

# 镉暴露大鼠肾脏 m<sup>6</sup>A 甲基转移酶的表达及其与微小 RNA-21 和转化生长因子-β1 的关系

杨倩, 张祎凡, 韩致超, 刘如洁, 李宇星, 申炜垌, 梁宇芬, 张佳晨, 李双婧, 周涵, 雷立健

山西医科大学公共卫生学院流行病学教研室, 山西 太原 030001



DOI 10.11836/JEOM21495

## 摘要:

**[背景]** 环境污染会导致机体 N<sup>6</sup>-甲基腺苷(m<sup>6</sup>A)水平发生变化,但镉介导肾脏 m<sup>6</sup>A 水平如何变化及肾损伤分子机制还需进一步研究。

**[目的]** 探索镉暴露大鼠肾脏 m<sup>6</sup>A 修饰、(去)甲基转移酶与微小 RNA-21(miR-21)和转化生长因子-β1(TGF-β1)表达水平的关系。

**[方法]** 24 只 SPF 级雄性 SD 大鼠随机分为 4 组,每组 6 只,分别皮下注射 2.0、1.0、0.5 mg·kg<sup>-1</sup> 氯化镉溶液和等体积生理盐水 2 周,每周 7 d。采用酶联免疫吸附试验检测大鼠尿液中 N-乙酰-β-D-葡萄糖苷酶(UNAG)和尿白蛋白(UALB)、肾脏 TGF-β1 和 m<sup>6</sup>A 修饰水平。采用脲酶法测定大鼠血浆尿素氮(BUN)水平。分别采用硫代巴比妥酸法、水溶性四唑盐法和比色法检测肾脏氧化应激指标丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的水平。采用逆转录聚合酶链反应测定肾组织纤维化因子 TGF-β1 mRNA 和 m<sup>6</sup>A(去)甲基转移酶水平。采用荧光定量聚合酶链反应检测肾组织 miR-21 的表达水平。

**[结果]** 2 周染毒结束后,2.0、1.0 mg·kg<sup>-1</sup> 氯化镉组的大鼠体重减轻,2.0 mg·kg<sup>-1</sup> 氯化镉组肾脏系数、BUN、UNAG 及 TGF-β1 的 mRNA 和蛋白水平均升高( $P < 0.05$ )。肾脏 m<sup>6</sup>A 修饰和甲基转移酶 METTL3、METTL14、Wilms 肿瘤 1-相关蛋白(WTAP)及 miR-21 表达水平在 2.0、1.0 mg·kg<sup>-1</sup> 氯化镉组升高,与对照组差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。相关性分析显示 m<sup>6</sup>A 修饰水平与 SOD( $r = -0.4489$ )和 GSH-Px( $r = -0.4874$ )呈负相关( $P < 0.05$ ),METTL3 与 MDA 呈负相关( $r = -0.5158$ ,  $P < 0.05$ ),而 FTO 与 GSH-Px 之间具有正相关关系( $r = 0.4802$ ,  $P < 0.05$ )。此外,miR-21 与 METTL3( $r = 0.7491$ )、METTL14( $r = 0.6157$ )和 WTAP( $r = 0.6660$ )表达水平呈正相关(均  $P < 0.05$ ),TGF-β1 与 METTL3 表达水平也具有正相关关系( $r = 0.5025$ ,  $P < 0.05$ ),但与 FTO 呈负相关关系( $r = -0.5634$ ,  $P < 0.05$ )。

**[结论]** 镉可致大鼠肾脏组织 m<sup>6</sup>A 修饰和 METTL3、METTL14、WTAP 及 miR-21 表达水平上调,提示 m<sup>6</sup>A 和 miR-21 可能与镉诱导的肾纤维化有关。

**关键词:** 镉;肾;N<sup>6</sup>-甲基腺苷;转化生长因子-β1;微小 RNA-21;甲基转移酶;去甲基转移酶

**Expressions of m<sup>6</sup>A methyltransferases and their associations with microR-21 and transforming growth factor-β1 in kidney of rats exposed to cadmium** YANG Qian, ZHANG Yifan, HAN Zhichao, LIU Rujie, LI Yuxing, SHEN Weitong, LIANG Yufen, ZHANG Jiachen, LI Shuangjing, ZHOU Han, LEI Lijian (Department of Epidemiology, School of Public Health, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China)

## Abstract:

**[Background]** Environmental pollutants can affect N<sup>6</sup>-methyladenosine (m<sup>6</sup>A) level in the body, but the change of m<sup>6</sup>A level in kidney after being exposed to cadmium (Cd) and the molecular mechanism of renal injury need to be further studied.

**[Objective]** To analyze the associations of m<sup>6</sup>A modification and methyltransferases/demethylases with microRNA-21 (miR-21) and transforming growth factor-β1 (TGF-β1) in kidney of rats exposed to Cd.

**[Methods]** Twenty-four SPF male SD rats were divided into 4 groups, with 6 rats in each group, and were exposed to Cd by subcutaneous injection of 2.0, 1.0, and 0.5 mg·kg<sup>-1</sup> cadmium chloride (CdCl<sub>2</sub>) and equal volume of normal saline for 2 weeks, 7 d a week, respectively. The levels of N-acetyl-β-D-glucosidase (UNAG) and albumin (UALB) in urine, and the levels of m<sup>6</sup>A methylation

## 基金项目

国家自然科学基金项目 (81872701)

## 作者简介

杨倩(1996—),女,硕士生;

E-mail: yangqian2424@126.com

## 通信作者

雷立健, E-mail: wwdlijian@sxmu.edu.cn

## 伦理审批

已获取

## 利益冲突

无申报

## 收稿日期

2021-10-17

## 录用日期

2022-05-06

## 文章编号

2095-9982(2022)08-0902-06

## 中图分类号

R114

## 文献标志码

A

## ► 引用

杨倩, 张祎凡, 韩致超, 等. 镉暴露大鼠肾脏 m<sup>6</sup>A 甲基转移酶的表达及其与微小 RNA-21 和转化生长因子-β1 的关系 [J]. 环境与职业医学, 2022, 39(8): 902-907.

## ► 本文链接

[www.jeom.org/article/cn/10.11836/JEOM21495](http://www.jeom.org/article/cn/10.11836/JEOM21495)

## Funding

This study was funded.

## Correspondence to

LEI Lijian, E-mail: wwdlijian@sxmu.edu.cn

## Ethics approval

Obtained

## Competing interests

None declared

## Received

2021-10-17

## Accepted

2022-05-06

## ► To cite

YANG Qian, ZHANG Yifan, HAN Zhichao, et al. Expressions of m<sup>6</sup>A methyltransferases and their associations with microR-21 and transforming growth factor-β1 in kidney of rats exposed to cadmium[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2022, 39(8): 902-907.

## ► Link to this article

[www.jeom.org/article/en/10.11836/JEOM21495](http://www.jeom.org/article/en/10.11836/JEOM21495)

and TGF- $\beta$ 1 in kidney were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The level of blood urea nitrogen (BUN) was measured by urease method. The levels of renal oxidative stress indicators such as malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), and glutathione peroxidase (GSH-Px) were detected by total bile acid method, water-soluble tetrazolium assay, and colorimetric method respectively. The relative levels of TGF- $\beta$ 1, methyltransferases, and demethylases in kidney were measured by reverse transcription-polymerase chain reaction. The expression of miR-21 in kidney was detected by fluorescent quantitative polymerase chain reaction.

**[Results]** After 2 weeks of exposure to Cd, the body weights of rats in the 2.0 and 1.0 mg·kg<sup>-1</sup> cadmium chloride groups decreased, and the ratio of kidney/body weight and the levels of BUN, UNAG, and TGF- $\beta$ 1 mRNA and protein increased in the 2.0 mg·kg<sup>-1</sup> cadmium chloride group ( $P < 0.05$ ). The expression levels of m<sup>6</sup>A modification, methyltransferases METTL3, METTL14, Wilms' tumor 1-associated protein (WTAP), and miR-21 were increased both in the 2.0 and 1.0 mg·kg<sup>-1</sup> cadmium chloride groups, with significant differences compared with the control group ( $P < 0.05$ ). The results of correlation analysis showed that the m<sup>6</sup>A modification level was negatively correlated with SOD ( $r = -0.4489$ ,  $P < 0.05$ ) and GSH-Px ( $r = -0.4874$ ,  $P < 0.05$ ), METTL3 was negatively correlated with MDA ( $r = -0.5158$ ,  $P < 0.05$ ), while there was a positive correlation between FTO and GSH-Px ( $r = 0.4802$ ,  $P < 0.05$ ). In addition, miR-21 was positively correlated with METTL3 ( $r = 0.7491$ ), METTL14 ( $r = 0.6157$ ), and WTAP ( $r = 0.6660$ ) ( $P < 0.05$ ), TGF- $\beta$ 1 was positively correlated with METTL3 ( $r = 0.5025$ ,  $P < 0.05$ ) but negatively correlated with FTO ( $r = -0.5634$ ,  $P < 0.05$ ).

**[Conclusion]** Cd can induce m<sup>6</sup>A methylation and up-regulation of METTL3, METTL14, WTAP, and miR-21 expression levels in rat kidney tissues, indicating that m<sup>6</sup>A and miR-21 may be associated with Cd-induced renal fibrosis.

**Keywords:** cadmium; kidney; N<sup>6</sup>-methyladenosine; transforming growth factor- $\beta$ 1; microRNA-21; methyltransferase; demethylase

镉是一种在全球多行业应用范围很广的重金属, 对人群健康危害的特点是低剂量、长期和慢性中毒<sup>[1-2]</sup>。肾脏是镉的靶器官之一, 也是主要的蓄积器官, 镉蓄积在肾脏可引起以多尿和蛋白尿为特征的近端小管功能紊乱, 进而导致肾脏纤维化并加重肾癌风险<sup>[3]</sup>。镉诱导肾损伤的最主要机制为氧化应激<sup>[4]</sup>。慢性镉暴露通过氧化应激介导细胞毒性, 诱导机体纤维化标志的表达改变, 导致肾脏纤维化的病理学改变, 引起肾损伤<sup>[5]</sup>。

N<sup>6</sup>-甲基腺苷(N<sup>6</sup>-methyladenosine, m<sup>6</sup>A)指 RNA 腺嘌呤上第 6 位氮原子衔接的一个氢原子被甲基基团(-CH<sub>3</sub>)所取代。近年来大量证据表明氧化应激作为最普遍的细胞应激类型, 可能改变 m<sup>6</sup>A 的水平<sup>[6]</sup>。m<sup>6</sup>A 修饰对热休克、紫外线、缺氧等环境变化具有动态反应<sup>[7]</sup>。应激条件下, 几乎所有的 YTH 结构域家族成员 2(YTH domain family member 2, YTHDF2)分子都从细胞质重新定位到细胞核中, YTHDF2 蛋白水平显著增加, 促使了应激诱导转录物的 5'非翻译区(5' untranslated region, 5'UTR)甲基化, 为应激条件下 mRNA 翻译提供了机制<sup>[8]</sup>。m<sup>6</sup>A 甲基化调节转化生长因子- $\beta$ 1(transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1)mRNA 的稳定性和翻译<sup>[9]</sup>。研究发现在非酒精性脂肪肝大鼠肝脏中, TGF- $\beta$ 1 上调与甲基转移酶 3(methyltransferase like 3, METTL3)、甲基转移酶 14(methyltransferase like 14, METTL14)上调和整体 m<sup>6</sup>A 超甲基化密切相关<sup>[10]</sup>。此外, 初级前体微小 RNA 能被 m<sup>6</sup>A 甲基转移酶 METTL3 标记, 并加工为成熟的微小 RNA(microRNA, miRNA, miR)<sup>[11]</sup>。镉暴露可致肾脏 miR-21 水平升高, miR-21 与 TGF- $\beta$ 1 相互作用调控纤维化的进展<sup>[1,12]</sup>。因此, miR-

21 和 TGF- $\beta$ 1 的表达作为 m<sup>6</sup>A 修饰的下游事件可能受 m<sup>6</sup>A 修饰的影响, 但关于镉引起肾脏 m<sup>6</sup>A 修饰及(去)甲基转移酶水平变化尚未完全阐明。

本研究拟通过建立动物模型, 检测镉暴露大鼠肾脏组织 m<sup>6</sup>A 修饰, 甲基转移酶 METTL3、METTL14、Wilm 肿瘤 1-相关蛋白(Wilms' tumor 1-associated protein, WTAP), 去甲基转移酶 AlkB 同源蛋白 5(AlkB homologue 5, ALKBH5)、脂肪和肥胖相关蛋白(fat mass and obesity-associated protein, FTO)的表达水平, 分析 m<sup>6</sup>A、(去)甲基转移酶与 miR-21 和 TGF- $\beta$ 1 表达水平的关系, 为镉暴露致肾纤维化的分子机制提供新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物染毒

24 只体重 180~200 g SPF 级雄性 SD 大鼠(约 40 日龄)购于北京兴旺动物养殖场, 合格证编号: SCXK(京)2019-0010。染毒前将大鼠置于饲养笼(苏州冯氏实验动物设备有限公司, 中国)适应性饲养一周。采用成组设计, 按体重将大鼠随机分为 4 组, 分别皮下注射 2.0、1.0、0.5 mg·kg<sup>-1</sup> 氯化镉(上海麦克林生化科技有限公司, 中国)和生理盐水, 共 2 周, 每周 7 d, 每天称量一次大鼠体重。本研究经山西医科大学医学伦理委员会批准(编号: 2017LL074), 实验严格遵循国家有关实验动物管理和使用的规定。

### 1.2 生物样品采集

染毒结束后将大鼠置于代谢笼(苏州冯氏实验动物设备有限公司, 中国)收集 24 h 尿液。禁食 12 h 后用质量分数为 10%的水合氯醛溶液(天津市化学试剂厂,

中国)麻醉处死大鼠,腹主动脉收集抗凝血。摘取大鼠双侧肾脏,剔除薄膜,预冷生理盐水漂洗后滤纸吸干水分进行称重。随后将肾脏分成均等的8份,−80℃保存待测。肾脏系数(%)=双侧肾重(g)/大鼠体重(kg)×100%。

### 1.3 肾功能及纤维化水平测定

大鼠24 h尿液离心后仔细收集上清。采用肌氨酸氧化酶法试剂盒(南京建成生物科技有限公司,中国)测定尿肌酐水平。采用酶联免疫吸附试剂盒检测尿N-乙酰-β-D-葡萄糖苷酶(urinary N-acetyl-β-D-glucosidase, UNAG)(武汉基因美生物科技有限公司,中国)和尿白蛋白(urinary albumin, UALB)水平(江苏酶免实业有限公司,中国),并以尿肌酐校正。采用脲酶法试剂盒(南京建成生物科技有限公司,中国)测定血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)水平。采用酶联免疫吸附试剂盒(博士德生物工程有限公司,中国)检测肾组织匀浆中TGF-β1蛋白水平。所有操作均严格按照试剂盒说明书进行。

### 1.4 氧化应激指标检测

按1:9的比例采用预冷的生理盐水制备质量分数为10%的肾组织匀浆,400×g离心15 min后仔细取上清。分别采用硫代巴比妥酸法、水溶性四唑盐法和比色法试剂盒(南京建成生物科技有限公司,中国)检测上清中丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)水平。采用蛋白定量试剂盒(北京赛文创新生物科技有限公司,中国)测定肾组织匀浆总蛋白浓度。所有操作均严格按照试剂盒说明书进行。

### 1.5 m<sup>6</sup>A 甲基化水平检测

采用EpiQuik™ m<sup>6</sup>A RNA甲基化定量试剂盒(Epigentek,美国)检测肾脏组织m<sup>6</sup>A甲基化水平。96孔板中加入80 μL结合溶液,再分别加入2 μL阴性对照(不含m<sup>6</sup>A的RNA)、2 μL阳性对照(m<sup>6</sup>A寡聚体依次稀释为0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5 ng·μL<sup>-1</sup>)和200 ng肾脏总RNA,37℃孵育90 min,依次加入50 μL捕获抗体溶液、50 μL检测抗体溶液、50 μL增强剂溶液、100 μL显色溶液、100 μL终止液,在450 nm的微孔板读数器上读数(TECAN,瑞士)。计算m<sup>6</sup>A在200 ng总RNA中的百分比。

### 1.6 逆转录聚合酶链反应测定(去)甲基转移酶及肾纤维化因子表达水平

采用柱式法试剂盒(Promega,美国)提取大鼠肾组织RNA。使用紫外分光光度计(PerkinElmer,美国)测定RNA浓度和纯度。采用反转录试剂盒(Promega,

美国)将RNA反转录为cDNA:25℃退火5 min;42℃扩展60 min;70℃失活15 min;cDNA 10倍稀释后分装于−80℃保存。

PCR试剂盒(莫纳生物科技有限公司,中国)配制20 μL·孔<sup>-1</sup>的反应体系混合物:2×SYBR Green混合液10 μL、cDNA 10~20 ng,正向引物和反向引物(10×)各0.4 μL,无酶水补至20 μL,每个样品设置3个复孔。PCR扩增仪(Bio-Rad,美国)上采用三步法扩增,程序如下:95℃预变性5 min;95℃变性10 s;57℃(*METTL3*、*METTL14*和*ALKBH5*)或60℃(*FTO*、*WTAP*和*TGF-β1*)退火;72℃延伸30 s;40个循环;熔解曲线由65℃升至95℃,内参选用β-actin。 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算(去)甲基转移酶和肾纤维化因子的相对含量。引物由上海生工生物工程股份有限公司合成,序列见表1。

表1 PCR引物序列

Table 1 Primer sequences of PCR

| 目的基因    | 正向                   | 反向                   |
|---------|----------------------|----------------------|
| β-actin | GGGAAATCGTGCCTGACATT | GCGGCAGTGGCCATCTC    |
| ALKBH5  | ACGGCCTCAGGACATCAAAG | AAGCATAGCTGGGTGGCAAT |
| FTO     | AGGTCGAGTTTGAGTGGCTG | TTCACGAAGCACGGCATTG  |
| METTL3  | ATGTGCAGCCCACTGGATT  | CTGTGCTTAAACCGGGCAAC |
| METTL14 | GCAGAAACCTACGCGTCTA  | CACCACGGTCAGACTTGGAT |
| TGF-β1  | CGCAACAACGCAATCTATGA | CCAAGGTAACGCCAGGAAT  |
| WTAP    | CTCGCCTCGTCTCTCTGG   | CATCTTGATCCCGAGACGC  |

### 1.7 荧光定量PCR检测miR-21表达水平

采用miRNA提取试剂盒(哈尔滨新海基因检测有限公司,中国)提取各组大鼠肾组织miRNA。随后采用加尾法试剂盒(广州复能基因有限公司,中国)对miRNA进行反转录。采用PCR反应试剂盒(广州复能基因有限公司,中国)制备PCR反应液:实时定量PCR(quantitative real-time PCR, qPCR)混合液10 μL, All-in-One™ miRNA qPCR引物(2 μmol·L<sup>-1</sup>)2 μL, Universal Adaptor PCR引物(2 μmol·L<sup>-1</sup>)2 μL, 第一链cDNA 2 μL, 无酶水加至20 μL。程序设置为:95℃预变性10 min;95℃变性10 s;60℃退火20 s;72℃延伸10 s;40个循环;熔解曲线温度均由65℃升至95℃,后续进行溶解曲线分析。

### 1.8 统计学分析

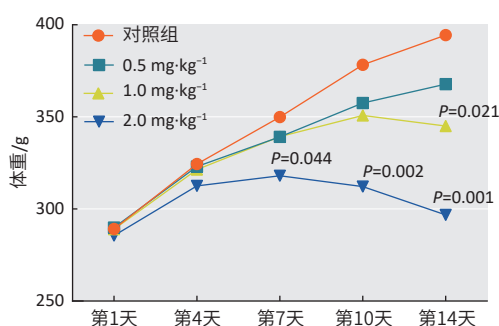
采用GraphPad 8.0.1和R 4.0进行统计学分析,正态资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,非正态资料采用 $M(P_{25}, P_{75})$ 描述。组间比较采用单因素方差分析或非参数Kruskal-Wallis H检验, Dunnett's t检验比较对照组与处理组间的差异。采用Pearson或Spearman相关进行相关性分析。检验水准α=0.05。



## 2 结果

### 2.1 大鼠的一般情况及肾功能改变

在染毒第 1、4、7、10、14 天称量大鼠体重, 可见  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  氯化镉组的大鼠体重从第 7 天开始下降,  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  氯化镉组的大鼠体重在第 14 天低于对照组, 见图 1 和表 2。组间比较发现各组大鼠肾脏系数、UNAG 和 BUN 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。两两比较显示, 与对照组比较,  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  氯化镉组的大鼠肾脏系数增大 ( $P < 0.05$ ), UNAG 和 BUN 水平升高 ( $P < 0.05$ )。各组间 UALB 水平未见差异有统计学意义。见表 2。



[注]  $P$ : 与同一时期对照组的体重相比。

图 1 大鼠染镉期间体重变化图 ( $n=6$ )

Figure 1 Weight changes of rats exposed to Cd ( $n=6$ )

表 2 第 14 天不同剂量镉染毒大鼠体重与肾功能比较 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 2 Comparison of body weight and renal function of rats exposed to Cd on day 14 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

| 分组                                           | 体重/g          | 肾脏系数/%     | UALB/<br>( $\text{ng} \cdot \mu\text{mol}^{-1}$ ,<br>肌酐校正) | UNAG/<br>( $\text{pg} \cdot \mu\text{mol}^{-1}$ ,<br>肌酐校正) | BUN/<br>( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) |
|----------------------------------------------|---------------|------------|------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| 对照组                                          | 394.38±44.61  | 6.95±0.40  | 385.96±68.27                                               | 11.57±1.61                                                 | 5.64±1.52                                     |
| 0.5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$<br>氯化镉组 | 367.78±22.69  | 6.94±0.59  | 366.17±109.90                                              | 11.97±3.45                                                 | 6.43±1.11                                     |
| 1.0 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$<br>氯化镉组 | 345.12±36.78* | 7.64±0.88  | 336.46±143.94                                              | 10.56±3.19                                                 | 6.07±0.93                                     |
| 2.0 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$<br>氯化镉组 | 296.80±29.93* | 8.13±0.75* | 435.86±133.43                                              | 16.83±3.74*                                                | 7.42±1.64*                                    |
| $P$                                          | <0.001        | 0.012      | 0.499                                                      | 0.012                                                      | 0.135                                         |

[注]\*: 与对照组相比,  $P < 0.05$ 。

### 2.2 大鼠肾组织氧化应激水平比较

各组大鼠肾组织 MDA 差异存在统计学意义 ( $P < 0.05$ ),  $0.5$ 、 $1.0$ 、 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  氯化镉组的大鼠肾组织 MDA 水平较对照组降低,  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  氯化镉组 SOD 活性低于对照组 ( $P < 0.05$ ), 见表 3。

### 2.3 大鼠肾组织纤维化因子 $TGF-\beta 1$ mRNA 及蛋白水平比较

两两比较显示,  $0.5$  和  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  氯化镉组的  $TGF-\beta 1$  mRNA 表达水平较对照组升高 ( $P < 0.05$ )。  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$

氯化镉组  $TGF-\beta 1$  蛋白水平高于对照组 ( $P < 0.05$ )。见表 4。

表 3 不同剂量镉染毒大鼠肾组织氧化应激指标水平比较 ( $n=6$ )

Table 3 Comparison of oxidative stress indicator levels in kidney tissues of rats exposed to Cd ( $n=6$ )

| 分组                                           | MDA/( $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ ,<br>以蛋白计)<br>$\bar{x} \pm s$ | SOD/( $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ )<br>$\bar{x} \pm s$ | GSH-Px/( $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ )<br>$M(P_{25}, P_{75})$ |
|----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| 对照组                                          | 2.86±1.05                                                               | 51.21±12.37                                                | 125.67(109.10, 137.25)                                            |
| 0.5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$<br>氯化镉组 | 1.72±0.68*                                                              | 45.47±7.32                                                 | 99.47(91.96, 106.61)                                              |
| 1.0 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$<br>氯化镉组 | 1.86±0.86*                                                              | 39.62±5.93*                                                | 106.82(83.41, 122.49)                                             |
| 2.0 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$<br>氯化镉组 | 1.63±0.41*                                                              | 48.22±7.65                                                 | 104.39(94.18, 145.22)                                             |
| $P$                                          | 0.038                                                                   | 0.147                                                      | 0.211                                                             |

表 4 不同剂量镉染毒大鼠肾纤维化因子  $TGF-\beta 1$  mRNA 及蛋白表达水平 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 4 Expression levels of  $TGF-\beta 1$  mRNA and protein in kidney tissues of rats exposed to Cd ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

| 分组                                        | $TGF-\beta 1$ mRNA | $TGF-\beta 1$ 蛋白/( $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) |
|-------------------------------------------|--------------------|-------------------------------------------------------|
| 对照组                                       | 1.00               | 189.03±91.38                                          |
| 0.5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 氯化镉组 | 2.19±1.04*         | 289.81±79.46                                          |
| 1.0 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 氯化镉组 | 1.44±0.47          | 269.84±72.32                                          |
| 2.0 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 氯化镉组 | 2.26±1.26*         | 323.68±137.55*                                        |
| $P$                                       | 0.060              | 0.141                                                 |

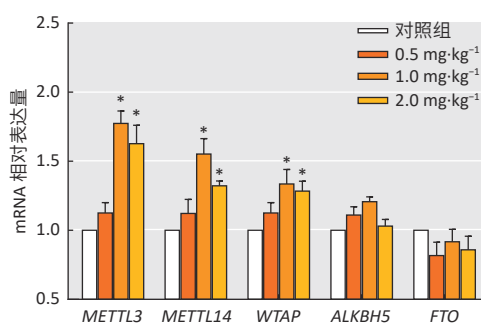
[注]\*: 与对照组相比,  $P < 0.05$ 。

### 2.4 大鼠肾组织 $m^6A$ 甲基化与(去)甲基转移酶 mRNA 水平比较

$1.0$  和  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  氯化镉组大鼠肾脏  $m^6A$  甲基化水平的  $M(P_{25}, P_{75})$  分别为  $3.31(2.77, 4.15)$ 、 $2.39(0.51, 5.05) \text{ ng}$ , 均高于对照组的  $0.62(0.14, 1.50)$  ( $P < 0.05$ )。荧光定量 PCR 检测发现, 甲基转移酶  $METTL3$ 、 $METTL14$  和  $WTAP$  mRNA 在  $1.0$ 、 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  氯化镉组的表达水平高于对照组 ( $P < 0.05$ )。去甲基转移酶  $ALKBH5$  和  $FTO$  mRNA 的表达水平在各组中未见统计学差异 ( $P > 0.05$ )。见图 2。

### 2.5 大鼠肾组织 $m^6A$ 甲基化及(去)甲基转移酶水平与氧化应激水平的相关性

Spearman 相关性分析结果显示:  $m^6A$  修饰与抗氧化酶 SOD ( $r = -0.4489$ ) 和 GSH-Px ( $r = -0.4874$ ) 呈负相关 ( $P < 0.05$ )。  $METTL3$  与 MDA 呈负相关 ( $r = -0.5158$ ,  $P < 0.05$ ), 而  $FTO$  与 GSH-Px 呈正相关 ( $r = 0.4802$ ,  $P < 0.05$ ), 其他(去)甲基转移酶与氧化应激指标未见相关性 ( $P > 0.05$ )。见图 3。



[注]\*: 与对照组相比,  $P < 0.05$ 。

图2 大鼠肾组织 m<sup>6</sup>A (去) 甲基转移酶 mRNA 表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

Figure 2 Comparison of mRNA expression levels of m<sup>6</sup>A methyltransferases and demethylases in rat kidney tissues ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

| MDA       | SOD       | GSH-Px    |                  |
|-----------|-----------|-----------|------------------|
| -0.268 5  | -0.448 9* | -0.487 4* | m <sup>6</sup> A |
| -0.515 8* | -0.253 2  | -0.289 6  | METTL3           |
| -0.290 4  | -0.064 3  | -0.085 2  | METTL14          |
| -0.113 8  | 0.092 2   | -0.153 3  | WTAP             |
| -0.291 2  | 0.088 3   | -0.347 0  | ALKBH5           |
| 0.037 2   | 0.017 0   | 0.480 2*  | FTO              |

[注]\*:  $P < 0.05$ 。

图3 m<sup>6</sup>A 甲基化水平及 (去) 甲基转移酶与氧化应激水平相关性热图

Figure 3 Heatmap of correlations of m<sup>6</sup>A methylation level, methyltransferases, and demethylases with oxidative stress

## 2.6 大鼠肾组织 miR-21 表达量和甲基转移酶的相关性

0.5、1.0、2.0 mg·kg<sup>-1</sup> 氯化镉组大鼠肾组织 miR-21 相对表达水平分别为 1.39±0.68、2.28±1.26、2.28±1.18, 两两比较显示 1.0、2.0 mg·kg<sup>-1</sup> 氯化镉组 miR-21 水平高于对照组 ( $P < 0.05$ )。Spearman 相关性分析发现: miR-21 表达水平与 METTL3 ( $r=0.749\ 1$ )、METTL14 ( $r=0.615\ 7$ ) 和 WTAP ( $r=0.666\ 0$ ) 表达水平呈正相关 (均  $P < 0.05$ ); TGF-β1 与 METTL3 呈正相关 ( $r=0.502\ 5$ ,  $P < 0.05$ ), 但与 FTO 呈负相关关系 ( $r=-0.563\ 4$ ,  $P < 0.05$ )。见图 4。

| miR-21   | TGF-β1    |                  |
|----------|-----------|------------------|
| 0.357 9  | 0.300 2   | m <sup>6</sup> A |
| 0.749 1* | 0.502 5*  | METTL3           |
| 0.615 7* | 0.374 7   | METTL14          |
| 0.666 0* | 0.282 7   | WTAP             |
| 0.130 2  | 0.171 2   | ALKBH5           |
| 0.129 8  | -0.563 4* | FTO              |
| 1.000 0  | 0.258 9   | miR-21           |
| 0.258 9  | 1.000 0   | TGF-β1           |

[注]\*:  $P < 0.05$ 。

图4 m<sup>6</sup>A 修饰及 (去) 甲基转移酶与 miR-21 和 TGF-β1 相关性热图

Figure 4 Heatmap of correlations of m<sup>6</sup>A methylation, methyltransferases, demethylases with miR-21 and TGF-β1

## 3 讨论

近年来, 多数研究均表明了环境污染会导致机体内 m<sup>6</sup>A 的升高, 如香烟烟雾、二噁英等<sup>[13-14]</sup>。尽管分子机制尚待阐明, 但 m<sup>6</sup>A 作为一种新的疾病生物标志物具有潜在的应用前景。本研究发现镉暴露使大鼠肾功能受损, 肾纤维化指标 TGF-β1 水平上升, 肾组织 m<sup>6</sup>A 水平升高, 以甲基转移酶 METTL3、METTL14 和 WTAP 水平改变最为显著。本研究也证实了 METTL3、METTL14 和 WTAP 与 miR-21 之间具有正相关关系。此外, METTL3 与 TGF-β1 也呈正相关。

体重作为生长发育的一个重要而敏感的指标, 反映外来化学物质对动物的毒性作用和对整体情况的影响。本次实验两周氯化镉染毒结束时, 1.0、2.0 mg·kg<sup>-1</sup> 氯化镉组的大鼠体重与对照组相比分别下降 10% 和 25% 左右, 且随着镉染毒剂量和时间的增加, 对大鼠体重的抑制效应愈加明显, 表明镉对 SD 大鼠的体重增长有明显的抑制作用, 与相关报道一致<sup>[15]</sup>。

氧化应激是镉致肾损伤的重要机制, SOD 和 GSH-Px 通常作为一种氧化应激反应的保护酶, 可以抵抗外来应激物的刺激反应<sup>[16]</sup>。本研究通过对各组大鼠肾组织氧化应激水平进行比较, 发现随染毒剂量的升高, MDA 呈下降趋势, 提示镉染毒致大鼠肾脏氧化和抗氧化系统失衡。本研究中 2.0 mg·kg<sup>-1</sup> 氯化镉组的大鼠 UNAG 和 BUN 升高, 说明大鼠肾功能出现了损伤。本研究中镉染毒致大鼠肾脏 miR-21 与 TGF-β1 水平均升高。miR-21 作为反映早期肾纤维化的一个可靠标志物, 可能通过正向调控 TGF-β/Smad 信号通路从而诱导肾间质纤维化<sup>[17]</sup>, 具体机制需进一步研究。

本研究发现镉染毒会导致大鼠肾脏组织 m<sup>6</sup>A 修饰及甲基转移酶表达发生改变。李萌竹等<sup>[18]</sup>对人肾小管上皮细胞进行硫酸镉染毒后, 发现 METTL3、METTL14、METTL16 表达水平升高。陈静等<sup>[19]</sup>发现小鼠肾纤维化模型中 m<sup>6</sup>A 水平上调, METTL14 可能是关键调控酶。以上结果均与本研究结果相似。本研究中相关性分析显示 m<sup>6</sup>A 水平与抗氧化酶 SOD 和 GSH-Px 呈正相关, METTL3 与 MDA 呈负相关, 提示 m<sup>6</sup>A 与镉诱导的肾脏氧化应激失衡存在一定的关联。有研究表明 METTL3 过表达对黏菌素诱导的氧化应激和细胞凋亡起保护作用<sup>[6, 20]</sup>。本研究中, 1.0 mg·kg<sup>-1</sup> 组 METTL3 水平最高, 而肾损伤和肾纤维化指标水平低于对照组, 可能是 METTL3 过表达对氧化应激和细胞凋亡发挥了一定的保护作用, 但尚需进一步的研究证实。

相关性分析发现 miR-21 与 METTL3、METTL14 和

WTAP 呈正相关。Alarcón 等<sup>[11]</sup>证实 METTL3 缺失减少了 RNA 结合蛋白与初级 miRNA 的结合,导致成熟体 miRNA 的整体减少,这可以解释大鼠镉染毒后肾脏组织 METTL3 和 miR-21 均升高且呈正相关。另有研究表明在输尿管结扎的小鼠模型中, METTL3 通过促进 miR-21-5p 成熟促进阻塞性肾纤维化的发展<sup>[21]</sup>,提示在肾纤维化过程中 METTL3 可能对 miR-21 具有一定的调控作用。

TGF-β1 是一种主要的促纤维化细胞因子, TGF-β1 mRNA 上的 m<sup>6</sup>A 甲基化增强了其 mRNA 的衰减并减少了翻译,这可能是本研究中 1.0 mg·kg<sup>-1</sup> 组甲基转移酶和 m<sup>6</sup>A 呈高水平,而 TGF-β1 的基因和蛋白水平较低的原因,使得染毒剂量与基因表达呈现复杂的态势<sup>[9]</sup>。另外,在 TGF-β1 介导的肠癌细胞上皮间充质转化中, m<sup>6</sup>A 甲基转移酶 METTL3 起关键作用,研究发现敲除 METTL3 可以抑制 TGF-β1 诱导的细胞上皮间充质转化<sup>[22]</sup>。本研究发现镉染毒后大鼠 TGF-β1 mRNA 与 METTL3 均上调且呈正相关,提示 TGF-β1 与 METTL3 可能存在生物学关联。

综上所述,镉暴露会导致大鼠肾功能受损,肾脏组织 m<sup>6</sup>A 甲基化和甲基转移酶 METTL3、METTL14、WTAP 及 miR-21 水平上调,提示 m<sup>6</sup>A 和 miR-21 可能与镉诱导的肾纤维化有关。本研究仅初步证实了镉暴露大鼠肾组织中 m<sup>6</sup>A 修饰及(去)甲基转移酶的水平,在今后的研究中,将检测镉暴露 m<sup>6</sup>A 结合蛋白 YTHDF1、YTHDF2 等在肾脏中的表达水平,并进一步探索 m<sup>6</sup>A 在镉诱导的肾纤维化的具体机制,是否对 miR-21 和 TGF-β1 通路具有调控作用以及如何调控。

(志谢:感谢课题组所有成员对本次研究的支持和帮助。)

## 参考文献

- [1] 雷立健, 康辉, 郭建勇, 等. 环境镉暴露致肾功能损伤: TGF-β1/Smad3 及其相关微小RNA的作用[J]. 环境与职业医学, 2019, 36(6): 511-518.  
LEI LJ, KANG H, GUO JY, et al. Renal impairment induced by environmental cadmium exposure: Role of TGF-β1/Smad3 and related microRNAs[J]. J Environ Occup Med, 2019, 36(6): 511-518.
- [2] SUHANI I, SAHAB S, SRIVASTAVA V, et al. Impact of cadmium pollution on food safety and human health[J]. Curr Opin Toxicol, 2021, 27: 1-7.
- [3] HSUEH YM, LIN YC, HUANG YL, et al. Effect of plasma selenium, red blood cell cadmium, total urinary arsenic levels, and eGFR on renal cell carcinoma[J]. Sci Total Environ, 2021, 750: 141547.
- [4] 金媛媛, 周蓉, 匡兴亚. 镉致肾损伤机制的研究进展[J]. 环境与职业医学, 2018, 35(2): 180-184.  
JIN YY, ZHOU R, KUANG XY. Research progress on renal injury induced by cadmium[J]. J Environ Occup Med, 2018, 35(2): 180-184.
- [5] TSUTSUMI T, ISHIHARA A, YAMAMOTO A, et al. The potential protective role of lysophospholipid mediators in nephrotoxicity induced by chronically exposed cadmium[J]. Food Chem Toxicol, 2014, 65: 52-62.
- [6] 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.
- HE ZS, LI MZ, GU SY. Changes of oxidative stress and expression of N6-methyladenosine modification enzymes during cell damage induced by cadmium in renal cells[J]. J Environ Occup Med, 2020, 37(9): 897-902.
- [7] YU J, LI Y, WANG T, et al. Modification of N6-methyladenosine RNA methylation on heat shock protein expression[J]. PLoS One, 2018, 13(6): e0198604.
- [8] ZHOU J, WAN J, GAO X, et al. Dynamic m<sup>6</sup>A mRNA methylation directs translational control of heat shock response[J]. Nature, 2015, 526(7574): 591-594.
- [9] LI J, CHEN F, PENG Y, et al. N6-methyladenosine regulates the expression and secretion of TGFβ1 to affect the epithelial-mesenchymal transition of cancer cells[J]. Cells, 2020, 9(2): 296.
- [10] FENG Y, DONG H, SUN B, et al. METTL3/METTL14 transactivation and m<sup>6</sup>A-dependent TGF-β1 translation in activated Kupffer cells[J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2021, 12(3): 839-856.
- [11] ALARCÓN CR, LEE H, GOODARZI H, et al. N<sup>6</sup>-methyladenosine marks primary microRNAs for processing[J]. Nature, 2015, 519(7544): 482-485.
- [12] 史秀京, 雷立健, 郭建勇, 等. 镉致大鼠肾脏微小RNA-21表达的生物信息学分析[J]. 环境与职业医学, 2016, 33(2): 113-118.  
SHI XJ, LEI LJ, GUO JY, et al. Bioinformatics analysis of miRNA-21 expression in kidney from rat exposed to cadmium[J]. J Environ Occup Med, 2016, 33(2): 113-118.
- [13] CHENG C, WU Y, XIAO T, et al. METTL3-mediated m<sup>6</sup>A modification of ZBTB4 mRNA is involved in the smoking-induced EMT in cancer of the lung[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2021, 23: 487-500.
- [14] ALURU N, KARCHNER SI. PCB126 exposure revealed alterations in m6A RNA modifications in transcripts associated with AHR activation[J]. Toxicol Sci, 2021, 179(1): 84-94.
- [15] 杨洋, 丁天云, 张明, 等. SD大鼠亚慢性镉中毒试验模型的构建[J]. 南昌大学学报(理科版), 2016, 40(3): 281-286, 291.  
YANG Y, DING TY, ZHANG M, et al. Construction of sub-chronic cadmium poisoning model in SD rat[J]. J Nanchang Univ (Nat Sci), 2016, 40(3): 281-286, 291.
- [16] 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.  
ZHANG GY, GUO JY, KANG H, et al. Oxidative damage and apoptosis induced by cadmium exposure in HEK293 cells[J]. J Environ Occup Med, 2017, 34(2): 148-153.
- [17] FAY MJ, ALT LA C, RYBA D, et al. Cadmium nephrotoxicity is associated with altered MicroRNA expression in the rat renal cortex[J]. Toxics, 2018, 6(1): 16.
- [18] 李萌竹, 何作顺, 屈腾佼, 等. NRF2与m<sup>6</sup>A催化酶在镉所致HK-2细胞氧化损伤中相关性[J]. 中国职业医学, 2020, 47(6): 650-655.  
LI MZ, HE ZS, QU TJ, et al. Correlation between NRF2 and m<sup>6</sup>A catalytic enzymes in cadmium-induced oxidative damage in HK-2 cells[J]. China Occup Med, 2020, 47(6): 650-655.
- [19] 陈静, 张函, 顾玉露, 等. RNA m6A甲基化参与肾脏纤维化进展的实验研究[J]. 临床肾脏病杂志, 2020, 20(12): 992-995.  
CHEN J, ZHANG H, GU YL, et al. Role of RNA m6A expression profile in progression of renal fibrosis[J]. J Clin Nephrol, 2020, 20(12): 992-995.
- [20] WANG J, ISHFAQ M, XU L, et al. METTL3/m<sup>6</sup>A/miRNA-873-5 p attenuated oxidative stress and apoptosis in colistin-induced kidney injury by modulating Keap1/Nrf2 pathway[J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 517.
- [21] LIU E, LV L, ZHAN Y, et al. METTL3/N6-methyladenosine/miR-21-5 p promotes obstructive renal fibrosis by regulating inflammation through SPRY1/ERK/NF-κB pathway activation[J]. J Cell Mol Med, 2021, 25(16): 7660-7674.
- [22] 蒯榕, 徐莹, 褚以忒, 等. m6A RNA甲基转移酶METTL3对肠癌细胞上皮间质转化及侵袭能力的影响[J]. 现代生物医学进展, 2021, 21(21): 4019-4023, 4074.  
KUAI R, XU Y, CHU YM, et al. The role of METTL3 in the EMT and invasion ability in colorectal cancer cells[J]. Progr Mod Biomed, 2021, 21(21): 4019-4023, 4074.

(英文编辑: 汪源; 责任编辑: 汪源)