

引文格式:李鹏飞,鲍思洁,王从玉,王思文,孙诚浩,康丽华,等. ALKBH5 对紫外线诱导的晶状体上皮细胞氧化损伤模型中 DNA 损伤修复的影响[J]. 眼科新进展,2022,42(11):847-852,862. doi:10.13389/j.cnki.rao.2022.0175

【实验研究】

ALKBH5 对紫外线诱导的晶状体上皮细胞氧化损伤模型中 DNA 损伤修复的影响[△]

李鹏飞 鲍思洁 王从玉 王思文 孙诚浩 康丽华 管怀进

【摘要】 目的 探究 N-甲基腺苷(m^6A)去甲基化酶 ALKBH5 对紫外线诱导的晶状体上皮细胞(LEC)氧化损伤模型中 DNA 损伤修复的影响。方法 运用 qRT-PCR 和免疫印迹实验检测年龄相关性白内障(ARC)患者和对照组晶状体前囊膜上皮细胞中 ALKBH5 的 mRNA 和蛋白的表达。通过紫外线 B(UVB)构建晶状体上皮细胞株 SRA01/04 细胞氧化损伤模型和靶向 ALKBH5 设计小干扰 RNA(siRNA)转染构建敲降模型,运用 qRT-PCR 和免疫印迹实验检测氧化损伤模型和敲降模型中 ALKBH5 的 mRNA 和蛋白表达。运用 CCK-8 法检测 Control 组、UVB 组、UVB + siNC 组和 UVB + siALKBH5#3 组中 SRA01/04 细胞活力变化。免疫荧光染色检测 UVB + siNC 组和 UVB + siALKBH5#3 组中 15A3 的荧光强度变化。运用 qRT-PCR 检测转染对照 siNC 组和转染 siALKBH5#3 组中 11 个 DNA 氧化损伤修复基因(ODRGs)的 mRNA 表达变化。结果 在 ARC 患者的晶状体前囊膜上皮细胞中,ALKBH5 的 mRNA 和蛋白表达水平均显著升高。在 UVB 以时间梯度诱导 SRA01/04 的细胞氧化损伤模型中,ALKBH5 的 mRNA 和蛋白表达水平均呈上升后下降趋势,其中 UVB 照射 10 min 后 ALKBH5 mRNA 和蛋白表达升高最为显著。ALKBH5 敲降效率结果显示,与转染对照 siNC 组相比,转染靶向 ALKBH5 的 siRNA 后,ALKBH5 的 mRNA 和蛋白表达均显著下降。CCK-8 法检测结果显示,与 UVB + siNC 组相比,UVB + siALKBH5#3 组 SRA01/04 细胞活力明显降低。免疫荧光染色检测结果显示,与 UVB + siNC 组相比,UVB + siALKBH5#3 组 SRA01/04 细胞内 DNA 氧化损伤指标 15A3 染色显著增加。同时,与转染对照 siNC 组相比,转染 ALKBH5#3 组 SRA01/04 细胞的 ODRGs 中,*TREX1*、*FANCD2*、*LIG1*、*MSH2*、*MSH3*、*RPA2*、*SMUG1*、*XRCC6* mRNA 的表达均显著上升,*DCLRE1A* mRNA 的表达显著下降,*MGMT* 和 *MRE11A* mRNA 的表达则未见明显差异。结论 m^6A 去甲基化酶 ALKBH5 在 UVB 诱导的 LEC 氧化损伤模型中诱导性表达上升,敲降 ALKBH5 可促进 LEC 内大部分 ODRGs 表达升高,参与调控 LEC 内损伤 DNA 的修复,阻止 ARC 的发生。

【关键词】 年龄相关性白内障;DNA 损伤修复;晶状体上皮细胞;紫外线 B;N⁶-甲基腺苷;ALKBH5

【中图分类号】 R776

作者简介:李鹏飞 (ORCID: 0000-0002-1229-3600), 男, 1994 年 5 月出生, 江苏宿迁人, 博士。研究方向: 白内障。E-mail: 1360404601@qq.com

作者简介: 鲍思洁 (ORCID: 000-0001-7856-4920), 女, 1998 年 7 月出生, 江苏南通人, 硕士。研究方向: 白内障。E-mail: 1721425383@qq.com

注:李鹏飞和鲍思洁为共同第一作者。

通信作者:管怀进 (ORCID: 0000-0002-4205-2015), 男, 1962 年 1 月出生, 江苏南通人, 硕士, 教授, 主任医师, 博士生导师。研究方向: 白内障。E-mail: guanhjeye@163.com

收稿日期:2022-02-23

修回日期:2022-10-09

本文编辑：盛丽娜

△基金项目:国家自然科学基金面上项目(编号:82171038, 81974129);国家自然科学基金青年基金项目(编号:82101101)

作者单位:226001 江苏省南通市,
南通大学附属医院眼科,南通大学
医学院

年龄相关性白内障(ARC)是白内障中最常见的类型^[1]。目前,氧化应激被认为是 ARC 发病的重要机制^[24]。晶状体上皮细胞(LEC)内的氧化应激反应不可避免地引起 DNA 损伤发生,与此同时,细胞内迅速且有效的 DNA 修复机制发挥作用,及时修复损伤的 DNA,维持基因组稳定^[5]。然而,随着年龄增长,DNA 损伤和修复的失衡引起损伤性 DNA 逐渐在 LEC 内积累,导致 ARC 形成^[6-7]。

已有研究发现,在紫外线照射引起的 DNA 损伤位点处发生 N⁶-甲基腺苷(m⁶A)修饰的聚集,通过多种机制促进 DNA 修复,对抗紫外线照射引起的损伤^[8-9]。m⁶A 是真核生物 mRNA 中最丰富的内部表观遗传学修饰,参与 mRNA 代谢全部环节,通过调节 RNA 稳定性和翻译调节基因表达,在各种生物过程中发挥重要作用^[10-12]。m⁶A 修饰过程受到 m⁶A 甲基转移酶复合物(MTC)、去甲基化酶和 m⁶A 识别酶的动态调控^[13-14]。其中,ALKBH5 作为去甲基化酶,

在氧化应激诱导的 DNA 损伤修复中发挥重要作用^[15-16]。虽然已有研究发现, ALKBH5 在皮质型 ARC 的 LEC 中的表达显著上调, 但是其在 ARC 发生发展过程中的作用机制尚不清楚^[17]。

本研究中,我们通过对 LEC 进行紫外线 B (UVB)照射构建氧化损伤模型,探究 m⁶A 去甲基化酶 ALKBH5 在氧化损伤模型中对损伤性 DNA 修复的影响,为 ARC 的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 一般资料 选取 2021 年 4 月至 10 月在南通大学附属医院眼科住院并行超声乳化白内障吸除术的 ARC 患者 8 例 8 眼为 ARC 组,选择同期住院并接受透明晶状体摘除术的黄斑前膜患者 8 例 8 眼为对照组,收集所有患者的临床资料及晶状体前囊膜,所有患者的晶状体混浊程度均根据 LOCS III 分级系统进行分级。ARC 组患者排除标准:(1)并发性、外伤

性、代谢性、药物及中毒性白内障等其他类型的白内障;(2)双眼中有一眼为无晶状体眼;(3)合并高血压、糖尿病或自身免疫病。对照组患者排除标准:(1)合并高度近视、葡萄膜炎或青光眼等眼部疾病;(2)合并高血压、糖尿病或其他全身性疾病。ARC组患者男5例、女3例,年龄为50~80(66.1 ± 3.4)岁,对照组患者男4例、女4例,年龄为50~80(65.6 ± 2.7)岁,两组患者间性别和年龄差异均无统计学意义($P=0.94, 0.18$)。本研究通过南通大学附属医院伦理委员会审批(伦理审查批号:2021-L091),所有患者均签署知情同意书。

1.2 材料 人LEC细胞系SRA01/04细胞购自中国科学院上海生命科学研究。DMEM培养基、胎牛血清、胰蛋白酶均购自美国Gibco公司;手持式紫外线检测灯购自中国光豪分析仪器公司;逆转录试剂盒购自美国Thermo Scientific公司,Trizol试剂盒购自美国Invitrogen公司,引物购自上海生工生物工程股份有限公司;靶向ALKBH5设计的siRNAs购自中国锐博生物科技有限公司;CCK-8试剂盒购自日本同仁化学研究所;15A3抗体购自英国Abcam公司;GAPDH抗体、荧光二抗(辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔和山羊抗鼠IgG)均购自中国ABclonal公司。

1.3 细胞培养和 UVB 处理 将SRA01/04细胞复苏后,加入完全培养基(含体积分数10%胎牛血清和 $10\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 青链霉素的DMEM培养基),并置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、含体积分数5% CO_2 培养箱中培养。待培养皿中的细胞融合度达80%左右时,用Hanks液清洗细胞2次,加入适量的无菌PBS,置于手持式紫外线检测灯(波长为275~400 nm,峰值为310 nm)下30 cm处照射。UVB照射时间梯度为0 min、10 min、15 min、30 min、45 min。照射后加入完全培养基继续培养24 h,进行后续实验。

1.4 qRT-PCR 检测 根据Trizol试剂盒的步骤提取ARC组($n=3$)和对照组($n=3$)患者晶状体前囊膜上皮细胞中的总RNA。按照说明书行qRT-PCR检测,以GAPDH为内参,使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 分析,实验均重复3次。GAPDH上游引物为5'-TGAAGGTCG-GAGTCAACGGATTTGGT-3',下游引物为5'-CAT-GTGGGCCATGAGGTCC ACCAC-3'。ALKBH5上游引物为5'-CCCGAGGGCTTCGTCAACA-3',下游引物为5'-CGACACCCGAATAGGCTTGA-3'。同样方法检测经不同方法处理后SRA01/04细胞中ALKBH5 mRNA和11个DNA氧化损伤修复基因(ODRGs)的表达,其中11个ODRGs的引物序列见表1。

1.5 免疫印迹实验检测 取ARC组($n=5$)和对照组($n=5$)患者的晶状体前囊膜,提取上皮细胞,加入蛋白裂解液冰上裂解,提取蛋白上清,于 $125\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的凝胶上进行电泳(电压80 V转120 V)分离蛋白;采用湿转法转膜(电流250 mA,2 h);采用 $5\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$

表 1 11 个 ODRGs 的引物序列

基因	引物序列
<i>TREX1</i>	上游:5'-CGCATGGGCGTCAATGTTTT-3' 下游:5'-GCAGTGATGCTATCCACACAGAA-3'
<i>FANCD2</i>	上游:5'-AAAACGGGAGAGAGTCAGAATCA-3' 下游:5'-ACGCTCACAAGACAAAAGGCA-3'
<i>LIG1</i>	上游:5'-ATAGATGGCGCTGTGATTCC-3' 下游:5'-CTGTCTACTATCCACCAGGC-3'
<i>MSH2</i>	上游:5'-CACTGTCTGCGGTAATCAAGT-3' 下游:5'-CTCTGACTGCTGCAATATCCAAT-3'
<i>MSH3</i>	上游:5'-GCAACTCTGAGCCAAAAGAAAT-3' 下游:5'-ACTTTGAGGAAGGGCAGAATC-3'
<i>RPA2</i>	上游:5'-GCACCTTCTCAAGCCGAAAAG-3' 下游:5'-CCCCACAATAGTGACCTGTGAAA-3'
<i>SMUG1</i>	上游:5'-CGCAACTACGTGACTCGCTAC-3' 下游:5'-GTCCCGGACCATGCTTACTTC-3'
<i>XRCC6</i>	上游:5'-GCTAGAAGACCTGTTGCGGAA-3' 下游:5'-TGTTGAGCTTCAGCTTTAACCTG-3'
<i>MGMT</i>	上游:5'-ACCGTTTTCGCACTTGGTACTT-3' 下游:5'-GGAGCTTTATTTCTGTCAGACC-3'
<i>MRE11A</i>	上游:5'-ATCGGCCTGTCCAGTTTGAAA-3' 下游:5'-TGCCATCTTGATAGTTCACCCAT-3'
<i>DCLRE1A</i>	上游:5'-ATGAGCCAGAATTTCACTCAGC-3' 下游:5'-GGCACACCCTCTAATGCCT-3'

脱脂奶粉室温下封闭2 h;参照说明书将稀释好的目的一抗(ALKBH5稀释度为1:1000;GAPDH稀释度为1:6000)加入PVDF膜中,置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱孵育过夜;次日,用TBST漂洗,然后加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔(二抗)IgG在室温下孵育2 h;最后,TBST洗涤后加入显影剂,置于暗室内曝光显影。以GAPDH为内参。同样方法检测经不同方法处理后SRA01/04细胞中ALKBH5蛋白表达。

1.6 细胞分组及转染 检测siALKBH5转染效率时,实验分为转染siALKBH5组(针对ALKBH5 mRNA的三个不同区域设计靶向敲低ALKBH5的siRNA,命名为siALKBH5#1、siALKBH5#2和siALKBH5#3)、转染对照siNC组(转染对照siNC)和Control组(未经任何处理)。检测ALKBH5在细胞氧化损伤模型中的功能时,实验分为Control组(未经任何处理)、UVB组(采用UVB照射)、UVB+siNC组(转染对照siNC,同时采用UVB照射处理)以及UVB+siALKBH5#3组(转染siALKBH5#3,同时采用UVB照射处理)。转染方法:6孔板每孔中加入Lipofectamine 3000和siRNA充分混匀后室温孵育15 min,之后,置于培养箱中继续培养72 h后,进行后续实验。

1.7 CCK-8 法检测细胞活力 CCK-8法检测Control组、UVB组、UVB+siNC组以及UVB+siALKBH5#3组细胞活力,具体方法为:将SRA01/04细胞以每孔 1×10^4 个的密度接种于96孔板,每组设6个复孔,培养箱培养24 h;分组处理后弃培养基,向每孔加入100 μL 完全培养基和10 μL CCK-8溶液;继续

置于培养箱中孵育 1~2 h(操作过程中注意避光);使用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度。

1.8 免疫荧光染色检测 DNA 氧化损伤 UVB + siNC 组和 UVB + siALKBH5#3 组 SRA01/04 细胞分组处理后,PBS 清洗,40 g·L⁻¹多聚甲醛室温固定 30 min,加入 30 g·L⁻¹牛血清白蛋白和体积分数 0.5% Triton X-100 溶液,室温封闭 2 h;依据 15A3 抗体(15A3 抗体可检测到发生损伤 DNA 的标志物 8-oxoG,而 8-oxoG 为 ALKBH5 修复损伤 DNA 的结合底物^[8])说明书,使用 10 g·L⁻¹牛血清白蛋白配一抗反应液,4℃ 孵育过夜;次日取出洗涤后,加入荧光二抗,室温下孵育 2 h(操作过程中注意避光);之后,Hoechst(1:10 000)孵育 8 min 染细胞核(操作过程中注意避光),荧光显微镜下避光观察、拍照。

1.9 统计学方法 实验数据均采用 Graphpad prism 8 统计学软件分析。多组间比较均采用单因素方差分析,两样本间比较采用 *t* 检验。所有实验均重复 3 次。检验水准:α=0.05。

2 结果

2.1 ARC 患者晶状体前囊膜上皮细胞中 ALKBH5 mRNA 和蛋白表达 qRT-PCR 和免疫印迹实验检测结果显示,与对照组相比,ARC 组患者晶状体前囊膜上皮细胞中 ALKBH5 mRNA 和蛋白表达均显著升高,差异均有统计学意义(均为 *P*<0.05)(图 1)。

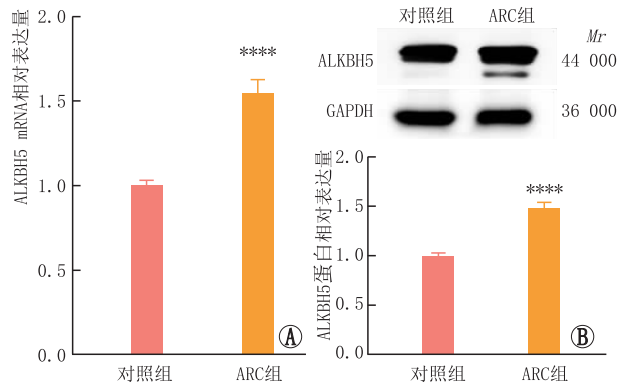


图1 ARC组和对照组患者晶状体前囊膜上皮细胞中ALKBH5的mRNA和蛋白表达 A:qRT-PCR检测ALKBH5 mRNA表达;B:免疫印迹实验检测ALKBH5蛋白表达。与对照组相比,*****P*<0.000 1。

2.2 UVB照射对LEC中ALKBH5表达的影响

2.2.1 UVB照射对LEC中ALKBH5 mRNA表达的影响 qRT-PCR 检测结果显示,与 UVB 照射 0 min 相比,SRA01/04 细胞中 ALKBH5 mRNA 表达量在 UVB 照射 10 min 时上升,在 UVB 照射 30 min 和 45 min 时下降,差异均有统计学意义(均为 *P*<0.05);UVB 照射 15 min 与 0 min 时相比差异无统计学意义(*P*>0.05)。其中,UVB 照射 10 min 时 ALKBH5 mRNA 的表达量最高(图 2)。

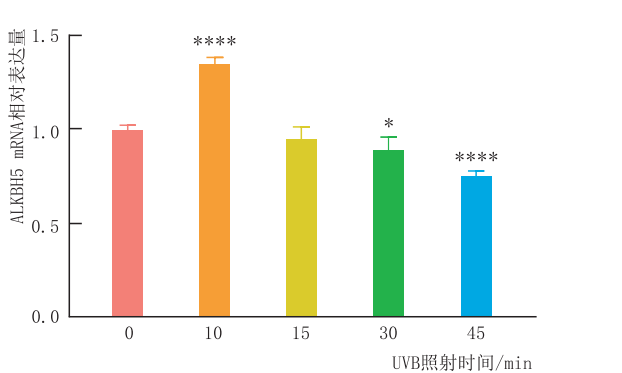


图2 qRT-PCR检测UVB照射不同时间SRA01/04细胞中ALKBH5 mRNA表达与照射0 min时相比,**P*<0.05,*****P*<0.000 1。

2.2.2 UVB照射对LEC中ALKBH5蛋白表达的影响

免疫印迹实验检测结果显示,在 UVB 以时间梯度照射 SRA01/04 细胞后,SRA01/04 细胞中 ALKBH5 的蛋白表达量呈上升后下降趋势。与 UVB 照射 0 min 时相比,SRA01/04 细胞中 ALKBH5 蛋白表达量在 UVB 照射 10 min 时和 15 min 时上升,在 UVB 照射 45 min 时下降,差异均有统计学意义(均为 *P*<0.05);UVB 照射 30 min 与照射 0 min 时相比差异无统计学意义(*P*>0.05)。其中,UVB 照射 10 min 时 ALKBH5 的蛋白表达量升高最明显(图 3)。因此,本实验细胞 UVB 照射氧化损伤模型的构建均采用辐射强度为 0.09 mW·cm⁻²的手持式紫外线检测灯照射 SRA01/04 细胞 10 min。

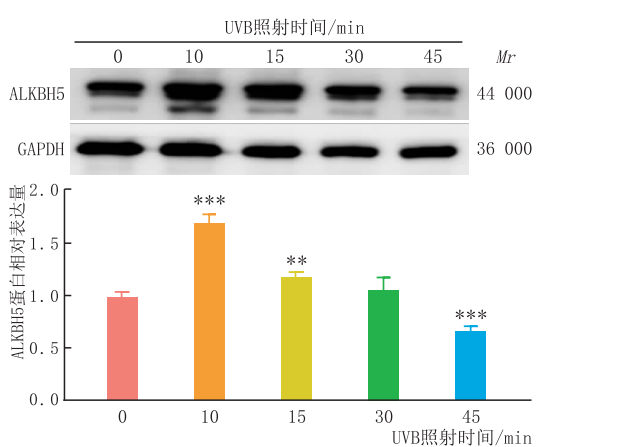


图3 免疫印迹实验检测UVB照射不同时间SRA01/04细胞中ALKBH5蛋白表达与照射0 min时相比,***P*<0.01,****P*<0.001。

2.3 ALKBH5敲降模型验证 qRT-PCR 和免疫印迹实验检测结果显示,与转染对照 siNC 组相比,转染 siALKBH5#3 后,SRA01/04 细胞中 ALKBH5 mRNA 和蛋白表达均显著降低(均为 *P*<0.001)(图 4)。因此,选取 siALKBH5#3 用于后续功能实验的 ALKBH5 敲降模型。

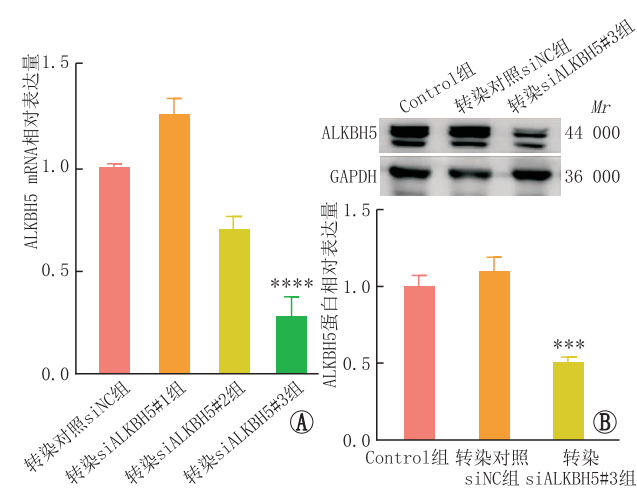


图4 不同 siALKBH5 转染 SRA01/04 细胞后 mRNA 和蛋白水平的敲降效率验证 与转染对照 siNC 组相比, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

2.4 敲降 ALKBH5 对 LEC 状态的影响
2.4.1 ALKBH5 转染后细胞活力检测 CCK-8 法检测结果显示,与 Control 组相比,UVB 和 UVB + siNC 组 SRA01/04 细胞活力均明显降低 (均为 $P < 0.0001$);与 UVB + siNC 组和 UVB 组相比,UVB + siALKBH5#3 组 SRA01/04 细胞活力明显降低,差异均有统计学意义 (均为 $P < 0.0001$) (图 5)。

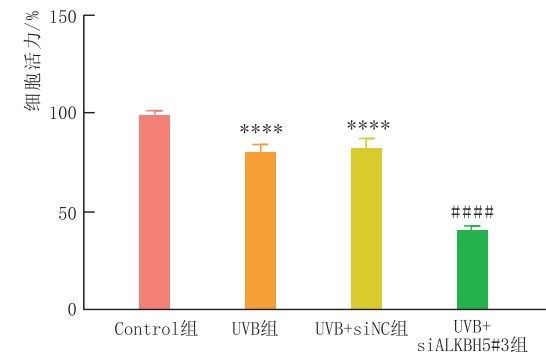


图5 siALKBH5#3 转染对 SRA01/04 细胞活力的影响 与 Control 组相比, **** $P < 0.0001$;与 UVB 组和 UVB + siNC 组相比, #### $P < 0.0001$ 。

2.4.2 ALKBH5 敲降后细胞内 DNA 氧化损伤程度变化 免疫荧光染色检测结果显示,与 UVB + siNC 组 (荧光强度为 33.8 ± 2.7) 相比,UVB + siALKBH5#3 组 SRA01/04 细胞的 15A3 染色 (荧光强度为 68.0 ± 6.0) 明显增多,差异具有统计学意义 ($t = 10.39, P < 0.0001$) (图 6)。

2.5 敲降 ALKBH5 对 LEC 的 ODRGs 表达的影响 qRT-PCR 检测结果显示,与转染对照 siNC 组相比,转染 siALKBH5#3 组 SRA01/04 细胞中 *TREX1*、*FANCD2*、*LIG1*、*MSH2*、*MSH3*、*RPA2*、*SMUG1*、*XRCC6* mRNA 的表达均显著升高,*DCLRE1A* mRNA 的表达显著降低,差异均有统计学意义 (均为 $P < 0.01$);两

组间 *MGMT* 和 *MRE11A* mRNA 的表达差异均无统计学意义 (均为 $P > 0.05$) (图 7)。

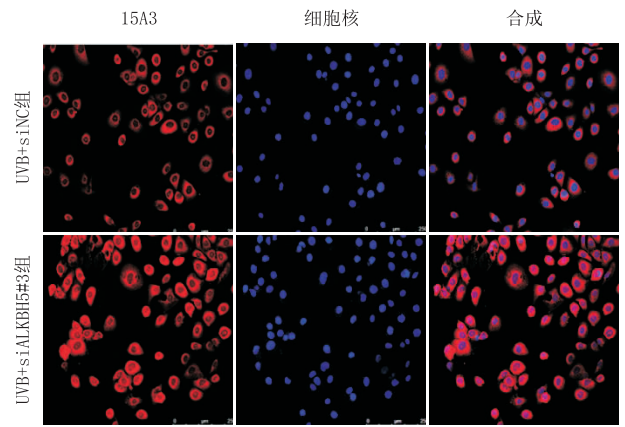


图6 siALKBH5 #3 转染对 SRA01/04 细胞 DNA 氧化损伤的影响

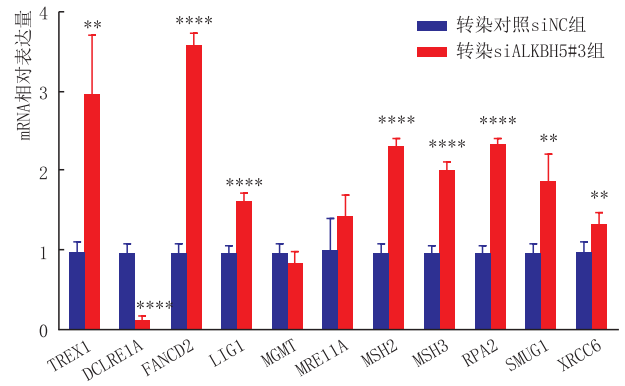


图7 敲降 ALKBH5 对 SRA01/04 细胞 ODRGs 表达的影响 与转染对照 siNC 组相比, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$ 。

3 讨论

LEC 是晶状体中唯一的细胞类型,在维持晶状体内部环境的稳态以及维持晶状体光学透明度方面发挥着关键作用^[18]。LEC 内的氧化应激诱发因素主要包括外源性紫外线和内源性的线粒体呼吸链所产生的活性氧(ROS),当 ROS 的产生超过细胞自身生理性的抗氧化防御机制时,就会导致氧化和抗氧化失衡,从而引发氧化应激反应^[19-21]。有研究显示,氧化应激可导致每个生物体每天大约 10^4 个 DNA 发生氧化损伤^[22]。氧化损伤往往是不可避免的,因此,在机制方面针对 DNA 损伤修复调控的研究在 ARC 的防治中具有重要意义。

m^6A 是发生在腺苷 N^6 位的甲基化,在真核生物的 mRNA 中广泛分布,调控多种生物活动过程,包括转录、翻译、干细胞的维持和分化以及肿瘤的恶化等^[23-25]。也有研究发现,在氧化应激条件下可以通过多种机制调节 m^6A 修饰水平,促进 DNA 修复,维

持基因稳定性^[8,16]。Xiang等^[8]研究发现,紫外线诱导的DNA损伤能特异性触发m⁶A甲基转移酶METTL3在DNA损伤位点的瞬时募集,促进m⁶A RNA水平全面升高,进而诱导与核苷酸切除修复和跨损伤合成有关的DNA聚合酶 κ (Pol κ)定位DNA损伤位点,参与损伤DNA的修复。Yu等^[16]研究发现,在ROS诱导的氧化应激过程中,ROS通过激活ERK/JNK信号通路促进m⁶A去甲基化酶ALKBH5 SUMO化,抑制ALKBH5活性,诱导mRNA m⁶A修饰,从而提高氧化修复基因的稳定性,促进DNA修复过程。所以,m⁶A可以通过响应氧化应激诱导的DNA损伤来调节DNA修复,在此过程中m⁶A调节酶起到了重要的调控作用。

m⁶A调节酶可分为3种类型,共同参与m⁶A动态可逆的调控过程,即m⁶A甲基转移酶复合物(MTC),包括METTL3、METTL14、WTAP等,负责催化m⁶A;m⁶A去甲基化酶,包括FTO、ALKBH5,负责将m⁶A删除;m⁶A识别酶,包括YT521-B同源域蛋白家族(YTHDF1/2/3和YTHDC1/2)等^[21],负责特异性识别m⁶A修饰位点并与之结合^[26]。本研究通过对比ARC组和对照组患者晶状体前囊膜样本,发现m⁶A去甲基化酶ALKBH5在ARC患者晶状体前囊膜上皮细胞中的表达显著升高,这也一定程度上提示了m⁶A水平的改变。另外,在采用UVB以时间梯度照射LEC构建的氧化损伤模型中,发现在UVB照射10 min后,ALKBH5 mRNA和蛋白表达水平均显著上升。因此,我们推测m⁶A去甲基化酶ALKBH5在LEC的氧化损伤过程中可能发挥着重要调控作用。

为了进一步探究ALKBH5在UVB诱导的LEC氧化损伤模型中的功能,本研究首先利用靶向ALKBH5的小干扰RNA(siRNA)对其进行了敲降实验,然后比较了各组中的细胞活力改变和DNA损伤情况,结果发现,同样经过UVB照射10 min,敲降ALKBH5的LEC与未处理组和干扰组相比细胞活力更差;15A3荧光染色结果也同样提示,遭受相同程度的UVB照射,敲降ALKBH5的细胞更易发生DNA损伤。因此,我们可以确定ALKBH5在LEC响应氧化应激损伤的过程中起到了保护作用,可对抗由UVB照射诱导的DNA损伤,具体机制尚不明确,仍然有待深入研究。

在DNA损伤修复过程中,首先检查点激酶CHK1和CHK2被激活,然后启动细胞周期检查点,从而引起细胞周期停滞和DNA修复^[27]。DNA修复主要包括直接修复、碱基切除修复、核苷酸切除修复、错配修复、单链断裂修复以及双链断裂修复等途径^[28]。相关研究发现,ALKBH5能调控ODRGs的表达^[16,29-30]。课题组前期通过微阵列分析筛选和qRT-PCR检测验证了96个ODRGs,发现了在ARC和对照患者样本中显著差异表达的11个ODRGs,这些差

异表达的ODRGs在DNA修复途径中发挥不同功能,促进DNA的损伤修复——*LIG1*、*MGMT*、*SMUG1*参与碱基切除修复,*DCLRE1A*、*RPA2*参与核苷酸切除修复,*TREX1*、*MSH2*、*MSH3*参与错配修复,*FANCD2*参与同源重组,*MRE11A*、*XRCC6*参与双链断裂修复^[31]。对此,我们在LEC中靶向ALKBH5进行敲低,观察这些ODRGs的表达情况,结果发现,*TREX1*、*FANCD2*、*LIG1*、*MSH2*、*MSH3*、*RPA2*、*SMUG1*、*XRCC6* mRNA的表达在ALKBH5敲降后均显著升高,而*DCLRE1A* mRNA的表达显著降低,*MGMT*和*MRE11A* mRNA的表达则未见明显差异,表明敲降ALKBH5后,细胞内ODRGs的表达明显改变。其中,表达升高最为显著的*FANCD2*,在DNA损伤反应的早期阶段可发挥信号转导作用被ATM磷酸化,从而触发细胞周期停滞^[32],同时还作为与其他信号转导通路协同作用的检查点机制的中心,在及时修复受损DNA中发挥着至关重要的作用^[33]。此外,作为哺乳动物细胞中重要的3'-5' DNA核酸外切酶,*TREX1*除了能优先选择错配的核苷酸,参与错配修复外^[34],还可通过降解细胞周期S期出现的单链DNA,阻止慢性ATM依赖性检查点的激活^[35],多阶段促进DNA损伤修复。

综上所述,ALKBH5在ARC患者以及UVB诱导的细胞氧化损伤模型中表达升高。在UVB诱导的细胞氧化损伤模型中靶向敲降ALKBH5,可导致细胞活力下降以及DNA损伤程度加重,同时ODRGs表达升高,促进DNA损伤修复。而在ARC患者中,ALKBH5表达的显著升高也意味着ODRGs的表达受到抑制,从而无法对LEC中长期累积的DNA损伤进行及时修复,最终导致ARC的发生。因此,我们的结果证实了m⁶A去甲基化酶ALKBH5在UVB诱导的LEC氧化损伤模型中诱导性表达上升,敲降ALKBH5可影响细胞内ODRGs表达变化,参与调控LEC内损伤DNA的修复,阻止ARC的发生。

参考文献

- [1] BLINDNESS G B D, VISION IMPAIRMENT C, VISION LOSS EXPERT GROUP OF THE GLOBAL BURDEN OF DISEASE S. Causes of blindness and vision impairment in 2020 and trends over 30 years, and prevalence of avoidable blindness in relation to VISION 2020: the right to sight: an analysis for the Global Burden of Disease Study[J]. *Lancet Glob Health*, 2021, 9(2): e144-e160.
- [2] EROL TINAZTEPE O, AY M, ESER E. Nuclear and mitochondrial DNA of age-related cataract patients are susceptible to oxidative damage[J]. *Curr Eye Res*, 2017, 42(4): 583-588.
- [3] KANTOROW M, HAWSE J R, COWELL T L, BENHAMED S, PIZARRO G O, REDDY V N, et al. Methionine sulfoxide reductase A is important for lens cell viability and resistance to oxidative stress[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(26): 9654-9659.
- [4] TRUSCOTT R J. Age-related nuclear cataract-oxidation is the key[J]. *Exp Eye Res*, 2005, 80(5): 709-725.
- [5] SU S, YAO Y, ZHU R, LIANG C, JIANG S, HU N, et al. The associations between single nucleotide polymorphisms of DNA repair genes, DNA damage, and age-related cataract: Jiangsu Eye Study[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013, 54(2): 1201-

- 1207.
- [6] WANG Y, ZHANG J, WU J, GUAN H. Expression of DNA repair genes in lens cortex of age-related cortical cataract[J]. *Exp Mol Pathol*, 2017, 102(2): 219-223.
- [7] SORTE K, SUNE P, BHAKE A, SHIVKUMAR V B, GANGANE N, BASAK A. Quantitative assessment of DNA damage directly in lens epithelial cells from senile cataract patients[J]. *Mol Vis*, 2011, 17: 1-6.
- [8] XIANG Y, LAURENT B, HSU C H, NACHTERGAELE S, LU Z, SHENG W, *et al*. RNA m⁶A methylation regulates the ultraviolet-induced DNA damage response [J]. *Nature*, 2017, 543(7646): 573-576.
- [9] SVOBODOVA KOVARIKOVA A, STIXOVA L, KOVARIK A, KOMURKOVA D, LEGARTOVA S, FAGHERAZZI P, *et al*. N⁶-adenosine methylation in RNA and a reduced m³G/TMG level in non-coding RNAs appear at microirradiation-induced DNA lesions[J]. *Cells*, 2020, 9(2): 360.
- [10] JIA G, FU Y, HE C. Reversible RNA adenosine methylation in biological regulation[J]. *Trends Genet*, 2013, 29(2): 108-115.
- [11] WANG X, LU Z, GOMEZ A, HON G C, YUE Y, HAN D, *et al*. N⁶-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability[J]. *Nature*, 2014, 505(7481): 117-120.
- [12] WANG X, ZHAO B S, ROUNDTREE I A, LU Z, HAN D, MA H, *et al*. N⁶-methyladenosine modulates messenger RNA translation efficiency[J]. *Cell*, 2015, 161(6): 1388-1399.
- [13] GUO X, LI K, JIANG W, HU Y, XIAO W, HUANG Y, *et al*. RNA demethylase ALKBH5 prevents pancreatic cancer progression by post transcriptional activation of PER1 in an m⁶A-YTHDF2-dependent manner[J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 91.
- [14] SONG H, FENG X, ZHANG H, LUO Y, HUANG J, LIN M, *et al*. METTL3 and ALKBH5 oppositely regulate m⁶A modification of TFEB mRNA, which dictates the fate of hypoxia/reoxygenation-treated cardiomyocytes [J]. *Autophagy*, 2019, 15(8): 1419-1437.
- [15] AKULA D, OCONNOR T R, ANINDYA R. Oxidative demethylase ALKBH5 repairs DNA alkylation damage and protects against alkylation-induced toxicity[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 534: 114-120.
- [16] YU F, WEI J, CUI X, YU C, NI W, BUNGERT J, *et al*. Post-translational modification of RNA m⁶A demethylase ALKBH5 regulates ROS-induced DNA damage response[J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(10): 5779-5797.
- [17] LI P, YU H, ZHANG G, KANG L, QIN B, CAO Y, *et al*. Identification and characterization of N⁶-methyladenosine circRNAs and methyltransferases in the lens epithelium cells from age-related cataract [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2020, 61(10): 13.
- [18] GALICHANIN K. Exposure to subthreshold dose of UVR-B induces apoptosis in the lens epithelial cells and does not in the lens cortical fibre cells [J]. *Acta Ophthalmol*, 2017, 95(8): 834-838.
- [19] DE JAGER T L, COCKRELL A E, DU PLESSIS S S. Ultraviolet light induced generation of reactive oxygen species[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 996: 15-23.
- [20] SLIMEN I B, NAJAR T, GHAM A, DABBEBI H, BEN MRAD M, ABDREBBAH M. Reactive oxygen species, heat stress and oxidative-induced mitochondrial damage; a review[J]. *Int J Hyperthermia*, 2014, 30(7): 513-523.
- [21] RECZEK C R, CHANDEL N S. ROS promotes cancer cell survival through calcium signaling[J]. *Cancer Cell*, 2018, 33(6): 949-951.
- [22] DAVALLI P, MARVERTI G, LAURIOLA A, D'ARCA D. Targeting oxidatively induced DNA damage response in cancer: opportunities for novel cancer therapies[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018: 2389523.
- [23] SLOBODIN B, HAN R, CALDERONE V, VRIELINK J, LOAYZA-PUCH F, ELKON R, *et al*. Transcription impacts the efficiency of mRNA translation via co-transcriptional N⁶-adenosine methylation[J]. *Cell*, 2017, 169(2): 326-337.
- [24] BATISTA P J, MOLINIE B, WANG J, QU K, ZHANG J, LI L, *et al*. m⁶A RNA modification controls cell fate transition in mammalian embryonic stem cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 15(6): 707-719.
- [25] LIU Z X, LI L M, SUN H L, LIU S M. Link between m⁶A modification and cancers[J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2018, 6: 89.
- [26] WANG S, LV W, LI T, ZHANG S, WANG H, LI X, *et al*. Dynamic regulation and functions of mRNA m⁶A modification [J]. *Cancer Cell Int*, 2022, 22(1): 48.
- [27] NEIZER-ASHUN F, BHATTACHARYA R. Reality CHECK: understanding the biology and clinical potential of CHK1 [J]. *Cancer Lett*, 2021, 497: 202-211.
- [28] HUANG R, ZHOU P K. DNA damage repair: historical perspectives, mechanistic pathways and clinical translation for targeted cancer therapy[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 254.
- [29] OZKUREDE U, KALA R, JOHNSON C, SHEN Z, MILLER R A, GARCIA G G. Cap-independent mRNA translation is up-regulated in long-lived endocrine mutant mice [J]. *J Mol Endocrinol*, 2019, 63(2): 123-138.
- [30] KOWALSKI-CHAUVEL A, LACORE M G, ARNAUDUC F, DELMAS C, TOULAS C, COHEN-JONATHAN-MOYAL E, *et al*. The m⁶A RNA demethylase ALKBH5 promotes radioresistance and invasion capability of glioma stem cells[J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 13(1): 40.
- [31] LI F, WANG Y, ZHANG G, ZHOU J, YANG L, GUAN H. Expression and methylation of DNA repair genes in lens epithelium cells of age-related cataract [J]. *Mutat Res*, 2014, 766/767: 31-36.
- [32] BARTEK J, LUKAS C, LUKAS J. Checking on DNA damage in S phase[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004, 5(10): 792-804.
- [33] NEPAL M, CHE R, MA C, ZHANG J, FEI P. FANCD2 and DNA Damage[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(8): 1804.
- [34] WANG C J, LAM W, BUSSEM S, CHANG H M, CHENG Y C. TREX1 acts in degrading damaged DNA from drug-treated tumor cells [J]. *DNA Repair (Amst)*, 2009, 8(10): 1179-1189.
- [35] YANG Y G, LINDAHL T, BARNES D E. Trex1 exonuclease degrades ssDNA to prevent chronic checkpoint activation and autoimmune disease[J]. *Cell*, 2007, 131(5): 873-886.

Effect of ALKBH5 on DNA repair in lens epithelial cells exposed to ultraviolet-induced oxidative damage

LI Pengfei, BAO Sijie, WANG Congyu, WANG Siwen, SUN Chenghao, KANG Lihua, GUAN Huaijin

Department of Ophthalmology, the Affiliated Hospital of Nantong University, Medical School of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Corresponding author: GUAN Huaijin, E-mail: guanhjeye@163.com

[Abstract] Objective To investigate the effect of N⁶-methyladenosine (m⁶A)-demethylase ALKBH5 on the repair of damaged DNA in lens epithelial cells (LECs) exposed to ultraviolet (UV)-induced oxidative damage. **Methods** The mRNA and protein levels of ALKBH5 in anterior LECs of age-related cataract (ARC) patients and controls were detected by

(下转第 862 页)