

METTL3 在同型半胱氨酸诱导小鼠胰岛 β 细胞自噬中的作用马凌桔^{1,2}, 汪乐新², 迟宏扬^{2,3}, 张竞文², 彭红建^{2,4}, 高春兰^{2,5}, 姜怡邓², 黄晖¹, 杨力¹, 马胜超^{2,3}<https://doi.org/10.12307/2024.423>

投稿日期: 2023-06-06

采用日期: 2023-07-24

修回日期: 2023-08-10

在线日期: 2023-08-23

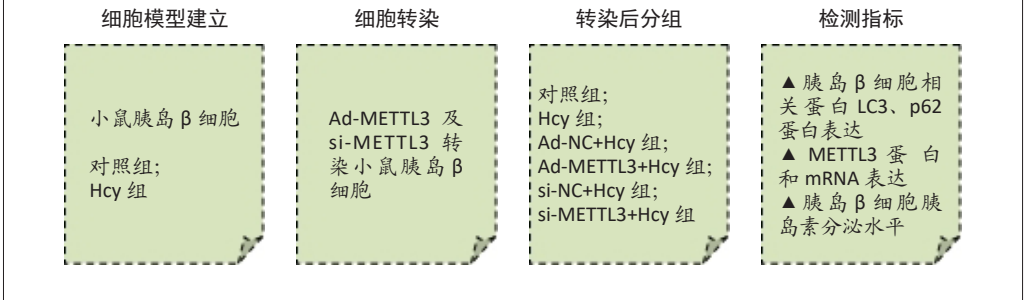
中图分类号:

R496; R318; R446

文章编号:

2095-4344(2024)26-04221-05

文献标识码: A

文章快速阅读: METTL3 参与了同型半胱氨酸诱导胰岛 β 细胞的自噬调控

文题释义:

自噬: 是指以胞质空泡化为特征依赖于溶酶体的一种降解途径, 在维持细胞内稳态中发挥重要作用, 自噬标志物微管相关蛋白 I 轻链 3 (LC3)、Beclin-1 蛋白及 p62 蛋白反映了自噬流的水平。

N6 甲基腺苷甲基转移酶 (METTL3): 是 m6A 甲基转移酶复合体亚复合物 MT-ADE 含甲基供体 S-腺苷甲硫氨酸的结合位点, 分子质量 70 kD, 在转录后水平发挥重要调控作用, 包括前体 mRNA 的剪接、成熟 mRNA 的输出、mRNA 的稳定性调节等。

摘要

背景: 高同型半胱氨酸 (homocysteine, Hcy) 血症与胰岛 β 细胞功能密切相关, 但其具体分子机制尚不完全明确。

目的: 探讨 METTL3 在 Hcy 诱导小鼠胰岛 β 细胞自噬中的作用。

方法: 取第 3, 4 代小鼠胰岛 β 细胞进行实验。① 细胞模型建立和分组: 对照组细胞不加入 Hcy, Hcy 组细胞加入浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ Hcy 干预 48 h; ② 按 Lipofectamine™ 2000 说明书将过表达质粒 Ad-METTL3 及 si-METTL3 转染小鼠胰岛 β 细胞, 设计 3 种不同干扰片段, PCR 验证、筛选出干扰效率最好的干扰片段; ③ 转染后实验分组: 对照组、Hcy 组、Ad-NC (阴性对照)+Hcy 组、Ad-METTL3+Hcy 组、si-NC (阴性对照)+Hcy 组和 si-METTL3+Hcy 组; ④ 采用 qRT-PCR 及 Western blot 检测细胞中 METTL3 及细胞自噬相关蛋白 LC3 II / I、p62 的表达; ELISA 法测定胰岛素水平来评价胰岛 β 细胞胰岛素分泌能力; 分别过表达和干扰 METTL3 后检测细胞自噬相关蛋白及胰岛素水平。

结果与结论: ① 与对照组相比, Hcy 组自噬相关蛋白 LC3 II / I 的表达水平升高 ($P < 0.05$), 而 p62 表达明显降低 ($P < 0.05$), 胰岛素分泌能力明显下降 ($P < 0.05$); ② 与对照组相比, Hcy 组中 METTL3 蛋白及 mRNA 水平表达均降低 ($P < 0.05$); ③ 胰岛 β 细胞中沉默 METTL3 后, Hcy 进一步上调了细胞中 LC3 II / I 的表达 ($P < 0.05$), 而 p62 表达显著下降 ($P < 0.05$), 细胞中胰岛素水平增加 ($P < 0.05$); 过表达 METTL3 后, Hcy 则使 LC3 II / I 表达显著降低且 p62 表达则增高 ($P < 0.05$); ④ 结论: METTL3 参与了 Hcy 诱导的胰岛 β 细胞自噬调控, 对胰岛素的分泌发挥着调控作用。

关键词: N6-甲基腺苷甲基转移酶 3; 胰岛 β 细胞; 同型半胱氨酸; 细胞自噬; LC3 II / I

Role of METTL3 in homocysteine-induced autophagy in mouse islet beta cells

Ma Lingju^{1,2}, Wang Lexin², Chi Hongyang^{2,3}, Zhang Jingwen², Peng Hongjian^{2,4}, Gao Chunlan^{2,5}, Jiang Yideng², Huang Hui¹, Yang Li¹, Ma Shengchao^{2,3}

¹Department of Geriatrics and Special Need Medicine, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China; ²Key Laboratory of Metabolic Cardiovascular Disease Research of National Health Commission, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China; ³School of Inspection, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China; ⁴College of Chemistry and Chemical Engineering, Central South University, Changsha 410083, Hunan Province, China; ⁵The First People's Hospital of Yinchuan, Yinchuan 750001, Ningxia Hui Autonomous Region, China

Ma Lingju, Master, Physician, Department of Geriatrics and Special Need Medicine, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China; Key Laboratory of Metabolic Cardiovascular Disease Research of National Health Commission, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China

Corresponding author: Ma Shengchao, MD, Associate professor, Key Laboratory of Metabolic Cardiovascular Disease Research of National Health Commission, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China; School of Inspection, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China

¹宁夏医科大学总医院老年与特需医学科, 宁夏回族自治区银川市 750004; ²国家卫生健康委员会代谢性心血管疾病研究重点实验室, 宁夏回族自治区银川市 750004; ³宁夏医科大学检验学院, 宁夏回族自治区银川市 750004; ⁴中南大学化学化工学院, 湖南省长沙市 410083; ⁵银川市第一人民医院, 宁夏回族自治区银川市 750001

第一作者: 马凌桔, 男, 1994 年生, 宁夏回族自治区平罗县人, 回族, 2022 年宁夏医科大学毕业, 硕士, 医师, 主要从事老年慢性代谢性疾病的研究。
通讯作者: 马胜超, 博士, 副教授, 国家卫生健康委员会代谢性心血管疾病研究重点实验室, 宁夏回族自治区银川市 750004; 宁夏医科大学检验学院, 宁夏回族自治区银川市 750004

<https://orcid.org/0009-0003-5188-3181> (马凌桔)

基金资助: 国家自然科学基金青年项目 (81900273), 项目负责人: 马胜超; 国家自然科学基金地区项目 (82060139, 82270492), 项目负责人: 马胜超; 宁夏自治区自然科学基金优秀青年项目 (2023AAC05035), 项目负责人: 马胜超; 宁夏回族自治区重点研发计划项目 (2019BEG03006), 项目负责人: 张竞文; 宁夏医科大学校级重点项目 (XZ2022004), 项目负责人: 彭红建

引用本文: 马凌桔, 汪乐新, 迟宏扬, 张竞文, 彭红建, 高春兰, 姜怡邓, 黄晖, 杨力, 马胜超. METTL3 在同型半胱氨酸诱导小鼠胰岛 β 细胞自噬中的作用 [J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(26):4221-4225.



Abstract

BACKGROUND: Hyperhomocysteinemia is closely related to the function of islet β cells, but its specific molecular mechanism is not fully understood.

OBJECTIVE: To investigate the role of N6 methyltransferase-like 3 (METTL3) in homocysteine (Hcy)-induced autophagy of mouse islet β cells.

METHODS: The 3rd and 4th generation mouse islet β cells were taken for the experiment. (1) Cell modeling and grouping: cells in control group were not treated with Hcy, while those in homocysteine group were treated with 100 μ mol/L Hcy for 48 hours. (2) The mouse islet β -cells were transfected with the plasmids overexpressing Ad-METTL3 and si-METTL3 according to the instructions of Lipofectamine™ 2000. Three different interfering fragments were designed, and the one with the best interfering efficiency was verified and screened by PCR. (3) After transfection, the cells were divided into control group, Hcy group, Ad-NC (negative control)+Hcy group, Ad-METTL3+Hcy group, si-NC (negative control)+Hcy group and si-METTL3+Hcy group. (4) qRT-PCR and western blot were used to detect the expression levels of METTL3 and autophagy-related proteins LC3II/I and p62 in cells. Insulin level was determined by ELISA to evaluate insulin secretion capacity of islet cells. Autophagy-related proteins and insulin level were detected after overexpression and interference with METTL3.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the control group, the expression level of LC3II/I was increased ($P < 0.05$), the expression of p62 was significantly reduced ($P < 0.05$), and the insulin secretion capacity was significantly decreased ($P < 0.05$) in the Hcy group. Compared with the control group, the protein and mRNA levels of METTL3 were reduced in the Hcy group ($P < 0.05$). After METTL3 silencing in islet β cells, Hcy further upregulated the expression of LC3II/I ($P < 0.05$), significantly downregulated the expression of p62 ($P < 0.05$), and increased the insulin level ($P < 0.05$). After overexpression of METTL3, Hcy significantly decreased the LC3II/I expression and increased the p62 expression in islet β cells ($P < 0.05$). To conclude, METTL3 is involved in the Hcy-induced autophagy regulation of islet β cells and plays a role in the regulation of insulin secretion.

Key words: methyltransferase-like 3; islet β cell; homocysteine; autophagy; LC3II/I

Funding: the National Natural Science Foundation of China (Youth Project), No. 81900273 (to MSC); National Natural Science Foundation of China (Regional Project), Nos. 82060139 and 82270492 (to MSC); Outstanding Youth Project of Natural Science Foundation of Ningxia Autonomous Region, No. 2023AAC05035 (to MSC); the Key Research and Development Program of Ningxia Hui Autonomous Region, No. 2019BEG03006 (to ZJW); The School-level Key Project of Ningxia Medical University, No. XZ2022004 (to PHJ)

How to cite this article: MA LJ, WANG LX, CHI HY, ZHANG JW, PENG HJ, GAO CL, JIANG YD, HUANG H, YANG L, MA SC. Role of METTL3 in homocysteine-induced autophagy in mouse islet beta cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2024;28(26):4221-4225.

0 引言 Introduction

循证医学证据表明同型半胱氨酸 (homocysteine, Hcy) 是一种反应性血管损伤氨基酸^[1], 高 Hcy 血症是心血管和其他代谢性疾病的独立危险因素, 涉及脏器多、危害性大, 流行病学调查显示 2 型糖尿病患者血清 Hcy 水平明显高于正常组, 高 Hcy 血症与 2 型糖尿病是相互影响、互为加重的关系^[2], 目前 Hcy 引起血糖异常的分子机制尚不完全明确。自噬是细胞器和大分子物质周转以及营养物质循环的过程^[3], 是细胞清除受损和有害物质、维持自身稳态的重要机制, 自噬可能参与了胰岛素合成、分泌、储存以及释放过程, 可维持和保护胰岛 β 细胞的数量、结构和功能^[4]。课题组也证实: Hcy 可显著激活肝细胞自噬调控^[5], 但 Hcy 能否引起胰岛 β 细胞自噬及其相关调控机制尚未见报道。

N6-甲基腺苷甲基转移酶 3 (methyltransferase-like 3, METTL3) 是 N6-甲基腺苷修饰过程中最主要的活性催化酶^[6], 在包括细胞周期进程、细胞增殖和分化、细胞迁移和侵袭、细胞自噬和炎症反应等多种生物过程中发挥重要作用。最近也有研究发现 METTL3 在炎症和氧化应激条件表达降低, 胰岛 β 细胞特异性缺失 METTL3 诱导 β 细胞凋亡^[7], 而 METTL3 在胰岛 β 细胞自噬调控中的作用罕见报道。故此次研究以 Hcy 作用的胰岛 β 细胞为模型, 观察细胞自噬相关蛋白的表达, 采用阻断为主的策略确定 METTL3 在自噬调控中的作用, 将为防治 Hcy 引起胰岛 β 细胞功能受损提供理论依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学实验观察。

1.2 时间及地点 实验于 2022 年 8 月至 2023 年 6 月在国家卫生健康委代谢性心血管疾病研究重点实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 细胞 小鼠胰岛 β 细胞株 (Min6, 上海晶抗生物工程有

限公司); DMEM 培养基、胎牛血清 (美国 Gibco 公司); Hcy 粉末 (Sigma 公司); 青霉素-链霉素双抗、胰蛋白酶 (北京碧云天生物技术公司); 蛋白提取试剂盒 (中国上海凯基生物技术有限公司); 胰岛素浓度 ELISA 测定试剂盒 (江苏晶美生物科技有限公司); 兔抗 LC3 单克隆抗体 (货号 ab192890)、兔抗 p62 单克隆抗体 (货号 ab109012) (美国 Abcam 公司); HRP 标记的山羊抗兔二抗 (货号 ZB-2306, 北京中杉金桥生物技术有限公司); 总 RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、荧光 PCR 试剂盒 (中国北京天根公司); METTL3 上下游引物 (中国上海生物生物工程公司); METTL3 干扰、过表达质粒 (Ad-METTL3、si-METTL3) 及阴性对照 (Ad-NC、si-NC) (上海吉玛制药技术有限公司); 蛋白上样缓冲液 (上海碧云天有限公司); 化学发光显色剂 (中国新赛美公司); 荧光定量 PCR 仪 (德国 Analytik Jena AG 公司); Bio-Rad 凝胶成像系统显影 (货号 MG8600, Thmorgan 公司); CO₂ 培养箱和 5415D 型微量台式离心机 (美国 Eppendorf 公司); 超净工作台 (中国苏州安泰有限公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 细胞模型建立与分组 用含有体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 条件下培养小鼠胰岛 β 细胞, 每 2 d 换液, 取对数增长期第 3, 4 代细胞用于实验。对照组细胞不加入 Hcy, Hcy 组细胞加入浓度为 100 μ mol/L Hcy 干预, 48 h 后, 将细胞收集于离心管中进行后续 Western blot 和 qRT-PCR 检测实验^[8]。

1.4.2 细胞转染与分组 根据 Lipofectamine™ 2000 说明书将过表达质粒 Ad-METTL3 及 si-METTL3 转染小鼠胰岛 β 细胞。转染前在 250 μ L 的 DMEM 培养基中接种 2×10^5 个细胞, 待细胞生长密度达到 70% 时, 开始进行转染。配制转染液, A 液: 250 μ L DMEM 纯培养基与 5 μ L 的 Ad-METTL3 或 si-METTL3 混合, 吹打两三次混匀; B 液: 250 μ L DMEM 纯培养基与 6 μ L 的 Lipofectamine™ 2000 混合, 吹打两三次混匀, 静

置 5 min。将 A 液加 B 液混匀吹打两三次，于室温下静置 20 min，加入 350 μ L 纯培养基混匀。将培养瓶置于 37 $^{\circ}$ C、体积分数 5%CO₂ 培养箱中培养，8 h 后更换培养液，Hcy 干预 48 h 后收细胞，以便进行后续其他实验。

实验分组：转染 Ad-METTL3 及 si-METTL3 后，PCR 分组：**①**对照组（不做处理）、Ad-NC+Hcy 组、Ad-METTL3 组；**②**对照组（不做处理）、si-NC+Hcy 组和 si-METTL3-1 组、si-METTL3-2 组、si-METTL3-3 组，设计 3 种不同干扰片段，PCR 验证、筛选出干扰效率最好的干扰片段。Western blot 分组：**①**对照组（不做处理）、Hcy 组、Ad-NC+Hcy 组、Ad-METTL3+Hcy 组；**②**对照组（不做处理）、Hcy 组、si-NC+Hcy 组和 si-METTL3+Hcy 组。

1.4.3 Western blot 检测细胞自噬相关蛋白 LC3 II / I、p62 及 METTL3 蛋白表达 收集各组细胞，用 5 000 r/min 离心 5 min，弃上清，根据凯基蛋白提取试剂盒说明书提取总蛋白，用 BCA 法测定浓度定量，加 50 μ L 蛋白上样缓冲液，金属浴 99 $^{\circ}$ C 煮沸 5 min 变性，经 SDS-PAGE 凝胶电泳 90 V 20 min，120 V 30 min 湿转 2 h 转移至 PVDF 膜，5% 脱脂牛奶封闭 2 h，用稀释比 1 : 1 000 的兔抗 P62、兔抗 LC3、兔抗 METTL3，抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜，PBST 液洗膜 3 次，每次 10 min，用稀释比 1 : 1 000 的兔二抗孵育 2 h，PBST 液洗膜 3 次，每次 10 min，通过 Image Lab 图像分析进行扫描采取图像，以 β -actin 为内参，计算 P62、LC3 II / I 和 METTL3 与 β -actin 内参灰度值的比值做定量分析。

1.4.4 qRT-PCR 方法检测 METTL3 的 mRNA 表达水平 收集各组细胞，按照试剂盒相关步骤进行总 RNA 的提取，反转录成 cDNA 后进行 qRT-PCR 的检测。采用 GenBank 数据库查询 METTL3 基因序列并设计引物。METTL3：上游：5'-CTG GGC ACT TGG ATT TAA GGA A-3'；下游：5'-TGA GAG GTG GTG TAG CAA CTT-3'。荧光定量 PCR 扩增程序：95 $^{\circ}$ C 30 s，95 $^{\circ}$ C 5 s，60 $^{\circ}$ C 35 s，共 40 个循环，并以内参 GAPDH 为对照进行平衡，同体系扩增目的基因的相对量。反应结束后，根据扩增曲线数据，根据公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算， $\Delta\Delta Ct = [Ct \text{ 目的基因 (待测样本)} - Ct \text{ GAPDH (待测样本)}] - [Ct \text{ 目的基因 (校正样本)} - Ct \text{ GAPDH (校正样本)}]$ 。

1.4.5 酶联免疫吸附测定胰岛素分泌水平 空白对照组，Hcy 组，si-NC+Hcy 组，si-METTL3 组细胞培养 24 h 后，分别以 2.8 mmol/L 和 30 mmol/L 葡萄糖刺激 1 h，吸取上清溶液，按照胰岛素 ELISA 试剂盒说明书进行。根据标准曲线计算胰岛素水平。

1.5 主要观察指标 **①** Hcy 对胰岛 β 细胞自噬的影响；**②** Hcy 对 METTL3 蛋白和 mRNA 的影响；**③** Hcy 对的胰岛 β 细胞分泌胰岛素的影响；**④** 过表达和沉默 METTL3 在胰岛 β 细胞中对自身表达的影响；**⑤** 过表达和沉默 METTL3 对 Hcy 诱导胰岛 β 细胞自噬的影响。

1.6 统计学分析 上述实验结果均为计量资料，采用 Graphpad Prism 9.3 统计软件对实验数据进行统计分析，符合正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示，两样本均数间结果的比较采用独立样本 *t* 检验，多样本比较采用单因素方差分析， $P < 0.05$ 为

差异有显著性意义。文章的统计学方法已经由宁夏医科大学统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 Hcy 对胰岛 β 细胞自噬水平的影响 用 Western blot 检测小鼠胰岛 β 细胞自噬相关蛋白 LC3 II / I 与 p62 的表达水平，结果显示，与对照组相比，Hcy 组自噬相关蛋白 LC3 II / I 的表达升高 ($P < 0.05$)，而 p62 表达明显降低 ($P < 0.05$)，见图 1。

2.2 Hcy 对 METTL3 蛋白及 mRNA 的影响 用 Western blot 检测小鼠胰岛 β 细胞 METTL3 蛋白表达水平，结果显示，与对照组相比，Hcy 组 METTL3 表达水平降低 ($P < 0.05$)；用 qRT-PCR 检测小鼠胰岛 β 细胞 METTL3 的 mRNA 表达水平，结果显示，与对照组相比，Hcy 组中的 mRNA 表达降低 ($P < 0.05$)，见图 2。

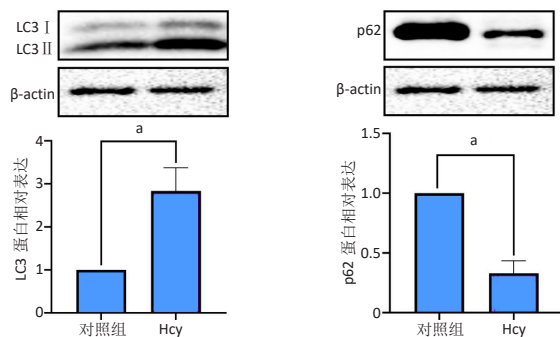
2.3 Hcy 对的胰岛 β 细胞分泌胰岛素的影响 为了了解 Hcy 对小鼠胰岛 β 细胞胰岛素分泌能力，采用 ELISA 法测定胰岛素含量。与空白对照组比较，Hcy 组小鼠胰岛 β 细胞分泌胰岛素水平降低 ($P < 0.05$)。与 si-NC+Hcy 组比较，si-METTL3 组小鼠胰岛 β 细胞分泌胰岛素水平升高 ($P < 0.05$)，见图 3。

2.4 过表达和沉默 METTL3 在胰岛 β 细胞中对自身表达的影响 为了明确 METTL3 在 Hcy 诱导小鼠胰岛 β 细胞自噬中的作用，在小鼠胰岛 β 细胞分别转染 ad-METTL3 及 si-METTL3 后采用 qRT-PCR 检测 METTL3 的 mRNA 表达。结果显示：转染 ad-METTL3 后，与 ad-NC+Hcy 组相比 METTL3 的 mRNA 表达上调 ($P < 0.05$)；转染 si-METTL3 后，与 si-NC+Hcy 组相比 METTL3 的 mRNA 表达下调 ($P < 0.05$)，且 si-METTL3-2 干扰效果最佳。表明 METTL3 干扰和过表达片段转染成功，并能小鼠胰岛 β 细胞中稳定的表达，见图 4。

2.5 过表达和沉默 METTL3 对 Hcy 诱导胰岛 β 细胞自噬的影响 为了进一步探讨 METTL3 对 Hcy 诱导小鼠胰岛 β 细胞自噬的作用，小鼠胰岛 β 细胞转染 ad-METTL3 及 si-METTL3 后，同时给予 100 μ mol/L Hcy 干预 24 h，采用 Western blot 检测自噬相关蛋白 LC3 II / I 和 p62 的表达。结果显示，转染 ad-METTL3 后与 ad-NC+Hcy 组相比，LC3 II / I 表达降低且 p62 表达明显增高 ($P < 0.05$)；转染 si-METTL3 后与 si-NC+Hcy 组相比，LC3 II / I 表达增高 ($P < 0.05$)，p62 表达降低 ($P < 0.05$)，见图 5。

3 讨论 Discussion

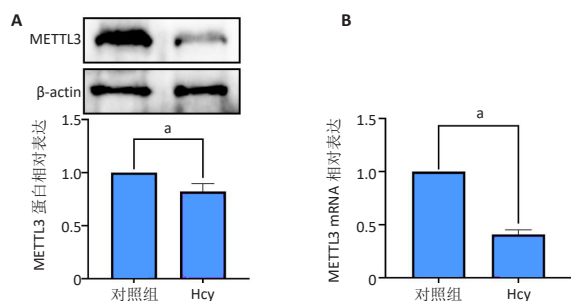
随着社会经济的发展和人类生活方式的改变，糖尿病逐渐成为严重威胁人类身体健康的慢性代谢性疾病之一^[9]。随着病程的发展，糖尿病并发症累及心脏、肾脏、眼及神经等多个器官，使糖尿病患者致残率与死亡率也在逐年上升，给全球带来了极大的疾病负担^[10]。胰岛 β 细胞通过分泌胰岛素来调节机体血糖水平，而机体的代谢应激反应是胰岛 β 细胞功能调节的关键机制，近年来研究发现胰岛 β 细胞的功能状态在 2 型糖尿病的发生发展过程中至关重要^[11]。因此研究胰岛 β 细胞衰竭的分子机制，采取手段保护胰岛 β 细胞的功能将会是治疗糖尿病的重要治疗靶点^[12]。



图注：^a $P < 0.05$ 。

图 1 | 同型半胱氨酸 (Hcy) 促进胰岛 β 细胞自噬

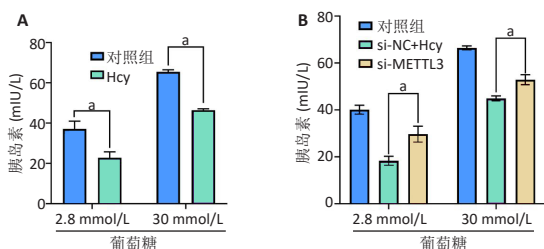
Figure 1 | Homocysteine promotes autophagy of islet beta cells



图注：图 A 为 Hcy 抑制 METTL3 蛋白水平；B 为 Hcy 抑制 METTL3 的 mRNA 水平。^a $P < 0.05$ 。

图 2 | 同型半胱氨酸 (Hcy) 在胰岛 β 细胞中抑制 METTL3 表达

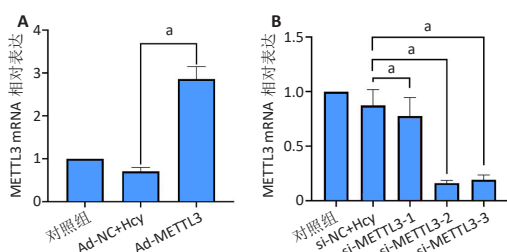
Figure 2 | Homocysteine inhibits METTL3 expression in islet beta cells



图注：图 A 为 Hcy 抑制胰岛素分泌；B 为沉默 METTL3 胰岛素分泌水平升高。^a $P < 0.05$ 。Hcy：同型半胱氨酸。

图 3 | 胰岛 β 细胞分泌胰岛素的情况

Figure 3 | The secretion of insulin by islet beta cells

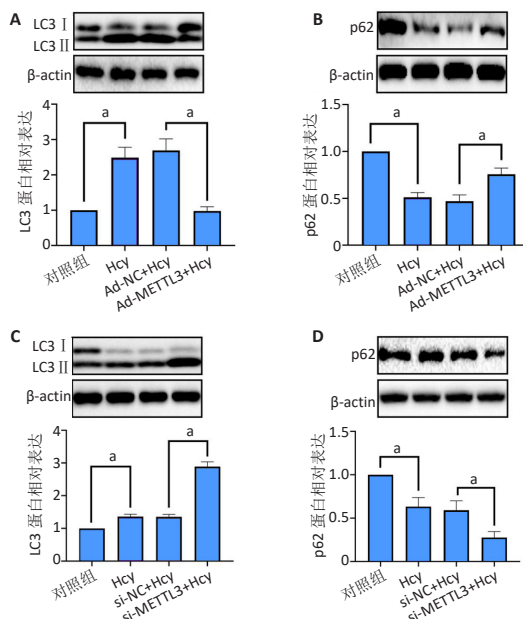


图注：图 A 为过表达 METTL3 后，mRNA 表达水平增高；B 为沉默 METTL3 后，mRNA 表达水平降低。^a $P < 0.05$ 。Hcy：同型半胱氨酸。

图 4 | 过表达和沉默 METTL3 后的 mRNA 表达水平

Figure 4 | mRNA expression levels of METTL3 after overexpression and silencing

Hcy 作为一种巯基氨基酸，是机体氨基酸的代谢产物，主要参与甲硫氨酸或半胱氨酸的转化。研究发现高 Hcy 水平与糖尿病患者胰岛 β 细胞功能受损相关^[13]，此次实验室前期研究也发现，高 Hcy 可以促进胰岛 β 细胞凋亡和焦亡^[8, 14]，因此 Hcy 与胰岛 β 细胞功能密切相关。自噬是细胞出现的一



图注：图 A 为过表达 METTL3，LC3 II / I 蛋白表达水平降低；B 为过表达 METTL3，p62 蛋白表达水平增高；C 为沉默 METTL3 后，LC3 II / I 蛋白表达水平增高；D 为沉默 METTL3 后，p62 蛋白表达水平降低。^a $P < 0.05$ 。Hcy：同型半胱氨酸。

图 5 | 沉默和过表达 METTL3 后胰岛 β 细胞自噬水平

Figure 5 | Effect of overexpression and silencing of METTL3 on the autophagy level of islet beta cells

种复杂的自降解过程，其参与神经退行性疾病、癌症、炎症性疾病和自身免疫性疾病的发生发展^[15]。同样自噬与糖尿病的发生发展密切相关，已有研究发现使用自噬抑制剂或敲除自噬相关基因来调节糖尿病自噬^[16]，如 KIM 等^[17]报道细胞自噬通过清除淀粉样蛋白生成的人 IAPP (hIAPP) 寡聚体抑制寡聚体介导的胰岛 β 细胞凋亡，以此开发自噬增强剂如 MSL-7，可能具有治疗以胰岛淀粉样蛋白积聚为特征的人类糖尿病的潜力。既往研究发现影响胰岛 β 细胞自噬的因素多是：氧化应激、炎症、未折叠蛋白质反应等^[18]，但在高 Hcy 诱导下的胰岛 β 细胞自噬情况研究尚少。此次研究结果显示：与对照组相比，Hcy 组自噬相关蛋白 LC3 II / I 的表达水平升高，p62 表达降低，并且 Hcy 组中胰岛素分泌水平明显低于对照组。进一步分析其作用机制认为，自噬在正常生理状态下，可以帮助机体清除多余、老化的细胞，降低炎症因子水平，来维持胰岛 β 细胞稳态并促进胰岛素合成^[19]，但高 Hcy 水平可能通过促进氧化应激^[20]、促进炎症因子释放等导致细胞过度自噬可引起自噬性细胞死亡^[21-22]，导致胰岛分泌功能障碍。然而 Hcy 诱导胰岛 β 细胞发生自噬的机制目前尚不明确。

METTL3 作为 m6A 甲基转移酶复合物组成之一，是 m6A 修饰过程中重要的酶复合体，被证实在多种疾病中发挥重要作用^[23]，如 WANG 等^[24]提出，METTL3 在人类和小鼠的急性肾损伤中被诱导表达，抑制 METTL3 通过 IGF2BP2 依赖机制减轻 TAB3 m6A 修饰可减轻肾损伤和炎症；而 LI 等^[25]发现 METTL3 是非酒精性脂肪性肝病发病机制的关键负调节因子，METTL3 过表达通过组蛋白修饰途径抑制调节肝 Cd36 和 Ccl2 基因转录以防止非酒精性脂肪性肝炎进展。另外，METTL3 调

节因子在肿瘤发生发展过程中也具有重要功能。如 CHEN 等^[26]发现 METTL3 通过靶向 m6 ABHLHE41-CXCL1/CXCR2 轴抑制抗肿瘤免疫促进结直肠癌的发展。同时相关研究也发现 METTL3 在细胞自噬调节过程中同样发挥着重要作用, 如 PENG 等^[27]发现 METTL3 过表达与 Rubicon mRNA 结合并介导 m6A 修饰, 抑制自噬体-溶酶体融合, 抑制肝细胞自噬; 伍义文等^[28]研究发现沉默 METTL3 基因可以抑制 miR-127 表达, 促进非小细胞肺癌 H460 细胞发生自噬。可见 METTL3 在不同细胞对细胞自噬的调节作用是不同的。另外 METTL3 可以通过调节血糖稳态、胰岛素敏感性以及胰岛 β 细胞存活和功能, 从而抑制葡萄糖不耐受和 2 型糖尿病的发展, ZHOU 等^[29]研究发现, 艾塞那肽通过上调 METTL3 表达促进 m6A 甲基化, 从而在胰腺 β 细胞中产生抗凋亡作用。因此猜测 METTL3 可能作为一种关键调节因子调控胰岛 β 细胞自噬水平。

此次实验结果显示: 与对照组相比, METTL3 在 Hcy 组中表达降低; 抑制 METTL3 后, 胰岛 β 细胞自噬相关蛋白 LC3 II / I 表达增高, p62 表达明显降低, 胰岛素分泌水平上升; 过表达 METTL3 后, LC3 II / I 表达降低且 p62 表达增高。分析其作用机制认为, Hcy 促进的胰岛 β 细胞自噬过程中, Hcy 下调了 METTL3 基因表达, 促进胰岛 β 细胞自噬, 这可能是因为 METTL3 依赖 m6A 甲基化修饰调节 mRNA 稳定性参与胰岛 β 细胞转录因子的表达, 调节胰岛 β 细胞功能^[30]。Hcy 促进了胰岛 β 细胞自噬, 作者之前分析认为: 细胞过度自噬引起自噬性细胞死亡, 损害胰岛 β 细胞分泌能力, 导致胰岛素分泌水平下降; 但此次实验的结果却截然相反, 因此作者查阅了一些同类文献, 发现胰岛 β 细胞特异性缺失 METTL3, 会导致胰岛素分泌受损^[31]。因此考虑可能是, Hcy 干预后, 胰岛 β 细胞通过保护性自噬维持了一定的细胞分泌能力^[32], 当然也不排除因为实验环境、人为因素等造成的实验误差所致, 但总的来说 METTL3 参与了胰岛 β 细胞的分泌调控过程, 具体机制还需要进一步研究说明。

综上所述, 此次研究发现, METTL3 在 Hcy 诱导下胰岛 β 细胞中低表达, 且 METTL3 负向调控 Hcy 诱导的胰岛 β 细胞自噬水平, 对胰岛 β 细胞分泌胰岛素具有调控作用, 可能为临床治疗糖尿病提供一种潜在的新方法。此研究仅局限于体外实验, 体内实验情况需进一步证实, 另外只探讨了 METTL3 对胰岛 β 细胞自噬的影响, 还需进一步深入研究 METTL3 是如何调控胰岛 β 细胞的自噬水平, 其具体调控机制及 METTL3 是否还通过其他机制来影响胰岛 β 细胞的功能, 还需进一步研究。

作者贡献: 马凌洁、马胜超完成实验设计及论文撰写, 张竟文、彭红建、高春兰负责实验数据分析处理, 马凌洁、迟宏扬和汪乐新负责细胞培养和指标检测, 黄辉、杨力负责数据和文章的校对, 实验评估由马胜超和姜怡邓完成。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让: 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范: 文章撰写遵守了《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发表宗旨。

4 参考文献 References

- [1] GUIEU R, RUF J, MOTTOLO G. Hyperhomocysteinemia and cardiovascular diseases. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2022;80(1):7-14.
- [2] CHENG Y, WANG C, ZHANG X, et al. Circulating homocysteine and folate concentrations and risk of type 2 diabetes: A retrospective observational study in Chinese adults and a Mendelian randomization analysis. *Front Cardiovasc Med*. 2022;9:978-998.
- [3] 陈幸玲, 王生兰. 细胞自噬过程、通路、调控及其与肺动脉高压的多重相关性 [J]. *中国组织工程研究*, 2021,25(2):311-316.
- [4] 丁宇, 王彦丰, 李小溪, 等. 细胞自噬与常见老年病的关联性研究进展 [J]. *国际老年医学杂志*, 2022,43(4):468-471.
- [5] 高源, 揭育祯, 马天龙, 等. miR-488-3p 靶向调控 RAP1A 在同型半胱氨酸介导肝细胞自噬的作用研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2022,32(9):1-9.
- [6] 赵轩汐, 杨淑德, 郭澍. METTL3 对细胞分化调控的研究进展 [J]. *中国美容整形外科杂志*, 2022,33(8):508-509,514-515.
- [7] LI X, JIANG Y, SUN X, et al. METTL3 is required for maintaining β -cell function. *Metabolism*. 2021;116:154702.
- [8] 张晴, 高春兰, 于飞飞, 等. 同型半胱氨酸致胰岛 β 细胞凋亡中肝蛋白 A 型受体 2 DNA 甲基化升高 [J]. *中国组织工程研究*, 2023,27(5):714-719.
- [9] SUN H, SAEEDI P, KARURANGA S, et al. IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract*. 2022;183:109119.
- [10] KOTWAS A, KARAKIEWICZ B, ZABIELSKA P, et al. Epidemiological factors for type 2 diabetes mellitus: evidence from the Global Burden of Disease. *Arch Public Health*. 2021;79(1):110.
- [11] 吕承安, 王若然, 孟卓贤. 2 型糖尿病进程中胰岛 β 细胞功能变化的分子机制 [J]. *遗传*, 2022,44(10):840-852.
- [12] CASSIDY FC, SHORTISS C, MURPHY CG, et al. Impact of type 2 diabetes mellitus on human bone marrow stromal cell number and phenotypic characteristics. *Int J Mol Sci*. 2020;21:2476.
- [13] 陈艳, 王萍. 同型半胱氨酸和总胆红素对胰岛 β 细胞功能的交互作用分析 [J]. *中国糖尿病杂志*, 2023,31(1):47-52.
- [14] 揭育祯, 杨慧霞, 周瑜瑾, 等. TRPC6 DNA 甲基化在同型半胱氨酸致胰岛 β 细胞凋亡中的作用研究 [J]. *广东医学*, 2022,43(2):162-168.
- [15] MIZUSHIMA N, LEVINE B. Autophagy in Human Diseases. *N Engl J Med*. 2020;383(16):1564-1576.
- [16] GE X, WANG L, FEI A, et al. Research progress on the relationship between autophagy and chronic complications of diabetes. *Front Physiol*. 2022;13:956344.
- [17] KIM J, PARK K, KIM MJ, et al. An autophagy enhancer ameliorates diabetes of human IAPP-transgenic mice through clearance of amyloidogenic oligomer. *Nat Commun*. 2021;12(1):183.
- [18] 任海文, 王林华, 龚权, 等. 胰岛 β 细胞自噬及其影响因素 [J]. *中国糖尿病杂志*, 2022,30(10):796-800.
- [19] ZHANG Y, ZHOU XA, LIU C, et al. Vitamin B6 Inhibits High Glucose-Induced Islet β Cell Apoptosis by Upregulating Autophagy. *Metabolites*. 2022;12(11):1048.
- [20] CAI XS, SHE MQ, XU MY, et al. GLP-1 treatment protects endothelial cells from oxidative stress-induced autophagy and endothelial dysfunction. *Int J Biol Sci*. 2018;14:1696-1708.
- [21] LAMBELET M, TERRA LF, FUKAYA M, et al. Dysfunctional autophagy following exposure to pro-inflammatory cytokines contributes to pancreatic β -cell apoptosis. *Cell Death Dis*. 2018;9(2):96.
- [22] MARIÑO G, NISO SM, BAEHRECKE EH, et al. Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(2):81-94.
- [23] SU X, QU Y, MU D. The Regulatory Network of METTL3 in the Nervous System: Diagnostic Biomarkers and Therapeutic Targets. *Biomolecules*. 2023;13(4):664.
- [24] WANG JN, WANG F, KE J, et al. Inhibition of METTL3 attenuates renal injury and inflammation by alleviating TAB3 m6A modifications via IGF2BP2-dependent mechanisms. *Sci Transl Med*. 2022;14(640):eabk2709.
- [25] LI X, YUAN B, LU M, et al. The methyltransferase METTL3 negatively regulates nonalcoholic steatohepatitis (NASH) progression. *Nat Commun*. 2021;12(1):7213.
- [26] CHEN H, PAN Y, ZHOU Q, et al. METTL3 Inhibits Antitumor Immunity by Targeting m6A-BHLHE41-CXCL1/CXCR2 Axis to Promote Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 2022;163(4):891-907.
- [27] PENG Z, GONG Y, WANG X, et al. METTL3-m6A-Rubicon axis inhibits autophagy in nonalcoholic fatty liver disease. *Mol Ther*. 2022;30(2):932-946.
- [28] 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.
- [29] ZHOU S, SUN Y, XING Y, et al. Exenatide ameliorates hydrogen peroxide-induced pancreatic β -cell apoptosis through regulation of METTL3-mediated m6A methylation. *Eur J Pharmacol*. 2022;924:174960.
- [30] WANG Y, SUN J, LIN Z, et al. m6A mRNA Methylation Controls Functional Maturation in Neonatal Murine β -Cells. *Diabetes*. 2020;69(8):1708-1722.
- [31] CHENG Y, YAO XM, ZHOU SM, et al. The m6A Methyltransferase METTL3 Ameliorates Methylglyoxal-Induced Impairment of Insulin Secretion in Pancreatic β Cells by Regulating MafA Expression. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022;13:910868.
- [32] FANG J, CHEN Z, LAI X, et al. Mesenchymal stem cells-derived HIF-1 α -overexpressed extracellular vesicles ameliorate hypoxia-induced pancreatic β cell apoptosis and senescence through activating YTHDF1-mediated protective autophagy. *Bioorg Chem*. 2022;129:106194.

(责任编辑: YJ, WZH, ZN, WL)