

WTAP 对博来霉素诱导的肺纤维化胶原沉积的影响

张云森^{1,2}, 刘震宇^{1,2}, 刘芷言^{1,2}, 林丽婵^{1,2}, 沙纪名³, 陶 辉^{1,2}, 陈 齐^{1,2}
(安徽医科大学第二附属医院¹ 麻醉与围术期医学科、³ 胸外科, 合肥 230601;
² 麻醉与围术期医学安徽普通高校重点实验室, 合肥 230601)

摘要 **目的** 探讨 Wilms 肿瘤 1 相关蛋白(WTAP)对博来霉素所致的肺纤维化组织胶原沉积的影响。**方法** 60 只小鼠随机分为 4 组:对照组(Control 组)、博来霉素诱导肺纤维化组(BLM 组)、肺纤维化慢病毒空载体对照组(BLM + LV-NC 组)、肺纤维化 WTAP 慢病毒组(BLM + LV-WTAP 组)。采用腹部皮下注射博来霉素(35 mg/kg)建立实验性肺纤维化小鼠模型,每周 2 次,共 8 次。造模结束后,使用 Western blot 检测纤维化相关标志物 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、I 型胶原(Collagen I)、纤维连接蛋白(Fibronectin)的蛋白表达情况以及 WTAP 蛋白表达情况;使用 Masson 染色和 Sirius Red 染色检测胶原沉积情况;采用 RT-qPCR 检测 WTAP mRNA 表达情况、WTAP 慢病毒感染效果及 Collagen I mRNA 表达情况。**结果** 与 Control 组比较, BLM 组肺组织 α -SMA($P < 0.001$)、Collagen I($P < 0.001$)、Fibronectin($P < 0.01$)蛋白表达均升高;Masson 染色($P < 0.001$)和 Sirius Red 染色($P < 0.001$)证实 BLM 组肺组织出现明显胶原沉积;且 BLM 组肺组织中 WTAP 蛋白表达升高($P < 0.01$)。与 Control 组比较, BLM 组肺组织中 WTAP mRNA 表达升高($P < 0.001$);与 BLM + LV-NC 组比较, BLM + LV-WTAP 组肺组织中 WTAP mRNA 表达下降($P < 0.001$),证明病毒感染有效。WTAP 慢病毒感染后, BLM + LV-WTAP 组胶原纤维沉积减少($P < 0.001$)、Collagen I mRNA 水平降低($P < 0.001$)及蛋白表达下降($P < 0.001$)。**结论** 敲低 WTAP 表达可减少博来霉素所致的小鼠肺纤维化组织的胶原沉积,改善实验性肺纤维化。

关键词 Wilms 肿瘤 1 相关蛋白;肺纤维化;博来霉素;表观转录组;胶原;N6-甲基腺苷

中图分类号 R 332;R 563.9;R 977.6

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)02-0266-06

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.02.011

肺纤维化是所有纤维化疾病中进展最快、致死率最高的疾病,从诊断到死亡的中位生存期仅 3~5 年^[1],不同信号的复杂相互作用触发不同的修复途径,最终导致患者的组织纤维化、呼吸衰竭和死亡^[2]。肺纤维化因其进展性和不可逆性,已成为肺移植的主要适应证之一^[3]。目前对肺纤维化的研究仍然是一个急需解决的问题。N6-甲基腺苷(N6-methyladenosine, m⁶A)是哺乳动物信使 RNA 和非编码 RNA 中最常见、最可逆的内部修饰^[4]。m⁶A 的 RNA 甲基化是由一组被称为甲基转移酶的复合体催化的^[5]。该转移酶复合体中相关酶已经被证实参与肺纤维化调节^[6]。而该复合体中的调节亚基——Wilms 肿瘤 1 相关蛋白(Wilms' tumor 1-associating protein, WTAP)的作用却未被探究证实。肺纤维化的特征是肺组织的重塑,包括成纤维细胞的过度增殖和大量胶原沉积^[7]。该研究旨在探讨

WTAP 对博来霉素(bleomycin, BLM)诱导的肺纤维化组织胶原沉积的影响,以期对肺纤维化治疗寻找新的方向。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 60 只 8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠,体质量(25±2)g,饲养在安徽医科大学第二附属医院科研实验中心动物室,环境维持(23±2)℃,光照 12 h,避光 12 h。所有实验操作遵守实验室相关管理规定。

1.1.2 主要试剂 TRIzol 试剂(货号:15596018,美国 Invitrogen 公司);逆转录试剂盒、RT-qPCR 试剂盒(货号:AG11707、AG11701,湖南艾科瑞生物工程有限公司);蛋白酶抑制剂 PMSF、细胞裂解液 RIPA、蛋白浓度测定 BCA 试剂盒、Western blot 试剂盒(货号:ST505、P0013B、P0012S、P0012A,上海碧云天生物技术有限公司);蛋白一抗试剂 GAPDH、WTAP、 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)、I 型胶原(type I collagen, Collagen I)、纤维连接蛋白(Fibronectin)(货号:60004-1-Ig、

2024-09-25 接收

基金项目:安徽省高校自然科学基金项目(编号:2023AH040376)

作者简介:张云森,女,硕士研究生;

陈 齐,男,主任医师,硕士生导师,通信作者, E-mail: 1228022438@qq.com

60188-1-Ig、67735-1-Ig、66761-1-Ig、15613-1-AP,武汉三鹰生物技术有限公司);兔源及鼠源二抗(货号:ab97051、ab6728,美国 Abcam 公司);相关 qPCR 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成提供。

1.1.3 主要设备与仪器 Varioskan LUX 酶标仪(型号:VLBL0TGD2,美国 Thermo Fisher Scientific 公司);低温高速离心机(型号:Centrifuge 5430/5430R,德国 Eppendorf 公司);实时荧光定量 PCR 仪(型号:CFX96,美国 Bio-Rad 公司);全自动化学发光/荧光图像分析系统(型号:Tanon 5200 Multi,上海天能生命科学有限公司);恒温金属浴(型号:DKT200-2,杭州米欧仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物实验分组与模型建立 60 只 8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠随机分为 4 组:对照组(Control 组)、BLM 诱导肺纤维化组(BLM 组)、肺纤维化慢病毒空载体对照组(BLM + LV-NC 组)、肺纤维化 WTAP 慢病毒组(BLM + LV-WTAP 组)。利用 BLM 构建小鼠肺纤维化模型,Control 组注射 0.9% 氯化钠溶液,其余 3 组均进行 BLM 注射。具体方法为:采用腹部皮下注射 BLM(35 mg/kg)建立肺纤维化小鼠模型,每周 2 次,共 8 次。Control 组使用相同剂量 0.9% 氯化钠溶液,BLM 组使用 BLM(35 mg/kg),同时最后 1 周鼠尾静脉分别注射 WTAP 空载慢病毒(1 mg/kg)构建 BLM + LV-NC 组,注射 WTAP 慢病毒载体(1 mg/kg)构建 BLM + LV-WTAP 组。模型构建完成后,采用麻醉处死后采集肺脏样本,每组随机取 6 个样本进行后续实验。

1.2.2 Masson 染色 取实验性肺纤维化组织,置于 4% 多聚甲醛溶液中进行组织固定。固定后进行石蜡包埋,制备石蜡切片。石蜡切片后使用不同浓度的二甲苯和无水乙醇进行脱蜡和脱水。切片制备完全后进行 Masson 染色观察肺组织胶原沉积情况。

1.2.3 Sirius Red 染色 取实验性肺纤维化组织,置于 4% 多聚甲醛溶液中进行组织固定。固定后进行石蜡包埋,制备石蜡切片。石蜡切片后使用不同浓度的二甲苯和无水乙醇进行脱蜡和脱水。切片制备完全后进行 Sirius Red 染色观察肺组织胶原沉积情况。

1.2.4 Western blot 检测 取实验性肺纤维化组织,称取一定量后按照比例加入裂解液,研磨,离心后提取含有组织总蛋白的上层清亮透明液体,使用 BCA 试剂盒进行蛋白定量。制备浓缩胶和分离胶进行 SDS-PAGE 电泳,转膜,5% 脱脂牛奶封闭 2 h,

TBST 洗膜后孵育所需要对应一抗,4 ℃ 慢摇过夜。次日 TBST 洗膜,常温孵育相对应二抗 1 h,洗膜,ECL 化学发光,凝胶成像仪成像,Image J 软件分析灰度值,采用目的条带与内参蛋白条带光密度比值作为结果进行统计分析。

1.2.5 RT-qPCR 检测 取适量实验性肺纤维化组织,利用 TRIzol 法抽提各组的总 RNA。检测 RNA 的纯度和浓度后逆转录为 cDNA。设置反应条件如下:RNA 逆转录为 cDNA 37 ℃ 15 min,逆转录酶失活 85 ℃ 5 s。将所得 cDNA 置于 -20 ℃ 保存。各组的 cDNA 根据试剂盒说明使用两步法进行 RT-qPCR 进行扩增,扩增热循环条件为:预变性 95 ℃ 30 s,循环反应 95 ℃ 5 s,60 ℃ 30 s,实时监测荧光量 40 个循环。使用 GAPDH 作为内参,mRNA 相对表达量应用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算。相关引物序列见表 1。

表 1 引物序列

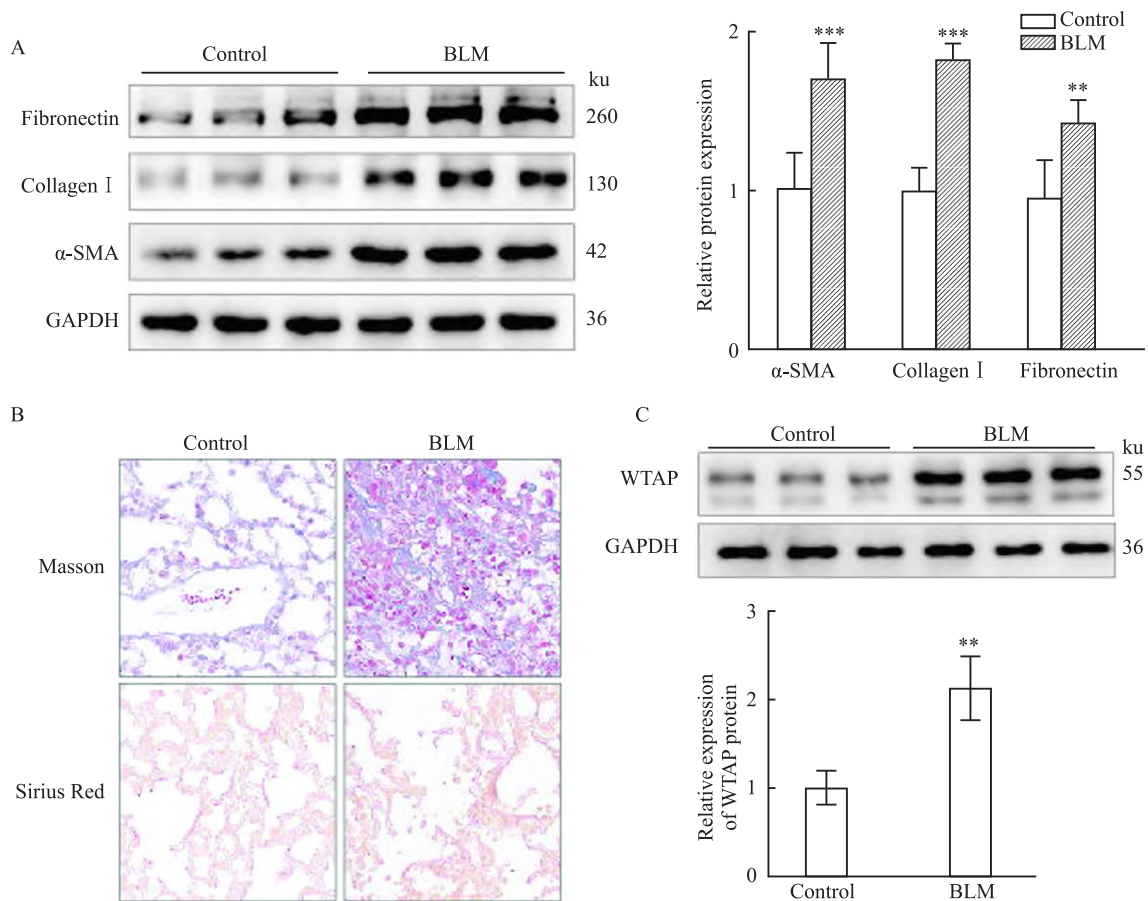
Tab.1 Primer sequences

Gene	Primer sequence	
	(5'-3')	Primer length (bp)
Collagen I	F: CGATGGATTCCCGTTTCGAGT	20
	R: GAGGCCTCGGTGGACATTA	19
WTAP	F: TTTGGAGGGAAAGTACACAGATCC	24
	R: TCCTGCTCTTTGGTTGCTAGG	21
GAPDH	F: CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG	22
	R: GGTGGAAGAATGGGAGTTGCT	21

1.3 统计学处理 使用 Graphpad Prism 9.0 软件进行统计学分析。所有实验均重复 3 次,实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。正态分布且方差齐的组间均值比较使用 Student's *t* 检验,多组间均值比较使用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BLM 诱导肺纤维化模型验证 应用 Western blot 检测 Control 组和 BLM 组中纤维化标志物蛋白表达情况。与 Control 组比较,BLM 组 α -SMA ($t = 6.064, P < 0.001$)、Collagen I ($t = 7.266, P < 0.001$)、Fibronectin ($t = 3.731, P < 0.01$) 蛋白表达升高,见图 1A。同时,Masson 染色 ($t = 11.630, P < 0.001$) 和 Sirius Red 染色 ($t = 9.949, P < 0.001$) 结果表明,与 Control 组比较,BLM 组的肺组织出现明显胶原沉积,纤维化改变明显,见图 1B。上述实验结果证明通过 BLM 成功构建了肺纤维化模型。此外,与 Control 组比较,BLM 组中 WTAP 蛋白表达上升 ($t = 5.465, P < 0.01$),见图 1C。

图 1 BLM 诱导肺纤维化模型验证 ($n=6, \bar{x} \pm s$)Fig. 1 Validation of bleomycin-induced pulmonary fibrosis model ($n=6, \bar{x} \pm s$)

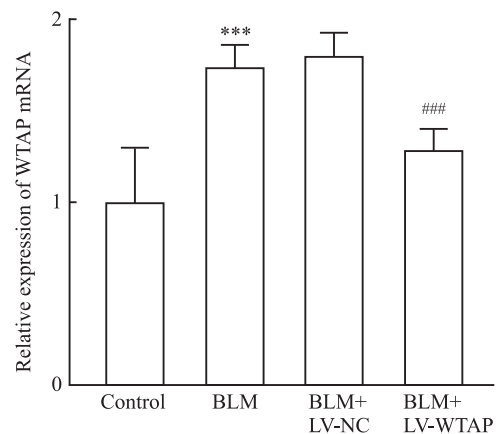
A: Western blot results showed the expression levels of α-SMA, Collagen I, and Fibronectin; B: Masson staining and Sirius Red staining images showed collagen deposition $\times 20$; C: Western blot results showed the expression level of WTAP; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Control group.

2.2 WTAP 慢病毒对 WTAP mRNA 表达的影响

RT-qPCR 对 WTAP 慢病毒侵染组织效果进行检测。与 Control 组比较, BLM 组的肺组织中 WTAP mRNA 水平升高 ($t = 5.651, P < 0.001$); 使用 LV-WTAP 靶向敲低 WTAP 表达后, 与 BLM + LV-NC 组比较, BLM + LV-WTAP 组的肺纤维化组织中 WTAP mRNA 水平下降 ($t = 7.306, P < 0.001$), 见图 2。上述实验结果证明通过小鼠尾静脉注射 LV-WTAP 慢病毒侵染有效, BLM + LV-WTAP 模型组构建成功。

2.3 靶向敲低 WTAP 表达对 BLM 诱导的肺纤维化胶原沉积的影响

Masson 染色和 Sirius Red 染色观察肺纤维化组织纤维化改变和胶原沉积情况。图 1B 已经表明, BLM 组的肺组织与 Control 组比较出现了明显胶原沉积, 纤维化改变明显。与 Control 组比较, BLM + LV-NC 组 Masson 染色 ($t = 16.510, P < 0.001$) 和 Sirius Red 染色 ($t = 14.070, P < 0.001$) 结

图 2 WTAP mRNA 表达的情况 ($n=6, \bar{x} \pm s$)Fig. 2 Situation of WTAP mRNA expression ($n=6, \bar{x} \pm s$)

*** $P < 0.001$ vs Control group; ### $P < 0.001$ vs BLM + LV-NC group.

果显示胶原沉积增加。与 BLM + LV-NC 组比较, BLM + LV-WTAP 组 Masson 染色 ($t = 7.626, P <$

0.001) 和 Sirius Red 染色 ($t = 11.600, P < 0.001$) 显示肺纤维化组织中的蓝色胶原沉积减少, 组织纤维化改变程度减轻。见图 3。上述结果证明靶向敲低 WTAP 表达能够减弱 BLM 诱导的肺纤维化胶原沉积。

2.4 靶向敲低 WTAP 表达对 BLM 诱导的肺纤维化 Collagen I 表达水平的影响 RT-qPCR 检测肺纤维化组织中 Collagen I mRNA 的表达情况。与 Control 组比较, BLM + LV-NC 组 Collagen I mRNA 水平升高 ($t = 8.141, P < 0.001$); 与 BLM + LV-NC 组比较, BLM + LV-WTAP 组 Collagen I mRNA 水平降低 ($t = 8.902, P < 0.001$)。见图 4A。同时, 应用

Western blot 检测肺纤维化组织中 Collagen I 蛋白的表达情况。与 Control 组比较, BLM + LV-NC 组 Collagen I 蛋白表达增加 ($t = 9.009, P < 0.001$), 而与 BLM + LV-NC 组比较, BLM + LV-WTAP 组 Collagen I 表达降低 ($t = 10.010, P < 0.001$)。见图 4B。即 WTAP 靶向敲低能够抑制 BLM 诱导的 Collagen I mRNA 和蛋白表达水平升高。

3 讨论

肺纤维化目前尚无有效的根治方法, 其进行性加重的特点以及不良的预后给治疗带来极大的困扰。肺纤维化可由多种潜在病因引起, 从遗传缺陷

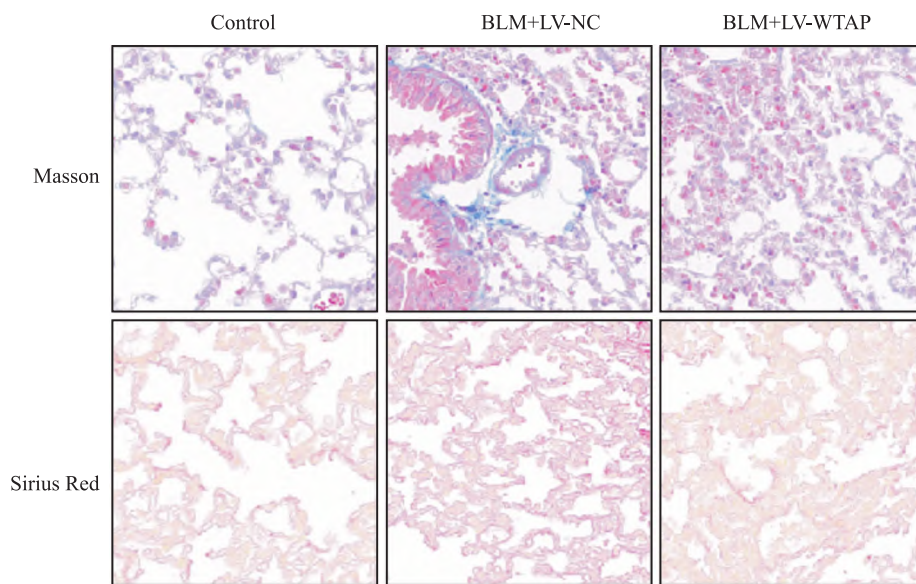


图 3 Masson 染色和 Sirius Red 染色观察肺组织胶原沉积情况 $\times 20$

Fig. 3 Masson staining and Sirius Red staining images showed collagen deposition in lung tissue $\times 20$

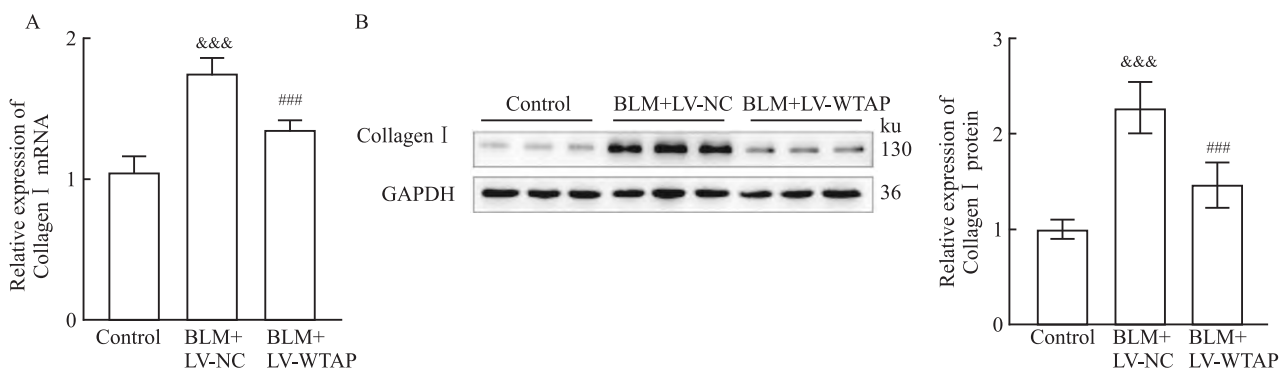


图 4 Collagen I 表达水平比较 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

Fig. 4 Comparison of the expression level of Collagen I ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

A: mRNA levels detected by RT-qPCR; B: Protein levels detected by Western blot; *** $P < 0.001$ vs Control group; ### $P < 0.001$ vs BLM + LV-NC group.

到自身免疫性疾病,甚至环境暴露也可造成^[3]。肺纤维化中的成纤维细胞和肌成纤维细胞灶形成后分泌过多的细胞外基质,主要是胶原蛋白,导致瘢痕和肺部结构的破坏^[8]。而 BLM 诱导肺纤维化是公认的造模方法^[9],本研究通过体内实验模拟肺纤维化过程中可能存在的病理过程,重点关注肺纤维化过程中胶原沉积的变化情况。本研究相关实验证实 BLM 组中与纤维化相关的标志物 α -SMA、Collagen I、Fibronectin、WTAP 表达均明显升高。表明在肺纤维化发生过程中可能伴随着纤维化相关的分子和 m^6A 相关酶的同时改变。抑制 m^6A 相关酶可影响纤维化和胶原沉积相关分子的表达。这些结果证实 WTAP 可以在一定程度上参与并影响肺纤维化的进程。

WTAP 是 m^6A 写入复合体中的一员,其中 METTL3 是主要的催化亚基,WTAP 则作为调节亚基发挥作用。WTAP 作为 m^6A 修饰的关键酶,可以调节体内 m^6A 甲基化水平,但 WTAP 目前多聚焦于肿瘤研究^[10]。研究^[11]表明,WTAP 增强雄激素受体甲基化,促进脂质氧化并诱导糖尿病心脏纤维化。在肝纤维化中也证实 WTAP 的 m^6A 水平发生上调。干扰 WTAP 的表达影响肝星状细胞 α -SMA 和 Collagen I 的 mRNA 和蛋白表达水平从而参与肝纤维化的发展^[12]。WTAP 与 *Ptch1* 基因 m^6A 位点结合,抗纤维化介质 N-乙酰基-丝氨酸-天门冬氨酸-赖氨酸-脯氨酸可降低 *Ptch1* 的 mRNA 稳定性,并通过 WTAP/ m^6A /*Ptch1* 轴减轻肝纤维化^[13]。但是 WTAP 对肺纤维化的调控尚不清楚。本研究认为 WTAP 作为 m^6A 甲基转移酶影响胶原沉积的机制可能与其相关靶基因的 mRNA,或者胶原沉积相关分子有关,但相关机制需要进一步研究。

因此,研究肺纤维化组织中胶原沉积的影响因素对肺纤维化的治疗具有重要的指导意义。本研究证实了表观转录组在肺纤维化疾病中的作用,结合相关研究表明表观遗传和表观转录修饰可作为肺纤维化治疗的突破口之一。

参考文献

[1] Selvarajah B, Platé M, Chambers R C. Pulmonary fibrosis: emerging diagnostic and therapeutic strategies[J]. *Mol Aspects Med*,

2023, 94: 101227. doi:10.1016/j.mam.2023.101227.

[2] Hewlett J C, Kropski J A, Blackwell T S. Idiopathic pulmonary fibrosis: epithelial-mesenchymal interactions and emerging therapeutic targets[J]. *Matrix Biol*, 2018, 71: 112 - 27. doi:10.1016/j.matbio.2018.03.021.

[3] Mathai S K, Schwartz D A. Translational research in pulmonary fibrosis[J]. *Transl Res*, 2019, 209: 1 - 13. doi:10.1016/j.trsl.2019.02.001.

[4] 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. doi:10.1038/s41590-020-0650-4.

[5] Zaccara S, Ries R J, Jaffrey S R. Reading, writing and erasing mRNA methylation[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(10): 608 - 24. doi:10.1038/s41580-019-0168-5.

[6] Zhang J X, Huang P J, Wang D P, et al. m^6A modification regulates lung fibroblast-to-myofibroblast transition through modulating *KCNH6* mRNA translation[J]. *Mol Ther*, 2021, 29(12): 3436 - 48. doi:10.1016/j.ymthe.2021.06.008.

[7] Chanda D, Otoupalova E, Smith S R, et al. Developmental pathways in the pathogenesis of lung fibrosis[J]. *Mol Aspects Med*, 2019, 65: 56 - 69. doi:10.1016/j.mam.2018.08.004.

[8] Davies H R, Richeldi L. Idiopathic pulmonary fibrosis: current and future treatment options[J]. *Am J Respir Med*, 2002, 1(3): 211 - 24. doi:10.1007/BF03256611.

[9] Chakraborty A, Wang C, Hodgson-Garms M, et al. Induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells reverse bleomycin-induced pulmonary fibrosis and related lung stiffness[J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 178: 117259. doi:10.1016/j.biopha.2024.117259.

[10] Huang Q, Mo J, Liao Z, et al. The RNA m^6A writer WTAP in diseases: structure, roles, and mechanisms[J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(10): 852. doi:10.1038/s41419-022-05268-9.

[11] Song K, Sun H, Tu B, et al. WTAP boosts lipid oxidation and induces diabetic cardiac fibrosis by enhancing AR methylation[J]. *iScience*, 2023, 26(10): 107931. doi:10.1016/j.isci.2023.107931.

[12] Fan C, Ma Y, Chen S, et al. Comprehensive analysis of the transcriptome-wide m^6A methylation modification difference in liver fibrosis mice by high-throughput m^6A sequencing[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 767051. doi:10.3389/fcell.2021.767051.

[13] Wei A, Zhao F, Hao A, et al. N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline (AcSDKP) mitigates the liver fibrosis via WTAP/ m^6A /*Ptch1* axis through Hedgehog pathway[J]. *Gene*, 2022, 813: 146125. doi:10.1016/j.gene.2021.146125.

Effect of WTAP on collagen deposition in bleomycin-induced pulmonary fibrosis

Zhang Yunsen^{1,2}, Liu Zhenyu^{1,2}, Liu Zhiyan^{1,2}, Lin Lichan^{1,2}, Sha Jiming³, Tao Hui^{1,2}, Chen Qi^{1,2}

(¹Dept of Anesthesiology and Perioperative Medicine, ³Dept of Thoracic Surgery, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601; ²Key Laboratory of Anesthesiology and Perioperative Medicine of Anhui Higher Education Institutes, Hefei 230601)

Abstract **Objective** To explore the effect of Wilms' tumor 1-associated protein (WTAP) on tissue collagen deposition in pulmonary fibrosis caused by bleomycin. **Methods** 60 mice were randomly divided into four groups: control group (Control group), Bleomycin-induced pulmonary fibrosis group (BLM group), pulmonary fibrosis lentivirus empty vector control group (BLM + LV-NC group), pulmonary fibrosis WTAP lentivirus group virus group (BLM + LV-WTAP group). Experimental pulmonary fibrosis mouse model was established by subcutaneous injection of bleomycin (35 mg/kg) into the abdomen, twice a week for a total of 8 times. After modeling, Western Blot was used to detect the protein expression of fibrosis-related markers α -smooth muscle actin (α -SMA), type I collagen (Collagen I), fibronectin (Fibronectin), and WTAP protein. Masson staining and Sirius Red staining were used to detect collagen deposition. RT-qPCR was used to detect WTAP mRNA expression, WTAP lentivirus infection effect, and Collagen I mRNA expression. **Results** Compared with the Control group, the expression of pulmonary fibrosis markers α -SMA ($P < 0.001$), Collagen I ($P < 0.001$), and Fibronectin ($P < 0.01$) protein in the BLM group all increased. Masson staining ($P < 0.001$) and Sirius Red staining ($P < 0.001$) confirmed that significant collagen deposition occurred in the lung tissue of the BLM group. In addition, the expression of WTAP protein in the lung tissue of the BLM group increased ($P < 0.01$). Compared with the Control group, the expression of WTAP mRNA in the BLM group increased ($P < 0.001$). Compared with the BLM + LV-NC group, the expression of WTAP mRNA in the tissues of the BLM + LV-WTAP group decreased ($P < 0.001$), proving that virus infection is effective. After infection with WTAP lentivirus, collagen fiber deposition decreased ($P < 0.001$), Collagen I mRNA ($P < 0.001$) level decreased, and protein ($P < 0.001$) expression decreased in the BLM + LV-WTAP group. **Conclusion** Knocking down of WTAP can reduce collagen deposition in bleomycin-induced pulmonary fibrosis tissue in mice and improve experimental pulmonary fibrosis.

Key words Wilms' tumor 1-associated protein; pulmonary fibrosis; bleomycin; epitranscriptome; collagen; N6-methyladenosine

Fund program Natural Science Research Project of Anhui Educational Committee (No. 2023AH040376)

Corresponding author Chen Qi, E-mail: 1228022438@qq.com