

m6A 甲基转移酶 METTL14 在滋养细胞中的表达及对早发型子痫前期发生的影响

唐 熊,陈 繁,谢丝雨,郭亚飞,何 晔,张 英
(安徽医科大学第一附属医院妇产科,合肥 230022)

摘要 **目的** 探究 RNA 的 N6-甲基腺苷(m6A)修饰及甲基转移酶样蛋白 14(METTL14)在早发型子痫前期(ePE)发病机制中的作用。**方法** 收集 15 例早发型子痫前期孕妇和 15 例正常孕妇的胎盘组织。利用比色法测定 m6A 水平,利用 RT-qPCR、Western blot 实验和免疫组化(IHC)实验测定 METTL14 表达情况。通过转染 siRNA 和质粒,敲低、过表达滋养细胞 METTL14 水平,开展体外细胞表型实验。通过 CCK-8、划痕试验、Transwell 实验和侵袭实验探究 METTL14 对滋养细胞增殖、迁移及侵袭的影响。**结果** 早发型子痫前期孕妇胎盘组织 m6A 水平较正常孕妇胎盘组织降低,METTL14 主要在滋养细胞细胞核中表达,与正常妊娠相比,METTL14 在早发型子痫前期胎盘组织中的表达降低,METTL14 mRNA 水平与胎盘组织 m6A 水平成正相关。CCK-8 实验结果显示,与对照组相比,敲低 METTL14 在滋养细胞中的表达,细胞增殖速度显著降低,过表达 METTL14 滋养细胞增殖能力增强。划痕试验结果显示,与对照组相比,METTL14 敲低后划痕的相对愈合率明显减小,过表达 METTL14 后划痕的相对愈合率增加。Transwell 实验和侵袭实验结果显示,与对照组相比,METTL14 敲低后,穿过小室的滋养细胞数目明显减少,过表达 METTL14 滋养细胞穿过小室的数目增多。**结论** 早发型子痫前期胎盘组织总 RNA m6A 修饰水平低于正常妊娠组,甲基转移酶 METTL14 的下调参与了总 RNA m6A 修饰水平的调控,过表达 METTL14 能够增强滋养细胞的增殖、迁移以及侵袭能力,为探究早发型子痫前期的发病机制提供了新视角。

关键词 早发型子痫前期;RNA;滋养细胞;m6A;METTL14

中图分类号 R 714.7

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)10-1887-10

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.10.015

子痫前期(preeclampsia, PE)是一种累及全身多个系统的疾病,在妊娠过程发病率为 2%~8%,是导致孕产妇及围产儿发病和死亡的重要原因^[1]。在妊娠 34 周前发病的 PE 称为早发型子痫前期(early-onset preeclampsia, ePE),其被认为是一种胎盘源性疾病,滋养细胞功能异常导致的胎盘功能障碍是其主要发病机制^[2]。研究^[3]表明 RNA 表观遗传可调控胎盘发育过程并参与胎盘源性疾病的发生发展,N6-甲基腺苷(N6-methyladenosine, m6A)修饰是真核生物 mRNA 中最丰富的转录后修饰,由甲基转移酶(Writer)、去甲基化酶(Eraser)以及阅读蛋白(Reader)共同参与^[4],其中甲基转移酶样蛋白 14(methyltransferase like protein 14, METTL14)与 MET-

TL13、肾母细胞瘤 1 相关蛋白(wilms tumor 1-associated protein, WTAP)共同构成甲基转移酶复合物,促进 m6A 的生成。去甲基化酶由脂肪和肥胖量相关蛋白(fat mass and obesity-associated protein, FTO)、Alkb 同源物 5(alkb homolog 5, ALKBH5)共同构成,两者都属于 α -酮戊二酸依赖性双加氧酶家族,通过 Fe(II)和 α -酮戊二酸依赖的方式去除 mRNA 中标记的 m6A 修饰,与 m6A 甲基转移酶共同调控,使体内 m6A 修饰水平保持动态平衡。“Reader”也称为 m6A 甲基识别蛋白,由来自不同蛋白家族的因子构成,包括核内不均一核糖核蛋白(heterogeneous nuclear ribonucleoproteins, hnRNPs)、胰岛素样生长因子 2 mRNA 结合蛋白 1/2/3(insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1/2/3, IGF2BP1/2/3)等,对 m6A 修饰的 RNA 的下游的生物学功能起决定作用。研究^[5]表明 m6A 的异常修饰参与人类多种疾病的发生,包括肿瘤、免疫系统疾病、生殖系统疾病等,但在 ePE 中的研究较少。本研究首先测定了 ePE 患者胎盘组织中的 m6A 水平,然后筛选表达水平明显改变的 m6A 甲基化调节蛋白,探究该蛋白对滋养细胞生物学功能的影响,探索

2025-05-14 接收

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:82301896);安徽省转化医学研究院科研基金项目(编号:2017zhxy09);安徽省重点研究与开发计划项目(编号:201904a07020046)

作者简介:唐 熊,女,硕士研究生;

张 英,女,教授,主任医师,硕士生导师,通信作者, E-mail: ahyingj@163.com

m6A 在 PE 发病的机制中的作用。

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集 2023 年 1—7 月在安徽医科大学妇产科住院分娩的产妇胎盘 30 例,其中 ePE 组 15 例,正常妊娠对照组 15 例,均采用剖宫产方式终止妊娠。PE 孕妇的纳入标准参照《妇产科学》第 9 版教材对 PE 的诊断:妊娠 20 周后出现收缩压 ≥ 18.62 kPa 和(或)舒张压 ≥ 11.97 kPa,并伴有蛋白尿 ≥ 0.3 g/24 h 或随机蛋白尿(+ +),或虽无蛋白尿但合并以下任何一项者:① 血小板减少;② 肝功能损害;③ 肾功能损害;④ 肺水肿;⑤ 新发头痛;⑥ 新发生的中枢神经系统异常或视觉障碍。排除标准:① 原发性高血压;② 糖尿病;③ 合并心、脑等严重的器质性病变;④ 自身免疫性疾病;⑤ 严重感染。研究对象均为单胎妊娠,无吸烟史及长期饮酒史。本研究经安徽医科大学伦理委员会批准(批号:P2021-12-22)。

1.2 标本保存和试剂 术中收集胎盘组织经 PBS 漂洗后,一份于 -80 ℃ 冰箱冻存,用于提取组织蛋白,另取两份浸于 4% 多聚甲醛溶液和 RNALater 中,用于免疫组化(immunohistochemistry, IHC)颜色及 RNA 的提取。人绒毛膜滋养细胞系 HTR-8-SVE-NO 和胎牛血清购自武汉普赛诺生物科技有限公司;DMEM-1640 培养基、PBS 购自武汉赛维尔生物科技有限公司;jetPRIME 转染试剂购自法国 Polyplus 公司;总 RNA 提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司;qPCR SYBR Green Master Mix 试剂购自上海翌圣生物科技有限公司;RNA m6A 甲基化测定试剂盒购自美国 Epigentek 公司;METTL3、FTO 抗体购自江苏亲科生物有限公司,METTL14 抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司;WTAP、ALK-BH5、IGF2BP2、GADPH 抗体购自美国 Immunoway 生物科技有限公司;CCK-8 试剂盒购自武汉亚科因生物技术有限公司;Transwell 小室购自天津本生健康科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 RNA 的提取及实时荧光定量 PCR 将 RNA Later 保存的胎盘组织剪碎,按照总 RNA 提取试剂盒步骤提取 RNA,并测定浓度和纯度。将总 RNA 逆转录为 cDNA 后,使用 qPCR SYBR Green Master Mix 进行 qPCR 检测,每个样品设置 3 个副孔,计算平均 C_T 值,采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法计算目的基因的相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 基因引物序列
Tab.1 Gene primer sequences

Gene	Primer sequences(5'-3')
METTL3	F:GCAGGCTCAACATACCCGTACT R:GATGCGTTGCAGTTGATTGTCT
METTL14	F:TGAGATTGCAGCACCTCGAT R:AATGAAGTCCCGTCTGTGC
WTAP	F:CTGACAAACGGACCAAGTAATG R:AAAGTCATCTTCGGTTGTGTTG
ALKBH5	F:CACATCCTGGAAGGCAGCAA R:CCCCCAAAGTGGTGGTATCC
FTO	F:CCAGAACCTGAGGAGAGAATGG R:CGATGCTGTGAGGTCAAACGG
IGF2BP2	F:AGTGGAAATTGCATGGGAAAATCA R:CAACGGCGGTTTCTGTGTC
GAPDH	F:TTCACCACCATGGAGAAGGC R:GGCATGGACTGTGTCATGA

1.3.2 m6A 水平测定 按照 m6A 甲基化定量试剂盒说明书进行操作。在条形井中加入 80 μ L 结合液进行 RNA 结合,以及 2 μ L 阳性对照和 2 μ L 阴性对照,加入 200 ng RNA 样本,混匀后 37 ℃ 孵育 90 min;弃去结合液,Western blot 溶液洗涤后依次加入 50 μ L 捕获抗体溶液、50 μ L 检测抗体溶液、50 μ L 增强液溶液进行 m6A RNA 捕获,加入不同溶液前用洗涤液清洗;加入 100 μ L 显色溶液室温避光孵育,当阳性对照孔颜色变为中蓝时加入 100 μ L 终止溶液终止反应,于酶标仪 450 nm 处读取吸光度,计算 m6A 的相对量比。

1.3.3 蛋白质的提取及 Western blot 实验 从 -80 ℃ 冰箱取出胎盘组织,称取 20 mg 加入含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液 400 μ L,加入研磨钢珠低温、间歇超声裂解后冰上静置 10 min,4 ℃ 14 000 r/min 离心 20 min,收集上清液,加入 1/4 体积 5 $\times$ 蛋白上样缓冲液,100 ℃ 金属浴 10 min,用于 Western blot 实验上样。蛋白电泳结束后,采用“三明治”法转膜,5% 牛血清白蛋白室温封闭 2 h,TBST 洗膜后 4 ℃ 孵育一抗过夜。次日 TBST 洗膜后室温孵育相应种属来源的二抗 2 h,洗膜后显影液显影,采用 Image J 软件对条带灰度值进行相对定量分析。

1.3.4 IHC 染色 组织切片后 65 ℃ 烤片 90 min,二甲苯脱蜡梯度乙醇复水,EDTA 抗原修复后 0.3% 曲拉通通透,内源性过氧化物酶灭活 30 min,PBS 清洗后采用 10% 山羊血清封闭 30 min,滴加稀释好的一抗 4 ℃ 过夜孵育,PBS 洗涤后滴加对应二抗孵育 30 min,二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)显色,镜下观察目标蛋白出现清晰的棕色而非特异性

蛋白未显色时终止反应,苏木精染核,终止显色后中性树脂封片,显微镜拍照保存。

1.3.5 小干扰 RNA (small disturbance RNA, siRNA)和质粒的构建及细胞转染 si-METTL14 由安徽通用生物股份有限公司合成,过表达 METTL14 的质粒由武汉灵淼生物科技有限公司合成。细胞用 0.25% 的胰酶消化后铺于 6 孔板中,汇合度达到 50% ~ 60% 用 jetPRIME 试剂转染并设置对照组,48 h 后进行后续细胞实验,并提取细胞总 RNA 和蛋白质,通过实时荧光定量 PCR 和 Western blot 实验验证转染效果,测定 m6A 水平。

1.3.6 细胞增殖实验 胰酶消化细胞后计数,梯度稀释至 2×10^4 /mL,取 100 μ L (2 000 个/孔)铺于 96 孔板,细胞贴壁后,将完全培养液和 CCK-8 试剂以 9 : 1 的比例混合,每孔加入 100 μ L 并设置对照组,放入培养箱避光培养 2 h,使用酶标仪读取 450 nm 处的吸光度 OD 值。

1.3.7 划痕试验 在 6 孔板底部用马克笔划 3 条横线,待转染组及相应的对照组细胞长满后,用 200 μ L 吸头垂直于孔板和标记线划 2 条垂线,用 PBS 润洗 2 ~ 3 次,加入含 1% FBS 的培养液继续培养,在 0、24 h 显微镜下观察并拍照,使用 Image J 软件统计划痕的面积。

1.3.8 细胞侵袭及迁移实验 基质胶化冻后,用无血清培养基以 1 : 8 的比例稀释,每个 Transwell 小室加入 60 μ L,放入培养箱孵育 2 ~ 3 h,使基质胶聚合成膜,去除多余液体。将干扰 METTL14 表达后的细胞消化,用无血清培养基重悬并计数,将细胞密度调整至 2×10^5 / mL,取 100 μ L 加入上室,下室加入含 10% FBS 的完全培养基 600 μ L,温箱培养 48 h。取出小室 PBS 清洗,4% 多聚甲醛固定 10 min,结晶紫染色 10 min,流水冲洗去除多余染料,用棉签擦除小室内未穿过的细胞,显微镜下观察并拍照。迁移

实验小室内不用铺基质胶,其余步骤同侵袭实验。

1.4 统计学处理 应用 GraphPad Prism 9 软件进行统计学分析。计量资料使用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,正态分布且方差齐的两组间使用 *t* 检验,多组间不同时间点数据比较采用重复测量资料的方差分析,两组间构成比采用卡方 (χ^2) 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 研究对象的一般资料 对纳入研究的孕妇年龄、体质量指数 (body mass index, BMI)、孕周、血压、随机蛋白尿、新生儿体质量、Apgar 评分等临床信息进行统计,发现除年龄外,差异均有统计学意义。见表 2。

2.2 两组胎盘组织中 m6A 水平及其相关蛋白的表达情况 提取组织 RNA 测定后显示,与正常妊娠组相比,ePE 组胎盘总 RNA m6A 水平降低 (图 1A),差异有统计学意义 ($t = 5.220, P < 0.001$)。为探究引起胎盘甲基化水平降低的主要原因,通过 RT-qPCR (图 1B) 和 Western blot 实验 (图 1C) 测定甲基转移酶 METTL3、METTL14、WTAP、去甲基化酶 ALKBH5、FTO 以及阅读蛋白 IGF2BP2 的 mRNA 和蛋白水平。结果显示 (图 1D),ePE 胎盘甲基化酶 METTL3 mRNA 水平较正常妊娠降低 ($P = 0.020$),但蛋白水平无明显差异。WTAP、FTO、ALKBH5、IGF2BP2 的表达也无明显差异。甲基化酶 METTL14 mRNA 水平及蛋白较正常妊娠降低,差异有统计学意义 ($t = 4.920, P < 0.01$)。

2.3 两组胎盘组织中 m6A 调节蛋白的组织表达情况 为明确 m6A 调节蛋白在胎盘组织中的细胞定位和表达情况,采用 IHC 法进行实验,Image J 软件进行平均吸光度分析 (图 2M)。结果显示,甲基转移酶 METTL3、METTL14、WTAP 主要在滋养细胞核

表 2 两组孕妇临床参数比较 ($\bar{x} \pm s$)
Tab.2 Comparison of clinical parameters between the two groups of pregnant women ($\bar{x} \pm s$)

Item	Early-onset preeclampsia (n = 15)	Normal pregnancy (n = 15)	t value	P value
Age (years)	31.13 $\pm$ 2.22	31.20 $\pm$ 2.26	0.08	0.940
BMI (kg/m ²)	25.08 $\pm$ 4.54	21.47 $\pm$ 2.20	2.68	0.010
Systolic blood pressure (kPa)	20.95 $\pm$ 2.02	15.37 $\pm$ 1.30	8.70	<0.001
Diastolic blood pressure (kPa)	13.84 $\pm$ 1.90	10.35 $\pm$ 1.11	5.84	<0.001
Random proteinuria (1 + - 3 +)	2.47 $\pm$ 1.02	0	9.01	<0.001
Gestational age of delivery (weeks)	31.97 $\pm$ 2.40	36.50 $\pm$ 3.20	4.27	<0.001
Birth weight (g)	1 612 $\pm$ 572.04	2 793 $\pm$ 820.47	4.42	<0.001
Apgar score (1 min)	7.53 $\pm$ 1.13	10.00	7.05	<0.001

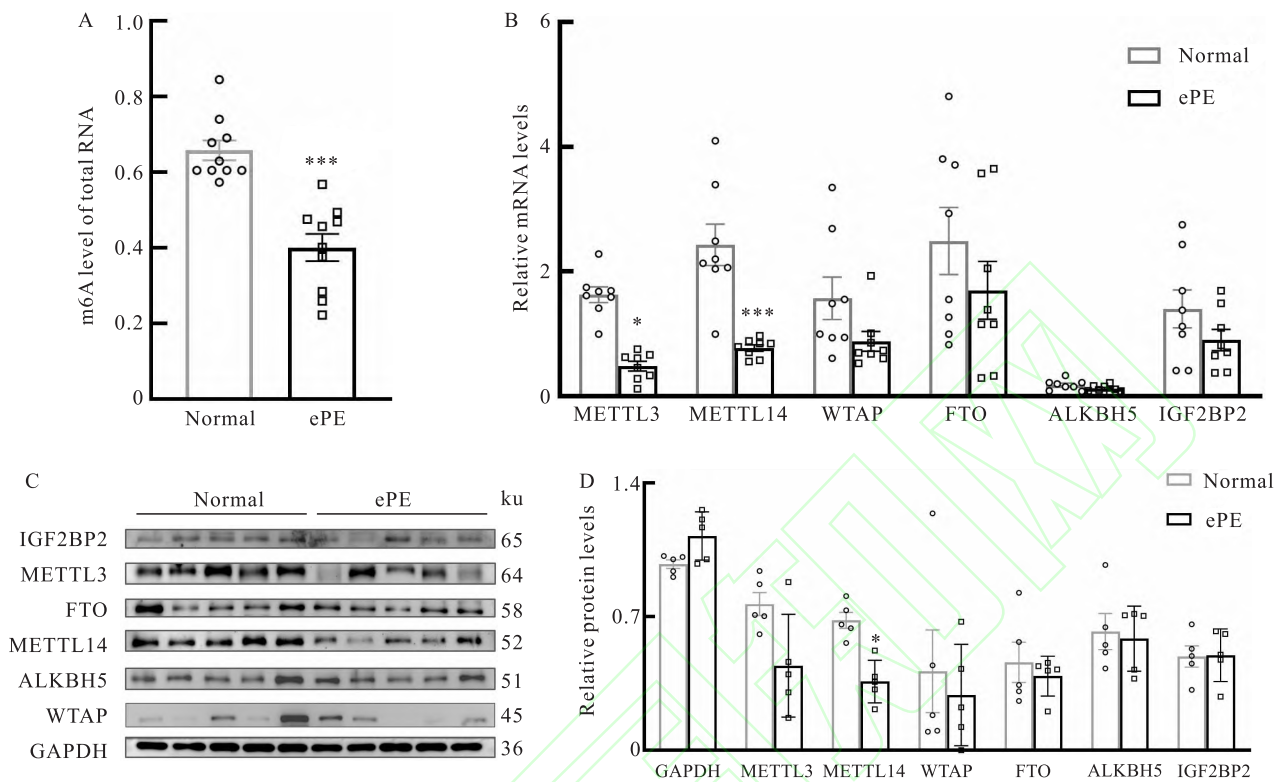


图1 胎盘组织 m6A 及其调节酶表达水平

Fig.1 The expression levels of m6A and its regulatory enzymes in placental tissue

A: The total RNA m6A level in placental tissue; B: mRNA levels of m6A regulatory protein; C: Western blot analysis of m6A regulatory proteins ; D: bar graph analysis of Western blot results; * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs Normal group.

中表达, METTL3(图 2A、2B)和 WTAP(图 2E、2F)在 ePE 胎盘组织和正常妊娠胎盘组织中的表达差异无统计学意义, METTL14(图 2C、2D)在 ePE 胎盘组织中的表达较正常妊娠组降低,且差异有统计学意义($t = 3.326$, $P = 0.022$)。去甲基化酶 FTO(图 2G、2H)、ALKBH5(图 2I、2J)在细胞核和细胞质中均有表达,细胞核更明显,在两组胎盘组织中的表达差异无统计学意义。阅读蛋白 IGF2BP2(图 2K、2L)主要在胞质中表达,在 ePE 和正常妊娠胎盘组织中的表达差异无统计学意义。

2.4 胎盘组织 m6A 水平与 METTL14 的相关性分析 基于 RT-qPCR、Western blot 和 IHC 实验,显示 METTL14 的表达水平在 ePE 期中变化最为显著,进一步将胎盘组织 RNA m6A 甲基化修饰水平与 METTL14 表达水平进行相关性分析,构建二者的表达相关性曲线,显示 RNA m6A 修饰水平与 METTL14 表达水平呈正相关(图 3), $Y = 0.167X + 0.287$ (Y : 胎盘总 RNA m6A 甲基化修饰水平, X : METTL14 mRNA 水平, $P < 0.001$)。

2.5 敲低及过表达 METTL14 后滋养细胞 m6A 水平 Western blot 实验验证干扰 METTL14 后滋养细胞中的蛋白表达情况(图 4A)。提取细胞总 RNA 测定 m6A 甲基化水平,显示 METTL14-siRNA 瞬时转染后细胞 m6A 甲基化降低($t = 15.230$, $P = 0.003$),过表达 METTL14 细胞 m6A 甲基化升高($t = 4.220$, $P = 0.0135$)(图 4B)。

2.6 敲低 METTL14 对滋养细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响 CCK-8 增殖实验中,下调 METTL14 的表达后,滋养细胞增殖能力降低(图 4C, $P_{48h} < 0.01$, $P_{72h} < 0.05$)。细胞划痕试验结果(图 5A、5B)显示,敲低 METTL14 的表达,划痕愈合速度慢于对照组($t = 17.900$, $P < 0.001$)。Transwell 迁移实验显示(图 5C),METTL14 表达降低后,与对照组相比,相同时间内穿过小室的细胞数量明显降低($t = 10.520$, $P < 0.0001$)。侵袭实验中(图 5D),与对照组相比, METTL14 表达降低,穿过基质胶的细胞减少($t = 5.850$, $P = 0.0008$)。因此,下调 METTL14 可抑制滋养细胞的增殖、迁移和侵袭。

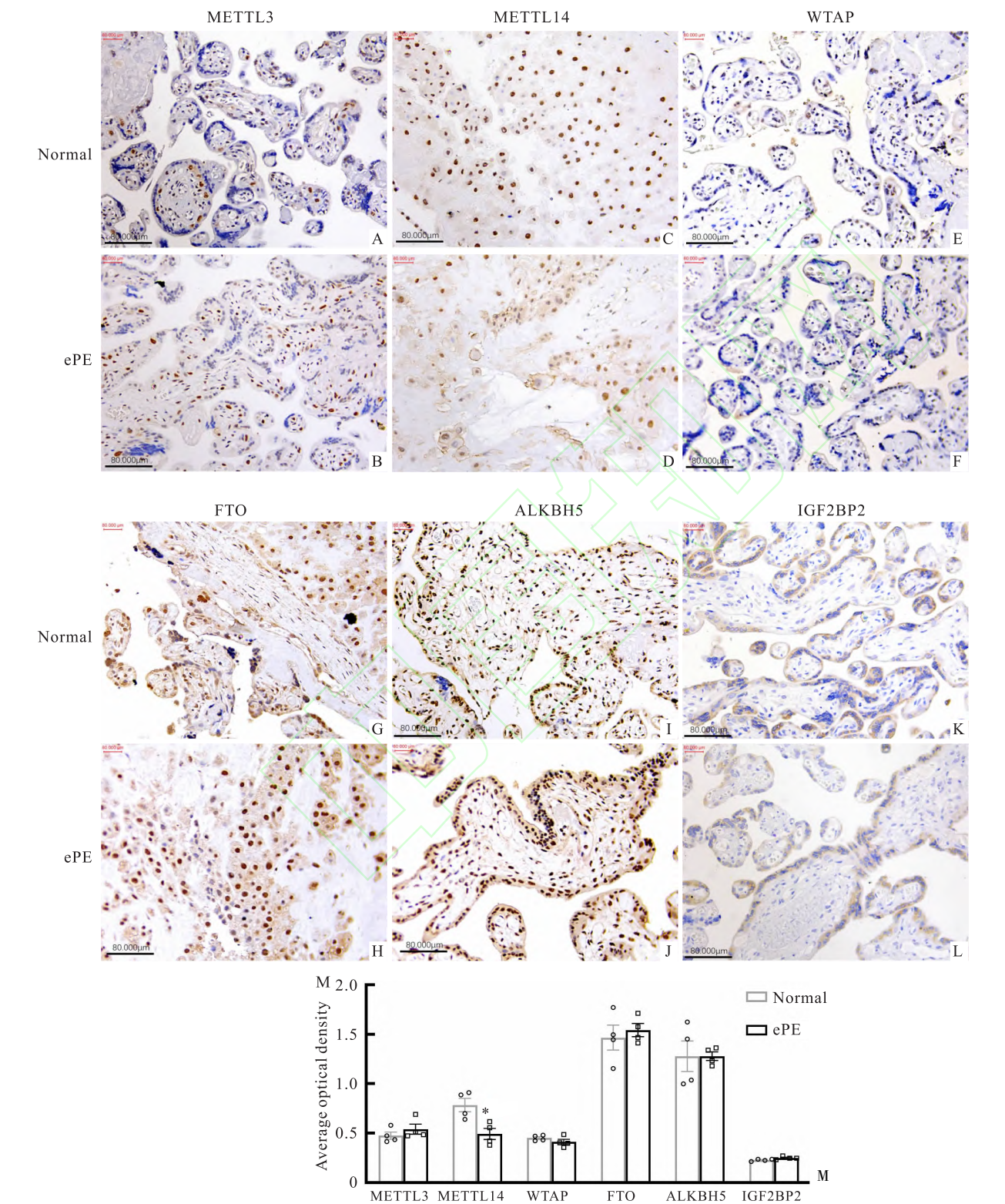


图2 m6A 调节酶在胎盘组织中的定位和表达 ×200

Fig.2 Localization and expression of m6A regulatory enzymes in placental tissue ×200

A, B: METTL3 expression in placental tissues; C, D: METTL14 expression in placental tissues; E, F: WTAP expression in placenta; G, H: FTO expression in placental tissues; I, J: ALKBH5 expression in placental tissues; K, L: IGF2BP2 expression in placental tissues; M: Statistical analysis of IHC average optical density; * $P < 0.05$ vs Normal group.

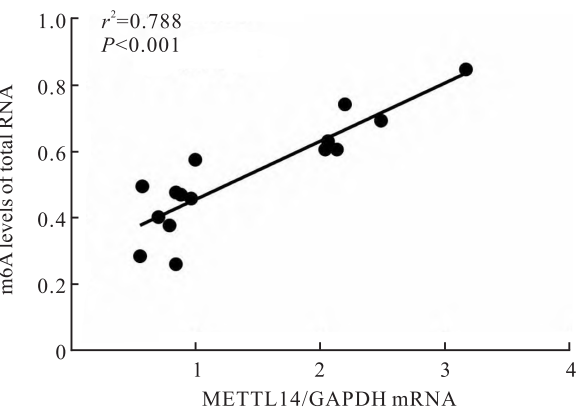


图3 胎盘组织 m6A 甲基化修饰水平与 METTL14 mRNA 水平的线性相关分析

Fig.3 Linear correlation analysis between m6A methylation modification levels and METTL14 mRNA levels in placental tissues

2.7 过表达 METTL14 对滋养细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响 CCK-8 增殖实验中,过表达 METTL14 后,滋养细胞增殖能力增强(图 4D, $P_{24\text{ h}} <$

0.05 , $P_{48\text{ h}} < 0.05$, $P_{72\text{ h}} < 0.01$)。细胞划痕试验(图 6A)结果(图 6B)显示, METTL14 过表达后,划痕愈合速度快于对照组($t = 4.810$, $P = 0.0086$)。Transwell 迁移实验显示(图 6C), METTL14 表达升高后,相同时间内穿过小室的细胞数量多于对照组($t = 7.018$, $P = 0.0002$)。侵袭实验中(图 6D),与对照组相比,过表达 METTL14 后穿过基质胶的细胞增多($t = 2.960$, $P = 0.0362$)。因此,上调 METTL14 可显著促进滋养细胞的增殖、迁移和侵袭。

3 讨论

PE 病情重,变化快,严重危害母子健康,目前除适时终止妊娠外没有确切有效的预防和治疗手段。与晚发型相比较,ePE 起病隐匿,病程进展迅速,更容易造成严重的临床后果,进一步探索其发病机制具有重要意义。正常妊娠依赖健康的子宫-胎盘循环的建立,滋养细胞是这一关系建立的关键,妊娠期间,由细胞滋养细胞分化而来的绒毛外滋养细胞侵

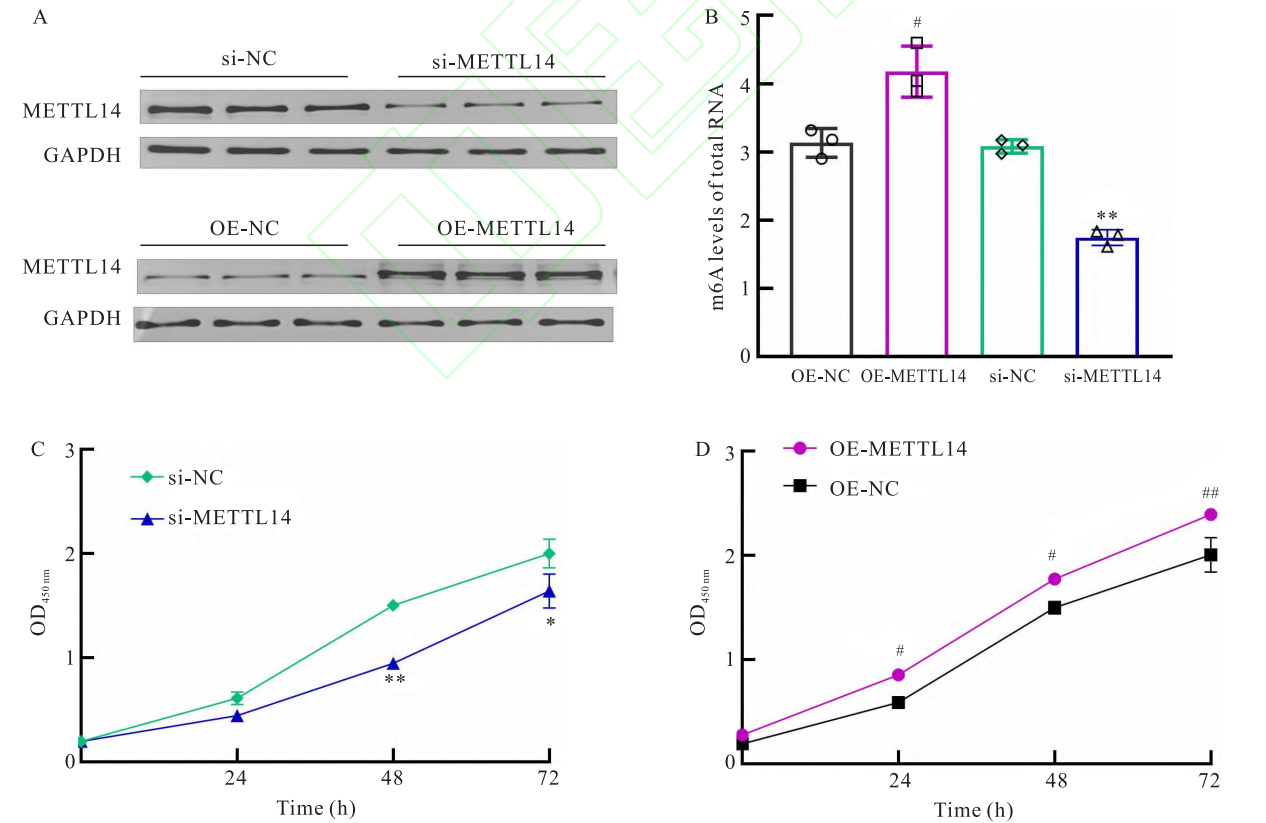


图4 敲低及过表达 METTL14 后滋养细胞 m6A 水平及增殖能力

Fig.4 Cell m6A level and proliferation ability after knockdown and overexpression of METTL14

A: Knockdown and overexpression effects were verified by Western blot; B: Trophoblast m6A level after interfering METTL14 expression; C: CCK-8 was used to detect the proliferation of trophoblast cells after METTL14 knockdown; D: CCK-8 was used to detect the proliferation ability of trophoblast cells after the overexpression of METTL14; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs si-NC group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs OE-NC group.

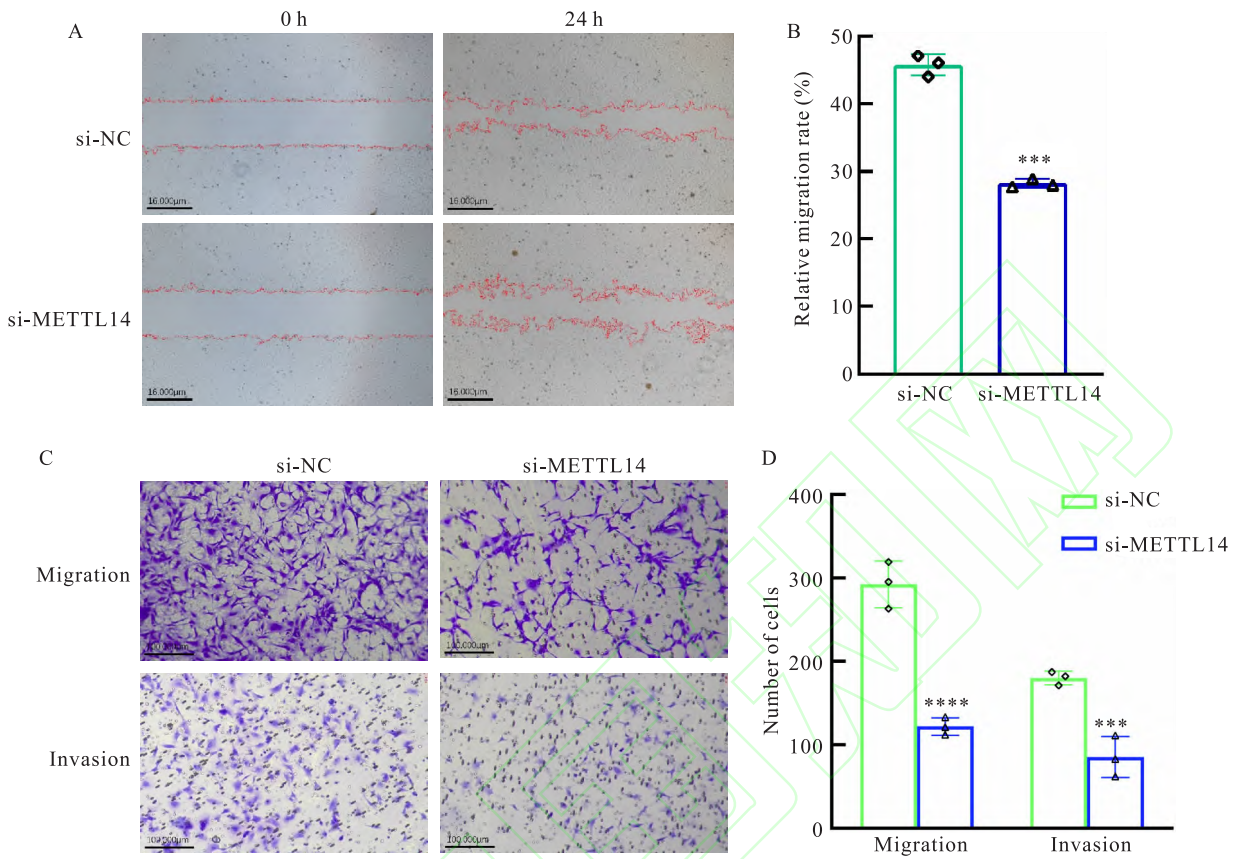


图5 敲低 METTL14 后滋养细胞的迁移及侵袭能力

Fig.5 The migration and invasion of trophoblast cells after the knockdown of METTL14

A: Scratch test $\times 40$; B: The percentage of cell healing area in the total scratch area in each group; C: Migration and invasion assay $\times 250$; D: Statistical analysis of migration and invasion assay; *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ vs si-NC group.

入子宫,在子宫螺旋动脉内形成细胞栓,通过凋亡机制破坏血管内皮,将狭窄、肌性的螺旋动脉转化为扩张、低阻力的子宫胎盘血管^[6]。当滋养细胞侵袭不足时,仅蜕膜血管而非子宫肌层血管被侵袭,造成“胎盘浅着床”,胎盘灌注减少,继而引发一系列 PE 的症状。能引起滋养细胞侵袭不足的因素较多,包括氧化应激、母胎界面自然杀伤细胞异常、表观遗传和环境因素等^[7]。

表观遗传修饰种类繁多,如 DNA 甲基化、组蛋白修饰、染色质重塑、非编码 RNA 调控等,m6A 甲基化修饰是真核生物 mRNA 最常见的转录后修饰,能够参与 mRNA 的翻译、核输出和衰变等过程,对于细胞分化、细胞运动、细胞应激反应等生物学过程具有重要的调控作用,与多个系统疾病的发生有关^[8]。本研究从 ePE 胎盘组织和正常胎盘组织总 RNA m6A 修饰水平入手,探究 m6A 修饰与 ePE 发病的相关性,为进一步认识 PE 的发病基础提供了新途径。

本研究提取胎盘组织总 RNA 后,通过显色法检测 m6A 甲基化水平,显示 ePE 胎盘组织 m6A 水平较正常妊娠组降低,有研究者^[9-11]对 m6A 修饰与 PE 相关性的研究也显示出一致的结果。Wang et al^[12]的研究则指出 PE 胎盘组织中 m6A 水平升高,经对照研究对象和实验方法推测:学者的研究结果不一致可能与选取的 PE 胎盘组织孕周较大(> 37 周)有关。PE 的发病机制还未完全阐明,ePE 主要与滋养细胞侵袭不足导致的子宫螺旋动脉重塑不足有关,晚发型子痫前期可能与胎盘绒毛过度拥挤、胎盘早衰等引起的合体滋养细胞应激有关^[13],不同的研究结果也进一步证明了 PE 的发病机制存在多样性。RNA m6A 甲基化水平受到甲基转移酶(Writer)、去甲基化酶(Eraser)和阅读蛋白(Reader)的动态调控,m6A 水平降低或与“Writer”表达降低、“Eraser”表达增多有关。为进一步探究引起胎盘组织 m6A 水平变化的原因,本实验通过 RT-qPCR、Western blot 实验和 IHC 实验继续探究表明,ePE 胎盘组

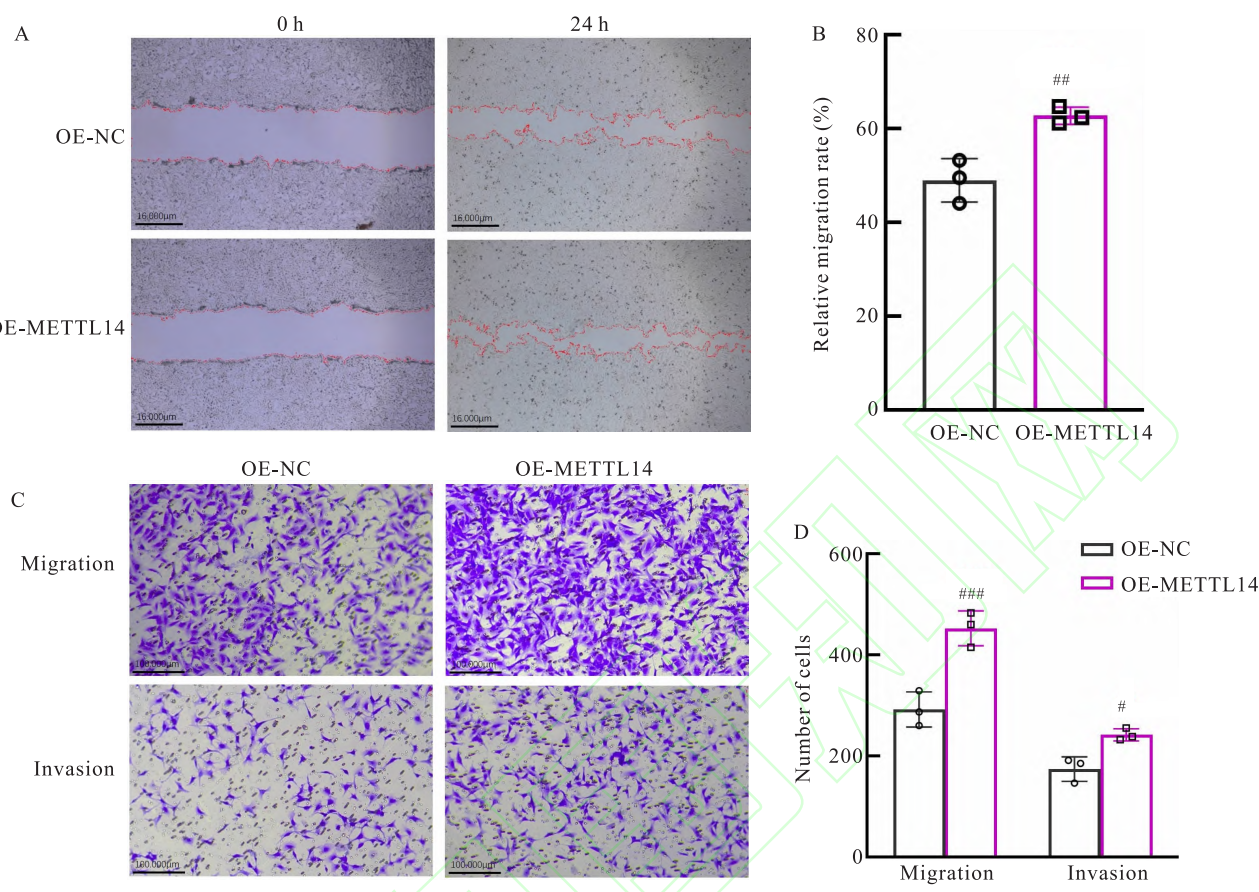


图6 过表达 METTL14 后滋养细胞的迁移及侵袭能力

Fig. 6 The migration and invasion of trophoblast cells after the overexpression of METTL14

A: Scratch test $\times 40$; B: The percentage of cell healing area in the total scratch area in each group; C: Migration and invasion assay $\times 250$; D: Statistical analysis of migration and invasion assay; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs OE-NC group.

织中甲基转移酶 METTL14 的表达水平较对照组降低,且 METTL14 的表达水平和 m6A 甲基化修饰水平呈正相关。

METTL14 在促进 m6A 生成中并不具备与 S-腺苷甲硫氨酸结合的结构域,而是通过与 METTL3 结合形成二聚体,作为 METTL3 的变构激活剂发挥作用。为进一步探究 METTL14 在 ePE 发病机制中的作用,根据 ePE 的发病机制与滋养细胞的浸润不足有关,本实验通过转染 siRNA 和过表达质粒改变 METTL14 在 HTR-8/Sveon 细胞系中的表达,利用 CCK-8 增殖实验、划痕试验、迁移实验和侵袭实验来观察 METTL14 对滋养细胞增殖、侵袭以及迁移能力的影响。CCK-8 增殖实验结果显示,过表达 METTL14 后,滋养细胞的增殖能力增强;在划痕试验中观察到 METTL14 在滋养细胞中的表达增多后,细胞划痕的相对愈合率升高;在迁移实验和基质胶侵袭实验中,过表达 METTL14 后,穿过小室膜的细胞数

量增多。此外,Qin et al^[14]研究表明在自然流产的绒毛组织中 m6A 表达降低,METTL14 的低表达参与其改变,且与滋养细胞的侵袭能力降低有关,这有助于将 m6A 及其调节酶的改变与 ePE 的发病机制联系到一起。

以上实验结果显示,METTL14 以及 m6A 的异常修饰在 ePE 的发病机制中发挥了重要的作用,同时也提示了 METTL14 以及 m6A 的异常修饰或许能为 ePE 的早期诊断及治疗提供新思路。但本研究还存在一些不足之处:一方面,实验组与对照组存在孕周不匹配的情况,孕周对 m6A 甲基化水平的影响仍需扩大样本量验证。另一方面,本研究没有系统筛选受 m6A 修饰的,能够影响滋养细胞功能的下游基因。研究^[15]表明,m6A 甲基化修饰能够影响滋养细胞中 HLA-G、VEGFR 和 MMP9 的表达水平,或许可以作为进一步研究的新靶点。此外,研究中没有探究引起胎盘组织中 METTL14 表达降低的上游基

因,研究^[16]表明,KDM5C 能够抑制 METTL14 的转录,在 PE 发病中的作用需要深入探究。最后,研究仅局限于细胞水平,未展开动物实验的探究,后续研究将在动物模型中进一步研究。

参考文献

- [1] Dimitriadis E, Rolnik D L, Zhou W, et al. Pre-eclampsia[J]. Nat Rev Dis Primers, 2023, 9: 8. doi:10.1038/s41572-023-00417-6.
- [2] Burton G J, Redman C W, Roberts J M, et al. Pre-eclampsia; pathophysiology and clinical implications[J]. BMJ, 2019, 366: l2381. doi:10.1136/bmj.l2381.
- [3] Apicella C, Ruano C S M, Méhats C, et al. The role of epigenetics in placental development and the etiology of preeclampsia[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20 (11): 2837. doi: 10.3390/ijms20112837.
- [4] Oerum S, Meynier V, Catala M, et al. A comprehensive review of m6A/m6A mRNA methyltransferase structures[J]. Nucleic Acids Res, 2021, 49(13): 7239-55. doi:10.1093/nar/gkab378.
- [5] An Y, Duan H. The role of m6A RNA methylation in cancer metabolism[J]. Mol Cancer, 2022, 21 (1): 14. doi:10.1186/s12943-022-01500-4.
- [6] Cross J C, Hemberger M, Lu Y, et al. Trophoblast functions, angiogenesis and remodeling of the maternal vasculature in the placenta[J]. Mol Cell Endocrinol, 2002, 187 (1 - 2): 207-12. doi:10.1016/s0303-7207(01)00703-1.
- [7] Hemberger M, Dean W. The placenta; epigenetic insights into trophoblast developmental models of a generation-bridging organ with long-lasting impact on lifelong health [J]. Physiol Rev, 2023, 103(4): 2523-60. doi:10.1152/physrev.00001.2023.
- [8] Bu F T, Wang H Y, Xu C, et al. The role of m6A-associated membraneless organelles in the RNA metabolism processes and human diseases[J]. Theranostics, 2024, 14 (12): 4683-700. doi:10.7150/thno.99019.
- [9] Guo Y, Song W, Yang Y. Inhibition of ALKBH5-mediated m(6) A modification of PPARG mRNA alleviates H/R-induced oxidative stress and apoptosis in placenta trophoblast[J]. Environ Toxicol, 2022, 37(4): 910-24. doi:10.1002/tox.23454.
- [10] Zhang T, Tang X, Zhu Y, et al. IGF2BP2 enhances Lin-cRNA01116 stability via m(6) A: a potential biomarker and therapeutic target for patients with pre-eclampsia[J]. J Cell Biochem, 2023, 124(2): 239-53. doi:10.1002/jcb.30358.
- [11] Bian Y, Li J, Shen H, et al. WTAP dysregulation-mediated HMG3-m6A modification inhibited trophoblast invasion in early-onset preeclampsia[J]. FASEB J, 2022, 36(12): e22617. doi: 10.1096/fj.202200700RR.
- [12] Wang J, Gao F, Zhao X, et al. Integrated analysis of the transcriptome-wide m6A methylome in preeclampsia and healthy control placentas[J]. PeerJ, 2020, 8: e9880. doi:10.7717/peerj.9880.
- [13] Lyall F, Robson S C, Bulmer J N. Spiral artery remodeling and trophoblast invasion in preeclampsia and fetal growth restriction: relationship to clinical outcome[J]. Hypertension, 2013, 62(6): 1046-54. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01892.
- [14] Qin X, Huo X, Dong J, et al. METTL14 depletion induces trophoblast cell dysfunction by inhibiting miR-21-5p processing in an m6A-dependent manner[J]. Int Immunopharmacol, 2024, 142 (Pt B): 113200. doi:10.1016/j.intimp.2024.113200.
- [15] Li X, Wu C, Shen Y, et al. Ten-eleven translocation 2 demethylates the MMP9 promoter, and its down-regulation in preeclampsia impairs trophoblast migration and invasion [J]. J Biol Chem, 2018, 293 (26): 10059-70. doi: 10.1074/jbc.RA117.001265.
- [16] Chen X, Xu M, Xu X, et al. METTL14-mediated N6-methyladenosine modification of SOX4 mRNA inhibits tumor metastasis in colorectal cancer[J]. Mol Cancer, 2020, 19(1): 106. doi:10.1186/s12943-020-01220-7.

Expression of m6A methyltransferase METTL14 in trophoblast cells and its effect on the development of early-onset preeclampsia

Tang Xiong, Chen Fan, Xie Siyu, Guo Yafei, He Ye, Zhang Ying

(Dept of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To explore the role of N6-methyladenosine (m6A) modification of RNA and Methyltransferase like Protein 14 methyltransferase (METTL14) in the pathogenesis of early-onset preeclampsia (ePE). **Methods** Placental tissues of 15 pregnant women with early-onset preeclampsia and 15 normal pregnant women were collected. The level of m6A was determined by colorimetry, and the expression of METTL14 was determined by RT-qPCR, Western blot and immunohistochemistry (IHC) experiments. By transfecting siRNA and plasmid, METTL14 levels of trophoblast cells were knocked down and overexpressed, and cell phenotype experiments were carried out *in vitro*. The effects of METTL14 on the proliferation, migration and invasion of trophoblast cells were investigated by CCK-8, scratch assay, Transwell assay and invasion assay. **Results** The level of m6A in placental tissue of ePE was lower than that of normal pregnancy. METTL14 was mainly expressed in the nuclei of trophoblast cells. Compared with normal pregnancy, the expression of METTL14 in placental tissue of ePE decreased, and the

(下转第1907页)

SeVGMT, CTRP3-Lv, or UCHL1-sh according to their grouping. Four weeks after treatment, fractional shortening (FS), ejection fraction (EF), left ventricular end-diastolic diameter (LVIDd), left ventricular end-systolic diameter (LVIDs), heart rate (HR), mean arterial pressure (MAP), serum creatine kinase isoenzyme MB (CK-MB), myocardial troponin I (cTnI) and lactate dehydrogenase (LDH) levels, and myocardial tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) and interleukin-6 (IL-6) levels in mice were detected. The pathological changes of myocardial tissue were detected by 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC), hematoxylin-eosin (HE), Masson trichrome and terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) staining. The mRNA expressions of CTRP3 and UCHL1 were detected by qRT-PCR. The protein expressions of CTRP3, UCHL1, collagen I, collagen III, Bcl-2-associated X (Bax) and B-cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2) in myocardial tissue were detected by Western blot or immunohistochemical staining. **Results** Compared with SeVGMT group and CTRP3-Lv group, the levels of EF, FS, HR and MAP in SeVGMT + CTRP3-Lv group increased ($P < 0.05$). The levels of LVIDd, LVIDs, CK-MB, cTnI, LDH, TNF- α , IL-1 β and IL-6 decreased ($P < 0.05$). MI area, fibrosis area and TUNEL positive rate decreased ($P < 0.05$), the protein levels collagen I, collagen III and Bax decreased ($P < 0.05$), and Bcl-2 protein levels increased ($P < 0.05$). The mRNA and protein levels and relative staining intensity of CTRP3 and UCHL1 increased ($P < 0.05$). Compared with SeVGMT + CTRP3-Lv group, the addition of UCHL1-sh treatment (SeVGMT + CTRP3-Lv + UCHL1-sh group) significantly weakened the influence of SeVGMT + CTRP3-Lv on the above indexes ($P < 0.05$). **Conclusion** CTRP3 mediated UCHL1 enhances the therapeutic effect of SeVGMT reprogrammed CFs on MI in mice.

Key words myocardial infarction; C1q tumor necrosis factor-related protein 3; SeVGMT; reprogramming; cardiac fibroblasts; ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1

Fund programs National Natural Science Foundation of China (Nos. 81960080,81760069)

Corresponding author Song Yanbin, E-mail: SongDrYB@163.com

(上接第 1895 页)

level of METTL14 mRNA was positively correlated with the level of m6A in placental tissue. The results of the CCK-8 experiment showed that compared with the control group, knockdown of METTL14 expression in trophoblast cells significantly reduced the cell proliferation rate, while the proliferation ability of trophoblast cells with overexpressed METTL14 was enhanced. The results of the scratch test showed that compared with the control group, the relative healing rate of scratches was significantly reduced after METTL14 knockdown, while it increased after the overexpression of METTL14. The results of the Transwell assay and invasion assay showed that compared with the control group, after knockdown of METTL14, the number of trophoblast cells passing through the chamber was significantly reduced, while the number of trophoblast cells with overexpressed METTL14 passing through the chamber increased. **Conclusion** The total RNA m6A modification level in placental tissue of ePE is lower than that in the normal pregnancy group. The down-regulation of methyltransferase METTL14 is involved in the regulation of the total RNA m6A modification level. The overexpression of METTL14 can enhance the proliferation, migration and invasion abilities of trophoblast cells. It provides a new perspective for exploring the pathogenesis of early-onset preeclampsia.

Key words early-onset preeclampsia; RNA; trophoblast cell; m6A; METTL14

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 82301896); Research Project of Anhui Provincial Institute of Translational Medicine (No. 2017zhxy09); Key Research and Development Program of Anhui Province (No. 201904a07020046)

Corresponding author Zhang Ying, E-mail: ahyingjj@163.com