

m⁶A RNA甲基化在非小细胞肺癌中的研究进展

潘红丽 李雪冰 陈琛 范亚光 周清华

【摘要】 m⁶A修饰是真核生物mRNA中最丰富的修饰之一，该过程受m⁶A甲基转移酶和去甲基化酶的共同调控。m⁶A修饰后的RNA能够被m⁶A识别蛋白特异性识别并结合，进而介导RNA的剪接、成熟、出核、降解和翻译等。目前国内外对于m⁶A修饰及其相关蛋白如何参与非小细胞肺癌发生发展的研究，主要集中于细胞恶性增殖、迁移、侵袭、转移和耐药等方面。m⁶A修饰相关蛋白在肺癌组织标本和血液循环肿瘤细胞（circulating tumor cell, CTC）中表达异常，有望成为肺癌诊断和预后判断的潜在分子标志物。本文围绕m⁶A修饰相关蛋白的组成、作用方式、在非小细胞肺癌恶性进展中的生物学功能，以及针对m⁶A修饰的靶向治疗等方面的研究进展进行综述，旨在为非小细胞肺癌的早期临床诊断和靶向药物的开发提供新思路。

【关键词】 肺肿瘤；m⁶A修饰；RNA甲基化；表观遗传修饰

Research Advances of m⁶A RNA Methylation in Non-small Cell Lung Cancer

Hongli PAN¹, Xuebing LI¹, Chen CHEN¹, Yaguang FAN¹, Qinghua ZHOU^{1,2}

¹Tianjin Key Laboratory of Lung Cancer Metastasis and Tumor Microenvironment, Tianjin Lung Cancer Institute, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China;

²Lung Cancer Center, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

Corresponding author: Xuebing LI, E-mail: xbli@tmu.edu.cn;

Qinghua ZHOU, E-mail: zhouqh135@163.com

【Abstract】 N⁶-methyladenosine is one of the most prevalent mRNA modification in eukaryotes. The regulation of this pervasive mark is a dynamic and reversible process. m⁶A RNA methylation is catalyzed by m⁶A writers, removed by m⁶A erasers and recognized by m⁶A readers, thereby regulating multiple RNA processes including alternative splicing, nuclear export, degradation and translation. Accumulated evidence suggests that m⁶A modification plays a crucial role in the pathogenic mechanism and malignant progression in non-small cell lung cancer (NSCLC), including cell survival, proliferation, migration, invasion, tumor metastasis and drug resistance. Moreover, the expression of m⁶A and its related proteins are dysregulated in clinical samples and circulating tumor cells (CTCs) of lung cancer patients, indicating that m⁶A modification may serve as a novel potential biomarker for the diagnosis and prognosis of lung cancer. In this review, by summarizing a great number of recent reports related to m⁶A's function and its modulators, we aim to provide a new insight on the early diagnosis and drug development in NSCLC therapy.

【Key words】 Lung neoplasms; N⁶-methyladenosine; RNA methylation; Epigenetic modification

This paper was supported by the grants from National Natural Science Foundation of China (to Xuebing LI)(No.81302002), Tianjin Natural Science Foundation (to Hongli PAN, No.17JCQNJC11700; No.18JCYBJC92100 and No.14JCQNJC12300, both to Xuebing LI) and Foundation of Tianjin Medical University General Hospital (to Hongli PAN)(No.ZYYFY2016013).

本文受国家自然科学基金项目（No.81302002）、天津市自然科学基金项目（No.17JCQNJC11700、No.18JCYBJC92100和No.14JCQNJC12300）和天津医科大学总医院孵育基金项目（No.ZYYFY2016013）资助

作者单位：300052 天津，天津市肺癌转移与肿瘤微环境重点实验室，天津市肺癌研究所，天津医科大学总医院（潘红丽，李雪冰，陈琛，范亚光，周清华）；610041 成都，四川大学华西医院肺癌中心（周清华）（通讯作者：李雪冰，E-mail: xbli@tmu.edu.cn；周清华，E-mail: zhouqh135@163.com）

肺癌是全球范围内发病率和死亡率增长最迅速、对人类健康和生命活动造成最大威胁的恶性肿瘤。全球疾病负担研究报告最新的统计数据^[1]表明仅2017年全球新增肺癌病例约220万,肺癌死亡病例约190万。中国国家癌症中心公布的数据^[2]显示2015年我国约有78万例新发肺癌病例,死于肺癌者高达63万人。按照组织类型分类,肺癌主要分为小细胞肺癌和非小细胞肺癌,其中85%的患者为非小细胞肺癌^[3]。非小细胞肺癌的发生发展是一个多步骤、多因素和多基因参与的极其复杂的过程,所以深入研究非小细胞肺癌的致病机理成为亟待解决的问题。

近年的研究表明,m⁶A修饰在癌症发生发展中发挥着不可替代的作用。m⁶A修饰是指RNA的腺嘌呤(A)第六号(6)氮原子上的单甲基化(m)修饰,简称m⁶A,通常发生在mRNA、lncRNA、circRNA、snRNA、tRNA和rRNA等多种RNA中。研究^[4]显示,m⁶A修饰的位点具有高度保守性,倾向于出现在共有序列RRm⁶ACH(R=G/A,H=A/C/U)上,这些位点主要分布在RNA的3'UTR、终止密码子或者长外显子附近,对RNA前体的剪接、3'末端的处理、出核转运、降解和翻译等过程起着重要调控作用。本文总结了有关m⁶A修饰的研究成果,阐述了其相关蛋白的组成、作用方式、在非小细胞肺癌恶性进展中的生物学功能以及针对m⁶A修饰的靶向治疗等方面的研究进展,为阐明非小细胞肺癌的发生发展提供新思路,对指导非小细胞肺癌的诊断和治疗提供新靶点。

1 m⁶A相关蛋白的组成及功能

m⁶A甲基化修饰最早在酵母tRNA中发现,tRNA发生m⁶A甲基化修饰后有助于维持其三叶草结构的稳定性,提高翻译效率^[5]。随后发现m⁶A甲基化在mRNA中是最丰富的修饰^[6],因此,越来越多的研究关注于mRNA的m⁶A甲基化修饰。m⁶A修饰是一种动态可逆的调节方式,受m⁶A甲基转移酶(m⁶A writers)和去甲基化酶(m⁶A erasers)的共同调控,能够被m⁶A识别蛋白(m⁶A readers)选择性的识别结合,从而转录后调控基因的表达。

1.1 m⁶A writers m⁶A writers,是指m⁶A甲基转移酶复合物,能够催化S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosyl methionine, SAM)的甲基转移至腺嘌呤第6位氮原子上。m⁶A writers包括METTL3、METTL14、WTAP、KIAA1429(VIRMA)、RBM15、HAKAI、ZC3H13(KIAA0853)和METTL16等。Knuckles等^[7]在小鼠胚胎干细胞中过表达了METTL3,期望通过TAP-LC-MS技术筛选鉴定与METTL3相互作用的

蛋白。结果表明:在高盐条件(500 mmol/L)下洗脱获得METTL3/METTL14复合物,命名为m⁶A-METTL复合物;在低盐条件(350 mmol/L)下洗脱得到WTAP/KIAA1429/RBM15/ZC3H13/HAKAI复合物,命名为m⁶A-METTL相关蛋白复合物。

1.1.1 m⁶A-METTL复合物 m⁶A-METTL复合物主要包括METTL3和METTL14蛋白。METTL3是最早被发现的m⁶A甲基转移酶复合物成分之一^[8],具有甲基转移酶活性。早期通过结构预测和DNA进化分析推测METTL3的功能与甲基转移酶活性相关^[9];后期研究^[10]发现METTL3能够和同源蛋白METTL14形成异源二聚体复合物,而METTL14虽能与RNA结合,但不具备催化活性;最终确定METTL3/METTL14复合物共同催化靶RNA的m⁶A修饰。

1.1.2 m⁶A-METTL相关蛋白复合物 m⁶A-METTL相关蛋白复合物主要是由接头蛋白WTAP、KIAA1429、RBM15、ZC3H13和HAKAI相互结合而形成的复合物。RNA剪接因子WTAP同样不具备甲基转移酶活性,而是作为接头蛋白招募m⁶A-METTL复合物定位到核散斑上,从而影响m⁶A修饰的定位^[11]。随后的研究发现KIAA1429能够直接与WTAP结合,引导METTL3/METTL14/WTAP复合物结合于靶RNA的3'UTR和终止密码子附近,发生位点选择性甲基化^[12]。因此,在细胞内敲低KIAA1429的表达后,m⁶A甲基化水平会明显下降^[13]。后续研究^[12,14]证实,接头蛋白RBM15、HAKAI、ZC3H13等能够与WTAP结合,决定METTL3/METTL14/WTAP复合物的正确定位。

1.1.3 METTL16 METTL16是另一具有催化活性的m⁶A甲基转移酶,与METTL3同源,可以结合于U6 snRNA,导致U6第43位的腺嘌呤发生m⁶A甲基化修饰,从而影响U6 snRNP对mRNA前体的剪接^[15]。METTL16也可以直接与mRNA前体结合,例如,与SAM合成酶MAT2A 3'UTR的一个保守发卡结构结合,在SAM充足或缺乏的情况下,由于停滞时间的差异,导致MAT2A的可变剪接,从而调控细胞内SAM含量的稳态^[16]。

早期从Hela细胞中分离出的m⁶A甲基转移酶复合物主要包括3个组分,分子量大小分别为30 kDa、200 kDa和875 kDa^[8]。m⁶A-METTL复合物属于200 kDa组分,但是METTL3/METTL14异源二聚体复合物分子量大小约为120 kDa,远低于200 kDa。m⁶A-METTL相关蛋白复合物属于875 kDa组分,但是WTAP/KIAA1429/RBM15/ZC3H13/HAKAI复合物分子量大小约为600 kDa,远远低于875 kDa。表明仍然有未知的蛋白作为m⁶A甲基转移酶复合物的成员,参与m⁶A甲基化修饰过程,需要进一步深入探讨。

1.2 m⁶A erasers m⁶A erasers, 即m⁶A去甲基化酶, 能够“擦除”靶RNA的m⁶A甲基化修饰。目前仅发现了两种m⁶A去甲基化酶, 包括脂肪质量与肥胖相关蛋白 (fat mass and obesity-associated protein, FTO) 和alkB同源蛋白5 (alkB homolog 5, ALKBH5)。

1.2.1 FTO FTO是第一个被发现的m⁶A去甲基化酶, 在细胞内敲低FTO的表达能够增加mRNA的m⁶A水平, 相反, 当过表达FTO时, 胞内mRNA的m⁶A水平受到抑制。FTO定位于核散斑, 这与m⁶A甲基转移酶复合物定位相同^[17]。m⁶A去甲基化酶FTO的发现, 明确了m⁶A修饰是一种动态可逆的调节方式。

然而, FTO作为m⁶A去甲基化酶还存在一些争议: 2011年, Jia等^[17]研究发现FTO的作用底物是m⁶A修饰; 2017年, Mauer等^[18]的研究否认FTO的底物是m⁶A修饰, 指出FTO的底物是m⁶Am修饰, 从而影响mRNA的稳定性和翻译。在随后的研究中, Su等^[19]分析了FTO催化m⁶A和m⁶Am修饰的偏好性, 发现FTO的偏好性受FTO蛋白定位的影响, 在细胞核中FTO催化m⁶A的去甲基化, 而在细胞质中的FTO可以同时介导m⁶A和m⁶Am的去甲基化。相比m⁶A修饰, m⁶Am修饰的RNA更加稳定, 在细胞内敲低FTO后不影响m⁶Am修饰的RNA的表达, 这一发现说明FTO主要通过介导m⁶A修饰的RNA的表达发挥作用。

1.2.2 ALKBH5 ALKBH5是第二个被发现的m⁶A去甲基化酶, 属于Fe²⁺和 α -酮戊二酸依赖的非血红素加氧酶, 能够把m⁶A甲基化位点的N-甲基氧化成羟甲基, 从而“擦除”mRNA的m⁶A甲基化。ALKBH5主要定位在核散斑, 依赖其去甲基化酶活性影响mRNA的出核转运^[20]。

目前发现的m⁶A去甲基化酶FTO和ALKBH5均属于AlkB家族, 但是二者对m⁶A修饰的擦除作用是相互独立的, 互不影响的。FTO和ALKBH5主要定位在细胞核, 在细胞质中表达较低, 所以细胞质中mRNA的m⁶A修饰是如何被调控的, 是否存在定位于细胞质中的m⁶A去甲基化酶, 仍需更多研究探索分析。

1.3 m⁶A readers m⁶A readers, 即m⁶A识别蛋白, 能够选择性识别靶RNA的m⁶A甲基化修饰, 进而参与RNA代谢的各个阶段。

1.3.1 YTH家族蛋白 目前m⁶A甲基识别蛋白功能研究比较明确的是YTH结构域家族成员, 包括定位于细胞质的YTHDF1、YTHDF2、YTHDF3、YTHDC2和定位于细胞核的YTHDC1, 均能通过YTH结构域选择性识别并结合m⁶A修饰位点。YTHDF1与m⁶A修饰位点结合后, 招募转录起始因子EIF3A及其复合物, 促进翻译的起始和多聚核糖体

的形成, 提高翻译效率^[21]; YTHDF2是最早被鉴定的m⁶A识别蛋白之一, 识别m⁶A甲基化位点后, 进而招募CCR4-NOT脱腺苷酸酶复合体或HRSP12/RNase P/MRP复合物, 加速RNA的脱腺苷酸化和切割^[4,22-24]。YTHDF3可与YTHDF1协同作用促进m⁶A修饰的mRNA翻译, 而YTHDF3与YTHDF2的协同作用会导致m⁶A修饰的靶RNA发生降解^[25]。YTHDC1与m⁶A修饰位点结合后, 能够通过剪接因子SRSF3和SRSF10的竞争性结合, 介导RNA前体的可变剪接及RNA的出核过程^[26,27]; 而YTHDC2能够提高靶基因的翻译效率和介导RNA的降解^[28,29]。

1.3.2 hnRNPs超家族蛋白 与m⁶A修饰相关的hnRNPs超家族蛋白包括HNRNPA2B1、HNRNPC和HNRNPG。RNA结合蛋白HNRNPA2B1可以与核内m⁶A修饰的RNA结合, 介导基因的可变剪接。同时, HNRNPA2B1也能够与miRNA初级转录本的m⁶A位点结合, 从而招募miRNA微处理复合物蛋白DGCR8, 促进miRNA初级转录本进一步的剪接加工^[30]。随后的研究^[31]发现, RNA发生m⁶A甲基化修饰后可以引起二级结构的改变, 部分m⁶A识别蛋白并非直接识别并结合m⁶A甲基化位点, 而是识别构象发生改变的RNA结构, 进而调控基因的表达, 这一现象被称为m⁶A开关 (m⁶A-switch)。通过晶体结构分析和生物信息学预测证实HNRNPA2B1并不含有与m⁶A甲基化位点结合的疏水口袋, 可能是采用m⁶A开关机制识别m⁶A修饰位点^[32]。核糖核蛋白HNRNPC/G对m⁶A修饰的识别结合也是间接性的, 通过m⁶A开关机制参与靶mRNA的加工及成熟^[31,33]。

1.3.3 其他 真核起始因子EIF3A能够直接和mRNA 5'UTR的m⁶A修饰位点结合, 招募43S核糖体复合物, 起始帽子结构非依赖型的蛋白翻译^[34]。IGF2BP1、IGF2BP2和IGF2BP3识别结合m⁶A修饰位点后, 增加靶mRNA的稳定性, 促进其翻译^[35]。

总体来说, m⁶A识别蛋白在RNA代谢的各个阶段均发挥了重要作用。

2 m⁶A修饰与肺癌

目前, m⁶A修饰在癌症发生发展中的作用及机制研究是肿瘤生物学的热点之一。在肺癌的发生发展中, m⁶A修饰发挥着举足轻重的作用。m⁶A相关蛋白表达的异常, 能够导致非小细胞肺癌的恶性增殖、迁移、侵袭、转移和耐药等。因此, 研究m⁶A修饰在非小细胞肺癌中的生物学功能, 鉴定m⁶A修饰的关键因子改变, 对阐明非小细胞肺癌发病机制具有重要意义, 可以为指导肺癌的临床治疗

提供理论依据。

2.1 m⁶A修饰与肺癌恶性增殖 肺癌是一种由肺上皮细胞恶性增殖而形成的肿瘤。肿瘤细胞的恶性增殖与细胞的过度分裂、周期紊乱和凋亡调控失常等相关。

研究^[36]表明m⁶A甲基转移酶METTL3处于甲基转移酶复合物的核心位置, METTL3纯合敲除小鼠是早期胚胎致死的, METTL3条件性敲除鼠表现为体重轻、体积小和发育迟缓等特点, 说明METTL3在早期胚胎发育和生存中发挥重要作用。METTL3在肝癌、宫颈癌、乳腺癌和胰腺癌等多种恶性肿瘤中表达均上调, 导致SOCS2^[37]、HBXIP^[38]和SNAI1^[39]等mRNA发生甲基化, 从而调控肿瘤的恶性进展。在非小细胞肺癌临床样本中, METTL3的表达是明显上调的, 并且与肿瘤大小、淋巴结转移和远端转移呈正相关。METTL3能够催化Hippo信号通路的核效应因子YAP发生m⁶A甲基化修饰, 促使其翻译, 介导非小细胞肺癌的增殖和转移^[40]。此外, METTL3的第177、211、212和215位赖氨酸残基可以发生SUMO化修饰, 显著抑制m⁶A甲基转移酶活性, 导致细胞整体基因表达谱的改变, 促进非小细胞肺癌的增殖和恶性转化^[41]。也有报道^[42,43]指出, METTL3可以不依赖甲基化酶活性而发挥作用, 即直接与表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 和Hippo信号通路的转录调节因子TAZ的m⁶A甲基化位点结合后, 招募真核翻译起始因子EIF3H, 介导癌蛋白EGFR和TAZ翻译的起始与多聚核糖体的形成, 促进肺腺癌细胞的恶性增殖、迁移和侵袭。此外, 还有研究^[44,45]表明, miR-33a和miR-600可以靶向METTL3而抑制非小细胞肺癌的恶性增殖。

m⁶A识别蛋白YTHDF1在非小细胞肺癌临床样本和细胞株中均高表达。在非小细胞肺癌细胞株中敲低YTHDF1的表达, 导致肺癌细胞G₀/G₁期阻滞, 细胞周期蛋白CDK2、CDK4和cyclin D1的翻译效率大大降低, 显著抑制肺癌细胞的恶性增殖^[46]。Sheng等^[47]研究表明YTHDF2在非小细胞肺癌组织中表达上调, 通过识别结合磷酸戊糖途径中的关键酶6-PGD 3'UTR的甲基化位点, 促进其翻译, 加速葡萄糖通过磷酸戊糖途径代谢, 为非小细胞肺癌的恶性增殖提供原料。

m⁶A去甲基化酶FTO的表达在非小细胞肺癌组织和细胞系中均上调, 它能够“擦除”去泛素化酶USP7 mRNA的m⁶A修饰, 增加其稳定性, 促进肺癌细胞的恶性增殖^[48]。而m⁶A去甲基化酶ALKBH5则可以靶向组织金属蛋白酶抑制因子 (metallopeptidase inhibitor 3, TIMP3), 降低TIMP3 mRNA的稳定性, 通过抑制凋亡而促进非小细胞肺癌的增

殖^[49]。USP7 mRNA的m⁶A甲基化修饰被FTO“擦除”后稳定性增加, 然而TIMP3 mRNA的m⁶A修饰被“擦除”后稳定性降低, 我们推测不同基因m⁶A修饰发生变化后, 导致转录后调控方式差异的原因是被不同的m⁶A识别蛋白所选择性识别, 从而导致作用方式不同。m⁶A识别蛋白如何选择性识别, 具体的分子机制仍需研究者们进一步探索。

2.2 m⁶A修饰与肺癌迁移、侵袭和转移 肺癌发展到晚期较易发生转移, 这也是导致肺癌死亡率居高不下的一个重要因素之一, 所以m⁶A修饰与肺癌侵袭及转移的关系需要研究者们深入探讨。

在肺腺癌细胞中METTL3依赖m⁶A甲基转移酶活性, 导致JUNB mRNA发生m⁶A修饰, 增加其稳定性, 从而作为转录因子入核开启下游基因的转录, 参与转化生长因子-β (transforming growth factor-β, TGF-β) 诱导的上皮细胞-间充质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 的发生, 促进肺腺癌细胞的迁移和侵袭^[50]。在肺癌脑转移过程中, METTL3被报道可以诱导miR-143-3p初级转录本发生m⁶A修饰, 加速miR-143-3p的加工成熟, 通过靶向血管生成抑制因子VASH1, 解除对血管内皮生长因子VEGFA的抑制作用, 诱发新生血管的形成, 促进肺癌细胞的淋巴结转移和远端转移^[51]。

Liu等^[52]研究发现在肺鳞癌中, 高表达的m⁶A去甲基化酶FTO通过“擦除”癌基因MZF1 mRNA的m⁶A修饰, 增加其稳定性, 促进肺鳞癌细胞的恶性增殖、迁移和侵袭。另一m⁶A去甲基化酶ALKBH5在间歇性缺氧处理后的肺腺癌细胞中表达明显上调, 进一步研究发现ALKBH5通过“擦除”癌基因FOXMI mRNA的m⁶A修饰, 促进FOXMI1的表达, 从而参与肺癌细胞的增殖和侵袭^[53]。近期的一项研究结果^[54]表明m⁶A去甲基化酶ALKBH5在非小细胞肺癌中表达明显下调, 且其低表达与整体生存期呈负相关; 在肺癌细胞中过表达ALKBH5能够明显抑制细胞增殖和迁移, 这一结果与前人的研究结果截然相反, 推测与细胞培养方式或处理方式的不同相关, 具体机制仍需进一步探讨。因此, m⁶A修饰在肿瘤生物学中的调控功能需要更深入、更详细、更全面的研究和探讨。

2.3 m⁶A修饰与肺癌耐药性 耐药是导致肿瘤治疗失败的关键因素。研究表明, 多药联合可以缓解肿瘤耐药。因此, 深入研究耐药的分子机制, 可以为指导正确的联合用药和克服耐药提供理论依据。m⁶A修饰相关蛋白在肺癌耐药中也发挥重要的作用。

Shi等^[46]研究发现在非小细胞肺癌中高表达的YTHDF1能够更好地识别m⁶A修饰的KEAP1 mRNA, 促进

KEAP1蛋白的表达,导致下游细胞氧化应激反应中的关键因子核因子E2相关因子2 (nuclear factor-E2-related factor 2, NRF2) 迅速降解,介导耐药基因AKR1C1表达的沉默,从而增加了化疗敏感性。 m^6A 甲基转移酶METTL3的敲低,也能够提高肺腺癌细胞A549对抗癌药物JQ1的敏感性^[42],但是具体机制仍未见报道。

近期Meng等^[55]深刻剖析了非小细胞肺癌中 m^6A 修饰与阿法替尼耐药性的关系:他们以阿法替尼敏感细胞株为对照,发现在阿法替尼耐药细胞株中有更多的基因发生 m^6A 修饰,从而导致整体基因表达谱发生了改变;通过基因功能富集分析,发现差异表达的基因主要富集在细胞周期,推测 m^6A 修饰的基因扰乱了正常的细胞周期,从而导致非小细胞肺癌产生阿法替尼耐药性。

2.4 m^6A 修饰与肺癌诊断及预后 越来越多的研究^[56,57]表明, m^6A 修饰可以作为诊断、药物治疗和预后判断的潜在分子标志物。研究人员利用LC-ESI-MS/MS方法检测肺癌单个循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)细胞或CTC细胞簇的 m^6A 修饰情况时发现,CTC细胞中的整体 m^6A 修饰水平是增加的,这表明从CTC细胞检测 m^6A 修饰也许可以成为肺癌的无创诊断方法。未来研究方向会更加关注肺癌早期阶段 m^6A 甲基化修饰或 m^6A 修饰相关蛋白的表达情况,从而明确 m^6A 修饰检测能否作为早期诊断指标。Zhang^[58]的团队对TCGA数据库S09例肺腺癌患者标本的 m^6A 相关蛋白的表达进行了分析,发现YTHDF1、YTHDF2和METTL3的表达均明显上调,并且其高表达与总体生存率和无复发生存率呈正相关,他们推测这是通过提高化疗敏感性进而延长了患者的生存期。Liu等^[59]对13个 m^6A 相关蛋白的基因表达进行一致性聚类分析,把肺腺癌患者分为了两组,这两组患者在年龄、种族、肿瘤大小、分期、远端转移方面均有明显差异。通过表达谱分析表明, m^6A 相关基因的表达可以作为肺腺癌晚期患者预后的评判标准。

3 针对 m^6A 修饰的靶向治疗进展

表观遗传学在恶性肿瘤的发生发展及诊断治疗中具有重要的作用,多个靶向DNA甲基化酶或组蛋白修饰酶的新药已获批用于恶性肿瘤的治疗。DNA甲基转移酶抑制剂Azacitidine和Decitabine已获得美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准,应用于骨髓增生异常综合征的临床治疗^[60,61]。组蛋白去乙酰化酶抑制剂Chidamide已获中国食品药品监督管理局(China Food and

Drug Administration, CFDA)批准用于外周T淋巴瘤的治疗^[62],目前Chidamide针对非小细胞肺癌的临床实验已进入III期阶段。近几年,以 m^6A 修饰为核心内容的靶向治疗已经成为药物新靶标的研究热点。主要包括:FTO抑制剂、METTL3-14/WTAP激活剂和联合用药。

3.1 FTO抑制剂 m^6A 去甲基化酶FTO是白血病、肺癌、乳腺癌等多种肿瘤发生发展中重要的癌基因之一,在多种肿瘤中普遍高表达,且与预后呈负相关。因此,研究者们致力于筛选或合成FTO抑制剂,为后续抗肿瘤药物的开发奠定了基础。

最早发现的FTO抑制剂是大黄酸,大黄酸是一种天然产物,可以与RNA竞争结合FTO活性位点,从而扰乱了FTO对已发生 m^6A 修饰的RNA的去甲基化作用,同时大黄酸也可以抑制去甲基化酶ALKBH2的活性,说明大黄酸并非是非特异性靶向FTO的抑制剂^[63]。研究^[64]表明用大黄酸处理非小细胞肺癌细胞系PC-9、H460和A549后,能够明显抑制细胞的活性及克隆形成能力,导致凋亡的发生和细胞周期的停滞。小鼠皮下荷瘤实验证实大黄酸能够以时间和剂量依赖的方式抑制肺癌的恶性增殖。之前的研究^[65]表明大黄酸对小细胞肺癌细胞系GLC4的增殖也有一定的抑制作用,可以诱导细胞发生凋亡。但是由于大黄酸水溶性较差,因此其抗肿瘤效率受到了明显的限制。

随后,研究学者通过高通量荧光偏振检测法筛选抑制FTO或ALKBH5活性的药物,发现非甾体抗炎药MA能够高效的特异性抑制FTO的去甲基化酶活性,并且以浓度依赖方式上调细胞内整体 m^6A 修饰水平,而对ALKBH5的表达及活性并未产生影响^[66]。Demertzi等^[67]研究发现肺腺癌细胞株A549对MA的敏感性较低,半数抑制率(50% inhibitory concentration, IC_{50})为139 $\mu\text{mol/L}$,一些MA金属配合物对A549细胞的 IC_{50} 值范围可降至25 $\mu\text{mol/L}$ -40 $\mu\text{mol/L}$,但是在生物系统的使用浓度仍然过高,所以进一步对MA进行改造,研究发现MA有机锡配合物大大提升了对A549细胞的抗增殖活性, IC_{50} 值仅为0.43 $\mu\text{mol/L}$,显著增加了肺腺癌细胞株A549对MA有机锡配合物的敏感性^[68]。MA配合物是否通过抑制FTO活性来发挥作用,MA配合物对肺鳞癌和大细胞癌的抗癌活性如何呢,有待进一步探讨。

研究者们为了获得特异性和靶向性更强的FTO抑制剂,针对晶体结构进行化合物设计和合成优化,最终筛选到小分子化合物FB23及其羧酸衍生物FB23-2能够特异性靶向FTO。研究^[69]发现在急性髓系白血病中,羧酸衍生物FB23-2抗增殖活性要优于FB23,能够特异性抑制FTO去甲基化酶活性,显著抑制细胞增殖,促进细胞分化成熟,

在一定程度上阻遏了急性髓系白血病的发展。FTO抑制剂FB23及其羧酸衍生物FB23-2在非小细胞肺癌中能否特异性靶向FTO,能否有效抑制肺癌的恶性进展,尚需更多的研究进行验证。

3.2 METTL3-14/WTAP激活剂 普遍认为m⁶A修饰的升高可以抑制癌症的恶性进展。前期大量研究聚焦于FTO抑制剂的开发,然而,亦可以通过激活METTL3甲基转移酶的活性来提高m⁶A水平。Selberg等^[70]基于METTL3/METTL14复合物晶体结构进行了虚拟筛选,发现4个小分子化合物能够与METTL3/METTL14复合物结合并激活甲基转移酶活性,这些小分子化合物能够在细胞水平发挥作用,导致mRNA和rRNA的整体m⁶A水平升高。但是,当使用高浓度(10 μmol/L)小分子化合物处理细胞时,胞内整体m⁶A修饰水平反而降低,我们推测这是细胞为了维持稳态而进行的负反馈调节。在非小细胞肺癌细胞株中METTL3普遍高表达,能够促进非小细胞肺癌的增殖和转移^[42,43]。随后Liu等^[59]分析了大量的肺腺癌和肺鳞癌临床样本中m⁶A相关基因的表达情况,结果表明在肺腺癌和肺鳞癌中METTL3的表达显著上调,并且高表达METTL3的非小细胞肺癌患者表现出较好的预后^[58,59,71]。综合临床数据来看, METTL3在非小细胞肺癌中的高表达能够延长患者的生存期。因此, METTL3-14/WTAP激活剂对非小细胞肺癌的治疗有着充分的理论可行性,相信后续的生物活性实验及临床实验会进一步开展起来。

3.3 联合用药 研究^[72]表明表观遗传修饰的异常能够导致肿瘤对化疗药物的耐受性,所以靶向表观遗传的疗法对逆转耐药提供了可能。Pemetrexed作为晚期非小细胞肺癌的临床药物被广泛使用,但是单药的使用对改善患者的总体生存率具有一定的局限性^[73],所以开展了多项针对Pemetrexed的联合用药研究, Bu等^[74]研究发现FTO抑制剂大黄酸和Pemetrexed联合处理肺腺癌细胞系A549时, IC₅₀由2.05 μmol/L降低为0.62 μmol/L,抗肿瘤活性得到明显的提升。Duffy等^[75]研究发现用阿霉素单药处理肺腺癌细胞株A549时,细胞存活率为65%,而FTO特异性抑制剂MA与阿霉素联用时的细胞存活率仅为16%,这一现象说明MA显著增加了肺腺癌细胞对阿霉素的敏感性。

目前,免疫检验点阻断疗法在抗肿瘤方面取得了较好的成效,已有多个药物获得美国FDA批准应用于肺癌的临床治疗,如Nivolumab、Pembrolizumab和Atezolizumab等。然而,免疫检验点阻断疗法仅对部分肺癌患者有效,并且容易产生耐药性。因此,需要多药联合治疗来扩大应用人群或者克服耐药。近期, Yang等^[76]研究发现在黑色素

瘤细胞中敲低FTO的表达可以增加癌细胞对γ干扰素和抗程序性细胞死亡蛋白1(programmed cell death 1, PD-1)免疫疗法的敏感性。Han等^[77]研究发现在YTHDF1敲除鼠中皮下注射黑色素瘤细胞,同时联合程序性细胞死亡配体1(programmed cell death-ligand 1, PD-L1)免疫检验点阻断疗法,获得了较好的治疗效果。表明m⁶A相关蛋白在抗肿瘤免疫治疗中发挥着重要的作用。Xu等^[78]分析了肺鳞癌患者中的免疫细胞类型及m⁶A相关蛋白的表达情况,结果显示滤泡辅助性T细胞的免疫特征可以作为判断肺鳞癌总体生存期的独立预后因素,并且ALKBH5、METTL3、HNRNPC和KIAA1429的低表达能够增加免疫治疗的敏感性。因此,我们有理由相信m⁶A相关蛋白的抑制剂或激活剂与免疫治疗联合用药在非小细胞肺癌治疗中能够提高抗肿瘤效率。

m⁶A相关蛋白的抑制剂或激活剂的开发尚处于起步阶段,现有在研的m⁶A相关蛋白抑制剂或激活剂普遍存在活性低、特异性差、在细胞内影响的表型过于复杂以及其确切的作用机制难以阐明等问题。因此, m⁶A相关蛋白抑制剂或激活剂主要用于临床前实验研究,对癌症患者的治疗效果尚未见报道。随着药物合成与筛选技术的发展、药物改良工艺的进步和多药联合应用的探索,相信未来针对m⁶A修饰的靶向药物一定能够广泛应用于临床抗肿瘤治疗。

4 小结与展望

已有研究表明^[79], m⁶A修饰的改变在肿瘤发生发展中发挥着重要功能。m⁶A修饰相关蛋白通过调控一系列重要基因的剪接、出核、降解和翻译等,参与多种恶性肿瘤的发生发展。随着m⁶A修饰相关蛋白相继被发现,越来越多的研究集中在m⁶A修饰的潜在机制,从而推动了肿瘤生物学中m⁶A修饰相关信号通路的研究。

当然,关于m⁶A修饰仍有许多未解的谜题:①在生命活动中是否仍存在未知的m⁶A修饰相关蛋白,它们以何种方式参与m⁶A修饰的调控;②迄今为止,已鉴定的m⁶A相关蛋白中m⁶A识别蛋白种类是最多的,每种m⁶A识别蛋白发挥的功能也是不同的,它们是如何选择性识别并结合靶RNA的,它们之间是相互竞争的,还是相互协同的;③m⁶A相关蛋白中有些蛋白具有双重身份,同时具备促癌和抑癌的双重作用,它是以何身份来调控肿瘤的进程,又是以何种作用方式来发挥功能;④目前,已筛选到多种FTO抑制剂及METTL3/METTL14激活剂,研究发现能够明显抑制

肿瘤细胞增殖或逆转耐药, 但是对癌症患者的治疗效果仍未见报道, 所以我们期待更多的临床研究来验证m⁶A相关蛋白是否可以作为恶性肿瘤治疗的新靶点。

参考文献

- Fitzmaurice C, Abate D, Abbasi N, *et al.* Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 29 cancer groups, 1990 to 2017. *JAMA Oncol*, 2019, 5(12): 1749-1768. doi: 10.1001/jamaoncol.2019.2996
- Zheng RS, Sun KX, Zhang SW, *et al.* Report of cancer epidemiology in China, 2015. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, 2019, 41(1): 19-28. [郑荣寿, 孙可欣, 张思维, 等. 2015年中国恶性肿瘤流行情况分析. *中华肿瘤杂志*, 2019, 41(1): 19-28.] doi: 10.3760/cma.j.issn.0253-3766.2019.01.005
- Zappa C, Mousa SA. Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances. *Transl Lung Cancer Res*, 2016, 5(3): 288-300. doi: 10.21037/tlcr.2016.06.07
- Dominissini D, Moshkovitz SM, Schwartz S, *et al.* Topology of the human and mouse m⁶A RNA methylomes revealed by m⁶A-seq. *Nature*, 2012, 485(7397): 201-206. doi: 10.1038/nature11112
- Hall RH. A general procedure for the isolation of "minor" nucleosides from ribonucleic acid hydrolysates. *Biochemistry*, 1965, 4(4): 661-670. doi: 10.1021/bi00880a008
- Desrosiers R, Friderici K, Rottman F. Identification of methylated nucleosides in messenger RNA from Novikoff hepatoma cells. *Proc Natl Acad Sci*, 1974, 71(10): 3971-3975. doi: 10.1073/pnas.71.10.3971
- Knuckles P, Lence T, Haussmann IU, *et al.* Zc3h13/Flacc is required for adenosine methylation by bridging them RNA-binding factor Rbm15/Spenito to the m⁶A machinery component Wtap/Fl(2)d. *Genes Dev*, 2018, 32(5-6): 415-429. doi: 10.1101/gad.309146.117
- Bokar JA, Rath-Shambaugh ME, Ludwiczak R, *et al.* Characterization and partial purification of mRNA N⁶-adenosine methyltransferase from HeLa cell nuclei. *J Bio Chem*, 1994, 269(26): 17697-17704.
- Bujnicki JM, Feder M, Radlinska M, *et al.* Structure prediction and phylogenetic analysis of a functionally diverse family of proteins homologous to the MT-A70 subunit of the human mRNA: m(6)A methyltransferase. *J Mol Evol*, 2002, 55(4): 431-444. doi: 10.1007/s00239-002-2339-8
- Liu J, Yue Y, Han D, *et al.* A METTL3-METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N⁶-adenosine methylation. *Nat Chem Biol*, 2014, 10(2): 93-95. doi: 10.1038/nchembio.1432
- Ping XL, Sun BF, Wang L, *et al.* Mammalian WTAP is a regulatory subunit of the RNA N⁶-methyladenosine methyltransferase. *Cell Res*, 2014, 24(2): 177-189. doi: 10.1038/cr.2014.3
- Yue YN, Liu J, Cui XL, *et al.* VIRMA mediates preferential m⁶A mRNA methylation in 3'UTR and near stop codon and associates with alternative polyadenylation. *Cell Discov*, 2018, 4: 10. doi: 10.1038/s41421-018-0019-0
- Schwartz S, Mumbach MR, Jovanovic M, *et al.* Perturbation of m⁶A writers reveals two distinct classes of mRNA methylation at internal and 5' sites. *Cell Rep*, 2014, 8(1): 284-296. doi: 10.1016/j.celrep.2014.05.048
- Horiuchi K, Kawamura T, Iwanari H, *et al.* Identification of Wilms' tumor 1-associating protein complex and its role in alternative splicing and the cell cycle. *J Biol Chem*, 2013, 288(46): 33292-33302. doi: 10.1074/jbc.M113.500397
- Warda AS, Kretschmer J, Hackert P, *et al.* Human METTL16 is a N⁶-methyladenosine (m⁶A) methyltransferase that targets pre-mRNAs and various non-coding RNAs. *EMBO Rep*, 2017, 18(11): 2004-2014. doi: 10.15252/embr.201744940
- Pendleton KE, Chen B, Liu K, *et al.* The U6 snRNA m⁶A methyltransferase METTL16 regulates SAM synthetase intron retention. *Cell*, 2017, 169(5): 824-835. doi: 10.1016/j.cell.2017.05.003
- Jia G, Fu Y, Zhao X, *et al.* N⁶-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. *Nat Chem Biol*, 2011, 7(12): 885-887. doi: 10.1038/nchembio.687
- Mauer J, Luo X, Blanjoie A, *et al.* Reversible methylation of m⁶Am in the 5' cap controls mRNA stability. *Nature*, 2017, 541(7637): 371-375. doi: 10.1038/nature21022
- Su R, Dong L, Li C, *et al.* R-2HG exhibits anti-tumor activity by targeting FTO/m⁶A/MYC/CEBPA signaling. *Cell*, 2018, 172(1-2): 90-105. doi: 10.1016/j.cell.2017.11.031
- 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(1): 18-29. doi: 10.1016/j.molcel.2012.10.015
- Wang X, Zhao BS, Roundtree IA, *et al.* N⁶-methyladenosine modulates messenger RNA translation efficiency. *Cell*, 2015, 161(6): 1388-1399. doi: 10.1016/j.cell.2015.05.014
- Wang X, Lu ZK, Gomez A, *et al.* m⁶A-dependent regulation of messenger RNA stability. *Nature*, 2014, 505(7481): 117-120. doi: 10.1038/nature12730
- Du H, Zhao Y, He JQ, *et al.* YTHDF2 destabilizes m⁶A-containing RNA through direct recruitment of the CCR4-NOT deadenylase complex. *Nat Commun*, 2015, 7: 12626. doi: 10.1038/ncomms12626
- Park OH, Ha H, Lee Y, *et al.* Endoribonucleolytic cleavage of m⁶A-containing RNAs by RNase P/MRP complex. *Mol Cell*, 2019, 74(3): 494-507. doi: 10.1016/j.molcel.2019.02.034
- Shi H, Wang X, Lu Z, *et al.* YTHDF3 facilitates translation and decay of N⁶-methyladenosine-modified RNA. *Cell Res*, 2017, 27(3): 315-328. doi: 10.1038/cr.2017.15
- Xiao W, Adhikari S, Dahal U, *et al.* Nuclear m⁶A reader YTHDC1 regulates mRNA splicing. *Mol Cell*, 2016, 61(4): 507-519. doi: 10.1016/j.molcel.2016.01.012
- Roundtree IA, Luo GZ, Zhang Z, *et al.* YTHDC1 mediates nuclear export of N⁶-methyladenosine methylated mRNAs. *Elife*, 2017, 6: e31311. doi: 10.7554/eLife.31311
- Hsu PJ, Zhu YF, Ma HG, *et al.* Ythdc2 is an N⁶-methyladenosine binding

- protein that regulates mammalian spermatogenesis. *Cell Res*, 2017, 27: 1115-1127. doi: 10.1038/cr.2017.99
- 29 Mao Y, Dong L, Liu XM, *et al.* m⁶A in mRNA coding regions promotes translation via the RNA helicase-containing YTHDC2. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 5332. doi: 10.1038/s41467-019-13317-9
- 30 Alarcon CR, Goodarzi H, Lee H, *et al.* HNRNPA2B1 is a mediator of m⁶A-dependent nuclear RNA processing events. *Cell*, 2015, 162(6): 1299-1308. doi: 10.1016/j.cell.2015.08.011
- 31 Wu BX, Su SC, Patil DP, *et al.* Molecular basis for the specific and multivalent recognitions of RNA substrates by human hnRNP A2/B1. *Nat Commun*, 2018, 9: 420. doi: 10.1038/s41467-017-02770-z
- 32 Liu N, Dai Q, Zheng G, *et al.* N⁶-methyladenosine-dependent RNA structural switches regulate RNA-protein interactions. *Nature*, 2015, 518(7540): 560-564. doi: 10.1038/nature14234
- 33 Liu N, Zhou KI, Parisien M, *et al.* N⁶-methyladenosine alters RNA structure to regulate binding of a low-complexity protein. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(10): 6051-6063. doi: 10.1093/nar/gkx141
- 34 Meyer KD, Pati DP, Zhou J, *et al.* 5'UTR m⁶A promotes Cap-independent translation. *Cell*, 2015, 163(4): 999-1010. doi: 10.1016/j.cell.2015.10.012
- 35 Huang H, Weng H, Sun W, *et al.* Recognition of RNA N⁶-methyladenosine by IGF2BP proteins enhances mRNA stability and translation. *Nat Cell Biol*, 2018, 20(3): 285-295. doi: 10.1038/s41556-018-0045-z
- 36 Geula S, Moshkovitz SM, Dominissini D, *et al.* m⁶A mRNA methylation facilitates resolution of naive pluripotency toward differentiation. *Science*, 2015, 347(6225): 1002-1006. doi: 10.1126/science.1261417
- 37 Chen M, Wei L, Law CT, *et al.* RNA N⁶-methyladenosine methyltransferase-like 3 promotes liver cancer progression through YTHDF2-dependent posttranscriptional silencing of SOCS2. *Hepatology*, 2018, 67(6): 2254-2270. doi: 10.1002/hep.29683
- 38 Cai X, Wang X, Cao C, *et al.* HBXIP-elevated methyltransferase METTL3 promotes the progression of breast cancer via inhibiting tumor suppressor let-7g. *Cancer Lett*, 2018, 415: 11-19. doi: 10.1016/j.canlet.2017.11.018
- 39 Lin X, Chai G, Wu Y, *et al.* RNA m⁶A methylation regulates the epithelial mesenchymal transition of cancer cells and translation of Snail. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 2065. doi: 10.1038/s41467-019-09865-9
- 40 Jin D, Guo J, Wu Y, *et al.* m⁶A mRNA methylation initiated by METTL3 directly promotes YAP translation and increases YAP activity by regulating the MALAT1-miR-1914-3p-YAP axis to induce NSCLC drug resistance and metastasis. *J Hematol Oncol*, 2019, 12(1): 135. doi: 10.1186/s13045-019-0830-6
- 41 Du Y, Hou G, Zhang H, *et al.* SUMOylation of the m⁶A-RNA methyltransferase METTL3 modulates its function. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(10): 5195-5208. doi: 10.1093/nar/gky156
- 42 Choe J, Lin S, Zhang W, *et al.* mRNA circularization by METTL3-*elF3h* enhances translation and promotes oncogenesis. *Nature*, 2018, 561(7724): 556-560. doi: 10.1038/s41586-018-0538-8
- 43 Lin S, Choe J, Du P, *et al.* The m⁶A methyltransferase METTL3 promotes translation in human cancer cells. *Mol Cell*, 2016, 62(3): 335-345. doi: 10.1016/j.molcel.2016.03.021
- 44 Wei W, Huo B, Shi X. miR-600 inhibits lung cancer via downregulating the expression of METTL3. *Cancer Manag Res*, 2019, 11: 1177-1187. doi: 10.2147/CMAR.S181058
- 45 Du M, Zhang Y, Mao Y, *et al.* MiR-33a suppresses proliferation of NSCLC cells via targeting METTL3 mRNA. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 482(4): 582-589. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.11.077
- 46 Shi Y, Fan S, Wu M, *et al.* YTHDF1 links hypoxia adaptation and non-small cell lung cancer progression. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 4892. doi: 10.1038/s41467-019-12801-6
- 47 Sheng H, Li Z, Su SX, *et al.* YTH domain family 2 promotes lung cancer cell growth by facilitating 6-phosphogluconate dehydrogenase mRNA translation. *Carcinogenesis*, 2020, 41(5): 541-550. doi: 10.1093/carcin/bgz152
- 48 Li J, Han Y, Zhang H, *et al.* The m⁶A demethylase FTO promotes the growth of lung cancer cells by regulating the m⁶A level of USP7 mRNA. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 512(3): 479-485. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.03.093
- 49 Zhu Z, Qian Q, Zhao X, *et al.* N⁶-methyladenosine (m⁶A) ALKBH5 promotes the non-small cell lung cancer progress by regulating TIMP3 stability. *Gene*, 2020, 731: 144348. doi: 10.1016/j.gene.2020.144348
- 50 Wanna-Udom S, Terashima M, Lyu H, *et al.* The m⁶A methyltransferase METTL3 contributes to transforming growth factor-beta-induced epithelial-mesenchymal transition of lung cancer cells through the regulation of JUNB. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 524(1): 150-155. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.01.042
- 51 Wang H, Deng Q, Lv Z, *et al.* N⁶-methyladenosine induced miR-143-3p promotes the brain metastasis of lung cancer via regulation of VASH1. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 181. doi: 10.1186/s12943-019-1108-x
- 52 Liu J, Ren D, Du Z, *et al.* m⁶A demethylase FTO facilitates tumor progression in lung squamous cell carcinoma by regulating MZF1 expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 502(4): 456-464. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.05.175
- 53 Chao Y, Shang J, Ji WD. ALKBH5-m⁶A-FOXO1 signaling axis promotes proliferation and invasion of lung adenocarcinoma cells under intermittent hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 521(2): 499-506. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.10.145
- 54 Jin D, Guo J, Wu Y, *et al.* m⁶A demethylase ALKBH5 inhibits tumor growth and metastasis by reducing YTHDFs-mediated YAP expression and inhibiting miR-107/LATS2-mediated YAP activity in NSCLC. *Mol Cancer*, 2020, 19: 40. doi: 10.1186/s12943-020-01161-1
- 55 Meng QQ, Wang SY, Zhou SH, *et al.* Dissecting the m⁶A methylation affection on afatinib resistance in non-small cell lung cancer. *Pharmacogenomics J*, 2019, 20: 227-234. doi: 10.1038/s41397-019-0110-4
- 56 Huang W, Qi CB, Lv SW, *et al.* Determination of DNA and RNA epigenetic modifications in circulating tumor cells by mass spectrometry. *Anal Chem*, 2016, 88(2): 1378-1384. doi: 10.1021/acs.

- analchem.5b03962
- 57 Cheng SB, Xie M, Chen Y, *et al.* Three-dimensional scaffold chip with thermosensitive coating for capture and reversible release of individual and cluster of circulating tumor cells. *Anal Chem*, 2017, 89(15): 7924-7932. doi: 10.1021/acs.analchem.7b00905
- 58 Zhang YY, Liu X, Liu LW, *et al.* Expression and prognostic significance of m⁶A-related genes in lung adenocarcinoma. *Med Sci Monit*, 2020, 26: e919644. doi: 10.12659/msm.919644
- 59 Liu Y, Guo X, Zhao M, *et al.* Contributions and prognostic values of m⁶A RNA methylation regulators in non-small-cell lung cancer. *J Cell Physiol*, 2020: 1-15. doi: 10.1002/jcp.29531
- 60 Kaminskas E, Farrell AT, Wang Y, *et al.* FDA drug approval summary: azacitidine (5-azacytidine, Vidaza™) for injectable suspension. *Oncologist*, 2005, 10(3): 176-182. doi: 10.1634/theoncologist.10-3-176
- 61 Gore SD, Jones C, Kirkpatrick P. Decitabine. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, 5(11): 891-892. doi: 10.1038/nrd2180
- 62 Lu X, Ning Z, Li Z, *et al.* Development of chidamide for peripheral T-cell lymphoma, the first orphan drug approved in China. *Intractable Rare Dis Res*, 2016, 5(3): 185-191. doi: 10.5582/irdr.2016.01024
- 63 Chen BE, Ye F, Yu L, *et al.* Development of cell-active N⁶-methyladenosine RNA demethylase FTO inhibitor. *J Am Chem Soc*, 2012, 134(43): 17963-17971. doi: 10.1021/ja3064149
- 64 Yang L, Li JF, Xu LY, *et al.* Rhein shows potent efficacy against non-small-cell lung cancer through inhibiting the STAT3 pathway. *Cancer Manag Res*, 2019, 11: 1167-1176. doi: 10.2147/CMAR.S171517
- 65 Gorkom B, Timmer-Bosscha H, Jong S, *et al.* Cytotoxicity of rhein, the active metabolite of sennoside laxatives, is reduced by multidrug resistance-associated protein 1. *Br J Cancer*, 2002, 86(9): 1494-1500. doi: 10.1038/sj/bjc/6600255
- 66 Huang Y, Yan JL, Li Q, *et al.* Meclofenamic acid selectively inhibits FTO demethylation of m⁶A over ALKBH5. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(1): 373-384. doi: 10.1093/nar/gku1276
- 67 Demertzi DK, Staninska M, Garcia-Santos I, *et al.* Synthesis, crystal structures and spectroscopy of meclofenamic acid and its metal complexes with manganese (II), copper (II), zinc (II) and cadmium (II) antiproliferative and superoxide dismutase activity. *J Inorg Biochem*, 2011, 105(9): 1187-1195. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2011.05.025
- 68 Demertzi DK, Dokorou V, Primikiri A, *et al.* Organotin meclofenamic complexes: synthesis, crystal structures and antiproliferative activity of the first complexes of meclofenamic acid-novel anti-tuberculosis agents. *J Inorg Biochem*, 2009, 103(5): 738-744. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2009.01.014
- 69 Huang Y, Su R, Sheng Y, *et al.* Small-molecule targeting of oncogenic FTO demethylase in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*, 2019, 35: 677-691. doi: 10.1016/j.ccell.2019.03.006
- 70 Selberg S, Blokhina D, Aatonen M, *et al.* Discovery of small molecules that activate RNA methylation through cooperative binding to the METTL3-14-WTAP complex active site. *Cell Rep*, 2019, 26(13): 3762-3771. doi: 10.1016/j.celrep.2019.02.100
- 71 Zhu J, Wang M, Hu DX. Deciphering N⁶-methyladenosine-related genes signature to predict survival in lung adenocarcinoma. *Biomed Res Int*, 2020: 2514230. doi: 10.1155/2020/2514230
- 72 Easwaran H, Tsai HC, Baylin S. Cancer epigenetics: tumor heterogeneity, plasticity of stem-like states, and drug resistance. *Mol Cell*, 2014, 54(5): 716-727. doi: 10.1016/j.molcel.2014.05.015
- 73 Hanna N, Shepherd FA, Fossella FV, *et al.* Randomized phase III trial of pemetrexed versus docetaxelin patients with non-small-cell lung cancer previously treated with chemotherapy. *J Clin Oncol*, 2004, 22(9): 1589-1597. doi: 10.1200/JCO.2004.08.163
- 74 Bu TC, Wang CY, Jin H, *et al.* Organic anion transporters and PI3K-AKT-mTOR pathway mediate the synergistic anticancer effect of pemetrexed and rhein. *J Cell Physiol*, 2020, 235(4):3309-3319. doi: 10.1002/jcp.29218
- 75 Duffy CP, Elliott CJ, O'Connor RA, *et al.* Enhancement of chemotherapeutic drug toxicity to human tumour cells in vitro by a subset of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Eur J Cancer*, 1998, 34(8): 1250-1259. doi: 10.1016/s0959-8049(98)00045-8
- 76 Yang SW, Wei JB, Cui YH, *et al.* m(6)a mRNA demethylase FTO regulates melanoma tumorigenicity and response to anti-PD-1 blockade. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 2782. doi: 10.1038/s41467-019-10669-0
- 77 Han DL, Liu J, Chen CY, *et al.* Anti-tumour immunity controlled through mRNA m(6)a methylation and YTHDF1 in dendritic cells. *Nature*, 2019, 566(7743): 270-274. doi: 10.1038/s41586-019-0916-x
- 78 Xu F, Zhang HP, Chen JX, *et al.* Immune signature of T follicular helper cells predicts clinical prognostic and therapeutic impact in lung squamous cell carcinoma. *Int Immunopharmacol*, 2020, 81: 105932. doi: 10.1016/j.intimp.2019.105932
- 79 Liu SP, Li QJ, Chen K, *et al.* The emerging molecular mechanism of m⁶A modulators in tumorigenesis and cancer progression. *Biomed Pharmacother*, 2020, 127: 110098. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110098

(收稿: 2020-04-26 修回: 2020-06-28 接受: 2020-07-06)

(本文编辑 丁燕)



Cite this article as: Pan HL, Li XB, Chen C, *et al.* Research Advances of m⁶A RNA Methylation in Non-small Cell Lung Cancer. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*, 2020, 23(11): 961-969. [潘红丽, 李雪冰, 陈琛, 等. m⁶A RNA甲基化在非小细胞肺癌中的研究进展. *中国肺癌杂志*, 2020, 23(11): 961-969.] doi: 10.3779/j.issn.1009-3419.2020.102.35