

脂肪量和肥胖相关蛋白 FTO 调控 IFIT2 促进肝细胞癌发生发展

兰 兰,宣自学,姜金颖

摘要 目的 初步研究脂肪量和肥胖相关蛋白(FTO)调控肝细胞癌(HCC)的分子机制。方法 构建 FTO 敲低的肝细胞癌细胞系 HepG2 细胞,收集 FTO 敲低的和未敲低的 HepG2 细胞,利用 Illumina Hiseq 平台进行高通量测序,筛选两组别间基因表达差异;通过对这些差异基因进行 GO 和 KEGG 富集分析,研究 FTO 调控通路及筛选 FTO 下游靶基因;利用生信分析和细胞实验揭示 FTO 下游靶基因在 HCC 中的作用。结果 转录组测序结果显示,FTO 敲低的和未敲低的 HepG2 细胞间有 386 个基因发生了差异性表达,它们参与对干扰素- γ 的反应等生物过程;FTO 敲低后 IFIT2(响应性最强的干扰素刺激基因之一)表达上调;IFIT2 多个位点会发生潜在的 m⁶A 甲基化;IFIT2 高表达 HCC 患者生存期显著延长,敲低 IFIT2 促进 HCC 生长和迁移。结论 FTO 可能通过介导 m⁶A 调控 IFIT2,进而促进 HCC 发生发展。

关键词 FTO;IFIT2;肝细胞癌;转录组测序;HepG2;m⁶A

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)05-0834-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.05.014

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是中国高发的恶性肿瘤,具有起病隐匿、生长迅速、侵袭性强和致死率高等特点^[1]。目前 HCC 的发生发展机制仍不明确,深入研究其分子机制,对于开发新的诊断方法以及鉴定新的治疗靶点至关重要^[2]。近年来,研究^[3]表明 N6 甲基化腺苷(N6-methyladenosine, m⁶A)修饰是真核生物 mRNA 上最为常见的一种内部修饰,可通过调节 mRNA 的结构、剪接、稳定性和翻译效率等方式影响靶基因的表达,进而参与肿瘤调控。研究^[4]已表明 m⁶A 的修饰水平受由甲基化转移酶、去甲基化酶和甲基化阅读蛋白等动态调控,其中脂肪量和肥胖相关蛋白(fat mass and

obesity-associated protein, FTO)是第一个被发现的 m⁶A 去甲基化酶,调控多种肿瘤,如透明细胞肾癌、非小细胞肺癌、胃癌等。另外,该研究已表明 FTO 在 HCC 组织中高表达,并且表达量与患者生存期负相关。当敲低 FTO 可显著抑制 HCC 细胞增殖和侵袭迁移,提示 FTO 促进 HCC 进展^[5]。然而,FTO 促 HCC 发生发展的分子机制尚未阐明。为进一步阐明 FTO 调控 HCC 的机制,该研究拟基于转录组测序及生信分析,筛选 FTO 的下游靶分子,然后验证靶分子在 HCC 中的作用。

1 材料与方法

1.1 HepG2 培养及构建 FTO 敲低的 HepG2 将 HCC 细胞 HepG2 铺板,当细胞铺板达到 70%~80%,根据细胞量计算所使用 siRNA 的量;分别将 siRNA 和 Lipofectamine 3000 用 Opti-MEM 进行稀释,混合均匀后,静置 5 min;用移液枪将 FTO siRNA 和脂质体进行混合均匀,室温静置 20 min;将混合液加入到刚处理好的细胞中,轻轻晃动培养皿,使其混合均匀,完成转染,构建 FTO 敲低的 HepG2^[5]。

1.2 样本准备及测序 收集 FTO 敲低的和未敲低的 HepG2,提取总 RNA,随后进行质量检测,若符合要求(RNA 样品浓度 ≥ 100 ng/ μ l,总量 > 2 μ g, OD260/280 值在 1.8~2.2 之间, OD260/230 ≥ 2.0 ,且 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测的 RIN ≥ 6.5),构建 mRNA-seq 文库。文库检测合格后,利用 Illumina Hiseq 平台,以 2 \times 150 bp 双端测序模式进行高通量测序^[6]。

1.3 基因表达差异分析 采用 Deseq2 软件分析 FTO 敲低的和未敲低的 HepG2 组的差异表达基因($P < 0.05$ 且 $|\log_2(\text{Fold Change})| > 1$),其中 $\log_2(\text{Fold Change}) > 1$ 标记为上调基因(Up); $\log_2(\text{Fold Change}) < -1$ 标记为下调基因(Down),不满足上述条件的为 Not DEGS(非显著差异表达基因)。

1.4 差异基因 GO 和 KEGG 富集分析 通过 GO 富集分析,按照细胞成分(cellular component, CC),分子功能(molecular function, MF),生物过程(biological process, BP)对差异表达基因进行分类,揭示

2024-01-14 接收

基金项目:浙江省公益技术应用研究计划项目(编号:LYY21H-310008);浙江省医药卫生科技计划项目(编号:2022KY060、2023KY459、2023KY524)

作者单位:浙江省人民医院(杭州医学院附属人民医院)临床药理学中心药理学部,杭州 310014

作者简介:兰 兰,女,初级药师;

姜金颖,女,初级药师,责任作者,E-mail:jyngjiang@163.com

com

两组别差异基因的功能。采用热图同时展现所有显著富集(筛选标准为 $P < 0.05$ 且 $\text{Count} > 1$)的 KEGG 通路及其对应的差异表达 mRNA^[7]。

1.5 预测 IFIT2 的 m⁶A 甲基化潜在位点 将下机 fastq 数据用 TrimGalore-0.6.5 软件质控过滤,随后利用 bowtie2-2.4.1 软件对过滤 fastq 进行序列比对,并转为 read 的 fasta 文件。使用 NCBI 的 Nucleotide 数据库获取 IFIT2 的成熟 mRNA 序列,并用 ncbi-blast-2.10.0+ 软件,将其与 read 的 fasta 文件比对。最后将比对得到的 IFIT2 不同 read 序列分别导入 SRAMP[A sequence-based N⁶-methyladenosine (m⁶A) modification site predictor]网站,预测 read 序列上的 m⁶A 潜在位点^[8-9]。

1.6 IFIT2 在 HCC 中作用研究 利用 Kaplan-Meier Plotter 网站(<https://kmplot.com/analysis/>)分析 IFIT2 基因表达与 HCC 预后的相关性,利用 Human Protein Atlas(<https://www.proteinatlas.org/>)查看 IFIT2 在 HCC 中的蛋白表达情况^[10]。构建敲低 siRNA-IFIT2 的 HepG2 细胞,利用 CCK-8 细胞增殖

实验和细胞划痕实验,分析 IFIT2 对 HepG2 细胞增殖、迁移的影响。

1.7 统计学处理 所有统计分析均使用 SPSS 13.0 进行,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用非配对 *t* 检验比较两组间的差异。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 转录组测序差异基因及其功能分析 转录组测序结果显示,FTO 敲低的和未敲低的 HepG2 间有 386 个基因发生了差异性表达,其中 214 个基因表达上调,172 个基因下调(图 1A)。GO 分析结果显示,两组间的差异基因与多个功能有关,如肌动蛋白结合(actin binding)等分子功能,蛋白的细胞外基质(proteinaceous extracellular matrix)等细胞成分,干扰素- γ 的反应(response to interferon gamma)等生物过程(图 1B)。KEGG 分析结果显示,两组间差异基因主要参与肌动蛋白骨架的调控(regulation of actin cytoskeleton)、癌症中的蛋白聚糖(proteoglycans in cancer)、局灶黏附(focal adhesion)(图 1C)。

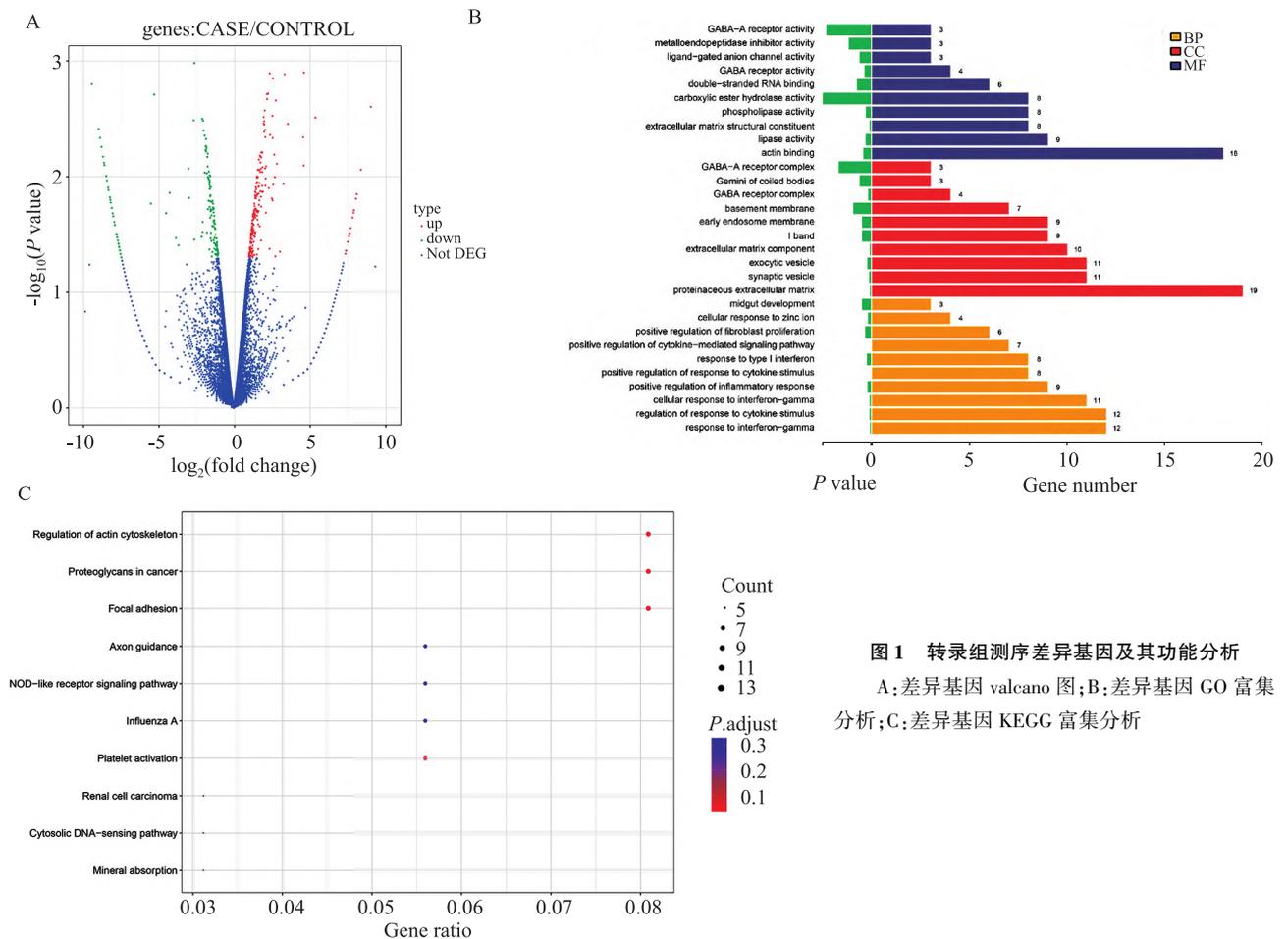


图 1 转录组测序差异基因及其功能分析

A: 差异基因 volcano 图; B: 差异基因 GO 富集分析; C: 差异基因 KEGG 富集分析

2.2 FTO 通过调控三角形四肽重复干扰素诱导蛋白 2(interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 2, IFIT2) 表达影响 HCC 预后 上述分析显示 FTO 敲低后的差异基因参与对干扰素- γ 的反应(response to interferon gamma)的生物过程,IFIT2 是响应性最强的干扰素刺激基因之一。转录组测序数据结果显示,FTO 敲低后 IFIT2 表达上调,且 IFIT2 与多种差异性表达基因有相互作用(图 2A)。此外,通过 Kaplan-Meier Plotter 网站分析 IFIT2 基因表达与 HCC 预后的相关性,显示 IFIT2 高表达 HCC 患者总生存期显著延长($P=0.0031$,图 2B)。

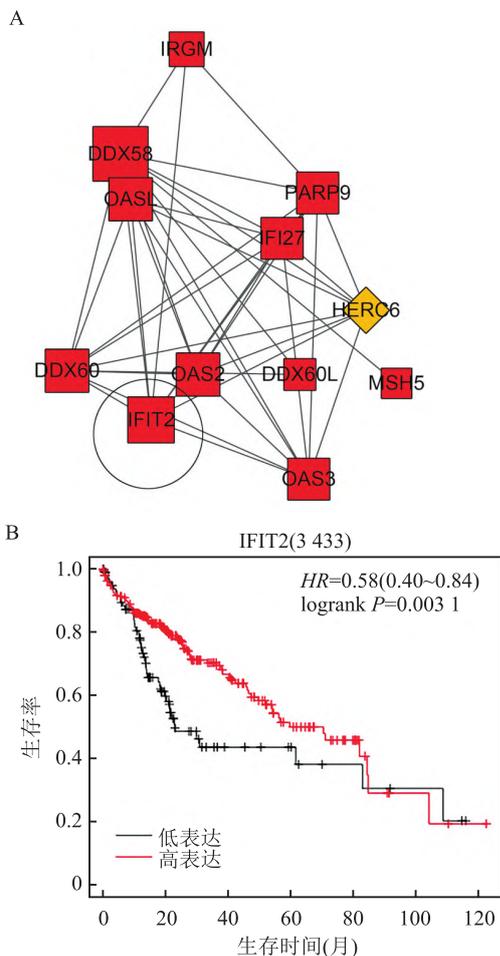


图2 IFIT2 基因表达及与 HCC 生存期相关性

A:FTO 敲低后 IFIT2 基因与多种差异性基因有相互作用;B:IFIT2 基因高表达与 HCC 患者总生存期延长相关

2.3 IFIT2 多个位点会发生潜在的 m⁶A 甲基化 通过对高质量 fastq 数据进行分析,并将比对得到的 IFIT2 不同 read 序列分别导入 SRAMP 网站,预测 read 序列上的 m⁶A 潜在位点。结果发现 IFIT2 具有多个位点会发生潜在的 m⁶A 甲基化(图 3、4),提示

FTO 可调控 IFIT2 m⁶A 甲基化。

位置	序列	结构	分数(二进制)	分数(综合)
104	UUGGU AUUCA AAUAU UGUAA UGACU GGUAU GGCAA AAGAU UGGAC	PPMMM MMMM MMMM MMMMM MMMMP PPPPP PPPII IPPPB PHHHH	0.610	0.659
125	GACUG GUAUG GCAAA AGAUU GGACU AAGAC ACUGG CCAUA CCACU	MMMP PPPPP PPIII PPBBP PHHHH HHHHP PPPIP PPPPP PPPPM	0.730	0.710
143	GACUG GUAUG GCAAA AGAUU GGACU AAGAC A-----	PIPPP PPIIP PPPII PIPPP IIPPP PMMMM M-----	0.766	0.696
116	GACUG GUAUG GCAAA AGAUU GGACU AAGAC ACUGG CCAUA CCACU	PMMP PPPPP PPIII PPBBP PHHHH HHHHP PPPIP PPPPP PPPPM	0.730	0.695
109	GACUG GUAUG GCAAA AGAUU GGACU AAGAC ACUGG CCAUA CCACU	MMMP PPPPP PPIII PPBBP PHHHH HHHHP PPPIP PPPPP PPPPM	0.730	0.690
64	GACUG GUAUG GCAAA AGAUU GGACU AAGAC ACUGG CCAUA CCACU	IIIPP PPPPP PPIII PPBBP PHHHH HHHHP PPPIP PPPPP PPPPI	0.730	0.692
51	GACUG GUAUG GCAAA AGAUU GGACU AAGAC ACUGG CCAUA CCACU	MMMP PPPPP PPIII PPBBP PHHHH HHHHP PPPIP PPPPP PPPPM	0.730	0.695
120	UGACU AAGG CCUGG UGCAA GGACU UGGGA AAUGU CAUUG AUAAU	MMMP PPIII PPPHH HHHP PPIPP PPPPM MMMM PPIPI IIIPP	0.728	0.696
90	UGACU AAGG CCUGG UGCAA GGACU UGGGA AAUGU CAUUG AUAAU	HHHP IPPPI IPPPI PPMMM PPIPI IPPPP MPPPP PIIII IIPIP	0.728	0.697
71	UGACU AAGG CCUGG UGCAA GGACU UGGGA AAUGU CAUUG AUAAU	PMMP PPIII PPPHH HHHP PPIPP PPPPM PPPPP PIIII IIPIP	0.728	0.697
33	UGACU AAGG CCUGG UGCAA GGACU UGGGA AAUGU CAUUG AUAAU	PMMP PPIII PPPHH HHHP PPIPP PPPPM MPPPP PPPPP PPPPM	0.728	0.673
31	UGACU AAGG CCUGG UGCAA GGACU UGGGA AAUGU CAUUG AUAAU	PPPP PPIII PPPHH HHHP PPIPP PPPPM PPPPP PIIII IIPIP	0.728	0.687
29	UGACU AAGG CCUGG UGCAA GGACU UGGGA AAUGU CAUUG AUAAU	PPPP PPIII PPPHH HHHP PMMP PPPPM PPPPP PIIII IIPIP	0.728	0.667

图3 IFIT2 具有多个会发生 m⁶A 甲基化的潜在位点

2.4 IFIT2 蛋白在 HCC 中表达情况及与患者预后相关性分析 由于 Human Protein Atlas 数据库收录了肿瘤组织的蛋白表达情况以及肿瘤患者的生存曲线。通过查询显示,IFIT2 蛋白在 HCC 中低表达的居多(图 5A),且 IFIT2 蛋白高表达的 HCC 患者总生存期延长($P=0.0067$)(图 5B)。

2.5 敲低 IFIT2 促进 HCC 生长和迁移 通过构建 siRNA 敲低 IFIT2 的 HepG2 细胞,然后进行体外细胞表型实验。CCK-8 实验结果表明,敲低 IFIT2 的 HepG2 细胞增殖能力增加(图 6A)。划痕实验结果显示,敲低 IFIT2 的 HepG2 细胞迁移能力增强(图 6B)。

3 讨论

研究表明,FTO 是一种 m⁶A 去甲基化酶,可通过调节其下游基因特定 m⁶A 位点的甲基化水平,进而调控其下游基因的蛋白水平,参与多种肿瘤的发生发展过程。例如,FTO 在急性髓细胞白血病中表达升高,并通过去甲基化作用调节 m⁶A 水平,靶向 ASB2 和 RARA,以促进急性髓细胞白血病的癌变^[11];Zhang et al^[12] 研究表明 FTO 可靶向 PI3K/AKT 和 MAPK 信号通路,促进子宫内膜癌细胞生长和侵袭;敲低 FTO 能显著抑制肺鳞癌细胞增殖、促

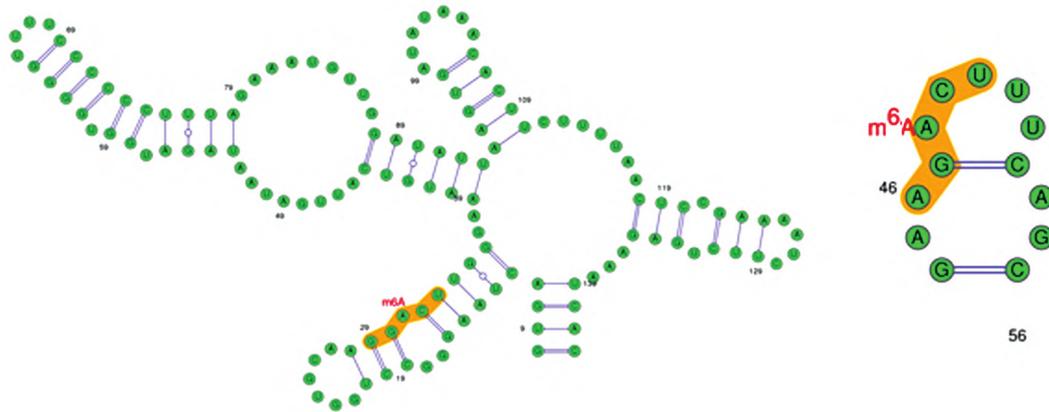


图4 部分潜在的 IFIT2 m⁶A 甲基化位点的结果图

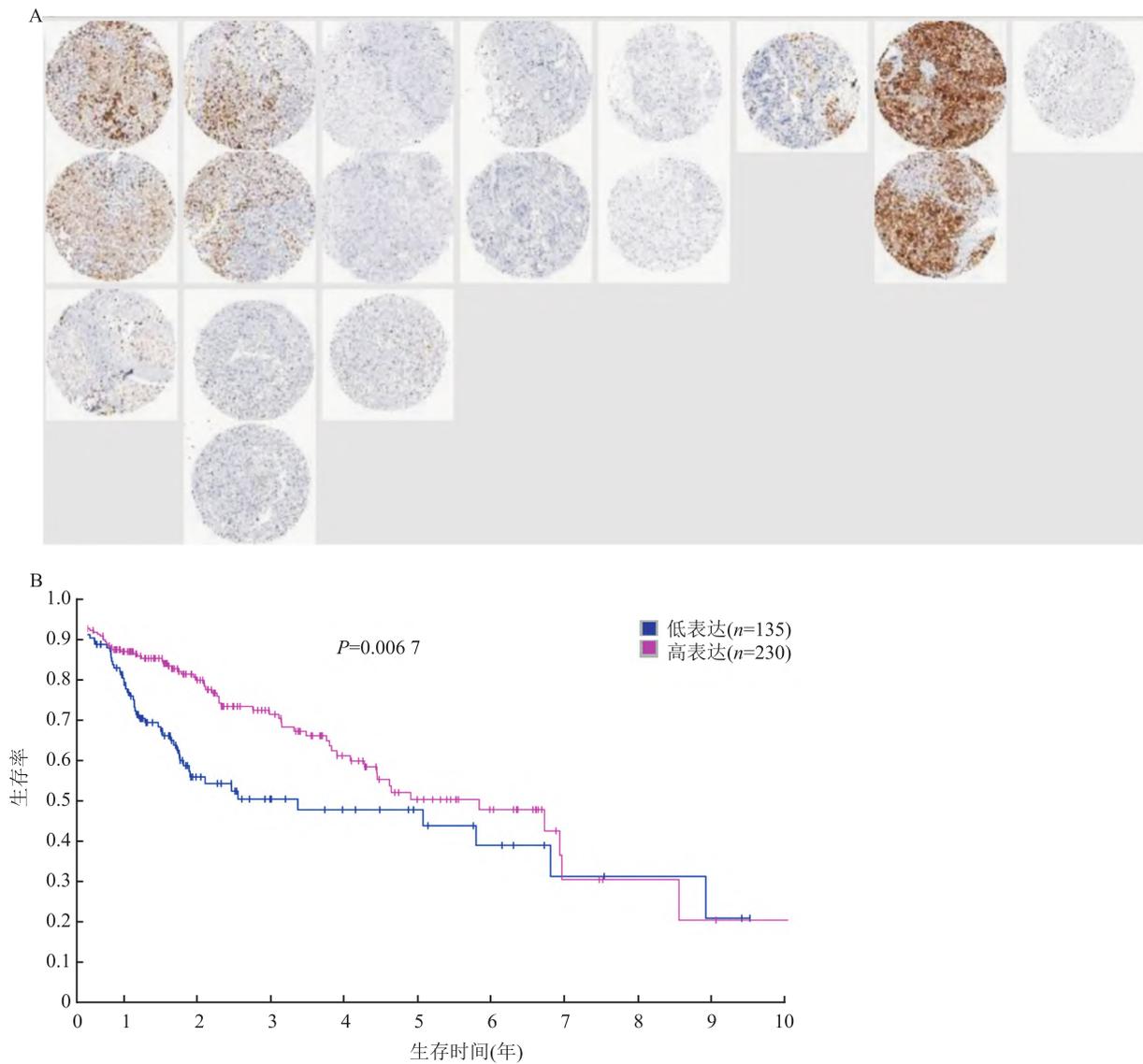


图5 IFIT2 蛋白在 HCC 中表达情况及与患者预后相关性分析

A: Human Protein Atlas 数据库中 IFIT2 蛋白在 HCC 中低表达的居多, bar = 200 μ m; B: Human Protein Atlas 数据库中 IFIT2 蛋白高表达的 HCC 患者生存期延长

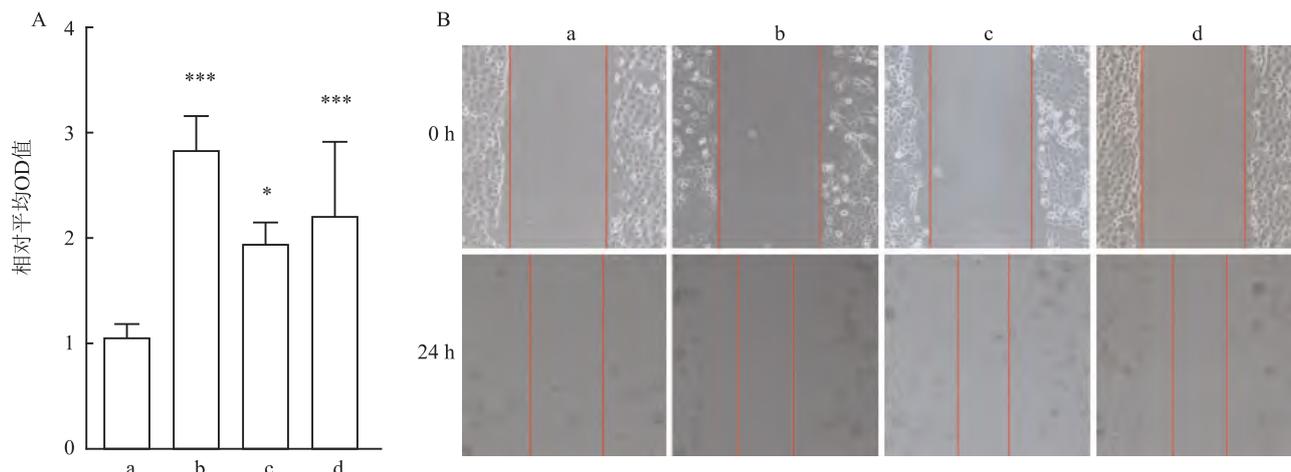


图6 敲低 IFIT2 促进 HepG2 细胞生长和迁移

A: CCK-8 细胞增殖实验结果; B: 划痕实验结果 ×10; a: siRNA-NC 组; b: siRNA-IFIT2-1 组; c: siRNA-IFIT2-2 组; d: siRNA-IFIT2-3 组; 与 siRNA-NC 组比较: * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$

进细胞凋亡,而过表达 FTO 促进肺鳞癌细胞恶性进展^[13];下调 FTO 表达能够抑制胶质瘤干细胞的生长和自我更新,且显著抑制胶质瘤干细胞异种移植瘤小鼠的肿瘤进展,延长移植瘤小鼠的生存期^[14]。此外,有文献^[15]报道,FTO 介导 BNIP3 mRNA 3' UTR 中的 m⁶A 去甲基化,在体内外发挥促进乳腺癌细胞生长和转移的作用。Yang et al^[16] 研究表明 FTO 促进黑色素瘤生长,并能通过降低 PD-1、CXCR4 和 SOX10 基因的 m⁶A 甲基化,促进黑色素瘤对 PD-1 治疗耐药。FTO 通过 m⁶A 依赖性方式降低 APOE mRNA 的稳定性来抑制糖酵解和甲状腺乳头状癌的生长^[17]。以上结果提示 FTO 能够通过不同方式参与调控多种肿瘤发生发展。

该课题组前期已经表明 FTO 促进 HCC 进展^[5],为揭示 FTO 在 HCC 的作用机制,该研究将 HCC 细胞 FTO 敲低后进行转录组测序,进而通过生信分析,初步显示 FTO 可能调控干扰素- γ 的反应的生物过程,IFIT2 是响应性最强的干扰素刺激基因之一^[18],该研究表明 FTO 负性调控 IFIT2。有研究表明 IFIT2 在多种肿瘤发生发展过程中发挥重要作用。例如,IFIT2 缺失促进口腔癌中的癌症干细胞样表型,最新研究^[19]表明,在食管鳞癌中,基于 MeRIP-seq 和 RNA-seq 测序分析显示 IFIT2 是 METTL3 靶基因,而 METTL3 可通过调节 IFIT2 从而影响食管鳞癌的增殖、迁移、侵袭等恶性生物学行为以及肿瘤的免疫微环境。在肝内胆管癌中,METTL3 介导的 m⁶A 上调 IFIT2 mRNA 的修饰并以 YTHDF2 依赖性方式加速 IFIT2 mRNA 的衰减,从而促进肝内

胆管癌的发展并导致较差的预后。但是,IFIT2 在 HCC 中的作用尚未见研究报道。该研究表明 IFIT2 高表达与 HCC 患者的生存期延长相关,敲低 IFIT2 能够促进 HCC 细胞增殖、迁移。

参考文献

- [1] Vogel A, Meyer T, Sapisochin G, et al. Hepatocellular carcinoma [J]. Lancet, 2022, 400(10360):1345-62.
- [2] Ganesan P, Kulik L M. Hepatocellular carcinoma: New developments[J]. Clin Liver Dis, 2023,27(1):85-102.
- [3] 宣自学,叶强,姜金颖,等. 综合分析 m⁶A RNA 甲基化调节因子与肺癌免疫浸润及预后的相关性[J]. 中国现代应用药学, 2021,38(21):2721-9.
- [4] 宣自学,王如意,胡颖,等. m⁶A 去甲基化酶 FTO 在肿瘤中的作用及研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2020,37(6):760-3.
- [5] Ye Z, Wang S, Chen W, et al. Fat mass and obesity-associated protein promotes the tumorigenesis and development of liver cancer [J]. Oncol Lett, 2020, 20(2):1409-17.
- [6] Bensalel J, Xu H, Lu M L, et al. RNA-seq analysis reveals significant transcriptome changes in huntingtin-null human neuroblastoma cells[J]. BMC Med Genomics, 2021, 14(1):176.
- [7] Tao R, Huang F, Lin K, et al. Using RNA-Seq to explore the hub genes in the trigeminal root entry zone of rats by compression injury [J]. Pain Physician, 2021, 24(5):E573-81.
- [8] Zhou Y, Zeng P, Li Y H, et al. SRAMP: Prediction of mammalian N6-methyladenosine (m⁶A) sites based on sequence-derived features[J]. Nucleic Acids Res, 2016, 44(10):e91.
- [9] Li X, Zhang K, Hu Y, et al. YTHDF2 regulates cell growth and cycle by facilitating KDM1A mRNA stability [J]. Am J Pathol, 2023, 193(4):442-55.
- [10] Lei Y, Yu T, Li C, et al. Expression of CAMK1 and its associa-

- tion with clinicopathologic characteristics in pancreatic cancer[J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(2):1198–206.
- [11] Li Z, Weng H, Su R, et al. FTO plays an oncogenic role in acute myeloid leukemia as a N6-methyladenosine RNA demethylase[J]. *Cancer Cell*, 2017, 31(1):127–41.
- [12] Zhang Z, Zhou D, Lai Y, et al. Estrogen induces endometrial cancer cell proliferation and invasion by regulating the fat mass and obesity-associated gene *via* PI3K/AKT and MAPK signaling pathways[J]. *Cancer Lett*, 2012, 319(1):89–97.
- [13] Zhou S, Bai Z L, Xia D, et al. FTO regulates the chemo-radiotherapy resistance of cervical squamous cell carcinoma (CSCC) by targeting β -catenin through mRNA demethylation[J]. *Mol Carcinog*, 2018, 57(5):590–7.
- [14] Cui Q, Shi H, Ye P, et al. m⁶A RNA methylation regulates the self-renewal and tumorigenesis of glioblastoma stem cells[J]. *Cell Rep*, 2017, 18(11):2622–34.
- [15] Niu Y, Lin Z, Wan A, et al. RNA N6-methyladenosine demethylase FTO promotes breast tumor progression through inhibiting BNIP3[J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1):46.
- [16] Yang S, Wei J, Cui Y H, et al. m⁶A mRNA demethylase FTO regulates melanoma tumorigenicity and response to anti-PD-1 blockade[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1):2782.
- [17] Huang J, Sun W, Wang Z, et al. FTO suppresses glycolysis and growth of papillary thyroid cancer *via* decreasing stability of APOE mRNA in an N6-methyladenosine-dependent manner[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, 41(1):42.
- [18] Fensterl V, Wetzel J L, Ramachandran S, et al. Interferon-induced Ifit2/ISG54 protects mice from lethal VSV neuropathogenesis[J]. *PLoS Pathog*, 2012, 8(5):e1002712.
- [19] Lai K C, Regmi P, Liu C J, et al. IFIT2 depletion promotes cancer stem cell-like phenotypes in oral cancer[J]. *Biomedicines*, 2023, 11(3):896.

FTO promotes the development of hepatocellular carcinoma *via* regulating IFIT2

Lan Lan, Xuan Zixue, Jiang Jinying

[Dept of Pharmacy, Center for Clinical Pharmacy, Zhejiang Provincial People's Hospital (Affiliated People's Hospital), Hangzhou Medical College, Hangzhou 310014]

Abstract *Objective* To study the molecular mechanism of fat mass and obesity-associated protein (FTO) regulating hepatocellular carcinoma (HCC). *Methods* HepG2 cells of knock-down FTO were constructed, HepG2 cells of knock-down FTO and HepG2 cells were collected, and high-throughput sequencing was performed using Illumina HiSeq platform to screen the gene expression differences between the two groups. Through GO and KEGG enrichment analysis of these differential genes, FTO regulatory pathways were studied and downstream target genes of FTO were screened. The role of FTO downstream target gene in HCC was revealed by bioinformatic analysis and cell experiments. *Results* Transcriptome sequencing showed that 386 genes were differentially expressed between HepG2 cells of knock-down FTO and HepG2 cells, and they were involved in biological processes such as response to interferon-gamma. The expression of IFIT2, one of the most responsive interferon-stimulating genes, was up-regulated after FTO knockdown. Potential m⁶A methylation occurred at multiple sites of IFIT2. The survival of HCC patients with high expression of IFIT2 was significantly prolonged, and knock-down of IFIT2 promoted the growth and migration of HepG2 cells. *Conclusion* FTO may regulate IFIT2 by mediating m⁶A, and further promote the occurrence and development of HCC.

Key words FTO; IFIT2; hepatocellular carcinoma; transcriptome sequencing; HepG2; m⁶A