

## • 论著 •

## 甲基化转移酶 WTAP 调节转录激活因子 4 表达加剧缺氧 / 复氧诱导的心肌细胞损伤

杨娜<sup>1</sup> 曹敏<sup>2</sup><sup>1</sup> 成都市第三人民医院麻醉科, 四川成都 610000; <sup>2</sup> 成都市第三人民医院泌尿外科, 四川成都 610000

通信作者: 曹敏, Email: 390952750@qq.com

**【摘要】 目的** 观察甲基化转移酶 Wilms 肿瘤蛋白 1 相关蛋白(WTAP)在缺氧 / 复氧(H/R)诱导的心肌细胞损伤中的调节作用及其分子机制。**方法** ① 实验一: 将 H9C2 心肌细胞分为空白对照组和 H/R 模型组。采用 H/R 诱导 H9C2 细胞建立心肌缺血 / 再灌注(I/R)损伤模型; 空白对照组不进行处理。采用 N6-甲基腺苷(m6A)RNA 甲基化测定试剂盒检测 m6A 水平; 分别采用实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)和蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测甲基化转移酶[WTAP、甲基转移酶样蛋白(METTTL3、METTL14)]的基因和蛋白表达水平。② 实验二: 将 H9C2 心肌细胞分为空白对照组、H/R+sh-NC 组、H/R+sh-WTAP 组。H/R+sh-WTAP 组转染 sh-WTAP 以敲降 WTAP 表达, 其余各组制模方法同实验一。转染 48 h 后, 采用流式细胞术检测细胞凋亡率; 采用 Western blotting 检测 WTAP、活化天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3(caspase-3)、活化多聚二磷酸腺苷酸核糖聚合酶(PARP)、转录激活因子 4(ATF4)、蛋白激酶 RNA 样内质网激酶(PERK)、磷酸化 PERK(p-PERK)和 CCAAT/ 增强子结合蛋白同源蛋白(CHOP)的蛋白表达水平; 采用免疫荧光染色观察 ATF4 阳性表达情况。③ 实验三: 将 H9C2 心肌细胞分为空白对照组、H/R+sh-NC 组、H/R+sh-WTAP 和 H/R+sh-WTAP+ATF4 组。H/R+sh-WTAP+ATF4 组用过表达质粒 ATF4 转染 H9C2 心肌细胞, 其余各组制模方法同实验二。采用流式细胞术检测细胞凋亡率; 采用 Western blotting 检测 ATF4、CHOP、活化 caspase-3 和活化 PARP 的蛋白表达水平。**结果** ① 实验一: H/R 模型组 m6A 甲基化水平较空白对照组显著上调。RT-qPCR 检测结果显示, H/R 模型组 METTL3、METTL14 和 WTAP 基因表达水平均较空白对照组显著上调, 以 WTAP 上调最显著; Western blotting 检测结果呈相同趋势。提示甲基化转移酶 WTAP 的表达水平在 H/R 诱导的心肌细胞中显著上调。② 实验二: H/R+sh-WTAP 组细胞凋亡水平较 H/R+sh-NC 组明显减少[(14.16±1.58)% 比 (24.51±2.38)%,  $P<0.05$ ]。Western blotting 检测结果显示, H/R+sh-WTAP 组 WTAP、活化 caspase-3、活化 PARP、p-PERK、ATF4 和 CHOP 的蛋白表达水平均较 H/R+sh-NC 组显著下调。荧光显微镜下显示, H/R+sh-WTAP 组 ATF4 阳性信号较 H/R+sh-NC 组显著减弱[(19.36±1.81)% 比 (32.83±2.69)%,  $P<0.01$ ]。提示敲降 WTAP 可抑制 H/R 诱导的心肌细胞凋亡和内质网应激。③ 实验三: H/R+sh-WTAP+ATF4 组细胞凋亡水平较 H/R+sh-WTAP 组显著增加[(26.61±2.76)% 比 (17.14±0.87)%,  $P<0.05$ ]。Western blotting 检测结果显示, H/R+sh-WTAP+ATF4 组 ATF4、CHOP、活化 caspase-3 和活化 PARP 的蛋白表达水平较 H/R+sh-WTAP 组显著上调。提示过表达 ATF4 可逆转 sh-WTAP 对 H/R 诱导的心肌细胞中内质网应激和细胞凋亡的抑制作用。**结论** 甲基化转移酶 WTAP 可调节 ATF4 表达, 介导细胞凋亡和内质网应激, 促进 H/R 诱导的心肌细胞损伤。

**【关键词】** 甲基化转移酶; Wilms 肿瘤蛋白 1 相关蛋白; 细胞凋亡; 内质网应激; 缺氧 / 复氧**基金项目:** 四川省科技计划项目(2022YFS0307)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20240108-00021

**Methyltransferase WTAP aggravates hypoxia/reoxygenation-induced myocardial cell injury by regulating the expression of activator of transcription 4**Yang Na<sup>1</sup>, Cao Min<sup>2</sup><sup>1</sup>Department of Anesthesiology, the Third People's Hospital of Chengdu, Chengdu 610000, Sichuan, China; <sup>2</sup>Department of Urology, the Third People's Hospital of Chengdu, Chengdu 610000, Sichuan, China

Corresponding author: Cao Min, Email: 390952750@qq.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the regulatory role of Wilms tumor 1-associating protein (WTAP) in hypoxia/reoxygenation (H/R)-induced cardiomyocyte injury and its molecular mechanism. **Methods** ① Experiment I: H9C2 cardiomyocytes were divided into blank control group and H/R model group. H/R was used to induce myocardial ischemia/reperfusion (I/R) injury model in H9C2 cells. The blank control group was not treated. N6-methyladenosine (m6A) RNA methylation assay kit was used to detect the level of m6A. Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) and Western blotting were used to detect the mRNA and protein expression levels of methyltransferases [WTAP, methyltransferase-like proteins (METTL3, METTL14)], respectively. ② Experiment II: H9C2 cardiomyocytes were divided into blank control group, H/R+sh-NC group, and H/R+sh-WTAP group. sh-WTAP was transfected to knock down the expression of WTAP in H/R+sh-WTAP group, and the model establishment method in

the other groups was the same as experiment I. At 48 hours after transfection, the apoptosis rate of cells was detected by flow cytometry. The protein expressions of WTAP, activated caspase-3, activated poly (ADP-ribose) polymerase (PARP), activating transcription factor 4 (ATF4), proline-rich receptor-like protein kinase (PERK), phosphorylated PERK (p-PERK) and CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein (CHOP) were detected by Western blotting. The positive expression of ATF4 was observed by immunofluorescence staining. ③ Experiment III: H9C2 cardiomyocytes were divided into blank control group, H/R+sh-NC group, H/R+sh-WTAP group and H/R+sh-WTAP+ATF4 group. The overexpression plasmid ATF4 was transfected into H9C2 cardiomyocytes, and the modeling method of the other groups were modeled the same as experiment II. The apoptosis rate was detected by flow cytometry. Western blotting was used to detect the protein expressions of ATF4, CHOP, activated caspase-3 and activated PARP. **Results** ① Experiment I: the methylation level of m6A in the H/R group was significantly higher than that in the blank control group. RT-qPCR results showed that the gene expressions of METTL3, METTL14 and WTAP in the H/R model group were significantly higher than those in the blank control group, and WTAP was the most significantly up-regulated. Western blotting results showed the same trend. These results suggested that the expression level of methyltransferase WTAP is significantly up-regulated in H/R-induced cardiomyocytes. ② Experiment II: the apoptosis level in H/R+sh-WTAP group was significantly lower than that in H/R+sh-NC group  $[(14.16 \pm 1.58)\% \text{ vs. } (24.51 \pm 2.38)\%, P < 0.05]$ . Western blotting results showed that the protein expressions of WTAP, activated caspase-3, activated PARP, p-PERK, ATF4 and CHOP in the H/R+sh-WTAP group were significantly lower than those in the H/R+sh-NC group. Fluorescence microscopy results showed that the ATF4 positive signal in the H/R+sh-WTAP group was significantly weaker than that in the H/R+sh-NC group  $[(19.36 \pm 1.81)\% \text{ vs. } (32.83 \pm 2.69)\%, P < 0.01]$ . The above results suggested that knockdown of WTAP could inhibit H/R-induced cardiomyocyte apoptosis and endoplasmic reticulum stress. ③ Experiment III: the apoptosis level of H/R+sh-WTAP+ATF4 group was significantly higher than that of H/R+sh-WTAP group  $[(26.61 \pm 2.76)\% \text{ vs. } (17.14 \pm 0.87)\%, P < 0.05]$ . Western blotting results showed that the protein expressions of ATF4, CHOP, activated caspase-3 and activated PARP in the H/R+sh-WTAP+ATF4 group were significantly higher than those in the H/R+sh-WTAP group. These results suggested that overexpression of ATF4 reversed the inhibitory effect of sh-WTAP on endoplasmic reticulum stress and apoptosis in H/R-induced cardiomyocytes. **Conclusion** Methyltransferase WTAP could regulate ATF4 expression, mediate cell apoptosis and endoplasmic reticulum stress, and promote H/R-induced myocardial cell injury.

**【Key words】** Methyltransferase; Wilms tumor 1-associating protein; Apoptosis; Endoplasmic reticulum stress; Hypoxia/reoxygenation

**Fund program:** Science and Technology Program of Sichuan Province (2022YFS0307)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20240108-00021

心肌梗死是指血流突然减少或停止,导致心肌死亡的急性心脏病<sup>[1]</sup>。心肌梗死的共同病理生理特征是缺血/再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)损伤。既往研究显示, I/R 过程中会发生凋亡、自噬、炎症和内质网应激等多种变化<sup>[2-4]</sup>。在缺血过程中,细胞凋亡是一个持续的过程,再灌注不仅可以恢复活细胞的氧气和葡萄糖供应,还可以为细胞凋亡的完成提供能量。有研究表明, I/R 促进天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3(caspase-3)的活化和细胞凋亡<sup>[5-7]</sup>。多聚二磷酸腺苷酸核糖聚合酶(poly ADP-ribose polymerase, PARP)已被证明可被裂解,通过心脏 I/R 损伤触发心肌细胞凋亡。CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白(CCAAT/enhance-binding protein homologous protein, CHOP)参与内质网应激诱导的凋亡信号通路, CHOP 的上调是蛋白激酶 RNA 样内质网激酶(proline-rich receptor-like protein kinase, PERK)信号通路激活的标志<sup>[8]</sup>。越来越多的证据也证实内质网应激加剧 I/R 诱导的损伤<sup>[9]</sup>。内质网应激通过诱导 PERK 激活未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)途径<sup>[10]</sup>。

此外,内质网应激可通过转录激活一系列受应激应答转录因子家族严密控制的适应性通路,包括转录激活因子 4(activating transcription factor 4, ATF4), ATF4 控制内质网应激相关基因的表达。有研究表明, ATF4 可受多种因素调控,包括缺氧胁迫和真核起始因子 2 $\alpha$ (eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$ , eIF2 $\alpha$ )的磷酸化<sup>[11-13]</sup>。最近的研究也表明, N6-甲基腺苷(N6-methyladenosine, m6A)是所有高等真核生物 mRNA 上最常见的内部修饰,也通过调节其 mRNA 的稳定性来调节 ATF4 的表达<sup>[14-15]</sup>。m6A 的形成是由甲基转移酶样蛋白 3(methyltransferase-like protein 3, METTL3)-甲基转移酶复合物催化<sup>[16]</sup>。Wilms 肿瘤蛋白 1 相关蛋白(Wilms tumor 1-associating protein, WTAP)已被证明可调节 m6A 甲基转移酶复合物向 mRNA 靶标的募集。尽管 WTAP 参与多种生物过程,如眼睛发育和血管平滑肌细胞增殖、癌细胞侵袭和迁移等,但其在心肌梗死中的作用尚不清楚<sup>[17-18]</sup>。因此,本研究探讨 WTAP 在心肌梗死中 m6A 修饰 ATF4 mRNA、内质网应激和细胞凋亡中的作用及其影响,现报告如下。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞来源及分组:** H9C2 细胞系购自美国 ATCC 公司,保存在含有 10% 胎牛血清(美国 Thermo Fisher 公司)的 DMEM 培养基中。①将 H9C2 心肌细胞分为空白对照组和缺氧/复氧(hypoxia/reoxygenation, H/R)模型组;②将 H9C2 心肌细胞分为空白对照组、H/R+sh-NC 组、H/R+sh-WTAP 组;③将 H9C2 心肌细胞分为空白对照组、H/R+sh-NC 组、H/R+sh-WTAP 组和 H/R+sh-WTAP+ATF4 组。

**1.2 细胞培养和 H/R 诱导的心肌细胞损伤模型制备:** 为模拟缺氧条件,取 H9C2 心肌细胞在无血清 DMEM 培养基中培养, 5% CO<sub>2</sub>、1% O<sub>2</sub> 和 94% N<sub>2</sub> 条件下培养 6 h。随后,将 H9C2 细胞在正常条件下培养 24 h,模拟再灌注。

**1.3 细胞转染:** 为了敲降 WTAP 的表达,利用 Lipofectamine 2000 试剂将 sh-WTAP 转染到 H9C2 细胞。为了过表达 ATF4,设计包装质粒 vector-ATF4,利用 Lipofectamine 2000 试剂将重组质粒转染到 H9C2 细胞。转染 48 h 后,收集细胞进行后续实验。

**1.4 m6A 甲基化检测:** 采用 m6A RNA 甲基化检测试剂盒检测细胞 m6A 甲基化水平,实验步骤按照试剂盒说明书进行。

**1.5 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测蛋白表达水平:** 利用 RIPA 裂解液提取总蛋白,BCA 蛋白浓度测定试剂盒(北京索莱宝公司)测定蛋白含量。随后每组取 30 μg 蛋白样本用 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE),转移到聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上,用溶解在含 0.1% 吐温 20 的缓冲盐溶液(Tris buffered saline with Tween 20, TBST)中的 3% 牛血清白蛋白(bovine albumin, BSA)室温下封闭 2 h。孵育一抗 WTAP、METTL3、METTL14、活化 caspase-3、活化 PARP、磷酸化 PERK(phosphorylated-PERK, p-PERK)、PERK、ATF4、CHOP 和 3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)4 ℃ 过夜, TBST 洗膜 3 次,与二抗 37 ℃ 孵育 1 h, TBST 洗膜后,增强化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)显色液(北京索莱宝公司)显色,最后利用 Image J 软件测定条带灰度值,以 GAPDH 作为内参进行蛋白定量分析。

**1.6 实时荧光定量聚合酶链反应(real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 检**

测基因水平:按照说明书要求利用 TRIzol 试剂提取总 RNA。使用 SYBR qPCR 混合试剂(美国 Bio-Rad 公司)在 ABI 7000 循环仪上进行 qRT-PCR。其中 GAPDH 为管家基因。采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法计算基因的相对表达量。

**1.7 流式细胞术检测细胞凋亡:** 按照分组分别将处理好的 H9C2 细胞(70% 融合度)用膜联蛋白 V (Annexin V)-异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)在黑暗中染色 20 min,再用碘化丙啶(propidium iodide, PI)孵育 20 min。使用 FACSscan 流式细胞仪检测细胞凋亡。

**1.8 免疫荧光染色检测细胞 ATF4 的表达水平:** 收集处理好的 H9C2 细胞,在室温下用 4% 多聚甲醛固定细胞 15 min,磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)洗涤,用含有 1% BSA 和 0.3% 曲拉通 X-100 的 PBS 在室温下封闭 1 h。将细胞与经 PBS 稀释的一抗在 4 ℃ 下孵育过夜。用 PBS 洗涤细胞 3 次,与相应的荧光二抗室温孵育 2 h。PBS 洗涤 3 次后,用 10 mg/L ATF4 抗体染色 30 min, PBS 洗涤,最后在荧光显微镜下观察并获取图像。

**1.9 统计学分析:** 使用 SPSS 11.0 统计软件处理数据。计量资料以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间差异比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

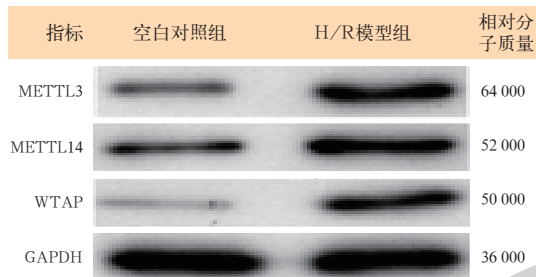
**2.1 甲基化转移酶 WTAP 在 H/R 诱导的心肌细胞中表达:** 与空白对照组比较, H/R 模型组 m6A 甲基化水平显著上调( $3.69 \pm 0.36$  比  $1.00 \pm 0.00$ ,  $P < 0.001$ )。RT-qPCR 检测结果显示(表 1),与空白对照组比较, H/R 模型组 METTL3、METTL14 和 WTAP 基因表达水平均显著上调,以 WTAP 上调最显著(均  $P < 0.01$ )。Western blotting 检测结果显示(表 1;图 1),与空白对

表 1 各组 H9C2 心肌细胞甲基化转移酶基因和蛋白表达水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别      | 孔数<br>(孔) | 基因表达( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) |                   |                   |
|---------|-----------|--------------------------------|-------------------|-------------------|
|         |           | METTL3                         | METTL14           | WTAP              |
| 空白对照组   | 3         | $1.00 \pm 0.00$                | $1.00 \pm 0.00$   | $1.00 \pm 0.00$   |
| H/R 模型组 | 3         | $1.87 \pm 0.14^a$              | $2.33 \pm 0.16^a$ | $5.85 \pm 0.29^a$ |
| 组别      | 孔数<br>(孔) | 蛋白表达                           |                   |                   |
|         |           | METTL3/<br>GAPDH               | METTL14/<br>GAPDH | WTAP/<br>GAPDH    |
| 空白对照组   | 3         | $0.26 \pm 0.03$                | $0.39 \pm 0.04$   | $0.11 \pm 0.02$   |
| H/R 模型组 | 3         | $0.60 \pm 0.08^a$              | $0.67 \pm 0.07^b$ | $0.51 \pm 0.06$   |

注: H/R 为缺氧/复氧, METTL 为甲基转移酶样蛋白, WTAP 为 Wilms 肿瘤蛋白 1 相关蛋白;与空白对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ , <sup>b</sup> $P < 0.05$

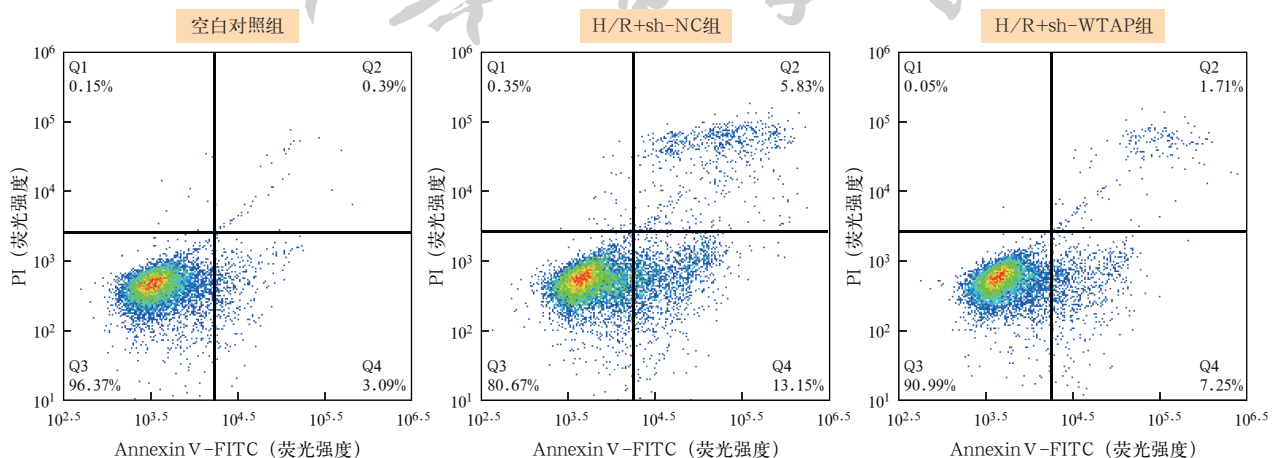
照组比较, H/R 模型组 METTL3、METTL14 和 WTAP 蛋白表达水平均显著上调(均  $P < 0.05$ )。提示甲基化转移酶 WTAP 的表达水平在 H/R 诱导的心肌细胞中显著上调。



H/R 为缺氧/复氧, METTL 为甲基转移酶样蛋白, WTAP 为 Wilms 肿瘤蛋白 1 相关蛋白, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶

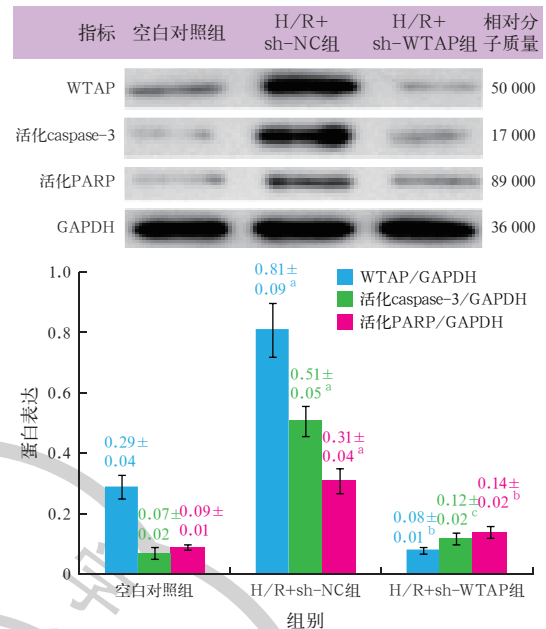
图 1 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测各组 H9C2 心肌细胞甲基化转移酶蛋白表达

**2.2 敲降 WTAP 可以抑制 H/R 诱导的心肌细胞凋亡:** RT-qPCR 检测结果显示, H/R+sh-WTAP 组 WTAP 基因表达较空白对照组显著下调( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ :  $0.24 \pm 0.06$  比  $1.00 \pm 0.00$ ,  $P < 0.01$ ), 证实 sh-WTAP 转染成功。流式细胞术检测结果显示(图 2), H/R+sh-NC 组细胞凋亡水平较空白对照组显著增加[( $24.51 \pm 2.38$ )% 比 ( $6.12 \pm 2.09$ )%,  $P < 0.01$ ]; H/R+sh-WTAP 组细胞凋亡水平较 H/R+sh-NC 组显著减少[( $14.16 \pm 1.58$ )% 比 ( $24.51 \pm 2.38$ )%,  $P < 0.05$ ]。Western blotting 检测结果显示(图 3), 与空白对照组比较, H/R+sh-NC 组 WTAP、活化 caspase-3 和活化 PARP 的蛋白表达水平均显著上调(均  $P < 0.01$ ); 与 H/R+sh-NC 组比较, H/R+sh-WTAP 组 WTAP、活化 caspase-3 和活化 PARP 的蛋白表达水平均显著下调(均  $P < 0.05$ )。提示敲降 WTAP 可以抑制 H/R 诱导的心肌细胞凋亡。



注: H/R 为缺氧/复氧, WTAP 为 Wilms 肿瘤蛋白 1 相关蛋白, Annexin V 为膜联蛋白 V, FITC 为异硫氰酸荧光素, PI 为碘化丙啶

图 2 流式细胞术检测各组 H9C2 心肌细胞的细胞凋亡水平

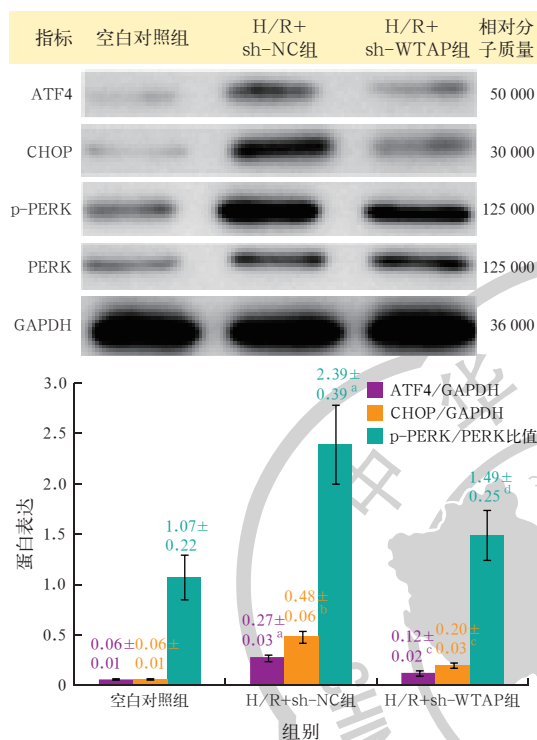


WTAP 为 Wilms 肿瘤蛋白 1 相关蛋白, caspase-3 为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3, PARP 为多聚二磷酸腺苷核糖聚合酶, H/R 为缺氧/复氧, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶; 与空白对照组比较,  $^aP < 0.01$ ; 与 H/R+sh-NC 组比较,  $^bP < 0.01$ ,  $^cP < 0.05$

图 3 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测各组 H9C2 心肌细胞 WTAP、活化 caspase-3 和活化 PARP 的蛋白表达

**2.3 敲降 WTAP 可以抑制 H/R 诱导的心肌细胞内质网应激:** Western blotting 检测结果显示(图 4), 与空白对照组比较, H/R+sh-NC 组 ATF4、p-PERK 和 CHOP 的蛋白表达水平均显著上调(均  $P < 0.05$ ); 与 H/R+sh-NC 组比较, H/R+sh-WTAP 组 ATF4、p-PERK 和 CHOP 的蛋白表达水平均显著下调(均  $P < 0.05$ )。免疫荧光染色结果显示(图 5), H/R+sh-NC 组 ATF4 阳性信号较空白对照组显著增加, 阳性率明显升高[( $32.83 \pm 2.69$ )% 比 ( $7.99 \pm 1.71$ )%]; H/R+sh-WTAP

组 ATF4 阳性信号较 H/R+sh-NC 组显著减弱, ATF4 阳性率明显降低[(19.36±1.81)%比(32.83±2.69)%], 差异均有统计学意义(均  $P<0.01$ )。提示 sh-WTAP 可显著抑制 H/R 诱导的心肌细胞内质网应激。



ATF4 为转录激活因子 4, PERK 为蛋白激酶 RNA 样内质网应激, p-PERK 为磷酸化 PERK, CHOP 为 CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白, H/R 为缺氧/复氧, WTAP 为 Wilms 肿瘤蛋白 1 相关蛋白, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶;与空白对照组比较, <sup>a</sup> $P<0.01$ , <sup>b</sup> $P<0.05$ ;与 H/R+sh-NC 组比较, <sup>c</sup> $P<0.05$ , <sup>d</sup> $P<0.01$

图 4 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测各组 H9C2 心肌细胞 ATF4、PERK、p-PERK 和 CHOP 的蛋白表达

**2.4 过表达 ATF4 可以逆转 sh-WTAP 对 H/R 诱导的心肌细胞损伤的保护作用:**过表达 ATF4 质粒转染后, RT-qPCR 检测结果显示, H/R+sh-WTAP+ATF4 组 ATF4 基因表达水平较空白对照组显著上调

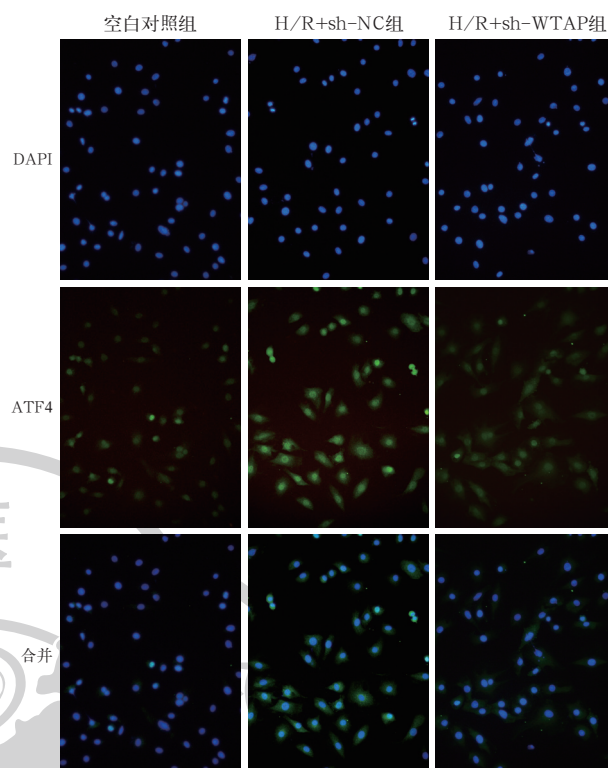
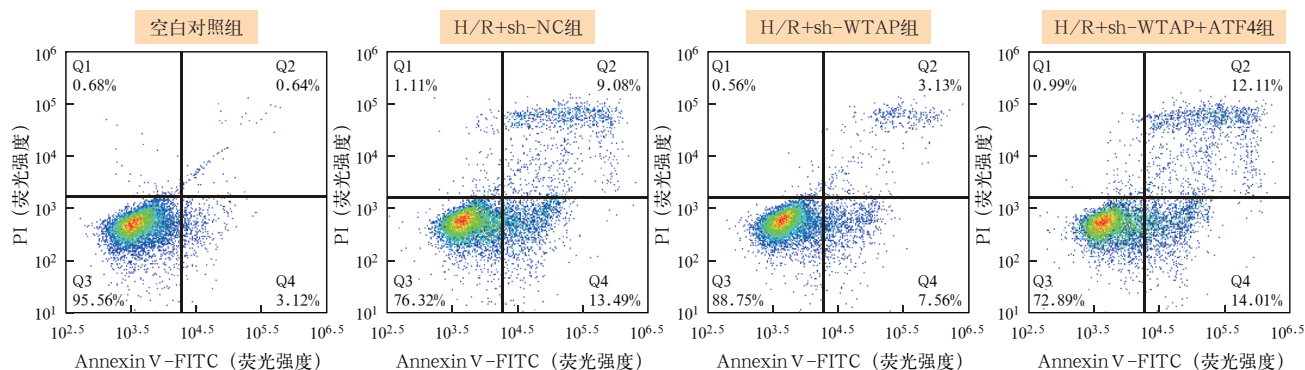


图 5 荧光显微镜下观察各组 H9C2 心肌细胞转录激活因子 4 (ATF4) 阳性信号 4', 6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI) 标记细胞核呈蓝色, ATF4 阳性信号呈绿色。空白对照组 ATF4 阳性信号较弱;缺氧/复氧(H/R)+sh-NC 组 ATF4 阳性信号显著增强;H/R+sh-WTAP 组 ATF4 阳性信号较 H/R+sh-NC 组显著减弱;WTAP 为 Wilms 肿瘤蛋白 1 相关蛋白 免疫荧光染色 中倍放大

( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ : 5.86±0.48 比 1.00±0.00,  $P<0.01$ ), 证实 ATF4 过表达质粒转染成功。流式细胞术检测结果显示(图 6;表 3), H/R+sh-WTAP+ATF4 组细胞凋亡水平较 H/R+sh-WTAP 组显著增加。Western blotting 检测结果显示(图 7;表 3),与 H/R+sh-WTAP 组比较, H/R+sh-WTAP+ATF4 组 ATF4、CHOP、活化 caspase-3 和活化 PARP 的蛋白表达水平显著上调(均  $P<0.05$ )。提示过表达 ATF4 可以逆转 sh-WTAP 对 H/R 诱导的心肌细胞中内质网应激和细胞凋亡的抑制作用。



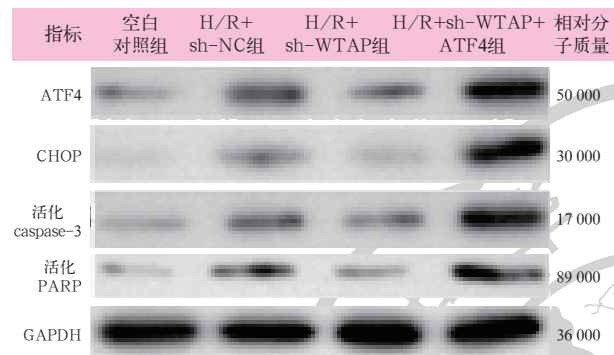
注: H/R 为缺氧/复氧, WTAP 为 Wilms 肿瘤蛋白 1 相关蛋白, Annexin V 为膜联蛋白 V, FITC 为异硫氰酸荧光素, PI 为碘化丙啶

图 6 流式细胞术检测各组 H9C2 心肌细胞的细胞凋亡水平

表 3 各组 H9C2 心肌细胞的细胞凋亡水平及 ATF4、CHOP、活化 caspase-3 和活化 PARP 蛋白表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别                 | 孔数<br>(孔) | 细胞凋亡率<br>(%)              | ATF4 蛋白<br>(ATF4/GAPDH)  | CHOP 蛋白<br>(CHOP/GAPDH)  | 活化 caspase-3 蛋白<br>(活化 caspase-3/GAPDH) | 活化 PARP 蛋白<br>(活化 PARP/GAPDH) |
|--------------------|-----------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|-----------------------------------------|-------------------------------|
| 空白对照组              | 3         | 6.80 ± 0.96               | 0.12 ± 0.01              | 0.31 ± 0.04              | 0.11 ± 0.01                             | 0.06 ± 0.01                   |
| H/R+sh-NC 组        | 3         | 24.40 ± 2.81 <sup>a</sup> | 0.39 ± 0.04 <sup>a</sup> | 0.24 ± 0.02 <sup>a</sup> | 0.33 ± 0.02 <sup>b</sup>                | 0.26 ± 0.03 <sup>a</sup>      |
| H/R+sh-WTAP 组      | 3         | 17.14 ± 0.87 <sup>c</sup> | 0.18 ± 0.03 <sup>c</sup> | 0.09 ± 0.02 <sup>c</sup> | 0.23 ± 0.04 <sup>c</sup>                | 0.10 ± 0.01 <sup>d</sup>      |
| H/R+sh-WTAP+ATF4 组 | 3         | 26.61 ± 2.76 <sup>e</sup> | 0.48 ± 0.06 <sup>e</sup> | 0.49 ± 0.06 <sup>f</sup> | 0.49 ± 0.09 <sup>e</sup>                | 0.37 ± 0.03 <sup>f</sup>      |

注: ATF4 为转录激活因子 4, CHOP 为 CCAAT/ 增强子结合蛋白同源蛋白, caspase-3 为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3, PARP 为多聚二磷酸腺苷酸核糖聚合酶, H/R 为缺氧/复氧, WTAP 为 Wilms 肿瘤蛋白 1 相关蛋白, GAPDH 为 3- 磷酸甘油醛脱氢酶; 与空白对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ , <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与 H/R+sh-NC 组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$ ; 与 H/R+sh-WTAP 组比较, <sup>e</sup> $P < 0.05$ , <sup>f</sup> $P < 0.01$



ATF4 为转录激活因子 4, CHOP 为 CCAAT/ 增强子结合蛋白同源蛋白, caspase-3 为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3, PARP 为多聚二磷酸腺苷酸核糖聚合酶, H/R 为缺氧/复氧, WTAP 为 Wilms 肿瘤蛋白 1 相关蛋白, GAPDH 为 3- 磷酸甘油醛脱氢酶

图 7 蛋白质免疫印迹试验 (Western blotting) 检测各组 H9C2 心肌细胞 ATF4、CHOP、活化 caspase-3 和活化 PARP 蛋白表达

### 3 讨论

心肌 I/R 损伤是急性心肌梗死后血液恢复供应引发的心肌损伤,伴随心律失常、心功能减弱和心肌组织损伤。随着溶栓治疗和体外循环的普及应用, I/R 损伤更加常见<sup>[19]</sup>。明确 I/R 损伤的分子机制,探索潜在的改善 I/R 诱发心肌损伤的治疗策略,对于临床挽救患者和改善患者生活质量具有重要意义。m6A 甲基化是最丰富的稳定 RNA 内部修饰模式,具有多种细胞调节功能,包括调控 mRNA 剪接、RNA 加工、核转运、转录、翻译和 RNA 稳定性。大量研究表明, RNA 的 m6A 修饰在 I/R 所致心肌损伤中起着重要作用<sup>[20]</sup>。沉默 METTL3 通过阻碍心肌成纤维细胞激活来减轻心肌梗死引起的心肌纤维化<sup>[21]</sup>。m6A 去甲基酶 ALKBH5 通过去甲基化 YTHDF1 mRNA 介导心脏再生的调节作用<sup>[22]</sup>。RNA 的 m6A 甲基化修饰在缺血性心脏病中显著升高,本研究显示, H/R 模型组甲基化转移酶 WTAP、METTL3 和 METTL14 表达水平均较空白对照组显著上调。

细胞凋亡和内质网应激与心肌 I/R 有关。内质网参与蛋白质折叠和转运过程。细胞微环境失衡会导致内质网应激的发生<sup>[23]</sup>。内质网应激涉及多

种疾病的发病机制,包括糖尿病、病毒感染、色素性视网膜炎、癌症和心肌梗死等<sup>[24-25]</sup>。在内质网应激过程中, ATF4 激活一系列参与各种适应途径的基因。细胞凋亡是一种程序性细胞死亡,是心肌梗死的另一个主要病理过程。研究表明,细胞凋亡在心肌细胞死亡过程中发挥作用<sup>[26]</sup>。本研究显示,沉默 WTAP 可通过抑制 ATF4 表达,从而抑制 H/R 诱导的心肌细胞损伤。

本研究不仅揭示了 WTAP 在心肌 I/R 损伤中的作用,而且深入探究了其潜在的分子机制。此外,敲低 WTAP 可显著抑制 H/R 诱导的心肌细胞损伤。在分子机制方面,敲低 WTAP 通过下调 ATF4 的表达水平,抑制心肌细胞凋亡和内质网应激发挥保护作用。本研究还显示,过表达 ATF4 可以逆转沉默甲基化转移酶 WTAP 在 H/R 诱导的心肌细胞中的保护作用。未来本课题组将在心肌 I/R 大鼠模型中进一步验证 WTAP 的调控分子机制。本研究可能为治疗心肌 I/R 损伤提供潜在的治疗策略,开发以 WTAP 为靶点的治疗药物。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

### 参考文献

- [1] Wu DD, Wang J, Wang HG, et al. Protective roles of bioactive peptides during ischemia-reperfusion injury: from bench to bedside [J]. Life Sci, 2017, 180: 83-92. DOI: 10.1016/j.lfs.2017.05.014.
- [2] Turer AT, Hill JA. Pathogenesis of myocardial ischemia-reperfusion injury and rationale for therapy [J]. Am J Cardiol, 2010, 106 (3): 360-368. DOI: 10.1016/j.amjcard.2010.03.032.
- [3] Zhao HJ, Yang YH, Si XY, et al. The role of pyroptosis and autophagy in ischemia reperfusion injury [J]. Biomolecules, 2022, 12 (7): 1010. DOI: 10.3390/biom12071010.
- [4] 张正义, 李培杰, 陈天铎, 等. 吗啡对急性心肌梗死再灌注损伤保护效应的实验研究 [J]. 中国危重病急救医学, 2004, 16 (11): 656-659. DOI: 10.3760/j.issn:1003-0603.2004.11.005.
- [5] Lu N, Sun YG, Zheng XX. Orientin-induced cardioprotection against reperfusion is associated with attenuation of mitochondrial permeability transition [J]. Planta Med, 2011, 77 (10): 984-991. DOI: 10.1055/s-0030-1250718.
- [6] 上官海娟, 徐江, 官洪山, 等. 当归对心肌梗死后心肌细胞凋亡和心室重构的影响 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2008, 15 (1): 39-44, 插 1. DOI: 10.3321/j.issn:1008-9691.2008.01.012.
- [7] 马超英, 夏红梅, 耿耘. 加减陷胸汤承汤合参麦注射液对急性呼吸窘迫综合征大鼠细胞凋亡的影响 [J]. 中国中西医结合急

- 救杂志, 2006, 13 (4): 195–197. DOI: 10.3321/j.issn:1008–9691.2006.04.001.
- [ 8 ] Li B, Li R, Zhang C, et al. MicroRNA–7a/b protects against cardiac myocyte injury in ischemia/reperfusion by targeting poly(ADP-ribose) polymerase [J]. PLoS One, 2014, 9 (3): e90096. DOI: 10.1371/journal.pone.0090096.
- [ 9 ] Feng DY, Wang B, Wang L, et al. Pre-ischemia melatonin treatment alleviated acute neuronal injury after ischemic stroke by inhibiting endoplasmic reticulum stress-dependent autophagy via PERK and IRE1 signalings [J]. J Pineal Res, 2017, 62 (3): e12395. DOI: 10.1111/jpi.12395.
- [ 10 ] Rozpedek W, Pytel D, Mucha B, et al. The role of the PERK/eIF2 $\alpha$ /ATF4/CHOP signaling pathway in tumor progression during endoplasmic reticulum stress [J]. Curr Mol Med, 2016, 16 (6): 533–544. DOI: 10.2174/1566524016666160523143937.
- [ 11 ] Shi JJ, Jiang Q, Ding XW, et al. The ER stress-mediated mitochondrial apoptotic pathway and MAPKs modulate tachypacing-induced apoptosis in HL–1 atrial myocytes [J]. PLoS One, 2015, 10 (2): e0117567. DOI: 10.1371/journal.pone.0117567.
- [ 12 ] Blais JD, Filipenko V, Bi MX, et al. Activating transcription factor 4 is translationally regulated by hypoxic stress [J]. Mol Cell Biol, 2004, 24 (17): 7469–7482. DOI: 10.1128/MCB.24.17.7469–7482.2004.
- [ 13 ] Vatter KM, Wek RC. Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101 (31): 11269–11274. DOI: 10.1073/pnas.0400541101.
- [ 14 ] Tuck MT. The formation of internal 6-methyladenine residues in eucaryotic messenger RNA [J]. Int J Biochem, 1992, 24 (3): 379–386. DOI: 10.1016/0020–711x(92)90028–y.
- [ 15 ] Fu Y, Dominissini D, Rechavi G, et al. Gene expression regulation mediated through reversible m<sup>6</sup>A RNA methylation [J]. Nat Rev Genet, 2014, 15 (5): 293–306. DOI: 10.1038/nrg.3724.
- [ 16 ] Ping XL, Sun BF, Wang L, et al. Mammalian WTAP is a regulatory subunit of the RNA N<sup>6</sup>-methyladenosine methyltransferase [J]. Cell Res, 2014, 24 (2): 177–189. DOI: 10.1038/cr.2014.3.
- [ 17 ] Anderson AM, Weasner BP, Weasner BM, et al. The drosophila Wilms' tumor 1-associating protein (WTAP) homolog is required for eye development [J]. Dev Biol, 2014, 390 (2): 170–180. DOI: 10.1016/j.ydbio.2014.03.012.
- [ 18 ] Chen YH, Peng CH, Chen JR, et al. WTAP facilitates progression of hepatocellular carcinoma via m6A–HuR-dependent epigenetic silencing of ETS1 [J]. Mol Cancer, 2019, 18 (1): 127. DOI: 10.1186/s12943-019-1053–8.
- [ 19 ] Pagliaro BR, Cannata F, Stefanini GG, et al. Myocardial ischemia and coronary disease in heart failure [J]. Heart Fail Rev, 2020, 25 (1): 53–65. DOI: 10.1007/s10741-019-09831–z.
- [ 20 ] Zhuang YT, Li TT, Hu XX, et al. MetBil as a novel molecular regulator in ischemia-induced cardiac fibrosis via METTL3-mediated m6A modification [J]. FASEB J, 2023, 37 (3): e22797. DOI: 10.1096/fj.202201734R.
- [ 21 ] Cheng H, Li LN, Xue JQ, et al. TNC accelerates hypoxia-induced cardiac injury in a METTL3-dependent manner [J]. Genes (Basel), 2023, 14 (3): 591. DOI: 10.3390/genes14030591.
- [ 22 ] Han ZB, Wang XX, Xu ZH, et al. ALKBH5 regulates cardiomyocyte proliferation and heart regeneration by demethylating the mRNA of YTHDF1 [J]. Theranostics, 2021, 11 (6): 3000–3016. DOI: 10.7150/thno.47354.
- [ 23 ] Krebs J, Agellon LB, Michalak M. Ca<sup>2+</sup> homeostasis and endoplasmic reticulum (ER) stress: an integrated view of calcium signaling [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 460 (1): 114–121. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.02.004.
- [ 24 ] Luo B, Lin Y, Jiang S, et al. Endoplasmic reticulum stress eIF2 $\alpha$ –ATF4 pathway-mediated cyclooxygenase–2 induction regulates cadmium-induced autophagy in kidney [J]. Cell Death Dis, 2016, 7 (6): e2251. DOI: 10.1038/cddis.2016.78.
- [ 25 ] Oakes SA, Papa FR. The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology [J]. Annu Rev Pathol, 2015, 10: 173–194. DOI: 10.1146/annurev-pathol-012513-104649.
- [ 26 ] Yang ZB, Xie YL, Li MY, et al. Ramelteon alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury (MIRI) through Sirt3-dependent regulation of cardiomyocyte apoptosis [J]. Biomed Pharmacother, 2024, 172: 116229. DOI: 10.1016/j.biopha.2024.116229.

(收稿日期: 2024–01–08)  
(责任编辑: 张耘菲 李银平)

## • 科研新闻速递 •

### 老年患者术前使用咪达唑仑与以患者为中心的临床结局

#### ——一项多中心随机临床试验

术前苯二氮䓬类药物用于减轻患者的焦虑并可能提高患者的临床满意度,但术前口服咪达唑仑对接受手术的老年患者的临床满意度的影响尚不清楚。近期德国学者进行了一项双盲、平行、安慰剂对照的随机临床试验,旨在明确术前口服咪达唑仑与安慰剂对患者围手术期整体满意度的影响,为临床用药提供依据。该研究于 2017 年 10 月至 2019 年 5 月在德国 9 家医院进行(最后一次随访时间为 2019 年 6 月 24 日)。研究纳入年龄 65~80 岁、计划在全身麻醉下进行至少 30 min 择期住院手术并计划拔管的患者。数据分析时间为 2019 年 11 月至 2020 年 12 月。患者在麻醉诱导前 30~45 min 被随机分为口服咪达唑仑(3.75 mg)组( $n=309$ )和安慰剂组( $n=307$ )。主要结局为术后第 1 天使用自我报告的麻醉综合评估(EVAN-G)问卷评估患者整体满意度;次要结局包括主要结局的敏感性和亚组分析、围手术期患者生命体征、不良事件、严重并发症以及术后 30 d 内的认知和功能恢复。结果显示:在 616 例随机患者中,607 例被纳入初步分析,其中 377 例(62.1%)为男性,平均年龄( $71.9\pm 4.4$ )岁。口服咪达唑仑组与安慰剂组患者满意度的平均总体指数(SD)无差异[分别为  $69.5\pm 10.7$  和  $69.6\pm 10.8$ ,平均差异为 0.2, 95% 可信区间(95%CI)为  $-1.9\sim 1.6$ ,  $P=0.85$ ]。敏感性(根据方案人群、多重插补)和亚组分析(焦虑、虚弱、性别和既往手术经验)并未改变主要结果。除了安慰剂组麻醉诱导时患有高血压(收缩压 $\geq 160$  mmHg, 1 mmHg $\approx 0.133$  kPa)的患者比例较高之外,两组次要结局无显著差异。研究人员据此得出结论:术前单次低剂量口服咪达唑仑并未改变接受手术的老年患者或焦虑患者的围手术期整体满意度。这些结果可能受小剂量口服咪达唑仑的影响。进一步的试验,包括更广泛的人群及普通小剂量静脉咪达唑仑和血浆水平的测量是必要的。

蒋佳维, 编译自《JAMA Surg》, 2024, 159 (2): 129–138