

· 基础研究 ·

FTO对小鼠肾小球系膜细胞m6A修饰及增殖能力的影响

陈天宇¹, 陈欣¹, 张恒璐¹, 李婉^{2*}, 陆卫平^{1*}

¹南京医科大学附属淮安第一医院内分泌科, 江苏 淮安 223300; ²南京医科大学病原生物学系, 江苏 南京 211166

[摘要] 目的: 构建表达脂肪与肥胖相关(fat mass and obesity associated, FTO)基因的重组质粒, 并检测其对小鼠肾小球系膜细胞(mice mesangial cell, MMC)N6-甲基腺嘌呤(m6A)修饰及增殖能力的影响。方法: PCR法扩增FTO基因片段, 并将其插入表达载体pCMV-MCS-EGFP质粒中以构建重组质粒pCMV-FTO。将目的质粒pCMV-FTO及对照质粒pCMV分别转染MMC, 采用qRT-PCR法检测FTO mRNA表达水平, 蛋白质印迹法检测细胞FTO蛋白和相关增殖标志物的表达, CCK8法检测细胞增殖, m6A RNA甲基化定量试剂盒检测m6A含量。结果: 菌落PCR鉴定以及测序结果证实重组质粒pCMV-FTO构建成功。RT-qPCR及蛋白印迹结果显示转染目的质粒pCMV-FTO后FTO表达明显增加。过表达FTO后, m6A含量、细胞增殖水平及细胞周期蛋白D1(Cyclin D1)、增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)蛋白水平均显著下降。结论: FTO可以降低MMC中m6A修饰水平及抑制细胞增殖。

[关键词] 脂肪与肥胖相关基因; 小鼠肾小球系膜细胞; m6A; 增殖

[中图分类号] Q78

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2019)06-851-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20190612

Effects of FTO on m6A and proliferation of mouse mesangial cells

Chen Tianyu¹, Chen Xin¹, Zhang Henglu¹, Li Wan^{2*}, Lu Weiping^{1*}

¹Department of Endocrinology and Metabolism, the Affiliated Huai'an NO.1 People's Hospital of Nanjing Medical University, Huai'an 223300; ²Department of Pathogen Biology, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to construct a recombinant plasmid expressing fat mass and obesity associated (FTO) gene and to detect its effects on m6A modification and proliferation of mouse mesangial cells (MMCs). **Methods:** The FTO gene fragment was amplified by PCR and inserted into the expression vector pCMV-MCS-EGFP plasmid to construct the recombinant plasmid pCMV-FTO. The target plasmid pCMV-FTO and the control plasmid pCMV were transfected into MMCs, respectively, and the mRNA expression of FTO was measured with real-time quantitative PCR (RT-qPCR). The total protein was extracted, and FTO, EGFP, proliferation markers of Cyclin D1 and PCNA were detected by Western blotting. The proliferation of MMCs were studied with CCK8 method. The m6A content was measured using the m6A RNA methylation quantification kit. **Results:** Colony PCR identification and sequencing confirmed that the recombinant plasmid pCMV-FTO was successfully constructed. The results showed that the mRNA and protein level of FTO was significantly increased after transfection of the target plasmid pCMV-FTO. After overexpression of FTO, m6A content, the proliferation of MMCs and Cyclin D1, PCNA protein levels decreased significantly. **Conclusion:** FTO can reduce the level of m6A modification and inhibit cell proliferation in MMCs.

[Key words] fat mass and obesity associated; mouse mesangial cells; m6A; cell proliferation

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(06): 851-855]

[基金项目] 江苏省卫生健康委员会课题(H201458); 淮安市533英才工程科研项目(HAA201744)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: wanli@njmu.edu.cn; hyhalwp@sina.com

脂肪与肥胖相关(fat mass and obesity associated, FTO)基因是肥胖易感基因, 能够通过调节脂肪酸转运, 调控脂肪代谢进而影响肥胖的发生^[1]。2011年, Jia等^[2]首次研究发现FTO蛋白为N6-甲基腺嘌呤(m6A)去甲基化酶, 参与m6A动态可逆的修饰过

程。已有相关研究报道FTO与肥胖、肿瘤、生长迟缓等相关^[3],但FTO与糖尿病肾病之间的关系目前尚不清楚。糖尿病肾病是糖尿病常见的慢性并发症,是终末期肾衰的主要病因。糖尿病肾病发病机制复杂,现有治疗手段效果有限,因此进一步探索其早期发病的分子机制有助于发现潜在治疗靶点,提供新的治疗方案。

m6A修饰是细菌和真核细胞mRNA中最丰富和保守的可逆性转录后修饰^[4]。m6A由甲基转移酶复合体在保守基序RRACH(R=G/A;H=A/C/U)上催化生成^[5-6]。与之相反,去甲基化酶如FTO、ALK-BH5则可以“擦除”RNA上的m6A^[2,7]。YTH结构域家族蛋白作为识别子可以特异性结合m6A修饰的RNA,从而调控RNA的剪切、转运、稳定性以及翻译效率^[8-10],并进一步参与干细胞分化、肿瘤发生等生物学过程^[11-14]。

本研究构建表达FTO基因的重组质粒,通过转染小鼠肾小球系膜细胞(mice mesangial cell, MMC),观察细胞m6A含量、细胞增殖水平、增殖标志物细胞周期蛋白D1(Cyclin D1)及增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)的变化。

1 材料和方法

1.1 材料

MMC(中国科学院上海细胞库)。由含5%胎牛血清的DMEM/F12(3:1)培养基置于5% CO₂ 37 °C细胞培养箱中培养。

pCMV-MCS-EGFP表达载体(上海吉凯公司);PCR酶及实时荧光定量酶(南京诺唯赞公司);PCR引物及定量引物由南京金斯瑞公司合成;限制性内切酶EcoR I/BamH I(TaKaRa公司,日本);感受态大肠埃希菌DH5 α (南京擎科公司);LipofectamineTM 2000(Invitrogen公司,美国);抗Cyclin D1抗体、抗PCNA抗体(Abcam公司,美国);抗FTO抗体(武汉三鹰公司);抗EGFP抗体、抗 β -actin抗体(南京巴傲得公司);m6A RNA甲基化定量试剂盒(Epigentek公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 PCR扩增FTO基因

根据FTO基因的核酸序列设计扩增引物,上游引物:5'-CGAGCTCAAGCTTCGAATTCGCCAC-CATGAAGCGCGTCCAGACCGCGGAG-3',下游引物:5'-TGGTGGCGACCGGTGGATCCCGGGATCTT-GCTTCCAGCAGCTGG-3'。以MMC细胞基因组cDNA

为模板,PCR扩增FTO基因片段。通过核酸电泳验证PCR产物并切胶回收。

1.2.2 重组质粒pCMV-FTO的构建与鉴定

用限制性内切酶EcoR I和BamH I酶切载体pCMV-MCS-EGFP使其线性化,与PCR产物进行重组反应,重组产物转化感受态大肠埃希菌DH5 α ,涂板并挑取有卡那抗性的单菌落进行PCR鉴定,上游引物:5'-GATGAAGTGGACCTTAAGAG-3',下游引物:5'-CGTCGCCGTCCAGCTCGACCAG-3',本对引物分别位于FTO基因片段及载体上,对阳性克隆测序分析。将正确克隆菌液扩增,提取质粒。

1.2.3 重组质粒pCMV-FTO转染MMC

用转染试剂LipofectamineTM2000分别将空载体pCMV和过表达质粒pCMV-FTO转染到提前接种在6孔板的MMC中(分别为对照组与实验组,细胞密度70%~90%),6h后替换为完全培养基继续培养。

1.2.4 qRT-PCR检测FTO mRNA表达水平

用TRIzol试剂抽提细胞总RNA,逆转录为cDNA,通过qRT-PCR法检测FTO mRNA表达水平,以 β -actin为内参。反应体系:SYBR预混液10.0 μ L,上游引物0.4 μ L,下游引物0.4 μ L,cDNA模板1.0 μ L,ddH₂O 8.2 μ L。扩增条件:95 °C 30 s预变性;95 °C 10 s,60 °C 30 s,共40个循环;95 °C 15 s,60 °C 60 s,95 °C 15 s采集熔解曲线。FTO上游引物:5'-GACACTTGGCTTCCTTACCTG-3',下游引物:5'-CTCACCACGTCCCGAAACAA-3'; β -actin上游引物:5'-GTGACGTTGACATCCGTAAGA-3,下游引物:5'-GCCGGACTCATCGTACTCC-3'。

1.2.5 蛋白质印迹法检测FTO、Cyclin D1及PCNA表达水平

收集对照组与实验组细胞,提取总蛋白,上样电泳并转膜,PVDF膜37 °C牛奶封闭1h后,一抗4 °C孵育过夜。之后,二抗37 °C孵育1h,TBST洗膜后加入ECL发光液显影。

1.2.6 CCK8法检测细胞增殖能力

在96孔板中铺等量细胞悬液(1000个/孔细胞重悬于100 μ L培养基),每组设7个复孔,共铺5块板,置于37 °C培养箱静置培养。每天同一时间取一块按照CCK8试剂盒推荐操作步骤检测细胞增殖情况。每孔加入10 μ L CCK8液,培养箱继续静置培养1h后,酶标仪检测450 nm处吸光度值。

1.2.7 m6A RNA甲基化定量试剂盒检测m6A含量

根据试剂盒说明书,在96孔板中先加入80 μ L结合试剂于相应孔中,接着分别加入2 μ L阳性对

照, 2 μ L 阴性对照以及 200 ngRNA 样品, 37 $^{\circ}$ C 孵育 90 min 后, 150 μ L 洗涤缓冲液洗孔 3 次。加入 50 μ L 捕获抗体室温孵育 60 min, 150 μ L 洗涤缓冲液洗孔 3 次, 加入 50 μ L 检测抗体室温孵育 30 min, 150 μ L 洗涤缓冲液洗孔 4 次, 加入 50 μ L 增强试剂室温孵育 30 min, 150 μ L 洗涤缓冲液洗孔 5 次。加入 100 μ L 显色试剂避光室温孵育 10 min, 加入 100 μ L 终止试剂结束反应, 酶标仪检测 450 nm 处吸光度值。

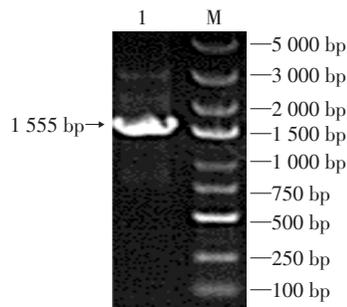
1.3 统计学方法

采用 SPSS20.0 软件进行数据分析。组间比较采用 *t* 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重组质粒 pCMV-FTO 的构建与鉴定

根据 FTO 基因的核酸序列设计扩增引物, 以 MMC 细胞基因组 DNA 为模板, 进行 PCR 反应。核酸电泳验证 PCR 产物, 可见大小约 1 555 bp 的单一一条带(图 1), 与预期一致。



M: DNA 标准参照物; 1: FTO 基因扩增产物。

图 1 PCR 扩增 FTO 基因

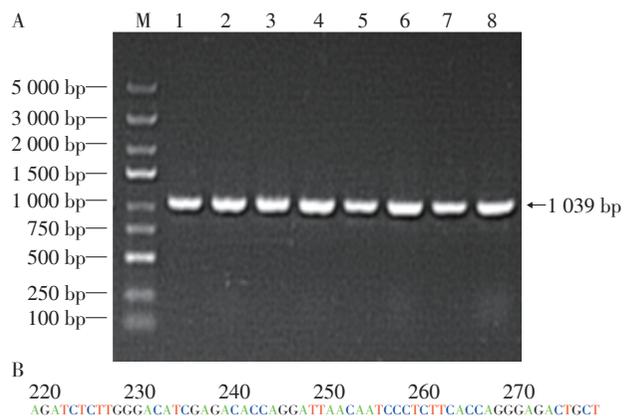
Figure 1 PCR products of the FTO gene cloned

PCR 产物与线性化载体连接重组后, 转化涂板挑取单菌落, PCR 鉴定重组克隆(图 2A), 阳性克隆大小为 1 039 bp, 与预期一致。阳性克隆测序及比对结果显示, 插入序列与目标序列一致(图 2B), 提示重组质粒 pCMV-FTO 构建成功。

2.2 过表达 FTO 对 MMC 增殖的影响

qRT-PCR 结果显示, 重组质粒 pCMV-FTO 转染 MMC 后 FTO 的表达水平与对照组相比明显上升(图 3)。蛋白质印迹结果与 RT-qPCR 结果一致, 表明 FTO 在 MMC 中过表达成功(图 4)。

过表达 FTO 后细胞增殖标志物 Cyclin D1 及 PCNA 的蛋白表达水平显著下降(图 4A), CCK8 法检测结果显示过表达 FTO 的 MMC 增殖能力受到显著抑制(图 4B), 提示 FTO 能够抑制 MMC 的增殖。



A: 菌落 PCR 鉴定; M: DNA 标准参照物; 1~8: 筛选单克隆 PCR 鉴定; B: 阳性克隆部分测序结果。

图 2 重组质粒 pCMV-FTO 的鉴定

Figure 2 Identification of recombinant plasmid pCMV-FTO

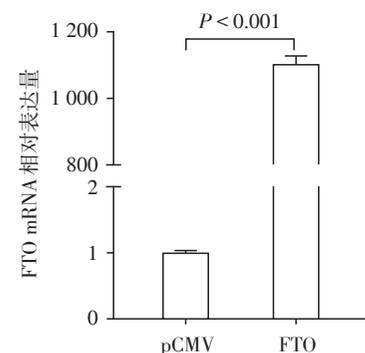


图 3 FTO 在 MMC 中的 mRNA 表达水平

Figure 3 The mRNA expression level of FTO in MMC

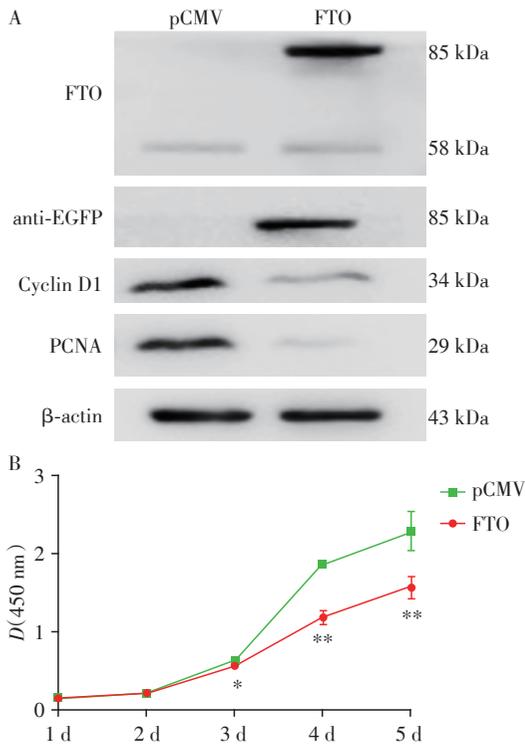
2.3 过表达 FTO 对细胞 m6A 修饰的影响

过表达 FTO 后, MMC 的 m6A 水平显著下降, 提示 FTO 在 MMC 中发挥去甲基化酶的作用(图 5)。

3 讨论

作为全基因组关联研究 (genome-wide association study, GWAS) 第一个鉴定出的肥胖易感基因, FTO 基因第 1 内含子的核酸多态性与肥胖相关^[15]。小鼠模型研究显示 FTO 在调节脂肪含量、脂肪生成和体重方面起关键作用^[16-18]。同时, FTO 在肿瘤发生中的作用也日益受到关注, 如白血病与宫颈癌中 FTO 基因呈高表达状态^[19-20]。

m6A 修饰是真核生物中最丰富的转录后修饰^[4],



A: FTO、Cyclin D1、PCNA在MMC中的蛋白表达水平; B: CCK8法检测过表达FTO后MMC的增殖。两组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ 。

图4 FTO对MMC增殖的影响

Figure 4 Effect of FTO on cell proliferation of MMC

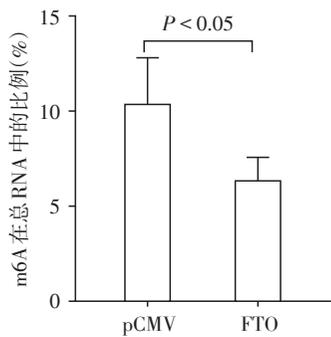


图5 MMC中的m6A水平

Figure 5 Level of m6A in MMC

通过调节基因的表达、编辑、稳定性及降解等代谢过程^[8-10],进而影响发育、代谢、生殖等生物学过程及肿瘤、肥胖、糖尿病等疾病的发生与发展^[21-22]。m6A修饰由Mettl 3、Mettl 14等多种甲基转移酶催化生成^[5],而FTO和ALKBH5则可以可逆性地“擦除”m6A^[2,7]。YTH结构域蛋白通过识别m6A修饰的RNA,从而发挥多种生物学功能,调节RNA代谢。

糖尿病肾病是糖尿病的重要并发症,其发病机制复杂,高血糖、肾脏血流动力学改变、氧化应激和炎症反应等,引起肾小球高滤过、动脉血压升高、肾

脏肥大、肾小球毛细血管基底膜增厚和细胞外基质蓄积^[23-24]。

本研究成功构建了FTO的重组质粒,在过表达FTO的MMC中,细胞增殖标志物Cyclin D1及PCNA的蛋白表达水平显著下降,而CCK8实验显示转染FTO的MMC生长速度相比对照组显著减慢,表明FTO抑制MMC增殖。通过检测m6A水平,发现过表达FTO的MMC中m6A水平显著下降。新近研究表明,FTO在脂肪形成与肿瘤发生中的功能与其m6A去甲基化酶活性有关^[8,19]。因此推测FTO依赖其m6A去甲基化酶活性调节肾小球系膜细胞的m6A水平,进而影响糖尿病肾病的发生发展。在下一步研究中,将利用MeRIP-Seq及RNA-Seq筛选并鉴定FTO在MMC中的下游靶基因,进而探索FTO参与糖尿病肾病的具体分子机制。

综上所述,本研究通过构建FTO重组质粒,发现FTO能够降低小鼠肾小球系膜细胞的m6A水平并抑制细胞增殖能力,为后续的机制研究奠定基础。

【参考文献】

- [1] Loos RJ, Bouchard C. FTO: the first gene contributing to common forms of human obesity [J]. *Obes Rev*, 2008, 9(3):246-250
- [2] Jia G, Fu Y, Zhao X, et al. N6-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO [J]. *Nat Chem Biol*, 2011, 7(12):885-887
- [3] Boissel S, Reish O, Proulx K, et al. Loss-of-function mutation in the dioxygenase-encoding FTO gene causes severe growth retardation and multiple malformations [J]. *Am J Hum Genet*, 2009, 85(1):106-111
- [4] Jia G, Fu Y, He C. Reversible RNA adenosine methylation in biological regulation [J]. *Trends Genet*, 2013, 29(2):108-115
- [5] Liu J, Yue Y, Han D, et al. A METTL3-METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N6-adenosine methylation [J]. *Nat Chem Biol*, 2014, 10(2):93-95
- [6] Ping XL, Sun BF, Wang L, et al. Mammalian WTAP is a regulatory subunit of the RNA N6-methyladenosine methyltransferase [J]. *Cell Res*, 2014, 24(2):177-189
- [7] Zheng G, Dahl JA, Niu Y, et al. ALKBH5 is a mammalian RNA demethylase that impacts RNA metabolism and mouse fertility [J]. *Mol Cell*, 2013, 49(1):18-29
- [8] Zhao X, Yang Y, Sun BF, et al. FTO-dependent demethylation of N6-methyladenosine regulates mRNA splicing and is required for adipogenesis [J]. *Cell Res*, 2014, 24(12):1403-1419
- [9] Wang X, Lu Z, Gomez A, et al. N6-methyladenosine-de-

- pendent regulation of messenger RNA stability [J]. *Nature*, 2014, 505(7481): 117-120
- [10] Wang X, Zhao BS, Roundtree IA, et al. N(6)-methyladenosine modulates messenger RNA Translation Efficiency [J]. *Cell*, 2015, 161(6): 1388-1399
- [11] Weng H. METTL14 Inhibits Hematopoietic stem/progenitor differentiation and promotes leukemogenesis via mRNA m6A modification [J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 22(2): 191-205
- [12] 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
- [13] Chen M, Wei L, Law CT, et al. RNA N6-methyladenosine methyltransferase METTL3 promotes liver cancer progression through YTHDF2 dependent post-transcriptional silencing of SOCS2 [J]. *Hepatology*, 2017, 67(6): 2254-2270
- [14] Batista PJ, Molinie B, Wang J, et al. m(6)A RNA modification controls cell fate transition in mammalian embryonic stem cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 15(6): 707-719
- [15] Dina C, Meyre D, Gallina S, et al. Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity [J]. *Nat Genet*, 2007, 39(6): 724-726
- [16] Church C, Moir L, McMurray F, et al. Overexpression of Fto leads to increased food intake and results in obesity [J]. *Nat Genet*, 2010, 42(12): 1086-1092
- [17] McMurray F, Church CD, Larder R, et al. Adult onset global loss of the fto gene alters body composition and metabolism in the mouse [J]. *PLoS Genet*, 2013, 9(1): e1003166
- [18] Merkestein M, Laber S, McMurray F, et al. FTO influences adipogenesis by regulating mitotic clonal expansion [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 6792
- [19] Li Z, Weng H, Su R, et al. FTO plays an oncogenic role in acute myeloid leukemia as a N(6)-methyladenosine RNA demethylase [J]. *Cancer Cell*, 2017, 31(1): 127-141
- [20] Zhou S, Bai ZL, Xia D, et al. FTO regulates the chemo-radiotherapy resistance of cervical squamous cell carcinoma (CSCC) by targeting beta-catenin through mRNA demethylation [J]. *Mol Carcinog*, 2018, 57(5): 590-597
- [21] Shen F, Huang W, Huang JT, et al. Decreased N(6)-methyladenosine in peripheral blood RNA from diabetic patients is associated with FTO expression rather than ALKBH5 [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2015, 100(1): E148-E154
- [22] Daoud H, Zhang D, McMurray F, et al. Identification of a pathogenic FTO mutation by next-generation sequencing in a newborn with growth retardation and developmental delay [J]. *J Med Genet*, 2016, 53(3): 200-207
- [23] Arora MK, Singh UK. Molecular mechanisms in the pathogenesis of diabetic nephropathy: an update [J]. *Vascul Pharmacol*, 2013, 58(4): 259-271
- [24] 李萍,方莉,蔡秋萍,等. 糖尿病肾病患者微炎症和氧化应激水平及其影响因素分析 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2016, 36(2): 214-217

[收稿日期] 2019-01-17