

· 实验技术 ·

大鼠亚慢性铝暴露N6-甲基腺苷甲基化和N6-甲基腺苷RNA结合蛋白1分析

丁晓慧¹, 卢炆¹, 郝嘉瑞¹, 王甜甜¹, 徐萌彤¹, 宋静^{1, 2, 3}

1.山西医科大学公共卫生学院, 山西 太原 030001; 2.煤炭环境致病与防治教育部重点实验室, 山西 太原 030001; 3.环境有害因素与人群健康山西省重点实验室, 山西 太原 030001

摘要: **目的** 观察亚慢性铝暴露对大鼠海马组织N6-甲基腺苷(m⁶A)甲基化水平及N6-甲基腺苷RNA结合蛋白1(YTHDF1)表达的影响。**方法** 24只SPF级雄性SD大鼠, 随机分为对照组(生理盐水)和低(10 μmol/kg)、中(20 μmol/kg)、高(40 μmol/kg)剂量Al(mal)₃组, 每组6只, 腹腔注射隔天染毒, 持续90 d。染毒结束后, 采用Morris水迷宫实验测试大鼠逃避潜伏期、目标象限停留时间和穿越平台次数, 评估学习记忆能力; 处死后, 取脑组织称重计算脑体比, 取海马组织采用酶联免疫吸附法测定m⁶A甲基化水平, 免疫印迹法测定YTHDF1蛋白相对表达量。**结果** 染毒期间无大鼠死亡。染毒结束后, 对照组和低、中、高剂量组大鼠脑体比分别为(0.46±0.06)%、(0.44±0.04)%、(0.49±0.06)%和(0.51±0.07)%, 差异无统计学意义($P>0.05$)。大鼠逃避潜伏期的时间与组间不存在交互作用($P>0.05$), 大鼠逃避潜伏期随训练时间增加而缩短($P<0.05$); 与对照组、低剂量组比较, 高剂量组第3~5天大鼠逃避潜伏期延长(均 $P<0.05$)。与对照组比较, 低、中、高剂量组大鼠目标象限停留时间缩短, 高剂量组大鼠穿越平台次数减少(均 $P<0.05$)。与对照组比较, 中、高剂量组大鼠海马组织m⁶A甲基化水平升高, YTHDF1蛋白相对表达量降低(均 $P<0.05$)。**结论** 亚慢性铝暴露可能通过升高m⁶A甲基化水平、抑制YTHDF1蛋白表达导致学习记忆能力损害。

关键词: 铝; N6-甲基腺苷; N6-甲基腺苷RNA结合蛋白1; 学习记忆能力**中图分类号:** R114 **文献标识码:** A **文章编号:** 2096-5087(2024)09-0825-04

Analysis of N6-methyladenosine methylation and N6-methyladenosine RNA binding protein 1 in rats with subchronic aluminum exposure

DING Xiaohui¹, LU Yang¹, HAO Jiarui¹, WANG Tiantian¹, XU Mengtong¹, SONG Jing^{1, 2, 3}

1.School of Public Health, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China; 2.Key Laboratory of Coal Environmental Diseases and Control, Ministry of Education, Taiyuan, Shanxi 030001, China; 3.Shanxi Key Laboratory of Environmental Hazard Factors and Population Health, Taiyuan, Shanxi 030001, China

Abstract: Objective To explore the effects of subchronic aluminum exposure on the level of N6-methyladenosine (m⁶A) methylation and the expression of N6-methyladenosine RNA binding protein 1 (YTHDF1) in the hippocampus of rats. **Methods** Twenty-four healthy male SD rats were randomly divided into the control group (normal saline), the low dose group [10 μmol/kg Al(mal)₃], the medium dose group [20 μmol/kg Al(mal)₃] and the high dose group [40 μmol/kg Al(mal)₃], with 6 rats in each group. The Al(mal)₃ solution was administered via intraperitoneal injection on alternate days for 90 days. Escape latency, target quadrant dwell time and platform crossing times were tested to evaluate the learning and memory ability of the rats by the Morris water maze test after exposure. The brain tissue was weighted and the brain-to-body weight ratio was calculated after euthanasia. The level of m⁶A methylation and the expression of YTHDF1 were determined by enzyme-linked immunosorbent assay and western blot assay, respectively. **Results** All

DOI: 10.19485/j.cnki.issn2096-5087.2024.09.021**基金项目:** 山西省自然科学基金面上项目(202303021211123); 山西省高等教育“百亿工程”科技引导专项(BYBLD001)**作者简介:** 丁晓慧, 硕士研究生在读, 公共卫生专业**通信作者:** 宋静, E-mail: sj4933749@126.com

rats survived during aluminum exposure period. The brain-to-body weight ratios of the control group and the low, medium and high dose groups were $(0.46\pm 0.06)\%$, $(0.44\pm 0.04)\%$, $(0.49\pm 0.06)\%$ and $(0.51\pm 0.07)\%$, respectively, with no statistically significant differences ($P>0.05$). The escape latency of rats in the high dose group was longer than that in control and low group during the third to fifth day (both $P>0.05$). The escape latency of rats in all groups was shortened with the increase of training days ($P<0.05$). The target quadrant dwell time of rats in low, medium and high dose groups were lower than that in control group, and the platform crossing times of rats in high dose group were lower than that in control group (all $P<0.05$). The methylation level of m⁶A and expression level of YTHDF1 in hippocampus of rats in medium and high dose groups was higher than that in control group (both $P<0.05$). **Conclusion** The learning and memory impairment caused by subchronic aluminum exposure may be related to the increase of m⁶A methylation level and the decrease of YTHDF1 expression.

Keywords: aluminum; N6-methyladenosine; N6-methyladenosine RNA binding protein 1; learning and memory ability

铝是地壳中含量最高的金属元素,广泛应用于化工、医药、交通和建筑等行业。长期低剂量接触铝会影响学习记忆能力,且与阿尔茨海默病、帕金森病等^[1]多种神经退行性疾病的发生有关,但其神经毒性作用机制未被完全阐明。N6-甲基腺苷(m⁶A)修饰是一种 mRNA 化学修饰,参与脑萎缩^[2]、肌萎缩侧索硬化^[3]等发生发展过程。课题组前期研究发现 m⁶A 修饰的去甲基化酶肥胖相关蛋白(FTO)参与了亚慢性铝暴露导致大鼠认知功能障碍的机制^[4]。m⁶A 修饰发挥功能除需要去甲基化酶 FTO 的参与,还需阅读蛋白识别^[5]。在成年小鼠海马中,N6-甲基腺苷 RNA 结合蛋白 1(YTHDF1)可提高靶蛋白翻译效率,促进学习和记忆,而 YTHDF1 缺失的小鼠则表现出学习和记忆缺陷及海马突触传递受损^[6]。因此,YTHDF1 是否参与亚慢性铝暴露大鼠学习记忆能力损害值得探究。本研究观察亚慢性铝暴露对大鼠海马组织 m⁶A 甲基化水平和 YTHDF1 表达的影响,为阐明 m⁶A 修饰在铝神经毒性中的作用机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

麦芽酚(美国 Sigma 公司),氯化铝(天津市风船化学试剂科技有限公司),戊巴比妥钠(北京北实纵横科技发展有限公司),RIPA 裂解液(北京康为世纪生物科技有限公司),YTHDF1 抗体(杭州华安生物技术有限公司),辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔、抗鼠 IgG(北京康为世纪生物科技有限公司);大鼠 m⁶A 酶联免疫吸附法(ELISA)检测试剂盒(上海酶联生物科技有限公司),0.22 μm 滤膜(美国 Millipore 公司),Universal Hood II 凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司),DYY-7C 凝胶电泳仪(北京六一生物科技有限公司),Infinite E plex 全波长多功能酶标仪(瑞士 TECAN 公司)。

1.2 Al(mal)₃ 溶液配制与实验动物

麦芽酚溶液和氯化铝溶液 1:1 等体积混合形成 Al(mal)₃ 溶液,10% 质量分数的氢氧化钠溶液调整 Al(mal)₃ 溶液的 pH 值至 7.4,使用 0.22 μm 滤膜过滤。

24 只 SPF 级 8 周龄健康雄性 SD 大鼠,体重 (200 ± 10) g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,生产许可证号:SCXK(京)2021-0011。在无病原体环境、带有密封空气过滤装置的隔离塑料笼中适应性饲养 7 d,温度 18~26 °C,相对湿度 40%~70%,噪声≤85 dB,换气 8~12 次/h。本研究通过山西医科大学实验动物福利伦理委员会审查,审批号:SYD2023055。

1.3 方法

1.3.1 动物分组及染毒

大鼠随机分为对照组和 Al(mal)₃ 组,参考文献[7],Al(mal)₃ 组分为低(10 μmol/kg)、中(20 μmol/kg)、高(40 μmol/kg)剂量 Al(mal)₃ 组,每组 6 只。参考文献[4,8],Al(mal)₃ 组腹腔注射(0.1 mL/100g 体重)隔天染毒,对照组腹腔注射(0.1 mL/100g 体重)生理盐水,持续 90 d。染毒期间观察大鼠的摄食、体重、活动和精神行为等情况。

1.3.2 大鼠学习记忆能力评估及脏器系数计算

采用 Morris 水迷宫实验测试大鼠学习记忆能力,包括反映学习能力的定位导航实验和反映记忆能力的空间探索实验。第 1~5 天,将大鼠置于 4 个不同象限的水池中,记录大鼠寻找到隐藏在水面下平台的时间,即逃避潜伏期,若找不到平台,逃避潜伏期记为 120 s。第 6 天,移走平台,系统自动记录 120 s 内大鼠在目标象限停留时间和穿过平台次数。水迷宫实验完成后,称重,腹腔注射 2% 戊巴比妥钠(0.3 mL/100g 体重)麻醉处死大鼠,取大鼠脑组织并称重,计算脑体比;分离大鼠海马组织,-80 °C 保

存备用。

1.3.3 海马组织 m⁶A 甲基化水平测定

采用大鼠 m⁶A ELISA 检测试剂盒测定大鼠海马组织 m⁶A 甲基化水平，按照说明书依次加入样本、标准品和 HRP 标记的检测抗体于预先包被 m⁶A 抗体的微孔中，经敷育、洗涤、显色终止后，使用全波长多功能酶标仪于 450 nm 波长下检测各孔光密度值。根据标准品的质量浓度和光密度值制作标准曲线，并计算 m⁶A 甲基化水平。

1.3.4 海马组织 YTHDF1 表达测定

提取各组大鼠海马组织总蛋白，采用免疫印迹法测定 YTHDF1 表达。每 10 mg 海马组织加入 100 mL RIPA 裂解液裂解海马组织，测定蛋白浓度后，100 °C 变性暂存蛋白样品。蛋白样品经过 10% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分离，恒流 280 mA 转膜 45 min，封闭，洗膜后，加入 YTHDF1 (1 : 4 000) 一抗，4 °C 孵育过夜，再加入二抗稀释液孵育、洗膜、化学显色。重复 3 次后采用 Image J 软件分析 YTHDF1 蛋白条带灰度值，以对照组的灰度值为标准，计算其他组的 YTHDF1 蛋白相对表达量。

1.4 统计分析

采用 SPSS 26.0 软件统计分析。定量资料服从正态分布的采用均数±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 描述，定位导航实验数据分析采用重复测量资料的方差分析，组间比

较采用单因素方差分析；两两比较，方差齐采用 Bonferroni 法，方差不齐采用 Games-Howell 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 4 组大鼠基本情况和脑体比

染毒期间，对照组大鼠摄食与活动能力正常，生长状态良好；低、中剂量组大鼠摄食与活动能力未观察到异常；高剂量组部分大鼠表现出摄食量减少、活动减弱、精神萎靡。染毒期间无大鼠死亡。染毒结束后，对照组和低、中、高剂量组大鼠脑体比分别为 (0.46±0.06) %、(0.44±0.04) %、(0.49±0.06) % 和 (0.51±0.07) %，差异无统计学意义 ($F=2.280, P=0.101$)。

2.2 4 组大鼠学习记忆能力比较

大鼠逃避潜伏期的时间与组间不存在交互作用 ($F_{\text{时间}\times\text{组间}}=0.341, P=0.979$)，大鼠逃避潜伏期随训练时间增加而缩短 ($F_{\text{时间}}=57.754, P<0.001$)；4 组大鼠逃避潜伏期差异有统计学意义 ($F_{\text{组间}}=3.524, P=0.028$)，与对照组、低剂量组比较，高剂量组大鼠第 3~5 天逃避潜伏期延长 (均 $P<0.05$)。4 组大鼠目标象限停留时间、穿越平台次数差异有统计学意义 ($F=8.841、10.279$ ，均 $P<0.001$)。与对照组比较，低、中、高剂量组大鼠目标象限停留时间缩短，高剂量组大鼠穿越平台次数减少 ($P<0.05$)。见表 1。

表 1 4 组大鼠逃避潜伏期、目标象限停留时间和穿越平台次数比较 ($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of escape latency, target quadrant dwell time and platform crossing times among 4 groups of rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	逃避潜伏期/s					目标象限停留时间/s	穿越平台次数
	第1天	第2天	第3天	第4天	第5天		
对照组	44.45±15.85	14.22±6.19	7.62±2.42	5.35±3.13	4.21±1.83	39.63±6.43	6.67±1.86
低剂量组	49.77±10.13	20.40±12.97	7.86±2.68	6.20±3.31	4.91±1.94	29.85±8.43 ^①	4.83±1.47
中剂量组	55.06±21.15	22.58±14.48	10.27±4.47	7.03±1.85	5.72±2.95	28.88±4.38 ^①	4.67±1.21
高剂量组	55.03±23.68	20.95±17.64	13.19±5.27 ^{①②}	11.09±3.26 ^{①②}	8.45±4.09 ^{①②}	24.00±4.85 ^①	2.33±0.52 ^{①②③}

注：①表示与对照组比较， $P<0.05$ ；②表示与低剂量组比较， $P<0.05$ ；③表示中剂量组比较， $P<0.05$ 。

2.3 4 组大鼠海马组织 m⁶A 甲基化水平和 YTHDF1 表达比较

与对照组比较，中、高剂量组大鼠海马组织 m⁶A 甲基化水平升高，YTHDF1 蛋白相对表达量降低；与低剂量组比较，中、高剂量组大鼠海马组织 YTHDF1 蛋白相对表达量降低 (均 $P<0.05$)。见表 2。

3 讨论

铝是导致中枢神经退行性疾病的重要环境因

素^[9]。本研究通过动物实验研究发现铝可能通过升高 m⁶A 甲基化水平、抑制 YTHDF1 蛋白表达导致大鼠学习记忆能力损害，进而为阐明 m⁶A 修饰在铝神经毒性中的作用提供理论依据。

Morris 水迷宫实验结果显示，与对照组比较，高剂量组大鼠第 3~5 天逃避潜伏期增加，目标象限停留时间缩短，穿越平台次数减少，与其他研究结果^[10]基本一致，提示亚慢性铝暴露对大鼠的学习记忆能力造成了一定程度的损害。

表2 4组大鼠海马组织 m⁶A 甲基化水平和 YTHDF1 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Comparison of m⁶A methylation level and YTHDF1 protein relative expression in hippocampal tissue among 4 groups of rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	m ⁶ A 甲基化水平	YTHDF1 蛋白相对表达量
对照组	980.63±94.30	1.00±0
低剂量组	1 165.66±165.02	1.09±0.25
中剂量组	1 307.73±118.56 ^①	0.78±0.22 ^{①②}
高剂量组	1 349.44±188.70 ^①	0.68±0.25 ^{①②}
F值	10.420	13.521
P值	<0.001	<0.001

注: ①表示与对照组比较, $P<0.05$; ②表示与低剂量组比较, $P<0.05$ 。

本研究结果显示, 与对照组相比, 中、高剂量组大鼠海马组织 m⁶A 甲基化水平升高, 差异有统计学意义。提示 m⁶A 修饰可能在铝神经毒性中发挥了作用, 通过升高 m⁶A 甲基化水平导致大鼠学习记忆能力损害。铝暴露导致认知功能损害的重要机制之一是表观遗传学^[11], 既往研究主要涉及 DNA 甲基化修饰^[12]和组蛋白翻译后修饰^[13]等。RNA 化学修饰, 尤其 m⁶A 修饰, 是哺乳动物中最普遍、最丰富的 RNA 甲基化修饰类型; m⁶A 修饰是可逆的、动态的, 在大脑中广泛存在, 并在生物体学习和记忆方面具有重要的调控作用^[14], 是表观遗传学研究领域的热点。

YTHDF1 是 YTH 结构域家族中的阅读蛋白之一, 它可作为配体, 非特异性地识别 m⁶A 修饰的 mRNA^[15], 通过促进 mRNA 翻译或调节 mRNA 的稳定性等不同机制调控靶基因表达。另有研究表明, 敲除海马神经元的 YTHDF1, 小鼠会出现学习和记忆缺陷, 而过表达 YTHDF1 则可减轻这些损害^[4, 16]。本研究论证上述结果, 随着亚慢性铝暴露剂量的增加, 大鼠海马组织 YTHDF1 蛋白相对表达量降低, 提示亚慢性铝暴露导致学习记忆能力损害的机制可能有阅读蛋白 YTHDF1 参与识别 m⁶A 修饰。但 YTHDF1 修饰的靶基因尚未明确, 有研究发现, 过表达 YTHDF1 后, 双酚 A 暴露的 TM3 间质细胞中的 CDK2、CyclinE1 和 Bcl-2 基因的表达增加^[17]; Robo3.1 mRNA 通过 m⁶A 修饰, 与 YTHDF1 结合后影响该基因的翻译和交联神经元的轴突引导^[18]。今后将基于本研究结果及研究前沿继续深入研究铝神经毒性的分子机制。

参考文献

[1] YANG W N, HAN H, HU X D, et al. The effects of perindopril on cognitive impairment induced by d-galactose and aluminum tri-

chloride via inhibition of acetylcholinesterase activity and oxidative stress [J/OL]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2013 [2024-06-10]. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2013.10.027>.

[2] 史佳宾, 王大勇, 夏晴, 等. m⁶A 修饰对中枢神经系统功能及疾病的影响 [J]. *遗传*, 2020, 42 (12): 1156-1167.

[3] 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.

[4] 徐萌彤, 王甜甜, 李文静, 等. 铝对大鼠脑部和 PC12 细胞中肥胖相关蛋白及脑源性神经营养因子表达的影响 [J]. *环境与职业医学*, 2022, 39 (8): 908-912.

[5] ZACCARA S, RIES R J, JAFFREY S R. Reading, writing and erasing mRNA methylation [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20 (10): 608-624.

[6] SHI H L, ZHANG X L, WENG Y L, et al. m⁶A facilitates hippocampus-dependent learning and memory through YTHDF1 [J]. *Nature*, 2018, 563 (7730): 249-253.

[7] SONG J, LI W J, YUAN C M, et al. Changes in miR-134-3p expression and zDHHC3-AMPA axis in association with aluminum neurotoxicity [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2023, 30 (40): 92880-92890.

[8] 高婷, 夏欣宇, 袁春满, 等. 亚慢性染铝对大鼠海马 PSD95 及长时程增强的影响 [J]. *环境与职业医学*, 2019, 36 (11): 995-1000.

[9] 宋珊珊, 徐旭, 许杨丹, 等. 铝暴露对大鼠 PC12 细胞 tau 蛋白异常磷酸化的影响 [J]. *预防医学*, 2023, 35 (3): 271-274.

[10] 李晨羽, 贾芸菁, 甘珏方, 等. 慢性铝中毒对大鼠记忆功能的影响 [J]. *南昌大学学报 (医学版)*, 2024, 64 (1): 1-5.

[11] LIANG R F. Cross talk between aluminum and genetic susceptibility and epigenetic modification in Alzheimer's disease [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1091: 173-191.

[12] 杨晓娟, 张慧芳, 原宇宙, 等. 铝电解职业人群认知功能和基因甲基化关系研究 [J]. *中国职业医学*, 2015, 42 (5): 489-494.

[13] 张士明, 张立丰. 铝对大鼠记忆及海马内组蛋白乙酰基转移酶 1 表达的影响 [J]. *神经解剖学杂志*, 2022, 38 (3): 273-278.

[14] YUE Y N, LIU J Z, HE C. RNA N⁶-methyladenosine methylation in post-transcriptional gene expression regulation [J]. *Genes Dev*, 2015, 29 (13): 1343-1355.

[15] CHEN Z Y, ZHONG X L, XIA M, et al. The roles and mechanisms of the m⁶A reader protein YTHDF1 in tumor biology and human diseases [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2021, 26: 1270-1279.

[16] ZHANG L, CHENG Y, XUE Z, et al. Sevoflurane impairs m⁶A-mediated mRNA translation and leads to fine motor and cognitive deficits [J]. *Cell Biol Toxicol*, 2022, 38 (2): 347-369.

[17] LI J Z, ZHOU S M, YUAN W B, et al. RNA binding protein YTHDF1 mediates bisphenol S-induced Leydig cell damage by regulating the mitochondrial pathway of Bcl-2 and the expression of CDK2-CyclinE1 [J/OL]. *Environ Pollut*, 2023 [2024-06-10]. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121144>.

[18] ZHUANG M R, LI X B, ZHU J D, et al. The m⁶A reader YTHDF1 regulates axon guidance through translational control of Robo3.1 expression [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47 (9): 4765-4777.

收稿日期: 2024-03-05 修回日期: 2024-06-10 本文编辑: 徐亚慧