



· 论 著 ·

m6Am修饰酶PCIF1调控靶基因ACOT8参与胃癌进展的机制研究

彭 进, 王伟宁, 谭 智, 叶冠男, 周 震

长沙市第一医院消化内科, 湖南长沙 410000

[摘要] 背景与目的: 最新证据显示N6, 2'-O- 二甲基腺苷 (N6, 2'-O-dimethyladenosine, m6Am) 修饰酶磷酸化C末端结构域相互作用因子1 (phosphorylated c-terminal domain-interacting factor 1, PCIF1) 可能是胃癌的重要生物标志物及治疗靶点。然而, 这种新的PCIF1分子机制与胃癌进展的关系仍有待进一步探索。本研究分析PCIF1对胃癌细胞增殖、迁移和侵袭的调控作用及其调控靶基因酰基辅酶A硫代酯酶8 (acyl-CoA thioesterase 8, ACOT8) 在胃癌进展中的机制。方法: 使用基因表达谱交互分析 (gene expression profiling interactive analysis, GEPIA) 分析胃癌患者的胃癌组织和非胃癌组织中的PCIF1表达, 并分析了PCIF1表达与胃癌患者总生存率的相关性。收集2019年——2021年长沙市第一医院消化内科就诊患者的89对胃癌组织和匹配的癌旁组织。通过实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RTFQ-PCR) 和蛋白质印迹法 (Western blot) 分析PCIF1表达。在体外实验中, 将SNU5细胞分为PCIF1敲低 (sh-PCIF1) 组和相应对照 (sh-NC) 组, 将AGS细胞分为载体对照组 (normal control, NC) 组和PCIF1过表达 (PCIF1) 组。使用细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8)、5-乙炔基-2'-脱氧尿苷 (5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU) 和transwell法分析了PCIF1对胃癌细胞增殖、侵袭和迁移的影响。此外, 在PCIF1过表达的AGS细胞中敲低ACOT8并进行了拯救实验。采用皮下异种移植瘤模型来测定PCIF1在胃癌中的生物学效应。结果: PCIF1在胃癌组织和细胞系中呈高表达, 并且PCIF1高表达胃癌患者的预后较差。与sh-NC组相比, sh-PCIF1组的细胞活力、EdU阳性细胞、迁移和侵袭细胞数均显著降低 ($P < 0.05$)。与NC组相比, PCIF1组的细胞活力、EdU阳性细胞、迁移和侵袭细胞数均显著增加 ($P < 0.05$)。在PCIF1过表达的AGS细胞中, 敲低ACOT8的表达可降低细胞活力、EdU阳性细胞、迁移和侵袭细胞数。在体内实验中, 与NC组相比, PCIF1过表达组裸鼠的移植瘤体积和重量均显著增加 ($P < 0.05$)。结论: PCIF1在胃癌细胞系和组织中上调。此外, PCIF1/ACOT8轴参与介导胃癌细胞的恶性行为产生。

[关键词] N6, 2'-O-二甲基腺苷; 磷酸化C末端结构域相互作用因子1; 酰基辅酶A硫代酯酶8; 胃癌; 增殖; 转移
中图分类号: R735.2 文献标志码: A DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2023.04.007

The mechanism of m6Am-modifying enzyme PCIF1 regulating target gene ACOT8 in gastric cancer progression PENG Jin, WANG Weining, TAN Zhi, YE Guannan, ZHOU Zhen (Department of Gastroenterology, Changsha First Hospital, Changsha 410000, Hunan Province, China)

Correspondence to: WANG Weining, E-mail: snwer2007@163.com.

[Abstract] **Background and purpose:** Recent evidence suggests that N6, 2'-O- dimethyladenosine (m6Am) modifying enzyme phosphorylated C-terminal domain-interacting factor 1 (PCIF1) may be an important biomarker/therapeutic target in gastric cancer. However, the relationship between this novel PCIF1 molecular mechanism and gastric cancer progression remains to be further explored. In this study, we analyzed the regulatory role of PCIF1 on gastric cancer proliferation, migration and invasion and the mechanism of its regulatory target gene ACOT8 in gastric cancer progression. **Methods:** PCIF1 expression in gastric cancer and non-gastric cancer tissues of gastric cancer patients was analyzed using Gene Expression Profile Interaction Analysis (GEPIA), and the correlation of PCIF1 expression with overall survival in gastric cancer patients was analyzed. We collected all gastric cancer tissues and matched para-cancerous tissues from 89 primary gastric cancer patients treated in Department of Gastroenterology of

基金项目: 湖南省卫生健康委科研计划课题 (B2019134)。

第一作者: 彭 进 (ORCID: 0009-0005-4434-7561), 硕士, 主治医师。

通信作者: 王伟宁 (ORCID: 0009-0003-5610-1951) 博士, 主任医师, E-mail: snwer2007@163.com。

Changsha First Hospital from 2019 to 2021. PCIF1 expression was analyzed by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RTFQ-PCR) and Western blot. In *in vitro* experiments, SNU5 cells were divided into PCIF1 knockdown (sh-PCIF1) group and corresponding control (sh-NC) group, and AGS cells were divided into vehicle as normal control (NC) group and PCIF1 overexpression (PCIF1) group. The effect of PCIF1 on gastric cancer cell proliferation, invasion and migration was investigated using cell counting kit-8 (CCK-8), EdU and transwell assays. Furthermore, ACOT8 expression was knocked down in PCIF1-overexpressing AGS cells, and rescue experiments were performed. A subcutaneous xenograft model was used to determine the biological effects of PCIF1 in gastric cancer *in vivo*. **Results:** PCIF1 expression was abnormally high in gastric cancer tissues and cell lines, with significant correlation between PCIF1 expression and the prognosis of gastric cancer patients. Compared with the sh-NC group, the cell viability, EdU positive cells, migration and invasion cell numbers in the sh-PCIF1 group were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with the NC group, the cell viability, EdU positive cells, migration and invasion cell numbers in the PCIF1 group were significantly increased ($P < 0.05$). In PCIF1-overexpressing AGS cells, knockdown of ACOT8 expression decreased cell viability, EdU-positive cells and migrating and invasive cell numbers. *In vivo* experiments showed, compared with the NC group, the tumor volume and weight of the nude mice in the PCIF1-overexpressing group were significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusions:** PCIF1 is upregulated in gastric cancer cell lines and tissues. In addition, the PCIF1/ACOT8 axis is involved in mediating the malignant behavior of gastric cancer cells.

[**Key words**] N6, 2'-O-dimethyladenosine; Phosphorylated C-terminal domain-interacting factor 1; Acyl-CoA thioesterase 8; Gastric cancer; Proliferation; Metastasis

胃癌在世界范围内普遍存在，其特点是早期诊断存在困难；大多数患者在确诊后往往错过最佳治疗时机，即使治疗后5年生存率也不足20%，严重威胁人类健康^[1]。胃癌发病机制涉及多种因素、发育过程中的多个步骤以及多重基因突变和异常^[2]。因此，迫切需要确定胃癌早期的诊断标志物和治疗靶点。最近，表观转录组学已成为癌症研究的一个有吸引力的领域^[3]。在RNA中发现了100多种转录后修饰方式，其中N6, 2'-O-二甲基腺苷（N6, 2'-O-dimethyladenosine, m6Am）是一种可逆的RNA修饰，有利于mRNA的翻译、表达和稳定性^[4]。先前的研究^[5]已将磷酸化C末端结构域相互作用因子1（phosphorylated C-terminal domain-interacting factor 1, PCIF1）确定为m6Am写入蛋白，其通过调节胰岛β细胞的功能或存活参与葡萄糖稳态。抑制PCIF1介导的mRNA中m6Am修饰会导致结直肠癌干细胞能力降低^[6]。值得注意的是，还有学者发现PCIF1激活在胃癌的发生和发展中起着重要作用，并且可能是胃癌的重要生物标志物及治疗靶点^[7]。然而，PCIF1作用的分子机制及其与胃癌进展的关系仍有待进一步探索。在本研究中，我们分析了PCIF1对胃癌细胞增殖、迁移和侵袭的调控作用及分子机制。

1 材料和方法

1.1 GEPIA数据库分析

从癌症基因组图谱（The Cancer Genome Atlas, TCGA）数据库中获得408个胃癌组织和211个非胃癌组织的mRNA表达谱并进行分析。利用基因表达谱交互分析（Gene Expression Profiling Interactive Analysis, GEPIA）计算胃癌患者的10年总生存（overall survival, OS）率，并分析其与PCIF1的相关性。

1.2 临床标本

收集2019年—2021年从长沙市第一医院获得89对胃癌组织和非胃癌组织（距胃癌边缘超过5 cm）。没有患者术前接受局部或全身化疗、放疗或靶向治疗，所有组织均由两名病理学家进行组织学鉴定。切除的标本立即处理并储存在-80℃。所有患者都签署了知情同意书。

1.3 细胞培养

正常人胃黏膜细胞系（GES-1）和胃腺癌细胞系（AGS、MKN45、SNU-5和NCI-N87；美国ATCC）接种在含有10%胎牛血清（美国Gibco公司）和1%双抗生素（青霉素/链霉素，美国Thermo Fisher Scientific公司）的Dulbecco改良Eagle培养基（DMEM）中培养。

实验1考察PCIF1对胃癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响。将SNU5细胞分为PCIF1敲低 (sh-PCIF1) 组和相应对照 (sh-NC) 组; 其中sh-NC组和sh-PCIF1组分别使用Lipofectamine™3000将sh-NC或sh-PCIF1转染细胞24 h。将AGS细胞分为载体 (NC) 组和PCIF1过表达 (PCIF1) 组; 其中NC组和PCIF1组AGS细胞分别使用Lipofectamine™3000将NC或PCIF1质粒转染细胞24 h。实验2考察PCIF1和酰基辅酶A硫代酯酶8 (Acyl-CoA thioesterase 8, ACOT8) 在胃癌细胞中的作用相互关系。将AGS细胞分为NC组、PCIF1组、PCIF1 + sh-NC组和PCIF1 + sh-ACOT8组。

1.4 细胞转染

将AGS细胞以 5×10^4 个细胞/mL接种到6孔板中, 并在细胞密度达到约70%时, 根据Lipofectamine™3000 (美国Thermo Fisher Scientific公司) 的说明将PCIF1质粒、PCIF1 shRNA (sh-PCIF1)、ACOT8 shRNA (sh-ACOT8) 和相应的NC (上海GenePharma公司) 转染细胞。采用实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RTFQ-PCR) 检查转染效率。

1.5 RTFQ-PCR分析

采用TRIzol试剂 (美国Thermo Fisher Scientific公司) 从胃癌组织或细胞获得总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) 在ABI-7900 RTFQ-PCR系统 (美国Applied Biosystems公司) 进行RTFQ-PCR检测。RTFQ-PCR检测用的引物由广州吉赛生物科技股份有限公司设计合成。使用标准的 $2^{-\Delta\Delta CT}$ (周期阈值) 方法测定PCIF1、ACOT8的相对表达水平。用于RTFQ-PCR的引物序列如下: ACOT8有义链5'-AGCTCCCGTGCCTTATGGTTA-3', 反义链5'-GGCTGGTAGGTTCCCGGAT A-3'; PCIF1有义链5'-ACTTGGCTCCCTTATCTGACC-3', 反义链5'-TGTGCAGTGTGAGAAAGGCTT-3'; GAPDH有义链5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3', 反

义链5'-GGCTGTTGTCATA CTTCTCATGG-3'。

1.6 RNA免疫沉淀定量聚合酶链反应 (RNA immunoprecipitation quantitative polymerase chain reaction, RIP-qPCR) 分析

使用离心柱 (MiniBEST Universal RNA Extraction Kit; 日本TaKaRa公司) 以获得完整的总RNA, 然后使用polyATtract mRNA分离系统 (美国Promega公司) 处理mRNA以进行纯化。随后, 使用PCIF1或IgG抗体进一步用于RIP-qPCR以检测PCIF1结合ACOT8 mRNA。通过RIP-qPCR对产生的IP进行分析。

1.7 蛋白质印迹法 (Western blot) 检测

通过放射免疫沉淀测定缓冲液制备胃癌组织或细胞蛋白质, 并通过二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白质测定试剂盒 (上海Beyotime公司) 进行定量。对样品进行10%的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, 然后转移到聚偏二氟乙烯膜 (美国Millipore公司)。将膜用5%脱脂牛奶封闭, 用一抗在4℃下温育过夜, 并与相应的HRP偶联二抗温育, 通过化学发光法检测印迹带。使用的抗体包括针对PCIF1和GAPDH (作为阴性对照) 的抗体购自英国Abcam公司, 一抗均购自美国Proteintech公司。

1.8 细胞增殖试验

细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8) 购自日本Dojindo公司, 将其和5-乙炔基-2'-脱氧尿苷 (5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU) 掺入试验评估细胞活力: 将 1×10^3 个细胞接种到96孔板中并温育过夜, 在指定时间点 (24、48、72、96和120 h) 向每个孔中加入10 μL CCK-8溶液试剂, 并将细胞在黑暗中温育2 h。随后, 通过Bio-Tek Elx 800酶标仪 (美国Bio-Tek Instruments公司) 测量450 nm波长处的吸光度 (D) 值。对于EdU测定, 使用Cell-Light EdU Apollo 488体外成像试剂盒 (广州锐博生物技术有限公司) 检测胃癌细胞的DNA合成。在24孔板中培养总共 5×10^4 个细胞。随后, 将细胞与EdU溶液一起温育2 h, 与 $1 \times$ Apollo反应混合物

反应30 min,并用Hoechst 33342染色30 min。通过ZEISS LSM800共聚焦显微镜(德国Carl Zeiss AG公司)对细胞进行检测和成像。

1.9 Transwell检测

将转染的胃癌细胞(2×10^4 个细胞/孔)接种在transwell小室(美国Corning公司)中用于迁移测定,或接种在预涂有100 μ L 1 μ g/ μ L的Matrigel基质胶(美国BD Biosciences公司)的小室中用于侵袭性测定。分别将无血清培养基和完全培养基添加到上室和下室。温育24 h后,侵入的细胞用4%的多聚甲醛固定,1%的结晶紫染色,显微镜下拍照。

1.10 动物实验

BALB/c裸鼠(雌性,6~8周)购自北京维通利华实验动物技术有限公司。将小鼠随机分为NC组和PCIF1组,每组6只。将稳定转染的PCIF1过表达的AGS细胞(1×10^6 个细胞)或载体转染细胞皮下注射到裸鼠的右背侧。在指定的时间点监测肿瘤体积。注射后25 d,处死小鼠,切除肿瘤,称重,拍照。

1.11 免疫组织化学检测

将移植瘤组织固定在4%的多聚甲醛中,并将石蜡包埋的组织切成4 μ m的切片。阻断内源性过氧化物酶活性后,切片与一抗在4 $^{\circ}$ C下温育过夜,然后在37 $^{\circ}$ C下与HRP偶联的二抗温育1 h。接下来,切片用HRP底物进行DAB染色。免疫组织化学检测用PCIF1和ACOT8抗体购自英国Abcam公司。

1.12 统计学处理

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 的形式呈现。使用Student's *t*检验(双尾)或单因素方差分析(ANOVA)检验分析实验结果。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。数据统计分析均使用SPSS 21.0进行处理。

2 结果

2.1 PCIF1在胃癌组织和细胞中表现出显著升高的表达

首先,我们分析了GEPIA数据库和临床样

本,发现PCIF1在胃癌组织中的表达显著增加(图1A~C)。然后,使用GEPIA数据库分析了PCIF1表达水平与胃癌患者OS之间的相关性,发现PCIF1低表达患者具有更好的生存预测(图1D)。此外,胃癌细胞系(AGS、BGC823、MKN45和SGC7901)中PCIF1的表达显著高于非胃癌细胞系(GES-1)中的表达(图1E)。上述结果表明,PCIF1在胃癌组织和细胞中的表达明显更高。

2.2 PCIF1是胃癌细胞恶性行为所必需的

为了评估PCIF1在胃癌中的作用,我们通过shRNA在SNU5细胞中稳定地敲低了PCIF1的表达(图2A)。与sh-NC组相比,sh-PCIF1组的细胞活力、EdU阳性细胞、迁移和侵袭细胞数均显著降低($P < 0.05$,图2B~F)。此外,我们通过慢病毒在AGS细胞中过表达PCIF1(图3A)。与NC组相比,PCIF1过表达组的细胞活力、EdU阳性细胞、迁移和侵袭细胞数均显著增加($P < 0.05$)(图3B~F)。这些数据表明,PCIF1在体外促进胃癌增殖和迁移。

2.3 PCIF1调节胃癌中的ACOT8表达

为了进一步研究PCIF1在胃癌增殖和侵袭中的作用机制,首先对m6A2Target数据库中潜在的修饰底物进行了预测,显示ACOT8是A549细胞系中经过验证的PCIF1修饰底物。然而,在胃癌中PCIF1和ACOT8之间的关系仍不清楚。因此,我们通过GEPIA数据库分析了胃癌中PCIF1和ACOT8之间mRNA表达的相关性,结果显示,PCIF1表达水平与ACOT8表达水平显著相关(图4A)。过表达PCIF1增强了AGS细胞中ACOT8 mRNA的表达(图4B)。RIP-qPCR结果显示,过表达PCIF1显著增强了AGS细胞中PCIF1结合ACOT8 mRNA的富集(图4C)。此外,测量了用RNA合成抑制剂 α -鹅膏蕈素处理的AGS细胞中ACOT8 mRNA的损失,结果显示PCIF1过表达延长了AGS细胞中ACOT8 mRNA的半衰期(图4D)。

2.4 PCIF1通过调节ACOT8抑制胃癌细胞增殖和侵袭

为了证实PCIF1通过ACOT8发挥促肿瘤

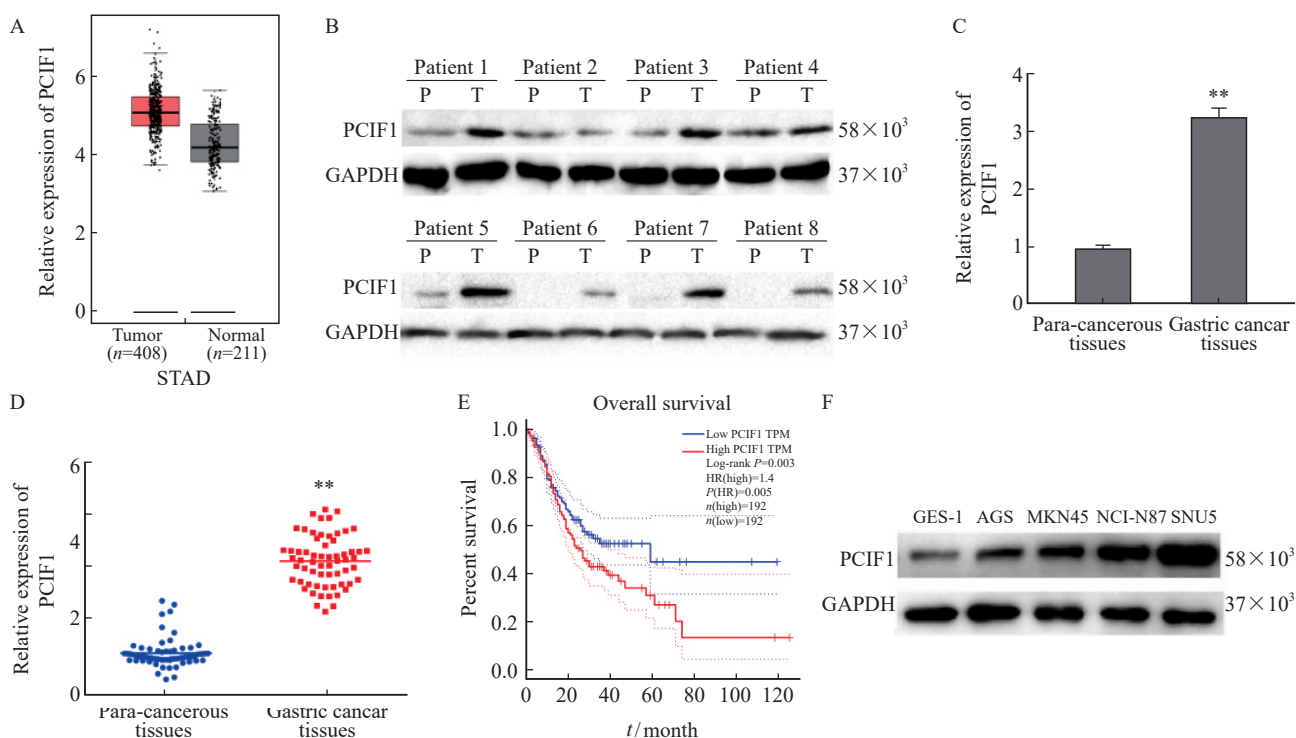


图1 胃癌组织和细胞中PCIF1表达

Fig. 1 Expression of PCIF1 in gastric cancer tissues and cells

A: The expressions of PCIF1 in gastric cancer tissues and normal control tissues were evaluated by GEPIA database; B: The relative expression levels of PCIF1 in para-cancerous tissues (P) and gastric cancer tissues (T) were examined by Western blot; C: The relative expression levels of PCIF1 in gastric cancer tissues and non-gastric cancer tissues were examined by RTFQ-PCR; D: GEPIA database analysis revealed that the high expression of PCIF1 indicated that the overall survival prediction of gastric cancer patients was better; E: The expression level of PCIF1 in gastric cancer cell lines was examined by Western blot. **: $P < 0.01$, compared with para-cancerous tissues.

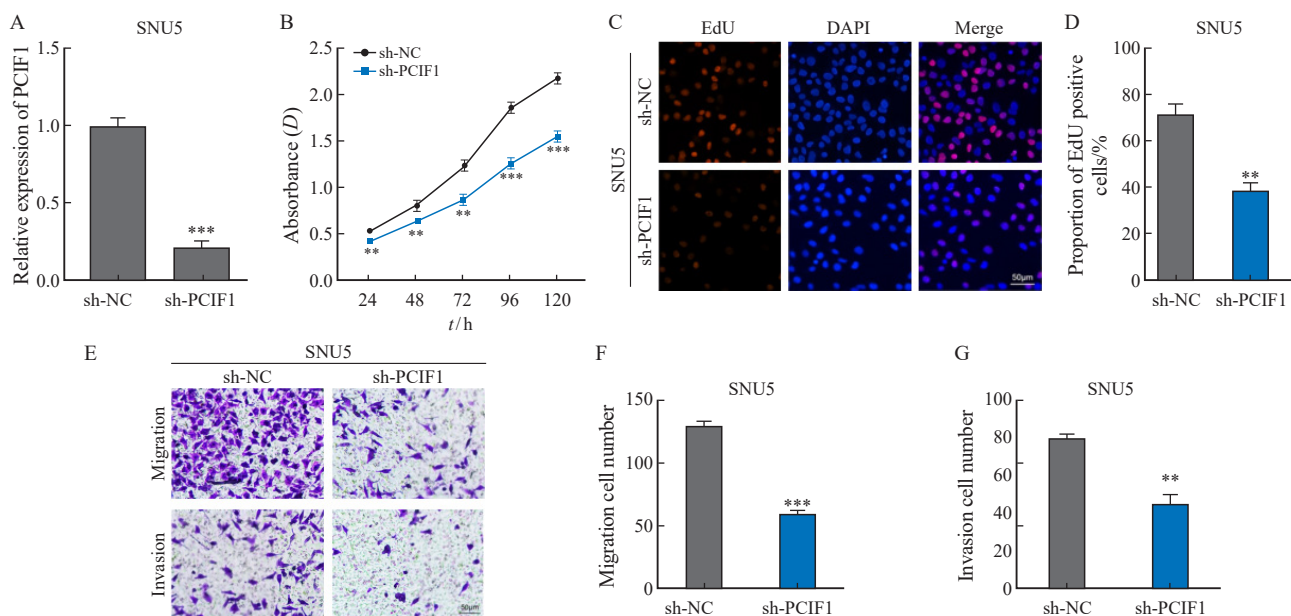


图2 敲除PCIF1在体外抑制胃癌增殖、迁移和侵袭

Fig. 2 Knockout PCIF1 inhibits the proliferation, migration and invasion of gastric cancer *in vitro*

A: RTFQ-PCR was used to evaluate the expression of PCIF1 knocked down by shRNA in SNU5 cells; B: CCK-8 assay was performed to evaluate the viability of SNU5 cells silenced by PCIF1; C: EdU assay was performed to evaluate the proliferation ability of SNU5 cells silenced by PCIF1; D-F: The effect of PCIF1 knock-down on migration and invasion of SNU5 cells was detected by transwell assay. *: $P < 0.05$, compared with sh-NC group; **: $P < 0.01$, compared with sh-NC group; ***: $P < 0.001$, compared with sh-NC group.

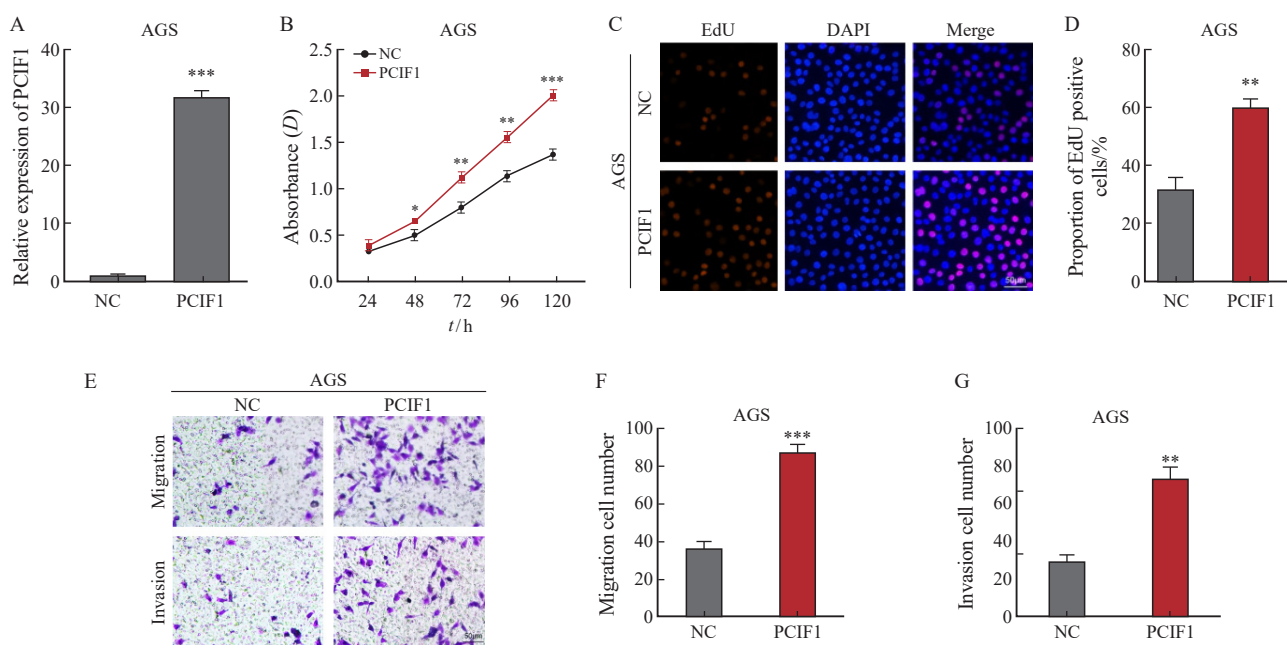


图3 PCIF1在体外促进胃癌增殖、迁移和侵袭

Fig. 3 PCIF1 promotes the proliferation, migration and invasion of gastric cancer *in vitro*

A: RTFQ-PCR was used to evaluate the expression of PCIF1 upregulated by lentivirus in AGS cells; B: CCK-8 assay was performed to evaluate the activity of AGS cells up-regulated by PCIF1; C: EdU assay was performed to evaluate the proliferation ability of AGS cells up-regulated by PCIF1; D-F: Transwell was used to detect the effect of PCIF1 upregulation on the migration and invasion of AGS cells. *: $P < 0.05$, compared with NC group; **: $P < 0.01$, compared with NC group; ***: $P < 0.001$, compared with NC group.

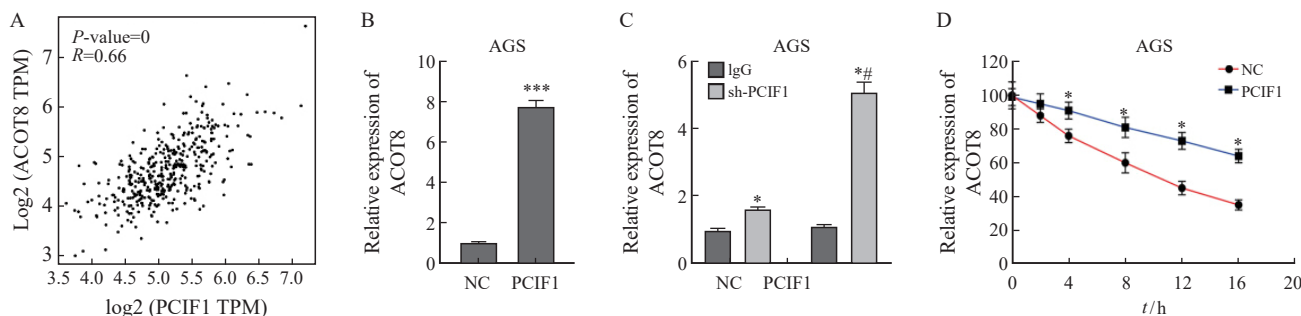


图4 PCIF1调节胃癌中的ACOT8表达

Fig. 4 PCIF1 regulates the expression of ACOT8 in gastric cancer

A: The correlation between PCIF1 and ACOT8 expression was analyzed by GEPIA database. B: RTFQ-PCR was used to evaluate the effect of overexpressing PCIF1 on ACOT8 expression in AGS cells (***: $P < 0.001$, compared with NC group). C: RIP-qPCR was used to detect the enrichment of PCIF1 combined with ACOT8 in AGS cells (*: $P < 0.05$, compared with IgG in NC group; #: $P < 0.05$, compared with sh-PCIF1 in NC group). D: Overexpression of PCIF1 prolonged the half-life of ACOT8 mRNA in AGS cells (*: $P < 0.05$, compared with NC group).

作用，我们敲低了PCIF1过表达的AGS细胞中ACOT8的表达并进行了拯救实验（图5A）。与PCIF1组相比，PCIF1 + sh-ACOT8组的细胞活力、EdU阳性细胞、迁移和侵袭细胞数均显著降低（ $P < 0.05$ ，图5B~F）。这些数据表明PCIF1通过调节ACOT8促进胃癌细胞增殖和侵袭。

2.5 PCIF1在体内促进胃癌生长

采用皮下异种移植瘤模型来测定PCIF1对胃癌生长表达的影响。与NC组相比，PCIF1过表达组裸鼠的肿瘤体积和重量均显著增加（ $P < 0.05$ ，图6A~C）。免疫组织化学检测结果显示，PCIF1过表达组肿瘤组织中PCIF1和ACOT8的表达水平均明显增加（图6D）。

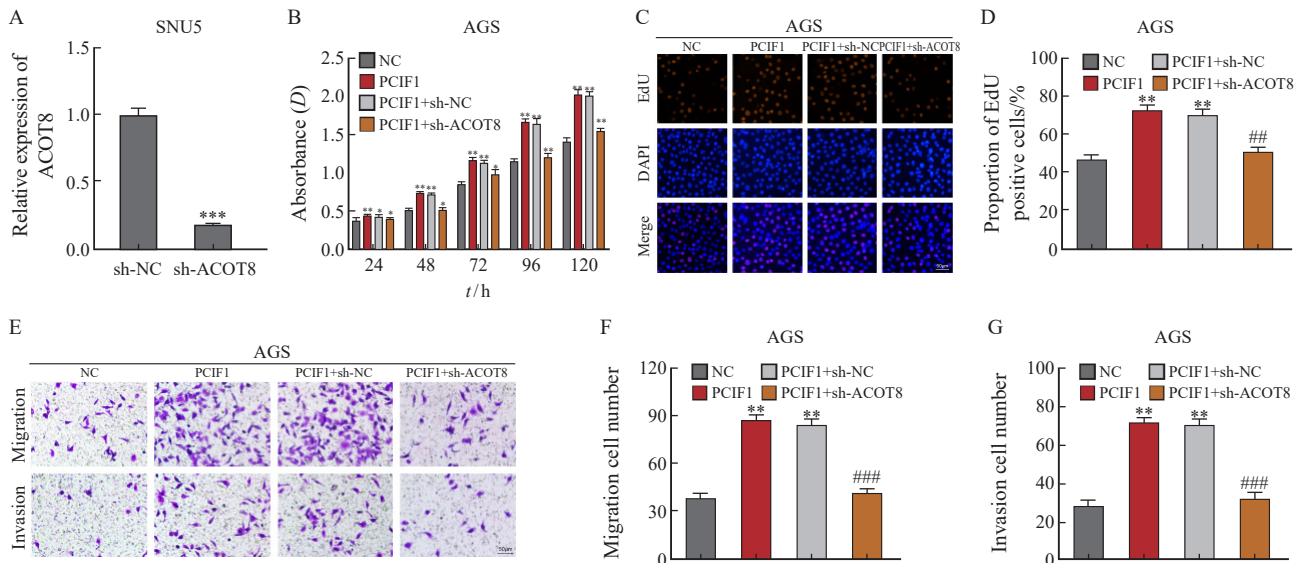


图5 PCIF1通过ACOT8发挥其促肿瘤作用

Fig. 5 PCIF1 exerts its tumor-promoting effect through ACOT8

A: RTFQ-PCR was used to confirm the efficiency of sh-ACOT8 in PCIF1 overexpressing AGS cells; B: CCK-8 assay was performed to assess the effect of ACOT8 silencing on the proliferative capacity of PCIF1 overexpressing AGS cells; C: EdU analysis of the effect of ACOT8 silencing on the proliferation of PCIF1 overexpressing AGS cells; D-F: Transwell assessment of the effect of ACOT8 silencing on migration and invasion of PCIF1 overexpressing AGS cells. *: $P < 0.05$, compared with NC group; **: $P < 0.01$, compared with NC group; ***: $P < 0.001$, compared with NC group; #: $P < 0.05$, compared with PCIF1 group; ##: $P < 0.01$, compared with PCIF1 group; ###: $P < 0.001$, compared with PCIF1 group.

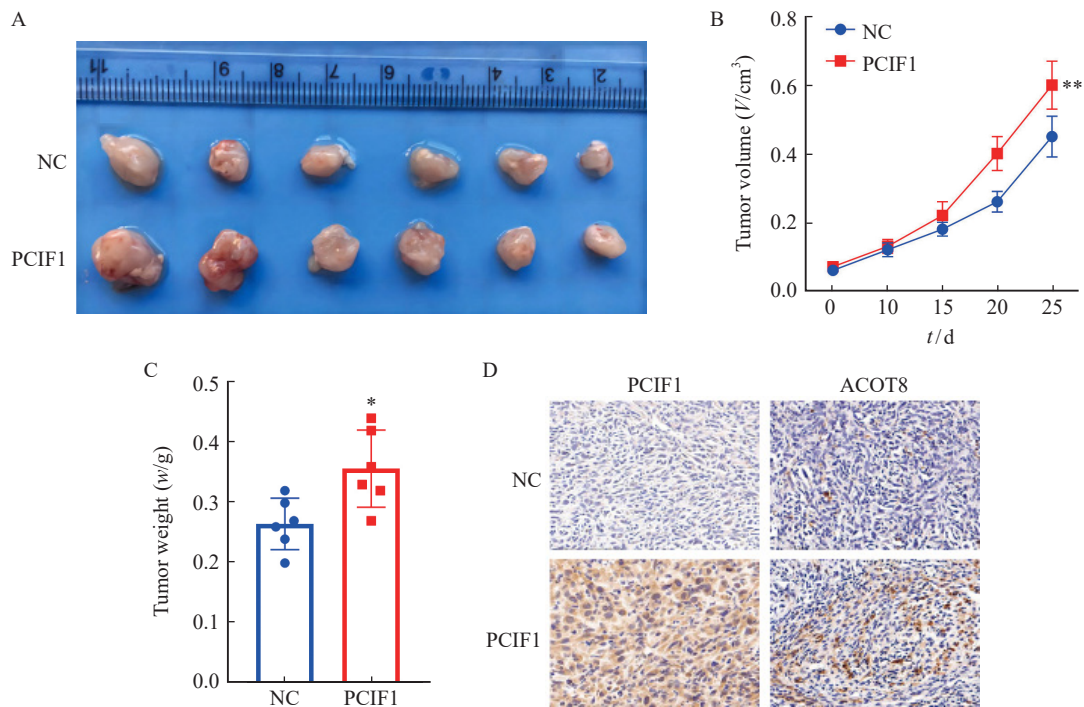


图6 PCIF1在体内促进胃癌生长

Fig. 6 PCIF1 promotes the growth of gastric cancer *in vivo*

A: Representative tumors after transplantation of PCIF1 overexpression or negative control AGS cells into nude mice; B: Comparison of tumor volumes in PCIF1 overexpressing or negative AGS cell transplanted tumor nude mice; C: Comparison of tumor weights; D: Expression levels of PCIF1 and ACOT8 in tumor tissues were determined using immunohistochemistry. *: $P < 0.05$, compared with NC group; **: $P < 0.01$, compared with NC group.

3 讨 论

研究^[7-8]表明, m6Am修饰的异常与包括胃癌在内的多种肿瘤的发生、发展过程密切相关。Hu等^[8]研究发现, 血清中的m6Am可能作为结直肠癌和胃癌的早期发现和预后预测的潜在生物标志物。有研究^[6]发现, FTO介导的细胞质m6Am去甲基化调节结直肠癌细胞的干细胞样特性。然而, PCIF1作为最新发现的m6Am唯一已知的修饰酶^[9], 其是否参与胃癌的进展仍不清楚。因此, 我们目前的研究集中在PCIF1的作用上, 并发现胃癌中PCIF1表达升高, 并且PCIF1表达升高与胃癌患者较差的生存率相关。我们证实PCIF1在体外可促进胃癌细胞的生长和侵袭能力, PCIF1通过介导ACOT8参与调节胃癌的进展。ACOT8随后被证实是胃癌的致癌驱动因子。总之, PCIF1/ACOT8轴在胃癌进展中发挥重要作用。

m6Am是细胞mRNA和一些小核RNA中第二常见的修饰, 它发生在mRNA帽附近^[10]。在正常生理条件下, 甲基化修饰受到甲基转移酶和去甲基化酶的精确调控, 参与调控甲基化RNA的可变剪接、核输出、稳定性、翻译或降解, 从而影响细胞代谢、细胞增殖和细胞分化^[11]。研究^[12]表明, 由导致甲基化位点获得或丢失的突变或失调导致的RNA甲基化异常与包括胃癌在内的各种肿瘤的起始、进展转移和抑制密切相关。PCIF1作为唯一已知的哺乳动物mRNA m6Am甲基转移酶, 到目前为止, 只有两项研究证明了PCIF1在癌症中的作用。Zhuo等^[7]发现了circ-ATAD1/miR-140-3p/YY1/PCIF1信号转导通路在加速胃癌细胞进展中的作用。Relier等^[6]研究表明, PCIF1沉默减少了结肠球形成和m6Am/m6A比率, 并导致CRC1结直肠癌细胞系对化疗产生耐药性。有研究^[13]通过泛癌分析探索PCIF1的致癌和免疫原性作用, 结果显示, PCIF1表达与癌症患者预后及免疫浸润相关, 表明它是癌症治疗的潜在靶点。本研究通过功能丧失和功能获得实验证明了PCIF1在体外促进胃癌细胞的增殖、

迁移和侵袭, 并采用皮下异种移植瘤模型在体内验证了PCIF1的促肿瘤作用。

此外, 我们还研究了PCIF1抑制胃癌生长和转移的潜在机制。基于m6A2Target数据库中PCIF1的预测底物, ACOT8是PCIF1用于m6A修饰的潜在底物。因此, 本研究验证了胃癌细胞中PCIF1和ACOT8之间的关系。值得注意的是, PCIF1不仅与来自TCGA数据库的STAD中的ACOT8表达呈正相关, 而且RTFQ-PCR检测结果也证实了PCIF1在胃癌细胞中过表达后ACOT8的变化。此外, 本研究结果还表明, PCIF1可以延长ACOT8 mRNA在胃癌细胞中的半衰期。ACOT8是一种过氧化物酶体脂解相关酶, 催化脂肪酰基辅酶A分解为FFA和辅酶A分子进行 β -氧化^[14]。由于ACOT8在直肠癌和肝癌细胞中高表达, 已经有研究^[15-16]报道了ACOT8在肿瘤发生、发展中的潜在作用。随后, 本研究通过拯救实验证实了PCIF1通过调节ACOT8促进胃癌细胞增殖和侵袭。以往研究^[10, 17-18]结果显示, m6Am修饰并不会改变 mRNA 转录或稳定性, 因此PCIF1如何调节ACOT8表达有待于进一步研究。

总之, 本研究分析了PCIF1在胃癌中的作用机制。本研究结果表明, PCIF1在胃癌细胞系和组织中表达上调。此外, PCIF1/ACOT8轴参与介导胃癌细胞的恶性生物学行为产生。因此PCIF1可能是治疗胃癌的一个潜在靶点。

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] SHIMURA T, KANDIMALLA R, OKUGAWA Y, et al. Novel evidence for m6A methylation regulators as prognostic biomarkers and FTO as a potential therapeutic target in gastric cancer [J]. *Br J Cancer*, 2022, 126(2): 228-237.
- [2] RAY K. New markers and models of premalignancy and the early development of gastric cancer [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2020, 17(4): 193.
- [3] 杨 敏, 赵国林, 张东伟. N6-甲基腺苷修饰在肿瘤及病毒感染中的研究进展 [J]. *中华实验外科杂志*, 2021, 38(4): 774-777.
YANG M, ZHAO G L, ZHANG D W. Research progress of N6-

- methyladenosine modification in tumor and virus infection [J] . Chin J Exp Surg, 2021, 38(4): 774-777.
- [4] TAN B, LIU H, ZHANG S Y, et al. Viral and cellular N6-methyladenosine and N6, 2'-O-dimethyladenosine epitranscriptomes in the KSHV life cycle [J] . Nat Microbiol, 2018, 3(1): 108-120.
- [5] TARTELL M A, BOULIAS K, HOFFMANN G B, et al. Methylation of viral mRNA cap structures by PCIF1 attenuates the antiviral activity of interferon- β [J] . Proc Natl Acad Sci U S A, 2021, 118(29): e2025769118.
- [6] RELIER S, RIPOLL J, GUILLORIT H, et al. FTO-mediated cytoplasmic m6Am demethylation adjusts stem-like properties in colorectal cancer cell [J] . Nat Commun, 2021, 12(1): 1716.
- [7] ZHUO W, SUN M, WANG K, et al. m6Am methyltransferase PCIF1 is essential for aggressiveness of gastric cancer cells by inhibiting TM9SF1 mRNA translation [J] . Cell Discov, 2022, 8(1): 48.
- [8] WU W Z, ZHANG F, ZHAO J, et al. The N6-methyladenosine: mechanisms, diagnostic value, immunotherapy prospects and challenges in gastric cancer [J] . Exp Cell Res, 2022, 415(2): 113115.
- [9] GAO S F, ZHOU J B, HU Z Y, et al. Effects of the m6Am methyltransferase PCIF1 on cell proliferation and survival in gliomas [J] . Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2022, 1868(11): 166498.
- [10] LUO Q, MO J Z, CHEN H, et al. Structural insights into molecular mechanism for N6-adenosine methylation by MT-A70 family methyltransferase METTL4 [J] . Nat Commun, 2022, 13(1): 5636.
- [11] XIE S S, CHEN W W, CHEN K H, et al. Emerging roles of RNA methylation in gastrointestinal cancers [J] . Cancer Cell Int, 2020, 20(1): 585.
- [12] LI Q H, HE W L, WAN G H. Methyladenosine modification in RNAs: classification and roles in gastrointestinal cancers [J] . Front Oncol, 2020, 10: 586789.
- [13] JIN M Z, ZHANG Y G, JIN W L, et al. A pan-cancer analysis of the oncogenic and immunogenic role of m6Am methyltransferase PCIF1 [J] . Front Oncol, 2021, 11: 753393.
- [14] PALMEIRA J D F, ARGANARAZ G A, DE OLIVEIRA G X L M, et al. Physiological relevance of ACOT8-Nef interaction in HIV infection [J] . Rev Med Virol, 2019, 29(5): e2057.
- [15] GHARIB E, NASRINASRABADI P, ZALI M R. Development and validation of a lipogenic genes panel for diagnosis and recurrence of colorectal cancer [J] . PLoS One, 2020, 15(3): e0229864.
- [16] YOU B J, CHEN L Y, HSU P H, et al. Orlistat displays antitumor activity and enhances the efficacy of paclitaxel in human hepatoma Hep3B cells [J] . Chem Res Toxicol, 2019, 32(2): 255-264.
- [17] BOULIAS K, TOCZYDŁOWSKA-SOCHA D, HAWLEY B R, et al. Identification of the m6Am methyltransferase PCIF1 reveals the location and functions of m6Am in the transcriptome [J] . Mol Cell, 2019, 75(3): 631-643.e8.
- [18] SUN H X, ZHANG M L, LI K, et al. Cap-specific, terminal N6-methylation by a mammalian m6Am methyltransferase [J] . Cell Res, 2019, 29(1): 80-82.

(收稿日期: 2022-04-03 修回日期: 2023-03-07)

《抗癌》2023年征订启事

《抗癌》杂志于1988年创刊, 主管单位为上海市科学技术协会, 主办单位为上海市抗癌协会。《抗癌》杂志坚持以读者为导向, 架起读者与医院之间的桥梁, 介绍抗癌防癌的科学知识, 倡导健康的生活方式, 宣传癌症患者战胜病魔的动人事迹, 努力为广大癌症患者和家属服务。杂志刊号: CN 31-1664/R, ISSN 1008-3065。欢迎广大读者订阅。

杂志为季刊, 每期48页。本刊季末出版, 每期8元, 全年共32元。订购请通过邮政局汇款。

通信地址: 上海市东安路270号10号楼415室《抗癌》杂志社

邮 编: 200032

电 话: 021-64042258

电子信箱: anti-cancer@163.com

《抗癌》编辑部