

RNA m⁶A 甲基转移酶 WTAP 在胶质母细胞瘤上皮-间质转化中的作用及其机制

刘聪为^{1,2,3}, 吕文英^{2,3}, 王淑为⁴, 谢胜强³, 程岗³, 张剑宁^{1,2,3*}

¹安徽医科大学海军临床学院/第五临床医学院, 安徽合肥 230032; ²解放军总医院第六医学中心神经外科, 北京 100048; ³解放军总医院第一医学中心神经外科医学部, 北京 100853; ⁴解放军总医院第一医学中心耳鼻咽喉头颈外科医学部, 北京 100853

[中图分类号] R739.41 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.0359.2025.0522

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 刘聪为, 吕文英, 王淑为, 等. RNA m⁶A 甲基转移酶 WTAP 在胶质母细胞瘤上皮-间质转化中的作用及其机制[J]. 解放军医学杂志, 2025, 50(11): 1433-1443.

[收稿日期] 2024-03-20 [录用日期] 2024-08-27 [上线日期] 2025-05-22

[摘要] **目的** 探讨 RNA m⁶A 甲基转移酶 Wilms 瘤 1-关联蛋白(WTAP)在胶质母细胞瘤(GBM)细胞上皮-间质转化(EMT)中的作用机制及与转录因子 JUNB 的联系。**方法** (1)基于人类癌症基因组图谱计划(TCGA)和 GTEx 数据库,分析 GBM 与正常脑组织中转化生长因子- β (TGF- β)、WTAP、JUNB 表达水平,及其对 GBM 诊断和预后的影响。通过中国脑胶质瘤基因组图谱计划(CGGA)数据库分析 TGF- β 、WTAP、JUNB 与不同 WHO 分级胶质瘤的联系。采用 Spearman 相关性分析 TGF- β 与 m⁶A 甲基转移酶的相关性。(2)采用 TGF- β_1 诱导人脑星形胶质母细胞瘤 U87-MG 细胞建立 EMT 模型,应用 qRT-PCR 和 Western blotting 检测 WTAP、JUNB、基质金属蛋白酶 2(MMP2)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)表达水平,采用细胞划痕实验和 Transwell 细胞迁移实验评估细胞迁移能力。m⁶A RNA 甲基化定量检测试剂盒(比色法)检测细胞 RNA m⁶A 甲基化修饰水平。构建 WTAP 低表达细胞株,观察 WTAP 敲低对细胞迁移能力及 JUNB 表达的影响。(3)通过 STRING 数据库和 GeneMANIA 构建蛋白互作网络(PPI),并进行基因本体论(GO)功能和 KEGG 通路富集分析,探究 TGF- β /WTAP/JUNB 可能参与的生物学过程、分子功能、细胞组分及信号通路。基因探针富集分析(GSEA)探究 JUNB 可能参与的下游信号通路。**结果** (1)TGF- β 、WTAP、JUNB 基因的表达水平在 GBM 中均明显增高($P < 0.001$),其表达水平与胶质瘤的 WHO 分级呈正相关($P < 0.001$);3 个基因均呈高表达的胶质瘤患者的总生存期和无病生存期均更短($P < 0.001$)。Spearman 相关性分析显示,TGF- β 在 GBM 中的表达与 WTAP 呈正相关($r = 0.175$, $P = 0.023$),与其他 m⁶A 甲基转移酶均无明显相关性($P > 0.05$)。(2)TGF- β_1 处理后 U87-MG 细胞总 RNA m⁶A 甲基化修饰水平明显升高($P < 0.001$)。细胞划痕实验和 Transwell 细胞迁移实验结果显示,TGF- β_1 处理后 U87-MG 细胞迁移能力明显增高($P < 0.01$);敲低 WTAP 基因后,U87-MG 细胞迁移能力明显下降($P < 0.01$)。qRT-PCR 和 Western blotting 检测结果显示,经 TGF- β_1 诱导 48 h 后,U87-MG 细胞中 WTAP、N-cadherin、MMP2、JUNB mRNA 和蛋白表达水平均明显升高($P < 0.001$);敲低 WTAP 后 JUNB mRNA 和蛋白表达均明显下降($P < 0.001$)。(3)构建 TGF- β /WTAP/JUNB 相关 PPI,该网络主要参与 mRNA 修饰和 EMT;GSEA 富集分析结果显示,JUNB 参与的信号通路均与胶质瘤恶性进展密切相关。**结论** TGF- β 、WTAP、JUNB 均与 GBM 恶性进展和患者预后变差相关。TGF- β 可能通过促进 WTAP 的表达,提高 RNA m⁶A 修饰水平,并使转录因子 JUNB 表达上调,促进 GBM 的 EMT 和恶性进展。

[关键词] 胶质母细胞瘤;上皮-间质转化;RNA m⁶A 甲基化;Wilms 瘤 1-关联蛋白

Role and mechanism of RNA m⁶A methyltransferase WTAP in epithelial-mesenchymal transition of glioblastoma cells

Liu Cong-Wei^{1,2,3}, Lyu Wen-Ying^{2,3}, Wang Shu-Wei⁴, Xie Sheng-Qiang³, Cheng-Gang³, Zhang Jian-Ning^{1,2,3*}

¹Naval Clinical College/the Fifth School of Clinical Medicine, Anhui Medical University, Hefei, Anhui 230032, China

[基金项目] 国家自然科学基金(81572899)

[作者简介] 刘聪为,医学硕士,主要从事脑胶质瘤临床与基础研究

[通信作者] 张剑宁, E-mail: jianningzhang2022@163.com

²Department of Neurosurgery, the Sixth Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100048, China

³Department of Neurosurgery, ⁴Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, the First Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

*Corresponding author, E-mail: jianningzhang2022@163.com

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81572899)

[Abstract] **Objective** To explore the role and mechanism of RNA m⁶A methyltransferase Wilms' tumor 1-associated protein (WTAP) in epithelial-mesenchymal transition (EMT) of glioblastoma cells and its association with transcription factor JUNB. **Methods** (1) Based on the Cancer Genome Atlas (TCGA) and Genotype-Tissue Expression (GTEx) databases, the expression levels of transforming growth factor β (TGF- β), WTAP, and JUNB in glioblastoma multiforme (GBM) and normal brain tissues were analyzed, as well as their diagnostic and prognostic values for GBM. The correlation of TGF- β , WTAP, and JUNB with gliomas of different WHO grades was analyzed using the Chinese Glioma Genome Atlas (CGGA) database. Spearman correlation analysis was performed to assess the correlation between TGF- β and m⁶A methyltransferases. (2) An EMT model was established in human astrocytoma U87-MG cells through TGF- β_1 induction. qRT-PCR and Western blotting were employed to detect the expression levels of WTAP, JUNB, matrix metalloproteinase 2 (MMP2), and N-cadherin. The migration capacity of U87-MG cells was evaluated by wound-healing and Transwell assays. An m⁶A RNA methylation quantification kit (colorimetric) was used to detect RNA m⁶A methylation modification levels. A stable cell line with low expression of WTAP was constructed to investigate the effects of WTAP knockdown on the migration ability of U87-MG cells, as well as the expression of JUNB. (3) A protein-protein interaction network was constructed using STRING database and GeneMANIA database, followed by gene ontology (GO) and KEGG pathway enrichment analyses to explore the biological processes, molecular functions, cellular components, and signaling pathways potentially involved in TGF- β /WTAP/JUNB. Gene set enrichment analysis (GSEA) was performed on JUNB-related genes to investigate their potential downstream signaling pathways. **Results** (1) The expression levels of TGF- β , WTAP, and JUNB were significantly higher in GBM ($P < 0.001$), positively correlated with WHO grades of glioma ($P < 0.001$). Glioma patients with high expression of all three genes had shorter overall and disease-free survival ($P < 0.001$). Spearman analysis showed that the expression of TGF- β in GBM was positively correlated with WTAP ($r = 0.175, P = 0.023$), but no significant correlation with other m⁶A methyltransferases ($P > 0.05$). (2) After TGF- β_1 treatment, the level of m⁶A methylation modification of total RNA in U87-MG cells significantly increased ($P < 0.001$). Wound-healing assay and Transwell assay results showed that the migration ability of U87-MG cells was significantly increased after TGF- β_1 treatment ($P < 0.01$), while WTAP knockdown significantly reduced the migration ability of U87-MG cells ($P < 0.01$). qRT-PCR and Western blotting results showed that the mRNA and protein expression levels of WTAP, N-Cadherin, MMP2, and JUNB in U87-MG cells were significantly increased after 48 h of TGF- β_1 induction ($P < 0.001$), while WTAP knockdown significantly reduced the mRNA and protein expression of JUNB ($P < 0.001$). (3) The TGF- β /WTAP/JUNB-related protein-protein interaction network was constructed, which was primary involved in mRNA modification and EMT. GSEA results showed that JUNB-related signaling pathways were closely associated with glioma malignant progression. **Conclusions** TGF- β , WTAP, and JUNB are all associated with GBM malignant progression and poor patient prognosis. TGF- β may enhance total RNA m⁶A modification by promoting the expression of m⁶A methyltransferase WTAP, and WTAP subsequently upregulates transcription factor JUNB, thereby promoting EMT and malignant progression of GBM.

[Key words] glioblastoma; epithelial-mesenchymal transition; RNA m⁶A methylation; Wilms' tumor 1-associated protein

按照世界卫生组织(WHO)分级,胶质瘤可分为 I—IV级;其中胶质母细胞瘤(glioblastoma, GBM)为 WHO IV级胶质瘤,是侵袭性较强的中枢神经系统恶性肿瘤^[1]。由于GBM的高度异质性及复杂的肿瘤微环境,其预后较差,其分子调控机制亟待深入探索。在表观遗传学中, N⁶-甲基腺嘌呤(m⁶A)甲基化修饰是真核生物 mRNA 修饰类型中较为丰富的类型^[2],可调控 mRNA 的剪接、翻译、稳定性、核输出及降解等^[3-5]。而 RNA m⁶A 甲基化修饰由甲基转移酶、去甲基化酶和 m⁶A 结合蛋白共同形成动态调控^[6]。

上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)被认为是癌细胞侵袭和转移的重要步骤;其间

上皮细胞间的黏附缺失,失去极性而转化为迁移性和侵袭性强的间质细胞^[7],进而促进癌细胞的运动性、侵袭性和干细胞样特性的形成。近年来的研究显示,脑胶质瘤也可发生 EMT 或 EMT 样改变^[8-10],其发生的确切机制尚不清晰,仍有待进一步探索。转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)被认为是癌细胞 EMT 过程中的主要诱导因子^[11]。本研究基于生物信息学分析和细胞实验,探讨 GBM 中 m⁶A 甲基转移酶 Wilms 瘤 1-关联蛋白(Wilms' tumor 1-associated protein, WTAP)在 TGF- β 诱导的 EMT 进程中的作用和相关转录因子 JUNB 的表达及相关下游信号通路,旨在为 GBM 靶向药物的开发提供新思路。

1 材料与方法

1.1 数据收集 本研究纳入的GBM及正常脑组织数据来源于人类癌症基因组图谱计划(TCGA)和基因型-组织表达(GTEX)数据库(<https://gtexportal.org/home/>),包括TCGA GBM肿瘤样本166例,TCGA GBM癌旁组织样本5例,GTEX正常脑组织样本1152例。RNA-seq数据是由加州大学圣克鲁兹分校(UCSC)XENA数据库(<https://xenabrowser.net/datapages/>)经Toil流程^[12]统一处理的TPM格式的RNA-seq数据。从中国脑胶质瘤基因组图谱计划(CGGA)^[13]数据库获取胶质瘤患者的临床数据集mRNAseq_325^[13-15],分析目的基因在WHO II—IV级胶质瘤中的表达差异。

1.2 生物信息学分析 将TCGA、GTEX数据库中获取的RNA-seq数据进行 \log_2 转化后,采用R软件包ggplot2(3.3.3版本)进行统计分析及可视化;采用Mann-Whitney *U*检验比较GBM与正常脑组织中TGF- β 、WTAP、转录因子JUNB及其他甲基转移酶的基因表达水平^[16]。将CGGA数据库中获取的胶质瘤患者分为WHO II—IV级,并采用单因素方差分析(one way ANOVA)3个分级之间TGF- β 、WTAP和JUNB基因表达差异。R软件包pROC(1.17.0.1版本)用于分析GBM测序数据,ggplot2包(3.3.3版本)进行可视化,得到目的基因在GBM中的ROC曲线。基因表达数据交互分析(GEPIA)数据库^[17]用于验证TGF- β 、WTAP和JUNB基因在GBM和正常脑组织中的表达情况。利用阿拉巴马伯明翰大学癌症(UALCAN)数据库(<http://ualcan.path.uab.edu/analysis-prot.html>)中CPTAC数据集和HPA(Human Protein Atlas, <https://www.proteinatlas.org/>)数据库分析GBM和正常脑组织中相关蛋白的表达水平。以目的基因的中位表达值为界限,将TCGA中的胶质瘤患者分为高表达组和低表达组,采用Kaplan-Meier生存曲线分析两组胶质瘤患者的总生存期(overall survival, OS)、无病生存期(disease free survival, DFS)差异。采用Spearman相关性分析GBM中TGF- β 与WTAP、JUNB及其他甲基转移酶的相关性,并利用TIMER2.0数据库^[18](<http://timer.cistrome.org/>)验证。STRING^[19](<https://string-db.org/>)和GeneMANIA^[20](<https://genemania.org/>)数据库用于构建蛋白互作网络(PPI),GeneMANIA进一步探索与TGF- β 、WTAP、JUNB相关的主要基因功能。基于TCGA中RNA测序数据,利用R软件包DESeq2(1.26.0版本)^[21]进行单基因差异分析,并绘制火山图;借助STRING数据库构建TGF- β /WTAP/JUNB的PPI。基于STRING数据库构建的PPI进行基因本体论(GO)功能和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。此外,

clusterProfiler包(3.14.3版本)^[22]用于基因集富集分析(gene set enrichment analysis, GSEA)。

1.3 细胞实验

1.3.1 细胞培养 人脑星形GBM细胞系U87-MG购自上海钰博生物公司。使用含有10%胎牛血清(北京达科为生物技术有限公司)、1%青霉素-链霉素双抗(美国赛默飞世尔科技公司)的高糖DMEM培养基(Gibco),于T75的细胞培养瓶(美国康宁公司)中培养U87-MG细胞,将培养瓶置于37℃、5%CO₂的细胞培养箱中。2~3 d进行一次换液,3~6 d进行一次传代,传代比例为1:3~1:5。及时冻存部分细胞。

1.3.2 TGF- β_1 诱导的GBM细胞EMT模型构建 TGF- β_1 购自美国PeproTech公司。根据前期研究结果,选取10 ng/ml TGF- β_1 诱导U87-MG细胞发生EMT^[23]。为建立U87-MG细胞TGF- β_1 诱导模型,将U87-MG细胞接种于T75细胞培养瓶中,以完全培养基培养。过夜待细胞贴壁后,更换为无血清基础培养基DMEM培养细胞12 h,再用含10 ng/ml TGF- β_1 的无血清培养基继续诱导细胞48 h,在倒置显微镜下观察细胞形态与对照组是否有差异,利用qRT-PCR和Western blotting检测间质标志物N-钙黏蛋白(N-cadherin)和基质金属蛋白酶2(MMP2)的表达情况,并收集细胞进行后续实验。使用无血清培养基诱导,以免受细胞增殖的影响。诱导前饥饿细胞12 h,可使细胞膜表面受体增多,更易诱导成功。

1.3.3 WTAP基因敲低细胞模型的建立 慢病毒购自上海吉凯基因医学科技股份有限公司。WTAP敲除组包含一个阴性对照慢病毒Scramble shRNA和一个低表达慢病毒WTAP shRNA(靶向序列:ggCAAGTACACAGATCTTAAC)。用完全培养基将U87-MG细胞接种于6孔板中培养,每孔 2×10^5 个细胞,接种体积为2 ml,至细胞融合度为20%~30%,弃上清,按照说明书要求,每孔加入完全培养基860 μ l,HitransG A/P感染增强液(上海吉凯基因医学科技股份有限公司)40 μ l及稀释后的病毒100 μ l,终体积为1 ml。37℃、5%CO₂条件下培养12~16 h,更换为完全培养基继续培养。感染约72 h后,在荧光显微镜下观察感染效率,感染效率80%左右,且细胞生长良好可用于后续实验。

1.3.4 qRT-PCR检测WTAP、N-cadherin、MMP2、JUNB mRNA表达水平 用Trizol裂解液(美国赛默飞世尔科技公司)提取总RNA,准备反转录试剂盒PrimeScriptTM RT Master Mix(日本宝日生物技术有限公司)、OD₂₆₀/OD₂₈₀比值为1.8~2.0的RNA、热循环仪,按产品说明书要求配制RT反应液20 μ l体系,对每个RNA样本进行反转录。使用增强版SuperReal荧光定量预混试剂SuperReal PreMix Plus(SYBR Green,

北京天根生化科技有限公司)、实时荧光定量PCR仪(西安天隆科技有限公司),按照产品说明书进行qRT-PCR。目的基因相对表达量 $=2^{-\Delta\Delta Ct}$, $\Delta\Delta Ct = \text{实验组}(CT_{\text{目的基因}} - CT_{\text{内参基因}}) - \text{对照组}(CT_{\text{目的基因}} - CT_{\text{内参基因}})$ 。目的基因和内参基因的正/反向引物(北京奥科鼎盛生物公司合成)序列: WTAP 正向 5'-GCTTCTGCCTGGAGAGGATTC-3', 反向 5'-TCTGTGTACTTGCCCTCCAA-3'; CDH2(*N-Cadherin*) 正向 5'-CTTGCCAGAAACTCCAGGG-3', 反向 5'-TGTGCCCTCAAATGAAACCG-3'; MMP2 正向 5'-TCATGATCAACTTTGGCCGC-3', 反向 5'-CATACTTCACACGGACCACTTG-3'; JUNB 正向 5'-AACAGCCCTTCTACCACGAC-3', 反向 5'-CAGGCTCGGTTTCAGGAGTT-3'; GAPDH 正向 5'-GTC TCCTCTGACTTCAACAGCG-3', 反向 5'-ACCACCC TGTGCTGTAGCCAA-3'。

1.3.5 Western blotting 检测 WTAP、CDH2、MMP2、JUNB 蛋白表达水平 采用加入磷酸化蛋白酶抑制剂和 50× Cocktail 蛋白酶抑制剂(武汉赛维尔生物科技有限公司)的 RIPA 裂解液从 U87-MG 细胞中提取总蛋白,使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒(合肥白鲨生物科技有限公司),按照说明书要求计算样本中的蛋白浓度。蛋白电泳凝胶试剂盒(BioSci™)购自北京达科为生物技术有限公司,根据说明书配制蛋白凝胶,通过电泳分离蛋白质,并将其转移到 PVDF 膜(美国默克密理博有限公司)上。转膜结束后,室温下使用 TBST 溶液(武汉赛维尔生物科技有限公司)配 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 4 °C 下与 WTAP 一抗(1:1000, 美国 Cell Signaling Technology 公司)、CDH2 一抗(1:1000, 美国 BOSTER 公司)、MMP2 一抗(1:400, 美国 BOSTER 公司)、JUNB 一抗(1:1000, 美国 BOSTER 公司)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)一抗(1:2000, 美国 BOSTER 公司)孵育过夜,以上一抗均为兔抗人单克隆抗体。一抗孵育结束后,回收一抗,加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔二抗(1:5000),室温孵育 1 h,使用 ECL 超敏化学发光底物(合肥白鲨生物科技有限公司),按照产品说明书操作,正面向上放入化学发光成像分析系统(ZF-670 型,上海嘉鹏科技有限公司)内曝光显影,使用 ImageJ 软件对目的蛋白条带进行灰度值分析。

1.3.6 m⁶A RNA 甲基化定量检测 使用 m⁶A RNA 甲基化定量检测试剂盒(比色法)(美国 Epigentek 公司)定量检测总 RNA 中的 m⁶A 甲基化水平。根据产品说明书,使用高效的 RNA 结合试剂将总 RNA 结合在孔板上,用高效捕获抗体及检测抗体来检测 m⁶A,检测信号被增强放大,通过在微孔板酶标仪中读取样本在波长 450 nm 处的吸光度值来进行比色定量, m⁶A 的量与测得的 OD 值成正比。

1.3.7 细胞划痕实验检测 U87-MG 细胞迁移能力

将 U87-MG 细胞接种于 24 孔板中,每孔 5×10^4 个细胞于完全培养基中培养,接种体积 500 μl ,在细胞培养箱(37 °C、5% CO₂)中培养。待细胞生长至 70%~80% 融合时,用 10 μl 枪头在 24 孔板底平行划痕,尽量保持划痕宽度一致。用无菌 PBS 洗去漂浮细胞,继续培养 48 h,倒置显微镜采集图像,观察划痕愈合情况。每组设置 3 个重复。利用 ImageJ 软件计算划痕间隙的面积来表示细胞的迁移能力。

1.3.8 Transwell 细胞迁移功能实验 将 1×10^5 个 U87-MG 细胞悬于 200 μl 无血清 DMEM 培养基后,加至 Transwell 小室(Corning)。在 24 孔板下室中加入 500 μl 含 10% 血清的完全培养基,将 Transwell 小室轻轻移入含有完全培养基的孔中,于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养 12 h。用 PBS 润湿的棉签轻轻擦拭小室内细胞。将小室浸入 0.1% 结晶紫染液(合肥白鲨生物科技有限公司)3~10 min。用 PBS 充分洗涤后晾干,拍照并保存图像,利用 ImageJ 软件进行细胞计数。每组设置 3 个复孔。

1.4 统计学处理 用 R 语言软件(3.6.3 版本)对数据进行统计和生物信息学分析。计量数据均符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验或 Mann-Whitney *U* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验。R 软件包 ggplot2(3.3.3 版本)对数据进行可视化。Spearman 相关系数进行相关性分析。生存分析采用 log-rank 检验比较 Kaplan-Meier 生存曲线之间差异的显著性。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

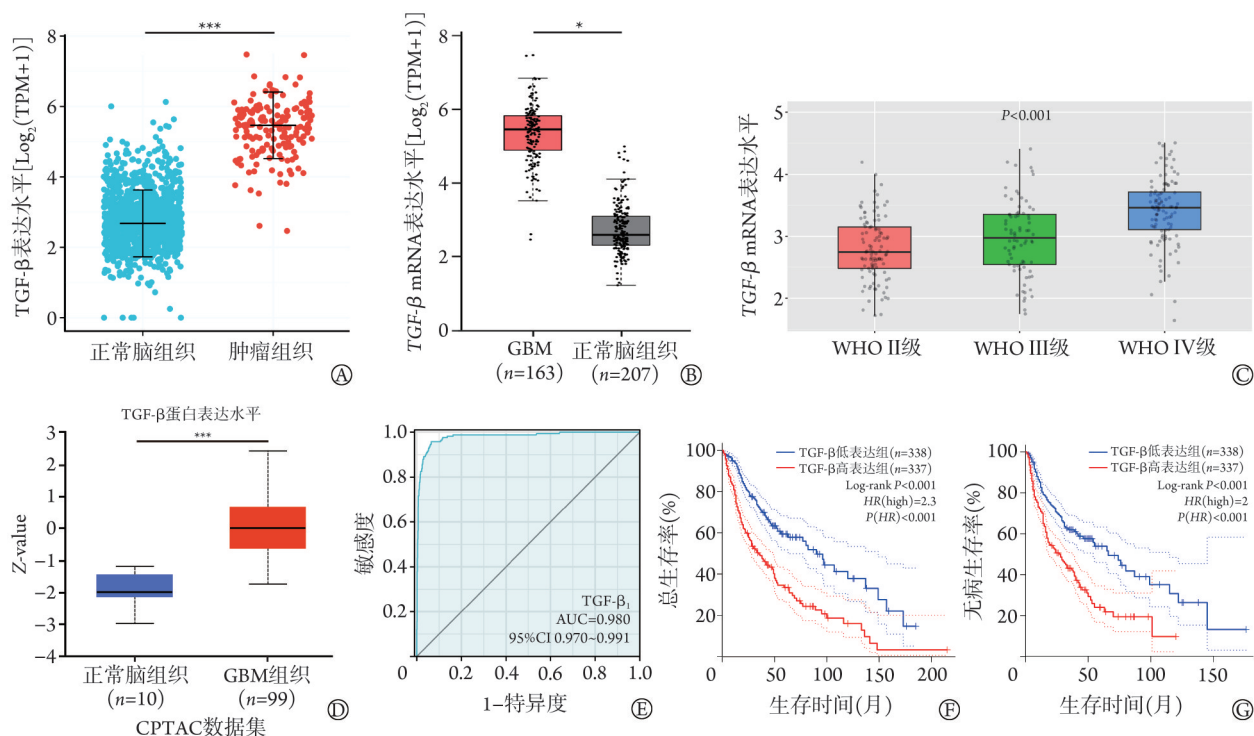
2 结 果

2.1 TGF- β 在 GBM 中的表达变化及对胶质瘤患者预后的影响 RNA-seq 数据分析结果显示,GBM 中 TGF- β 基因表达水平明显高于正常脑组织($P < 0.001$, 图 1A); GEPIA 数据库分析结果也支持这一结论($P < 0.05$, 图 1B)。CGGA 数据分析结果显示, TGF- β 表达水平随胶质瘤 WHO 分级上升而增高($P < 0.001$, 图 1C); GBM 中 TGF- β 蛋白表达水平亦明显高于正常脑组织($P < 0.001$, 图 1D)。TGF- β 预测 GBM 的 ROC 曲线下面积(AUC)为 0.980(95%CI 0.970~0.991, 图 1E)。TGF- β 高表达的胶质瘤患者 OS 和 DFS 明显更短($P < 0.001$, 图 1F-G)。

2.2 WTAP 在 GBM 中的表达变化及对胶质瘤患者预后的影响 RNA-seq 数据分析结果显示, WTAP 基因表达水平在 GBM 中明显上调($P < 0.001$ 、 $P < 0.05$, 图 2A-B); CGGA 数据分析显示, WTAP 表达水平与胶质瘤的 WHO 组织学分级呈正相关($P < 0.001$, 图 2C)。GBM 组织中 WTAP 蛋白表达水平明显高于正常脑组

织($P<0.001$, 图2D); HPA数据库中标本的免疫组化染色结果显示, WTAP在GBM中呈高表达(图2E)。WTAP诊断GBM的ROC曲线下面积(AUC)为0.977

(95%CI 0.964~0.989, 图2F)。生存曲线分析显示, WTAP表达量较高的胶质瘤患者OS和DFS更短($P<0.05$, 图2G-H)。



TGF- β . 转化生长因子- β ; A. GBM和正常脑组织中TGF- β mRNA表达水平(数据来源: TCGA、GTEx数据库); B. GBM和正常脑组织中TGF- β mRNA表达水平(数据来源: GEPIA数据库; 设置参数: $|\text{Log}_2\text{FC}|$ 截断值=1, P 截断值=0.001); C. 不同WHO分级胶质瘤中TGF- β 表达情况(数据来源: CGGA数据库); D. GBM和正常脑组织中TGF- β 蛋白表达水平(UALCAN数据库、CPTAC数据集); E. TGF- β 预测GBM的ROC曲线; F. TGF- β 表达对胶质瘤患者总生存期的影响; G. TGF- β 表达对与胶质瘤患者无病生存期的影响; * $P<0.05$, *** $P<0.001$

图1 TGF- β 在胶质母细胞瘤(GBM)中的表达及对胶质瘤患者预后的影响

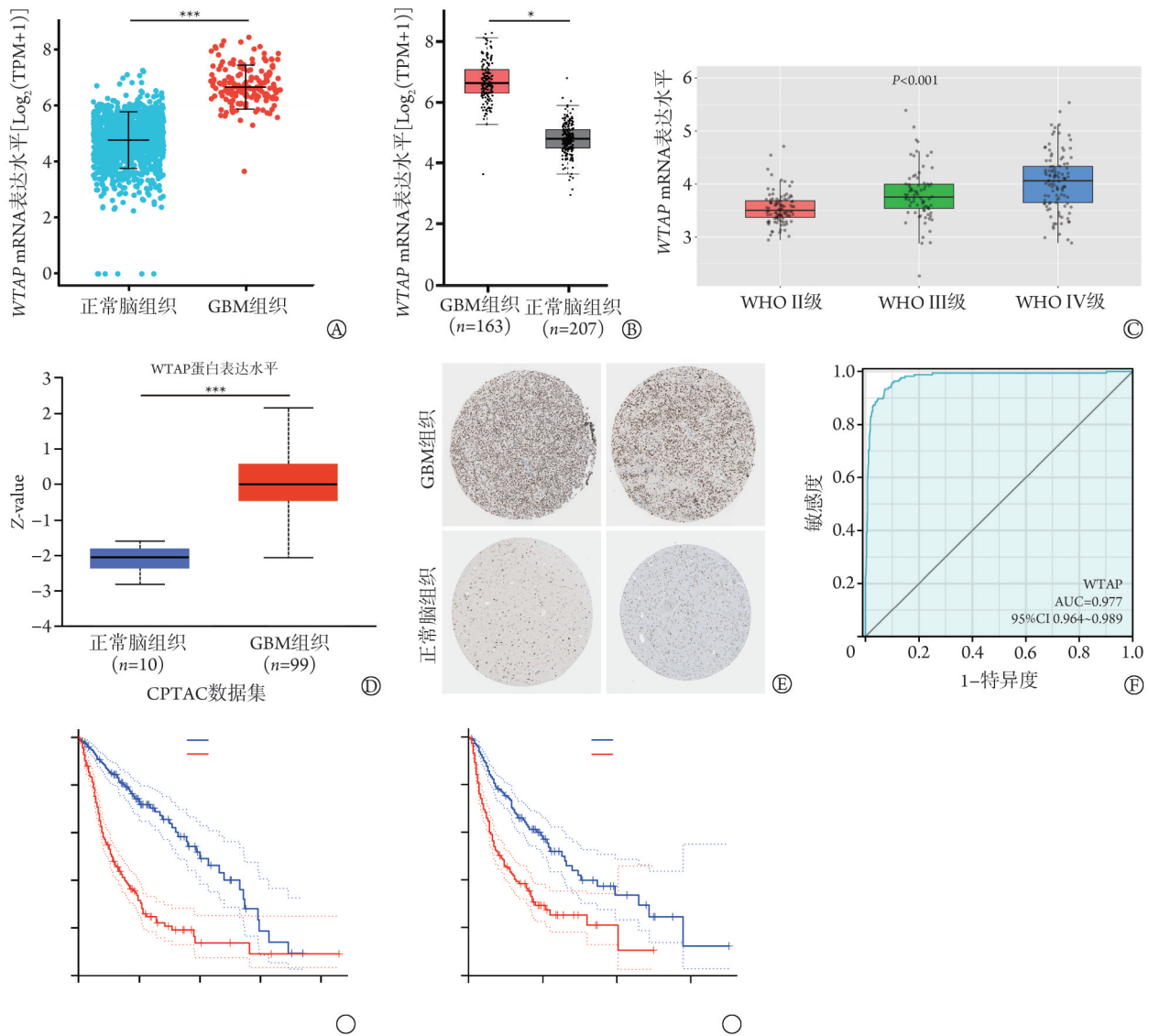
Fig.1 TGF- β expression in glioblastoma (GBM) and its effects on glioma patients

2.3 GBM中TGF- β 与WTAP以外的m⁶A甲基转移酶的相关性分析 在GBM中介导RNA m⁶A修饰的甲基转移酶, 除WTAP外, 还包括METTL3、METTL14、VIRMA/KIAA1429、ZC3H13、RBM15、RBM15B。生物信息学分析结果显示, 除了ZC3H13蛋白在GBM组织中表达降低($P<0.05$)外, METTL3、METTL14、VIRMA/KIAA1429、RBM15、RBM15B在GBM组织中的表达均明显高于正常脑组织($P<0.001$, 附图1, <https://dx.doi.org/10.11855/j.issn.0577-7402.0359.2025.0522FJ>)。对TCGA数据集和TIMER2.0数据库相关数据的Spearman相关性分析结果显示, 在GBM中, TGF- β 与甲基转移酶METTL3、METTL14、VIRMA/KIAA1429、ZC3H13、RBM15、RBM15B均没有明显的相关性($P>0.05$, 附图2, <https://dx.doi.org/10.11855/j.issn.0577-7402.0359.2025.0522FJ>)。

2.4 TGF- β_1 诱导的U87-MG细胞EMT过程中RNA m⁶A甲基化修饰水平及WTAP表达量变化 U87-MG细胞经TGF- β_1 诱导48 h后, 形态更为狭长, 表现为间质状态(图3A)。TGF- β_1 处理组细胞总RNA m⁶A甲

基含量明显高于对照组(0.528 ± 0.003 vs. 0.416 ± 0.005 , $P<0.001$, 图3B)。Spearman相关性分析显示, 在GBM中WTAP与上皮标志物E-钙黏蛋白(E-cadherin, CDH1)的表达呈负相关($r=-0.217$, $P=0.005$, 图3C); TGF- β 在GBM中的表达与WTAP呈正相关($r=0.175$, $P=0.023$, 图3D)。细胞划痕实验和Transwell细胞迁移功能实验结果显示, TGF- β_1 处理后的U87-MG细胞划痕愈合率明显高于对照组($35.100\pm 2.072\%$ vs. $4.030\pm 3.470\%$, $P<0.001$), 迁移细胞数明显多于对照组 433.667 ± 26.407 vs. 292.000 ± 23.431 , $P=0.002$) (图3E-F)。经TGF- β_1 诱导48 h后, U87-MG细胞中WTAP、N-cadherin、MMP2 mRNA表达水平均明显升高 (12.475 ± 0.994 vs. 1.000 ± 0.022 , 71.094 ± 5.948 vs. 1.046 ± 0.402 , 5.445 ± 0.127 vs. 1.003 ± 0.087 , $P<0.001$, 图3G)。Western blotting检测结果显示, 经TGF- β_1 诱导48 h后, U87-MG细胞中WTAP、N-cadherin、MMP2蛋白表达水平明显升高($P<0.001$, 图3H)。

2.5 JUNB在GBM中的表达及对胶质瘤患者预后的影响 基于RNA测序数据及GEPIA在线数据库分



WTAP, Wilms 瘤 1-关联蛋白; A. GBM 和正常脑组织中 WTAP mRNA 表达水平(数据来源: TCGA、GTEX 数据库); B. GBM 和正常脑组织中 WTAP mRNA 表达水平(数据来源: GEPIA 数据库; 设置参数: $|\text{Log}_2\text{FC}|$ 截断值=1, P 截断值=0.001); C. 不同 WHO 分级胶质瘤中 WTAP 表达情况(数据来源: CGGA 数据库); D. GBM 和正常脑组织中 TGF- β 蛋白表达水平(数据来源: UALCAN 数据库、CPTAC 数据集); E. GBM 和正常脑组织中 WTAP 表达水平(免疫组化; 数据来源: HPA 数据库); F. WTAP 诊断 GBM 的 ROC 曲线; G. WTAP 与胶质瘤患者总生存期的关系; H. WTAP 与胶质瘤患者无病生存期的关系; * $P<0.05$, *** $P<0.001$

图 2 WTAP 在胶质母细胞瘤(GBM)中的表达及对胶质瘤患者预后的影响

Fig.2 WTAP expression in glioblastoma (GBM) and its effects on glioma patients

析, GBM 中 *JUNB* 基因表达量明显高于正常脑组织 ($P<0.001$ 、 $P<0.05$, 图 4A—B); 胶质瘤中 *JUNB* 基因表达量随 WHO 分级升高而上调 ($P<0.001$, 图 4C)。GBM 组织中 *JUNB* 蛋白水平表达也明显高于正常脑组织 ($P<0.001$, 图 4D); HPA 数据库中标本免疫组化染色结果也与该结果一致(图 4E)。JUNB 诊断 GBM 的 ROC 曲线 AUC 为 0.799(95%CI 0.767~0.831, 图 4F)。JUNB 表达量较高的胶质瘤患者 OS 和 DFS 更短 ($P<0.05$, 图 4G—H)。

2.6 在 TGF- β_1 诱导的 U87-MG 细胞 EMT 过程中 JUNB 表达变化 基于 TCGA 数据集和 TIMER2.0 数

据库的分析结果显示, GBM 中 *JUNB* mRNA 表达水平与 TGF- β 、WTAP 表达水平均呈正相关 ($P<0.001$) (图 5A—B)。qRT-PCR 检测结果显示, *JUNB* mRNA 表达水平在 TGF- β_1 诱导的 U87-MG 细胞 EMT 中明显升高 (12.758 ± 0.806 vs. 1.004 ± 0.112 , $P<0.001$, 图 5C)。Western blotting 检测结果显示, 与对照组相比, TGF- β_1 诱导的 U87-MG 细胞中 *JUNB* 蛋白表达水平明显升高 ($P<0.001$, 图 5D)。

2.7 WTAP 表达水平与 U87-MG 细胞迁移能力及 JUNB 表达水平的相关性 对 U87-MG 细胞进行慢病毒转染, 建立稳定转染的 WTAP 敲低模型。细胞划

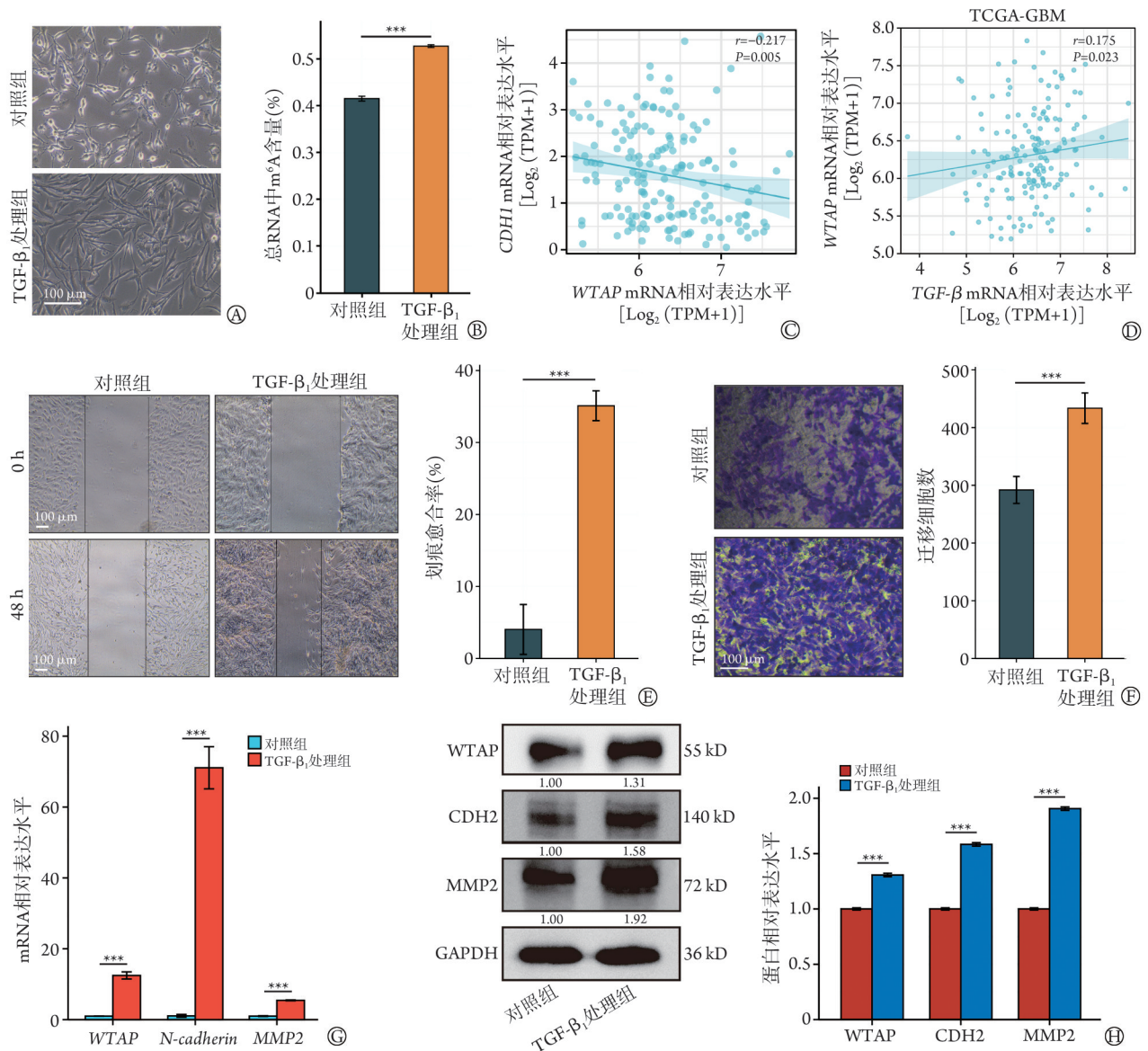


图3 TGF-β₁诱导的U87-MG细胞上皮-间充质转化(EMT)过程中RNA m⁶A甲基化修饰及WTAP表达水平

WTAP, Wilms瘤1-关联蛋白; A. TGF-β₁诱导48 h的U87-MG细胞形态; B. TGF-β₁诱导48 h的U87-MG细胞RNA m⁶A甲基化修饰水平; C. WTAP与CDH1/E-cadherin在GBM中表达的相关性分析; D. GBM中TGF-β与WTAP表达的相关性分析; E. 细胞划痕实验; F. TGF-β₁诱导12 h的U87-MG细胞Transwell迁移功能实验; G. TGF-β₁诱导U87-MG细胞48 h后WTAP、CDH2/N-Cadherin和MMP2 mRNA表达水平(qRT-PCR); H. TGF-β₁诱导U87-MG细胞48 h后WTAP、CDH2/N-cadherin和MMP2蛋白表达水平(Western blotting); ***P<0.001

图3 RNA m⁶A methylation modification and WTAP expression during TGF-β₁-induced EMT of U87-MG cells

痕实验和Transwell细胞迁移功能实验结果显示, 敲低WTAP表达后, U87-MG细胞划痕愈合率明显降低(6.167%±0.262% vs. 57.170%±9.958%, P=0.001), 迁移细胞数明显减少(121.333±18.903 vs. 188.667±8.083, P=0.005, 图6A—B)。qRT-PCR检测结果显示, WTAP敲低后, U87-MG细胞转录因子JUNB mRNA表达明显下调(0.039±0.008 vs. 1.001±0.055, P<0.001, 图6C)。Western blotting检测结果显示, 与对照组相比, WTAP敲低组U87-MG细胞JUNB蛋白表达水平明显降低(P<0.001, 图6D)。

2.8 TGF-β/WTAP/JUNB PPI的构建及基因功能预测 借助STRING数据库构建了TGF-β/WTAP/JUNB的PPI(附图3A, <https://dx.doi.org/10.11855/j.issn.0577-7402.0359.2025.0522FJ>)。该PPI中包括35个节点, 即35个蛋白分子, 以及178条边。基于STRING数据库构建的PPI进行GO功能和KEGG通路富集分析(附表1, <https://dx.doi.org/10.11855/j.issn.0577-7402.0359.2025.0522FJ>)。

GO功能富集分析包括: 生物学过程、分子功能和细胞组分。该PPI参与mRNA甲基化修饰、髓样

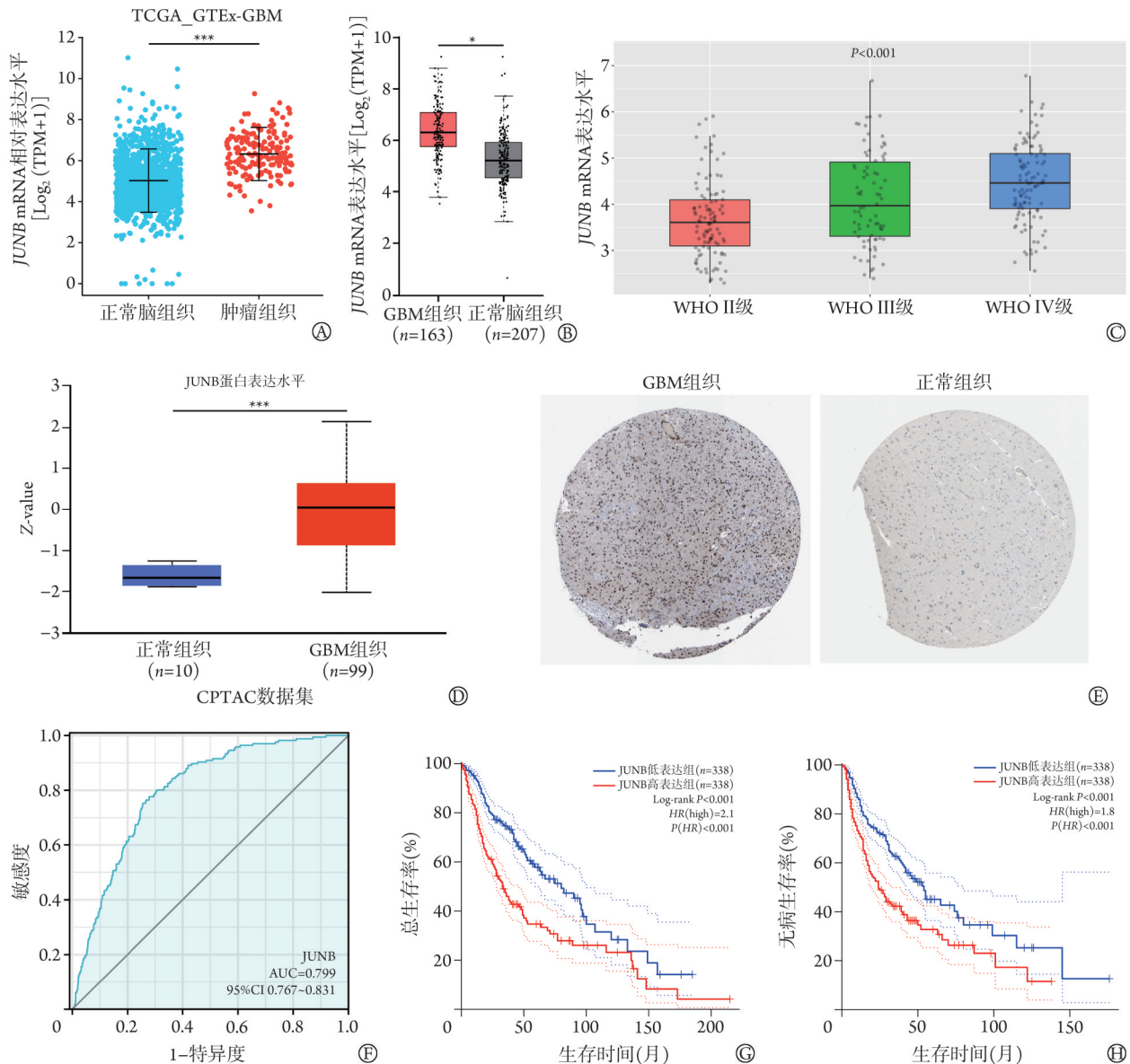
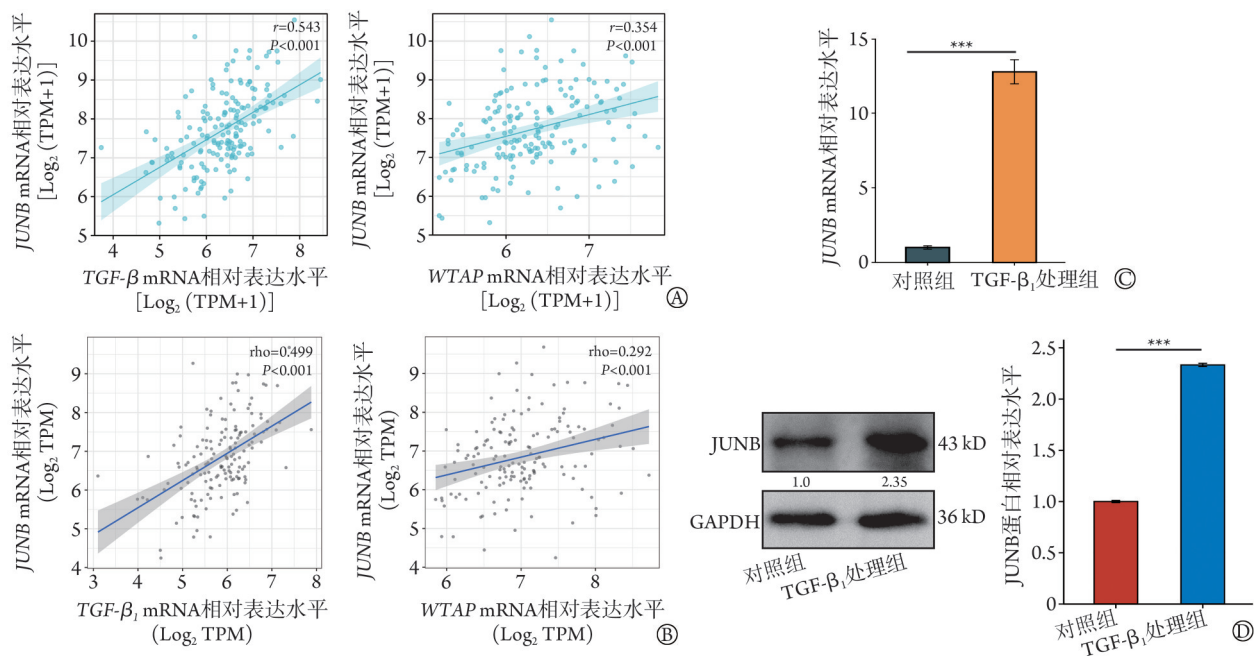


图4 转录因子JUNB在胶质母细胞瘤(GBM)中的表达及对胶质瘤患者预后的影响
Fig.4 JUNB expression in glioblastoma (GBM) and its effects on prognosis of glioma patients

树突状细胞分化、EMT的正调控、细胞外基质-细胞信号转导及中枢神经系统血管生成等生物学过程。在分子功能,该网络影响3种亚型的TGF- β 受体结合、TGF- β 激活受体活性以及mRNA(2-O-甲基腺苷-N₆)-甲基转移酶活性。在细胞组分,该网络除参与m⁶A甲基转移酶复合物形成,还包括转录因子ap-1复合物、Wnt信号体及RNA聚合酶II转录调节复合物的形成。在KEGG通路富集分析中,该PPI参与IL-17、Wnt、肿瘤坏死因子(TNF)信号通路等。这些信号通路都与肿瘤发生发展密切相关,此外,程序

性死亡受体-1(PD-1)及其配体(PD-L1)的表达也受该PPI的影响。基于GeneMANIA数据库构建TGF- β /WTAP/JUNB的基因功能预测网络(附图3B, <https://dx.doi.org/10.11855/j.issn.0577-7402.0359.2025.0522FJ>),也显示TGF- β /WTAP/JUNB参与mRNA修饰及TGF- β 诱导的EMT。TGF- β /WTAP/JUNB这一反应轴参与多种致癌信号通路的调控。

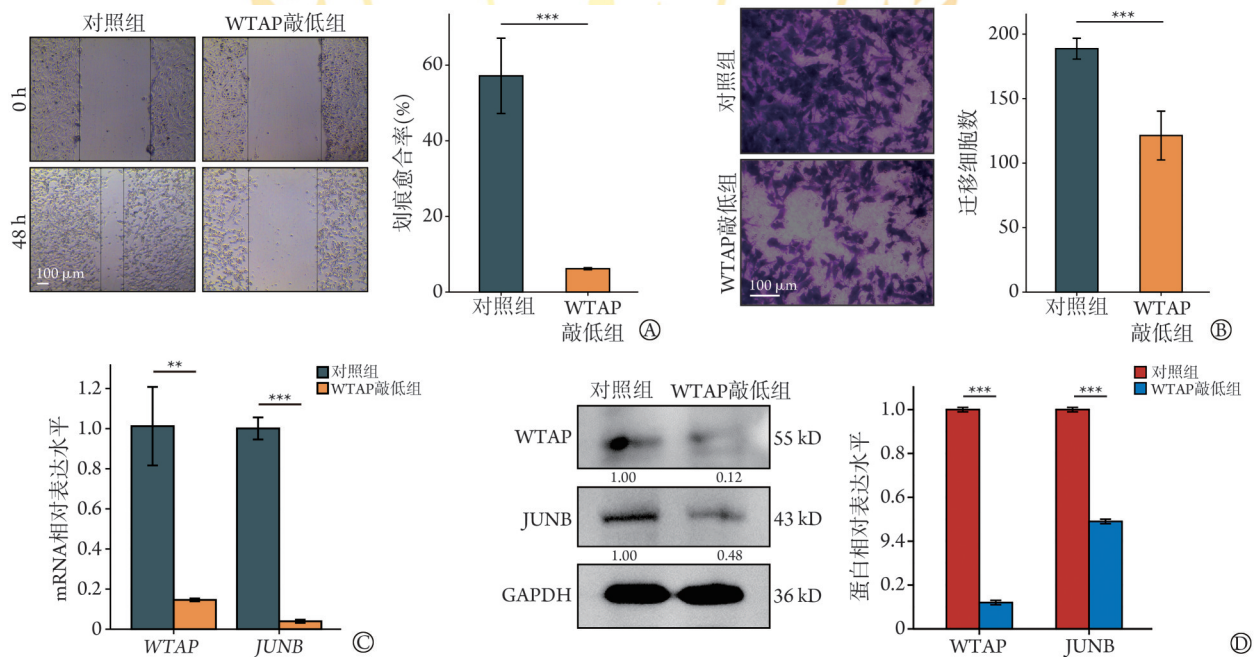
2.9 JUNB相关差异基因分析及GSEA富集分析 基于TCGA数据库的JUNB单基因差异分析结果显示,满足 $|\log_2FC|>1$ 且 $P_{adj}<0.05$ 阈值的基因有813个,包



GBM. 胶质母细胞瘤; TGF- β_1 . 转化生长因子- β_1 ; WTAP. Wilms瘤1-关联蛋白; A. GBM中JUNB与TGF β 、WTAP表达的相关性(TCGA数据集); B. GBM中JUNB与TGF- β 、WTAP表达的相关性(TIMER2.0数据库); C. JUNB mRNA表达情况(qRT-PCR); D. JUNB蛋白表达情况(Western blotting); *** $P < 0.001$

图5 在TGF- β_1 诱导的U87-MG细胞上皮-间充质转化(EMT)过程中的转录因子JUNB的表达水平

Fig.5 Expression levels of JUNB during TGF- β -induced EMT of U87-MG cells



WTAP. Wilms瘤1-关联蛋白; A. 细胞划痕实验; B. 细胞Transwell迁移功能实验; C. JUNB mRNA表达情况; D. JUNB蛋白表达情况; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

图6 敲低WTAP表达对U87-MG细胞迁移能力及转录因子JUNB表达的影响

Fig.6 Effects of knockdown of WTAP expression on migration of U87-MG cells and the expression of JUNB

括高表达基因354个,低表达基因459个。其中,免疫检查点分子*IDO1*、*CD70*表达明显升高($P < 0.05$)。IL-6作为胶质瘤中关键的细胞因子,其表达受JUNB影响。*FOS*和*FOSB*作为FOS基因家族的成员,被认为是细胞增殖、分化和转化的重要调节因子,*FOS*

基因的表达也与细胞凋亡有关(附图4, <https://dx.doi.org/10.11855/j.issn.0577-7402.0359.2025.0522FJ>)。

GSEA富集分析结果显示,*JUNB*在GBM中参与血管生成、细胞凋亡、EMT、糖酵解、缺氧信号通路、IL6/JAK/STAT3信号通路、炎症反应、KRAS信

号通路激活、p53 信号通路、PI3K/Akt/mTOR 信号通路、TGF- β 信号通路和 TNF- α /NF- κ B 信号通路(附图 5, <https://dx.doi.org/10.11855/j.issn.0577-7402.0359.2025.0522FJ>)。

3 讨 论

2021 年第五版 WHO 中枢神经系统肿瘤分类将分子诊断学作为中枢神经系统肿瘤的重要分类标准^[24]。GBM 异质性强, 个体化诊治亟待发展, 需要进一步探究其病理调控机制及潜在治疗靶点。脑胶质瘤细胞可发生 EMT 或 EMT 样改变^[9,25-26], 从而增强肿瘤细胞的侵袭性。尽管该过程在胶质瘤中的作用仍存在争议, 但其与胶质瘤的恶性程度密切相关, 在 GBM 中尤为显著。此外, 这些细胞形态发生改变, 可对化疗产生耐药性^[10]。

EMT 的重要特征是上皮标志物 E-cadherin 表达下调, 而 MMP2、N-cadherin 等间质标志物表达上调。研究显示, 在 TGF- β 诱导的肺癌、乳腺癌、肝癌细胞 EMT 中, RNA m⁶A 甲基化修饰均可发挥重要调控作用, 包括甲基转移酶 METTL3、去甲基化酶 ALKBH5 等重要的 m⁶A 修饰调节酶^[27-28]。甲基转移酶主要包括 METTL3、METTL14、WTAP、VIRMA/KIAA1429、RBM15、RBM15B、ZC3H13 等, 且可构成甲基转移酶复合物^[29]。其中, WTAP 的功能是将复合物招募到细胞核, 催化靶基因的 m⁶A 修饰。有研究显示, WTAP 的表达与 GBM 患者不良预后相关; WTAP 参与调控活性氧生成, 促进肿瘤恶性进展, 与 GBM 的肿瘤微环境密切相关^[30]。此外, WTAP 介导脂筏蛋白 flotillin-1 (FLOT1) mRNA 的 m⁶A 修饰, 促进 FLOT1 在胶质瘤中高表达, 发挥致癌作用, 促进胶质瘤生长和侵袭^[31]; 提示 WTAP 对胶质瘤的诊断和预后具有重要意义。然而, WTAP 在 GBM 中是否参与 TGF- β 调控的 EMT 尚不明确。此外, JUNB 作为重要的转录因子, 可在 TGF- β 诱导的肺癌细胞 EMT 中发挥重要作用^[27], 并受到 m⁶A 修饰调控; 但 JUNB 在 GBM 中是否受 m⁶A 甲基转移酶调控仍不清楚。

TGF- β 相关信号转导通路在癌症进展中具有关键作用, 可通过多途径促进胶质瘤细胞侵袭: 促进 lncRNA-ATB 表达, 进而激活 NF- κ B 和 p38/MAPK 信号通路促进细胞侵袭; 通过调控干扰素诱导跨膜蛋白 3 (IFITM3)/STAT3 轴影响胶质瘤细胞侵袭能力^[32]。WTAP 与肿瘤细胞周期调节、代谢调控、自噬、肿瘤免疫、铁死亡、EMT 及耐药性密切相关^[33]。本研究中, RNA m⁶A 甲基化修饰及 WTAP 表达水平在 TGF- β_1 诱导的 U87-MG 细胞 EMT 过程中均升高; 敲低 WTAP 表达, 可抑制 U87-MG 细胞的迁移能力; 表

明 m⁶A 甲基化修饰可能参与 TGF- β_1 诱导的 GBM 细胞 EMT。WTAP 作为一种 m⁶A 甲基转移酶, 可促进 GBM 细胞侵袭迁移, 并受 TGF- β 调控。此前研究报告, TGF- β 诱导的乳腺癌细胞中, 甲基转移酶 METTL3 和 WTAP 均明显升高^[34]。本研究 Spearman 相关性分析显示, 在 GBM 中, TGF- β 与 m⁶A 甲基转移酶 METTL3、METTL14、VIRMA/KIAA1429、ZC3H13、RBM15、RBM15B 均没有明显的相关性。TGF- β 与 m⁶A 甲基转移酶表达的关系在不同肿瘤类型中存在差异, 因此组织环境对其功能至关重要。近年来, 肿瘤微环境在 GBM 易复发和治疗耐药中的作用愈发受到重视; 多项研究提示 TGF- β 在肿瘤微环境中发挥重要作用^[32]。TGF- β 的来源包括肿瘤细胞和正常的肿瘤邻近细胞, 如成纤维细胞、内皮细胞、免疫细胞和间质细胞。TGF- β 在 GBM 进展过程中的生物学作用不仅取决于其在恶性肿瘤细胞中的信号转导, 还取决于这些肿瘤邻近细胞中的信号转导。

本研究显示, JUNB 在 GBM 中高表达, 且与胶质瘤预后不良密切相关; 在 GBM 中, TGF- β 、WTAP 都与 JUNB 的表达呈正相关; 在 TGF- β_1 诱导 U87-MG 细胞后, JUNB 表达水平明显升高; 敲低 WTAP 后, U87-MG 细胞迁移能力被抑制的同时, JUNB 表达水平也降低。这提示 JUNB 可能是 WTAP 的下游靶基因之一。然而, 在 GBM 中 TGF- β_1 是否直接作用于 JUNB 从而影响其表达, 目前尚不明确。

本研究初步显示, TGF- β /WTAP/JUNB 共表达, 并增强 RNA m⁶A 修饰水平, 促进 GBM 细胞发生 EMT; 该共表达网络中还包括其他几类甲基转移酶; 提示 TGF- β 在促进 WTAP 表达的同时, 可能借助 WTAP 招募其他甲基转移酶进入细胞核, 作用于靶基因, 促进 m⁶A 甲基化修饰。此外, 该 PPI 还与免疫检查点通路相关, 提示 TGF- β /WTAP/JUNB 可能参与免疫调节。在 JUNB 高表达组 GBM 的差异表达基因中, 免疫检查点分子 IDO1、CD70 表达明显升高, 提示 JUNB 参与肿瘤的免疫系统调节。对这些差异表达基因的 GSEA 富集分析显示, JUNB 在 GBM 中所参与的信号通路及生物学过程均与胶质瘤的恶性进展密切相关; 进一步证实 JUNB 很可能在胶质瘤的恶性进展中发挥重要作用。这些信号通路或生物学过程不仅相互调控, 更与 RNA m⁶A 甲基化修饰密切相关。由于本研究仅在体外细胞水平进行探索, 未进行体内实验, 所以未来还需要更多的实验进行验证, 探索 RNA m⁶A 甲基化修饰和转录因子 JUNB 在这些致癌信号通路中的作用。随着测序技术的不断进步, 未来从单细胞水平对 RNA m⁶A 甲基化修饰调控网络进行探索, 或许可更清晰地揭示 GBM 的病理机制,

为GBM患者的早期诊断、组织学分级和精准靶向治疗提供新的见解和发展方向。

【参考文献】

- [1] Thakkar JP, Prabhu VC, Peters KB, *et al.* What is new in neuro-oncology? [J]. *Neurol Clin*, 2021, 39(1): 163-179.
- [2] Li J, Chen F, Peng Y, *et al.* N⁶-methyladenosine regulates the expression and secretion of TGF- β_1 to affect the epithelial-mesenchymal transition of cancer cells [J]. *Cells*, 2020, 9(2): 296.
- [3] Jiang X, Liu B, Nie Z, *et al.* The role of m⁶A modification in the biological functions and diseases [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 74.
- [4] Jing JJ, Zhao X, Li H, *et al.* Expression profiles and prognostic roles of m⁶A writers, erasers and readers in gastric cancer [J]. *Future Oncol*, 2021, 17(20): 2605-2620.
- [5] Nombela P, Miguel-López B, Blanco S. The role of m⁶A, m⁵C and Ψ RNA modifications in cancer: novel therapeutic opportunities [J]. *Mol Cancer*, 2021, 20(1): 18.
- [6] Hong K. Emerging function of N⁶-methyladenosine in cancer [J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(5): 5519-5524.
- [7] Zhang Y, Weinberg RA. Epithelial-to-mesenchymal transition in cancer: complexity and opportunities [J]. *Front Med*, 2018, 12(4): 361-373.
- [8] Takashima Y, Kawaguchi A, Yamanaka R. Promising prognosis marker candidates on the status of epithelial-mesenchymal transition and glioma stem cells in glioblastoma [J]. *Cells*, 2019, 8(11): 1312.
- [9] Kubelt C, Hattermann K, Sebens S, *et al.* Epithelial-to-mesenchymal transition in paired human primary and recurrent glioblastomas [J]. *Int J Oncol*, 2015, 46(6): 2515-2525.
- [10] Iser I C, Pereira MB, Lenz G, *et al.* The epithelial-to-mesenchymal transition-like process in glioblastoma: an updated systematic review and in silico investigation [J]. *Med Res Rev*, 2017, 37(2): 271-313.
- [11] Derynck R, Muthusamy BP, Saetern KY. Signaling pathway cooperation in TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2014, 31: 56-66.
- [12] Vivian J, Rao AA, Nothaft FA, *et al.* Toil enables reproducible, open source, big biomedical data analyses [J]. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(4): 314-316.
- [13] Zhao Z, Zhang KN, Wang Q, *et al.* Chinese Glioma Genome Atlas (CGGA): a comprehensive resource with functional genomic data from Chinese gliomas [J]. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2021, 19(1): 1-12.
- [14] Bao ZS, Chen HM, Yang MY, *et al.* RNA-seq of 272 gliomas revealed a novel, recurrent PTPRZ1-MET fusion transcript in secondary glioblastomas [J]. *Genome Res*, 2014, 24(11): 1765-1773.
- [15] Zhao Z, Meng F, Wang W, *et al.* Comprehensive RNA-seq transcriptomic profiling in the malignant progression of gliomas [J]. *Sci Data*, 2017, 4: 170024.
- [16] Dong Z, Cui H. The emerging roles of RNA modifications in glioblastoma [J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(3): 736.
- [17] Tang Z, Li C, Kang B, *et al.* GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(W1): W98-W102.
- [18] Li T, Fan J, Wang B, *et al.* TIMER: a web server for comprehensive analysis of tumor-infiltrating immune cells [J]. *Cancer Res*, 2017, 77(21): e108-e110.
- [19] Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, *et al.* STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D607-D613.
- [20] Warde-Farley D, Donaldson SL, Comes O, *et al.* The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function [J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(Web Server issue): W214-W220.
- [21] Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 [J]. *Genome Biol*, 2014, 15(12): 550.
- [22] Yu G, Wang L G, Han Y, *et al.* clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters [J]. *Omics*, 2012, 16(5): 284-287.
- [23] 宋扬, 赵丽艳, 陈勇, 等. TGF- β_1 对胶质瘤U87细胞上皮-间质转化的诱导作用 [J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2016, 42(6): 1087-1091, 1013.
- [24] Louis DN, Perry A, Wesseling P, *et al.* The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: a summary [J]. *Neuro Oncol*, 2021, 23(8): 1231-1251.
- [25] Yang HW, Menon LG, Black PM, *et al.* SNAI2/Slug promotes growth and invasion in human gliomas [J]. *BMC Cancer*, 2010, 10: 301.
- [26] Ning W, Qiu Z, Ji X, *et al.* The prognostic value of EMT in glioma and its role in the glioma immune microenvironment [J]. *J Mol Neurosci*, 2020, 70(10): 1501-1511.
- [27] Wanna-Udom S, Terashima M, Lyu H, *et al.* The m⁶A methyltransferase METTL3 contributes to transforming growth factor-beta-induced epithelial-mesenchymal transition of lung cancer cells through the regulation of JUNB [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 524(1): 150-155.
- [28] Lin X, Chai G, Wu Y, *et al.* RNA m⁶A methylation regulates the epithelial mesenchymal transition of cancer cells and translation of Snail [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 2065.
- [29] Pan T, Wu F, Li L, *et al.* The role m⁶A RNA methylation is CNS development and glioma pathogenesis [J]. *Mol Brain*, 2021, 14(1): 119.
- [30] Ji Q, Guo Y, Li Z, *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 (Albany NY)*, 2024, 16(6): S601-S617.
- [31] Song T, Hu Z, Zeng C, *et al.* FLOT1, stabilized by WTAP/IGF2BP2 mediated N⁶-methyladenosine modification, predicts poor prognosis and promotes growth and invasion in gliomas [J]. *Heliyon*, 2023, 9(6): e16280.
- [32] Golán-Cancela I, Caja L. The TGF- β family in glioblastoma [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(2): 1067.
- [33] Ju G, Lei J, Cai S, *et al.* The emerging, multifaceted role of WTAP in cancer and cancer therapeutics [J]. *Cancers (Basel)*, 2023, 15(11): 3053.
- [34] Li L, Chen YX, Yang B, *et al.* The crosstalk between RNA m⁶A epitranscriptome and TGF- β signaling pathway contributes to the arrest of cell cycle [J]. *Gene*, 2020, 738: 144483.

(责任编辑: 蒋铭敏)