

网络出版时间:2023-08-31 15:02:29 网络出版地址:<https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20230831.1357.017>

# STM2457 减轻顺铂诱导的高尿酸下肾小管细胞损伤

卞和格,金 娟

**摘要 目的** 观察小鼠在高尿酸血症基础上使用顺铂诱导急性肾损伤(AKI)对于肾脏病变的影响情况以及探究甲基转移酶-3(METTL3)在其中发挥的作用。**方法** 将C57BL/6小鼠随机分成对照组、高尿酸血症组、AKI组和高尿酸血症+AKI复合模型组。通过灌胃氧嗪酸钾+腺嘌呤21 d建立高尿酸血症模型,腹腔注射顺铂3 d建立AKI模型,检测血肌酐、尿素氮、血尿酸、HE、Masson病理染色,探究不同模型对小鼠肾脏损伤情况。Western blot检测 $\alpha$ -平滑肌蛋白( $\alpha$ -SMA)、肾损伤分子-1(METTL3)蛋白表达变化;qPCR检测白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )、IL-1 $\beta$ 等mRNA变化。m6A检测试剂盒检测小鼠总体甲基化水平。**结果** 与单纯顺铂引起的AKI模型组相比,高尿酸血症和AKI复合模型组的血肌酐、尿素氮、血尿酸均明显升高。病理染色、Western blot和qPCR也显示复合模型组肾脏纤维化加重,METTL3表达水平升高。m6A检测结果说明实验组小鼠的总体甲基化水平升高且复合模型组明显高于单纯AKI组。体外实验中,使用METTL3特异性抑制剂STM2457则能够有效减轻肾小管上皮细胞的损伤以及降低炎症。**结论** 顺铂能够加重高尿酸引起的肾脏炎症和纤维化;STM2457对于高尿酸基础上顺铂诱导的细胞损伤具有治疗作用,METTL3可能是治疗有关肾脏损伤的潜在靶点。

**关键词** 高尿酸血症;高尿酸肾病;急性肾损伤;m6A;表观遗传学

**中图分类号** R 967

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2023)09-1540-07  
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.09.017

急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)也被称为急性肾衰竭,可以在数小时或几天内发生<sup>[1]</sup>。AKI的病因有肾脏直接损害、血流减少和尿路堵塞等<sup>[2]</sup>。慢性肾脏疾病(chronic kidney disease, CKD)是指肾脏损害持续较长时间。CKD的病因包括糖尿病、高血压、原发性肾小球肾炎、慢性肾小管间质肾炎、遗传性或囊性疾病、心脏病和中风等<sup>[3]</sup>。尿酸是嘌呤代谢的最终氧化产物,在肾脏中,低的尿液

2023-02-22 接收

基金项目:国家自然科学基金青年项目(编号:82100727)

作者单位:安徽医科大学基础医学院药理教研室,合肥 230032

作者简介:卞和格,男,硕士研究生;

金 娟,女,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: juan-jin@ahmu.edu.cn

pH有助于尿酸晶体的沉积,随着时间进展会发生尿酸结晶肉芽肿,最终导致CKD<sup>[4]</sup>。

表观遗传修饰在许多疾病的发生和发展中起着重要作用, RNA中腺苷酸的第六位N处发生甲基化(N6-methyladenosine, m6A)就叫做m6A甲基化修饰,m6A甲基化一共有三大类酶参与:Writers、Erasers和Readers<sup>[5]</sup>,m6A在AKI、CKD中都有既定的作用<sup>[6]</sup>,多项研究<sup>[7,8]</sup>证明甲基转移酶-3(methyltransferase like 3, METTL3)在哺乳动物细胞中起m6A甲基转移酶的作用。然而METTL3在高尿酸血症基础上发生的AKI中的作用尚不清楚,因此该研究旨在探究在小鼠体内高尿酸能否促进AKI的进展,以及METTL3在此过程中发挥的功能。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 24只7周龄SPF级雄性C57BL/6小鼠购于杭州子源实验动物科技有限公司,体质量20~25g,合格证号:SCXK2019-0004。饲养于清洁级实验室,恒温恒湿,不限食物和水,适应一周后开展后续实验。

**1.2 主要试剂及仪器** 羧甲基纤维素钠(北京索莱宝科技有限公司,批号:421V024);氧嗪酸钾(美国Sigma-Aldrich公司,批号:STBF9706V);腺嘌呤(美国Sigma-Aldrich公司,批号:WXBC4019V);肌酐(Cr)测定试剂盒(南京建成生物有限公司,批号:20220605);尿酸检测试盒(南京建成生物有限公司,批号:20220605);尿素氮(BUN)测试盒(南京建成生物有限公司,批号:20220605); $\alpha$ -平滑肌蛋白(Alpha-smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)抗体(批号:5344587)购自江苏亲科生物研究中心有限公司;METTL3抗体(批号:6264931)购自江苏亲科生物研究中心有限公司;Kim1肾损伤分子-1抗体(批号:BAO01154890)购自北京博奥森生物技术有限公司;尿酸(美国Sigma-Aldrich公司,批号:BCBZ4702);STM2457(美国MedchemExpress公司批号:114514)。

**1.3 模型制备与评价** 高尿酸血症模型构建:先制备1%羧甲基纤维素钠(sodium carboxymethylcellu-

lose, CMC-NA) 溶液, 然后将氧嗪酸钾 (250 mg/kg)、腺嘌呤 (100 mg/kg) 混于 1% 的羧甲基纤维素钠溶液中制备成混悬液, 根据小鼠体质量进行灌胃, 每隔 1 天 1 次, 持续 21 天, 对照组小鼠灌胃等量 CMC-NA 溶液; AKI 组采用腹腔注射顺铂 (20 mg/kg) 连续 3 天, 对照组腹腔注射等量 0.9% 氯化钠溶液; 复合模型组小鼠在灌胃至 18 d 时开始腹腔注射顺铂连续 3 d, 第 21 天牺牲小鼠取血、肾脏等。

**1.4 血清学检测** 第 21 天, 事先标记好采血的 EP 管, 眼球取血 1 ml 左右, 室温静置 1 h 后 3 000 r/min 离心 15 min, 用移液枪小心吸出分离上清液于新标记好的 EP 管中, 随即进行血肌酐、血尿素氮、血尿酸的检测。

**1.5 HE 染色** 取小鼠左肾于滤纸上, 将肾膜去除后, 用手术刀将左肾切下一部分放于事先标记好并且加入足量 4% 多聚甲醛固定液的 EP 管中, 固定 24 h 后, 进行组织脱水、石蜡包埋、切片等, 最后进行 HE 染色观察小鼠肾脏病理变化。

**1.6 Masson 染色** 脱蜡至水后, 根据组织大小用组化笔在载玻片上画圈, 随后根据 Masson 染色试剂盒说明书进行染色, 并随时在镜下观察并调整染色时间, 最后封片并用显微镜拍照。

**1.7 Western blot** 用细胞裂解液 RIPA + PMSF (100 : 1) 提取总蛋白, BCA 法调整蛋白浓度, 将各组等量样本进行 SDS-PAGE 凝胶电泳 (先电压 80 V 电泳约 30 min, 待 maker 分开后调整电压为 120 V 继续电泳约 60 min 至条带明显分开), 采用半干法转膜, 转膜后用 5% 牛奶封闭 1 h, 洗膜后 4 °C 孵育一抗过夜, 洗膜后加二抗孵育 1 h, 洗膜后加 ECL 曝光液显影。计算灰度值, β-actin 作为内参, 计算目的蛋白相对表达量。

**1.8 qPCR** 细胞总 RNA 提取和逆转录成 cDNA 分别按照 Total RNA Kit 和 RT 试剂盒说明书进行, 采用 SYBR 荧光检测试剂盒进行 Real-time PCR 分析, 引物序列见表 1。

**1.9 细胞培养与分组给药** 使用小鼠肾小管上皮细胞 (mouse renal tubular epithelial cells, mTECs) 进行实验, 常规培养采用含 10% FBS 的 F12/DMEM 培养基进行细胞传代。种板后分成以下几组: 对照组、高尿酸组 (15 mg/dl 尿酸)、单纯 CIS 组 (20 μmol/L)、复合模型组 (15 mg/dl 尿酸 + 20 μmol/L CIS)、抑制剂组 (复合模型组 + 1 μmol/L STM2457), 每组 3 个复孔, 造模 24 h 后, 提取蛋白以及 mRNA 进行后续检测。

表 1 实时定量 PCR 目的基因引物序列

基因名称	引物序列 (5'-3')
Mouse TNF-α	F: CATCTTCTCAAATTCGAGTGACAA R: TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC
Mouse IL-1β	F: CTTGAAGTTGACGGACCCC R: TGAGTGATACTGCCTGCCTG
Mouse IL-6	F: TGAACAACGATGATGCACTTG R: CTGAAGGACTCTGGCTTGTG
Mouse α-SMA	F: TGCGAGCGTGAGATTGTC R: CGTCGTTCCAATGGTGATC
Mouse β-actin	F: GCGTGACATCAAAGAGAAGC R: GCGTGACATCAAAGAGAAGC

**1.10 统计学处理** 使用 GraphPad Prism8.0 软件进行数据分析, 符合正态分布的数据采用 t 检验来比较两组间的显著性, 采用 Tukey 后检验的单因素方差分析比较三组或更多组, 结果采用表示并列出相应均值、标准差以及 t 检验后 t 值的具体大小, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 顺铂加重高尿酸诱导的肾功能损伤** 动物实验设计方案如图 1A 所示, 实验分组为正常组、高尿酸血症组、顺铂诱导的 AKI 组、复合模型组; 与正常组相比 (图 1B), 高尿酸血症组小鼠血尿酸水平明显升高 ( $P < 0.01$ ), 顺铂对血尿酸水平无影响, 而复合模型组小鼠血尿酸水平相对高尿酸血症组小鼠明显升高 ( $P < 0.05$ ), 这说明虽然顺铂刺激不会升高血尿酸水平但是在有高尿酸血症的基础上顺铂刺激会加重血尿酸的堆积。与正常组相比 (图 1C-D), 高尿酸组和顺铂刺激组小鼠均出现血肌酐、尿素氮的明显升高 ( $P < 0.01$ ), 复合模型组相对于顺铂组均有所加重 ( $P < 0.05$ )。综上所述, 高尿酸和顺铂刺激均会导致小鼠肾脏损伤, 但顺铂刺激并不会导致小鼠尿酸升高, 但若是在高尿酸基础上给予顺铂刺激, 小鼠肾功能损伤加重, 并且小鼠的血尿酸水平会进一步升高。见图 1。

**2.2 顺铂加重高尿酸诱导的肾组织损伤** 图 2 中 HE 结果显示, 高尿酸组、顺铂刺激的 AKI 组、复合模型组相较正常组均产生不同程度的肾小管扩张、肾小球萎缩、间质水肿并伴有炎症细胞浸润, 且复合模型组较单纯的 AKI 组和单纯高尿酸组, 均出现更严重的肾小管扩张、肾小球萎缩、间质水肿以及炎症细胞浸润。见图 2。

**2.3 顺铂加重高尿酸诱导的肾脏纤维化** Masson 染色 (图 3A-D) 结果显示, 高尿酸组小鼠肾脏出现

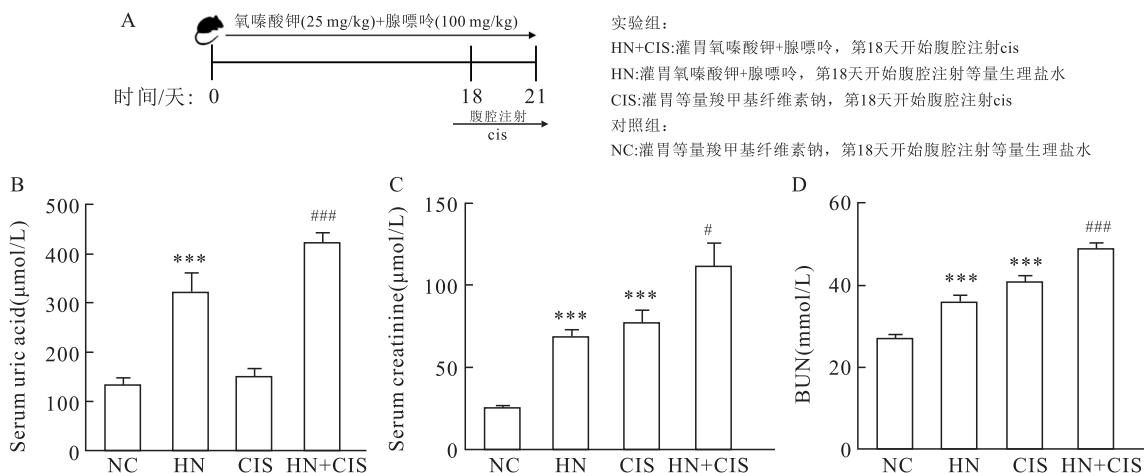
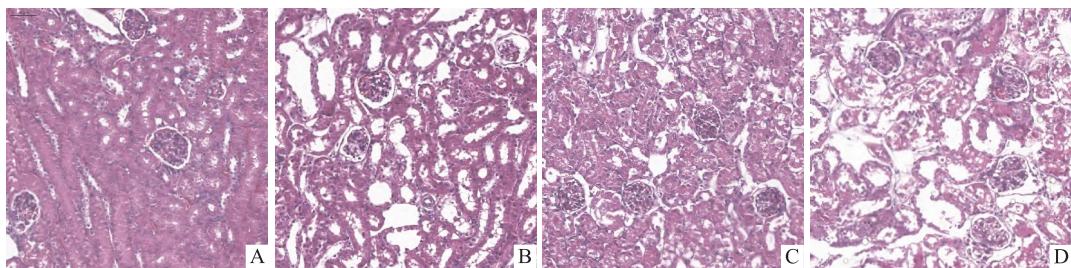


图 1 小鼠模型构建及分组情况与血清学指标检测

A: 动物实验模型构建及分组情况; B: 血尿酸; C: 血肌酐; D: 尿素氮; NC: 对照组; HN: 单纯高尿酸组; CIS: 单纯顺铂刺激组; HN+CIS: 复合模型组; , 与 NC 组比较: \*\*\*  $P < 0.001$ ; 与 CIS 组比较: #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.001$

图 2 各组小鼠肾脏损伤情况 HE 染色  $\times 200$ 

a: NC 组; b: HN 组; c: CIS 组; d: HN + CIS 组

纤维化,单纯顺铂刺激的 AKI 组小鼠肾脏纤维化不明显,复合模型组较单纯高尿酸组纤维化更为明显。接下来观察高尿酸和 CIS 刺激对小鼠肾脏  $\alpha$ -SMA 表达的影响。如图 3E 所示,与正常组相比,高尿酸组小鼠肾脏  $\alpha$ -SMA 表达上调( $P < 0.01$ );单纯顺铂刺激, $\alpha$ -SMA 变化不明显;复合模型组小鼠肾脏中  $\alpha$ -SMA 上调最明显,显著高于单纯顺铂刺激的急性肾损伤组( $P < 0.01$ )。上述结果表明,高尿酸会导致小鼠肾脏产生明显纤维化,并且伴有高尿酸血症的情况下发生 AKI,小鼠肾脏纤维化会明显加重。见图 3。

**2.4 顺铂加重高尿酸诱导的肾脏炎症反应** 实时荧光定量 PCR 结果(图 4A-C),实验组小鼠炎症水平与对照组相比均升高,且复合模型组炎症水平明显高于单纯 AKI 模型组( $P < 0.05$ )。见图 4。

**2.5 METTL3 在顺铂诱导的高尿酸小鼠肾脏中高表达** 根据检测结果(图 5A),该实验发现相较于正常组,实验组小鼠的总体 m6A 甲基化水平平均明显

升高( $P < 0.01$ );已知 METTL3 是哺乳动物细胞中重要的 m6A 甲基转移酶。因此,该实验检测小鼠肾脏中 METTL3 的蛋白表达水平(图 5B),结果显示实验组小鼠的肾脏中 METTL3 水平均升高( $P < 0.01$ ),且复合模型组相较于单纯 AKI 组小鼠的 METTL3 升高更明显( $P < 0.01$ )。结果表明,METTL3 水平的升高可能和小鼠肾脏损伤相关,且与损伤程度成正相关。见图 5。

**2.6 METTL3 抑制剂 STM2457 抑制高尿酸基础上顺铂诱导的细胞损伤和炎症反应** 该实验使用 METTL3 特异性抑制剂 STM2457 在小鼠肾小管上皮细胞上进行实验,结果如图 6A 所示,尿酸基础上给予顺铂刺激可以显著的上调肾损伤分子-1 蛋白表达,但 STM2457 可以有效抑制两者造成的小鼠肾小管上皮细胞的损伤( $P < 0.05$ );此外,通过实时荧光定量 PCR 检测(图 6B-D)结果显示,STM2457 能够有效抑制尿酸基础上给予顺铂刺激引起的炎症因子白细胞介素-6(Interleukin-6, IL-6)和肿瘤坏死因子

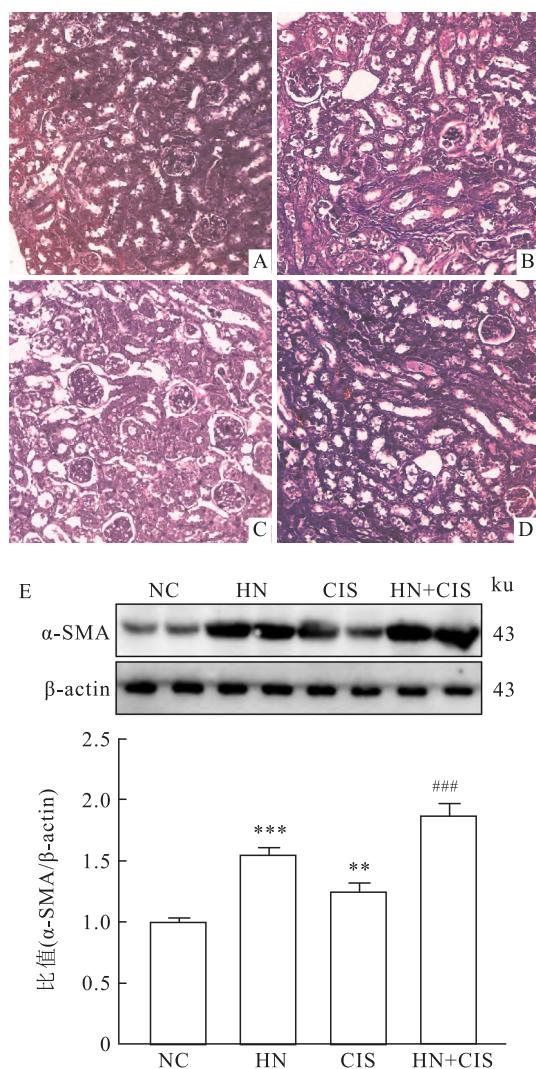


图3 Masson染色及Western blot检测肾脏纤维化情况

A:各组小鼠肾脏纤维化情况 Masson染色  $\times 200$ ; A: NC组; B: HN组; C: CIS组; D: HN+CIS组; E: Western blot检测各组小鼠肾脏 $\alpha$ -SMA表达水平,与NC组比较: \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ;与 CIS组比较: ###  $P < 0.001$

(tumor necrosis factor, TNF- $\alpha$ )的释放,以及降低纤维化指标 $\alpha$ -SMA的水平。结果表明METTL3特异性抑制剂STM2457可以减轻顺铂诱导的高尿酸小鼠肾小管上皮细胞的炎症和纤维化反应,提示抑制METTL3能够对小鼠肾脏产生保护作用。见图6。

### 3 讨论

传统上,高尿酸血症被认为通过尿酸晶体在肾单位集合管中的沉积诱发肾脏疾病,其方式类似于痛风性关节病。研究表明高尿酸血症会促进初期肾脏损伤或其进展,持续高血清尿酸水平又进而引发肾脏炎症和纤维化,并逐渐发展为CKD<sup>[9]</sup>。该实验研究同样证实,长期高尿酸可以诱导小鼠肾脏炎症和纤维化。He et al<sup>[10]</sup>发现当CKD患者出现AKI时,已知会更加严重且难以恢复。此外,wen et al<sup>[11]</sup>发现高尿酸血症与术后即刻和住院期间AKI风险增加和血肌酐高峰值相关。因此本研究旨在探究在小鼠体内高尿酸能否促进AKI的进展。该实验的研究结果发现,在高尿酸基础上给予顺铂刺激,可以导致小鼠的血肌酐、血尿素氮均显著高于高尿酸组和顺铂组小鼠,且肾脏炎症和纤维化反应均加重,提示高尿酸血症可以加重AKI时肾脏功能和组织损伤。

表观遗传学是指在不改变DNA序列的情况下调节基因表达,包括DNA甲基化、组蛋白修饰和RNA修饰等<sup>[12]</sup>;其中RNA修饰普遍存在于各种RNA中,并在维持正常发育和生理上起着关键作用<sup>[13]</sup>。课题组近期发现RNA甲基化与多种肾脏疾病(包括AKI)的病理生理学有关。在缺血再灌注、顺铂和LPS引起的AKI模型的肾小管中,以及在人

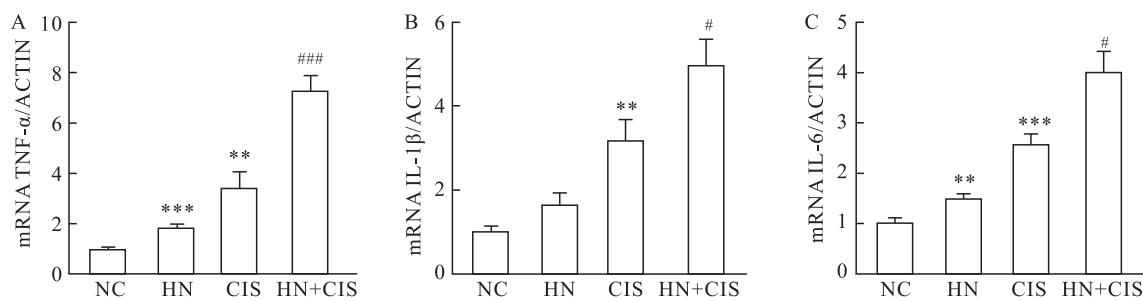


图4 顺铂对高尿酸诱导的肾脏炎症反应的影响

A: qPCR检测各组小鼠肾脏中TNF- $\alpha$ 表达;B: qPCR检测各组小鼠肾脏中IL-1 $\beta$ 表达;C: qPCR检测各组小鼠肾脏中IL-6表达;与NC组比较: \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ;与 CIS组比较: #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.001$

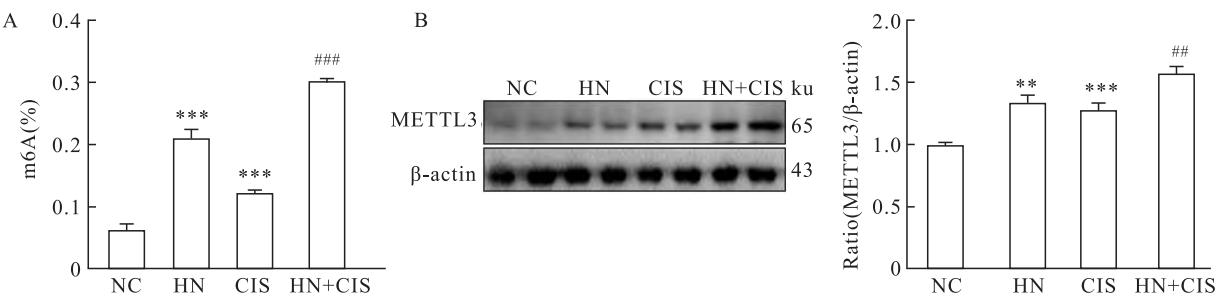


图 5 各组小鼠总体 m6A 甲基化水平及 METTL3 表达情况

A: 各组小鼠总体 m6A 甲基化水平; B: Western blot 检测各组小鼠肾脏 METTL3 表达水平;与 NC 组比较: \*\*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ;与 CIS 组比较: ##  $P < 0.01$ , ##  $P < 0.001$

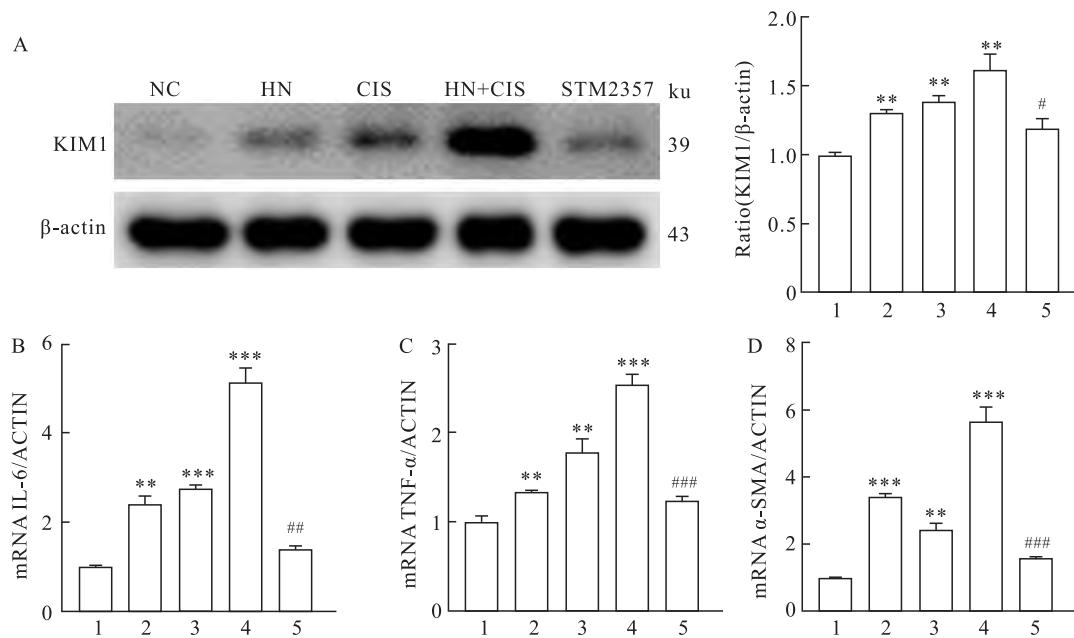


图 6 METTL3 抑制剂 STM2457 抑制高尿酸基础上顺铂诱导的细胞损伤和炎症反应

A: Western blot 检测肾损伤分子-1 蛋白表达水平;B: qPCR 检测各组小鼠肾脏中 IL-6 表达;C: qPCR 检测各组小鼠肾脏中 TNF-α 表达;D: qPCR 检测各组小鼠肾脏中 α-SMA 表达;1:NC 组,2:HN 组,3:CIS 组,4:HN + CIS 组,5:STM2457 组;与 NC 组比较: \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ;与 HN + CIS 组比较: #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$

类活组织检查中, METTL3 的表达均升高。Wang et al<sup>[7]</sup>发现 METTL3 通过将 IGF2BP2(胰岛素样生长因子 2 结合蛋白 2)与其 m6A 修饰的终止密码子区域结合,提高了 TAB3 的稳定性,促进了 TAB3 介导的炎症以及肾功能损伤。Jiang et al<sup>[8]</sup>发现 METTL3 通过 IGF2BP2 依赖的 m6A 修饰 TIMP2 来调节 Notch 信号,并发挥促炎和促凋亡作用。尿酸的分泌和重吸收主要经过肾小管进行处理,而肾小管上皮细胞不仅可以被高尿酸刺激而受到损伤,同时损伤的肾小管上皮细胞释放多种趋化因子,招募炎症细胞浸润,导致炎症反应加重,进而参与损伤进程<sup>[14]</sup>。AKI 是一个全球性健康问题,目前临幊上针对 AKI 的治疗方法仅是支持性的,治疗方法有限,

短期死亡率仍然很高,探索新的治疗靶点,可能为相关疾病的治疗和预防提供帮助。在研究中,发现实验组小鼠的总体 m6A 甲基化水平均升高,且顺铂刺激可以诱导高尿酸基础上小鼠的肾脏 m6A 甲基化水平进一步升高;同时小鼠肾脏 METTL3 表达水平也与 m6A 结果一致。进一步研究发现,使用 METTL3 特异性抑制剂 STM2457 可以有效减轻高尿酸基础上给予顺铂对小鼠肾小管上皮细胞造成的损伤、炎症和纤维化反应。

STM2457 是一种高效、特异的 METTL3 抑制剂,不仅对 METTL3 具有高度特异性,而且未显示出对其他 RNA 甲基转移酶的抑制作用<sup>[15]</sup>;在体外实验中,该研究发现 STM2457 可以有效减轻在高尿酸基

础上给予顺铂刺激对小鼠肾小管上皮细胞造成的损伤。在课题组另一项研究中,结合 RNA-seq 等结果,该研究发现 METTL3 抑制剂可能对尿酸相关转运体的表达有影响,其机制可能为 METTL3 调节尿酸相关转运体 ABCG2 的表达并发挥作用,从而影响尿酸在体内的代谢。当然对于 METTL3 是如何调控尿酸转运体以及相关尿酸转运体如何减轻肾脏损伤还有待进一步探究。

综上所述,高尿酸血症小鼠肾脏尿酸排泄异常,肾功能不全,并伴有肾脏炎症和纤维化加重。在高尿酸基础上发生 AKI 会导致小鼠肾脏功能和组织损伤情况明显加重,也就是说高尿酸会加重和促进 AKI 进展。使用特异性抑制剂 STM2457 抑制甲基化转移酶 METTL3 活性,能够有效减轻小鼠肾小管上皮细胞损伤,提示 METTL3 有望成为高尿酸基础上发生 AKI 时潜在治疗靶点,但其具体作用机制还有待进一步探究。

### 参考文献

- [1] Levey A S. Defining AKD: the spectrum of AKI, AKD, and CKD [J]. *Nephron*, 2022, 146(3): 302–5.
- [2] Kellum J A, Romagnani P, Ashuntantang G, et al. Acute kidney injury [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2021, 7(1):51.
- [3] Zhang X Q, Agborbesong E, Li X G. The role of mitochondria in acute kidney injury and chronic kidney disease and its therapeutic potential [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(20):11253.
- [4] Sellmayr M, Hernandez Petzsche M R, Ma Q, et al. Only hyperuricemia with crystalluria, but not asymptomatic hyperuricemia, drives progression of chronic kidney disease [J]. *J. Am. Soc. Nephrol*, 2020, 31(12): 2773–92.
- [5] Jiang X, Liu B, Nie Z, et al. The role of m6A modification in the biological functions and diseases [J]. *Signal Transduction Targeted Ther*, 2021, 6(1):74.
- [6] Luan J, Kopp J B, Zhou H. N6-methyladenine RNA methylation epigenetic modification and kidney diseases [J]. *Kidney Int*, 2023, 8(1): 36–50.
- [7] Wang J N, Wang F, Ke J, et al. Inhibition of METTL3 attenuates renal injury and inflammation by alleviating TAB3 m6A modifications via IGF2BP2-dependent mechanisms [J]. *Sci Transl Med*, 2022, 14(640):eabk2709.
- [8] Jiang L, Liu X, Hu X, et al. METTL3-mediated m(6) A modification of TIMP2 mRNA promotes podocyte injury in diabetic nephropathy [J]. *Mol Ther*, 2022, 30(4): 1721–40.
- [9] Li Y, Zhao Z, Luo J, et al. Apigenin ameliorates hyperuricemic nephropathy by inhibiting URAT1 and GLUT9 and relieving renal fibrosis via the Wnt/beta-catenin pathway [J]. *Phytomedicine*, 2021, 87: 153585.
- [10] He L, Wei Q, Liu J, et al. AKI on CKD: heightened injury, suppressed repair, and the underlying mechanisms [J]. *Kidney Int*, 2017, 92(5): 1071–83.
- [11] Wen L, Yang H, Ma L, et al. The roles of NLRP3 inflammasome-mediated signaling pathways in hyperuricemic nephropathy [J]. *Mol Cell Biochem*, 2021, 476(3): 1377–86.
- [12] Jin J, Yang Y R, Gong Q, et al. Role of epigenetically regulated inflammation in renal diseases [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2022, S1084–9521(22): 00292–0.
- [13] Akhtar J, Lugoboni M, Junion G. m6A RNA modification in transcription regulation [J]. *Transcription*, 2021, 12(5): 266–76.
- [14] Zhao L, Li C, Zhou B, Crucial role of serum response factor in renal tubular epithelial cell epithelial-mesenchymal transition in hyperuricemic nephropathy [J]. *Aging-US*, 2019, 11(22): 10597–609.
- [15] Yankova E, Blackaby W, Albertella M, et al. Small-molecule inhibition of METTL3 as a strategy against myeloid leukaemia [J]. *Nature*, 2021, 593(7860): 597–601.

## STM2457 reduces cisplatin-induced renal tubular epithelial cells injury in the high uric acid setting

Bian Hege, Jin Juan

(Dept of Pharmacology, School of Basic Medical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032)

**Abstract Objective** To observe the effect of Methyltransferase like 3 (METTL3) in cisplatin-induced acute kidney injury (AKI) in mice with hyperuricemia. **Methods** C57BL/6 mice were randomly divided into control group, hyperuricemia group, AKI group, and hyperuricemia + AKI group. The hyperuricemia model was established by injecting with gavage potassium oxyzinate and adenine for 21 days, and the AKI model was established by intraperitoneal injection of cisplatin for 3 days. Serum creatinine, urea nitrogen, blood uric acid, the pathological staining of HE and Masson were detected. The expression of alpha-smooth muscle actin (α-SMA), Kim-1 and METTL3 proteins were detected by Western blot. qPCR detected mRNA changes such as interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor (TNF-α), and IL-1β. The m6A assay detected overall methylation levels in mice. **Results**

网络出版时间:2023-08-31 16:52:22 网络出版地址:<https://link.cnki.net/urlid/34.1065.r.20230831.1128.001>

# 免疫沉淀联合质谱筛选与纳尔逊湾正呼肠孤病毒 σNS 互作的宿主 RNA 结合蛋白

李润林,胡思漫,骆丽可,贾雪娇,刘梦琦,李永刚,陶晓莉

**摘要 目的** 筛选出宿主细胞中与纳尔逊湾呼肠孤病毒(NBV)非结构蛋白 σNS 互作的 RNA 结合蛋白并分析其生物信息学功能。**方法** 本研究通过构建 NBV σNS 真核表达载体 pEF-HA-MB-S3,验证正确后转染 HEK293T 细胞,所得的细胞蛋白裂解液经 RNase A 处理后,利用免疫沉淀富集 σNS 结合蛋白,经 LC-MS/MS 质谱分析技术鉴定分析互作蛋白,并且借助相关生信工具挖掘蛋白性质和具体功能。**结果**

本实验成功筛选出 32 个与 NBV σNS 蛋白存在互作的候选 RNA 结合蛋白;生物分析结果显示,这些蛋白主要定位于细胞质与细胞核中,并且主要参与细胞代谢、生物调控、病毒翻译与转录等生物学过程。**结论** 本研究初步分析与 NBV σNS 互作的 RNA 结合蛋白功能,为深入研究 σNS 蛋白在 NBV 生命周期中的作用机制奠定基础。

**关键词** 纳尔逊湾病毒;σNS 蛋白;RNA 结合蛋白;宿主蛋白;免疫沉淀

**中图分类号** R 373

**文献标志码** A 文章编号 1000-1492(2023)09-1546-05

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.09.018

纳尔逊湾呼肠孤病毒(Nelson Bay orthoreoviruses, NBV)是一种人兽共患病病毒,起初见于果蝠体

2023-08-16 接收

基金项目:辽宁省自然科学基金(编号:2022-BS-320)

作者单位:锦州医科大学基础医学院病原生物学教研室,锦州 121000

作者简介:李润林,女,硕士研究生;  
陶晓莉,女,讲师,责任作者,E-mail: 420391072@qq.com

内,后由急性呼吸道感染患者的痰液分离所得<sup>[1]</sup>。NBV 为分节段双链 RNA,隶属于呼肠孤病毒科,其中非结构蛋白 σNS 由 S3 基因表达,一方面通过与 μNS 稳定嵌合,介导病毒工厂的形成,汇集 RNA 合成等必须活性成分,为病毒复制提供稳定场所;另一方面,经宿主 RNA 相关因子的招募,加快病毒包装效率,并且定向结合单链 RNA 构成核蛋白复合物,推动 NBV 病毒后续的蛋白表达、递送、组装等相关程序<sup>[2-6]</sup>。然而,NBV σNS 与宿主 RNA 结合的具体蛋白及相关功能,尚不明确。因此,通过构建 NBV S3 的重组质粒 pEF-HA-S3,经摒除 RNA、转染宿主细胞及免疫沉淀联合质谱技术筛选出 RNA 互作蛋白,由生物信息学预测相关蛋白的亚细胞定位、潜在功能和作用机制,以期为探究 NBV 复制过程和防控对策提供理论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 重组 NBV-MB 病毒株日本大阪大学病毒复制实验室赠与,HEK293T 细胞和 NBV σNS 蛋白抗体均为锦州医科大学基础医学院病原生物学实验室保存;HA 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司;脂质体转染试剂(Lipofectamine 2000)、NP-40 细胞裂解液、PMSF 均购自碧云天公司;4 × 蛋白上样缓冲液购自 Solorio 公司;In-Fusion® HD Cloning Kit 和 RNase A 均购自 Takara 公司;DMEM 培

Compared with the AKI group alone, the serum creatinine, urea nitrogen and blood uric acid in the hyperuricemia + AKI group significantly increased. Pathological staining, Western blot, and qPCR also showed worsening of renal fibrosis and elevated METTL3 expression in the composite model group. The m6A test results showed that the overall methylation level of mice in the experimental group increased, and the composite model group was significantly higher than that in the AKI group. **In vitro** experiments, the METTL3-specific inhibitor STM2457 was given to effectively reduce the injury of renal tubular epithelial cells and reduce the level of inflammation and fibrosis. **Conclusion** Cisplatin can exacerbate renal inflammation and fibrosis caused by high uric acid; STM2457 has therapeutic effects in hyperuricemic nephropathy and cisplatin-induced acute kidney injury, and METTL3 may be a potential target for the treatment of related kidney injury.

**Key words** hyperuricemia; hyperuricemic nephropathy; acute kidney injury; m6A; epigenetics