

热预适应对大鼠肌肉组织中 m⁶A 修饰的影响

张静婷

(河南师范大学 体育学院,河南 新乡 453007)

摘要:为了解大鼠肌肉中 m⁶A 修饰在热预适应过程中的变化,并初步探讨 m⁶A 在热预适应过程中发挥的作用,选用 24 只成年雄性 SD 大鼠,随机分为 2 组,12 只为预热组,12 只为对照组.热预处理组是 42 °C 热处理 15 min,每天 3 次,连续 5 d,对照组不做任何处理.处理结束后检测关键酶的转录和翻译表达水平,以及总 m⁶A 的变化.与对照组相比,热预处理组的甲基转移酶 METTL3 和 METTL14, KIAA1429 的 mRNA 表达水平均有不同程度上升, METTL3 最为显著;去甲基化酶 FTO 和 ALKBH5 的 mRNA 水平下降, FTO 蛋白表达水平下降极显著; LC-MS 检测发现 m⁶A 修饰水平升高.在热预适应过程中,大鼠骨骼肌中 m⁶A 甲基化修饰增强,去甲基化减弱,总体 m⁶A 水平升高,表明 m⁶A 信号通路在大鼠肌肉预适应过程中可能发挥正调控作用.

关键词:热预适应; m⁶A 修饰; 甲基化酶; 去甲基化酶

中图分类号: G804

文献标志码: A

m⁶A 修饰是指由甲基化转移酶复合体在转录后识别特定 RNA 序列,在腺苷酸第 6 位 N 原子添加 1 个甲基团形成 N6-甲基腺嘌呤的甲基化修饰过程^[1]. m⁶A 修饰在 mRNA 中的出现的频率最高,哺乳动物中 m⁶A 约占所有腺苷核苷酸的 0.1~0.4%,每个 mRNA 分子中至少有 1 个位点,少数 mRNA 可能超过 20 个^[2].通常 m⁶A 修饰发生在 RRACH 序列(R=A 或 G, H=A, C 或 U)上,其修饰位点主要聚集在终止密码子和 3'非翻译区,能够调节 mRNA 转录、剪接、翻译和降解,参与体内多种生理和病理过程^[3].甲基化转移酶包括 METTL3/14、WTAP 和 KIAA1429 等,其作用是催化腺苷酸发生 m⁶A 修饰,去甲基化酶包括 FTO 和 ALKBH5 等,其作用是消除 RNA 上腺苷酸上的甲基化修饰,使 m⁶A 修饰能够双向调节.

热预适应是指运动员重复暴露在自然或人工高温环境中产生一系列提高人体耐受能力和缓解高温损伤的可逆适应性反应.在生理层面,热预适应可提高下丘脑体温调节中枢的敏感性,下调温度调节点,加速出汗、增加体表血流量、增加机体应对高温高湿环境的抵抗力^[4-5];在细胞和基因调控层面,热预适应的发生过程涉及多种热耐受和细胞保护反应,如抗炎症反应、抗凋亡和抗氧化反应增强、缺血性耐受性增强等,涉及的分子调控机制有热应激蛋白(HSP)信号通路、活性氧(ROS)清除基因、细胞凋亡基因 *Bcl-xl* 和 *Bad*、炎症基因肿瘤坏死因子 TNF- α 和白细胞介素 IL-1、缺氧诱导因子 HIF 等的表达调控^[6-7].研究证明甲基化在热应激、炎症发生、肌肉发育和再生、活性氧代谢和缺氧应激^[8-10]等多种热预适应相关通路中发挥重要作用.本研究选用健康大鼠作为研究对象,60 °C 高温重复刺激实验组至肛温 42 °C 构建热预适应模型,同时利用实时定量 PCR、蛋白印迹和液相色谱-质谱(LC-MS)分析检测 m⁶A 关键酶和 m⁶A 修饰水平在热预适应过程中的变化趋势.

1 材料与方法

1.1 热预适应大鼠模型建立

从北京维通利华实验动物公司选购成年雄性健康 SD 大鼠 24 只,体质量范围 240~260 g.实验室温度为

收稿日期:2021-11-18;修回日期:2022-01-28.

基金项目:河南师范大学博士科研启动费支持课题(5101069170120)

作者简介(通信作者):张静婷(1984—),女,山东潍坊人,河南师范大学讲师,博士,研究方向为运动疲劳与康复, E-mail: 70284902@qq.com.

18~24 ℃,空气相对湿度 45%~55%,自由饮水、饮食、运动和休息。预热组大鼠每 100 g 体质量注射 0.6 mL 质量分数为 6% 水合氯醛,腹腔注射麻醉,放置于 60 ℃ 恒温水浴箱中,保证大鼠自由呼吸,等肛温升至 42 ℃ 后,维持肛温 42 ℃ 15 min,再置于常温环境下恢复体温,1 h 后,升高体温 42 ℃ 15 min,反复 3 次,连续 5 d。对照组不进行任何处理。本实验中的动物饲养和处理程序均经学校动物伦理审查委员会审核,实验方案符合首都师范大学实验动物管理规程。

1.2 RNA 与蛋白提取

使用总 RNA 分离试剂盒(Tiangen,北京)从 100 mg 组织样品中提取骨骼肌总 RNA。总 RNA 的质量和浓度分别通过常规琼脂糖凝胶分析和分光光度法(ND-2000,Thermo Scientific)确定。

总蛋白质提取使用 RIPA 裂解液(碧云天,中国)然后用 BCA 法试剂盒测定蛋白质浓度。25 μg 变性后的蛋白质样品在质量分数为 12% SDS(十二烷基硫酸钠)-聚丙烯酰胺凝胶上进行分离并转移到聚偏二氟乙烯膜(PVDF)上。将 PVDF 膜置于质量分数为 5% 的脱脂奶粉(Amresco,美国)溶液中并在摇床上室温孵育 2 h。然后将 PVDF 膜与 FTO 蛋白抗体 4 ℃ 孵育过夜。用含有体积分数 0.5% 吐温-20(TBST)的 Tris 缓冲液(TBS)洗涤 4 次,每次 10 min。再将 PVDF 膜与二抗在室温孵育 1.5 h,之后用 TBST 洗涤 4 次,每次 8 min。使用 SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate 试剂盒(Thermo,美国)和 Tanon2500 全自动数码凝胶成像系统(天能,上海)曝光蛋白免疫印迹图像。

1.3 实时定量 PCR(RT-qPCR)

使用一步法 cDNA 合成试剂盒(Takara)将 2 μg miRNA 反转录。包括 10 μL 反应缓冲液,2 μL 质量分数为 0.1% BSA,2 μL miRNA PrimeScript® RT 酶混合物,2 μg 总 RNA 和不含 RNA 的 ddH₂O 体积为 20 μL。程序为 37 ℃,60 min,85 ℃,5 s。cDNA 产物储存在 -20 ℃。RT-qPCR(ABI7500)反应体系在冰上制备,包含 10 μL SYBR Premix Ex Taq,0.8 μL PCR 正向引物(10 μmol/L),0.8 μL 反向引物(10 μmol/L),0.4 μL ROX 参考染料,2 μL cDNA(100 ng/L)和 ddH₂O,终体积为 20 μL。将反应混合物在 96 孔板使用 2 步法进行反应:95 ℃ 预变性 30 s,然后在 95 ℃ 变性 5 s,60 ℃ 退火 30 s,40 个循环。使用 2^{-ΔΔCt} 方法确定对照组和热适应组大鼠之间的 mRNA 表达差异,所有反应均重复 3 次,基因 *ALKBH5*(NM_001191643.1),*FTO*(NM_001039713.1),*GAPDH*(NM_017008.4),*METTL14*(NM_001106470.1),*METTL3*(NM_001024794.1),*KIAA1429*(XM_032905901.1)定量引物参考 PrimerBank 数据库。

1.4 液相色谱-质谱(LC-MS)

使用 RNeasy 试剂盒(QIAGEN,德国)提取细胞中总 RNA,取 1 μg RNA 加入到含有核酸酶的 40 μL 缓冲液(10 mmol/L TrisHCl pH 7.0,100 mmol/L NaCl,2.5 mmol/L ZnCl₂)中,于 37 ℃ 孵育 0.5 h,然后加入 1 U 碱性磷酸酶,在 37 ℃ 下孵育 0.5 h。孵育结束,混合溶液用超纯水稀释 10 倍,取 40 μL 稀释后样品加入 10 μL 内标溶液和 60 μL 甲醇,混匀后进行检测,进样量 5 μL。

Shimadzu 20AD 液相色谱仪设置:C18 色谱柱(3 μm,3.0 mm×100 mm),柱温 40 ℃,流动相 A 为含有体积分数为 0.1% FA 的超纯水,流动相 B 为 MeOH,采用梯度洗脱,流速为 0.5 mL/min,总分析时间为 4 min。质谱系统为美国 AB SCIEX QTRAP 3200 串联质谱仪,配有电喷雾离子源 ESI,电离方式为 ESI⁺。离子源温度 550 ℃,电喷雾电压 5 000 V,扫描方式为多反应监测(MRM)模式。RNA 中发生 m⁶A 修饰的水平为 $C_{m^6A}/(C_A+C_{m^6A})$ 。

1.5 数据分析统计

定量数据来源于 3 次独立实验,数据采用均值±标准误。使用 SPSS 18.0 软件进行分析统计,多组数据通过单因素方差(Turkey 检验)分析,2 组数据采用独立样本 T 检验进行统计, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结 果

2.1 甲基转移酶基因的转录水平检测

单因素方差分析显示 3 种酶在热适应组的转录表达均有升高,其中 *METTL3* 上升 2 倍($P < 0.05$),*KIAA1429* 上升 1.5 倍($P < 0.05$),*METTL14* 有稍微上升($P > 0.05$,图 1)。

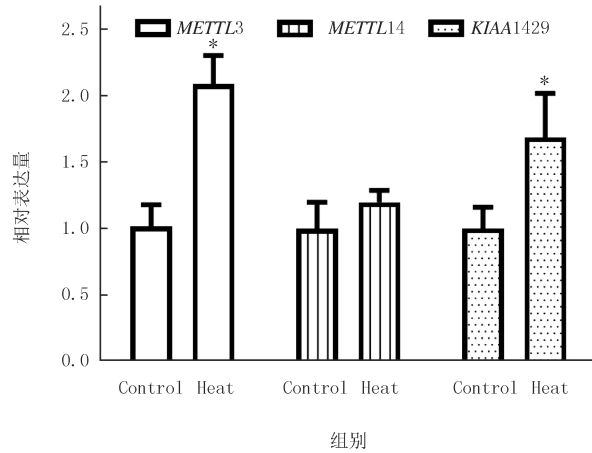


图1 3个甲基转移酶基因的RT-qPCR检测

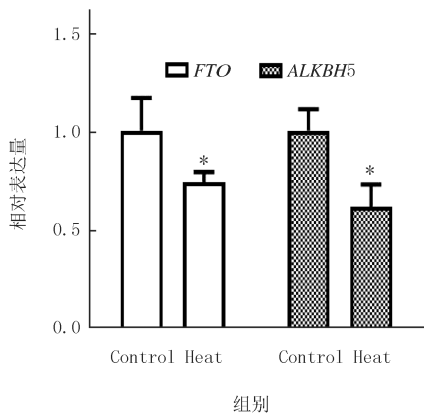
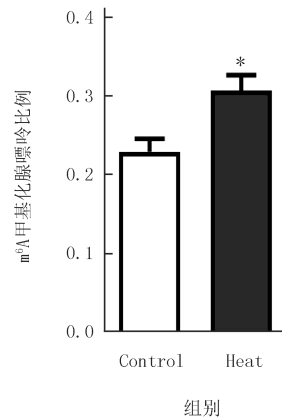
Fig.1 RT-qPCR detection of 3 methyltransferase genes

2.2 去甲基化酶基因的表达水平检测

通过 RT-qPCR 和单因素方差分析发现两个去甲基化酶基因 *FTO* 和 *ALKBH5* 的转录水平在热预适应组中均有下降 30% 到 40% ($P < 0.05$) (图 2). 通过蛋白印迹检测发现 *FTO* 在热预适应组中的蛋白含量极显著低于对照组.

2.3 m⁶A 甲基化水平检测

利用 LC-MS 分别检测对照组和热预适应组中总 RNA 中 m⁶A 甲基化的水平, 发现热预处理组显著高于对照组 (图 3).

图2 2个去甲基化酶基因*FTO*和*ALKBH5*的RT-qPCR检测Fig.2 RT-qPCR detection of 2 demethylase genes *FTO* and *ALKBH5*图3 总RNA中m⁶A甲基化水平检测Fig.3 Detection of m⁶A methylation level in total RNA

3 讨论

3.1 热预适应对甲基转移酶的影响

mRNA 的 m⁶A 修饰过程由一个多蛋白甲基转移酶复合体催化而成, 该复合体由甲基转移酶样蛋白 METTL3, METTL14 和辅助因子组成, 辅助因子包括肾母细胞瘤关蛋白 WTAP, 病毒样 m⁶A 甲基转移酶相关蛋白 VIRMA/KIAA1429、含锌指 CCCH 型蛋白 ZC3H13 和 RNA 结合基序蛋白 RBM15B 等^[11]. 其中, METTL3 是甲基转移酶复合体促进 m⁶A 修饰形成的催化中心, METTL14 是负责将复合物与 RNA 结合稳

定整个复合物的结构,辅助因子 WTAP 能够将复合物固定于 mRNA, VIRMA 可将 m⁶A 与 3'UTR 结合, ZC3H13 诱导复合物向核内转移, RBM15B 能够结合在尿嘧啶富集区,促进甲基化过程^[8-9,12]. METTL3-METTL14 形成的异二聚体复合物能够结合 mRNA 中大部分 m⁶A 位点,小鼠细胞中 METTL3 基因缺失或 METTL14 失活会导致 poly(A)RNA 中总 m⁶A 损失超过 99%^[13].

本实验发现热预适应处理能提高甲基转移酶复合体中 METTL3、METTL14 和 KIAA1429 的转录水平,其中以 METTL3 的变化最为显著,这可能与它是复合体的催化中心有关.卢增奎等^[14]研究发现热应激处理能显著增加绵羊肝脏中 METTL3 和 METTL14 的表达,但是 METTL3 蛋白在热应激绵羊中上升倍数更高.试验中 mRNA 的变化有较大差异,这可能与实验处理的程度和时间、物种和采样组织存在差异有关.试验中观察到 m⁶A 甲基化修饰水平的上升,通过 siRNA 抑制 METTL3 表达能降低 m⁶A 水平,并影响其后期的移植能力^[15].从 METTL3 条件敲除鼠模型中分离成肌干细胞,发现干细胞增殖和损伤后肌肉再生收到严重影响,而在 METTL3 敲入鼠中模型能促进增殖和损伤后的修复,进一步的研究发现 METTL3 通过甲基化修饰在翻译水平调节 Notch 信号通路参与这一过程^[15].在人肝癌细胞系 HepG2 上的研究发现,41 °C 持续 1 h 的热休克处理后, METTL3 的表达水平下降,而 m⁶A 特异性结合蛋白 YTHDF2 和热休克蛋白 HSP70 的表达水平上升,大量 YTHDF2 蛋白由细胞质转移到细胞核中, siRNA-METTL3 会上调或下降 HSP70, HSP60 和 HSP27^[16-17].说明热预适应可能通过提高 m⁶A 甲基化修饰促进肌纤维再生或促进热应激蛋白表达等方式提高机体对热应激的抵抗力.

3.2 热预适应对去甲基转移酶的影响

mRNA 的去甲基化过程由去甲基转移酶介导,当去甲基转移酶敲除或者表达水平降低时,转录本的 m⁶A 修饰水平升高.由于大部分 RNA 半衰期很短, m⁶A 修饰被长期认为是不可逆的. m⁶A 去甲基酶的发现改变了这一认知.2011 年在人细胞上干扰和超表达 FTO 以及体外试验发现包含 m⁶A 的 RNA 是 FTO 的重要底物, m⁶A 修饰是动态可逆的过程,进一步丰富了甲基化调节的分子机制^[1]. FTO 通过 N6-羟甲基腺苷 (hm⁶A) 和 N6-甲酰腺苷 (fm⁶A) 中间体将 m⁶A 催化成 A (腺嘌呤, Adenine), 且该反应速度较快^[3]. 2013 年人们发现了第 2 个去甲基转移酶 ALKB 同源蛋白 ALKBH5, 为 FTO 的同系物, 都属于 Fe(II) 和 α -酮戊二酸依赖性 ALKB 加氧酶家族, 与 FTO 一样促进体内和体外的 mRNA 脱甲基化, 但 ALKBH5 可直接将 m⁶A 转化为 A, 且反应速度比 FTO 慢^[18]. 本实验首先验证了热预适应能显著下调 FTO 和 ALKBH5 的 mRNA 转录水平, 随后利用蛋白印迹显示了 FTO 在翻译水平的显著下降. FTO 转录和翻译水平下降的结果与小鼠胚胎成纤维细胞 (MEF) 上的结果一致, 当 MEF 细胞遭受 1 h, 42 °C 的热休克处理后, 其 mRNA 和蛋白在处理 2 h 内呈下降趋势, 有助于增加 5'UTR 的甲基化^[9]. 由此可以推测热预适应能够通过降低去甲基转移酶的转录和翻译水平, 抑制肌肉中的去甲基转移酶活性. mRNA 中 m⁶A 修饰是动物中最丰富的 RNA 修饰, 一旦打破这种平衡将会引起严重的生理功能异常.

3.3 热预适应对 m⁶A 修饰水平的影响

本实验中发现热预适应可使肌肉中的 m⁶A 甲基化修饰水平显著升高, 甲基转移酶表达水平上升和去甲基转移酶表达水平下降所产生的结果一致. 一般认为 m⁶A 可以提高 mRNA 稳定性, 促进细胞翻译出更多的蛋白质, 使其正常的增殖、分化、发挥功能和抵抗应激, 但 m⁶A 异常可能伴随癌症的发生. 在热预适应过程中, 细胞受到轻度热刺激的影响, 细胞代谢增强, 热应激响应基因和信号通路被激活, 多种关键基因开始转录和翻译, m⁶A 能通过提高 mRNA 稳定性和促进 mRNA 出核转移进而促进基因表达谱发生转变.

目前有多种方法检测 m⁶A 修饰水平, 如 2D-TLC, Dot-blot 法, 检测特定基因位点 m⁶A 水平的 SCAR-LET 法以及在全转录组中定位 m⁶A 位置的 MeRIP-Seq 法等^[14]. 这些方法中有的需要放射性标记, 有的无法检测 RNA 中所有位点, 或者需要非特异性抗体以及检测灵敏度不理想等. 综合比较后, 本实验选择并改良了可以定量检测 RNA 中所有 m⁶A 位点的 LC-MS 法, 具有样品前处理简单, 仪器分析时间短, 适用于大样本量的优点. 本实验利用 LC-MS 法发现了 m⁶A 修饰在热预适应过程中总体水平的上升趋势, 初步揭示其可能在热预适应过程中发挥调控作用, 但是该实验却不能在检测已知靶基因如热应激蛋白、缺氧诱导因子和肿瘤坏死因子等在热预适应过程中的变化趋势, 也不能通过 m⁶A 水平的变化检测参与热预适应调控的未知基因和信号通路. 在未来的研究中, 需要采用 SCARLET, MeRIP-Seq 和 PA-m⁶A-Seq 等可识别特定基因或在

转录组中定位 m⁶A 位点方法,分析发现新的候选关键靶基因和信号通路,然后借助基因敲除或超表达等方法进行验证。

参 考 文 献

- [1] 孙文举,周克任,杨建华,等.mRNA 修饰研究概况及展望[J].生命科学,2016,28(5):531-538.
SUN W J,ZHOU K R,YANG J H,et al.Research progress and prospects of mRNA modification[J].Chinese Bulletin of Life Sciences, 2016,28(5):531-538.
- [2] ZACCARA S,RIES R J,JAFFREY S R.Reading, writing and erasing mRNA methylation[J].Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2019,20(10):608-624.
- [3] 薛翔澜,丁洋洋,刘悦,等.哺乳动物 m⁶A 与生长发育相关生物学功能研究进展[J].生物技术通报,2021,37(4):251-259.
XUE X L,DING Y Y,LIU Y,et al.Research progress on biological function growth and development related to N⁶-methyladenosine in mammals[J].Biotechnology Bulletin,2021,37(4):251-259.
- [4] 刘珺,等.模拟条件下热预适应训练的必要性、方法和效果评估[J].武警医学,2021,32(07):641-644.
LIU J,et al.Necessity, method and effect evaluation of thermal preconditioning training under simulated conditions[J].Med J Chin PAP, 2021,32(07):641-644.
- [5] 高金卯,张水宽,谢晓莉.热环境对军队战斗力的影响及热致疾病防治策略[J].中华灾害救援医学,2021,9(4):946-949.
GAO J M,ZHANG S K,XIE X L.Influence of thermal environment on combat effectiveness and the strategies to the prevention and treatment of heat illness[J].Chinese Journal of Disaster Medicine,2021,9(4):946-949.
- [6] SCHNEIDER S M.Heat acclimation:gold mines and genes[J].Temperature(Austin, Tex),2016,3(4):527-538.
- [7] 徐嘉宝,吴卫东.有氧运动通过脂联素/p38MAPK 延缓高脂膳食大鼠肝脏炎症[J].河南师范大学学报(自然科学版),2022,50(1):139-143.
XU J B,WU W D. Aerobic exercise retarded liver inflammation by adiponectin/p38MAPK in rats with high fat diet[J].Journal of Henan Normal University (Natural Science Edition),2022,50(1):139-143.
- [8] ZHOU J,WAN J,GAO X,et al.Dynamic m⁶A mRNA methylation directs translational control of heat shock response[J].Nature,2015, 526(7574):591-594.
- [9] YE F,WANG X Y,TU S,et al.The effects of NCBP3 on METTL3-mediated m⁶A RNA methylation to enhance translation process in hypoxic cardiomyocytes[J].Journal of Cellular and Molecular Medicine,2021,25(18):8920-8928.
- [10] 黎涌明,邱俊强,徐飞,等.奥运会运动员竞技表现提升的非训练类策略:基于国际创新成果与实践应用[J].北京体育大学学报,2020, 43(4):51-63.
LI Y M, QIU J Q, XU F, et al. Non-training strategies for performance enhancement in Olympic Athletes; based on international innovative findings and practical application[J].Journal of Beijing Sport University,2020,43(4):51-63.
- [11] 茹文秀,沈雪梅,张晓燕,等.RNA m⁶A 甲基化修饰的研究进展[J].中国牛业科学,2019,45(4):44-49.
RU W X, SHEN X M, ZHANG X Y, et al. Recent progresses in RNA m⁶A methylation research[J].China Cattle Science,2019,45(4): 44-49.
- [12] 王晓蓉,梁炜琪,辉朝晖,等.m⁶A 修饰在脂肪生成中的作用[J].中国细胞生物学学报,2021,43(10):2101-2108.
WANG X R, LIANG W Q, YUN Z H, et al. The role of m⁶A modification in adipogenesis[J].Chinese Journal of Cell Biology,2021, 43(10):2101-2108.
- [13] GEULA S, MOSHITCH-MOSHKOVITZ S, DOMINISSINI D, et al. Stem cells. m⁶A mRNA methylation facilitates resolution of naive pluripotency toward differentiation[J].Science,2015,347(6225):1002-1006.
- [14] 卢曾奎.基于 RNA-Seq 和 MeRIP-Seq 的湖羊热应激研究[D].兰州:甘肃农业大学,2019.
LU Z K. RNA-seq and MeRIP-seq reveal the heat stress response in hu sheep(Ovis aries)[D].Lanzhou:Gansu Agricultural University, 2019.
- [15] GHELLER B J, BLUM J E, FONG E H H, et al. A defined N⁶-methyladenosine(m⁶A) profile conferred by METTL3 regulates muscle stem cell/myoblast state transitions[J].Cell Death Discovery,2020,6:95.
- [16] YU J Y, LI Y, WANG T, et al. Modification of N⁶-methyladenosine RNA methylation on heat shock protein expression[J].PLoS One, 2018,13(6):e0198604.
- [17] 王曼,鄢丹,孟波,等.基于非标记定量技术的肝细胞癌血浆蛋白质组学研究[J].河南师范大学学报(自然科学版),2022,50(1):115-122.
WANG M, YAN D, MENG B, et al. Plasma proteomic analysis of hepatocellular carcinoma based on label-free quantitative technology [J].Journal of Henan Normal University (Natural Science Edition),2022,50(1):115-122.
- [18] ZHENG G Q, DAHL J A, NIU Y M, et al. ALKBH₅ is a mammalian RNA demethylase that impacts RNA metabolism and mouse fertility [J].Molecular Cell,2013,49(1):18-29.

Effects of heat precondition on m⁶A modification in rat muscle tissue

Zhang Jingting

(College of Physical Education, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: To observe the changes of m⁶A modification in rat muscles during heat precondition, and to preliminarily explore the role of m⁶A in heatprecondition, 24 adult male SD rats were randomly divided into 2 groups, 12 were preheating group and 12 were control group. The preheating group was treated at 42 °C for 15 minutes, 3 times a day for 5 consecutive days, and the control group were raised under the room temperature. After the treatment, the transcription and translation expression levels of key enzymes and the changes of total m⁶A were detected. Compared with the control group, the mRNA expression levels of methyltransferases METTL3 and METTL14 and KIAA1429 in the heat precondition group increased to varying degrees, with METTL3 being the most significant. The mRNA expression of demethylases FTO and ALKBH5 decreased, and the FTO protein reduced significantly. LC-MS detection revealed that the m⁶A modification level increased in total RNA. In the process of heatprecondition, m⁶A methylation modification in rat skeletal muscle is enhanced, demethylation is weakened, and overall m⁶A level increases, indicating that m⁶A signaling pathway may play a positive regulatory role.

Keywords: heat precondition; m⁶A modification; methylase; demethylase

[责任编辑 刘洋 杨浦]