

· 综 述 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.18.035

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20200323.0835.002.html\(2020-03-23\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20200323.0835.002.html(2020-03-23))

m6aRNA 甲基化在肝细胞癌中的研究进展*

李 兵¹, 温迪光²综述, 龚建平², 刘作金^{2△}审校

(1. 重庆市长寿区第三人民医院外科 401220; 2. 重庆医科大学附属第二医院肝胆外科 400010)

[摘要] 肝细胞癌(HCC)是全球病死率排名第四的恶性肿瘤,目前对于 HCC 发生发展机制尚不完全了解,患者预后较差,手术介入等治疗方式往往给患者带来较大损伤且未必能有效延长患者生存时间,寻找 HCC 新的干预靶点,可以更好地理解 HCC 发生机制和造福患者。m6aRNA 甲基化是一种新兴的在真核细胞中最常见的 RNA 修饰。目前已经发现 m6aRNA 甲基化在多种人体生命活动中起重要作用,且参与包括 HCC 在内的多种肿瘤的发生发展,是一种新的 HCC 干预靶点,但在某些方面仍存在争议,该文综述了 m6aRNA 甲基化在 HCC 治疗中的相关最新研究进展并提出一些笔者的看法。

[关键词] RNA 甲基化;癌,肝细胞;N6 甲基腺苷

[中图法分类号] R735.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2020)18-3132-04

Study advances of m6aRNA methylation and liver cancer*

LI Bing¹, WEN Diguang², GONG Jianping², LIU Zuojin^{2△}

(1. Department of Surgery, the Third People's Hospital of Changshou District, Chongqing 401220, China; 2. Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

[Abstract] Hepatocellular carcinoma (HCC) is the fourth ranked malignant tumor in the world. At present, the mechanism of HCC occurrence and development is not fully understood. The prognosis of patients is poor. Surgical treatment method often brings great damage to patients and may not be effectively prolong the survival time of patients. Finding new targets for HCC intervention can better understand the mechanism of HCC occurrence and benefit patients. m6aRNA methylation is a new and most common RNA modification in eukaryotic cells. It has been found that the methylation of m6aRNA plays an important role in a variety of human life activities, and is involved in the occurrence and development of a variety of tumors, including HCC. It is a new target for HCC intervention, but it is still controversial in some aspects. This paper reviewed the latest research progress of the m6aRNA methylation in the treatment of HCC, and puts forward some views of its own.

[Key words] RNA methylation; carcinoma, hepatocellular; m6a

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是世界许多地区癌症相关死亡的主要原因^[1]。在过去的几十年里,我们已经在了解 HCC 的流行病学、危险因素和分子特征方面取得了很大的进展。既往 HCC 治疗主要以手术切除治疗为主,然而,患者在发现 HCC 时,多已至晚期失去手术治疗机会,且考虑到手术介入等治疗方式创伤大,肿瘤患者又多为中老年人,身体素质相对较差,难以耐受创伤较大的治疗方式,因此,寻找 HCC 的治疗及预后靶点造福更多 HCC 患者具有重要意义,且更容易实现目前个性化治疗及微创乃至无创治疗的治疗理念^[1]。既往科学研究者认为

为包括 HCC 在内的肿瘤主要由基因突变驱动,为一种基因疾病,然而随着研究的深入,表观遗传修饰逐渐进入了人们的视野,DNA 甲基化、微 RNA (miRNA)、长链非编码 RNA (lncRNA)、组蛋白乙酰化等均被证实参与肿瘤发生发展过程,且被科学家们作为治疗肿瘤或判断患者预后的指标^[2]。截至 2017 年底,在所有生物体中,已经鉴定出 163 种不同的 RNA 化学修饰。在这些修饰中,N6 甲基腺苷 (m6a) 被认为是真核信使 RNA (mRNAs)、miRNA 和 lncRNA 中最普遍、最丰富和最保守的一种修饰方式,影响这些 RNA 的转录、加工、翻译和代谢等多个方面^[3]。考虑

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81702357)。 作者简介:李兵(1975—),副主任医师,本科,主要从事普通外科及腹部微创外科临床工作。 △ 通信作者,E-mail:300376@hospital.cqmu.edu.cn。

到 m6aRNA 甲基化修饰普遍影响生物体内 RNA 且对这些 RNA 的功能具有多方面影响,其机制较为复杂,结合最新研究也表明 m6aRNA 甲基化在 HCC 发生发展过程中发挥促进和抑制双重影响,甚至在某些方面存在严重争议,本文将对 m6aRNA 甲基化修饰对 HCC 进展影响的研究进行综述。

m6aRNA 甲基化修饰在细胞内由编码器“writers”、清除器“erasers”、阅读器“readers”维持其动态平衡。甲基转移酶样 3(Mettl3)、Mettl14、肾母细胞瘤 1 相关蛋白(WTAP)、RBM15/15B 和 KIAA1429 共同在细胞内形成复合物,被认为是细胞内最主要的 m6aRNA 编码器,也有少量研究发现 Mettl16 也参与 m6aRNA 修饰。脂肪和肥胖相关蛋白(FTO)和 ALKB 同源物 5(ALKBH5)能选择性地从靶 RNA 中去除甲基化修饰;读取器能够解码 m6a 甲基化并产生功能信号,包括 YT521-B 同源物(YTH)结构域、真核起始因子 3(EIF3)、IGF2 mRNA 结合蛋白(IGF2BP)家族和异质性胞核核糖核蛋白(HNRNP)家族^[4]。

1 m6aRNA 甲基化酶在 HCC 中的作用

m6aRNA 甲基化编码器被识别主要是由 Mettl3、Mettl14、WTAP、BM15/15B 和 KIAA1429 共同形成的 m6aRNA 甲基化酶复合物。其中 Mettl3、Mettl14 具有催化 m6a 形成的酶活性,而对 WTAP、BM15/15B 和 KIAA1429 的体外研究表明并无 m6a 催化活性,但在维持复合物稳定性及选择性招募识别 m6a 位点上具有关键作用,敲除(低)上述任何一种蛋白均显著降低细胞 m6aRNA 水平^[4]。

2017 年 MA 等^[5]发现,HCC 组织中 m6a 水平下调,且广谱地识别了各种 RNA 甲基化酶表达差异,发现上述甲基化酶催化复合物中 Mettl3、Mettl14 表达均明显下调,该文着重对 Mettl14 进行了研究,并在 SMMC-7721、HepG2、Hep3b、HCC-1664 4 种 HCC 细胞中进行了验证,发现其可以影响转移相关 miRNA 成熟从而抑制 HCC 生长转移。然而几个月后,CHEN 等^[6]团队通过 TCGA 数据库及外部 HCC 组织却发现 HCC 中 m6a 水平上调,Mettl14 无明显表达差异,Mettl3 表达上调,且通过 m6a 依赖途径沉默 SOCS2 从而促进 HCC 进展,进一步在 Huh7 细胞系中研究 Mettl14 却发现其促进 HCC 进展。相似的是,另一个研究团队也在体外研究中发现 HepG2 细胞株中敲低 Mettl14 也促进了 HepG2 细胞侵袭和转移^[7]。上述的矛盾结果可能归因于细胞系选择不同和 HCC 组织来源及实验条件不同。此外,WTAP、KIAA1429 均被发现在 HCC 中高表达,以一种较为复杂的通路 m6a 依赖性调节 HUR 与靶 RNA 结合的机制,从而促进 HCC 进展^[8-9]。

除了 m6aRNA 编码器,细胞内还存在 m6aRNA 清除器可以降低机体内 RNA 的 m6a 修饰。目前已

发现的 m6aRNA 清除器有 FTO 和 ALKBH5。FTO 是第 1 个被发现的 m6aRNA 脱甲基酶,其被发现参与多种肿瘤进展,如黑色素瘤、急性髓性白血病^[10]。在 HCC 中,部分研究发现 FTO 表达增加,通过介导 PKM2 去甲基化促进 HCC 进展^[11],然而也有研究认为 FTO 在 HCC 中低表达,且与患者预后呈正相关^[12]。这些研究可能归因子样本量和细胞系的选择不同,这也进一步提示了 m6a 在 HCC 进展调控中的复杂性和异质性。ALKBH5 在肿瘤进展中具有双向作用,如在胰腺癌中发挥抑癌基因作用,而胃癌中则促进肿瘤发生^[13-14]。在 HCC 中,ALKBH5 已被一些文献发现其在肝母细胞瘤中表达下调,且研究发现在 HepG2(一种经典的肝母细胞瘤细胞株)细胞中,敲低 ALKBH5 显著抑制肿瘤转移增殖^[7,15],但在 HCC 中,目前研究者仅发现其 mRNA 表达水平下调,蛋白水平及其在 HCC 扮演的角色仍需进一步研究^[16]。

2 m6aRNA 甲基化识别蛋白在 HCC 中的作用

阅读器识别并结合 m6a 位点,并发挥不同功能。目前已经发现的 m6a 识别蛋白,YTH 蛋白家族有同源 YTH 域用于识别 m6a 位点,其中 YTHDF1 促进 mRNA 稳定和翻译,YTHDF2 通过选择性地与靶 RNA 衰变位点结合促进 RNA 降解,YTHDF3 通过与 YTHDF1 或 YTHDF2 选择性结合发挥促进 RNA 稳定或降解的双向调控作用,YTHDC1 参与 RNA 识别剪切,YTHDC2 则通过促进 mRNA 翻译降低其丰度。新近研究发现,胰岛素样生长因子包括 IGF2BP1~3 在内的 IGF2BPs 也可以识别结合 m6a 位点,IGF2BPs 提高 RNA 稳定性促进 RNA 表达。EIF3 通过识别 m6a 促进 cap 非依赖性翻译。HNRNP A2B1 介导靶 RNA 选择性剪接和增强前 miRNA(pre-miRNA)与 miRNA 微处理器复合蛋白(DGCR8)相互作用促进其成熟^[17]。

在 HCC 中,目前研究比较详细的 m6aRNA 结合蛋白仅有 YTHDF2,YTHDF2 最先被发现参与 Mettl3 介导的 SOCS2 沉默从而促进 HCC 进展^[6],而后的研究却发现,单独的 YTHDF2 在 HCC 中尽管高表达,却抑制 HCC 生长转移并与肿瘤炎性环境密切相关^[18-19];但在肝母细胞瘤中,研究发现敲低 YTHDF2 抑制了肿瘤细胞生长转移潜力^[15]。此外,一项基于 TCGA 和 GEO 数据库的生物信息学分析表明 YTHDF1、YTHDF2、YTHDF3 及 EIF3 在 HCC 中普遍高表达,YTHDF1 可作为 HCC 预后的独立预测因子,若与 Mettl3 联合则可更好地预测 HCC 患者预后^[20]。HNRNPA2B1、EIF3 和 IGF2BPs 等蛋白在过去已被大量研究证实参与 HCC,然而截至目前,尚罕见通过 m6a 参与 HCC 进展相关的研究报道^[21-23]。尽管在 HCC 中,m6aRNA 结合蛋白的研究相对较少,但目前已有研究提示这些蛋白与其他肿瘤密切相关,如 YTHDF1 通过促进 CDK2、CDK4 和 cyclin D1 等

mRNA 稳定性和翻译促进肺癌进展, IGF2BP1 以 m6a 依赖机制促进 mRNA 稳定性从而参与多种肿瘤发生发展^[4]。考虑到在 HCC 中, 这些 RNA 结合蛋白也存在差异表达, 以及 m6a 在 HCC 发生发展过程中的关键作用, 这些蛋白在 HCC 中的作用机制仍有待进一步研究挖掘。

3 m6aRNA 甲基化靶点在 HCC 中的作用

前文已提及在包括 HCC 在内的多种肿瘤, 存在 m6aRNA 甲基化酶及识别蛋白的差异表达, 并且研究也发现在 HCC 中 m6aRNA 峰值与正常肝组织存在明显差异, 这种差异表明 m6aRNA 水平可能贡献肿瘤基因的表达或功能存在差异。如 lncRNA 已被识别在肿瘤进展中发挥重要作用, 而 lncRNA 的 m6a 水平可能影响其海绵 miRNA 功能、出核及降解^[24]。此外, m6a 也广泛影响 miRNA 成熟, 通过敲低 Mettl3 使细胞内 m6a 水平降低, 可使细胞内 miRNA 丰度明显降低^[25]。最新研究也发现, 组蛋白乙酰化、Smad 信号通路均与 m6aRNA 甲基化存在密切关联^[26-27], 这些研究进一步提示了 m6aRNA 甲基化可能在 HCC 中扮演着至关重要的作用。如在 HCC 中已经发现, m6a 介导 linc00958 上调从而影响 HCC 脂质代谢, 促进 HCC 进展^[28]。除了已经在 HCC 中识别的 m6aRNA 甲基化靶点, c-MYC、BCL2、PTEN、NANOG、PGC-1 α 等均在其他肿瘤中被识别为 m6aRNA 甲基化靶点, 这些基因亦被识别在 HCC 中扮演重要角色^[4]。并且 m6a 在细胞内呈现可逆的动态平衡, 如缺氧亦可使 m6aRNA 甲基化基因表达水平改变, 在乳腺癌研究中发现, 缺氧可使 NANOG 以 HIF-1 α 及 ALKBH5 依赖性上调从而强化乳腺癌干细胞特征^[29]。考虑到缺氧也在 HCC 进展中扮演重要角色, 缺氧情况下, m6aRNA 甲基化是否贡献靶基因的功能或表达异常, 通过广泛或局部干预这些 RNA 甲基化水平或位点, 能否逆转缺氧等应激情况下诱导的 HCC 恶性转化仍有待进一步研究。上述研究也提示局部干预靶基因上 m6a 位点从而抑制 HCC 进展, 也可能是一种新的研究方向。

4 总 结

m6aRNA 甲基化在 HCC 发生发展中发挥着重要的作用, 但目前关于 m6aRNA 甲基化与 HCC 缺氧诱导恶性转化、微环境塑造、转移及化疗耐药等恶性过程是否相关仍有待进一步研究挖掘。RNA 甲基化识别蛋白在 HCC 发生发展中扮演的角色需要进一步研究去证实。此外, m6aRNA 甲基化可能具有较强的异质性, 在研究 HCC m6aRNA 甲基化的过程中需要注意不同 HCC 对其的反应性, 如 HCC 和肝母细胞瘤; 同时研究时尽量选择多种 HCC 细胞系进行反复验证, 考虑到 m6aRNA 甲基化可能会受应激影响, 为了实验的可重复性, 实验条件也需要尤其注意。总之, m6aRNA 甲基化是一种新的 HCC 干预靶点, 通

过全面或局部的干预可能可以有效地抑制 HCC 进展, 同时, m6aRNA 甲基化与 HCC 的相关性仍有待进一步研究挖掘。

参考文献

- [1] CRAIG A J, VON FELDEN J, GARCIA-LEZANA T, et al. Tumour evolution in hepatocellular carcinoma [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2020, 17(3): 139-152.
- [2] FAIVRE S, RIMASSA L, FINN R S. Molecular therapies for HCC: looking outside the box [J]. *J Hepatol*, 2020, 72(2): 342-352.
- [3] HU B B, WANG X Y, GU X Y, et al. N6-methyladenosine (m6A) RNA modification in gastrointestinal tract cancers: roles, mechanisms, and applications [J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 178.
- [4] CHEN X Y, ZHANG J, ZHU J S. The role of m6A RNA methylation in human cancer [J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 103.
- [5] MA J Z, YANG F, ZHOU C C, et al. METTL14 suppresses the metastatic potential of hepatocellular carcinoma by modulating N6-methyladenosine-dependent primary MicroRNA processing [J]. *Hepatology*, 2017, 65(2): 529-543.
- [6] CHEN M, WEI L, LAW C T, et al. RNA N6-methyladenosine methyltransferase-like 3 promotes liver cancer progression through YTHDF2-dependent posttranscriptional silencing of SOCS2 [J]. *Hepatology*, 2018, 67(6): 2254-2270.
- [7] PANNEERDOSS S, EEDUNURI V K, YADAV P, et al. Cross-talk among writers, readers, and erasers of m6A regulates cancer growth and progression [J]. *Sci Adv*, 2018, 4(10): eaar8263.
- [8] CHEN Y, PENG C, CHEN J, et al. WTAP facilitates progression of hepatocellular carcinoma via m6A-HuR-dependent epigenetic silencing of ETS1 [J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 127.
- [9] LAN T, LI H, ZHANG D, et al. KIAA1429 contributes to liver cancer progression through N6-methyladenosine-dependent post-transcriptional modification of GATA3 [J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 186.
- [10] CHEN J, DU B. Novel positioning from obesity to cancer: FTO, an m6A RNA demethylase, regulates tumour progression [J]. *J Cancer Res*

- Clin Oncol, 2019, 145(1):19-29.
- [11] LI J, ZHU L, SHI Y, et al. m6A demethylase FTO promotes hepatocellular carcinoma tumorigenesis via mediating PKM2 demethylation[J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(9):6084-6092.
- [12] ZHAO Y, YOU S, YU Y Q, et al. Decreased nuclear expression of FTO in human primary hepatocellular carcinoma is associated with poor prognosis[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2019, 12(9):3376-3383.
- [13] TANG B, YANG Y, KANG M, et al. m6A demethylase ALKBH5 inhibits pancreatic cancer tumorigenesis by decreasing WIF-1 RNA methylation and mediating Wnt signaling[J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1):3.
- [14] ZHANG J, GUO S, PIAO H Y, et al. ALKBH5 promotes invasion and metastasis of gastric cancer by decreasing methylation of the lncRNA NEAT1[J]. *J Physiol Biochem*, 2019, 75(3):379-389.
- [15] LIU L, WANG J, SUN G, et al. m6A mRNA methylation regulates CTNBN1 to promote the proliferation of hepatoblastoma[J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1):188.
- [16] LI Z, LI F, PENG Y, et al. Identification of three m6A-related mRNAs signature and risk score for the prognostication of hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Med*, 2020, 9(5):1877-1889.
- [17] ZHAO W, QI X, LIU L, et al. Epigenetic Regulation of m6A modifications in human cancer[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, 19:405-412.
- [18] ZHONG L, LIAO D, ZHANG M, et al. YTHDF2 suppresses cell proliferation and growth via destabilizing the EGFR mRNA in hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Lett*, 2019, 442:252-261.
- [19] HOU J, ZHANG H, LIU J, et al. YTHDF2 reduction fuels inflammation and vascular abnormalization in hepatocellular carcinoma[J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1):163.
- [20] ZHOU Y, YIN Z, HOU B, et al. Expression profiles and prognostic significance of RNA N6-methyladenosine-related genes in patients with hepatocellular carcinoma; evidence from independent datasets[J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11:3921-3931.
- [21] SHAALAN Y M, HANDOUSSA H, YOUNESS R A, et al. Destabilizing the interplay between miR-1275 and IGF2BPs by *Tamarix articulata* and quercetin in hepatocellular carcinoma[J]. *Nat Prod Res*, 2018, 32(18):2217-2220.
- [22] HEO C K, HWANG H M, LEE H J, et al. Serum anti-EIF3A autoantibody as a potential diagnostic marker for hepatocellular carcinoma[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1):11059.
- [23] YANG H, ZHU R, ZHAO X, et al. Sirtuin-mediated deacetylation of hnRNP A1 suppresses glycolysis and growth in hepatocellular carcinoma[J]. *Oncogene*, 2019, 38(25):4915-4931.
- [24] JACOB R, ZANDER S, GUTSCHNER T. The dark side of the epitranscriptome; chemical modifications in long non-coding RNAs[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(11):2387.
- [25] ALARCÓN C R, LEE H, GOODARZI H, et al. N6-methyladenosine marks primary microRNAs for processing[J]. *Nature*, 2015, 519(7544):482-485.
- [26] BERTERO A, BROWN S, MADRIGAL P, et al. The SMAD2/3 interactome reveals that TGF β controls m6A mRNA methylation in pluripotency[J]. *Nature*, 2018, 555(7695):256-259.
- [27] WANG Q, CHEN C, DING Q, et al. METTL3-mediated m6A modification of HDGF mRNA promotes gastric cancer progression and has prognostic significance[J]. *Gut*, 2019, 69(7):1193-1205.
- [28] ZUO X, CHEN Z, GAO W, et al. M6A-mediated upregulation of LINC00958 increases lipogenesis and acts as a nanotherapeutic target in hepatocellular carcinoma[J]. *J Hematol Oncol*, 2020, 13(1):5.
- [29] 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(14):E2047-2056.