

• 实验研究 •

RNA m6A 甲基化参与肾脏纤维化进展的实验研究

陈静 张函 顾玉露 丁小强 章晓燕
200032 上海, 复旦大学附属中山医院肾内科



开放科学
(资源服务)
标识码(OSID)

【摘要】 目的 本研究探讨肾脏纤维化过程中 RNA m6A 水平的变化, 为深入探讨和研究 RNA m6A 在肾脏纤维化中的变化及作用机制提供实验基础和理论依据。方法 采用 C57BL/6 小鼠单侧输尿管结扎方法建立肾脏纤维化小鼠模型(unilateral ureteral obstruction, UUO)。随机分为假手术(Sham)组和 UUO 组。首先运用质谱法检测两组肾脏 RNA m6A 含量变化, 进一步运用 RNA 甲基化免疫共沉淀(methylated RNA Immunoprecipitation, MeRIP)测序方法检测两组肾脏 RNA m6A 具体修饰位点的变化情况。在明确纤维化肾脏存在 RNA m6A 异常修饰后, 我们通过 RT-PCR 方法, 进一步筛选肾脏 RNA m6A 相关的调控酶。结果 与 Sham 组相比, UUO 组肾脏 RNA m6A 含量显著升高。MeRIP 测序分析发现甲基化水平差异 >1.5 倍的位点共 1 352 个, 其中上调位点 906 个, 下调位点 446 个, 包括细胞连接、炎症反应、转分化、钙离子结合、细胞黏附等相关的基因。RT-PCR 筛选结果提示甲基转移酶样蛋白(methyltransferase-like protein, METTL14)可能为关键调控酶。结论 RNA m6A 表观遗传调控参与肾脏纤维化发生, METTL14 可能是关键调控酶。

【关键词】 肾脏纤维化; RNA 甲基化; Mettl14
DOI: 10.3969/j.issn.1671-2390.2020.12.011

Role of RNA m6A expression profile in progression of renal fibrosis CHEN Jing, ZHANG Han, GU Yu-lu, DING Xiao-qiang, ZHANG Xiao-yan. Department of Nephrology, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

Corresponding author: ZHANG Xiao-yan, E-mail: zhang.xiaoyan@zs-hospital.sh.cn

【Abstract】 **Objective** To investigate the expression profile of RNA m6A in renal fibrosis model of unilateral ureteral obstruction (UUO) mice and conduct its related bioinformatics analysis, so as to provide theoretical basis and experimental basis for further study on the change and mechanism of RNA m6A in renal fibrosis. **Methods** C57BL/6 UUO mouse model of renal fibrosis was established by unilateral ureteral ligation. They were randomly divided into sham and UUO group. At first, mass-spectrography was used to detect the changes of RNA m6A contents in the kidney in the two groups. Then, methylated RNA immunoprecipitation (MeRIP) sequencing method was used to detect the changes of the modified sites of RNA m6A in the two groups. After identifying presence of abnormal modification of RNA m6A in renal fibrosis, we further screened out regulation enzymes associated with RNA m6A in the kidney through real quantitative RT-PCR. **Results** Compared with the sham group, the RNA m6A content in the kidney in the UUO group was elevated significantly. MeRIP sequencing analysis showed a total of 1352 sites with methylation level differences >1.5 times among them, including 906 up-regulating ones and 446 down-regulating ones, involved the genes associated with cell junction, inflammatory response, transdifferentiation, calcium binding, cell adhesion, vascular calcification, etc. RT-PCR re-

【基金项目】 国家自然科学基金-重大研究计划(No. 91849123) **【作者简介】** 陈静, 女, 博士, 主治医师, 研究方向: 慢性肾脏病相关血管钙化, E-mail: chen.jing3@zs-hospital.sh.cn **【通信作者】** 章晓燕, 女, 博士, 副主任医师, 研究方向: 肾脏纤维化, E-mail: zhang.xiaoyan@zs-hospital.sh.cn

sults suggested that RNE methylase METTL14 might be a key regulatory enzyme. **Conclusions** The epigenetic regulation of RNA m6A is involved in the development of renal fibrosis, and METTL14 may be the key regulatory enzyme.

【Key words】 Renal fibrosis; RNA methylation; METTL14

慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)是一种严重危害人类健康的慢性疾病。RNA 甲基化主要发生在 N6-甲基腺苷(N6-methyladenosine, m6A)位点^[1]。m6A 修饰在基因表达调控、mRNA 剪接、RNA 稳定性等方面扮演重要角色^[2]。m6A 修饰主要由甲基化酶(writers)、去甲基化酶(erasers)和识别蛋白(readers)所调控,参与 RNA 剪接、出入核、蛋白质翻译及降解等多种生物学过程^[3-5]。甲基化 RNA 免疫共沉淀结合高通量测序(Methylated RNA Immunoprecipitation with next generation sequencing, MeRIP-seq)^[5],使用 N6-甲基腺嘌呤抗体富集高甲基化的 RNA 片段,并通过结合高通量测序,能够高效精确的全转录组范围内检测发生甲基化的 RNA 区域。通过使用这一技术,我们可以比较不同细胞、组织、样本间的 RNA 甲基化修饰模式的差异,发现疾病发生、发展过程中的关键生物学改变^[6-7]。

近年研究表明,m6A 在肿瘤发生、发展中发挥重要作用^[1]。但在肾脏纤维化发生过程中 m6A 变化如何、扮演什么角色?目前还不明确。本研究基于 MeRIP-seq 数据库解析肾脏纤维化发生过程中 RNA m6A 的变化,筛选出差异基因和关键通路,初步确定参与调控 RNA m6A 的关键甲基酶,为肾脏纤维化的 RNA 甲基化机制研究提供重要理论参考。

材料与方法

一、实验动物与试剂

1. 动物 健康的 6~8 周龄雄性小鼠(种系 C57BL/6),重量 19~24 g,购自上海杰思捷生物科技有限公司,自由进食饮水。

2. 试剂 PrimeScript RT 试剂盒(日本 Takara 公司)、RNAiso Plus(Trizol)(美国 Thermo 公司)、SYBR Green PCR 试剂盒(日本 Takara 公司)

二、方法

1. 动物模型与实验分组 C57BL/6 小鼠适应环境 7 d。采用随机数字表法分成 2 组:假手术组(Sham 组)(n = 6)、肾脏纤维化组(UUO 组)(n = 6)。UUO 组经小鼠背部右侧切口将小鼠右侧输尿管

游离、结扎并剪断,Sham 组仅游离右侧输尿管不结扎。造模 7 d 后收集肾组织标本。

2. mRNA 样品制备 利用 Trizol 法提取总 RNA 并检测 RNA 的浓度和纯度。使用 rRNA 试剂盒去除 rRNA,琼脂糖凝胶电泳法检测 RNA 完整性。然后高频超声仪随机打断 RNA 样本,将片段化的 RNA 与 m6A 抗体加入 IPP 缓冲液中,4 °C 孵育 2 h。进一步反应混合物用 protein A 磁珠在 4 °C 环境下免疫沉淀 2 h。之后用游离的 m6A 腺苷类似物洗脱磁珠上结合的 mRNA。洗脱的 mRNA 进一步通过 Trizol 试剂(Thermo Fisher)进行抽提。抽提纯化的 RNA 进行质谱检测,并进一步 MeRIP-seq 测序(上海云序生物公司)。

3. RT-PCR 检测 根据已有文献报道,选取目前已知 m6A 关键调控酶甲基转移酶样蛋白(methyltransferase-like protein, METTL)3、METTL4、METTL14、肥胖相关基因(fat mass and obesity associated, FTO)、ALKBH5 基因进行 RT-PCR 检测。所用引物均由上海生工生物技术有限责任公司合成,具体引物序列见表 1,其中 18s 作为内参对照,采用 2^{-ΔΔCt}分析方法计算目的基因的表达差异。

表 1 RT-PCR 引物列表

基因	引物序列
METTL3	CTGGGCACTTGGATTAAAGGAA TGAGAGGTGGTGTAGCAACTT
METTL4	TGGGTGGTACTGGATCATCT AGCAAAGCACATAGCAGGAGC
METTL14	GAGCTGAGAGTGCGGATAGC GCAGATGTATCATAGGAAGCCC
ALKBH5	GCGCGGTCAACGACTA ATCAGCAGCATACCCACTGAG
FTO	GACACTGGCTTCCTTACCTG CTCACCACGTCCCGAAACAA

4. 免疫组化检测 使用 Abcam 公司的 METTL14 抗体(货号:ab252562,抗体使用浓度 1:200),检测小鼠肾脏组织 METTL14 的表达情况。

三、统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计软件,所有 RT-PCR 结果数据以 Mean ± SD 表示,进行单因素方差分析。采用 Dunnett's T3 法分析组间差异,以 P < 0.05 为差

异有统计学意义。

结 果

一、质谱结果

首先通过 MASSON 染色,证实肾脏纤维化模型造模成功($P < 0.05$)。我们使用质谱法检测两组 RNA m6A 含量变化(由复旦大学生物医学研究院提供技术支持),发现 UUO 组肾脏 RNA m6A 含量显著升高($P < 0.05$)。(图 1)

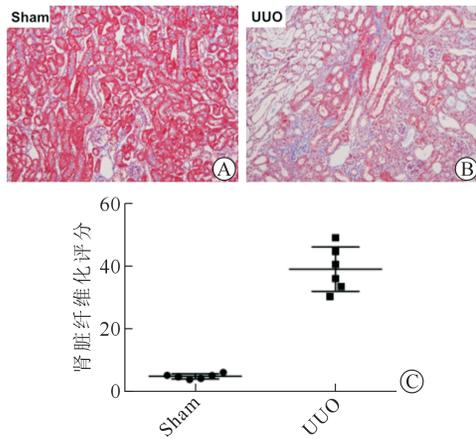


图 1 两组肾组织纤维及 RNA m6A 水平比较 A、B,两组肾组织 Masson 染色图($\times 200$);C,两组肾脏 RNAm6A 含量比较

二、测序结果

我们使用 Illumina 平台对 Sham 组和 UUO 组肾组织样本 RNA m6A 进行比较发现,与对照组相比,UUO 处理肾脏差异表达 1.5 倍以上的差异甲基化的编码基因共 1 352 个,其中上调 906 个,下调 446 个,包括细胞连接、炎症反应、转分化、钙离子结合、细胞黏附等相关的基因。(图 2~3)

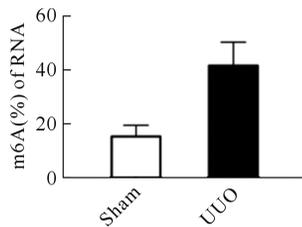


图 2 筛选的差异最显著的 14 个 RNA m6A 相应的变化倍数

三、m6A 关键调控酶的筛选

采用 RT-PCR 检测 METTL3、METTL4、METTL14、肥胖相关基因(fat mass and obesity associated, FTO)、ALKBH5 基因的表达差异情况。进一步通过免疫组化方法,我们发现 METTL14 在肾脏的主要表达部位为肾小管上皮细胞的细胞核,

UUO 组肾脏 METTL14 表达显著升高($P < 0.05$)。由此,我们推测 RNA m6A 甲基转移酶 METTL14 可能是肾脏纤维化过程中 m6A 的关键调控酶。(图 4)

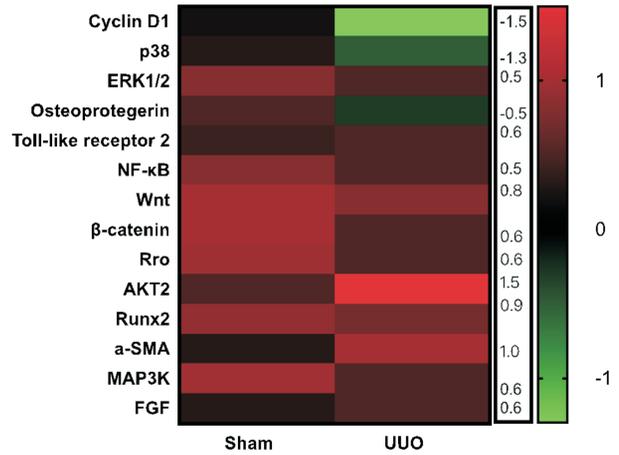


图 3 差异最为显著的 14 个 RNA m6A 甲基化位点基因

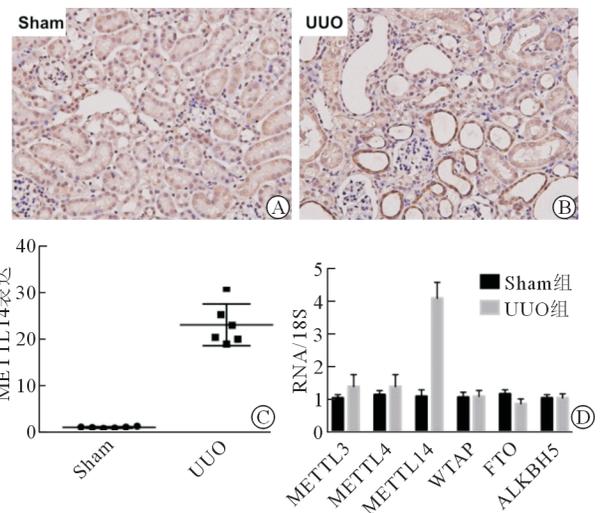


图 4 两组肾组织免疫组化图及 METTL14 表达变化的比较 A、B,两组肾组织免疫组化图;C,Sham 组、UUO 组小鼠肾脏 METTL14 表达比较;D,RT-PCR 示两组 METTL3、METTL4、METTL14、WTAP、FTO、ALKBH5 甲基化酶表达比较

讨 论

本研究通过高通量测序的方法,研究了 RNA m6A 修饰在 UUO 小鼠纤维化肾脏的变化发现,纤维化肾脏 m6A 含量显著升高。我们还初步筛选了引起 m6A 变化的调控酶,发现 METTL14 在 UUO 组显著升高,可能是引起 m6A 参与肾脏纤维化的关键调控酶。

m6A 甲基化修饰是一种动态可逆的反应,由甲基化酶、去甲基化酶和甲基化阅读蛋白共同参

与^[8-10]。RNA m6A 修饰主要由甲基转移酶系催化进行,以 METTL3 和 METTL14 最为重要。甲基转移酶的主要作用就是催化 mRNA 上腺苷酸发生 m6A 修饰。而去甲基化酶包括 FTO 和 ALKBH5 等,它的作用是对已发生 m6A 修饰的碱基进行去甲基化修饰,使 RNA 甲基化成为一种可逆的反应^[8-9]。研究还发现 m6A 甲基转移酶(如 METT14)和去甲基酶(如 FTO)分别作为编码器和消码器。m6A 的阅读器可以选择性地结合到含有 m6A 修饰位点的 RNA 上,从而介导下游基因表达调控效应。国内外越来越多的学者在胚胎干细胞的维持和分化、昼夜节律改变、热休克反应、减数分裂进展和神经元功能等方面开展了 m6A 的深入研究^[10]。然而,目前仍有大部分 RNA 修饰的生物学作用未被发现,尤其是 m6A 甲基化在肾脏纤维化发生和发展中的作用。

本研究通过高通量测序的方法,分析了 RNA m6A 修饰在 UUO 小鼠纤维化肾脏 RNA m6A 甲基化差异位点的变化。这些差异化位点基因包括细胞连接、炎症反应、转分化、钙离子结合、细胞黏附、血管钙化等,其中差异最显著的基因 Cyclin D1 在调控细胞周期中发挥重要作用,为本课题后续的分子机制研究提供了重要依据。在本研究中,我们还通过 RT-PCR 实验初步筛选了参与调控 RNA 甲基化的关键调控酶,发现 METTL14 可能是引起肾脏纤维化过程中一系列基因表达改变的关键酶。由此我们推断 METTL14 可能是 RNA 甲基化参与肾脏纤维化的关键调控酶。结合目前 RNA 甲基化的系列研究,我们将围绕甲基化酶 METTL14 在肾脏纤维化中的作用开展深入研究。本研究的不足之处,我们只观察了输尿管梗阻后 7 d 的肾组织 RNA m6A 表达变化,对于梗阻后 RNA m6A 的动态变化过程没有进行观察,所以不能对其与肾脏纤维化发生、发展的相关性做出有效的预测。

RNA 表观遗传学已成为表观遗传学中一个快速发展的研究热点,在未来人类疾病的治疗方面有很好的发展前景^[11-15]。因此,深入研究和探讨 RNA 甲基化在肾脏纤维化的生物学作用,将加深我们对肾脏纤维化病理机制的理解,为临床诊断和治疗提供新思路。

参 考 文 献

- [1] Zhao BS, Wang X, Beadell AV, et al. M6A-dependent maternal mRNA clearance facilitates zebrafish maternal-to-zygotic transition[J]. *Nature*, 2017, 542(7642): 475. DOI: 10. 1038/nature21355.
- [2] Ma HH, Wang XY, Cai JB, et al. N6-Methyladenosine methyltransferase ZCCHC4 mediates ribosomal RNA methylation[J]. *Nat Chem Biol*, 2019, 15(1): 88-94. DOI: 10. 1038/s41589-018-0184-3.
- [3] Huang HL, Weng HY, Sun WJ, et al. Recognition of RNA N6-methyladenosine by IGF2BP proteins enhances mRNA stability and translation[J]. *Nat Cell Biol*, 2018, 20(3): 285-295. DOI: 10. 1038/s41556-018-0045-z.
- [4] Cui Q, Shi HL, Ye P, et al. m6A RNA methylation regulates the self-renewal and tumorigenesis of glioblastoma stem cells[J]. *Cell Rep*, 2017, 18(11): 2622-2634. DOI: 10. 1016/j. cellrep. 2017. 02. 059.
- [5] Ma JZ, Yang F, Zhou CC, et al. METTL14 suppresses the metastatic potential of hepatocellular carcinoma by modulating N6-methyladenosine-dependent primary MicroRNA processing[J]. *Hepatology*, 2017, 65(2): 529-543. DOI: 10. 1002/hep. 28885.
- [6] Kim D, Langmead B, Salzberg SL. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements[J]. *Nat Methods*, 2015, 12(4): 357-360. DOI: 10. 1038/nmeth. 3317.
- [7] Shen L, Shao NY, Liu XC, et al. diffReps: detecting differential chromatin modification sites from ChIP-seq data with biological replicates[J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e65598. DOI: 10. 1371/journal. pone. 0065598.
- [8] Chen MN, Wei L, Law CT, et al. RNA N6-methyladenosine methyltransferase-like 3 promotes liver cancer progression through YTHDF2-dependent posttranscriptional silencing of SOCS2[J]. *Hepatology*, 2018, 67(6): 2254-2270. DOI: 10. 1002/hep. 29683.
- [9] Zhuang C, Zhuang C, Luo X, et al. N6-methyladenosine demethylase FTO suppresses clear cell renal cell carcinoma through a novel FTO-PGC-1 α signalling axis[J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(3): 2163-2173. DOI: 10. 1111/jcmm. 14128.
- [10] Zhang SC, Zhao BS, Zhou AD, et al. m6A demethylase ALKBH5 maintains tumorigenicity of glioblastoma stem-like cells by sustaining FOXM1 expression and cell proliferation program[J]. *Cancer Cell*, 2017, 31(4): 591-606. e6. DOI: 10. 1016/j. ccell. 2017. 02. 013.
- [11] Ashapkin VV, Kutueva LI, Vanyushin BF. Aging as an epigenetic phenomenon[J]. *Curr Genom*, 2017, 18(5): 385-407. DOI: 10. 2174/1389202918666170412112130.
- [12] Li HB, Tong J, Zhu S, et al. m6A mRNA methylation controls T cell homeostasis by targeting the IL-7/STAT5/SOCS pathways[J]. *Nature*, 2017, 548(7667): 338-342. DOI: 10. 1038/nature23450.
- [13] Xiang Y, Laurent B, Hsu CH, et al. RNA m6A methylation regulates the ultraviolet-induced DNA damage response[J]. *Nature*, 2017, 543(7646): 573-576. DOI: 10. 1038/nature21671.
- [14] Zhang C, Chen Y, Sun B, et al. m6A modulates haematopoietic stem and progenitor cell specification[J]. *Nature*, 2017, 549(7671): 273-276. DOI: 10. 1038/nature23883.
- [15] Roundtree IA, Evans ME, Pan T, et al. Dynamic RNA modifications in gene expression regulation[J]. *Cell*, 2017, 169(7): 1187-1200. DOI: 10. 1016/j. cell. 2017. 05. 045.

(收稿日期: 2020-06-07)