

DOI: 10.13376/j.cbls/2022022

文章编号: 1004-0374(2022)02-0190-07

m⁶A甲基化修饰对环状RNA调控作用研究进展

马 严, 姚牧笛, 赵 雅, 蒋 沁, 曹国凡*

(南京医科大学附属眼科医院, 南京 210029)

摘 要: N⁶-甲基腺苷(N⁶-methyladenosine, m⁶A)是真核细胞 mRNA 上含量丰富且可逆的 RNA 甲基化修饰形式, 在 RNA 的剪接和翻译中起着至关重要的作用。环状 RNA (circular RNA, circRNA) 是由前体 mRNA 反向剪接形成的一类进化保守的共价闭环非编码 RNA, 参与调控多种生理病理过程。近年来, 越来越多的研究表明 m⁶A 修饰在调节 circRNA 生物发生、翻译、稳定、核转运以及 circRNA-microRNA 海绵吸附等方面均具有重要作用。m⁶A 修饰的 circRNA 还参与免疫疾病、肿瘤、急性冠状动脉综合征、肺动脉高压和年龄相关性白内障等疾病进程。现就 m⁶A 修饰对 circRNA 调控作用机制和疾病进展进行综述, 以期疾病诊疗提供新思路。

关键词: m⁶A 修饰; circRNA; 表观遗传修饰; 调控机制; RNA

中图分类号: Q522; Q34 **文献标志码:** A

Advance of N⁶-methyladenosine modification on circular RNA

MA Yan, YAO Mu-Di, ZHAO Ya, JIANG Qin, CAO Guo-Fan*

(The Affiliated Eye Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

Abstract: N⁶-methyladenosine (m⁶A), the most abundant reversible modification in eukaryotic mRNA, regulates RNA transcription, processing, splicing, degradation, translation and so on. Circular RNA (circRNA) is a class of endogenously expressed non-coding RNA with a single-stranded circular structure, mainly deriving from back-splicing of exons of pre-mRNAs, plays an important role in various pathophysiological processes. In recent years, accumulating evidence shows that m⁶A modification regulates various aspects of circRNA metabolism, including biogenesis, translation, degradation, cellular localization and circRNA-miRNA interaction. Dysregulated m⁶A modification in circRNAs can be a cause of many diseases, such as immune-related diseases, cancers, acute coronary syndrome, pulmonary arterial hypertension, age-related cataract and so on. This review mainly discusses the regulatory mechanism of m⁶A modification on circRNA metabolism and the role of m⁶A-modified circRNAs in diseases.

Key words: N⁶-methyladenosine; circRNA; epigenetic modification; regulatory mechanism; RNA

随着 RNA 检测技术的快速发展, RNA 修饰被广泛研究, 为表观遗传学增添了新的调控机制。N⁶-甲基腺苷(N⁶-methyladenosine, m⁶A)是哺乳动物真核细胞 mRNA 上最丰富可逆的 RNA 甲基化修饰形式, 主要位于 3' 非翻译区(3'untranslated regions, 3'UTR), DRACH 序列是 m⁶A (D = G/A/U; R = G/A; H = U/A/C) 的共有基序, 由 m⁶A 酶系统动态可逆调节^[1]。m⁶A 修饰通过影响 RNA 的剪接和翻译进而影响 RNA 的结构、成熟和稳定性, 广泛参与细

胞分化、血管生成、免疫反应、炎症反应和癌变等生理病理过程^[2]。m⁶A 调节蛋白的异常表达及异常 m⁶A 水平可导致多种疾病的发生。

环状 RNA (circular RNA, circRNA) 是前体 mRNA

收稿日期: 2021-07-29; 修回日期: 2021-10-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(81870679、82070983);

江苏省卫生健康委医学科科研项目(No.114)

*通信作者: E-mail: caoguofan587@163.com

反向剪接而成的一种进化保守的共价闭合环状非编码 RNA (non-coding RNA, ncRNA), 在不同物种间具有高度保守性, 部分人类 circRNA 可在其他物种基因组上找到对应的同源序列^[3-4]。CircRNA 的功能主要是通过作为竞争内源性 RNA (competing endogenous RNA, ceRNA)^[5] 及 RNA 结合蛋白 (RNA binding protein, RBP)^[6] 竞争位点, 在转录和转录后水平上控制基因表达, 部分细胞质 circRNA 还可编码成蛋白质^[7-8]。与线性 RNA 相比, circRNA 因其闭合环状结构不易被核酸外切酶降解, 具有更高的稳定性, 可通过细胞或组织特异性的方式在各种标本中广泛表达, 其异常表达与疾病的发生密切相关, 可作为疾病的生物标志物^[9]。CircRNA 因其广泛性、丰富性、稳定性、物种间高度保守等特性而被广泛研究^[3-4]。CircRNA 广泛参与细胞分化、组织发育、肿瘤发生等生物学过程, 在多种生理和病理过程中发挥着独特的调控功能^[10]。

由于 m⁶A 主要通过影响 RNA 代谢发挥作用, 目前的研究主要集中在 m⁶A 修饰的 mRNA 上。大量研究表明, m⁶A 修饰与 ncRNA 等其他已知的表观遗传调节剂相互作用, 在多种生理过程和疾病进展中起着重要作用。m⁶A 修饰可通过调节 circRNA 生物发生、翻译、稳定、核转运及 circRNA-microRNA 海绵吸附等从而影响 circRNA 代谢及肿瘤、急性冠状动脉综合征 (acute coronary syndrome, ACS)、肺动脉高压 (hypoxia-induced pulmonary hypertension, HPH) 和年龄相关性白内障 (age-related cataract, ARC) 等疾病进程^[11-13]。本文旨在对近年来 m⁶A 修饰对 circRNA 的调控作用机制和疾病进展进行综述。

1 m⁶A 修饰调控 circRNA 代谢

m⁶A 修饰的 circRNA 通常由缺乏 m⁶A 峰的 mRNA 外显子产生, 且长的单外显子 circRNA 更有可能被 m⁶A 修饰。与 mRNA 一样, circRNA 由 METTL3 (methyltransferase like 3) 等蛋白质甲基化修饰, 并被 YTHDF1 (YTH domain-containing protein 1)/YTHDF2 (YTH domain-containing protein 2) 等识别^[14-15]。

1.1 m⁶A 修饰调控 circRNA 的生物发生

CircRNA 在不同的生理和病理过程中发挥多种调控功能。因此, 了解 circRNA 生物发生的相关调控机制至关重要。CircRNA 的生物发生与规范剪接不同, 主要通过直接反剪接 (内含子配对介导的环化) 和外显子跳跃 (套索机制驱动的环化) 两种剪接机制产生^[16]。Tang 等^[17] 发现 m⁶A 可以促进雄性

生殖细胞中有开放阅读框 (open reading frames, ORF) 的 circRNA 的生物发生, 而 circRNA 的反剪接则主要发生在 m⁶A 富集位点。敲除生精细胞 ALKBH5 (alkB homolog 5), m⁶A 和 circRNA 丰度显著增加, 敲除 METTL3 则与之相反。因此, ALKBH5 和 METTL3 通过调节 m⁶A 水平影响 circRNA 的生物发生。此外, Di Timoteo 等^[18] 分析了 m⁶A 修饰对 circZNF609 的生成和翻译调控的机制, 发现 m⁶A 以 METTL3/YTHDC1 (YTH domain containing 1) 依赖性方式调节 circRNA 的生物发生。同样的, 在结直肠癌中, METTL3 可增加 circ1662 的表达。基于此, m⁶A 修饰可以增加 circRNA 的生物合成^[19]。然而, m⁶A 调节 circRNA 生物发生的具体调控机制需要进一步探索 (图 1)。

1.2 m⁶A 修饰调控 circRNA 的翻译

CircRNA 是缺乏多聚腺苷酸 (poly-A) 尾巴的闭合环状 RNA, 不能通过帽依赖方式行使翻译功能^[20]。研究发现, 一些 circRNA 具有蛋白质编码潜能, 可通过非帽依赖方式如 IRES (internal ribosome entry sites)^[7] 和 m⁶A^[21] 途径翻译多肽。m⁶A 驱动的 circRNA 翻译是由因子 eIF4G2 (eukaryotic initiation factor 4 gamma 2) 和 m⁶A 阅读器 YTHDF3 (YTH domain-containing protein 3) 启动的, 由甲基转移酶 METTL3/14 增强, 由去甲基酶 FTO (fat mass and obesity associated gene) 抑制^[18, 22]。Legnini 等^[7] 分析了 m⁶A-Seq 和免疫沉淀数据, 并与其他 m⁶A 免疫沉淀结果结合分析发现 circZNF609 高度甲基化, 提示这两个非帽依赖的翻译方式之间可能存在一定联系。Yang 等^[22] 发现 circRNA 中含有丰富的 m⁶A 基序, 含有 m⁶A 基序的 circRNA 参与 IRES 驱动的翻译途径, 且翻译效率受 m⁶A 水平的调控。此外, Zhao 等^[23] 研究发现, m⁶A 修饰的 circE7 可翻译成 E7 蛋白, 调节宫颈癌细胞增殖。CircRNA 中含有丰富的 m⁶A 基序, 就整个人类转录组来看, 具有编码潜能的 m⁶A 的 circRNA 并不少见^[24-25]。但非帽依赖的翻译启动机制效率远低于帽依赖的启动, 且翻译的肽类物质没有检测到明显的调控功能^[26]。然而, circRNA 的翻译功能丰富人类基因组的翻译机制, 其具体调控机制及潜在的生物学功能还有待挖掘 (图 1)。

1.3 m⁶A 修饰调控 circRNA 的降解

相比其亲代线性 RNA, circRNA 具有更稳定的环状结构, 不易被核酸外切酶降解^[5]。然而, circRNA 是如何降解的, 在很大程度上仍不清楚。目前已知核内裂解途径是 m⁶A 修饰降解 RNA 的途

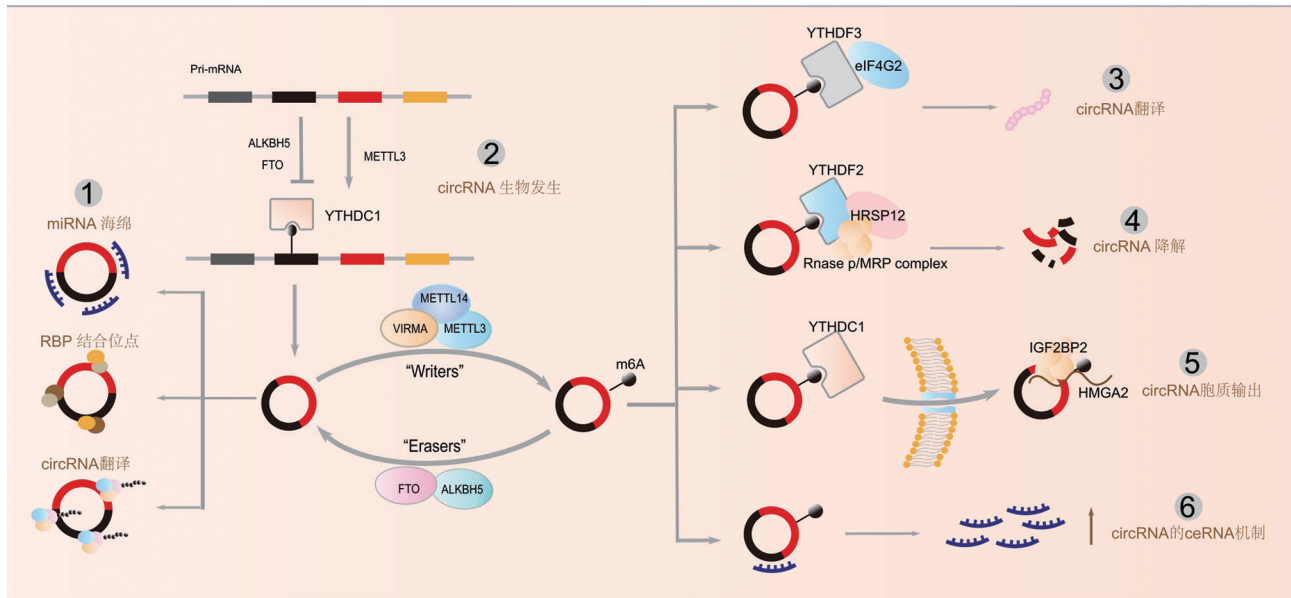


图1 m^6A 修饰调控circRNA的功能及作用机制

径之一。 m^6A 修饰后的 circRNA 可通过 YTHDF2-HRSP12-RNase P/MRP 轴被核酸内切酶降解^[27]。HRSP12 (heat-responsive protein 12) 是一种连接 YTHDF2 和 RNaseP/MRP (核酸内切酶) 的接头蛋白, 形成 YTHDF2-HRSP12-RNaseP/MRP 复合物, YTHDF2 作为引导因子。当 m^6A 修饰的 circRNA 被 YTHDF2 识别时, RNaseP/MRP 即执行内切酶功能。HRSP12 结合位点大大提高了核内溶解切割的效率^[27]。随后, m^6A 修饰的 circRNA 被选择性下调, 从而导致 circRNA 调控靶点生物学功能的变化。由此可见, m^6A 修饰调控 circRNA 的生物学功能是影响 circRNA 降解的途径之一, 揭示了 circRNA 中 m^6A 修饰介导的多层基因调控的分子机制 (图 1)。

1.4 m^6A 修饰调控circRNA的胞质输出

CircNSUN2 是一种重要的致癌环状 RNA, Chen 等^[28] 在大肠癌细胞中发现 m^6A 修饰可介导 circNSUN2 的胞质输出。细胞核中的 m^6A 修饰的 circNSUN2 由 YTHDC1 以 m^6A 甲基化依赖的方式从细胞核输出到细胞质。CircNSUN2 通过在细胞质内形成 circNSUN2/IGF2BP2 (insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2)/HMGA2 RNA-蛋白质三元复合物, 增强 HMGA2 mRNA 的稳定性, 促进大肠癌转移。CircNSUN2 和 HMGA2 在结肠癌肝转移组织中的表达明显高于在原发性大肠癌组织中的表达^[28]。以上结果表明: circNSUN2 的 m^6A 修饰调节 circNSUN2 胞浆输出和 HMGA2 稳定以促进结直肠癌肝转移, circNSUN2 可能是结肠癌重要的预后

标志和治疗靶点 (图 1)。

1.5 m^6A 修饰调控circRNA的ceRNA机制

竞争内源性 RNA (competing endogenous RNA, ceRNA) 假说是指含有与 microRNA 反应元件 (microRNA response element, MRE) 结合的编码或非编码 RNA 竞争结合 microRNA 位点, 从而抑制 microRNA 活性^[29]。CircRNA 通常具有多个 microRNA 吸附位点, 结合 microRNA 并抑制其相关功能, 而 m^6A 修饰的 circRNA 通过调控 circRNA 与 microRNA 的结合从而增强 microRNA 功能^[30]。Su 等^[30] 在缺氧介导的 HPH 模型中发现, circRNAs 的 m^6A 表达增加, circRNA/microRNA/mRNA 网络受 m^6A 修饰的调控。除了直接修饰 circRNA 外, m^6A 还可以通过改变下游分子的甲基化状态来影响 circRNA 的功能。YAP (Yes-associated protein) 作为 Hippo 信号通路下游的主要反应因子之一, 密切参与多种肿瘤的发生、发展^[31]。circ_104075 可通过 YAP 结合 miR-582-3p 促进肝癌的发生, 而 YAP 的 m^6A 修饰促进了与 miR-382-5P 的相互作用, 从而导致 YAP 的抑制, 进而抑制 circ_104075 对肝癌的促进作用^[32] (图 1)。

2 m^6A 修饰调控circRNA在疾病中的作用

2.1 m^6A 修饰的circRNA与先天性免疫

非特异性免疫 (又称先天免疫) 是机体在发育和进化过程中形成的天然免疫防御功能, 在组织损伤的炎症修复方面起着决定性作用。外源性 circRNA 可通过宿主防御促进抗病毒基因的表达,

激活 RG-1 途径, 导致干扰素产生, 诱导免疫反应; 而内源性 circRNA 则可避免引起非必要的免疫反应。Chen 等^[15]发现生物体内的内源性 circRNA (circSELF) 可发生 m⁶A 修饰, m⁶A 修饰的 circRNA 被 YTHDF2 识别标记为“自身的”分子, 进一步抑制免疫系统 RIG-1 激活。而未经 m⁶A 修饰的外源性 circRNA (circFOREIGN) 可在 K3 连接的多聚泛素分子存在的情况下激活免疫系统。此外, Zhao 等^[23]研究发现 m⁶A 修饰的人乳头瘤病毒 (human papillomavirus, HPV) 来源的环状 RNA circE7 被识别为“自身的”从而帮助病毒逃避宿主的抗病毒免疫监控。因此, m⁶A 可作为识别“自身”与“外源”circRNA 的标记, circRNA 的 m⁶A 修饰可抑制外源性 circRNA 诱导的非特异性免疫, m⁶A 修饰的 circRNAs 在肿瘤的免疫治疗方面提供了新的观点。

2.2 m⁶A 修饰的 circRNA 与肿瘤

m⁶A 修饰与 circRNA 都与肿瘤密切相关, m⁶A 修饰的 circRNA 同样参与了肿瘤的发生发展。结肠癌是世界上第三大恶性肿瘤, 结肠癌肝转移是最常见的器官转移方式, 5 年生存率较低^[33]。CircNSUN2 的 m⁶A 修饰通过促进胞质输出和形成 circNSUN2/IGF2BP2/HMGA2 RNA-蛋白质三元复合物来稳定 HMGA2 mRNA, 促进结肠癌肝转移^[28]。宫颈癌是一类常见的妇科癌症, 几乎所有的宫颈癌都是由 HPV 引起的^[34]。Zhou 等^[14]在人宫颈癌细胞 (HeLa 细胞) 中建立了 m⁶A-circRNA 的全基因组图谱, 并揭示了 circRNA 上 m⁶A 修饰的细胞类型特异模式。此外, m⁶A 依赖的 circARHGAP12 通过 IGF2BP2/FOXO1 通路发挥致癌作用^[35]。CircE7 是从 HPV 病毒中分离的一种 circRNA, 与 CaSki 宫颈癌细胞的体内外生长密切相关。m⁶A 修饰是 CircE7 编码的一个重要基序, 帮助病毒逃避宿主的抗病毒免疫监控, 促进宫颈癌的发生^[23]。在非小细胞肺癌中, circNDUFB2 的 m⁶A 修饰有助于增强 E3 泛素连接酶 TRIM25 (tripartite motif-containing 25) 与癌胚蛋白 IGF2BPs (insulin-like growth factor 2 mRNA-binding proteins) 的结合并促进 IGF2BPs 的泛素化降解, 从而抑制非小细胞肺癌的增殖及转移^[36]。在骨肉瘤中, METTL3 诱导的 circNRIP1 通过 circNRIP1/miR-199a 途径在骨肉瘤中发挥致癌作用^[37]。在肝癌中, VIRMA (vir like m⁶A methyltransferase associated protein, KIAA1429/VIRMA) 调控的 circDLC1 与肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 的预后发展相关, circDLC1 通过 HuR-MMP1 轴抑制 HCC 的生

长和转移^[38]。基于以上研究总结, circRNA 的 m⁶A 修饰在肿瘤的发生、发展和转移中起着关键作用。除上述调控作用外, circRNA 的 m⁶A 修饰还与放疗的耐药性有关。在索拉非尼耐药的 HCC 中, m⁶A 可增加 circRNA-SORE 水平, 并通过 circRNA-SORE/miR-103a-2-5p、miR-660-3p/Wnt、β-连环蛋白途径诱导耐药性产生^[39]。在下咽鳞状细胞癌中, m⁶A 可以稳定 circCUX1 的表达, 而敲低 circCUX1 促进下咽癌细胞对放疗的敏感性^[40]。

2.3 m⁶A 修饰的 circRNA 与 ACS

ACS 和动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是全球发病率和死亡率较高的疾病, 可导致严重的临床并发症, 严重威胁人类健康并增加公共卫生负担^[41]。研究发现, 干扰素调节因子 -1 (interferon regulatory factor, IRF-1) 可激活氧化低密度脂蛋白 (oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL) 诱导的巨噬细胞焦亡, 导致坏死核心形成和斑块破裂^[42-43]。Guo 等^[44]研究发现, 在 ACS 巨噬细胞中, hsa_circ_0029589 的表达显著降低, 而 circ_0029589 的 m⁶A 甲基转移酶 METTL3 水平明显升高。此外, 过表达巨噬细胞 IRF-1 可抑制 circ_0029589 表达但增加 circ_0029589 的 m⁶A 水平。敲低 METTL3 可增加 circ_0029589 的表达并减少巨噬细胞焦亡。由此可见, IRF-1 通过促进 circ_0029589 的 m⁶A 修饰从而抑制 circ_0029589 表达, 促进了 ACS 中的巨噬细胞焦亡和炎症发生。m⁶A 修饰的 circ_0029589 靶向调控巨噬细胞潜在机制可能为 ACS 及 AS 的诊疗提供新的靶点。

2.4 m⁶A 修饰的 circRNA 与 HPH

缺氧诱导的 HPH 是一种由缺氧引起的慢性进行性疾病, 目前尚无有效针对性治疗方案。Su 等^[30]通过高通量 m⁶A 测序和 circRNA 测序, 分析了大鼠 HPH 模型 m⁶A-circRNA 转录组图谱。研究发现, 在体外缺氧条件下, circRNA 中的 m⁶A 丰度显著降低。此外, m⁶A 修饰的 circXpo6 和 circTmtc3 可能通过影响 circRNA 和 miRNA 之间的相互作用来调节 Wnt 和 FoxO 信号通路。HPH 中 m⁶A-circRNA 的差异性表达水平及 m⁶A 修饰的 circRNA/microRNA/mRNA 网络调控, 表明其可能参与 HPH 进展或作为病理性标志物。然而, m⁶A-circRNA 对 HPH 的临床意义有待进一步验证。

2.5 m⁶A 修饰的 circRNA 与 ARC

ARC 是全球老年性视力障碍的主要原因, 发病原因尚不明确。Li 等^[45]首先使用 MeRIP-Seq (methylated RNA immunoprecipitation sequencing) 对 ARC 中 m⁶A

表1 m⁶A修饰调控circRNA在疾病中的作用

疾病	靶点	功能作用	参考文献
子宫颈癌	circE7	m ⁶ A修饰的circE7抑制非特异性免疫, 促进E7癌蛋白翻译和宫颈癌的生长	[27]
子宫颈癌	circARHGAP12	m ⁶ A依赖的circARHGAP12通过IGF2BP2/FOXO1通路发挥致癌作用	[35]
结肠癌	circNSUN2	m ⁶ A修饰的circNSUN2促进胞质输出和形成circNSUN2/IGF2BP2/HMGA2 RNA三元复合物, 稳定HMGA2mRNA, 促进结肠癌肝转移	[28]
结肠癌	circ1662	m ⁶ A修饰增加circRNA的生物合成	[19]
非小细胞肺癌	circNDUFB2	m ⁶ A修饰的circNDUFB2可促进形成TRIM25/CircNDUFB2/IGF2BPs三元复合物, 促进IGF2BPs泛素化降解	[36]
骨肉瘤	circNRIP1	METTL3诱导的circNRIP1通过circNRIP1/miR-199a途径发挥致癌作用	[37]
肝细胞癌	circDLC1	VIRMA调控的circDLC1通过HuR-MMP1轴抑制HCC的生长和转移	[38]
肝细胞癌	circRNA-SORE	m ⁶ A修饰的circRNA-SORE作为miR-103a-2-5p和miR-660-3p海绵, 竞争性激活Wnt/ β -catenin途径, 诱导肝细胞癌对索拉非尼的抗性	[39]
肝细胞癌	circ_104075	Circ_104075通过m ⁶ A修饰的YAP结合miR-582-3p促进肝癌的发生	[32]
下咽鳞状细胞癌	circCUX1	m ⁶ A稳定circCUX1的表达, 敲低circCUX1促进下咽癌细胞放疗敏感性	[40]
急性冠状动脉综合征	hsa_circ_0029589	m ⁶ A修饰抑制circ_0029589表达, 促进ACS中巨噬细胞焦亡和炎症发生	[44]
肺动脉高压	circXpo6 circTmtc3	m ⁶ A修饰的circRNA促进与miRNA之间相互作用, 调节Wnt和FoxO通路	[30]

circRNA 表达状态进行研究, 并针对 ARC 的氧化损伤机制进行 MeRIP-seq 和 RNA-seq 联合分析和 GO (gene ontology)、KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 通路分析。结果发现, 与对照组相比, ARC 患者晶状体上皮细胞 (lens epithelium cell, LEC) 总 circRNA 中 m⁶A 水平降低, ALKBH5 表达水平升高。其中 DNA 损伤、DNA 修复和氧化应激相关的 circRNA 可能参与 ARC 的氧化损伤机制。因此, circRNA 的 m⁶A 修饰可能通过调节与 ARC 发病相关的基因表达参与 LEC 病变, 干预晶状体基因组的表观遗传谱为治疗 ARC 提供新的见解。

表 1 总结了 m⁶A 修饰的 circRNA 在疾病病理过程中的作用机制。

3 展望

m⁶A 修饰的 circRNA 已成为广泛的调控机制, 在不同的生理和病理过程中调控基因表达。越来越多的研究表明 m⁶A 可调节 circRNA 代谢, 包括 circRNA 的生物发生、翻译、降解和细胞定位, m⁶A 修饰的 circRNA 在免疫调节、肿瘤、ACS、HPH 和 ARC 等多种疾病进程中发挥着关键作用。目前, MeRIP-seq 和 RNA-seq 联合分析主要用于挖掘疾病特异性 m⁶A 修饰的 circRNA, qRT-PCR、RIP (RNA immunoprecipitation assays)、RNA pull down 和荧光素酶报告基因检测用于探索 m⁶A 修饰 circRNA 的作用机制。此外, PA-m⁶A-seq^[46] 和 miCLIP (m⁶A individual-nucleotide resolution UV crosslinking and

immunoprecipitation)^[47] 等技术可达到单碱基分辨率, 一些不依赖于抗体的检测方法如 m⁶A-REF-seq (m⁶A-sensitive RNA-endoribonuclease-facilitated sequencing)^[48]、DART-seq (deamination adjacent to RNA modification targets)^[49] 和 m⁶A-SEAL (FTO-assisted m⁶A selective chemical labeling method)^[50] 等方法也能以单碱基分辨率精准量化甲基化水平。以 RNA 修饰和非编码 RNA 为代表的表观遗传修饰已成为基因时空特异性表达的重要调控因子, 为大多数生理或病理过程增加新的调控层面。m⁶A 修饰的 circRNA 研究进一步扩大了表观遗传调控的范围, 开辟了表观转录组学新的研究领域。

然而, m⁶A 修饰的 circRNA 研究目前还存在很多问题: (1) 目前主流 m⁶A 检测方法 MeRIP-seq 不能做到单核苷酸定位分析, 难以精确定位 m⁶A, 且每种检测技术存在各自的局限性, circRNA 上 m⁶A 修饰的时间和方式等具体调控机制并未完全明了; (2) 挖掘更多 m⁶A 修饰的 circRNA 及数据库, 预测 m⁶A 修饰的 circRNA 在疾病中的生物学功能还有很长的路要走; (3) 对于 m⁶A 修饰的 circRNA 的研究目前主要集中在其生理病理过程中的表达变化, 尚未进行临床转化。因此, 未来需要克服技术难题, 开发推广简单、精确、灵敏的检测方法, 进一步研究 m⁶A 修饰与 circRNA 详细作用机制, 并积极进行临床转化和应用研究, 开发相关诊断生物标记物和治疗靶点, 使表观遗传调控在人类疾病的诊疗方面发挥无限的潜力 (表 2)。

表2 circRNA m⁶A修饰调控主要研究手段

检测技术	是否依赖抗体	分辨率	特点	不足	文献
MeRIP-seq	依赖抗体	非单碱基分辨率	目前使用较为广泛	样本量大, 分辨率低	[25]
PA-m ⁶ A-seq	依赖抗体	单碱基分辨率	加入4SU加强交联	只能检测到4SU位点附近的m ⁶ A	[46]
miCLIP	依赖抗体	单碱基分辨率	不受峰形状影响, 结果无偏差	PA-m ⁶ A-seq基础上的优化	[47]
m ⁶ A-REF-seq	不依赖抗体	单碱基分辨率	基于RNA内切酶MAZ对m ⁶ A的敏感性	MAZ酶只能识别ACA motif, 不能覆盖所有m ⁶ A	[48]
DART-seq	不依赖抗体	单碱基分辨率	可回收和分析更多种类分子	只能识别某种信使RNA	[49]
m ⁶ A-SEAL	不依赖抗体	单碱基分辨率	对RNA甲基化代谢的源头进行标记	标记产率和标记时间窗口还有待优化	[46]

[参 考 文 献]

- Yang Y, Hsu PJ, Chen YS, et al. Dynamic transcriptomic m⁶A decoration: writers, erasers, readers and functions in RNA metabolism. *Cell Res*, 2018, 28: 616-24
- Jiang X, Liu B, Nie Z, et al. The role of m⁶A modification in the biological functions and diseases. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6: 74
- Rybak-Wolf A, Stottmeister C, Glazar P, et al. Circular RNAs in the mammalian brain are highly abundant, conserved, and dynamically expressed. *Mol Cell*, 2015, 58: 870-85
- Jeck WR, Sorrentino JA, Wang K, et al. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats. *RNA*, 2013, 19: 141-57
- Su M, Xiao Y, Ma J, et al. Circular RNAs in cancer: emerging functions in hallmarks, stemness, resistance and roles as potential biomarkers. *Mol Cancer*, 2019, 18: 90
- Okholm TLH, Sathe S, Park SS, et al. Transcriptome-wide profiles of circular RNA and RNA-binding protein interactions reveal effects on circular RNA biogenesis and cancer pathway expression. *Genome Med*, 2020, 12: 112
- Legnini I, Di Timoteo G, Rossi F, et al. Circ-ZNF609 is a circular RNA that can be translated and functions in myogenesis. *Mol Cell*, 2017, 66: 22-37 e29
- Huang W, Ling Y, Zhang S, et al. TransCirc: an interactive database for translatable circular RNAs based on multi-omics evidence. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49: D236-42
- Chen I, Chen CY, Chuang TJ. Biogenesis, identification, and function of exonic circular RNAs. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2015, 6: 563-79
- Chen LL. The expanding regulatory mechanisms and cellular functions of circular RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21: 475-90
- Zhang L, Hou C, Chen C, et al. The role of N⁶-methyladenosine (m⁶A) modification in the regulation of circRNAs. *Mol Cancer*, 2020, 19: 105
- Wu J, Guo X, Wen Y, et al. N⁶-methyladenosine modification opens a new chapter in circular RNA biology. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 709299
- Tang M, Lv Y. The role of N⁶-methyladenosine modified circular RNA in pathophysiological processes. *Int J Biol Sci*, 2021, 17: 2262-77
- Zhou C, Molinie B, Daneshvar K, et al. Genome-wide maps of m⁶A circRNAs identify widespread and cell-type-specific methylation patterns that are distinct from mRNAs. *Cell Rep*, 2017, 20: 2262-76
- Chen YG, Chen R, Ahmad S, et al. N⁶-methyladenosine modification controls circular RNA immunity. *Mol Cell*, 2019, 76: 96-109
- Aufiero S, Reckman YJ, Pinto YM, et al. Circular RNAs open a new chapter in cardiovascular biology. *Nat Rev Cardiol*, 2019, 16: 503-14
- Tang C, Xie Y, Yu T, et al. m⁶A-dependent biogenesis of circular RNAs in male germ cells. *Cell Res*, 2020, 30: 211-28
- Di Timoteo G, Dattilo D, Centron-Broco A, et al. Modulation of circRNA metabolism by m⁶A modification. *Cell Rep*, 2020, 31: 107641
- Chen C, Yuan W, Zhou Q, et al. N⁶-methyladenosine-induced circ1662 promotes metastasis of colorectal cancer by accelerating YAP1 nuclear localization. *Theranostics*, 2021, 11: 4298-315
- Memczak S, Jens M, Elefsinioti A, et al. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. *Nature*, 2013, 495: 333-8
- Yang Y, Fan X, Mao M, et al. Extensive translation of circular RNAs driven by N⁶-methyladenosine. *Cell Res*, 2017, 27: 626-41
- Yang Y, Gao X, Zhang M, et al. Novel role of FBXW7 circular RNA in repressing glioma tumorigenesis. *J Natl Cancer Inst*, 2018, 110: 304-15
- Zhao J, Lee EE, Kim J, et al. Transforming activity of an oncoprotein-encoding circular RNA from human papillomavirus. *Nat Commun*, 2019, 10: 2300
- Meyer KD, Saletore Y, Zumbo P, et al. Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3' UTRs and near stop codons. *Cell*, 2012, 149: 1635-46
- Dominissini D, Moshitch-Moshkovitz S, Schwartz S, et al. Topology of the human and mouse m⁶A RNA methylomes revealed by m⁶A-seq. *Nature*, 2012, 485: 201-6
- Yang Y, Wang Z. IRES-mediated cap-independent translation, a path leading to hidden proteome. *J Mol Cell Biol*, 2019, 11: 911-9
- Park OH, Ha H, Lee Y, et al. Endoribonucleolytic cleavage of m⁶A-containing RNAs by RNase P/MRP complex. *Mol*

- Cell, 2019, 74: 494-507
- [28] Chen RX, Chen X, Xia LP, et al. N⁶-methyladenosine modification of circNSUN2 facilitates cytoplasmic export and stabilizes HMGA2 to promote colorectal liver metastasis. *Nat Commun*, 2019, 10: 4695
- [29] Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, 2011, 473: 298-307
- [30] Su H, Wang G, Wu L, et al. Transcriptome-wide map of m⁶A circRNAs identified in a rat model of hypoxia mediated pulmonary hypertension. *BMC Genomics*, 2020, 21: 39
- [31] White SM, Avantiaggiati ML, Nemazanyy I, et al. YAP/TAZ inhibition induces metabolic and signaling rewiring resulting in targetable vulnerabilities in NF2-deficient tumor cells. *Dev Cell*, 2019, 49: 425-43
- [32] Zhang X, Xu Y, Qian Z, et al. circRNA_104075 stimulates YAP-dependent tumorigenesis through the regulation of HNF4a and may serve as a diagnostic marker in hepatocellular carcinoma. *Cell Death Dis*, 2018, 9: 1091
- [33] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71: 209-49
- [34] Chibwesa CJ, Stringer JSA. Cervical cancer as a global concern: contributions of the dual epidemics of HPV and HIV. *JAMA*, 2019, 322: 1558-60
- [35] Ji F, Lu Y, Chen S, et al. IGF2BP2-modified circular RNA circARHGAP12 promotes cervical cancer progression by interacting m⁶A/FOXMI manner. *Cell Death Discov*, 2021, 7: 215
- [36] Li B, Zhu L, Lu C, et al. circNDUFB2 inhibits non-small cell lung cancer progression via destabilizing IGF2BPs and activating anti-tumor immunity. *Nat Commun*, 2021, 12: 295
- [37] Meng Y, Hao D, Huang Y, et al. Circular RNA circNRIP1 plays oncogenic roles in the progression of osteosarcoma. *Mamm Genome*, 2021, 32: 448-56
- [38] Liu H, Lan T, Li H, et al. Circular RNA circDLC1 inhibits MMP1-mediated liver cancer progression via interaction with HuR. *Theranostics*, 2021, 11: 1396-411
- [39] Xu J, Wan Z, Tang M, et al. N⁶-methyladenosine-modified circRNA-SORE sustains sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma by regulating β -catenin signaling. *Mol Cancer*, 2020, 19: 163
- [40] Wu P, Fang X, Liu Y, et al. N⁶-methyladenosine modification of circCUX1 confers radioresistance of hypopharyngeal squamous cell carcinoma through caspase1 pathway. *Cell Death Dis*, 2021, 12: 298
- [41] Gach O, El HZ, Lancellotti P. Syndrome coronarien aigu [Acute coronary syndrome]. *Rev Med Liege*, 2018, 73: 243-50
- [42] Guo M, Yan R, Yao H, et al. IFN regulatory factor 1 mediates macrophage pyroptosis induced by oxidized low-density lipoprotein in patients with acute coronary syndrome. *Mediators Inflamm*, 2019, 2019: 2917128
- [43] Xu YJ, Zheng L, Hu YW, et al. Pyroptosis and its relationship to atherosclerosis. *Clin Chim Acta*, 2018, 476: 28-37
- [44] Guo M, Yan R, Ji Q, et al. IFN regulatory factor-1 induced macrophage pyroptosis by modulating m⁶A modification of circ_0029589 in patients with acute coronary syndrome. *Int Immunopharmacol*, 2020, 86: 106800
- [45] Li P, Yu H, Zhang G, et al. Identification and characterization of N⁶-methyladenosine circRNAs and methyltransferases in the lens epithelium cells from age-related cataract. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2020, 61: 13
- [46] Chen K, Luo GZ, He C. High-Resolution mapping of N⁶-methyladenosine in transcriptome and genome using a photo-crosslinking-assisted strategy. *Methods Enzymol*, 2015, 560: 161-85
- [47] Linder B, Grozhik AV, Olarerin-George AO, et al. Single-nucleotide-resolution mapping of m⁶A and m⁶A throughout the transcriptome. *Nat Methods*, 2015, 12: 767-72
- [48] Zhang Z, Chen LQ, Zhao YL, et al. Single-base mapping of m⁶A by an antibody-independent method. *Sci Adv*, 2019, 5: eaax0250
- [49] Meyer KD. DART-seq: an antibody-free method for global m⁶A detection. *Nat Methods*, 2019, 16: 1275-80
- [50] Wang Y, Xiao Y, Dong S, et al. Antibody-free enzyme-assisted chemical approach for detection of N⁶-methyladenosine. *Nat Chem Biol*, 2020, 16: 896-903