

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2024.20.006

文章编号: 1005-8982 (2024) 20-0031-09

实验研究·论著

METTL14介导ACSL4的m6A甲基化在髓核细胞铁死亡和细胞衰老中的作用*

陈特, 肖权洲, 孙杨, 刘向阳

[湖南师范大学附属第一医院(湖南省人民医院)骨科三病区, 湖南长沙 410000]

摘要: **目的** 探究METTL14介导ACSL4的m6A甲基化在髓核细胞铁死亡和细胞衰老中的作用。**方法** 采用市售人髓核细胞, 利用叔丁基氢过氧化物复制细胞模型, 分别复制METTL14过表达和敲除的稳转细胞株。通过分光光度法检测细胞内亚铁离子、MDA、GSH、GPX4水平, 流式细胞术检测ROS和细胞线粒体膜电位, 采用 β -半乳糖苷酶染色评估细胞衰老情况。同时进行了甲基化RNA免疫共沉淀结合实时荧光定量聚合酶链反应(MeRIP-qRT-PCR)和RNA稳定性实验, 探究METTL14对ACSL4表达的调控作用。**结果** METTL14过表达在髓核细胞中导致显著的铁过载($P < 0.05$)、ROS相对表达量升高($P < 0.05$)、MDA水平增加($P < 0.05$), 以及GSH与GPX4水平下降($P < 0.05$), 同时降低线粒体膜电位($P < 0.05$), 从而促进了细胞衰老。通过MeRIP-qRT-PCR和RNA稳定性实验发现METTL14调控ACSL4的表达, 并影响其mRNA的稳定性。挽救实验进一步证实METTL14通过调控ACSL4促进髓核细胞衰老的机制。**结论** METTL14通过介导ACSL4的m6A甲基化过程促进髓核细胞的铁死亡和衰老, 为深入理解髓核细胞相关疾病的发病机制提供新的视角和治疗靶点。

关键词: 髓核细胞; 铁死亡; 细胞衰老; METTL14; ACSL4; m6A甲基化

中图分类号: R681.5

文献标识码: A

Role of METTL14-mediated m6A methylation of ACSL4 in ferroptosis and senescence of nucleus pulposus cells*

Chen Te, Xiao Quan-zhou, Sun Yang, Liu Xiang-yang

[Ward Three of Department of Orthopedics, The First Affiliated Hospital of Hunan Normal University (Hunan Provincial People's Hospital), Changsha, Hunan 410000, China]

Abstract: **Objective** To elucidate the role of METTL14-mediated m6A methylation of ACSL4 in ferroptosis and senescence of nucleus pulposus cells. **Methods** Human nucleus pulposus cells were utilized to establish a tert-butyl hydroperoxide-induced cell model. Stable cell lines were generated with either overexpression or knockdown of METTL14. Intracellular levels of ferrous ions, MDA, GSH, and GPX4 were quantified using spectrophotometry, while ROS and mitochondrial membrane potential were measured via flow cytometry. Cell senescence was evaluated through β -galactosidase staining. The methylated RNA immunoprecipitation (MeRIP) and quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR), as well as RNA stability experiments, were performed to investigate the regulatory effects of METTL14 on ACSL4 expression. **Results** METTL14 overexpression in nucleus pulposus cells caused significant iron overload ($P < 0.05$), increased ROS levels ($P < 0.05$), elevated MDA levels ($P < 0.05$), a significant decrease in GSH and GPX 4 levels ($P < 0.05$), and a reduction in the mitochondrial membrane potential ($P < 0.05$), thus promoting cellular senescence. Using MeRIP-qRT-PCR and RNA stability

收稿日期: 2024-04-26

*基金项目: 湖南省卫生健康委科研计划项目 (No: 202104071114)

assays, we found that METTL14 regulated the expression of ACSL4 and affected its mRNA stability ($P < 0.05$). The rescue experiment further confirmed that METTL14 promoted nucleus pulposus cell senescence by regulating ACSL4 ($P < 0.05$). **Conclusions** This study unveils the role of METTL14 in promoting ferroptosis and senescence of nucleus pulposus cells via mediating m6A methylation of ACSL4, offering a novel perspective and potential therapeutic target for understanding the pathogenesis of diseases involving nucleus pulposus cells.

Keywords: METTL14; ACSL4; m6A methylation; nucleus pulposus cells; ferroptosis; cell senescence

椎间盘退变是一种常见的脊柱疾病,流行病学数据显示,全球有大量人群受其影响^[1-3]。据统计,> 80%的成年人在一生中至少会经历1次椎间盘退变的症状,其中以40~60岁的中年人群为主^[4-5]。椎间盘退变会导致椎间盘的结构和功能发生变化,最终导致脊柱的稳定性下降,引起腰背疼痛、神经根压迫等症状,严重影响患者的生活质量^[6]。研究表明,椎间盘退变的发病机制与多种因素有关,包括基因表达调控、细胞凋亡、炎症因子释放等^[7]。其中,基因表达调控在椎间盘退变中扮演着重要角色^[8]。最近研究发现,ACSL4是一种脂肪酰辅酶A合成酶,其过度表达与椎间盘细胞的凋亡和炎症反应有关,进而加速了椎间盘退变的进程。因此,寻找椎间盘退变的作用靶点对于预防和治疗该疾病具有重要意义。

m6A表观遗传学修饰是一种重要的RNA修饰方式。有研究发现,m6A修饰在椎间盘退变的发生、发展中起着重要作用^[9-11]。有研究表明,m6A修饰水平在椎间盘组织中明显下降,导致一系列基因的表达异常,从而影响椎间盘的稳定性和功能^[12-14]。此外,m6A修饰还可以调控一些关键信号通路,进一步加剧椎间盘退变的进程。ACSL4介导的细胞铁死亡与髓核细胞衰老之间存在一定的关联。ACSL4是一种参与细胞脂质代谢的酶,在细胞内负责催化脂肪酸与辅酶A结合形成酰辅酶A。有研究表明,ACSL4介导的细胞铁死亡过程中,铁离子的积累会导致细胞内氧化应激增加,进而引发细胞凋亡或坏死。而在髓核细胞中,铁离子的过度积累也会导致细胞氧化损伤和衰老现象。因此,需要进一步研究来揭示两者之间的具体机制和相互作用。本研究旨在探究METTL14通过介导ACSL4的m6A甲基化促进髓核细胞铁死亡及细胞衰老的机制,对于深入理解椎间盘退变的发病机制具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 细胞和主要试剂

人髓核细胞购自于上海康朗生物科技有限公司,叔丁基氢过氧化物(Tert-butyl hydroperoxide, TBHP)购自于美国GIBCO公司,DMSO、慢病毒、亚铁离子检测试剂盒、丙二醛(Malonaldehyde, MDA)检测试剂盒、谷胱甘肽(Glutathione, GSH)检测试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4, GPX4)检测试剂盒、 β -半乳糖苷酶染色试剂盒、放线菌素D、RNA提取试剂盒、cDNA合成试剂盒、实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)试剂盒、甲基化RNA免疫共沉淀(MeRIP)试剂盒、Western blotting试剂盒、活性氧类(reactive oxygen species, ROS)检测试剂盒、线粒体膜电位检测试剂盒、TRIzol试剂盒均购自于美国Invitrogen公司。

1.2 分组

根据研究目的和方法,将人髓核细胞进行分组。对照组:细胞使用等量DMSO处理,作为基础对照。模型组:细胞经过TBHP诱导复制氧化压力模型。为全面评估METTL14在髓核细胞铁死亡与细胞衰老中的作用,笔者设计了两个系列的对照组、实验组,以确保结果的可靠性与有效性。这两个系列的实验分别采用了不同的干预手段(过表达和敲除),以验证METTL14在不同条件下的功能。模型+METTL14过表达组:TBHP诱导的模型细胞中,METTL14基因过表达。并分为模型+sh-METTL14组:TBHP诱导的模型细胞中,METTL14基因被敲除。模型+oe-NC+sh-NC组:此分组同时使用过表达METTL14基因(oe-NC指标准对照的过表达)和shRNA的负对照,可以用来探究过表达基因在非特异性shRNA背景下的效应。模型+METTL14+sh-NC组:此分组METTL14基因被过表达,同时使用shRNA负对照,用来研究METTL14

基因过表达的效果,并排除 shRNA 引入的干扰。模型 + METTL14 + sh-ACSL4 组:此分组同时过表达 METTL14 基因、沉默 ACSL4 基因,用于探索这两种基因表达变化交互作用对生物学性质的影响。模型 + sh-METTL14 + oe-NC 组:此分组沉默 METTL14 基因,同时过表达一个可能的标准对照基因,这样的组合有助于理解在标准对照过表达的背景下 METTL14 沉默的具体影响。模型 + sh-METTL14 + ACSL4 组:此分组涉及沉默 METTL14 基因和过表达 ACSL4 基因,旨在研究在 ACSL4 过表达的情况下, METTL14 沉默所产生的影响。模型 + NC 组为模型组转入标准对照的过表达,模型 + sh-NC 组为模型组转入 shRNA 的负对照。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养及转染 人髓核细胞在含有适当浓度培养基(DMEM/F12)的细胞培养皿中培养。置入 37 °C、5% 二氧化碳培养箱。为复制铁过载细胞模型,采用 TBHP 进行细胞诱导^[15]。具体操作步骤如下:将 TBHP 按照实验所需浓度配制成工作液,加入到培养皿中,与细胞共培养一定时间,以诱导铁过载状态的髓核细胞。采用慢病毒转染技术,将 METTL14 基因的携带载体与辅助载体共转染至包装细胞中,通过病毒颗粒包装 METTL14 的载体。将包含 METTL14 慢病毒颗粒的培养上清收集,与人髓核细胞共培养一定时间,使其稳定表达 METTL14。将稳转细胞株分别处理为 METTL14 过表达和敲除的组别,并使用 TBHP 进行细胞诱导,复制稳转细胞株的铁过载模型。在培养过程中,定期更换培养基,保持培养皿内细胞的健康状态。同时,细胞的传代也需按照标准操作进行。

1.3.2 Western blotting 检测 METTL14、ACSL4 蛋白表达 收集不同处理组的人髓核细胞,并用 RIPA Lysis 缓冲液裂解细胞,提取蛋白质。再使用 BCA 蛋白定量试剂盒确定蛋白质浓度,并将蛋白样品以相同的蛋白质浓度加载到 SDS-PAGE 凝胶上进行电泳分离。分离后将蛋白转移到 PVDF 膜上,后用 5% 脱脂奶粉或 3% BSA 进行膜的阻断处理。接下来,使用特异性的一抗体进行孵育,包括 METTL14、ACSL4 的一抗,与适当的辣根过氧化物酶标记的二抗结合。使用 ECL 亮光发生剂观察蛋白带,并通过化学发光成像系统进行成像和分析。

1.3.3 流式细胞术检测 ROS 相对表达量 收集对照组、模型组及转染相关载体的髓核细胞,分别进行预处理。细胞按照各组设定条件处理后,分别添加 ROS 探针,避光孵育,促使 ROS 与探针结合,以对照组作为参照,利用流式细胞仪检测细胞内 ROS 相对表达量。

1.3.4 流式细胞术检测细胞线粒体膜电位 收集待检测的髓核细胞,离心弃上清液,收集细胞沉积。使用含有荧光探针(如 JC-1)的染料缓冲液(1 × PBS)对细胞进行染色,按照荧光染色试剂盒说明书中的推荐浓度进行稀释。染色后,将细胞在室温条件下孵育一段时间,以确保荧光探针充分进入细胞内。随后,使用流式细胞仪进行样品检测,设置相应的激发波长和荧光信号收集通道。通过流式细胞仪测量细胞中荧光信号的强度,并记录结果。根据荧光信号的强度,分析细胞线粒体膜电位的变化。

1.3.5 分光光度法检测细胞内亚铁离子、MDA、GSH、GPX4 水平 取得所需试剂和仪器,配制细胞裂解液和缓冲液,对仪器进行预热和校准。将收集的细胞沉淀加入适量的细胞裂解液,并在冰上振荡裂解,保证细胞完全溶解。将裂解后的细胞溶液进行高速离心,去除细胞核和细胞膜碎片,收集上清液。将上清液分别置于分光光度计的反应槽中,设置合适的检测波长:亚铁离子在 535 nm,MDA 在 532 nm,GSH 在 412 nm,GPX4 在 340 nm。根据吸光度值计算出各组细胞中亚铁离子、MDA、GSH、GPX4 水平。

1.3.6 β-半乳糖苷酶染色评估细胞衰老情况 β-半乳糖苷酶染色方法是通过检测细胞内 β-galactosidase (β-Gal) 活性来判断细胞老化程度。具体步骤如下:使用含有不同处理的髓核细胞培养物,包括对照组、模型组及经过 METTL14 过表达或敲除处理后的细胞。将培养好的细胞收集于离心管中,进行离心处理以去除培养基。使用 PBS 缓冲液洗涤细胞,并加入 4% 的多聚甲醛溶液进行细胞固定。在固定的细胞上加入 β-半乳糖苷酶染色液,在 37 °C 染色 12 h。使用显微镜观察染色结果,选择随机视野拍摄图像。对图像中的细胞进行计数,包括染色阳性和阴性细胞数。计算染色阳性细胞的百分比。同时,通过模型 + METTL14 + sh-ACSL4 组(即过表达 METTL14 基因同时沉默 ACSL4 基因)和模型 + sh-METTL14 + ACSL4 组(即同时沉默

METTL14 基因和过表达 ACSL4 基因)进行挽救实验,以探究 METTL14、ACSL4 在细胞衰老的调控机制和相互作用。

1.3.7 RNA 稳定性实验 为进一步探究 METTL14 对 ACSL4 表达的调控机制,本研究使用基因转录抑制剂放线菌素 D 对细胞进行干预,以模拟不同条件下 RNA 的稳定性变化。具体步骤如下:将人髓核细胞分别分为 sh-NC 组、sh-METTL14 组。sh-NC 组细胞作为对照组,sh-METTL14 组细胞用于敲除 METTL14 基因,分别给予 sh-NC 组和 sh-METTL14 组细胞相同浓度的放线菌素 D 处理,以抑制基因转录。使用 TRIzol 法从各组处理后的细胞中提取总 RNA。使用 RNA 纯化试剂盒进行 RNA 纯化,保证 RNA 的纯度和完整性。利用逆转录酶将 RNA 转录成 cDNA。使用特定的引物和探针对 ACSL4 基因进行 qRT-PCR。采用 β -actin 作为内参对数据进行标准化,以消除实验中的变异性。ACSL4 正向引物:5'-AGTGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG-3',反向引物:5'-CCACAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG-3',均为 20 bp; β -actin 正向引物:5'-AGAGCTACGAGCTGCCTGAC-3',反向引物:5'-TGAAGGTAGTTTCGTGGATGC-3',均为 20 bp,反应体系:10 μ L SYBR Green PCR Master Mix、0.5 μ L 正向引物、0.5 μ L 反向引物、1 μ L cDNA 模板、8 μ L nuclease-free。反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min,95 $^{\circ}$ C 变性 15 s,60 $^{\circ}$ C 退火 1 min,共 40 个循环。

1.3.8 qRT-PCR 检测 ACSL4 mRNA 相对表达量 为进一步研究 METTL14 对 ACSL4 的 m6A 甲基化的调控作用,笔者进行了甲基化 RNA 免疫共沉淀(MeRIP)实验,并结合 qRT-PCR 对 m6A 修饰的 ACSL4 mRNA 进行定量分析。笔者采用特异性抗体对 m6A 修饰的 RNA 进行免疫沉淀,随后提取 RNA,并使用逆转录酶将其转录为 cDNA。利用设计好的 ACSL4 基因的特异性引物进行 qRT-PCR,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算实验后 2、4、6、8 和 10 h ACSL4 mRNA 相对表达量。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 25.0 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)或中位数(下四分位数,上四分位数)[$M(P_{25}, P_{75})$]表示,比较用单因素方差分析、重复测量设计的方差分析或 H 检验,两两比较用 SNK- q 检验或 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 METTL14 诱导髓核细胞内铁过载

对照组、模型组、模型 + NC 组、模型 + METTL14 组亚铁离子水平分别为 (95.12 ± 12.46) 、 (165.20 ± 24.58) 、 (166.32 ± 37.74) 、 (221.14 ± 30.37) ,经单因素方差分析,差异有统计学意义($F = 23.215$, $P = 0.000$),模型组、模型 + METTL14 组分别较对照组、模型 + NC 组高($P < 0.05$)。

对照组、模型组、模型 + sh-NC 组、模型 + sh-METTL14 组亚铁离子水平分别为 (99.56 ± 12.79) 、 (171.65 ± 22.46) 、 (169.56 ± 31.46) 、 (125.67 ± 23.46) ,经单因素方差分析,差异有统计学意义($F = 26.781$, $P = 0.000$),模型组较对照组高($P < 0.05$),模型 + sh-METTL14 组较模型 + sh-NC 组低($P < 0.05$)。

2.2 METTL14 升高髓核细胞内 ROS 相对表达量

对照组、模型组、模型 + NC 组、模型 + METTL14 组、模型 + sh-NC 组、模型 + sh-METTL14 组 ROS 相对表达量分别为 $(100.00 \pm 27.63)\%$ 、 $(256.0 \pm 23.58)\%$ 、 $(263.30 \pm 37.63)\%$ 、 $(640.30 \pm 72.67)\%$ 、 $(263.30 \pm 13.01)\%$ 、 $(158.00 \pm 7.81)\%$,经单因素方差分析,差异有统计学意义($F = 69.440$, $P = 0.000$),模型组、模型 + METTL14 组分别较对照组、模型 + NC 组高($P < 0.05$),模型 + sh-METTL14 组较模型 + sh-NC 组低($P < 0.05$)。见图 1。

2.3 METTL14 升高髓核细胞内 MDA 水平、降低 GSH 和 GPX4 水平

对照组、模型组、模型 + NC 组、模型 + METTL14 组 MDA、GSH 及 GPX4 水平比较,经单因素方差分析,差异均有统计学意义($P < 0.05$),模型组、模型 + METTL14 组 MDA 水平分别较对照组、模型 + NC 组高($P < 0.05$),GSH、GPX4 水平分别较对照组、模型 + NC 组低($P < 0.05$)。见表 1。

对照组、模型组、模型 + sh-NC 组、模型 + sh-METTL14 组 MDA、GSH 及 GPX4 水平比较,经单因素方差分析,差异均有统计学意义($P < 0.05$),模型组 MDA 水平较对照组高($P < 0.05$),GSH、GPX4 水平较对照组低($P < 0.05$)。模型 + sh-METTL14 组 MDA 水平较模型 + sh-NC 组低($P < 0.05$),GSH 与 GPX4 水平较模型 + sh-NC 组高($P < 0.05$)。见表 1、2。

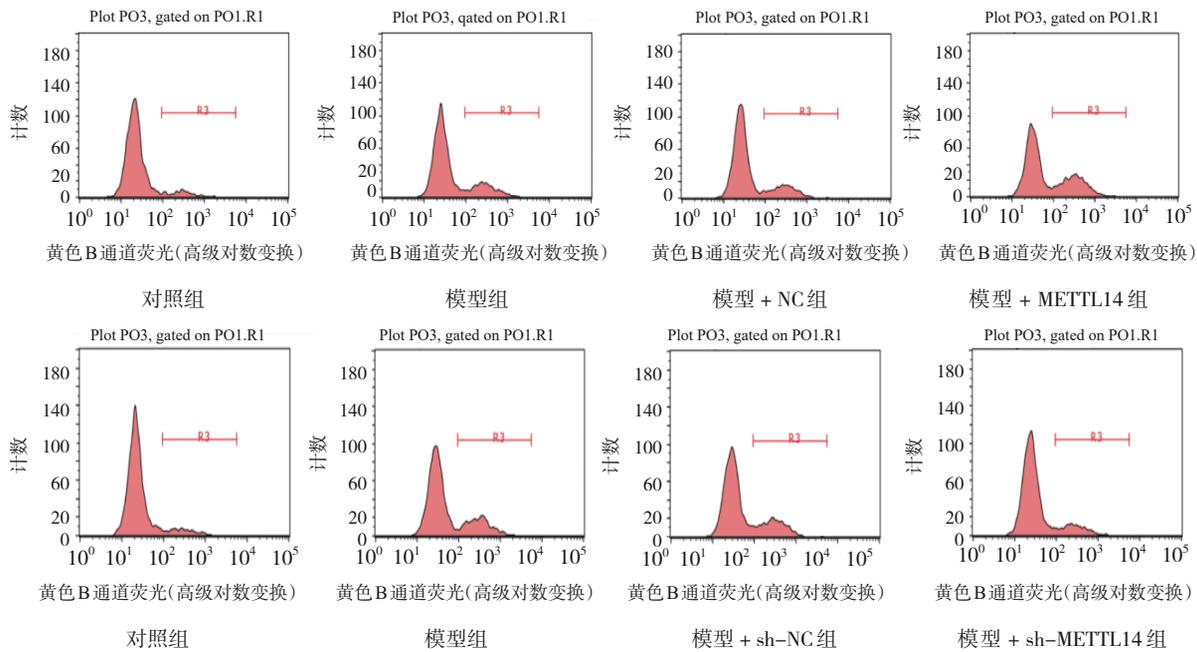


图 1 流式细胞术检测过表达和敲除 METTL14 对髓核细胞 ROS 水平的影响

表 1 对照组、模型组、模型 + NC 组、模型 + METTL14 组 MDA、GSH 及 GPX4 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	MDA/ (nmol/mg)	GSH/ ($\mu\text{mol/mg}$)	GPX4/ (u/mg)
对照组	99.64 \pm 11.46	98.12 \pm 12.54	99.17 \pm 11.46
模型组	148.64 \pm 19.46	69.20 \pm 22.78	75.20 \pm 24.58
模型 + NC 组	151.32 \pm 22.34	79.32 \pm 27.74	76.32 \pm 37.74
模型 + METTL14 组	201.14 \pm 20.37	51.14 \pm 30.37	41.14 \pm 30.37
F 值	16.834	18.456	19.579
P 值	0.000	0.000	0.000

表 2 对照组、模型组、模型 + sh-NC 组、模型 + sh-METTL14 组 MDA、GSH 及 GPX4 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	MDA/ (nmol/mg)	GSH/ ($\mu\text{mol/mg}$)	GPX4/ (u/mg)
对照组	99.12 \pm 12.79	97.35 \pm 12.94	99.67 \pm 13.64
模型组	147.46 \pm 18.84	79.20 \pm 22.86	75.56 \pm 24.87
模型 + sh-NC 组	151.79 \pm 22.65	81.32 \pm 27.64	76.32 \pm 27.67
模型 + sh-METTL14 组	101.14 \pm 18.56	91.14 \pm 30.37	91.14 \pm 30.64
F 值	21.479	19.744	21.464
P 值	0.000	0.000	0.000

2.4 METTL14 对髓核细胞线粒体膜电位的影响

对照组、模型组、模型 + NC 组、模型 + METTL14 组、模型 + sh-NC 组、模型 + sh-METTL14 组线粒体

膜电位下降细胞比例分别为 (0.08 \pm 0.02)、(0.21 \pm 0.03)、(0.22 \pm 0.03)、(0.60 \pm 0.07)、(0.24 \pm 0.01)、(0.14 \pm 0.02), 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F=90.270, P=0.000$)。模型组较对照组高 ($P < 0.05$), 模型 + METTL14 组较模型 + NC 组高 ($P < 0.05$), 模型 + sh-METTL14 组较模型 + sh-NC 组低 ($P < 0.05$)。见图 2。

2.5 METTL14 促进髓核细胞衰老

对照组、模型组、模型 + NC 组、模型 + METTL14 组 β -半乳糖苷酶染色阳性率分别为 (20.11 \pm 2.56)%、(31.64 \pm 2.87)%、(29.32 \pm 2.58)%、(39.54 \pm 2.84)% , 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F=14.247, P=0.000$) , 模型组较对照组高 ($P < 0.05$) , 模型 + METTL14 组较模型 + NC 组高 ($P < 0.05$)。见图 3。

对照组、模型组、模型 + sh-NC 组、模型 + sh-METTL14 组 β -半乳糖苷酶染色阳性率分别为 (20.46 \pm 2.46)%、(34.54 \pm 1.79)%、(36.79 \pm 2.65)%、(22.14 \pm 1.86)% , 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F=23.456, P=0.000$) , 模型组较对照组高 ($P < 0.05$) , 模型 + sh-METTL14 组较模型 + sh-NC 组低 ($P < 0.05$)。见图 4。

2.6 METTL14 促进 ACSL4 的表达

对照组、模型组、模型 + NC 组、模型 + METTL14 组 ACSL4 蛋白相对表达量分别为 (0.21 \pm

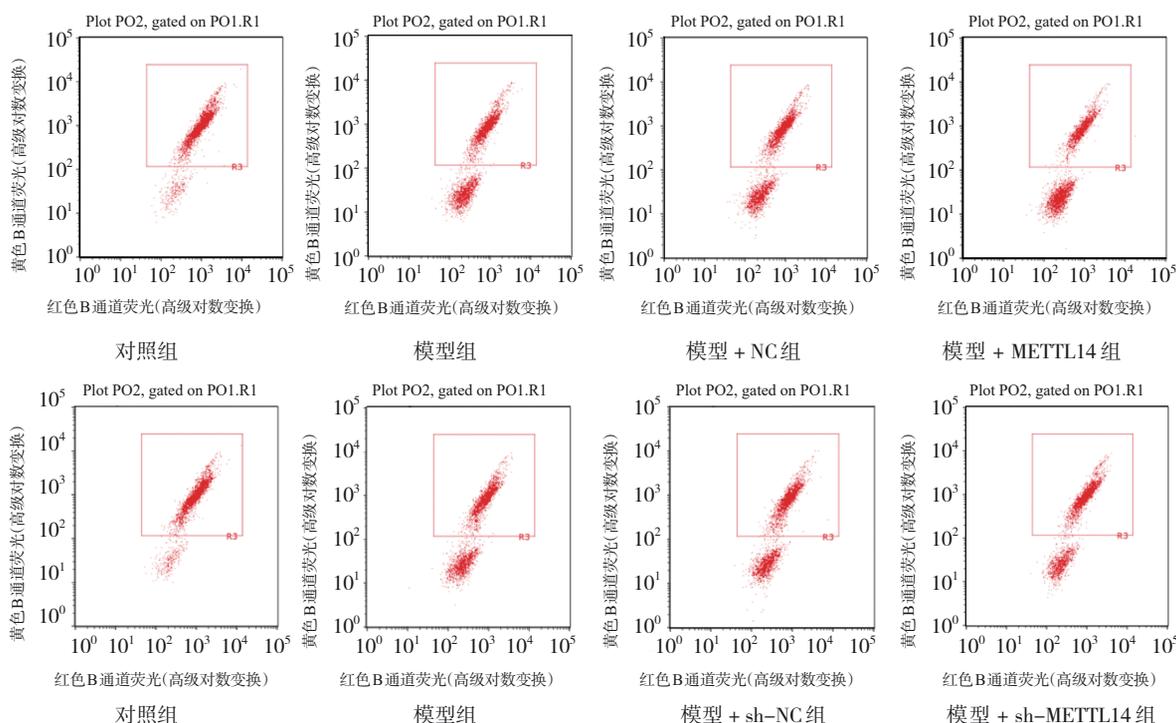


图2 流式细胞术检测过表达和敲除METTL14对髓核细胞线粒体膜电位的影响

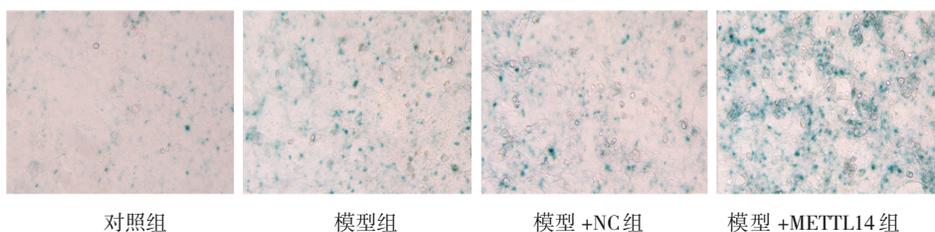


图3 过表达METTL14对髓核细胞衰老的影响 (β-半乳糖苷酶染色×200)

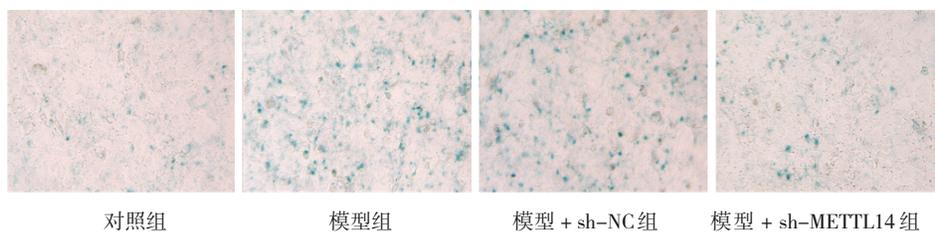
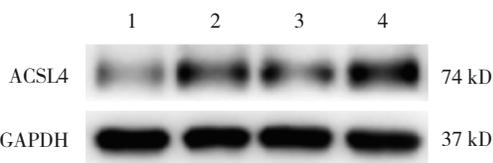


图4 敲除METTL14对髓核细胞衰老的影响 (β-半乳糖苷酶染色×200)

0.14)、(0.54 ± 0.09)、(0.59 ± 0.08)、(0.92 ± 0.08), 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 27.746$, $P = 0.000$), 模型组较对照组高 ($P < 0.05$), 模型 + METTL14 组较模型 + NC 组高 ($P < 0.05$)。见图 5。

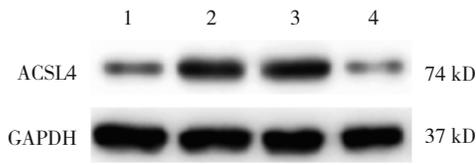
对照组、模型组、模型 + sh-NC 组、模型 + sh-METTL14 组 ACSL4 蛋白相对表达量分别为 (0.51 ± 0.08)、(0.72 ± 0.07)、(0.73 ± 0.06)、(0.52 ± 0.08), 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 17.462$, $P =$



1: 对照组; 2: 模型组; 3: 模型 + NC 组; 4: 模型 + METTL14 组。

图5 蛋白条带图

0.000), 模型组较对照组高 ($P < 0.05$), 模型 + sh-METTL14 组较模型 + sh-NC 组低 ($P < 0.05$)。表明 METTL14 促进 ACSL4 的表达。见图 6。



1: 对照组; 2: 模型组; 3: 模型 + METTL14 组; 4: 模型 + sh-METTL14 组。

图 6 蛋白条带图

2.7 METTL14 调控 ACSL4 的稳定性而影响其表达

模型 + sh-NC 组与模型 + sh-METTL14 组不同时间点的 ACSL4 mRNA 相对表达量比较, 经重复测量数据的方差分析, 结果: ①不同时间点的 ACSL4 mRNA 相对表达量比较有差异 ($F=8.963, P=0.000$); ②两组 ACSL4 mRNA 相对表达量比较有差异 ($F=$

$5.509, P=0.000$), 模型 + sh-METTL14 组较模型 + sh-NC 组低; ③两组 ACSL4 mRNA 相对表达量的变化趋势比较有差异 ($F=20.712, P=0.000$)。见图 7 和表 3。

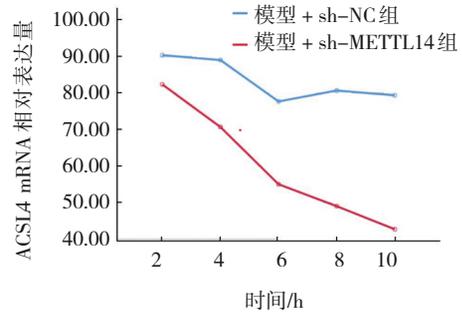


图 7 模型 + sh-NC 组与模型 + sh-METTL14 组不同时间点 ACSL4 mRNA 相对表达量的变化趋势

表 3 模型 + sh-NC 组与模型 + sh-METTL14 组不同时间点 ACSL4 mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h
模型 + sh-NC 组	90.33 ± 1.53	89.00 ± 3.60	84.33 ± 2.08	80.67 ± 5.13	79.33 ± 8.39
模型 + sh-METTL14 组	82.33 ± 2.51	70.67 ± 1.16	55.00 ± 5.00	49.00 ± 1.00	42.67 ± 2.52

2.8 METTL14 通过调控 ACSL4 促进髓核细胞衰老

挽救实验结果显示, 对照组、模型组、模型 + oe-NC + sh-NC 组、模型 + METTL14 + sh-NC 组、模型 + METTL14 + sh-ACSL4 组 β -半乳糖苷酶染色阳性率分别为 (21.56 ± 2.46)%、(26.46 ± 2.78)%、(25.97 ± 2.48)%、(44.79 ± 3.43)%、(38.54 ± 3.13)%、(22.79 ± 2.17)%、(28.46 ± 3.78)%。经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F=19.544, P=0.000$); 模型组较对照组高 ($P<0.05$), 模型 + METTL14 + sh-NC 组较模型组高 ($P<0.05$)。

见图 8。

对照组、模型组、模型 + oe-NC + sh-NC 组、模型 + sh-METTL14 + oe-NC 组、模型 + sh-METTL14 + ACSL4 组 β -半乳糖苷酶染色阳性率分别为 (20.46 ± 1.46)%、(36.79 ± 2.44)%、(35.95 ± 2.74)%、(22.79 ± 2.17)%、(28.46 ± 3.78)%。经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F=17.543, P=0.000$), 模型组较对照组高 ($P<0.05$), 模型 + sh-METTL14 + oe-NC 组较模型组低 ($P<0.05$)。见图 8。

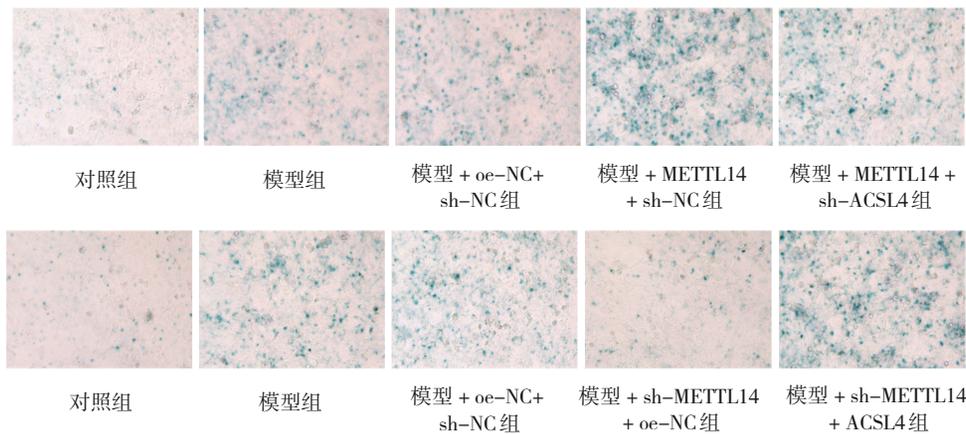


图 8 挽救实验验证 ACSL4 对 METTL14 促进髓核细胞衰老的介导作用 ($\times 200$)

3 讨论

目前为止,椎间盘退变发生、发展的分子生物学及细胞生物学机制尚未明确,进一步揭示其发病机制对开发针对性的治疗方式有着极为重要的意义。本研究旨在探讨 METTL14 通过介导 ACSL4 的 m6A 甲基化促进髓核细胞铁死亡及细胞衰老的机制。铁代谢在细胞内起重要的调节作用,而铁过载与细胞死亡、衰老等病理过程密切相关。

铁是细胞内重要的营养元素,但过量的铁会导致细胞内铁过载,产生大量的自由基,从而引起氧化应激和细胞损伤^[16-17]。本研究发现 METTL14 可以诱导髓核细胞内铁过载,这与之前的研究结果一致^[18]。以往研究表明,铁过载可以导致细胞内 ROS 水平增加,从而引发氧化应激反应,最终导致细胞凋亡和衰老。因此,笔者推测 METTL14 通过介导 ACSL4 的 m6A 甲基化,促进了髓核细胞内铁过载,参与了细胞死亡和衰老的调控过程。

ROS 是氧化应激的重要指标,细胞内 ROS 水平的升高可以导致氧化蛋白质、脂质和核酸,最终引发细胞损伤和凋亡。本研究结果显示, METTL14 的过表达可以显著提高髓核细胞内 ROS 水平,而敲除 METTL14 则可以降低 ROS 水平。这表明 METTL14 在调控髓核细胞内 ROS 水平中发挥了重要作用。相关研究表明,ROS 的产生与铁代谢密切相关,铁过载可以促进 ROS 的产生,而 ROS 又可以进一步促进铁的积累,形成恶性循环^[19]。因此, METTL14 通过调控髓核细胞内 ROS 水平,可能参与了铁死亡和细胞衰老的调控过程。

MDA 是脂质过氧化的产物,是氧化应激的重要指标之一。本研究观察到 METTL14 的过表达可以增加髓核细胞内 MDA 水平,降低 GSH、GPX4 水平,而敲除 METTL14 则可以逆转这一趋势。这表明 METTL14 在调控髓核细胞内氧化应激反应中发挥了重要作用。相关研究表明, GSH 和 GPX4 是细胞内的重要抗氧化物质,可以清除 ROS,保护细胞免受氧化损伤^[20]。因此, METTL14 通过调控髓核细胞内 MDA、GSH 和 GPX4 水平,可能参与了细胞氧化应激和衰老的调控过程。

线粒体是细胞内的重要能量中心,线粒体膜电位是维持线粒体功能和细胞代谢的重要指标。本研究观察到 METTL14 的过表达可以导致髓核细胞

内线粒体膜电位下降,而敲除 METTL14 则可以逆转这一趋势。这表明 METTL14 在调控髓核细胞线粒体功能中发挥了重要作用。相关研究表明,线粒体功能的损害与细胞凋亡和衰老密切相关,线粒体膜电位的下降可能会引发线粒体通透性转变,释放细胞色素 c 等凋亡因子,最终导致细胞凋亡^[21-22]。因此, METTL14 通过调控髓核细胞线粒体膜电位,可能参与了细胞死亡和衰老的调控过程。

本研究 β -半乳糖苷酶染色实验结果显示,模型组 β -半乳糖苷酶染色阳性率高于对照组,而过表达 METTL14 导致 β -半乳糖苷酶染色阳性率增加,敲除 METTL14 则导致 β -半乳糖苷酶染色阳性率降低,这表明 METTL14 在髓核细胞衰老过程中发挥了促进作用。进一步的实验结果显示, METTL14 可以促进 ACSL4 的表达,并且调控 ACSL4 的稳定性,影响其表达水平。MeRIP-qRT-PCR 实验结果表明,敲除 METTL14 后, ACSL4 的 m6A 甲基化水平显著降低,而 RNA 稳定性实验结果显示,模型 + sh-METTL14 组 ACSL4 的 mRNA 降解速度较快。这表明 METTL14 通过调控 ACSL4 的 m6A 甲基化水平和稳定性来影响 ACSL4 的表达水平。本研究挽救实验结果显示,模型 + METTL14 + sh ACSL4 组的髓核细胞 β -半乳糖苷酶染色阳性率较低,表明 METTL14 通过调控 ACSL4 促进了髓核细胞的衰老过程。

综上所述, METTL14 通过介导 ACSL4 的 m6A 甲基化促进了髓核细胞的铁死亡和细胞衰老过程。这一发现对于深入理解髓核细胞的病理生理过程有重要意义,为相关疾病的治疗提供了新的靶点和策略。然而,本研究还存在一些局限性,如未探讨其他可能参与的信号通路、机制研究不够深入等,需要进一步的研究来验证和完善结论。

参考文献:

- [1] FRANCISCO V, PINO J, GONZÁLEZ-GAY M, et al. A new immunometabolic perspective of intervertebral disc degeneration[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2022, 18(1): 47-60.
- [2] OICHI T, TANIGUCHI Y, OSHIMA Y, et al. Pathomechanism of intervertebral disc degeneration[J]. *JOR Spine*, 2020, 3(1): e1076.
- [3] 王啸华, 谢林. 椎间盘退变的生物疗法研究进展[J]. *中医正骨*, 2023, 35(07): 40-45.
- [4] 潘成, 江华. 线粒体稳态在椎间盘退变中的作用[J]. *中国矫形外科杂志*, 2023, 31(12): 1102-1105.
- [5] 陈大智. 椎间盘退变差异表达 mRNAs 的生物信息学分析[D].

- 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2022.
- [6] 田增辉, 陈云刚, 李颖颖, 等. 干细胞外泌体治疗椎间盘退变作用机制的研究进展[J]. 中医正骨, 2022, 34(12): 56-59.
- [7] GRANVILLE SMITH I, DANCKERT N P, FREIDIN M B, et al. Evidence for infection in intervertebral disc degeneration: a systematic review[J]. *Eur Spine J*, 2022, 31(2): 414-430.
- [8] KAMALI A, ZIADLOU R, LANG G, et al. Small molecule-based treatment approaches for intervertebral disc degeneration: current options and future directions[J]. *Theranostics*, 2021, 11(1): 27-47.
- [9] LI G, LUO R, ZHANG W, et al. m6A hypomethylation of DNMT3B regulated by ALKBH5 promotes intervertebral disc degeneration via E4F1 deficiency[J]. *Clin Transl Med*, 2022, 12(3): e765.
- [10] LI G, MA L, HE S, et al. WTAP-mediated m(6)A modification of lncRNA NORAD promotes intervertebral disc degeneration[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 1469.
- [11] 朱斌. N6-甲基腺苷(m6A)修饰在小鼠腰椎间盘退变中的相关研究[D]. 衡阳: 南华大学, 2021.
- [12] CHEN Z, SONG J, XIE L, et al. N6-methyladenosine hypomethylation of circGPATCH2L regulates DNA damage and apoptosis through TRIM28 in intervertebral disc degeneration[J]. *Cell Death Differ*, 2023, 30(8): 1957-1972.
- [13] 郑振中, 王冰, 李亚伟, 等. DNA 甲基化调控椎间盘退变的研究进展[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2023, 33(12): 1128-1132.
- [14] 张旭阳. 高同型半胱氨酸促进 GPX4 甲基化介导髓核氧化/还原失衡在腰椎间盘退变中的作用机制研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2021.
- [15] LIAO Z, LIU H, MA L, et al. Engineering extracellular vesicles restore the impaired cellular uptake and attenuate intervertebral disc degeneration[J]. *ACS Nano*, 2021, 15(9): 14709-14724.
- [16] WANG W, JING X, DU T, et al. Iron overload promotes intervertebral disc degeneration via inducing oxidative stress and ferroptosis in endplate chondrocytes[J]. *Free Radic Biol Med*, 2022, 190: 234-246.
- [17] FAN C, CHU G, YU Z, et al. The role of ferroptosis in intervertebral disc degeneration[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2023, 11: 1219840.
- [18] CHEN J, YANG X, FENG Y, et al. Targeting ferroptosis holds potential for intervertebral disc degeneration therapy[J]. *Cells*, 2022, 11(21): 3508.
- [19] ZHOU L P, ZHANG R J, JIA C Y, et al. Ferroptosis: A potential target for the intervention of intervertebral disc degeneration[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022, 13: 1042060.
- [20] ZHANG P, RONG K, GUO J, et al. Cynarin alleviates intervertebral disc degeneration via protecting nucleus pulposus cells from ferroptosis[J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 165: 115252.
- [21] DAI Z, XIA C, ZHAO T, et al. Platelet-derived extracellular vesicles ameliorate intervertebral disc degeneration by alleviating mitochondrial dysfunction[J]. *Mater Today Bio*, 2023, 18: 100512.
- [22] KANG L, LIU S, LI J, et al. The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ protects against intervertebral disc degeneration by ameliorating mitochondrial dysfunction and redox imbalance[J]. *Cell Prolif*, 2020, 53(3): e12779.

(李科 编辑)

本文引用格式: 陈特, 肖权洲, 孙杨, 等. METTL14 介导 ACSL4 的 m6A 甲基化在髓核细胞铁死亡和细胞衰老中的作用[J]. 中国现代医学杂志, 2024, 34(20): 31-39.

Cite this article as: CHEN T, XIAO Q Z SUN Y, et al. Role of METTL14-mediated m6A methylation of ACSL4 in ferroptosis and senescence of nucleus pulposus cells[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2024, 34(20): 31-39.