

DOI: 10.13376/j.cbils/2022029

文章编号: 1004-0374(2022)03-0243-11

## m<sup>6</sup>A 甲基化修饰在胶质瘤中的研究进展

刘学润<sup>1</sup>, 曹颖<sup>1</sup>, 汪应龙<sup>2</sup>, 王瑞<sup>1</sup>, 张祎年<sup>3,4\*</sup>

(1 兰州大学第一临床医学院, 兰州 730000; 2 中南大学湘雅医学院, 长沙 410000;

3 兰州大学第二医院神经外科, 兰州 730000; 4 兰州大学神经病学研究所, 兰州 730000)

**摘要:** 胶质瘤是中枢神经系统最常见的原发性恶性肿瘤, 预后较差, 部分高级别胶质瘤即使采用手术联合放化疗的高强度治疗措施, 效果也不理想。*N*<sup>6</sup>-甲基腺嘌呤 (*N*<sup>6</sup>-methyladenosine, m<sup>6</sup>A) 是真核生物信使 RNA (messenger RNA, mRNA) 中最丰富的转录后 RNA 修饰形式, 在 mRNA 剪接、翻译、运输、降解等过程中发挥关键作用。从肿瘤生物发生的角度探讨肿瘤的起源和发展机制一直是胶质瘤领域的研究热点。研究表明, m<sup>6</sup>A 甲基化修饰通过多种机制在胶质瘤中发挥关键作用, 为胶质瘤的早期诊断和靶向治疗提供了更多的可能性。该文就 m<sup>6</sup>A 甲基化修饰与神经胶质瘤的关系进行综述, 为胶质瘤的早期诊断、组织学分级、靶向治疗及预后评估等方面的研究提供新的见解。

**关键词:** m<sup>6</sup>A 甲基化; 胶质瘤; 胶质母细胞瘤; RNA 行为; 表观遗传

中图分类号: R739.41

文献标志码: A

## Research progress of m<sup>6</sup>A methylation modification in glioma

LIU Xue-Run<sup>1</sup>, CAO Ying<sup>1</sup>, WANG Ying-Long<sup>2</sup>, WANG Rui<sup>1</sup>, ZHANG Yi-Nian<sup>3,4\*</sup>

(1 The First School of Clinical Medicine, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China; 2 Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410000, China; 3 Department of Neurosurgery, Lanzhou University Second Hospital, Lanzhou 730000, China; 4 Institute of Neurology, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

**Abstract:** Glioma is the most common primary malignant tumor in the central nervous system and has a poor prognosis. Some high-grade gliomas have unsatisfactory therapeutic effects even though surgery is combined with radiotherapy. *N*<sup>6</sup>-methyladenosine (m<sup>6</sup>A) modification is the most abundant form of post-transcriptional RNA modification in eukaryotic messenger RNA (mRNA) and plays a key role in mRNA splicing, translation, transport and degradation. Exploring the mechanism of tumor origin and development from the perspective of tumor biogenesis has been a hot research topic in the field of glioma. Studies have shown that m<sup>6</sup>A methylation modification plays a key role in glioma through multiple mechanisms, providing more possibilities for early diagnosis and targeted treatment of glioma. In this review, the relationship between m<sup>6</sup>A methylation modifications and glioma is discussed, providing new insights into the early diagnosis, histological grading, targeted therapy and prognostic assessment of glioma.

**Key words:** *N*<sup>6</sup>-methyladenosine; glioma; glioblastoma; RNA behavior; epigenetic

胶质瘤是中枢神经系统最常见的原发性恶性肿瘤, 占有所有脑肿瘤的 50%, 具有侵袭性高、易复发、

预后差的特点, 其中以胶质母细胞瘤 (GBM) 恶性程度最高。即使采用手术全切联合术后同步放化疗,

收稿日期: 2021-10-17; 修回日期: 2021-11-15

基金项目: 甘肃省基础研究创新群体项目(21JR7RA432); 甘肃省卫生行业项目(GSWSKY2018-01); 兰州大学第二医院博士研究生培养专项基金项目(YJS-BD-31); 兰州大学第二医院萃英科技计划(CY2017-BJ15); 兰州大学第一医院卓越计划项目(20200060084, 20210060005, 20210060069)

\*通信作者: E-mail: ery\_zhangyn@lzu.edu.cn

GBM 患者的中位生存时间仍仅为 14.6 个月, 仅有 3%~5% 的患者生存时间超过 3 年<sup>[1-2]</sup>。因此, 探索胶质瘤的生物学起源, 寻找潜在的诊断和治疗靶点一直是相关分子生物学领域的研究重点。

表观遗传是在不改变 DNA 基本序列的前提下通过调控基因组与环境之间的相互作用而实现基因表达或功能的可遗传变化, 主要包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰、染色质重塑、RNA 修饰等。RNA 修饰已成为当前肿瘤研究的活跃领域, 60% 以上的 RNA 修饰是甲基化修饰, 其中 m<sup>6</sup>A 甲基化修饰是真核 mRNA 中最丰富的化学修饰<sup>[3]</sup>。现有研究发现 m<sup>6</sup>A RNA 修饰通过影响 RNA 代谢过程在调控细胞周期、增殖、代谢和肿瘤的生物学起源中发挥重要作用<sup>[3-4]</sup>, 这也为胶质瘤研究和治疗开辟了新的思路。本文综述了 m<sup>6</sup>A 甲基化修饰在胶质瘤中的最新研究进展, 并对可能的研究方向进行了展望, 旨在为进一步探讨 m<sup>6</sup>A 修饰与胶质瘤的关系提供理论依据。

## 1 m<sup>6</sup>A 甲基化概述

m<sup>6</sup>A 甲基化在 1975 年被首次发现, 是 RNA 腺苷酸第六位 N 上发生的甲基化<sup>[5]</sup>。目前认为 m<sup>6</sup>A 甲基化是真核生物 mRNA 中最丰富和最广泛的表观转录组学修饰, 在所有腺苷中占 0.1%~0.4%<sup>[6]</sup>。m<sup>6</sup>A 修饰通常发生在 3' 非翻译末端区域 (3'-UTR)、长外显子区和近终止密码子区中的保守序列 RRACH (其中 R 代表 G 或 A; H 表示 A、C 或 U) 上<sup>[7]</sup>, 其中 A 转换为 m<sup>6</sup>A。除 mRNA 外, microRNA (miRNA)、长链非编码 RNA (lncRNA)、环状 RNA (circRNA)、核糖体 RNA (rRNA)、转运 RNA (tRNA) 和小核仁 RNA (snoRNA) 均具有 m<sup>6</sup>A 修饰, 其调控几乎涉及所有种类的蛋白质编码基因和非编码基因<sup>[8]</sup>。在分子机制上, m<sup>6</sup>A 参与了 RNA 代谢的几乎所有步骤, 包括 mRNA 的翻译、降解、剪接、输出和折叠等<sup>[9-10]</sup>。作为一种动态可逆的修饰过程, m<sup>6</sup>A 可以被甲基转移酶 (又称 writer) 添加, 并被去甲基化酶 (又称 eraser) 去除。此外, 特定的 m<sup>6</sup>A 识别蛋白 (又称 reader) 可以直接或间接结合 m<sup>6</sup>A 序列以影响 RNA 功能。

### 1.1 Writers

m<sup>6</sup>A 修饰发生在转录和 mRNA 加工过程中的 pre-mRNA 阶段<sup>[11]</sup>, 该过程主要由 m<sup>6</sup>A 甲基转移酶复合体 (MTC) 催化。MTC 的核心成分是由甲基转移酶样 3 (methyltransferase-like 3, METTL3) 和 METTL14

以 1:1 的比例形成的异源二聚体。METTL3 是首个被发现的甲基转移酶, 为 MTC 的核心亚基, 起主要的催化作用, 敲除 METTL3 基因可导致 m<sup>6</sup>A 修饰活性几乎完全丧失。METTL14 本身不具有甲基转移能力, 主要发挥 RNA 结合支架、变构激活并增强 METTL3 催化活性的作用<sup>[12]</sup>。1 型 Wilms 肿瘤相关蛋白 (WTAP) 是 MTC 的第三种成分, 通过与病毒样 m<sup>6</sup>A 甲基转移酶相关蛋白 (VIRMA)、含锌指 CCCH 域的蛋白 13 (ZC3H13) 和 RNA 结合基序蛋白 15 (RBM15)/RBM15B 等辅助因子互作, 招募 METTL3-METTL14 二聚体并定位在细胞核剪切相关细胞器核小斑中, 赋予 m<sup>6</sup>A 修饰特异性<sup>[13]</sup>。

METTL16 也是一种具有催化活性的 m<sup>6</sup>A 甲基转移酶。METTL16 与 METTL3 在结构上十分相似, 但功能相对单一, 依赖 RNA 序列和结构来识别其 RNA 底物。METTL16 依赖的 m<sup>6</sup>A 修饰广泛存在于内含子、内含子-外显子交界和 U6 小核 RNA 上, 在 mRNA 稳定性和剪接中发挥重要作用<sup>[14]</sup>。

### 1.2 Erasers

脂肪肥胖相关蛋白 (FTO) 和烷基化修复同系物 5 (ALKBH5) 两种主要去甲基化酶的相继发现表明 m<sup>6</sup>A 甲基化修饰是一个动态可逆的过程。FTO 和 ALKBH5 同属于 ALKB 家族, 依赖于 Fe<sup>2+</sup> 和  $\alpha$ -酮戊二酸去除 m<sup>6</sup>A 甲基化修饰。FTO 在细胞质和细胞核中均有分布, 但目前的研究认为细胞核中 FTO 只催化 m<sup>6</sup>A 去甲基化, 而在细胞质中 FTO 似乎更倾向于催化 N<sup>6</sup>,2'-O-二甲腺基 (m<sup>6</sup>Am) 的去甲基化<sup>[15-16]</sup>。ALKBH5 定位于细胞核, 调节 mRNA 加工因子的组装和修饰, 并调节 mRNA 的输出和稳定性<sup>[17]</sup>。在 ALKBH5 缺陷细胞中, 由于核 RNA 输出加速, 细胞质 RNA 水平显著升高, 新生 RNA 合成增强, 整体 RNA 稳定性降低<sup>[17]</sup>。2019 年, 研究人员又发现 ALKBH3 参与 tRNA 的 m<sup>6</sup>A 修饰, 进一步丰富了 m<sup>6</sup>A 修饰的内容<sup>[18]</sup>。

### 1.3 Readers

YTHs 家族是最先被鉴定出的 m<sup>6</sup>A 识别蛋白, 通过 YTH 结构域直接与 m<sup>6</sup>A 位点结合调控 RNA 的剪接、翻译、定位和稳定性, 从而广泛参与转录后调控<sup>[19]</sup>。在人类中有 5 种含有 YTH 结构域的蛋白 (YTHDF1、YTHDF2、YTHDF3、YTHDC1 和 YTHDC2), 它们结构非常相似, 但功能完全不同。YTH 结构域家族蛋白 1 (YTHDF1) 与 m<sup>6</sup>A 结合后可提高 mRNA 的翻译效率<sup>[20]</sup>。YTHDF2 通过招募 CCR4-NOT 复合物来促进 mRNA 的降解<sup>[21]</sup>。YTHDF3

与 YTHDF1 协同促进蛋白质合成, 并影响 YTHDF2 介导的甲基化 mRNA 降解<sup>[22]</sup>。YTH 结构域包含蛋白 1 (YTHDC1) 是目前已知的唯一定位于胞核的 m<sup>6</sup>A 识别蛋白, 被报道参与剪接时的外显子选择<sup>[19]</sup>、非编码 RNA XIST 介导的表观遗传沉默<sup>[23]</sup>, 以及 mRNA 的核输出<sup>[24]</sup>。不同于其他 YTH 蛋白, YTHDC2 在睾丸组织中高表达, 与减数分裂特异性蛋白 MEIOC 相互作用, 在减数分裂期间提高靶蛋白的翻译效率, 同时降低靶蛋白 mRNA 丰度, 在精子形成中发挥关键作用<sup>[25]</sup>。

一些不具有 YTH 结构域的蛋白质也可以识别 m<sup>6</sup>A 甲基化修饰。核不均一核糖蛋白 (HNRNP) 含有 RNA 结合结构域, 其成员 HNRNPC、HNRNPG 和 HNRNPA2B1 在可变剪接、RNA 变构、mRNA 前体和 miRNA 前体加工中发挥作用<sup>[10, 26-27]</sup>。真核起始因子 3 (EIF3) 被证明可以通过直接结合 mRNA 5'-UTR 的 m<sup>6</sup>A 修饰位点, 以不依赖帽的方式募集 43S 复合体促进蛋白质翻译<sup>[28]</sup>。胰岛素样生长因子 2 mRNA 结合蛋白 (IGF2BPs) 包括 IGF2BP1~3, 此类蛋白通过结合 KH 结构域 (尤其是 KH3-4 双结构域) 识别具有 m<sup>6</sup>A 的修饰的 mRNA<sup>[29]</sup>。IGF2BPs 识别结合 m<sup>6</sup>A 修饰位点后, 通过抑制 mRNA 的降解或增强 mRNA 的储存来促进稳定性, 并促进其翻译<sup>[29]</sup>。此外, 胚胎致死异常视觉蛋白 1 (ELAVL1)、脆性 X 智力低下蛋白 (FMRP)、FMRP 翻译调节蛋白 1 (FMR1) 以及核糖体也能识别 m<sup>6</sup>A 修饰并影响 RNA 行为, 但其选择性识别 m<sup>6</sup>A 修饰转录物的机制仍有待探索<sup>[30]</sup>。

## 2 m<sup>6</sup>A 调节因子与胶质瘤

胶质瘤中 m<sup>6</sup>A 转录组的研究是一个较为年轻的领域, 该领域的研究成果在过去 5 年中不断涌现, 为胶质瘤的治疗提供了新的方向和可能。在已发表的研究中, 大约一半的研究认为, 胶质瘤中 m<sup>6</sup>A 甲基化水平普遍降低, m<sup>6</sup>A 修饰具有保护作用, 而另一半则持相反的观点。m<sup>6</sup>A 在胶质瘤中的不同表达说明 m<sup>6</sup>A 修饰在胶质瘤的发生发展过程中不仅可能促进肿瘤的发生, 还可能抑制肿瘤的发生。

### 2.1 Writers 与胶质瘤

一方面, 一些研究认为 METTL3 促进胶质瘤的发生。胶质瘤干细胞 (GSCs) 被认为是胶质母细胞瘤的起始细胞, 能自我更新并向多向分化, 是胶质瘤放疗抵抗和最终复发的重要原因<sup>[31]</sup>。Visvanathan 等<sup>[32]</sup>发现, GSCs 在体外分化过程中

m<sup>6</sup>A RNA 甲基化水平降低, 可能是由于分化过程中 METTL3 表达下降所造成。敲除 GSCs 中的 METTL3, GSCs 特异性标记物表达显著减少且凋亡明显增加。机制上, METTL3 在人类抗原 R (HuR) 存在时, 识别性别决定区 Y 框蛋白 2 (SOX2) mRNA 3'-UTR 的特异性位点并对其进行 m<sup>6</sup>A 甲基化修饰, 通过提高 SOX2 mRNA 的稳定性介导 GSCs 干细胞特性维持。Li 等<sup>[33]</sup>率先揭示了 m<sup>6</sup>A 修饰调节无义介导的 mRNA 降解 (NMD) 促进 GBM 生长和进展的机制: METTL3 介导的 m<sup>6</sup>A 修饰可以通过上调 BCL-X 或 NCOR2 来影响丝氨酸 / 精氨酸富集剪接因子 (SRSFs) 的表达水平, 并可以抑制 YTHDC1 依赖的 NMD。Visvanathan 等<sup>[34]</sup>认为, METTL3 通过调节 RNA 编辑酶 ADAR 和 APOBEC3A 来改变 A-I 和 C-U RNA 编辑事件, 在 RNA 加工的许多步骤中起着至关重要的作用, 沉默 METTL3 导致异常选择性剪接事件的增加。分析 METTL3 沉默后 RNA 调控的直接和间接靶点, 发现 METTL3 在 NOTCH、NF- $\kappa$ B、Wnt、c-MYC、TGF- $\beta$  等胶质母细胞瘤相关的关键致癌通路中都是必不可少的<sup>[34]</sup>。非编码 RNA 的 m<sup>6</sup>A 修饰鲜有报道, METTL3 还可以在 HuR 的辅助下通过 m<sup>6</sup>A 修饰增强 lncRNA MALAT1 的稳定性并激活 NF- $\kappa$ B, 促进 IDH 野生型胶质瘤的恶性进展<sup>[35]</sup>。METTL3 还通过修饰替莫唑胺 (TMZ) 抗性基因 O6-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶 (MGMT) 和烷基嘌呤-DNA-N-葡萄糖基转移酶 (APNG)<sup>[36]</sup>、组蛋白修饰相关基因的转录本<sup>[37]</sup>, 以及 METTL3-SOX2 级联增强 DNA 修复<sup>[32]</sup>, 在胶质瘤放疗耐受中发挥重要作用。

另一方面, 一些研究提示 METTL3 及高 m<sup>6</sup>A 修饰具有抑瘤作用。人脑胶质瘤组织中 mRNA 的 m<sup>6</sup>A 修饰水平降低, 随着胶质瘤恶性程度的上升 METTL3 的表达呈下降趋势, METTL3 通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路中这些蛋白的磷酸化水平抑制胶质瘤细胞增殖、迁移和侵袭, 并诱导其凋亡<sup>[38]</sup>。Cui 等<sup>[39]</sup>发现, 下调 METTL3 和 METTL14 可诱导原癌基因 (如 ADAM19、EPHA3 和 KLF4) 上调和抑癌基因 (如 CDKN2A、BRCA2 和 TP53I11) 下调, 星形胶质细胞标志物神经胶质原纤维酸性蛋白 (GFAP) 和神经元标志物 III 型  $\beta$  微管蛋白 (TUBB3) 也下调, 促进 GSCs 的自我更新和肿瘤发生; 进一步用 FTO 抑制剂 MA2 处理 GSCs, 发现其生长和自我更新受到明显抑制。此外, Han 等<sup>[40]</sup>的研究同样发现相比于正常脑组织, METTL3 在胶质瘤组织中下调, METTL3 下调降低了 COL4A1 的甲基化

并上调其表达水平,促进了胶质瘤细胞的增殖、迁移和侵袭。

甲基转移酶 WTAP 在胶质瘤中高表达,且与胶质瘤分级密切相关,在高级别(III~IV级)胶质瘤组织中 WTAP 的表达明显高于低级别胶质瘤组织<sup>[41]</sup>。WTAP 通过影响表皮生长因子受体(EGFR)活性影响 Akt 的磷酸化,调节 GBM 细胞的增殖、迁移和侵袭,其异常增高可能导致胶质瘤的复发<sup>[42]</sup>。cDNA 芯片还显示 WTAP 可能调节肿瘤细胞迁移侵袭相关基因,如 CCL2、CCL3、HAS1、LOXL1、MMP3 和 THBS1 的表达<sup>[42]</sup>。有研究表明,miR-29a 可与 QKI-6 的 3'-UTR 结合并抑制 QKI-6 的表达,WTAP 作为 QKI-6 的下游靶基因表达也下降,从而使胶质瘤细胞的恶性行为受到抑制<sup>[43]</sup>。

## 2.2 Erasers与胶质瘤

ALKBH5 和 FTO 两种 m<sup>6</sup>A 去甲基化酶在乳腺癌、胃癌和卵巢癌中促进细胞增殖和侵袭,而在胰腺癌和大肠癌中具有相反的作用,这表明 erasers 在肿瘤中可能是一个复杂的调节系统<sup>[44]</sup>。Erasers 在胶质瘤的发生发展中也扮演着重要的角色。2017年,Zhang 等<sup>[45]</sup>研究表明,ALKBH5 在 GSCs 中升高,增强了细胞的自我更新、增殖和致瘤性;机制上,ALKBH5 通过降低靶 mRNA 转录本(特别是 3'-UTR)中 m<sup>6</sup>A 的丰度,使 m<sup>6</sup>A 修饰的碱基去甲基化,提高 GBM 患者中关键靶基因 FOXM1 的表达水平。葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PD)是磷酸戊糖途径的重要限速酶,研究发现 ALKBH5 可以催化胶质瘤细胞中 G6PD mRNA 去甲基化,增强其稳定性并促进翻译,激活磷酸戊糖途径,在胶质瘤细胞增殖和能量代谢中起重要作用<sup>[46]</sup>。Yes 相关蛋白 1(YAP1)在 GBM 的迁移和侵袭中是必需的<sup>[47]</sup>。Kowalski-Chauvel 等<sup>[44]</sup>研究显示,ALKBH5 与 YAP1 表达呈正相关,ALKBH5 可能通过调控 YAP1 影响 GBM 的侵袭能力。此外,下调 ALKBH5 可以通过降低同源重组修复相关的基因(如 RAD51、CHK1、XRCC2、BRCA2、EXO1 和 BRIP1)的表达使恶性胶质瘤干细胞对辐射增敏。LncRNA SOX2OT 在 TMZ 耐药细胞和复发性 GBM 患者样本中升高,其通过招募 ALKBH5 使 SOX2 转录本去甲基化,上调 SOX2 的表达,激活 Wnt5a/ $\beta$ -catenin 信号通路,抑制细胞凋亡,促进细胞增殖和 TMZ 抗性<sup>[48]</sup>。

Cui 等<sup>[39]</sup>发现,FTO 抑制剂 MA2 在体外可减缓 GSCs 的生长和自我更新。异柠檬酸脱氢酶 1(IDH1)和 IDH2 以 NADP<sup>+</sup> 依赖的方式催化异柠檬

酸酯氧化脱羧生成  $\alpha$ -酮戊二酸酯,约 80% 的 II~III 级胶质瘤和继发性 GBM 存在 IDH1 和 IDH2 的反复体细胞突变,突变的 IDH1/2 产生一种肿瘤代谢物 2-羟甲基二酸(R-2HG)<sup>[49]</sup>。Su 等<sup>[50]</sup>研究显示,FTO 是 R-2HG 的直接靶点,R-2HG 与 FTO 结合抑制 FTO 的去甲基作用,降低 MYC/CEBPA 转录本的稳定性,发挥抗肿瘤作用。然而,Tao 等<sup>[51]</sup>研究显示,FTO 在胶质瘤中表达水平低下,其趋势在高级别胶质瘤中更显著,FTO 与 FOXO3a 相互作用可促进核转位并调节 FOXO3a 靶基因,抑制肿瘤恶性行为。

## 2.3 Readers与胶质瘤

### 2.3.1 YTHDF和YTHDC家族

与 METTL3 相似,分化的胶质瘤细胞中 YTHDF2 水平低于未分化的 GSCs<sup>[32,52]</sup>。Chai 等<sup>[53]</sup>研究表明,YTHDF2 表达与胶质瘤恶性程度高、WHO 胶质瘤分级、预后差呈正相关;机制上,YTHDF2 通过识别 METTL3 介导的 UBXM1 mRNA 上的 m<sup>6</sup>A 修饰位点加速 UBXM1 mRNA 的降解,激活 NF- $\kappa$ B,加速肿瘤进展。Fang 等<sup>[52]</sup>发现 YTHDF2 通过 m<sup>6</sup>A 依赖的 mRNA 衰减下调 LXR $\alpha$  和 HIVEP2。LXR $\alpha$  通过调节胆固醇的摄入及排出维持胞内胆固醇的动态平衡,而胆固醇对胶质瘤的增殖和侵袭必不可少<sup>[54]</sup>。HIVEP2 是一种转录因子,其下游靶标 SSTR2 可抑制胶质瘤增殖<sup>[55]</sup>,对 MYC、NF- $\kappa$ B 和 TGF- $\beta$  信号通路也有调节作用<sup>[56]</sup>。在大多数胶质瘤中,EGFR/SRC/ERK 途径稳定 YTHDF2 的表达<sup>[52]</sup>,后者又以依赖 m<sup>6</sup>A 的方式稳定 MYC 和 VEGFA 在 GSCs 中的转录<sup>[57]</sup>。综上所述,YTHDF2 过表达可能同时加速 UBXM1、LXR $\alpha$  和 HIVEP2 mRNA 的降解,通过复杂的作用网络促进胶质瘤的发展。

YTHDF1 在胶质瘤中高表达,且与患者年龄及肿瘤分级呈正相关,敲低 YTHDF1 的表达将抑制肿瘤细胞的侵袭与迁移能力<sup>[58]</sup>。Yarmishyn 等<sup>[59]</sup>同样发现,YTHDF1 在胶质瘤中表达上调,进一步研究证实 YTHDF1 参与了 RNA 结合蛋白 MSI1 介导的 GBM 细胞增殖和迁移等肿瘤发生过程,并在调节 GBM 细胞的干细胞样特性中发挥关键作用,YTHDF1 是胶质瘤的阴性预后标志物。

Li 等<sup>[33]</sup>研究显示,METTL3 调节剪接因子的 NMD 需要 YTHDC1 存在。敲低 YTHDC1 基因后,METTL3 过表达的 U87 细胞的增殖明显降低。在 METTL3 过表达的 W377A/W428A 突变体中,YTHDC1 未能促进 U87 细胞球状细胞形成能力,说明 YTHDC1

依赖于其 m<sup>6</sup>A 结合活性促进 GBM 的功能表型。

### 2.3.2 IGF2BP家族

与 YTHDF2 促进 mRNA 降解相反, IGF2BP 家族 (IGF2BP 1/2/3) 可以增强 m<sup>6</sup>A 修饰 mRNA 的稳定性, 促进翻译<sup>[29]</sup>。尽管这些蛋白质的某些功能与癌变没有直接关系, 但仍被认为是 GBM 发病的重要调控因子。miR-873 和 miR-506 在 GBM 中低表达, IGF2BP1 作为它们的直接靶标, 上调 miR-873 和 miR-506 可以降低 IGF2BP1 的表达, 破坏 IGF2BP1 对其靶基因 c-MYC、MKI67、PTEN 和 CD44 mRNA 的稳定作用, 抑制 GBM 细胞的增殖和侵袭<sup>[60-61]</sup>。

研究表明, IGF2BP2 在 GBM 组织中上调, 通过调节胰岛素样生长因子 2 (IGF-2) 活性, 进一步激活 PI3K/Akt 信号通路, 促进 GBM 细胞的增殖、迁移、侵袭和上皮-间充质转化 (EMT), 抑制 IGF2BP2 可使 GBM 对 TMZ 的敏感性增加<sup>[62]</sup>。IGF2BP2 还与几种编码线粒体呼吸链复合体亚基的 mRNA 结合, 包括线粒体细胞色素 C 氧化酶 7B (COX7B)、NADH 脱氢酶铁硫蛋白 7 (NDUS7) 和 NADH 脱氢酶, 促进 GSCs 的氧化磷酸化<sup>[63]</sup>。还有研究表明, IGF2BP2 在间充质 GSCs 中表达上调, 在 lncRNA 缺氧诱导因子-1 $\alpha$ -反义链 2 (HIF1A-AS2) 存在下, IGF2BP2 与 ATP 依赖性 RNA 解旋酶 A (DXH9) 形成复合物, 促进 HMGA1 等癌基因的表达, 介导 GSCs 对缺氧应激的适应<sup>[64]</sup>。此外, 还有多项研究表明, IGF2BP2 通过与 miRNA 或 lncRNA 相互作用影响胶质瘤的进展。let-7 miRNA 家族已经被证明通过沉默干性相关基因来诱导分化, IGF2BP2 可以通过阻断 let-7 miRNA 家族成员的靶基因沉默作用, 维持胶质母细胞瘤干细胞的干性<sup>[65]</sup>。Li 等<sup>[66]</sup>首次报道了 IGF2BP2 的类泛素化修饰调控 lncRNA OIP5-AS1/miRNA-4950-3p 轴, 促进胶质瘤血管生成拟态 (VM) 形成。在低级别胶质瘤 (LGG) 中, miR-138 通过直接靶向 IGF2BP2 mRNA 的 3'-UTR 抑制 IGF2BP2 来减弱 EMT, 降低 LGG 的侵袭性<sup>[67]</sup>。血液肿瘤屏障 (BTB) 能显著降低化疗对胶质瘤的疗效, Liu 等<sup>[68]</sup>发现 IGF2BP2 在胶质瘤微血管和胶质瘤内皮细胞 (GECs) 中过表达, 并阐明了 IGF2BP2/lncRNA FBXL19-AS1/ZNF765 轴对 BTB 通透性的调控机制, 为提高化疗效果提供了新见解。

IGF2BP3 mRNA 和蛋白在 GBM 中均上调, 但在低级别星形细胞瘤中未上调<sup>[69]</sup>。胶质瘤细胞的基因芯片分析表明, IGF2BP3 在转录组水平的直接靶标与细胞周期相关过程有关, 在翻译组水平的直接

靶标与凋亡相关通路有关<sup>[70]</sup>。类似于 IGF2BP2<sup>[62]</sup>, IGF2BP3 与 IGF-2 mRNA 的 5'-UTR 结合激活 PI3K/MAPK 通路, 促进细胞增殖、锚定非依赖生长、侵袭和耐药性<sup>[69]</sup>; IGF2BP3 过表达导致 E-钙黏蛋白表达降低, 上调 N-钙黏蛋白、波形蛋白和 MMP9 的表达, 诱导 EMT 并促进细胞增殖、迁移和侵袭<sup>[71]</sup>。IGF2BP3 还能结合 NF- $\kappa$ B 异二聚体的亚基 p65 促进胶质瘤细胞迁移, IGF2BP3 和 p65 之间还存在正反馈回路<sup>[72]</sup>。

### 2.3.3 HNRNPA2B1和HNRNPC家族

SOX2 蛋白互作研究表明, 在 GBM 中 HNRNPA2B1 和 HNRNPC 可与 SOX2 互作, 提示它们可能在维持 GSCs 干性方面发挥关键作用<sup>[73]</sup>。目前认为 HNRNPA2B1 是与胶质瘤细胞生长密切相关的致癌基因, 在人脑胶质瘤组织标本中也观察到 hnRNPA2B1 的过表达, 并与晚期胶质瘤分级密切相关。Golan-Gerstl 等<sup>[74]</sup>研究表明, HNRNPA2B1 调控抑癌基因 c-FLIP、BIN1 和 WWOX, 以及原癌基因 RON 的表达, 是一个 GBM 的潜在治疗新靶点。敲低 HNRNPA2B1 能降低磷酸化 STAT3 和 MMP2 的表达, 降低 GBM 的活力、黏附、迁移、侵袭和抗 TMZ 能力, 诱导肿瘤细胞凋亡和活性氧 (ROS) 生成<sup>[75]</sup>。

HNRNPC 是 3'-UTR 加工和 miRNA 成熟的重要生理调节因子, 也是肿瘤疾病的重要调节因子。在胶质瘤中, HNRNPC 表达水平随肿瘤级别升高而升高, HNRNPC 结合 pri-miR-21 并诱导 miR-21 表达, 其具体机制可能是抑制 Akt 和 p70S6K 通路导致胶质母细胞瘤细胞 miR-21 表达增加, 从而调控 GBM 的转移潜能<sup>[76]</sup>。

以上对 m<sup>6</sup>A 调节因子在胶质瘤中的研究进行了总结归纳, 不难看出 m<sup>6</sup>A 修饰在胶质瘤的增殖、凋亡、迁移、侵袭、EMT、干性维持、能量代谢、化疗耐受、血管生成以及血液肿瘤屏障等多方面发挥重要作用; 但一些结果之间尚存在争议, 尤其在 METTL3 是促进还是抑制胶质瘤的发生方面分歧最大。我们认为导致以上两种截然相反的结论的原因可能是由不同的肿瘤类型、肿瘤异质性、肿瘤细胞中其他代偿性基因突变和表观遗传改变等方面造成的。澄清具体 mRNA 是高甲基化还是低甲基化, 以及在何种情况下哪些 readers 识别甲基化可能是解决此争议的方法。此外, 特定位点 m<sup>6</sup>A 修饰的动态变化可能远比 m<sup>6</sup>A 修饰总数的变化更重要。总之, m<sup>6</sup>A 甲基化修饰在胶质瘤中发挥着关键作用是不容

置疑的, 基于近期研究获得的关于胶质瘤转录组修饰的信息, 揭示的可能只是冰山一角, 未来必然会发现更复杂、精确的关于胶质瘤细胞转录命运的调控机制。m<sup>6</sup>A 调节因子与胶质瘤细胞生物学行为相关的作用机制整理如下(表 1)。

### 3 m<sup>6</sup>A修饰在胶质瘤中的临床意义

#### 3.1 诊断

表观遗传改变已经被广泛用于多种疾病的诊断, m<sup>6</sup>A 甲基化作为 RNA 上最重要的修饰也被证明是肿瘤的可靠生物标志物。Ge 等<sup>[77]</sup>发现, 外周

表1 胶质瘤中m<sup>6</sup>A调节因子的表达与功能

| m <sup>6</sup> A调节因子 | 中间/靶标分子  | 细胞/组织模型                             | 促进/抑制 | 文献   |
|----------------------|--|-------------------------------------|-------|------|
| METTL3               | SOX2、HuR   | GBM干细胞和U87、LN229细胞系                 | 促进    | [32] |
| METTL3和<br>YTHDC1    | 剪接因子SRSFs对mRNA NMD的调控  | GBM干细胞和U87、U251细胞系                  | 促进    | [33] |
| METTL3               | ADAR等RNA编辑酶  | GBM干细胞                              | 促进    | [34] |
| METTL3               | lncRNA MALAT1/NF-κB  | LN229、H4和U87细胞系等                    | 促进    | [35] |
| METTL3               | TMZ抗性基因MGMT和ANPG   | U251和U87-MG细胞系                      | 促进    | [36] |
| METTL3               | EZH2   | U251和U87-MG细胞系                      | 促进    | [37] |
| METTL3               | PI3K/Akt/mTOR  | U87和LN229细胞系                        | 抑制    | [38] |
| METTL3和<br>METTL14   | ADAM19、EPHA3、KLF4、<br>CDKN2A、BRCA2、TP53I11                   | GBM干细胞                              | 抑制    | [39] |
| METTL3               | COL4A1   | U87和U251细胞系                         | 抑制    | [40] |
| WTAP                 | EGFR/Akt   | U87-MG和 GBM05细胞                     | 促进    | [42] |
| ALKBH5               | FOXM1、HuR、FOXM1-AS   | GBM干细胞和LN229、U87-MG、U251-MG等<br>细胞系 | 促进    | [45] |
| ALKBH5               | G6PD   | U87和U251细胞系                         | 促进    | [46] |
| ALKBH5               | SOX2/Wnt5a/β-catenin   | U87和U251细胞系                         | 促进    | [48] |
| ALKBH5               | YAP1、同源重组修复相关的基因<br>(如RAD51、CHK1、XRCC2、<br>BRCA2、EXO1和BRIP1) | 患者GBM活检标本的GBMSCs                    | 促进    | [44] |
| ALKBH5               | Akt2   | U87和U251细胞系                         | 促进    | [86] |
| ALKBH5               | CD73   | U87细胞系                              | 促进    | [87] |
| ALKBH5               | NANOG  | U87和U251细胞系                         | 促进    | [90] |
| FTO                  | MYC/CEBPA  | 8MGBA、A172、U87-MG、DK-MG等细胞系         | 促进    | [50] |
| FTO                  | FOXO3a   | U87和U251细胞系                         | 抑制    | [51] |
| YTHDF2               | UBXN1/NF-κB  | H4、LN229和U87细胞系                     | 促进    | [53] |
| YTHDF2               | LXRα、HIVP2   | Hs683、SW1783、U87-MG等细胞系             | 促进    | [52] |
| YTHDF1               | ——   | U87和U251细胞系                         | 促进    | [58] |
| YTHDF1               | MSI1   | DBTRG-05MG细胞系                       | 促进    | [59] |
| IGF2BP1              | c-MYC、MKI67、PTEN、CD44  | A172、U251、U87等细胞系                   | 促进    | [61] |
| IGF2BP2              | IGF-2/PI3K/Akt   | U87和U251细胞系                         | 促进    | [62] |
| IGF2BP2              | 编码线粒体呼吸链复合体亚基的mRNA   | GBM患者组织                             | 促进    | [63] |
| IGF2BP2              | DXH9/HMGA1   | GBM干细胞                              | 促进    | [64] |
| IGF2BP2              | let-7 miRNA家族成员的靶基因  | GBM干细胞                              | 促进    | [65] |
| IGF2BP2              | lncRNA OIP5-AS1/miRNA-495-3p                                 | U87、U251和HA等细胞系                     | 促进    | [66] |
| IGF2BP2              | lncRNA FBXL19-AS1/ZNF765                                     | hcMEC/D3和U87-MG细胞系                  | 促进    | [68] |
| IGF2BP3              | IGF-2/PI3K/MAPK  | U373、U138、H1299等细胞系                 | 促进    | [69] |
| IGF2BP3              | NF-κB p65  | 293T、U87和HCT116等细胞系                 | 促进    | [72] |
| HNRNPA2B1和<br>HNRNPC | SOX2   | LN229细胞系                            | 促进    | [73] |
| HNRNPA2B1            | c-FLIP、BIN1、WWOX、RON   | U87-MG和 T98G细胞系                     | 促进    | [74] |
| HNRNPA2B1            | 磷酸化STAT3、MMP-2   | U251和SHG44细胞系                       | 促进    | [75] |
| HNRNPC               | PDCD4  | T98G、U87-MG和U87L4等细胞系               | 促进    | [76] |

血 RNA 中的 m<sup>6</sup>A 水平是胃癌的生物标志物; 还有研究报道了 miRNAs 的甲基化水平也是早期胃肠道癌的潜在诊断生物标志物<sup>[78]</sup>。Huang 等<sup>[79]</sup> 研究证实了肺癌患者循环肿瘤细胞 (CTC) 中 m<sup>6</sup>A 修饰水平的升高, 检测 CTC 中 m<sup>6</sup>A 修饰的整体水平和特定位点可能是发现原发灶以及监测转移的有效手段。目前还没有 m<sup>6</sup>A 修饰在胶质瘤诊断方面的相关报道, 识别外周血或脑脊液的 RNA m<sup>6</sup>A 修饰可能是一种潜在的诊断方法。

常见的 m<sup>6</sup>A 修饰检测方法包括液相色谱质谱联用 (LC-MS/MS)、薄层色谱 (TLC)、比色法、斑点印迹等, 但这些方法主要从整体水平上判断 mRNA 的 m<sup>6</sup>A 修饰水平, 不适合高通量分析, 也无法鉴定出修饰的具体位点<sup>[80]</sup>。RNA 甲基化免疫沉淀测序 (m<sup>6</sup>A-seq) 是基于 m<sup>6</sup>A 高特异性抗体结合高通量测序的技术, 可绘制转录组的 m<sup>6</sup>A 图谱, 但不能将 m<sup>6</sup>A 残基的定位精确到单个碱基, 也无法对修饰定量<sup>[80]</sup>。由 m<sup>6</sup>A-seq 改进而来的光交联辅助 m<sup>6</sup>A 测序 (PA-m<sup>6</sup>A-Seq) 技术是将核糖核苷 4- 硫尿苷掺入到 mRNA 中, 免疫沉淀后用紫外光照射形成硫酮结构, 在后续测序中呈现出胸腺嘧啶 (T) 向胞嘧啶 (C) 的转变以及碱基对读数的改变, 实现了 m<sup>6</sup>A 位点的精确识别<sup>[81]</sup>。当前 m<sup>6</sup>A 检测还面临着: (1) 对测序样品质量要求高; (2) rRNA 污染问题严重; (3) 样品起始量较大, 难以进行单细胞测序; (4) m<sup>6</sup>A 的单碱基检测实现比较困难等问题。以上问题严重制约了 m<sup>6</sup>A 检测的发展, 未来开发更简单可靠的检测技术将会极大地推动 m<sup>6</sup>A 甲基化在胶质瘤等疾病诊断以及研究中的应用。

### 3.2 临床病理特征

Chai 等<sup>[82]</sup> 基于基因组图谱的数据挖掘和生物信息学分析, 系统地研究了各种类型的 m<sup>6</sup>A 调节因子与胶质瘤病理特征 (包括 WHO 分类、IDH 分类和 1p/19q 缺失状态) 之间的关系, 其结果显示, 大多数 m<sup>6</sup>A 调节因子的表达水平与 WHO 的组织学分级及相应的分类显著相关。定量分析发现 WTAP、YTHDF、ALKBH5 和 FTO 的表达水平与组织学分级显著相关, WTAP、YTHDF 和 ALKBH5 的表达丰度与组织学分级呈正相关, FTO 的表达丰度与组织学分级呈负相关。Chang 等<sup>[83]</sup> 观察到 METTL3 的表达与 IDH 野生型胶质瘤恶性程度的增加呈正相关, 而与 IDH 突变型胶质瘤无关, 印证了 Li 等<sup>[33]</sup> 所提出的 METTL3 的表达可以用来分析组织学相似的 GBM 实体之间的分子差异。此外, YTHDF1

在弥漫星形细胞瘤中的表达水平高于少突胶质细胞瘤<sup>[58]</sup>, 毛细胞黏液样星形细胞瘤中的 IGF2BP3 表达水平几乎是毛细胞星形细胞瘤中的 2 倍<sup>[84]</sup>, 提示 m<sup>6</sup>A 调节因子可能与胶质瘤的组织学类型相关。

### 3.3 治疗

2017 年, Cui 等<sup>[39]</sup> 首先报道了 FTO 抑制剂 MA2 可以抑制胶质瘤进展。此后, Xiao 等<sup>[85]</sup> 阐明 MA2 通过靶向 MYC-miR-155/23a-MXI1 反馈回路, 调节胶质瘤的发生和增殖并可增强 TMZ 的抗肿瘤作用。Cui 等<sup>[86]</sup> 发现, miRNA-193a-3p 通过靶向 ALKBH5 调控 Akt2 通路抑制胶质瘤细胞生长, 促进细胞凋亡, 表明 miR-193a-3p 在胶质瘤的发生中发挥了关键作用, 并提出靶向 miR-193a-3p 可能是一种理想的基因靶向治疗胶质瘤的策略。ALKBH5 抑制剂 MV1035 能通过降低胶质母细胞瘤 U87 细胞系中 CD73 蛋白表达水平显著降低肿瘤的迁移和侵袭性<sup>[87]</sup>。此外, Kowalski-Chauvel 等<sup>[44]</sup> 研究表明, 抑制 ALKBH5 可以增加 GSCs 对放疗的敏感性。目前还没有 METTL3 抑制剂与胶质瘤的直接研究, 但 Marcelino 等<sup>[88]</sup> 的研究提示了一定的可行性: S-腺苷同型半胱氨酸 (SAH) 是一种 METTL3 抑制剂, 应激状态下脑内腺苷增高导致的 SAH 积累可通过抑制甲基转移酶活性抑制人星形胶质细胞增殖。2021 年, Yankova 等<sup>[89]</sup> 筛选出了一种高效、选择性的 METTL3 抑制剂 STM2457, 对急性髓系白血病显示出了强大的疗效, 但其是否能用于胶质瘤的治疗还有待探究。基于以上研究, m<sup>6</sup>A 修饰相关的靶向治疗大有潜力, 但由于胶质瘤治疗中涉及血脑屏障等许多特殊问题, m<sup>6</sup>A 调节剂类药物应用于临床可能还有很长的路要走。

### 3.4 化疗耐药

TMZ 是治疗胶质瘤的一线化疗药物, 但胶质瘤易对其耐受是当今临床面临的巨大挑战。目前认为的耐药产生机制主要涉及 DNA 损伤修复、肿瘤微环境、信号通路异常、胶质瘤干细胞学说、肿瘤细胞自噬等方面, 最近的研究显示 m<sup>6</sup>A 甲基化修饰也参与了胶质瘤耐药。Li 等<sup>[37]</sup> 首次揭示了 m<sup>6</sup>A 和组蛋白修饰在 TMZ 耐药中的交互作用, m<sup>6</sup>A 通过抑制 NMD 促进组蛋白修饰物 EZH2 表达, 靶向 SOX4/EZH2/METTL3 轴治疗 GBM 显示出巨大潜力。在多数情况下, TMZ 抗性细胞株高表达 MGMT 和 ANPG, 这可能是由 METTL3 以 m<sup>6</sup>A 依赖的方式实现的<sup>[36]</sup>。一项研究表明, 外泌体 circ\_0072083 可通过调节 miR1252-5p/ALKBH5/NANOG 轴增加胶质瘤细胞对 TMZ 的耐药性<sup>[90]</sup>。Wang 等<sup>[91]</sup> 报道了

lncRNA OIP5-AS1 通过抑制 miR-129-5p 提高 IGF2BP2 的表达, 而 IGF2BP2 可以促进胶质瘤细胞增殖并抑制凋亡, 增强对 TMZ 的化疗抗性。目前有限的研究报道表明, m<sup>6</sup>A 甲基化在胶质瘤的耐药中发挥重要作用, 并且从 m<sup>6</sup>A 甲基化角度出发可能是解决胶质瘤耐药的新途径。

### 3.5 预后

Chai 等<sup>[82]</sup>对中国胶质瘤基因组图谱 (CGGA) 数据库中 m<sup>6</sup>A 相关蛋白的表达水平进行了单因素 Cox 回归分析, 发现高危基因主要包括 ALKBH5、YTHDF1、YTHDF2、HNRNPC、RBM15、KIAA1429 和 WTAP, 保护基因主要为 FTO、YTHDC1、ZC3H13 和 METTL3。在成人 LGG 中, YTHDF2、WTAP、ALKBH5、RBM15、KIAA1429、HNRNPC、YTHDF1 和 FTO 的表达水平与 IDH 突变胶质瘤患者的总生存期 (OS) 显著相关。YTHDF2、KIAA1429、HNRNPC 和 YTHDF1 对野生型 IDH 的 LGG 有预测价值, FTO、YTHDF2 和 RBM15 对野生型 IDH 的 GBM 有预测价值; FTO 对 IDH 突变的 GBM 也有预测价值。单因素和多因素 Cox 回归分析显示, 危险评分、1p/19q 序列、IDH 状态、年龄和 WHO 分级均与 OS 有关。进一步的多元回归分析显示, 由 m<sup>6</sup>A 调节因子得出的风险评分可以独立预测胶质瘤患者的预后。类似地, Guan 等<sup>[92]</sup>通过对 TCGA 中胶质瘤数据的分析, 发现具有 m<sup>6</sup>A 甲基化修饰功能的 8 个基因 (ALKBH5、hnRNPA2B1、IGF2BP2、IGF2BP3、RBM15、WTAP、YTHDF1 和 YTHDF2) 可以构建风险特征, 其中 IGF2BP2 和 IGF2BP3 可能是 m<sup>6</sup>A 甲基化调节因子参与胶质瘤发生发展的关键因子, 可作为判断胶质瘤预后的分子标志物。此外, Xi 等<sup>[41]</sup>研究表明, WTAP 高表达是胶质瘤不良预后的相关因素; He 等<sup>[93]</sup>在对中国儿童 m<sup>6</sup>A 修饰基因的遗传变异与胶质瘤的风险分析中发现, WTAP 和 YTHDF2 的表达与胶质瘤进展和不良总生存期呈正相关。

## 4 总结与展望

胶质瘤作为中枢神经系统最常见的原发恶性肿瘤, 尽管目前普遍采取手术治疗及辅助放疗的手段, 大部分患者预后仍欠佳, 因此, 寻找新的治疗方案迫在眉睫。m<sup>6</sup>A 甲基化是由甲基转移酶、去甲基化酶、甲基化识别蛋白三种甲基化调节因子共同参与调节的转录后修饰, 在各种病理生理过程中发挥重要作用, 是许多疾病的潜在诊疗靶点。目前已有大量的研究报道了 m<sup>6</sup>A 甲基化调节因子在胶质瘤

中的作用, 但一些结果之间尚存在争议。尽管部分研究结果之间存在分歧, 一些参与 mRNA 表达的基因或蛋白质仍被证实是胶质瘤的潜在预后标志物。不可否认 m<sup>6</sup>A 甲基化是胶质瘤诊断、治疗以及预后判断等方面的潜在标志物, 但目前 m<sup>6</sup>A 甲基化在胶质瘤中的研究依然十分有限, 亟需更多基础和临床研究来进一步阐明 m<sup>6</sup>A 甲基化修饰调控胶质瘤的分子机制。

结合现有的研究, 我们认为 m<sup>6</sup>A 甲基化修饰在胶质瘤中的研究还存在以下问题: (1) m<sup>6</sup>A 甲基化修饰是由众多调节因子共同参与的, 目前已经鉴别到的 m<sup>6</sup>A 修饰相关蛋白可能只是其中的一小部分, 未知的调节因子仍有待进一步挖掘和鉴定; (2) m<sup>6</sup>A 甲基化修饰在 mRNA 中最为丰富, 但同样存在于 miRNA、lncRNA 和 circRNA 中, 但目前 m<sup>6</sup>A 甲基化在上述非编码 RNA 中的研究十分匮乏, 深入研究非编码 RNA 中的 m<sup>6</sup>A 修饰将会更加全面地揭示 m<sup>6</sup>A 甲基化在胶质瘤中的作用; (3) RNA 在外泌体中非常丰富且作用众多, 胶质瘤外泌体中的 m<sup>6</sup>A 修饰可能是一个很有必要探讨和研究的问题; (4) m<sup>6</sup>A 甲基化是动态可逆的过程, 甲基转移酶和去甲基化酶如何协调作用是一个十分值得深究的问题; (5) m<sup>6</sup>A 识别蛋白如何选择性识别并结合靶 RNA, 识别 RNA 甲基化后如何发挥作用, 不同识别蛋白之间是相互竞争还是具有协同作用; (6) 目前胶质瘤中 m<sup>6</sup>A 甲基化的研究仍处于早期阶段, m<sup>6</sup>A 水平及其修饰蛋白的失调似乎起到抑癌和促癌的“双刃剑”作用, 合理解释有争议的研究结果仍具有很大挑战性; (7) 哪些 m<sup>6</sup>A 甲基化调节因子可以用作胶质瘤早癌筛查或肿瘤预后还有待进一步研究; (8) 目前已有部分 m<sup>6</sup>A 调节剂被批准用于白血病等疾病的临床治疗, 而在胶质瘤方面还鲜有报道, 未来有望开发特异性的 m<sup>6</sup>A 调节剂为胶质瘤治疗提供新的可能; (9) 目前 m<sup>6</sup>A 检测还面临着众多难题, 开发更简单可靠的检测技术显得尤为重要。

虽然 m<sup>6</sup>A 修饰与肿瘤的相关性作为生物医学领域的一个热点正在被广泛探索, 但大多数研究集中在基因测序分析、差异表达分析和修饰位点分析, 在细胞水平上对功能表型和作用机制的研究较少, 但后者却恰好可能是揭示肿瘤起源, 特别是恶性肿瘤起源和发展的关键。随着分子生物学技术的快速发展, 特别是单细胞测序和第三代测序, 关于 RNA 甲基化修饰如何影响胶质瘤生物学行为也将会获得更为清晰的解答。这为胶质瘤的早期诊断、组织学

分级和靶向治疗提供了新的思路, 也为其他肿瘤疾病的研究指明了新的方向。

### [参 考 文 献]

- [1] Louis DN, Perry A, Reifenberger G, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*, 2016, 131: 803-20
- [2] Kristensen BW, Priesterbach-Ackley LP, Petersen JK, et al. Molecular pathology of tumors of the central nervous system. *Ann Oncol*, 2019, 30: 1265-78
- [3] Chen XY, Zhang J, Zhu JS. The role of m<sup>6</sup>A RNA methylation in human cancer. *Mol Cancer*, 2019, 18: 103
- [4] Deng X, Su R, Weng H, et al. RNA N<sup>6</sup>-methyladenosine modification in cancers: current status and perspectives. *Cell Res*, 2018, 28: 507-17
- [5] Schmidt W, Arnold HH, Kersten H. Biosynthetic pathway of ribothymidine in *B. subtilis* and *M. lysodeikticus* involving different coenzymes for transfer RNA and ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res*, 1975, 2: 1043-51
- [6] Fu Y, Dominissini D, Rechavi G, et al. Gene expression regulation mediated through reversible m<sup>6</sup>A RNA methylation. *Nat Rev Genet*, 2014, 15: 293-306
- [7] 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
- [8] Ma S, Chen C, Ji X, et al. The interplay between m<sup>6</sup>A RNA methylation and noncoding RNA in cancer. *J Hematol Oncol*, 2019, 12: 121
- [9] Liu Q, Gregory RI. RNAmoD: an integrated system for the annotation of mRNA modifications. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47: W548-55
- [10] Liu N, Zhou KI, Parisien M, et al. N<sup>6</sup>-methyladenosine alters RNA structure to regulate binding of a low-complexity protein. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45: 6051-63
- [11] Huang H, Weng H, Zhou K, et al. Histone H3 trimethylation at lysine 36 guides m<sup>6</sup>A RNA modification co-transcriptionally. *Nature*, 2019, 567: 414-9
- [12] Wang X, Feng J, Xue Y, et al. Structural basis of N<sup>6</sup>-adenosine methylation by the METTL3-METTL14 complex. *Nature*, 2016, 534: 575-8
- [13] 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 m<sup>6</sup>A machinery component Wtap/Fl(2)d. *Genes Dev*, 2018, 32: 415-29
- [14] Pendleton KE, Chen B, Liu K, et al. The U6 snRNA m<sup>6</sup>A methyltransferase METTL16 regulates SAM synthetase intron retention. *Cell*, 2017, 169: 824-35, e814
- [15] Mauer J, Luo X, Blanjoie A, et al. Reversible methylation of m<sup>6</sup>A in the 5' cap controls mRNA stability. *Nature*, 2017, 541: 371-5
- [16] Wei J, Liu F, Lu Z, et al. Differential m<sup>6</sup>A, m<sup>6</sup>Am, and m<sup>1</sup>A demethylation mediated by FTO in the cell nucleus and cytoplasm. *Mol Cell*, 2018, 71: 973-85, e975
- [17] Wang J, Wang J, Gu Q, et al. The biological function of m<sup>6</sup>A demethylase ALKBH5 and its role in human disease. *Cancer Cell Int*, 2020, 20: 347
- [18] Chen Z, Qi M, Shen B, et al. Transfer RNA demethylase ALKBH3 promotes cancer progression via induction of tRNA-derived small RNAs. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47: 2533-45
- [19] Zhao YL, Liu YH, Wu RF, et al. Understanding m<sup>6</sup>A function through uncovering the diversity roles of YTH domain-containing proteins. *Mol Biotechnol*, 2019, 61: 355-64
- [20] Wang X, Zhao BS, Roundtree IA, et al. N<sup>6</sup>-methyladenosine modulates messenger RNA translation efficiency. *Cell*, 2015, 161: 1388-99
- [21] Du H, Zhao Y, He J, et al. YTHDF2 destabilizes m<sup>6</sup>A-containing RNA through direct recruitment of the CCR4-NOT deadenylase complex. *Nat Commun*, 2016, 7: 12626
- [22] Shi H, Wang X, Lu Z, et al. YTHDF3 facilitates translation and decay of N<sup>6</sup>-methyladenosine-modified RNA. *Cell Res*, 2017, 27: 315-28
- [23] Patil DP, Pickering BF, Jaffrey SR. Reading m<sup>6</sup>A in the transcriptome: m<sup>6</sup>A-binding proteins. *Trends Cell Biol*, 2018, 28: 113-27
- [24] Xiang Y, Laurent B, Hsu CH, et al. RNA m<sup>6</sup>A methylation regulates the ultraviolet-induced DNA damage response. *Nature*, 2017, 543: 573-6
- [25] Hsu PJ, Zhu Y, Ma H, et al. Ythdc2 is an N<sup>6</sup>-methyladenosine binding protein that regulates mammalian spermatogenesis. *Cell Res*, 2017, 27: 1115-27
- [26] Liu N, Dai Q, Zheng G, et al. N<sup>6</sup>-methyladenosine-dependent RNA structural switches regulate RNA-protein interactions. *Nature*, 2015, 518: 560-4
- [27] Alarcon CR, Goodarzi H, Lee H, et al. HNRNPA2B1 is a mediator of m<sup>6</sup>A-dependent nuclear RNA processing events. *Cell*, 2015, 162: 1299-308
- [28] Meyer KD, Patil DP, Zhou J, et al. 5' UTR m<sup>6</sup>A promotes cap-independent translation. *Cell*, 2015, 163: 999-1010
- [29] Huang H, Weng H, Sun W, et al. Recognition of RNA N<sup>6</sup>-methyladenosine by IGF2BP proteins enhances mRNA stability and translation. *Nat Cell Biol*, 2018, 20: 285-95
- [30] Liao S, Sun H, Xu C. YTH domain: a family of N<sup>6</sup>-methyladenosine m<sup>6</sup>A readers. *Genom Proteom Bioinf*, 2018, 16: 99-107
- [31] Wang J, Ma Y, Cooper MK. Cancer stem cells in glioma: challenges and opportunities. *Transl Cancer Res*, 2013, 2: 429-41
- [32] Visvanathan A, Patil V, Arora A, et al. Essential role of METTL3-mediated m<sup>6</sup>A modification in glioma stem-like cells maintenance and radioresistance. *Oncogene*, 2018, 37: 522-33
- [33] Li F, Yi Y, Miao Y, et al. N<sup>6</sup>-methyladenosine modulates nonsense-mediated mRNA decay in human glioblastoma. *Cancer Res*, 2019, 79: 5785-98
- [34] Visvanathan A, Patil V, Abdulla S, et al. N<sup>6</sup>-methyladenosine landscape of glioma stem-like cells: METTL3 is essential for the expression of actively transcribed genes and sustenance of the oncogenic signaling. *Genes (Basel)*, 2019, 10: 141

- [35] Chang YZ, Chai RC, Pang B, et al. METTL3 enhances the stability of MALAT1 with the assistance of HuR via m<sup>6</sup>A modification and activates NF- $\kappa$ B to promote the malignant progression of IDH-wildtype glioma. *Cancer Lett*, 2021, 511: 36-46
- [36] Shi J, Chen G, Dong X, et al. METTL3 promotes the resistance of glioma to temozolomide via increasing MGMT and ANPG in a m<sup>6</sup>A dependent manner. *Front Oncol*, 2021, 11: 702983
- [37] Li F, Chen S, Yu J, et al. Interplay of m<sup>6</sup>A and histone modifications contributes to temozolomide resistance in glioblastoma. *Clin Transl Med*, 2021, 11: e553
- [38] 冀建文. Mettl3抑制胶质瘤细胞增殖、迁移和侵袭的分子机制研究[D]. 上海: 中国人民解放军海军军医大学, 2020
- [39] Cui Q, Shi H, Ye P, et al. m<sup>6</sup>A RNA methylation regulates the self-renewal and tumorigenesis of glioblastoma stem cells. *Cell Rep*, 2017, 18: 2622-34
- [40] Han J, Du S, Wu C, et al. METTL3 participates in glioma development by regulating the methylation level of COL4A1. *J BUON*, 2021, 26: 1556-62
- [41] Xi Z, Xue Y, Zheng J, et al. WTAP expression predicts poor prognosis in malignant glioma patients. *J Mol Neurosci*, 2016, 60: 131-6
- [42] Jin DI, Lee SW, Han ME, et al. Expression and roles of Wilms' tumor 1-associating protein in glioblastoma. *Cancer Sci*, 2012, 103: 2102-09
- [43] Cai Z, Zhang J, Xiong J, et al. New insights into the potential mechanisms of spermatogenic failure in patients with idiopathic azoospermia. *Mol Hum Reprod*, 2020, 26: 469-84
- [44] Kowalski-Chauvel A, Lacore MG, Arnauduc F, et al. The m<sup>6</sup>A RNA demethylase ALKBH5 promotes radioresistance and invasion capability of glioma stem cells. *Cancers (Basel)*, 2020, 13: 40
- [45] Zhang S, Zhao BS, Zhou A, et al. m<sup>6</sup>A demethylase ALKBH5 maintains tumorigenicity of glioblastoma stem-like cells by sustaining FOXM1 expression and cell proliferation program. *Cancer Cell*, 2017, 31: 591-606,e596
- [46] Liu Z, Chen Y, Wang L, et al. ALKBH5 promotes the proliferation of glioma cells via enhancing the mRNA stability of G6PD. *Neurochem Res*, 2021, 46: 3003-11
- [47] Yu OM, Benitez JA, Plouffe SW, et al. YAP and MRTF-A, transcriptional co-activators of RhoA-mediated gene expression, are critical for glioblastoma tumorigenicity. *Oncogene*, 2018, 37: 5492-507
- [48] Liu B, Zhou J, Wang C, et al. LncRNA SOX2OT promotes temozolomide resistance by elevating SOX2 expression via ALKBH5-mediated epigenetic regulation in glioblastoma. *Cell Death Dis*, 2020, 11: 384
- [49] Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive, integrative genomic analysis of diffuse lower-grade gliomas. *N Engl J Med*, 2015, 372: 2481-98
- [50] Su R, Dong L, Li C, et al. R-2HG exhibits anti-tumor activity by targeting FTO/m<sup>6</sup>A/MYC/CEBPA signaling. *Cell*, 2018, 172: 90-105,e123
- [51] Tao B, Huang X, Shi J, et al. FTO interacts with FOXO3a to enhance its transcriptional activity and inhibits aggression in gliomas. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5: 130
- [52] Fang R, Chen X, Zhang S, et al. EGFR/SRC/ERK-stabilized YTHDF2 promotes cholesterol dysregulation and invasive growth of glioblastoma. *Nat Commun*, 2021, 12: 177
- [53] Chai RC, Chang YZ, Chang X, et al. YTHDF2 facilitates *UBXN1* mRNA decay by recognizing METTL3-mediated m<sup>6</sup>A modification to activate NF- $\kappa$ B and promote the malignant progression of glioma. *J Hematol Oncol*, 2021, 14: 109
- [54] Villa GR, Hulce JJ, Zanca C, et al. An LXR-cholesterol axis creates a metabolic co-dependency for brain cancers. *Cancer Cell*, 2016, 30: 683-93
- [55] Appay R, Tabouret E, Touat M, et al. Somatostatin receptor 2A protein expression characterizes anaplastic oligodendrogliomas with favorable outcome. *Acta Neuropathol Commun*, 2018, 6: 89
- [56] Iwashita Y, Fukuchi N, Waki M, et al. Genome-wide repression of NF- $\kappa$ B target genes by transcription factor MIBP1 and its modulation by O-linked  $\beta$ -N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) transferase. *J Biol Chem*, 2012, 287: 9887-900
- [57] Dixit D, Prager BC, Gimple RC, et al. The RNA m<sup>6</sup>A reader YTHDF2 maintains oncogene expression and is a targetable dependency in glioblastoma stem cells. *Cancer Discov*, 2021, 11: 480-99
- [58] 常颖. m<sup>6</sup>A结合蛋白YTHDF1在脑胶质瘤中的表达及作用研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2020
- [59] Yarmishyn AA, Yang YP, Lu KH, et al. Musashi-1 promotes cancer stem cell properties of glioblastoma cells via upregulation of YTHDF1. *Cancer Cell Int*, 2020, 20: 597
- [60] Luo YG, Sun RR, Zhang J, et al. miR-506 inhibits the proliferation and invasion by targeting IGF2BP1 in glioblastoma. *Am J Transl Res*, 2015, 7: 2007-14
- [61] Wang RJ, Li JW, Bao BH, et al. MicroRNA-873 (miRNA-873) inhibits glioblastoma tumorigenesis and metastasis by suppressing the expression of IGF2BP1. *J Biol Chem*, 2015, 290: 8938-48
- [62] Mu Q, Wang L, Yu F, et al. Imp2 regulates GBM progression by activating IGF2/PI3K/Akt pathway. *Cancer Biol Ther*, 2015, 16: 623-33
- [63] Janiszewska M, Suva ML, Riggi N, et al. Imp2 controls oxidative phosphorylation and is crucial for preserving glioblastoma cancer stem cells. *Genes Dev*, 2012, 26: 1926-44
- [64] Mineo M, Ricklefs F, Rooj AK, et al. The long non-coding RNA HIF1A-AS2 facilitates the maintenance of mesenchymal glioblastoma stem-like cells in hypoxic niches. *Cell Rep*, 2016, 15: 2500-9
- [65] Degrauwe N, Schlumpf TB, Janiszewska M, et al. The RNA binding protein IMP2 preserves glioblastoma stem cells by preventing let-7 target gene silencing. *Cell Rep*, 2016, 15: 1634-47

- [66] Li H, Wang D, Yi B, et al. SUMOylation of IGF2BP2 promotes vasculogenic mimicry of glioma via regulating OIP5-AS1/miR-495-3p axis. *Int J Biol Sci*, 2021, 17: 2912-30
- [67] Yang Y, Liu X, Cheng L, et al. Tumor suppressor microRNA-138 suppresses low-grade glioma development and metastasis via regulating IGF2BP2. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 2247-60
- [68] Liu X, Wu P, Su R, et al. IGF2BP2 stabilized FBXL19-AS1 regulates the blood-tumour barrier permeability by negatively regulating ZNF765 by STAU1-mediated mRNA decay. *RNA Biol*, 2020, 17: 1777-88
- [69] Suvasini R, Shruti B, Thota B, et al. Insulin growth factor-2 binding protein 3 (IGF2BP3) is a glioblastoma-specific marker that activates phosphatidylinositol 3-kinase/mitogen-activated protein kinase (PI3K/MAPK) pathways by modulating IGF-2. *J Biol Chem*, 2011, 286: 25882-90
- [70] Bhargava S, Patil V, Shah RA, et al. IGF2 mRNA binding protein 3 (IMP3) mediated regulation of transcriptome and translome in glioma cells. *Cancer Biol Ther*, 2018, 19: 42-52
- [71] Wu C, Ma H, Qi G, et al. Insulin-like growth factor II mRNA-binding protein 3 promotes cell proliferation, migration and invasion in human glioblastoma. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 3661-70
- [72] Bhargava S, Visvanathan A, Patil V, et al. IGF2 mRNA binding protein 3 (IMP3) promotes glioma cell migration by enhancing the translation of RELA/p65. *Oncotarget*, 2017, 8: 40469-85
- [73] Fang X, Yoon JG, Li L, et al. Landscape of the SOX2 protein-protein interactome. *Proteomics*, 2011, 11: 921-34
- [74] Golan-Gerstl R, Cohen M, Shilo A, et al. Splicing factor HNRNP A2/B1 regulates tumor suppressor gene splicing and is an oncogenic driver in glioblastoma. *Cancer Res*, 2011, 71: 4464-72
- [75] Deng J, Chen S, Wang F, et al. Effects of HNRNP A2/B1 knockdown on inhibition of glioblastoma cell invasion, growth and survival. *Mol Neurobiol*, 2016, 53: 1132-44
- [76] Park YM, Hwang SJ, Masuda K, et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C1/C2 controls the metastatic potential of glioblastoma by regulating PDCC4. *Mol Cell Biol*, 2012, 32: 4237-44
- [77] Ge L, Zhang N, Chen Z, et al. Level of N<sup>6</sup>-methyladenosine in peripheral blood RNA: a novel predictive biomarker for gastric cancer. *Clin Chem*, 2020, 66: 342-51
- [78] Konno M, Koseki J, Asai A, et al. Distinct methylation levels of mature microRNAs in gastrointestinal cancers. *Nat Commun*, 2019, 10: 3888
- [79] Huang W, Qi CB, Lv SW, et al. Determination of DNA and RNA methylation in circulating tumor cells by mass spectrometry. *Anal Chem*, 2016, 88: 1378-84
- [80] 裴雨晴, 崔巍. m<sup>6</sup>A RNA甲基化在肿瘤中的研究进展. *中华医学杂志*, 2020, 100: 556-60
- [81] Chen K, Lu Z, Wang X, et al. High-resolution N<sup>6</sup>-methyladenosine (m<sup>6</sup>A) map using photo-crosslinking-assisted m<sup>6</sup>A sequencing. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2015, 54: 1587-90
- [82] Chai RC, Wu F, Wang QX, et al. m<sup>6</sup>A RNA methylation regulators contribute to malignant progression and have clinical prognostic impact in gliomas. *Aging*, 2019, 11: 1204-25
- [83] Chang YZ, Chai RC, Pang B, et al. METTL3 enhances the stability of MALAT1 with the assistance of HuR via m<sup>6</sup>A modification and activates NF-κB to promote the malignant progression of IDH-wildtype glioma. *Cancer Lett*, 2021, 511: 36-46
- [84] Kleinschmidt-DeMasters BK, Donson AM, Vogel H, et al. Pilomyxoid astrocytoma (PMA) shows significant differences in gene expression vs. pilocytic astrocytoma (PA) and variable tendency toward maturation to PA. *Brain Pathol*, 2015, 25: 429-40
- [85] Xiao L, Li X, Mu Z, et al. FTO inhibition enhances the antitumor effect of temozolomide by targeting MYC-miR-155/23a cluster-MXI1 feedback circuit in glioma. *Cancer Res*, 2020, 80: 3945-58
- [86] Cui Y, Wang Q, Lin J, et al. miRNA-193a-3p regulates the AKT2 pathway to inhibit the growth and promote the apoptosis of glioma cells by targeting ALKBH5. *Front Oncol*, 2021, 11: 600451
- [87] Malacrida A, Rivara M, Di Domizio A, et al. 3D proteome-wide scale screening and activity evaluation of a new ALKBH5 inhibitor in U87 glioblastoma cell line. *Bioorg Med Chem*, 2020, 28: 115300
- [88] Marcelino H, Nogueira VC, Santos CRA, et al. Adenosine inhibits human astrocyte proliferation independently of adenosine receptor activation. *J Neurochem*, 2020, 153: 455-67
- [89] Yankova E, Blackaby W, Albertella M et al. Small-molecule inhibition of METTL3 as a strategy against myeloid leukaemia. *Nature*, 2021, 593: 597-601
- [90] Ding C, Yi X, Chen X, et al. Warburg effect-promoted exosomal circ\_0072083 releasing up-regulates NANGO expression through multiple pathways and enhances temozolomide resistance in glioma. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, 40: 164
- [91] Wang X, Li X, Zhou Y, et al. Long non-coding RNA OIP5-AS1 inhibition upregulates microRNA-129-5p to repress resistance to temozolomide in glioblastoma cells via downregulating IGF2BP2. *Cell Biol Toxicol*, 2021 [Online ahead of print]
- [92] Guan S, He Y, Su Y, Zhou L. A risk signature consisting of eight m<sup>6</sup>A methylation regulators predicts the prognosis of glioma. *Cell Mol Neurobiol*, 2021, [Online ahead of print]
- [93] He J, Yuan L, Lin H, et al. Genetic variants in m<sup>6</sup>A modification core genes are associated with glioma risk in Chinese children. *Mol Ther Oncolytics*, 2021, 20: 199-208