

m⁶A 在肿瘤恶性生物学行为中的作用及靶向治疗策略

彭彦茜, 杜 军, 王红胜*

(中山大学药学院, 广东 广州 510006)

摘要: N6-甲基腺苷 (N6-methyladenosine, m⁶A) 修饰是真核生物信使 RNA (messenger RNA, mRNA) 中最常见的修饰之一, 近年来已成为生命科学领域的研究热点。mRNA 的 m⁶A 修饰动态可逆, 主要由甲基化酶 (writers)、去甲基化酶 (erasers) 和识别蛋白 (readers) 所调控, 从而参与 RNA 剪接、出入核、蛋白质翻译及降解等多种生物学过程。近年研究表明, m⁶A 在肿瘤发生发展中发挥重要作用。本文围绕 m⁶A 的生物学功能, 研究其在肿瘤细胞增殖、转移、能量代谢和血管生成等恶性生物学行为中的作用, 阐述其在急性白血病、肝癌、结直肠癌等多种肿瘤中的作用及机制。目前, 包括脂肪和肥胖相关蛋白和 AlkB 同源物 5 在内的 m⁶A 相关酶的抑制剂正在开发中。本文进一步讨论了 m⁶A 的潜在价值及其在癌症治疗中的相关靶点。

关键词: m⁶A 甲基化; 恶性肿瘤; 调控机制; 抑制剂; 靶向治疗

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)10-1771-12

The roles of m⁶A in cancer biology and its targeted therapy

PENG Yan-xi, DU Jun, WANG Hong-sheng*

(School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: N6-methyladenosine (m⁶A) modification is one of the most common modifications of eukaryotic mRNA, and has become a hotspot in the field of life sciences in recent years. m⁶A modification is dynamically reversible in mammalian cells and regulated by m⁶A methyltransferase (writers), demethylase (erasers), and "reader" proteins. m⁶A can regulate various biological processes of mRNA such as RNA splicing, nuclear export, protein translation and degradation. Recent studies indicated that m⁶A is important for the initiation and development of cancer. The present review summarized biological functions of m⁶A on mRNA and discussed its roles in cell proliferation, migration, invasion, cell mentalism, and angiogenesis. Further, the m⁶A can regulate the development of various cancers including acute myelocytic leukemia (AML), breast, liver and colorectal cancer. Nowadays, the inhibitors of m⁶A related enzymes including fat-mass and obesity-associated protein and AlkB homolog 5 are being developed. We further discussed the potential values of m⁶A and its related targets on cancer therapy and treatment.

Key words: m⁶A; cancer; regulatory mechanism; inhibitor; targeted therapy

信使 RNA (messenger RNA, mRNA) 是联系 DNA 与蛋白质的核心分子, 通过密码子方式指导蛋白的合成, 从而参与遗传信息传递过程, 是生命的核心进程。

1974 年首次发现信使 RNA (mRNA) 存在 N6-甲基腺苷 (N6-methyladenosine, m⁶A)^[1], 此外 mRNA 上还存在着 N7-甲基鸟苷 (7-methylguanosine, m⁷G) 和 N6-2-氧-二甲基腺苷 (N6-2-O-dimethyladenosine, m⁶Am) 等多种甲基化修饰^[2]。m⁶A 是大多数真核生物 mRNA 中丰度最高的化学修饰^[3], 由于当时技术限制, 关于 mRNA 修饰的作用及功能研究进展缓慢。2011 年, 芝加哥大学何川教授实验室^[4]报道了第一个 mRNA 去甲基化酶脂

收稿日期: 2019-07-02; 修回日期: 2019-08-01.

基金项目: 国家自然科学基金面上资助项目 (81673454, 81973343); 广东省自然科学基金杰出青年基金资助项目 (2014A030306025).

*通讯作者 Tel: 86-20-39943024, E-mail: whongsh@mail.sysu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0524

肪和肥胖相关蛋白 (fat-mass and obesity-associated protein, FTO), 其可特异性将 mRNA 上的 m⁶A 转化为 A, 表明 mRNA 上甲基化修饰是动态可逆过程, 从而拉开 RNA 表观遗传学/表观转录组学的研究热潮。

根据中心法则, 遗传信息从 DNA 传递给 RNA, 再从 RNA 传递给蛋白质, 从而完成遗传信息的转录和翻译。由于 RNA 的生物学行为涉及转录、剪切、出入核、翻译及降解等众多步骤, 其调控机制备受关注。作为 mRNA 上丰度最高的修饰, m⁶A 广泛存在于原核和真核生物中。Dominissini 等^[5]通过 m⁶A 测序 (m⁶A sequencing, m⁶A-seq) 发现人的 mRNA 上有超过 12 000 个 m⁶A 修饰位点, 其主要分布于终止密码子附近和长外显子内, 并且修饰位点的分布在人鼠之间高度保守。随后, Meyer 等^[6]通过甲基化 RNA 免疫沉淀反应测序 (methylated RNA immunoprecipitation sequencing, MeRIP-seq) 发现 7 676 个哺乳类基因的 mRNA 上存在 m⁶A 修饰, 主要分布于终止密码子附近和 3'-非翻译区 (3'-untranslated region, 3'UTR)。由于 RNA 在基因表达中的中心作用, 越来越多的证据支持 RNA 生物学在肿瘤中发挥着重要的功能^[7]。本文综述了 m⁶A 调控 mRNA 的生物学行为, 研究其在肿瘤细胞增殖、转移、能量代谢和血管生成等恶性生物学行为中的作用, 阐述其在急性白血病等多种肿瘤中的作用及机制, 探讨其相应的靶向治疗策略, 并评价其作为肿瘤治疗靶点的可行性。

1 m⁶A 在 mRNA 修饰中的作用及生物学意义

1.1 m⁶A 及相关酶

与 DNA 和组蛋白甲基化相类似, RNA m⁶A 甲基化修饰是一个动态可逆的表观调控过程^[4], 主要由甲

基化酶 (writers)、去甲基化酶 (erasers) 和识别蛋白 (readers) 所调控^[3,8]。其中 m⁶A 甲基转移酶如甲基转移酶样因子 3/14 (methyltransferase like 3/14, METTL3/14) 和/或 Wilm'肿瘤 1 相关蛋白 (Wilm's tumor 1-associated protein, WTAP)^[9]和去甲基化酶 FTO^[4]和 AlkB 同源物 5 (AlkB homolog 5, ALKBH5)^[10] 分别负责细胞核内 mRNA 的甲基化及去甲基化。而识别蛋白如 YT521-B 同源性 (YT521-B homology, YTH) 家族蛋白 YTHDF1~3 和核成员 YTHDC1~2、异质核核糖核蛋白 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein, hnRNPs) 等则可识别 mRNA 的 m⁶A 从而调控 mRNA 生物学行为 (图 1)。

m⁶A 甲基化酶是将甲基化修饰“写入”RNA 从而介导 RNA 甲基化修饰过程, 由 METTL3、METTL14 和 WTAP 复合物组成^[9]。该多组分甲基转移酶复合物最初是从 HeLa 细胞核提取物中分离出来的^[11,12]。蛋白 METTL3 是该复合物的催化核心酶, METTL14 是 METTL3 的结构支持伴侣, 两者可以 1:1 形成稳定的复合物^[13]。敲低 METTL3 及 METTL14 均可导致细胞内 mRNA 的总 m⁶A 水平下调^[9]。两者的复合体可进一步与锌指 CCCH 域蛋白 13 (zinc finger CCCH domain-containing protein 13, Zc3h13)、WTAP、Virilizer、Hakai 及 RNA 结合基序蛋白 15 (RNA binding motif protein 15, RBM15) 等形成甲基转移酶复合体^[14,15]。WTAP 最初被鉴定为 METTL3 同源蛋白的伴侣蛋白^[16], 后续研究发现 WTAP 缺乏保守的催化甲基化域, 其本身不具有甲基化活性^[9], 但 WTAP 可与 METTL3/METTL14 复合体结合并相互作用, 在细胞内与核斑点中的 METTL3-METTL14 异二聚体共定位, 共同参与 m⁶A 修饰调

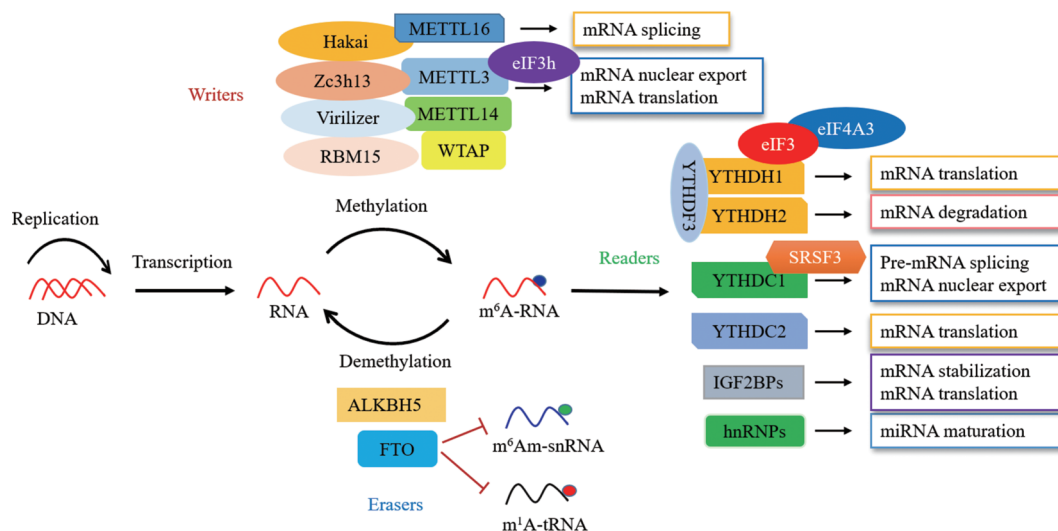


Figure 1 The m⁶A modification, related proteins and biological functions. m⁶A modification is dynamically reversible in mammalian cells and regulated by m⁶A methyltransferase (writers), demethylase (erasers), and "reader" proteins. m⁶A can regulate various biological processes of mRNA such as RNA splicing, nuclear export, protein translation and degradation

控^[17]。敲低 WTAP 可显著降低细胞中 m⁶A 水平,其可能与 WTAP 蛋白招募 METTL3/METTL14 复合体作用于目标 mRNA 的功能有关^[9]。

m⁶A 去甲基化酶主要包括 FTO (也称 ALKBH9)^[4]和 ALKBH5^[10]。两者均为 FeII/ α -酮戊二酸依赖性双加氧酶 AlkB 亚家族成员,具有 FeII 和 α -酮戊二酸依赖性。FTO 最早是通过全基因组关联研究 (genome-wide association study, GWAS) 分析鉴定到的与肥胖相关的基因^[18]。2011 年芝加哥大学何川教授课题组^[4]发现 FTO 是 RNA 的 m⁶A 去甲基化酶,并开启了 m⁶A 研究热潮的序幕。2017 年,康奈尔大学 Samie Jaffrey 教授课题组^[19]报道 FTO 通过调节 mRNA 的 m⁶Am 水平,影响 mRNA 的稳定性和翻译效率。m⁶A 和 m⁶Am 两者结构非常类似,差别仅仅在于核糖 2'-O 上的甲基修饰。2018 年,何川教授课题组^[20]对 FTO 介导的 RNA 去甲基化进行了更全面的解析,发现细胞核的 FTO 介导 m⁶A 的去甲基化,细胞质中的 FTO 介导 m⁶Am 和 m⁶A 的去甲基化,且 FTO 可以结合转运体 RNA (transfer RNA, tRNA) 发挥 tRNA 的 N1-甲基腺嘌呤 (N1-methyladenosine, m¹A) 去甲基化酶作用,并进一步影响蛋白的翻译速度。2019 年, Samie Jaffrey 教授课题组^[21]发现 FTO 可作用于核内小 RNA (small nuclear RNA, snRNA) 的 m⁶Am 修饰并影响 mRNA 的可变剪接。ALKBH5 定位于细胞核,沉默或过表达 ALKBH5 均可改变细胞中 m⁶A 的水平^[10]。m⁶A 的动态修饰状态依赖于甲基转移酶和去甲基化酶之间的功能相互作用。

m⁶A 识别蛋白可通过读取 m⁶A 甲基化修饰信息从而调控 mRNA 的生物学行为及功能,主要包括 YTH 家族成员及相关 RNA 结合蛋白。具有 RNA 结合结构域的 YTH 结构域家族是第一个被发现直接识别的“阅读器”^[22], YTH (YT521-B 同源性) 家族蛋白 YTHDF1~3 和核成员 YTHDC1~2 可直接与含有 m⁶A 的 RNA 结合。近期发现胰岛素样生长因子 2 mRNA 结合蛋白 (insulin-like growth factor 2 mRNA-binding proteins, IGF2BPs) 可识别共有序列 GG(m⁶A)C 从而靶向 mRNA 转录本^[23]。在哺乳动物细胞中发现与 m⁶A 关联的蛋白还有核 RNA 结合蛋白 (HuR) 和 hnRNP 等^[5]。

1.2 m⁶A 调控 mRNA 的生物学行为及可能机制

近年来研究表明, m⁶A 甲基化修饰几乎参与调控 mRNA 生物学行为的全过程,包括 mRNA 剪切、从细胞核向细胞质输出、翻译起始及延伸、降解等^[3]。此外, m⁶A 在长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 和微小 RNA (microRNA, miRNA) 的生成及功能等方面也发挥了重要调控作用^[24]。

1.2.1 m⁶A 影响 mRNA 剪切及成熟 从前体 mRNA

(precursor mRNA, pre-mRNA) 到成熟 mRNA 的过程包括 3 个主要步骤: 5'-加帽、3'-多聚腺苷酸化和剪接。Pre-mRNA 剪接是基因表达重要过程,涉及内含子的精确切除和外显子的连接,可增加基因产物的多样性^[25]。m⁶A 最初被认为是一种剪接调节因子,早期研究发现它在 pre-mRNA 中比在成熟 mRNA 中更丰富^[26],且许多 m⁶A 位点集中于内含子^[27,28]。FTO 敲除可显著调节 pre-mRNA 剪切过程中的外显子跳跃事件并上调 3'末端外显子表达^[29]。甲基转移酶样因子 16 (methyltransferase like 16, METTL16) 最近被鉴定为 RNA 甲基化酶,其可甲基化 mRNA 的 3'UTR 和 U6 的 43A 从而调控其与 mRNA 5'剪切位点结合并影响其剪切^[30]。YTHDC1 可与剪切因子富含丝氨酸和精氨酸的剪接因子 3 (serine and arginine rich splicing factor 3, SRSF3) 结合并促进 pre-mRNA 向成熟 mRNA 的剪切^[31]。hnRNPC 及 hnRNPG 可识别 mRNA m⁶A 并负责 pre-mRNA 加工和 mRNA 成熟^[32]。

1.2.2 m⁶A 介导 mRNA 从细胞核向细胞质的输出

mRNA 核输出是连接细胞核内转录和加工与细胞质内表达的关键过程^[33],可选择性地调控基因表达。研究表明, mRNA 的 m⁶A 可促进 mRNA 的核输出, METTL3 的缺失可抑制 mRNA 核输出^[34]。细胞内 ALKBH5 的敲除可加速目标 RNA 从细胞核向细胞质的转运^[10]。YTHDC1 可识别 m⁶A 甲基化 mRNA 并促进其与转运适配器 SRSF3 及核 RNA 输出因子 1 (nuclear RNA export factor 1, NXF1) 的结合从而促进核输出^[35]。

1.2.3 m⁶A 调节 mRNA 的翻译

m⁶A 可通过多种机制促进翻译,主要包括: ① 识别蛋白介导的 mRNA 翻译: YTHDF1 通过结合 m⁶A 修饰的 mRNA 并招募翻译真核起始因子 3 (eukaryotic initiation factor 3, eIF3) 及真核起始因子 4A3 (eukaryotic initiation factor 4A3, eIF4A3), 显著提高帽子 (Cap) 依赖翻译的效率,促进 m⁶A 甲基化 mRNA 的翻译^[8]。而 YTHDF3 可通过与 YTHDF1 及 eIF4A3 结合促进翻译起始^[36]。识别蛋白 IGF2BP1/2/3 可通过提高 mRNA 的稳定性及翻译效率从而促进 mRNA 翻译^[23]; ② METTL3 可通过与核糖体结合促进翻译起始复合物组装从而促进癌基因如表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR)、转录辅激活剂与 PDZ 结合基序 (transcriptional coactivator wit PDZ-binding motif, TAZ) 等的翻译并促进肿瘤恶性进展^[37], 进一步研究表明, METTL3 还可通过与 eIF3h 的结合促进 mRNA 翻译环 (loop) 的形成、核糖体循环利用 (ribosome recycling) 及翻译加速^[38]; ③ 本课题组最近研究表明,在肿瘤转移过程中关键转录因子 Snail mRNA 的编码序列 (coding sequence, CDS) 区而

非 3'UTR 区的 m⁶A 修饰,可促进其 mRNA 的翻译延伸,其可能机制是通过 YTHDF1 与真核延伸因子 2 (eukaryotic elongation factor 2, eEF-2) 的共结合促进多聚核糖体对其翻译延伸的作用^[39]。

1.2.4 m⁶A 调控 mRNA 的降解 m⁶A 与 mRNA 稳定性降低有关。目前研究表明, YTHDF2 可结合 m⁶A 从而促进翻译后的 mRNA 通过 P-body 等形式进行降解^[22]。敲低 METTL3/METTL14 可增加其靶基因 mRNA 的表达^[9]。最近研究发现, IGF2BP 蛋白介导的 m⁶A 在促进 mRNA 的稳定性方面具有独特的功能,表现为 IGF2BP 可能与 mRNA 稳定蛋白如 ELAV 样蛋白 1 (ELAVL1)、基质蛋白 3 (matrin 3, MATR3)、胞质多聚 (A) 结合蛋白 1 [cytoplasmic poly(A)-binding protein 1, PABPC1] 的结合从而提高其靶标 mRNA 的稳定性^[23]。

1.2.5 m⁶A 对非编码 RNA 的生成及功能影响 除 mRNA 外,非编码 RNA 也受 m⁶A 调控。lncRNA 和 miRNA 是两大类非编码 RNA。m⁶A 结合蛋白 hnRNP A2B1 可与初级 miRNA (pri-miRNA) 剪切复合物 DGCR8 蛋白相互作用促进 miRNA 成熟^[40]。METTL3 可增加 pri-miRNAs 的 m⁶A 修饰,增强 DGCR8 对 pri-miRNAs 的识别及剪切,从而促进 miRNAs 生成^[41]。同时, hnRNP C 以“m⁶A 开关”调控的方式结合 lncRNA MALAT1 的 2577-m⁶A 发夹,从而调控 MALAT1 的功能,促进癌细胞增殖和侵袭的作用^[40]。本课题组近期研究表明, m⁶A 修饰的 lncRNA RP11 (RP11-138J23.1) 可通过与核内 RNA 结合蛋白 hnRNP A2B1 结合从而降低负调控 E 盒结合锌指蛋白 1 (zinc finger E-box-binding protein 1, ZEB1) 蛋白稳定性^[42]。此外, m⁶A 还可以改变 RNA 的折叠和结构及其与 RNA 结合蛋白的结合^[32,43]、影响 tRNA 对 mRNA 密码子的选择性和配对速率^[44]及 miRNA 与靶标 mRNA 的配对结合从而发挥作用。

综上所述, m⁶A 在甲基化酶的作用下对目标 mRNA 进行 m⁶A 修饰,通过不同的识别蛋白及相应的分子机制来调控 mRNA 加工、核输出、翻译和降解等生物学行为,最后依靠去甲基化的作用让 m⁶A 修饰这一过程变得动态可逆,从而起到通过 m⁶A 修饰动态调控 mRNA 行为的作用,也正是这种模式使得 m⁶A 甲基化修饰在生理过程中发挥了重要的作用。

2 m⁶A 在肿瘤细胞生物学行为中的作用及机制

随着研究的深入,近期发现 m⁶A 修饰在人类疾病如脂肪代谢、神经发育及紊乱、免疫功能调节、病毒复制及感染等诸多疾病密切相关^[3]。肿瘤细胞具有独特的恶性生物学特征,表现为自给自足生长信号、抗生长信号的不敏感、抵抗细胞死亡、潜力无限的复制能力、持续的血管生成、组织浸润和转移、免疫逃逸、促进肿

瘤的炎症、细胞能量异常、基因组不稳定和突变等生物学现象^[45]。本文将围绕 m⁶A 在肿瘤恶性生物学行为中的作用及可能机制展开探讨。

2.1 m⁶A 与肿瘤上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 及侵袭转移

EMT 是肿瘤细胞侵袭转移的最重要步骤之一,指的是在特定生理病理情况下,具有极性的上皮细胞向间质化细胞转化的现象^[46]。其主要特征是上皮细胞表型分子如 E-钙黏素 (E-Cad) 的丧失和间质细胞特性如波形蛋白 (Vim) 的获得,从而使肿瘤细胞摆脱细胞间黏附,表现得更为疏松且细胞更具侵袭与转移能力^[46]。有研究表明抑制 METTL3 表达可降低 E-Cad 表达并促进间质标志物 Vim 等的表达从而促进细胞 EMT^[47]。Snail 被认为是 EMT 过程中最重要的调控因子之一,其与 E-Cad 基因启动子上 E-box (5'-CAGGTG-3') 作用元件特异性结合并抑制其转录,从而启动 EMT 的过程^[48]。

本课题组前期研究发现,在肿瘤细胞 EMT 过程中, mRNAs 的 m⁶A 修饰增加。甲基转移酶 METTL3 的缺失使得 m⁶A 水平下调,并抑制癌细胞在体外和体内的迁移、侵袭和 EMT 过程。m⁶A-seq 和功能实验表明, EMT 的关键转录因子 Snail 的表达受 m⁶A 调控,且过表达 Snail 能逆转 METTL3 缺失导致的细胞 EMT 抑制。进一步研究表明, Snail mRNA 的 CDS 区而非 3'UTR 区的 m⁶A 修饰,可促进其 mRNA 的翻译延伸,其可能机制是通过 YTHDF1 与 eEF-2 的共结合促进多聚核糖体对其的翻译作用^[39]。同时,还发现 m⁶A 甲基化可导致 lncRNA RP11 表达上调从而促进细胞的迁移、侵袭和 EMT 发生^[42]。

以上结果提示, m⁶A 对肿瘤细胞 EMT 及侵袭转移有重要的作用,其相关机制亟待进一步研究。

2.2 m⁶A 与肿瘤耐药

在肿瘤的治疗过程中,化学药物及放射治疗有着不可替代的作用。耐药已经成为恶性肿瘤治疗失败的主要因素,研究肿瘤耐药的机制及逆转方法对恶性肿瘤的治疗有着重要意义。近期研究表明, m⁶A 在肿瘤耐药中发挥着重要作用,有望成为肿瘤耐药治疗的新靶点。m⁶A 通过稳定 FZD10 上调 Wnt/ β -catenin 通路,促进 BRAC 缺乏而使卵巢上皮癌 (epithelial ovarian cancers, EOC) 细胞的 PARP 抑制剂耐药^[49]。m⁶A 甲基化酶 METTL3 促进胰腺癌细胞的化疗和放疗耐药,敲低 METTL3 可显著增加胰腺癌细胞对抗癌药物 5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil, 5-FU)、顺铂 (cis-platinum, CDDP) 及放疗的敏感性^[50]。FTO 在宫颈鳞状细胞癌 (cervical squamous cell carcinoma, CSCC) 组织中高表达,其可通过降低 β -catenin 的 m⁶A 从而降低其表达并提高

CSCC 细胞的化疗敏感性^[51]。敲除 YTHDF1 可抑制结肠癌细胞的增殖并增强其对化疗药物如 5-FU 和顺铂的敏感性,同时 MYC (myelocytomatosis oncogene) 的高表达可促进 YTHDF1 的表达从而促进 CRC 恶性进展^[52]。

肿瘤干细胞 (cancer stem cells, CSCs) 通常是调节治疗耐药性的关键因素,而研究发现 m⁶A 修饰对胶质母细胞瘤干细胞 (GCSs) 的自我更新和肿瘤发生具有重要作用^[53]。在神经胶质瘤干细胞样细胞 (glioma stem-like cells, GSCs) 中, METTL3 高表达并上调 SOX2 (sex determining region Y box 2, SOX2) mRNA 3'UTR 的 m⁶A 甲基化从而上调其稳定性和表达,从而降低其放疗敏感性并提高 DNA 修复效率^[52]。

2.3 m⁶A 与细胞能量代谢

近年来,肿瘤代谢越来越受到研究者的重视。作为肿瘤细胞的标志, Warburg 效应指的是肿瘤细胞即使在氧供应充分的条件下也主要以糖酵解获取能量^[54]。FTO 最早是通过 GWAS 分析鉴定到的与肥胖相关的基因^[18]。在小鼠研究模型中, FTO 的缺失可导致脂肪组织和体重的显著降低,其机制是通过增强能量消耗及交感神经活化^[55]。此外, FTO 介导的 m⁶A 去甲基化控制着脂肪调节因子 RUNX1T1 的剪接^[56]。在乳腺癌细胞 MDA-MB-231 中, 靶向抑制 FTO 可降低乳酸和 ATP 的生成, 抑制丙酮酸激酶与己糖激酶的活性, 并导致 AKT 失活, 过表达 FTO 则可促进肿瘤细胞糖酵解能力及 PI3K/AKT 通路的活化^[57]。然而, 目前关于 m⁶A 其他相关酶对肿瘤细胞代谢的影响尚知之甚少。

2.4 m⁶A 与血管生成

近期研究提示, m⁶A 调控 mRNA 在血管生成中发挥重要作用。FTO 在衰竭的哺乳动物心脏和缺氧心肌细胞中表达减少, 增加衰竭小鼠心脏中 FTO 的表达可减轻缺血引起的 m⁶A 升高和心肌收缩功能下降, 在心肌梗死小鼠模型中, FTO 过表达可降低心肌细胞纤维化并促进血管生成^[58]。通过数据库分析发现 FTO 的表达可调控 EGFR 相关通路并调控血管生成信号, 过表达 FTO 可抑制体内肿瘤生长^[59]。在肿瘤细胞中, METTL14/ALKBH5 可通过调控血管生成相关基因如 TGF- β 表达从而发挥促癌作用^[60]。

3 m⁶A 修饰调控肿瘤体内发生发展

越来越多的研究发现, 恶性肿瘤发生发展与 m⁶A 修饰存在诸多潜在的联系。m⁶A 作为 mRNA 重要表观标记, 可实现对转录本的标记及分组, 从而快速跟踪并调控 mRNA 的生物学功能和代谢, 实现对细胞功能和分化的调控。如在肿瘤 EMT 过程中 mRNAs 的 m⁶A 显著上调, 且可调控侵袭转移及细胞黏连相关基因^[39]。

此外, m⁶A 还可通过影响 miRNA^[40,41] 及 lncRNA^[42,61] 的生成、生物学功能及稳定性从而调控肿瘤进展。接下来, 本文将根据不同的肿瘤类型来综述 m⁶A 与肿瘤之间的关系 (表 1)^[37,39,53,62-76]

3.1 m⁶A 与急性白血病

与正常造血祖细胞相比, METTL3 和 METTL14 在急性髓系白血病 (acute myelocytic leukemia, AML) 细胞中呈高表达^[62,63]。METTL3 敲除可上调磷酸化 AKT 水平并诱导细胞分化及凋亡, 并抑制 AML 的体内进展, 单碱基精度的 m⁶A 测序发现 m⁶A 可调控 c-myc、BCL2 及磷酸酶和紧张素同源物 (phosphatase and tensin homolog, PTEN) 等癌基因的表达^[62]。同时 METTL3 可结合于基因启动子区域并通过 mRNA m⁶A 从而促使其与核糖体结合并翻译, 促进 AML 恶化^[64]。METTL14 也可通过调控 MYB (myeloblastosis oncogene) 及 MYC 的 m⁶A 从而促进骨髓细胞的生成及白血病发生^[63]。

FTO 在 t(11q23)/MLL 重排及 t(15;17)/PML-RARA、FLT3-ITD、NPM1 突变的 AML 细胞中高表达, 可增强癌基因诱导的细胞分化及白血病生成, 并通过降低 ASB2 及 RARA (retinoic acid receptor alpha, RARA) 等基因的 m⁶A 抑制其表达从而抑制 ATRA 诱导 AML 细胞分化^[64]。此外, 异柠檬酸脱氢酶 1/2 (IDH1/2) 突变体代谢产物 R-2-羟基戊二酸盐 (R-2HG) 可抑制 FTO 活性, 从而增加 R-2HG 敏感性白血病细胞中 m⁶A 修饰, 进而降低 MYC/CEBPA 转录本稳定性, 导致相关通路的抑制。R-2HG 通过抑制白血病细胞增殖/存活、促进细胞周期阻滞和凋亡, 在体内外均具有广泛的抗白血病活性^[77]。

YTHDF2 在多种 AML 细胞中高表达并介导 AML 的发生, 其可识别转录本 m⁶A 并降低其半衰期从而增强白血病干细胞 (leukemic stem cells, LSCs) 的功能, 调控的靶基因主要包括受体 Tnfrsf2 等。同时, YTHDF2 的表达对正常造血干细胞 (hematopoietic stem cells, HSC) 的功能维系并非必需条件, 相反其缺失甚至有利于增强 HSC 的活性^[65]。

这些发现提示, m⁶A 可通过调控 AML 关键基因的 mRNA 生物学功能从而调控其发生发展, 通过靶向 m⁶A 动态调控相关蛋白, 有望开发出针对 AML 的治疗方法 及 药物用于临床治疗。

3.2 m⁶A 与肺癌

肺癌是全球最常见的肿瘤, 也是导致肿瘤死亡的主要原因。接受标准治疗的患者在大多数国家的 5 年生存率低于 15%^[78,79]。因此, 探索新的肺癌治疗靶点具有重要意义。肿瘤基因组图谱 (TCGA) 数据表明, METTL3 mRNA 在人肺腺癌 (LUAD) 中的表达显著升高, 其可

Table 1 The biological functions of m⁶A on cancer progression and its related mechanisms. METTL3: Methyltransferase like 3; METTL14: Methyltransferase-like 14; FTO: Fat-mass and obesity-associated protein; YTHDF2: YTH N⁶-methyladenosine RNA binding protein 2; ALKBH5: Alk B homolog 5; MYC: Myelocytomatosis oncogene; BCL2: B cell leukaemia 2; RARA: Retinoic acid receptor alpha; m⁶A: N⁶-Methyladenosine; EGFR: Epidermal growth factor receptor; TAZ: Transcriptional coactivator wit PDZ-binding motif; USP7: Ubiquitin specific protease 7; MZF1: Myeloid zinc finger 1; SUMO1: Small ubiquitin-like modifier 1; CDS: Coding sequence; KLF4: Kruppel like factor 4; NANOG: Nanog homeobox; EMT: Epithelial-mesenchymal transition; DGCR8: DiGeorge syndrome critical region 8; NSCLC: Nonsmall-cell lung carcinoma; ZNF217: Zinc finger protein 217; ADAM19: A disintegrin and metalloproteinase domain 19; EPHA3: EPH receptor A3; BNIP3: BCL2 interacting protein 3; FOXM1: Forkhead box M1; MMP2: Matrix metalloproteinase 2

Tumor tissue or cell line	Change in expression	Function	Reference
Acute myeloid leukemia cells	METTL3 & METTL14 ↑	Promotes oncogene translation and induces cancer cell growth, survival, and invasion	[62,63]
Acute myeloid leukemia cells	METTL3 ↑	Loss of METTL3 leads to increased levels of phosphorylated AKT; enhances MYC and BCL2 mRNA translation	[62]
Acute myeloid leukemia cells	METTL14 ↑	Enhances MYC and BCL2 mRNA translation, inhibits cell differentiation, induces leukemia progression in mice	[63]
Acute myeloid leukemia cells	FTO ↑	Reduces ASB2 and RARA m ⁶ A, suppresses leukemia cell differentiation, and enhances leukemogenesis	[64]
Acute myeloid leukemia cells	YTHDF2 ↑	YTHDF2 is overexpressed, target genes mainly include receptor Tnfrsf2	[65]
Lung cancer tissues	METTL3 ↑	Promotes translation of certain mRNAs including EGFR and TAZ	[37]
Lung cancer cells	FTO ↑	Promotes the growth of lung cancer cells by regulating the m ⁶ A level of USP7 mRNA	[66]
Lung cancer cells	FTO ↑	Facilitates tumor progression in lung squamous cell carcinoma by regulating MZF1 expression	[67]
Lung cancer cells	METTL3 ↓	Modified by SUMO1 at lysine residues K177/211/212/215, reduce the mRNA m ⁶ A level, inhibit the proliferation and cloning ability	[68]
Lung cancer cells	METTL3 ↓	miR-33a suppresses proliferation of NSCLC cells <i>via</i> targeting METTL3 mRNA	[69]
Liver cancer tissues	METTL3 ↑	Promotes liver cancer progression through YTHDF2-dependent posttranscriptional	[70]
Liver cancer tissues	METTL3 ↑	Upregulation of Snail CDS m ⁶ A level, promoting the cancer cell proliferation and EMT	[39]
Liver cancer tissues	METTL14 ↑	Inhibits liver cancer metastasis by regulating its interaction with DGCR8	[71]
Liver cancer cells	YTHDF2 ↑	MicroRNA-145 modulates m ⁶ A levels by targeting the YTHDF2 mRNA	[72]
Breast cancer cells	ALKBH5 ↑	ZNF217 interacts with METTL3 and inhibits the m ⁶ A methylation of KLF4 and NANOG	[73]
Breast cancer tissues	FTO ↑	Promotes breast tumor progression by inhibiting BNIP3	[74]
Glioblastoma stem cell	METTL3 & METTL14 ↓	Induce the expression of oncogene ADAM19, EPHA3 and KLF4 mRNA, and promote the growth and self-renewal	[53]
Glioblastoma stem-like cells	ALKBH5 ↑	Sustaining FOXM1 expression and cell proliferation	[75]
Melanoma cells	METTL3 ↑	Upregulated in human melanoma and plays a role in invasion/migration through MMP2	[76]

增加 EGFR 和 TAZ 的表达, 促进细胞生长、存活和侵袭^[37]。肺癌组织中 FTO 过表达, 可降低 USP7 m⁶A 水平, 提高其 mRNA 的稳定性, 并通过增加其表达促进非小细胞肺癌 (non-small cell lung carcinoma, NSCLC) 细胞的生长^[66]。此外, FTO 还可通过降低 MZF1 的 m⁶A 水平从而提高其 mRNA 稳定性并促进肺癌增殖与生长^[67]。在 NSCLC 中, METTL3 的赖氨酸残基 K177/211/212/215 SUMO 化可抑制其 m⁶A 甲基化酶活性, 从而降低细胞 mRNA m⁶A 水平, 并抑制肺癌细胞的增殖及克隆形成能力^[68]。此外, miR-33a 通过靶向 METTL3 mRNA 的 3'UTR, 可以减弱 NSCLC 细胞的增殖^[69]。这些研究为了解 METTL3 和 FTO 在肺癌中的重要作用提供了依据。

3.3 m⁶A 与肝癌

研究表明, mRNA m⁶A 及其相关蛋白在肝癌的恶

性进展中发挥了重要作用。METTL3 与肝癌患者预后不良有关, 表现为 METTL3 在肝癌组织中较癌旁组织表达显著升高, 其不仅可以通过 YTHDF2 沉默 SOCS2 的 mRNA 从而抑制其表达^[70]。临床分析表明, 肝癌组织中 METTL3 和 YTHDF1 表达高于癌旁组织, 其上调是肝癌患者总体生存率 (overall survival, OS) 不良预后因素^[39]。同时有研究表明, 肝癌细胞中 m⁶A 甲基化修饰水平显著降低, 下调 METTL3 的表达可促进肿瘤的发生以及肝细胞癌的转移, 其分子机制在于通过与 DGCR8 的相互作用从而促使前期 miR-126 向成熟体的生成, 靶向抑制 miR-126 则可逆转 METTL3 抑制肝癌进展的作用^[71]。综上所述, METTL3 上调或 METTL14 下调可预测肝癌患者预后不良, 并可导致 HCC 进展和转移^[70,71]。此外, 肝癌细胞中 miR-145 通过靶向 YTHDF2 mRNA 的 3'UTR 下调其表达并上调细胞中 m⁶A 甲基化

修饰水平^[72]。这些研究为肝癌进展过程中的 RNA 表观遗传改变提供了新的研究成果及发展方向。

3.4 m⁶A 与其他肿瘤

研究还发现 m⁶A 参与乳腺癌的恶性进展。低氧刺激促进依赖低氧因子 (HIF) 的 ALKBH5 高表达, 从而导致 NANOG 基因 mRNA 上 m⁶A 的去甲基化并增强其 mRNA 的稳定性, 进而促进乳腺肿瘤干细胞的维持和转移^[73]。同样, 缺氧可诱导乳腺癌干细胞形成, 在此过程中伴随着 ALKBH5 及锌指蛋白 217 (zinc finger protein 217, ZNF217) 的表达上升, 而抑制 ALKBH5 可抑制乳腺癌细胞从乳腺向肺的体内转移^[80]。FTO 可通过对 BNIP3 的 3'UTR 去甲基化从而导致其降解并促进乳腺癌的生长及转移^[74]。

m⁶A RNA 甲基化下调显著促进恶性胶质瘤干细胞 (GSCs) 的生长、自我更新和肿瘤发生。GSCs 对放疗具有耐药性, 研究发现分化的 GSC 细胞株 m⁶A 水平升高而原代 GSC 细胞株 m⁶A 水平较低, METTL3 或 METTL14 的下调可诱导原癌基因分解素和金属肽酶结构域 19 (a disintegrin and metalloproteinase domain 19, ADAM19)、EPHA3 和 KLF4 mRNA 的表达, 促进 GSCs 的生长和自我更新^[53]。ALKBH5 可去除去甲基叉头核蛋白 M1 (forkhead box M1, FOXM1) 的新生成 mRNA 的 m⁶A 从而提高其稳定性并促进 CSC 细胞增殖^[75]。METTL3 在黑色素瘤中上调, 并通过基质金属蛋白酶 2 (matrix metalloproteinase 2, MMP2) 在侵袭/迁移中发挥作用, 表明 METTL3 抑制剂在治疗黑色素瘤中可能具有良好前景^[76]。子宫内膜癌中, m⁶A 修饰可调控 AKT 通路活性从而对肿瘤细胞的增殖及肿瘤进展进行调节^[81]。本课题组前期研究还发现, m⁶A 可导致 lncRNA RP11 在 CRC 细胞核中的积累并促进 CRC 细胞的迁移、侵袭和 EMT 发生^[42]。

目前关于 m⁶A 调控肿瘤进展还存在不一致的研究结论。以 AML 为例, 甲基化酶 METTL3 可结合于基因启动子区域并通过 mRNA m⁶A 从而促使其与核糖体结合并翻译, 促进 AML 恶化^[64]。去甲基化酶 FTO 在 AML 中表达水平升高, 并可降低抑癌基因 ASB2 和 RARA 促进 AML 细胞增殖^[82]。其可能原因在于 METTL3 及 FTO 可通过作用于不同的靶标 mRNA 并调控其生物学功能, 从而在肿瘤进展中共同发挥促进作用。

以上研究表明, m⁶A 可调控包括白血病、乳腺癌、肝癌、肺癌、结直肠癌、黑色素瘤等多种肿瘤的发生及发展, 靶向抑制 m⁶A 相关蛋白对相关肿瘤的治疗具有良好的应用前景和临床价值。同时, m⁶A 在肿瘤恶性生物学行为中的作用可能与肿瘤细胞种属、分化及生理状态等多种因素有关, 相关机制亟待进一步阐明。

4 基于 m⁶A 的相关靶向治疗策略

针对靶点的特异性小分子抑制剂开发具有巨大的科学意义及应用价值。一方面, 小分子抑制剂可大大推动其靶点的生物学功能及分子机制研究。以溴结构域蛋白 4 (BRD4) 为例, 其特异性抑制剂 JQ1 的开发^[83]使得对其功能及机制研究出现井喷式增长; 另一方面, 小分子抑制剂的研发为临床药物提供了候选化合物。根据药渡数据, 目前有 13 个以 BRD4 为靶点的药物已经进入临床试验研究阶段。

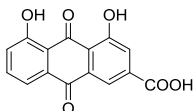
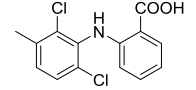
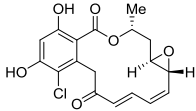
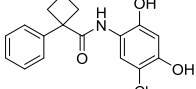
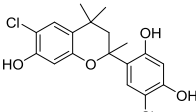
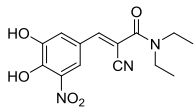
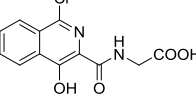
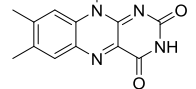
基于表观遗传分子机制开发的药物目前广泛应用于肿瘤治疗, 主要代表性药物有 DNA 甲基化酶抑制剂阿扎胞苷 (azacitidine)、组蛋白去乙酰化酶抑制剂伏立诺他 (vorinostat) 及其他表观遗传相关蛋白特异性的抑制剂, 在临床上发挥显著作用^[84]。鉴于表观遗传均基于对转录及转录后产物进行调控的分子机制, 且前期研究结果表明 m⁶A 在肿瘤的发生、侵袭转移、分化、能量代谢及血管生成等恶性生物学行为中均发挥重要作用, 因此 m⁶A 相关蛋白的特异性抑制剂开发具有巨大的科学意义和临床价值, 可在肿瘤治疗中发挥重要作用 (表 2)^[85-91]。

4.1 FTO 抑制剂

目前基于 m⁶A 相关酶抑制剂的开发主要集中于首个发现的 RNA 去甲基化酶 FTO。FTO 是一类保守的 2OG 加氧酶, 通用抑制剂 NOG 可抑制 FTO 的活性。中国科学院上海药物所杨财广课题组^[85]通过虚拟筛选发现大黄酸是 FTO 竞争性抑制剂, 在大黄酸存在的情况下 FTO 的去甲基化酶活性并未因 Fe²⁺ 浓度加倍而恢复, 表明大黄酸并没有去螯合金属离子, 其机制在于通过与单链 RNA (single stranded RNA, ssRNA) 底物竞争性结合催化域抑制 FTO, 可体内外抑制 FTO 对 mRNA 上 m⁶A 的去甲基化活性, 从而提高细胞中 m⁶A 的水平。随后, 其发现荧光素衍生物可同时抑制及标记 FTO 蛋白^[92], 进一步研究发现甲氯芬那酸 (meclofenamic acid, MA) 是一种选择性较强的 FTO 抑制剂, 能与 FTO 结合并稳定 FTO, 而不影响 ALKBH5 的去甲基化酶活, 可显著提高细胞 m⁶A 的水平, 但对于 FTO 缺失的细胞 m⁶A 水平无显著影响^[86]。这项研究还发现 FTO/MA 复合物的晶体结构清晰地展现了 FTO 中 β 3i 和 β 4i 可形成特异性识别 MA 的疏水口袋, 而 ALKBH5 缺乏相应的结构, 该研究为开发特异性的 FTO 抑制剂提供了化学基础。

此外, Aik 等^[93]发现了一系列化合物可通过金属离子螯合基团与 2OG 竞争抑制 FTO 的活性, 但此类抑制剂开发药物时需避免抑制其他 2OG 加氧酶, 提高特异性。Zheng 等^[94]发现的化合物能有效抑制其 2OG 加氧酶家族的 FTO, 而且 IC₅₀ 值和广谱性 2OG 酶抑制剂

Table 2 The inhibitors of m⁶A related enzymes. *IC₅₀ represents the value of *in vitro* reaction. N-CDPCB: N-(5-Chloro-2,4-dihydroxyphenyl)-1-phenylcyclobutanecarboxamide; CHTB: 4-Chloro-6-(6'-chloro-7'-hydroxy-2',4',4'-trimethyl-chroman-2'-yl)benzene-1,3-diol; IOX3: [(1-Chloro-4-hydroxy-isoquinoline-3-carbonyl)-amino]-acetic acid

Inhibitor	Structural formula	IC ₅₀ / mmol·L ⁻¹ *	Target	Biological function	Reference
Rhein		21	FTO	Inhibit FTO by competitively binding the catalytic domain against ssRNA substrate, also effectively inhibit m ⁶ A demethylation <i>in vitro</i> and increase cellular levels of m ⁶ A	[85]
MA		17.4	FTO	Bind and stabilize FTO but had minimal influence on ALKBH5	[86]
Radicicol		16.0	FTO	Radicicol, as an FTO inhibitor <i>in vitro</i> , provided new information on designing more potent compounds to inhibit the activity of the enzyme	[87]
N-CDPCB		4.95	FTO	Inhibitory activity on FTO demethylation of the 15-mer ssRNA, significantly decreased the level of m ⁶ A of mRNA in preadipocytes	[88]
CHTB		39.2	FTO	CHTB complexed with human FTO reveals that the novel small molecule binds to FTO in a specific manner, regulation of mRNA splicing and adipogenesis by modulating m ⁶ A levels	[88]
Entacapone		3.5	FTO	Entacapone as a chemical inhibitor of FTO mediating metabolic regulation through FOXO1	[89]
IOX3		2.8	FTO/ ALKBH5	An inhibitor of the HIF prolyl hydroxylases, decreased cellular protein expression of FTO, failed to alter the m ⁶ A level inside of cells. IOX3 also could bind to ALKBH5 in a covalent attachment	[90]
FMN			Nucleoside	Combined with blue-light irradiation substantially decreases m ⁶ A levels in cells by directly targeting the nucleoside modification	[91]

NOG 接近。郑州大学常俊标课题组^[87,88]发现根赤壳菌素 (radicicol)、N-CDPCB 及 CHTB 等化合物可作为 FTO 抑制剂。

2019 年, 杨财广课题组^[95]根据 FTO 识别 m⁶A 修饰底物的分子机制等特点, 应用基于晶体结构的化合物设计、合成优化等手段, 获得 FTO 小分子抑制剂。该化合物选择性抑制 AML 细胞中 FTO 的去甲基化功能, 上调 AML 关键基因 mRNA 上 m⁶A 修饰, 增加抑癌蛋白质例如 ASB2 和 RARA 的丰度, 降低促癌蛋白质如 MYC 和 CEBPA 的丰度, 从而抑制 AML 细胞增殖, 并且在 PDX 小鼠模型上展现抗白血病的治疗效果, 本研究指明了分子靶向性干预 m⁶A 修饰从而影响基因表达来实现抗肿瘤的研究新方向。

最近, 黄牛课题组^[89]基于结构的虚拟筛选以及一系列体内外生物活性实验, 发现之前被 FDA 批准上市

的恩他卡朋 (entacapone) 可以作为一个 FTO 的特异性抑制剂, FTO 抑制后 m⁶A 修饰水平在 FOXO1 信使 RNA 上升高, 引起了 FOXO1 蛋白表达下调, 从而调控糖异生关键基因 G6PC 的表达, 小鼠在服用恩他卡朋后表现出体重显著减少、血糖水平明显降低以及脂肪组织产热明显增强等特征。本研究进一步揭示了 FTO 在能量代谢方面调控的分子机制, 并且 FTO 的抑制剂恩他卡朋的发现对肥胖患者的临床用药具有一定指导意义。

作为最早是通过 GWAS 分析鉴定到的与肥胖相关的基因^[18], FTO 不仅与肥胖及肿瘤密切相关, 其常见变异 rs9939609 可能与中枢神经系统疾病如脑容量下降、酒精依赖等有关^[96]。因此 FTO 抑制剂的潜在用途除抗肿瘤及减肥外, 还可能被研发为神经类疾病药物。

4.2 m⁶A 相关其他蛋白抑制剂及化学干预

ALKBH5 和 FTO 均属于 Fe(II)/2-氧戊二酸盐

(2OG) 双加氧酶超家族的 AlkB 亚家族。2OG 双加氧酶超家族成员作用于多种底物, 参与调控蛋白质的生物合成。IOX3 也可以与 ALKBH5 共价结合^[90]。在 ALKBH5 结晶条件下, 柠檬酸盐在烷烃的活性部位与 2OGs 和 Mn(ii) 竞争, 可以作为 ALKBH5 的抑制剂发展和改造的方向^[97]。在甲基化酶中, METTL3 是主要的活性催化位点, 而 METTL14 在底物识别过程起到关键作用。由于对甲基化酶识别和催化 RNA 甲基化机制认知有限, 其抑制剂开发相对进展较慢。到目前为止, 仅发现脱氮腺苷 (3-deazaadenosine, DAA) 对 METTL3 有抑制作用^[34], 但是 DAA 的作用属于广谱作用, 抑制所有 RNA 甲基化酶的活性, 没有针对 m⁶A 甲基化酶的特异性。

此外, 利用化学方法对 m⁶A 进行去甲基化反应也是另外一种重要的化学干预策略。周翔课题组^[98]在 H₂O₂ 条件下利用化学氧化的方法得到可对 mRNA 的 m⁶A 进行 39% 的特异性去除。程靓课题组^[99]利用外源性光敏分子核黄素 (riboflavin) 可在 LED 蓝光的催化下可对 mRNA 的 m⁶A 进行选择性的氧化, 从而降低 mRNA 的 m⁶A 修饰。在此基础上, 该课题组进一步开发出可在活细胞上进行 mRNA 的 m⁶A 修饰去除的化合物黄素单核苷酸 (flavin mononucleotide, FMN), 其可在 LED 蓝光的催化下在细胞内进行化学去 m⁶A 修饰, 从而实现利用化合物在活体细胞内进行 mRNA m⁶A 特异性去甲基化作用^[91]。

5 结论和展望

近年来, 随着研究的深入, m⁶A 甲基化修饰相关酶体系、m⁶A 在 mRNA 修饰中的作用和生物学意义以及 m⁶A 在恶性肿瘤中的调控机制均得到了揭示。m⁶A 被甲基化酶、去甲基化酶及识别蛋白精确调控, 几乎涉及 mRNA 生物学从生成到降解的每个步骤, 并参与调控 miRNA、lncRNA 的生成及生物学功能。m⁶A 在多种恶性肿瘤的代谢、耐药和转移等方面发挥重要作用, 表明 m⁶A 修饰可以作为预防和治疗人类肿瘤的靶点。

研究发现的 m⁶A 相关因子 (如 FTO、ALKBH5 和 HIF) 抑制剂, 为实现肿瘤基因靶向治疗提供了帮助。到目前为止, 已经报道的多种 FTO 抑制剂 (大黄酸、甲氧芬那酸和 IOX3 等), 大部分不具有特异性。甲氧芬那酸 (MA) 作为选择性 FTO 抑制剂之一, 是一种与 FTO 结合位点竞争的非甾体类抗炎药物^[86]。FTO 抑制剂 MA2 (MA 的乙酯衍生物) 延长了 GSC 移植小鼠的寿命, 这意味着 m⁶A 修饰可能是抑制肿瘤进展和逆转胶质母细胞瘤放疗和化疗耐药性的靶点^[53]。此外, 贝克曼研究所陈建军课题组^[77]发现, 异柠檬酸脱氢酶 (IDH) 突变造成的代谢产物 R-2HG 通过抑制 FTO/m⁶A/

MYC/CEBPA 信号发挥抗白血病的作用, 为临床治疗白血病的用药提供了新的靶点。虽然已经发现了许多针对 m⁶A 去甲基酶的抑制剂, 但它们的作用在体内证据有限, m⁶A 相关蛋白抑制剂的开发及临床适应症选择仍有广泛探索空间。

同时, m⁶A 调控肿瘤进展及其靶向治疗也存在着诸多尚待解决的问题: 首先, RNA 修饰具有时空动态性和组织特异性, 其调控相关机制亟待单碱基精度的高分辨测序与测量技术, 目前主流的抗体捕获技术尚不能满足 m⁶A 的单碱基精度定位; 其次, 目前尚未有技术可针对特异性基因实现其转录本的 m⁶A 单基因编辑技术, 本课题组在前期工作中结合 PspCas13b/gRNA 系统, 构建出 PspCas13b-Alkbh5 融合蛋白, 并针对目的基因设计 gRNA, 实验验证其可特异性去除目的基因 mRNA 的甲基化修饰, 从而提供一种基于 PspCas13b-Alkbh5 单基因特异性 m⁶A 修饰编辑方法^[100], 后续工作中可进一步优化提高其编辑效率及特异性; 此外, 虽然发现了一些去甲基化酶抑制剂, 并且为肿瘤用药提供了新的靶点, 但在体内外作用及具体机制尚不完全清楚, 并且缺乏特异性。因此, 研究者们期望获得更多针对 m⁶A 相关蛋白的抑制剂, 尤其是特异性更强的抑制剂, 为指导基于 RNA 表观遗传的肿瘤靶向治疗带来新的曙光。

靶向 DNA 甲基化酶或者组蛋白修饰酶的数个新药获批用于治疗肿瘤并获得良好的治疗效果和巨大的经济效益。基于表观遗传的化学干预研究已经成为国际上药物新靶标研究的活跃领域。由于起步时间较晚, 目前以 m⁶A 修饰为核心的 RNA 表观遗传研究尚处于早期阶段。由于靶向 RNA 表观转录组包括其编辑、降解、转运及翻译在安全性及时效性等方面存在良好的优势, 因此发现高质量化学探针及特异性抑制剂, 开发单基因特异性编辑技术, 靶向性干预 m⁶A 修饰, 不仅可推动相关领域的基础研究, 也可在肿瘤治疗等疾病相关领域展现出巨大的应用前景, 在生命科学和新药发现领域同时展现重要科学意义。

References

- [1] Desrosiers R, Friderici K, Rottman F, et al. Identification of methylated nucleosides in messenger RNA from Novikoff hepatoma cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1974, 71: 3971-3975.
- [2] Wei CM, Gershowitz A, Moss B, et al. Methylated nucleotides block 5' terminus of HeLa cell messenger RNA [J]. Cell, 1975, 4: 379-386.
- [3] Roundtree IA, Evans ME, Pan T, et al. Dynamic RNA modifications in gene expression regulation [J]. Cell, 2017, 169: 1187-1200.

- [4] Jia G, Fu Y, Zhao X, et al. N6-Methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO [J]. *Nat Chem Biol*, 2011, 7: 885-887.
- [5] Dominissini D, Moshitch-Moshkovitz S, Schwartz S, et al. Topology of the human and mouse m⁶A RNA methylomes revealed by m⁶A-seq [J]. *Nature*, 2012, 485: 201-206.
- [6] Meyer KD, Saletore Y, Zumbo P, et al. Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3' UTRs and near stop codons [J]. *Cell*, 2012, 149: 1635-1646.
- [7] Sullenger BA, Nair S. From the RNA world to the clinic [J]. *Science*, 2016, 352: 1417-1420.
- [8] Wang X, Zhao BS, Roundtree IA, et al. N6-Methyladenosine modulates messenger RNA translation efficiency [J]. *Cell*, 2015, 161: 1388-1399.
- [9] Liu JZ, Yue YN, Han DL, et al. A METTL3-METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N6-adenosine methylation [J]. *Nat Chem Biol*, 2014, 10: 93-95.
- [10] Zheng G, Dahl JA, Niu Y, et al. ALKBH5 is a mammalian RNA demethylase that impacts RNA metabolism and mouse fertility [J]. *Mol Cell*, 2013, 49: 18-29.
- [11] Narayan P, Rottman FM. An *in vitro* system for accurate methylation of internal adenosine residues in messenger RNA [J]. *Science*, 1988, 242: 1159-1162.
- [12] Bokar JA, Rath-Shambaugh ME, Ludwiczak R, et al. Characterization and partial purification of mRNA N6-adenosine methyltransferase from HeLa cell nuclei. Internal mRNA methylation requires a multisubunit complex [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269: 17697-17704.
- [13] Wang P, Doxtader KA, Nam Y. Structural basis for cooperative function of METTL3 and METTL14 methyltransferases [J]. *Mol Cell*, 2016, 63: 306-317.
- [14] Wen J, Lv R, Ma H, et al. Zc3h13 regulates nuclear RNA m⁶A methylation and mouse embryonic stem cell self-renewal [J]. *Mol Cell*, 2018, 69: 1028-1038.e6.
- [15] Knuckles P, Lence T, Haussmann IU, et al. Zc3h13/Flacc is required for adenosine methylation by bridging the mRNA-binding factor Rbm15/Spenito to the m⁶A machinery component Wtap/Fl(2)d [J]. *Genes Dev*, 2018, 32: 415-429.
- [16] Zhong S, Li H, Bodi Z, et al. MTA is an *Arabidopsis* messenger RNA adenosine methylase and interacts with a homolog of a sex-specific splicing factor [J]. *Plant Cell*, 2008, 20: 1278-1288.
- [17] Ping XL, Sun BF, Wang L, et al. Mammalian WTAP is a regulatory subunit of the RNA N6-methyladenosine methyltransferase [J]. *Cell Res*, 2014, 24: 177-189.
- [18] Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, et al. A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity [J]. *Science*, 2007, 316: 889-894.
- [19] Mauer J, Luo X, Blanjoie A, et al. Reversible methylation of m⁶Am in the 5' cap controls mRNA stability [J]. *Nature*, 2017, 541: 371-375.
- [20] Wei J, Liu F, Lu Z, et al. Differential m⁶A, m⁶Am, and m¹A demethylation mediated by FTO in the cell nucleus and cytoplasm [J]. *Mol Cell*, 2018, 71: 973-985.e5.
- [21] Mauer J, Sindelar M, Despic V, et al. FTO controls reversible m⁶Am RNA methylation during snRNA biogenesis [J]. *Nat Chem Biol*, 2019, 15: 340-347.
- [22] Wang X, Lu Z, Gomez A, et al. N6-Methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability [J]. *Nature*, 2014, 505: 117-120.
- [23] Huang H, Weng H, Sun W, et al. Recognition of RNA N6-methyladenosine by IGF2BP proteins enhances mRNA stability and translation [J]. *Nat Cell Biol*, 2018, 20: 285-295.
- [24] Coker H, Wei G, Brockdorff N. m⁶A modification of non-coding RNA and the control of mammalian gene expression [J]. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, 2019, 1862: 310-318.
- [25] Baralle FE, Giudice J. Alternative splicing as a regulator of development and tissue identity [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, 18: 437-451.
- [26] Salditt-Georgieff M, Jelinek W, Darnell JE, et al. Methyl labeling of HeLa cell hnRNA: a comparison with mRNA [J]. *Cell*, 1976, 7: 227-237.
- [27] Carroll SM, Narayan P, Rottman FM. N6-Methyladenosine residues in an intron-specific region of prolactin pre-mRNA [J]. *Mol Cell Biol*, 1990, 10: 4456-4465.
- [28] Stoltzfus CM, Dane RW. Accumulation of spliced avian retrovirus mRNA is inhibited in S-adenosylmethionine-depleted chicken embryo fibroblasts [J]. *J Virol*, 1982, 42: 918-931.
- [29] Bartosovic M, Molares HC, Gregorova P, et al. N6-Methyladenosine demethylase FTO targets pre-mRNAs and regulates alternative splicing and 3'-end processing [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45: 11356-11370.
- [30] Shima H, Matsumoto M, Ishigami Y, et al. S-Adenosylmethionine synthesis is regulated by selective N6-adenosine methylation and mRNA degradation involving METTL16 and YTHDC1 [J]. *Cell Rep*, 2017, 21: 3354-3363.
- [31] Xiao W, Adhikari S, Dahal U, et al. Nuclear m⁶A reader YTHDC1 regulates mRNA splicing [J]. *Mol Cell*, 2016, 61: 507-519.
- [32] Liu N, Dai Q, Zheng G, et al. N6-Methyladenosine-dependent RNA structural switches regulate RNA-protein interactions [J]. *Nature*, 2015, 518: 560-564.
- [33] Wickramasinghe VO, Laskey RA. Control of mammalian gene expression by selective mRNA export [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2015, 16: 431-442.
- [34] Fustin JM, Doi M, Yamaguchi Y, et al. RNA-methylation-dependent RNA processing controls the speed of the circadian clock [J]. *Cell*, 2013, 155: 793-806.
- [35] Roundtree IA, Luo GZ, Zhang Z, et al. YTHDC1 mediates nuclear export of N6-methyladenosine methylated mRNAs [J]. *Elife*, 2017, 6: e31311.
- [36] Shi H, Wang X, Lu Z, et al. YTHDF3 facilitates translation and decay of N6-methyladenosine-modified RNA [J]. *Cell Res*, 2017,

- 27: 315-328.
- [37] Lin SB, Choe J, Du P, et al. The m⁶A methyltransferase METTL3 promotes translation in human cancer cells [J]. *Mol Cell*, 2016, 62: 335-345.
- [38] Choe J, Lin S, Zhang W, et al. mRNA circularization by METTL3-eIF3h enhances translation and promotes oncogenesis [J]. *Nature*, 2018, 561: 556-560.
- [39] Lin X, Chai G, Wu Y, et al. RNA m⁶A methylation regulates the epithelial mesenchymal transition of cancer cells and translation of Snail [J]. *Nat Commun*, 2019, 10: 2065.
- [40] Alarcon CR, Goodarzi H, Lee H, et al. HNRNPA2B1 is a mediator of m⁶A-dependent nuclear RNA processing events [J]. *Cell*, 2015, 162: 1299-1308.
- [41] Alarcon CR, Lee H, Goodarzi H, et al. N6-Methyladenosine marks primary microRNAs for processing [J]. *Nature*, 2015, 519: 482-485.
- [42] Wu Y, Yang X, Chen Z, et al. m⁶A-induced lncRNA RP11 triggers the dissemination of colorectal cancer cells *via* upregulation of Zeb1 [J]. *Mol Cancer*, 2019, 18: 87.
- [43] Liu N, Zhou KI, Parisien M, et al. N6-Methyladenosine alters RNA structure to regulate binding of a low-complexity protein [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45: 6051-6063.
- [44] Choi J, Jeong KW, Demirci H, et al. N6-Methyladenosine in mRNA disrupts tRNA selection and translation-elongation dynamics [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2016, 23: 110-115.
- [45] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation [J]. *Cell*, 2011, 144: 646-674.
- [46] Brabletz T, Kalluri R, Nieto MA, et al. EMT in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2018, 18: 128-134.
- [47] Li X, Tang J, Huang W, et al. The m⁶A methyltransferase METTL3: acting as a tumor suppressor in renal cell carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2017, 8: 96103-96116.
- [48] Stemmler MP, Eccles RL, Brabletz S, et al. Non-redundant functions of EMT transcription factors [J]. *Nat Cell Biol*, 2019, 21: 102-112.
- [49] Fukumoto T, Zhu H, Nacarelli T, et al. N6-Methylation of adenosine of FZD10 mRNA contributes to PARP inhibitor resistance [J]. *Cancer Res*, 2019, 79: 2812-2820.
- [50] Taketo K, Konno M, Asai A, et al. The epitranscriptome m⁶A writer METTL3 promotes chemo- and radioresistance in pancreatic cancer cells [J]. *Int J Oncol*, 2018, 52: 621-629.
- [51] Zhou S, Bai ZL, Xia D, et al. FTO regulates the chemo-radiotherapy resistance of cervical squamous cell carcinoma (CSCC) by targeting beta-catenin through mRNA demethylation [J]. *Mol Carcinog*, 2018, 57: 590-597.
- [52] Nishizawa Y, Konno M, Asai A, et al. Oncogene c-Myc promotes epitranscriptome m⁶A reader YTHDF1 expression in colorectal cancer [J]. *Oncotarget*, 2018, 9: 7476-7486.
- [53] Cui Q, Shi H, Ye P, et al. m⁶A RNA methylation regulates the self-renewal and tumorigenesis of glioblastoma stem cells [J]. *Cell Rep*, 2017, 18: 2622-2634.
- [54] Warburg O. On the origin of cancer cells [J]. *Science*, 1956, 123: 309-314.
- [55] Fischer J, Koch L, Emmerling C, et al. Inactivation of the FTO gene protects from obesity [J]. *Nature*, 2009, 458: 894-898.
- [56] Zhao X, Yang Y, Sun BF, et al. FTO-dependent demethylation of N6-methyladenosine regulates mRNA splicing and is required for adipogenesis [J]. *Cell Res*, 2014, 24: 1403-1419.
- [57] Liu Y, Wang R, Zhang L, et al. The lipid metabolism gene FTO influences breast cancer cell energy metabolism *via* the PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Oncol Lett*, 2017, 13: 4685-4690.
- [58] Mathiyalagan P, Adamiak M, Mayourian J, et al. FTO-dependent N6-methyladenosine regulates cardiac function during remodeling and repair [J]. *Circulation*, 2019, 139: 518-532.
- [59] Rong ZX, Li Z, He JJ, et al. Downregulation of fat mass and obesity associated (FTO) promotes the progression of intrahepatic cholangiocarcinoma [J]. *Front Oncol*, 2019, 9: 369.
- [60] Panneerdoss S, Eedunuri VK, Yadav P, et al. Cross-talk among writers, readers, and erasers of m⁶A regulates cancer growth and progression [J]. *Sci Adv*, 2018, 4: eaar8263.
- [61] Yang D, Qiao J, Wang G, et al. N6-Methyladenosine modification of lincRNA 1281 is critically required for mESC differentiation potential [J]. *Nucleic acids research*, 2018, 46: 3906-3920.
- [62] Vu LP, Pickering BF, Cheng Y, et al. The N6-methyladenosine (m⁶A)-forming enzyme METTL3 controls myeloid differentiation of normal hematopoietic and leukemia cells [J]. *Nat Med*, 2017, 23: 1369-1376.
- [63] Weng H, Huang H, Wu H, et al. METTL14 inhibits hematopoietic stem/progenitor differentiation and promotes leukemogenesis *via* mRNA m⁶A modification [J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 22: 191-205.e9.
- [64] Barbieri I, Tzelepis K, Pandolfini L, et al. Promoter-bound METTL3 maintains myeloid leukaemia by m⁶A-dependent translation control [J]. *Nature*, 2017, 552: 126-131.
- [65] Paris J, Morgan M, Campos J, et al. Targeting the RNA m⁶A reader YTHDF2 selectively compromises cancer stem cells in acute myeloid leukemia [J]. *Cell Stem Cell*, 2019, 25: 137-148.e6.
- [66] Li J, Han Y, Zhang H, et al. The m⁶A demethylase FTO promotes the growth of lung cancer cells by regulating the m⁶A level of USP7 mRNA [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 512: 479-485.
- [67] Liu J, Ren D, Du Z, et al. m⁶A demethylase FTO facilitates tumor progression in lung squamous cell carcinoma by regulating MZF1 expression [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 502: 456-464.
- [68] Du Y, Hou G, Zhang H, et al. SUMOylation of the m⁶A-RNA methyltransferase METTL3 modulates its function [J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46: 5195-5208.
- [69] Du M, Zhang Y, Mao Y, et al. MiR-33a suppresses proliferation of NSCLC cells *via* targeting METTL3 mRNA [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 482: 582-589.
- [70] Chen M, Wei L, Law CT, et al. RNA N6-methyladenosine

- methyltransferase-like 3 promotes liver cancer progression through YTHDF2-dependent posttranscriptional silencing of SOCS2 [J]. *Hepatology*, 2018, 67: 2254-2270.
- [71] Ma JZ, Yang F, Zhou CC, et al. METTL14 suppresses the metastatic potential of hepatocellular carcinoma by modulating N6-methyladenosine-dependent primary microRNA processing [J]. *Hepatology*, 2017, 65: 529-543.
- [72] Yang Z, Li J, Feng G, et al. MicroRNA-145 modulates N6-methyladenosine levels by targeting the 3'-untranslated mRNA region of the N6-methyladenosine binding YTH domain family 2 protein [J]. *J Biol Chem*, 2017, 292: 3614-3623.
- [73] Zhang C, Samanta D, Lu H, et al. Hypoxia induces the breast cancer stem cell phenotype by HIF-dependent and ALKBH5-mediated m⁶A-demethylation of NANOG mRNA [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113: 2047-2056.
- [74] Niu Y, Lin Z, Wan A, et al. RNA N6-methyladenosine demethylase FTO promotes breast tumor progression through inhibiting BNIP3 [J]. *Mol Cancer*, 2019, 18: 46.
- [75] Zhang S, Zhao BS, Zhou A, et al. m⁶A demethylase ALKBH5 maintains tumorigenicity of glioblastoma stem-like cells by sustaining FOXM1 expression and cell proliferation program [J]. *Cancer Cell*, 2017, 31: 591-606.e6.
- [76] Dahal U, Kang L, Gupta M. RNA m⁶A methyltransferase METTL3 regulates invasiveness of melanoma cells by matrix metalloproteinase 2 [J]. *Melanoma Res*, 2019, 29: 382-389.
- [77] Su R, Dong L, Li C, et al. R-2HG exhibits anti-tumor activity by targeting FTO/m⁶A/MYC/CBPBPA signaling [J]. *Cell*, 2018, 172: 90-105.e23.
- [78] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China [J]. *Cancer J Clin*, 2016, 66: 115-132.
- [79] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66: 7-30.
- [80] Zhang C, Zhi WI, Lu H, et al. Hypoxia-inducible factors regulate pluripotency factor expression by ZNF217- and ALKBH5-mediated modulation of RNA methylation in breast cancer cells [J]. *Oncotarget*, 2016, 7: 64527-64542.
- [81] Liu J, Eckert MA, Harada BT, et al. m⁶A mRNA methylation regulates AKT activity to promote the proliferation and tumorigenicity of endometrial cancer [J]. *Nat Cell Biol*, 2018, 20: 1074-1083.
- [82] Li Z, Weng H, Su R, et al. FTO plays an oncogenic role in acute myeloid leukemia as a N6-methyladenosine RNA demethylase [J]. *Cancer Cell*, 2017, 31: 127-141.
- [83] Filippakopoulos P, Qi J, Picaud S, et al. Selective inhibition of BET bromodomains [J]. *Nature*, 2010, 468: 1067-1073.
- [84] Pfister SX, Ashworth A. Marked for death: targeting epigenetic changes in cancer [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16: 241-263.
- [85] Chen B, Ye F, Yu L, et al. Development of cell-active N6-methyladenosine RNA demethylase FTO inhibitor [J]. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 17963-17971.
- [86] Huang Y, Yan J, Li Q, et al. Meclofenamic acid selectively inhibits FTO demethylation of m⁶A over ALKBH5 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43: 373-384.
- [87] Wang R, Han Z, Liu B, et al. Identification of natural compound radicicol as a potent FTO inhibitor [J]. *Mol Pharm*, 2018, 15: 4092-4098.
- [88] He W, Zhou B, Liu W, et al. Identification of a novel small-molecule binding site of the fat mass and obesity associated protein (FTO) [J]. *J Med Chem*, 2015, 58: 7341-7348.
- [89] Peng S, Xiao W, Ju D, et al. Identification of entacapone as a chemical inhibitor of FTO mediating metabolic regulation through FOXO1 [J]. *Sci Transl Med*, 2019, 11: eaau7116.
- [90] Han X, Wang N, Li J, et al. Identification of nafamostat mesilate as an inhibitor of the fat mass and obesity-associated protein (FTO) demethylase activity [J]. *Chem Biol Interact*, 2019, 297: 80-84.
- [91] Xie LJ, Yang XT, Wang RL, et al. Identification of flavin mononucleotide as a cell-active artificial N6-methyladenosine RNA demethylase [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2019, 58: 5028-5032.
- [92] Wang T, Hong T, Huang Y, et al. Fluorescein derivatives as bifunctional molecules for the simultaneous inhibiting and labeling of FTO protein [J]. *J Am Chem Soc*, 2015, 137: 13736-13739.
- [93] Aik W, Demetriades M, Hamdan MK, et al. Structural basis for inhibition of the fat mass and obesity associated protein (FTO) [J]. *J Med Chem*, 2013, 56: 3680-3688.
- [94] Zheng G, Cox T, Tribbey L, et al. Synthesis of a FTO inhibitor with anticonvulsant activity [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2014, 5: 658-665.
- [95] Huang Y, Su R, Sheng Y, et al. Small-molecule targeting of oncogenic FTO demethylase in acute myeloid leukemia [J]. *Cancer Cell*, 2019, 35: 677-691.e10.
- [96] Milaneschi Y, Lamers F, Mbarek H, et al. The effect of FTO rs9939609 on major depression differs across MDD subtypes [J]. *Mol Psychiatry*, 2014, 19: 960-962.
- [97] Xu C, Liu K, Tempel W, et al. Structures of human ALKBH5 demethylase reveal a unique binding mode for specific single-stranded N6-methyladenosine RNA demethylation [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289: 17299-17311.
- [98] Wu J, Xiao H, Wang T, et al. N6-Hydroperoxymethyladenosine: a new intermediate of chemical oxidation of N6-methyladenosine mediated by bicarbonate-activated hydrogen peroxide [J]. *Chem Sci*, 2015, 6: 3013-3017.
- [99] Xie LJ, Wang RL, Wang D, et al. Visible-light-mediated oxidative demethylation of N6-methyl adenines [J]. *Chem Commun (Camb)*, 2017, 53: 10734-10737.
- [100] Li JX, Chen ZJ, Chen F, et al. Targeted mRNA demethylation using an engineered dCas13b-ALKBH5 fusion protein [J]. *bioRxiv*, 2019. DOI: 10.1101/614859.