

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.21.004

m6A RNA 甲基转移酶 METTL3 对肠癌细胞上皮间质转化及侵袭能力的影响*

蒯 榕 徐 莹 褚以恣 周 璐 张海芹 李 吉[△]

(上海市同仁医院 上海交通大学医学院附属同仁医院 内窥镜室 上海 200336)

摘要 目的:探讨 METTL3 对肠癌细胞上皮间质转化及侵袭能力的影响。**方法:**TGFβ 诱导肠癌细胞 HCT116 和 SW480 发生上皮间质转化;细胞划痕实验和 Transwell-Matrigel 穿膜试验分别检测细胞转移侵袭能力;实时荧光定量 PCR 检测靶基因转录水平;siRNA 干扰技术敲减肠癌细胞 METTL3 水平。**结果:**细胞划痕修复实验表明:TGFβ 诱导组相对愈合面积与对照组相比显著增大 ($P<0.0001$),而 TGFβ+ 敲减 METTL3 联合组处理组相对愈合面积与 TGFβ 诱导组相比显著减少 ($P<0.0001$)。Transwell-Matrigel 细胞穿膜试验表明:TGFβ 诱导组穿膜细胞数较对照组细胞显著增多 ($P<0.0001$),而 TGFβ+ 敲减 METTL3 联合组处理组与 TGFβ 诱导组相比显著减少。TGFβ 诱导组可显著诱导肠癌细胞发生上皮间质转化,即增加核心转录因子 Snail1 和 ZEB1 水平,减低 CDH1 及上调 Vimentin(VIM)水平,METTL3 表达随 TGFβ 处理时间逐步上调。TGFβ+ 敲减 METTL3 联合组较 TGFβ 诱导组 ZEB1 和 Snail1 转录水平显著减低。**结论:**METTL3 在 TGFβ 介导肠癌细胞 EMT 中起到关键作用,敲减 METTL3 可削弱肠癌细胞转移和侵袭能力,靶向抑制 METTL3 可能成为干预结直肠癌转移的重要分子靶点。

关键词:METTL3;上皮间质转化;转移;TGFβ

中图分类号:R-33;R735.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2021)21-4019-05

The Role of METTL3 in the EMT and Invasion Ability in Colorectal Cancer Cells*

KUAI Rong, XU Ying, CHU Yi-min, ZHOU Lu, ZHANG Hai-qin, LI Ji[△]

(Digestive Endoscopy Center, Tongren Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200336, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the impact of METTL3 on EMT and invasion ability in colorectal cancer cells. **Methods:** TGFβ was used to induce EMT in HCT116 and SW480 cells. Wound scratch assay and Transwell-matrigel assay were used to evaluate the invasion ability of CRC cells. qPCR was used to measure the expression of target genes. SiRNAs were used to knockdown METTL3 in CRC cells. **Results:** The healing area in the TGFβ treated cells was larger than control cells ($P<0.0001$), while TGFβ plus METTL3 knockdown groups cells showed smaller healing area than TGFβ treated cells ($P<0.0001$). Transwell-Matrigel showed the penetrated cells in the TGFβ treated cells was more than control cells ($P<0.0001$), while TGFβ plus METTL3 knockdown groups cells showed less penetrated cells than TGFβ treated cells ($P<0.0001$). TGFβ treatment induced EMT, while expression of snail1, ZEB1, VIM and METTL3 was up-regulated and CDH1 was down-regulated. TGFβ plus METTL3 knockdown groups cells showed less expression of snail1 and ZEB1 than TGFβ treated cells. **Conclusion:** METTL3 plays key role in the TGFβ induced EMT. Knockdown of METTL3 can impair TGFβ's effect, which provides novel target for blocking metastasis in CRC.

Key words: METTL3; EMT; Metastasis; TGFβ

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R735.3 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)21-4019-05

前言

结直肠癌(Colorectal Cancer, CRC)为我国常见消化道肿瘤之一,环境和遗传因素均可影响其发生风险。近年来,结直肠癌发病率呈逐年上升趋势,患者就诊时往往已诊断为中晚期;

尽管新型靶向药物及免疫治疗正不断被临床广泛应用,晚期肠癌患者预后仍不理想^[1,2]。因此,不断揭示肠癌发生发展过程中的致病机理及分子机制可为临床治愈和早期干预 CRC 提供重要的药理靶点或诊断标记物。

晚期肠癌患者往往伴有肝转移,而上皮间充质转化(ep-

* 基金项目:上海交通大学医工(理)交叉基金项目(ZH2018QNB24);上海市长宁区科学技术委员会一般项目(CNKW2018Y02)

作者简介:蒯榕(1983-),女,硕士,主治医师,研究方向:早期胃肠道肿瘤的诊断及治疗;肿瘤分子靶向治疗临床研究,

E-mail: kr2113@shtrhospital.com

△ 通讯作者:李吉(1980-),男,硕士,研究方向:消化道肿瘤分子靶向治疗临床研究, E-mail: LJ1723@shtrhospital.com, li_li1900@126.com

(收稿日期:2021-02-24 接受日期:2021-03-21)

ithelial-mesenchymal transition, EMT) 是肠癌细胞转移侵袭能力增强、发生远处转移的主要细胞生物学变化^[3]。m6A RNA 甲基化是真核细胞内 mRNA 最为丰富的化学修饰方式, 甲基化转移酶样 3 (Methyltransferase-like 3, METTL3) 是催化 mRNA 甲基化修饰的主要转移酶^[4]。近年来, METTL3 及 m6A RNA 甲基化为肿瘤研究热点^[5], 然而其在肠癌细胞 EMT 过程中的作用研究较少。本研究拟利用 TGF β 诱导肠癌 EMT 细胞模型, 阐述 METTL3 生物学功能, 为肠癌转移机制提供新理论依据。

1 材料方法

1.1 主要实验材料

DMEM 培养基、10% 胎牛血清及青霉素 / 链霉素 (100 U/mL) 购自 Gibco 公司。TGF β 购自 R&D Systems。Trizol 及转染试剂 Lipofectamine 2000 购于美国 Thermo Fisher Scientific 公司。逆转录及荧光定量 Advantage RT-for-PCR 试剂盒及 SYBR Green qPCR Master Mix-SYBR Advantage 试剂盒购自购自大连宝生物公司的。siRNA 由上海生工合成。Transwell-Matrigel 小室购自 Corning 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养及实验分组 肠癌细胞培养 HCT116 及 SW480 于含 10% 胎牛血清和 100 U/mL 青霉素 / 链霉素的 DMEM 培养基于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养。细胞培养至 70-80% 进行传代。本实验将肠癌细胞分成三组: 1) 实验对照组: 未经任何处理肠癌细胞; 2) TGF β 诱导组: 肠癌细胞经 1 ng/mL of TGF β 处理; 3) TGF β + 敲减 METTL3 联合组: 肠癌细胞经 1 ng/mL of TGF β 处理, 并同时 TGF β 处理, 并同时 TGF β 处理, 并同时 TGF β 处理。

1.2.2 METTL3 siRNA 构建及其细胞转染 选择 2 条 METTL3 特异 siRNA 序列, 分别为: siMETTL3-1: 5'-GCA AGA ATT CTG TGA CTA T-3', siMETTL3-2: 5'-GAC UGC UCU U-UC CUU AAU A-3', 阴性对照 siRNA 为 5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG U)。siRNA 转染肠癌细胞按脂质体转染试剂 Lipofectamine 2000 说明书 (Thermo Fisher Scientific 公司) 进行操作。

1.2.3 细胞划痕实验 实验前于 6 孔板用 marker 笔标记做好定位工作。肠癌细胞铺于 6 孔板, 次日用枪头垂至横线划痕, 用 PBS 洗细胞 3 次, 去除划下的细胞, 加入无血清培养基。放入 37 °C 5% CO₂ 培养箱培养, 并于 0 h 和 48 h 取样, 拍照。计算相对迁移率%, 即 48 h 相对于 0 h 细胞迁移增加面积%。

1.2.4 Transwell-Matrigel 穿膜试验 肠癌细胞制成单细胞悬液并调整浓度至 5×10^4 接种于 Transwell 小室 (膜上已铺有 Matrigel), 下室加入正常含胎牛血清完全培养基 700 μ L, 培养 48 h 后取出小室。预冷甲醇, 固定 10 min, 在 PBS 中用棉签刮去小室上层细胞后, 进行结晶紫染色, ddH₂O 清洗。倒置显微镜取 3 个视野, 计数取均值。

1.2.5 总 RNA 提取及荧光定量 PCR 总 RNA 提取、逆转录及荧光定量 PCR 按试剂盒说明书操作。Real-time 定量 PCR 条件为: 95 °C 10 min 后, 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 40 循环。Real-time 定量 PCR 使用 ABI 7500 仪器进行。根据待测标本的 Ct 值, 以 GAPDH 作为内参照, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对表达倍数变化。其中各基因引物为: Snail1: F: 5'-TCT AGG CCC TGG CTG CTA

CA-3', R: 5'-CAT CTG AGT GGG TCT GGA GGT-3'。ZEB1: F: 5'-GGC AGA TGA AGC AGG ATG TA-3', R: 5'-GAC AGC AGT GTC TTG TTG TTG-3'。CDH1: F: 5'-TTG ACG CCG A-GA GCT ACA C GA CCG GTG CAA TCT TCA AA-3'。VIM: F: 5'-CCA AAC TTT TCC TCC CTG AAC C-3', R: 5'-CGT GAT GCT GAG AAG TTT CGT TGA-3'。GAPDH: F: 5'-CTC TGC TCC TCC TGT TCG AC-3', R: 5'-GAC CAA ATC CGT TGA CTC CG-3'。METTL3: F: 5'-CTA TCT CCT GGC ACT CGCAAGA-3', R: 5'-GCT TGA ACC GTG CAA CCA CAT C-3'。

1.3 统计方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据统计。本实验数据为正态分布, 以 $\bar{x} \pm SD$ 表示; 并采用参数检验进行分析, 其中两组数据比较采用独立样本 t 检验, 多组数据比较采用 Tukey 法检验。P<0.05 为假设检验有统计学意义。

2 结果

2.1 TGF β 诱导组细胞和对照组肠癌细胞的侵袭能力和上皮间充质转化 (EMT) 比较

我们利用 1 ng/mL of TGF β 处理 HCT116 和 SW480 肠癌细胞 48 h。细胞划痕实验表明: HCT116 细胞中, TGF β 诱导组相对愈合面积 ($49.34 \pm 4.94\%$) 较对照组细胞 ($64.17 \pm 2.91\%$) 显著增大 ($t=4.48, P=0.011$); SW480 细胞中, TGF β 诱导组相对愈合面积 ($49.63 \pm 1.19\%$) 较对照组细胞 ($65.90 \pm 1.02\%$) 显著增大 ($t=17.95, P<0.0001$), 见图 1。Transwell-Matrigel 实验表明: HCT116 细胞中, TGF β 诱导组穿膜细胞数 (44 ± 2 个 / 高倍镜视野) 较对照组细胞 (29 ± 2 个 / 高倍镜视野) 显著增多 ($t=10.06, P=0.0005$); SW480 细胞中, TGF β 诱导组穿膜细胞数 (19 ± 2 个 / 高倍镜视野) 较对照组细胞 (7 ± 2 个 / 高倍镜视野) 显著增多 ($t=10.16, P=0.0005$), 见图 2。利用 qPCR 实验, 我们发现 TGF β 诱导组可显著诱导肠癌细胞发生上皮间充质转化, 即增加核心转录因子 Snail1 和 ZEB1 水平, 减低 CDH1 及上调 Vimentin (VIM) 水平, 见表 1。

2.2 TGF β 诱导肠癌细胞 EMT 过程中 METTL3 表达变化

TGF β 处理肠癌细胞 HCT116 及 SW480 细胞 6 h、12 h、24 h 及 48 h 后, qPCR 检测发现 METTL3 表达随 TGF β 处理时间逐步上调; 其中, TGF β 处理肠癌细胞 HCT116 及 SW480 细胞 12 h、24 h 及 48 h 后 METTL3 相对表达倍数与 0 h 相比有显著差异 ($P<0.0001$), 详见表 2。

2.3 TGF β 诱导组和 TGF β + 敲减 METTL3 联合组细胞促转移和侵袭能力作用比较

2 条 siRNA (siMETTL3-1 和 siMETTL3-2) 转染 HCT116 细胞, 转染后 METTL3 相对表达倍数变化如表 3 所示。结果 siMETTL3-1 敲减效果显著, 选此 siRNA 进行后续试验。

细胞划痕修复实验表明: TGF β 诱导组相对愈合面积 (67.34 ± 0.99) 与对照组 (49.54 ± 0.23) 相比显著增大 ($q=52.75, P<0.0001$), 而 TGF β + 敲减 METTL3 联合组处理组相对愈合面积 (48.80 ± 0.010) 与 TGF β 诱导组相比显著减少 ($q=198.1, P<0.0001$), 见图 3。Transwell-Matrigel 细胞穿膜试验表明: TGF β 诱导组穿膜细胞数 (55 ± 3 个 / 高倍镜视野) 较对照组细胞 (21 ± 2 个 / 高倍镜视野) 显著增多 ($q=25.23, P<0.0001$), 而 TGF β + 敲减 METTL3 联合组处理组 (45 ± 3 个 / 高倍镜视野)

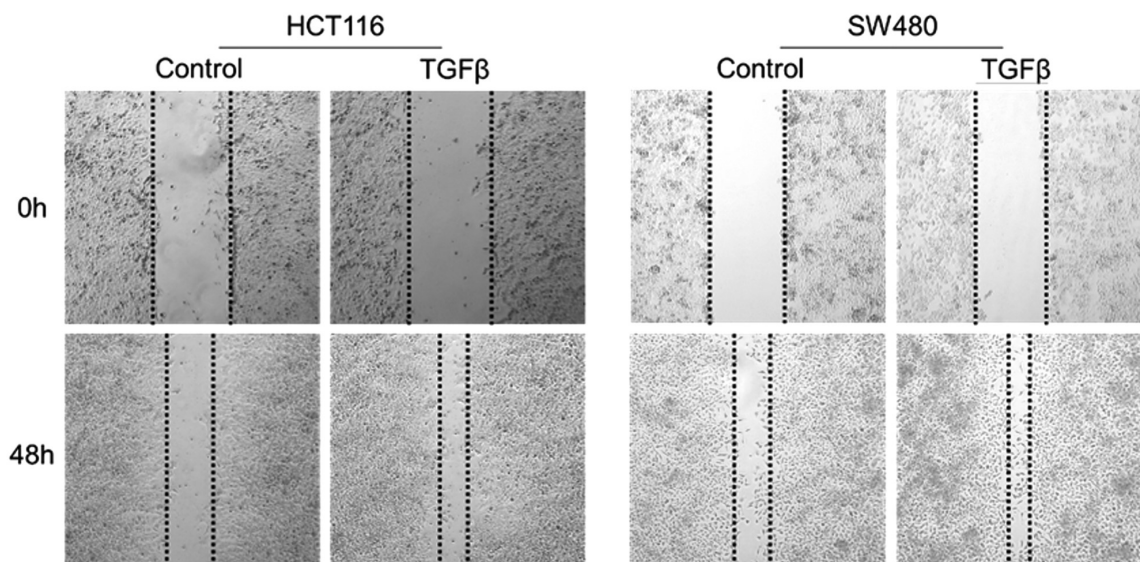


图1 TGFβ 处理组和对照肠癌细胞组划痕修复能力比较

Fig.1 The wound healing assay for TGFβ treated and control colorectal cancer cells

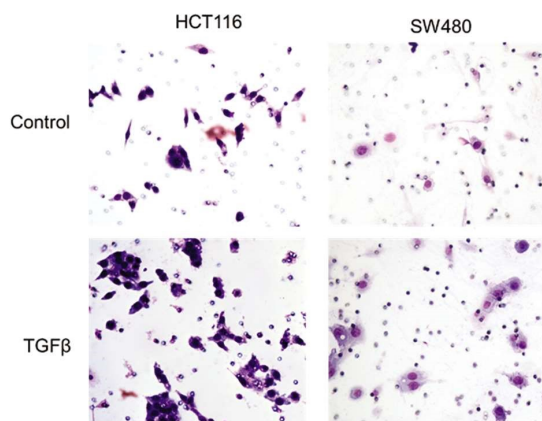


图2 TGFβ 诱导组和对照肠癌细胞 Transwell-Matrigel 小室穿膜能力比较

Fig.2 The Transwell-Matrigel assay for TGFβ treated and control colorectal cancer cells

与 TGFβ 诱导组相比显著减少($q=7.838$, $P=0.0035$), 见图 4。

2.4 TGFβ 诱导组和 TGFβ+ 敲减 METTL3 联合组 ZEB1 和 Snail1 转录表达变化

如表 4 所示, 荧光定量 PCR 结果: TGFβ 诱导组 ZEB1 和

Snail1 转录水平较对照组显著增加, 而 TGFβ+ 敲减 METTL3 联合组较 TGFβ 诱导组显著减低。

3 讨论

结直肠癌在我国发病率逐年升高, 且晚期患者预后不佳。结直肠癌致病机制复杂, 环境和遗传因素共同促进结直肠癌的发生、发展。研究发现 m6A RNA 甲基化可能参与疾病的发生过程, 尤其在近年来的癌症研究中不断被报导^[6-9]。甲基化转移酶样 3 (Methyltransferase-like 3, METTL3) 是催化 mRNA 甲基化修饰的主要转移酶。研究发现 METTL3 在食管癌、肝癌、胃癌、乳腺癌、结直肠癌等表达升高^[10-16]。在结直肠癌中, METTL3 在转移组织中上调更为明显, 且高水平 METTL3 与患者预后不佳正相关^[17-19], 提示 METTL3 不仅与结直肠癌发生相关、更与肠癌细胞转移侵袭有关。据此, 本研究利用 TGFβ 诱导肠癌细胞发生 EMT, 增强其转移侵袭能力; 并研究 METTL3 在其过程中的重要作用, 阐述 m6A RNA 甲基化修饰在肠癌转移侵袭中的生物学意义。

TGFβ 为结直肠癌微环境中常见的促 EMT、促转移和侵袭细胞因子, 研究报导 TGFβ 表达水平与肠癌发生、发展及预后有着密切的关系^[20,21]。我们利用 TGFβ 成功诱导了肠癌细胞

表 1 TGFβ 诱导组和对照肠癌细胞 EMT 相关基因的相对表达倍数比较

Table 1 The relative expression of EMT associated genes in TGFβ treated and control cells

Cell lines	gene	control	TGFβ treatment	t*	P*
HCT116	Snail1	1.00± 0.098	5.44± 0.16	40.45	<0.0001
	ZEB1	1.00± 0.23	4.44± 0.11	23.30	<0.0001
	CDH1	1.00± 0.13	0.53± 0.065	5.71	0.0047
	VIM	1.00± 0.14	2.54± 0.14	13.62	0.0002
SW480	Snail1	1.00± 0.13	5.65± 0.40	19.14	<0.0001
	ZEB1	1.00± 0.34	4.18± 0.13	15.03	0.0001
	CDH1	1.00± 0.26	0.41± 0.057	3.80	0.019
	VIM	1.00± 0.20	7.54± 0.40	25.17	<0.0001

Note: *TGFβ treatment vs control.

表 2 肠癌细胞 METTL3 在 TGFβ 不同处理时间后的表达变化

Table 2 The relative expression of METTL3 by TGFβ treatment at different time

Time	HCT116			SW480		
	Fold Change	*t	*P	Fold Change	*t	*P
0 h	1.00± 0.063			1.00± 0.010		
6 h	1.11± 0.025	0.38	0.99	0.80± 0.036	9.183	0.7695
12 h	3.5± 0.39	8.39	<0.0001	3.48± 0.39	11.13	<0.0001
24 h	6.49± 0.60	18.31	<0.0001	3.48± 0.45	24.73	<0.0001
48 h	6.53± 0.40	18.43	<0.0001	5.44± 0.19	19.88	<0.0001

Note: *different time point vs 0 h.

表 3 对照及 siRNA 转染 HCT116 细胞 METTL3 相对表达倍数比较

Table 3 The relative expression of METTL3 in control and METTL3 knockdown HCT116 cells

Groups	Fold Change	*t	*P
Control	1.00± 0.071		
siMETTL3-1	0.23± 0.047	12.57	<0.001
siMETTL3-2	0.57± 0.057	7.04	0.007

Note: *siMETTL3-1 or siMETTL3-2 vs control.

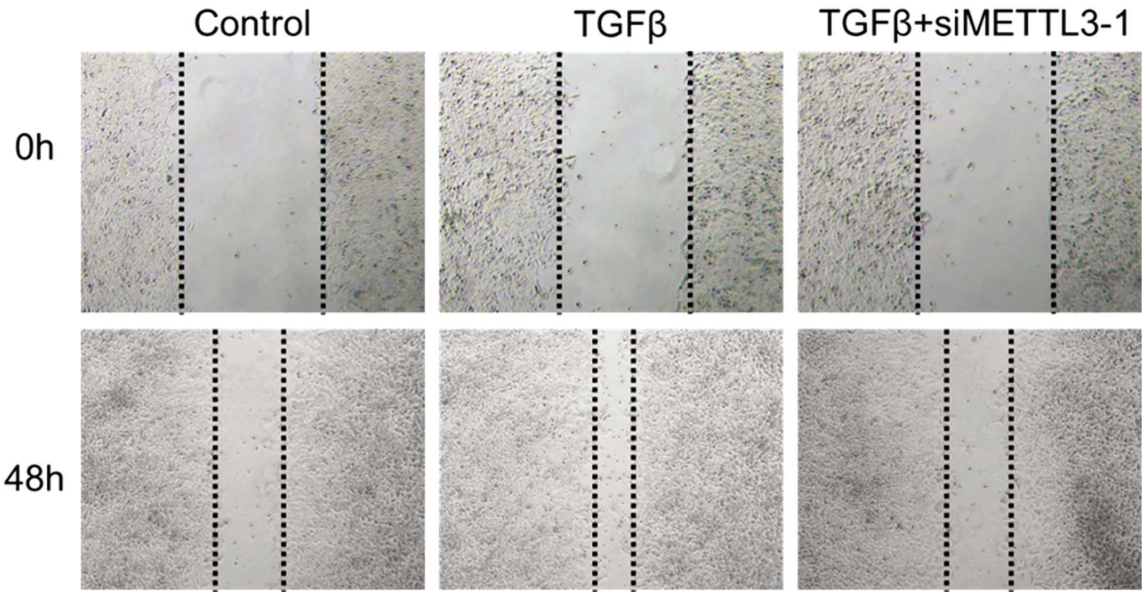


图 3 TGFβ 诱导组和 TGFβ+ 敲减 METTL3 联合组处理组细胞行划痕修复能力比较

Fig.3 The wound healing assay for TGFβ treated, TGFβ plus METTL3 knockdown and control colorectal cancer cells

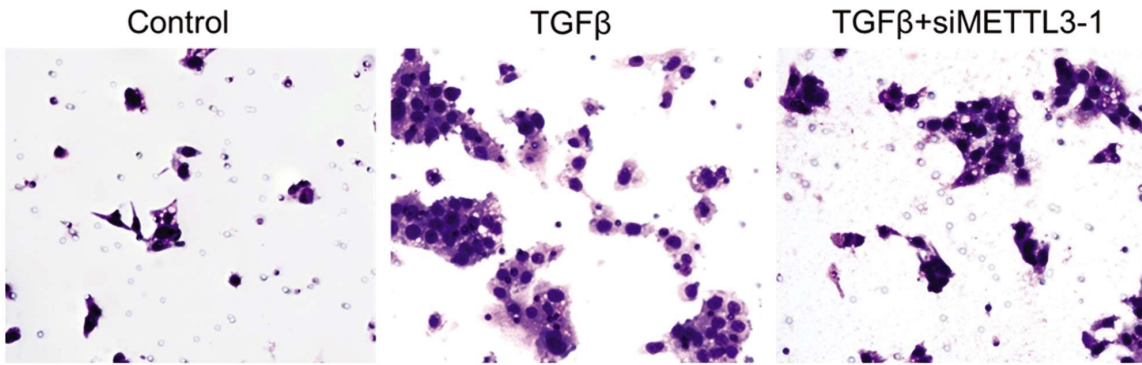


图 4 TGFβ 诱导组和 TGFβ+ 敲减 METTL3 联合组处理组 Transwell-Matrigel 小室穿膜能力比较

Fig.4 The Transwell-Matrigel assay for TGFβ treated, TGFβ plus METTL3 knockdown and control colorectal cancer cells

表 4 TGFβ 诱导组和 TGFβ+ 敲减 METTL3 联合组 ZEB1 和 Snail1 转录水平

Table 4 The expression of ZEB1 and Snail1 in TGFβ treated, TGFβ plus METTL3 knockdown and control cells

gene	Group	Fold Change	q	P
Snail1	Control	1.00± 0.068		
	TGFβ treatment	5.42± 0.30*	10.68*	0.0007
	TGFβ+siMETTL3	2.30± 0.19 [#]	25.69 [#]	<0.0001
ZEB1	Control	1.00± 0.10		
	TGFβ treatment	4.70± 0.44*	24.17*	<0.0001
	TGFβ+siMETTL3	2.5± 0.081 [#]	14.67 [#]	0.0001

Note: * TGFβ treatment vs control; [#]TGFβ+siMETTL3 vs TGFβ treatment.

HCT116 和 SW480 发生上皮间充质转化, 表现为核心转录因子 Snail1 和 ZEB1 水平, 减低 CDH1 及上调 VIM 水平。同时, 细胞划痕实验发现 TGFβ 处理细胞划痕修复能力显著提升, 体外小室侵袭穿膜能力也得到增加。

在上述细胞表型变化中, 我们检测了 METTL3 表达变化。我们发现 METTL3 表达随 TGFβ 处理时间逐步上调, 且在 24h 达到峰值水平。我们推测 METTL3 可能在 TGFβ 诱导肠癌细胞发生 EMT 中起到重要作用。据此, 我们利用 siRNA 干扰技术成功在肠癌细胞 HCT116 中减低 METTL3 水平, 同时予以 TGFβ 处理。结果发现 TGFβ 对肠癌细胞促 EMT、促转移侵袭能力在 METTL3 敲减细胞中显著减弱, 表型为划痕修复能力和小室穿膜能力减低, 表明 METTL3 在 TGFβ 诱导作用中起到关键作用。

ZEB1 和 Snail1 是肿瘤细胞发生 EMT 的核心转录因子, 其表达变化会直接影响 EMT 的发生^[22-26]。我们发现 TGFβ 可显著诱导肠癌细胞 ZEB1 和 Snail1 转录水平, 但同时敲减 METTL3 后, 其上调能力减弱。有报导称 METTL3 在肿瘤细胞(食管癌、宫颈癌和肝癌细胞)中增加 Snail1 mRNA m6 甲基化修饰水平, 导致其转录增加^[27,28]。那么本研究中 Snail1 和 ZEB1 在结肠水平升高是否由于 METTL3 导致, 还有待进步研究验证。

综上所述, METTL3 在 TGFβ 介导肠癌细胞 EMT 中起到关键作用, 敲减 METTL3 可削弱肠癌细胞转移和侵袭能力。分子机制上, METTL3 可能通过增强靶基因 mRNA m6 甲基化修饰水平, 促进其转录水平。研究表明, 靶向抑制 METTL3 有望成为干预结肠转移的重要分子靶点。

参考文献(References)

- [1] Hirano H, Takashima A, Hamaguchi T, et al. Shida D, Kanemitsu Y; Colorectal Cancer Study Group (CCSG) of the Japan Clinical Oncology Group (JCOG). Current status and perspectives of immune checkpoint inhibitors for colorectal cancer [J]. Jpn J Clin Oncol, 2021, 51 (1): 10-19
- [2] Malki A, ElRuz RA, Gupta I, et al. Molecular Mechanisms of Colon Cancer Progression and Metastasis: Recent Insights and Advancements[J]. Int J Mol Sci. 2020, 24, 22(1): 130
- [3] Vu T, Datta PK. Regulation of EMT in Colorectal Cancer: A Culprit in Metastasis[J]. Cancers (Basel), 2017, 9(12): 171
- [4] Xie S, Chen W, Chen K, et al. Emerging roles of RNA methylation in gastrointestinal cancers[J]. Cancer Cell Int, 2020, 20(1): 585
- [5] Yang X, Hu X, Liu J, et al. N6-methyladenine modification in noncoding RNAs and its function in cancer[J]. Biomark Res, 2020, 8(1): 61
- [6] 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
- [7] Li M, Zha X, Wang S. The role of N6-methyladenosine mRNA in the tumor microenvironment [J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2021, 1875(2): 188522
- [8] Zhu J, Xiao J, Wang M, et al. Pan-Cancer Molecular Characterization of m (6)A Regulators and Immunogenomic Perspective on the Tumor Microenvironment[J]. Front Oncol, 2021, 10: 618374
- [9] Shen S, Yan J, Zhang Y, et al. N6-methyladenosine (m6A)-mediated messenger RNA signatures and the tumor immune microenvironment can predict the prognosis of hepatocellular carcinoma [J]. Ann Transl Med, 2021, 9(1): 59
- [10] Zhang M, Bai M, Wang L, et al. Targeting SNHG3/miR-186-5p reverses the increased m6A level caused by platinum treatment through regulating METTL3 in esophageal cancer [J]. Cancer Cell Int, 2021, 21(1): 114
- [11] Fan Z, Gao Y, Zhang W, et al. METTL3/IGF2BP1/CD47 contributes to the sublethal heat treatment induced mesenchymal transition in HCC[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2021, 546: 169-177
- [12] Song C, Zhou C. HOXA10 mediates epithelial-mesenchymal transition to promote gastric cancer metastasis partly via modulation of TGFβ2/Smad/METTL3 signaling axis [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2021, 40(1): 62
- [13] Rong D, Dong Q, Qu H, et al. m (6)A-induced LINC00958 promotes breast cancer tumorigenesis via the miR-378a-3p/YY1 axis [J]. Cell Death Discov, 2021, 7(1): 27
- [14] Tassinari V, Cesarini V, Tomaselli S, et al. ADAR1 is a new target of METTL3 and plays a pro-oncogenic role in glioblastoma by an editing-independent mechanism[J]. Genome Biol, 2021, 22(1): 51
- [15] Cheng L, Zhang X, Huang YZ, et al. Metformin exhibits antiproliferation activity in breast cancer via miR-483-3p/METTL3/m(6)A/p21 pathway[J]. Oncogenesis, 2021, 10(1): 7
- [16] Shen S, Yan J, Zhang Y, et al. N6-methyladenosine (m6A)-mediated messenger RNA signatures and the tumor immune microenvironment can predict the prognosis of hepatocellular carcinoma [J]. Ann Transl Med, 2021, 9(1): 59
- [17] Xiang S, Liang X, Yin S, et al. N6-methyladenosine methyltransferase METTL3 promotes colorectal cancer cell proliferation through enhancing MYC expression [J]. Am J Transl Res, 2020, 12 (5): 1789-1806

(下转第 4074 页)

- [5] Kaźmierczak-Siedlecka K, Skonieczna-Żydecka K, Folwarski M, et al. Influence of malnutrition stage according to GLIM 2019 criteria and SGA on the quality of life of patients with advanced cancer [J]. *Nutr Hosp*, 2020, 37(6): 1179-1185
- [6] Guo ZQ, Yu JM, Li W, et al. Survey and analysis of the nutritional status in hospitalized patients with malignant gastric tumors and its influence on the quality of life [J]. *Support Care Cancer*, 2020, 28(1): 373-380
- [7] Agudo A, Cayssials V, Bonet C, et al. Inflammatory potential of the diet and risk of gastric cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2018, 107(4): 607-616
- [8] Arslan M, Soylu M, Kaner G, et al. Evaluation of malnutrition detected with the Nutritional Risk Screening 2002 (NRS-2002) and the quality of life in hospitalized patients with chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Hippokratia*, 2016, 20(2): 147-152
- [9] 何燕, 赵龙超, 刘丹萍, 等. SF-36 和 SF-12 在人群生命质量调查中的性能比较研究[J]. *现代预防医学*, 2017, 44(5): 852-862
- [10] 叶春荣, 王雯. 食管腺癌和贲门癌关系的研究进展[J]. *临床消化病杂志*, 2007, 19(3): 195-198
- [11] 张富治, 窦忠义, 李永伟, 等. 河北省涉县 2000~2004 年恶性肿瘤发病与死亡[C]. 中国抗癌协会 / 中华医学会肿瘤学分会. 第五届中国肿瘤学术大会暨第七届海峡两岸肿瘤学术会议、国际肿瘤细胞与基因治疗学会会议、第二届中国肿瘤介入治疗学术会议论文集, 2008
- [12] Abdi E, Latifi-Navid S, Zahri S, et al. Risk factors predisposing to cardia gastric adenocarcinoma: Insights and new perspectives[J]. *Cancer Med*, 2019, 8(13): 6114-6126
- [13] 韩伟, 王正彩, 周敏, 等. TAMs 在贲门癌和非贲门癌组织中的表达及其临床意义[J]. *现代生物医学进展*, 2013, 13(31): 6073-6076
- [14] Li S, Zhu J, Li J, et al. MicroRNA-141 inhibits proliferation of gastric cardia adenocarcinoma by targeting MACC1[J]. *Arch Med Sci*, 2018, 14(3): 588-596
- [15] 丁丽平, 张趁欣, 张爽. 消化系统恶性肿瘤患者营养状况及其影响因素分析[J]. *预防医学情报杂志*, 2020, 36(9): 1228-1231, 1237
- [16] Nakano T, Koyama K. Surgery and Perioperative Management of Esophageal Cancer Patients with Malnutrition[J]. *Kyobu Geka*, 2020, 73(10): 876-882
- [17] Gilliland TM, Villafane-Ferriol N, Shah KP, et al. Nutritional and Metabolic Derangements in Pancreatic Cancer and Pancreatic Resection[J]. *Nutrients*, 2017, 9(3): 243
- [18] Hayama T, Ozawa T, Okada Y, et al. The pretreatment Controlling Nutritional Status (CONUT) score is an independent prognostic factor in patients undergoing resection for colorectal cancer [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 13239
- [19] 杨怡, 韩艳. 个体化护理模式对晚期胃癌和贲门癌患者化疗后营养状况及生活质量的影响 [J]. *中国肿瘤临床与康复*, 2015, 22(9): 1083-1087
- [20] 许静涌, 杨剑, 陈伟, 等. 老年肿瘤住院患者营养不良的横断面调查[J]. *中华老年医学杂志*, 2019, 38(11): 1298-1303
- [21] 张雨, 张敏, 姬颖华, 等. 消化系统恶性肿瘤患者营养风险的相关危险因素[J]. *新乡医学院学报*, 2020, 37(11): 55-58
- [22] 毕研霞, 洪忠新, 张立红, 等. 肿瘤化疗患者营养风险评估及影响因素分析[J]. *中国食物与营养*, 2018, 24(3): 66-70
- [23] 叶忠伟, 吴雪莲, 吴敏华, 等. 营养筛查下针对性早期肠内营养对消化道肿瘤患者化疗并发症和营养状况的影响[J]. *中华全科医学*, 2019, 17(2): 149-152
- [24] 钟明霞, 傅聿铭, 吴万庆, 等. 早期肠内营养对结肠癌根治术后患者营养状态及消化道功能恢复的影响 [J]. *癌症进展*, 2020, 18(3): 317-320
- [25] 王水莲, 杨芳. 预后营养指数对癌症患者预后的临床意义[J]. *现代肿瘤医学*, 2019, 27(6): 184-187

(上接第 4023 页)

- [18] Zhu W, Si Y, Xu J, et al. Methyltransferase like 3 promotes colorectal cancer proliferation by stabilizing CCNE1 mRNA in an m6A-dependent manner[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(6): 3521-3533
- [19] Peng W, Li J, Chen R, et al. Upregulated METTL3 promotes metastasis of colorectal Cancer via miR-1246/SPRED2/MAPK signaling pathway[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 393
- [20] Ioannou M, Kouvaras E, Papamichali R, et al. Smad4 and epithelial-mesenchymal transition proteins in colorectal carcinoma: an immunohistochemical study[J]. *J Mol Histol*, 2018, 49(3): 235-244
- [21] Young KH, Gough MJ, Crittenden M. Tumor immune remodeling by TGFβ inhibition improves the efficacy of radiation therapy [J]. *Oncoimmunology*, 2014, 4(3): e955696
- [22] Li Y, Li L, Wu J, et al. YEATS4 is associated with poor prognosis and promotes epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis by regulating ZEB1 expression in breast cancer [J]. *Am J Cancer Res*, 2021, 11(2): 416-440
- [23] Ye DX, Wang SS, Huang Y, et al. USP43 directly regulates ZEB1 protein, mediating proliferation and metastasis of colorectal cancer[J]. *J Cancer*, 2021, 12(2): 404-416
- [24] Anastasov N, Hirmer E, Klenner M, et al. MEK1 Inhibitor Combined with Irradiation Reduces Migration of Breast Cancer Cells Including miR-221 and ZEB1 EMT Marker Expression [J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(12): 3760
- [25] Wu L, Zhao N, Zhou Z, et al. PLAGL2 promotes the proliferation and migration of gastric cancer cells via USP37-mediated deubiquitination of Snail1[J]. *Theranostics*, 2021, 11(2): 700-714
- [26] Zhou Z, Liu X, Li Y, et al. TP53INP2 Modulates Epithelial-to-Mesenchymal Transition via the GSK-3β/beta-Catenin/Snail1 Pathway in Bladder Cancer Cells[J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 9587-9597
- [27] Yu X, Zhao H, Cao Z. The m6A methyltransferase METTL3 aggravates the progression of nasopharyngeal carcinoma through inducing EMT by m6A-modified Snail mRNA[J]. *Minerva Med*, 2020[Epub ahead of print]
- [28] Lin X, Chai G, Wu Y, et al. RNA m (6)A methylation regulates the epithelial mesenchymal transition of cancer cells and translation of Snail[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 2065