

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.12.003

· 基础研究 ·

## METTL3 修饰的 RNASEH1-AS1 通过 BUD13/ANXA2/Wnt/ $\beta$ -catenin 轴调控结直肠癌 SW480 细胞的恶性生物学行为

庄盛威<sup>a</sup>, 吴志荣<sup>a</sup>, 张秀萍<sup>b</sup>, 黄哲昆<sup>a</sup>, 张勇<sup>a</sup> (复旦大学附属中山医院厦门医院 a. 普外科; b. 肿瘤内科, 福建厦门 351006)

**[摘要]** **目的:** 探究甲基转移酶样蛋白 3 (METTL3) 修饰的 RNASEH1-AS1 通过 BUD13/膜联蛋白 A2/ Wnt/ $\beta$ -连环蛋白 (BUD13/ANXA2/Wnt/ $\beta$ -catenin) 轴调控结直肠癌细胞 SW480 恶性生物学行为的分子机制。**方法:** 选取 2022 年 6 月至 2022 年 11 月间在复旦大学附属中山医院厦门医院手术治疗的 24 例 CRC 患者, 收集患者的 CRC 组织和对应的癌旁组织, 用 qPCR 法检测其中 METTL3、RNASEH1-AS1、BUD13、ANXA2、 $\beta$ -catenin、GSK-3 $\beta$  mRNA 的表达, 用 Pearson 法分析 CRC 组织中 RNASEH1-AS1 表达分别与 METTL3 和 BUD13 表达的相关性。常规培养结直肠癌细胞 SW480, 分为 sh-NC 组、sh-RNASEH1-AS1 组、NC 组、sh-METTL 组、si-NC 组、si-BUD13 组、sh-RNASEH1-AS1+pc-NC 组、sh-RNASEH1-AS1+pc-ANXA2 组、sh-METTL+pc-NC 组、sh-METTL+pc-ASEH1-AS1 组, 用 Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 转染试剂将 sh-NC、sh-RNASEH1-AS1、sh-NC、sh-METTL、si-NC、si-BUD13、sh-RNASEH1-AS1+pc-NC、sh-RNASEH1-AS1+pc-ANXA2、sh-METTL+pc-NC、sh-METTL+pc-ASEH1-AS1 分别转染 SW480 细胞, 用 qPCR 法检测后 SW480 细胞中 METTL3、RNASEH1-AS1、BUD13、ANXA2 的表达, 细胞克隆形成实验检测转染后各组 SW480 细胞的增殖能力, FCM 术检测转染后各组 SW480 细胞的凋亡情况, 细胞划痕实验检测转染后各组 SW480 细胞的迁移能力, WB 法检测转染后各组 SW480 细胞中 ANXA2、 $\beta$ -catenin、p- $\beta$ -catenin、GSK-3 $\beta$ 、p-GSK-3 $\beta$ 、c-Myc、cyclinD1 蛋白表达, RNA 免疫沉淀 (RIP) 法检测 RNASEH1-AS1 与 BUD1、BUD1 与 ANXA2 的靶向关系。**结果:** 数据库 CRC 数据分析和中国人 CRC 组织和癌旁组织的 qPCR 法检测结果均显示, 与癌旁组织相比 CRC 组织中 METTL3、RNASEH1-AS1、BUD13、ANXA2、 $\beta$ -catenin、GSK-3 $\beta$  均呈明显高表达 (均  $P < 0.01$ ), 且 RNASEH1-AS1 表达与 METTL3 ( $r = 0.698$ ,  $P < 0.01$ )、BUD13 ( $r = 0.784$ ,  $P < 0.01$ ) 的表达呈正相关。在结直肠癌各细胞中 METTL3、RNASEH1-AS1、BUD13、ANXA2 mRNA 均呈高表达 (均  $P < 0.05$ ); 敲减 RNASEH1-AS1 或 METTL3 后 SW480 细胞中 RNASEH1-AS1、BUD13、ANXA2 表达显著降低 (均  $P < 0.05$ ), 而过表达 RNASEH1-AS1 后上述分子表达明显上调 (均  $P < 0.05$ ); 敲减 RNASEH1-AS1 或 METTL3 可抑制 SW480 的增殖、迁移和 p- $\beta$ -catenin、p-GSK-3 $\beta$ 、c-Myc、cyclinD1 蛋白的表达, 促进其凋亡 (均  $P < 0.05$ ), 而过表达 RNASEH1-AS1 则可促进 SW480 增殖、迁移和 p- $\beta$ -catenin、p-GSK-3 $\beta$ 、c-Myc、cyclinD1 蛋白的表达和抑制其凋亡 (均  $P < 0.05$ ); RNASEH1-AS1 通过招募 BUD13 靶向促进 ANXA2 的表达 (均  $P < 0.05$ ); 过表达 ANXA2 可部分逆转敲减 RNASEH1-AS1 对 SW480 细胞的影响 (均  $P < 0.05$ )。**结论:** METTL3 修饰的 RNASEH1-AS1 通过 BUD13/ANXA2/Wnt/ $\beta$ -catenin 轴调控 SW480 细胞的恶性生物学行为。

**[关键词]** 结直肠癌; SW480 细胞; 甲基转移酶样蛋白 3; RNASEH1-AS1; BUD13; 膜联蛋白 A2

**[中图分类号]** R735.3; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2023)12-1051-10

## METTL3-modified RNASEH1-AS1 regulates the malignant biological behaviors of colorectal cancer SW480 cells through the BUD13/ANXA2/Wnt/ $\beta$ -catenin axis

ZHUANG Shengwei<sup>a</sup>, WU Zhirong<sup>a</sup>, ZHANG Xiuping<sup>b</sup>, HUANG Zhekun<sup>a</sup>, ZHANG Yong<sup>a</sup> (a. Department of General Surgery; b. Department of Medical Oncology, Xiamen Hospital, Zhongshan Hospital, Fudan University, Xiamen 351006, Fujian, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the molecular mechanism by which methyltransferase-like protein 3 (METTL3) -modified RNASEH1-AS1 regulates the malignant biological behaviors of colorectal cancer cells SW480 through the BUD13/membrane associated protein A2/Wnt/ $\beta$ -catenin (BUD13/ANXA2/Wnt/ $\beta$ -catenin) axis. **Methods:** Twenty-four CRC patients who were surgically treated in our hospital from June 2022 to November 2022 were selected as the study subjects, and the patients' CRC tissues and corresponding paracancerous tissues were collected, and the qPCR method was used to detect the METTL3, RNASEH1-AS1, BUD13, ANXA2,  $\beta$ -catenin, GSK-3 $\beta$  mRNA in CRC tissues and paracancerous tissues expression, and the correlation of RNASEH1-AS1

**[基金项目]** 福建省科技厅引导性科研项目 (No. 2022R0027)

**[作者简介]** 庄盛威 (1989—), 男, 硕士, 主治医师, 主要从事胃肠道肿瘤基础与临床的研究。E-mail: 15259221272@163.com

**[通信作者]** 张勇, E-mail: 13681971072@163.com

expression with METTL3 expression and BUD13 expression in CRC tissues was analyzed by Pearson's method. Colorectal cancer cells SW480 were routinely cultured, and the experiments were divided into sh-NC group, sh-RNASEH1-AS1 group, NC group, sh-METTL3 group, si-NC group, si-BUD13 group, sh-RNASEH1-AS1+pc-NC group, sh-RNASEH1-AS1+pc-ANXA2 group, sh-METTL3+pc-NC group, sh-METTL3+pc-ASEH1-AS1 group, and sh-NC, sh-RNASEH1-AS1, sh-NC, sh-METTL3, si-NC, si-BUD13, sh-RNASEH1-AS1 and pc-NC, sh-RNASEH1-AS1 and pc-ANXA2, sh-METTL3 and pc-NC, sh-METTL3 and pc-ASEH1-AS1 were transfected in SW480 cells. The expression of METTL3, RNASEH1-AS1, BUD13, and ANXA2 in SW480 cells was detected by qPCR. The cell clone formation assay detected the proliferative ability of SW480 cells in the transfected groups; FCM assay detected the apoptosis of SW480 cells in the transfected groups; cell scratch assay detected the migratory ability of SW480 cells in the transfected groups; and WB assay detected the migration of SW480 cells in the transfected groups. ANXA2,  $\beta$ -catenin, p- $\beta$ -catenin, GSK-3 $\beta$ , p-GSK-3 $\beta$ , c-Myc, cyclinD1 protein expression in each group of SW480 cells; RNA immunoprecipitation (RIP) assay to detect the targeting relationship between RNASEH1-AS1 and BUD1, and BUD1 and ANXA2. **Results:** Both database analysis and qPCR assay results of CRC tissues and cancerous tissues of nationals showed that METTL3, RNASEH1-AS1, BUD13, ANXA2,  $\beta$ -catenin, and GSK-3 $\beta$  were significantly highly expressed in CRC tissues compared with paracancerous tissues (all  $P<0.01$ ), and RNASEH1-AS1 expression was positively correlated with the METTL3 ( $r=0.698$ ,  $P<0.01$ ) and BUD13 ( $r=0.784$ ,  $P<0.01$ ) expression were positively correlated. METTL3, RNASEH1-AS1, BUD13, and ANXA2 mRNA were highly expressed in colon cancer cells (all  $P<0.05$ ), and the expression of RNASEH1-AS1, BUD13, and ANXA2 was significantly decreased in SW480 cells after knockdown of RNASEH1-AS1 or METTL3 (all  $P<0.05$ ), while overexpression of RNASEH1-AS1 significantly upregulated the expression of the above molecules (all  $P<0.05$ ). Knockdown of RNASEH1-AS1 or METTL3 inhibited the proliferation, migration and expression of p- $\beta$ -catenin, p-GSK-3 $\beta$ , c-Myc, cyclinD1 proteins, and promoted apoptosis of SW480 (all  $P<0.05$ ), whereas over-expression of RNASEH1-AS1 promoted the proliferation, migration and expression of p- $\beta$ -catenin p- $\beta$ -catenin, p-GSK-3 $\beta$ , c-Myc, cyclinD1 protein expression and inhibited its apoptosis (all  $P<0.05$ ). RNASEH1-AS1 promoted the expression of ANXA2 by recruiting BUD13 targeting (all  $P<0.05$ ); over-expression of ANXA2 partially reversed the knockdown of the effect of RNASEH1-AS1 on SW480 cells (all  $P<0.05$ ). **Conclusion:** METTL3-modified RNASEH1-AS1 regulates the malignant biological behavior of SW480 cells through the BUD13/ANXA2/Wnt/ $\beta$ -catenin axis.

**[Key words]** colorectal cancer; SW480 cell; methyltransferase-like protein 3 (METTL3); RNASEH1-AS1; BUD13; annexin A2 (ANXA2)

[Chin J Cancer Biother, 2023, 30(12): 1051-1060. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.12.003]

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是癌症死亡的第二大原因,随着早癌筛查的推广,CRC早期诊断率有了很大的提高,但中晚期CRC患者复发率和病死率仍然较高,预后较差<sup>[1-2]</sup>。CRC的发生发展机制还不甚清晰,仍需要深入研究。研究<sup>[3]</sup>发现,lncRNA在CRC的发生、转移和预后等过程中起着重要的调控作用,如lncRNA GAS8-AS通过下调lncRNA AFAP1-AS1抑制CRC细胞增殖。本研究前期通过StarBase数据库预测发现,lncRNA RNASEH1-AS1在CRC组织中显著性上调,提示RNASEH1-AS1可能参与调控CRC发生发展,然而,其在CRC中的作用和机制尚未见报道,故本研究着重探究RNASEH1-AS1对CRC发生发展的影响。研究<sup>[4]</sup>发现,甲基转移酶样蛋白3(methyltransferase-like protein 3, METTL3)是N<sup>6</sup>-甲基腺嘌呤(m<sup>6</sup>A)修饰的一个关键组分,其在RNA稳定性方面发挥重要功能。已有研究<sup>[5]</sup>发现,METTL3介导lncRNA LBX2-AS1水平的增加,并促进CRC发生发展,提示了METTL3为CRC治疗的潜在作用靶点。本研究前期通过SRAMP数据库和RPISeq数据库分析发现,RNASEH1-AS1作为一种lncRNA,其具有多个m<sup>6</sup>A修饰位点,且METTL3蛋白与

RNASEH1-AS1具有相互结合作用,提示了METTL3可能通过介导RNASEH1-AS1 m<sup>6</sup>A修饰来促进CRC的发生发展。RNA结合蛋白BUD13为蛋白质的表达以及蛋白质与特定的RNA结合提供结合位点<sup>[6]</sup>。本研究已通过StarBase数据库预测发现,BUD13在CRC中显著上调,而且RNASEH1-AS1与BUD13具有相互结合位点,进一步的生物信息学预测发现BUD13与膜联蛋白A2(annexin A2, ANXA2)具有相互结合位点。ANXA2已被报道在许多癌症中均具有激活Wnt/ $\beta$ -Catenin信号的作用<sup>[7]</sup>。本研究将探究RNASEH1-AS1是否通过招募BUD13维持ANXA2 mRNA稳定性,进而激活Wnt/ $\beta$ -Catenin信号通路,促进CRC发生发展。

## 1 材料与方法

### 1.1 组织标本、细胞及主要试剂

本研究采集2022年6月至2022年11月间在复旦大学附属中山医院厦门医院手术切除的24例CRC患者癌组织(CRC组)及距离癌组织5 cm外的癌旁组织(癌旁组织组),患者平均年龄(62.50 $\pm$ 8.76)岁,其中I~II期患者16例、III期患者8例。所有肿瘤组织

均经组织病理学确诊为CRC,并于-80℃冰箱保存。本研究方案获得本院伦理委员会批准(批准号:院科伦审[2022]第031号)。所有患者均充分知情并签署书面知情同意书。

CRC细胞SW480、HCT116、LoVo和SW620和人正常结肠上皮细胞NCM460均购自中国科学院上海细胞库,TRIzol®试剂购自上海冠泰生物科技有限公司,M-MLV2反转录试剂盒购自深圳市润博科仪科技有限公司,AnnexinV-FITC/PI细胞凋亡双染试剂盒购自美国BD公司,sh-NC和sh-RNASEH1-AS1、NC和sh-METTL、si-NC和si-BUD13、pc-NC和pc-ANXA2均购自上海艾博思生物科技有限公司,Lipofectamine® 2000转染试剂购自美国Invitrogen技术公司,鼠抗ANXA2、兔抗p-β-catenin、鼠抗β-catenin、兔抗p-糖原合成酶激酶-3β(glycogen synthase kinase,GSK-3β)、鼠抗GSK-3β、鼠抗c-Myc、兔抗cyclinD1、鼠抗GAPDH一抗、HRP偶联的羊抗鼠、羊抗兔二抗均购自美国Thermo Fisher Scientific公司。

1.2 细胞培养、转染与分组

SW480细胞和NCM460细胞均培养于含10%胎牛血清的RPMI1640培养基中,在5%CO<sub>2</sub>、37℃培养箱

中培养。待细胞汇合度达约85%时进行细胞传代,细胞稳定传3代后取对数生长期细胞进行实验。参照Lipofectamine® 2000说明书进行细胞转染。分别将sh-NC、sh-RNASEH1-AS1、sh-NC、sh-METTL、si-NC、si-BUD13、sh-RNASEH1-AS1和pc-NC、sh-RNASEH1-AS1和pc-ANXA2、sh-METTL和pc-NC、sh-METTL和pc-ASEH1-AS1转染至SW480细胞中,记为sh-NC组、sh-RNASEH1-AS1组、NC组、sh-METTL组、si-NC组、si-BUD13组、sh-RNASEH1-AS1+pc-NC组、sh-RNASEH1-AS1+pc-ANXA2组、sh-METTL+pc-NC组、sh-METTL+pc-ASEH1-AS1组。另取未转染的SW480细胞,记为对照组。每组设置6个复孔。

1.3 qPCR法检测转染后各组SW480细胞中METTL3、RNASEH1-AS1、BUD13、ANXA2、β-catenin、GSK-3β mRNA的表达

用TRIzol试剂提取各组组织或细胞中的总RNA,并检测RNA浓度和纯度,-80℃冰箱中保存备用。使用反转录试剂盒将RNA反转录合成cDNA,进行PCR检测。PCR反应参数:94℃10min,94℃5s,64℃30s,72℃20s,共35个循环。以β-actin作为内参基因,用2<sup>-ΔΔCt</sup>法计算目的基因的相对表达水平。所用引物见表1。

表1 qPCR引物序列

基因名称	正向引物(5'~3')	反向引物(5'~3')
METTL3	TTGTCTCCAACCTTCCGTAGT	CCAGATCAGAGAGGTGGTGTAG
RNASEH1-AS1	GCGGATCTACAGTAAGGGCTGT	CGCCCTCCTTTGTGCTTATTC
BUD13	AAGGCCGAGTATCTGAAGCG	GCCTCCCAGAAGCTTCCATT
ANXA2	GAGCGGGATGCTTTGAACATT	TAGGCGAAGGCAATATCCTGT
β-catenin	GCTGATTTGATGGAGTTGGA	GCTACTTGTCTTGAGTGAA
GSK-3β	CCGGGTTCCCATGTCCCCGGCGAAT	AGGCTGCTGCACCGGCTTGCAGCT
β-actin	TCACCCACACTGTGCCCA-TCTACGA	CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG

1.4 细胞克隆形成实验检测转染后各组SW480细胞的增殖能力

以500个/孔密度将转染后各组对数生长期SW480细胞接种于6孔板中,在37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养14d,肉眼看到细胞克隆时,弃去上清液,用4%多聚甲醛固定细胞15min,用结晶紫染色5min,小心洗涤后采用Image J软件计数细胞克隆数,分析细胞增殖情况。

1.5 FCM术检测转染后各组SW480细胞的凋亡情况

收集转染各组SW480细胞,PBS洗涤细胞后,用100μL结合缓冲液重悬细胞,每管中加入10μL Annexin V-FITC染液,避光处理10min后加入10μL碘化丙啶(PI)染液避光处理5min,立即使用FACSLytic™流式细胞仪检测细胞凋亡情况,并用

FlowJo-V10软件进行分析。

1.6 细胞划痕实验检测转染后各组SW480细胞的迁移能力

将转染后各组SW480细胞接种到6孔板中(1×10<sup>6</sup>个/孔)。过夜后,使用10μL移液器吸头垂直划线,使用PBS洗涤脱落的细胞,加入培养基继续培养24h。显微镜拍照记录0h和24h时划痕宽度,通过Image J软件测量、分析细胞迁移率。细胞迁移率=(0h划痕宽度-24h划痕宽度)/0h划痕宽度×100%。

1.7 WB法检测转染各组SW480细胞中METTL3、RNASEH1-AS1、BUD13、ANXA2、β-catenin、GSK-3β蛋白的表达

收集各组细胞,使用RIPA缓冲液提取细胞中总蛋白,使用BCA试剂盒测定蛋白质浓度。变性后的



蛋白质通过 10% SDS-PAGE 分离并转移到聚偏氟乙烯膜上,在 37 °C 下用 5% 脱脂牛奶封闭 2 h 后,将膜与以下一抗 ANXA2 (1:500)、 $\beta$ -catenin (1:1 000)、p- $\beta$ -catenin (1:500)、GSK-3 $\beta$  (1:250)、p-GSK-3 $\beta$  (1:1 000)、c-Myc (1:1 000)、cyclinD1 (1:1 000)、GAPDH (1:500) 在 4 °C 下处理过夜,随后,将膜与 HRP 偶联的二抗 (1:500) 在 37 °C 下处理 2 h,用增强型化学发光试剂曝光显影拍照,以 GAPDH 为内参,使用 Image J 软件量化蛋白条带的灰度值。

1.8 RNA 免疫沉淀(RNA immunoprecipitation, RIP) 法检测 RNASEH1-AS1 与 BUD13、BUD13 与 ANXA2 的结合关系

收集 SW480 细胞,用含蛋白酶和 RNA 酶抑制剂的 RIP 细胞缓冲液重悬细胞。向 100 mL 细胞裂解物中加入 IgG (IgG 组) 或 AGO2 抗体 (AGO2 组),4 °C 下旋转处理过夜,其中 Input 样本作为阳性对照。使用蛋白酶 K 处理后获得 RNA 沉淀并进行纯化,然后进行反转录反应,最后进行 qPCR 检测 RNASEH1-AS1 与 BUD13、BUD13 与 ANXA2 的表达。

1.9 统计学处理

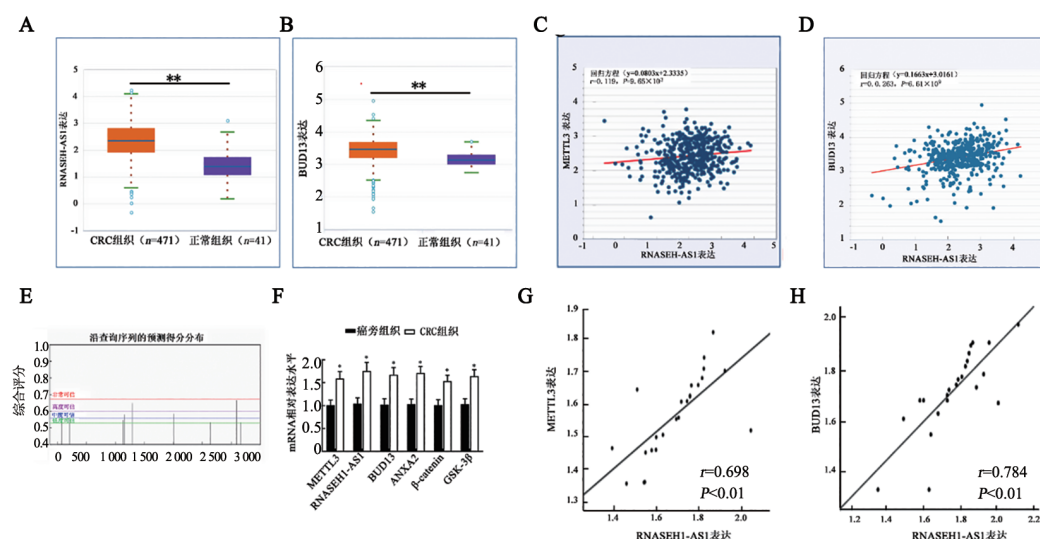
所有数据均使用 SPSS 25.0 进行统计分析。所有实验均独立重复 3 次。符合正态分布的计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间的差异比较用 *t* 检验,单因素方差分析多组间差异。用 Pearson 法分析 CRC 组织中

RNASEH1-AS1 表达与 METTL3 和 BUD13 表达相关性。以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 数据库分析和国人癌组织样本 qPCR 检查结果均显示 CRC 组织中 RNASEH1-AS1、METTL3、BUD13 呈高表达且 RNASEH1-AS1 与 METTL3、BUD13 的表达呈正相关

Starbase、SRAMP 和 RPISeq 数据库分析显示, RNASEH1-AS1、BUD13 在 CRC 组织中均呈高表达 (图 1A、B, 均  $P < 0.01$ ); RNASEH1-AS1 的表达与 METTL3 (图 1C) 和 BUD13 (图 1D) 的表达均呈正相关 (均  $P < 0.01$ ); 此外,还发现 RNASEH1-AS1 RNA 具有多个 m<sup>6</sup>A 修饰位点 (图 1E)。qPCR 法检查检测国人 CRC 组织和癌旁组织的结果 (图 1F) 显示,与癌旁组织相比, CRC 组织中 METTL3、RNASEH1-AS1、BUD13、ANXA2、 $\beta$ -catenin、GSK-3 $\beta$  的表达均呈明显高表达 (均  $P < 0.01$ ); CRC 组织中 RNASEH1-AS1 与 METTL3 (图 1G;  $r = 0.698$ ,  $P < 0.01$ )、BUD13 (图 1H,  $r = 0.784$ ,  $P < 0.01$ ) 的表达均呈正相关。数据库分析结果和国人 CRC 组织和癌旁组织 qPCR 检测结果均证实 RNASEH1-AS1、METTL3、BUD13 在 CRC 中均呈高表达, RNASEH1-AS1 的表达与 METTL3 和 BUD13 的表达均呈正相关。



A: StarBase 数据库分析 RNASEH1-AS1 在 CRC 组织中的表达; B: 数据库分析 BUD13 在 CRC 组织中的表达; C、D: StarBase 数据库分析 RNASEH1-AS1 与 METTL3 (C) 和 BUD13 (D) 表达的相关性; E: RNASEH1-AS1 RNA 全长 m<sup>6</sup>A 甲基化修饰位点预测; F: qPCR 法检测中国人 CRC 组织中 METTL3、RNASEH1-AS1、BUD13、ANXA2、 $\beta$ -catenin、GSK-3 $\beta$  的表达; G、H: qPCR 法检测中国人 CRC 组织中 RNASEH1-AS1 表达与 METTL3 (G) 和 BUD13 (H) 表达的相关性。

图 1 在 CRC 组织中 RNASEH1-AS1 表达与 METTL3 和 BUD13 表达的相关性

2.2 METTL3、RNASEH1-AS1、BUD13、ANXA2 mRNA 在结直肠癌细胞中呈高表达

qPCR 法检测结果 (图 2) 显示, 与正常结肠 NCM460

细胞相比, SW480、HCT116、LoVo 和 SW620 细胞中 METTL3、RNASEH1-AS1、BUD13、ANXA2 表达均呈高表达 (图 2, 均  $P < 0.05$ )。由于 SW480 细胞中上述分子

的表达水平最高,因此后续实验选用SW480细胞。

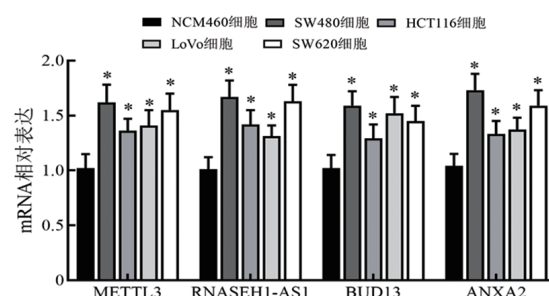
2.3 敲减RNASEH1-AS1或METTL3后SW480细胞中RNASEH1-AS1、BUD13、ANXA2表达显著下调而过表达RNASEH1-AS1后表达明显上调

qPCR检测结果(图3)显示,与对照组和sh-NC组相比,sh-RNASEH1-AS1组SW480细胞中RNASEH1-AS1、BUD13、ANXA2表达均显著降低(均 $P<0.05$ );与对照组和NC组相比,sh-METTL组SW480细胞中METTL3、RNASEH1-AS1、BUD13、ANXA2表达均显著降低(均 $P<0.05$ );与sh-METTL组和sh-METTL+pc-NC组相比,sh-METTL+pc-ASEH1-AS1组SW480细胞中RNASEH1-AS1、BUD13、ANXA2表达均显著升高(均 $P<0.05$ )。实验结果说明,SW480细胞中RNASEH1-AS1、METTL3、BUD13、ANXA2的表达特征一致即RNASEH1-AS1与METTL3、BUD13、ANXA2的表达呈正相关趋势。

2.4 敲减RNASEH1-AS1或METTL可抑制SW480细胞增殖而过表达ASEH1-AS1则可促进其增殖

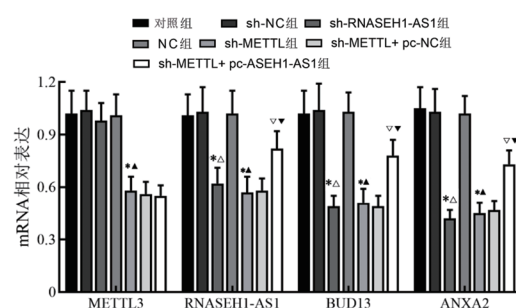
细胞克隆形成实验检测结果(图4)显示,与对照组和sh-NC组相比,sh-RNASEH1-AS1组SW480细胞的克隆形成数显著降低(均 $P<0.05$ ),sh-METTL组细胞克隆形成数也较对照组和NC组均显著减少(均 $P<0.05$ );与sh-METTL组和sh-METTL+pc-NC组相比,sh-METTL+pc-ASEH1-AS1组细胞克隆形成数显著增加(均 $P<0.05$ )。实验结果说明,敲减-RNASEH1-AS1或METTL均可抑制SW480

的增殖活性,过表达ASEH1-AS1则可以增强SW480细胞的增殖活性。



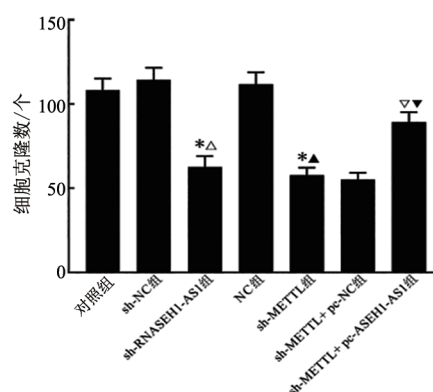
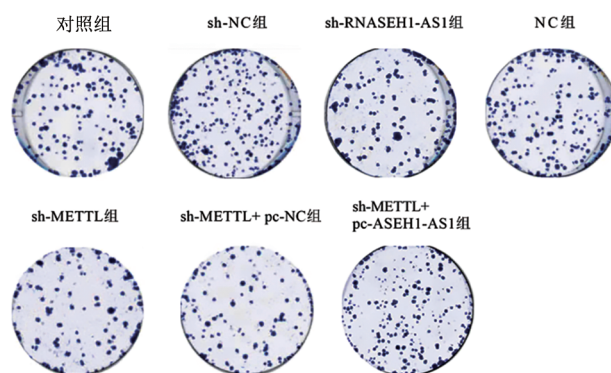
与NCM460细胞相比,\* $P<0.05$ 。

图2 正常结肠NCM460细胞和各CRC细胞中METTL3、RNASEH1-AS1、BUD13、ANXA2的表达



与对照组相比,\* $P<0.05$ ;与sh-NC组相比, $\Delta P<0.05$ ;  
与NC相比, $\Delta P<0.05$ ;与sh-METTL相比, $\nabla P<0.05$ ;  
与sh-METTL+pc-NC组相比, $\blacktriangledown P<0.05$ 。

图3 各组SW480细胞中RNASEH1-AS1、METTL3、BUD13、ANXA2的表达



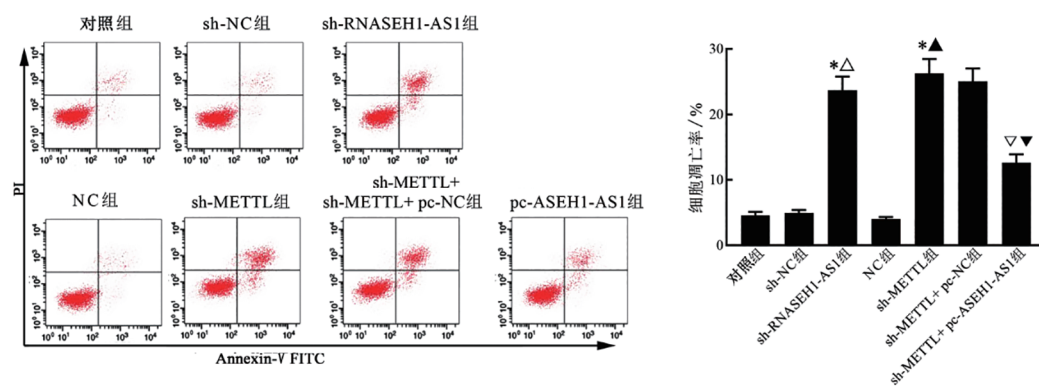
与对照组相比,\* $P<0.05$ ;与sh-NC组相比, $\Delta P<0.05$ ;与NC相比, $\Delta P<0.05$ ;  
与sh-METTL相比, $\nabla P<0.05$ ;与sh-METTL+pc-NC组相比, $\blacktriangledown P<0.05$ 。

图4 转染各组SW480细胞的增殖情况( $\times 40$ )

2.5 敲减RNASEH1-AS1或METTL促进SW480细胞凋亡而过表达ASEH1-AS1则可抑制其凋亡

FCM术检测结果(图5)显示,与对照组和sh-NC组相比,sh-RNASEH1-AS1组SW480细胞凋亡率显著升高(均 $P<0.05$ ),sh-METTL组细胞凋亡率也较对照组

和NC组显著升高(均 $P<0.05$ );与sh-METTL组和sh-METTL+pc-NC组相比,sh-METTL+pc-ASEH1-AS1组细胞凋亡数显著降低(均 $P<0.05$ )。实验结果说明,敲减-RNASEH1-AS1或METTL均可促进SW480细胞的凋亡,过表达ASEH1-AS1则可抑制其凋亡。



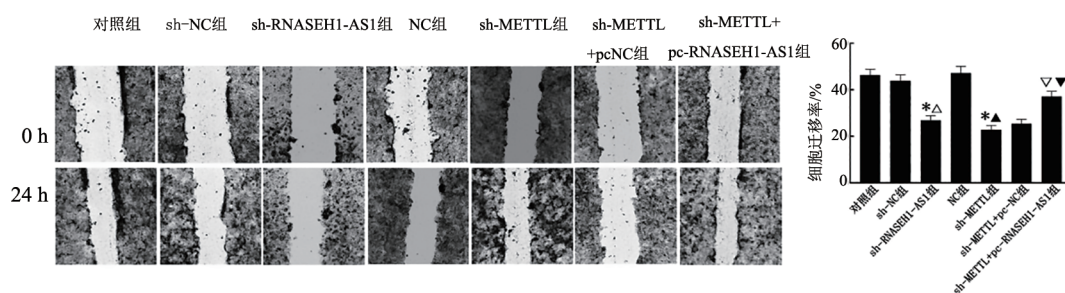
与对照组相比, \* $P<0.05$ ; 与 sh-NC 组相比, △ $P<0.05$ ; 与 NC 相比, ▲ $P<0.05$ ; 与 sh-METTL 相比, ▽ $P<0.05$ ; 与 sh-METTL+pc-NC 组相比, ▼ $P<0.05$ 。

图5 各组SW480细胞的凋亡情况

## 2.6 敲减 RNASEH1-AS1 或 METTL 抑制 SW480 细胞迁移而过表达 ASEH1-AS1 则可促进其迁移

细胞划痕实验检测结果(图6)显示,与对照组和 sh-NC 组相比,sh-RNASEH1-AS1 组 SW480 细胞迁移率显著变低(均  $P<0.05$ ),sh-METTL 组细胞迁移率也较对

照组和 NC 组显著变低(均  $P<0.05$ );与 sh-METTL 组和 sh-METTL+pc-NC 组相比,sh-METTL+pc-ASEH1-AS1 组细胞迁移率显著变高(均  $P<0.05$ )。实验结果说明,敲减-RNASEH1-AS1 或 METTL 均可抑制 SW480 细胞的迁移,过表达 ASEH1-AS1 则可促进其迁移。



与对照组相比, \* $P<0.05$ ; 与 sh-NC 组相比, △ $P<0.05$ ; 与 NC 相比, ▲ $P<0.05$ ; 与 sh-METTL 相比, ▽ $P<0.05$ ; 与 sh-METTL+pc-NC 组相比, ▼ $P<0.05$ 。

图6 各组SW480细胞的迁移情况(×40)

## 2.7 敲减 RNASEH1-AS1 或 METTL 可抑制 SW480 细胞中 p-β-catenin、p-GSK-3β、c-Myc、cyclinD1 蛋白的表达而过表达 ASEH1-AS1 则可促进它们表达

WB法检测结果(图7)显示,与对照组和sh-NC 组相比,sh-RNASEH1-AS1 组 SW480 细胞中p-β-catenin、p-GSK-3β、c-Myc、cyclinD1 蛋白水平均显著降低(均  $P<0.05$ ),sh-METTL 组细胞中 p-β-catenin、p-GSK-3β、c-Myc、cyclinD1 蛋白的表达水平也较对照组和 NC 组显著降低(均  $P<0.05$ );与 sh-METTL 组和 sh-METTL+pc-NC 组相比,sh-METTL+pc-ASEH1-AS1 组细胞中 p-β-catenin、p-GSK-3β、c-Myc、cyclinD1 蛋白的表达水平均显著升高(均  $P<0.05$ )。实验结果说明,敲减RNASEH1-AS1 或 METTL 均可抑制 SW480 中 p-β-catenin、p-GSK-3β、c-Myc、cyclinD1 蛋白的表达,过表达 ASEH1-AS1 则可促进这些分子的表达。

## 2.8 RNASEH1-AS1 通过招募 BUD13 来促进 CRC

### 细胞中 ANXA2 的表达

StarBase 数据库预测发现 RNASEH1-AS1 与 BUD13、BUD13 与 ANXA2 具有相互结合位点(图8A~B)。RIP实验检测结果(图8C)显示,与IgG组相比,RNASEH1-AS1、BUD13、ANXA2在Ago2组中显著升高(均  $P<0.05$ ),实验结果证实了RNASEH1-AS1、BUD13和ANXA2可以相互结合。此外,与对照组和 sh-NC 组相比,sh-RNASEH1-AS1 组 SW480 细胞中RNASEH1-AS1、BUD13、ANXA2 表达均显著降低(均  $P<0.05$ );与对照组和 si-NC 组相比,si-BUD13 组 SW480 细胞 BUD13、ANXA2 表达显著降低(图8D,均  $P<0.05$ )。实验结果说明,RNASEH1-AS1 可招募 BUD13 来靶向促进 SW480 细胞中 ANXA2 的表达。

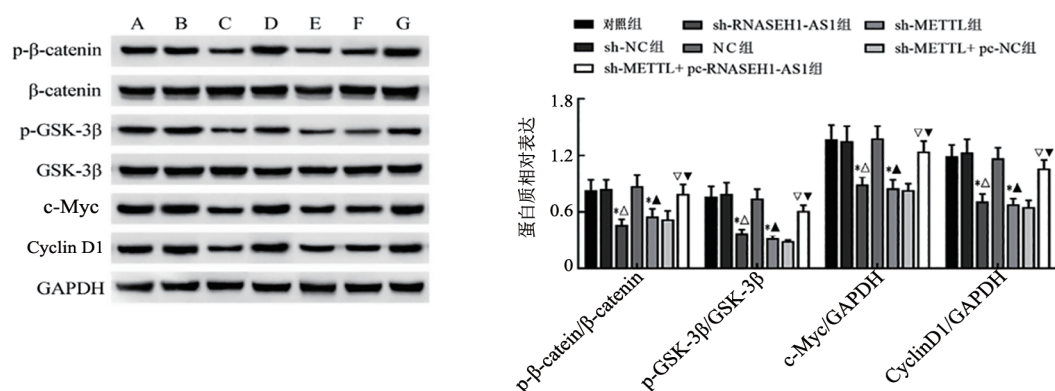
## 2.9 过表达 ANXA2 可部分逆转敲减 RNASEH1-AS1 对 SW480 细胞的影响

qPCR法检测结果(图9)显示,与对照组和 sh-NC



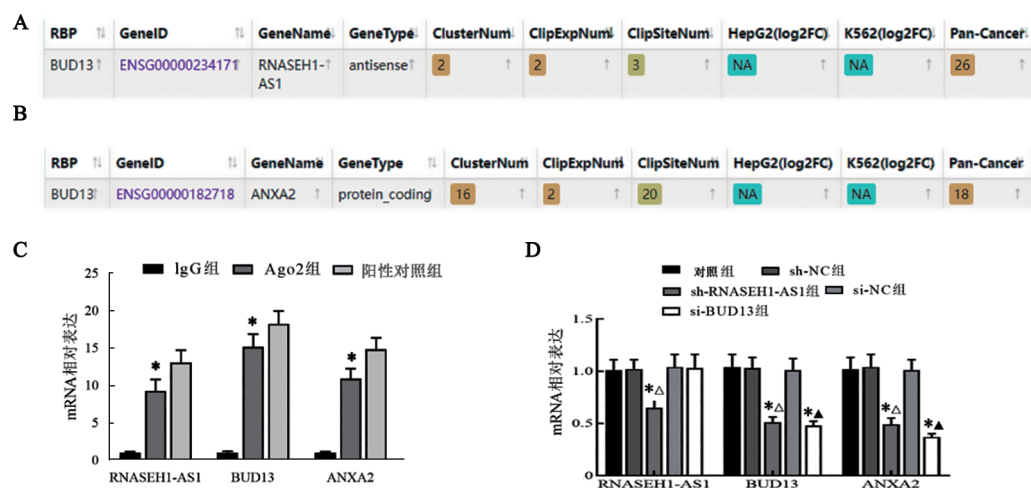
组比较, sh-RNASEH1-AS1组SW480细胞中ANXA2、RNASEH1-AS1、BUD13的表达、细胞克隆数、细胞迁移率、ANXA2、p- $\beta$ -catenin、p-GSK-3 $\beta$ 、c-Myc、cyclinD1蛋白表达均显著降低(均 $P<0.05$ ),细胞凋亡率显著升高( $P<0.05$ );与sh-RNASEH1-AS1组和sh-RNASEH1-AS1+pc-NC组相比,sh-RNASEH1-

AS1+pc-ANXA2组SW480细胞中ANXA2表达、细胞克隆数、细胞迁移率、p- $\beta$ -catenin、p-GSK-3 $\beta$ 、c-Myc、cyclinD1蛋白表达均显著升高(均 $P<0.05$ ),细胞凋亡率显著降低(均 $P<0.05$ )。实验结果说明,过表达ANXA2可部分逆转敲减RNASEH1-AS1对SW480细胞的影响。



A: 对照组; B: sh-NC组; C: sh-RNASEH1-AS1组; D: NC组; E: sh-METTL; F: sh-METTL+pc-NC组; G: sh-METTL+pc-ANXA2组。与对照组相比,  $*P<0.05$ ; 与 sh-NC组相比,  $^{\wedge}P<0.05$ ; 与 NC组相比,  $^{\Delta}P<0.05$ ; 与 sh-METTL相比,  $^{\nabla}P<0.05$ ; 与 sh-METTL+pc-NC组相比,  $^{\nabla}P<0.05$ 。

图7 各组SW480细胞中 $\beta$ -catenin、p- $\beta$ -catenin、GSK-3 $\beta$ 、p-GSK-3 $\beta$ 、c-Myc、cyclinD1蛋白表达



A: StarBase数据库预测RNASEH1-AS1与BUD13的结合位点; B: StarBase数据库预测BUD13与ANXA2的结合位点; C: RIP检测SW480细胞中RNASEH1-AS1与BUD13的表达; D: qPCR检测SW480细胞中RNASEH1-AS1、BUD13和ANXA2水平。

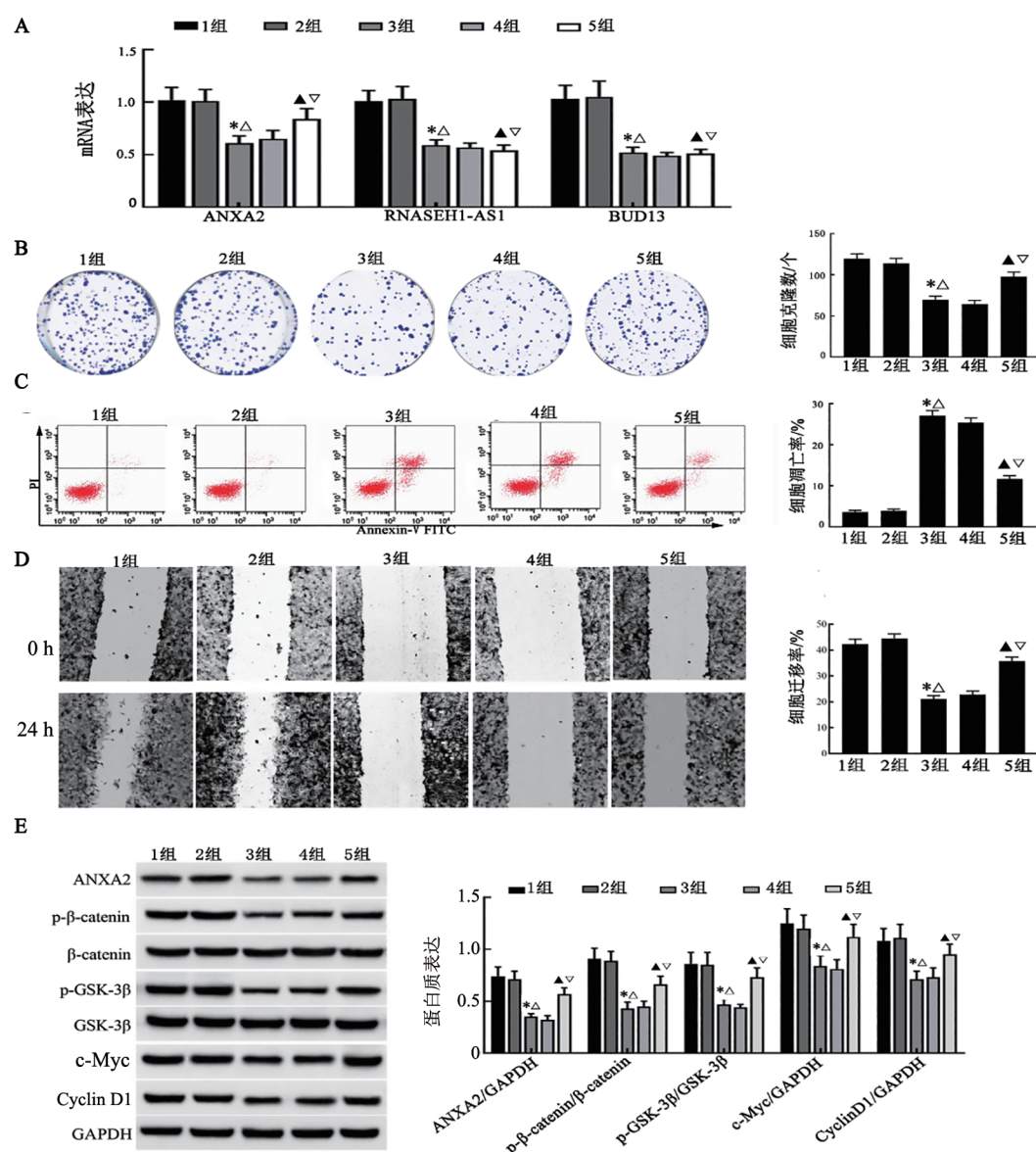
与IgG组相比或对照组相比,  $*P<0.05$ ; 与 sh-NC组相比,  $^{\wedge}P<0.05$ ; 与 si-NC相比,  $^{\Delta}P<0.05$ 。

图8 SW480细胞中RNASEH1-AS1与BUD13、BUD13和ANXA2的相关性

### 3 讨论

lncRNA是长度大于200 nt的非编码RNA,其在各种类型的癌细胞中异常表达,在癌症的发生发展过程中起着至关重要的作用<sup>[8]</sup>。lncRNA参与CRC发生发展也有诸多报道。lncRNA SNHG6可通过靶向UPF1激活TGF- $\beta$ /smad信号通路促进CRC细胞增殖、转移<sup>[9]</sup>。LIN等<sup>[10]</sup>研究表明, lncRNA ITGB8-AS1

作为一种竞争的内源性RNA,可通过调节局灶性黏附信号转导来促进CRC细胞的增殖、迁移。研究<sup>[11]</sup>发现, RNASEH1-AS1可促进非小细胞肺癌的生长、转移和上皮间质转化,加剧非小细胞肺癌的进展。本研究结果也显示, CRC组织中RNASEH1-AS1表达高于癌旁组织, CRC细胞中RNASEH1-AS1表达也高于正常结直肠细胞, 下调RNASEH1-AS1表达可抑制SW480细胞增殖、迁移,



1组:对照组;2组:sh-NC组;3组:sh-RNASEH1-AS1组;4组:sh-RNASEH1-AS1+pc-NC组;5组:sh-RNASEH1-AS1+pc-ANXA2组。A:qPCR检测SW480细胞ANXA2、RNASEH1-AS1、BUD13表达水平;B:细胞克隆形成实验检测各组SW480细胞的增殖能力( $\times 40$ );C:FCM术检测各组SW480细胞的凋亡情况;D:细胞划痕实验检测各组SW480细胞的迁移能力( $\times 40$ );E:WB检测各组SW480细胞中ANXA2、 $\beta$ -catenin、p- $\beta$ -catenin、GSK-3 $\beta$ 、p-GSK-3 $\beta$ 、c-Myc、cyclinD1蛋白表达。与对照组相比,\* $P < 0.05$ ;与sh-NC组相比, $\Delta P < 0.05$ ;与sh-RNASEH1-AS1组相比, $\Delta P < 0.05$ ;与sh-RNASEH1-AS1+pc-NC组相比, $\nabla P < 0.05$ 。

图9 过表达ANXA2可部分逆转敲减RNASEH1-AS1对SW480细胞的影响

并促进细胞凋亡,这表明RNASEH1-AS1参与CRC的发生发展。目前已知RNA有150多种表观遗传修饰, $m^6A$ 是真核细胞中最主要的RNA修饰, $m^6A$ 修饰由甲基转移酶METTL3、METTL14等对腺嘌呤核糖核苷酸的第6位N原子进行甲基修饰<sup>[12]</sup>。 $m^6A$ 修饰位点可被许多 $m^6A$ 结合蛋白识别,识别不同基因上的 $m^6A$ 位点发挥着不同的功能,如RNA稳定性、剪接、结构、出核、翻译效率以及miRNA生物合成。 $m^6A$ 碱基修饰影响几乎所有重要的细胞生物学过程、细胞成分和分子功能,一旦 $m^6A$ 修饰过程异常,就会引起一系列疾病,包括癌症,神经系统疾病和生长障

碍<sup>[13-14]</sup>等。METTL3作为 $m^6A$ 修饰的关键甲基转移酶,在稳定lncRNA方面发挥重要作用<sup>[5]</sup>。ZHENG等<sup>[15]</sup>研究发现,上调METTL3可通过影响lncRNA PTTG3P的稳定性而增加其表达,从而通过CRC糖酵解促进CRC的增殖。本研究发现,CRC组织中METTL3表达高于癌旁组织,CRC组织中RNASEH1-AS1的表达与METTL3的表达呈正相关。下调SW480细胞,METTL3后,RNASEH1-AS1表达显著下降,并且会抑制SW480细胞增殖、迁移,促进细胞凋亡。通过StarBase数据库分析发现,METTL3与RNASEH1-AS1具有相互结合作用。为进一步分



析 RNASEH1-AS1 是否可通过 METTL3 影响 SW480 细胞,本研究敲减 RNASEH1-AS1 表达后进一步过表达 METTL3,结果发现过表达 METTL3 可部分逆转敲减 RNASEH1-AS1 表达对 SW480 细胞增殖和迁移的抑制作用,并减少 SW480 细胞凋亡。这些结果表明, METTL3 介导的 RNASEH1-AS1 可影响 SW480 细胞增殖和迁移。

研究<sup>[16]</sup>发现, lncRNA 通过作为竞争性内源 RNA 调节关键基因的表达,以及与 RNA 结合蛋白结合调控下游基因表达,在调控 CRC 发生发展中发挥重要作用。BUD13 是保留和拼接复合物的一个亚基,可维持细胞分裂,具有成熟 mRNA 的剪切作用。XING 等<sup>[17]</sup>研究发现, circSERPINA3 通过竞争性结合 miR-653-5p 和募集 BUD13 调节 SERPINA3 介导的前列腺癌细胞凋亡、自噬和有氧糖酵解。本研究通过 StarBase 数据库分析发现, RNASEH1-AS1 与 BUD13 具有相互结合位点, CRC 组织中 BUD13 表达高于癌旁组织,并且 RNASEH1-AS1 水平与 BUD13 水平呈正相关。细胞实验结果发现, SW480 细胞中 BUD13 呈高表达,抑制 RNASEH1-AS1 表达会进一步抑制 BUD13 的表达。另外, RIP 法实验也表明 BUD13 与 RNASEH1-AS1 具有较好的结合关系,表明 RNASEH1-AS1 通过 BUD13 调节 CRC 细胞的发生发展。

经典 Wnt/β-catenin 信号通路中, Wnt 蛋白与其受体结合后,可阻断由细胞支架蛋白、GSK-3β 等编码蛋白组成的降解复合体降解 β-catenin<sup>[18]</sup>; 并且细胞 cyclin D1 和 c-Myc 基因均为 Wnt 通路的下游蛋白, cyclin D1 的主要功能是促进细胞增殖, c-Myc 基因参与细胞凋亡等过程,两者与多种肿瘤发生发展密切相关<sup>[19]</sup>。研究<sup>[20]</sup>发现, ANXA2 干扰多个细胞过程,其通过结合 GSK-3β 破坏肝细胞中 GSK3β/β-catenin 复合物的形成,防止 β-catenin 磷酸化和降解,进而激活 Wnt/β-catenin 信号转导来促进肝癌生成。TANG 等<sup>[21]</sup>也研究发现, ANXA2 过表达可以促进乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖、迁移和侵袭,并伴随着 Wnt/β-catenin 信号转导和 EMT 过程的激活。本研究发现, GSK-3β 和 β-catenin 在 CRC 组织中呈高表达,抑制 RNASEH1-AS1 的表达后 SW480 细胞中 BUD13、ANXA2、p-β-catenin、p-GSK-3β、c-Myc、cyclinD1 表达显著下降。同时,本研究通过 StarBase 数据库分析发现, BUD13 与 ANXA2 具有相互结合位点, RIP 法实验也表明 BUD13 与 ANXA2 具有较好的结合关系;实验结果显示, SW480 细胞中敲减 BUD13 表达可抑制 ANXA2 表达。另外,研究还进一步发现过表达 ANXA2 可部分逆转敲减 RNASEH1-AS1 对 SW480 细胞增殖、迁移的抑制作用,增加细胞凋亡以及

p-β-catenin、p-GSK-3β、c-Myc、cyclinD1 蛋白的表达,表明 RNASEH1-AS1 可能通过招募 BUD13 维持 ANXA2 mRNA 稳定性,进而激活 Wnt/β-catenin 信号,促进 CRC 发生发展。

综上所述, METTL3 介导 RNASEH1-AS1 通过靶向招募 BUD13 进而调控 ANXA2 表达,促进 CRC 细胞增殖、迁移,降低细胞凋亡,并激活 Wnt/β-catenin 通路,最终促进 CRC 的发生发展。本研究后续将进一步通过敲低 Wnt/β-catenin 轴上下游分子验证其对细胞生物学行为的影响,并通过体内裸鼠成瘤实验验证细胞水平结果,为 CRC 发生发展机制提供更有价值的理论依据,也为如何阻断 CRC 的发生发展和转移过程提供相关的实验基础。

## [参 考 文 献]

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424. DOI: 10.3322/caac.21492.
- [2] 谭宜, 高华, 郭杨超, 等. 结直肠癌组织 AGR2、MFAP2 蛋白表达与临床病理特征和预后的关系研究[J]. *现代生物医学进展*, 2022, 22(6): 1116-1120. DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.06.025.
- [3] ZHAO Y Y, CHU Y J, SUN J, *et al.* LncRNA GAS8-AS inhibits colorectal cancer (CRC) cell proliferation by downregulating lncRNA AFAP1-AS1[J]. *Gene*, 2019, 710: 140-144. DOI: 10.1016/j.gene.2019.05.040.
- [4] MA Z H, JI J F. N<sup>6</sup>-methyladenosine (m<sup>6</sup>A) RNA modification in cancer stem cells[J]. *Stem Cells*, 2020, 38(12): 1511-1519. DOI: 10.1002/stem.3279.
- [5] MA Y N, HONG Y G, YU G Y, *et al.* LncRNA LBX2-AS1 promotes colorectal cancer progression and 5-fluorouracil resistance[J/OL]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1): 501[2023-08-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34535128/>. DOI: 10.1186/s12935-021-02209-y.
- [6] SONG Y P, GAO F, PENG Y, *et al.* Long non-coding RNA DBH-AS1 promotes cancer progression in diffuse large B-cell lymphoma by targeting FN1 via RNA-binding protein BUD13[J]. *Cell Biol Int*, 2020, 44(6): 1331-1340. DOI: 10.1002/cbin.11327.
- [7] SUN T F, ZHANG J. ETV4 mediates the Wnt/β-catenin pathway through transcriptional activation of ANXA2 to promote hepatitis B virus-associated liver hepatocellular carcinoma progression[J]. *J Biochem*, 2021, 170(5): 663-673. DOI: 10.1093/jb/mvab088.
- [8] WANG L Y, CHO K B, LI Y, *et al.* Long noncoding RNA (lncRNA)-mediated competing endogenous RNA networks provide novel potential biomarkers and therapeutic targets for colorectal cancer[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(22): 5758. <https://doi.org/10.3390/ijms20225758>. DOI: 10.3390/ijms20225758.
- [9] WANG X K, LAI Q H, HE J, *et al.* LncRNA SNHG6 promotes proliferation, invasion and migration in colorectal cancer cells by activating TGF-β/Smad signaling pathway via targeting UPF1 and inducing EMT via regulation of ZEB1[J]. *Int J Med Sci*, 2019, 16(1): 51-59. DOI: 10.7150/ijms.27359.

- [10] LIN X T, ZHUANG S W, CHEN X, *et al.* lncRNA ITGB8-AS1 functions as a ceRNA to promote colorectal cancer growth and migration through integrin-mediated focal adhesion signaling[J]. *Mol Ther*, 2022, 30(2): 688-702. DOI: 10.1016/j.ymthe.2021.08.011.
- [11] ZHANG C, HUANG J, LOU K, *et al.* Long noncoding RNASEH1-AS1 exacerbates the progression of non-small cell lung cancer by acting as a ceRNA to regulate microRNA-516a-5p/FOXK1 and thereby activating the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway[J]. *Cancer Med*, 2022, 11(7): 1589-1604. DOI: 10.1002/cam4.4509.
- [12] WANG L L, HUI H, AGRAWAL K, *et al.* m<sup>6</sup>A RNA methyltransferases METTL3/14 regulate immune responses to anti-PD-1 therapy[J/OL]. *EMBO J*, 2020, 39(20): e104514[2023-08-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32964498/>. DOI: 10.15252/embj.2020104514.
- [13] HE L E, LI H Y, WU A Q, *et al.* Functions of N<sup>6</sup>-methyladenosine and its role in cancer[J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 1-15. DOI: 10.1186/s12943-019-1109-9.
- [14] NIU Y M, ZHAO X, WU Y S, *et al.* N<sup>6</sup>-methyl-adenosine (m<sup>6</sup>A) in RNA: an old modification with a novel epigenetic function[J]. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2013, 11(1): 8-17. DOI: 10.1016/j.gpb.2012.12.002.
- [15] ZHENG Y, WANG Y, LIU Y Y, *et al.* N<sup>6</sup>-methyladenosine modification of PTTG3P contributes to colorectal cancer proliferation *via* YAP1[J/OL]. *Front Oncol*, 2021, 11: 669731[2023-08-10]. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.669731>. DOI: 10.3389/fonc.2021.669731.
- [16] LAN Y, XIAO X W, HE Z C, *et al.* Long noncoding RNA OCC-1 suppresses cell growth through destabilizing HuR protein in colorectal cancer[J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(11): 5809-5821. DOI: 10.1093/nar/gky214.
- [17] XING Z S, LI S L, LIU Z X, *et al.* CircSERPINA3 regulates SERPINA3-mediated apoptosis, autophagy and aerobic glycolysis of prostate cancer cells by competitively binding to miR-653-5p and recruiting BUD13[J]. *J Transl Med*, 2021, 19(1): 1-13. DOI: 10.1186/s12967-021-03063-2.
- [18] ANTHONY C C, ROBBINS D J, AHMED Y, *et al.* Nuclear regulation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling: it's a complex situation[J/OL]. *Genes*, 2020, 11(8): 886[2023-08-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32759724/>. DOI: 10.3390/genes11080886.
- [19] MOON H, PARK H, RO S W. c-Myc-driven hepatocarcinogenesis [J]. *Anticancer Res*, 2021, 41(10): 4937-4946. DOI: 10.21873/anticancer.15307.
- [20] YAN X L, ZHANG D D, WU W, *et al.* Mesenchymal stem cells promote hepatocarcinogenesis *via* lncRNA-MUF interaction with ANXA2 and miR-34a[J]. *Cancer Res*, 2017, 77(23): 6704-6716. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-17-1915.
- [21] TANG T T, GUO C Y, XIA T S, *et al.* LncCCAT1 promotes breast cancer stem cell function through activating WNT/ $\beta$ -catenin signaling [J]. *Theranostics*, 2019, 9(24): 7384-7402. DOI: 10.7150/thno.37892.

[收稿日期] 2023-08-15

[修回日期] 2023-11-03

[本文编辑] 向正华, 沈志超