

N⁶ 甲基腺苷在砷诱导 tau 蛋白磷酸化中的作用研究

龙科言, 熊文晓, 郑群荟, 张乾, 张遵真, 赵田禾

四川大学华西公共卫生学院 / 华西第四医院, 四川 成都 610041

摘要:目的 探究 N⁶ 甲基腺苷(N⁶-methyladenosine, m⁶A)是否参与砷诱导的 tau 蛋白磷酸化。方法 采用 0、1、5 和 10 μmol/L 亚砷酸钠处理神经母细胞瘤 (SH-SY5Y) 细胞 24 h 后, 检测细胞内 m⁶A 水平, qPCR 检测细胞内 m⁶A 相关酶 mRNA 的表达量, Western Blot 检测细胞内总 tau 蛋白表达量、磷酸化 tau 蛋白水平和 m⁶A 相关酶的表达量。利用 3-脱氮腺苷抑制细胞内 m⁶A 水平后, 验证细胞内 m⁶A 水平和 tau 蛋白磷酸化水平的变化。采用 SPSS 对实验结果进行方差分析, 检验水准 α=0.05。结果 各浓度砷处理 SH-SY5Y 细胞 24 h 后, 细胞内总 tau 蛋白水平差异不显著 ($F=3.047, P>0.05$)。5 μmol/L 砷处理细胞 24 h 后, 细胞内 m⁶A 水平上升 31.4% ($F=4.511, P<0.05$), 磷酸化 tau 蛋白 (T231 位点) 水平上升 42.6% (95%CI: 0.165 ~ 0.689, $P<0.01$)。磷酸化 tau 蛋白 (S202+T205 位点) 水平随砷浓度的提高而上升, 最高在 10 μmol/L 浓度砷处理 24 h 后上升 55.2% (95%CI: 0.050 ~ 0.409, $P<0.05$)。随着砷处理浓度增加, 细胞内 METTL3 mRNA 表达增加, 10 μmol/L 浓度下最高增加 73.2% (95%CI: 0.201 ~ 1.423, $P<0.05$)。METTL14、WTAP 和 FTO mRNA 表达量下降, 在 10 μmol/L 砷处理后分别降至对照组的 65.4% (95%CI: -1.055 ~ -0.337, $P<0.01$)、64.8% (95%CI: -0.389 ~ -0.111, $P<0.05$) 和 85.4% (95%CI: -0.030 ~ -0.010, $P<0.01$)。ALKBH5 mRNA 表达先升高后降低, 在 1 μmol/L 砷处理 24 h 后表达量增加 27.5% (95%CI: 0.033 ~ 0.147, $P<0.05$); 而 10 μmol/L 浓度砷处理后降低 30.7% (95%CI: -1.62 ~ -0.038, $P<0.01$)。砷处理导致 METTL3 蛋白表达增高, 最高在 5 μmol/L 浓度砷处理 24 h 后增加 107.1% (95%CI: 0.331 ~ 1.009, $P<0.01$), 而 METTL14、WTAP 和 ALKBH5 蛋白表达量在 10 μmol/L 砷处理 SH-SY5Y 细胞 24 h 后分别下降至对照组的 20.4% (95%CI: -0.788 ~ -0.509, $P<0.001$)、23.5% (95%CI: -1.371 ~ -0.685, $P<0.001$) 和 49.2% (95%CI: -0.423 ~ -0.183, $P<0.001$)。FTO 蛋白表达量随砷浓度的提高呈下降趋势, 最低在 10 μmol/L 砷处理 24 h 后降低 45.3% (95%CI: -0.709 ~ -0.413, $P<0.001$)。DAA 抑制细胞内 m⁶A 水平后, 磷酸化 tau 蛋白水平均显著降低 ($P<0.05$)。结论 砷可以通过增加 m⁶A 甲基化酶 METTL3 的表达量、降低 m⁶A 去甲基化酶 FTO 和 ALKBH5 的表达量, 提高 SH-SY5Y 细胞内的 m⁶A 水平, 进而诱导细胞内 tau 蛋白发生磷酸化。

关键词: 砷; N⁶ 甲基腺苷; 磷酸化 tau 蛋白; SH-SY5Y 细胞

中图分类号: R12 文献标志码: A 文章编号: 1003-8507(2025)03-533-08

DOI: 10.20043/j.cnki.MPM.202406423

Study on the role of N⁶-methyl adenosine in arsenic induced tau protein phosphorylation

LONG Ke-yan, XIONG Wen-xiao, ZHENG Qun-hui, ZHANG Qian, ZHANG Zun-zhen, ZHAO Tian-he

West China School of Public Health/West China Fourth Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China

Abstract: Objective To explore whether N⁶-methyl adenosine (m⁶A) is involved in arsenic-induced tau protein phosphorylation. **Methods** Neuroblastoma (SH-SY5Y) cells were treated with 0, 1, 5, 10 μmol/L sodium arsenate for 24 hours. Then, the intracellular m⁶A level was detected, the mRNA expression levels of m⁶A-related enzymes in the cells were detected by qPCR, and the total tau protein expression level, phosphorylated tau protein level and m⁶A-related enzyme expression levels in the cells were detected by Western Blot. After inhibiting the intracellular m⁶A level with 3-deoxyadenosines, the changes in the intracellular m⁶A level and tau protein phosphorylation level were verified. SPSS was used for analysis of variance of the experimental results, with α=0.05. **Results** After SH-SY5Y cells were treated with various concentrations of arsenic for 24 hours, there was no significant difference in the total tau protein level in the cells ($F=3.047, P>0.05$). After the cells were treated with 5 μmol/L arsenic for 24 hours, the intracellular m⁶A level increased by 31.4% ($F=4.511, P<0.05$), and the phosphorylated tau protein (at site T231) level increased by 42.6% (95%CI: 0.165-0.689, $P<0.01$). The level of phosphorylated tau protein (at sites S202 + T205) increased with the increase in arsenic concentration, and the highest increase was 55.2% (95%CI: 0.050-0.409, $P<0.05$) after treatment with 10 μmol/L arsenic for 24 hours. As the arsenic treatment concentration

基金项目: 四川省自然科学基金青年基金项目 (24NSFSC3231)

作者简介: 龙科言 (1999—), 男, 硕士在读, 研究方向: 环境与健康

通信作者: 赵田禾, E-mail: zhaotianhe8@163.com

increased, the METTL3 mRNA expression in the cells increased, with the highest increase of 73.2% (95%CI: 0.201–1.423, $P < 0.05$) at a concentration of 10 $\mu\text{mol/L}$. The mRNA expression levels of METTL14, WTAP and FTO decreased, and they decreased to 65.4% (95%CI: -1.055 to -0.337, $P < 0.01$), 64.8% (95%CI: -0.389 to -0.111, $P < 0.05$) and 85.4% (95%CI: -0.030 to -0.010, $P < 0.01$) of the control group respectively after treatment with 10 $\mu\text{mol/L}$ arsenic. The ALKBH5 mRNA expression first increased and then decreased, with an increase of 27.5% (95%CI: 0.033–0.147, $P < 0.05$) after treatment with 1 $\mu\text{mol/L}$ arsenic for 24 hours; while it decreased by 30.7% (95%CI: -1.62 to -0.038, $P < 0.01$) after treatment with 10 $\mu\text{mol/L}$ arsenic. Arsenic treatment led to an increase in METTL3 protein expression, with the highest increase of 107.1% (95%CI: 0.331–1.009, $P < 0.01$) after treatment with 5 $\mu\text{mol/L}$ arsenic for 24 hours, while the protein expression levels of METTL14, WTAP and ALKBH5 decreased to 20.4% (95%CI: -0.788 to -0.509, $P < 0.001$), 23.5% (95%CI: -1.371 to -0.685, $P < 0.001$) and 49.2% (95%CI: -0.423 to -0.183, $P < 0.001$) of the control group respectively after treatment of SH-SY5Y cells with 10 $\mu\text{mol/L}$ arsenic for 24 hours. The FTO protein expression level showed a decreasing trend with the increase in arsenic concentration, with the lowest decrease of 45.3% (95%CI: -0.709 to -0.413, $P < 0.001$) after treatment with 10 $\mu\text{mol/L}$ arsenic for 24 hours. After DAA inhibited the intracellular $m^6\text{A}$ level, the phosphorylated tau protein levels were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Arsenic can increase the $m^6\text{A}$ level in SH-SY5Y cells by increasing the expression level of the $m^6\text{A}$ methylase METTL3 and decreasing the expression levels of the $m^6\text{A}$ demethylases FTO and ALKBH5, thereby inducing the phosphorylation of tau protein in the cells.

Keywords: Arsenic; N^6 -methyl adenosine; Phosphorylated tau protein; SH-SY5Y cells

砷不仅是人类致癌物,同时也是明确的神经毒物,能通过血脑屏障富集于特定脑区^[1],是以阿尔茨海默症(Alzheimer disease, AD)为代表的多种神经系统退行性疾病的危险因素^[2]。Tau 蛋白是一种微管相关蛋白,主要在神经组织中表达,生理状态下 tau 蛋白促进微管的组装,并维持微管结构的稳定^[3]。已有研究显示砷暴露可诱导 tau 蛋白磷酸化^[4],磷酸化的 tau 蛋白将失去正常的生理功能,并从微管剥离^[5],最终经过折叠、剪切等变化演变成 tau 蛋白聚集^[6]。磷酸化 tau(phosphorylated tau, p-tau)蛋白聚集是 AD 的主要病理特征之一,临床上已将部分 p-tau 蛋白认定为 AD 的生物标志物^[7]。砷诱导 tau 蛋白磷酸化的机制研究不多,特别是 RNA 表观遗传学中的 N^6 甲基腺苷(N^6 -methyladenosine, $m^6\text{A}$) 在砷诱导 tau 蛋白磷酸化中的作用知之甚少。大量研究显示 $m^6\text{A}$ 是细胞感知外界环境变化的关键因子,与砷诱发的神经系统损伤密切相关^[8-9]。更重要的是,细胞内 $m^6\text{A}$ 不仅可以激活磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶(BPI3K/AKT)通路^[10],也可以介导糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β)的磷酸化^[11],提示 $m^6\text{A}$ 具有调控蛋白磷酸化的作用。然而, $m^6\text{A}$ 是否可以引起 tau 蛋白发生磷酸化目前尚未见报道,因此本研究从表观遗传学角度探讨砷是否可以通过 $m^6\text{A}$ 诱导 tau 蛋白发生磷酸化,为砷的神经毒性研究提供新线索。

1 材料与方

1.1 细胞与受试物 采用人源性神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞(武汉赛维尔生物)作为研究对象。亚砷酸钠(sodium arsenite, NaAsO_2 , 购自 Fluka, 纯度 > 99.0%)是典型的砷化物,白色粉末易溶于水,广泛应用于砷毒性机制研究。

1.2 Cell Counting Kit-8(CCK8)法检测 SH-SY5Y 细

胞存活率 采用 CCK8 法探究不同浓度、不同时间的亚砷酸钠对 SH-SY5Y 细胞增殖的影响。将 SH-SY5Y 细胞按 1×10^5 个/孔的浓度接种至 96 孔板中,采用 1~30 $\mu\text{mol/L}$ (实验组浓度梯度设置为 1、5、10、20 和 30 $\mu\text{mol/L}$, 设置对照组和空白组)亚砷酸钠分别处理 24、48、72 和 96 h,加入 CCK8 试剂(TargetMol 公司)于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h 后,用酶标仪(Thermo Fisher, Multiskan GO 1510)检测 450 nm 吸光值,设置对照组吸光度为 100%,按公式计算细胞存活率。细胞存活率(%) = $\frac{\text{实验组吸光值} - \text{空白组吸光值}}{\text{对照组吸光值} - \text{空白组吸光值}} \times 100$

1.3 蛋白免疫印迹(Western Blot, WB)检测细胞内蛋白表达量 根据 1.2 实验的结果,设置 WB 分组为对照组和砷处理组(分为 1、5、10 $\mu\text{mol/L}$ 亚砷酸钠),处理时间为 24 h。采用 RIPA 裂解液(TargetMol 公司)提取细胞总蛋白,用 BCA 法(南京诺唯赞生物)测定蛋白浓度。WB 方案参照本课题组以前的研究^[12],电泳、转膜、封闭后孵育一抗和二抗,最后滴加 ECL 显色液成像拍照。

T231(苏氨酸)位点是 tau 蛋白最先发生磷酸化的位点^[7],S202+T205(丝氨酸 202+ 苏氨酸 205)位点磷酸化伴随 tau 蛋白的构象变化,可以反映细胞中神经原纤维缠结(一种由高磷酸化 tau 蛋白组成的聚集体)的水平^[6],因此本研究选择 T231 和 S202+T205 位点作为 tau 蛋白磷酸化的观察指标。METTL3、METTL14 和 WTAP ($m^6\text{A}$ 甲基化酶)以及 FTO 和 ALKBH5($m^6\text{A}$ 去甲基化酶)是目前研究较为深入,功能明确的 $m^6\text{A}$ 相关酶^[8]。本研究所使用的 WB 抗体见表 1。

1.4 实时荧光定量 PCR(qPCR)检测 $m^6\text{A}$ 相关酶的基因表达水平 实验分组与 1.3 一致,细胞处理 24 h 后,提取总 RNA(Vazyme Biotech),逆转录为 cDNA 以

备用。qPCR 方案参照本课题组以前的研究^[12], 设置 GAPDH 基因为内参。依据阈值循环数(Ct 值)计算 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 以进行数据处理和统计分析。本研究所选用的 qPCR 引物见表 2。

表 1 研究中使用的 WB 抗体

Table 1 WB antibodies used in the study

抗体名称	厂家	备注
Anti-Tau(TAU-5)	Abcam	总 tau 蛋白
Phospho-Tau(Thr231)	Affinity	p-tau 蛋白
Anti-Tau(phospho S202 + T205)	Abcam	p-tau 蛋白
METTL3	Abcam	m ⁶ A 甲基化酶
METTL14	Abclonal	m ⁶ A 甲基化酶
WTAP	Abclonal	m ⁶ A 甲基化酶
FTO	成都正能生物	m ⁶ A 去甲基化酶
ALKBH5	成都正能生物	m ⁶ A 去甲基化酶
GAPDH	华安生物	内参蛋白
Goat anti-Rabbit IgG Goat Polyclonal Antibody	华安生物	二抗, 抗兔

表 2 研究中使用的 qPCR 引物

Table 2 The qPCR primers used in the study

基因名称	引物序列(5'-3')
METTL3	F: AGATGGGCTAGAAAGCCTCCT
	R: TGGTCAGCATAGGTTACAAGAGT
METTL14	F: GAGTGTCTTTACGAAAATGGGGT
	R: CCGTCTGTGCTACGCTTCA
WTAP	F: TTGTAATCCGACTAGCAACCAA
	R: GCTGGGTCTACCATTGTTGATCT
ALKBH5	F: CATCTAATCTTGTCTTCCTGAG
	R: TCCAGTTCAAGCCTATTTCG
FTO	F: CTTACCAAGGAGACTGCATTTTC
	R: CAAGGTTCCCTGTTGAGCACTCTG
GAPDH	F: TCTATAAATTGAGCCCGCAGC
	R: CCAATACGACCAAATCCGTTG

1.5 检测细胞内 m⁶A 总水平 采用斑点印迹(Dot Blot) 和 EpiQuik m⁶A RNA Methylation Quantification 试剂盒(简称 EpiQuik 法)两种方法测定细胞内 m⁶A 水平。实验分组与 1.3 一致。斑点印迹是将 RNA 样品于 95℃加热 3 min 后接种至尼龙膜, 于紫外灯下照射 1 h; 用 5%脱脂牛奶封闭 1 h 后孵育一抗(Anti-m⁶A Antibody, 华安生物, 稀释比 1 : 2 000)过夜, 次日于室温孵育二抗 (Goat anti-Rabbit IgG Goat Polyclonal Antibody, 华安生物, 稀释比 1 : 50 000)1 h, 滴加 ECL 显色液成像拍照。成像后洗脱 ECL 显色液, 将膜置于亚甲蓝染色液中染色 30 min, 随后洗去多余染色液并拍照。EpiQuik 法参照本课题组以前的研究^[12], 根据吸光度测算 m⁶A 水平。

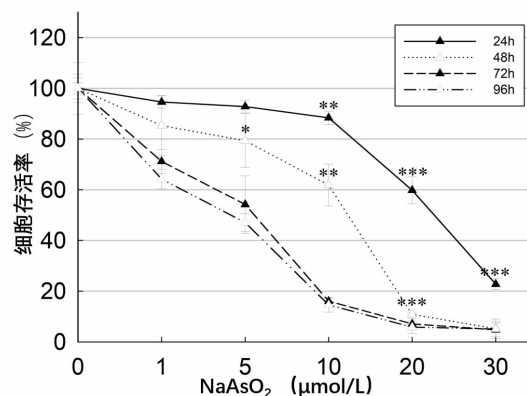
1.6 3-脱氮腺苷(3-Deazaadenosine, DAA)抑制细胞的整体 m⁶A 水平 采用 DAA(APEX-BIO 公司, 终浓度为 3.9 μmol/L)预处理细胞 24 h 后, 加入亚砷酸钠(终

浓度为 5 μmol/L)处理 24 h; 随后提取细胞总 RNA 检测 m⁶A 抑制效果, 见 1.5 实验, 提取总蛋白检测 p-tau 蛋白水平, 见 1.3 实验。

1.7 统计分析 所有实验重复至少 3 次, 实验数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 来表示。采用 SPSS 26 进行统计分析。对于 3 组及 3 组以上的数据间比较使用单因素方差分析(one-way analysis of variance, ANOVA), 检验水准 $\alpha=0.05$; 当方差分析表明差异显著时, 采用 Student-Newman-Keuls 或 Dunnett *t* 检验进行多组内各处理组与对照组的比较。使用 SigmaPlot 12.5 制作图表, 误差棒值表示一个标准差大小。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 砷抑制 SH-SY5Y 细胞增殖 CCK8 实验表明, 亚砷酸钠在各浓度下均可以抑制 SH-SY5Y 细胞的增殖。10 μmol/L 砷处理 24 h 后, 细胞存活率为 88.4%; 5 μmol/L 砷处理 48 h 后, 细胞存活率为 79.4%; 而 1 μmol/L 砷处理 72 h 后, 细胞存活率降低至 71.2%。因此, 为确保细胞存活率高于 80%, 保证后续实验的可行性, 本研究设置亚砷酸钠的浓度梯度为 1、5 和 10 μmol/L, 处理时间为 24 h。见图 1。

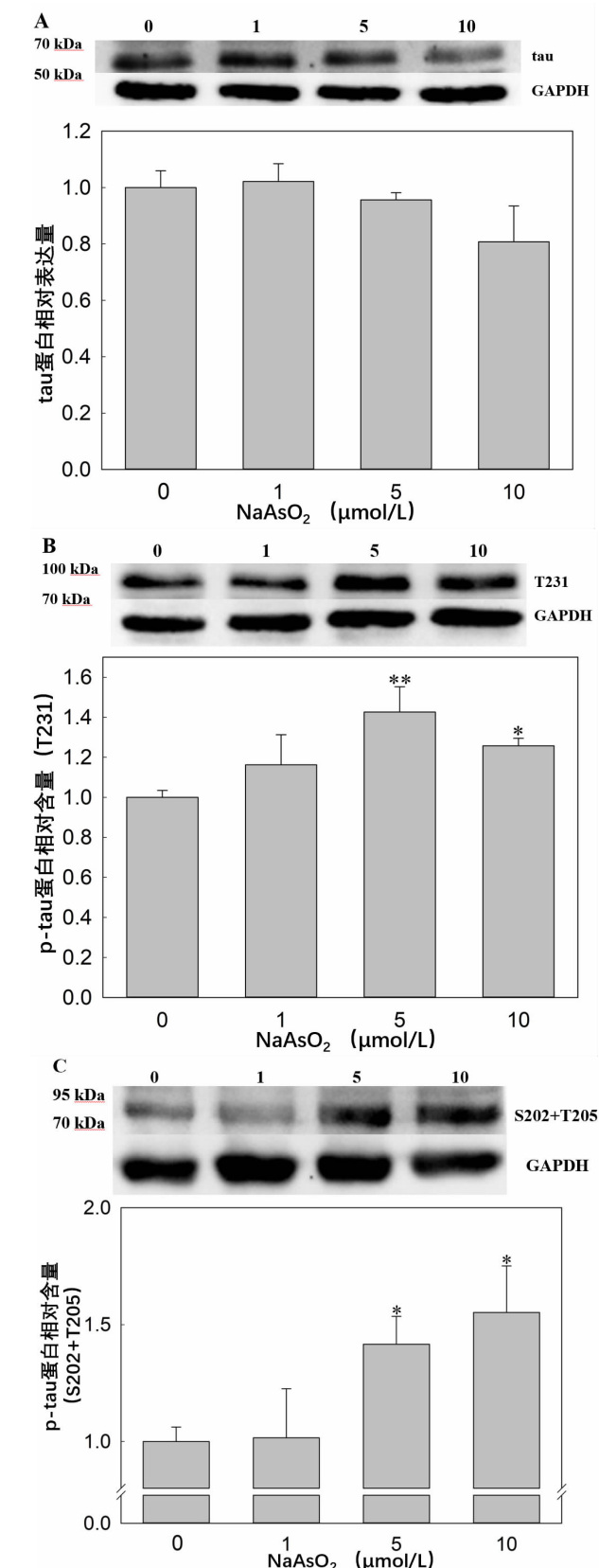


注: 不同曲线代表不同处理时间; **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001。

图 1 砷抑制 SH-SY5Y 细胞的增殖(*n*=3)

Figure 1 Arsenic inhibits the proliferation of SH-SY5Y cells (*n*=3)

2.2 砷导致细胞内 tau 蛋白磷酸化增加 与对照组相比, 1、5 和 10 μmol/L 砷处理 SH-SY5Y 细胞 24 h 后, 细胞内总 tau 蛋白表达量的差异不具有统计学差异(*F*=3.047, *P*>0.05), 见图 2A。然而, 砷处理可以显著增加细胞内 tau 蛋白 T231 位点(图 2B)磷酸化, 在 5 μmol/L 砷处理 24 h 后最高上升 42.6% (95%CI: 0.165 ~ 0.689, *P*<0.01)。此外, S202+T205 位点的磷酸化水平(图 2C)伴随砷浓度的提高而上升, 在 10 μmol/L 浓度砷处理 24 h 后最高上升 55.2% (95%CI: 0.050 ~ 0.409, *P*<0.05)。这些结果表明, 砷可以显著诱导 SH-SY5Y 细胞内 p-tau 蛋白增加。

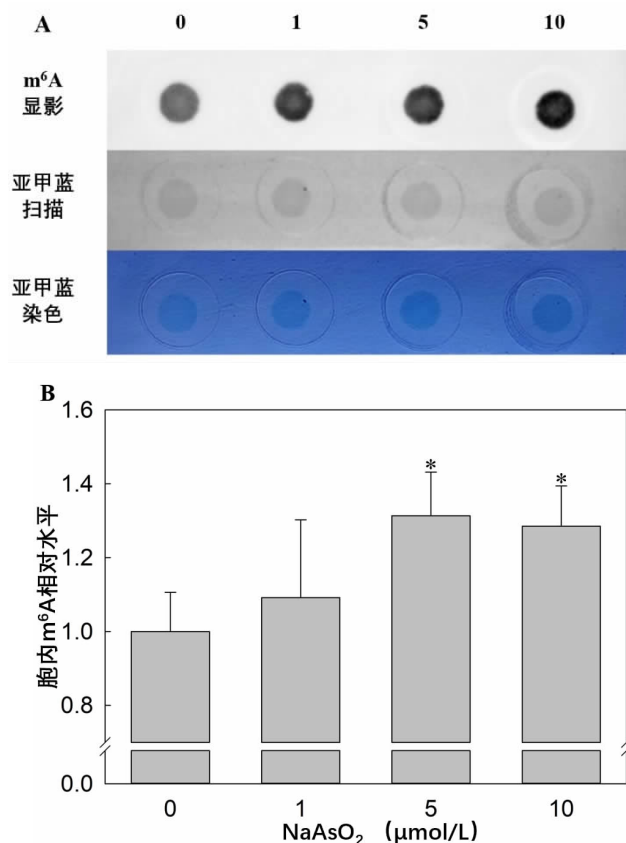


注：图 A 采用免疫印迹法检测不同浓度砷处理 24 h 后细胞内的 tau 蛋白表达量；图 B 为 T231 位点磷酸化 tau 蛋白；图 C 为 S202+T205 位点磷酸化 tau 蛋白的含量；采用 ImageJ 软件对条带图进行相对定量分析。

图 2 砷处理后 SH-SY5Y 细胞内 tau 蛋白表达量和磷酸化 tau 蛋白水平 (n=3)

Figure 2 The level of tau protein and phosphorylated tau protein in SH-SY5Y cells after arsenic treatment (n=3)

2.3 砷诱导细胞内 m⁶A 水平增加 从斑点印迹结果可以直观看出,砷处理组 SH-SY5Y 细胞内的 m⁶A 水平高于对照组,见图 3A。由于斑点印迹不便定量分析,为了增加客观性,本研究采用 EpiQuik 法对细胞内的 m⁶A 水平进行精确定量。图 3B 表明,砷可以刺激细胞内 m⁶A 水平上升 (F=4.511, P<0.05), 在 5 μmol/L 砷处理 24 h 后最高上升 31.4%, 在 10 μmol/L 砷处理 24 h 后上升 28.5%。



注:图 A 斑点印迹实验,检测不同浓度砷处理 24 h 细胞内 m⁶A 水平;“m⁶A 显影”表示细胞总 RNA 中 m⁶A 的水平,颜色越深表示 m⁶A 水平越高;“亚甲蓝扫描”和“亚甲蓝染色”颜色深浅一致表明 RNA 上样量一致(下同);图 B 采用 EpiQuik 法对细胞内 m⁶A 水平进行定量。

图 3 砷处理后 SH-SY5Y 细胞内 m⁶A 水平 (n=3)

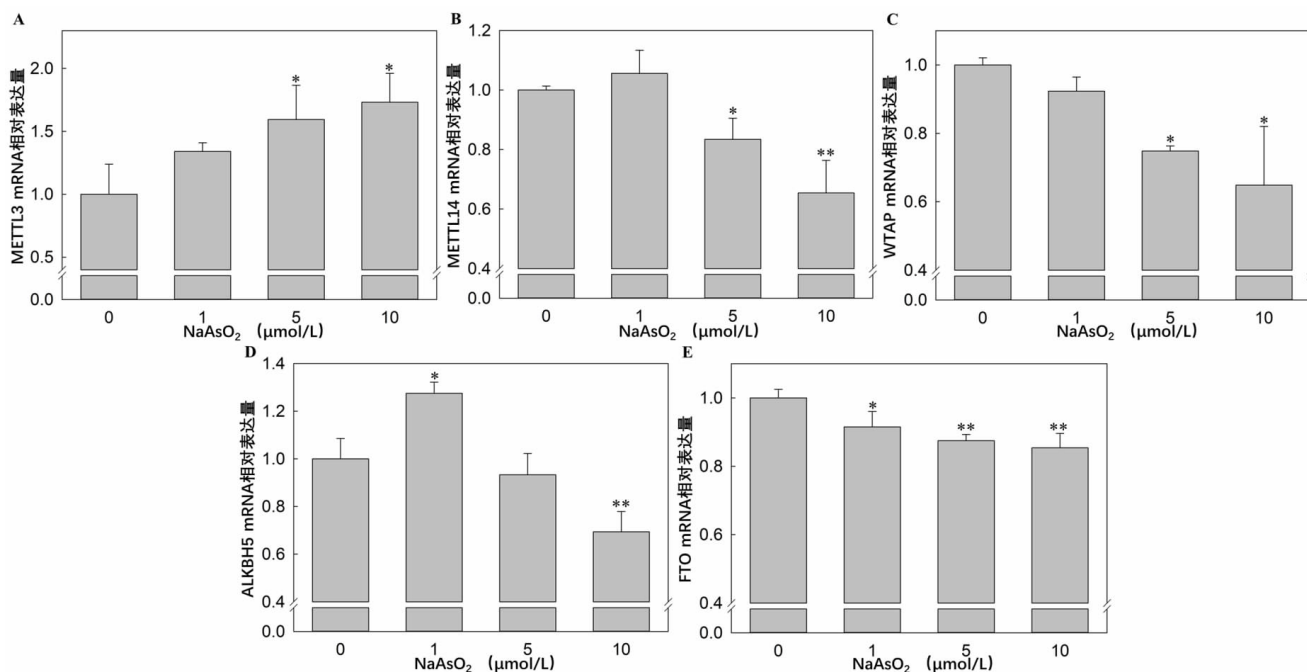
Figure 3 The level of m⁶A in SH-SY5Y cells after arsenic treatment (n=3)

2.4 砷通过影响 m⁶A 相关酶来增加细胞内 m⁶A 水平 如图 4A 所示,随着砷处理浓度增加,细胞内 METTL3 mRNA 表达增加,10 μmol/L 浓度下最高增加 73.2% (95% CI: 0.201 ~ 1.423, P<0.05)。METTL14、WTAP 和 FTO mRNA 表达量下降,在 10 μmol/L 砷处理后分别降至对照组的 65.4% (95% CI: -1.055 ~ -0.337, P<0.01)、64.8% (95% CI: -0.389 ~ -0.111, P<0.05) 和 85.4% (95% CI: -0.030 ~ -0.010, P<0.01),见图 4B、C、E。图 4D 所示,ALKBH5 mRNA 在 1 μmol/L 砷处理 24 h 后表达量增加 27.5% (95% CI:

0.033 ~ 0.147, $P < 0.05$),但在 5 $\mu\text{mol/L}$ 砷浓度下与对照组基本持平,而 10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度砷处理后降低 30.7%(95%CI: -1.62 ~ -0.038, $P < 0.01$)。

如图 5A 所示,砷处理 24 h 后细胞内 METTL3 蛋白表达增加,5 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下最高增加 107.1%(95%CI: 0.331 ~ 1.009, $P < 0.01$),10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下增加 58.7%(95%CI: 0.028 ~ 0.706, $P < 0.05$)。1 $\mu\text{mol/L}$ 砷处理 24 h 后,METTL14 和 WTAP 蛋白表达量基本不变,但在 10 $\mu\text{mol/L}$ 砷处理后分别降至对照组的 20.4%(95%CI: -0.788 ~ -0.509, $P < 0.001$) 和 23.5%

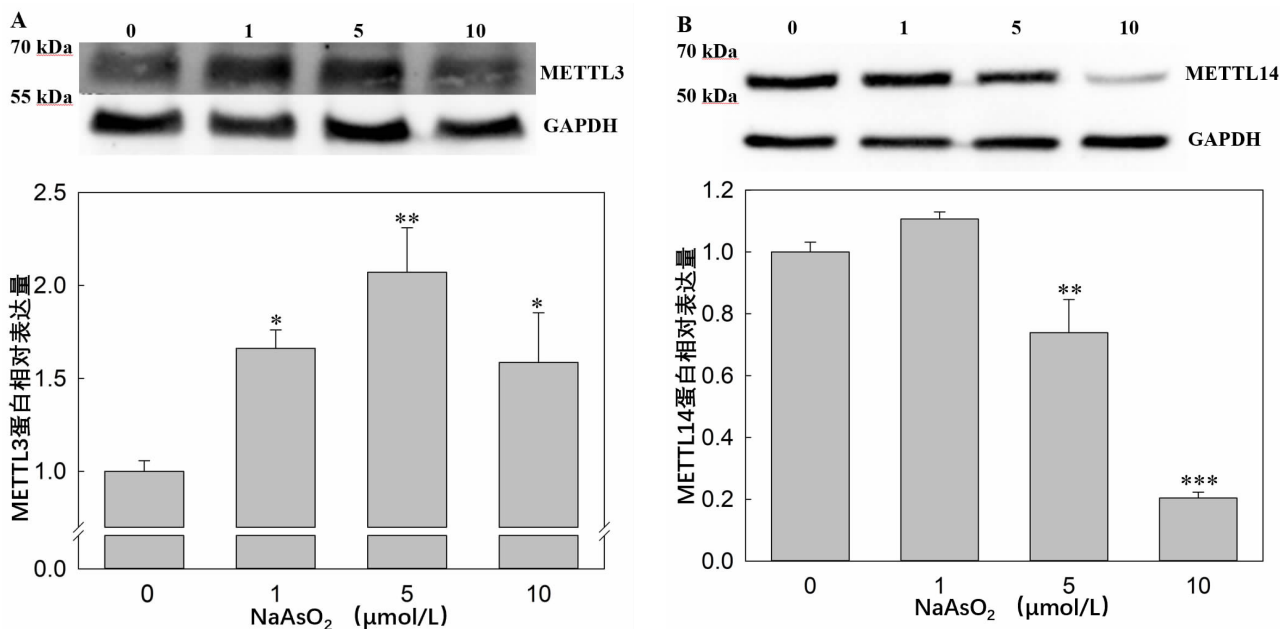
(95%CI: -1.371 ~ -0.685, $P < 0.001$),对细胞内 RNA 的甲基化催化作用下降,见图 5B、C。图 5D 所示,ALKBH5 蛋白表达趋势与 mRNA 表达趋势相似,在 1 $\mu\text{mol/L}$ 砷处理 24 h 后表达量增加 35.6%(95%CI: 0.092 ~ 0.332, $P < 0.01$),在 10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度砷处理后降低 50.8%(95%CI: -0.423 ~ -0.183, $P < 0.001$)。图 5E 表明,随着砷浓度增高,FTO 蛋白表达量呈下降趋势,在 10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度砷处理 24 h 时降低 45.3%(95%CI: -0.709 ~ -0.413, $P < 0.001$)。

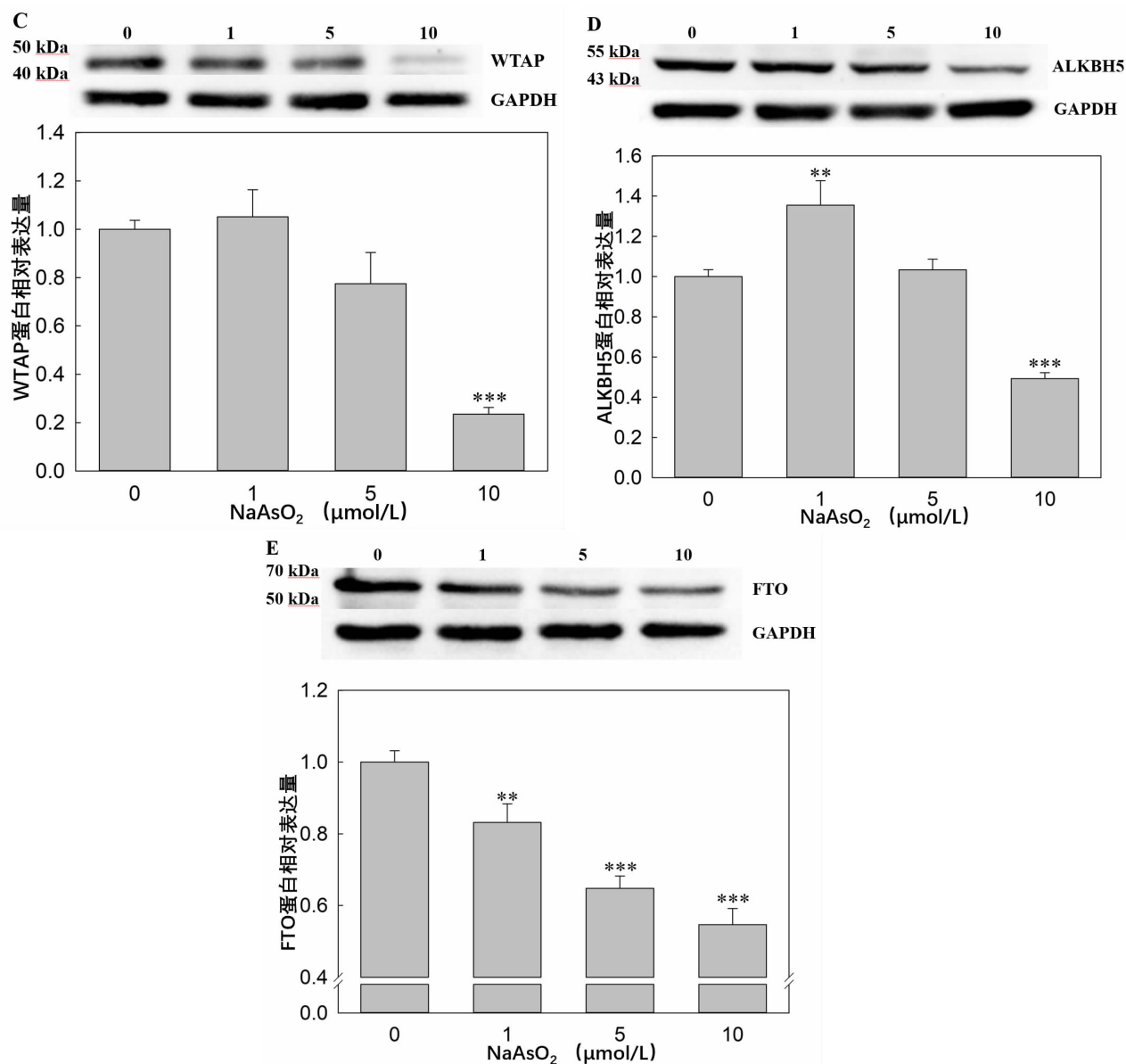


注:图 A、B、C、D、E 分别为采用 qPCR 检测不同浓度砷处理 24 h 后细胞内的 METTL3、METTL14、WTAP、ALKBH5 和 FTO mRNA 的表达量。

图 4 砷处理后 SH-SY5Y 细胞内 m⁶A 相关酶 mRNA 表达量(n=4)

Figure 4 The mRNA expression of m⁶A-related enzymes in SH-SY5Y cells after arsenic treatment (n=4)





注:图 A、B、C、D、E 分别为采用免疫印迹法检测不同浓度砷处理 24 h 后细胞内的 METTL3、METTL14、WTAP、ALKBH5 和 FTO 蛋白的表达量;采用 ImageJ 软件对条带进行相对定量分析。

图 5 砷处理后 SH-SY5Y 细胞内 m⁶A 相关酶表达量(n=3)

Figure 5 Expression of m⁶A-related enzymes in SH-SY5Y cells after arsenic treatment (n=3)

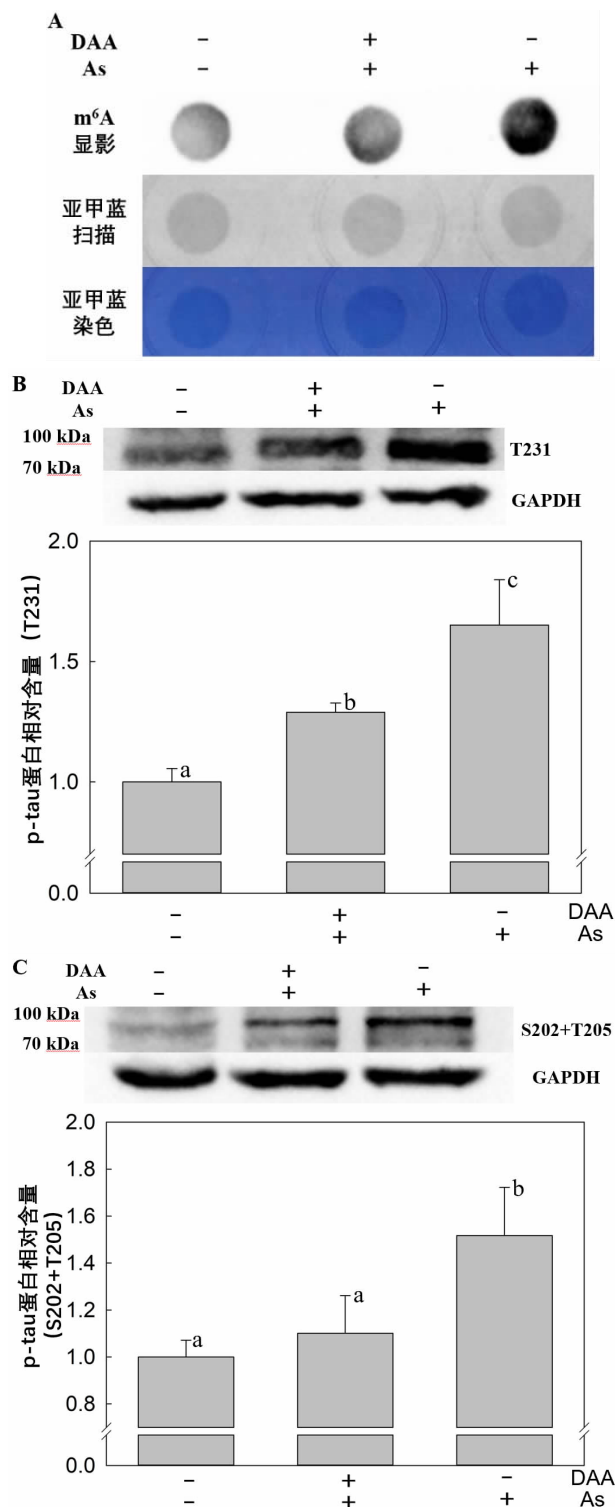
2.5 m⁶A 参与砷导致的 tau 蛋白磷酸化 实验 1.3 ~ 1.5 的结果表明,5 μmol/L 的亚砷酸钠处理 24 h 可以有效增加 SH-SY5Y 细胞内的 m⁶A 水平,并显著诱导 tau 蛋白发生磷酸化。因此,为探究 m⁶A 是否参与了砷诱导的 tau 蛋白磷酸化,本研究采用 DAA 来抑制细胞内的 m⁶A 水平,见图 6A。图 6B、C 显示,与无 DAA 组相比,细胞内 T231 位点 p-tau 蛋白水平降低至对照组的 129.0%(*P*<0.05),S202+T205 位点 p-tau 蛋白水平降低至对照组的 110.1%(*P*<0.05)说明 m⁶A 可以调控 tau 蛋白的磷酸化,是砷诱导 tau 蛋白磷酸化的关键环节之一。

3 讨论

大量研究显示,细胞内 p-tau 蛋白聚集体的产生

是 AD 的重要病理特征。Tau 蛋白全长有多个位点可发生磷酸化,其中 T231 是最先发生磷酸化的位点,因此成为 AD 最早的生物标志物^[7]。Tau 蛋白 T231 位点发生磷酸化后,会引发一系列磷酸化过程,期间 tau 蛋白发生折叠、剪切等变化,最后形成聚集体^[6]。S202+T205 位点磷酸化对 tau 蛋白的构象改变具有关键作用,是神经原纤维缠结产生的关键环节^[6],同样被认为是 AD 重要的生物标志物^[7]。鉴于此,本研究选择 tau 蛋白的 T231 和 S202+T205 位点磷酸化作为结局,探究 m⁶A 在砷诱导 tau 蛋白磷酸化的作用。研究结果显示,砷处理后 SH-SY5Y 细胞内 tau 蛋白 T231 位点和 S202+T205 位点磷酸化显著上升,提示砷不只是诱导 SH-SY5Y 细胞内 tau 蛋白发生磷酸化,还

可能诱导细胞内神经原纤维缠结的产生,具有导致神经退行性疾病的潜在风险。



注:图 A 斑点印迹实验检测 m⁶A 水平,“As”表示添加 5 μmol/L 亚砷酸钠处理 24 h,“DAA”表示添加 m⁶A 抑制剂;图 B、C 采用免疫印迹法检测砷与 DAA 共同处理 24 h 后细胞内的 p-tau 蛋白水平;采用 Student-Newman-Keuls 法进行两两比较,不同字母表示差异具有统计学意义,α=0.05。

图 6 DAA 处理后 SH-SY5Y 细胞内 m⁶A 水平和磷酸化 tau 蛋白水平(n=3)

Figure 6 The levels of m⁶A and phosphorylated tau protein in SH-SY5Y cells after DAA treatment (n=3)

斑点印迹法和 EpiQuik 法是目前最常用于检测细胞内 m⁶A 整体水平的实验方法,斑点印迹法可以直观地看出不同砷处理组的 m⁶A 水平与对照组存在差异,EpiQuik 法则可以精确定量砷对 SH-SY5Y 细胞内 m⁶A 的影响。本研究发现,砷可以诱导细胞内 m⁶A 水平显著上升,在 5 μmol/L 砷浓度下最高上升 31.4%。砷处理导致细胞内 tau 蛋白磷酸化和 m⁶A 水平同步上升,提示两者之间可能存在关联。

m⁶A 水平升高首先依赖于 m⁶A 甲基化酶的增加,砷处理 24 h 后细胞内 METTL3 mRNA 表达增加, METTL14 和 WTAP mRNA 表达降低。相应的,砷处理后 METTL3 蛋白表达增加,而 METTL14 和 WTAP 蛋白表达量在 5 和 10 μmol/L 浓度砷浓度时降低。这些结果提示, METTL3 可能是砷诱导细胞内 m⁶A 水平增加的主要调节酶。相印证的是,研究发现 METTL3 和 tau 蛋白在 AD 患者海马体的不溶性成分中显著增多,提示 METTL3 增多与 tau 蛋白的聚集有关^[13]。不仅如此,随着砷处理浓度增加,FTO mRNA 和蛋白表达量呈下降趋势; ALKBH5 mRNA 和蛋白在 1 μmol/L 砷处理时表达量增高,但 10 μmol/L 砷处理后表达量显著下降,这说明 m⁶A 去甲基化酶的降低也是砷导致细胞内 m⁶A 水平增加的原因。相似的是,动物实验发现,亚砷酸钠可以降低小鼠大脑中 FTO 的水平、增加 m⁶A 水平,从而引起小鼠神经功能缺陷^[9];细胞实验发现,敲低 ALKBH5 会导致 tau 蛋白发生过度磷酸化^[14],提示 m⁶A 水平增加可能与 tau 蛋白过度磷酸化存在关系,也恰好印证了本研究的观点。此外,本研究发现 METTL3 mRNA 在表达高浓度砷处理时持续升高,但 METTL3 蛋白的表达量在高浓度砷处理后却明显低于中浓度砷处理组,且其他 m⁶A 相关酶的蛋白表达量下降程度也远高于 mRNA 表达量的下降程度。究其原因,可能与蛋白的翻译后修饰、高浓度砷对 SH-SY5Y 细胞正常生理状态的干扰,以及亚砷酸钠的低剂量兴奋效应^[15]有关。

纵观 m⁶A 的水平变化和调节酶的表达量变化,本研究发现,在 1 μmol/L 砷浓度情况下, ALKBH5 的增加限制了 m⁶A 的增长速率。但在高浓度砷处理下, METTL3 显著增加,伴随着 FTO 的显著降低、 ALKBH5 表达量的下降,故细胞内 m⁶A 水平显著增加。这些结果表明, METTL3、 ALKBH5 和 FTO 蛋白是参与砷诱导细胞内 m⁶A 水平增加的主要调节酶。为了证实 m⁶A 在砷诱导 tau 蛋白磷酸化中的关键作用,本研究采用 DAA 抑制细胞内的 m⁶A 水平。结果显示,在 m⁶A 水平被明显抑制的情况下,砷处理后的 tau 蛋白磷酸化也显著抑制,尤其是 S202+T205 位点磷酸化的抑制,说明 m⁶A 水平降低能有效防止 tau 蛋

白的过度折叠,提示降低 m⁶A 水平(m⁶A 抑制剂、降低 m⁶A 甲基化酶或者增加 m⁶A 去甲基化酶等)可能有助于延缓神经退行性疾病的发生发展。

m⁶A 结合蛋白是 m⁶A 行使功能的必要条件^[8],神经处理诱导 SH-SY5Y 细胞内 m⁶A 水平增加后,可能通过 m⁶A 结合蛋白来调控蛋白激酶的表达,从而影响 tau 蛋白的磷酸化。值得注意的是,研究发现 AD 患者大脑中的 m⁶A 结合蛋白——HNRNPA2B1 表达增多;HNRNPA2B1 可以将 m⁶A 修饰的 RNA 与 tau 蛋白连接起来,促进 tau 蛋白寡聚体的形成,最终导致 tau 蛋白聚集^[16]。这说明,m⁶A 不仅可以调控 tau 蛋白磷酸化,间接导致 tau 蛋白聚集,还可以直接诱导 tau 蛋白形成寡聚体。由此可见,RNA 甲基化修饰与 tau 蛋白聚集之间的关系密切且复杂,亟待深入研究。在之后的研究中,可以从 m⁶A 结合蛋白、信号通路等方面深入探究 m⁶A 如何调控 tau 蛋白的磷酸化。

综上所述,本研究表明,神可以通过增加 METTL3、降低 ALKBH5 和 FTO 来增加细胞内 m⁶A 水平,进而促进 tau 蛋白磷酸化、促进神经原纤维缠结产生。总之,本研究建立了 m⁶A 与 tau 蛋白磷酸化之间的联系,丰富了 AD 的病理机制,也为神在神经退行性疾病中的研究提供了新的线索。

利益冲突声明 本研究不存在任何利益冲突

参考文献

- [1] Li JL, Guo YY, Duan XX, et al. Tissue- and Region-Specific accumulation of Arsenic species, especially in the brain of mice, after long-term arsenite exposure in drinking water [J]. *Biological Trace Element Research*, 2020, 198(1): 168-176.
- [2] Rahman MA, Hannan MA, Uddin MJ, et al. Exposure to environmental Arsenic and emerging risk of alzheimer's disease: perspective mechanisms, management strategy, and future directions [J]. *Toxics*, 2021, 9(8): 188.
- [3] Hernández-Vega A, Braun M, Scharrel L, et al. Local nucleation of microtubule bundles through tubulin concentration into a condensed Tau phase[J]. *Cell Reports*, 2017, 20(10): 2304-2312.
- [4] Wisessaowapak C, Visitnonthachai D, Watcharasit P, et al. Prolonged Arsenic exposure increases tau phosphorylation in differentiated SH-SY5Y cells: The contribution of GSK3 and ERK1/2 [J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2021, 84: 103626.
- [5] Rai SK, Savastano A, Singh P, et al. Liquid-liquid phase separation of tau: From molecular biophysics to physiology and disease [J]. *Protein Science*, 2021, 30(7): 1294-1314.
- [6] Luna-Viramontes NI, Campa-Córdoba BB, Ontiveros-Torres M, et al. PHF-Core Tau as the potential initiating event for Tau pathology in alzheimer's disease [J]. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2020, 14: 247.
- [7] Ossenkoppele R, Van der Kant R, Hansson O. Tau biomarkers in Alzheimer's disease: towards implementation in clinical practice and trials[J]. *Lancet Neurolog*, 2022, 21(8): 726-734.
- [8] 张圆,张巳,时萌萌,等. m⁶A 修饰在神经系统疾病中的作用 [J]. *中南大学学报:医学版*, 2022, 47(1): 109-115.
Zhang Y, Zhang S, Shi MM, et al. Roles of m⁶A modification in neurological diseases[J]. *Journal of Central South University(Medical Science)*, 2022, 47(1): 109-115.(In Chinese)
- [9] Bai LL, Tang QH, Zou Z, et al. m⁶A demethylase FTO regulates dopaminergic neurotransmission deficits caused by arsenite [J]. *Toxicological Sciences*, 2018, 165(2): 431-446.
- [10] Diao MY, Zhu Y, Yang J, et al. Hypothermia protects neurons against ischemia/reperfusion-induced pyroptosis via m⁶A-mediated activation of PTEN and the PI3K/Akt/GSK-3 β signaling pathway [J]. *Brain Research Bulletin*, 2020, 159: 25-31.
- [11] Zou YT, Zheng SQ, Xie XH, et al. N⁶-methyladenosine regulated FGFR4 attenuates ferroptotic cell death in recalcitrant HER2-positive breast cancer [J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 2672.
- [12] Zhao TH, Li XY, Sun DL, et al. Oxidative stress: One potential factor for arsenite-induced increase of N⁶-methyladenosine in human keratinocytes[J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2019, 69: 95-103.
- [13] Huang H, Camats-Perna J, Medeiros R, et al. Altered expression of the m⁶A methyltransferase METTL3 in alzheimer's disease [J]. *eNeuro*, 2020, 7(5): 125.
- [14] Qu ML, Zuo LH, Zhang MR, et al. High glucose induces tau hyperphosphorylation in hippocampal neurons via inhibition of ALKBH5-mediated Dgkh m⁶A demethylation: a potential mechanism for diabetic cognitive dysfunction [J]. *Cell Death & Disease*, 2023, 14(6): 385.
- [15] Chen HY, Zhao TH, Sun DL, et al. Changes of RNA N⁶-methyladenosine in the hormesis effect induced by arsenite on human keratinocyte cells[J]. *Toxicology in Vitro*, 2019, 56: 84-92.
- [16] Jiang LL, Lin WW, Zhang C, et al. Interaction of tau with HNRNPA2B1 and N⁶-methyladenosine RNA mediates the progression of tauopathy [J]. *Molecular Cell*, 2021, 81(20): 4209-4227.e12.

收稿日期:2024-06-23