

本文引用: 刘彦俊, 魏培坚, 黄智琪, 等. 过表达甲基转移酶 3 发挥促进心肌纤维化的作用研究[J]. 中国动脉硬化杂志, 2022, 30(6): 476-482.

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2022)30-06-0476-07

## 过表达甲基转移酶 3 发挥促进心肌纤维化的作用研究

刘彦俊<sup>1</sup>, 魏培坚<sup>2</sup>, 黄智琪<sup>3</sup>, 郭继深<sup>4</sup>, 陈泽润<sup>4</sup>, 朱杰宁<sup>1</sup>, 徐金东<sup>1</sup>, 单志新<sup>1,3,4</sup>, 郭惠明<sup>1</sup>

(1. 广东省心血管病研究所 广东省人民医院 广东省医学科学院, 广东省广州市 510080; 2. 汕头大学医学院, 广东省汕头市 515041; 3. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广东省广州市 510006; 4. 南方医科大学第二临床医学院, 广东省广州市 510280)

[关键词] 甲基转移酶 3; m6A 修饰; 心肌纤维化; 心肌成纤维细胞

[摘要] **目的** 研究过表达甲基转移酶 3(METTL3)对小鼠心肌纤维化的影响。**方法** 检测心衰患者和健康器官捐献者心肌 METTL3 表达水平。建立主动脉弓缩窄(TAC)手术诱导的 C57BL/6 小鼠心肌纤维化模型,检测 TAC 组与假手术组小鼠心肌 METTL3 表达水平。建立血管紧张素 II(Ang II)诱导小鼠心肌成纤维细胞(CF)的心肌纤维化细胞模型,并检测小鼠 CF 中 METTL3 的表达水平。利用腺病毒介导小鼠 CF 高表达 METTL3,检测纤维化相关基因 I 型胶原  $\alpha 1$  链(COL1 $\alpha 1$ )、III 型胶原  $\alpha 1$  链(COL3 $\alpha 1$ )和肌动蛋白  $\alpha 2$ (ACT $\alpha 2$ )的表达。通过流式细胞术、EdU 和 Transwell 细胞迁移实验检测小鼠 CF 的增殖和迁移能力。在整体水平鉴定心肌特异过表达 METTL3 对 TAC 小鼠心功能和心肌纤维化的影响。**结果** 心衰患者心肌中 METTL3 的表达显著升高( $P < 0.05$ )。TAC 小鼠心肌与 Ang II 诱导的小鼠 CF 中 METTL3 的表达显著增加( $P < 0.05$ )。过表达 METTL3 可显著提高小鼠 CF 的增殖、迁移能力和纤维化相关基因的表达。与假手术组小鼠相比,TAC 诱导心肌特异过表达 METTL3 小鼠心肌中纤维化相关基因表达显著增加,心肌纤维化和心功能损伤显著加重。**结论** 过表达 METTL3 具有促进心肌纤维化的作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### Study on overexpression of methyltransferase-like 3 promoting myocardial fibrosis

LIU Yanjun<sup>1</sup>, WEI Peijian<sup>2</sup>, HUANG Zhiqi<sup>3</sup>, GUO Jishen<sup>4</sup>, CHEN Zerun<sup>4</sup>, ZHU Jiening<sup>1</sup>, XU Jindong<sup>1</sup>, SHAN Zhixin<sup>1,3,4</sup>, GUO Huiming<sup>1</sup>

(1. Guangdong Cardiovascular Institute & Guangdong Provincial People's Hospital & Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou, Guangdong 510080, China; 2. Shantou University Medical College, Shantou, Guangdong 515041, China; 3. School of Biology and Biological Engineering, South China University of Technology, Guangzhou, Guangdong 510006, China; 4. The Second School of Clinical Medicine, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510280, China)

[KEY WORDS] methyltransferase-like 3; m6A modification; cardiac fibrosis; cardiac fibroblast

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of overexpression of methyltransferase-like 3 (METTL3) on myocardial fibrosis. **Methods** METTL3 protein expression was detected in the myocardium of patients with heart failure (HF) and the healthy donors by Western blot assay. A C57BL/6 mouse model of transverse aortic constriction (TAC) surgery-induced myocardial fibrosis was established, and METTL3 protein expression was detected in the myocardium of TAC mice and sham mice. A cell model of angiotensin II (Ang II)-induced myocardial fibrosis in mouse cardiac fibroblasts (CF) was established and used to detect METTL3 expression by Western blot assay. Expression of fibrosis-related genes, including collagen type I  $\alpha 1$  (COL1 $\alpha 1$ ), collagen type III  $\alpha 1$  (COL3 $\alpha 1$ ) and actin  $\alpha 2$  (ACT $\alpha 2$ ), was detected in mouse CF

[收稿日期] 2021-10-09

[修回日期] 2021-12-25

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82070254、81770264);广州市科技计划项目(202002030013、202002030039、202102080093);广东省自然科学基金项目(2021A1515011554);广东省人民医院心血管专项(2020XXG003)

[作者简介] 刘彦俊,硕士研究生,主要研究方向为心肌重构分子调控机制,E-mail 为 2963379371@qq.com。刘彦俊和魏培坚为本文并列第一作者。通信作者单志新,研究员,博士研究生导师,主要研究方向为非编码 RNA 与心肌重构,E-mail 为 shanzhixin@gdph.org.cn。通信作者郭惠明,主任医师,硕士研究生导师,主要研究方向为肥厚性心脏病的治疗,E-mail 为 guohuiming@163.net。

with adenovirus-mediated overexpression of METTL3. Flow cytometry, EdU and Transwell migration assay were used to detect proliferation and migration activity of mouse CF, respectively. Effects of cardiac specific expression of METTL3 on cardiac function and fibrosis were explored in mice subjected to TAC surgery. **Results** Protein expression of METTL3 was significantly increased in the myocardium of HF patients ( $P < 0.05$ ). Consistently, significant up-regulation of METTL3 was observed in the myocardium of TAC mice and Ang II-treated mouse CF ( $P < 0.05$ , respectively). Overexpression of METTL3 could markedly enhance mouse CF proliferation and migration activities, as well as expression of fibrosis-related genes in mouse CF. Compared with mice in the sham group, significant increase of fibrosis-related gene expression, cardiac fibrosis and cardiac function injury were observed in TAC-induced mice with cardiac specific overexpression of METTL3. **Conclusion** Overexpression of METTL3 promotes cardiac fibrosis in mice.

心肌纤维化在各种心血管疾病的终末阶段普遍存在,其发生发展机制尚未阐明,临床治疗效果差<sup>[1-2]</sup>。心肌纤维化会引起心肌细胞排列紊乱,破坏心肌组织的舒缩协调性,影响心肌的血供与电生理信号的传导,加剧心功能下降,引发心律失常和心力衰竭(heart failure, HF)<sup>[3-4]</sup>。心肌纤维化的发生发展和许多因素相关,如缺血再灌注、炎症、氧化应激和肠道菌群代谢产物等都可能引起心肌纤维化<sup>[5-7]</sup>。

表观遗传广泛参与生理和病理过程中的基因表达调控<sup>[8]</sup>, N6-甲基腺苷(N6-methyladenosine, m6A)修饰是一种重要的 RNA 表观遗传调控方式。m6A 修饰是指腺嘌呤第 6 位氮原子上发生甲基化修饰<sup>[9]</sup>,它主要由甲基转移酶 3(methyltransferase-like 3, METTL3)、甲基转移酶 4(methyltransferase-like 4, METTL4)等为代表的甲基转移酶复合物通过识别 RNA 上一个特异的“RRACH”序列 motif 介导腺嘌呤甲基化修饰,也可由脂肪量与肥胖相关(fat mass and obesity associated, FTO)和 alkB 同系物 5(alkB homolog 5, ALKBH5)等介导去甲基化修饰,是一种可逆的调控方式<sup>[10]</sup>。m6A 修饰要发挥生物学功能,还有赖于 YTH 结构域蛋白 1(YTH domain containing 1, YTHDC1)等 Reader 蛋白的结合作用<sup>[11-13]</sup>。研究表明 METTL3 介导的 m6A 修饰与生长发育、炎症免疫、代谢调控、肿瘤形成和发展等过程密切相关<sup>[12,14-15]</sup>。METTL3、METTL4 和 FTO 等 m6A 修饰相关基因表达在胚胎干细胞向成体心脏和心血管系统的生长发育过程中有重要调节作用<sup>[16]</sup>。研究发现 FTO 可通过去甲基化降低 m6A 修饰水平而减少心肌梗死小鼠心肌坏死引起的替代性纤维化,并促进新生血管形成<sup>[17]</sup>。近期的研究显示, METTL3 介导的 m6A 修饰可促进心肌梗死引发的心肌纤维化过程<sup>[18]</sup>。

在前期实验中,本课题组利用甲基化 RNA 免疫共沉淀结合高通量测序(methylated RNA immuno-

precipitation sequencing, MeRIP-seq)发现 HF 患者心肌 m6A 修饰水平升高。目前, METTL3 介导的 m6A 修饰在心肌纤维化中的作用尚不明确。本研究在细胞和整体水平初步探讨介导 m6A 修饰的 METTL3 对压力负荷增加引起的心肌纤维化的调控作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 组织标本

利用 HF 患者和健康器官捐献者的心肌组织进行 Masson 染色和 METTL3 表达的 Western blot 检测分析。本文经广东省人民医院伦理委员会批准[批准号:GDREC2019238H(R1)],手术标本来自广东省心血管病研究所。

### 1.2 实验动物

由广州中医药大学动物中心提供的 1~3 天的 SPF 级 C57BL/6 乳鼠,许可证号为 SCXK(粤)2013-0034。心肌特异表达(以 Myh6 为启动子)METTL3 的转基因小鼠(Tg-METTL3)委托广东药康生物科技有限公司建立和繁殖养育。

### 1.3 主要试剂

F12 细胞培养基、胎牛血清、胰酶、胶原酶 II(Gibco 公司);1×TBS 粉末(博士德公司);Trizol 试剂、METTL3、I 型胶原 α1 链(collagen type I α1, COL1α1)、III 型胶原 α1 链(collagen type III α1, COL3α1)、肌动蛋白 α2(actin α2, ACTα2)及 GAPDH 引物(Invitrogen 公司);反转录试剂盒、2×SYBR Green Mix(TaKaRa 公司);METTL3 重组腺病毒(山东维真生物科技有限公司);RIPA 裂解液、SDS-PAGE 配制试剂盒(碧云天生物公司);4×Loading Buffer(Thermo 公司);GAPDH 抗体、COL3α1 抗体、METTL3 抗体、兔种属抗体、鼠种属抗体(Protein Technology 公司);α-SMA 抗体(Abcam 公司);COL1α1 抗体、BCA 蛋白定量试剂盒(Thermo

公司);Marker(Fermentas 公司);ECL 发光液(Millipore 公司);血管紧张素 II(angiotensin II, Ang II)粉末(Sigma 公司);EdU 增殖实验试剂盒(广州市锐博生物科技有限公司);PI 细胞周期与凋亡试剂盒(上海爱必信山东维真生物科技有限公司);PVDF 膜(Whatman 公司);其他生化试剂均为进口分装或国产分析纯。

#### 1.4 心肌成纤维细胞的原代分离、培养及处理

按本研究组已报道的方法分离小鼠心肌成纤维细胞(cardiac fibroblasts, CF)。仰卧位固定出生 1~3 天的乳鼠,沿左第 4 肋骨下缘剪开表皮及肋骨,分离并取出乳鼠心脏,用 PBS 溶液漂洗并尽可能去除心脏周围结缔组织。漂洗完成后将乳鼠心脏放入含 0.25% 胰酶的无血清培养基中消化 12 h,之后加入含有胶原酶 II 的无血清培养基,用巴氏管充分吹打混匀并过滤,得到小鼠心肌细胞与 CF 的细胞悬液。将细胞悬液接种至 T75 培养瓶中,90 min 后利用差速贴壁原理取出瓶中上清液,重新加入 10% 血清完全培养基,即可得到纯度较高的 CF。待细胞长满 T75 瓶后,0.25% 胰酶消化传代,培养至 P2 代将细胞均匀接种于细胞板或皿中,进行后续实验。

#### 1.5 小鼠主动脉弓缩窄模型的建立

将 C57BL/6 小鼠置于诱导麻醉盒中,2% 异氟烷吸入诱导麻醉,麻醉后仰卧位固定,以第 2 肋骨为中心剪开表皮,从第 2 肋骨与胸骨连接处剪开并暴露主动脉弓,于无名动脉和左颈总动脉结扎主动脉弓,待小鼠情况稳定后缝合。术后于饲养笼内继续日常饲养 3 周。

#### 1.6 小鼠心肌组织标本留取

将小鼠脱臼处死,仰卧位固定,剪开表皮和胸骨,暴露心脏后将其小心取出,置于冰上,去除心脏周围血管和结缔组织,后续用于 Masson 染色、总 RNA 提取和总蛋白提取。

#### 1.7 心肌成纤维细胞的处理

参照说明将 Ang II 粉末用 0.1% BSA 溶液配置成  $10^{-5}$  mol/L 的储存浓度。小鼠 CF 在造模前用无血清培养基饥饿 12 h,之后更换 1% 血清培养基,加入 Ang II 储存液,培养 24 h。使用 METTL3 重组腺病毒(rAd-METTL3)半量感染小鼠 CF,4 h 后补充等量完全培养基,感染后于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 24 h。以重组绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)腺病毒(rAd-GFP)作为对照(rAd-METTL3 和 rAd-GFP 的 MOI 均为 5)。

#### 1.8 RT-qPCR 检测

Trizol 法提取 RNA,取 500 ng 总 RNA 反转录得到 cDNA。取 1 μL cDNA,加入 2×SYBR Green Mix 5 μL 及相应引物在 Vii 7 Quantitative PCR System 上进行定量 PCR,以 GAPDH 作为对照,计算  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  并分析 mRNA 表达水平。引物序列见表 1。

表 1. PCR 引物序列

Table 1. The primers used in PCR assay

项目	序列	产物大小
COL1α1	正向:5'-GGCAAAGATGGACTCAACGG-3' 反向:5'-AGTAACGGCCACCATCTTGA-3'	196 bp
COL3α1	正向:5'-CTGGCGGCTTTTCACCATAT-3' 反向:5'-TCTCCGCTCTTGAGTTCAGG-3'	190 bp
ACTα2	正向:5'-CACTACCATGTACCCAGGCA-3' 反向:5'-CATTTGCGGTGGACAATGGA-3'	216 bp
METTL3	正向:5'-CAGATGATGAGATGCGCAGG-3' 反向:5'-CCAACCAAGCAGTGTTCCTT-3'	229 bp
GAPDH	正向:5'-CAAGAAGGTGCTGAAGCAGG-3' 反向:5'-CCACCCTGTTGCTGTAGCC-3'	200 bp

#### 1.9 Western blot 检测

RIPA 冰上研磨裂解细胞与组织,离心后取上清蛋白定量,加 4×Loading Buffer,99 °C 变性,10% SDS-PAGE 电泳。电泳后转膜,5% 脱脂奶粉封闭 1 h,用相应一抗[METTL3(1:1 000)、COL1α1(1:1 000)、COL3α1(1:1 000)、α-SMA(1:10 000)、GAPDH(1:10 000)]于 4 °C 孵育 12 h,二抗(1:5 000)室温孵育 1 h,ECL 发光液显影。以 GAPDH 为对照,Image J 灰度分析蛋白表达水平。

#### 1.10 流式细胞术检测细胞周期

将 P2 代细胞均匀接种于 6 孔板中,稳定生长后用重组腺病毒半量感染小鼠 CF,4 h 后补充等量 10% 血清完全培养基。感染后 24 h 取细胞悬液,70% 乙醇静置 4 h,固定细胞周期。固定后用 PBS 清洗,避光,37 °C、PI 染色 30 min,上流式细胞仪检测。

#### 1.11 EdU 检测细胞增殖能力

将 P2 代细胞均匀接种于 confocal 皿中,稳定生长后用重组腺病毒半量感染小鼠 CF,4 h 后补充等量 10% 血清完全培养基。24 h 后避光加入 EdU 增殖试剂盒中的试剂 A,放置 4~6 h,4% 多聚甲醛室温固定 4 h。固定完成后 PBS 清洗,甘氨酸溶液脱色后加入 0.5% Triton X-100 通透,然后加入 Apollo 染色工作液,静置 20 min,滴加 1~2 滴含 DAPI 的封片剂并均匀覆盖 confocal 皿上,激光共聚焦显微镜



下观察,选择合适的视野采集图像并进行分析。

### 1.12 Transwell 细胞迁移能力检测

将 P2 代细胞均匀接种于 Transwell 小室中,稳定生长后用重组腺病毒半量感染小鼠 CF,4 h 后补充等量 10% 血清完全培养基。24 h 后趋化处理 4 h,室温下 4% 多聚甲醛固定 4 h,结晶紫染色 1 h。染色后清洗,恒温箱烘干,显微镜观察,选择合适的视野采集图像并进行分析。

### 1.13 统计学处理

使用 GraphPad Prism 8 软件进行统计分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,并用 Bonferroni 校正的 *t* 检验行组间两两比较。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 METTL3 在心肌纤维化中表达增加

与健康对照组相比,Masson 染色结果显示 HF 患者心肌胶原容积分数 (collagen volume fraction, CVF) 显著增加 ( $P < 0.001$ ; 图 1A), Western blot 结果显示 HF 患者心肌中 METTL3 的表达显著增加 (图 1B)。与假手术组相比,主动脉弓缩窄 (transverse aortic constriction, TAC) 组小鼠 CVF 显著增加 ( $P < 0.001$ ; 图 1C), METTL3 的蛋白表达显著增加 ( $P < 0.01$ ; 图 1D)。Western blot 结果显示,Ang II 处理的小鼠 CF 中促纤维化相关的 COL1 $\alpha$ 1、COL3 $\alpha$ 1 和  $\alpha$ -SMA 以及 METTL3 的蛋白表达均显著增加 ( $P < 0.05$ ; 图 1E)。

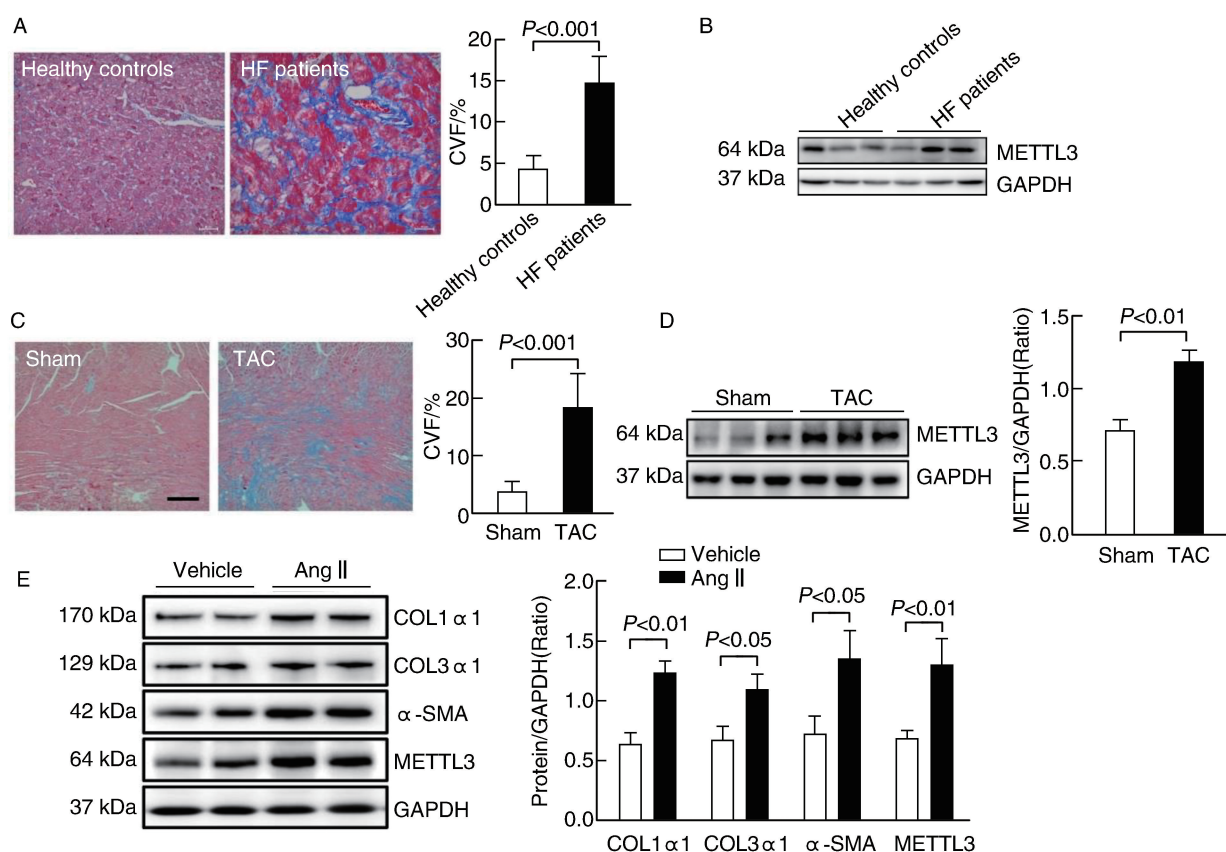


图 1. METTL3 在心肌纤维化中表达增加

Masson 染色结果显示 HF 患者心肌(A)和 TAC 小鼠心肌(C)出现显著的纤维化( $n=5$ ); Western blot 检测结果显示 HF 患者心肌(B)和 TAC 小鼠心肌(D)中 METTL3 表达增加( $n=5$ ); Western blot 检测结果显示 Ang II 处理的小鼠 CF 中纤维化相关基因和 METTL3 表达显著增加(E) ( $n=3$ )。

Figure 1. Upregulation of METTL3 in cardiac fibrosis

### 2.2 过表达 METTL3 促进小鼠 CF 中纤维化相关基因表达

RT-qPCR 和 Western blot 检测结果显示, rAd-

METTL3 可有效介导小鼠 CF 过表达 METTL3, 同时显著增加小鼠 CF 中促纤维化相关的 COL1 $\alpha$ 1、COL3 $\alpha$ 1 和 ACT $\alpha$ 2 的 mRNA 和蛋白表达 ( $P < 0.05$ ;



图 2A 和 2B)。

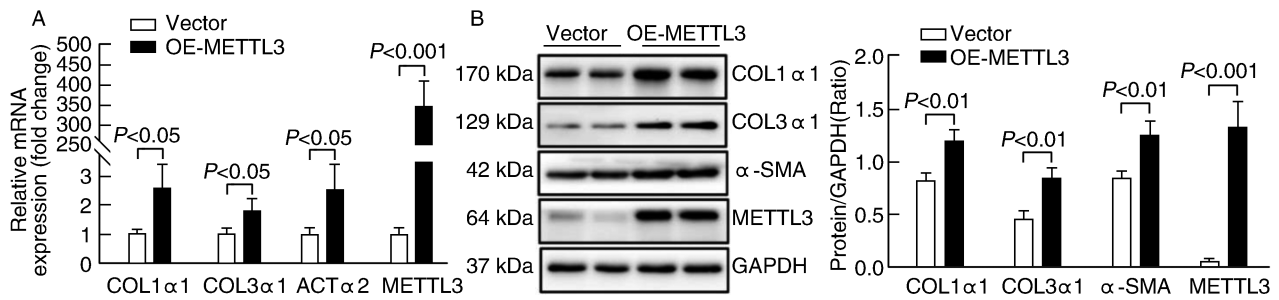


图 2. 过表达 METTL3 可增加小鼠心肌成纤维细胞中纤维化相关基因表达 ( $n=3$ )

Figure 2. Overexpression of METTL3 enhanced fibrosis-related gene expression in mouse CF

### 2.3 过表达 METTL3 增强小鼠 CF 增殖和迁移能力

EdU 实验结果显示,过表达 METTL3 显著增加小鼠 CF 的增殖能力( $P < 0.01$ ;图 3A)。流式细胞术

检测结果显示,过表达 METTL3 显著增加 S 期小鼠 CF 的比例( $P < 0.01$ ;图 3B)。Transwell 迁移实验结果显示,过表达 METTL3 可明显增强小鼠 CF 的迁移能力( $P < 0.001$ ;图 3C)。

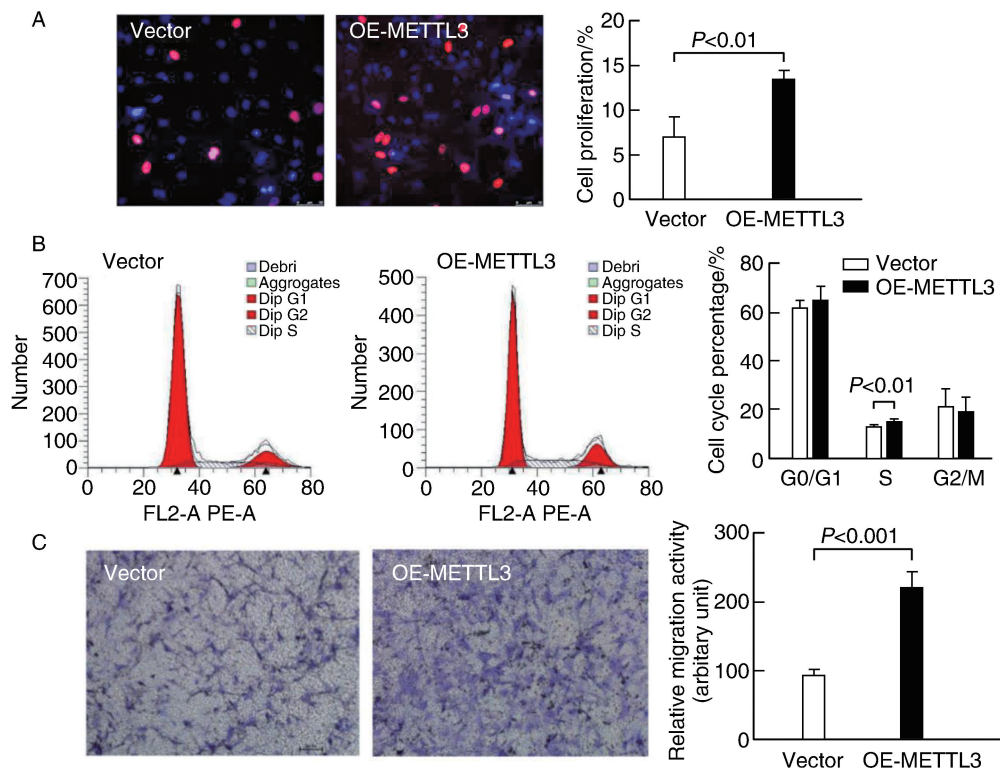


图 3. 过表达 METTL3 增加小鼠心肌成纤维细胞的增殖和迁移能力 ( $n=3$ )

A 为 EdU 荧光染色显示增殖细胞新生成的 DNA(红色),DAPI 示细胞核(蓝色);B 为流式细胞术检测小鼠 CF 的细胞周期分布;  
C 为 Transwell 迁移实验检测小鼠 CF 的迁移能力。

Figure 3. Overexpression of METTL3 enhanced proliferation and migration of mouse CF

### 2.4 心肌特异过表达 METTL3 加重 TAC 诱导的小鼠心肌纤维化

对野生型 C57BL/6 (WT) 和 Tg-METTL3 小鼠进行 TAC 手术干预,3 周后 B 超检测小鼠心功能。相

比于假手术组小鼠,TAC 手术可以显著降低小鼠心脏左室射血分数(ejection fraction, EF)和短轴缩短分数(fractional shortening, FS) ( $P < 0.05$ ;图 4A 和 4B)。相比于 TAC 手术的 WT 小鼠,TAC 手术的 Tg-

METTL3 小鼠心功能轻微下降,但没有统计学差异(图 4A 和 4B)。Masson 染色显示 TAC 手术的 WT 小鼠和 Tg-METTL3 小鼠心肌 CVF 显著增加( $P < 0.001$ ),且 TAC 手术的 Tg-METTL3 小鼠比 WT 小鼠心肌 CVF 增加更显著( $P < 0.001$ ;图 4C)。Western

blot 结果显示 TAC 手术可显著增加 WT 小鼠和 Tg-METTL3 小鼠心肌中 COL1 $\alpha$ 1、COL3 $\alpha$ 1 和  $\alpha$ -SMA 的表达( $P < 0.001$ ),且 TAC 手术的 Tg-METTL3 小鼠心肌中 COL1 $\alpha$ 1、COL3 $\alpha$ 1 和  $\alpha$ -SMA 表达增加更显著( $P < 0.001$ ;图 4D)。

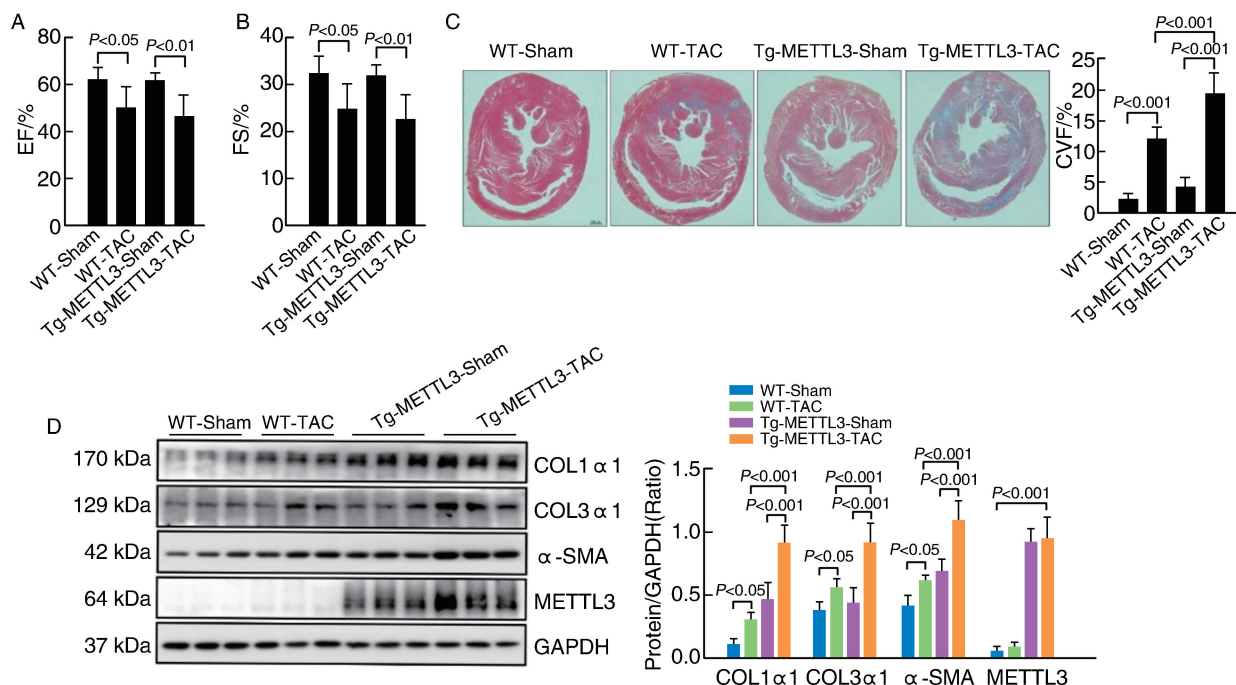


图 4. 心肌过表达 METTL3 加重 TAC 诱导的小鼠心肌纤维化

小动物心脏 B 超检测小鼠心脏左心室射血分数(A)和短轴缩短分数(B)( $n=5$  或  $n=6$ );Masson 染色结果显示心肌过表达 METTL3 可增加 TAC 手术小鼠的心肌胶原沉积(C)( $n=5$ );Western blot 结果显示心肌过表达 METTL3 可增加 TAC 手术小鼠心肌纤维化相关基因表达(D)( $n=5$ )。

Figure 4. Overexpression of METTL3 enhanced TAC-induced mouse cardiac fibrosis

### 3 讨论

作为真核生物基因组中最普遍和最丰富的 RNA 修饰,m6A 修饰的稳态调节在心血管疾病的病理过程中发挥重要的作用<sup>[19-22]</sup>。m6A 修饰主要是通过 mRNA 甲基化水平影响转录本稳定性,从而调节下游基因的蛋白表达来参与心血管疾病的发生、发展过程<sup>[20-24]</sup>。研究证实,METTL3 表达水平的增加可能导致心肌肥大和心肌重塑,抑制其活性可能会使心肌细胞失去响应肥厚刺激所致的心脏代偿性肥大的能力<sup>[21,23]</sup>。因此,最近的研究显示 m6A 与引起多种心血管疾病中代谢紊乱的外部环境因素调节相关,并可能成为潜在的治疗干预靶点<sup>[16]</sup>。

本研究结果证实,METTL3 在 HF 患者心肌、TAC 手术小鼠心肌和 Ang II 处理的小鼠 CF 中表达均显著升高,过表达 METTL3 可增加 CF 中 S 期的

细胞比例,提高细胞增殖和迁移能力,增加纤维化相关基因表达。本研究结果与以往关于过表达 METTL3 可增加 CF 增殖和胶原产生增加的报道一致<sup>[18]</sup>。同时,本研究利用心肌特异过表达 METTL3 的转基因小鼠进行 TAC 手术干预,3 周后检测发现心肌特异过表达 METTL3 能显著增加小鼠心肌纤维化和心功能损伤。因此,本研究在细胞和整体水平的实验结果证实过表达 METTL3 可以促进心肌纤维化的发生。以往的报道显示过表达 METTL3 可以激活 NF- $\kappa$ B 信号通路而参与成骨分化<sup>[25]</sup>,而 NF- $\kappa$ B 信号通路也是参与促进心肌纤维化发生的重要信号通路<sup>[26-27]</sup>,在后续研究中,本课题组也将进一步明确过表达 METTL3 能否激活 NF- $\kappa$ B 信号来促进心肌纤维化的发生和发展进程。

综上,本研究证实了 METTL3 在心肌纤维化时表达增强,通过在小鼠心肌中特异过表达 METTL3,

在整体水平证实 METTL3 具有促进心肌纤维化的作用。在后续研究中, 本课题组将进一步明确 METTL3 介导 m6A 修饰的下游靶基因, 并探讨其对 NF- $\kappa$ B 信号激活的调节作用, 进而阐明 METTL3 促进心肌纤维化发生的分子机制。

#### [参考文献]

- [1] SUTHAHAR N, MEIJERS W C, SILLJÉ H, et al. From inflammation to fibrosis-molecular and cellular mechanisms of myocardial tissue remodelling and perspectives on differential treatment opportunities[J]. *Curr Heart Fail Rep*, 2017, 14(4): 235-250.
- [2] 《中国心血管健康与疾病报告》编写组. 中国心血管健康与疾病报告 2020 概要[J]. *中国循环杂志*, 2021, 36(6): 521-545.
- [3] DOPPLER S A, CARVALHO C, LAHM H, et al. Cardiac fibroblasts: more than mechanical support[J]. *J Thorac Dis*, 2017, 9 (Suppl 1): S36-S51.
- [4] TRAVERS J G, KAMAL F A, ROBBINS J, et al. Cardiac fibrosis: the fibroblast awakens[J]. *Circ Res*, 2016, 118(6): 1021-1040.
- [5] NGUYEN M N, KIRIAZIS H, GAO X M, et al. Cardiac fibrosis and arrhythmogenesis[J]. *Compr Physiol*, 2017, 7(3): 1009-1049.
- [6] BERK B C, FUJIWARA K, LEHOUS S. ECM remodeling in hypertensive heart disease[J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(3): 568-575.
- [7] 韩冰清, 白春林. 肠道菌群代谢产物与心肌纤维化关系的研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2021, 29(1): 87-92.
- [8] LESTER B M, TRONICK E, NESTLER E, et al. Behavioral epigenetics[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2011, 1226(1): 14-33.
- [9] ZHANG X, JIA G F. RNA epigenetic modification: N6-methyladenosine[J]. *Yi Chuan*, 2016, 38(4): 275-288.
- [10] ARCIDIACONO O A, KREJČÍ J, BÁRTOVÁ E. The distinct function and localization of METTL3/METTL14 and METTL16 enzymes in cardiomyocytes[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(21): 8139.
- [11] SHI H, WEI J, HE C. Where, when, and how: context-dependent functions of RNA methylation writers, readers, and erasers[J]. *Mol Cell*, 2019, 74(4): 640-650.
- [12] MAITY A, DAS B. N6-methyladenosine modification in mRNA: machinery, function and implications for health and diseases[J]. *FEBS J*, 2016, 283(9): 1607-1630.
- [13] FU Y, DOMINISSINI D, RECHAVI G, et al. Gene expression regulation mediated through reversible m6A RNA methylation[J]. *Nat Rev Genet*, 2014, 15(5): 293-306.
- [14] HE L, LI H, WU A, et al. Functions of N6-methyladenosine and its role in cancer[J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 176.
- [15] ZHANG B, JIANG H, DONG Z, et al. The critical roles of m6A modification in metabolic abnormality and cardiovascular diseases[J]. *Genes Dis*, 2021, 8(6): 746-758.
- [16] ZHAO K, YANG C X, LI P, et al. Epigenetic role of N6-methyladenosine (m6A) RNA methylation in the cardiovascular system[J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2020, 21(7): 509-523.
- [17] MATHIYALAGAN P, ADAMIAK M, MAYOURIAN J, et al. FTO-dependent N6-methyladenosine regulates cardiac function during remodeling and repair[J]. *Circulation*, 2019, 139(4): 518-532.
- [18] LI T, ZHUANG Y, YANG W, et al. Silencing of METTL3 attenuates cardiac fibrosis induced by myocardial infarction via inhibiting the activation of cardiac fibroblasts[J]. *FASEB J*, 2021, 35(2): e21162.
- [19] QIN Y, LI L, LUO E, et al. Role of m6A RNA methylation in cardiovascular disease (Review)[J]. *Int J Mol Med*, 2020, 46(6): 1958-1972.
- [20] BERULAVA T, BUCHHOLZ E, ELERDASHVILI V, et al. Changes in m6A RNA methylation contribute to heart failure progression by modulating translation[J]. *Eur J Heart Fail*, 2020, 22(1): 54-66.
- [21] PARAMASIVAM A, PRIYADHARSINI J V. m6A RNA methylation in heart development, regeneration and disease[J]. *Hypertens Res*, 2021, 44(9): 1236-1237.
- [22] DORN L E, LASMAN L, CHEN J, et al. The N6-methyladenosine mRNA methylase METTL3 controls cardiac homeostasis and hypertrophy[J]. *Circulation*, 2019, 139(4): 533-545.
- [23] GAO X Q, ZHANG Y H, LIU F, et al. The piRNA CHAPIR regulates cardiac hypertrophy by controlling METTL3-dependent N6-methyladenosine methylation of Parp10 mRNA[J]. *Nat Cell Biol*, 2020, 22(11): 1319-1331.
- [24] KUMARI R, RANJAN P, SULEIMAN Z G, et al. mRNA modifications in cardiovascular biology and disease: with a focus on m6A modification[J]. *Cardiovasc Res*, 2021. DOI: 10.1093/cvr/cvab160.
- [25] YU J, SHEN L, LIU Y, et al. The m6A methyltransferase Mettl3 cooperates with demethylase ALKBH5 to regulate osteogenic differentiation through NF- $\kappa$ B signaling[J]. *Mol Cell Biochem*, 2020, 463(1/2): 203-210.
- [26] QI H P, WANG Y, ZHANG Q H, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) through NF- $\kappa$ B/Brg1 and TGF- $\beta$ 1 pathways attenuates cardiac remodeling in pressure-overloaded rat hearts[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 35(3): 899-912.
- [27] CAU S B, GUIMARAES D, RIZZI E, et al. The nuclear factor kappaB inhibitor pyrrolidine dithiocarbamate prevents cardiac remodelling and matrix metalloproteinase-2 up-regulation in renovascular hypertension[J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2015, 117(4): 234-241.

(此文编辑 文玉珊)