



[DOI]10.3969/j.issn.1001-9057.2025.03.015

http://www.lcnkzz.com/CN/10.3969/j.issn.1001-9057.2025.03.015

• 临床基础研究 •

N6-甲基腺嘌呤-胰岛素样生长因子-2 mRNA 结合蛋白 1 通过促进甾醇邻酰基转移酶 1 表达调节心力衰竭的机制研究

钟妮尔 王菲 邓纪钊 杨光

[摘要] **目的** 探讨胰岛素样生长因子-2 mRNA 结合蛋白 1(IGF2BP1)和甾醇邻酰基转移酶 1(SOAT1)在心力衰竭(HF)中的分子机制。**方法** 分离获取大鼠心肌细胞,将其分为对照组、缺氧模型组、sh-NC 组、sh-SOAT1 组、sh-METTL3 组、sh-METTL3 + Vector 组、sh-METTL3 + pcDNA-SOAT1 组、sh-IGF2BP1 组、sh-IGF2BP1 + Vector 组、sh-IGF2BP1 + pcDNA-SOAT1 组。对照组细胞在正常氧环境培养,其余各组均在缺氧环境培养。采用 Me-RIP 分析 SOAT1 mRNA 的 N6-甲基腺嘌呤(m6A)富集水平;RIP 分析验证 SOAT1 mRNA 与 METTL3 和 IGF2BP1 蛋白的结合情况;检测细胞活力、细胞凋亡率、活性氧(ROS)、乳酸脱氢酶(LDH)、葡萄糖摄取、IL-1 β 及肿瘤坏死因子(TNF)- α 水平。通过横向主动脉收缩(TAC)手术构建 HF 模型,将 64 只雄性 SD 大鼠随机分为假手术组、HF 组、HF + LV-NC 组、HF + sh-SOAT1 组、HF + sh-SOAT1 + METTL3 组和 HF + sh-SOAT1 + IGF2BP1 组,术后均饲养 4 周。采用超声心动图分析左心室的功能,2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染色分析梗

基金项目:陕西省自然科学基金基础研究计划项目(2024JC-YBMS-670);陕西省人民医院科技人才支持计划项目(2022BJ-16,2023JY-49)

作者单位:710068 西安,陕西省人民医院心血管内二科

通讯作者:杨光,E-mail:sxyangg@21cn.com

本研究亦存在一定的局限性:首先,为单中心、回顾性研究,虽已调整混杂因素,但仍可能存在一定偏倚;其次,样本量有限,因此未针对脓毒症病因分型及晚期组患者 CRRT 介入治疗的时间进一步分析;同时,结局指标受数据库的限制并未分析更多实验室检查结果。综上,本研究提示早期开展 CRRT 干预能改善预后,鉴于本研究的局限性,结论有待大样本、多中心的研究进一步证实。

参 考 文 献

- [1] Font MD, Thyagarajan B, Khanna AK. Sepsis and Septic Shock-Basics of diagnosis, pathophysiology and clinical decision making[J]. Med Clin North Am, 2020, 104(4):573-585.
- [2] Romagnoli S, Ricci Z, Ronco C. CRRT for sepsis-induced acute kidney injury[J]. Curr Opin Crit Care, 2018, 24(6):483-492.
- [3] 李雅琳, 李东风, 孙振康, 等. 基于脓毒症急性肾损伤多因素的预测模型构建及验证[J]. 临床内科杂志, 2023, 40(11):754-757.
- [4] 林泽华, 黎代强, 陈琳. 脓毒症合并急性肾损伤生存预后列线图预测模型的构建与验证[J]. 临床内科杂志, 2023, 40(2):97-100.
- [5] Poston JT, Koyner JL. Sepsis associated acute kidney injury[J]. BMJ, 2019, 364:k4891.
- [6] Shankar-Hari M, Phillips GS, Levy ML, et al. Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock(Sepsis-3)[J]. JAMA, 2016, 315(8):775-787.
- [7] Khwaja A. KDIGO clinical practice guidelines for acute kidney injury [J]. Nephron Clin Pract, 2012, 120(4):c179-c184.
- [8] Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016[J]. Intensive Care Med, 2017, 43(3):304-377.
- [9] 王文雷, 沈清. 急性肾损伤的流行病学和早期诊断及治疗进展[J]. 中国医药, 2024, 19(1):137-141. [10] Evans L, Rhodes A, Alhazzani W, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock 2021[J]. Intensive Care Medicine, 2021, 47(11):1181-1247.
- [11] Hoste EA, Bagshaw SM, Bellomo R, et al. Epidemiology of acute kidney injury in critically ill patients: the multinational AKI-EPI study[J]. Intensive Care Med, 2015, 41(8):1411-1423.
- [12] 苗云凤, 蒲燕, 刘海霞. 急性中毒患者连续性肾脏替代治疗后并发肺部感染的危险因素分析[J]. 临床内科杂志, 2022, 39(7):478-480.
- [13] Yang K, Fan M, Wang X, et al. Lactate promotes macrophage HMGB1 lactylation, acetylation, and exosomal release in polymicrobial sepsis [J]. Cell Death Differ, 2022, 29(1):133-146.
- [14] Hernandez G, Bellomo R, Bakker J. The ten pitfalls of lactate clearance in sepsis[J]. Intensive Care Med, 2019, 45(1):82-85.
- [15] Suetrong B, Walley KR. Lactic Acidosis in Sepsis: It's Not All Anaerobic: Implications for Diagnosis and Management[J]. Chest, 2016, 149(1):252-261.
- [16] Zarbock A, Kellum JA, Schmidt C, et al. Effect of Early vs Delayed Initiation of Renal Replacement Therapy on Mortality in Critically Ill Patients With Acute Kidney Injury: The ELAIN Randomized Clinical Trial [J]. JAMA, 2016, 315(20):2190-2199.
- [17] Barbar SD, Clere-Jehl R, Bourredjem A, et al. Timing of Renal-Replacement Therapy in Patients with Acute Kidney Injury and Sepsis[J]. N Engl J Med, 2018, 379(15):1431-1442.

(收稿日期:2023-11-23)

(本文编辑:余晓曼)

死面积, Western blot 检测 SOAT1、METTL3 和 IGF2BP1 蛋白表达水平。**结果** 与对照组比较, 缺氧模型组 SOAT1 的 mRNA 和蛋白表达水平均显著升高, 细胞活力和葡萄糖摄取水平减少, 细胞凋亡率、ROS、LDH、IL-1 β 、TNF- α 水平均升高; 与 sh-NC 组比较, sh-METTL3 组、sh-IGF2BP1 组和 sh-SOAT1 组 SOAT1 的 mRNA 和蛋白表达水平均降低, 细胞活力和葡萄糖摄取水平增多, 细胞凋亡率、ROS、LDH、IL-1 β 、TNF- α 水平均降低 ($P < 0.05$)。与 sh-NC 组比较, sh-METTL3 组 Anti-METTL3 抗体下拉的复合物中 m6A 修饰的 SOAT1 mRNA 减少, sh-IGF2BP1 组 SOAT1 mRNA 的半衰期更短; 分别与 sh-METTL3 + vector 组和 sh-IGF2BP1 + vector 组比较, sh-METTL3 + pcDNA-SOAT1 组和 sh-IGF2BP1 + pcDNA-SOAT1 组细胞活力均更低、细胞凋亡均更高 ($P < 0.05$)。动物实验结果显示, 与假手术组比较, HF 组大鼠心脏组织中 SOAT1、METTL3 和 IGF2BP1 蛋白表达水平均升高, 心肌梗死面积增大, 心脏功能发生障碍[左心室射血分数 (LVEF)、左心室短轴收缩率 (LVFS)、左心室最大压力和 dP/dt 均降低, 左心室舒张内径和收缩内径 (LVID, d 和 LVID, s)] 均增大; HF + sh-SOAT1 组大鼠心肌梗死面积比 HF + LV-NC 组减小, 心脏功能得到改善; 而 HF + sh-SOAT1 + METTL3 组和 HF + sh-SOAT1 + IGF2BP1 组大鼠心脏功能障碍进一步加剧 ($P < 0.05$)。**结论** IGF2BP1 通过识别 METTL3-m6A 介导的 SOAT1 mRNA 促进其稳定性, 上调 SOAT1 蛋白表达水平, 从而促进 HF 发生与发展。

[关键词] 心力衰竭; RNA N6 腺苷甲基化; 甾醇邻酰基转移酶 1; 甲基转移酶样蛋白 3; 胰岛素样生长因子-2 mRNA 结合蛋白 1

[中图分类号] R394.3; R541

[文献标识码] A

N6-methyladenosine-Insulin-like growth factor- II binding protein 1 exacerbates heart failure by promoting sterol O-acyltransferase 1 expression Zhong Nier, Wang Fei, Deng Jizhao, Yang Guang. Department of Cardiology, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, China

[Abstract] **Objective** To investigate the role of Insulin-like growth factor- II binding protein 1 (IGF2BP1) and sterol O-acyltransferase 1 (SOAT1) in heart failure (HF). **Methods** Rat cardiomyocytes were isolated and divided into control group, hypoxia model group, sh-NC group, sh-SOAT1 group, sh-METTL3 group, sh-METTL3 + Vector group, sh-METTL3 + pcDNA-SOAT1 group, sh-IGF2BP1 group, sh-IGF2BP1 + Vector group, sh-IGF2BP1 + pcDNA-SOAT1 group. The cells in control group were cultured in normal oxygen environment, and other groups were cultured in hypoxic environment. N6-methyladenosine (m6A) level of SOAT1 mRNA was analyzed by Me-RIP, and the bindings of METTL3 and IGF2BP1 to SOAT1 mRNA were verified by RIP. Cell viability, cell apoptosis, reactive oxygen species (ROS), lactate dehydrogenase (LDH), glucose uptake, IL-1 β , and tumor necrosis factor (TNF)- α levels were detected. HF model was constructed by transverse aortic constriction (TAC) surgery, and 64 male SD rats were randomly divided into sham group, HF group, HF + LV-NC group, HF + sh-SOAT1 group, HF + sh-SOAT1 + METTL3 group and HF + sh-SOAT1 + IGF2BP1 group, 4 weeks of post operative feeding in each group. The function of left ventricle was analyzed by echocardiography; infarct volume was analyzed by 2, 3, 5-Triphenyl tetrazolium chloride (TTC) staining; protein levels of SOAT1, METTL3 and IGF2BP1 were detected by Western blot. **Results** Compared with control group, mRNA and protein levels of SOAT1 in hypoxia model group were significantly increased, cell viability and glucose uptake were decreased, and cell apoptosis rate, ROS, LDH, IL-1 β , and TNF- α levels were increased; compared with sh-NC group, sh-METTL3 group, sh-IGF2BP1 group, and the sh-SOAT1 group mRNA and protein levels of SOAT1 were decreased, cell viability and glucose uptake were increased, and cell apoptosis rate, ROS, LDH, IL-1 β , and TNF- α levels were decreased ($P < 0.05$). Compared with sh-NC group, the m6A-modified SOAT1 mRNA in the complex of Anti-METTL3 in sh-METTL3 group was reduced, and the half-life of SOAT1 mRNA in sh-IGF2BP1 group was shorter. The cell viability of sh-METTL3 + vector group and sh-IGF2BP1 + vector group was lower and the cell apoptosis rate was higher in sh-METTL3 + pcDNA-SOAT1 and sh-IGF2BP1 + pcDNA-SOAT1 groups than in sh-METTL3 + vector group and sh-IGF2BP1 + vector group respectively ($P < 0.05$). The results of animal experiments showed that the levels of SOAT1, METTL3 and IGF2BP1 in the cardiac tissues of rats in HF group were increased, the infarcted area of the heart was increased, and cardiac dysfunction occurred (LVEF, LVFS, LV maximal pressure, and dP/dt were all decreased, and LVID, d and LVID, s) were increased; the infarcted area of the hearts of rats in HF + sh-SOAT1 group was reduced and cardiac function was improved compared with HF + LV-NC group ($P < 0.05$), whereas cardiac dysfunction was further exacerbated in rats in HF + sh-SOAT1 + METTL3 group and HF + sh-SOAT1 + IGF2BP1 group ($P < 0.05$). **Conclusion** IGF2BP1 promotes the stability of SOAT1 mRNA by recognizing METTL3-m6A-mediated SOAT1 mRNA and up-regulates SOAT1 protein levels, thereby promoting the occurrence and development of HF.

[Key words] Heart failure; RNA N6 adenosine methylation; Sterol O-acyltransferase 1; Methyltransferase-like 3; Insulin-like growth factor- II binding protein 1

心力衰竭(HF)是一种全球性流行病,其特点是高发病率和死亡率^[1-2]。目前,临床上的靶向治疗在减轻 HF 死亡率方面收效甚微^[3-5]。甾醇邻酰基转移酶 1 (SOAT1)是参与细胞胆固醇代谢的关键酶^[6]。报道显示 SOAT1 在动脉粥样硬化和冠心病等心血管疾病中上调,可促进炎症因子分泌^[7]。我们早期研究发现 SOAT1 水平在 HF 大鼠心脏组织中上调,沉默 SOAT1 可抑制缺氧诱导的心肌细胞凋亡^[8],但 SOAT1 在 HF 中的调节机制尚未完全清楚。N6-甲基腺嘌呤(m6A)是最普遍的表现遗传转录组修饰蛋白,其调节蛋白由甲基转移酶(Writer)、去甲基化酶(Eraser)和甲基化识别蛋白(Reader)组成^[9]。既往报道显示 m6A 修饰在心脏功能中具有关键调节作用^[10-11]。m6A 甲基转移酶样蛋白 3(METTL3)在体外促进心肌细胞肥大,在体内驱动心脏代偿性肥大^[12]。m6A“Readers”可选择性地识别 m6A 修饰的 RNA,并执行特定生物学功能,包括 RNA 降解、运输、定位和翻译^[13];m6A“Reader”胰岛素样生长因子-2 mRNA 结合蛋白 1(IGF2BP1)在 HF 中表达上调^[14],而 IGF2BP1 在 HF 中的调节机制尚不清楚。本研究旨在探讨 IGF2BP1 和 SOAT1 在 HF 中的调节机理,以期 HF 治疗提供新的分子靶点。

材料与方法

1. 材料:8 周龄雄性 SD 大鼠(体重 250 ~ 300 g) 64 只及 1 ~ 3 日龄新生 SD 大鼠 2 只均购自西安交通大学医学院实验动物中心。阿伐麦布(Avasimibe, CAS: 166518-60-1)购自 Sigma 公司;DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司;CCK-8 细胞检测试剂盒购自上海碧云天生物有限公司;Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司;Lipofectamine™ 3000 试剂盒、TRIzol 试剂均购自 Invitrogen 公司;PrimeScript RT-PCR 试剂盒购自 Takara 公司;SYBR Green 试剂盒购自 Takara 公司;BCA 蛋白含量测定试剂盒购自美国 Thermo Scientific 公司;Anti-SOAT1 (ab307597)、Anti-METTL3 (ab195352)、Anti-IGF2BP1 (ab100999)、Anti-GAPDH (ab8245)、Anti-m6A 抗体(ab151230)和 IgG(ab109489)抗体购自美国 Abcam 公司。Sigma Vet 小动物心脏超声仪购自上海玉研科学仪器有限公司。

2. 方法

(1) 心肌细胞培养和分组:解剖新生 SD 大鼠获取心脏,并将心室切成小块,转移至含有 0.1% IV 型胶原酶、0.1% 胰蛋白酶、15 μg/ml DNA 酶 I 和 1% 胎牛血清的 HEPES 缓冲液中,37 °C 下孵育 15 min,加入含有 10% 胎牛血清的培养基和胰蛋白酶,离心,用 DMEM

重悬细胞,并将其分为 10 组:①对照组:细胞在 37 °C 5% 的 CO₂ 培养箱中培养 48 h;②缺氧模型组:细胞在缺氧培养箱(含有 94% N₂、5% CO₂ 和 1% O₂)中培养 48 h;③sh-NC 组:sh-NC 转染细胞 48 h;④sh-SOAT1 组:sh-SOAT1 转染细胞 48 h;⑤sh-METTL3 组:sh-METTL3 转染细胞 48 h;⑥sh-METTL3 + Vector 组:sh-METTL3 和空载体共转染细胞 48 h;⑦sh-METTL3 + pcDNA-SOAT1 组:sh-METTL3 和 pcDNA-SOAT1 共转染细胞 48 h;⑧sh-IGF2BP1 组:sh-IGF2BP1 转染细胞 48 h;⑨sh-IGF2BP1 + Vector 组:sh-IGF2BP1 和空载体共转染细胞 48 h;⑩sh-IGF2BP1 + pcDNA-SOAT1 组:sh-IGF2BP1 和 pcDNA-SOAT1 共转染细胞 48 h。③ ~ ⑩组均为缺氧条件下培养,收集以上细胞,采用 CCK-8 检测细胞活力;流式细胞术检测细胞凋亡率;D-(2-3H)-葡萄糖摄取法检测葡萄糖摄取水平;2',7'-二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)法测定活性氧(ROS)水平;ELISA 测定乳酸脱氢酶(LDH)水平;生化试剂盒检测 IL-1β 和肿瘤坏死因子(TNF)-α 水平;实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)和 Western blot 检测 SOAT1、METTL3 和 IGF2BP1 的 mRNA 和蛋白表达水平。

(2) 甲基化 RNA 免疫沉淀(Me-RIP)测定:将 Anti-m6A 抗体或 IgG 添加到 IP 缓冲液,与蛋白 A/G 磁珠孵育 1 h。将分离纯化的 RNA 和磁珠-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,4 °C 下孵育过夜。用洗脱缓冲液洗脱 RNA,通过 qPCR 分析 m6A 的富集水平。

(3) RNA 免疫沉淀(RIP)测定:将 Anti-METTL3、Anti-IGF2BP1 抗体或 IgG 添加到 IP 缓冲液,与蛋白 A/G 磁珠孵育 1 h。将 sh-NC、sh-METTL3 和 sh-IGF2BP1 转染的细胞进行裂解,裂解液与磁珠-抗体复合物在 4 °C 下孵育过夜。用洗脱缓冲液洗脱 RNA,通过 qPCR 分析 m6A 的 SOAT1 mRNA 表达水平。

(4) mRNA 稳定性实验:细胞转染 sh-NC 或 sh-IGF2BP1 48 h 后,使用转录抑制剂放线菌素 D 进行干预,分别在干预 0、2、4、6 h 后收获细胞,提取总 RNA,RT-qPCR 检测 SOAT1 mRNA 水平。

(5) 动物实验:64 只 8 周龄的雄性 SD 大鼠(体重 250 ~ 300 g)被随机分为假手术组、HF 组、HF + LV-NC 组(HF 建模后注射 LV-NC 慢病毒载体)、HF + sh-SOAT1 组(HF 建模后注射 sh-SOAT1 慢病毒载体)、HF + sh-SOAT1 + METTL3 组(HF 建模后注射 sh-SOAT1 和 METTL3 的慢病毒载体)和 HF + sh-SOAT1 + IGF2BP1 组(HF 建模后注射 sh-SOAT1 和 IGF2BP1 的慢病毒载体),每组 8 只。参照 Cui 等^[15]的研究方法通过横向主动脉收缩(TAC)手术构建 HF 模型,即是

将 6-0 缝合线放置在升主动脉中,并围绕 27 号针收紧。当针头被移除时,主动脉收缩到均匀的直径。假手术组大鼠在不系缝线的情况下进行了相同的手术。术后 4 周,通过小动物心脏超声仪拍摄超声心动图,分析左心室大小、形状和功能[包括左心室射血分数(LVEF)、左心室短轴收缩率(LVFS)、左心室最大压力和 dP/dt 最大率、左心室舒张内径和收缩内径(LVID,d 和 LVID,s)];采用 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染色分析梗死面积。随后注射 150 mg/kg 戊巴比妥钠对大鼠实施安乐死,进行心脏摘除,收集血清和心脏组织,采用 Western blot 检测 SOAT1、METTL3 和 IGF2BP1 蛋白表达水平。

3. 统计学处理:应用 SPSS 22.0 进行统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 Student's *t* 检验,多组间比较采用方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

1. 对照组、缺氧模型组、sh-NC 组和 sh-SOAT1 组心肌细胞的 SOAT1 表达水平、细胞活力、细胞凋亡率、ROS、LDH、葡萄糖摄取水平、IL-1 β 、TNF- α 水平比较:缺氧模型组及 Sh-NC 组细胞活力和葡萄糖摄取量均低于对照组,SOAT1 的 mRNA 和蛋白表达水平、细胞凋亡率、ROS、LDH、IL-1 β 、TNF- α 水平均显著高于对照组;sh-SOAT1 组细胞活力和葡萄糖摄取量均高于 sh-NC 组,SOAT1 的 mRNA 和蛋白表达水平、细胞凋亡率、ROS、LDH、IL-1 β 、TNF- α 水平均低于 sh-NC 组 ($P < 0.05$)。见表 1。

2. 对照组、缺氧模型组、sh-NC 组和 sh-METTL3 组心肌细胞中 METTL3 表达水平比较:对照组、缺氧模型组、sh-NC 组和 sh-SOAT1 组 METTL3 的 mRNA 表达水平分别为(1.01 \pm 0.07)、(3.41 \pm 0.18)、(3.36 \pm 0.21)、(0.98 \pm 0.13),蛋白表达水平分别为(1.02 \pm 0.11)、(3.15 \pm 0.13)、(3.23 \pm 0.15)、(1.03 \pm 0.12)。缺氧模型组 METTL3 的 mRNA 和蛋白表达水平均显著高于对照组,而 sh-METTL3 组以上指标均低于 sh-NC 组 ($P < 0.05$)。

3. sh-NC 组和 sh-METTL3 组 SOAT1 mRNA 的

m6A 修饰水平和表达水平比较:与 IgG 比较,Anti-m6A 抗体下拉的 RNA-蛋白质复合物中 SOAT1 mRNA [(62.89 \pm 5.12)% 比 (0.85 \pm 0.71)%] 显著富集 ($P < 0.01$)。与 sh-NC 组比较,sh-METTL3 组 Anti-METTL3 抗体下拉的 RNA-蛋白复合物中 SOAT1 mRNA [(26.37 \pm 3.15)% 比 (60.96 \pm 4.89)%] 富集水平降低;同时,sh-METTL3 组 SOAT1 的 mRNA [(0.37 \pm 0.05) 比 (1.01 \pm 0.09)] 和蛋白 [(0.46 \pm 0.08) 比 (1.03 \pm 0.11)] 表达水平均降低 ($P < 0.01$)。

4. sh-NC 组和 sh-IGF2BP1 组 SOAT1 mRNA 的稳定性和表达水平比较:与 IgG 比较,Anti-IGF2BP1 抗体下拉的 RNA-蛋白质复合物中 SOAT1 mRNA [(65.67 \pm 4.69)% 比 (0.85 \pm 0.31)%] 显著富集 ($P < 0.01$)。与 sh-NC 组比较,sh-IGF2BP1 组 Anti-IGF2BP1 抗体下拉的 RNA-蛋白复合物中 SOAT1 mRNA [(61.89 \pm 4.17)% 比 (63.28 \pm 3.87)%] 富集水平无显著变化 ($P > 0.05$)。与 sh-NC 组比较,sh-IGF2BP1 组 SOAT1 的 mRNA 半衰期 [(3.6 \pm 0.21) h 比 (1.8 \pm 0.17) h] 缩短,mRNA [(0.36 \pm 0.21) 比 (1.02 \pm 0.10)] 和蛋白 [(0.33 \pm 0.23) 比 (1.03 \pm 0.07)] 表达水平均降低 ($P < 0.01$)。

5. 7 组心肌细胞中 METTL3、IGF2BP1、SOAT1 蛋白表达水平、细胞活力、细胞凋亡率、ROS、LDH、葡萄糖摄取、IL-1 β 及 TNF- α 水平比较:与 sh-NC 组比较,sh-METTL3 组 METTL3 [(0.40 \pm 0.04) 比 (1.01 \pm 0.05)] 和 SOAT1 [(0.45 \pm 0.04) 比 (1.03 \pm 0.04)] 蛋白表达水平均降低,sh-IGF2BP1 组 IGF2BP1 [(0.43 \pm 0.05) 比 (1.03 \pm 0.05)] 和 SOAT1 [(0.47 \pm 0.04) 比 (1.03 \pm 0.04)] 蛋白表达水平均降低 ($P < 0.01$);sh-METTL3 + pcDNA-SOAT1 组 SOAT1 蛋白表达水平高于 sh-METTL3 + Vector 组 [(1.03 \pm 0.04) 比 (0.44 \pm 0.05)], $P < 0.01$;sh-IGF2BP1 + pcDNA-SOAT1 组 SOAT1 蛋白表达水平高于 sh-IGF2BP1 + Vector 组 [(1.05 \pm 0.06) 比 (0.44 \pm 0.05)], $P < 0.01$ 。与 sh-NC 组比较,sh-METTL3 组、Sh-METTL3 + Vector 组、sh-IGF2BP1 组和 Sh-IGF2BP1 + Vector 组细胞活力和葡萄糖摄取水平均显著升高,细胞凋亡率、ROS、LDH、IL-1 β 及 TNF- α 水平均降低;与 sh-METTL3 + Vector 组比较,sh-METTL3 + pcDNA-SOAT1 组细胞活力和葡萄糖摄取水平均

表 1 4 组心肌细胞的 SOAT1 表达水平、细胞活力、细胞凋亡率、ROS、LDH、葡萄糖摄取、IL-1 β 及 TNF- α 水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	SOAT1		细胞活力 (%)	细胞凋亡率 (%)	ROS (%)	LDH (U/L)	葡萄糖摄取	IL-1 β (pg/ml)	TNF- α (pg/ml)
	mRNA	蛋白							
对照组	1.01 \pm 0.05	1.02 \pm 0.07	100.61 \pm 6.81	7.21 \pm 2.15	101.37 \pm 3.71	467.81 \pm 58.97	178.55 \pm 18.96	13.12 \pm 2.89	6.81 \pm 0.75
缺氧模型组	4.63 \pm 0.31 ^a	4.21 \pm 0.24 ^a	37.59 \pm 3.28 ^a	31.66 \pm 3.73 ^a	316.91 \pm 25.69 ^a	1 439.85 \pm 389.64 ^a	67.31 \pm 6.87 ^a	47.61 \pm 4.35 ^a	33.47 \pm 3.25 ^a
Sh-NC 组	4.58 \pm 0.26 ^a	4.27 \pm 0.22 ^a	38.21 \pm 3.94 ^a	30.97 \pm 3.56 ^a	328.64 \pm 23.91 ^a	1 510.40 \pm 351.85 ^a	70.05 \pm 7.21 ^a	45.98 \pm 5.13 ^a	32.97 \pm 3.46 ^a
Sh-SOAT1 组	1.01 \pm 0.17 ^b	1.05 \pm 0.21 ^b	89.96 \pm 4.13 ^b	11.08 \pm 1.99 ^b	152.37 \pm 7.28 ^b	816.65 \pm 97.89 ^b	142.66 \pm 12.35 ^b	20.64 \pm 3.19 ^b	11.27 \pm 1.89 ^b

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与 sh-NC 组比较,^b $P < 0.05$

表 2 7 组心肌细胞活力、细胞凋亡率、ROS、LDH、葡萄糖摄取、IL-1β、TNF-α 水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	细胞活力 (%)	细胞凋亡率 (%)	ROS (%)	LDH (U/L)	葡萄糖摄取	IL-1β (pg/ml)	TNF-α (pg/ml)
Sh-NC 组	100.61 ± 6.81	27.91 ± 5.16	103.47 ± 6.12	1 486.45 ± 416.80	71.50 ± 8.23	43.12 ± 5.12	31.81 ± 3.76
Sh-METTL3 组	157.06 ± 13.21 ^a	10.84 ± 2.47 ^a	46.77 ± 3.81 ^a	768.61 ± 89.83 ^a	167.93 ± 16.81 ^a	17.16 ± 3.15 ^a	11.47 ± 1.94 ^a
Sh-METTL3 + Vector 组	161.24 ± 11.84 ^a	9.45 ± 3.15 ^a	45.67 ± 3.19 ^a	801.34 ± 109.21 ^a	173.28 ± 18.14 ^a	18.93 ± 2.89 ^a	12.31 ± 2.33 ^a
Sh-METTL3 + pcDNA-SOAT1 组	91.01 ± 7.49 ^b	31.21 ± 4.73 ^b	121.43 ± 5.32 ^b	1 684.88 ± 279.83 ^a	67.36 ± 7.98 ^b	52.34 ± 3.86 ^b	33.84 ± 4.06 ^b
Sh-IGF2BP1 组	168.21 ± 12.43 ^a	11.07 ± 3.11 ^a	43.18 ± 4.01 ^a	805.79 ± 89.83 ^a	146.89 ± 13.27 ^a	20.07 ± 2.75 ^a	13.07 ± 2.43 ^a
Sh-IGF2BP1 + Vector 组	165.72 ± 11.87 ^a	10.82 ± 2.16 ^a	45.03 ± 3.89 ^a	834.34 ± 79.74 ^a	153.28 ± 14.69 ^a	21.91 ± 3.19 ^a	12.89 ± 3.02 ^a
Sh-IGF2BP1 + pcDNA-SOAT1 组	86.44 ± 7.03 ^c	30.74 ± 4.93 ^c	114.39 ± 6.15 ^c	1 504.43 ± 319.65 ^c	77.65 ± 9.87 ^c	49.66 ± 4.32 ^c	30.91 ± 3.47 ^c

注：与 sh-NC 组比较，^a $P < 0.05$ ；与 sh-METTL3 + Vector 组比较，^b $P < 0.05$ ；与 sh-IGF2BP1 + Vector 组比较，^c $P < 0.05$

表 3 6 组大鼠心肌梗死面积、心脏功能和 METTL3、IGF2BP1 及 SOAT1 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	心肌梗死面积 (%)	LVEF (%)	LVFS (%)	LVID,d (mm)	LVID,s (mm)	左心室最大压力 (mmHg)	dP/dt	蛋白表达水平		
								METTL3	IGF2BP1	SOAT1
假手术组	0	71.86 ± 4.84	38.19 ± 3.15	2.18 ± 0.34	1.68 ± 0.26	86.55 ± 6.27	12 368 ± 627	1.01 ± 0.11	1.03 ± 0.15	1.03 ± 0.04
HF 组	36.85 ± 4.16 ^a	33.21 ± 3.28 ^a	12.67 ± 1.81 ^a	5.26 ± 0.37 ^a	3.53 ± 0.17 ^a	31.74 ± 3.78 ^a	4 738 ± 491 ^a	3.43 ± 0.31 ^a	3.27 ± 0.28 ^a	3.65 ± 0.24 ^a
HF-LV-NC 组	38.21 ± 3.83 ^a	33.35 ± 4.17 ^a	13.43 ± 2.13 ^a	5.43 ± 0.41 ^a	3.47 ± 0.21 ^a	33.29 ± 4.12 ^a	4 356 ± 583 ^a	3.45 ± 0.28 ^a	3.29 ± 0.32 ^a	3.44 ± 0.35 ^a
HF + sh-SOAT1 组	11.28 ± 1.87 ^b	56.43 ± 3.26 ^b	29.75 ± 3.16 ^b	1.78 ± 0.36 ^b	1.18 ± 0.16 ^b	73.41 ± 4.16 ^b	9 743 ± 416 ^b	3.58 ± 0.37 ^a	3.31 ± 0.39 ^a	0.97 ± 0.14 ^b
HF + sh-SOAT1 + METTL3 组	38.17 ± 4.48 ^c	30.28 ± 4.41 ^c	11.27 ± 2.14 ^c	5.17 ± 0.42 ^c	3.31 ± 0.22 ^c	36.28 ± 4.32 ^c	4 681 ± 312 ^c	6.81 ± 0.48 ^c	3.29 ± 0.27 ^a	3.58 ± 0.37 ^c
HF + sh-SOAT1 + IGF2BP1 组	33.36 ± 4.34 ^c	32.37 ± 3.45 ^c	13.09 ± 2.17 ^c	5.29 ± 0.43 ^c	3.29 ± 0.26 ^c	33.21 ± 4.08 ^c	4 387 ± 403 ^c	3.51 ± 0.34 ^a	7.23 ± 0.45 ^c	3.05 ± 0.26 ^c

注：与假手术组比较，^a $P < 0.05$ ；与 HF + LV-NC 组比较，^b $P < 0.05$ ；与 HF + sh-SOAT1 组比较，^c $P < 0.05$

降低，细胞凋亡率、ROS、LDH、IL-1β、TNF-α 水平均升高；与 sh-IGF2BP1 + Vector 组比较，sh-IGF2BP1 + pcDNA-SOAT1 组细胞活力和葡萄糖摄取水平均降低，细胞凋亡率、ROS、LDH、IL-1β 及 TNF-α 水平均升高 ($P < 0.05$)。见表 2。

6. 6 组大鼠心肌梗死面积、心脏功能和 METTL3、IGF2BP1 及 SOAT1 蛋白表达水平比较：与假手术组比较，HF 组大鼠心肌梗死面积显著增大，如图 1 所示。与假手术组比较，HF 组大鼠 LVEF、LVFS、左心室最大压力和 dP/dt 均降低，LVID, d、LVID, s 和 METTL3、IGF2BP1 及 SOAT1 蛋白表达水平均显著升高；与 HF + LV-NC 组比较，HF + sh-SOAT1 组大鼠心肌梗死面积、LVID, d、LVID, s 及 SOAT1 蛋白表达水平均降低，LVEF、LVFS、左心室最大压力和 dP/dt 均升高；与 HF + sh-SOAT1 组比较，HF + sh-SOAT1 + METTL3 组和 HF + sh-SOAT1 + IGF2BP1 组大鼠心肌梗死面积、LVID, d、LVID, s 及 SOAT1 蛋白表达水平均显著升高，LVEF、LVFS、左心室最大压力和 dP/dt 均显著降低；与 HF + sh-SOAT1 + METTL3 组 METTL3 蛋白表达水平及 HF + sh-SOAT1 + IGF2BP1 组 IGF2BP1 蛋白表达水平均高于 HF + sh-SOAT1 组 ($P < 0.05$)。见表 3。

讨 论

心脏是体内耗能、耗氧最多的器官之一，而脂肪酸

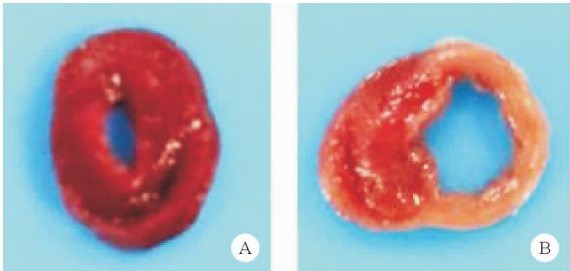


图 1 假手术组和 HF 组大鼠代表性心脏图
(A:假手术组;B:HF 组,白色未染色区域为梗死部分)

是心脏的主要燃料，因此脂质代谢调节在心脏中起着至关重要的作用^[16]。SOAT1 是一种参与细胞胆固醇代谢的关键酶。SOAT1 可促进炎症因子表达，在动脉粥样硬化和冠心病等心血管疾病中表达上调^[6-7]。SOAT1 通过将氧化低密度脂蛋白 (LDL) 的毒性成分 7-酮胆固醇 (7KCh) 酯化为脂肪酸，然后选择性流出为高密度脂蛋白 (HDL)，导致心肌细胞中 ROS 形成，诱导心肌细胞凋亡^[17]。我们早期的研究发现，SOAT1 在 HF 大鼠的心脏组织中显著上调。沉默 SOAT1 促进心肌细胞增殖，抑制细胞凋亡、ROS 生成、LDH、炎症因子分泌，促进葡萄糖摄取^[6]。本研究发现 SOAT1 沉默对心肌细胞的影响与早期的报道一致。此外，既往研究显示雌激素替代疗法是治疗 HF 的有效策略之一^[18]。因此，为了避免雌激素水平波动对实验结果带来干扰，

在本研究中我们通过对雄性大鼠进行 TCA 手术来构建 HF 动物模型,结果发现敲低 SOAT1 可改善 HF 大鼠的心脏功能,抑制 HF 进展。由此,我们推测 SOAT1 可能是 HF 发生和发展的一个关键调节基因。

m6A 甲基化研究的热潮可能为 HF 发病机制的深入研究带来新方向和新思路。m6A 甲基化相关过程的靶向调控可能有助于 HF 患者的诊断、治疗和药物开发^[8]。m6A 在室间隔和房室缺损、肥厚型心肌病、心律失常、冠心病、缺血性 HF 等心血管疾病中起关键作用^[11,19]。如 m6A 甲基化的上调可促进代偿性心肌肥大,而下调则与心肌细胞重塑和功能障碍有关^[20]。扩张型心肌病伴 HF 患者的 m6A 水平高于无 HF 患者^[21]。编码肌球蛋白调节轻链 2 在衰竭的心脏中其 mRNA 的 m6A 修饰水平升高,导致蛋白质水平降低^[22]。此外,有报道显示 METTL3 抑制减弱了心肌细胞的肥大生长,而 METTL3 过表达促进心肌细胞肥大。在健康的动物中, METTL3 过表达诱导心脏的适应性生长而没有不良的功能作用;在压力超负荷刺激或衰老导致的 HF 小鼠中过表达 METTL3 进一步加剧心脏代偿性肥大,而特异性敲除 METTL3 可改善心脏代偿性肥大^[12]。与上述研究一致,在我们的研究中发现 METTL3 在 HF 大鼠的心脏组织和缺氧诱导的心肌细胞中显著上调,沉默 METTL3 升高细胞活力,过表达 METTL3 加剧了 HF 大鼠的心脏功能障碍。

M6A“Readers”(YTHDF1/2/3、YTHDC1/2、eIF3、HNRNPA2/B1、HNRNPC、HNRNPG、IGF2BP1/2/3 和 Prrc2a)可以选择性地识别 m6A 修饰的 RNA,并执行特定的生物学功能,包括 RNA 降解、运输、定位和翻译^[9,13]。作为 m6A“reader”,IGF2BP1 被报道在 HF 中表达升高^[14]。我们的研究发现 IGF2BP1 能够通过识别 METTL3-m6A 介导的 SOAT1 mRNA 并与之结合,促进 SOAT1 mRNA 稳定性,上调 SOAT1 蛋白表达。此外,沉默 IGF2BP1 抑制缺氧诱导的心肌细胞凋亡,过表达 IGF2BP1 进一步加剧 HF 大鼠的心脏功能障碍。提示 IGF2BP1 可能通过识别 m6A 修饰的 SOAT1 mRNA 调节其稳定性,从而促进 HF 发生与发展,这一发现与已有报道的结果基本一致。

综上所述,我们的研究表明 IGF2BP1 通过识别 METTL3-m6A 介导的 SOAT1 mRNA 促进其稳定性,上调 SOAT1 蛋白,从而促进 HF 大鼠的心脏功能障碍。因此,我们推测 m6A-IGF2BP1 可能通过促进 SOAT1 表达参与心力衰竭的发生与发展。本研究为更进一步明确 HF 的发病机理提供了一定的基础,也为 HF 的诊断和治疗提供了新的思路。

参 考 文 献

- [1] Khan MS, Shahid I, Bennis A, et al. Global epidemiology of heart failure [J]. Nat Rev Cardiol, 2024, 21 (10): 717-734.
- [2] 蒋丽, 顾宇, 段丽钦. 血清白介素-8、血管紧张素Ⅱ与慢性心力衰竭患者临床预后的关系[J]. 临床内科杂志, 2023, 40 (6): 398-402.
- [3] Zamorano JL, González Leal A. Advances in heart failure management [J]. Med Clin (Barc), 2024, 163 (1): 32-39.
- [4] 李文邦, 刘希金, 刘佳月, 等. 沙库巴曲缬沙坦对慢性心力衰竭患者运动耐量的影响[J]. 临床内科杂志, 2022, 39 (6): 392-395.
- [5] 兰友玲, 李天发, 陈燕娥, 等. 强化阿托伐他汀改善缺血性心力衰竭患者近期疗效及对铁死亡通路蛋白的影响[J]. 中国医药, 2024, 19 (7): 980-984.
- [6] Fu R, Xue W, Liang J, et al. SOAT1 regulates cholesterol metabolism to induce EMT in hepatocellular carcinoma [J]. Cell Death Dis, 2024, 15 (5): 325.
- [7] Huynh TN, Fikse EN, De La Torre AL, et al. Inhibiting the Cholesterol Storage Enzyme ACAT1/SOAT1 in Aging Apolipoprotein E4 Mice Alters Their Brains' Inflammatory Profiles [J]. Int J Mol Sci, 2024, 25 (24): 13690.
- [8] Zhong N, Nong X, Diao J, et al. piRNA-6426 increases DNMT3B-mediated SOAT1 methylation and improves heart failure [J]. Aging (Albany NY), 2022, 14 (6): 678-294.
- [9] Wei G. RNA m6A modification, signals for degradation or stabilisation? [J]. Biochem Soc Trans, 2024, 52 (2): 707-717.
- [10] Ho JSY, Jou E, Khong PL, et al. Epigenetics in Heart Failure [J]. Int J Mol Sci, 2024, 25 (22): 12010.
- [11] Liu ZY, You QY, Liu ZY, et al. m6A control programmed cell death in cardiac fibrosis [J]. Life Sci, 2024, 353 (15): 122922.
- [12] Huang K, Sun X, Xu X, et al. METTL3-mediated m6A modification of OTUD1 aggravates press overload induced myocardial hypertrophy by deubiquitinating PGAM5 [J]. Int J Biol Sci, 2024, 20 (12): 4908-4921.
- [13] Widmer J, Vitalis A, Caflisch A. On the specificity of the recognition of m6A-RNA by YTH reader domains [J]. J Biol Chem, 2024, 300 (12): 107998.
- [14] Krumbein M, Oberman F, Cinnamon Y, et al. RNA binding protein IGF2BP2 expression is induced by stress in the heart and mediates dilated cardiomyopathy [J]. Commun Biol, 2023, 6 (1): 1229.
- [15] Cui Y, Wang P, Li M, et al. Cinnamic acid mitigates left ventricular hypertrophy and heart failure in part through modulating FTO-dependent N(6)-methyladenosine RNA modification in cardiomyocytes [J]. Biomed Pharmacother, 2023, 165: 115168.
- [16] Tan W, Wang Y, Cheng S, et al. AdipoRon ameliorates the progression of heart failure with preserved ejection fraction via mitigating lipid accumulation and fibrosis [J]. J Adv Res, 2025, 68: 299-315.
- [17] Bairos JA, Njoku U, Zafar M, et al. Sterol O-acyltransferase (SOAT/ACAT) activity is required to form cholesterol crystals in hepatocyte lipid droplets [J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids, 2024, 1869 (6): 159512.
- [18] Qian C, Liu J, Liu H. Targeting estrogen receptor signaling for treating heart failure [J]. Heart Fail Rev, 2024, 29 (1): 125-131.
- [19] Liu L, Yu L, Wang Y, et al. Unravelling the impact of RNA methylation genetic and epigenetic machinery in the treatment of cardiomyopathy [J]. Pharmacol Res, 2024, 207: 107305.
- [20] Dorn LE, Lasman L, Chen J, et al. The N(6)-Methyladenosine mRNA Methylase METTL3 Controls Cardiac Homeostasis and Hypertrophy [J]. Circulation, 2019, 139 (4): 533-545.
- [21] Zhou F, Yu Y, Li Y, et al. Expression of m6A Regulator Genes can Facilitate the Diagnosis of Chronic Heart Failure [J]. Heart Surg Forum, 2023, 26 (5): E485-e497.
- [22] Zhao J, Ding H, Ding J, et al. The m(6) A methyltransferase METTL3 promotes trophoblast cell invasion by regulating MYLK expression [J]. Placenta, 2022, 129: 1-6.

(收稿日期:2024-07-17)

(本文编辑:高婷)