

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.10.003

氧化应激下角质形成细胞中 YTHDC1 升高促进 IL-1 β 表达*

张 喆 王 琪 陈佳希 易秀丽 李舒丽[△]

(第四军医大学西京皮肤医院 陕西 西安 710032)

摘要 目的:探讨氧化应激下角质形成细胞内 m6A 甲基化修饰酶 YTHDC1 异常对促炎因子的调控机制。**方法:**通过 Western blot 和 qRT-PCR 实验检测氧化应激下角质形成细胞中 YTHDC1 蛋白和 mRNA 表达水平。siRNA 转染至角质形成细胞以干涉 YTHDC1 表达,随后继续给予 300 μ M 过氧化氢处理,通过 Western blot 和 qRT-PCR 实验检测角质形成细胞中促炎因子 IL-1 β 蛋白和 mRNA 表达,进一步通过 ELISA 检测细胞上清中 IL-1 β 分泌,通过 CCK8 法检测细胞存活水平。**结果:**1)过氧化氢刺激后人角质形成细胞系 HaCaT 细胞中 YTHDC1 表达水平较未处理组明显升高;2)干涉 YTHDC1 可以显著降低 HaCaT 细胞中 IL-1 β 表达和上清中分泌;3)干涉 YTHDC1 后 IL-1 β mRNA 稳定性下降,并且细胞存活率下降。**结论:**氧化应激下角质形成细胞中 m6A 甲基化修饰酶 YTHDC1 表达水平升高,通过提高 mRNA 稳定性促进 IL-1 β 表达,可能是外界环境应激引起各种免疫性皮肤病的重要机制。

关键词:表观遗传修饰;m6A 甲基化修饰;氧化应激;角质形成细胞;自身免疫性皮肤病

中图分类号:R-33;R751 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2022)10-1811-06

YTHDC1 Mediates IL-1 β Expression in Keratinocyte under Oxidative Stress*

ZHANG Zhe, WANG Qi, CHEN Jia-xi, YI Xiu-li, LI Shu-li[△]

(Department of Dermatology, Xijing Hospital, Fourth Military University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To explore the regulatory mechanism of abnormal m6A methylation modifying enzyme YTHDC1 on pro-inflammatory factors in keratinocytes under oxidative stress. **Methods:** Western blot and qRT-PCR was used to detect the protein and mRNA expression of YTHDC1 in keratinocytes after the stimulation with H₂O₂. siRNA was transfected into keratinocytes to interfere with the expression of YTHDC1, and then treated with 300 μ M H₂O₂, the expression of pro-inflammatory factor IL-1 β protein and mRNA in keratinocytes was detected by Western blot and qRT-PCR. The secretion of IL-1 β in the supernatant was further detected by ELISA, and the cell survival level was detected by CCK8. **Results:** 1) H₂O₂ increased the expression of YTHDC1 in HaCaT; 2) The knockdown of YTHDC1 could significantly reduce the expression and secretion of IL-1 β in HaCaT; 3) IL-1 β mRNA stability and cell viability decreased after YTHDC1 interference. **Conclusions:** m6A methylation modification enzyme YTHDC1 is involved in the stability of IL-1 β mRNA in keratinocytes under oxidative stress, which may be an important mechanism of autoimmune skin diseases induced by external stress.

Key words: Epigenetic modification; N6-methyladenosine; Oxidative stress; Keratinocytes; Autoimmune dermatosis

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R751 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2022)10-1811-06

前言

表皮中角质形成细胞在抵御外界环境刺激和维护局部免疫稳态中具有重要作用^[1,2],是连接外界环境和皮肤局部免疫的重要细胞。既往研究及我们课题组前期均发现在氧化应激等外界有害刺激下角质形成细胞功能异常,分泌多种促炎介质如 IL-1 β 、CXCL10 等,进而启动或加重局部免疫炎症反应,参与各种皮肤疾病的发病和发展^[3-5]。然而这些外界刺激介导角质形成细胞分泌 IL-1 β 、CXCL10 等促炎介质,进而参与各种皮肤疾病发病的具体机制目前尚未完全阐明。

IL-1 β 是免疫炎症性皮肤病中一种关键的促炎免疫因子,能够单独或诱导其他细胞因子分泌来参与免疫炎症反应、细胞增殖和分化等病理生理过程。在免疫系统中 IL-1 β 除了参与固有免疫外,还参与 Th1、Th17 诱导的适应性免疫应答反应。既往研究证实 IL-1 β 在银屑病、白癜风等多种皮肤病表皮中升高,本课题组前期研究发现白癜风患者皮损处表皮中氧化应激促进 IL-1 β 表达升高,能够通过影响 CD8⁺T 功能来特异性杀伤黑素细胞^[6]。因此 IL-1 β 在表皮的局部激活是介导局部免疫炎症反应,引发下游瀑布式级联炎症反应,最终参与皮肤疾病发生和发展的重要炎症介质,其表达机制的研究对阐明多种皮肤

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81930087)

作者简介:张喆(1991-),硕士研究生,主要研究方向:皮肤病与性病学, E-mail: zz18710883471@163.com

[△] 通讯作者:李舒丽(1986-),女,博士,主治医师,主要研究方向:白癜风的发病机制, E-mail: lishuli@fimmu.edu.cn, 电话: 029-84775406

(收稿日期:2021-12-09 接受日期:2022-01-05)

病的发病具有重要意义,值得进一步研究。

表观遗传修饰是细胞应对外界环境应激以适应环境改变的重要途径。近些年来,越来越多研究证实外界环境刺激能够通过介导细胞内部遗传物质发生表观遗传重编程从而调控细胞功能和表型,参与各种疾病发生进展^[6-8]。其中 N6-甲基腺苷甲基化修饰(m6A 甲基化修饰)是 mRNA 上最普遍的表观遗传修饰方式,对外界环境变化感知较为敏感,能够通过甲基转移酶、去甲基酶、识别蛋白三大修饰因子来调控靶基因 mRNA 表达,影响基因产物表达和细胞功能^[9-13]。YTHDC1 是细胞核内表达的关键的 m6A 甲基化修饰阅读蛋白,广泛参与 mRNA 剪接、出核、稳定性等多个转录后加工过程,进而影响基因产物表达和细胞功能,在急性淋巴细胞性白血病、胚胎干细胞分化等疾病和生物学过程中已被证实具有重要作用^[14,15]。由此我们推测,外界刺激下角质形成细胞内 m6A 甲基化修饰酶 YTHDC1 异常介导 IL-1 β 表达,可能与各种皮肤病的发生和发展密切相关。

1 材料和方法

1.1 主要细胞、试剂和仪器

1.1.1 角质形成细胞系 人表皮永生化角质形成细胞系 HaCaT 购自美国 ATCC 公司,本实验室常规液氮保存。

1.1.2 实验试剂 siYTHDC1 干涉序列由上海吉玛制药技术有限公司合成,序列为:CGACCAGAAGAUUAUGAUAT,对照 siNC 序列为 UUCUCCGAACGUGUCACG。CCK8 试剂购自上海七海复泰生物科技有限公司。胎牛血清购自美国 Gibco 生命科技公司。细胞转染试剂 Lipo3000 购自美国 Invitrogen 公司。DMEM 培养基购自美国 Hyclone 公司。GAPDH、 β -actin、IL-1 β 抗体均购自美国 proteintech 公司(GAPDH 抗体货号 60004-1-Ig; β -actin 抗体货号 66009-1-Ig,IL-1 β 抗体货号 16806-1-AP),YTHDC1 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司(货号 77422)。细胞质和核 RNA 纯化试剂盒订购于 Norgen 公司(货号:21000)。

1.1.3 实验仪器 免疫印迹蛋白电泳仪、免疫印迹蛋白转膜仪(湿型)、免疫印迹凝胶成像系统均购自美国 Bio-Rad 公司;荧光定量 PCR 检测系统购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 细胞培养 HaCaT 细胞系使用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基。

1.2.2 细胞分组与处理 分别使用 100、200、300 μ M 浓度 H₂O₂ 刺激 HaCaT 细胞,每个浓度设置 3 个复孔,共进行 3 次独立重复试验,裂解细胞后收集蛋白和 RNA 用于后续实验。在干涉 YTHDC1(YTHDC1-siRNA)对 IL-1 β 表达影响的实验中,分组为 NC-siRNA、YTHDC1-siRNA、NC-siRNA+H₂O₂、YTHDC1-siRNA+H₂O₂,每组设置 3 个复孔,共设置 3 次独立重复试验。

1.2.3 siRNA 转染 取 2 $\times$ 10⁵ 个/孔铺 6 孔板,培养 24 小时后细胞长至 50%密度时进行转染,配置转染体系:分别用 125 μ L 无血清 DMEM 培养基重悬 5 μ L Lip 3000 和 5 μ L siRNA,5 分钟后将两管混合均匀室温静置 20 分钟,小心加入六孔板中,37 $^{\circ}$ C 孵箱培养 48 h 后做后续刺激。

1.2.4 Western blot 实验 六孔板贴壁细胞用含蛋白酶抑制剂

的 RIPA 裂解液冰上裂解 10 min,收集 EP 管后于 12000 rpm 4 $^{\circ}$ C 离心 20 min,吸取上清按试剂盒步骤进行 BCA 浓度检测,剩余液体中加入 1/4 体积上样缓冲液,随后 100 $^{\circ}$ C 沸水煮 5 min。加入 10%凝胶中进行电泳,蛋白充分分离后转至 PVDF 膜上,之后用 5%脱脂牛奶室温封闭 1 h,置于稀释的一抗中 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBST 洗膜 10 min,三遍,二抗常温下孵育 1 h 后重复洗膜三遍,下一步进行显影。

1.2.5 RNA 提取和 qRT-PCR 实验 用 Trizol 试剂(Invitrogen)提取总 RNA,用细胞质和核 RNA 纯化试剂盒产品说明书(Norgen)分离细胞核及胞质 RNA,随后逆转录为单链 cDNA。按 Takara 公司 SYBR[®] PremixExTaqTM II 操作说明进行 qRT-PCR 实验,通过 2^{- Δ CT} 方法计算 mRNA 的变化,并以 actin 基因的转录水平进行数值标准化。

1.2.6 CCK8 实验检测细胞活力 细胞以 5 $\times$ 10³/孔密度接种 96 孔板,siRNA 转染 48 h 后给予每孔 10 μ L 的 CCK8 检测试剂,在 37 $^{\circ}$ C 孵箱继续孵育 90 min,通过全自动酶标仪(Bio-Rad)在 450 nm 波长下检测吸光度以计算细胞存活率。

1.2.7 免疫荧光 细胞以 5 $\times$ 10³/孔密度接种于小皿中,给予相应处理后用 PBS 洗 3 遍,多聚甲醛固定和 Triton 破膜后给予一抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,PBS 清洗后二抗室温避光孵育 1 h,之后用 DAPI 染细胞核 10 min。皮肤组织切片用 Tris-EDTA 高压修复并用山羊血清室温封闭 30 min,之后用 IL-1 β 抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,PBS 清洗后给予二抗室温避光孵育 1 h,之后用 DAPI 染细胞核 10 min,最后甘油封片。

1.3 统计方法

通过 GraphPadPrism5 软件进行统计分析,采取双尾非配对 t 检验或者 one-wayANOVA。数据以平均值 $\pm$ 标准差展示,实验均需独立重复至少 3 次,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 氧化应激下 YTHDC1 表达水平升高

我们分别给予 100、200、300 μ M 过氧化氢处理角质形成细胞系 HaCaT 细胞,以模拟体外皮肤病体外氧化应激模型。通过 Western-blot 和 qRT-PCR 实验检测过氧化氢处理前后 YTHDC1 的蛋白和 mRNA 表达水平。结果显示,过氧化氢处理后角质形成细胞中 YTHDC1 蛋白水平和 mRNA 水平表达均升高,且具有统计学差异(*P<0.05,***P<0.001,****P<0.0001),在此基础上进一步通过免疫荧光实验证实过氧化氢刺激后 HaCaT 细胞中 YTHDC1 荧光强度显著增加(见图 1)。该部分结果证实,外界氧化应激刺激下角质形成细胞中 m6A 甲基化修饰阅读蛋白 YTHDC1 表达升高,提示氧化应激是诱导角质形成细胞内遗传物质发生表观遗传重编程的重要始动因素。

2.2 YTHDC1 干涉效率验证

为了探讨 YTHDC1 在角质形成细胞中的作用,我们首先合成了干涉 YTHDC1 表达的 siRNA 片段,并对其干涉效率分别进行 qRT-PCR 和 Western-blot 验证,结果均显示 YTHDC1 干涉效果良好,与阴性对照组(siNC 转染组)相比,YTHDC1 干涉组(siYTHDC1 转染组)细胞内 YTHDC1 蛋白和 mRNA 含量显著下降(*P<0.05,**P<0.01,****P<0.0001)(见图 2)。

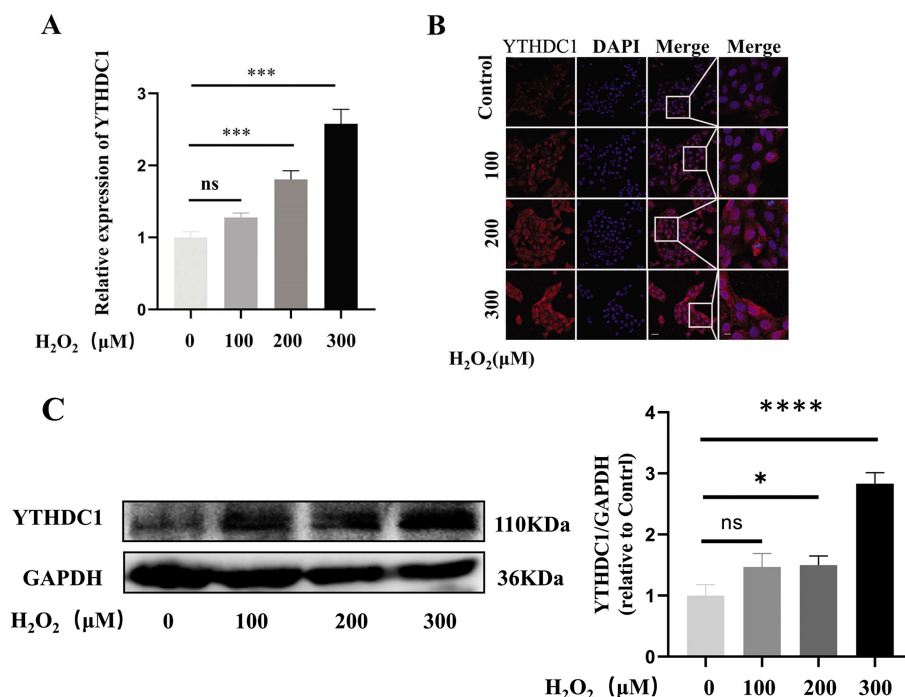


图1 氧化应激下角质形成细胞内 YTHDC1 表达水平升高

A.氧化应激下 HaCaT 细胞中 YTHDC1 mRNA 表达。B-C.氧化应激下 HaCaT 细胞中 YTHDC1 蛋白表达变化, Scale bar=50 μm。

数据以平均值±标准差展示, n=3, **P*<0.05, ****P*<0.001, *****P*<0.0001, ns:无统计学意义, 和对照组相比。

Fig. 1 The expression of YTHDC1 is significantly up-regulated in HaCaT cells under oxidative stress

A. The mRNA levels of YTHDC1 in HaCaT cells under oxidative stress.

B, C. The protein levels of YTHDC1 in HaCaT cells under oxidative stress, Scale bars=50 μm.

Note: Data are expressed as mean±SD, n=3. **P*<0.05, ****P*<0.001, *****P*<0.0001, ns: no significance, compare with the Control group.

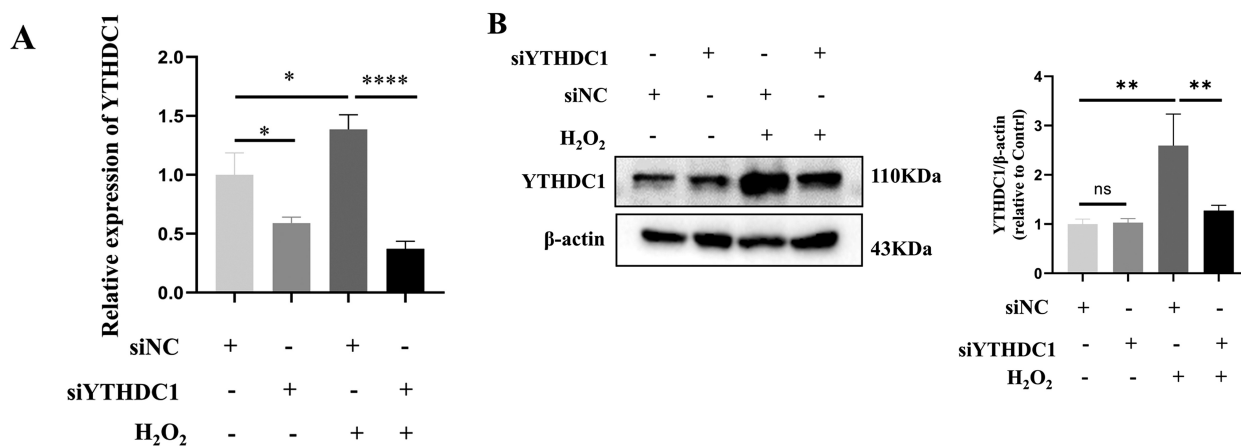


图2 氧化应激下 HaCaT 细胞中 YTHDC1 干涉效率验证

A. qRT-PCR 验证氧化应激下 YTHDC1 干涉效率。B. Western blot 验证氧化应激下 YTHDC1 干涉效率。数据以平均值±标准差展示, n=3,

P*<0.05, *P*<0.01, *****P*<0.0001, ns:无统计学意义, 和对照组相比。

Fig. 2 The efficacy of YTHDC1 knockdown in HaCaT cells under oxidative stress

A. Detection of YTHDC1 interference efficiency by qRT-PCR; B. Detection of YTHDC1 interference efficiency by Western blot.

Note: Data are expressed as mean±SD, n=3, **P*<0.05, ***P*<0.01, *****P*<0.0001, ns: no significance, compare with the Control group.

2.3 干涉 YTHDC1 可显著降低角质形成细胞中 IL-1β 表达

为了探讨 YTHDC 对促炎因子 IL-1β 的调控作用,我们转染 siNC 或 siYTHDC1 以沉默 YTHDC1 表达, 分别通过 Western-Blot, qRT-PCR、免疫荧光检测细胞内 IL-1β 表达变化,结果显示:与阴性对照组 (siNC 转染组)相比,氧化应激下 YTHDC1 干涉组 (siYTHDC1 转染组)IL-1β 细胞内蛋白和 mRNA 表达

显著降低 (***P*<0.01, *****P*<0.0001)。进一步通过 ELISA 检测 YTHDC1 干涉前后 HaCaT 上清中 IL-1β 分泌水平,结果显示,与对阴性对照组相比, YTHDC1 干涉组 (siYTHDC1 组)HaCaT 上清中 IL-1β 分泌显著降低 (**P*<0.05)。该部分结果证实角质形成细胞中 YTHDC1 升高能够促进 IL-1β mRNA 和蛋白水平表达 (见图 3)。

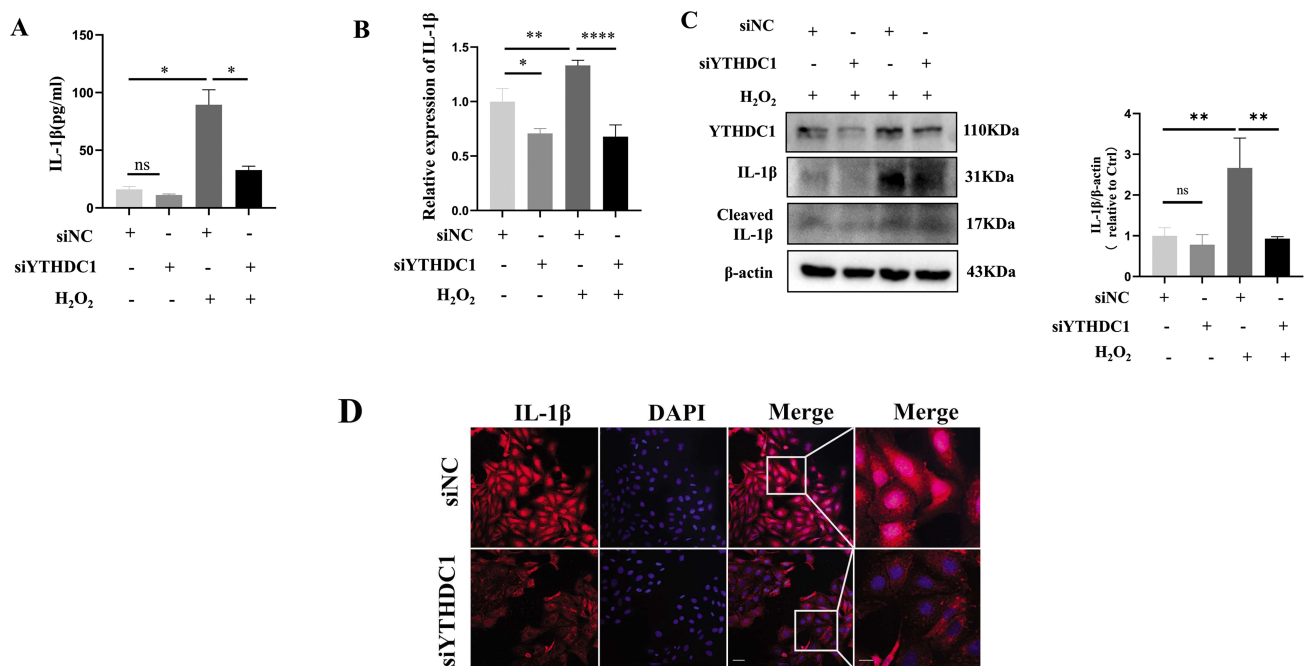


图3 氧化应激下干扰 YTHDC1 可显著降低角质形成细胞中 IL-1β 表达

A. 氧化应激下 YTHDC1 干涉后 HaCaT 细胞上清中 IL-1β 分泌; B. D. 氧化应激下 YTHDC1 干涉后 HaCaT 细胞中 IL-1β 蛋白水平;

C. 氧化应激下 YTHDC1 干涉后 HaCaT 细胞中 IL-1β mRNA 水平。

数据以平均值±标准差展示, n=3, *P<0.05, **P<0.01, ****P<0.0001, ns: 无统计学意义, 和对照组相比。

Fig. 3 The interference of YTHDC1 can significantly reduce the expression of IL-1β in HaCaT under oxidative stress.

A. The secretion of IL-1β in the supernatant of HaCaT cells when silencing YTHDC1 under oxidative stress; B, D. The protein levels of IL-1β when silencing YTHDC1 in HaCaT cells under oxidative stress; C. The mRNA levels of IL-1β when silencing YTHDC1 in HaCaT cells under oxidative stress.

Note: Data are expressed as mean±SD, n=3, *P<0.05, **P<0.01, ****P<0.0001, ns: no significance, compare with the Control group.

2.4 YTHDC1 提高 IL-1β 稳定性

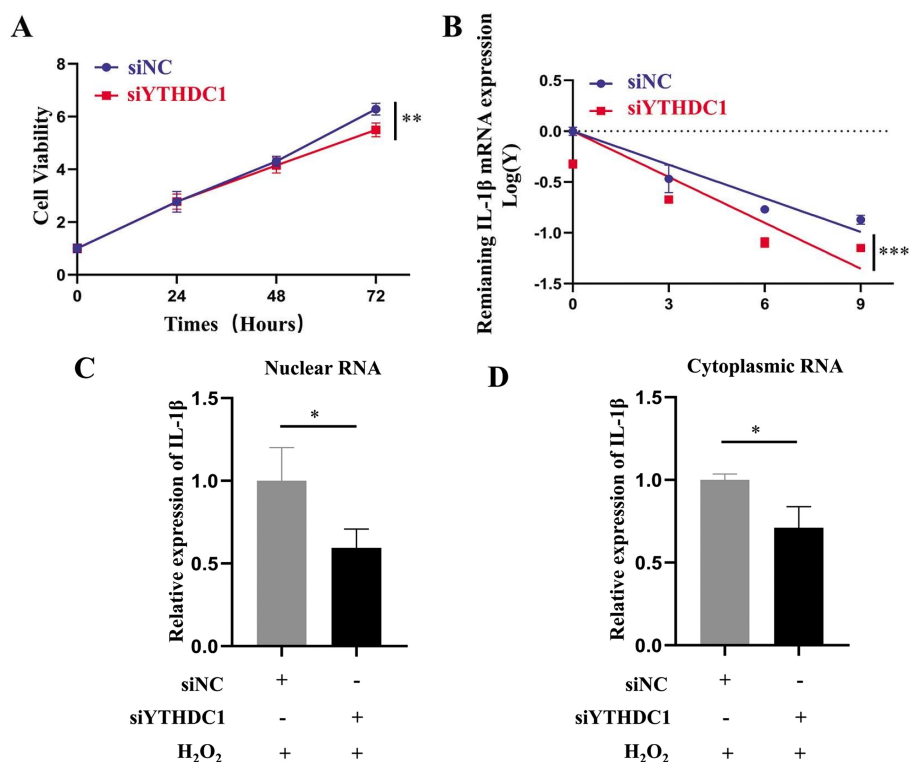
为了明确 YTHDC1 对角质形成细胞增殖功能的影响以及调控 IL-1β mRNA 表达的具体分子机制, 接下来我们通过 CCK8 法检测阴性对照组和 YTHDC1 干涉组中细胞存活水平。结果显示, 与阴性对照组相比, YTHDC1 干涉组相比细胞存活率下降, 提示 YTHDC1 能够促进角质形成细胞增殖 (**P<0.01)。由于 YTHDC1 能够通过影响 mRNA 稳定性、出核等过程来影响靶基因 mRNA 表达^[16-18], 接下来, 我们首先用 5 μg/mL 放线菌素 D 分别给予 YTHDC1 干涉组与阴性对照组处理 0 h、3 h、6 h、9 h 来抑制 DNA 转录, 通过 qRT-PCR 检测剩余 mRNA 含量, 结果显示, YTHDC1 干涉后 IL-1β mRNA 稳定性下降 (**P<0.001)。此外, 我们还将对照组和 YTHDC1 干涉组细胞核及胞质 RNA 分离, 通过 qRT-PCR 检测核内外 IL-1β mRNA 表达, 结果显示, YTHDC1 干涉前后胞核与胞质内 IL-1β mRNA 比例无显著改变。该部分结果表明, 干涉 YTHDC1 能够降低 IL-1β mRNA 稳定性进而抑制其表达 (*P<0.05), 见图 4。

3 讨论

皮肤作为人体抵御外界环境的第一道防线, 不但能够直接作为物理屏障保护机体免受外界有害刺激损伤, 还能够通过调控局部免疫微环境来发挥免疫屏障作用。其中角质形成细胞是皮肤最外层细胞并且在表皮中占比最大, 是感受外界环境变化并做出及时应答的最前卫细胞, 对于皮肤局部免疫稳态的维持具有重要作用。既往研究发现外界环境中氧化应激是启动皮肤局

部免疫的始动因素之一, 在其参与下角质形成细胞功能异常, 能够介导各种促炎因子大量释放, 从而引起局部免疫紊乱, 但具体机制尚不明确。其中 IL-1β 作为重要的促炎介质, 已被证实氧化应激、紫外线、皮肤菌群等各种外界刺激下在银屑病、白癜风等皮肤病的表皮中表达升高, 但这些外界因素激活 IL-1β 表达的机制尚未完全明确。

随着近些年来对表观遗传修饰的研究越来越深入, 多种研究发现在外界环境刺激下细胞内部表观遗传修饰水平改变, 是导致细胞功能异常进而导致多种疾病的启动或加重原因。目前研究较多的遗传物质表观遗传修饰方式包括 DNA 甲基化、组蛋白乙酰化、mRNA 甲基化等。其中 m6A 甲基化修饰是 mRNA 上最常见的表观遗传修饰方式, 其能够通过调控 mRNA 转录后修饰等多个生物学过程, 影响基因产物表达和细胞功能, 在乳腺癌、肥胖等多种疾病发生发展的重要作用逐渐被证实^[19,20]。目前已有研究证实在外界氧化应激、紫外线照射及亚硝酸盐损伤下, 皮肤角质形成细胞中 m6A 甲基化修饰异常时能够加重胞内氧化损伤, 并且抑制抑癌基因 p53 激活, 而当紫外线引起 DNA 损伤时却能够快速发生 m6A 甲基化修饰进而对损伤位点进行修复^[21-23], 这些研究均提示外界环境刺激下角质形成细胞内部靶基因 mRNA 上 m6A 甲基化修饰水平改变, 进而引起基因产物表达异常。YTHDC1 作为最重要的 m6A 修饰阅读蛋白 YTH 家族中成员之一, 且是唯一表达于胞核内的 YTH 家族蛋白, 对靶基因 mRNA 表达调控作用广泛且重要。最新研究发现外界热应激下, 绵羊肝脏细胞中 YTHDC1、

图4 YTHDC1 提高 IL-1 β mRNA 稳定性

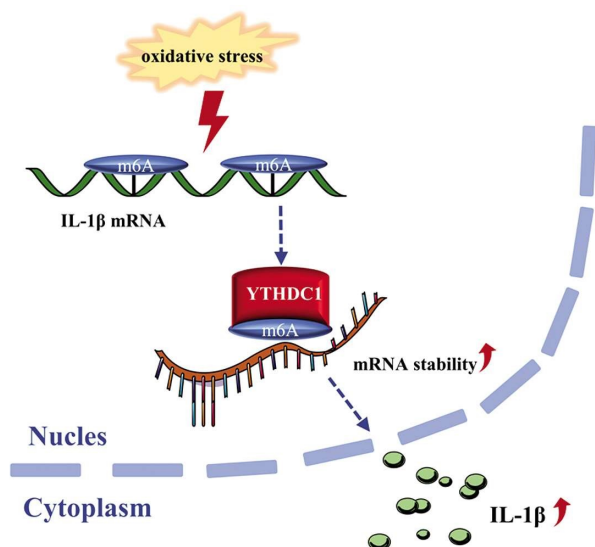
A. YTHDC1 干涉后 HaCaT 细胞活力; B. YTHDC1 干涉后 IL-1 β mRNA 稳定性; C, D. YTHDC1 干涉后 IL-1 β mRNA 胞核及胞质表达水平。数据以平均值 $\pm$ 标准差展示, $n=3$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, ns: 无统计学意义, 和对照组相比。

Fig. 4 YTHDC1 enhance the stability of IL-1 β mRNA

A. The cell viability of HaCaT cells when silencing YTHDC1; B. The mRNA stability of IL-1 β in HaCaT cells when silencing YTHDC1;

C, D. The mRNA levels of IL-1 β in nucleus and cytoplasm.

Note: Data are expressed as mean $\pm$ SD, $n=3$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, ns: no significance, compare with the Control group.

图5 氧化应激下角质形成细胞中 YTHDC1 调控 IL-1 β 表达机制图

氧化应激下角质形成细胞中 YTHDC1 提高 IL-1 β mRNA 稳定性

Fig. 5 The mechanism diagram of YTHDC1 mediates IL-1 β expression in keratinocytes under oxidative stress

The mRNA stability of IL-1 β is enhanced by YTHDC1 in keratinocytes under oxidative stress

METTL3 等 m6A 甲基化修饰酶表达上调^[24]; 在紫外线引起的 DNA 损伤中, 除了 METTL3-METTL14 复合物快速定位到损

伤位点外, YTHDC1 也能快速定位到 DNA 损伤位点, 通过对核苷酸进行切除修复、同源重组等来修复损伤^[25]。以上研究强烈提示 m6A 甲基化修饰酶 YTHDC1 等发生改变, 可能是连接外界环境应激与角质形成细胞免疫炎症信号激活的桥梁。

本研究中我们的结果显示, 外界氧化应激下角质形成细胞中 m6A 甲基化修饰酶中重要的识别蛋白 YTHDC1 表达升高, 干涉 YTHDC1 可以降低重要的促炎因子 IL-1 β mRNA 和蛋白水平表达, 提示 m6A 甲基化修饰酶 YTHDC1 可能是连接外界应激、角质形成细胞、局部免疫炎症反应激活的关键环节。我们进一步发现干涉 YTHDC1 后 IL-1 β mRNA 稳定性下降, 而出核过程不受影响, 证实氧化应激下角质形成细胞中 YTHDC1 表达升高是通过提高 IL-1 β mRNA 稳定性来促进其表达。而 YTHDC1 对 IL-1 β 的调控是否是以 m6A 甲基化修饰方式来完成还有待进一步明确, 这将是接下来主要的研究内容之一。综上所述, 本研究首次证实氧化应激下角质形成细胞内部 YTHDC1 升高, 通过影响 mRNA 稳定性来调控促炎因子 IL-1 β 表达。因此抑制 YTHDC1 可能是角质形成细胞参与的皮肤免疫炎症疾病的重要治疗靶点。

参考文献(References)

- [1] Burian M, Yazdi AS. NLRP1 Is the Key Inflammasome in Primary Human Keratinocytes[J]. J Invest Dermatol, 2018, 138(12): 2507-2510. 6
- [2] Kashiwagi M, Hosoi J, Lai JF, et al. Direct control of regulatory T cells by keratinocytes[J]. Nat Immunol, 2017, 18(3): 334-343

- [3] Zhang W, Guo S, Li B, et al. Proinflammatory effect of highmobility group protein B1 on keratinocytes: an autocrine mechanism underlying psoriasis development[J]. *J Pathol*, 2017, 241(3): 392-404
- [4] Li S, Kang Pan, Zhang weigang, et al. Activated NLR family pyrin domain containing 3 (NLRP3) inflammasome in keratinocytes promotes cutaneous T-cell response in patients with vitiligo [J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2020, 145(2): 632-645
- [5] Li S, Zhu guannan, Yang yuqi, et al. Oxidative Stress-Induced Chemokine Production Mediates CD8 (+) T Cell Skin Trafficking in Vitiligo[J]. *J Investig Dermatol Symp Proc*, 2015, 17(1): 32-33
- [6] Jurkowska RZ, Jurkowski TP, Jeltsch A, et al. Structure and function of mammalian DNA methyltransferases [J]. *Chembiochem*, 2011, 12(2): 206-222. 24
- [7] Okano M, Bell DW, Haber DA, et al. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development[J]. *Cell*, 1999, 99(3): 247-257
- [8] Xiang Y, Laurent B, Hsu CH, et al. RNA m(6A) methylation regulates the ultraviolet-induced DNA damage response [J]. *Nature*, 2017, 543(7646): 573-576
- [9] Roundtree, I.A, Evans, M.E, Pan T, et al. Dynamic RNA Modifications in Gene Expression Regulation[J]. *Cell*, 2017, 169: 1187-1200
- [10] Liu J, Yue Y, Han D, et al. METTL3-METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N6-adenosine methylation [J]. *Nat. Chem. Biol*, 2014,10: 93-95
- [11] Ping X, Sun B, Wang L, et al. Mammalian WTAP is a regulatory subunit of the RNA N6-methyladenosine methyltransferase [J]. *Cell Res*, 2014, 24: 177-189
- [12] Fu Y, Jia G, Pang X, et al. FTO-mediated formation of N6-hydroxymethyladenosine and N6-formyladenosine in mammalian RNA[J]. *Nat. Commun*, 2013, 4: 1798
- [13] Zheng G, Dahl JA, 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
- [14] Sheng Y, Wei J, Yu F, et al. A Critical Role of Nuclear m6A Reader YTHDC1 in Leukemogenesis by Regulating MCM Complex-Mediated DNA Replication[J]. *Blood*, 2021 [Epub ahead of print]
- [15] Chen C, Liu W, Guo J, et al. Nuclear m (6)A reader YTHDC1 regulates the scaffold function of LINE1 RNA in mouse ESCs and early embryos[J]. *Protein Cell*, 2021, 12(6): 455-474
- [16] RoundtreeLA, LuoGZ, ZhangZ, et al. YTHDC1 mediates nuclear export ofN(6)-methyladenosine methylated mRNAs[J]. *elife*, 2017, 6: e31311
- [17] XiaoW, AdhikariS, DahalU, et al. Nuclearm (6)A reader YTHDC1 regulates mRNA splicing[J]. *MolCell*, 2016, 61: 507-519
- [18] 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): 580-586
- [19] Zhang C, Samanta D, Lu H, et al. Hypoxia induces the breast cancer stem cell phenotype by HIF-dependent and ALKBH5-mediated m6A-demethylation of NANOG mRNA[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(14): E2047-56
- [20] Ben-Haim MS, Moshitch-Moshkovitz S, Rechavi G, et al. FTO : linking m6A demethylation to adipogenesis [J]. *Cell Res*, 2015, 25: 3-4
- [21] Chen H, Zhao T, Sun D, et al. Changes of RNA N (6) -methyladenosine in the hormesis effect induced by arsenite on human keratinocyte cells[J]. *Toxicol In Vitro*, 2019, 56: 84-92
- [22] Zhao T, Sun D, Zhao M, et al. N (6)-methyladenosine mediates arsenite-induced human keratinocyte transformation by suppressing p53 activation[J]. *Environ Pollut*, 2020, 259: 113908
- [23] Yang Xiang, Benoit Laurent, Chih-Hung Hsu, et al. RNA m(6A) methylation regulates the ultraviolet-induced DNA damage response [J]. *Nature*, 2017, 543(7646): 573-576
- [24] Lu Z, Ma Y, Li Q et al. The role of N (6)-methyladenosine RNA methylation in the heat stress response of sheep (*Ovis aries*) [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2019, 24(2): 333-342
- [25] Yu D, Horton J, Yang J, et al. Human MettL3-MettL14 RNA adenine methyltransferase complex is active on double-stranded DNA containing lesions[J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(20): 11629-11642