



N⁶-甲基腺苷修饰 (m⁶A) 在乳腺癌中的研究进展*

方润平^{2)**} 许飞飞^{2)**} 赵路萍¹⁾ 于露¹⁾ 蔡晓丽²⁾ 杨哲³⁾张伟英²⁾ 叶丽虹²⁾ 史慧^{1)***}

(1) 济宁医学院免疫与分子研究所, 济宁 272067; (2) 南开大学生物化学与分子生物学实验室, 天津 300071;

(3) 辽宁大学生命科学学院, 沈阳 110036)

摘要 乳腺癌是女性最常见的癌症之一, 也是导致女性癌症死亡的最主要原因. 尽管早期乳腺癌的治疗已经取得了极大进展, 但晚期伴转移乳腺癌治疗效果较差, 具有高复发率和高死亡率. 因此, 鉴定新的用于诊断和预测乳腺癌转移的分子标记、开发新的治疗策略成为迫切需要. 近年来, mRNA 的异常 N⁶-甲基腺苷修饰 (N⁶-methyladenosine, m⁶A) 对癌基因功能和表达水平的表观遗传学调控逐渐成为恶性乳腺癌研究的焦点. 本文分析和总结了 m⁶A 甲基化修饰及其调节蛋白参与调控乳腺癌发生发展的最新研究进展, 以期对乳腺癌中 m⁶A 甲基化修饰研究提供新的思路 and 参考, 进一步为乳腺癌的诊断、治疗、预后及监测提供新的有效策略.

关键词 m⁶A, m⁶A 调节蛋白, RNA 修饰, 表观遗传, 乳腺癌

中图分类号 R730.2, R730.5

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0347

在全球范围内, 乳腺癌是女性最常见的癌症之一, 是女性癌症相关死亡的第二大原因^[1-2]. 目前乳腺癌的治疗主要集中在手术干预、放射治疗或这些治疗手段的组合, 基于局部治疗和抗癌药物, 包括化疗、激素治疗和靶向治疗^[3-5]. 然而, 全面的治疗策略仍然有限, 一些患者的肿瘤最终发展为更有侵略性的恶性形式, 并且对常见的治疗产生了耐药性^[6-7]. 因此, 根治乳腺癌仍然是严峻的挑战, 开发新的治疗策略成为迫切需要.

N⁶-甲基腺苷修饰 (N⁶-methyladenosine, m⁶A) 是 mRNA 最普遍和最丰富的修饰, 在 7 600 多个 mRNA 转录本中都检测到一致的 R-R-A-C-H 基序 (R = G 或 A; H = A、C 或 U)^[8-9]. m⁶A 甲基化修饰对 mRNA 的剪接过程、稳定性、翻译效率和核滞留等均可产生重要影响^[10]. m⁶A 甲基化修饰通过甲基转移酶、去甲基转移酶和甲基化识别蛋白质, 在表观遗传水平上调控原癌基因、抑癌基因等的表达, 进而影响肿瘤的发生发展^[11-13]. 越来越多的研

究表明, m⁶A 修饰参与了人类复杂疾病的发生发展过程, 尤其在癌症的发生发展中扮演着重要的角色^[14-17]. 目前, 研究者们对 m⁶A 甲基化在乳腺癌中的调控机制了解仍然有限, 对 m⁶A 甲基化在乳腺癌发生发展中的作用具有浓厚的兴趣. 本文分析和总结了近几年 m⁶A 甲基化修饰和 m⁶A 调节蛋白在乳腺癌中的作用及其分子机制的研究进展, 以期对乳腺癌中 m⁶A 甲基化研究提供新的思路 and 参考, 进一步为乳腺癌的诊断、治疗、预后及监测提供新的有效策略.

* 国家自然科学基金(81802856, 31800688), 山东省高等学校科技计划项目(J17KA230), 山东省大学生创新创业训练计划项目(201910443011)和地方高校国家级大学生创新创业训练计划项目(201610443043)资助.

** 并列第一作者.

*** 通讯联系人.

Tel: 0537-3616283, E-mail: 8858shihui@163.com

收稿日期: 2020-09-30, 接受日期: 2020-10-30

1 m⁶A修饰与调控

1.1 m⁶A修饰

早在20世纪70年代, Desrosiers等^[18]在哺乳动物细胞mRNA中发现了m⁶A的存在, 但是m⁶A的功能和作用机制却因为技术难题一直鲜有研究。直到2011年, 芝加哥大学何川教授团队揭示m⁶A的可逆化修饰, 使m⁶A的研究重新热门起来^[19-20]。m⁶A发生在RNA转录后水平腺苷氮原子的第6位置, S-腺苷甲硫氨酸作为m⁶A形成的甲基供体, 称为m⁶A修饰^[21]。m⁶A免疫沉淀测序技术证实, 人类大约25%的转录本具有m⁶A修饰, 并且m⁶A修饰富集于终止密码子周围, 5'-和3'-非翻译区和长居间外显子中^[22]。m⁶A位点具有典型的进化保守性, 在所有m⁶A位点中约90%的位点发现了保守的G-A-C和A-A-C基序^[23-24]。

1.2 m⁶A修饰的调控

参与m⁶A修饰的调节蛋白分为3种类型: “编码器”(“writer”)——甲基转移酶、“消码器”(“eraser”)——去甲基转移酶和“读码器”(“reader”)——甲基识别蛋白^[15]。m⁶A修饰的可逆活性是由“编码器”复合物和“消码器”共同调节的^[11]。已知编码器复合物含有甲基转移酶3 (methyltransferase like 3, METTL3)、甲基转移酶14 (methyltransferase like 14, METTL14)、维尔姆斯氏瘤蛋白1相关蛋白 (Wilms' tumor 1-associated protein, WTAP) 和其他蛋白质, 包括RNA结合基序蛋白15和15B (RNA-binding motif protein 15/15B, RBM15/15B)、KIAA1429 (VIRMA)、锌指CCCH结合域蛋白13 (zinc finger CCCH domain-containing protein, ZC3H13) 和casitas b系淋巴瘤转化序列样蛋白1 (casitas B-lineage lymphoma-transforming sequence-like protein 1, CBLL1), 其中METTL3起核心作用, METTL14在结构上辅助METTL3蛋白, WTAP通过招募METTL3和METTL14到核斑中促进m⁶A修饰过程^[25]。RBM15和RBM15B结合METTL3和WTAP, 将这两个蛋白质引导至特定的RNA位点进行m⁶A修饰。KIAA1429则优先介导3'非翻译区和终止密码子区域附近的m⁶A甲基化^[25-26]。ZC3H13与其他辅助因子如WTAP一起控制核m⁶A^[26]。CBLL1最初是通过与WTAP的相互作用被识别出来的, 目前存在于植物和动物中。甲基转移酶16 (methyltransferase like 16, METTL16) 是一种新发现的m⁶A甲基转

移酶, 主要甲基化mRNA 3'非翻译区的m⁶A位点^[27]。目前已知的可以逆转m⁶A修饰的去甲基转移酶包括肥胖相关蛋白 (fat mass and obesity-associated protein, FTO) 和 α -酮戊二酸依赖双加氧酶 alkB 同源蛋白 5 (α -Ketoglutarate-dependent dioxygenase alkB homolog 5, ALKBH5)^[28-29]。m⁶A的“读码器”蛋白有多种, 其中包括YT521-B同源性结构域蛋白 (YTH domain-containing proteins) (包括YTHDF1/2/3和YTHDC1/2)、胰岛素样生长因子2结合蛋白1/2/3 (insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1/2/3, IGF2BP1/2/3)、真核起始因子3 (eukaryotic translation initiation factor 3, EIF3)、核不均一核糖蛋白A2/B1 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1, HNRNPA2B1)、核不均一核糖蛋白C (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C, HNRNPC)、核不均一核糖蛋白G (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G, HNRNPG)、脆性X智力低下蛋白 (fragile X mental retardation protein, FMRP) 和多脯氨酸螺旋蛋白 (proline rich coiled-coil 2A, PRRC2A)^[11]。这些“读码器”蛋白可以识别m⁶A修饰, 参与mRNA的翻译、稳定、剪接或核输出^[21]。不同位置的“读码器”蛋白可能发挥不同的功能: 细胞核内的“读码器”蛋白如HNRNPC、HNRNPA2B1和YTHDC1负责RNA结构转换、选择性剪接、microRNA成熟、RNA稳定性、RNA输出和X染色体失活; 而细胞质中的“读码器”蛋白YTHDF1/2/3和YTHDC2主要负责mRNA的翻译和降解^[8] (图1)。

2 m⁶A修饰以及m⁶A调节蛋白在乳腺癌中的作用

越来越多的研究表明, m⁶A与乳腺癌的发生发展密切相关。m⁶A调节蛋白是肿瘤发生发展中的重要调节因子, 其表达水平的高低往往直接决定了肿瘤的病理学进程^[15, 30]。一方面, m⁶A调控癌基因或抑癌基因的表达, 从而影响乳腺癌^[21]。另一方面, m⁶A调节蛋白 (“writer”、“eraser”和“reader”) 也通过m⁶A依赖或者非依赖的方式参与乳腺癌进展^[31-33] (表1)。m⁶A与乳腺肿瘤的增殖、迁移和浸润密切相关, 这提示m⁶A以及相关调节蛋白可能是潜在的药物靶点。

2.1 “编码器”——甲基转移酶

2.1.1 METTL3

METTL3是m⁶A甲基转移酶复合物的第一个特征成员，在从酵母到人类的真核生物中高度保守^[34]。Wang等^[12]发现METTL3在乳腺癌中的表达显著升高，METTL3的升高增加乳腺癌细胞中mRNA甲基化水平，抑制细胞凋亡，同时促进肿瘤增殖和肿瘤生长。基因特异性m⁶A-qPCR结果显示，METTL3表达的改变可以调节乳腺癌细胞中B

淋巴细胞瘤2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 基因mRNA的m⁶A水平^[12]。METTL3的表达可以被癌蛋白乙肝x蛋白-相互作用蛋白 (hepatitis B virus x interacting protein, HBXIP) 调控，HBXIP通过抑制靶向METTL3的miRNA let-7g表达水平上调METTL3，METTL3的升高通过正反馈增加mRNA中m⁶A修饰从而提高HBXIP的水平，促进乳腺癌增殖^[35]。

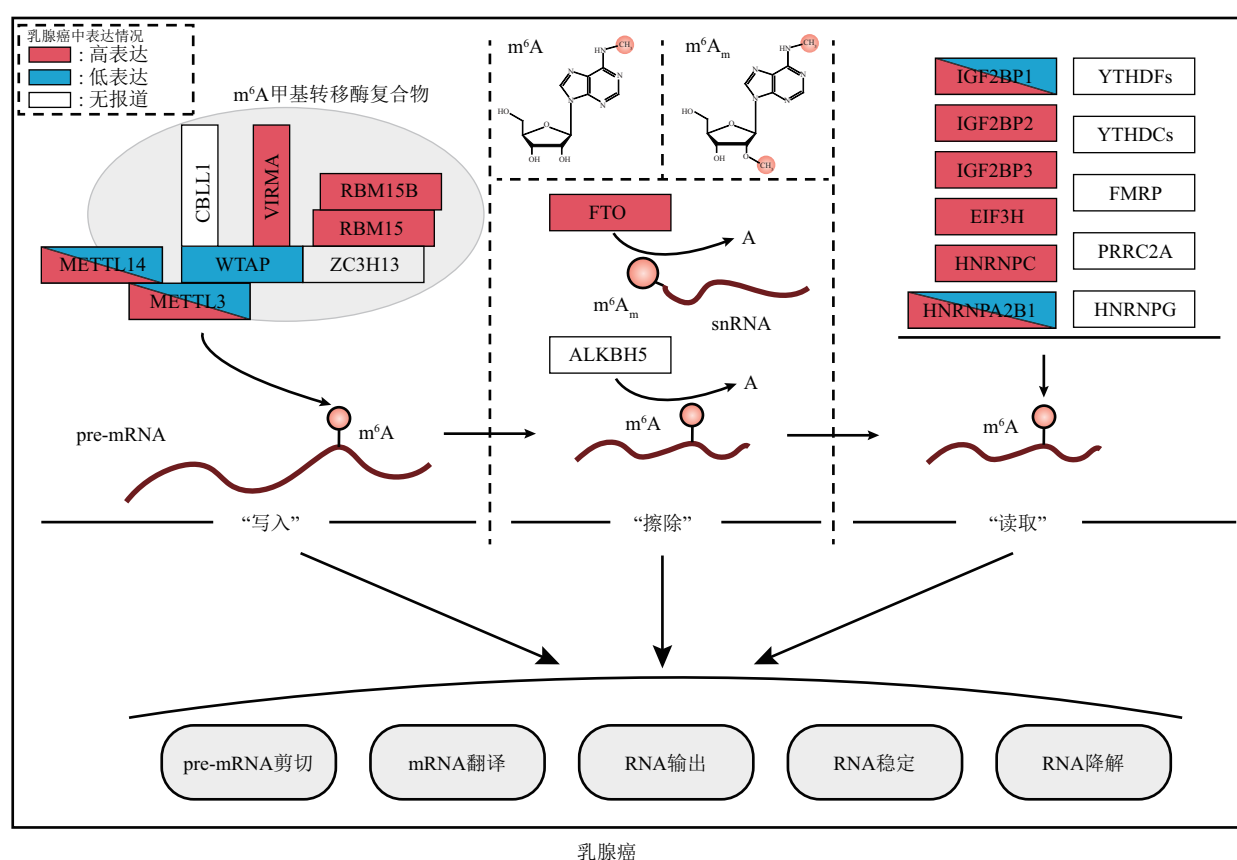


Fig. 1 m⁶A modification and their regulatory proteins in breast cancer

图1 乳腺癌中m⁶A修饰及其调节蛋白

“编码器”蛋白包括METTL3、METTL14、WTAP、KIAA1429、RBM15、RBM15B、CBL1和ZC3H13；“消码器”蛋白包括FTO和ALKBH5；“读码器”蛋白包括YTH家族蛋白、IGF2BP家族蛋白、EIF3H、HNRNPC、HNRNPA2B1、HNRNPG、FMRP和PRRC2A。红色代表在乳腺癌中高表达，蓝色代表在乳腺癌中低表达，白色代表该蛋白质的表达在乳腺癌中未报道或不显著。

2.1.2 METTL14

METTL14在乳腺癌中的表达也是显著升高的，并且通过调节m⁶A促进乳腺癌细胞迁移和侵袭^[32]。METTL14可以上调hsa-miR-146a-5p的表达，增强乳腺癌细胞的迁移和侵袭^[32]。此外，长链非编码RNA LINC00942 (LNC942) 与

METTL14的表达在乳腺癌细胞和组织中呈正相关，LNC942可以促进METTL14介导的m⁶A，调控其靶基因C-X-C基序趋化因子受体4 (C-X-C motif chemokine receptor 4, CXCR4) 和细胞色素P450家族1亚家族B成员1 (cytochrome P450 family 1 subfamily B member 1, CYP1B1) 的表达和稳定

性, 促进乳腺肿瘤的生长^[36]. 然而, 另一项相反的研究表明 METTL3 和 METTL14 可能是乳腺癌的抑癌基因^[34]. 研究者通过对来自 Oncomine 和 The Cancer Genome Atlas (TCGA) 数据库的 36 对乳腺癌和癌旁组织的联合分析发现, 包括 METTL3 和 METTL14 在内的所有 m⁶A 甲基转移酶在乳腺癌组织中的表达都降低了. 这些研究人员还注意到相比基底样和 HER2 阳性组织, METTL3 和 METTL14 在正常乳腺样型和管腔型乳腺癌亚型中的表达是上调的^[34].

2.1.3 WTAP

WTAP 是 m⁶A 甲基转移酶复合物的一个重要组成成员^[11]. 乳腺癌 TCGA 数据显示, 与正常组织相比, 乳腺癌样本中 WTAP 的表达减少了 1.883 倍; 利用临床乳腺癌患者组织进行 PCR 检测发现, WTAP 的表达量相比于正常乳腺组织减少 69.04%^[34]. 此外, WTAP mRNA 的低水平与雌激素受体 (estrogen receptor, ER) 阳性或孕激素受体 (progesterone receptor, PR) 阳性状态相关, WTAP 的 mRNA 在基底样型乳腺癌中表达水平最高, 其次为正常乳腺样型乳腺癌^[34].

2.1.4 KIAA1429 (VIRMA)

KIAA1429 (VIRMA) 是 m⁶A 甲基转移酶复合物中的成员. KIAA1429 是一个大分子质量蛋白质, 可能作为甲基转移酶复合体的支架, 通过其 N-KIAA1429 结构域, 在 METTL3/METTL14/WTAP 的催化核心组分与 RNA 底物之间起桥梁作用, 从而影响 m⁶A 在特定位置的安装^[11]. 乳腺癌患者中高表达 KIAA1429 的总生存期明显短于低表达 KIAA1429 的总生存期. 体内和体外实验表明 KIAA1429 与乳腺癌的增殖和转移有关. RNA 免疫沉淀反应测序显示周期蛋白依赖性激酶 1 (cyclin-dependent kinase 1, CDK1) 是 KIAA1429 调节的下游基因^[37]. 值得注意的是, KIAA1429 上调 CDK1 的表达是通过 m⁶A 非依赖的方式^[37].

2.1.5 RBM15/15B

RBM15/15B 在乳腺癌中的研究非常有限. 有报道称 RBM15/15B 在浸润性乳腺癌中呈高表达, 但其在乳腺癌中的表达及功能仍有待进一步研究^[38-39].

2.1.6 CBLL1

CBLL1 是一种 E3 泛素连接酶, 调节 E 钙黏附蛋白 (E-cadherin) 的内吞作用, 在细胞增殖和肿瘤发生中发挥重要作用. 在乳腺癌中, 瞬时转染的

CBLL1 通过直接与 ER α 结合抑制了 ER α 转录活性, 干扰其他共激活因子的招募进而抑制了 ER α 依赖的乳腺癌细胞增殖和迁移. 因此, CBLL1 作为乳腺癌细胞中的转录协同调节因子发挥作用^[40].

总之, m⁶A “编码器”复合物的不同成员在乳腺癌进展中发挥促癌或抑癌作用, 但是研究的深度相当有限. METTL3 和 METTL14 角色的多样性反映了乳腺癌细胞系和临床样本的异质性. 因此, 还需要进一步深入的研究来解释这些矛盾, 并且阐明 m⁶A “编码器”复合物不同成员在乳腺癌发生发展中的具体作用及调节机制.

2.2 “消码器”——去甲基转移酶

2.2.1 FTO

和“编码器”一样, m⁶A “消码器”在乳腺癌中也扮演着同等重要的角色. 临床数据显示, FTO 表达水平高的患者表现出更低的生存率^[41], 并且在三阴性乳腺癌 (triple-negative breast cancer, TNBC) 中, FTO 表达水平高的患者显示出更低的远端转移生存率^[69]. 最近的一项研究表明, HER2 阳性乳腺癌组织中, FTO 表达水平显著升高, 敲除 FTO 的表达在体内及体外均能明显抑制乳腺癌细胞的增殖和转移^[33]. 进一步的实验表明, FTO 介导 BCL2 相互作用蛋白 3 (Bcl2 interacting protein 3, BNIP3) 基因 mRNA 3'UTR 的 m⁶A 去甲基化并诱导其降解^[42]. 此外, 还有文献报道 FTO 的促癌作用机制在于参与 ATP 生成过程, 包括通过 PI3K/AKT 信号通路促进糖酵解和乳酸生成^[43].

2.2.2 ALKBH5

乳腺癌干细胞 (breast cancer stem cells, BCSCs) 是一组通过自我更新能够无限增殖的细胞亚群, BCSCs 可形成复发性或转移性肿瘤^[44]. 乳腺癌细胞在缺氧环境中会增加 BCSCs 的比例, 这是肿瘤起始和转移所必需的条件, 并且这种反应取决于低氧诱导因子 (hypoxia inducible factor, HIF) 的活性. 缺氧条件会诱导 m⁶A 去甲基化酶 ALKBH5 在乳腺癌细胞中的表达, ALKBH5 通过去甲基化使多能性因子 NANOG 的 mRNA 稳定, 进而促进 BCSCs 中 NANOG 的表达, 从而增加 BCSCs 的比例. 在功能上, 敲除 ALKBH5 基因可抑制乳腺癌细胞活力、克隆形成和细胞迁移^[44]. 此外, HIF 还通过 ZNF217 (一种 m⁶A 甲基转移酶抑制子) 和 ALKBH5 介导的 RNA 甲基化来调控乳腺癌细胞中其他多能因子表达. ZNF217 与 ALKBH5 相互作用并抑制多能性因子 NANOG 和 KLF mRNA 的 m⁶A

Table 1 List of the expression and function of m⁶A regulatory proteins in breast cancer表1 乳腺癌中m⁶A调节蛋白的表达与功能

m ⁶ A调节蛋白	m ⁶ A 修饰类型	表达 趋势	靶基因	乳腺癌发生发展	文献
METTL3	writer	上调 下调	HBXIP Bcl-2	促进细胞增殖 抑制细胞凋亡	[12, 34-35]
METTL14	writer	上调 下调	has-miR-146a-5p CXCR4、CYP1B1	促进细胞增殖、迁移和侵袭、促进细胞集落形 成、促进细胞周期 抑制克隆形成和细胞活力	[32, 34, 36]
WTAP	writer	下调	——	——	[34]
VIRMA/KIAA1429	writer	上调	CDK1	促进细胞增殖和转移	[37]
RBM15	writer	上调	——	——	[38-39]
RBM15B	writer	上调	——	——	[38-39]
CBLL1	writer	——	ER α	抑制细胞增殖和迁移	[40]
FTO	eraser	上调	BNIP PI3K/AKT	促进细胞增殖和转移、促进细胞克隆形成能力、 提高ATP产量，促进糖酵解和乳酸形成	[33, 41-43]
ALKBH5	eraser	——	NANOG	促进细胞活力、克隆形成和转移	[44-45]
IGF2BP1/IMP1	reader	上调 下调	UCA1 c-MYC、IGF-II	促进细胞增殖，减少侵袭和转移 抑制肿瘤生长	[46-49]
IGF2BP2/IMP2	reader	上调	PR RPSAP52	促进转移、迁移和增长、促进自我更新	[50-53]
IGF2BP3/IMP3	reader	上调	WNT5B BCRP CD44 CERS6	促进细胞增殖，侵袭和转移、促进细胞耐药、 促进细胞干性	[50, 54-60]
EIF3H	reader	上调	YAP	促进细胞迁移和转移	[61-62]
HNRNPC	reader	上调	——	促进细胞增殖	[63-64]
HNRNPA2B1	reader	上调 下调	STAT3、ERK1/2 ERK-MAPK/Twist GR-beta/TCF4 PFN2	促进细胞增殖，减少细胞凋亡 抑制细胞转移	[65-68]

甲基化，最终导致KLF4和NANOG表达升高，从而促进乳腺癌发生^[45]。基于乳腺癌公共数据库的分析指出，ALKBH5在乳腺癌与正常乳腺组织中的表达无显著差异^[69]，提示ALKBH5在乳腺癌中的表达可能主要受缺氧条件的诱导^[44]。

这些结果表明，m⁶A“消码器”在乳腺癌发生发展中同样具有重要作用，也可能是乳腺癌治疗的潜在药物靶点。

2.3 “读码器”——甲基识别蛋白

2.3.1 YTH家族蛋白

含有YT521-B同源性域(YTH)的蛋白质YTHDF1、YTHDF2、YTHDF3、YTHDC1和YTHDC2被鉴定为mRNA上m⁶A标记的“读码器”蛋白^[70]。它们对m⁶A甲基化的mRNA的亲和力比

未甲基化的mRNA高10~50倍。当在不同的细胞环境中受到干扰时，单个的YTH家族蛋白与不同的m⁶A位点亚群相互作用，并对基因表达产生不同的影响^[70]。TCGA数据分析显示，YTHDF1和YTHDF3在乳腺癌组织中呈高表达并且和淋巴结转移及不良预后有关^[31]。然而，关于YTH家族蛋白在乳腺癌中的调控机制尚未报道，仍存在很大的研究空间。

2.3.2 IGF2BP家族蛋白

长期以来，包括IGF2BP1、IGF2BP2和IGF2BP3在内的IGF2BP家族被认为是乳腺癌进展的重要调节因子^[50, 71]。IGF2BP1可以抑制MDA-MB-231细胞增殖和转移^[46-47]。另一项研究表明，IGF2BP1与长链非编码RNA——UCA1相互作用，

并通过招募 CCR4-NOT1 腺嘌呤酶复合物降解 UCA1. 进一步实验表明 UCA1 可以作为内源性 miR-122-5p 的分子海绵, 而 miR-122-5p 是多种细胞侵袭相关基因的 mRNA 的抑制因子. 因此 IGF2BP1 与 UCA1 的相互作用阻止了 miR-122-5p 与 UCA1 的结合, 从而将 miR-122-5p 靶向到靶基因的 mRNA 上, 以此减少 UCA1 介导的细胞侵袭^[48]. 但之前的一项研究表明, IGF2BP1 在 MCF-7 细胞中表达量虽低, 但对于乳腺癌细胞的克隆形成能力是必不可少的^[49]. IGF2BP2 在乳腺癌组织中呈高表达^[50-52]. 它通过破坏孕激素受体 (progesterone receptor, PR) 基因的 mRNA 稳定性促进三阴性乳腺癌 (triple-negative breast cancer, TNBC) 的转移^[50]. 此外, IGF2BP2 与假基因 RPSAP52 相互作用, 通过 Lin28b 依赖和非依赖的机制促进 let-7 水平下调, 从而促进乳腺癌的增殖和转移^[53]. IGF2BP2 可以通过结合结缔组织生长因子 (connective tissue growth factor, CTGF) 基因的 mRNA 并且稳定其 mRNA 减少细胞外基质黏连蛋白的表达, 促进乳腺癌细胞的迁移^[51]. 同样, IGF2BP3 也与高侵袭性三阴性乳腺癌相关^[50]. 研究发现, IGF2BP3 是 EGFR 介导的乳腺癌迁移和侵袭的效应因子, EGFR/MEK/MAPK 信号通路可以调节 IGF2BP3 的表达^[54]. IGF2BP3 在三阴性乳腺癌中高表达促使癌细胞对许多化疗药物产生耐药性. 在三阴性乳腺癌中, IGF2BP3 表达的减少显著增加了乳腺癌细胞对阿霉素和米托蒽醌的敏感性. 研究还发现, IGF2BP3 调节乳腺癌耐药蛋白 (breast cancer resistance protein, BCRP) 的表达, 而 BCRP 的表达是乳腺癌细胞产生耐药性的主要效应因子^[55]. Liu 等^[56]证实, IGF2BP3 通过结合 CD44 的 mRNA, 增加 CD44 的表达, 同时促进乳腺癌细胞增殖能力和耐药性, 增加成纤维细胞中胰岛素样生长因子 2 (insulin-like growth factor 2, IGF2) 水平. 此外, IGF2BP3 同 IGF2BP1 一样, 也可与长非编码 RNA 相互作用. 长非编码 RNA—CERS6-AS1 在乳腺癌组织中高表达, 可以促进细胞增殖并抑制细胞凋亡. IGF2BP3 作为 CERS6-AS1 的 RNA 结合蛋白, 可以促进 CERS6 mRNA 的稳定性, 参与乳腺癌的进展^[57]. 乳腺癌细胞中 miRNA-3614-3p 可以靶向三基序蛋白 25 (tripartite motif-containing, TRIM25) 基因的 3' 非编码区, IGF2BP3 可以结合 TRIM25 的 3' 非编码区拮抗 miRNA-3614-3p, 抑制 miRNA-3614-3p 的成熟促进

乳腺癌增殖^[58]. 在维持乳腺癌细胞的干细胞特性方面, IGF2BP3 也发挥着重要的作用. IGF2BP3 在干细胞中高表达, 在这个过程中, IGF2BP3 结合 SLUG (snail family transcriptional repressor 2) 的 5' 非编码区促进了 SLUG 下游基因 SOX2 (SRY-like HMG box gene 2) 的转录, 促进细胞的自我更新能力^[59], 并且还有文献报道在乳腺癌干细胞中 IGF2BP3 可以被 miR-34a 调控^[60].

值得注意的是, 由于最近发现 IGF2BPs 可以作为 m⁶A 新的“读码”蛋白, 能够抑制 m⁶A 修饰的转录本的降解并促进其翻译^[72], 因此前期对 IGF2BP 在乳腺癌中的功能是否与其作为 m⁶A 读码蛋白的功能相关仍需进一步确定, 对 IGF2BPs 的研究还有更广阔的空间.

2.3.3 EIF

EIF3 也具有 m⁶A 的“读码”功能. 通过识别 mRNA 5' 非编码区的 m⁶A 修饰, 可以直接与 METTL3 进行相互作用, 从而增强翻译, 形成密集排列的多核糖体^[73]. 目前, EIF3H 的扩增和高表达已在包括乳腺癌在内的多种癌症中得到证实^[61]. Zhou 等^[62]发现 EIF3H 可作为去泛素化酶发挥其致癌作用. EIF3H 可以催化 YAP 去泛素化, 使其稳定进而调节 Hippo-YAP 通路促进乳腺肿瘤的侵袭和转移. 但是, EIF3 作为 m⁶A 读码器参与乳腺癌的进展还未有报道.

2.3.4 HNRNPC 和 HNRNPA2B1

在核 RNA 加工期间, HNRNPC 和 HNRNPA2B1 是 m⁶A 的另外两种“读码器”, 它们可以通过 m⁶A 的结构转换机制与未折叠 RNA 结合^[74]. 最近的一项研究表明, HNRNPC 在乳腺癌肿瘤组织中高表达, MCF-7 和 T47D 乳腺癌细胞中干扰 HNRNPC 的表达后, 细胞增殖受到抑制. 在此过程中, 由 RNA 传感器维甲酸诱导基因 (retinoic acid-inducible gene 1, RIG-I) 介导的干扰素反应负责抑制 HNRNPC 的增殖效应^[63-64]. HNRNPA2B1 在乳腺癌组织标本和细胞系中同样高表达, 乳腺癌细胞中敲除 HNRNPA2B1 可诱导细胞凋亡^[65-66]. 此外, HNRNPA2B1 可以激活信号传导与转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 和细胞外调节蛋白激酶 1/2 (extracellular-signal-regulated kinase 1/2, ERK1/2) 信号通路, 增加细胞的致癌能力^[67]. 然而, 一项结论相反的研究显示, HNRNPA2B1 的表达与乳腺癌转移呈负相关. 在体内及体外实验发现 HNRNPA2B1 可以抑

制三阴性乳腺癌细胞MDA-MB-231的转移. 进一步研究发现, HNRNPA2B1的敲除激活了ERK-MAPK/Twist和GR-beta/TCF4信号通路, 但抑制了STAT3和WNT/TCF4信号通路^[68]. 之所以会有相反的结论可能是由于实验所使用的乳腺癌细胞系的局限和动物模型的不同, 因此这些结论可能对不同的乳腺癌细胞系及不同乳腺癌亚型应用不用. 然而, 这种现象是否取决于它的m⁶A“读码”功能仍不清楚.

3 总结与展望

虽然m⁶A是近年来许多研究的焦点, 但人们对它的调控仍知之甚少. 值得注意的是, 从目前的研究报道来看, METTL3、METTL14、FTO和ALKBH5在乳腺癌中发挥作用可以依赖于其m⁶A的生物学功能, 但其他m⁶A调节蛋白影响乳腺肿瘤进展则并不能确定是否依赖m⁶A相关功能. 因此还需要进一步研究确定它们在乳腺癌中的作用是否与m⁶A有关. 但可以推测的是, 它们的大部分功能依赖于其RNA结合能力, 这意味着它们的结合及其在乳腺癌中的功能很可能与m⁶A有关.

靶向DNA甲基化酶或者组蛋白修饰酶的数个新药已获批用于治疗癌症, 表观遗传学影响基因表达的化学干预研究已经成为国际上药物新靶标研究的活跃领域. 鉴于m⁶A调节蛋白在乳腺癌中的关键作用, 它们有望成为癌症治疗的良好药物靶点. 最近以急性髓细胞白血病亚型 (acute myeloid leukemia, AML) 中高表达的FTO为靶标, 研究者们开发出了FTO小分子抑制剂CS1和CS2^[75-76]. 该抑制剂结合并占据FTO的催化“口袋”, 从而阻止m⁶A修饰的寡核苷酸进入, 进而抑制FTO的去甲基化功能, 在PDX小鼠模型上展现出有效的抗白血病治疗效果, 并且临床试验显示出令人满意的抗癌效果. 更值得注意的是, CS1和CS2的抗癌效果在包括乳腺癌在内的多种实体瘤模型中得到验证. 该研究提示, 开发临床适用的m⁶A调节蛋白的选择性和有效抑制剂很可能为乳腺癌提供更有效的治疗策略, 特别是与其他治疗药物联合治疗对现有疗法有耐药性的癌症. 虽然目前的研究只是冰山一角, 但m⁶A重要的功能组成成分的不断发现, 对m⁶A甲基化修饰和调控功能认知的不断丰富, 这些都可能为乳腺癌的治疗提供新的重要科学依据.

参 考 文 献

- [1] Khaled N, Bidet Y. New insights into the implication of epigenetic alterations in the EMT of triple negative breast cancer. *Cancers (Basel)*, 2019, **11**(4): 559
- [2] Waks A G, Winer E P. Breast cancer treatment: a review. *JAMA*, 2019, **321**(3): 288-300
- [3] Senapati S, Mahanta A K, Kumar S, *et al.* Controlled drug delivery vehicles for cancer treatment and their performance. *Signal Transduct Target Ther*, 2018, **3**: 7
- [4] Fisusi F A, Akala E O. Drug combinations in breast cancer therapy. *Pharm Nanotechnol*, 2019, **7**(1): 3-23
- [5] Abrahao C A, Bomfim E, Lopes-Junior L C, *et al.* Complementary therapies as a strategy to reduce stress and stimulate immunity of women with breast cancer. *J Evid Based Integr Med*, 2019, **24**: 2515690X19834169
- [6] Musgrove E A, Sutherland R L. Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. *Nat Rev Cancer*, 2009, **9**(9): 631-643
- [7] Rachdi H, Mokrani A, Batti R, *et al.* Target therapy for metastatic breast cancer. *Tunis Med*, 2018, **96**(8-9): 465-471
- [8] Sun T, Wu R, Ming L. The role of m⁶A RNA methylation in cancer. *Biomed Pharmacother*, 2019, **112**: 108613
- [9] Ma S, Chen C, Ji X, *et al.* The interplay between m⁶A RNA methylation and noncoding RNA in cancer. *J Hematol Oncol*, 2019, **12**(1): 121
- [10] Dai D, Wang H, Zhu L, *et al.* N⁶-methyladenosine links RNA metabolism to cancer progression. *Cell Death Dis*, 2018, **9**(2): 124
- [11] He L, Li H, Wu A, *et al.* Functions of N⁶-methyladenosine and its role in cancer. *Mol Cancer*, 2019, **18**(1): 176
- [12] Wang H, Xu B, Shi J. N⁶-methyladenosine METTL3 promotes the breast cancer progression via targeting Bcl-2. *Gene*, 2020, **722**: 144076
- [13] Peng W, Li J, Chen R, *et al.* Upregulated METTL3 promotes metastasis of colorectal cancer via miR-1246/SPRED2/MAPK signaling pathway. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, **38**(1): 393
- [14] Yang G, Sun Z, Zhang N. Reshaping the role of m⁶A modification in cancer transcriptome: a review. *Cancer Cell Int*, 2020, **20**: 353
- [15] Hong K. Emerging function of N⁶-methyladenosine in cancer. *Oncol Lett*, 2018, **16**(5): 5519-5524
- [16] Liu T, Wei Q, Jin J, *et al.* The m⁶A reader YTHDF1 promotes ovarian cancer progression via augmenting EIF3c translation. *Nucleic Acids Res*, 2020, **48**(7): 3816-3831
- [17] Wang Q, Chen C, Ding Q, *et al.* Mettl3-mediated m⁶A modification of HDGF mRNA promotes gastric cancer progression and has prognostic significance. *Gut*, 2020, **69**(7): 1193-1205
- [18] Desrosiers R, Friderici K, Rottman F. Identification of methylated nucleosides in messenger RNA from Novikoff hepatoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1974, **71**(10): 3971-3975
- [19] Nachtergaele S, He C. Chemical modifications in the life of an

- mRNA transcript. *Annu Rev Genet*, 2018, **52**: 349-372
- [20] 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
- [21] Deng X, Su R, Feng X, *et al.* Role of N(6)-methyladenosine modification in cancer. *Curr Opin Genet Dev*, 2018, **48**: 1-7
- [22] Meyer K D, Saletore Y, Zumbo P, *et al.* Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3' UTRs and near stop codons. *Cell*, 2012, **149**(7): 1635-1646
- [23] Dominissini D, Moshitch-Moshkovitz S, Schwartz S, *et al.* Topology of the human and mouse m6A RNA methylomes revealed by m6A-seq. *Nature*, 2012, **485**(7397): 201-206
- [24] Cao G, Li H B, Yin Z, *et al.* Recent advances in dynamic m6A RNA modification. *Open Biol*, 2016, **6**(4): 160003
- [25] Lan Q, Liu P Y, Haase J, *et al.* The critical role of RNA m(6)A methylation in cancer. *Cancer Res*, 2019, **79**(7): 1285-1292
- [26] Wang T, Kong S, Tao M, *et al.* The potential role of RNA N6-methyladenosine in cancer progression. *Mol Cancer*, 2020, **19**(1): 88
- [27] Pendleton K E, Chen B, Liu K, *et al.* The U6 snRNA m(6)A methyltransferase mettl16 regulates SAM synthetase intron retention. *Cell*, 2017, **169**(5): 824-835.e14
- [28] Chen J, Du B. Novel positioning from obesity to cancer: FTO, an m(6)A RNA demethylase, regulates tumour progression. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2019, **145**(1): 19-29
- [29] Zhang S, Zhao B S, Zhou A, *et al.* m(6)A demethylase ALKBH5 maintains tumorigenicity of glioblastoma stem-like cells by sustaining FOXM1 expression and cell proliferation program. *Cancer Cell*, 2017, **31**(4): 591-606.e6
- [30] Liu L, Liu X, Dong Z, *et al.* N6-methyladenosine-related genomic targets are altered in breast cancer tissue and associated with poor survival. *J Cancer*, 2019, **10**(22): 5447-5459
- [31] Anita R, Paramasivam A, Priyadharsini J V, *et al.* The m6A readers YTHDF1 and YTHDF3 aberrations associated with metastasis and predict poor prognosis in breast cancer patients. *Am J Cancer Res*, 2020, **10**(8): 2546-2554
- [32] Yi D, Wang R, Shi X, *et al.* METTL14 promotes the migration and invasion of breast cancer cells by modulating N6methyladenosine and hsa-miR-146a5p expression. *Oncol Rep*, 2020, **43**(5): 1375-1386
- [33] Xu Y, Ye S, Zhang N, *et al.* The FTO/miR-181b-3p/AR15b signaling pathway regulates cell migration and invasion in breast cancer. *Cancer Commun (Lond)*, 2020, **40**(10): 484-500
- [34] Wu L, Wu D, Ning J, *et al.* Changes of N6-methyladenosine modulators promote breast cancer progression. *BMC Cancer*, 2019, **19**(1): 326
- [35] 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
- [36] Sun T, Wu Z, Wang X, *et al.* LNC942 promoting METTL14-mediated m(6)A methylation in breast cancer cell proliferation and progression. *Oncogene*, 2020, **39**(31): 5358-5372
- [37] Qian J Y, Gao J, Sun X, *et al.* KIAA1429 acts as an oncogenic factor in breast cancer by regulating cdk1 in an N6-methyladenosine-independent manner. *Oncogene*, 2019, **38**(33): 6123-6141
- [38] Stevens T A, Meech R. BARX2 and estrogen receptor-alpha (ESR1) coordinately regulate the production of alternatively spliced ESR1 isoforms and control breast cancer cell growth and invasion. *Oncogene*, 2006, **25**(39): 5426-5435
- [39] Shahriyari L, Abdel-Rahman M, Cebulla C. BAP1 expression is prognostic in breast and uveal melanoma but not colon cancer and is highly positively correlated with RBM15b and USP19. *Plos One*, 2019, **14**(2): e0211507
- [40] Gong E Y, Park E, Lee K. Hakai acts as a coregulator of estrogen receptor alpha in breast cancer cells. *Cancer Sci*, 2010, **101**(9): 2019-2025
- [41] Tan A, Dang Y, Chen G, *et al.* Overexpression of the fat mass and obesity associated gene (FTO) in breast cancer and its clinical implications. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, **8**(10): 13405-13410
- [42] Niu Y, Lin Z, Wan A, *et al.* RNA N6-methyladenosine demethylase fto promotes breast tumor progression through inhibiting BNIP3. *Mol Cancer*, 2019, **18**(1): 46
- [43] Liu Y, Wang R, Zhang L, *et al.* The lipid metabolism gene FTO influences breast cancer cell energy metabolism *via* the PI3k/Akt signaling pathway. *Oncol Lett*, 2017, **13**(6): 4685-4690
- [44] Zhang C, Samanta D, Lu H, *et al.* Hypoxia induces the breast cancer stem cell phenotype by HIF-dependent and ALKBH5-mediated m(6)A-demethylation of NANOG mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, **113**(14): E2047-2056
- [45] Zhang C, Zhi W I, Lu H, *et al.* Hypoxia-inducible factors regulate pluripotency factor expression by ZNF217- and ALKBH5-mediated modulation of RNA methylation in breast cancer cells. *Oncotarget*, 2016, **7**(40): 64527-64542
- [46] Nwokafor C U, Sellers R S, Singer R H. IMP1, an mRNA binding protein that reduces the metastatic potential of breast cancer in a mouse model. *Oncotarget*, 2016, **7**(45): 72662-72671
- [47] Wang G, Huang Z, Liu X, *et al.* IMP1 suppresses breast tumor growth and metastasis through the regulation of its target mRNAs. *Oncotarget*, 2016, **7**(13): 15690-15702
- [48] Zhou Y, Meng X, Chen S, *et al.* IMP1 regulates UCA1-mediated cell invasion through facilitating UCA1 decay and decreasing the sponge effect of UCA1 for miR-122-5p. *Breast Cancer Res*, 2018, **20**(1): 32
- [49] Fakhraldeen S A, Clark R J, Roopra A, *et al.* Two isoforms of the RNA binding protein, coding region determinant-binding protein (CRD-BP/IGF2BP1), are expressed in breast epithelium and support clonogenic growth of breast tumor cells. *J Biol Chem*, 2015, **290**(21): 13386-13400
- [50] Kim H Y, Ha Thi H T, Hong S. IMP2 and IMP3 cooperate to promote the metastasis of triple-negative breast cancer through destabilization of progesterone receptor. *Cancer Lett*, 2018, **415**: 30-39
- [51] Li Y, Francia G, Zhang J Y. P62/IMP2 stimulates cell migration and

- reduces cell adhesion in breast cancer. *Oncotarget*, 2015, **6**(32): 32656-32668
- [52] Barghash A, Helms V, Kessler S M. Overexpression of IGF2 mRNA-binding protein 2 (IMP2/p62) as a feature of basal-like breast cancer correlates with short survival. *Scand J Immunol*, 2015, **82**(2): 142-143
- [53] Oliveira-Mateos C, Sanchez-Castillo A, Soler M, *et al.* The transcribed pseudogene RPSAP52 enhances the oncofetal HMGA2-IGF2BP2-RAS axis through LIN28B-dependent and independent let-7 inhibition. *Nat Commun*, 2019, **10**(1): 3979
- [54] Samanta S, Sharma V M, Khan A, *et al.* Regulation of IMP3 by EGFR signaling and repression by ERbeta: implications for triple-negative breast cancer. *Oncogene*, 2012, **31**(44): 4689-4697
- [55] Samanta S, Pursell B, Mercurio A M. IMP3 protein promotes chemoresistance in breast cancer cells by regulating breast cancer resistance protein (ABCG2) expression. *J Biol Chem*, 2013, **288**(18): 12569-12573
- [56] Liu Y, Yu C, Wu Y, *et al.* CD44(+) fibroblasts increases breast cancer cell survival and drug resistance *via* IGF2BP3-CD44-IGF2 signalling. *J Cell Mol Med*, 2017, **21**(9): 1979-1988
- [57] Bao G, Huang J, Pan W, *et al.* Long noncoding RNA CERS6-AS1 functions as a malignancy promoter in breast cancer by binding to IGF2BP3 to enhance the stability of CERS6 mRNA. *Cancer Med*, 2020, **9**(1): 278-289
- [58] Wang Z, Tong D, Han C, *et al.* Blockade of miR-3614 maturation by IGF2BP3 increases TRIM25 expression and promotes breast cancer cell proliferation. *EBioMedicine*, 2019, **41**: 357-369
- [59] Samanta S, Sun H, Goel H L, *et al.* IMP3 promotes stem-like properties in triple-negative breast cancer by regulating SLUG. *Oncogene*, 2016, **35**(9): 1111-1121
- [60] Huang Q D, Zheng S R, Cai Y J, *et al.* IMP3 promotes tnbc stem cell property through miRNA-34a regulation. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, **22**(9): 2688-2696
- [61] Mahmood S F, Gruel N, Chapeaublanc E, *et al.* A siRNA screen identifies RAD21, EIF3h, CHRAC1 and TANC2 as driver genes within the 8q23, 8q24.3 and 17q23 amplicons in breast cancer with effects on cell growth, survival and transformation. *Carcinogenesis*, 2014, **35**(3): 670-682
- [62] Zhou Z, Zhou H, Ponzoni L, *et al.* Eif3h orchestrates hippo pathway-mediated oncogenesis *via* catalytic control of YAP stability. *Cancer Res*, 2020, **80**(12): 2550-2563
- [63] Wu Y, Zhao W, Liu Y, *et al.* Function of HNRNPC in breast cancer cells by controlling the dsRNA-induced interferon response. *EMBO J*, 2018, **37**(23): e99017
- [64] Sarbanes S L, Le Pen J, Rice C M. Friend and foe, HNRNPC takes on immunostimulatory RNAs in breast cancer cells. *EMBO J*, 2018, **37**(23): e100923
- [65] Klinge C M, Piell K M, Tooley C S, *et al.* HNRNPA2/B1 is upregulated in endocrine-resistant LCC9 breast cancer cells and alters the mirna transcriptome when overexpressed in MCF-7 cells. *Sci Rep*, 2019, **9**(1): 9430
- [66] Zhou J, Allred D C, Avis I, *et al.* Differential expression of the early lung cancer detection marker, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-a2/b1 (HNRNP-A2/B1) in normal breast and neoplastic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 2001, **66**(3): 217-224
- [67] Hu Y, Sun Z, Deng J, *et al.* Splicing factor hnRNP2BL contributes to tumorigenic potential of breast cancer cells through STAT3 and ERK1/2 signaling pathway. *Tumour Biol*, 2017, **39**(3): 1010428317694318
- [68] Liu Y, Li H, Liu F, *et al.* Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 is a negative regulator of human breast cancer metastasis by maintaining the balance of multiple genes and pathways. *EBioMedicine*, 2020, **51**: 102583
- [69] Shi Y, Zheng C, Jin Y, *et al.* Reduced expression of METTL3 promotes metastasis of triple-negative breast cancer by m6A methylation-mediated COL3A1 up-regulation. *Front Oncol*, 2020, **10**: 1126
- [70] Liao S, Sun H, Xu C. Yth domain: a family of N(6) - methyladenosine (m(6)A) readers. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2018, **16**(2): 99-107
- [71] Gu W, Katz Z, Wu B, *et al.* Regulation of local expression of cell adhesion and motility-related mRNAs in breast cancer cells by IMP1/ZBP1. *J Cell Sci*, 2012, **125**(Pt 1): 81-91
- [72] Huang H, Weng H, Sun W, *et al.* Recognition of RNA N(6) - methyladenosine by IGF2BP proteins enhances mRNA stability and translation. *Nat Cell Biol*, 2018, **20**(3): 285-295
- [73] Choe J, Lin S, Zhang W, *et al.* Mra circularization by METTL3-EIF3h enhances translation and promotes oncogenesis. *Nature*, 2018, **561**(7724): 556-560
- [74] Bi Z, Liu Y, Zhao Y, *et al.* A dynamic reversible RNA N(6) - methyladenosine modification: current status and perspectives. *J Cell Physiol*, 2019, **234**(6): 7948-7956
- [75] Huang Y, Su R, Sheng Y, *et al.* Small-molecule targeting of oncogenic FTO demethylase in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*, 2019, **35**(4): 677-691.e10
- [76] Su R, Dong L, Li Y, *et al.* Targeting FTO suppresses cancer stem cell maintenance and immune evasion. *Cancer Cell*, 2020, **38**(1): 79-96.e11

The Roles of m⁶A Modification in Breast Cancer*

FANG Run-Ping^{2)**}, XU Fei-Fei^{2)**}, ZHAO Lu-Ping¹⁾, YU Lu¹⁾, CAI Xiao-Li²⁾, YANG Zhe³⁾,
ZHANG Wei-Ying²⁾, YE Li-Hong²⁾, SHI Hui^{1)***}

⁽¹⁾*Institute of Immunology and Molecular Medicine, Jining Medical University, Jining 272067, China;*

⁽²⁾*State Key Laboratory of Medicinal Chemical Biology, Department of Biochemistry, College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China;*

⁽³⁾*School of Life Sciences, Liaoning University, Shenyang 110036, China)*

Abstract Breast cancer is the most common cancer and the leading cause of cancer death in women worldwide. Although huge progress has been made in managing early-stage breast cancer, no effective strategy can prevent or treat breast cancer metastasis which has high recurrence rate and high mortality rate. Thus, identification of new molecular markers for the diagnosis and prognostic prediction of metastatic breast cancer and development of innovative therapeutic measures are urgently needed. Recently, epigenetic regulation of the expression and function of oncogenes by aberrant N⁶-methyladenosine (m⁶A) modification of mRNA in aggressive breast cancer is investigated widely. In this review, we retrieve and analyze the most recent studies on m⁶A modification, and summarize the expression and the function of m⁶A regulatory proteins, including the writers, erasers and readers, in the tumorigenesis and progression of breast cancer, and point out the defects in the recent field of m⁶A-related researches, so as to provide scientific basis for diagnosis, therapies and prognosis in breast cancer.

Key words N⁶-methyladenosine, RNA-modifying proteins, RNA modifications, epigenetic modification, breast cancer

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0347

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (81802856, 31800688), The Projects of Shandong Province Higher Education Science and Technology (J17KA230), The Shandong Province Undergraduate Training Program for Innovation and Entrepreneurship (201910443011) and The National Level of Local Universities Undergraduate Training Program for Innovation and Entrepreneurship (201610443043).

**These authors contributed equally to this work.

*** Corresponding author.

Tel: 86-537-3616283, E-mail: 8858shihui@163.com

Received: September 30, 2020 Accepted: October 30, 2020