



· 论 著 ·

METTL14介导ER α 的m6A修饰调控子宫内膜癌转移的机制研究

赵满英¹, 伍东月², 杜瑞亭², 尹璐³, 骆玉露¹

1. 青海省人民医院干部保健处, 青海 西宁 810000;
2. 青海省人民医院妇科, 青海 西宁 810000;
3. 青海省人民医院高压氧科, 青海 西宁 810000

[摘要] 背景与目的: 甲基转移酶样因子14 (methyltransferase-like factor 14, METTL14) 失调引起的异常N6-甲基腺苷 (N6-methyladenosine, m6A) 修饰在多种癌症的进展中发挥重要作用, 目前尚不清楚其是否参与子宫内膜癌 (endometrial cancer, EC) 的进展。本研究旨在探讨METTL14失调引起的异常m6A修饰在EC侵袭和转移中的作用。方法: 收集96例2017—2021年在青海省人民医院接受治疗性手术的EC患者。从冷冻组织中分离RNA (70对) 或蛋白质 (10对), 用于实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RTFQ-PCR) 或免疫印迹分析, 以评估METTL14在EC中的表达。评估METTL14的表达及其与EC临床病理学特征的相关性。在体外和体内测定METTL14在EC中的生物学效应。将甲基化RNA免疫沉淀测序 (methylated RNA immunoprecipitation sequencing, MeRIP-seq) 与RNA测序 (RNA sequencing, RNA-seq) 相结合, 并在m6A斑点印迹后, 采用MeRIP-RTFQ-PCR、RIP-RTFQ-PCR或双荧光素酶报告基因分析来筛选和验证METTL14的候选靶标。结果: 与匹配的相邻组织相比, EC中METTL14的mRNA表达和蛋白质水平显著下调。与METTL14高表达组相比, METTL14低表达组国际妇产科联盟 (International Federation of Gynecology and Obstetrics, FIGO) 分期、浸入深度、淋巴管血管侵犯、淋巴结转移及肿瘤转移例数显著增加 ($P < 0.05$)。在功能上, METTL14在体外和体内抑制EC细胞的增殖和侵袭能力。从机制上讲, METTL14介导的m6A去甲基化导致雌激素受体 α (estrogen receptor alpha, ER α) 转录后抑制。此外, 与METTL14相比, ER α 诱导肿瘤的致癌行为。结论: METTL14通过m6A依赖性方式在EC细胞中减弱ER α 的表达, 进而抑制肿瘤转移和侵袭。

[关键词] 甲基转移酶样因子14; N6-甲基腺苷; 子宫内膜癌; 雌激素受体 α

中图分类号: R737.33 文献标志码: A DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2023.03.008

Mechanism of METTL14-mediated ER α m6A regulation of endometrial cancer metastasis ZHAO Manying¹, WU Dongyue², DU Ruiting², YIN Lu³, LUO Yulu¹ (1. Department of Cadres Health Care, Qinghai Provincial People's Hospital, Xining 810000, Qinghai Province, China; 2. Department of Gynecology, Qinghai Provincial People's Hospital, Xining 810000, Qinghai Province, China; 3. Department of Hyperbaric Oxygen, Qinghai Provincial People's Hospital, Xining 810000, Qinghai Province, China)

Correspondence to: LUO Yulu, E-mail: 137185544@qq.com.

[Abstract] **Background and purpose:** Aberrant N6-methyladenosine (m6A) modification caused by dysregulation of methyltransferase-like factor 14 (METTL14) plays an important role in the progression of various cancers, and it is unclear whether it is involved in the endometrial cancer (EC) progression. This study aimed to investigate the role of aberrant m6A modification caused by dysregulation of METTL14 in EC invasion and metastasis. **Methods:** Ninety-six EC patients who underwent curative surgery in Qinghai Provincial People's Hospital from 2017 to 2021 were enrolled. RNA (70 pairs) or proteins (10 pairs) were isolated from frozen tissues for real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RTFQ-PCR) or immunoblot analysis to assess METTL14 expression in EC. The expression of METTL14 and its correlation with clinicopathological features of EC were assessed.

基金项目: 青海省卫生健康科研基金项目 (2020-q-1271)。

第一作者: 赵满英 (ORCID: 0000-0002-3324-4859), 本科, 主治医师。

通信作者: 骆玉露 (ORCID: 0000-0002-4929-4906), 本科, 主任医师, E-mail: 137185544@qq.com。

The biological effects of METTL14 in EC were determined *in vitro* and *in vivo*. Methylated RNA immunoprecipitation sequencing (MeRIP-seq) combined with RNA sequencing (RNA-seq), and following m6A dot blot, MeRIP-RTFQ-PCR, RIP-RTFQ-PCR or dual luciferase reporter assays were employed to screen and validate the candidate targets of METTL14. **Results:** The mRNA expression and protein levels of METTL14 were significantly downregulated in EC compared with matched adjacent tissues. Compared with the METTL14 high expression group, the METTL14 low expression group had a significant increase in International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) stage, infiltration depth, lymphovascular invasion, lymph node metastasis and the number of cases of tumor metastasis ($P < 0.05$). Functionally, METTL14 inhibited the proliferation and invasive capacity of EC cells *in vitro* and *in vivo*. Mechanistically, METTL14-mediated demethylation of m6A resulted in post-transcriptional repression of estrogen receptor alpha (ER α). Furthermore, compared with METTL14, ER α induced oncogenic behavior of tumors. **Conclusion:** METTL14 attenuates ER α expression in EC cells in a m6A-dependent manner, thereby inhibiting tumor metastasis and invasion.

[**Key words**] Methyltransferase-like factor 14; N6-methyladenosine; Endometrial cancer; Estrogen receptor alpha

子宫内膜癌 (endometrial cancer, EC) 是女性生殖道最常见的恶性肿瘤。被诊断患有晚期或复发性EC的女性患者预后较差, 5年生存率仅为17%, 这可能是由于这些女性对局部治疗的低反应^[1]。目前, 放射治疗对晚期EC的疗效仍然存在争议, 并且初始治疗后在疾病进展或复发时没有标准治疗选择^[2]。因此, 需要更好地了解EC的分子特征, 以改善患者的预后。N6-甲基腺苷 (N6-methyladenosine, m6A) 是哺乳动物mRNA中最常见的化学修饰^[3]。在细胞核中, mRNA上的m6A修饰受到动态调节, 甲基转移酶样因子 (methyltransferase-like factor, METTL) 3/14等蛋白质通过形成甲基转移酶复合物催化特定RNA上m6A修饰的形成^[4]。最近研究^[5-6]发现, METTL14失调引起的异常m6A修饰在各种癌症的进展中起重要作用, 例如, 在结直肠癌和肝细胞癌中, METTL14已被报道通过调节m6A来抑制癌细胞转移。考虑到m6A RNA甲基化是mRNA最常见的修饰, 我们假设METTL14也可能通过该方式调节特定mRNA来抑制EC的转移潜能。本研究旨在分析METTL14对EC侵袭和转移的调控作用, 并基于m6A调控机制探讨肿瘤转移的分子机制。

1 材料和方法

1.1 患者样本

收集96例2017—2021年在青海省人民医院接受治疗性手术的EC患者, 采集肿瘤和邻近组织的标本, 从冷冻组织中分离RNA (70对) 或

蛋白质 (10对), 用于实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RTFQ-PCR) 或免疫印迹分析, 以评估METTL14在EC中的表达。

1.2 细胞培养

人EC细胞系AN3CA和KLE (美国典型培养物保藏中心) 维持在含有10%胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS, 美国Thermo Fisher Scientific公司) 和1%链霉素/青霉素的DMEM (美国Hyclone公司) 中, 并置于37 °C、CO₂体积分数为5%的细胞培养箱中培养。

实验1考察METTL14对EC细胞增殖、迁移和侵袭的影响。将AN3CA细胞分为METTL14敲低 (si-METTL14) 组和相应对照 (si-NC) 组; 其中si-NC组和si-METTL14组分别使用Lipofectamine™2000 (美国Invitrogen公司) 将si-NC或si-METTL14转染细胞24 h。将KLE细胞分为载体组和METTL14过表达 (METTL14) 组; 其中载体组和METTL14组KLE细胞分别使用Lipofectamine™2000将载体或METTL14质粒转染细胞24 h。

实验2考察METTL14和雌激素受体 α (estrogen receptor alpha, ER α) 在EC细胞中的相互作用。将AN3CA细胞分为si-METTL14+si-NC组和si-METTL14+si-ER α 组。各组细胞分别使用Lipofectamine™2000将si-METTL14、si-ER α 和相应对照 (si-NC) 转染细胞24 h。

1.3 RTFQ-PCR分析

使用TRIzol试剂 (日本Takara公司) 获得EC

组织或细胞的总RNA。然后, 使用PrimeScript RT Reagent Kit (日本Takara公司) 进行反转录, 使用TB Green Premix Ex Taq II (日本Takara公司) 进行RTFQ-PCR。引物由广州锐博生物技术有限公司设计合成。使用标准的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (周期阈值) 方法测定METTL14、ER α 的相对表达水平。用于RTFQ-PCR的引物序列如下: METTL14正向为5'-TGGTTCAAGTGACTACCA-3', 反向为5'-TTGGTTGGACTACTTTCTGCTA-3'; ER α 正向为5'-CAATGACCCCTTCATTGACC-3', 反向为5'-TTGATTTTGGAGGGATCTCG-3'; GAPDH正向为5'-TCAAGAAGGTGGTGAAGCAGG-3', 反向为5'-TCAAAGGTGGAGGAGTGGGT-3'。

1.4 质粒构建和寡核苷酸转染

为建立METTL14稳定过表达的细胞系, 将512 bp的METTL14 cDNA序列克隆到从汉恒生物科技(上海)有限公司获得的pHBLV-CMV-crRNA质粒慢病毒载体中。然后用2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 嘌呤霉素选择转染的细胞。METTL14特异性siRNA (si-METTL14)、ER α 特异性siRNA (si-ER α) 及其对照 (si-NC) 由上海吉玛制药技术有限公司设计和合成。

1.5 蛋白质印迹法 (Western blot) 分析

通过蛋白质提取试剂 (北京索莱宝科技有限公司) 制备来自EC组织或细胞的蛋白质。采用二辛可宁酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白检测试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司) 检测蛋白浓度。通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 分离蛋白质后, 使用以下针对指定靶蛋白的一抗进行探测: 抗METTL14抗体 (1:1 000, 美国Cell Signaling Technology公司)、抗ER α 抗体 (1:1 000, 美国Cell Signaling Technology公司) 和抗GAPDH抗体 (1:5 000, 武汉Proteintech公司)。洗涤后, 聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜用辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 偶联的山羊抗兔免疫球蛋白G (immunoglobulin G, IgG) (1:5 000, 美国Cell Signaling Technology公司) 在室温

下温育1 h。洗涤后, PVDF膜与电化学发光 (electrochemical luminescence, ECL) 底物一起温育以在印迹上产生化学发光, 由ChemiDoc MP成像系统 (美国Bio-Rad公司) 捕获图像并通过Image J软件进行标准化。

1.6 细胞增殖分析

使用EdU试剂盒 (美国Roche公司) 进行EdU掺入测定以评估细胞增殖能力。将细胞接种在96孔培养板中 (1×10^3 个细胞/孔), 培养72 h后, 加入100 μL 含50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ EdU的培养基温育2 h。弃培养液, 加入100 μL 4%多聚甲醛溶液固定细胞15 min, 加入100 μL 0.5% TritonX-100透化细胞30 min。在暗处加入100 μL $1 \times$ Hoechst反应液温育20 min。冲洗后, 在荧光显微镜 (德国Carl Zeiss公司) 下随机选取5个不同视野进行量化。

1.7 Transwell检测

将转染后的AN3CA细胞或KLE细胞重悬于不含FBS的DMEM中并调整细胞密度至 1×10^6 个/mL。然后, 将100 μL 细胞悬液加入未包被或Matrigel基质胶包被的transwell小室 (美国BD Biosciences公司) 的上室。下室充满500 μL 含15%FBS的DMEM, 细胞在37 $^{\circ}\text{C}$ 、CO $_2$ 体积分数为5%的条件下培养24 h。用棉签去除transwell膜上层细胞, 下层细胞用100%甲醇固定5 min, 0.1%结晶紫染色15 min。在光学显微镜 (日本Olympus公司) 下选取5个不同视野定量通过膜的细胞数, 并计算平均值。Transwell小室的孔径为8 μm 。

1.8 免疫荧光

细胞用4%多聚甲醛溶液固定, 用0.1% Triton X-100透化并用5%FBS白蛋白封闭。然后, 将细胞与一抗在4 $^{\circ}\text{C}$ 下温育过夜, 并在室温下荧光标记的二抗中温育30 min。肌动蛋白细胞骨架直接用罗丹明标记鬼笔环肽 (瑞士Roche公司) 染色。4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 用于核染色。通过荧光显微镜捕获图像。

1.9 m6A斑点印迹分析

将从EC细胞中分离的总RNA混合在3倍体积的SSC缓冲液 (美国Sigma-Aldrich公司) 中,

并在65 °C下变性5 min。将溶解在SSC缓冲液中的样品（400、200或100 ng）沉积在Amersham Hybond-N+膜（美国GE Healthcare公司）上。然后将膜通过紫外光交联5 min，用0.02%亚甲蓝[生工生物工程（上海）股份有限公司]染色。对蓝点进行扫描以显示输入RNA含量。用m6A抗体（1:5 000，美国Synaptic System公司）在4 °C下将膜孵化过夜。与二抗温育后，通过成像系统显示斑点印迹。

1.10 甲基化RNA免疫沉淀测序（methylated RNA immunoprecipitation sequencing, MeRIP-seq）和数据分析

MeRIP-seq和后续数据分析主要由上海天昊生物科技有限公司提供支持。收集具有稳定过表达METTL14的KLE细胞和用空载体转染的对照细胞。从每组中提取超过250 μg的总RNA，并使用NEBNext Poly(A) mRNA磁分离模块通过寡核苷酸（dT）珠进一步纯化mRNA。使用NanoDrop分光光度计和Agilent 2100生物分析仪（美国Agilent公司）评估RNA的浓度和完整性，然后用片段化缓冲液将mRNA片段化为150个核苷酸。在将10%的片段化mRNA保存为输入后，用抗m6A抗体免疫沉淀m6A修饰的mRNA并洗脱。使用VAHTS Total RNA-seq (H/M/R) Library Prep Kit for Illumina（南京诺唯赞生物科技股份有限公司）同时构建输入mRNA（RNA-seq）和富含m6A的mRNA（MeRIP-seq）的RNA测序文库，然后在Novaseq测序仪（美国Illumina公司）上进行测序。

1.11 RNA免疫沉淀

使用Magna RIP Kit（美国Millipore公司）进行RIP检测。将磁珠与5 μg抗METTL14（美国Sigma-Aldrich公司）和抗兔IgG（美国Millipore公司）混合，然后加入细胞裂解物（每个样品约 2×10^7 个细胞）。用蛋白酶K处理后，将感兴趣的RNA从免疫沉淀复合物中洗脱出来，并纯化后使用RTFQ-PCR进行进一步分析。相对富集被归一化为输入： $\%Input = 1/10 \times 2^{Ct[IP]} - Ct[input]$ 。

1.12 MeRIP-RTFQ-PCR

使用Magna MeRIP™ m6A试剂盒（美国Millipore公司）进行MeRIP测定，以确定单个转录本上的m6A修饰。从预处理的细胞中分离出150 μg的总RNA，并随机片段化为100个或更小的核苷酸。然后用预先包被10 μg抗m6A抗体或抗小鼠IgG的磁珠对RNA样品进行免疫沉淀。并应用m6A 5'-单磷酸钠盐（6.7 mmol/L）洗脱m6A修饰的RNA片段。基于MeRIP-seq结果，我们专注于ERα转录本的位点，其中在METTL14过表达细胞和空对照细胞之间鉴定出差异m6A峰。根据来自MeRIP-seq和基序依赖性m6A位点预测因子SRAMP（<http://www.cuilab.cn/sramp>）的信息设计用于MeRIP-RTFQ-PCR分析的特异性引物（正向为5'-AGCAGAATTGGCTGGTTTCG-3'，反向为5'-AGCCCCAGTCTAAGTCCCA-3'）。

1.13 体内转移模型建立

5周龄雌性BALB/c无胸腺裸小鼠由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。20只小鼠随机分为Vector组和METTL14组，每组10只。转染METTL14过表达或对照载体慢病毒的KLE细胞通过尾静脉注射到小鼠体内以建立肺转移模型。第21天，使用Caliper IVIS Spectrum生物发光成像系统（美国PerkinElmer公司）通过量化肺区域中的荧光素酶活性来拍摄具有代表性的小鼠体内图像。

1.14 统计学处理

使用SPSS 19.0软件对数据进行分析。分别通过 χ^2 和Fisher精确检验分析基因表达与临床病理学参数之间的相关性。至少进行3个独立的重复实验用于计算标准差。定量数据表示为 $\bar{x} \pm s$ 。使用Student's *t*检验对两组之间的平均值进行统计分析；单向方差分析用于多组平均值的统计分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 METTL14在EC中的mRNA和蛋白质水平

为研究METTL14在EC中的表达谱，本研

究分析了EC和匹配的相邻组织中METTL14的mRNA和蛋白质水平,发现METTL14在EC中的mRNA和蛋白质水平显著下调(图1)。此外,与METTL14高表达组相比,METTL14低表达组国际妇产科联盟(International Federation of Gynecology and Obstetrics, FIGO)分期、浸入深度、淋巴管血管侵犯、淋巴结转移及肿瘤转移例数显著增加($P<0.05$,表1)。

2.2 METTL14抑制EC侵袭和转移

为探索METTL14在调控EC侵袭和转移中的作用,本研究选择来源于淋巴结转移的AN3CA细胞系和具有高转移潜能的KLE细胞进行后续实验。分别将AN3CA和KLE细胞建立METTL14沉默和过表达模型(图2A)。如EdU测定所示,METTL14的敲低增强了AN3CA细胞增殖能力,而METTL14的上调则显示出相反的效果(图2B、2C)。Transwell测定显示,METTL14的抑制增强了AN3CA细胞迁移和侵袭能力,而METTL14的过表达则降低了KLE细胞迁移和侵袭能力(图2D、2E)。为验证这种现象是否是由于细胞骨架的重塑引起的,随后进行了鬼笔环肽染色。METTL14的敲低通过微管和微丝的重排导致细胞骨架更松散和更分散的模式,这表示更活跃的迁移形式,而METTL14的上调则显示出相反的效果(图2F、2G)。为阐明METTL14对体内EC转移的影响,通过尾静脉注射将METTL14过表达和si-NC细胞移植BALB/c裸小鼠进行生物发光成像。与载体组相比,METTL14

组荧光素酶活性和EC细胞的肺转移显著降低($P<0.05$,图2H、2I)。通过H-E染色结果证实上述发现(图2J)。因此,METTL14在体外和体内抑制EC细胞迁移和侵袭能力。

2.3 MeRIP-seq与RNA-seq结合显示ER α 作为METTL14的靶标

首先应用斑点印迹分析来检查METTL14在调节m6A修饰中的作用。METTL14的缺失导致AN3CA细胞m6A水平增加,而METTL14过表达导致KLE细胞m6A水平减少(图3A)。当METTL14上调时,MeRIP-seq揭示了1 538个不同的m6A峰,其中1 344个相应的转录本丰度降低。同时,RNA-seq在METTL14过表达时发现了481个转录本下调。本研究重点关注重叠的前10个基因,即COCH、ER α 、ADAMTS14、ABCA4、TP53I11、COLCA2、TMED7、CYP4F3、IL17RB和VCAN,按表达倍数变化的升序排列(图3B、3C)。通过RTFQ-PCR在METTL14沉默或过表达细胞中进行了初步验证。在AN3CA和KLE细胞中,只有ER α 受到METTL14的反向调节(图3D),Western blot结果进一步证实该结果(图3E)。综上所述,ER α 可能是METTL14的直接下游目标。

2.4 METTL14通过调节m6A修饰消除ER α 的稳定性

MeRIP-seq分析表明,3'非翻译区(3'-untranslated region, 3'-UTR)中ER α 的m6A峰随着METTL14的过表达而显著缩小(图

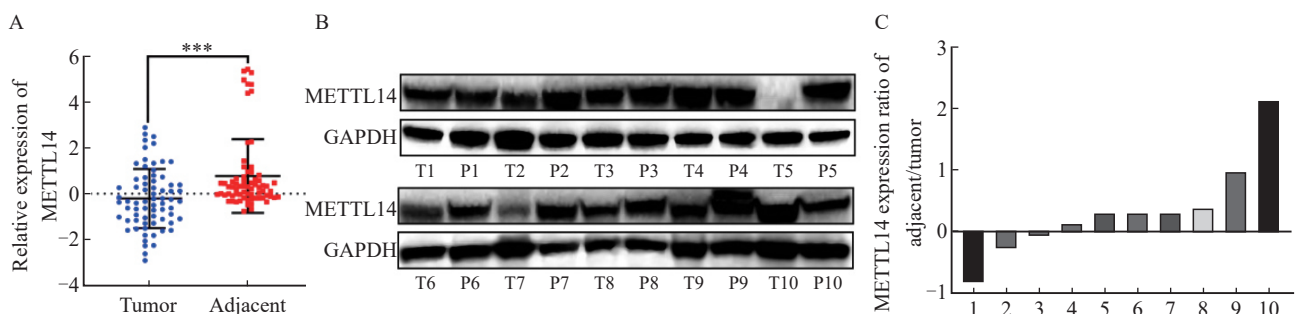


图1 METTL14在EC中的mRNA和蛋白质水平显著下调

Fig. 1 mRNA and protein levels of METTL14 in EC were significantly down-regulated

A: METTL14 mRNA expression was measured in tumor and normal tissues based on 70 pairs of EC samples. B, C: Representative plots and grayscale analysis of western blot analysis of METTL14 (calculated by the log₂ ratio of EC and matched adjacent tissue, normalized to GAPDH) of 10 pairs of EC samples. ***: $P<0.001$. T: Tumor tissue; P: Paracancerous tissue.

表1 METTL14表达与临床病理学参数之间的关联

Tab. 1 Association between METTL14 expression and clinicopathologic parameters

Clinicopathologic parameter	Number of patients <i>n</i>	Expression of METTL14 <i>n</i>		χ^2 value	<i>P</i> value
		High	Low		
Patients	96	40	56		
Age/year				0.841	0.593
<60	38	18	20		
≥60	58	22	36		
Histology type				-	0.192
Grade 1 endometrioid	38	20	18		
Grade 2 endometrioid	27	9	18		
Grade 3 endometrioid	23	8	15		
UPSC	8	3	5		
FIGO stage				-	<0.001
I - II	68	35	33		
III - IV	28	5	23		
Depth of invasion				6.796	0.018
<50%	42	25	17		
≥50%	54	15	39		
lymphovascular invasion				8.820	<0.001
Negative	50	28	22		
Positive	46	12	34		
Lymph node metastasis				-	<0.001
Negative	74	38	36		
Positive	22	2	20		
Metastasis tumor				-	<0.001
Uterine tumor without metastasis	66	32	34		
Uterine tumor with metastasis	30	5	25		
Abdominal metastasis	24	1	23		
Lymph node metastasis	22	2	20		

4A)。为证实这一结果，在KLE细胞中使用抗METTL14抗体进行RIP检测，并观察到METTL14可以富集ER α mRNA（图4B、4C），表明ER α 可能在与METTL14相互作用后在RNA水平上受到调节。然后用针对潜在m6A位点的特异性引物进行的MeRIP-RTFQ-PCR分析显示，敲除METTL14可以促进3'-UTR中ER α 的m6A修饰，而METTL14过表达导致该位点的m6A水平降低（图4D、4E）。荧光素酶报告基因显示，当METTL14沉默时，转染ER α -WT质粒的细胞的荧光素酶活性增加，而突变组的荧光素酶活性不受影响，并且可以在过表达METTL14的细胞中验

证类似的结果（图4F、4G）。

2.5 ER α 敲低逆转METTL14抑制EC细胞增殖或迁移的作用

为证实观察到的EC的表型变化是由METTL14-ER α 轴的失调介导的，本研究进行了功能性拯救试验。EdU结果显示，METTL14的敲低导致EC细胞增殖能力增强，这可以通过ER α 沉默来恢复（图5A）。ER α 的敲低也显著消除了由METTL14敲低引起的迁移和侵袭能力增强（图5B）。综上所述，ER α 的功能障碍可能是METTL14介导的EC细胞增殖或迁移特征的原因。

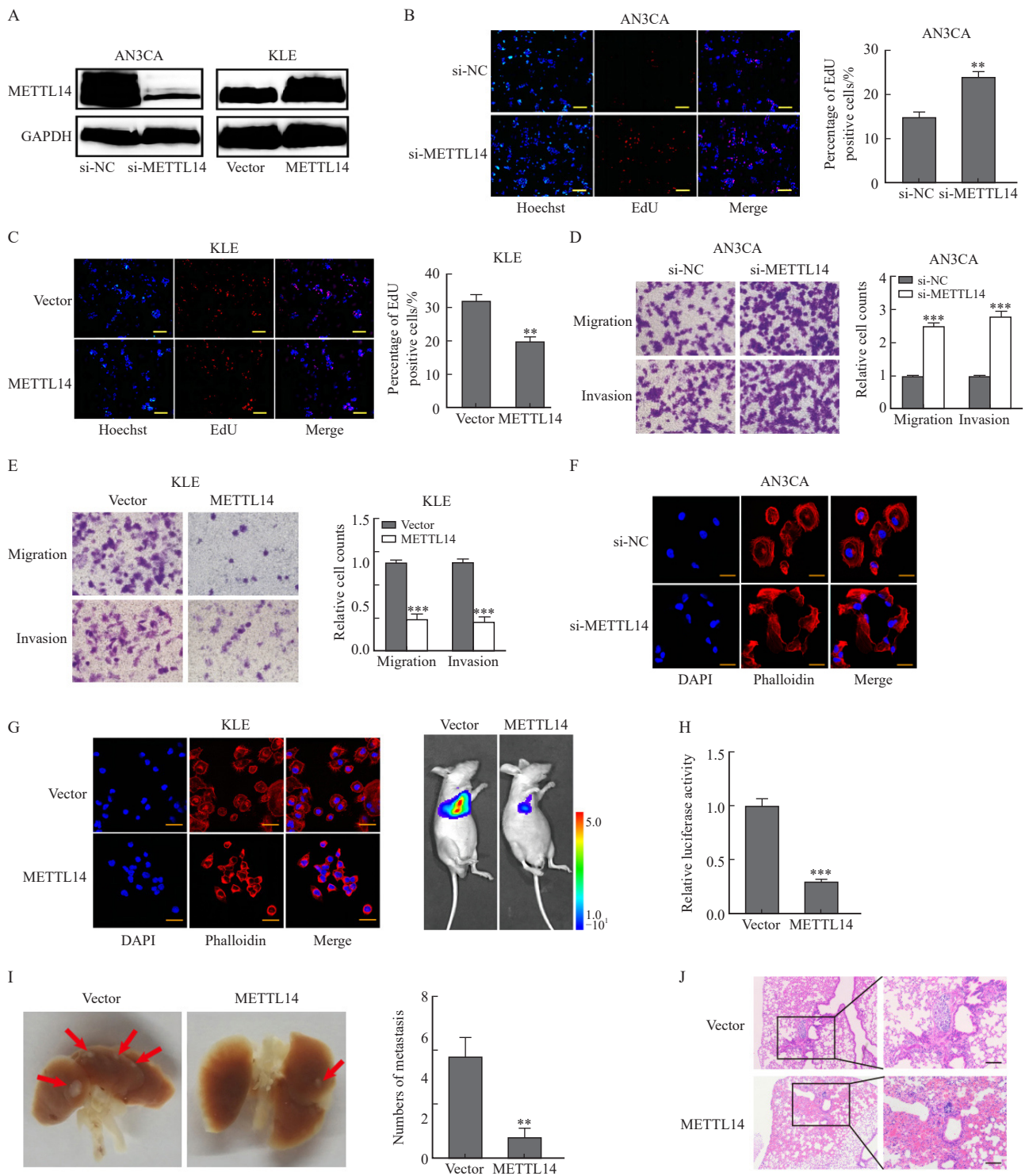


图2 METTL14抑制EC侵袭和转移

Fig. 2 METTL14 inhibited EC invasion and metastasis

A: Western blot validation of METTL14 silencing and overexpression in AN3CA and KLE cells. B, C: EdU assay was used to determine the effects of METTL14 silencing and overexpression on the proliferation of AN3CA and KLE cells, respectively. D, E: Transwell analysis of the effects of METTL14 silencing and overexpression on the migration and invasion of AN3CA and KLE cells, respectively. F, G: Immunofluorescence imaging detected the cytoskeletal changes of AN3CA and KLE by METTL14 silencing and overexpression, respectively. Phalloidin (red) was used for cytoskeleton staining and DAPI (blue) was used to label nuclei (scale bar=30 μ m). H: Representative *in vivo* images of mice were taken by quantifying luciferase activity in lung regions. I: Metastatic tumor foci in the lungs were photographed and quantified. J: The presence of metastatic tumor lesions was confirmed by H-E staining (scale bar=100 μ m). **: $P < 0.01$, compared with Vector group or si-NC group; ***: $P < 0.001$, compared with Vector group or si-NC group.

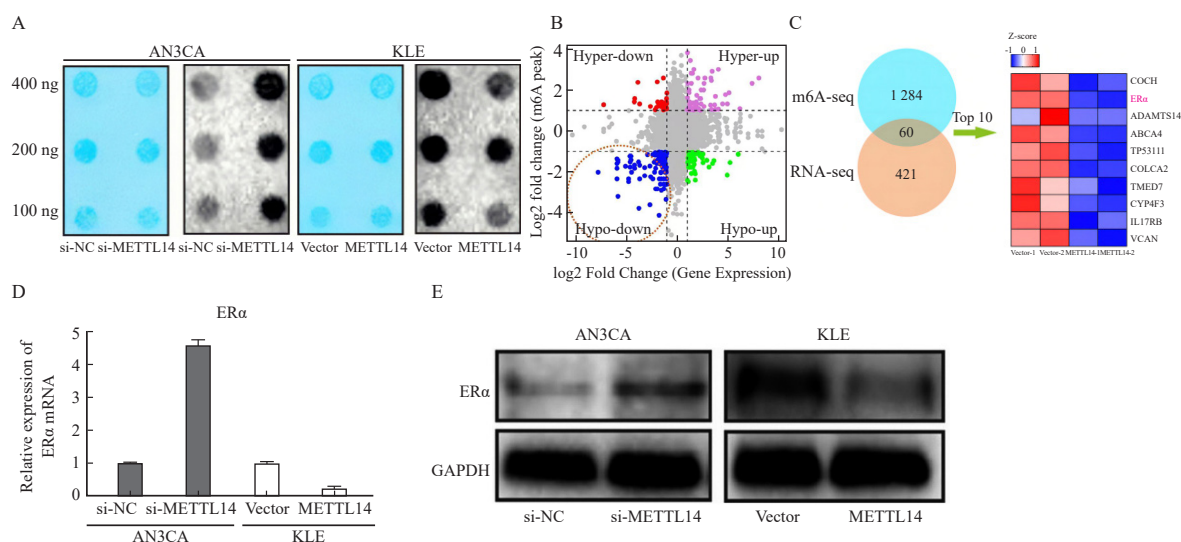


图3 ERα被确定为METTL14的候选目标

Fig. 3 ERα identified as a candidate target for METTL14

A: Overall m6A levels of RNA extracted from METTL14 knockdown or overexpressing EC cells were measured by m6A dot blot analysis. Methylene blue staining (left) was used to detect input RNA, and the intensity of dot immunoblotting (right) represents the level of m6A modification. B: Star chart showing the distribution of genes with differential (high or low) m6A peaks (Y axis; fold change >1.5 or <2/3, $P < 0.05$) and differential (up or down) expression (X axis; fold change). Blue dots highlighted with circles represent down-regulated transcripts with reduced m6A abundance upon METTL14 overexpression, which were selected for the following studies. C: The results of MeRIP-seq (blue circles) and RNA-seq (brown circles) were combined using a Venn diagram. The overlap contains 60 transcripts affected by METTL14 for m6A content and expression. The top 10 differentially expressed genes shown in the heatmap (red for up-regulation, blue for down-regulation). D: RNA levels of ERα were detected in METTL14 silenced or overexpressed cells using RTFQ-PCR. E: The effects of METTL14 silencing and overexpression on the protein levels of ERα in AN3CA and KLE cells were detected by Western blot, respectively.

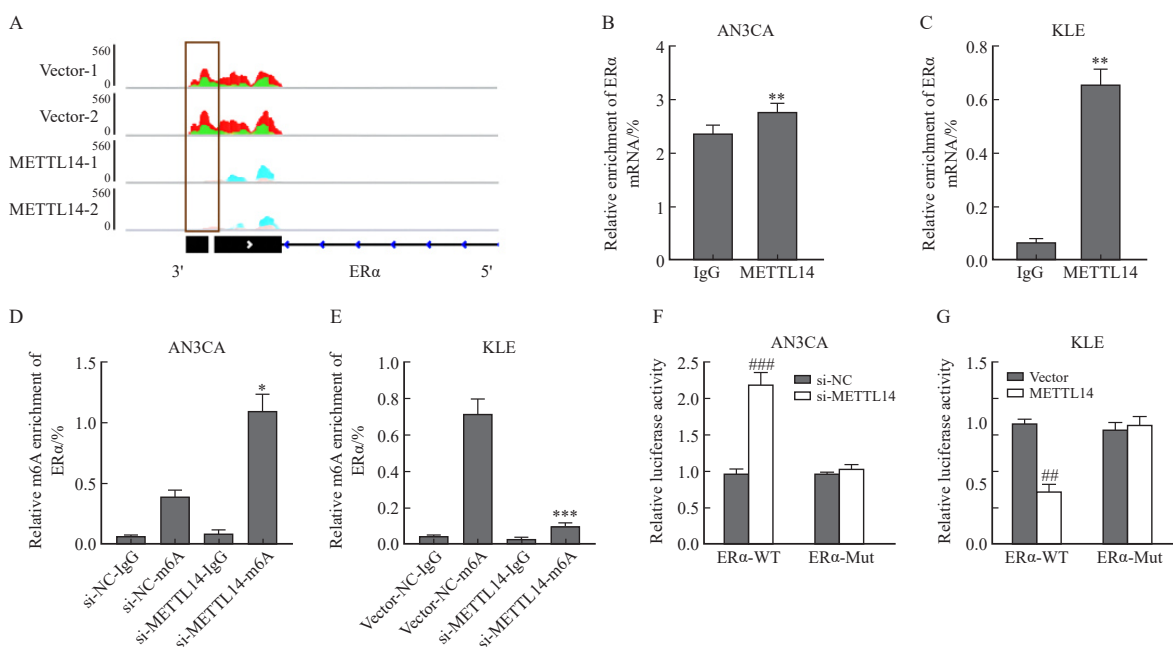


图4 METTL14通过调节m6A修饰消除ERα的稳定性

Fig. 4 METTL14 destabilized ERα by regulating m6A modification

A: IGV plotted m6A abundance on ERα mRNA in negative control or METTL14-overexpressing KLE cells. Green and pink represent the m6A signal of the input sample, while red and blue represent the signal of the IP sample. Black blocks indicate sites where m6A levels differ between the two groups, with the most significant locations highlighted with grey panes. B, C: Relative enrichment of ERα mRNA associated with METTL14 protein was identified by RIP assay using anti-IgG and anti-METTL14 antibodies. The IgG group was a negative control to exclude nonspecific binding. The Y-axis represents the percentage of input for each IP sample. **: $P < 0.01$, compared with the IgG group. D, E: Detection of m6A modification of ERα by MeRIP-RTFQ-PCR analysis using anti-IgG and anti-m6A antibodies. *: $P < 0.05$, compared with si-NC-m6A group or Vector-m6A group; ***: $P < 0.001$, compared with si-NC-m6A group or Vector-m6A group. F, G: Relative luciferase activity of AN3CA and KLE cells transfected with ERα-wild-type or mutant constructs. #: $P < 0.01$, compared with Vector group or si-NC group; ###: $P < 0.001$, compared with Vector group or si-NC group.

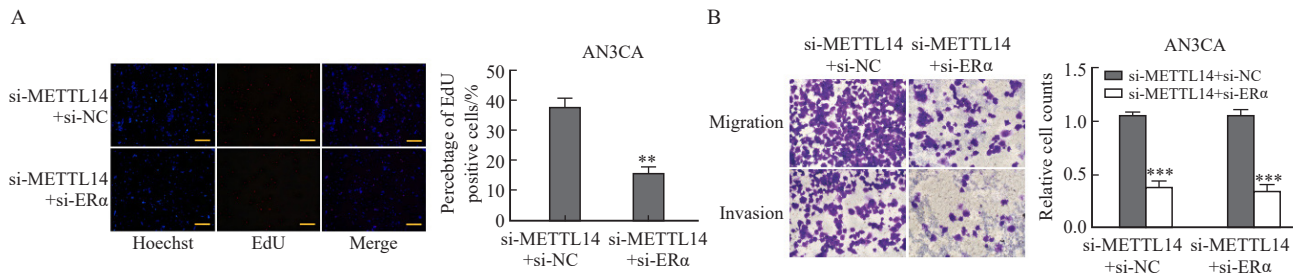


图5 ER α 敲低逆转METTL14抑制EC细胞增殖或迁移的作用

Fig. 5 ER α knockdown reversed the effect of METTL14 on EC cell proliferation or migration

A: EdU assayed the effect of METTL14 silencing and ER α silencing on the proliferation of AN3CA cells. B: Transwell analysis of the effects of METTL14 silencing and ER α silencing on the migration and invasion of AN3CA cells. **: $P < 0.01$, compared with si-METTL14+si-NC group; ***: $P < 0.001$, compared with si-METTL14+si-NC group.

3 讨 论

有证据^[7]表明, m6A修饰的异常与包括EC在内的多种疾病密切相关。先前研究^[8]发现, m6A甲基转移酶METTL14以m6A依赖性方式抑制肝细胞癌的进展。此外, 已陆续报道METTL3、WTAP和KIAA1429通过多种机制影响EC细胞生长和侵袭^[9-10]。然而, METTL14是否参与EC的演变仍不清楚。因此, 本研究旨在探讨METTL14的作用, 并发现EC中METTL14表达降低, 并且METTL14表达与肿瘤侵袭及淋巴结转移相关。此外, METTL14表达降低与EC患者的FIGO分期较差、浸入深度、淋巴管血管侵犯、淋巴结转移及肿瘤转移相关。本研究在功能上证实METTL14在体外和体内抑制EC细胞生长和侵袭能力。从机制上讲, METTL14通过m6A介导ER α 参与调节EC的进展。ER α 随后被证实是EC的致癌驱动因子。总之, METTL14/ER α 轴的失调促进了EC的进展。

METTL14是一种核酸加氧酶, 可催化m6A标记的RNA去甲基化^[11]。有研究^[12]显示, METTL14缺乏通过控制生殖细胞中长3'-UTR mRNA的剪接导致生育能力受损。在病毒感染领域的研究^[13]表明, METTL14通过m6A指导的细胞代谢和先天免疫调节参与抗病毒过程。Pang等^[14]在缺血性心脏病中证实了METTL14与自噬之间的联系。此外, METTL14在肿瘤发生中也起着重要作用。METTL14通过维持FOXMI

的表达来增强胶质母细胞瘤的自我更新和肿瘤发生^[15], 它还介导缺氧诱导的乳腺癌干细胞表型^[16]。然而, Yao等^[17]通过m6A依赖性Wnt信号失活揭示了METTL14的肿瘤抑制功能。此外, METTL14通过消除非小细胞肺癌中YAP的表达和活性来抑制肿瘤生长和转移^[18]。本研究结果阐明了METTL14通过损害ER α 的表达来抑制EC, 提示METTL14对致癌作用的影响取决于特定的组织环境和不同的下游分子。

ER是配体诱导转录因子核受体超家族的一部分, 主要由ER α 和ER β 组成^[19]。ER的功能与人类子宫内膜的发育和功能维持密切相关^[19]。因此, 雌激素的原位代谢在EC的发生、发展中发挥重要作用。EC是激素依赖性的, ER α 在子宫内膜中明显表达, 导致细胞增殖和分化。大量研究^[20-21]报告了ER α 参与EC的证据。本研究系统阐明ER α 在基于m6A调节中的癌症相关行为, 证实METTL14通过调节m6A修饰消除ER α 的稳定性, 支持m6A调节的METTL14/ER α 轴在EC进展有重要作用, 但本研究仍存在一定缺陷, 如ER α 介导的下游通路调节的潜在机制尚未完全阐明。

综上所述, 本研究揭示了METTL14在EC发展中的肿瘤抑制特性。METTL14的下调激活了m6A机制, 该机制有助于ER α 的表观遗传激活。本研究结果突出了m6A去甲基化酶的价值, 并丰富了对癌症研究中m6A表观转录组修饰的理解, 进一步为开发有效的EC预测因子和治疗策略提供了新的见解。

利益冲突声明: 所有作者均声明不存在利益

冲突。

[参 考 文 献]

- [1] URICK M E, BELL D W. Clinical actionability of molecular targets in endometrial cancer [J] . Nat Rev Cancer, 2019, 19(9): 510–521.
- [2] DE BOER S M, POWELL M E, MILESHKIN L, et al. Adjuvant chemoradiotherapy versus radiotherapy alone in women with high-risk endometrial cancer (PORTEC-3): patterns of recurrence and post-hoc survival analysis of a randomised phase 3 trial [J] . Lancet Oncol, 2019, 20(9): 1273–1285.
- [3] LI M, ZHA X, WANG S J. The role of N6-methyladenosine mRNA in the tumor microenvironment [J] . Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2021, 1875(2): 188522.
- [4] LI J M, LIANG L, YANG Y Z, et al. N6-methyladenosine as a biological and clinical determinant in colorectal cancer: progression and future direction [J] . Theranostics, 2021, 11(6): 2581–2593.
- [5] YANG X, ZHANG S, HE C Y, et al. METTL14 suppresses proliferation and metastasis of colorectal cancer by down-regulating oncogenic long non-coding RNA XIST [J] . Mol Cancer, 2020, 19(1): 46.
- [6] SHEN S, YAN J Y, ZHANG Y Z, et al. N6-methyladenosine (m6A)-mediated messenger RNA signatures and the tumor immune microenvironment can predict the prognosis of hepatocellular carcinoma [J] . Ann Transl Med, 2021, 9(1): 59.
- [7] 韩娟娟, 张新安, 艾福录. m6A RNA甲基化修饰异常在肿瘤中的作用 [J] . 中国生物化学与分子生物学报, 2020, 36(4): 383–391.
- HAN J J, ZHANG X N, AI F L. The role of m6A RNA methylated abnormality in tumor [J] . Chin J Biochem Mol Biol, 2020, 36(4): 383–391.
- [8] MA J Z, YANG F, ZHOU C C, et al. METTL14 suppresses the metastatic potential of hepatocellular carcinoma by modulating N6-methyladenosine-dependent primary microRNA processing [J] . Hepatology, 2017, 65(2): 529–543.
- [9] LI Q, WANG C Y, DONG W, et al. WTAP facilitates progression of endometrial cancer via CAV-1/NF- κ B axis [J] . Cell Biol Int, 2021, 45(6): 1269–1277.
- [10] MA J, YANG D, MA X X. Immune infiltration-related N6-methyladenosine RNA methylation regulators influence the malignancy and prognosis of endometrial cancer [J] . Aging, 2021, 13(12): 16287–16315.
- [11] WENG H Y, HUANG H L, WU H Z, et al. METTL14 inhibits hematopoietic stem/progenitor differentiation and promotes leukemogenesis via mRNA m6A modification [J] . Cell Stem Cell, 2018, 22(2): 191–205.e9.
- [12] WEI J C, HARADA B T, LU D, et al. HRD1-mediated METTL14 degradation regulates m6A mRNA modification to suppress ER proteotoxic liver disease [J] . Mol Cell, 2021, 81(24): 5052–5065.e6.
- [13] QIN F, CAI B S, ZHAO J, et al. Methyltransferase-like protein 14 attenuates mitochondrial antiviral signaling protein expression to negatively regulate antiviral immunity via N6-methyladenosine modification [J] . Adv Sci (Weinh), 2021, 8(15): e2100606.
- [14] PANG P, QU Z Z, YU S T, et al. Mettl14 attenuates cardiac ischemia/reperfusion injury by regulating Wnt1/ β -catenin signaling pathway [J] . Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 762853.
- [15] GALARDI S, MICHENZI A, CIAFRÈ S A. Insights into the regulatory role of m6A epitranscriptome in glioblastoma [J] . Int J Mol Sci, 2020, 21(8): E2816.
- [16] SUN T, WU Z K, WANG X F, et al. LNC942 promoting METTL14-mediated m6A methylation in breast cancer cell proliferation and progression [J] . Oncogene, 2020, 39(31): 5358–5372.
- [17] YAO Q, HE L Z, GAO X C, et al. The m6A methyltransferase METTL14-mediated N6-methyladenosine modification of PTEN mRNA inhibits tumor growth and metastasis in stomach adenocarcinoma [J] . Front Oncol, 2021, 11: 699749.
- [18] CHENG Y, WANG M Q, ZHOU J L, et al. The important role of N6-methyladenosine RNA modification in non-small cell lung cancer [J] . Genes (Basel), 2021, 12(3): 440.
- [19] KASOHA M, DERNEKTSI C, SEIBOLD A, et al. Crosstalk of estrogen receptors and Wnt/ β -catenin signaling in endometrial cancer [J] . J Cancer Res Clin Oncol, 2020, 146(2): 315–327.
- [20] JING X X, PENG J, DOU Y, et al. Macrophage ER α promoted invasion of endometrial cancer cell by mTOR/KIF5B-mediated epithelial to mesenchymal transition [J] . Immunol Cell Biol, 2019, 97(6): 563–576.
- [21] CHEN Z, YANG H J, LIN Q, et al. Estrogen-ER α signaling and DNA hypomethylation co-regulate expression of stem cell protein PIWIL1 in ER α -positive endometrial cancer cells [J] . Cell Commun Signal, 2020, 18(1): 84.

(收稿日期: 2022-05-11 修回日期: 2022-08-06)