

# 甲基化酶WTAP通过调控FOXO1的表达参与肾缺血再灌注损伤

赵刚刚<sup>1</sup>, 李华锋<sup>1</sup>, 张鸿毅<sup>1</sup>, 肖克兵<sup>1</sup>, 杨辉<sup>1</sup>, 李子峰<sup>1</sup>, 傅崇德<sup>2</sup>

<sup>1</sup>西安医学院第一附属医院泌尿外科, 陕西 西安 710000; <sup>2</sup>西安航天总医院泌尿外科, 陕西 西安 710100

**摘要:**目的 探讨m<sup>6</sup>A甲基化酶WTAP在小鼠肾缺血再灌注(I/R)损伤中的表达情况及对肾小管上皮细胞生物学行为的影响, 阐明其可能的作用机制。方法 C57BL/6小鼠随机分为假手术组(sham组)、I/R组, 8只/组, 建立急性缺血肾损伤模型; 全自动生化分析仪检测血中尿素氮(BUN)及肌酐(Scr)水平评估肾功能; HE染色检测肾组织病理和形态改变; IHC检测肾组织中WTAP和FOXO1蛋白的表达; 人肾小管上皮细胞(HK-2)分为Control、H/R、si-NC、si-WTAP、si-NC+H/R、si-WTAP+H/R组; Western blot检测蛋白表达; qRT-PCR检测mRNA水平; CCK8检测细胞活性; TUNEL染色法检测细胞凋亡; 试剂盒分别检测LDH的释放水平和Caspase-3活性; SRAMP(<http://www.cuilab.cn/sramp/>)网站预测FOXO1的m<sup>6</sup>A修饰位点; RIP实验检测WTAP与FOXO1 mRNA的相互作用; MeRIP-qPCR检测m<sup>6</sup>A修饰FOXO1的水平。结果 与sham组相比, I/R组Scr、BUN水平显著升高( $P < 0.001$ ), WTAP mRNA和蛋白水平都显著升高( $P < 0.001$ )。与正常HK-2细胞相比, H/R组细胞活性显著下降( $P < 0.01$ ), LDH的释放水平显著升高( $P < 0.001$ ), WTAP的mRNA和蛋白水平都显著升高( $P < 0.001$ )。抑制WTAP表达, 上述细胞损伤减弱, FOXO1的mRNA和蛋白水平都显著下降( $P < 0.01$ )。WTAP与FOXO1 mRNA结合, 抑制WTAP表达能够显著降低FOXO1 m<sup>6</sup>A水平( $P < 0.001$ )。结论 WTAP在体内外肾缺血再灌注损伤模型中表达均上调; 体外抑制WTAP能够抵抗H/R诱导的凋亡损伤, 这可能与介导的FOXO1 m<sup>6</sup>A调控有关。

**关键词:** WTAP; m<sup>6</sup>A; FOXO1; 肾缺血再灌注损伤; 细胞凋亡

## m<sup>6</sup>A methylase WTAP participates in renal ischemia-reperfusion injury by regulating FOXO1 expression

ZHAO Ganggang<sup>1</sup>, LI Huafeng<sup>1</sup>, ZHANG Hongyi<sup>1</sup>, XIAO Kebing<sup>1</sup>, YANG Hui<sup>1</sup>, LI Zifeng<sup>1</sup>, FU Chongde<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Urology, First Affiliated Hospital of Xi'an Medical University, Xi'an 710000, China; <sup>2</sup>Department of Urology, Xi'an Aerospace General Hospital, Xi'an 710000, China

**Abstract: Objective** To investigate the expression of WTAP, a m<sup>6</sup>A methylase, in a mouse model of renal ischemia-reperfusion (I/R) injury and the effect of WTAP knockdown on biological behavior of renal tubular epithelial cells exposed to I/R injury. **Methods** Sixteen C57BL/6 mice with renal I/R injury or sham operation ( $n=8$ ) were examined for blood urea nitrogen (BUN) and creatinine (Scr) levels to assess renal function, and renal pathologies were observed with HE staining. The expressions of WTAP and FOXO1 proteins in the kidneys of the mice were detected using immunohistochemistry. Human renal tubular epithelial cells (HK-2) were transfected with si-WTAP or si-NC followed by hypoxia-reoxygenation (H/R) exposure. Protein and mRNA expression were assessed by Western blot and qRT-PCR, and changes and changes in cell viability and apoptosis were assessed using CCK8 assay and TUNEL staining, respectively; LDH release level and caspase-3 activity of the cells were measured using commercial assay kits. FOXO1 m<sup>6</sup>A modification sites were predicted using SRAMP website (<http://www.cuilab.cn/sramp/>), and the interaction between WTAP and FOXO1 mRNA was analyzed with RIP experiment; the level of FOXO1 modified by m<sup>6</sup>A was detected by MeRIP-qPCR. **Results** Compared with sham-operated mice, the mice with renal I/R injury showed significantly increased Scr and BUN levels ( $P < 0.001$ ) and renal expressions of WTAP mRNA and protein ( $P < 0.001$ ). In cultured HK-2 cells, H/R exposure significantly decreased the cell viability ( $P < 0.001$ ) and increased cellular LDH release ( $P < 0.001$ ) and expressions of WTAP mRNA and protein ( $P < 0.001$ ). WTAP knockdown obviously reduced the cell damage induced by I/R injury and significantly decreased the mRNA and protein levels of FOXO1 in the cells ( $P < 0.001$ ). RIP experiment confirmed WTAP binding to FOXO1 mRNA, and inhibition of WTAP expression significantly reduced FOXO1 m<sup>6</sup>A level in HK-2 cells ( $P < 0.001$ ). **Conclusion** WTAP expression is up-regulated in the kidneys of mice with renal I/R injury and in HK-2 cells with H/R exposure. Inhibition of WTAP alleviates H/R-induced apoptotic damage in HK-2 cells possibly by inhibiting FOXO1 expression.

**Keywords:** WTAP; m<sup>6</sup>A; FOXO1; renal ischemia-reperfusion injury; apoptosis

急性肾损伤(AKI)是一种常见的肾功能突然丧失的临床综合症,表现为血清肌酐显著升高和尿量迅速减少,最终可逐渐发展为慢性肾病和终末期肾病,重症患者可导致死亡<sup>[1]</sup>。肾脏缺血再灌注损伤(I/R)是导致

AKI的主要原因之一,在过去的几十年里,有关肾脏的I/R损伤在该领域得到了广泛的研究<sup>[2]</sup>。然而,肾脏I/R的发病机制十分复杂,尚未完全阐明<sup>[3,4]</sup>。因此,更为透彻地了解肾I/R的病理生理反应对预防和治疗AKI具有重要的意义。

N<sup>6</sup>-甲基腺甘氨酸(m<sup>6</sup>A)是mRNA修饰物中含量最多的一种,存在于整个转录组四分之一的RNA中<sup>[5,6]</sup>,与各种生物过程有关如干细胞增殖与分化、心脏肥厚、

收稿日期:2023-06-05

基金项目:西安航天总医院医学科研项目(2022KY006)

作者简介:赵刚刚,硕士,主治医师,E-mail: mr\_zgg8@163.com

通信作者:傅崇德,硕士,副主任医师,E-mail: fchd1984@163.com

DNA损伤和肿瘤发生等<sup>[7]</sup>,而这种RNA修饰在AKI和I/RI中的功能作用和调控机制研究较少。Wilms瘤1-相关蛋白(WTAP)是一种重要的m<sup>6</sup>A甲基化酶,可通过调节mRNA修饰来影响基因表达。WTAP在膀胱癌、急性髓系白血病等多种疾病中参与调控增殖、凋亡等过程<sup>[8,9]</sup>。值得注意的是,WTAP通过调节ATF4 mRNA的m<sup>6</sup>A修饰增加内质网应激,促进了心肌I/R损伤<sup>[10]</sup>,但WTAP在AKI和肾I/R损伤中的作用目前仍未见报道。

叉头蛋白O1(FOXO1)是叉头转录因子家族中的一员,在哺乳动物中广泛表达,具有调节细胞增殖、凋亡、自噬、氧化应激和能量代谢等功能<sup>[11]</sup>。FOXO1已被证明在肾I/R损伤中高表达,促进了线粒体相关的细胞凋亡,在维持肾小管上皮细胞线粒体功能发挥关键作用<sup>[12]</sup>。有关FOXO1的m<sup>6</sup>A修饰研究较少,有报道称METTL14通过增加FOXO1的m<sup>6</sup>A修饰加重内皮细胞炎症和动脉粥样硬化<sup>[13]</sup>。但FOXO1的m<sup>6</sup>A修饰在肾I/R损伤中的作用仍未见研究。

因此,本项目通过构建肾I/R损伤小鼠模型和缺氧/复氧(H/R)诱导的肾小管上皮细胞损伤模型,体内外探讨WTAP介导的m<sup>6</sup>A修饰在肾I/R损伤中的作用,并明确该作用是否与调控FOXO1表达有关,旨在为肾I/R损伤和AKI的防治提供新的分子靶点。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物和细胞 实验所用C57BL/6J小鼠购自空军军医大学动物实验中心;将6~8周龄小鼠常规条件下饲养,自由进食和饮水,实验前禁食12 h,自由饮水;所有动物实验经西安医学院第一附属医院伦理委员会批准(XYYFY2022LSDW-001),实验过程遵循“3R”原则;人肾小管上皮细胞(HK-2细胞)购自ATCC细胞库。

1.1.2 主要试剂和仪器 凋亡(TUNEL)检测试剂盒(南京诺唯赞医疗科技有限公司);尿素氮(BUN)及血肌酐(Scr)试剂盒(南京建成科技有限公司);m<sup>6</sup>A甲基化水平检测试剂盒(武汉艾美捷科技有限公司);CCK-8试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);反转录试剂盒、SYBR Green混合液(TaKaRa);蛋白裂解液和BCA蛋白定量检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);10%PAGE凝胶剂盒(上海雅酶生物科技有限公司);ECL化学发光底物(西安米鼠生物科技有限公司);m<sup>6</sup>A、WTAP、FOXO1、GAPDH抗体(ProteinTech);LDH检测试剂盒(南京诺唯赞医疗科技有限公司)。小动物麻醉系统(瑞沃德生命科技有限公司);全自动血生化分析仪(中山新锐医疗设备科技公司);实时定量PCR仪(苏州雅睿生物技术有限公司);化学发光机(北京赛智创业科技有限公司);电泳仪、多功能酶标仪和凝胶成

像分析仪(Bio-Rad);倒置显微镜(上海维翰光电科技有限公司);细胞培养箱(北京五洲东方科技发展有限公司);厌氧箱(上海龙跃仪器设备有限公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 FOXO1的甲基化位点预测 从NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)得到FOXO1的mRNA FASTA序列,将此序列复制到SRAMP(<http://www.cuilab.cn/sramp/>)网站“Prediction”阅读框内,点击“submit”进行预测。

1.2.2 肾I/R损伤模型的构建 选取16只雄性C57BL/6J小鼠(6~8周,体质量20~25 g),随机分为假手术组(Sham)和肾脏缺血再灌注损伤组(I/R),每组8只小鼠;所有小鼠在造模前12 h禁饮禁食;术前先称量小鼠体质量,并进行记录;2%异氟烷麻醉(固定过程流量为3 L/min);造模过程(1.5 L/min)进行麻醉,并行右肾切除术,然后用无损伤血管夹阻断左肾动静脉45 min,随后恢复左肾动静脉血流,建立肾脏缺血再灌注模型。整个建模过程中善待小鼠,熟练操作,最大限度减少对小鼠的伤害。

1.2.3 样本收集 造模后24 h,采用苯巴比妥钠腹腔注射麻醉,行腹部正中切口,切取左肾,将肾脏组织纵行剖开,一半放入4%多聚甲醛液中固定,另外一半再分成两份,一份用于组织染色使用,另一份放入冻存管中并放入液氮罐保存。取材时极尽小鼠最大科研价值,结束后立即用CO<sub>2</sub>安乐死的方式处死小鼠,减轻其痛苦。

1.2.4 肾功能检测 收集各组小鼠血液,分离血清后用根据试剂盒说明书,采用比色法,用全自动生化分析仪检测肌酐及尿素氮水平。

1.2.5 肾组织病理学检测 肾组织病理学检测取各组小鼠肾组织4%甲醛固定48 h后石蜡包埋制作切片,切片厚度大约为5 μm,进行HE染色,在200倍荧光显微镜下观察肾组织损伤情况。

1.2.6 免疫组织化学染色 包埋、切片和脱水同HE染色步骤。将3%双氧水滴加于切片上,37℃阻断内源性过氧化物酶20 min;流水冲洗20 min;将切片浸没在现配的柠檬酸钠中进行抗原修复(微波炉高火6 min;中高火13 min);自然晾至室温;使用5%山羊血清室温封闭15 min;吸去多余血清,滴加一抗,室温过夜;PBS洗切片(3次/5 min);滴加二抗,37℃孵育40 min;PBS洗切片(3次/5 min);DAB显色液滴加于切片上(显色0.5~3 min);镜下控制,着色深立即终止;流水冲洗10 min;苏木精染核3~5 min,自来水冲洗5 min;0.5%的盐酸酒精分化1 s,自来水冲洗2 min;1%氨水返蓝3 min,流水冲洗5 min;脱水封片步骤同HE染色,最后显微镜下拍照。

1.2.7 细胞凋亡染色 根据TUNEL染色试剂盒说明书操作。4,6-二脒基-2-苯基吲哚二盐酸盐(DAPI)所

染细胞核在紫外激发波下呈蓝色(即为视野所见所有肾小管上皮细胞),阳性凋亡细胞核为绿色。使用Eclipse Ci-L荧光拍照显微镜选取切片的目的区域进行200倍成像。成像完成后使用Image-Pro Plus 6.0分析软件,分别测量每张切片5个视野中阳性细胞数以及对应的总细胞数,并计算出阳性率(%)=阳性细胞数/总细胞数×100%。

**1.2.8 qRT-PCR法检测mRNA水平** 收集的组织和细胞用TRIZOL提取总RNA。TaKaRa反转录试剂盒反转录为cDNA;然后根据实时定量PCR试剂盒说明书配制PCR反应体系,程序为:95℃预变性30s,(95℃变性5s,60℃延伸30s)×40个循环,GAPDH作为内参, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因表达水平。

**1.2.9 Western blot法检测蛋白表达情况** RIPA裂解液提取总蛋白。BCA试剂盒定量蛋白浓度。上样进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(80V,30min;120V,60min),300mA电流转膜90min,50g/L脱脂牛奶封闭1h。孵育相应一抗进行4℃过夜;TBST清洗后,室温孵育二抗1h;TBST清洗3次后进行显影并拍照。

**1.2.10 HK-2细胞H/R模型构建和转染** 人肾小管上皮细胞株(HK-2)细胞用新鲜的含10%FBS的DMEM/F12(1:1)完全培养基于37℃、5%CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中进行培养,选对数生长期的细胞根据实验分组均匀铺板。

**HK-2细胞H/R模型构建:**细胞分为Control组和H/R组待细胞完全贴壁后,弃去培养液,加入不含FBS的无糖培养基,放入厌氧箱中缺氧24h,除去细胞缺氧液,加入新鲜的DMEM/F12完全培养基于CO<sub>2</sub>细胞培养箱中复氧培养6h。

**细胞转染:**细胞以 $5\times 10^4$ /孔铺于6孔细胞培养板,待细胞贴壁长至70%左右时,换成无血清培养基,将Lipofectamine™ 2000转染试剂和si-NC、si-WTAP干扰片段混合匀静置5~10min,将混合液均匀加入每个孔中,4~6h后进行换液,继续培养24、48h后,收集细胞用于后续实验。

**1.2.11 HK-2细胞活性检测** 将各组细胞悬液分别接种于96孔板中,每孔中含 $5\times 10^3$ 个细胞,培养2~4h后,设空白孔(完全培养基和CCK-8总体积110μL)和对照孔(含正常培养细胞、完全培养基和CCK-8,总体积110μL),周边各孔加100μL去离子水减少边缘效应,各组细胞均处理完成后,在各孔中斜贴培养板滴加CCK-8溶液10μL,然后于37℃、5%CO<sub>2</sub>的细胞培养箱内孵育1~4h(根据显色情况调整时间),用酶标仪检测各孔的 $A_{450nm}$ 值判断细胞活性。

**1.2.12 HK-2细胞培养液LDH释放水平检测** 吸取各组细胞培养液500μL,每组设置两组重复,全自动血生化仪进行检测。

**1.2.13 Caspase3活性检测** 收集细胞样本后根据Abcam试剂盒说明书进行检测。

**1.2.14 甲基化RNA免疫共沉淀后实时定量PCR(Me-RIP qPCR)** RNA提取试剂盒提取总RNA,PolyA mRNA纯化试剂盒纯化的总RNA。将小鼠抗人m<sup>6</sup>A抗体和IgG的抗体分别添加到免疫共沉淀(IP)缓冲液中,并与蛋白质A/G磁珠孵育1h进行结合。然后将纯化的mRNA以及磁珠-抗体复合物加入到含有核糖核酸酶抑制剂和蛋白酶抑制剂的IP缓冲液中,于4℃下孵育过夜。将使用洗脱缓冲液洗脱下的RNA,用苯酚-氯仿法提取、纯化后,用实时定量PCR分析。

**1.2.15 统计学分析** 所有数据采用GraphPad Prism8.0.2软件进行统计分析,每种实验至少重复3次,实验结果以均数±标准差表示,两组之间的比较采用*t*检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 小鼠肾I/R损伤组织中WTAP的表达上调

全自动血生化分析仪检测了小鼠肾I/R损伤后的血清肌酐和血尿素氮的水平,与sham组相比,I/R组血清肌酐、尿素氮显著升高( $P<0.001$ ,图1A、B);HE染色结果显示,与sham组相比,I/R组肾组织产生病理性改变,表现为肾小球皱缩,肾小囊腔和肾小管腔扩张,上皮细胞肿胀坏死,细胞核缺失,细胞碎片堆积(图1C);qRT-PCR结果显示,与sham组比较,I/R组WTAP的mRNA水平显著升高( $P<0.001$ ,图1D);WB结果显示,与sham组比较,I/R组WTAP蛋白的表达水平显著上升( $P<0.001$ ,图1E);IHC结果显示I/R后WTAP阳性面积显著增多(图1F)。

### 2.2 HK-2细胞H/R损伤后WTAP表达上调

CCK-8细胞活性检测结果显示,与Control组比较,H/R组细胞活性显著降低( $P<0.01$ ,图2A);全自动血生化分析仪检测了细胞培养液中LDH的释放水平,与Control组比较,H/R组LDH的释放水平显著降低( $P<0.001$ ,图2B);qRT-PCR检测了WTAP的mRNA水平,结果显示,与Control组比较,H/R组WTAP的mRNA水平显著升高( $P<0.001$ ,图2C);Western blot结果显示,与Control组比较,H/R组WTAP蛋白水平显著升高( $P<0.001$ ,图2D)。

### 2.3 体外证明沉默WTAP对HK-2细胞H/R损伤作用的影响

通过转染siRNA对WTAP进行沉默,qRT-PCR鉴定干扰效果。与si-NC+H/R组相比,si-WTAP+H/R组WTAP的mRNA显著降低( $P<0.0001$ ,图3A);与si-NC+H/R组相比,si-WTAP+H/R组WTAP蛋白水平显著降低( $P<0.0001$ ,图3B、C);细胞活性结果显示,与si-NC+H/R组相比,si-WTAP+H/R组细胞活性显著升高

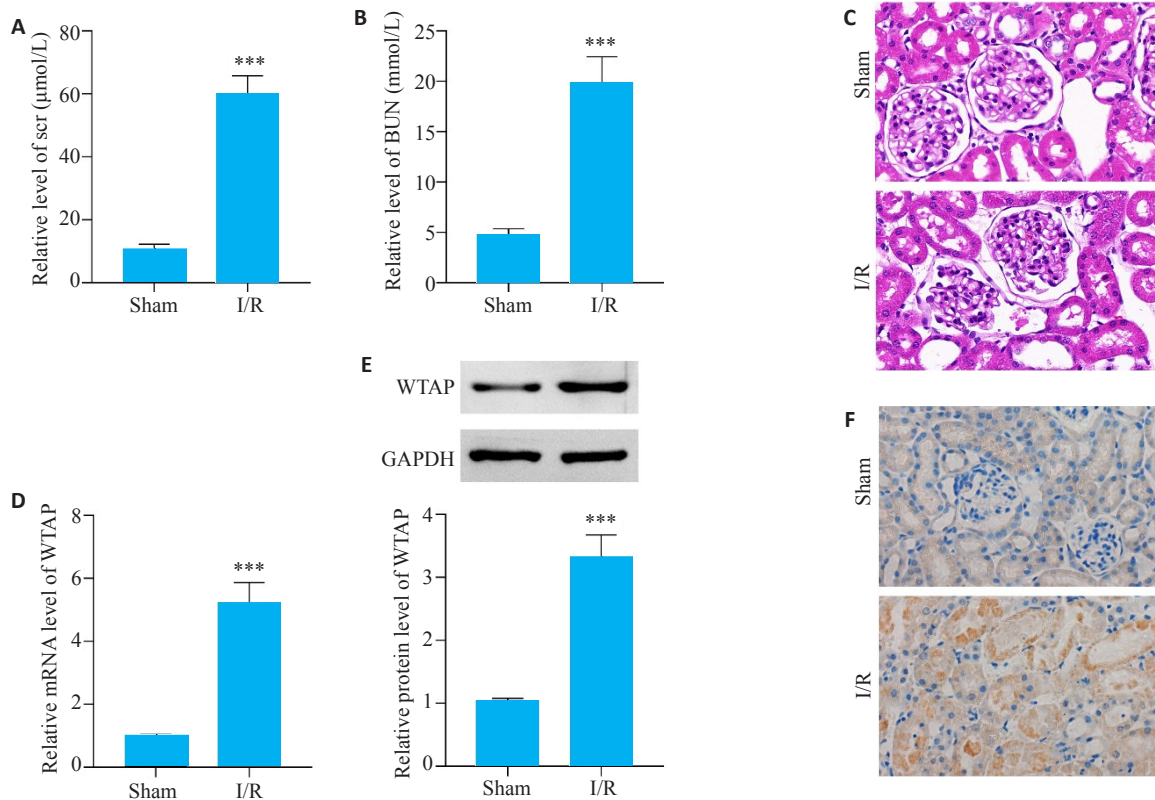


图1 WTAP在小鼠肾I/R损伤组织中的表达情况

Fig.1 Expression of WTAP in mouse renal I/R injury tissues. **A:** Serum creatinine level in mice with renal I/R injury. **B:** Blood urea nitrogen level in mice with renal I/R injury. **C:** Pathological changes of the kidney in mice with renal I/R injury (HE staining, original magnification: ×400). **D:** WTAP mRNA level in the kidney of mice with renal I/R injury. **E:** Changes of WTAP protein expression after renal I/R injury in mice. **F:** Expression of WTAP after renal I/R injury in mice (IHC, ×200). \*\*\* $P < 0.001$ .

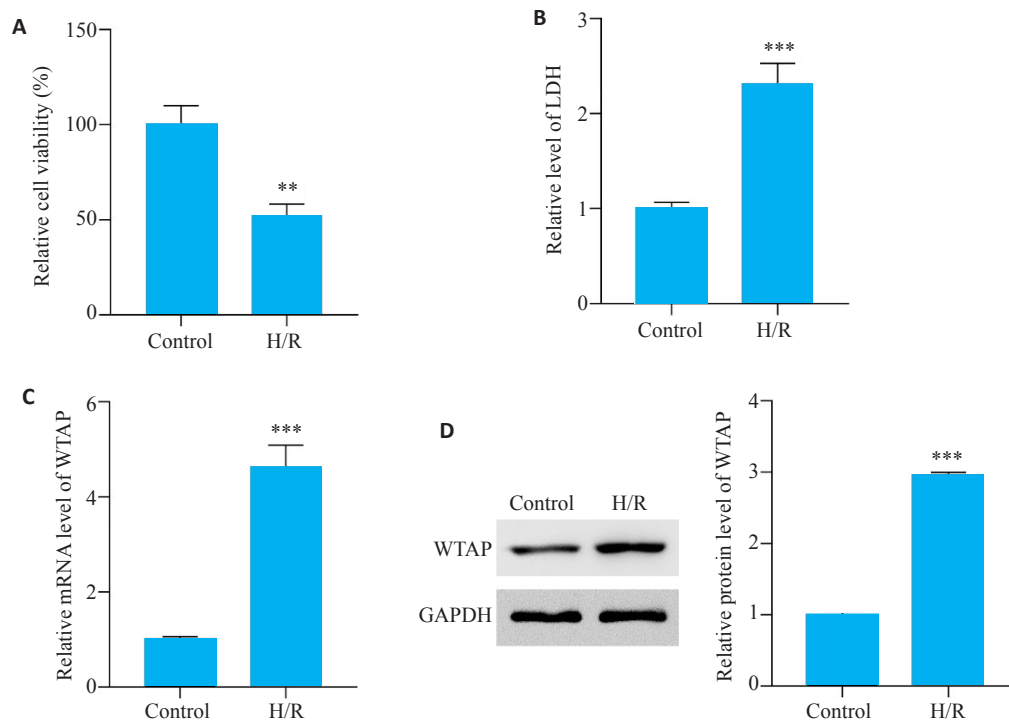


图2 WTAP在HK-2细胞H/R损伤中的表达情况

Fig.2 Expression of WTAP in HK-2 cells with H/R injury. **A:** Changes of HK-2 cell viability after H/R injury. **B:** LDH release in HK-2 cells after H/R injury. **C:** WTAP mRNA level in HK-2 cells with H/R injury. **D:** Protein expression level of WTAP in HK-2 cells with H/R injury. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

( $P < 0.01$ , 图3D)。TUNEL染色结果显示,与si-NC+H/R组相比,si-WTAP+H/R组细胞凋亡率显著降低( $P < 0.01$ ,图3E、F);Caspase-3活性结果显示,与si-NC+H/R

组相比,si-WTAP+H/R组Caspase-3活性显著降低( $P < 0.001$ ,图3G)。与si-NC+H/R组相比,si-WTAP+H/R组LDH释放水平显著降低( $P < 0.001$ ,图3H)。

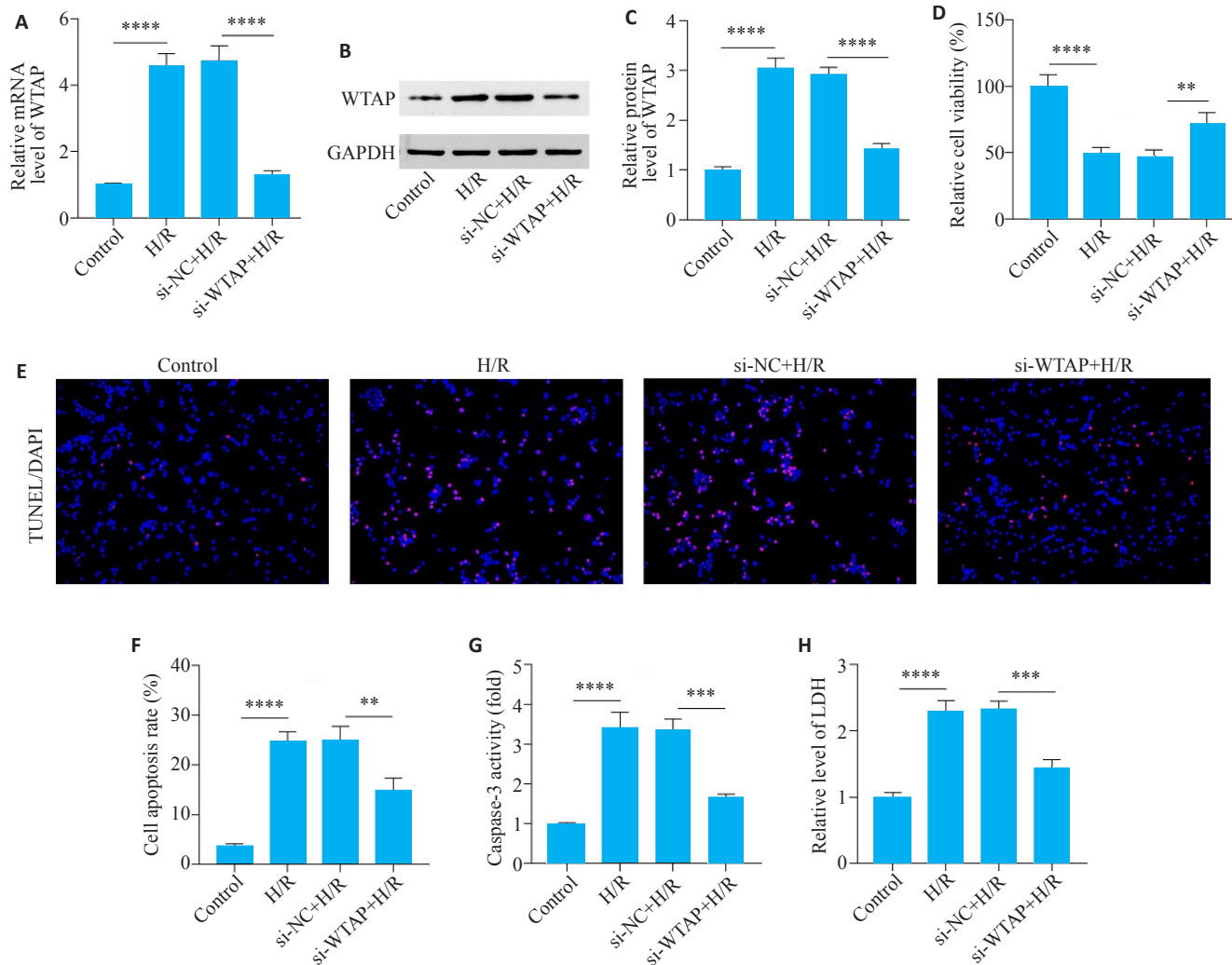


图3 沉默WTAP对HK-2细胞H/R损伤的影响

Fig.3 Effect of WTAP silencing on cell damage in HK-2 cells with H/R exposure. **A:** WTAP mRNA expression level in HK-2 cells with H/R injury after WTAP silencing. **B, C:** Protein expression level of WTAP in HK-2 cells with H/R injury after WTAP silencing. **D:** Cell viability changes in HK-2 cells with H/R injury after WTAP silencing. **E:** TUNEL staining of HK-2 cells with H/R injury after WTAP silencing ( $\times 200$ ). **F:** Statistical diagram of HK-2 cells with H/R injury by TUNEL staining after WTAP silencing. **G:** Changes of Caspase3 activity in HK-2 cell with H/R injury after WTAP silencing. **H:** LDH release in HK-2 cells with H/R injury after WTAP silencing. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ .

#### 2.4 小鼠肾 I/R 损伤组织和 HK-2 细胞 H/R 损伤中 FOXO1 的 mRNA 和蛋白表达上调

与 Sham 组相比,在肾 I/R 损伤组织中,FOXO1 的 mRNA 和蛋白的表达水平都显著升高( $P < 0.001$ ,图4A、B);IHC 结果显示 I/R 后,FOXO1 阳性面积较多(图4C);与 Control 组相比,H/R 组细胞中 FOXO1 的 mRNA 和蛋白的表达水平也显著升高( $P < 0.001$ ,图4D、E)。

#### 2.5 WTAP 可直接作用于 FOXO1 mRNA 并与 m<sup>6</sup>A 调控有关

首先根据 SRAMP (<http://www.cuilab.cn/sramp/>) 网站预测可知,FOXO1 具有多个 m<sup>6</sup>A 甲基化位点(图5A)。与 si-NC+H/R 组相比,si-WTAP+H/R 组 FOXO1 mRNA 和蛋白水平都显著下降( $P < 0.01$ 图5B、C);RIP-qPCR 检测结果显示,与 IgG 组相比,WTAP 抗体组 FOXO1 的 mRNA 水平显著上升( $P < 0.05$ ,图5D);MeRIP-qPCR 结果显示,与 si-NC+H/R 组相比,si-WTAP+H/R 组 m<sup>6</sup>A-FOXO1 水平显著降低( $P < 0.001$ ,图5E)。

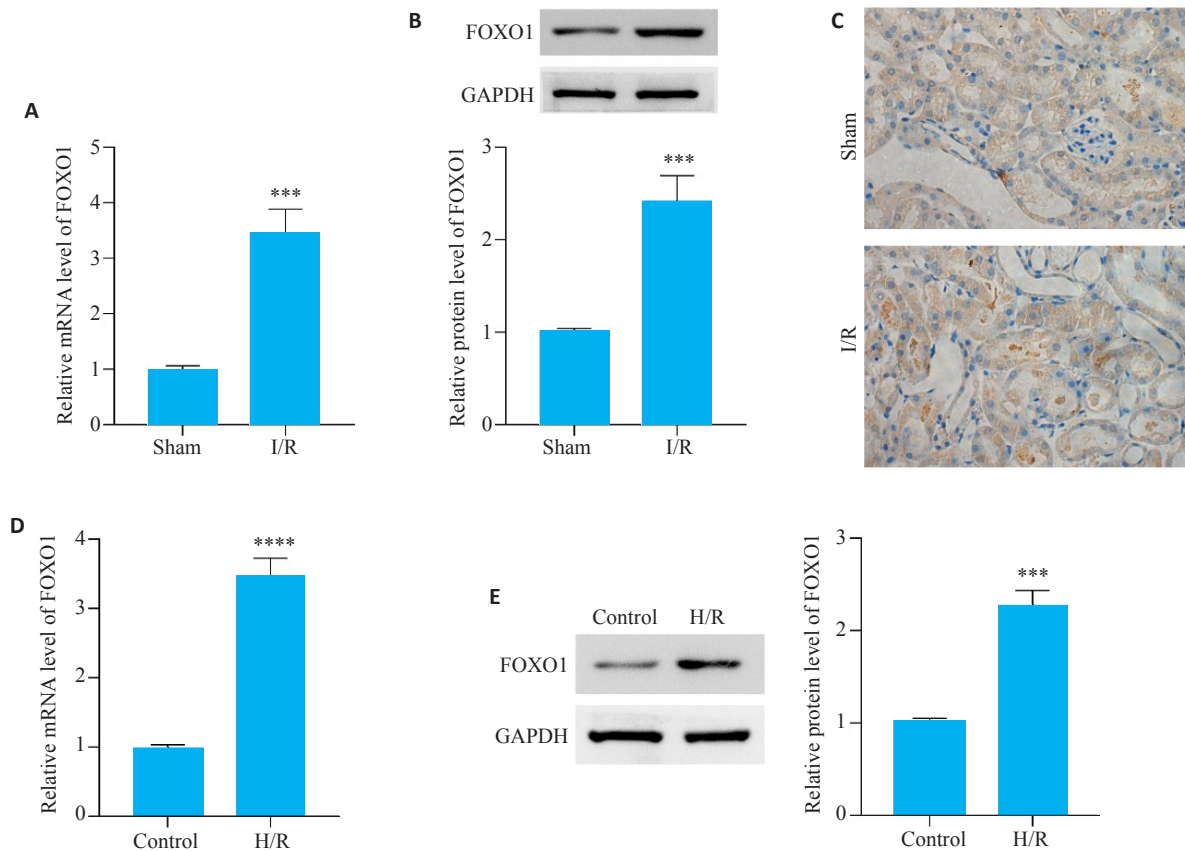


图4 FOXO1在小鼠肾组织I/R损伤和HK-2细胞H/R损伤中的表达情况

Fig.4 FOXO1 expression in renal tissue of mice with I/R injury and in HK-2 cells with H/R injury. A: FOXO1 mRNA level in mouse renal tissue. B: FOXO1 protein expression in mouse renal tissue. C: Expression of FOXO1 in mice after renal I/R injury (IHC, ×400). D: FOXO1 mRNA level in HK-2 cells with H/R injury. E: Changes of FOXO1 protein expression in HK-2 cells with H/R injury. \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ .

### 3 讨论

RNA 修饰是一类重要的表观遗传修饰,通过影响 RNA 的稳定性和翻译来调节基因表达<sup>[14-16]</sup>。RNA 甲基化占有所有 RNA 修饰的 60% 以上,包括 m<sup>6</sup>A、m<sup>5</sup>C、m<sup>3</sup>U、m<sup>7</sup>G 等,其中 m<sup>6</sup>A 修饰是 mRNA 中最常见的 RNA 甲基化类型<sup>[17-20]</sup>。WTAP 是 m<sup>6</sup>A 修饰中的“阅读者”,和 METTL3、METTL14 都是重要的甲基转移酶<sup>[21]</sup>。I/R 损伤发生在各种组织和器官中,包括心脏、肝脏、肺、肾脏、皮肤等<sup>[22-26]</sup>。有关 I/R 损伤的 m<sup>6</sup>A 修饰还未得到广泛的研究。Song 等<sup>[27]</sup>证明 m<sup>6</sup>A 修饰与心肌 I/R 损伤的发病机制密切相关,在心肌 I/R 损伤小鼠中, METTL3 蛋白的表达水平显著升高,心肌细胞活性显著降低;在新生儿心肌细胞的 H/R 损伤模型中,上调 METTL3 可降低自噬流,促进心肌细胞凋亡,而沉默 METTL3 可增强心肌细胞活力。m<sup>6</sup>A 的甲基化调控也参与了肾 I/R 损伤的发生发展。Xu 等<sup>[1]</sup>的研究证明低表达 METTL14,小鼠肾组织和 HK-2 细胞的 I/R 损伤都被抑制,并与甲基化 YAP1 和 YAP1-TEAD 通路有关。WTAP 在 I/R 损伤中的作用目前只在心肌中被研究,其在肾 I/R 损伤中是否发挥作用还处于未知阶段<sup>[10]</sup>。本研究发现,WTAP 在小鼠肾 I/R 损伤和 HK-2 细胞 H/R 损伤中都高表达,提示

WTAP 在肾缺血再灌注损伤中起促进作用。沉默 WTAP 后,与对照组相比, HK-2 细胞活性增加,凋亡率降低,证明降低 WTAP 的表达可以减轻 HK-2 细胞的 H/R 损伤,可能通过凋亡通路发挥作用。

FOXO1 作为一种重要的转录因子,是细胞代谢的关键调节者。已有多项研究证明 FOXO1 参与 I/R 损伤的进展<sup>[28]</sup>。FOXO1 可促进脑 I/R 损伤的进展<sup>[29]</sup>; Wang 等<sup>[12]</sup>发现 FOXO1 下调可抑制肾的 I/R 损伤;我们的研究结果也与此相一致,在小鼠肾 I/R 损伤和 HK-2 细胞的 H/R 损伤中, FOXO1 的表达都显著升高,由此说明 FOXO1 的表达会加重肾 I/R 损伤。在缺血再灌注损伤诱导的急性肾损伤中不可避免地存在细胞凋亡。细胞凋亡是受多种基因调控的程序性细胞死亡;在凋亡信号调控下,线粒体膜电位之间的转运孔被打开,膜电位崩解,最终导致细胞凋亡<sup>[30]</sup>。大量研究表明, Caspases 是参与调控细胞凋亡的重要蛋白<sup>[31]</sup>。当线粒体膜通透性改变时,启动 Caspase 9 的表达, Caspase 3 作为最后的效应器元件被激活, Cleaved Caspase 3 是其活化形式,进入内源性凋亡通路,阻碍 PARP 发挥正常功能,导致细胞凋亡<sup>[32]</sup>。Wang 等<sup>[12]</sup>在 HK-2 细胞 H/R 损伤研究中,用 FOXO1 的抑制剂 AS1842856 进行预处理,结果显示与

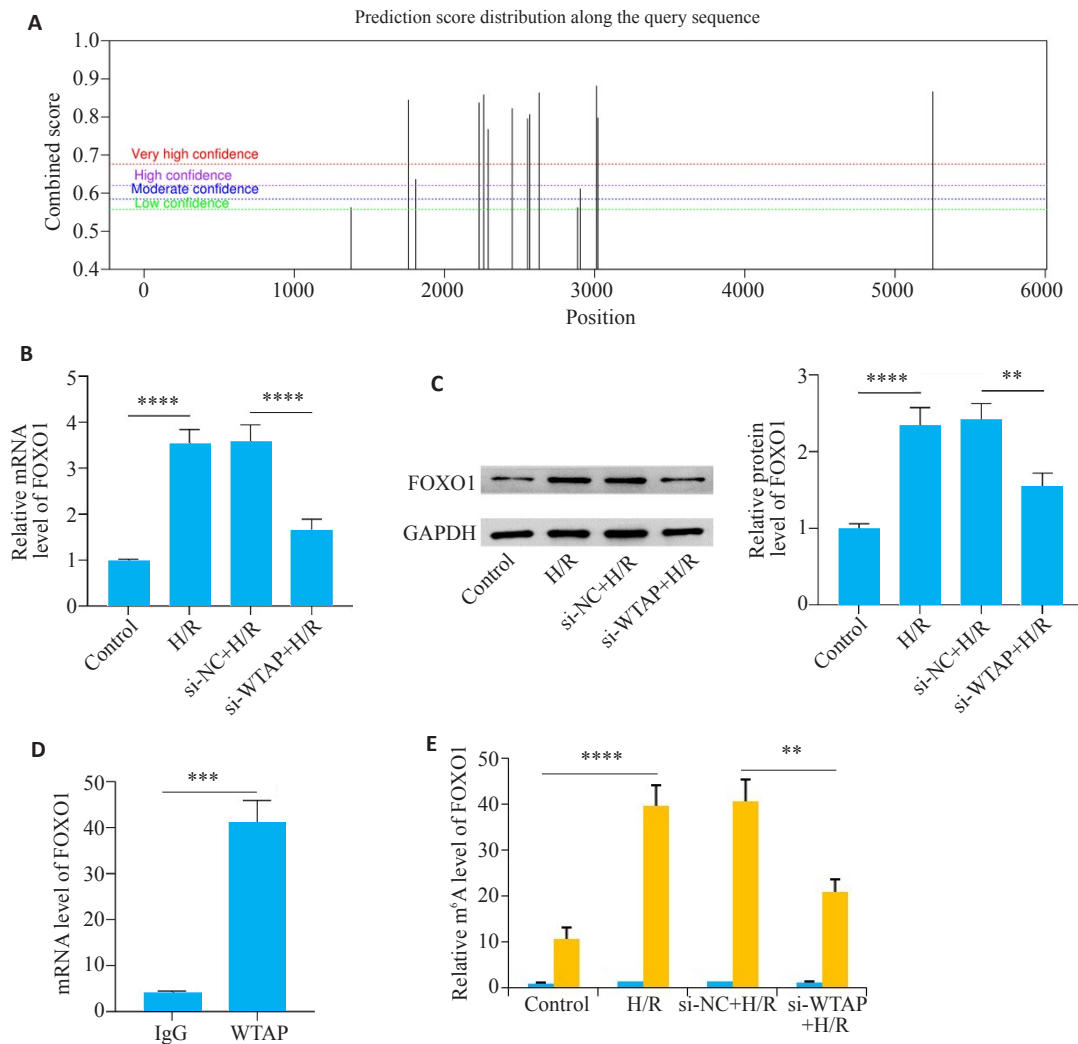


图5 WTAP通过FOXO1发挥作用及其m<sup>6</sup>A水平

Fig.5 WTAP functions through FOXO1 and its m<sup>6</sup>A levels. A: Prediction of m<sup>6</sup>A modification site of FOXO1 using SRAMP. B: Changes of FOXO1 mRNA level after WTAP knockdown. C: Expression level of FOXO1 protein after WTAP knockdown. D: RIP experiment showing the interaction between WTAP and FOXO1. E: m<sup>6</sup>A level of FOXO1 detected by MeRIP-qPCR. \*\**P*<0.01, \*\*\**P*<0.001, \*\*\*\**P*<0.0001.

对照组相比, TUNEL 阳性染色的百分比降低, pro-Caspase3 的裂解减少, 说明 FOXO1 在 HK-2 细胞的 H/R 损伤中促进了细胞凋亡。本次研究结果显示, 在小鼠肾 I/R 损伤后, TUNEL 阳性肾小管上皮细胞数目增加, 说明损伤后凋亡加重; 同时, 通过体外研究 HK-2 细胞的 H/R 损伤, Caspase3 活性检测结果显示 H/R 损伤后 Caspase3 活性显著增加, 进一步证明了肾 I/R 损伤的机制与凋亡有关; 以上研究结果与前人相一致, 都证明了 FOXO1 在急性肾损伤中起促凋亡的作用。

m<sup>6</sup>A 修饰在多种生物过程中发挥着重要作用, 但有关 FOXO1 这一重要转录因子的 m<sup>6</sup>A 修饰研究甚少。目前相关学者报道了 FOXO1 的 m<sup>6</sup>A 修饰在内皮细胞炎症和动脉粥样硬化中的作用。内皮细胞炎症过程中, FOXO1 的 m<sup>6</sup>A 修饰水平显著升高; METTL14 敲低之后, FOXO1 的表达显著降低; MeRIP 实验证实 METTL14 可直接与 FOXO1 mRNA 结合, 增加其 m<sup>6</sup>A

修饰, 促进其表达, 诱导内皮细胞炎症反应和动脉粥样硬化斑块形成<sup>[13]</sup>。虽然本研究采用 SRAMP (<http://www.cuilab.cn/sramp/>) 网站预测了 FOXO1 有多个高水平的 m<sup>6</sup>A 修饰位点, 但仍需进一步的实验证明。通过 MeRIP 实验检测了 HK-2 细胞 H/R 损伤中, FOXO1 的 m<sup>6</sup>A 修饰水平显著升高; 沉默 WTAP, FOXO1 的 m<sup>6</sup>A 修饰水平显著降低。以上结果提示, WTAP 可直接作用于 FOXO1 mRNA, 增加其 m<sup>6</sup>A 修饰, 调控其表达, 诱导 HK-2 细胞凋亡。

综上所述, 在 I/R 损伤的小鼠肾组织和 H/R 损伤的 HK-2 细胞中, WTAP 和 FOXO1 表达均上调; 沉默 WTAP 可明显抑制和 HK-2 细胞的 H/R 损伤, 其机制可能是沉默 WTAP, 减弱了 FOXO1 的 m<sup>6</sup>A 修饰, 降低了 FOXO1 及凋亡相关蛋白的表达, 从而抑制细胞凋亡, 对肾 I/R 损伤起到保护作用。本研究证明 WTAP-FOXO1 可能成为治疗肾 I/R 损伤的潜在靶点, 抵抗 H/R 损伤。

但由于 HK-2 细胞属于肾小管上皮细胞, WTAP-FOXO1 轴能否参与调控肾 I/R 损伤中其他类型细胞的功能, 还需进一步探讨。

### 参考文献:

- [1] Xu Y, Yuan XD, Wu JJ, et al. The N6-methyladenosine mRNA methylase METTL14 promotes renal ischemic reperfusion injury via suppressing YAP1[J]. *J Cell Biochem*, 2020, 121(1): 524-33.
- [2] Liang H, Huang J, Huang Q, et al. Pharmacological inhibition of Rac1 exerts a protective role in ischemia/reperfusion-induced renal fibrosis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 503(4): 2517-23.
- [3] Zhou HL, Zhang RL, Anand P, et al. Metabolic reprogramming by the S-nitroso-CoA reductase system protects against kidney injury [J]. *Nature*, 2019, 565(7737): 96-100.
- [4] Mehran R, Dangas GD, Weisbord SD. Contrast-associated acute kidney injury[J]. *N Engl J Med*, 2019, 380(22): 2146-55.
- [5] Roundtree IA, Evans ME, Pan T, et al. Dynamic RNA modifications in gene expression regulation[J]. *Cell*, 2017, 169(7): 1187-200.
- [6] Vu LP, Pickering BF, Cheng YM, et al. The N6-methyladenosine (m<sup>6</sup>A)-forming enzyme METTL3 controls myeloid differentiation of normal hematopoietic and leukemia cells[J]. *Nat Med*, 2017, 23(11): 1369-76.
- [7] Winkler R, Gillis E, Lasman L, et al. m<sup>6</sup>A modification controls the innate immune response to infection by targeting type I interferons [J]. *Nat Immunol*, 2019, 20(2): 173-82.
- [8] Wei WJ, Sun JY, Zhang H, et al. Circ0008399 interaction with WTAP promotes assembly and activity of the m<sup>6</sup>A methyltransferase complex and promotes cisplatin resistance in bladder cancer [J]. *Cancer Res*, 2021, 81(24): 6142-56.
- [9] Zhang L, Khadka B, Wu JY, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells-derived exosomal miR-425-5p inhibits acute myeloid leukemia cell proliferation, apoptosis, invasion and migration by targeting WTAP[J]. *OncoTargets Ther*, 2021, 14: 4901-14.
- [10] Wang JY, Zhang JH, Ma Y, et al. WTAP promotes myocardial ischemia/reperfusion injury by increasing endoplasmic reticulum stress via regulating m<sup>6</sup>A modification of ATF4 mRNA [J]. *Aging*, 2021, 13(8): 11135-49.
- [11] Sanchez AMJ, Candau RB, Bernardi H. FoxO transcription factors: their roles in the maintenance of skeletal muscle homeostasis [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2014, 71(9): 1657-71.
- [12] Wang D, Wang YQ, Zou XT, et al. FOXO1 inhibition prevents renal ischemia-reperfusion injury via cAMP-response element binding protein/PPAR- $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$ -mediated mitochondrial biogenesis [J]. *Br J Pharmacol*, 2020, 177(2): 432-48.
- [13] Jian DD, Wang Y, Jian LG, et al. METTL14 aggravates endothelial inflammation and atherosclerosis by increasing FOXO1 N6-methyladenosine modifications[J]. *Theranostics*, 2020, 10(20): 8939-56.
- [14] Jonkhout N, Tran J, Smith MA, et al. The RNA modification landscape in human disease[J]. *RNA*, 2017, 23(12): 1754-69.
- [15] Batista PJ. The RNA modification N6-methyladenosine and its implications in human disease[J]. *Genom Proteom Bioinform*, 2017, 15(3): 154-63.
- [16] Yao WF, Han XE, Ge MA, et al. N6-methyladenosine (m<sup>6</sup>A) methylation in ischemia-reperfusion injury[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(6): 478.
- [17] Liu RJ, Long T, Li J, et al. Structural basis for substrate binding and catalytic mechanism of a human RNA: m<sup>5</sup>C methyltransferase NSun6[J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(11): 6684-97.
- [18] Glasner H, Riml C, Micura R, et al. Label-free, direct localization and relative quantitation of the RNA nucleobase methylations m<sup>6</sup>A, m<sup>5</sup>C, m<sup>3</sup>U, and m<sup>5</sup>U by top-down mass spectrometry [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(13): 8014-25.
- [19] Malbec L, Zhang T, Chen YS, et al. Dynamic methylome of internal mRNA N7-methylguanosine and its regulatory role in translation[J]. *Cell Res*, 2019, 29(11): 927-41.
- [20] Tuck MT. The formation of internal 6-methyladenine residues in eucaryotic messenger RNA[J]. *Int J Biochem*, 1992, 24(3): 379-86.
- [21] Schöller E, Weichmann F, Treiber T, et al. Interactions, localization, and phosphorylation of the m<sup>6</sup>A generating METTL3-METTL14-WTAP complex[J]. *RNA*, 2018, 24(4): 499-512.
- [22] Vilalva KH, Memic FT, Silveira MRG, et al. Use of methylene blue to treat hypovolemic shock followed by ischemia-reperfusion injury in the postoperative orthotopic liver transplant patient: a case report [J]. *Exp Clin Transplant*, 2018, 16(4): 511-4.
- [23] Chies AB, Nakazato PCG, Spadella MA, et al. Rivastigmine prevents injury induced by ischemia and reperfusion in rat liver[J]. *Acta Cir Bras*, 2018, 33(9): 775-84.
- [24] de Perrot M, Liu MY, Waddell TK, et al. Ischemia-reperfusion-induced lung injury[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003, 167(4): 490-511.
- [25] Wu HL, Chen G, Wyburn KR, et al. TLR4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury[J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(10): 2847-59.
- [26] Koutsogiannidis CP C, Johnson EO. Pharmacological neuroprotection in cardiac surgery: effectiveness of pharmacologic-preconditioning with erythromycin[J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2018, 16(4): 329-35.
- [27] Song HW, Feng X, Zhang H, et al. METTL3 and ALKBH5 oppositely regulate m<sup>6</sup>A modification of TFEB mRNA, which dictates the fate of hypoxia/reoxygenation-treated cardiomyocytes [J]. *Autophagy*, 2019, 15(8): 1419-37.
- [28] Li WY, Zhu QB, Xu XY, et al. miR-27a-3p suppresses cerebral ischemia-reperfusion injury by targeting FOXO1[J]. *Aging*, 2021, 13(8): 11727-37.
- [29] Wen Y, Zhang XJ, Liu XY, et al. Suppression of lncRNA SNHG15 protects against cerebral ischemia-reperfusion injury by targeting miR-183-5p/FOXO1 axis[J]. *Am J Transl Res*, 2020, 12(10): 6250-63.
- [30] Hu FD, Zhang SY, Chen X, et al. miR-219a-2 relieves myocardial ischemia-reperfusion injury by reducing calcium overload and cell apoptosis through HIF1 $\alpha$ /NMDAR pathway[J]. *Exp Cell Res*, 2020, 395(1): 112172.
- [31] Liu Y, Liu YH, Huang XC, et al. Protective effects and mechanism of curcumin on myocardial injury induced by coronary microembolization[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(4): 5695-703.
- [32] 华海燕, 严杰, 秦宇芬, 等. 五味子乙素通过抑制心肌细胞凋亡减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤的实验研究[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2022, 27(8): 848-56.