DOI:10.16016/j.2097-0927.202109187

WTAP 通过调控 SIRT1 诱导小胶质细胞 M1 型极化的研究

周虹秀[1],高 煦[2],侯胜平[1] 400016 重庆,重庆医科大学附属第一院眼科,眼科学重庆市重点实验室,重庆市眼科研究所[1];402760 重庆,重庆市璧山区人民医院眼科[2]

[摘要] **目的** 探讨 Wilms 肿瘤抑制因子 1 相关蛋白(Wilms' tumor 1-associating protein,WTAP)在小胶质细胞活化调控中的作用及其可能的分子机制。**方法** 用 100 ng/mL IFNγ 联合 1 μg/mL LPS 诱导 HMC3 小胶质细胞 M1 极化作为实验组,以未处理的细胞作为空白对照组,采用实时荧光定量 PCR 和 Western blot 检测细胞中促炎细胞因子 IL-6、IL-1β、TNF-α 和 N6-甲基腺苷(m6A)相关基因的表达,在 HMC3 小胶质细胞中转染 RNAi 慢病毒敲低 WTAP,使用实时荧光定量 PCR 和 Western blot 检测敲低效率,Western blot 检测敲低 HMC3 小胶质细胞 WTAP 后促炎细胞因子 IL-6、IL-1β 和 TNF-α 蛋白表达,Western blot 检测敲低 WTAP 后 HMC3 小胶质细胞沉默信息调节因子 2 相关酶 1(silent mating-type information regulation 2 homolog 1,SIRT1)、COP1、USP18、EP4、促炎转录因子和部分炎症相关通路受体的表达,使用 SIRT1 激动剂 SRT1720 和 SIRT1 抑制剂 EX527 分别处理空载病毒组和敲低 WTAP 组 HMC3 细胞后,Western blot 检测 c/EBPβ 的表达。**结果** 与空白对照组比较,100 ng/mL IFNγ 联合 1 μg/mL LPS 诱导的 HMC3 细胞 IL-6、IL-1β、TNF-α 表达上调($P<0.05$)。M1 极化的 HMC3 小胶质细胞中 WTAP 高表达($P<0.05$)。敲低 WTAP 后,HMC3 细胞促炎细胞因子 IL-6、IL-1β 和 TNF-α 表达降低($P<0.05$),SIRT1 表达升高($P<0.05$),且促炎转录因子 c/EBPβ 表达降低($P<0.05$)。SIRT1 激动剂 SRT1720 使空载病毒组相对高表达的 c/EBPβ 降低($P<0.01$)。SIRT1 抑制剂 EX527 使敲低 WTAP 的 HMC3 细胞相对低表达的 c/EBPβ 升高($P<0.05$)。**结论** WTAP 促进 HMC3 小胶质细胞 M1 极化,其作用机制可能与通过调控 SIRT1 表达进而影响 c/EBPβ 信号通路有关。

[关键词] 小胶质细胞;Wilms 肿瘤抑制因子 1 相关蛋白;沉默信息调节因子 2 相关酶 1;N6-甲基腺苷;细胞极化

[中图法分类号] R322.91;R329.25;R341 [文献标志码] A

WTAP promotes microglial M1 polarization by regulating SIRT1

ZHOU Hongxiu[1], GAO Xu[2], HOU Shengping[1] [1]Department of Ophthalmology, Chongqing Key Laboratory of Ophthalmology, Chongqing Eye Institute, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Ophthalmology, People's Hospital of Bishan District, Chongqing, 402760, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the role and the possible molecular mechanism of RNA methylase, Wilms' tumor 1-associating protein (WTAP), in microglial activation. **Methods** HMC3 cells was induced to M1 polarization by treatment of 100 ng/mL IFNγ combined with 1 μg/mL LPS and then served as experimental group, and the untreated cells served as control group. The expression of pro-inflammatory cytokines IL-6, IL-1β, TNF-α and N6-methyladenosine (m6A) at mRNA and protein levels was detected by real-time quantitative PCR and Western blotting, respectively. After HMC3 cells were transfected with RNAi

[基金项目] 重庆市教委创新科研团队项目(CXQT19015);重庆市自然科学基金面上项目(cstc2019jcyjmsxmX0120);重庆市留学创新支持计划项目(cx2018010);重庆市教委项目(KJQN202000406)

[通信作者] 侯胜平,E-mail:sphou828@163.com

2097-0927/Copyright © 2022,陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

lentivirus to knock down WTAP, the knockdown efficiency was detected by real-time quantitative PCR and Western blotting. Western blot assay was employed to measure the expression levels of pro-inflammatory cytokines IL-6 IL-1β and TNF-α in WTAP knockdown HMC3 cells. Western blotting was also adopted to detect the protein levels of silent mating-type information regulation 2 homolog 1 (SIRT1), COP1, USP18, EP4, pro-inflammatory transcription factors and some inflammatory pathway receptors in the knockdown cells. SIRT1 agonist SRT1720 and SIRT1 inhibitor EX527 were employed to treat HMC3 cells in the blank-virus group and the knockdown WTAP group, respectively, and the expression level of C/EBPβ was detected by Western blotting. **Results** Treatment of 100 ng/mL IFNγ combined with 1 μg/mL LPS induced significant up-regulation of IL-6, IL-1β and TNF-α expression in HMC3 cells as compared with the untreated cells ($P<0.05$). WTAP was highly expressed in M1 polarized HMC3 microglia ($P<0.05$). WTAP knockdown resulted in obviously decreased expression levels of pro-inflammatory cytokines IL-6, IL-1β and TNF-α ($P<0.05$), increased level of SIRT1 ($P<0.05$), and reduced pro-inflammatory transcription factor C/EBPβ ($P<0.05$). SIRT1 agonist SRT1720 reduced the relatively high expression of C/EBPβ in the blank-virus group ($P<0.01$). While, the inhibitor EX527 increased the relative low expression of C/EBPβ in HMC3 cells with low WTAP knockdown ($P<0.05$). **Conclusion** WTAP promotes M1 polarization in HMC3 cells, possibly through regulating the expression of SIRT1 and thus affecting the C/EBPβ signaling pathway.

[**Key words**] microglia; Wilms' tumor 1-associating protein; silent mating-type information regulation 2 homolog 1; N6-methyladenosine; polarization

Supported by the Project of Innovative Research Group of Chongqing Education Commission (CXQT19015), the General Program of Natural Science Foundation of Chongqing (cstc2019jcyjmsxmX0120), the Innovation Supporting Plan of Overseas Returnees of Chongqing (cx2018010), and the Project of Chongqing Education Commission (KJQN202000406). Corresponding author: HOU Shengping, E-mail: sphou828@163.com

小胶质细胞是视网膜中的一类常驻免疫细胞,在正常的静息状态下,主要分布于视网膜外丛状层至视网膜神经纤维层,动态监视周围组织微环境的变化。视网膜微环境的细微变化即可触发小胶质细胞的激活。小胶质细胞激活后向视网膜下间隙迁移,召集周围炎性细胞进入视网膜,加剧视网膜的损伤,可引发自身免疫性葡萄膜炎等多种视网膜疾病[1]。激活的小胶质细胞可以表现出不同类型,其中一种是经典激活状态(M1 型),这种表型分泌大量促炎细胞因子和毒性物质,在组织间主要发挥促进炎症和清除异物的作用[2]。阐明小胶质细胞激活的调控机制也许是治疗葡萄膜炎等自身免疫性疾病的潜在突破口。

N6-甲基腺苷(m6A)修饰作为哺乳动物细胞中最丰富的 mRNA 转录后修饰,其由一系列"writers""erasers"和"readers"动态调节,从 mRNA 加工、核输出、mRNA 翻译和衰变等方面影响 mRNA 代谢,进而参与许多细胞生物过程[3]。Wilms 肿瘤抑制因子 1 相关蛋白(WTAP)是 m6A 修饰甲基转移酶复合物的重要组成部分,与 METTL3-METTL14 异二聚体相互作用,共同参与 m6A 修饰的调控[4]。本研究以 HMC3 小胶质细胞为研究对象,旨在探讨 RNA 甲基化酶 WTAP 在小胶质细胞 M1 极化中的表达和生物学功能,为调控小胶质细胞极化,乃至为治疗葡萄膜炎等自身免疫性疾病提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

细胞株:HMC3(人源小胶质细胞)与 EMEM 培养基购自美国模式培养物集存库(ATCC)。胎牛血清与 0.25%胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司,TRIzol 购自美国 Roche 公司,RNA 逆转录试剂盒购自日本 TaKaRa 公司,iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix 购自美国 Bio-Rad 公司,脂多糖(LPS)购自美国 Sigma 公司,重组人γ干扰素蛋白(IFN-γ)购自美国 Peprotech 公司,化学发光液(ECL)购自四正柏生物科技公司,RIPA 裂解液、BCA 蛋白检测试剂盒购自上海碧云天生物研究所,PVDF 膜购自德国 Millipore 公司,兔抗 IL-6、兔抗 IL-1β、兔抗 TNF-α、兔抗 WTAP、兔抗 STAT3、兔抗 p-STAT3、兔抗 TLR4 与兔抗 NF-κB 抗体购自英国 Abcam 公司,兔抗 SIRT1 与兔抗 c/EBPβ 抗体购自美国 CST 公司,兔抗 USP18 抗体与兔抗 GAPDH 购自美国 Immunoway 公司,鼠抗 EP4 与鼠抗 EGR1 抗体购自美国 Santa Cruz 公司,兔抗 COP1 抗体购自美国 Bethyl 公司,HRP 标记山羊抗兔 IgG 与 HRP 标记山羊抗鼠

IgG 抗体购自中国武汉 Proteintech 公司,SIRT1 激动剂 SRT1720 购自美国 Selleck 公司,SIRT1 抑制剂 EX527 购自上海陶素生物科技公司。

1.2 细胞培养

将 HMC3 细胞培养于含 10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素的 EMEM 培养基中,在温度 37 ℃、5% CO_2 的细胞培养箱中进行培养,每隔 2~3 d 更换 1 次培养液。待细胞融合度达到 80%左右时,PBS 缓冲液洗涤细胞后,用 0.25%胰蛋白酶消化细胞,离心并用 EMEM 培养基按 1∶3的比例重悬后传代培养。

1.3 细胞分组与处理

使用终浓度为 100 ng/mL 的 IFNγ 联合 1 μg/mL 的 LPS 处理 HMC3 细胞 24 h 作为实验组(IFNγ+LPS 组),以不含 IFN-γ 及 LPS 培养基处理的细胞作为空白对照组(Control 组),检测各组细胞炎症因子表达。使用慢病毒敲低 WTAP,具体分组包括:NC 组(使用空载慢病毒处理细胞),ShWTAP 组(使用 WTAP-RNAi 处理细胞)。为探讨 WTAP 对小胶质细胞极化的作用,实验分组包括:NC 组(空载病毒处理,不含 IFNγ 及 LPS),NC+IFNγ+LPS 组(空载病毒处理,100 ng/mL IFNγ 联合 1 μg/mL 的 LPS 处理细胞),ShWTAP 组(使用 WTAP-RNAi 处理细胞,不含 IFNγ 及 LPS),ShWTAP+IFNγ+LPS 组(使用 WTAP-RNAi 处理细胞,100 ng/mL IFNγ 联合 1 μg/mL LPS 处理细胞)。为研究 SIRT1 对 c/EBPβ 的作用,具体分组包括,溶剂组:NC+Vehicle 组(空载病毒+DMSO 溶剂处理细胞),ShWTAP+Vehicle 组(WTAP-RNAi 处理细胞+DMSO 溶剂处理细胞);处理组:NC+SRT1720 组(空载病毒+2.5 μmol/L SRT1720 处理细胞),ShWTAP+SRT1720 组(WTAP-RNAi+2.5 μmol/L SRT1720 处理细胞),NC+EX527 组(空载病毒+10 μmol/L EX527 处理细胞),ShWTAP+ EX527 组(WTAP-RNAi+10 μmol/L EX527 处理细胞)。

1.4 实时荧光定量 PCR 检测

将生长良好的 HMC3 细胞接种于 6 孔细胞培养板,按照实验需求分组及药物干预,实验结束后收集细胞,用 TRIzol 试剂按照制造商说明提取和纯化细胞总 RNA。接着使用逆转录试剂盒从等量的 RNA 中逆转录 cDNA。利用 SYBR Green 在美国 Applied Biosystems 公司 7500 PCR 系统上检测 RNA 转录水平。将管家基因 β-actin 作为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目标基因的相对表达量。所有引物序列见表 1。

表 1 人源 qRT-PCR 引物序列与产物长度

引物名称	引物序列(5′→3′)	产物长度/bp
β-actin	上游:CTGGCACCCAGCACAATG 下游:GCCGATCCACACGGAGTACT	69
IL-6	上游:AGTGAGGAACAAGCCAGAGC 下游:CATTTGTGGTTGGGTCAGG	112
TNF-α	上游:CTTCTCCTTCCTGATCGTGG 下游:GCTGGTTATCTCTCAGCTCCA	266
IL-1β	上游:ATGATGGCTTATTACAGTGGCAA 下游:GTCGGAGATTCGTAGCTGGA	132
WTAP	上游:ACCTCTTCCCAAGAAGGTTCG 下游:GATCTGTGTACTTGCCCTCCA	125
eIF3	上游:ACAGGCAGTGTTTGGACCTT 下游:TACGCGTGTATTGGAGGCAG	102
RBM15	上游:GATGCTTTTGGACATCGGGC 下游:GTGGCACCCAATCAGAGTCA	115
HNRNPC	上游:ACAGCCTGATGTTTGGGACC 下游:AGAGGTTTTGTGGAGGACGC	152
ELAVL1	上游:CGCCAACTTGTACATCAGCG 下游:TAAACGCAACCCCTCTGGAC	140
METTL3	上游:TTGTCTCCAACCTTCCGTAGT 下游:CCAGATCAGAGAGGTGGTGTAG	145
METTL14	上游:AGTGCCGACAGCATTGGTG 下游:GGAGCAGAGGTATCATAGGAAGC	101
METTL4	上游:TCTGTGGTACACCAGTTGTCA 下游:CCTTTTTACGGCAACAAGGTTCA	109
FTO	上游:CCAGGGTTGGGATGGGTTCA 下游:CGCTGACCTGTCCACCAGAT	194
ALKBH5	上游:CGCTGCCGCCGAACCTTAC 下游:GGATGCCGCTCTTCACCTTGC	134
HNRNPA2B1	上游:TCGGACCAGGACCAGGAAGTAAC 下游:GTCCTCCACCACCATATCCTCCTC	165
YTHDF1	上游:AGCACAGAGCACGGCAACAAG 下游:CCATTGACGCTGAAGAGCAGGTAG	89
YTHDF2	上游:CAGACACAGCCATTGCCTCCAC 下游:AGAACCAGCCTGAGACTGTCCTAC	162
YTHDF3	上游:TCCAGCAGCCTCAGCCATTAATTC 下游:TGCTGTGGTTGTGGTGGTTGAG	88
HNRNPG	上游:CTTCAGGACCAGTTCGCAGTA 下游:TCACGACCACTTGAGTAGAGAT	520

1.5 Western blot 检测

将不同实验分组细胞进行药物干预后,用含 1 mmol/L PMSF 的 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白。将收集的细胞裂解液放置在冰上裂解 30 min 后,于设置转速 14 000×*g*、温度 4 ℃的离心机离心 15 min 后收集上清。按 BCA 蛋白检测试剂盒步骤测定蛋白浓度。将等量的蛋白(15 μg)用 8%~15% SDS-PAGE 胶分离,切胶

后将蛋白转移到 PVDF 膜上。在室温下用含 5%脱脂奶粉的 TBST 缓冲液封闭 PVDF 膜 2 h。分别加兔抗 IL-6(1∶1 000)、兔抗 IL-1β(1∶1 000)、兔抗 TNF-α(1∶500)、兔抗 WTAP(1∶1 000)、兔抗 STAT3(1∶1 000)、兔抗 p-STAT3(1∶2 000)、兔抗 TLR4(1∶500)、兔抗 NF-κB(1∶1 000)、兔抗 SIRT1(1∶1 000)、兔抗 c/EBPβ(1∶1 000)、兔抗 USP18(1∶500)、鼠抗 EP4(1∶200)、鼠抗 EGR1(1∶200)、兔抗 COP1(1∶1 000)抗体,兔抗 GAPDH(1∶5 000),在 4 ℃下孵育过夜。次日,用 TBST 缓冲液洗涤膜 3 次后,加 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体(1∶5 000)或 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 抗体(1∶5 000),在室温下孵育 1 h。TBST 缓冲液洗膜 3 次后,滴加化学发光液 ECL 后在 VILBER 成像系统下显影。用 Image J 分析蛋白质的灰度值。

1.6　慢病毒转染

本实验所用慢病毒购自上海吉凯基因化学技术有限公司,将生长状态良好对数期的 HMC3 细胞,按 5×10^5/孔接种于 6 孔细胞培养板中常规培养过夜。实验组分为 NC 组(转染空载病毒,靶标序列为 TTCTCCGAACGTGTCACGT)和 ShWTAP 组(转染 WTAP-RNAi 慢病毒,靶标序列为 CAAGTACACACAGATCTTAAC)。根据吉凯公司提供的说明书按 MOI = 50 进行 HMC3 细胞慢病毒感染实验,转染 10 h 后更换新鲜培养基,培养 72 h 后收集细胞进行后续实验。

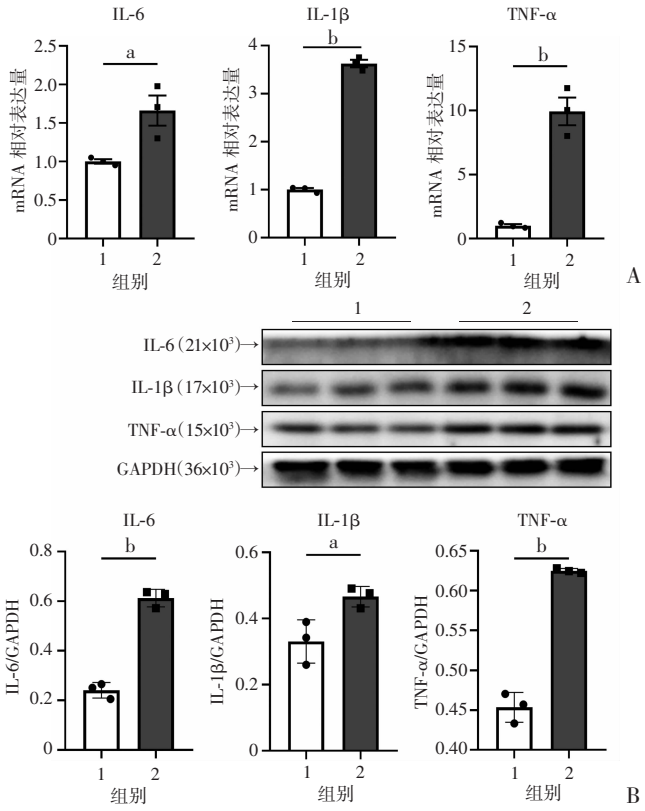
1.7　统计学分析

采用 SPSS 26.0 统计软件进行分析,采用 GraphPad Prism 8.0 软件制图。除另有说明,实验均重复 3 次或 3 次以上。实验数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示。为了进行统计比较,首先评估数据是否正态分布,然后评估正态分布数据之间的方差齐性。具有正态分布且方差齐的数据采用 Student's t 检验进行比较。$P<0.05$ 被认为差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　IFN-γ 联合 LPS 诱导 HMC3 小胶质细胞 M1 极化

按分组处理 HMC3 细胞 24 h 后,实时荧光定量 PCR 结果显示:与空白对照组比较,100 ng/mL IFNγ 联合 1 μg/mL LPS 处理可显著升高 HMC3 小胶质细胞促炎细胞因子 IL-6、IL-1β 和 TNF-α mRNA 表达($P<0.05$,图 1A)。Western blot 检测结果显示:与空白对照组相比较,100 ng/mL IFNγ 联合 1 μg/mL LPS 处理可显著升高 HMC3 小胶质细胞促炎细胞因子 IL-6、IL-1β 和 TNF-α 的蛋白表达($P<0.05$,图 1B)。



1:空白对照组;2:IFNγ+LPS 组;a:$P<0.05$, b:$P<0.01$
A:实时荧光定量 PCR 检测 2 组细胞 IL-6、IL-1β 和 TNF-α 的 mRNA 表达;B:Western blot 检测 2 组细胞 IL-6、IL-1β 和 TNF-α 的蛋白表达

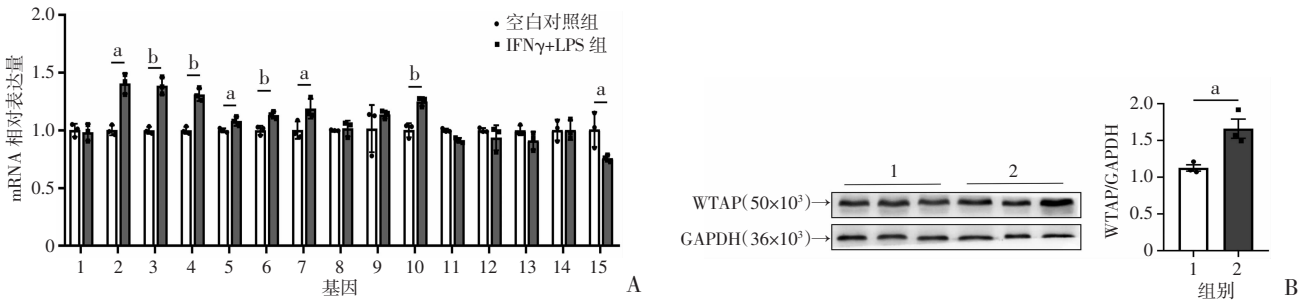
图 1　HMC3 小胶质细胞 M1 极化表型

2.2　WTAP 在 M1 极化的 HMC3 小胶质细胞中高表达

运用实时荧光定量 PCR 检测空白对照组和实验组 m6A 修饰相关基因(METTL3, METTL4, METTL14, WTAP, RBM15, FTO, ALKBH5, YTHDF1, YTHDF2, YTHDF3, ELAVL1, eIF3, HNRNPC, HNRNPA2B, HNRNPG)的表达。与空白对照组比较,WTAP mRNA 水平在 M1 极化的 HMC3 小胶质细胞中显著升高($P<0.05$,图 2A)。Western blot 检测结果显示:与空白对照组比较,WTAP 蛋白水平在 M1 极化的 HMC3 小胶质细胞中也显著升高($P<0.05$,图 2B)。

2.3　敲低 HMC3 小胶质细胞 WTAP 的表达

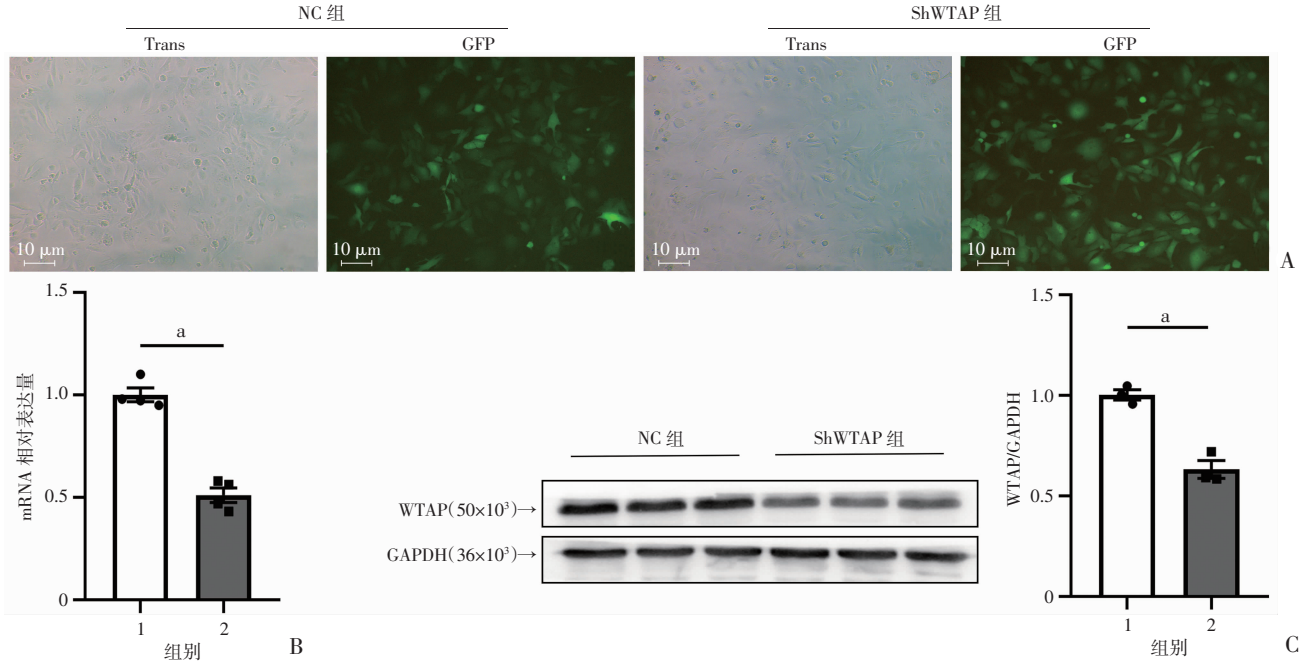
利用慢病毒转染 HMC3 小胶质细胞 72 h,空载病毒组(NC 组)和 WTAP-RNAi 组(ShWTAP 组)可见明显较多的 GFP^+ 细胞(图 3A)。使用实时荧光定量 PCR 和 Western blot 检测转染 WTAP-RNAi 的细胞的敲低效率,结果显示:WTAP 在 HMC3 细胞中 mRNA 水平成功敲低($P<0.01$,图 3B),蛋白水平也成功敲低($P<0.01$,图 3C)。



a:$P<0.05$, b:$P<0.01$

A:实时荧光定量 PCR 检测 2 组细胞 m6A 相关基因的 mRNA 表达 1:METTL3;2:METTL4;3:METTL14;4:WTAP;5:RBM15;6:FTO;7:ALKBH5;8:YTHDF1;9:YTHDF2;10:YTHDF3;11:ELAVL1;12:eIF3;13:HNRNPC;14:HNRNPA2B;15:HNRNPG;B:Western blot 检测 2 组细胞 WTAP 蛋白的表达 1:空白对照组;2:IFNγ+LPS 组

图 2 M1 极化的 HMC3 小胶质细胞高表达 WTAP



1:NC 组;2:ShWTAP 组;a:$P<0.01$

A:荧光显微镜观察 HMC3 细胞转染病毒 72 h 后的变化;B:实时荧光定量 PCR 检测 NC 组与 ShWTAP 组 WTAP 的 mRNA 表达;C:Western blot 检测 NC 组与 ShWTAP 组 WTAP 蛋白的表达

图 3 敲低 HMC3 小胶质细胞 WTAP 表达的验证

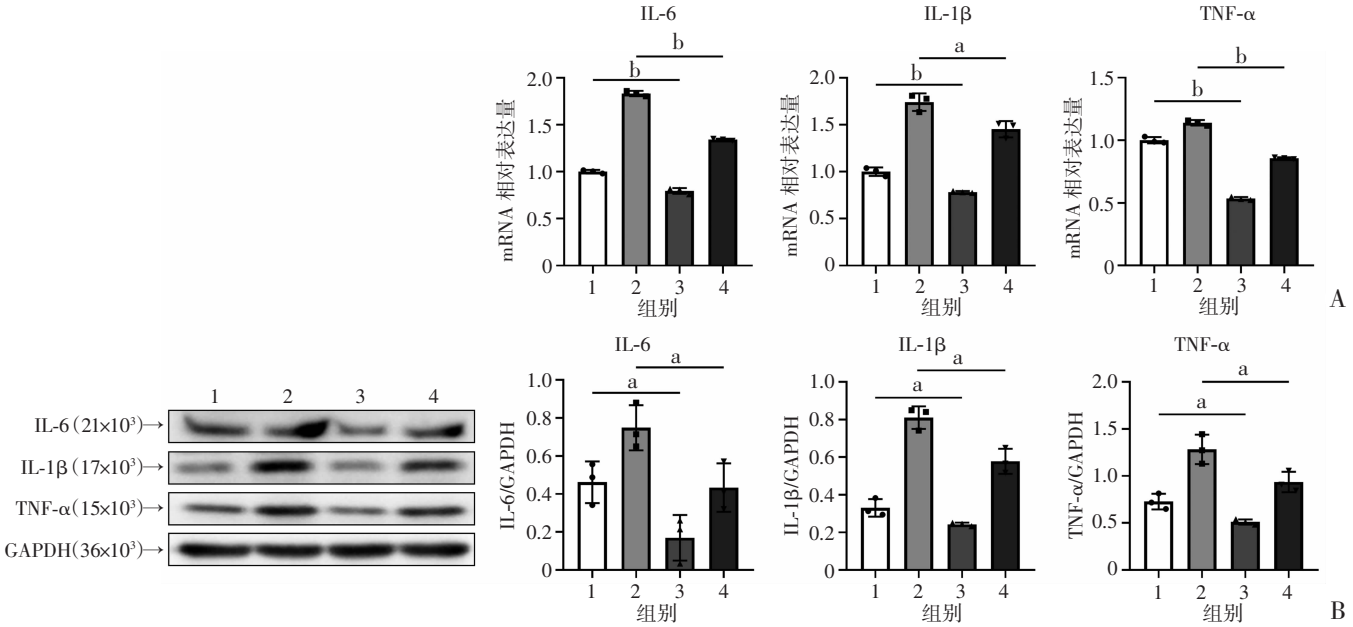
2.4 WTAP 影响 HMC3 小胶质细胞 M1 激活

在 HMC3 小胶质细胞中敲低 WTAP,采用实时荧光定量 PCR 检测敲低 WTAP 基因后 HMC3 小胶质细胞的 M1 型极化相关炎症因子 mRNA 表达的变化,结果显示:ShWTAP 组 IL-6、IL-1β 和 TNF-α mRNA 水平显著低于 NC 组,ShWTAP+IFNγ+LPS 组 IL-6、IL-1β 和 TNF-α mRNA 水平显著低于 NC+IFNγ+LPS 组($P<0.05$,图 4A)。采用 Western blot 检测敲低 WTAP 基因后 HMC3 小胶质细胞 M1 型极化相关炎症因子蛋白表达的变化,结果显示:ShWTAP 组 IL-6、IL-1β 和 TNF-α 的蛋白水平显著低于 NC 组,ShWTAP+IFNγ+LPS 组 IL-6、IL-1β 和 TNF-α 的蛋白水平显著低于 NC+IFNγ+LPS 组($P<0.05$,图 4B)。上述结果表明敲低 WTAP 显著抑制了 HMC3 小胶质细胞 M1 极化。

2.5 敲低 WTAP 使 HMC3 小胶质细胞高表达 SIRT1

为了探究 WTAP 调控 HMC3 小胶质细 M1 极化的机制,采用 Western blot 检测具有抑制小胶质细胞炎症的相关基因(SIRT1、COP1、USP18 和 EP4)的表达,结果显示:ShWTAP 组的 SIRT1 蛋白水平显著高于 NC 组($P<0.05$),而 ShWTAP 组的 COP1、USP18 和 EP4

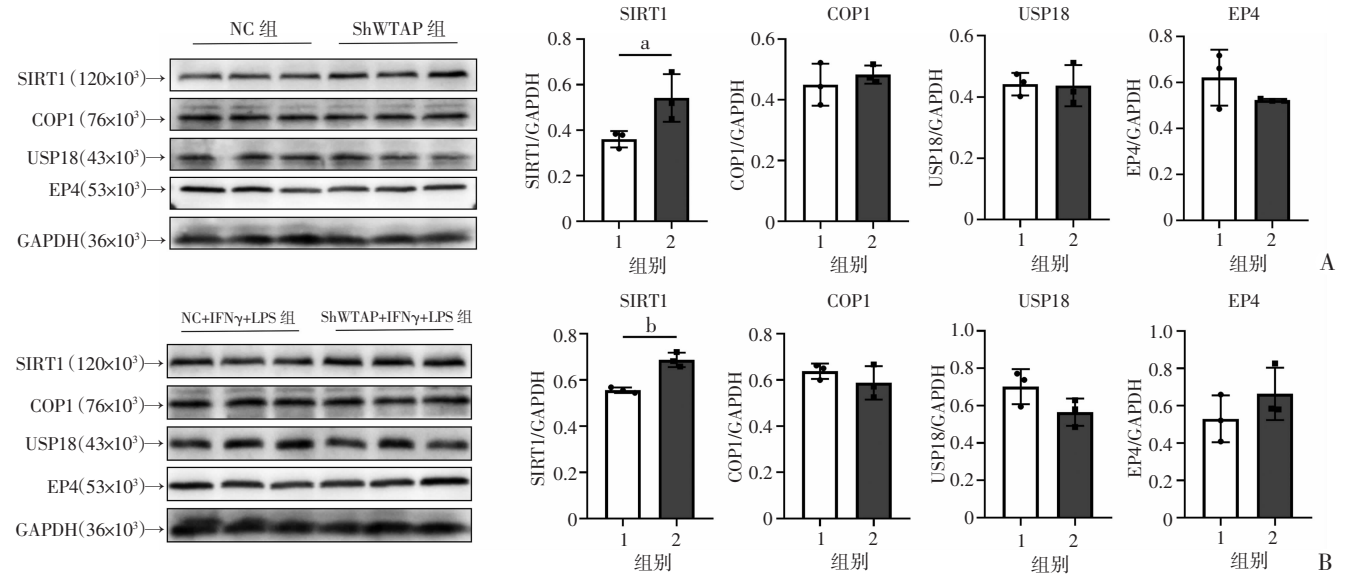
的蛋白水平与 NC 组比较差异无统计学意义(图 5A),ShWTAP+IFNγ+LPS 组的 SIRT1 蛋白水平显著高于 NC+IFNγ+LPS 组($P<0.01$),而 ShWTAP+IFNγ+LPS 组的 COP1、USP18 和 EP4 的蛋白水平与 NC+IFNγ+LPS 组比较差异无统计学意义(图 5B)。



1:NC 组;2:NC+IFNγ+LPS 组;3:ShWTAP 组;4:ShWTAP+IFNγ+LPS 组;a:$P<0.05$, b:$P<0.01$

A:实时荧光定量 PCR 检测各组细胞 IL-6、IL-1β 和 TNF-α 的 mRNA 表达;B:Western blot 检测各组细胞 IL-6、IL-1β 和 TNF-α 的蛋白表达

图 4　WTAP 影响 HMC3 小胶质细胞 M1 激活



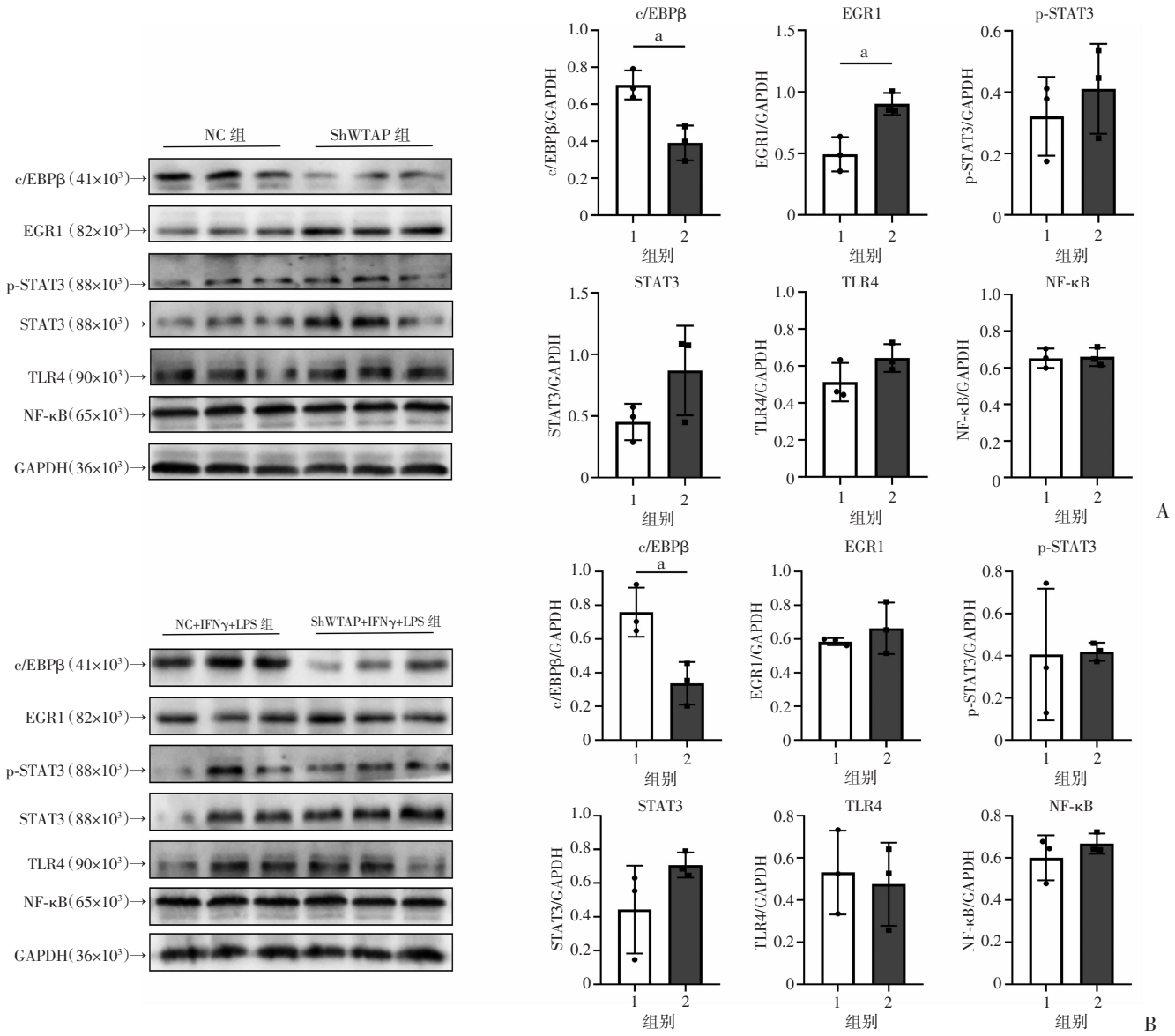
a:$P<0.05$, b:$P<0.01$

A:Western blot 检测各组细胞 SIRT1、COP1、USP18 和 EP4 的蛋白表达　1:NC 组;2:ShWTAP 组;B:Western blot 检测各组细胞 SIRT1、COP1、USP18 和 EP4 的蛋白表达　1:NC+IFNγ+LPS 组;2:ShWTAP+IFNγ+LPS 组

图 5　HMC3 细胞敲低 WTAP 后高表达 SIRT1

2.6 敲低 WTAP 使 HMC3 小胶质细胞低表达 c/EBPβ

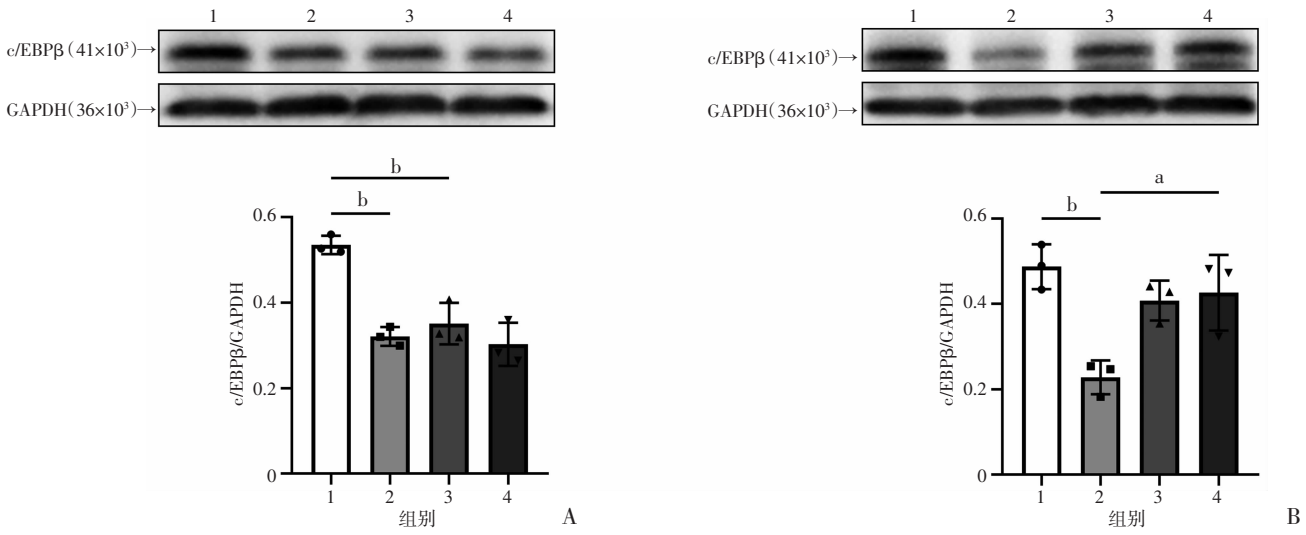
上述实验结果显示:敲低 WTAP 促进了 HMC3 小胶质细胞 SIRT1 的表达,考虑到小胶质细胞 M1 极化需要激活促炎转录因子和炎症相关通路受体,因此采用 Western blot 检测部分促炎转录因子和炎症相关通路受体的表达变化。结果显示:ShWTAP 组的 c/EBPβ 蛋白水平显著低于 NC 组($P<0.05$),而 ShWTAP 组的 STAT3、p-STAT3、TLR4 和 NF-κB 的蛋白水平与 NC 组比较差异无统计学意义(图 6A),ShWTAP+IFNγ+LPS 组的 c/EBPβ 蛋白水平显著低于 NC+IFNγ+LPS 组($P<0.05$),而 ShWTAP+IFNγ+LPS 组的 STAT3、p-STAT3、TLR4 和 NF-κB 的蛋白水平与 NC+IFNγ+LPS 组比较差异无统计学意义(图 6B)。虽然 ShWTAP 组的 EGR1 蛋白水平显著高于 NC 组($P<0.05$,图 6A),但 ShWTAP+IFNγ+LPS 组的 EGR1 蛋白水平与 NC+IFNγ+LPS 组的差异无统计学意义(图 6B)。



a:$P<0.05$

A:Western blot 检测各组细胞 c/EBPβ、EGR1、p-STAT3、STAT3、TLR4 和 NF-κB 的蛋白表达 1:NC 组;2:ShWTAP 组;B:Western blot 检测各组细胞 c/EBPβ、EGR1、p-STAT3、STAT3、TLR4 和 NF-κB 的蛋白表达 1:NC+IFNγ+LPS 组;2:ShWTAP+IFNγ+LPS 组

图 6 HMC3 细胞敲低 WTAP 后低表达 c/EBPβ



a:$P<0.05$, b:$P<0.01$

A:Western blot 检测各组细胞在溶剂和 SIRT1 激动剂 SRT1720 的作用下 c/EBPβ 的蛋白表达 1:NC+Vehicle 组;2:ShWTAP+Vehicle 组;3:NC+SRT1720 组;4:ShWTAP+SRT1720 组; B:Western blot 检测各组细胞在溶剂和 SIRT1 抑制剂 EX527 的作用下 c/EBPβ 的蛋白表达 1:NC+Vehicle 组;2:ShWTAP+Vehicle 组;3:NC+EX527 组;4:ShWTAP+EX527 组

图 7 WTAP 通过 SIRT1 调控 c/EBPβ 在 HMC3 小胶质细胞中的表达

2.7 SIRT1 通过调控 c/EBPβ 表达参与 WTAP 对 HMC3 小胶质细 M1 极化的影响

为了证明 SIRT1 是否调控转录因子 c/EBPβ 表达,对 NC 组和 ShWTAP 组细胞分别用 SIRT1 激动剂 SRT1720/SIRT1 抑制剂 EX527 促进 SIRT1 活性/抑制 SIRT1 活性,采用 Western blot 检测各组细胞 c/EBPβ 的蛋白表达,结果显示:与溶剂组相比较,SIRT1 激动剂 SRT1720 能使 NC 组相较于 ShWTAP 组高表达的 c/EBPβ 表达显著降低($P<0.01$,图 7A),SIRT1 抑制剂 EX527 能使 ShWTAP 组相较于 NC 组低表达的 c/EBPβ 表达显著升高($P<0.05$,图 7B)。表明在敲低 WTAP 的 HMC3 小胶质细胞中,SIRT1 参与调控转录 c/EBPβ 的表达。

3 讨论

小胶质细胞是视网膜的一类固有免疫细胞,其对维持视网膜组织结构及其功能正常是必不可少的[5]。目前有研究证实:在自身免疫性葡萄膜炎中,小胶质细胞在启动免疫细胞浸润中起着至关重要的作用,清除视网膜小胶质细胞后,外周免疫细胞不能通过血视网膜屏障侵入视网膜,而不能诱发自身免疫性葡萄膜炎[6]。也有研究表明:在视网膜脱离中,小胶质细胞迁移到损伤部位保护感光细胞,并且参与调节局部的炎症反应[7]。因此,寻找调控小胶质细胞活化的新靶标,也许能为视网膜疾病,特别是为葡萄膜炎等自身免疫性疾病的治疗带来新的突破口。

在健康的视网膜中,小胶质细胞通常呈高度分支的形态,具有小细胞体和长细胞突起等典型特征[8],它们通过不断移动突起来扫描周围组织微环境。当周围组织微环境发生变化时,小胶质细胞就会被激活,激活的小胶质细胞胞体变大,水平突起会收缩,它们的形态变成“阿米巴样”[9]。我们在 HMC3 小胶质细胞系上也观察到类似的形态特征。在静息状态下,HMC3 小胶质细胞胞体较小,呈“分支样”。使用 IFNγ+LPS 诱导 M1 极化后,HMC3 小胶质细胞的胞体变大,呈“阿米巴样”的形态。而使用 IFNγ+LPS 诱导敲低 WTAP 的 HMC3 细胞时,我们发现“阿米巴样”的细胞明显减少,说明敲低 WTAP 可抑制 HMC3 细胞的 M1 型极化。

mRNA 的转录后修饰主要包括 m6A、5-甲基胞嘧啶(m5C)和假尿苷(ψ)。近年来,mRNA 的表观遗传修饰受到越来越多的关注,尤其是 m6A 修饰。m6A 修饰是哺乳动物细胞中最为丰富的 mRNA 转录后修饰形式[10],由甲基化酶、去甲基化酶和 m6A 修饰识别蛋白动态可逆调控[11]。研究表明 m6A 修饰在 mRNA 加

工、核输出、mRNA 翻译和衰变等方面影响 mRNA 代谢[3],参与了多种细胞生物过程,如迁移、侵袭、细胞周期、细胞黏附、分化和炎症等。这意味着 m6A 修饰与许多疾病相关,如卵巢癌发生、转移[12]和心肌梗死后的修复[13]等。此外,m6A 修饰与免疫细胞的激活和免疫应答的关系也十分密切[14]。

WTAP 是 m6A 修饰的一种重要的甲基转移酶,参与了许多疾病的发生、发展。如 WTAP 蛋白的增加可增强了 Wnt 信号的激活,促进胰腺癌的进展[15];WTAP 的降解通过降低 IRF3 和 IFNAR1 mRNA 的 m6A 水平来阻断抗病毒反应[16];WTAP 通过影响 MYC mRNA 的 m6A 水平调节 MYC mRNA 在急性髓系白血病细胞中的半衰期,WTAP 的高表达预示着预后不良[17]。然而 WTAP 对小胶质细胞极化的调控,乃至在自身免疫性葡萄膜炎中的作用尚不明确。

本研究结果显示 WTAP 在 M1 极化的 HMC3 小胶质细胞中高表达,进一步研究发现 WTAP 在 HMC3 细胞 M1 极化的过程中具有重要的生物学功能,在体外发挥着促进 HMC3 小胶质细胞炎性细胞因子表达的作用,敲低 WTAP 可以抑制这一现象。提示 WTAP 可能是调控小胶质细胞 M1 极化的潜在作用靶点。本研究发现:敲低 WTAP 通过促进 SIRT1 的表达而降低 c/EBPβ 抑制 HMC3 小胶质细胞 M1 极化。SIRT1 是一种烟酰胺腺苷二核苷酸(NAD+)依赖性酶,属于 Sirtuin 蛋白家族,是细胞调控相关蛋白去乙酰化的关键酶[18]。越来越多的证据显示:SIRT1 参与机体许多生理和病理的过程,如细胞凋亡、衰老、调控炎症反应等。最近有研究表明:在创伤性脑损伤后,增加 SIRT1 活性,可促进小胶质细胞由 M1 型向 M2 型转变,并抑制了小胶质细胞的活化,从而减轻随后的神经炎症反应[19]。此外,AMPK-SIRT1 轴通过介导下游途径的去乙酰化,抑制 NF-κB 活化,从而减少促炎细胞因子的分泌,减轻实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠的神经炎症[20]。由此可见,SIRT1 降低促炎信号的强度,抑制小胶质细胞 M1 激活,这与我们的研究发现一致:敲低 HMC3 小胶质细胞 WTAP 后,SIRT1 表达增加,降低了 c/EBPβ 的表达,进而抑制了小胶质细胞 M1 激活。

综上所述,本研究结果表明 m6A 甲基化酶 WTAP 可能是一种重要的转录后调控因子,参与了小胶质细胞 M1 极化。靶向 WTAP 可能为减轻免疫反应,降低视网膜损伤,保护视功能提供了一种潜在的治疗策略。结合目前已知的对 WTAP 的研究,WTAP 有可能影响了 SIRT1 mRNA 的 m6A 水平,进而可能通过 m6A 识别蛋白以 m6A 依赖的方式对 SIRT1 mRNA 的加工、核输出、翻译甚至衰变等方面产生影响,从而可能影响 SIRT1 在小胶质细胞中的表达,参与小胶质细胞 M1 极化的调控过程。然而,WTAP 如何通过 m6A 修饰发挥调控小胶质细胞 M1 极化的具体机制还需进行深入的研究和探讨。

参考文献:

[1] RATHNASAMY G, FOULDS W S, LING E A, *et al*. Retinal microglia: a key player in healthy and diseased Retina[J]. Prog Neurobiol, 2019, 173: 18-40. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2018.05.006.

[2] ORIHUELA R, MCPHERSON C A, HARRY G J. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states[J]. Br J Pharmacol, 2016, 173(4): 649-665. DOI: 10.1111/bph.13139.

[3] DOMINISSINI D, MOSHITCH-MOSHKOVITZ S, SCHWARTZ S, *et al*. Topology of the human and mouse m6A RNA methylomes revealed by m6A-seq[J]. Nature, 2012, 485(7397): 201-206. DOI: 10.1038/nature11112.

[4] PING X L, SUN B F, WANG L, *et al*. Mammalian WTAP is a regulatory subunit of the RNA N6-methyladenosine methyltransferase[J]. Cell Res, 2014, 24(2): 177-189. DOI: 10.1038/cr.2014.3.

[5] GUO M, SCHWARTZ T D, DUNAIEF J L, *et al*. Myeloid cells in retinal and brain degeneration[J]. FEBS J, 2021. DOI: 10.1111/febs.16177. [Online ahead of print].

[6] OKUNUKI Y, MUKAI R, NAKAO T, *et al*. Retinal microglia initiate neuroinflammation in ocular autoimmunity[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2019, 116(20): 9989-9998. DOI: 10.1073/pnas.1820387116.

[7] OKUNUKI Y, MUKAI R, PEARSALL E A, *et al*. Microglia inhibit photoreceptor cell death and regulate immune cell infiltration in response to retinal detachment[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2018, 115(27): E6264-E6273. DOI: 10.1073/pnas.1719601115.

[8] CEBULLA C M, ZELINKA C P, SCOTT M A, *et al*. A chick model of retinal detachment: cone rich and novel[J]. PLoS One, 2012, 7(9): e44257. DOI: 10.1371/journal.pone.0044257.

[9] KARLSTETTER M, SCHOLZ R, RUTAR M, *et al*. Retinal microglia: just bystander or target for therapy?[J]. Prog Retin Eye Res, 2015, 45: 30-57. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2014.11.004.

[10] ZHANG Y, GENG X, LI Q, *et al*. m6A modification in RNA: biogenesis, functions and roles in gliomas[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2020, 39(1): 192. DOI: 10.1186/s13046-020-01706-8.

[11] ROBINSON M, SHAH P, CUI Y H, *et al*. The role of dynamic m6A RNA methylation in photobiology [J]. Photochem Photobiol, 2019, 95(1): 95-104. DOI: 10.1111/php.12930.

[12] LIU T, WEI Q, JIN J, *et al*. The m6A reader YTHDF1 promotes ovarian cancer progression *via* augmenting EIF3C translation[J]. Nucleic Acids Res, 2020, 48(7): 3816-3831. DOI: 10.1093/nar/gkaa048.

[13] GONG R, WANG X, LI H, *et al*. Loss of m6A methyltransferase METTL3 promotes heart regeneration and repair after myocardial injury[J]. Pharmacol Res, 2021: 105845. DOI: 10.1016/j.phrs.2021.105845.

[14] WANG H, HU X, HUANG M, *et al*. Mettl3-mediated mRNA m6A methylation promotes dendritic cell activation [J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 1898. DOI: 10.1038/s41467-019-09903-6.

[15] DENG J, ZHANG J, YE Y, *et al*. N6 -methyladenosine-mediated upregulation of WTAPP1 promotes WTAP translation and wnt signaling to facilitate pancreatic cancer progression[J]. Cancer Res, 2021, 81(20): 5268-5283. DOI: 10.1158/0008-5472.can-21-0494.

[16] GE Y, LING T, WANG Y, *et al*. Degradation of WTAP blocks antiviral responses by reducing the m6 A levels of IRF3 and IFNAR1 mRNA[J]. EMBO Rep, 2021: e52101. DOI: 10.15252/embr.202052101.

[17] NAREN D, YAN T, GONG Y, *et al*. High Wilms' tumor 1 associating protein expression predicts poor prognosis in acute myeloid leukemia and regulates m6A methylation of MYC mRNA[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2021, 147(1): 33-47. DOI: 10.1007/s00432-020-03373-w.

[18] MELHEM H, HANSMANNEL F, BRESSENOT A, *et al*. Methyl-deficient diet promotes colitis and SIRT1-mediated endoplasmic Reticulum stress[J]. Gut, 2016, 65(4): 595-606. DOI: 10.1136/gutjnl-2014-307030.

[19] CHEN X, CHEN C, FAN S, *et al*. Omega-3 polyunsaturated fatty acid attenuates the inflammatory response by modulating microglia polarization through SIRT1-mediated deacetylation of the HMGB1/NF-κB pathway following experimental traumatic brain injury[J]. J Neuroinflammation, 2018, 15(1): 116. DOI: 10.1186/s12974-018-1151-3.

[20] PARODI B, ROSSI S, MORANDO S, *et al*. Fumarates modulate microglia activation through a novel HCAR2 signaling pathway and rescue synaptic dysregulation in inflamed CNS[J]. Acta Neuropathol, 2015, 130(2): 279-295. DOI: 10.1007/s00401-015-1422-3.

(**收稿**:2021-09-24;**修回**:2021-11-17)

(编辑 王 红)