

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2025.02.002

· 基础研究 ·

WTAP通过m⁶A修饰增强MAP3K9 mRNA稳定性促进食管鳞状细胞癌细胞的恶性生物学行为

潘英杰^{1,2}, 孙珊^{1,2}, 杨航², 谭劲松², 陈巧玲², 赵全能², 杨蜜², 刘康², 宋桂芹¹(1. 川北医学院基础医学与法医学研究所, 四川 南充 637100; 2. 川北医学院第二临床医学院暨首都医科大学附属北京安贞医院南充医院暨南充市中心医院 组织工程与干细胞研究所, 四川 南充 637000)

[摘要] **目的:** 探讨肾母细胞瘤1相关蛋白(WTAP)对食管鳞状细胞癌(ESCC)细胞生物学特性的影响及分子机制。**方法:** 收集2019年9月至2021年4月期间在川北医学院第二临床医学院手术切除的31对ESCC组织及其配对的癌旁组织, 常规培养食管癌细胞KYSE30、KYSE410、KYSE150、KYSE510、TE-1和正常人食管上皮细胞HET-1A, 用转染试剂将si-NC、si-WTAP#1和si-WTAP#2核酸转染至KYSE150和KYSE510细胞中, 实验分为si-NC、si-WTAP#1和si-WTAP#2组, 用qPCR法检测各组细胞中WTAP和MAP3K9 mRNA的表达, CCK-8法、克隆形成实验、划痕愈合实验、Transwell小室实验检测敲减WTAP表达对ESCC细胞增殖、迁移、侵袭能力和凋亡的影响, WB法检测各组ESCC细胞中WTAP、MAP3K9、EMT及MAPK通路相关蛋白的表达, 免疫组化法检测ESCC组织中WTAP蛋白的表达, 甲基化RNA免疫共沉淀(MeRIP)-qPCR实验检测ESCC细胞MAP3K9 m⁶A水平, 放线菌素D实验检测MAP3K9的mRNA的稳定性, 用数据库数据分析WTAP的表达、靶基因、功能富集和互作RNA。**结果:** WTAP在ESCC组织和细胞中高表达($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)且与分化程度有关联($P < 0.01$); 在KYSE150和KYSE510细胞中成功地敲减了WTAP mRNA和蛋白的表达($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$); 敲减WTAP可明显抑制KYSE150和KYSE510细胞的增殖、迁移和侵袭能力($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$), 促进KYSE150和KYSE510细胞凋亡($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 敲低WTAP后MAP3K9的m⁶A水平显著下降($P < 0.05$), 其mRNA表达水平及mRNA稳定性均显著降低($P < 0.05$); 数据库数据分析显示, WTAP靶基因富集于MAPK信号通路; 敲减WTAP后KYSE150和KYSE510细胞中MAP3K9、p-ERK、N-cadherin和MMP9表达水平显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), E-cadherin表达水平显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论:** WTAP在ESCC组织和细胞中呈高表达且与其分化相关, 其通过m⁶A修饰促进MAP3K9 mRNA稳定性, 激活MAPK通路进而促进ESCC细胞的恶性生物学行为。

[关键词] 食管鳞状细胞癌; 肾母细胞瘤1相关蛋白; N⁶-甲基腺苷; 增殖; 迁移; 侵袭; 凋亡

[中图分类号] R735.1; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2025)02-0140-11

WTAP enhances MAP3K9 mRNA stability via m⁶A modification to promote malignant biological behaviors in esophageal squamous cell carcinoma cells

PAN Yingjie^{1,2}, SUN Shan^{1,2}, YANG Hang², TAN Jinsong², CHEN Qiaoling², ZHAO Quanneng², YANG Mi², LIU Kang², SONG Guiqin¹(1. Institute of Basic Medicine and Forensic Medicine, North Sichuan Medical College, Nanchong 637100, Sichuan, China; 2. Institute of Tissue Engineering and Stem Cell Research, the Second Clinical College of North Sichuan Medical College & Beijing Anzhen Nanchong Hospital Affiliated to Capital Medical University & Nanchong Central Hospital, Nanchong 637000, Sichuan, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects and molecular mechanisms of Wilms tumor 1-associated proteins (WTAP) on the cell biological properties of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) cells. **Methods:** 31 pairs of ESCC tissues and their paired paracancerous tissues that were surgically resected at the Second Clinical Medical College of Chuanbei Medical College between September 2019 and April 2021 were collected. The esophageal cancer cells KYSE30, KYSE410, KYSE150, KYSE510, TE-1, and normal human esophageal epithelial cells HET-1A were routinely cultured. Transfection reagents were used to transfect si-NC, si-WTAP#1 and si-WTAP#2 nucleic acids into KYSE150 and KYSE510 cells. The cells were divided into si-NC, si-WTAP#1 and si-WTAP#2 groups. The expressions of WTAP and MAP3K9 mRNA were detected in the cells of each group by qPCR assay. CCK-8

[基金项目] 国家自然科学基金项目(No.82203851); 四川省科技计划资助项目(No.2023YFSY0045, No.2023NSFSC0731); 四川省卫健委普及应用项目(No.21PJ194); 南充市校企合作项目(No.22SXQT0336); 南充市基础研究平台项目(No.23JCYJPT0027, No.22SXQT0096, No.22SXQT0087)

[作者简介] 潘英杰(2001—), 女, 硕士生, 主要从事肿瘤发生的基础机制及生物治疗研究。E-mail: panpan02082022@163.com

[通信作者] 宋桂芹, E-mail: songguiqin@nsmc.edu.cn; 刘康, E-mail: liukang@nsmc.edu.cn

assay, clone formation assay, and scratch healing assay, Transwell assay were employed to detect the effects of knockdown of WTAP expression on ESCC cell proliferation, migration, invasion and apoptosis. WB assay was used to detect the expressions of WTAP, MAP3K9, EMT and MAPK pathway-related proteins in ESCC cells of each group knocked down of WTAP; immunohistochemistry to detect the expression of WTAP proteins in ESCC tissues, immunoprecipitation of methylated RNA (MeRIP)-qPCR assay to detect the level of MAP3K9 m⁶A in ESCC cells, actinomycin D assay to detect the stability of mRNA of MAP3K9, and database data to analyze the expression, target genes, functional enrichment, and interacting RNA of WTAP. **Results:** WTAP was highly expressed in ESCC tissues and cells ($P < 0.05$ or $P < 0.01$ or $P < 0.001$) and correlated with the degree of differentiation ($P < 0.01$); the expression of WTAP mRNA and its protein were successfully knocked down in KYSE150 and KYSE510 cells ($P < 0.01$ or $P < 0.001$); the knockdown of WTAP significantly inhibited the proliferation, migration and invasion of KYSE150 and KYSE510 cells ($P < 0.05$ or $P < 0.01$ or $P < 0.001$), and promoted the apoptosis of KYSE150 and KYSE510 cells ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Knockdown of WTAP resulted in a significant decrease in the m⁶A level of MAP3K9 ($P < 0.05$), and its mRNA expression level and mRNA stability were both significantly reduced ($P < 0.05$). Database data analysis showed that WTAP target genes clustered in the MAPK signaling pathway; the expression levels of MAP3K9, p-ERK, N-cadherin, and MMP9 were significantly reduced ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the expression level of E-cadherin was significantly elevated ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) in the KYSE150 and KYSE510 cells after knockdown of WTAP. **Conclusions:** WTAP is highly expressed in ESCC tissues and cells and correlates with their differentiation. It promotes the stability of MAP3K9 mRNA through m⁶A modification, activates the MAPK pathway and thus promotes the malignant biological behaviors of ESCC cells.

[Key words] esophageal squamous cell carcinoma (ESCC); Wilms tumor 1-associated protein (WTAP); N⁶-methyladenosine (m⁶A); proliferation; migration; invasion; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2025, 32(2): 140-150. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2025.02.002]

食管癌是全球第七大癌症死亡原因,最新数据显示,2022年有50多万新发病例和40多万死亡病例^[1]。在中国,食管癌病死率在恶性肿瘤中排第五位,其中90%以上的病例为食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)^[2]。目前,主要通过手术和放化疗治疗ESCC,但效果并不理想,5年生存率低于20%^[3-4]。因此,寻找ESCC的治疗靶点及其分子机制具有重要意义。N⁶-甲基腺苷(N⁶-methyladenosine, m⁶A)是mRNA中最普遍的一种RNA化学修饰。m⁶A酶系统主要由识别蛋白、去甲基酶和甲基转移酶等组成,其中肾母细胞瘤1相关蛋白(Wilms tumor 1-associated protein, WTAP)是m⁶A甲基转移酶复合物(m⁶A methyltransferase complex, MTC)的重要调节亚基,它将MTC募集到靶mRNA上,调节RNA剪接、细胞增殖和肿瘤发生等生物过程^[5-7]。研究^[8]表明,WTAP通过介导FAM83H-AS1的m⁶A修饰促进胃癌的发生发展;WTAP通过调节PLAU稳定性促进喉鳞状细胞癌的进展^[9];然而,m⁶A甲基转移酶WTAP在ESCC发生发展中的作用仍需进一步探索。本研究将WTAP作为切入点,通过构建敲减WTAP的细胞模型,探讨其对ESCC细胞生物学特性的影响,预测并验证其信号通路及下游靶基因,探索其新的分子机制,以期ESCC的治疗提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 组织标本、细胞及主要试剂

收集2019年9月至2021年4月期间在川北医学院第二临床医学院手术切除的31对ESCC组织及其配对的癌旁组织。该研究已获伦理委员会批准,[NSMC伦理项目审(2021)42]。所有ESCC患者及其家属都已充分知情并签署了知情同意书。人ESCC细胞KYSE30、KYSE410购自湖南丰晖生物科技有限公司,KYSE150、TE-1细胞来自上海中国科学院细胞资源中心,KYSE510购自武汉尚恩生物科技有限公司,人正常食管上皮细胞HTE-1A购自上海名劲生物有限公司,RPMI 1640培养基、0.25% EDTA胰蛋白酶、胎牛血清均购自Invitrogen公司,LipofectamineTM 2000转染试剂购自赛默飞公司,CCK-8细胞增殖检测试剂购自江苏凯基生物技术公司,细胞凋亡检测试剂盒、RNA提取试剂盒、逆转录试剂盒、FastPure Cell/Tissue Total RNA Isolation Kit、HiScript II Q RT SuperMix for qPCR(+gDNA wiper)试剂盒和ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix均购自南京诺唯赞生物公司,GAPDH和WTAP抗体均购自武汉菲恩生物公司,MAP3K9抗体购自Affinity公司,辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(H+L)购自碧云天生物公司,通用二步法检测试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司,siRNA由上海艾博思生物公司合成,PCR引物由上海生物工程公司合成^[10]。

1.2 细胞培养、转染及分组

KYSE30细胞用含10%胎牛血清的DMEM培养基,其他ESCC细胞用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基,HET-1A细胞用其专用培养基,置于37℃、

5% CO₂的恒温培养箱中培养。转染前1 d,将细胞以3 × 10⁵个/孔接种于6孔培养板中,第2天待细胞汇合度为50%~70%时进行转染,用Lipofectamine™ 2000转染试剂将阴性对照序列si-NC和敲减序列si-WTAP#1、si-WTAP#2分别转染细胞,转染6 h后,更换为完全培养基并继续培养24~48 h,进行后续实验。

1.3 qPCR法检测各组细胞中WTAP及MAP3K9 mRNA的表达水平

根据FastPure Cell/Tissue Total RNA Isolation Kit说明书,提取各组细胞中的总RNA,按照HiScript II Q RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper)说明书将其反转录为cDNA,再按照qPCR试剂盒说明书步骤进行PCR反应,其参数为:95 °C 3 min,95 °C 30 s、60 °C 30 s,循环数为40。以GAPDH作为内参基因,用2^{-ΔΔCt}法计算目的基因WTAP和MAP3K9的相对表达量。PCR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')
WTAP	CTTCCCAAGAAGGTTTCGATTGA	TCAGACTCTCTTAGGCCAGTTAC
MAP3K9	GCCGTGTTCGAGTACGAGG	GGACACCTGCGAGTCCTTG
GAPDH	GGAGTCCACTGGCGTCTCA	GTCATGAGTCCTTCCACGATACC

1.4 CCK-8法和克隆形成实验检测敲减WTAP表达对ESCC细胞增殖活性的影响

CCK-8法:收集各组细胞,以3 × 10³个/孔接种于96孔板中,每组设计3个复孔。在0、24、48和72 h时,向孔中加入10 μL CCK-8试剂,继续培养1 h,用酶标仪测定450 nm处各孔的光密度(D)值,以D值代表各组细胞的增殖活力。

克隆形成实验:将各组细胞制成单细胞悬液,以1.5 × 10³个/孔接种于6孔板中,每组设置3个复孔,每3 d换一次培养基,待大多数克隆细胞数达到50个以上后,进行固定、染色及PBS冲洗后进行拍照,利用ImageJ软件分析并统计细胞克隆数量。

1.5 划痕愈合实验检测敲减WTAP表达对ESCC细胞迁移能力的影响

划痕愈合实验:将各组细胞接种于6孔板中,当细胞汇合度为70%~80%时,用200 μL吸头画线,PBS洗2次后加入无血清培养基,在0、24 h时在显微镜下观察并拍照记录划痕愈合情况,最后用“划痕愈合率=(初始划痕面积-最终划痕面积)/初始划痕面积×100%”计算细胞划痕的愈合程度。

1.6 Transwell小室实验检测敲减WTAP表达对ESCC细胞迁移和侵袭能力的影响

用无血清培养基将各组细胞制成细胞悬液,调节其密度为3 × 10⁵个/mL。将100 μL细胞悬液加入上室中,在下室中加入600 μL完全培养,培养24 h后,固定小室并染色,除去小室上层细胞,PBS冲洗后,对穿膜细胞进行拍照和计数。Transwell侵袭实验中,上室底铺基质胶处理1 h并加入200 μL细胞悬液,按照与迁移实验相同的步骤进行后续操作。

1.7 流式细胞术检测敲减WTAP对ESCC细胞凋亡率的影响

将各组细胞用无EDTA的胰酶进行消化处理,接着用预冷的PBS清洗2次,去除上清液,根据细胞凋亡试剂盒说明书加入1 × 结合缓冲液、Annexin V-FITC及PI,室温避光处理10 min后,上机检测。

1.8 WB法检测敲减WTAP对ESCC细胞中WTAP、EMT及MAPK通路相关蛋白表达的影响

收集各组细胞,用RIPA裂解液处理后提取各组细胞的总蛋白,加入适量上样缓冲液,100 °C下处理5 min,蛋白样品保存在-20 °C备用。蛋白样品用10% SDS-PAGE分离,然后转移到NC膜上,封闭液处理1 h后,将蛋白条带置于稀释的WTAP(1:3 000)和GAPDH(1:10 000)一抗中,在4 °C摇床上处理过夜,PBST冲洗4次后加入5 mL稀释的二抗,室温处理1 h,PBST洗4次,制备显影液进行蛋白条带显影,最后用ImageJ软件分析蛋白条带灰度值。

1.9 免疫组化法检测ESCC组织中WTAP蛋白的表达

将ESCC癌组织和癌旁组织石蜡切片放入恒温箱中,65 °C下烘烤2 h,经过脱蜡复水过程后,切片再在柠檬酸盐缓冲液中高压加热进行抗原修复,过氧化氢酶阻断剂室温处理10 min,然后用通用二步法检测试剂盒进行后面染色步骤。染色评分:根据细胞染色强度评为4个等级,无阳性着色、淡黄色、棕黄色、棕褐色分别为0、1、2和3分;根据阳性细胞百分比评定为4个等级,≤25%、>25%~≤50%、>50%~≤75%、>75%分别为1、2、3和4分,将这两项评定分数相乘得出最终评分结果,≤7分为阴性,>7分为阳性^[10]。

1.10 甲基化RNA免疫共沉淀(methylated RNA immunoprecipitation, MeRIP)-qPCR实验检测ESCC细胞MAP3K9 m⁶A水平

提取各组ESCC细胞中RNA,对RNA完整性进行质检合格后,用二价阳离子将完整的mRNA打断成

100 bp左右的短片段并分为两部分,一部分与带有m⁶A抗体的免疫磁珠共处理;另一部分作为对照组与蛋白A/G免疫磁珠处理,富集后从RNA-抗体复合物中将mRNA片段消化下来,接着进行反转录和qPCR实验。

1.11 放线菌素D实验检测MAP3K9 mRNA的稳定性

将ESCC细胞铺于6孔板中,待细胞汇合度约为50%时加入放线菌素D(2.5 mg/mL),根据设置时间点收集细胞,提取其总RNA并其反转录为cDNA,然后进行qPCR反应。

1.12 用数据库数据分析WTAP的表达、靶基因、功能富集和互作RNA

利用TIMER2.0数据库中WTAP的表达数据进行在线预测;利用RM2Target数据库(<http://rm2target.canceromics.org/>)筛选WTAP的靶基因,并结合KOBAS数据库(<http://bioinfo.org/kobas/>)进行KEGG功能富集分析;通过CatRAPID数据库(http://s.tartagialab.com/page/catrapid_group)预测与WTAP结合互作的RNA。

1.13 统计学处理

每个实验均独立重复3次。使用GraphPad Prism 8.0软件进行数据分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 WTAP在ESCC组织和细胞中呈高表达且与其分化程度有关联

根据TIMER2.0数据库数据分析结果(图1A)显示,相较于癌旁组织($n = 11$),ESCC组织($n = 184$)中WTAP呈明显高表达($P < 0.001$)。qPCR法检测结果(图1B)显示,在KYSE510、KYSE150、KYSE410、KYSE30及TE-1细胞中的WTAP mRNA表达均明显高于HET-1A细胞($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。由于KYSE150和KYSE510细胞中WTAP mRNA表达水平较其他食管癌细胞高,所以选择这两种细胞做后续实验。为了验证WTAP在ESCC组织中呈高表达,本课题组收集了31例ESCC患者的组织切片进行免疫组化法检测结果(图1C~D)显示,在ESCC组织中WTAP蛋白表达显著高于癌旁组织($P < 0.0001$)。分析WTAP蛋白表达水平与ESCC病理分化程度、患者性别、年龄临床分期和淋巴结是否转移等临床病理特征的关系,结果(图1E~F)显示,在低分化的ESCC组织中WTAP蛋白表达水平均明显高于中分化和高分化的ESCC组织(均 $P < 0.01$),与其他临床病理特征均无明显的关联(均 $P > 0.05$)。实验结果

说明,WTAP在ESCC组织和细胞中呈高表达,且与ESCC的分化程度有关联。

2.2 成功构建敲减了WTAP mRNA及其蛋白表达的KYSE150和KYSE510细胞

qPCR法和WB法结果(图2A~B)显示,与si-NC组比较,si-WTAP#1组和si-WTAP#2组细胞中WTAP mRNA及其蛋白表达均明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。实验结果说明,在KYSE150和KYSE510细胞中成功地敲减了WTAP mRNA和蛋白的表达。

2.3 敲减WTAP可明显抑制KYSE150和KYSE510细胞的增殖能力

CCK-8法和克隆形成实验检测结果(图3)显示,与si-NC组比较,si-WTAP#1和si-WTAP#2组细胞增殖活性和克隆形成数均明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 或 $P < 0.0001$)。实验结果说明,敲减WTAP表达可明显抑制KYSE150和KYSE510细胞的增殖能力。

2.4 敲减WTAP表达可明显抑制KYSE150和KYSE510细胞的迁移和侵袭能力

划痕愈合实验和Transwell小室实验检测结果(图4)显示,与si-NC组比较,si-WTAP#1、si-WTAP#2组KYSE150、KYSE510细胞的划痕愈合率和迁移、侵袭细胞数均明显下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。实验结果表明,敲减WTAP表达可明显抑制KYSE150和KYSE510细胞的迁移和侵袭能力。

2.5 敲减WTAP表达可明显促进KYSE150和KYSE510细胞凋亡

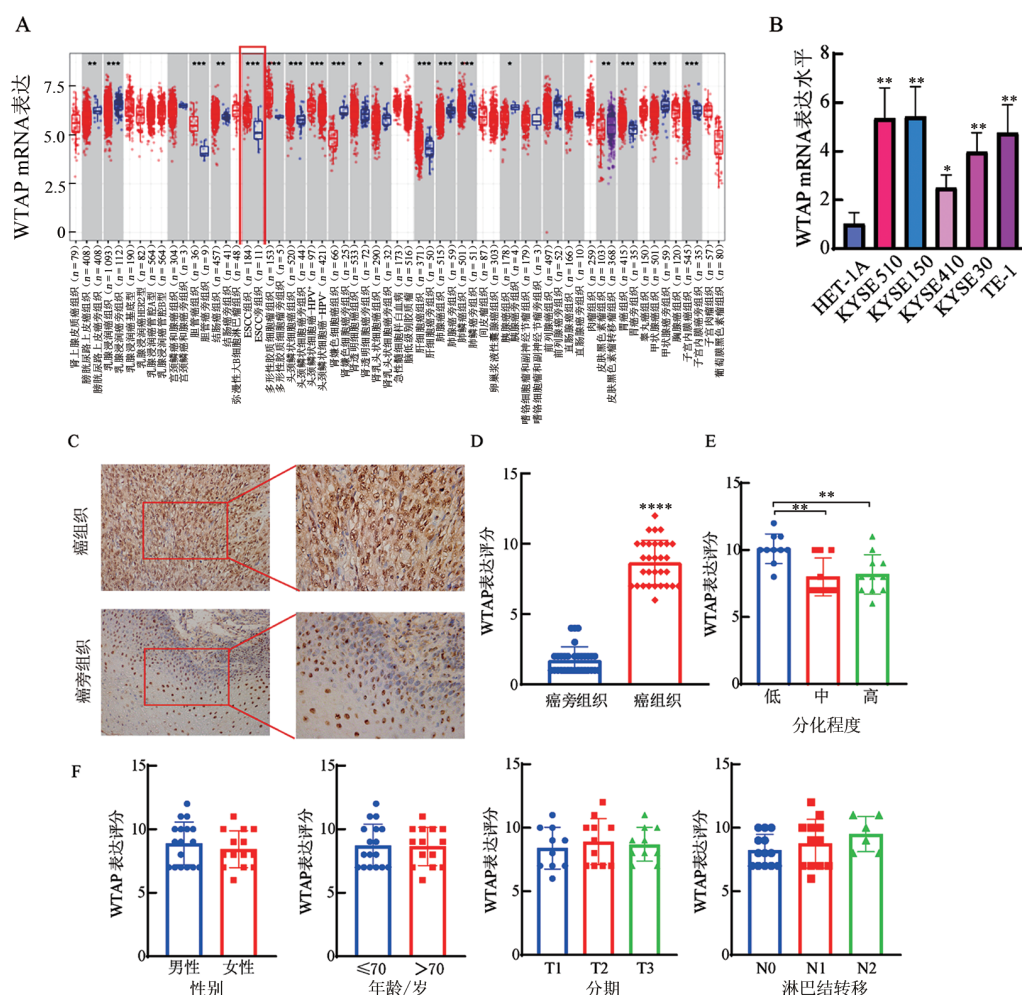
流式细胞术检测结果(图5)显示,与si-NC组比较,si-WTAP#1、si-WTAP#2组KYSE150和KYSE510细胞凋亡率均明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$ 或 $P < 0.0001$)。实验结果表明,敲减WTAP表达能显著促进KYSE150和KYSE510细胞凋亡。

2.6 WTAP通过调控m⁶A修饰影响MAP3K9 mRNA稳定性

为了进一步探索WTAP在ESCC中的生物学作用机制,将课题组前期的RNA-seq中在ESCC组织中相对高表达的基因($\log_2FC > 1$ 且 $P < 0.05$)(GEO数据库编号:GSE263647)和MeRIP-seq数据中基于Fold Enrichment > 10 得到的筛选结果与CatRAPID数据库以及RM2Target数据库预测的WTAP靶基因结果结合分析得到关键基因丝裂原活化蛋白激酶9(mitogen-activated protein kinase 9, MAP3K9)(图6A),表明MAP3K9在ESCC组织中高表达且具有m⁶A修饰,可能是WTAP的下游靶基因。为探究WTAP是否会影响MAP3K9的m⁶A修饰水平,设计特异性引物通过MeRIP-qPCR实验验证,结果(图6B)显示,敲减WTAP后,MAP3K9的m⁶A修饰水平

显著降低($P < 0.05$)。通过qPCR法检测,结果(图6C)显示,敲减WTAP后,MAP3K9的mRNA表达水平显著下降($P < 0.05$)。推测WTAP通过m⁶A修饰介导MAP3K9 mRNA稳定性,放线菌素D实验结果(图

6D)表明,敲低WTAP后,MAP3K9的mRNA稳定性明显下降($P < 0.05$)。实验结果说明,WTAP通过m⁶A修饰介导MAP3K9 mRNA稳定性。



A:TIMER2.0数据库在线分析WTAP mRNA在泛癌组织中的表达;B:qPCR法检测HET-1A和ESCC细胞中WTAP mRNA的表达;C:免疫组化法检测ESCC组织和癌旁组织中WTAP蛋白的表达($\times 100, \times 400$);D:免疫组化法评分统计分析;E:不同病理分化程度的ESCC组织中WTAP表达评分统计分析;F:WTAP蛋白表达水平与ESCC患者性别、年龄、分期及淋巴结转移与否的关系。与癌旁组织或HET-1A细胞比较,** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 、**** $P < 0.0001$ 。

图1 WTAP在ESCC组织和细胞中的表达

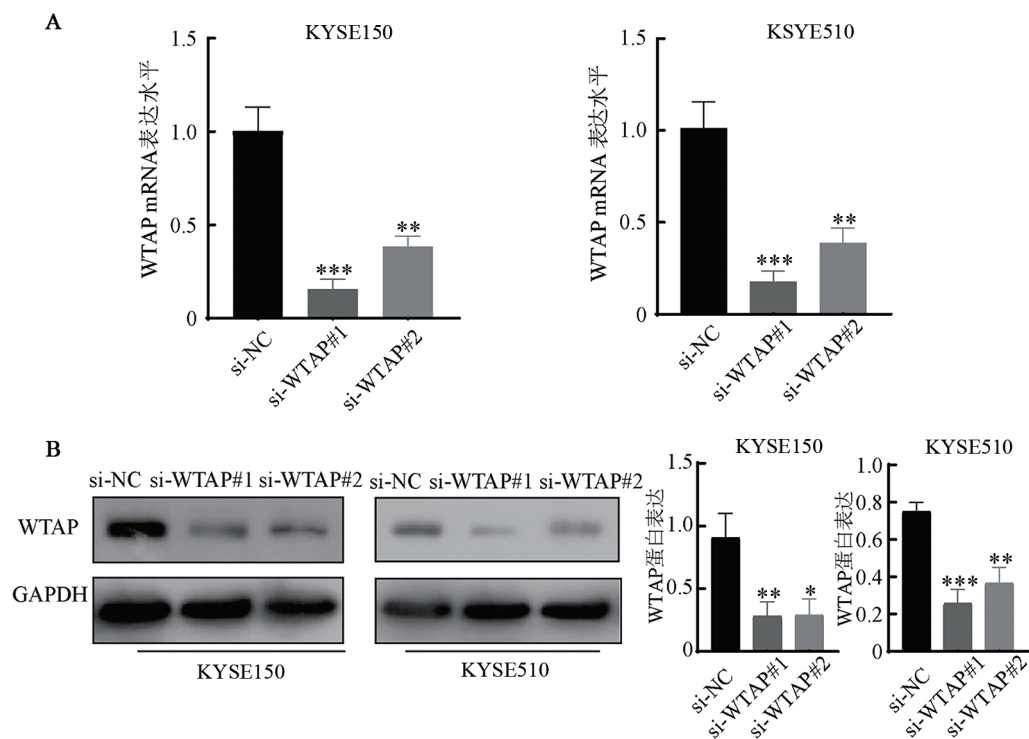
2.7 WTAP通过下调MAP3K9表达激活MAPK通路的磷酸化进而促进EMT进程

为明确WTAP在ESCC中的信号通路,本研究使用RM2Target数据库数据结合KOBAS数据库数据分析WTAP靶基因富集的信号通路,结果(图7A)发现,WTAP下游靶基因在MAPK信号通路中显著富集;由于MAP3K9是MAPK通路上游的重要组成部分,所以通过WB法检测敲减WTAP表达后MAP3K9蛋白表达变化及MAPK信号通路中关键蛋白的表达变化,以验证上述分析结果的可靠性,结果(图7B)显示,在ESCC细胞中敲减WTAP表达后,MAP3K9、p-ERK、N-cadherin和MMP9的表达水

平均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),E-cadherin表达明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。上述结果表明,WTAP可通过下调MAP3K9激活MAPK通路磷酸化途径来促进ESCC细胞的EMT进程。

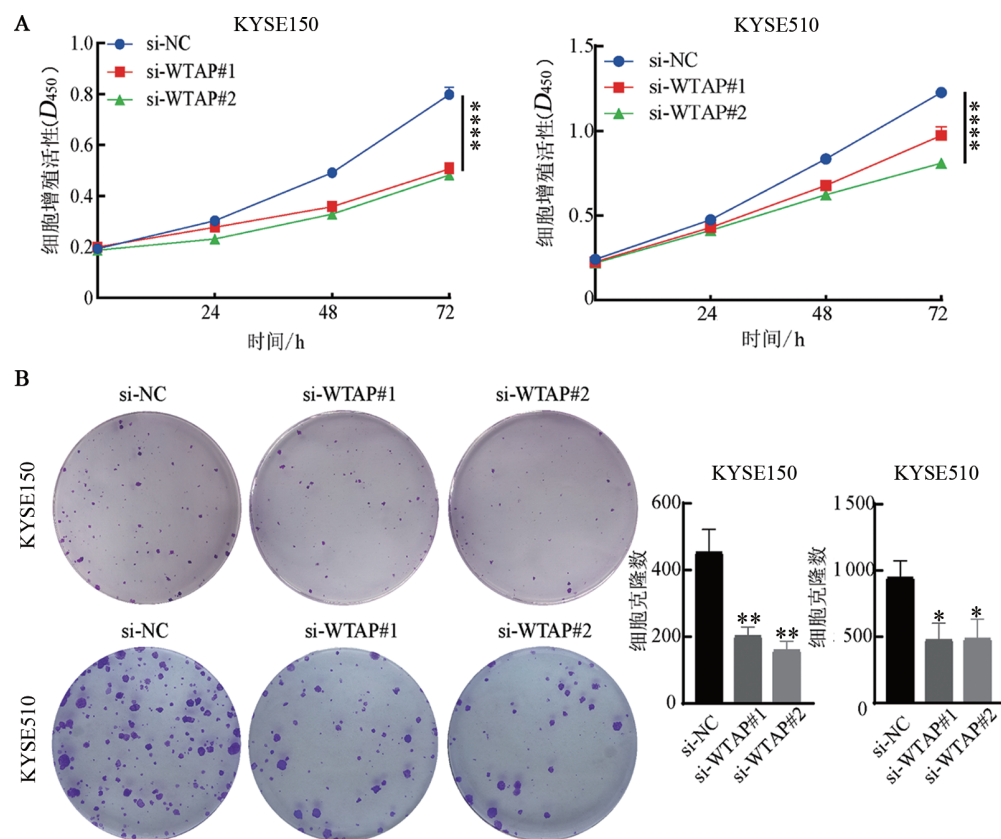
3 讨论

食管癌是全球消化系统中最常见的恶性肿瘤之一,其发病率和病死率均较高,早期通常无症状,导致确诊晚和愈后差^[1]。尽管诊断技术和治疗水平在不断提高,ESCC治疗取得了一定的临床突破,但改善患者预后仍面临许多挑战^[12]。



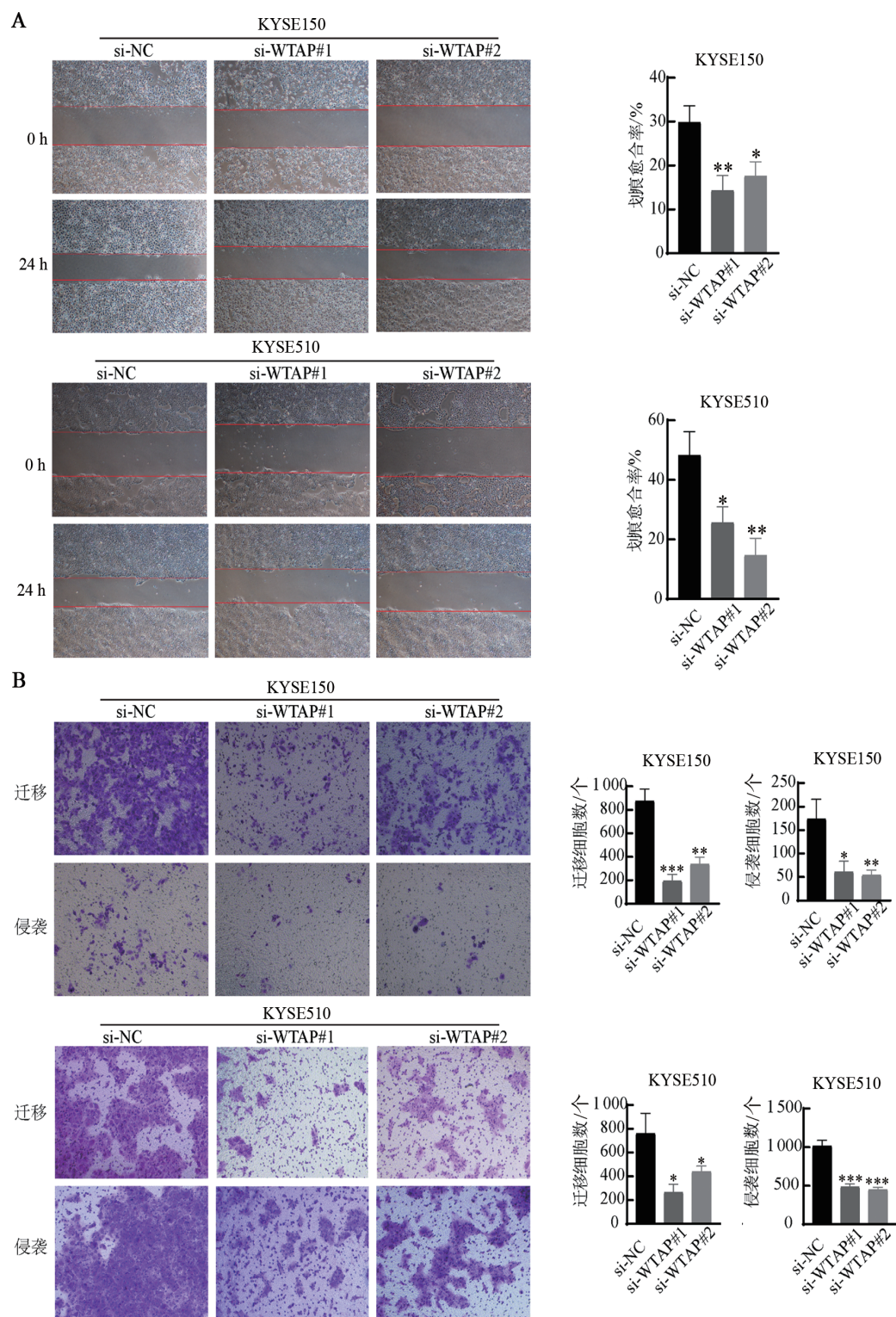
A: qPCR法检测各组 KYSE150 和 KYSE510 细胞中 WTAP mRNA 的表达; B: WB 法检测各组 KYSE150 和 KYSE510 细胞中 WTAP 蛋白的表达。与 si-NC 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图2 在 KYSE150 和 KYSE510 细胞中敲低 WTAP mRNA 和其蛋白表达的效率验证



A: CCK-8 法检测各组 KYSE150 和 KYSE510 细胞的增殖活性; B: 克隆形成实验检测各组 KYSE150 和 KYSE510 细胞的克隆形成能力($\times 40$)。与 si-NC 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.0001$ 。

图3 敲减 WTAP 表达对 KYSE150 和 KYSE510 细胞增殖活性的影响



A: 划痕愈合实验检测敲减WTAP表达对KYSE150、KYSE510细胞迁移能力的影响($\times 40$); B: Transwell 小室实验检测敲减WTAP表达对KYSE150、KYSE510细胞迁移和侵袭能力的影响($\times 200$)。与si-NC组比较,* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 。

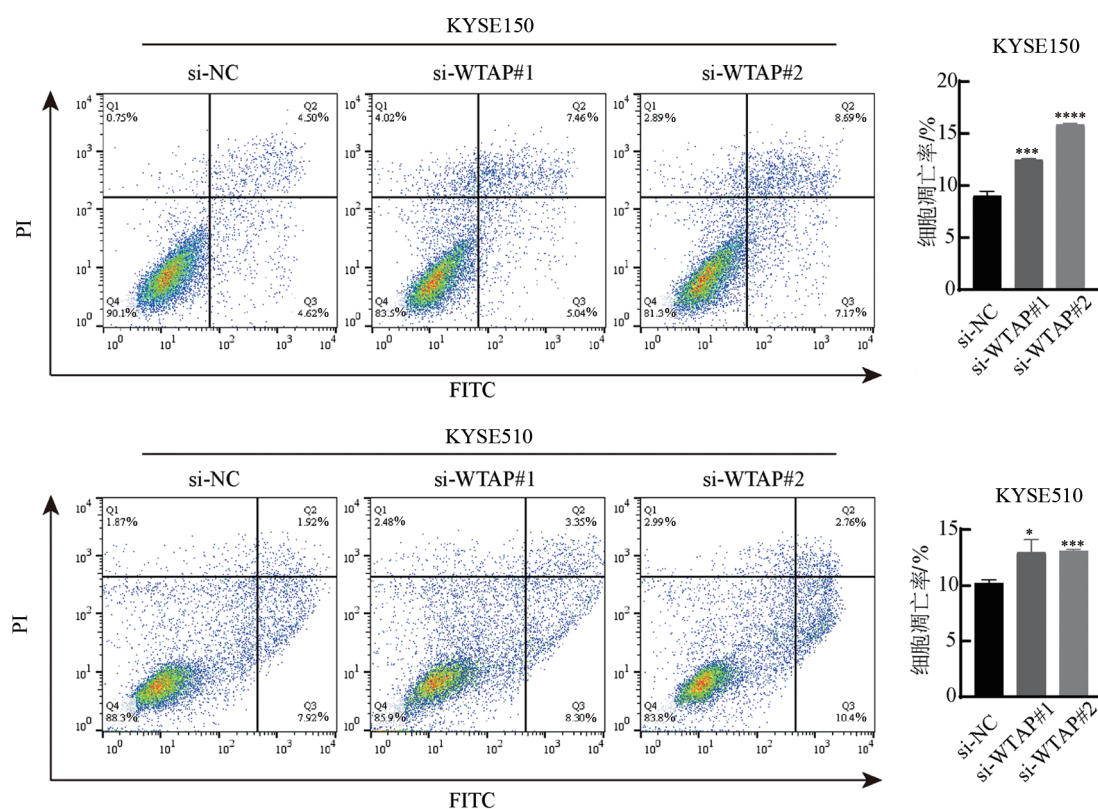
图4 敲减WTAP表达对KYSE150和KYSE510细胞迁移和侵袭能力的影响

WTAP最早被报道为剪接因子。在随后的几年中,其生物学功能逐渐被发现,包括在m⁶A修饰、胚胎发育、细胞周期进展和分化、前体mRNA剪接和抗病毒反应中的功能。随着m⁶A修饰检测技术的发展,发现WTAP是m⁶A甲基转移酶复合体的一部分,它与METTL3和METTL14以及其他甲基转移酶一

起参与m⁶A修饰,而m⁶A水平在很大程度上取决于MTC^[6]。许多研究揭示了WTAP在控制肿瘤增殖、侵袭和凋亡中的关键作用,例如,WTAP通过胰岛素样生长因子2结合蛋白2介导磷脂酰肌糖生物合成T类(phosphatidylinositol glycan biosynthesis class T, PIGT)m⁶A修饰增加PIGT的稳定性,调节葡萄糖转

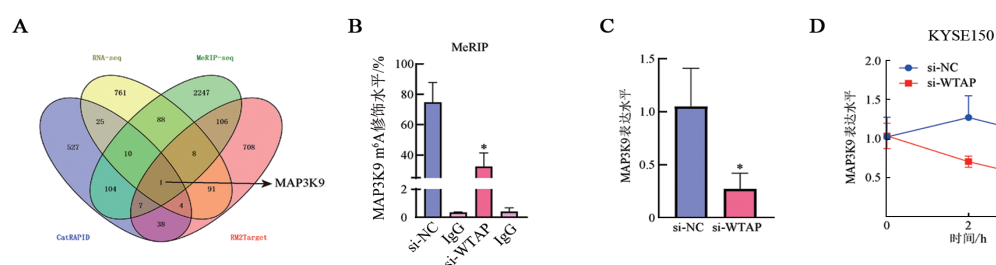
运体 1 型糖基化和膜运输增强膀胱癌细胞增殖、糖酵解和转移^[13];此外,WTAP 可能参与调节肿瘤微环境中趋化因子的分泌和免疫细胞的迁移,有望成为胶质母细胞瘤的新治疗靶点^[14];同时,外泌体成分 2 可通过激活 Wnt/ β -catenin 信号介导 WTAP 的促肿瘤作用^[15];WTAP 还通过含 YTH 结构域 2 蛋白介导自噬相关蛋白 5 (autophagy-related protein 5, ATG5) m⁶A 修

饰,上调转录后 ATG5 的表达,从而促进肝细胞癌铁死亡过程中 ATG5 mRNA 的翻译^[16];长链非编码 RNA AGAP2-AS1 可通过与 WTAP 结合促进 m⁶A 甲基转移酶的组装和 IL6/STAT3 通路的激活,从而促进胃癌的发生^[17]。然而,其在 ESCC 中生物学功能和作用机理还不清晰,有待深入研究。



与 si-NC 组比较, * $P < 0.05$ 、*** $P < 0.001$ 、**** $P < 0.0001$ 。

图5 敲减 WTAP 表达对 KYSE150 和 KYSE510 细胞凋亡的影响



A: RNA-seq、MeRIP-seq 数据结合在线网站 CatRIPID 及 RM2Target 筛选 WTAP 下游靶基因; B: MeRIP-qPCR 检测敲减 WTAP 后 MAP3K9 的 m⁶A 修饰水平变化; C: qPCR 法检测敲减 WTAP 后 MAP3K9 mRNA 水平变化; D: 放线菌素 D 实验检测敲减 WTAP 后 MAP3K9 mRNA 稳定性变化。与 si-NC 组或 IgG 组比较, * $P < 0.05$ 。

图6 WTAP 下游靶基因 MAP3K9 的筛选

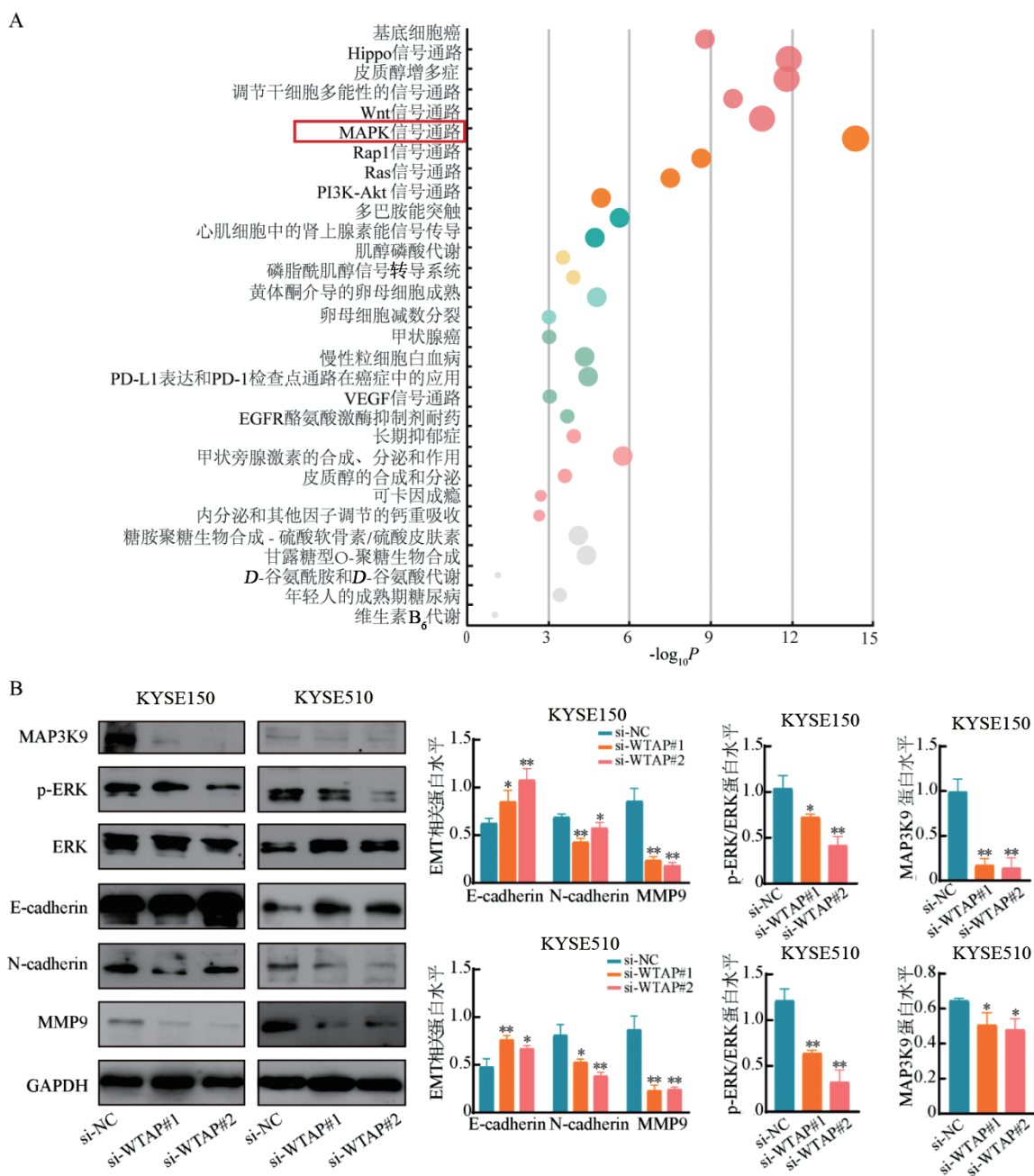
本研究前期应用 TIMER2.0 数据库数据分析发现, WTAP 在 ESCC 中高表达, 并证实其在中国人 ESCC 组织中高表达。通过敲减 WTAP 表达证明了 WTAP 可增强 ESCC 细胞的增殖、迁移和侵袭能力,

抑制 ESCC 细胞凋亡。由此证实了 WTAP 在 ESCC 中的功能与其在胃癌、胶质母细胞瘤、肝细胞癌等恶性肿瘤中一致, 均发挥促癌作用。

为寻找 WTAP 在 ESCC 中的下游靶基因, 本研究

通过CatRAPID和RM2Target在线网站预测WTAP的靶基因,再结合课题组前期RNA-seq和MeRIP-seq数据筛选出1个RNA——MAP3K9。MAP3K9是混合谱系激酶(mixed-lineage kinase, MLK)家族的一员,也被称为MLK1,属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶^[18]。作为MAPK通路上游的重要组成部分,MAP3K9主要激活ERK、JNK和丝裂原活化蛋白激酶p38信号通路,从而影响细胞增殖、分化、凋亡、炎症以及固有免疫等过程^[19]。研究^[20]表明,miR-148a-3p的启动子区甲在化导致其表达水平下降,从而使得MAP3K9水

平升高导致肺癌转移;miR-125b-5p升高与喉鳞状细胞癌预后改善有关,并通过靶向MAP3K9抑制恶性肿瘤和糖代谢紊乱^[21];miR-361-5p通过靶向MAP3K9诱导肝细胞癌细胞凋亡并增强药物敏感性^[22];circSEC24A通过调节miR-1193/MAP3K9轴促进皮肤鳞状细胞癌进展^[23];miR-148a通过靶向MAP3K9调节MAPK/ERK信号通路并抑制ESCC的发展^[24]。本研究发现敲减WTAP表达后MAP3K9的m⁶A修饰和mRNA水平均降低,mRNA稳定性下降,表明WTAP通过m⁶A修饰介导MAP3K9 mRNA稳定性。



A: WTAP相关信号通路富集分析;B: WB法检测敲减WTAP表达对KYSE150和KYSE510细胞中MAP3K9、ERK磷酸化及EMT相关蛋白的表达的影响。与si-NC组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

图7 敲减WTAP表达对KYSE150和KYSE510细胞中MAP3K9、MAPK通路及EMT关键蛋白表达的影响

为确定WTAP在ESCC中发挥作用的信号通路, 利用RM2Target数据库及KOBAS数据库对WTAP的下游靶基因进行KEGG富集分析, 发现其主要富集在MAPK信号通路。MAPK激酶通路是与细胞生长和增殖相关的重要信号转导通路^[25]。YE等^[26]发现, WTAP通过含YTH结构域蛋白1介导的VEGFA mRNA中的m⁶A甲基化激活MAPK信号转导, 促进结直肠癌的发展; DING等^[27]研究表明, 叉头框蛋白O4通过介导circPDE5A-WTAP-EIF3C-MAPK轴控制前列腺癌转移。本研究利用WB法验证了WTAP在ESCC中MAPK信号通路的ERK磷酸化起促进作用, 同时, 敲低WTAP后N-cadherin和MMP9蛋白表达降低, E-cadherin蛋白表达增加, 表明WTAP能促进ESCC细胞的EMT进程。由于MAP3K9是MAPK信号通路的上游激活因子, 敲减WTAP表达后MAP3K9的蛋白水平也同样下降, 表明WTAP介导MAP3K9的表达激活MAPK通路的磷酸化和EMT进程, 从而促进ESCC细胞增殖、迁移及侵袭。

综上所述, WTAP在ESCC组织中呈高表达, 通过m⁶A修饰促进MAP3K9 mRNA稳定性, 激活MAPK通路并促进EMT进程, 从而促进ESCC细胞的增殖、迁移、侵袭, 抑制细胞凋亡。本研究揭示WTAP作为促癌基因在ESCC中发挥功能, 为进一步探索ESCC潜在的治疗靶点提供了实验依据。

利益冲突声明:

所有作者在文章的撰写过程中都积极参与了审阅和修改工作, 并且对最终发表的内容达成了一致的意见, 不存在任何利益冲突。本论文作者独立取得实验数据, 并对数据的准确性和可靠性负责。

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): 229-263. DOI:10.3322/caac.21834.
- [2] 王少明, 郑荣寿, 韩冰峰, 等. 2022年中国人群恶性肿瘤发病与死亡年龄特征分析[J]. *中国肿瘤*, 2024, 33(3): 165-174. DOI: 10.11735/j.issn.1004-0242.2024.03.A001
- [3] ZHANG Y L, CHEN P, GUO Y, *et al.* Clinical value of SIRT1 as a prognostic biomarker in esophageal squamous cell carcinoma, a systematic meta-analysis[J]. *Open Med*, 2022, 17(1): 527-535. DOI: 10.1515/med-2022-0454.
- [4] THRIFT A P. Global burden and epidemiology of Barrett oesophagus and oesophageal cancer[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021, 18(6): 432-443. DOI:10.1038/s41575-021-00419-3.
- [5] LIU Q Z, ZHANG N, CHEN J Y, *et al.* WTAP-induced N⁶-methyladenosine of PD-L1 blocked T-cell-mediated antitumor activity under hypoxia in colorectal cancer[J]. *Cancer Sci*, 2024, 115(6): 1749-1762. DOI:10.1111/cas.16136.
- [6] HUANG Q B, MO J, LIAO Z B, *et al.* The RNA m⁶A writer WTAP in diseases: structure, roles, and mechanisms[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(10): 852[2024-11-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36207306/>. DOI:10.1038/s41419-022-05268-9.
- [7] FAN Y F, LI X W, SUN H H, *et al.* Role of WTAP in cancer: from mechanisms to the therapeutic potential[J/OL]. *Biomolecules*, 2022, 12(9): 1224[2024-11-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36139062/>. DOI:10.3390/biom12091224.
- [8] LIU N, ZHANG C, ZHANG L. WTAP-involved the m⁶A modification of lncRNA FAM83H-AS1 accelerates the development of gastric cancer [J]. *Mol Biotechnol*, 2024, 66(8): 1883-1893. DOI:10.1007/s12033-023-00810-2.
- [9] LIU F, XIA F, WANG C, *et al.* m⁶A Methyltransferase, WTAP, promotes cancer progression in laryngeal squamous cell carcinoma by regulating PLAU stability[J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2023, 53(2): 293-302. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37094860/>.
- [10] 孙姗, 潘英杰, 谭劲松, 等. m⁶A阅读蛋白IGF2BP1对食管鳞癌细胞生物学行为的影响及其机制探讨[J/OL]. *基因组学与应用生物学*, 2023: 1-21. (2023-11-23). <https://kns.cnki.net/kcms/detail/45.1369.q.20231122.1128.002.html>.
- [11] ZHOU M, BAO S Q, GONG T Y, *et al.* The transcriptional landscape and diagnostic potential of long non-coding RNAs in esophageal squamous cell carcinoma[J/OL]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 3799 [2024-11-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37365153/>. DOI: 10.1038/s41467-023-39530-1.
- [12] TAKAHASHI J, SUZUKI T, SATO M, *et al.* Differential squamous cell fates elicited by NRF2 gain of function versus KEAP1 loss of function [J/OL]. *Cell Rep*, 2024, 43(4): 114104[2024-11-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38602872/>. DOI:10.1016/j.celrep.2024.114104.
- [13] TAN M Y, PAN Q, YU C, *et al.* PIGT promotes cell growth, glycolysis, and metastasis in bladder cancer by modulating GLUT1 glycosylation and membrane trafficking[J/OL]. *J Transl Med*, 2024, 22(1): 5[2024-11-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38169393/>. DOI:10.1186/s12967-023-04805-0.
- [14] JI Q K, GUO Y Z, LI Z B, *et al.* WTAP regulates the production of reactive oxygen species, promotes malignant progression, and is closely related to the tumor microenvironment in glioblastoma[J]. *Aging*, 2024, 16(6): 5601-5617. DOI:10.18632/aging.205666.
- [15] LV C G, CHENG Y, ZHANG L, *et al.* EXOSC2 mediates the pro-tumor role of WTAP in breast cancer cells via activating the Wnt/β-catenin signal[J]. *Mol Biotechnol*, 2024, 66(9): 2569-2582. DOI: 10.1007/s12033-023-00834-8.
- [16] LI Y J, GUO M, QIU Y L, *et al.* Autophagy activation is required for N⁶-methyladenosine modification to regulate ferroptosis in hepatocellular carcinoma[J/OL]. *Redox Biol*, 2024, 69: 102971[2024-11-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38056309/>. DOI:10.1016/j.redox.2023.102971.
- [17] NIE K C, ZHENG Z H, LI J, *et al.* AGAP2-AS1 promotes the assembly of m⁶A methyltransferases and activation of the IL6/STAT3 pathway by binding with WTAP in the carcinogenesis of gastric cancer[J/OL]. *FASEB J*, 2023, 37(12): e23302[2024-11-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37983949/>. DOI: 10.1096/fj.202301249R.
- [18] GALLO K A, JOHNSON G L. Mixed-lineage kinase control of

- JNK and p38 MAPK pathways[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3 (9): 663-672. DOI:10.1038/nrm906.
- [19] KIM E K, CHOI E J. Compromised MAPK signaling in human diseases: an update[J]. *Arch Toxicol*, 2015, 89(6): 867-882. DOI: 10.1007/s00204-015-1472-2.
- [20] LIANG L, XU W Y, SHEN A, *et al.* Promoter methylation-regulated miR-148a-3p inhibits lung adenocarcinoma (LUAD) progression by targeting MAP3K9[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2022, 43 (11): 2946-2955. DOI:10.1038/s41401-022-00893-8.
- [21] CHEN F, LAO Z, ZHANG H Y, *et al.* Elevation of miR-125b-5p is related to improved prognosis in laryngeal squamous cell carcinoma and inhibits the malignancy and glycometabolic disorder by targeting MAP3K9[J]. *Neoplasma*, 2022, 69(3): 550-559. DOI: 10.4149/neo_2022_211027N1532.
- [22] REN Q B, XIAO X M, LENG X Q, *et al.* microRNA-361-5p induces hepatocellular carcinoma cell apoptosis and enhances drug sensitivity by targeting MAP3K9[J/OL]. *Exp Ther Med*, 2021, 21 (6): 574[2024-11-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33850546/>. DOI:10.3892/etm.2021.10006.
- [23] LU X Y, GAN Q, GAN C B. Circular RNA circSEC24A promotes cutaneous squamous cell carcinoma progression by regulating miR-1193/MAP3K9 axis[J]. *Onco Targets Ther*, 2021, 14: 653-666. DOI: 10.2147/OTT.S275691.
- [24] ZHANG B X, YU T, YU Z, *et al.* microRNA-148a regulates the MAPK/ERK signaling pathway and suppresses the development of esophagus squamous cell carcinoma *via* targeting MAP3K9[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(15): 6497-6504. DOI:10.26355/eurev_201908_18533.
- [25] ZHANG L, ZHU J H, WU K, *et al.* Effects of Raf kinase inhibitor protein on biological characteristics of hepatocellular carcinoma cells and its potential therapeutic effects[J]. *iLIVER*, 2022, 1(4): 275-282. DOI:10.1016/j.iliver.2022.11.005.
- [26] YE M J, CHEN J H, YU P, *et al.* WTAP activates MAPK signaling through m⁶A methylation in VEGFA mRNA-mediated by YTHDC1 to promote colorectal cancer development[J/OL]. *FASEB J*, 2023, 37(8): e23090[2024-11-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37428639/>. DOI: 10.1096/fj.202300344RRR.
- [27] DING L F, WANG R Y, ZHENG Q M, *et al.* circPDE5A regulates prostate cancer metastasis *via* controlling WTAP-dependent N⁶-methyladenosine methylation of EIF3C mRNA[J/OL]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, 41(1): 187[2024-11-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35650605/>. DOI:10.1186/s13046-022-02391-5.

[收稿日期] 2024-11-11

[修回日期] 2025-01-14

[本文编辑] 向正华