

张昕怡,郭敏,高慧,等. METTL3 介导的 m6A 修饰对 ox-LDL 诱导的巨噬细胞焦亡的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(8): 38-46.

Zhang XY, Guo M, Gao H, et al. Effects of methyltransferase-like 3-mediated N6 methyladenosine modification on oxidized low-density lipoprotein-induced macrophage pyroptosis [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(8): 38-46.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.08.006

METTL3 介导的 m6A 修饰对 ox-LDL 诱导的巨噬细胞焦亡的影响

张昕怡¹, 郭 敏², 高 慧³, 刘 宇^{1*}

(1.山西医科大学基础医学院药理学教研室,山西 晋中 030619;2.山西医科大学第一医院心内科,太原 030000;
3.山西医科大学第一临床医学院,太原 030000)

【摘要】 目的 探究 METTL3(methyltransferase like 3,METTL3)介导的 m6A(N6 甲基腺苷)修饰对氧化低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein,ox-LDL)诱导的小鼠单核巨噬细胞白血病细胞(RAW264.7)焦亡的影响。**方法** ox-LDL(50 μg/mL)诱导 RAW264.7 细胞 24 h 后,对 METTL3 进行敲低或过表达,检测培养细胞 RNA m6A 甲基化水平,荧光定量 PCR 和 Western blot 法检测 METTL3 和细胞焦亡相关基因 NLRP3、NF-κB p65、GSDMD-N、Caspase-1 mRNA 和蛋白表达水平,乳酸脱氢酶(LDH)细胞毒性检测细胞死亡率,酶联免疫吸附法检测炎症细胞因子 IL-1β、IL-18、IL-6、TNF-α 和 IL-10 的含量。**结果** ox-LDL 能够促进 RAW264.7 巨噬细胞 METTL3 的表达和 RNA m6A 甲基化水平,同时也能促进炎症因子 IL-1β、IL-18、IL-6、TNF-α 的分泌($P<0.05$),降低 IL-10($P<0.05$)的表达。在 ox-LDL 诱导基础上,METTL3 过表达后,RNA m6A 甲基化水平升高,NLRP3、NF-κB p65、GSDMD-N、Caspase-1 表达显著增加,促炎细胞因子 IL-6、TNF-α、IL-1β、IL-18 水平升高,抗炎细胞因子 IL-10 水平降低,LDH 释放增加,METTL3 敲低后结果相反。**结论** METTL3 介导的 m6A 修饰能够显著促进 ox-LDL 诱导的巨噬细胞焦亡和炎症反应。

【关键词】 METTL3;巨噬细胞焦亡;炎症反应

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 08-0038-09

Effects of methyltransferase-like 3-mediated N6 methyladenosine modification on oxidized low-density lipoprotein-induced macrophage pyroptosis

ZHANG Xinyi¹, GUO Min², GAO Hui³, LIU Yu^{1*}

(1. Department of Pharmacology, School of Basic Medicine, Shanxi Medical University, Jinzhong 030619, China.
2. Department of Cardiology, the First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030000.
3. the First Clinical Medical School of Shanxi Medical University, Taiyuan 030000)

【 Abstract 】 Objective To investigate the effect of methyltransferase-like 3 (METTL3)-mediated N6 methyladenosine (m6A) modification on oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL)-induced mouse monocyte-macrophage leukemic cell (RAW264.7) pyroptosis. **Methods** RAW264.7 cells were treated with 50 μg/mL ox-LDL for 24 h, and then METTL3 overexpression and knockdown experiments were conducted, and RNA m6A methylation levels were

[基金项目] 国家自然科学基金(82000426)。

[作者简介] 张昕怡(1995—),女,在读硕士研究生,研究方向:心血管药理学。E-mail:1121897504@qq.com

[通信作者] 刘宇(1977—),女,教授,硕士生导师,研究方向:心血管药理学。E-mail:hitec@126.com

analyzed. Fluorescence quantitative PCR and Western blot were used to measure mRNA and protein expression levels of METTL3, NLRP3, NF- κ B p65, GSDMD-N and Caspase-1. Lactate dehydrogenase (LDH) cytotoxicity was used to detect LDH release. Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) to measure the levels of inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-10 and IL-18. **Results** After ox-LDL stimulation, METTL3 expression and the RNA m6A methylation level were upregulated. Secreted IL-1 β , IL-6, IL-18 and TNF- α were significantly increased, while IL-10 expression was decreased after ox-LDL stimulation of RAW264.7 macrophages ($P < 0.05$). On the basis of ox-LDL induction, after METTL3 overexpression, the RNA m6A methylation level was increased, mRNA and protein expression of NLRP3, NF- κ B p65, GSDMD-N and Caspase-1 were significantly increased, the levels of proinflammatory cytokines IL-6, TNF- α , IL-1 β and IL-18 were increased, the level of anti-inflammatory cytokine IL-10 was decreased, and LDH release was increased. METTL3 knockdown the showed the opposite trends. **Conclusions** METTL3-mediated m6A modification promotes ox-LDL-induced macrophage pyroptosis and inflammatory responses.

【Keywords】 METTL3; macrophage pyroptosis; inflammatory response

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一种以脂质和纤维积聚于大动脉并引起一系列炎症反应的慢性进行性疾病,在 AS 起始阶段,低密度脂蛋白积聚后迁移到内膜氧化,使单核细胞的黏附增加,随后单核细胞分化为巨噬细胞发挥免疫反应,巨噬细胞摄取被清道夫受体识别的 ox-LDL 形成泡沫细胞从而介导一系列炎症反应^[1-2],并且巨噬细胞吞噬 ox-LDL 后可以激活 NLRP3 炎症小体活化 Caspase-1 诱导巨噬细胞的焦亡,最终导致坏死核心的形成和斑块破裂^[3-4]。巨噬细胞焦亡作为一种新的细胞死亡方式在 AS 血管炎症反应中发挥重要的作用^[5-6]。

m6A 甲基化(N6-methyladenosine)修饰是 RNA 上最丰富的一种修饰,存在于大多数真核生物和一些病毒的 mRNA 中。m6A 甲基化是指 RNA 分子在 RNA 甲基化转移酶复合体(包括 METTL3/14、WTAP 和 KIAA1429)的作用下将甲基选择性地添加到特定腺嘌呤碱基上的过程。早年研究发现 m6A 修饰异常可促进癌症的发生^[7],后期有研究证实 m6A 修饰中的甲基化转移酶 METTL3 能够影响心力衰竭进程^[8],以及通过影响心肌细胞自噬和凋亡影响缺血性心脏病的发生发展^[9]。近年来关于 METTL3 以及 m6A 修饰在 AS 中的作用引起广泛关注^[10]。有研究表明, METTL3 介导的 m6A 修饰可以通过诱导内皮细胞的炎症反应^[11]、促进 M1 巨噬细胞的极化^[12]、促进 ox-LDL 介导的炎症反应^[13]、血管生成^[14]等方面来促进 AS 的发生,然而 METTL3 介导的 m6A 修饰对 AS 发生发展中巨噬细胞焦亡中如何作用还未明确,这或许可以作为一个治疗动脉粥样硬化的新策略。本文通过在 ox-LDL 诱导巨噬细胞的体外研究上进行 METTL3 的过表达和敲低实验,探讨 METTL3 介导的 m6A 甲基化修饰对于巨噬

细胞焦亡和炎症反应的影响。

1 材料和方法

1.1 细胞

RAW264.7 细胞购自上海启达生物科技有限公司(CD0168)。

1.2 主要试剂与仪器

ox-LDL 购自北京协生生物科技有限公司;蛋白酶抑制剂 PMSF (AR1178)、广谱磷酸酶抑制剂 (AR1183)、SDS-PAGE 上样缓冲液 (AR1112-10)、BCA 蛋白定量试剂盒 (AR1110)、RPMI 1640 培养液 (PYG0006)购自武汉博士德生物科技有限公司;乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒 (C0017)购自上海碧云天生物科技有限公司;嘌呤霉素 (MA0318)、0.25%胰酶消化液含 EDTA (MA0232)均购自大连美仑生物;胎牛血清购自 GIBCO 生物科技公司;METTL3 敲低和过表达慢病毒载体交由上海吉玛生物科技公司进行构建;NLRP3 (ab263899)、NF- κ B p65 (ab16502)、METTL3 (ab195352)一抗购自 Abcam;GSDMD Antibody-N-terminal (DF13758)、Cleaved Caspase-1 p10 (AF4022)一抗购自 Affinity 生物科技公司;羊抗兔 IgG-HRP (ab6721)购自 Abcam; β -actin (AP0060)购自 Bioworld;M5 Prestained Protein Ladder (10-180 kDa)三色预染 (MF212-01)购自北京聚合美生物有限公司;组织/细胞 RNA 快速提取试剂盒 (9108)、去基因组与逆转录一管化一代预混液 (RR047)、TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (RR820)购自 TaKaRa 生物有限公司;小鼠 IL-1 β 、IL-6、IL-10、IL-18、TNF- α ELISA 试剂盒购自 Bender Medsystems 生物科技公司;m6A 甲基化检测试剂盒 (P-9005)购自 Epigentek 生物科技

公司;Superkine 超敏型 ECL 发光液(BMU102-CN)购自武汉亚克因生物科技有限公司;EZ Cell Transfection Reagent(AC04L091)购自上海李记生物科技有限公司。

多功能酶标仪(SMATB)购自美国博腾仪器有限公司;C1000 Touch 普通 PCR 仪、CFX96 荧光定量 PCR 仪购自美国 Thermo 公司;凝胶成像仪(ChemiDoc, XRS+)购自美国 Bio Rad 公司;荧光显微镜 DM2500 购自德国 LEIKA 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞的培养处理

将冻存的 RAW264.7 细胞从液氮取出后 37℃ 水浴复苏,用含 10%胎牛血清的 RPMI1640 重悬,放置于 37℃,5%的 CO₂ 的孵箱中培养直至细胞密度达到 70%~80%后进行传代培养,将 RAW264.7 细胞接种于 6 孔板中进行培养,接种密度达到 70%~80%后进行后续试验。

1.3.2 细胞转染及其稳定细胞株的建立

METTL3 敲低的慢病毒包装、过表达质粒载体以及空载质粒载体的构建交由上海吉玛生物有限公司进行构建。构建 LV3-shNC、LV3-METTL3、OE-control、OE-METTL3 载体。

LV3-METTL3 siRNA 慢病毒感染:将状态良好的 RAW 264.7 细胞接种于 24 孔板中,使细胞密度为 2×10^4 /孔,培养过夜,培养液不含抗生素,使细胞在转染时的密度大约在 80%。实验步骤按照转染手册操作说明进行,然后选择具有抗性的嘌呤霉素最小致死浓度,选取能够杀死 90%以上细胞的最低浓度 8 μ g/mL 进行后续的实验,最终得到能够稳定遗传的 LV3-shNC 和 LV3-METTL3 siRNA 细胞株,后续进行 RT-qPCR 和 Western blot 检测感染细胞的表达分析。

METTL3 过表达质粒转染:

(1)从质粒中扩增出 cDNA 编码 METTL3 (NCBI 参考序列 NM_019721.2),导入 pcDNA3.1 载体构建过表达载体 METTL3 (OE-METTL3)。本实验转染所用试剂为 EZ Cell Transfection Reagent。转染前 24 h 将细胞铺板于 6 孔板中,培养液不含抗生素,使细胞在转染时的密度大约在 80%。

(2)将细胞分为对照 (OE-control) 组和过表达 METTL3 (OE-METTL3) 组,准备 4 个高压灭菌的 1.5 mL 的 EP 管,每个孔用两个高温高压灭菌的 EP 管,一个管装 125 μ L 含有 3 μ g 过表达质粒或空载的无

血清 RPMI1640 培养基,另外一管装有 125 μ L 无血清 RPMI1640 培养基含有 9 μ L EZ Trans 转染试剂,轻轻混匀。然后将装有稀释好的 EZ Trans 转染试剂尽快全部加入到已稀释好的质粒 DNA 中的 EP 管中,轻轻混匀,室温放置 15 min,以形成 EZ Trans-DNA 复合物,然后将上述 EZ Trans-DNA 转染复合物均匀滴入到含细胞的培养皿中。轻轻晃动培养皿或轻微振荡,让 EZ Trans-DNA 复合物分散均匀,将细胞放入在 37℃,5% CO₂ 培养箱培养 18 h,更换含 EZ Trans-DNA 复合物的培养液,继续培养 48 h 进行细胞 RNA 和蛋白的提取。

1.3.3 实验分组

将细胞分为 Control 组(对照组)、ox-LDL 组、OE-control 组(METTL3 过表达对照组)、LV3-shNC 组(METTL3 敲低阴性对照组)、LV3-METTL3 组(METTL3 敲低组)和 OE-METTL3 (METTL3 过表达组),用 ox-LDL (50 μ g/mL) 刺激 24 h,收集细胞及其培养液上清。

1.3.4 m6A 甲基化检测

将细胞以 5×10^5 /孔接种于 6 孔板,各组用 ox-LDL 50 μ g/mL 诱导 24 h 后按照 RNA 提取试剂说明提取细胞总 RNA,控制总 RNA 量 200 ng,然后按照 EpiQuik™ m6A RNA 甲基化试剂说明进行 m6A 相对定量检测,按照以下公式对总 RNA 中 m6A 的百分比进行简单计算:

$$m6A\% = \{ [(Sample\ OD-NCOD) \div S] / (PCOD-NCOD) \div P \} \times 100\%$$

S 是输入样本 RNA 的量,单位为 ng;P 是输入阳性对照的量,单位为 ng。

1.3.5 LDH 检测

乳酸脱氢酶的释放通常被用作细胞毒性检测和细胞死亡的定量分析。

乳酸脱转染后的各组 RAW264.7 细胞提前 24 h 接种于 96 孔板中,细胞密度约为 5×10^3 /孔,待细胞密度为 80%~90%时,更换为不含血清的新鲜培养基,按照试剂说明操作,用酶标仪检测各组细胞在 450 nm 的吸光度值,细胞毒性或死亡率(%) = $100 \times (\text{处理样品吸光度值} - \text{样品对照孔吸光度值}) / (\text{最大酶活性的吸光度值} - \text{样品对照孔吸光度值})$ 。

1.3.6 RT-qPCR 检测

按照 RNA 提取试剂说明提取细胞总 RNA,取 500 ng RNA 进行逆转录,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)

作为内参,进行定量 PCR,引物序列由上海生工生物工程股份有限公司合成,如表 1,计算 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 评估 mRNA 的相对表达水平。

1.3.7 Western blot 检测

将转染后的细胞以 5×10^5 /孔接种于 6 孔板,继续培养 24 h,同时以 ox-LDL 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 刺激 24 h,随后冰上裂解细胞提取蛋白,用 BCA 蛋白浓度检测试剂盒检测蛋白浓度。取 30~40 μg 总蛋白,使用 10%的 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白,转膜、封闭、漂洗后,使用抗体稀释溶液按比例(1:1000)稀释 NLRP3、GSDMD-N、NF- κB p65、Caspase-1 p10 和内参抗体(1:5000),在抗体孵育盒中加入相应一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,然后用对应种属的二抗(1:5000)稀释后室温孵育 1 h,用 1 $\times$ TBST 漂洗 3 次,ECL 发光液进行显影,最后用 Image Lab 进行条带分析。

1.3.8 ELISA 检测炎症因子 IL-1 β 、IL-6、IL-10、IL-

18 和 TNF- α 水平

收集各组转染细胞培养液的上清,实验步骤按照试剂说明操作,在酶标仪 450 nm 波长测定各孔吸光度,按照标准品的蛋白浓度与对应的吸光度值绘制标准曲线,代入公式计算待测样本的蛋白浓度,依次测定 IL-1 β 、IL-6、IL-10、TNF- α 、IL-18 的含量。

1.4 统计学方法

数据采用 SPSS 26.0 进行分析,用 GraphPad Prism 8 软件进行作图,组间比较采用 t 检验,所属资料服从正态分布,数据用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)来表示, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

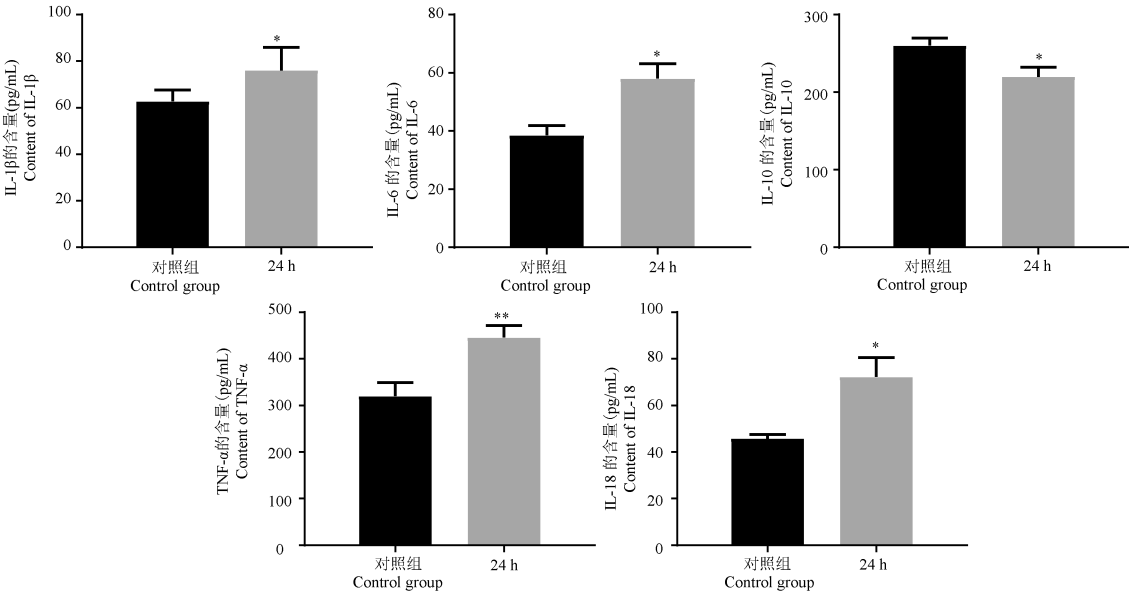
2 结果

2.1 ox-LDL 能够促进巨噬细胞炎症反应

ELISA 法检测 ox-LDL 诱导的巨噬细胞上清中炎症因子水平(图 1),结果表明,与 Control 组相比,

表 1 RT-qPCR 引物序列
Table 1 RT-qPCR Primer sequence

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence	
NLRP3 (m)	F:5'-ATTACCGCCCGAGAAAGG-3'	R:5'-TCGCAGCAAAGATCCACACAG-3'
Caspase-1 (m)	F:5'-CTTGGAGACATCCTGTCAGG-3'	R:5'-AGTCACAAGACCAGGCATATTCT-3'
GAPDH (m)	F:5'-AAGGTCGGAGTCAACGGATTT-3'	R:5'-AGATGATGACCCTTTTGGCTC-3'
GSDMD-N	F:5'-TGCCTGTGACTCAGAAGACC4-3'	R:5'-ATAAAGCTCCAGGCAGCGTA-3'
NF- κB p65	F:5'-GGATGGCTACTATGAGGCTGACC-3'	R:5'-GTCTGGATTTCGCTGGCTAATGG-3'



注:ELISA 检测 ox-LDL 对巨噬细胞炎症因子的影响。与 Control 组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 1 ox-LDL 能够促进巨噬细胞对炎症性细胞因子的释放 ($n=6$, pg/mL)

Note. Effects of ox-LDL on macrophage inflammatory factors were detected by ELISA. Compared with Control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 1 ox-LDL promotes the release of inflammatory cytokines from macrophages

ox-LDL 诱导的巨噬细胞中促炎细胞因子 IL-6、IL-1 β 、IL-18 ($P<0.05$) 和 TNF- α ($P<0.01$) 水平升高,而抗炎细胞因子 IL-10 水平降低 ($P<0.05$),进而表明 ox-LDL 与巨噬细胞的相互作用促进炎症反应。

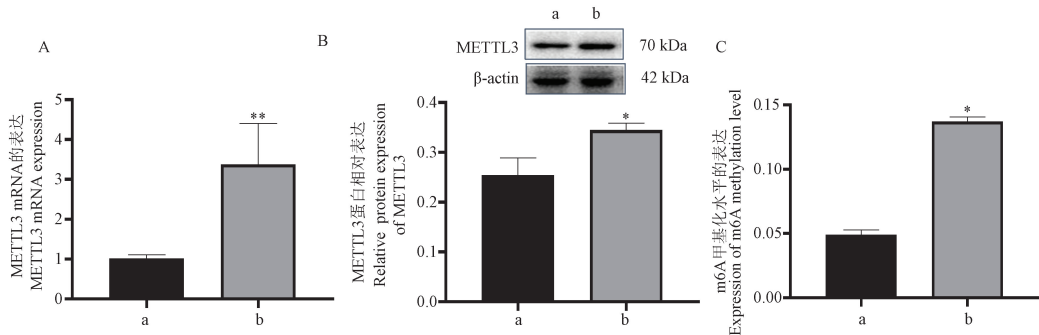
2.2 ox-LDL 能够促进 METTL3 表达及 RNA m6A 甲基化水平

RT-qPCR (图 2A)、Western blot (图 2B) 和 RNA m6A 甲基化水平检测 (图 2C) 检测 ox-LDL 诱导后

METTL3 的表达和 RNA m6A 甲基化水平。结果表明,与 Control 组相比,ox-LDL 诱导后 METTL3 的 mRNA 水平和蛋白水平增加, RNA m6A 甲基化水平也随之增加 ($P<0.05$),表明 ox-LDL 可通过影响 METTL3 的表达进而影响 RNA m6A 甲基化水平。

2.3 转染后 RAW264.7 巨噬细胞中 METTL3 表达检测

RT-qPCR (图 3A、3B) 和 Western blot (图 3C、

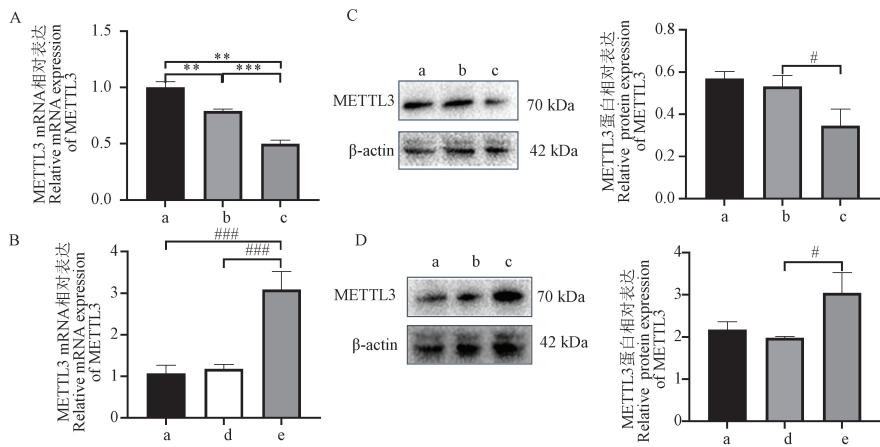


注:A:ox-LDL 诱导对 RAW264.7 细胞 METTL3 mRNA 水平的影响;B:ox-LDL 诱导对 RAW264.7 细胞 METTL3 蛋白水平的影响;C:ox-LDL 诱导对 RAW264.7 细胞 m6A 甲基化水平的影响。a:对照组;b:ox-LDL 组。与 Control 组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 2 ox-LDL 能够促进 METTL3 表达及 m6A 甲基化水平 ($n=3$)

Note. A, Effects of ox-LDL induction on METTL3 mRNA levels in RAW264.7 cells. B, Effects of ox-LDL induction on METTL3 protein levels in RAW264.7 cells. C, Effects of ox-LDL induction on m6A methylation levels in RAW264.7 cells. a, Control group. b, ox-LDL group. Compared with Control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 2 ox-LDL can promote METTL3 expression and m6A methylation level



注:A:转染 METTL3 慢病毒后,RAW264.7 细胞中 METTL3 mRNA 的表达;B:转染 METTL3 过表达质粒后,RAW264.7 细胞中 METTL3 mRNA 的表达;C:转染 METTL3 慢病毒后,RAW264.7 细胞中 METTL3 蛋白的表达;D:转染 METTL3 过表达质粒后,RAW264.7 细胞中 METTL3 蛋白的表达。a:对照组;b:LV3-shNC 组;c:LV3-METTL3 组;d:OE-control 组;e:OE-METTL3 组。与 Control 组相比, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。与 LV3-shNC 组和 OE-control 组相比, # $P<0.05$, ### $P<0.001$ 。

图 3 转染后 RAW264.7 细胞中 METTL3 mRNA 和蛋白表达检测 ($n=3$)

Note. A, Expression of METTL3 mRNA in RAW264.7 cells after transfection with METTL3 lentivirus. B, Expression of METTL3 mRNA in RAW264.7 cells after transfection with METTL3 overexpressing plasmid. C, Expression of METTL3 protein in RAW264.7 cells after transfection with METTL3 lentivirus. D, Expression of METTL3 protein in RAW264.7 cells after transfection with METTL3 overexpressing plasmid. a, Control group. b, LV3-shNC group. c, LV3-METTL3 group. d, OE-control group. e, OE-METTL3 group. Compared with Control group, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. Compared with LV3-shNC group and OE-control group, # $P<0.05$, ### $P<0.001$.

Figure 3 Detection of METTL3 mRNA and protein expression in RAW264.7 cells after transfection

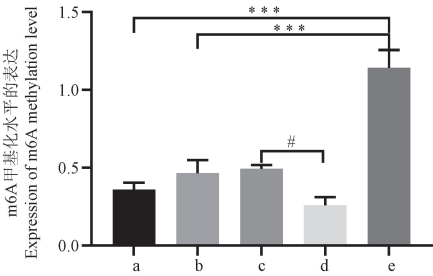
3D) 检测 METTL3 在细胞中蛋白和 mRNA 水平, 结果表明, 与 Control 组相比, LV3-shNC 组 mRNA 水平降低, LV3-shNC 组蛋白水平及 OE-control 组的 mRNA 和蛋白水平无明显差异, 同 Control 组及 LV3-shNC 组相比, LV3-METTL3 组的表达降低 ($P < 0.05$)。同 Control 组及 OE-control 组相比, OE-METTL3 组的表达升高 ($P < 0.05$)。

2.4 METTL3 对于 ox-LDL 诱导的巨噬细胞中的 RNA m6A 含量的影响

m6A 甲基化检测结果表明(图 4), 与 ox-LDL 组相比, LV3-shNC 组, OE-control 组的 RNA m6A 含量无差异; 与 ox-LDL 组及 OE-control 组相比, OE-METTL3 组的 RNA m6A 含量增加 ($P < 0.001$); 与 LV3-shNC 组相比, LV3-METTL3 组的 RNA m6A 含量降低 ($P < 0.05$), 进一步证明可通过干预 METTL3 的表达影响 m6A 甲基化水平。

2.5 在 ox-LDL 诱导 RAW264.7 巨噬细胞中 METTL3 促进细胞焦亡

RT-qPCR 结果表明(图 5A), METTL3 的敲低或

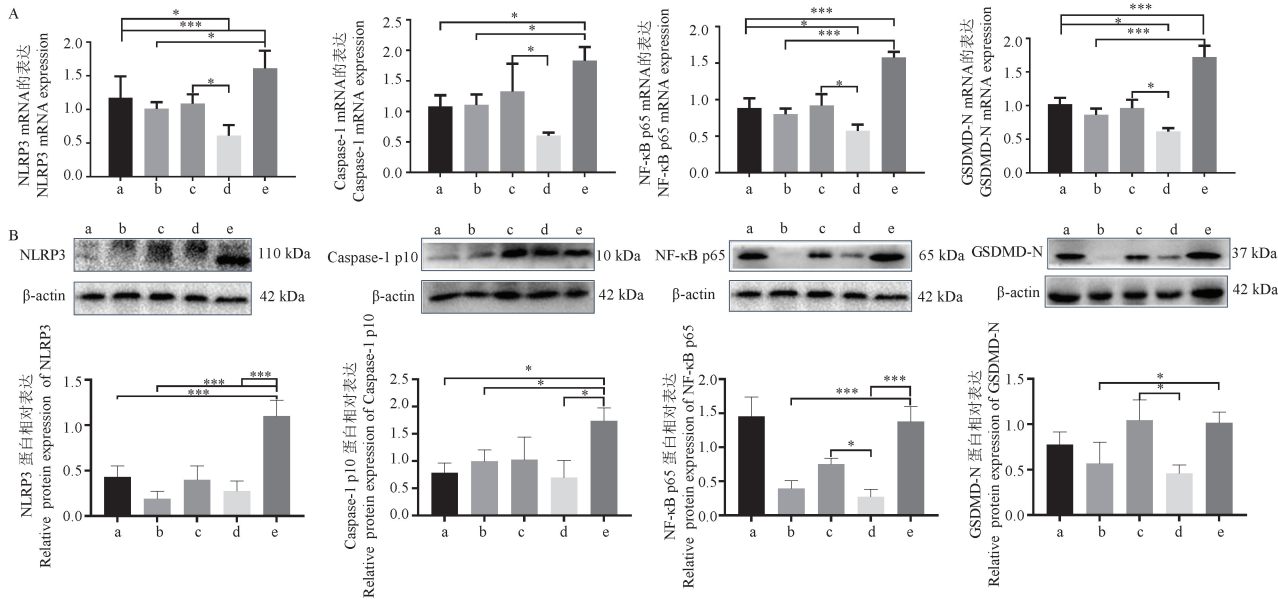


注: m6A 甲基化水平的检测, a: ox-LDL 组; b: OE-control 组; c: LV3-shNC 组; d: LV3-METTL3 组; e: OE-METTL3 组。与 LV3-shNC 组相比, # $P < 0.05$; 与 ox-LDL 组和 OE-control 组相比, *** $P < 0.001$ 。

图 4 METTL3 对于 ox-LDL 诱导的巨噬细胞中的 RNA m6A 含量的影响 ($n = 6$)

Note. m6A methylation level was detected. Compared with LV3-shNC group, * $P < 0.05$. a, ox-LDL group. b, OE-control group. c, LV3-shNC group. d, LV3-METTL3 group. e, OE-METTL3 group. Compared with ox-LDL group and OE-control group, *** $P < 0.001$.

Figure 4 Effect of METTL3 on the content of RNA m6A in ox-LDL induced macrophages



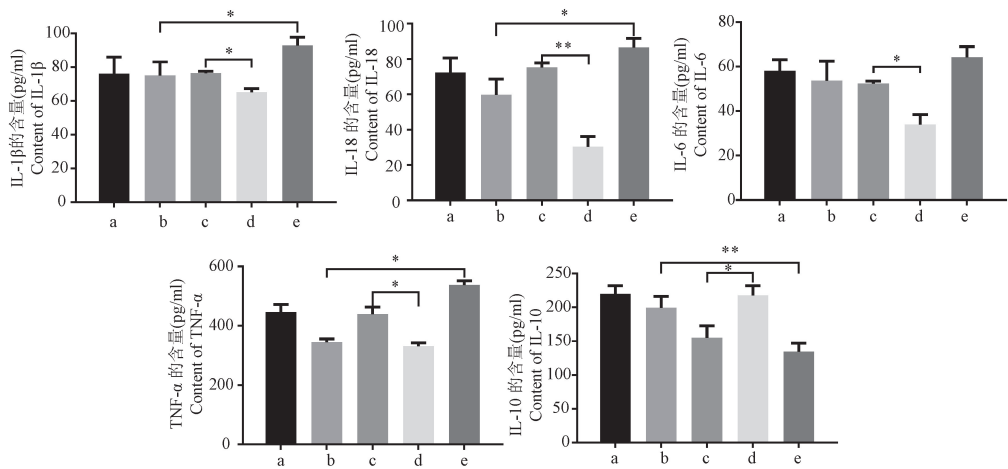
注: A: RT-qPCR 检测不同组焦亡相关基因 NLRP3、Caspase-1、GSDMD-N、NF-κB p65 mRNA 水平; B: Western blot 检测不同组焦亡相关基因 NLRP3、Caspase-1 p10、GSDMD-N、NF-κB p65 蛋白水平。a: ox-LDL 组; b: OE-control 组; c: LV3-shNC 组; d: LV3-METTL3 组; e: OE-METTL3 组。与 ox-LDL 组、OE-control 组、LV3-shNC 组相比, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ 。

图 5 METTL3 的敲低或过表达抑制或者促进焦亡相关基因 NLRP3、Caspase-1、GSDMD-N、NF-κB p65 mRNA 水平 ($n = 3$) 及相关蛋白 NLRP3、Caspase-1 p10、GSDMD-N、NF-κB p65 表达 ($n = 4$)

Note. A, The mRNA levels of NLRP3, Caspase-1, GSDMD-N, NF-κB p65 by RT-qPCR in different groups. B, Western blot was used to detect NLRP3, Caspase-1 p10, GSDMD-N, NF-κB p65 protein levels in different groups. a, ox-LDL group. b, OE-control group. c, LV3-shNC group. d, LV3-METTL3 group. e, OE-METTL3 group. Compared with ox-LDL group, OE-control group and LV3-shNC group, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

Figure 5 Knockdown or overexpression of METTL3 inhibits or promotes mRNA levels of related genes NLRP3, Caspase-1, GSDMD-N, NF-κB p65 and the protein expression of NLRP3, Caspase-1 p10, GSDMD-N, NF-κB p65

过表达能够抑制或促进 ox-LDL 诱导的巨噬细胞 NLRP3、GSDMD-N、NF- κ B p65、Caspase-1 mRNA 的表达 ($P<0.05$)。Western blot 检测结果显示 (图 5B) METTL3 的过表达能显著增强焦亡相关蛋白 NLRP3、NF- κ B p65、Caspase-1 p10、GSDMD-N 的表达 ($P<0.05$)。而 METTL3 的敲低能减弱焦亡相关蛋白 GSDMD-N、NF- κ B p65 的表达 ($P<0.05$)，结果表明 METTL3 可以促进 ox-LDL 诱导的巨噬细胞的焦亡。



注:METTL3 对 ox-LDL 诱导的巨噬细胞炎症因子的影响。a: ox-LDL 组; b: OE-control 组; c: LV3-shNC 组; d: LV3-METTL3 组; e: OE-METTL3 组。与 OE-control 组、LV3-shNC 组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 6 METTL3 在 ox-LDL 诱导的巨噬细胞中促进炎症因子的表达 ($n=3$)

Note. Effects of METTL3 on ox-LDL-induced macrophage inflammatory cytokines. a, ox-LDL group. b, OE-control group. c, LV3-shNC group. d, LV3-METTL3 group. e, OE-METTL3 group. Compared with OE-control group, and LV3-shNC group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 6 METTL3 promotes the expression of inflammatory factors in ox-LDL-induced macrophages

2.7 METTL3 促进 ox-LDL 诱导的巨噬细胞死亡

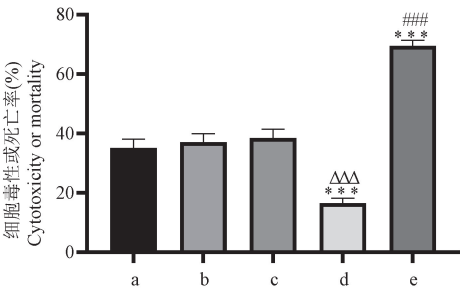
LDH 的释放检测 (图 7) 结果显示,与 ox-LDL 组相比,LV3-shNC 组、OE-control 组 LDH 的释放无差异,LV3-METTL3 组 LDH 的释放减少 ($P<0.001$), OE-METTL3 组 LDH 的释放增加 ($P<0.001$)。与 OE-control 组相比,OE-METTL3 组的 LDH 的释放显著增加 ($P<0.001$);与 LV3-shNC 组相比,LV3-METTL3 组 LDH 的释放显著减少 ($P<0.001$)。

3 讨论

AS 是一种慢性进行性炎症性疾病,作为内源性危险信号的 ox-LDL 与具有吞噬、分泌和摄取功能的巨噬细胞的相互作用及其免疫炎症反应是动脉粥样硬化发生的启动事件,巨噬细胞表面的模式识别受体清道夫受体 A (scavenger receptor-A, SR-A)、CD36、NOD 样受体 (NOD-like receptor, NLR) 以及 Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR) 通过吞噬 ox-

2.6 在 ox-LDL 诱导的巨噬细胞中 METTL3 促进炎症因子的表达

ELISA 检测各组细胞上清中炎症因子 (图 6),结果表明 METTL3 敲低抑制促炎因子 IL-1 β 、IL-18、IL-6 和 TNF- α 的水平,促进抗炎因子 IL-10 的释放 ($P<0.05$)。而 METTL3 过表达可显著促进促炎因子 IL-1 β 、IL-18、TNF- α 的释放,抑制抗炎因子 IL-10 的释放 ($P<0.05$),验证了 METTL3 能促进焦亡相关炎症因子及其促炎因子的表达。



注:METTL3 对 ox-LDL 诱导的巨噬细胞 LDH 释放的影响。a: ox-LDL 组; b: OE-control 组; c: LV3-shNC 组; d: LV3-METTL3 组; e: OE-METTL3 组。同 ox-LDL 组相比, *** $P<0.001$;同 OE-control 组相比, #### $P<0.001$;同 LV3-shNC 组相比, ΔΔΔ $P<0.001$ 。

图 7 METTL3 促进 ox-LDL 诱导的巨噬细胞死亡 ($n=6$)

Note. Effect of METTL3 on LDH release in ox-LDL-induced macrophages. a, ox-LDL group. b, OE-control group. c, LV3-shNC group. d, LV3-METTL3 group. e, OE-METTL3 group. Compared with ox-LDL group, *** $P<0.001$. Compared with OE-control group, #### $P<0.001$. Compared with LV3-shNC group, ΔΔΔ $P<0.001$.

Figure 7 METTL3 promoted ox-LDL-induced macrophage death

LDL 并与其相互作用形成泡沫细胞,促进动脉粥样硬化斑块形成^[15]及其巨噬细胞的焦亡^[16]。研究表明 ox-LDL 能诱导 NLRP3 炎症小体介导的巨噬细胞的焦亡及其上调 NF- κ B 信号激活标志的 p-NF κ B 和 p-I κ B 蛋白水平^[17]。ox-LDL 能以剂量和时间依赖性的方式促进 Caspase-1 的激活且促进巨噬细胞的裂解和焦亡,在此过程中 Caspase-1 活化后 NLRP3 炎症小体转录上调及炎症因子表达增加^[18]。巨噬细胞焦亡作为一种炎症性的细胞死亡方式,可在炎症反应中通过 NLRP3 炎症小体的激活导致 Caspase-1 活化,自动剪切休眠的 pro-Caspase-1 激活为具有两个 10 和 20 kDa 亚基的 p10/p20 的酶活性异二聚体^[19],切割 GSDMD,促使 N 端成孔结构域(PFD)与 C 端阻遏结构域分离,形成具有活性的 GSDMD-N 孔膜,释放 IL-1 β 和 IL-18,促进炎症和细胞因子释放^[20-22]。此外,对于 IL-1 β 和 IL-18 的释放除了以上方式,还可通过激活 NF- κ B 信号转录促进其分泌^[17]。同时研究表明,炎症小体介导的巨噬细胞的焦亡在 AS 过程中发挥重要作用,巨噬细胞焦亡在 AS 中能够促进斑块的早期形成及晚期的不稳定及破裂,我们早期研究证实 IRF-1 能通过促进巨噬细胞焦亡参与急性冠脉综合征的发生发展^[23]。另外,在动物模型上聚焦于焦亡关键蛋白 NLRP3 的缺陷能够减弱巨噬细胞焦亡及 AS 斑块不稳定性和发展进程^[24]。

m6A 修饰作为一种普遍的甲基化修饰在心血管方面的研究越来越普遍,已有研究表明在 AS 斑块中 m6A 甲基化修饰水平升高,METTL3 作为调控 m6A 修饰的关键催化酶在 ox-LDL 诱导 HUVEC(人脐静脉内皮细胞)中影响血管增殖、迁移和内皮功能障碍^[14],在巨噬细胞中能影响表型变化和炎症反应^[12-13]。在本研究中也证实了 ox-LDL 在诱导的巨噬细胞中促进了 METTL3 和 m6A 甲基化的表达。m6A 修饰与巨噬细胞焦亡在 AS 斑块形成过程的关键作用,也是目前研究的热点。本研究在进行 ox-LDL 诱导的同时转染 METTL3 敲低载体和过表达载体,探究 METTL3 介导的 m6A 修饰对于 ox-LDL 诱导巨噬细胞焦亡的作用,证明 METTL3 可促进焦亡信号关键蛋白 NF- κ B、NLRP3、GSDMD-N、Caspase-1 表达。LDH 的释放常用来评估细胞焦亡^[25],ox-LDL 诱导细胞后通过 LDH 释放来观察各组巨噬细胞死亡情况,进而表明 METTL3 促进 ox-LDL 诱导的巨噬细胞死亡。

AS 发生必然伴随炎症反应的发生,促炎因子的上调^[26-27]和抗炎因子的下调^[27-28]能显著增加 AS 斑块进程。早期研究也表明促炎因子 TNF- α ^[29]、IL-1 β ^[30]在其敲除的 AS 动物模型中的表达降低,IL-18 能够增强炎症因子的表达从而加剧斑块破裂^[31],IL-6 能够促进细胞迁移和活力加剧斑块进程^[32]。本研究模拟 AS 的体外环境验证了 ox-LDL 与巨噬细胞的相互作用促进炎症反应及 METTL3 能促进焦亡相关炎症因子及其促炎因子的表达。

综上所述,METTL3 介导的 m6A 修饰可以有效促进 ox-LDL 诱导的巨噬细胞焦亡,促发炎症反应,也为 AS 炎症反应的治疗提供了新的研究方向。

参考文献:

- [1] Zhu Y, Xian X, Wang Z, et al. Research progress on the relationship between atherosclerosis and inflammation [J]. Biomolecules, 2018, 8(3) : 80.
- [2] Khatana C, Saini NK, Chakrabarti S, et al. Mechanistic insights into the oxidized low-density lipoprotein-induced atherosclerosis [J]. Oxid Med Cell Longev, 2020, 2020: 5245308.
- [3] Martinet W, Coornaert I, Puylaert P, et al. Macrophage death as a pharmacological target in atherosclerosis [J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 306.
- [4] Zeng W, Wu D, Sun Y, et al. The selective NLRP3 inhibitor MCC950 hinders atherosclerosis development by attenuating inflammation and pyroptosis in macrophages [J]. Sci Rep, 2021, 11(1) : 19305.
- [5] Xu YJ, Zheng L, Hu YW, et al. Pyroptosis and its relationship to atherosclerosis [J]. Clin Chim Acta, 2018, 476: 28-37.
- [6] He X, Fan X, Bai B, et al. Pyroptosis is a critical immune-inflammatory response involved in atherosclerosis [J]. Pharmacol Res, 2021, 165: 105447.
- [7] Lin S, Choe J, Du P, et al. The m(6) A methyltransferase METTL3 promotes translation in human cancer cells [J]. Mol Cell, 2016, 62(3) : 335-345.
- [8] Dorn LE, Lasman L, Chen J, et al. The N⁶-methyladenosine mRNA methylase METTL3 controls cardiac homeostasis and hypertrophy [J]. Circulation, 2019, 139(4) : 533-545.
- [9] 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(8) : 1419-1437.
- [10] Fu J, Cui X, Zhang X, et al. The role of m6A ribonucleic acid modification in the occurrence of atherosclerosis [J]. Front Genet, 2021, 12: 733871.
- [11] Chien CS, Li JY, Chien Y, et al. METTL3-dependent N⁶-methyladenosine RNA modification mediates the atherogenic inflammatory cascades in vascular endothelium [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2021, 118(7) : e2025070118.

- [12] Liu Y, Liu Z, Tang H, et al. The N^6 -methyladenosine (m^6A)-forming enzyme METTL3 facilitates M1 macrophage polarization through the methylation of *STAT1* mRNA [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2019, 317(4): C762–C775.
- [13] Li Z, Xu Q, Huangfu N, et al. Mettl3 promotes oxLDL-mediated inflammation through activating *STAT1* signaling [J]. *J Clin Lab Anal*, 2022, 36(1): e24019.
- [14] Dong G, Yu J, Shan G, et al. N^6 -methyladenosine methyltransferase METTL3 promotes angiogenesis and atherosclerosis by upregulating the *JAK2/STAT3* pathway via m^6A reader *IGF2BP1* [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 731810.
- [15] Malekmohammad K, Bezsonov EE, Rafieian-Kopaei M. Role of lipid accumulation and inflammation in atherosclerosis: focus on molecular and cellular mechanisms [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2021, 8: 707529.
- [16] Lara-Guzmán OJ, Gil-Izquierdo Á, Medina S, et al. Oxidized LDL triggers changes in oxidative stress and inflammatory biomarkers in human macrophages [J]. *Redox Biol*, 2018, 15: 1–11.
- [17] Li J, Liu J, Yu Y, et al. *NF- κ B/ABCA1* pathway aggravates ox-LDL-induced cell pyroptosis by activation of *NLRP3* inflammasomes in THP-1-derived macrophages [J]. *Mol Biol Rep*, 2022, 49(7): 6161–6171.
- [18] Lin J, Shou X, Mao X, et al. Oxidized low density lipoprotein induced caspase-1 mediated pyroptotic cell death in macrophages: implication in lesion instability? [J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e62148.
- [19] Franchi L, Eigenbrod T, Muñoz-Planillo R, et al. The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis [J]. *Nat Immunol*, 2009, 10(3): 241–247.
- [20] Qian Z, Zhao Y, Wan C, et al. Pyroptosis in the initiation and progression of atherosclerosis [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 652963.
- [21] Kovacs, SB, Miao EA. Gasdermins: Effectors of Pyroptosis [J]. *Trends Cell Biol*, 2017, 27(9): 673–684.
- [22] 李志明, 王铭洁. 细胞因子在动脉粥样硬化发病中的作用机制及相关治疗举措研究现状 [J]. *生理学报*, 2021, 73(3): 501–508.
- [23] Guo M, Yan R, Ji Q, et al. IFN regulatory Factor-1 induced macrophage pyroptosis by modulating m^6A modification of circ_0029589 in patients with acute coronary syndrome [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 86: 106800.
- [24] Zheng F, Xing S, Gong Z, et al. Silence of *NLRP3* suppresses atherosclerosis and stabilizes plaques in apolipoprotein E-deficient mice [J]. *Mediators Inflamm*, 2014, 2014: 507208.
- [25] Evavold CL, Ruan J, Tan Y, et al. The pore-forming protein gasdermin D regulates interleukin-1 secretion from living macrophages [J]. *Immunity*, 2018, 48(1): 35–44.
- [26] Ghanim H, Green K, Abuaysheh S, et al. Ezetimibe and simvastatin combination inhibits and reverses the pro-inflammatory and pro-atherogenic effects of cream in obese patients [J]. *Atherosclerosis*, 2017, 263: 278–286.
- [27] Tousoulis D, Oikonomou E, Economou EK, et al. Inflammatory cytokines in atherosclerosis: current therapeutic approaches [J]. *Eur Heart J*, 2016, 37(22): 1723–1732.
- [28] Han X, Kitamoto S, Wang H, et al. Interleukin-10 overexpression in macrophages suppresses atherosclerosis in hyperlipidemic mice [J]. *FASEB J*, 2010, 24(8): 2869–2880.
- [29] Brännén L, Hovgaard L, Nitulescu M, et al. Inhibition of tumor necrosis factor- α reduces atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24(11): 2137–2142.
- [30] Kiri H, Niwa T, Yamada Y, et al. Lack of interleukin-1 β decreases the severity of atherosclerosis in ApoE-deficient mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23(4): 656–660.
- [31] Durpès MC, Morin C, Paquin-Veillet J, et al. PKC- β activation inhibits IL-18-binding protein causing endothelial dysfunction and diabetic atherosclerosis [J]. *Cardiovasc Res*, 2015, 106(2): 303–313.
- [32] Luo P, Shi W, Wang Y, et al. Raloxifene inhibits IL-6/*STAT3* signaling pathway and protects against high-fat-induced atherosclerosis in ApoE $^{-/-}$ mice [J]. *Life Sci*, 2020, 261: 118304.

[收稿日期]2022-12-11