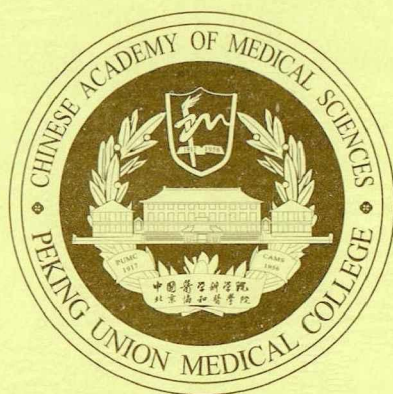


北京协和医学院
中国医学科学院

硕士研究生学位论文



北京协和医学院研究生院

硕士学位论文

RNA m⁶A 去甲基化酶 ALKBH5

在胶质母细胞瘤和小脑退行性病变中的功能研究

所 院： 基础学院

姓 名： 费祎

指导教师： 宋伟教授、牛亚梅研究员

导师小组： 佟伟民教授

学科专业： 生物化学与分子生物学

研究方向： RNA 表观遗传调控

完成日期： 2023 年 5 月

目 录

前言.....	6
材料与方法.....	12
1. 实验材料.....	12
1.1 实验动物.....	12
1.2 主要试剂.....	12
1.3 耗材.....	13
1.4 抗体.....	13
1.5 引物.....	14
1.6 主要仪器设备.....	15
1.7 主要溶液的配制.....	16
1.8 siRNA 序列信息.....	17
1.9 质粒.....	18
2.方法.....	18
2.1 小鼠基因型的鉴定.....	18
2.2 小鼠平衡木实验.....	19
2.3 小鼠步态分析实验.....	19
2.4 HE 染色.....	19
2.5 免疫组织化学染色.....	19
2.6 RNA 的提取及实时荧光定量 PCR (Quantitative Real-time PCR,RT-qPCR).....	20
2.7 组织、细胞蛋白的提取、浓度测定及 Western-blot 分析.....	22
2.8 RNA 免疫沉淀,RNA Immunoprecipitation (RIP).....	23
2.9 RNA 沉降实验,RNA pull down.....	26
2.10 RNA stability 实验.....	27
2.11 双荧光素酶报告实验,Dual luciferase assay.....	27
2.12 利用 total RNA 进行 m ⁶ A-IP 及建库测序.....	28
2.13 利用 Total RNA 进行 m ⁶ A-IP-qPCR.....	32
2.14 铁检测实验方法.....	34
2.15 统计学分析.....	35
实验结果.....	36
一: RNAm ⁶ A 去甲基化酶 ALKBH5 在胶质母细胞瘤中调控铁代谢的机制研究.....	36
1. 胶质母细胞瘤中,铁代谢基因 FTH1 是 ALKBH5 调控的下游靶基因.....	36

2. ALKBH5 对铁代谢基因 FTH1 RNA 代谢过程的调控机制.....39

3. 探究 ALKBH5 对铁代谢通路的调控机制.....42

二:RNAm⁶A 去甲基化酶 ALKBH5 在小脑萎缩中的研究.....43

1. 老年 Alkbh5^{-/-}小鼠小脑发生萎缩43

2. 老年 KO 小鼠小脑中的浦肯野神经元数量及神经树突的数目显著减少45

3. Alkbh5 敲除后老年小鼠的平衡性下降.....46

讨论.....48

一:RNAm⁶A 去甲基化酶 ALKBH5 在胶质母细胞瘤中调控铁代谢的机制研究48

二: RNAm⁶A 去甲基化酶 ALKBH5 在小脑萎缩中的研究.....49

小结.....51

一:RNAm⁶A 去甲基化酶 ALKBH5 在胶质母细胞瘤中调控铁代谢的机制研究51

1. 本研究的主要结论.....51

2. 本研究的应用价值与创新性.....51

3. 本研究的局限性.....51

4. 未来的研究方向.....51

二: RNAm⁶A 去甲基化酶 ALKBH5 在小脑萎缩中的研究.....52

1. 本研究的主要结论.....52

2. 本研究的创新性.....52

3. 本研究的局限性.....52

参考文献.....53

缩略表.....58

综述 铁代谢失调与肿瘤发生发展的相关研究进展59

1. 细胞内正常的铁代谢.....59

1.1 铁在体内摄取过程.....59

1.2 铁代谢调节.....60

2. 铁代谢与癌症.....60

4. 结论.....64

参考文献.....65

摘要

近年来, RNA 表观转录修饰是研究热门领域之一, N⁶-甲基腺嘌呤(N⁶-methyladeniosion, m⁶A)是哺乳动物 mRNA 上丰度最高的一种表观转录修饰方式, 由甲基转移酶、去甲基化酶和其结合蛋白共同调节。通过影响 mRNA 的代谢参与了多种生理与病理的调控。如果 m⁶A 修饰出现异常, 可能导致肿瘤和神经退行性病变等疾病的发生。

迄今为止的研究表明 RNA m⁶A 去甲基化酶 ALKBH5 在中枢神经系统、生殖系统发挥着重要的生理调控功能, 同时也与乳腺癌、胰腺癌、结肠癌等多种肿瘤的进展过程密切相关。本课题组主要关注 RNA m⁶A 甲基化在脑肿瘤与神经退行性病变过程中的功能与机制研究, 本课题即以 ALKBH5 为切入点, 一方面探讨 ALKBH5 在脑肿瘤胶质母细胞瘤(Glioblastoma multiforme, GBM)中的促癌机制; 另一方面则是 ALKBH5 在小脑神经退行性病病变过程中的作用。

胶质母细胞瘤是中枢神经系统最恶性的肿瘤之一, 为了提高其疗效、改善患者预后, 亟需对齐发病机制有更加全面和深入的了解。有研究报道铁代谢紊乱时会产生氧化应激反应, 将加速胶质母细胞瘤的进展, 使得患者的存活率下降, 而引发铁代谢紊乱的分子调控机制仍需要进一步的研究。我们前期研究发现胰腺导管腺癌中 ALKBH5 通过调控铁代谢可以控制肿瘤的进展, 同时有研究报道 ALKBH5 在胶质母细胞瘤中过表达并具有促癌作用, 因此我们推测胶质母细胞瘤中 ALKBH5 的过表达是否也会通过 m⁶A 调控, 导致铁代谢发生紊乱, 进而促进胶质母细胞瘤的进展。

为了验证这一猜想, 我们首先利用多发胶质母瘤临床病人样本进行 m⁶A 测序及生物信息学分析, 发现肿瘤标本中铁代谢相关基因的甲基化水平出现明显变化。同时敲低 ALKBH5 之后, 胶质母细胞瘤细胞中铁离子的含量明显减少。我们进一步利用敲低前后的胶质母细胞瘤细胞系进行 m⁶A 测序, 发现多种铁代谢相关基因的甲基化水平发生变化, 其中编码铁蛋白的 *FTH1* RNA 甲基化水平升高最为显著。因此我们进一步探究在胶质母细胞瘤中, ALKBH5 通过 *FTH1* RNA 去甲基化对铁代谢的调控作用。我们从 RNA 代谢的角度分别从剪切、RNA 稳定性和翻译效率三个方面探究 m⁶A 对 *FTH1* 靶基因的作用, 发现 ALKBH5 对 *FTH1* 的去甲基化作用不影响其 RNA 稳定性和剪切, 主要参与翻译调控。此外, 我们发现 *FTH1* 的 m⁶A 位点能够影响 IRP 蛋白和 *FTH1* 的结合。综上, 这项研究提示 m⁶A 去甲基化酶 ALKBH5 的表达异常和由此产生的 m⁶A 异常甲基化修饰可以通过 *FTH1* 铁代谢通路影响 GBM 的发生发展, 从而为探究胶质母细胞瘤的发病机制与治疗靶点提供了新的思

路与理论依据。

另一部分我们探讨了 ALKBH5 在小脑退行性病变过程中的作用。本课题组前期研究发现在低压低氧刺激下, *Alkbh5* 缺失破坏了 RNA m⁶A 甲基化的平衡, 导致小脑细胞异常增殖和分化, 小脑发育障碍。已有研究表明 m⁶A 参与大脑皮层神经退行性病变过程, 但是小脑退行性病变是否也受到 m⁶A 调控目前尚未见报道, 于是我们进一步研究 ALKBH5 是否参与老年小鼠小脑的神经病变。我们发现随着小鼠老龄化的加剧, ALKBH5 蛋白在小脑中的表达逐渐升高, 且在浦肯野细胞中的表达高于其他类型的神经细胞。同时老年 *Alkbh5*^{-/-} 小鼠 (KO) 的体重和全脑重相较于老年野生型小鼠 (WT) 均有所下降, 且老年 KO 小鼠的小脑重量明显减少。通过免疫组织化学实验检测中年及老年 WT 小鼠和 KO 小鼠中 NeuN, Calbindin-D28K, MAP2, GFAP 等蛋白的表达情况, 发现老年 KO 小鼠的浦肯野神经元缺失且排列紊乱, 同时树突数量明显减少。老年 KO 小鼠通过平衡木的时间相较于同龄的野生型小鼠明显增长, 且出现步态不稳的情况。以上结果说明去甲基化酶 ALKBH5 缺失会造成老年小鼠小脑萎缩、浦肯野神经元缺失与受损, 进而损害其运动协调和平衡能力, 同时提示 RNA m⁶A 甲基化失衡会导致小脑的神经退行性病变。

综上, 我们分别从两部分探究 RNA m⁶A 去甲基化酶 ALKBH5 表达异常对胶质母细胞瘤和老年小鼠小脑退行性病变的影响, 该研究为治疗相关的神经系统疾病提供了新的思路。

关键词: RNA m⁶A 甲基化; ALKBH5; 胶质母细胞瘤; 铁代谢; *FTH1*; 小脑; 神经退行性病变

Abstract

In recent years, RNA epigenetic transcription modification has become one of the hot research fields. N⁶-methyladenine (m⁶A) is the most abundant posttranscriptional modification on mammalian mRNAs, which is jointly regulated by methyltransferases, demethylases, and their binding proteins. It participates in various physiological and pathological regulation by influencing mRNA metabolism. This dynamic and reversible regulation is associated with the occurrence of various diseases, and abnormal m⁶A modification may lead to the occurrence of tumors and neurodegenerative diseases.

ALKBH5 is one of the major RNA m⁶A demethylases and plays multiple biological functions in diseases. As reported, ALKBH5 is involved in the progression of glioblastoma, pancreatic cancer, colon cancer and other tumors. In addition, ALKBH5 also plays important functions in the nervous system, reproductive system, etc. Our research group focuses on investigation of RNA m⁶A methylation in brain tumors and neuronal diseases. Here, we mainly focus on ALKBH5 to study its associated mechanism of tumorigenesis of glioblastoma and neurodegeneration of the mouse cerebellum.

Glioblastoma multiform (GBM) is one of the most malignant tumors in the central nervous system. In recent years, various efforts have been paid to improve its therapeutic efficiency and clinical outcomes of the patients, which requires a comprehensive understanding of its mechanism. It has been reported that when iron metabolism is disrupted, oxidative stress reactions will occur and accelerate the progression of glioblastoma and reduce the survival rate of patients. So far, detailed molecular mechanism is unclear yet and await further investigation. Previously, ALKBH5 is found to play a role in maintaining tumorigenicity of glioblastoma in m⁶A-dependent manner. On the other hand, we previously found that ALKBH5 regulates iron metabolism in pancreatic ductal adenocarcinoma. Therefore, we speculate that if overexpression of ALKBH5 in the glioblastoma may also lead to the disorder of iron metabolism, thus triggering tumor development of glioblastoma.

To verify this hypothesis, we first performed m⁶A sequencing and bioinformatics analysis on clinical patient samples of multiple glioblastomas, and found significant changes in the methylation levels of iron metabolism related genes in the tumor samples. Meanwhile, *ALKBH5* knockdown caused significant decrease of the content of iron ions in glioblastoma cells. We further compared the transcriptome-wide m⁶A changes in glioblastoma cell lines before and after knockdown *ALKBH5*. We found that the

methylation levels of various iron metabolism-related genes changed, with the most significant increase observed in ferritin-encoding *FTH1* RNA methylation levels. Therefore, we further investigated the regulatory effect of ALKBH5 on iron metabolism through *FTH1* RNA demethylation in glioblastoma. We investigated the effects of m⁶A on *FTH1* target genes from the perspectives of RNA metabolism, including RNA splicing, RNA stability, and translation. We found that the demethylation effect of ALKBH5 on *FTH1* did not affect its RNA splicing or stability, but mainly participated in translation regulation. In addition, we found that m⁶A methylation of *FTH1* can enhance the binding of IRP protein to *FTH1*. Those results suggest that overexpression of m⁶A demethylase ALKBH5 and the resulting abnormal m⁶A methylation can affect the occurrence and development of GBM through the *FTH1* iron metabolism pathway, providing new ideas and theoretical basis for exploring the novel therapeutic targets of glioblastoma.

In the second part, we investigated the effects of RNA m⁶A demethylase *Alkbh5* gene knockout on cerebellar morphology and function in elderly mice. Our group previously found that under hypobaric hypoxia stimulation, the loss of *Alkbh5* affects the balance of RNA m⁶A methylation, leading to impaired postnatal cerebellar development. We further investigated here whether ALKBH5 affects cerebellar neuropathy in the elderly mice. We found that with the aging of mice, the expression of ALKBH5 protein in cerebellum gradually increased, and the expression in Purkinje cell was higher than that in other types of neural cells. At the same time, the body weight and whole brain weight of elderly *Alkbh5*^{-/-} mice (KO) decreased compared to age-matched wild-type mice (WT), and the cerebellar weight of elderly KO mice was significantly reduced. We also detected the expression of NeuN, Calbindin D28K, MAP2, GFAP and other proteins in the middle-aged and elderly WT and KO mice through immunohistochemistry experiments. The number of Purkinje cell and neuron dendrites in aged KO mice decreased significantly. The time for the elderly KO mice to pass through the balance beam was significantly longer than that of the wild type mice of the same age, and their gait was unstable. However, we failed to observe similar phenotypes in the middle-aged mice. In summary, the deficiency of demethylase *ALKBH5* caused cerebellar atrophy, loss and damage of Purkinje neurons in the elderly mice, thereby impairing their motor coordination and balance abilities. The above results suggest that imbalance in RNA m⁶A methylation can lead to neurodegenerative lesions in the mouse cerebellum.

In conclusion, we explored the function and mechanism of RNA m⁶A demethylase ALKBH5 in glioblastoma and cerebellar neurodegeneration from two different viewpoints, thus providing new idea for the treatment of nervous system disease.

Keywords:

RNA m⁶A methylation; ALKBH5; GBM; Iron metabolism; FTH1; Cerebellar atrophy; Purkinje neurons; neurodegenerative diseases

前言

1. RNA m⁶A 甲基化

m⁶A 是 mRNA 上丰度最高的一种表观转录修饰方式^[1]，其受到甲基转移酶和去甲基化酶共同调控，并在识别蛋白的介导下调控 RNA 的剪切、出核、降解或翻译等过程^[2]（图 1.1）。常见的甲基转移酶有 METTL3，METTL14 和 WTAP 等，三者共同催化 RNA m⁶A 甲基化的形成^[3-5]。除此之外，近年来相关研究也发现了甲基转移酶复合体其他组分，包括 VIRMA^[6]、ZC3H13^[7]、RBM15/15B^[8]、METTL16^[9]等，它们在甲基化过程中也发挥着相关功能。目前发现的去甲基化酶有两个：FTO 和 ALKBH5。FTO 和 ALKBH5 均为 Fe²⁺和 α-酮戊二酸依赖的非血红素加氧酶，属于 AlkB 家族成员^[10]。除了甲基转移酶和去甲基化酶以外，RNA m⁶A 还会与特定的识别蛋白结合，按照其结合方式不同，可以分为直接结合和间接结合^[11]。直接结合是由识别蛋白内部特定的结构域介导，该结构域识别序列基序内的修饰，例如含有 YTH 结构域的结合蛋白：YTHDC1、YTHDC2、YTHDF1、YTHDF2、YTHDF3；间接结合的有 HNRNPC 和 HNRNPG 等^[11]。

RNA m⁶A 甲基化在甲基转移酶、去甲基化酶的作用下维持生物体内的动态平衡，并且在识别蛋白结合下调节 RNA 的剪切、出核、翻译或降解等环节。例如，YTHDC1 在细胞核内调控含有 m⁶A 修饰的 mRNA 的剪接和出核^[12, 13]；在细胞质中，m⁶A 读码器 YTH 家族(YTHDF1、YTHDF2、YTHDF3)和胰岛素样生长因子 2 的 mRNA 结合蛋白(IGF2BP1/2/3)调控含有 m⁶A 修饰的 mRNA 的稳定性、翻译和降解^[14]；除此之外，研究发现突触调节因子 FMRP 也增强 RNA m⁶A 的稳定性^[2]。

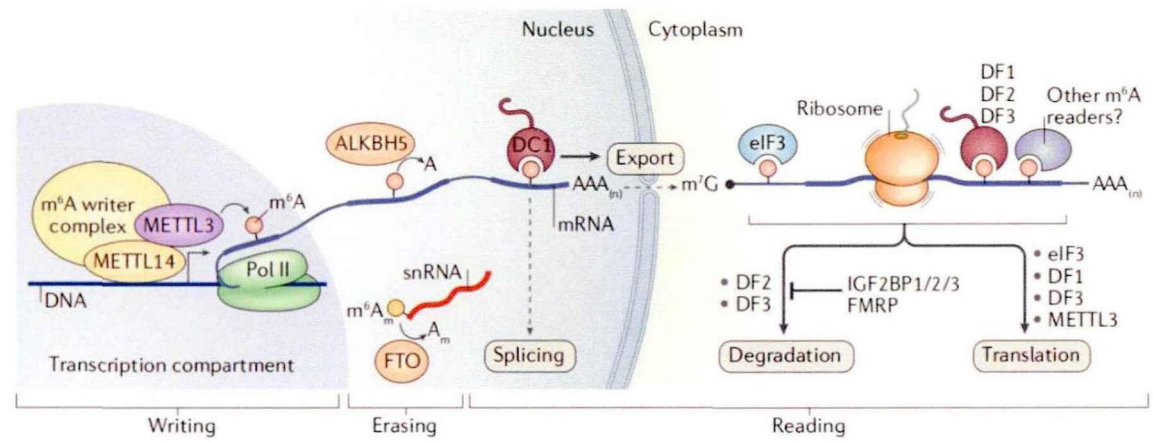


图 1.1 RNA m⁶A 甲基化调节酶结构和功能示意图^[16]

基于其对 RNA 代谢的调控作用，RNA m⁶A 在生殖^[15]、代谢^[16]、免疫^[17]及发育^[18]等多种生命活动中发挥重要的调控作用，因此 RNA m⁶A 甲基化异常会引起多种

疾病的发生^[15]。相关研究已表明，RNA m⁶A 甲基化通过调节癌基因和抑癌基因的表达从而影响肿瘤细胞增殖、分化、侵袭和转移等进程。其中甲基转移酶 METTL3 在肺癌与髓母细胞瘤中起着致癌或促癌的作用^[19]，METTL3 和 METTL14 在胶质母细胞瘤中对肿瘤具有抑制作用^[20, 21]；WTAP 在急性髓性白血病中具有致癌作用^[22]。去甲基化酶 FTO 在急性髓性白血病中发挥着癌基因的功能，促进白血病的发生发展^[23]；ALKBH5 在胶质母细胞瘤（Glioblastoma multiforme, GBM）和肺癌中具有致癌作用^[20, 24]、在白血病中具有抑癌作用^[25]；m⁶A 识别蛋白 YTHDF2 通过 m⁶A 修饰降解 mRNA 以选择性损害急性髓性白血病的肿瘤干细胞^[26]；IGF2BP 通过阻止 mRNA 的降解而发挥致癌作用^[27]。因此研究 RNA m⁶A 甲基化参与的发病机制可以为研发新的诊疗措施提供重要的理论依据。

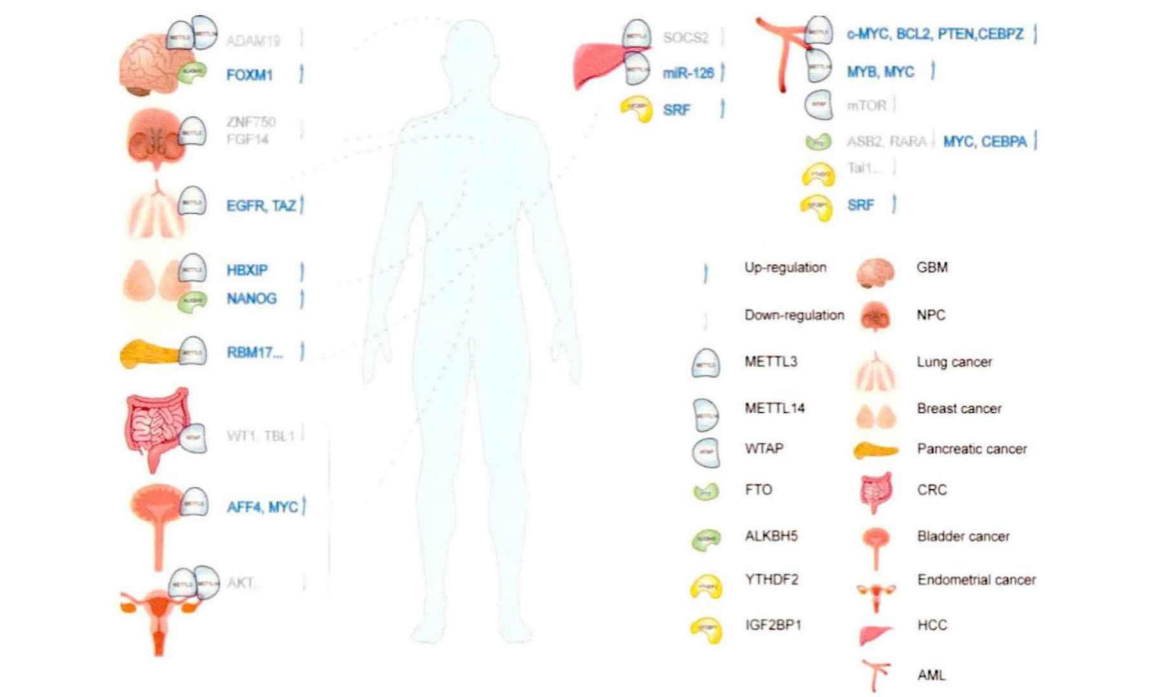


图 1.2 RNA m⁶A 甲基化修饰在多种人类肿瘤中的作用示意图^[28]

2. RNA m⁶A 甲基化与胶质母细胞瘤的研究

胶质母细胞瘤是脑组织中最常见的恶性肿瘤，占恶性脑肿瘤的 50%左右^[29]（图 1.3）。GBM 的标准治疗方法是手术切除、放化疗和化学药物治疗。手术治疗的指导原则是最大程度的安全切除，切除范围取决于所涉及的脑区部位，因此并不能通过手术完全治愈^[30]。因此放疗被用于 GBM 的治疗中，旨在提高局部控制率和生存时间。另外，近年来较为常用的化学治疗药物有替莫唑胺、卡莫司汀和洛莫司汀等，替莫唑胺作为辅助或伴随放疗的治疗口服给药是 GBM 患者的标准治疗方法^[30]，在治疗过程中经常出现耐药性的问题。同时，由于肿瘤的高度浸润性、遗传异质性以及存在血脑屏障的作用，使得 GBM 的治疗面临着巨大的挑战，目前 5 年生存率仅

为 7.2%。因此，探究新的 GBM 治疗靶点，以及新的治疗方法是非常必要的^[29]，而这首先需要对 GBM 的发生、发展与耐药性机制有全面而深入的了解。

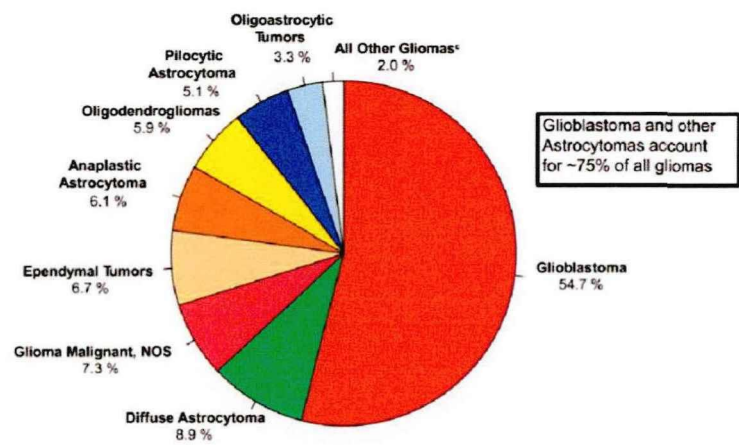


图 1.3 胶质母细胞瘤在脑恶性肿瘤中占比图^[28]

铁在肿瘤进展中起着至关重要的作用，它对肿瘤存活和肿瘤微环境的重编程都有重要的贡献^[31]。大规模的流行病学研究表明，全身铁水平含量与癌症风险增加直接相关^[32,33]。首先，肿瘤细胞比正常细胞需要更多的铁，细胞摄入过多的铁是癌变的标志之一。过度铁积累会导致氧化应激并促进癌症的发展。研究表明，GBM 中铁代谢失衡，引起铁的摄取和储存增加，导致氧化应激，从而促进肿瘤生长、并产生治疗耐药性^[34-36]。因此我们进一步探究在胶质母细胞瘤中，铁代谢的调控机制。

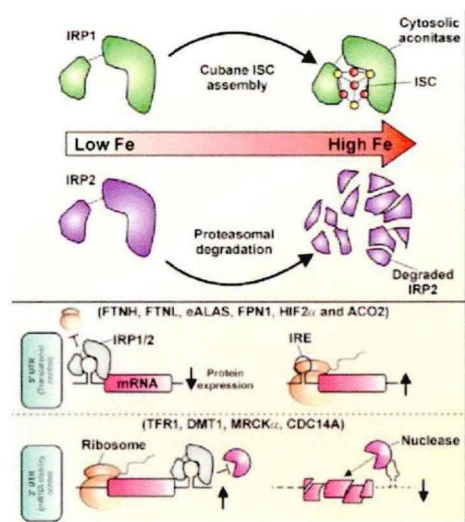


图 1.4 铁代谢中 IRP/IRE 调控示意图^[37]

铁调节蛋白 1 和 2 (Iron-regulatory protein, IRP1 和 IRP2) 是铁代谢的主要调节因子，在铁水平较低时被激活^[38,39]（图 1.4）。IRP 具有 RNA 结合结构域，识别被称为“铁响应元件 (iron response element, IRE)”的 mRNA 中的发夹状结构^[40]。根

据 IRE 定位在 mRNA 上的位置, IRP 结合可以稳定靶 mRNA (3'UTR) 或抑制其翻译 (5'UTR)^[40, 41]。在铁缺乏的条件下, IRP 被激活, 可以结合 *TFRC* mRNA 的 3'UTR, 增加 *TFRC* 蛋白水平和铁摄取^[42]。同时 IRPs 与铁蛋白 (*FTL/FTHI*) mRNA 的 5'UTR 结合以抑制其翻译, 从而降低铁蛋白水平并释放储存的铁^[37]。同理, 当铁含量充足时, IRP 被抑制, 减少 *TFRC* 蛋白水平和铁摄取, 增加铁蛋白的含量^[37]。因此, 当 IRP 被激活时, IRP 通过调节铁の利用、运输和储存来增加可获得的细胞铁库, 维持细胞内铁含量的稳定。

在 GBM 中, 铁主要通过转铁蛋白 1 (transferrin receptor 1, TFR1) 转运进入细胞内, 然后被铁载蛋白转运至线粒体中进行代谢^[43]。过多的铁会导致线粒体呼吸链受损, 从而引起氧化应激和细胞凋亡。GBM 细胞中 TFR1 的表达较高, 且其表达水平与肿瘤分级、预后等指标有关。研究发现, TFR1 促进 GBM 细胞的增殖、侵袭和转移, 并影响其对化疗和放疗的敏感性^[43]。除了 TFR1 外, 一些铁相关的蛋白也在 GBM 中发挥重要作用。例如, 铁载蛋白 1 (ferroportin 1, FP1) 负责将细胞内多余的铁转运至细胞外, 其在 GBM 中的表达水平与预后有关。另外, 铁调节蛋白可以调节细胞内铁的稳态, 影响 GBM 细胞对铁の利用和积累, GBM 患者中, 铁蛋白的含量较高^[44]。铁在胶质瘤细胞内还通过转运蛋白 DMT1 (divalent metal transporter 1) 进入细胞。近期的研究表明, DMT1 的表达水平与胶质瘤的恶性程度呈正相关, 同时也与胶质瘤患者的预后相关。综上, 研究发现铁能够增加细胞中的氧化应激并作为多种酶的辅助因子使其成为癌症治疗的靶点。

研究表明, RNA m⁶A 修饰的失衡与脑中胶质母细胞瘤的发生发展密切相关。例如, 甲基转移酶 METTL3 和识别蛋白 YTHDC1 通过对剪接因子 SRSF3、SRSF6 和 SRSF11 的 mRNA 的调节在胶母细胞系 U87 中发挥着促癌作用^[45]。去甲基化酶 FTO 通过调节 MYC 和其他致癌基因在胶母细胞系中发挥着抑癌作用^[46]。研究发现 m⁶A 去甲基化酶 ALKBH5 的过表达是胶质瘤干细胞增殖和肿瘤发生所必需的, 并且 FOXM1 是介导 ALKBH5 在胶质瘤干细胞中的关键靶标^[20]。值得注意的是, 去甲基化酶 ALKBH5 通过调节铁代谢在胰腺癌中发挥着抑癌作用^[47]。铁代谢异常对胶质母细胞瘤进展具有重要的调节作用, RNA m⁶A 修饰是否通过铁代谢途径在胶母中发挥作用, 目前尚不清楚。因此本研究以 ALKBH5 为切入点, 探讨胶质母细胞瘤中 m⁶A 甲基化修饰和铁代谢平衡的关系, 以期治疗胶质母细胞瘤的提供新的思路。

3. RNA m⁶A 在神经退行性疾病中的研究

研究发现, 在小鼠全身各组织中, RNA m⁶A 在脑组织的丰度最高^[48, 49], 提示其在神经系统可能发挥了重要的功能 (图 1.5)。已有研究表明 RNA m⁶A 甲基化失衡会导致皮质和小脑发育的严重缺陷^[50], 并且 RNA m⁶A 甲基化紊乱会引发神经退行

性病变^[51]（图 1.6）。

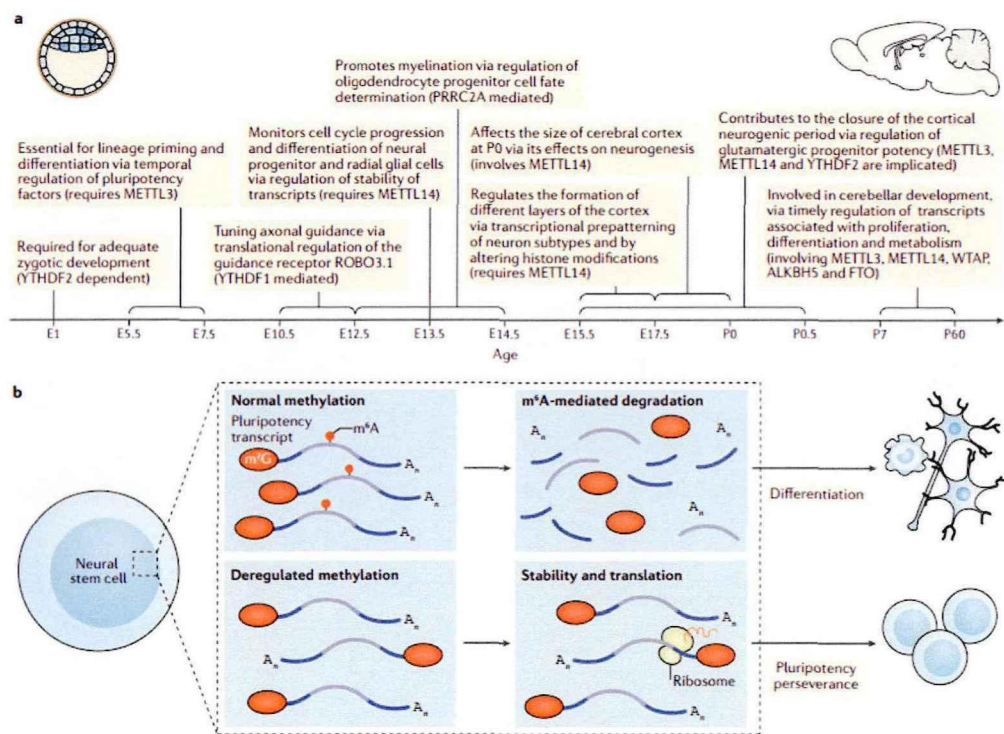


图 1.5 RNA m⁶A 甲基化参与神经细胞发育过程的示意图^[11]

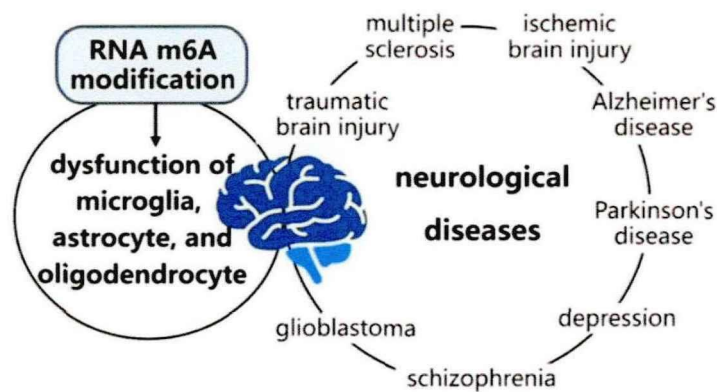


图 1.6 RNA m⁶A 甲基化在神经退行性疾病功能示意图^[52]

我们课题组前期对小鼠大脑皮层和小脑进行了表观转录组水平的甲基化分析，以描绘其区域特异性甲基化特征，发现小鼠小脑的 RNA 甲基化水平普遍高于大脑皮层，RNA 甲基化的异质性存在于不同的脑区和不同类型的神经细胞中^[49]。另有研究发现在大脑皮层区域，甲基化转移酶 METTL14 通过 RNA m⁶A 调控小鼠大脑皮层的时序性发育^[53]。而在小脑区域中，METTL3 和 ALKBH5 的缺失都会使小脑的发育受损，表明 RNA m⁶A 甲基化对于小鼠小脑正常发育至关重要^[54, 55]。

RNA m⁶A 甲基化除了影响小脑和皮质的发育以外，RNA m⁶A 甲基化紊乱会引发神经退行性病变^[51]。在阿尔兹海默症 (Alzheimer's disease, AD) 模型小鼠的海马

中 METTL3 表达增加, FTO 表达减少, 提示 RNA m⁶A 甲基化修饰促进 AD 进展^[56, 57]。甲基化酶 METTL3 和 RBM15B 在 AD 患者的海马中差异表达, METTL3 的表达水平与异常磷酸化的 tau 呈正相关^[58]。肌萎缩性脊髓侧索硬化症是一种致命的进行性神经退行性疾病, 导致肌肉无力, 瘫痪, 最终死于呼吸衰竭^[59, 60]。有研究表明 m⁶A 修饰的 RNA 片段的调控作用可能有助于肌萎缩性脊髓侧索硬化症新型治疗剂的开发。帕金森病是一种相对常见的神经退行性疾病, 帕金森病患者的多巴胺能神经元逐渐丧失, 这些蛋白介导神经毒性^[61, 62]。研究表明去甲基化酶 FTO 基因的失活会导致帕金森病患者的多巴胺能神经元活性丧失^[63]。

我们课题组前期研究发现在低压低氧刺激下, m⁶A 去甲基化酶 *Alkbh5* 缺失使得小脑发育异常^[49, 54], 但是 *Alkbh5* 缺失是否会引起老年小脑的神经退行性病变尚不明确。本研究中, 我们发现随着小鼠老龄化的加剧, ALKBH5 蛋白在小脑中的表达逐渐升高。虽然在 *Alkbh5* 缺失的中年小鼠的表型分析中未发现小脑体积与形态上的改变, 但是 *Alkbh5* 缺失的老年小鼠小脑体积明显变小、浦肯野神经元数量及神经树突的数目显著减少, 运动平衡性明显减弱, 说明 ALKBH5 在老年小鼠小脑的神经退行性病变过程中发挥一定的作用。

材料与方法

1. 实验材料

1.1 实验动物

本课题利用野生型小鼠 2 月龄 (2m)、6 月龄 (6m)、18 月龄 (18m) 的 C57BL/6 小鼠各 3 只进行 western blot 分析; 利用雌性 12 月龄和 18 月龄 *Alkbh5* 基因全身敲除小鼠 (KO) 及其同窝对照 (WT) 小鼠各 10 对进行免疫组织化学和行为学实验。

Alkbh5 基因敲除杂合小鼠由挪威奥斯陆大学 Arne Klungland 教授赠予, C57BL/6 野生型小鼠在维通利华公司购买。本课题所有的动物实验是在中国医学科学院基础医学研究所实验动物使用与管理委员会 (Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC) 的批准下、在实验动物中心的支持下完成。伦理编号是 AUCU-A01-2019-009。

1.2 主要试剂

- (1) Harris 苏木精染液: 中杉金桥, ZLI-9610。
- (2) 伊红染液: 中杉金桥, ZLI-9612。
- (3) 封闭用正常羊血清原液: 中杉金桥, ZLI-9021。
- (4) 过氧化物酶封闭液: 中杉金桥, ZLI-9311。
- (5) DAB Peroxidase (HRP) Substrate Kit (with Nickel), 3,3'-diaminobenzidine: Vector, SK-4100。
- (6) 兔二步法检测试剂盒: 中杉金桥, PV-9001。
- (7) 中性树脂: 西雅金桥, FZ-5202。
- (8) TritonX-100: Amresco, 0694。
- (9) Tween-20: Fluka, 93773。
- (10) NP40: Sigma, 18896。
- (11) 10%PAGE 凝胶快速制备试剂盒: 上海雅酶生物医药科技有限公司, PG112。
- (12) Western 转膜液: 碧云天, P0021A。
- (13) 十二烷基磺酸钠 (SDS): AMRESCO, 0227-1KG。
- (14) 预染蛋白质分子量标准 marker: Thermo Fisher, 26616。
- (15) Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets: Roche, 04693159001。
- (16) PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets: Roche, 04906845001。
- (17) BCA 蛋白浓度测定试剂盒和 BSA Protein Standard: GenStar, E162-05。
- (18) ECL 化学发光高敏显色试剂盒: Tanon, 180-5001。
- (19) TRIzol: Sigma, T9424。

- (20) 鼠尾裂解液(Tail buffer): Vingen Biotech Inc., 102-T。
- (21) 琼脂糖(Agarose): 擎科, R9012LE。
- (22) 溴化乙锭 (EB) : Sigma, E8751。
- (23) DEPC (焦碳酸二乙酯) : 国产试剂。
- (24) PCR Taq 酶: Genstar, A012。
- (25) 多聚甲醛(PFA): Sigma, P6418。
- (26) DNA 分子标记 Marker / 6×loading buffer: GenStar, E106-10。
- (27) 蛋白酶 K 粉末: AMRESCO, 0706-100MG。
- (28) 无水乙醇、二甲苯、甲醛溶液购自国药集团化学试剂有限公司。
- (29) RNasin Ribonuclease Inhibitor: Promega, N2515。
- (30) 比色法铁含量检测试剂盒: Abcam, ab83366。
- (31) 逆转录试剂盒: TOYOBO, FS301。
- (32) SYBR 绿色荧光染料 Realtime PCR 试剂盒: TOYOBO, QPS-201。
- (33) 建库试剂盒 SMARTer® Stranded Total RNA-Seq Kit: Takara, 634413。
- (34) Fragmentation Reagents: Ambion, AM8740。
- (35) Glycogen RNA grade: Themmo, R0551。
- (36) Dynabeads protein A/G: Life technologies, 10002D。
- (37) RNeasy MinElute Cleanup Kit: Qiagen, 74204。
- (38) RNase-free water: Thermo Fisher, 10977-015。
- (39) Streptavidin Magnrtic Beads: NEB, S1420S。
- (40) DFO: MedChemExpress, 138-14-7。
- (41) FAC: MedChemExpress, HY-B1645。
- (42) Luciferase assay 试剂盒: Promega, E1910。

1.3 耗材

- (1) 各型号离心管、Eppendorf 管、枪头, 购自 Axygen 公司。
- (2) Real-time PCR 所用 96 孔板, 96 孔板封口膜, 购自 ABI 公司。
- (3) 载玻片、盖玻片, 购自西雅金桥公司。
- (4) Tissue-Tek 塑料包埋模块, 购自北京海德创业公司。
- (5) PVDF 膜购自美国 Millipore 公司, 转膜滤纸, 购自 Whatman 公司。

1.4 抗体

抗体名称	抗体公司	抗体货号	抗体用途
Anti-NeuN	Millipore	MAB377	IHC

Anti-GFAP	SIGMA	G6171	IHC
Anti-ALKBH5	SIGMA	HPA007196	WB
Anti-ALKBH5	MBL	RN122PW	RIP
Anti-MAP2	Abcam	Ab32454	IHC
Anti-Calbindin-D28K	SIGMA	C9848	IHC
Anti-GAPDH	CST	2118S	WB
Anti-Rabbit IgG	MBL	PM035	RIP
Anti-m ⁶ A	Synaptic Systems	202003	m ⁶ A-IP
Anti-FTH1	Abcam	Ab65080	WB
Anti-IRP2	Abcam	Ab129069	WB/RIP
Anti-IRP1	Abcam	Ab183721	WB/RIP

1.5 引物

小鼠模型基因型鉴定引物	
mouse <i>Alkbh5</i> ^{-/-}	forward: 5'-AATCTGACGGAGTATCAAAGACTGGAAAAGG-3'
	reverse: 5'-AAGGAGACCACATTCATAGAACTCGAACTCC-3'
mouse WT	forward: 5'-CGATCCGTGGTAAATCTG-3'
	reverse: 5'-TAAGTAAGTGCCTGAATGG-3'
qPCR引物	
<i>FTH1</i>	forward: 5'-ACGTTCTTCGCCGAGAGTC-3'
	reverse: 5'-AGGTTGATCTGGCGGTTGATG-3'
5'UTR- <i>FTH1</i> Luciferase	forward: 5'-CCCGGCGCTCGTTCC-3'
	reverse: 5'-CGCCGGGCCTTTCTTTATGT-3'
<i>IREB2</i> 内源	forward: 5'-ATGGAGCAGCAGATAGTCCC-3'
	reverse: 5'-AGGTCTCTTCCACAACACACT-3'
<i>IREB2</i> 外源	forward: 5'-TCAGCGTGATTGCTTCGTTTG-3'
	reverse: 5'-AACAACAGATGGCTGGCAAC-3'

FTL	forward: 5'-CAGTGTTTGGACGGAACAGA-3'
	reverse: 5'-CCTCCACGTCGGTGGGAATAA-3'
TFRC	forward: 5'-TCTTCTGTGTGGCAGTTCAGA-3'
	reverse: 5'-CATCTACTTGCCGAGCCAGG-3'
FBXL5	forward: 5'-TCCAACAACAACGATTTCCGT-3'
	reverse: 5'-CCCTTTTCAAAGAGGCTAAGCA-3'

1.6 主要仪器设备

仪器名称	生产厂家
PowerPac Basic 基础电源	美国 Biorad 公司
PowerPac™ HC 高电流电泳仪电源	美国 Biorad 公司
Mini-PROTEAN® 电泳仪及附件	美国 Biorad 公司
Mini Trans-Blot®湿法转膜仪及附件	美国 Biorad 公司
高速冷冻离心机	美国 Thermo 公司
高速常温离心机	
酶标仪	美国 BIO-RAD680 型全自动酶标仪
Leica DM3000 显微镜	中国徕卡仪器有限公司
3D-Histech 全信息数字切片扫描仪	匈牙利 Pannoramic 公司
凝胶成像仪 UVI	中国 Tanon 公司
ImageQuant LAS4000 凝胶成像系统	美国 GE Healthcare 公司
TS-1 型摇床	中国其林贝尔仪器制造有限公司
迷你型旋涡混合器	美国 Gilson 公司
恒温水浴箱	中国长风仪器仪表公司
金属浴仪器	美国 Thermo 公司
PH 计	美国 METTLER-TOLEDO 公司
电子天平	美国 METTLER-TOLEDO 公司
RH basic 2 经济型加热磁力搅拌器	德国 IKA 公司
移液器	美国 Gilson 公司
G50 组织研磨器金属研磨器、研磨棒	中国卡由迪公司
1.5ml EP 管铅块架	中国卡由迪公司
梯度 PCR 仪	美国 BIO-RAD 公司

StepOnePlus Real Time PCR 仪	美国 Applied biosystems 公司
NanoPhotometer-P360 超微量分光光度计	德国 IMPL&EN 公司
4℃、-20℃、-40℃低温冰箱	中国海尔公司
-80℃超低温冰箱	美国 Thermo 公司
微波炉（800W）	中国格兰仕公司
烘干箱	美国 Thermo 公司
超纯水制备器	美国 Millipore 公司

1.7 主要溶液的配制

(1) 琼脂糖凝胶电泳用液

- a) 50×Tris-乙酸 (TAE): 242 g Tris 碱, 57.1 ml HAC, 100 ml 0.5 mol/L EDTA pH=8.0, 加水至 1 L。
- b) 溴化乙锭 (EB): 100 ml 去离子水中溶解 1 g 溴化乙锭, 磁力搅拌数小时, 终浓度为 10 mg/ml。

(2) SDS-PAGE 蛋白电泳主要试剂

a) 裂解液 (RIPA)

按下表配好后, 10 ml/支分装, -20℃保存, 用前半小时内加入蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂。

贮存液	终浓度
10% NP40/IPEGAL	1%
1 M Tris-HCl (pH 8.0)	50 mM
5 M NaCl	150 mM
1 M DTT	1 mM
10×蛋白酶抑制剂	1×
10×磷酸酶抑制剂	1×

- b) 5×SDS Buffer 电泳液 (pH 8.3): 称取 94 g 甘氨酸; 15.1 g Tris 碱; 5 g SDS, 用 NaOH 调节 pH 至 8.3, 加蒸馏水定容至 1L, 4 度冰箱保存。
- c) 封闭液 (5%脱脂奶粉, 现用现配): 脱脂奶粉 1.0 g 溶于 20 ml 的 1×TBST 工作液中。
- d) Stripping Buffer (pH 2.2): 称取甘氨酸 7.5 g; SDS 0.5 g; 10%Tween-20 50 ml, 加去离子水 400 ml 充分溶解, 用 HCl、NaOH 调 pH=2.2, 然后加蒸馏水定容至 500 ml。
- e) 10×TBS 缓冲液: 30.0 g Tris 碱, 80.0 g NaCl, 2.0 g KCl 溶解于 800 ml 蒸馏水, 用 HCl 调节 pH 值至 7.4, 加蒸馏水定容至 1 L, 室温保存。1×TBST 溶液即用 100 ml 10×TBS + 10 ml 10% Tween-20 + 890 ml 蒸馏水配制成 1 L 工作液。

(3) 组织化学常用溶液配制

a) 4%多聚甲醛：取 20 g 多聚甲醛溶于 400 ml 0.01 M PBS (pH = 7.4)，磁力搅拌器加热搅拌，温度控制在 60℃ 以下，滴加 NaOH (1 N 或 0.1 N)，最后调 pH 值 7.4 并定容到 500 ml，现用现配，4℃ 保存。

b) 2.5%山羊血清封闭液

工作液	10 ml
10% Triton X-100	100 μl
10% NP-40	500 μl
山羊血清原液	250 μl
1×PBS	9.15 ml

c) 0.5%山羊血清抗体稀释液

工作液	10 ml
10% Triton X-100	100 μl
10% NP-40	500 μl
山羊血清原液	50 μl
1×PBS	9.35 ml

d) 1%盐酸酒精：浓盐酸 1 ml，75%乙醇 99 ml。

e) 50×枸橼酸盐缓冲液 (pH 6.0)：称量 150 g 柠檬酸钠和 20 g 的柠檬酸盐，最后定容到 1 L (pH 6.0)，充分溶解，于室温条件下保存。待使用时，用蒸馏水稀释至 1×即可。

(4) 小鼠取材麻醉剂：称量三溴乙醇粉末 25 g，加入 15.5 ml 叔戊醇后避光溶解至少 12 个小时，于 4℃ 条件下避光保存。待使用时，用生理盐水稀释 80 倍即可。

(5) 10 mg/ml 蛋白酶 K 溶液：称量蛋白酶 K 粉末 100 mg，加入 1 ml 0.1M Tris (pH 8.0) 和 1 ml 0.05M EDTA，最后定容到 10 ml 充分溶解，于 4℃ 条件下保存。

1.8 siRNA 序列信息

敲低ALKBH5的siRNA

siALKBH5-1#	forward: 5'-ACAAGUACUUCUUCGGCGA-3'
	reverse: 5'-UCGCCGAAGAAGUACUUGU-3'
	forward: 5'-GCUGCAAGUCCAGUUCAA-3'

siALKBH5-2#	reverse: 5'-UUGAACUGGAACUUGCAGC-3'
	forward: 5'-GCGCCGUCAUCAACGACUA-3'
siALKBH5-3#	reverse: 5'-UAGUCGUUGAUGACGGCGC-3'

1.9 质粒

质粒名称	质粒来源
pGL3-h-FTH1-5'UTR-WT	上海生工公司
pGL3-h-FTH1-5'UTR-dIRE	上海生工公司
pGL3h-FTH1-5'UTR-Mut1	上海生工公司
pGL3-h-FTH1-5'UTR-Mut2	上海生工公司
pGL3-h-FTH1-5'UTR-Mut1+2	上海生工公司
pGL3-h-FTH1-5'UTR-dIRE-Mut1+2	上海生工公司

2. 方法

2.1 小鼠基因型的鉴定

取 0.2~0.3 厘米长鼠尾或脚趾置于 100 μl Tail Buffer 中，加入 3 μl 蛋白酶 K 溶液，在 55℃金属浴中 500 rpm/min 消化过夜。次日，将金属浴调整为 85℃、200 rpm/min 继续消化 45 min 使蛋白酶 K 变性。常温离心机中 13300 rpm/min 离心 5 min，吸取上清液进行 PCR 反应。PCR 反应条件如下：

Mouse WT 引物程序：

94℃	2 min	
94℃	30 s	} ×35
56℃	30 s	
68℃	30 s	
68℃	8 min	

Mouse *Alkbh5*^{-/-}引物程序：

94℃	2 min	
94℃	30 s	} ×35
66℃	30 s	
68℃	30 s	
10℃	8 min	

将 PCR 产物进行 2%琼脂糖凝胶电泳，电压为 150 V，电泳时间为 30 min，随后在 DNA 凝胶成像仪中分析结果。

2.2 小鼠平衡木实验

将小鼠放在平衡木上进行行走训练,训练其能在平衡木上较稳定地行走,每天训练 2 次,每次时间间隔至少 30 分钟,训练 3 天,然后进行测试。全程视频记录小鼠走过平衡木时的状态,观察小鼠在行走过程中有无身体倾斜、步态不稳、后爪频繁跌落及后爪抱杆等异常现象,同时统计在一次行走中通过平衡木抵达平台所用的时间作为评价指标。

2.3 小鼠步态分析实验

将小鼠前爪涂有红色染料,后爪涂有蓝色染料,放在白纸上训练其能较稳定地行走,每天训练两次,每次时间间隔至少 30 min,训练两天。然后统计小鼠行走过程中,后爪是否能较为稳定地落在前爪走过的印记上,进行定量分析,统计前后爪印记的距离,从而评价小鼠的步态稳定性。

2.4 HE 染色

- (1) 组织固定、梯度酒精脱水、二甲苯透明、浸蜡、包埋。
- (2) 常规石蜡切片,厚度 3~5 μm 。
- (3) 石蜡切片至于 60℃烤箱烘烤 2 h。
- (4) 脱蜡:石蜡切片置于二甲苯(I、II)中各浸泡 15 min。
- (5) 水化:100%乙醇(I、II)中各浸泡 10 min;95%乙醇(I、II)中各浸泡 10 min;90%乙醇中浸泡 10 min;80%乙醇中浸泡 5 min;70%乙醇中浸泡 5 min。
- (6) 苏木素染色 10~20 s,自来水冲洗 2 min。
- (7) 1%盐酸酒精分化 1~5 s。
- (8) 自来水返蓝 2 min。
- (9) 伊红(酒精溶性)染色 1~5 s。
- (10) 梯度酒精脱水:80%乙醇中浸泡 30 s;95%乙醇(I、II)中各浸泡 30 s;100%乙醇 I 中浸泡 1 min;100%乙醇 II 中浸泡 2 min。
- (11) 透明:二甲苯 I、II 各透明 10 min。
- (12) 中性树胶封片,37℃烤箱过夜干燥,显微镜下拍照观察。

2.5 免疫组织化学染色

- (1) 组织固定、梯度酒精脱水、二甲苯透明、浸蜡、包埋。
- (2) 常规石蜡切片,厚度 3~5 μm 。
- (3) 石蜡切片至于 60℃烤箱烘烤 2 h。
- (4) 脱蜡:石蜡切片置于二甲苯(I、II)中各浸泡 15 min。
- (5) 水化:100%乙醇(I、II)中各浸泡 10 min;95%乙醇(I、II)中各浸泡 10 min;90%乙醇中浸泡 10 min;80%乙醇中浸泡 5 min;70%乙醇中浸泡 5 min。

- (6) 1×PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min。
- (7) 内源性过氧化氢酶失活: 3%过氧化氢溶液室温孵育 10 min。
- (8) 1×PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min。
- (9) 抗原修复。
- (10) 1×PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min。
- (11) 封闭: 2.5%山羊血清室温封闭至少 30 min。
- (12) 一抗孵育: 按比例使用抗体稀释液稀释一抗后, 滴加于组织上, 放置湿盒中 4℃ 孵育过夜。
- (13) 1×PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min。
- (14) 二抗孵育: 湿盒中 37℃孵育 60 min。
- (15) 1×PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min。
- (16) DAB 显色。
- (17) 苏木素染色 10~20 s, 自来水冲洗。
- (18) 1%盐酸酒精分化 1~5 s。
- (19) 自来水返蓝 2 min。
- (20) 梯度酒精脱水: 80%乙醇中浸泡 30 s; 95%乙醇 (I、II) 中各浸泡 30 s; 100%乙醇 I 中浸泡 1 min; 100%乙醇 II 中浸泡 2 min。
- (21) 透明: 二甲苯 I、II 各透明 5 min。
- (22) 中性树胶封片, 37℃烤箱过夜干燥, 显微镜下观察。

2.6 RNA 的提取及实时荧光定量 PCR (Quantitative Real-time PCR, RT-qPCR)

2.6.1 Total RNA 的提取

- (1) 细胞中加入 Trizol 后, 室温摇床颠倒混匀 10 min, 使其充分裂解。
- (2) 4℃ 13300 rpm/min 离心 5 min, 弃沉淀, 每毫升 Trizol 中加入 200 μl 氯仿, 上下颠倒混匀 10 min, 冰上静置 15 min。
- (3) 4℃ 13300 rpm/min 离心 20 min。
- (4) 吸取上层水相至另一新的 1.5 ml 离心管中。
- (5) 加入与吸取的水相等体积的约 600 μl 异丙醇, 颠倒混匀, 室温静置 10 min。
- (6) 4℃ 13300 rpm/min 离心 30 min, 弃上清, RNA 已沉于管底。
- (7) 加入 1 ml 75%乙醇溶液, 颠倒振荡离心管, 悬浮 RNA 沉淀。
- (8) 洗涤 RNA, 4℃ 13300 /min 离心 5 min, 弃上清, 重复一次。
- (9) 室温晾干 5~10 min。用 20~40 μl RNAase free H₂O 溶解 RNA, 振荡 1 min, 离心 5 min, 重复一次, 然后迅速置于冰上。
- (10) 使用 NanoPhotometer 测定 RNA 的浓度, 记录 A260/A280 及 A260/A230, 同时

用 0.8%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 是否降解。

2.6.2 cDNA 的合成

按照 ReverTra Ace qPCR RT Kit (TOYOBO-FS301) 说明书进行

(1) 0.5μg RNA 的变性：

将 RNA 用 RNAase free H₂O 补齐至 6 μl，在 65℃条件下温浴 5 min 后，立即放于冰上冷却。

(2) 去除 Genome DNA 反应：制备 4×DNA Master Mix（440 μl DNA Master + 8.8 μl gDNA Remover），37℃条件下温浴 5 min 后，迅速至于冰上。

Nuclear-free H ₂ O	up to 8 μl
4×DNA Master Mix	2.0 μl
RNA	0.5 μg

(3) 逆转录反应：

Nuclear-free H ₂ O	up to 10 μl
5×RT Master Mix	2.0 μl
RNA	0.5 μg

- a) 37℃条件下，进行 15 min 的逆转录反应。
- b) 98℃条件下，进行 5 min 的酶失活反应。
- c) 反应结束之后，cDNA 保存于-20℃条件下。在进行 RT-qPCR 反应时，将 cDNA 1：10~1：20 稀释后作为反应模板添加。

2.6.3 RT-qPCR 反应

参照 SYBR Green Realtime PCR Master Mix 说明书进行

(1) 反应体系如下：

SYBR Green Realtime PCR Master Mix	5 μl
上游引物	0.5 μl
下游引物	0.5 μl
ROX	0.2 μl
cDNA 模板	1 μl
蒸馏水	2.8 μl

- (2) 上样时，每个反应设 3 个复孔。加样完成后，用专用封口膜将 96 孔板封口。将上样板在 4℃平板离心机中离心，500 rpm/min，5 分钟，使反应液全部沉于底部。
- (3) 将样品放入 ABI StepOne Real-Time PCR Detection System 中进行 Comparative CT (ΔΔCT) 反应，反应采用二步法，反应条件如下：

95℃	30 s	} ×40 循环
95℃	5 s	
60℃	30 s	
95℃	15 s	
60℃	60 s	
95℃	15 s	

(4) 结果分析：反应结束后观察溶解曲线以检测引物特异性良好后，进行 PCR 定量时制作标准曲线等（ $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法或直接用 RQ 值，或以内参为标准的 $2^{-\Delta CT}$ 法），通过与内参 GAPDH 对比检测不同分组中目的基因 mRNA 的表达情况。

2.7 组织、细胞蛋白的提取、浓度测定及 Western-blot 分析

2.7.1 组织、细胞蛋白的提取

冻存的组织取出后，放入无菌的 EP 管中，将适量预冷的裂解液 (RIPA) 加入组织中，用研磨棒或者电动研磨器在冰上研磨组织至无肉眼可见的组织块，冰浴 30 min，期间充分振荡 4~5 次，使组织充分裂解。4℃，13300 rpm/min 离心 20 min，收集上清，-80℃分装冻存。细胞中蛋白的提取则是直接将细胞重悬于适量预冷的 RIPA 裂解液中，冰浴 30 min，后续步骤与组织蛋白提取相一致。

2.7.2 BCA 法蛋白定量

- (1) BCA 工作液：根据标准品和样品数量，按 A 试剂和 B 试剂体积比 50：1 配制成 BCA 工作液，充分混匀。
- (2) 配制 BSA 标准品：取 10 μl 10 mg/ml BSA 标准品用 PBS 稀释至 200 μl（待测样品一般用 PBS 以 1：20 稀释），使终浓度为 0.5 mg/ml。将 BSA 标准品按 0，2，4，8，16，20 μl 加到 96 孔板中，加 1×PBS 补足到 20 μl。如下表：

BSA（0.5 mg/ml）对应体积（μl）	0	2	4	8	16	20
PBS 对应体积（μl）	20	18	16	12	4	0
对应标准蛋白浓度（μg/ml）	0	50	100	200	400	500

- (3) 稀释后的待测样品加 20 μl 到 96 孔板中。
- (4) 各孔加入 200 μl BCA 工作液，37℃放置 25~30 min。酶标仪测定样品吸光值，根据标准 BSA 浓度及吸光值得到标准曲线 $y=ax+b$ （x 为蛋白浓度，y 为 A562，a、b 为常数），根据标准曲线计算出蛋白浓度。

2.7.3 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳

- (1) 根据“雅酶 PAGE 凝胶快速制备试剂盒”操作说明书将玻璃板安装至制胶架上。
取等体积下层胶溶液和下层胶缓冲液, 各 4.0 ml, 同时加入 80 μ l 的改良型促凝剂, 混匀。混合溶液注入制胶玻璃板中, 加入适量水覆盖于下层胶之上。
- (2) 待下层胶凝固后 (约 15 min), 倒去上层水或醇; 取等体积上层胶溶液和彩色上层胶缓冲液, 各 1.0 ml, 同时加入 20 μ l 的改良型促凝剂, 混匀;
- (3) 将 2 的混合溶液注入制胶玻璃板中, 插入梳齿; 待上层胶凝固后 (约 15 min), 拔去梳齿即可用于电泳。
- (4) 各组取等量蛋白提取液与 5 $\times$ SDS 混合均匀, 95 $^{\circ}$ C 金属浴 5 min 使蛋白变性, 然后 12000 rpm/min, 离心 5 min。用 20 μ l 加样枪按预定顺序加样于分离胶的凝胶加样孔内, 总蛋白量在 40~100 μ g /孔。
- (5) 80 V 30 min 稳压电泳至溴酚蓝前缘进入分离胶, 然后 100 V 稳压电泳直至溴酚蓝到达分离胶的底部, 停止电泳取出凝胶, 共约 2 h。

2.7.4 湿法转膜

制作湿法转移的凝胶“三明治”, 夹子黑色面朝下, 依次放海绵、滤纸、凝胶、PVDF 膜、滤纸和海绵。将夹子黑色面朝向转膜槽黑色面, 4 $^{\circ}$ C 转膜一般恒压“100v, 2 h”。

2.7.5 免疫印迹检测

- (1) 封闭: 转膜完毕, 取出 PVDF 膜, 置于 1 $\times$ TBST 缓冲液中漂洗, 再将 PVDF 膜放入含 5%脱脂奶粉的 TBST 封闭液中, 4 $^{\circ}$ C 过夜。
- (2) 一抗结合: 将封闭后的 PVDF 膜置于适当比例的一抗稀释液中, 4 $^{\circ}$ C 摇床过夜。
- (3) 洗膜: 取出 PVDF 膜置于适量 1 $\times$ TBST 缓冲液的平皿中, 室温洗膜, 每次 5 min, 共 3 次。
- (4) 二抗结合: 将 PVDF 膜置于辣根过氧化物酶标记二抗溶液中, 其按 1: 10000 比例在含 5%脱脂奶粉的 TBST 溶剂中稀释, 于室温摇床反应 1 h。取出 PVDF 膜放入有适量 1 $\times$ TBST 缓冲液的平皿中, 室温洗膜, 每次 5 min, 共 3 次。

2.7.6 化学发光检测

- (1) 配制 ECL 工作液: 等体积混合适量的 ECL A 液和 B 液。
- (2) 把滴加过 ECL 工作液的膜用 ImageQuant LAS4000 凝胶成像系统自动成像。

2.8 RNA 免疫沉淀 (RNA Immunoprecipitation, RIP)

2.8.1 溶液配制

- (1) Non-denaturing lysis buffer

Stock con.	Reagents	Final con.	10 ml
1 M	Tris-HCl (PH=7.4)	50 mM	500 μl
5 M	NaCl	250 mM	500 μl
10%	Triton X-100	0.5%	500 μl
1M	DTT	1 mM	10 μl
100 mM	EDTA	2 mM	200 μl
500 mM	NaF	1 mM	20 μl
500×	Protease inhibitor cocktail	1×	20 μl
40 U/ml	RNasin Ribonuclease Inhibitor	0.04 U/ml	10 μl
	ddH ₂ O		8.24 ml

(2) Low salt TBS

Stock con.	Reagents	Final con.	10 ml
1 M	Tris-HCl (PH=7.4)	50 mM	500 μl
5 M	NaCl	250 mM	500 μl
1 M	DTT	1 mM	10 μl
500 mM	NaF	1 mM	20 μl
500×	Protease inhibitor cocktail	1×	20 μl
40 U/ml	RNasin Ribonuclease Inhibitor	0.04 U/ml	10 μl
	ddH ₂ O		8.94 ml

(3) High salt TBS

Stock con.	Reagents	Final con.	10 ml
1 M	Tris-HCl (PH=7.4)	50 mM	500 μl
5 M	NaCl	250 mM	600 μl
1 M	DTT	1 mM	10 μl
500 mM	NaF	1 mM	20 μl
500×	Protease inhibitor cocktail	1×	20 μl
40 U/ml	RNasin Ribonuclease Inhibitor	0.04 U/ml	10 μl
	ddH ₂ O		8.84 ml

(4) 2×Proteinase K buffer

Stock con.	Reagents	Final con.	1 ml
1 M	Tris-HCl (PH=7.4)	100 mM	100 μl
5 M	NaCl	150 mM	30 μl

100 mM	EDTA	1 mM	10 μl
500 mM	NaF	12.5 mM	25 μl
10%	SDS	2%	200 μl
DEPCH ₂ O			645 μl

2.8.2 细胞蛋白的提取

在新鲜或冻存的细胞中加入适量预冷的 non-denaturing lysis buffer, 冰浴 30 min, 期间充分振荡 4 次, 使细胞充分裂解。4℃, 13300 rpm/min 离心 20 min, 收集上清于新 EP 管中, 测浓度, 留取 100 ug 蛋白作为 input。

2.8.3 Preclear 蛋白

- (1) 取 protein-A beads (200 μl/EP 管), 用 low salt TBS 洗 3 次, 每次 1 ml。
- (2) 加 50~60 μl 洗过的 beads 到蛋白原液中, 冰上孵育 30 min。
- (3) 在磁力架上将 beads 洗脱, 留蛋白原液进行下一步实验。

2.8.4 封闭 beads

- (1) 将 beads 按每管 140~150 μl 分开, 加入 1 ml lysis buffer、25 μl 10 mg/ml BSA, 4℃摇床孵育 1 小时。
- (2) 用 low salt TBS 洗 3 次, 每次 1 ml。

2.8.5 免疫沉淀, Immunoprecipitation

- (1) 将留取的蛋白原液用 lysis buffer 稀释至浓度为 4 mg/ml 左右。
- (2) 在上述蛋白中加入 anti-ALKBH5 抗体, 4℃摇床孵育 5 小时。
- (3) 将封闭好的 beads 加入(2)的反应体系中, 4℃摇床孵育过夜。
- (4) 将 beads 在磁力架上洗脱, 依次用 low salt TBS 洗 2 次, 用 high salt TBS 洗 2 次。

2.8.6 蛋白酶 K 处理

2×Proteinase K buffer 现用现配, 估计得到的 beads 的体积, 加入等体积的 Proteinase K buffer, 再加入蛋白酶 K 至其终浓度为 1.2 mg/ml, 55℃金属浴孵育 30 min。

2.8.7 RNA 的提取

同 2.4.1 中的实验步骤。

2.9 RNA 沉降实验, RNA pull down

2.9.1 探针的构建:

(1) 设计原则: 根据自己的需求来委托公司合成 (带有特殊修饰的 oligo-RNA 送至公司合成), 基于本实验采用的是 biotin-streptomycin 纯化方式, 因此在其 5'端引入了 biotin 标记。

ss-FTH1-WT 探针序列为:

GGGGUUUCCUGCUUCAACAGUGCUUGGACGGAACCCGGCG; ss-FTH1-M2-m⁶A 探针序列在红色标记第 33 个碱基处进行 m⁶A 修饰:

GGGGUUUCCUGCUUCAACAGUGCUUGGACGGAACCCGGCG。

(2) 具体详情见 Takara 官网:

<https://www.takarabiomed.com.cn/Product.aspx?m=20141215103055560178#p>)

2.9.2 蛋白提取:

(1) 收集足够量的新鲜的细胞于 1.5 ml 离心管中, 1×PBS 清洗后, 重悬于 1 ml lysis buffer 裂解液中。

(2) 冰上裂解 30 min, 期间每隔 6~7 min 振荡一次。

(3) 4℃离心, 13300 rpm/min, 40 min。

(4) 将上清转移至另一新的 15 ml 离心管中, 冰上放置。

(5) BCA 法测蛋白浓度。

(6) 留适量蛋白作为 Western Blot 和 IP 的 input。

2.9.3 RNA 与 Streptavidin Magnetic Beads 结合:

(1) 使用 100~200 pmol 的 RNA 对应于 200~400 μg 的 beads。200 pmol 的 RNA 对应于 100 μl 的 beads。

(2) 试剂盒中提供阳性和阴性 RNA 对照, 可以验证 RNA-oligo 的特异性。

(3) 200 μl beads 充分混悬加入 1.5 ml EP 管中, 放在磁力架上, 弃上清, 用等体积的 20 mM Tris (pH =7.5)上下吹打或 vortex 来重悬 beads。置于磁力架上, 弃上清, 重复两次, 均分为 2 份, 每份各 100 μl beads。

(4) 弃上清, 加入 600 μl 的 RNA Capture Buffer, 上下吹打或 vortex 来重悬 beads, 加入 200 pmol 标记的 RNA, 轻柔的吹打混匀, 摇床室温 20~30 rpm/min 孵育 30~45 min。

2.9.4 蛋白与 RNA 结合

- (1) 将 RNA-beads 复合物放在磁力架上, 去掉上清, 加入等体积的 20 mM Tris (pH 7.5) 上下吹打重悬 beads。置于磁力架上, 弃上清, 重复两次。
- (2) 用 500 μ l 的 Protein-RNA Binding Buffer 混悬 beads 复合物。
- (3) 将管置于磁力架上, 弃上清, 加入 300 μ l 配置好的 protein-RNA Binding Buffer 与约 1 mg 蛋白的混合液, 轻柔吹打混匀, 4 $^{\circ}$ C 摇床 20~30 rpm/min, 过夜孵育。

2.9.5 RNA-Binding Protein 复合物的洗脱

- (1) 将管置于磁力架上, 保留上清。用等体积的 wash buffer, 重悬 beads, 洗三次。
- (2) 弃上清后, 加入 50 μ l 的 Elution Buffer, vortex 混匀。37 $^{\circ}$ C 孵育 15~30 min, 500 rpm/min, 将管置于磁力架上, 上清液为获得的蛋白。
- (3) 做 WB 的情况下, 直接弃上清后加 50 μ l 的 lysis buffer 和 12 μ l 5 $\times$ SDS Loading buffer, 98 $^{\circ}$ C 孵育 5 min, 使蛋白变性; 4 $^{\circ}$ C 13300 rpm/min, 5 min, 将上清 (约 50~60 μ l) 转移至一新的 EP 管中, 对照反应每孔上样 20~30 μ l。

2.10 RNA stability 实验

- (1) 提前一天铺细胞 (两个 10 cm 培养皿), 待细胞密度至 50%~60% 进行转染 siRNA。在转染前 2 小时, 更换新鲜的完全培养基 (含 10% 血清的 MEM 培养基, 无抗生素)。
- (2) EP 管中加入 siRNA, 并加入相应体积的 Opti-MEM 稀释混合均匀, 调整 siRNA 浓度 20 nM, 室温下温育 5 分钟。加入 Rfect 转染试剂, 共同孵育 20 min, 加入 10 cm 培养皿中。
- (3) siRNA 转染 24 小时后, 对 U251 细胞进行胰蛋白酶处理, 并重新接种到 6 孔板中, 一式两份, 每个检测时间点保证有 4 个复孔。细胞密度要保证在检测开始时能达到 50~70% 的密度。
- (4) 开始放线菌素 D 处理时, 先收集 0 小时时间点的细胞
- (5) 在其他检测时间点的细胞中添加放线菌素 D (#A9415, Sigma), 以达到 5 μ g/ml 的最终浓度。
- (6) 在处理 3 小时、6 小时和 9 小时, 收集细胞并进行 RT-qPCR 用于目标基因的定量分析。18S 用作内参阴性对照。使用以下公式计算 RNA 的降解率: $N_t/N_0=e^{-kt}$, 其中 N_t 代表放线菌素 D 处理 t 小时之后, RNA 的相对表达量, N_0 代表放线菌素处理 0 小时的 RNA 的相对表达量, t 代表放线菌素处理的时间。

2.11 双荧光素酶报告实验, Dual luciferase assay

- (1) 质粒载体的选择: 选用 pGL3 Luciferase Reporter Vectors, 以 Promega 公司为例, 选用载体 pGL3-Promoter Vector: 该载体有 SV40 promoter 但无 enhancer, 其用于验

- 证 FTH1-5'UTR 的功能验证：将 5'UTR 构建到载体的启动子下游与 luciferase 的 CDS 区上游的区域，通过报告基因的荧光强度判断 5'UTR 对编码基因的表达式的影响。
- (2) 质粒的构建：根据实验目的确定所需要的突变位点位置，可通过委托公司进行质粒构建，公司备选：上海生工。
- (3) 质粒转染：转染前 1 天进行细胞铺板，将需要进行转染的细胞铺在 6 孔板中，细胞铺板密度约为 60%。铺板 24 h 后，进行转染，将包含突变位点的质粒转入细胞，同时转染带有海肾荧光素酶的质粒，质粒的添加比例如下：萤火虫荧光素酶质粒:海肾荧光素酶质粒=19:1。
- (4) 使用 Dual-Luciferase Reporter Assay System 试剂盒收集、裂解细胞，使用多功能酶标仪 LB942 reader 进行生物荧光检测。
- (5) 取试剂盒中的 5×Passive lysis buffer (PLB)，以双蒸水稀释为 1×，6 孔板每孔加 500 μl。
- (6) 去除 6 孔板中的培养基，以 PBS 洗 1 遍。
- (7) 加入 1× PLB，后避光，用摇床以中速摇 15~20 min。
- (8) 将细胞吹打下来，并收集在 1.5 ml EP 管中，4℃，13300 rpm/min 离心 5 min。
- (9) 留取上清，可直接进行后续的检测；若不立即实验，可保存于-80℃冰箱。

2.12 利用 total RNA 进行 m⁶A-IP 及建库测序

2.12.1 Total RNA 打断及 Total RNA-m⁶A-IP

方法见“total RNA m⁶A-IP-qPCR”。

2.12.2 文库构建

利用 SMARTer® Stranded Total RNA-seq Kit v2-Pico Input Mammalian User Manual 试剂盒对 IP 与 Input 样品进行 cDNA 文库构建，具体操作步骤如下：

2.12.2.1 第一链 cDNA 合成

- (1) 在冰上混合以下组分：

成分	体积(μl)
RNA(0.25~10ng)	1~8 μl
SMART Pico Oligos Mix	1 μl
Nuclease-Free Water	0~7 μl
Total volume per reaction	9 μl

- (2) 72℃孵育 3 min，然后将样品放在冰上孵育 2 min。
- (3) 按如下顺序在冰上配置一链混合物：

成分	体积(μl)
5×First-Strand Buffer(Rnase-Free)	4 μl
Template Switching Oligo Mix(TSO mix)	4.5 μl
Rnase Inhibitor	0.5 μl
SMARTScribe Reverse Transcriptase	2 μl
Total volume per reaction	11 μl

- (4) 每反应管中加入 11 μl 的一链混合物，手指轻弹混合管中成分，轻微离心至管底。
- (5) 使用以下程序在预热的 PCR 仪器中孵育：

温度	时间
42℃	90 min
70℃	10 min
4℃	forever

2.12.2.2: PCR1-添加 Illumina Adapters 以及 Indexes

- (1) 按如下顺序在冰上配置 PCR Master Mix，混合均匀，轻微离心至管底：

成分	体积
Nuclease-Free Water	2 μl
2×SeqAmp PCR Buffer	25 μl
SeqAmp DNA Polymerase	1 μl
Total volume per reaction	28 μl

- (2) 在上一步骤(5)中的每个样本中加入 28 μl PCR Master Mix。
- (3) 在每个样品中加入正向和反向 PCR Primer HT 各 1 μl。手指轻弹混合管中成分，轻微离心至管底。
- (4) 使用以下程序在预热的 PCR 仪器中孵育：

94℃	1 min
5 cycles:	
98℃	15 sec
55℃	15 sec
68℃	30 sec
68℃	2 min
4℃	forever

2.12.2.3: PCR1-添加 Illumina Adapters 以及 Indexes

- (1) AMPure 磁珠在使用前室温平衡约 30 min。在每个样品中加入 45 μl 的 AMPure 磁珠。
- (2) 室温孵育 8 min，使 DNA 与磁珠结合。
- (3) 轻微离心至管底，磁力架上放置 5 min 或更长时间，直到溶液澄清。
- (4) 小心弃上清液，在每个样品中小心加入 200 μl 现配的 80%乙醇，以洗去污染物。静置 30 s，小心弃上清液。
- (5) 重复步骤(4)一次。
- (6) 轻微离心以收集每个管底剩余的乙醇，磁力架上静置 30 s 后，小心地移除剩余的所有乙醇。
- (7) 打开 EP 管，室温下干燥约 3~5 min。
- (8) 加入 52 μl 的 Nuclease-Free Water，吹打混匀磁珠。
- (9) 室温孵育 5 min 以溶解 DNA，轻微离心至管底。
- (10) 磁力架上静置 1 min 或更长时间，直到溶液澄清。
- (11) 将每个样品的 50 μl 上清液放入新 0.2ml 管中。
- (12) 重复步骤 (1)-(7)，第二次清洗时步骤(7)大约 1~2 min 干燥。
- (13) 加入 18 μl 的 Nuclease-Free Water，吹打混匀磁珠。
- (14) 室温孵育 5 min 以溶解 DNA，轻微离心至管底。
- (15) 磁力架上静置 1 min 或更长时间，直到溶液澄清。
- (16) 将每个样品的 16 μl 上清液置于新的 0.2 ml 管中。

2.12.2.4: 用 ZapR 和 r-Probes 去 rRNA 的 cDNA

- (1) 室温解冻 R-Probes、ZapR 和 ZapR buffer，随后将解冻后的 R-Probes 和 ZapR 立即放在冰上，但 ZapR buffer 仍保持室温。
- (2) 将足量反应的 R-Probes（1 μl/反应）72℃的预热的 PCR 仪中放置 2 min 并逐渐恢复至 4℃。
- (3) 将 R-Probes 在 4℃放置至少 2 min，但不超过 10 min，然后在下一步使用。
- (4) 按如下顺序在冰上配置 Master Mix，轻微涡旋混合，轻微离心至管底：

成分	体积
10× ZapR Buffer	2
R-Probes	1
ZapR	1.25
Total volume per reaction	4.25

(5) 将 4.25 μ l 的 Master Mix 添加到上步骤 (16) 中纯化的 RNA-seq 文库中，使总体积为 20.25 μ l，轻微涡旋混合，轻微离心至管底。

(6) 使用以下程序在预热的 PCR 仪器中孵育：

温度	时间
37℃	60 min
72℃	10 min
4℃	forever

2.12.2.5: PCR2-最终 RNA-Seq 文库扩增

(1) 按如下顺序在冰上配置 PCR Master Mix，混合均匀，轻微离心至管底：

成分	体积
Nuclease-Free Water	26
2×SeqAmp PCR Buffer	50
PCR2 Primer mix	2
SeqAmp DNA Polymerase	2
Total volume per reaction	80

(2) 每反应体系中加入 80 μ l PCR Master Mix。轻轻混合均匀，轻微离心至管底。

(3) 将管子放在预热 PCR 仪中，使用以下程序进行 PCR：

94℃	1 min
12–16 cycles:	
98℃	15 sec
55℃	15 sec
68℃	30 sec
4℃	forever

2.12.2.6: AMPure 磁珠纯化 RNA-Seq 文库

(1) AMPure 磁珠在使用前室温平衡约 30 min。在每个样品中加入 100 μ l 的 AMPure 磁珠。

(2) 室温孵育 8 min，使 DNA 与磁珠结合。

(3) 轻微离心至管底，磁力架上放置 5~10 min 直到溶液澄清。

(4) 小心弃上清液，在每个样品中加入 200 μ l 现配的 80%乙醇。静置 30 s，小心弃上清液。

(5) 重复步骤(4)一次。

(6) 轻微离心以收集每个管底剩余的乙醇。

- (7) 开管室温下干燥约 10 min。
- (8) 加入 14 μl 的 Nuclease-Free Water，吹打混匀磁珠。
- (9) 室温孵育 5 min 以溶解 DNA，轻微离心至管底。
- (10) 磁力架上静置 2 min，直到溶液澄清。
- (11) 将每个样品的约 12 μl 上清液放入新 0.2 ml 管中。

2.12.3 浓度测定、测序样本交付

将样本浓度进行测定，寄送北京诺和生物进行测序。

2.13 利用 Total RNA 进行 m⁶A-IP-qPCR

2.13.1 打断 total RNA

- (1) 将 total RNA 分装到 0.2 ml 的 EP tube 中，每管约 10 μg total RNA，将每管 total RNA 体积用 RNase-free water 调整为 9 μl。
- (2) 在小管中加入 1 μl 10×RNA 打断试剂，快速放到已经预热到 85℃的 PCR 仪中，计时 30 s 后，在小管中加入 1 μl stop buffer，吹打搅拌终止反应，放在冰上。
- (3) 将所有 0.2 ml 中的液体回收到一个 1.5 ml EP tube 中，加 RNase-free water 冲洗所有小管，最后将总体积调整为 400 μl，再加 40 μl 的 5 M 醋酸铵，加 1 μl Glycogen，加 1 ml 的无水乙醇，上下颠倒混匀，-80℃放置 30 min 以上，或者液氮中放置 2~3 min，4℃，13300 rpm/min 离心 30 min，去除上清。
- (4) 用 70%乙醇洗沉淀 1 次，4℃，13300 rpm/min 离心 5 min，去除上清，再离心 1 min，除去多余液体，在冰上干燥 20 min，加 RNase-free water 30 μl 溶解 total RNA，50 倍 lid 测浓度。
- (5) 取 300 ng 打断的 total RNA 跑胶验证打断的片段大小，应为 300~500 nt 左右。

2.13.2 免疫沉淀，Immunoprecipitation (IP)

- (1) 留取 5~20 μg 已打断的 RNA 作为 input（做 IP 的起始量）。
- (2) 配制 10 ml 5×IPP buffer

成分	体积	终浓度
Tris-HCl (1 M stock) (pH 7.4)	0.5 ml	50 mM
NaCl (5 M stock)	1.5 ml	750 mM
NP40 (10% vol/vol stock)	0.5 ml	0.5% vol/vol
RNase-free water	7.5 ml	

- (3) 将打断的 total RNA 和 anti-m⁶A 混合，4℃旋转孵育 3~4 h，转速 20 rpm/min 左右。

成分	体积(μl)	最终量
打断的 total RNA	X	20 μg
RNain (40 U/μl)	2.5	200 U
5×IPP buffer	50	1×
Anti-m ⁶ A (0.5 mg/ml)	4 μl	2 μg
RNase-free water	193.5-X	
Total volume	250	

- (4) 之后充分混悬 dynabeads protein A/G beads，吸取 40 μl beads，放在磁力架上静置 1 min，去除储存液，用 1 ml 1×IPP buffer 4℃摇床洗 2 min，转速 60~70 rpm/min 左右，洗 3 次。用 500 μl BSA (0.5 mg/ml)重悬，4℃旋转孵育 2~3h，转速 20 rpm/min 左右。
- (5) beads 封闭完毕后，去除上清，用 1 ml 1×IPP buffer 4℃摇床洗 2 min，转速 60~70 rpm/min 左右，洗 2 次，去除上清。
- (6) 将(3)步骤的溶液转入(5)步骤已经去除上清的 beads 中，4℃旋转孵育 2 h，转速 20 rpm/min 左右。
- (7) 将上清转入干净的 EP 管中，保留上清。用 1ml 1×IPP buffer 4℃摇床洗 2 min，转速 60~70 rpm/min 左右，洗 3 次。
- (8) 用 150 μl elution buffer 洗脱结合了 total RNA 的 beads，4℃旋转孵育 1 h，转速 50~60 rpm/min 左右。

成分	体积(μl)	终浓度
5×IPP buffer	72	1×IPP buffer
M ⁶ A (20 mM stock)	120	6.7 mM
RNasin	5.6	
RNase-free water	162.4	
Total Volum	360	

- (9) 将上清（此上清为 IP 产物）转入干净的 EP 管中
- (10) 用 50 μl 1×IPP buffer 4℃摇床洗 2 min，将上清转入 9 步骤干净的 EP 管中。
- (11) 重复 8~10 步骤。
- (12) 将以上洗脱产物用 RNeasy MinElute spin 柱子回收 total RNA，400 μl 洗脱产物加 1/10 体积的 5M 醋酸铵，加 1 μl Glycogen，加 1 ml 乙醇，上下颠倒，不要离心。
- (13) 将柱子放在试剂盒中提供的 2 ml tube 上，取上步的 700 μl sample 转入柱子上，轻轻扣上盖子，常温 13300 rpm/min 离心 15 s，重复操作。
- (14) 将柱子放在一个新的 2 ml tube 中，取 500 μl 80%乙醇加在柱子上，静置 30 s，轻轻扣上盖子，常温 13300 rpm/min 离心 2 min。

(15) 将柱子放在一个新的 2 ml tube 中，打开盖子，常温 13300 rpm/min 离心 5 min 使柱子上的膜干燥。

(16) 将柱子放在一个新的 1.5 ml tube 中，加 30 μ l RNase-free water 到柱子中央，常温 13300 rpm/min 离心 1 min，体积为 30 μ l，10 倍 lid 测浓度，浓度在 15 ng/ μ l 左右。

2.13.3 total RNA 反转成 cDNA

- (1) 具体操作见东洋纺 RT 反转试剂盒说明书(Code No. FSQ-301)。
- (2) Input 和 IP 反转起始量取决于二者起始量，原则为 input 和 IP 等比例 1:1。
- 如：input 投入量为 20 μ g，IP 最后产量是 30 μ l，反转起始量一般均为二者的 1/4，则 input 反转起始量为 5 μ g，IP 反转起始量为 7.5 μ l，反转体积为 100 μ l，做 qPCR 时 1：2 稀释。

2.13.4 qPCR

(1) 体系

成分	体积(μ l)
SYBR	5
ROX	0.2
primers (F+R)	1
cDNA	1
ddH2O	2.8
Total volume	10

2.14 铁检测实验方法

本实验采用铁检测试剂盒（Abcam，ab83366），比色法进行检测细胞中铁离子的含量。

- (1) 细胞准备：至少准备 10^7 的细胞进行实验。
- (2) 用冰预冷的 PBS 轻轻洗涤细胞，并用细胞刮刀将细胞刮除到冰预冷的 PBS 中。将细胞悬液以 1,000 g 离心沉淀 5 min，重悬于铁检测缓冲液中。
- (3) 在冰上短时超声并轻轻振荡。在 4℃ 下以 16,000 g 离心 10 min 以除去不溶物，并将上清液用于测定。
- (4) 制备标准品：
- 铁标准品的浓度为 100 mM，将其稀释，用 990 μ l dd H₂O 稀释 10 μ l 铁标准品，制备成 1 mM 标准品。

Standard #	Volume of Iron 1mM Standard (μl)	Assay Buffer (μl)	Final Volume Standard in well(μl)	End Conc Iron in well (nmol/well)
1	0	300	100	0
2	6	294	100	2
3	12	288	100	4
4	18	282	100	6
5	24	276	100	8
6	30	270	100	10

- (5) 解冻铁探针、铁检测缓冲液、铁还原剂、铁标准品（按需分装）；准备好仪器。制备铁标准品稀释液 [2~10 nmol/孔]。将样本稀释到最佳稀释度，使其读数落在标准曲线线性范围内。
- (6) 在微孔板上分别设置标准品 (100 μl) 和样本 (100 μl) 的两复孔检测孔。
- (7) 在每个标准品孔中加入 5 μl 铁还原剂。铁 (II) 检测：在每份样本中加入 5 μl 铁检测缓冲液。铁 (II + III) 检测：在每份样本中加入 5 μl 铁还原剂。混匀并在 37 °C 下孵育 30 min。
- (8) 在铁标准品孔和测试样本孔中分别加入 100 μl 铁探针。

# order in reaction	Component	Standard (μl)	Iron (II) (μl)	Totol Iron (II + III) (μl)
1	Standard	100	-	-
2	Sample	-	100	100
3	Iron Reducer	5	-	5
4	Iron Buffer	-	5	-
5	Iron Probe	100	100	100

- (9) 混匀并在 37°C 下避光孵育 60 min。在 OD 593 nm 处检测微孔板。

2.15 统计学分析

利用 Tissue Gnostics 对免疫组化染色的片子进行扫描。利用 ImageJ 测定蛋白条带的灰度值和免疫组化的染色强度进行数据分析；所有数据以均数±标准差表示。采用 GraphPad prism 6.0，对两样本之间进行独立 t 检验，对多样本采用单因素方差分析，当 $P<0.05$ 时视为差异具有统计学意义。

实验结果

一、RNA m⁶A 去甲基化酶 ALKBH5 在胶质母细胞瘤中调控铁代谢的机制研究

1. 胶质母细胞瘤中，铁代谢基因 *FTH1* 是 ALKBH5 调控的下游靶基因

1.1 胶质瘤病人样本中铁代谢相关基因 RNA m⁶A 甲基化紊乱

为了探究胶质母细胞瘤病人的 m⁶A 甲基化水平如何变化，我们将胶质母细胞瘤病人和正常对照样本进行全转录组水平的 m⁶A 甲基化测序 (m⁶A-seq)，分析发现在功能富集分析前五的通路中，除了和 DNA 复制、RNA 转录等相关通路，我们关注到铁代谢相关通路。其中有 50 个铁代谢相关基因的 RNA 甲基化水平出现明显变化，在图 2 中我们展示了铁代谢中功能重要的几个基因甲基化富集变化，例如在 GBM 样本中，铁蛋白重链 Ferritin heavy polypeptide 1 (*FTH1*)甲基化富集出现明显下调；铁转运蛋白 (Transferrin Receptor, *TFRC*)、铁反应原件结合蛋白(Iron responsive element binding protein 2, *IREB2*)和维持细胞内铁稳态泛素连接酶(F-box and leucine-rich repeat protein 5, *FBXL5*)甲基化水平均有升高。以上结果提示 RNA m⁶A 甲基化可能通过影响铁代谢相关基因的功能在胶质母细胞瘤的进展中发挥了重要调控作用。

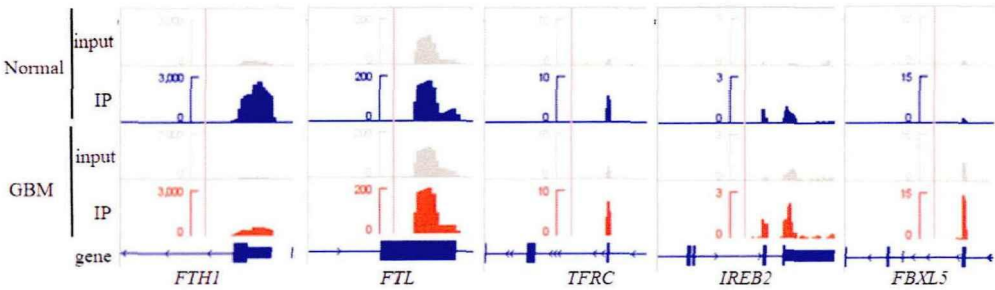


图 2：铁代谢相关基因在 GBM 样本和正常对照样本中甲基化水平变化

1.2 ALKBH5 影响胶质瘤细胞中的铁离子含量

有研究发现 ALKBH5 在胶质母细胞瘤中发挥着促癌作用，同时 ALKBH5 在胰腺癌中通过调控铁代谢发挥着抑癌作用^[47]。铁代谢相关基因的调控与铁稳态密切相关，因此，我们下一步分析了胶质母细胞瘤中的 m⁶A 水平变化是否会影响铁离子的含量。我们分别在 U87（图 3A），U118（图 3B）和 U251（图 3C）胶质母细胞瘤细胞系中，敲低 ALKBH5，用铁探针的方法检测其铁离子的含量是否变化，结果发现三种细胞系中铁离子含量有一定升高。上述结果提示，ALKBH5 会影响胶质母细

胞瘤中的铁离子含量，因此我们推测 ALKBH5 可能在胶质母和细胞瘤中调控铁代谢信号通路。

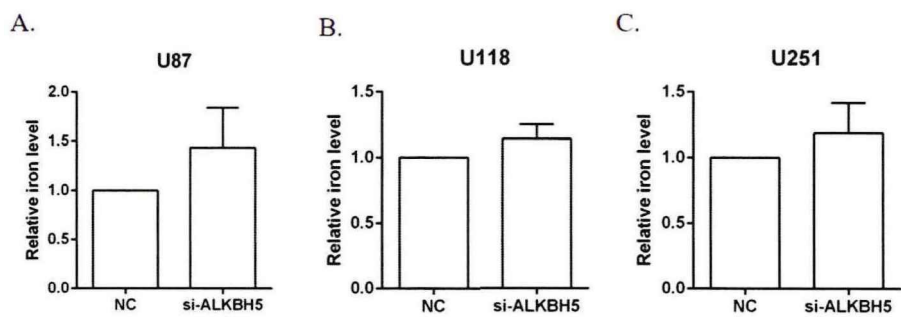


图 3: U87 (A), U118 (B)和 U251 (C)三种胶质母细胞瘤细胞系在敲低 ALKBH5 之后，铁离子含量变化。

1.3 敲低 ALKBH5 的 GBM 细胞系 U251 中铁代谢相关基因 RNA m⁶A 甲基化水平升高

为了进一步探究在胶质母细胞瘤中 ALKBH5 敲低后调控铁代谢的靶点，我们在 U251 细胞系中敲低 ALKBH5（图 4A），然后利用对照组与敲低组的细胞进行了 m⁶A-seq。首先，m⁶A 基序分析分析表明我们成功富集了 m⁶A 甲基化的 RNA（图 4B）。进一步的差异甲基化分析结果发现 ALKBH5 敲低引起 3,696 个 RNA 的甲基化修饰水平升高。为了进一步鉴别铁代谢相关基因的 RNA 甲基化水平变化，我们首先利用 MSigDB 数据库^[64]，搜索筛选出 531 个与铁代谢通路相关的基因。将敲低 ALKBH5 之后的 3,696 个甲基化水平上调的基因和 531 个铁代谢基因进行统计分析，从中筛选出 76 个铁代谢基因的甲基化水平出现上升趋势（图 4C）。如图 4D 所示，我们发现编码铁蛋白的基因 *FTH1* 在敲低和对照组之间差异最为显著，这表明 *FTH1* 可能是 ALKBH5 调控的靶基因（图 4D）。

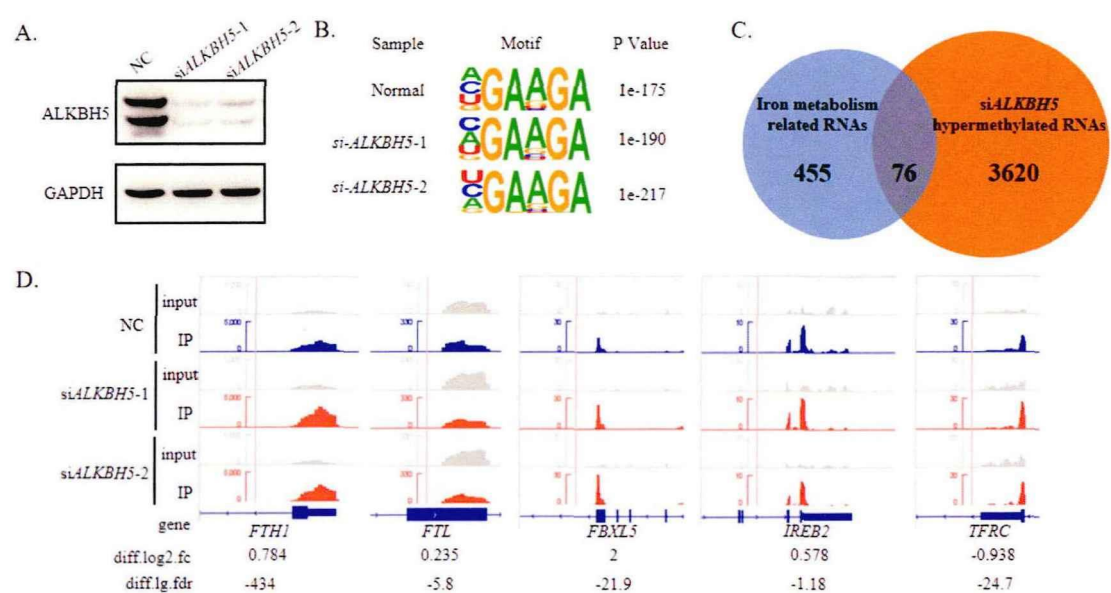


图 4：在 U251 中敲低 *ALKBH5* 前后的 m⁶A 甲基化分析。A.U251 胶质母细胞瘤细胞系中敲低 *ALKBH5* 的验证。B.对照和 *ALKBH5* 敲低组的 m⁶A 测序基序分析。C. 韦恩图展示铁代谢富集 peak 和细胞中 m⁶A 修饰水平升高的 peak 所在基因的比较。D.IGV 图展示铁代谢相关基因(*FTH1*、*FTL*、*FBXL5*、*IREB2*、*TFRC*)在敲低 *ALKBH5* 前后的甲基化水平以及以及具体的变化幅度 (diff.log2fc) 与 FDR 值。

1.4 铁代谢基因 *FTH1* 是 *ALKBH5* 的下游靶基因

为了进一步验证在胶质母细胞瘤中 *ALKBH5* 对铁代谢相关基因的调控作用，我们根据甲基化水平升高的程度以及参与调控铁代谢基因功能，从中挑选了 5 个铁代谢相关基因 (*FTH1*、*FTL*、*FBXL5*、*IREB2*、*TFRC*) 进行验证。首先在 U87 (图 5A)，U118 (图 5B) 和 U251 (图 5C) 三种细胞系中进行了 m⁶A-IP-qPCR，结果发现只有 *FTH1* 的甲基化水平在三种细胞系中呈现一致性地显著升高。随后在 U251 细胞系中，用 *ALKBH5* 抗体进行 RIP 实验，qPCR 结果显示 *FTH1* 与 *ALKBH5* 的结合也最为显著 (图 5D)。上述结果说明 *FTH1* 是 *ALKBH5* 直接调控的靶基因。

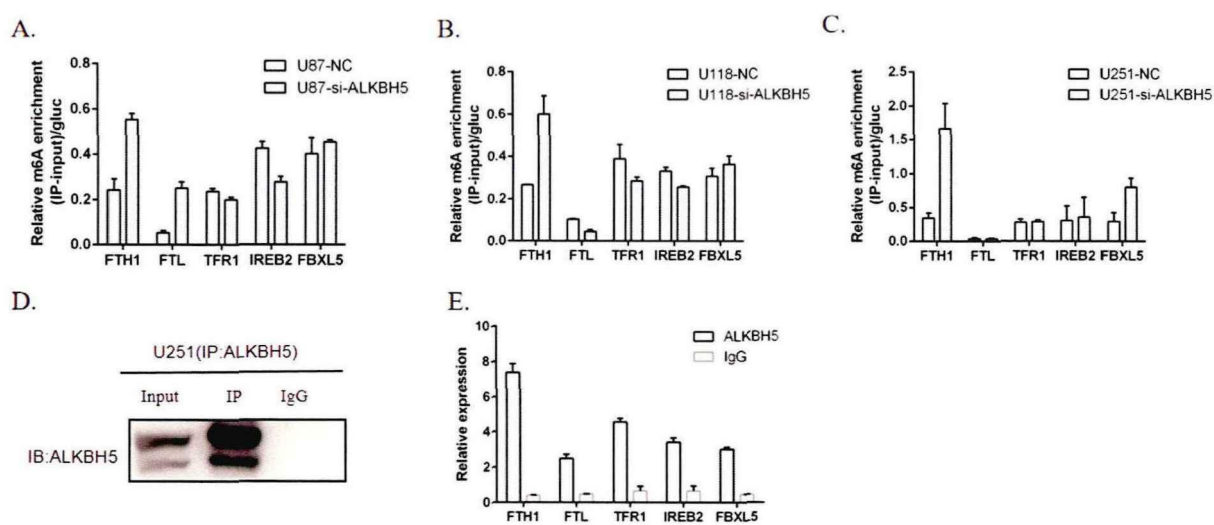


图 5: 铁代谢基因 *FTH1* 是 ALKBH5 的下游靶基因。A~C. 分别在 U87 (A), U118 (B) 和 U251 (C) 三种胶质母细胞瘤细胞系中进行 m⁶A-IP-qPCR 实验; D. U251 细胞中进行 ALKBH5-RIP 实验时通过 WB 验证 IP 效率。E. U251 细胞中进行 ALKBH5-RIP-qPCR 实验。

2. ALKBH5 对铁代谢基因 *FTH1* RNA 代谢过程的调控机制

多项研究表明 RNA m⁶A 甲基化在 RNA 剪切、翻译和降解等代谢过程中发挥了重要作用。因此我们计划从这几个角度出发，探究 ALKBH5 介导的 m⁶A 去甲基化对 *FTH1* RNA 代谢的调控作用。首先利用 m⁶A 测序的结果进行外显子频率分析，用实验组和对照组外显子表达频率来判断其是否发生了剪切事件，如果某一外显子表达频率发生变化，那么就认为这个基因在转录后有剪切事件发生，发现在 ALKBH5 敲低前后，*FTH1* 基因的 4 个外显子被检测到的 9 个剪切位点的可变剪切均没有显著差异，表明这 *FTH1* 基因的剪切并没有发生变化。如图 6 所示，展示的是 *FTH1* 的第三个外显子处的 3'端的可变剪切 (A3SS) 没有明显差异。

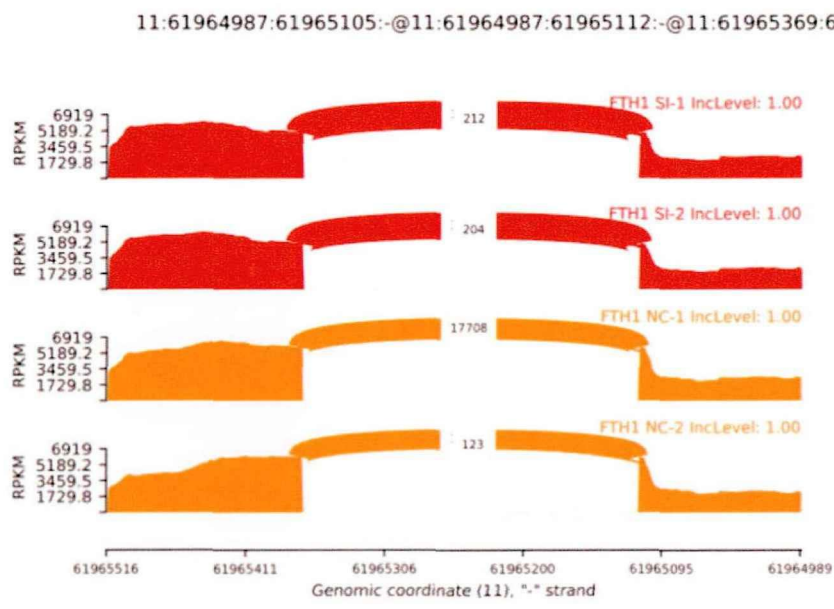


图 6: 敲低 *ALKBH5* 前后的 *FTH1* 的 3'端可变剪切示意图。

接下来，我们使用放线菌素 D 处理 U251 细胞以抑制 RNA 的转录，用于检测实验组（敲低 *ALKBH5*）和对照组每个时间点目的基因的剩余量来推测 *FTH1* 的半衰期。如图 7A 所示，当敲低 *ALKBH5* 前后，*FTH1* 的半衰期没有明显变化。说明 *ALKBH5* 异常所导致的 m⁶A 修饰的变化不会影响 *FTH1* 靶基因 mRNA 的稳定性。与之对应的是，我们也发现 *ALKBH5* 敲低之后的，*FTH1* 的 RNA 丰度并没有发生变化（图 7B）。

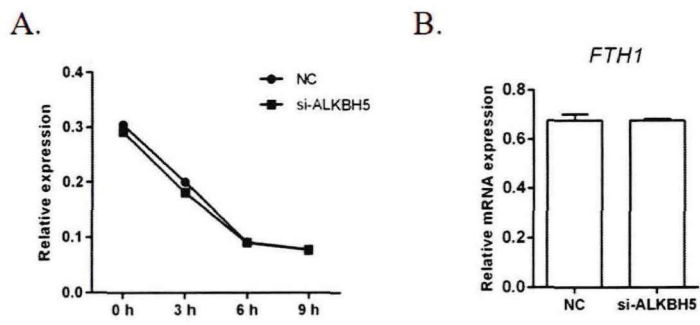


图 7: 敲低 *ALKBH5* 前后，*FTH1* 的 RNA 水平变化。A.敲低 *ALKBH5* 前后，检测铁代谢基因 *FTH1* 的 RNA 稳定性。B.敲低 *ALKBH5* 前后，*FTH1* 的 RNA 相对表达量。

但是我们却发现在 U251 细胞系中敲低 *ALKBH5* 之后，*FTH1* 蛋白丰度明显降低（图 8A）。于是我们进一步探究 m⁶A 甲基化是否会影响 *FTH1* 的翻译进程。首先，我们利用 RMBase 单碱基分辨率网站^[65]发现 *FTH1* RNA 中潜在的 9 个 m⁶A 甲基化位点（图 8B），通过与胶质母细胞瘤中 *FTH1* 的甲基化模式相比较，我们发现其差异甲基化的 m⁶A 区域位于 *FTH1* 的 5'UTR 区域处（图 8C）。图 C 显示为 *FTH1*

的 5'UTR 区域，将其中“GGACT”和“GGAAC”中的腺嘌呤突变为胸腺嘧啶，分别为“GGTCT (Mut1)”和“GGATC (Mut2)”。因此我们进一步利用双荧光素酶报告系统检测 *FTH1* 的 RNA m⁶A 甲基化修饰是否会影响 *FTH1* 的翻译。首先我们根据单碱基分辨率网站预测出的 *FTH1* 的 m⁶A 位点进行突变，构建 pGL3-promoter-h-*FTH1*-5'UTR-WT、pGL3-promoter-h-*FTH1*-5'UTR-dIRE、pGL3-promoter-h-*FTH1*-5'UTR-Mut1、pGL3-promoter-h-*FTH1*-5'UTR-Mut2 和 pGL3-promoter-h-*FTH1*-5'UTR-Mut1+2 的荧光素酶报告质粒（图 8D）。已有研究证明在铁代谢通路中，铁调节蛋白 IRP 通过与 *FTH1* 的 IRE-motif 区域结合对 *FTH1* 翻译有抑制作用^[40]。因此，我们同时构建了缺失 IRE 的突变体 *FTH1*-5'UTR-dIRE，作为该实验的阳性对照。之后，通过 m⁶A-IP-qPCR 检测各质粒转染之后对应转录本的 m⁶A 水平，证实所预测的 mut1、mut2 位点的确是 *FTH1* 的 m⁶A 位点（图 8E）。

但是，我们发现虽然转染质粒之后，6 条转录本之间的 RNA 水平没有显著变化（图 8F），转染 *FTH1*-5'UTR-MUT（m⁶A 位点突变）系列质粒的荧光强度明显高于转染 *FTH1*-5'UTR-WT 质粒（图 8G）。以上研究表明 m⁶A 位点的突变之后造成 m⁶A 水平升高、并进一步使得 *FTH1* 翻译增强。并且我们发现 Mut2 位点（***P<0.0001）的作用要强于 Mut1（**P<0.01）。

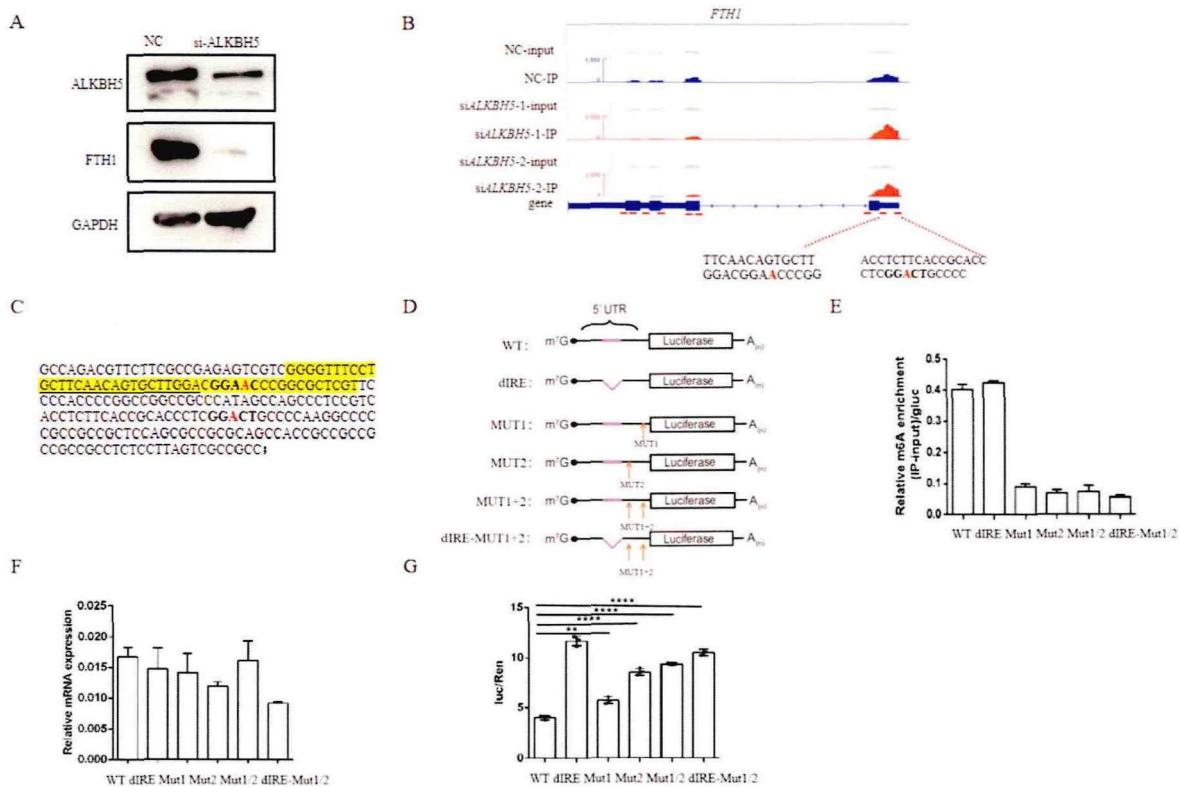


图 8：敲低 ALKBH5 对 *FTH1* 的翻译影响。A.敲低 ALKBH5 之后，*FTH1* 蛋白翻译水平显著降低。B.利用 RMBase 单碱基分辨率网站发现 *FTH1* RNA 中潜在的 9 个 m⁶A 甲基化位点，其位置用红色短横线标出。C.*FTH1* 的 5'UTR 区域，黄色荧光标

记 *FTH1* 的 dIRE motif 区域，下划线区域为 *FTH1* 的核心 dIRE motif 区域，加粗区域的区域为 m⁶A motif 区域，将其中“GGACT”和“GGAAC”中的腺嘌呤突变为胸腺嘧啶，分别为“GGTCT (Mut1)”和“GGATC (Mut2)”。D.构建 pGL3-promoter-h-FTH1-5'UTR-WT、pGL3-promoter-h-FTH1-5'UTR-dIRE、pGL3-promoter-h-FTH1-5'UTR-Mut1 、 pGL3-promoter-h-FTH1-5'UTR-Mut2 和 pGL3-promoter-h-FTH1-5'UTR-Mut1+2 荧光素酶报告质粒。E: 验证所构建“GGTCT (Mut1)”和“GGATC (Mut2)”质粒的突变位点是 m⁶A 位点。F: 验证转染 6 种质粒之后，*FTH1* 的 mRNA 相对表达情况。G: Luciferase assay 验证转染 *FTH1* 的 5'UTR 和 m⁶A 位点突变的 5'UTR 质粒的荧光强度变化。

3. 探究 ALKBH5 对铁代谢通路的调控机制

在上述结果中，我们已经了解到 ALKBH5 会影响 *FTH1* 的翻译，已有研究证明 IRP2 会抑制 *FTH1* 的翻译，因此我们提出问题，m⁶A 位点的突变是否会影响 IRP2 与 *FTH1* 的结合。

为了验证上述结果，我们体外合成了有无 m⁶A 位点修饰的 *FTH1* RNA 片段，本实验使用的 *FTH1*-m⁶A-oligo-RNA 是根据上述单碱基分辨率结合 IGV 测序数据以及实验结果，寻找 AAC/GAC 等 m⁶A 修饰 motif，在其左右各选择大约 10 nt 的 RNA 片段，来设计含有和不含有 m⁶A 修饰的 2 个约 20~30 nt 的 RNA 片段。其中 ss-*FTH1*-WT 探针序列为：GGGGUUUCCUGCUUCAACAGUGCUUGGACGGAACCCGGCG；ss-*FTH1*-M2-m⁶A 探针序列在红色标记第 33 个碱基处进行 m⁶A 修饰：GGGGUUUCCUGCUUCAACAGUGCUUGGACGGA(m⁶A)CCCGGCG。我们进行 RNA pull down 实验，结果发现 oligo-m⁶A-*FTH1* 可以结合更多的 IRP2 蛋白，说明 m⁶A 位点确实能够促进 IRP2 蛋白和 *FTH1* 的结合，同时发现 oligo-m⁶A-*FTH1* 也可以结合更多的 IRP1 蛋白（图 9）。

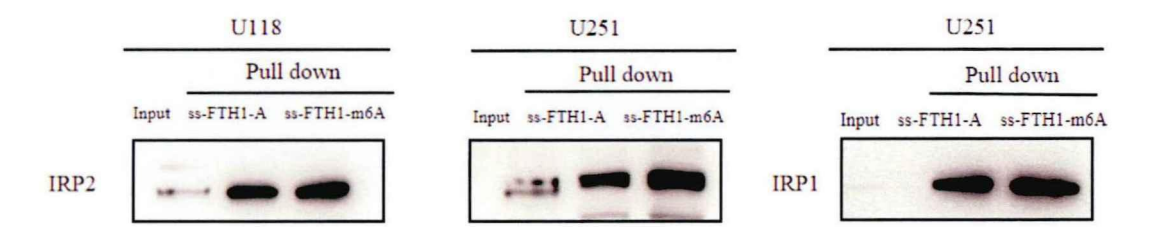


图 9: m⁶A 位点促进 IRP2 蛋白和 IRP1 蛋白和 *FTH1* 的结合,相较于 oligo-WT-*FTH1*, oligo-m⁶A-*FTH1* 可以结合更多的 IRP 蛋白。

综上所述，这项研究表明 *FTH1* RNA 是 m⁶A 去甲基化酶 ALKBH5 的去甲基化作用底物，ALKBH5 敲低之后对其剪切与 RNA 降解没有影响，但是会引起其蛋白

水平下降。我们推测这一现象可能是因为 m⁶A 甲基化促进了 IRP 蛋白与 *FTH1* RNA 的结合，从而抑制了 FTH1 蛋白的翻译所致。我们推测 ALKBH5 在胶质母细胞瘤中的表达异常和由此产生的 m⁶A 异常甲基化修饰可以通过 *FTH1* 铁代谢通路影响 GBM 的发生发展，从而为开发针对胶质母细胞瘤的治疗靶点提供了新的思路与理论依据。

二、RNA m⁶A 去甲基化酶 ALKBH5 在小脑萎缩中的研究

1. 老年 *Alkbh5*^{-/-}小鼠小脑发生萎缩：

本课题组前期研究证明 ALKBH5 在出生后 7 天 (P7) 的小鼠小脑中表达明显高于 2 月龄小鼠^[9]，并且 ALKBH5 参与调控小鼠的小脑发育进程。为了探究 ALKBH5 在小脑衰老的过程中是否同样发挥作用，本研究进一步检测了小鼠衰老过程中 ALKBH5 在小脑的表达情况。我们比较了四个年龄阶段 (2m、6m、12m、18m) 的小鼠，发现随着年龄的增长，ALKBH5 表达呈渐进性增高模式 (图 10)，提示该基因可能在老年小鼠小脑中起着重要作用。

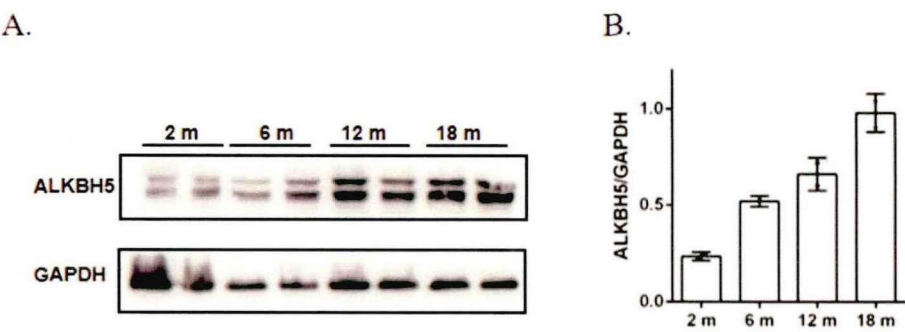


图 10: ALKBH5 在不同年龄 WT 小鼠小脑中的表达情况。A: ALKBH5 在不同年龄野生型小鼠小脑中的表达情况，GAPDH 为内参，n=2。B: 图 A 的量化统计分析结果。

为探究 ALKBH5 在老年小鼠小脑中的作用，我们选用中年 (12 月龄) 和老年 (18 月龄) 的野生型 (WT) 和 *Alkbh5* 基因敲除 (KO) 小鼠 (图 11A, 11B) 进行表型分析和比较。首先我们通过免疫组织化学染色观察 ALKBH5 在 WT 小鼠小脑的原位表达情况，发现 ALKBH5 在小脑的浦肯野神经元的细胞核中高表达，而在颗粒神经元中的表达相对较弱 (图 11C)，提示 ALKBH5 在老年小鼠小脑的浦肯野细胞中可能发挥重要的作用。其次，我们发现与同龄的 WT 小鼠相比，虽然 12 月龄的 KO 小鼠的体重和脑重没有明显变化 ($P>0.05$)，但 18 月龄的老年 KO 小鼠的体重、脑重以及小脑重量分别下降 15%，10% 和 21%，且具有统计学差异 (图 12A-12C)。进一步我们利用 H & E 染色实验观察比较 WT 与 KO 小鼠的小脑形态，同样发现 18 月龄 KO 小鼠的小脑明显减小 (图 12D)，但在小叶结构、分子

层与颗粒细胞层的细胞大小、数量与分布方式方面并未见明显改变。由此可知，虽然在中年小鼠中未观察到 *Alkbh5* 缺失在小脑产生的变化，但是随着小鼠老龄化的加剧，*Alkbh5* 缺失的老年小鼠小脑出现萎缩现象。

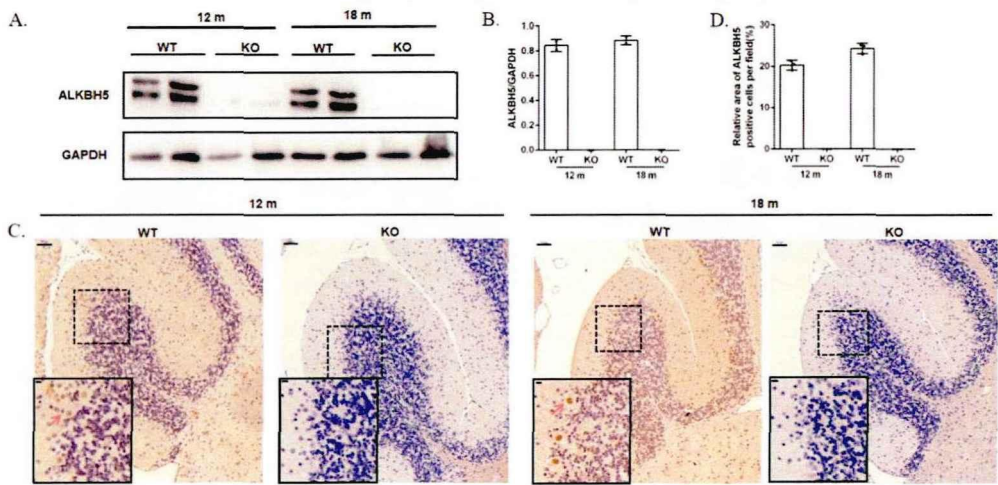


图 11: KO 小鼠的敲除效率验证。A: WB 验证 12 和 18 月龄 KO 小鼠的敲除效率，GAPDH 为内参，n=2。B: 图 A 的量化统计分析结果。C: 免疫组织化学验证 12 月龄和 18 月龄 KO 小鼠的敲除效率。箭头: 浦肯野细胞。低倍图 Scale bar=50 μ m，高倍图 Scale bar=10 μ m。D: 图 C 的量化统计分析结果，n=3，*P < 0.05。

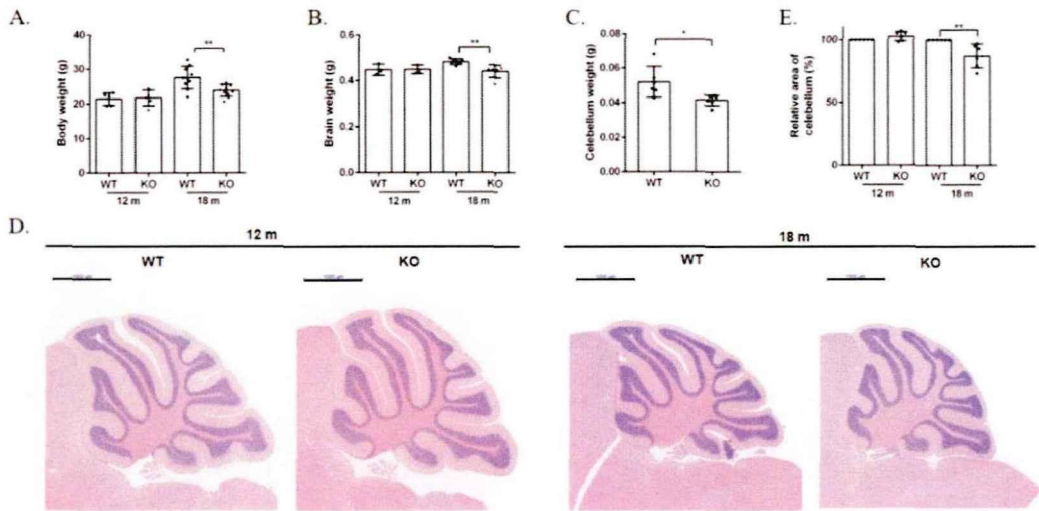


图 12: WT 和 KO 小鼠小脑的形态分析。A: 12 月龄 (n=5) 和 18 月龄 (n=10) 的 WT 和 KO 小鼠体重统计。B: 12 月龄 (n=3) 和 18 月龄 (n=7) 的 WT 和 KO 小鼠脑重统计。C: 18 月龄 WT 和 KO 小鼠小脑脑重统计，n=6。D: 12 月龄和 18 月龄 WT 和 KO 小鼠小脑 HE 染色结果，Scale bar=1000 μ m。E: 图 D 的量化统计分

析结果，n=6。*P < 0.05，**P < 0.01。

2. 老年 KO 小鼠小脑中的浦肯野神经元数量及神经树突的数目显著减少：

为进一步探究 *Alkbh5* 缺失后小脑的表型变化，我们利用免疫组化技术检测了中年（12 m）和老年（18 m）小鼠小脑中不同类型神经细胞的变化程度。与同龄的中老年 WT 小鼠相比，我们在 KO 小鼠小脑中均未观察到 NeuN 标记的成熟神经元数量和 GFAP 标记的星形胶质细胞的数量与分布模式有明显变化（图 13A~J）。

进一步利用标记浦肯野神经元的 Calbindin-D28K 抗体进行染色，结果表明中年 WT 和 KO 小鼠小脑的浦肯野神经元均排列整齐、致密，未见明显改变（图 14A, 14B）；同时 MAP2 标记的神经元树突排列整齐，也没有明显变化（图 14C, 14D）。但是在老年小鼠中，KO 小鼠的小脑中出现明显的浦肯野神经元缺失现象（图 14E, 14F）。同时 MAP2 染色结果亦表明分子层中神经树突变短、数量减少（图 14G, 14H）。上述在老年 KO 小鼠小脑中出现的浦肯野神经元数量及树突减少的表型提示 *Alkbh5* 缺失会使得老年小鼠小脑发生退行性病变。

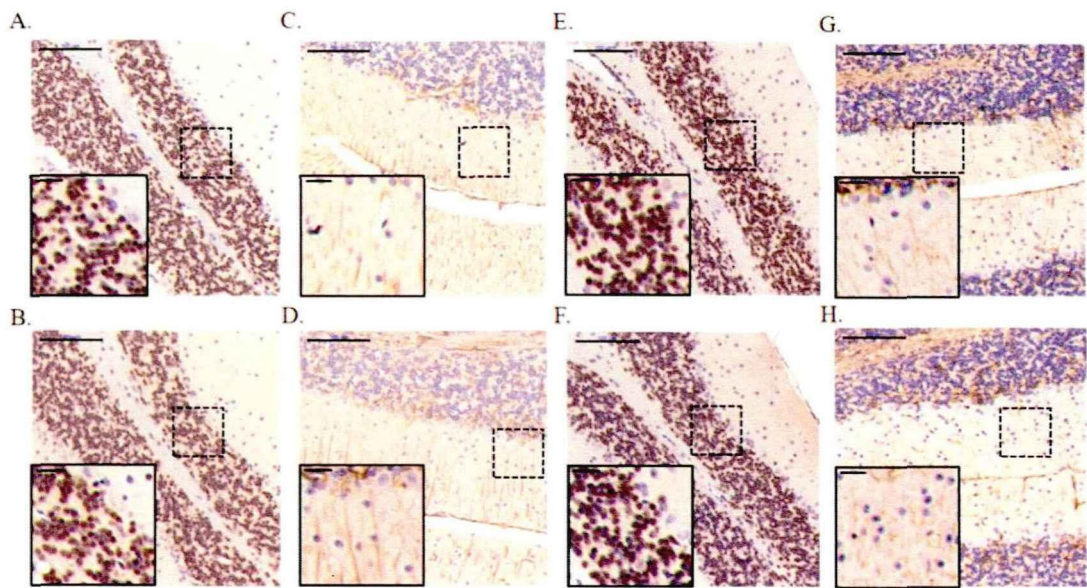


图 13：NeuN (A, B, E, F)和 GFAP (C, D, G, H)在 12 月龄(A~D)和 18 月龄(E~H)的 WT (A, C, E, G)和 KO (B, D, F, H)小鼠小脑中的免疫组化分析。低倍图 Scale bar=100 μm，高倍图 Scale bar=20 μm。

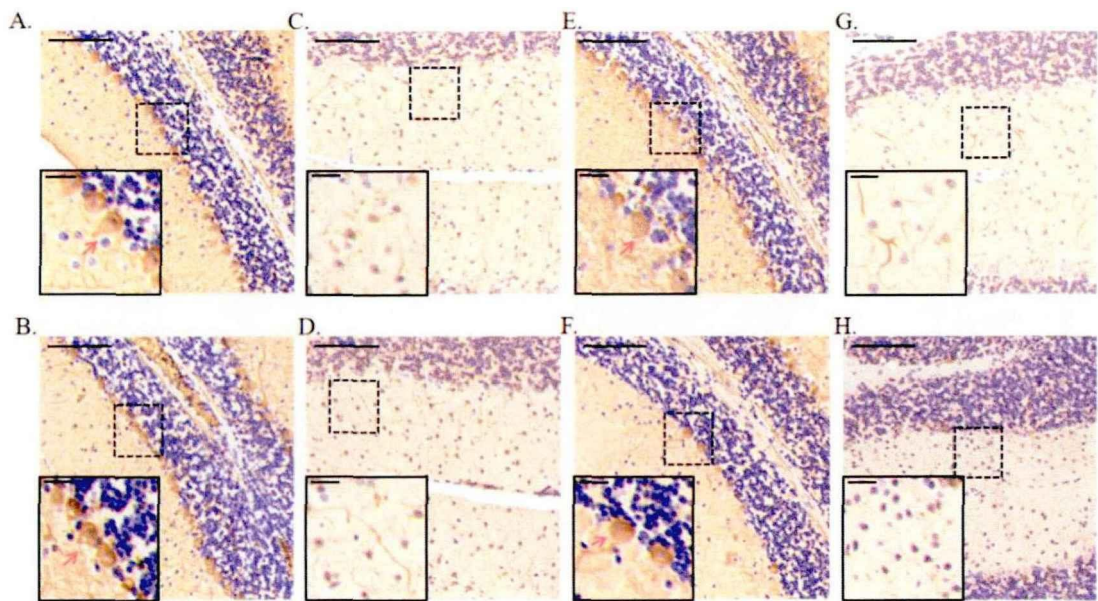


图 14: D28K (A, B, E, F)和 MAP2 (C, D, G, H)在 12 月龄(A~D)和 18 月龄(E~H)的 WT (A, C, E, G)和 KO (B, D, F, H) 小鼠小脑的免疫组化分析。箭头: 浦肯野细胞; 低倍图 Scale bar=100 μm , 高倍图 Scale bar=20 μm 。

3. *Alkbh5* 敲除后老年小鼠的平衡性下降:

基于上述表型，我们进一步开展了行为学实验，以观察 *Alkbh5* 缺失之后是否会造成老年小鼠小脑功能上的改变。平衡木实验结果表明中年 WT 与 KO 小鼠走过平衡木的时间未见明显差异，但老年 KO 小鼠通过平衡木时后爪脱杆现象明显增多，相较于 WT 小鼠通过平衡木所用的时间增长约 70%、且差异具有统计学意义($P<0.05$) (图 15A)。进一步我们通过步态实验分析了 WT 和 KO 小鼠的协调运动能力，发现 12 月龄的 WT 和 KO 小鼠没有显著差异，小鼠后爪能够较为稳定地落在前爪位置，但 18 月龄的 KO 小鼠出现明显的步态紊乱现象，老年 WT 和 KO 小鼠的步态协调性有明显的统计学差异 (15B, 15C)。上述表型提示老年 *Alkbh5*^{-/-}小鼠的平衡能力与协调性下降。

综上，ALKBH5 基因敲除的小鼠在老年之后出现了小脑神经退行性病变，提示 ALKBH5 以及其调控的 RNA m⁶A 甲基化体系对于维持老龄小脑的正常功能是必须的。

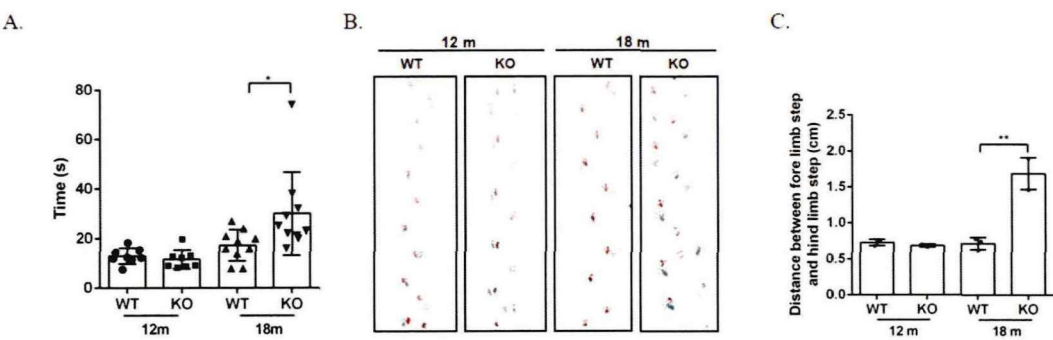


图 15：行为学实验分析结果。A：平衡木实验验证 12 月龄 (n=8) 和 18 月龄 (n=10) 小鼠的平衡能力变化。B：步态实验分析验证小鼠的运动协调能力变化。C：图 B 的量化统计分析结果，n=3，*P < 0.05，**P < 0.01。

讨 论

一、RNA m⁶A 去甲基化酶 ALKBH5 在胶质母细胞瘤中调控铁代谢的机制研究

近年来有研究表明去甲基化酶 ALKBH5 在胶质母细胞瘤中发挥着促癌作用。在本课题中，我们以 RNA m⁶A 去甲基化酶 ALKBH5 调控铁代谢为切入点，探究其对于胶质母细胞瘤的影响。结果发现，在胶质母细胞瘤中，敲低 ALKBH5 之后铁代谢相关基因的甲基化水平出现明显变化，其中编码铁蛋白的 *FTH1* 甲基化水平显著上调，进一步研究发现 ALKBH5 介导的 m⁶A 调控了 *FTH1* 的翻译。迄今为止的研究表明 *FTH1* 的翻译调控主要是受到 IRP 蛋白的调控^[40]，我们的结果表明除此调控途径之外，RNA m⁶A 甲基化也是调控铁蛋白 *FTH1* 翻译进程的重要机制之一，从而为阐明胶质母细胞瘤的发病机制提供了新的视角。

在过去的一些研究中，有研究表明 m⁶A 通过调控铁代谢在肿瘤中发挥作用。在胰腺癌中，ALKBH5 过表达导致了铁调节蛋白 IRP2 和上皮-间充质转化调节因子 SNAI1 的显著减少，从而在胰腺癌中发挥着抑癌作用^[47]。在头颈部鳞状细胞癌 (HNSCC) 中，m⁶A 识别蛋白 YTHDF1 的甲基转移酶结构域与铁转运蛋白受体 *TRFC* mRNA 的 3'UTR 和 5' UTR 相互作用，进一步调节 m⁶A 修饰的 *TRFC* mRNA 的翻译。*TRFC* 是 YTHDF1 介导的铁代谢增加的关键靶基因^[66]。在 GBM 中，我们研究发现 ALKBH5 增强 *FTH1* 在 GBM 中的表达。从治疗的角度来看，靶向 ALKBH5 和 *FTH1* 介导的铁代谢可能是治疗 GBM 的一个有前途的策略。

已有研究发现 IRPs 以铁依赖的方式抑制 *FTL* mRNA 的翻译，而 m⁶A 识别蛋白 eIF3 以铁不依赖的方式抑制 *FTL* 的翻译。IRP 抑制和 eIF3 抑制之间的协调可能因细胞和组织环境而异^[67]。我们研究发现，ALKBH5 调控铁代谢基因 *FTH1* 的翻译，同时 m⁶A 水平会影响 IRP2 与 *FTH1* 的结合。今后我们将进一步探究在胶质母细胞瘤中，ALKBH5 对 *FTH1* 的翻译抑制和 IRP2 对 *FTH1* 的翻译抑制之间是否存在一定的关联，即 *FTH1* 的 m⁶A 水平变化 IRP2 与 *FTH1* 结合的分子机制，从而为阐明 GBM 中铁代谢紊乱的调控网络提供了新的思路。

本课题主要探究去甲基化酶 ALKBH5 会影响 IRP2 对 *FTH1* 翻译的抑制。相关研究表明 IRPs 蛋白，包括 IRP1 和 IRP2 都会与 *FTH1* 结合，并且抑制 *FTH1* 的翻译，m⁶A 修饰如何影响 IRP1 与 *FTH1* 的结合有待进一步研究。同时，本课题中，我们主要探究 ALKBH5 对 *FTH1* 的剪切、RNA 稳定性以及翻译的影响。已有研究表明 ALKBH5 会影响 RNA 代谢中的出核^[68]，而在胶质母细胞瘤中，ALKBH5 对其出核是否有影响，在后续的实验中需要进一步补充。在进行 m⁶A-IP 测序中，敲低 ALKBH5 之后，铁蛋白 *FTH1* 的甲基化水平升高最为明显，所以在该课题中，我们以 *FTH1* 为主要靶点进行后续机制研究。除此之外，也有其他的铁代谢相关基因也

受 m⁶A 水平的影响，这些基因的相关机制有待进一步研究。

综上所述，这项研究表明 *FTH1* RNA 是 m⁶A 去甲基化酶 ALKBH5 的去甲基化作用底物，ALKBH5 敲低之后会引起其蛋白水平下降。我们推测 ALKBH5 在胶质母细胞瘤中的表达异常和由此产生的 m⁶A 异常甲基化修饰可以通过 *FTH1* 铁代谢通路影响 GBM 的发生发展，从而为开发针对胶质母细胞瘤的治疗靶点提供了新的思路与理论依据。

二、RNA m⁶A 去甲基化酶 ALKBH5 在小脑神经退行性病变中的研究

RNA m⁶A 修饰在神经发育等生物学过程中发挥着重要的功能，m⁶A 修饰的失调会导致神经系统疾病，其中包括神经退行性疾病^[57]。有研究表明 RNA m⁶A 调控因子的改变会引起老年痴呆症 (AD) 和帕金森综合征 (PD) 等多种神经退行性疾病。例如，甲基转移酶 METTL3 在 AD 小鼠海马区呈异常表达，表明 m⁶A 修饰可能与 AD 发病相关^[58]；去甲基化酶 FTO 通过调节酪氨酸羟化酶的表达进而影响多巴胺神经元的传递，因此可能与 PD 的发生密切相关^[69]。而 ALKBH5 与神经退行性疾病的关系尚不明确。本研究发现随着小鼠老龄化的加剧，ALKBH5 蛋白在小脑中的表达逐渐升高。同时发现敲除 *Alkbh5* 基因之后，幼年^[54]和中年 12 月龄的 KO 小鼠的小脑大小和形态均未见明显差异，但是 18 月龄的老年 KO 小鼠的小脑明显变减小，平衡能力减弱，提示 *Alkbh5* 缺失可能会导致老年小鼠小脑的神经退行性病变。

脑组织中的基因表达具有较强的时空特异性。例如，ALKBH5 在小脑中的表达在小鼠的不同年龄阶段有所不同，在 P7 中表达最高，随着小脑发育的完成，ALKBH5 表达逐渐减少^[5]。而本研究中我们发现，随着小鼠生理性衰老的进行，ALKBH5 在小脑的表达再次升高。另一方面，在小鼠小脑发育早期阶段，ALKBH5 主要表达于颗粒神经元^[54]。但在老年小鼠中，我们发现 ALKBH5 多表达于浦肯野神经元。ALKBH5 在小脑中表达的时空特异性与细胞特异性表明该基因在不同阶段的小脑中发挥的功能亦有所差别，但是目前调控 ALKBH5 基因表达的上游因素并不清楚。有研究表明低氧可以诱导 ALKBH5 的表达升高^[24]。脑衰老的进程中同样会有低氧的发生^[70]，而且浦肯野细胞对于低氧损伤非常敏感^[71]，因此我们推测脑衰老过程中 ALKBH5 表达的升高或许与低氧环境有关，后续我们将对此开展进一步的验证与探究。

浦肯野细胞是小脑皮层中唯一的传出神经元，被认为是协调身体运动的最重要的功能神经元^[72]。在人类疾病中，浦肯野细胞缺陷与多种遗传性共济失调有关，如小脑萎缩和进行性浦肯野细胞丧失^[73]。本研究中我们发现在老年小鼠小脑中 ALKBH5 在浦肯野细胞中高表达，而且在老年 KO 小鼠中观察到浦肯野神经元的胞体和树突数量减少最为明显，这一表型与浦肯野细胞参与调控小脑共济失调的功能相对应^[72]。同时我们注意到老年 KO 小鼠表现出异常的步态，并伴有进行性运动障碍，这与人类的遗传性共济失调病理高度相似^[74]，

提示 ALKBH5 可能参与人类遗传性共济失调的疾病发生。为了阐明 ALKBH5 蛋白与小脑共济失调的关联,则需要鉴定它在浦肯野细胞中的去甲基化作用底物,以及经由该底物在浦肯野神经元中的作用机制。已有研究表明 ITRP1, AFG3L2, TRPC3 和 CACNA1G 等基因通过控制线粒体钙摄取来调节细胞内神经元钙稳态^[75],这些基因功能的异常可引起浦肯野神经元的变性,从而导致小脑共济失调。因此后续我们将继续探究 ALKBH5 蛋白是否通过 m⁶A 去甲基化作用调控这类基因。

过去有研究报道小脑发育及其功能的正常发挥均受到表观遗传调控^[74],而本文中我们证明了 *Alkbh5* 缺失导致小脑神经退行性病变,提示小脑衰老的过程亦受到表观转录调控,这为全面解析老年小脑退行性病变的分子机制提供了新的方向。后续我们将进一步探究 ALKBH5 基因在浦肯野神经元中的去甲基化作用底物,通过阐明其作用机制诠释 *Alkbh5* 缺失导致的浦肯野神经元受损、并进一步引起神经退行性病变的分子机制。

小 结

一、RNA m⁶A 去甲基化酶 ALKBH5 在胶质母细胞瘤中调控铁代谢的机制研究

1. 本研究的主要结论

- (1) ALKBH5 介导的 RNA m⁶A 水平的改变会影响胶质母细胞瘤中铁离子含量。
- (2) 在胶质母细胞瘤中, ALKBH5 通过 m⁶A 调控 *FTH1* RNA 的翻译进而影响铁代谢途径。
- (3) ALKBH5 影响 *FTH1* 与其翻译抑制因子 IRP2 蛋白之间的结合。

2. 本研究的应用价值与创新性

- (1) 通过对 RNA 剪切、翻译与降解机制的依次分析, 我们首次发现 ALKBH5 通过去甲基化调控铁代谢基因的翻译进程, 我们推测这一过程是 ALKBH5 在胶质母细胞瘤中发挥促癌作用的重要机制之一。
- (2) IRP2 作为铁的调控蛋白, 会和 *FTH1* 结合调控铁代谢, 本课题探究 m⁶A 会影响 IRP2 与 *FTH1* 的结合, 进而对铁代谢的调控机制进行了深入研究和理解。

3. 本研究的局限性

- (1) 本课题主要探究去甲基化酶 ALKBH5 会影响 IRP2 对 *FTH1* 翻译的抑制。相关研究表明 IRPs 蛋白, 包括 IRP1 和 IRP2 都会与 *FTH1* 结合, 并且抑制 *FTH1* 的翻译, m⁶A 修饰如何影响 IRP1 与 *FTH1* 的结合有待进一步研究。
- (2) 在进行 m⁶A-IP 测序中, 敲低 ALKBH5 之后, 铁蛋白基因 *FTH1* 的甲基化水平升高最为明显, 所以在该课题中, 我们以 *FTH1* 为主要靶点进行后续机制研究。除此之外, 也有其他的铁代谢相关基因也受 m⁶A 水平的影响, 这些基因的相关机制有待进一步研究。

4. 未来的研究方向

- (1) 针对 ALKBH5 对下游 mRNA 翻译的调控作用展开进一步的研究, 同时可针对已发现的分子机制进行相应的动物体内水平验证, 揭示 ALKBH5 通过调节铁代谢通路在胶质母细胞瘤中的功能。
- (2) 除 *FTH1* 外, 可关注铁代谢途径的其它基因如 *FTL*、*TFR* 等, 利用相关的小鼠模型探究其在胶质母细胞瘤中发挥的作用, 进一步揭示 m⁶A 调控铁代谢途径在胶质母细胞瘤中发挥的功能。

二、RNA m⁶A 去甲基化酶 ALKBH5 在小脑神经退行性病变中的研究

1. 本研究的主要结论

- (1) ALKBH5 蛋白在小脑中的表达随着小鼠衰老过程逐渐升高。
- (2) *Alkbh5* 缺失的老年小鼠,其体重、全脑重和小脑重相较于 WT 小鼠均有所下降。
- (3) *Alkbh5* 缺失的老年小鼠的浦肯野细胞和神经元树突数量明显减少。
- (4) *Alkbh5* 缺失的老年小鼠呈现出小脑神经退行性病变。

2. 本研究的创新性

本研究利用中年和老年的野生型小鼠与 *Alkbh5* 敲除小鼠,证明 ALKBH5 对于维持老年小鼠小脑的正常功能非常重要,从而证明了 RNA m⁶A 甲基化与小脑神经退行性疾病之间的关联,从而为研发小脑共济失调等疾病的治疗策略提供新的思路。

3. 本研究的局限性

- (1) 在前期的研究中已发现老年 KO 小鼠与 WT 小鼠比较,脑重下降,其中小脑出现明显下降的现象。但是脑中其他脑区的变化我们没有深入研究。前期我们通过对大脑皮质比较分析,发现虽然在 12 月龄小鼠中未见改变,但是 18 月龄的 WT 和 KO 小鼠的皮质前后径长度和皮层厚度亦有变薄的现象,因此 ALKBH5 在大脑皮层以及其他脑区的功能仍需进一步探究。
- (2) 研究发现老年 KO 小鼠中,浦肯野细胞数量明显减少,小鼠有步态紊乱的现象,导致其出现行为及形态学异常的分子机制仍有待进一步探究。

参考文献

1. Liu, N. and T. Pan, *RNA epigenetics*. Transl Res, 2015. **165**(1): p. 28-35.
2. Zaccara, S., R.J. Ries, and S.R. Jaffrey, *Reading, writing and erasing mRNA methylation*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019. **20**(10): p. 608-624.
3. Wang, X., et al., *Structural basis of N(6)-adenosine methylation by the METTL3-METTL14 complex*. Nature, 2016. **534**(7608): p. 575-8.
4. Wang, P., K.A. Doxtader, and Y. Nam, *Structural Basis for Cooperative Function of Mettl3 and Mettl14 Methyltransferases*. Mol Cell, 2016. **63**(2): p. 306-317.
5. Huang, Q., et al., *The RNA m(6)A writer WTAP in diseases: structure, roles, and mechanisms*. Cell Death Dis, 2022. **13**(10): p. 852.
6. Yue, Y., et al., *VIRMA mediates preferential m(6)A mRNA methylation in 3'UTR and near stop codon and associates with alternative polyadenylation*. Cell Discov, 2018. **4**: p. 10.
7. Wen, J., et al., *Zc3h13 Regulates Nuclear RNA m(6)A Methylation and Mouse Embryonic Stem Cell Self-Renewal*. Mol Cell, 2018. **69**(6): p. 1028-1038.e6.
8. Wang, X., et al., *RBM15 facilitates laryngeal squamous cell carcinoma progression by regulating TMBIM6 stability through IGF2BP3 dependent*. J Exp Clin Cancer Res, 2021. **40**(1): p. 80.
9. Su, R., et al., *METTL16 exerts an m(6)A-independent function to facilitate translation and tumorigenesis*. Nat Cell Biol, 2022. **24**(2): p. 205-216.
10. Jia, G., et al., *N6-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO*. Nat Chem Biol, 2011. **7**(12): p. 885-7.
11. Zhou, K.I. and T. Pan, *An additional class of m(6)A readers*. Nat Cell Biol, 2018. **20**(3): p. 230-232.
12. Louloup, A., et al., *Transient N-6-Methyladenosine Transcriptome Sequencing Reveals a Regulatory Role of m6A in Splicing Efficiency*. Cell Rep, 2018. **23**(12): p. 3429-3437.
13. Roundtree, I.A., et al., *YTHDC1 mediates nuclear export of N(6)-methyladenosine methylated mRNAs*. Elife, 2017. **6**.
14. Wang, X., et al., *N(6)-methyladenosine Modulates Messenger RNA Translation Efficiency*. Cell, 2015. **161**(6): p. 1388-99.
15. Jiang, X., et al., *The role of m6A modification in the biological functions and diseases*. Signal Transduct Target Ther, 2021. **6**(1): p. 74.
16. Zhang, B., et al., *The critical roles of m6A modification in metabolic abnormality*

- and cardiovascular diseases*. Genes Dis, 2021. **8**(6): p. 746-758.
17. Winkler, R., et al., *m(6)A modification controls the innate immune response to infection by targeting type I interferons*. Nat Immunol, 2019. **20**(2): p. 173-182.
 18. Du, K., et al., *m(6)A RNA Methylation Controls Neural Development and Is Involved in Human Diseases*. Mol Neurobiol, 2019. **56**(3): p. 1596-1606.
 19. Lin, S., et al., *The m(6)A Methyltransferase METTL3 Promotes Translation in Human Cancer Cells*. Mol Cell, 2016. **62**(3): p. 335-345.
 20. Zhang, S., et al., *m(6)A Demethylase ALKBH5 Maintains Tumorigenicity of Glioblastoma Stem-like Cells by Sustaining FOXM1 Expression and Cell Proliferation Program*. Cancer Cell, 2017. **31**(4): p. 591-606.e6.
 21. Cui, Q., et al., *m(6)A RNA Methylation Regulates the Self-Renewal and Tumorigenesis of Glioblastoma Stem Cells*. Cell Rep, 2017. **18**(11): p. 2622-2634.
 22. Bansal, H., et al., *WTAP is a novel oncogenic protein in acute myeloid leukemia*. Leukemia, 2014. **28**(5): p. 1171-4.
 23. Li, Z., et al., *FTO Plays an Oncogenic Role in Acute Myeloid Leukemia as a N(6)-Methyladenosine RNA Demethylase*. Cancer Cell, 2017. **31**(1): p. 127-141.
 24. Zhang, C., et al., *Hypoxia induces the breast cancer stem cell phenotype by HIF-dependent and ALKBH5-mediated m⁶A-demethylation of NANOG mRNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(14): p. E2047-56.
 25. Kwok, C.T., et al., *Genetic alterations of m(6)A regulators predict poorer survival in acute myeloid leukemia*. J Hematol Oncol, 2017. **10**(1): p. 39.
 26. Paris, J., et al., *Targeting the RNA m(6)A Reader YTHDF2 Selectively Compromises Cancer Stem Cells in Acute Myeloid Leukemia*. Cell Stem Cell, 2019. **25**(1): p. 137-148.e6.
 27. Huang, H., et al., *Recognition of RNA N(6)-methyladenosine by IGF2BP proteins enhances mRNA stability and translation*. Nat Cell Biol, 2018. **20**(3): p. 285-295.
 28. Chen, X.Y., J. Zhang, and J.S. Zhu, *The role of m(6)A RNA methylation in human cancer*. Mol Cancer, 2019. **18**(1): p. 103.
 29. Ostrom, Q.T., et al., *CBTRUS Statistical Report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010-2014*. Neuro Oncol, 2017. **19**(suppl_5): p. v1-v88.
 30. Wu, W., et al., *Glioblastoma multiforme (GBM): An overview of current therapies and mechanisms of resistance*. Pharmacol Res, 2021. **171**: p. 105780.
 31. Jung, M., et al., *Iron as a Central Player and Promising Target in Cancer*

- Progression*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(2).
32. Merk, K., et al., *The incidence of cancer among blood donors*. Int J Epidemiol, 1990. **19**(3): p. 505-9.
 33. Osborne, N.J., et al., *HFE C282Y homozygotes are at increased risk of breast and colorectal cancer*. Hepatology, 2010. **51**(4): p. 1311-8.
 34. Lok, C.N. and P. Ponka, *Identification of a hypoxia response element in the transferrin receptor gene*. J Biol Chem, 1999. **274**(34): p. 24147-52.
 35. Weston, C., et al., *Aberrations in the Iron Regulatory Gene Signature Are Associated with Decreased Survival in Diffuse Infiltrating Gliomas*. PLoS One, 2016. **11**(11): p. e0166593.
 36. Lee, S.Y., et al., *HFE polymorphisms affect survival of brain tumor patients*. J Neurooncol, 2015. **122**(1): p. 97-104.
 37. Aziz, N. and H.N. Munro, *Iron regulates ferritin mRNA translation through a segment of its 5' untranslated region*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(23): p. 8478-82.
 38. Hentze, M.W., et al., *Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism*. Cell, 2010. **142**(1): p. 24-38.
 39. Wang, J. and K. Pantopoulos, *Regulation of cellular iron metabolism*. Biochem J, 2011. **434**(3): p. 365-81.
 40. Hentze, M.W., et al., *Identification of the iron-responsive element for the translational regulation of human ferritin mRNA*. Science, 1987. **238**(4833): p. 1570-3.
 41. Mazumder, B., V. Seshadri, and P.L. Fox, *Translational control by the 3'-UTR: the ends specify the means*. Trends Biochem Sci, 2003. **28**(2): p. 91-8.
 42. Koeller, D.M., et al., *A cytosolic protein binds to structural elements within the iron regulatory region of the transferrin receptor mRNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(10): p. 3574-8.
 43. Babu, K.R. and M.U. Muckenthaler, *miR-148a regulates expression of the transferrin receptor 1 in hepatocellular carcinoma*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 1518.
 44. Sato, Y., et al., *Cerebrospinal fluid ferritin in glioblastoma: evidence for tumor synthesis*. J Neurooncol, 1998. **40**(1): p. 47-50.
 45. Li, F., et al., *N(6)-Methyladenosine Modulates Nonsense-Mediated mRNA Decay in Human Glioblastoma*. Cancer Res, 2019. **79**(22): p. 5785-5798.
 46. Su, R., et al., *R-2HG Exhibits Anti-tumor Activity by Targeting*

- FTO/m(6)A/MYC/CEBPA Signaling*. Cell, 2018. **172**(1-2): p. 90-105.e23.
47. Huang, R., et al., *RNA m(6)A Demethylase ALKBH5 Protects Against Pancreatic Ductal Adenocarcinoma via Targeting Regulators of Iron Metabolism*. Front Cell Dev Biol, 2021. **9**: p. 724282.
48. Dominissini, D., et al., *Topology of the human and mouse m6A RNA methylomes revealed by m6A-seq*. Nature, 2012. **485**(7397): p. 201-6.
49. Chang, M., et al., *Region-specific RNA m(6)A methylation represents a new layer of control in the gene regulatory network in the mouse brain*. Open Biol, 2017. **7**(9).
50. Livneh, I., et al., *The m(6)A epitranscriptome: transcriptome plasticity in brain development and function*. Nat Rev Neurosci, 2020. **21**(1): p. 36-51.
51. Deng, J., et al., *m(6)A RNA methylation in brain injury and neurodegenerative disease*. Front Neurol, 2022. **13**: p. 995747.
52. You, S., et al., *Research Progress on the Role of RNA m6A Modification in Glial Cells in the Regulation of Neurological Diseases*. Biomolecules, 2022. **12**(8).
53. Yoon, K.J., et al., *Temporal Control of Mammalian Cortical Neurogenesis by m(6)A Methylation*. Cell, 2017. **171**(4): p. 877-889.e17.
54. Ma, C., et al., *RNA m(6)A methylation participates in regulation of postnatal development of the mouse cerebellum*. Genome Biol, 2018. **19**(1): p. 68.
55. Wang, C.X., et al., *METTL3-mediated m6A modification is required for cerebellar development*. PLoS Biol, 2018. **16**(6): p. e2004880.
56. Han, M., et al., *Abnormality of m6A mRNA Methylation Is Involved in Alzheimer's Disease*. Front Neurosci, 2020. **14**: p. 98.
57. Shu, L., et al., *Emerging Roles of N6-Methyladenosine Modification in Neurodevelopment and Neurodegeneration*. Cells, 2021. **10**(10).
58. Huang, H., et al., *Altered Expression of the m6A Methyltransferase METTL3 in Alzheimer's Disease*. eNeuro, 2020. **7**(5).
59. Gordon, P.H., et al., *Clinical features that distinguish PLS, upper motor neuron-dominant ALS, and typical ALS*. Neurology, 2009. **72**(22): p. 1948-52.
60. Johnson, F.O. and W.D. Atchison, *The role of environmental mercury, lead and pesticide exposure in development of amyotrophic lateral sclerosis*. Neurotoxicology, 2009. **30**(5): p. 761-5.
61. Tanudjojo, B., et al., *Phenotypic manifestation of α -synuclein strains derived from Parkinson's disease and multiple system atrophy in human dopaminergic neurons*. Nat Commun, 2021. **12**(1): p. 3817.

62. Batelli, S., et al., *The Parkinson's disease-related protein DJ-1 protects dopaminergic neurons in vivo and cultured cells from alpha-synuclein and 6-hydroxydopamine toxicity*. Neurodegener Dis, 2015. **15**(1): p. 13-23.
63. Hess, M.E., et al., *The fat mass and obesity associated gene (Fto) regulates activity of the dopaminergic midbrain circuitry*. Nat Neurosci, 2013. **16**(8): p. 1042-8.
64. Liberzon, A., *A description of the Molecular Signatures Database (MSigDB) Web site*. Methods Mol Biol, 2014. **1150**: p. 153-60.
65. Xuan, J.J., et al., *RMBase v2.0: deciphering the map of RNA modifications from epitranscriptome sequencing data*. Nucleic Acids Res, 2018. **46**(D1): p. D327-d334.
66. Ye, J., et al., *YTHDF1-enhanced iron metabolism depends on TFRC m(6)A methylation*. Theranostics, 2020. **10**(26): p. 12072-12089.
67. Pulos-Holmes, M.C., et al., *Repression of ferritin light chain translation by human eIF3*. Elife, 2019. **8**.
68. Zheng, G., et al., *ALKBH5 is a mammalian RNA demethylase that impacts RNA metabolism and mouse fertility*. Mol Cell, 2013. **49**(1): p. 18-29.
69. Bai, L., et al., *m6A Demethylase FTO Regulates Dopaminergic Neurotransmission Deficits Caused by Arsenite*. Toxicol Sci, 2018. **165**(2): p. 431-446.
70. Bartscher, J., et al., *Hypoxia and brain aging: Neurodegeneration or neuroprotection?* Ageing Res Rev, 2021. **68**: p. 101343.
71. Hausmann, R., S. Seidl, and P. Betz, *Hypoxic changes in Purkinje cells of the human cerebellum*. Int J Legal Med, 2007. **121**(3): p. 175-83.
72. Wang, S.S., A.D. Kloth, and A. Badura, *The cerebellum, sensitive periods, and autism*. Neuron, 2014. **83**(3): p. 518-32.
73. Ashizawa, T., G. Öz, and H.L. Paulson, *Spinocerebellar ataxias: prospects and challenges for therapy development*. Nat Rev Neurol, 2018. **14**(10): p. 590-605.
74. Shakkottai, V. and H. Paulson, *Expanding the genetic basis of ataxia*. Nat Genet, 2019. **51**(4): p. 580-581.
75. Huang, M. and D.S. Verbeek, *Why do so many genetic insults lead to Purkinje Cell degeneration and spinocerebellar ataxia?* Neurosci Lett, 2019. **688**: p. 49-57.

缩略表

英文名称缩写	全称
IRP2	Iron regulatory protein-2
IRP1	Iron regulatory protein-1
FTH1	Ferritin heavy polypeptide 1
DFO	Deferoxamine B mesylate
FAC	Ammonium iron(III) citrate
MAP2	microtubule-associated protein 2
GFAP	glial fibrillary acidic protein
WB	Western Blot
IP	Immunoprecipitation
RIP	RNA Binding Protein Immunoprecipitation

综 述

铁代谢失调与肿瘤发生发展的相关研究进展

【摘要】：

铁是人体必需的微量元素，其缺乏或过量均会引起多种生理过程。大量证据表明，铁代谢与肿瘤的发生、发展密切相关。此外，铁在细胞死亡中起着重要作用，这对于潜在的肿瘤治疗策略非常重要。在这篇综述中，我们回顾了关于各种类型肿瘤中铁代谢紊乱的最新研究，铁浓缩和铁蛋白吞噬中铁的功能和特性，以及基于肿瘤治疗方法，提供了更多关于预防和治疗肿瘤的新思路。

关键词：铁代谢，肿瘤，铁死亡

【Abstract】

Iron is an essential trace element in the human body, and its deficiency or excess can cause various physiological processes. A large amount of evidence suggests that iron metabolism is closely related to the occurrence and development of tumors. In addition, iron plays an important role in cell death, which is crucial for potential tumor treatment strategies. In this review, we review the latest research on iron metabolism disorders in various types of tumors, the function and characteristics of iron in iron concentration and ferritin phagocytosis, and provide more new ideas for preventing and treating tumors based on tumor treatment methods.

Keywords: iron metabolism, tumors, iron death

1. 细胞内正常的铁代谢

铁作为一种必需的微量元素，在人体中参与多种代谢过程。人体内铁代谢的平衡是通过调节铁的摄入和再利用来维持的。

1.1 铁在体内摄取过程

铁代谢的稳态是一个需要严格控制的生理过程。铁主要以氧化态 (Fe^{3+}) 存在，分为膳食铁和环境铁。膳食铁主要以非血红素结合铁或血红素铁的形式存在^[1]。血红素铁比非血红素结合铁具有更高的吸收率。饮食中的铁主要在十二指肠中被十二指肠细胞色素 B (DCYTB) 还原为 Fe^{2+} ，并在二价金属转运蛋白 1 (DMT1) 的协同

作用下被肠上皮细胞吸收^[2]。血红素铁也通过未知的机制被肠道细胞吸收,并被血红素加氧酶-1 (HO-1) 代谢以释放 Fe^{2+} 。血红素铁通过未知机制被肠细胞吸收,并被血红素加氧酶-1 (HO-1) 降解,释放出 Fe^{2+} , Fe^{2+} 通过肠上皮细胞基底侧的铁外排泵铁蛋白 (FPN1) 转运出细胞,从而被血红素 (HEPH) 氧化为 Fe^{3+} ^[2]; 然后 Fe^{3+} 与转铁蛋白 (TF) 结合并通过门静脉进入循环。 Fe^{3+} 与转铁蛋白 (TF) 结合形成的复合物与细胞表面的转铁蛋白受体 (TFR1) 结合,并被吸收到细胞中形成内体^[3]。随后,它被六种跨膜前列腺上皮抗原 3 (STEAP3) 还原为 Fe^{2+} , 然后通过 DMT1 转运到细胞质中以发挥生理功能或构成细胞质不稳定铁池 (LIP) ^[2,4]。

1.2 铁代谢调节

细胞内铁稳态主要通过铁依赖性蛋白网络调节,包括铁反应元件结合蛋白 (iron regulatory protein, IRPs), 其中 IRP1 和 IRP2 都是重要成分^[5]。值得注意的是,硫氧还蛋白家族蛋白是铁代谢中的重要介质,这些蛋白调节 IRP 的表达^[6]。为了确保铁稳态,IRP 与编码细胞铁调节必需蛋白的 mRNA 未翻译区上的相应铁反应元件结合,从而参与铁摄取 (Transferrin, TFR1)、储存 (Fetitin, FT)、再分配和流出 (ferroportin 1, FPN1)^[7]。在缺乏细胞内铁的情况下,IRP 可以抑制 FPN1 和 FT 的翻译,但增加 TFR1 的蛋白质合成。相反,当细胞内铁充足时,由于 IRP 的不稳定性,FPN1 和 FT 的合成增加,同时促进 TFR1 的降解^[8]。IRP1/2 是维持细胞铁稳态的关键铁调节因子。IRP1 是一种含有 [4Fe-4S] 簇的胞质乌头酶。当细胞内缺乏铁时,形成不完整的 [3Fe-4S] 簇,乌头酶的酶活性丧失,之后这种蛋白质启动其 IRP1 活性。当蛋白质含有 [3Fe-4S] 簇时,它可以与 IREs 结合^[9,10]。通过这些机制,IRP 不仅可以满足细胞铁的代谢需求,还可以最大限度地减少过量铁的毒性作用。

2. 铁代谢与癌症

大量研究表明,异常铁稳态是癌症的标志之一。由于肿瘤细胞的代谢和增殖速率通常高于正常细胞,因此它们对铁的需求也显著高于正常细胞的需求,这导致了过度的氧化应激;然而,肿瘤细胞可以同时上调抗氧化防御以维持生存,例如激活抗氧化转录因子和促进各种抗氧化基因的表达^[11]。相反,由于肿瘤细胞的生长和增殖强烈依赖铁,因此它们比正常细胞对铁耗竭更敏感。癌症中的这种失衡主要表现为铁代谢增加、铁亲和力增加、铁输入和输出抑制,从而完成铁积累。

2.1 铁吸收、储存与癌症的关系

2.1.1 铁吸收与癌症的关系

在 1980 年,有研究表明 *TFR1* 在乳腺癌中显著上调^[12]。随后的研究证实,*TFR1* 在各种癌症中高度表达,如胶质瘤、白血病、乳腺癌和卵巢癌^[13-16]。最近的研究表明,*Beclin 1* 通过调节 *EGFR* 和 *TFR1* 的内吞运输和降解来抑制乳腺癌细胞的增殖^[17]。研究发现雌激素抑制铁蛋白的合成,并增强细胞内铁的流出。同时使用基因表达谱交互分析(GEPIA)数据库分析,研究发现 *TFR1* 在肝细胞癌组织和肝细胞癌干细胞中显著上调^[18],敲低 *TFR1* 减少了铁的积累、erastin 诱导的活性氧(ROS)的积累,并维持了线粒体功能,从而抑制肿瘤的发展^[18]。此外,*TFR1* 的高表达与甲状腺癌 ERK 信号通路的激活密切相关,导致参与细胞内游离铁异常积累的基因紊乱和耐药性^[19]。这些结果表明 *TFR1* 可能具有肿瘤特异性的作用。

2.1.2 细胞内铁代谢与癌症关系

铁稳态已被证明在不同水平下受到调节。在细胞水平上,铁代谢主要受铁反应元件铁调节蛋白(IRE-IRP)系统的转录后控制^[20-23]。在低铁条件下,IRP 与编码铁蛋白亚单位 FPN、DMT1 和 TfR-1 的 mRNA 的 IREs 结合。结合可稳定 TfR-1 和 DMT1 mRNA,同时抑制铁蛋白和 FPN 的翻译,从而提高铁的吸收和利用率,减少铁的储存和流出^[24-26]。在系统水平上,铁稳态主要由关键的铁感应和调节激素铁调素控制。铁调素促进 FPN 降解,从而阻止铁从肠道肠细胞、网状内皮细胞(巨噬细胞)和肝细胞输出到循环中^[27]。肿瘤或肝脏合成的铁调素有助于癌症的增殖和进展。BMP/Smad4/Hamp-铁调素调节途径中的重要基因变异有助于预测接受确定性放疗的 NSCLC 患者的预后^[28]。研究表明,调节铁调素水平以降低肿瘤细胞中铁的利用率可能是抗癌治疗的一种新策略^[29]。正如在肿瘤细胞中所承认的那样,那些提高细胞内铁含量的蛋白质(TfR-1、DMT1、铁调素)被广泛上调,而那些较低的铁水平(FPN、hephaestin)则被下调。否则它们被认为是乳腺癌、肝癌、肺癌、结肠癌、脑癌、前列腺癌、卵巢癌、胃癌和胰腺癌、白血病和胶质瘤患者临床预后的有希望的预测因子^[30-32]。

IRP1 或 IRP2 可以增加细胞内铁离子含量,它们的异常激活与许多癌症密切相关。与正常结肠粘膜相比,IRP2 在癌症中过度表达,并与 TfR1 表达呈正相关。此外,IRP2 的表达与 BRAF 的突变有关,BRAF 主要发生在结直肠癌的早期,通常与预后不良有关^[33]。IRP1 和 IRP2 在铁参与的信号通路中调节肿瘤进展,例如 IRP2 由泛素连接酶 FBXL5 调节,其在充足铁的条件下介导 IRP2 泛素化和降解;FBXL5 的失调与人类肝细胞癌的不良预后有关^[34];这种 IRP2-FBXL5 相互作用可能有助于从

IREs 中释放 IRP2, 以改变铁代谢基因的翻译^[35]。IRP2 也由去平衡酶 OTUD1 调节, 该酶通过去平衡和稳定 IRP2 促进 TFR1 介导的铁转运, 导致 ROS 生成增加, 并且发现 OTUD1 的下调与结直肠癌的不良预后高度相关^[36]; 此外, IRP1/2 失调的具体原因可能与 TAp63 的抑制和 MDM2 的激活有关^[37,38]。值得注意的是, 化疗和靶向治疗可能共同破坏 IRP 介导的铁调节。研究发现 MEK 抑制剂曲美替尼在四种结肠直肠癌细胞系中持续抑制 IRP2 的表达, 导致 TFR1 表达降低和铁蛋白表达增加^[39]; 研究证实铁死亡诱导剂 erastin 和 RSL3 增加了 IRP1 和 IRP2 的表达, 其敲低反过来抑制 erastin 或 RSL3 诱导细胞死亡, IRP2 可以增强 IRP1 在黑色素瘤细胞中的促进作用^[40]。

2.1.3 铁外排与癌症的关系

FPN1 (Ferroportin) 是唯一的铁输出蛋白, 参与细胞内铁浓度的调节, 在大多数肿瘤中观察到其异常下调^[41-44]。FPN 过度表达诱导自噬并激活 p53 及其下游靶点 p21, 从而导致前列腺癌细胞周期停滞和应激诱导的 DNA 损伤^[45]。乳腺癌细胞 (TNBC) 中 FPN 水平降低刺激增殖和上皮间充质干细胞分化。E-钙粘蛋白的增加和 N-钙粘蛋白、Twist 和 Slug 表达的减少表明了过渡 (EMT)^[46]。这些发现丰富了我们对于 FPN 介导铁输出的认识, 并有助于在癌症治疗中操纵 FPN 的策略制定。

FPN1 在肿瘤中被证实具有抑制作用, 例如在前列腺癌细胞系中, 铁蛋白上调可促进增殖、迁移和凋亡抵抗, FPN1 过度表达可诱导 p53 和细胞自噬, 并降低体内肿瘤生长^[47]; FPN1 的过度表达降低了乳腺癌的增殖、集落形成、肿瘤生长以及肝转移^[48]。与此相同的是, 有研究表明, FPN1 通过破坏铁稳态来调节肿瘤进展。一项研究表明, FPN1 介导的铁代谢可能在急性髓系白血病的化疗敏感性和治疗结果中发挥作用^[49]; 类似地, ZNF217 的过度表达通过抑制 FPN1 传导的铁流出促进前列腺癌生长^[50]; FPN1 的转录因子 Nr1h2 通过上调 FPN1 抑制前列腺癌细胞的增殖和转移, 这也与细胞内铁蛋白含量降低有关^[51], Nr1h2 能够通过促进 FPN1 转录抑制骨髓瘤细胞增殖^[52]。此外, 研究证明, 敲低 FPN1 通过增加铁依赖性脂质 ROS 的积累, 加速了 erastin 诱导的对神经母细胞瘤的抑制, FPN1 抑制剂可能为神经母细胞瘤的化学增敏提供一种新的方法^[53]; USP35 可以通过去平衡 FPN1 维持其蛋白的稳定性, 并减少由 erastin/RSL3 引发的铁紊乱, 从而促进肺癌细胞生长和肿瘤进展。同时, 通过靶向肺癌中的 FPN1, 敲除 USP35 提高了癌细胞对顺铂和紫杉醇的敏感性^[54]。然而, 一项研究表明, Lcn-2 的基质/巨噬细胞表达与肿瘤发病、肺转移和复发相关, 而 FPN1 不是通过分析自发聚合酶中 T 癌基因 (PyMT) 乳腺癌模型中脂蛋白-2 (Lcn-2) 和 FPN1 的表达谱, 并从基因表达合成中挖掘公开可用的 TCGA 和 GEO 数据库来实现的^[55]。巨噬细胞通过迫使 Lcn-2-结合铁的分泌和增加 FPN1 的表达, 为乳腺肿瘤的微环境提供铁^[55]。然而, FPN1 的基质/巨噬细胞表达

与肿瘤发作、肺转移和复发的原因需要进一步研究。

2.3 癌症中的铁转运蛋白铁调素轴(hepcidin ferroportin)

铁调素(Hepcidin)抑制肠粘膜细胞和巨噬细胞释放铁入血清,维持铁代谢的稳定。癌症中铁调节剂的紊乱导致铁稳态的改变。肝素是 FPN1 的负调节因子,在多种肿瘤中显著上调,如乳腺癌、结直肠癌和前列腺癌^[56-58]。许多研究表明,hepcidin 对肿瘤进展的促进作用,例如,与野生型同卵双胞胎相比,结肠肿瘤上皮细胞中缺乏 hepcidine 的小鼠显著减少了散发性大肠癌模型的数量、肿瘤负担和大小,而缺乏 FPN1 导致细胞内铁积聚并促进肿瘤的发生^[59];急性髓系白血病中转铁蛋白低表达,铁蛋白和铁调素的高表达^[60];此外 hepcidin 通过减少 FPN1 的表达和增加细胞内铁水平来增强前列腺癌细胞的增殖、迁移和抗凋亡能力^[61]。总之,癌症细胞通常增加铁的输入并抑制其输出,从而实现铁的积累。然而,目前尚不完全清楚其具体作用机制。

2.4 铁死亡(Ferroptosis) 与癌症的关系

近年来,非凋亡细胞死亡在肿瘤治疗中引起了广泛关注,其中脱铁性贫血被定义为大量脂质过氧化介导的膜损伤引起的铁依赖性调节性坏死^[62-64]。在经历脱铁症后,细胞表现出独特的迹象,如细胞膜破裂、细胞质肿胀、线粒体膜密度增加、线粒体嵴减少/消失、线粒体外膜破裂等。脱铁症可通过两种主要途径发生:外部或转运蛋白依赖途径,以及内部或酶调节的途径^[65]。脱铁症是由氧化剂和抗氧化剂产生之间的氧化还原失衡引起的,这是由产生或解毒自由基和脂质氧化产物的许多氧化还原活性酶的异常表达和活性驱动的^[65]。

线粒体作为代谢的中心,是大多数哺乳动物细胞中 ROS 的重要来源。早期的研究表明,线粒体介导的 ROS 产生对于脱铁性贫血是不必要的^[66]。然而,最近的研究表明,线粒体介导的 ROS 产生、DNA 应激和代谢重编程对于脂质过氧化和诱导脱铁性贫血是必要的^[67-69]。在这里,我们关注最近的研究,旨在阐明癌症中铁死亡的可能新机制。

先前的研究表明,IRP2 蛋白的稳定性主要由 E3 泛素连接酶 FBXL5 调节^[70],而 Terzi 等人证实了 IRP2 的一种新的调节机制,它可以感知 ISC 合成的缺失,并且 ISC 缺陷可以增强 IRP2 与靶 mRNA 的结合。ISC 由铁离子和硫离子组成,形成[1Fe-0S]、[2Fe-2S]、[3Fe-4S]和[4Fe-4S]团簇^[71]。抑制 ISC 合成可以激活 IRP2 并促进脱铁敏感性^[72];与这一发现一致,ISC 维持不足已被证明能有力地激活铁饥饿反应并引发脱铁症^[73]。值得注意的是,无机硫首先由半胱氨酸脱硫酶 NFS1 从半胱氨酸中产生,ISC 在 frataxin (FXN) 的帮助下在 ISC 组装酶 (ISCU) 上形成 (122),其

被认为定位于线粒体基质中并参与 ISC 的生物合成, FXN 缺乏加速 erastin 活化的脱铁性贫血^[74]。此外, ISCU 的过表达通过调节铁代谢、挽救线粒体功能和提高 GSH 水平, 显著减轻了双氢青蒿素诱导的脱铁性贫血^[75]。此外, FXN 可以激活 NFS1 并加速 ISC 组装的速率限制性硫转移步骤, NFS1 的抑制使癌症细胞对铁下垂敏感^[76]。研究表明通过阐明 CAIX 在氧化还原稳态和通过 pH 调节预防脱铁性贫血中的重要作用, 确定了碳酸酐酶 IX (CAIX) 和 NFS1 之间的一种新的合成致死相互作用, 这可能有助于研究人员开发治疗实体瘤的新策略^[77]。

4. 结论

据我们所知, 铁在肿瘤的发生、发展、转移和微环境中起着不同的作用。癌细胞的增殖和进展需要大量的铁。许多铁代谢相关蛋白在恶性肿瘤中的表达受到异常调节, 铁在癌症中改变了多种信号通路和生理过程, 表明铁在癌症发展中的重要作用。总的来说, 异常的铁稳态在某种程度上是癌症的标志。因此, 基于铁稳态研究为癌症治疗提供新的选择。除了通过铁螯合剂降低细胞内铁含量外, 靶向铁相关蛋白进行药物递送或通过提高细胞内铁水平都已被证实是癌症治疗的可行方法。尽管在现有的研究中已经阐明了癌症发展中大量的铁相关信号, 但对铁稳态维持机制、铁相关蛋白功能以及铁对表观遗传学和微环境的整体影响仍需进一步探索。基于铁代谢调节的癌症治疗策略的有效性和安全性仍需进一步提高。

参考文献

- [1] Abbaspour N, Hurrell R, Kelishadi R. Review on Iron and Its Importance for Human Health. *J Res Med Sci* (2014) 19(2):164–74.
- [2] Vogt AS, Arsiwala T, Mohsen M, Vogel M, Manolova V, Bachmann MF. On Iron Metabolism and Its Regulation. *Int J Mol Sci* (2021) 22(9):4591. doi: 10.3390/ijms22094591
- [3] Kawabata H. Transferrin and Transferrin Receptors Update. *Free Radical Biol Med* (2019) 133:46–54. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.06.037
- [4] Bogdan AR, Miyazawa M, Hashimoto K, Tsuji Y. Regulators of Iron Homeostasis: New Players in Metabolism, Cell Death, and Disease. *Trends Biochem Sci* (2016) 41(3):274–86. doi: 10.1016/j.tibs.2015.11.012
- [5] Zhang DL, Ghosh MC, Rouault TA. The Physiological Functions of Iron Regulatory Proteins in Iron Homeostasis - An Update. *Front Pharmacol* (2014) 5:124. doi: 10.3389/fphar.2014.00124
- [6] Seco-Cervera M, González-Cabo P, Pallardó FV, Romá-Mateo C, García-Giménez JL. Thioredoxin and Glutaredoxin Systems as Potential Targets for the Development of New Treatments in Friedreich's Ataxia. *Antioxid (Basel Switzerland)* (2020) 9(12):1257. doi: 10.3390/antiox9121257
- [7] Torti SV, Manz DH, Paul BT, Blanchette-Farra N, Torti FM. Iron and Cancer. *Annu Rev Nutr* (2018) 38:97–125. doi: 10.1146/annurev-nutr-082117-051732
- [8] Anderson CP, Shen M, Eisenstein RS, Leibold EA. Mammalian Iron Metabolism and Its Control by Iron Regulatory Proteins. *Biochim Biophys Acta* (2012) 1823(9):1468–83. doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.05.010
- [9] Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B, Camaschella C. Two to Tango: Regulation of Mammalian Iron Metabolism. *Cell* (2010) 142(1):24–38. doi: 10.1016/j.cell.2010.06.028
- [10] Petronek MS, Spitz DR, Buettner GR, Allen BG. Linking Cancer Metabolic Dysfunction and Genetic Instability Through the Lens of Iron Metabolism. *Cancers* (2019) 11(8):1077. doi: 10.3390/cancers11081077
- [11] Schieber M, Chandel NS. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Curr Biol CB* (2014) 24(10):R453–62. doi: 10.1016/j.cub.2014.03.034
- [12] Faulk WP, Hsi BL, Stevens PJ. Transferrin and Transferrin Receptors in Carcinoma of the Breast. *Lancet (Lond Engl)* (1980) 2(8191):390–2. doi: 10.1016/S0140-6736(80)90440-7
- [13] Prior R, Reifenberger G, Wechsler W. Transferrin Receptor Expression in Tumours of

- the Human Nervous System: Relation to Tumour Type, Grading and Tumour Growth Fraction. *Virchows Archiv A Pathol Anat Histopathol* (1990) 416(6):491–6. doi: 10.1007/BF01600299
- [14] Das Gupta A, Shah VI. Correlation of Transferrin Receptor Expression With Histologic Grade and Immunophenotype in Chronic Lymphocytic Leukemia and Non-Hodgkin's Lymphoma. *Hematol Pathol* (1990) 4(1):37–41.
- [15] Zhang S, Chang W, Wu H, Wang YH, Gong YW, Zhao YL, et al. Pan-Cancer Analysis of Iron Metabolic Landscape Across the Cancer Genome Atlas. *J Cell Physiol* (2020) 235(2):1013–24. doi: 10.1002/jcp.29017
- [16] Basuli D, Tesfay L, Deng Z, Paul B, Yamamoto Y, Ning G, et al. Iron Addiction: A Novel Therapeutic Target in Ovarian Cancer. *Oncogene* (2017) 36(29):4089–99. doi: 10.1038/onc.2017.11
- [17] Matthew-Onabanjo AN, Janusis J, Mercado-Matos J, Carlisle AE, Kim D, Levine F, et al. Beclin 1 Promotes Endosome Recruitment of Hepatocyte Growth Factor Tyrosine Kinase Substrate to Suppress Tumor Proliferation. *Cancer Res* (2020) 80(2):249–62. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-19-1555
- [18] Xiao C, Fu X, Wang Y, Liu H, Jiang Y, Zhao Z, et al. Transferrin Receptor Regulates Malignancies and the Stemness of Hepatocellular Carcinoma-Derived Cancer Stem-Like Cells by Affecting Iron Accumulation. *PLoS One* (2020) 15(12):e0243812. doi: 10.1371/journal.pone.0243812
- [19] Campisi A, Bonfanti R, Raciti G, Bonaventura G, Legnani L, Magro G, et al. Gene Silencing of Transferrin-1 Receptor as a Potential Therapeutic Target for Human Follicular and Anaplastic Thyroid Cancer. *Mol Ther Oncol* (2020) 16:197–206. doi: 10.1016/j.omto.2020.01.003
- [20] Deshpande, C.N.; Ruwe, T.A.; Shawki, A.; Xin, V.; Vieth, K.R.; Valore, E.V.; Qiao, B.; Ganz, T.; Nemeth, E.; Mackenzie, B.; et al. Calcium is an essential cofactor for metal efflux by the ferroportin transporter family. *Nat. Commun.* 2018, 9, 3075. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 95
- [21] Sanchez, M.; Galy, B.; Schwanhaeusser, B.; Blake, J.; Bahr-Ivacevic, T.; Benes, V.; Selbach, M.; Muckenthaler, M.U.;
- [22] Hentze, M.W. Iron regulatory protein-1 and -2: Transcriptome-wide definition of binding mRNAs and shaping of the cellular proteome by iron regulatory proteins. *Blood* 2011, 118, e168–e179.34.
- [23] Kwok, J.C.; Richardson, D.R. The iron metabolism of neoplastic cells: Alterations that

facilitate proliferation? Crit. Rev. Oncol. Hematol. 2002, 42, 65–78.

[24]Holmes-Hampton, G.P.; Ghosh, M.C.; Rouault, T.A. Methods for Studying Iron Regulatory Protein 1: An Important Protein in Human Iron Metabolism. Methods Enzym. 2018, 599, 139–155.

[25]Wilkinson, N.; Pantopoulos, K. The IRP/IRE system in vivo: Insights from mouse models. Front. Pharmacol. 2014, 5, 176.

[26]Pantopoulos, K. Iron metabolism and the IRE/IRP regulatory system: An update. Ann. N. Y. Acad. Sci. 2004, 1012, 1–13.

[27]Du, F.; Qian, Z.M.; Gong, Q.; Zhu, Z.J.; Lu, L.; Ke, Y. The iron regulatory hormone hepcidin inhibits expression of iron release as well as iron uptake proteins in J774 cells. J. Nutr. Biochem. 2012, 23, 1694–1700.

[28]Yang, J.; Xu, T.; Gomez, D.R.; Yuan, X.; Nguyen, Q.N.; Jeter, M.; Song, Y.; Komaki, R.; Hu, Y.; Hahn, S.M.; et al. Nomograms incorporating genetic variants in BMP/Smad4/Hamp pathway to predict disease outcomes after definitive radiotherapy for non-small cell lung cancer. Cancer Med. 2018, 7, 2247–2255.

[29]Vela, D.; Vela-Gaxha, Z. Differential regulation of hepcidin in cancer and non-cancer tissues and its clinical implications. Exp. Mol. Med. 2018, 50, e436.

[30]Huang, X. Iron overload and its association with cancer risk in humans: Evidence for iron as a carcinogenic metal. Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen. 2003, 533, 153–171.

[31]Cairo, G.; Recalcati, S. Iron-regulatory proteins: Molecular biology and pathophysiological implications. Expert Rev. Mol. Med. 2007, 9, 1–13.

[32]Kabat, G.C.; Rohan, T.E. Does excess iron play a role in breast carcinogenesis? An unresolved hypothesis. Cancer Causes Control 2007, 18, 1047–1053.

[33]Sideris M, Adams K, Moorhead J, Diaz-Cano S, Bjarnason I, Papagrigoriadis S. BRAF V600E Mutation in Colorectal Cancer Is Associated With Right-Sided Tumours and Iron Deficiency Anaemia. *Anticancer Res* (2015) 35(4):2345–50.

[34]Jiao Q, Du X, Wei J, Li Y, Jiang H. Oxidative Stress Regulated Iron Regulatory Protein IRP2 Through FBXL5-Mediated Ubiquitination-Proteasome Way in SH-SY5Y Cells. *Front Neurosci* (2019) 13:20. doi: 10.3389/fnins.2019.00020

[35]Wang H, Shi H, Rajan M, Canarie ER, Hong S, Simoneschi D, et al. FBXL5 Regulates IRP2 Stability in Iron Homeostasis via an Oxygen-Responsive [2Fe2S] Cluster. *Mol Cell* (2020) 78(1):31–41.e5. doi: 10.1016/j.molcel.2020.02.011

- [36] Song J, Liu T, Yin Y, Zhao W, Lin Z, Yin Y, et al. The Deubiquitinase OTUD1 Enhances Iron Transport and Potentiates Host Antitumor Immunity. *EMBO Rep* (2021) 22(2):e51162. doi: 10.15252/embr.202051162
- [37] Zhang Y, Feng X, Zhang J, Chen X. Iron Regulatory Protein 2 Exerts Its Oncogenic Activities by Suppressing TAp63 Expression. *Mol Cancer Res MCR* (2020) 18(7):1039–49. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-19-1104
- [38] Zhang J, Kong X, Zhang Y, Sun W, Xu E, Chen X. Mdm2 is a Target and Mediator of IRP2 in Cell Growth Control. *FASEB J* (2020) 34(2):2301–11. doi: 10.1096/fj.201902278RR
- [39] Horniblow RD, Bedford M, Hollingworth R, Evans S, Sutton E, Lal N, et al. BRAF Mutations Are Associated With Increased Iron Regulatory Protein-2 Expression in Colorectal Tumorigenesis. *Cancer Sci* (2017) 108(6):1135–43. doi: 10.1111/cas.13234
- [40] Yao F, Cui X, Zhang Y, Bei Z, Wang H, Zhao D, et al. Iron Regulatory Protein 1 Promotes Ferroptosis by Sustaining Cellular Iron Homeostasis in Melanoma. *Oncol Lett* (2021) 22(3):657. doi: 10.3892/ol.2021.12918
- [41] Basuli D, Tesfay L, Deng Z, Paul B, Yamamoto Y, Ning G, et al. Iron Addiction: A Novel Therapeutic Target in Ovarian Cancer. *Oncogene* (2017) 36(29):4089–99. doi: 10.1038/onc.2017.11
- [42] Tesfay L, Clausen KA, Kim JW, Hegde P, Wang X, Miller LD, et al. Hepcidin Regulation in Prostate and Its Disruption in Prostate Cancer. *Cancer Res* (2015) 75(11):2254–63. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-2465
- [43] Pan X, Lu Y, Cheng X, Wang J. Hepcidin and Ferroportin Expression in Breast Cancer Tissue and Serum and Their Relationship With Anemia. *Curr Oncol (Toronto Ont)* (2016) 23(1):e24–6. doi: 10.3747/co.23.2840
- [44] Babu KR, Muckenthaler MU. miR-20a Regulates Expression of the Iron Exporter Ferroportin in Lung Cancer. *J Mol Med (Berlin Germany)* (2016) 94(3):347–59. doi: 10.1007/s00109-015-1362-3
- [45] Moussa, R.S.; Park, K.C.; Kovacevic, Z.; Richardson, D.R. Ironing out the role of the cyclin-dependent kinase inhibitor, p21 in cancer: Novel iron chelating agents to target p21 expression and activity. *Free Radic. Boil. Med.* 2018.31.
- [46] han, Z.; Wei, Z.; Shaikh, Z.A. Suppression of ferroportin expression by cadmium stimulates proliferation, EMT, and migration in triple-negative breast cancer cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2018, 356, 36–43.

- [47] Deng Z, Manz DH, Torti SV, Torti FM. Effects of Ferroportin-Mediated Iron Depletion in Cells Representative of Different Histological Subtypes of Prostate Cancer. *Antioxid Redox Signaling* (2019) 30(8):1043–61. doi: 10.1089/ars.2017.7023
- [48] Guo W, Zhang S, Chen Y, Zhang D, Yuan L, Cong H, et al. An Important Role of the Hepcidin-Ferroportin Signaling in Affecting Tumor Growth and Metastasis. *Acta Biochim Biophys Sin* (2015) 47(9):703–15. doi: 10.1093/abbs/gmv063
- [49] Gasparetto M, Pei S, Minhajuddin M, Stevens B, Smith CA, Seligman P. Low Ferroportin Expression in AML Is Correlated With Good Risk Cytogenetics, Improved Outcomes and Increased Sensitivity to Chemotherapy. *Leukemia Res* (2019) 80:1–10. doi: 10.1016/j.leukres.2019.02.011
- [50] Jiang X, Zhang C, Qi S, Guo S, Chen Y, Du E, et al. Elevated Expression of ZNF217 Promotes Prostate Cancer Growth by Restraining Ferroportin-Conducted Iron Egress. *Oncotarget* (2016) 7(51):84893–906. doi: 10.18632/oncotarget.12753
- [51] Xue D, Zhou C, Shi Y, Lu H, Xu R, He X. Nuclear Transcription Factor Nrf2 Suppresses Prostate Cancer Cells Growth and Migration Through Upregulating Ferroportin. *Oncotarget* (2016) 7(48):78804–12. doi: 10.18632/oncotarget.12860
- [52] Kong Y, Hu L, Lu K, Wang Y, Xie Y, Gao L, et al. Ferroportin Downregulation Promotes Cell Proliferation by Modulating the Nrf2-miR-17-5p Axis in Multiple Myeloma. *Cell Death Dis* (2019) 10(9):624. doi: 10.1038/s41419-019-1854-0
- [53] Geng N, Shi BJ, Li SL, Zhong ZY, Li YC, Xua WL, et al. Knockdown of Ferroportin Accelerates Erastin-Induced Ferroptosis in Neuroblastoma Cells. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* (2018) 22(12):3826–36. doi: 10.26355/eurev_201806_15267
- [54] Tang Z, Jiang W, Mao M, Zhao J, Chen J, Cheng N. Deubiquitinase USP35 Modulates Ferroptosis in Lung Cancer via Targeting Ferroportin. *Clin Trans Med* (2021) 11(4):e390. doi: 10.1002/ctm2.390
- [55] Mertens C, Schnetz M, Rehwald C, Grein S, Elwakeel E, Weigert A, et al. Iron-Bound Lipocalin-2 From Tumor-Associated Macrophages Drives Breast Cancer Progression Independent of Ferroportin. *Metabolites* (2021) 11(3):108. doi: 10.3390/metabo11030180
- [56] Pinnix ZK, Miller LD, Wang W, D'Agostino R Jr., Kute T, Willingham MC, et al. Ferroportin and Iron Regulation in Breast Cancer Progression and Prognosis. *Sci Trans Med* (2010) 2(43):43ra56. doi: 10.1126/scitranslmed.3001127
- [57] Sornjai W, Nguyen Van Long F, Pion N, Pasquer A, Saurin JC, Marcel V, et al. Iron and Hepcidin Mediate Human Colorectal Cancer Cell Growth. *Chemico-Biol Interact* (2020) 319:109021. doi: 10.1016/j.cbi.2020.109021

- [58]Tesfay L, Clausen KA, Kim JW, Hegde P, Wang X, Miller LD, et al. Hepcidin Regulation in Prostate and Its Disruption in Prostate Cancer. *Cancer Res* (2015) 75(11):2254–63. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-2465
- [59]Schwartz AJ, Goyert JW, Solanki S, Kerk SA, Chen B, Castillo C, et al. Hepcidin Sequesters Iron to Sustain Nucleotide Metabolism and Mitochondrial Function in Colorectal Cancer Epithelial Cells. *Nat Metab* (2021) 3(7):969–82. doi: 10.1038/s42255-021-00406-7
- [60]Lopes M, Duarte TL, Teles MJ, Mosteo L, Chacim S, Aguiar E, et al. Loss of Erythroblasts in Acute Myeloid Leukemia Causes Iron Redistribution With Clinical Implications. *Blood Adv* (2021) 5(16):3102–12. doi: 10.1182/bloodadvances.2021004373
- [61]Zhao B, Li R, Cheng G, Li Z, Zhang Z, Li J, et al. Role of Hepcidin and Iron Metabolism in the Onset of Prostate Cancer. *Oncol Lett* (2018) 15(6):9953–8. doi: 10.3892/ol.2018.8544
- [62]Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, et al. Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Nonapoptotic Cell Death. *Cell* (2012) 149(5):1060–72. doi: 10.1016/j.cell.2012.03.042
- [63]Tang D, Chen X, Kang R, Kroemer G. Ferroptosis: Molecular Mechanisms and Health Implications. *Cell Res* (2021) 31(2):107–25. doi: 10.1038/s41422-020-00441-1
- [64]Hirschhorn T, Stockwell BR. The Development of the Concept of Ferroptosis. *Free Radical Biol Med* (2019) 133:130–43. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.09.043
- [65]Jiang X, Stockwell BR, Conrad M. Ferroptosis: Mechanisms, Biology and Role in Disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2021) 22(4):266–82. doi: 10.1038/s41580-020-00324-8
- [66]Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, et al. Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Nonapoptotic Cell Death. *Cell* (2012) 149(5):1060–72. doi: 10.1016/j.cell.2012.03.042
- [67]Gao M, Yi J, Zhu J, Minikes AM, Monian P, Thompson CB, et al. Role of Mitochondria in Ferroptosis. *Mol Cell* (2019) 73(2):354–63.e3. doi: 10.1016/j.molcel.2018.10.042
- [68]Li C, Zhang Y, Liu J, Kang R, Klionsky DJ, Tang D. Mitochondrial DNA Stress Triggers Autophagy-Dependent Ferroptotic Death. *Autophagy* (2021) 17(4):948–60. doi: 10.1080/15548627.2020.1739447
- [69]Lee H, Zandkarimi F, Zhang Y, Meena JK, Kim J, Zhuang L, et al. Energy-Stress-Mediated AMPK Activation Inhibits Ferroptosis. *Nat Cell Biol* (2020) 22(2):225–34. doi: 10.1038/s41556-020-0461-8

- [70]Jiao Q, Du X, Wei J, Li Y, Jiang H. Oxidative Stress Regulated Iron Regulatory Protein IRP2 Through FBXL5-Mediated Ubiquitination-Proteasome Way in SH-SY5Y Cells. *Front Neurosci* (2019) 13:20. doi: 10.3389/fnins.2019.00020
- [71]Lill R, Mühlenhoff U. Maturation of Iron-Sulfur Proteins in Eukaryotes: Mechanisms, Connected Processes, and Diseases. *Annu Rev Biochem* (2008) 77:669–700. doi: 10.1146/annurev.biochem.76.052705.162653
- [72]Terzi EM, Sviderskiy VO, Alvarez SW, Whiten GC, Possemato R. Iron-Sulfur Cluster Deficiency can be Sensed by IRP2 and Regulates Iron Homeostasis and Sensitivity to Ferroptosis Independent of IRP1 and FBXL5. *Sci Adv* (2021) 7(22):eabg430. doi: 10.1126/sciadv.abg4302
- [73]Alvarez SW, Sviderskiy VO, Terzi EM, Papagiannakopoulos T, Moreira AL, Adams S, et al. NFS1 Undergoes Positive Selection in Lung Tumours and Protects Cells From Ferroptosis. *Nature* (2017) 551(7682):639–43. doi: 10.1038/nature24637
- [74]Rouault TA. Biogenesis of Iron-Sulfur Clusters in Mammalian Cells: New Insights and Relevance to Human Disease. *Dis Models Mech* (2012) 5(2):155–64. doi: 10.1242/dmm.009019
- [75]Du J, Zhou Y, Li Y, Xia J, Chen Y, Chen S, et al. Identification of Frataxin as a Regulator of Ferroptosis. *Redox Biol* (2020) 32:101483. doi: 10.1016/j.redox.2020.101483
- [76]Du J, Wang T, Li Y, Zhou Y, Wang X, Yu X, et al. DHA Inhibits Proliferation and Induces Ferroptosis of Leukemia Cells Through Autophagy Dependent Degradation of Ferritin. *Free Radical Biol Med* (2019) 131:356–69. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.12.011
- [77]Patra S, Barondeau DP. Mechanism of Activation of the Human Cysteine Desulfurase Complex by Frataxin. *Proc Natl Acad Sci USA* (2019) 116(39):19421–30. doi: 10.1073/pnas.1909535116