

METTL3 介导的 m⁶A 修饰在结直肠癌奥沙利铂耐药中的作用研究

张世慧,齐秋晨,李培龙,杜鲁涛,王传新

(山东大学第二医院检验医学中心、山东省肿瘤标志物检测工程实验室,济南 250033)

【摘要】目的: 探究 N⁶-甲基腺嘌呤 (N⁶-methyladenosine, m⁶A) 调控因子甲基转移酶样蛋白 3 (methyltransferase-like 3, METTL3) 在结直肠癌奥沙利铂 (oxaliplatin, OXA) 耐药中的作用。**方法:** 采用浓度梯度法构建 OXA 耐药细胞株 HCT116/OXA, CCK-8 分析其耐药性; 采用 Dot blot 及 m⁶A RNA 甲基化定量 ELISA 实验检测细胞 RNA m⁶A 水平, RNA-seq 及 qRT-PCR 筛选差异 m⁶A 调控因子, Western blot 验证 METTL3 表达水平; 利用腺病毒感染技术在 HCT116 细胞过表达 METTL3, CCK-8 检测各组细胞的增殖活性; 通过对 GEO 数据库中 HCT116 细胞敲除 METTL3 的 MeRIP-seq 和 RNA-seq 数据与耐药细胞 RNA-seq 联合分析, 筛选耐药相关的 METTL3 介导 m⁶A 修饰调控的下游靶基因及信号通路; TCGA 数据库分析 METTL3 与患者预后的相关性。**结果:** HCT116/OXA 细胞对 OXA 的耐药性明显高于其亲代细胞 ($P<0.01$); 与 HCT116 相比, 耐药细胞的 RNA m⁶A 水平异常上调 ($P<0.01$), 且伴随 METTL3 的 mRNA 和蛋白水平升高; 过表达 METTL3 明显增强 HCT116 细胞对 OXA 的耐药性 ($P<0.01$); 多组学数据联合分析筛选的 METTL3 介导 m⁶A 修饰调控的与耐药相关的关键基因主要富集在 ABC 转运蛋白、干细胞多能性调节信号通路、TGF-β 信号通路等; METTL3 高表达与结直肠癌患者的不良预后明显相关 ($P<0.01$)。**结论:** METTL3 介导的 m⁶A 修饰可能通过调节 ABC 转运蛋白、调节干细胞多能性的信号通路、TGF-β 信号通路等经典耐药信号通路促进结直肠癌 OXA 耐药。

【关键词】 结直肠癌; 奥沙利铂; 化疗耐药; m⁶A 甲基化; METTL3

【中图分类号】R735.3

【文献标志码】A

【收稿日期】2022-06-01

Role of N⁶-methyladenosine mediated by methyltransferase-like 3 in oxaliplatin resistance of colorectal cancer

Zhang Shihui, Qi Qiuchen, Li Peilong, Du Lutao, Wang Chuanxin

(Department of Clinical Laboratory, The Second Hospital of Shandong University/Tumor Marker Detection Engineering Laboratory of Shandong Province)

[Abstract] **Objective:** To investigate the role of N⁶-methyladenosine (m⁶A) mediated by methyltransferase-like 3 (METTL3) in oxaliplatin (OXA) resistance of colorectal cancer. **Methods:** Concentration gradient induction method was used to establish OXA resistant cell line HCT116/OXA, and CCK-8 was used to detect the drug resistance of cells. Dot blot and ELISA were used to analyze the expression level of m⁶A in HCT116/OXA and parental cells. RNA-seq and qRT-PCR were used to screen the differential regulators of m⁶A. Western blot was used to detect the expression level of METTL3. METTL3 was overexpressed in HCT116 by adenovirus infection technique, and the proliferation activity of each group was detected by CCK-8. The key genes and signal pathways of m⁶A modification and regulation mediated by METTL3 related to drug resistance were screened through the combined analysis of MeRIP-seq and RNA-seq data of METTL3 knocked out by HCT116 cells in GEO database and RNA-seq data of drug-resistant cells. The correlation between METTL3 and prognosis was analyzed by TCGA database. **Results:** The resistance of HCT116/OXA cells to OXA was significantly higher than that of their parents ($P<0.01$). Compared with HCT116 cells, the level of RNA m⁶A modification in HCT116/OXA cells was significantly up-regulated ($P<0.01$) and the expression of METTL3 was significantly increased. Overexpression of METTL3 significantly enhanced the resistance of HCT116 cells to OXA ($P<0.01$). Differential genes selected from multiomics data conjoint analysis, related to drug resistance and regulated by METTL3-mediated m⁶A modification had significant correlation to ABC transporters, stem cell pluripotency, TGF-β signaling pathway and other signaling pathways. The high expression of METTL3 was significantly correlated with the poor prognosis of colorectal cancer patients ($P<0.01$). **Conclusion:** METTL3 mediated m⁶A methylation modification may promote the OXA resistance of colorectal cancer by regulating ABC transporter, stem cell pluripotency and TGF-β signaling pathway and other classical drug resistance signaling pathways.

作者介绍: 张世慧, Email: zhangshzsh@163.com,

研究方向: 肿瘤新型标志物的发现与应用。

通信作者: 王传新, Email: cxwang@sdu.edu.cn。

基金项目: 山东省自然科学基金资助项目(编号: ZR2020QH197)。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20220831.0934.014.html>

(2022-08-31)

[Key words] colorectal cancer; oxaliplatin; chemotherapy resistance; m⁶A methylation; methyltransferase-like 3

结直肠癌是全球第3大常见恶性肿瘤,其死亡率高居肿瘤第2位,严重威胁人类健康^[1]。我国结直肠癌的发病率和死亡率呈明显上升趋势,每年新发结直肠癌约56万例,因其早期起病隐匿,一经确诊多为进展期或出现了转移,错过手术的最佳时机^[2]。奥沙利铂(oxaliplatin, OXA)作为一线和二线联合化疗方案的组成部分,用于治疗进展期及转移性结直肠癌,其在肿瘤降期、减少局部复发率等方面取得了明显的效果,中位生存时间明显增加^[3-4]。然而,大多数结直肠癌患者最终会产生化疗耐药,导致临床治疗无效,出现肿瘤复发或转移,晚期结直肠癌患者的5年生存率仍不足10%^[5]。因此,阐明OXA耐药的分子机制,是克服耐药、提高结直肠癌患者预后的关键。

近期研究表明,m⁶A在表观遗传修饰水平调控基因的表达影响肿瘤发生进展及耐药,已成为生命科学领域的研究热点^[6-7],有研究报道METTL3介导的m⁶A修饰通过调控FOXO3 mRNA表达影响自噬调节肝癌索拉非尼耐药^[8],也可通过调控MALAT1-miR-1914-3p-YAP轴促进YAP表达,促进非小细胞肺癌顺铂耐药^[9]。但m⁶A修饰在结直肠癌OXA耐药中的调控作用及机制尚未明确。本研究通过构建结直肠癌OXA耐药株,探讨m⁶A修饰及其甲基转移酶METTL3与结直肠癌OXA耐药的关系,为逆转OXA化疗耐药提供新的分子靶标。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料与试剂

奥沙利铂(齐敖)购自齐鲁制药有限公司;DMEM高糖培养基及胎牛血清购自美国Gibco公司;人源METTL3基因腺病毒载体购自山东维真生物科技有限公司;RNA fast 2000提取试剂盒购自上海飞捷生物技术有限公司;qRT-PCR各种引物由山东济芫生物技术有限公司设计并合成;polybrene购自上海吉玛制药技术有限公司;m⁶A抗体(货号202003)购自德国Synaptic Systems公司;METTL3(货号96391)、GAPDH(货号5174S)一抗抗体购自美国CST公司;辣根过氧化物酶标记的抗兔二抗(货号ZB2301)购自北京中杉金桥生物技术公司;CCK-8检测试剂盒购自北京赛智生物制品有限公司;EpiQuik m⁶A RNA甲基化定量试剂盒(货号P-9005-48)购自美国Epigentek公司。

1.2 实验方法

1.2.1 耐药细胞株的构建 采用浓度梯度法构建HCT116/OXA细胞株。将亲代HCT116细胞培养于含1 μmol/L的

OXA培养基中,置于培养箱培养3~4周,直至细胞生长状态较好,继续培养2周后传代,增加OXA浓度到5 μmol/L。按此循环,逐渐提高药物浓度,最终OXA浓度达到25 μmol/L,以此获得耐药细胞命名为HCT116/OXA,并将耐药细胞培养在含10 μmol/L的OXA培养基中维持其耐药性,对于后续细胞实验,耐药细胞传代次数均小于15代。

1.2.2 细胞培养 HCT116亲代细胞用含10%胎牛血清和1%青链霉素(双抗)的DMEM培养基中培养,为维持HCT116/OXA细胞对OXA的耐药性,用含10 μmol/L OXA的上述DMEM培养基培养,细胞培养箱的条件均为37℃、含5%CO₂。

1.2.3 Dot blot 按照RNA fast 2000说明书的步骤提取细胞中的总RNA,并用NanoDrop2000测定浓度,在95℃中加热5 min使RNA变性,然后置于冰上冷却,将适量的RNA转移至尼龙膜上,UV-交联仪交联2次,每次50 s,使用5%脱脂奶粉室温封闭1 h,加入m⁶A抗体(1:1 000稀释)4℃孵育过夜,PBST洗涤后用羊抗兔IgG-HRP(1:5 000稀释),于摇床上室温孵育1 h,用PBST漂洗3遍,加入ECL发光液显影观察。设置对照组用亚甲蓝染色证实膜上有等量的RNA。

1.2.4 m⁶A RNA甲基化定量ELISA实验 采用m⁶A RNA甲基化定量试剂盒测定总RNA中m⁶A水平,每检测孔中加入适量总RNA,37℃密封孵育90 min,洗液洗板3次后,按照说明书在每孔中先后加入稀释好的50 μL捕获抗体溶液和检测抗体溶液,期间室温密封孵育后用洗液重复洗板3次,洗板后在每孔中加入100 μL的DS,室温下避光孵育5 min,每孔加入100 μL SS终止显色,用酶标仪读取450 nm处吸光度值,并计算m⁶A含量。

1.2.5 RNA-seq TRIzol法提取上述HCT116/OXA和HCT116细胞总RNA(各3次重复),随后用RiboMinus方法建库、采用HiSeq 2000平台测序,采用DESeq2、Wilcoxon rank sum test等分析方法,筛选耐药及其亲代细胞的差异m⁶A甲基化调控因子。

1.2.6 CCK-8 取对数生长期的各组细胞,计数后制备细胞悬液(5×10⁴个/mL),取100 μL细胞悬液接种于96孔板,培养过夜后加入不同浓度的OXA处理,每组3个复孔,药物分别作用48 h后,各孔加入CCK-8试剂(终浓度为10%),37℃培养箱中继续孵育2 h,使用酶标仪检测各孔450 nm处吸光度值。

1.2.7 腺病毒感染 取对数生长期的HCT116细胞接种于6孔板中培养过夜,第2天细胞密度达40%~60%为宜,选定感染复数为20,依据腺病毒滴度和铺板的细胞数计算病毒液的体积,将培养基更换为含DMEM培养基(无双抗)、病毒液和Polybrene(终浓度1 μg/mL)的新鲜培养基,24 h后更换新鲜培养基,继续培养至感染48 h收集细胞,验证感染效率并进行后续实验操作。

1.2.8 qRT-PCR 收集各组细胞沉淀重悬于100 μL PBS,按照试剂盒步骤提取总RNA,测定浓度及纯度,按照逆转录试剂盒说明进行逆转录,逆转录体系为5× RT Buffer 2 μL,

Enzyme 0.5 μL, Primer 0.5 μL; 逆转录程序设置:37℃ 30 min, 85℃ 5 s。逆转录完成后进行qPCR,体系为SYBR Green 5 μL、上游引物0.2 μL、下游引物0.2 μL,Cdna 1 μL、无酶水3.6 μL,共10 μL;程序设置:95℃ 30 s后,95℃ 5 s,60℃ 30 s,39次循环。使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算相对表达量,引物序列见表1。

1.2.9 Western blot 收集各组细胞沉淀,使用RIPA细胞裂解液(含1%PMSF)提取细胞总蛋白,每个泳道内加入适量蛋白样品及Marker,经SDS-PAGE电泳后,于200 mA恒流条件下进行转模,5%BSA室温封闭1 h,再加入适量METTL3及GAPDH一抗(1:1 000稀释),4℃孵育过夜,用TBST洗3遍,加入二抗(1:5 000稀释)室温孵育1 h,再用TBST洗3遍,每次10 min,最后用ECL发光试剂A液和B液以1:1比例配置进行曝光显影。

1.2.10 METTL3 表达与结直肠癌患者预后关系的分析 利用HPA网页工具(<https://www.proteinatlas.org/>)分析TCGA数据库中METTL3的mRNA表达量对Ⅲ、Ⅳ期结直肠癌患者总体生存率的影响。

1.2.11 多组学联合分析 GSE130012数据集是在HCT116细胞中沉默METTL3进行MeRIP-seq和RNA-seq得到的测序数据。根据GSE130012数据集上传的RNA-seq的Count表达矩阵以及MeRIP-seq获得的差异m⁶A修饰位点关联基因,筛选原则为|log₂FC|>0.3,且P<0.05。联合HCT116/OXA细胞的RNA-seq数据,筛选METTL3介导的m⁶A修饰调控的耐药相关的基因,根据差异分析结果,借助clusterProfiler R包进行KEGG分析。

1.3 统计学处理

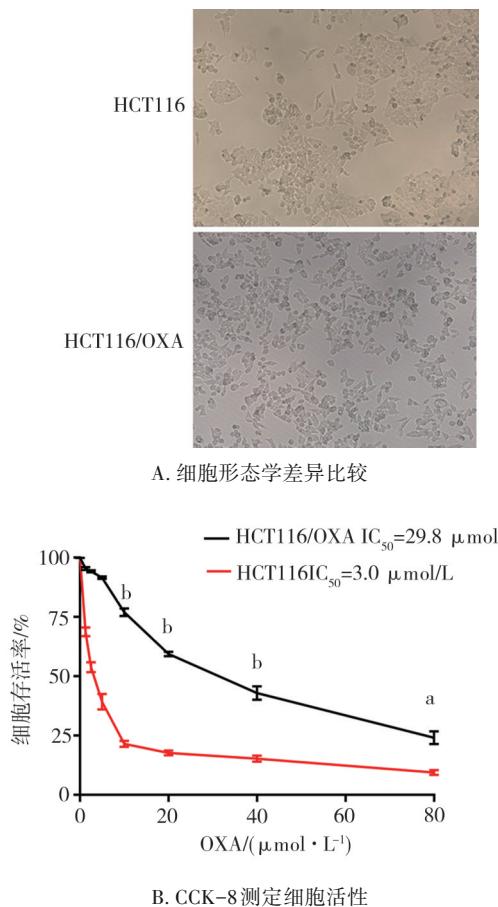
本实验使用Graph-Pad Prism 8.0.2软件进行统计分析。所涉及的数据采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。正态分布的两样本均数间比较使用t检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 HCT116/OXA细胞的耐药性分析

倒置显微镜明场下观察HCT116及HCT116/OXA两株

细胞,与HCT116细胞相比,100×镜下见HCT116/OXA细胞间隙增大、细胞离散、细胞出现伪足(图1A)。不同浓度OXA作用48 h后,CCK-8检测结果显示在相同浓度OXA处理时,HCT116/OXA的细胞存活率均明显高于其亲代细胞($P<0.01$),HCT116、HCT116/OXA细胞的IC₅₀分别为3.0 μmol/L、29.8 μmol/L(图1B),表明HCT116/OXA细胞对OXA具有一定的抗性,提示耐药细胞建立成功。



注:a,与HCT116组相比, $P<0.01$;b:与HCT116组相比, $P<0.001$

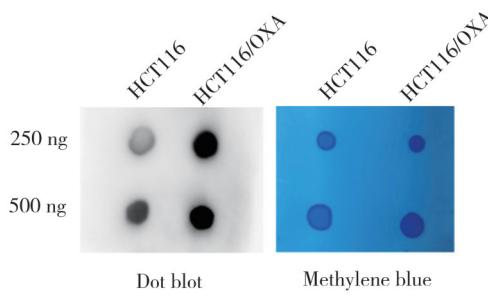
图1 HCT116/OXA细胞的耐药性分析

表1 qRT-PCR引物序列

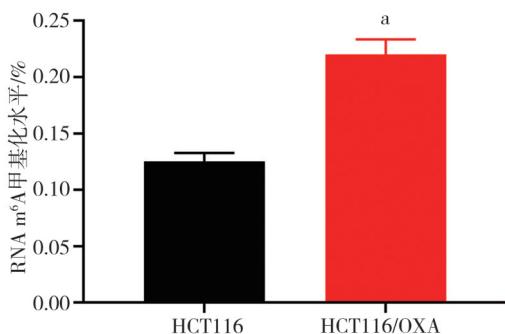
名称	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')
METTL3	ATCCCCAAGGCTTCAACCAG	GCGAGTGCCAGGAGATAGTC
METTL14	GAGTGTGTTACGAAATGGGGT	CCGCTGTGCTACGCTTCA
METTL16	CTCTGACCGTGTACTCTCCTAAGG	TACCAGCCATTCAAGGTTGCT
RBM15	GGCTGCCTGAGGAGAGTGGAG	CGGCTACTGCTCAATTCTGGACTG
RBM15B	TGAGGAACGGAGTAGGACCAA	CTCGCTGTCTTGCCTTCT
VIRMA	CTTGGCAAGTGGCTGAACC	ACGTAAGGCACTGGTAAGGC
WTAP	ACTGGCCTAACGAGAGTCTGAAG	GTTGCTAGTCGCATTACAAGGA
ZC3H13	AAAGGAGGGTTCACCAAGAGT	CGCTICGGAGATTGCTAGAC
ALKBH5	CGGCGAAGGCTACACTTACCG	CCACCAGCTTTGGATCACCA
FTO	GCTGCTTATTCGGGACCTG	AGCCTGGATTACCAATGAGGA
GAPDH	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC	TGGTGAAGACGCCAGTGGAA

2.2 HCT116/OXA 细胞 RNA m⁶A 水平较其亲代细胞株升高

采用 Dot blot 检测结直肠癌 OXA 耐药及其亲代细胞 RNA m⁶A 水平, Dot blot 结果显示与亲代细胞相比,HCT116/OXA 细胞的 m⁶A 斑点印记灰度值更高(图 2A),且 m⁶A RNA 甲基化定量 ELISA 实验结果显示 HCT116 与 HCT116/OXA 细胞 RNA m⁶A 水平分别为 0.12%、0.22%,OXA 耐药细胞中 RNA m⁶A 水平明显升高($P<0.01$)(图 2B)。



A. Dot blot 检测细胞 RNA m⁶A 水平



注:a,与 HCT116 组相比, $P<0.01$

B. m⁶A RNA 甲基化定量实验检测 RNA m⁶A 水平

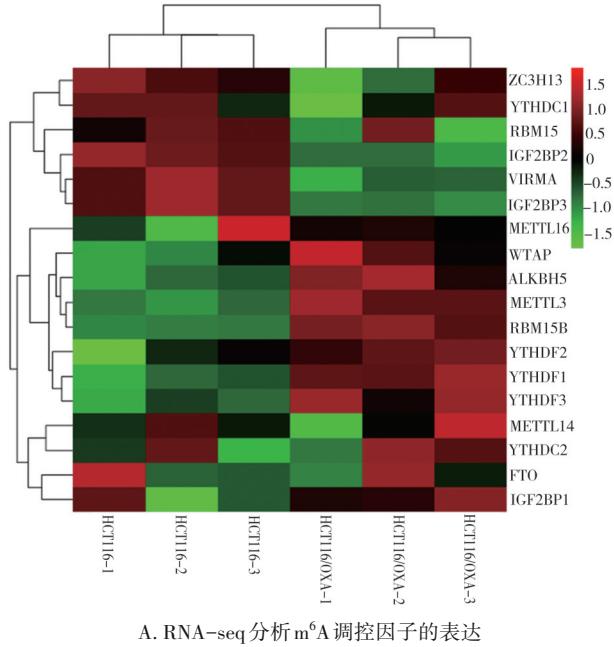
图 2 HCT116/OXA 及亲代细胞 RNA m⁶A 水平

2.3 m⁶A 甲基化调控因子表达的差异分析

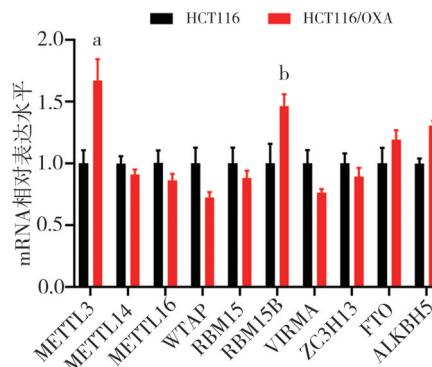
通过 RNA-seq 对 OXA 耐药细胞的 m⁶A 调控因子进行差异分析,以 $P<0.01$ 且 $\log_{2}FC>0.5$ 为差异标准,结果显示耐药细胞中 METTL3 和 RBM15B 明显上调(图 3A);进一步通过 qRT-PCR 验证 m⁶A 甲基转移酶的表达,结果显示 OXA 耐药细胞中 METTL3 和 RBM15B 的 mRNA 表达增加($P<0.05$),与测序结果一致,且 METTL3 升高更明显(图 3B);Western blot 结果进一步证实耐药细胞中 METTL3 蛋白表达增加(图 3C)。提示 OXA 耐药细胞中 m⁶A 修饰水平上调与 METTL3 的异常升高有关。因此选择 METTL3 进行后续的研究。

2.4 腺病毒感染后 METTL3 的表达变化

利用腺病毒感染的方法在 HCT116 细胞中过表达 METTL3,qRT-PCR 验证其过表达效率的结果显示(图 4A),过表达 METTL3 组(Ad-METTL3)细胞中 METTL3 的 mRNA 表达较转染空载腺病毒的对照组细胞(Ad-NC)升高 206.2 倍($P<0.001$),且 Western blot 结果显示 Ad-METTL3 组 METTL3 蛋白表达明显升高(图 4B),表明腺病毒感染过表达效果较好。

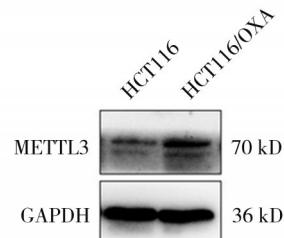


A. RNA-seq 分析 m⁶A 调控因子的表达



注:a,与 HCT116 组相比, $P<0.05$;b:与 HCT116 组相比, $P<0.01$

B. qRT-PCR 检测 m⁶A 调控因子 mRNA 的表达

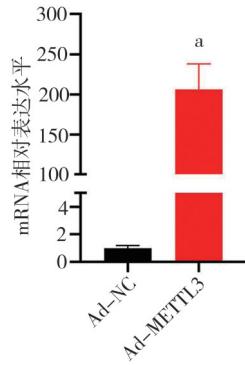


C. Western blot 检测 METTL3 蛋白的表达

图 3 m⁶A 调控因子表达的差异分析

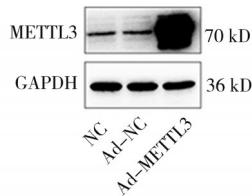
2.5 过表达 METTL3 增强 HCT116 细胞的 OXA 耐药性

在 HCT116 细胞过表达 METTL3 后,CCK-8 检测 OXA 处理 48 h 的细胞活力,结果显示,过表达 METTL3 明显增强了 HCT116 细胞的存活率($P<0.01$),与转染空载腺病毒的 Ad-NC 组相比,Ad-METTL3 组细胞的 IC_{50} 由 3.7 $\mu\text{mol/L}$ 升高到 26.5 $\mu\text{mol/L}$ (图 5)。



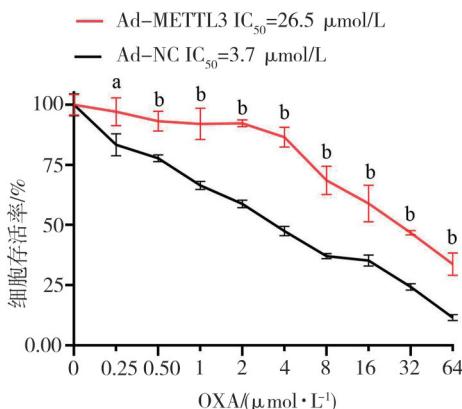
注:a,与 Ad-NC 相比, $P < 0.001$

A. qRT-PCR 验证 METTL3 过表达效率



B. Western blot 验证 METTL3 过表达效率

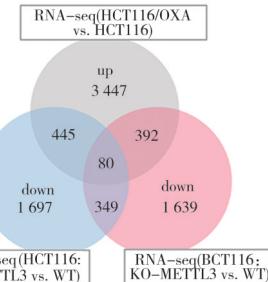
图4 验证腺病毒感染后 METTL3 过表达效率



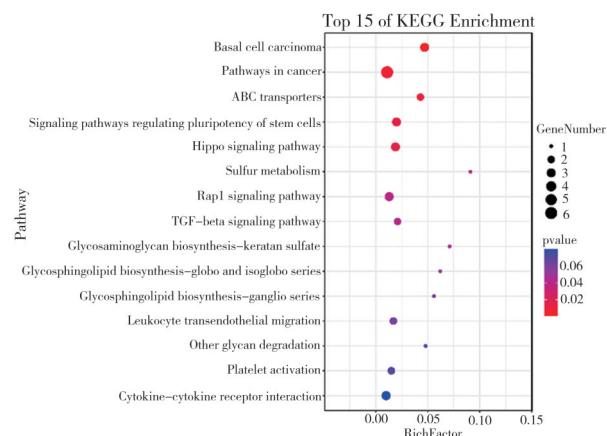
注:a,与 Ad-NC 相比, $P < 0.01$; b:与 Ad-NC 相比, $P < 0.001$

图5 HCT116 亲代细胞株过表达 METTL3 后的细胞存活率曲线

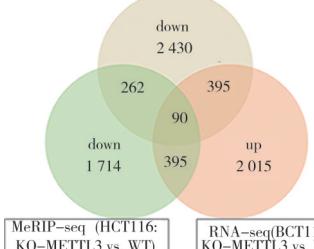
2.6 METTL3 介导的 m⁶A 修饰下游靶基因及信号通路分析
为寻找 METTL3 介导 m⁶A 修饰调控 OXA 耐药的下游基因, 对 GSE130012 数据集中沉默 METTL3 的 HCT116 细胞的 MeRIP-seq 和 RNA-seq 测序数据联合分析。筛选得到沉默 METTL3 后 m⁶A 修饰及其转录水平明显下调的基因 429 个, 与 RNA-seq 中 HCT116/OXA 细胞特异性上调的基因进行 Overlap 分析, 获得 METTL3 介导 m⁶A 修饰正向调控的与耐药相关的基因 80 个(图 6A)。KEGG 分析显示, 差异基因主要与 ABC 转运蛋白、干细胞多能性调节信号通路、TGF-β 信号通路等通路明显正相关($P < 0.05$)(图 6B)。筛选得到沉默 METTL3 后 m⁶A 修饰明显下调且转录水平上调的基因 595 个, 与 RNA-seq 中 HCT116/OXA 细胞特异性下调的基因进行 Overlap 分析, 获得 METTL3 介导 m⁶A 修饰负向调控的与耐药相关的基因 90 个(图 6C)。KEGG 分析显示, 负向调控的下游基因主要富集在 AMPK 信号通路、自噬等通路(图 6D)。



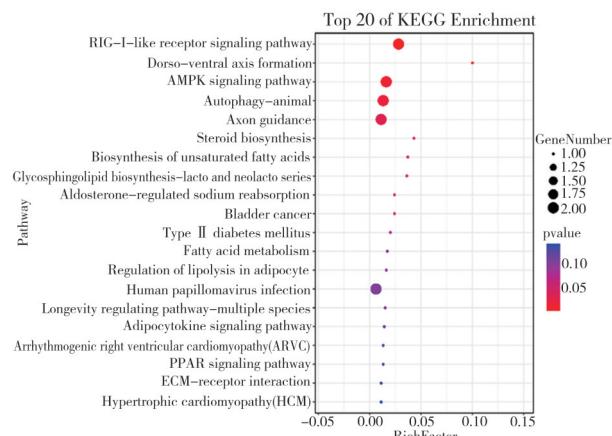
A. METTL3 介导 m⁶A 修饰正向调控的靶基因筛选



B. 正向调控的下游靶基因 KEGG 分析



C. METTL3 介导 m⁶A 修饰负向调控的靶基因筛选



D. 负向调控的下游靶基因 KEGG 分析

图6 METTL3 介导的 m⁶A 修饰下游靶基因及信号通路分析

2.7 METTL3 表达与结直肠癌患者预后关系的分析

利用 HPA 网页在线分析 TCGA 数据库中 METTL3 的表达量对Ⅲ、Ⅳ期结直肠癌患者生存的影响,结果表明(图 7),在 440 例结直肠癌患者中,METTL3 高表达的患者的总体生存率明显低于其低表达组($P < 0.01$)。

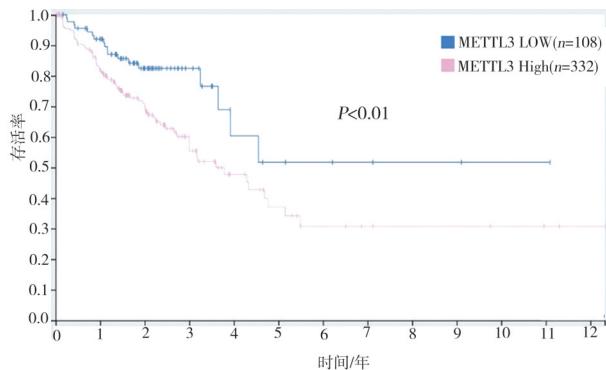


图 7 METTL3 表达与患者预后相关

3 讨 论

m^6A 修饰是真核生物 RNA 中最丰富的转录后修饰,主要发生于 3' UTR、终止密码子及长外显子附近的特定保守性序列的腺嘌呤第 6 位 N 上,由 m^6A 甲基转移酶、去甲基化酶和甲基化阅读蛋白共同调节^[10-11]。近年研究表明, m^6A 修饰通过调节癌基因或抑癌基因 RNA 代谢过程,参与调控多种肿瘤发生进展及耐药^[12],但其在结直肠癌 OXA 化疗耐药中的作用尚不清楚。本研究成功建立结直肠癌 OXA 耐药细胞 HCT116/OXA,细胞形态学和细胞增殖活性均表明 HCT116/OXA 细胞株对 OXA 具有一定抗性,并且发现结直肠癌 OXA 耐药细胞中 RNA m^6A 水平较其亲代细胞明显升高,提示结直肠癌细胞对 OXA 的耐药性与其 m^6A 修饰水平呈一定的相关性。

为进一步探索引起 m^6A 修饰变化的 m^6A 甲基化调控因子,通过 RNA-seq 筛选耐药及其亲代细胞差异 m^6A 调控因子,并通过 qRT-PCR 和 Western blot 验证发现 OXA 耐药细胞中 METTL3 表达水平明显升高。METTL3 是 m^6A 甲基转移酶复合体的核心组成成分,主要介导催化 RNA 发生 m^6A 修饰,是调控 RNA m^6A 修饰水平的关键调控因子^[13]。已有研究证明 METTL3 在结直肠癌中高表达,既可以通过激活 m^6A -GLUT1-mTORC1 轴^[14],也可以增加 HK2 和 SLC2A1 的 m^6A 修饰稳定其表达^[15],进而促进结直肠癌进展。本研究结果提示 METTL3 的异常表达是影响 OXA 耐药细胞内 RNA 的 m^6A 水平异常升高的关键

调控因子,可能在结直肠癌 OXA 耐药中发挥重要作用。随后在 HCT116 细胞进行 METTL3 过表达,以揭示其表达水平变化对 OXA 耐药的影响,结果表明过表达 METTL3 能够促进结直肠癌细胞 OXA 化疗耐药。值得一提的是,本研究首次证实 METTL3 在结直肠癌 OXA 化疗耐药中的调控作用,为逆转 OXA 耐药提供新的研究靶点。

肿瘤化疗耐药的产生是一个涉及多基因参与、表观遗传学异常、信号通路调控的复杂过程。为了进一步研究 METTL3 介导的 m^6A 修饰通过何种机制影响 OXA 化疗耐药,通过 GEO 数据库中沉默 METTL3 的 HCT116 细胞 MeRIP-seq 和 RNA-seq 测序数据以及 OXA 耐药细胞的 RNA-seq 联合分析。已有研究证实 METTL3 介导的 m^6A 修饰对 mRNA 代谢的调控作用需要特定的阅读蛋白介导,既可以通过 IGF2BPs 依赖的 m^6A 修饰增强 mRNA 的稳定性促进其表达^[16],也可以通过 YTHDF2 介导 mRNA 降解抑制其表达^[17]。本研究通过联合分析,结果表明 METTL3 介导 m^6A 修饰正向调控的与耐药相关的基因主要富集在 ABC 转运蛋白、干细胞多能性调节信号通路、TGF-β 信号通路等,METTL3 介导 m^6A 修饰负向调控的与耐药相关的基因与 AMPK 信号通路、自噬等信号通路明显相关。越来越多的研究证明,ABC 转运蛋白介导的药物外排^[18]、TGF-β 信号通路介导的 EMT^[19]与化疗耐药密切相关。也有研究报道 METTL3 介导的 CBX8 mRNA 的 m^6A 修饰调节结肠癌细胞的干性影响化疗敏感性^[20]。据此推测,METTL3 介导的 m^6A 修饰可能通过调节 ABC 转运蛋白、调节干细胞多能性的信号通路、TGF-β 信号通路等经典耐药信号通路促进结直肠癌 OXA 耐药,但其下游具体调控的靶基因和信号通路均需进一步实验证实。

目前还没有临床验证的有效标志物用来预测 OXA 的化疗反应,导致相当大比例的患者在忍受 OXA 化疗的毒副作用却没有临床治疗效果。因此,寻找有效预测标志物指导治疗决策至关重要,是改善患者预后的关键。RNA m^6A 修饰水平及其调控因子的异常表达可为肿瘤的诊断、预后预测提供参考依据,有望成为临床最有前景的肿瘤新型分子标志物^[21]。例如,有研究表明 m^6A 调控因子在小细胞肺癌中可作为耐药预测的标志物^[22]。本研究证实 METTL3 介导 m^6A 修饰在 OXA 耐药中起关键作用,而且通过分析 TCGA 数据库中 METTL3 表达对Ⅲ、Ⅳ 期结直肠癌患者生存的影响,发现 METTL3 高表达的患者预后较差,且有研究证实结直肠癌 OXA 耐

药组织中 METTL3 表达水平较敏感组织明显升高^[23], 含 OXA 的标准化疗方案对 METTL3 高表达的患者治疗效果较差^[16]。这一结果提示 METTL3 可能有潜力作为结直肠癌 OXA 化疗耐药预测及预后预测标志物, 但仍需进一步通过临床样本证明其作为标志物的可行性。

综上所述, 本研究证实了 RNA m⁶A 修饰及其调控因子 METTL3 在结直肠癌 OXA 耐药细胞中明显上调, 过表达 METTL3 促进结直肠癌细胞 OXA 耐药, 并探讨了其下游机制可能与 ABC 转运蛋白、干细胞多能性调节信号通路、TGF-β 信号通路有关。这一研究结果为从 mRNA 表观遗传学角度揭示结直肠癌 OXA 耐药的新机制提供实验依据, 也为克服 OXA 化疗耐药提供新思路, 同时为新型耐药预测标志物的发现提供重要依据。

参 考 文 献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209–249.
- [2] Sun W, Li JL, Zhou LK, et al. The c-Myc/miR-27b-3p/ATG10 regulatory axis regulates chemoresistance in colorectal cancer[J]. Theranostics, 2020, 10(5): 1981–1996.
- [3] Benson AB, Venook AP, Al-Hawary MM, et al. Colon cancer, version 2. 2021, NCCN clinical practice guidelines in oncology[J]. J Natl Compr Canc Netw, 2021, 19(3): 329–359.
- [4] Cremolini C, Schirripa M, Antoniotti C, et al. First-line chemotherapy for mCRC: a review and evidence-based algorithm[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2015, 12(10): 607–619.
- [5] Siegel RL, Miller KD, Goding Sauer A, et al. Colorectal cancer statistics, 2020[J]. CA Cancer J Clin, 2020, 70(3): 145–164.
- [6] Deng XL, Su R, Weng HY, et al. RNA N⁶-methyladenosine modification in cancers: current status and perspectives[J]. Cell Res, 2018, 28(5): 507–517.
- [7] Li BW, Jiang JW, Assaraf YG, et al. Surmounting cancer drug resistance: new insights from the perspective of N⁶-methyladenosine RNA modification[J]. Drug Resist Updat, 2020, 53: 100720.
- [8] Lin ZY, Niu Y, Wan A, et al. RNA m⁶A methylation regulates sorafenib resistance in liver cancer through FOXO3⁻ mediated autophagy[J]. EMBO J, 2020, 39(12): e103181.
- [9] Jin D, Guo JW, Wu Y, et al. m⁶A mRNA methylation initiated by METTL3 directly promotes YAP translation and increases YAP activity by regulating the MALAT1-miR-1914-3p-YAP axis to induce NSCLC drug resistance and metastasis[J]. J Hematol Oncol, 2021, 14(1): 32.
- [10] Liu N, Pan T. N⁶-methyladenosine-encoded epitranscriptomics [J]. Nat Struct Mol Biol, 2016, 23(2): 98–102.
- [11] Huang HL, Weng HY, Chen JJ. m⁶A modification in coding and non-coding RNAs: roles and therapeutic implications in cancer[J]. Cancer Cell, 2020, 37(3): 270–288.
- [12] Lan Q, Liu PY, Bell JL, et al. The emerging roles of RNA m⁶A methylation and demethylation as critical regulators of tumorigenesis, drug sensitivity, and resistance[J]. Cancer Res, 2021, 81(13): 3431–3440.
- [13] Barbieri I, Tzelepis K, Pandolfini L, et al. Promoter-bound METTL3 maintains myeloid leukaemia by m⁶A-dependent translation control[J]. Nature, 2017, 552(7683): 126–131.
- [14] Chen HR, Gao SS, Liu WX, et al. RNA N⁶-methyladenosine methyltransferase METTL3 facilitates colorectal cancer by activating the m⁶A-GLUT1-mTORC1 axis and is a therapeutic target[J]. Gastroenterology, 2021, 160(4): 1284–1300.e16.
- [15] Shen CQ, Xuan BQ, Yan TT, et al. m⁶A-dependent glycolysis enhances colorectal cancer progression[J]. Mol Cancer, 2020, 19(1): 72.
- [16] Li T, Hu PS, Zuo ZX, et al. METTL3 facilitates tumor progression via an m⁶A-IGF2BP2-dependent mechanism in colorectal carcinoma[J]. Mol Cancer, 2019, 18(1): 112.
- [17] Zhou D, Tang WW, Xu YD, et al. METTL3/YTHDF2 m⁶A axis accelerates colorectal carcinogenesis through epigenetically suppressing YPEL5[J]. Mol Oncol, 2021, 15(8): 2172–2184.
- [18] Chen ZJ, Wu L, Zhou JW, et al. N⁶-methyladenosine-induced ERR γ triggers chemoresistance of cancer cells through upregulation of ABCB1 and metabolic reprogramming[J]. Theranostics, 2020, 10(8): 3382–3396.
- [19] Tripathi V, Shin JH, Stuelten CH, et al. TGF-β-induced alternative splicing of TAK1 promotes EMT and drug resistance[J]. Oncogene, 2019, 38(17): 3185–3200.
- [20] Zhang Y, Kang M, Zhang B, et al. m⁶A modification-mediated CBX8 induction regulates stemness and chemosensitivity of colon cancer via upregulation of LGR5[J]. Mol Cancer, 2019, 18(1): 185.
- [21] 李丹丹, 汪俊军. RNA m⁶A 修饰检测及作为肿瘤新型分子标志物的临床应用前景[J]. 中华检验医学杂志, 2021, 44(6): 466–469.
- [22] Li DD, Wang JJ. Detection of RNA m⁶A modification and its clinical application prospect as a novel molecular marker of tumor[J]. Chin J Lab Med, 2021, 44(6): 466–469.
- [23] Zhang ZH, Zhang CQ, Yang ZY, et al. m⁶A regulators as predictive biomarkers for chemotherapy benefit and potential therapeutic targets for overcoming chemotherapy resistance in small-cell lung cancer [J]. J Hematol Oncol, 2021, 14(1): 190.
- [24] Lan HR, Liu YY, Liu JL, et al. Tumor-associated macrophages promote oxaliplatin resistance via METTL3-mediated m⁶A of TRAF5 and necroptosis in colorectal cancer[J]. Mol Pharmaceutics, 2021, 18(3): 1026–1037.

(责任编辑:唐秋姗)