

# m6A 修饰在创伤性脑损伤诱导神经损伤中的作用研究

刘雨 康倩倩 刘欣宇 马哲 陈玉华

西安培华学院

DOI:10.12238/ffcr.v3i2.14034

**[摘要]** 创伤性脑损伤 (traumatic brain injury, TBI) 被认为是重要的全球卫生优先事项, TBI 可触发神经炎症、氧化应激、线粒体功能障碍等病理事件, 并引发神经损伤和脑萎缩。该研究旨在进一步揭示 TBI 病生理的复杂机制, 为 TBI 后神经损伤的治疗提供新的思路。RNA 甲基化是转录后调控中最重要的修饰之一, 而 N6-甲基腺苷 (N6-methyladenosine, m6A) 修饰是真核生物中最丰富的 mRNA 转录后修饰。既往研究指出, m6A 修饰通过表观遗传调控神经发育及神经系统疾病, 可调控神经元损伤。该研究旨在阐述 TBI 诱导氧化应激和神经炎症的病理变化, 探讨 RNA m6A 修饰在 TBI 后神经损伤中的特点, 重点讨论将 m6A 作为治疗靶点来改善 TBI 引起氧化应激和神经炎症的潜在作用及机制, 为 TBI 的治疗和预后提供新思路 and 药物作用新靶点。

**[关键词]** 创伤性脑损伤; N6-甲基腺苷; 神经元损伤

**中图分类号:** R742 **文献标识码:** A

The role of m6A modification in inducing nerve injury in traumatic brain injury

Yu Liu, Qianqian Kang, Xinyu Liu, Zhe Ma, Yuhua Chen

Xi'an Peihua College

**[Abstract]** Traumatic brain injury (TBI) is recognized as an important global health priority and can trigger pathological events such as neuroinflammation, oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and trigger nerve damage and brain atrophy. To further reveal the complex mechanism of TBI pathogenesis and provide a new idea for the treatment of nerve injury after TBI. RNA methylation is one of the most important modifications in post-transcriptional regulation, and N6-methyladenosine (m6A) modification is the most abundant mRNA post-transcriptional modification in eukaryotes. Previous studies have pointed out that m6A modification can regulate neuronal damage through epigenetic regulation of neurodevelopment and nervous system diseases. This review aims to describe the pathological changes of oxidative stress and neuroinflammation induced by TBI, explore the characteristics of RNA m6A modification in nerve injury after TBI, focus on m6A as a therapeutic target to improve the potential effects and mechanisms of TBI induced oxidative stress and neuroinflammation, and provide new ideas and new targets for drug action for the treatment and prognosis of TBI.

**[Keywords]** Traumatic brain injury; N6-methyladenosine; Neuronal injury

## 1 前言

创伤性脑损伤 (traumatic brain injury, TBI) 是机械外力直接或间接作用于头部所造成的脑结构和功能损伤, 交通事故、高空坠落、外力打击等是主要病因, 是导致全球死亡和残疾的主要原因之一<sup>[1]</sup>。约 50% 的人在一生中会经历一次或多次 TBI, 全世界每年有超过 5,000 万人罹患 TBI, 其中有 1,000 万人死亡, 另有近 3,000 万人持续身体残疾, 给患者家庭和社会带来了巨大的负担。我国人口基数大, TBI 患者绝对数量超过了全球大多数国家和地区, TBI 成为一个严重的公共健康问题。近年来, 政府及卫生系统在 TBI 的防治方面投入巨大, 但随着经济、交通的发展, 我国 TBI 的发生率仍呈逐年上升趋势, 并远高于其他国家<sup>[2]</sup>。事实上, TBI 可触

发多种神经损伤机制, 关键病理特征包括神经炎症、氧化应激、兴奋性毒性和线粒体功能障碍, 这些病理过程在 TBI 后持续数月或数年, 可导致机体二次损伤, 引发神经损伤和脑萎缩, 且神经细胞死亡在中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 损伤的病理生理中起着至关重要的作用<sup>[3]</sup>。因此, 发现特异性生物标志物, 进一步揭示 TBI 后病生理机制, 是目前我国亟待解决的重大临床问题。

在真核细胞中, 精准调控基因的转录及转录后水平, 对于细胞的存活和功能至关重要。目前, 真核生物中已鉴定了 100 多种 RNA 转录后修饰。作为真核生物中最常见的一种转录后 RNA 修饰, N6-甲基腺苷 (N6-methyladenosine, m6A) 参与 RNA 修饰并调节基因表达, m6A 修饰可以影响 RNA

表达、剪接、出核、翻译、降解，以及 RNA 与蛋白质的相互作用等。近期研究揭示了 m6A 能够精细地调节多种时空生理过程，包括胚胎发生及发育、性别决定、昼夜节律、DNA 损伤、热休克应答、细胞生理进程、细胞多能性、重编程以及神经元功能等。在神经元的发育、分化及再生中，m6A 发挥着重要作用<sup>[4]</sup>。研究指出，氧葡萄糖剥夺/再氧化 (oxygen-glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R) 通过增加甲基转移酶样蛋白 3 (methyltransferase-like protein 3, METTL3) 依赖的 Lnc-D63785 m6A 甲基化，下调 Lnc-D63785 的表达，促进 miR-422a 的积累，导致 miR-422a 靶基因肌细胞增强因子-2d 和丝裂原活化蛋白激酶 6 的下调，从而诱导神经元凋亡。因此，m6A 对神经元损伤具有重要影响。

## 2 m6A 修饰的调控机制

m6A 修饰的调控机制涉及一种动态、可逆的甲基化和去甲基化过程，需要由编写基因 (writer)、擦除基因 (eraser) 和读取基因 (reader) 编码的多个调节蛋白参与。m6A 的催化作用由一个编写复合物完成，包括核心蛋白 METTL3、甲基转移酶样蛋白 14 (METTL14) 和 Wilms 肿瘤 1 结合蛋白 (Wilms tumor 1-associated protein, WTAP)，以及若干 m6A 修饰的调节亚基，RNA 结合基序蛋白 15 (RNA-binding motif protein 15, RBM15)、含锌指 CCCH 结构域的蛋白质 13 (Zinc finger CCCH-type containing 13, ZC3H13)、METTL16、METTL5、病毒样 m6A 甲基转移酶相关蛋白 (vir like m6A methyltransferase associated protein, VIRMA, 又称 KIAA1429) 及含锌指 CCHC 结构域的蛋白 4 (ZCCHC4) 等。在甲基转移酶复合物 (methyltransferase complex, MTC) 中，METTL3 是第一个与 S-腺苷甲硫氨酸 (S-adenosylmethionine, SAM) 结合的 m6A “writer”。METTL3 和 METTL14 的结合在细胞核内的核斑点中共定位，形成一个稳定的 1:1 异源二聚体，协同提高甲基化能力。METTL3/METTL14 异源二聚体在细胞质中形成，并通过 METTL3 中的核定位信号 (NLSs) 被招募到细胞核中<sup>[5]</sup>。METTL3 能通过其螺旋区域与 WTAP 的卷曲部分相互作用，并将其锚定到具有丰富的 pro-mRNA 处理因子特异位点的细胞核 RNA 上。WTAP 与 ZC3H13 相互作用，使 MTC 保持在细胞核内，而 ZC3H13 能与 RBM15 相互作用，将 MTC 招募到与 RRACH 序列相邻的 U 丰富的区域。另一个与 WTAP 相互作用的蛋白是 VIRMA，它提供序列特异性，指导 MTC 在 3'UTR 区域和近停止密码子处进行甲基化。迄今为止，在 MTC 中的最后一个蛋白是 Hakai，它在性别决定中发挥作用。此外，Hakai 的泛素结构域对于维持 m6A-MTC 完整性至关重要，并可通过保持 m6A-MTC 组分的稳定性来维持 m6A 介导生物学功能。

m6A 的去甲基酶 “eraser” 包括肥胖相关基因 (fat mass

and obesity associated gene, FTO) 和 AlkB 同系物 5 (AlkB homologue 5, ALKBH5)。FTO 的去甲基化过程需要亚铁离子和  $\alpha$ -酮戊二酸，通过一个复杂的中间反应去除 m6A 的甲基：首先，FTO 将 m6A 氧化形成 N6-羟甲基腺苷 (N6-hydroxymethyladenosine, hm6A)，然后催化形成 N6-甲酰腺苷 (N(6)-formyladenosine, f6A)；最后，f6A 生成腺苷 (adenosine, A)，去甲基化过程完成。有趣的是，最近的研究发现 FTO 可去甲基化 N6, 2-O-二甲基腺苷 (m6Am) 而通过 FTO 敲除也提高了 m6Am 的 mRNA 稳定性。此外，FTO 在核内小 RNA 生物合成中调控可逆的 m6Am RNA 甲基化；在转录 RNA (transfer RNA, tRNA) 生物合成中调控 N1-甲基腺苷 (N1-methyladenosine, m1A) RNA 甲基化，FTO 可以通过催化 m1A tRNA 去甲基化直接抑制翻译。ALKBH5 作为另一种 m6A 去甲基酶，对 m6Am 没有活性，但对 m6A 的作用强烈。ALKBH5 调控靶 mRNA 的稳定性，影响 mRNA 的出核转运。但 m6A 去甲基化的复杂调控机制仍待深入揭示。

m6A “reader” 通过识别 m6A 位点，调节 m6A 修饰的生物学功能。在哺乳动物中有五个涉及 YTH 结构域的蛋白质 (YTHDF1-3、YTHDC1 和 YTHDC2)。YTHDF1 在经典模型中促进 mRNA 翻译，YTHDF2 促进 mRNA 降解，YTHDF3 与 YTHDF1 或 YTHDF2 合作促进 mRNA 翻译或降解。然而，最近的研究证实，与 YTHDF1、YTHDF2 或 YTHDF3 结合的 m6A 位点非常相似，这三个类似物共同调节 m6A 标记 mRNA 的降解。

## 3 m6A 修饰与 TBI

TBI 的特征是由于机械外力导致大脑底层组织和血管发生原发性损伤。随之而来的生化和病理生理变化构成了继发性损伤，包括氧化应激、神经炎症、兴奋性毒性和线粒体功能障碍等<sup>[6]</sup>。继发性损伤在 TBI 后持续数月或数年，可导致机体二次损伤，引发神经损伤和脑萎缩。研究表明，TBI 最终会导致其他神经退行性疾病 (neurodegenerative disorders, NDD) 的发作，如 PD、AD、癫痫和慢性创伤性脑病 (chronic traumatic encephalopathy, CTE) 等；而 TBI 的其他一些较温和的长期表现包括认知障碍、运动功能残疾和行为改变。

### 3.1 m6A 修饰介导 TBI 后氧化应激

研究表明，TBI 后兴奋性氨基酸如谷氨酸释放到突触中，过度刺激 NMDAR，导致钠和钙离子的内流<sup>[7]</sup>；细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  超载可触发磷脂酶、蛋白酶和核酸内切酶的释放，分别导致膜破坏、细胞骨架损伤和 DNA 断裂。 $\text{Ca}^{2+}$  超载和兴奋性毒性诱导活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 释放，过量的 ROS 导致氧化应激和神经元死亡；氧化应激引起过量自由基生成，进一步促进线粒体功能障碍和炎症反应，将加重

神经元损伤。

氧化应激在TBI的起始阶段即可发生,并贯穿整个过程,是TBI病生理进程的重要机制之一,抗氧化也被视为TBI的潜在治疗方向。大量研究证实m6A在氧化应激中发挥重要作用。METTL3介导的m6A修饰通过TRAF6 (TNF receptor-associated factor 6) 信号通路和下丘脑室旁核的氧化应激促进交感神经亢进,从而导致心肌梗死后室性心律失常。在百草枯诱导小鼠神经母细胞瘤细胞氧化应激模型中,长链非编码RNA的m6A修饰与氧化应激水平和细胞损伤程度密切相关。此外,Zoya Ignatova 教授团队等首次发现m6A信号在氧化应激的SGs中积累,YTHDF3促进目标m6A修饰的mRNA转运到SGs中,而YTHDF1/3缺失可抑制SGs的形成和mRNA向SGs的募集,而重新引入YTHDF蛋白到敲除细胞中可以恢复SGs的形成。研究发现YTHDF蛋白的N端内在无序区和C端m6A结合的YTH结构域对SGs的形成至关重要。YTHDF蛋白家族由一个C端YTH结构域和一个富含P/Q/N的N端结构域(Pro/Gln/Asn)组成,YTH结构域具有疏水口袋,是特异性识别m6A RNA的基础,其靶向位置和共识序列与m6A位点在mRNA上的分布模式相似。N端结构域的朊病毒样低复杂度序列区与液-液相分离(liquid-liquid phase separation, LLPS)有关。LLPS可促使mRNA-YTHDFs复合物位于细胞质中不同的无膜结构的“隔室”,如P小体(processing bodies, P-bodies)、SGs或核糖核蛋白颗粒,可以通过RNA的多价m6A修饰增强这种调控,如YTHDF2和m6A以及RNA共同定位在SGs中以应对外界压力

### 3.2 m6A修饰介导TBI后神经炎症

神经炎症是TBI继发性损伤阶段的关键病生理现象之一,参与神经细胞受损的修复过程,并保护CNS损伤或创伤后免受病原体入侵。研究发现,METTL3在脂多糖激活下调NF- $\kappa$ B信号,减轻神经炎症。而FTO则通过降低cGAS mRNA的稳定性减轻脑缺血/再灌注(I/R)诱导的神经炎症。ALKBH5的敲低加剧了I/R损伤,通过增加内质网应激依赖性神经炎症。此外,YTHDF1通过调节TRAF6蛋白的表达来加剧炎症因子的表达。m6A的另一阅读蛋白YTHDF2和IGF2BP1则参与调控小胶质细胞的激活和炎症反应。m6A还通过其他机制参与神经炎症调控<sup>[8]</sup>。例如,甜菜碱通过增加NLRP3 mRNA的m6A修饰来抑制小胶质细胞焦亡,显示m6A在调节脑内炎症和氧化应激中的潜在作用。NR4A1在缺血后的小胶质细胞中上调,通过加速TNF mRNA的降解帮助改善预后。

TBI后神经炎症相关基因表达和信号通路涉及到TRAF6/NF- $\kappa$ B、PI3K (phosphoinositide 3-kinase) /AKT

(protein kinase B)、NLRP3和Nrf2等关键信号或分子,并被证实受到m6A修饰的调控。METTL3通过甲基化促进TRAF6 mRNA的m6A修饰,YTHDF1则通过识别TRAF6 mRNA的m6A修饰促进其翻译过程。同样地,FTO降低Nrf2 mRNA的m6A甲基化,YTHDF2通过识别Nrf2 mRNA的m6A修饰降低其稳定性。基于以上证据,通过m6A修饰探讨TBI后神经炎症的调控成为可能,为神经炎症内源性调控机制的揭示提供参考。

### 3.3 TBI后存在m6A修饰异常

m6A修饰在调控TBI后的生物过程中发挥关键作用。在TBI后小鼠海马中,发现METTL3的表达和RNA m6A的整体水平下降,这与认知功能障碍可能相关。同时,大鼠皮层中METTL14和FTO的表达下降,1,580个mRNA的m6A甲基化水平显著改变,突显了FTO在维持神经功能和减轻TBI损伤中的潜在作用。研究还揭示了m6A修饰在调节TBI后海马的代谢活性和神经细胞损伤中的重要性。m6A“reader”YTHDF1的敲除减少了TBI诱发的细胞凋亡和炎症反应,表明m6A可能通过调节脑肠轴功能影响肠道健康。在创伤性视神经损伤(TON)的研究中,发现mRNA甲基化相关基因在大鼠视网膜组织中表达上调,指出m6A可能参与创伤后视神经的损伤过程,尽管具体机制尚需进一步探究。

此外,m6A在针对TBI治疗过程中也发挥着重要作用,如低温治疗可逆转TBI大鼠海马组织中m6A修饰改变,传统中草药配方血府逐瘀汤可提高TBI大鼠病变周围皮层中m6A水平及METTL14和YTHDC2的表达,从而改善TBI大鼠的神经功能障碍。

## 4 总结与展望

m6A甲基化在组织和器官的稳态调控中发挥着重要作用,特别是在损伤发生时,如I/R损伤和TBI等,并了解m6A在氧化应激和神经炎症中的潜在作用,与TBI后神经损伤程度相关。尽管神经损伤的转录后调控研究取得了快速发展,但仍存在许多问题。

首先,虽然已经确认m6A在TBI后神经损伤中发挥了重要作用,但m6A修饰“writer”、“reader”和“eraser”在神经损伤中的具体作用及其详细机制尚不清楚。其次,m6A相关酶和蛋白的特异性激动剂或抑制剂较少,相关研究仍待加速。

目前还没有发现m6A“writer”和“reader”的小分子抑制剂,但已鉴定出m6A“eraser”FTO去甲基化抑制剂,大黄酸可以结合FTO催化结构域来抑制m6A去甲基化。通过基于结构的虚拟筛选、荧光能量共振转移及生物化学分析, $\alpha$ -酮戊二酸类似物、黄酮类化合物、N-CDPCB、CHTB及双醋瑞因等FTO抑制剂在体内动物实验和体外细胞实验中

均展现出潜在的作用。一种可抑制 FTO 去甲基化功能的锌化合物被证实可改善小鼠中脑多巴胺能神经元躲避生长因子剥夺诱导的细胞凋亡，且具有良好的血脑屏障穿透性。武汉大学赵剡教授团队研究发现，FTO 抑制剂 FB23-2 并不影响 TBI 大鼠的空间学习和记忆能力，而功能性 FTO 是 TBI 后神经修复所必需的。因此，FTO/m6A/Nrf2 信号通路调控氧化应激和神经炎症的策略将为 TBI 后神经功能改善提供潜在可能。

基于现有的小分子抑制剂或天然产物，虽然 FTO 抑制剂或激活剂能否以 m6A 修饰依赖的形式调控 TBI 后氧化应激和神经炎症仍然未知，但随着研究的深入和加速，m6A 相关靶向制剂可能在未来得到开发和应用，将会推动 m6A 修饰在 TBI 后神经损伤中的研究和应用，为 TBI 患者的临床诊治和预后带来希望。

#### [参考文献]

- [1] Boulias K, Greer EL. Biological roles of adenine methylation in RNA[J]. *Nat Rev Genet*, 2023, 24(3): 143–160.
- [2] Sendinc E, Shi Y. RNA m6A methylation across the transcriptome[J]. *Mol Cell*, 2023, 83(3): 428–441.
- [3] Wang MK, Gao CC, Yang YG. Emerging roles of RNA methylation in development[J]. *Acc Chem Res*, 2023, 56(23): 3417–3427.

[4] Chen Y, Wang W, Zhang W, et al. Emerging roles of biological m6A proteins in regulating virus infection: A review[J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 253(Pt 3): 126934.

[5] Sikorski V, Selberg S, Lalowski M, et al. The structure and function of YTHDF epitranscriptomic m6A readers[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2023, 44(6): 335–353.

[6] Chen L, Gao Y, Xu S, et al. N6-methyladenosine reader YTHDF family in biological processes: Structures, roles, and mechanisms[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1162607.

[7] Zou Z, Sepich-Poore C, Zhou X, et al. The mechanism underlying redundant functions of the YTHDF proteins[J]. *Genome Biol*, 2023, 24(1): 17.

[8] Ng SY, Lee AYW. Traumatic Brain Injuries: Pathophysiology and Potential Therapeutic Targets[J]. *Front Cell Neurosci*, 2019, 13: 528.

#### 作者简介：

刘雨（2004.02-），女，汉族，陕西省宝鸡市人，本科在读，研究方向为脑损伤与修复。

#### 基金项目：

西安培华学院 2024 年大学生创新创业训练计划项目，课题名称：不同分子量丝胶蛋白调控铁死亡改善创伤性脑损伤的作用机制研究，项目编号：PHDC2024065。