

DOI: 10.13376/j.cbils/2023128

文章编号: 1004-0374(2023)09-1169-08

## m<sup>6</sup>A修饰对神经干细胞分化的影响

杨明思<sup>1,2</sup>, 陈海龙<sup>3</sup>, 冀国华<sup>3</sup>, 宋波<sup>1\*</sup>, 曲丽娜<sup>3\*</sup>

(1 大连医科大学病理学与法医学教研室, 大连 116041; 2 白城医学高等专科学校病理学教研室, 白城 137000; 3 中国航天员科研训练中心航天医学基础与应用国家重点实验室, 北京 100094)

**摘要:** 神经干细胞是中枢神经系统中具有自我更新能力并且能够分化产生成熟脑细胞的多潜能细胞, 移植神经干细胞治疗神经退行性疾病是一项新兴趋势, 已被证实可恢复疾病动物的神经功能。*N*<sup>6</sup>-甲基腺苷 (*N*<sup>6</sup>-methyladenosine, m<sup>6</sup>A) 发生在 RNA 分子腺苷酸第六位氮原子上, m<sup>6</sup>A 甲基转移酶 (Writers) 和去甲基化酶 (Erasers) 能够可逆性调控 RNA 分子的 m<sup>6</sup>A 甲基化水平, 而 m<sup>6</sup>A 甲基化结合蛋白 (Readers) 则可以识别 RNA 上的 m<sup>6</sup>A 修饰, 影响 RNA 的降解、稳定性和翻译等生物学过程。研究表明, m<sup>6</sup>A 修饰在神经系统中含量丰富, 并且随着年龄的增长、疾病的进展, 其水平发生改变。m<sup>6</sup>A 相关酶表达的差异可引起 m<sup>6</sup>A 修饰水平的改变。一些神经相关因子受到 m<sup>6</sup>A 修饰的调控, 在不改变碱基序列的条件下影响着神经干细胞的分化和神经系统功能的发挥。现将 m<sup>6</sup>A 修饰对神经干细胞分化的调控作一综述, 并进一步展望 m<sup>6</sup>A 修饰对神经系统发育及神经退行性疾病治疗的影响。

**关键词:** 神经干细胞; 分化; m<sup>6</sup>A 修饰; 甲基转移酶; 去甲基化酶; 甲基化结合蛋白

**中图分类号:** Q189; R74 **文献标志码:** A

## The effects of m<sup>6</sup>A modification on differentiation of neural stem cells

YANG Ming-Si<sup>1,2</sup>, CHEN Hai-Long<sup>3</sup>, JI Guo-Hua<sup>3</sup>, SONG Bo<sup>1\*</sup>, QU Li-Na<sup>3\*</sup>

(1 Department of Pathology and Forensic, Dalian Medical University, Dalian 116041, China; 2 Department of Pathology, Baicheng Medical College, Baicheng 137000, China; 3 State Key Laboratory of Space Medicine Fundamentals and Application, China Astronaut Research and Training Center, Beijing 100094, China)

**Abstract:** Neural stem cells are pluripotent cells in the central nervous system that have the ability of self-renewal and can differentiate into mature brain cells. Transplantation of neural stem cells for the treatment of neurodegenerative diseases is a new trend, which has been proved to restore the neural function of diseased animals. *N*<sup>6</sup>-methyladenosine (m<sup>6</sup>A) occurs at the sixth nitrogen atom of adenylyl in RNA molecule. m<sup>6</sup>A methyltransferases (Writers) and demethylases (Erasers) can reversibly regulate the level of m<sup>6</sup>A methylation of RNA molecules, while m<sup>6</sup>A methylation binding proteins (Readers) can recognize the modification of m<sup>6</sup>A on RNA and affect biological processes such as RNA degradation, stability and translation. Studies have shown that m<sup>6</sup>A modification is abundant in the nervous system, and its level changes with the growth of age and the progress of disease. The difference in the expression of m<sup>6</sup>A related enzymes caused the change of m<sup>6</sup>A modification level. Some nerve related factors are regulated by m<sup>6</sup>A modification, which affects the differentiation of neural stem cells and the function of nervous system without changing the base sequence. This article reviews the regulation of m<sup>6</sup>A modification on the differentiation of neural stem cells, and further prospects the impact of m<sup>6</sup>A modification on the development of nervous system and the treatment of neurodegenerative diseases.

**Key words:** neural stem cell; differentiation; *N*<sup>6</sup>-methyladenosine; methyltransferase; demethylase; methylation binding protein

收稿日期: 2023-04-10; 修回日期: 2023-06-13

基金项目: 航天医学基础与应用国家重点实验室研究基金资助自主研究项目(SMFA20A01)

\*通信作者: E-mail: bosong@dmu.edu.cn (宋波); linaqu@263.net (曲丽娜)

在中心法则中, RNA 分子是遗传信息传递的桥梁, RNA 修饰使 RNA 的功能更具多样性。迄今为止, MODOMICS 数据库已经收录了多种 RNA 分子上存在的 163 种修饰方式, 包括 tRNA、rRNA 和 mRNA, 以及各种类型的非编码 RNA。其中, m<sup>6</sup>A 修饰是真核生物 mRNA 上最常见的修饰方式<sup>[1]</sup>。m<sup>6</sup>A 修饰分布广泛, 在脑、肝、心脏、肌肉等组织中均有分布, 尤其在脑组织中含量丰富<sup>[2]</sup>。许多与精神障碍(如精神分裂症和自闭症谱系障碍)遗传相关的风险基因在人类的 RNA 中存在 m<sup>6</sup>A 标记, 而在小鼠中则不存在, 也就是说表观转录失调导致人类大脑产生疾病的可能性更高<sup>[3]</sup>。m<sup>6</sup>A 修饰水平的失调与神经分化、神经发育密切相关, 本文通过对 m<sup>6</sup>A 修饰及其相关酶的基本概念、作用机制以及其对神经系统发育及对分化方面的影响进行了阐述, 以期从 m<sup>6</sup>A 修饰的角度深入探究神经干细胞分化的调控机制, 为神经退行性疾病的治疗提供一些见解。

## 1 m<sup>6</sup>A 修饰

m<sup>6</sup>A 修饰位于共同基序 RRACH (其中 R 为 A/G, H 为 A/C/U) 上, 在终止密码子和 3' 非翻译区(3'UTR) 附近富集<sup>[4]</sup>。1955 年, m<sup>6</sup>A 修饰最先在细菌 DNA 中被发现, 随后也在酵母、病毒及哺乳动物体内检测到<sup>[5]</sup>。1974 年, 在 Novikoff 肝癌细胞中, 首次检测到了 mRNA 上的 m<sup>6</sup>A 修饰<sup>[6]</sup>。近年来,

随着 m<sup>6</sup>A 甲基转移酶、去甲基化酶逐步被发现, 对于 RNA m<sup>6</sup>A 修饰的研究渐渐兴起。不仅在 mRNA 中, miRNA、lncRNA、circRNA 等小分子 RNA 中也发现了 m<sup>6</sup>A 修饰的存在。RNA 分子上存在的 m<sup>6</sup>A 修饰, 受到 m<sup>6</sup>A 甲基转移酶和去甲基化酶两类分子的可逆调控, 而被甲基化结合蛋白识别后, 可能调控 RNA 的剪切、核转运、稳定性、翻译等生物学过程<sup>[7]</sup>(图 1)。

## 2 m<sup>6</sup>A 甲基转移酶对神经干细胞分化的影响

### 2.1 m<sup>6</sup>A 甲基转移酶

m<sup>6</sup>A 甲基转移酶是一个复合物, 主要包括甲基化转移酶样蛋白 3 (methyltransferase-like 3, METTL3)、METTL14、肾母细胞瘤 1- 结合蛋白 (Wilms' tumor 1-associating protein, WTAP) 等, 催化 m<sup>6</sup>A 修饰的形成。Bokar 等<sup>[8]</sup>于 1994 年首次将其纯化为蛋白质复合物, 并逐步明确了其主要组成成分。一个 METTL3 分子和一个 METTL14 分子形成了一个不对称的反平行异源二聚体, 两者都属于 I 类 MTase 家族成员, 并作为 m<sup>6</sup>A 甲基转移酶的核心成分, 协同催化 m<sup>6</sup>A 的形成, 而单独成分的活性较低。在异源二聚体中, METTL3 是以 S-腺苷甲硫氨酸 (S-adenosylmethionine, SAM) 为甲基供体的催化亚基; 而 METTL14 是 RNA 底物, 是识别和维持适当的 METTL3 构象所必需的<sup>[9]</sup>。其他复合物成分, 包括 WTAP、KIAA1429 (也称 Virilizer)、ZC3H13、

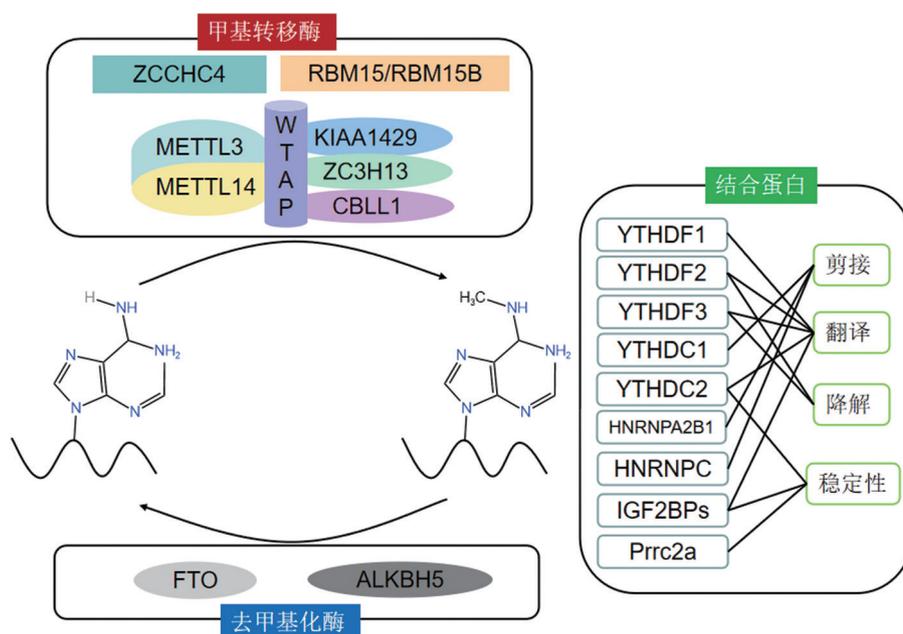


图1 m<sup>6</sup>A 修饰相关酶对 RNA 上 m<sup>6</sup>A 修饰的调控

CBL1 (也称 Hakai)、ZCCHC4、RBM15 和 RBM15B 等蛋白也相继被报道与甲基转移酶复合物有相互联系。WTAP 作为甲基转移酶复合物的另一个亚基, 与 METTL3 直接相互作用, 并介导 METTL3-METTL14-WTAP 复合物的核斑点定位, 从而允许目标腺苷残基发生甲基化<sup>[10]</sup>。研究表明, 超过一百种蛋白质可能与 METTL3 或 METTL14 结合, 核心复合物之外的蛋白质同样有助于 RNA 的甲基化形成。ZC3H13 的敲除使 WTAP、Virilizer 和 Hakai 转移到胞质, 可能由于 ZC3H13 自身含有将蛋白质靶向亚细胞“细胞器”的 LC 区域, 可将 ZC3H13-WTAP-Virilizer-Hakai 复合物保留在核斑点, 从而调节 m<sup>6</sup>A 修饰<sup>[11]</sup>。WTAP 存在于两种不同的复合物中, 可能是 METTL3-METTL14-WTAP 复合物和 ZC3H13-WTAP-Virilizer-Hakai 复合物的桥接分子, 从而将酶募集到核斑点, 调节甲基化。ZCCHC4 主要调节人的 28S rRNA 以及部分 mRNA 甲基化<sup>[12]</sup>。RBM15 和 RBM15B 也可以招募甲基化复合物到 RNA 特定位点, 它们的结合序列富含 U 基序<sup>[13]</sup>。这些结果提示 m<sup>6</sup>A 甲基转移酶种类较多, 可能还有其他的甲基转移酶调控着 m<sup>6</sup>A 修饰的变化, 有待发掘。其中, METTL3 的抑制剂 STM2457 已经被报道可以参与急性髓系白血病 (AML) 的调控<sup>[14]</sup>, 但在神经分化异常相关疾病中尚未见应用。m<sup>6</sup>A 调节剂的发现和挖掘为疾病治疗提供了潜在的策略。

## 2.2 m<sup>6</sup>A 甲基转移酶与神经干细胞分化

m<sup>6</sup>A 修饰在哺乳动物大脑组织含量丰富, 在神经系统神经发生和发育中也发挥着重要的调控作用。为了了解 m<sup>6</sup>A 在早期神经发生中的潜在功能, Wang 等<sup>[15]</sup> 条件性敲除 (cKO) 了小鼠胚胎神经干细胞中的 METTL14, 发现整体的 m<sup>6</sup>A 修饰水平降低。对胚胎期第 14.5 天的小鼠的研究发现, 敲除 METTL14 的小鼠皮层厚度更薄, 从皮层提取出来的神经干细胞数量更少, 神经干细胞体外培养形成的神经球的尺寸更小; 神经干细胞增殖能力明显减弱, 神经元细胞 (Tuj1) 增多, 存在提前分化的现象。从机制看, METTL14 的缺失使得全转录组组蛋白修饰发生改变, 调节了组蛋白乙酰转移酶 CBP 和 P300 mRNA 的稳定性。Yoon 等<sup>[3]</sup> 同样构建了神经干细胞特异性敲除 METTL14 的小鼠, 发现小鼠出生后 5 天, 皮质中仍有大量放射状胶质细胞 (Pax6) 及中间祖细胞 (Tbr2) 存在, 但 Stab2 上层神经元和星形胶质细胞 (S100 $\beta$ ) 明显减少, 皮层神经元亚型的产生出现延迟; 总体 m<sup>6</sup>A 水平下降, 许多与神经

干细胞维持和神经发生相关的存在 m<sup>6</sup>A 修饰的分子, 如 Pax6、Sox2、Tbr2、Neurog2、Neurod1 和 Neurod2 等, 其 mRNA 衰变减少。除此之外, 一些与细胞周期相关的转录本上的 m<sup>6</sup>A 修饰也出现了丢失, 如 Cdk9、Cch/Cyclin H 和 Cdkn1C/p57, 使得 METTL14 cKO 小鼠的细胞周期延长, S-G<sub>2</sub>-M 期特异性增长。不仅是小鼠脑组织, METTL14 敲除的前类脑器官 (一种由人类诱导性多能干细胞衍生的器官模型) 的神经干细胞同样显示出细胞周期延迟。另一方面, 将甲基转移酶的另一个成分 METTL3 敲低后, m<sup>6</sup>A 水平降低, 神经干细胞的百分比降低, 与 METTL14 cKO 小鼠表现一致。也有研究发现, 利用慢病毒系统在小脑中敲低 METTL3 后, 浦肯野细胞数量和片层结构以及树突发育不良, 胶质细胞纤维出现严重紊乱<sup>[16]</sup>。

m<sup>6</sup>A 甲基转移酶调控成体神经干细胞 (aNSCs) 的研究也有报道。李学坤教授实验室发现, aNSCs 中 METTL3 基因缺失使得神经干细胞谱系中胶质细胞增多, 并抑制体外和体内的新生神经元形态成熟<sup>[17]</sup>。Xu 等<sup>[18]</sup> 发现缺失 METTL3 或 METTL14 的成体神经干细胞, 神经元的发生显著减少, 而向着胶质细胞的分化增强。在非洲爪蟾中敲低 METTL3 后, 伴随着神经嵴和神经细胞的缺失, 神经管和尾芽胚胎出现前向化<sup>[19]</sup>。甲基转移酶与神经干细胞分化之间的调控关系见表 1。

## 3 m<sup>6</sup>A 去甲基化酶对神经干细胞分化的影响

### 3.1 m<sup>6</sup>A 去甲基化酶

擦除 m<sup>6</sup>A 修饰的去甲基化酶包括脂肪量与肥胖相关蛋白 (fat mass and obesity-related protein, FTO) 和 AlkB 同源蛋白 5 (AlkB homolog 5, ALKBH5), 可催化已发生 m<sup>6</sup>A 修饰的碱基去甲基化, 两者均属于  $\alpha$ -KG 依赖型双加氧酶 AlkB 家族。m<sup>6</sup>A 去甲基化酶的发现为 RNA 上 m<sup>6</sup>A 修饰的可逆性提供了有力证据。2011 年, 第一种 RNA 去甲基化酶 FTO 被发现。FTO 在体外条件下可以氧化去除 mRNA 中的 m<sup>6</sup>A 修饰, 并且 FTO 部分定位于核斑点<sup>[20]</sup>。然而在 FTO 敲除小鼠中, 总体的 m<sup>6</sup>A 水平受影响较小, 似乎只是涉及 m<sup>6</sup>A 靶标 mRNA 的一个子集<sup>[21]</sup>。2018 年, 何川教授实验室对 FTO 进行了新的解读, 他们发现在大多数细胞中, 位于细胞核内的 FTO 催化 m<sup>6</sup>A 的去甲基化, 而细胞质中的 FTO 可介导 m<sup>6</sup>A 和 m<sup>6</sup>Am 的去甲基化<sup>[22]</sup>。FTO 还可以去除 tRNA 上的 m<sup>1</sup>A 甲基化。另一种 m<sup>6</sup>A 去甲基化酶 ALKBH5

表1 m<sup>6</sup>A修饰相关酶对神经干细胞分化的调控

类型	m <sup>6</sup> A修饰相关酶	动物/细胞模型	m <sup>6</sup> A修饰的mRNA靶标	对神经分化的影响	文献
甲基转移酶	METTLL14	小鼠神经干细胞特异性敲除	METTLL14	神经干细胞增殖能力明显减弱, 神经元细胞增多	[15]
		小鼠神经干细胞特异性敲除	METTLL14	神经发生延迟到出生后, 细胞周期延长	[3]
	METTLL3	小鼠敲低	Neurod1、Neurod2	皮层NPCs细胞周期进程延长, 并导致RGCs分化减少	
		小鼠小脑慢病毒敲低	METTLL3	浦肯野细胞数量和片层结构以及树突发育不良, 胶质细胞纤维严重紊乱	[16]
		成体神经干细胞敲低	METTLL3	aNSCs的增殖和细胞周期进程被抑制, 倾向分化为胶质细胞, 新生神经元的形态成熟被抑制	[17]
		非洲爪蟾敲低	METTLL3	神经嵴和神经细胞减少, 神经管和尾芽胚胎出现前向化	[19]
去甲基化酶	METTLL3/METTLL14	成体神经干细胞敲低	METTLL3/METTLL14	神经元发生减少, 胶质细胞分化增多	[18]
	FTO	小鼠敲除	Lrp2 脑源性神经营养因子BDNF	脑组织变小, 神经元分化减少, 学习记忆能力障碍	[29]
		小鼠神经干细胞特异性敲除	FTO	短期促进神经干细胞增殖和神经元分化, 长期效果抑制神经元发生和发育	[30]
	ALKBH5	小鼠基因敲除	ALKBH5	成熟神经元的数量明显减少, 浦肯野细胞的树突分枝减少, 胶质细胞中放射状纤维的解体增加	[16]
甲基化结合蛋白	YTHDF2	小鼠基因敲除	YTHDF2	神经干细胞增殖率下降, 神经元分化受损, 轴突长度和复杂度明显下降, 对氧化应激敏感性增加	[47]
	Prrc2a	小鼠神经干细胞特异性敲除	Prrc2a	少突胶质细胞前体细胞的自我增殖受到抑制, 促进少突胶质细胞的分化	[46]

也是何川课题组发现的<sup>[23]</sup>, 它可以在体外和体内催化去除核 RNA (主要是 mRNA) 上的 m<sup>6</sup>A 修饰。FTO 对 m<sup>6</sup>A 和 m<sup>6</sup>Am 有去甲基化酶的催化作用, 而 ALKBH5 仅对 m<sup>6</sup>A 产生影响。

除此之外, 在靶向 m<sup>6</sup>A 的调节剂中, FTO 抑制剂是第一个被报道的, 如甲氧苯那酸 (MA)<sup>[24]</sup>、天然产物大黄酸<sup>[25]</sup>、荧光素衍生物<sup>[26]</sup>。而抑制剂 FB23、FB23-2、CS1 和 CS2 已在白血病治疗中有所报道<sup>[27]</sup>。2021 年, ALKBH5 抑制剂也首次被报道, 即化合物 2-[(1-羟基-2-氧代-2-苯乙基)] 乙酸和化合物 4-[(咪喃-2-基) 甲基] 氨基-1,2-二噁烷-3,6-二酮<sup>[28]</sup> 在低浓度时抑制白血病细胞增殖。上述研究表明, 这些抑制剂在白血病治疗中有广阔的应用前景, 但在神经系统疾病中的应用仍有待挖掘。

### 3.2 m<sup>6</sup>A 去甲基化酶与神经干细胞分化

去甲基化酶 FTO 在成熟神经元中呈现高表达的状态, 李学坤实验室通过构建 *FTO* 基因敲除小鼠, 发现与野生型小鼠相比, *FTO* 丢失导致小鼠体重减轻, 脑整体变小, 各脑分区包括嗅球、脑室下区、海马、小脑等结构均变小<sup>[29]</sup>。成年小鼠的海马齿状回和侧脑室下区的神经干细胞数量明显减少, 并且神经干细胞向未成熟神经元、成熟神经元的分化均减少, 树突长度显著变短, 损害了小鼠的学习记忆能力。*FTO* 基因敲除后, 小鼠海马组织中的 m<sup>6</sup>A 水平上调。RNA-seq 与 MeRIP-seq 分析发现, 被 m<sup>6</sup>A 修饰的差异基因高度富集在与细胞增殖、迁移和神经元发育等相关的通路中。FTO 可能通过 BDNF 调节 PI3K-Akt 途径调控神经发生。为了研究 FTO 对神经干细胞的特异性影响, 李学坤教授实验室继而构建了神经干细胞上特异性敲除 *FTO* 的小鼠, 发现敲除 *FTO* 短期内会增强神经干细胞的增殖能力和分化为神经元的能力, 但是从长期来看, 神经干细胞特异性缺失 *FTO* 会使神经元数量及其树突的长度和交叉点的数量都明显减少, 抑制神经元的发生和发育<sup>[30]</sup>。机制研究显示, 敲除 *FTO* 会上调 Stat3 通路中的关键因子 *Pdgfra* 和 *Socs5* mRNA 上的 m<sup>6</sup>A 修饰水平, 影响两者的表达水平, 协同推动 Stat3 磷酸化, 从而调控神经干细胞的增殖和神经元的分化。另外, 在丰富的环境中, 可能由于 FTO 水平的降低, 增加整体的 m<sup>6</sup>A 水平, 进而差异表达的 m<sup>6</sup>A 修饰基因增强了成年神经干细胞的神经分化<sup>[31]</sup>。对于 ALKBH5 的研究发现, 在缺氧条件下, *ALKBH5* 基因敲除小鼠的整个大脑和小脑显

著减小, 处于增殖状态和有丝分裂状态的细胞数量显著增多, 小脑中成熟神经元的数量明显减少, 浦肯野细胞的树突分枝受损, 并伴随着胶质细胞中放射状纤维的解体增多, m<sup>6</sup>A 修饰水平失衡。其中涉及不同途径中的 RNA 核输出紊乱, 如细胞分裂相关基因 *Mphosph9*、膜电位基因 *Opa1* 和微管细胞骨架组织基因 *Wdpcp* 等, 其在细胞质中的丰度增加; 控制细胞周期的基因 *Ddx11*、*Ccnb1* 和 *Cbx1* 的 mRNA 水平及甲基化水平均下降; 与运输或代谢相关的基因, 如 *Cacna2d3*、*Notch3* 和 *Jam3* 的 mRNA 水平下降, 而 *Slc6a20a*、*Dlk1*、*Slc2a4* 和 *Ascl2* 的 mRNA 水平增加<sup>[16]</sup>。去甲基化酶与神经干细胞分化之间的调控关系见表 1。

## 4 m<sup>6</sup>A 甲基化结合蛋白对神经干细胞分化的影响

### 4.1 m<sup>6</sup>A 甲基化结合蛋白

RNA 上存在的 m<sup>6</sup>A 修饰被相应的结合蛋白识别, 产生生物学效应。m<sup>6</sup>A 甲基化结合蛋白主要包括 YTHDF1、YTHDF2、YTHDF3、YTHDC1、YTHDC2、核不均一核糖核蛋白 HNRNP 家族 (包括 HNRNPA2B1、HNRNPC)、胰岛素样生长因子 2 结合蛋白家族 (IGF2BP1、IGF2BP2、IGF2BP3) 等。它们主要识别 RNA 上的 m<sup>6</sup>A 位点, 进而调控 RNA 的稳定性、翻译和剪切等功能。在 2012 年, YTHDF2 和 YTHDF3 最早被发现与 m<sup>6</sup>A 结合, 这两种蛋白以其特别的 YTH 结构域命名<sup>[32]</sup>。随后哺乳动物中含有的其他三种 YTH 结构域蛋白, 包括 YTHDC1、YTHDC2、YTHDF1, 也被证明具有识别 RNA 上 m<sup>6</sup>A 修饰的能力。YTHDF1、YTHDF2 和 YTHDF3 位于细胞质中, YTHDC1 和 YTHDC2 则位于细胞核中, 它们都通过高度保守的 YTH 结构域结合单链 mRNA, 决定 RNA 的不同命运<sup>[33]</sup>。YTHDF1 参与识别蛋白质翻译起始因子 EIF3 的亚单位 EIF3C 的 mRNA 上的 m<sup>6</sup>A 位点, 以 m<sup>6</sup>A 依赖的方式增强 EIF3C 蛋白翻译<sup>[34]</sup>。YTHDF2 通过招募 CCR4 分子, 介导 m<sup>6</sup>A 修饰的 mRNA 的降解<sup>[35]</sup>, 也参与 m<sup>6</sup>A 依赖的蛋白质翻译过程<sup>[36]</sup>。YTHDF3 协同 YTHDF1 影响含有 m<sup>6</sup>A 的 mRNA 的翻译, 并通过 YTHDF2 影响 RNA 降解<sup>[37]</sup>。这些报道表明 YTHDF1~3 对细胞质中 mRNA 的代谢调控起着重要作用, 三种蛋白通过不同的合作方式影响着 RNA 的生物学行为。YTHDC1 通过招募和调节 pre-mRNA 剪接因子来调节 mRNA

剪接,使其进入靶向 mRNA 的结合区域<sup>[38]</sup>。YTHDC2 能够提高靶基因的翻译效率<sup>[39]</sup>,也能够破坏 mRNA 的稳定性<sup>[40]</sup>。也有报道发现 YTHDC2 能够识别 mRNA 中 5'UTR 区域的 m<sup>6</sup>A 位点,在不影响 mRNA 水平的情况下提高翻译效率<sup>[41]</sup>。

HNRNPA2B1 与含有 m<sup>6</sup>A 修饰的 miRNA 前体结合,促进 miRNA 前体的选择性剪接,影响其加工<sup>[42]</sup>,也可增强 mRNA 转录本的稳定性<sup>[43]</sup>。m<sup>6</sup>A 改变 RNA 的局部结构,影响 HNRNPC 与 RNA 的结合,进而调节靶 mRNA 的剪接及 mRNA 的丰度<sup>[44]</sup>。IGF2BPs 识别 m<sup>6</sup>A 修饰的 RNA,影响其稳定性和翻译效率<sup>[45]</sup>。Prcc2a 是一种新兴的 m<sup>6</sup>A 甲基化结合蛋白,存在着识别 m<sup>6</sup>A 修饰的 GRE 结构域,并调节 RNA 的稳定性<sup>[46]</sup>。

#### 4.2 m<sup>6</sup>A 甲基化结合蛋白与神经干细胞分化

m<sup>6</sup>A 甲基化结合蛋白同样影响着神经干细胞分化。Klungland 实验室构建了 *YTHDF2* 基因敲除的小鼠,发现小鼠胚胎的前期皮质发育存在异常,皮质层厚度明显变薄,顶端祖细胞有丝分裂能力受损,导致基底祖细胞数量明显减少;神经干细胞增殖能力减弱,神经元分化受损,轴突长度变短、复杂度明显下降,并且神经干细胞分化出的神经元对诱导氧化应激的亚硝酸盐更敏感;神经元分化相关基因如 JAK-STAT 通路的抑制性基因 (*Flrt2* 和 *PtPrd*) mRNA 上的 m<sup>6</sup>A 修饰水平降低,使得基因降解的过程出现延迟<sup>[47]</sup>。另一项研究发现,小鼠小脑发育期 HNRNPA2B1 的 RNA 及总体蛋白水平高于成年小鼠小脑,并在含有增殖细胞的外颗粒层低表达,而在浦肯野细胞与分子层细胞中高表达,具体的调控机制还需进一步探究<sup>[48]</sup>。Wu 等<sup>[46]</sup>研究 Nestin-Cre 介导的 *Prcc2a* 条件性敲除小鼠发现,小鼠脑中 *Prcc2a* 的特异性丢失导致小鼠发育延迟、体重下降、脑质量增加、侧脑室扩大和大脑结构异常。虽然小鼠脑中的神经元数量没有显著变化,但不同脑区的有髓轴突百分比和髓鞘厚度显著减少。*Prcc2a* 调控神经干细胞分化为少突前体细胞的命运决定,抑制少突胶质细胞前体细胞的自我增殖,促进少突胶质细胞的分化。甲基化结合蛋白与神经干细胞分化之间的调控关系见表 1。

### 5 总结和展望

m<sup>6</sup>A 在 RNA 修饰中丰度最高,研究兴起。METTL3-METTL14-WTAP 是甲基转移酶复合物的核心成分,越来越多的甲基转移酶已被发现,相信

也有其他的甲基转移酶正待发掘。FTO 在细胞核中介导 mRNA 去甲基化,在细胞质中对 m<sup>6</sup>A 和 m<sup>6</sup>Am 都有调控,但哪些因素会影响 FTO 的定位进而影响 m<sup>6</sup>A 和 m<sup>6</sup>Am 修饰尚不明确。甲基化结合蛋白种类繁多,不同的蛋白质可能发挥同样的功能,同样的蛋白质可能发挥不同的功能,同样的功能也可以通过不同的蛋白质协同发挥作用。不同的结合蛋白亲和什么序列的 RNA,发挥怎样的功能,是否能提供一些规律性的信息呢?

随着 m<sup>6</sup>A 高通量检测技术 MeRIP-seq 的推出,m<sup>6</sup>A 修饰研究的发展取得了巨大进步。m<sup>6</sup>A 修饰在组织器官的发育、干细胞的更新和分化、神经退行性疾病、癌症的发生发展中都有重要的调控作用。m<sup>6</sup>A 修饰在大脑中广泛分布,紧密调控基因表达的表观转录组机制,在神经表观遗传学领域中已经获得了广泛认可。m<sup>6</sup>A 修饰相关酶的缺失,导致一些转录本的 m<sup>6</sup>A 修饰水平和 mRNA 水平变化,使得神经分化失调。这些研究已经取得了一些可观的成果,拓宽了人们对 m<sup>6</sup>A 修饰的认识,也丰富了神经系统功能的调节机制。m<sup>6</sup>A 修饰可以调控神经干细胞分化,也影响着神经分化因子的表达。而 m<sup>6</sup>A 通过哪条神经分化通路诱导神经干细胞分化,分化方向是向着神经元还是星形胶质细胞亦或是少突胶质细胞还不十分清楚。m<sup>6</sup>A 在神经细胞命运决定和可塑性中起着重要作用,并且有迹象表明异常甲基化与大脑疾病有关。神经退行性疾病存在着神经元结构的损伤和功能的缺失,那么通过调控 m<sup>6</sup>A 修饰促进神经干细胞分化为神经元,便可能为神经退行性疾病的治疗提供一些有效的帮助,但这仍需要进一步探究。基因表达调控是一个连锁反应,深入研究 m<sup>6</sup>A 修饰在大脑的不同区域和神经细胞的不同分化阶段、神经发育及神经退行性疾病中对基因表达的调控机制,阐明 m<sup>6</sup>A 修饰与神经干细胞分化的关系,不但能在生理水平上描绘出神经干细胞分化的途径,也能在病理水平揭示治疗神经退行性疾病的潜在靶点<sup>[49-50]</sup>。目前已有许多 m<sup>6</sup>A 修饰的抑制剂和激活剂已被报道,随着技术水平的发展,更具有有效性和安全性的 m<sup>6</sup>A 药物的开发不仅能够推动神经退行性疾病的研究,更可为临床上其他疾病的精准治疗奠定基础。但同时也应该认识到,只有对 m<sup>6</sup>A 的作用机制有透彻、完整的了解,才能为药物研发和疾病治疗提供可靠的理论依据。

#### [参 考 文 献]

- [1] Boccaletto P, Stefaniak F, Ray A, et al. MODOMICS: a

- database of RNA modification pathways. 2021 update. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50: D231-5
- [2] Xiong X, Hou L, Park YP, et al. Genetic drivers of m<sup>6</sup>A methylation in human brain, lung, heart and muscle. *Nat Genet*, 2021, 53: 1156-65
- [3] Yoon KJ, Ringeling FR, Vissers C, et al. Temporal control of mammalian cortical neurogenesis by m<sup>6</sup>A methylation. *Cell*, 2017, 171: 877-89.e17
- [4] Wang S, Lv W, Li T, et al. Dynamic regulation and functions of mRNA m<sup>6</sup>A modification. *Cancer Cell Int*, 2022, 22: 48
- [5] Dunn DB, Smith JD. Occurrence of a new base in the deoxyribonucleic acid of a strain of *Bacterium coli*. *Nature*, 1955, 175: 336-7
- [6] Desrosiers R, Friderici K, Rottman F. Identification of methylated nucleosides in messenger RNA from Novikoff hepatoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1974, 71: 3971-5
- [7] Wang S, Lv W, Li T, et al. Dynamic regulation and functions of mRNA m<sup>6</sup>A modification. *Cancer Cell Int*, 2022, 22: 48
- [8] Bokar JA, Rath-Shambaugh ME, Ludwiczak R, et al. Characterization and partial purification of mRNA N<sup>6</sup>-adenosine methyltransferase from HeLa cell nuclei. Internal mRNA methylation requires a multisubunit complex. *J Biol Chem*, 1994, 269: 17697-704
- [9] X Wang, J Feng, Y Xue, et al. Structural basis of N<sup>6</sup>-adenosine methylation by the METTL3-METTL14 complex. *Nature*, 2017, 534: 260
- [10] Ping XL, Sun BF, Wang L, et al. Mammalian WTAP is a regulatory subunit of the RNA N<sup>6</sup>-methyladenosine methyltransferase. *Cell Res*, 2014, 24: 177-89
- [11] Wen J, Lv R, Ma H, et al. Zc3h13 regulates nuclear RNA m<sup>6</sup>A methylation and mouse embryonic stem cell self-renewal. *Mol Cell*, 2018, 69: 1028-38.e6
- [12] Ma H, Wang X, Cai J, et al. N<sup>6</sup>-Methyladenosine methyltransferase ZCCHC4 mediates ribosomal RNA methylation. *Nat Chem Biol*, 2019, 15: 88-94
- [13] Patil DP, Chen CK, Pickering BF, et al. m<sup>6</sup>A RNA methylation promotes XIST-mediated transcriptional repression. *Nature*, 2016, 537: 369-73
- [14] Yankova E, Blackaby W, Albertella M, et al. Small-molecule inhibition of METTL3 as a strategy against myeloid leukaemia. *Nature*, 2021, 593: 597-601
- [15] Wang Y, Li Y, Yue M, et al. N<sup>6</sup>-methyladenosine RNA modification regulates embryonic neural stem cell self-renewal through histone modifications. *Nat Neurosci*, 2018, 21: 195
- [16] Ma C, Chang M, Lv H, et al. RNA m<sup>6</sup>A methylation participates in regulation of postnatal development of the mouse cerebellum. *Genome Biol*, 2018, 19: 68
- [17] Chen J, Zhang YC, Huang C, et al. m<sup>6</sup>A regulates neurogenesis and neuronal development by modulating histone methyltransferase Ezh2. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2019, 17: 154-68
- [18] Xu B, Li Q, Wu Y, et al. Mettl3-mediated m<sup>6</sup>A modification of Lrp2 facilitates neurogenesis through Ythdc2 and elicits antidepressant-like effects. *FASEB J*, 2022, 36: e22392
- [19] Kim H, Jang S. RNA m<sup>6</sup>A methyltransferase Mettl3 regulates spatial neural patterning in *Xenopus laevis*. *Mol Cell Biol*, 2021, 41: e0010421
- [20] Jia G, Fu Y, Zhao Z, et al. N<sup>6</sup>-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. *Nat Chem Biol*, 2011, 7: 885-7
- [21] Hess ME, Hess S, Meyer KD, et al. The fat mass and obesity associated gene (Fto) regulates activity of the dopaminergic midbrain circuitry. *Nat Neurosci*, 2013, 16: 1042-8
- [22] 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
- [23] Zheng G, Dahl JA, Niu Y, et al. ALKBH5 is a mammalian RNA demethylase that impacts RNA metabolism and mouse fertility. *Mol Cell*, 2013, 49: 18-29
- [24] Gao R, Ye M, Liu B, et al. m<sup>6</sup>A modification: a double-edged sword in tumor development. *Front Oncol*, 2021, 11: 679367
- [25] Chen B, Ye F, Yu L, et al. Development of cell-active N<sup>6</sup>-methyladenosine RNA demethylase FTO inhibitor. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 17963-71
- [26] Wang T, Hong T, Huang Y, et al. Fluorescein derivatives as bifunctional molecules for the simultaneous inhibiting and labeling of FTO protein. *J Am Chem Soc*, 2015, 137: 13736-9
- [27] Huang Y, Su R, Sheng Y, et al. Small-molecule targeting of oncogenic FTO demethylase in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*, 2019, 35: 677-91
- [28] Selberg S, Seli N, Kankuri E, et al. Rational design of novel anticancer small-molecule RNA m<sup>6</sup>A demethylase ALKBH5 inhibitors. *ACS Omega*, 2021, 6: 13310-20
- [29] Li L, Zang L, Zhang F, et al. Fat mass and obesity-associated (FTO) protein regulates adult neurogenesis. *Hum Mol Genet*, 2017, 26: 2398-411
- [30] Cao Y, Zhuang Y, Chen J, et al. Dynamic effects of Fto in regulating the proliferation and differentiation of adult neural stem cells of mice. *Hum Mol Genet*, 2020, 29: 727-35
- [31] Qu W, Li Q, Wang M, et al. m<sup>6</sup>A modification involves in enriched environment-induced neurogenesis and cognition enhancement. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 903179
- [32] Dominissini D, Moshitch-Moshkovitz S, Schwartz S, et al. Topology of the human and mouse m<sup>6</sup>A RNA methylomes revealed by m<sup>6</sup>A-seq. *Nature*, 2012, 485: 201-6
- [33] Roundtree IA, Luo GZ, Zhang Z, et al. YTHDC1 mediates nuclear export of N<sup>6</sup>-methyladenosine methylated mRNAs. *Elife*, 2017, 6: e31311
- [34] T Liu, Q Wei, J Jin, et al. The m<sup>6</sup>A reader YTHDF1 promotes ovarian cancer progression via augmenting EIF3C translation. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48: 3816-31
- [35] Wang JY, Lu AQ. The biological function of m<sup>6</sup>A reader YTHDF2 and its role in human disease. *Cancer Cell Int*, 2021, 21: 109
- [36] Zhang C, Huang S, Zhuang H, et al. YTHDF2 promotes the liver cancer stem cell phenotype and cancer metastasis

- by regulating OCT4 expression via m<sup>6</sup>A RNA methylation. *Oncogene*, 2020, 39: 4507-18
- [37] Shi H, Xiao W, Lu Z, et al. YTHDF3 facilitates translation and decay of N<sup>6</sup>-methyladenosine-modified RNA. *Cell Res*, 2017, 27: 315-28
- [38] Xiao W, Adhikari S, Dahal U, et al. Nuclear m<sup>6</sup>A reader YTHDC1 regulates mRNA splicing. *Mol Cell*, 2016, 61: 507-19
- [39] 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
- [40] Ma L, Zhang X, Yu K, et al. Targeting SLC3A2 subunit of system XC<sup>-</sup> is essential for m<sup>6</sup>A reader YTHDC2 to be an endogenous ferroptosis inducer in lung adenocarcinoma. *Free Radic Biol Med*, 2021, 168: 25-43
- [41] Yuan W, Chen S, Li B, et al. The N<sup>6</sup>-methyladenosine reader protein YTHDC2 promotes gastric cancer progression via enhancing YAP mRNA translation. *Transl Oncol*, 2022, 16: 101308
- [42] Liu Y, Shi SL. The roles of hnRNP A2/B1 in RNA biology and disease. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2021, 12: e1612
- [43] Jiang F, Tang X, Tang C, et al. HNRNPA2B1 promotes multiple myeloma progression by increasing AKT3 expression via m<sup>6</sup>A-dependent stabilization of ILF3 mRNA. *J Hematol Oncol*, 2021, 14: 54
- [44] 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
- [45] Korn SM, Ulshöfer CJ, Schneider T, et al. Structures and target RNA preferences of the RNA-binding protein family of IGF2BPs: an overview. *Structure*, 2021, 29: 787-803
- [46] Wu R, Li A, Sun B, et al. A novel m<sup>6</sup>A reader Prrc2a controls oligodendroglial specification and myelination. *Cell Res*, 2019, 29: 23-41
- [47] Li M, Zhao X, Wang W, et al. Ythdf2-mediated m<sup>6</sup>A mRNA clearance modulates neural development in mice. *Genome Biol*, 2018, 19: 69
- [48] 赵顺莉, 赵赋, 李晴, 等. 异质性细胞核糖蛋白A2B1在小鼠小脑发育与人髓母细胞瘤中的表达. *中华病理学杂志*, 2019, 48: 6
- [49] Du K, Zhang L, Lee T, et al. m<sup>6</sup>A RNA methylation controls neural development and is involved in human diseases. *Mol Neurobiol*, 2019, 56: 1596-606
- [50] Livneh I, Moshitch-Moshkovitz S, Amariglio N, et al. The m<sup>6</sup>A epitranscriptome: transcriptome plasticity in brain development and function. *Nat Rev Neurosci*, 2020, 21: 36-51