DOI:10.16016/j.2097-0927.202307062

METTL3 通过 IGF2BP2 依赖性方式参与 m6A 修饰调控 HBV 复制的机制

余 玲[1],张自力[1],曾 蓉[1],张 节[1],王 鹏[2],潘万龙[1] 637100 四川 南充,川北医学院:基础医学与法医学院[1],附属医院老年科[2]

[摘要] **目的** 探究胰岛素样生长因子 2 mRNA 结合蛋白 2(insulin like growth factor 2 mRNA binding protein 2,IGF2BP2)协助甲基转移酶样 3(methytransferase like 3,METTL3)通过 N6-甲基腺苷(N6-methyladenosine,m6A)修饰调控 HBV 复制的分子机制。**方法** 以 HBV 稳定复制细胞系 HepG2.2.15 及其亲本细胞 HepG2 为模型,斑点杂交分析 m6A 修饰水平,RT-qPCR 和 Western blot 检测 METTL3、IGF2BP2 表达。生物信息学及免疫共沉淀分析 METTL3 与 m6A 阅读蛋白及其相互作用。将 METTL3 质粒、METTL3 siRNA 和(或)IGF2BP2 siRNA 转染至 HepG2.2.15 细胞,分别记为 OE-METTL3、si-METTL3、si-IGF2BP2、OE-METTL3+si-IGF2BP2、si-METTL3+si-IGF2BP2、Control 组;qPCR 检测 *HBV DNA*、*HBV rcDNA*、*HBV cccDNA* 拷贝数,RT-qPCR 或 Western blot 检测 *HBV pgRNA*、METTL3、IGF2BP2 表达。**结果** 与 HepG2 细胞相比,在 HepG2.2.15 细胞中 m6A 修饰富集,METTL3、IGF2BP2 表达水平升高($P<0.05$)。与 Control 组相比,在 OE-METTL3 组中 m6A 修饰富集增强,IGF2BP2 表达水平升高($P<0.05$),HBV 复制相关指标(*HBV DNA*、*HBV rcDNA*、*HBV cccDNA*、*HBV pgRNA*)升高($P<0.01$);在 si-METTL3 组中则相反。生物信息学分析及免疫共沉淀显示 METTL3 与 IGF2BP2 为互作蛋白。与 Control 组相比,在 si-IGF2BP2 组中 m6A 修饰富集减弱,METTL3 表达水平降低($P<0.01$),HBV 复制相关指标降低($P<0.01$)。在 OE-METTL3+si-IGF2BP2 组中,HBV 复制相关指标较 OE-METTL3 组降低($P<0.001$)。在 si-METTL3+si-IGF2BP2 组中,HBV 复制相关指标较 si-METTL3 组、si-IGF2BP2 组降低($P<0.05$)。**结论** METTL3 依赖 IGF2BP2 富集 m6A 通过增强 *HBV rcDNA* 转化为 *cccDNA*,进而增强 *pgRNA* 逆转录复制病毒。

[关键词] 甲基转移酶样 3;胰岛素样生长因子 2 mRNA 结合蛋白 2;N6-甲基腺苷;乙型肝炎病毒
[中图法分类号] R341;R373.21;R394.3 [文献标志码] A

METTL3 participates in m6A modification to regulate HBV replication through an IGF2BP2-dependent manner

YU Ling[1], ZHANG Zili[1], ZENG Rong[1], ZHANG Jie[1], WANG Peng[2], PAN Wanlong[1] [1]School of Basic Medical Sciences and Forensic Medicine, North Sichuan Medical College, [2]Department of Geriatrics, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan Province, 637100, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the molecular mechanism by which methytransferase like3 (METTL3) cooperates with insulin like growth factor 2 mRNA binding protein 2 (IGF2BP2) to regulate HBV replication through N6-methyladenosine (m6A) modifications. **Methods** HBV stably replicating cell line HepG2.2.15 and its source cells HepG2 were used as models. Spot hybridization was used to analyze m6A modification level, and RT-qPCR and Western blotting were utilized to detect the expression of METTL3 and IGF2BP2 at mRNA and protein levels. Bioinformatics analysis and co-immunoprecipitation assay were applied to analyze METTL3 and m6A reading proteins and their interactions. After METTL3 plasmid, METTL3 siRNA and/or IGF2BP2 siRNA were transfected into HepG2.2.15 cells, respectively, the cells were assigned into

[基金项目] 南充市市校科技战略合作专项(22SXQT0318)
[通信作者] 潘万龙,E-mail:panwl@aliyun.com

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

OE-METTL3 group, si-METTL3 group, si-IGF2BP2 group, OE-METTL3+si-IGF2BP2 group, si-METTL3+si-IGF2BP2 group, and the cells untreated were subjected as control group. Copy numbers of HBV DNA, HBV rcDNA, and HBV cccDNA were detected by qPCR, and the expression of HBV pgRNA , METTL3, and IGF2BP2 were measured with RT-qPCR or Western blotting. **Results** Compared with HepG2 cells, m6A modification was enriched, and the expression levels of METTL3 and IGF2BP2 were elevated in HepG2.2.15 cells ($P<0.05$). Compared with the control group, m6A modification enrichment was enhanced and IGF2BP2 expression level was elevated in the OE-METTL3 group ($P<0.05$), and HBV replication-related indexes (HBV DNA, HBV rcDNA, HBV cccDNA, and HBV pgRNA) were increased ($P<0.01$); and opposite phenomena were observed in the si-METTL3 group. Bioinformatics analysis and co-immunoprecipitation assay showed that METTL3 and IGF2BP2 were interacting proteins. Compared with the control group, m6A modification enrichment was attenuated and METTL3 expression level was reduced ($P<0.01$), and HBV replication-related indexes were decreased in the si-IGF2BP2 group ($P<0.01$). In the OE-METTL3+si-IGF2BP2 group, HBV replication-related indexes were reduced when compared with the OE-METTL3 group ($P<0.01$). In the si-METTL3+si-IGF2BP2 group, HBV replication-related indexes were reduced when compared with the si-METTL3 group and si-IGF2BP2 group ($P<0.05$). **Conclusion** METTL3 enriches m6A by depending on IGF2BP2, replicates the virus by enhancing the conversion of HBV rcDNA to cccDNA, and in turn enhances pgRNA reverse transcription.

[**Key words**] methytransferase like 3; insulin like growth factor 2 mRNA binding protein 2; m6A methylation; hepatitis B virus

Supported by the Special Project of Strategic Cooperation in Science and Technology of Nanchong City and Colleges and Universities (22SXQT0318).
Corresponding author: PAN Wanlong, E-mail: panwl@aliyun.com

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus,HBV)是一种嗜肝小包膜DNA病毒,其基因组是由3.2 kb的松弛环状DNA(relaxed circular DNA,*rcDNA*)组成。在病毒复制过程中同时还存在一种共价闭合环状DNA(covalently closed circular DNA,*cccDNA*),作为HBV逆转录复制的模板产生子代病毒,损伤机体肝脏功能[1]。此外,其前基因组RNA(pregenomic RNA,*pgRNA*)又可以组装包裹反转录形成*rcDNA*,重新进入细胞核补充*cccDNA*池,导致病毒持续复制[2]。乙型肝炎患者体内HBV难以清除,究其原因在于HBV复制调控的具体机制还不甚明了。

N6-甲基腺苷(N6-methyladenosine,m6A)修饰是RNA中腺苷N6位置的甲基化,是表观遗传修饰中最广泛的转录后修饰[3],也是真核生物中常见的RNA修饰方式之一[2,4]。m6A修饰通过写入蛋白、擦除蛋白和阅读蛋白共同参与实现其调控功能[5]。甲基转移酶样3(methytransferase like 3,METTL3)作为写入蛋白主要参与m6A的形成,在病毒复制[6]、免疫逃逸[3]、致癌[7]中发挥关键作用。而胰岛素生长因子2 mRNA结合蛋白(insulin like growth factor 2 mRNA binding protein, IGF2BPs)包括IGF2BP1、IGF2BP2和IGF2BP3,主要参与m6A功能的发挥,通过GGC基序与m6A修饰位点结合,促进RNA的稳定性[8-9]。最近研究发现HBV转录本在epsilon茎环的共识DRACH基序中存在m6A修饰,根据m6A在5'或3'epsilon茎环上的不同位置而调节HBV的不同命运[10]。同时m6A可通过干预宿主RNA和(或)病毒mRNA直接调节HBV病毒复制,或者通过改变参与病毒复制的相关基因或RNA的表达发挥间接调节作用[11]。IMAM等[10]研究认为YTH N6-甲基腺苷RNA结合蛋白2(YTH N6-methyladenosine RNA binding protein 2, YTHDF2)与HBV RNA结合,负向调控*HBV pgRNA*的表达,抑制HBV复制。功能上,YTHDF2调节m6A修饰病毒RNA的转换和降解[10, 12],而IGF2BPs却与YTHDF2作用不同,以m6A依赖的方式促进RNA的稳定[7-8, 13]。已有研究发现METTL3调节HBV复制[14],另有报道METTL3功能依赖于IGF2BP2,它识别甲基化转录本的编码序列区域,防止RNA降解[15]。然而IGF2BP2如何与METTL3协作通过m6A修饰调控HBV复制目前尚不清楚。

基于此,本研究探索m6A写入蛋白METTL3与阅读蛋白IGF2BP2对HBV复制的影响及其作用机制,为探明HBV复制机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料、试剂

人肝癌细胞株HepG2细胞、HBV稳定复制细胞系

HepG2.2.15 肝癌细胞均购自上海赛佰康生物公司;METTL3 质粒及 siRNA、IGF2BP2 siRNA 由广州锐博公司合成;引物由上海生工生物有限公司合成;RNA 逆转录试剂盒购自美国 Thermo Fisher 公司;RT-qPCR 检测试剂盒购自北京康为公司;T5 核酸外切酶及免疫共沉淀试剂盒(Protein A+G 磁珠法)购自上海碧云天公司;兔抗 m6A、GAPDH、METTL3、IGF2BP2 抗体购自成都正能生物公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗抗体购自美国 ABclonal 公司;动物组织/细胞基因组 DNA 提取试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组 用含 10%胎牛血清和 1%青、链霉素的 DMEM 培养基在 37 ℃、5% CO_2 细胞培养箱中培养。以 5×10^5 个/孔接种于 6 孔板,细胞融合度达到 60%~80%时,将 METTL3 质粒、METTL3 siRNA 和(或)IGF2BP2 siRNA 转染至 HepG2.2.15 细胞培养 24~48 h,分别记为 OE-METTL3、si-METTL3、si-IGF2BP2、OE-METTL3 + si-IGF2BP2、si-METTL3 + si-IGF2BP2、Control 组。

1.2.2 斑点杂交检测 提取细胞总 RNA,梯度稀释至 200、100、50 ng/μL,95 ℃金属浴加热 5 min 使 RNA 变性,迅速置于冰上冷却。将 2 μL RNA 转移至 NC 膜,紫外灯照射 2 h 后使用 5%脱脂奶粉室温封闭 1 h,加入一抗 m6A(1∶1 000) 4 ℃孵育过夜,TBST 洗涤,用山羊抗兔二抗(1∶5 000)室温孵育 1 h,TBST 洗涤后暗室曝光显影。

1.2.3 *HBV DNA* 提取及 *HBV cccDNA* 分离 收集细胞按照动物组织/细胞基因组 DNA 提取试剂盒说明书要求提取细胞总 DNA,然后对 cccDNA 进行选择性 PCR[16]。

1.2.4 qPCR 和 RT-qPCR 检测 提取细胞总 RNA,按照逆转录试剂盒说明书制备 cDNA,然后以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。使用体外 HBV 质粒的 10 倍稀释系列标准进行荧光定量 PCR 扩增,制作标准曲线。使用特异性引物检测 *HBV rcDNA*[17]。按照标准曲线计算 *HBV DNA*、*HBV rcDNA*、*HBV cccDNA* 绝对拷贝数;*HBV rcDNA* 转化率:*HBV cccDNA/HBV rcDNA*×100%;以 *β-actin* 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算相对表达量。引物序列如下:*METTL3* 上游 5′-TTGTCTCCAACCTTCCGTAGT-3′,下游 5′-CCAGATCAGAGAGGTGGTGTAG-3′;*IGF2BP2* 上游 5′-AGCTAAGCGGGCATCAGTTTG-3′,下游 5′-CCGCAGCGGGAAATCAATCT-3′;*HBV DNA* 上游 5′-ACCGACCTTGAGGCATACTT-3′,下游 5′-GCCTACAGCCTCCTAGTACA-3′;*HBV rcDNA* 上游 5′-TTTCACCTCTGCCTAATCATCTCT-3′,下游 5′-CTTTATAAGGGTCGATGCCATGC-3′;*HBV cccDNA* 上游 5′-GCCTATTGATTGATTGGAAAGTATG-3′,下游 5′-AGCTGAGGCGGTATCTA-3′;*HBV pgRNA* 上游 5′-CCTGCACCACCAACTGCTTA-3′,下游 5′-CATGAGTCCTTCCACGATACCA-3′;*β-actin* 上游 5′-CTCCATCCTGGCCTCGCTGT-3′;下游 5′-GCTGTCACCTTCACCGTTCC-3′。

1.2.5 免疫共沉淀实验 在细胞中转染 METTL3 质粒,48 h 后收集细胞制备蛋白样品。取 20 μL(Protein A+G 磁珠)和 2 μg 一抗 METTL3、Normol Rabit IgG 室温翻转 4 h,再加入 500 μg 蛋白混合液 4 ℃旋转过夜。磁力架分离,弃上清,加入含抑制剂的 Lysis Buffer 洗涤磁珠 3 次,加入 50 μL SDS-PAGE 上样缓冲液,95 ℃加热 10 min 洗脱,分离磁珠后取上清做后续分析。

1.2.6 Western blot 检测 提取细胞总蛋白,SDS-PAGE 分离蛋白并转移至 PVDF 膜,然后分别加入一抗 METTL3(1∶2 000)、IGF2BP2(1∶1 000)、GAPDH(1∶5 000)4 ℃孵育过夜,TBST 洗涤后再加入山羊抗兔二抗(1∶5 000)室温孵育 1 h,最后曝光显影。采用 Image J 对结果进行量化。

1.2.7 生物信息学分析 蛋白-蛋白相互作用 STRING 数据库(https://cn.string-db.org/)[18]预测分析 METTL3 与 m6A 阅读蛋之间的相互作用。

1.3 统计学分析

使用 Graph-Pad Prism 8.0.2 软件进行数据统计及作图分析。数据结果采用 $\bar{x}\pm s$ 表示。2 组间差异比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用最小显著性差异 t 检验;$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 m6A 修饰在 HBV 稳定复制细胞系 HepG2.2.15 细胞中富集

与 HepG2 细胞相比,m6A 修饰在 HepG2.2.15 细胞中富集;在 HepG2 细胞和 HepG2.2.15 细胞中分别检测 METTL3 和 IGF2BP2,结果显示在 HepG2.2.15 细胞中 *METTL3*、*IGF2BP2* mRNA 表达水平较 HepG2 细胞分别升高(3.16±0.18)、(2.43±0.17)倍($P<0.001$);蛋白表达水平分别升高(1.36±0.05)、(2.10±0.01)倍($P<0.05$)。这提示 m6A 修饰与 HBV 复制有关,METTL3、IGF2BP2 可能参与了 HBV 的复制。

2.2 METTL3 通过 m6A 修饰促进 HBV 复制

与 Control 组相比,在 OE-METTL3 组中 *METTL3* mRNA 水平升高了(367.0±13.04)倍($P<0.001$,图 1A);m6A 修饰富集增强(图 1B);*HBV DNA*、*HBV*

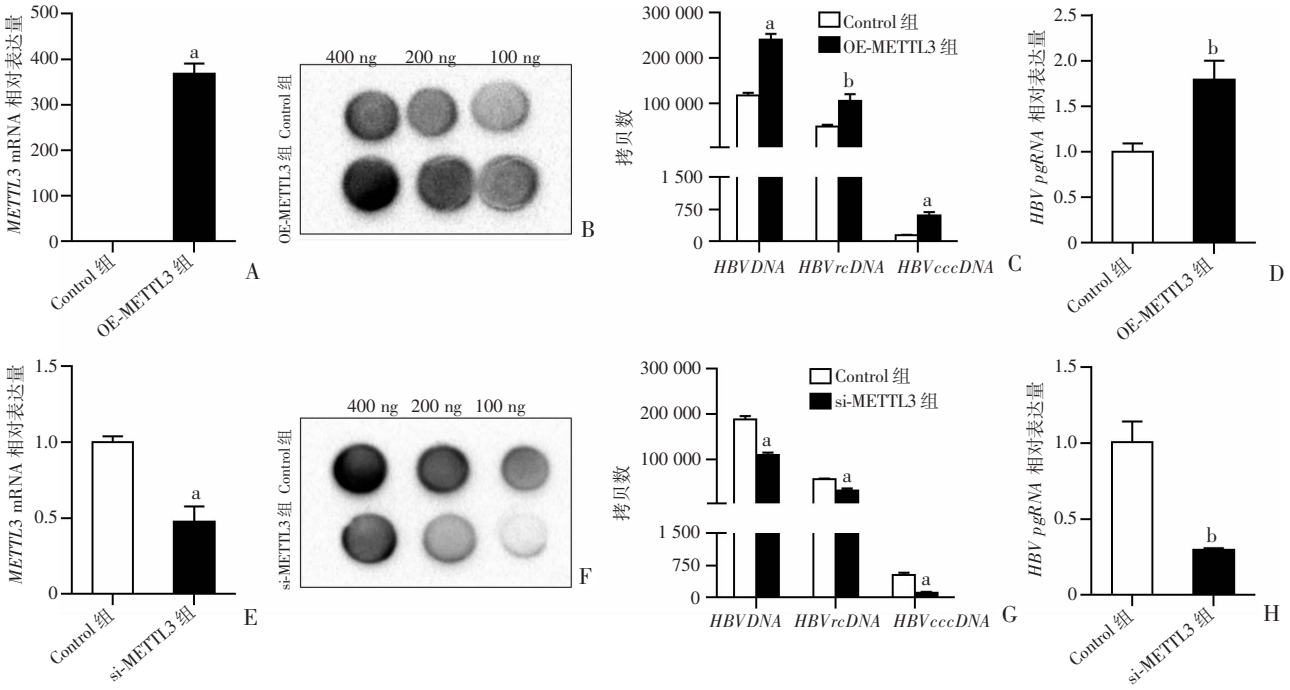
rcDNA、*HBV cccDNA* 拷贝数分别增加(1.23±0.09)×10^5、(5.70±0.87)×10^4、(4.16±0.50)×10^2 拷贝(P<0.01,图 1C);*HBV pgRNA* 表达水平升高(1.79±0.13)倍(P<0.01,图 1D);*HBV rcDNA* 转化率由 0.30%升高至 0.58%,升高 1.93 倍。

与 Control 组相比,在 si-METTL3 组中 *METTL3* mRNA 表达水平降低了 70%(图 1E,P<0.001);m6A 修饰富集减弱(图 1F);*HBV DNA*、*HBV rcDNA*、*HBV cccDNA* 拷贝数分别降低(0.78±0.05)×10^5、(2.41±0.24)×10^4、(4.18±0.30)×10^2 拷贝(P<0.001,图 1G);*HBV pgRNA* 表达水平降低(2.10±0.60)倍(P<0.01,图 1H);*HBV rcDNA* 转化率由 0.95%下降至 0.36%,降低 2.63 倍。

2.3　METTL3 依赖 IGF2BP2 调控 HBV 复制

2.3.1　METTL3 与 IGF2B2 相互作用　通过蛋白-蛋白相互作用网络显示,METTL3 可以与 m6A 阅读蛋白 IGF2BP1 和 IGF2BP2 相互作用,不与 IGF2BP3 相互作用(图 2A)。

在转染 METTL3 质粒的 HepG2.2.15 细胞中,利用 METTL3 特异性抗体进行免疫共沉淀,IP 组结果显示 METTL3 与 IGF2BP2 蛋白被同时沉淀下来,表明 METTL3 可以与 IGF2BP2 相互作用(图 2B)。



a:P<0.001,b:P<0.01,与 Control 组比较

A、E:RT-qPCR 检测 *METTL3* 表达水平;B、F:斑点杂交分析 m6A 水平;C、G:qPCR 检测 HBV 复制相关指标;D、H:RT-qPCR 检测 *HBV pgRNA* 表达水平

图 1　METTL3 通过 m6A 修饰促进 HBV 复制



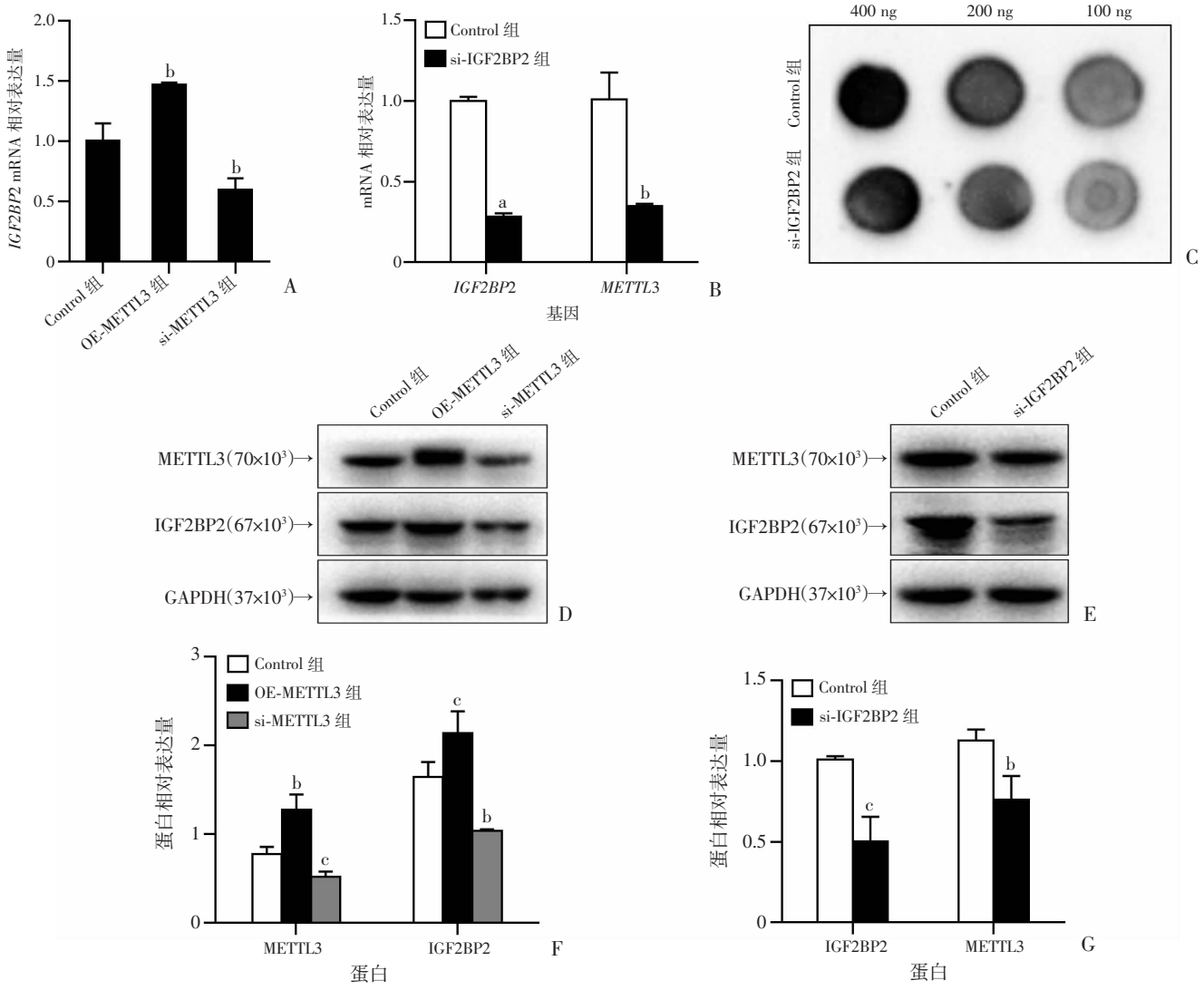
A:生物信息学分析　深紫色线条表示已知相互作用,浅紫色线条表示蛋白质具有同源性,黑色线条表示共表达,浅绿色线条表示文本挖掘;B:免疫共沉淀实验

图 2　METTL3 与 IGF2BP2 相互作用

2.3.2 干扰 METTL3 或 IGF2BP2 分别对 IGF2BP2 或 METTL3 mRNA 及蛋白的影响 与 Control 组相比,在 OE-METTL3 组、si-METTL3 组中,*IGF2BP2* mRNA 表达水平分别升高(1.47±0.08)倍、降低(1.69±0.10)倍($P<0.01$,图 3A)。与 Control 组相比,在 si-IGF2BP2 组中,*IGF2BP2* mRNA 表达水平降低了 65%($P<0.001$,图 3B);*METTL3* mRNA 表达水平降低(2.91±0.10)倍($P<0.01$,图 3B);m6A 修饰富集减弱(图 3C)。与 Control 组相比,在 OE-METTL3 组、si-METTL3 组中,METTL3 蛋白水平分别升高(1.63±0.11)倍、降低(1.50±0.06)倍($P<0.05$,图 3D、F),IGF2BP2 蛋白表达水平分别升高(1.31±0.17)倍、降低(1.58±0.10)倍($P<0.05$,图 3D、F);在 si-IGF2BP2 组中,IGF2BP2、METTL3 蛋白水平分别降低(2.01±0.09)、(1.49±0.09)倍($P<0.05$,图 3E、G)。

2.3.3 IGF2BP2 协助 METTTL3 促进 HBV 复制 与 Control 组相比,在 si-IGF2BP2 组中 *HBV DNA*、*HBV rcDNA*、*HBV cccDNA* 拷贝数分别降低(0.42±0.03)×10^5、(1.10±0.28)×10^4、(1.94±0.32)×10^2 拷贝($P<0.01$,图 4A~C);*HBV pgRNA* 表达水平降低(1.46±0.02)倍($P<0.001$,图 4D);*HBV rcDNA* 转化率由 1.22%下降至 0.92%,降低 1.33 倍。

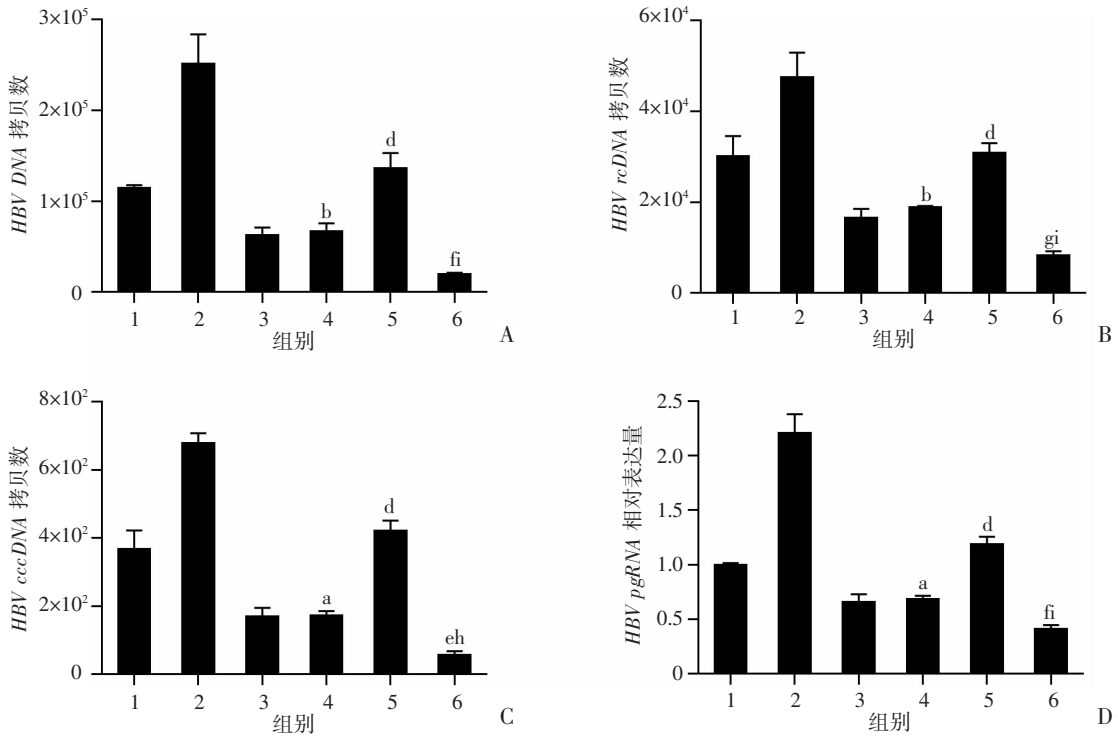
与 OE-METTL3 组相比,在 OE-METTL3+si-IGF2BP2 组中 *HBV DNA*、*HBV rcDNA*、*HBV cccDNA* 拷贝数分别降低(1.15±0.21)×10^5、(1.66±0.37)×10^4、(2.58±0.24)×10^2 拷贝($P<0.001$,图 4A~C);*HBV pgRNA* 表达水平降低 1.95±0.10 倍($P<0.001$,图 4D);*HBV rcDNA* 转化率由 1.43%下降至 1.30%,降低 1.10 倍。



a:$P<0.001$,b:$P<0.01$,c:$P<0.05$,与 Control 组比较

A、B:RT-qPCR 检测;C:斑点杂交分析;D、E:Western blot 检测;F、G:各组蛋白表达分析

图 3 干扰 METTL3(IGF2BP2)对 IGF2BP2(METTL3)mRNA 及蛋白的影响



1:Control 组;2:OE-METTL3 组;3:si-METTL3 组;4:si-IGF2BP2 组;5:OE-METTL3+si-IGF2BP2 组;6:si-METTL3+si-IGF2BP2 组;a:$P<0.001$,b:$P<0.01$,c:$P<0.05$,与 Control 组比较;d:$P<0.001$,与 OE-METTL3 组比较;e:$P<0.001$,f:$P<0.01$,g:$P<0.05$,与 si-METTL3 组比较;h:$P<0.001$,i:$P<0.01$,与 si-IGF2BP2 组比较

A~C:qPCR 检测不同组间 HBV 复制相关指标拷贝数;D:RT-qPCR 检测不同组间 *HBV pgRNA* 表达水平

图 4 IGF2BP2 协助 METTL3 促进 HBV 复制

与 si-METTL3 组相比,在 si-METTL3+si-IGF2BP2 组中 *HBV DNA*、*HBV rcDNA*、*HBV cccDNA* 拷贝数分别降低 $(0.44\pm0.05)\times10^5$、$(0.68\pm0.07)\times10^4$、$(1.13\pm0.15)\times10^2$ 拷贝($P<0.05$,图 4A~C);*HBV pgRNA* 降低(1.6±0.04)倍($P<0.01$,图 4D);*HBV rcDNA* 转化率由 1.03% 下降至 0.69%,降低 1.49 倍。与 si-IGF2BP2 组相比,在 si-METTL3+si-IGF2BP2 组中 *HBV DNA*、*HBV rcDNA*、*HBV cccDNA* 拷贝数分别降低 $(0.53\pm0.02)\times10^5$、$(1.09\pm0.05)\times10^4$、$(1.16\pm0.09)\times10^2$ 拷贝($P<0.01$,图 4A~C);*HBV pgRNA* 降低(1.66±0.03)倍($P<0.01$,图 4D);*HBV rcDNA* 转化率由 0.92% 下降至 0.69%,降低 1.33 倍。

3 讨论

慢性乙型肝炎患者即使经过长期抗病毒治疗,病毒基因组仍可能持续存在于受感染的肝细胞中,破坏宿主基因组的稳定[19]。已有研究表明,HBV RNA 的 m6A 修饰参与了病毒免疫逃逸,导致慢性感染和持续性复制[20]。因此,探索 m6A 修饰调控 HBV 复制机制可能为清除肝细胞内 *cccDNA*,治愈慢性乙肝提供新的方法和策略。

3.1 m6A 修饰在 HepG2.2.15 细胞中富集

本研究发现 m6A 修饰在 HepG2.2.15 细胞中富集,METTL3 和 IGF2BP2 表达亦明显升高。上调 METTL3 后 m6A 修饰富集增强,而下调 METTL3 或 IGF2BP2 后 m6A 修饰富集均减弱。以上结果提示 METTL3 与 IGF2BP2 介导的 m6A 修饰可能与 HBV 复制有关。

3.2 METTL3 通过 m6A 修饰促进 HBV 复制

METTL3 作为 m6A 甲基转移酶的主要催化亚基,已被证明在多种病毒复制中起关键作用[21-22]。本研究在 HepG2.2.15 细胞中过表达或敲低 METTL3,结果发现,METTL3 增强了 *HBV DNA* 拷贝数和 *pgRNA* 的表达,表明 METTL3 以 m6A 依赖的方式促进了 HBV 复制。这与 KIM 等[19]研究结果一致。同时该研究还发现 HBV X 蛋白结合并招募 METTL3/14 复合物到 *cccDNA* 上,促进病毒转录物的 m6A 修饰[19],这表明 *HBV cccDNA* 的转录活性受到 m6A 修饰的影响[23],而 *HBV rcDNA* 转化形成 *cccDNA* 是病毒复制的关键,我们进一步研究发现过表达 METTL3 后,*HBV rcDNA* 转化

率升高;而敲低 METTL3 后,*HBV rcDNA* 转化率则下降。这表明 METTL3 介导 m6A 修饰可促进 *HBV rcDNA* 转化形成 *cccDNA*,进而促进 HBV 复制。

3.3 METTL3 依赖 IGF2BP2 调控 HBV 复制

本研究通过生物信息学分析及免疫共沉淀实验证实 METTL3 可以与 IGF2BP2 相互作用。在 HepG2.2.15 细胞中上调或下调 METTL3,发现 IGF2BP2 表达水平亦升高或降低;下调 IGF2BP2,METTL3 表达水平降低,HBV 复制指标(*HBV DNA*、*HBV rcDNA*、*HBV cccDNA* 和 *HBV pgRNA*)降低,*HBV rcDNA* 转化率降低。以上结果充分表明 IGF2BP2 可以促进 HBV 复制。WALY 等[24]研究亦表明了 HBV 可通过抑制 *p*53 介导的 miR-216b 激活并促进 IGF2BP2 的表达。已有研究报道 METTL3 介导靶 mRNA 的 m6A 修饰,并增加其与 IGF2BP2 结合[25];IGF2BP2 能够以依赖 METTL3 的方式结合并稳定 mRNA[26]。另有研究指出 METTL3-LYN m6A-IGF2BP2 抑制内皮细胞迁移[27]等。据此推测 METTL3 与 IGF2BP2 之间可能通过间接互作来调控 HBV 复制,但是具体互作机制我们拟在后续研究中进一步分析验证。

m6A 调节机制依赖于写入蛋白与阅读蛋白的合作。ZHAO 等[28]发现 METTL3 和 IGF2BP2 协同增加 m6A 修饰,从而促进卵巢子宫内膜基质细胞的增殖、迁移和侵袭。本研究在 HepG2.2.15 细胞中,过表达 METTL3 后再敲低 IGF2BP2,HBV 复制指标较单独过表达 METTL3 降低,*HBV rcDNA* 转化率亦随之下降;同时敲低 METTL3 和 IGF2BP2 后,HBV 复制指标较单独敲低 METTL3 或 IGF2BP2 更低,*HBV rcDNA* 转化率亦降低。这提示 TGF2BP2 可协助 METTL3 促进 HBV 复制。KIM 等[29]研究报道 HBV RNA 不同位置的 m6A 修饰具有不同的功能,位于 3'-epsilon 茎环端的 m6A 修饰可降低病毒转录物的 m6A 修饰,抑制病毒复制,而位于 5'-epsilon 中的 m6A 修饰增加了 HBV 核心相关 DNA 的水平。据此分析二者协作机制可能原因是 IGF2BP2 与 METTL3 共同作用于病毒转录本的 5'-epsilon 茎环端,促进 *pgRNA* 的逆转录,增加核心相关 DNA 水平,进而促进 HBV 复制。以上证据揭示了 METTL3 通过 m6A 修饰促进 HBV 复制及 *rcDNA* 转化功能依赖于阅读蛋白 IGF2BP2,IGF2BP2 可协助 METTL3 促进 HBV 复制。

综上所述,本研究探明了 m6A 修饰通过 METTL3-m6A-IGF2BP2 轴调控 HBV 复制的机制。METTL3 依赖 IGF2BP2 富集 m6A 修饰,增强 *HBV rcDNA* 转化为 *cccDNA*,通过 *pgRNA* 复制病毒,为 HBV 复制机制研究提供新思路。

志谢 感谢川北医学院基础与法医学院创新平台提供实验仪器、设备的支持

参考文献:

[1] FUNK A L, LU Y, YOSHIDA K, *et al*. Efficacy and safety of antiviral prophylaxis during pregnancy to prevent mother-to-child transmission of hepatitis B virus: a systematic review and meta-analysis[J]. Lancet Infect Dis, 2021, 21(1): 70-84. DOI: 10.1016/S1473-3099(20)30586-7.

[2] WANG J, HUANG H X, LIU Y Z, *et al*. HBV genome and life cycle[J]. Adv Exp Med Biol, 2020, 1179: 17-37. DOI: 10.1007/978-981-13-9151-4_2.

[3] ZHANG Q, CAO X T. Epigenetic regulation of the innate immune response to infection[J]. Nat Rev Immunol, 2019, 19(7): 417-432. DOI: 10.1038/s41577-019-0151-6.

[4] LIU C, YANG Z, LI R, *et al*. Potential roles of N6-methyladenosine (m6A) in immune cells[J]. J Transl Med, 2021, 19(1): 1-13. DOI: 10.1186/s12967-021-02918-y.

[5] YUE J Y, WEI Y, ZHAO M M. The reversible methylation of m6A is involved in plant virus infection[J]. Biology, 2022, 11(2): 271. DOI: 10.3390/biology11020271.

[6] WU F, CHENG W Z, ZHAO F Y, *et al*. Association of N6-methyladenosine with viruses and virally induced diseases[J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2020, 25(6): 1184-1201. DOI: 10.2741/4852.

[7] FANG Z, MEI W T, QU C, *et al*. Role of m6A writers, erasers and readers in cancer[J]. Exp Hematol Oncol, 2022, 11(1): 45. DOI: 10.1186/s40164-022-00298-7.

[8] HUANG H L, WENG H Y, SUN W J, *et al*. Recognition of RNA N^6-methyladenosine by IGF2BP proteins enhances mRNA stability and translation[J]. Nat Cell Biol, 2018, 20(3): 285-295. DOI: 10.1038/s41556-018-0045-z.

[9] DAI N. The diverse functions of IMP2/IGF2BP2 in metabolism[J]. Trends Endocrinol Metab, 2020, 31(9): 670-679. DOI: 10.1016/j.tem.2020.05.007.

[10] IMAM H, KHAN M, GOKHALE N S, *et al*. *N*6-methyladenosine modification of hepatitis B virus RNA differentially regulates the viral life cycle[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2018, 115(35): 8829-8834. DOI: 10.1073/pnas.1808319115.

[11] KOSTYUSHEVA A, BREZGIN S, GLEBE D, *et al*. Host-cell interactions in HBV infection and pathogenesis: the emerging role of m6A modification[J]. Emerg Microbes Infect, 2021, 10(1): 2264-2275. DOI: 10.1080/22221751.2021.2006580.

[12] TAN B, LIU H, ZHANG S Y, *et al*. Viral and cellular N6-methyladenosine and N6, 2'-O-dimethyladenosine epitranscriptomes in the KSHV life cycle [J]. Nat Microbiol, 2018, 3(1): 108-120. DOI: 10.1038/s41564-017-0056-8.

[13] FENG H R, YUAN X F, WU S T, *et al*. Effects of writers, erasers and readers within miRNA-related m6A modification in cancers[J]. Cell Prolif, 2023, 56(1): e13340. DOI: 10.1111/cpr.13340.

[14] KIM G W, IMAM H, KHAN M, *et al*. HBV-induced increased N6 methyladenosine modification of PTEN RNA affects innate immunity and contributes to HCC [J]. Hepatology, 2021, 73(2): 533-547. DOI: 10.1002/hep.31313.

[15] LI T, HU P S, ZUO Z X, *et al*. METTL3 facilitates tumor progression via an m^6A-IGF2BP2-dependent mechanism in colorectal carcinoma[J]. Mol Cancer, 2019, 18(1): 112. DOI: 10.1186/s12943-019-1038-7.

[16] KO C, CHAKRABORTY A, CHOU W M, *et al*. Hepatitis B virus genome recycling and *de novo* secondary infection events maintain stable cccDNA levels[J]. J Hepatol, 2018, 69(6): 1231-1241. DOI: 10.1016/j.jhep.2018.08.012.

[17] WING P A, DAVENNE T, WETTENGEL J, *et al*. A dual role for SAMHD1 in regulating HBV cccDNA and RT-dependent particle genesis[J]. Life Sci Alliance, 2019, 2(2): e201900355. DOI: 10.26508/lsa.201900355.

[18] SZKLARCZYK D, MORRIS J H, COOK H, *et al*. The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible[J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(D1): D362-D368. DOI: 10.1093/nar/gkw937.

[19] KIM G W, SIDDIQUI A. Hepatitis B virus X protein recruits methyltransferases to affect cotranscriptional N6-methyladenosine modification of viral/host RNAs[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2021, 118(3): e2019455118. DOI: 10.1073/pnas.2019455118.

[20] HU J M, PROTZER U, SIDDIQUI A. Revisiting hepatitis B virus: challenges of curative therapies[J]. J Virol, 2019, 93(20): e01032-e01019. DOI: 10.1128/JVI.01032-19.

[21] LI N, HUI H, BRAY B, *et al*. METTL3 regulates viral m6A RNA modification and host cell innate immune responses during SARS-CoV-2 infection [J]. Cell Rep, 2021, 35(6): 109091. DOI: 10.1016/j.celrep.2021.109091.

[22] HAO H J, HAO S J, CHEN H H, *et al*. N6-methyladenosine modification and METTL3 modulate enterovirus 71 replication[J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(1): 362-374. DOI: 10.1093/nar/gky1007.

[23] BHAT S A, KAZIM S N. HBV cccDNA—A culprit and stumbling block for the hepatitis B virus infection: its presence in hepatocytes perplexed the possible mission for a functional cure[J]. ACS Omega, 2022, 7(28): 24066-24081. DOI: 10.1021/acsomega.2c02216.

[24] WALY A A, EL-EKIABY N, ASSAL R A, *et al*. Methylation in MIRLET7A3 gene induces the expression of IGF-II and its mRNA binding proteins IGF2BP-2 and 3 in hepatocellular carcinoma [J]. Front Physiol, 2018, 9: 1918. DOI: 10.3389/fphys.2018.01918.

[25] CHEN Y J, CAI K Y, DU Y L, *et al*. HDAC1 overexpression promoted by METTL3-IGF2BP2 inhibits FGF21 expression in metabolic syndrome-related liver injury [J]. Biochimie Biol Cell, 2023, 101(1): 52-63. DOI: 10.1139/bcb-2022-0314.

[26] ZHANG X, YIN H L, ZHANG X F, *et al*. N6-methyladenosine modification governs liver glycogenesis by stabilizing the glycogen synthase 2 mRNA [J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 7038. DOI: 10.1038/s41467-022-34808-2.

[27] 白秦, 陈燕华, 卢尧, 等. 下调 METTL3-LYN m6A-IGF2BP2 通路抑制内皮细胞迁移[J]. 第三军医大学学报, 2021, 43(9): 845-851. DOI: 10.16016/j.1000-5404.202011144.
BAI Q, CHEN Y H, LU Y, *et al*. Down-regulation of METTL3-LYN m6A-IGF2BP2 pathway inhibits endothelial cell migration[J]. J Third Mil Med Univ, 2021, 43(9): 845-851. DOI: 10.16016/j.1000-5404.202011144.

[28] ZHAO S J, ZHANG B, YUAN H, *et al*. IGF2BP2 promotes the progression of ovarian endometriosis by regulating m6A-modified MEIS2 and GATA6[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2022, 152: 106296. DOI: 10.1016/j.biocel.2022.106296.

[29] KIM G W, MOON J S, SIDDIQUI A. N6-methyladenosine modification of the 5' epsilon structure of the HBV pregenome RNA regulates its encapsidation by the viral core protein[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2022, 119(7): e2120485119. DOI: 10.1073/pnas.2120485119.

(收稿:2023-07-12;修回:2023-08-28)

(编辑 刘秋池)