

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2024.24.017

METTL14 通过 m6A 甲基化调控 SIRT6 介导线粒体自噬影响心肌细胞 IR 损伤的机制研究

黄敏, 何娟, 何秀波[△]

湖南省长沙市第四医院超声医学科, 湖南长沙 410006

摘要:目的 探究甲基转移酶 14(METTL14)通过 N6-甲基腺嘌呤(m6A)甲基化调控沉默信息调节因子 6(SIRT6)介导线粒体自噬影响心肌细胞缺血再灌注(I/R)损伤的可能机制。方法 以人心肌细胞系 AC16 细胞株为研究对象,构建 p-METTL14(p-METTL14 组)、p-METTL14/SIRT6 siRNA(p-METTL14/si-SIRT6 组)、si-METTL14(si-METTL14 组)及其阴性对照(p-NC METTL14 组、si-NC SIRT6 组)转染细胞,并采用定量聚合酶链反应(qPCR)检测各组细胞中 METTL14、SIRT6 表达水平。将稳定表达的 p-METTL14 组、p-METTL14/SIRT6 siRNA 组及 p-NC 组细胞给予缺氧(37 °C、5% CO₂、92% N₂、3% O₂ 中孵育 21 h)/复氧(37 °C 常氧环境中培养 3 h)培养并分别命名为 I/R+p-METTL14 组、I/R+p-METTL14/si-SIRT6 组、I/R+p-NC 组,将缺氧/复氧培养的 AC16 细胞记为 I/R 组,不做任何处理的 AC16 细胞记为空白组。采用 RNA 甲基化免疫共沉淀技术(MeRIP)-qPCR 检测 METTL14 对 SIRT6 m6A 富集程度的影响,采用细胞计数试剂盒-8(CCK-8)和流式细胞仪检测各组 AC16 细胞的细胞增殖水平及凋亡率,采用线粒体/溶酶体免疫荧光双标记染色法观察各组细胞线粒体自噬水平;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测各组 AC16 细胞中自噬标志物(LC3 II/I、自噬相关基因 1(Beclin-1)、p62、Caspase-3、B 淋巴细胞瘤-2 关联 X 蛋白(bax)、B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)蛋白表达水平。结果 si-METTL14/anti-m6A 组中的 SIRT6 m6A 相对富集程度为 0.41±0.11,低于 si-NC anti-m6A 组的 0.92±0.13,差异均有统计学意义(P<0.05);与空白组比较,I/R 组和 I/R+p-NC 组 AC16 细胞的细胞活力、Bcl-2、LC3 II/I、Beclin-1、p62 蛋白表达水平降低,细胞凋亡率、Bax、Caspase-3 蛋白表达水平升高,差异均有统计学意义(P<0.05)。与 I/R+p-NC 组比较,I/R+p-METTL14 组 AC16 细胞的细胞活力、Bcl-2 蛋白水平、LC3 II/I、Beclin-1、p62 蛋白升高,细胞凋亡率、Bax、Caspase-3 蛋白表达水平降低,差异均有统计学意义(P<0.05)。与 I/R+p-METTL14 组比较,I/R+p-METTL14/si-SIRT6 组的细胞活力、Bcl-2、LC3 II/I、Beclin-1、p62 蛋白表达水平降低,细胞凋亡率、Bax、Caspase-3 蛋白表达水平升高,差异均有统计学意义(P<0.05);免疫荧光双标记法染色结果显示,I/R 组和 I/R+p-NC 组细胞中线粒体活性表达明显降低,溶酶体活性明显上调,I/R+p-METTL14 组细胞中的线粒体活性及溶酶体活性均有一定程度上调,但线粒体活性表达较低,I/R+p-METTL14/si-SIRT6 组细胞中线粒体活性降低,溶酶体活性一定程度升高。结论 METTL14 能够通过 m6A 甲基化作用稳定 SIRT6 的 mRNA 并促进心肌细胞的线粒体自噬,最终改善心肌细胞 I/R 损伤。

关键词:心肌细胞; 缺血再灌注; 线粒体自噬; m6A 甲基化; 沉默信息调节因子 6

中图分类号:[R34];R541 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2024)24-3669-07

Mechanism of METTL14 affecting IR injury of cardiomyocytes by m6A methylation regulating SIRT6-mediated mitochondrial autophagy

HUANG Min, HE Juan, HE Xiubo[△]

Department of Ultrasound Medicine, Changsha Fourth Hospital, Changsha, Hunan 410006, China

Abstract: Objective To explore the possible mechanism of methyltransferase 14 (METTL14) affecting ischemia/reperfusion (I/R) injury of cardiomyocytes by N6-methyladenine (m6A) methylation regulating silent information regulator 6 (SIRT6)-mediated mitochondrial autophagy. **Methods** Human cardiomyocytes AC16 cells were selected as the research objects to construct cells transfected with p-METTL14 (p-METTL14 group), p-METTL14/SIRT6 siRNA (p-METTL14/si-SIRT6 group), si-METTL14 (si-METTL14 group) and their negative controls (p-NC METTL14 group, si-NC SIRT6 group). The expression levels of METTL14 and SIRT6 in different groups were detected by quantitative polymerase chain reaction (qPCR). The cells with stable expression in p-METTL14 group, p-METTL14/SIRT6 siRNA group and p-NC group were treated with hypoxia (incubation under 37 °C, 5% CO₂, 92% N₂ and 3% O₂ for 21 h) and reoxygenation (culture in 37 °C

normal oxygen environment for 3 h), and then the above cells were included into I/R+p-METTL14 group, I/R+p-METTL14/si-SIRT6 group and I/R+p-NC group respectively. AC16 cells treated with hypoxia/reoxygenation were enrolled as I/R group, while AC16 cells without any treatment were enrolled as blank group. The enrichment degree of METTL14 for SIRT6 m6A was detected by methylated RNA immunoprecipitation (MeRIP)-qPCR. The proliferation level and apoptosis rate of AC16 cells were detected by cell counting kit-8 (CCK-8) and flow cytometry. The mitochondrial autophagy level was observed by immunofluorescence double-labeling staining. The expression levels of autophagy marker (LC3) I / II, Beclin-1, p62, Caspase-3, B lymphoma-2-associated X protein (bax) and B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) proteins in AC16 cells were detected by Western blot. **Results** The relative enrichment degree of SIRT6 m6A⁺ in si-METTL14 anti-m6A group was lower than that in si-NC anti-m6A group [0.41 ± 0.11 vs (0.92 ± 0.13), $P < 0.05$]. Compared with those in the blank group, AC16 cells activity, expression levels of Bcl-2, LC3 II / I, Beclin-1 and p62 proteins decreased, while apoptosis rate and expression levels of Bax and Caspase-3 proteins increased in I/R group and I/R+p-NC group ($P < 0.05$). Compared with I/R+p-NC group, AC16 cells activity, expression levels of Bcl-2, LC3 II / I, Beclin-1 and p62 proteins increased, while apoptosis rate and expression levels of Bax and Caspase-3 proteins decreased in I/R+p-METTL14 group ($P < 0.05$). Compared with I/R+p-METTL14 group, AC16 cells activity, expression levels of Bcl-2, LC3 II / I, Beclin-1 and p62 proteins decreased, while cells apoptosis rate and expression levels of Bax and Caspase-3 proteins increased in I/R+p-METTL/si-SIRT6 group ($P < 0.05$). The results of immunofluorescence double-labeling staining showed that expression of mitochondrial activity decreased significantly, while lysosome activity increased significantly in I/R group and I/R+p-NC group. The mitochondrial activity and lysosome activity up-regulated to a certain extent in I/R+p-METTL14 group, but the expression of mitochondrial activity lower. Mitochondrial activity decreased, while lysosomal activity increased to a certain extent in I/R+p-METTL14/si-SIRT6 group. **Conclusion** METTL14 can stabilize SIRT6 mRNA and promote mitochondrial autophagy of cardiomyocytes by m6A methylation, and finally improve I/R injury of cardiomyocytes.

Key words: cardiomyocyte; ischemia/reperfusion; mitochondrial autophagy; m6A methylation; silent information regulator 6

心肌梗死是指因冠状动脉出现急性阻塞导致心肌缺血性坏死的急性病症,可使心脏功能受损^[1]。近年来,我国缺血性心肌病的发病率及患病率呈逐年升高趋势^[2]。除了梗死过程导致的心功能受损外,经皮冠状动脉介入术等血管内治疗后恢复血流的同时,也会进一步加重心肌组织损伤,导致无复流、慢血流、加速性室性心动过速,临床上称其为缺血再灌注(I/R)损伤^[3]。I/R损伤过程受多种生理机制调节,但目前心肌I/R损伤的分子生物学及细胞学机制仍未完全阐明。m6A修饰在代谢异常和心血管疾病中有调节作用,N6-甲基腺嘌呤(m6A)甲基化能够通过多种酶介导RNA的写入、读取及去甲基化过程,进而改变RNA的稳定性来调控相关基因RNA表达^[4]。甲基转移酶14(METTL14)是m6A甲基化关键蛋白之一,有研究结果显示METTL14能够调节Wnt1/ β -Catenin信号通路的关键蛋白表达,从而减轻心肌损伤^[5],可见其在心肌I/R损伤中发挥作用,但其通过何种途径改善心肌I/R损伤仍需要进一步分析。自噬是真核生物维持细胞内蛋白代谢平衡及内环境稳定的重要生理机制,线粒体自噬则是发生在线粒体内的细胞自噬过程,在心肌缺血阶段及再灌注阶段中线

粒体自噬的机制不同,但一般认为激活或提高线粒体自噬水平对改善I/R损伤有积极作用^[6]。沉默信息调节因子6(SIRT6)是一类具有高烟酰胺腺嘌呤二核苷酸+依赖性组蛋白去乙酰化酶,在心血管疾病中可促进细胞或线粒体自噬进程^[7]。本课题组前期通过m6A生物分析数据库分析检索发现,SIRT6是METTL14介导m6A修饰的靶基因之一,因此,本研究拟选取人心肌细胞系AC16细胞株为研究对象,通过过表达METTL14及抑制SIRT6表达,以探讨METTL14通过m6A甲基化调控SIRT6在心肌I/R损伤过程中的可能作用机制,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 细胞来源 人心肌细胞系AC16细胞株(产品编号A3137)由上海酶研生物科技有限公司提供,在含有10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素的DMEM培养基及恒温37℃、5%CO₂的培养箱中培养,细胞2~3d传代1次,用于后续试验。

1.2 仪器与试剂 Agilent NovoCyte 流式细胞仪购自美国agilent公司,SpectraMax Gemini XPS酶标仪购自美国Molecular Devices公司;荧光显微镜(micropublisher 3.3RTV)购自奥林巴斯公司。DMEM

培养基、胎牛血清、BCA 蛋白定量试剂盒、Trizol 试剂盒、定量聚合酶链反应 (q-PCR) 检测试剂盒均购自 Thermo Fisher Scientific 公司; m6A 修饰检测试剂盒购自美国 Epigentek 公司; 阴性对照 METTL14 过表达质粒 (p-NC METTL14)、METTL14 过表达质粒 (p-METTL14)、阴性对照 siRNA METTL14 质粒 (si-NC METTL14)、METTL14 siRNA 质粒 (si-METTL14)、阴性对照 siRNA SIRT6 质粒 (si-NC SIRT6)、SIRT6 siRNA 质粒 (si-SIRT6) 均委托上海吉凯基因化学技术有限公司合成并测序; Lipofectamine3000 细胞转染试剂购自美国 Invitrogen 公司; 兔抗人自噬标志物 (LC3) I / II、自噬相关基因 1 (Beclin-1)、p62、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 (Caspase-3)、B 淋巴瘤细胞瘤-2 关联 X 蛋白 (bax)、B 淋巴瘤细胞瘤-2 (Bcl-2)、GAPDH 一抗购自美国 Santa Cruz 公司; 细胞计数试剂盒-8 (CCK-8) 购自中国艾美捷科技有限公司; Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒购自中国凯基生物有限公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞转染及 I/R 处理 取生长至对数期的 AC16 细胞, 待细胞在细胞培养板上生长 24 h 后, 将 AC16 进行 2 种细胞转染, 第 1 种转染情况: 将 p-METTL14、p-NC METTL14、p-METTL14 + si-SIRT6 质粒载体及 si-NC SIRT6 分别转染至 AC16 细胞, 分别记为 p-METTL14 组、p-NC METTL14 组、p-METTL14/si-SIRT6 组、si-NC SIRT6 组; 第 2 种转染情况: 将 si-METTL14、si-NC METTL14 分别转染至 AC16 细胞, 分别记为 si-METTL14 组、si-NC METTL14 组; 2 种细胞转染情况均同时设置对照组 (不做细胞转染处理), 分别命名为对照组_{p-METTL14}、对照组_{p-NC METTL14}、对照组_{p-METTL14/si-SIRT6}、对照组_{si-NC SIRT6}、对照组_{si-METTL14}、对照组_{si-NC METTL14}; 转染 48 h 后使用定量聚合酶链反应 (qPCR) 验证 METTL14、SIRT6 表达。将 p-NC 组、p-METTL14 组、p-METTL14/si-SIRT6 组的 AC16 细胞在缺氧 (37 °C、5% CO₂、92% N₂、3% O₂ 中) 孵育 21 h/复氧 (37 °C 常氧环境中培养 3 h) 条件下培养以建立细胞 I/R 模型, 将其重新命名为 I/R + p-NC 组、I/R + p-METTL14 组、I/R + p-METTL14/si-SIRT6 组, 将缺氧/复氧培养的 AC16 细胞记为 I/R 组, 不做任何处理的 AC16 细胞记为空白组。

1.3.2 RNA 甲基化免疫共沉淀技术 (MeRIP)-qPCR 法检测 METTL14 对 SIRT6 m6A 富集程度的影响 采用 Trizol 法提取 si-METTL14 组、si-NC METTL14 组 AC16 细胞中的总 RNA 后通过 PolyA mRNA 纯化试剂盒对其进行提纯, 将每种样品取等量 2 份 (A、B); 将 m6A 抗体、IgG 抗体分别添加至免疫共沉淀缓冲液, 与蛋白质 A/G 磁珠孵育 1 h, 将获得

的 2 种磁珠-抗体复合物免疫共沉淀缓冲液分别加入 A、B mRNA 样品中并于 4 °C 孵育过夜, 用洗脱缓冲液获得 pulldown 从而得到含有 m6A 甲基化修饰的片段, 将其分别记为 si-NC/anti-m6A 组、si-METTL14/anti-m6A 组、si-NC/anti-IgG 组、si-METTL14/anti-IgG 组, 使用苯酚-氯仿对所得片段进行纯化, 再使用 qPCR 检测 SIRT6 表达, 以 β -actin 为内参基因。

1.3.3 CCK8 检测细胞活力 将空白组、I/R 组、I/R + p-NC 组、I/R + p-METTL14 组、I/R + p-METTL14/si-SIRT6 组 AC16 细胞以密度 5×10^3 细胞/孔接种于 96 孔板, 同时设置空白孔 (有培养基, 无细胞), 生长 48 h 后, 每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液, 继续孵育 4 h, 于酶标仪 450 nm 波长检测吸光度 (A) 值, 细胞活力 (%) = $(A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白孔}}) / (A_{\text{空白组}} - A_{\text{空白孔}}) \times 100\%$ 。

1.3.4 流式细胞仪检测细胞凋亡 将空白组、I/R 组、I/R + p-NC 组、I/R + p-METTL14 组、I/R + p-METTL14/si-SIRT6 组 AC16 细胞以 2×10^6 个/板密度接种至 6 孔板, 待细胞贴壁后在恒温 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中继续培养 24 h, 收集细胞, 以 2 000 r/min 离心 5 min 后, 再使用 Buffer 重悬细胞, 然后在避光条件下加入 Annexin V-FITC/PI 试剂盒中试剂, 反应 5 min 后采用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.3.5 线粒体/溶酶体免疫荧光双标记法染色检测细胞线粒体自噬水平 将空白组、I/R 组、I/R + p-NC 组、I/R + p-METTL14 组、I/R + p-METTL14/si-SIRT6 组 AC16 细胞接种至 6 孔板上, 培养 48 h 后去除培养液, 加入 50 nmol/L 的 Lyso-Tracker Red 染料后, 37 °C 下避光染色 1 h, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 漂洗 2 次后, 加入 Hoechst 33342 染液避光复染 20 min, PBS 清洗干净后, 采用激光共聚焦显微镜进行观察; Mito-Tracker green 染色步骤同 Lyso-Tracker Red 染色, 激光共聚焦显微镜观察后, 将两组染色图片进行合并。

1.3.6 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测凋亡及自噬相关蛋白表达水平 收集空白组、I/R 组、I/R + p-NC 组、I/R + p-METTL14 组、I/R + p-METTL14/si-SIRT6 组 AC16 细胞, 经细胞破碎、冰浴裂解 10 min, 以 4 °C、12 000 g 离心力离心 5 min, 采集离心后的上清液置于无菌级离心管中, 并作为 Western blot 样品, 采用 Bradford 法检测各组细胞蛋白表达水平, 取 50 μ g 蛋白作为上样总质量, 70 V 恒压电泳 1.5 h, 再以 100 V 电泳至距离胶边缘 5 mm, 将分离的蛋白经恒电流 200 mA 湿转至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜, 然后置于含 5% 脱脂奶粉的 PBS 中封闭液室温封闭 2 h, 洗涤后加入兔抗人 LC3 I / II、Beclin-1、p62、Caspase-3、bax、Bcl-2、GAPDH (1 : 1 000) 4 °C 孵育过夜, 洗涤后加入经辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二

抗(1 : 2 000)孵育 1 h,化学显影后,采用凝胶成像仪采集蛋白条带影像,分析目标蛋白与 GAPDH 蛋白条带灰度比值。

1.4 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计软件进行数据处理及统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,多组间的两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 细胞转染效果验证 p-METTL14 组和 p-METTL14/si-SIRT6 组 AC16 细胞中 METTL14 相对表达水平分别为 4.75 ± 0.38 、 4.26 ± 0.37 ,均高于对照组_{p-METTL14} 和 p-NC METTL14 组的 1.00 ± 0.03 、 1.01 ± 0.05 ,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); p-METTL14/si-SIRT6 组 AC16 细胞中 SIRT6 相对表达水平为 0.24 ± 0.03 ,低于对照组_{p-METTL14/si-SIRT6}、p-NC METTL14 组、si-NC SIRT6 组的 1.00 ± 0.02 、 1.01 ± 0.02 、 0.99 ± 0.01 ,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); si-METTL14 组 AC16 细胞中 METTL14 相对表达水平为 0.18 ± 0.04 ,低于对照组_{si-METTL14} 和 si-NC SIRT6 组的 1.01 ± 0.04 、 1.00 ± 0.06 ,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2 METTL14 对 SIRT6 m6A 富集程度的影响 si-METTL14/anti-m6A 组的 SIRT6 m6A+ 相对富集程度为 0.41 ± 0.11 ,低于 si-NC/anti-m6A 组的 0.92 ± 0.13 ,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 而 si-

METTL14/anti-IgG 组、si-NC/anti-IgG 组的 SIRT6 m6A+ 相对富集程度分别为 0.22 ± 0.05 、 0.21 ± 0.04 ,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 METTL14 介导 SIRT6 对 I/R 心肌细胞活力的影响 I/R 组、I/R+p-NC 组 AC16 细胞的细胞活力分别为 $(49.52 \pm 5.63)\%$ 、 $(50.49 \pm 4.96)\%$,均低于空白组的 $(95.41 \pm 3.42)\%$,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。I/R+p-METTL14 组、I/R+p-METTL/si-SIRT6 组 AC16 细胞的细胞活力分别为 $(84.16 \pm 6.12)\%$ 、 $(72.68 \pm 6.38)\%$,均高于 I/R+p-NC 组,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。I/R+p-METTL/si-SIRT6 组 AC16 细胞的细胞活力低于 I/R+p-METTL14 组,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.4 METTL14 介导 SIRT6 对 I/R 心肌细胞凋亡的影响 与空白组比较,I/R 组和 I/R+p-NC 组 AC16 细胞的细胞凋亡率、Bax、Caspase-3 蛋白表达水平升高,Bcl-2 蛋白表达水平降低,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 I/R+p-NC 组比较,I/R+p-METTL14 组、I/R+p-METTL/si-SIRT6 组 AC16 细胞的细胞凋亡率、Bax、Caspase-3 蛋白表达水平降低,Bcl-2 蛋白表达水平升高,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 I/R+p-METTL14 组比较,I/R+p-METTL/si-SIRT6 组的 AC16 细胞的细胞凋亡率、Bax、Caspase-3 蛋白表达水平升高,Bcl-2 蛋白表达水平降低,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组 AC16 细胞的细胞凋亡率及 Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

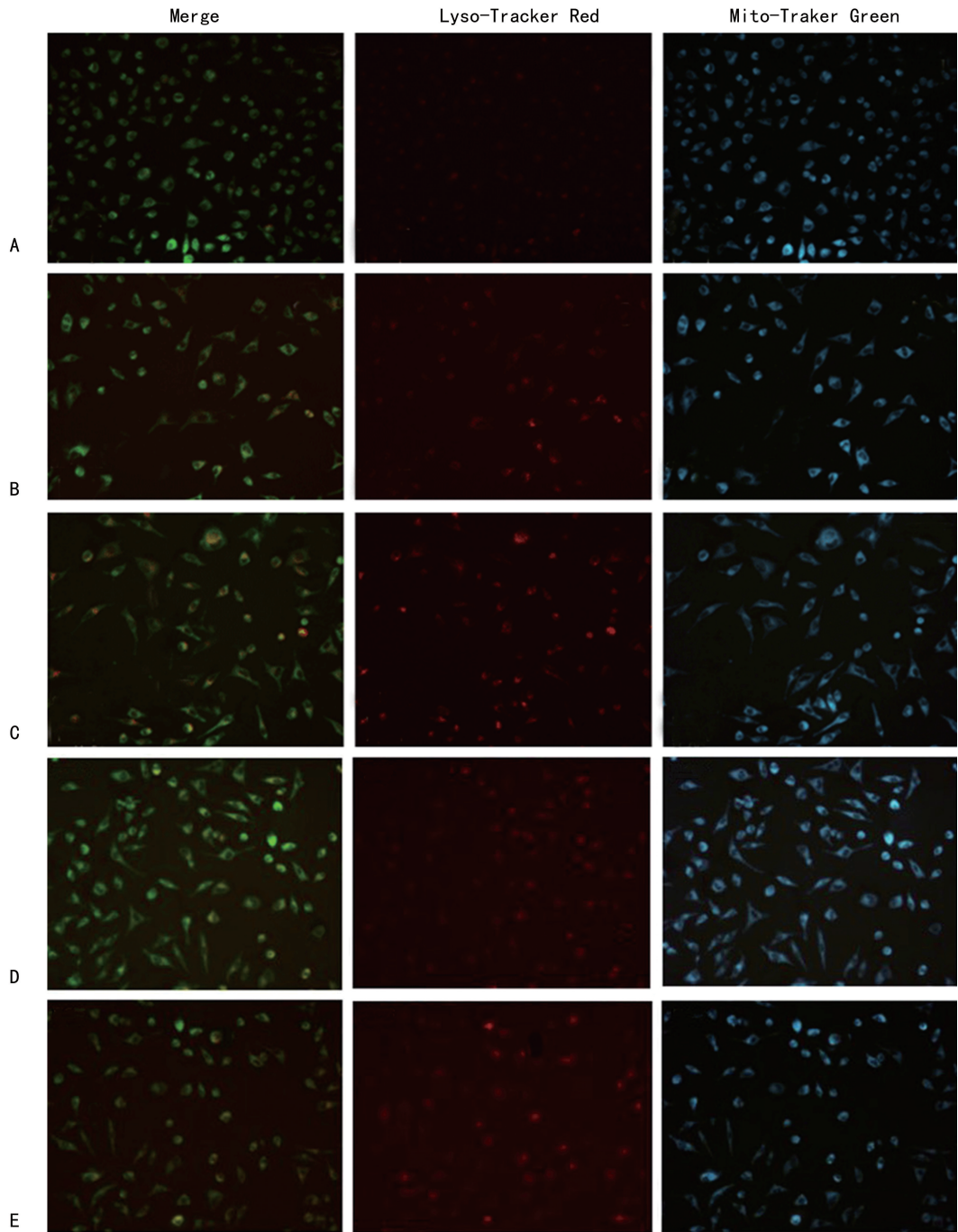
组别	n	细胞凋亡率 (%)	Bcl-2	Bax	Caspase-3
空白组	6	4.51 ± 1.05	1.12 ± 0.15	0.36 ± 0.09	0.35 ± 0.05
I/R 组	6	$12.39 \pm 2.25^*$	$0.39 \pm 0.07^*$	$1.39 \pm 0.25^*$	$1.56 \pm 0.29^*$
I/R+p-NC 组	6	$11.84 \pm 2.19^*$	$0.41 \pm 0.09^*$	$1.43 \pm 0.21^*$	$1.48 \pm 0.25^*$
I/R+p-METTL14 组	6	$7.52 \pm 1.37^\#$	$0.72 \pm 0.07^\#$	$0.67 \pm 0.09^\#$	$0.57 \pm 0.07^\#$
I/R+p-METTL14/si-SIRT6 组	6	$9.68 \pm 1.38^\#\&$	$0.63 \pm 0.06^\#\&$	$0.78 \pm 0.12^\#\&$	$0.73 \pm 0.08^\#\&$
F		21.385	59.884	47.915	56.347
P		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与空白组比较,* $P < 0.05$;与 I/R+p-NC 组比较,^\# $P < 0.05$;与 I/R+p-METTL14 组比较,^\& $P < 0.05$ 。

2.5 METTL14 介导 SIRT6 对 I/R 心肌细胞线粒体及溶酶体水平的影响 免疫荧光双标记法染色结果显示,空白组中线粒体活性较高,溶酶体活性较低;I/R 组和 I/R+p-NC 组细胞中线粒体活性表达明显降低,溶酶体活性明显上调;I/R+p-METTL14 组细胞中的线粒体活性及溶酶体活性均有一定程度上调,但线粒体活性表达较低;I/R+p-METTL14/si-SIRT6 组细胞中线粒体活性降低,溶酶体活性一定程度升高。见图 1。

2.6 METTL14 介导 SIRT6 对 I/R 心肌细胞中自噬

相关蛋白表达的影响 Western blot 检测结果显示:与空白组比较,I/R 组和 I/R+p-NC 组 AC16 细胞 LC3 II / I、Beclin-1、p62 蛋白表达水平降低,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$);与 I/R+p-NC 组比较,I/R+p-METTL14 组、I/R+p-METTL/si-SIRT6 组、AC16 细胞的 LC3 II / I、Beclin-1、p62 蛋白表达水平升高,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$);与 I/R+p-METTL14 组比较,I/R+p-METTL/si-SIRT6 组 LC3 II / I、Beclin-1、p62 蛋白表达水平降低,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。



注:A 为对照组;B 为 I/R 组;C 为 I/R+p-NC 组;D 为 I/R+p-METTL14 组;E 为 I/R+p-METTL14/si-SIRT6 组。

图 1 线粒体/溶酶体免疫荧光双标记法染色检测细胞线粒体自噬水平

表 2 各组 AC16 细胞中 LC3 II / I、Beclin-1、p62 蛋白相对表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	LC3 II / I	Beclin-1	p62
空白组	6	0.78±0.09	0.76±0.11	0.65±0.07
I/R 组	6	0.54±0.05*	0.39±0.05*	0.47±0.09*
I/R+p-NC 组	6	0.52±0.04*	0.41±0.06*	0.48±0.08*
I/R+p-METTL14 组	6	0.96±0.10 [#]	1.17±0.14 [#]	1.09±0.13 [#]
I/R+p-METTL14/si-SIRT6 组	6	0.82±0.08 ^{#&}	0.89±0.12 ^{#&}	0.73±0.09 ^{#&}
F		37.636	62.920	45.737
P		<0.001	<0.001	<0.001

注:与空白组比较,* $P < 0.05$;与 I/R+p-NC 组比较,[#] $P < 0.05$;与 I/R+p-METTL14 组比较,[&] $P < 0.05$ 。

3 讨 论

目前研究结果证实, I/R 损伤是缺血性心肌梗死过程中导致心肌损伤的主要病理机制, 而梗死后血流再通使得 I/R 损伤无法避免^[8-9], 因此, 研究这一病理进程的相关机制是医学工作者们亟待解决的问题之一。随着基础生物学的不断发展, 心肌细胞铁死亡^[10]、铜死亡^[11]、非编码 RNA 异常表达^[12]等与心肌 I/R 损伤的相关机制陆续被报道, 但 I/R 损伤过程的病理机制极为复杂, 涉及多种细胞功能的改变, 而表观遗传学调控的深入研究发现 m6A 甲基化修饰途径可能通过改变心肌 I/R 损伤过程中的关键基因 RNA 的稳定性从而参与心血管疾病发生、发展中^[13]。METTL14 是 writer 酶即甲基化转移酶中的一种, 是催化 m6A 修饰发生的关键调节酶^[14]; SIRT6 在细胞自噬进程中发挥着重要的作用^[15]。本研究基于既往研究提出一个假说, 即 METTL14 通过 m6A 甲基化作用稳定 SIRT6 的 mRNA 并促进心肌细胞的线粒体自噬, 最终改善心肌 I/R 损伤。

为了验证提出的这一假说, 本研究选取人心肌细胞系 AC16 细胞株为研究对象, 以慢病毒载体构建低 METTL14 表达的细胞, MeRIP-qPCR 试验结果显示, si-METTL14/anti-m6A 组的 SIRT6 m6A + 相对富集程度低于 si-NC anti-m6A 组 ($P < 0.05$), 反向说明 METTL14 能够通过 m6A 甲基化作用稳定 SIRT6 的 mRNA 表达。接着为了进一步探究 METTL14 介导 SIRT6 在心肌细胞 I/R 损伤过程中的调控机制, 分别通过 p-METTL14、si-SIRT6 慢病毒转染方式构建了 p-METTL14 组、p-METTL14/si-SIRT6 组细胞, 经过 qPCR 验证, 与对照组 p-METTL14 和 p-NCMETTL14 组、si-NC SIRT6 组相比, p-METTL14 组的 METTL14 表达水平明显升高, p-METTL14/si-SIRT6 组细胞中 SIRT6 表达明显降低, 说明细胞转染构建成功。在此基础上将各组稳定表达的细胞以缺氧 (37 °C、5% CO₂、92% N₂、3% O₂ 中孵育 21 h), 复氧 (37 °C 的常氧环境中培养 3 h) 的方式模拟 I/R 损伤过程, 通过 CCK-8、流式细胞术检测发现, 与未处理的空白组比较, I/R 组与 I/R+p-NC 组细胞的细胞活力及 Bcl-2 蛋白表达水平明显降低, 细胞凋亡率及 Bax、Caspase-3 蛋白表达水平明显升高, 而 I/R+p-METTL14 组细胞的活力及 Bcl-2 蛋白表达水平较 I/R+p-NC 组明显升高, 细胞凋亡率及 Bax、Caspase-3 蛋白表达明显降低, 提示过表达 METTL14 在改善 I/R 引起的心肌细胞损伤中具有积极作用, 而 I/R+p-METTL14/si-SIRT6 组与 I/R+p-METTL14 组比较, 细胞活力、Bcl-2 蛋白表达水平降低, 而细胞凋亡率、Bax、Caspase-3 蛋白表达水平升高, 证实了在改善心肌细胞 I/R 损伤过程中, METTL14 通过 m6A 甲基化稳定 SIRT6 表达抑制心肌细胞的凋亡从而发挥保

护作用。

细胞自噬是机体的正常自我净化过程, 线粒体自噬是指细胞清除线粒体过程。在缺血和再灌注阶段细胞自噬发挥着不同的作用, 在缺血阶段细胞自噬处于过激反应阶段, 而在再灌注阶段则可能出现病理性降低^[16-17], 因此, 激活或促进线粒体自噬有利于改善心肌细胞 I/R 损伤。本研究通过免疫荧光双标记法染色对各组细胞中溶酶体及线粒体的变化进行了观察, 其中 Lyso-Tracker Red 标记溶酶体, Mito-Traker Green 标记线粒体, 结果表明 METTL14 介导 SIRT6 促进线粒体自噬进程。同时对各组 AC16 细胞中调控自噬的蛋白表达进行分析发现, 与空白组比较, I/R 组和 I/R+p-NC 组中 LC3 II/I、Beclin-1、p62 蛋白表达水平均明显降低, 表明 I/R 损伤能够一定程度抑制细胞自噬过程, 而 I/R+p-METTL14 组较 I/R+p-NC 组 LC3 II/I、Beclin-1、p62 蛋白表达水平升高, I/R+p-METTL14/si-SIRT6 组较 I/R+p-METTL14 组 LC3 II/I、Beclin-1、p62 蛋白表达水平降低, 表明过表达 METTL14 可以上调 SIRT6 的表达, 同时激活 I/R 心肌细胞线粒体中的自噬通路进而改善心肌细胞损伤。

综上所述, 本研究初步证实了提出的假说, 即 METTL14 通过 m6A 甲基化作用稳定 SIRT6 的 mRNA, 并促进心肌细胞的线粒体自噬, 最终改善心肌 I/R 损伤, 为心肌 I/R 损伤的诊治及研究提供了新的靶点。但本研究尚存在一定的局限性, 本研究仅进行了体外实验, 还需要进一步体内试验证实本研究的推论。

参考文献

- [1] CUI Q, LIU Z, LI J, et al. Impact of cardiovascular health and genetic risk on coronary artery disease in Chinese adults[J]. *Heart*, 2023, 109(10): 756-762.
- [2] ZHOU M, WANG H, ZENG X, et al. Mortality, morbidity, and risk factors in China and its provinces, 1990 - 2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 [J]. *Lancet*, 2019, 394 (10204): 1145-1158.
- [3] SOARES R, LOSADA D M, JORDANI M C, et al. Ischemia/Reperfusion injury revisited: an overview of the latest pharmacological strategies [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20 (20): 5034.
- [4] ZHANG B, JIANG H, DONG Z, et al. The critical roles of m6A modification in metabolic abnormality and cardiovascular diseases[J]. *Genes Dis*, 2020, 8(6): 746-758.
- [5] PANG P, QU Z, YU S, et al. METTL14 attenuates cardiac ischemia/reperfusion injury by regulating Wnt1/ β -catenin signaling pathway [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 762853.
- [6] 熊永红, 陶洁, 田浩, 等. TBK1 过表达 (下转第 3681 页)

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2024.24.018

茯苓酸调节 IL-6/JAK2/STAT3 信号通路对肺炎支原体肺炎小鼠的治疗作用研究*

赵之寒¹, 刘卓^{2△}, 赵峥², 张亮亮², 靳兆²

河北省邯郸市中心医院西区:1. 胸外科;2. 呼吸内科, 河北邯郸 056000

摘要:目的 分析茯苓酸调节白细胞介素(IL)-6/酪氨酸激酶 2(JAK2)/信号转导和转录激活因子 3(STAT3)信号通路在肺炎支原体肺炎(MPP)小鼠治疗中的作用。方法 将 60 只小鼠按照随机数字表法分为对照(CK)组、模型(Model)组、茯苓酸低剂量组、茯苓酸高剂量组、茯苓酸高剂量+Colivelin(JAK2 激活剂)组、Fedratinib(JAK2 抑制剂)组。采用血气分析仪检测动脉血中氧分压(PaO₂)、二氧化碳分压(PaCO₂),并计算氧合指数(OI);检测肺组织湿/干(W/D)比值;采用酶联免疫吸附试验检测肺组织中肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、IL-10、IL-18 水平;采用苏木精-伊红(HE)染色观察肺组织病理损伤;采用原位末端标记(TUNEL)染色检测肺组织细胞凋亡情况;采用蛋白印迹法检测小鼠肺组织中 B 淋巴细胞瘤-2 关联 X 蛋白(Bax)、B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)、IL-6、磷酸化酪氨酸激酶 2(p-JAK2)/JAK2、磷酸化信号传导子及转录激活子 3(p-STAT3)/STAT3 蛋白表达水平。结果 CK 组小鼠肺组织形态结构正常;与 CK 组比较,Model 组小鼠肺组织结构明显被破坏,动脉血中 PaCO₂、肺组织 W/D 比值、TNF-α 及 IL-18 水平、凋亡率,以及 Bax、IL-6、p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3 蛋白表达水平明显升高,动脉血中 PaO₂、OI,以及肺组织 IL-10 水平、Bcl-2 蛋白表达水平明显降低,差异均有统计学意义(P<0.05);与 Model 组比较,茯苓酸低剂量组、茯苓酸高剂量组和 Fedratinib 组小鼠肺组织形态有所改善,动脉血中 PaCO₂、肺组织 W/D 比值、TNF-α 及 IL-18 水平、凋亡率,以及 Bax、IL-6、p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3 蛋白表达水平明显降低,动脉血中 PaO₂、OI,肺组织 IL-10 水平、Bcl-2 蛋白表达水平明显升高,差异均有统计学意义(P<0.05)。结论 茯苓酸可降低 MPP 小鼠肺组织炎症反应和细胞凋亡,改善肺组织功能,可能与抑制 IL-6/JAK2/STAT3 信号通路有关。

关键词:茯苓酸; IL-6/JAK2/STAT3 信号通路; 肺炎支原体肺炎; B 淋巴细胞瘤-2; 肺组织

中图分类号:R392.1

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2024)24-3675-07

Study on the therapeutic effect of pachymic acid on regulating IL-6/JAK2/STAT3 signaling pathway in rats with mycoplasma pneumoniae pneumonia*

ZHAO Zhihan¹, LIU Zhuo^{2△}, ZHAO Zheng², ZHANG Liangliang², JIN Zhao²

1. Department of Thoracic Surgery; 2. Department of Respiratory Medicine, Western Area of Handan Central Hospital, Handan, Hebei 056000, China

Abstract: Objective To analyze the role of pachymic acid in regulating the interleukin (IL)-6/tyrosine kinase 2 (JAK2)/signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) signaling pathway in the treatment of Mycoplasma pneumoniae pneumonia (MPP) mice. **Methods** Sixty mice were randomly divided into control (CK) group, model group, low-dose pachymic acid group, high-dose pachymic acid group, high-dose pachymic acid+Colivelin (JAK2 activator) group, and Fedratinib (JAK2 inhibitor) group according to a random number table. Blood gas analyzer was used to detect in arterial blood partial pressure of oxygen (PaO₂) and partial pressure of carbon dioxide (PaCO₂) and calculates oxygenation index (OI). The wet/dry (W/D) ratio of lung tissue was detected. Enzyme linked immunosorbent assay was used to detect the levels of tumor necrosis factor-α (TNF-α), IL-10 and IL-18 in lung tissue. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe pathological damage in lung tissue. Apoptosis in lung tissue cells was detected using in situ end labeling (TUNEL) staining. Western blot was used to detect the protein expression levels of Bax, Bcl-2, IL-6, p-JAK2/JAK2, p-STAT3/STAT3 in mouse lung tissue. **Results** The lung tissue morphology and structure of the CK group mice were normal. Compared with the CK group, the lung tissue structure of the model group mice was significantly disrupted, and the levels of PaCO₂ in arterial blood, lung tissue W/D ratio, TNF-α, IL-18, apoptosis

* 基金项目:河北省医学科学研究课题(20220022)。

作者简介:赵之寒,女,主治医师,主要从事肺部感染方向的研究。△ 通信作者, E-mail:15333303295@163.com。