

m⁶A 甲基化转移酶 3 在糖尿病性白内障发病中的作用机制

陈思¹, 叶巍², 唐韵³, 王文喆³, 葛轶睿², 王雪莹², 黄振平²

引用:陈思,叶巍,唐韵,等. m⁶A 甲基化转移酶 3 在糖尿病性白内障发病中的作用机制. 国际眼科杂志 2023;23(8):1250-1259

作者单位:¹(210003)中国江苏省南京市,东南大学医学院;
²(210002)中国江苏省南京市,东部战区总医院眼科;³(210008)
中国江苏省南京市,南京大学医学院

作者简介:陈思,女,在读硕士研究生,研究方向:白内障。

通讯作者:黄振平,男,毕业于北京大学医学院,博士,主任医师,
博士研究生导师,研究方向:白内障、角膜病、眼视光. hzp19633@
hotmail.com

收稿日期:2023-01-28 修回日期:2023-07-10

摘要

目的:探讨 N⁶-甲基腺嘌呤(N⁶-methyladenosine, m⁶A)甲基化转移酶 3(METTL3)在糖尿病性白内障发病中的作用机制。

方法:用低糖和高糖培养基培养人晶状体上皮细胞系(SRA01/04)24h后,采用 RT-qPCR 和 Western blot 实验检测细胞的上皮-间质转分化(EMT)指标:E-钙黏蛋白(E-Cadherin)、N-钙黏蛋白(N-Cadherin)、紧密连接蛋白 1(ZO-1)和 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)的变化情况;transwell 和划痕实验检测细胞迁移能力。采用免疫荧光染色检测人晶状体前囊膜组织中 METTL3 的表达量及定位,m⁶A dot blot 实验检测在低糖和高糖培养基中培养 24h 细胞的 m⁶A 甲基化水平,RT-qPCR 和 Western blot 实验检测细胞中 METTL3 的 RNA 和蛋白表达量。加入 METTL3 抑制剂的培养基中培养 24h 的细胞,RT-qPCR 和 Western blot 实验检测 EMT 指标的变化情况;m⁶A dot blot 实验检测细胞 m⁶A 甲基化水平;Transwell 和划痕实验检测细胞迁移能力。免疫荧光染色检测细胞中转化生成因子 β (TGF β_1)的表达;RT-qPCR 和 Western blot 实验检测细胞中的 TGF β_1 和 SNAIL 的表达量。

结果:与低糖条件相比,高糖条件能够促进细胞 EMT 的发生,促进 METTL3 的表达和上调了细胞总 RNA 的 m⁶A 甲基化水平($P<0.05$)。高糖能够促进细胞的迁移能力。糖尿病性白内障患者晶状体前囊膜中 METTL3 表达较单纯年龄相关性白内障患者增高。与高糖+DMSO 组相比,加入 METTL3 抑制剂 STM2457,能够抑制细胞的 EMT 发生,抑制 TGF β_1 和 SNAIL 的表达,抑制细胞总 RNA 的 m⁶A 甲基化水平(均 $P<0.05$)。加入 METTL3 抑制剂 STM2457 后细胞迁移能力较高糖+DMSO 组降低。

结论:m⁶A 甲基化转移酶 METTL3 通过激活 TGF β_1 /SNAIL 通路促进了在高糖条件下人晶状体上皮细胞的 EMT 发生从而诱导糖尿病性白内障的发生。

关键词:糖尿病性白内障;甲基化转移酶 3(METTL3);N⁶-甲基腺嘌呤(m⁶A);上皮-间质转分化

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2023.8.03

Mechanism of m⁶A methyltransferase 3 in the pathogenesis of diabetic cataract

Si Chen¹, Wei Ye², Yun Tang³, Wen-Zhe Wang³, Yi-Rui Ge², Xue-Ying Wang², Zhen-Ping Huang²

¹School of Medicine, Southeast University, Nanjing 210003, Jiangsu Province, China; ²Department of Ophthalmology, General Hospital of Eastern Theater Command, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China; ³Medical School of Nanjing University, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Zhen - Ping Huang. Department of Ophthalmology, General Hospital of Eastern Theater Command, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China. hzp19633@hotmail.com
Received:2023-01-28 Accepted:2023-07-10

Abstract

• **AIM:** To investigate the role and mechanism of N⁶-methyladenosine (m⁶A) methyltransferase 3 (METTL3) in the pathogenesis of diabetic cataract.

• **METHODS:** We cultured SRA01/04 cells in low and high sugar media for 24h and measured changes in epithelial-mesenchymal transition (EMT) indicators (E-Cadherin, N-Cadherin, ZO-1 and α -SMA) using RT-qPCR and Western blot assays. Cell migration was also assessed using transwell and scratch assays. To investigate the expression level and localization of METTL3 in human lens anterior capsules tissues. Additionally, we used m⁶A dot blot assay to detect the m⁶A methylation level of cells cultured in low and high glucose media for 24h, and employed RT-qPCR and Western blot experiments to detect RNA and protein expression of METTL3 in cells. We then treated the cells with METTL3 inhibitor and measured changes in EMT markers by RT-qPCR and Western blot; m⁶A methylation level was detected by m⁶A dot blot test; cell migration was detected by Transwell. Finally, the expression of transforming growth factor- β (TGF β_1) in cultured cells was assessed by immunofluorescence staining and the expression levels of TGF β_1 and SNAIL in cells were determined using RT-qPCR and Western blot.

• **RESULTS:** Under high glucose conditions, the expression of EMT markers, METTL3, and m⁶A methylation levels were significantly increased in cells ($P<0.05$). Furthermore, the migratory ability of cells was higher in high-sugar medium than in low-sugar medium. In human lens anterior capsules, METTL3 expression was

higher in patients with diabetic cataract compared to those with age-related cataract. Importantly, treatment with the METTL3 inhibitor STM2457 inhibited EMT in cells, the expression of TGFβ1 and SNAIL, as well as m⁶A methylation levels in cells (all $P < 0.05$) compared to high-sugar + dimethyl sulfoxide (DMSO) group. Moreover, the migratory capacity of cells was reduced after the addition of STM2457 compared to the high-sugar + DMSO group.

• **CONCLUSION:** METTL3 promotes the EMT in human lens epithelial cells under high glucose conditions by activating the TGFβ₁/SNAIL pathway, thus contributing to the development of diabetic cataracts.

• **KEYWORDS:** diabetic cataract; methyltransferase 3 (METTL3); N⁶-methyladenosine (m⁶A); epithelial-mesenchymal transition

Citation: Chen S, Ye W, Tang Y, et al. Mechanism of m⁶A methyltransferase 3 in the pathogenesis of diabetic cataract. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2023;23(8):1250-1259

0 引言

随着社会发展和生活水平的提高,糖尿病的患病率逐年上升,预计到2030年全球糖尿病患病率为4.4%^[1]。糖尿病性白内障是糖尿病的眼部常见并发症之一,与非糖尿病人群相比,糖尿病患者患白内障的发病率增加了5倍^[2],尤其是囊膜下型混浊在糖尿病性白内障中发生率更高^[3]。近年来,有研究表明晶状体上皮细胞发生上皮-间质转分化(EMT)是糖尿病性白内障发生的重要病理过程^[4-6]。

EMT是上皮细胞转化成间质细胞的过程。在EMT发生过程中上皮细胞标志物如E-钙黏蛋白(E-Cadherin)、紧密连接蛋白(zonula occludens-1,ZO-1)等下降,而间质细胞标志物如N-钙黏蛋白(N-Cadherin)、α-平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle actin,α-SMA)等上升。有研究发现在链脲佐菌素诱导的糖尿病小鼠晶状体中,在晶状体后囊下区域有异常的有核细胞存在即发生EMT^[7],EMT在高糖诱导的晶状体上皮细胞中也被发现^[8-9]。但是高糖调控晶状体上皮细胞EMT的发病机制尚不明确。

N⁶-甲基嘌呤(m⁶A)主要通过RNA甲基化的转移酶(如METTL3等),m⁶A去甲基化酶,还有m⁶A结合蛋白等^[10]。在一些肿瘤相关研究中,发现METTL3表达升高,METTL3介导的m⁶A甲基化促进了肿瘤细胞的EMT发生^[11-12]。也有研究提出m⁶A甲基化在糖尿病性白内障的发生^[13]。而在糖尿病性白内障发病过程中,METTL3对晶状体上皮细胞EMT的调控相关研究较少。在调控细胞EMT发生的各种信号通路中,转化生成因子-β

(transforming growth factor-β,TGF-β)相关的信号通路发挥了重要的作用,TGF-β也是调节眼组织生理或病理过程中最重要的信号分子之一^[14]。有研究表明,在活化的库普弗细胞(Kupffer细胞)中,METTL3可以调控TGF-β的表达^[15-16]。而SNAIL已被证实是参与TGF-β调控EMT的重要的下游核转录因子^[17-18]。

本文主要研究了在糖尿病性白内障发病过程中,METTL3介导的晶状体上皮细胞的m⁶A甲基化的发生,以及对其EMT的调控作用,初步探索了下游的调控机制,为防治糖尿病性白内障找寻新的靶点。

1 对象和方法

1.1 对象 前瞻性研究。收集2022-04/10东部战区总医院收治的年龄相关性白内障患者20例和糖尿病性白内障患者20例,所有患者除白内障外均无眼部其他病变。在行常规的白内障超声乳化手术中,由同一术者行连续环形撕囊,获得直径约为5~6mm的类圆形前囊膜组织片,其上附有晶状体上皮细胞。术中取患者晶状体前囊膜,两组患者术前一般资料比较结果见表1。本研究经东部战区总医院伦理委员会批准(No.2022DZGZR-092)。实验过程中对手术标本的处理遵照《赫尔辛基宣言》,样本获取过程中,均获得患者在术前签署的知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和处理及分组 人晶状体上皮细胞SRA01/04(ATCC公司,美国)在DMEM培养基中培养,补充10%胎牛血清(FBS)和1%青霉素-链霉素双抗,并置于37℃,5%CO₂细胞孵箱中孵育。分为4组:低糖组:低糖(5.5mmol/L)DMEM培养基中培养24h;高糖组:高糖(35.5mmol/L;每100mL低糖DMEM培养基+0.54g葡萄糖糖粉)中培养24h;高糖+DMSO组:高糖DMEM培养基+二甲基亚砜(DMSO)中培养24h;高糖+STM2457组:高糖DMEM培养基+1μmol/L STM2457(溶于DMSO中)中培养24h。

1.2.2 Transwell 实验 将细胞消化、离心,重悬于无血清的DMEM培养液中,取10μL细胞悬液用于细胞计数,将Transwell小室(Millipore,德国)置于24孔板中,下室分别加入600μL的条件培养基,上室加入计数的细胞悬液(约5×10⁵个),做好标记,细胞孵箱中孵育24h后,经过4%多聚甲醛固定、结晶紫染色后在倒置显微镜(OLYMPUS,日本)下观察拍照,实验重复3次以上。

1.2.3 划痕实验 在6孔板的背面划出需要的横线,将细胞接种于6孔板中,在细胞孵箱中孵育待细胞融合至90%,然后用无菌移液枪头在相应地方作细胞划痕,PBS清洗掉脱落细胞,分别加入相应条件培养基,放入37℃,5%CO₂细胞孵箱中孵育24h,在倒置显微镜下观察拍照,实验重复3次以上。细胞迁移率=(0h划痕面积-24h划痕面积)/0h划痕面积×100%。

表1 两组患者术前一般资料比较

分组	例数(眼数)	性别(男/女,例)	年龄($\bar{x} \pm s$,岁)	随机血糖($\bar{x} \pm s$,mmol/L)	糖化血红蛋白($\bar{x} \pm s$,%)
年龄相关性白内障组	20(20)	10/10	72.30±12.36	5.02±0.24	5.62±0.53
糖尿病性白内障组	20(20)	11/9	71.25±12.89	6.41±0.39	7.17±1.14
χ^2/t		0.1	-0.263	2.981	5.488
P		0.752	0.794	0.005	<0.0001

1.2.4 Western blot 实验 将细胞接种于10cm 细胞培养皿,收集细胞裂解物,提取总蛋白并且定量,经过制胶、电泳、转膜、封闭、孵育、清洗,发光液均匀铺洒后于显影仪(Tanon5500,中国)下显影拍照,实验重复3次以上。用于免疫印迹的一抗包括 GAPDH (BC004109, Proteintech, 中国武汉)、ZO-1 (BC111712, Proteintech, 中国武汉)、E-Cadherin (BC141838, Proteintech, 中国武汉)、N-Cadherin (BC036470, Proteintech, 中国武汉)、 α -SMA (NM-001613, Proteintech, 中国武汉)、METTL3 (BC001650, Proteintech, 中国武汉)、TGF β_1 (BC000125, Proteintech, 中国武汉)、SNAIL(ab180714, abcam, 英国)。

1.2.5 细胞免疫荧光法 将置于96孔培养板中的晶状体前囊膜标本(用于检测 METTL3 及 N-cadherin 表达)/共聚焦小皿中不同条件培养基的 SRA01/04 细胞(用于检测不同条件培养基中 TGF β_1 表达)进行清洗、固定、封闭、孵育一抗(1:100)、清洗,孵育加荧光标记的二抗(1:200),封片后于共聚焦显微镜下观察拍照,实验重复3次以上。所用的一抗包括:N-Cadherin (BC036470, Proteintech, 中国武汉)、METTL3 (BC001650, Proteintech, 中国武汉)、TGF β_1 (BC000125, Proteintech, 中国武汉)。

1.2.6 RNA 提取和 RT-qPCR 实验 将 SRA01/04 细胞接种于12孔板中,加入相应条件的培养液,培养24h,trizol法提取总 RNA, RNA 逆转录使用逆转录试剂盒(R333, Vazyme), 50°C 15min, 85°C 5s, 实验重复3次以上。引物设计通过 Primer5.0 软件自行设计,所设计引物通过 Blast 软件检测其产物正确, β -actin: 上游引物 5'-GCCATGTACGTAGCCATCCA-3', 下游引物 5'-ACGCTCGTCAGGATCTTCA-3' 作为内参。靶基因的引物如下: E-Cadherin 引物序列: 上游 5'-GCTGGACCGAGAGTCC-3', 下游 5'-CAAATCCAAGCCCGTGGTG-3'; ZO-1 引物序列: 上游 5'-GAAATACCTGACGGTGCTGC-3', 下游 5'-GAGGATGGCGTTACCCACAG-3'; N-Cadherin 引物序列: 上游 5'-GGCGTTATGTGTATCTTCACTG-3', 下游 5'-ACTTCTGCTGACTCCTTCACTG-3'; α -SMA 引物序列: 上游 5'-AGTACCCGCCAGAACTA-3', 下游 5'-GTCGCCACGTAGGAATCTT-3'; TGF β_1 引物序列: 上游 5'-CGCGTGCTAATGGTGAAA-3', 下游 5'-CGCTTCTCGG

AGCTCTGATG-3', SNAIL 引物序列: 上游 5'-TCAGACGAGGACAGTGGGAAAG-3', 下游 5'-GCTTGTGGAGCAGGGACATTC-3'; METTL3 引物序列: 上游 5'-TTGTCTCCAACTTCCGTAGT-3', 下游: 5'-CCAGATCAGAGAGGTGGTGTAG-3'; 实时定量反应体系 20 μ L, 所用 qPCR 试剂(Q131, Vazyme), ABI 7500PCR 荧光定量扩增仪进行。计算目的基因相对表达量,即目的基因/内参基因。

1.2.7 RNA dot blot 实验 Trizol 法提取总 RNA, 统一浓度后,经加热 95°C, 3min, 冰上冷却后,用枪头吸取加热冷却后产物在 NC 膜上留下印记,晾干后紫外线照射 30min, 经清洗、封闭、孵育, 均匀滴上发光液后在显影仪(TANON5500, 中国)下显影拍照, 后经亚甲蓝染色 30min 并在白光下拍照, 通过 Image J 软件测量每个点的相对信号密度。

统计学分析:使用 SPSS18.0 和 Graphpad Prism 8.0 统计软件进行分析, 计量数据均以均数 \pm 标准差表示, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验, 采用单因素方差分析比较多组间差异, 多组间两两比较采用 LSD-*t* 检验, 计数资料用例数(眼数)表示, 采用卡方检验。以 *P*<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同糖浓度培养 24h 对人晶状体上皮细胞 EMT 的影响

2.1.1 Western blot 实验结果 将人晶状体上皮细胞分别在低糖(5.5mmol/L)和高糖(35.5 mmol/L)的 DMEM 培养液中培养 24h, 提取总蛋白行 Western blot 实验, 结果显示与低糖组相比, 高糖组 EMT 上皮标志物 E-Cadherin (*t* = 16.74, *P*<0.05)、ZO-1 (*t* = 13.21, *P*<0.05) 下降, 间质标志物 N-Cadherin (*t* = 20.49, *P*<0.05)、 α -SMA (*t* = 14.29, *P*<0.05) 上升, 差异均有统计学意义。提示高糖促进了人晶状体上皮细胞 EMT 的发生, 见图 1。

2.1.2 RT-qPCR 实验结果 提取高糖组和低糖组人晶状体上皮细胞的 RNA 行 RT-qPCR 实验, 结果提示高糖组上皮标志物 E-Cadherin (*t* = 4.959, *P*<0.01)、ZO-1 (*t* = 16.22, *P*<0.01) 较低糖组下降, 间质标志物 N-Cadherin (*t* = 8.973, *P*<0.01)、 α -SMA (*t* = 3.668, *P*<0.05) 较低糖组上升, 差异均有统计学意义。提示高糖促进了人晶状体上皮细胞 EMT 的发生, 见图 2。

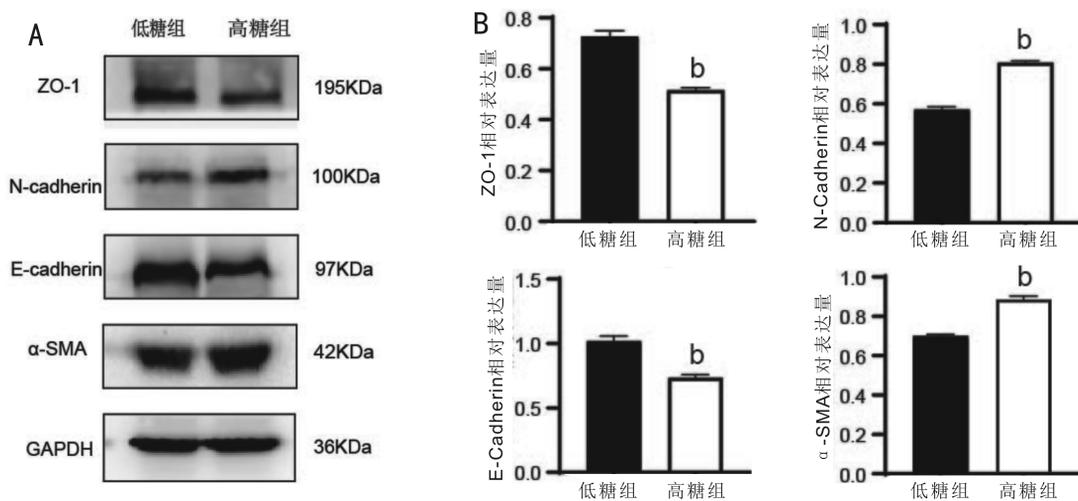


图 1 Western blot 实验检测不同糖浓度培养 24h 后对人晶状体上皮细胞 EMT 的影响 A: Western blot 实验结果; B: 柱状图 (*n* = 3; ^b*P*<0.01 vs 低糖组)。

2.1.3 划痕实验结果 划痕实验结果提示高糖组人晶状体上皮细胞迁移能力较低糖组增加, 差异有统计学意义 ($t=24.66, P<0.01$), 见图 3。

2.1.4 Transwell 实验结果 Transwell 实验结果提示高糖组人晶状体上皮细胞迁移能力大于低糖组, 差异有统计学意义 ($t=24.47, P<0.05$), 见图 4。

2.2 免疫荧光实验检测人晶状体前囊膜 METTL3 表达情况 免疫荧光实验检测糖尿病性白内障和年龄相关性白内障患者前囊膜中人晶状体上皮细胞 METTL3 的表达及定位, 以及共染 N-Cadherin, 发现在糖尿病性白内障患

者前囊膜中 METTL3、N-Cadherin 表达高于年龄相关性白内障患者中的表达(图 5)。

2.3 不同糖浓度培养 24h 对人晶状体上皮细胞 METTL3 和 m⁶A 甲基化水平的影响

2.3.1 m⁶A dot blot 实验结果 m⁶A dot blot 实验结果提示高糖组人晶状体上皮细胞总 RNA 的 m⁶A 甲基化水平较低糖组升高, 差异有统计学意义 ($t=12.83, P<0.01$), 见图 6。

2.3.2 Western blot 实验结果 Western blot 实验结果提示高糖组人晶状体上皮细胞中 METTL3 蛋白表达较低糖组高, 差异有统计学意义 ($t=10.20, P<0.01$), 见图 7。

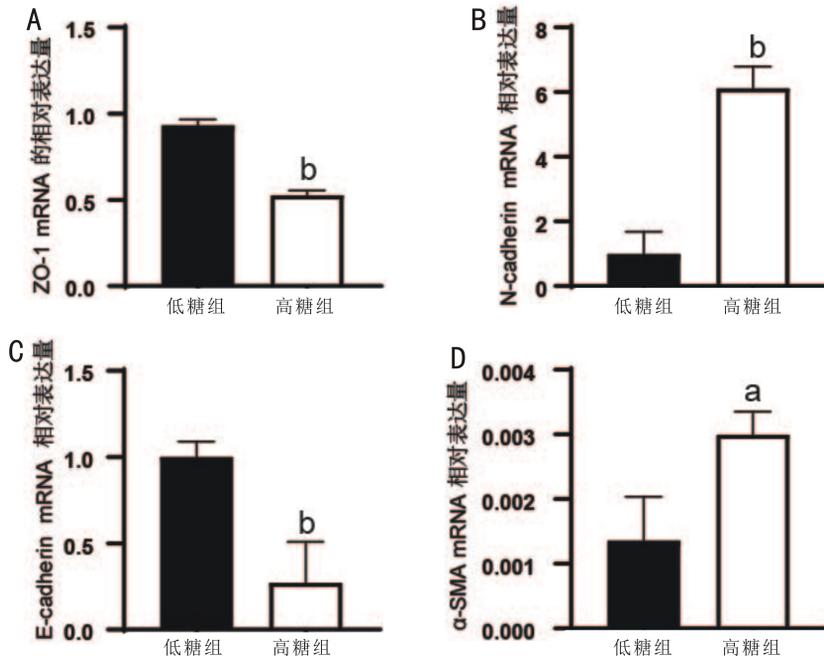


图 2 RT-qPCR 检测不同糖浓度培养 24h 后对人晶状体上皮细胞 EMT 的影响 A: ZO-1; B: N-Cadherin; C: E-Cadherin; D: α -SMA; ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs 低糖组。

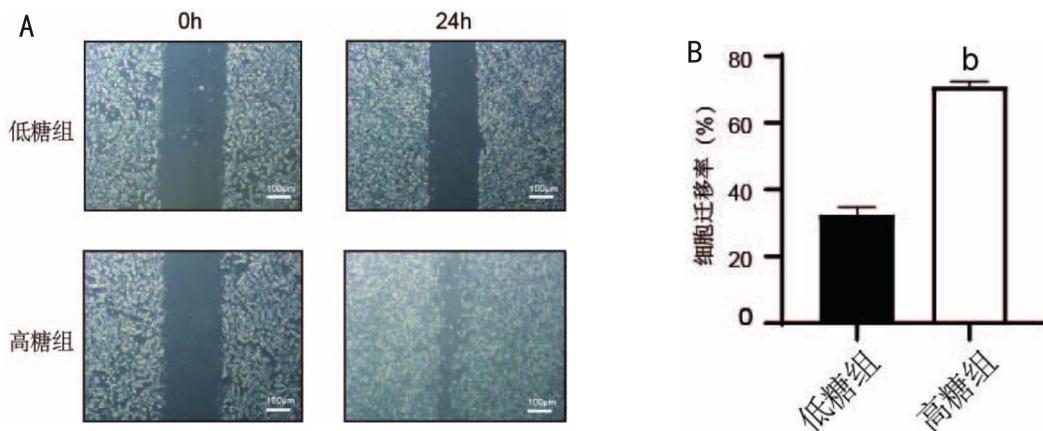


图 3 划痕实验检测不同糖浓度培养 24h 后对人晶状体上皮细胞迁移能力的影响 A: 划痕实验检测结果; B: 柱状图 ($n=3$; ^b $P<0.01$ vs 低糖组)。

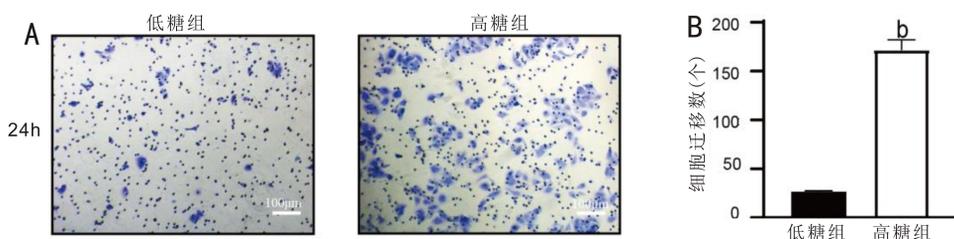


图 4 Transwell 实验检测不同糖浓度培养 24h 后对人晶状体上皮细胞迁移能力的影响 A: Transwell 实验结果; B: 柱状图 ($n=5$; ^b $P<0.01$ vs 低糖组)。

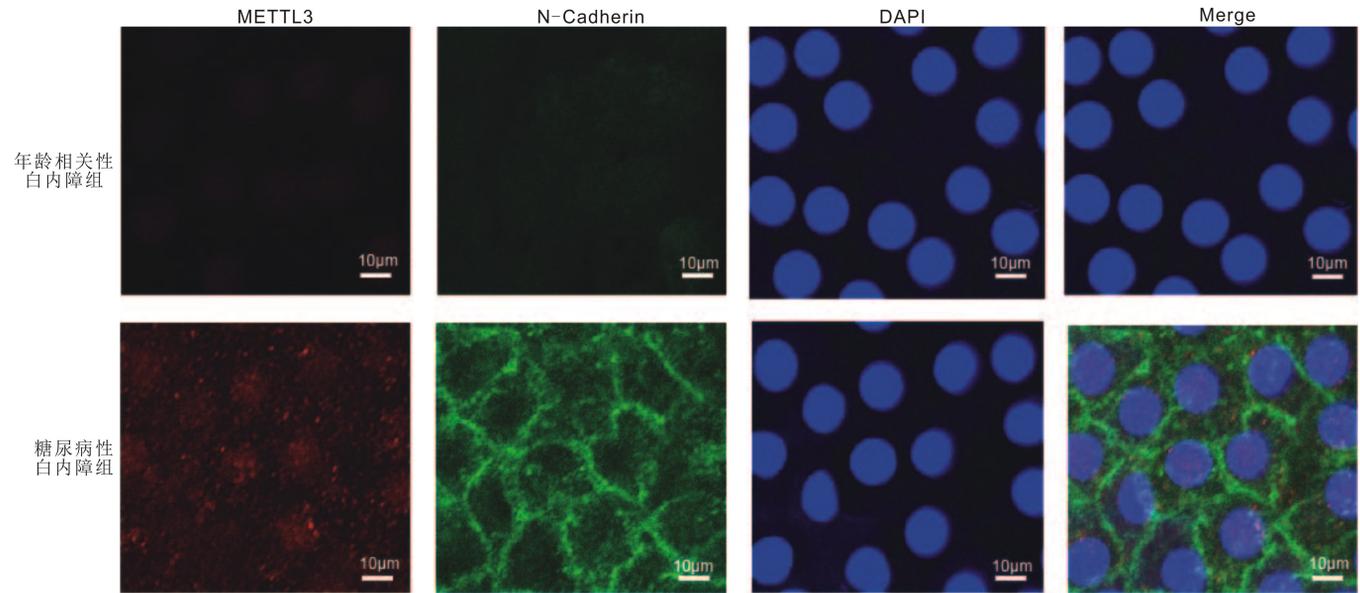


图5 免疫荧光实验检测人晶状体前囊膜 METTL3 表达情况 红色:METTL3;绿色:N-cadherin;蓝色:DAPI;Merge:共定位图像。

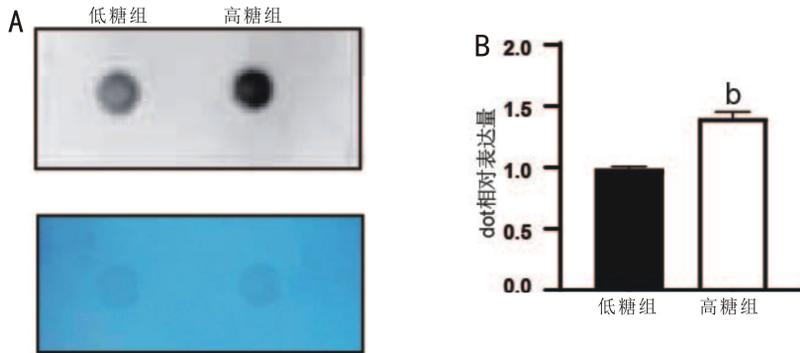


图6 m^6A dot blot 实验检测不同糖浓度培养 24h 后对人晶状体上皮细胞 m^6A 甲基化水平的影响 A: m^6A dot blot 实验结果;B:柱状图;^b $P < 0.01$ vs 低糖组。

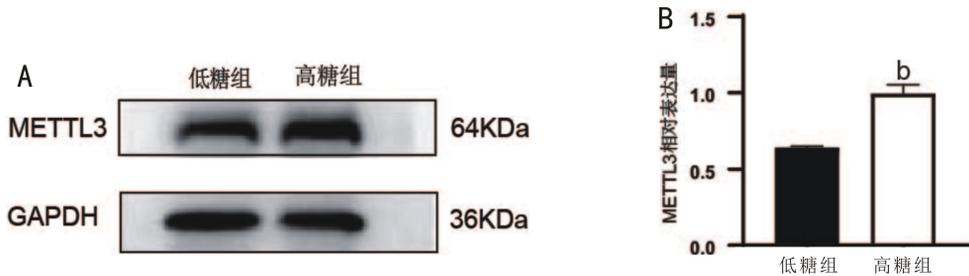


图7 Western blot 实验检测不同糖浓度培养 24h 后对人晶状体上皮细胞 METTL3 表达的影响 A: Western blot 实验结果;B:柱状图($n=3$;^b $P < 0.01$ vs 低糖组)。

2.3.3 RT-qPCR 实验结果 RT-qPCR 实验结果提示高糖组人晶状体上皮细胞的 METTL3 RNA 表达量较低糖组升高,差异有统计学意义($t=3.811, P < 0.05$),见图 8。

2.4 METTL3 抑制剂 STM2457 对人晶状体上皮细胞 EMT 的影响

2.4.1 m^6A dot blot 实验结果 m^6A dot blot 实验检测四组人晶状体上皮细胞的 m^6A 甲基化水平差异有统计学意义($F=102.3, P < 0.01$)。LSD- t 检验结果显示,与低糖组相比,高糖组 m^6A 甲基化水平增高,差异有统计学意义($P < 0.01$);与高糖 + DMSO 组相比,加入 METTL3 抑制剂 STM2457 后, m^6A 甲基化水平降低,差异有统计学意义($P < 0.01$),提示 STM2457 降低了高糖条件下 m^6A 甲基化水平,且溶剂 DMSO 对实验结果无显著影响,见图 9。

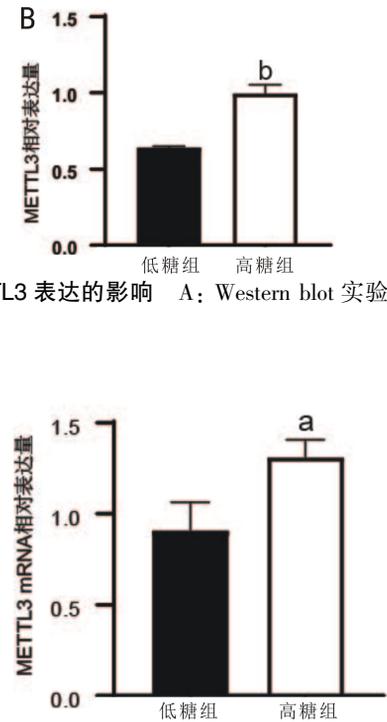


图8 RT-qPCR 实验检测不同糖浓度培养 24h 后对人晶状体上皮细胞 METTL3 表达的影响 ^a $P < 0.05$ vs 低糖组。

2.4.2 RT-qPCR 实验结果 RT-qPCR 实验检测四组人晶状体上皮细胞的 EMT 的上皮标志物 ZO-1 ($F=16.17$,

$P < 0.05$)、E-Cadherin ($F = 75.82, P < 0.01$), 间质标志物 N-Cadherin ($F = 58.95, P < 0.01$)、 α -SMA ($F = 25.14, P < 0.01$) 差异均有统计学意义。LSD- t 检验结果显示, 与低糖组相比, 高糖组细胞 EMT 的上皮标志物 ZO-1、E-Cadherin 降低, 间质标志物 N-Cadherin、 α -SMA 升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 与高糖+DMSO 组相比, 加入 STM2457 后, 细胞 EMT 的上皮标志物 ZO-1、E-Cadherin 升高, 间质标志物 N-Cadherin、 α -SMA 降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 提示 STM2457 能有效抑制高糖条件处理的人晶状体上皮细胞的 EMT 的水平, 且溶剂 DMSO 对实验结果无显著影响, 见图 10。

2.4.3 Western blot 实验结果 Western blot 实验检测四组人晶状体上皮细胞的 EMT 的上皮标志物 ZO-1 ($F = 303.4, P < 0.01$)、E-Cadherin ($F = 76.97, P < 0.01$), 间质标志物 N-Cadherin ($F = 45.65, P < 0.01$)、 α -SMA ($F = 76.96, P < 0.01$) 差异均有统计学意义。LSD- t 检验结果显示, 与低糖组相比, 高糖组细胞 EMT 的上皮标志物 ZO-1、E-Cadherin 降低, 间质标志物 N-Cadherin、 α -SMA 升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 与高糖+DMSO 组相比, 加入 STM2457 后, 细胞 EMT 的上皮标志物 ZO-1、E-Cadherin 升高, 间质标志物 N-Cadherin、 α -SMA 降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 提示 STM2457 能有效抑制高糖条件处理的人晶状体上皮细胞的 EMT 的水平, 且溶剂 DMSO 对实验结果无显著影响, 见图 11。

2.4.4 Transwell 实验结果 Transwell 实验检测四组人晶状体上皮细胞的迁移能力差异有统计学意义 ($F = 1969, P < 0.01$)。LSD- t 检验结果显示, 与低糖组相比, 高糖组细胞迁移能力升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 与高糖+DMSO 组相比, 加入 STM2457 后, 细胞迁移能力降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 提示 STM2457 能有效抑制高糖条件处理的人晶状体上皮细胞的迁移能力, 且溶剂 DMSO 对实验结果无显著影响, 见图 12。

2.4.5 划痕实验结果 划痕实验检测四组人晶状体上皮细胞的迁移能力差异有统计学意义 ($F = 1477, P < 0.01$)。LSD- t 检验结果显示, 与低糖组相比, 高糖组细胞迁移能力升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 与高糖+DMSO 组相比, 加入 STM2457 后, 细胞迁移能力降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 提示 STM2457 能有效抑制高糖条件处理的人晶状体上皮细胞的迁移能力, 且溶剂 DMSO 对实验结果无显著影响, 见图 13。

2.5 METTL3 抑制剂对 SRA01/04 细胞 TGF β_1 和 SNAIL 影响

2.5.1 免疫荧光实验结果 免疫荧光实验结果提示, 在高糖培养组中, 细胞中 TGF β_1 表达量较低糖组增高; 加入 METTL3 抑制剂后 TGF β_1 的表达较高糖+DMSO 组降低, 提示加入 METTL3 抑制剂降低了高糖条件下 TGF β_1 的表达, 见图 14。

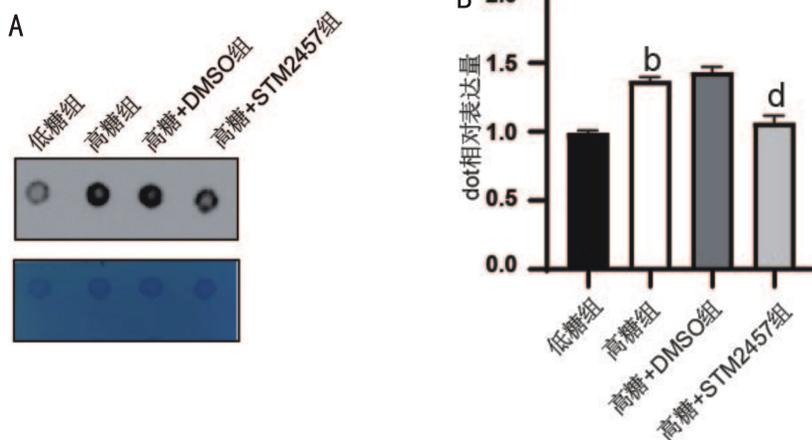


图 9 m⁶A dot blot 实验检测四组人晶状体上皮细胞的 m⁶A 甲基化水平 A: m⁶A dot blot 实验; B: 柱状图; ^b $P < 0.01$ vs 低糖组; ^d $P < 0.01$ vs 高糖+DMSO 组。

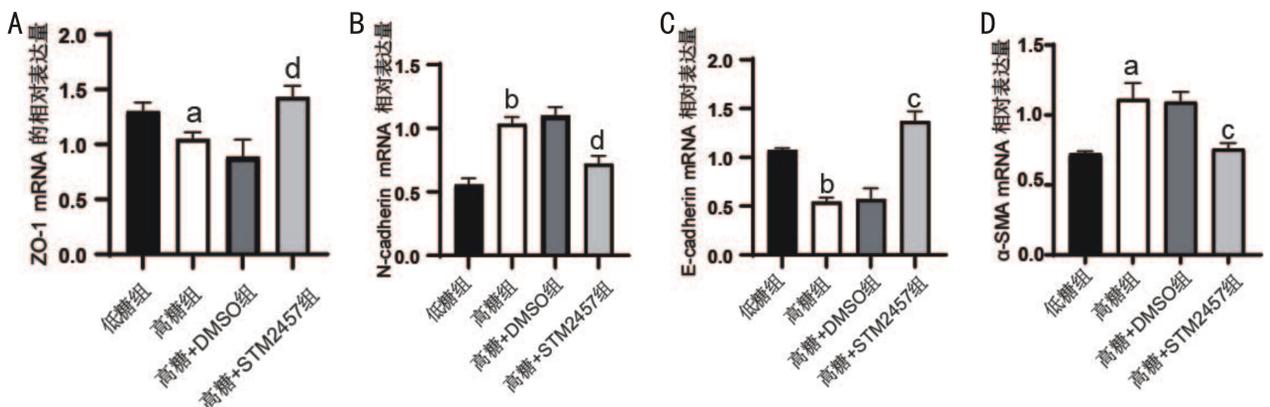


图 10 RT-qPCR 实验检测四组人晶状体上皮细胞的 EMT 指标 mRNA 相对表达量情况 A: ZO-1; B: N-Cadherin; C: E-Cadherin; D: α -SMA; ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 低糖组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 高糖+DMSO 组。

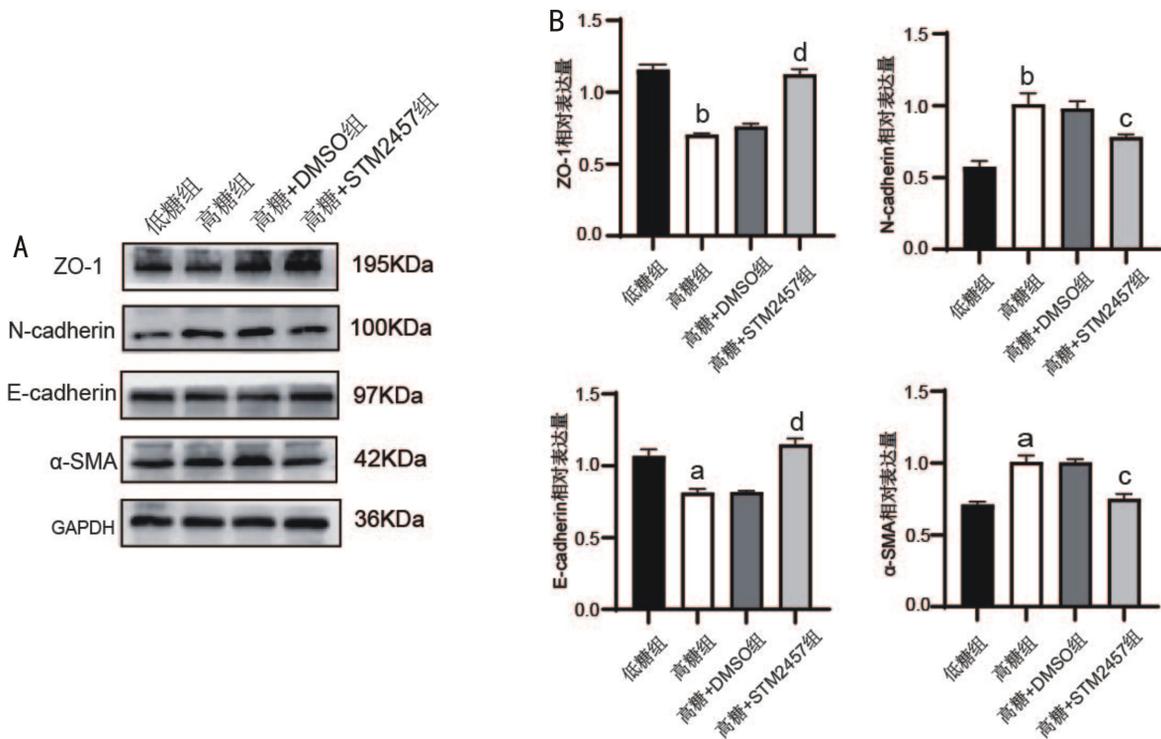


图 11 Western blot 实验检测四组人晶状体上皮细胞的 EMT 指标蛋白表达情况 A: Western blot 实验结果; B: 柱状图 ($n=3$; $^aP<0.05$, $^bP<0.01$ vs 低糖组; $^cP<0.05$, $^dP<0.01$ vs 高糖+DMSO 组)。

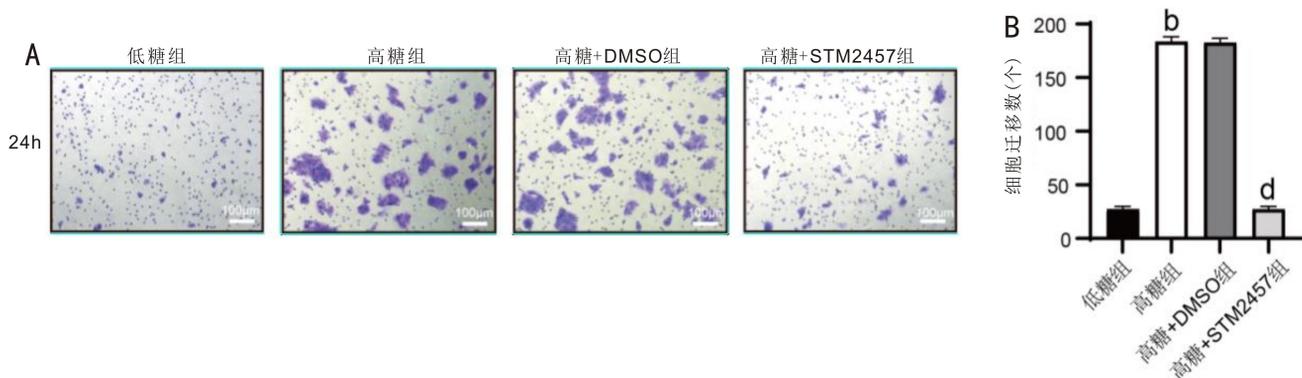


图 12 Transwell 实验测定加入 METTL3 抑制剂 STM2457 对人晶状体上皮细胞迁移能力的影响 A: Transwell 实验结果; B: 柱状图 ($n=5$, $^bP<0.01$ vs 低糖组; $^dP<0.01$ vs 高糖+DMSO 组)。

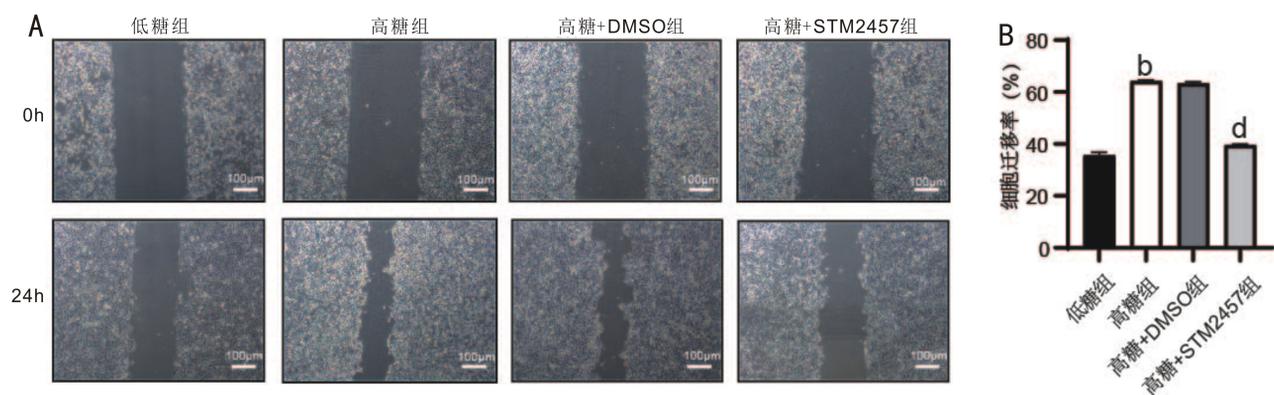


图 13 划痕实验测定加入 METTL3 抑制剂 STM2457 对人晶状体上皮细胞迁移能力的影响 A: 划痕实验结果; B: 柱状图 ($n=3$, $^bP<0.01$ vs 低糖组; $^dP<0.01$ vs 高糖+DMSO 组)。

2.5.2 Western blot 实验结果 Western blot 实验检测四组人晶状体上皮细胞的 $TGF\beta_1$ ($F=47.88$, $P<0.01$)、SNAIL ($F=69.68$, $P<0.01$) 差异均有统计学意义。LSD- t 检验结果显示,与低糖组相比,高糖组细胞 $TGF\beta_1$ 、SNAIL 升高,差异均有统计学意义 ($P<0.05$);与高糖+DMSO 组相比,

加入 STM2457 后,细胞 $TGF\beta_1$ 、SNAIL 降低差异均有统计学意义 ($P<0.05$),提示 STM2457 能有效抑制高糖条件处理的人晶状体上皮细胞的 $TGF\beta_1$ 、SNAIL 表达水平,且溶剂 DMSO 对实验结果无显著影响,见图 15。

2.5.3 RT-qPCR 实验结果 RT-qPCR 实验检测四组人

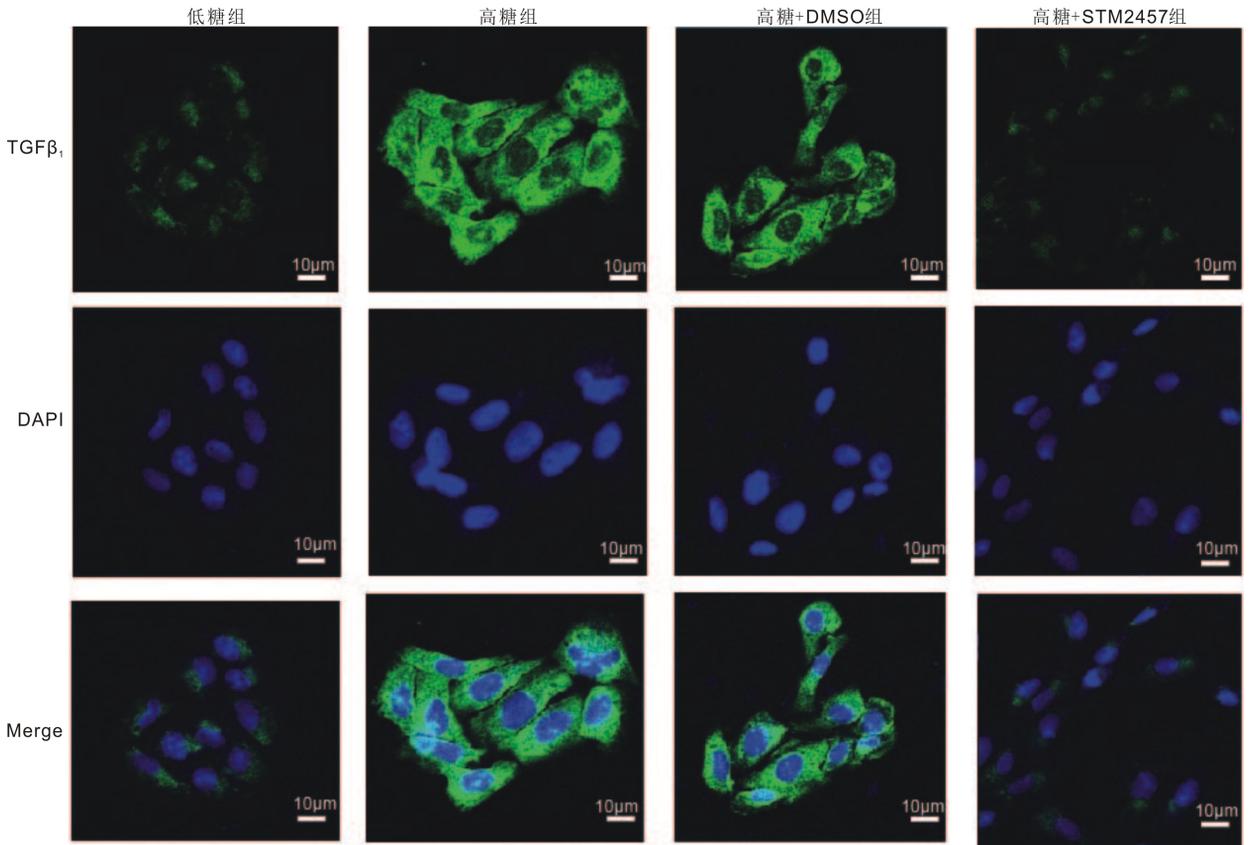


图 14 免疫荧光实验检测加入 METTL3 抑制剂 STM2457 对人晶状体上皮细胞 TGFβ₁ 的影响 绿色:TGFβ₁;蓝色:DAPI; Merge:共定位图像。

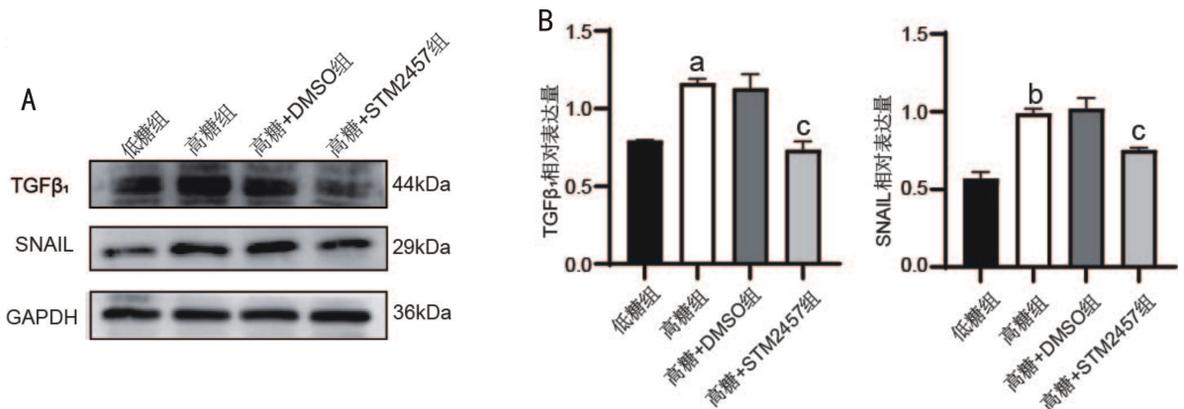


图 15 Western blot 实验检测加入 METTL3 抑制剂对人晶状体上皮细胞 TGFβ₁ 和 SNAIL 的影响 A:Western blot 实验结果;B:柱状图,以 GAPDH 为内参($n=3$;^a $P<0.05$,^b $P<0.01$ vs 低糖组;^c $P<0.05$ vs 高糖+DMSO 组)。

晶状体上皮细胞的 TGFβ₁ ($F=9.65, P<0.05$)、SNAIL ($F=29.94, P<0.01$) 差异均有统计学意义。LSD-*t* 检验结果显示,与低糖组相比,高糖组细胞 TGFβ₁、SNAIL 升高,差异均有统计学意义 ($P<0.01$);与高糖+DMSO 组相比,加入 STM2457 后,细胞 TGFβ₁、SNAIL 降低,差异均有统计学意义 ($P<0.05$),提示 STM2457 能有效抑制高糖条件处理的人晶状体上皮细胞的 TGFβ₁、SNAIL 表达,且溶剂 DMSO 对实验结果无显著影响,见图 16。

3 讨论

RNA 的 m⁶A 修饰是表观遗传调控中的关键调控之一,如今受到越来越多研究者的关注。作为真核细胞中最丰富的内部修饰,m⁶A 在各种生理过程和疾病进展中显示出广泛的调节作用^[19-21]。有研究行 RT-qPCR 实验发现糖尿病性白内障患者前囊膜组织中 METTL3 水平升高,并

且通过 IGV 软件对 MeRIP-Seq 火山图进行分析,提出几个 m⁶A 靶基因包括 ICAM-1、TGFβ₁ 和 DUSP5^[13]。本实验中我们使用免疫荧光染色发现在糖尿病性白内障患者的前囊膜中 m⁶A 的甲基化转移酶 METTL3 表达增加;使用 RT-qPCR 和 Western blot 实验发现在高糖条件下培养的细胞中 METTL3 的 RNA 和蛋白表达水平增加,利用 dot blot 实验发现在高糖条件下 m⁶A 甲基化水平增高。而关于 METTL3 在糖尿病性白内障发病中的作用机制我们仍然不是很清楚。

EMT 是参与细胞可塑性的过程,也在越来越多研究中发现其在各种疾病的发生中占有重要的位置^[22]。EMT 是由 TGF-β、骨形态发生蛋白 (BMP)、Wnt-β-连环蛋白和 Notch 等信号通路介导的,这些通路可以被局部微环境的各种因素刺激激活^[18, 23]。在 EMT 的过程中,细胞的迁

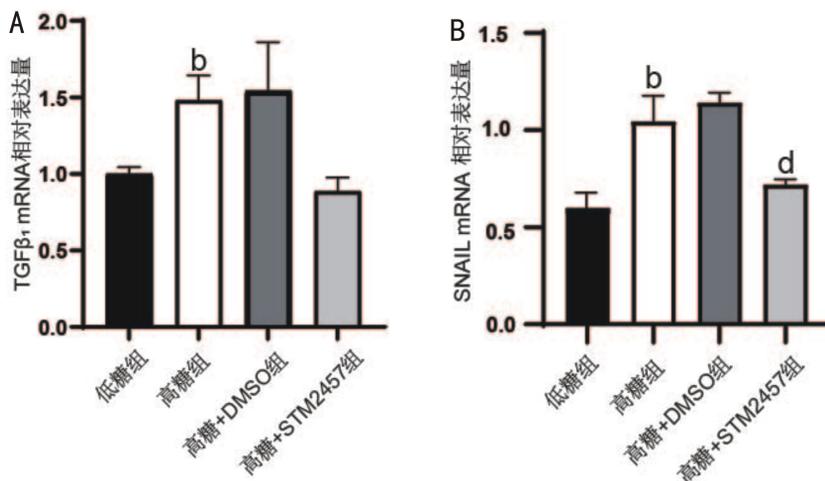


图 16 RT-qPCR 法检测在不同条件培养基培养 24h 后细胞的 TGFβ₁ 和 SNAIL mRNA 表达水平 A:TGFβ₁; B:SNAIL; ^bP<0.01 vs 低糖组; ^cP<0.05, ^dP<0.01 vs 高糖+DMSO 组。

移能力增加,白内障与 EMT 之间有着密切联系也被相关研究提出^[24]。同时,在高糖环境中,由于抗氧化能力的损伤,晶状体也更易发生 EMT^[4]。在高糖培养的细胞中我们利用 RT-qPCR 和 Western blot 实验同样发现 EMT 的上皮标志物 E-Cadherin 和 ZO-1 下降,间质标志物 N-Cadherin 和 α-SMA 上升,且细胞迁移实验也发现在高糖条件下细胞迁移能力增加。这提示我们 EMT 可能与糖尿病性白内障的发生相关。

除此之外,在肿瘤学的相关研究中,发现 METTL3 介导了宫颈癌、肝癌、肺癌中 EMT 的发生,并且 m⁶A 甲基化可以调节 SNAIL 的翻译^[25-26]。但是 METTL3 在糖尿病性白内障中与 EMT 相关性的研究还未见报导。在本实验中我们发现加入 METTL3 抑制剂 STM2457 之后,EMT 的上皮标志物 E-Cadherin、ZO-1 上升,间质标志物 N-Cadherin、α-SMA 下降,且细胞的迁移能力较高糖+DMSO 条件下降低,这提示我们 METTL3 促进了高糖条件下细胞的 EMT 发生。而在糖尿病性白内障中,METTL3 介导 EMT 发生的通路还鲜有研究。

在哺乳动物中,已知的有三种 TGF-β 异构体,即 β₁、β₂ 和 β₃。其中 TGFβ₁ 在包括糖尿病性白内障在内的许多疾病中对 EMT 的发生起着重要的调节作用^[14, 27-28]。而 SNAIL 家族参与了细胞运动的过程,包括生理及病理过程中获得侵袭性和迁移性的过程^[17]。SNAIL 的病理激活参与了 EMT 的过程已在多种研究中得到验证^[29-30]。而 TGFβ₁/SNAIL 通路在 EMT 的进展中发挥着重要的作用也得到了研究证实^[31-32]。在本实验中我们发现,高糖条件下 TGFβ₁ 和 SNAIL 的表达量升高,而加入 METTL3 抑制剂之后 TGFβ₁ 和 SNAIL 表达量下降。所以我们推断 METTL3 通过调控 TGFβ₁/SNAIL 通路促进高糖条件下的 EMT。

综上所述,我们发现了高糖可以促进人晶状体上皮细胞 EMT 的发生、METTL3 的增高和 m⁶A 甲基化水平的增高;同时,糖尿病性白内障患者前囊膜中 METTL3 表达的升高。在加入 METTL3 抑制剂后可以抑制高糖引起的细胞 EMT 的发生,同时引起 TGFβ₁ 和 SNAIL 的下降。据此,我们推测 METTL3 可能通过调控 TGFβ₁/SNAIL 促进高糖

条件下 EMT。但是该信号通路与 m⁶A 甲基化在糖尿病性白内障中 EMT 的作用仍然需要进一步的研究证实。而该通路是否是调控糖尿病性白内障患者 EMT 发生的关键通路也需要更多的研究。

参考文献

- 1 Wild SH, Roglic G, Green A, et al. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004; 27(10):1047-1053
- 2 Barbara EK, Klein, MD, et al. Diabetes, cardiovascular disease, selected cardiovascular disease risk factors, and the 5-year incidence of age-related cataract and progression of lens opacities: the beaver dam eye study. *Am J Ophthalmol* 1998;126(6):782-790
- 3 Klein BEK, Klein R, Moss SE. Prevalence of cataracts in a population-based study of persons with diabetes mellitus. *Ophthalmology* 1985; 92(9):1191-1196
- 4 Wu TT, Chen YY, Chang HY, et al. AKR1B1-induced epithelial-mesenchymal transition mediated by RAGE-oxidative stress in diabetic cataract lens. *Antioxidants* 2020;9(4):273
- 5 Zhang L, Wang Y, Li WF, et al. MicroRNA-30a regulation of epithelial-mesenchymal transition in diabetic cataracts through targeting SNAIL. *Sci Rep* 2017;7:1117
- 6 马济远,叶巍,李吉,等.自噬调节高浓度葡萄糖诱导的人晶状体上皮细胞上皮间质转化. *国际眼科杂志* 2020;20(5):759-767
- 7 Hegde KR, Varma SD. Cataracts in experimentally diabetic mouse: morphological and apoptotic changes. *Diabetes Obes Metab* 2005;7(2):200-204
- 8 Du L, Hao M, Li C, et al. Quercetin inhibited epithelial mesenchymal transition in diabetic rats, high-glucose-cultured lens, and SRA01/04 cells through transforming growth factor-β2/phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Mol Cell Endocrinol* 2017;452:44-56
- 9 Ye W, Ma JY, Wang F, et al. LncRNA MALAT1 regulates miR-144-3p to facilitate epithelial-mesenchymal transition of lens epithelial cells via the ROS/NRF2/Notch1/snail pathway. *Oxid Med Cell Longev* 2020; 2020:8184314
- 10 Gokhale NS, Horner SM. RNA modifications go viral. *PLoS Pathog* 2017;13(3):e1006188
- 11 Lin SB, Choe J, Du P, et al. The m(6)a methyltransferase METTL3 promotes translation in human cancer cells. *Mol Cell* 2016; 62(3):335-345
- 12 Yue B, Song CL, Yang LX, et al. METTL3-mediated N6-

- methyladenosine modification is critical for epithelial – mesenchymal transition and metastasis of gastric cancer. *Mol Cancer* 2019;18(1):142
- 13 Yang J, Liu J, Zhao S, *et al.* N⁶-methyladenosine METTL3 modulates the proliferation and apoptosis of lens epithelial cells in diabetic cataract. *Mol Ther Nucleic Acids* 2020;20:111–116
- 14 Saika S. TGFβ pathobiology in the eye. *Lab Invest* 2006;86(2):106–115
- 15 Li JX, Chen F, Peng YX, *et al.* N⁶-methyladenosine regulates the expression and secretion of TGFβ1 to affect the epithelial–mesenchymal transition of cancer cells. *Cells* 2020;9(2):296
- 16 Feng Y, Dong HB, Sun B, *et al.* METTL3/METTL14 transactivation and m⁶A-dependent TGF-β1 translation in activated kupffer cells. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2021;12(3):839–856
- 17 Nieto MA. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3(3):155–166
- 18 Gonzalez DM, Medici D. Signaling mechanisms of the epithelial – mesenchymal transition. *Sci Signal* 2014;7(344):8
- 19 Meng SJ, Zhou HC, Feng ZY, *et al.* Epigenetics in neurodevelopment; emerging role of circular RNA. *Front Cell Neurosci* 2019;13:327
- 20 Wu J, Guo X, Wen Y, *et al.* N⁶-methyladenosine modification opens a new chapter in circular RNA biology. *Front Cell Dev Biol* 2021;9:709299
- 21 Widagdo J, Anggono V. The m⁶A – epitranscriptomic signature in neurobiology: from neurodevelopment to brain plasticity. *J Neurochem* 2018;147(2):137–152
- 22 Lee SY, Jeong EK, Ju MK, *et al.* Induction of metastasis, cancer stem cell phenotype, and oncogenic metabolism in cancer cells by ionizing radiation. *Mol Cancer* 2017;16(1):1–25
- 23 Liu X, Gong QY, Yang LF, *et al.* MicroRNA – 199a – 5p regulates epithelial – to – mesenchymal transition in diabetic cataract by targeting *SP1* gene. *Mol Med* 2020;26(1):1–10
- 24 Chen XY, Xiao W, Chen WR, *et al.* MicroRNA – 26a and – 26b inhibit lens fibrosis and cataract by negatively regulating Jagged-1/Notch signaling pathway. *Cell Death Differ* 2017;24(8):1431–1442
- 25 Lin XY, Chai GS, Wu YM, *et al.* RNA m⁶A methylation regulates the epithelial mesenchymal transition of cancer cells and translation of Snail. *Nat Commun* 2019;10(1):2065
- 26 Li JX, Xie GY, Tian YF, *et al.* RNA m⁶A methylation regulates dissemination of cancer cells by modulating expression and membrane localization of β-catenin. *Mol Ther* 2022;30(4):1578–1596
- 27 Qian WB, Cai XR, Qian QH, *et al.* Astragaloside IV modulates TGF-β1-dependent epithelial – mesenchymal transition in bleomycin – induced pulmonary fibrosis. *J Cell Mol Med* 2018;22(9):4354–4365
- 28 Li TT, Huang HP, Shi GY, *et al.* TGF-β1 – SOX9 axis – inducible COL10A1 promotes invasion and metastasis in gastric cancer via epithelial – to – mesenchymal transition. *Cell Death Dis* 2018;9:849
- 29 Cano A, Pérez-Moreno MA, Rodrigo I, *et al.* The transcription factor Snail controls epithelial – mesenchymal transitions by repressing E – cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2000;2(2):76–83
- 30 Batlle E, Sancho E, Francí C, *et al.* The transcription factor Snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* 2000;2(2):84–89
- 31 Abrial M, Paffett-Lugassy N, Jeffrey S, *et al.* TGF-β signaling is necessary and sufficient for pharyngeal arch artery angioblast formation. *Cell Rep* 2017;20(4):973–983
- 32 Akhurst RJ, Balmain A. Genetic events and the role of TGFβ in epithelial tumour progression. *J Pathol* 1999;187(1):82–90