

镉致肾细胞损伤中氧化应激及 N⁶-甲基腺苷修饰酶表达变化

何作顺, 李萌竹, 谷仕艳

大理大学公共卫生学院, 大理大学预防医学研究所, 云南 大理 671000

摘要:

[背景] N⁶-甲基腺苷 (m⁶A) 修饰酶可参与细胞损伤过程, 但 m⁶A 修饰酶在镉引起肾细胞损伤中有何变化尚不清楚。

[目的] 观察 CdSO₄ 致肾小管上皮细胞 (HK-2 细胞) 损伤过程中 m⁶A 修饰酶的变化水平。

[方法] 以不同浓度 CdSO₄ (0、4、8、16 μmol·L⁻¹) 处理 HK-2 细胞 24 h 后对相应指标进行检测。用 Hoechst 染色法观察细胞凋亡水平, 镜下随机选取视野计数正常细胞和凋亡细胞, 计算细胞凋亡率, 利用相应试剂盒检测细胞中超氧化物歧化酶 (SOD) 活性、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-PX) 活性、丙二醛 (MDA) 含量, 以蛋白免疫印迹法检测 m⁶A 甲基转移酶中的甲基转移酶样 3 (METTL3) 和脂肪量与肥胖相关蛋白 (FTO) 的蛋白表达水平, 荧光定量 PCR 法检测 YTH 结构域家族蛋白 1 (YTHDF1) 和 YTH 结构域家族蛋白 3 (YTHDF3) 的 mRNA 水平。

[结果] 经 0、4、8、16 μmol·L⁻¹ CdSO₄ 处理后, 细胞凋亡率依次为 6.83%、5.17%、21.17%、35.80%; 4、8、16 μmol·L⁻¹ 组 SOD 活性依次是 (15.41±0.96)、(13.57±1.42)、(10.96±0.61) ×10³ U·g⁻¹, 与“0”组相比, 各组均有降低 ($P<0.05$)。GSH-PX 活性在 CdSO₄ 浓度为 8 μmol·L⁻¹ 时降低至 (8.74±3.91) U·g⁻¹, 而在 8、16 μmol·L⁻¹ CdSO₄ 作用时, MDA 含量分别升高至 (87.69±3.05)、(93.42±4.71) μmol·g⁻¹ ($P<0.05$)。蛋白免疫印迹结果显示, METTL3 蛋白相对表达水平在 4、8、16 μmol·L⁻¹ 时分别升高至“0”组的 1.09、1.25、1.33 倍, FTO 蛋白相对表达水平在 8、16 μmol·L⁻¹ 时分别为 0.81 和 0.74 ($P<0.05$)。在 CdSO₄ 浓度为 4 μmol·L⁻¹ 时, YTHDF1 的 mRNA 水平是“0”组的 7.62 倍, YTHDF3 的 mRNA 水平在 4、16 μmol·L⁻¹ CdSO₄ 作用时是“0”组的 2.65、2.26 倍 ($P<0.05$)。

[结论] 在 CdSO₄ 致 HK-2 细胞发生损伤过程中, m⁶A 修饰酶 METTL3 和 FTO 的蛋白水平以及 YTHDF1 和 YTHDF3 的 mRNA 水平发生不同程度的变化。

关键词: HK-2 细胞; 氧化应激; 甲基转移酶; 去甲基化酶; 甲基结合蛋白

Changes of oxidative stress and expression of N⁶ methyladenosine modification enzymes during cell damage induced by cadmium in renal cells HE Zuo-shun, LI Meng-zhu, GU Shi-yan (Institute of Preventive Medicine, School of Public Health, Dali University, Dali, Yunnan 671000, China)

Abstract:

[Background] N⁶ methyladenosine (m⁶A) modification enzymes participate in the process of cell damage. However, the changes of m⁶A modification enzymes in renal cell damage induced by cadmium remain unclear.

[Objective] This experiment investigates changes of m⁶A modification enzymes during the process of CdSO₄-induced cell damage in human renal tubules cells (HK-2 cells).

[Methods] HK-2 cells were treated with different concentrations of CdSO₄ (0, 4, 8, and 16 μmol·L⁻¹) for 24 h and corresponding indicators were tested. The apoptotic level was observed after Hoechst staining by counting normal cells and apoptotic cells in a random field under microscope and the apoptotic rate was calculated; the activity of superoxide dismutase (SOD), the activity of glutathione peroxidase (GSH-PX), and the content of malondialdehyde (MDA) were detected using corresponding kits; the protein expression levels of methyltransferase like 3 (METTL3) and fat mass and obesity associated protein (FTO) were detected by Western blotting, and the mRNA expression levels of YTH domain family protein 1 (YTHDF1) and YTH domain family protein 3 (YTHDF3) were detected by real-time PCR.

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2020.20169

基金项目

2019 年云南省教育厅科学研究基金项目 (2019Y0255); 大理大学博士科研启动项目 (KYBS2018006)

作者简介

何作顺 (1966—), 男, 学士, 教授;
E-mail: hzs338@163.com

通信作者

谷仕艳, E-mail: ygsy727@163.com

利益冲突 无申报

收稿日期 2020-04-17

录用日期 2020-07-20

文章编号 2095-9982(2020)09-0897-06

中图分类号 R114

文献标志码 A

►引用

何作顺, 李萌竹, 谷仕艳. 镉致肾细胞损伤中氧化应激及 N⁶-甲基腺苷修饰酶表达变化[J]. 环境与职业医学, 2020, 37 (9): 897-902.

►本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2020.20169

Funding

This study was funded.

Correspondence to

GU Shi-yan, E-mail: ygsy727@163.com

Competing interests None declared

Received 2020-04-17

Accepted 2020-07-20

►To cite

HE Zuo-shun, LI Meng-zhu, GU Shi-yan. Changes of oxidative stress and expression of N⁶ methyladenosine modification enzymes during cell damage induced by cadmium in renal cells[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2020, 37(9): 897-902.

►Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2020.20169

[Results] After administration with CdSO_4 at 0, 4, 8, and $16 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, the cell apoptotic rates were 6.83%, 5.17%, 21.17%, and 35.80%, respectively. Compared with the $0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CdSO_4 group, the SOD activities of the 4, 8, and $16 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CdSO_4 groups were decreased $[(15.41\pm 0.96), (13.57\pm 1.42), \text{ and } (10.96\pm 0.61)\times 10^3 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}]$ ($P<0.05$), the GSH-PX activity of the $8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CdSO_4 group was decreased to $(8.74\pm 3.91) \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$, and the MDA content of the 8 and $16 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CdSO_4 groups were increased to (87.69 ± 3.05) and $(93.42\pm 4.71) \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ ($P<0.05$). The results of Western blotting showed that the protein expression levels of METTL3 of the 4, 8, and $16 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CdSO_4 groups increased to 1.09, 1.25, and 1.33 times of the $0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CdSO_4 group respectively, and the protein expression levels of FTO of the 8 and $16 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CdSO_4 groups decreased to 0.81 and 0.74 times of the $0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CdSO_4 group respectively ($P<0.05$). At $4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CdSO_4 , the mRNA expression level of *YTHDF1* increased to 7.62 times of the $0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CdSO_4 group, and at 4 and $16 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CdSO_4 , the mRNA expression levels of *YTHDF3* increased to 2.65 and 2.26 times of the $0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CdSO_4 group respectively ($P<0.05$).

[Conclusion] The protein expressions of METTL3 and FTO as well as the mRNA expressions of *YTHDF1* and *YTHDF2* are changed in the process of CdSO_4 -induced cell damage in HK-2 cells.

Keywords: HK-2 cell; oxidative stress; methyltransferase; demethylase; methyl binding protein

镉作为最常见的环境污染物, 长期过量摄入将对机体造成不可逆损伤^[1-2]。近年研究者对镉毒性展开了大量研究, 其中以慢性镉中毒造成的肾细胞损伤格外引人关注^[2-4]。目前, 学术界普遍认为氧化应激和细胞凋亡是镉致肾细胞损伤的重要机制, 即镉能显著降低超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-PX) 等抗氧化酶的活性, 削弱肾细胞抵御氧化损伤的能力进而升高丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 含量, 引起细胞凋亡、坏死或自噬等多种不良结局, 最终诱发多种肾相关疾病^[4-7]。然而, 镉致肾细胞损伤的毒性机制仍未完全明确, 尚需做进一步探讨。

N^6 -甲基腺苷 (N^6 -methyladenosine, m^6A) 修饰酶是甲基转移酶、去甲基化酶和甲基结合蛋白的统称, 它们共同调控多种 RNA 上的 m^6A 修饰而参与多种生理病理学事件^[8-9]。当前研究显示, m^6A 修饰酶中的甲基转移酶样 3 (methyltransferase like 3, METTL3)、脂肪量与肥胖相关蛋白 (fat mass and obesity associated protein, FTO)、YTH 结构域家族蛋白 1 (YTH domain family protein 1, YTHDF1) 和 YTH 结构域家族蛋白 3 (YTH domain family protein 3, YTHDF3) 可改变细胞的氧化应激水平, 引起细胞凋亡, 最终导致细胞损伤^[10-15]。那么在镉致肾细胞损伤过程中, METTL3、FTO、YTHDF1 和 YTHDF3 等 m^6A 修饰酶如何变化? 目前未见报道。

本研究选取人肾小管上皮细胞 HK-2 作为研究对象, 使用不同浓度硫酸镉 (CdSO_4) 对 HK-2 细胞进行染毒, 以氧化应激指标 (SOD、GSH-PX、MDA) 和细胞凋亡评估 CdSO_4 对 HK-2 细胞的损伤情况, 同时测定 METTL3、FTO、YTHDF1 和 YTHDF3 等 m^6A 修饰酶的变化情况, 旨在了解 m^6A 修饰酶在镉致 HK-2 细胞损伤过程中的变化规律, 这将为镉致肾细胞损伤的 RNA 表观遗传学研究提供新思路。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

1.1.1 实验细胞株 人肾小管上皮细胞 HK-2 购自广州吉妮欧生物科技有限公司。

1.1.2 主要试剂 硫酸镉 (CdSO_4 , 国药集团化学试剂有限公司, 无色结晶, 溶于生理盐水), RPMI 1640 细胞培养基 (美国 Gibco 公司), 细胞凋亡-Hoechst 染色试剂盒 (北京雷根生物技术有限公司), 总 SOD 活性检测试剂盒、GSH-PX 检测试剂盒、MDA 检测试剂盒、Western 及 IP 细胞裂解液 (上海碧云天生物技术有限公司), 兔抗 METTL3 多克隆抗体、兔抗 FTO 多克隆抗体、兔抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 多克隆抗体 (北京博奥森生物技术有限公司), 山羊抗兔 IgG/辣根过氧化物酶 (北京中杉金桥生物技术有限公司), 总 RNA 提取试剂盒、Quant cDNA 第一链合成试剂盒、SuperReal 荧光定量预混试剂增强版 (SYBR Green) (北京天根生化科技有限公司), *YTHDF1*、*YTHDF3* 和 *GAPDH* 引物 (上海捷瑞生物工程有限公司)。

1.1.3 主要仪器 荧光显微镜 (日本 Nikon 公司), 多功能荧光酶标仪 (上海闪谱生物科技有限公司), 恒温金属浴 (杭州博日科技有限公司), 垂直蛋白电泳仪、转印电泳仪 (北京六一生物科技有限公司), 脱色摇床 (常州国华电器有限公司), 荧光化学发光凝胶成像系统 (上海培清科技有限公司), 超微量紫外可见分光光度计 (四川中浪科技有限公司), 荧光定量聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 仪 (美国 Applied biosystems 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 HK-2 细胞置于饱和湿度、 37°C 、5% CO_2 的细胞培养箱中培养, 细胞长至铺满瓶底 80%~90% 时传代一次。每 100 mL 培养基由 89 mL RPMI

1640 细胞培养基、10 mL 胎牛血清和 1 mL 双抗组成。

1.2.2 细胞凋亡测定 根据课题组前期的研究, CdSO_4 终浓度为 0、4、8、16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 染毒 24 h 后可较好观察到 CdSO_4 对 HK-2 细胞存活率的影响, 故本研究采用这 4 个浓度对 HK-2 细胞进行后续的研究。取生长状态良好的细胞接种于 6 孔板中, 过夜孵育后, 每孔分别加入 CdSO_4 终浓度为 0、4、8、16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的培养基 1 mL, 待 CdSO_4 染毒 24 h 后弃液, 据细胞凋亡-Hoechst 染色试剂盒说明书依次进行固定、清洗和染色, 在荧光显微镜下以紫外光激发, 镜下随机选取视野观察凋亡情况并拍照, 计数 200 个细胞并计算凋亡率: 细胞凋亡率 = (凋亡细胞数 / 200) $\times 100\%$ 。

1.2.3 氧化应激相关指标测定 收集经 0、4、8、16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CdSO_4 处理 24 h 的细胞, 离心弃上清后加入裂解液裂解 10 min, 接着 4°C, 13 000 $\times g$ 离心 10 min, 取上清备用。分别按总 SOD 活性检测试剂盒 GSH-PX 检测试剂盒和 MDA 检测试剂盒说明书依次进行上样和孵育后, 以多功能荧光酶标仪分别在 450、340、532 nm 波长下检测光密度, 并按说明书计算 SOD、GSH-PX 活性以及 MDA 含量。

1.2.4 METTL3 和 FTO 的蛋白水平测定 待测样品获取方法同“1.2.3”, 采用二喹啉甲酸 (bicin choninic acid, BCA) 法测定蛋白浓度。制备 12% 分离胶和 5% 浓缩胶, 每个样品上样量为 80 μg , 以 4:1 的体积比将待测样品和 5 $\times$ 蛋白上样缓冲液混匀并于 100°C 金属浴 5 min, 待冷却后上样, 同时在胶左侧留一孔加 10 μL marker 标记蛋白进行电泳, 电泳后将蛋白转印至聚偏氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜上, 室温封闭 2 h 后, 加入 METTL3、FTO 和 GAPDH 的一抗 (1:500), 4°C 孵育过夜, 洗膜缓冲液清洗 3 次后加入相应二抗 (1:5000), 室温孵育 1 h, 洗膜缓冲液清洗 3 次, 用荧光化学发光凝胶成像系统采集蛋白印迹图像, 使用 Image J 软件对图像结果进行分析。蛋白相对表达水平 = 所测条带灰度值 / 内参灰度值, 以“0”组的蛋白表达水平进行校正。

1.2.5 YTHDF1 和 YTHDF3 的 mRNA 水平测定 收集经不同浓度 CdSO_4 (0、4、8、16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理 24 h 后的 HK-2 细胞, 按总 RNA 提取试剂盒提取各组 RNA 并以“Quant cDNA 第一链合成试剂盒”逆转录获得 DNA。RNA 和 DNA 的浓度及 D_{260}/D_{280} 、 D_{260}/D_{230} 的值采用微量紫外可见分光光度计获得, D_{260}/D_{280} 、 D_{260}/D_{230} 的比

值均在 1.8~2.2 即视为样品合格。之后, 据 SuperReal 荧光定量预混试剂盒说明书制备好反应液后进行荧光定量 PCR。目的基因的校正以 GAPDH 作为参考, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算后获得 YTHDF1 和 YTHDF3 的 mRNA 相对表达水平。

1.3 统计学处理

以上实验均独立重复 3 次, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 利用统计软件 SPSS 17.0 进行统计学处理。多组间比较用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 两组间比较用 Dunnett-t 检验; 对不满足方差齐的数据采用 Kruskal-Wallis 秩和检验 (H 检验), 组间均数的多重比较采用完全随机设计多个样本间的秩和检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 CdSO_4 对细胞凋亡的影响

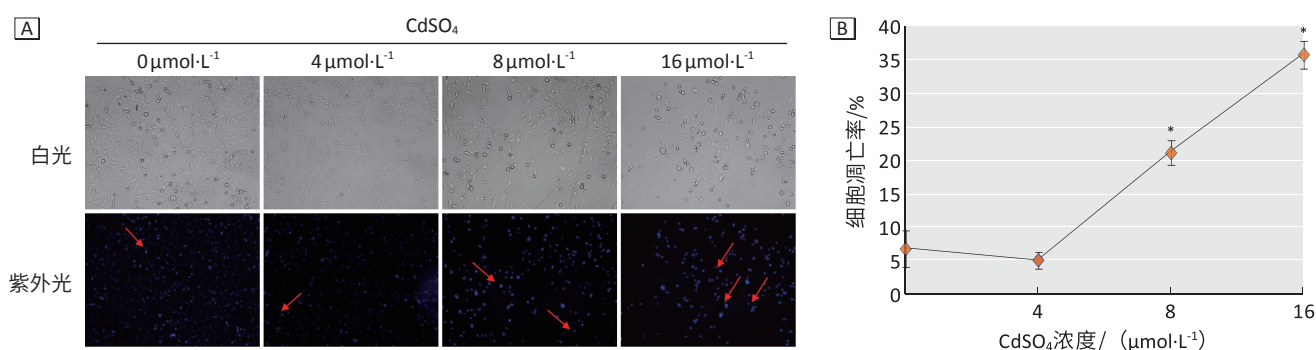
如图 1A 所示, 在 0、4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CdSO_4 作用时, 细胞在白光下形态正常, 贴壁能力较好, 在紫外光激发下, 大多数细胞核呈圆形且蓝色均染; 8、16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CdSO_4 作用时, 细胞间隙变大, 大部分细胞失去贴壁能力, 紫外光激发下大部分细胞核皱缩且变白发亮, 呈典型的凋亡形态。各浓度组 HK-2 细胞的凋亡率依次为 6.83%、5.17%、21.17%、35.80%, 与“0”组相比, 8、16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CdSO_4 组凋亡率升高 ($P<0.05$), 4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CdSO_4 组凋亡率改变无统计学意义 ($P>0.05$), 见图 1B。

2.2 CdSO_4 对氧化应激相关指标的影响

4、8、16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CdSO_4 作用 HK-2 细胞 24 h 后, 各组 SOD 活性相比“0”组均降低 ($P<0.05$); 8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组 GSH-PX 活性与“0”组相比降低 ($P<0.05$), 4、16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组差异无统计学意义 ($P>0.05$); 8、16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组 MDA 含量相较于“0”组升高 ($P<0.05$), 4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 1。

2.3 METTL3 和 FTO 蛋白表达水平测定结果

如图 2A 和图 2B 所示, 4、8、16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CdSO_4 作用细胞后, METTL3 的蛋白相对表达水平分别升高至“0”组的 1.09、1.25、1.33 倍, 与“0”组相比, 差异均具有统计学意义 ($P<0.05$); 与“0”组相比, 8、16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CdSO_4 作用 HK-2 细胞 24 h 后, FTO 的蛋白相对表达水平分别为 0.81 和 0.74, 较“0”组有所降低 ($P<0.05$); 4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CdSO_4 作用后 FTO 的蛋白相对表达水平为 0.92, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。



[注] A：荧光显微镜下的细胞凋亡情况($\times 100$)；B：细胞凋亡率。在紫外光激发下，细胞核呈蓝色均染的为正常细胞，细胞核皱缩变白的为凋亡细胞，如图中红色箭头所示。*：与“0”组比较， $P < 0.05$ 。

图1 CdSO_4 对HK-2细胞凋亡的影响

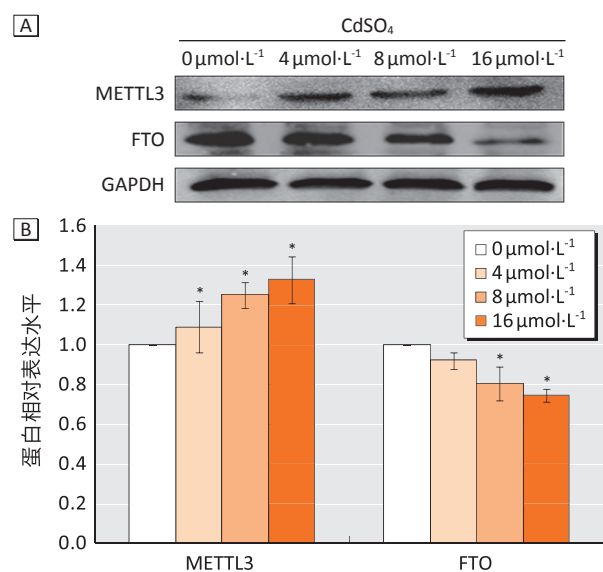
Figure 1 Effects of CdSO_4 on apoptosis of HK-2 cells

表1 CdSO_4 对HK-2细胞氧化应激相关指标的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 1 Effects of CdSO_4 on oxidative stress indicators of HK-2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

CdSO_4 浓度 / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	SOD 活性 / ($\times 10^3 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$)	GSH-PX 活性 / ($\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$)	MDA 含量 / ($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$)
0	19.91 ± 1.04	22.19 ± 6.07	66.03 ± 3.72
4	$15.41 \pm 0.96^*$	18.80 ± 7.97	87.62 ± 3.02
8	$13.57 \pm 1.42^*$	$8.74 \pm 3.91^*$	$87.69 \pm 3.05^*$
16	$10.96 \pm 0.61^*$	10.08 ± 3.07	$93.42 \pm 4.71^*$

[注] *：与“0”组比较， $P < 0.05$ 。



[注] A：免疫印迹蛋白条带代表图；B：蛋白相对表达水平。*：与“0”组比较， $P < 0.05$ 。

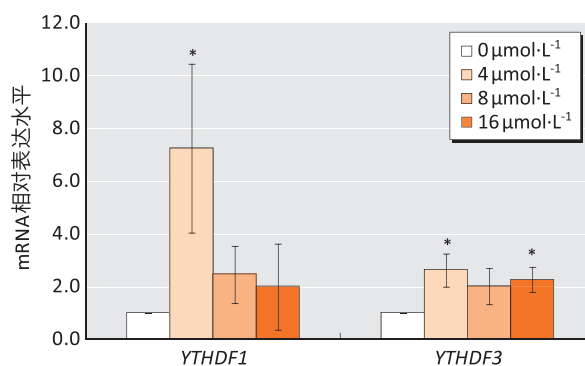
图2 CdSO_4 对HK-2细胞METTL3和FTO蛋白表达的影响

Figure 2 Effects of CdSO_4 on protein expressions of METTL3 and FTO of HK-2 cells

2.4 YTHDF1和YTHDF3 mRNA水平测定结果

如图3所示，当 CdSO_4 浓度为 $4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时，*YTHDF1*的mRNA水平升高至“0”组的7.62倍($P < 0.05$)，8、 $16 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组分别是“0”组的2.48、2.01倍，差异均无统计学意义($P > 0.05$)。与“0”组相比，4、 $16 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

CdSO_4 作用HK-2细胞时，*YTHDF3*的mRNA水平分别升高至“0”组的2.65、2.26倍($P < 0.05$)， $8 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组的mRNA水平是“0”组的2.04倍，差异无统计学意义($P > 0.05$)。



[注] *：与“0”组比较， $P < 0.05$ 。

图3 CdSO_4 对HK-2细胞YTHDF1和YTHDF2 mRNA水平的影响

Figure 3 Effects of CdSO_4 on mRNA expressions of YTHDF1 and YTHDF2 of HK-2 cells

3 讨论

细胞损伤是生物分子异常而引起细胞功能紊乱的统称，最常见的形式就是氧化损伤和细胞凋亡，是多种疾病发生发展的病理学基础。本研究的结果显示， $4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CdSO_4 处理后无细胞凋亡，在8、 $16 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CdSO_4 处理HK2细胞24 h后，细胞发生不同程度凋亡，且具有一定的剂量依赖性，这与陈嘉兴等^[7]在人胚肾上皮细胞中的研究结果一致，说明镉能呈剂量依赖性诱导细胞凋亡，引起细胞损伤。GSH-PX能特异性地催化还原型谷胱甘肽的生成，保护细胞膜免受氧化损伤，而SOD可以把细胞内有害的超氧自由基转化为过氧化氢，是细胞内清除自由基的首要物质，MDA含量则能反映细胞脂质过氧化速率和强度，是细胞过氧化损

伤的重要指标^[6-7]。本研究结果显示,在8、16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CdSO_4 处理HK2细胞24 h后,SOD和GSH-PX的活性降低,MDA含量升高,呈现出一定的剂量依赖效应,表明 CdSO_4 可削弱HK-2细胞的抗氧化能力,引起脂质过氧化物的增加,细胞内发生了较为严重的氧化应激。Wang等^[16]在小鼠间质细胞TM3中的研究结果表明,随 CdSO_4 染毒剂量的增加,氧化应激水平呈剂量依赖性增加的同时,细胞凋亡水平也增加,结合本研究中的细胞凋亡和氧化应激检测结果,有理由认为镉可能通过氧化应激和细胞凋亡诱导HK-2细胞发生损伤,细胞损伤水平随 CdSO_4 染毒剂量的增加而上升。然而,涉及细胞损伤的分子众多,镉诱发细胞损伤的具体机制还需做进一步的探讨。

m^6A 修饰酶是一系列影响 m^6A 修饰水平及生物学功能的蛋白的总称,它们能广泛参与细胞增殖、凋亡及氧化应激等多种生物学事件^[8, 13-15]。既往研究显示,过表达METTL3后,小鼠肾小管上皮细胞的抗氧化能力增强,进而抑制了黏菌素对细胞造成的损伤^[10];METTL3还通过调控炎症反应和软骨细胞的凋亡而参与骨关节炎的发展^[15];大鼠青春发育前的睾丸经邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯诱导后,FTO的mRNA水平降低,从而抑制了核因子E2相关因子2的抗氧化能力,加重睾丸损伤^[11]。在亚砷酸钠诱导的细胞增殖和凋亡紊乱中,METTL3和FTO等多个 m^6A 修饰酶水平发生改变^[13];同样,在亚砷酸钠诱导的氧化应激中, m^6A 修饰酶METTL3和FTO的水平也发生显著变化^[14];甲基结合蛋白中的YTHDF3能特异性地富集在应激颗粒中,而应激颗粒能在氧化和热休克等多种细胞应激条件下形成,参与细胞损伤^[12]。以上研究提示 m^6A 修饰酶可参与多种细胞损伤过程,然而,在镉暴露诱发的细胞损伤过程中, m^6A 修饰酶究竟如何变化目前尚不清楚。为明确 m^6A 修饰酶在镉致细胞损伤中的变化规律,本研究检测了METTL3、FTO、YTHDF1和YTHDF3等 m^6A 修饰酶在 CdSO_4 致HK2细胞损伤中的变化情况。结果显示,随 CdSO_4 浓度升高,METTL3的蛋白表达水平升高,而FTO的蛋白表达水平降低,均呈一定的剂量依赖性,表明 CdSO_4 致HK2细胞损伤过程中 m^6A 修饰的甲基转移酶和去甲基化酶的变化规律呈相反趋势,根据METTL3和FTO对 m^6A 修饰的催化特点^[8-9],我们有理由推测METTL3和FTO可能共同调控 m^6A 修饰水平,进而参与 CdSO_4 诱导的细胞损伤。此外,在 CdSO_4 处理后的HK2细胞中,YTHDF1仅在4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

CdSO_4 处理时明显高于“0”组,究其原因:一方面,4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CdSO_4 并不引起细胞损伤,YTHDF1的增加可能是某种不引起细胞损伤的应激反应;另一方面,尽管8、16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CdSO_4 处理下YTHDF1 mRNA水平未发生显著变化,但YTHDF1仍有可能参与镉引起的细胞损伤过程,因为YTHDF1作为 m^6A 修饰的结合蛋白,在细胞核和细胞质中均有分布,在发挥具体功能时,可能只是在核质中的分布比例发生变化,具体的表达水平并无改变^[8]。对于YTHDF3而言,在各个浓度处理下,YTHDF3仅在4、16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CdSO_4 作用时高于“0”组,这可能与生物学实验的结果变异较大有关,也有可能是8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CdSO_4 处理下,HK-2细胞中YTHDF3 mRNA的生成和翻译或降解达到一定的平衡,从而使YTHDF3的mRNA水平与“0”组相比无差异。值得注意的是,对于YTHDF1和YTHDF3而言,我们仅仅只是检测mRNA水平,蛋白水平如何变化以及在细胞中的核质分布情况等均不清楚,还需进一步检测蛋白水平和分布后,方能解析YTHDF1和YTHDF3在镉致HK2细胞损伤中的变化规律。

综上所述, CdSO_4 暴露可诱导HK-2细胞发生以氧化应激和细胞凋亡为表征的细胞损伤,在此过程中,METTL3、FTO、YTHDF1和YTHDF3等 m^6A 修饰酶的水平发生了不同程度的变化,提示 m^6A 修饰酶可能参与镉诱导的细胞损伤。本研究结果可为 m^6A 修饰酶在镉致肾细胞损伤中的作用研究提供初步的参考依据,鉴于本研究仅明确了部分 m^6A 修饰酶的蛋白或mRNA水平在镉致肾细胞损伤中的变化规律,在今后的研究中将进一步明确 m^6A 修饰其他酶类在镉致肾细胞损伤中的变化规律,并检测 m^6A 修饰水平,以全面探讨 m^6A 修饰及其相关酶在镉致肾细胞损伤中的具体机制。

(志谢:感谢课题组成员对本课题的支持和帮助)

参考文献

- [1] FILIPPINI T, TORRES D, LOPES C, et al. Cadmium exposure and risk of breast cancer: a dose-response meta-analysis of cohort studies [J]. Environ Int, 2020, 142: 105879.
- [2] FATIMA G, RAZA AM, HADI N, et al. Cadmium in human diseases: it's more than just a mere metal [J]. Indian J Clin Biochem, 2019, 34 (4): 371-378.
- [3] 刘宣宣,王文倩,毛伟平. 镉诱导HEK293细胞自噬和凋亡[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2016, 30 (5): 569-575.
- [4] 代娇,谷仕艳. 非编码RNA在镉毒性调控中的研究进展

- [J]. 现代预防医学, 2019, 46 (7) : 1267-1270.
- [5] WANG Y, MANDAL A K, SON Y O, et al. Roles of ROS, Nrf2, and autophagy in cadmium-carcinogenesis and its prevention by sulforaphane [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2018, 353 : 23-30.
- [6] 张国艳, 郭建勇, 康辉, 等. 镉致 HEK293 细胞氧化损伤及细胞凋亡 [J]. 环境与职业医学, 2017, 34 (2) : 148-153.
- [7] 陈嘉兴, 陈智健, 吴礼康, 等. Nrf2 信号因子在镉所致 HEK 细胞氧化损伤中的作用 [J]. 华中科技大学学报 (医学版), 2017, 46 (2) : 145-149, 154.
- [8] YANG Y, HSU P J, CHEN Y S, et al. Dynamic transcriptomic m⁶A decoration : writers, erasers, readers and functions in RNA metabolism [J]. *Cell Res*, 2018, 28 (6) : 616-624.
- [9] 谷仕艳, 曹亮, 何作顺. N⁶-甲基腺苷相关蛋白及其对非编码 RNA 调控的研究进展 [J]. 环境与职业医学, 2019, 36 (1) : 84-89.
- [10] WANG J, ISHFAQ M, XU L, et al. METTL3/m⁶A/miRNA-873-5p attenuated oxidative stress and apoptosis in colistin-induced kidney injury by modulating Keap1/Nrf2 pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10 : 517.
- [11] ZHAO T X, WANG J K, SHEN L J, et al. Increased m⁶A RNA modification is related to the inhibition of the Nrf2-mediated antioxidant response in di- (2-ethylhexyl) phthalate-induced prepubertal testicular injury [J]. *Environ Pollut*, 2020, 259 : 113911.
- [12] FU Y, ZHUANG X. m⁶A-binding YTHDF proteins promote stress granule formation [J]. *Nat Chem Biol*, 2020, 16 (9) : 955-963.
- [13] GU S, SUN D, DAI H, et al. N⁶-methyladenosine mediates the cellular proliferation and apoptosis via microRNAs in arsenite-transformed cells [J]. *Toxicol Lett*, 2018, 292 : 1-11.
- [14] ZHAO T, LI X, SUN D, et al. Oxidative stress : one potential factor for arsenite-induced increase of N⁶-methyladenosine in human keratinocytes [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2019, 69 : 95-103.
- [15] LIU Q, LI M, JIANG L, et al. METTL3 promotes experimental osteoarthritis development by regulating inflammatory response and apoptosis in chondrocyte [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 516 (1) : 22-27.
- [16] WANG S, REN X, HU X, et al. Cadmium-induced apoptosis through reactive oxygen species-mediated mitochondrial oxidative stress and the JNK signaling pathway in TM3 cells, a model of mouse Leydig cells [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2019, 368 : 37-48.

(英文编辑 : 汪源 ; 责任编辑 : 王晓宇)

(上接第 896 页)

- [16] MOHASSEB M, EBIED S, YEHIA M A, et al. Testicular oxidative damage and role of combined antioxidant supplementation in experimental diabetic rats [J]. *J Physiol Biochem*, 2011, 67 (2) : 185-194.
- [17] SCHMIEDCHEN K, PETRI A K, DRIESSEN S, et al. Systematic review of biological effects of exposure to static electric fields. Part II : invertebrates and plants [J]. *Environ Res*, 2018, 160 : 60-76.
- [18] 李俊涛, 曲晓伟, 张蜀武, 等. 益肾生精胶囊对邻苯二甲酸二丁酯致生殖功能损伤大鼠精子质量及生殖激素水平的影响 [J]. 中华男科学杂志, 2016, 22 (12) : 1110-1115.
- [19] PRATHIMA P, PAVANI R, SUKEERTHI S, et al. α -Lipoic acid inhibits testicular and epididymal oxidative damage and improves fertility efficacy in arsenic-intoxicated rats [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2018, 32 (2) : e22016.

(英文编辑 : 汪源 ; 责任编辑 : 王晓宇)