·论著·

矽肺早期炎症中环状 RNA 氮 6-腺苷酸甲基化修饰差异

罗薇 王莎 李永琪 王静 杨少奇 巢杰

210009 南京,东南大学医学院生理学系(罗薇、王静、巢杰);210009 南京,东南大学医学院(王莎、李永琪);210009 南京,东南大学公共卫生学院(杨少奇)

通信作者:巢杰,E-mail:chaojie@seu.edu.cn

【摘要】 **目的** 探究矽肺早期炎症中环状 RNA(circRNA)的氮 6-腺苷酸甲基化修饰(m6A)差异,分析 circRNA 参与矽肺进程的分子机制。**方法** 体外培养人单核细胞系(THP-1)诱导的巨噬细胞,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测巨噬细胞活化标志物,细胞计数试剂盒 8(CCK8)法检测细胞活力,确定二氧化硅(SiO_2)刺激浓度。比色法测定矽肺模型中总 RNA 的 m6A 甲基化修饰变化,检测 m6A 甲基化酶、去甲基酶和阅读蛋白表达情况。Arraystar m6A-circRNA 表观转录组芯片检测二氧化硅模型组和对照组小鼠肺组织中 m6A 修饰差异表达的 circRNA,并用荧光实时定量 PCR(RT-qPCR)验证遴选出高表达 circRNA。**结果** SiO_2 浓度为 50 μg/cm^2 时对 THP-1 诱导的巨噬细胞活化标志物和细胞活性影响最为明显($P<0.05$)。与对照组比较,SiO_2 引起小鼠原代巨噬细胞和 THP-1 诱导的巨噬细胞总 RNA 的 m6A 水平升高,甲基化酶 METTL3 和阅读蛋白 YTDHF3 表达量明显升高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与对照组比较,矽肺模型小鼠肺中 132 个 circRNA 的 m6A 甲基化修饰水平升高,296 个 circ RNA 的 m6A 甲基化修饰水平下降,基于基础表达量筛选得到靶标-circSLC2A13;SiO_2 引起巨噬细胞中 circSLC2A13 的表达和 m6A 化修饰明显升高($P<0.05$)。**结论** 矽肺早期炎症阶段存在 RNA 的 m6A 甲基化修饰异常现象,其中 circSLC2A13 的 m6A 甲基化修饰参与矽肺早期炎症中巨噬细胞的激活。

【关键词】 巨噬细胞;二氧化硅;矽肺早期炎症;氮 6-腺苷酸甲基化修饰;环状 RNA

基金项目:国家自然科学基金项目(81803182、81972987、81773796)

DOI:10.3760/cma.j.cn121094-20210312-00141

Differential on N6-methyladenosine modification of circRNA in early inflammation of silicosis

Luo Wei, Wang Sha, Li Yongqi, Wang Jing, Yang Shaoqi, Chao Jie

School of Medicine, Southeast University, Nanjing 210009, China (Luo Wei, Wang Jing, Chao Jie); Department of Physiology, School of Medicine, Southeast University, Nanjing 210009, China (Wang Sha, Li Yongqi); School of Public Health, Southeast University, Nanjing 210009, China(Yang Shaoqi)

Corresponding author: Chao Jie, E-mail: chaojie@seu.edu.cn

【**Abstract**】 **Objective** To explore the difference of methylation of circRNA related m6A in early inflammation of silicosis and to elucidate the underlying molecular mechanism of circRNA involved in the process of silicosis. **Methods** The activation markers of macrophages were detected by Western blotting (WB) in THP-1-derived macrophages. The cell viability was detected with CCK8, by which the stimulation concentration and time of silica were determined. The methylation of total RNA was determined by colorimetry, and the expression of RNA m6A methylase, demethylase and reading protein were detected by Western blotting in mouse model of silicosis. The differential expression of m6A modified circRNA in lung tissues form silicosis and control mice was obtained through Arraystar m6A circRNA epigenetic transcriptome Chip and verified by RT-PCR. **Results** The concentration of SiO_2 at 50 μg/cm^2 had the most significant effect on the activation markers and activity of macrophages. Compared with the control group, SiO_2 increased the total RNA m6A level of macrophages, and there were significant differences in the expression of methylase METTL3 and reading protein YTDHF3. High throughput sequencing analysis showed that compared with the control group, the methylation levels of 132 circRNA m6A in the lung of silicosis model mice were increased, while the methylation levels of 296 circRNA m6A were decreased, and then the target circSLC2A13 was screened based on the basic expression. Further verification showed that SiO_2 significantly increased the expression of circSLC2A13 and m6A modification in macrophages. **Conclusion** The methylation of circRNA m6A is involved in the activation of macrophages in early inflammation of silicosis.

【Key words】 Macrophages; Silica; Early inflammation of silicosis; Methylation of m6A; circRNA
Foud program: National Natural Science Foundation of China(81803182、81972987、81773796)
DOI:10.3760/cma.j.cn121094-20210312-00141

矽肺是由于吸入游离二氧化硅(SiO_2)晶体引起的肺部纤维化疾病，是世界范围内最重要的职业病之一[1-2]。矽肺早期炎症是矽肺发生发展过程中的重要环节，但其机制尚不完全清楚。表观遗传修饰广泛参与生物体生命进程，与人类疾病有关[3]。我们以RNA 的氮 6-腺苷酸甲基化修饰(m6A)为切入点，分析总 RNA 与早期炎症中环状 RNA (circRNA)的m6A 差异情况，初步筛选具有表达差异和 m6A 修饰差异的 circRNA 靶标，探究 circRNA 的 m6A 修饰与矽肺早期炎症的相关性。

材料与方法

1.主要仪器与试剂：酶标仪(美国 BioTek 公司)，二氧化碳培养箱(新加坡 ESCO 公司)，高温低速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司)，垂直式小型电泳仪(美国 Bio-Rad 公司)，直径 0.5~10 μm(约 80%在 1~5 μm)SiO_2(美国 Sigma 公司)，内参 ACTB 蛋白单克隆抗体 (美国 Santa 公司)，THP-1 诱导的巨噬细胞活化标志细胞因子信号法律那样导抑制因子(SOCS3) 蛋白单克隆抗体 (美国 Cell Signaling Technology 公司)和一氧化氮合酶(NOS2)蛋白单克隆抗体 (美国 abcam 公司)，RNA 甲基化酶 METTL3、METTL14 和 WTAP 蛋白单抗隆抗体、RNA 去甲基化酶 FTO 和 ALKBH5 蛋白单克隆抗体、RNA 甲基化酶阅读蛋白 YTDHF3 单克隆抗体 (美国 proteintech 公司)，m6A 抗体、RNA 免疫共沉淀试剂盒 (美国 Millipore 公司)，m6A RNA 甲基化定量检测试剂盒(美国 EpiQuik 公司)，RNA 提取试剂(日本 Takara 公司)，通用型高特异性染料定量 PCR 检测试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)。

2.实验动物与分组：健康 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠 24 只(6~8 周)，购买自杭州子源实验动物科技有限公司[许可证编号：SCXK(浙)2019-0004]，体重 18~20 g，室温环境 20~25 ℃，昼夜节律，自由进食饮水，适应性饲养 1 周后随机分为矽肺模型组小鼠(15 只)和正常对照组小鼠(9 只)。本次实验经东南大学实验伦理委员会批准(审批号：20200402024)。

3.小鼠矽肺模型的建立：SiO_2 置于烘箱内 180 ℃消毒烘干 16 h，超净台内减重法称取一定量 SiO_2，加入生理盐水配成 5 mg/ml SiO_2 悬液，涡旋振荡器涡旋至完全混匀。小鼠腹腔注射戊巴比妥钠(2%，45 mg/kg)麻醉，动物呈仰卧位，颈部剃毛，皮肤经 75%酒精消毒后，暴露气管，经气管软骨环间隙注入 0.1 ml SiO_2 悬液，立即将小鼠直立，旋转 2 min 使药物均匀分布至双侧肺，缝合皮肤，局部消毒后继续饲养 7 d 作为 SiO_2 模型组，正常健康小鼠假手术组为对照组。

4.离体 SiO_2 刺激巨噬细胞模型建立：人单核细胞系(THP-1)(购自美国模式菌种收集中心)按标准培养步骤进行培养，加入佛波酯(PMA)诱导为巨噬细胞。SiO_2 粉末高温高压灭菌后彻底烘干，配置成 SiO_2 悬浮液，按细胞培养面积沿孔板边缘小心加入 12.5、25.0、50.0 μg/cm^2 SiO_2 粉末，按实验安排于 6、12、24 h 和 48 h 收集样品为 SiO_2 刺激组，同时收集 SiO_2 处理 0 h 组作为对照组，PBS 润洗 3 遍，加细胞裂解液或 RNA 提取液水三唑醇(Trizol)检测细胞内蛋白及 RNA 变化。

5.小鼠原代巨噬细胞的分离：小鼠脊髓离断处死，75%酒精消毒后固定并暴露四肢，钝性分离肌肉，取出股骨、胫骨消毒后放入 PBS 中暂存。使用 PBS 冲出骨髓，转入离心管 1 500 r/min (离心半径 15 cm)，离心 5 min。弃去上清，加入 1 ml PBS，1 ml 红细胞裂解液，裂解 3 min 后 1 500 r/min(离心半径 15 cm)离心 10 min。培养 7 d 后收获贴壁细胞。

6.总 RNA m6A 修饰水平的测定：按照标准流程提取总 RNA，使用 RNA m6A 甲基化定量试剂盒进行测定。将 RNA 浓度调整为 200 ng/μl，并置于冰上备用，根据实验样本数取出需要的酶标条，按照说明书依次加入结合试剂、阴性对照、阳性对照、样本、捕获试剂、检测试剂、增强试剂、放大试剂和终止试剂，使用酶标仪在 450 nm 处 135 s 内测定吸光度(A)。

7.circRNA m6A 差异修饰的测定：按照上述方法构建小鼠矽肺模型(方法 3)，收集模型组和对照组小鼠肺组织，委托上海康成生物工程有限公司使用 Arraystar m6A-circRNA 表观组芯片高通量测定模型组和对照组小鼠肺组织 circRNA m6A 差异修饰情况。

8.目标 circRNA m6A 修饰水平 m6A-meRIP 的测定：按照实验要求提前准备裂解液。制备免疫沉淀磁珠，每管加入 100 μl 制备好的裂解液上清和 900 μl 免疫共沉淀缓冲液 (另取 10 μl 裂解液上清放入新

的离心管中，作为自身对照），4 ℃旋转孵育过夜。加入 500 μl 免疫共沉淀洗液，配制蛋白酶 K 缓冲液，用 150 μl 蛋白酶 K 缓冲液重悬磁珠，同时在自身对照组中按比例加入蛋白酶 K 缓冲液。55 ℃孵育 30 min 振动消化蛋白质。按照 RNA 提取标准实验操作提取 RNA，利用特异性 circRNA Divergent 引物实时荧光定量逆转录 PCR（RT-qPCR）检测 m6A 修饰情况。

9.统计学方法：用 Sigma plot 11.0 分析软件进行分析，计量数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示，两组间比较用 t 检验，多组组间比较用 AVONA 方差分析，以 P<0.05 为差异有统计学意义。

结　　果

1.SiO_2 刺激 THP-1 诱导的巨噬细胞活化的量效关系：与对照组比较，当 SiO_2 刺激浓度为 12.5、25.0、50.0 μg/cm² 时，THP-1 诱导的巨噬细胞中 NOS2 和 SOCS3 蛋白表达均升高，差异有统计学意义（$P<0.05$）。结合细胞增殖实验发现，6、12、24 和 48 h 使用 SiO_2 刺激 THP-1 诱导的巨噬细胞，细胞活性随 SiO_2 浓度增加明显升高（$P<0.05$），其中当 SiO_2 浓度为 50.0 μg/cm² 时在各个时间点细胞活性都有明显升高，差异均有统计学意义（$P<0.05$）。见表 1。结合上述两个实验后续实验选择刺激 THP-1 诱导巨噬细胞的 SiO_2 浓度为 50.0 μg/cm²。

2.不同矽肺模型中总 RNA 的 m6A 甲基化水平：分别使用整体与离体矽肺模型，检测总 RNA 的 m6A 甲基化水平，在整体矽肺模型中，与对照组（0.113±0.008）比较，小鼠矽肺模型组 m6A 甲基化水平（0.235±0.010）明显升高（$P<0.05$）。在离体细胞矽肺模型中，小鼠原代巨噬细胞 50.0 μg/cm² 刺激组在 3 和 12 h m6A 甲基化水平明显升高，差异有统计学意义（$P<0.05$），THP-1 诱导的巨噬细胞 50.0 μg/cm² 刺激组在 6 和 12 h m6A 甲基化水平明显升高，差异有统计学意义（$P<0.05$）。见表 2。

表 1　不同浓度 SiO_2 刺激下 THP-1 诱导的巨噬细胞的细胞活力变化情况（CCK8 法，$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

组别	SiO_2 刺激时间			
	6 h	12 h	24 h	48 h
对照组	0.170±0.008	0.067±0.004	0.194±0.018	0.106±0.002
12.5 μg/cm² 刺激组	0.209±0.005[a]	0.094±0.002[a]	0.196±0.003	0.129±0.010
25.0 μg/cm² 刺激组	0.231±0.008[a]	0.123±0.001[a]	0.230±0.003[a]	0.152±0.011
50.0 μg/cm² 刺激组	0.269±0.006[a]	0.168±0.002[a]	0.262±0.003[a]	0.255±0.007[a]

注：与对照组比较，[a]$P<0.05$

表 2　SiO_2 刺激 THP-1 诱导的巨噬细胞和小鼠原代巨噬细胞总 RNA m6A 修饰变化情况（$\bar{x}\pm s$）

组别	小鼠原代巨噬细胞	THP-1 诱导的巨噬细胞
对照组	0.873±0.057	1.232±0.022
50.0 μg/cm² 刺激组（3 h）	1.299±0.091[a]	1.268±0.037
50.0 μg/cm² 刺激组（6 h）	0.960±0.153	1.447±0.060[a]
50.0 μg/cm² 刺激组（12 h）	1.266±0.050[a]	1.338±0.003[a]

注：与对照组比较，[a]$P<0.05$

3.SiO_2 对 THP-1 诱导的巨噬细胞中 RNA 的 m6A 甲基化酶和去甲基酶及阅读蛋白表达的影响：随着 SiO_2 刺激时间延长，模型组甲基化酶 METTL3 和阅读蛋白 YTHDF3 表达量明显，差异有统计学意义（$P<0.05$），见表 3。

表 3　SiO_2 刺激 THP-1 诱导的巨噬细胞 RNA m6A 甲基化酶和去甲基酶及阅读蛋白表达情况（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

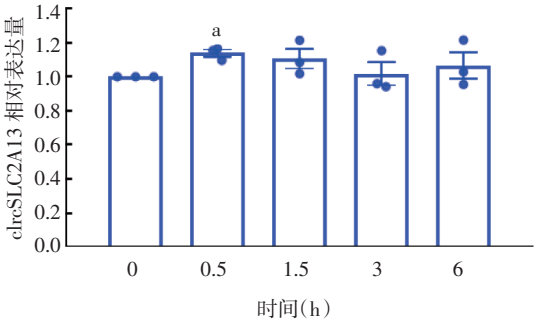
组别	METTL3	METTL14	WTAP	YTHDF3	FTO	ALKBH5
对照组	9928.74±2534.30	21584.51±663.23	12220.48±2958.01	5824.82±101.73	27208.40±6560.55	28394.23±2948.02
50.0 μg/cm² 刺激组（0.5 h）	15623.10±1060.12[a]	21607.99±506.99	13329.17±2795.13	5679.06±1536.97	26696.38±9896.76	24800.15±861.26
50.0 μg/cm² 刺激组（1.5 h）	20971.18±262.75[a]	20059.38±766.75	24406.97±765.14[a]	5634.93±1478.08	24454.05±10958.11	22451.79±3515.51
50.0 μg/cm² 刺激组（3 h）	19946.98±857.97[a]	15388.57±1529.19[a]	23372.21±1733.06	16000.62±1596.46[a]	20286.71±12484.2	21764.83±4530.25
50.0 μg/cm² 刺激组（6 h）	26466.03±1186.32[a]	22830.07±633.35	25404.52±1284.91[a]	19829.39±2846.59[a]	24198.32±4106.76	24527.34±2244.47
50.0 μg/cm² 刺激组（12 h）	18066.36±2494.72[a]	24587.4±509.24[a]	16579.97±5315.4	18866.42±4483.05[a]	26550.48±6755.23	23376.96±1163.26

注：mbA：氮 6-腺苷酸甲基化修饰；与对照组比较，[a]$P<0.05$

4.小鼠矽肺早期炎症阶段中 circRNA m6A 修饰差异分析：与对照组比较，矽肺模型小鼠肺中 132 个 circRNA m6A 修饰水平升高，296 个 circRNA m6A 修饰水平下降；从 m6A 修饰水平升高的 circRNA 中初步选出 7 个差异修饰最为明显的 circRNA，通过 RT-qPCR 检测 circRNA 基础表达量，以 circDACT3 为对照组，circDACT3、circMAGI1、circZMYND11、circFNDC3A、circSLC2A13、circAGAP1、circACAP2 变化倍数分别为 1.0、1.1、1.9、1.0、15.0、5、7 和 6.8。

5.SiO_2 对 THP-1 诱导的巨噬细胞中circSLC2A13 表达和 m6a 修饰的影响：与对照组比较，SiO_2 刺激 THP-1 诱导的巨噬细胞 circSLC2A13 的表达量在 0.5 h 明显升高，差异有统计学意义（$P<0.05$）。见图1。SiO_2 刺激 THP-1 诱导的巨噬细胞 circSLC2A13 的

m6A 修饰水平在 6 h 明显升高（以 IgG 为对照，使用 m6A 抗体下拉 circSLC2A13，对照组变化倍数为 1.0，SiO_2 刺激组变化倍数为 2.7），差异有统计学意义（$P<0.05$）。



注：与 0 h 比较，$^aP<0.05$

图 1 SiO_2 刺激 THP-1 诱导的巨噬细胞 circSLC2A13 表达情况

讨 论

矽肺是尘肺中最常见的类型，目前，矽肺的发病机制还不完全清楚。有研究发现，矽肺患者肺部巨噬细胞吞噬 SiO_2 颗粒诱发早期炎症，造成级联反应导致胶原合成、沉积异常增加，矽肺早期炎症对于矽肺病程发展至关重要[5]，研究矽肺早期炎症形成机制具有十分重要的现实意义。

甲基化修饰主要包括 DNA 甲基化和 RNA 甲基化。目前研究已经表明异常的 DNA 甲基化可以介导 SiO_2 诱导的肺纤维化[6]。m6A 是 RNA 甲基化修饰最为常见类型，参与多种疾病的发生发展过程[7]。本次研究发现，在矽肺模型早期炎症中总 RNA m6A 水平均明显上升，提示炎症与 RNA 的 m6A 甲基化可能有关系。有研究发现，METTL3、METTL14 和 WTAP 与其他一些因子形成杂络物构成 m6A 甲基化酶复合体，以及与之协同调控的去甲基化酶 FTO、ALKBH5，阅读蛋白 YTHDF2 和 YTHDF3 对于 RNA m6A 甲基化修饰至关重要[8]。RNA 的 m6A 甲基化相关酶的变化在一定程度上反映了 RNA 的 m6A 甲基化与疾病的相关性。本次研究发现，矽肺模型早期炎症中，甲基化酶 METTL3 和阅读蛋白 YTHDF3 表达明显上调，进一步证实 RNA 的 m6A 甲基化修饰对于矽肺病早期炎症发展起重要作用。

circRNA 是一种广泛表达的非编码 RNA，具有多种生物学功能[9]，本课题组前期研究发现，circRNA 广泛参与了矽肺炎症和纤维化进程，可能是矽肺的诊断治疗的重要靶点[10]，有研究发现，circRNA 存在 m6A 修饰，且经过 m6A 修饰 circRNA 具有生物学功能[5]。circRNA m6A 修饰可能是通过参与 mRNA和 circRNA 降解，促进 circRNA 出核，调控细胞固有免疫等过程发挥作用[7]。目前关于 circRNA 的 m6A 修饰的研究较少，circRNA m6A 修饰在疾病中功能尚不明确，为了探究矽肺早期炎症与 circRNA 甲基化修饰之间的关系，本次研究使用表观组芯片检测发现了矽肺早期炎症中 circRNA 的 m6A 修饰存在差异，进一步通过实验和生物信息学分析选择了 circSLC2A13 作为研究靶标。

综上所述，在矽肺早期炎症中，总 RNA m6A 修饰水平和调控 m6A 甲基化的酶发生变化，这提示 RNA m6A 甲基化修饰可能参与了矽肺早期炎症。进一步实验发现 circRNA m6A 修饰与矽肺早期炎症存在关联性，后续实验需要对这种关联性进行进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

[1] Leung CC, Yu IT, Chen W. Silicosis[J]. Lancet, 2012, 379(9830): 2008-2018.DOI:10.1016/S0140-6736(12)60235-9.

[2] Barber CM, Fishwick D, Seed MJ, et al. Artificial stone-associated silicosis in the UK[J]. Occup Environ Med, 2018, 75(7):541. DOI: 10.1136/oemed-2018-105028.

[3] Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease[J]. Nat Biotechnol, 2010, 28(10):1057-1068.DOI:10.1038/nbt.1685.

[4] Tang C, Xie Y, Yu T, et al. m6A-dependent biogenesis of circular RNAs in male germ cells [J]. Cell Res, 2020, 30(3):211-228. DOI: 10.1038/s41422-020-0279-8.

[5] Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, et al. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization[J]. Nat Immunol, 2008, 9(8):847-856. DOI: 10.1038/ni.1631.

[6] Li J, Yao W, Zhang L, et al. Genome-wide DNA´ methylation analysis in lung fibroblasts co-cultured with silica-exposed alveolar macrophages[J]. Respir Res, 2017, 18(1):91. DOI: 10.1186/s12931-017-0576-z.

[7] Chen YG, Chen R, Ahmad S, et al. N6-Methyladenosine modification controls circular RNA immunity[J]. Mol Cell, 2019, 76(1):96-109.DOI: 10.1016/j.molcel.2019.07.016.

[8] Lin X, Chai G, Wu Y. et al. RNA m6A methylation regulates the epithelial mesenchymal transition of cancer cells and translation of Snail[J]. Nat Commun, 2019, 10(1):2065.DOI:10. 1038/s41467-019-09865-9.

[9] Arcinas C, Tan W, Fang W. et al. Adipose circular RNAs exhibit dynamic regulation in obesity and functional role in adipogenesis[J]. Nat Metab, 2019, 1 (7):688-703.DOI:10.1038/s42255-019-0078-z.

[10] Zhou Z, Jiang R, Yang X, et al. circRNA mediates silica-induced macrophage activation via HECTD1/ZC3H12A-dependent ubiquitination[J]. Theranostics, 2018, 8(2):575-592.DOI: 10. 7150/thno.21648.

（收稿日期：2021-03-12）
（本文编辑：霍飞）