

网络出版时间:2025-05-12 16:24:48 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20250509.1631.042

METTL3 促进非小细胞肺癌细胞增殖、迁移和 EMT

金丹¹,邵爽¹,李睿²,郭纪伟¹(滨州医学院附属医院¹医学研究中心、²消化内科,滨州 256601)

摘要 **目的** 探讨甲基转移酶样 3 (METTL3) 作为 m⁶A 修饰的甲基转移酶对非小细胞肺癌 (NSCLC) 细胞增殖、克隆形成和迁移能力的影响。**方法** 通过生物信息学探讨 METTL3 表达水平与 NSCLC 患者预后的关系,通过 RT-PCR、Western blot、m⁶A 定量检测、CCK-8、免疫荧光、克隆形成和细胞划痕实验等探讨敲减或高表达 METTL3 后 NSCLC 细胞 METTL3 mRNA 和蛋白水平、m⁶A 水平、增殖、克隆形成、迁移及凋亡能力的变化。**结果** 生物信息学分析表明 METTL3 在 NSCLC 中高表达且与患者生存期呈负相关。RT-PCR 和 Western blot 实验显示 METTL3 在 NSCLC 细胞系中高表达。在 A549 细胞中,高表达 METTL3 后显著增加 NSCLC 细胞 m⁶A 水平并促进其增殖、生长、肿瘤形成和细胞迁移,且抑制细胞凋亡并上调波形蛋白 (Vimentin),下调 E-钙黏蛋白 (E-cadherin) 的 mRNA 和蛋白表达水平 ($P < 0.01$),从而促进 A549 细胞的上皮-间质转化进程 (EMT)。但在 A549 细胞中靶向敲除 METTL3 则得到相反结果 ($P < 0.01$)。**结论** 过表达 METTL3 增加 NSCLC 细胞 m⁶A 水平并促进其增殖、克隆形成和细胞迁移能力,为今后以 METTL3 为靶点的 NSCLC 早期诊断与靶向药物开发奠定理论基础。

关键词 METTL3;m⁶A;增殖;迁移;EMT;NSCLC

中图分类号 R 394.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)05-0928-10

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.05.021

近些年来,肺癌的发病率在全球范围内呈上升趋势^[1]。中国的肺癌死亡人数已高达全球肺癌死亡人数的 40%,已成为病死率最高的癌症^[2]。但目前非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 发病的分子机制尚不明确。N6-甲基腺苷 (N6-methyladenosine, m⁶A) 是真核生物 RNA 最常见的表观遗传修饰方式之一,是指腺苷碱基第 6 号 N 原子上的甲基化^[3]。m⁶A 修饰是动态可逆的,由甲基转移酶、去甲基化酶和甲基化识别蛋白等调控^[4]。近年来的研究^[5]表明,m⁶A 修饰在肿瘤的发生发展中发挥着重要作用,m⁶A 修饰及相关调控蛋白异常影响癌症的进展。近期研究^[6-9]表明 m⁶A 甲基转移酶样 3 (methyltransferase like 3, METTL3)

功能异常与肝癌、肺癌、乳腺癌、胃癌等多种癌症密切相关。由 METTL3 介导的 m⁶A 表观遗传修饰将成为包括 NSCLC 在内的患者的早期诊断和预后的潜在指标,并能够为临床治疗癌症提供分子靶点。因此,该研究旨在探讨 METTL3 调控对 NSCLC 细胞增殖、克隆和迁移能力的影响,阐明 METTL3 在 NSCLC 发病过程中的作用及机制,这对于探索新的 NSCLC 临床治疗途径具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 细胞培养皿和培养板采购于美国 Corning 公司;细胞培养基 RPMI-1640 和胎牛血清 (货号:SH30809.01、SH30071.03) 购于美国 Hyclone 公司;转染试剂 Lipofectamine™ 2000 (货号:11668027) 购于美国 Invitrogen 公司;BCA 试剂盒 (货号:PC0020) 购于北京 Solarbio 公司;一抗 METTL3, E-钙黏蛋白,波形蛋白,β-Tubulin, Annexin V 等单克隆抗体及羊抗兔 IgG H&L (Alexa Fluor®

2025-03-05 接收

基金项目:山东省高等学校“青创科技支持计划”项目 (编号:2020KJK002)

作者简介:金丹,女,技师;

郭纪伟,男,副主任技师,通信作者, E-mail: guojw0510@bzmc.edu.cn

Province (No. YCBZ2024150); Scientific Research Program of Faculty of Chinese Medicine Science Guangxi University of Chinese Medicine (Nos. 2024ZZA002, 2024ZZA003, 2024ZZB007, 2024ZZB010)

Corresponding authors Zheng Yang, E-mail: 1793853705@qq.com; Duan Xuelin, E-mail: 403605650@qq.com

488)(货号: ab195352、ab1416、ab45939、ab6046、ab137321、ab150077) 购于英国 Abcam 公司; 二抗 HRP-linked goat anti rabbit IgG (货号: 511203) 购于成都正能生物公司; CCK-8 试剂盒、结晶紫 (货号: E606335、A100528) 购于上海生工生物工程公司; HRP 底物 (货号: WBKLS0100) 试剂盒购于美国 millipore 公司; TRIzol 试剂、TransScript All-in-One First-Strand cDNA 合成试剂盒 (货号: ET101-01-V2、AT321-01) 购于北京 TransGen Biotech 公司; $2 \times$ Taq Master Mix (货号: P111-01) 购于南京 Vazyme 公司; m^6A 定量检测试剂盒 (货号: C11051-1) 购于广州锐博生物公司。

1.1.2 主要仪器 细胞培养箱 (型号: Thermo3541, 美国 Thermo Fisher 公司); 酶标仪 (型号: SynergyH1M, 美国 Bio-Tek 公司); 激光共聚焦显微镜 (型号: NCF950, 美国 Leica 公司); Real-time PCR 仪 (型号: CFX96 Touch)、凝胶成像系统 (型号: ChemiDocXRS+) 购自美国 Biorad 公司; 显微镜 (型号: Olympus BX63, 日本奥林帕斯公司)。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析 使用 TCGA (<https://www.cancer.gov>) 和 GEPIA (<http://gepia.cancer-pku.cn>) 数据库分析 NSCLC 患者的中 METTL3 表达水平及其与生存期之间的关系。

1.2.2 细胞培养 人源 NSCLC 细胞株 A549、H1299 和正常肺上皮细胞株 BEAS-2B 从美国 ATCC 细胞库购入。用含 10% 胎牛血清, 1% 青-链霉素的 RPMI-1640 培养基培养细胞, 培养于 37°C 、5% CO_2 及保持一定湿度的培养箱中。

1.2.3 质粒构建 过表达质粒通过 PCR 扩增方法将 METTL3 的 cDNA 插入到载体 pcDNA3.1 (Invitrogen) 的多克隆位点中。sh-METTL3 质粒购于吉凯生物科技有限公司, 靶向位点是 5'-CTGCAAGTATGT-TCACTATGA-3'。

1.2.4 细胞转染 A549 细胞中通过瞬时转染 METTL3 或 sh-METTL3, 增加或靶向敲低 METTL3 的表达水平。每组取 1.5 μg 质粒和 3 μl 转染试剂 LipofectamineTM 2000 分别与无血清 RPMI-1640 培养基混合, 再将两种混合液混匀, 室温静置 5 min。然后加入到 6 孔板中, 每孔 250 μl , 培养 36~48 h, 进行后续实验。

1.2.5 RT-PCR 收集细胞, 用 TRIzol 试剂提取细胞总 RNA。取 1 μg RNA, 采用 TransScript All-in-One First-Strand cDNA 合成试剂盒反转录成 cDNA。

采用 $2 \times$ Taq Master Mix 盒, 以反转录的 cDNA 为模板, GAPDH 为内参进行 RT-PCR 实验, 每组设置 3 个复孔。独立重复实验 3 次, 使用 ChemiDocXRS+, Bio-Rad 凝胶成像系统获取结果图像, 并利用 ImageJ 软件对结果进行灰度值定量分析。qPCR 引物序列见表 1。

表 1 基因引物序列

Tab. 1 Primer sequences of the genes

Genes	Sequences
METTL3	Forward: 5'-AGCCTTCTGAACCAACAGTCC-3'
	Reverse: 5'-CCGACCTCGAGAGCGAAAT-3'
E-cadherin	Forward: 5'-ACCATTAACAGGAACACAGG-3'
	Reverse: 5'-CAGTCACTTTTCACTGTGGTG-3'
Vimentin	Forward: 5'-CGCCAACTACATCGACAAGGTGC-3'
	Reverse: 5'-CTGGTCCACCTGCCGGCGCAG-3'
GAPDH	Forward: 5'-CTCCTCCTGTTTCGACAGTCAGC-3'
	Reverse: 5'-CCCAATACGACCAAATCCGTT-3'

1.2.6 免疫印迹实验 收集细胞, PBS 洗 1 次, 加入 NP-40 裂解液裂解细胞。12 000 r/min 离心 10 min 收集上清液, 用 BCA 法测定蛋白浓度。加入 $5 \times$ 上样缓冲液, 煮沸 5 min 变性。上样 30 μg 蛋白, 进行 SDS-PAGE 电泳, 转膜。用含 5% 的脱脂奶粉 TBST 封闭 2 h, 4°C 过夜孵育 METTL3、E-钙黏蛋白 (E-cadherin)、波形蛋白 (Vimentin)、Tubulin (浓度均为 1:1 000) 一抗, 室温孵育二抗 HRP-linked goat anti rabbit IgG (1:2 000) 2 h。用化学成像系统检测化学发光情况, ImageJ 软件分析蛋白条带灰度值。

1.2.7 m^6A 水平检测 m^6A 甲基化水平检测使用 m^6A 定量检测试剂盒并参照其操作手册进行。简单操作过程为: 收集细胞, PBS 洗 1 次, 裂解细胞, 加样, 分别设空白孔、标准孔和待测样品孔。在酶标包被板上标准品准确加样 50 μl , 待测样品孔中先加样品稀释液 40 μl , 然后再加待测样品 10 μl , 使用移液器将样品垂直加至酶标板孔底部, 样品尽量不触及孔壁, 轻轻晃动混匀样品; 温育: 用封板膜封板后置 37°C 温育 30 min; 配液, 将 30 倍浓缩洗涤液用蒸馏水 30 倍稀释后备用; 洗涤: 小心揭掉封板膜, 弃去液体, 甩干, 每孔加满洗涤液, 静置 30 s 后弃去, 如此重复 5 次; 加酶: 每孔加入酶标试剂 50 μl , 空白孔除外; 随后温育和洗涤; 显色: 每孔先加入显色剂 A 50 μl , 再加入显色剂 B 50 μl , 轻轻振荡混匀, 37°C 避光显色 10 min; 终止: 每孔加终止液 50 μl , 终止反应; 测定: 以空白孔调零, 450 nm 波长依序测量各孔的吸光度 (A)。

1.2.8 CCK-8 检测细胞增殖活性 选取对数生长

期细胞,接种于96孔板,每孔 5×10^3 个细胞。细胞贴壁后,转染质粒 METTL3 或 sh-METTL3,同时设调零孔,每组做3个复孔,继续培养48 h。然后向每孔加入 CCK-8 $10 \mu\text{l}$, 37°C 孵育2 h,用酶标仪检测每孔在450 nm 波长下的吸光度 A 值,计算细胞存活率。细胞存活率($\%$) = $(A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100$ 。

1.2.9 免疫荧光实验 免疫荧光实验用以检测细胞凋亡情况。将细胞接种于铺有盖玻片的24孔板内,待细胞贴壁后转染质粒 METTL3 和 sh-METTL3,继续培养48 h。弃去培养基,PBS洗1次,加入4%多聚甲醛,室温放置30 min,PBS洗3次。加入1% Triton X-100,室温放置30 min,PBS洗3次。加入2% BSA,室温封闭30 min。加入一抗 Annexin V (1:500), 4°C 孵育过夜,PBS洗3次。加入荧光二抗 IgG H&L (Alexa Fluor® 488) (1:1 000),避光室温孵育2 h,PBS洗3次。1% Hoechst 或 PI 室温30 min 染核,PBS洗3次,封片。于共聚焦显微镜下观察,ImageJ 软件分析荧光强度。

1.2.10 细胞克隆形成实验 收集转染 METTL3 和 sh-METTL3 的 A549 细胞,接种于12孔板,每孔200个细胞,每组设3个复孔。培养于含10%胎牛血清,100 mg/ml 青-链霉素的 RPMI-1640 培养基中,每3 d 更换培养新鲜培养基,培养14 d 后,弃去培养基,PBS洗1次,加入1%结晶紫染色20 min,PBS洗1次。拍照后用 ImageJ 软件分析克隆数量。

1.2.11 细胞划痕实验 在6孔板背面划3条线横穿过孔,取对数生长期细胞接种至该6孔板,细胞贴壁后转染质粒 METTL3 和 sh-METTL3,继续培养48 h。用200 μl 枪头在孔中纵向划3条线,尽量垂直于背后的横线。弃去培养基,PBS洗2次,加入含2%胎牛血清的培养基,在显微镜下拍照。继续培养36 h,再次拍照。独立重复实验3次,用 ImageJ 软件分析划痕两侧细胞之间的距离。

1.2.12 统计学处理 用软件 SPSS 20.0 对实验结果进行统计学分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,所有实验均至少完成3次以上生物学重复实验,两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用方差分析。计数资料以率($\%$)表示,组间比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 METTL3 在 NSCLC 中高表达且与患者生存期呈负相关 METTL3 作为 m^6A 甲基转移酶复合物

中的核心组分与人类的多种癌症的发生密切相关。GEPID 数据库的结果表明 METTL3 的 mRNA 在结肠腺癌(colon adenocarcinoma, COAD)、多形性胶质母细胞瘤(glioblastoma multiforme, GBM)、卵巢癌(ovarian cancer, OV)、直肠腺癌(rectal adenocarcinoma, READ)、胸腺癌(thymic carcinoma, THYM)、肺腺癌(lung adenocarcinoma, LUAD)和肺鳞癌(lung squamous cell carcinoma, LUSC)等癌症组织中的表达水平与正常组织相比明显增加($P < 0.01$, 图1A)。TCGA 数据结果表明 METTL3 在 LUSC 和 LUAD(均 $P < 0.01$, 图1B、1C)中的表达水平与正常组织相比增加。TCGA 数据库中患者生存期分析表明, METTL3 表达水平高的患者($n = 344$)生存期较短, METTL3 表达水平低的患者($n = 147$)生存期较长(图1D, $P < 0.01$)。以上结果表明 METTL3 在 NSCLC 中高表达且与患者生存期呈负相关。

2.2 NSCLC 细胞中 METTL3 的 mRNA 和蛋白表达水平升高 为了验证 METTL3 与 NSCLC 的关系,本研究检测了 NSCLC 细胞 A549 和 H1299 及正常肺上皮细胞系 BEAS-2B 中 METTL3 的 mRNA 和蛋白表达水平。通过 ChemoDocXRS + , Bio-Rad 凝胶成像系统得到 RT-PCR 结果,将白色目的条带颜色翻转为黑色目的条带,黑色背景翻转为白色背景,可见 A549($t = 5.68, P < 0.01$)和 H1299($t = 12.63, P < 0.01$)细胞中 METTL3 的 mRNA 水平明显高于对照组 BEAS-2B 细胞(图2A)。Western blot 实验结果显示,与对照组 BEAS-2B 细胞相比, A549($t = 23.88, P < 0.01$)和 H1299($t = 12.09, P < 0.01$)细胞中 METTL3 蛋白表达的水平上调(图2B)。

2.3 METTL3 调控 NSCLC 细胞中 m^6A 水平 蛋白通过免疫印迹实验,检测过表达或靶向敲低 METTL3 的效果。结果显示, A549 细胞中瞬时转染 METTL3 明显增加其蛋白水平(图3A, $t = 15.68, P < 0.01$),瞬时转染 sh-METTL3 明显降低其蛋白水平(图3B, $t = 10.11, P < 0.01$)。为了进一步确定 METTL3 是否通过 m^6A 甲基化修饰发挥调控作用,检测 METTL3 变化对 A549 细胞中 m^6A 水平的影响。 m^6A 定量试剂盒检测结果表明,过表达 METTL3 明显增加 A549 细胞中 m^6A 水平(图3C, $t = 13.43, P < 0.01$),而敲减 METTL3 显著减少细胞中 m^6A 水平(图3D, $t = 40.17, P < 0.01$),差异具有统计学意义。以上结果表明, METTL3 影响 NSCLC 细胞的 m^6A 水平。

2.4 METTL3 促进 NSCLC 细胞增殖 在 A549

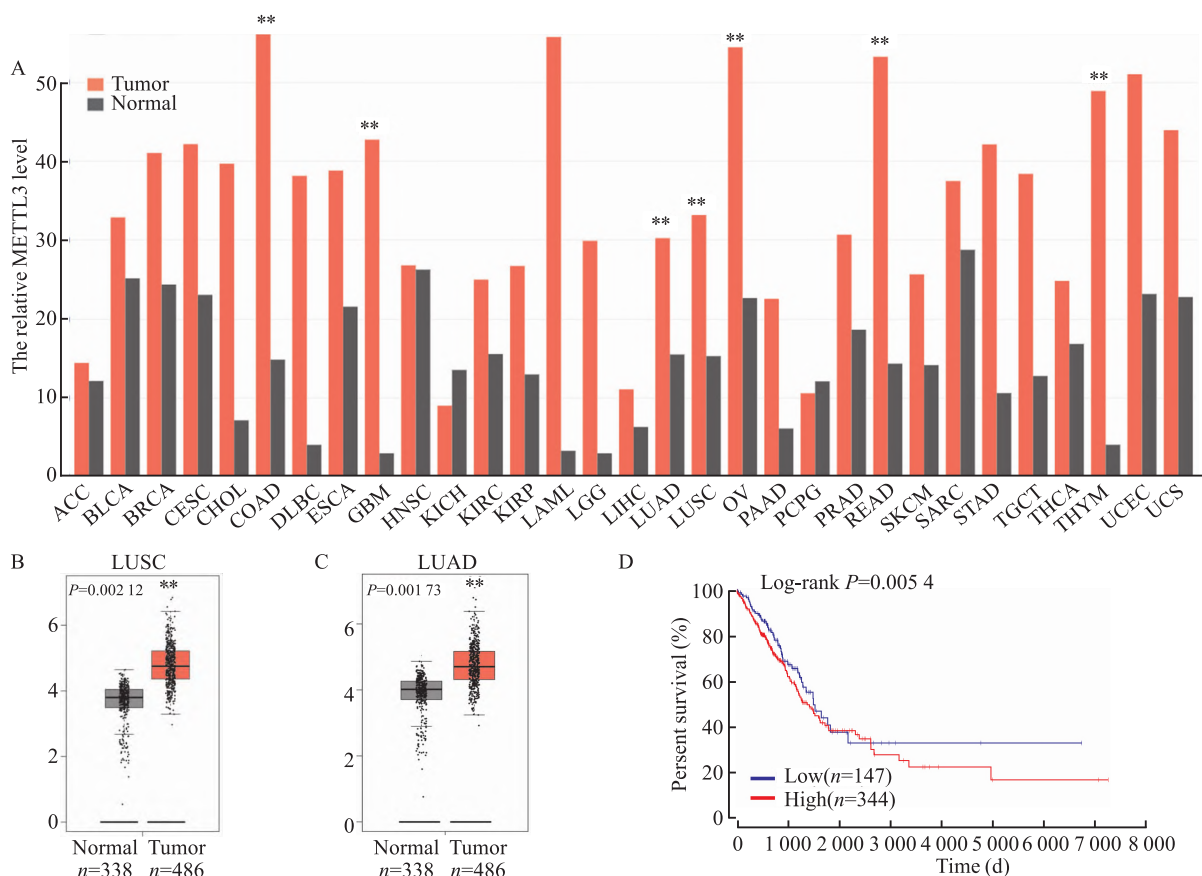


图1 METTL3 在 NSCLC 中高表达且与患者生存期呈负相关

Fig.1 METTL3 expressions were higher and negatively correlated with patient survival in NSCLC

A: The expression of METTL3 was analysis in human tumor tissues (T) using GEPIA data compared to the normal tissues (N); B: The expression of METTL3 in the LUSC was analyzed by the TCGA data base; C: The expression of METTL3 in the LUAD was analyzed by the TCGA data base; D: The relationship between METTL3 level and patient survival was analyzed by the TCGA data; ** $P < 0.01$ vs Normal group.

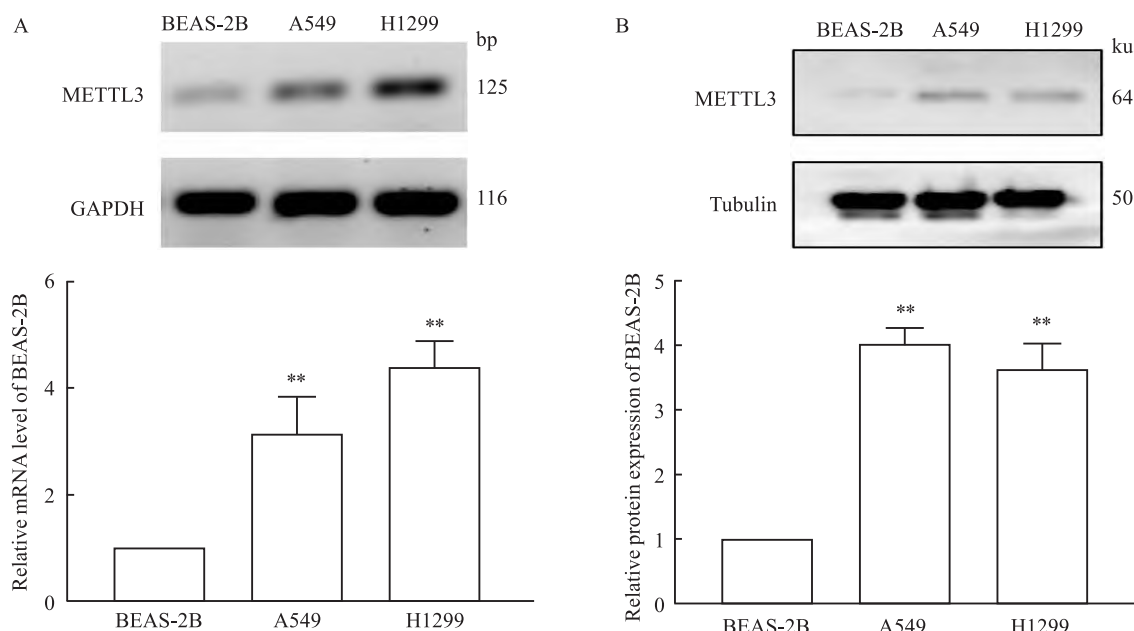


图2 METTL3 在 NSCLC 细胞中高表达

Fig.2 Higher expression of METTL3 in NSCLC cells

A: RT-PCR detection of the expression of METTL3 and GAPDH in A549, H1299 and BEAS-2B cells; B: Western blot detection of protein level of METTL3 and Tubulin in A549, H1299 and BEAS-2B cells; ** $P < 0.01$ vs BEAS-2B cells.

细胞中过表达或靶向敲低 *METTL3*, 检测 *METTL3* 表达的变化对 NSCLC 细胞增殖能力的影响。CCK-8 实验结果显示, 过表达 *METTL3* 促进 A549 细胞的增殖能力 (图 4A, $t = 29.57$, $P < 0.01$), 而降低 *METTL3* 表达水平抑制细胞的增殖能力 (图 4B, $t =$

10.97, $P < 0.01$)。细胞生长实验得到同样结果, 过表达 *METTL3* 促进细胞生长 (图 4C, $F = 87.62$, $P < 0.01$), 而靶向敲低 *METTL3* 抑制细胞生长 (图 4D, $F = 21.01$, $P < 0.01$)。结果表明, *METTL3* 促进 NSCLC 细胞增殖能力。

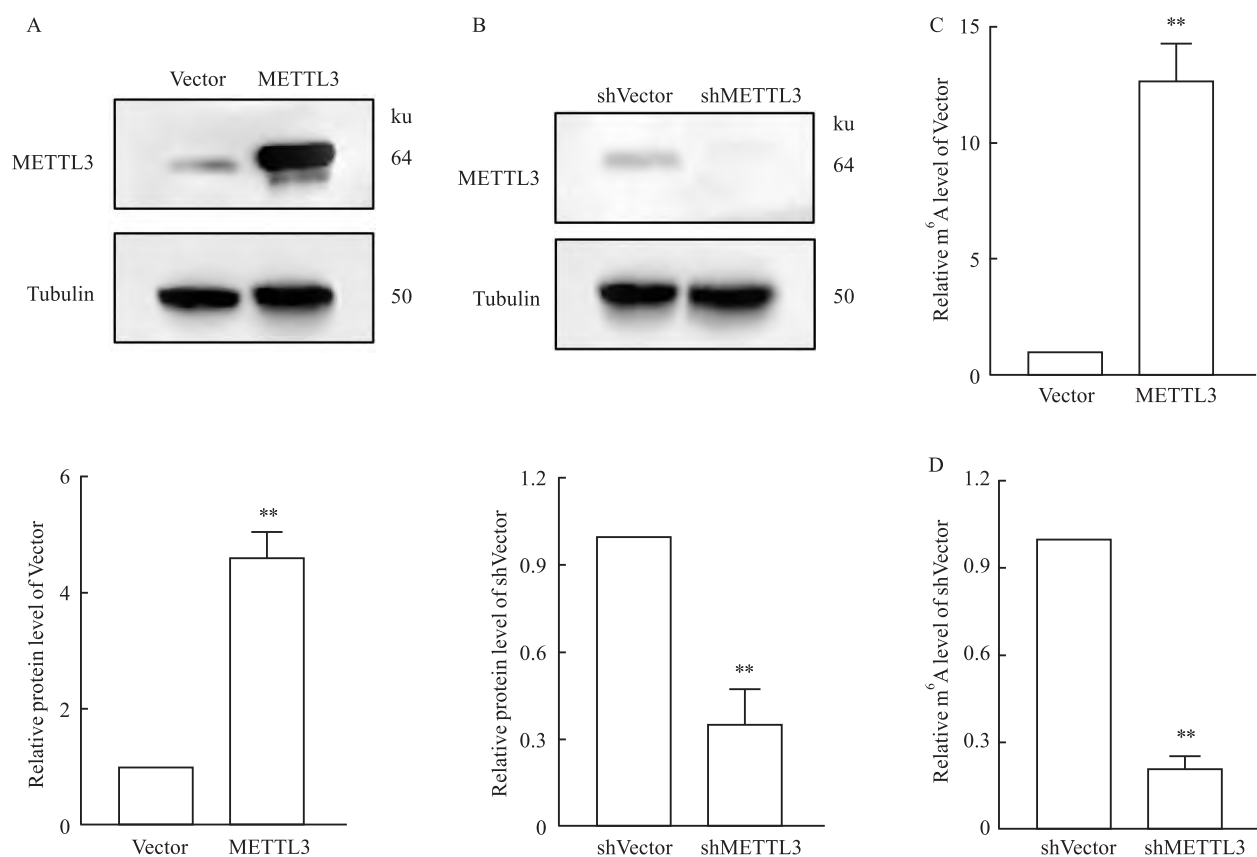


图3 *METTL3* 增加细胞内 m⁶A 的修饰水平

Fig. 3 *METTL3* elevated m⁶A level in lung cancer cells

A: Western blot detection of protein level of *METTL3* and Tubulin in A549 cells with over-expression of *METTL3*; B: Western blot detection of protein level of *METTL3* and Tubulin in A549 cells with knockdown of *METTL3*; C: The total m⁶A level was determined in the A549 cells with over-expression of *METTL3*; D: The total m⁶A level was determined in the A549 cells with knockdown of *METTL3*; ** $P < 0.01$ compared between two groups.

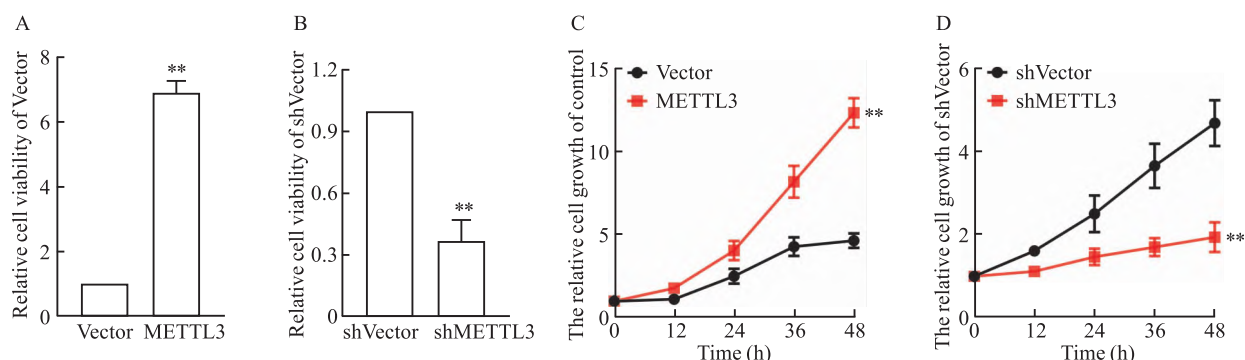


图4 过表达的 *METTL3* 促进细胞增殖

Fig. 4 Over expression of *METTL3* promoted cell proliferation of A549 cells

A, B: The CCK-8 detection of cellular viability in A549 cells after overexpression (A) or knockdown (B) of *METTL3*, respectively; C, D: The CCK-8 detection of cellular growth in A549 cells after overexpression (C) or knockdown (D) of *METTL3*, respectively; ** $P < 0.01$ compared between two groups.

2.5 METTL3 抑制细胞凋亡 A549 细胞中过表达或靶向敲低 METTL3, 探讨 METTL3 与细胞凋亡的关系。免疫荧光结果显示, 过表达 METTL3 抑制细胞凋亡 (图 5A, $t = 13.10, P < 0.01$), 而靶向敲低 METTL3 促进细胞凋亡 (图 5B, $t = 40.24, P < 0.01$)。结果提示, METTL3 抑制 NSCLC 细胞的凋亡。

2.6 METTL3 增加 NSCLC 细胞克隆形成能力 利用过表达或靶向敲低 METTL3, 进一步检测 METTL3 水平变化对 A549 细胞克隆形成能力的影响。细胞克隆形成实验结果表明, 过表达 METTL3 明显提高 A549 细胞克隆形成能力 (图 6A, $t = 12.09, P < 0.01$), 而靶向敲低 METTL3 则明显降低细胞克隆形成能力 (图 6B, $t = 15.93, P < 0.01$)。结果提示,

METTL3 促进 NSCLC 细胞克隆形成能力。

2.7 METTL3 促进 NSCLC 细胞的迁移 A549 细胞中过表达或靶向敲低 METTL3 后, 研究 METTL3 对 NSCLC 细胞迁移能力的影响。细胞划痕实验结果表明, 过表达 METTL3 显著增强 A549 细胞的迁移能力 (图 7A, $t = 7.30, P < 0.01$), 而靶向敲低 METTL3 显著减弱 A549 细胞的迁移能力 (图 7B, $t = 22.53, P < 0.01$)。结果提示, METTL3 促进 NSCLC 细胞的迁移能力。

2.8 METTL3 促进 NSCLC 细胞 EMT 进程 上皮-间质转化过程 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 是恶性肿瘤细胞转移的重要环节之一, 为了评估 METTL3 变化对 NSCLC 细胞 EMT 的影响,

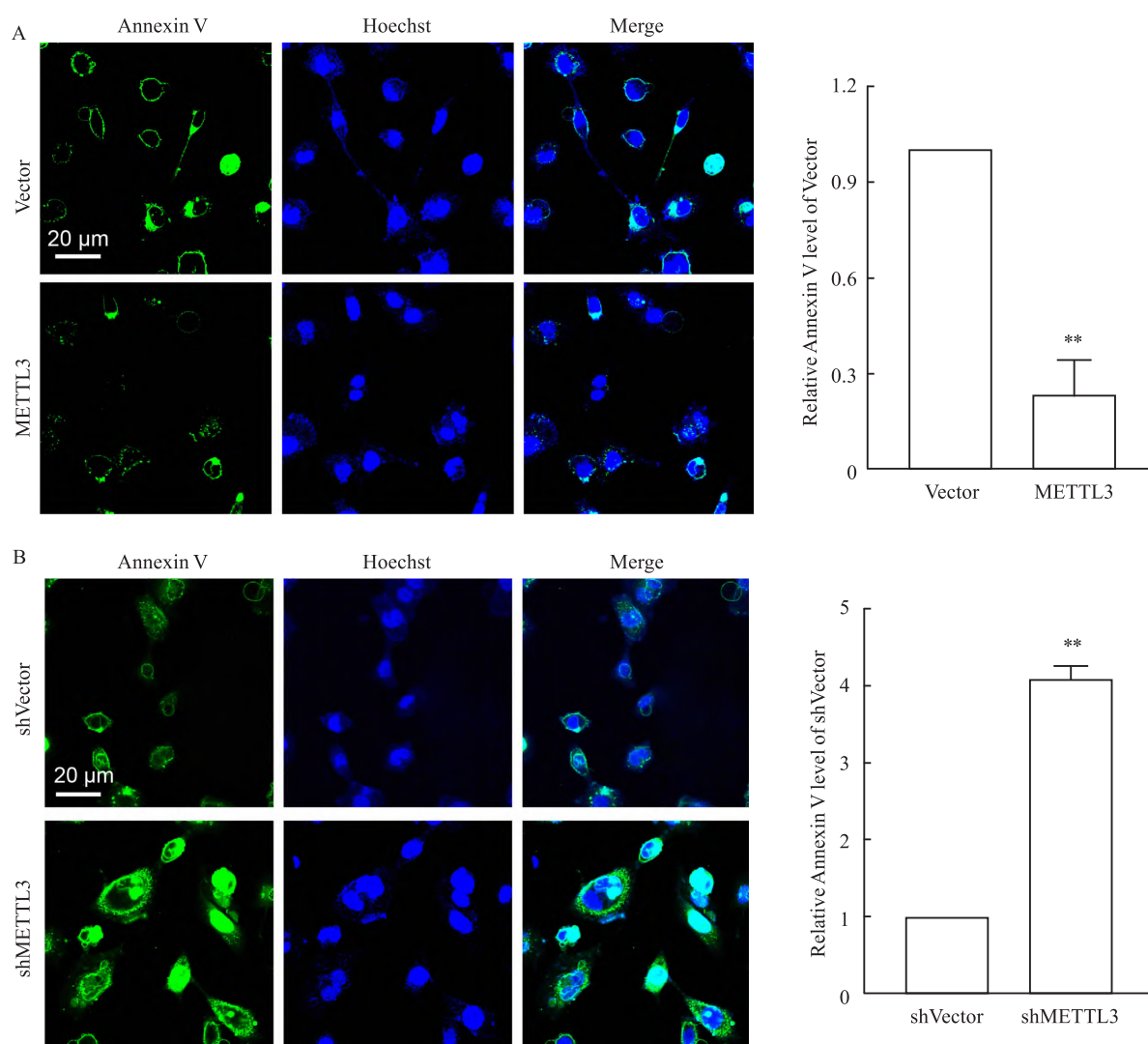


图 5 过表达 METTL3 抑制细胞凋亡

Fig. 5 Overexpression of METTL3 inhibited apoptosis of A549 cells

A: The immunofluorescent assay detection of apoptosis of A549 cells with overexpression of METTL3; B: The immunofluorescent assay detection of apoptosis of A549 cells with knockdown of METTL3; ** $P < 0.01$ compared between two groups.

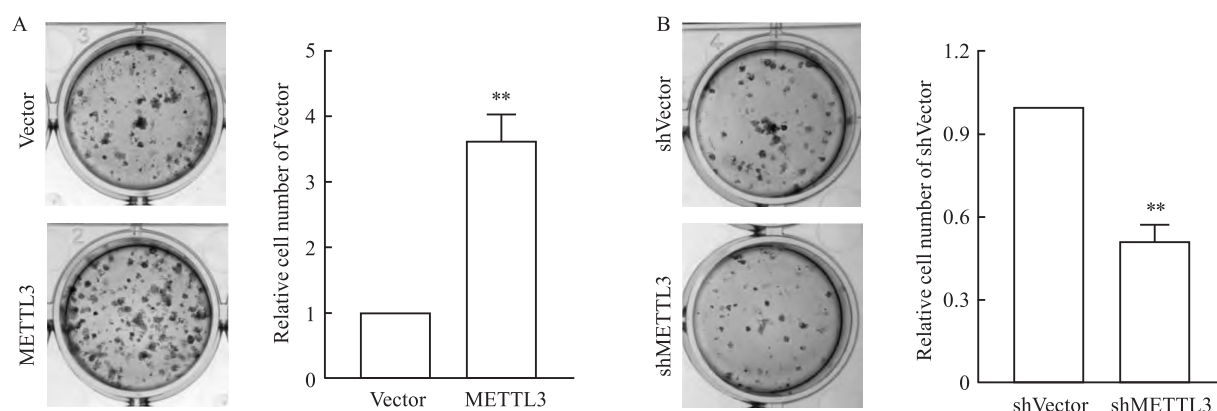


图6 METTL3 促进细胞克隆形成能力

Fig.6 METTL3 enhanced colony formation ability of lung cancer cells

A: The colony formation detection of colony growth of A549 cells with overexpression of METTL3; B: The colony formation detection of colony growth of A549 cells with knockdown of METTL3; ** $P < 0.01$ compared between two groups.

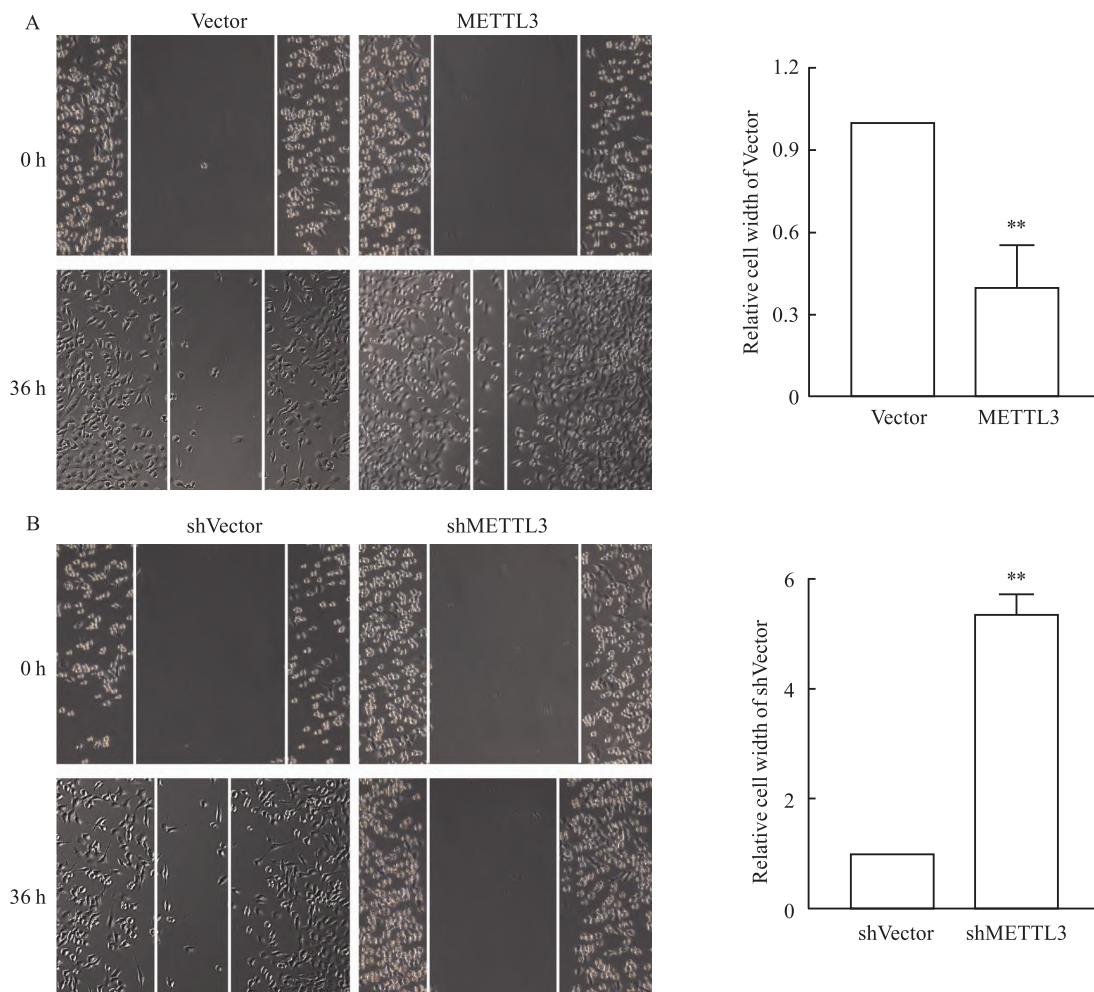
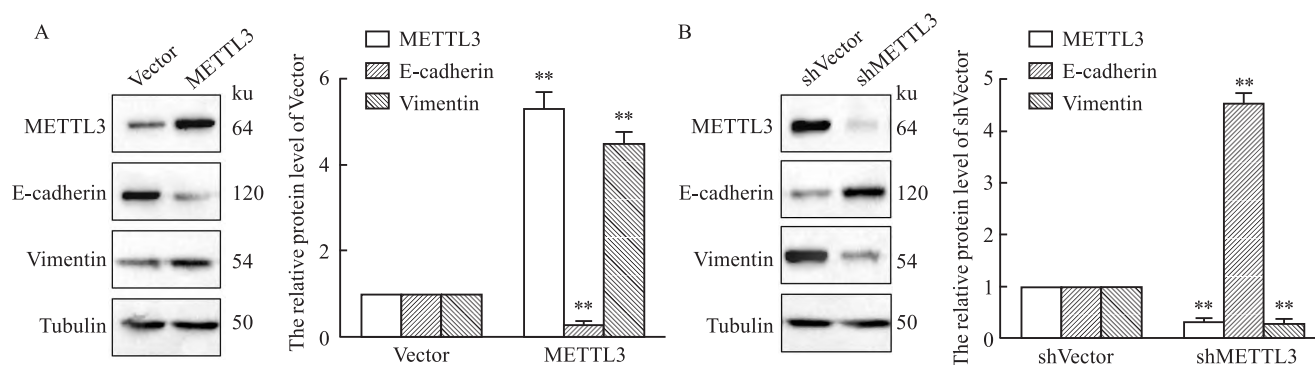


图7 过表达 METTL3 促进细胞的迁移能力

Fig.7 Over expression of METTL3 promoted cellular migration of A549 cells

A: The scratch assay detection of cell migration of A549 cells with overexpression of METTL3; B: The scratch assay detection of cell migration of A549 cells with knockdown of METTL3; ** $P < 0.01$ compared between two groups.

图8 过表达的 *METTL3* 促进细胞的 EMTFig. 8 Over expression of *METTL3* influenced the EMT in A549 cells

A: The Western blot detection of protein levels of *METTL3*, E-cadherin, Vimentin in A549 cells with overexpression of *METTL3*; B: The Western blot detection of protein levels of *METTL3*, E-cadherin, Vimentin in A549 cells with knockdown of *METTL3*; * * $P < 0.01$ compared between two groups.

在转染 *METTL3* 或 *shMETTL3* 的 A549 细胞中,检测 EMT 标志性分子 E-cadherin 和 Vimentin 的 mRNA 和蛋白水平变化情况。Western blot 和 RT-PCR 实验结果显示,过表达 *METTL3* 增加 Vimentin ($t = 25.54, P < 0.01$) 表达水平并减少 E-cadherin ($t = 26.76, P < 0.01$) 蛋白表达水平(图 8A),而靶向敲低 *METTL3* 促进 E-cadherin ($t = 36.57, P < 0.01$) 蛋白表达水平并抑制 Vimentin ($t = 24.02, P < 0.01$) 表达水平(图 8B)。结果提示, *METTL3* 促进 NSCLC 细胞的 EMT。

3 讨论

NSCLC 的恶性程度高,治疗难度大。虽然目前临床上采用手术切除、放疗、化疗及免疫和靶向治疗等多种方案对 NSCLC 患者进行治疗,但是治疗效果并不理想^[1]。超过一半的患者就诊时已处于肺癌晚期,出现远处转移,5 年生存率低于 20%^[10]。因此,探索 NSCLC 相关基因及其作用机制对改进 NSCLC 患者的诊治方案具有重要意义。

近年来的研究^[3]表明, m^6A 修饰在肿瘤的发生发展中发挥着双重作用。在子宫内膜癌中,减少 m^6A 修饰能增加蛋白激酶 B 活性从而促进细胞增殖和肿瘤发生^[11]。在宫颈鳞状细胞癌中,脂肪与肥胖相关蛋白通过下调 β -catenin 的 m^6A 水平增强其化疗耐药^[12]。在肝癌中,增加细胞因子信号转导抑制因子 2 上的 m^6A 修饰能促进其 mRNA 降解,从而加速肿瘤进展^[13]。在肺癌细胞中,高表达的 *METTL3* 和 m^6A 水平参与转化生长因子- β 介导的肺癌细胞的 EMT 转化^[14]。由此可见,促癌基因的 m^6A 水平的增高促进人类肿瘤的进程。而另一些基因的

m^6A 修饰减少同样能够加快肿瘤的进展,这主要是由不同的 m^6A 识别蛋白特异性识别 m^6A 位点后的作用机制,以及 m^6A 修饰的基因是癌基因还是抑癌基因等因素所导致。

近期研究表明 m^6A 修饰调控蛋白异常与多种类型的癌症密切相关, *METTL3* 作为最主要的 m^6A 甲基化蛋白,相关的研究日益增多。有研究^[15]证实, *METTL3* 蛋白分子的赖氨酸残基发生小泛素样修饰蛋白修饰后会抑制其 m^6A 甲基化的酶活性进而抑制 NSCLC 细胞的增殖。miR-33a 可靶向 *METTL3* mRNA 的 3'UTR,下调 *METTL3* 的表达水平,从而抑制 NSCLC 细胞的增殖^[16]。这些研究均表明 *METTL3* 参与调控 NSCLC 的进程,其表达水平和活性与 NSCLC 的发生和发展密切相关。为阐明 *METTL3* 调控 NSCLC 发生发展的分子机制,本研究通过构建 *METTL3* 过表达的 A549 细胞模型,发现 *METTL3* 的高表达显著提高细胞内 m^6A 修饰水平并促进了 A549 细胞增殖,克隆形成,迁移和 EMT 同时抑制细胞凋亡。而在 A549 细胞中靶向敲低 *METTL3* 则得到相反的结果。这些结果表明,过表达的 *METTL3* 能够促进 NSCLC 细胞增殖、迁移和 EMT,且 *METTL3* 作为癌基因在 NSCLC 的生长和转移中发挥重要作用。

参考文献

- [1] Bray F, Laversanne M, Sung H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2024, 74(3): 229-63. doi: 10.3322/caac.21834.
- [2] Cao W, Chen H D, Yu Y W, et al. Changing profiles of cancer

- burden worldwide and in China: a secondary analysis of the global cancer statistics 2020[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2021, 134(7): 783–91. doi: 10.1097/CM9.0000000000001474.
- [3] Wang T, Kong S, Tao M, et al. The potential role of RNA N6-methyladenosine in cancer progression[J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 88. doi: 10.1186/s12943-020-01204-7.
- [4] 徐丽秀, 倪伟建, 王伟, 等. m⁶A 甲基化修饰在肾细胞癌中的研究进展[J]. *安徽医科大学学报*, 2023, 58(12): 2159–64. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.12.028.
- [4] Xu L X, Ni W J, Wang W, et al. Research progress of methylation modification of m⁶A in renal cell carcinoma[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2023, 58(12): 2159–64. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.12.028.
- [5] Li T F, Xu Z, Zhang K, et al. Effects and mechanisms of N6-methyladenosine RNA methylation in environmental pollutant-induced carcinogenesis[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2024, 277: 116372. doi: 10.1016/j.ecoenv.2024.116372.
- [6] Lan Q, Liu P Y, Haase J, et al. The critical role of RNA m⁶A methylation in cancer[J]. *Cancer Res*, 2019, 79(7): 1285–92. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-2965.
- [7] Lin X, Chai G, Wu Y, et al. RNA m⁶A methylation regulates the epithelial mesenchymal transition of cancer cells and translation of Snail[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 2065. doi: 10.1038/s41467-019-09865-9.
- [8] Wang H, Xu B, Shi J. N6-methyladenosine METTL3 promotes the breast cancer progression *via* targeting Bel-2[J]. *Gene*, 2020, 722: 144076. doi: 10.1016/j.gene.2019.144076.
- [9] Taketo K, Konno M, Asai A, et al. The epitranscriptome m⁶A writer METTL3 promotes chemo- and radioresistance in pancreatic cancer cells[J]. *Int J Oncol*, 2018, 52(2): 621–9. doi: 10.3892/ijo.2017.4219.
- [10] Zhang Y, Rumgay H, Li M, et al. Nasopharyngeal cancer incidence and mortality in 185 countries in 2020 and the projected burden in 2040: population-based global epidemiological profiling[J]. *JMIR Public Health Surveill*, 2023, 9: e49968. doi: 10.2196/49968.
- [11] Liu J, Eckert M A, Harada B T, et al. m⁶A mRNA methylation regulates AKT activity to promote the proliferation and tumorigenicity of endometrial cancer[J]. *Nat Cell Biol*, 2018, 20(9): 1074–83. doi: 10.1038/s41556-018-0174-4.
- [12] Zhou S, Bai Z L, Xia D, et al. FTO regulates the chemo-radiotherapy resistance of cervical squamous cell carcinoma (CSCC) by targeting β -catenin through mRNA demethylation[J]. *Mol Carcinog*, 2018, 57(5): 590–7. doi: 10.1002/mc.22782.
- [13] Chen M, Wei L, Law C T, et al. RNA N6-methyladenosine methyltransferase-like 3 promotes liver cancer progression through YTHDF2-dependent posttranscriptional silencing of SOCS2[J]. *Hepatology*, 2018, 67(6): 2254–70. doi: 10.1002/hep.29683.
- [14] Wana-Udom S, Terashima M, Lyu H, et al. The m⁶A methyltransferase METTL3 contributes to transforming growth factor-beta-induced epithelial-mesenchymal transition of lung cancer cells through the regulation of JUNB[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 524(1): 150–5. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.01.042.
- [15] Du Y, Hou G, Zhang H, et al. SUMOylation of the m⁶A-RNA methyltransferase METTL3 modulates its function[J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(10): 5195–208. doi: 10.1093/nar/gky156.
- [16] Du M, Zhang Y, Mao Y, et al. miR-33a suppresses proliferation of NSCLC cells *via* targeting METTL3 mRNA[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 482(4): 582–9. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.11.077.

METTL3 promotes cellular proliferation, migration and EMT in non-small cell lung cancer cells

Jin Dan¹, Shao Shuang¹, Li Rui², Guo Jiwei¹

(¹Medical Research Center, ²Dept of Gastroenterology, Binzhou Medical University Hospital, Binzhou 256601)

Abstract Objective To investigate the effect and mechanism of methyltransferase-like3 (METTL3), which functions as m⁶A modification methyltransferase, on the cellular proliferation, clone formation and migration of non-small cell lung cancer (NSCLC) cells. **Methods** The METTL3 level and patient overall survival were analyzed by bioinformatics. In the transfected A549 cells, the expression of METTL3 was detected by RT-PCR and Western blot assays, the m⁶A level was detected by m⁶A RNA Methylation Assay kit, the cellular viability and growth were detected by CCK-8 assay, the apoptosis was detected by immunofluorescent assay, the colony growth was detected by clone formation assay, the cell migration growth was detected by scratch. **Results** Bioinformatics showed that METTL3 was highly expressed in NSCLC and negatively correlated with patient overall survival. The RT-PCR and Western blot data showed that the METTL3 level was higher in NSCLC cells. Moreover, higher METTL3 significantly promoted m⁶A level, cell proliferation, colony formation, migration, inhibited cell apoptosis, increased the

网络出版时间:2025-05-20 13:06:12 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20250519.1745.004

◇预防医学研究◇

2019—2021 年喀什地区莎车县肺结核时空流行特征分析

陈晓蝶¹, 买吾拉江·依马木², 常敏丽¹, 张利萍³, 郑彦玲³

(新疆医科大学¹ 公共卫生学院、³ 医学工程技术学院, 乌鲁木齐 830017;

² 喀什地区疾病预防控制中心, 喀什 844000)

摘要 目的 探讨新疆喀什地区莎车县肺结核流行的时间和空间分布特点。**方法** 收集 2019—2021 年莎车县的肺结核发病资料,应用圆形分布法、局部空间自相关分析、冷热点分析、方向分布和空间重心方法进行时空分析。**结果** 2019—2021 年莎车县肺结核发病数共 8 345 例,其中男性占 52.03%,女性占 47.97%,患者以 60~75 岁为主。塔孜尔其乡、莎车镇和恰热克镇的肺结核报告发病数位居全县前三。春、夏季为肺结核的疾病高发季,3 月中旬至 7 月中旬为疾病高发期。米夏乡、伊什库力乡等为“高高”聚集区,“低低”聚集区主要集中在霍什拉甫乡、喀拉苏乡等。塔孜尔其乡、米夏乡、伊什库力乡等为莎车县肺结核发病的热点区域。研究期间内,喀什地区莎车县肺结核发病重心逐渐由西南向东北偏移。**结论** 莎车县肺结核疫情存在一定的聚集性,男性发病略多于女性,老年群体占比较大,春、夏为疾病高发季节,米夏乡、伊什库力乡为重点发病区域。相关部门应持续加强肺结核高发期间重点人群、区域的疾病监测工作,采取相应的干预措施,降低肺结核的传播风险。

关键词 肺结核;圆形分布法;空间自相关;冷热点分析;空间重心分布;新疆喀什

中图分类号 R 521

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)05-0937-08

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.05.022

肺结核是由结核杆菌引起的一种慢性呼吸系统疾病,可对人体健康造成严重危害,是全球十大死因之一^[1]。根据世界卫生组织发布的《2022 年全球结核病报告》,中国是 30 个结核病高负担国家之一,2021 年有 78.0 万例新发结核病例,总发病率为

55/10 万^[2]。新疆喀什是中国结核病发病率较高的地区之一,在其 12 个县市中,莎车县肺结核疫情较为严重,结核病防控任务艰巨^[3]。

在时间流行特征分析方面,圆形分布法可以描述疾病季节性的强弱并确定疾病的发病高峰期,从而科学地解释莎车县结核病时间上的变化情况^[4]。通过比较和讨论局部空间自相关分析(local index spatial analysis, LISA)和冷热点分析的结果,可以得到的空间聚集结果更具有说服力^[5]。而方向分布及空间重心分布模型能确定发病区域的大致变化范围及疾病重心的逐年变化情况,使研究结果更加

2025-02-25 接收

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:72174175、72064036、72163033)

作者简介:陈晓蝶,女,硕士研究生;

郑彦玲,女,教授,硕士生导师,通信作者,E-mail:zhengyl_math@sina.cn

mRNA and protein expressions of EMT-related marker Vimentin but inhibited apoptosis and decreased the mRNA and protein expressions of EMT-related marker E-cadherin in the A549 cells. Furthermore, the contrasting results were obtained in the A549 cells with the knockdown of METTL3. **Conclusion** The over-expressed METTL3 increases the m⁶A levels in NSCLC cells and promotes cellular proliferation, colony formation, and migration growth, thereby laying a theoretical foundation for future research on early diagnosis and targeted drug development for NSCLC by targeting METTL3.

Key words METTL3; m⁶A; proliferation; migration; EMT; NSCLC

Fund program “Youth Innovation Science and Technology Support Plan” of Colleges and Universities in Shandong Province (No. 2020KJK002)

Corresponding author Guo Jiwei, E-mail: guojw0510@bzmc.edu.cn