

ALKBH5 通过调控 *Fdx1* 表达 改善单侧输尿管梗阻模型小鼠肾间质纤维化

侯冬华¹, 吴琦², 梁慧³, 包娜娜¹, 吕慧妍², 岱德羽⁴, 张蕾^{1*}

哈尔滨医科大学附属第一医院 1. 血液净化科; 2. 肾内科; 3. 中心实验室; 4. 呼吸科, 黑龙江 哈尔滨 150001

摘要:目的 探讨 m6A RNA 去甲基化酶烷化修复同源物 5 (ALKBH5) 调控铜死亡相关基因铁氧还蛋白 1 (*Fdx1*) 表达对单侧输尿管梗阻 (UUO) 模型小鼠肾间质纤维化 (RIF) 的影响。方法 将 UUO 模型小鼠随机分为模型组 (UUO 组)、阴性对照组 (LV5-vector 组)、ALKBH5 过表达组 (LV5-ALKBH5 组)、LV5-vector+FDX1 激活剂 (Elesclomol) 组、LV5-ALKBH5+Elesclomol 组, 每组 12 只。另取 12 只健康小鼠作为对照组 (control 组)。ELISA 试剂盒检测血清炎症因子水平; 采用 HE、Masson 染色观察肾脏组织病理变化和纤维化情况; RT-qPCR 检测肾脏组织上皮细胞-间质转化 (EMT) 相关基因及 *Alkbh5*、*Fdx1* mRNA 表达; 蛋白质免疫印迹检测 ALKBH5、FDX1 蛋白表达。结果 与 control 组相比, UUO 组小鼠的肾脏组织病变加重, 纤维化占比增加 ($P < 0.05$), 血清肾功能指标、炎症因子水平及肾脏组织 α -SMA、snail、FDX1 表达上升 ($P < 0.05$), E-cadherin、ALKBH5 表达下降 ($P < 0.05$)。与 LV5-vector 组相比, LV5-ALKBH5 组小鼠的上述指标结果明显改善 ($P < 0.05$), 且 ALKBH5 的过表达减轻了 FDX1 激活对 UUO 小鼠肾脏组织炎症反应、EMT 及肾间质纤维化的促进作用。结论 ALKBH5 可能通过下调铜死亡相关基因 *Fdx1* 的表达, 减轻炎症反应, 抑制 EMT, 改善 UUO 小鼠的肾脏损伤, 缓解 RIF。

关键词: 单侧输尿管梗阻; 肾间质纤维化; 烷化修复同源物 5 (ALKBH5); 铁氧还蛋白 1 (FDX1); 铜死亡

中图分类号: R691.2 文献标志码: A

DOI: 10.16352/j.issn.1001-6325.2026.07.0950

ALKBH5 ameliorates renal interstitial fibrosis in mouse models with unilateral ureteral obstruction by regulating the expression of *Fdx1*

HOU Donghua¹, WU Qi², LIANG Hui³, BAO Nana¹, LYU Huiyan², DAI Deyu⁴, ZHANG Lei^{1*}

1. Department of Hematology Purification; 2. Department of Nephrology; 3. Central Laboratory;

4. Department of Respiratory Medicine; the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University; Harbin 150001, China

Abstract: Objective To explore the effect of alkylated repair (RNA demethylase ALKB) homologue 5 (ALKBH5) to regulate the expression of cuproptosis-related gene ferredoxin 1 (*Fdx1*) on renal interstitial fibrosis (RIF) in unilateral ureteral obstruction (UUO) mice. **Methods** The UUO model mice were randomly divided into a model group (UUO group), a negative control group (LV5-vector group), an ALKBH5 over-expression group (LV5-ALKBH5 group), an LV5-vector+ FDX1 activator (Elesclomol) group and an LV5-ALKBH5+Elesclomol group, with 12 mice in each. Another 12 healthy mice were taken as control group (control group). ELISA kit was

收稿日期: 2025-06-06 修回日期: 2025-09-24

基金项目: 哈尔滨医科大学附属第一医院科研创新基金 (2023B16); 哈尔滨医科大学肝脾外科教育部重点实验室开放课题 (GPKF202311)

* 通信作者 (corresponding author): Zhllb1996@163.com

used to detect serum inflammatory factor; HE and Masson staining microscopy was used to observe renal histopathological changes and fibrosis; RT-qPCR detection of epithelial-mesenchymal transition (EMT)-related genes and *Alkbh5* and *Fdx1* mRNA expression in renal tissue epithelial cells; The expression of ALKBH5 and FDX1 protein were detected by immunoblotting. **Results** Compared with the control group, mice in the UUO group showed increased renal tissue lesions, increased percentage of fibrosis ($P<0.05$), increased serum renal function indexes; Higher level of inflammation factor and renal tissue α -SMA, snail and FDX1 expression ($P<0.05$), and decreased E-cadherin and ALKBH5 expression ($P<0.05$). Compared with the LV5-vector group, mice in the LV5-ALKBH5 group showed significantly improved results on above indexes ($P<0.05$). Over-expression of ALKBH5 was reversed which promoted FDX1 activation on renal tissue inflammation, EMT and renal interstitial fibrosis in UUO mice. **Conclusions** ALKBH5 may attenuate the inflammatory response, inhibit EMT, ameliorate kidney injury, and alleviate RIF in UUO mice by down-regulating the expression of the cuproptosis-related gene *Fdx1*.

Key words: unilateral ureteral obstruction; renal interstitial fibrosis; alkylated repair homologue 5 (ALKBH5); ferredoxin 1 (FDX1); cuproptosis

单侧输尿管梗阻(unilateral ureteral obstruction, UUO),作为研究肾间质纤维化(renal interstitial fibrosis, RIF)的经典动物模型,其特征为梗阻导致肾盂积水、肾小管萎缩及间质纤维化^[1]。UUO 通过诱导缺氧、炎性细胞浸润及 TGF- β 通路激活,驱动肌成纤维细胞活化与细胞外基质(extracellular matrix, ECM)过度沉积,最终造成肾功能进行性丧失^[2]。目前临床治疗(如血管紧张素转换酶抑制剂)仅能延缓 RIF 进展,无法有效缓解纤维化且存在多种副作用^[3]。因此,探索 RIF 的新分子机制及干预靶点至关重要。

烷化修复同源物 5[alkylation repair(RNA demethylase ALKB) homologue 5, ALKBH5]作为一种 m6A RNA 去甲基化酶,通过调控靶基因 mRNA 稳定性和翻译效率参与炎性反应、纤维化等过程,其过表可缓解 UUO 诱导的肾纤维化^[4]。已有研究提示,ALKBH5 的过表达可缓解 UUO 诱导的肾纤维化^[5]。铜死亡(cuproptosis)作为一种新型铜依赖性细胞死亡方式备受关注,其核心调控基因铁氧还蛋白 1(ferredoxin 1, FDX1)在肾脏疾病中高表达^[6],提示其可能促进 RIF。然而,ALKBH5 改善 RIF 的作用是否涉及调控 FDX1 介导的铜死亡尚不清楚。因此,本研究基于 UUO 小鼠模型,旨在探讨 ALKBH5 是否通过调控 FDX1 表达影响 RIF,为 RIF 的治疗提供新的依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物:8 周龄 SPF 级 C57BL/6 雄性小

鼠(体质量 20~25 g),实验动物由哈尔滨医科大学科技园利民生物医药科技发展有限公司提供[实验动物生产许可证号:SCXK(黑)2021-005]。所有实验动物均饲养于标准 SPF 级屏障环境中,环境参数严格控制在温度 24~26 °C、相对湿度 50%的条件下,并维持 12 h/12 h 明暗循环的光照周期。实验期间,动物可自由获取灭菌饲料及饮用水。此研究已通过哈尔滨医科大学附属第一医院伦理委员会审批。

1.1.2 试剂:FDX1 激活剂 Elesclomol(MCE 公司);慢病毒载体 LV5-vector 及 LV5-ALKBH5(吉凯基因公司);FDX1 抗体(Abcam 公司);肿瘤坏死因子- α (tumour necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 、IL-6 试剂盒(R&D 公司);Masson 三色染色试剂盒(Sigma-Aldrich 公司);RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒(TaKaRa 公司);ALKBH5 抗体(Proteintech 公司)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠的分组及处理:通过结扎单侧输尿管的方法建立 UUO 小鼠模型^[7];麻醉小鼠并将其于仰卧位固定于手术台,左腹部剃毛消毒后,纵向切口(约 1 cm),钝性分离肌肉层暴露左侧输尿管,用 6-0 无菌丝线双重结扎左侧输尿管中段(近肾门端),剪断结扎处远端输尿管,关腹缝合。另取 12 只健康小鼠作为对照组(control 组),只暴露左侧输尿管但不结扎。

小鼠造模成功后,将其随机分为模型组(UUO

组)、阴性对照组(LV5-vector组)、ALKBH5过表达组(LV5-ALKBH5组)、LV5-vector+FDX1激活剂组(LV5-vector+Elesclomol组)、LV5-ALKBH5+Elesclomol组,每组12只。术后第3天,LV5-vector组、LV5-ALKBH5组分别尾静脉注射 1×10^9 PFU/mL的慢病毒LV5-vector和LV5-ALKBH5各100 μ L^[8],LV5-vector+Elesclomol组尾静脉注射等剂量LV5-vector的同时腹腔注射Elesclomol 10 mg/kg^[9],LV5-ALKBH5+Elesclomol组尾静脉注射等剂量LV5-ALKBH5的同时腹腔注射Elesclomol 10 mg/kg,每日1次,连续注射7 d。

1.2.2 ELISA检测炎症因子水平:随机选取各组6只小鼠,麻醉处死后取其新鲜血液,离心(3 000 r/min, 10 min)取上清,按对应试剂盒的说明梯度稀释标准品,依次将标准品、样本、生物素标记抗体、显色剂以及终止液加入预包被板孔中,使用酶标仪检测各孔吸光度值(450 nm波长),计算血清各炎症因子TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平。

1.2.3 HE染色检测病理变化:取小鼠肾脏组织,使用多聚甲醛的4%水溶液固定24 h,随后进行脱水、包埋、切片(4 μ m厚)。脱蜡复水后,切片经常规HE染色,即苏木精染色、伊红染色,脱水、透明后中性树胶封片。显微镜观察肾脏组织病理形态。

1.2.4 Masson染色检测纤维化情况:肾脏组织切片经铁苏木精染色5 min后,采用流水冲洗进行返蓝处理。随后依次进行以下染色步骤:1)丽春红-酸性品红复合染色;2)1%磷钼酸溶液分化处理;3)苯胺蓝染色;4)1%冰醋酸溶液分化处理。整个染色过程严格按照组织学染色规范进行操作。随后对切片进行脱水、透明、封片。于显微镜下评估肾脏组织纤维化程度,并使用Image J软件分析胶原纤维区域占比。

1.2.5 RT-qPCR检测*Alkbh5*、*Fdx1* mRNA水平:取各组剩余6只小鼠,麻醉处死后收集肾脏组织。取50 mg肾脏组织加入裂解液,离心(12 000 r/min, 15 min, 4 $^{\circ}$ C)取上清,异丙醇沉淀RNA,并检测其浓度。取1 μ g RNA,经反转录试剂盒合成cDNA,建立体系进行PCR扩增,条件:95 $^{\circ}$ C 30 s;95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 40个循环。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *Gapdh*)作为内参基因。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算方法对目标基因

Alkbh5、*Fdx1*的表达量进行标准化处理和分析。

1.2.6 Western blot检测ALKBH5、FDX1蛋白水平:取小鼠肾脏组织50 mg,加入裂解液冰上裂解30 min,离心取上清,双辛可宁酸法检测蛋白质浓度。取等量蛋白质凝胶电泳并转至膜上,室温封闭1 h,4 $^{\circ}$ C与ALKBH5(1:1 000)、FDX1(1:1 000)、GAPDH(1:2 000)一抗孵育过夜。后室温加入HRP标记的二抗(1:5 000)孵育1 h,经增强型化学发光液显色,成像后使用Image J分析条带吸光度值。

1.3 统计学分析

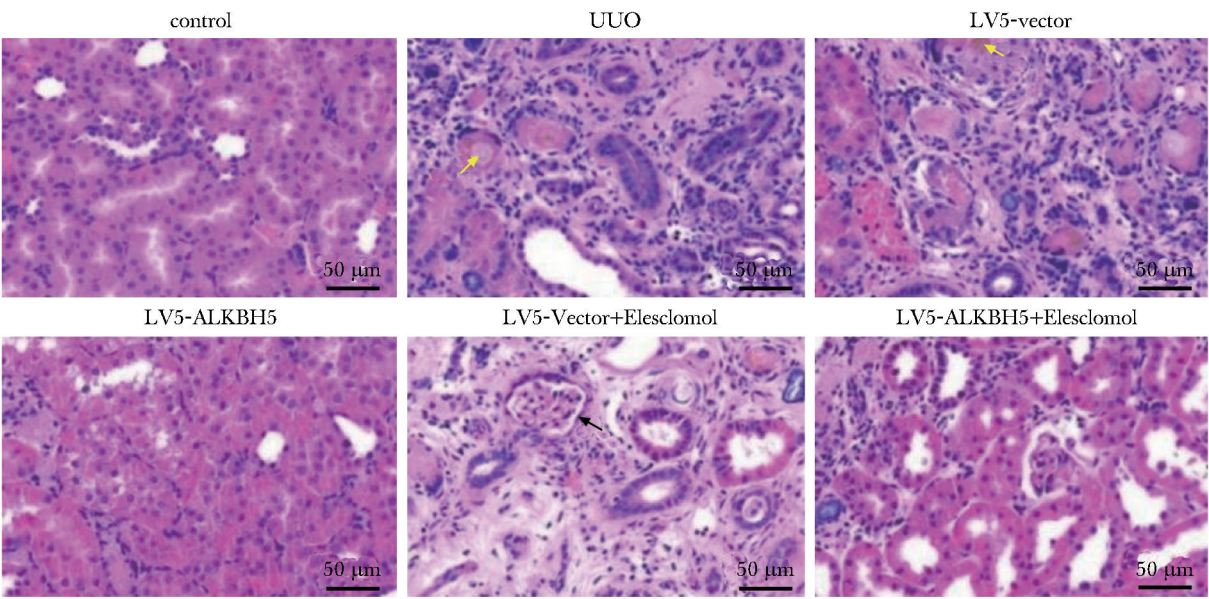
本研究采用SPSS 22.0统计软件(IBM公司)对所有实验数据进行统计分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)形式表示。对于多组间比较,首先进行单因素方差分析(One-way Anova),若结果显示具有统计学意义,则进一步采用最小显著差异 t 检验(LSD- t 检验)进行两两比较。所有统计检验均采用双侧检验。

2 结果

2.1 各组小鼠肾脏组织病理变化和纤维化情况比较

HE染色结果:control组小鼠肾脏组织结构正常,无明显病变。与control组相比,UUO组小鼠肾脏组织出现肾小管扩张或萎缩,间质有炎性细胞浸润,肾小管上皮细胞空泡化,胶原纤维增生。与LV5-vector组相比,LV5-ALKBH5组的肾脏组织病变均有明显改善,LV5-vector+Elesclomol组则有加重现象。与LV5-vector+Elesclomol组相比,LV5-ALKBH5+Elesclomol组小鼠肾脏组织病变得明显改善(图1)。

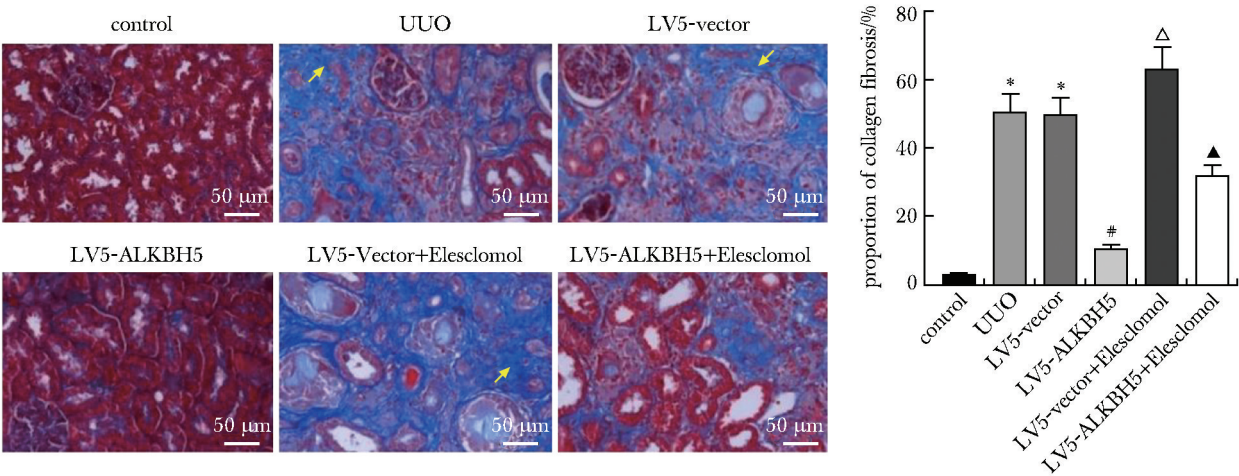
Masson染色结果:control组的肾小管结构正常,未出现纤维增生。与control组相比,UUO组的肾小管和肾间质出现大量胶原纤维增生,呈现出明显的蓝色染色,肾间质有炎性细胞浸润,肾小管上皮细胞坏死,胶原纤维化占比升高($P < 0.05$)。与LV5-vector组相比,LV5-ALKBH5组的纤维化、炎性细胞浸润等现象均有明显改善,胶原纤维化占比下降($P < 0.05$);LV5-vector+Elesclomol组则有加重现象,胶原纤维化占比升高($P < 0.05$)。与LV5-vector+Elesclomol组相比,LV5-ALKBH5+Elesclomol组的上述变化得到明显改善,胶原纤维化占比下降($P < 0.05$)(图2)。



The yellow arrow points to renal tubule atrophy, and the black arrow points to vacuolation of renal tubule epithelial cells.

图 1 各组小鼠肾脏组织病理损伤

Fig 1 Histopathological changes in the kidneys of mice in each group



The yellow arrows pointed to collagen fibres. * $P < 0.05$ compared with control group; # $P < 0.05$ with UUO group and LV5-vector group; $\Delta P < 0.05$ compared with LV5-ALKBH5 group; $\blacktriangle P < 0.05$ compared with LV5-vector+Elesclomol group.

图 2 各组小鼠肾脏组织纤维化

Fig 2 Fibrosis in kidney tissue of mice in each group($\bar{x} \pm s, n = 6$)

2.2 各组小鼠血清炎症因子水平比较

与 control 组相比, UUO 组的血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平升高 ($P < 0.05$)。与 LV5-vector 组相比, LV5-ALKBH5 组的 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平下降 ($P < 0.05$) , LV5-vector + Elesclomol 组的 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平升高 ($P < 0.05$)。与 LV5-vector + Elesclomol 组相比, LV5-ALKBH5 + Elesclomol 组的

TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平下降 ($P < 0.05$) (图 3)。

2.3 各组小鼠肾脏组织 EMT 相关基因表达水平比较

与 control 组相比, UUO 组和 LV5-vector 组的肾脏组织 E-cadherin mRNA 表达降低 ($P < 0.05$) , α -SMA、snail mRNA 表达升高 ($P < 0.05$)。与 LV5-vector 组相比, LV5-ALKBH5 组的 E-cadherin mRNA 表达升高

($P<0.05$), α -Sma、snail mRNA 表达下降 ($P<0.05$); LV5-vector+Elesclomol 组的 E-cadherin mRNA 表达下降 ($P<0.05$), α -SMA、snail mRNA 表达升高 ($P<0.05$)。与 LV5-vector+Elesclomol 组相比, LV5-ALKBH5+Elesclomol 组的 E-cadherin mRNA 表达升高 ($P<0.05$), α -Sma、snail mRNA 表达下降 ($P<0.05$) (图 4)。

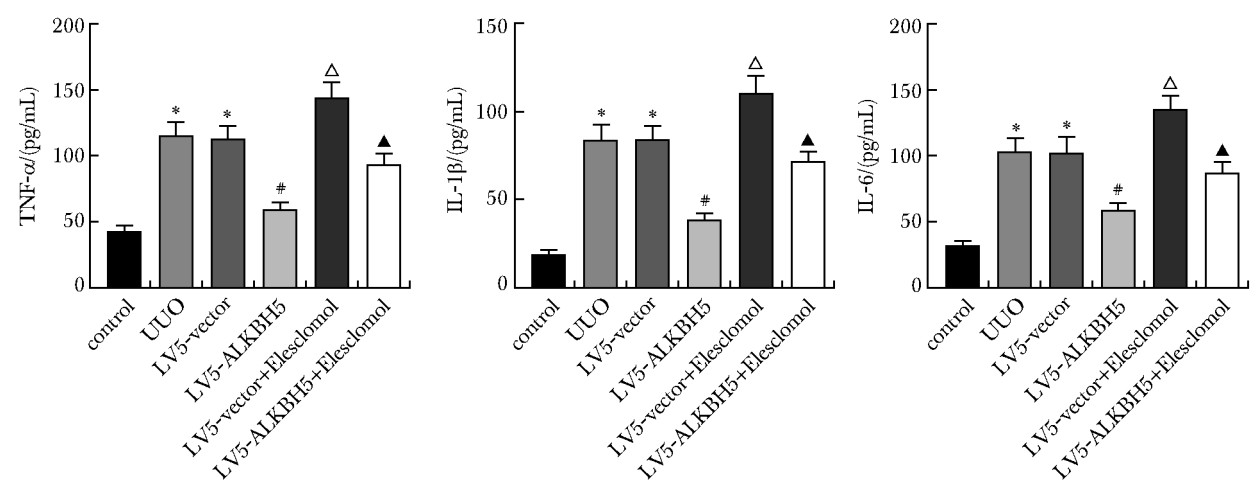
2.4 各组小鼠肾脏组织 *Alkbh5*、*Fdx1* mRNA 及蛋白表达水平比较

与 control 组相比, UUO 组和 LV5-vector 组的 *Alkbh5*/ALKBH5 表达降低 ($P<0.05$), *Fdx1*/FDX1 表达

升高 ($P<0.05$)。与 LV5-vector 组相比, LV5-ALKBH5 组的 *Alkbh5*/ALKBH5 表达升高 ($P<0.05$), *Fdx1*/FDX1 表达下降 ($P<0.05$); LV5-vector + Elesclomol 组的 *Fdx1*/FDX1 表达升高 ($P<0.05$)。与 LV5-vector + Elesclomol 组相比, LV5-ALKBH5 + Elesclomol 组的 *Alkbh5*/ALKBH5 表达升高 ($P<0.05$), *Fdx1*/FDX1 表达下降 ($P<0.05$) (图 5)。

3 讨论

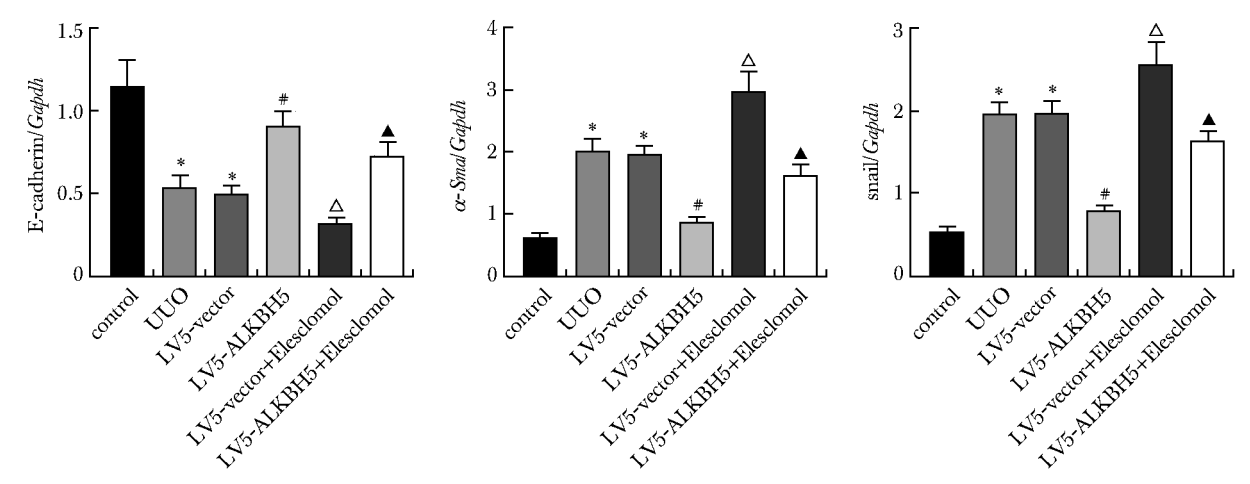
UUO 模型是研究 RIF 的经典方法,其特征是肾



* $P<0.05$ compared with control group; # $P<0.05$ compared with UUO group and LV5-vector group; Δ $P<0.05$ compared with LV5-ALKBH5 group; $\blacktriangle$ $P<0.05$ compared with LV5-vector+Elesclomol group.

图3 各组小鼠血清炎症因子水平比较

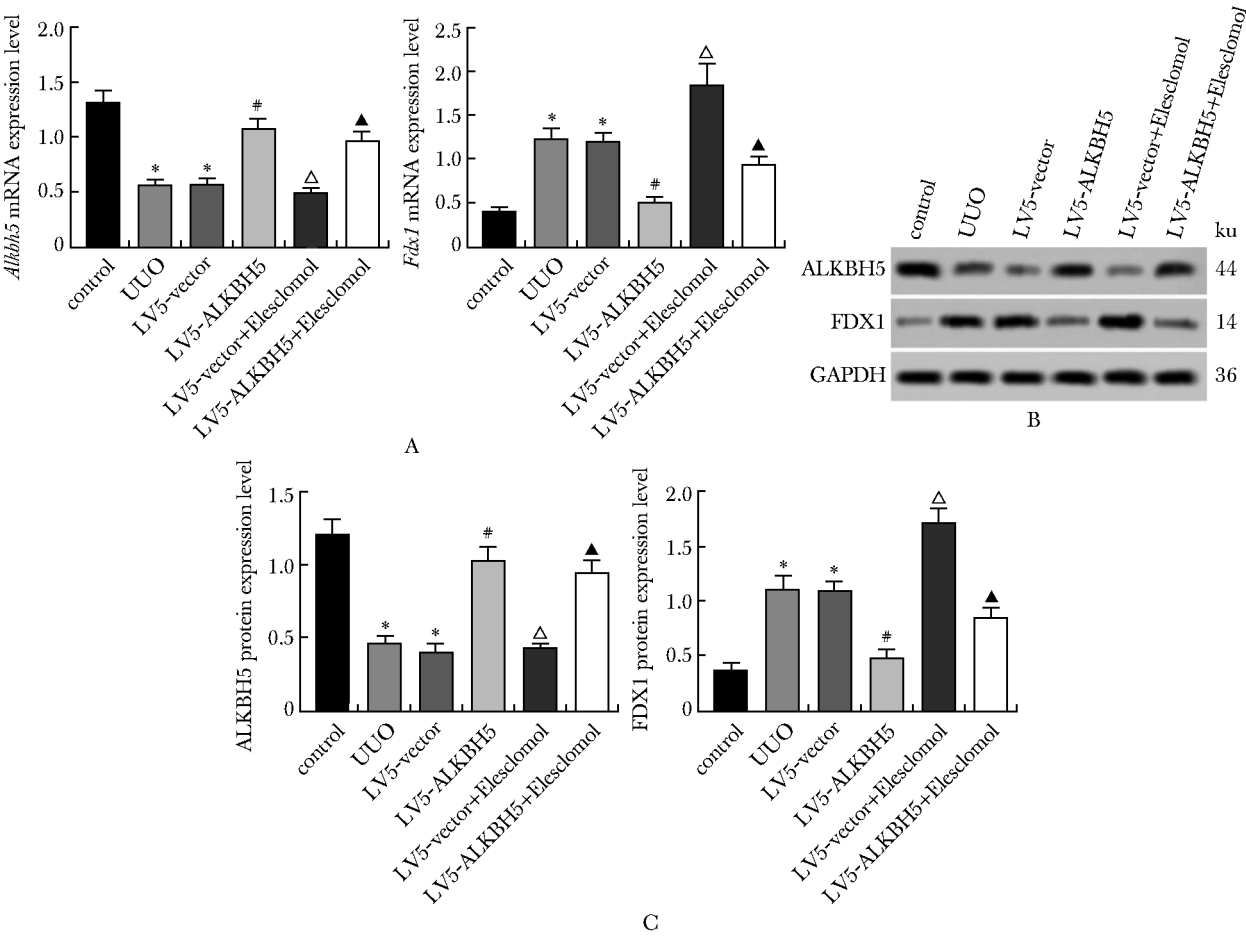
Fig 3 Comparison of serum inflammatory factor levels among groups of mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)



* $P<0.05$ compared with control group; # $P<0.05$ compared with UUO group and LV5-vector group; Δ $P<0.05$ compared with LV5-ALKBH5 group; $\blacktriangle$ $P<0.05$ compared with LV5-vector+Elesclomol group.

图4 各组小鼠肾脏组织 EMT 相关基因表达水平比较

Fig 4 Comparison of the expression levels of EMT-related genes in kidney tissues of mice in each group ($\bar{x}\pm s, n=6$)



A. *Alkbh5*, *Fdx1* mRNA expression levels; B. ALKBH5, FDX1 protein expression bands; C: ALKBH5, FDX1 protein expression levels; * $P < 0.05$ compared with control group; # $P < 0.05$ compared with UUO group and LV5-vector group; [△] $P < 0.05$ compared with LV5-ALKBH5 group; [▲] $P < 0.05$ compared with LV5-vector+Elesclomol group.

图5 各组小鼠肾脏组织 ALKBH5、FDX1 表达情况
Fig 5 Expression of ALKBH5 and FDX1 in kidney tissues of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

间质成纤维细胞增生、炎细胞浸润和 ECM 异常沉积。本研究中,UUO 组小鼠肾脏组织出现肾小管扩张、炎性细胞浸润和胶原纤维增生,提示 UUO 模型建立成功。研究表明,m6A 去甲基化酶 ALKBH5 在纤维化肝脏中表达降低,过表达则可改善肝纤维化并抑制 EMT 进程^[10]。本研究发现,而 UUO 组小鼠肾脏组织中 ALKBH5 表达的明显下降,提示 ALKBH5 降低可能促进肾纤维化。经 ALKBH5 过表达后,小鼠肾脏组织病理损伤减轻,胶原纤维增生减少,提示 ALKBH5 过表达可缓解 UUO 小鼠肾脏损伤,缓解 RIF。

慢性炎症反应是 RIF 的关键触发因素。炎症级联反应促进肌成纤维细胞活化和 ECM 过度沉积,导致纤维化。研究报道,m6A 修饰可调控炎症因子

(如 $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-6)mRNA 稳定性,而 ALKBH5 在炎症环境中通过去除 m6A 修饰的酶减少促炎性因子的释放^[11]。本研究发现,UUO 组小鼠血清炎症因子水平升高,ALKBH5 过表达则可显著抑制炎症因子水平的升高,提示 ALKBH5 过表达通过抑制炎症反应减轻肾组织损伤。EMT 是 RIF 进展的关键环节,其特征表现为上皮标志物表达下调及间充质标志物上调。研究表明,敲除 *ALKBH5* 增强间充质标志物的表达,而过表达 ALKBH5 则增加 E-cadherin 并降低 snail 的表达,减轻 RIF^[12]。本研究中,UUO 组肾脏呈现典型 EMT 特征,而 ALKBH5 过表达可逆转上述 EMT 标志物表达变化,与前人研究结果一致,提示 ALKBH5 通过抑制 EMT 过程减轻肾组织损伤,缓解 UUO 小鼠的 RIF。

铜死亡是一种新型铜依赖性细胞死亡方式,其核心调控因子 FDX1 介导 Cu^{2+} 进入线粒体产生毒性,导致应激和铜沉积。研究发现,下调 *Fdx1* 的表达可减轻急性心肌梗死大鼠机体炎性反应及心肌纤维化^[13]。铜转运蛋白 1 诱导的细胞内铜升高会促进肾纤维化^[14],说明抑制细胞内铜过载可能是缓解 RIF 的潜在途径。此外,铜稳态还参与 ECM 重塑和 EMT 进程。研究证明,在肺纤维化的小鼠模型中 CuSO_4 治疗导致 EMT 被激活^[15]。本研究发现,*Fdx1* 的上调加剧了 RIF 进展,而 ALKBH5 过表达可下调 *Fdx1* 的表达,ALKBH5 过表达可减轻 *Fdx1* 激

活剂 Elesclomol 对小鼠炎性反应、EMT 的促进作用,表明 ALKBH5 可能通过抑制 FDX1 的表达来抑制铜死亡,减轻炎性反应和 EMT,从而改善 UUO 小鼠的 RIF 进程。

综上所述,ALKBH5 可能通过下调铜死亡相关基因 *Fdx1* 的表达,减轻炎性反应,抑制 EMT,改善 UUO 小鼠的肾脏损伤,缓解 RIF。然而 ALKBH5 对 FDX1 的调控是否依赖特定 m6A 阅读蛋白(如 YTHDF1),以及铜死亡与其他程序性死亡途径(如铁死亡)的交互作用仍需深入探索,为开发基于 m6A 修饰的 RIF 治疗策略奠定基础。

参考文献:

[1] Wang J, Wang ZC, Xia F, *et al.* Atorvastatin reduces renal interstitial fibrosis caused by unilateral ureteral obstruction through inhibiting the transcriptional activity of YAP[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2023, 678: 109-114.

[2] 徐刚, 邹循亮, 傅珍春, 等. 硒与苯那普利抑制单侧输尿管梗阻大鼠肾间质纤维化[J]. *基础医学与临床*, 2018, 38: 361-369.

[3] Ruiz-Ortega M, Lamas S, Ortiz A. Antifibrotic agents for the management of CKD: a review[J]. *Am J Kidney Dis*, 2022, 80: 251-263.

[4] Ning J, Pei ZJ, Wang MR, *et al.* Site-specific Atg13 methylation-mediated autophagy regulates epithelial inflammation in PM2.5-induced pulmonary fibrosis [J]. *J Hazard Mater*, 2023, 457: 131791. doi: 10.1016/j.jhazmat.2023.131791.

[5] Liao ZW, Wang J, Xu MR, *et al.* The role of RNA m6A demethylase ALKBH5 in the mechanisms of fibrosis[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2024, 12: 1447135. doi: 10.3389/fcell.2024.1447135.

[6] Chen TT, Liang LF, Wang YZ, *et al.* Ferroptosis and cuproptosis in kidney diseases: dysfunction of cell metabolism[J]. *Apoptosis*, 2024, 29: 289-302.

[7] 吴志全, 杜斯斯, 王延鑫, 等. 银杏叶提取物调节 TGF- β 1/HGF 信号通路对单侧输尿管梗阻小鼠肾纤维化的影响 [J]. *现代生物医学进展*, 2024, 24: 3039-3045.

[8] Yang JJ, Wang J, Yang Y, *et al.* ALKBH5 ameliorated liver fibrosis and suppressed HSCs activation via triggering PTCH1 activation in an m6A dependent manner[J]. *Eur J Pharmacol*, 2022, 922: 174900. doi: 10.1016/j.ejphar.2022.174900.

[9] Chen YF, Qi RQ, Song JW, *et al.* Sirtuin 7 ameliorates cuproptosis, myocardial remodeling and heart dysfunction in hypertension through the modulation of YAP/ATP7A signaling[J]. *Apoptosis*, 2024, 29: 2161-2182.

[10] Zhou HY, Wang BQ, Chen MX, *et al.* KDM4C represses liver fibrosis by regulating H3K9me3 methylation of ALKBH5 and m6A methylation of snail1 mRNA [J]. *J Dig Dis*, 2024, 25: 298-309.

[11] Ye CZ, Huang XL, Tong Y, *et al.* Over-expression of ALKBH5 alleviates LPS induced neuroinflammation via increasing NFKBIA [J]. *Int Immunopharmacol*, 2025, 144: 113598. doi: 10.1016/j.intimp.2024.113598.

[12] Ning YC, Chen J, Shi YQ, *et al.* Genistein ameliorates renal fibrosis through regulation snail via m6A RNA demethylase ALKBH5 [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 579265. doi: 10.3389/fphar.2020.579265.

[13] Fang X, Ji YX, Li S, *et al.* Paeoniflorin attenuates cuproptosis and ameliorates left ventricular remodeling after AMI in hypobaric hypoxia environments[J]. *J Nat Med*, 2024, 78: 664-676.

[14] Niu YY, Zhang YY, Zhu Z, *et al.* Elevated intracellular copper contributes a unique role to kidney fibrosis by lysyl oxidase mediated matrix crosslinking[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11: 211. doi: 10.1038/s41419-020-2404-5.

[15] Guo HR, Jian ZJ, Liu H, *et al.* TGF- β 1-induced EMT activation via both Smad-dependent and MAPK signaling pathways in Cu-induced pulmonary fibrosis [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2021, 418: 115500. doi: 10.1016/j.taap.2021.115500.