

敲低 *Cav1* 基因可抑制小鼠肝细胞线粒体功能及关键基因 mRNA 的 m⁶A 修饰和表达

丁珊珊¹, 廖颖¹, 白雪¹, 黄娇阳¹, 浅川哲也^{1,2}

¹福建中医药大学中医学院, 福建 福州 350122; ²日本滨松医科大学神经外科系, 日本 静冈 4313192

摘要:目的 探讨 *Cav1* 对小鼠肝细胞线粒体功能和 mRNA 的 m⁶A 甲基化修饰及表达水平的影响。方法 采用慢病毒转染敲低小鼠肝细胞 AML12 中 *Cav1* 基因的表达 (sh*Cav1* 组), 转染阴性对照病毒作为对照组。采用 TMRE 荧光探针检测线粒体膜电位变化, 结合 Seahorse 能量代谢分析系统检测线粒体呼吸功能。采用甲基化 RNA 免疫共沉淀技术 (MeRIP) 联合 m⁶A 表观转录组芯片检测 mRNA 的 m⁶A 甲基化修饰和表达水平变化, 通过富集分析筛选线粒体功能相关基因, 并用 qPCR 验证目标基因 mRNA 的 m⁶A 修饰和表达水平。结果 与对照组相比, sh*Cav1* 组线粒体膜电位 ($P < 0.05$) 和线粒体呼吸能力降低 ($P < 0.01$)。m⁶A 表观转录组芯片检测结果显示, sh*Cav1* 组有 7814 个 mRNA 的 m⁶A 甲基化修饰水平发生变化 (变化倍数 > 1.5 , $P < 0.05$), 其中 152 个上调、7662 个下调。联合表达差异分析显示, 有 2497 个 mRNA 的 m⁶A 甲基化修饰和表达水平存在协同变化。协同变化的 mRNA 富集到氧化磷酸化通路, 其中 *Usp15*、*Suclg2*、*Ppa2* mRNA 的 m⁶A 甲基化修饰变化百分比最高。芯片和 qPCR 结果均显示 sh*Cav1* 组中 *Usp15*、*Suclg2*、*Ppa2* mRNA 的 m⁶A 修饰和表达水平均较对照组降低 ($P < 0.05$)。结论 *Cav1* 敲低的小鼠肝细胞 mRNA 的 m⁶A 甲基化修饰变化显著, 该变化与 mRNA 的表达有关, *Cav1* 对线粒体功能的调节作用可能依赖于其对 *Usp15*、*Suclg2*、*Ppa2* mRNA 的 m⁶A 修饰调控。

关键词: *Cav1* 基因; m⁶A RNA 甲基化; mRNA 表达; 线粒体膜电位; 线粒体呼吸

Knockdown of *Cav1* inhibits mitochondrial function and mRNA m⁶A modification and expression of key genes in mouse hepatocytes

DING Shanshan¹, LIAO Ying¹, BAI Xue¹, HUANG Jiaoyang¹, ASAKAWA Tetsuya^{1,2}

¹School of Traditional Chinese Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China; ²Department of Neurosurgery, Hamamatsu University School of Medicine, Shizuoka 4313192, Japan

Abstract: Objective To investigate the role of *Cav1* gene in regulating mitochondrial function and mRNA m⁶A modification and expressions of the key genes in mouse hepatocytes. **Methods** In mouse hepatocyte AML12 cells, the effects of lentivirus-mediated *Cav1* knockdown and transfection with a negative control virus on mitochondrial membrane potential and mitochondrial respiratory function were analyzed using the TMRE fluorescent probe and the Seahorse extracellular flux analysis system. Methylated RNA immunoprecipitation (MeRIP) combined with m⁶A microarray was utilized to evaluate the changes in mRNA m⁶A modification and expression levels, followed by enrichment analysis to identify the functionally relevant genes. The m⁶A modification and expression levels of the mRNAs were validated by qPCR. **Results** Compared with the negative control group, the cells with *Cav1* knockdown exhibited significantly reduced mitochondrial membrane potential and respiratory capacity. m⁶A microarray analysis revealed significant changes in m⁶A modification levels (fold change > 1.5) of 7814 mRNAs, including 152 upregulated and 7662 downregulated mRNAs. Integrated expression analysis identified 2497 mRNAs showing coordinated changes in m⁶A modification and expression levels. These mRNAs were enriched in the oxidative phosphorylation pathway, with *Usp15*, *Suclg2*, and *Ppa2* exhibiting the highest percent changes in m⁶A modification. Both microarray and qPCR results showed that the m⁶A modification and expression levels of *Usp15*, *Suclg2* and *Ppa2* mRNAs were significantly reduced in cells with *Cav1* knockdown compared to the NC group. **Conclusion** *Cav1* knockdown induces significant alterations in mRNA m⁶A modification as well as their expression levels. The regulatory effects of *Cav1* on mitochondrial function may be mediated by modulation of m⁶A modification of *Usp15*, *Suclg2*, and *Ppa2* mRNAs.

Keywords: *Cav1* gene; m⁶A RNA methylation; mRNA expression; mitochondrial membrane potential; mitochondrial respiratory

代谢相关脂肪性肝病 (MAFLD) 是一种与代谢功能障碍密切相关的慢性肝脏疾病, 全球患病率和发病率不断增高, 加重了全球医疗及社会经济负担^[1,2]。MAFLD 的发病机制尚未全面解析, 但研究表明线粒体

功能障碍是其中的核心病理机制之一^[3,4]。线粒体功能障碍导致 ATP 合成减少、氧化应激增加、脂毒性积累和肝细胞损伤, 推动 MAFLD 从单纯的脂肪变性发展为更严重的脂肪性肝炎和肝纤维化^[3,4]。因此, 对肝细胞线粒体功能的分子调控机制进行深入探究, 能够为 MAFLD 发病机制提供新的分子病理学依据, 对于预防和治疗该病具有重要的意义。

小窝蛋白 1 (Cav1) 作为细胞膜脂筏的核心结构蛋白, 在细胞信号转导过程中发挥着重要的调控作用, 是

收稿日期: 2025-07-22

基金项目: 国家自然科学基金 (82474391); 福建省自然科学基金 (2024J01133)

Supported by National Natural Science Foundation of China (82474391).

作者简介/通信作者: 丁珊珊, 博士, 副教授, 硕士生导师, E-mail: ding123shan@163.com

脂质代谢的关键调节因子^[5]。近年来,Cav1已被证明参与调节线粒体功能和细胞能量代谢^[6,7],主要通过维持线粒体膜稳定性、呼吸链复合物功能稳态、抗氧化能力及代谢平衡,对线粒体功能起到多方面的保护作用^[8]。在肝细胞中,Cav1通过减少脂质过氧化,上调过氧化物酶的表达^[9],或者通过抑制缺氧诱导因子的表达和线粒体定位^[10],减轻氧化应激对线粒体的损伤。现有证据表明,Cav1在MAFLD中起到保护作用,可能成为预测和防治MAFLD进展的重要分子靶点^[11]。

N6-甲基腺嘌呤(m⁶A)作为真核生物mRNA中最普遍的转录后修饰形式,在甲基转移酶、去甲基化酶和m⁶A结合蛋白的共同调控下,通过介导mRNA稳定性、翻译效率及可变剪接等过程,动态调节细胞的生理功能和病理进程^[12,13]。研究发现m⁶A修饰在维持线粒体功能方面发挥着重要作用。m⁶A修饰调控线粒体动力学和生物发生相关基因mRNA的稳定性和翻译,促进线粒体 β 氧化^[14]。另外,m⁶A修饰通过促进核编码的线粒体电子传递链复合物亚基mRNA的翻译来维持线粒体呼吸^[15]。研究表明,m⁶A修饰还可以调节线粒体氧化应激和活性氧的产生,影响器官纤维化的进展^[16]。尽管m⁶A修饰已被证明参与线粒体功能调控,但关于Cav1在此过程中的作用及其调控机制尚未有研究报道。基于此,本研究采用m⁶A-mRNA表观转录组芯片,探讨Cav1敲低对小鼠肝细胞mRNA的m⁶A甲基化修饰和表达水平的影响,从中挖掘m⁶A修饰依赖的Cav1调节线粒体功能的潜在靶基因,为Cav1在肝细胞的转录后调控提供实验依据,也为MAFLD的防治提供参考资料。

1 材料和方法

1.1 材料

小鼠肝细胞AML12(SCSP-550)及其专用完全培养液(SCSP-654,中国科学院细胞库);慢病毒载体(69089-1,CON313,上海吉凯基因);TB Green[®] Premix Ex Taq[™] II (RR820A, TaKaRa); TRIzol (15596026, Invitrogen);Cav1抗体(ab17052, Abcam); β -actin抗体(sc-69879, Santa Cruz);线粒体膜电位检测试剂盒(C2001S,上海碧云天);线粒体呼吸检测试剂盒(103015-100, Agilent);抗m⁶A抗体(202003, Synaptic Systems);RNA标记试剂盒(AL-SE-005)及m⁶A-mRNA表观转录组芯片(Arraystar)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 AML12细胞接种于专用完全培养液(含DMEM/F-12培养基、10%胎牛血清、1% ITS补充剂和40 ng/mL地塞米松),于37 °C、5% CO₂的培养箱中培养,待细胞密度达到80%~90%时进行细胞传代。

1.2.2 慢病毒转染 shCav1慢病毒载体的构建、扩增及包装由上海吉凯基因公司完成,shCav1病毒的靶向序列为:5'-CGACGTGGTCAAGATTGACTT-3',阴性对照病毒的靶向序列为:5'-TTCTCCGAACGTGTCA CGT-3'。将AML12细胞进行常规传代,当细胞融合度达到20%~40%进行转染。对照组(NC组)细胞转染阴性对照病毒,实验组(shCav1组)细胞转染shCav1病毒,转染后于37 °C、5% CO₂培养箱中培养24 h。通过Real-time PCR和Western blotting检测Cav1 mRNA及蛋白表达水平,验证Cav1敲低效果。

1.2.3 Real-time PCR实验 使用TRIzol试剂提取细胞的总RNA,并根据说明书使用逆转录试剂盒合成cDNA。采用TB Green Premix Ex Taq II试剂盒进行实时定量PCR反应,采用2^{- $\Delta\Delta$ CT}法计算mRNA的相对表达量。引物序列:Cav1上游5'-GCGACCCCAAGCATCTCAA-3',下游5'-ATGCCGTCGAAACTGTGTGT-3',产物长度为91 bp; β -actin上游5'-GCACCACACCTTCTAC AATG-3',下游5'-GTGAGGGAGAGCATAGCC-3',产物长度为262 bp(上海吉凯基因)。

1.2.4 Western blotting实验 使用RIPA裂解液提取细胞的蛋白,BCA蛋白定量法测定浓度,95 °C变性10 min。取50 μ g蛋白进行SDS-PAGE电泳,将蛋白条带转至PVDF膜上,10%脱脂牛奶室温封闭1 h,分别加入一抗(Cav1抗体,1:200; β -actin抗体,1:5000),4 °C孵育过夜,二抗(IgG,1:5000)室温孵育1 h,使用ECL发光液与PVDF膜反应后,于成像系统显影成像。

1.2.5 线粒体膜电位检测 当细胞融合度达到80%时,弃去原培养液,PBS洗涤后,加入线粒体膜电位检测探针TMRE染色工作液,培养箱中孵育30 min,弃去染色工作液,用培养液洗涤2次以去除未结合探针,随后加入培养液,于显微镜下观察并采集图片。使用10 μ mol/L氧化磷酸化抑制剂CCCP处理细胞20 min,作为诱导线粒体膜电位下降的阳性对照。

1.2.6 线粒体呼吸功能检测 使用Seahorse XF细胞能量代谢分析仪进行检测。将细胞接种到特定的细胞板中培养,实验时细胞融合度达80%~90%;探针板于37 °C、无CO₂培养箱中水化过夜;配制检测液,放入37 °C、无CO₂培养箱中温育备用;取出待测细胞,用温育的检测液为细胞换液后,放入37 °C、无CO₂培养箱中孵育1 h;探针板对应的加药孔中,依次加入寡霉素1.5 μ mol/L、FCCP 1.0 μ mol/L、鱼藤酮/抗霉素A 0.5 μ mol/L。在Wave软件模板界面选择线粒体压力测试模板,设置分组定义和布板,经校准后,进行细胞能量代谢检测。检测结束后,对数据进行归一化处理,利用Wave软件计算得出细胞线粒体功能的关键参数:基础呼吸值、最大呼吸值、质子漏、ATP生成量等。

1.2.7 MeRIP-芯片检测 TRIzol法提取细胞总RNA,用NanoDrop ND-1000检测总RNA的纯度和浓度,电泳检测RNA的完整性。用抗m⁶A的抗体免疫沉淀总RNA。被免疫沉淀下来的RNA为IP,上清液的RNA为Sup。设计有m⁶A修饰的阳性对照引物和非m⁶A修饰的阴性对照引物,对IP和Sup的RNA分别进行反转录和qPCR,计算%MeRIP对MeRIP进行质检。Cy5和Cy3分别标记IP和Sup的RNA,将标记后的RNA与芯片杂交。清洗后,使用安捷伦G2505C扫描仪对阵列进行双色扫描。

1.2.8 芯片数据分析 使用安捷伦特征提取软件(11.0.1.1版)对采集的阵列图像进行分析。IP和Sup的原始强度用log₂转换后的Spike-in RNA强度的平均值归一化。根据IP(Cy5标记)的归一化强度计算RNA的m⁶A甲基化量。根据IP(Cy5标记)和Sup(Cy3标记)归

一化强度计算RNA的m⁶A甲基化百分比(%m⁶A)和RNA的表达量。两组间的修饰和表达差异通过设置倍数变化量(FC)与统计显著性(P值)的阈值来进行筛选。采用R包对差异基因进行富集分析。

1.2.9 MeRIP-qPCR检测 泛素特异性蛋白酶15(Usp15)、琥珀酰辅酶A合成酶β亚基(Suclg2)、无机焦磷酸酶2(Ppa2)是富集到的差异mRNA表达和m⁶A修饰的线粒体功能相关基因。分别对被抗m⁶A的抗体免疫沉淀下来的RNA(IP)以及未免疫沉淀的RNA(input)进行qPCR验证。使用Gapdh作为内参,计算Usp15、Suclg2和Ppa2 mRNA的相对表达水平。以input作为内参,计算Usp15、Suclg2和Ppa2 mRNA的相对m⁶A修饰量。引物由浙江尚亚生物技术有限公司合成,引物序列(表1)。

表1 MeRIP-qPCR引物序列
Tab.1 Primer sequences for MeRIP-qPCR

Gene	Forward primers sequences	Reverse primers sequences
Usp15	CCGTGGATGAAAACCTGAGTAG	TTCTCTTAGGCAGACAGGGATAA
Suclg2	CCAGCGAAGCTTCTGGACCT	CACAGTTGACGATCCCACCA
Ppa2	CGGTGGACAAATGCCAAGATG	TTCGGTGTGTAGCGTAGCTT
Gapdh	CACTGAGCAAGAGAGGCCCTAT	GCAGCGAAGCTTATTGATGGTATT

1.3 统计学分析

采用SPSS20.0软件分析数据。计量资料符合正态分布的以均数±标准差表示,不符合正态分布的以中位数(四分位数间距)表示。组间比较分别采用两样本t检验和非参数检验。以P<0.05(双侧)为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 shCav1慢病毒转染下调Cav1的表达

阴性对照病毒(NC)及目的病毒(shCav1)分别转染AML12细胞后,荧光显微镜下可见大部分细胞有绿色荧光蛋白表达,而未转染病毒的空白对照细胞(Control)未见绿色荧光蛋白表达,显示慢病毒转染细胞的效率达到80%以上(图1A)。Real-time PCR和Western blotting结果显示,与NC组比较,shCav1组Cav1 mRNA和蛋白的表达降低(P<0.01)。

2.2 Cav1敲低损伤线粒体膜电位和线粒体呼吸

经TMRE染色后,CCCP作为诱导线粒体膜电位下降的阳性对照,可见其使细胞呈弱红色荧光;NC组细胞显示明亮的红色荧光;而shCav1组细胞红色荧光明显减弱,Cav1的敲低导致线粒体膜电位下降(图2A)。Seahorse XF能量代谢分析结果显示,与NC组比较,shCav1组细胞的基础呼吸量(P<0.05)、最大呼吸量

(P<0.01)和ATP生成量(P<0.05)减少,Cav1的敲低使线粒体呼吸能力下降(图2B)。

2.3 MeRIP质量控制良好,芯片数据可靠

细胞总RNA的OD₂₆₀/A₂₈₀接近2.0, RNA纯度良好。RNA电泳结果显示, RNA条带清晰,亮度比例合适, RNA的完整性良好(图3A)。所有样本的RNA质量良好,符合后续实验要求。MeRIP-qPCR结果显示, m⁶A修饰阳性对照的%MeRIP>90%, 阴性对照的%MeRIP<5%, MeRIP质量检测合格(图3B)。标记的RNA与芯片杂交后,扫描得到的阵列图谱信号分布均匀,背景噪声低(图3C)。

2.4 Cav1敲低改变mRNA的m⁶A修饰和表达

m⁶A-mRNA表观转录组芯片结果分析可见,与NC组比较,shCav1组m⁶A修饰变化倍数大于1.5(P<0.05)的mRNA共7814个(上调的152个,下调的7662个,图4A)。其中%m⁶A>20%的有595个(上调的27个,下调的568个)。m⁶A修饰上调和下调的前20个mRNA(表2)。

与NC组比较,shCav1组表达变化倍数大于1.5(P<0.05)的mRNA共2946个(图4B),表达上调和下调的前20个mRNA(表3)。m⁶A修饰和表达水平均发生变化的mRNA有2497个(均上调的89个,均下调的2404个,m⁶A修饰下调、表达上调的4个,图4C),其中%

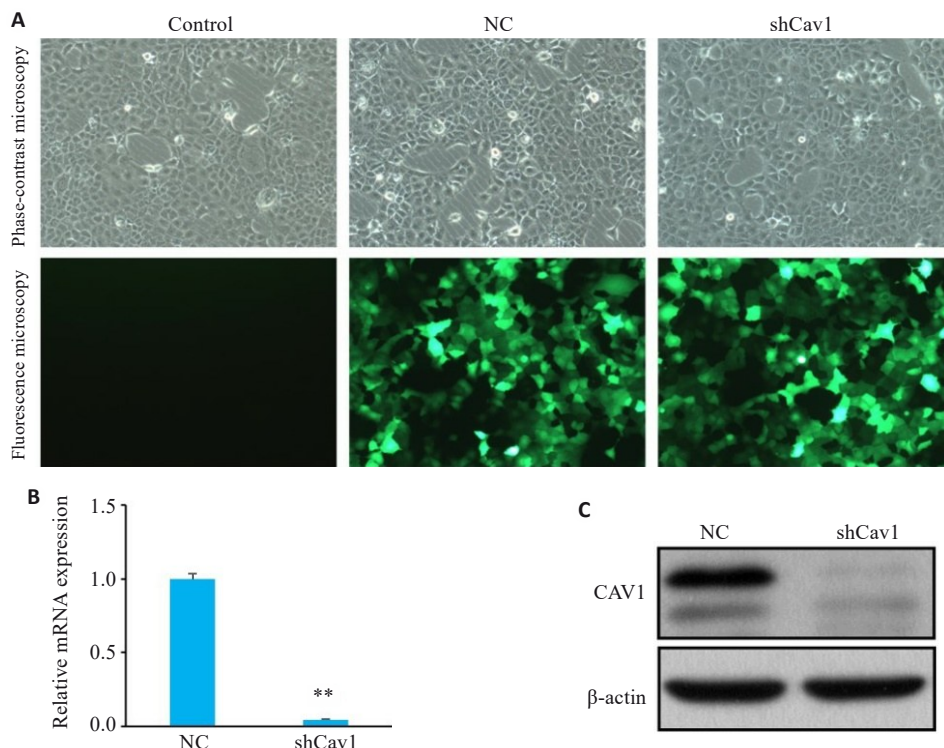


图1 shCav1慢病毒转染AML12细胞下调Cav1的表达

Fig.1 Knockdown of *Cav1* by lentivirus-mediated transfection with shCav1 in AML12 cells. A: Phase-contrast and fluorescence microscopy of the cells under bright-field conditions (GFP, Original magnification: $\times 100$). B: Real-time PCR analysis of *Cav1* mRNA expression levels. C: Western blotting of *Cav1* protein expression. Control : Untreated control; NC: Control shRNA; shCav1: *Cav1* shRNA. ** $P < 0.01$ vs NC group.

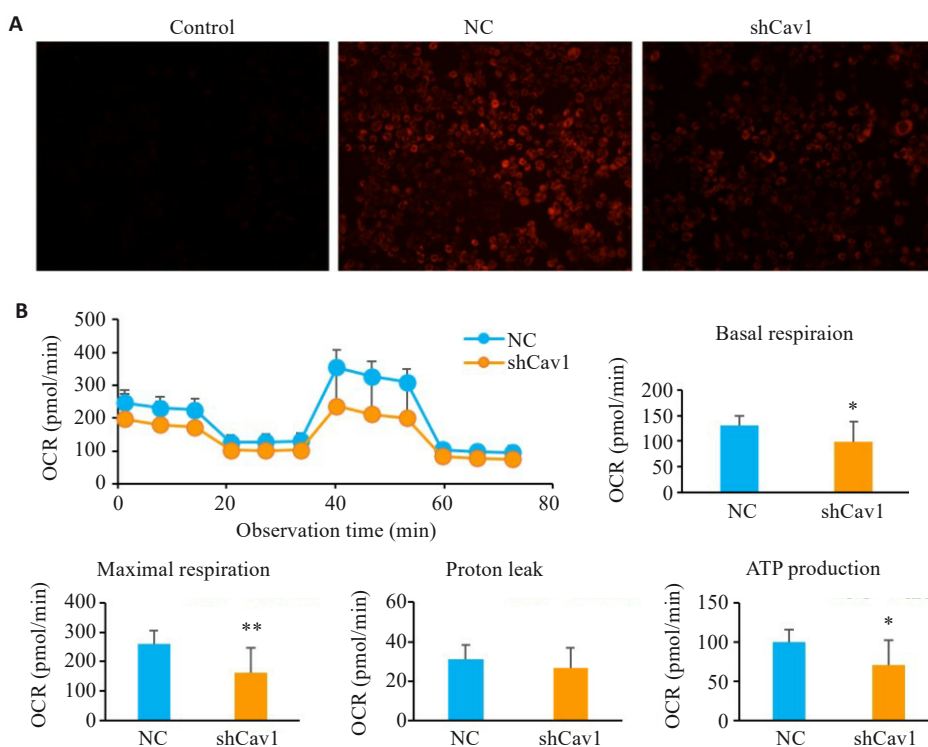


图2 Cav1敲低损伤AML12细胞线粒体膜电位和线粒体呼吸

Fig.2 *Cav1* knockdown impairs mitochondrial membrane potential and respiratory function in AML12 cells. A: TMRE staining for analysis of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) ($\times 100$). B: Seahorse XF metabolic analysis of basal respiration, maximal respiration and ATP production. CCCP: A mitochondrial uncoupler, used as a positive control to induce $\Delta\Psi_m$ collapse (dim red fluorescence); OCR: Oxygen consumption rate. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs NC group.

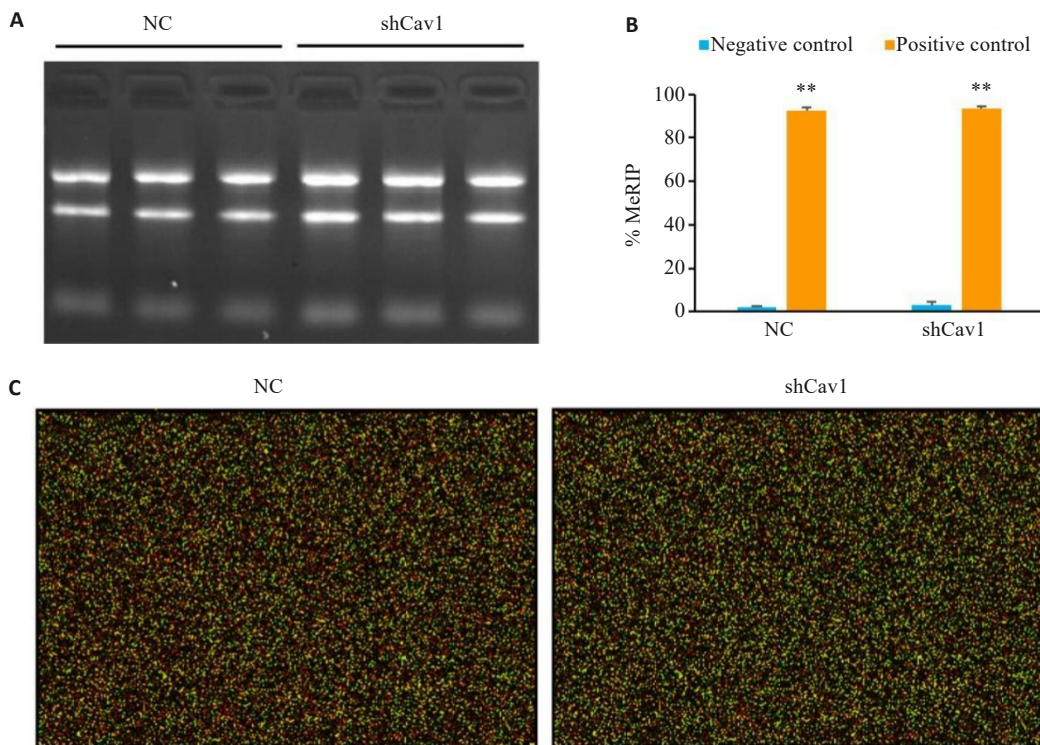


图3 MeRIP质量控制良好, 芯片数据可靠

Fig.3 Quality control of MeRIP and reliability of microarray. A: Agarose gel electrophoresis of the total RNA to confirm RNA integrity. B: MeRIP quality control demonstrating efficient m⁶A enrichment (% MeRIP confirming assay specificity). C: Representative RNA microarray hybridization image (Cy5 and Cy3). Positive controls: m⁶A-modified RNAs; Negative controls: Non-methylated RNAs. ***P*<0.01 vs negative control.

m⁶A>20%的有288个(均上调的22个,均下调的264个,m⁶A修饰下调、表达上调的2个)。差异mRNA富集分析得到的GO和pathway条目,主要为RNA剪接、核质转运和氧化磷酸化等生物学过程(图4D)。

2.5 Cav1敲低调节线粒体功能相关mRNA的m⁶A修饰和表达

Cav1敲低后,差异m⁶A修饰和差异表达的线粒体功能相关mRNA中m⁶A变化百分比最高的是*Usp15*、*Suclg2*、*Ppa2*,芯片结果显示三者mRNA的m⁶A修饰均下调(*P*<0.01,图5A),其mRNA表达也下调(*P*<0.05,图5B)。qPCR检测结果与芯片结果一致(*P*<0.05,图5)。

3 讨论

线粒体功能异常是MAFLD关键病理机制之一,其诱发的氧化应激和炎症反应会驱动病程的进一步发展^[17]。前期研究结果也表明,高脂饮食诱导的MAFLD小鼠肝脏中线粒体功能异常^[18]。在MAFLD患者^[19]和小鼠^[18]肝脏中Cav1的表达下调。Cav1在线粒体功能调控中具有重要作用,本研究通过shCav1慢病毒转染,也证实Cav1敲低导致AML12肝细胞线粒体膜电位显著下降,线粒体基础呼吸量、最大呼吸量和ATP生成量显著减少。有学者发现Cav1通过调节胆固醇外排和线粒体膜脂质组成维持线粒体膜稳定,Cav1缺失会导致

线粒体胆固醇蓄积和呼吸链功能受损^[20]。研究表明,Cav1可通过维持线粒体质量控制系统,即线粒体动力学和线粒体自噬的稳态,对线粒体功能起到关键的保护和促进作用^[21]。也有研究指出Cav1能够通过靶向氧化磷酸化通路,减少活性氧的生成和脂质过氧化,抑制铁死亡,从而改善线粒体功能并发挥保护作用^[22]。与前述既往研究一致,本研究结果也表明了Cav1在保护肝细胞线粒体功能中的重要作用。

m⁶A修饰作为真核生物mRNA的动态表观调控机制,在维持线粒体功能中也发挥核心作用。为了探讨Cav1对线粒体功能的保护作用是否与m⁶A修饰介导的线粒体功能调控之间存在潜在关联,本研究采用m⁶A表观转录组芯片检测Cav1敲低的肝细胞中m⁶A修饰表达谱的变化,结果显示,Cav1敲低导致肝细胞mRNA的m⁶A甲基化修饰和表达水平发生显著变化,存在协同变化的mRNA富集到氧化磷酸化通路。有学者发现甲基转移酶Mettl14的缺失使线粒体基础呼吸量、最大呼吸量和ATP生成量均降低^[23],进一步证实m⁶A修饰通过促进ATP5A1、COX4I1等线粒体蛋白的翻译效率来维持线粒体功能。有研究发现甲基转移酶Mettl3的缺失下调肝细胞线粒体电子传递链复合物II的表达,抑制氧化磷酸化和线粒体呼吸^[24]。由此可见,m⁶A修饰水平下调会抑制线粒体功能。Cav1敲低后,m⁶A修饰水平下调,

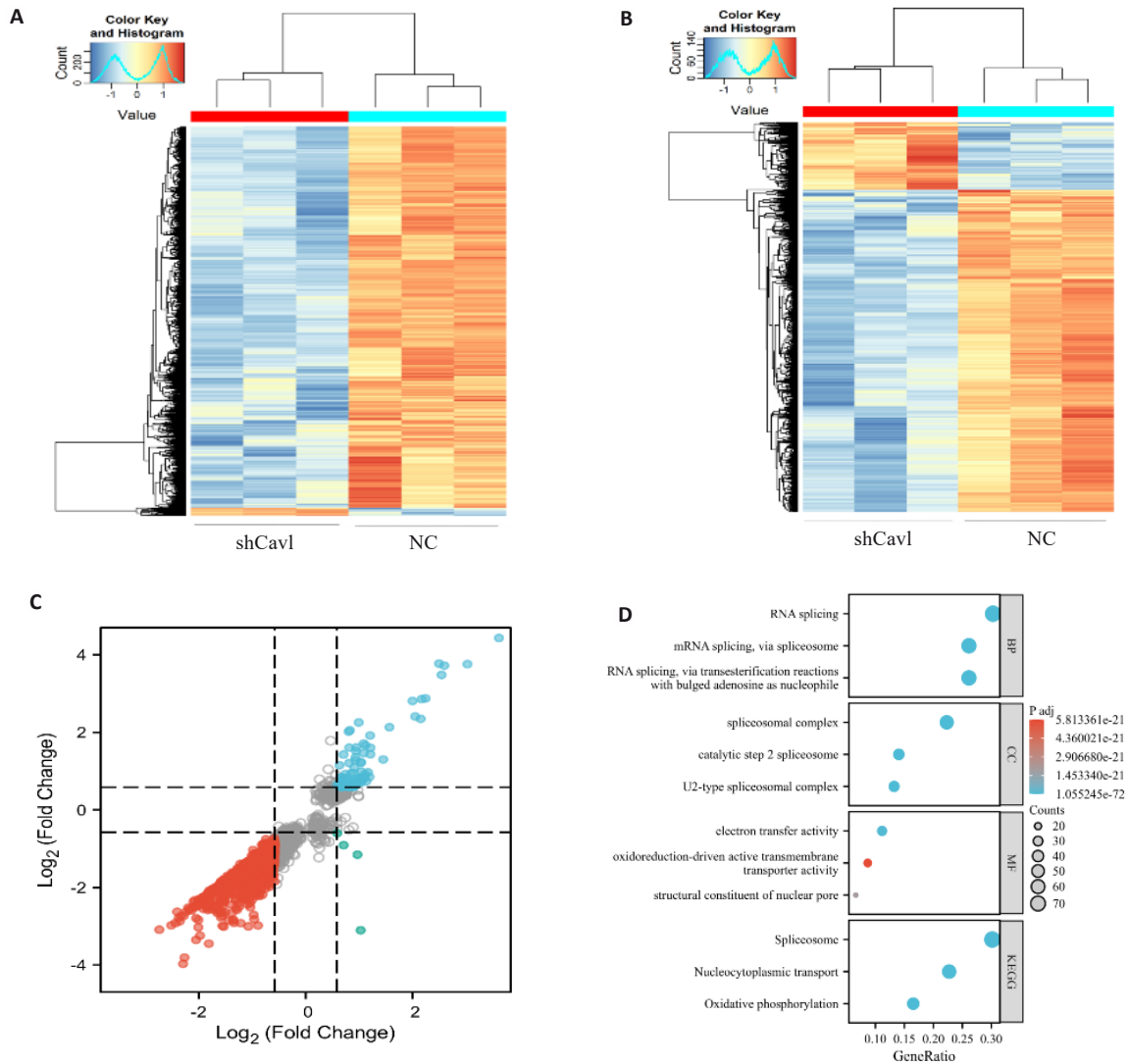


图4 Cav1敲低改变AML12细胞mRNA的m⁶A修饰和表达

Fig.4 Cav1 knockdown alters mRNA m⁶A modification and expression profiles in AML12 cells. A: Heatmap of differentially methylated mRNAs. B: Heatmap of differentially expressed mRNAs. C: Nine-quadrant analysis of coordinated m⁶A methylation and mRNA expression changes. D: Gene Ontology and KEGG pathway enrichment analysis of genes with concurrent m⁶A and expression changes. $|\log_2 \text{fold change}| > 0.58, P < 0.05$.

并且与氧化磷酸化有关,提示 Cav1 可能通过 m⁶A 修饰调控线粒体功能稳态。

Cav1 敲低后,氧化磷酸化相关基因中 *Usp15*、*Suclg2* 和 *Ppa2* mRNA 的 m⁶A 修饰最为显著,同时 mRNA 表达也存在变化,但目前尚未见 Cav1 调控 *Usp15*、*Suclg2* 和 *Ppa2* 表达的研究报道。*Usp15* 编码的泛素特异性蛋白酶 15(*Usp15*)是一种去泛素化酶。研究表明,*Usp15* 敲低导致线粒体膜电位异常降低,并降低了基础呼吸量和最大呼吸量^[25]。有研究发现,甲基转移酶 *Mettl3* 修饰 *Usp15* mRNA,增加其的稳定性,从而上调其蛋白表达水平^[26]。本研究中 *Usp15* mRNA 的 m⁶A 修饰水平和 mRNA 表达水平均降低,推测 Cav1 敲低影响 m⁶A 修饰相关蛋白,使 *Usp15* mRNA 的 m⁶A 修饰减少, mRNA 稳定性降低,从而影响线粒体功能。

Suclg2 编码的琥珀酰辅酶 A 合成酶 β 亚基

(*Suclg2*)是线粒体三羧酸循环中的关键酶,催化琥珀酰辅酶 A 转化成琥珀酸同时生成 GTP。有研究指出,*Suclg2* 表达降低会直接抑制琥珀酸的生成,导致三羧酸循环中间产物不足,而抑制线粒体功能^[27]。研究表明,*Suclg2* 敲低会增加线粒体蛋白琥珀酰化水平^[28, 29],抑制代谢酶活性并导致电子传递链解偶联^[29]。目前尚未有关 *Suclg2* mRNA m⁶A 修饰调控的相关研究报道,但本研究可见 *Suclg2* mRNA 的 m⁶A 修饰水平和 mRNA 表达水平均降低,为进一步探讨 m⁶A 修饰调控 *Suclg2* mRNA 表达提供参考。

Ppa2 编码无机焦磷酸酶 2(*Ppa2*),*Ppa2* 主要定位于线粒体,催化无机焦磷酸盐水解为磷酸盐,为 ATP 合成提供底物,对维持线粒体功能至关重要。研究指出,*Ppa2* 过表达能够通过增加 ATP 产生和线粒体膜电位来逆转线粒体功能紊乱^[30]。研究显示,*Ppa2* 蛋白受琥珀

表2 *Cav1* 敲低导致 AML12 细胞 m⁶A 修饰上调前 20 位和下调前 20 位的 mRNA

Tab.2 Top 20 upregulated and downregulated m⁶A-modified mRNAs in AML12 cells with *Cav1* knockdown

Gene	FC	P	Reg	%m ⁶ A	Gene	FC	P	Reg	%m ⁶ A
<i>Ifrd1</i>	0.07	0.002	Down	-55%	<i>Olfr175-ps1</i>	19.55	0.001	Up	54%
<i>Zfp934</i>	0.08	0.000	Down	-54%	<i>Crhr2</i>	13.70	0.000	Up	52%
<i>Kif18a</i>	0.06	0.001	Down	-54%	<i>Glis1</i>	13.21	0.008	Up	49%
<i>Kif20b</i>	0.07	0.000	Down	-51%	<i>Olfr175-ps1</i>	21.62	0.000	Up	47%
<i>Tcaf1</i>	0.12	0.001	Down	-51%	<i>Fam19a2</i>	2.14	0.045	Up	40%
<i>Zufsp</i>	0.08	0.004	Down	-50%	<i>Gss</i>	11.18	0.001	Up	37%
<i>Zfp932</i>	0.09	0.000	Down	-50%	<i>Slc13a4</i>	7.35	0.000	Up	36%
<i>Klhl32</i>	0.13	0.000	Down	-49%	<i>Elavl2</i>	4.16	0.003	Up	33%
<i>Slc35d1</i>	0.15	0.003	Down	-49%	<i>Crflf1</i>	4.78	0.032	Up	33%
<i>Mis18bp1</i>	0.12	0.028	Down	-47%	<i>Mdc1</i>	2.62	0.042	Up	32%
<i>Samd9l</i>	0.14	0.002	Down	-46%	<i>Grm2</i>	7.02	0.004	Up	32%
<i>Smek1</i>	0.13	0.001	Down	-45%	<i>Tulp2</i>	4.39	0.001	Up	31%
<i>Fastkd2</i>	0.19	0.000	Down	-45%	<i>Dynap</i>	2.69	0.020	Up	28%
<i>Zfp280d</i>	0.13	0.001	Down	-45%	<i>Adamts11</i>	3.05	0.008	Up	26%
<i>Sema6d</i>	0.10	0.002	Down	-44%	<i>Txnip</i>	2.68	0.005	Up	26%
<i>Pole4</i>	0.15	0.006	Down	-44%	<i>Dpp4</i>	13.55	0.000	Up	26%
<i>Kif20b</i>	0.10	0.000	Down	-43%	<i>Il5ra</i>	7.25	0.000	Up	25%
<i>Pcdhb18</i>	0.14	0.000	Down	-42%	<i>Klrc1</i>	3.28	0.001	Up	24%
<i>Wac</i>	0.14	0.005	Down	-42%	<i>Txnip</i>	3.17	0.004	Up	24%
<i>Cdadcl</i>	0.15	0.015	Down	-42%	<i>Kcne3</i>	2.70	0.048	Up	23%

FC: Fold change, sh*Cav1* group vs NC group; Reg: Regulation.

表3 *Cav1* 敲低导致 AML12 细胞表达上调前 20 位和下调前 20 位的 mRNA

Tab.3 Top 20 upregulated and downregulated mRNAs in AML12 cells with *Cav1* knockdown

Gene	FC	P	Reg	Gene	FC	P	Reg
<i>Cav1</i>	0.05	0.000	Down	<i>Olfr175-ps1</i>	12.25	0.000	Up
<i>Dek</i>	0.14	0.000	Down	<i>Olfr175-ps1</i>	8.42	0.000	Up
<i>Dek</i>	0.15	0.000	Down	<i>Dpp4</i>	8.14	0.000	Up
<i>Upf3b</i>	0.16	0.000	Down	<i>Glis1</i>	6.03	0.000	Up
<i>Tpr</i>	0.18	0.000	Down	<i>Gss</i>	5.82	0.000	Up
<i>Arid4b</i>	0.19	0.000	Down	<i>Crhr2</i>	5.64	0.000	Up
<i>Dtnbp1</i>	0.19	0.000	Down	<i>Slc13a4</i>	4.73	0.000	Up
<i>Hells</i>	0.20	0.010	Down	<i>Il5ra</i>	4.49	0.000	Up
<i>Zfml</i>	0.20	0.000	Down	<i>Slc45a4</i>	4.44	0.000	Up
<i>Kif18a</i>	0.20	0.000	Down	<i>Pdzd2</i>	4.14	0.000	Up
<i>Ccl2</i>	0.21	0.000	Down	<i>Grm2</i>	3.99	0.000	Up
<i>Dek</i>	0.21	0.000	Down	<i>Cdh26</i>	3.73	0.000	Up
<i>Kif20b</i>	0.21	0.000	Down	<i>Ube2i</i>	3.13	0.040	Up
<i>Thoc2</i>	0.21	0.000	Down	<i>Tulp2</i>	2.96	0.000	Up
<i>Ccar1</i>	0.22	0.000	Down	<i>Olfr70</i>	2.81	0.000	Up
<i>Zfml</i>	0.22	0.000	Down	<i>Chpf2</i>	2.73	0.000	Up
<i>mt-Nd1</i>	0.22	0.000	Down	<i>Slc6a20b</i>	2.66	0.040	Up
<i>Zfp950</i>	0.22	0.000	Down	<i>Msantd3</i>	2.61	0.020	Up
<i>Zfp960</i>	0.22	0.000	Down	<i>Atp2c1</i>	2.59	0.010	Up
<i>Ccar1</i>	0.23	0.010	Down	<i>Fam32a</i>	2.58	0.050	Up

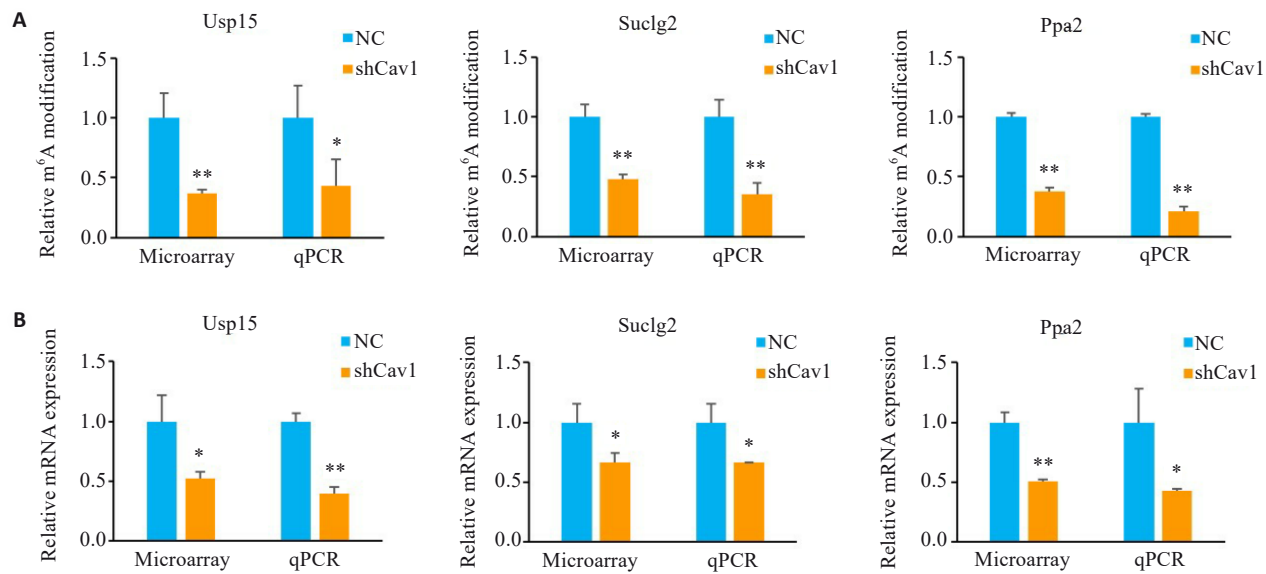


图5 *Cav1* 敲低调节 AML12 细胞线粒体功能相关 mRNA 的 m⁶A 修饰和表达

Fig. 5 m⁶A modification and relative expression levels of mitochondrial function-associated mRNAs in AML12 cells. A: Microarray and qPCR analysis of relative m⁶A modification of *Usp15*, *Suclg2* and *Ppa2* mRNA. B: Microarray and qPCR analysis of relative mRNA expression of *Usp15*, *Suclg2* and *Ppa2*. **P*<0.05, ***P*<0.01 vs NC group.

酰化修饰调控而参与细胞在低氧环境下的能量代谢调节^[31]。但目前尚未见 m⁶A 修饰等转录后调控 *Ppa2* 的报道,本研究中 *Ppa2* mRNA 的 m⁶A 修饰水平下调伴随着 mRNA 表达水平降低,表明 *Ppa2* mRNA 稳定性或许受到其 m⁶A 修饰调控,从而影响其调节线粒体功能。

Cav1 敲低使线粒体功能相关基因 *Usp15*、*Suclg2* 和 *Ppa2* mRNA 的 m⁶A 修饰和表达水平均降低,表明 *Cav1* 维持线粒体功能与 m⁶A 修饰存在密切联系。报道称 *Cav1* mRNA 的降解^[32]和翻译^[33]受 m⁶A 修饰调控,然而并未见 *Cav1* 调控 m⁶A 修饰的相关报道,其可能通过间接调节 m⁶A 修饰相关蛋白,从而影响 *Usp15*、*Suclg2* 和 *Ppa2* 的表达:一方面 *Cav1* 作为细胞重要的信号转导分子,可能通过调控其下游信号分子而影响甲基化/去甲基化酶的表达;另一方面 *Cav1* 作为脂筏的核心支架蛋白,是细胞膜结构的重要调节因子,或许通过膜微结构域调节 m⁶A 结合蛋白的招募和定位。

综上,本研究揭示了 *Cav1*-m⁶A 修饰在肝细胞线粒体功能调控中的重要作用,*Cav1* 可能通过调控 *Usp15*、*Suclg2* 和 *Ppa2* mRNA 的 m⁶A 修饰水平影响线粒体功能稳态,能够为从维持线粒体功能角度防治 MAFLD 提供新靶点新参考。虽然本研究确定了 *Cav1* 与 *Usp15*、*Suclg2* 和 *Ppa2* mRNA 的 m⁶A 修饰的关联,但 *Cav1* 如何直接调控 m⁶A 修饰的机制尚未阐明。后续需运用 Co-IP、质谱等技术,验证 *Cav1* 与 m⁶A 修饰酶之间的相互作用;利用报告基因实验和位点突变,证实 m⁶A 修饰对 *Usp15*、*Suclg2*、*Ppa2* mRNA 稳定性或翻译效率的具体影响。

Declaration of interests: The authors declare no competing interests.

参考文献:

- [1] 范建高, 徐小元, 南月敏, 等. 代谢相关(非酒精性)脂肪性肝病防治指南(2024年版)[J]. 实用肝脏病杂志, 2024, 27(4): 494-510.
- [2] Eslam M, Sarin SK, Wong VW, et al. The Asian Pacific Association for the Study of the Liver clinical practice guidelines for the diagnosis and management of metabolic associated fatty liver disease [J]. *Hepato Int*, 2020, 14(6): 889-919.
- [3] Radosavljevic T, Brankovic M, Samardzic J, et al. Altered mitochondrial function in MASLD: key features and promising therapeutic approaches [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2024, 13(8): 906.
- [4] Shin S, Kim J, Lee JY, et al. Mitochondrial quality control: its role in metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD) [J]. *J Obes Metab Syndr*, 2023, 32(4): 289-302.
- [5] Bhowmick S, Biswas T, Ahmed M, et al. Caveolin-1 and lipids: association and their dualism in oncogenic regulation [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2023, 1878(6): 189002.
- [6] Jiang Y, Krantz S, Qin X, et al. Caveolin-1 controls mitochondrial damage and ROS production by regulating fission - fusion dynamics and mitophagy [J]. *Redox Biol*, 2022, 52: 102304.
- [7] Fu DD, Wu S, Jiang XF, et al. Caveolin-1 alleviates acetaminophen-induced vascular oxidative stress and inflammation in non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Free Radic Biol Med*, 2023, 195: 245-57.
- [8] Tang WX, Li YS, Li Y, et al. Caveolin-1, a novel player in cognitive decline [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2021, 129: 95-106.
- [9] Timmins LR, Ortiz-Silva M, Joshi B, et al. Caveolin-1 promotes mitochondrial health and limits mitochondrial ROS through ROCK/AMPK regulation of basal mitophagic flux [J]. *FASEB J*, 2024, 38: e23343.
- [10] You TY, Li Y, Li BW, et al. Caveolin-1 protects against liver damage exacerbated by acetaminophen in non-alcoholic fatty liver disease

- by inhibiting the ERK/HIF-1 α pathway[J]. *Mol Immunol*, 2023, 163: 104-15.
- [11] Deng GH, Wu CF, Li YJ, et al. Caveolin-1 is critical for hepatic iron storage capacity in the development of nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Mil Med Res*, 2023, 10(1): 53.
- [12] Ćorović M, Hoch-Kraft P, Zhou Y, et al. m⁶A in the coding sequence: linking deposition, translation, and decay[J]. *Trends Genet*, 2025: S0168-9525(25)00132-5.
- [13] Xie XZ, Fang Z, Zhang HY, et al. The role of N(6)-methyladenosine (m⁶a) modification in cancer: recent advances and future directions [J]. *EXCLI J*, 2025, 24: 113-50.
- [14] Ming XY, Chen SR, Li HJ, et al. m⁶A RNA methylation and implications for hepatic lipid metabolism[J]. *DNA Cell Biol*, 2024, 43(6): 271-8.
- [15] Yan W, Saqirile, Li K, et al. The role of N6-methyladenosine in mitochondrial dysfunction and pathology[J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(8): 3624.
- [16] Fan JH, You JB, Liu ZY, et al. Novel landscapes of N6-methyladenosine modification of mitochondrial oxidative stress in organ fibrosis [J]. *Eur J Pharmacol*, 2025, 1003: 177888.
- [17] Fromenty B, Roden M. Mitochondrial alterations in fatty liver diseases[J]. *J Hepatol*, 2023, 78(2): 415-29.
- [18] 丁珊珊, 庄妍, 廖颖, 等. 二陈汤通过抑制 mTORC1/SREBP1/CAV1 通路改善高脂饮食小鼠肝脏线粒体功能的作用研究[J]. *中国中药杂志*, 2024, 49(3): 763-9.
- [19] Xu HL, Li Y, Guo N, et al. Caveolin-1 mitigates the advancement of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease by reducing endoplasmic reticulum stress and pyroptosis through the restoration of cholesterol homeostasis[J]. *Int J Biol Sci*, 2025, 21(2): 490-506.
- [20] Razani B, Combs TP, Wang XB, et al. Caveolin-1-deficient mice are lean, resistant to diet-induced obesity, and show hypertriglyceridemia with adipocyte abnormalities[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(10): 8635-47.
- [21] Xu YQ, Chen BW, Yi J, et al. Buyang Huanwu Decoction alleviates cerebral ischemic injury through modulating caveolin-1-mediated mitochondrial quality control[J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1137609.
- [22] Wu S, Guo N, Xu HL, et al. Caveolin-1 ameliorates hepatic injury in non-alcoholic fatty liver disease by inhibiting ferroptosis *via* the NOX4/ROS/GPX4 pathway[J]. *Biochem Pharmacol*, 2024, 230(Pt 2): 116594.
- [23] Kahl M, Xu ZF, Arumugam S, et al. m⁶A RNA methylation regulates mitochondrial function[J]. *Hum Mol Genet*, 2024, 33(11): 969-80.
- [24] Wang SW, Zhang WY, Wang ZJ, et al. Mettl3-m⁶A-YTHDF1 axis promotion of mitochondrial dysfunction in metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease[J]. *Cell Signal*, 2024, 121: 111303.
- [25] Huangfu LT, Zhu HB, Wang GJ, et al. The deubiquitinase USP15 drives malignant progression of gastric cancer through glucose metabolism remodeling[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2024, 43(1): 235.
- [26] Fang RH, Jia ZG, Xin YH, et al. N6-methyladenosine-modification of USP15 regulates chemotherapy resistance by inhibiting LGALS3 ubiquitin-mediated degradation *via* AKT/mTOR signaling activation pathway in hepatocellular carcinoma[J]. *Cell Death Discov*, 2025, 11(1): 3.
- [27] Wu BW, Qiu JT, Zhao TV, et al. Succinyl-CoA ligase deficiency in pro-inflammatory and tissue-invasive T cells[J]. *Cell Metab*, 2020, 32(6): 967-80.e5.
- [28] Zhang XM, Liu J, Cheng YJ, et al. Metabolic enzyme Suclg2 maintains tolerogenicity of regulatory dendritic cells diffDCs by suppressing Lactb succinylation[J]. *J Autoimmun*, 2023, 138: 103048.
- [29] Hu QF, Xu J, Wang L, et al. SUCLG2 regulates mitochondrial dysfunction through succinylation in lung adenocarcinoma[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2023, 10(35): e2303535.
- [30] Yu HF, Zeng QR, Xiao PY, et al. Hippo-YAP signaling alleviates copper-induced mitochondrial dysfunction and oxidative damage *via* the ATOX1-PPA2 pathway[J]. *Int J Biol Macromol*, 2025, 290: 138908.
- [31] Zhang X, Di YQ, Wang YP, et al. SIRT5-mediated desuccinylation of PPA2 enhances HIF-1 α -dependent adaptation to hypoxic stress and colorectal cancer metastasis[J]. *EMBO J*, 2025, 44(9): 2514-40.
- [32] Zhou Y, Wang Q, Deng HF, et al. N6-methyladenosine demethylase FTO promotes growth and metastasis of gastric cancer *via* m⁶A modification of caveolin-1 and metabolic regulation of mitochondrial dynamics[J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(1): 72.
- [33] Golubeva VA, Das AS, Rabolli CP, et al. YTHDF1 is pivotal for maintenance of cardiac homeostasis[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2024, 193: 25-35.

(编辑:郎 朗)