2蛋白内部二硫键位置及面积
Table 2 Positions and areas of internal disulfide bonds in NR4A2 protein among the three groups

二硫键位点 S-S site	对照组(XIC峰面积) Control (XIC area)	3天组(XIC峰面积) Day 3 (XIC area)	5天组(XIC峰面积) Day 5 (XIC area)
3-77	3.99×10 ⁶ ±0.55×10 ⁶	6.28×10 ⁶ ±0.45×10 ⁶ *	1.62×10 ⁴ ±1.12×10 ³
3-190	2.83×10 ⁶ ±0.51×10 ⁶	5.73×10 ⁶ ±0.65×10 ⁶ *	—
77-465	3.22×10 ⁶ ±0.36×10 ⁶	4.21×10 ⁶ ±0.62×10 ⁶ *	4.79×10 ⁶ ±0.35×10 ⁶
190-475	1.11×10 ⁶ ±0.25×10 ⁶	2.76×10 ⁶ ±0.56×10 ⁶ *	—
190-534	1.26×10 ⁷ ±3.28×10 ⁶	3.29×10 ⁷ ±5.51×10 ⁶ *	—
77-534	—	4.34×10 ⁶ ±0.34×10 ⁶	—
77-566	—	1.79×10 ⁷ ±1.27×10 ⁶	—
190-505	—	1.39×10 ⁷ ±1.19×10 ⁶	—
465-3	—	1.23×10 ⁷ ±5.48×10 ⁶	—
465-475	—	5.38×10 ⁶ ±0.84×10 ⁶	—
465-505	—	5.40×10 ⁷ ±1.26×10 ⁶	—
475-505	—	1.26×10 ⁷ ±2.27×10 ⁶	—
505-566	—	6.70×10 ⁶ ±0.54×10 ⁶	—
190-77	—	—	1.16×10 ⁷ ±1.58×10 ⁶
475-534	—	—	4.89×10 ⁶ ±0.27×10 ⁶
505-534	—	—	1.02×10 ⁶ ±0.15×10 ⁶

*P<0.05, 与对照组比较。—: 不适用。
*P<0.05 compared with control group. —: unavailable.

表3 三组间NR4A2蛋白-蛋白之间二硫键位置及面积
Table 3 Positions and areas of disulfide bonds between NR4A2 protein-protein among the three groups

分组 Group	蛋白质编号1 Protein ID-1	蛋白质编号2 Protein ID-2	二硫键位点 S-S site	XIC 峰面积总和 XIC area summed
Control	NR4A2	NR4A1	465-135	54 000 000±1 753 823.75
	NR4A2	RXR γ	77-226	12 600 000±3 218 562.64
	NR4A2	PPAR α	77-384	67 000 00±37 281.37
Day 3	NR4A2	NR4A1	475-79	123 000 000±16 582 548.42
	NR4A2	PPAR γ	190-313	1 560 000±195 735.81
	NR4A2	LXR β	77-311	33 700 000±2 957 382.57
Day 5	NR4A2	—	—	—

—: 不适用。
—: unavailable.

导致互作丧失的动态过程。

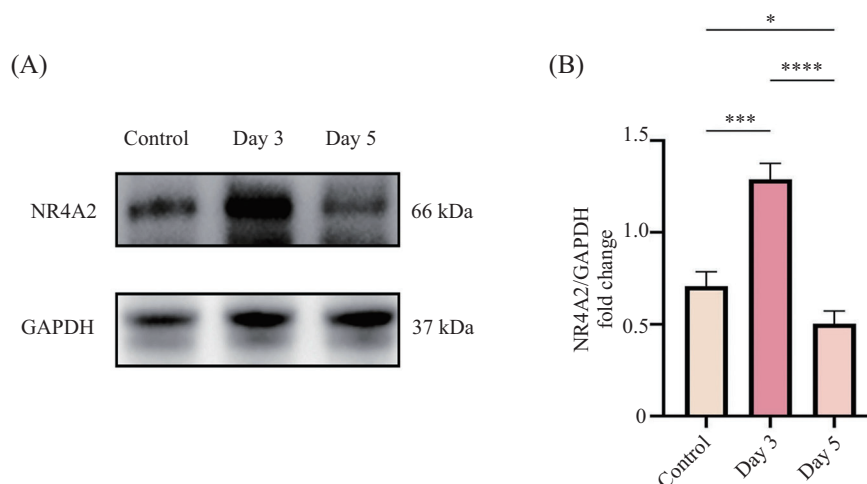
2.5 NR4A2蛋白表达水平的动态变化

为验证二硫键蛋白质组学结果,对MI后不同时间点心肌组织中NR4A2蛋白水平进行了WB(Western blot)检测(图4A)。结果显示,在对照组中NR4A2表达处于基础水平;在3天组中,NR4A2水平在3天组中达到最高值,较对照组显著升高(P<0.01);而在5天组中,NR4A2表达水平较3天组明显下降(P<0.01),并低于对照组(P<0.05)(图4B)。WB结果表明NR4A2蛋白水平在MI早期呈现先升高后下降的动态变化趋势,与二硫键蛋白质组学检测结果相一致,说明

NR4A2在MI早期具有短暂的激活和保护作用,但随后保护作用逐渐衰减。

2.6 NR4A2蛋白二硫键的可逆性验证

为验证NR4A2蛋白二硫键修饰的可逆性,采用免疫共沉淀(immunoprecipitation, IP)结合NR/R SDS-PAGE检测其分子形式(图5A)。结果显示,在对照组中,NR4A2主要以单体形式存在,高分子条带显示强度较弱,且经还原处理前后无显著差异(图5B)。在3天组中,NR4A2在非还原条件下出现明显的高分子条带,且高分子/单体值显著升高;在加入还原剂后,高分子条带显示强度显著减弱,单体增强,表明该阶段NR4A2存

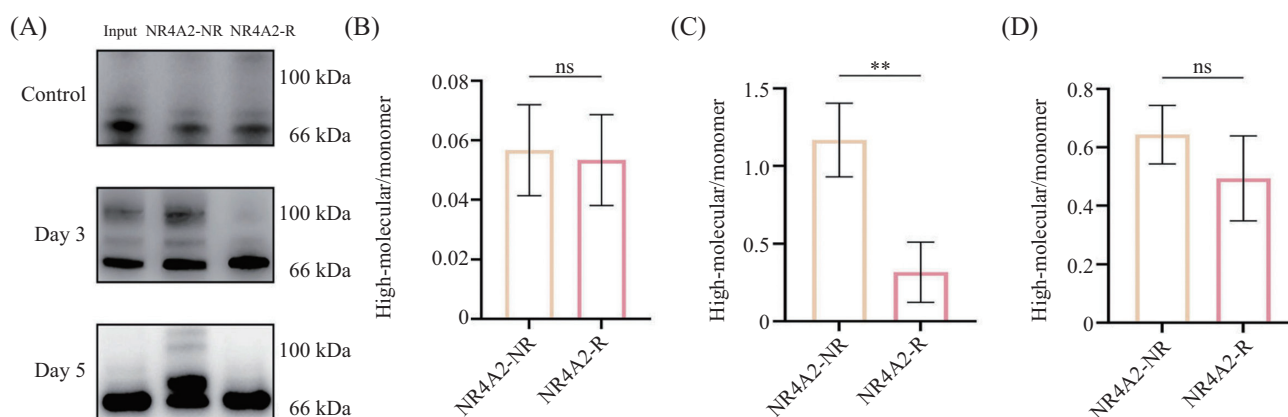


A: 三组间NR4A2蛋白条带图; B: 组间NR4A2蛋白灰度值柱状图。n=3, * $P<0.05$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ 。

A: representative Western blot bands of NR4A2 protein in the three groups; B: quantitative bar graph of NR4A2 protein gray intensity. n=3, * $P<0.05$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ 。

图4 三组间NR4A2蛋白表达差异

Fig.4 Differential expression of NR4A2 protein among the three groups



A: 在还原(R, +DTT/TCEP)与非还原(NR, -DTT/TCEP)条件下对NR4A2免疫沉淀产物进行SDS-PAGE分析; B-D: 对照组、心梗后3天组及5天组在还原与非还原条件下NR4A2高分子/单体值的定量比较。n=3; ** $P<0.01$; ns: $P>0.05$ 。

A: SDS-PAGE analysis of NR4A2 immunoprecipitates under reducing (R, +DTT/TCEP) and non-reducing (NR, -DTT/TCEP) conditions; B-D: quantitative comparison of high-molecular-weight to monomer ratios of NR4A2 under reducing and non-reducing conditions in the control, Day 3, and Day 5 groups, respectively. n=3; ** $P<0.01$; ns: $P>0.05$ 。

图5 三组间NR4A2蛋白二硫键状态的变化

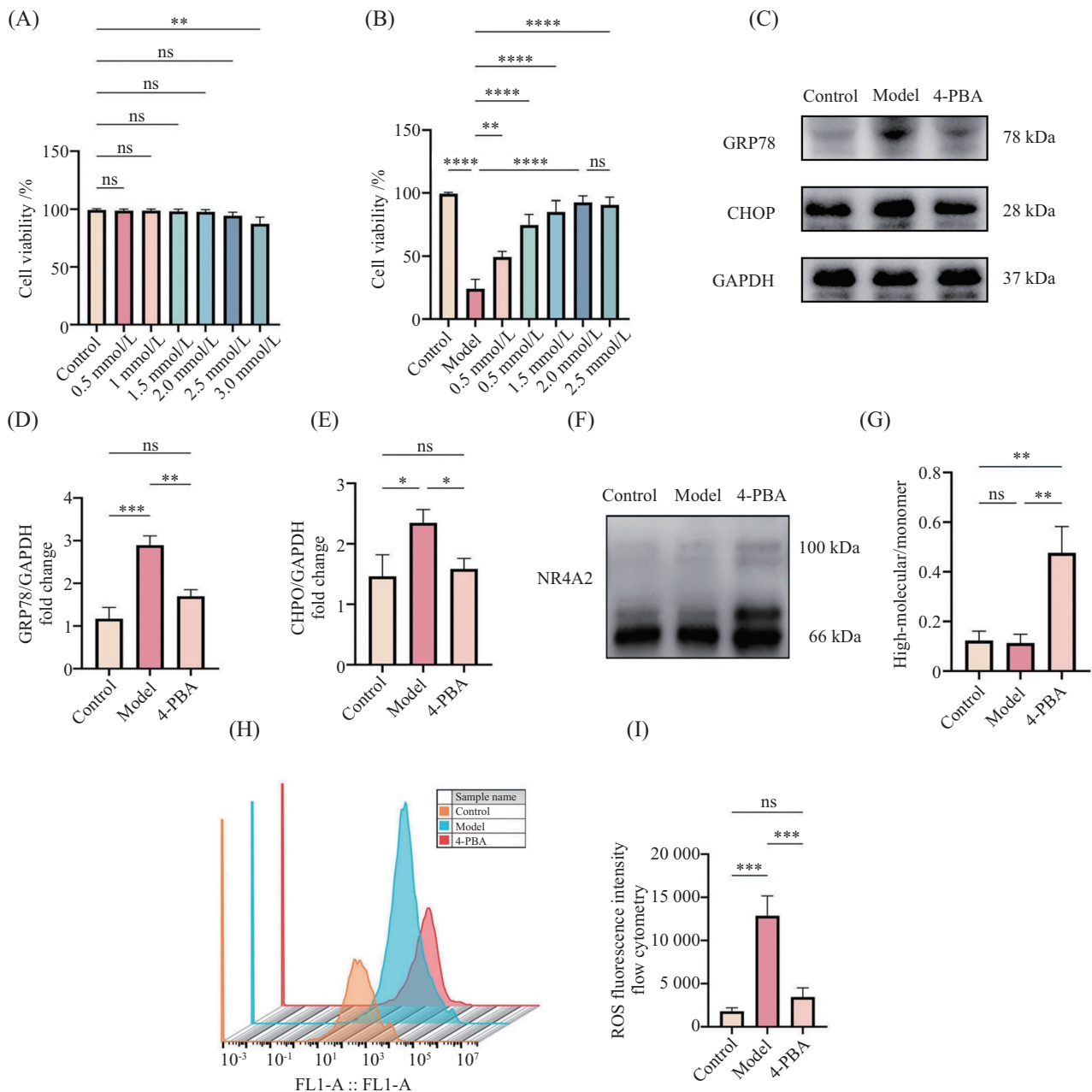
Fig.5 Changes in NR4A2 protein disulfide bond status among the three groups

在大量可逆二硫键(图5C, $P<0.01$)。在5天组中, 高分子条带较3天组明显减少, 且还原处理前后差异不显著, 提示此阶段NR4A2的二硫键修饰水平下降, 部分二硫键可能已发生错配或过度氧化(图5D)。上述结果证实NR4A2在MI早期发生可逆性二硫键修饰, 而在5天阶段二硫键水平下降, 功能性修饰减弱。

2.7 4-PBA对NR4A2二硫键修饰及ER应激水平的影响

为进一步验证ER应激在NR4A2二硫键修饰异

常中的作用, 本研究首先检测了不同浓度4-PBA对对照组及OGD处理H9C2细胞活力的影响(图6A和图6B)。结果显示, 4-PBA在0.5~2.5 mmol/L范围内对细胞活力无显著影响, 而3 mmol/L时细胞活力显著下降($P<0.01$), 提示在0.5~2.5 mmol/L剂量区间内4-PBA对细胞无明显毒性。进一步在OGD模型中比较不同浓度4-PBA的保护效果, 结果显示, 与OGD组相比, 2.0 mmol/L和2.5 mmol/L 4-PBA均能显著提高细胞活力($P<0.0001$), 且两者之间差异无统计学



A: 不同浓度4-PBA对H9C2细胞活力的影响; B: 不同浓度4-PBA对OGD模型细胞活力的影响; C: 对照组、模型组及4-PBA组GRP78和CHOP蛋白表达的Western blot结果; D、E: GRP78与CHOP蛋白灰度值统计分析; F: 三组在非还原(NR, -DTT/TCEP)条件下NR4A2的SDS-PAGE条带图; G: NR4A2高分子/单体值定量比较; H、I: 三组细胞内ROS水平的流式检测结果及其定量分析。n=3; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$; ns: $P>0.05$ 。

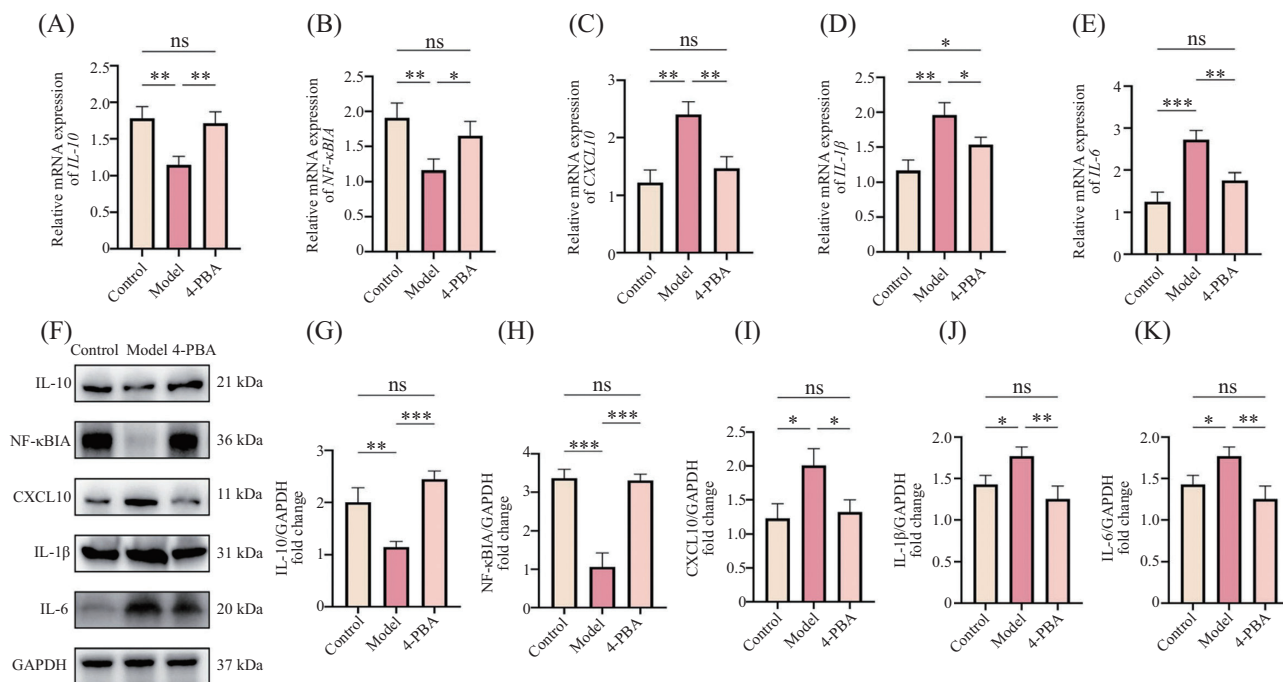
A: effects of different concentrations of 4-PBA on the viability of normal H9C2 cells; B: effects of different concentrations of 4-PBA on the viability of OGD-treated H9C2 cells; C: Western blot results showing GRP78 and CHOP protein expression in the control, model, and 4-PBA groups; D,E: quantitative analysis of GRP78 and CHOP protein levels; F: SDS-PAGE bands of NR4A2 under non-reducing (NR, -DTT/TCEP) conditions in the three groups; G: quantification of the NR4A2 high-molecular/monomer ratio; H,I: flow cytometry results and quantitative analysis of intracellular ROS levels among the three groups. $n=3$; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$; ns: $P>0.05$.

图6 4-PBA对H9C2细胞活力、NR4A2二硫键修饰及内质网应激水平的影响

Fig.6 Effects of 4-PBA on cell viability, NR4A2 disulfide bond modification, and ER stress levels in H9C2 cells

意义($P>0.05$)。其中2.0 mmol/L的保护作用最为稳定且无潜在毒性,因此选定2.0 mmol/L作为后续实验的干预浓度。WB检测结果显示,与对照组相比,

OGD模型组细胞中GRP78与CHOP蛋白水平均显著升高($P<0.001$, $P<0.05$),提示OGD可有效诱导心肌细胞发生ER应激反应。4-PBA预处理后,GRP78与



A-E: 对照组、模型组及4-PBA组 *IL-10*、*NF-κB1α*、*CXCL10*、*IL-1β*和*IL-6*的mRNA表达量统计结果; F: 三组的蛋白表达条带图; G-K: 三组间 *IL-10*、*NF-κB1α*、*CXCL10*、*IL-1β*及*IL-6*蛋白表达的定量分析。 $n=3$; $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$, $****P<0.0001$; ns: $P>0.05$ 。

A-E: statistical analysis of mRNA expression levels of *IL-10*, *NF-κB1α*, *CXCL10*, *IL-1β*, and *IL-6* in the control, model, and 4-PBA groups; F: representative protein bands of *IL-10*, *NF-κB1α*, *CXCL10*, *IL-1β*, and *IL-6* among the three groups; G-K: quantitative analysis of protein expression levels of *IL-10*, *NF-κB1α*, *CXCL10*, *IL-1β*, and *IL-6* among the three groups. $n=3$; $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$, $****P<0.0001$; ns: $P>0.05$.

图7 三组间炎症相关因子表达的影响

Fig.7 Expression of inflammation-related factors among the three groups

CHOP蛋白表达水平明显下降 ($P<0.01$, $P<0.05$) (图6D和图6E), 表明ER应激得到显著缓解。进一步检测NR4A2的二硫键修饰状态(图6F和图6G), 结果显示, OGD组NR4A2高分子聚合物/单体值略有下降, 而4-PBA干预可显著恢复该比值 ($P<0.01$), 提示ER应激抑制可部分恢复NR4A2的二硫键形成。此外, 为探讨二硫键修饰变化与细胞氧化还原状态的关系, 本研究检测了三组间细胞内ROS水平(图6H和图6I)。结果显示, OGD模型组ROS荧光强度显著升高 ($P<0.001$), 而4-PBA干预可明显降低ROS水平 ($P<0.001$), 恢复至接近对照组水平。综上, ER应激通过破坏细胞内氧化还原稳态导致NR4A2二硫键形成受损, 而ER应激抑制剂4-PBA可通过减轻氧化应激恢复其正常二硫键构象, 从而改善细胞应激状态。

2.8 抗炎-促炎基因转录水平变化

为进一步验证NR4A2二硫键修饰变化对炎症基因转录调控的功能意义, 本研究检测了已报道的炎症与免疫相关靶基因的mRNA表达水平。如图7所示, 在OGD模型组中, 与*IL-10*与*NF-κB1α*转录水

平均较对照组显著下调 ($P<0.01$), 提示抗炎及抑制NF-κB活化的信号受损。相反, 促炎因子*CXCL10*、*IL-1β*与*IL-6*在模型组中显著上调 (图7A~图7E, $P<0.01$), 进一步表明心肌细胞在缺氧损伤状态下处于炎症应激的激活状态。在4-PBA干预后, *IL-10*与*NF-κB1α*蛋白表达水平部分恢复, 而*CXCL10*、*IL-1β*与*IL-6*的蛋白表达能力显著减弱(图7F~图7K, $P<0.05$, $P<0.01$)。这一结果提示NR4A2二硫键修饰异常可能通过调控炎症基因转录参与炎症反应, 而抑制ER应激可在一定程度上逆转这一过程。

3 讨论

本研究基于二硫键蛋白质组学系统揭示了心肌梗死后蛋白质二硫键修饰的动态变化, 并重点关注了转录因子NR4A2的功能重塑。结果显示, MI发生后整体二硫键修饰谱显著改变, 差异蛋白和二硫键位点在不同时间点呈现出分群和数量学差异。进一步实验表明, NR4A2在缺血应激条件下出现可逆性二硫键修饰, 其跨蛋白二硫键数量在3天时明显增

加,而在5天时减少或消失。与此同时,内质网应激水平与NR4A2的二硫键状态密切相关,4-PBA干预能够部分恢复其二硫键修饰。此外,RT-qPCR结果显示IL-10、NF- κ BIA、CXCL10和IL-1 β 等炎症相关基因的表达亦随NR4A2二硫键变化而动态调整。这些结果提示NR4A2在MI早期经历了二硫键依赖的结构与功能重编程,可能通过影响炎症因子表达参与心肌损伤与修复调控。

二硫键是维持蛋白质稳定性与功能活性的关键修饰,本研究发现,NR4A2在MI早期经历显著的二硫键重塑,提示其功能状态受氧化还原环境及折叠负荷调控。在蛋白内部,正常情况下NR4A2仅存在少量稳定二硫键以维持基础构象,而在应激下二硫键数量短暂增加,可能改变DNA结合或辅因子亲和性^[18-19]。第5天时,二硫键数量减少并出现错配,提示过度氧化修饰可能削弱蛋白稳定性和转录功能。在蛋白互作水平,NR4A2在3天时通过二硫键与RXR、PPAR、LXR等核受体形成复合物,可能增强异源二聚体稳定性并拓展靶基因谱,而在5天时这些二硫键消失。

内质网是蛋白折叠与二硫键形成的主要场所,其氧化还原环境直接影响二硫键质量^[20-21]。MI缺血缺氧可导致钙稳态紊乱与折叠负荷增加^[22-23],诱导GRP78、CHOP等分子上调,提示内质网应激过度激活。已有研究表明,在此环境下蛋白极易出现二硫键过度形成、错配或断裂^[24]。本研究发现,OGD模型中NR4A2高分子/单体值下降,而在4-PBA干预后该比值显著回升,且伴随GRP78、CHOP水平下降,提示抑制ER应激可部分恢复NR4A2的二硫键修饰。结合蛋白质组学结果,可推测过度应激则导致错配或断裂,最终削弱转录活性。

NR4A2在炎症调控中的作用亦得到了炎症相关基因检测结果的支持。既往研究提示,IL-10与NF- κ BIA的上调可在炎症环境中发挥抗炎效应^[25],而CXCL10与IL-1 β 等促炎因子表达量的增加则会加重细胞及组织炎症浸润^[26-27]。本研究发现,在OGD模型中IL-10与NF- κ BIA表达水平显著下降,而CXCL10与IL-1 β 表达明显上调。结合二硫键蛋白质组学结果可见,这种由抗炎向促炎的转变与NR4A2二硫键修饰状态高度一致,当NR4A2二硫键修饰减少或错配时,其蛋白互作能力受损,转录活性发生偏移,从而削弱抗炎效应。值得注意的是,4-PBA干预

能够恢复IL-10与NF- κ BIA的表达,并抑制CXCL10与IL-1 β 表达水平的升高,这进一步支持了NR4A2二硫键修饰与炎症基因表达存在因果联系的观点。

先前关于NR4A2的研究多聚焦于磷酸化、乙酰化及泛素化等修饰,证实其在核定位、稳定性及转录活性中发挥作用^[28]。然而,对依赖氧化还原状态的二硫键修饰鲜有报道。本研究首次在MI背景下系统描绘了NR4A2二硫键动态图谱,揭示了其经历数量增加、互作增强到错配减少的过程,并通过免疫沉淀和还原/非还原SDS-PAGE实验证实了其可逆性。同时结合4-PBA干预,明确了ER应激在NR4A2二硫键重塑中的作用,并将这一结构变化与炎症基因转录重编程相联系。因此,本研究提出了ER应激-二硫键修饰-NR4A2功能重编程-炎症调控的新机制链条,拓展了对NR4A2调控模式的认识,为理解MI后炎症反应提供了新视角。

本研究亦存在局限性。首先,尚未通过定点突变直接验证关键二硫键位点的功能因果关系。其次,实验主要基于动物组织H9C2细胞模型,缺乏临床患者心肌样本验证,限制了结论的转化价值。此外,二硫键与其他翻译后修饰的交互尚未深入探讨,可能低估了NR4A2功能重编程的复杂性。最后,由于目前尚无公认且特异有效的二硫键形成/断裂调控药物,本研究未能通过直接的激动或抑制实验进一步验证二硫键修饰变化与NR4A2功能调控的因果关系。

参考文献 (References)

- [1] KOMAI K, KAWASAKI N K, HIGA J K, et al. The role of ferroptosis in adverse left ventricular remodeling following acute myocardial infarction [J]. *Cells*, 2022, 11(9): 1399.
- [2] EGHBALZADEH K, GEORGI L, LOUIS T, et al. Compromised anti-inflammatory action of neutrophil extracellular traps in PAD4-deficient mice contributes to aggravated acute inflammation after myocardial infarction [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 2313.
- [3] FARAH A, BARBAGELATA A. Unmet goals in the treatment of acute myocardial infarction: review [J]. *F1000Res*, 2017, doi: 10.12688/f1000research.10553.1.
- [4] LIU M, LIU P, ZHENG B, et al. Cardioprotective effects of alantolactone on isoproterenol-induced cardiac injury and cobalt chloride-induced cardiomyocyte injury [J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2022, 36: 356444711.
- [5] WEDEMEYER W J, WELKER E, NARAYAN M, et al. Disulfide bonds and protein folding [J]. *Biochemistry*, 2000, 39(15): 4207-16.
- [6] YAN L. Protein redox modification as a cellular defense mecha-

- nism against tissue ischemic injury [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2014, 2014: 343154.
- [7] BINEK A, CASTANS C, JORGE I, et al. Oxidative post-translational protein modifications upon ischemia/reperfusion injury [J]. *Antioxidants*, 2024, 13(1): 106.
- [8] TERATANI T, TOMITA K, TOMA-FUKAI S, et al. Redox-dependent PPARgamma/Tnpo1 complex formation enhances PPARgamma nuclear localization and signaling [J]. *Free Radic Biol Med*, 2020, 156: 45-56.
- [9] CARTER E L, RAGSDALE S W. Modulation of nuclear receptor function by cellular redox poise [J]. *J Inorg Biochem*, 2014, 133: 92-103.
- [10] WOO M S, BAL L C, WINSCHER I, et al. The NR4A2/VGF pathway fuels inflammation-induced neurodegeneration via promoting neuronal glycolysis [J]. *J Clin Invest*, 2024, 134(16): e177692.
- [11] MAHAJAN S, SAINI A, CHANDRA V, et al. Nuclear receptor Nr4a2 promotes alternative polarization of macrophages and confers protection in sepsis [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(30): 18304-14.
- [12] MOK J, PARK J H, YEOM S C, et al. PROKR1-CREB-NR4A2 axis for oxidative muscle fiber specification and improvement of metabolic function [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2024, 121(4): e1986007175.
- [13] BRUNING J M, WANG Y, OLTRABELLA F, et al. Covalent modification and regulation of the nuclear receptor Nurr1 by a dopamine metabolite [J]. *Cell Chem Biol*, 2019, 26(5): 674-85.
- [14] HASHIDA R, KAWABATA T. Structural perspective of NR4A nuclear receptor family and their potential endogenous ligands [J]. *Biol Pharm Bull*, 2024, 47(3): 580-90.
- [15] OZCAN U, YILMAZ E, OZCAN L, et al. Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes [J]. *Science*, 2006, 313(5790): 1137-40.
- [16] JIANG L, DAI S, LI J, et al. Structural basis of binding of homodimers of the nuclear receptor NR4A2 to selective Nur-responsive DNA elements [J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(51): 19795-803.
- [17] LIU H, COLAVITTI R, ROVIRA I I, et al. Redox-dependent transcriptional regulation [J]. *Circ Res*, 2005, 97(10): 967-74.
- [18] FEIGE M J, HENDERSHOT L M. Disulfide bonds in ER protein folding and homeostasis [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2011, 23(2): 167-75.
- [19] USHIODA R, NAGATA K. Redox-mediated regulatory mechanisms of endoplasmic reticulum homeostasis [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2019, 11(5): a033910.
- [20] GLEMBOTSKI C C. Endoplasmic reticulum stress in the heart [J]. *Circ Res*, 2007, 101(10): 975-84.
- [21] MAINALI N, LI X, WANG X, et al. Myocardial infarction elevates endoplasmic reticulum stress and protein aggregation in heart as well as brain [J]. *Mol Cell Biochem*, 2024, 479(10): 2741-53.
- [22] FEIGE M J, HENDERSHOT L M. Disulfide bonds in ER protein folding and homeostasis [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2011, 23(2): 167-75.
- [23] CARLINI V, NOONAN D M, ABDALELEM E, et al. The multifaceted nature of IL-10: regulation, role in immunological homeostasis and its relevance to cancer, COVID-19 and post-COVID conditions [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1161067.
- [24] KOCHUMON S, AL-SAYYAR A, JACOB T, et al. IL-1beta-induced CXCL10 expression in THP-1 monocytic cells involves the JNK/c-Jun and NF-kappaB-mediated signaling [J]. *Pharmaceuticals*, 2024, 17(7): 823.
- [25] TRIPATHY A S, VISHWAKARMA S, TRIMBAKE D, et al. Pro-inflammatory CXCL-10, TNF-alpha, IL-1beta, and IL-6: biomarkers of SARS-CoV-2 infection [J]. *Arch Virol*, 2021, 166(12): 3301-10.
- [26] JAGIRDAR K, YIN K, HARRISON M, et al. The NR4A2 nuclear receptor is recruited to novel nuclear foci in response to UV irradiation and participates in nucleotide excision repair [J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e78075.