

# METTL3 介导的 m6A 甲基化调控脂多糖诱导的内皮细胞通透性变化

王建丰<sup>1</sup>, 余慧林<sup>2</sup>, 余又新<sup>1</sup>, 宋均辉<sup>1</sup>, 孟承颖<sup>1</sup>, 蒋薇<sup>1</sup>, 胡德林<sup>1</sup>

**摘要** 目的 探讨甲基化转移酶 3 (METTL3) 介导的 N6-甲基腺苷 (m6A) 甲基化修饰参与调控脂多糖 (LPS) 诱导的内皮细胞通透性变化的分子生物学机制。方法 选用入脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 进行体外培养, 使用 50、125、250、500、1 000、2 000 ng/ml 的 LPS 干预 HUVECs 24 h, 应用 Real-time PCR 检测 METTL3 mRNA 的表达; 选用 500 ng/ml 的 LPS 干预 HUVECs 24 h, 检测 m6A 甲基化水平, 应用细胞通透性实验检测细胞通透性, 应用 Real-time PCR 和 Western blot 检测细胞间连接蛋白 (Claudin-5、Occludin 和 VE-cadherin) mRNA 和蛋白表达; 构建 METTL3 过表达稳转细胞株, 检测 METTL3 过表达时内皮细胞 m6A 甲基化水平及通透性的变化。结果 与对照组相比, LPS 抑制 HUVECs METTL3 mRNA 表达, 使得内皮细胞 m6A 甲基化下调, 细胞通透性升高, 细胞间连接蛋白 (Claudin-5、Occludin 和 VE-cadherin) mRNA 和蛋白表达下降; 当 METTL3 过表达时, 内皮细胞 m6A 甲基化水平增强, LPS 诱导的内皮细胞通透性增加得以改善。结论 METTL3 介导的 m6A 甲基化能够改善脓毒症诱导的内皮细胞通透性增加。

**关键词** 脓毒症; m6A; METTL3; 内皮细胞通透性; 脂多糖

**中图分类号** R 644

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2024)06-1023-06  
**doi**: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.06.017

脓毒症是一种危及生命的多器官功能衰竭, 由机体对感染的反应失调引起<sup>[1]</sup>。已有研究<sup>[2]</sup>表明血管内皮屏障功能障碍在脓毒症发生的过程中起着重要作用。m6A 修饰是指在 RNA 甲基化转移酶的作用下 RNA 腺嘌呤第 6 位氮原子发生甲基化的过程<sup>[3]</sup>, 它是真核生物 RNA 重要的转录后修饰之一, 广泛参与多种生物过程的调控。m6A 修饰受到一

组酶的动态调控, 这些酶被称为“writers” (甲基化转移酶 METTL3、METTL14)、“erasers” (去甲基化酶 ALKBH5、FTO) 和“readers” (识别 m6A 位点并与其相互作用的蛋白质)<sup>[4]</sup>。这些酶的改变会影响 m6A 修饰的程度以及随后 RNA 的剪接、定位、稳定性和翻译。这些变化可能导致多种病理生理过程中的基因表达异常。越来越多的证据<sup>[5-7]</sup>表明, METTL3 介导 m6A 甲基化修饰是肿瘤、先天免疫和炎症发生的关键调节因子。然而, m6A 甲基化修饰在脓毒症中对血管内皮细胞通透性是否有调节作用不甚清楚。该研究旨在通过探讨 METTL3 介导 m6A 甲基化修饰对脓毒症诱导的内皮细胞通透性变化的影响, 以期对内皮细胞屏障功能的保护及烧伤脓毒症的分子靶向治疗提供可能的理论基础。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 购自青旗 (上海) 生物技术发展有限公司; TRIzol、Real-time PCR 引物和脂质体 3000 均购自 Invitrogen 公司 (美国); 反转录试剂盒购自 Thermo Fisher 公司 (美国); Real-time PCR 试剂盒、DNA 聚合酶、DNA marker 均购自 Takara 公司 (日本); RIPA 细胞裂解液 (强)、BCA 蛋白质定量试剂盒购自碧云天生物技术研究所 (上海); SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒购自上海雅酶生物医药科技有限公司 (上海); m6A 甲基化检测试剂盒购自 EPIGENTEK 公司 (美国); PVDF 膜购自 Millipore 公司 (美国); 光谱彩虹预染蛋白 Marker 购自 Thermo Fisher 公司 (美国); ECL 超敏发光试剂盒购自 Affinity 公司 (美国); GAPDH 抗体、METTL3 抗体均购自 ABclonal 公司 (武汉); 山羊抗小鼠 IgG、山羊抗兔 IgG 购自北京康为世纪生物科技有限公司 (北京); 质粒提取试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司 (北京); 克隆试剂盒购自 Vazyme 公司 (南京); 嘌呤霉素购自 Gibco 公司 (美国); METTL3 真核表达载体购自上海吉凯生物技术有限公司 (上海)。

## 1.2 方法

2024-04-25 接收

基金项目: 安徽省省级临床重点专科建设项目 (编号: 060102027);  
安徽省重点研究和开发计划项目 (编号: 1804h08020230)

作者单位: <sup>1</sup> 安徽医科大学第一附属医院烧伤科, 合肥 230022

<sup>2</sup> 安徽医科大学附属安庆市第一人民医院重症医学科, 安庆 246003

作者简介: 王建丰, 男, 硕士研究生;

胡德林, 男, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: hdl0522@163.com

**1.2.1 细胞培养** 采用 ECM 培养基常规方法(37 ℃、5% CO<sub>2</sub>) 培养 HUVECs, 隔天换液, 倒置显微镜下观察细胞状态, 待其汇合度为 70% ~ 80% 时, 应用 0.25% 胰蛋白酶消化 2 ~ 3 min, 细胞计数, 按实验设计方案进行种板及检测。

**1.2.2 METTL3 过表达稳转细胞株构建** 根据人基因库中 METTL3 (NM\_019852) CDS 序列将其构建真核表达载体 GV657 上, 双酶切及测序均检测成功后进行细胞转染。按照脂质体 3000 (Lipofectamine3000) 操作说明进行细胞转染, 转染 6 h 后按 1:5 的比例进行传代。同时, 应用浓度为 2.5 μg/ml 的嘌呤霉素筛选 7 d, 倍比稀释法将阳性细胞接种于 12 孔板继续培养以构建稳转细胞株。

**1.2.3 m6A 甲基化水平检测** 按照 m6A 甲基化快速定量检测试剂盒(比色法)说明书进行相关操作, 具体如下: 提取 RNA (TRIzol 或 RNA 提取试剂盒), 取出试剂盒膜条, 加入 RNA 结合液 (Binding Solution), 分别设置阴性对照孔、阳性对照孔 (即标准品孔) 和待测样品孔, 每个均设置复孔, 37 ℃ 孵育 1.5 h, 依次加入捕获抗体 (capture antibody)、检测抗体 (detection antibody) 以及增强剂 (enhancer solution), 洗板后加入显影液, 室温孵育 5 min, 终止反应后应用酶标仪于 450 nm 波长进行信号检测, 根据公式:  $m6A (\%) = (A_{\text{样本组}} - A_{\text{NC组}}) / (A_{\text{PC组}} - A_{\text{NC组}}) \times 100\%$  [吸光度 (absorbance, A)], 计算各组样本甲基化水平。

**1.2.4 Real-time PCR** 应用 RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA, 并以其为模版进行反转录, 设计 PCR 引物(表 1), 采用 SYBR Green 染料法进行 Real-time PCR 检测各目的基因 mRNA 表达。反应体系为: 2 × SYBR Green mixture 10 μl, Forward primer, 10 μmol/L 0.4 μl, Reverse primer, 10 μmol/L 0.4 μl, cDNA 2.0 μl, ddH<sub>2</sub>O 7.2 μl; 反应过程及条件: 预变性 95 ℃、30 s, 变性 95 ℃、5 s, 60 ℃、30 s, 设定循环数为 40。以 GAPDH 作为内参, 采用 2<sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup> 法比较分析各基因表达水平。

**1.2.5 Western blot** 用 RIPA 细胞裂解液(强)提取细胞总蛋白, BCA 法进行蛋白定量后将各组样品蛋白浓度调整一致, SDS-PAGE 凝胶快速制备试剂盒配制合适浓度的凝胶。电泳、转膜、封闭、一抗孵育、二抗孵育后, 应用全自动化学发光检测仪进行 ECL 法检测目的蛋白。应用 Quantity One 软件进行灰度分析, 并进行差异性统计分析。

**1.2.6 细胞通透性检测** 将 HUVECs 接种在插入

表 1 Real-time PCR 引物序列

基因名称	引物序列(5'-3')	产物长度(bp)
GAPDH	F: TCGGAGTCAACGGATTGGTC R: TGAAGGGGTCATTGATGGCA	96
METTL3	F: TGGGGGTATGAACGGGTAGA R: TCCTTTGACACCAACCAAGC	129
Claudin-5	F: CCGTGTGCGAGAAGTACGAG R: TTCTTCTTGTGCTAGTCGCCG	190
Occludin	F: TGGCCTACAGGAATACAAGAGC R: AAAGGATGCTGTACTCCACAG	181
VE-cadherin	F: CCCACAGGCACGATCTGTT R: GTTGGGCAGGGTTAGCACC	128

式细胞培养皿(millicell)底部, 使其融合成完整的单层内皮细胞膜, 并将 millicell 放置在 6 孔细胞培养板孔内, 构成血管内皮细胞通透性体外模型。其有效滤过面积 4.2 cm<sup>2</sup>, 滤膜微孔直径 0.4 μm。在 millicell 内(内室)和 6 孔培养板孔中(外室)均加入相同的 ECM 培养液。测定单层细胞膜通透性时, 在 millicell 内加入 FITC 标记的白蛋白 3 μg/ml, 60 min 后, 取出 millicell 内和 6 孔培养板孔中的培养液 1 ml, 测定各自荧光强度。以白蛋白标准曲线, 将荧光强度转换成白蛋白浓度值, 再按下列公式得出内皮细胞的通透性。公式 = ([A]/t) \* (1/A) \* (V/[L]), 注: [A]: 外室白蛋白浓度; t: 时间(sec); A: 单层细胞膜的面积(cm<sup>2</sup>); V: 外室(6 孔培养板孔内)液体容量; [L]: 内室白蛋白的浓度。

**1.3 统计学处理** 统计分析采用 GraphPad Prism 5.0 软件进行统计分析, 数据显示均为均值, 以  $\bar{x} \pm s$  表示。F 检验用来判定两组样本的方差齐性, 若方差齐, 则直接采用 t 检验比较两组是否存在差异, P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 LPS 对内皮细胞 METTL3 mRNA 表达及 m6A 甲基化水平的影响** 应用 50、125、250、500、1 000、2 000 ng/ml 的 LPS 干预 HUVECs 24 h, Real-time PCR 检测结果显示各组细胞 METTL3 mRNA 的表达量见图 1A。统计分析结果进一步证实, 与正常对照组(N)相比, 125、250、500、1 000、2 000 ng/ml 的 LPS 均可显著降低 METTL3 mRNA 的表达 (F = 1.541, t = 3.208, P < 0.05; F = 2.087, t = 2.720, P < 0.01; F = 1.814, t = 3.882, P < 0.01; F = 2.585, t = 5.979, P < 0.01; F = 11.400, t = 7.925, P < 0.01)。500 ng/ml LPS 作用 HUVECs 24 h 后, m6A 甲基化水平检测及分析结果表明, 与 N 组相

比,LPS组 m6A 甲基化水平显著降低 ( $F = 1.102, t = 7.095, P < 0.01$ ),见图 1B。

**2.2 LPS 对 HUVECs 通透性及相关基因表达的影响** 500 ng/ml 的 LPS 处理 HUVEC 细胞 24 h 后,细胞通透性检测实验表明,与 N 组相比,LPS 干预组荧光强度明显增强,单层细胞通透性系数显著升高 ( $F = 3.133, t = 5.035, P < 0.01$ ),为正常组的 ( $1.814 \pm 0.447$ ) 倍,见图 2A。同时,Real-time PCR 和

Western blot 检测及分析结果均表明,LPS 可显著抑制细胞通透性相关基因 Claudin-5、Occludin 和 VE-cadherin mRNA 表达(图 2B) ( $F = 4.094, t = 3.689, P < 0.01; F = 5.372, t = 5.945, P < 0.01; F = 2.318, t = 2.441, P < 0.05$ ) 和其蛋白表达(图 2C、D) ( $F = 1.820, t = 3.210, P < 0.01; F = 1.852, t = 7.209, P < 0.01; F = 2.973, t = 5.429, P < 0.05$ )。

**2.3 METTL3 过表达稳转细胞株构建 应用 2.5**

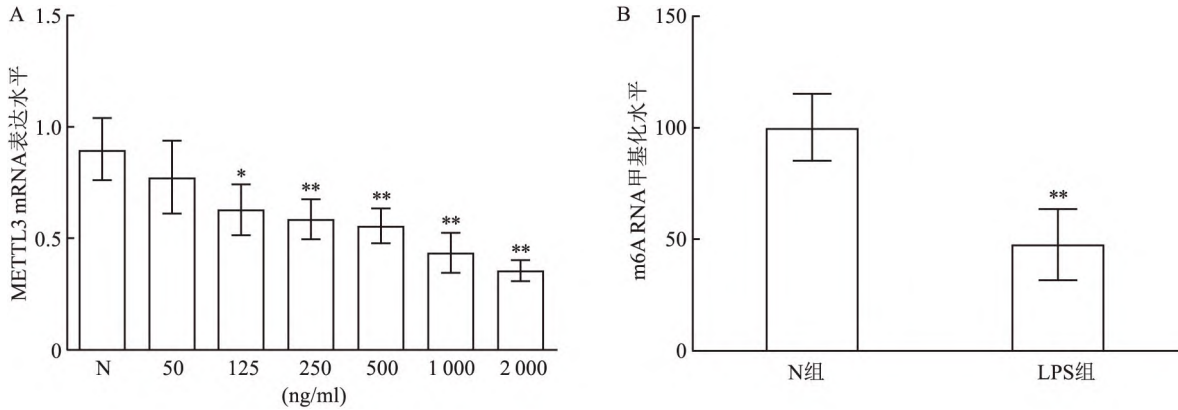


图1 LPS 对 METTL3 mRNA 表达及 m6A 甲基化水平的影响

A:Real-time PCR 检测内皮细胞中 METTL3 mRNA 表达水平;B:m6A 甲基化水平检测内皮细胞 m6A 甲基化水平;与 N 组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

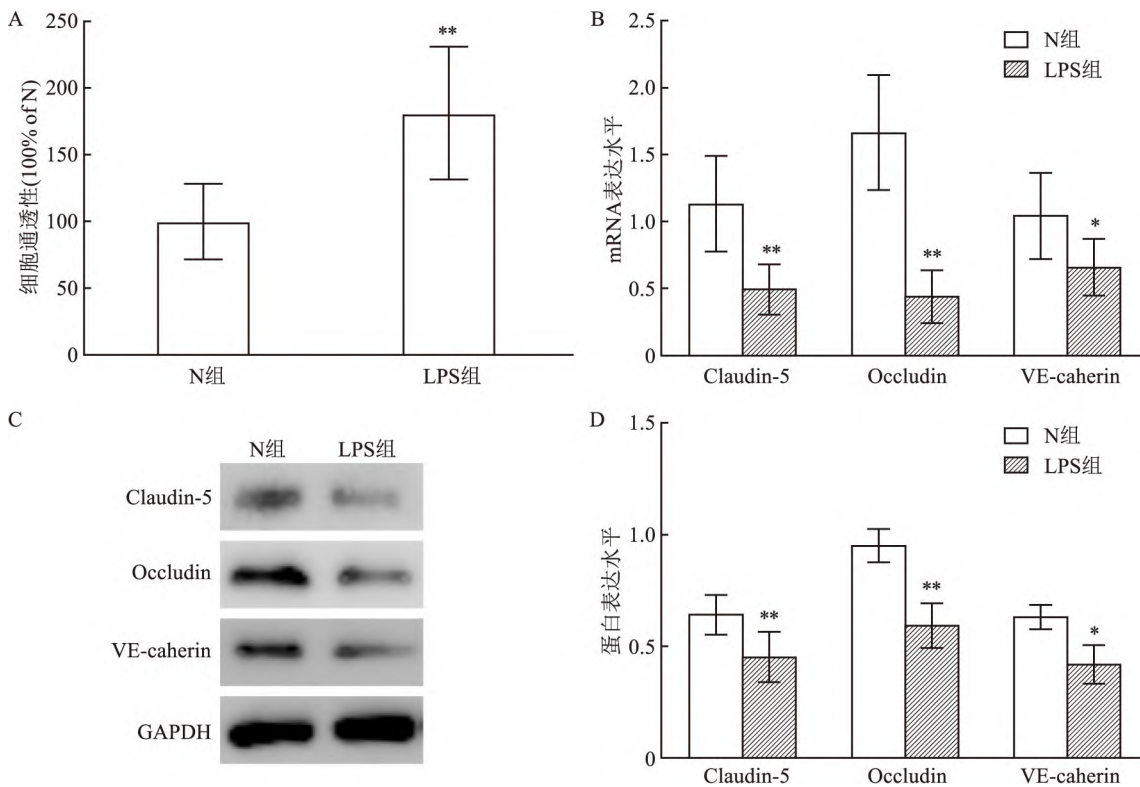


图2 LPS 对 HUVEC 细胞通透性及相关基因的影响

A:LPS 对细胞通透性的影响;B:Real-time PCR 检测通透性相关基因 mRNA 的表达;C:Western blot 检测通透性相关基因蛋白的表达;D:Western blot 检测后灰度分析蛋白相对量;与 N 组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$



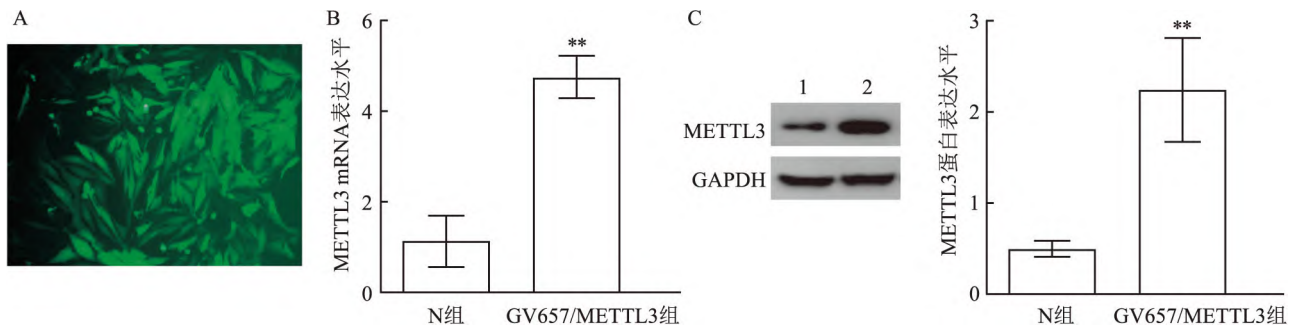


图3 METTL3 过表达稳转细胞株构建

A: METTL3 过表达稳转细胞株 ×200; B: Real-time PCR 检测 METTL3 mRNA 的表达; C: Western blot 检测 METTL3 蛋白的表达; 1: 正常对照组(N); 2: METTL3 过表达组(GV657/METTL3); 与 N 组比较: \*\*  $P < 0.01$

μg/ml 嘌呤霉素筛选 3 周, 挑取单克隆细胞株, 常规培养建立 METTL3 过表达稳转细胞株。荧光倒置显微镜观察(图 3A)、Real-time PCR(图 3B)和 Western blot(图 3C)检测均证实 METTL3 过表达稳转细胞株构建成功。与 N 组相比, GV657/METTL3 组 METTL3 mRNA 和蛋白表达均显著升高( $F = 1.505, t = 11.080, P < 0.01$ ;  $F = 55.080, t = 7.593, P < 0.01$ )。

**2.4 METTL3 过表达对内皮细胞 m6A 甲基化的影响** m6A 甲基化水平检测显示, 与 N 组相比, GV657/METTL3 组 m6A 甲基化水平显著增强( $F = 4.241, t = 7.851, P < 0.01$ ), 差异有统计学意义; 与 LPS 组相比, LPS + GV657/METTL3 组 m6A RNA 甲基化水平明显升高( $F = 1.889, t = 6.106, P < 0.01$ )。见图 4。

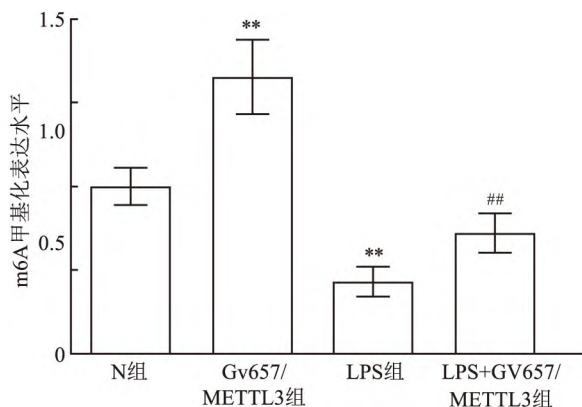


图4 METTL3 过表达对内皮细胞 m6A 甲基化的影响  
与 N 组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与 LPS 组比较: ##  $P < 0.01$

**2.5 METTL3 过表达对细胞通透性相关基因及细胞通透性的影响** 与 LPS 干预组相比, LPS + GV657/METTL3 组细胞通透性相关基因 Claudin-5、Occludin 和 VE-cadherin mRNA 表达水平均显著升

高( $F = 1.964, t = 2.423, P < 0.05$ ;  $F = 3.645, t = 1.098, P < 0.01$ ;  $F = 1.067, t = 3.107, P < 0.05$ ), 见图 5A; 同时, 其对应的蛋白表达水平亦明显增强( $F = 1.816, t = 3.423, P < 0.01$ ;  $F = 1.678, t = 2.782, P < 0.05$ ;  $F = 1.748, t = 2.932, P < 0.05$ ), 见图 5B、C。同时, 细胞通透性检测结果表明, 与 LPS 干预组相比, LPS + GV657/METTL3 组细胞通透性则明显降低( $F = 1.148, t = 2.082, P < 0.05$ ), 见图 5D。

### 3 讨论

血管内皮是一单层细胞, 在循环血液和组织之间形成半透性屏障, 控制着氧气与二氧化碳的交换以及营养物质的运输。内皮屏障主要由黏附连接(adheres junction, AJ)、紧密连接(tight junction, TJ)和间隙连接(gap junction, GJ)等细胞间连接构成。Claudin-5、Occludin 是 TJ 中的连接蛋白, VE-cadherin 是 AJ 中的连接蛋白, 这些连接蛋白的改变会影响内皮屏障功能及细胞通透性。在炎症的刺激下, 细胞间连接蛋白发生改变, 血管内皮屏障被破坏, 细胞通透性增加, 导致炎性水肿液在各个脏器积聚, 使得组织脏器缺血缺氧, 导致机体脓毒症发生。脓毒症的发生会进一步加重炎症反应, 进而导致内皮屏障进一步破坏, 细胞通透性进一步增加, 由此形成恶性循环, 最终导致多脏器功能衰竭。因此保护内皮屏障, 避免细胞通透性增加在预防脓毒症发生上就显得举足轻重了。LPS 是革兰阴性细菌细胞外壁的组成成分, 是一种常见的内毒素, 在体内外可以通过细胞信号转导通路促进多种细胞因子和炎症介质释放, 破坏血管内皮屏障功能, 从而引起机体脓毒症的发生。该研究采用 LPS 诱导 HUVECs 的脓毒症模型, 结果证明在 LPS 的作用下, 细胞间连接蛋

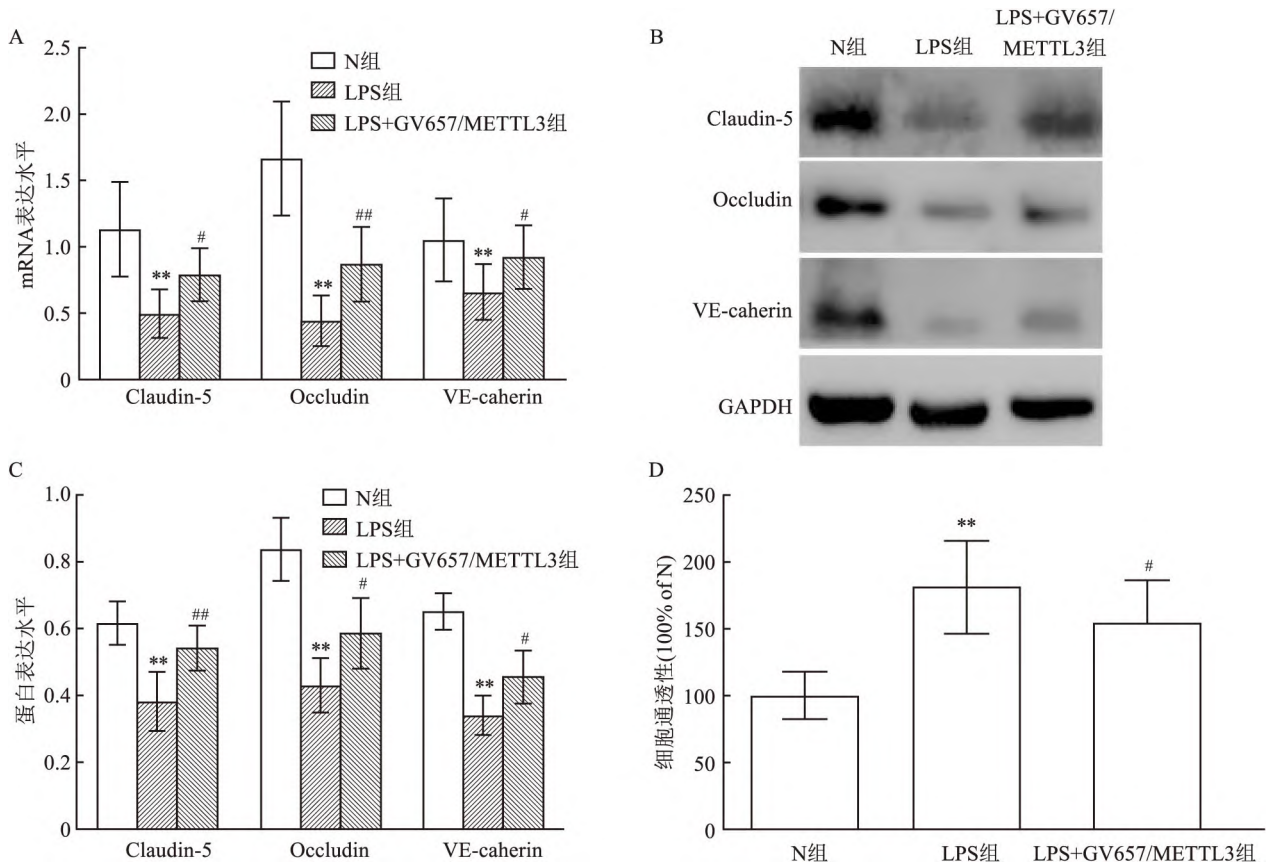


图5 METTL3 过表达对细胞通透性相关基因及细胞通透性的影响

A: Real-time PCR 检测 METTL3 mRNA 的表达; B: Western blot 检测 METTL3 蛋白的表达; C: Western blot 检测后灰度分析蛋白相对量; D: 细胞通透性变化; 与 N 组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与 LPS 组比较: #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$

白 (Claudin-5、Occludin 和 VE-cadherin) 表达水平下降, HUVECs 的通透性增加。与此同时, 该研究结果显示在 LPS 的作用下, HUVECs 中的 METTL3 表达和 m6A 甲基化水平均下调。上述结果表明 METTL3 介导的 m6A 甲基化可能参与调控内皮细胞通透性。

m6A 修饰是真核生物中普遍存在的 RNA 表观遗传修饰, 受甲基化转移酶和去甲基化酶的动态可逆调控, 并被 m6A 结合蛋白识别发挥生物学功能<sup>[8]</sup>。METTL3 作为首个发现的甲基化转移酶和核心甲基化转移酶亚基, 在 m6A 甲基化过程中起重要的催化作用, 并参与各种生理过程<sup>[9]</sup>。在肿瘤方面, METTL3 作为 m6A 甲基化转移酶在癌症中发挥着关键作用, 在胃癌、肺癌中, 其表达明显升高, 提示预后不良<sup>[10-11]</sup>。在病毒免疫中, 先天信号通过 TBK1 激活 METTL3, 而 METTL 介导的 m6A 修饰通过促进 mRNA 的稳定性和蛋白质翻译来确保抗病毒免疫<sup>[12]</sup>。在炎症相关性疾病中, 也有着 m6A 甲基化参与调控。在经 LPS 刺激的人单核细胞诱导

分化的巨噬细胞炎症模型中, METTL3 过表达可抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路, 减轻巨噬细胞炎症反应<sup>[13]</sup>。在中枢神经系统小胶质细胞中, METTL3 介导的 m6A 甲基化修饰能够促进小胶质细胞中 TRAF6-NF- $\kappa$ B 通路的激活, 促进炎症因子 (如 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  等) 释放, 从而加速神经退行性病变<sup>[14]</sup>。从中可以发现 METTL3 介导的 m6A 甲基化在不同的组织或细胞中对炎症的作用是不同的, 有的是抑制炎症, 有的却促进炎症发生发展, 结果不尽相同。而关于 m6A 甲基化对脓毒症内皮细胞通透性的影响鲜有研究涉及。有研究<sup>[15]</sup>表明, METTL3 介导的 m6A 甲基化可以改善脓毒症诱导的急性呼吸窘迫综合征的内皮屏障功能, 减轻内皮细胞通透性, 从而对脓毒症诱导的 ARDS 起到保护作用。为了进一步证实 m6A 甲基化参与调控内皮细胞通透性, 该研究构建 METTL3 过表达稳转细胞株, 实验结果证实了 METTL3 介导 m6A 甲基化, 且上调的 m6A 能够改善内皮细胞通透性。这些数据表明 METTL3 在血管内皮屏障功能的调节中起着关键作用。

综上所述, METTL3 介导 m6A 甲基化修饰能够改善脓毒症诱导的内皮功能障碍, 减轻内皮通透性, 这为脓毒症的临床治疗提供了可能的理论基础。当然关于 m6A 甲基化通过何种具体信号通路来改善脓毒症诱导的内皮屏障功能障碍仍需要进一步研究探讨, 这也是该研究的不足之处。

### 参考文献

- [1] Singer M, Deutschman C S, Seymour C W, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3)[J]. *JAMA*, 2016, 315(8):801.
- [2] Dolmatova E V, Wang K, Mandavilli R, et al. The effects of sepsis on endothelium and clinical implications[J]. *Cardiovasc Res*, 2021, 117(1):60-73.
- [3] 刘笑笑, 刘德伍. RNA N6-甲基腺嘌呤修饰在创面修复相关病理生理进程中的作用研究进展[J]. *中华烧伤与创面修复杂志*, 2022, 38(10):989-93.
- [4] Yang Y, Hsu P J, Chen Y S, et al. Dynamic transcriptomic m(6)A decoration: writers, erasers, readers and functions in RNA metabolism[J]. *Cell Res*, 2018, 28(6):616-24.
- [5] He L, Li H, Wu A, et al. Functions of N6-methyladenosine and its role in cancer[J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1):176.
- [6] Shulman Z, Stern-Ginossar N. The RNA modification N6-methyladenosine as a novel regulator of the immune system[J]. *Nat Immunol*, 2020, 21(5):501-12.
- [7] Luo J, Xu T, Sun K. N6-methyladenosine RNA modification in

- inflammation: roles, mechanisms, and applications [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9:670711.
- [8] Zhu Z M, Huo F C, Pei D S. Function and evolution of RNA N6-methyladenosine modification[J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(11):1929-40.
  - [9] Jiang X, Liu B, Nie Z, et al. The role of m6A modification in the biological functions and diseases[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1):74.
  - [10] Wang Q, Chen C, Ding Q, et al. METTL3-mediated m6A modification of HDGF mRNA promotes gastric cancer progression and has prognostic significance[J]. *Gut*, 2020, 69(7):1193-205.
  - [11] Lin S, Choe J, Du P, et al. The m(6)A methyltransferase METTL3 promotes translation in human cancer cells [J]. *Molecular Cell*, 2016, 62(3):335-45.
  - [12] Chen J, Wei X, Wang X, et al. TBK1-METTL3 axis facilitates antiviral immunity[J]. *Cell Reports*, 2022, 38(7):110373.
  - [13] Wang J, Yan S, Lu H, et al. METTL3 attenuates LPS-induced inflammatory response in macrophages *via* NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. *Mediators Inflamm*, 2019, 2019:3120391.
  - [14] Wen L, Sun W, Xia D, et al. The m6A methyltransferase METTL3 promotes LPS-induced microglia inflammation through TRAF6/NF- $\kappa$ B pathway[J]. *Neuroreport*, 2022, 33(6):243-51.
  - [15] Chen Y, Wu Y, Zhu L, et al. METTL3-mediated N6-methyladenosine modification of trim59 mRNA protects against sepsis-induced acute respiratory distress syndrome [J]. *Front Immunol*, 2022, 13:897487.

## METTL3-mediated m6A methylation regulates lipopolysaccharide-induced endothelial cell permeability changes

Wang Jianfeng<sup>1</sup>, Yu Huilin<sup>2</sup>, Yu Youxin<sup>1</sup>, Song Junhui<sup>1</sup>, Meng Chengying<sup>1</sup>, Jiang Wei<sup>1</sup>, Hu Delin<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Dept of Burns, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022; <sup>2</sup>Dept of Critical Care Medicine, Anqing First People's Hospital Affiliated to Anhui Medical University, Anqing 246003)

**Abstract Objective** To explore the molecular mechanism of N6-methyladenosine (m6A) methylation mediated by methyltransferase 3 (METTL3) in regulating lipopolysaccharide (LPS)-induced endothelial cell permeability changes. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were cultured *in vitro*. HUVECs were treated with LPS 50, 125, 250, 500, 1 000, 2 000 ng/ml for 24 h. METTL3 mRNA expression was detected by Real-time PCR. After HUVECs were intervened with 500 ng/ml for 24 h, the methylation level of m6A was detected, and cell permeability was measured by cell permeability test. Real-time PCR and Western blot were used to detect mRNA and protein expression of intercellular junction proteins (Claudin-5, Occludin and VE-cadherin). METTL3 overexpressed stable cell lines were constructed to measure the changes of m6A methylation level and permeability of endothelial cells during METTL3 overexpression. **Results** Compared to the control group, LPS inhibited the expression of HUVECs METTL3 mRNA, decreased the methylation of m6A, increased the cell permeability, and decreased the mRNA and protein expression of intercellular junction proteins (Claudin-5, Occludin and VE-cadherin). When METTL3 was overexpressed, the m6A methylation levels of endothelial cells were enhanced, and the increase of endothelial cell permeability induced by LPS was reversed. **Conclusion** METTL3-mediated m6A methylation can improve the permeability of endothelial cells induced by sepsis.

**Key words** sepsis; m6A; METTL3; endothelial cell permeability; lipopolysaccharide