



· 论 著 ·

# YTHDF2通过诱导IGFBP7的mRNA衰变激活PI3K/AKT信号转导通路促进胶质母细胞瘤进展的研究

刁新峰<sup>1</sup>, 李新茂<sup>1</sup>, 候亮<sup>2</sup>, 魏志玄<sup>1</sup>

1. 南阳医学高等专科学校第一附属医院神经外科, 河南 南阳 473000 ;
2. 武安市第一人民医院神经外科, 河北 武安 056300

**[摘要]** 背景与目的: N6-甲基腺苷(N6-methyladenosine, m6A)甲基化修饰识别蛋白YTHDF2被证实在癌症进展中扮演重要角色。探讨YTHDF2是否通过促进胰岛素样生长因子结合蛋白7(insulin-like growth factor binding protein 7, IGFBP7)的mRNA衰变, 激活磷脂酰肌醇3-激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)-蛋白激酶B(protein kinase, AKT)信号转导通路, 调控胶质母细胞瘤(glioblastoma, GBM)的细胞周期和凋亡。方法: 采用实时荧光定量聚合酶链反应(real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RTFQ-PCR)检测YTHDF2和IGFBP7在GBM组织和细胞中的表达。通过流式细胞术检测细胞周期和凋亡率。采用蛋白质印迹法(Western blot)检测p-AKT、AKT、p-PI3K和PI3K蛋白表达。采用RNA免疫沉淀(RNA immunoprecipitation, RIP)实验和RNA稳定性实验验证YTHDF2与IGFBP7之间的关系。结果: 与癌旁组织和正常星形胶质细胞系(NHA细胞)相比, YTHDF2在GBM组织和细胞中表达升高, IGFBP7表达降低( $P < 0.05$ )。敲减YTHDF2可诱导GBM细胞周期阻滞和凋亡率升高( $P < 0.05$ )。在GBM细胞中, YTHDF2可通过识别m6A修饰的IGFBP7进而促进IGFBP7 mRNA降解( $P < 0.05$ )。抑制IGFBP7可部分地挽救si-YTHDF2对GBM细胞周期和凋亡的影响( $P < 0.05$ )。此外, YTHDF2还可通过调控IGFBP7激活PI3K/AKT信号转导通路促进GBM恶性进展( $P < 0.05$ )。结论: YTHDF2通过m6A修饰的方式调控IGFBP7的表达, 激活PI3K/AKT信号转导通路以促进GBM细胞恶性生物学行为。

**[关键词]** YTHDF2; 胶质母细胞瘤; 细胞周期; 细胞凋亡

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2022.03.004

中图分类号: R739.41 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2022)03-0218-10

**YTHDF2 promotes progression of glioblastoma via inducing mRNA decay of IGFBP7 and activating PI3K/AKT signaling pathway** Diao Xinfeng<sup>1</sup>, Li Xinmao<sup>1</sup>, Hou Liang<sup>2</sup>, Wei Zhixuan<sup>1</sup> (1. Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital of Nanyang Medical College, Nanyang 473000, Henan Province, China; 2. Department of Neurosurgery, Wu'an First People's Hospital, Wu'an 056300, Hebei Province, China)

Correspondence to: Wei Zhixuan E-mail: 155212056@qq.com

**[Abstract]** **Background and purpose:** N6-methyladenosine (m6A) methylation modification recognition protein YTHDF2 has been shown to play an important role in cancer progression. This research was designed to explore whether YTHDF2 regulated cell cycle and apoptosis of glioblastoma (GBM) via promoting mRNA decay of insulin-like growth factor binding protein 7 (IGFBP7) and activating phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-protein kinase (AKT) signaling pathway. **Methods:** The expressions of YTHDF2 and IGFBP7 in GBM tissues and cells were detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RTFQ-PCR). The cell cycle and apoptosis rate were detected by flow cytometry. Protein expressions of p-AKT, AKT, p-PI3K and PI3K were detected by Western blot. RNA immunoprecipitation (RIP) assay and RNA stability experiment were used to verify the relationship between YTHDF2 and IGFBP7. **Results:** Compared with adjacent tissues and normal astrocyte line (NHA cells) expression of YTHDF2 was increased while expression of IGFBP7 was decreased in GBM tissues and cells (all  $P < 0.05$ ). Knockdown of YTHDF2 could induce GBM cell cycle arrest and increase apoptotic rate ( $P < 0.05$ ). In GBM cells, YTHDF2 could induce IGFBP7 mRNA decay via recognizing m6A modified IGFBP7 ( $P < 0.05$ ). Inhibition of IGFBP7 partially rescued the effects of si-YTHDF2 on GBM cell cycle

基金项目: 河北省医学科学研究重点课题计划项目(20171165)。

通信作者: 魏志玄 E-mail: 155212056@qq.com

and apoptosis (all  $P < 0.05$ ). In addition, YTHDF2 promoted the malignant progression of GBM by regulating IGFBP7 to activate PI3K/AKT signaling pathway ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** YTHDF2 promotes the malignant biological behavior of GBM cells through regulating IGFBP7 expression by means of m6A modification and activating PI3K/AKT signaling pathway.

[Key words] YTHDF2; Glioblastoma; Cell cycle; Cell apoptosis

胶质母细胞瘤 (glioblastoma, GBM) 是常见的原发性脑肿瘤之一, 占脑部肿瘤的80%以上<sup>[1]</sup>。尽管可采用手术和放化疗等多模式综合治疗, 但GBM患者的预后仍然较差<sup>[2]</sup>。GBM形成和发展过程中的复杂分子变化使得识别参与GBM病理生理学过程的关键靶点具有重要意义。

表观遗传修饰与肿瘤发展密切相关, RNA的N6-甲基腺苷 (N6-methyladenosine, m6A) 修饰是一种可逆的动态表观遗传学改变<sup>[3]</sup>。据研究<sup>[4]</sup>报道, YTHDF2作为m6A修饰过程的重要识别蛋白, 能够对结合m6A修饰的RNA进行识别, 进而促进RNA降解, 如YTHDF2通过识别m6A甲基化调节的OCT4基因进而影响OCT4的mRNA表达, 促进肝细胞癌转移。YTHDF2可能通过靶向不同基因的mRNA转录物对不同的癌症发挥作用, 而YTHDF2及其新靶点在GBM发展中的作用仍需要进一步阐明。胰岛素样生长因子 (insulin-like growth factor, IGF) 能够参与细胞生长, 并受一组IGF结合蛋白及其受体调控, IGF结合蛋白7 (IGF binding protein 7, IGFBP7) 是一种分泌性蛋白, 可作为IGF依赖和非依赖的细胞生长调节剂进而发挥作用<sup>[5]</sup>。IGFBP7被发现在GBM中表达显著降低, 具有肿瘤抑制特性<sup>[6]</sup>。然而, IGFBP7在GBM中的分子机制尚未完全明确。本研究旨在探讨YTHDF2是否通过影响m6A修饰的方式调节IGFBP7的mRNA稳定性, 明确YTHDF2在GBM进展中的重要作用及其潜在机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 仪器与试剂

人GBM细胞系 (LN229和U251细胞) 和正常星形胶质细胞系 (NHA细胞) 购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。含有10%胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 的DMEM培养基购

自武汉普诺赛生命科技有限公司。100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素-100 U/mL青霉素混合溶液购自苏州新赛美生物科技有限公司。Lipofectamine<sup>TM</sup>3000试剂购自赛因百奥生物技术 (北京) 有限公司。RIPA裂解缓冲液购自上海尚宝生物科技有限公司。放线菌素D和二辛可宁酸 (bicinchoninic acid, BCA) 法蛋白定量试剂盒购自上海联祖生物科技有限公司。YTHDF1、IGFBP1、p-磷脂酰肌醇3-激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3K)、PI3K、p-蛋白激酶B (protein kinase, AKT)、AKT、 $\beta$ -actin、m6A、免疫球蛋白G (immunoglobulin G, IgG) 和HRP结合的二级抗体均购自英国Abcam公司。超敏型电化学发光 (electrochemical luminescence, ECL) 底物试剂盒购自上海炎熙生物科技有限公司。TRIzol试剂购自上海博湖生物科技有限公司。反转录试剂盒购自北京百奥莱博科技有限公司。YTHDF2、IGFBP7和GAPDH的聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 引物均购自德国Qiagen公司。SYBR Green Realtime PCR Master Mix购自北京索莱宝科技有限公司。PolyATtract<sup>®</sup> mRNA纯化系统购自上海前尘生物科技有限公司。RNA免疫沉淀 (RNA immunoprecipitation, RIP) 试剂盒购自广州伯信生物科技有限公司。MeRIP试剂盒购自上海玉博生物科技有限公司。碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 和Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒购自大连美仑生物技术有限公司。流式细胞仪购自北京盛科信德科技有限公司。

### 1.2 生物信息学分析

GEPIA网站 (<http://gepia.cancer-pku.cn>) 用于预测基因在GBM中的表达水平及相关性分析。GSCA网站 (<http://bioinfo.life.hust.edu.cn/web/GSCALite/>) 用于预测基因在GBM中可能参与的生物学过程。CGGA数据库 (<http://www.cgga.org.cn>) 用于预测YTHDF2的表达水平与GBM患者临床特征的相关性。从UALCAN

网站 (<http://ualcan.path.uab.edu/index.html>) 获取与YTHDF2在GBM具有负相关性的基因。从StarBase网站 (<http://starbase.sysu.edu.cn/index.php>) 获取可与YTHDF2结合的mRNA。通过RMVAR数据库 (<http://rmvar.renlab.org/index.html>) 预测IGFBP7的m6A修饰位点及识别蛋白。LinkedOmics网站 (<http://www.linkedomics.org/admin.php>) 用于预测YTHDF2与PTEN在GBM中表达的相关性。

### 1.3 样本采集

从2020年3月—2021年3月于南阳医学高等专科学校第一附属医院确诊为GBM的患者中收集40对肿瘤组织及匹配的癌旁组织(距离肿瘤组织边缘 $\geq 2$  cm)。所有患者术前均未接受放疗或化疗等治疗。手术结束后, 立即将组织冷冻在液氮中, 于 $-80$  °C保存。本研究得到南阳医学高等专科学校第一附属医院伦理委员会的批准。所有患者在研究开始前均签署书面知情同意书。

### 1.4 细胞培养

LN229、U251和NHA细胞均保存在DMEM培养基中, 添加10%FBS和100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素-100 U/mL青霉素混合溶液, 细胞培养在37 °C、 $\text{CO}_2$ 体积分数为5%的加湿培养箱中。

### 1.5 细胞转染

构建并合成靶向YTHDF2的小干扰RNA (si-YTHDF2)、siRNA阴性对照 (si-NC)、IGFBP7 shRNA (shIGFBP7) 和shRNA阴性对照 (shRNA)。将U251细胞接种在96孔板中, 待细胞融合至80%, 将上述siRNA或shRNA通过Lipofectamine<sup>TM</sup>3000试剂转染至U251细胞中, 转染48 h后, 通过实时荧光定量PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RTFQ-PCR) 检测目的基因的表达水平。

### 1.6 细胞周期检测

采用流式细胞术检测细胞周期分布。将转染后的细胞悬浮在含有10%FBS的磷酸缓冲盐溶液 (phosphate-buffered saline, PBS) 中, 在室温下将细胞固定在水乙醇中24 h。在室温下以 $3\ 000 \times g$ 离心30 s, 弃上清液。将细胞悬浮在100  $\mu\text{L}$  RNase A溶液 (1 mg/mL) 中, 在37 °C下消化

10 min。在黑暗中使用400  $\mu\text{L}$  PI (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 在室温下对细胞染色10 min, 采用流式细胞术分析 $G_0/G_1$ 、S和 $G_2/M$ 期细胞的比例。

### 1.7 细胞凋亡检测

使用Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒检测细胞凋亡率变化。将转染后的U251细胞以 $1 \times 10^5$ 个/孔的密度接种于6孔板中, 培养24 h后在室温下以 $1\ 000 \times g$ 离心5 min。弃上清液, 将细胞重新悬浮在200  $\mu\text{L}$ 结合缓冲液中。用10  $\mu\text{L}$ 膜联蛋白Annexin V-FITC和10  $\mu\text{L}$  PI对细胞进行染色, 在4 °C避光条件下培养30 min。采用流式细胞术检测细胞凋亡, 并使用CXP2.1软件进行分析。通过早期和晚期凋亡细胞的百分比计算凋亡率。

### 1.8 蛋白质印迹法 (Western blot)

使用RIPA裂解缓冲液从组织和细胞中分离总蛋白, 使用BCA法对蛋白浓度进行定量。50  $\mu\text{g}$ 蛋白质裂解物经8%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 转移到聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜上, 用5%脱脂奶粉在室温下封闭1 h。将蛋白条带与YTHDF1 (1 : 1 000)、IGFBP1 (1 : 1 000)、p-PI3K (1 : 1 000)、PI3K (1 : 1 000)、p-AKT (1 : 1 000)、AKT (1 : 1 000) 和 $\beta$ -actin (1 : 1 000) 抗体在4 °C下温育过夜。弃一抗, 加入含吐温-20磷酸缓冲盐溶液 (phosphate-buffered saline with Tween-20, PBST) 洗涤3次。在室温下与HRP结合的二级抗体 (1 : 2 000) 温育2 h。通过超敏型ECL底物试剂盒显色, 使用Image Lab软件进行定量分析。

### 1.9 RIP实验

使用RIP试剂盒进行RIP分析。IP裂解缓冲液用于裂解U251细胞。细胞裂解物与涂有5  $\mu\text{g}$ 特异性抗体 (YTHDF2抗体或IgG抗体) 的磁珠在4 °C下温育过夜。洗涤后, 裂解物用蛋白酶K消化, 纯化与免疫沉淀蛋白质结合的RNA。使用RTFQ-PCR测定IGFBP7的mRNA表达水平。

### 1.10 mRNA稳定性检测

将转染si-NC或si-YTHDF2的U251细胞接种

于6孔板中,用放线菌素D(5 μg/mL)处理细胞0、3或6 h。通过RTFQ-PCR测定IGFBP7的mRNA表达水平。

### 1.11 RTFQ-PCR

使用TRIzol试剂从GBM组织和细胞中提取总RNA。使用反转录试剂盒将mRNA反转录成cDNA。使用SYBR Green Realtime PCR Master Mix进行RTFQ-PCR。以GAPDH作为内参。相对表达水平使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行计算。本实验中使用的PCR引物序列如下:YTHDF2的上游引物序列为5'-CATGAATGGGAAGGGTCCCG-3',下游引物序列为5'-GACGAATGTGTCGCAGT TGG-3';IGFBP7的上游引物序列为5'-TGG AACAAGGTAAAAAGGGGT-3',下游引物序列为5'-TGGTATTTTCATGTAAGGCATAC-3';GAPDH的上游引物序列为5'-CGCTCTGCTCC TGTTTC-3',下游引物序列为5'-ATCCGTT GATCCGACCTTCAC-3'。

### 1.12 统计学处理

使用SPSS 22.0软件对实验数据进行分析。采用 $t$ 检验或Mann-Whitney  $U$ 检验比较两组之间的差异。方差分析或Kruskal-Wallis检验用于多组间的比较分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 YTHDF2在GBM组织和细胞中高表达

利用GEPIA数据库评估正常和GBM样本中m6A识别蛋白(YTHDF1、YTHDF2、YTHDF3、YTHDC1和YTHDC2)的表达水平。发现与正常大脑组织样本相比,GBM组织样本中的YTHDF1、YTHDF2和YTHDF3表达较高(图1A)。在GSCA网站对YTHDF1、YTHDF2、YTHDF3、YTHDC1和YTHDC2在GBM进展中参与的生物学过程进行预测,结果显示,仅YTHDF2在GBM中参与多个生物学过程(图1B)。此外,在CGGA数据库中预测得到YTHDF2的表达与GBM患者的组织学分级( $P = 9.8 \times 10^{-38}$ )、世界卫生组织(World Health

Organization, WHO)分级( $P = 1.8 \times 10^{-24}$ )和IDH突变( $P = 2 \times 10^{-10}$ )显著相关(图1C)。RTFQ-PCR和Western blot显示,与正常组相比,GBM组织中的YTHDF2表达水平显著升高(图1D、1E,  $P < 0.05$ ),与NHA细胞相比,LN229和U251细胞中的YTHDF2也呈高表达( $P$ 均 $< 0.05$ ,图1F)。由于YTHDF2在U251细胞中的表达最为显著,因此选用U251细胞进行后续实验。

### 2.2 敲减YTHDF2可诱导GBM细胞周期阻滞和细胞凋亡

为探究YTHDF2在GBM细胞中的作用,用si-YTHDF2和si-NC转染U251细胞。与si-NC组相比,si-YTHDF2组的YTHDF2表达降低( $P < 0.05$ ,图2A)。采用流式细胞术检测U251细胞的细胞周期,si-YTHDF2组较si-NC组的 $G_0/G_1$ 期细胞比例显著增加,S期减少( $P < 0.05$ ,图2B、2C)。细胞凋亡实验显示,与si-NC组相比,si-YTHDF2组细胞凋亡率明显升高( $P < 0.05$ ,图2D、2E)。

### 2.3 YTHDF2能够识别m6A修饰的IGFBP7进而促进其降解

为探究YTHDF2的下游靶点,将StarBase网站获取的可与YTHDF2结合的mRNA与UALCAN网站获取的与YTHDF2在GBM具有负相关性的基因取交集(图3A),结果为CYBA、TMEM223、RNASEK、IGFBP7、ATP6V0E1和PNKD,将IGFBP7纳入本研究。RTFQ-PCR检测发现,IGFBP7在GBM组织和细胞系中的表达均低于癌旁组织和NHA细胞( $P$ 均 $< 0.05$ ,图3B、3C)。在RMVAR数据库预测得到IGFBP7上存在多个m6A修饰位点,其中YTHDF2可作为RBP识别IGFBP7的m6A修饰位点(图3D)。RIP分析证实了U251细胞中YTHDF2和IGFBP7 mRNA之间的相互作用( $P < 0.05$ ,图3E)。此外,敲减YTHDF2可增加U251细胞中IGFBP7的mRNA表达和蛋白水平( $P$ 均 $< 0.05$ ,图3F~3H)。对U251细胞进行mRNA稳定性分析,与si-NC组细

胞相比, si-YTHDF2组细胞中IGFBP7的中位半衰期显著延长 ( $P < 0.05$ , 图3I)。

2.4 下调IGFBP7可部分地挽救敲减YTHDF2对GBM细胞周期分布和凋亡的调控作用

进一步研究YTHDF2调控IGFBP7在GBM细胞活性中的潜在作用。首先采用RTFQ-PCR确认IGFBP7在si-YTHDF2+shIGFBP7组细胞中的表达较si-YTHDF2+shNC组降低 ( $P < 0.05$ , 图4A)。细胞周期检测结果显示, 与si-YTHDF2+shNC

组相比, si-YTHDF2+shIGFBP7组细胞在G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期比例减少。在细胞分裂的S和G<sub>2</sub>/M期, si-YTHDF2+shIGFBP7组细胞增加 ( $P < 0.05$ , 图4B、4C)。流式细胞术测定数据显示, 与转染shNC的细胞相比, 细胞凋亡率在转染shIGFBP7后明显降低 ( $P < 0.05$ , 图4D、4E)。上述结果表明, 抑制IGFBP7可部分地挽救敲减YTHDF2诱导的GBM细胞周期阻滞和凋亡增加。

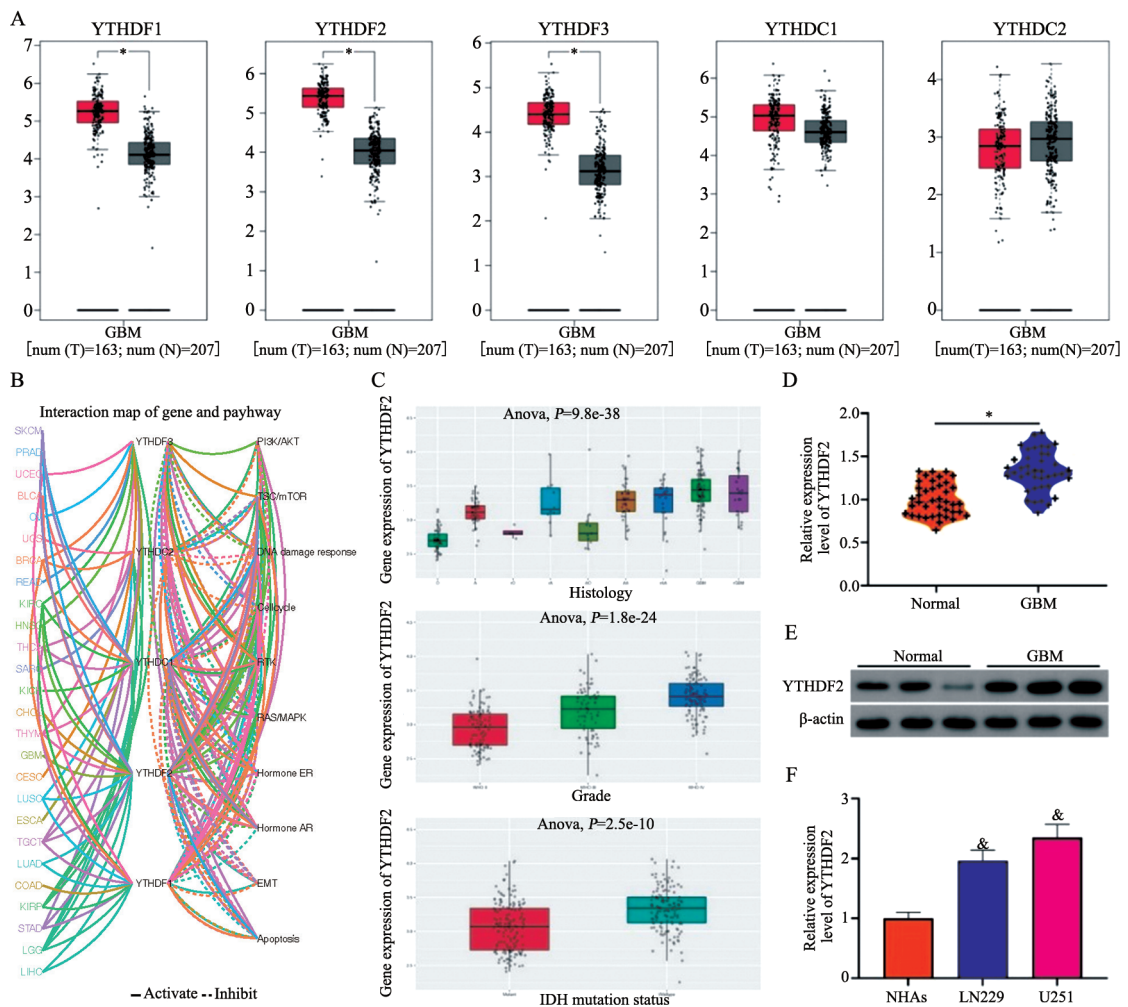


图 1 YTHDF2在GBM组织和细胞中表达上调

Fig. 1 The expression of YTHDF2 is up-regulated in GBM tissue and cells

A: Results predicted by GEPIA website; B: Results predicted by GSCA website; C: CGGA database prediction results; D, E: The expression level of YTHDF2 in GBM tissue and adjacent normal tissue was detected by RTFQ-PCR and Western blot ( $n = 40$ ); F: The expression level of YTHDF2 in GBM cells (LN229 and U251) and NHAs cells was detected by RTFQ-PCR. \*:  $P < 0.05$ , compared with Normal group; &:  $P < 0.05$ , compared with NHAs cell group.

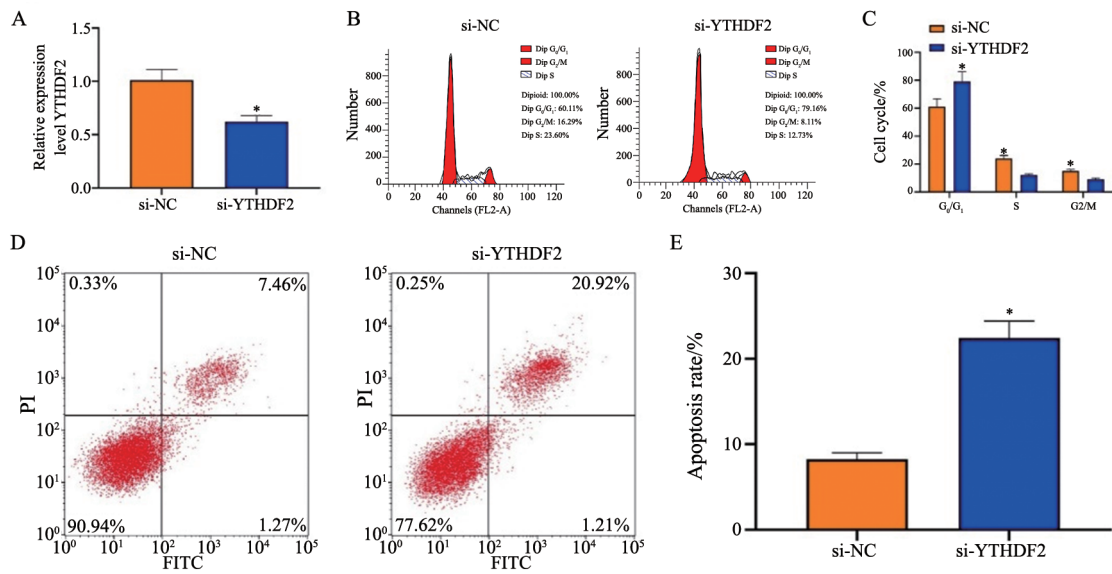


图2 敲减YTHDF2可诱导GBM细胞周期阻滞和细胞凋亡

Fig. 2 Knockdown of YTHDF2 can induce GBM cell cycle arrest and apoptosis

A: The knockdown efficiency of YTHDF2 was detected by RTFQ-PCR; B, C: Cell cycle distribution was detected by flow cytometry; D, E: The level of apoptosis rate was detected by flow cytometry. \*:  $P < 0.05$ , compared with si-NC group.

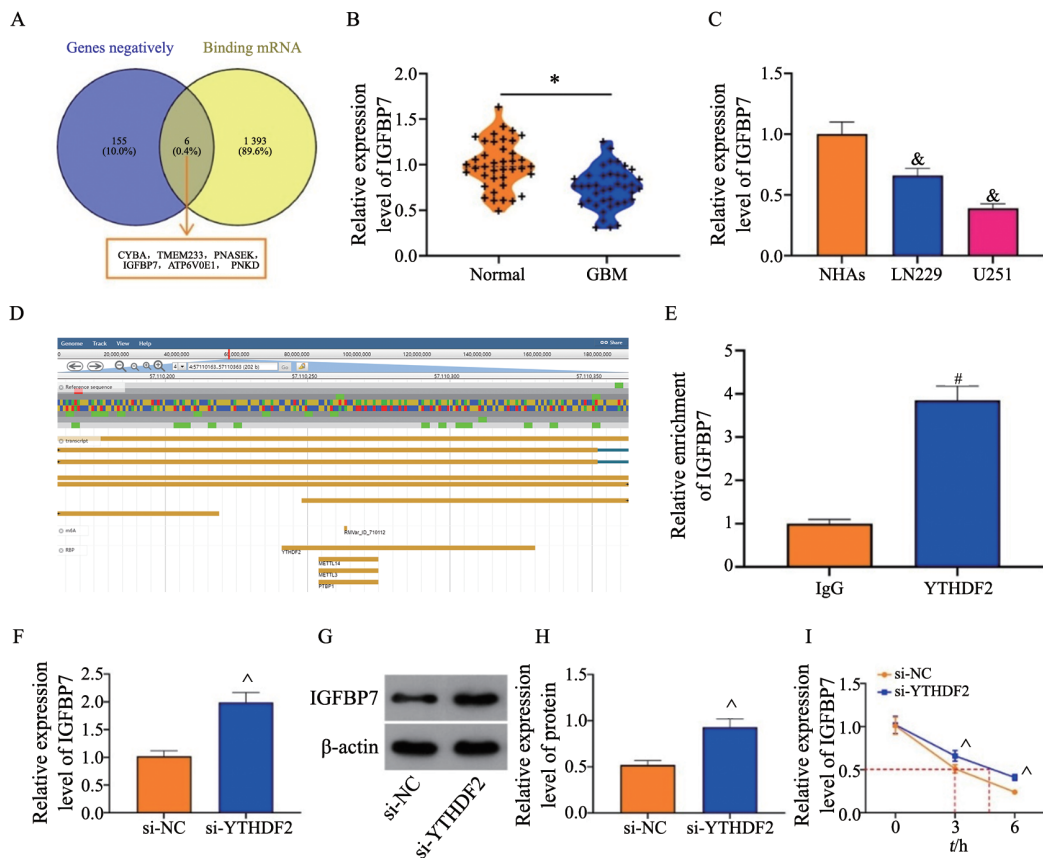


图3 YTHDF2识别m6A修饰的IGFBP7进而促进IGFBP7降解

Fig. 3 YTHDF2 promotes the degradation of IGFBP7 via recognizing m6A modified IGFBP7

A: Intersection of mRNA that have binding sites with YTHDF2 and genes that negatively correlated with YTHDF2; B: The expression level of IGFBP7 in GBM tissue and adjacent normal tissue was detected by RTFQ-PCR ( $n=40$ ); C: The expression level of IGFBP7 in GBM (LN229 and U251) cells and NHAs cells was detected by RTFQ-PCR; D: Results predicted by RMVAR database; E: RIP test results; F-H: RTFQ-PCR was used to detect the mRNA and protein expression of IGFBP7 in GBM cells in si-NC and si-YTHDF2 group; I: The stability of IGFBP7 mRNA was detected. \*:  $P < 0.05$ , compared with Normal group; &:  $P < 0.05$ , compared with NHAs cell group; #:  $P < 0.05$ , compared with IgG group; ^:  $P < 0.05$ , compared with si-NC group.

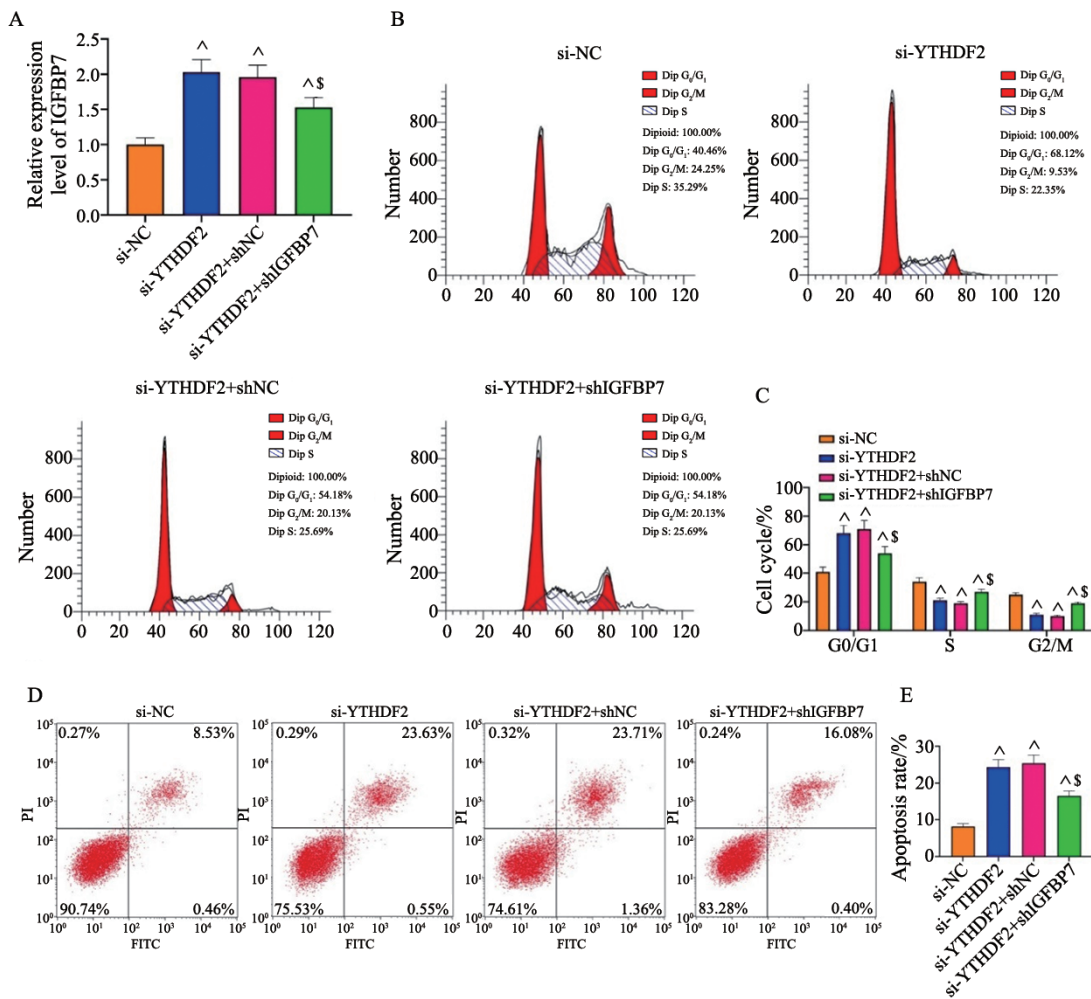


图 4 下调IGFBP7可部分挽救敲减YTHDF2对GBM细胞周期分布和凋亡的调控作用

Fig. 4 Downregulation of IGFBP7 could partially rescue the regulatory effects of YTHDF2 knockdown on GBM cell cycle distribution and apoptosis

A: The expression of IGFBP7 was detected by RTFQ-PCR; B, C: cell cycle distribution was detected by flow cytometry; D, E: The level of apoptosis was detected by flow cytometry.  $\wedge$ :  $P < 0.05$ , compared with si-NC group;  $\$$ :  $P < 0.05$ , compared with si-YTHDF2+shNC group.

### 2.5 YTHDF2通过抑制IGFBP7诱导PI3K/AKT活化

由图1B得知, YTHDF2可能通过激活PI3K/AKT信号转导通路促进GBM的发生。在GEPIA和LinkedOmics网站得到IGFBP7与PI3K/AKT信号转导通路中的关键基因PIK3CA在GBM中显著负相关, 而与PI3K/AKT信号转导通路负调节因子PTEN正相关(图5A、5B)。在U251细胞中用Western blot检测p-AKT、AKT、p-PI3K和PI3K

蛋白水平, 结果显示, 过表达IGFBP7可降低p-AKT和p-PI3K的蛋白水平, 抑制IGFBP7则相反( $P$ 均 $< 0.05$ )。进一步分析YTHDF2和IGFBP7是否能调控PI3K/AKT信号转导通路, 结果表明, p-AKT和p-PI3K的蛋白水平因敲减YTHDF2而显著降低, 因抑制IGFBP7而部分恢复( $P$ 均 $< 0.05$ , 图5E、5F)。上述数据表明, PI3K/AKT信号转导通路可能由YTHDF2通过IGFBP7进行调节。

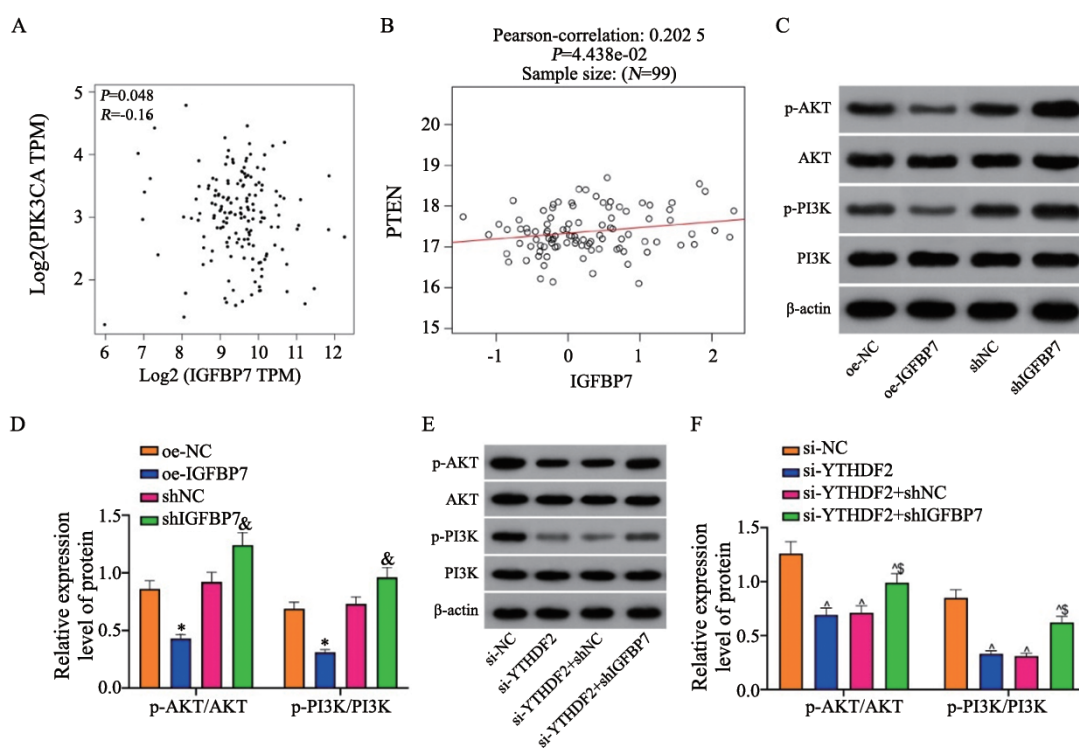


图5 YTHDF2通过抑制IGFBP7诱导PI3K/AKT活化

Fig. 5 YTHDF2 induces PI3K/AKT activation by inhibiting IGFBP7

A: GEPIA website forecast results; B: Prediction results from Linkedomics website; C-F: The protein expression level of p-AKT, AKT, p-PI3K and PI3K was detected by Western blot. TPM: Transcripts per million. \*:  $P < 0.05$ , compared with oe-NC group; &:  $P < 0.05$ , compared with shNC group; ^:  $P < 0.05$ , compared with si-NC group; §:  $P < 0.05$ , compared with si-YTHDF2+shNC group.

### 3 讨 论

RNA的m6A修饰是研究GBM的一个新兴领域<sup>[7]</sup>。先前研究<sup>[8]</sup>表明，m6A“写入器”、“擦除器”和“识别器”的表达与GBM的恶性进展和预后高度相关。本研究中，作为m6A“识别器”的YTHDF2在GBM组织和细胞中表达升高。敲减YTHDF2基因能够通过提高IGFBP7的mRNA表达，抑制PI3K/AKT信号转导通路，诱导GBM细胞周期阻滞和凋亡率升高。

据研究<sup>[9]</sup>报道，YTHDF2对GBM细胞增殖、侵袭和肿瘤的发生具有促进作用。YTHDF2通过诱导细胞质中的靶mRNA稳定性降低来执行其功能，如YTHDF2介导肿瘤抑制因子的mRNA降解，促进前列腺癌的恶性进展<sup>[10]</sup>。YTHDF2下调IRS1的mRNA水平在子宫内膜癌中发挥肿瘤抑制作用<sup>[11]</sup>。本研究借助一系列生

物信息学预测网站发现YTHDF2在GBM中表达升高，并通过RTFQ-PCR和Western blot得以证实。通过CSCA网站预测YTHDF2可能参与调控GBM细胞周期进展和凋亡过程，本研究的实验数据显示，敲减YTHDF2在GBM细胞中的表达可有效地抑制GBM细胞的周期分布，增加细胞凋亡，提示YTHDF2可作为GBM中的有效治疗靶点。

借助StarBase和UALCAN网站获取YTHDF2可特异性结合的mRNA和与YTHDF2在GBM中具有负相关性的基因，筛选得到IGFBP7。IGFBP7先前被发现在多种恶性肿瘤中充当肿瘤抑制因子发挥作用<sup>[12-14]</sup>。研究<sup>[15]</sup>表明，IGFBP7在GBM中的低表达与患者预后不良显著相关。IGFBP7在GBM组织和细胞系中的低表达水平通过RTFQ-PCR得到证实。在RMVAR数据库预测得到YTHDF2可识别IGFBP7的m6A修饰位点，本实验通过RIP分析证实YTHDF2可特异性地结合GBM

细胞中的IGFBP7, 敲减YTHDF2可有效地提高IGFBP7的mRNA稳定性。功能性实验数据显示, 敲减YTHDF2对GBM细胞周期分布的抑制和凋亡的促进可通过敲减IGFBP7实现部分消除, 表明YTHDF2通过抑制IGFBP7的表达在GBM中发挥促癌作用。此外, CSCA网站还显示, YTHDF2可能通过调节PI3K/AKT信号转导通路参与GBM进程。既往研究<sup>[16]</sup>表明, m6A水平的降低激活致癌的PI3K/AKT信号转导通路促进胃癌细胞的恶性表型。抑制PI3K/AKT信号转导通路的激活可抑制GBM细胞增殖和耐药性增加<sup>[17]</sup>。本研究采用Western blot检测证实, 敲减YTHDF2可降低p-PI3K和p-AKT的蛋白水平。IGFBP7先前被报道可抑制PI3K/AKT信号转导通路的激活进而抑制乳腺癌细胞的生长<sup>[18]</sup>。IGFBP7抑制甲状腺癌中的AKT活性来抑制癌细胞增殖<sup>[19]</sup>。此外, GEPIA和LinkedOmics数据库显示, IGFBP7与PI3K/AKT信号转导通路中的关键基因PIK3CA在GBM中显著负相关, 而与PI3K/AKT信号转导通路负调节因子PTEN呈正相关<sup>[20]</sup>。Western blot检测结果显示, 过表达IGFBP7可降低p-PI3K和p-AKT蛋白水平, 敲减IGFBP7则相反。此外, 下调IGFBP7可部分地挽救因敲减YTHDF2降低的p-PI3K和p-AKT蛋白水平, 提示YTHDF2可能通过抑制IGFBP7激活PI3K/AKT信号转导通路参与调节GBM进展。

本实验的局限性在于未对YTHDF2在GBM中的作用展开体内实验的验证。此外, 下游信号转导通路的作用也有待进一步探索。本研究证实, 敲减YTHDF2可通过识别m6A修饰的IGFBP7, 降低其mRNA的稳定性, 阻断PI3K/AKT信号转导通路的激活, 抑制GBM细胞周期分布, 诱导细胞凋亡。这些发现初步阐明了m6A“识别器”调控GBM肿瘤发生的潜在机制, 有望为GBM的有效治疗提供新的思路。

#### [参 考 文 献]

- [1] 张良龙, 安宏伟, 赵立智, 等. LncRNA LINC00152过表达在替莫唑胺诱导脑胶质瘤干细胞周期阻滞中的作用机制探讨 [J]. 中国癌症杂志, 2020, 30(5): 328-334.  
ZHANG L L, AN H W, ZHAO L Z, et al. Mechanism of overexpression of lncRNA LINC00152 in temozolomide-induced stem cell cycle arrest in glioma [J]. China Oncol, 2020, 30(5): 328-334.
- [2] CHAVDA V, PATEL V, YADAV D, et al. Therapeutics and research related to glioblastoma: advancements and future targets [J]. Curr Drug Metab, 2020, 21(3): 186-198.
- [3] 董明皓, 张 霓, 何 锋. N6-腺苷酸甲基化修饰在肿瘤发生发展中的作用 [J]. 中华实验外科杂志, 2020, 37(9): 1770-1774.  
DONG M H, ZHANG N, HE F. The role of N6-methyladenosine modification in tumorigenesis and development [J]. Chin J Exp Surg, 2020, 37(9): 1770-1774.
- [4] ZHANG C Z, HUANG S Z, ZHUANG H K, et al. YTHDF2 promotes the liver cancer stem cell phenotype and cancer metastasis by regulating OCT4 expression via m6A RNA methylation [J]. Oncogene, 2020, 39(23): 4507-4518.
- [5] RUPP C, SCHERZER M, RUDISCH A, et al. IGFBP7, a novel tumor stroma marker, with growth-promoting effects in colon cancer through a paracrine tumor-stroma interaction [J]. Oncogene, 2015, 34(7): 815-825.
- [6] PEN A, DUROCHER Y, SLINN J, et al. Insulin-like growth factor binding protein 7 exhibits tumor suppressive and vessel stabilization properties in U87MG and T98G glioblastoma cell lines [J]. Cancer Biol Ther, 2011, 12(7): 634-646.
- [7] CUI Q, SHI H L, 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.
- [8] DU J Y, HOU K Y, MI S, et al. Malignant evaluation and clinical prognostic values of m6A RNA methylation regulators in glioblastoma [J]. Front Oncol, 2020, 10: 208.
- [9] FANG R P, CHEN X, ZHANG S C, et al. EGFR/SRC/ERK-stabilized YTHDF2 promotes cholesterol dysregulation and invasive growth of glioblastoma [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 177.
- [10] LI J F, XIE H Y, YING Y F, et al. YTHDF2 mediates the mRNA degradation of the tumor suppressors to induce AKT phosphorylation in N6-methyladenosine-dependent way in prostate cancer [J]. Mol Cancer, 2020, 19(1): 152.
- [11] HONG L, PU X W, GAN H L, et al. YTHDF2 inhibit the tumorigenicity of endometrial cancer via downregulating the expression of IRS1 methylated with m6A [J]. J Cancer, 2021, 12(13): 3809-3818.
- [12] LI Y F, XI Y F, ZHU G Q, et al. Downregulated IGFBP7 facilitates liver metastasis by modulating epithelial-mesenchymal transition in colon cancer [J]. Oncol Rep, 2019, 42(5): 1935-1945.
- [13] ZHAO Q Y, ZHAO R L, SONG C H, et al. Increased IGFBP7 expression correlates with poor prognosis and immune infiltration in gastric cancer [J]. J Cancer, 2021, 12(5): 1343-1355.
- [14] AKIEL M, GUO C Q, LI X, et al. IGFBP7 deletion promotes hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Res, 2017, 77(15): 4014-4025.

- [ 15 ] TIAN X Y, ZHANG L, SUN L G, et al. Low expression of insulin-like growth factor binding protein 7 associated with poor prognosis in human glioma [ J ] . J Int Med Res, 2014, 42(3): 651-658.
- [ 16 ] ZHANG C, ZHANG M Q, GE S, et al. Reduced m6A modification predicts malignant phenotypes and augmented Wnt/PI3K/AKT signaling in gastric cancer [ J ] . Cancer Med, 2019, 8(10): 4766-4781.
- [ 17 ] YANG J B, DING W L, WANG X Y, et al. Knockdown of DNA polymerase  $\zeta$  relieved the chemoresistance of glioma via inhibiting the PI3K/AKT signaling pathway [ J ] . Bioengineered, 2021, 12(1): 3924-3933.
- [ 18 ] EVDOKIMOVA V, TOGNON C E, BENATAR T, et al. IGF1BP7 binds to the IGF-1 receptor and blocks its activation by insulin-like growth factors [ J ] . Sci Signal, 2012, 5(255): ra92.
- [ 19 ] ZHANG L, LIAN R, ZHAO J J, et al. IGF1BP7 inhibits cell proliferation by suppressing AKT activity and cell cycle progression in thyroid carcinoma [ J ] . Cell Biosci, 2019, 9: 44.
- [ 20 ] HADDADI N, LIN Y G, TRAVIS G, et al. PTEN/PTENP1: 'regulating the regulator of RTK-dependent PI3K/AKT signalling', new targets for cancer therapy [ J ] . Mol Cancer, 2018, 17(1): 37.

( 收稿日期: 2021-11-08 修回日期: 2021-12-30 )

## 《中国癌症杂志》2022年征稿启事

《中国癌症杂志》1991年创刊,是由中华人民共和国教育部主管、复旦大学附属肿瘤医院主办的全国性肿瘤类学术期刊。名誉主编为汤钊猷、曹世龙、沈镇宙教授,主编为邵志敏教授。其宗旨是“服务读者,成就作者”。

《中国癌症杂志》为中文核心期刊(《中文核心期刊要目总览(2020年版)》收录)、中国科技核心期刊、中国科学引文数据库(CSCD)来源期刊、“中国精品科技期刊顶尖学术论文(F5000)”项目来源期刊,并被国内多家大型数据库收录。国际上,《中国癌症杂志》目前被荷兰Scopus数据库、美国《化学文摘》(CA)、美国EBSCO数据库、日本科学技术振兴机构数据库(JST)以及WHO西太平洋地区医学索引(WPRIM)收录。《中国癌症杂志》主要报道国内外肿瘤学领域前沿的研究内容,包括肿瘤的临床医学、基础医学、流行病学等。开设栏目包括专家述评与论著、论著、综述、论著选登、个案报道、指南与共识等。

欢迎广大作者踊跃投稿。投稿请通过《中国癌症杂志》网站投稿([www.china-oncology.com](http://www.china-oncology.com)),稿约、作者指南及写作格式,请登录《中国癌症杂志》网站查阅。

联系地址:上海市东安路270号复旦大学附属肿瘤医院10号楼409室

电 话:021-64188274

电子邮箱:[zgazz@china-oncology.com](mailto:zgazz@china-oncology.com)

《中国癌症杂志》编辑部