



# SHANGHAI JIAO TONG UNIVERSITY SCHOOL OF MEDICINE 学者介绍



倪兆慧 博士  
NI Zhao-hui Ph.D

教授、主任医师、博士生导师  
Professor, Chief Physician, Doctoral Supervisor



ORCID ID: 0000-0002-1334-7658



**倪兆慧** (1960—), 上海交通大学医学院附属仁济医院首席专家, 大内科主任, 内科住院医师规范化培训基地主任, 内科教研室主任。上海医学会肾脏病分会前任主任委员, 上海市医学会肾脏病分会腹膜透析学组组长, 上海市中西医结合肾脏病学会主任委员, 上海市医院管理协会血液净化分会副会长, 中国医院管理协会血液净化分会副主任委员, 世界华人肾脏医师协会副会长, 中华医学会肾脏病分会常务委员, 中国医师学会肾脏病分会常务委员, 国家卫生健康委员会肾脏病质控中心委员, 中国中西医结合肾病学会秘书长, 中关村肾病血液净化创新联盟副理事长, 中国医疗保健国际交流促进会血液净化工程技术分会常务委员, 华东肾脏病协会副主任委员。担任多本期刊的常务编委和编委。长期从事急慢性肾脏病防治的临床与基础研究。近年负责和参加多项国家级和省部级科研课题, 曾获得多项国家级和省部级科研奖项。主编和参编专著 14 本, 发表论著 300 余篇, 其中 SCI 收录论文 100 余篇。

该研究依托上海交通大学医学院“双一流”暨高水平地方高校建设一流学科—基础医学平台。

## 代表性论著

1. Yu Z, Wang Z, Wang Q, Zhang M, Jin H, Ding L, Yan H, Huang J, Jin Y, Davies S, Fang W, Ni Z. Understand the difference between clinical measured ultrafiltration and real ultrafiltration in peritoneal dialysis[J]. BMC Nephrol, 2021, 22(1): 382.
2. Lu R, Zhang X, Cai X, Wang X, Li H, Wang L, Zhou Y, Shen J, Liu Q, Zhang H, Ni Z. Efficacy and safety of polysaccharide iron complex capsules compared with iron sucrose in hemodialysis patients: study protocol for a randomized, open-label, positive control, multicenter trial (IHOPE)[J]. Trials, 2021, 22(1): 691.
3. Ni Z, Zhou Y, Lu R, Shen J, Zhao L, Jin H, Zhang H, Zhang B, Li Z, Fang Y, Fang W, Wang Q, Gu L, Zhang W, Zhang J, Mou S, Li W. Intelligent “Internet Plus” services in the first case of home hemodialysis in mainland China[J]. Hemodial Int, 2021, 25(4): E33–E39.
4. Zhou Y, Qi C, Li S, Shao X, Ni Z. Investigation of the mechanism underlying calcium dobesilate-mediated improvement of endothelial dysfunction and inflammation caused by high glucose[J]. Mediators Inflamm, 2019, 2019: 9893682.
5. Zhang Z, Shao X, Jiang N, Mou S, Gu L, Li S, Lin Q, He Y, Zhang M, Zhou W, Ni Z. Caspase-11-mediated tubular epithelial pyroptosis underlies contrast-induced acute kidney injury[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(10): 983.



## 论著·基础研究

顺铂诱导的急性肾损伤中肾脏组织m<sup>6</sup>A甲基化水平的变化沈剑箫<sup>1</sup>, 王万鹏<sup>2</sup>, 邵兴华<sup>1</sup>, 吴晶魁<sup>1</sup>, 李舒<sup>1</sup>, 车霞静<sup>1</sup>, 倪兆慧<sup>1</sup>

1. 上海交通大学医学院附属仁济医院肾脏科, 上海 200127; 2. 江苏省涟水县人民医院肾脏科, 涟水 223400

**[摘要]** **目的**·探讨N<sup>6</sup>-甲基腺嘌呤(N<sup>6</sup>-methyladenosine, m<sup>6</sup>A)甲基化修饰在顺铂诱导的小鼠急性肾损伤进程中的作用。**方法**·选择4只C57BL/6小鼠, 尾静脉注射顺铂(20 mg/kg)诱导急性肾损伤(损伤组); 另取4只C57BL/6小鼠, 尾静脉注射等量生理盐水(对照组)。检测2组小鼠血清肌酐及血尿素氮水平变化, 观察小鼠肾脏组织切片中病理损伤情况, 评估模型是否成功。进一步运用甲基化RNA免疫共沉淀技术(methylated RNA immunoprecipitation, MeRIP)与RNA测序技术分别检测2组小鼠肾脏组织中m<sup>6</sup>A甲基化水平与RNA表达变化。运用基因本体论及京都基因和基因组数据库进行结果可视化和综合研究, 并将RNA测序技术所得转录组数据与MeRIP技术检测所得表观遗传数据联合分析, 寻找参与顺铂诱导急性肾损伤病理变化过程的候选基因。**结果**·顺铂可诱导小鼠血清肌酐与血尿素氮水平显著升高。光学显微镜观察肾脏组织发现广泛的肾小管空泡变性, 上皮细胞剥脱, 肾小管坏死, 提示造模成功。MeRIP检测发现损伤组与对照组小鼠肾脏中共有2 227个基因含有2 981个差异化表达的m<sup>6</sup>A甲基化位点(表达变化倍数≥2且P<0.05), 这些基因主要富集于代谢及细胞死亡通路。表达差异化m<sup>6</sup>A甲基化位点的基因与RNA差异化表达基因的联合分析发现1 002个表达趋势相同的基因, 如纤维蛋白原α链、溶质载体12家族成员1和肝病毒细胞受体1等。**结论**·顺铂可诱导肾脏组织中基因mRNA上m<sup>6</sup>A甲基化位点的甲基化水平变化, 促进急性肾损伤进程。

**[关键词]** N<sup>6</sup>-甲基腺嘌呤甲基化; 顺铂诱导急性肾损伤; 纤维蛋白原α链; 溶质载体12家族成员1; 肝病毒细胞受体1

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2021.12.009 **[中图分类号]** R692.5 **[文献标志码]** A

Changes of m<sup>6</sup>A methylation in renal tissue during cisplatin-induced acute injurySHEN Jian-xiao<sup>1</sup>, WANG Wan-peng<sup>2</sup>, SHAO Xing-hua<sup>1</sup>, WU Jing-kui<sup>1</sup>, LI Shu<sup>1</sup>, CHE Xia-jing<sup>1</sup>, NI Zhao-hui<sup>1</sup>

1. Department of Nephrology, Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200127, China; 2. Department of Nephrology, Lianshui People's Hospital, Jiangsu Province, Lianshui 223400, China

**[Abstract]** **Objective**·To investigate the role of N<sup>6</sup>-methyladenosine (m<sup>6</sup>A) methylation modification in the process of cisplatin-induced acute injury in mice. **Methods**·Four C57BL/6 mice were injected with cisplatin (20 mg/kg) through tail vein (the injury group); Another 4 C57BL/6 mice were injected with the same amount of saline (the control group). The changes of serum creatinine and urea nitrogen levels in the mice and the pathological injury in the renal tissue sections of the mice were evaluated to judge the success of the model. Methylated RNA immunoprecipitation (MeRIP) and RNA sequencing were used to detect the changes of m<sup>6</sup>A methylation and RNA expression in the kidney tissue of the two groups of mice. Gene ontology and Kyoto Encyclopedia of genes and genomes were used for visualization and comprehensive research. Transcriptome data and epigenetic data were combined to find candidate genes for pathological changes of cisplatin-induced acute injury. **Results**·Cisplatin could induce significant increase in the levels of serum creatinine and urea nitrogen compared with those in the baseline. Light microscope showed extensive tubular vacuolar degeneration, epithelial cell exfoliation and tubular necrosis, suggesting the success of modeling. MeRIP detection showed that a total of 2 277 genes contained 2 981 differentially expressed m<sup>6</sup>A methylation sites (expression multiple ≥2 and P<0.05) in the kidneys of mice in the injury group and the control group. These genes were mainly concentrated in the metabolic and cell death pathways. The joint analysis of genes expressing differential m<sup>6</sup>A methylation sites and RNA differential expression genes found 1 002 genes with the same expression trend, such as fibrinogen α chain, solute carrier family 12 member 1 and hepatitis A virus cellular receptor 1. **Conclusion**·Cisplatin can induce the change of methylation level of m<sup>6</sup>A methylation site on mRNA in renal tissue, and promote the process of acute renal injury.

**[Key words]** N<sup>6</sup>-methyladenosine (m<sup>6</sup>A) methylome; cisplatin-induced acute kidney injury (CI-AKI); fibrinogen α chain (FGA); solute carrier family 12 member 1 (Slc12a1); hepatitis A virus cellular receptor 1 (Havcr1)

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81700586, 81670691, 81670752); 上海市核酸化学与纳米医学重点实验室资助计划(2020ZYB009); 上海申康医院发展中心临床三年行动计划(SHDC2020CR3029B); 上海市卫生健康委员会科研基金(ZHYY-ZXYJHZX-202014); 上海市科学技术委员会基金(13401906100, 20ZR1432600)。

**[作者简介]** 沈剑箫(1985—), 男, 主治医师, 博士; 电子信箱: shenjianxiao@aliyun.com。

**[通信作者]** 倪兆慧, 电子信箱: profnizh@126.com。

**[Funding Information]** National Natural Science Foundation of China (81700586, 81670691, 81670752); Key Shanghai Laboratory of Nucleic Acid Chemistry and Nanomedicine (2020ZYB009); Clinical Research Plan of Shenkang Hospital Development Center (SHDC2020CR3029B); Science and Research Fund of Shanghai Municipal Health Commission (ZHYY-ZXYJHZX-202014); Fund from Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (13401906100, 20ZR1432600)。

**[Corresponding Author]** NI Zhao-hui, E-mail: profnizh@126.com.



顺铂是一种常用的治疗实体肿瘤的药物,通过与细胞中的DNA相结合,干扰DNA与线粒体功能,发挥抗肿瘤作用,但其也具有肾毒性。在代谢过程中,顺铂逐渐汇聚于肾小管细胞,导致细胞凋亡或坏死,引起急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)<sup>[1-3]</sup>。已有研究<sup>[4-6]</sup>发现凋亡、坏死、炎症等均与顺铂诱导的急性肾损伤(cisplatin-induced AKI, CI-AKI)有关。

N<sup>6</sup>-甲基腺嘌呤(N<sup>6</sup>-methyladenosine, m<sup>6</sup>A)甲基化修饰是mRNA常见的调控方式。新的测序技术使人们可以深入研究m<sup>6</sup>A对细胞生理功能的调控作用。目前的研究<sup>[7-8]</sup>发现m<sup>6</sup>A修饰主要发生在“RRACH”序列中的腺嘌呤上(其中R=A或G, H=A、C或U),其功能由“编码器(writer)”“读(reader)”与“消码器(eraser)”决定。编码器也就是甲基转移酶,是由甲基转移酶3(methyltransferase 3, METTL3)、甲基转移酶14(methyltransferase 14, METTL14)、WT1相关蛋白(WT1 associated protein WTAP)、KIAA1429等蛋白组合而成的复合物。读码器则是由具有YTH结构域的蛋白(包括YTHDF1、YTHDF2、YTHDF3)及核不均一蛋白HNRNP家族蛋白(包括HNRNPA2B1和HNRNPC)组成。消码器则是ALKB同源染色体5(alkB homolog 5, ALKBH5)及FTO蛋白为代表的去甲基酶<sup>[9-10]</sup>。

部分研究分析了m<sup>6</sup>A甲基化与AKI间的关系。有研究<sup>[11]</sup>报道过Mettl3基因可有效抑制抗黏菌素诱导的小鼠肾小管上皮细胞氧化应激和细胞凋亡。另一项研究<sup>[12]</sup>发现顺铂可诱导小鼠肾小管上皮细胞凋亡,细胞中FTO蛋白表达降低。在AKI患者中,血清METTL14水平升高<sup>[13]</sup>。但是,目前尚无研究通过高通量测序的方式检测m<sup>6</sup>A甲基化在顺铂诱导的AKI中的变化。m<sup>6</sup>A甲基化在CI-AKI发生、发展中的作用机制值得进一步探讨。本研究建立了一种有效的CI-AKI小鼠模型,采用甲基化RNA免疫共沉淀技术(methylated RNA immunoprecipitation, MeRIP)检测小鼠肾脏组织中m<sup>6</sup>A甲基化水平的变化,采用RNA-seq测序技术检测mRNA水平的变化,探索m<sup>6</sup>A甲基化在CI-AKI中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物与主要试剂、仪器

实验用小鼠为C57BL/6小鼠,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司[生产许可证:SCXK(沪)2017-0005]。RNA分离剂、RNA质量检测紫外分光光度计、血液离心机购自美国赛默飞公司;线粒体RNA分离试剂

盒、RNA裂解液、高通量测序仪(Hiseq)购自美国Illumina公司;mRNA分离提取试剂盒购自美国Arraystar公司;NEBNextR Ultra II RNA建库试剂盒购自美国New England生物实验室;m<sup>6</sup>A-RNA免疫共沉淀试剂盒购自上海云序生物科技有限公司;血液成分检测机购自德国罗氏诊断有限公司。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 动物饲养与取材** 8只雄性8周龄C57BL/6小鼠随机分至对照组与损伤组(每组4只),统一饲养于上海斯莱克实验动物有限责任公司所属动物房[使用许可证:SYXK(沪)2017-0008]。小鼠饲养于环境温度20~22℃,相对湿度为40%~50%,恒温、恒湿、独立通气鼠笼中,使用经灭菌处理后的全价营养饲料与饮用水,给予昼夜明暗交替(12 h/12 h)光照。饲养14 d后,损伤组小鼠尾静脉注射顺铂20 mg/kg,对照组尾静脉注射等量生理盐水,继续常规饲养。72 h后断颈处死所有小鼠,剥除小鼠眼球,采集外周血;切开腹腔,取出双侧肾脏。研究获得上海交通大学医学院附属仁济医院动物伦理委员会批准。

**1.2.2 血清肌酐与血尿素氮检测** 收集小鼠外周血,1 500×g离心10 min,收集上清液,运用标准分光光度法检测血清肌酐与血尿素氮。

**1.2.3 组织病理学分析** 用生理盐水清洗肾组织,10%福尔马林固定,再用10%石蜡制片,切片5片(厚度5 μm)后运用苏木精-伊红染色,光学显微镜分析皮质-髓质交界肾小管受损情况。每组随机选取8个标本,在放大倍数为400倍的显微镜下观察是否存在肾小管扩张、刷状缘丢失、肾小管坏死等变化,并评分<sup>[14]</sup>。评分标准:0分为正常;1分为轻度(损伤小管占视野内小管百分比≤10%);2分为中度(损伤小管占比>10%且≤25%);3分为严重(损伤小管占比>25%且≤50%);4分为非常严重(损伤小管占比>50%且≤75%);5分为最严重(损伤小管占比>75%)。

**1.2.4 肾组织中m<sup>6</sup>A检测与分析** 运用TRIzol溶解肾脏组织提取总RNA,使用线粒体RNA分离试剂盒从总RNA中去除线粒体RNA。用RNA裂解液将RNA分裂成约100个核苷酸长度的片段。运用紫外分光光度计检测RNA的质量,变性琼脂糖凝胶评估RNA完整性。使用mRNA分离试剂盒从总RNA中分离mRNA,再运用m<sup>6</sup>A RNA共沉淀试剂盒将m<sup>6</sup>A与RNA共沉淀。运用NEBNextR Ultra II RNA工具包构建转录组文库。运用高通量测序仪检测所有样本,质控要求为Q30(碱基质量值



错误率小于0.1%)。运用Cutadapt软件(v1.9.3)适配3'端并去除低质量数据。使用Hisat2软件(v2.0.4)校准及读取参考基因组文库。使用MACS(model-based analysis of ChIP-Seq)软件分析确定RNA上的m<sup>6</sup>A甲基化位点。使用motif富集软件对m<sup>6</sup>A甲基化位点进行富集分析,并使用R-package MetaPlotR软件对m<sup>6</sup>A甲基化位点在基因及染色体上的分布进行分类<sup>[15]</sup>。运用DREME软件评估位点所修饰的碱基序列。将不同组间差异m<sup>6</sup>A甲基化表达变化倍数≥2且P<0.05的位点作为显著差异的界限。运用diffReps差异分析软件分析这些位点甲基化水平变化。最后使用基因本体论(gene ontology, GO)及京都基因和基因组数据库(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)进行结果可视化和综合研究。

**1.2.5 肾组织RNA测序与分析** 使用TRIzol从肾脏样本中提取总RNA,变性琼脂糖凝胶电泳法检测总RNA完整性。用mRNA分离试剂盒分离mRNA。使用BGISEQ-500平台将mRNA碎片适配为50 bp单链。使用SOAPnuke软件去除低质量碎片,使用bowtie2软件将这些数据与软件

自身参考基因组比对。使用cuffdiff软件分析2组小鼠之间差异表达基因。

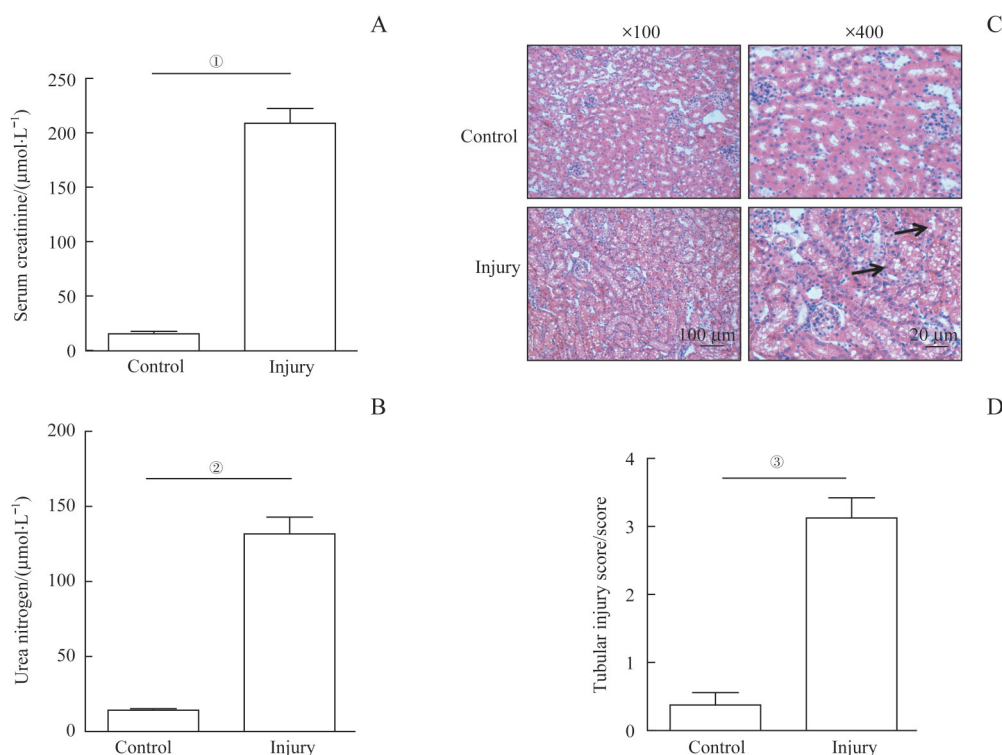
### 1.3 统计学方法

定量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。用配对t检验对2组进行比较,P<0.05为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 小鼠CI-AKI模型的建立

本研究成功构建了顺铂诱导的小鼠AKI模型。结果显示:在损伤组中,给予小鼠尾静脉注射顺铂20 mg/kg可使血清肌酐与血尿素氮水平显著升高(图1A、B)。肾脏病理分析结果提示顺铂可显著诱导肾脏结构损伤:损伤组小鼠的肾脏中可见广泛的肾小管空泡化变性,上皮细胞剥脱,肾小管坏死等病理改变(图1C、D)。血清肌酐、血尿素氮及肾脏病理结果均提示AKI造模成功。



**Note:** A. Analysis of serum creatinine level in mice following different treatments. <sup>①</sup>P=0.000. B. Analysis of urea nitrogen level in mice following different treatments. <sup>②</sup>P=0.000. C. Image of hematoxylin and eosin staining in kidney (black arrows indicating the injury). D. Score for characteristic histologic signs of renal injury. <sup>③</sup>P=0.000.

图1 顺铂诱导的C57bL/6小鼠AKI模型建立

Fig 1 Establishment of CI-AKI model in C57bL/6 mice

### 2.2 对照组与损伤组之间m<sup>6</sup>A甲基化水平变化的比较

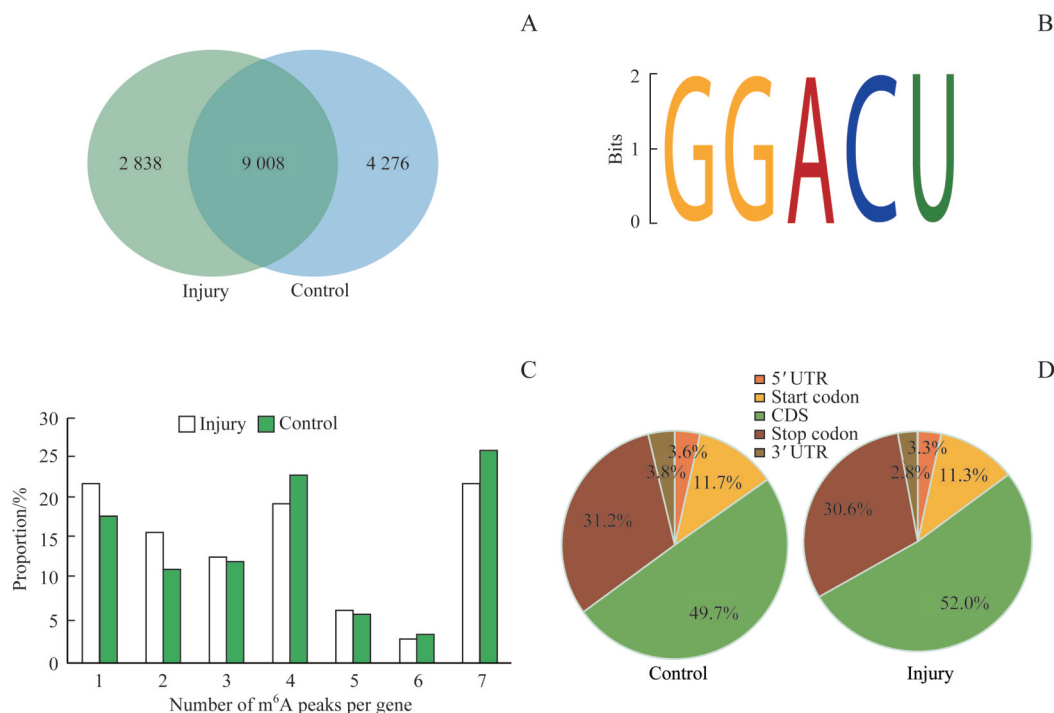
对照组4个样本中共有7 942个mRNA含13 284个m<sup>6</sup>A位点,损伤组4个样本共有7 422个转录本含11 846

个m<sup>6</sup>A位点。损伤组与对照组相比,9 008个位点一致(图2A)。从2组中各随机选择1份样本,并从2份样本中各选择1 000个甲基化水平最高的位点,2组中m<sup>6</sup>A甲基

化修饰的常见序列均为“RRACH”保守序列(图2B)。

进一步研究发现,含有1个m<sup>6</sup>A甲基化位点的基因只占对照组全部含甲基化位点基因的16.6%,在损伤组中这

一比例为21.2%;超过75.0%的含有甲基化位点的基因含有2个或以上的m<sup>6</sup>A甲基化位点(图2C)。



**Note:** A. Venn diagram showing the overlap of m<sup>6</sup>A peaks within mRNAs between the injury group and the control group. B. The top motif enriched across m<sup>6</sup>A peaks was identified from both groups. C. Proportion of genes harboring different numbers of m<sup>6</sup>A peaks in both groups. D. Pie charts showing the percentage of m<sup>6</sup>A peaks in five segments of transcripts. m<sup>6</sup>A peaks were most enriched in the coding sequence segment.

图2 对照组和损伤组mRNAs中m<sup>6</sup>A变化情况

Fig 2 Overview of m<sup>6</sup>A methylation within mRNAs in the control group and the injury group

为了分析甲基化位点在基因上的分布区域,将基因按结构分为5个区域,即5'端、启动编码区域、编码序列(coding sequence, CDS)区域、终止编码区域与3'端。结果显示,m<sup>6</sup>A在CDS区域最丰富,其次是终止编码区域。损伤组中m<sup>6</sup>A甲基化位点在终止编码区域更多(图2D)。

进一步将损伤组与对照组甲基化位点进行比对后,共有2 227个基因中的2 981个甲基化位点存在差异表达。损伤组相对对照组,在2 981个差异化位点中48.2%的位点甲基化水平升高。表1展示了m<sup>6</sup>A甲基化水平变化最大的20个位点。将这些差异表达位点进行染色体归类后发现:4号、2号、7号与11号染色体含有最多的差异m<sup>6</sup>A甲基化位点(differentially methylated m<sup>6</sup>A site, DMMS)(图3A)。将位点数除以染色体平均长度后,发现11号、19号、7号及4号染色体含有的DMMS密度最高(图3B)。同时,CDS区域含有大部分DMMS(图3C);5'端甲基化位点上调倍数较高,3'端甲基化位点下调幅度较大(图3D)。这些数据揭示了不同基因甲基化与去甲基化的趋势。

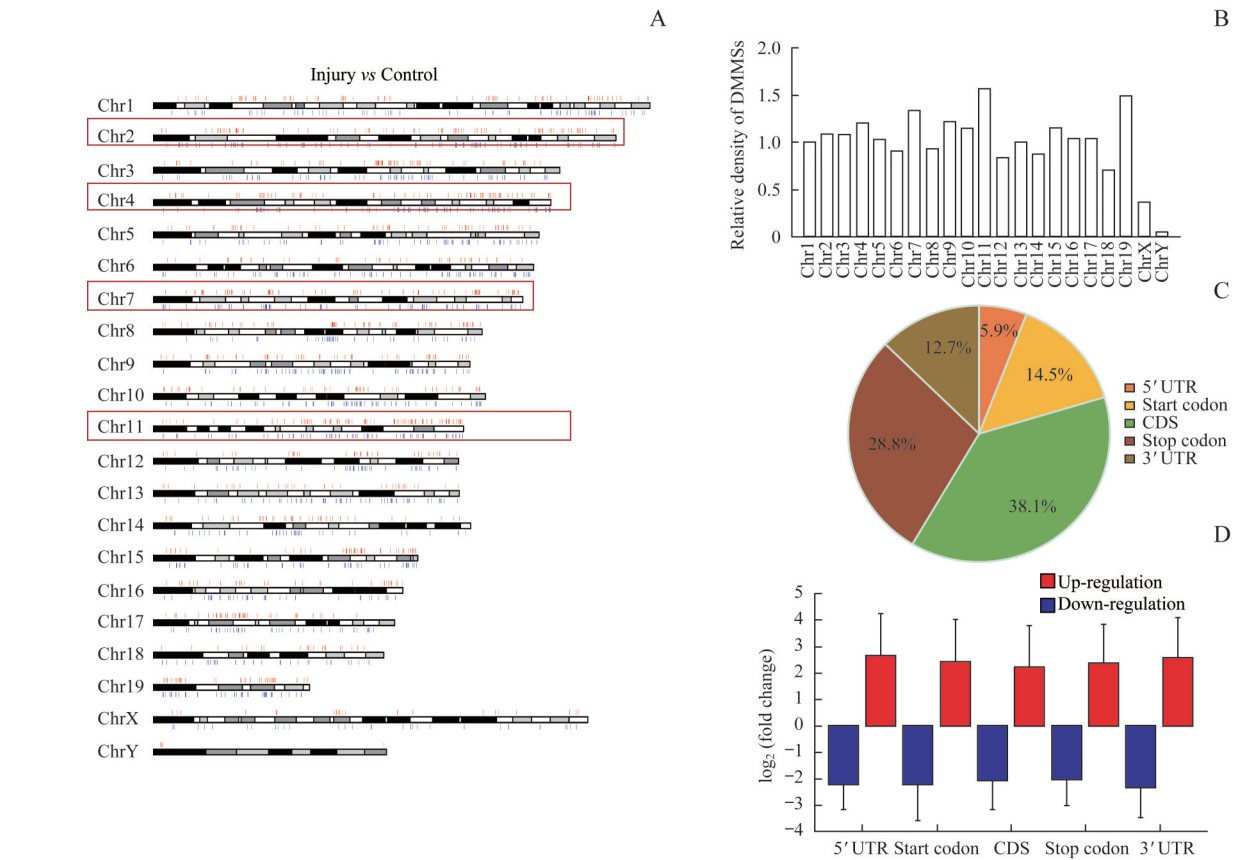
### 2.3 含有DMMS的基因的重要通路

运用GO富集分析和KEGG通路分析探索了2组中含有DMMS的基因的生物学功能。从生物过程角度来看,含有m<sup>6</sup>A甲基化上调位点的基因多富集于细胞代谢与死亡进程,比如大分子代谢、细胞代谢、凋亡、细胞死亡过程等(图4A)。而含有m<sup>6</sup>A甲基化下调位点的基因富集于细胞代谢、氧化、转运、跨膜转运过程(图4B)。KEGG通路分析则提示相关基因参与了包括肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)、丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)、P53等凋亡相关通路中(图4C)。含有m<sup>6</sup>A甲基化下调位点的基因富集于增殖、碳代谢、氧化磷酸化等过程(图4D)。通路分析提示基因主要富集于催化活性、离子结合、辅酶结合、辅因子结合等通路。这些结果提示m<sup>6</sup>A在CI-AKI发生、发展中参与了代谢、细胞死亡、氧化等多种进程。

表1 甲基化水平变化差异最大的20个m<sup>6</sup>A甲基化位点

Tab 1 Top 20 differentially methylated m<sup>6</sup>A peaks

Gene name	Full name	Gene ID	Fold change	Regulation	Chromosome	Peak start	Peak end	Peak length	P value
<i>BC061237</i>	cDNA sequence BC061237	385138	1 489.5	Up	Chr14	44504106	44504291	185	0.000
<i>BC061237</i>	cDNA sequence BC061237	385138	816.8	Up	Chr14	44500121	44500197	76	0.000
<i>Krt20</i>	Keratin 20	66809	498.7	Up	Chr11	99430752	99430920	168	0.000
<i>Krt20</i>	Keratin 20	66809	498.0	Up	Chr11	99429021	99429078	57	0.000
<i>Krt20</i>	Keratin 20	66809	483.5	Up	Chr11	99432181	99432343	162	0.000
<i>1700001F09Rik</i>	RIKEN cDNA 1700001F09 gene	71826	383.8	Up	Chr14	43346701	43346790	89	0.000
<i>Ccdc85b</i>	Coiled-coil domain containing 85B	240514	328.6	Up	Chr19	5454141	5454580	439	0.000
<i>Gm3543</i>	Predicted gene 3543	100041849	318.0	Up	Chr14	41982201	41982290	89	0.000
<i>Serpina3n</i>	Serinepeptidase inhibitor, clade A, member 3N	20716	316.3	Up	Chr12	104414261	104414329	68	0.000
<i>Gm3543</i>	Predicted gene 3543	100041849	254.0	Up	Chr14	41982133	41982180	47	0.000
<i>Alms1</i>	ALMS1 centrosome and basal body associated protein	236266	503.6	Down	Chr6	85694833	85694951	118	0.000
<i>Tas2r119</i>	Taste Receptor, type 2, member 119	57254	385.6	Down	Chr15	32177288	32177620	332	0.000
<i>Ctnna2</i>	Catenin $\alpha$ 2	12386	220.8	Down	Chr6	77600041	77600380	339	0.000
<i>Afm</i>	Afamin	280662	195.1	Down	Chr5	90518931	90519060	129	0.000
<i>Slc5a4a</i>	Solute carrier family 5, member 4a	64452	126.7	Down	Chr10	76163688	76163769	81	0.000
<i>Nat1</i>	N-acetyltransferase 1	17960	123.5	Down	Chr8	67490861	67491460	599	0.000
<i>Pzp</i>	PZP $\alpha$ -2-macroglobulin like	11287	111.1	Down	Chr6	128526621	128526720	99	0.000
<i>Dpf3</i>	Double PHD fingers 3	70127	99.2	Down	Chr12	83215461	83215800	339	0.000
<i>Dgkg</i>	Diacylglycerol Kinase $\gamma$	110197	95.3	Down	Chr16	22479365	22479426	61	0.000
<i>Dpf3</i>	Double Phd fingers 3	70127	94.3	Down	Chr12	83214541	83214840	299	0.000

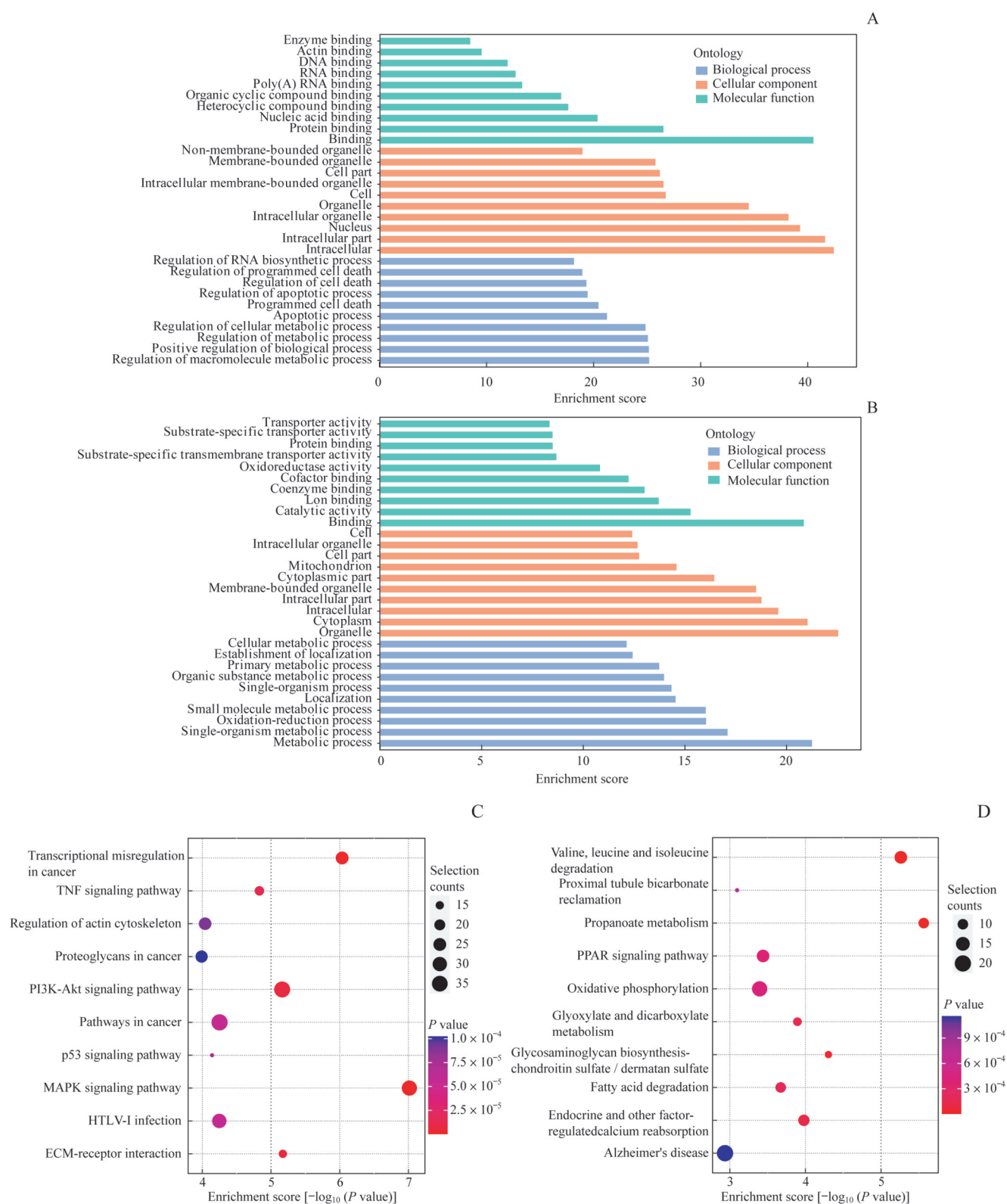


**Note:** A. Chromosomal distribution of all DMMSs. Red lines indicate up regulation m<sup>6</sup>A methylation sites; Blue line indicate down regulation m<sup>6</sup>A methylation sites. B. Relative occupancy of DMMSs in each chromosome was normalized by length. C. Pie chart showing the percentage of DMMS peaks in five non-overlapping segments. D. Statistics of fold change of DMMS peaks in five segments. The histogram shows the mean of the fold change.

图3 DMMS在染色体上分布情况

Fig 3 Distribution of DMMSs in chromosomes





**Note:** A. Major GO terms were enriched for the genes containing up-regulated m<sup>6</sup>A sites. B. Major GO terms were enriched for the genes containing down-regulated methylated m<sup>6</sup>A sites. C. Major enriched pathways for the genes containing up-regulated methylated m<sup>6</sup>A sites. D. Major enriched pathways for the genes containing down-regulated methylated m<sup>6</sup>A sites.

图4 GO与KEGG分析包含DMMS的编码基因

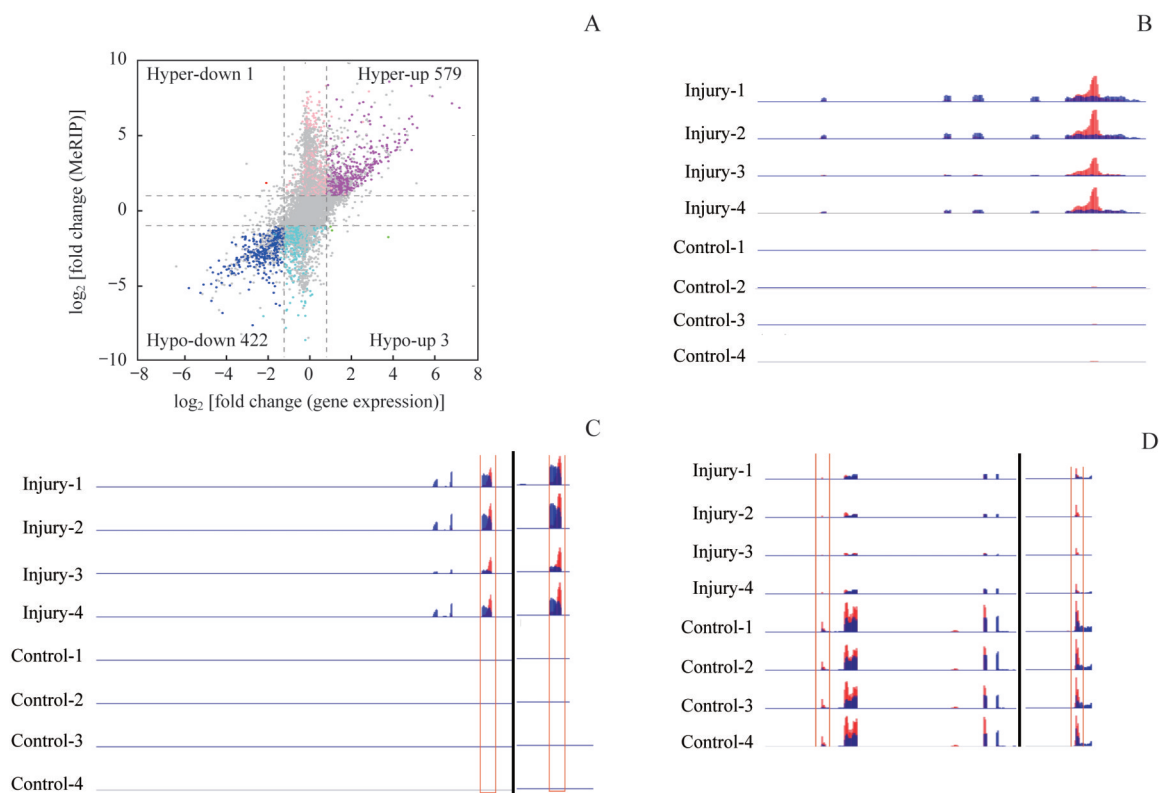
Fig 4 GO and KEGG analyses of coding genes containing DMMSs



## 2.4 m<sup>6</sup>A修饰与基因调控的联合分析

应用RNA-seq技术检测对照组和损伤组间差异表达基因。共发现差异表达的基因4 469个(表达变化倍数 $\geq 2$ ,  $P < 0.05$ ),其中下调基因1 655个,上调基因2 814个。将含有DMMS的基因与差异表达基因取交集,共得出1 002个基因。这些基因可分为4类,包括576个甲基化水平升高且RNA表达上调的基因,422个甲基化水平降低且RNA表达下调的基因,1个甲基化水平升高且RNA表达下调的基因和3个甲基化水平降低且RNA表达上调的基因(图5A)。

深入分析甲基化与基因表达趋势相同的基因后,发现部分基因含有生理学功能。如顺铂可促进编码纤维蛋白原的纤维蛋白原 $\alpha$ 链(fibrinogen  $\alpha$  chain, *Fga*)基因中甲基化位点变化趋势和mRNA表达趋势均升高(图5B)。介导Na<sup>+</sup>与K<sup>+</sup>离子跨膜运动的溶质载体12家族成员1(solute carrier family 12 member 1, *Slc12a1*)基因受顺铂刺激后mRNA甲基化位点变化趋势和mRNA表达趋势均降低(图5C)。顺铂也可诱导甲肝病毒细胞受体1(hepatitis A virus cellular receptor 1, *Havcr1*)基因mRNA中m<sup>6</sup>A甲基化水平升高,mRNA高表达(图5D)。



**Note:** A. Four-quadrant graph exhibiting the differentially expressed genes containing DMMS peaks. B. Visualization of m<sup>6</sup>A-modified gene *Fga*. C. Visualization of m<sup>6</sup>A-modified gene *Slc12a1*. D. Visualization of m<sup>6</sup>A-modified gene *Havcr1*.

图5 差异甲基化基因和差异表达基因的联合分析

Fig 5 Conjoint analysis of differentially methylated genes and differentially expressed genes

## 3 讨论

m<sup>6</sup>A甲基化在许多物种中被认为是一种可逆的动态修饰。既往研究<sup>[16-18]</sup>表明,m<sup>6</sup>A修饰可以通过影响mRNA的转录、剪接、定位、翻译、稳定性以及RNA水平上的转录后调节应答各种生理刺激。也有证据<sup>[11-13]</sup>提示m<sup>6</sup>A修饰与肾损伤之间存在密切关系,揭示了m<sup>6</sup>A在肾损伤调节中的重要生物学作用。

本研究建立了一种稳定可靠的CI-AKI小鼠模型,并

通过血清肌酐、血尿素氮检测和肾组织病理分析证实了建模成功。不同的外界刺激可导致肾脏中m<sup>6</sup>A的动态修饰和基因的表达。本研究结果显示,顺铂诱导小鼠肾组织中mRNA甲基化水平和基因表达量均发生变化,且m<sup>6</sup>A甲基化修饰的常见序列为“RRACH”保守序列。这一结果与其他研究一致<sup>[19-20]</sup>。同时,超过75.0%的含有甲基化位点的基因含有2个或以上的m<sup>6</sup>A甲基化位点,这一结果与前期在脑<sup>[19]</sup>和肝<sup>[20]</sup>等脏器中的研究结果不一致,提示肾脏组织有一定特殊性。2组中m<sup>6</sup>A甲基化含量丰富的区域均位于基因的CDS区域,这与部分已有研究



结果一致<sup>[18-20]</sup>。进一步运用GO和KEGG分析含有DMMS的基因发现:甲基化水平升高(含有m<sup>6</sup>A甲基化上调位点)的基因主要富集在代谢和细胞死亡相关的通路中,如大分子代谢、细胞代谢、TNF信号通路和MAPK信号通路;甲基化水平降低(含有m<sup>6</sup>A甲基化下调位点)的基因主要集中在代谢、氧化和转运通路中,说明顺铂导致了复杂的m<sup>6</sup>A甲基化变化。所涉及的通路中已有多条通路被证实是CI-AKI的影响因素。其中,代谢相关通路的变化可能是构成CI-AKI病理生理变化的基础。

最后,本研究结合m<sup>6</sup>A修饰和基因调控探索了CI-AKI的可能发生机制。将转录组的数据与表观遗传学数据整合分析得到的1 002个基因中,绝大部分基因中m<sup>6</sup>A甲基化趋势与基因表达趋势一致,这与文献报道相同<sup>[19-21]</sup>,提示顺铂可能通过影响这些基因的m<sup>6</sup>A甲基化水平进而影响转录组水平变化。这为进一步研究CI-AKI机制提供了新的思路。同时,有几个变化的基因引起了我们的注意。例如,顺铂诱导小鼠肾脏中*Fga*基因甲基化水平和表达水平均上调,且*Fga*是编码纤维蛋白原的关键基因。顺铂可引起肾脏血管内皮损伤和广泛的炎症反应,激活凝血级联反应<sup>[22-24]</sup>。本研究结果则提示顺铂

对m<sup>6</sup>A甲基化水平的影响可能是*Fga*基因表达水平变化的重要原因。*Slc12a1*是袢利尿剂的分子靶点<sup>[25-27]</sup>。*Slc12a1*介导Na<sup>+</sup>和K<sup>+</sup>的跨膜运动,顺铂破坏小管转运Na<sup>+</sup>和K<sup>+</sup>等离子功能。在本研究中,*Slc12a1*在顺铂的刺激下甲基化水平下调并低表达,这提示顺铂对离子转运功能的破坏可能部分通过影响关键基因*Slc12a1* mRNA上的m<sup>6</sup>A甲基化水平实现。*Harvc1*已被证实可作为肾损伤预测的标志物<sup>[28-30]</sup>。有报道<sup>[31]</sup>表明,*Harvc1*通过介导吞噬作用减轻急性肾脏损伤。本研究结果表明顺铂诱导*Harvc1* mRNA的m<sup>6</sup>A甲基化水平升高,提示m<sup>6</sup>A甲基化可能也是*Harvc1*发挥作用的机制之一,这为进一步研究*Harvc1*在肾脏疾病中的功能提供了思路。

综上,本研究通过比较正常小鼠与CI-AKI小鼠模型中肾脏组织的m<sup>6</sup>A甲基化及RNA表达差异,表明m<sup>6</sup>A甲基化与CI-AKI之间存在重要关联。此外,获得的候选基因揭示了m<sup>6</sup>A甲基化与CI-AKI之间可能存在的关联。但本研究仍存在一些不足。目前尚无法确定观测到的m<sup>6</sup>A变化是由顺铂直接导致,还是在AKI过程中细胞生理活动变化后发生,这也是我们今后的研究方向。课题组拟在下一步研究中结合其他研究中的数据 and 体内、体外实验明确顺铂对m<sup>6</sup>A甲基化的影响。

## 参·考·文·献

- [1] Lebwohl D, Canetta R. Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update[J]. *Eur J Cancer*, 1998, 34(10): 1522-1534.
- [2] Ozkok A, Edelstein CL. Pathophysiology of cisplatin-induced acute kidney injury[J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 967826.
- [3] Holditch SJ, Brown CN, Lombardi AM, et al. Recent advances in models, mechanisms, biomarkers, and interventions in cisplatin-induced acute kidney injury[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(12): 3011.
- [4] Yimit A, Adebali O, Sancar A, et al. Differential damage and repair of DNA-adducts induced by anti-cancer drug cisplatin across mouse organs[J]. *Nat Commun*, 2019, 10: 309.
- [5] Zuk A, Bonventre JV. Acute kidney injury[J]. *Annu Rev Med*, 2016, 67(1): 293-307.
- [6] Sahu BD, Mahesh Kumar J, Sistla R. Baicalein, bioflavonoid, prevents cisplatin-induced acute kidney injury by up-regulating antioxidant defenses and down-regulating the MAPKs and NF- $\kappa$ B pathways[J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0134139.
- [7] Csepány T, Lin A, Baldick CJ, et al. Sequence specificity of mRNA N<sup>6</sup>-adenosine methyltransferase[J]. *J Biol Chem*, 1990, 265(33): 20117-20122.
- [8] Lichinchi G, Gao S, Saletore Y, et al. Dynamics of the human and viral m<sup>6</sup>A RNA methylomes during HIV-1 infection of T cells[J]. *Nat Microbiol*, 2016, 1: 16011.
- [9] Spitale RC, Flynn RA, Zhang QC, et al. Structural imprints *in vivo* decode RNA regulatory mechanisms[J]. *Nature*, 2015, 519(7544): 486-490.
- [10] Wang Y, Li Y, Toth JJ, et al. N<sup>6</sup>-methyladenosine modification destabilizes developmental regulators in embryonic stem cells[J]. *Nat Cell Biol*, 2014, 16(2): 191-198.
- [11] Wang J, Ishfaq M, Xu L, et al. METTL3/m<sup>6</sup>A-miRNA-873-5p attenuated oxidative stress and apoptosis in colistin-induced kidney injury by modulating Keap1/Nrf2 pathway[J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 517.
- [12] Zhou PH, Wu M, Ye CY, et al. Meclofenamic acid promotes cisplatin-induced acute kidney injury by inhibiting fat mass and obesity-associated protein-mediated m<sup>6</sup>A abrogation in RNA[J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(45): 16908-16917.
- [13] Xu Y, Yuan XD, Wu JJ, et al. The N<sup>6</sup>-methyladenosine mRNA methylase METTL14 promotes renal ischemic reperfusion injury via suppressing YAP1[J]. *J Cell Biochem*, 2020, 121(1): 524-533.
- [14] Leemans JC, Stokman G, Claessen N, et al. Renal-associated TLR2 mediates ischemia/reperfusion injury in the kidney[J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(10): 2894-2903.
- [15] Wang L, Feng Z, Wang X, et al. DEGseq: an R package for identifying differentially expressed genes from RNA-seq data[J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(1): 136-138.
- [16] Zhou J, Wan J, Gao X, et al. Dynamic m<sup>6</sup>A mRNA methylation directs translational control of heat shock response[J]. *Nature*, 2015, 526(7574): 591-594.
- [17] Li HB, Tong J, Zhu S, et al. m<sup>6</sup>A mRNA methylation controls T cell homeostasis by targeting the IL-7/STAT5/SOCS pathways[J]. *Nature*, 2017, 548(7667): 338-342.
- [18] Fry NJ, Law BA, Ilkayeva OR, et al. N<sup>6</sup>-methyladenosine is required for the hypoxic stabilization of specific mRNAs[J]. *RNA*, 2017, 23(9): 1444-1455.
- [19] Wang Y, Mao J, Wang X, et al. Genome-wide screening of altered m<sup>6</sup>A-tagged transcript profiles in the hippocampus after traumatic brain injury in mice[J]. *Epigenomics*, 2019, 11(7): 805-819.
- [20] Luo Z, Zhang Z, Tai L, et al. Comprehensive analysis of differences of N<sup>6</sup>-methyladenosine RNA methylomes between high-fat-fed and normal mouse livers[J]. *Epigenomics*, 2019, 11(11): 1267-1282.
- [21] Dominissini D, Moshitch-Moshkovitz S, Schwartz S, et al. Topology of the human and mouse m<sup>6</sup>A RNA methylomes revealed by m<sup>6</sup>A-seq[J]. *Nature*, 2012, 485(7397): 201-206.
- [22] Vilar R, Fish RJ, Casini A, et al. Fibrin(ogen) in human disease: both friend and foe[J]. *Haematologica*, 2020, 105(2): 284-296.
- [23] Meyer KD, Saletore Y, Zumbo P, et al. Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3' UTRs and near stop codons[J]. *Cell*,

- 2012, 149(7): 1635-1646.
- [24] Riccioni G, Gammone M, Currenti W, et al. Effectiveness and safety of dietetic supplementation of a new nutraceutical on lipid profile and serum inflammation biomarkers in hypercholesterolemic patients[J]. *Molecules*, 2018, 23(5): 1168.
- [25] Markadieu N, Delpire E. Physiology and pathophysiology of SLC12A1/2 transporters[J]. *Pflugers Arch*, 2014, 466(1): 91-105.
- [26] Martini F, Cecconi N, Paolicchi A, et al. Interference of monoclonal gammopathy with fibrinogen assay producing spurious dysfibrinogenemia[J]. *TH Open*, 2019, 3(1): e64-e66.
- [27] Hao S, Hao M, Ferreri NR. Renal-specific silencing of TNF (tumor necrosis factor) unmasks salt-dependent increases in blood pressure *via* an NKCC2A (Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> cotransporter isoform A) -dependent mechanism[J]. *Hypertension*, 2018, 71(6): 1117-1125.
- [28] Zdziechowska M, Gluba-Brzózka A, Franczyk B, et al. Biochemical markers in the prediction of contrast-induced acute kidney injury[J]. *Curr Med Chem*, 2021, 28(6): 1234-1250.
- [29] Lippi I, Perondi F, Meucci V, et al. Clinical utility of urine kidney injury molecule-1 (KIM-1) and gamma-glutamyl transferase (GGT) in the diagnosis of canine acute kidney injury[J]. *Vet Res Commun*, 2018, 42(2): 95-100.
- [30] Yang L, Brooks CR, Xiao S, et al. KIM-1-mediated phagocytosis reduces acute injury to the kidney[J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(4): 1620-1636.
- [31] Song J, Yu J, Prayogo GW, et al. Understanding kidney injury molecule 1: a novel immune factor in kidney pathophysiology[J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(3): 1219-1229.

[收稿日期] 2021-08-12

[本文编辑] 崔黎明

## “双一流”暨高水平地方高校建设项目

### 一流学科——基础医学

在保持原有基础医学学科优势和特色的基础上,通过完善基础医学“人才特区”、培育国家创新群体、组建以国家重点实验室为核心的重点实验室群、创建国际联合研究中心和基础临床创新研究中心、建设大型仪器和实验动物公共技术平台等,充分与临床交叉融合,建设特色鲜明和世界一流的学科体系,为培养具有卓越追求和卓越能力的医学人才打下扎实的基础。学科整体达到国内一流水平,免疫学、生物化学与分子生物学等学科方向继续位列世界一流行列。

