#### DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2025.01.009

### ・基础研究・

# METTL3介导的m<sup>6</sup>A修饰调控miR-1224-5p在前列腺癌细胞增殖和迁移中的作用

胡东来<sup>1</sup>,赵梓岐<sup>1</sup>,楚元奎<sup>12</sup>(1.宁夏医科大学 检验学院,宁夏 银川 750004;2.宁夏医科大学总医院 医学实 验中心,宁夏 银川 750003)

[中图分类号] R737.25; R730.2 [文献标识码] A [文章编号] 1007-385x(2025) 01-0064-09

## Role of METTL3-mediated m<sup>6</sup>A modification in regulating miR-1224-5p in the proliferation and migration of prostate cancer cells

HU Donglai<sup>1</sup>, ZHAO Ziqi<sup>1</sup>, CHU Yuankui<sup>1,2</sup> (1. School of Laboratory Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia, China; 2. Medical Experimental Center, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750003, Ningxia, China)

**[Abstract] Objective:** To investigate the biological role of miR-1224-5p in the proliferation, migration and apoptosis of prostate cancer cells, as well as its regulatory mechanism of expression. **Methods:** Human prostate cancer cells (PC3, DU145, LNCaP, 22Rv1) and normal prostate epithelial RWPE-1 cells were selected for this study. The expression of miR-1224-5p in prostate cancer cells was detected by qPCR. miR-1224-5p mimic, inhibitor and corresponding negative control (NC) plasmids were transfected into PC3 and DU145 cells by liposome transfection technology, respectively. The transfection efficiency was verified by qPCR. The effects of miR-1224-5p mimic and inhibitor on cell proliferation, migration and apoptosis were detected by CCK-8 assay, plate clone formation assay, scratch healing assay and flow cytometry. The potential N<sup>6</sup>-methyladenosine (m<sup>6</sup>A) modification sites in the pri-miR-1224-5p sequence were predicted using SRAMP website, and the prediction results were verified using methylated RNA immunoprecipitation (MeRIP). The expression of methyltransferase 3 (METTL3), a key methyltransferase involved in m<sup>6</sup>A modification, in prostate cancer cells was detected by qPCR. CCK-8 assay and Transwell assay were used to detect the effect of METTL3 siRNA transfection on the proliferation and migration of PC3 and DU145 cells. The regulatory effect of METTL3-mediated m<sup>6</sup>A modification on the expression of miR-1224-5p was detected by qPCR and MeRIP. **Results:** miR-1224-5p was upregulated in prostate cancer cells (all P < 0.01). Transfection with miR-1224-5p mimic promoted the proliferation, migration and inhibited the apoptosis of PC3 and DU145 cells (P < 0.05 or P < 0.01). Conversely, miR-1224-5p inhibitor suppressed the proliferation, migration and induced apoptosis of PC3

 $-\oplus$ 

<sup>[</sup>基金项目] 国家自然科学基金(No. 82160465)

<sup>[</sup>作者简介] 胡东来(1994一),男,硕士生,检验技师,主要从事肿瘤分子诊断与治疗研究。E-mail: hudonglaiyx@163.com

<sup>[</sup>通信作者] 楚元奎, E-mail: 201100201@nxmu.edu.cn

· 65 ·

and DU145 cells (P < 0.05 or P < 0.01). pri-miR-1224-5p contained m<sup>6</sup>A modification sites. METTL3 was highly expressed in prostate cancer cells (all P < 0.01). Transfection of METTL3 siRNA inhibited the proliferation and migration of PC3 and DU145 cells (all P < 0.01). METTL3-mediated m<sup>6</sup>A modification regulated the expression of miR-1224-5p. **Conclusion:** miR-1224-5p is upregulated in prostate cancer cells through METTL3-mediated m<sup>6</sup>A modification. Down-regulation of miR-1224-5p can inhibit the proliferation, migration and induce apoptosis of prostate cancer cells.

[Key words] prostate cancer; miR-1224-5p; N<sup>6</sup>-methyladenosine (m<sup>6</sup>A); methyltransferase 3 (METTL3); proliferation; migration; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2025, 32(1): 64-72. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2025.01.009]

前列腺癌是男性高发的恶性肿瘤之一凹。临床 上通常采用雄激素剥夺疗法(androgen deprivation therapy, ADT)治疗晚期前列腺癌,然而大多数前列腺 癌患者会对ADT治疗产生耐药,从而导致去势抵抗 性前列腺癌四。转移性去势抵抗性前列腺癌患者预 后较差,患者5年生存率仅为34%左右13-4]。因此,寻 找潜在的诊断标志物与治疗靶点,有助于临床制定 前列腺癌更有效的诊断与治疗策略。miRNA是一类 内源性短链非编码RNA,主要在转录后水平调控基 因的表达<sup>[5]</sup>。越来越多的证据表明,miRNA的失调与 癌症的发生与发展密切相关[6-8],miRNA可作为癌基 因或抑癌基因参与前列腺癌发生与发展过程<sup>99</sup>,为前 列腺癌潜在诊断、治疗和预后的生物标志物[10]。在众 多的miRNA中,miR-1224-5p能够通过靶向溶质载体 有机阴离子转运蛋白家族成员4A1抑制结直肠癌细 胞增殖、迁移、侵袭及上皮间质转化进程<sup>111</sup>,但其在前 列腺癌中的生物学作用及其分子机制尚未明了。N<sup>6</sup>-甲基腺苷(N<sup>e</sup>-methyladenosine, m<sup>e</sup>A)修饰是真核生物 mRNA 最丰富的内源性修饰类型<sup>[12]</sup>,由写入器 (writers)、擦除器(erasers)和阅读器(readers)三种核心 蛋白动态调控<sup>13-14]</sup>。甲基转移酶3(methyltransferase 3, METTL3)是m<sup>6</sup>A修饰中的主要甲基化转移酶<sup>[15]</sup>,其 能够诱导初级miRNA(pri-miRNA)的m<sup>6</sup>A修饰并通 过与双链RNA结合蛋白相互作用增强对其底物的识 别和结合,从而促进pri-miRNA的加工和成熟,在肿 瘤的进展中发挥相应作用<sup>[16]</sup>。然而,miR-1224-5p的 产生和成熟是否与METTL3介导的m<sup>6</sup>A修饰有关, 值得探讨。本文以miR-1224-5p分子为研究对象,探 讨miR-1224-5p在前列腺癌细胞中的潜在生物学作 用及其表达是否与m<sup>6</sup>A修饰有关,以期为阐明前列 腺癌的发病机制和寻找更加有效的分子治疗靶点提 供实验依据。

#### 1 材料与方法

#### 1.1 细胞及主要试剂

人正常前列腺上皮细胞 RWPE-1 及前列腺癌细胞 PC3、DU145 和22RV1 均购自中国科学院上海生科院细胞资源中心,LNCaP 细胞购自武汉普诺赛生命

 $- \oplus$ 

#### 科技有限公司。

RPMI 1640 培养基、DMEM 培养基购自上海源 培生物科技股份有限公司,特级胎牛血清购自以色 列 Biological Industries 公司,Lipofectamine<sup>™</sup>2000 购 自美国 Invitrogen 公司,miR-1224-5p 模拟物(mimic) 与抑制剂(inhibitor)及相应的阴性对照(NC)由广州 锐博生物科技有限公司合成,si-METTL3、si-NC由上 海吉玛制药技术有限公司合成,细胞凋亡检测试剂 盒购自上海贝博生物科技有限公司,逆转录试剂盒、 实时荧光定量PCR(qPCR)试剂盒购自南京诺唯赞生 物科技股份有限公司,PCR 引物由上海生工生物工 程股份有限公司,PCR 引物由上海生工生物工 程股份有限公司合成,甲基化 RNA 免疫沉淀 (methylated RNA immunoprecipitation, MeRIP)试剂 盒购自广州伯信生物科技有限公司,m<sup>6</sup>A和METTL3 抗体购自美国Abcam公司,GAPDH和山羊抗兔IgG-HRP抗体购自美国Proteintech公司。

1.2 细胞培养及分组转染

前列腺癌 PC3、DU145、LNCaP 细胞在含 10% 胎 牛血清和 1% 双抗(青霉素与链霉素)的 RPMI 1640 培养基中培养,22Rv1 细胞在含 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 DMEM 培养基中培养,RWPE-1 细胞在 RWPE-1 专用培养基中培养。取对数生长期的 PC3 和 DU145 细胞,消化并接种于 6 孔板中,分为 inhibitor NC、miR-1224-5p inhibitor、mimic NC、miR-1224-5p mimic、si-NC、si-METTL3 组,待各组细胞汇 合度达 50%~70%时,按照转染试剂说明书进行转染。 转染 24 h或 48 h后,进行后续实验。

1.3 qPCR 法检测前列腺癌细胞中 METTL3、miR-1224-5p及pri-miR-1224-5p 的表达水平

TRIzol 法提取各组细胞中总 RNA,使用微量分 光光度计测量 RNA 样品的浓度和纯度,并逆转录为 cDNA。按照 qPCR 试剂盒说明书进行 qPCR 检测。 PCR 引物序列: METTL3 上游引物为 5'-CTGTGG CAGAAAAGAAGGGC-3',下游引物为 5'-ACTAAC GAACTGGCAAAGGC-3'; miR-1224-5p 上游引物为 5'-GTGAGGACTCGGGAGGTGG-3',下游引物为 5'-CAGTGCAGGGTCCGAGGTAT-3';pri-miR-1224-5p 上游引物为 5'-AAACTCTGTAGCCCTGACCCG-3', 下游引物为 5'-GGGAGAAGCGAGCTGAAAC-3'; miR-1224-5p RT引物为 5'-GTCGTATCCAGTGCA GGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCCAC CTC-3; GAPDH上游引物为 5'-AAATCCCATCAC CATCTTCC-3',下游引物为 5'-ATGACCCTTTTGGC TCCC-3'; U6上游引物为 5'-CTCGCTTCGGCAGCA CATATA-3',下游引物为 5'-CGCTTCACGAATTTGC GTGTC-3'。PCR反应条件:95 °C 5 min; 95 °C 15 s、 58 °C 15 s、72 °C 15 s,共40个循环。分别以 GAPDH、U6为内参照,按照 2-ΔΔCt法计算各基因的相 对表达量。

1.4 CCK-8法检测前列腺癌细胞的增殖能力

将各组 PC3 和 DU145 细胞以每孔3×10<sup>3</sup>个细胞 数量接种于96孔板中,每孔终体积为200 μL,每组设 6个重复。待细胞贴壁后,分别于0、24、48、72 和96 h 时去除旧培养基,每孔避光加入110 μL含10 μL CCK-8 试剂的培养基混合溶液,置于恒温培养箱中 作用1h,通过酶标仪检测波长450 nm 处的光密度 (D)值,依据D值绘制细胞增殖曲线。

1.5 平板克隆形成实验检测前列腺癌细胞的克隆形 成能力

将各组 PC3 和 DU145 细胞以每孔 3 × 10<sup>2</sup>个的细胞数量接种于 12 孔板中,每孔终体积为1 mL,每组设3 个重复。每3 d换液1次,连续培养9~14 d。培养结束后用 4% 多聚甲醛溶液固定 20~30 min,再用0.1%结晶紫溶液染色 20~30 min。去除染液,使用PBS溶液小心洗涤3次。室温风干,光学显微镜下拍照并计数大于100个细胞的克隆形成数,按照公式"克隆形成率=(克隆数/接种细胞数)×100%"计算细胞的克隆形成率。

1.6 细胞划痕愈合实验检测前列腺癌细胞的划痕愈合能力

使用胰酶消化处于对数生长期的各组 PC3 和 DU145 细胞,以3×10<sup>5</sup>个/孔的细胞数量接种于6孔 板中,各孔用1 mL 移液器吸头平行划 3~4条直线, PBS 溶液洗去漂浮的细胞,加入完全培养基继续培 养,分别于0h和24h时在各孔同一位置拍照并测量 划痕的宽度,按照公式"细胞迁移率 = [(0h划痕宽 度-培养后划痕宽度)/0h划痕宽度]×100%"计算细 胞的迁移率。

1.7 Transwell实验检测前列腺癌细胞的迁移能力

将各组 PC3 和 DU145 细胞以每孔 5×10<sup>5</sup>个细胞 量接种于无预铺基质胶的 Transwell 上小室中,下室 中加入 600 μL 含 20% 胎牛血清的完全培养基,培养 24 h 后,取出 Transwell 小室,弃去孔中培养液,用 PBS 清洗后,使用 4% 多聚甲醛溶液固定 20~30 min, 再在 0.1% 结晶紫溶液中染色 20~30 min,去除染液, PBS 溶液洗涤 3次,使用一次性棉签轻轻擦去上小室 中残留的细胞,光学显微镜下观察、计数迁移细胞 数,按照公式"细胞迁移率=(迁移细胞数/接种细胞 数)× 100%"计算细胞迁移率。

1.8 流式细胞术检测前列腺癌细胞的凋亡水平

使用无 EDTA 的胰酶消化完成转染的 PC3 和 DU145细胞,2~8 °C,180 × g 离心 3 min,预冷的 PBS 溶液重悬1次,去除上清液,加入400 µL Annexin V-FITC 结合液重悬细胞,加入 5 µL Annexin V-FITC 染色液 并混匀,置于 2~8 °C避光条件下作用 15 min,在细胞 悬浮液中加入 5~10 µL PI 染色液并轻轻混匀,置于 2~8 °C避光条件下作用 2~5 min,上流式细胞仪检测 细胞的调亡水平,以公式"细胞凋亡率=(凋亡细胞 数/总细胞数) × 100%"计算细胞凋亡率。

1.9 MeRIP实验检测前列腺癌细胞中m<sup>6</sup>A抗体对 pri-miR-1224-5p的富集

TRIzol法提取各组细胞的总RNA,IP组中加入 IP缓冲液和m<sup>6</sup>A抗体,IgG组中加入IP缓冲液和IgG 抗体,置于旋转混匀仪中,4℃摇动作用4h进行免疫 沉淀。将Protein A/G磁珠分别加入IP组和IgG组, 4℃下处理1h。向IP组、IgG组分别加入洗脱缓冲 液、蛋白酶K并垂直混匀,55℃条件下消化蛋白质-RNA 复合物,使用苯酚-氯仿-异戊醇混合液(25:24:1)提 取免疫沉淀的RNA样品,以IgG组为对照组,通过 qPCR法检测pri-miR-1224-5p(其引物序列详见1.3) 的表达。

1.10 WB法检测前列腺癌细胞中 METTL3 蛋白的 表达

提取转染48h后的PC3和DU145细胞总蛋白质,BCA法测量蛋白质样品的浓度。取20~30 μg蛋白质上样,通过10%SDS-PAGE电泳分离蛋白质并转移至PVDF膜上,在5%脱脂牛奶中封闭2~3h,PBST缓冲液漂洗3次,按分组加入METTL3(稀释比例为1:1000)和GAPDH(稀释比例为1:2000)一抗,4℃摇动处理过夜。次日回收一抗,PBST缓冲液漂洗3次,加入羊抗兔IgG-HRP(稀释比例为1:5000)二抗,室温下摇动作用1h,漂洗3次,避光加入ECL化学发光液,使用化学发光仪曝光成像。以GAPDH为内参,用ImageJ软件分析蛋白质条带的灰度值。

#### 1.11 统计学处理

 $-\oplus$ 

以上主要实验均独立重复3次。采用 Graphad Prism 9.4.1及 SPSS.26 软件对实验数据进行统计分 析。符合正态分布的计量资料以*x*±*s*表示,两组间数 据比较采用独立样本*t*检验,多组间数据比较采用单 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 miR-1224-5p在前列腺癌细胞中呈高表达

qPCR法检测结果(图1A)显示,与正常前列腺上 皮细胞RWPE-1相比,miR-1224-5p在前列腺癌PC3、 DU145、LNCaP、22Rv1细胞中均高表达(均P<0.01)。 结果提示,miR-1224-5p可能在前列腺癌的进展中起 到促癌因子的作用。

2.2 miR-1224-5p促进前列腺癌细胞增殖、迁移并抑制细胞凋亡

2.2.1 miR-1224-5p促进前列腺癌细胞增殖

qPCR法检测结果(图1B)显示,与inhibitor NC 组相比,miR-1224-5p inhibitor组PC3与DU145细胞中miR-1224-5p的表达水平均显著降低(均P<0.01);

与 mimic NC 组相比, miR-1224-5p mimic 组 PC3 与 DU145 细胞中 miR-1224-5p 的表达水平均显著升高 (均 *P* < 0.01)。结果表明, miR-1224-5p inhibitor 和 mimic 转染成功, 可以进行后续功能试验。

CCK-8法检测结果(图1C)显示,与inhibitor NC 组相比,miR-1224-5p inhibitor组 PC3和DU145细胞 的增殖能力均显著降低(均P < 0.01);与mimic NC组 相比,miR-1224-5p mimic组两种细胞的增殖能力均 显著升高(均P < 0.01)。平板克隆形成实验结果(图 1D)显示,与inhibitor NC组相比,miR-1224-5p inhibitor组PC3和DU145细胞的克隆形成率均显著 降低(均P < 0.01);与mimic NC组相比,miR-1224-5p mimic组两种细胞的克隆形成率均显著升高(均 P < 0.01)。结果表明,转染miR-1224-5p mimic则促 进前列腺癌细胞增殖。



A:qPCR法检测miR-1224-5p在前列腺癌细胞中的表达水平;B:qPCR法检测miR-1224-5p inhibitor和mimic 的转染效果; C:CCK-8法检测细胞的增殖能力;D:平板克隆形成实验检测细胞的克隆形成能力。\*\**P* < 0.01。 图1. miP 1224.5p.在前列腺癌细胞中的表达及其转染miP 1224.5p.inhibitor和mimic 对前列腺癌细胞增殖的影响

图1 miR-1224-5p在前列腺癌细胞中的表达及其转染miR-1224-5p inhibitor和mimic对前列腺癌细胞增殖的影响

2.2.2 miR-1224-5p促进前列腺癌细胞迁移 划痕愈合实验结果(图2A)显示,划痕后24h,与 inhibitor NC组相比,miR-1224-5p inhibitor组PC3与 DU145细胞迁移率均显著降低(P<0.05或P<0.01); 与 mimic NC组相比,miR-1224-5p mimic组PC3与 DU145细胞迁移率均显著升高(均P<0.01)。结果表 明,转染miR-1224-5p inhibitor能够抑制前列腺癌细 胞的迁移,转染miR-1224-5p mimic则能够促进前列 腺癌细胞的迁移。 2.2.3 miR-1224-5p 抑制前列腺癌细胞凋亡

流式细胞术检测结果(图 2B)显示,与 inhibitor NC组相比,miR-1224-5p inhibitor组PC3与DU145细 胞凋亡率均显著升高(P < 0.01或P < 0.05);与 mimic NC相比,miR-1224-5p mimic组PC3与DU145细胞 凋亡率均显著降低(均P < 0.01)。结果表明,转染 miR-1224-5p inhibitor能够促进前列腺癌细胞凋亡, 转染 miR-1224-5p mimic则能够抑制前列腺癌细胞 凋亡。



A:划痕愈合实验检测细胞的迁移能力;B:流式细胞术检测细胞的凋亡水平。\*P < 0.05,\*\*P < 0.01。</li>
 图2 转染miR-1224-5p inhibitor与mimic对前列腺癌细胞迁移和凋亡的影响

 $\oplus$ 

显示,pri-miR-1224-5p的序列中存在m<sup>6</sup>A修饰位点, 提示miR-1224-5p的生成可能与m<sup>6</sup>A修饰相关。

2.3.1 pri-miR-1224-5p m<sup>6</sup>A 修饰位点的预测与验证 通过 SRAMP 网站(https://www.cuilab.cn/sramp)
预测 pri-miR-1224-5p 的 m<sup>6</sup>A 修饰位点,结果(图 3A)

2.3 miR-1224-5p 受 METTL3 介导的 m<sup>6</sup>A 修饰调控

为进一步确认pri-miR-1224-5p 序列中可能存在的m<sup>6</sup>A修饰位点,以IgG组为对照,使用m<sup>6</sup>A抗体免

疫沉淀来自PC3和DU145细胞的RNA进行MeRIP。 结果(图3B)显示,与IgG组相比,m<sup>6</sup>A组pri-miR- 1224-5p能够显著被m<sup>6</sup>A抗体免疫富集(P<0.01),表明pri-miR-1224-5p序列中确实存在m<sup>6</sup>A作用位点。



A:SRAMP网站预测pri-miR-1224-5p的m<sup>6</sup>A修饰位点;B:MeRIP法检测m<sup>6</sup>A抗体对pri-miR-1224-5p的富集。与IgG组比较,

 $^{**}P < 0.01$  .

图 3 pri-miR-1224-5p m<sup>6</sup>A 修饰位点的预测与验证

2.3.2 干扰 METTL3 抑制前列腺癌细胞的增殖与迁移 qPCR法检测结果(图4A)显示,与RWPE-1细胞 相比,PC3、DU145、LNCaP和22Rv1细胞中METTL3 mRNA均显著高表达(均P<0.01)。WB法检测结 果(图4B)显示,与si-NC组相比,si-METTL3-1组和 si-METTL3-2组PC3和DU145细胞中METTL3蛋白 表达水平均显著下降(均P<0.01),表明干扰成功。 因此,选择干扰效果较好的si-METTL3-1(si-METTL3) 进行后续实验。

CCK-8 实验结果(图 4C)显示,与si-NC 组相比, si-METTL3 组 PC3 和 DU145 细胞增殖能力均显著降 低(均P < 0.01)。Transwell实验结果(图 4D)显示,与 si-NC 组相比,si-METTL3 组 PC3 和 DU145 细胞的迁 移率均显著下降(均P < 0.01)。结果表明,干扰 METTL3 表达能够显著抑制前列腺癌细胞的增殖与 迁移能力。

2.3.3 miR-1224-5p 与 METTL3 介导的 m<sup>6</sup>A 修饰之 间靶向关系的验证

qPCR法检测结果(图 5A、B)显示,与 si-NC 组相 比, si-METTL3 组 PC3 和 DU145 细胞中 pri-miR-1224-5p 的表达水平均显著升高(均 P < 0.01),而 miR-1224-5p 的表达水平均显著降低(均 P < 0.01)。 MeRIP检测结果(图 5C、D)显示,与 m<sup>6</sup>A 抗体处理 的 si-NC 组相比, si-METTL3 组 PC3 和 DU145 细胞中 pri-miR-1224-5p的免疫富集显著降低(均P < 0.01); 而与 IgG 抗体处理的 si-NC 组相比, si-METTL3 组 PC3 和 DU145 细胞中 pri-miR-1224-5p 的免疫富集均 无明显变化(均P > 0.05)。实验结果表明,干扰 METTL3 表达能够促进前列腺癌细胞中 pri-miR-1224-5p 的表 达,同时抑制 miR-1224-5p 的表达、抑制 m<sup>6</sup>A 抗体对 pri-miR-1224-5p 的特异性免疫富集,即:miR-1224-5p 的表达受 METTL3 介导的m<sup>6</sup>A 修饰正向调控。

#### 3 讨 论

前列腺癌是由前列腺上皮细胞恶性增殖所引起的肿瘤<sup>[17]</sup>。目前已获批准的前列腺癌疗法具有较大的临床疗效局限性,患者的预后依然较差<sup>[18]</sup>,这一现状凸显了寻找更加有效的治疗靶点的重要性。随着肿瘤分子靶向治疗研究的不断深入和临床应用的日益广泛,越来越多的证据表明,miRNA在肿瘤发展过程中的作用日益凸显。本文通过 qPCR 实验发现,miR-1224-5p 在前列腺癌细胞中呈高表达,细胞功能实验揭示miR-1224-5p 具有促进前列腺癌细胞增殖、迁移及负向诱导细胞凋亡的能力,提示miR-1224-5p 在前列腺癌的进展中可能发挥促癌作用,这与 JIN等<sup>[19]</sup>报道的miR-1224-5p 能够抑制骨肉瘤细胞的增殖与 侵袭,以及HAN等<sup>[20]</sup>报道的miR-1224在胃癌细胞中

呈低表达,过表达miR-1224能够抑制胃癌细胞的增殖、迁移与侵袭研究均不同。本研究可能揭示了miR-1224-5p在前列腺癌中不同于在其他肿瘤中的

异常表达。鉴于此,本文随后着重探讨miR-1224-5p 表达的调控机制。



A:qPCR 法检测 METTL3 在前列腺癌细胞中的表达水平;B:WB 法检测 METTL3 siRNA 的转染效果;C:CCK-8 实验检测细胞增殖;D:Transwell实验检测细胞迁移能力。与RWPE-1 细胞或 si-NC 组比较,\*P < 0.05,\*P < 0.01。</li>
 图4 转染 METTL3 siRNA 对前列腺癌细胞的增殖与迁移的影响





m<sup>6</sup>A 修饰是近年来肿瘤领域研究的热点。 METTL3作为主要甲基化转移酶,已被证实能够通过 介导m<sup>6</sup>A修饰调控pri-miRNA的成熟,进而影响肿瘤 的进展<sup>[21]</sup>。例如,METTL3通过介导m<sup>6</sup>A修饰促进 pri-miR-1246的加工和成熟,进而促进结直肠癌 细胞的迁移与侵袭<sup>22]</sup>;此外,通过介导m<sup>6</sup>A修饰促进 pri-miRNA-19a的加工和成熟,进而促进鼻咽癌细胞 的增殖和侵袭<sup>[23]</sup>。然而,miR-1224-5p在前列腺癌细 胞中的表达是否与METTL3介导的m<sup>6</sup>A修饰有关, 此前尚未见报道。本文借助SRAMP网站及MeRIP 实验发现,pri-miR-1224-5p序列中具有m<sup>6</sup>A修饰位 点。qPCR、CCK-8等细胞功能实验揭示,METTL3在 前列腺癌细胞中呈高表达,干扰METTL3表达能够 抑制前列腺癌细胞的增殖与迁移并诱导细胞凋亡, 这与本研究miR-1224-5p在前列腺癌细胞中的表达 及生物学作用类似。qPCR实验结果表明,干扰 METTL3能够显著促进pri-miR-1224-5p的表达。与此 同时,MeRIP实验结果表明,干扰METTL3能够显著 降低pri-miR-1224-5p在前列腺癌细胞中的免疫富 集,即:干扰METTL3能够阻滞pri-miR-1224-5p的成 熟。上述结果提示,miR-1224-5p在前列腺癌细胞中 的表达受METTL3介导的m<sup>6</sup>A修饰正向调控。

综上所述,本研究初步阐明miR-1224-5p受 METTL3介导的m<sup>6</sup>A修饰调控,从而在前列腺癌细胞 中呈高表达,下调miR-1224-5p能够抑制前列腺癌细 胞的增殖、迁移并诱导细胞凋亡。本研究不足之处 是由于时间和客观条件的限制,未能通过体内实验 做进一步探讨,未来课题组将开展体内实验及miR-1224-5p下游相关调控机制的深入研究。

#### [参考文献]

- 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.
- KELLY W K, DANILA D C, LIN C C, et al. Xaluritamig, a STEAP1
   × CD3 XmAb 2+1 immune therapy for metastatic castration-resistant prostate cancer: results from dose exploration in a first-in-human study [J/OL]. Cancer Discov, 2024, 14(1): 76-89[2024-05-26]. https://www. ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10784743/. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-23-0964.
- [3] TURCO F, GILLESSEN S, CATHOMAS R, et al. Treatment landscape for patients with castration-resistant prostate cancer: ptient selection and unmet clinical needs[J/OL]. Res Rep Urol, 2022, 14: 339-350[2024-05-26]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9529226/. DOI: 10.2147/RRU.S360444.
- [4] GILLESSEN S, BOSSI A, DAVIS I D, et al. Management of patients with advanced prostate cancer-metastatic and/or castration-resistant prostate cancer: report of the Advanced Prostate Cancer Consensus Conference (APCCC) 2022[J]. Eur J Cancer, 2023, 185: 178-215. DOI: 10.1016/j.ejca.2023.02.018.
- [5] LI Z, MAO K X, LIU L, *et al.* Nuclear microRNA-mediated transcriptional control determines adult microglial homeostasis and brain function[J]. Cell Rep, 2024, 43(3): 113964. DOI: 10.1016/j. celrep.2024.113964.
- [6] TANG J L, LI Y, WANG J Y, et al. Molecular mechanisms of microRNAs in regulating epithelial-mesenchymal transitions in human

Æ

cancers[J]. Cancer Lett, 2016, 371(2): 301-313. DOI: 10.1016/j. canlet.2015.11.043.

- [7] RUPAIMOOLE R, SLACK F J. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases[J]. Nat Rev Drug Discov, 2017, 16(3): 203-222. DOI: 10.1038/nrd.2016.246.
- [8] FEIERSINGER F, NOLTE E, WACH S, et al. MiRNA-21 expression decreases from primary tumors to liver metastases in colorectal carcinoma[J/OL]. PLoS One, 2016, 11(2): e0148580 [2024-05-26]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26845148/. DOI: 10.1371/journal.pone.0148580.
- [9] WANG Z G, XU L, HU Y Y, et al. miRNA let-7b modulates macrophage polarization and enhances tumor-associated macrophages to promote angiogenesis and mobility in prostate cancer[J/OL]. Sci Rep, 2016, 6: 25602[2024-05-26]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/ PMC4860600/. DOI: 10.1038/srep25602.
- [10] FABRIS L, CEDER Y, CHINNAIYAN A M, *et al.* The potential of microRNAs as prostate cancer biomarkers[J]. Eur Urol, 2016, 70 (2): 312-322. DOI: 10.1016/j.eururo.2015.12.054.
- [11] JIANG Y, ZHOU X Z, LI Y Y, et al. Solute carrier organic anion transporter family member 4A1 promotes colorectal cancer progression and is regulated by miR-1224-5p[J]. Neoplasma, 2022, 69(4): 776-784. DOI: 10.4149/neo\_2022\_211230N1854.
- [12] WU X W, SU T T, ZHANG S Y, et al. N<sup>6</sup>-methyladenosinemediated feedback regulation of abscisic acid perception via phaseseparated ECT8 condensates in Arabidopsis[J/OL]. Nat Plants, 2024, 10(3): 469-482[2024-05-26]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/ pmc/articles/9990323/. DOI: 10.1038/s41477-024-01638-7.
- [13] QIAN J Y, GAO J, SUN X, et al. KIAA1429 acts as an oncogenic factor in breast cancer by regulating CDK1 in an N6methyladenosine-independent manner[J]. Oncogene, 2019, 38(33): 6123-6141. DOI: 10.1038/s41388-019-0861-z.
- [14] PAN J X, XU L C, PAN H D. Development and validation of an m6A RNA methylation regulator-based signature for prognostic prediction in cervical squamous cell carcinoma[J]. Front Oncol, 2020, 10: 1444. DOI: 10.3389/fonc.2020.01444.
- [15] LI H Y, ZHANG Q, FENG Q, et al. The development of small molecules targeting methyltrans-ferase-like 3[J]. Drug Discov Today, 2023, 28(4): 103513. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2023.103513. DOI: 10.1016/j.drudis.2023.103513.
- [16] ALARCÓN C R, LEE H, GOODARZI H, et al. N6-methyladenosine marks primary microRNAs for processing[J/OL]. Nature, 2015, 519 (7544): 482-485[2024-05-26]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/ articles/PMC4475635/. DOI: 10.1038/nature14281.
- [17] GUO L X, LIU Y X, YANG T, *et al.* CAV1 and KRT5 are potential targets for prostate cancer[J/OL]. Medicine, 2023, 102(49): e36473
   [2024-05-26]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC 10713156/. DOI: 10.1097/MD.00000000036473.
- [18] PALENA C, GULLEY J L. A rare insight into the immunosuppressive landscape of prostate cancer bone metastases[J]. Cancer Cell, 2021, 39 (11): 1450-1452. DOI: 10.1016/j.ccell.2021.09.004.
- [19] JIN B C, JIN D F, ZHUO Z Z, et al. MiR-1224-5p activates autophagy, cell invasion and inhibits epithelial-to-mesenchymal transition in osteosarcoma cells by directly targeting PLK1 through PI3K/AKT/mTOR signaling pathway[J/OL]. Onco Targets Ther, 2020, 13: 11807-11818[2024-05-26]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/

pmc/articles/PMC7680192/. DOI: 10.2147/OTT.S274451.

- [20] HAN G D, SUN Y, HUI H X, et al. MiR-1224 acts as a prognostic biomarker and inhibits the progression of gastric cancer by targeting SATB1[J/OL]. Front Oncol, 2021, 11: 748896[2024-05-26]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8484804/. DOI: 10.3389/fonc.2021.748896.
- [21] HAN J, WANG J Z, YANG X, *et al.* METTL3 promote tumor proliferation of bladder cancer by accelerating pri-miR221/222 maturation in m<sup>6</sup>A-dependent manner[J/OL]. Mol Cancer, 2019, 18
   (1): 110[2024-05-26]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/ PMC6588935/. DOI: 10.1186/s12943-019-1036-9.
- [22] PENG W, LI J, CHEN R R, et al. Upregulated METTL3 promotes

metastasis of colorectal cancer *via* miR-1246/SPRED2/MAPK signaling pathway[J/OL]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1): 393 [2024-05-26]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31492150/. DOI: 10.1186/s13046-019-1408-4.

[23] GONG Y Q, JIANG Q S, LIU L J, et al. METTL3-mediated m6A modification promotes processing and maturation of pri-miRNA-19a to facilitate nasopharyngeal carcinoma cell proliferation and invasion[J]. Physiol Genomics, 2022, 54(9): 337-349. DOI: 10.1152/ physiolgenomics.00007.2022.

[收稿日期] 2024-05-27 [本文编辑] 党瑞山

 $\oplus$ 

[修回日期] 2024-11-24

凹口朔」 2024-11-24