

网络出版时间:2024-04-12 13:53:26 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20240410.1009.010

METTL3 通过 mRNA m6A 甲基化促进类风湿关节炎滑膜成纤维细胞增殖、迁移及分泌炎症因子

李娟,蒋扬青,沈瑞明,李国铨,王敏,徐逢皇

摘要 **目的** 探讨甲基转移酶样 3 (METTL3) 对类风湿关节炎 (RA) 滑膜成纤维细胞增殖、迁移及分泌炎症因子的作用及机制。**方法** 本研究纳入类风湿关节炎及骨关节炎患者各 25 例,留取滑膜组织,分别用 RT-qPCR 及免疫组化法检测 METTL3 表达水平,ELISA 检测 RNA m6A 浓度;分离培养 RA 滑膜成纤维细胞,分为 NC 组、hi-METTL3 (过表达 METTL3) 组、si-METTL3 (敲低 METTL3) 组、STM2457 (METTL3 抑制剂) 干预组,用 CCK-8 法检测细胞增殖,流式细胞仪检测细胞凋亡,ELISA 检测细胞培养上清液白介素-6 (IL-6)、白介素-17A (IL-17A)、肿瘤坏死因子- κ B 活化受体配体 (RANKL)、骨保护素 (OPG) 的浓度。**结果** 与骨关节炎滑膜组织相比,RA 滑膜组织 RNA m6A 表达显著增高 ($P < 0.05$),METTL3 的表达显著增高 ($P < 0.05$)。过表达 METTL3 后,滑膜成纤维细胞 m6A 表达增加,细胞增殖、迁移能力显著提高,凋亡无明显变化,分泌细胞因子 IL-6、RANKL 显著增加,OPG 显著减少 ($P < 0.05$)。干扰 METTL3 表达后,滑膜成纤维细胞 m6A 表达减少,细胞增殖、迁移显著减低,分泌细胞因子 IL-6、RANKL 显著降低,OPG 显著增高 ($P < 0.05$);使用 METTL3 抑制剂 STM2457 干预后,滑膜成纤维细胞增殖、迁移显著减低,分泌细胞因子 IL-6、RANKL 显著降低,OPG 显著增高 ($P < 0.05$);各组表达 IL-17A 无显著差异。**结论** METTL3 可能通过 RNA m6A 甲基化修饰促进 RA 滑膜成纤维细胞增殖、迁移及促进 IL-6、RANKL 的表达,抑制 OPG 的表达。

关键词 甲基转移酶样 3;甲基化;类风湿关节炎;增殖;迁移;炎症因子

中图分类号 R 593.22

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)04-0619-08
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.04.010

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种以侵袭性对称性多关节炎为主要临床表现的自身免疫性疾病,RA 关节病理特征是滑膜增生、血管翳形成,表现为滑膜成纤维细胞 (synovial fibroblast, SF)

类瘤样增生、浸润软骨和骨,并导致关节破坏^[1]。目前,我国 RA 的发病率约为 0.34%,3 年致残率达 70%,每 10 年死亡的总体危险增加 1.3~2 倍,且患者出现心血管疾病的风险显著增高^[2],给个人、家庭和社会带来沉重的经济负担。迄今 RA 的发病机制尚未明确,SF 是 RA 疾病进展最主要的效应细胞^[3],深入研究病理状态下 SF 表型发生变化的机制、寻找可能干预的靶点将对未来开发潜在的治疗药物具有重大意义。研究^[4-6]显示表观遗传学的异常可导致类风湿关节炎滑膜成纤维细胞活化及炎症反应的发生,表现为异常增殖,具有侵袭性,破坏软骨和骨。mRNA 腺嘌呤 N6 位甲基化 (N6-methyladenosine, m6A) 是高等真核生物基因转录后 mRNA 最主要的修饰^[7],m6A 是否参与 RA-SF 表型的改变及其中的调节机制尚未明确。该研究以 RA 关节滑膜组织、滑膜成纤维细胞为研究对象,采用免疫组化、酶联免疫吸附试验、流式细胞术、基因过表达及敲低等技术探讨 METTL3 对滑膜细胞增殖、迁移及分泌细胞因子的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 临床资料 选取 2020 年 1 月-2021 年 12 月海南医学院第一附属医院风湿免疫科及关节外科收治的行关节置换或关节镜下滑膜切除术的 RA 及骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 患者各 25 例,两组患者年龄、性别比例差异无统计学意义。RA 患者符合 1987 年美国风湿病协会或 2010 年美国风湿病协会和欧洲抗风湿联盟发布的分类标准。本研究经过医院伦理委员会的批准 [批准号:2020 (科研 L) 第 (114) 号],所有患者均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂及仪器 兔抗 METTL3 单克隆抗体 (ab195352)、鼠抗人 METTL14 单克隆抗体 (ab220030)、兔抗 WTAP 单克隆抗体 (ab195380)、兔抗 ALKBH5 单克隆抗体 (195377)、m6A RNA 甲基化定量试剂盒 (ab185912) 购自英国 Abcam 公司;抗兔 IgG 过氧化物酶 (31460)、抗鼠 IgG 过氧化物酶

2024-03-01 接收

基金项目:海南省自然科学基金青年基金项目 (编号:820QN400)

作者单位:海南医学院第一附属医院风湿免疫科,海口 570102

作者简介:李娟,女,博士,副主任医师,责任作者,E-mail:cyhan87@163.com

(32430)购自美国赛默飞公司;STM2457(HY-134836, MedChemExpress 公司), TRIzol 试剂(A33250)、转染试剂 Lipofectamine 3000(L3000001)购自美国 Invitrogen 公司;细胞计数试剂盒-8(FY600001)购自弗元生物公司;凋亡试剂盒(22839)购自 AAT Bioquest 公司;5 × PrimeScript RT Master Mix(RR036A)、TB Green qPCR Premix Ex Taq II(RR820Q)购自 TAKARA 公司;METTL3-siRNA 及 METTL3-pcDNA3.1 购自上海吉玛制药技术有限公司。

NanoDrop 2000 分光光度计(nd2000)、Pikoreal 96 real-time PCR 系统(PikoReal)、iBright CL750 成像系统(iBright CL750)购自美国赛默飞公司。

1.2.2 RA 滑膜成纤维细胞的分离培养及分组

RA 患者滑膜组织中加入 RPMI 1640 洗涤,解剖剪锐性切碎。用 4 mg/ml I 型胶原酶的 RPMI 1640 消化 37 °C 孵育 120 min。收集细胞悬液,经细胞滤网过滤,反复离心洗涤,重悬,接种到培养瓶中培养。取 P3 代 SFs 制细胞爬片,细胞免疫组化检查抗原 Vimentin 和 CD68 的表达水平。对滑膜细胞分别转染针对 METTL3-siRNA(si-METTL3 组)、METTL3-pcDNA3.1(hi-METTL3 组)及阴性对照(MOCK 组),以及给予 STM2457(METTL3 抑制剂)10 μmol/ml 干预组。分别在细胞培养的 12、24、48 h 检测每组细胞的增殖活性、凋亡比例、迁移能力及培养液上清液白介素-6(interleukin-6, IL-6)、白介素-17A(interleukin-17A, IL-17A)、肿瘤坏死因子-κB 活化受体配体(receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand, RANKL)、骨保护素(osteoprotegerin, OPG)的浓度。

1.2.3 m6A 检测 使用 m6A RNA 甲基化定量试剂盒检测总 RNA 中的 m6A 水平。根据实验操作步骤,使用 TRIzol 试剂提取滑膜组织中总 RNA。分别加入 200 ng 总 RNA、捕获抗体溶液和检测抗体溶液,用比色法测量每个孔在 450 nm 的吸光度,根据标准曲线定量 m6A 水平。

1.2.4 免疫组化检测甲基转移酶样 3(methyltransferase-like 3, METTL3)、甲基转移酶样 14(methyltransferase-like 14, METTL14)、肾母细胞瘤 1 相关蛋白(Wilms' tumor 1-associating protein, WTAP)、AlkB 同系物 5(AlkB homologue 5, ALKBH5)的表达

滑膜组织浸泡于 10% 的多聚甲醛中 24 h 后石蜡包埋。石蜡块切片(5 μm)后进行苏木精-伊红(HE)染色,免疫组化检测 METTL3、METTL14、

WTAP、ALKBH5 表达。石蜡切片干燥、脱蜡和水合、抗原修复、蛋白封闭后,加入特异性一抗进行孵育,4 °C 过夜,加入二抗孵育 2 h 后显色。显微镜下观察目的蛋白表达情况。将免疫组化图片输入 Image J 软件中计算阳性细胞数占比。

1.2.5 细胞转染 小干扰 RNA 转染: METTL3 siRNA 的序列为 5'-GUCAGUAUCUUGGGCAAUUTT-3'(正向)和 5'-AUUUGCCCAAGAUACUGACTT-3'(反向)。在 6 孔板中培养滑膜成纤维细胞(3.0×10^5 /孔),按照操作流程使用转染试剂 Lipofectamine 3000 转染 1 μg 小干扰 RNA, RT-qPCR 和 Western blot 验证 METTL3 转染后 mRNA 及蛋白的表达。质粒转染:在 6 孔板中培养滑膜成纤维细胞(3.0×10^5 /孔),按照操作流程使用转染试剂 Lipofectamine 3000 转染 1 μg METTL3-pcDNA3.1, RT-qPCR 和 Western blot 验证 METTL3 转染后 mRNA 及蛋白的表达。

1.2.6 CCK-8 法检测细胞增殖 原代 RA 滑膜细胞在 96 孔培养板(每孔 6 000 个细胞)中培养,每组分别在培养 12、24、48 h,加入 10 μl CCK-8 溶液,并共培养 1.5 h。用酶标仪在 450 nm 下测试吸光度值。

1.2.7 流式细胞术检测细胞凋亡 在 6 孔板中培养滑膜成纤维细胞(2.0×10^5 /孔),各组分别在培养 12、24、48 h 收集细胞,采用凋亡试剂盒对细胞进行染色,使用流式细胞仪进行细胞凋亡检测。

1.2.8 划痕实验检测细胞迁移 4 组滑膜成纤维细胞分别培养在 6 孔板中(1.0×10^5 /孔),用 10 μl 移液管尖端在每个孔的单细胞层中间刮划一痕, PBS 洗涤未附着的细胞,每组分别在培养 12、24、48 h,用 4% 多聚甲醛固定细胞,用 0.1% 结晶紫染色后使用显微镜进行观察。

1.2.9 RT-qPCR 检测 为检测 METTL3 mRNA 表达,首先根据操作说明使用 TRIzol 试剂提取总 RNA,使用 NanoDrop 2000 分光光度计测量浓度。使用 5 × PrimeScript RT Master Mix 通过反转录获得互补 DNA(cDNA)。在实验说明的基础上利用 TB Green qPCR Premix Ex Taq II 制备反应混合物。反应在 Pikoreal 96 real-time PCR 系统中进行,使用以下条件检测 mRNA 水平:95 °C 持续 10 min,然后在 95 °C 下循环 40 次持续 15 s,60 °C 持续 60 s。使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算相对表达,以 β-actin mRNA 表达作为内参。

1.2.10 Western blot 检测 等量(约 0.2 g)的组织

或计数细胞在 RIPA 缓冲液(0.1 g/ml)中匀浆,在 4 °C 下以 12 000 r/min 离心 20 min,收集上清液蛋白质。测量蛋白浓度后,在 1 × SDS 缓冲液中煮沸(100 μl /10⁶ cells)5 min。在 10% SDS-PAGE 凝胶上加等量(50 μg)蛋白,分离后转移到 PVDF 膜,之后分别与特异性抗 METTL3(1:2 000)、抗 METTL14(1:5 000)、抗 WTAP(1:5 000)、抗 ALKBH5(1:2 000)、二抗(1:5 000)一起孵育后用蛋白印迹成像系统检测。

1.2.11 ELISA 法检测细胞培养上清液 IL-6、IL-17A、RANKL、OPG 浓度 在 6 孔板中培养滑膜成纤维细胞(2.0×10^5 /孔),各组分别在培养 12、24、48 h 收集细胞培养液上清液,按照人 IL-6、IL-17A、RANKL、OPG ELISA 试剂盒操作步骤进行检测。

1.3 统计学处理 用 SPSS 18.0 统计软件进行分析,正态分布计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较用 *t* 检验;多组间比较,方差齐时采用方差分析,方差不齐时采用非参数检验;计数资料用百分比表示,用 χ^2 检验进行比较;*P* < 0.05 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RA 和 OA 滑膜组织 m6A 含量 RA 滑膜组织 m6A 含量显著高于对照组(OA 组),差异有统计学意义(图 1),说明 RA 滑膜组织 m6A 甲基化水平增高。

2.2 RA 及 OA 滑膜组织中 METTL3、METTL14、WTAP 及 ALKBH5 的表达 与 OA 滑膜组织相比,免疫组化(阳性细胞数占比,图 2)及 Western blot(图 3)结果显示 RA 滑膜组织 METTL3 的表达显著高于 OA 组(*P* < 0.05),METTL14、WTAP 及 ALKBH5 的表达在两组间差异无统计学意义(*P* >

0.05)。

2.3 RA 滑膜细胞培养及鉴定 体外培养 RA 滑膜成纤维细胞,P3 时呈较为均一的长梭形细胞(图 4)。流式细胞术检测体外培养滑膜成纤维细胞:CD68⁻CD14⁻CD90⁺(图 5)。

2.4 METTL3 促进 RA 滑膜成纤维细胞增殖、迁移及分泌炎症因子 与阴性对照相比,RT-qPCR 及 Western blot 显示 si-METTL3 组滑膜成纤维细胞中 METTL3 表达显著降低,hi-METTL3 组滑膜成纤维细胞中 METTL3 表达显著增高,见图 6A-6C。

2.4.1 METTL3 对 RA 滑膜成纤维细胞增殖的作用

细胞培养 12、24 h,四组细胞增殖差异无统计学意义,48 h 后,hi-METTL3 组滑膜成纤维细胞增殖能力显著高于对照组(*P* < 0.05),si-METTL3 组和 STM2457 组滑膜成纤维细胞增殖能力显著低于对照组(*P* < 0.05),见图 7。

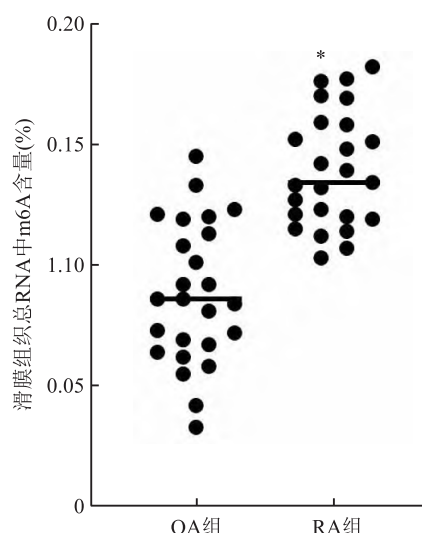


图1 RA与OA滑膜组织m6A的含量与OA组比较: **P* < 0.05

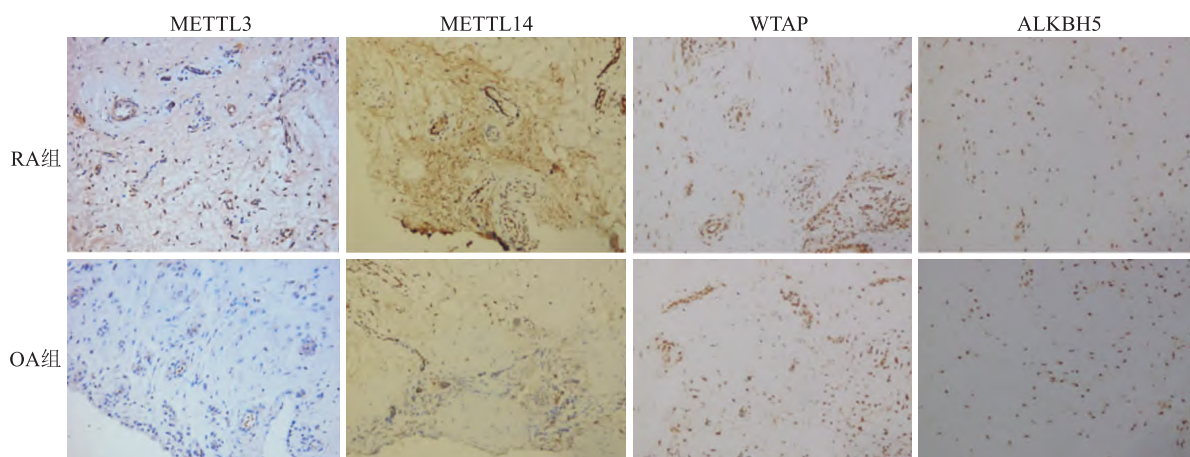


图2 免疫组化检测 RA 及 OA 滑膜组织中 METTL3、METTL14、WTAP 及 ALKBH5 的表达 ×200

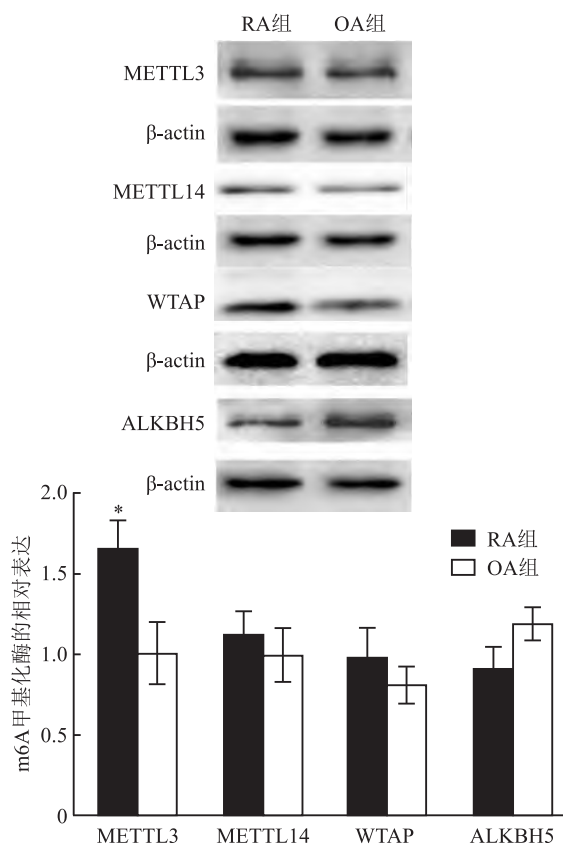


图3 Western blot 检测 RA 及 OA 滑膜组织中 METTL3、METTL14、WTAP、ALKBH5 的表达与 OA 组比较: * $P < 0.05$

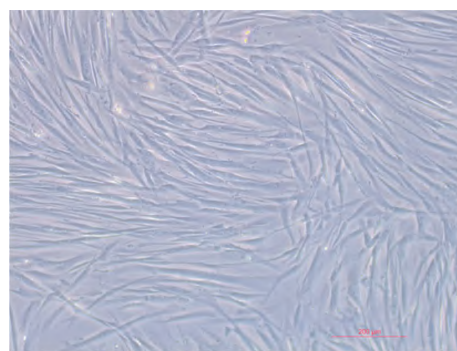


图4 体外培养 RA 滑膜细胞 ×400

2.4.2 METTL3 对 RA 滑膜成纤维细胞凋亡的作用

hi-METTL3 组滑膜成纤维细胞凋亡比例低于对照组, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); si-METTL3 组和 STM2457 组细胞凋亡比例高于对照组, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 8。

2.4.3 METTL3 对 RA 滑膜成纤维细胞迁移的作用

滑膜成纤维细胞培养 12 h 开始, hi-METTL3 组细胞迁移能力显著高于对照组, si-METTL3 组及 STM2457 组细胞迁移能力显著低于对照组, 并持续至 24 h 和 48 h, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 9。

2.4.4 METTL3 对 RA 滑膜成纤维细胞分泌细胞因

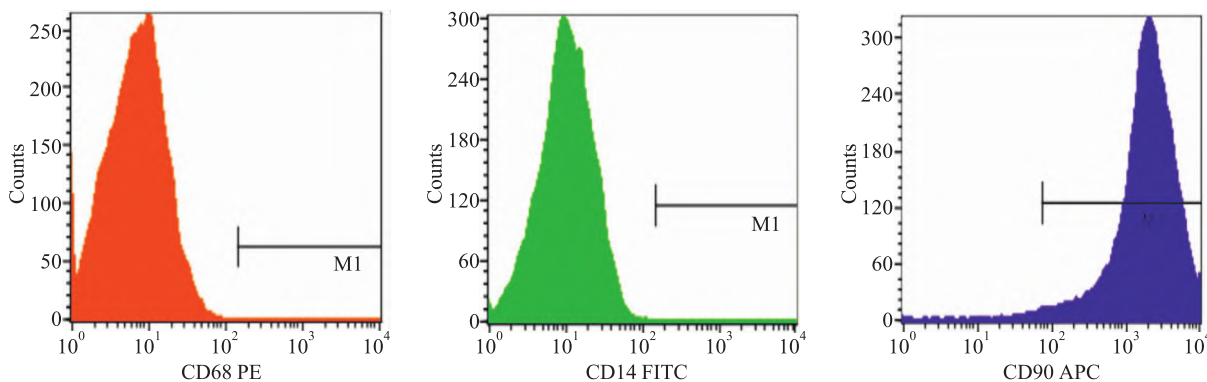


图5 流式细胞术检测体外培养滑膜样成纤维细胞

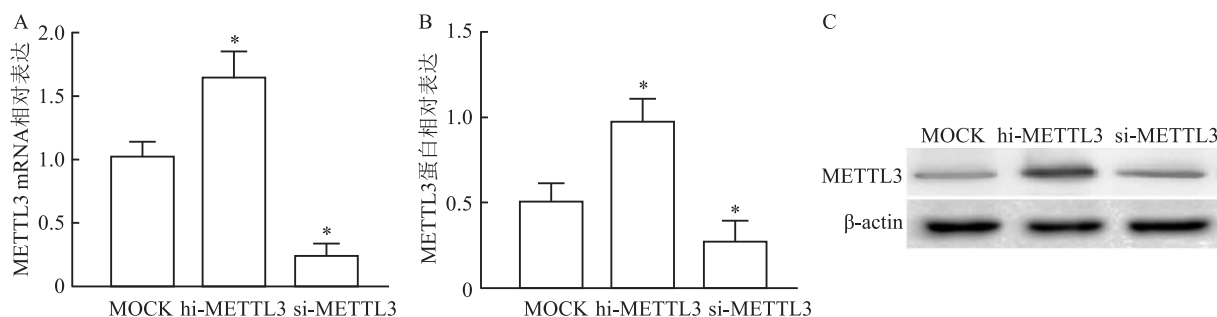


图6 RT-qPCR 及 Western blot 检测 si-METTL3 及 hi-METTL3 细胞 METTL3 的表达与 MOCK 组比较: * $P < 0.05$

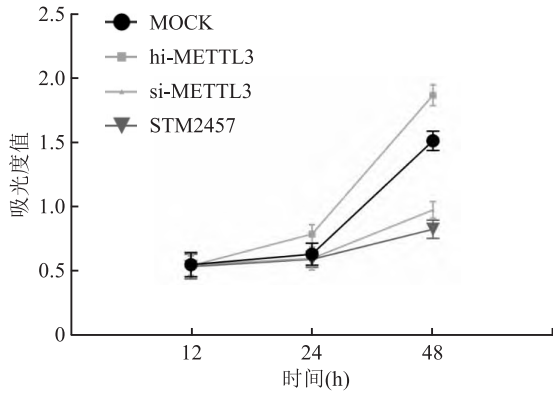


图7 CCK-8法检测四组滑膜成纤维细胞12、24、48 h增殖能力

子的作用 滑膜成纤维细胞培养48 h后上清液IL-6的浓度在si-METTL3组和STM2457组均显著低于对照组,hi-METTL3组显著高于对照组($P < 0.05$)。滑膜成纤维细胞培养24 h后,培养上清液中RANKL的浓度在hi-METTL3组显著高于对照组,并持续至48 h;培养48 h后,hi-METTL3及STM2457组上清液RANKL的浓度显著低于对照组($P < 0.05$)。滑膜成纤维细胞培养24、48 h时,hi-METTL3组细胞培养上清液OPG浓度显著低于对照组($P < 0.05$),si-METTL3组及STM2457组浓度显著高于对照组($P < 0.05$)。四组间在各培养时间点IL-17A浓度无显著差异(图10)。

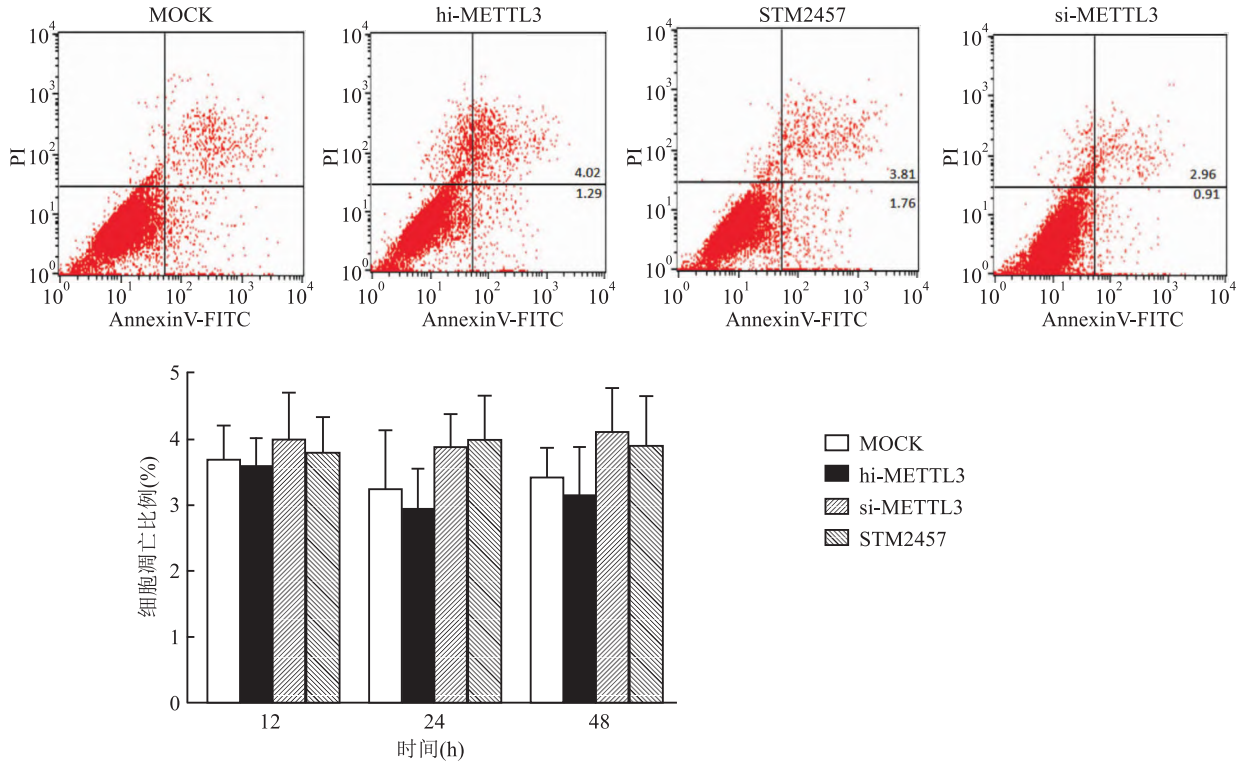


图8 流式细胞术检测四组滑膜成纤维细胞凋亡比例

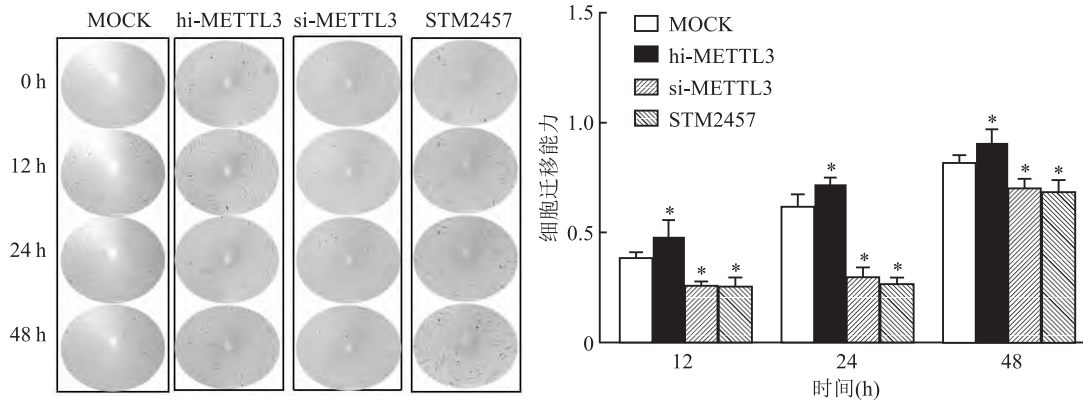


图9 划痕实验检测四组滑膜成纤维细胞12、24、48 h细胞迁移能力与MOCK组比较: * $P < 0.05$

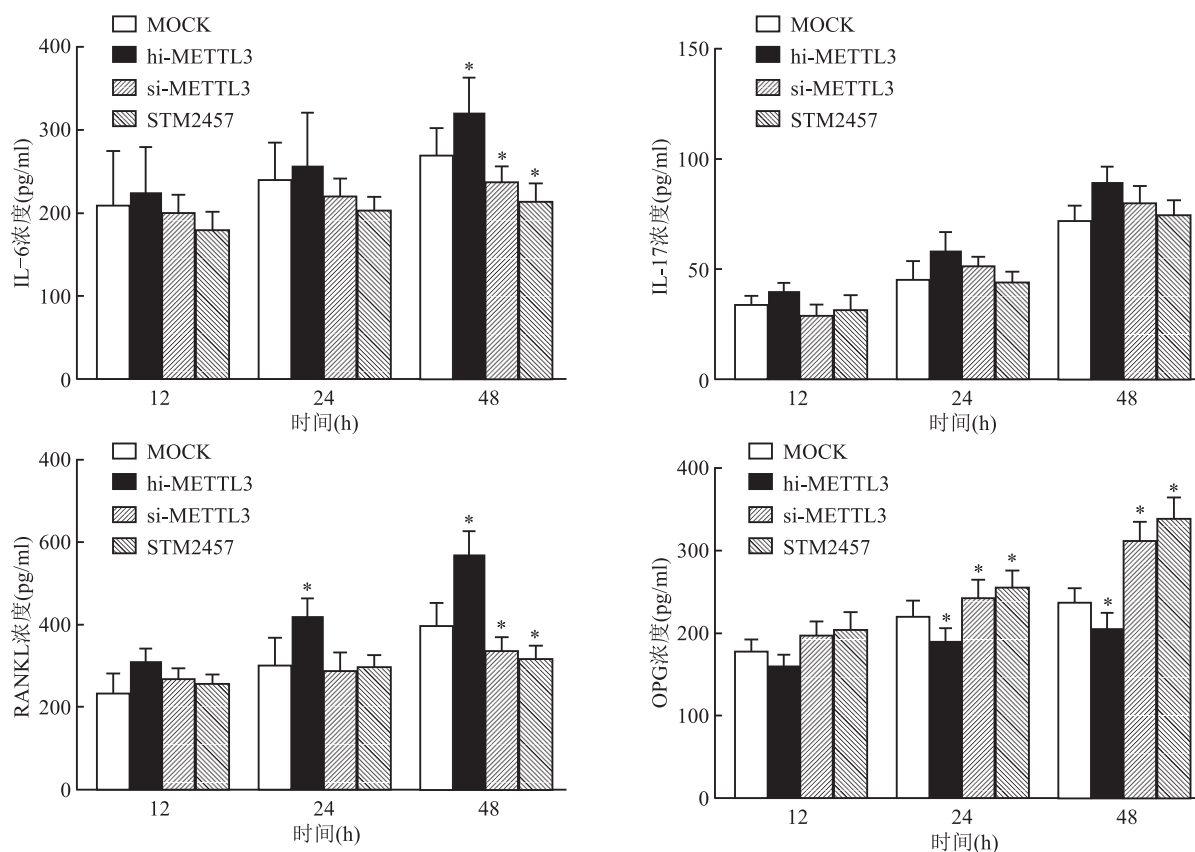


图10 ELISA法检测四组滑膜成纤维细胞12、24、48 h细胞培养上清液中IL-6、IL-17A、RANKL、OPG浓度与MOCK组比较: * $P < 0.05$

3 讨论

RA是一种慢性自身免疫性疾病,如未及时正规治疗可导致关节畸形、残疾,严重影响患者的生活质量。类风湿关节炎的病因目前尚未明确,SF是RA疾病进展最主要的效应细胞,在生理条件下,SF是滑液和滑膜基质中分子成分的关键制造者,保证关节的平衡与功能优化。在RA病理条件下,滑膜衬里层SF可由正常的1~3层增至15层甚至更多层细胞。SF表现为失去接触抑制的非依赖性生长,具有异常的增殖和侵蚀特性^[8]。

表观遗传调控是以独立于基因组序列的方式,在核苷酸序列不发生改变的情况下调控基因的表达,并影响蛋白功能等重要的生命过程。研究^[9]显示表观遗传学异常可导致RA-SF活化及炎症反应的发生,表现为异常增殖,具有侵袭性,破坏软骨和骨。mRNA m6A甲基化是高等真核生物基因转录后mRNA最主要的修饰。mRNA m6A修饰由甲基转移酶复合体对mRNA进行甲基化,去甲基化酶移除甲基,RNA结合蛋白与其特异性结合后可读取相关信息。其中甲基转移酶复合体是由METTL3、

METTL14和WTAP组成。ALKBH5作为去甲基酶从而实现去甲基化^[7]。因正常关节滑膜组织较难获得,因此本课题组研究了RA和OA患者关节滑膜组织RNA m6A甲基化情况,发现RA滑膜组织RNA m6A甲基化程度显著增高,进一步研究了参与RNA m6A甲基化的相关甲基化酶及去甲基化酶,发现METTL3在RA滑膜组织中的表达显著增高。接下来本课题组对SF进行体外培养,发现与对照组相比,过表达METTL3组SF细胞RNA m6A显著增加,细胞增殖活性、迁移能力显著增强^[10],细胞凋亡无明显差异;敲低METTL3细胞RNA m6A显著减少,SF细胞增殖活性、迁移能力显著下降^[11]。STM2457干预SF后,细胞增殖、迁移的变化与siMETTL3组相似。说明METTL3通过调控SF mRNA m6A甲基化促进SF细胞增殖和迁移。

SF除了具有异常的增殖特性,也能够刺激炎症,更能够直接破坏关节软骨和骨。研究^[12]表明SF可分泌一系列细胞因子,对单核巨噬细胞、淋巴细胞和骨细胞发挥多效性作用。RA SF能够产生及(或)应答的炎症介质包括IL-6、IL-17、RANKL、OPG等。IL-6是活化的T细胞和成纤维细胞产生的淋巴

因子,是 RA 的发生发展中重要炎症因子之一^[13-14]。IL-17 是重要的促炎细胞因子,由 T 辅助细胞 17 产生,IL-17 能够诱导上皮细胞、内皮细胞、成纤维细胞合成分泌 IL-6,从而导致炎症产生^[15-16]。RANKL 也叫做破骨细胞分化因子,其与受体结合后可激活破骨细胞,促进骨破坏^[17-18]。OPG 属于肿瘤坏死因子(TNF)受体家族,是 RANKL 的诱导受体,通过与 RANKL 的结合减少破骨细胞的产生,发挥骨保护作用^[19-20]。本研究显示,与对照组相比,hi-METTL3 组滑膜成纤维细胞 RNA m6A 甲基化程度增加,细胞分泌 IL-6、RANKL 显著增加、OPG 显著减少;si-METTL3 组 SF RNA m6A 甲基化程度显著下降,细胞分泌 IL-6、RANKL 显著减少,OPG 显著增加,说明 METTL3 调控 RNA m6A 甲基化后可促进炎症因子 IL-6 的表达及破骨细胞分化因子 RANKL 的表达,减少骨保护素 OPG 的表达,可能会促进骨破坏。各组细胞培养上清液中 IL-17A 浓度无明显变化,说明 METTL3 对 IL-17A 的作用影响小。METTL3 对 SF 合成分泌 IL-6、RANKL 及 OPG 的具体调控机制,如蛋白基因转录的影响、mRNA m6A 甲基化的区域或位点值得进一步探讨,这也是课题组下一步的研究方向。本研究显示给予 METTL3 特异性抑制剂 STM2457 干预后,SF 细胞增殖活性、迁移能力显著下降,分泌 IL-6 及 RANKL 显著减少,OPG 表达显著增加,STM2457 作为 METTL3 特异性抑制剂是未来 RA 治疗的潜在药物之一,本课题组下一步将对 STM2457 干预 RA 动物模型的体内作用进行研究。

总之,本研究表明 RA 滑膜成纤维细胞 mRNA m6A 甲基化显著增加,且主要为 METTL3 所调控。METTL3 可通过促进 RA-SF 细胞 mRNA m6A 甲基化,促进 SF 增殖和迁移,同时促进 SF 分泌 IL-6 及 RANKL。METTL3 特异性抑制剂 STM2457 是 RA 治疗的潜在靶点药物,值得后续进一步研究。

参考文献

- [1] Weyand C M, Goronzy J J. The immunology of rheumatoid arthritis [J]. *Nat Immunol*, 2021, 22(1): 10-8.
- [2] Hansilkaar R, Vedder D, Baniaamam M, et al. Cardiovascular risk in inflammatory arthritis: rheumatoid arthritis and gout [J]. *Lancet Rheumatol*, 2021, 3(1): e58-70.
- [3] Yan X, Liu Y, Kong X, et al. MicroRNA-21-5p are involved in apoptosis and invasion of fibroblast-like synoviocytes through PTEN/PI3K/AKT signal [J]. *Cytotechnology*, 2019, 71(1): 317-28.
- [4] Ambatipudi S, Sharp G C, Clarke S, et al. Assessing the role of DNA methylation-derived neutrophil-to-lymphocyte ratio in rheumatoid arthritis [J]. *J Immunol Res*, 2018, 2018: 2624981.
- [5] Zhu H, Wu L F, Mo X B, et al. Rheumatoid arthritis-associated DNA methylation sites in peripheral blood mononuclear cells [J]. *Ann Rheum Dis*, 2019, 78(1): 36-42.
- [6] Li Y, Zhou M, Lv X, et al. Reduced activity of HDAC3 and increased acetylation of histones H3 in peripheral blood mononuclear cells of patients with rheumatoid arthritis [J]. *J Immunol Res*, 2018, 2018: 7313515.
- [7] Liang Z, Geng Y, Gu X. Adenine methylation: New epigenetic marker of DNA and mRNA [J]. *Mol Plant*, 2018, 11(10): 1219-21.
- [8] 白永峰,曹乌吉斯古楞. 滑膜成纤维细胞在类风湿性关节炎中的作用及中药干预研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(14): 226-34.
- [9] 宋彦. 类风湿关节炎滑膜成纤维细胞的表现遗传学研究进展 [J]. *现代医学*, 2022, 50(2): 263-7.
- [10] Shi W, Zheng Y, Luo S, et al. METTL3 promotes activation and inflammation of FLSs through the NF-kappaB signaling pathway in rheumatoid arthritis [J]. *Front Med (Lausanne)*, 2021, 8: 607585.
- [11] Chen J, Lin X, He J, et al. Artemisitene suppresses rheumatoid arthritis progression via modulating METTL3-mediated N6-methyladenosine modification of ICAM2 mRNA in fibroblast-like synoviocytes [J]. *Clin Transl Med*, 2022, 12(12): e1148.
- [12] Ganesan R, Rasool M. Fibroblast-like synoviocytes-dependent effector molecules as a critical mediator for rheumatoid arthritis: Current status and future directions [J]. *Int Rev Immunol*, 2017, 36(1): 20-30.
- [13] 邓毅凡,张晶,周玮. 类风湿关节炎合并冠心病患者冠状动脉病变程度与白细胞介素-6、白细胞介素-17 水平的相关性 [J]. *实用临床医药杂志*, 2022, 26(3): 55-8.
- [14] 马晓莉,吴丽丽,郭东更,等. 初发类风湿关节炎患者外周血淋巴细胞亚群及 TNF- α 、IL-6 表达与临床意义 [J]. *宁夏医学杂志*, 2022, 44(4): 328-30.
- [15] 杨威,荣晓凤. 白细胞介素-17 在风湿病中的作用及中医药干预研究进展 [J]. *风湿病与关节炎*, 2023, 12(2): 75-80.
- [16] Selimov P, Karalilova R, Damjanovska L, et al. Rheumatoid arthritis and the proinflammatory cytokine IL-17 [J]. *Folia Med (Plovdiv)*, 2023, 65(1): 53-9.
- [17] 程增玉,姜雯,徐浩东,等. 基于核因子- κ B 受体活化因子受体/骨保护素探讨复方雷公藤外敷剂改善 II 型胶原诱导型关节炎模型大鼠骨破坏 [J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2023, 31(2): 12-7.
- [18] Tanaka S, Tanaka Y. RANKL as a therapeutic target of rheumatoid arthritis [J]. *J Bone Miner Metab*, 2021, 39(1): 106-12.
- [19] 周志锋,郭会卿,曹玉举,等. 中医药通过 OPG/RANKL/RANK 系统干预类风湿关节炎骨破坏的研究进展 [J]. *中医学报*, 2023, 38(1): 77-82.
- [20] Quaresma T O, de Almeida S, Da S T, et al. Comparative study of the synovial levels of RANKL and OPG in rheumatoid arthritis,

METTL3 promotes proliferation, migration, and secretion of inflammatory factors by mRNA m6A methylation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts

Li Juan, Jiang Yangqing, Shen Ruiming, Li Guoquan, Wang Min, Xu Fenghuang

(Dept of Rheumatology and Immunology, First Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou 570102)

Abstract Objective To investigate the effect and mechanism of methyltransferase-like 3 (METTL3) on the proliferation, migration, and secretion of inflammatory factors by synovial fibroblasts from rheumatoid arthritis (RA).

Methods The expression of METTL3 in synovial tissue (SF) from 25 patients with rheumatoid arthritis and 25 patients with osteoarthritis was detected by RT-qPCR and immunohistochemistry, respectively. The concentration of RNA m6A was detected by ELISA. RA synovial fibroblasts were isolated and cultured, and divided into NC (normal control) group, hi-METTL3 (overexpression of METTL3) group, si-METTL3 (knock-down METTL3) group, and STM2457 (METTL3 specific inhibitor) intervention group. Cell proliferation was detected by CCK-8 method. Apoptosis was detected by flow cytometry. And the concentrations of interleukin-6 (IL-6), interleukin-17A (IL-17A), receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL), and osteoprotegerin (OPG) in the supernatant of cell culture were detected by ELISA. **Results** Compared with synovial tissue of osteoarthritis, the expression of mRNA m6A and METTL3 in synovial tissue of RA significantly increased ($P < 0.05$). After overexpression of METTL3, the expression of m6A in synovial fibroblasts increased. The proliferation and migration abilities of SF in hi-METTL3 group were significantly improved, and their apoptosis did not change significantly. The secretion of cytokines IL-6 and RANKL of SF in hi-METTL3 group significantly increased, while the OPG significantly decreased ($P < 0.05$). After interfering with METTL3 expression, the expression of m6A in synovial fibroblasts decreased. Cell proliferation and migration of SF in siMETTL3 group significantly decreased. The secretion of cytokines IL-6 and RANKL significantly decreased, and OPG significantly increased ($P < 0.05$). After intervention with METTL3 inhibitor STM2457, the proliferation and migration of synovial fibroblasts were significantly reduced, and the secretion of cytokines IL-6 and RANKL significantly reduced, and OPG significantly increased ($P < 0.05$). There was no significant difference in the expression of IL-17A among each group. **Conclusion** METTL3 may promote the proliferation and migration of RA synovial fibroblasts, enhance the expression of IL-6 and RANKL, and inhibit the expression of OPG through RNA m6A methylation modification.

Key words methyltransferase like 3; methylation; rheumatoid arthritis; proliferation; migration; inflammatory factors