

实验室介绍



高义萌, 同济大学“青年百人计划”特聘研究员、博士生导师, 同济大学附属东方医院特聘研究员。2017年于中国科学院分子细胞科学卓越创新中心(原上海生物化学与细胞生物学研究所)获博士学位。2017年至2022年在美国耶鲁大学医学院从事博士后研究, 其间获耶鲁大学医学院Brown-Coxe Fellowship和美国血液学会学者奖(ASH Scholar Award)支持。2023年加入同济大学生命科学与技术学院, 入选上海市“海外高层次人才引进计划”、白玉兰人才计划浦江项目。获得国家自然科学基金面上项目、青年项目支持。高义萌研究员聚焦于RNA修饰对血液发育与疾病调控机制的研究, 为白血病治疗提供新策略。主要贡献有: (1) 揭示RNA修饰通过天然免疫反应调控造血发育的机制(*Immunity* 2020, *Development* 2025); (2) 揭示RNA修饰介导造血干祖细胞能量代谢重编程的分子机制(*Cell Reports* 2023, *Leukemia* 2022)。

<https://life.tongji.edu.cn/65/c9/c12618a288201/page.htm>

RNA修饰与细胞命运调控

胡晓杰[#] 于仁杰[#] 蒋悦[#] 贺一睿[#] 高义萌^{*}

(同济大学生命科学与技术学院, 上海 200092)

摘要 RNA修饰作为一种基因表达转录后调控机制, 对于细胞命运调控具有关键作用。其中N⁶-甲基腺苷(N⁶-methyladenosine, m⁶A)作为真核生物中最丰富的RNA修饰, 可以被m⁶A“书写器”(writer)、“擦除器”(eraser)及“阅读器”(reader)动态调控。m⁶A通过影响RNA剪接、稳定性、翻译效率及染色质状态, 参与胚胎发育、免疫应答与基因组稳定性的维持。近年来, 表观转录组测序技术的革新使得研究者能够对RNA上的m⁶A甲基化进行精确、大规模的检测分析。此外, m⁶A在癌症领域的研究也取得了重大突破, 多种小分子抑制剂已进入临床试验阶段。该文旨在综述近年来m⁶A修饰在细胞命运调控中的研究进展, 重点探讨m⁶A动态调控机制、检测技术, 以及其对RNA命运、染色质状态与癌症进展的作用。

关键词 RNA修饰; m⁶A; RNA稳定性; 细胞命运; 测序技术

RNA Modification and Cell Fate Regulation

HU Xiaojie[#], YU Renjie[#], JIANG Yue[#], HE Yirui[#], GAO Yimeng^{*}

(School of Life Sciences and Technology, Tongji University, Shanghai 200092, China)

收稿日期: 2025-03-31

接受日期: 2025-05-27

国家自然科学基金(批准号: 82200119、32471163)和中央高校基本科研经费(批准号: 22120250374)资助的课题

[#]共同第一作者

^{*}通信作者。E-mail: gaoyim@tongji.edu.cn

Received: March 31, 2025

Accepted: May 27, 2025

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.82200119, 32471163), and the Fundamental Research Funds for the Central Universities (Grant No.22120250374)

[#]These authors contributed equally to this work

^{*}Corresponding author. E-mail: gaoyim@tongji.edu.cn

Abstract RNA modification has emerged as a widespread mechanism for regulating gene expression during cell fate determination. Among these modifications, m⁶A (N⁶-methyladenosine), the most abundant RNA modification in eukaryotes, is dynamically regulated by m⁶A “writer”, “eraser”, and “reader”. m⁶A influences RNA splicing, stability, translation efficiency, and chromatin states, thereby participating in embryonic development, immune responses, and the maintenance of genome stability. Recent advancements in epitranscriptomic sequencing technologies have enabled precise and large-scale detection and analysis of m⁶A methylation on RNA. Furthermore, significant breakthroughs have been achieved in cancer research related to m⁶A, with several small-molecule inhibitors entering clinical trials. This review aims to summarize recent progress in the role of m⁶A modification in cell fate regulation, with a focus on its dynamic regulatory mechanisms, detection technologies, and its impacts on RNA fate, chromatin states, and cancer progression.

Keywords RNA modification; m⁶A; RNA stability; cell fate; sequencing technologies

RNA作为遗传信息的重要“传递者”,在转录水平、转录后水平等多个层面调控基因表达。近年来, RNA修饰对基因表达的调控机制极大地扩充了中心法则的内容,得到了广泛关注。已知的RNA修饰有170多种化学形式,包括N⁶-甲基腺苷(N⁶-methyladenosine, m⁶A)、N¹-甲基腺苷(N¹-methyladenosine, m¹A)、N⁶,2'-O-二甲基腺苷(N⁶,2'-O-dimethyladenosine, m⁶Am)、假尿苷(pseudouridine, Ψ)等,广泛分布于信使RNA(mRNA)、核糖体RNA(rRNA)、转运RNA(tRNA)、长链非编码RNA(lncRNA)、微小RNA(microRNA)、环状RNA(circRNA)等多种RNA,对RNA结构及功能进行精细调控^[1]。其中, m⁶A修饰是真核生物细胞中最常见的内部修饰^[2],其分布特征、调控机制及生物学功能被研究得最为透彻。

早在20世纪70年代,已经有研究表明mRNA上存在m⁶A修饰^[3],并将m⁶A修饰与mRNA的稳定性联系起来^[4]。20世纪90年代,研究人员在HeLa细胞核提取物中发现了一种具有mRNA m⁶A甲基化催化活性的蛋白。通过克隆纯化,该蛋白被鉴定出含有S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosylmethionine, SAM)甲基转移酶结构域,这一发现进一步验证了其甲基化功能,该蛋白被命名为METTL3(methyltransferase like 3),并被确认为m⁶A甲基化转移酶^[5]。然而,由于当时既缺乏高通量测序技术对m⁶A修饰进行全转录组检测和定位,又缺乏对m⁶A修饰动态调控机制的认识, m⁶A修饰并未引起人们的关注。直到2011年,肥胖基因相关蛋白FTO(fat mass and obesity-associated protein)有效催化m⁶A去甲基化这项重要的工作的相关成果发表,第一次将FTO确定为m⁶A去甲基化酶,

揭示了RNA m⁶A修饰潜在的动态可逆的调控机制,并提示了其DNA甲基化修饰具有类似的调控机理^[6],推动了表观转录组学研究的兴起。

随着测序技术不断革新,研究人员通过将m⁶A修饰特异性抗体的核糖核酸免疫沉淀与下一代测序相结合(methylated RNA immunoprecipitation sequencing, MeRIP-seq),绘制了首批全转录组m⁶A修饰图谱^[7-8],揭示了全转录组中的大量m⁶A位点及其功能。大约25%的哺乳动物mRNA中含有m⁶A修饰,平均每个m⁶A mRNA转录本中有1~3个腺苷被修饰^[9]。m⁶A修饰主要富集在与调节生物体分化和发育相关的转录本的3'端的非翻译区(3' untranslated region, 3'UTR)和终止密码子附近,且其共识基序DRACH(D=A/G/U; R=A/G; H=A/C/U)在mRNA中每隔约57个核苷酸出现一次^[10]。

m⁶A通过调控RNA的剪接、核质转运、稳定性及翻译效率,对RNA的命运和功能产生广泛的影响^[9]。此外, m⁶A修饰不仅在转录组水平发挥重要作用,也可通过与组蛋白相互作用及调控异染色质开放程度深刻地影响着基因表达^[11-12]。随着对m⁶A修饰调控机制的不断挖掘,其生理学意义以及在癌症等疾病中的作用也得到了广泛关注^[13]。m⁶A修饰在早期胚胎干细胞的自我更新和分化过程中必不可少,在小鼠中METTL3的组成性缺失会造成早期胚胎的死亡,并使胚胎干细胞停滞在“naïve”态多能干细胞时期^[14-15]。我们的研究发现RNA上m⁶A修饰的存在可以维持细胞对于自体RNA的自我识别作用,而m⁶A修饰缺失会诱发内源双链RNA(double-stranded RNA)形成,进而引发强烈的天然免疫反应^[16]。本文旨在回顾近年来m⁶A修饰在细胞命运调控中的研究

进展,详细探讨 m⁶A 修饰的调控机制、生物学意义、检测手段以及癌症治疗中的应用,为表观转录组学研究提供参考。

1 m⁶A 调控机制概述

RNA m⁶A 修饰的添加与去除是动态可逆的调控过程,其调控元件主要分为甲基转移酶“书写器”(writer)、去甲基化酶“擦除器”(eraser)和 m⁶A 识别蛋白“阅读器”(reader),分别负责对 RNA 的特定位点进行甲基化、去甲基化、结合并整合下游生物过程。

m⁶A 修饰的添加过程由多组分甲基转移酶复合物(multicomponent methyl-transferase complex, MTC)催化。该复合物将甲基分子转移至 RNA 的特定位置,其核心组分为甲基转移酶样 3 和 14(methyl-transferase-like 3 and 14, METTL3 和 METTL14)异源二聚体、WTAP^[17]。目前被鉴定的“erasers”有 FTO 和 alkB 同源物 5(alkB homologue 5, ALKBH5)。FTO 是第一个被鉴定的 RNA 去甲基化酶,对于 mRNA 中的 m⁶A 和 m⁶A_m 以及 tRNA 中的 m¹A 修饰均具有去甲基化活性^[6,18],与 FTO 不同,ALKBH5 对 m⁶A 的去甲基化作用具有更高的底物特异性^[19]。虽然 m⁶A 的在 RNA 上的分布是由“writer”和“eraser”决定的,但 m⁶A 依赖的功能是由“reader”介导的,它通过对 m⁶A 修饰 RNA 的特异性识别和结合以决定转录本的命运并参与调控下游生物学过程。已知的 m⁶A “reader”主要包括三大家族:YT521-B 同源性(YT521-B homology, YTH)结构域家族蛋白,包括 YTHDF1~3(YTH domain family 1-3)及 YTHDC1~2(YTH domain containing 1-2)^[20];胰岛素样生长因子 2 结合蛋白(insulin-like growth factor 2 binding proteins, IGF2BPs),包括 IGF2BP1~3^[21];核内不均一核糖核蛋白(heterogeneous nuclear ribonucleoproteins, HNRNPs),如 HNRNPA2B1、HNRNPC 和 HNRNPG^[22]。

1.1 m⁶A 修饰调控 RNA 命运和功能

m⁶A 修饰几乎参与 RNA 代谢的各个方面,影响 RNA 的折叠和结构,并调控 mRNA 的剪接、核质运输、稳定性及翻译效率。

1.1.1 m⁶A 修饰影响 RNA 结构 虽然 m⁶A 修饰并不影响碱基互补配对,但 m⁶A:U 碱基对氢键强度弱于 A:U 碱基对,单个 m⁶A 的存在会使短 RNA 螺旋结构不稳定,同时熔化温度降低 5 °C^[23]。m⁶A 修饰的核苷

酸改变了碱基对动力学,也抑制了内源性双链 RNA 的形成。在 m⁶A 甲基转移酶缺失后,原本高度 m⁶A 修饰并表现出低折叠倾向的 RNA,则会形成双链结构。这些异常形成的内源性 dsRNA 通过激活细胞内视黄酸诱导基因 I 样受体(Rig-I-like receptors, RLRs),如 RIG-I 和 MDA5,导致先天免疫的激活^[16]。

1.1.2 m⁶A 修饰调控 mRNA 剪接及核质转运 m⁶A 修饰通过与核内阅读器 YTHDC1 直接相互作用或通过间接结合核内不均一核糖核蛋白(HNRNPs)影响 mRNA 选择性剪接。YTHDC1 直接与 m⁶A 修饰的 mRNA 结合,通过招募剪接因子 SRSF3,并抑制剪接因子 SRSF10 的结合来调节选择性剪接^[24]。m⁶A 修饰改变 mRNA 和长链非编码 RNA(long noncoding RNA, lncRNA)的局部结构,以促进 HNRNPC 的结合,进而影响靶 mRNA 的丰度和选择性剪接^[25]。YTHDC1 还能通过与核输出组分的相互作用改变 mRNA 的亚细胞定位。YTHDC1 通过与 SRSF3 相互作用,招募 m⁶A 修饰转录本至核输出受体 NXF1,加速其从细胞核的输出^[26]。

1.1.3 m⁶A 修饰调控 mRNA 稳定性 1978 年,研究人员通过放射性同位素标记的方法,比较了含有 m⁶A 修饰的 mRNA 以及缺乏该修饰的 mRNA 的半衰期,证实了 m⁶A 修饰的存在会导致 mRNA 稳定性降低^[4]。最近的研究表明 m⁶A 修饰对 mRNA 稳定性的调控是通过“reader”介导的。YTHDF2 可直接与 m⁶A 标记的转录本结合,通过招募 CCR4-NOT 去腺化酶复合物,介导 mRNA 靶向降解^[27]。然而,另一 m⁶A “reader”IGF2BP 则可以通过与甲基化的 mRNA 结合避免其降解^[21],说明 m⁶A 修饰对 mRNA 稳定性的影响具有多层面的调控机制。

1.1.4 m⁶A 修饰调控翻译效率 m⁶A 对翻译速率的促进作用具有文本依赖性,即 m⁶A 修饰对翻译的调控方式与 m⁶A 修饰的位置有关, m⁶A 在 mRNA 上的定位不同,其促进翻译的方式也不同^[28]。大多数真核生物 mRNA 的翻译起始依赖于真核起始因子 4E(eukaryotic initiation factor 4E, eIF4E)识别 mRNA 5' 端的 m⁷G 帽结构,然而,在细胞应激等特殊情况下,部分 mRNA 可通过非帽依赖性的方式翻译^[29]。定位在 3'UTR 的 m⁶A 修饰具有翻译促进作用, YTHDF1 优先结合 3'UTR m⁶A,并通过与翻译起始因子的直接结合来促进帽依赖的翻译,从而增强翻译能力^[20]。定位在 5'UTR 的 m⁶A 修饰促进非帽依赖性的翻译过程,单

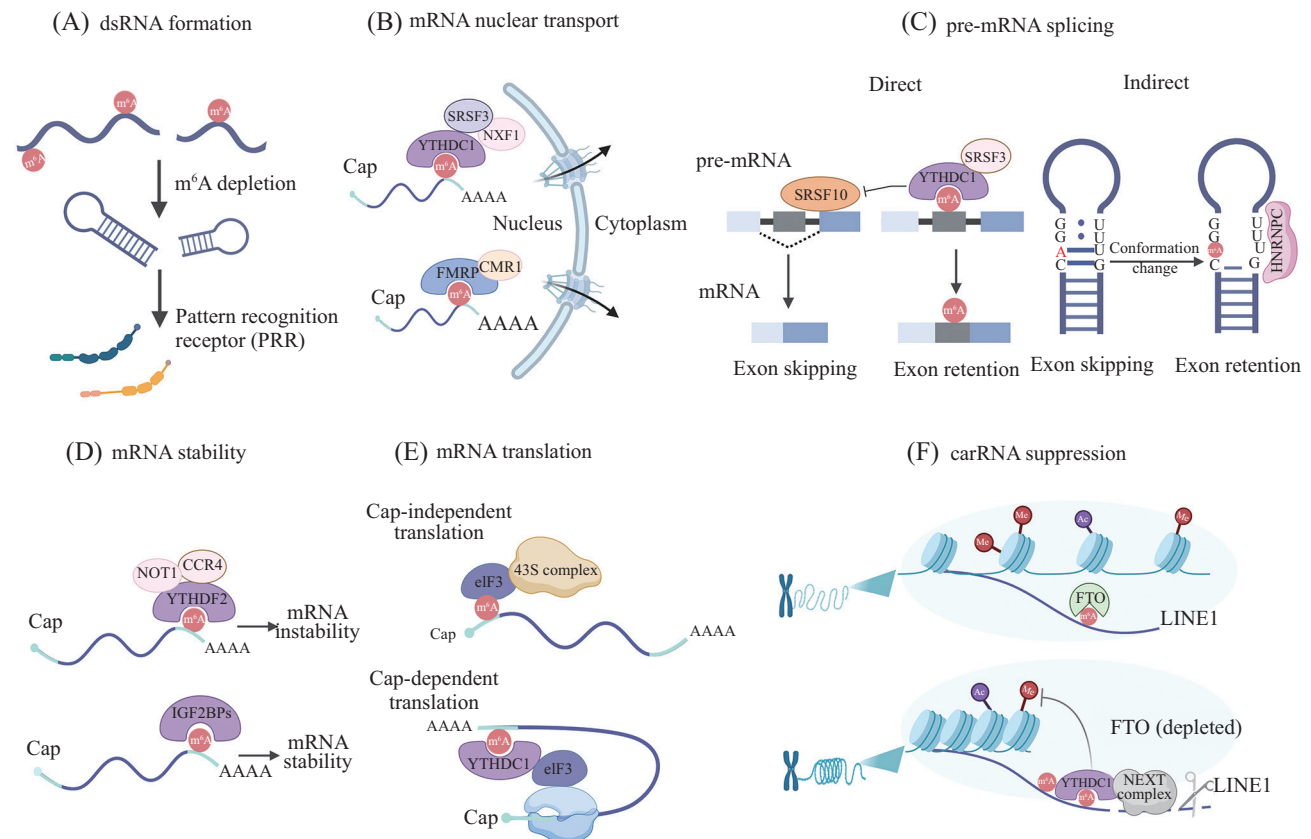
个的5'UTR m⁶A直接结合真核起始因子3(eukaryotic initiation factor 3, eIF3), 在没有eIF4E的情况下, 直接招募43S核糖体复合物来启动翻译, 以响应热休克等压力条件^[30]。此外, m⁶A在非编码RNA, 如rRNA上的修饰也对翻译效率有重要调控作用, 特定细胞系中18S和28S rRNA上m⁶A修饰缺失使细胞整体翻译水平明显下降, 并影响正常生理过程^[2]。

1.2 m⁶A修饰参与染色质调控

m⁶A修饰不仅影响RNA命运及功能, 而且可在染色质可及性及基因组稳定性的调控中发挥重要作用。m⁶A修饰通过影响染色质相关调控RNA(chromosome-associated regulatory RNA, carRNA)丰度, 调控邻近染色质状态和下游基因的转录, METTL3和YTHDC1的缺失都可以显著促进染色质的开放和转录活性的上调^[31]。在小鼠胚胎干细胞和早期胚胎发育中, FTO介导逆转座子

LINE1(long-interspersed element-1)的RNA m⁶A去甲基化, 调节染色质表观修饰水平, 并影响LINE1及其下游靶基因的表达^[12]。此外, m⁶A修饰可显著影响基因组稳定性, YTHDC1与特定长链非编码RNA *Xist*(long non-coding RNA *Xist*, lncRNA *Xist*)上的m⁶A修饰位点结合并相互作用, 构成了X染色体失活和基因沉默过程中的重要环节^[32]。R-loop是由新生RNA(nascent RNA)与DNA模板链形成的RNA-DNA杂合结构, METTL3和YTHDF2的缺失都可造成R-loop的异常累积, 从而对基因组稳定性产生影响^[33-34]。

m⁶A修饰在转录水平影响RNA结构、加工及代谢过程并影响RNA功能的行使。此外, m⁶A修饰调控染色质状态机制的发现, 将m⁶A修饰对基因表达的影响从表观转录组水平拓宽到表观遗传组水平, 加深了人们对m⁶A修饰调控机制的理解(图1)。



A: m⁶A修饰缺失诱导双链RNA形成; B: m⁶A影响mRNA从细胞核到细胞质的输出过程; C: m⁶A通过直接和间接方式影响mRNA前体剪接; D: m⁶A调控mRNA稳定性; E: m⁶A介导帽依赖性和非帽依赖性的翻译起始过程; F: m⁶A通过调控carRNA丰度与稳定性进行染色质互作。

A: m⁶A deficiency induces dsRNA (double-stranded RNA) formation; B: m⁶A regulates mRNA nuclear export to the cytoplasm; C: m⁶A modulates pre-mRNA splicing through both direct and indirect mechanisms; D: m⁶A regulates mRNA stability via dynamic modification; E: m⁶A mediates cap-dependent and cap-independent translation initiation processes; F: m⁶A facilitates chromatin interactions by regulating carRNA abundance and stability.

图1 m⁶A修饰的分子作用机制

Fig.1 Molecular mechanisms of m⁶A regulation

2 m⁶A“书写器”(writer)

大部分 m⁶A 是被甲基转移酶复合物 (methyltransferase complex, MTC) 以高度特异性的方式添加到 mRNA 上的, 这种具有添加 m⁶A 修饰功能的甲基转移酶被称为 m⁶A “书写器”, 该复合物靶向一个包含 DRACH 基序的特定位点^[17]。为了保证 m⁶A 高效、准确地被安装到 RNA 上, 组成 MTC 的三个核心亚基发挥了主要的功能。其中 METTL3 是复合物中唯一一个具有甲基转移酶活性的组分, METTL14 也包含 RNA 结合位点, 但其主要作为一种变构激活剂来促进 METTL3 的酶活性, 二者结合形成一个异源二聚体来发挥催化功能^[35]。除此之外, MTC 还包括第三个核心亚基——WTAP。虽然 WTAP 本身不具有甲基转移酶活性^[36], 但它可以通过与一些其他的辅助亚基结合来促进 MTC 的精准定位。这些辅助亚基包括 VIRMA、HAKAI、ZC3H13 以及 RBM15/15B 等。一般来说, ZC3H13-WTAP-VIRMA-HAKAI 四聚体被认为是一种较为经典的调控复合物, 发挥着 MTC 核定位的功能, 可以调节其底物区域选择性, 但不直接参与单个 RNA 靶点的识别^[37-38]。然而, 包含 RNA 结合基序的 RBM15/15B 则完美地弥补了这一缺陷, 它可以精准识别单个 RNA 靶点, 并将 MTC 招募到此位点^[32]。在一些特定的 RNA 中, m⁶A 的添加由其他特定的“writer”负责。ZCCHC4 和 METTL5-TRMT112 复合体分别在 28S 和 18S rRNA 中催化 m⁶A 的形成^[39], 而 METTL16 的两种已验证的底物是 U6 snRNA 和 MAT2A mRNA 3'UTR 区的茎环结构, 该 mRNA 编码 S-腺苷甲硫氨酸 (SAM) 合成酶^[40]。这些不同 RNA 上的 m⁶A 修饰将从 RNA 稳定性、翻译效率、RNA 剪接等不同方面影响细胞的基因调控网络。

METTL3 作为 MTC 的核心亚基, 已被证明可以在多种组织中调节细胞分化与细胞重编程等机体内重要的生物学过程。mRNA 上的 m⁶A 甲基化是影响细胞命运的一个关键控制器。目前已有研究表明了 METTL3 在哺乳动物胚胎发育中的必要性, 它可以促进胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ESCs) 从“naïve”状态向“primed”状态过渡, 确保胚胎早期发育过程中的细胞命运决定^[14]。

在这些生理过程中, METTL3 介导的 m⁶A 甲基化主要是通过影响 mRNA 转录本的稳定性、翻译和构象来调节机体功能。许多研究已经探索了 m⁶A 甲基化调节转录本命运的机制, 有实验证明敲除 METTL3

和 METTL14 将会提高其靶 mRNA 的稳定性^[41]。m⁶A 对于 RNA 稳定性的调节在细胞应激状态下发挥着重要的功能, 能够维持细胞稳态。例如, 当细胞热休克后, METTL3 通过共转录的方式在这些热休克转录本上添加 m⁶A, 以确保它们被及时清除^[42]。另外还有研究显示, METTL3 催化的 m⁶A 甲基化可以促使机体清除内源性逆转录病毒 (endogenous retroviruses, ERVs) 来源的 RNA, 为维持细胞完整性提供了保护作用^[43]。然而 METTL16 介导的 m⁶A 修饰则通过维持 MAT2A 转录本的稳定性来调节 SAM 的稳态, 这一现象是与上述结论相反的^[44], 原因可能是不同的 m⁶A “reader”对 RNA 命运具有不同的调节作用。除此之外, 我们前期的研究发现 m⁶A 影响 RNA 命运的另一种机制, 在小鼠造血系统中特异性敲除 METTL3 会诱导 dsRNA 的形成, 致使机体将内源性 dsRNA 识别成外来的病毒 RNA, 引发异常的天然免疫反应, 最终导致造血干细胞 (hematopoietic stem cells, HSCs) 自我更新缺陷及造血衰竭^[16]。近期有研究表明, 在 1 型糖尿病个体的胰岛 β 细胞中 METTL3 也可以通过影响天然免疫反应来调控疾病的进程^[45]。

到目前为止, m⁶A “writer”被认为不仅可以通过结合 RNA 来发挥作用, 还可以利用共转录的方式在细胞核中将 m⁶A 添加到 RNA 上, 但其如何将甲基化修饰定位到一个特定转录本上也是一个十分有趣的话题。人们经过长期的研究发现, 在染色质中, 转录因子 (transcription factors, TFs) 或表观遗传修饰可以将“writer”复合物招募到特定的基因组位点, 这可能有助于 m⁶A 的区域修饰特异性的形成^[28]。一项对急性髓系白血病 (acute myeloid leukemia, AML) 的研究表明, METTL3 与细胞增殖活性基因的启动子区域有关, 启动子上的转录因子 CAATT-box 结合蛋白 zeta (CCAAT/enhancer binding protein zeta, CEBPZ) 是将 METTL3 招募到染色质所必需的, 而 METTL3 在启动子上的定位并不依赖于 METTL14^[46]。此外有其他研究表明, 组蛋白 H3K36me3 修饰对 MTC 的招募则需要 METTL14 发挥其识别功能^[11]。目前, m⁶A “writer”参与染色质共转录的分子机制仍然在不断探索中。近期的研究发现 R-loop-DDX21-METTL3 轴参与了染色质共转录的调节过程, 这三种元件对 m⁶A 的成功安装缺一不可^[47]。除此之外, 最新的一项研究表明, 染色质上的同义突变会影响下游 mRNA 的 m⁶A 修饰, 从而破坏抑癌基因的转录本稳定性^[48]。

这为RNA修饰的探索提供了新的思路,同义突变对RNA修饰的调节如何影响肿瘤疾病的进展仍有待深入研究。

3 m⁶A“擦除器”(eraser)

m⁶A修饰在生物体中是一个动态调控的过程,RNA上m⁶A的添加由甲基转移酶介导,反之,其修饰的去除也需要一种相应的酶来催化,人们将这种m⁶A去甲基化酶命名为m⁶A“擦除器”。到目前为止,已鉴定出两个m⁶A“eraser”。FTO是第一个被鉴定的m⁶A“eraser”,它可以去除mRNA中的m⁶A和m⁶A_m以及tRNA中的m⁶A等^[18]。FTO的亚细胞定位在不同的哺乳动物细胞系中存在差异,其在正常细胞内主要集中于细胞核;而在肿瘤细胞内,FTO则会从细胞核转运到细胞质中。第二个被发现的m⁶A“eraser”是 α -酮戊二酸(α -KG)依赖的双加氧酶ALKBH5。与FTO不同,ALKBH5是迄今为止被发现的第一种以m⁶A为唯一底物的RNA去甲基化酶,其主要定位于细胞核中^[19]。

虽然FTO和ALKBH5在结构和功能上存在一定的相似性,但它们具有完全不同的催化特性。在哺乳动物中,ALKBH5在睾丸中表达量最高^[19],而FTO在大脑中表达量最高,两者在不同组织间的表达差异可能是这两种m⁶A去甲基化酶参与不同的生物学途径的原因之一。除此之外,对于不同底物的靶向性也是二者差异的一个重要因素。值得注意的是,m⁶A可能不是FTO的关键靶点。有研究指出,FTO对m⁶A_m去甲基化活性明显高于m⁶A,FTO敲除细胞可以通过维持m⁶A_m形式的snRNA导致剪接缺陷^[49]。目前m⁶A去甲基化酶实现底物特异性的机制尚未完全阐明。研究者提出假设,m⁶A“eraser”的去甲基化酶活性与底物选择性是由RNA结合蛋白调控的,HNRNP A2/B1可能在“m⁶A开关”发挥功能的过程中起着关键的协助定位作用,而不是直接作为m⁶A修饰的“reader”^[50]。对于这类假设,近期已有研究给出了相关的答案,RNA结合蛋白RBM33通过促进ALKBH5去SUMO化,进而激活其去甲基化酶活性,并将ALKBH5选择性招募到RNA的m⁶A修饰位点^[51],以此实现m⁶A“eraser”的精准定位。

FTO和ALKBH5对其靶RNA功能的调控在生命过程中具有重要的生理意义。FTO已被证明有助于AML的发生,而R-2-羟基戊二酸(R-2-HG)

作为一种由突变体IDH1/2产生的代谢物,可以抑制FTO活性,限制AML的有氧糖酵解^[52]。在这之后,我们的研究发现,ALKBH5缺失通过降低酮戊二酸脱氢酶(OGDH)转录本的稳定性,从而抑制其蛋白表达,导致 α -KG积累并转变为L-2-羟基戊二酸(L-2-HG),最终抑制造血细胞的能量代谢^[53]。最近的一项研究显示,肝脏中的ALKBH5可以独立调控GCGR和mTORC1信号通路,从而维持葡萄糖和脂质代谢的稳态^[54]。这些结论揭示了m⁶A“eraser”在细胞代谢中的复杂功能网络,为治疗代谢性疾病提供了潜在靶点。除此之外,m⁶A“eraser”对染色质的状态也有着重要的调节作用。FTO敲除会导致纯合雌鼠无法产生健康存活的后代,这种生殖缺陷被发现与染色质相关RNA LINE1上的m⁶A缺失有关,由此导致的染色质开放程度降低将损害卵母细胞的成熟^[12]。

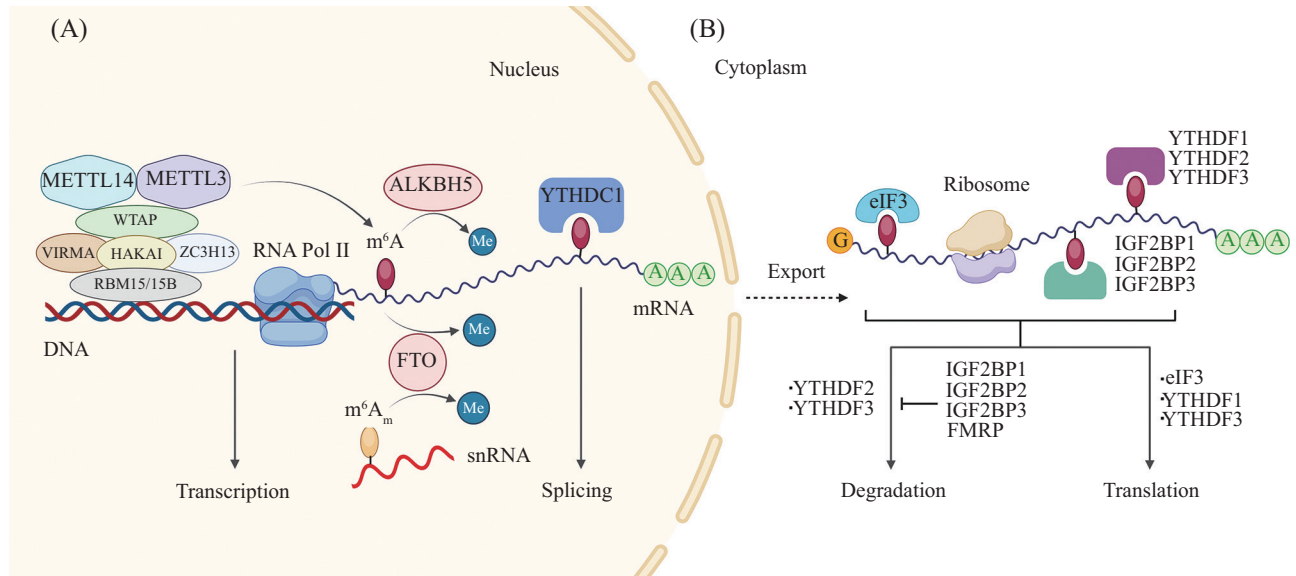
FTO和ALKBH5的发现拉开了m⁶A修饰动态调控的序幕,然而到目前为止,m⁶A可逆修饰的时空特异性及其分子机制仍未被完全阐明。m⁶A“eraser”在细胞核与细胞质中均有出现,那么它们究竟是在细胞核中通过共转录的方式擦除m⁶A还是依赖其他方式进行转录后去甲基化还有待深入研究,这将进一步理解m⁶A的动态调控提供更有力的证据(图2)。

4 m⁶A阅读器(reader)

m⁶A“书写器”、“擦除器”对靶RNA作用后,一些RNA结合蛋白能够识别靶RNA上的m⁶A修饰并影响其稳定性及后续加工等过程,这些能够识别靶RNA上m⁶A修饰的RNA结合蛋白被称为m⁶A“阅读器”。通过亲和层析、RNA pull-down实验和质谱技术,已在哺乳动物中鉴定出多种m⁶A“reader”,如YTH结构域蛋白、胰岛素样生长因子2结合蛋白(IGF2BPs)、核内不均一核糖核蛋白(HNRNPs)。针对这些m⁶A“reader”的研究揭示了m⁶A修饰在RNA稳定性及后续加工等过程中的重要作用。

4.1 YTH结构域蛋白

YT521-B剪接因子是首个被发现具有结合RNA上m⁶A修饰能力的蛋白质,YTH(YT521-B homology)结构域使其具备了结合RNA上m⁶A修饰的能力,因此该蛋白也被称为YTHDC1^[55]。在哺乳动物中,主要有两类含有YTH结构域的蛋白质家族:YTHDF与YTHDC。



A: 核内调控阶段。转录过程中, m^6A 甲基转移酶复合体催化生成 m^6A 修饰, 该修饰由 ALKBH5 和 FTO 动态可逆调控。YTHDC1 结合 m^6A 位点调控前体 mRNA 剪接与核输出。B: 胞质功能阶段。YTHDF1 与 eIF3 增强 mRNA 与核糖体的结合效率, YTHDF2 介导 mRNA 降解, YTHDF3 既可以促进 mRNA 翻译又可以促进其降解, IGF2BP 家族维持 mRNA 稳定, FMRP 抑制 mRNA 翻译。

A: nuclear regulation phase. During transcription, the m^6A methyltransferase complex catalyzes the formation of m^6A modifications, which are dynamically and reversibly regulated by ALKBH5 and FTO. YTHDC1 binds to m^6A sites to regulate pre-mRNA splicing and nuclear export. B: cytoplasmic function phase. YTHDF1 collaborates with eIF3 to enhance the binding efficiency of mRNA to ribosomes, while YTHDF2 mediates mRNA degradation. YTHDF3 exhibits dual roles in promoting both mRNA translation and degradation. The IGF2BP family maintains mRNA stability, whereas FMRP suppresses mRNA translation.

图2 mRNA上 m^6A 修饰的动态调控网络与功能

Fig.2 Dynamic regulatory network and functional mechanisms of m^6A -modified mRNA

4.1.1 YTHDF 家族蛋白 YTHDF 蛋白由 C-端的 YTH 结构域以及富含脯氨酸(Pro)、谷氨酰胺(Gln)和天冬酰胺(Asn)的 N-端结构域构成。YTH 结构域与 m^6A 修饰前后的核苷酸相互作用, 进而实现与 DRACH 基序的结合, 这是 YTH 结构域特异性识别 m^6A 修饰 RNA 的基础^[32]。YTH 结构域也具备识别 m^1A 修饰的能力, 但相较于识别 m^6A 修饰, 灵敏度更低^[56]。

YTHDF 蛋白家族成员包括 YTHDF1、YTHDF2、YTHDF3, 都定位于细胞质中。YTHDF2 是目前研究最多的 YTHDF 蛋白家族成员, 其主要功能是介导靶 mRNA 的降解。在大多数细胞中, 其表达水平远高于 YTHDF1 和 YTHDF3^[57]。YTHDF2 在结合 m^6A 修饰的 mRNA 后, 其 N-端的第 101 至 200 个氨基酸会招募 CCR4-NOT 脱腺苷酸酶复合物启动脱腺苷酸化过程, 导致靶 mRNA 降解^[41]。此外, m^6A 修饰的 mRNA 还以依赖热激反应蛋白 12(heat-responsive protein 12, HRSP12)的方式与 YTHDF2 结合, 随后被核糖核酸酶 P/MRP 切割^[58]。YTHDF2 在内皮细胞向造血干细胞转变的过程中, 介导动脉内皮基因 *notch1a* 和 *rhoca* 转录本的降解, 促进造血干祖细胞(hematopoietic

stem/progenitor cells, HSPCs) 的产生^[59]。

与 YTHDF2 不同, YTHDF1 的功能主要是促进核糖体与靶 mRNA 的结合, 并且通过与 eIF3 以帽依赖的方式相互作用, 关联 eIF4G 介导的环状结构, 从而提高翻译起始速率^[20]。基于 YTHDF1 在靶 mRNA 翻译进程中的重要作用, 最新的研究发现 YTHDF1 的缺失会导致 IgG 分泌量的减少, 有助于红斑狼疮的恢复^[60]。此外, 抑制 YTHDF1 还可以抑制肝癌干细胞的自我更新, 提高治疗效果^[61]。除了促进靶 mRNA 的翻译过程外, YTHDF1 还能通过液-液相分离(liquid-liquid phase separation, LLPS)促进靶 mRNA 的降解。液-液相分离是指在特定条件下, 由蛋白质、核酸等生物大分子组成的混合物在液相中发生分离, 形成两个或更多相互独立的液相; 这一现象在细胞内具有重要的生物学意义和功能^[62]。而 YTHDF1 正是借助液-液相分离促进加工小体(P-body)的形成, 进而实现对 mRNA 的降解的目的^[63]。

YTHDF3 在靶 mRNA 调控中发挥双重作用: YTHDF3 通过与 YTHDF1、40S/60S 核糖体亚基相互作用, 促进 m^6A 修饰 mRNA 的翻译过程^[64]; 同时,

YTHDF3还能与YTHDF2共同作用,促进m⁶A修饰的mRNA的降解^[65]。总体而言,YTHDF3充当一个枢纽,用于调节YTHDF1和YTHDF2对RNA的可及性。

YTHDF1和YTHDF3在其低复杂度结构域中具有高水平的O-GlcNAc修饰。在高O-GlcNAc修饰水平下,YTHDF蛋白的翻译促进功能受到抑制;而在低O-GlcNAc修饰水平下,其翻译促进功能得以发挥。这部分解释了YTHDF蛋白在不同细胞类型和实验条件下表现出不同的功能的原因^[66]。但针对YTHDF蛋白的功能存在不同的见解,部分研究人员认为YTHDF蛋白的功能是冗余的,并且其功能只是诱导mRNA的降解并不直接促进mRNA的翻译^[67]。因此,针对YTHDF蛋白的确切功能仍需进一步的研究。

4.1.2 YTHDC家族蛋白 YTHDC蛋白家族成员包括YTHDC1与YTHDC2。与存在于细胞质中的YTHDF蛋白不同,YTHDC1存在于细胞核中,具有一个YTH结构域以及多个其他功能结构域^[68]。YTHDC1可以通过优先招募特定的剪接因子来调控mRNA的剪接、加快mRNA的输出以及加速某些转录本的降解。YTHDC1结合m⁶A修饰的长链非编码RNA NEAT1后,其稳定性增强并促进了肝癌的进展,是肝癌潜在的治疗靶点^[69]。

YTHDC2是一种穿梭于细胞核与细胞质之间的蛋白质,它含有一个DEAD-box RNA解旋酶结构域,该结构使其能够通过m⁶A靶向到特定的RNA上。与YTHDF直接结合成熟的mRNA不同,YTHDC2主要与非编码RNA以及内含子和基因间区域结合^[32]。YTHDC2与减数分裂特异性蛋白MEIOC相互作用,影响减数分裂中靶转录本稳定性,在精子发生中具有重要作用^[70]。

4.2 胰岛素样生长因子2结合蛋白(IGF2BPs)

胰岛素样生长因子2结合蛋白(IGF2BPs)能够结合胰岛素样生长因子2(insulin-like growth factor 2, IGF2)的mRNA,调节其翻译过程,但它的功能并不局限于调节IGF2的表达。IGF2BPs是一个保守的单链RNA结合蛋白家族,包含两个RNA识别基序(RNA recognition motif, RRM)结构域和四个K同源(K-homology, KH)结构域,其主要功能是通过招募mRNA稳定因子来抑制靶mRNA的降解^[21]。针对急性髓系白血病(AML)的研究发现,IGF2BPs与其他RNA结合蛋白共同稳定了包括MYC、BCL2在内的多个促进AML细胞存活和增殖的mRNA,成为了潜

在的AML治疗靶点^[71]。此外,IGF2BP3通过与长链非编码RNA CDR1as的相互作用调控黑色素瘤细胞的侵袭和转移,并通过影响特定mRNA(如HMGA2)的稳定性促进肿瘤细胞的恶性进展,是潜在的黑色素瘤治疗靶点^[72]。

4.3 核内不均一核糖核蛋白(HNRNPs)

m⁶A的存在能够重塑RNA的结构,进而调节其周围或附近的RNA与蛋白质之间的相互作用,这被称为“m⁶A开关”^[25]。核内不均一核糖核蛋白(HNRNPs),如HNRNPC、HNRNPG可以通过“m⁶A开关”,调控靶转录本的可变剪接或加工过程。然而,核内不均一核糖核蛋白HNRNPA2B1的作用机制存在争议:有研究认为HNRNPA2B1能够直接结合m⁶A影响靶RNA的加工过程^[73]。然而,针对其空间结构的研究表明HNRNPA2B1可能并非通过直接结合m⁶A影响靶RNA的加工过程,更可能是利用“m⁶A开关”对靶RNA的后续加工进行调控^[50]。

4.4 其他m⁶A “reader”

除了上述三类研究较多且功能较为确切的m⁶A “reader”以外,还已知一些其他的“reader”。

脆性X智力障碍1蛋白(fragile X mental retardation 1, FMR1)含有三个K同源(KH)结构域和一个富含精氨酸/甘氨酸结构域,倾向于结合含有m⁶A的RNA,通过与YTHDF1和YTHDF2的相互作用,对RNA的翻译和稳定性产生影响^[74]。

5'UTR中约35%的m⁶A位点与eIF3的交联免疫沉淀(crosslinking-immunoprecipitation, CLIP)位点重叠,并且与未甲基化的RNA相比,eIF3更倾向于与含有m⁶A修饰的mRNA发生交联^[30],因此,eIF3也被认为是m⁶A “reader”的一种。

部分RNA结合蛋白也被报道为m⁶A “reader”,如:甲基化RNA结合蛋白1(mitochondrial RNA-binding complex 1, Mrb1)、ELAV(embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila)样RNA结合蛋白1(ELAV-like 1, ELAVL1)、富含亮氨酸的五肽重复序列包含蛋白(leucine-rich pentatricopeptide repeat-containing protein, LRPPRC)。然而,这些蛋白质是直接结合m⁶A,还是属于m⁶A结合核糖核蛋白复合物的一部分,还需要进一步研究^[75](图2)。

5 RNA m⁶A测序技术的进展

RNA m⁶A研究早期,由于缺乏可靠的测序分析

方法,因此关于m⁶A分布和功能的深入研究受到了限制。m⁶A高通量测序技术的出现打破了m⁶A在转录组中的检测限制,使得m⁶A的深入研究成为了可能,开启了表观转录组研究的热潮。为了更加深入地揭示m⁶A的生物学功能,测序方法经过不断迭代,能够更灵敏、更准确、更高通量地绘制m⁶A转录组图谱。

2012年,基于m⁶A特异性抗体免疫沉淀的m⁶A-seq(m⁶A-MeRIP-seq)首次绘制了人类与小鼠的m⁶A图谱,证明了m⁶A在多种RNA类型中存在并随着细胞状态而动态改变,展示了m⁶A在基因表达调控上的重要作用^[7-8]。但是该方法分辨率不足,只能将m⁶A定位到100~200 nt的RNA片段,限制了人们的进一步研究。为了提高检测的分辨率,m⁶A单核苷酸拆分交联和免疫共沉淀技术miCLIP(m⁶A individual-nucleotide-resolution cross-linking and immunoprecipitation, m⁶A-CLIP)和光交联辅助m⁶A测序技术(photo-crosslinking-assisted m⁶A sequencing strategy, PA-m⁶A-seq)优化了抗体策略,利用紫外线使蛋白质与RNA交联使交联位点在逆转录过程中导致截断或错误掺入,从而精确反映出了修饰位点,实现了m⁶A的单碱基定位^[10,76]。m⁶A水平和亚型特征测序(m⁶A-level and isoform-characterization sequencing, m⁶A-LAIC-seq)在RNA与抗体杂交后定量地分解甲基化和非甲基化转录本,对完整的全长转录本进行测序,并提供这两种转录本的量化比例,首次描绘了m⁶A的化学计量学特征^[77]。但是基于抗体的检测方法其特异性及分辨率仍然有限,且抗体的亲和力变异和批处理效应导致重复率较差,这限制了对于m⁶A生物学功能的研究。

为了突破抗体分辨率的限制这一瓶颈,研究人员开发了全新的m⁶A检测方法。MAZTER-seq和m⁶A-REF-seq(m⁶A-sensitive RNA-endoribonuclease-facilitated sequencing)基于MazF RNase的差异性切割,能在ACA特异性序列的未甲基化A位点上切割RNA。随后,对处理后的RNA片段进行逆转录和测序,通过量化每个转录片段ACA位点的起始、终止和读取的数量,从而实现m⁶A的定量分析^[78-79]。但是这种方法可以检测的位点仅占mRNA中m⁶A总位点的16%~25%,不能检测mRNA上所有的m⁶A修饰。近RNA修饰靶点脱氨测序技术(deamination adjacent to RNA modification targets sequencing, DART-seq)利用YTH结构域与胞苷脱氨酶APOBEC1结合,诱

导m⁶A残基附近的胞嘧啶脱氨转变为尿嘧啶(C-to-U),进而在微量的RNA样本中实现转录组范围内的m⁶A定位^[80],但是其性能依赖于APOBEC1-YTH质粒的转染效率,并受到YTH结构域的亲和力以及m⁶A与相邻C之间的距离的影响。m⁶A-SEAL(FTO-assisted m⁶A selective chemical labeling method)和m⁶A-label-seq(metabolic labeling method to detect mRNA m⁶A transcriptome-wide at base resolution)为m⁶A特异性映射提供了新的选择,但它们仍然缺乏化学计量学信息^[81-82]。

m⁶A选择性烯丙基化学标记和测序(m⁶A-selective allyl chemical labeling and sequencing, m⁶A-SAC-seq)通过连续的甲基化反应将A转化为m⁶A,同时将m⁶A转化为m⁶₂A,可以提供m⁶A修饰的化学计量学^[83],但是在AAC序列位点存在限制,并依赖于基于RNA的归一化进行定量。最近,改良的TadA辅助N⁶-甲基腺苷测序(evolved TadA-assisted N⁶-methyladenosine sequencing, eTAM-seq)和乙二醛和亚硝酸盐介导的未甲基化腺苷的脱氨测序技术(glyoxal and nitrite-mediated deamination of unmethylated adenosines, GLORI)通过将未甲基化腺苷高效脱氨,保持m⁶A信息的完整性,能够对m⁶A甲基组进行绝对定量^[84-85],且在不断变化的细胞条件下更细致地展示m⁶A的动态变化,这将有助于解决m⁶A的重大生物学问题。

单细胞RNA测序(single-cell RNA sequencing, scRNA-seq)能够揭示单细胞间的差异性,这一技术的出现代表转录组测序进入新的时代。scm⁶A-seq(single-cell m⁶A sequencing)与scDART-seq(single-cell DART-seq)分别在原有的MeRIP和DART-seq的基础上进行了改进,实现了单细胞水平的m⁶A修饰检测,使m⁶A细胞异质性的研究成为了可能,但依旧受到了原有方法策略的限制^[86-87]。sn-m⁶A-CT(single-nucleus m⁶A-CUT&Tag)能够原位富集m⁶A标记的RNA分子,进行高通量分析而不需要事先对细胞进行基因操作^[88],适用于分析高度异质性的细胞群体。这些方法将会有助于揭示m⁶A异质性信息,进而对m⁶A的功能机制提出新的见解。

上述基于m⁶A的特异性的测序方法极大地推动了m⁶A研究的进展,此外,还有许多RNA修饰的测序方法值得讨论。高灵敏度液相色谱-质谱法(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)将RNA

水解成单核苷酸,通过液相层析将混合物分离为单一组分,然后借助高分辨质谱提供每个组分的精确质量数,通过匹配已知修饰核苷的质谱数据库,能够同时测定数十种RNA修饰类型的丰度,被广泛应用于RNA修饰的检测和定量,是识别和定量RNA修饰的有力工具^[89],但是这种方法无法获得修饰的具体位置信息。MLC-seq(MS ladder complementation sequencing approach)通过可控的酸水解的方式,使得RNA变成梯度大小的片段,满足了质谱检测对于梯度的要求,以单核苷酸精度对全长异质细胞的转录本进行了从头质谱测序,弥补了质谱检测法不能获得修饰具体位置信息的缺陷^[90],但是它无法进行微量样本的检测。PANDORA-seq(panoramic RNA display by overcoming RNA modification aborted sequencing)通过克服RNA修饰的终止测序而绘制了全景RNA图谱,发现了大量带有修饰的sncRNA,更加真实地反映了小RNA在体内的表达情况^[91]。纳米孔测序可以在天然RNA上进行,从而在建库过程中保留RNA修饰,具有相当的准确性、较长的读取长度和较大的通量,并已广泛应用于m⁶A和其他RNA修饰的检测^[92]。除此之外还有针对Ψ、m⁷G、m⁵C、m³C、m¹A、Nm等修饰的检测技术^[1],这些RNA修饰检测技术的开发,为表观转录组在RNA加工和细胞生物学中的具体作用提供了新的视角(图3和表1)。

6 RNA m⁶A修饰与癌症进程

在过去的十年中,由m⁶A机制的改变引起的基因表达失调已被广泛研究。m⁶A并被证明可以作为癌蛋白或肿瘤抑制因子在癌症起始、进展和药物反应中发挥重要作用。包括m⁶A修饰及其“writer”、“eraser”和“reader”在内的异常特征可能作为癌症诊断、预后和预测生物标志物,且具有巨大的临床治疗潜力。

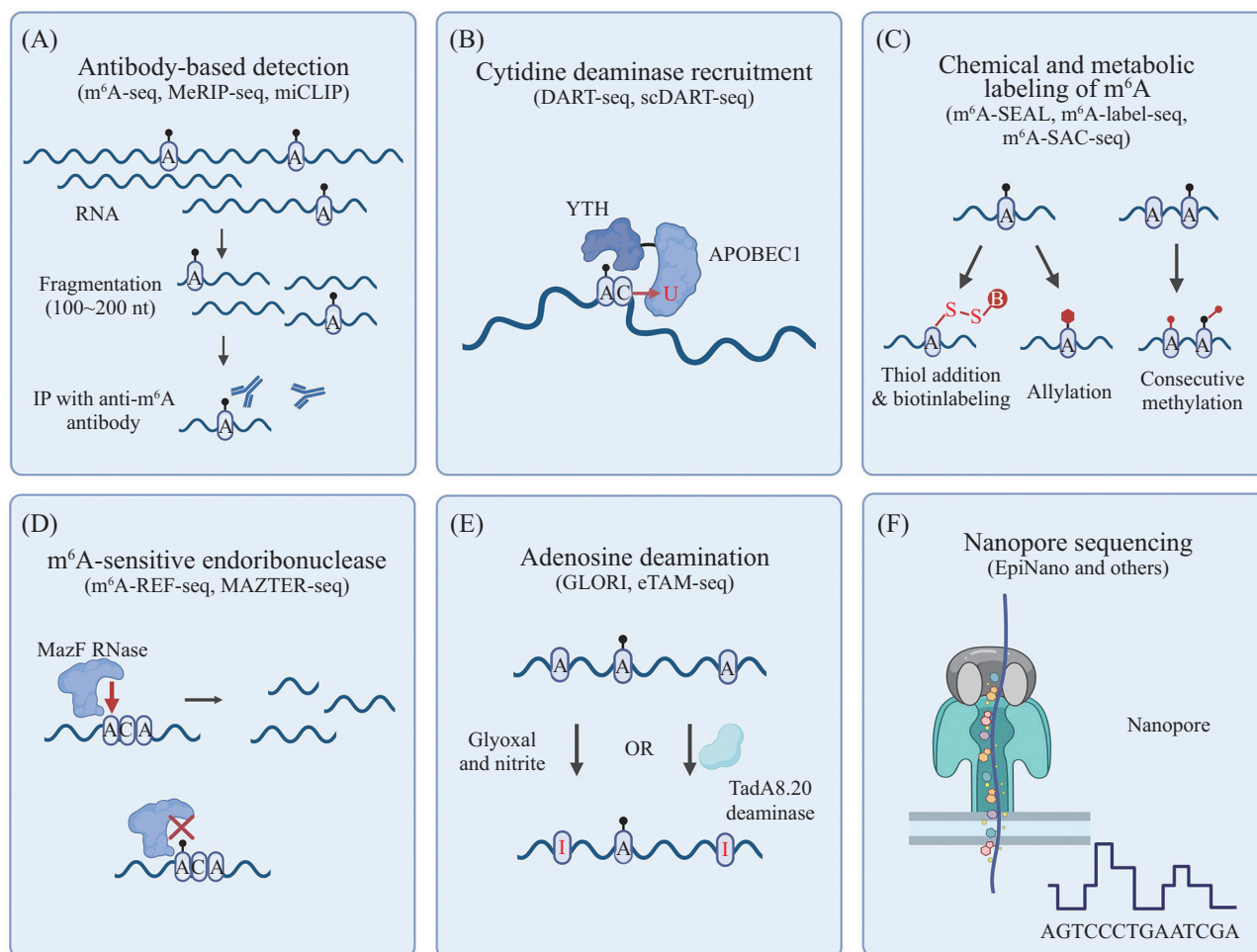
近年来越来越多的证据表明, METTL3、METTL14、WTAP作为m⁶A甲基转移酶在多种癌症中作为致癌因子发挥着关键作用,在肿瘤中的高水平表达通常与不良的预后相关^[13]。在急性髓系白血病(AML)中, METTL3、METTL14以及WTAP均异常表达。这些蛋白通过m⁶A介导的方式增加致癌基因mRNA靶点的稳定性和促进其翻译,同时导致抑癌基因mRNA的失稳和表达抑制,因此对造血/白血病干细胞的自我更新和分化至关重要^[13]。

目前有3种METTL3的小分子抑制剂被报道。UZH1a和UZH2是一组对映体化合物,在结构上与甲基转移酶辅助因子SAM相似,通过竞争性结合抑制METTL3催化活性,降低了白血病细胞中的m⁶A水平。STM2457是另一种METTL3抑制剂,其结构与SAM无关,但是能以更加高效且更具选择性的方式占用SAM的结合区域(IC₅₀=16.9 nmol/L),抑制METTL3的催化活性,在体外有效显著抑制AML细胞生长、分化并促进其凋亡,并在多个AML小鼠模型中具有良好的治疗活性^[93]。目前,以STM2457为基础开发的STC-15正在进行临床I期试验(NCT05584111),它有着良好的临床活性,且在药理活性剂量范围内耐受性良好^[94]。

m⁶A去甲基化酶的失调在癌症中也很常见。ALKBH5可以通过擦除m⁶A促进癌症干细胞的自我更新、扩张和转移,在许多恶性肿瘤中高表达。例如,胶质母细胞瘤干细胞样细胞(glioblastoma stem cell-like cells, GSCs)依赖于ALKBH5的高表达和优先的铁转运, ALKBH5去甲基化铁蛋白下游因子FOXM1的新生转录本,增强了FOXM1表达能力,促进了GSC的肿瘤发生^[95]。

FTO的高表达通过m⁶A依赖的机制促进了肿瘤的发生与转移,标志着癌症患者的不良预后,抑制FTO能够抑制肿瘤细胞依赖的免疫检查点基因LILRB4的表达,重新编程免疫反应,阻碍了癌症干细胞的自我更新和免疫逃避,显示出了抗肿瘤作用^[96]。最新的FTO的小分子抑制剂CS1和CS2通过直接与FTO蛋白紧密结合,并占据催化结合位点,抑制FTO催化活性,从而抑制MYC通路并激活凋亡信号通路,进而显著降低患者AML细胞的活力与增殖速率^[96]。这两种抑制剂的IC₅₀均已达到nmol/L级别,有效性在先前FTO抑制剂FB23-2的基础上提升了10倍,并且对高FTO水平的AML样本更具敏感性,具有高度的临床应用可行性。

YTH蛋白家族作为最早被发现的m⁶A阅读器,已经在许多癌症类型中得到了充分的研究。在AML中, YTHDF2促进m⁶A转录本的降解,在AML发展阶段促进白血病干细胞的扩增^[97]。IGF2BP是癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)中上调最多的RNA结合蛋白之一,在大多数癌症尤其是晚期癌症中高表达。IGF2BP以m⁶A依赖的方式调控经典致癌基因的稳定性及储存,能够调控多种生长因



A: m⁶A-seq与MeRIP-seq检测m⁶A修饰基于m⁶A特异性抗体,其定位分辨率为100~200核苷酸;B: DART-seq技术通过招募胞苷脱氨酶至m⁶A位点,诱导特定位点的突变信号进行m⁶A修饰检测;C: 化学代谢标记法包括,m⁶A-SEAL、m⁶A-label-seq、m⁶A-SAC-seq;D: m⁶A-REF-seq和MAZTER-seq检测m⁶A修饰基于m⁶A敏感内切酶MazF特异性切割ACA序列,保留m⁶ACA;E: 选择性腺苷脱氨技术实现了全转录组m⁶A修饰的化学计量检测;F: 纳米孔测序技术可以实现m⁶A及其他RNA修饰的直接检测。

A: m⁶A-seq and MeRIP-seq detect m⁶A modifications using m⁶A-specific antibodies, achieving localization resolution of 100-200 nucleotides; B: DART-seq technology detects m⁶A modifications by recruiting cytidine deaminase to m⁶A sites, inducing site-specific mutagenesis signals; C: chemical metabolic labeling methods include, m⁶A-SEAL, m⁶A-label-seq, and m⁶A-SAC-seq; D: m⁶A-REF-seq and MAZTER-seq detect m⁶A modifications through m⁶A-sensitive endonuclease MazF, which specifically cleaves ACA sequences while preserving m⁶ACA; E: selective adenosine deamination technology enables transcriptome-wide stoichiometric detection of m⁶A modifications; F: nanopore sequencing technology allows direct detection of m⁶A and other RNA modifications.

图3 m⁶A修饰检测技术

Fig.3 Detection technologies for m⁶A modification

子,促进癌症细胞上皮-间充质转化,加速癌症的进程,靶向IGF2BP2的抑制剂CW11-2,通过与IGF2BP2选择性结合,抑制其m⁶A阅读器活性,且副作用较小,在体内和体外都显示出良好的抗白血病作用^[98]。

m⁶A修饰因子在其他癌症类型中也可能作为肿瘤抑制因子。例如,在结直肠癌中METTL3被发现可以通过p38/ERK通路抑制癌细胞增殖、迁移和侵袭^[99]。在肝癌中METTL14以m⁶A依赖的方式通过促进初级microRNA加工进而抑制癌症转移^[100]。因此,

m⁶A及其调控蛋白在癌症中的作用具有复杂性,需要在具体的癌症中加以深入研究。

RNA m⁶A修饰在细胞中分布的多样性以及调控机制的复杂性提示它是转录后调控的一个关键因子。不断改进的m⁶A测序技术使m⁶A机制的深入研究成为可能,未来的研究或许将解释单个细胞甚至是单个位点上m⁶A修饰的作用机理;药物筛选和合理的药物设计策略产生了有效的m⁶A修饰机制的小分子抑制剂,m⁶A的中心数据库已经被开发并被

表1 检测m⁶A mRNA修饰的测序技术
Table 1 Sequencing technologies for the detection of m⁶A mRNA modifications

检测方法 Detection methods	RNA输入 RNA input	基频分辨率 Base resolution	优点 Advantage	缺点 Disadvantage
m ⁶ A-seq	400 µg mRNA or 2.5 mg total RNA	No	The m ⁶ A map of human and mouse was mapped for the first time	m ⁶ A residues only be localized to transcript regions 100-200 nt long
miCLIP	20 µg fragmented RNA after depleted ribosomal RNA	Yse	Achieved single base localization of m ⁶ A	The specificity and resolution are still limited, and the affinity variation and batch effect of antibodies lead to poor reproducibility
PA-m ⁶ A-seq	10 µg of mRNA	Yse	Achieved single base localization of m ⁶ A	The specificity and resolution are still limited, and the affinity variation and batch effect of antibodies lead to poor reproducibility
m ⁶ A-LAIC-seq	150 µg of total RNA	Yse	The stoichiometric information of m ⁶ A were depicted for the first time	The specificity and resolution are still limited, and the affinity variation and batch effect of antibodies lead to poor reproducibility
MAZTER-seq	100 ng of mRNA	Yse	Avoiding the limitation of antibody resolution	Only reads m ⁶ A sites in ACA motifs that accounts for 16%-25% of the total m ⁶ A sites in mRNA, and the quantitative power of MAZTER-seq is further challenged by the limited enzymatic efficiency of MazF
m ⁶ A-REF-seq	500 ng of mRNA	Yse	Avoiding the limitation of antibody resolution	Only reads m ⁶ A sites in ACA motifs that accounts for 16%-25% of the total m ⁶ A sites in mRNA, and the quantitative power of MAZTER-seq is further challenged by the limited enzymatic efficiency of MazF
DART-seq	10 ng-100 ng of total RNA	Yse	Map m ⁶ A sites from low quantities of RNA	High false-positive rates derived from non-specific C-to-U editing events
m ⁶ A-SEAL	200 ng mRNA	No	FTO protein that the method relies on is commercially available or can be easily purified in laboratory	The resolution of m ⁶ A-SEAL (~200 nt) is compatible with MeRIP
m ⁶ A-label-seq	10 µg total RNA	Yse	Applicable to all m ⁶ A motif sequences and its entire procedure is easier to handle	Lack of a long time period of labeling and need to consider the methionine analog-induced moderate cellular stress
m ⁶ A-SAC-seq	~30 ng of mRNA or rRNA-depleted RNA	Yse	The stoichiometry of m ⁶ A modification can be provided by converting A to m ⁶ A and m ⁶ A to m ⁶ 2A simultaneously through continuous methylation reactions	There are limitations at AAC sequence sites and quantification relies on RNA based normalization
eTAM-seq	50 ng mRNA	Yse	Allow detection limit and maintain RNA integrity with no measurable degradation	May not work well for highly structured RNA; stoichiometry estimation may be less accurate at lowly methylated sites or sites of compromised accessibility
GLORI	1 µg mRNA	Yse	Allow detection limit and maintain RNA integrity with no measurable degradation	High sequencing cost compared to enrichment-based methods; do not enable to direct distinguish m ⁶ A from some other A modifications

不断完善。随着研究人员对复杂生物过程中 m⁶A 修饰机制理解的不断推进, 针对表观转录组的治疗策略也将被开发用于治疗人类疾病。总而言之, 以 m⁶A 为代表的 RNA 修饰介导的调控机制极大地拓展了我们对细胞命运调控的认知, 并为疾病治疗带

来了全新的思路。

参考文献 (References)

[1] CERNECKIS J, MING G L, SONG H, et al. The rise of epitranscriptomics: recent developments and future directions [J]. Trends Pharmacol Sci, 2024, 45(1): 24-38.

- [2] BOULIAS K, GREER E L. Biological roles of adenine methylation in RNA [J]. *Nat Rev Genet*, 2022, 24(3): 143-60.
- [3] DESROSIERES R, FRIDERICI K, ROTTMAN F. Identification of methylated nucleosides in messenger RNA from Novikoff hepatoma cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1974, 71(10): 3971-5.
- [4] SOMMER S, LAVI U, DARNELL J E, JR. The absolute frequency of labeled *N*⁶-methyladenosine in HeLa cell messenger RNA decreases with label time [J]. *J Mol Biol*, 1978, 124(3): 487-99.
- [5] BOKAR J A, SHAMBAUGH M E, POLAYES D, et al. Purification and cDNA cloning of the AdoMet-binding subunit of the human mRNA (*N*⁶-adenosine)-methyltransferase [J]. *RNA*, 1997, 3(11): 1233-47.
- [6] JIA G, FU Y, ZHAO X, et al. *N*⁶-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO [J]. *Nat Chem Biol*, 2011, 7(12): 885-7.
- [7] DOMINISSINI D, MOSHITCH-MOSHKOVITZ S, SCHWARTZ S, et al. Topology of the human and mouse m⁶A RNA methylomes revealed by m⁶A-seq [J]. *Nature*, 2012, 485(7397): 201-6.
- [8] MEYER K D, SALETORRE Y, ZUMBO P, et al. Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3'UTRs and near stop codons [J]. *Cell*, 2012, 149(7): 1635-46.
- [9] ZACCARA S, RIES R J, JAFFREY S R. Reading, writing and erasing mRNA methylation [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(10): 608-24.
- [10] LINDER B, GROZHIK A V, OLARERIN-GEORGE A O, et al. Single-nucleotide-resolution mapping of m⁶A and m⁶A_m throughout the transcriptome [J]. *Nat Methods*, 2015, 12(8): 767-72.
- [11] HUANG H, WENG H, ZHOU K, et al. Histone H3 trimethylation at lysine 36 guides m⁶A RNA modification co-transcriptionally [J]. *Nature*, 2019, 567(7748): 414-9.
- [12] WEI J, YU X, YANG L, et al. FTO mediates LINE1 m⁶A demethylation and chromatin regulation in mESCs and mouse development [J]. *Science*, 2022, 376(6596): 968-73.
- [13] DENG X, QING Y, HORNE D, et al. The roles and implications of RNA m⁶A modification in cancer [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2023, 20(8): 507-26.
- [14] GEULA S, MOSHITCH-MOSHKOVITZ S, DOMINISSINI D, et al. Stem cells. m⁶A mRNA methylation facilitates resolution of naive pluripotency toward differentiation [J]. *Science*, 2015, 347(6225): 1002-6.
- [15] BATISTA PEDRO J, MOLINIE B, WANG J, et al. m⁶A RNA modification controls cell fate transition in mammalian embryonic stem cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 15(6): 707-19.
- [16] GAO Y, VASIC R, SONG Y, et al. m⁶A modification prevents formation of endogenous double-stranded RNAs and deleterious innate immune responses during hematopoietic development [J]. *Immunity*, 2020, 52(6): 1007-21.e8.
- [17] LIU J, YUE Y, HAN D, et al. A METTL3-METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA *N*⁶-adenosine methylation [J]. *Nat Chem Biol*, 2014, 10(2): 93-5.
- [18] WEI J, LIU F, LU Z, et al. Differential m⁶A, m⁶A_m, and m¹A demethylation mediated by FTO in the cell nucleus and cytoplasm [J]. *Mol Cell*, 2018, 71(6): 973-85.e5.
- [19] ZHENG G, DAHL J A, NIU Y, et al. ALKBH5 is a mammalian RNA demethylase that impacts RNA metabolism and mouse fertility [J]. *Mol Cell*, 2013, 49(1): 18-29.
- [20] WANG X, ZHAO B S, ROUNDTREE I A, et al. *N*⁶-methyladenosine modulates messenger RNA translation efficiency [J]. *Cell*, 2015, 161(6): 1388-99.
- [21] HUANG H, WENG H, SUN W, et al. Recognition of RNA *N*⁶-methyladenosine by IGF2BP proteins enhances mRNA stability and translation [J]. *Nat Cell Biol*, 2018, 20(3): 285-95.
- [22] LIU N, ZHOU K I, PARISIEN M, et al. *N*⁶-methyladenosine alters RNA structure to regulate binding of a low-complexity protein [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(10): 6051-63.
- [23] ROOST C, LYNCH S R, BATISTA P J, et al. Structure and thermodynamics of *N*⁶-methyladenosine in RNA: a spring-loaded base modification [J]. *J Am Chem Soc*, 2015, 137(5): 2107-15.
- [24] XIAO W, ADHIKARI S, DAHAL U, et al. Nuclear m⁶A reader YTHDC1 regulates mRNA splicing [J]. *Mol Cell*, 2016, 61(4): 507-19.
- [25] LIU N, DAI Q, ZHENG G, et al. *N*⁶ methyladenosine-dependent RNA structural switches regulate RNA-protein interactions [J]. *Nature*, 2015, 518(7540): 560-4.
- [26] ROUNDTREE I A, LUO G Z, ZHANG Z, et al. YTHDC1 mediates nuclear export of *N*⁶-methyladenosine methylated mRNAs [J]. *eLife*, 2017, 6: e31311.
- [27] DU H, ZHAO Y, HE J, et al. YTHDF2 destabilizes m⁶A-containing RNA through direct recruitment of the CCR4-NOT deadenylase complex [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 12626.
- [28] SHI H, WEI J, HE C. Where, when, and how: context-dependent functions of RNA methylation writers, readers, and erasers [J]. *Mol Cell*, 2019, 74(4): 640-50.
- [29] GENTRY R C, IDE N A, COMUNALE V M, et al. The mechanism of mRNA cap recognition [J]. *Nature*, 2025, 637(8046): 736-43.
- [30] MEYER K D, PATIL D P, ZHOU J, et al. 5'UTR m⁶A promotes cap-independent translation [J]. *Cell*, 2015, 163(4): 999-1010.
- [31] LIU J, DOU X, CHEN C, et al. *N*⁶-methyladenosine of chromosome-associated regulatory RNA regulates chromatin state and transcription [J]. *Science*, 2020, 367(6477): 580-6.
- [32] PATIL D P, CHEN C K, PICKERING B F, et al. m⁶A RNA methylation promotes XIST-mediated transcriptional repression [J]. *Nature*, 2016, 537(7620): 369-73.
- [33] YANG X, LIU Q L, XU W, et al. m⁶A promotes R-loop formation to facilitate transcription termination [J]. *Cell Res*, 2019, 29(12): 1035-8.
- [34] ABAKIR A, GILES T C, CRISTINI A, et al. *N*⁶-methyladenosine regulates the stability of RNA:DNA hybrids in human cells [J]. *Nat Genet*, 2020, 52(1): 48-55.
- [35] WANG X, FENG J, XUE Y, et al. Structural basis of *N*⁶-adenosine methylation by the METTL3-METTL14 complex [J]. *Nature*, 2016, 534(7608): 575-8.
- [36] PING X L, SUN B F, WANG L, et al. Mammalian WTAP is a regulatory subunit of the RNA *N*⁶-methyladenosine methyltransferase [J]. *Cell Res*, 2014, 24(2): 177-89.
- [37] WEN J, LYU R, MA H, et al. Zc3h13 regulates nuclear RNA m⁶A methylation and mouse embryonic stem cell self-renewal [J]. *Mol Cell*, 2018, 69(6): 1028-38.e6.
- [38] YUE Y, LIU J, CUI X, et al. VIRMA mediates preferential m⁶A mRNA methylation in 3'UTR and near stop codon and associates with alternative polyadenylation [J]. *Cell Discov*, 2018, 4: 10.

- [39] MA H, WANG X, CAI J, et al. *N*⁶-methyladenosine methyltransferase ZCCHC4 mediates ribosomal RNA methylation [J]. *Nat Chem Biol*, 2019, 15(1): 88-94.
- [40] PENDLETON K E, CHEN B, LIU K, et al. The U6 snRNA m⁶A methyltransferase METTL16 regulates SAM synthetase intron retention [J]. *Cell*, 2017, 169(5): 824-35, e14.
- [41] WANG X, LU Z, GOMEZ A, et al. *N*⁶-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability [J]. *Nature*, 2014, 505(7481): 117-20.
- [42] KNUCKLES P, CARL S H, MUSHEEV M, et al. RNA fate determination through cotranscriptional adenosine methylation and microprocessor binding [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2017, 24(7): 561-9.
- [43] CHELMICKI T, ROGER E, TEISSANDIER A, et al. m⁶A RNA methylation regulates the fate of endogenous retroviruses [J]. *Nature*, 2021, 591(7849): 312-6.
- [44] SHIMA H, MATSUMOTO M, ISHIGAMI Y, et al. S-adenosylmethionine synthesis is regulated by selective *N*⁶-adenosine methylation and mRNA degradation involving METTL16 and YTHDC1 [J]. *Cell Rep*, 2017, 21(12): 3354-63.
- [45] DE JESUS D F, ZHANG Z, BROWN N K, et al. Redox regulation of m⁶A methyltransferase METTL3 in beta-cells controls the innate immune response in type 1 diabetes [J]. *Nat Cell Biol*, 2024, 26(3): 421-37.
- [46] BARBIERI I, TZELEPIS K, PANDOLFINI L, et al. Promoter-bound METTL3 maintains myeloid leukaemia by m⁶A-dependent translation control [J]. *Nature*, 2017, 552(7683): 126-31.
- [47] HAO J D, LIU Q L, LIU M X, et al. DDX21 mediates co-transcriptional RNA m⁶A modification to promote transcription termination and genome stability [J]. *Mol Cell*, 2024, 84(9): 1711-26, e11.
- [48] LAN Y, XIA Z, SHAO Q, et al. Synonymous mutations promote tumorigenesis by disrupting m⁶A-dependent mRNA metabolism [J]. *Cell*, 2025, 188(7): 1828-41, e15.
- [49] BARTOSOVIC M, MOLARES H C, GREGOROVA P, et al. *N*⁶-methyladenosine demethylase FTO targets pre-mRNAs and regulates alternative splicing and 3'-end processing [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(19): 11356-70.
- [50] WU B, SU S, PATIL D P, et al. Molecular basis for the specific and multivariant recognitions of RNA substrates by human hnRNP A2/B1 [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 420.
- [51] YU F, ZHU A C, LIU S, et al. RBM33 is a unique m⁶A RNA-binding protein that regulates ALKBH5 demethylase activity and substrate selectivity [J]. *Mol Cell*, 2023, 83(12): 2003-19, e6.
- [52] QING Y, DONG L, GAO L, et al. R-2-hydroxyglutarate attenuates aerobic glycolysis in leukemia by targeting the FTO/m⁶A/PFKP/LDHB axis [J]. *Mol Cell*, 2021, 81(5): 922-39, e9.
- [53] GAO Y, ZIMMER J T, VASIC R, et al. ALKBH5 modulates hematopoietic stem and progenitor cell energy metabolism through m⁶A modification-mediated RNA stability control [J]. *Cell Rep*, 2023, 42(10): 113163.
- [54] DING K, ZHANG Z, HAN Z, et al. Liver ALKBH5 regulates glucose and lipid homeostasis independently through GCGR and mTORC1 signaling [J]. *Science*, 2025, 387(6737): eadp4120.
- [55] STOILOV P, RAFALSKA I, STAMM S. YTH: a new domain in nuclear proteins [J]. *Trends Biochem Sci*, 2002, 27(10): 495-7.
- [56] DAI X, WANG T, GONZALEZ G, et al. Identification of YTH domain-containing proteins as the readers for N1-methyladenosine in RNA [J]. *Anal Chem*, 2018, 90(11): 6380-4.
- [57] PATIL D P, PICKERING B F, JAFFREY S R. Reading m⁶A in the transcriptome: m⁶A-binding proteins [J]. *Trends Cell Biol*, 2018, 28(2): 113-27.
- [58] PARK O H, HA H, LEE Y, et al. Endoribonucleolytic cleavage of m⁶A-containing RNAs by RNase P/MRP complex [J]. *Mol Cell*, 2019, 74(3): 494-507, e8.
- [59] ZHANG C, CHEN Y, SUN B, et al. m⁶A modulates haematopoietic stem and progenitor cell specification [J]. *Nature*, 2017, 549(7671): 273-6.
- [60] WANG Y, ZHANG S, KANG N, et al. Progressive polyadenylation and m⁶A modification of Iggh1 mRNA maintain IgG1 antibody homeostasis in antibody-secreting cells [J]. *Immunity*, 2024, 57(11): 2547-64, e12.
- [61] ZHANG X, SU T, WU Y, et al. *N*⁶-methyladenosine reader YTHDF1 promotes stemness and therapeutic resistance in hepatocellular carcinoma by enhancing NOTCH1 expression [J]. *Cancer Res*, 2024, 84(6): 827-40.
- [62] ALBERTI S, GLADFELTER A, MITTAG T. Considerations and challenges in studying liquid-liquid phase separation and biomolecular condensates [J]. *Cell*, 2019, 176(3): 419-34.
- [63] LI J, CHEN K, DONG X, et al. YTHDF1 promotes mRNA degradation via YTHDF1-AGO2 interaction and phase separation [J]. *Cell Prolif*, 2022, 55(1): e13157.
- [64] LI A, CHEN Y S, PING X L, et al. Cytoplasmic m⁶A reader YTHDF3 promotes mRNA translation [J]. *Cell Res*, 2017, 27(3): 444-7.
- [65] SHI H, WANG X, LU Z, et al. YTHDF3 facilitates translation and decay of *N*⁶-methyladenosine-modified RNA [J]. *Cell Res*, 2017, 27(3): 315-28.
- [66] CHEN Y, WAN R, ZOU Z, et al. O-GlcNAcylation determines the translational regulation and phase separation of YTHDF proteins [J]. *Nat Cell Biol*, 2023, 25(11): 1676-90.
- [67] ZACCARA S, JAFFREY S R. A unified model for the function of YTHDF proteins in regulating m⁶A-modified mRNA [J]. *Cell*, 2020, 181(7): 1582-95, e18.
- [68] WIDMER J, VITALIS A, CAFLISCH A. On the specificity of the recognition of m⁶A-RNA by YTH reader domains [J]. *J Biol Chem*, 2024, 300(12): 107998.
- [69] DU W, TAN S, PENG Y, et al. Histone lactylation-driven YTHDC1 promotes hepatocellular carcinoma progression via lipid metabolism remodeling [J]. *Cancer Lett*, 2024, 611: 217426.
- [70] ABBY E, TOURPIN S, RIBEIRO J, et al. Implementation of meiosis prophase I programme requires a conserved retinoid-independent stabilizer of meiotic transcripts [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 10324.
- [71] FENG M, XIE X, HAN G, et al. YBX1 is required for maintaining myeloid leukemia cell survival by regulating BCL2 stability in an m⁶A-dependent manner [J]. *Blood*, 2021, 138(1): 71-85.
- [72] HANNIFORD D, ULLOA-MORALES A, KARZ A, et al. Epigenetic silencing of CDR1as drives IGF2BP3-mediated melanoma invasion and metastasis [J]. *Cancer Cell*, 2020, 37(1): 55-70, e15.
- [73] ALARCÓN C R, GOODARZI H, LEE H, et al. HNRNPA2B1 is a mediator of m⁶A-dependent nuclear RNA processing events [J].

- Cell, 2015, 162(6): 1299-308.
- [74] EDUPUGANTI R R, GEIGER S, LINDEBOOM R G H, et al. *N*⁶-methyladenosine (m⁶A) recruits and repels proteins to regulate mRNA homeostasis [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2017, 24(10): 870-8.
- [75] YANG Y, HSU P J, CHEN Y S, et al. Dynamic transcriptomic m⁶A decoration: writers, erasers, readers and functions in RNA metabolism [J]. *Cell Res*, 2018, 28(6): 616-24.
- [76] CHEN K, LU Z, WANG X, et al. High-resolution *N*⁶-methyladenosine m⁶A map using photo-crosslinking-assisted m⁶A sequencing [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2015, 54(5): 1587-90.
- [77] MOLINIE B, WANG J K, LIM K S, et al. m⁶A-LAIC-seq reveals the census and complexity of the m⁶A epitranscriptome [J]. *Nat Methods*, 2016, 13(8): 692-8.
- [78] GARCIA-CAMPOS M A, EDELHEIT S, TOTH U, et al. Deciphering the "m⁶A Code" via antibody-independent quantitative profiling [J]. *Cell*, 2019, 178(3): 731-47, e16.
- [79] ZHANG Z, CHEN L Q, ZHAO Y L, et al. Single-base mapping of m⁶A by an antibody-independent method [J]. *Sci Adv*, 2019, 5(7): eaax0250.
- [80] MEYER K D. DART-seq: an antibody-free method for global m⁶A detection [J]. *Nat Methods*, 2019, 16(12): 1275-80.
- [81] WANG Y, XIAO Y, DONG S Q, et al. Antibody-free enzyme-assisted chemical approach for detection of *N*⁶-methyladenosine [J]. *Nat Chem Biol*, 2020, 16(8): 896-903.
- [82] SHU X, CAO J, CHENG M H, et al. A metabolic labeling method detects m⁶A transcriptome-wide at single base resolution [J]. *Nat Chem Biol*, 2020, 16(8): 887-95.
- [83] HU L L, LIU S, PENG Y, et al. m⁶A RNA modifications are measured at single-base resolution across the mammalian transcriptome [J]. *Nat Biotechnol*, 2022, 40(8): 1210-9.
- [84] LIU C, SUN H X, YI Y P, et al. Absolute quantification of single-base m⁶A methylation in the mammalian transcriptome using GLORI [J]. *Nat Biotechnol*, 2023, 41(3): 355-66.
- [85] XIAO Y L, LIU S, GE R Q, et al. Transcriptome-wide profiling and quantification of *N*⁶-methyladenosine by enzyme-assisted adenosine deamination [J]. *Nat Biotechnol*, 2023, 41(7): 993-1003.
- [86] TEGOWSKI M, FLAMAND M N, MEYER K D. scDART-seq reveals distinct m⁶A signatures and mRNA methylation heterogeneity in single cells [J]. *Mol Cell*, 2022, 82(4): 868-78, e10.
- [87] YAO H, GAO C C, ZHANG D R, et al. scm⁶A-seq reveals single-cell landscapes of the dynamic m⁶A during oocyte maturation and early embryonic development [J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 315.
- [88] HAMASHIMA K, WONG K W, SAM T W, et al. Single-nucleus multiomic mapping of m⁶A methylomes and transcriptomes in native populations of cells with sn-m⁶A-CT [J]. *Mol Cell*, 2023, doi: 10.1016/j.molcel.2023.08.010.
- [89] SU D, CHAN C T, GU C, et al. Quantitative analysis of ribonucleoside modifications in tRNA by HPLC-coupled mass spectrometry [J]. *Nat Protoc*, 2014, 9(4): 828-41.
- [90] YUAN X H, SU Y, JOHNSON B, et al. Mass spectrometry-based direct sequencing of tRNAs *de novo* and quantitative mapping of multiple RNA modifications [J]. *J Am Chem Soc*, 2024, 146(37): 25600-13.
- [91] SHI J C, ZHANG Y F, TAN D M, et al. PANDORA-seq expands the repertoire of regulatory small RNAs by overcoming RNA modifications [J]. *Nat Cell Biol*, 2021, 23(4): 424-36.
- [92] WANG Y H, ZHAO Y, BOLLAS A, et al. Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications [J]. *Nat Biotechnol*, 2021, 39(11): 1348-65.
- [93] YANKOVA E, BLACKABY W, ALBERTELLA M, et al. Small-molecule inhibition of METTL3 as a strategy against myeloid leukaemia [J]. *Nature*, 2021, 593(7860): 597-601.
- [94] MOSER J C, PAPADOPOULOS K P, AHNERT J R, et al. Phase 1 dose escalation and cohort expansion study evaluating safety, PK, PD and clinical activity of STC-15, a METTL-3 inhibitor, in patients with advanced malignancies [J]. *J Clin Oncol*, 2024, 42(16): 2586.
- [95] ZHANG S C, ZHAO B S, ZHOU A D, et al. m⁶A demethylase ALKBH5 maintains tumorigenicity of glioblastoma stem-like cells by sustaining FOXM1 expression and cell proliferation program [J]. *Cancer Cell*, 2017, 31(4): 591.
- [96] SU R, DONG L, LI Y, et al. Targeting FTO suppresses cancer stem cell maintenance and immune evasion [J]. *Cancer Cell*, 2020, 38(1): 79-96, e11.
- [97] PARIS J, MORGAN M, CAMPOS J, et al. Targeting the RNA m⁶A reader YTHDF2 selectively compromises cancer stem cells in acute myeloid leukemia [J]. *Cell Stem Cell*, 2019, 25(1): 137.
- [98] WENG H, HUANG F, YU Z, et al. The m⁶A reader IGF2BP2 regulates glutamine metabolism and represents a therapeutic target in acute myeloid leukemia [J]. *Cancer Cell*, 2022, 40(12): 1566-82, e10.
- [99] ZENG C W, HUANG W X, LI Y Q, et al. Roles of METTL3 in cancer: mechanisms and therapeutic targeting [J]. *J Hematol Oncol*, 2020, 13(1): 117.
- [100] MA J Z, YANG F, ZHOU C C, et al. METTL14 suppresses the metastatic potential of hepatocellular carcinoma by modulating *N*⁶-methyladenosine-dependent primary microRNA processing [J]. *Hepatology*, 2017, 65(2): 529-43.