

砷致人胚肺成纤维细胞氧化应激过程中 m⁶A 修饰的变化

郑婧婧¹, 赵钊¹, 张佳靖², 王素华¹, 卜宁¹, 史雪敏¹, 赵宇航¹

1. 包头医学院公共卫生学院, 内蒙古 包头 014040

2. 内蒙古包钢疗养院, 内蒙古 包头 014040

摘要:

[背景] 砷可以通过触发氧化应激对机体产生毒作用, 这一过程伴随表观遗传修饰的改变。

[目的] 探讨亚砷酸钠 (NaAsO₂) 引起人胚肺成纤维细胞 (HEL F) 氧化应激过程中的 N⁶-甲基腺苷 (m⁶A) 修饰变化。

[方法] 使用不同浓度的 NaAsO₂ (0、2.5、5、10、20 μmol·L⁻¹) 处理 HEL F 细胞 48 h, 采用 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐 (MTS) 法检测细胞活力; 使用相应试剂盒检测氧化应激因子总超氧化物歧化酶 (T-SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 的活性以及丙二醛 (MDA) 的含量; 酶联免疫吸附法检测细胞总 RNA 中的 m⁶A 甲基化水平; 实时荧光定量 PCR 法检测 m⁶A 修饰酶: 甲基转移酶样 3 (METTL3)、甲基转移酶样 14 (METTL14)、肾母细胞瘤 1 关联蛋白 (WTAP)、脂肪量与肥胖相关蛋白 (FTO)、Fe(II) 和 α-KG 依赖的双加氧酶 AlkB 家族成员 5 (ALKBH5)、YTH 结构域蛋白 2 (YTHDC2)、YTH 结构域家族蛋白 2 (YTHDF2)、YTH 结构域家族蛋白 3 (YTHDF3) 的 mRNA 表达情况; Western blotting 法检测 METTL3、FTO、YTHDC2、YTHDF3、核因子 E2 相关因子 2 (NRF2) 的蛋白表达情况。采用 RNA 甲基化免疫共沉淀-实时荧光定量 PCR 法 (MeRIP-qPCR) 检测 NRF2 mRNA 中 m⁶A 的富集情况。

[结果] 使用 0、2.5、5、10、20 μmol·L⁻¹ NaAsO₂ 处理细胞后, MTS 实验结果显示, 相较于对照组, 20 μmol·L⁻¹ 组的细胞活力降低至 84% ($P < 0.05$)。比色法检测结果显示, 相较于对照组, 10、20 μmol·L⁻¹ 组 T-SOD 活性降低 (均 $P < 0.05$); 2.5、10 μmol·L⁻¹ 组 GSH-Px 活性降低 (均 $P < 0.05$); 10、20 μmol·L⁻¹ 组 MDA 含量升高 (均 $P < 0.05$)。酶联免疫吸附法结果显示, 0、2.5、5、10、20 μmol·L⁻¹ 组总体 m⁶A 甲基化水平依次为 (0.193±0.023)%、(0.247±0.021)%、(0.253±0.006)%、(0.233±0.006)%、(0.262±0.010)%, 相较于对照组, 各组 m⁶A 甲基化水平均升高 (均 $P < 0.05$)。实时荧光定量 PCR 结果显示, 相较于对照组, METTL3 的 mRNA 相对表达量在 NaAsO₂ 浓度为 2.5、10、20 μmol·L⁻¹ 时降低 (均 $P < 0.05$), FTO 的 mRNA 相对表达量在 NaAsO₂ 浓度为 20 μmol·L⁻¹ 时降低 ($P < 0.05$), YTHDC2 的 mRNA 相对表达量在 NaAsO₂ 浓度为 10、20 μmol·L⁻¹ 时升高 (均 $P < 0.05$), YTHDF3 的 mRNA 相对表达量在 NaAsO₂ 浓度为 2.5、10、20 μmol·L⁻¹ 时升高 (均 $P < 0.05$)。Western blotting 结果显示, 相较于对照组, METTL3 的蛋白相对表达量在 NaAsO₂ 浓度为 10、20 μmol·L⁻¹ 时降低 (均 $P < 0.05$), FTO 的蛋白相对表达量在 NaAsO₂ 浓度为 5、20 μmol·L⁻¹ 时降低 (均 $P < 0.05$), YTHDC2 的蛋白相对表达量在 NaAsO₂ 浓度为 20 μmol·L⁻¹ 时降低 ($P < 0.05$), NRF2 的胞核蛋白相对表达量在 NaAsO₂ 浓度为 10、20 μmol·L⁻¹ 时降低 (均 $P < 0.05$)。MeRIP-qPCR 结果显示, 相较于对照组, 20 μmol·L⁻¹ NaAsO₂ 暴露组的 m⁶A 富集比例明显增加 ($P < 0.05$)。过表达 FTO 后, FTO 组 FTO 的 mRNA 及蛋白相对表达量较对照组升高, NRF2 的胞核蛋白相对表达量较对照组升高 (均 $P < 0.05$); NaAsO₂+FTO 组的 FTO 的 mRNA 及蛋白相对表达量较 NaAsO₂ 组明显升高 (均 $P < 0.05$), NRF2 的胞核蛋白相对表达量较 NaAsO₂ 组升高 ($P < 0.05$)。

[结论] NaAsO₂ 引起 HEL F 细胞发生氧化应激过程中, 总体 m⁶A 甲基化程度、m⁶A 修饰酶、NRF2 mRNA 的 m⁶A 修饰以及 NRF2 的表达发生变化。

关键词: 砷; 氧化应激; N⁶-甲基腺苷; 人胚肺成纤维细胞; 核因子 E2 相关因子 2

Changes of m⁶A modification in arsenic-induced oxidative stress of human embryonic lung fibroblasts ZHENG Jingjing¹, ZHAO Zhao¹, ZHANG Jiajing², WANG Suhua¹, BU Ning¹, SHI Xuemin¹, ZHAO Yuhang¹ (1. School of Public Health, Baotou Medical College, Baotou, Inner Mongolia 014040, China; 2. Inner Mongolia Baotou Steel Sanatorium, Baotou, Inner Mongolia 014040, China)



DOI 10.11836/JEOM21566

基金项目

内蒙古教育厅科技项目 (NJZY17260); 内蒙古自然科学基金 (2017BS0301); 内蒙古自治区高校“青年科技英才”支持计划 (NJYT-20-B34); 包头医学院研究生科研创新项目 (bycx2020005)

作者简介

郑婧婧 (1997—), 女, 硕士生;
E-mail: 760093531@qq.com

通信作者

史雪敏, E-mail: sxmyyhx@126.com
赵宇航, E-mail: idealgas@foxmail.com

伦理审批

不需要

利益冲突

无申报

收稿日期

2021-11-28

录用日期

2022-04-15

文章编号

2095-9982(2022)05-0499-08

中图分类号

R114

文献标志码

A

► 引用

郑婧婧, 赵钊, 张佳靖, 等. 砷致人胚肺成纤维细胞氧化应激过程中 m⁶A 修饰的变化 [J]. 环境与职业医学, 2022, 39(5): 499-505, 511.

► 本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.11836/JEOM21566

Funding

This study was funded.

Correspondence to

SHI Xuemin, E-mail: sxmyyhx@126.com

ZHAO Yuhang, E-mail: idealgas@foxmail.com

Ethics approval

Not required

Competing interests

None declared

Received

2021-11-28

Accepted

2022-04-15

► To cite

ZHENG Jingjing, ZHAO Zhao, ZHANG Jiajing, et al. Changes of m⁶A modification in arsenic-induced oxidative stress of human embryonic lung fibroblasts [J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2022, 39(5): 499-505, 511.

► Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.11836/JEOM21566

Abstract:

[Background] Arsenic can be toxic to human by triggering oxidative stress, which is accompanied by epigenetic modifications.

[Objective] To investigate the modification of N⁶-methyladenosine (m⁶A) in human embryonic lung fibroblasts (HELFL) during oxidative stress induced by sodium arsenite (NaAsO₂).

[Methods] HELFL cells were treated by designed concentrations of NaAsO₂ (0, 2.5, 5, 10, and 20 μmol·L⁻¹) for 48 h. Cell viability was detected by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) method; the activities of total superoxide dismutase (T-SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) as well as the content of malondialdehyde (MDA) were detected with corresponding kits; the level of m⁶A methylation in total RNA was detected by enzyme-linked immunosorbent assay; the mRNA expressions of m⁶A modified enzymes were detected by real-time fluorescence quantitative PCR, including methyltransferase-like 3 (METTL3), methyltransferase-like 14 (METTL14), Wilms' tumor 1-associated protein (WTAP), fat mass and obesity-associated protein (FTO), alkB family of Fe(II)/α-ketoglutarate-dependent dioxygenases 5 (ALKBH5), YTH domain containing protein 2 (YTHDC2), YTH domain family protein 2 (YTHDF2), and YTH domain family protein 3 (YTHDF3); the protein expressions of METTL3, FTO, YTHDC2, YTHDF3, and nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2) were detected by Western blotting. The enrichment of m⁶A in *NRF2* mRNA was detected by RNA methylated immunoprecipitation combined with real-time fluorescence quantitative PCR (MeRIP-qPCR).

[Results] After the 0, 2.5, 5, 10, and 20 μmol·L⁻¹ NaAsO₂ treatment, the MTS results showed that compared with the control group, the cell viability of the 20 μmol·L⁻¹ group decreased to 84% ($P < 0.05$). The colorimetry results showed that compared with the control group, the activities of T-SOD in the 10 and 20 μmol·L⁻¹ groups decreased ($P < 0.05$); the activities of GSH-Px in the 2.5 and 10 μmol·L⁻¹ groups decreased ($P < 0.05$); the contents of MDA in the 10 and 20 μmol·L⁻¹ groups increased. The results of enzyme-linked immunosorbent assay showed that the overall m⁶A methylation levels in the 0, 2.5, 5, 10, and 20 μmol·L⁻¹ groups were (0.193 ± 0.023)%, (0.247 ± 0.021)%, (0.253 ± 0.006)%, (0.233 ± 0.006)%, and (0.262 ± 0.010)%, respectively, and compared with the control group, the m⁶A methylation levels in all the NaAsO₂ treated groups increased ($P < 0.05$). The real-time fluorescence quantitative PCR results showed that compared with the control group, the mRNA relative expression level of *METTL3* decreased in the 2.5, 10, and 20 μmol·L⁻¹ groups ($P < 0.05$); the mRNA relative expression level of *FTO* decreased in the 20 μmol·L⁻¹ group; the mRNA relative expression level of *YTHDC2* increased in the 10 and 20 μmol·L⁻¹ groups ($P < 0.05$); the mRNA relative expression level of *YTHDF3* increased in the 2.5, 10, and 20 μmol·L⁻¹ groups ($P < 0.05$). The Western blotting results showed that compared with the control group, the relative protein expression of *METTL3* decreased in the 10 and 20 μmol·L⁻¹ groups; the relative protein expression of *FTO* decreased in the 5 and 20 μmol·L⁻¹ groups; the relative protein expression of *YTHDC2* decreased in the 20 μmol·L⁻¹ group ($P < 0.05$); the relative nuclear protein expression of *NRF2* decreased in the 10 and 20 μmol·L⁻¹ groups ($P < 0.05$). The MeRIP-qPCR results showed that m⁶A enrichment was significantly increased in the 20 μmol·L⁻¹ NaAsO₂ exposure group compared with the control group ($P < 0.05$). After over-expression of *FTO*, the mRNA and protein relative expression levels of *FTO* and the relative expression level of nuclear protein of *NRF2* in the *FTO* group were higher than those in the control group ($P < 0.05$); the mRNA and protein relative expression levels of *FTO* in the NaAsO₂ + *FTO* group and the nuclear protein expression level of *NRF2* were higher than those in the NaAsO₂ group ($P < 0.05$).

[Conclusion] In the process of oxidative stress induced by NaAsO₂, m⁶A methylation level, m⁶A modified enzymes, m⁶A modification of *NRF2* mRNA, and *NRF2* expression could change in HELFL cells.

Keywords: arsenic; oxidative stress; N⁶-methyladenosine; human embryonic lung fibroblast; nuclear factor erythroid 2-related factor 2

砷是一种广泛分布于自然界的环境及职业污染物,严重危害着人类的健康。长期砷暴露可使人体的各个系统及器官受到损害。人类接触砷的方式主要通过饮用受污染的水,其次是呼吸吸入和皮肤接触^[1-2]。内蒙古地区是国内地方性饮水砷中毒的重病区之一。研究发现,长期饮用砷污染的水可导致慢性阻塞性肺疾病、肺纤维化、肺癌等呼吸系统疾病^[3-4],因此肺是砷作用的主要敏感器官^[3]。目前认为氧化应激是砷致肺损伤的主要机制之一,砷暴露可降低抗氧化酶活性,使肺内氧化还原状态失衡并诱导 DNA 链断裂,最终导致肺功能受损^[5-6]。核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, NRF2)是调节氧化应激的重要核转录因子,激活 NRF2 介导的防御反应是

对抗肺组织中外源性氧化损伤的有效手段^[7]。最新研究表明,表观遗传修饰可能参与砷诱导的氧化应激过程,但这一过程的毒作用机制尚未完全被阐明,还需进一步探讨。

RNA 修饰是表观遗传学领域的重要分支,近年来由于其在疾病预防和治疗方面的良好应用前景而备受关注。RNA 甲基化占有 RNA 修饰的 60%,其中 N⁶-甲基腺苷(N⁶-methyladenosine, m⁶A)是真核生物 RNA 中最为丰富、保守的甲基化修饰^[8]。m⁶A 修饰主要由以下几种酶协同调控:(1)具有写入功能的甲基转移酶,如甲基转移酶样 3(methyltransferase-like 3, METTL3)、甲基转移酶样 14(methyltransferase-like 14, METTL14)、肾母细胞瘤 1 关联蛋白(Wilms' tumor 1-associated

protein, WTAP)等。(2)能够去除 m⁶A 甲基化的去甲基化酶,如脂肪量与肥胖相关蛋白(fat mass and obesity-associated protein, FTO)、Fe(II)和 α -KG 依赖的双加氧酶 AlkB 家族成员 5[alkB family of Fe(II)/ α -ketoglutarate-dependent dioxygenases 5, ALKBH5]等。(3)识别 m⁶A 位点并调控下游基因表达的阅读蛋白,如 YTH 结构域家族蛋白 2(YTH domain family protein 2, YTHDF2)、YTH 结构域家族蛋白 3(YTH domain family protein 3, YTHDF3)、YTH 结构域蛋白 2(YTH domain containing protein 2, YTHDC2)等^[9]。m⁶A 修饰能够调控 mRNA 的剪接、表达和翻译,并参与细胞发育、细胞分化、细胞自我更新等过程^[10-11],m⁶A 修饰的改变可能导致免疫反应异常^[12]、神经退行性病变^[13]、类风湿性关节炎^[14]、肥胖^[15]以及各种癌症^[16]的发生。最近的研究表明,m⁶A 修饰参与钴^[17]、镉^[18]、邻苯二甲酸酯^[19]、伏马菌素^[20]以及黏菌素^[21]等环境诱变剂诱导的氧化应激过程,引起细胞凋亡、细胞周期阻滞和自噬等不良结局,最终诱发各种疾病。然而,目前对 m⁶A 修饰在砷诱导的肺部氧化应激反应中的作用还知之甚少。因此,阐明 m⁶A 修饰在砷诱导的氧化应激过程中的变化,有利于提高人们在表观遗传水平上对砷毒性的认识。

本研究以人胚肺成纤维细胞(human embryonic lung fibroblast, HELF)为研究对象,使用不同浓度的亚砷酸钠(sodium arsenite, NaAsO₂)处理细胞后,通过检测氧化应激因子、总体 m⁶A 甲基化水平、m⁶A 修饰酶的表达情况以及 Nrf2 mRNA 的 m⁶A 修饰水平,阐明砷暴露引起 HELF 细胞氧化应激过程中的 m⁶A 修饰改变,推进砷的毒理机制研究,进而为砷中毒的防治提供新的策略。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

NaAsO₂(纯度 99%,中国成都艾科公司),HELF 细胞(中国武汉普诺赛公司),m⁶A 甲基化定量检测试剂盒、m⁶A 甲基化片段富集试剂盒(美国 Epigentek 公司),CellTiter 96 Aqueous One Solution Reagent 细胞增殖试剂盒、反转录试剂盒、实时荧光定量 PCR 试剂盒(美国 Promega 公司),总超氧化物歧化酶(total superoxide dismutase, T-SOD)检测试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)检测试剂盒、丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒(中国武汉伊莱瑞特公司),FTO 过表达载体(中国南京金斯瑞公司),兔抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-

phosphate dehydrogenase, GAPDH)、METTL3、NRF2、FTO 和辣根过氧化物酶抗体(美国 CST 公司),YTHDC2 和 YTHDF3 抗体(英国 Abcam 公司),Histone H3 抗体(中国北京索莱宝公司),其他常规试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 细胞培养及转染

HELF 细胞复苏后,接种于含 10%(体积分数)胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中,于 37℃、5%(体积分数)CO₂ 的培养箱中培养,每 2~3 d 更换一次培养基。将 HELF 细胞以 10⁶ 个·孔⁻¹接种于 6 孔板中,培养至细胞贴壁后,将 FTO 过表达载体转染进细胞,使用实时荧光定量 PCR 法及 Western blotting 法检测转染效率。继续培养 24 h 后进行后续实验。

1.3 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐 [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium, MTS] 法检测细胞活力

将 HELF 细胞以 5000 个·孔⁻¹接种于 96 孔板中,每孔加入 100 μ L 浓度为 0、2.5、5、10、20 μ mol·L⁻¹ 的 NaAsO₂,培养 48 h。按照细胞增殖试剂盒说明书操作,使用全自动酶标仪读取 490 nm 处的光密度值,并计算细胞活力。

1.4 试剂盒检测氧化应激因子

将 HELF 细胞以 4×10⁶ 个·皿⁻¹接种于 100 mm 细胞培养皿中,每皿加入 10 mL 浓度为 0、2.5、5、10、20 μ mol·L⁻¹ 的 NaAsO₂,培养 48 h。按照 T-SOD、GSH-Px 以及 MDA 试剂盒说明书进行操作,使用全自动酶标仪分别读取 550、412、532 nm 处的光密度值,并计算 T-SOD 和 GSH-Px 的活性以及 MDA 的含量。

1.5 酶联免疫吸附法检测 m⁶A 甲基化水平

将 HELF 细胞以 2×10⁶ 个·皿⁻¹接种于 60 mm 细胞培养皿中,每皿加入 4 mL 浓度为 0、2.5、5、10、20 μ mol·L⁻¹ 的 NaAsO₂,培养 48 h 后,提取细胞总 RNA。按照 m⁶A 甲基化定量检测试剂盒说明书进行操作,使用全自动酶标仪读取 450 nm 处的光密度值,并计算 m⁶A 甲基化水平。

1.6 实时荧光定量 PCR 法检测 m⁶A 修饰酶 mRNA 水平

将 HELF 细胞以 10⁶ 个·孔⁻¹接种于 6 孔板中,每皿加入 2 mL 浓度为 0、2.5、5、10、20 μ mol·L⁻¹ 的 NaAsO₂,培养 48 h 后提取细胞总 RNA,反转录获得 cDNA,按照实时荧光定量 PCR 试剂盒说明书进行操作。以 GAPDH 为内参基因,用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法计算相对表达量。具体基因和引物序列如表 1 所示。

表 1 m⁶A 修饰酶引物序列
Table 1 Primer sequences of m⁶A modified enzymes

基因名称 Gene	正向引物(5'→3') Forward	反向引物(5'→3') Reverse
GAPDH	TCGTGGAGTCTACTGGCGTCTT	CATTGCTGACAATCTTGAGGGAG
FTO	ACTTGGCTCCCTTATCTGACC	TGTGCAAGTGTGAGAAAGGCTT
METTL3	TTGTCTCCAACCTCCGTAGT	CCAGATCAGAGAGGTGGTGTAG
METTL14	GAACACAGAGCTTAAATCCCA	TGTCAGCTAAACCTACATCCCTG
ALKBH5	TGAGCACAGTCACGCTTCCC	TCCGTGCTCTTCTTAGCGACTC
YTHDF2	CCTTAGTGGAGCCATAGTTG	TCTGTGCTACCAACTTCAGT
YTHDF3	GGTGATTATGTAACCTGGGG	AAGAGAACTAGGTGGATAGCCAT
YTHDC2	CAAAACATGCTGTTAGGAGCCT	CCACTTGTCTGCTCATTTCCC
WTAP	GGCGAAGTGTCGAATGCT	CCAACTGCTGGCGTGTCT

1.7 Western blotting 法检测 m⁶A 修饰酶蛋白水平和 NRF2 胞核蛋白表达水平

将 HELF 细胞以 2×10⁶ 个·皿⁻¹ 接种于 60 mm 细胞培养皿中, 每皿加入 2 mL 浓度为 0、2.5、5、10、20 μmol·L⁻¹ 的 NaAsO₂, 培养 48 h 后提取细胞总蛋白或核蛋白, 使用二喹啉甲酸(bicin choninic acid, BCA)试剂盒(中国北京索莱宝公司)测定蛋白浓度后制胶、电泳、转膜、封闭, 加入一抗, 4℃ 孵育过夜。洗膜后加入二抗, 室温孵育 1 h, 曝光显色, 使用 Image Lab 5.2.1 软件分析条带灰度值。

1.8 RNA 甲基化免疫共沉淀-实时荧光定量 PCR 法 (methylated RNA immunoprecipitation combined with real-time fluorescence quantification PCR, MeRIP-qPCR) 检测 NRF2 mRNA 的 m⁶A 富集情况

使用 SRAMP 软件对 NRF2 mRNA 的 m⁶A 位点进行预测, 筛选出 NRF2 mRNA 第 1164 个碱基(NRF2-1164), 将生长至对数期的 HELF 细胞使用 0、20 μmol·L⁻¹ 的 NaAsO₂ 处理 48 h 后, 提取细胞总 RNA, 按照 m⁶A 甲基化片段富集试剂盒说明书进行操作, 计算富集比例。

1.9 统计学分析

使用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析, 采用 ANOVA 和 SNK 法比较各组差异, 检验水准为 α=0.05。

2 结果

2.1 NaAsO₂ 对 HELF 细胞活力的影响

不同浓度的 NaAsO₂ 处理 HELF 细胞 48 h 后, 相较于对照组(0 μmol·L⁻¹ NaAsO₂, 下同), NaAsO₂ 浓度为 20 μmol·L⁻¹ 时 HELF 细胞活力降低至 84%(*P*<0.05), 2.5、5、10 μmol·L⁻¹ NaAsO₂ 处理组细胞活力无明显改变(均 *P*>0.05)。

2.2 NaAsO₂ 对氧化应激因子的影响

不同浓度 NaAsO₂ 处理 HELF 细胞 48 h 后, 如表 2 所示, 相较于对照组, 10、20 μmol·L⁻¹ NaAsO₂ 组 T-SOD 活性降低, 2.5、10 μmol·L⁻¹ NaAsO₂ 组 GSH-Px 活性降低, 10、20 μmol·L⁻¹ NaAsO₂ 组 MDA 含量升高(均 *P*<0.05)。

表 2 NaAsO₂ 对氧化应激因子的影响 ($\bar{x} \pm s$, *n*=3)
Table 2 Effects of NaAsO₂ on oxidative stress factors ($\bar{x} \pm s$, *n*=3)

NaAsO ₂ 浓度 (NaAsO ₂ concentration)/ (μmol·L ⁻¹)	T-SOD活性 (T-SOD activity)/ (U·mg ⁻¹)	GSH-Px活性 (GSH-Px activity)/ (U·mg ⁻¹)	MDA含量 (MDA content)/ (μmol·g ⁻¹)
0	409.80±36.00	0.0110±0.0011	0.53±0.03
2.5	401.10±43.57	0.0052±0.0004 [*]	0.60±0.04
5	347.06±21.54	0.0071±0.0019	0.65±0.10
10	291.20±13.73 [*]	0.0066±0.0013 [*]	0.97±0.19 [*]
20	179.36±26.86 [*]	0.0150±0.0016	1.52±0.21 [*]

[注]*: 与对照组相比, *P*<0.05。
[Note]*: Compared with the control group, *P*<0.05.

2.3 NaAsO₂ 对 m⁶A 甲基化水平的影响

使用不同浓度 NaAsO₂ 处理 HELF 细胞 48 h 后, 0、2.5、5、10、20 μmol·L⁻¹ NaAsO₂ 组总体 m⁶A 甲基化水平依次为(0.193±0.023)%、(0.247±0.021)%、(0.253±0.006)%、(0.233±0.006)%和(0.262±0.010)%, 相较于对照组, 各组 m⁶A 甲基化水平均升高(均 *P*<0.05)。

2.4 NaAsO₂ 对 m⁶A 修饰酶 mRNA 表达的影响

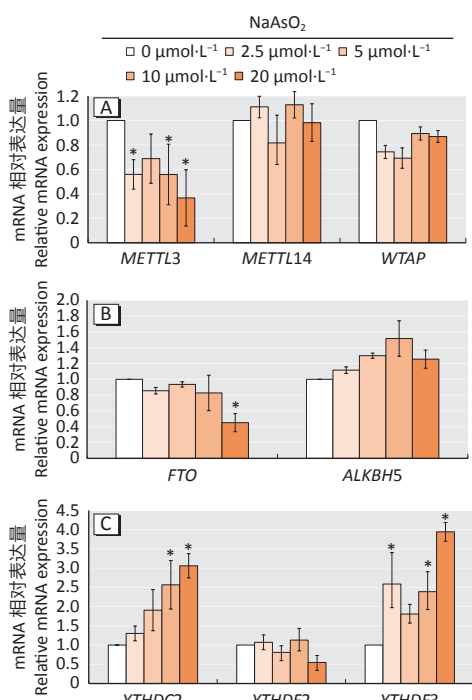
对 m⁶A 修饰酶的 mRNA 相对表达量进行实时荧光定量 PCR 检测, 结果如图 1 所示, 相较于对照组, METTL3 的 mRNA 相对表达量在 NaAsO₂ 浓度为 2.5、10、20 μmol·L⁻¹ 时降低, FTO 的 mRNA 相对表达量在 NaAsO₂ 浓度为 20 μmol·L⁻¹ 时降低, YTHDC2 的 mRNA 相对表达量在 NaAsO₂ 浓度为 10、20 μmol·L⁻¹ 时升高, YTHDF3 的 mRNA 相对表达量在 NaAsO₂ 浓度为 2.5、10、20 μmol·L⁻¹ 时升高(均 *P*<0.05)。

2.5 NaAsO₂ 对 m⁶A 修饰酶蛋白水平的影响

对 m⁶A 修饰酶的蛋白相对表达量进行检测, 结果如图 2 所示, 相较于对照组, METTL3 的蛋白相对表达量在 NaAsO₂ 浓度为 10、20 μmol·L⁻¹ 时降低, FTO 的蛋白相对表达量在 NaAsO₂ 浓度为 5、20 μmol·L⁻¹ 时降低, YTHDC2 的蛋白相对表达量在 NaAsO₂ 浓度为 20 μmol·L⁻¹ 时降低(均 *P*<0.05)。

2.6 NaAsO₂ 对 NRF2 mRNA 中 m⁶A 修饰的影响

使用 MeRIP-qPCR 法对 NRF2 mRNA 的 m⁶A 富集情况进行检测, 对照组和暴露组的 m⁶A 富集比例分别为(0.00011±0.000021)%和(0.00032±0.000043)%, 相较于对照组, 暴露组的 m⁶A 富集比例增加(*P*<0.05)。

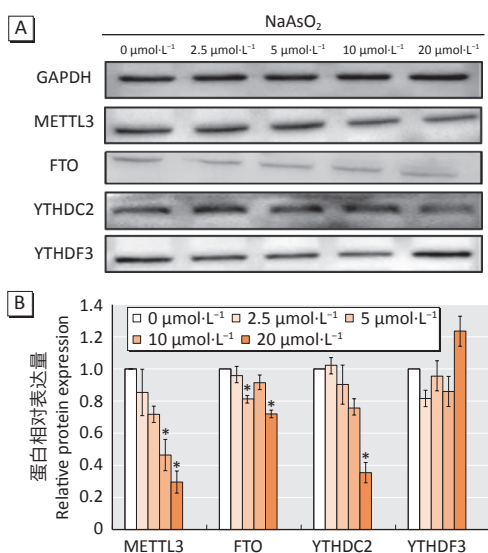


[注] A: m^6A 甲基化转移酶的 mRNA 相对表达量; B: m^6A 去甲基化转移酶的 mRNA 相对表达量; C: m^6A 阅读蛋白的 mRNA 相对表达量。
*: 与对照组相比, $P < 0.05$ 。

[Note] A: Relative mRNA expression of m^6A methyltransferase; B: Relative mRNA expression of m^6A demethylase; C: Relative mRNA expression of m^6A reading protein. *: Compared with the control group, $P < 0.05$.

图 1 $NaAsO_2$ 对 HELF 细胞 m^6A 修饰酶 mRNA 表达的影响 ($n=3$)

Figure 1 Effects of $NaAsO_2$ on m^6A modified enzyme mRNA expressions in HELF cells ($n=3$)



[注] A: 蛋白条带; B: 蛋白相对表达量。*: 与对照组相比, $P < 0.05$ 。

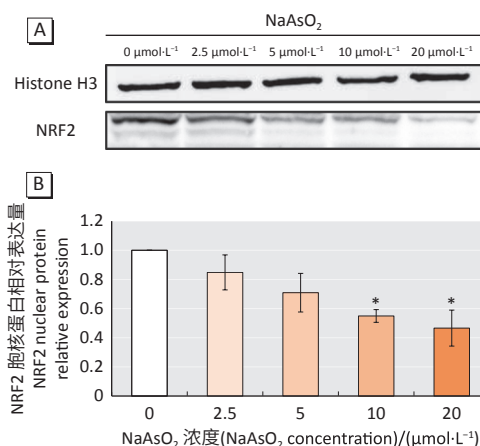
[Note] A: Western blotting image; B: Relative protein expression. *: Compared with the control group, $P < 0.05$.

图 2 $NaAsO_2$ 对 HELF 细胞 m^6A 修饰酶蛋白表达的影响 ($n=3$)

Figure 2 Effects of $NaAsO_2$ on m^6A modified enzyme protein expressions in HELF cells ($n=3$)

2.7 $NaAsO_2$ 对 NRF2 胞核蛋白表达的影响

如图 3 所示, 相较于对照组, 细胞核内 NRF2 的蛋白相对表达量在 $NaAsO_2$ 浓度为 10 和 20 $\mu mol \cdot L^{-1}$ 时降低(均 $P < 0.05$)。



[注] *: 与对照组相比, $P < 0.05$ 。

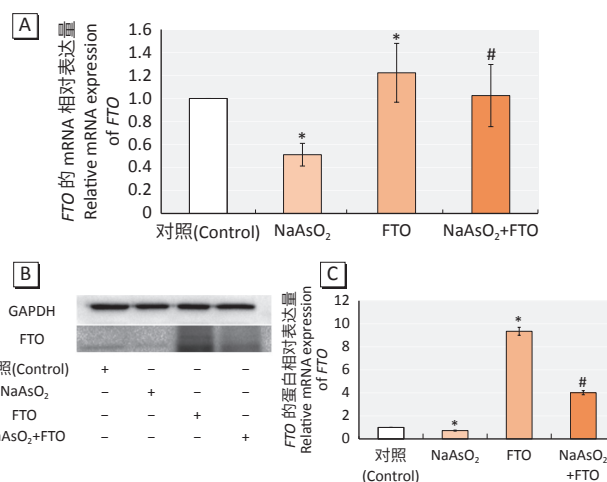
[Note] *: Compared with the control group, $P < 0.05$.

图 3 $NaAsO_2$ 对 NRF2 胞核蛋白表达的影响 ($n=3$)

Figure 3 Effects of $NaAsO_2$ on NRF2 nuclear protein expression ($n=3$)

2.8 转染效率

如图 4 所示, 经 20 $\mu mol \cdot L^{-1}$ 的 $NaAsO_2$ 处理的 $NaAsO_2$ 组 FTO 的 mRNA 及蛋白相对表达量较对照组降低(均 $P < 0.05$); FTO 组 FTO 的 mRNA 及蛋白相对表达量较对照组升高(均 $P < 0.05$); $NaAsO_2$ +FTO 组 FTO 的 mRNA 及蛋白相对表达量较 $NaAsO_2$ 组升高(均 $P < 0.05$)。



[注] A: FTO 的 mRNA 相对表达量; B: FTO 蛋白条带图; C: FTO 的蛋白相对表达量。*: 与对照组相比, $P < 0.05$ 。#: 与 $NaAsO_2$ 组比较, $P < 0.05$ 。

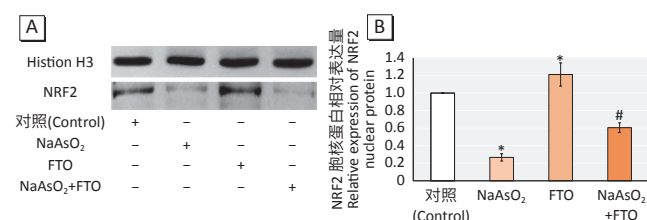
[Note] A: Relative expression of FTO mRNA; B: Western blotting image; C: Relative expression of FTO protein. *: Compared with the control group, $P < 0.05$. #: Compared with the $NaAsO_2$ group, $P < 0.05$.

图 4 转染效率 ($n=3$)

Figure 4 Transfection efficiency ($n=3$)

2.9 过表达 FTO 后 NRF2 胞核蛋白水平的变化

过表达 FTO 后,进一步检测 NRF2 的胞核蛋白水平。结果如图 5 所示,经 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaAsO_2 处理的 NaAsO_2 组 NRF2 的胞核蛋白相对表达量较对照组降低,FTO 组 NRF2 的胞核蛋白相对表达量较对照组升高(均 $P < 0.05$); NaAsO_2 +FTO 组 NRF2 的胞核蛋白相对表达量较 NaAsO_2 组升高($P < 0.05$)。



[注] A: 蛋白条带图; B: NRF2 胞核蛋白相对表达量。*: 与对照组相比, $P < 0.05$ 。#: 与 NaAsO_2 组比较, $P < 0.05$ 。

[Note] A: Western blotting image; B: Relative expression of NRF2 nuclear protein. *: Compared with the control group, $P < 0.05$. #: Compared with the NaAsO_2 group, $P < 0.05$.

图 5 过表达 FTO 后 NRF2 胞核蛋白表达的变化 ($n=3$)

Figure 5 Changes of NRF2 nuclear protein expression after over-expression of FTO ($n=3$)

3 讨论

当机体受到不同应激源刺激或病原体感染时,体内会产生过量的活性氧,此时抗氧化防御系统被破坏,从而诱发氧化应激。T-SOD 和 GSH-Px 是两种重要的抗氧化酶,可维持体内氧化与抗氧化的平衡^[22],二者的活性可反映机体的抗氧化能力;MDA 是脂质过氧化终产物,其含量可反映机体脂质过氧化程度。有研究表明, NaAsO_2 可通过降低 SOD、GSH 的活性进而增加 MDA 的含量,最终导致小鼠肺损伤^[3],说明砷暴露可通过抑制抗氧化酶的活性,加重机体的脂质过氧化程度,最终导致机体发生损伤。本研究中同样发现, T-SOD 和 GSH-Px 活性降低,MDA 含量升高,表明 NaAsO_2 可降低 HELF 细胞的抗氧化能力,使细胞内脂质过氧化物增加,细胞内发生了氧化应激。NRF2 是一种重要的内源性抗氧化调节因子,维持体内氧化与抗氧化的平衡。有研究发现,砷暴露后大鼠的心脏和肝脏内发生了氧化应激,且伴随 NRF2 的表达降低^[23-24]。本研究同样发现,使用不同浓度的 NaAsO_2 处理细胞后,细胞核内 NRF2 的蛋白相对表达量降低。以上结果提示 NaAsO_2 诱导的氧化损伤与 NRF2 介导的抗氧化途径受到抑制具有重要联系。

最新研究显示, m^6A 修饰参与环境诱变剂诱导的氧化应激、凋亡以及自噬等过程。例如, FTO 介导的 m^6A 修饰参与钴诱导的氧化应激过程,导致细胞凋

亡^[17]。METTL3 介导的 m^6A 修饰参与 $\text{PM}_{2.5}$ 诱导的细胞凋亡和自噬^[25]。METTL3 和 FTO 介导的 m^6A 修饰共同参与硫酸铜诱导的氧化应激过程,引起细胞凋亡^[18]。

在氧化应激过程中,细胞的 m^6A 修饰水平可能上升,也可能下降。使用黏菌素处理小鼠肾小管上皮细胞后,细胞总体 m^6A 甲基化水平下降^[21];多柔比星处理大鼠心肌细胞后,细胞总体 m^6A 甲基化水平上升^[26]。本研究对 NaAsO_2 暴露后 HELF 细胞总体 m^6A 甲基化水平及 m^6A 修饰酶表达情况进行检测,结果显示,相较于对照组,各组 m^6A 甲基化水平均升高,提示 NaAsO_2 可增加 HELF 细胞的总体 m^6A 甲基化水平。

m^6A 主要由甲基转移酶、去甲基化酶以及阅读蛋白调控。METTL3 属于 m^6A 甲基转移酶,可催化 mRNA 上的碱基发生 m^6A 甲基化;FTO 是一种 m^6A 去甲基化酶,可以对已经发生 m^6A 修饰的碱基进行去甲基化修饰,二者对 m^6A 修饰的调节具有重要作用。黏菌素处理的小鼠肾小管上皮细胞模型^[21]和肝缺血再灌注小鼠模型中^[27],MDA 含量升高,SOD、GSH-Px 活性均降低, METTL3 或 FTO 的表达下调,过表达 METTL3 或 FTO 后,MDA 含量降低,SOD、GSH-Px 活性均升高。以上研究说明, METTL3 和 FTO 可能调节氧化应激相关基因的表达。本研究中, NaAsO_2 处理 HELF 细胞后, METTL3 和 FTO 的 mRNA 以及蛋白表达量下降,但细胞总体的 m^6A 甲基化水平上升,可能与这一过程中的信号通路调节有关,未来还需明确相关信号通路的表达情况来究其原因,且 METTL3 和 FTO 在这一过程中如何发挥作用还需进一步研究。

YTHDC2 和 YTHDF3 属于阅读蛋白,通过形成“氨基酸笼”选择性地识别含有 m^6A 的转录本,并与之结合,进而提高翻译效率^[28]。Zhao 等^[19]发现,邻苯二甲酸酯处理后,大鼠体内发生了氧化应激,阅读蛋白 YTHDC2 的 mRNA 表达量增加。Arumugam 等^[20]发现,伏马菌素诱导人肝癌细胞发生氧化应激过程中,阅读蛋白 YTHDC2、YTHDF3 的 mRNA 表达量增加。本研究结果中,阅读蛋白 YTHDC2 的 mRNA 表达量升高而蛋白表达量降低, YTHDF3 的 mRNA 表达量升高而蛋白表达量无明显变化。由于这两种阅读蛋白的表达量在 mRNA 和蛋白水平不一致,尚无法判断在砷致 HELF 细胞发生氧化应激过程中 YTHDC2 和 YTHDF3 是否起作用,还需通过后续的实验来验证。本研究仅选取了 mRNA 水平上有变化的 m^6A 修饰酶来检测其蛋白表达情况,存在一定缺陷。

在氧化应激过程中, NRF2 作为重要的抗氧化转录

调节因子,可能具有 m⁶A 修饰的改变作用。在邻苯二甲酸酯诱导的青春期前睾丸损伤的动物模型中,睾丸内发生了氧化应激,且伴随 *NRF2* mRNA 的 m⁶A 修饰增加^[19]。本研究使用“SRAMP”软件对 *NRF2* mRNA 可能的 m⁶A 位点进行预测,筛选出 *NRF2* mRNA 第 1164 个碱基(*NRF2*-1164),并在实验中验证,NaAsO₂ 可增加 *NRF2* mRNA 的 m⁶A 修饰水平,推测 *NRF2* mRNA 的 m⁶A 修饰水平的增加可能导致 *NRF2* 的表达降低,影响了 *NRF2* 介导的抗氧化系统,进而使细胞内发生氧化应激。

FTO 是一种重要的 m⁶A 去甲基化酶,可以去除发生 m⁶A 修饰的 RNA 上的甲基基团。在环境诱变剂诱导的氧化应激过程中,FTO 可能发挥重要作用。使用邻苯二甲酸酯染毒后,大鼠睾丸内总体 m⁶A 甲基化水平升高,伴随 FTO 的表达降低,导致睾丸内发生氧化应激,最终使睾丸损伤^[19]。使用氯化镉处理人神经胶质瘤细胞后,FTO 的表达降低,从而引起细胞内发生氧化应激,最终导致细胞凋亡^[17]。本研究显示,NaAsO₂ 暴露后细胞内发生了氧化应激,且伴随 FTO 的表达降低。为了探究 FTO 在这一过程中的作用,将 FTO 在细胞内过表达后检测了 *NRF2* 胞核蛋白的表达情况。结果显示,过表达 FTO 后 *NRF2* 胞核蛋白相对表达量升高,表明 NaAsO₂ 可能通过下调 FTO 来抑制 *NRF2* 的表达进而导致细胞内发生氧化应激。那么,*NRF2* mRNA 的 m⁶A 修饰的增加是否与 FTO 的下调有关,还需后续实验来证明。

综上所述,NaAsO₂ 可诱导 HELF 细胞发生氧化应激,这一过程伴随细胞总体 m⁶A 甲基化水平, m⁶A 修饰酶 METTL3、FTO、YHDC2、YTHDF3 表达水平, *NRF2* 胞核蛋白表达水平以及 *NRF2* mRNA 的 m⁶A 修饰改变,提示 m⁶A 修饰可能参与砷暴露诱导的氧化应激过程。本研究为 m⁶A 修饰在砷诱导的肺细胞氧化应激过程中的作用提供了初步实验依据。但需要注意的是,本研究各剂量组间差异性不够明显且差距不具有统一性,可能是由于本研究采用的暴露剂量较小,仅在引起细胞增殖较小改变的情况下开展工作导致。此外,本研究仅为体外细胞实验且只以 HELF 细胞为单一的细胞模型进行实验,后续还需在更多细胞模型以及体内模型中明确具体的机制。

参考文献

[1] DKHIL MA, MONEIM AE A, BAUOMY AA, et al. Chlorogenic acid prevents hepatotoxicity in arsenic-treated mice: role of oxidative stress and apoptosis[J]. *Mol Biol Rep*, 2020, 47(2): 1161-1171.

[2] 李勇. 改水对慢性砷中毒影响的研究[D]. 太原: 山西医科大学, 2012.
LI Y. Study on the effect of water modification on chronic Arsenism[D]. Taiyuan: Shanxi Medical University, 2012.

[3] LI J, ZHAO L, ZHANG Y, et al. Imbalanced immune responses involving inflammatory molecules and immune-related pathways in the lung of acute and subchronic arsenic-exposed mice[J]. *Environ Res*, 2017, 159: 381-393.

[4] 王馨悦, 王素华, 王丽, 等. 亚砷酸钠致人胚肺成纤维细胞损伤中自噬和凋亡的关系[J]. 环境与职业医学, 2019, 36(9): 853-857,863.
WANG XY, WANG SH, WANG L, et al. Relationship between autophagy and apoptosis of human embryonic lung fibroblasts induced by sodium Arsenite[J]. *J Environ Occup Med*, 2019, 36(9): 853-857,863.

[5] MAHALANOBISH S, SAHA S, DUTTA S, et al. Mangiferin alleviates arsenic induced oxidative lung injury via upregulation of the Nrf2-HO1 axis[J]. *Food Chem Toxicol*, 2019, 126: 41-55.

[6] 杨欢, 王素华, 苏鑫, 等. 亚砷酸钠对雄性大鼠炎症因子和氧化应激的影响[J]. 环境与职业医学, 2017, 34(6): 542-544.
YANG H, WANG SH, SU X, et al. Effects of sodium arsenite on inflammatory cytokines and oxidative stress in male rats[J]. *J Environ Occup Med*, 2017, 34(6): 542-544.

[7] ZHOU MX, LI GH, SUN B, et al. Identification of novel Nrf2 activators from *Cinnamomum chartophyllum* H. W. Li and their potential application of preventing oxidative insults in human lung epithelial cells[J]. *Redox Biol*, 2018, 14: 154-163.

[8] ROUNDTREE IA, EVANS ME, PAN T, et al. Dynamic RNA modifications in gene expression regulation[J]. *Cell*, 2017, 169(7): 1187-1200.

[9] ZACCARA S, RIES RJ, JAFFREY SR. Reading, writing and erasing mRNA methylation[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(10): 608-624.

[10] HE PC, HE C. m⁶A RNA methylation: from mechanisms to therapeutic potential[J]. *EMBO J*, 2021, 40(3): e105977.

[11] ZHU ZM, HUO FC, PEI DS. Function and evolution of RNA N⁶-methyladenosine modification[J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(11): 1929-1940.

[12] ZHAO H, XU Y, XIE Y, et al. m⁶A regulators is differently expressed and correlated with immune response of esophageal cancer[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 650023.

[13] SHAFIK AM, ZHANG F, GUO Z, et al. N⁶-methyladenosine dynamics in neurodevelopment and aging, and its potential role in Alzheimer's disease[J]. *Genome Biol*, 2021, 22(1): 17.

[14] FAN D, XIA Y, LU C, et al. Regulatory role of the RNA N⁶-methyladenosine modification in immunoregulatory cells and immune-related bone homeostasis associated with rheumatoid arthritis[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 627893.

[15] RØNNINGEN T, DAHL MB, VALDERHAUG TG, et al. m⁶A regulators in human adipose tissue - depot-specificity and correlation with obesity[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2021, 12: 778875.

[16] SUN T, WU R, MING L. The role of m⁶A RNA methylation in cancer[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 112: 108613.

[17] TANG J, SU Q, GUO Z, et al. N⁶-methyladenosine(m⁶A) demethylase FTO regulates cellular apoptosis following cobalt-induced oxidative stress[J]. *Environ Pollut*, 2022, 297: 118749.

[18] QU T, MOU Y, DAI J, et al. Changes and relationship of N⁶-methyladenosine modification and long non-coding RNAs in oxidative damage induced by cadmium in pancreatic β-cells[J]. *Toxicol Lett*, 2021, 343: 56-66.