

# METTL3 介导的 m<sup>6</sup>A 甲基化修饰经 Notch 通路调控血管内皮细胞生物学活性

唐韵, 陈思, 叶巍, 王文喆, 高颖, 葛轶睿, 黄振平

引用: 唐韵, 陈思, 叶巍, 等. METTL3 介导的 m<sup>6</sup>A 甲基化修饰经 Notch 通路调控血管内皮细胞生物学活性. 国际眼科杂志 2023; 23(5):723-730

作者单位: (210002) 中国江苏省南京市, 南京大学医学院附属金陵医院(东部战区总医院)眼科

作者简介: 唐韵, 女, 南京大学在读硕士研究生, 研究方向: 白内障、眼底病。

通讯作者: 黄振平, 男, 毕业于北京大学, 博士, 博士研究生导师, 主任医师, 主任, 研究方向: 角膜、白内障. hzp19633@126.com

收稿日期: 2023-01-17 修回日期: 2023-04-17

## 摘要

目的: 探索甲基转移酶 3 (METTL3) 介导的 N6-甲基腺苷 (m<sup>6</sup>A) 甲基化修饰在脉络膜新生血管发病中对血管内皮细胞生物学活性的调控作用及机制。

方法: 将体外培养的人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 分为: 对照组 (正常培养)、低密度脂蛋白 (LDL) 组、荧光标记 LDL (Dil-LDL) 组、12.5 μg/mL、25 μg/mL 氧化低密度脂蛋白 (ox-LDL) 组、12.5 μg/mL、25 μg/mL 荧光标记 ox-LDL (Dil-ox-LDL) 组、DMSO 组、STM2457 (METTL3 抑制剂) 组、DAPT 组; 将体外培养的猴视网膜-脉络膜内皮细胞 (RF/6A) 分为: 对照组、DMSO 组、12.5 μg/mL ox-LDL 组、DAPT 组。荧光显微镜观察细胞内吞脂蛋白水平, dot blot 检测 m<sup>6</sup>A 甲基化水平, Western blot 检测 METTL3 及血管形成相关蛋白的表达水平, 实时荧光定量聚合酶链反应 (RT-qPCR) 检测 METTL3 及血管形成相关标志物的 mRNA 表达水平, 免疫荧光检测 METTL3 表达水平及定位, transwell 实验检测细胞迁移能力, 体外成管实验检测细胞血管形成能力。

结果: 与对照组相比, Dil-LDL 组、12.5 μg/mL、25 μg/mL Dil-ox-LDL 组细胞内荧光标记的脂蛋白含量显著升高, 12.5 μg/mL、25 μg/mL ox-LDL 组 m<sup>6</sup>A 甲基化水平显著升高 (均  $P < 0.05$ ), METTL3 蛋白表达水平显著升高 (均  $P < 0.01$ ), 细胞迁移及血管形成能力显著上升 (均  $P < 0.01$ ), 12.5 μg/mL ox-LDL 组 METTL3 mRNA 表达水平显著上调 ( $P < 0.05$ ); 与 DMSO 组相比, STM2457 组 m<sup>6</sup>A 甲基化水平显著降低 ( $P < 0.05$ ), METTL3 的蛋白及 mRNA 表达水平无显著差异 (均  $P > 0.05$ ), 血管内皮生长因子 (VEGF) 等血管形成相关标志物表达水平显著下降 (均  $P < 0.05$ ), 细胞迁移及血管形成能力显著下降 (均  $P < 0.01$ ), NICD 表达水平显著下降 ( $P < 0.05$ ); 与 DMSO 组相比, DAPT 组 NICD、VEGF 表达水平显著下降 (均  $P < 0.05$ ), HUVEC 及 RF/6A 细胞迁移及血管形成能力显著下降 (均  $P < 0.01$ )。

结论: METTL3 介导的 m<sup>6</sup>A 甲基化修饰在脉络膜新生血管发病中可经 Notch 通路促进血管内皮细胞的血管形成。

关键词: 脉络膜新生血管; N6-甲基腺苷 (m<sup>6</sup>A) 甲基化修饰; 甲基转移酶 3 (METTL3)

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2023.5.03

## Methyltransferase - like 3 - mediated N6 - methyladenosine methylation modification regulates the biological activity of vascular endothelial cells via the Notch pathway

Yun Tang, Si Chen, Wei Ye, Wen-Zhe Wang, Ying Gao, Yi-Rui Ge, Zhen-Ping Huang

Department of Ophthalmology, Affiliated Jinling Hospital, Medical School, Nanjing University (General Hospital of Eastern Theater Command), Nanjing 210002, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Zhen - Ping Huang. Department of Ophthalmology, Affiliated Jinling Hospital, Medical School, Nanjing University (General Hospital of Eastern Theater Command), Nanjing 210002, Jiangsu Province, China. hzp19633@126.com

Received: 2023-01-17 Accepted: 2023-04-17

## Abstract

• AIM: To investigate the role and mechanism of methyltransferase - like 3 (METTL3) - mediated N6 - methyladenosine (m<sup>6</sup>A) methylation modification in regulating biological activity of vascular endothelial cells in the pathogenesis of choroidal neovascularization.

• METHODS: Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) cultured *in vitro* were divided into the following groups: control group (normal culture), low density lipoprotein (LDL) group, fluorescence-labelled LDL (Dil-LDL) group, 12.5 μg/mL and 25 μg/mL oxidized LDL (ox-LDL) groups, 12.5 μg/mL and 25 μg/mL fluorescence - labelled ox-LDL (Dil-ox-LDL) groups, DMSO group, STM2457 (METTL3 inhibitor) group, DAPT group; and monkey retina - choroidal endothelial cells (RF/6A) cultured *in vitro* were divided into control group, DMSO group, 12.5 μg/mL ox-LDL group, and DAPT group. Endocytosed lipoprotein level was examined through fluorescence microscopy. RNA m<sup>6</sup>A methylation level was detected through a dot blot assay. Protein and RNA levels of METTL3 or angiogenesis - related markers were

measured through Western blot assays and real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR), respectively. METTL3 expression and localization were investigated through immunofluorescence. Cell migratory and tube formation capacities were assessed through transwell migration and tube formation assays, respectively.

• **RESULTS:** Endocytosed lipoprotein levels in HUVECs exposed to Dil-LDL, 12.5 $\mu$ g/mL and 25 $\mu$ g/mL Dil-ox-LDL groups were significantly higher than those in the control group. 12.5 $\mu$ g/mL and 25 $\mu$ g/mL ox-LDL groups significantly increased m<sup>6</sup>A methylation (all  $P < 0.05$ ), METTL3 protein expression (all  $P < 0.01$ ), and cell migration and angiogenesis capacities (all  $P < 0.01$ ). METTL3 mRNA level was significantly unregulated in the 12.5 $\mu$ g/mL ox-LDL group ( $P < 0.05$ ). In comparison to the DMSO group, the addition of STM2457 caused significant decrease in m<sup>6</sup>A methylation level ( $P < 0.05$ ), expression of VEGF and other angiogenesis-related markers (all  $P < 0.05$ ), cell migration and angiogenesis capacities (all  $P < 0.01$ ) and the expression of NICD ( $P < 0.05$ ). However, there were no significant differences in METTL3 protein and mRNA levels (all  $P > 0.05$ ). The expression of VEGF and NICD (all  $P < 0.05$ ), as well as the ability of cell migration and angiogenesis of RF/6A, was all significantly decreased in the DAPT group compared to the DMSO group (all  $P < 0.01$ ).

• **CONCLUSION:** METTL3-mediated m<sup>6</sup>A methylation modification promotes angiogenesis in vascular endothelial cells via the Notch signaling pathway in the pathogenesis of choroidal neovascularization.

• **KEYWORDS:** choroidal neovascularization; N6-methyladenosine (m<sup>6</sup>A) methylation modification; methyltransferase-like 3 (METTL3)

**Citation:** Tang Y, Chen S, Ye W, et al. Methyltransferase-like 3-mediated N6-methyladenosine methylation modification regulates the biological activity of vascular endothelial cells via the Notch pathway. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2023;23(5):723-730

## 0 引言

年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, ARMD) 是一种视网膜慢性退行性疾病,其病变主要发生在黄斑区,是 55 岁以上人群常见的致盲性眼病<sup>[1]</sup>。ARMD 的全球患病率约为 8.7%,预计 2040 年全球患病人数将达到 2.88 亿<sup>[2]</sup>。其主要临床表现为视物变形、视野中央暗点,严重者出现不可逆性视力丧失<sup>[3]</sup>。早期和中期 ARMD 表现为黄斑区的玻璃膜疣和色素异常,晚期 ARMD 表现为新生血管和地图状萎缩<sup>[4]</sup>。晚期 ARMD 与严重的中心视力丧失有关,其中未经治疗的新生血管性 ARMD 导致超过 90% 的患者失明<sup>[5]</sup>。新生血管性 ARMD 主要由脉络膜新生血管 (choroidal neovascularization, CNV) 引起。早期 ARMD 的特征是脂质

和蛋白质沉积于 Bruch 膜形成玻璃膜疣,在黄斑区氧化应激环境下形成氧化磷脂<sup>[6]</sup>,与动脉粥样硬化沉积物的组成相似<sup>[7]</sup>,可促进炎症因子和血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的分泌,诱导 CNV 形成<sup>[8]</sup>。且在病理状态下,脉络膜血流灌注受损<sup>[9]</sup>,缺血和缺氧诱导 VEGF 上调,促进 CNV 形成。目前抗 VEGF 治疗是延缓疾病进展的主要手段<sup>[10]</sup>,但价格昂贵,需要频繁治疗,且不能完全治愈疾病。因此,为了降低成本且进一步提高治疗效果,新的药物仍在研究中。在多种缺氧、炎症、代谢障碍引起的微血管病变中,N6-甲基腺苷 (N6-methyladenosine, m<sup>6</sup>A) 甲基化修饰发挥着关键作用<sup>[11]</sup>。m<sup>6</sup>A 甲基化修饰是真核生物 RNA 中最普遍的表现遗传修饰,由甲基转移酶复合物、去甲基化酶和结合蛋白动态调控,它影响 RNA 剪接、翻译和稳定性以及某些非编码 RNA 的表现遗传效应<sup>[12]</sup>。m<sup>6</sup>A 甲基化修饰对血管发育和血管内皮细胞的正常功能至关重要<sup>[13]</sup>。甲基转移酶 3 (methyltransferase-like 3, METTL3) 是 m<sup>6</sup>A 甲基化最关键的甲基转移酶之一<sup>[14]</sup>,它的缺失或过表达会改变 m<sup>6</sup>A 的总甲基化水平,在多种疾病发生发展过程中发挥重要作用。METTL3 介导的 m<sup>6</sup>A 修饰促进动脉粥样硬化的发展<sup>[15]</sup>,在胃癌、结直肠癌等肿瘤进展中促进血管生成<sup>[16-17]</sup>,参与糖尿病视网膜病变中视网膜血管并发症的发生<sup>[18]</sup>,但其在 CNV 发病过程中的机制尚不明确。因此,本文旨在探索 METTL3 介导的 m<sup>6</sup>A 甲基化修饰在 CNV 发病中对血管内皮细胞生物学活性的调控作用及机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞株 人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)、猴视网膜-脉络膜内皮细胞 (RF/6A) 购自美国 ATCC。

1.1.2 主要试剂 胎牛血清购自美国 ScienCell; DMEM 高糖、低糖培养基购自上海中乔新舟生物科技有限公司;青霉素/链霉素溶液、胰酶购自苏州新赛美生物科技有限公司;荧光标记的低密度脂蛋白 (Dil-LDL)、荧光标记的氧化低密度脂蛋白 (Dil-ox-LDL)、低密度脂蛋白 (LDL)、氧化低密度脂蛋白 (ox-LDL) 购自广州奕源生物科技有限公司;STM2457、DAPT (溶于 DMSO)、DMSO 购自美国 MCE 公司;m<sup>6</sup>A 抗体 (68055-1-Ig)、METTL3 抗体 (15073-1-AP)、VEGF 抗体 (19003-1-AP)、 $\alpha$ -SMA 抗体 (67735-1-Ig)、VE-Cadherin 抗体 (66804-1-Ig)、GAPDH 抗体 (10494-1-AP)、HRP 标记山羊抗兔 IgG (SA00001-2)、HRP 标记山羊抗鼠 IgG (SA00001-1)、594 标记山羊抗兔 IgG (SA00013-4) 购自武汉三鹰生物技术有限公司;DAPI、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、ECL 化学发光试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;Trizol 试剂购自美国 Thermo Fisher Scientific;Evo M-MLV 反转录预混型试剂盒、SYBR Green Premix Pro Taq HS qPCR Kit (Rox Plus) 购自湖南艾科瑞生物工程有限公司;transwell 小室、Matrigel 胶购自美国 Corning;结晶紫溶液购自美国 SigmaAldrich。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养和分组** HUVEC 细胞用 10% 胎牛血清、1% 青霉素/链霉素的 DMEM 高糖培养基, RF/6A 细胞用 10% 胎牛血清、1% 青霉素/链霉素的 DMEM 低糖培养基, 均在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养。检测 HUVEC 细胞内吞脂蛋白水平的实验中, 将细胞分为以下 4 组培养 6h: 对照组 (Control 组, 正常培养), Dil-LDL 组 (12.5 μg/mL Dil-LDL), 12.5 μg/mL Dil-ox-LDL 组, 25 μg/mL Dil-ox-LDL 组。检测 ox-LDL 处理对 HUVEC 细胞 METTL3 表达水平及血管形成影响的实验中, 将细胞分为以下 4 组培养 24h: 对照组; LDL 组; 12.5 μg/mL ox-LDL 组; 25 μg/mL ox-LDL 组。检测抑制 METTL3 对 HUVEC 细胞血管形成、对 Notch 通路影响的实验中, 将细胞分为以下 4 组培养 24h: 对照组; 12.5 μg/mL ox-LDL 组; DMSO 组, 细胞培养基中同时加入 12.5 μg/mL ox-LDL 和 0.1% DMSO 处理; STM2457 组, 细胞培养基中同时加入 12.5 μg/mL ox-LDL 和 5 μmol/L METTL3 抑制剂 STM2457 处理。检测抑制 Notch 通路对血管形成影响的实验中, 将 HUVEC 及 RF/6A 细胞各分为以下 4 组培养 24h: 对照组; 12.5 μg/mL ox-LDL 组; DMSO 组, 细胞培养基中同时加入 12.5 μg/mL ox-LDL 和 0.1% DMSO 处理; DAPT 组, 细胞培养基中同时加入 12.5 μg/mL ox-LDL 和 5 μmol/L Notch 通路抑制剂 DAPT。

**1.2.2 激光共聚焦显微镜观察细胞吞脂水平** 无菌条件下, 将 Dil-LDL 和 Dil-ox-LDL 用细胞培养基稀释至目标浓度加入活细胞培养皿内, 37°C 培养 3~6h。吸去培养基, 并用无探针的培养基清洗 3 次, 激光共聚焦显微镜下观察。

**1.2.3 免疫荧光检测 METTL3 蛋白表达量** 细胞经 PBS 洗涤、4% 多聚甲醛固定、0.5% Triton X-100 通透后, 1% BSA 室温下封闭 30min, METTL3 一抗 (1:100 稀释) 4°C 孵育过夜。PBS 洗涤后荧光二抗标记山羊抗兔 IgG (按 1:200 稀释) 避光室温孵育 1h。经 PBS 洗涤后, DAPI (1:1000 稀释) 室温孵育 15min。激光共聚焦显微镜下观察。

**1.2.4 Dot blot 检测 m<sup>6</sup>A 甲基化水平** 使用 Trizol 法提取 HUVEC 中的总 RNA。分光光度计测定 RNA 浓度。取 2 μL RNA 样品按顺序滴在 NC 膜上, 紫外灯照 30min。TBST 洗涤后 5% 脱脂牛奶封闭 1h, m<sup>6</sup>A 抗体 (1:1000 稀释) 4°C 孵育过夜。TBST 洗涤 3 次, 二抗 HRP 标记山羊

抗兔 IgG (按 1:10000 稀释) 室温孵育 1h。TBST 洗涤 3 次, ECL 化学发光法显影检测, 亚甲蓝染色 30min 清洗后拍照。通过 Image J 软件测量每个点的相对信号密度。

**1.2.5 RT-qPCR 检测 mRNA 水平** 使用 Trizol 法提取 HUVEC 中的总 RNA。按照 Evo M-MLV 反转录预混型试剂盒说明书反转录合成 cDNA。RT-qPCR [SYBR Green Premix Pro Taq HS qPCR Kit (Rox Plus)] 检测靶基因的 mRNA 水平。反应条件参照试剂盒说明书。ACTB 作为内参基因, 使用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 公式计算靶基因的相对表达量。基因引物序列见表 1。

**1.2.6 Western blot 检测蛋白水平** 提取各组细胞中的总蛋白, 采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒对蛋白进行定量。SDS-PAGE 凝胶分离蛋白, 转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂牛奶封闭 1h。一抗 METTL3、VEGF、α-SMA、VE-Cadherin 及 GAPDH (均按 1:1000 稀释) 4°C 孵育过夜, TBST 洗涤 3 次, 二抗 HRP 标记山羊抗兔 IgG 及 HRP 标记山羊抗鼠 IgG (均按 1:10000 稀释) 室温孵育 1h。ECL 化学发光法显影检测, Image J 分析条带灰度值。

**1.2.7 Transwell 实验检测细胞迁移能力** 将无血清培养基中的 HUVEC 细胞 (5 × 10<sup>4</sup> 个) 植入每个 24 孔板中 transwell 小室的上室, 并将培养基加入下室。培养 24h 后用 4% 多聚甲醛固定, 结晶紫溶液染色, 显微镜成像。在 5 个随机视野检测迁移细胞的平均数量。

**1.2.8 体外成管实验检测细胞血管形成能力** 96 孔板每孔加入 50 μL Matrigel 胶, 凝固后每孔加入 1 × 10<sup>4</sup> 个 HUVEC 细胞。5% CO<sub>2</sub>、37°C 孵箱内孵育 6h, 显微镜下观察管状结构, 拍照记录并通过总管长评估细胞成管能力。使用 Image-Pro Plus 软件测量管的总长度。每组细胞接种 3 个复孔, 结果取平均值。

统计学分析: 采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行绘图, SPSS 21 软件进行数据分析, 结果以均数 ± 标准差表示。两组间差异比较采用独立样本 *t* 检验, 采用单因素方差分析比较多组间差异, 多组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 HUVEC 细胞内吞脂蛋白** 与对照组相比, Dil-LDL 组、12.5 μg/mL、25 μg/mL Dil-ox-LDL 组 HUVEC 细胞内的荧光标记的脂蛋白含量显著增加, 见图 1, 提示脂蛋白能够进入 HUVEC 细胞。

表 1 基因引物序列

基因	正向引物 (5'-3')	反向引物 (5'-3')
METTL3	GCTGACCATTCCAAGCTCTC	ATTTCTTGGCTGGCTCCTTT
VEGF	AGGGCAGAATCATCACGAAGT	AGGGTCTCGATTGGATGGCA
α-SMA	AGCTACCCGCCAGAACTA	GTCGCCCACGTAGGAATCTT
VE-Cadherin	TTGGAACCAGATGCACATTGAT	TCTTGGCACTCACGCTTGAC
ACTB	CTCGCCTTTGCCGATCC	TCTCCATGTCTGCCAGTTG

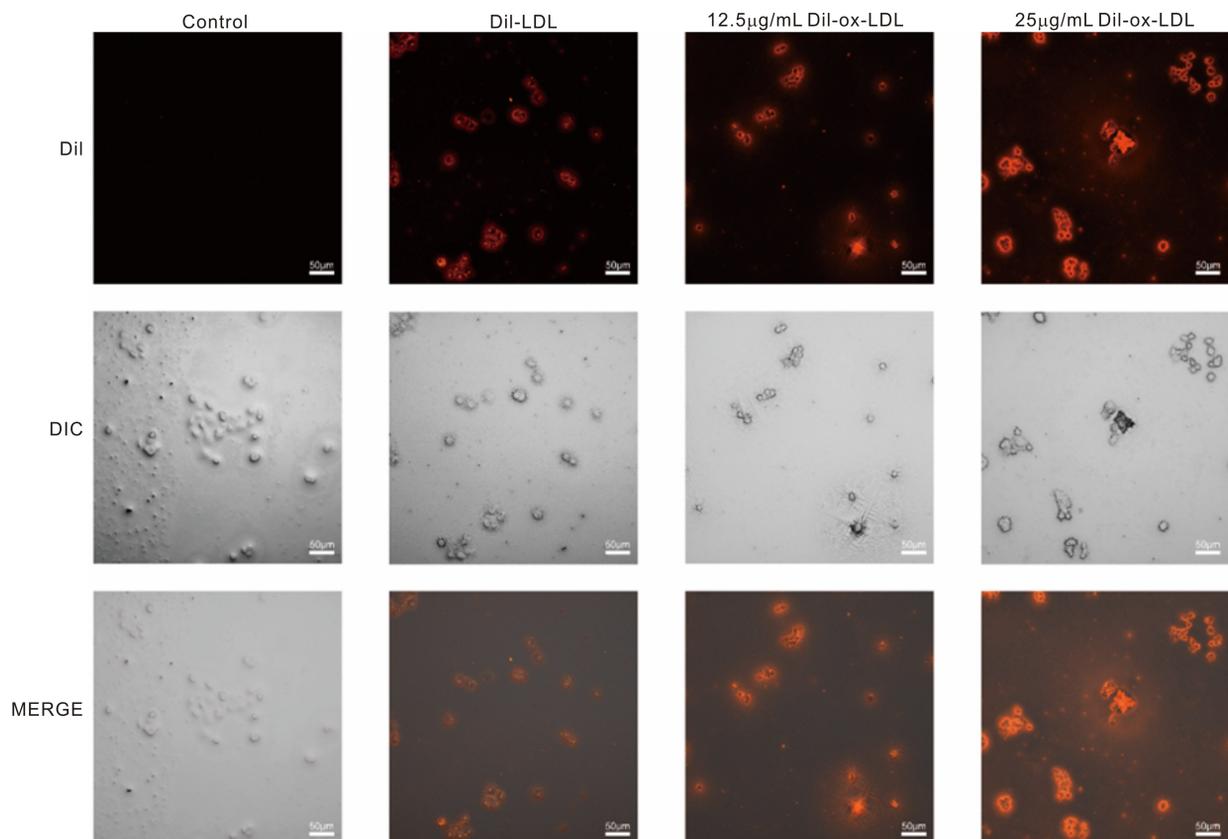


图1 激光共聚焦显微镜观察 HUVEC 内吞脂蛋白结果 红色荧光为吞噬的 DiI-LDL、DiI-ox-LDL; DIC 图像为明场图像; MERGE 图像为共定位。

**2.2 ox-LDL 处理的 HUVEC 细胞 METTL3 表达水平及细胞迁移和血管形成能力升高** 与对照组相比, 12.5 μg/mL、25 μg/mL ox-LDL 组 HUVEC 总 RNA 整体 m<sup>6</sup>A 水平显著升高 ( $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ ), 见图 2A、B; 12.5 μg/mL ox-LDL 组 METTL3 mRNA 表达水平显著上调 ( $P < 0.05$ ), 见图 2C; METTL3 蛋白表达水平显著上调 (均  $P < 0.01$ ), 见图 2D、E; 免疫荧光检测 METTL3 表达水平升高且定位于细胞核内, 见图 2F; 12.5 μg/mL ox-LDL 组、25 μg/mL ox-LDL 组细胞迁移能力和血管形成能力显著升高 (均  $P < 0.01$ ), 见图 2G、H。与对照组相比, LDL 组 HUVEC 总 RNA 整体 m<sup>6</sup>A 水平、METTL3 表达水平、细胞迁移和血管形成能力均无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。提示 ox-LDL 刺激使 HUVEC 细胞 m<sup>6</sup>A 甲基化水平升高, METTL3 表达水平上调, 促进血管形成。12.5 μg/mL ox-LDL 用于后续实验。

**2.3 METTL3 抑制剂使经 ox-LDL 处理的 HUVEC 细胞的 VEGF、α-SMA、VE-Cadherin 表达水平及细胞迁移和血管形成能力下降** 与 DMSO 组相比, STM2457 组总 RNA 整体 m<sup>6</sup>A 水平显著下降 ( $P < 0.05$ ), 见图 3A、B; METTL3 的蛋白及 mRNA 表达水平无显著差异 (均  $P > 0.05$ ), VEGF、α-SMA、VE-Cadherin 等与血管生成相关标志物蛋白表达水平显著下降 (均  $P < 0.01$ ), mRNA 表达水平显著下调 (均  $P < 0.05$ ,  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 见图 3C~E; 细胞迁移能力和血管形成能力显著降低 (均  $P < 0.01$ ), 见图 3F、G; ox-LDL 组总 RNA 整体 m<sup>6</sup>A 水平, METTL3、VEGF、α-SMA、VE-Cadherin 的蛋白及 mRNA 表达水平, 细胞迁移能

力和血管形成能力均无显著差异 ( $P > 0.05$ )。与对照组相比, ox-LDL 组 METTL3 蛋白及 mRNA 表达水平均显著升高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。这提示 STM2457 能有效抑制经 ox-LDL 处理的 HUVEC 细胞的 m<sup>6</sup>A 水平和血管生成能力, 但不影响 METTL3 的表达, 且溶剂 DMSO 对实验结果无显著影响。

**2.4 抑制 Notch 通路使 VEGF 和 NICD 表达水平及细胞迁移与血管形成能力下降** 与 DMSO 组相比, STM2457 组 NICD 蛋白表达水平显著下降 ( $P < 0.05$ ), 见图 4A、B。VEGF mRNA 表达水平显著下调 ( $P < 0.01$ ), 见图 4C; 与 DMSO 组相比, DAPT 组 VEGF 及 NICD 蛋白表达水平显著下降 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 见图 4D、E; HUVEC 细胞迁移能力和血管形成能力显著降低 (均  $P < 0.01$ ), 见图 4F、G; RF/6A 细胞迁移能力和血管形成能力显著降低 (均  $P < 0.01$ ), 见图 4H、I; ox-LDL 组 VEGF 及 NICD 蛋白水平、HUVEC 及 RF/6A 细胞迁移和血管形成能力均无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。与对照组相比, ox-LDL 组 VEGF、NICD 表达量均显著升高 (均  $P < 0.05$ )。这提示 DAPT 能有效抑制经 ox-LDL 处理的 HUVEC 细胞 VEGF 表达、HUVEC 及 RF/6A 细胞血管生成能力, 且溶剂 DMSO 对实验结果无显著影响。

### 3 讨论

在本研究中, 我们发现 HUVEC 细胞可内吞 LDL 和 ox-LDL, 但仅 ox-LDL 刺激可使 HUVEC 细胞 m<sup>6</sup>A 甲基化水平升高, METTL3 表达水平上调, 对血管形成有促进作用。使用 METTL3 抑制剂使 m<sup>6</sup>A 甲基化水平下降, VEGF、

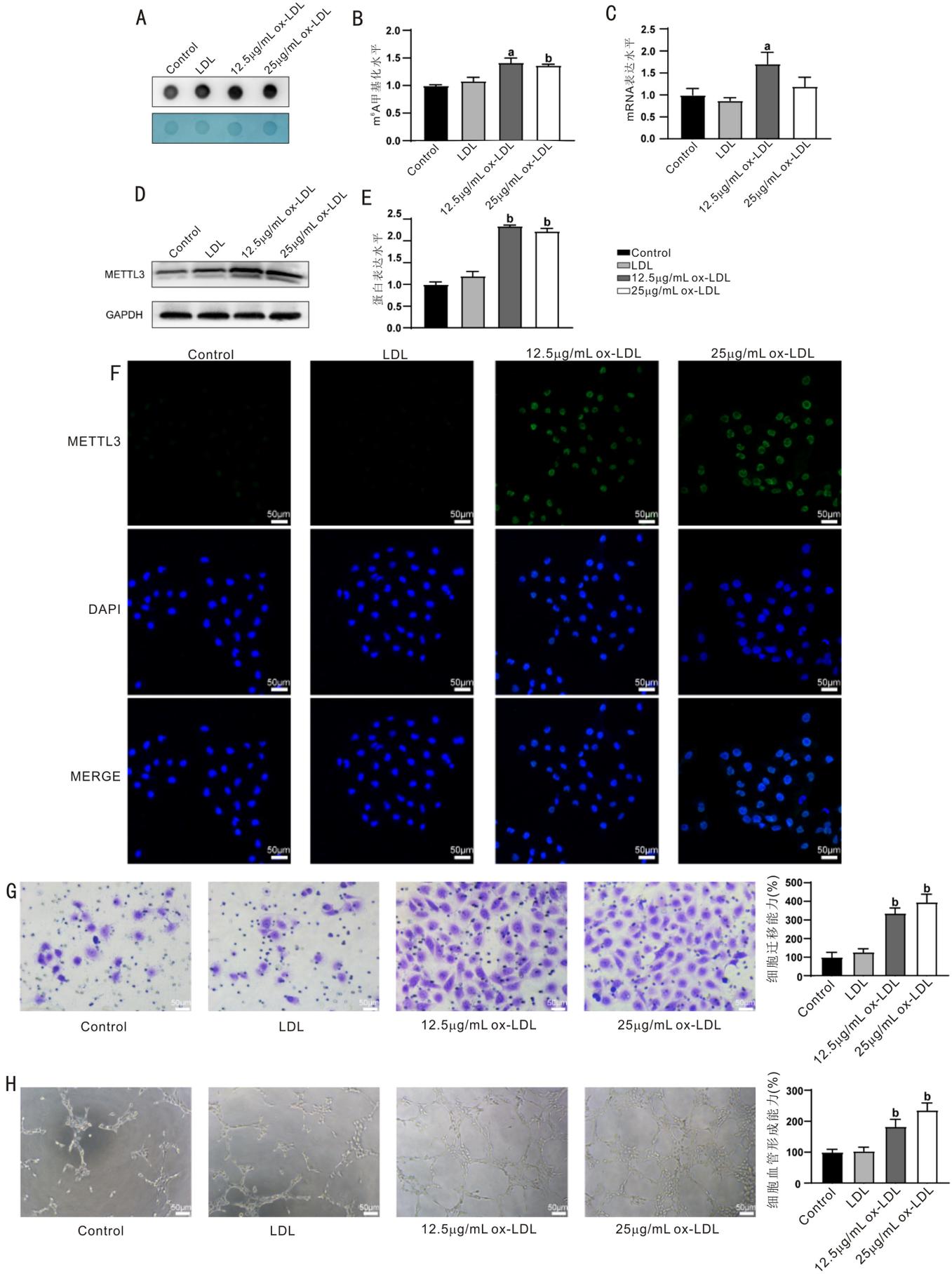


图2 ox-LDL处理的HUVEC细胞METTL3表达水平及细胞迁移和血管形成能力升高 A:Dot blot检测m<sup>6</sup>A甲基化水平;B:Dot blot结果统计图;C:RT-qPCR检测METTL3 mRNA表达水平;D:Western blot检测METTL3蛋白表达水平;E:Western blot结果统计图;F:免疫荧光检测METTL3的蛋白表达水平及细胞内定位;绿色荧光为METTL3;蓝色荧光为DAPI染细胞核;MERGE图像为共定位;G:Transwell实验检测细胞迁移能力;H:体外成管实验检测细胞血管形成能力。<sup>a</sup>P<0.05, <sup>b</sup>P<0.01 vs 对照组。

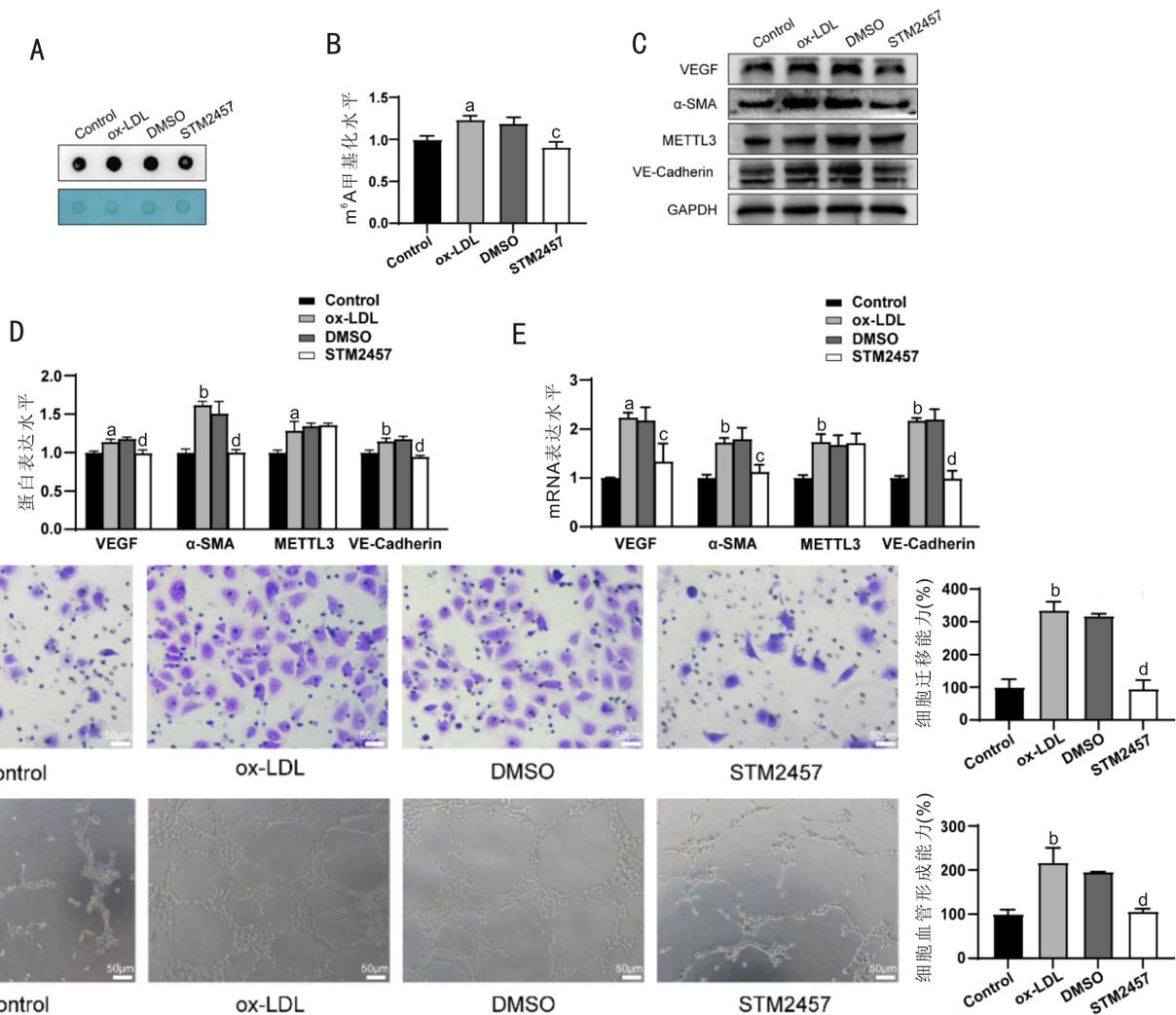


图3 抑制METTL3使经ox-LDL处理的HUVEC细胞的VEGF、 $\alpha$ -SMA、VE-Cadherin表达水平及细胞迁移、血管形成能力下降  
 A:Dot blot 检测 m<sup>6</sup>A 甲基化水平;B:Dot blot 结果统计图;C:Western blot 检测 VEGF、 $\alpha$ -SMA、METTL3、VE-Cadherin 蛋白表达水平;  
 D:Western blot结果统计图;E:RT-qPCR 检测 VEGF、 $\alpha$ -SMA、METTL3、VE-Cadherin mRNA 表达水平;F:Transwell 实验检测细胞迁移能力;  
 G:体外成管实验检测细胞血管形成能力。<sup>a</sup>*P*<0.05, <sup>b</sup>*P*<0.01 vs 对照组; <sup>c</sup>*P*<0.05, <sup>d</sup>*P*<0.01 vs DMSO 组。

$\alpha$ -SMA、VE-Cadherin 等血管形成相关标志物<sup>[19-20]</sup>表达下降,对血管形成有抑制作用。这表明 METTL3 的表达水平可以显著影响血管内皮细胞的血管生成, METTL3 的升高可能促进 CNV 病变的发生发展。Dong 等<sup>[21]</sup>研究发现, METTL3 在 ox-LDL 诱导的 HUVEC 中高表达, METTL3 的敲除抑制了 ox-LDL 处理的 HUVEC 细胞增殖、迁移、血管的形成和 VEGF 的表达与分泌,阻碍了体内的动脉粥样硬化过程,并阻止了正在发育的胚胎的体内血管生成。Chamorro-Jorganes 等<sup>[22]</sup>研究表明, METTL3 维持 m<sup>6</sup>A RNA 水平并提高内皮细胞的血管生成能力。Yao 等<sup>[23]</sup>研究显示,增强的 m<sup>6</sup>A 甲基化修饰有助于病理性血管生成, METTL3 沉默减少了内皮细胞的异常增殖、迁移和血管形成,在角膜新生血管模型中发挥抗血管生成作用。Jiang 等<sup>[24]</sup>研究证明,在 CNV 模型中 METTL3 沉默导致 CNV 面积减少。STM2457 是一种具有高度特异性的 METTL3 催化抑制剂,它通过直接结合 METTL3 的 S-腺苷甲硫氨酸结合位点抑制其甲基转移酶活性,但并不破坏其结构<sup>[25]</sup>。STM2457 使 m<sup>6</sup>A 水平显著下降,但对 METTL3 蛋白及

RNA 表达水平无显著影响。因此,我们认为 RNA 的 m<sup>6</sup>A 水平与 METTL3 的表达量不完全相关,主要与 METTL3 和 mRNA 的结合量密切相关。

m<sup>6</sup>A 高甲基化 mRNA 的相关通路分析中显示, Notch 信号是 METTL3 调控的首要信号<sup>[24]</sup>。Han 等<sup>[26]</sup>研究报道, METTL3 介导的 m<sup>6</sup>A 修饰通过调控 Notch 信号通路促进癌症的进展。Lv 等<sup>[27]</sup>研究显示,内皮特异性 m<sup>6</sup>A 通过 Notch 信号调节小鼠造血干细胞和祖细胞发育。因此,我们选择探索在 CNV 形成中 METTL3 对 Notch 通路是否具有调控作用。Notch 通路是一种进化保守的细胞间信号通路,在血管系统中主要分布于动脉血管的内皮细胞和平滑肌细胞中<sup>[28]</sup>,在生理性和病理性血管生成中均发挥重要作用<sup>[29]</sup>。在本研究中, ox-LDL 刺激 HUVEC 细胞 METTL3 升高的同时 Notch 胞内结构域(Notch intracellular domain, NICD)蛋白表达升高,使用 METTL3 抑制剂使 NICD 蛋白表达下降,这表明 METTL3 可能通过调控 Notch 通路影响血管内皮细胞的血管形成。DAPT 是一种  $\gamma$ -分泌酶抑制剂,通过阻止  $\gamma$ -分泌酶的裂解抑制 NICD 蛋白的形成,从

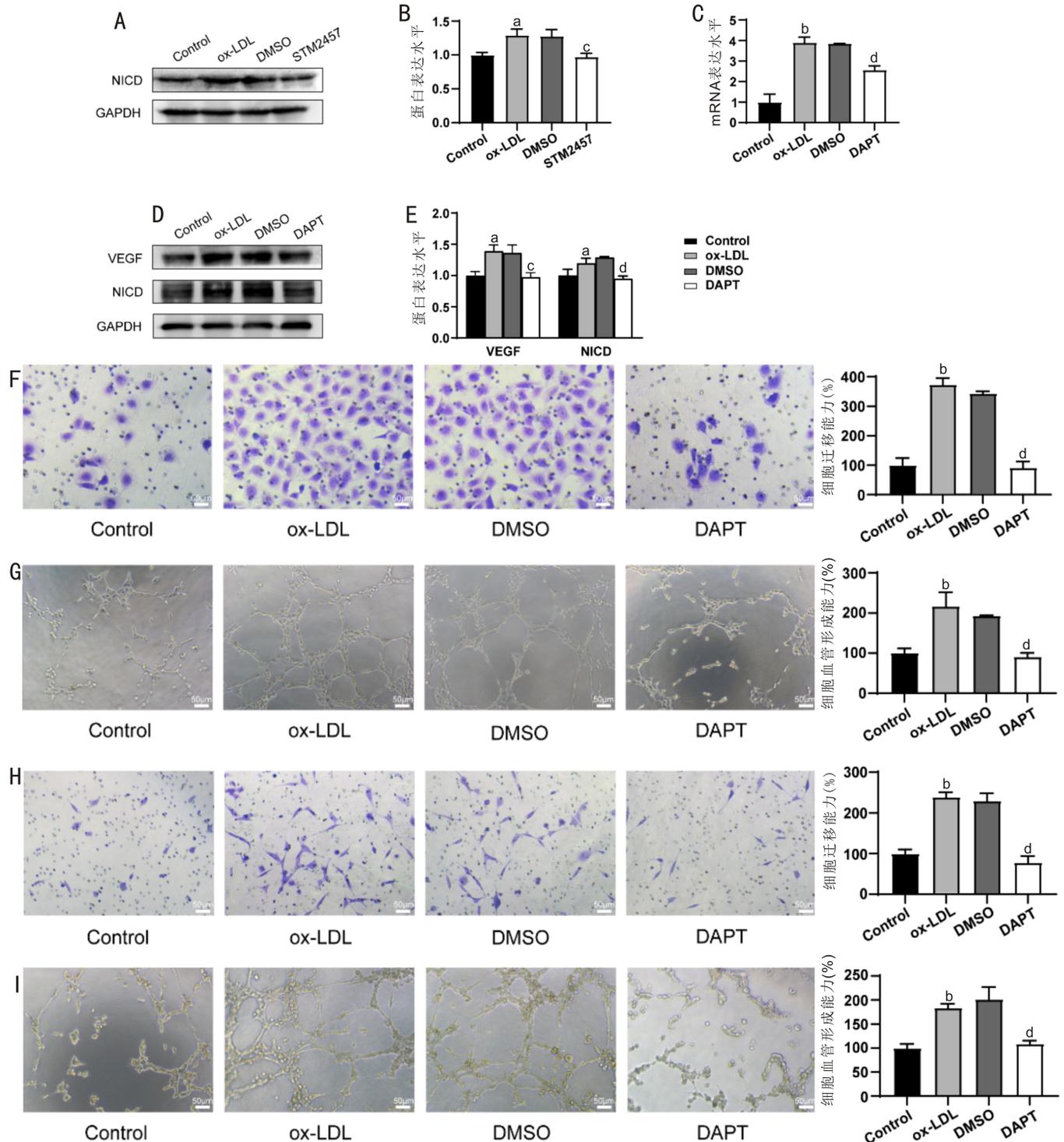


图4 抑制METTL3使HUVEC细胞Notch通路受抑制,抑制Notch通路使HUVEC细胞VEGF、NICD表达水平及HUVEC与RF/6A细胞迁移、血管形成能力下降 A: Western blot检测NICD蛋白表达水平; B: Western blot结果统计图; C: RT-qPCR检测VEGF mRNA表达水平; D: Western blot检测VEGF、NICD蛋白表达水平; E: Western blot结果统计图; F: Transwell实验检测HUVEC细胞迁移能力; G: 体外成管实验检测HUVEC细胞血管形成能力; H: Transwell实验检测RF/6A细胞迁移能力; I: 体外成管实验检测RF/6A细胞血管形成能力。<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照组; <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs DMSO组。

而有效地阻断Notch信号通路<sup>[30]</sup>。本研究发现,使用DAPT抑制Notch通路使NICD表达下降,导致VEGF表达下降,对血管形成有抑制作用,这说明Notch通路在CNV病变中可能有促进血管形成的作用。Dong等<sup>[31]</sup>研究发现,在缺氧诱导的CNV模型中,Notch家族配体中的Delta-like ligand 4(Dll4)可能参与HIF-1 $\alpha$ -VEGF通路调控CNV血管生成,Notch信号促进了CNV血管生成的过

程。这与我们的研究结果一致。

综上所述,在ox-LDL处理的细胞中m<sup>6</sup>A甲基化修饰水平升高,METTL3表达上调,抑制METTL3对mRNA的m<sup>6</sup>A甲基化修饰能够减少ox-LDL诱导的血管生成,METTL3通过Notch通路在CNV病变中促进血管内皮细胞的血管形成。本研究为阐明CNV发病的分子机制提供了新的证据,METTL3介导的m<sup>6</sup>A甲基化修饰或许能作为

临床防治 CNV 的重要靶点。但本研究存在一定的局限性:所涉及实验均为离体实验,缺乏在体实验的验证,后续需进一步探索在体实验中 METTL3 介导的 m<sup>6</sup>A 甲基化修饰在 CNV 发病中的作用。

#### 参考文献

- 1 Chew EY, Swaroop A eds. Age-related Macular Degeneration: From Clinic to Genes and Back to Patient Management. Cham: Springer International Publishing 2021:1-31
- 2 Wong WL, Su XY, Li X, et al. Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health* 2014;2(2):e106-e116
- 3 Lim LS, Mitchell P, Seddon JM, et al. Age-related macular degeneration. *Lancet* 2012;379(9827):1728-1738
- 4 Ferris FL, Wilkinson CP, Bird A, et al. Clinical classification of age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2013;120(4):844-851
- 5 Pugazhendhi A, Hubbell M, Jairam P, et al. Neovascular macular degeneration; a review of etiology, risk factors, and recent advances in research and therapy. *Int J Mol Sci* 2021;22(3):1170
- 6 Khan KN, Mahroo OA, Khan RS, et al. Differentiating drusen: Drusen and drusen-like appearances associated with ageing, age-related macular degeneration, inherited eye disease and other pathological processes. *Prog Retin Eye Res* 2016;53:70-106
- 7 Mullins RF, Russell SR, Anderson DH, et al. Drusen associated with aging and age-related macular degeneration contain proteins common to extracellular deposits associated with atherosclerosis, elastosis, amyloidosis, and dense deposit disease. *FASEB J* 2000;14(7):835-846
- 8 Wu T, Dang KR, Wang YF, et al. A modified laser-induced choroidal neovascularization animal model with intravitreal oxidized low-density lipoprotein. *Int J Ophthalmol* 2020;13(8):1187-1194
- 9 朱玉婕, 陈茜, 魏伟. 脉络膜厚度与年龄相关性黄斑变性发病关系的研究进展. *国际眼科杂志* 2022;22(11):1804-1808
- 10 欧阳灵艺, 邢怡桥. 抗 VEGF 药物在湿性年龄相关性黄斑变性中的应用进展. *国际眼科杂志* 2020;20(1):74-78
- 11 Zhang YR, Ji JD, Wang JN, et al. The role of N<sup>6</sup>-methyladenosine modification in microvascular dysfunction. *Cells* 2022;11(20):3193
- 12 Meyer KD, Jaffrey SR. Rethinking m<sup>6</sup>A readers, writers, and erasers. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2017;33:319-342
- 13 Parial R, Li H, Li J, et al. Role of epigenetic m<sup>6</sup>A RNA methylation in vascular development; mettl3 regulates vascular development through PHLPP2/mTOR-AKT signaling. *FASEB J* 2021;35(5):e21465
- 14 Bokar JA, Shambaugh ME, Polayes D, et al. Purification and cDNA cloning of the AdoMet-binding subunit of the human mRNA (N<sup>6</sup>-adenosine)-methyltransferase. *RNA* 1997;3(11):1233-1247
- 15 Zhang GA, Li XW, Huang XY. m<sup>6</sup>A-related bioinformatics analysis and functional characterization reveals that METTL3-mediated NPC1L1 mRNA hypermethylation facilitates progression of atherosclerosis via inactivation of the MAPK pathway. *Inflamm Res* 2023;72(3):429-442
- 16 Wang Q, Chen C, Ding QQ, et al. METTL3-mediated m<sup>6</sup>A

modification of HDGF mRNA promotes gastric cancer progression and has prognostic significance. *Gut* 2020;69(7):1193-1205

- 17 Zhang GY, Wang TJ, Huang ZH, et al. METTL3 dual regulation of the stability of LINC00662 and VEGFA RNAs promotes colorectal cancer angiogenesis. *Discov Onc* 2022;13(1):89
- 18 Suo L, Liu C, Zhang QY, et al. METTL3-mediated N<sup>6</sup>-methyladenosine modification governs pericyte dysfunction during diabetes-induced retinal vascular complication. *Theranostics* 2022;12(1):277-289
- 19 Carmeliet P, Collen D. Molecular basis of angiogenesis: role of VEGF and VE-cadherin. *Ann N Y Acad Sci* 2000;902(1):249-264
- 20 Milewicz DM, Kwartler CS, Papke CL, et al. Genetic variants promoting smooth muscle cell proliferation can result in diffuse and diverse vascular diseases: evidence for a hyperplastic vasculomyopathy. *Genet Med* 2010;12(4):196-203
- 21 Dong G, Yu JB, Shan GJ, et al. N<sup>6</sup>-methyladenosine methyltransferase METTL3 promotes angiogenesis and atherosclerosis by upregulating the JAK2/STAT3 pathway via m<sup>6</sup>A reader IGF<sub>2</sub>BP<sub>1</sub>. *Front Cell Dev Biol* 2021;9:731810
- 22 Chamorro-Jorganes A, Sweaad WK, Katare R, et al. METTL3 regulates angiogenesis by modulating let-7e-5p and miRNA-18a-5p expression in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2021;41(6):e325-e337
- 23 Yao MD, Jiang Q, Ma Y, et al. Role of METTL3-dependent N<sup>6</sup>-methyladenosine mRNA modification in the promotion of angiogenesis. *Mol Ther* 2020;28(10):2191-2202
- 24 Jiang Q, Ma Y, Zhao Y, et al. tRNA-derived fragment tRF-1001: a novel anti-angiogenic factor in pathological ocular angiogenesis. *Mol Ther Nucleic Acids* 2022;30:407-420
- 25 Yankova E, Blackaby W, Albertella M, et al. Small-molecule inhibition of METTL3 as a strategy against myeloid leukaemia. *Nature* 2021;593(7860):597-601
- 26 Han H, Yang CL, Zhang SS, et al. METTL3-mediated m<sup>6</sup>A mRNA modification promotes esophageal cancer initiation and progression via Notch signaling pathway. *Mol Ther Nucleic Acids* 2021;26:333-346
- 27 Lv JH, Zhang YF, Gao SW, et al. Endothelial-specific m<sup>6</sup>A modulates mouse hematopoietic stem and progenitor cell development via Notch signaling. *Cell Res* 2018;28(2):249-252
- 28 Iso T, Hamamori Y, Keddes L. Notch signaling in vascular development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23(4):543-553
- 29 Akil A, Gutiérrez-García AK, Guenter R, et al. Notch signaling in vascular endothelial cells, angiogenesis, and tumor progression: an update and prospective. *Front Cell Dev Biol* 2021;9:642352
- 30 Dornenburg C, Goß AV, Fischer M, et al. γ-secretase inhibitor I inhibits neuroblastoma cells, with NOTCH and the proteasome among its targets. *Oncotarget* 2016;7(39):62799-62813
- 31 Dong X, Wang YS, Dou GR, et al. Influence of Dll4 via HIF-1α-VEGF signaling on the angiogenesis of choroidal neovascularization under hypoxic conditions. *PLoS One* 2011;6(4):e18481