



## • 综述 •

# $m^6A$ 修饰在慢性疼痛中的研究进展 \*

吕楠<sup>1</sup> 吕志峰<sup>2△</sup>

(<sup>1</sup>河南中医药大学第一临床医学院, 郑州 450046; <sup>2</sup>河南中医药大学第一附属医院麻醉科, 郑州 450000)

**摘要** 慢性疼痛是持续超过组织正常愈合时间的疼痛, 严重影响病患的生活质量, 且易引发焦虑、抑郁等消极情绪及行为, 目前仍缺乏标准的生物医学管理和治愈方法。表观遗传学在疼痛领域逐步受到关注, 其中 N<sup>6</sup>-甲基腺苷 (N<sup>6</sup>-methyladenosine, m<sup>6</sup>A) 是真核生物中丰度最高的 RNA 修饰, 其由甲基转移酶、去甲基化酶以及结合蛋白共同动态调控, 通过影响靶基因的表达参与机体的疼痛反应。本文总结了 m<sup>6</sup>A 修饰的最新研究进展及其在慢性疼痛中的可能作用机制, 以期为临幊上有效治疗慢性疼痛提供新思路。

**关键词** m<sup>6</sup>A 修饰; RNA 甲基化; 慢性疼痛; 表观遗传学

慢性疼痛是指持续时间超过 3 个月的疼痛, 目前也被视为一种疾病而非疾病所伴随的状态, 受其困扰的人群仅我国已超过 3 亿, 并且每年增幅超过千万<sup>[1]</sup>。慢性疼痛加重病人个人、家庭乃至整个社会的负担, 已然成为亟待解决的公共卫生问题。随着对疼痛研究的深入, DNA 甲基化、组蛋白修饰等表观遗传修饰已被证实参与慢性疼痛的发生发展, 其中 N<sup>6</sup>-甲基腺苷 (N<sup>6</sup>-methyladenosine, m<sup>6</sup>A) 是真核生物 RNA 内部最普遍的修饰类型<sup>[2]</sup>。正是由于第一个 m<sup>6</sup>A 去甲基化酶——脂肪含量与肥胖相关蛋白 (fat mass and obesity-associated protein, FTO) 的发现与 m<sup>6</sup>A 高通量测序技术 (m<sup>6</sup>A-seq) 的发展, 使人们意识到 m<sup>6</sup>A 是一种动态可逆的修饰过程并在生物学中发挥重要作用。诸多证据表明<sup>[3,4]</sup>, m<sup>6</sup>A 修饰在不改变基因序列的前提下凭借其动态变化调控多种生理病理过程, 包括神经调节、免疫激活、肿瘤侵袭等, 并且与慢性疼痛关系密切。本文围绕 m<sup>6</sup>A 与 RNA 的关系、m<sup>6</sup>A 相关调控蛋白、m<sup>6</sup>A 在慢性疼痛中的作用三方面进行综述, 以总结国内外科研工作者们对 m<sup>6</sup>A 修饰的最新认识及其在慢性疼痛领域最新的研究成果, 旨在完善慢性疼痛作用机制并为其治疗提供部分理论依据。

### 一、m<sup>6</sup>A 与 RNA 的关系

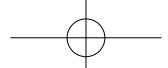
m<sup>6</sup>A 是指在 RNA 腺嘌呤第 6 位 N 上发生的甲基化修饰。m<sup>6</sup>A 修饰相对保守, 大多发生于 DRACH 序列的腺嘌呤中, 其中 D 代表 A/G/U, R 代表 A/G, H 代表 A/C/U。约有 94.5% 的 m<sup>6</sup>A 修饰都发生在

mRNA 上, 其大多数富集在 mRNA 的蛋白质编码区和非翻译区 (untranslated region, UTR), 且 m<sup>6</sup>A 修饰更集中在长外显子、终止密码子及 3'UTR 区域<sup>[5]</sup>。此外, mRNA 被 m<sup>6</sup>A 甲基化的特定位置也与基因表达相关, 同时 m<sup>6</sup>A 介导的基因表达调控也取决于转录物中 m<sup>6</sup>A 的位置。虽然 m<sup>6</sup>A 并不改变碱基序列的配对及编码, 但却广泛参与 mRNA 的剪接、稳定、出核、翻译及降解等过程。

m<sup>6</sup>A 也存在于非编码 RNA (noncoding RNA, ncRNA) 中, 目前相关研究多集中于微小 RNA (microRNA, miRNA)、长链非编码 RNA (long noncoding RNA, lncRNA) 以及环状 RNA (circular RNA, circRNA)。微处理器复合体 (DiGeorge critical region8, DGCR8) 通过识别 miRNA 初级体 (primary miRNA, pri-miRNA) 上的 m<sup>6</sup>A 修饰位点实现对 miRNA 的加工生成, 使得 miRNA 发挥生物学功能<sup>[6]</sup>。与之不同, m<sup>6</sup>A 通过改变 lncRNA 的空间结构及稳定性来调节其与 RNA 结合蛋白 (RNA-binding proteins, RBP) 的结合能力, 并且经过 m<sup>6</sup>A 修饰后的 lncRNA 可通过内源性竞争结合 miRNA 位点进而促进下游 mRNA 的翻译<sup>[7]</sup>。此外, m<sup>6</sup>A 修饰同样参与 circRNA 的表达与分布, 并且影响其与 miRNA 及 RBP 的结合从而发挥对下游靶点的调控<sup>[8]</sup>。由此可见, m<sup>6</sup>A 修饰较多通过调节 ncRNA 的结构和功能进而影响基因表达; 同时 ncRNA 还可通过影响 m<sup>6</sup>A 相关调控蛋白来反向调节 m<sup>6</sup>A 修饰。以上均表明 m<sup>6</sup>A 修饰是介导遗传信息的新一面, 并可与其他表观遗传修

\* 基金项目: 河南省卫健委中医药科学研究专项课题 (2022ZY2005); 中国博士后科学基金新冠肺炎疫情防控专项资助 (面上资助) (2020M670025ZX)

△ 通信作者 吕志峰 mazui1846@126.com



饰协同发挥调控作用。

## 二、 $m^6A$ 相关调控蛋白

与  $m^6A$  相关的调控蛋白包括:  $m^6A$  甲基转移酶 (writers)、 $m^6A$  去甲基化酶 (erasers) 以及  $m^6A$  结合蛋白 (readers)。writers 与 erasers 协同调控  $m^6A$  的动态可逆性修饰过程, 而 readers 通过识别  $m^6A$  修饰位点继而发挥生物学功能, 三者协作使  $m^6A$  甲基化水平与生物整体状态相适应。 $m^6A$  相关调控蛋白及主要作用机制见表 1。

### 1. $m^6A$ 甲基转移酶

$m^6A$  修饰的发生依赖甲基转移酶, writers 是一个复合物, 主要由甲基转移酶样蛋白 3 (methyltransferase-like 3, METTL3)、甲基转移酶样蛋白 14 (methyltransferase-like 14, METTL14)、辅助因子 Wilms 肿瘤 1 相关蛋白 (Wilms tumor 1-associated protein, WTAP) 三个核心成分组成。METTL3 通过结合催化 S-腺苷甲硫氨酸 (S-adenosyl methionine, SAM) 为甲基供体, 在细胞核发挥甲基化作用; 而 METTL14 则与 METTL3 结合形成复合物以提高酶的活性; WTAP 则是促进复合物与目标 RNA 结合发挥生物学功能<sup>[9]</sup>。

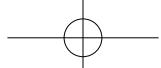
然而, 近年来对 writers 复合物的组成还有很多新发现。RNA 结合基序蛋白 15 (RNA binding motif

protein 15, RBM15) 和其同源物 RBM15B 含有 RNA 结合结构域, 使 writers 复合体能够与 mRNA 特定位点结合, 起到招募作用<sup>[10]</sup>。病毒样  $m^6A$  甲基转移酶相关蛋白 (vir-like  $m^6A$  methyltransferase associated protein, VIRMA) 也称 KIAA1429, 指导 writers 复合物进行选择性甲基化, 并优先使 3'UTR 和终止密码子发生  $m^6A$  修饰<sup>[11]</sup>。锌指 CCCH 结构域蛋白 13 (zinc finger CCCH domain-containing protein 13, ZC3H13) 与 WTAP 发挥协同作用使复合物准确定位到细胞核并发生甲基化, 敲除 ZC3H13 可显著降低 mRNA 的整体  $m^6A$  水平<sup>[12]</sup>。E3 泛素连接酶 Casitas B 系淋巴瘤原癌基因转化序列样蛋白 1 (Casitas B-lineage lymphoma-transforming sequence-like protein 1, CBLL1) 也称 HAKAI, 是  $m^6A$  writers 的核心成员之一, 其与 WTAP/FI(2)d-VIRMA/Vir-ZC3H13/Flacc 形成一个稳定的复合物, 整合环境和细胞信号。HAKAI 突变则会破坏复合物亚基的稳定性, 进而导致 mRNA 中  $m^6A$  下调、与果蝇性别发育相关的 Sxl 基因可变剪接发生异常<sup>[13]</sup>。

锌指蛋白 217 (zinc finger protein 217, ZFP217) 是一种具有保守锌指结构的转录因子, 其与 METTL3 以非活性复合物的形式结合, 可减少 METTL3 与 RNA 相结合、防止 METTL3 介导的  $m^6A$  异常甲基化;

表 1  $m^6A$  相关调控蛋白及作用机制

分类	调控蛋白	主要定位	主要作用	参考文献
$m^6A$ 甲基转移酶	METTL3	细胞核	催化甲基转移以发生甲基化	[9]
	METTL14	细胞核	与 METTL3 形成稳定异二聚体、增强催化活性	[9]
	WTAP	细胞核	促进 writers 复合物与目标 RNA 结合	[9]
	RBM15/RBM15B	细胞核	与 writers 复合物结合并募集到特定位点	[10]
	VIRMA (KIAA1429)	细胞核	起到支架作用并指导发生选择性甲基化	[11]
	ZC3H13	细胞核	诱导 writers 复合物准确定位到细胞核	[12]
	HAKAI	细胞核	与 WTAP/FI(2)d-VIRMA/Vir-ZC3H13/Flacc 形成稳定复合物、参与调控 $m^6A$ 修饰	[13]
$m^6A$ 去甲基化酶	ZFP217	细胞核/细胞质	可与 METTL3、YTHDF2 结合并激活 FTO 以调控 $m^6A$ 修饰、提高 mRNA 稳定性	[14]
	FTO	细胞核	靶向 RNA 发生去甲基化	[15]
	ALKBH5	细胞核	靶向 RNA 发生去甲基化; 调节 mRNA 出核	[16]
	ALKBH3	细胞核	对 tRNA 具有更强的底物特异性	[16]
$m^6A$ 结合蛋白	YTHDF1	细胞质	与起始因子相互作用促进 mRNA 翻译	[17]
	YTHDF2	细胞质	通过 N-末端区域与 CCR4-NOT 结合介导 mRNA 降解、抑制翻译	[17]
	YTHDF3	细胞质	与 YTHDF1、YTHDF2 协作共同调控 mRNA 的翻译与降解	[17]
	YTHDC1	细胞核	介导 mRNA 的剪接与出核; 参与调节 mRNA 稳定及降解	[18]
	YTHDC2	细胞质	同时调节 mRNA 翻译与降解	[19]
	hnRNPC/hnRNPG	细胞核	识别 $m^6A$ 位点、调节 mRNA 成熟与丰度	[20]
	hnRNPA2B1	细胞核	调节 miRNA 的选择性剪接	[20]
	IGF2BPs	细胞质	维持 mRNA 稳定性、与 YTHDF2 降解作用相互制约	[21]
	eIF3	细胞质	与 mRNA 5'UTR 的 $m^6A$ 位点结合、促进非帽依赖性翻译	[22]
	FMR1	细胞质	识别 $m^6A$ 位点并阻碍核糖体位易、抑制翻译	[23]
LRPPRC	ELAVL1	细胞核	与 YTHDC1、IGF2BP1 等分子结合, 协同促进 mRNA 稳定	[24]
	LRPPRC	线粒体	识别 $m^6A$ 位点、调控 mRNA 成熟	[25]



与此同时, ZFP217 还可以激活 FTO 的表达来促进去甲基化, 并且 ZFP217 还可抑制 YTHDF2 与 m<sup>6</sup>A 结合, 以利于 FTO 与 mRNA 上 m<sup>6</sup>A 位点结合、促进 mRNA 的稳定性<sup>[14]</sup>。基于现有研究可知, writers 复合物在介导 m<sup>6</sup>A 修饰过程中发挥不可替代的作用, 并且可能还存在更多的 writers 有待挖掘。

### 2. m<sup>6</sup>A 去甲基化酶

m<sup>6</sup>A 是一种动态可逆的修饰过程, erasers 可以介导 m<sup>6</sup>A 去甲基化修饰, 包括 FTO、ALKB 同源物 5 (ALKB homolog 5, ALKBH5) 和 ALKB 同源物 3 (ALKB homolog 3, ALKBH3), 它们同属于  $\alpha$ -酮戊二酸依赖性双加氧酶。最近研究发现, FTO 不仅可以擦除 m<sup>6</sup>A, 还可以作用于核内小 RNA (small nuclear RNA, snRNA) 擦除 N<sup>6</sup>-2'-O-二甲基腺嘌呤 (m<sup>6</sup>Am) 修饰, 从而调节 mRNA 的可变剪接; 并且 FTO 所作用的位置与其在细胞内的定位有关, FTO 在细胞核中是 poly(A) RNA m<sup>6</sup>A、snRNA m<sup>6</sup>A 和 m<sup>6</sup>Am 以及 tRNA m<sup>1</sup>A 的去甲基化酶, 而在细胞质中 FTO 还介导 poly(A) RNA m<sup>6</sup>Am 的去甲基化<sup>[15]</sup>。因此在探究 FTO 去甲基化作用时, 敏感且准确的实验检测方法显得至关重要。ALKBH5 与 FTO 去甲基化过程大体一致, 但不需要中间产物即可去除 m<sup>6</sup>A 修饰, 且更针对于单链 RNA 的去甲基化, 同时还介导调节 mRNA 出核; 而 ALKBH3 对 tRNA 具有更强的底物特异性<sup>[16]</sup>。总而言之, FTO、ALKBH5 和 ALKBH3 均通过擦除 m<sup>6</sup>A 的修饰作用并相应地调节靶基因的翻译进而参与 RNA 代谢及多种生理病理进程。

### 3. m<sup>6</sup>A 结合蛋白

m<sup>6</sup>A 修饰的识别由 m<sup>6</sup>A 结合蛋白介导并发挥其功能。目前发现的 readers 主要包括: 含 YTH 结构域蛋白、核不均一核糖核蛋白 (heterogeneous nuclear ribonucleoproteins, hnRNPs)、胰岛素样生长因子 2-mRNA 结合蛋白 (insulin-like growth factor 2 mRNA binding proteins, IGF2BPs) 及真核翻译起始因子 3 (eukaryotic initiation factor 3, eIF3) 等。

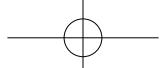
含 YTH 结构域的蛋白包括 m<sup>6</sup>A YTH 结合蛋白 1-3 (YTH N<sup>6</sup>-methyladenosine RNA binding protein 1-3, YTHDF1-3) 以及 YTH 结构域蛋白 1-2 (YTH domain-containing 1-2, YTHDC1-2)。YTHDF1 通过与翻译起始因子相互作用, 将含有 m<sup>6</sup>A 的 mRNA 招募到核糖体, 从而促进翻译; YTHDF2 通过 N-末端区域与去腺苷酶复合物 CCR4-NOT 相互作用, 介导含 m<sup>6</sup>A 修饰的 RNA 通过 poly(A) 尾以去腺苷酸依赖性途径降解, 从而抑制翻译; YTHDF3 可以分别与 YTHDF1 和 YTHDF2 协作, 共同调控 mRNA

的翻译与降解<sup>[17]</sup>。YTHDC1 是细胞核内最主要的结合蛋白, 其不仅优先且高效识别 m<sup>6</sup>A 序列, 还与丝氨酸/精氨酸富集剪接因子 3 (serine and arginine rich splicing factor 3, SRSF3) 相互作用, 最终通过核 RNA 输出因子 1 (nuclear RNA export factor 1, NXF1) 促进 mRNA 的剪接与出核, 亦可调节靶基因的稳定及降解参与多种生物学反应<sup>[18]</sup>。YTHDC2 能够识别 mRNA 编码区 m<sup>6</sup>A 修饰的特殊二级结构, 促进了结构化 mRNA 的翻译; 并且 YTHDC2 还通过与 5'-3' 核糖核酸外切酶 1 (5'-3' RNA exoribonuclease 1, XRN1) 相互作用参与靶 mRNA 的降解<sup>[19]</sup>。hnRNPs 包括 hnRNP<sub>C</sub>、hnRNP<sub>G</sub> 和 hnRNP<sub>A2B1</sub>, 其中 hnRNP<sub>C</sub> 与 hnRNP<sub>G</sub> 在细胞核中识别甲基化位点, 调节 mRNA 的成熟与丰度; 而 hnRNP<sub>A2B1</sub> 主要调控 pri-miRNA 剪接加工为 miRNA 前体 (pre-miRNA), 影响 miRNA 的生成<sup>[20]</sup>。IGF2BPs 包含 IGF2BP1、IGF2BP2 和 IGF2BP3, 均为进化保守的 RNA 结合蛋白, 都含有 K 蛋白同源结构域来识别 m<sup>6</sup>A 修饰, 具有维持 mRNA 稳定性和翻译的作用, 并且 IGF2BPs 的稳定翻译作用与 YTHDF2 的降解作用还相互制约, 共同介导基因表达<sup>[21]</sup>。eIF3 可以直接与 mRNA 5'UTR 上的 m<sup>6</sup>A 修饰位点结合, 促进翻译起始复合物募集至 mRNA 上, 以启动翻译过程<sup>[22]</sup>。

此外, 脆性 X 智力低下蛋白 1 (fragile-X mental retardation protein 1, FMR1) 是一种核糖体蛋白, 最近被证实能够识别并结合 m<sup>6</sup>A 修饰的 mRNA。FMR1 与 mRNA 结合阻碍核糖体易位, 阻止多肽延伸, 起到翻译抑制作用; 并且 FMR1 还可抑制 tRNA 与核糖体的结合<sup>[23]</sup>。ELAV 样蛋白 1 (ELAV-like protein 1, ELavl1) 通过与 YTHDC1 和 IGF2BP1 等分子结合来协同促进 mRNA 的稳定<sup>[24]</sup>。富含亮氨酸的五肽重复基序蛋白 (leucine-rich PPR motif-containing protein, LRPPRC) 通过调节由线粒体 DNA 编码的 mRNA 成熟, 参与多种恶性肿瘤疾病进程, 但具体分子机制尚不完全清楚<sup>[25]</sup>。由此可见, 未来致力于结合蛋白的研究有益于在更深层面阐明 m<sup>6</sup>A 修饰所介导的生物学功能。

### 三、m<sup>6</sup>A 在慢性疼痛中的作用

国际疾病分类第 11 版 (ICD-11) 将慢性疼痛分为慢性原发性疼痛和慢性继发性疼痛两个大类。而在慢性疼痛的基础研究中, 以对建立由外周或中枢神经损伤引起的慢性神经病理性疼痛 (neuropathic pain, NP) 和外周组织持续炎症状态引发的慢性炎症性疼痛的研究更为广泛。此外, 基于 m<sup>6</sup>A 修饰作用探讨肌肉骨骼疼痛的机制也备受关注。



### 1. $m^6A$ 与神经病理性疼痛

NP 是躯体感觉神经系统损伤或疾病导致的一类疼痛，以自发痛、触诱发痛及痛觉超敏为主要特点。免疫反应和神经炎症是诱发及维持 NP 的关键因素<sup>[26]</sup>。但目前对其发病机制尚不完全清楚，且缺乏行之有效的治疗方案。

既往研究表明，FTO 可能通过正向调控背根神经节中的组蛋白甲基转移酶 (G9a) 来促进 NP；而最近的研究发现，FTO 还可通过减少脊髓中基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 中 MMP24 的  $m^6A$  修饰，促进 MMP24 蛋白表达，继而激活细胞外信号调节蛋白激酶 (extracellular signal regulated kinase, ERK) 磷酸化导致 NP 反应，而 p-ERK 也被广泛认为是脊髓神经元痛觉敏化的标志物<sup>[27]</sup>。有研究报道，脊神经结扎 (spinal nerve ligation, SNL) 小鼠脊髓内 FTO 表达上调，METTL14 表达下调，进而导致趋化因子受体 3 (chemokine receptor 3, CXCR3) 的  $m^6A$  修饰水平降低；CXCR3 表达上调并介导肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、白介素-6 (interleukin-6, IL-6) 表达量升高，从而使 SNL 小鼠的痛阈值下降<sup>[28]</sup>。以上结果均提示 FTO 可能凭借其对  $m^6A$  的去甲基化作用通过多个靶点参与疼痛反应。另有数据证实，鞘内注射 FTO 抑制剂可呈剂量依赖性地减轻 SNL 所诱发的机械性痛觉超敏和温度刺激性痛觉过敏，其机制与下调 G9a 从而上调 mu 阿片受体 (opioid receptor, MOR) 以及电压门控钾离子通道 Kv1.2 有关<sup>[29]</sup>。由此可见，FTO 抑制剂可能对临床治疗慢性疼痛具有潜在价值。

有研究报道，在 NP 大鼠中，METTL3 和 YTHDF2 显著下调，脑源性神经营养因子 (brain derived neurotrophic factor, BDNF) 显著上调，这可能与 METTL3 和 YTHDF2 协同介导 pri-miR-150 的  $m^6A$  修饰以及 miR-150 靶向抑制 BDNF 的表达有关。BDNF 是体内最丰富的神经营养因子，它通过与酪氨酸激酶受体 B (tyrosine kinase receptor, TrkB) 结合，促进 TrkB 自磷酸化，激活肾素-血管紧张素系统 (renin-angiotensin system, RAS)、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 等多种途径，进而参与 NP<sup>[30]</sup>。Bai 等<sup>[31]</sup> 报告，Wnt3a/β-catenin 信号途径的异常激活可通过加强神经炎症反应，调节神经元突触可塑性及降低表皮神经纤维密度引发慢性疼痛。在奥沙利铂引起的 NP 小鼠脊髓背角中 Wnt3a 上调 YTHDF1 的表达，并促使 TNF- $\alpha$  和白介素-18 (interleukin-18, IL-18) 大量产生，引发小鼠

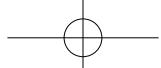
的疼痛反应；而沉默 YTHDF1 基因可以下调 TNF- $\alpha$  和 IL-18 表达，缓解小鼠的疼痛行为。综上所述，外周及中枢等疼痛信号传导部位的  $m^6A$  修饰在 NP 进展中起重要作用，靶向  $m^6A$  的干预手段可能成为治疗 NP 的新方法。

### 2. $m^6A$ 与炎症性疼痛

炎症性疼痛是由于创伤感染等原因导致组织受损并产生强烈的炎症反应而引起的疼痛。10-11 易位蛋白 1 (ten-eleven translocation 1, TET1) 是一种 DNA 去甲基化酶，介导 5-甲基胞嘧啶 (5mC) 向 5-羟甲基胞嘧啶 (5hmC) 转化，通过激活疼痛相关靶点信号转导和转录激活因子 3 (signal transducers and activators of transcription 3, STAT3)、代谢性谷氨酸受体 5 (metabotropic glutamate receptor 5, mGluR5) 的表达参与疼痛反应；TET1 还介导脊髓中 miR-365-3p 的启动子 5hmC 含量增加来促进自身表达，并通过靶向抑制电压门控钾离子通道 Kv11.1 的表达来加强疼痛反应<sup>[32]</sup>。研究发现，在完全弗氏佐剂 (complete Freund's adjuvant, CFA) 诱导的慢性炎症性疼痛模型中，METTL3 与 YTHDF2 协同调节 TET1 参与炎症性疼痛；模型中同侧脊髓内 METTL3 表达降低，减少了 TET1 mRNA 的  $m^6A$  修饰并促进 TET1 的表达；同时，YTHDF2 的表达下调减少了 TET1 的降解，两者共同作用促进了疼痛反应；而表达 METTL3 和 YTHDF2 则可逆转这一现象<sup>[33]</sup>。值得关注的是，METTL3 是 RNA 甲基转移酶，TET1 是 DNA 去甲基化酶，两者共同参与伤害性信息的加工，这也说明表观遗传学是疼痛机制的重要组成部分，其内在的基因调控关系庞杂、需要深入挖掘探索。

但对于 METTL3 在 CFA 诱导的慢性炎症性疼痛中的表达及作用尚存争议，Zhang 等<sup>[34]</sup> 报道，CFA 诱导脊髓神经元中 METTL3 和总  $m^6A$  修饰水平显著增加，METTL3 促进 pri-miR-365-3p 的  $m^6A$  修饰，并增强了 DGCR8 对 pri-miR-365-3p 的识别结合，正向调控 miR-365-3p 的成熟，从而下调钾离子通道 Kv11.1 的表达介导疼痛敏化；而敲除 METTL3 基因可预防和逆转 CFA 的作用。因此，对于慢性炎症性疼痛反应中  $m^6A$  相关酶的表达及其修饰水平的变化还需实验进一步验证，这也说明了表观遗传学介导疼痛过程的复杂性。

胶质细胞作为维持中枢系统稳态的免疫细胞已被证实参与慢性疼痛有关的神经炎症反应，特别是小胶质细胞的激活，而神经炎症反应也是中枢神经系统疾病的共同病理特征<sup>[35]</sup>。最近的证据表明<sup>[36]</sup>，小胶质细胞在发挥其促炎及抗炎作用中均有大量



$m^6A$  修饰，尤其在 mRNA 和 lncRNA 上存在多种差异。这些差异在促炎过程中，多体现于与免疫系统调节有关的细胞信号传导和蛋白质降解等途径；在抗炎过程中体现于遗传信息编码及细胞发育代谢等途径。 $m^6A$  修饰的调节与平衡介导小胶质细胞在静息稳态 M0、经典激活 M1 和替代激活 M2 三者之间的转化，且已在缺血性脑损伤、抑郁症等神经系统疾病中得到验证，但其在疼痛反应中如何修饰并发挥何种作用尚未明确。由此，于小胶质细胞层面探讨  $m^6A$  修饰与炎症性疼痛的关系，相信对完善慢性疼痛的分子作用机制意义重大。

### 3. $m^6A$ 与肌肉骨骼疼痛

肌肉骨骼疾病是一类累及肌肉、软骨、骨、关节等部位的炎症相关性退行性疾病，包括椎间盘退变 (intervertebral disc degeneration, IVDD)、骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 等，由其所导致的慢性疼痛已成为医疗卫生不容忽视的客观问题。IVDD 是腰背痛最常见的病因之一，有研究发现 IVDD 病人髓核 (nucleus pulposus, NP) 中存在大量的 METTL14 并且会上调炎症小体复合物中 NOD 样受体蛋白 3 (NOD-like receptor protein 3, NLRP3) 的表达，增加 IL-1 $\beta$  和 IL-18 的表达，最终导致髓核细胞 (nucleus pulposus cells, NPCs) 凋亡；而抑制 METTL14 有利于维持 NP 功能、延缓椎间盘退变的进展<sup>[37]</sup>。此外，METTL14 还促进 pri-miR-34a-5p 的  $m^6A$  修饰、上调 miR-34a-5p 表达，继而下调去乙酰化酶 SIRT1 (sirtuin 1) 从而加速 NPCs 的衰老；而下调 METTL14 可以抑制细胞周期的停滞与衰老<sup>[38]</sup>。以上研究均提示 METTL14 抑制剂可能成为延缓、治疗 IVDD 的新型辅助药物。还有研究发现在衰老的 NPCs 中，lncRNA 内由 DNA 损伤激活的非编码 RNA (non-coding RNA-activated by DNA damage, NORAD) 的  $m^6A$  修饰显著增多，WTAP 表达上调；同时 YTHDF2 介导 lncRNA NORAD 大量降解，NORAD 的缺失使 PUMILIO (高度保守的 RBP，识别 mRNA 序列抑制翻译) 活性增强，抑制 E2F 转录因子 3 (E2F transcription factor 3, E2F3) 的表达，继而促进 NPCs 衰老加重 IVDD<sup>[39]</sup>。因此，调控 lncRNA NORAD 的  $m^6A$  修饰水平很可能成为治疗 IVDD 的新策略。

关节软骨的细胞代谢紊乱和细胞外基质 (extra-cellular matrix, ECM) 降解目前被认为是 OA 发生发展的主要病理机制，其过程涉及转化生长因子- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )/SMAD、核转录因子- $\kappa$ B (nuclear factor kappa B, NF- $\kappa$ B)、MAPK 等多条信号通路。Bertero 等<sup>[40]</sup> 发现 SMAD2/3 可以

促进 writers 复合物与 SMAD2/3 特异性转录因子结合，破坏转录因子的稳定性，加速其降解，从而影响下游靶基因的表达和软骨细胞的活性。还有研究证实，OA 病人膝关节组织中 METTL3 表达量减少，在以 IL-1 $\beta$  处理的 SW1353 细胞炎症模型中，过表达 METTL3 后，p65、p-ERK、MMP1 和 MMP3 表达增加，TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8、组织金属蛋白酶抑制剂 (tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1, TIMP-1)、组织金属蛋白酶抑制剂 (tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 2, TIMP-2) 及 MMP13 表达量降低<sup>[41]</sup>。这也提示 METTL3 可能通过调节炎症反应以及 TIMPs 与 MMPs 之间的平衡来影响 OA 中 ECM 的降解，进而缓解 OA 所致的疼痛反应。同样 METTL3 和 YTHDF2 等  $m^6A$  调控蛋白在类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 中，也多数通过介导炎症、免疫相关信号通路及与 RA 有关的基因表达发挥作用<sup>[42]</sup>。 $m^6A$  修饰还可能直接参与影响滑膜细胞的增殖，这也为今后探究、治疗 RA 疾病提供一种新思路。

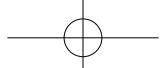
### 四、小结与展望

综上所述，现有研究均证实  $m^6A$  修饰在炎症性疼痛、神经病理性疼痛以及与慢性疼痛相关的肌肉骨骼疾病的发生发展中存在显著变化并发挥重要作用，其通过调控疼痛相关炎症因子与基因表达，进而改变神经元兴奋性及突触可塑性，最终影响慢性疼痛。与此同时，多种  $m^6A$  调控蛋白的发现与鉴定，不断扩增的靶基因筛选，也在表观遗传学层面丰富了慢性疼痛机制。然而目前研究尚存在不足之处：首先， $m^6A$  修饰并非疼痛相关区域所特有，在其他组织细胞中也有表达，关注与疼痛有关的特异性、减少与其他反应相关的干扰至关重要；其次，在未来可重复并增加一些慢性疼痛模型的研究，进一步可着重关注  $m^6A$  修饰和胶质细胞间的调节作用以及对慢性疼痛调控的时间进程及确切的因果关系；再者，探索发现与慢性疼痛相关的  $m^6A$  修饰标志物，也可作为临床预测、诊疗、评估疼痛的重要依据，然而此过程仍需要大量客观、标准的实验进行验证。深入探索  $m^6A$  修饰参与疼痛反应的作用机制，必将加快表观遗传学从理论靶点到临床应用的转化，从而改善慢性疼痛病人的生活质量及社会的经济负担。

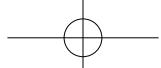
利益冲突声明：作者声明本文无利益冲突。

### 参 考 文 献

- [1] Jiang Y, Xu T, Mao F, et al. The prevalence and management of chronic pain in the Chinese population:



- findings from the China Pain Health Index (2020)[J]. *Popul Health Metr*, 2022, 20(1):20.
- [2] Boccaletto P, Stefaniak F, Ray A, et al. MODOMICS: a database of RNA modification pathways. 2021 update[J]. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50(D1):D231-D235.
- [3] Zhu R, Tian D, Zhao Y, et al. Genome-wide detection of m<sup>6</sup>A associated genetic polymorphisms associated with ischemic stroke[J]. *J Mol Neurosci*, 2021, 71(10):2107-2115.
- [4] Shen S, Zhang R, Jiang Y, et al. Comprehensive analyses of m<sup>6</sup>A regulators and interactive coding and non-coding RNAs across 32 cancer types[J]. *Mol Cancer*, 2021, 20(1):67.
- [5] Meyer KD, Saletore Y, Zumbo P, et al. Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3' UTRs and near stop codons[J]. *Cell*, 2012, 149(7):1635-1646.
- [6] Alarcón CR, Lee H, Goodarzi H, et al. N6-methyladenosine marks primary microRNAs for processing[J]. *Nature*, 2015, 519(7544):482-485.
- [7] Zuo L, Su H, Zhang Q, et al. Comprehensive analysis of lncRNAs N<sup>6</sup> methyladenosine modification in colorectal cancer[J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(3):4182-4198.
- [8] Di Timoteo G, Dattilo D, Centrón-Broco A, et al. Modulation of circRNA metabolism by m<sup>6</sup>A modification[J]. *Cell Rep*, 2020, 31(6):107641.
- [9] Schöller E, Weichmann F, Treiber T, et al. Interactions, localization, and phosphorylation of the m<sup>6</sup>A generating METTL3-METTL14-WTAP complex[J]. *Rna*, 2018, 24(4):499-512.
- [10] Coker H, Wei G, Moindrot B, et al. The role of the Xist 5' m<sup>6</sup>A region and RBM15 in X chromosome inactivation[J]. *Wellcome Open Res*, 2020, 5:31.
- [11] Yue Y, Liu J, Cui X, et al. VIRMA mediates preferential m<sup>6</sup>A mRNA methylation in 3'UTR and near stop codon and associates with alternative polyadenylation[J]. *Cell Discov*, 2018, 4:10.
- [12] Wen J, Lv R, Ma H, et al. Zc3h13 regulates nuclear RNA m<sup>6</sup>A methylation and mouse embryonic stem cell self-renewal[J]. *Mol Cell*, 2018, 69(6):1028-1038.e6.
- [13] Wang Y, Zhang L, Ren H, et al. Role of Hakai in m<sup>6</sup>A modification pathway in drosophila[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1):2159.
- [14] Song T, Yang Y, Wei H, et al. Zfp217 mediates m<sup>6</sup>A mRNA methylation to orchestrate transcriptional and post-transcriptional regulation to promote adipogenic differentiation[J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(12):6130-6144.
- [15] Mauer J, Sindelar M, Despic V, et al. FTO controls reversible m<sup>6</sup>A mRNA methylation during snRNA biogenesis[J]. *Nat Chem Biol*, 2019, 15(4):340-347.
- [16] Kaur S, Tam NY, McDonough MA, et al. Mechanisms of substrate recognition and N6-methyladenosine demethylation revealed by crystal structures of ALKBH5-RNA complexes[J]. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50(7):4148-4160.
- [17] Shi H, Wang X, Lu Z, et al. YTHDF3 facilitates translation and decay of N<sup>6</sup>-methyladenosine-modified RNA[J]. *Cell Res*, 2017, 27(3):315-328.
- [18] Roundtree IA, Luo GZ, Zhang Z, et al. YTHDC1 mediates nuclear export of N<sup>6</sup>-methyladenosine methylated mRNAs[J]. *Elife*, 2017, 6.
- [19] Mao Y, Dong L, Liu XM, et al. m<sup>6</sup>A in mRNA coding regions promotes translation via the RNA helicase-containing YTHDC2[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1):5332.
- [20] Yin M, Cheng M, Liu C, et al. HNRNPA2B1 as a trigger of RNA switch modulates the miRNA-mediated regulation of CDK6[J]. *iScience*, 2021, 24(11):103345.
- [21] Huang H, Weng H, Sun W, et al. Recognition of RNA N<sup>6</sup>-methyladenosine by IGF2BP proteins enhances mRNA stability and translation[J]. *Nat Cell Biol*, 2018, 20(3):285-295.
- [22] Ma F, Li X, Ren J, et al. Downregulation of eukaryotic translation initiation factor 3b inhibited proliferation and metastasis of gastric cancer[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(9):623.
- [23] Zhang G, Xu Y, Wang X, et al. Dynamic FMR1 granule phase switch instructed by m<sup>6</sup>A modification contributes to maternal RNA decay[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1):859.
- [24] Cai Z, Xu H, Bai G, et al. ELAVL1 promotes prostate cancer progression by interacting with other m<sup>6</sup>A regulators[J]. *Front Oncol*, 2022, 12:939784.
- [25] Huang G, Huang S, Cui H. Effect of m<sup>6</sup>A regulators on diagnosis, subtype classification, prognosis and novel therapeutic target development of idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13:993567.
- [26] GuidaaF, Iannottaa M, Misso G, et al. 李芸 (译). 长期神经病理性疼痛行为学改变与突触可塑性和边缘回路改变的相关性研究: 一项小鼠的对照观察研究 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2022, 28(11): 801-804.
- [27] Ma L, Huang Y, Zhang F, et al. MMP24 contributes to neuropathic pain in an FTO-dependent manner in the spinal cord neurons[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 673831.
- [28] Wu SF, Wang Y, Zhao QC. Demethylase FTO promotes neuropathic pain development via regulating the m<sup>6</sup>A methylation levels of CXCR3[J]. *Acta Biochim Pol*, 2022, 69(4):819-824.
- [29] Li X, Tao YX. Intrathecal administration of the fat-mass and obesity-associated protein inhibitor mitigates neuropathic pain in female rats[J]. *Transl Perioper Pain Med*, 2022, 9(4):478-487.
- [30] Zhang L, Zhao X, Wang J, et al. METTL3 suppresses neuropathic pain via modulating N<sup>6</sup> methyladenosine-dependent primary miR-150 processing[J]. *Cell Death Discov*, 2022, 8(1):80.



- [31] Bai X, Huang Y, Huang W, et al. Wnt3a/YTHDF1 regulated oxaliplatin-induced neuropathic pain via TNF- $\alpha$ /IL-18 expression in the spinal cord[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2023, 43(4):1583-1594.
- [32] Pan Z, Xue ZY, Li GF, et al. DNA hydroxymethylation by ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase 1 and 3 regulates nociceptive sensitization in a chronic inflammatory pain model[J]. *Anesthesiology*, 2017, 127(1):147-163.
- [33] Pan Z, Zhang Q, Liu X, et al. Methyltransferase-like 3 contributes to inflammatory pain by targeting TET1 in YTHDF2-dependent manner[J]. *Pain*, 2021, 162(7):1960-1976.
- [34] Zhang C, Wang Y, Peng Y, et al. METTL3 regulates inflammatory pain by modulating m<sup>6</sup>A-dependent pri-miR-365-3p processing[J]. *Faseb J*, 2020, 34(1):122-132.
- [35] Tansley S, Gu N, Guzman AU, et al. 袁宝童(译). 小胶质细胞介导的神经元周围网络降解促进疼痛[J]. 中国疼痛医学杂志, 2022, 28(10): 721-723.
- [36] Li Q, Wen S, Ye W, et al. The potential roles of m<sup>6</sup>A modification in regulating the inflammatory response in microglia[J]. *J Neuroinflammation*, 2021, 18(1):149.
- [37] Yuan X, Li T, Shi L, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells deliver exogenous miR-26a-5p via exosomes to inhibit nucleus pulposus cell pyroptosis through METTL14/NLRP3[J]. *Mol Med*, 2021, 27(1):91.
- [38] Zhu H, Sun B, Zhu L, et al. N6-methyladenosine induced miR-34a-5p promotes TNF- $\alpha$ -induced nucleus pulposus cell senescence by targeting SIRT1[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9:642437.
- [39] Li G, Ma L, He S, et al. WTAP-mediated m<sup>6</sup>A modification of lncRNA NORAD promotes intervertebral disc degeneration[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1):1469.
- [40] Bertero A, Brown S, Madrigal P, et al. The SMAD2/3 interactome reveals that TGF $\beta$  controls m<sup>6</sup>A mRNA methylation in pluripotency[J]. *Nature*, 2018, 555(7695):256-259.
- [41] Sang W, Xue S, Jiang Y, et al. METTL3 involves the progression of osteoarthritis probably by affecting ECM degradation and regulating the inflammatory response[J]. *Life Sci*, 2021, 278:119528.
- [42] Chen Q, Li H, Liu Y, et al. Epigenetic regulation of immune and inflammatory responses in rheumatoid arthritis[J]. *Front Immunol*, 2022, 13:881191.

(上接第527页)

- [7] 麦海妙, 郑佐勇, 杨康胜. 健康教育联合家庭-医护一体化护理对老年股骨骨折患者的影响研究[J]. *护理学*, 2021, 10(2):117-122.
- [8] 甘春霞, 瞿广素, 罗维, 等. 基于遗忘曲线的记忆训练对老年心力衰竭认知功能障碍患者的影响研究[J]. *现代医药卫生*, 2020, 36(9):1330-1333.
- [9] Schlereth T. Guideline "diagnosis and non intervention-al therapy of neuropathic pain" of the German Society of Neurology (deutsche Gesellschaft für Neurologie)[J]. *Neurol Res Pract*, 2020, 2:16.
- [10] Wilke CT, Pickard AS. PMC58 test-retest reliability of the eq-5d visual analog scale across populations and conditions[J]. *Value Health*, 2009, 12(3):A30-A30.
- [11] Liew TM, Feng L, Gao Q, et al. Diagnostic utility of montreal cognitive assessment in the fifth edition of diagnostic and statistical manual of mental disorders: major and mild neurocognitive disorders[J]. *J Am Med Dir Assoc*, 2015, 16(2):144-148.
- [12] Mezo PG, Short MM. Construct validity and confirmatory factor analysis of the self-control and self-management scale[J]. *Can J Behav Sci*, 2012, 44(1):1-8.
- [13] Bousquet J, Bullinger M, Fayol C, et al. Assessment of quality of life in patients with perennial allergic rhinitis with the French version of the SF-36 health status questionnaire[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 1994, 94(2 Pt 1): 182-188.
- [14] 宫淑文. 医护一体化护理结合营养护理干预对住院血液肿瘤患者营养状态, 生活质量的影响[J]. *中国医药导报*, 2022, 19(13):185-189.
- [15] Knotkova H, Hamani C, Sivanesan E, et al. Neuromodulation for chronic pain[J]. *Lancet*, 2021, 397(10289):2111-2124.
- [16] Sun L, Peng C, Joosten E, et al. Spinal cord stimulation and treatment of peripheral or central neuropathic pain: mechanisms and clinical application[J]. *Neural Plast*, 2021, 2021:5607898.
- [17] Kankowski S, Grothe C, Haastert-Talini K. Neuropathic pain: spotlighting anatomy, experimental models, mechanisms, and therapeutic aspects[J]. *Eur J Neurosci*, 2021, 54(2):4475-4496.
- [18] 杨群, 邓巧丽, 李秀君, 等. 基于遗忘曲线的自我管理对轻度认知功能障碍患者认知功能, 日常生活能力及疗效的影响[J]. *四川精神卫生*, 2022, 35(2):161-164.
- [19] 付莉, 袁海川, 万里红, 等. 基于遗忘曲线规律的健康教育在维持性血液透析患者中的应用[J]. *中华现代护理杂志*, 2022, 28(32):4550-4555.
- [20] 冯晶晶, 薛静, 胡洁. 基于“遗忘曲线”的教育方案对老年痴呆患者认知功能障碍及自我管理行为的影响[J]. *国际老年医学杂志*, 2019, 40(6):357-360.