

基础研究

Mettl3 介导 m⁶A 甲基化修饰对过氧化氢诱导的脊髓神经元氧化应激和凋亡的影响

李宏维, 张海鸿

(兰州大学第二医院脊柱外科 730030 兰州市)

【摘要】目的:探讨 Mettl3 介导 m⁶A 甲基化修饰对过氧化氢(H₂O₂)诱导的脊髓神经元氧化应激和凋亡的影响。**方法:**分离新生(24h 内)SD 大鼠脊髓,经消化、离心后重悬沉淀,差速贴壁 30min 后收集未贴壁细胞培养于 Neurobasal 培养基中,经免疫荧光鉴定呈 β 3-tubulin 阳性,确认为脊髓神经元。将脊髓神经元随机分为 6 组:空白组,细胞不予任何处理,正常培养;转染对照组,细胞转染阴性对照 siRNA(si-NC);转染组,细胞转染 Mettl3 siRNA(si-Mettl3);诱导组,细胞采用 300 μ mol/L 的 H₂O₂ 处理;转染对照诱导组,细胞先转染 si-NC,然后采用 300 μ mol/L H₂O₂ 处理;转染诱导组,细胞先转染 si-Mettl3,然后采用 300 μ mol/L H₂O₂ 处理。实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)检测各组细胞 Mettl3 的 mRNA 表达水平,Western blot 检测 Mettl3、Bax、Bcl-2 和 cleaved Caspase-3 的蛋白表达水平,免疫荧光检测 Mettl3 表达,酶标仪检测各组整体 m⁶A 水平,并检测白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子(TNF)- α 、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和丙二醛(MDA)水平,流式细胞仪检测细胞凋亡。**结果:**与空白组相比,诱导组的 m⁶A 甲基化修饰水平显著提高($P<0.05$),Mettl3 的 mRNA 和蛋白表达水平显著性上调($P<0.05$),IL-1 β (73.39 $\pm$ 8.82ng/L vs 125.58 $\pm$ 15.31ng/L)、IL-6 (63.34 $\pm$ 7.12ng/L vs 101.28 $\pm$ 12.49ng/L)、TNF- α (103.29 $\pm$ 12.19ng/L vs 204.37 $\pm$ 23.65ng/L)和 MDA (4.01 $\pm$ 0.67pmol/L vs 9.23 $\pm$ 1.05pmol/L)水平显著性升高($P<0.05$),SOD (28.37 $\pm$ 3.72U/mg vs 17.23 $\pm$ 2.05U/mg)和 GSH-Px (158.19 $\pm$ 19.26U/mg vs 83.35 $\pm$ 9.05U/mg)水平显著性降低($P<0.05$),且 Bax 和 cleaved Caspase-3 的蛋白表达水平显著性上调($P<0.05$),Bcl-2 的蛋白表达水平显著性下调($P<0.05$),细胞凋亡率显著升高[(8.30 $\pm$ 0.68)% vs (34.29 $\pm$ 3.16)%, $P<0.05$];与诱导组相比,转染诱导组的 m⁶A 甲基化修饰水平显著性降低($P<0.05$),Mettl3 的 mRNA 和蛋白表达水平显著性下调($P<0.05$),IL-1 β (125.58 $\pm$ 15.31ng/L vs 96.28 $\pm$ 11.27ng/L)、IL-6 (101.28 $\pm$ 12.49ng/L vs 84.56 $\pm$ 10.24ng/L)、TNF- α (204.37 $\pm$ 23.65ng/L vs 147.15 $\pm$ 18.46ng/L)和 MDA (9.23 $\pm$ 1.05pmol/L vs 7.28 $\pm$ 0.96pmol/L)水平显著性降低($P<0.05$),SOD (17.23 $\pm$ 2.05U/mg vs 24.01 $\pm$ 2.76U/mg)和 GSH-Px (83.35 $\pm$ 9.05U/mg vs 121.48 $\pm$ 15.47U/mg)水平显著升高($P<0.05$),且 Bax 和 cleaved Caspase-3 的蛋白表达水平显著性下调($P<0.05$),Bcl-2 的蛋白表达水平显著性上调($P<0.05$),细胞凋亡率显著性降低[(34.29 $\pm$ 3.16)% vs (23.57 $\pm$ 2.01)%, $P<0.05$]。与空白组相比,转染组的炎症因子、氧化应激和凋亡水平均无显著性差异($P>0.05$)。**结论:**H₂O₂ 可上调脊髓神经元中 m⁶A 甲基化修饰水平,并可诱导氧化应激和细胞凋亡;抑制 Mettl3 表达能够降低 H₂O₂ 诱导的脊髓神经元 m⁶A 甲基化修饰水平,进而缓解氧化应激和细胞凋亡。

【关键词】脊髓损伤;m⁶A 甲基化修饰;Mettl3;细胞凋亡;氧化应激

doi:10.3969/j.issn.1004-406X.2022.09.08

中图分类号:R338.2 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2022)-09-0834-09

Effects of Mettl3-mediated m⁶A methylation modification on oxidative stress and apoptosis induced by hydrogen peroxide in spinal cord neurons/LI Hongwei, ZHANG Haihong//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2022, 32(9): 834-842

【Abstract】 Objectives: To investigate the effects of Mettl3-mediated m⁶A methylation modification on the oxidative stress and apoptosis of spinal cord neurons induced by hydrogen peroxide (H₂O₂). **Methods:** The spinal cord of neonatal SD rats (within 24h) were isolated, and resuspended precipitated after digestion and

基金项目:国家自然科学基金地区科学基金项目(编号:31960175)

第一作者简介:男(1981-),医学硕士,副主任医师,研究方向:脊髓损伤

电话:(0931)8942366 E-mail:hongwei_lilz@163.com

通讯作者:张海鸿 E-mail:haihongzhz@163.com

centrifugation, and the non-adherent cells were collected and cultured in Neurobasal medium after 30min of differential adhesion, which was $\beta 3$ -tubulin positive by immunofluorescence and confirmed to be spinal cord neurons. Then the spinal cord neurons were randomly divided into 6 groups: blank group, cells were cultured without any treatment; Transfection control group, cells were transfected with negative control siRNA(si-NC); Transfection group, cells were transfected with Mettl3 siRNA(si-Mettl3); Induction group, cells were treated with 300 μ mol/L H_2O_2 ; Transfection control-induction group, cells were transfected with si-NC and then treated with 300 μ mol/L H_2O_2 . Transfection-induction group, cells were transfected with si-Mettl3 and then treated with 300 μ mol/L H_2O_2 . Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used to detect the expression level of Mettl3 mRNA. The protein expression levels of Mettl3, Bax, Bcl-2 and cleaved Caspase-3 were detected by Western blot. Immunofluorescence was used to determine Mettl3 expression. The level of m^6A and the levels of interleukin(IL)-1 β , IL-6, tumor necrosis factor(TNF- α), superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GSH-Px), and malondialdehyde(MDA) were detected by microplate reader. Cell apoptosis was assessed by flow cytometry. **Results:** Compared with the blank group, of the induction group, the level of m^6A methylation modification, as well as the Mettl3 mRNA and protein expression were significantly up-regulated($P<0.05$), the levels of IL-1 β (73.39 $\pm$ 8.82ng/L vs 125.58 $\pm$ 15.31ng/L), IL-6(63.34 $\pm$ 7.12ng/L vs 101.28 $\pm$ 12.49ng/L), TNF- α (103.29 $\pm$ 12.19ng/L vs 204.37 $\pm$ 23.65ng/L) and MDA(4.01 $\pm$ 0.67pmol/L vs 9.23 $\pm$ 1.05pmol/L) were markedly increased($P<0.05$), while the levels of SOD(28.37 $\pm$ 3.72U/mg vs 17.23 $\pm$ 2.05U/mg) and GSH-Px(158.19 $\pm$ 19.26U/mg vs 83.35 $\pm$ 9.05U/mg) were significantly decreased($P<0.05$), the protein expression levels of Bax and cleaved Caspase-3 were significantly up-regulated($P<0.05$), and the protein expression level of Bcl-2 was significantly down-regulated($P<0.05$), meanwhile the apoptosis rate was significantly increased[(8.30 $\pm$ 0.68)% vs (34.29 $\pm$ 3.16)%, $P<0.05$]. Compared with the induction group, of the transfection-induction group, the m^6A methylation modification level was significantly decreased($P<0.05$), the mRNA and protein expression of Mettl3 were significantly down-regulated($P<0.05$), the levels of IL-1 β (125.58 $\pm$ 15.31ng/L vs 96.28 $\pm$ 11.27ng/L), IL-6(101.28 $\pm$ 12.49ng/L vs 84.56 $\pm$ 10.24ng/L), TNF- α (204.37 $\pm$ 23.65ng/L vs 147.15 $\pm$ 18.46ng/L) and MDA(9.23 $\pm$ 1.05pmol/L vs 7.28 $\pm$ 0.96pmol/L) were significantly decreased($P<0.05$), while the levels of SOD(17.23 $\pm$ 2.05U/mg vs 24.01 $\pm$ 2.76U/mg) and GSH-Px(83.35 $\pm$ 9.05U/mg vs 121.48 $\pm$ 15.47U/mg) were significantly increased($P<0.05$), the protein expression levels of Bax and cleaved Caspase-3 were significantly down-regulated($P<0.05$), and the protein expression level of Bcl-2 was significantly up-regulated($P<0.05$), the apoptosis rate was markedly decreased[(34.29 $\pm$ 3.16)% vs (23.57 $\pm$ 2.01)%, $P<0.05$]. Compared with the blank group, there were no significant differences in the levels of pro-inflammatory factors, oxidative stress, and apoptosis in the transfection group ($P>0.05$). **Conclusions:** H_2O_2 could elevate the level of m^6A methylation modification, oxidative stress, and cell apoptosis in spinal neurons; Inhibition of Mettl3 expression could reduce the level of m^6A methylation modification induced by H_2O_2 , thereby alleviating oxidative stress and cell apoptosis in spinal neurons.

【Key words】 Spinal cord injury; m^6A modification; Mettl3; Apoptosis; Oxidative stress

【Author's address】 Spinal Surgery Department, the Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou, 730030, China

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是一种高致残率的中枢神经系统损伤,给患者及其家属带来了巨大的负担^[1]。SCI包括原发性机械损伤和继发性损伤,而继发性损伤与临床预后密切相关^[2]。氧化应激是诱导神经元凋亡等继发性损伤的主要因素之一^[3],但其分子机制尚不明确。 m^6A 甲基化(N6-methyladenosine)修饰是腺苷酸的第六位N处发生甲基化,是真核细胞中最普遍和最丰富的转录后RNA修饰类型,与肿瘤、病毒复制、胚胎干细胞的多能性以及神经损伤等密切相关^[4-6]。 m^6A

甲基化修饰的发生主要依赖于甲基转移酶,其中Mettl3是催化 m^6A 甲基化修饰的关键甲基转移酶^[7]。有研究报道,SCI小鼠的脊髓星形胶质细胞和神经干细胞中Mettl3的表达显著上调^[8]。提示Mettl3在SCI中可能发挥重要的调控作用,但其具体生物学功能还未见报道。本研究通过 H_2O_2 处理大鼠脊髓神经元建立体外SCI模型,探讨Mettl3及其介导的 m^6A 甲基化修饰对 H_2O_2 诱导的脊髓神经元炎症因子、氧化应激和凋亡的影响,以期阐明Mettl3介导的 m^6A 甲基化修饰变化在

SCI中的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

取新生(24h内)SD大鼠[兰州大学第二医院提供,实验动物许可证号:SYXK(甘)2018-0003],置于75%酒精浸泡3~5min,经断头后暴露脊柱,分离脊髓,剥离脊髓上的血管膜和脊膜。将脊髓剪成0.5~1.0mm³大小,加入0.25%胰蛋白酶于37℃培养箱中放置20~30min以消化细胞。20%胎牛血清终止消化后,吹打成单细胞悬液。200目滤网过滤,1000r/min离心5min,弃上清,加入培养基重悬沉淀,移入培养瓶于37℃培养箱中30min差速贴壁,收集未贴壁细胞,计数后接种于经多聚赖氨酸处理的不同孔板中。将细胞置于含2% B27、0.25% L-谷氨酰胺、1%青链霉素混合液的Neurobasal培养基中,在37℃、5%CO₂的培养箱中培养,每3d半量换液1次。培养约7~9d后,细胞经PBS洗涤,4%多聚甲醛固定、0.1% Triton X-100通透后,5%山羊血清室温封闭1h,然后添加一抗(β 3-tubulin,按1:1000稀释)4℃孵育,16h后添加荧光二抗(594标记山羊抗兔IgG,按1:200稀释)避光室温孵育2h。经PBS洗涤后,DAPI(上海碧云天,按1:1000稀释)室温孵育15min。经PBS洗涤后,在荧光下显微镜观察。 β 3-tubulin阳性即为脊髓神经元。

1.2 细胞转染及分组

采用Lipofectamine 3000进行细胞转染。将脊髓神经元随机分为6组:(1)空白组,细胞不予任何处理,正常培养;(2)转染对照组,细胞转染阴性对照siRNA(si-NC);(3)转染组,细胞转染Mettl3 siRNA(si-Mettl3);(4)诱导组,细胞采用300 μ mol/L H₂O₂处理;(5)转染对照诱导组,细胞先转染si-NC,然后采用300 μ mol/L H₂O₂处理;(6)转染诱导组,细胞先转染si-Mettl3,然后采用300 μ mol/L H₂O₂处理。细胞转染48h,或H₂O₂处理3h后进行后续检测。

1.3 Mettl3 的 mRNA 水平检测

Trizol法提取各组脊髓神经元中的总RNA,按照SuperScript VILO cDNA合成试剂盒(美国Invitrogen)说明书反转录成cDNA。RT-qPCR[SYBR Premix Ex Taq II(大连TaKaRa)]检测Mettl3的mRNA水平。反应条件为:预变性95℃,10s;变性95℃,5s,退火60℃,15s,延伸72℃,15s,循环40次。以 β -actin为内参,2^{- $\Delta\Delta$ CT}法分析Mettl3的相对mRNA表达水平。基因引物序列见表1。

1.4 蛋白表达检测

提取各组脊髓神经元中的总蛋白,采用BCA蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天)对蛋白进行定量;SDS-PAGE分离蛋白,蛋白转移至PVDF膜(美国Millipore),5% BSA封闭1h;添加一抗Mettl3、Bax、Bcl-2、cleaved Caspase-3及GAPDH(均按1:1000稀释)4℃孵育过夜;然后添加二抗(HRP标记山羊抗兔IgG,按1:10000稀释)室温孵育2h;ECL化学发光法(美国Millipore)显影检测,Image J分析条带灰度值。

1.5 免疫荧光检测

细胞经PBS洗涤,4%多聚甲醛固定、0.1% Triton X-100通透后,5%山羊血清室温封闭1h,然后添加一抗(Mettl3,1:1000稀释)4℃孵育,16h后添加荧光二抗(594标记山羊抗兔IgG,按1:200稀释)避光室温孵育2h。经PBS洗涤后,DAPI(上海碧云天,按1:1000稀释)室温孵育15min。最后经PBS洗涤后,荧光显微镜下观察。

1.6 RNA m⁶A 甲基化修饰水平检测

使用酶标仪[EpiQuik m⁶A RNA Methylation Quantification Kit(武汉艾美捷科技)]检测细胞中RNA整体m⁶A甲基化修饰水平。提取总RNA,然后按照试剂盒说明书进行操作,用酶标仪测定450nm吸光值。

1.7 炎症因子水平检测

根据ELISA试剂盒说明书(南京建成生物技术研究所在)检测IL-1 β 、IL-6和TNF- α 水平。首先

表1 基因引物序列
Table 1 Primer sequences

	正向引物(5'-3') Forward primer (5'-3')	反向引物(5'-3') Reverse primer (5'-3')
Mettl3	AGCTTGGGCTGCACTTACTG	AACTTCCCAGGATGGACACATC
β -actin	CTCTCCAGCCTTCCTTCCT	CACCGATCCAGACGGAGTAT

准备试剂,将稀释的样品加样并盖上封板膜,37℃反应 60min。随后洗板 5 次,加入显色液 AB,37℃下显色 10min 后加入终止液。在 10min 之内用酶标仪测定 490nm 处吸光度值。根据各自标准质量浓度制定标准曲线,在标准曲线上查找相应的值。

1.8 氧化应激水平检测

分别按照 SOD、GSH-Px 和 MDA 检测试剂盒说明书(上海碧云天)进行细胞处理,使用酶标仪测定 450nm 处吸光度值并计算 SOD 活性,使用酶标仪测定 340nm 处吸光度值并计算 GSH-Px 活性,使用酶标仪测定波长 532nm 处吸光度值并计算 MDA 水平。

1.9 细胞凋亡水平检测

根据 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡试剂盒(上海翊圣)说明书进行操作:将细胞用 PBS 洗涤后进行胰酶消化,然后转移至离心管,1000g 离心 5min,计数保证每个样本中细胞数量不少于 1.0×10^5 ,弃上清,PBS 再次清洗。加入 400μl Binding Buffer 轻轻重悬细胞,加入 5μl Annexin V-FITC,

10μl PI 染色液,轻轻混匀,避光放置 10~15min。流式细胞仪上机检测、分析。

1.10 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8.0 软件分析数据,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两组间比较采用 *t* 检验;多组间比较采用单因素方差分析,组内两两比较采用 Bonferroni 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

大鼠脊髓神经元鉴定(β3-tubulin 标记)见图 1。 H_2O_2 对整体 m⁶A 甲基化修饰水平和 Mettl3 表达的影响见表 2、图 2、图 3。与空白组(0.34 ± 0.03)%相比,诱导组的 m⁶A 水平(0.58 ± 0.06)%显著提高($P < 0.05$),且 Mettl3 的 mRNA 和蛋白表达水平也显著上调($P < 0.05$)。

抑制 Mettl3 表达对 H_2O_2 诱导的整体 m⁶A 甲基化修饰水平的影响见表 2、图 2。与空白组相比,si-Mettl3 转染显著降低了 Mettl3 mRNA 和蛋白

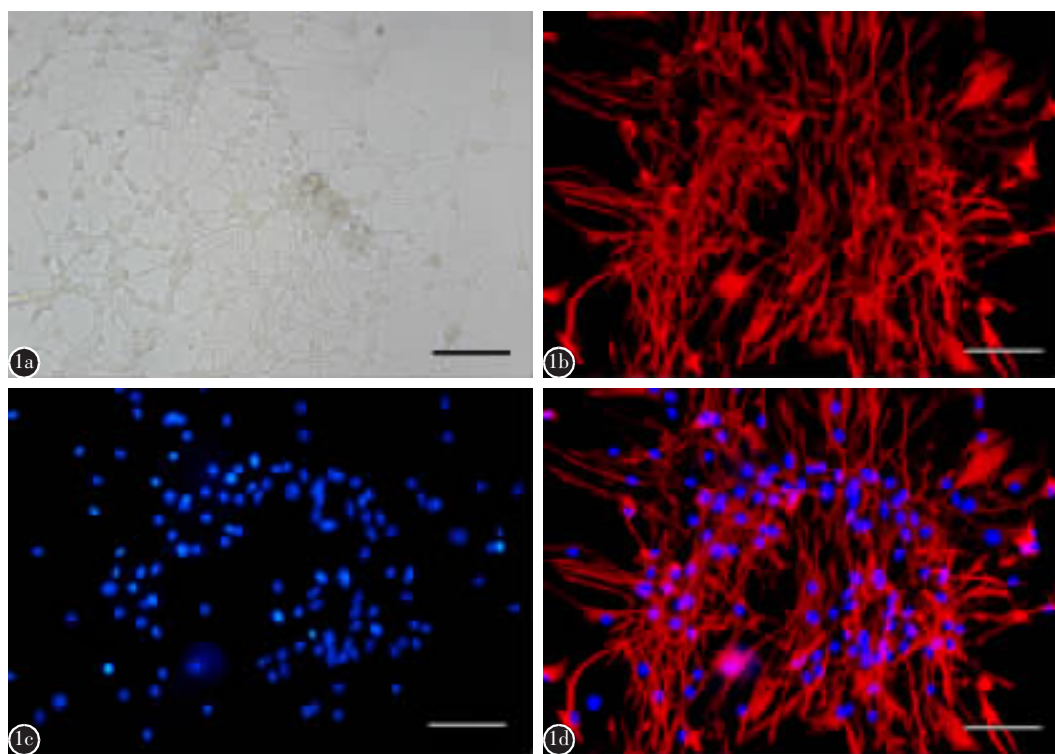


图 1 脊髓神经元观察与鉴定(标尺:40μm) a 光学显微镜观察脊髓神经元,可看到神经元的胞体和轴突 b、c 免疫荧光鉴定脊髓神经元,红色荧光代表 β3-tubulin 蛋白,蓝色荧光为 DAPI 染色的细胞核 d 图片 b 和 c 免疫荧光重合图像

Figure 1 Observation and identification of spinal cord neurons (Scale: 40μm) a The cell bodies and axons of spinal cord neurons could be seen by optical microscopy b, c Identification of spinal cord neurons by immunofluorescence, red fluorescence represented β3-tubulin protein, blue fluorescence was DAPI-stained nucleus d Merge of two immunofluorescence images

表达水平($P<0.05$)。与诱导组相比,si-Mettl3 转染显著抑制 H_2O_2 诱导的 Mettl3 mRNA 和蛋白表达水平上调($P<0.05$)。与诱导组(0.58 ± 0.06)%相比,转染诱导组的 m⁶A 甲基化修饰水平(0.41 ± 0.04)%也显著降低($P<0.05$)。

各组炎症因子水平见表 3。与空白组相比,诱导组的 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平显著升高 ($P<$

表 2 各组细胞中 Mettl3 mRNA 和蛋白表达水平比较
($n=5$)

Table 2 Comparison of Mettl3 mRNA and protein expression between groups

	Mettl3 mRNA 表达 Mettl3 mRNA expression	Mettl3 蛋白表达 Mettl3 protein expression
空白组 Blank group	1.00 $\pm$ 0.08	1.00 $\pm$ 0.09
转染对照组 Transfection control group	1.04 $\pm$ 0.09	0.98 $\pm$ 0.10
转染组 Transfection group	0.32 $\pm$ 0.04 ^①	0.43 $\pm$ 0.05 ^①
诱导组 Induction group	5.78 $\pm$ 0.62 ^①	3.24 $\pm$ 0.35 ^①
转染对照诱导组 Transfection control-induction group	5.47 $\pm$ 0.61	3.38 $\pm$ 0.37
转染诱导组 Transfection-induction group	2.43 $\pm$ 0.28 ^②	1.62 $\pm$ 0.18 ^②

注:①与空白组比较 $P<0.05$;②与诱导组比较 $P<0.05$

Note: ①Compared with blank group, $P<0.05$; ②Compared with induction group, $P<0.05$

0.05); 与诱导组相比,si-Mettl3 转染显著抑制 H_2O_2 诱导的 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平上调($P<0.05$)。另外,与对照组相比,单独抑制 Mettl3 表达对 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平无显著影响。

各组的氧化应激水平见表 4。与空白组相比,诱导组的 SOD、GSH-PX 水平显著性下降,MDA 显著性上升($P<0.05$);与诱导组相比,转染诱导组的 SOD、GSH-PX 水平显著性升高,MDA 水平显著性降低($P<0.05$)。另外,与空白组相比,单独抑制 Mettl3 表达对 SOD、GSH-PX 和 MDA 水平无显著性影响。

细胞凋亡相关蛋白表达水平见图 4、表 5。与空白组相比,诱导组的 Bax、cleaved Caspase-3 蛋白水平显著性上调,Bcl-2 蛋白水平显著性下调($P<0.05$);与诱导组相比,转染诱导组的 Bax、cleaved Caspase-3 蛋白水平显著降低,Bcl-2 蛋白水平显著性升高($P<0.05$)。另外,与空白组相比,单独抑制 Mettl3 表达对 Bax、Bcl-2 和 cleaved Caspase-3 水平无显著性影响($P>0.05$)。进一步发现(图 5),与空白组(8.30 ± 0.68)%相比,诱导组(34.29 ± 3.16)%的细胞凋亡率显著性升高($P<0.05$);与诱导组相比,转染诱导组(23.57 ± 2.01)%的细胞凋亡率显著性降低($P<0.05$)。单独抑制 Mettl3 表达对凋亡率无显著性影响(9.79 ± 0.89)%($P>0.05$)。

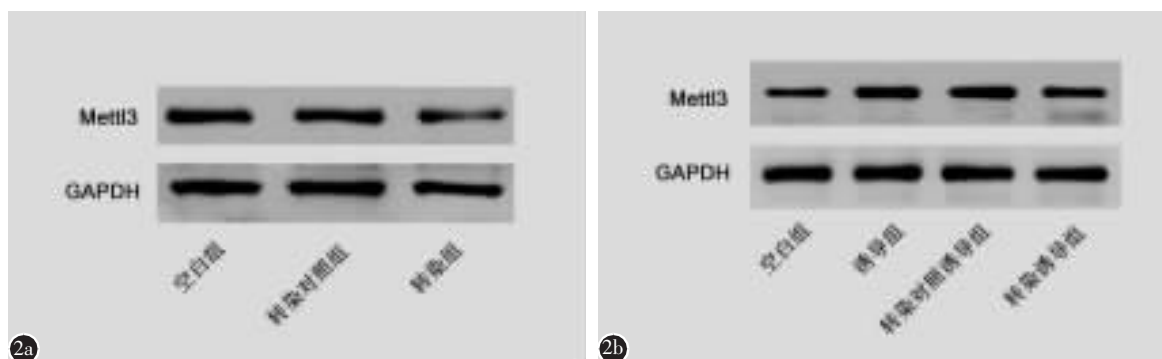


图 2 Western blot 检测 Mettl3 的蛋白表达 a 转染对照组 Mettl3 的蛋白表达与空白组相比无明显差异,转染组 Mettl3 的蛋白表达较空白组明显降低 b 诱导组 Mettl3 蛋白表达较空白组明显升高,转染对照诱导组 Mettl3 蛋白表达与诱导组相比无明显差异,转染诱导组 Mettl3 蛋白表达较诱导组明显降低

Figure 2 Protein expression of Mettl3 was detected by Western blot a The protein expression of Mettl3 in the transfection control group was not significantly different from that in the blank group, but the protein expression of Mettl3 in the transfection group was significantly lower than that in the blank group b The protein expression of Mettl3 in the induction group was significantly higher than that in the blank group. There was no significant difference in the protein expression of Mettl3 between the transfected control-induction group and the induction group, but the protein expression of Mettl3 in the transfection-induction group was significantly lower than that in the induction group

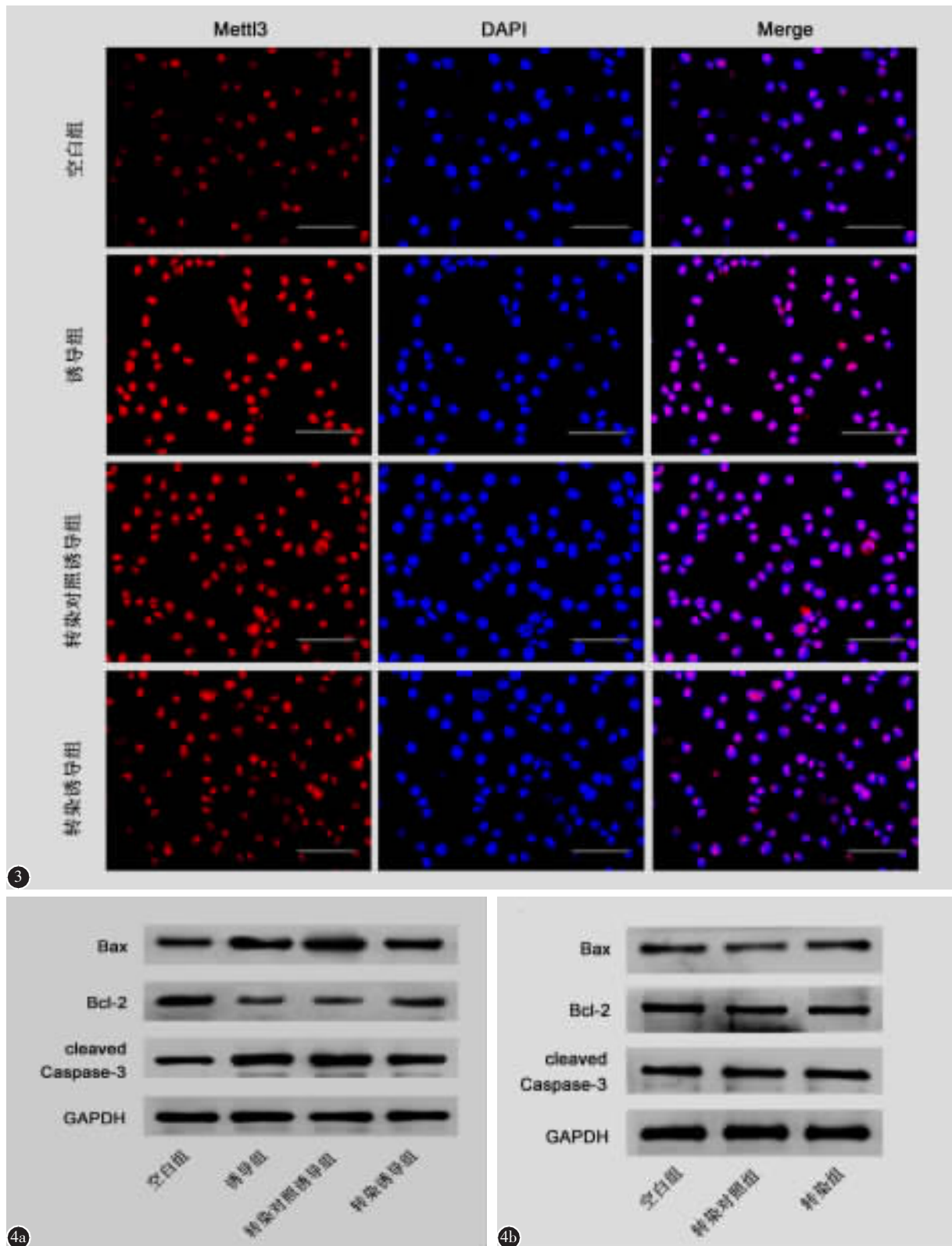


图 3 免疫荧光检测 Mettl3 的蛋白表达(红色荧光代表 Mettl3 蛋白,蓝色荧光为 DAPI 染色的细胞核,Merge 为前 2 张免疫荧光重合图像)(标尺:40 μ m) 图 4 Western blot 检测凋亡相关蛋白的表达结果

Figure 3 Protein expression of Mettl3 was detected by immunofluorescence (red fluorescence represented Mettl3 protein, blue fluorescence was DAPI-stained nucleus, Merge was the first two immunofluorescence coincidence images) (scale: 40 μ m) **Figure 4** Expression of apoptosis-related proteins were detected by Western blot

3 讨论

m⁶A 可修饰多种类型的 RNA, 主要包括 mRNAs、rRNAs、tRNAs、长链非编码 RNAs 和 microRNAs^[9]。然后通过影响这些靶分子的剪接、转运、稳定性和可翻译性等, 参与调控众多的生理和病理过程^[10-12]。Mettl3 是一种甲基化转移酶, 在 m⁶A 修饰的调控过程中发挥重要作用。Liu 等^[13]的研究发

表 3 各组细胞中炎症因子水平 (n=5)

Table 3 Comparison of inflammatory cytokines in each group

	IL-1 β (ng/L)	IL-6(ng/L)	TNF- α (ng/L)
空白组 Blank group	73.39 $\pm$ 8.82	63.34 $\pm$ 7.12	103.29 $\pm$ 12.19
转染对照组 Transfection control group	77.31 $\pm$ 10.49	64.59 $\pm$ 8.21	108.21 $\pm$ 11.83
转染组 Transfection group	78.27 $\pm$ 11.24	67.35 $\pm$ 7.92	106.28 $\pm$ 13.26
诱导组 Induction group	125.58 $\pm$ 15.31 ^①	101.28 $\pm$ 12.49 ^①	204.37 $\pm$ 23.65 ^①
转染对照诱导组 Transfection control-induction group	131.24 $\pm$ 16.29	105.65 $\pm$ 13.43	210.28 $\pm$ 25.83
转染诱导组 Transfection-induction group	96.28 $\pm$ 11.27 ^②	84.56 $\pm$ 10.24 ^②	147.15 $\pm$ 18.46 ^②

注: ①与空白组比较 $P<0.05$; ②与诱导组比较 $P<0.05$

Note: ①Compared with blank group, $P<0.05$; ②Compared with induction group, $P<0.05$

表 4 各组细胞中氧化应激水平 (n=5)

Table 4 Comparison of oxidative stress levels in each group

	SOD(U/mg)	GSH-PX(U/mg)	MDA(pmol/L)
空白组 Blank group	28.37 $\pm$ 3.72	158.19 $\pm$ 19.26	4.01 $\pm$ 0.67
转染对照组 Transfection control group	30.47 $\pm$ 3.15	155.38 $\pm$ 22.45	4.32 $\pm$ 0.58
转染组 Transfection group	32.47 $\pm$ 4.16	162.46 $\pm$ 25.93	3.95 $\pm$ 0.62
诱导组 Induction group	17.23 $\pm$ 2.05 ^①	83.35 $\pm$ 9.05 ^①	9.23 $\pm$ 1.05 ^①
转染对照诱导组 Transfection control-induction group	16.87 $\pm$ 1.94	80.86 $\pm$ 10.38	9.83 $\pm$ 1.11
转染诱导组 Transfection-induction group	24.01 $\pm$ 2.76 ^②	121.48 $\pm$ 15.47 ^②	7.28 $\pm$ 0.96 ^②

注: ①与空白组比较 $P<0.05$; ②与诱导组比较 $P<0.05$

Note: ①Compared with blank group, $P<0.05$; ②Compared with induction group, $P<0.05$

现, 褪黑素通过 Mettl3 介导 m⁶A 甲基化修饰水平的下调, 对 SCI 小鼠的功能恢复有重要意义, 提示 Mettl3 介导的 m⁶A 甲基化修饰调控与 SCI 进程密切相关。但 Mettl3 介导的 m⁶A 甲基化修饰调控在氧化应激诱导的 SCI 中的具体生物学功能还需进一步明确。因此, 体外探讨 Mettl3 及其介导的 m⁶A 修饰对 H₂O₂ 诱导的脊髓神经元炎症因子、氧化应激和凋亡的影响, 对阐明 Mettl3 介导的 m⁶A 修饰变化在 SCI 中的作用有重要意义。

本研究首先分离培养大鼠脊髓神经元, 经免疫荧光鉴定为 β 3-tubulin 阳性。 β 3-tubulin 是神经元的结构蛋白, 可作为鉴定神经元的标志分子。SCI 后包括炎症、氧化应激和凋亡等不断加重神经元损伤, 从而导致功能损伤^[14,15]。在本研究中, 采用 H₂O₂ 处理脊髓神经元, 发现与空白组相比, 诱导组的炎症因子(IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α)水平升高, 氧化应激水平提高(抗氧化酶 SOD、GSH-Px 水平降低而脂质过氧化产物 MDA 含量增加), 且细胞凋亡水平增加(促凋亡蛋白 Bax、Caspase-3 表达上调而抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达下调), 以上结果提示 H₂O₂ 处理的脊髓神经元可模拟 SCI 细胞模型。

Jian 等^[16]研究发现, m⁶A 甲基化修饰诱导内皮细胞炎症反应, 进而促进动脉粥样硬化斑块的形成。Zhao 等^[17]的研究显示, m⁶A 甲基化修饰增加能

表 5 各组细胞中凋亡相关蛋白表达水平 (n=5)

Table 5 Expression levels of apoptosis-related proteins in each group

	Bax 蛋白 Bax protein expression	Bcl-2 蛋白 Bcl-2 protein expression	Caspase-3 蛋白 Caspase-3 protein expression
空白组 Blank group	1.00 $\pm$ 0.08	1.00 $\pm$ 0.09	1.00 $\pm$ 0.08
转染对照组 Transfection control group	1.04 $\pm$ 0.09	1.03 $\pm$ 0.09	1.03 $\pm$ 0.09
转染组 Transfection group	1.08 $\pm$ 0.10	0.98 $\pm$ 0.11	1.08 $\pm$ 0.10
诱导组 Induction group	3.12 $\pm$ 0.35 ^①	0.48 $\pm$ 0.05 ^①	3.45 $\pm$ 0.41 ^①
转染对照诱导组 Transfection control-induction group	3.34 $\pm$ 0.36	0.44 $\pm$ 0.06	3.61 $\pm$ 0.42
转染诱导组 Transfection-induction group	1.87 $\pm$ 0.21 ^②	0.75 $\pm$ 0.09 ^②	2.02 $\pm$ 0.27 ^②

注: ①与空白组比较 $P<0.05$; ②与诱导组比较 $P<0.05$

Note: ①Compared with blank group, $P<0.05$; ②Compared with induction group, $P<0.05$

够抑制抗氧化反应,加重氧化应激。Wang 等^[18]的研究报道,Mettl14 介导的 m⁶A 甲基化修饰诱导 SCI 神经元凋亡。以上研究表明,m⁶A 甲基化修饰水平的提高与炎症、氧化应激、神经元凋亡等病理进程密切相关。在本研究中,与空白组相比,诱导组的 m⁶A 水平显著提高,提示 H₂O₂ 诱导的 SCI 可能和 m⁶A 甲基化修饰水平提高有关。进一步研究发现,与空白组相比,诱导组的 Mettl3 的 mRNA 和蛋白表达水平也显著上调,与 Xing 等^[18]研究结果相符。提示 H₂O₂ 可能通过上调 Mettl3 而提高脊髓神经元中的 m⁶A 甲基化修饰水平。

为了进一步探讨 Mettl3 的作用,本研究通过转染 si-Mettl3 抑制其表达,发现下调 Mettl3 表达可显著抑制 H₂O₂ 诱导的 m⁶A 甲基化修饰水平升高。提示抑制 Mettl3 介导的 m⁶A 甲基化修饰可能是缓解 H₂O₂ 诱导 SCI 的重要方面。有研究报道,

降低 Mettl3 表达能够通过抑制 m⁶A 甲基化修饰水平而减少内皮细胞中的 NF- κ B 炎症反应,提示 Mettl3 在炎症反应中重要的调控作用^[19]。与该研究结果一致,本研究结果显示,减少 Mettl3 介导的 m⁶A 甲基化修饰显著抑制了 H₂O₂ 诱导的炎症因子(IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α)水平升高说明抑制 Mettl3 显著降低了 H₂O₂ 诱导的炎症损伤。

氧化损伤在 SCI 后的继发性损伤中具有长期作用,与持续激活的炎症密切相关^[20]。本研究结果显示,减少 Mettl3 介导的 m⁶A 甲基化修饰显著降低了 H₂O₂ 诱导的 MDA 水平,提高了 SOD、GSH-PX 水平,说明抑制 Mettl3 显著降低了 H₂O₂ 诱导的氧化应激损伤。Yuan 等^[21]的研究发现,敲低 Mettl3 可降低 PM2.5 诱导的人呼吸道上皮细胞凋亡。本研究结果显示,减少 Mettl3 介导的 m⁶A 甲基化修饰显著下调了 H₂O₂ 诱导的 Bax、cleaved

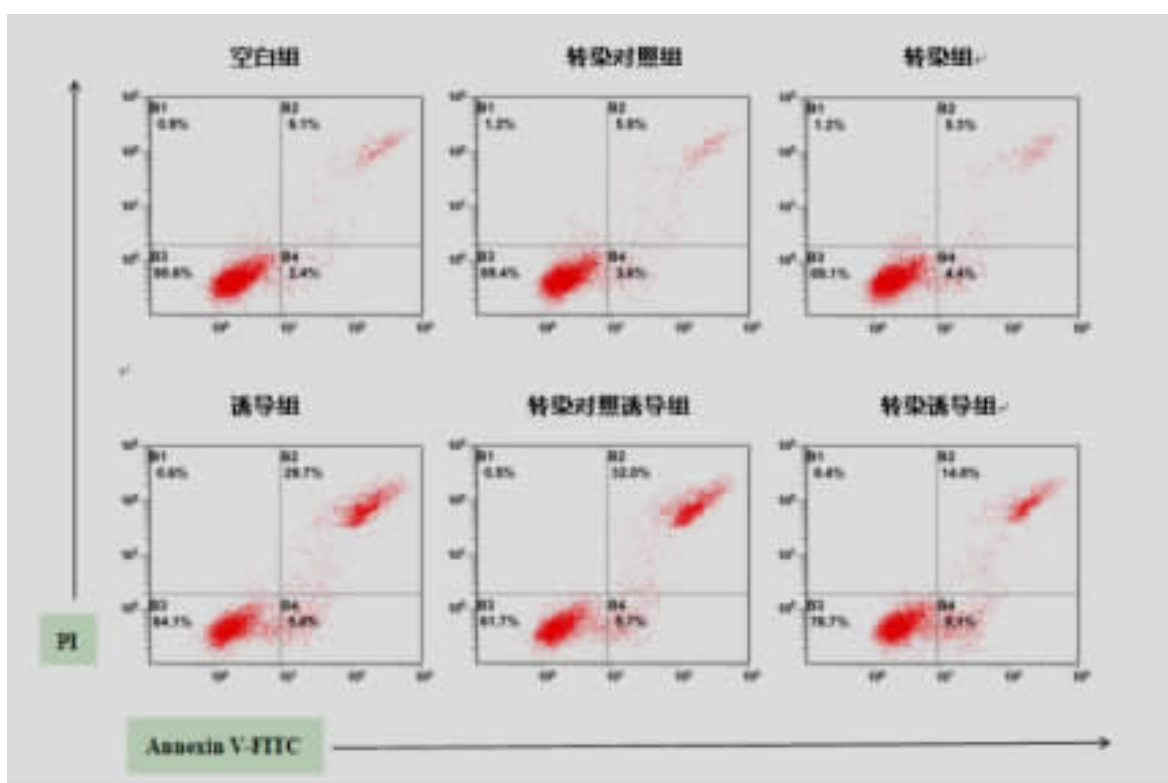


图5 流式细胞仪检测细胞凋亡。转染对照组(或转染组)的细胞凋亡水平与空白组相比无明显差异,诱导组的细胞凋亡水平较空白组明显提高;转染对照诱导组的细胞凋亡水平与诱导组相比无明显差异,转染诱导组的细胞凋亡水平较诱导组明显降低

Figure 5 Cell apoptosis was detected by flow cytometry. The apoptosis level of the transfection control group (or the transfection group) was not significantly different from that of the blank group, while the apoptosis level of the induction group was significantly higher than that of the blank group, the apoptosis level of the transfection control-induction group was not significantly different from that of the induction group, and the apoptosis level of the transfection-induction group was significantly lower than that of the induction group

Caspase-3 蛋白表达,上调了 Bcl-2 蛋白表达;流式细胞仪检测细胞凋亡发现,抑制 Mettl3 显著降低了 H₂O₂ 诱导的细胞凋亡。另外,与空白组相比,单独抑制 Mettl3 表达对炎性因子、氧化应激以及凋亡水平无显著性影响。提示 Mettl3 抑制不能直接影响炎性因子、氧化应激以及凋亡水平。

综上所述,在 H₂O₂ 诱导的脊髓神经元损伤中,Mettl3 表达上调,m⁶A 甲基化修饰增加;抑制 Mettl3 能够减少 H₂O₂ 诱导的 m⁶A 甲基化修饰,进而抑制炎性因子的产生、降低氧化应激反应,并减少细胞凋亡。本研究为阐明 SCI 后继发性损伤的分子机制提供了新的依据,Mettl3 介导的 m⁶A 甲基化修饰或许能作为临床防治 SCI 的重要靶点。但本研究存在一定的局限性;由于 m⁶A 可修饰多种类型的 RNA,后续需要进一步探讨 Mettl3 介导的 m⁶A 甲基化修饰调控的下游靶分子,明确下游靶分子的 m⁶A 甲基化修饰在 SCI 中的重要作用。另外,m⁶A 甲基化修饰是由甲基转移酶(METTL3/14 和 WTAP 等)、去甲基酶(FTO 和 ALKBH5 等)和 m⁶A 结合蛋白(YTHDF1/3 和 hnRNP A2B1 等)共同介导的动态过程。后续研究需要进一步明确其他甲基转移酶,以及去甲基酶、m⁶A 结合蛋白在 SCI 中的表达和作用,深入探讨 SCI 中 m⁶A 甲基化修饰的调控机制。

4 参考文献

- 谢慕可,许念茹,黄贤胜.三七总皂苷对脊髓损伤大鼠神经元凋亡及 Nrf2, caspase-3 表达的影响[J]. 世界中医药, 2020, 15(10): 44-47.
- James ND, McMahon SB, Field-Fote EC, et al. Neuromodulation in the restoration of function after spinal cord injury [J]. Lancet Neurol, 2018, 17(10): 905-917.
- Wu WD, Wang LH, Wei NX, et al. MicroRNA-15a inhibits inflammatory response and apoptosis after spinal cord injury via targeting STAT3[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(21): 9189-9198.
- Tong J, Flavell RA, Li HB. RNA m⁶A modification and its function in diseases[J]. Front Med, 2018, 12(4): 481-489.
- Brocard M, Ruggieri A, Locker N. m⁶A RNA methylation, a new hallmark in virus-host interactions[J]. J Gen Virol, 2017, 98(9): 2207-2214.
- Ma L, Huang Y, Zhang F, et al. MMP24 contributes to neuropathic pain in an FTO-dependent manner in the spinal cord neurons[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 673831.
- Liu S, Zhuo L, Wang J, et al. METTL3 plays multiple functions in biological processes[J]. Am J Cancer Res, 2020, 10(6): 1631-1646.
- Xing L, Cai Y, Yang T, et al. Epitranscriptomic m⁶A regulation following spinal cord injury[J]. J Neurosci Res, 2021, 99(3): 843-857.
- Roundtree IA, Evans ME, Pan T, et al. Dynamic RNA modifications in gene expression regulation[J]. Cell, 2017, 169(7): 1187-1200.
- Qin Y, Li L, Luo E, et al. Role of m⁶A RNA methylation in cardiovascular disease(review)[J]. Int J Mol Med, 2020, 46(6): 1958-1972.
- Ma Z, Ji J. N6-methyladenosine(m⁶A) RNA modification in cancer stem cells[J]. Stem cells, 2020, doi: 10.1002/stem.3279. Online ahead of print.
- Zhang H, Shi X, Huang T, et al. Dynamic landscape and evolution of m⁶A methylation in human [J]. Nucleic Acids Res, 2020, 48(11): 6251-6264.
- Liu W, Tang P, Wang J, et al. Extracellular vesicles derived from melatonin-preconditioned mesenchymal stem cells containing USP29 repair traumatic spinal cord injury by stabilizing Nrf2[J]. J Pineal Res, 2021, 71(4): e12769.
- Pelisch N, Rosas Almanza J, Stehlik KE, et al. CCL3 contributes to secondary damage after spinal cord injury [J]. J Neuroinflammation, 2020, 17(1): 362.
- 方立琛,高小亮,武明媚.人参皂甙 Rd 在神经损伤中的保护作用[J]. 神经损伤与功能重建, 2020, 15(2): 108-110.
- Jian D, Wang Y, Jian L, et al. METTL14 aggravates endothelial inflammation and atherosclerosis by increasing FOXO1 N6-methyladenosine modifications [J]. Theranostics, 2020, 10(20): 8939-8956.
- Zhao TX, Wang JK, Shen LJ, 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.
- Wang H, Yuan J, Dang X, et al. Mettl14-mediated m⁶A modification modulates neuron apoptosis during the repair of spinal cord injury by regulating the transformation from pri-mir-375 to miR-375[J]. Cell Biosci, 2021, 11(1): 52.
- Chien CS, Li JY, Chien Y, et al. METTL3-dependent N(6)-methyladenosine RNA modification mediates the atherogenic inflammatory cascades in vascular endothelium[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2021, 118(7): e2025070118.
- Zrzavy T, Schwaiger C, Wimmer I, et al. Acute and non-resolving inflammation associate with oxidative injury after human spinal cord injury[J]. Brain, 2021, 144(1): 144-161.
- Yuan Q, Zhu H, Liu H, et al. METTL3 regulates PM(2.5)-induced cell injury by targeting OSGIN1 in human airway epithelial cells[J]. J Hazard Mater, 2021, 415: 125573.

(收稿日期:2021-11-19 末次修回日期:2022-07-23)

(英文编审 谭 啸)

(本文编辑 姜雅浩)