

网络出版时间: 2022 - 11 - 28 19: 42 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20221128.1703.001.html>

◇ 基础医学研究 ◇

# METTL16 对肝癌细胞 增殖、迁移和侵袭能力的影响及其作用机制

胡 磊<sup>1</sup>, 陈红霞<sup>2</sup>, 周钢桥<sup>1</sup>

**摘要** 目的 探究甲基转移酶样蛋白 16 (METTL16) 对肝癌细胞 (HCC) 增殖、迁移和侵袭的影响及其潜在的作用机制。方法 在 HepG2 和 HCC-LM3 细胞中转染 METTL16 过表达载体及干扰载体, 用嘌呤霉素筛选稳定转染细胞, Western blot 和实时定量 PCR 实验评估过表达以及干扰效果; 采用 CCK-8 与 Transwell 实验检测 METTL16 对 HCC 增殖、迁移及侵袭的影响; 采用流式细胞术检测 METTL16 对 HCC 细胞周期的影响; 采用 Western blot 实验检测扰动 METTL16 后对肝癌细胞 VEGFA-VEGFR2 通路相关蛋白表达的影响; 采用高通量基因表达数据库 (GEO) 分析 METTL16 在人肝癌组织与癌旁组织中的表达水平, 通过 Log-rank 检验比较 METTL16 高表达和低表达肝癌患者生存期的差异。结果 Western blot 和实时定量 PCR 实验显示, 在 HepG2 和 HCC-LM3 细胞中, METTL16 过表达细胞株和干扰细胞株构建成功。CCK-8、Transwell 和流式细胞术结果显示, 过表达 METTL16 后, 增殖、迁移和侵袭的细胞数目减少, 处于 G<sub>2</sub>/M 期的细胞比例上升。敲低 METTL16 后, 增殖、迁移和侵袭的细胞数目增加, 处于 G<sub>2</sub>/M 期的细胞比例降低。Western blot 检测结果显示过表达 METTL16 可抑制 HepG2 细胞中 VEGFA-VEGFR2 通路相关蛋白 VEGFR2、p-AKT、Cyclin B、CDK1 的表达, 但敲低 METTL16 后可逆转对上述蛋白的抑制作用。METTL16 在人肝癌组织中的表达水平低于癌旁组织, 并且 METTL16 与肝癌患者的生存预后无相关性。结论 METTL16 可能通过抑制 VEGFR2 通路抑制肝癌细胞的增殖、迁移和侵袭。

**关键词** 肝细胞癌; METTL16; 细胞增殖; 细胞迁移; 细胞侵袭

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A 文章编号 1000 - 1492(2022) 12 - 1849 - 09

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2022.12.001

## 肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 在原

2022 - 08 - 25 接收

基金项目: 北京市自然科学基金资助项目 (编号: 5202025)

作者单位: <sup>1</sup>安徽医科大学生命科学学院, 合肥 230032

<sup>2</sup>军事科学院军事医学研究院辐射医学研究所, 蛋白质组学国家重点实验室, 国家蛋白质科学中心, 北京 100850

作者简介: 胡 磊, 男, 硕士研究生;

周钢桥, 男, 研究员, 博士生导师, 责任作者, E-mail: zhougq114@126.com

发性肝癌中约占比 70% ~ 90%, 同时也是全球癌症死亡的第 3 大原因<sup>[1]</sup>。近年来针对肝癌患者的外科切除和肝移植等技术有了显著进步, 然而目前肝癌患者的 5 年生存率仍不到 17%<sup>[2]</sup>, 并且肝癌发生发展确切的分子机制仍未得到具体阐明。

甲基转移酶样蛋白 16 (methyltransferase like protein 16, METTL16) 包含 N 端保守的甲基转移酶结构域 (MTD) 和 C 端的脊椎动物保守结构域 (VCRs)<sup>[3]</sup>。METTL16 可催化某些编码和非编码 RNA 发生甲基化修饰, 与多种生物学过程密切相关。除了与 m<sup>6</sup>A 修饰相关的功能外, METTL16 与多种肿瘤发生发展的过程也密切相关。现已有研究<sup>[4-5]</sup>表明 METTL16 在胃癌、乳腺癌及软组织肉瘤等多种恶性肿瘤中的表达水平呈现异常。尤其是最近的一项研究<sup>[6]</sup>显示, METTL16 的表达水平下调与肝癌患者较低的总体生存率相关。然而, METTL16 是否调控肝癌的发生发展及其具体的分子机制还未见报道。因此, 该研究旨在探索 METTL16 对肝癌细胞系的增殖、迁移及侵袭能力的影响, 并初步探索其潜在的作用机制。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞系和载体** 人源肝癌细胞系 HCC-LM3、HepG2 和 HEK293T 工具细胞均来自辐射医学研究所遗传学与整合组学实验室细胞保存库; 空载体、METTL16 过表达载体 pLVX-METTL16-Puro、干扰载体 pLKO.1-shMETTL16-1 与 pLKO.1-shMETTL16-2 均购自苏州金唯智生物科技有限公司; pMD2.G 和 psPAX2 包装质粒来自辐射医学研究所遗传学与整合组学实验室。

**1.2 主要试剂** 细胞培养所用的 DMEM 培养基购自北京细工生物科技有限公司; 胎牛血清及细胞传代所用的 0.25% 胰蛋白酶购自北京荣夏生物科技有限公司; CCK-8 检测试剂盒购自北京庄盟国际生物公司; RIPA (强) 细胞/组织蛋白裂解液、兔种属来源二抗、鼠种属来源二抗和快速 RNA 提取试剂盒均

购自北京康为世纪生物科技有限公司; METTL16 抗体(货号: 19924-1-AP)、GAPDH 抗体(货号: 60004-1-AP)、细胞周期依赖激酶 1 (cyclin-dependent kinases-1, CDK1) 抗体(货号: 19532-1-AP) 及细胞周期蛋白 B (CyclinB) 抗体(货号: 55004-1-AP) 购自武汉三鹰生物技术有限公司; 细胞外信号调节激酶 (ERK1/2) 抗体(货号: 4695S)、磷酸化细胞外信号调节激酶 (p-ERK) 抗体(货号: 9101S)、AKT 抗体(货号: 4685S) 及磷酸化蛋白激酶 B (phosphorylated protein kinase B, p-AKT) 抗体(货号: 4060S) 购自美国 CST 公司; 用于细胞转染的试剂 Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司。qRT-PCR 快速试剂盒(货号: Kk4601) 购自北京欣盛百泰科技有限公司; Transwell 迁移、侵袭小室购自北京中生华美科学器材有限公司; 磷酸盐缓冲液由本实验室制备。

### 1.3 方法

**1.3.1 过表达及敲低 METTL16 的肝癌细胞系的构建** 分别将慢病毒包装质粒 (pMD2. G、psPAX2) 与目的质粒 pLVX-Puro 或 pLVX-METTL16-Puro 共转染于 HEK293T 细胞, 培养 2~3 d 后, 收集培养皿中的培养基于 15 ml 离心管中, 高速离心后取上清液, 使用滤器过滤上清液并使用病毒浓缩液浓缩含有目的基因的病毒液, 分装于 1.5 ml 离心管于 -80 °C 保存。取分装的病毒感染细胞 HCC-LM3 和 HepG2 在 Polybrene 介导下, 使用病毒上清液感染目的细胞, 将细胞分为对照组 (pLVX-Puro 组)、过表达组 (pLVX-METTL16-Puro 组), 10 h 后更换为正常培养基继续培养, 48 h 后向培养基加入嘌呤霉素进行筛选, 嘌呤霉素终浓度为 2 mg/L。筛选成功的细胞用于后续实验。

同样采用慢病毒包装技术, 将构建好的靶向敲低 METTL16 的 shMETTL16 质粒分别转染到 HEK293T 细胞, 获得 shRNA 病毒, 将病毒感染目的细胞 HepG2 和 HCC-LM3, 将细胞分为阴性组 (Scramble 组)、感染组 (shMETTL16-1 组、shMETTL16-2 组), 使用终浓度为 2 mg/L 嘌呤霉素筛选细胞, 筛选成功敲低 METTL16 的细胞用于后续实验。

**1.3.2 细胞总蛋白提取及 Western blot 实验** 常规手法消化细胞, 随后收集 shMETTL16-1、shMETTL16-2 及各自对照组的细胞悬液, 使用细胞裂解液裂解细胞。冰上裂解 5~10 min 后, 离心细胞沉淀, 加入蛋白上样缓冲液, 沸水中煮沸 5~10 min, -20 °C 冰箱保存样品。随后, 根据实验设计上样顺序, 并且依据目的蛋白分子量的大小使用相应浓度的聚丙烯

酰胺凝胶进行电泳, 使用半干转膜仪进行转膜过程。封闭、洗膜、孵育特异性一抗。次日, 孵育二抗, 洗膜后显影并对结果进行分析。

**1.3.3 总 RNA 提取及 qRT-PCR 实验** 提取 pLVX-METTL16、shMETTL16-1、shMETTL16-2 及各自对照组总 RNA。对每组 RNA 浓度进行测量后, 取 500 μg RNA 进行逆转录。随后采用 KAPA SYBR® FAST qRT-PCR 试剂盒, 在 96 孔板中加入试剂盒配套试剂及引物。包括 METTL16 正向引物: 5'-CTCTGACGTGTACTCTCCTAAGG-3', 反向引物: 5'-TACCAGCCATTCAAGGTTGCT-3'。最后加入逆转录完成的模板进行 qRT-PCR 实验。记录实验组与对照组反应完成后的 Ct 值, 每组设置 3 个复孔, 通过  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  进行换算, 得到每组 METTL16 mRNA 表达水平的一个相对量。对 3 个复孔的相对量取平均值作为最终结果进行统计分析。

**1.3.4 细胞增殖能力的检测** 提前接种 pLVX-METTL16、shMETTL16-1、shMETTL16-2 及对照组细胞于 6 孔板中, 次日使用显微镜观察细胞状态, 当其密度在 90% 时常规手法消化细胞, 随后计数。取新的 96 孔板, 按每个孔 2 000 个细胞量进行接种, 分别在 24、48、72、96、120、144、168 h 通过 CCK-8 法检测肝癌细胞增殖能力。具体方法为: 弃去原有培养基, 每孔加入 90 μl 空 DMEM 和 10 μl CCK-8 试剂配置的 100 μl 反应液(尽量减少气泡), 继续培养 1 h; 随后收集孔板中 1 h 后的反应液, 酶标仪的吸光度值(450 nm) 按照摇晃 3 s 静置 3 s 的程序进行检测; 实验组与对照组均设置 3 个独立复孔。

**1.3.5 细胞迁移和侵袭能力的检测** 提前将 pLVX-METTL16、shMETTL16-1、shMETTL16-2 及对照组细胞接种至 6 孔板中, 常规手法消化细胞, 随后计数。各组别细胞浓度均调整至  $5 \times 10^5$  个/ml。随后取用迁移、侵袭小室专用的 24 孔板进行后续实验。先于孔板中加入含有 20% 胎牛血清的培养基, 随后轻轻放入迁移和侵袭的小室, 注意底部及侧壁不要产生气泡。随后在小室内轻轻滴加 200 μl 稀释好的细胞悬液(体系不含有血清), 继续培养 24~48 h。随后固定、染色, 使用 PBS 清洗(期间可通过哨兵孔观察细胞的迁移及侵袭的程度)。随后对穿过小室的细胞进行拍照, 并进行统计分析。

**1.3.6 流式细胞术对细胞周期的检测** 取对数生长期的细胞, 接种于直径 6 cm 的培养皿中, 培养 24 h, 采用终浓度为 0.1 mg/L 的 BrdU 染料处理 1 h 后, 常规手法消化细胞, 离心收集细胞后, 使用 PBS

轻柔洗涤细胞 2 次(清洗最后 1 次时剩余约 50  $\mu\text{l}$  PBS)。之后吸取 500  $\mu\text{l}$  提前预冷的浓度为 70% 的乙醇吹悬细胞,  $4^{\circ}\text{C}$  固定过夜。次日, 用 PBS 洗涤 2 次, 将 500  $\mu\text{l}$  HCl(2 mol/L) 悬滴到细胞中, 处理 30 min。PBS 洗涤 2 次, 加入 BrdU 抗体孵育 20 min、PBS 洗涤 2 次, 加入带有识别 BrdU 的二抗, 孵育 15 min(注意避光)。加入 PBS 洗涤 2 次。使用过滤水稀释  $10\times$  Assay buffer 至  $1\times$  Assay buffer。配制终浓度 1 g/L 核糖核酸酶 A(RNaseA) 和 PI 染料的混合液重悬细胞, 孵育 15 min(注意避光)。PBS 清洗 1 次, 上机检测, 应用 FlowJo 7.6 软件分析细胞周期数据。

**1.3.7 临床相关性分析** 下载高通量基因表达数据库(Gene Expression Omnibus database, GEO) 中 1 个中国人群的肝癌数据集(编号: GSE14520)。该数据集包括 220 个癌旁组织样本和 225 个癌组织样本的表达谱数据及其临床信息(其中有临床信息的癌组织样本为 221 个), 表达谱由 Affymetrix HT Human Genome U133A Array 或 Affymetrix Human Genome U133A 2.0 Array 芯片测得。之后使用 Mann-Whitney  $U$  检验对该数据集癌和癌旁组织中 METTL16 基因表达差异进行分析。根据癌症患者中 METTL16 基因 mRNA 的表达均值的表达水平将患者分为 METTL16 高表达组与低表达组, 随后使用 Fisher 精确检验评价 METTL16 基因的 mRNA 表达值与患者临床信息的相关性。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS 16.0 软件进行分析, 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用单因素方差分析, Leven 检验方差齐性,  $P < 0.05$  时, 组间比较采用 Dunnett's T3 法; 反之采用 SNK 法。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 过表达 METTL16 对肝癌细胞的增殖能力的影响** Western blot 实验检测显示, pLVX-METTL16-Puro 组的 METTL16 蛋白表达量高于 pLVX-Puro 组。采用 CCK-8 实验检测 HepG2 和 HCC-LM3 细胞增殖能力的变化, 结果显示, 与 pLVX-Puro 组相比, pLVX-METTL16-Puro 组细胞的增殖能力降低( $t = 9.680, 35.844, P < 0.001$ ), 提示 METTL16 过表达可抑制肝癌细胞系的增殖能力。见图 1。

**2.2 过表达 METTL16 对肝癌细胞的迁移和侵袭能力的影响** Transwell 实验结果显示, 与 pLVX-Puro 组相比, pLVX-METTL16-Puro 组中 HepG2 和 HCC-LM3 细胞迁移( $t = 44.920, 22.462, P < 0.001$ ) 和侵袭( $t = 83.742, 59.848, P < 0.001$ ) 的细胞数目减少。以上表明 METTL16 可抑制肝癌细胞迁移和侵袭能力。见图 2。

**2.3 敲低 METTL16 对肝癌细胞的增殖能力的影响** Western blot 和 qRT-PCR 实验显示, 与 Scramble 组相比, shMETTL16-1、shMETTL16-2 组中的 HepG2 和 HCC-LM3 细胞中 METTL16 蛋白表达水平均降低

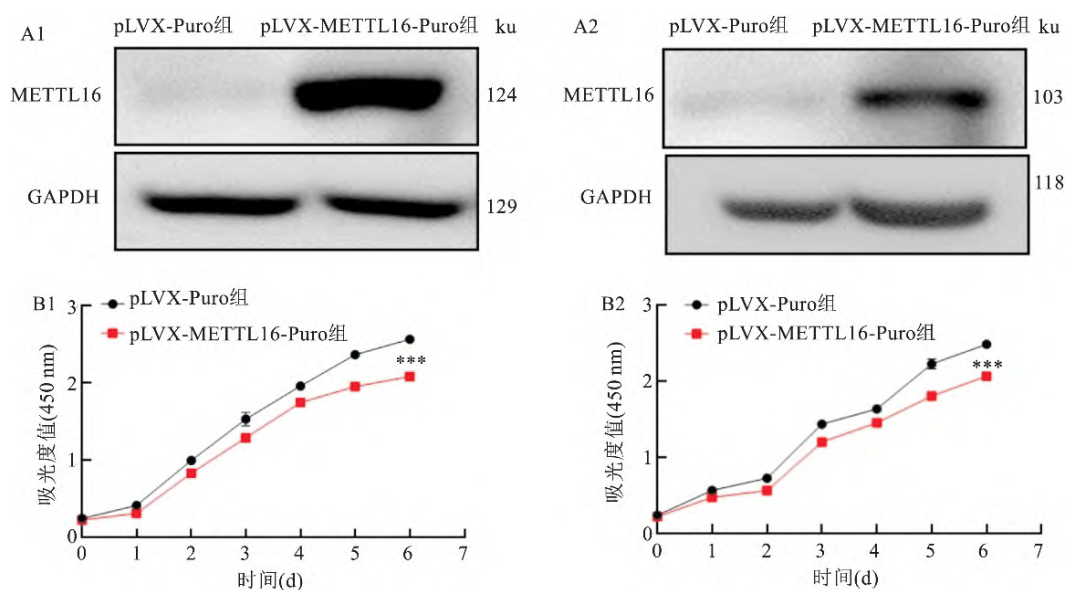


图 1 过表达 METTL16 对肝癌细胞系增殖能力的影响

A: Western blot 实验检测 HepG2、HCC-LM3 细胞中 METTL16 的蛋白表达水平; B: CCK-8 实验检测 HepG2、HCC-LM3 细胞增殖能力; 1: HepG2 细胞; 2: HCC-LM3 细胞; 与 pLVX-Puro 组比较: \*\*\*  $P < 0.001$

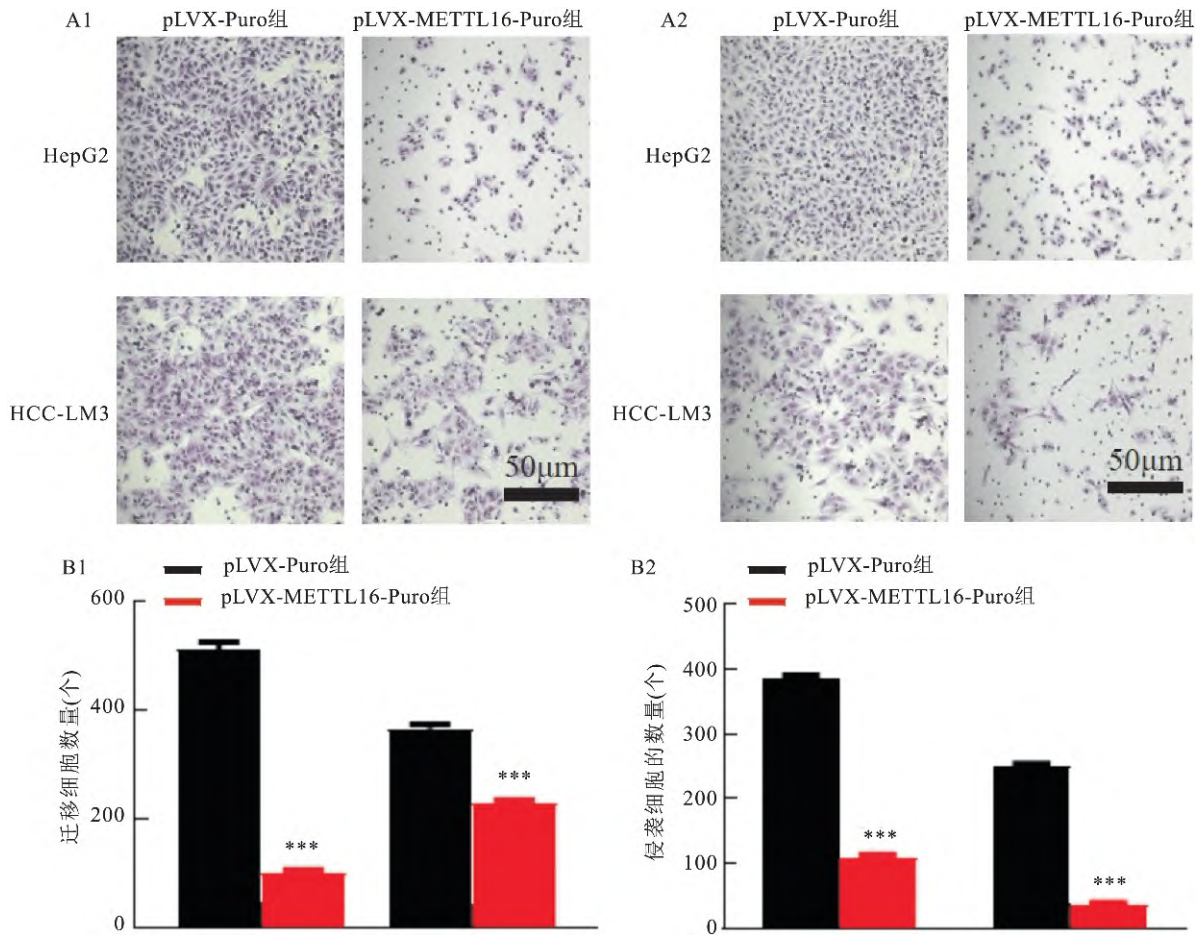


图2 过表达 METTL16 对肝癌细胞系迁移和侵袭能力的影响

A: Transwell 实验分别检测 HepG2、HCC-LM3 细胞的迁移和侵袭能力。0.5% 结晶紫染色 ×10; B: 统计直方图; 1: HepG2 细胞; 2: HCC-LM3 细胞; 与 pLVX-Puro 组比较: \*\*\*  $P < 0.001$

( $t_{\text{HepG2-shMETTL16-1}} = 14.154$ ,  $t_{\text{HepG2-shMETTL16-2}} = 16.111$ ;  $t_{\text{HCC-LM3-shMETTL16-1}} = 15.981$ ,  $t_{\text{HCC-LM3-shMETTL16-2}} = 12.144$ ;  $P < 0.001$ ) (图 3A、B)。各组筛选成功的细胞培养 168 h 后, CCK-8 法检测显示, 与 Scramble 组相比, shMETTL16-1、shMETTL16-2 组中 HepG2 与 HCC-LM3 细胞的增殖能力增加 ( $t_{\text{HepG2-shMETTL16-1}} = 5.838$ ,  $t_{\text{HepG2-shMETTL16-2}} = 5.859$ ;  $t_{\text{HCC-LM3-shMETTL16-1}} = 7.230$ ,  $t_{\text{HCC-LM3-shMETTL16-2}} = 7.948$ ;  $P < 0.01$ ) (图 3C), 提示敲低 METTL16 可促进肝癌细胞的增殖。

**2.4 敲低 METTL16 对肝癌细胞的迁移和侵袭能力的影响** Transwell 实验显示, 在 HepG2 和 HCC-LM3 细胞中, 相比于 Scramble 组, shMETTL16-1、shMETTL16-2 组中迁移 ( $t_{\text{HepG2-shMETTL16-1}} = 16.865$ ,  $t_{\text{HepG2-shMETTL16-2}} = 12.574$ ;  $t_{\text{HCC-LM3-shMETTL16-1}} = 28.822$ ,  $t_{\text{HCC-LM3-shMETTL16-2}} = 78.644$ ;  $P < 0.001$ ) 和侵袭 ( $t_{\text{HepG2-shMETTL16-1}} = 17.884$ ,  $t_{\text{HepG2-shMETTL16-2}} = 26.111$ ;  $t_{\text{HCC-LM3-shMETTL16-1}} = 42.823$ ,  $t_{\text{HCC-LM3-shMETTL16-2}} = 77.529$ ;

$P < 0.001$ ) 的细胞数目增多, 表明 METTL16 可抑制肝癌细胞迁移和侵袭。见图 4。

**2.5 过表达 METTL16 对肝癌细胞周期的进程的影响** 采用 PI 和 BrdU 对细胞进行染色, 随后通过流式细胞仪上机检测过表达 METTL16 后对 HepG2 和 HCC-LM3 细胞周期的影响。结果显示, 与 pLVX-Puro 组相比, pLVX-METTL16-Puro 组中 BrdU 阳性细胞减少。接下来对各个时期的细胞比例进行统计显示, 与 pLVX-Puro 组相比, pLVX-METTL16-Puro 组中 HepG2 和 HCC-LM3 S 期细胞比例减少, 分别由 26.3%、47.1% 减少至 19.2%、37.3% ( $t_{\text{HepG2}} = 8.782$ ,  $t_{\text{HCC-LM3}} = 43.643$ ; 均  $P < 0.001$ );  $G_2/M$  期细胞比例增加, 分别由 17.4%、16.4% 增加至 27.2%、29.5% ( $t_{\text{HepG2}} = 11.603$ ,  $t_{\text{HCC-LM3}} = 19.385$ ; 均  $P < 0.001$ )。见图 5。

**2.6 敲低 METTL16 对肝癌细胞周期的影响** 流式细胞仪检测了稳定敲低 METTL16 后的 HepG2 和

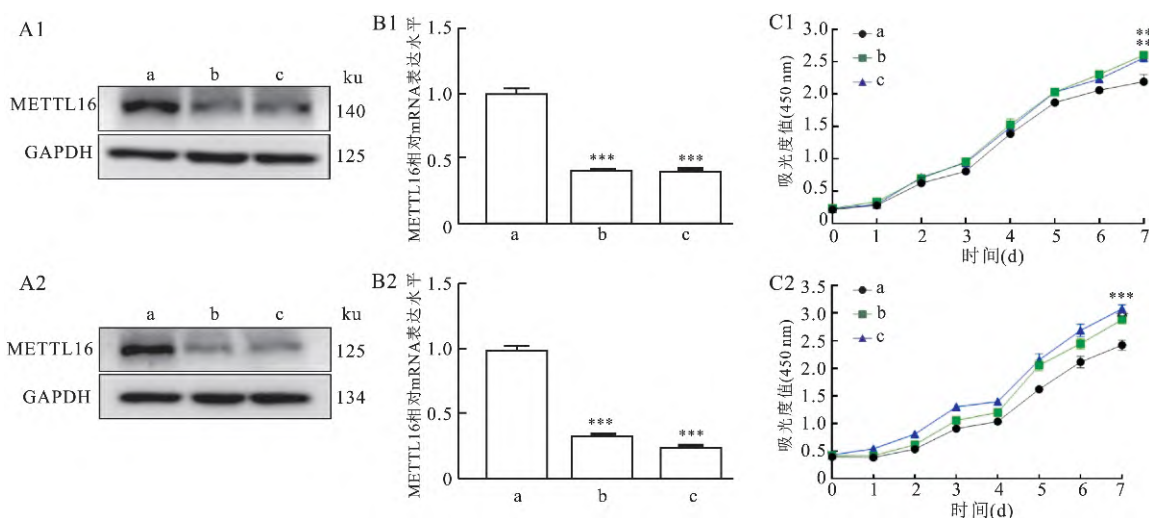


图3 敲低 METTL16 对肝癌细胞系增殖能力的影响

A、B: Western blot、qRT-PCR 分别检测 HepG2、HCC-LM3 细胞中 METTL16 的蛋白及 mRNA 表达水平; C: CCK-8 法检测 HepG2、HCC-LM3 细胞增殖能力; 1: HepG2 细胞; 2: HCC-LM3 细胞; a: Scramble 组; b: shMETTL16-1 组; c: shMETTL16-2 组; 与 Scramble 组比较: \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$

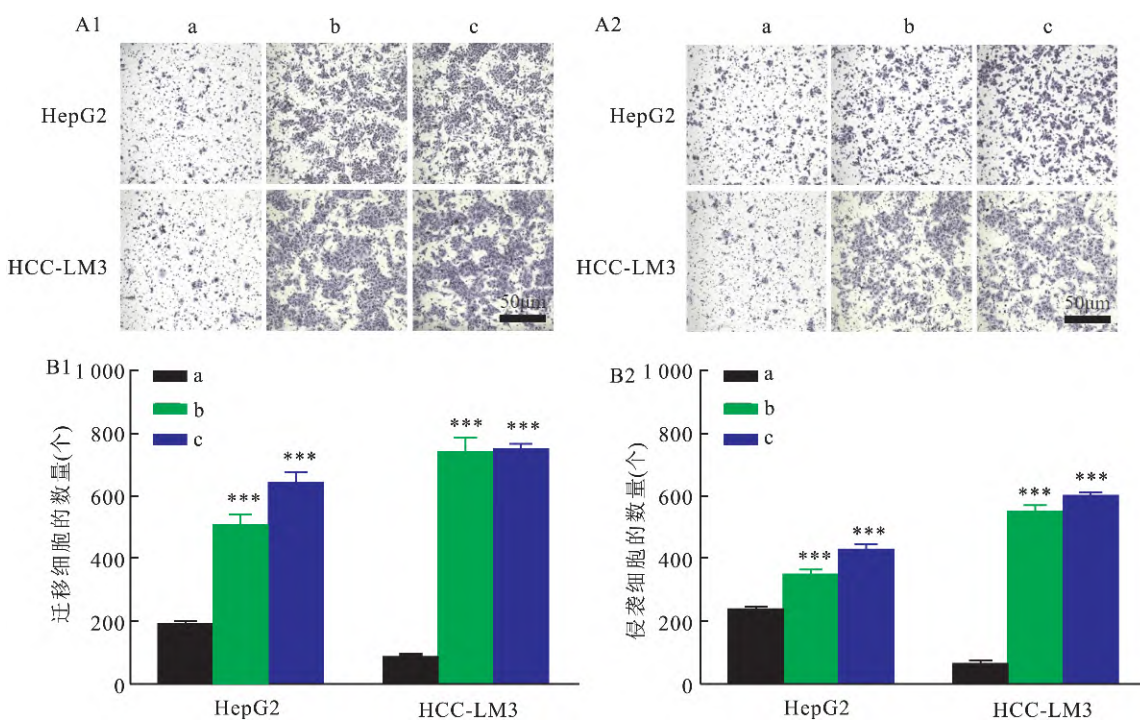


图4 敲低 METTL16 后对肝癌细胞系迁移和侵袭能力的影响

A: Transwell 实验分别检测 HepG2 和 HCC-LM3 细胞的迁移和侵袭能力。0.5% 结晶紫染色  $\times 10$ ; B: 统计直方图; 1: HepG2 细胞; 2: HCC-LM3 细胞; a: Scramble 组; b: shMETTL16-1 组; c: shMETTL16-2 组; 与 Scramble 组比较: \*\*\*  $P < 0.001$

HCC-LM3 细胞周期变化,结果显示,与 Scramble 组相比,shMETTL16-1、shMETTL16-2 组中 BrdU 阳性细胞增多,处于细胞周期 S 期的细胞增加,分别由 16.9%、40.7% 增加至 20.5%、22.5% 和 53.4%、55.3% ( $t_{\text{HepG2-shMETTL16-1}} = 5.258$ ,  $t_{\text{HepG2-shMETTL16-2}} = 9.108$ ;  $t_{\text{HCC-LM3-shMETTL16-1}} = 6.780$ ,  $t_{\text{HCC-LM3-shMETTL16-2}} =$

11.440;  $P < 0.01$ ) ,处于  $G_2/M$  期的细胞降低,分别由 26.4%、31.0% 降低至 19.4%、14.6% 和 21.7%、19.9% ( $t_{\text{HepG2-shMETTL16-1}} = 12.042$ ,  $t_{\text{HepG2-shMETTL16-2}} = 16.402$ ;  $t_{\text{HCC-LM3-shMETTL16-1}} = 7.389$ ,  $t_{\text{HCC-LM3-shMETTL16-2}} = 11.141$ ;  $P < 0.01$ )。上述结果提示, METTL16 可通过诱导细胞周期阻滞于  $G_2/M$  期

进而抑制肝癌细胞的增殖。见图 6。

### 2.7 扰动 METTL16 后对肝癌细胞血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor A ,

VEGFA) – 血管内皮细胞生长因子受体 2 (vascular endothelial growth factor receptor 2 ,VEGFR2) 通路相关蛋白表达的影响 为探索 METTL16 抑制肝

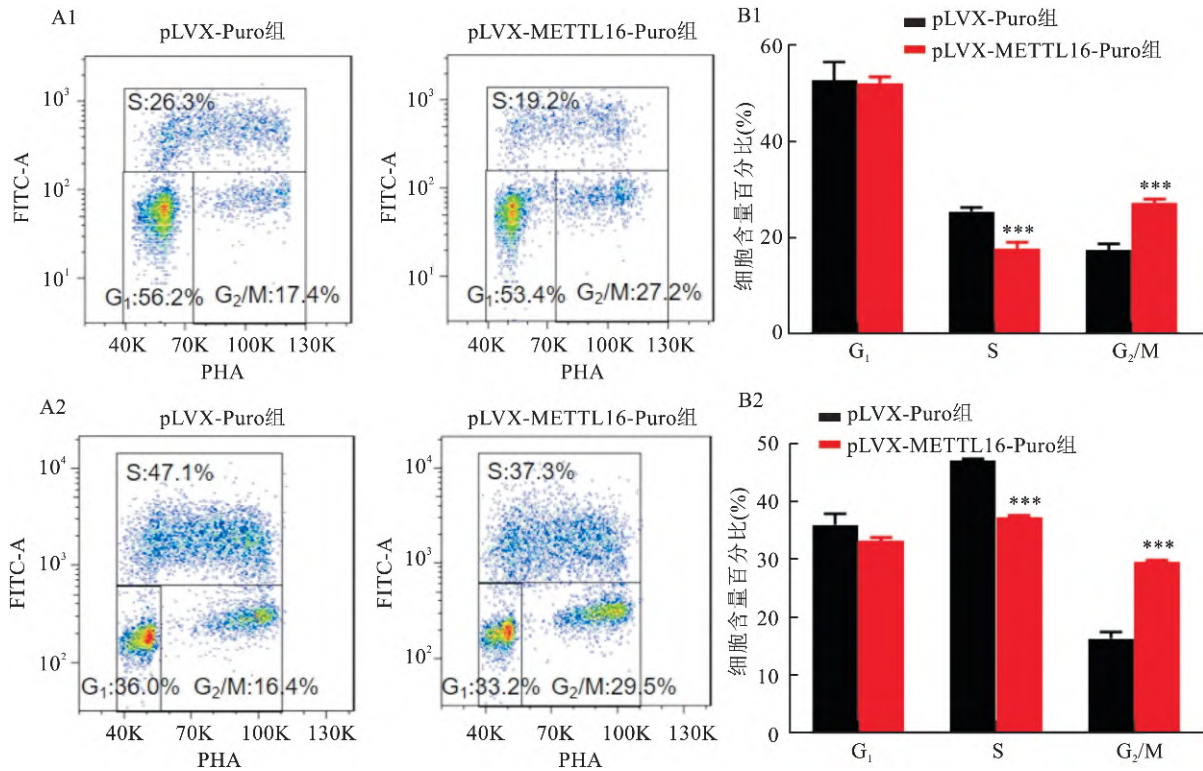


图 5 过表达 METTL16 对肝癌细胞周期的影响

A: 流式细胞仪检测细胞中过表达 METTL16 对 HepG2 和 HCC-LM3 细胞周期的影响; B: 统计直方图; 1: HepG2 细胞; 2: HCC-LM3 细胞; 与 pLVX-Puro 组比较: \*\*\*  $P < 0.001$

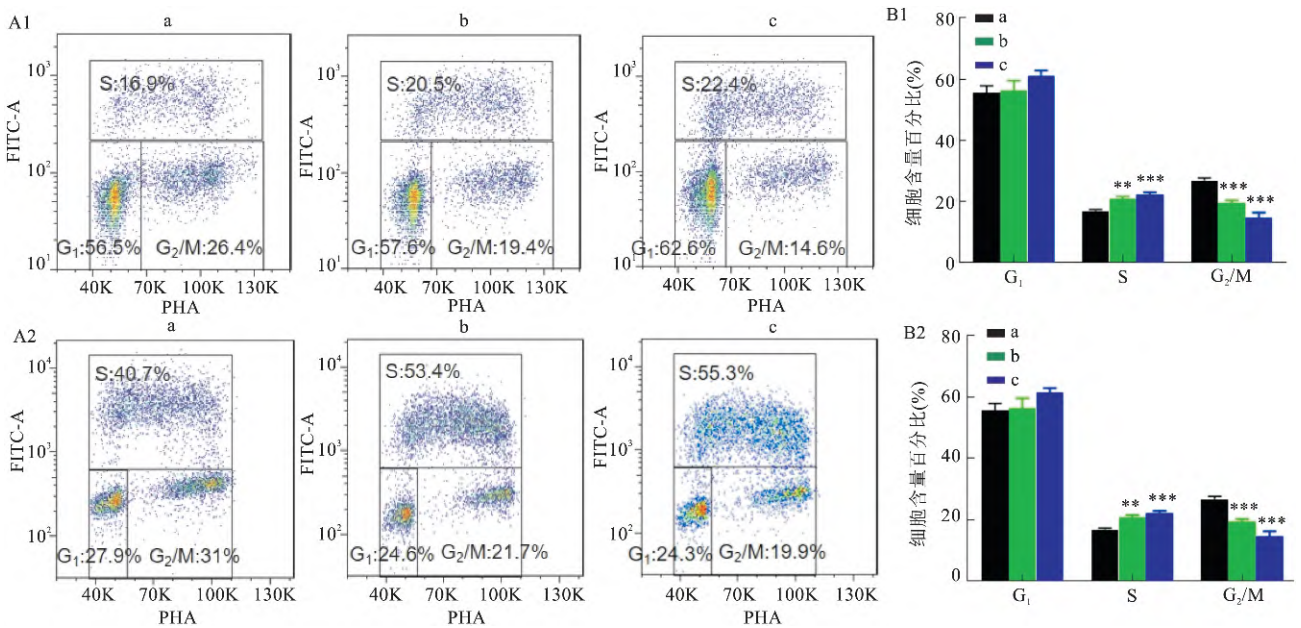


图 6 敲低 METTL16 对肝癌细胞周期的影响

A: 流式细胞仪检测细胞中敲低 METTL16 对 HepG2、HCC-LM3 细胞周期的影响; B: 统计直方图; 1: HepG2 细胞; 2: HCC-LM3 细胞; a: Scramble 组; b: shMETTL16-1 组; c: shMETTL16-2 组; 与 Scramble 组比较: \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$

癌细胞增殖和迁移能力的分子机制,本研究从高通量基因表达数据库(GEO)中下载了肝癌细胞表达谱数据集(编号:GSE14520)。对GSE14520数据按照METTL16在肿瘤中的表达中位数大小,将数据分为高、低表达两组,随后采用Network Analyst进行差异表达分析,共获得442个差异表达基因(差异倍数>1.2,并且 $P < 0.05$ )。采用Enrichr分析显示,这些基因富集于包括VEGFA-VEGFR2信号通路在内的5个信号通路(图7A)。接下来Western blot的结果显示,过表达METTL16后VEGFR2( $t = 13.643$ )、p-AKT( $t = 4.506$ )、Cyclin B( $t = 13.919$ )和CDK1( $t = 11.855$ )蛋白表达水平降低,差异有统计学意义;反之,敲低METTL16后,VEGFR2( $t_{shMETTL16-1} = 10.861$ ,  $t_{shMETTL16-2} = 8.566$ )、p-AKT

( $t_{shMETTL16-1} = 8.772$ ,  $t_{shMETTL16-2} = 7.883$ )、CyclinB( $t_{shMETTL16-1} = 3.191$ ,  $t_{shMETTL16-2} = 1.797$ )、CDK1( $t_{shMETTL16-1} = 3.793$ ,  $t_{shMETTL16-2} = 3.275$ )表达水平增加,差异有统计学意义(图7B、C);提示METTL16可抑制肝癌细胞VEGFA-VEGFR2通路相关蛋白的表达。

**2.8 肝癌和癌旁组织中METTL16表达水平及临床患者的生存分析** 通过分析高通量基因表达数据库(编号:GSE14520)一个中国人群肝癌数据集中220个癌旁组织样本和225个癌组织样本的表达谱数据及其临床信息发现,癌组织中METTL16的mRNA表达水平低于癌旁组织,差异有统计学意义(图8A)。然而,两组间的总体生存率和无病生存率无明显差异(图8B、C)。

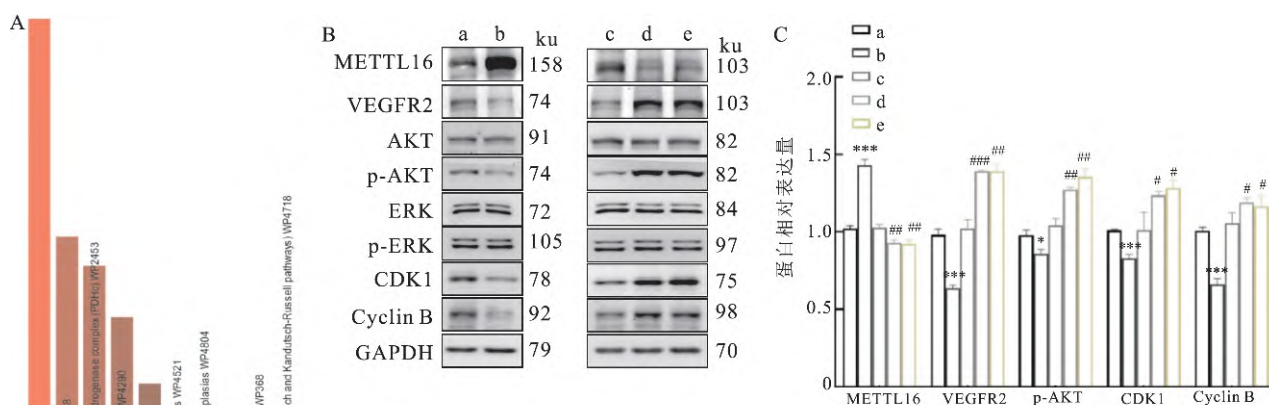


图7 扰动METTL16后对肝癌细胞VEGFA-VEGFR2通路相关蛋白表达的影响

A: 采用Enrichr法富集分析与METTL16相关的信号通路; B: Western blot检测HepG2细胞中VEGFA-VEGFR2通路相关蛋白表达水平; C: 统计直方图; a: pLVX-Puro组; b: pLVX-METTL16-Puro组; c: Scramble组; d: shMETTL16-1组; e: shMETTL16-2组; 与pLVX-Puro组、Scramble组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ; 与Scramble组比较: #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$

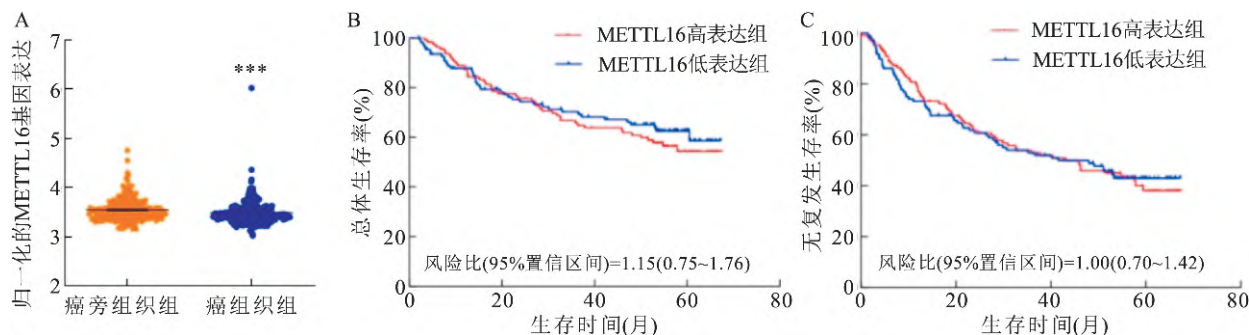


图8 METTL16的表达及总体生存率和无病生存率的相关性

A: 癌旁组织与肝癌组织中METTL16 mRNA表达水平; B: METTL16高表达组与METTL16低表达组肝癌患者之间总体生存率的差异; C: METTL16高表达组与METTL16低表达组肝癌患者之间无病生存率的差异; 与癌旁组织组比较: \*\*\*  $P < 0.001$

### 3 讨论

METTL16 是一种 RNA m<sup>6</sup>A 甲基转移酶,可催化 RNA 发生甲基化修饰,其生物学功能仍不完全清楚。最近的研究<sup>[7]</sup>表明,METTL16 参与催化 U6 snRNA 的甲基化修饰,进而调控真核生物的 RNA 剪切过程。在脊椎动物中,METTL16 通过催化编码 s-腺苷蛋氨酸合成酶 (methionineadenosyltransferase2A, MAT2A) 前体 mRNA 的 3' 非翻译区发生 m<sup>6</sup>A 修饰,进而调控 MAT2A 前体 RNA 的剪切过程,影响其 mRNA 的稳定性,从而维持细胞中 s-腺苷蛋氨酸合成酶的稳态<sup>[8]</sup>。也有报道指出 METTL16 与肿瘤的发生发展密切相关。如在结直肠癌中,METTL16 基因发生移码突变后可促进肿瘤的发生发展<sup>[9]</sup>。此外,研究<sup>[6]</sup>表明 METTL16 的低表达与肝癌细胞的代谢重编程过程的激活相关,METTL16 可能通过减慢癌细胞的新陈代谢进而抑制肿瘤的生长。该研究通过 CCK-8 实验以及 Transwell 实验表明 METTL16 对肝癌细胞的增殖、迁移和侵袭具有抑制作用,提示在肝癌细胞中,METTL16 可能发挥抑癌基因功能。此外,文献<sup>[4]</sup>报道在小鼠胃癌细胞中敲低 METTL16 可抑制细胞周期蛋白 Cyclin D1 的表达,进而抑制肿瘤细胞的增殖和生长能力。以上研究提示 METTL16 在不同肿瘤中可发挥不同的功能。

VEGF/VEGFR 信号通路与多种疾病的发生发展相关,如 VEGFA 可促进血管生成、视网膜屏障破坏、炎症和视力丧失等的发生。在肿瘤细胞中,VEGFA 能刺激内皮细胞的增殖和存活,导致新血管的形成,进而促进肿瘤进展<sup>[10]</sup>。VEGF 受体家族包括 VEGFR1、VEGFR2 和 VEGFR3,其中的 VEGFR2 是活性最高的酪氨酸激酶受体 (TKR),负责肿瘤组织中血管生成信号的转导。在肝癌细胞系中,MiR-199a-3p 通过抑制 VEGFA-VEGFR2 血管生成信号通路的激活进而降低肿瘤细胞的增殖能力<sup>[11]</sup>。然而在肝癌中,METTL16 与 VEGFA-VEGFR2 信号通路之间的关系尚未见报道。在本研究中,通过基因通路富集分析显示,METTL16 的异常表达与 VEGFA-VEGFR2 信号通路的激活相关。进一步的细胞功能学实验也初步验证了 METTL16 影响 VEGFA-VEGFR2 信号通路中的关键分子蛋白 VEGFR2 和 p-AKT 的表达,对 p-ERK 蛋白的表达无影响,表明 METTL16 更有可能依赖 PI3K-AKT 途径参与 VEGFA-VEGFR2 信号通路的传导过程。此外,活化的

AKT 可通过磷酸化作用激活或抑制 Bad、Caspase-9、NF- $\kappa$ B、GSK-3、FKHR、p21<sup>Cip1</sup> 和 p27<sup>Kip1</sup> 等下游靶蛋白的表达,进而调节细胞的增殖、分化、凋亡及迁移等过程。有研究<sup>[12]</sup>报道,在肝癌细胞系中,EGR1 通过抑制 Cyclin B 与 CDK1 的表达将细胞周期阻滞在 G<sub>2</sub>/M 期进而发挥抑癌基因的作用。本研究表明 METTL16 也可通过调控细胞周期发挥类似的生物学功能。总之,本研究通过生物信息学预测结合初步的功能实验验证,首次证实了 METTL16 可能通过抑制 VEGFA-VEGFR2 信号通路及阻滞细胞周期进程抑制肝癌细胞的增殖、迁移和侵袭。

研究<sup>[13]</sup>表明,METTL16 低表达与内分泌系统肿瘤患者较差的总体生存率相关。在卵巢癌中,相对于癌旁组织,癌组织中 METTL16 的 mRNA 水平降低<sup>[14]</sup>。上述结果提示 METTL16 可能作为抑癌基因抑制内分泌系统肿瘤与卵巢癌的发生发展。本研究显示,在肝癌组织中 METTL16 mRNA 的表达水平低于癌旁组织;然而,基于公共数据集对患者进行生存分析显示,METTL16 mRNA 的表达水平与其总体生存率和无病生存率并无相关性,这可能是由于样本量较小或该公共数据集收集的样本自身原因导致。因此,METTL16 的表达水平与肝癌患者不良预后之间的关系仍需进一步探索。

综上所述,该研究通过一系列细胞功能学实验初步验证了 METTL16 可抑制肝癌细胞的增殖、迁移、侵袭能力及阻滞细胞周期的进程,并且 VEGFA-VEGFR2 信号通路的激活可能是肝癌发展的重要分子机制。

### 参考文献

- [1] Miller K D, Siegel R L, Lin C C, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(4): 271-89.
- [2] Schlachterman A, Craft J W W, Hilgenfeldt E, et al. Current and future treatments for hepatocellular carcinoma [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(28): 8478-91.
- [3] Ruszkowska A. METTL16, Methyltransferase-like protein 16: current insights into structure and function [J]. *Int J Mol Sci* 2021, 22(4): 2176.
- [4] Wang X K, Zhang Y W, Wang C M, et al. METTL16 promotes cell proliferation by up-regulating cyclin D1 expression in gastric cancer [J]. *J Cell Mot Med*, 2021, 25(14): 6602-17.
- [5] Zhang B, Gu Y, Jiang G. Expression and prognostic characteristics of m(6) A RNA methylation regulators in breast cancer [J]. *Front Genet*, 2020, 11(3): 604597.
- [6] Wang P, Wang X, Zheng L, et al. Gene signatures and prognostic



- values of m<sup>6</sup>A regulators in hepatocellular carcinoma [J]. *Front Genet*, 2020, 11(4): 540186.
- [7] Warda A S, Kretschmer J, Hackert P, et al. Human METTL16 is a N(6)-methyladenosine (m(6)A) methyltransferase that targets pre-mRNAs and various non-coding RNAs [J]. *EMBO Rep*, 2017, 18(11): 2004–14.
- [8] Pendleton K E, Chen B, Liu K, et al. The U6 snRNA m<sup>6</sup>A methyltransferase METTL16 regulates SAM synthetase intron retention [J]. *Cell*, 2017, 169(5): 824–35. e14.
- [9] Yeon S Y, Jo Y S, Choi E J, et al. Frameshift mutations in repeat sequences of ANK3, HACD4, TCP10L, TP53BP1, MFN1, LCMT2, RNMT, TRMT6, METTL8 and METTL16 genes in colon cancers [J]. *Pathol Oncol Res*, 2018, 24(3): 617–22.
- [10] Fearnley G W, Smith G A, Abdul-Zani I, et al. VEGF-A isoforms program differential VEGFR2 signal transduction, trafficking and proteolysis [J]. *Biol Open*, 2016, 5(5): 571–83.
- [11] Ghosh A, Dasgupta D, Ghosh A, et al. MiRNA199a-3p suppresses tumor growth, migration, invasion and angiogenesis in hepatocellular carcinoma by targeting VEGFA, VEGFR1, VEGFR2, HGF and MMP2 [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(3): e2706.
- [12] Wang L, Sun H, Wang X, et al. EGR1 mediates miR-203a suppress the hepatocellular carcinoma cells progression by targeting HOXD3 through EGFR signaling pathway [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(20): 45302–16.
- [13] Li K, Luo H, Luo H, et al. Clinical and prognostic pan-cancer analysis of m<sup>6</sup>A RNA methylation regulators in four types of endocrine system tumors [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(23): 23931–44.
- [14] Zheng J, Guo J, Wang Y, et al. Bioinformatic analyses of the ferroptosis-related lncRNAs signature for ovarian cancer [J]. *Front Mol Biosci* 2021, 8: 735871.

## Effects of METTL16 on proliferation, migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells and its mechanism of action

Hu Lei<sup>1</sup>, Chen Hongxia<sup>2</sup>, Zhou Gangqiao<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>*School of Life Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032*; <sup>2</sup>*National Center for Protein Sciences, The State Key Lab of Proteomics, Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Sciences, Beijing 100850*)

**Abstract Objective** To investigate how the m<sup>6</sup>A methylation enzyme Methyltransferase like protein 16 (METTL16) exerts its effects on the proliferation, migration and invasion of hepatocellular carcinoma (HCC) cells HepG2 and HCC-LM3, and to further explore the underlying molecular mechanism. **Methods** The overexpression and RNA interference vectors targeting METTL16 were transfected into HepG2 and HCC-LM3 cells and screened the stable cell lines by puromycin. The expressions of METTL16 were detected by means of qRT-PCR and Western blot assay; in HCC cell lines, Cell counting kit-8 (CCK-8), Transwell assays, and flow cytometry were used to observe the effects in the proliferation, migration, invasion and cell cycle after transfection; Western blot assay was used to detect the effect of expression of VEGFA-VEGFR2 pathway-related proteins in hepatocellular carcinoma cells; Gene Expression Omnibus database was used to analyze the expression levels of METTL16 in human liver cancer tissues and paraneoplastic tissues. Log-rank test was used to compare the clinic pathological characteristics between patients with high and low expression of METTL16 in hepatocellular carcinoma. **Results** Western blot and real-time quantitative PCR experiments showed that METTL16 overexpressing cell lines and interfering cell lines were successfully constructed in HepG2 and HCC-LM3 cells. CCK-8, Transwell and flow cytometry results showed that overexpression of METTL16 resulted in a decrease in the number of proliferating, migrating and invasive cells, and the number of cells in G<sub>2</sub>/M phase proportion increased. Western blot showed that overexpression of METTL16 inhibited the expression of VEGFA-VEGFR2 pathway-related proteins VEGFR2, p-AKT, Cyclin B, and CDK1 in HepG2 cells, but knockdown of METTL16 reversed the inhibition effect on these proteins. Compared to the matched non-tumor liver tissues, METTL16 was downregulated in HCC tissues; however, the levels of METTL16 were not significantly associated with the clinic pathological characteristics of HCC patients. **Conclusion** METTL16 may inhibit the proliferation, migration and invasion of HCC cells by inhibiting the VEGFR2 pathway.

**Key words** hepatocellular carcinoma; METTL16; cell proliferation; cell migration; cell invasion