

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.12.003

· 基础研究 ·

甲基转移酶样因子3通过调控 GLUT4-mTORC1 轴影响食管鳞状细胞癌细胞的糖酵解及增殖

周锡^{ab}, 钟晓武^{abc}, 高川力^a, 李青容^b, 程吉兵^b, 马强^{bc}, 郭晓兰^{abc} (川北医学院 a. 检验系; b. 检验科; c. 转化医学研究中心, 四川 南充 637000)

[摘要] **目的:** 探讨甲基转移酶样因子3(METTL3)在食管鳞状细胞癌(ESCC)组织和细胞中的表达水平及其对 ESCC 细胞糖酵解和增殖能力的影响和潜在的分子机制。 **方法:** 基于 TCGA 数据库分析 METTL3 在 ESCC 细胞中的表达及可能的富集通路。收集 2021 年 1 月至 2021 年 6 月间在北川医学院附属医院外科手术切除的 34 例 ESCC 组织及相应癌旁组织, 采用免疫组化法验证 ESCC 组织中 METTL3 的表达。采用 CCK-8 法和平板克隆形成实验检测干扰 METTL3 后 ESCC 细胞增殖能力的变化, 利用比色法检测干扰 METTL3 后 ESCC 细胞总 RNA 中 m⁶A 的表达水平, 采用甲基化 RNA 免疫沉淀定量 PCR (MeRIP-qPCR) 检测 METTL3 对葡萄糖转运蛋白 4 (GLUT4) 基因 mRNA 的 m⁶A 修饰水平的影响, 采用 WB 和 qPCR 等技术探索 METTL3 参与 ESCC 细胞糖酵解的生物学机制。 **结果:** METTL3 在 ESCC 组织以及细胞中均呈高表达 (均 $P < 0.001$)。干扰 METTL3 表达后, ESCC 细胞的增殖能力明显减弱、细胞内总 RNA 的 m⁶A 修饰水平显著降低 (均 $P < 0.001$)。此外, 干扰 METTL3 可显著抑制 KYSE150 和 TE-1 细胞中 GLUT4 基因 mRNA 的 m⁶A 修饰水平 (均 $P < 0.01$), 并通过下调 GLUT4 的表达抑制葡萄糖的摄取以及乳酸的释放 (均 $P < 0.01$), 最终下调 mTORC1 通路活性并抑制 ESCC 细胞的增殖; 在干扰 METTL3 的 ESCC 细胞同时联合运用 mTORC1 通路抑制剂显示有协同的抗癌作用。 **结论:** METTL3 介导的 m⁶A 修饰通过调控 GLUT4-mTORC1 信号轴影响 ESCC 细胞的糖酵解及增殖。

[关键词] 食管鳞状细胞癌; 甲基转移酶样因子3; 葡萄糖转运蛋白4; 糖酵解; mTORC1 通路

[中图分类号] R735.1; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2022)12-1076-11

Methyltransferase-like 3 affects glycolysis and proliferation of esophageal squamous cell carcinoma cells by regulating the GLUT4-mTORC1 axis

ZHOU Xi^{ab}, ZHONG Xiaowu^{abc}, GAO Chuanli^a, LI Qingrong^b, CHENG Jibing^b, MA Qiang^{bc}, GUO Xiaolan^{abc} (a. Department of Laboratory Medicine; b. Department of Clinical Laboratory; c. Translational Medicine Research Center, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression of methyltransferase-like 3 (METTL3) in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) tissue and cells and its effect on the glycolysis proliferation of ESCC cells as well as the potential molecular mechanisms. **Methods:** Based on the TCGA database, the expression of METTL3 and its possible enrichment pathway in ESCC were elucidated. Thirty-four ESCC tissues and corresponding paracancerous tissues were collected from surgical resections at the Affiliated Hospital of Beichuan Medical College between January 2021 and June 2021, the expression of METTL3 in ESCC tissues was verified by immunohistochemistry. The CCK-8 and colony formation assay were used to evaluate the change in the proliferation ability of ESCC cells after METTL3 knockdown. The expression level of m⁶A in total RNA of ESCC cells after METTL3 knockdown was detected by colorimetric method. Methylated RNA immunoprecipitation qPCR (MeRIP-qPCR) was used to detect the effect of METTL3 on the m⁶A modification level of glucose transporter 4 (GLUT4) mRNA. The biological mechanisms of METTL3 in the glycolysis metabolism of ESCC were evaluated using WB and qPCR. **Results:** The expression level of METTL3 was significantly increased in ESCC tissues as well as cell lines (all $P < 0.001$). After the knockdown of METTL3, the proliferation ability of ESCC cells was significantly reduced, and the m⁶A modification level of total RNA was significantly reduced (all $P < 0.001$). In addition, knockdown of METTL3 significantly inhibited the m⁶A modification level of GLUT4 mRNA in KYSE150 and TE-1 cells (all $P < 0.01$), inhibited glucose uptake and lactate release by down-regulating GLUT4 expression (all $P < 0.01$), and finally down-regulated the activity of mTORC1 pathway and inhibited

[基金项目] 四川省应用基础研究计划项目 (No.2021YJ0202)

[作者简介] 周锡 (1996—), 男, 硕士, 检验技师, 主要从事食管鳞癌发生发展的机制及治疗的研究, E-mail: 1213736081@qq.com

[通信作者] 郭晓兰, E-mail: alan5200@hotmail.com

the proliferation of ESCC cells. Moreover, a synergetic effect was found in METTL3-depleted ESCC cells combined with mTORC1 pathway inhibitor. **Conclusion:** METTL3-mediated m⁶A modification promotes glycolysis and proliferation of ESCC cells by regulating the GLUT4-mTORC1 signaling axis.

[Key words] esophageal squamous cell carcinoma (ESCC); methyltransferase-like 3 (METTL3); glucose transporter 4 (GLUT4); glycolysis; mTORC1 pathway

[Chin J Cancer Biother, 2022, 29(12): 1076-1086. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.12.003]

食管癌是全球范围内的常见恶性肿瘤,其发病率和病死率分别位列所有恶性肿瘤的第七位和第六位^[1]。在亚洲国家,食管癌的组织学亚型主要为食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC),约占食管癌的95%^[2]。尽管ESCC的诊断和治疗取得了显著的突破^[3],ESCC患者的预后仍然较差,5年生存率不足15%^[4],主要的原因是其发病机制尚未完全阐明。N⁶-甲基腺苷(N⁶-methyladenosine, m⁶A)修饰是最常见的RNA修饰之一^[5]。m⁶A甲基转移酶中最重要的成分是甲基转移酶样因子3(methyltransferase-like 3, METTL3)^[6]。近年的研究结果显示,METTL3与多种人类癌症有关,包括宫颈癌^[7]、结直肠癌^[8]、卵巢癌^[9]、肺腺癌^[10]等。METTL3参与癌细胞增殖^[11]、凋亡^[12]、侵袭和迁移^[13]、自噬^[14]以及代谢^[15]等多种生物学进程。然而,METTL3在ESCC发生发展中的生物学作用和分子机制鲜有研究报道。本研究检测METTL3在ESCC组织和细胞中的表达水平,并通过功能学实验阐明其对ESCC细胞增殖能力的影响和可能的分子机制,以期为ESCC的治疗提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 主要实验用试剂

DMEM培养基、胎牛血清和青链霉素均购自美国Gibco公司,免疫组化染色SABC-POD试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司,TRIzol试剂购自美国赛默飞公司,反转录试剂盒和TB Green Premix试剂盒购自日本TaKaRa公司,RIPA购自中国上海碧云天生物有限公司,METTL3兔单克隆抗体、mTOR兔单克隆抗体、p-mTOR兔单克隆抗体、p-S6K1兔单克隆抗体、p-4E-BP1兔单克隆抗体购自美国CST生物公司,葡萄糖转运蛋白4(glucose transporter 4, GLUT4)兔单克隆抗体购自中国华安生物技术有限公司,细胞转染试剂Lipofectamine 2000购于美国Invitrogen公司,嘌呤霉素购于美国赛默飞公司,m⁶A RNA甲基化定量检测试剂盒(比色法)购自英国Abcam公司,EpiQuik™ CUT&RUN m⁶A RNA富集(MeRIP)试剂盒购自艾维缔科技怀来有限公司,CCK-8试剂盒购自日本Dojindo公司,葡萄糖检测试剂盒购自中国普利莱基因技术有限公司,乳酸检测

试剂盒购自中国凯基生物技术有限公司,mTOR抑制剂雷帕霉素购自德国Sigma公司。

1.2 ESCC组织标本收集和细胞培养

本研究共纳入34例于2021年1月至2021年6月间在川北医学院附属医院胸外科首次就诊的ESCC患者,患者样本经组织病理确诊,收集ESCC组织及对应癌旁组织。排除标准是接受过术前化疗、放疗或靶向治疗的患者。本研究获得了所有患者的知情同意并签署知情同意书,研究方案获得川北医学院附属医院医学伦理委员会批准[2019 ER(R)061-01],患者的一般临床特征见表1。人ESCC细胞KYSE150、TE-1、ECA109及人正常食管上皮细胞HET-1A均由川北医学院转化医学研究中心提供。所有细胞均培养于含10%胎牛血清的DMEM培养皿中,并置于37℃、含5%CO₂的细胞培养箱中静置培养。

1.3 免疫组织化学染色法检测METTL3在ESCC组织中的表达

将组织样本放入4%多聚甲醛中固定,经脱水、包埋后制成石蜡切片,梯度乙醇脱水,使用柠檬酸盐进行抗原修复,再滴加10%的山羊血清封闭,加入稀释比例为1:250的METTL3兔抗人单克隆抗体反应过夜,依次使用抗兔IgG二抗、DAB染色和苏木精复染处理切片。由两名病理科医生通过倒置显微镜观察,高倍镜下每个视野计数100个肿瘤细胞,每张切片观察5个视野,对阳性细胞染色强度和阳性细胞染色占比进行评分。染色结果判读:(1)染色强度评分为0分(无染色)、1分(弱)、2分(中)以及3分(强);(2)阳性细胞百分数评分:≤10%为0分、>10%~≤25%为1分、>25%~≤50%为2分、>50%~≤75%为3分、>75%以上为4分。由染色强度评分乘以阳性细胞评分得到每视野免疫组化评分,取平均值。并根据免疫组化评分将其分为METTL3高表达(≥4分)和METTL3低表达(<4分)两组。

1.4 生物信息学分析

患者临床信息以及基因表达数据源自TCGA数据库(<http://www.cancer.gov>),共收集184例TCGA食管癌患者、11个正常食管组织样本的数据,分析METTL3基因mRNA在两组中的表达差异。基于TCGA数据库的在线软件TIMER2.0(<http://timer.cistrome.org/>)分析基因在肿瘤和癌旁组织之间的差

异表达,使用 Gene_DE 模块进行分析,以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。利用 STRING 数据库(<https://string-db.org/>)构建蛋白质-蛋白质相互作用网络。功能富集分析采用 DAVID 数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>),进行基因本体(GO)分析和京都基因和基因组百科全书(KEGG)分析,使用 R 软件中的 ClusterProfiler 软件包对富集结果可视化,以标准误检率(FDR) < 0.05 、 $P < 0.01$ 为阈值,表示差异有统计学意义。使用 R 软件中的 ClusterProfiler 和 ggplot2 软件包进行基因富集分析,通过对 81 个从 TCGA 获得的 ESCC 组织进行 METTL3 基因的生物学功能分析,以 $|NES| > 1$ 和 $P < 0.05$ 为阈值对富集途径进行分类,当满足上述条件时,认为通路显著富集。利用在线数据分析软件 GEPIA(<http://gepia.cancer-pku.cn>)分析 METTL3 在 ESCC 组织中与葡萄糖转运蛋白家族相关基因之间的基因相关性,利用 Spearman 统计方法计算相关系数,以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

1.5 qPCR 法检测 ESCC 细胞中相关基因的表达

采用 TRIzol 试剂提取 ESCC 细胞的总 RNA。用随机引物和反转录试剂盒从总 RNA 中提取 $1 \mu\text{g}$ 反转录为 cDNA,反转录成最终体积为 $10 \mu\text{L}$ 的 cDNA。采用 TB Green Premix 试剂盒进行 qPCR。GAPDH 作为内源性标准对照进行 mRNA 检测。本研究使用的引物均购自上海生工生物工程股份有限公司, METTL3 的正向引物为 5'-TTGTCTCCAACCT TCCGTAGT-3',反向引物为 5'-CCAGATCAGAGAG GTGGTGTAG-3'; GLUT4 的正向引物为 5'-TGG GCGGCATGATTCCTC-3',反向引物为 5'-GCC AGGACATTGTTGACCAG-3'; GAPDH 的正向引物为 5'-AGCCTCAAGATCATCAGC-3',反向引物为 5'-GAGTCCTTCCACGATAACC-3'。每个样本设 3 个复孔,重复 3 次,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 mRNA 的相对表达量。

1.6 WB 法检测 ESCC 细胞中相关蛋白的表达

将转染后的各组 ESCC 细胞用 RIPA 裂解液裂解 15 min, RIPA 裂解液含有蛋白酶抑制剂用于裂解细胞总蛋白,离心并收集上清液。采用双喹啉酸测定试剂盒(美国赛默飞生物公司)对蛋白裂解液进行定量。采用 8%~12% 的 SDS-PAGE 分离蛋白提取物,转移到 PVDF 膜上,用 5% 浓度的牛奶密封, 37°C 下 2 h。PVDF 膜与一抗在 4°C 下反应过夜后,与 HRP 标记抗兔二抗在室温下反应 2 h。最后使用 Pierce ECL 显色液显示蛋白条带并检测其灰度值。

1.7 慢病毒感染法构建干扰 METTL3 或过表达 GLUT4 基因的 ESCC 细胞

METTL3 干扰质粒 pHHLV-H1-mCherry-BSD-T2A-shMETTL3(序列: shM3-1: GCCAAGGAACAA

TCCATTGTT、shM3-2: GCAAGTATGTTCACTATG AAA)及其对照组质粒 pHHLV-H1-mCherry-BSD-T2A-shNC(序列: TTCTCCGAACGTG TCACGT)均由上海海吉浩格生物技术有限公司合成。转染步骤按照 Lipofectamine 2000 说明书进行,将目的质粒以及包装质粒(PMD、VSVG、REV)共转染至 293T 细胞中,8 h 后更换新的完全培养基,继续培养 48 h 后收集病毒上清。选择生长状态良好的 KYSE150 和 TE-1 细胞,将细胞接种于 6 孔板,细胞密度达到 50% 后,将慢病毒感染 KYSE150 和 TE-1 细胞,同时加入 $6\sim 8 \mu\text{g/mL}$ 聚凝胺增强感染效率。在 DMEM 培养基中培养 6 h 后更换为含 10% 胎牛血清的新 DMEM 培养基,培养 24 h 后加入 2.0 mg/mL 嘌呤霉素筛选至少 2 周,获得稳定干扰 METTL3 的 ESCC 细胞。采用 qPCR 和 WB 法检测转染效率。GLUT4 的过表达质粒 HBLV-h-GLUT4-3xflag-ZsGreen-puro(OE-GLUT4)及其过表达对照质粒 HBLV-ZsGreen-puro(OE-NC)均由上海汉恒生物科技有限公司合成。根据制造商的说明,在 293T 细胞中通过转染试剂 Lipofectamine 2000 将目的质粒以及包装质粒包装为慢病毒,转染 48 h 后显微镜视野下观察荧光,并收集上清液并浓缩病毒。将 2.5×10^5 个稳定干扰 METTL3 的 KYSE150 和 TE-1 细胞接种于 6 孔板中, GLUT4 过表达病毒以及阴性对照病毒感染细胞,加入嘌呤霉素筛选出稳定过表达的细胞,通过 WB 法验证过转染效率。

1.8 比色法测定总 RNA 中 m^6A 的表达水平

采用比色法 m^6A RNA 甲基化定量试剂盒检测细胞总 RNA 中 m^6A 水平。通过 TRIzol 试剂提取 ESCC 细胞的总 RNA,将 200 ng RNA、阳性对照以及阴性对照固定于微孔中,在 37°C 下静置 90 min。洗涤微孔后与抗 m^6A 的特异性抗体混合,室温静置 30 min。再次洗涤后加入 $100 \mu\text{L}$ 显色液,室温避光反应 5 min,加入终止液后在 450 nm 处测定光密度(D)值。根据以下公式计算 m^6A 在总 RNA 中的含量。

$$\text{m}^6\text{A}\% = [(D_{\text{Sample}} - D_{\text{NC}}) / S] / (D_{\text{PC}} - D_{\text{NC}}) / P \times 100\%$$

(NC 为阴性对照、PC 为阳性对照、S 为待测样本总 RNA 的上样量、P 为阳性对照的上样量)。

1.9 甲基化 RNA 免疫沉淀定量 PCR(MeRIP-qPCR)检测 m^6A RNA 表达水平

通过 TRIzol 试剂提取 ESCC 细胞的总 RNA,使用 EpiQuikTM CUT&RUN m^6A RNA 富集(MeRIP)试剂盒富集总 RNA 中含有 m^6A 的 RNA 片段,富集步骤按照说明书进行。在 $10 \mu\text{g}$ RNA 样本中加入 m^6A 抗体、亲和磁珠和免疫捕获缓冲液,在室温下反应 90 min,用以免疫捕获含有 m^6A 的 RNA 片段。以蛋

白酶 K 和 RNA 结合磁珠将 RNA 的剪切和纯化,最后将磁珠重悬于 13 μ L 洗脱缓冲液中,室温下反应 5 min,富集含有 m⁶A 的 RNA 片段。采用 GLUT4 引物对富集的 RNA 进行 qPCR 检测,以量化含 m⁶A RNA 的表达水平。

1.10 CCK-8 法和平板克隆形成实验检测干扰 METTL3 表达对 ESCC 细胞增殖的影响

采用 CCK-8 法试剂盒检测细胞增殖活力。将稳定干扰 METTL3 的 KYSE150 和 TE-1 细胞(1×10^4 个/孔)接种于 96 孔板中,在不同时间点分别加入 10 μ L 的 CCK-8 溶液,37 $^{\circ}$ C 下反应 2 h。使用酶标仪测定 450 nm 处的 *D* 值。当检测雷帕霉素联合 METTL3 干扰对 ESCC 细胞增殖能力影响时,细胞贴壁后在实验组中添 10 μ mol/L 以及 20 μ mol/L 的雷帕霉素处理细胞 72 h 后,测定细胞的增殖活力。所有的实验都重复了 3 次,绘制细胞增殖曲线。

采用平板克隆形成实验检测细胞克隆形成能力。将稳定干扰 METTL3 的 KYSE150 和 TE-1 细胞(3×10^4 个/孔)接种在 6 孔板中,在 37 $^{\circ}$ C 下培养 2 周以检测集落形成能力。当检测雷帕霉素联合 METTL3 干扰 ESCC 细胞的集落形成能力影响时,通过在实验组中添加 20 μ mol/L 雷帕霉素处理细胞 2 周后,将 6 孔板中的细胞用甲醇固定,通过 0.1% 的结晶紫染色,20 min 后用 PBS 冲洗 2 次,晾干后拍照。

1.11 转染细胞的葡萄糖消耗和乳酸释放量的检测

将稳定干扰的 KYSE150 和 TE-1 细胞(3×10^5 个/孔)接种于 6 孔板上,细胞贴壁后将培养液改为无血清的 DMEM 培养,24 h 后收集培养基,根据制造商的说明书,使用葡萄糖检测试剂盒和乳酸检测试剂盒分别测定培养基中的葡萄糖和乳酸浓度,最后计算出葡萄糖的相对消耗量和乳酸的相对释放量。

1.12 统计学处理

以上实验均独立重复 3 次。实验数据用统计学软件 SPSS 22.0 进行统计学分析,采用 GraphPad Prism 8 软件绘制结果图。符合正态分布的计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,配对数据采用配对 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析。以 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 METTL3 在 ESCC 组织和细胞中呈高表达

通过 TIMER 数据库系统分析 METTL3 mRNA 在多种癌症中的表达水平,结果(图 1A)显示,与癌旁组织相比,METTL3 mRNA 在包括食管癌在内的多种肿瘤中的表达水平升高。利用 TCGA 数据库验证食管癌患者中 METTL3 mRNA 的表达,与癌旁组织

相比,在食管癌组织中 METTL3 mRNA 表达明显上调(图 1B)。进一步通过 qPCR 和 WB 法检测 ESCC 细胞 ECA109、TE-1、KYSE150 和人正常食管上皮细胞 HET-1A 中 METTL3 mRNA 的相对表达以及蛋白表达,结果显示 TE-1 和 KYSE150 细胞中 METTL3 mRNA 的表达(图 1C)以及蛋白表达水平(图 1D)均高于 HET-1A 细胞。此外,本课题组收集了 34 例 ESCC 组织样本,ESCC 患者的临床特征见表 1。通过免疫组化检测 METTL3 的蛋白表达水平,结果(图 1E)显示,METTL3 高表达率在 ESCC 组织以及癌旁组织中分别为 85.29%(29/34)和 32.35%(11/34)。免疫组化染色结果(图 1E)显示,METTL3 蛋白在 ESCC 组织中的表达强度明显高于癌旁组织,且 METTL3 阳性染色集中在细胞核附近。

表 1 ESCC 患者临床特征

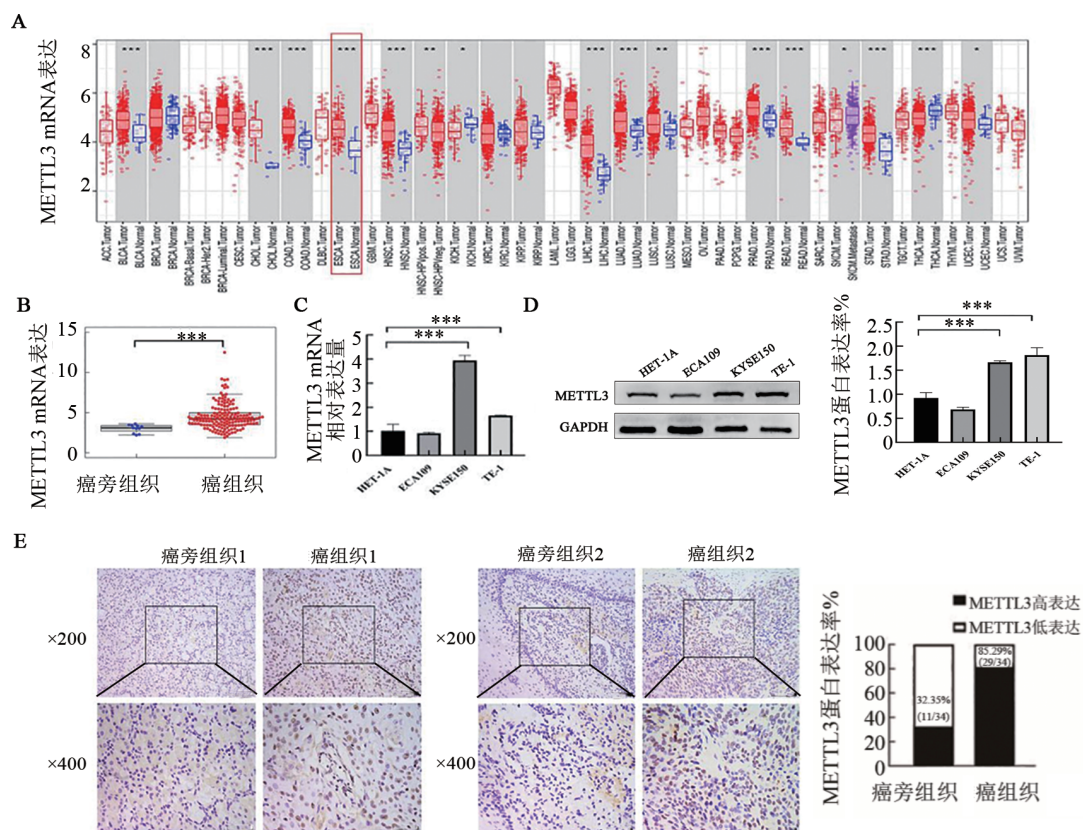
临床特征	患者数量
年龄/岁	
平均值 \pm 标准差	68.22 \pm 6.54
范围	42~81
性别	
男	19
女	15
肿瘤位置	
上	6
中	23
下	5
分化	
高度	11
中度	16
低度	7
肿瘤直径/cm	
平均值 \pm 标准差	3.14 \pm 1.30
范围	1.20~8.30
淋巴结转移	
阳性	15
阴性	19
肿瘤分级	
I - II	21
III-IV	13

2.2 干扰 METTL3 表达可显著抑制 KYSE150 和 TE-1 细胞的增殖能力

共设计两种不同的干扰序列 shMETTL3-1 和 shMETTL3-2(分别标记为 shM3-1 和 shM3-2),利用慢病毒感染技术构建稳定干扰 METTL3 的 KYSE150 和 TE-1 细胞系。结果(图 2A、B)显示,与对照组相比,稳定干扰 METTL3 的细胞中 METTL3 的 mRNA

和蛋白表达水平均显著降低(均 $P<0.001$)。此外, 干扰 METTL3 可显著抑制 ESCC KYSE150 和 TE-1 细胞的克隆形成能力和细胞增殖活力(均 $P<0.001$,

图 2C、D)。这些结果表明, 干扰 METTL3 可显著抑制 ESCC KYSE150 和 TE-1 细胞的增殖能力。



*** $P<0.001$

A: 分析不同类型的 ESCC 组织及癌旁组织中 METTL3 mRNA 的表达水平; B: 分析 ESCC 组织中 METTL3 mRNA 的表达水平; C: qPCR 法分析 ESCC 细胞中 METTL3 mRNA 的相对表达; D: WB 法分析 ESCC 细胞中 METTL3 蛋白的表达; E: METTL3 蛋白在 ESCC 组织以及癌旁组织中的表达率; F: 免疫组化分析 ESCC 组织中 METTL3 的表达

图 1 METTL3 在 ESCC 组织和细胞中呈高表达

2.3 METTL3 参与调控 ESCC 细胞的糖酵解代谢

通过生物信息学工具分析 METTL3 在 ESCC 中可能参与的生物学过程。利用在线数据库 STRING 构建了 METTL3 及其 50 个相关基因的蛋白-蛋白互作网络(图 3A), 功能富集分析结果显示, 基于 METTL3 的蛋白-蛋白互作网络显著调控了基因表达、mRNA 剪接、成纤维细胞生长因子受体信号通路等生物过程(图 3B); 互作网络参与细胞核、核质、核仁等细胞组分的调控(图 3C); 互作网络影响 DNA 结合、甲基转移酶活性、mRNA 甲基转移酶活性等分子功能(图 3D)。KEGG 通路分析结果显示, 互作网络主要功能富集于嘌呤代谢、嘧啶代谢等代谢途径(图 3E)。通过 TCGA 数据库对 METTL3 低表达和高表达的数据集进行了 GSEA 分析, 基因富集结果显示, METTL3 的表达与糖酵解代谢(图 3F)、mTORC1 信号通路(图 3G)呈正相关。进一步用细胞实验验证

METTL3 对糖酵解相关代谢表征的影响, 结果显示, METTL3 的干扰会显著抑制 ESCC 细胞 KYSE150 以及 TE-1 对葡萄糖的摄取(图 3H)和乳酸的释放(图 3I)。WB 法检测结果显示, 相较于非特异性对照组, METTL3 的干扰抑制了 KYSE150 以及 TE-1 细胞中 mTOR 及其磷酸化蛋白的表达, 以及抑制了 mTORC1 通路下游效应因子 S6K1 和 4E-BP1 的磷酸化蛋白表达(图 3J、K)。实验结果表明, METTL3 参与调控 ESCC 的糖酵解代谢, 而 mTORC1 通路是 METTL3 的潜在下游通路。

2.4 METTL3 可能通过 GLUT4 基因促进 ESCC 细胞的糖酵解代谢

进一步分析了 METTL3 对葡萄糖转运蛋白家族和糖酵解途径关键酶的影响, 结果显示, 干扰 KYSE150 和 TE-1 细胞中 METTL3 后, GLUT4 表达量显著降低(图 4A、B, $P<0.001$)。相关性分析结果(表 2)

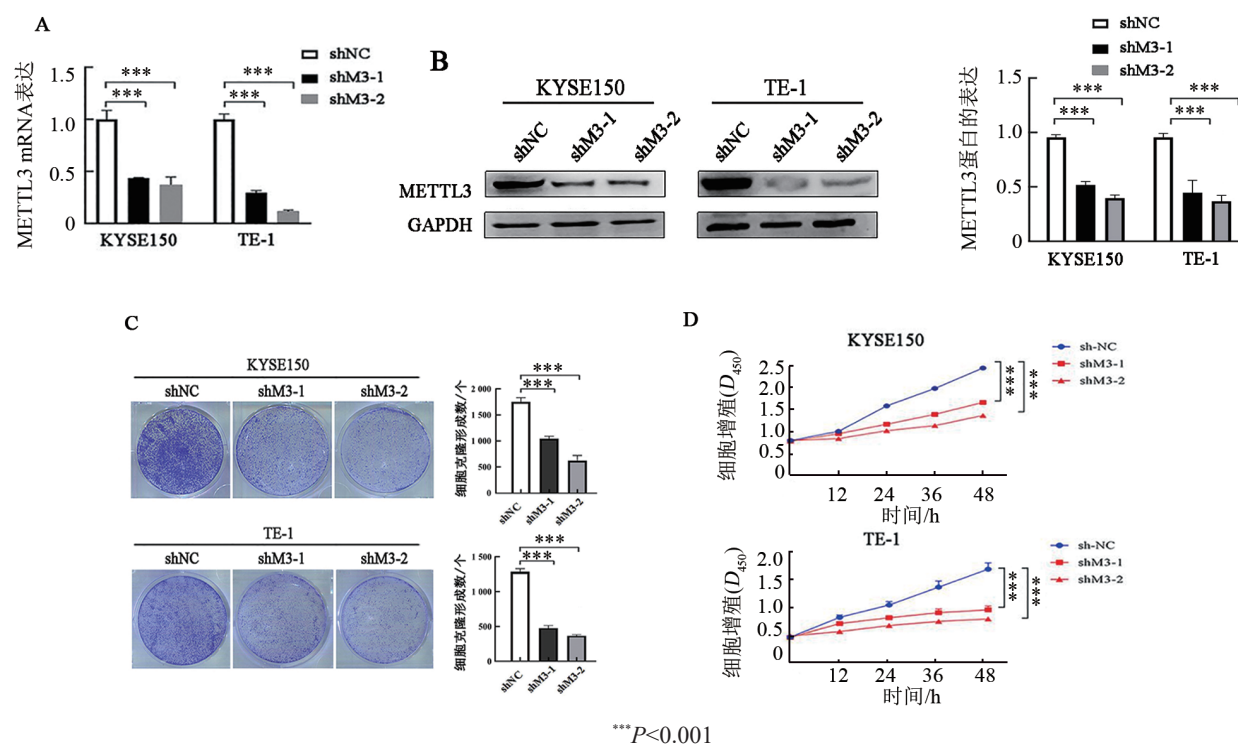


图2 干扰METTL3表达可显著抑制ESCC细胞的增殖

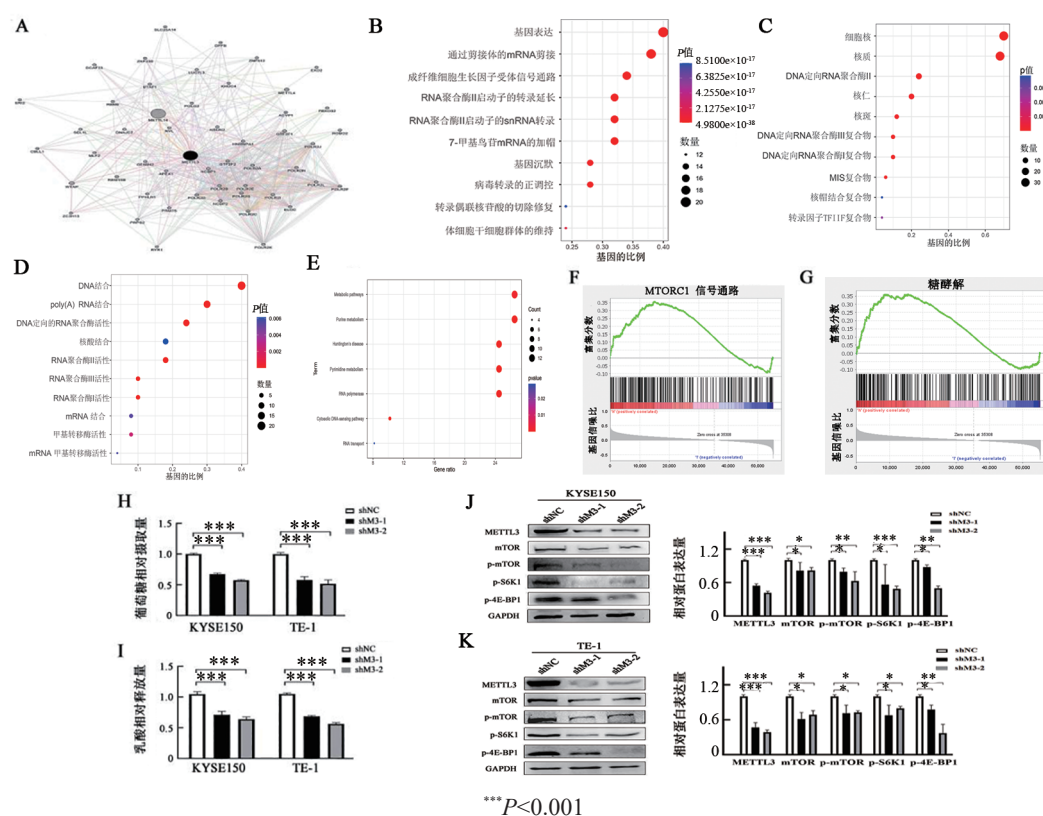
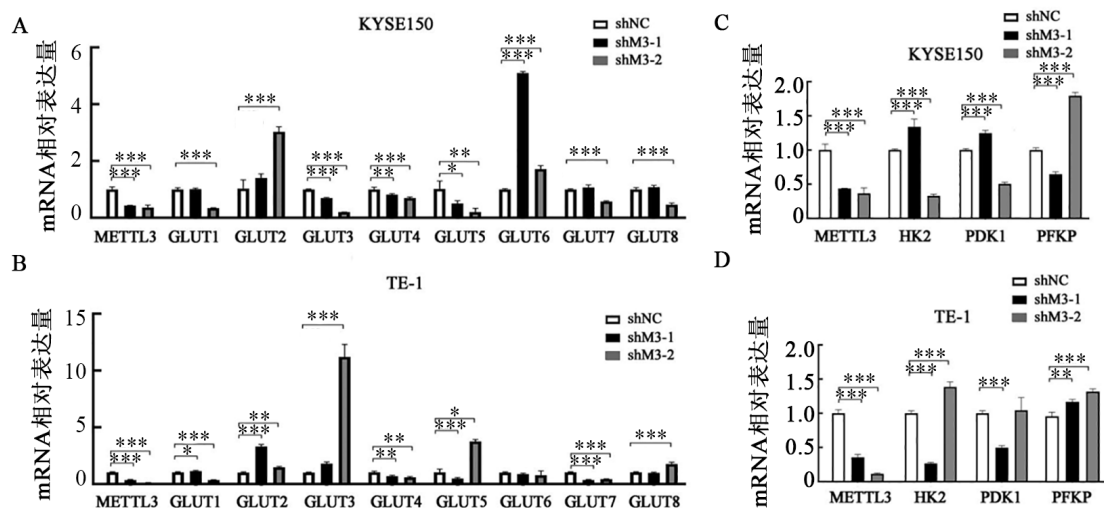


图3 METTL3参与调控ESCC细胞的糖酵解代谢

显示, GLUT4 在 ESCC 组织中与 METTL3 呈正相关, 但在正常食管组织中与 METTL3 无相关性。qPCR 检测结果(图 4C、D)显示, METTL3 的干扰对糖酵解途径其他关键酶如己糖激酶(HK2)、丙酮酸脱氢酶

(PDK1)、磷酸果糖激酶(PFKP)的表达也均有显著影响($P<0.01$ 或 $P<0.001$)。这些结果提示, METTL3 可能通过 GLUT4 调控 ESCC 细胞糖酵解。



** $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

A、B: qPCR 检测葡萄糖转运蛋白家族基因 GLUT1-8 mRNA 在 METTL3 干扰后 KYSE150 和 TE-1 细胞中的相对表达量;

C、D: qPCR 检测在 METTL3 干扰后 KYSE150 和 TE-1 细胞中 METTL3、HK2、PDK1 和 PFKP mRNA 的相对表达量

图 4 干扰 METTL3 对 ESCC 细胞中糖酵解代谢相关的下游靶基因的影响

表 2 ESCC 组织中 METTL3 与葡萄糖转运蛋白家族相关基因表达的相关性

基因	ESCC 癌旁组织		ESCC 癌组织	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
GLUT1	0.73	0.017	0.12	0.120
GLUT2	0.32	0.280	0.10	0.160
GLUT3	0.57	0.045	0.20	0.006
GLUT4	0.15	0.630	0.18	0.014
GLUT5	0.62	0.002	0.26	0.001
SLC2A6	0.85	0.001	0.17	0.020
GLUT7	0.32	0.280	0.11	0.150
SLC2A8	0.97	0.001	0.34	0.001

SLC2A6 (GLUT6): 溶质载体家族 2 成员 6; SLC2A8 (GLUT8): 溶质载体家族 2 成员 8

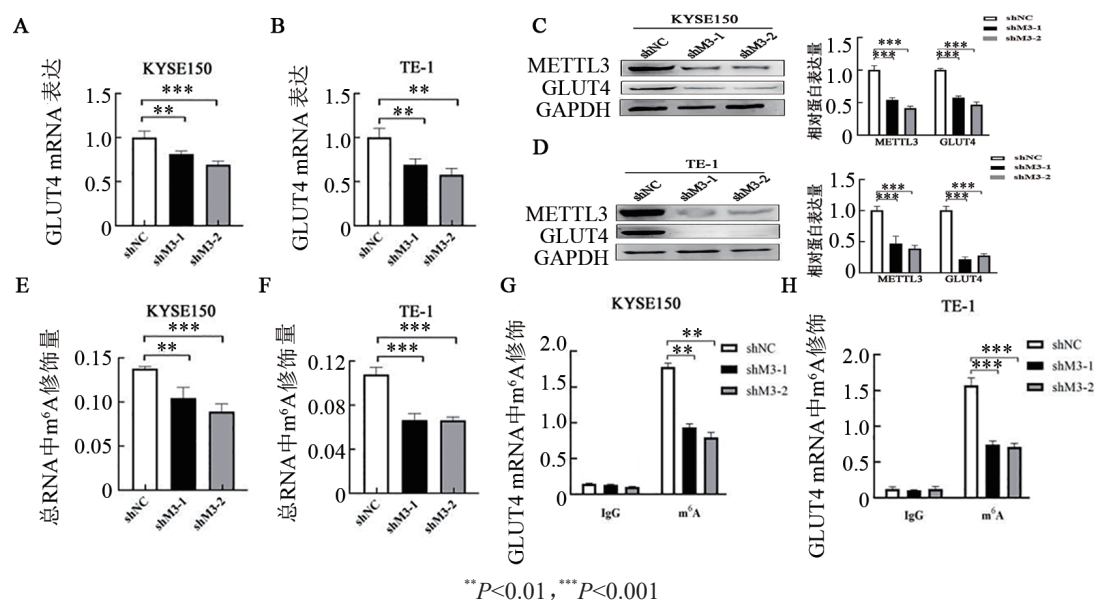
2.5 METTL3 调控 GLUT4 的表达及 mRNA 的 m⁶A 修饰水平

qPCR 检测结果(图 5A、B)显示, 干扰 METTL3 会显著抑制 KYSE150 和 TE-1 细胞中 GLUT4 mRNA 表达水平(均 $P<0.01$)。WB 法检测结果(图 5C、D)显示, 干扰 METTL3 可抑制 KYSE150 和 TE1 细胞中 GLUT4 蛋白表达。进一步探讨 METTL3 是否通过 m⁶A 修饰调控 GLUT4 的表达。比色法检测结果(图

5E、F)显示, 干扰 METTL3 可显著降低 ESCC 细胞总 RNA 的 m⁶A 含量(均 $P<0.01$)。MeRIP-qPCR 检测结果(图 5G、H)显示, METTL3 的干扰显著抑制了 ESCC 细胞中 GLUT4 的 m⁶A 甲基化水平(均 $P<0.01$)。这些结果表明, METTL3 调控 GLUT4 的表达及 mRNA 的 m⁶A 修饰水平。

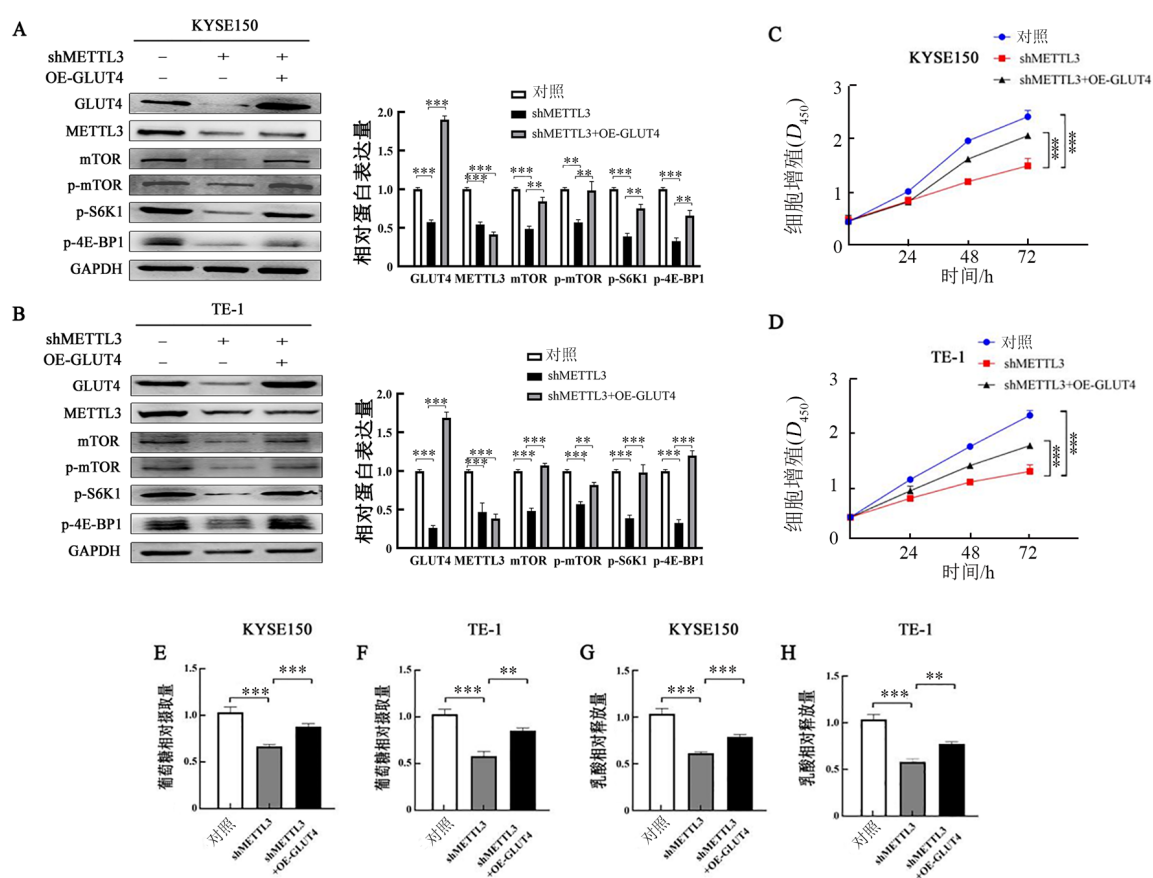
2.6 METTL3 调控 GLUT4-mTORC1 信号轴并促进 ESCC 细胞的增殖

为了验证 GLUT4 是否作为 METTL3 的下游靶基因并调控 mTORC1 信号通路, 在稳定干扰 METTL3 的 KYSE150 和 TE-1 细胞中进行过表达 GLUT4 回复实验。WB 法检测结果(图 6A、B)显示, 在稳定干扰 METTL3 的 ESCC 细胞中, mTOR、p-mTOR、p-S6K1 和 p-4E-BP1 蛋白的表达水平降低, 而过表达 GLUT4 可部分逆转因干扰 METTL3 导致的上述蛋白降低。CCK-8 法检测结果(图 6C、D)显示, 在干扰 METTL3 的 ESCC 细胞中, 过表达 GLUT4 可部分逆转因干扰 METTL3 导致 KYSE150 和 TE-1 细胞增殖能力的减弱。此外, 过表达 GLUT4 可部分逆转因干扰 METTL3 导致的 KYSE150 和 TE-1 细胞葡萄糖的摄取能力(图 6E、F)和乳酸释放能力(图 6G、H)的降低。这些结果表明, METTL3 通过 GLUT4 激活了 mTORC1 信号通路, 从而促进了 ESCC 细胞的糖酵解以及增殖能力。



A、B: qPCR法检测 GLUT4 mRNA 在 METTL3 干扰后 KYSE150 和 TE-1 细胞中的相对表达量; C、D: WB 法检测 GLUT4 蛋白在 METTL3 干扰后 KYSE150 和 TE-1 细胞中的相对表达; E、F: 比色法检测检测干扰 METTL3 后 ESCC 细胞总 RNA 中的 m⁶A 的表达水平; G、H: MeRIP-qPCR 法检测干扰 METTL3 对 GLUT4 mRNA 的 m⁶A 修饰水平的影响, IgG 被用作为阴性对照判断是否非特异性扩增

图5 在 ESCC 细胞中 METTL3 调控 GLUT4 的表达及 mRNA 的 m⁶A 修饰水平



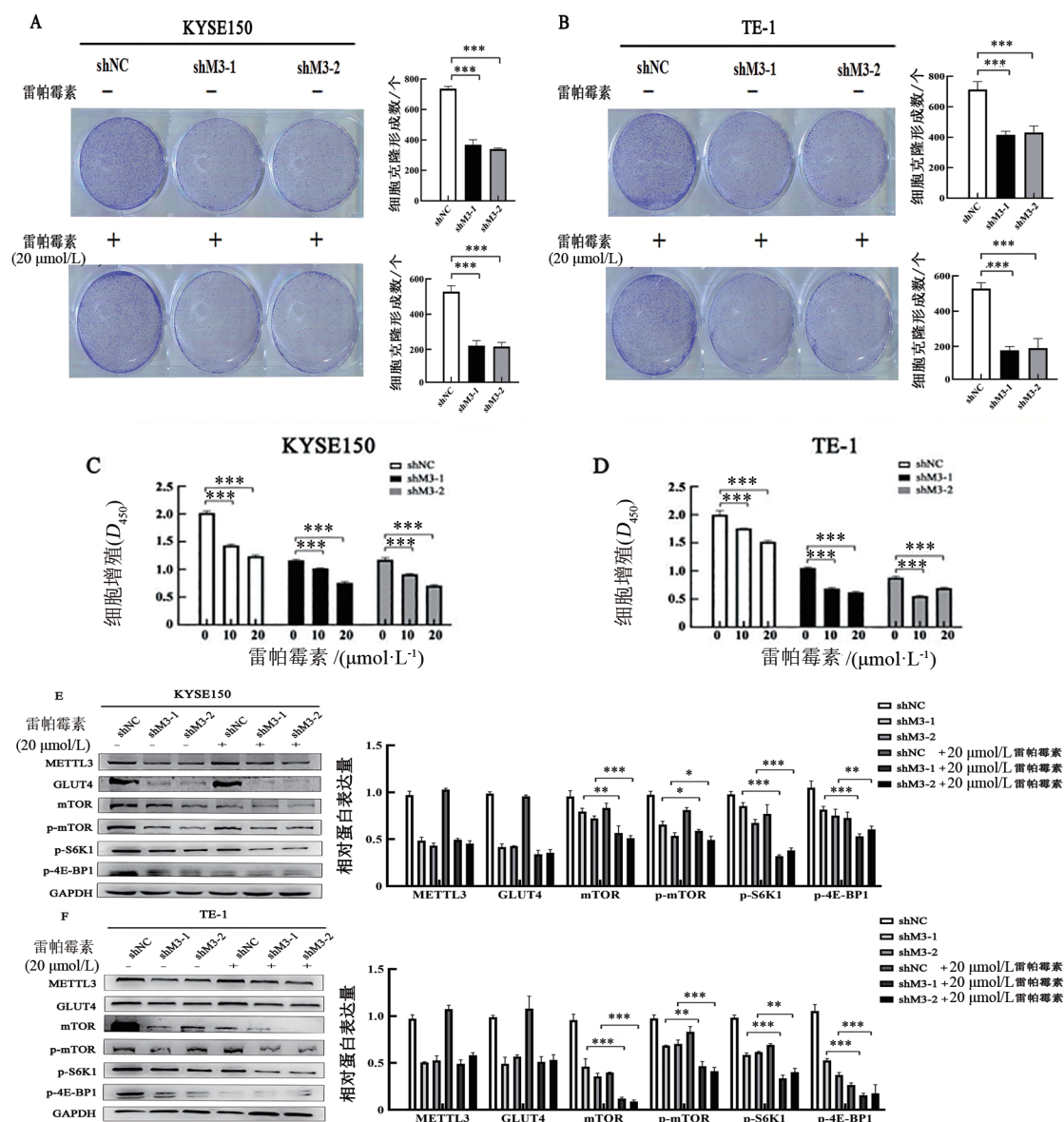
A、B: 过表达 GLUT4 后稳定干扰 METTL3 的 KYSE150 和 TE-1 细胞中 METTL3、GLUT4、mTOR、p-mTOR、p-S6K1 和 p-4E-BP1 蛋白的表达水平; C、D: CCK-8 法检测在过表达 GLUT4 后稳定干扰 METTL3 的 KYSE150 和 TE-1 细胞的增殖活力; E、F: 过表达 GLUT4 后稳定干扰 METTL3 的 KYSE150 和 TE-1 细胞中葡萄糖的相对摄取量; G、H: 过表达 GLUT4 后稳定干扰 METTL3 的 KYSE150 和 TE-1 细胞中乳酸的相对释放量

图6 METTL3 通过调控 GLUT4-mTORC1 轴影响 ESCC 细胞的增殖

2.7 mTORC1抑制剂对干扰METTL3后的ESCC细胞增殖能力的影响

平板克隆形成实验和CCK-8实验结果(图7A~D)显示,雷帕霉素可增强因干扰METTL3后对KYSE150和TE1细胞的集落形成能力和细胞活力的抑制作用。WB法检测雷帕霉素处理后mTOR、

p-mTOR、p-S6K1和p-4E-BP1的表达,结果(图7E、F)显示,相较于对照组,雷帕霉素处理组抑制了mTORC1通路相关蛋白的表达,但其对METTL3和GLUT4的表达无显著影响。这些结果表明,雷帕霉素作为mTORC1抑制剂,可以增强METTL3干扰后的抗ESCC作用。



*** $P < 0.001$

A、B: 平板克隆形成实验检测雷帕霉素对干扰METTL3后KYSE150和TE-1细胞克隆形成能力的影响; C、D: CCK-8法检测雷帕霉素对干扰METTL3后的KYSE150和TE-1细胞后细胞增殖活力的影响; E、F: WB法检测雷帕霉素对干扰METTL3后KYSE150和TE-1细胞中GLUT4、mTOR、p-mTOR、p-S6K1和p-4E-BP1蛋白表达水平的影响

图7 mTORC1抑制剂对干扰METTL3后的ESCC细胞增殖能力的影响

3 讨论

已有超过170种不同类型的RNA修饰被发现,其中m⁶A修饰是mRNA中最常见的修饰类型之一^[8]。m⁶A修饰在肿瘤的发生发展中起着重要的作用^[11],尤

其METTL3作为m⁶A修饰中的主要催化亚基,近年来备受关注^[16]。METTL3在大多数肿瘤中发挥致癌作用,并且METTL3高表达与肿瘤患者的不良预后密切相关,包括结直肠癌^[17]、胃癌^[18]、膀胱癌^[19]等。然而,METTL3在ESCC中作用的潜在分子机制仍不清

楚。METTL3在ESCC中呈高表达并通过Notch信号通路促进ESCC细胞增殖^[20],METTL3的高表达可预测ESCC患者的不良预后^[21]。在本课题组前期研究中发现,METTL3 mRNA的表达与肿瘤分化程度和性别相关,并且体外实验证明METTL3的高表达促进了ESCC的生长^[22]。在本研究中发现,METTL3在ESCC中高表达,基于生物信息学分析对METTL3生物学功能的探索,揭示METTL3通过调控GLUT4-mTORC1轴促进ESCC细胞的糖酵解及增殖。

异常的能量代谢为癌细胞提供了恶性发展的能力^[23]。METTL3通过METTL3-m⁶A-IGF2BP3轴增强下游靶基因HDGF mRNA的稳定性,而核HDGF激活了GLUT4和ENO2的表达,从而增强胃癌细胞的糖酵解代谢^[18]。GLUT4是葡萄糖转运体之一,沉默GLUT4可抑制乳腺癌细胞增殖,严重影响缺氧条件下细胞活力^[24]。在本研究中,METTL3调控了GLUT4 mRNA的m⁶A修饰水平,并且METTL3的干扰抑制了GLUT4的表达,降低葡萄糖消耗以及乳酸的释放,抑制了ESCC细胞的糖酵解和增殖,为METTL3参与调控肿瘤异常能量代谢提供了新的思路。mTORC1信号通路是控制细胞生长和代谢的中枢信号通路,mTORC1信号通路在糖酵解代谢中发挥着重要的作用^[25]。最新的研究^[26]表明,在大多数肿瘤细胞中mTORC1信号通路调控异常。在结直肠癌中,METTL3通过调控mTORC1通路促进了结直肠癌细胞的增殖^[17]。METTL3通过调控PI3K/AKT/mTOR通路促进视网膜母细胞瘤进展^[27]。本研究发现,在ESCC中,METTL3与mTORC1信号通路活化水平呈正相关。干扰METTL3后,ESCC细胞KYSE150和TE-1中mTOR、p-mTOR、p-S6K1和p-4E-BP1的蛋白表达量降低。进一步通过功能回复实验验证发现,在干扰METTL3的ESCC细胞中过表达GLUT4能部分逆转因干扰METTL3导致细胞中mTORC1信号通路蛋白表达的降低。同时,METTL3的干扰对ESCC细胞KYSE150和TE-1的葡萄糖摄取能力、乳酸的释放能力以及细胞增殖能力的抑制在过表达GLUT4后被部分逆转。这些结果表明,METTL3对mTORC1的激活依赖于GLUT4介导的糖酵解代谢。本课题组前期研究^[22]发现,METTL3通过激活m⁶A修饰的方式促进ESCC细胞的细胞周期,在ESCC细胞中METTL3的干扰抑制了GLUT4 mRNA的m⁶A甲基化水平,然而,METTL3介导的m⁶A修饰如何参与调控GLUT4的表达,以及促进ESCC糖酵解代谢的具体机制还需要进一步探索。

雷帕霉素作为一种特异性的mTORC1抑制剂,被广泛用于治疗癌症^[28]。在本研究中,雷帕霉素对

mTORC1通路有显著的阻断作用,且雷帕霉素对METTL3和GLUT4表达无影响。此外,雷帕霉素对通路的药理性阻断让沉默METTL3后的ESCC细胞的增殖受到更为显著的抑制作用。据报道,mTORC1通路抑制剂因具有阻断细胞增殖的能力,有助于延缓肿瘤的恶性增殖。然而,单一的mTORC1抑制剂对肿瘤中的细胞存活和肿瘤消退影响较小^[29],而mTORC1通路抑制剂联合癌症新靶点治疗具有良好前景,进一步探讨METTL3化疗增强敏感性的作用具有重要意义。

综上所述,本研究发现,METTL3在ESCC组织和细胞中的表达呈高水平,揭示了METTL3通过介导m⁶A修饰调控GLUT4-mTORC1轴影响ESCC细胞的糖酵解以及增殖活性,为制定有效的ESCC治疗策略提供新的见解,为其临床应用提供实验基础。

[参考文献]

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, *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. DOI:10.3322/caac.21660.
- [2] YANG Y M, HONG P, XU W W, *et al.* Advances in targeted therapy for esophageal cancer[J/OL]. Signal Transduct Target Ther, 2020, 5(1): 229[2022-09-13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33028804/>. DOI:10.1038/s41392-020-00323-3.
- [3] ZHANG Z H, LENG Z Y, FANG K, *et al.* Global research trend of esophageal squamous cell carcinoma from 2012 to 2022: a bibliometric analysis[J/OL]. Front Oncol, 2022, 12: 977935 [2022-09-13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36033465/>. DOI:10.3389/fonc.2022.977935.
- [4] JI Z Q, BAO S H, LI L, *et al.* Hypoxia-inducible factor-2 α promotes EMT in esophageal squamous cell carcinoma through the Notch pathway[J]. Adv Clin Exp Med, 2022, 31(7): 795-805. DOI:10.17219/acem/147270.
- [5] CHEN M N, WONG C M. The emerging roles of N⁶-methyladenosine (m⁶A) deregulation in liver carcinogenesis[J/OL]. Mol Cancer, 2020, 19(1): 44[2022-09-13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32111216/>. DOI:10.1186/s12943-020-01172-y.
- [6] CUI L, MA R, CAI J, *et al.* RNA modifications: importance in immune cell biology and related diseases[J/OL]. Signal Transduct Target Ther, 2022, 7(1): 334[2022-09-13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36138023/>. DOI:10.1038/s41392-022-01175-9.
- [7] LI R Y, SONG Y Z, CHEN X, *et al.* METTL3 increases cisplatin chemosensitivity of cervical cancer cells *via* downregulation of the activity of RAGE[J]. Mol Ther Oncolytics, 2021, 22: 245-255. DOI:10.1016/j.omto.2021.05.013.
- [8] ZENG C W, HUANG W X, LI Y Q, *et al.* Roles of METTL3 in cancer: mechanisms and therapeutic targeting[J/OL]. J Hematol Oncol, 2020, 13(1): 117[2022-09-13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32854717/>. DOI:10.1186/s13045-020-00951-w.
- [9] BI X H, LV X, LIU D J, *et al.* METTL3-mediated maturation of

- miR-126-5p promotes ovarian cancer progression via PTEN-mediated PI3K/Akt/mTOR pathway[J]. *Cancer Gene Ther*, 2021, 28(3/4): 335-349. DOI:10.1038/s41417-020-00222-3.
- [10] GAO F Y, WANG Q Q, ZHANG C, *et al.* RNA methyltransferase METTL3 induces intrinsic resistance to gefitinib by combining with MET to regulate PI3K/AKT pathway in lung adenocarcinoma [J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(5): 2418-2425. DOI: 10.1111/jcmm.16114.
- [11] ZHOU D, TANG W W, XU Y D, *et al.* METTL3/YTHDF2 m⁶A axis accelerates colorectal carcinogenesis through epigenetically suppressing YPEL5[J]. *Mol Oncol*, 2021, 15(8): 2172-2184. DOI: 10.1002/1878-0261.12898.
- [12] XU Y M, LV D D, YAN C, *et al.* METTL3 promotes lung adenocarcinoma tumor growth and inhibits ferroptosis by stabilizing SLC7A11 m⁶A modification[J/OL]. *Cancer Cell Int*, 2022, 22(1): 11[2022-09-13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34996469/>. DOI:10.1186/s12935-021-02433-6.
- [13] PAN J S, LIU F, XIAO X L, *et al.* METTL3 promotes colorectal carcinoma progression by regulating the m⁶A-CRB3-Hippo axis [J/OL]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, 41(1): 19[2022-09-13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35012593/>. DOI: 10.1186/s13046-021-02227-8.
- [14] PENG J J, ZHENG H, LIU F, *et al.* The m⁶A methyltransferase METTL3 affects autophagy and progression of nasopharyngeal carcinoma by regulating the stability of lncRNA ZFAS1[J/OL]. *Infect Agent Cancer*, 2022, 17(1): 1[2022-09-13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34980191/>. DOI:10.1186/s13027-021-00411-1.
- [15] SHEN C Q, XUAN B Q, YAN T T, *et al.* m⁶A-dependent glycolysis enhances colorectal cancer progression[J/OL]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 72[2022-09-13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32245489/>. DOI:10.1186/s12943-020-01190-w.
- [16] AN Y Y, DUAN H. The role of m⁶A RNA methylation in cancer metabolism[J/OL]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 14 [2022-09-13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35022030/>. DOI: 10.1186/s12943-022-01500-4.
- [17] CHEN H R, GAO S S, LIU W X, *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. DOI:10.1053/j.gastro.2020.11.013.
- [18] WANG Q, CHEN C, DING Q Q, *et al.* METTL3-mediated m⁶A modification of HDGF mRNA promotes gastric cancer progression and has prognostic significance[J]. *Gut*, 2020, 69(7): 1193-1205. DOI:10.1136/gutjnl-2019-319639.
- [19] WANG X S, YU J W, CHEN J B, *et al.* Copy number variation analysis of m⁶A regulators identified METTL3 as a prognostic and immune-related biomarker in bladder cancer[J]. *Cancer Med*, 2021, 10(21): 7804-7815. DOI:10.1002/cam4.3981.
- [20] HAN H, YANG C L, ZHANG S S, *et al.* METTL3-mediated m⁶A mRNA modification promotes esophageal cancer initiation and progression via Notch signaling pathway[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2021, 26: 333-346. DOI:10.1016/j.omtn.2021.07.007.
- [21] XIA T L, YAN S M, YUAN L, *et al.* Upregulation of METTL3 expression predicts poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Manag Res*, 2020, 12: 5729-5737. DOI:10.2147/CMAR.S245019.
- [22] ZOU J, ZHONG X W, ZHOU X, *et al.* The m⁶A methyltransferase METTL3 regulates proliferation in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 580: 48-55. DOI:10.1016/j.bbrc.2021.05.048.
- [23] SHI X K, YANG J, DENG S Z, *et al.* TGF- β signaling in the tumor metabolic microenvironment and targeted therapies[J/OL]. *J Hematol Oncol*, 2022, 15(1): 135 [2022-09-13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36115986/>. DOI:10.1186/s13045-022-01349-6.
- [24] GARRIDO P, OSORIO F G, MORÁN J, *et al.* Loss of GLUT4 induces metabolic reprogramming and impairs viability of breast cancer cells[J]. *J Cell Physiol*, 2015, 230(1): 191-198. DOI:10.1002/jcp.24698.
- [25] BATTAGLIONI S, BENJAMIN D, WÄLCHLI M, *et al.* mTOR substrate phosphorylation in growth control[J]. *Cell*, 2022, 185(11): 1814-1836. DOI:10.1016/j.cell.2022.04.013.
- [26] NAVARRO C, ORTEGA Á, SANTELIZ R, *et al.* Metabolic reprogramming in cancer cells: emerging molecular mechanisms and novel therapeutic approaches[J/OL]. *Pharmaceutics*, 2022, 14(6): 1303 [2022-09-13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35745875/>. DOI:10.3390/pharmaceutics14061303.
- [27] ZHANG H, ZHANG P, LONG C D, *et al.* m⁶A methyltransferase METTL3 promotes retinoblastoma progression via PI3K/AKT/mTOR pathway[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(21): 12368-12378. DOI:10.1111/jcmm.15736.
- [28] ZHANG J J, WU N, SHI D Y. The involvement of the mammalian target of rapamycin, protein tyrosine phosphatase 1b and dipeptidase 4 signaling pathways in cancer and diabetes: a narrative review[J]. *Mini Rev Med Chem*, 2021, 21(7): 803-815. DOI: 10.2174/1389557520666201113110406.
- [29] ALI E S, MITRA K, AKTER S, *et al.* Recent advances and limitations of mTOR inhibitors in the treatment of cancer[J/OL]. *Cancer Cell Int*, 2022, 22(1): 284 [2022-09-13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36109789/>. DOI:10.1186/s12935-022-02706-8.

[收稿日期] 2022-09-13

[修回日期] 2022-11-20

[本文编辑] 黄静怡