

· 论著 · 一次研究 ·

WTAP通过调控ACSL4 m⁶A甲基化促进脂多糖诱导人肾小管上皮细胞铁死亡的研究

张 琴¹, 唐 庆², 陈兵阳¹

1. 成都市第七人民医院重症医学科 (成都 610213)

2. 成都市第七人民医院呼吸内科 (成都 610213)

【摘要】目的 探讨 Wilms 肿瘤 1 相关蛋白 (WTAP) 在脂多糖 (LPS) 诱导人肾小管上皮细胞 (HK-2) 铁死亡中的作用及分子机制。**方法** 基于 GEO 数据库分析 *WTAP* 和长链酯酰辅酶 A 合成酶 4 (*ACSL4*) 在急性肾损伤和健康对照组织中的表达差异。采用 10 $\mu\text{g/mL}$ LPS 处理 HK-2 细胞, 检测细胞活性、凋亡、活性氧 (ROS) 水平、谷胱甘肽 (GSH) 和 Fe^{2+} 含量, 并通过 Western blotting 检测 GPX4、*ACSL4* 和 WTAP 的蛋白表达。采用 MeRIP-qPCR 检测 *ACSL4* 的 m⁶A 甲基化水平。利用 si-RNA 和质粒构建 *WTAP* 基因干扰与 *ACSL4* 过表达的细胞模型, 检测 *ACSL4* 与 WTAP 的结合, 以及 *ACSL4* 过表达对细胞损伤和铁死亡的影响。**结果** 与健康对照组相比, 急性肾损伤组织中 *WTAP* 和 *ACSL4* 的表达显著上调。LPS 处理以时间依赖性方式降低 HK-2 细胞活性, 促进细胞凋亡, 降低 GSH 含量, 提升 Fe^{2+} 和 ROS 水平, 并降低 GPX4 表达, 同时上调 WTAP 和 *ACSL4* 的蛋白表达以及 *ACSL4* 的 m⁶A 甲基化水平。敲低 *WTAP* 后, *ACSL4* 的蛋白表达和 m⁶A 甲基化水平下降, *ACSL4* 和 WTAP 的结合能力降低, 并且 *ACSL4* 的 mRNA 稳定性减弱。与 LPS 组相比, LPS+si-WTAP 组 HK-2 细胞活性升高, 凋亡和铁死亡水平降低, 而 *ACSL4* 过表达逆转了 si-WTAP 对 HK-2 细胞的保护作用。**结论** WTAP 通过促进 *ACSL4* 的 m⁶A 甲基化修饰, 上调 *ACSL4* 表达, 进而促进 LPS 诱导的 HK-2 细胞铁死亡和细胞损伤。

【关键词】 Wilms 肿瘤 1 相关蛋白; 长链酯酰辅酶 A 合成酶 4; N⁶- 甲基腺苷; 铁死亡; 脓毒症

【中图分类号】 R 631; R 692.5 **【文献标识码】** A

WTAP promotes lipopolysaccharides-induced ferroptosis in human renal tubular epithelial cells by regulating *ACSL4* m⁶A methylation

ZHANG Qin¹, TANG Qing², CHEN Bingyang¹

1. Department of Intensive Care Medicine, Chengdu Seventh People's Hospital, Chengdu 610213, China

2. Department of Respiratory Medicine, Chengdu Seventh People's Hospital, Chengdu 610213, China

Corresponding author: CHEN Bingyang, Email: bingyang_ch@163.com

【Abstract】Objective To investigate the role of Wilms' tumor 1-associating protein (WTAP) in lipopolysaccharide (LPS) induced ferroptosis in human renal tubular epithelial cells (HK-2) and its molecular mechanism. **Methods** Expression differences of *WTAP* and long chain acyl-CoA synthetase 4 (*ACSL4*) between acute kidney injury tissues and healthy control tissues were analyzed based on the GEO database. HK-2 cells were treated with 10 $\mu\text{g/mL}$ LPS, and cell

DOI: 10.12173/j.issn.1004-5511.202503048

通信作者: 陈兵阳, 主任医师, Email: bingyang_ch@163.com

viability, cell apoptosis, reactive oxygen species (ROS), glutathione (GSH) and Fe^{2+} contents were measured. The expression levels of *GPX4*, *ACSL4*, and *WTAP* were evaluated by Western blotting, and MeRIP-qPCR was used to examine the m^6A methylation level of *ACSL4*. A cellular model of *WTAP* gene disruption with *ACSL4* overexpression was constructed using si-RNA and plasmids to detect the binding of *ACSL4* to *WTAP* and the effect of *ACSL4* overexpression on cell injury and ferroptosis. **Results** Compared with the healthy control group, the expression levels of *WTAP* and *ACSL4* were significantly upregulated in acute kidney injury tissues. LPS treatment reduces HK-2 cell viability, increases apoptosis, reduces GSH content, increases the level of Fe^{2+} and ROS, reduces *GPX4* expression, upregulates the protein expression of *WTAP* and *ACSL4*, and the m^6A methylation level of *ACSL4* in a time-dependent manner. After knocking down of *WTAP*, the protein expression and m^6A methylation level of *ACSL4* were decreased, the binding between *ACSL4* and *WTAP* weakened, and the mRNA stability of *ACSL4* was reduced. Compared with the LPS group, the LPS+si-*WTAP* group showed increased cell viability, decreased apoptosis, and reduced ferroptosis levels, and overexpression of *ACSL4* reversed the protective effects of si-*WTAP* on LPS-induced HK-2 cells. **Conclusion** *WTAP* upregulates the expression of *ACSL4* by promoting m^6A methylation of *ACSL4*, thereby aggravating LPS-induced ferroptosis and cell injury in human renal tubular epithelial cells.

【Keywords】 Wilms' tumor 1-associating protein; Long chain acyl-CoA synthetase 4; N6-methyladenosine; Ferroptosis; Sepsis

脓毒症是一种由感染引起的全身炎症反应综合征,常伴随多器官功能障碍,发病率和死亡率极高^[1]。其中,急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)是脓毒症的严重并发症之一,与患者死亡风险增加密切相关^[2]。脓毒症 AKI 病理机制复杂,现有的治疗方法难以有效降低患者病死率^[3]。因此,深入阐明其病理生理机制并探索有效治疗靶点,对于改善患者的预后具有重要的意义。

近年来,铁死亡作为一种以铁离子积累和脂质过氧化增高为特征的新型程序性细胞死亡途径,在脓毒症 AKI 等多种炎症性疾病中的作用受到广泛关注^[4]。长链酯酰辅酶 A 合成酶 4 (long chain acyl-CoA synthetase 4, *ACSL4*) 是脂质代谢的关键调节蛋白酶之一,通过促进膜磷脂的合成推动铁死亡的发生^[5]。目前 *ACSL4* 调控的铁死亡作用于脓毒症 AKI 的具体机制尚不明确。

N6-甲基腺苷(N6-methyladenosine, m^6A) 甲基化修饰作为真核细胞内含量最丰富的 RNA 修饰形式,在基因表达调控中发挥重要作用^[6]。Wilms 肿瘤 1 相关蛋白(Wilms' tumor 1-associating protein, *WTAP*) 是 m^6A 甲基转移酶复合物的核心组份^[7]。有研究表明 *WTAP* 在 AKI 患者肾脏组织中显著高表达,且与 *ACSL4* 的表达水平呈正相关,提示 *WTAP* 可能通过 m^6A 修饰调控 *ACSL4* 的表达,进而影响 AKI 的铁死亡进程^[8]。本研究

旨在探讨 *WTAP* 介导的 *ACSL4* m^6A 甲基化对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导人肾小管上皮细胞 HK-2 铁死亡和细胞损伤的影响,以期脓毒症 AKI 的治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

人肾小管上皮细胞(HK-2)购于美国模式培养物保藏所(American Type Culture Collection, ATCC);链霉素、青霉素、胎牛血清(FBS)和 DMEM/F12 培养基从美国 Gibco 公司购买;细胞增殖检测试剂盒(CCK-8)由上海生工生物工程有限公司提供;细胞凋亡检测试剂盒(Annexin V-FITC)购于维百奥(北京)生物科技有限公司;谷胱甘肽(GSH)酶联免疫吸附测定试剂盒和细胞亚铁(Fe^{2+})比色测定试剂盒购于武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司;DCFH-DA 检测试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司;氨基黑蛋白定量试剂盒由陕西健吉跃生物科技有限公司提供;*ACSL4*、*WTAP*、谷胱甘肽过氧化物酶 4(*GPX4*)、 β -actin、 m^6A 蛋白一抗和 HRP 标记的山羊抗兔二抗购于美国 Abcam 公司;*WTAP* siRNA 以及 *ACSL4* 的过表达质粒购于上海吉玛公司;X-tremeGENE™ 9 DNA 转染试剂盒购于瑞士罗氏公司;Magna RIP™ RNA 结合蛋白免疫沉淀

试剂盒购于默克生命科学有限公司。

1.2 数据的获取与处理

从 GEO 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 下载 GSE30718 获取 AKI 基因表达数据。分析 *WTAP* 和 *ACSL4* 在 AKI 和健康对照 (Control) 肾脏组织中的表达差异和相关性, 其中 AKI 组 26 例, Control 组 11 例。

1.3 细胞培养

HK-2 采用 DMEM/F12 基础培养基 (含 10% FBS、100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素), 置于恒温培养箱 (37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂, 饱和湿度) 中培养。

1.4 CCK-8检测细胞活性

将 HK-2 细胞以 4×10^3 细胞 / 孔的接种密度均匀铺板于 96 孔细胞培养板中, 加入 10 μ g/mL 的 LPS 培养 4、8、12 h, 然后加入 CCK-8 试剂在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 2 h。用酶标仪检测 450 nm 下的吸光度值 (OD), 细胞活性 (%) = (实验组 OD 值 - 空白组 OD 值) / (对照组 OD 值 - 空白组 OD 值) $\times$ %。

1.5 流式细胞术检测细胞凋亡

将 HK-2 细胞以 4×10^5 / 孔的密度接种于 6 孔板, LPS 处理 4、8、12 h 后, 更换为无血清培养基继续培养 24 h。收集细胞样本, 用 PBS 清洗后, 加入预冷的 75% 乙醇溶液, 于 4 $^{\circ}$ C 条件下固定 4 h。离心后加入 500 μ L 结合缓冲液重悬细胞。依次加入 5 μ L V-FITC 和 5 μ L 碘化丙啶染色液, 室温避光反应 5~15 min。流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.6 GSH含量的测定

用预冷的 PBS 洗涤待测 HK-2 细胞两次后, 加入 RIPA 裂解液冰上裂解 30 min, 4 $^{\circ}$ C、12 000 $\times$ g 离心 10 min 收集上清。GSH 含量测定使用 GSH 酶联免疫吸附测定试剂盒, 按照说明书操作, 在 450 nm 波长下测定吸光值, 通过标准曲线计算 GSH 浓度。

1.7 Fe²⁺含量的测定

Fe²⁺ 含量检测采用细胞亚铁 (Fe²⁺) 比色测定试剂盒, 将待测细胞裂解后加入显色剂, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min, 在 593 nm 波长下测定吸光值, 根据标准曲线计算 Fe²⁺ 含量。

1.8 ROS测定

采用 DCFH-DA 荧光法测定 HK-2 细胞中活

性氧 (reactive oxygen species, ROS) 含量。将 HK-2 细胞以 3×10^3 / 孔的密度接种于 96 孔板中, 加入 10 μ g/mL 的 LPS 培养 4、8、12 h。随后在细胞中加入 10 μ mol/L 的 DCFH-DA, 置于 37 $^{\circ}$ C 恒温环境中孵育 20 min。荧光显微镜下观察并记录细胞的荧光表达情况。

1.9 蛋白质免疫印迹法 (Western Blot)

RIPA 组织裂解液提取 HK-2 细胞总蛋白, 采用氨基黑染色法测定蛋白含量。取 20 μ g 蛋白样品, 经 10% SDS-PAGE 分离后, 转印至 PVDF 膜上, 5% 脱脂乳封闭 1 h。分别加入 ACSL4 (1 : 10 000)、WTAP (1 : 1 000)、GPX4 (1 : 500) 或 β -actin (1 : 10 000) 蛋白一抗在 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜。三羟甲基氨基甲烷缓冲盐溶液 (TBST) 洗涤后与山羊抗兔 IgG 二抗 (1 : 1 000) 室温孵育 2 h。滴加 ECL 发光液显影后凝胶成像, Image J 软件分析结果。

1.10 RNA甲基化免疫共沉淀后实时定量 PCR (MeRIP-qPCR)

收集待测细胞, 加入 Trizol 裂解液进行 RNA 提取。随后, 分别将 m⁶A 特异性抗体和 IgG 对照抗体与蛋白 A/G 磁珠复合物在 4 $^{\circ}$ C 条件下共孵育 12~16 h。使用洗脱缓冲液回收 RNA, 通过苯酚-氯仿法纯化 RNA 样品。最后, 采用 qPCR 进行定量分析。*ACSL4* 上游引物 5'-CCGACCTAAGGGAGTGATGA-3', 下游引物 5'-CCTGCAGCCATAGGTAAAGC-3'。

1.11 细胞转染

HK-2 细胞以 2×10^5 / 孔的密度接种于 6 孔板中, 孵育 12 h, 然后加入 2 μ L X-tremeGENE™ 9 DNA 转染试剂分别将 si-WTAP (5'-GGAACA GACUAAAGACAAACU-3')、si-NC (5'-UUCUCC GAACGUGUCACGUTT-3') 或 OE-ACSL4 (pcDNA3.1-ACSL4 过表达质粒) 转染细胞, 培养 48 h 后, 加入 10 μ g/mL LPS 进行诱导培养。

1.12 RNA免疫共沉淀 (RIP)

使用 Magna RIP™ RNA 结合蛋白免疫沉淀试剂盒, 提取待测细胞 RNA, 加入 IgG、WTAP 或 ACSL4 抗体和蛋白 A/G 磁珠在 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜。洗涤后, 在 RNA-蛋白质复合物中加入蛋白酶 K 缓冲液。最后, 使用苯酚-氯仿法提取 RNA。qPCR 检测 *WTAP* 和 *ACSL4* 转录本之间的相互作用。

1.13 放线菌素D实验

将 HK-2 细胞接种至 96 孔板中, 分组处理后添加 5 $\mu\text{g/mL}$ 的放线菌素 D。分别在培养的 0、3、6 h 收集细胞, qPCR 检测 ACSL4 的 mRNA 表达水平。

1.14 统计学分析

实验数据采用 SPSS 26.0 统计软件进行处理和分析。计量数据以均数和标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较采用 t 检验; 多组间比较采用单因素方差分析, 进一步采用 Bonferroni 检验进行组间两两比较。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 WTAP和ACSL4在AKI患者组织中高表达

使用 GEO 数据库对 GSE30718 表达谱数据进行分析, 绘制 AKI 组与 Control 组肾脏组织样本差异表达基因火山图 (图 1-A)。与 control 组相比, AKI 组 WTAP 和 ACSL4 的表达水平显著上调 ($P < 0.05$, 图 1-B)。此外, WTAP 和 ACSL4 的表达水平呈显著正相关 ($P < 0.01$, 图 1-C)。

2.2 LPS对HK-2细胞活性和凋亡的影响

与 control 组相比, LPS 处理以时间依赖性方式降低了 HK-2 细胞活性 (图 2-A), 促进细胞

凋亡 (图 2-B、2-C)。

2.3 LPS对HK-2细胞铁死亡的影响

与 control 组相比, 随着 LPS 处理时间的延长, HK-2 细胞中 GSH 的含量明显下降 (图 3-A), Fe^{2+} 和 ROS 水平逐渐提升 (图 3-B、3-C)。同时, GPX4 的表达随着 LPS 处理时间增加而降低 ($P < 0.05$, 图 3-D)。

2.4 LPS对HK-2细胞中ACSL4 m⁶A甲基化修饰的影响

与 control 组相比, LPS 处理以时间依赖性方式提升 HK-2 细胞中 ACSL4 和 WTAP 蛋白表达 ($P < 0.05$, 图 4-A)。同时, 与 control 组相比, ACSL4 的 m⁶A 甲基化水平随着 LPS 处理时间增加而升高 ($P < 0.05$, 图 4-B)。

2.5 si-WTAP对LPS诱导的HK-2细胞中ACSL4 m⁶A甲基化修饰的影响

与 LPS 组相比, LPS+si-WTAP 组细胞中 WTAP 和 ACSL4 的蛋白表达显著降低 (图 5-A), ACSL4 的 m⁶A 甲基化水平显著下降 ($P < 0.05$, 图 5-B)。此外, ACSL4 和 WTAP 的结合在 WTAP 干扰组中被减弱 ($P < 0.05$, 图 5-C)。与 control 组相比, LPS 组的 ACSL4 的 mRNA 稳定性显著增强, 在干扰 WTAP 后减弱 ($P < 0.05$, 图 5-D)。

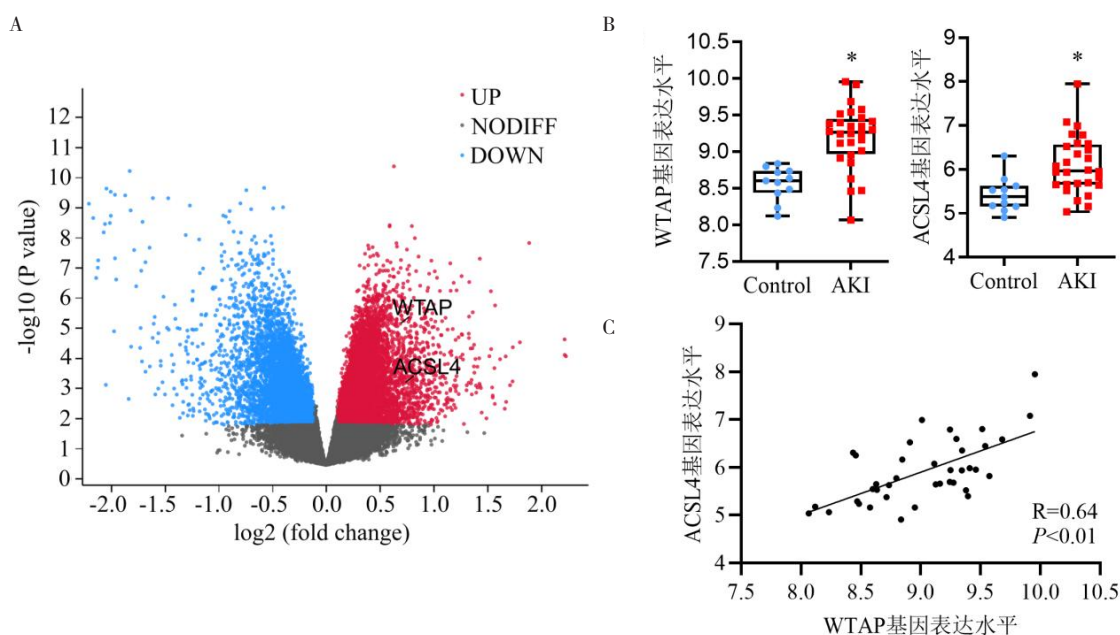


图1 WTAP和ACSL4在AKI患者中的表达

Figure 1. Expression of WTAP and ACSL4 in patients with acute kidney injury

注: A.AKI与健康对照组织样本差异表达基因火山图; B.WTAP和ACSL4在组织中的表达; C.WTAP和ACSL4在组织中表达的相关性; * $P < 0.05$ 。

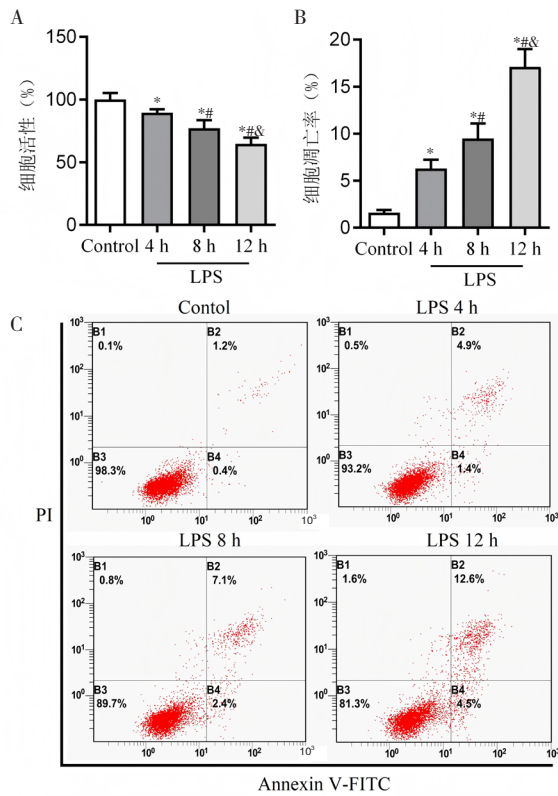


图2 LPS对人肾小管上皮细胞HK-2活性和凋亡的影响
Figure 2. Effect of LPS on cell viability and apoptosis of human renal tubular epithelial cell HK-2

注: A.CCK-8检测细胞活性; B、C.流式细胞术检测细胞凋亡; *与对照组比较, $P < 0.05$; #与4 h组比较, $P < 0.05$; &与8 h组比较, $P < 0.05$ 。

2.6 OE-ACSL4逆转si-WTAP对ACSL4蛋白的影响

与 LPS 组相比, LPS+si-WTAP 组中 WTAP 和 ACSL4 的蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$)。与 LPS+si-WTAP 组相比, LPS+si-WTAP+OE-ACSL4 组中 WTAP 的蛋白表达没有明显改变, 而 ACSL4 的蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$, 图 6)。

2.7 si-WTAP通过抑制ACSL4影响LPS诱导的HK-2细胞损伤

与 LPS 组相比, LPS+si-WTAP 组的 HK-2 细胞活性明显升高, 在 ACSL4 过表达后下降 ($P < 0.05$, 图 7-A)。干扰 WTAP 降低了 LPS 诱导的 HK-2 细胞凋亡, 并在 ACSL4 过表达后提升 ($P < 0.05$, 图 7-B)。

2.8 WTAP敲低通过抑制ACSL4抑制LPS诱导的细胞铁死亡

与 LPS 组相比, LPS+si-WTAP 组细胞中 GSH 含量显著升高, Fe^{2+} 和 ROS 水平明显降低 ($P < 0.05$)；然而, 在 LPS+si-WTAP+OE-ACSL4 组中, GSH 含量下降, Fe^{2+} 和 ROS 水平提升 ($P < 0.05$, 图 8-A 至图 8-C)。干扰 WTAP 上调 GPX4 的蛋白表达, 并在加入 OE-ACSL4 后下降 ($P < 0.05$, 图 8-D)。

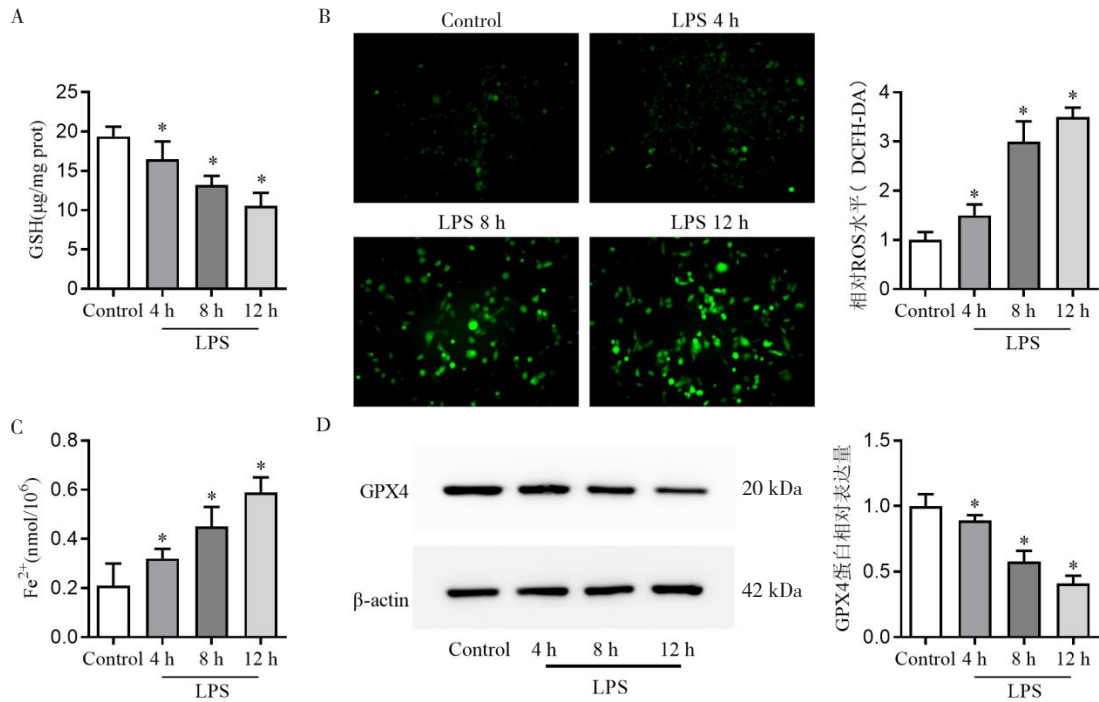


图3 LPS对人肾小管上皮细胞HK-2铁死亡的影响

Figure 3. Effect of LPS on ferroptosis in human renal tubular epithelial cell HK-2

注: A.细胞中GSH的含量; B.DCFH-DA检测ROS水平; C.细胞中 Fe^{2+} 含量; D.Western blot检测GPX4蛋白表达; * $P < 0.05$ 。

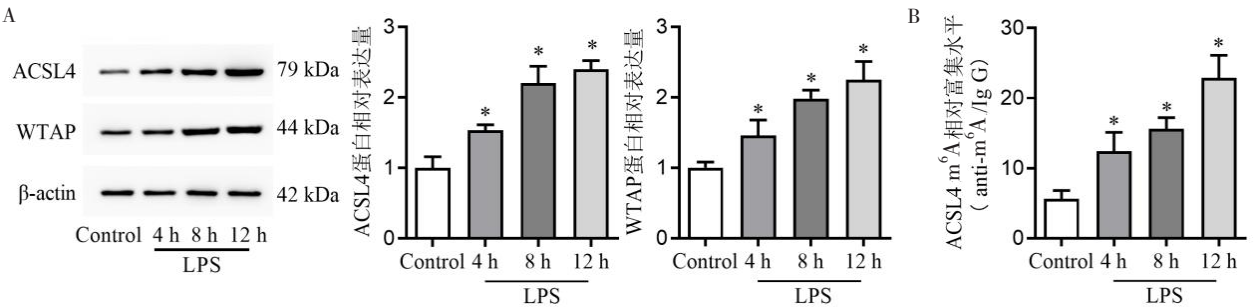


图4 LPS对人肾小管上皮细胞HK-2中ACSL4 m⁶A甲基化修饰的影响

Figure 4. Effect of LPS on ACSL4 m⁶A modification in human renal tubular epithelial cell HK-2

注：A. Western blot检测ACSL4和WTAP蛋白表达及定量分析；B. Me-RIP检测ACSL4的m⁶A甲基化水平；**P*<0.05。

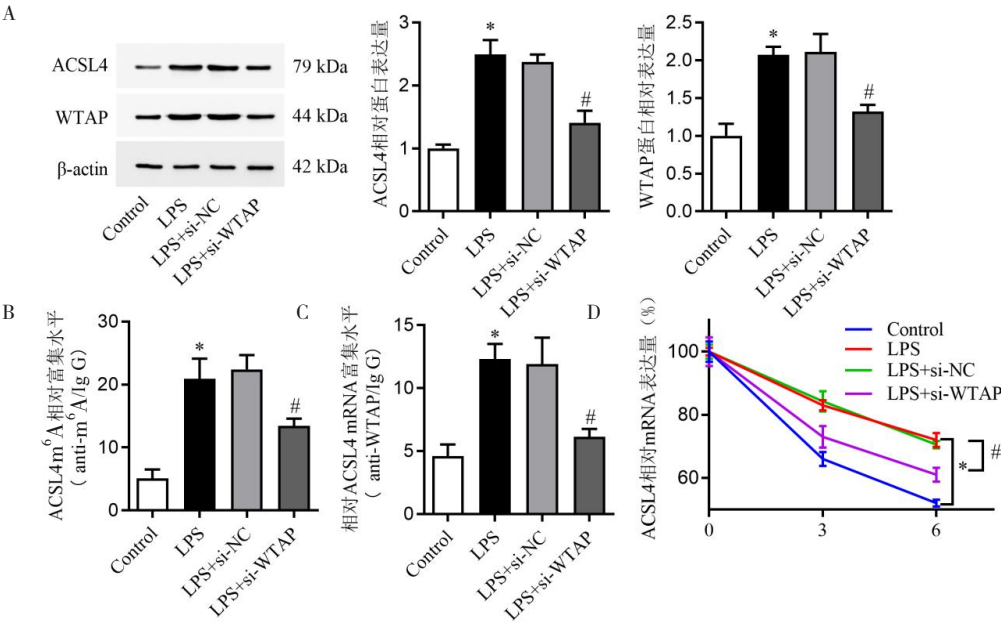


图5 WTAP敲低对LPS诱导的HK-2细胞中ACSL4 m⁶A甲基化修饰的影响

Figure 5. Effect of WTAP knockdown on ACSL4 m⁶A modification in LPS induced HK-2 cells

注：A. Western blot检测ACSL4和WTAP蛋白表达及定量分析；B. Me-RIP检测ACSL4的m⁶A甲基化水平；C. RIP检测ACSL4和WTAP的结合；D. RNA分解实验检测ACSL4 mRNA的稳定性；*与对照组比较，*P*<0.05；#与LPS组比较，*P*<0.05。

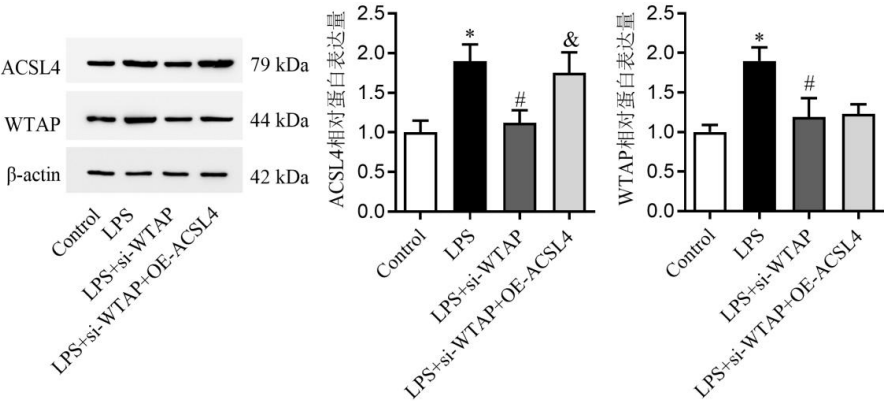


图6 si-WTAP和OE-ACSL4对ACSL4和WTAP蛋白表达的影响

Figure 6. Effects of si-WTAP and OE-ACSL4 co-transfection on the protein expression of ACSL4 and WTAP

注：*与对照组比较，*P*<0.05；#与LPS组比较，*P*<0.05；*与LPS+si-WTAP组比较，*P*<0.05。

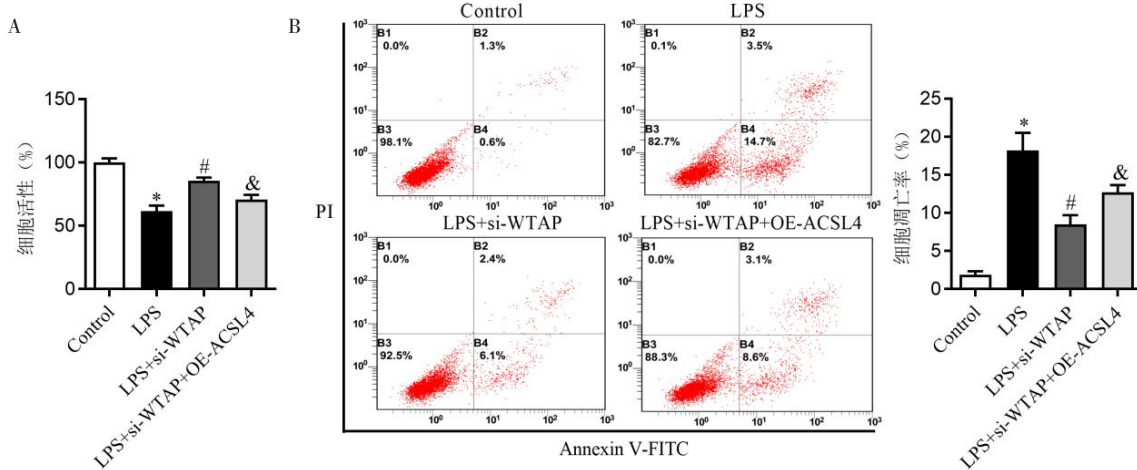


图7 si-WTAP和OE-ACSL4对LPS诱导的HK-2细胞损伤的影响

Figure 7. Effects of si-WTAP and OE-ACSL4 co-transfection on LPS-induced injury in HK-2 cells

注：A.CCK-8检测细胞活性；B.流式细胞术检测细胞凋亡；*与对照组比较， $P<0.05$ ；#与LPS组比较， $P<0.05$ ；&与LPS+si-WTAP组比较， $P<0.05$ 。

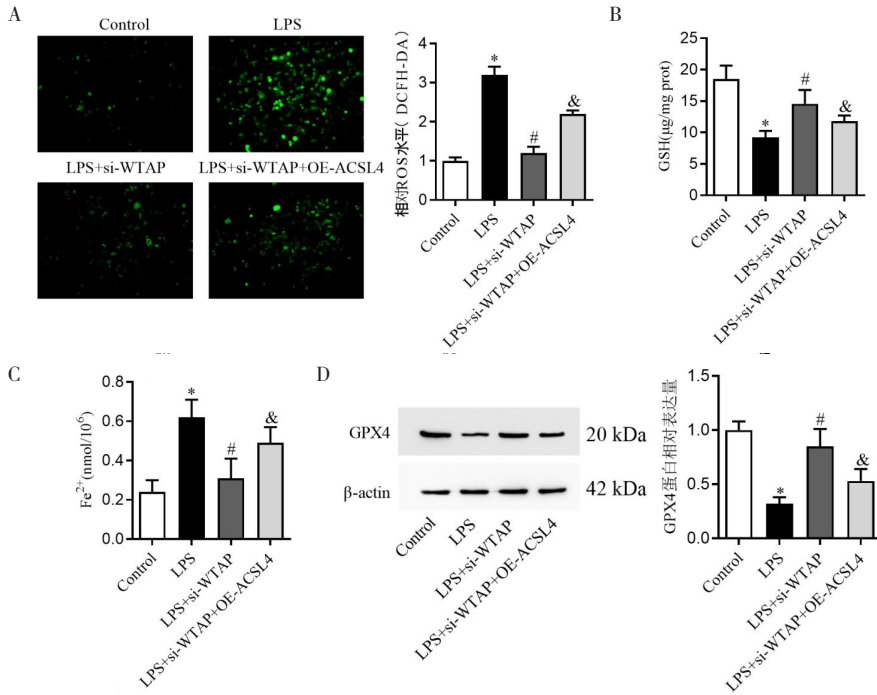


图8 si-WTAP和OE-ACSL4对LPS诱导的HK-2细胞铁死亡的影响

Figure 8. Effect of si-WTAP and OE-ACSL4 co-transfection on LPS-induced ferroptosis in HK-2 cells

注：A.DCFH-DA检测ROS水平；B.细胞中GSH含量；C.细胞中 Fe^{2+} 含量；D.Western blot检测GPX4蛋白表达；*与对照组比较， $P<0.05$ ；#与LPS组比较， $P<0.05$ ；&与LPS+si-WTAP组比较， $P<0.05$ 。

3 讨论

m^6A 甲基化修饰广泛存在于真核生物的 RNA 中，通过影响 RNA 的表观遗传修饰调节基因表达，参与到多种生物学过程的调控中^[9]。研究表明 m^6A 甲基化在脓毒症 AKI 的疾病发展中发挥重要作用，有望成为潜在的治疗靶点^[10]。

m^6A 修饰由甲基化转移酶和去甲基化酶共同调控^[11]。WTAP 作为关键的甲基化转移酶之一，通过促进 RNA 腺苷酸第六个氮原子的甲基化，影响 RNA 的出核、剪接、翻译和稳定性等，进而参与氧化应激、炎症和细胞死亡等过程的调控^[12]。在 LPS 诱导的 AKI 动物和细胞模型中，WTAP 高表达加剧炎症和线粒体损伤^[13]。顺珀诱

导的 AKI 小鼠肾脏损伤组织中也观察到整体 m⁶A 水平和 WTAP 表达的增高^[14]。本研究通过 GEO 数据分析表明 *WTAP* 在 AKI 组织中的表达显著上调, 并且在 LPS 诱导的人肾小管上皮细胞中, 随着 LPS 刺激时间的加长, *WTAP* 的蛋白表达逐渐提升, 与 Ni 等^[8] 研究结果一致, 提示 *WTAP* 在脓毒症 AKI 中可能发挥重要作用。

上皮细胞是肾结构和功能的基础, 脓毒症 AKI 发生时肾上皮细胞发生铁死亡, 肾组织受到严重破坏, 器官功能受损^[15]。在脓毒症 AKI 实验模型中, 抑制铁死亡被证明可以有效减轻 AKI 损伤^[16]。铁死亡的发生和细胞中铁离子的累积和 ROS 水平的升高紧密相关^[17]。在生化特征上, 铁死亡表现为 GSH 的耗竭和 GXP4 的失活^[18]。本研究发现, 随着 LPS 诱导时间的加长, HK-2 细胞的活性降低, 凋亡上升, ROS 和铁离子水平升高, 同时伴随 GSH 含量和 GXP4 蛋白表达降低, 表明铁死亡参与了 LPS 诱导的 HK-2 细胞损伤。

ACSL4 是调控铁死亡的关键分子, 通过促进多不饱和脂肪酸的酯化作用, 驱动脂质过氧化和铁死亡的发生^[19]。*ACSL4* 失调与多种疾病有关, 包括癌症、神经退行性疾病、心血管疾病、代谢性疾病和 AKI 等^[20]。在 AKI 小鼠肾小管中特异性敲除 *ACSL4* 能够明显降低铁死亡并抑制小鼠肾脏病理损伤^[21]。 $\alpha 2$ 肾上腺素受体激动剂右美托咪啶能够通过抑制 *ACSL4* 减轻缺血 / 再灌注引起的铁死亡和 AKI^[22]。本研究证实, *ACSL4* 在 AKI 患者组织和 LPS 诱导的 HK-2 细胞中均显著高表达, 提示 *ACSL4* 介导的铁死亡在脓毒症 AKI 中起关键作用。

近年来, m⁶A 修饰在铁死亡调控中的作用逐渐被揭示^[23-24]。例如, 甲基化转移酶 *METTL3* 能够通过促进 *ACSL4* 的 m⁶A 修饰加重受损肝脏的铁死亡^[25]。敲低 *METTL14* 可以抑制 *ACSL4* 的表达, 逆转急性胰腺炎的炎症和铁死亡^[26]。老年肝脏中去甲基化酶 *FTO* 的缺乏会通过上调 *ACSL4* 加剧缺血 / 再灌注引起的铁死亡^[27]。但目前有关 *ACSL4* 在 AKI 中 m⁶A 修饰的调控还未有报道。本研究中观察到在 AKI 患者的肾脏组织中甲基化转移酶 *WTAP* 和 *ACSL4* 的表达呈显著正相关, 且抑制 *WTAP* 能够通过降低 *ACSL4* 的 m⁶A 修饰水平, 降低其 mRNA 稳定性和蛋白表达。此外, 敲低 *WTAP* 可减轻 LPS 诱导的 HK-2 细胞损伤和铁

死亡, 而 *ACSL4* 过表达可逆转这一效应。以上结果提示, *WTAP* 可通过增加 *ACSL4* 的 m⁶A 修饰促进其表达, 进而调控铁死亡的发生。

综上所述, 本研究揭示了 *WTAP* 通过 m⁶A 修饰提升 *ACSL4* 表达, 促进 LPS 诱导的肾小管上皮细胞铁死亡的分子机制。这一发现为阐明 m⁶A 修饰在脓毒症 AKI 中的作用提供了新的理论依据, 并为 AKI 的临床治疗提供了潜在靶点。然而, *WTAP* 和 *ACSL4* 在脓毒症中的作用仍需在动物模型中进一步验证, 以明确其临床应用价值。未来的研究可进一步探索 *WTAP/ACSL4* 调控轴在脓毒症 AKI 中的具体作用机制, 为开发靶向 m⁶A 修饰的治疗策略提供更多实验依据。

伦理声明: 不适用

作者贡献: 研究设计: 张琴、陈兵阳; 实验操作、数据分析: 张琴、唐庆; 论文撰写: 张琴; 论文审定: 陈兵阳

数据获取: 本研究中使用和 (或) 分析的数据可联系通信作者获取

利益冲突声明: 无

致谢: 不适用

参考文献

- 1 Chiu C, Legrand M. Epidemiology of sepsis and septic shock[J]. Curr Opin Anaesthesiol, 2021, 34(2): 71-76. DOI: 10.1097/ACO.0000000000000958.
- 2 Chang YM, Chou YT, Kan WC, et al. Sepsis and acute kidney injury: a review focusing on the bidirectional interplay[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(16): 9159. DOI: 10.3390/ijms23169159.
- 3 Zarbock A, Koyner JL, Gomez H, et al. Sepsis-associated acute kidney injury-treatment standard[J]. Nephrol Dial Transplant, 2023, 39(1):26-35. DOI: 10.1093/ndt/gfad142.
- 4 Zhou J, Tang J, Zhang C, et al. ALKBH5 targets *ACSL4* mRNA stability to modulate ferroptosis in hyperbilirubinemia-induced brain damage[J]. Free Radic Biol Med, 2024, 220: 271-287. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2024.05.014.
- 5 高洋, 秦合伟, 刘丹丹. *ACSL4* 介导铁死亡及在动脉粥样硬化性心血管疾病中的潜在作用 [J]. 中国组织工程研究, 2025, 29(6): 1239-1247. [Gao Y, Qin HW, Liu DD. *ACSL4* mediates ferroptosis and its potential role in atherosclerotic cardiovascular disease[J]. Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2025, 29(6): 1239-1247.] DOI: 10.12307/2025.299.
- 6 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. DOI: 10.1038/s41392-020-00450-x.
- 7 石颖鹏, 刘华, 张栋林, 等. m6A 甲基化修饰介导的 UBAC2

- 对结肠癌细胞侵袭和迁移能力的影响及机制[J]. 解放军医学杂志, 2025, 50(18): 1–9. [Shi YP, Liu H, Zhang DL, et al. Effect and mechanism of UBAC2 mediated by m⁶A methylation modification on the invasion and migration abilities of colorectal cancer cells[J]. Medical Journal of Chinese People's Liberation Army, 2025, 50(18): 1–9.] DOI: [10.11855/j.issn.0577-7402.0858.2025.0528](https://doi.org/10.11855/j.issn.0577-7402.0858.2025.0528).
- 8 Ni L, Bai R, Zhou Q, et al. The correlation between ferroptosis and m⁶A methylation in patients with acute kidney injury[J]. Kidney Blood Press Res, 2022, 47(8): 523–533. DOI: [10.1159/000524900](https://doi.org/10.1159/000524900).
- 9 De Kesel J, Fijalkowski I, Pieters T, et al. HNRNPC and m⁶A RNA methylation control oncogenic transcription and metabolism in T-cell leukemia[J]. Blood, 2025, 146(3): 275–290. DOI: [10.1182/blood.2024026848](https://doi.org/10.1182/blood.2024026848).
- 10 Qi S, Song J, Chen L, et al. The role of N-methyladenosine modification in acute and chronic kidney diseases[J]. Mol Med, 2023, 29(1): 166. DOI: [10.1186/s10020-023-00764-w](https://doi.org/10.1186/s10020-023-00764-w).
- 11 温亚男, 方姝, 杨晶晶, 等. t(8;21) 急性髓系白血病中 RNAN RNAN6- 甲基腺嘌呤 (m⁶A) 的修饰特征[J]. 南方医科大学学报, 2022, 42: 690–697. [Wen YN, Fang S, Yang JJ, et al. t(8; 21) modification of RNAN RNAN6-methyladenine (m⁶A) in acute myeloid leukemia [J]. Journal of Southern Medical University, 2022, 42: 690–697.] DOI: [10.12122/j.issn.1673-4254.2022.05.09](https://doi.org/10.12122/j.issn.1673-4254.2022.05.09).
- 12 Ju G, Lei J, Cai S, et al. The emerging, multifaceted role of WTAP in cancer and cancer therapeutics[J]. Cancers (Basel), 2023, 15(11): 3053. DOI: [10.3390/cancers15113053](https://doi.org/10.3390/cancers15113053).
- 13 Huang F, Wang Y, Lv X, et al. WTAP-mediated N⁶-methyladenosine modification promotes the inflammation, mitochondrial damage and ferroptosis of kidney tubular epithelial cells in acute kidney injury by regulating LMNB1 expression and activating NF- κ B and JAK2/STAT3 pathways[J]. J Bioenerg Biomembr, 2024, 56(3): 285–296. DOI: [10.1007/s10863-024-10015-0](https://doi.org/10.1007/s10863-024-10015-0).
- 14 Li CM, Li M, Zhao WB, et al. Alteration of N⁶-methyladenosine RNA profiles in cisplatin-induced acute kidney injury in mice[J]. Front Mol Biosci, 2021, 8: 654465. DOI: [10.3389/fmolb.2021.654465](https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.654465).
- 15 Mihevc M, Petreski T, Maver U, et al. Renal proximal tubular epithelial cells: review of isolation, characterization, and culturing techniques[J]. Mol Biol Rep, 2020, 47(12): 9865–9882. DOI: [10.1007/s11033-020-05977-4](https://doi.org/10.1007/s11033-020-05977-4).
- 16 Feng Q, Yu X, Qiao Y, et al. Ferroptosis and acute kidney injury (AKI): molecular mechanisms and therapeutic potentials[J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 858676. DOI: [10.3389/fphar.2022.858676](https://doi.org/10.3389/fphar.2022.858676).
- 17 Su L, Zhang J, Gomez H, et al. Mitochondria ROS and mitophagy in acute kidney injury[J]. Autophagy, 2023, 19(2): 401–414. DOI: [10.1080/15548627.2022.2084862](https://doi.org/10.1080/15548627.2022.2084862).
- 18 Cao L, Qin R, Liu J. Farnesoid X receptor protects against lipopolysaccharide-induced endometritis by inhibiting ferroptosis and inflammatory response[J]. Int Immunopharmacol, 2023, 118: 110080. DOI: [10.1016/j.intimp.2023.110080](https://doi.org/10.1016/j.intimp.2023.110080).
- 19 Ding K, Liu C, Li L, et al. Acyl-CoA synthase ACSL4: an essential target in ferroptosis and fatty acid metabolism[J]. Chin Med J (Engl), 2023, 136(21): 2521–2537. DOI: [10.1097/CM9.0000000000002533](https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000002533).
- 20 Chen F, Kang R, Liu J, et al. The ACSL4 network regulates cell death and autophagy in diseases[J]. Biology (Basel), 2023, 12(6): 864. DOI: [10.3390/biology12060864](https://doi.org/10.3390/biology12060864).
- 21 Wang Y, Zhang M, Bi R, et al. ACSL4 deficiency confers protection against ferroptosis-mediated acute kidney injury[J]. Redox Biol, 2022, 51: 102262. DOI: [10.1016/j.redox.2022.102262](https://doi.org/10.1016/j.redox.2022.102262).
- 22 Tao WH, Shan XS, Zhang JX, et al. Dexmedetomidine attenuates ferroptosis-mediated renal ischemia/reperfusion injury and inflammation by inhibiting ACSL4 via α 2-AR[J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 782466. DOI: [10.3389/fphar.2022.782466](https://doi.org/10.3389/fphar.2022.782466).
- 23 Xie H, Shi M, Liu Y, et al. Identification of m⁶A- and ferroptosis-related lncRNA signature for predicting immune efficacy in hepatocellular carcinoma[J]. Front Immunol, 2022, 13: 914977. DOI: [10.3389/fimmu.2022.914977](https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.914977).
- 24 Yang H, Hu Y, Weng M, et al. Hypoxia inducible lncRNA-CBSLR modulates ferroptosis through m⁶A-YTHDF2-dependent modulation of CBS in gastric cancer[J]. J Adv Res, 2022, 37: 91–106. DOI: [10.1016/j.jare.2021.10.001](https://doi.org/10.1016/j.jare.2021.10.001).
- 25 Wu D, Spencer CB, Ortoga L, et al. Histone lactylation-regulated METTL3 promotes ferroptosis via m⁶A-modification on ACSL4 in sepsis-associated lung injury[J]. Redox Biol, 2024, 74: 103194. DOI: [10.1016/j.redox.2024.103194](https://doi.org/10.1016/j.redox.2024.103194).
- 26 Chen F, Su M, Han D, et al. METTL14 depletion ameliorates ferroptosis in severe acute pancreatitis by increasing the N⁶-methyladenosine modification of ACSL4 and STA1[J]. Int Immunopharmacol, 2024, 128: 111495. DOI: [10.1016/j.intimp.2024.111495](https://doi.org/10.1016/j.intimp.2024.111495).
- 27 Li R, Yan X, Xiao C, et al. FTO deficiency in older livers exacerbates ferroptosis during ischaemia/reperfusion injury by upregulating ACSL4 and TFRC[J]. Nat Commun, 2024, 15(1): 4760. DOI: [10.1038/s41467-024-49202-3](https://doi.org/10.1038/s41467-024-49202-3).

收稿日期: 2025 年 03 月 07 日 修回日期: 2024 年 05 月 20 日
本文编辑: 桂裕亮 曹越

引用本文: 张琴, 唐庆, 陈兵阳. WTAP通过调控ACSL4 m⁶A甲基化促进脂多糖诱导人肾小管上皮细胞铁死亡的研究[J]. 医学新知, 2025, 35(7): 827–835. DOI: [10.12173/j.issn.1004-5511.202503048](https://doi.org/10.12173/j.issn.1004-5511.202503048).
Zhang Q, Tang Q, Chen BY. WTAP promotes lipopolysaccharides-induced ferroptosis in human renal tubular epithelial cells by regulating ACSL4 m⁶A methylation[J]. Yixue Xinzhi Zazhi, 2025, 35(7): 827–835. DOI: [10.12173/j.issn.1004-5511.202503048](https://doi.org/10.12173/j.issn.1004-5511.202503048).