

m⁶A 甲基化修饰介导的 UBAC2 对结肠癌细胞侵袭和迁移能力的影响及其机制

石颖鹏, 刘华, 张栋林, 倪亚萍, 崔洁*

西安医学院第一附属医院全科医学科, 陕西西安 710077

[中图分类号] R735.3⁵ [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.0858.2025.0528

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 石颖鹏, 刘华, 张栋林, 等. m⁶A 甲基化修饰介导的 UBAC2 对结肠癌细胞侵袭和迁移能力的影响及其机制[J]. 解放军医学杂志, 2025, 50(9): 1162-1170.

[收稿日期] 2024-06-17 [录用日期] 2024-12-10 [上线日期] 2025-05-28

[摘要] **目的** 探究 m⁶A 甲基化修饰介导的泛素相关结构域样蛋白 2(UBAC2)对结肠癌细胞侵袭和迁移能力的影响及其机制。**方法** 采用 GEPIA2.0 数据库分析 UBAC2 mRNA 在结肠癌组织与正常癌旁组织中的表达差异, 及其在不同分期结肠癌组织中的表达情况, 并分析 Wilms 肿瘤 1 相关蛋白(WTAP)与 UBAC2 表达的相关性。采用 Kaplan-Meier plotter 在线工具分析 UBAC2 与结肠癌患者总生存率的相关性; 采用 RMVar 和 SRAMP 数据库预测 UBAC2 基因中潜在的 m⁶A 甲基化修饰位点; 采用 qRT-PCR 和 Western blotting 检测结肠癌细胞系中 UBAC2 mRNA 和蛋白表达水平。取 SW480 结肠癌细胞, UBAC2 敲低实验分为对照组(无任何处理)、sh-NC 组(转染 sh-NC 阴性对照质粒)及 sh-UBAC2 组(转染 sh-UBAC2 质粒); WTAP 敲低实验分为对照组(无任何处理)、si-NC 组(转染阴性对照 siRNA)及 si-WTAP 组(转染 WTAP 干扰 siRNA); UBAC2 过表达实验分为对照组(无任何处理)、si-WTAP 组(转染 pcDNA3.1 空质粒)及 si-WTAP+OE-UBAC2 组(转染 UBAC2 过表达质粒 pcDNA3.1-UBAC2)。采用 Western blotting 检测 UBAC2、WTAP、E-cadherin、N-cadherin 和波形蛋白表达水平; qRT-PCR 检测 UBAC2 mRNA 表达水平; Transwell 检测细胞侵袭和迁移能力。采用 MeRIP-qPCR 检测 UBAC2 mRNA 的 m⁶A 甲基化修饰水平; RIP-qPCR 验证 WTAP 与 UBAC2 mRNA 的结合情况。裸鼠结肠癌肺转移实验分为 LV-sh-NC 组(尾静脉注射 LV-sh-NC 稳定感染的 SW480 细胞)及 LV-sh-UBAC2 组(尾静脉注射 LV-sh-UBAC2 稳定感染的 SW480 细胞)。裸鼠荷瘤 42 d 后取其肺组织, 苏木精/伊红(HE)染色观察肺结节数量, qRT-PCR 检测 *Luc2* mRNA 表达水平。**结果** GEPIA2.0 数据库分析结果显示, UBAC2 mRNA 在结肠癌组织中的表达水平明显高于正常癌旁组织, 且随着肿瘤分期进展而逐渐升高($P<0.05$)。UBAC2 mRNA 和蛋白表达水平在多种结肠癌细胞系中均明显高于正常结肠上皮细胞($P<0.05$)。与 sh-NC 组比较, sh-UBAC2 组 SW480 细胞中 E-cadherin 蛋白表达水平明显升高, N-cadherin 和波形蛋白表达水平明显降低, 侵袭和迁移细胞数均明显减少($P<0.05$)。GEPIA2.0 数据库分析结果显示 WTAP 与 UBAC2 表达呈正相关($r=0.24$, $P<0.001$)。与 si-NC 组比较, si-WTAP 组 SW480 细胞中 WTAP、UBAC2 mRNA 和蛋白表达水平均明显降低($P<0.05$)。MeRIP-qPCR 实验结果显示, 与 si-NC 组比较, si-WTAP 组 UBAC2 mRNA 的 m⁶A 修饰水平明显降低($P<0.05$)。RIP-qPCR 实验进一步证实 WTAP 可与 UBAC2 mRNA 相结合。与对照组比较, si-WTAP 组 SW480 细胞中 E-cadherin 蛋白表达水平明显升高, N-cadherin 和波形蛋白表达水平明显降低($P<0.05$); 与 si-WTAP 组比较, si-WTAP+OE-UBAC2 组 SW480 细胞中 E-cadherin 蛋白表达水平明显降低, N-cadherin 和波形蛋白表达水平明显升高($P<0.05$)。LV-sh-UBAC2 组裸鼠肺结节数量明显少于 LV-sh-NC 组, 肺组织中 *Luc2* mRNA 表达水平明显低于 LV-sh-NC 组($P<0.05$)。**结论** m⁶A 甲基化修饰介导的 UBAC2 可调控结肠癌细胞的上皮-间质转化(EMT)进程, 进而影响结肠癌细胞的侵袭和迁移能力。

[关键词] 结肠癌; 泛素相关结构域样蛋白 2; m⁶A 甲基化; Wilms 肿瘤 1 相关蛋白; 侵袭; 迁移

Effect and mechanism of UBAC2 mediated by m⁶A methylation modification on the invasion and migration abilities of colorectal cancer cells

Shi Ying-Peng, Liu Hua, Zhang Dong-Lin, Ni Ya-Ping, Cui Jie*

Department of General Practice, the First Affiliated Hospital of Xi'an Medical University, Xi'an, Shaanxi 710077, China

[作者简介] 石颖鹏, 硕士研究生, 主治医师, 主要从事消化系统肿瘤临床诊治方面的研究

[通信作者] 崔洁, E-mail: yingzi_4549@163.com

*Corresponding author, E-mail: yingzi_4549@163.com

[Abstract] Objective To investigate the effects and mechanisms of ubiquitin-associated domain-containing protein 2 (UBAC2) mediated by m⁶A methylation modification on the invasion and migration abilities of colorectal cancer cells. **Methods** The GEPIA2.0 database was utilized to analyze the expression differences of UBAC2 mRNA between colorectal cancer tissues and adjacent normal tissues, as well as its expression in colorectal cancer tissues at different stages. The correlation between Wilms tumor 1-associated protein (WTAP) and UBAC2 expression was analyzed. The Kaplan-Meier plotter online tool was applied to analyze the correlation between UBAC2 and the overall survival rate of colorectal cancer patients. The RMVar and SRAMP databases were employed to predict potential m⁶A methylation modification sites in the UBAC2 gene. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and Western blotting were performed to detect the expression levels of UBAC2 mRNA and protein in colorectal cancer cell lines. For UBAC2 knockdown experiments, SW480 cells were divided into control group (no treatment), sh-NC group (transfected with sh-NC negative control plasmid), and sh-UBAC2 group (transfected with sh-UBAC2 plasmid). For WTAP knockdown experiments, groups included control group (no treatment), si-NC group (transfected with negative control siRNA), and si-WTAP group (transfected with WTAP-targeting siRNA). For UBAC2 overexpression experiments, groups were control group (no treatment), si-WTAP group (transfected with pcDNA3.1 empty plasmid), and si-WTAP+OE-UBAC2 group (transfected with UBAC2 overexpression plasmid pcDNA3.1-UBAC2). Western blotting was used to detect the protein expression levels of UBAC2, WTAP, E-cadherin, N-cadherin, and Vimentin; qRT-PCR was applied to detect the expression level of UBAC2 mRNA; Transwell assays were conducted to assess cell invasion and migration abilities. MeRIP-qPCR was employed to detect the m⁶A methylation modification of UBAC2 mRNA; RIP-qPCR experiments were conducted to verify the binding of WTAP to UBAC2 mRNA. In nude mouse colorectal cancer lung metastasis experiments, groups included LV-sh-NC group (tail vein injection of SW480 cells stably infected with LV-sh-NC) and LV-sh-UBAC2 group (tail vein injection of SW480 cells stably infected with LV-sh-UBAC2). After 42 d of tumor-implantation in nude mice, lung tissues were harvested: the number of lung nodules observed by hematoxylin/eosin (HE) staining, and the expression level of *Luc2* mRNA detected by qRT-PCR. **Results** GEPIA2.0 database analysis revealed that the expression level of UBAC2 mRNA in colorectal cancer tissues was significantly higher than that in adjacent normal tissues, and it gradually increased with the progression of tumor stage ($P<0.05$). The expression levels of UBAC2 mRNA and protein in multiple colorectal cancer cell lines were significantly higher than those in normal colonic epithelial cells ($P<0.05$). Compared with sh-NC group, sh-UBAC2 group showed significantly increased E-cadherin protein expression, significantly decreased N-cadherin and Vimentin protein expression, and significantly reduced number of invaded and migrated SW480 cells ($P<0.05$). GEPIA2.0 database analysis results indicated a positive correlation between WTAP and UBAC2 expression ($r=0.24$, $P<0.001$). Compared with si-NC group, si-WTAP group showed significantly decreased expression levels of WTAP and UBAC2 mRNA and protein in SW480 cells ($P<0.05$). MeRIP-qPCR results demonstrated that the m⁶A modification level of UBAC2 mRNA in si-WTAP group was significantly lower than that in si-NC group ($P<0.05$). RIP-qPCR further confirmed that WTAP could bind to UBAC2 mRNA. Compared with control group, si-WTAP group showed significantly increased E-cadherin protein expression and significantly decreased N-cadherin and Vimentin protein expression in SW480 cells ($P<0.05$); compared with si-WTAP group, si-WTAP+OE-UBAC2 group showed significantly decreased E-cadherin protein expression and significantly increased N-cadherin and Vimentin protein expression in SW480 cells ($P<0.05$). The number of lung nodules in LV-sh-UBAC2 group was significantly fewer than that in LV-sh-NC group, and the expression level of *Luc2* mRNA in lung tissues was significantly lower than that in LV-sh-NC group ($P<0.05$). **Conclusion** UBAC2 mediated by m⁶A methylation modification can regulate the epithelial-mesenchymal transition (EMT) process in colorectal cancer cells, thereby affecting the invasion and migration abilities of colorectal cancer cells.

[Key words] colorectal cancer; ubiquitin-associated domain-containing protein 2; N⁶-methyladenosine; Wilms tumor 1-associated protein; invasion; migration

结肠癌是全球常见消化道恶性肿瘤，其发病率呈上升趋势，致死率较高^[1-4]。结肠癌转移是其致死的主要原因，而结肠癌细胞侵袭、迁移和上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是转移的关键^[5]。靶向抑制结肠癌细胞侵袭、迁移和EMT是结肠癌治疗的重要手段^[6]。m⁶A(N⁶-methyladenosine)甲基化是RNA的一种表观遗传修饰，在癌症的发生发展中发挥重要作用^[7-8]，m⁶A甲基化修饰也参与结肠癌进展和转移过程的调控^[9-10]。泛素相关结构域样

蛋白2(ubiquitin-associated domain-containing protein 2, UBAC2)是存在于多物种的高度保守的蛋白质，近年来发现，其在膀胱癌^[11]、甲状腺乳头状癌^[12]等恶性肿瘤中高表达，并与皮肤癌^[13]、膀胱癌^[11]、甲状腺乳头状癌^[12]的发生发展密切相关。但UBAC2在结肠癌中的作用及其机制鲜见报道。本研究探索UBAC2对结肠癌细胞迁移和侵袭的影响及m⁶A甲基化修饰对UBAC2的调控机制，以期对结肠癌的治疗提供新的潜在分子靶标。

1 材料与方 法

1.1 材料 结肠癌细胞系 HCT116、HT29、SW480 及正常结肠上皮细胞 NCM460 购自美国 ATCC 菌种保藏中心；Lipofectamine™ 2000(11668027)、TRIzol 试剂盒(15596026CN)购自美国 Invitrogen 公司；胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、RPMI 1640 培养基购自美国 Gibco 公司；RIPA 裂解液(P0038)、BCA 蛋白定量试剂盒(P0010S)、ECL 发光检测试剂盒(P0018M)购自上海碧云天生物技术有限公司；PVDF 膜、RNA 甲基化免疫共沉淀(methylated RNA immunoprecipitation, MeRIP)试剂盒(17-10499)、RNA 结合蛋白免疫沉淀(RNA binding protein immunoprecipitation, RIP)试剂盒(17-700)购自美国 Millipore 公司；小鼠抗 β -actin 单克隆抗体(ab8226)、兔抗 E-钙黏蛋白(E-cadherin)单克隆抗体(ab227639)、兔抗 N-钙黏蛋白(N-cadherin)单克隆抗体(ab76011)、兔抗波形蛋白(Vimentin)单克隆抗体(ab92547)、兔抗 Wilms 肿瘤 1 相关蛋白(Wilms tumor 1 associated protein, WTAP)单克隆抗体(ab195380)、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的兔抗小鼠 IgG(ab6728)、HRP 标记的山羊抗兔 IgG(ab6721)购自英国 Abcam 公司；兔抗 UBAC2 多克隆抗体(25122-1-AP)购自武汉三鹰生物技术有限公司；Prime Script RT Reagent 试剂盒(RR047A)和 TB Green™ Premix Ex Taq™ 试剂盒(RR420A)购自日本 TaKaRa 公司；Transwell 小室购自美国 Corning 公司；Matrigel 胶购自美国 BD 公司；sh-UBAC2 及其阴性对照 sh-NC、WTAP 干扰 siRNA 及其阴性对照 siRNA、UBAC2 过表达质粒 pcDNA3.1-UBAC2、UBAC2 敲低慢病毒载体(pcSLenti-U6-sh-UBAC2-EF1-Luc2-F2A-Puro-WPRE, LV-sh-UBAC2)及其阴性对照慢病毒载体(pcSLenti-U6-NC-EF1-Luc2-F2A-Puro-WPRE, LV-sh-NC)均由和元生物技术(上海)股份有限公司合成。

1.2 生物信息学分析 采用 GEPIA2.0 数据库(<http://gepia2.cancer-pku.cn/#index>)分析 UBAC2 在结肠癌组织与正常癌旁组织中的表达差异,及其在不同分期结肠癌组织中的表达情况,并分析 WTAP 与 UBAC2 表达水平的相关性。采用 Kaplan-Meier plotter 在线工具(<https://www.kmplot.com/analysis/>)分析 UBAC2 与结肠癌患者总生存率(OS)的相关性。采用 R² 数据库(<https://rmvar.renlab.cn/#/home>)和 SRAMP 数据库(<http://www.cuilab.cn/sramp/>)预测 UBAC2 基因中的潜在 m⁶A 甲基化修饰位点。

1.3 细胞培养与转染 将正常结肠上皮细胞 NCM460 与结肠癌细胞系 HCT116、HT29、SW480 用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基(添加 100 U/ml 青

霉素和 100 μ g/ml 链霉素), 37 $^{\circ}$ C 下常规培养于含 5% CO₂ 的培养箱中。采用 qRT-PCR 和 Western blotting 检测结肠癌细胞系中 UBAC2 mRNA 和蛋白表达水平。

SW480 细胞培养至 80% 融合度时, 采用 Lipofectamine™ 2000 转染试剂进行转染。(1)UBAC2 敲低实验: 将 SW480 细胞分为对照组(无任何处理)、sh-NC 组(转染 sh-NC 阴性对照质粒)及 sh-UBAC2 组(转染 sh-UBAC2 质粒); 采用 qRT-PCR 检测 UBAC2 mRNA 表达水平, Western blotting 检测 UBAC2、E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 蛋白表达水平, Transwell 小室检测细胞侵袭和迁移能力。

(2)WTAP 敲低实验: 将 SW480 细胞分为对照组(无任何处理)、si-NC 组(转染阴性对照 siRNA)及 si-WTAP 组(转染 WTAP 干扰 siRNA); 采用 qRT-PCR 检测 WTAP、UBAC2 mRNA 表达水平, Western blotting 检测 WTAP、UBAC2 蛋白表达水平, MeRIP-qPCR 实验检测 UBAC2 mRNA 的 m⁶A 甲基化修饰水平, RIP-qPCR 实验验证 WTAP 与 UBAC2 mRNA 的结合情况。

(3)UBAC2 过表达实验: 将 SW480 细胞分为对照组(无任何处理)、si-WTAP 组(转染 pcDNA3.1 空质粒)及 si-WTAP+OE-UBAC2 组(转染 UBAC2 过表达质粒 pcDNA3.1-UBAC2)。采用 Western blotting 检测 UBAC2、E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 蛋白表达水平。

1.4 裸鼠肿瘤体内转移实验 12 只 4~6 周龄雌性 BALB/c 裸鼠由西安交通大学医学院实验动物中心提供[实验动物生产许可证号: SCXK(陕)2023-002], 饲养于湿度 50% 左右、温度 22 $^{\circ}$ C 左右的清洁环境中, 自由饮食。本研究经西安医学院第一附属医院实验动物福利伦理审批(XYYFY2024LSDW-013), 实验过程符合国家和单位有关实验动物的管理和使用规定。

采用 UBAC2 敲低慢病毒载体 LV-sh-UBAC2 或阴性对照慢病毒 LV-sh-NC 感染 SW480 细胞, 采用嘌呤霉素(5 μ g/ml)筛选稳定感染的细胞株。肿瘤体内转移实验参考文献[14-15]。将裸鼠分为 LV-sh-NC 组与 LV-sh-UBAC2 组, 每组 6 只。采用 75% 乙醇消毒裸鼠尾部皮肤, LV-sh-NC 组尾静脉注射 2×10^6 个 LV-sh-NC 稳定感染的 SW480 细胞; LV-sh-UBAC2 组尾静脉注射 2×10^6 个 LV-sh-UBAC2 稳定感染的 SW480 细胞。继续饲养 42 d, 采用异氟醚麻醉裸鼠致死, 取肺组织, 一部分肺组织进行石蜡包埋、切片, 用于苏木精/伊红(HE)染色, 在显微镜下计数肺结节数量; 另一部分肺组织用于提取总 RNA, 由于该慢病毒载体上含有 Luc2 元件, 故采用 qRT-PCR 检测慢病毒载体中 Luc2 mRNA 表达水平, 以评估转移至肺组织中的肿瘤细胞数量。

1.5 qRT-PCR 检测 *UBAC2*、*WTAP*、*Luc2* mRNA 表达水平 收集 SW480 细胞及肺组织, 使用 TRIzol 试剂提取细胞总 RNA, 紫外分光光度计测定 RNA 的浓度。根据 Prime Script RT Reagent 试剂盒将总 RNA 反转录为 cDNA, 采用 TB Green[®] Premix Ex Taq[™] 试剂盒进行 qRT-PCR 反应检测 *UBAC2*、*Luc2* mRNA 表达水平。*UBAC2* 引物: 正向 5'-TGGACCGCCATGAGCATGAA-3', 反向 5'-AGCCTGGAACAAGGCTTTATTTGT-3'; *WTAP* 引物: 正向 5'-AACCTGTAGAACAGTCA GAGGC-3', 反向 5'-TTGCCCTCCCTGTGAAATCC-3'; *Luc2* 引物: 正向 5'-ACACCCGAGGGGATGATAA-3', 反向 5'-TCTCACACACAGTTCGCCTC-3'; β -actin 引物: 正向 5'-GCTCACCATGGATGATGATATCGC-3', 反向 5'-TAGGAATCCTTCTGACCCATGCC-3^[11]。PCR 反应体系 (20 μ l): TB Green Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus) (2 \times) 10 μ l, 正向引物 0.4 μ l, 反向引物 0.4 μ l, cDNA 模板 2 μ l, ddH₂O 7.2 μ l。PCR 扩增步骤: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 共 40 个循环。以 β -actin 作为内参, 根据 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 方法计算基因相对表达水平。

1.6 Western blotting 检测 *UBAC2*、*E-cadherin*、*N-cadherin*、*Vimentin*、*WTAP* 蛋白表达水平 收集各组 SW480 细胞, 采用 RIPA 裂解液提取总蛋白。取 20 μ g 总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 然后转移至 PVDF 膜上, 用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h 后, 加入抗 *UBAC2* (1: 600)、*E-cadherin* (1: 1000)、*N-cadherin* (1: 1000)、*Vimentin* (1: 1000)、*WTAP* (1: 1000)、 β -actin (1: 2000) 抗体, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBST 洗膜, 加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG (1: 3000) 或 HRP 标记的兔抗小鼠 IgG (1: 3000), 室温孵育 1 h。TBST 洗膜, 加入 ECL 化学发光液, 凝胶成像仪中曝光成像。以 β -actin 为内参照, 采用 ImageJ 软件对蛋白条带进行灰度值分析。

1.7 Transwell 小室检测细胞侵袭和迁移能力 调整 SW480 细胞浓度为 1 \times 10⁶ 个/ml。在 Transwell 培养板上室加入 200 μ l 细胞悬液, 下室加入 600 μ l 含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养液。将 Transwell 培养板孵育 24 h 后, 用无菌棉签拭去上层小室未迁移细胞, 采用 4% 多聚甲醛溶液固定 20 min, 0.1% 结晶紫染色 30 min。PBS 轻轻漂洗, 采用倒置显微镜随机选取 5 个视野 (\times 200) 计数迁移细胞数。细胞侵袭实验需先用 Matrigel 基质胶包被 Transwell 小室, 其余步骤同迁移实验。

1.8 MeRIP-qPCR 检测 *UBAC2* mRNA 的 m⁶A 甲基化修饰水平 提取转染后细胞的总 RNA, 进行 MeRIP-qPCR 实验。采用 MeRIP 试剂盒, 参照说明书进行 m⁶A MeRIP 实验。将最终富集到的 RNA 进行 qRT-

PCR 检测。

1.9 RIP-qPCR 验证 *WTAP* 与 *UBAC2* mRNA 的结合情况 使用 RIP 试剂盒进行 RIP 实验。用 RIP 裂解缓冲液裂解细胞, 将裂解液离心后分离上清, 用 5 μ g *WTAP* 抗体或 IgG 抗体在 4 $^{\circ}$ C 下过夜结合 RNA 并沉淀, 纯化 RNA, 采用 qRT-PCR 检测共沉淀产物中 *UBAC2* 的含量。

1.10 统计学处理 采用 Graphpad Prism 8.0 软件进行统计分析。所有数据均符合正态分布, 以 $\bar{x}\pm s$ 表示。两组间比较采用 *t* 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 Bonferroni 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 *UBAC2* 在结肠癌组织及细胞中的表达情况 GEPIA2.0 数据库分析结果显示, *UBAC2* mRNA 在结肠癌组织中的表达水平明显高于正常癌旁组织 (P<0.05, 图 1A), 且随着肿瘤分期进展 *UBAC2* mRNA 表达水平逐渐升高 (P<0.05, 图 1B)。Kaplan-Meier plotter 在线工具分析结果显示, *UBAC2* 与结肠癌患者 OS 无明显相关性 (P>0.05, 图 1C)。qRT-PCR 和 Western blotting 检测结果显示, 与正常结肠上皮细胞 NCM460 比较, 结肠癌细胞系 HCT116、HT29 和 SW480 中 *UBAC2* mRNA 和蛋白表达水平均明显升高 (P<0.05, 图 1D、E)。由于 *UBAC2* 在 SW480 细胞中表达最高, 故选取 SW480 细胞进行后续实验。

2.2 *UBAC2* 敲低对结肠癌细胞侵袭和迁移能力的影响 采用 sh-*UBAC2* 转染结肠癌细胞 SW480 敲低 *UBAC2*, qRT-PCR 和 Western blotting 检测结果显示, 与对照组比较, sh-NC 组 SW480 细胞中 *UBAC2* mRNA 和蛋白表达水平差异无统计学意义 (P>0.05); 与 sh-NC 组比较, sh-*UBAC2* 组 SW480 细胞中 *UBAC2* mRNA 和蛋白表达水平明显降低 (P<0.05, 图 2)。

Transwell 实验检测结果显示, 与对照组比较, sh-NC 组 SW480 细胞侵袭和迁移细胞数差异均无统计学意义 (P>0.05); 与 sh-NC 组比较, sh-*UBAC2* 组 SW480 细胞侵袭和迁移细胞数均明显减少 (P<0.05, 图 3)。

2.3 *UBAC2* 敲低对结肠癌细胞 EMT 进程的影响 Western blotting 检测结果显示, 与对照组比较, sh-NC 组 SW480 细胞中 *E-cadherin*、*Vimentin* 和 *N-cadherin* 蛋白表达水平差异均无统计学意义 (P>0.05); 与 sh-NC 组比较, sh-*UBAC2* 组 SW480 细胞中 *E-cadherin* 蛋白表达水平明显升高 (P<0.05), *N-cadherin* 和 *Vimentin* 蛋白表达水平明显降低 (P<0.05, 图 4A)。

通过尾静脉注射 SW480 细胞构建裸鼠肿瘤体内转移模型。HE 染色结果显示, LV-sh-NC 组裸鼠肺组

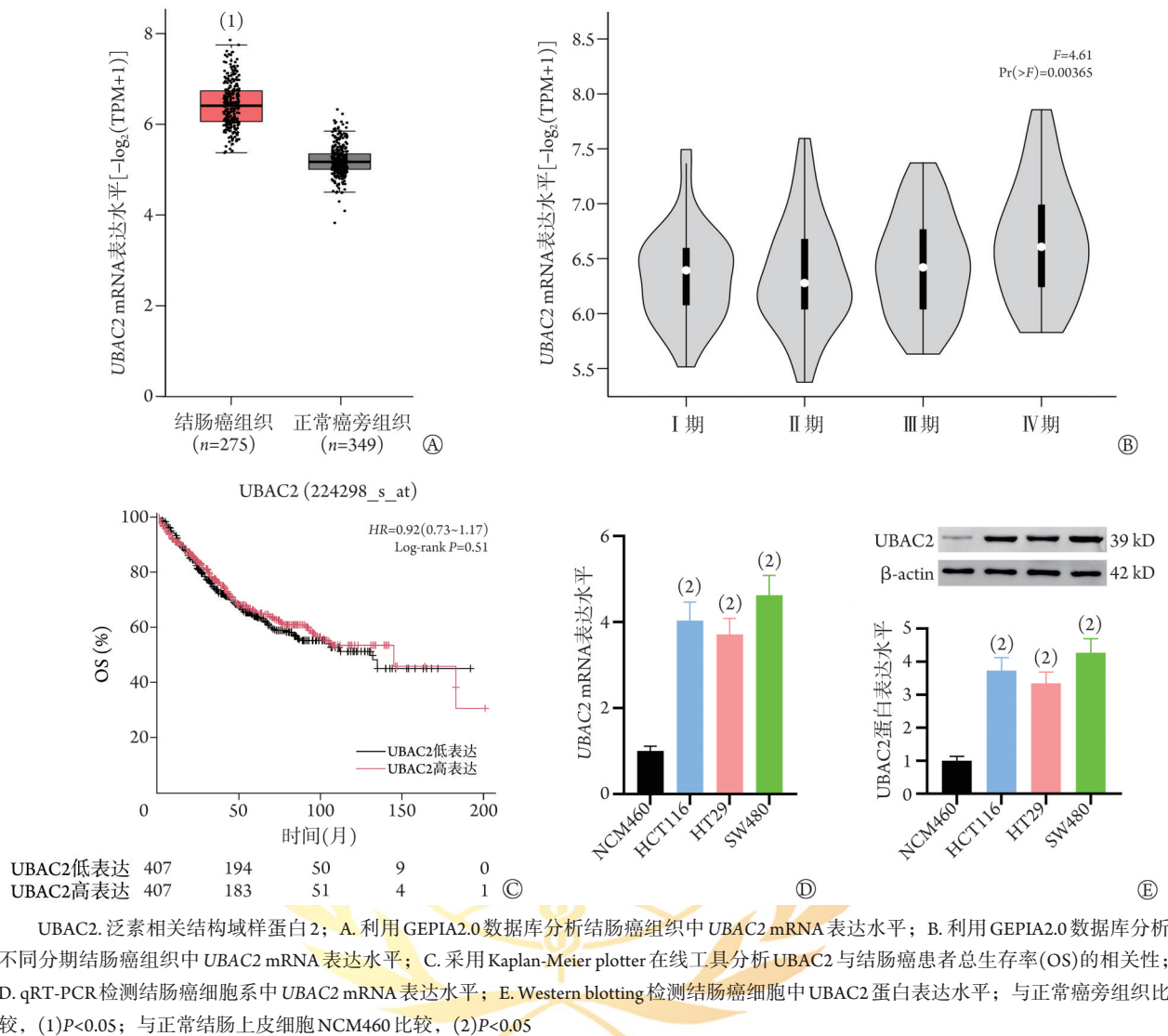
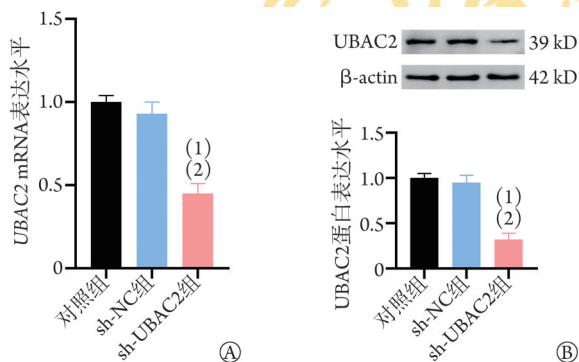


图1 结肠癌组织和细胞中UBAC2的表达情况

Fig.1 The expression level of UBAC2 in colon cancer tissues and cells



UBAC2. 泛素相关结构域样蛋白2; 与对照组比较, (1) $P<0.05$; 与sh-NC组比较, (2) $P<0.05$

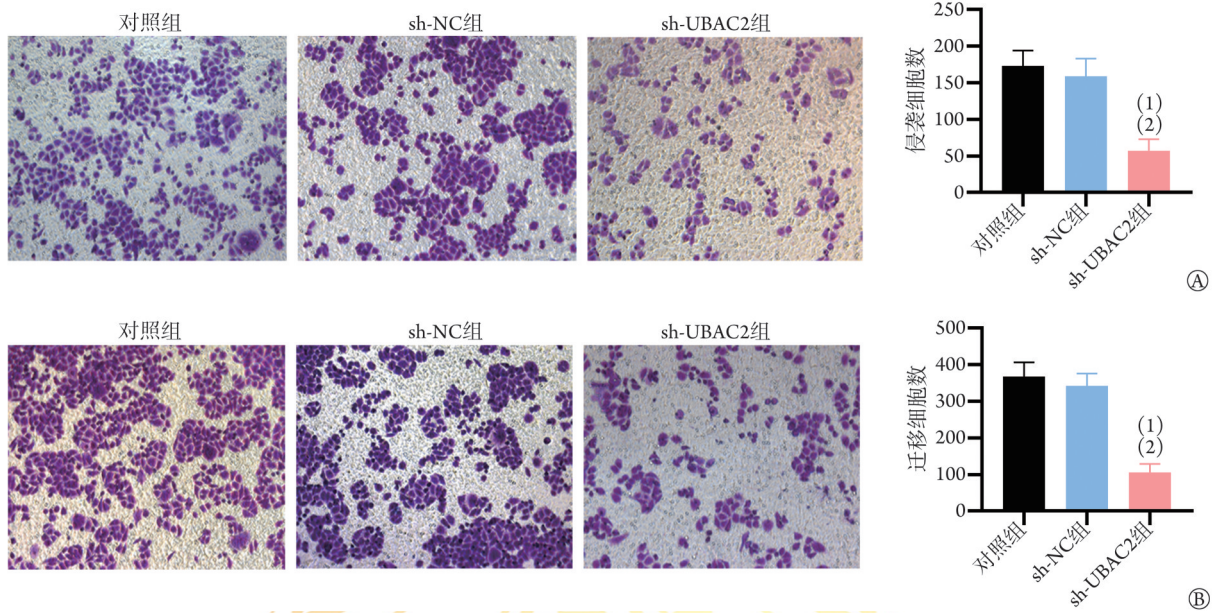
图2 采用qRT-PCR(A)和Western blotting(B)验证结肠癌细胞SW480中UBAC2敲低效果

Fig.2 UBAC2 transfection efficiency was undertaken via qRT-PCR (A) and Western blotting (B) assay in SW480 cell

UBAC2. 泛素相关结构域样蛋白2; A. 利用GEPIA2.0数据库分析结肠癌组织中UBAC2 mRNA表达水平; B. 利用GEPIA2.0数据库分析不同分期结肠癌组织中UBAC2 mRNA表达水平; C. 采用Kaplan-Meier plotter在线工具分析UBAC2与结肠癌患者总生存率(OS)的相关性; D. qRT-PCR检测结肠癌细胞系中UBAC2 mRNA表达水平; E. Western blotting检测结肠癌细胞中UBAC2蛋白表达水平; 与正常癌旁组织比较, (1) $P<0.05$; 与正常结肠上皮细胞NCM460比较, (2) $P<0.05$

织内有明显的肿瘤转移结节, 而LV-sh-UBAC2组裸鼠肺组织内肿瘤转移结节不明显(图4B); LV-sh-UBAC2组裸鼠肺结节数量明显少于LV-sh-NC组($P<0.05$, 图4C)。qRT-PCR检测结果显示, LV-sh-UBAC2组裸鼠肺组织Luc2 mRNA表达水平明显低于LV-sh-NC组($P<0.05$, 图4D)。

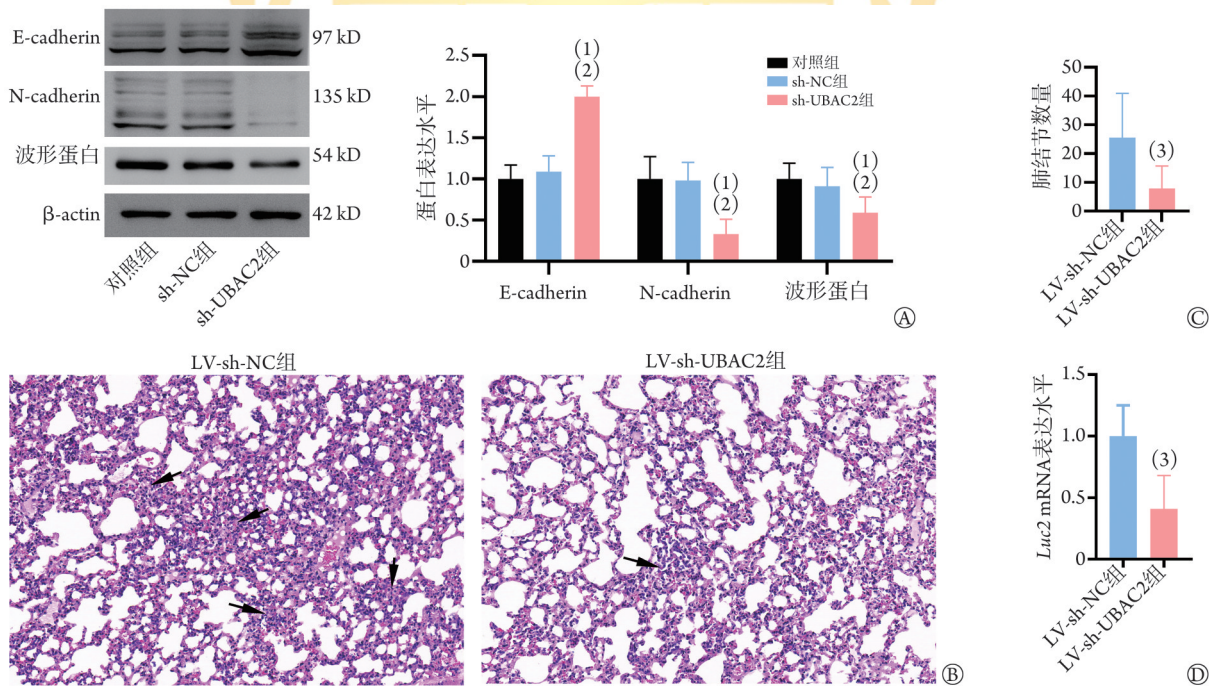
2.4 m⁶A修饰调控UBAC2的表达 RMVar和SRAMP预测结果显示, UBAC2基因存在丰富的m⁶A修饰位点, 提示UBAC2基因极有可能受m⁶A修饰的调控; 其中SRAMP软件显示1440位点的m⁶A具有高度可靠性, 后期重点验证该位点(附图1, <https://dx.doi.org/10.11855/j.issn.0577-7402.0858.2025.0528FJ>)。GEPIA2.0数据库分析结果显示, WTAP与UBAC2表达呈正相关($r=0.24$, $P<0.001$; 图5A)。qRT-PCR和Western blotting检测结果显示, 与对照组比较, si-NC组SW480细胞中WTAP、UBAC2 mRNA和蛋白表达水平



UBAC2. 泛素相关结构域样蛋白2; A. Transwell实验检测细胞侵袭能力; B. Transwell实验检测细胞迁移能力; 与对照组比较, (1) $P < 0.05$; 与sh-NC组比较, (2) $P < 0.05$

图3 UBAC2敲低对结肠癌细胞SW480侵袭和迁移能力的影响

Fig.3 The impact of UBAC2 knockdown on cell invasion and migration of colon cancer SW480 cells



UBAC2. 泛素相关结构域样蛋白2; EMT. 上皮-间质转化; A. Western blotting检测各组结肠癌细胞SW480中EMT标志性蛋白E-cadherin、N-cadherin和波形蛋白的表达水平; B. 裸鼠体内转移模型肺组织HE染色($\times 200$); 黑色箭头示肿瘤浸润; C. 肿瘤肺转移结节量化结果; D. qRT-PCR检测肺组织中Luc2 mRNA表达水平; 与对照组比较, (1) $P < 0.05$; 与sh-NC组比较, (2) $P < 0.05$; 与LV-sh-NC组比较, (3) $P < 0.05$

图4 UBAC2敲低对结肠癌细胞EMT进程的影响

Fig.4 The impact of UBAC2 knockdown on EMT process in colon cancer cells

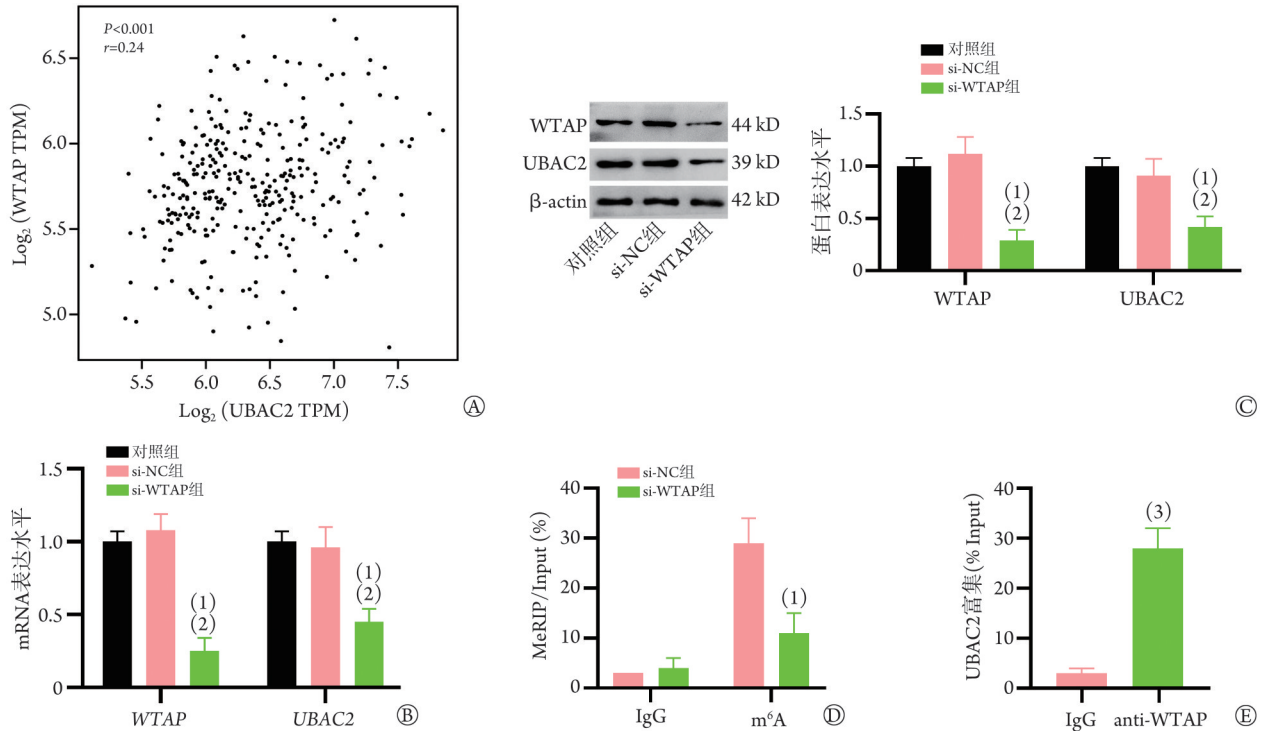
差异均无统计学意义($P > 0.05$); 与si-NC组比较, si-WTAP组SW480细胞中WTAP、UBAC2 mRNA和蛋白表达水平均明显降低($P < 0.05$, 图5B、C)。MeRIP-qPCR实验结果显示, 与si-NC组比较, si-WTAP组UBAC2 mRNA的m⁶A修饰水平明显降低($P < 0.05$,

图5D)。RIP-qPCR实验进一步证实WTAP能够与UBAC2 mRNA相结合(图5E)。

2.5 WTAP通过UBAC2调控结肠癌细胞EMT进程
与对照组比较, si-WTAP组SW480细胞中UBAC2蛋白表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$); 与si-WTAP

组比较, si-WTAP+OE-UBAC2组 SW480 细胞中 UBAC2 蛋白表达水平明显升高($P<0.05$, 图 6A)。与对照组比较, si-WTAP 组 SW480 细胞中 E-cadherin 蛋白表达水平明显升高, N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表

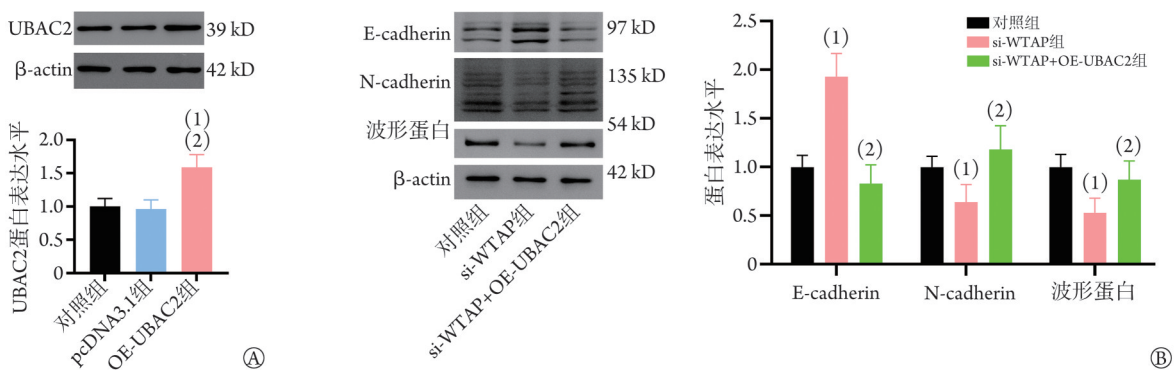
达水平明显降低($P<0.05$); 与 si-WTAP 组比较, si-WTAP+OE-UBAC2 组 SW480 细胞中 E-cadherin 蛋白表达水平明显降低, N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达水平明显升高($P<0.05$, 图 6B)。



UBAC2. 泛素相关结构域样蛋白2; WTAP. Wilms 肿瘤 1 相关蛋白; A. GEPIA2.0 数据库中 WTAP 与 UBAC2 的相关性分析; B. qRT-PCR 检测 UBAC2、WTAP mRNA 表达水平; C. Western blotting 检测 UBAC2、WTAP 蛋白表达水平; D. MeRIP-qPCR 检测 UBAC2 mRNA 的 m⁶A 甲基化修饰水平; E. RIP-qPCR 验证 WTAP 与 UBAC2 mRNA 的结合情况; 与对照组比较, (1) $P<0.05$; 与 si-NC 组比较, (2) $P<0.05$; 与 IgG 组比较, (3) $P<0.05$

图 5 WTAP 通过 m⁶A 修饰调控结肠癌细胞中 UBAC2 的表达

Fig.5 UBAC2 expression was regulated by WTAP in m⁶A-dependent manner in colon cancer cells



UBAC2. 泛素相关结构域样蛋白2; EMT. 上皮-间质转化; A. Western blotting 检测 UBAC2 蛋白表达水平; B. Western blotting 检测 EMT 标志性蛋白 E-cadherin、N-cadherin 和 Vimentin 的表达水平; 与对照组比较, (1) $P<0.05$; 与 si-WTAP 组比较, (2) $P<0.05$

图 6 WTAP 敲低及 UBAC2 过表达对结肠癌细胞 SW480 EMT 的影响

Fig.6 The influence of WTAP knockdown and UBAC2 overexpression on EMT process in colon cancer SW480 cells

3 讨论

抑制肿瘤细胞的 EMT 进而抑制肿瘤的侵袭和转移是改善结肠癌患者预后的重要策略^[6,16-17]。有研究

显示, UBAC2 在膀胱癌^[11]和甲状腺乳头状癌^[12]中高表达, 参与肿瘤的发生发展过程。然而, 目前鲜见 UBAC2 与结肠癌的相关研究。GEPIA2.0 数据库分析及细胞实验结果均显示 UBAC2 在结肠癌组织及细胞

中高表达,且UBAC2表达水平随着结肠癌分期增加而逐渐升高。

EMT与肿瘤的发生、侵袭和转移密切相关^[18-19]。E-cadherin是上皮细胞标志蛋白,N-cadherin和Vimentin是间质细胞标志蛋白。本研究结果显示,UBAC2敲低导致结肠癌细胞中E-cadherin蛋白表达水平升高,而Vimentin和N-cadherin蛋白表达水平降低,提示UBAC2敲低可抑制结肠癌细胞的EMT进程;功能实验结果显示,UBAC2敲低可抑制结肠癌细胞的侵袭和迁移能力,小鼠体内实验进一步证实UBAC2敲低抑制了结肠癌细胞的肺转移;表明UBAC2敲低可能通过抑制EMT进程来抑制结肠癌细胞的侵袭和迁移,进而抑制结肠癌细胞转移。

研究发现,UBAC2在膀胱癌^[11]和甲状腺乳头状癌^[10]中的表达水平越高患者预后越差^[11-12]。目前,UBAC2与结肠癌患者预后的关系尚不清楚。虽然,本研究使用Kaplan-Meier plotter在线工具(<https://kmplot.com/analysis/>)进行分析,结果显示,UBAC2与结肠癌患者OS无明显相关性,但并不能表明UBAC2与结肠癌的EMT无关,因为肿瘤的EMT与肿瘤预后并非绝对必然相关,肿瘤预后还受肿瘤分期、肿瘤类型、患者情况、治疗方式等多种因素影响^[20-25]。因此,本研究结果与预后结果并不矛盾。

m⁶A修饰在肿瘤的发生发展中发挥重要的调控作用^[26-30]。WTAP是m⁶A甲基转移酶复合物的关键组成部分,可招募m⁶A甲基转移酶METT13和METTL14与相应的mRNA靶点共催化m⁶A的形成^[29]。WTAP参与调控胆管癌^[30]、胶质母细胞瘤^[31]、卵巢癌^[32]以及结肠癌^[33-36]等多种肿瘤的增殖、迁移、侵袭。本研究采用在线工具RMVar和SRAMP预测发现UBAC2上存在丰富的m⁶A修饰位点;进一步通过MeRIP-qPCR检测证实,WTAP敲低后,UBAC2 mRNA的m⁶A修饰水平明显降低,UBAC2蛋白和mRNA表达水平明显降低,EMT表型也被抑制,而UBAC2过表达部分逆转了WTAP敲低的作用。

综上所述,本研究结果表明,UBAC2在结肠癌组织及细胞中高表达,且其表达受m⁶A修饰调控,而UBAC2敲低可抑制结肠癌细胞的侵袭、迁移能力及EMT进程,抑制结肠癌细胞肺转移。本研究从RNA表观遗传学角度探讨UBAC2在结肠癌中发挥作用的分子机制,为结肠癌的治疗提供了新靶点和新思路。本研究尚存在如下局限:本研究采用尾静脉注射结肠癌细胞系建立肿瘤体内转移裸鼠模型,不能再现真实的自然转移过程,需要进一步采用条件性诱导结肠组织特异性UBAC2基因敲除小鼠构建自发结肠癌小鼠模型,或构建原位结肠癌小鼠模型以验证UBAC2对结肠癌EMT及转移的影响。

【参考文献】

- [1] Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, *et al.* Cancer statistics, 2023[J]. *CA Cancer J Clin*, 2023, 73(1): 17-48.
- [2] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249.
- [3] Qu R, Ma Y, Zhang Z, *et al.* Increasing burden of colorectal cancer in China[J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2022, 7(8): 700.
- [4] 史益凡,沈晓明,杨增辉,等.结肠癌根治术后严重并发症危险因素分析及动态列线图预测模型构建[J].*解放军医学杂志*, 2024, 49(4): 416-425.
- [5] 张婷,姚宁华,王馨,等.β-微管蛋白在不同部位结肠癌组织中表达差异及与患者预后相关性[J].*临床军医杂志*, 2024, 52(3): 306-308.
- [6] Lu J, Kornmann M, Traub B. Role of epithelial to mesenchymal transition in colorectal cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(19): 14815.
- [7] Lan Q, Liu PY, Haase J, *et al.* The critical role of RNA m⁶A methylation in cancer[J]. *Cancer Res*, 2019, 79(7): 1285-1292.
- [8] Wang T, Kong S, Tao M, *et al.* The potential role of RNA N⁶-methyladenosine in cancer progression[J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 88.
- [9] Cui J, Tian J, Wang W, *et al.* IGF2BP2 promotes the progression of colorectal cancer through a YAP-dependent mechanism[J]. *Cancer Sci*, 2021, 112(10): 4087-4099.
- [10] Wang S, Gan M, Chen C, *et al.* Methyl CpG binding protein 2 promotes colorectal cancer metastasis by regulating N⁶-methyladenosine methylation through methyltransferase-like 14[J]. *Cancer Sci*, 2021, 112(8): 3243-3254.
- [11] Gu C, Zhao K, Zhou N, *et al.* UBAC2 promotes bladder cancer proliferation through BCRC-3/miRNA-182-5p/p27 axis[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(9): 733.
- [12] Han J, Chen M, Fang Q, *et al.* Prediction of the prognosis based on chromosomal instability-related DNA methylation patterns of ELOVL2 and UBAC2 in PTCs[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, 18: 650-660.
- [13] Nan H, Xu M, Kraft P, *et al.* Genome-wide association study identifies novel alleles associated with risk of cutaneous basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma[J]. *Hum Mol Genet*, 2011, 20(18): 3718-3724.
- [14] Chen J, Wu Y, Luo X, *et al.* Circular RNA circRHOBTB3 represses metastasis by regulating the HuR-mediated mRNA stability of PTBP1 in colorectal cancer[J]. *Theranostics*, 2021, 11(15): 7507-7526.
- [15] Chen X, Xu M, Xu X, *et al.* METTL14-mediated N⁶-methyladenosine modification of SOX4 mRNA inhibits tumor metastasis in colorectal cancer[J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 106.
- [16] Sabouni E, Nejad MM, Mojtavani S, *et al.* Unraveling the function of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in colorectal cancer: metastasis, therapy response, and revisiting molecular pathways[J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 160: 114395.
- [17] 吴文章,张凡,贾祺,等.MAGE-A4在肿瘤诊断与免疫治疗中的作用研究进展[J].*解放军医学杂志*, 2023, 48(7): 834-840.
- [18] Zhang N, Ng AS, Cai S, *et al.* Novel therapeutic strategies: targeting epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer[J]. *Lancet Oncol*, 2021, 22(8): e358-e368.

- [19] 魏雁虹, 杨晨雪, 杨广民, 等. 下调HMGB2表达对肝癌LM3细胞上皮-间质转化的抑制作用及其AKT/mTOR信号通路机制[J]. 吉林大学学报(医学版), 2024, 50(1): 143-149.
- [20] Bakir B, Chiarella AM, Pitarresi JR, *et al.* EMT, MET, plasticity, and tumor metastasis[J]. *Trends Cell Biol*, 2020, 30(10): 764-776.
- [21] Zheng X, Carstens JL, Kim J, *et al.* Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer[J]. *Nature*, 2015, 527(7579): 525-530.
- [22] 曹勤琛, 赵路军, 王平. 非小细胞肺癌中EMT的发生机制及预后价值的研究进展[J]. 中国肺癌杂志, 2014, 17(7): 569-574.
- [23] Antony J, Thiery JP, Huang RY. Epithelial-to-mesenchymal transition: lessons from development, insights into cancer and the potential of EMT-subtype based therapeutic intervention[J]. *Phys Biol*, 2019, 16(4): 041004.
- [24] 施长鹰, 董志涛, 廖博懿, 等. 不同部位结肠癌肝转移临床病理特点及其术后预后影响因素分析[J]. 中华肝脏外科手术学电子杂志, 2020, 9(4): 324-328.
- [25] 雷海科, 王璐璐, 李小升, 等. 重庆市结肠癌患者生存影响因素及预后分析[J]. 肿瘤, 2020, 40(3): 206-214.
- [26] An Y, Duan H. The role of m⁶A RNA methylation in cancer metabolism[J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 14.
- [27] 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.
- [28] 周海霞, 张靖. m⁶A甲基化修饰调控肿瘤免疫的研究进展[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2024, 44(1): 137-144.
- [29] Ping XL, Sun BF, Wang L, *et al.* Mammalian WTAP is a regulatory subunit of the RNA N⁶-methyladenosine methyltransferase[J]. *Cell Res*, 2014, 24(2): 177-189.
- [30] Jo HJ, Shim HE, Han ME, *et al.* WTAP regulates migration and invasion of cholangiocarcinoma cells[J]. *J Gastroenterol*, 2013, 48(11): 1271-1282.
- [31] Jin DI, Lee SW, Han ME, *et al.* Expression and roles of Wilms' tumor 1-associating protein in glioblastoma[J]. *Cancer Sci*, 2012, 103(12): 2102-2109.
- [32] Barbolina MV, Adley BP, Shea LD, *et al.* Wilms tumor gene protein 1 is associated with ovarian cancer metastasis and modulates cell invasion[J]. *Cancer*, 2008, 112(7): 1632-1641.
- [33] Wang S, Fan X, Zhu J, *et al.* The differentiation of colorectal cancer is closely relevant to m⁶A modification[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 546: 65-73.
- [34] Liang H, Lin Z, Ye Y, *et al.* ARRB2 promotes colorectal cancer growth through triggering WTAP[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2021, 53(1): 85-93.
- [35] Dong XF, Wang Y, Tang CH, *et al.* Upregulated WTAP expression in colorectal cancer correlates with tumor site and differentiation[J]. *PLoS One*, 2022, 17(2): e0263749.
- [36] You A, Tian W, Yuan H, *et al.* TTC22 promotes m⁶A-mediated WTAP expression and colon cancer metastasis in an RPL4 binding-dependent pattern[J]. *Oncogene*, 2022, 41(32): 3925-3938.

(责任编辑: 纪方方)



解放军医学杂志®