

# METTL14 在结肠癌根治术后患者中的临床意义

谭明华, 胡海涛, 区小卫, 廖建南, 冯伟清, 朱劲涛  
佛山市禅城区中心医院 普外科, 广东 佛山 528031

**【摘要】** 目的 探讨 METTL14 与结肠癌的临床病理特点和预后的关系。方法 分别通过免疫组织化学和 Western blot 的方法分析 66 例接受根治手术的结肠癌患者中 METTL14 的表达水平, 同时结合 TCGA 和人类蛋白质图谱图像分类(Human Protein Atlas)数据库, 分析 METTL14 的表达与临床病理特点与临床预后的关系。结果 我们观察到结肠癌组织中的 METTL14 水平明显低于正常邻近组织。在 TCGA 数据库中也有类似的发现。本研究的数据显示 METTL14 的表达与进展的 T 分期、N 分期和 TNM 分期呈负相关。此外, 在 TCGA 数据库中同样显示 I 期的结肠癌患者 METTL14 的 mRNA 水平明显高于 II、III 和 IV 期患者。本组研究中 METTL14 阳性和 METTL14 阴性组的 5 年生存率分别为 73.9% 和 32.6%, 生存差异具有显著的统计学意义。多变量 Cox 回归分析显示, 只有 T 分期和 METTL14 表达水平是本组结肠癌患者的独立预后因素。在 Human protein atlas 数据库中观察到类似的结果。METTL14 高表达组与低表达组的生存差异具有统计学意义(分别为 70% 和 59%,  $P=0.006$ )。结论 METTL14 低表达可能提示结肠癌的恶性肿瘤生物学行为, 并可作为评估生存预后的预测生物标志物。

**【关键词】** 结肠癌; METTL14; 临床病理; 生存预后

## Clinical value of METTL14 in colon cancer patients after radical surgery

Tan Minghua, Hu Haitao, Ou Xiaowei, Liao Jiannan, Feng Weiqing, Zhu Jingtao

Department of General Surgery, Chancheng District Central Hospital of Foshan City, Foshan 528031, China

Corresponding author: Tan Minghua, E-mail: tmh@fscyy.com

**【Abstract】** **Objective** METTL14 was known to be involved in all stages in the life cycle of RNA. However, whether METTL14 had a close relationship with the clinical parameters and prognosis of colon cancer was not reported yet. **Methods** METTL14 was studied in TCGA datasets, Human protein atlas datasets and in 66 colon cancer following radical surgery. The level of METTL14 was evaluated by immunohistochemistry (IHC) and Western blot and correlated with clinicopathological variables and clinical outcome. **Results** We observed that the level of METTL14 in colon cancer was significantly lower than the one in the normal adjacent tissues. A similar result was found in the TCGA datasets. We confirmed a adverse association between the expression of METTL14 and advanced T stage, N stage and TNM stage. Moreover, METTL14 mRNA level in stage I was significantly higher than the one in stage II, III and IV. The 5 year survival rate of METTL14 positive and METTL14 negative group was 73.9% and 32.6% in this study, and the survival difference had statistical significance. Multivariate Cox regression analysis revealed that only T stage and the expression of METTL14 were the independent prognostic factors. A similar founding was observed in the Human protein atlas datasets. There was significant difference between METTL14 high expression group and low expression group (70% vs 59%,  $P=0.006$ ). **Conclusions** Our findings suggested that low expression of METTL14 could be used to determine the aggressiveness of colon cancer and could be predicted the long-term survival outcome.

**【Key words】** Colon cancer; METTL14; Clinicopathological features; Survival outcome

结肠癌是常见的恶性肿瘤之一,由于早期结肠癌无明显的临床症状及体征,结直肠癌筛查工作开展难度大,结肠癌的发病率仍居高不下。据最新的2018年Globocan研究数据显示,结肠癌发病率高居恶性肿瘤第三位,分别占有恶性肿瘤的10.2%。尽管随着结肠癌手术方式的规范化、化疗药物的进步、治疗措施的多样化,结肠癌仍然是威胁人类健康最常见的致死性肿瘤之一。Globocan研究数据显示结肠癌的死亡率高居所有恶性肿瘤的第二位,占9.2%<sup>[1]</sup>。因此对结肠癌患者进行有效的治疗及预后监测,具有重要的临床实际意义。

近年来越来越多的研究结果显示表观遗传学可能参与肿瘤的发生、发展,在肿瘤研究领域占据关键作用<sup>[2]</sup>。甲基化修饰是广泛存在于人体内的一种RNA修饰方式,并在多种恶性肿瘤中发挥关键作用<sup>[3]</sup>。m6A甲基化是最为常见的甲基化修饰方式。m6A甲基化是指当RNA分子腺苷酸上第六位氮原子通过甲基转移酶催化而发生的甲基化修饰表现<sup>[4]</sup>。目前m6A甲基化修饰的作用很多,包括维持mRNA稳定、mRNA前体剪切、多腺苷酸化、mRNA运输与翻译起始、出核转运、翻译起始,以及与polyA结合蛋白一起维持mRNA的结构稳定。一旦参与m6A修饰的酶出现异常会引起一系列疾病,包括肿瘤、神经性疾病、机体发育异常等<sup>[5]</sup>。METTL14作为m6A甲基化修饰的关键功能组成部分,可能对调控m6A甲基化修饰发挥关键作用。因此本研究通过比较结肠癌及其癌旁组织的METTL14的表达差异,了解METTL14与结肠癌临床病理及生存预后的关系,为结肠癌的诊断、基因治疗及预后标志物提供新的分子生物学指标。

## 1 资料与方法

1.1 一般资料 本实验回顾性分析2013年1月至2014年12月佛山市禅城区中心医院普外科的手术病例。本研究入选标准如下:术后病理均证实为结肠腺癌;所有行根治手术的患者均未接受术前新辅助化疗、放疗、放化疗或免疫治疗等抗肿瘤治疗措施;既往无存在恶性肿瘤病史,入院时未发现其他部位的原发恶性肿瘤;有完整的临床病理资料及随访信息。最终本研究入组结肠癌患者66例。其中,年龄25~85(60.6±12.5)岁;男43例,女23例,男女比例为1.87:1.00;肿瘤位于结肠37

例,肿瘤位于直肠29例;同时在肿瘤相邻结肠正常黏膜采集组织标本20例。

1.2 主要试剂 鼠抗人METTL14(ab220030)单克隆抗体购自Abcam公司;兔抗大鼠GAPDH(BM1623)二抗购自博士德公司。免疫组织化学EliVision™ P路上检测试剂盒购自中国福州迈新生物技术开发有限公司。

1.3 免疫组化 按照EliVision™ super/HRP试剂盒说明进行免疫组化染色。主要步骤为:病理蜡块切成4 μm的厚度后,按要求进行二甲苯脱蜡、不同浓度的乙醇脱水;在95℃的枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0)中15 min进行抗原热修复,在切片上滴加3%过氧化氢溶液并在室温中孵育10 min后用磷酸盐缓冲液冲洗。加入一抗(鼠抗人METTL14,1:150稀释),4℃孵育过夜,并以PBS作为阴性对照。分别滴加放大剂及辣根过氧化物酶标记的二抗在室温下孵育20 min。滴加DAB溶液显色,苏木精复染、二甲苯透明处理、中性树脂封片。

免疫组织化学结果判定标准参照Pilotti标准。随机选取5个高倍镜视野,并在400×高倍镜视野下观察细胞,要求每个视野的细胞个数不少于300个。METTL14阳性染色正常位于胞核内。结果评分根据阳性细胞比例与染色强度之和。阳性细胞比例分别将≤25%、25%~50%、50%~75%、>75%定义为0分、1分、2分、3分。染色程度分别将无着色、淡黄色、黄色、棕黄色定义为0分、1分、2分、3分。总评分为0~3分定义为阴性表达,4~7分定义为阳性表达。

1.4 免疫印迹实验 将新鲜结肠癌及癌旁组织研磨至粉末后,加入RIPA裂解液及蛋白酶抑制剂,提取蛋白上清后采用BCA蛋白浓度测定试剂盒检测样本蛋白浓度。提取20 μg蛋白用于10%的SDS-PAGE凝胶电泳,转膜至PVDF膜,5%的BSA在4℃下封闭过夜,加入鼠抗人METTL14单克隆一抗(1:200)室温孵育2小时,后予兔抗大鼠GAPDH二抗(1:500)室温孵育1小时,TBST洗膜,化学发光法ECL试剂显色,显影、定影、曝光。

1.5 统计方法 采用SPSS 20.0统计软件进行统计学处理。计量资料以均数( $\bar{x}$ )±标准差( $s$ )表示,数据比较采用两独立样本 $t$ 检验。生存分析采用Life-table法,生存图绘制采用Kaplan-Meier检验,生存资料比较采用Log-rank法检验,生存的多因素分析采用Cox regression (Backward Wald)方

法。 $P < 0.05$  表明差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 METTL14 在结肠癌组织和癌旁正常组织的表达分析** IHC 结果显示无论是癌旁组织或结肠癌组织中 METTL14 的表达均位于细胞核内,细胞质及细胞核内的表达并不多见。其中 METTL14 蛋白在癌旁正常组织中(12/20, 60.0%)的表达阳性率显著高于结肠癌组织(23/66, 34.8%),差异具有显著的统计学意义( $\chi^2=4.023, P=0.045$ )。具体见图 1。

以 GAPDH 作为 Western blot 的内参,结果显示 METTL14 蛋白在结肠癌组织中的表达明显低于配对癌旁正常组织。具体见图 2。

通过 TCGA 数据库,结果同样显示 METTL14 在结肠癌组织中的表达显著低于癌旁正常组织,差异同样具有显著的统计学差异( $P < 0.001$ ),具体见图 3。

**2.2 METTL14 表达与结肠癌临床病理特点的关系** 通过免疫组化结果分析 METTL14 表达与结肠癌临床病理特点的关系,结果见表 1。结果显示 METTL14 的表达与肿瘤的年龄、性别、手术方式以及组织分化类型等无相关性,均无统计学意义( $P >$

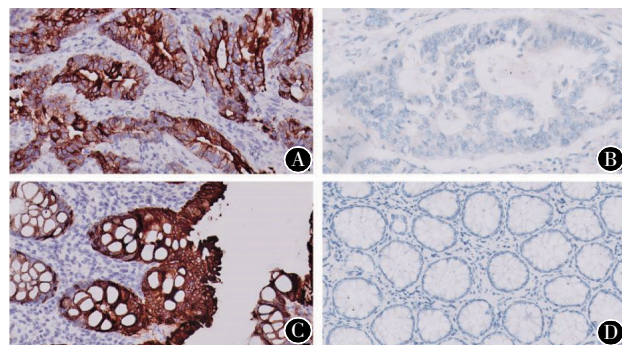


图 1 免疫组化(IHC)方法检测结肠癌组织及癌旁正常组织中 METTL14 的表达(20×)

注:A. 结肠癌组织, METTL14 阳性;B. 结肠癌组织, METTL14 阴性;C. 癌旁正常组织, METTL14 阳性;D. 癌旁正常组织, METTL14 阴性

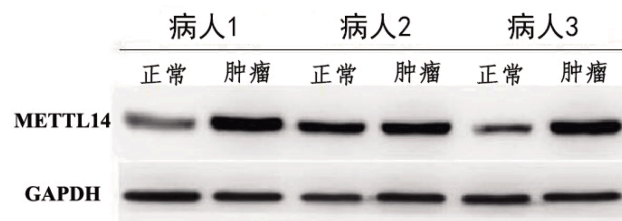


图 2 Western blot 检测 METTL14 蛋白在癌旁组织和结肠癌组织中的表达情况

0.05)。然而 METTL14 蛋白的表达与肿瘤的浸润深度、N 分期、TNM 分期呈负相关( $P < 0.05$ ),浸润深度深、淋巴转移、TNM 分期较晚患者的 METTL14 表达水平越低。

采用 TCGA 数据库进行分析,结果如图 4 所示,随时肿瘤分期的增加, METTL14 的表达水平呈进行性下降的趋势。其中 II 期、III 期、IV 期的结肠癌患者中 METTL14 的 mRNA 表达量明显低于 I 期患者,差异均具有显著的统计学意义( $P < 0.05$ )。

**2.3 METTL14 蛋白表达与结肠癌生存预后的关系** 本研究中位随访时间为 52.0 月。其中 METTL14 阳性组的 5 年生存率为 73.9%,中位随访, METTL14 阴性组的 5 年生存率为 32.6%,生存资料图详见图 5。Log-rank 分析的结果显示两组资料的生存差异比较具有显著的统计学意义( $\chi^2=9.697, P=0.002$ )。

Cox 回归分析的结果见表 2。结果显示年龄、性别、手术类型、组织类型与本组结肠癌患者的预后无明显相关性,而 T 分期、淋巴转移、TNM 分

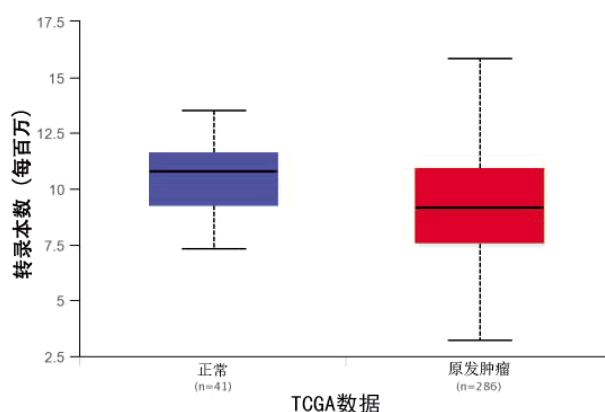


图 3 分析 TCGA 数据库中 METTL14 在癌旁组织和结肠癌组织中的表达情况

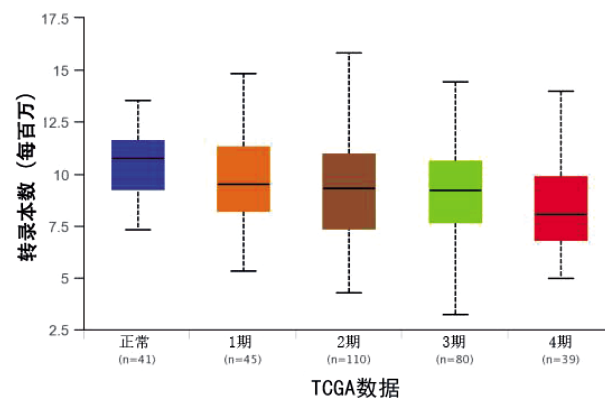


图 4 分析 TCGA 数据库中不同肿瘤分期中, METTL14 在结肠癌组织中的表达情况

期、METTL14 的表达水平是影响本组结肠癌患者预后的因素,差异均具有显著的统计学意义。我们进而将与生存预后相关的单因素纳入 Cox 多因素回归分析,结果显示仅 T 分期 ( $P=0.012$ ) 和 METTL14 ( $P=0.017$ ) 是影响本组结肠癌患者的独立预后因素。

Human protein atlas 数据库的结果显示 METTL14 的中位截点值为 2.74, 最佳截点值为 3.28。以 METTL14 基因表达量的最佳截点值 3.28 为界, 将患者分为 2 组: METTL14 高表达组和

METTL14 低表达组。结果显示 METTL14 高表达组 (127 例) 的 5 年生存率为 70%, METTL14 低表达组 (470 例) 的 5 年生存率为 59%, 差异具有显著的统计学意义 ( $P=0.006$ ) (图 6)。

### 3 讨论

早在 20 世纪 70 年代, 学者们就在真核生物的信使 RNA (message RNA, mRNA) 上发现了 m6A 甲基化修饰的现象。m6A 甲基化修饰广泛存在于各种真核生物的 mRNA 及其他非编码 RNA 中, 其中在真核生物体内 RNA 甲基化修饰的比例超过 80%<sup>[6]</sup>。由于 m6A 甲基化是在不改变碱基序列的状态下调控癌基因或抑癌基因转录后的表达水平, 其调控机制远比 DNA 甲基化复杂得多。但目前 m6A 甲基化修饰在肿瘤中发挥着的生物学功能目前尚不明确。m6A 甲基化修饰的过程中, 分别

表 1 METTL14 与结肠癌临床病理特点的关系 [n(%)]

影响因素	例数	METTL14		$\chi^2$ 值	P 值
		阳性	阴性		
性别				0.285	0.593
男	43	14(60.9)	29(67.4)		
女	56	9(39.1)	14(32.6)		
年龄				0.699	0.403
≤60 岁	27	11(47.8)	16(37.2)		
>60 岁	39	12(52.2)	27(62.8)		
手术方式				1.853	0.173
右半结肠	27	12(52.2)	15(34.9)		
左半结肠+乙状结肠	39	11(47.8)	28(65.1)		
组织分型				3.270	0.071
分化佳	33	15(65.2)	18(41.9)		
分化差	33	8(34.8)	25(58.1)		
浸润深度				7.930	0.005
T1+T2	25	14(60.9)	11(25.6)		
T3+T4	41	9(39.1)	32(74.4)		
淋巴转移				3.875	0.049
无	35	16(69.6)	19(44.2)		
有	31	7(30.4)	24(55.8)		
TNM 分期				8.502	0.014
I	9	6(26.1)	3(7.0)		
II	22	10(43.5)	12(27.9)		
III	35	7(30.4)	28(65.1)		

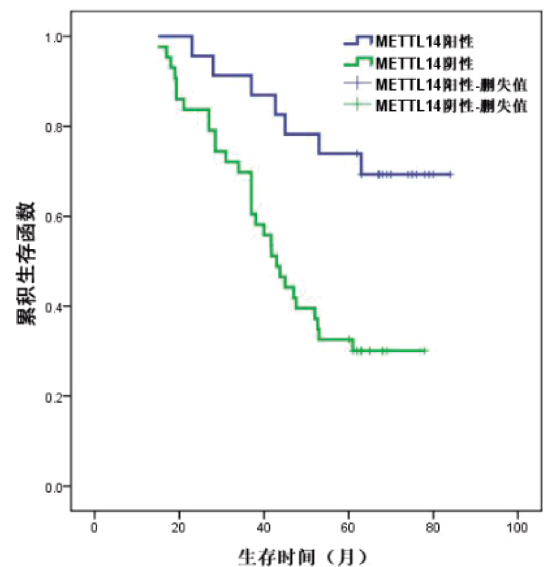


图 5 通过 Kaplan-Meier 法检测本组 66 例结肠癌患者 METTL14 表达状况与预后的关系

表 2 66 例可根治结肠癌患者生存预后分析

临床特征	单因素分析				多因素分析			
	$\chi^2$ 值	95%CI		P 值	$\chi^2$ 值	95%CI		P 值
		下限	上限			下限	上限	
年龄	0.002	-	-	0.965				
性别	0.087	-	-	0.768				
手术方式	0.088	-	-	0.767				
分化程度	3.321	-	-	0.068				
T 分期	9.195	1.539	7.447	0.002	6.296	1.252	6.222	0.012
淋巴转移	8.066	1.194	2.634	0.005				
TNM 分期	5.460	1.105	3.130	0.019				
METTL14 表达	8.466	1.494	7.830	0.004	5.685	1.200	6.465	0.017

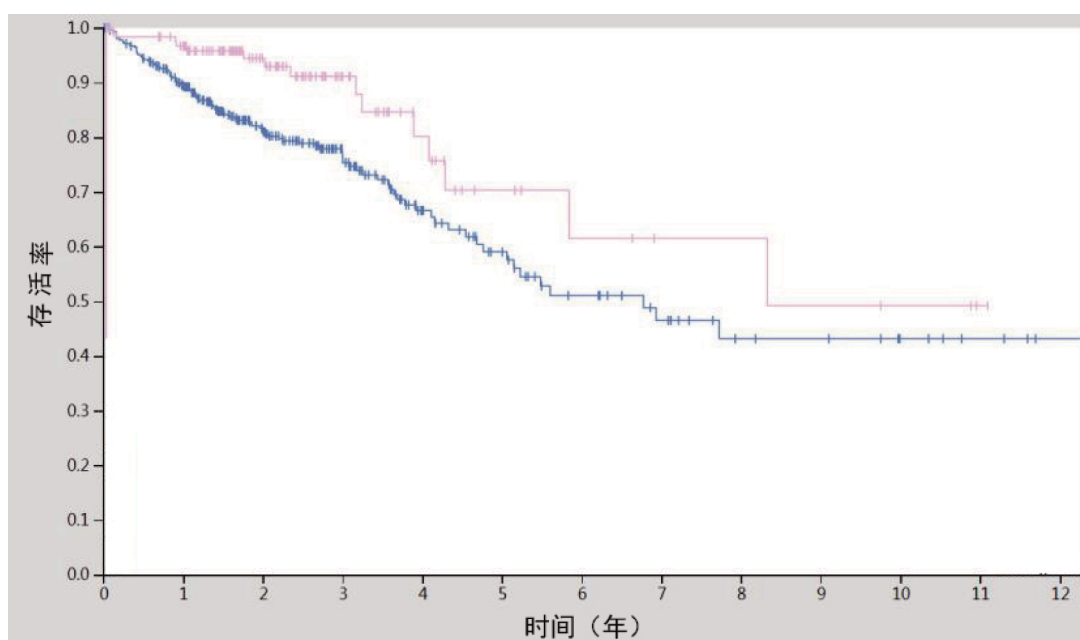


图6 分析 Human protein atlas 数据库,探讨 METTL14 表达水平与结肠癌患者预后的关系

由写入基因(writers)、擦除基因(erasers)和读取基因(readers)共同发挥作用。METTL3、METTL14和WATP等m6A甲基转移酶形成复合物促使m6A甲基化基团写入RNA中,从而让下游的靶RNA发生m6A甲基化修饰,因此m6A甲基转移酶又被称为writers<sup>[7]</sup>。METTL14是writers复合物的核心组成部分。在Hela细胞中,METTL14表达缺陷会导致m6A甲基化水平下降30%,通过免疫荧光实验结果显示METTL14定位在富含剪切因子的细胞核内亚细胞器-核小班上,揭示METTL14介导的m6A修饰可能和RNA的剪切加工密切相关<sup>[8]</sup>。然而METTL14在结肠癌中的表达水平及其表达部位如何,目前国内外的并无相关研究。本研究通过免疫组织化学及Western blot的方法揭示在结肠癌组织METTL14蛋白在癌旁正常组织中的表达阳性率显著高于结肠癌组织。由于本研究样本量偏少,我们进一步通过生物信息学的方法分析美国TCGA数据库,有相近的研究结果,同样揭示METTL14在结肠癌组织中的表达显著降低。提示METTL14的低表达可能是结肠癌中m6A甲基化修饰的关键基因并在结肠癌中发挥关键的肿瘤生物学行为。

METTL14在多种恶性肿瘤的发生发展中已显示多种生物调节功能,如调控肿瘤干细胞的“干性”、肿瘤增殖、肿瘤的侵袭转移和肿瘤免疫<sup>[9]</sup>。METTL14基因表达下调会促进急性髓细胞白血病

细胞的分化,从而促使癌基因SP1 mRNA高m6A甲基化水平,从而调控造血干细胞向急性髓细胞白血病细胞分化。这一研究提示急性髓细胞白血病细胞能够通过靶基因的mRNA在转录后层面调控m6A的甲基化修饰而改变其翻译状态,以此保留急性髓细胞白血病细胞的多功能性从而抑制细胞分化,提示METTL14基因可能成为某些特定类型急性髓细胞白血病的潜在治疗靶点<sup>[10]</sup>。同时METTL14表达下调可降低胶质母细胞瘤的mRNA m6A水平,是维持胶质细胞瘤干样细胞生长、自我更新和肿瘤发展的关键因素<sup>[11]</sup>。在乳腺癌中,METTL14通过m6A修饰作用促进HBXIP基因的过表达,形成HBXIP/let-7g/METTL14/XBXIP的正反馈调节,最终增强乳腺癌的增殖能力<sup>[12]</sup>。因此这也能解释本研究结果中METTL14的低表达与结肠癌恶性临床病理特点相关。METTL14与恶性肿瘤预后的关系的文献并不多,Wu的研究结果显示METTL14与乳腺癌的关系密切,但METTL14的表达水平与预后无明显关系,然而本研究的结果显示METTL14的低表达预示本组结肠癌患者的总体生存期不佳。

本研究通过免疫组化、Western blot及生物信息学的方法分析METTL14蛋白与临床病理特点及生存预后的关系,揭示METTL14表达低提示结肠癌的肿瘤生物学行为差及预后不佳,提示METTL14基因将来可能作为结肠癌的生物预测

指标。但由于本组研究的样本量不大,无关于METTL14的分子机制研究,尚待今后更大规模的临床及基础研究结果验证疗效及揭示其分子机制。

#### 参考文献

- [1] CLAUDIA A, TOMOHIRO M, VERONICA D, et al. Global surveillance of trends in cancer survival 2000 - 14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37?513?025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries [J]. *Lancet*, 2018, 391(10125): 1023- 1075.
- [2] DIENSTMANN R, VERMEULEN L, GUINNEY J, et al. Consensus molecular subtypes and the evolution of precision medicine in colorectal cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2017,17(2):79-92.
- [3] GAO D, HERMAN JG, GUO M. The clinical value of aberrant epigenetic changes of DNA damage repair genes in human cancer[J]. *Oncotarget*, 2016,7(24):37331-37346.
- [4] SUN T, WU R, MING L. The role of m6A RNA methylation in cancer[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019,112:108613.
- [5] WEI W, JI X, GUO X, et al. Regulatory Role of N6 - methyladenosine (m6A) Methylation in RNA Processing and Human Diseases[J]. *J Cell Biochem*, 2017,118(9):2534-2543.
- [6] 王天工, 叶孟. m6A 甲基化与肿瘤研究进展 [J]. *遗传*, 2018,40(12): 1055-1065.
- [7] 地里呼玛尔·吐鲁洪, 曾慧娟, 王少华. m6A 甲基化在肿瘤中的作用研究进展[J]. *东南国防医药*, 2019, 21(4): 402-407.
- [8] SCHÖLLER E, WEICHMANN F, TREIBER T, et al. Interactions, localization, and phosphorylation of the m6A generating METTL3 -METTL14 -WTAP complex [J]. *RNA*, 2018,24(4):499-512.
- [9] 龙文林, 郭辉, 盛杰, 等. m6A RNA 甲基化在肿瘤发生发展中的作用[J]. *生物技术通报*, 2019,35(6): 178-186.
- [10] WENG H, HUANG H, WU H, et al. METTL14 Inhibits Hematopoietic Stem/Progenitor Differentiation and Promotes Leukemogenesis via mRNA m6A Modification [J]. *Cell Stem Cell*, 2018;22(2):191-205.
- [11] CUI Q, SHI H, YE P, et al. m6A RNA Methylation Regulates the Self-Renewal and Tumorigenesis of Glioblastoma Stem Cells [J]. *Cell Rep*, 2017,18(11):2622-2634.
- [12] FRY NJ, LAW BA, ILKAYEVA OR, CARRAWAY KR, HOLLEY CL, MANSFIELD KD. N6 -methyladenosine contributes to cellular phenotype in a genetically -defined model of breast cancer progression[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(58):31231-31243.

·读者·作者·编者·

## 本刊最新出版发行情况说明

《消化肿瘤杂志(电子版)》(国际标准连续出版物号 ISSN 1674-7402, 国内统一连续出版物号 CN 11-9301/R)是国家卫生健康委员会主管、人民卫生出版社有限公司主办、中山大学附属第一医院为主编单位的消化肿瘤专业电子学术期刊。本刊目前为中国科技核心期刊被《中国科技论文统计源期刊》《中国核心期刊(遴选)数据库》《中国学术期刊网络出版总库》《中文科技期刊数据库》全文收录。本刊旨在为广大医务工作者提供了一个优秀的专业论文发表和交流平台。本刊每年主办或参与举办的全国性和区域性大型学术会议达 10 余次,大大促进了消化肿瘤学术领域的交流,同时出版发行量大、覆盖范围广、在国内具有一定的影响力。欢迎各位同仁向本刊投稿,同时欢迎订阅。