

FTO介导m6A修饰的PRKD2调节SIRT1/HIF-1 α 通路抑制糖尿病肾病足细胞损伤的机制研究

李亚宁, 李成乾 (青岛大学附属医院内分泌科, 山东青岛 264200)

摘要: 目的 探究脂肪含量和肥胖相关蛋白 (fat mass and obesity-associated protein, FTO) 和丝氨酸-苏氨酸激酶蛋白激酶 D2 (serine-threonine kinase protein kinase D2, PRKD2) 在糖尿病肾病 (diabetic kidney disease, DKD) 进展中的调控作用和调节机制。方法 采用 35 mmol/L 葡萄糖对足细胞 (MPC5 细胞) 进行高糖刺激 24h 构建 DKD 体外模型。采用 FTO 过表达载体 (pcDNA-FTO) 和 PRKD2 过表达载体 (pcDNA-PRKD2), 或空载体 (vector) 转染高糖诱导的 MPC5 细胞。通过 RT-qPCR 检测 FTO 和 PRKD2 过表达效率; MeRIP 检测 PRKD2 mRNA 的 N6-甲基腺苷 (N6-methyladenosine, m6A) 修饰水平; ELISA 检测 Caspase-3 活性、IL-6、TNF- α 和单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemotactic protein-1, MCP-1) 分泌量; 流式细胞术分析细胞凋亡率; Western blot 评估 FTO 和 PRKD2 蛋白水平, 以及 SIRT1/HIF-1 α 通路关键蛋白表达水平; Pearson 分析 FTO 和 PRKD2 水平的相关性。结果 与无高糖诱导对照组比较, 高糖诱导的足细胞中 FTO 蛋白 (0.51 ± 0.04 vs 1.00 ± 0.03) 和 PRKD2 蛋白 (0.45 ± 0.03 vs 1.01 ± 0.04) 水平显著下调, 差异具有统计学意义 ($t=13.17, 16.76$, 均 $P<0.001$)。高糖诱导的足细胞中 FTO 蛋白水平和 PRKD2 蛋白水平呈正相关 ($r^2=0.705$, $P<0.001$)。与 vector 组相比, pcDNA-FTO 组 PRKD2 mRNA 的 m6A 水平 (0.56 ± 0.09 vs 1.01 ± 0.13) 降低, PRKD2 mRNA 水平 (3.16 ± 0.14 vs 1.03 ± 0.02) 显著升高, 差异具有统计学意义 ($t=51.37, 11.82$, 均 $P<0.001$)。与 control 组 (IL-6: 512.76 ± 61.85 pg/ml, TNF- α : 28.17 ± 2.83 pg/ml, MCP-1: 157.31 ± 17.69 pg/ml) 和 vector 组 (IL-6: 498.41 ± 87.51 pg/ml, TNF- α : 26.35 ± 5.47 pg/ml, MCP-1: 165.52 ± 16.87 pg/ml) 比较, pcDNA-PRKD2 组 IL-6 (301.86 ± 21.85 pg/ml), TNF- α (11.06 ± 4.12 pg/ml), MCP-1 分泌量 (81.45 ± 9.03 pg/ml) 显著减少, 差异具有统计学意义 ($F=7.51, 10.47, 61.97$, 均 $P<0.01$)。与 control 组 (Caspase-3: 689.65 ± 79.5 U/L, 细胞凋亡率: $22.31\% \pm 2.69\%$) 和 vector 组 (Caspase-3: 715.91 ± 113.58 U/L, 细胞凋亡率: $21.07\% \pm 3.28\%$) 比较, pcDNA-PRKD2 组 Caspase-3 活性 (437.64 ± 104.76 U/L) 和细胞凋亡率 ($8.41\% \pm 3.15\%$) 下降, 差异具有统计学意义 ($F=2.35, 79.13$, 均 $P<0.01$)。与 control 组 (SIRT1: 1.01 ± 0.05 , HIF-1 α : 1.03 ± 0.07) 和 vector 组 (SIRT1: 0.97 ± 0.05 , HIF-1 α : 1.02 ± 0.03) 相比, pcDNA-PRKD2 组 SIRT1 蛋白 (3.51 ± 0.15) 水平升高, HIF-1 α 蛋白 (0.37 ± 0.07) 水平降低, 差异具有统计学意义 ($F=31.54, 8.31$, 均 $P<0.01$)。结论 FTO 介导 m6A 修饰的 PRKD2 通过 SIRT1/HIF-1 α 通路抑制高糖诱导的足细胞炎症反应和细胞凋亡。

关键词: 糖尿病肾病; 足细胞; N6 甲基腺苷修饰; 脂肪和肥胖相关蛋白; 丝氨酸-苏氨酸激酶蛋白激酶 D2
中图分类号: R587.2; R392.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2024) 01-005-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2024.01.002

Mechanism of FTO-mediated and m6A-modified PRKD2 Inhibiting Podocyte Injury in Diabetic Kidney Disease through the SIRT1/HIF-1 Pathway

LI Yaning, LI Chengqian (Department of Endocrinology, Affiliated Hospital of Qingdao University, Shandong Qingdao 264200, China)

Abstract: Objective To explore the regulatory role of fat mass and obesity-associated protein (FTO) and serine-threonine kinase protein kinase D2 (PRKD2) in progression of diabetic kidney disease (DKD) and its regulatory mechanisms. **Methods** DKD model in vitro was constructed by podocytes (MPC5 cells) treated with high glucose (HG, 35 mmol/L glucose) for 24 h. HG-induced MPC5 cells were transfected with FTO overexpression vector (pcDNA-FTO) and PRKD2 overexpression vector (pcDNA-PRKD2), or empty vector. The overexpression efficiency of FTO and PRKD2 were detected with RT-qPCR. MeRIP was used to detect the N6-methyladenosine(m6A) modification level of PRKD2 mRNA. The activity of Caspase-3 and the secretion of IL-6, TNF- α and monocyte chemotactic protein-1(MCP-1) were detected by ELISA. Cell apoptosis rate was analyzed by flow cytometry. The protein levels of FTO and PRKD2, as well as the key proteins in SIRT1/HIF-1 α pathway, were evaluated by Western blot. Pearson analysis was used to analyze the correlation between FTO levels and PRKD2 levels. **Results** Compared

作者简介: 李亚宁 (1985-), 女, 本科, 硕士研究生在读, 副主任医师, 研究方向: 糖尿病发病机制、糖尿病诊治, E-mail: he_554706@163.com。

通讯作者: 李成乾 (1974-), 男, 博士, 副主任医师, E-mail: 13754620843@163.com。

with the control group without HG-induction, the protein expression of FTO (0.51 ± 0.04 vs 1.00 ± 0.03) and PRKD2 (0.45 ± 0.03 vs 1.01 ± 0.04) was significantly down-regulated in HG-induced podocytes, and the differences were statistically significant ($t=13.17, 16.76$, all $P<0.001$). FTO protein levels were positively correlated with PRKD2 protein levels in HG-induced podocytes ($r^2=0.705$, $P<0.001$). Compared with the vector group, the m6A levels of PRKD2 mRNA (0.56 ± 0.09 vs 1.01 ± 0.13) in the pcDNA-FTO group were decreased, and the mRNA levels of PRKD2 (3.16 ± 0.14 vs 1.03 ± 0.02) were increased, with significant differences ($t=51.37, 11.82$, all $P<0.001$). Compared with the control group (IL-6: 512.76 ± 61.85 pg/ml, TNF- α : 28.17 ± 2.83 pg/ml, MCP-1: 157.31 ± 17.69 pg/ml) and the vector group (IL-6: 498.41 ± 87.51 pg/ml, TNF- α : 26.35 ± 5.47 pg/ml, MCP-1: 165.52 ± 16.87 pg/ml), the secretion of IL-6 (301.86 ± 21.85 pg/ml), TNF- α (11.06 ± 4.12 pg/ml) and MCP-1 (81.45 ± 9.03 pg/ml) were significantly decreased in the pcDNA-PRKD2 group, and the differences were statistically significant ($F=7.51, 10.47, 61.97$, all $P<0.01$). Compared with the control group (caspase-3 activity: 689.65 ± 79.5 U/L, cell apoptosis: $22.31\% \pm 2.69\%$) and the vector group (Caspase-3 activity: 715.91 ± 113.58 U/L, cell apoptosis: $21.07\% \pm 3.28\%$), Caspase-3 activity (437.64 ± 104.76 U/L) and the rate of apoptosis ($8.41\% \pm 3.15\%$) were significantly decreased in the pcDNA-PRKD2 group, and the differences were statistically significant ($F=2.35, 79.13$, all $P<0.01$). Compared with the control group (SIRT1: 1.01 ± 0.05 , HIF-1 α : 1.03 ± 0.07) and the vector group (SIRT1: 0.97 ± 0.05 , HIF-1 α : 1.02 ± 0.03), SIRT1 protein levels (3.51 ± 0.15) were increased and HIF-1 α protein levels (0.37 ± 0.07) were decreased in the pcDNA-PRKD2 group, and the differences were statistically significant ($F=31.54, 8.31$, all $P<0.01$). **Conclusion** FTO-mediated and m6A-modified PRKD2 suppresses inflammation and apoptosis in HG-induced podocytes through the SIRT1/HIF-1 pathway.

Keywords: diabetic kidney disease; podocytes; N6-methyladenosine modification; fat mass and obesity-associated protein; serine-threonine kinase protein kinase D2

糖尿病肾病 (diabetic kidney disease, DKD) 是糖尿病常见的微血管并发症, 也是世界终末期肾脏病的第二位原因^[1]。目前常见治疗方法如控制血糖或血压, 只能实现部分肾保护^[2-3]。因此开发新的且有效的治疗方法成为了DKD研究的首要任务。足细胞是终末分化的肾小球上皮细胞, 在维持肾小球滤过屏障的完整性方面起着重要作用^[4]。研究证实, 足细胞功能障碍或损伤是DKD发生发展的核心事件^[5-6]。确定介导足细胞损伤的关键因素将有助于理解DKD发病机制提供重要见解。有报道显示, 丝氨酸-苏氨酸激酶蛋白激酶D2 (serine-threonine kinase protein kinase D2, PRKD2) 缺乏会促进胰岛素抵抗和代谢紊乱, 引发高胰岛素血症^[7]。高胰岛素血症等异常的代谢综合征会导致DKD发生^[8-9]。N6-甲基腺苷 (N6-methyladenosine, m6A) 甲基化是真核生物 mRNA 中普遍存在的修饰, m6A 修饰可以维持 mRNA 的稳定性、转运、剪接、定位、翻译和蛋白 RNA 相互作用^[10-11]。据报道显示, m6A 修饰可以调节炎症和凋亡, 是介导DKD病理损伤的重要机制^[6,12]。然而, PRKD2 和 m6A 在DKD发病中的生物学作用尚不清楚。本研究通过高糖诱导小鼠足细胞构建DKD体外模型, 分析了PRKD2 和 m6A 去甲基化酶脂肪含量和肥胖相关蛋白 (fat mass and obesity-associated protein, FTO) 在高糖诱导的小鼠足细胞中的表达及其调控关系, 探究FTO介导的PRKD2对DKD进展的调控机制。

1 材料与方法

1.1 研究对象 小鼠足细胞 (MPC5) 购自中国

医学科学院基础医学研究所, 在含 10 g/dl 胎牛血清和 20 U/ml 小鼠重组干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ) 的 RPMI 1640 培养液中于 33 $^{\circ}$ C 下培养。

1.2 仪器与试剂 Magna RIP RNA 结合蛋白免疫沉淀试剂盒 (17-701, Millipore Sigma); Lipofectamine RNAiMAX 试剂盒 (13, 778-030, Invitrogen Life Technologies); Anti- β -actin 抗体 (ab8226, Abcam); Anti-m6A 抗体 (ab284130, Abcam); Anti-FTO (ab280081, Abcam); Anti-SIRT1 (ab110304, Abcam); Anti-IgG (ab302644, Abcam); Anti-HIF-1 α (ab179483, Abcam); 半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶3 (CysteinyI aspartate-specific proteinase-3, Caspase-3, G015-1-3), 白细胞介素-6 (interleukin 6, IL-6, H007-1-2), 肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α , H052-1-2) 及单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemotactic protein 1, MCP-1, H115) 检测 ELISA 试剂盒 (南京建成); Trizol 试剂 (Life Technologies, Carlsbad, CA); ExoQuick exosome 提取试剂盒 (System Biosciences, 美国); Prime Script RT 反转录试剂盒 (Takara, 中国大连); miScript SYBR Green 荧光定量 PCR 试剂盒 (QIAGEN, 德国); RIPA 裂解缓冲液和 BCA 蛋白测定试剂盒 (Beyotime Institute of Biotechnology, 上海); ECL 化学发光试剂盒 (Thermo Scientific, 美国); MK3 型酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Multizoom AZ100 型光学生物显微镜 [尼康仪器 (上海) 有限公司]; Centrifuge5804R 型高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司); Tanno 5200 型化学发光凝胶成像仪 (上海天

能科技有限公司) Spectra-Maxi3x 型多功能酶标仪(美国 MD 公司)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养: 未分化的 MPC5 细胞在含 10 g/dl 胎牛血清和 20 U/ml 小鼠重组 IFN- γ 的 RPMI 1640 培养液中 33 °C 培养。诱导分化时, 将足细胞在不含 IFN- γ 的非允许条件下 37 °C 维持 7 天进行实验。建立体外足细胞损伤模型时, 将分化的足细胞在含 1 g/dl 胎牛血清的培养液中饥饿 12h, 后接受 35 mmol/L 葡萄糖进行高糖刺激 24 h。

1.3.2 细胞转染与分组: 将高糖诱导后的 MPC5 细胞分为 control 组、空载体 (vector) 组及 pcDNA-PRKD2 组和 pcDNA-FTO 组。按照分组, control 组加入转染试剂培养; vector 组采用空载体进行转染; pcDNA-PRKD2 组采用 PRKD2 过表达载体 (pcDNA-PRKD2) 进行转染; pcDNA-FTO 组采用 FTO 过表达载体 (pcDNA-FTO) 进行转染; 按照 Lipofectamine RNAiMAX 试剂盒说明书将上述载体分别转染到 MPC5 细胞中。

1.3.3 RT-qPCR 实验: 使用 Trizol 法提取总 RNA, 核酸定量后, 采用 Prime Script RT 试剂盒进行逆转录为 cDNA, 以此为模版配置 PCR 反应体系, 使用 miScript SYBR Green 荧光定量 PCR 试剂盒进行实时分析, 条件: 95 °C 1min, 95 °C 20s, 56 °C 10s 和 72 °C 15s, 32 个循环。引物序列: FTO-F: 5'-TCACAG ACGTGGTTTCCGAG-3', FTO-R: 5'-ACCACTGGG TTGAGAGGA GT-3'; PRKD2-F: 5'-AGAGCCAGG TAACAGGAACAATAG; PRKD2-R: GTGCTAAGGA GGGAGGCTCT-3'; β -actin-F: 5'-CATCCGTAAA GACCTCTATGCCAAC-3', β -actin-R: 5'-ATGGAG CCACCGATCCACA-3'。 β -actin 作为内参, 通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算相对表达水平。

1.3.4 Western blot 分析: 用 RIPA 裂解缓冲液裂解细胞, 通过 BCA 蛋白测定试剂盒测量蛋白浓度。将 30 μ g 蛋白在 10g/dl 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 上分离, 并转移到 PVDF 膜上。将膜在室温下用 5g/dl 脱脂乳封闭 2h, 加入 Anti-FTO (ab280081, Abcam), Anti-SIRT1 (ab110304, Abcam), Anti-HIF-1 α (ab179483, Abcam) 和 Anti- β -actin 抗体 (ab8226, Abcam), 4 °C 孵育过夜。次日将膜与辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 在室温下孵育 1h。 β -actin 作为内参, 通过化学发光 (ECL) 试剂盒对蛋白条带进行可视化, 并通过化学发光成像系统进行拍照。

1.3.5 m6A-MeRIP 分析: 根据制造商说明, 使用 Magna RIP RNA 结合蛋白免疫沉淀试剂盒进行

RIP。MPC5 细胞在用高糖处理之前用质粒转染。将预先涂有 5 μ g Anti-m6A 抗体或 IgG 抗体的磁珠与细胞裂解物在 4 °C 下孵育过夜。然后用蛋白酶 K 处理含有免疫沉淀的 RNA-蛋白质复合物的磁珠以去除蛋白质。使用 Trizol 提取 RNA, 并使用样品进行 mRNA 的 m6A 免疫纯化, 以使用 RT-qPCR 进行检测。

1.3.6 ELISA 试剂盒检测 IL-6, TNF- α , MCP-1 水平和 Caspase-3 活性: 按照试剂盒使用说明书, 分别检测细胞培养液中的 IL-6, TNF- α , MCP-1 水平以及 Caspase-3 活性。

1.3.7 流式细胞术分析: 通过膜联蛋白 V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒检测细胞凋亡。将细胞悬浮在膜联蛋白 V-FITC 和结合缓冲液的混合物中, 室温孵育 30 min, 然后加入 PI 和结合缓冲溶液混匀, 室温温育 15 min。通过流式细胞仪检测荧光, 计算细胞凋亡率。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间差异比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 组间两两比较采用 LSD 检验; 两组间差异比较采用 Students- t 检验; 相关性分析用 Pearson 法。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 高糖诱导的足细胞中 FTO 和 PRKD2 蛋白表达及相关性研究 Western blots 检测显示, 与无高糖诱导对照组相比, 高糖诱导的足细胞中 FTO 蛋白 (0.51 ± 0.04 vs 1.00 ± 0.03) 和 PRKD2 蛋白 (0.45 ± 0.03 vs 1.01 ± 0.04) 水平显著下调, 差异具有统计学意义 ($t=13.17, 16.76$, 均 $P < 0.001$)。Pearson 相关性分析显示, 高糖诱导的足细胞中 FTO 和 PRKD2 蛋白水平呈正相关 ($r^2=0.7051$, $P < 0.001$)。

2.2 FTO 过表达转染效率验证 RT-qPCR 检测发现, pcDNA-FTO 组 FTO mRNA 表达水平 (3.21 ± 0.15) 较 control 组 (1.01 ± 0.03) 和 vector 组 (1.03 ± 0.08) 显著升高, 差异有统计学意义 ($F=8.35$, $P < 0.001$), 提示 FTO 过表达细胞系构建成功。

2.3 FTO 对 m6A 修饰的 PRKD2 mRNA 表达的影响 MeRIP 分析结果显示, 与 vector 组相比, pcDNA-FTO 组 PRKD2 mRNA m6A 水平 (1.01 ± 0.13 vs 0.56 ± 0.09) 显著降低, 差异有统计学意义 ($t=51.37$, $P < 0.001$)。RT-qPCR 结果显示, pcDNA-FTO 组 PRKD2 mRNA 水平 (3.16 ± 0.14) 较 vector 组 (1.03 ± 0.02) 显著升高, 差异有统计学意义 ($t=11.82$, $P < 0.001$)。提示过表达 FTO 通过抑制 PRKD2 mRNA 的 m6A 修饰可上调 PRKD2 表达。

2.4 RKD2 过表达转染效率验证 RT-qPCR 检测

显示, pcDNA-PRKD2 组 PRKD2 mRNA 表达水平 (3.52 ± 0.21) 与 control 组 (1.03 ± 0.05) 和 vector 组 (1.03 ± 0.14) 比较显著升高, 差异有统计学意义 ($F=47.13$, $P<0.001$), 提示 RKD2 过表达细胞系构建成功。

2.5 过表达 PRKD2 对足细胞炎症反应及细胞凋亡

表 1 过表达 PRKD2 对足细胞炎症反应和细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$)

项 目	control 组	vector 组	pcDNA-PRKD2 组	<i>F</i>	<i>P</i>
IL-6 (pg/ml)	512.76 \pm 61.85	498.41 \pm 87.51	301.86 \pm 21.85	7.51	<0.01
TNF- α (pg/ml)	28.17 \pm 2.83	26.35 \pm 5.47	11.06 \pm 4.12	10.47	<0.01
MCP-1 (pg/ml)	157.31 \pm 17.69	165.52 \pm 16.87	81.45 \pm 9.03	61.97	<0.01
Caspase-3 活性 (U/L)	689.65 \pm 79.53	715.91 \pm 113.58	437.64 \pm 104.76	2.35	<0.01
细胞凋亡 (%)	22.31 \pm 2.69	21.07 \pm 3.28	8.41 \pm 3.15	79.13	<0.01

2.6 过表达 PRKD2 对 SIRT1/HIF-1 α 通路的影响 Western blots 检测显示, 与 control 组 (1.01 ± 0.05 , 1.03 ± 0.07) 和 vector 组 (0.97 ± 0.05 , 1.02 ± 0.03) 比较, pcDNA-PRKD2 组 SIRT1 蛋白 (3.51 ± 0.15) 水平显著升高, HIF-1 α 蛋白 (0.37 ± 0.07) 水平显著降低, 差异具有统计学意义 ($F=31.54$, 8.31 , 均 $P<0.01$)。

3 讨论

目前人们普遍认为进行性蛋白尿是 DKD 最早的临床特征之一^[13]。尿液中清蛋白的存在与足细胞受损和肾小球滤过屏障破坏有关, 这种情况称为足细胞病^[14]。系膜细胞和足细胞功能障碍会导致糖尿病肾病, 足细胞损伤被认为是蛋白尿性肾脏疾病进展的最重要决定因素之一。与许多肾脏疾病一样, DKD 的特征是出现蛋白尿, 这是由足细胞凋亡和功能丧失诱导的, 随后是与肾小球硬化相关的肾小球滤过率降低^[6]。足细胞在支持肾小球结构和功能以及形成滤过屏障方面发挥着重要作用, 当足细胞受到葡萄糖或活性氧 (read only storage, ROS) 等刺激时, 会导致足细胞病中蛋白尿的发生^[15-16]。葡萄糖通过诱导 E-钙黏蛋白 (E-cadherin) 和 β -钙黏蛋白 (β -cadherin) 减少, 间充质神经型钙黏附蛋白 (N-cadherin) 的表达及肌成纤维细胞的形成, 进而诱导足细胞损伤^[15-16]。因此, 足细胞耗竭已被作为建立蛋白尿新疗法的新策略。

高血糖是糖尿病并发症的主要因素, 高糖诱导的肾脏缺氧是 DKD 的常见途径^[6]。在 1 型或 2 型糖尿病早期阶段, 长期强化血糖控制被认为是糖尿病并发症的强有力的预防策略, 尤其是对于 DKD。然而, 尽管强化血糖控制, 约三分之一的糖尿病患者仍进展为 DKD, 这提出了“代谢记忆”现象。在负责“代谢记忆”的各种机制中, 表观遗传修饰 (主要包括甲基化修饰、组蛋白修饰和非编

码 RNA 的表达) 引起了更多关注。基于对代谢记忆现象的认识, m6A 甲基化修饰与表观遗传变化的相互作用可导致信号通路持续激活, 从而促进 DKD 肾脏炎症、纤维化和肾小球肥大的发生。高血糖会增加缺氧诱导因子 -1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α) 的积累并破坏 HIF-1 α 的稳定性, 通过多种机制导致足细胞损伤^[17]。例如, Kang 等报道^[18], 葡萄糖负载足细胞和糖尿病肾脏中 HIF-1 α 被诱导, 高血糖引起的缺氧通过加速糖尿病足细胞的上皮间质转换和肌成纤维细胞形成导致足细胞损伤。基于以上报道, 本研究通过高糖诱导足细胞构建 DKD 体外模型, 探究 m6A 去甲基化酶 FTO 介导的 PRKD2 对 DKD 进展的调控机制。

m6A 修饰是真核生物 mRNA 中最丰富的修饰^[10]。m6A 修饰的作用包括维持 mRNA 稳定性、运输、剪接、定位、翻译和蛋白质-RNA 相互作用。哺乳动物细胞中, m6A 修饰是动态且可逆的, m6A 甲基转移酶执行修饰反应, 而 m6A 去甲基酶则逆转该修饰。特定的 RNA 结合蛋白可以直接或间接结合 m6A 基序, 从而影响 RNA 功能。m6A 调节剂的生物学功能与组织发育、细胞分化、昼夜节律和其他多种人类疾病相关, 例如癌症进展、糖尿病、神经发育障碍和缺血性心脏病^[7,11,19]。此外, m6A 修饰可以调节炎症和细胞凋亡, 这是介导 DKD 病理损伤的重要机制。LU 等人^[20]的研究发现糖尿病肾病的小鼠肾脏中 m6A RNA 水平升高, 其甲基转移酶 14 (methyltransferase 14, METTL14) 表达上调; METTL14 通过促进 m6A 修饰降解 SIRT1 mRNA 来加重足细胞损伤, METTL14 敲低通过促进自噬, 减轻体内和体外炎性细胞凋亡, 对受损的足细胞产生保护作用。FTO 作为 RNA 去甲基化酶, 控制 m6A 修饰以影响 mRNA 的生物合成、衰变和翻译^[10,21]。大量研究已证实, FTO 调

控 miRNA 参与糖尿病并发症的疾病进展, 如 SUN 等^[22] 研究发现, 过表达 FTO 导致 m6A 水平降低, 通过增加细胞因子信号转导抑制因子 1 (suppressor of cytokine signaling 1, SOCS1) 蛋白表达, 减轻炎症反应和肾损伤, 抑制 DKD 进展。HU 等^[23] 研究显示, FTO 介导的 m6A 水平降低诱导 LncRNA EST00000436340 表达上调, 增强了 ENST00000436340 与多嘧啶束结合蛋白 1 (polypyrimidine tract binding protein 1, PTBP1) 的结合, 进一步导致细胞骨架重排, 造成足细胞损伤和 DKD 进展。与已有报道相一致, 本研究发现过表达 FTO 通过介导 PRKD2 mRNA 的 m6A 修饰可抑制高糖诱导的足细胞炎症反应和细胞凋亡, 抑制 DKD 进展。

PRKD 家族属于钙模块依赖蛋白激酶超级家族, 早期研究表明 PRKD 亚型在胰腺的各种外分泌和内分泌细胞中具有不同的表达。现有报道显示, PRKD2 通过调节糖代谢参与各种疾病的发病过程, PKD2 是促进膳食脂肪吸收的关键信号节点, 其缺失、失活或抑制可改善高脂饮食诱导的肥胖和糖尿病^[24]。XIAO 等^[25] 研究发现, PRKD2 缺乏会增加胰岛素分泌, 诱导肥胖和胰岛素抵抗, 导致代谢紊乱, 引发高胰岛素血症。JIAO 等^[7] 报道显示, PRKD2 在高脂饮食喂养的小鼠骨骼肌和棕榈酸诱导的 C2C12 细胞中表达下调。糖尿病、高胰岛素血症等异常的代谢综合征会导致 DKD 发生^[8-9]。基于以上报道猜测, PRKD2 可能是抑制 DKD 进展的调节因子。本研究对此猜测进行了验证, 发现过表达 PRKD2 能够抑制高糖诱导的足细胞的炎症反应和细胞凋亡, 与早期报道相一致, 证实 PRKD2 对 DKD 进展具有抑制作用。除此之外, JIAO 等^[7] 报道还显示, PRKD2 在棕榈酸诱导的 C2C12 细胞中的表达受 m6A 甲基化水平调控, 这与本研究结果一致, FTO 通过降低 m6A 修饰上调 PRKD2 的表达。除此之外, 沉默信号调节因子 1 (silent information regulator 1, SIRT1) /HIF-1 α 通路被报道在足细胞相关疾病进展中扮演重要角色^[26], 如 LU 等^[20] 研究发现, 在足细胞病中 SIRT1 mRNA 显著降低。CHANG 等^[27] 研究显示, 与非糖尿病小鼠相比, 糖尿病小鼠的足细胞中 SIRT1 表达减少, 调控 SIRT1/HIF-1 α 通路能够改善糖尿病小鼠肾脏足细胞损伤, 减轻 DKD。SUN 等^[28] 研究显示, 连接蛋白 43 (connexin 43, Cx43) 通过调节 SIRT1/HIF-1 α 信号通路, 抑制高血糖诱导的肾上皮间质转化和肾小管间质纤维化。本研究发现, 过表达 PRKD2 可促进 SIRT1 蛋白表达, 降低 HIF-1 α 蛋白表达, 说明 PRKD2 调控 SIRT1/HIF-1 α 通路抑制高糖诱导的足

细胞炎症反应和细胞凋亡。但本研究还存在一定的局限性, 首先只做了体外实验, FTO 和 PRKD2 在体内的调控机制还有待进一步验证; 其次 PRKD2 是否还通过其他途径来调控 DKD 的发生还需进行深入研究, 以期对 DKD 的治疗提供更有价值的治疗靶点, 以及更可靠的实验依据。

综上所述, 过表达 FTO 通过抑制 PRKD2 mRNA 的 m6A 修饰上调 PRKD2 蛋白表达, 通过 SIRT1/HIF-1 α 通路抑制高糖诱导的足细胞炎症反应和细胞凋亡。

参考文献:

- [1] PELLE M C, PROVENZANO M, BUSUTTI M, et al. Up-date on diabetic nephropathy[J]. Life (Basel, Switzerland), 2022, 12(8): 1202.
- [2] YANG Ming, CHEN Wei, HE Liyu, et al. Intermittent fasting-a healthy dietary pattern for diabetic nephropathy[J]. Nutrients, 2022, 14(19): 3995.
- [3] HU Qichao, JIANG Lan, YAN Qi, et al. A natural products solution to diabetic nephropathy therapy[J]. Pharmacology & Therapeutics, 2023, 241: 108314.
- [4] STEFANSSON V T N, NAIR V, MELSOM T, et al. Molecular programs associated with glomerular hyperfiltration in early diabetic kidney disease[J]. Kidney International, 2022, 102(6): 1345-1358.
- [5] 杨阳, 吕幸, 彭俊华. 牛磺酸上调基因 1 在糖尿病及其并发症中的研究进展 [J]. 现代检验医学杂志, 2022, 37(6): 198-204.
YANG Yang, LÜ Xing, PENG Junhua. Progress in research of taurine up-regulated gene 1 in diabetes mellitus and its complications[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2022, 37(6): 198-204.
- [6] MOHANDÉS S, DOKE T, HU Hailong, et al. Molecular pathways that drive diabetic kidney disease[J]. Journal of Clinical Investigation, 2023, 133(4): e165654.
- [7] JIAO Yang, WILLIAMS A, WEI Ning. Quercetin ameliorated insulin resistance via regulating METTL3-mediated N6-methyladenosine modification of PRKD2 mRNA in skeletal muscle and C2C12 myocyte cell line[J]. Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases, 2022, 32(11): 2655-2668.
- [8] OPAZO-RÍOS L, MAS S, MARÍN-ROYO G, et al. Lipotoxicity and diabetic nephropathy: novel mechanistic insights and therapeutic opportunities[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(7): 2632.
- [9] PARWANI K, MANDAL P. Role of advanced glycation end products and insulin resistance in diabetic nephropathy[J]. Archives of Physiology and Biochemistry, 2023, 129(1): 95-107.
- [10] SENDINC E, SHI Yang. RNA m6A methylation across the transcriptome[J]. Molecular Cell, 2023, 83(3): 428-441.

(下转第 22 页)

- [23] YIN Zhangyuan, POPELKA H, LEI Yuchen, et al. The roles of ubiquitin in mediating autophagy[J]. *Cells*, 2020, 9(9): 2025.
- [24] ÇETIN G, KLAFAK S, STUDENCKA-TURSKI M, et al. The ubiquitin-proteasome system in immune cells[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(1): 60.
- [25] MENDOZA R P, FUDGE D H, BROWN J M. Cellular energetics of mast cell development and activation[J]. *Cells*, 2021, 10(3): 524.
- [26] THEOHARIDES T C, PERLMAN A I, TWAHIR A, et al. Mast cell activation: beyond histamine and tryptase[J]. *Expert Review of Clinical Immunology*, 2023, 19(6): 639-654.
- [27] CRUZ F M, CHAN A, ROCK K L. Pathways of MHC I cross-presentation of exogenous antigens[J]. *Seminars in Immunology*, 2023, 66: 101729.
- [28] SONG Shuting, WU Mengli, ZHANG Haijiao, et al. Mast cell activation triggered by retrovirus promotes acute viral infection[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 798660.

收稿日期: 2023-04-18

修回日期: 2023-11-07

(上接第9页)

- [11] WANG Yuting, WANG Yujie, GU Jiarui, et al. The role of RNA m6A methylation in lipid metabolism[J]. *Frontiers in Endocrinology(Lausanne)*, 2022, 13: 866116.
- [12] SANZ A B, SANCHEZ-NIÑO M D, RAMOS A M, et al. Regulated cell death pathways in kidney disease[J]. *Nature Reviews Nephrology*, 2023, 19(5): 281-299.
- [13] TUTTLE K R, AGARWAL R, ALPERS C E, et al. Molecular mechanisms and therapeutic targets for diabetic kidney disease[J]. *Kidney International*, 2022, 102(2): 248-260.
- [14] KOPP J B, ANDERS H J, SUSZTAK K, et al. Podocytopathies[J]. *Nature Reviews Disease Primers*, 2020, 6(1): 68.
- [15] LIU Tongtong, YANG Liping, MAO Huimin, et al. Sirtuins as novel pharmacological targets in podocyte injury and related glomerular diseases[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2022, 155: 113620.
- [16] STARUSCHENKO A, MA Rong, PALYGIN O, et al. Ion channels and channelopathies in glomeruli[J]. *Physiological Reviews*, 2023, 103(1): 787-854.
- [17] DING Hong, TANG Chuanfeng, WANG Wei, et al. Polydatin ameliorates high fructose-induced podocyte oxidative stress via suppressing HIF-1 α /NOX4 pathway[J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14(10): 2202.
- [18] KANG M K, KIM S I, OH S Y, et al. Tangeretin ameliorates glucose-induced podocyte injury through blocking epithelial to mesenchymal transition caused by oxidative stress and hypoxia[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(22): 8577.
- [19] 伍义文, 曹健斌, 黄维佳, 等. m6A 甲基转移酶 METTL3 介导 miR-127 调控非小细胞肺癌细胞系自噬的机制研究[J]. *现代检验医学杂志*, 2022, 37(2): 12-16, 32.
- WU Yiwen, CAO Jianbin, HUANG Weijia, et al. Mechanism of M6A methyltransferase METTL3 mediates miR-127 to regulate autophagy in non-small cell lung cancer cell lines[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2022, 37(2): 12-16, 32.
- [20] LU Zhihui, LIU Hong, SONG Nana, et al. METTL14 aggravates podocyte injury and glomerulopathy progression through N6 - methyladenosine - dependent downregulating of Sirt1[J]. *Cell Death & Disease*, 2021, 12(10): 881.
- [21] AZZAM S K, ALSAFAR H, SAJINI A A. FTO m6A demethylase in obesity and cancer: Implications and underlying molecular mechanisms[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(7): 3800.
- [22] SUN Qiang, GENG Houfa, ZHAO Meng, et al. FTO-mediated m6A modification of SOCS1 mRNA promotes the progression of diabetic kidney disease[J]. *Clinical and Translational Medicine*, 2022, 12(6): e942.
- [23] HU Jinxiu, WANG Qimeng, FAN Xiaoting, et al. Long noncoding RNA ENST00000436340 promotes podocyte injury in diabetic kidney disease by facilitating the association of PTBP1 with RAB3B[J]. *Cell Death & Disease*, 2023, 14(2): 130.
- [24] TRUJILLO-VIERA J, EL-MERAHBI R, SCHMIDT V, et al. Protein kinase D2 drives chylomicron-mediated lipid transport in the intestine and promotes obesity[J]. *EMBO Molecular Medicine*, 2021, 13(5): e13548.
- [25] XIAO Yao, WANG Can, CHEN Jiayu, et al. Deficiency of PRKD2 triggers hyperinsulinemia and metabolic disorders[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 2015.
- [26] YANG Yunshu, LIU Yang, WANG Yunwei, et al. Regulation of SIRT1 and its roles in inflammation[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 831168.
- [27] CHANG Jing, ZHENG Jinsu, GAO Xia, et al. TangShenWeiNing formula prevents diabetic nephropathy by protecting podocytes through the SIRT1/HIF-1 α pathway[J]. *Frontiers in Endocrinology, (Lausanne)* 2022, 13: 888611.
- [28] SUN Xiaohong, HUANG Kaipeng, XIAO Hai ming, et al. Connexin 43 prevents the progression of diabetic renal tubulointerstitial fibrosis by regulating the SIRT1-HIF-1 α signaling pathway[J]. *Clinical Science (London)*, 2020, 134(13): 1573-1592.

收稿日期: 2023-08-08

修回日期: 2023-12-09