

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.09.001

• 基础研究 •

m6A 甲基化修饰识别蛋白 YTHDF2 在肝癌组织中的表达及临床意义*

王月帆¹ 葛春梅¹ 尹昊瓚¹ 戴智慧¹ 董峻鹏¹ 季 曼¹ 李 雯² 杨 富^{1Δ}

(1 海军军医大学医学遗传学教研室 上海 200433; 2 东方肝胆外科医院肝外三科 上海 200438)

摘要 目的:探讨 m6A 甲基化修饰结合蛋白 YTHDF2(YTH domain-containing family protein 2)在肝癌(Hepatocellular carcinoma, HCC)组织中的表达及临床意义。**方法:**1)采用 Western blot 和实时荧光定量 PCR(Quantitative Real Time PCR, qRT-PCR)检测 20 对肝癌和癌旁组织中 YTHDF2 在蛋白和 mRNA 水平的表达情况。2)通过免疫组织化学(Immunohistochemistry, IHC)检测 40 对肝癌和癌旁组织芯片 YTHDF2 的表达情况,并以 H-score 评分法进行半定量分析。3)通过基因表达谱数据动态分析数据库 GEPIA (<http://gepia.cancer-pku.cn/>)分析 YTHDF2 在肝癌组织中的表达及对患者生存预后的影响;通过肿瘤免疫评估资源数据库 TIMER (<https://cistrome.shinyapps.io/timer/>)分析 YTHDF2 与肝癌免疫微环境的相关性。**结果:**相比于癌旁肝组织,YTHDF2 在肝癌组织中蛋白和 mRNA 水平均显著高表达($P<0.05$);GEPIA 数据库分析验证:YTHDF2 肝癌组织表达水平高于正常肝组织,且 YTHDF2 在肝癌不同分期中表达水平均高于正常肝组织($P=0.0206$),Stage III 期最为明显;YTHDF2 高表达患者的总体生存率(Overall Survival, OS)和无复发生存率(Disease Free Survival, DFS)均较差($P=0.00027$ 和 $P=0.013$);TIMER 数据库分析表明:YTHDF2 在肝癌免疫微环境中与各类免疫细胞呈正相关($P<0.05$),但肝癌患者的累积存活率不受免疫细胞的影响($P>0.05$),YTHDF2 高表达对患者的生存预后具有不良影响($P=0.007$)。**结论:**YTHDF2 在肝癌组织中显著高表达,且 YTHDF2 高表达水平对肝癌患者生存预后具有不良影响,YTHDF2 可作为肝癌临床预后判断的分子标志物,为今后肝癌治疗靶点提供新的策略。

关键词:肝癌;m6A 甲基化修饰;YTHDF2;临床预后**中图分类号:**R-33;R735.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2021)09-1601-06

Expression and Clinical Significance of m6A Binding-Protein YTHDF2 in Hepatocellular Carcinoma*

WANG Yue-fan¹, GE Chun-mei¹, YIN Hao-zan¹, DAI Zhi-hui¹, DONG Jun-peng¹, JI Man¹, LI Wen², YANG Fu^{1Δ}

(1 The Department of Medical Genetics, Naval Medical University, Shanghai, 200433, China;

2 The Third Department of Hepatic Surgery, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Shanghai, 200438, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression and clinical significance of m6A methylated modification binding protein YTHDF2 (YTH domain-containing family protein 2) in hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods:** 1) The protein and mRNA expression of YTHDF2 in 20 pairs of HCC tissue and para-cancer tissue was detected by western blot and quantitative real-time PCR (qRT-PCR). 2) The expression of YTHDF2 in microarray with 40 pairs of HCC tissue and para-tumor tissue was detected by immunohistochemistry. H-score was used for semi-quantitative analysis. 3) The expression of YTHDF2 in HCC as well as its influence on survival prognosis of patients were analyzed by the GEPIA database (<http://gepia.cancer-pku.cn/>); The correlation between YTHDF2 and tumor immune microenvironment was analyzed by the TIMER database (<https://cistrome.shinyapps.io/timer/>). **Results:** The protein and mRNA expression of YTHDF2 in HCC was significantly higher than that in para-tumor tissue ($P<0.05$). GEPIA analysis verified that the expression of YTHDF2 in HCC was higher than that in normal liver tissue; the expression of YTHDF2 in different stages of HCC was also higher than that in normal liver tissue ($P=0.0206$), which was most obvious at Stage III. The overall survival (OS) and disease-free survival (DFS) of patients with high YTHDF2 expression were poor ($P=0.00027$ and $P=0.013$). TIMER database analysis showed that YTHDF2 was positively correlated with various types of immune cells in the immune microenvironment of HCC ($P<0.05$), but cumulative survival of HCC patients was not affected by immune cells ($P>0.05$), and the overexpression of YTHDF2 had a negative influence on the survival prognosis of patients ($P=0.007$). **Conclusions:** YTHDF2 was obviously overexpressed in HCC tissue. The overexpression of YTHDF2 had an adverse effect on the survival prognosis of HCC patients, suggesting that YTHDF2 may be a predictive molecular marker for clinical prog-

* 基金项目:国家重点研发计划项目(2016YFC1302303);国家自然科学基金项目(81972657;81672345)

作者简介:王月帆(1996-),男,硕士研究生,主要研究方向:肝癌 RNA 甲基化修饰,E-mail: wangyuefan2015@163.com

Δ 通讯作者:杨富(1980-),男,博士研究生导师,教授,主要研究方向:肝癌及炎-癌转换表观遗传学调控机制,

E-mail: yangfusq1997@smmu.edu.cn

(收稿日期:2020-11-23 接受日期:2020-12-18)

nosis of HCC and providing a new strategy for therapeutic targets of HCC in the future.

Key words: Hepatocellular carcinoma; M6A methylation modification; YTHDF2; Prognosis

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R735.7 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)09-1601-06

前言

肝细胞癌是临床最常见的原发性肝脏肿瘤,具有生长快,侵袭性强,以及高发病率、高复发率和高死亡率的特点^[1],严重影响着人类健康。肝癌病因众多,主要为肝炎性病毒,酒精,代谢紊乱,遗传与免疫,环境等因素^[2],且除手术和靶向药物外,尚缺乏更为有效的治疗手段。探究肝癌发生发展的分子生物学机制,可以为肝癌治疗提供新的策略以期改善患者的预后,深入此方面的研究也显得依然重要。近年来,RNA 甲基化修饰尤其是 m6A 甲基化修饰(N6-methyladenosine, m6A),逐渐被证实在肝癌的发生发展过程中扮演着重要角色^[3-11]。而 m6A 甲基化修饰是一个动态可逆的过程,主要由甲基化转移酶复合物(writer),去甲基化酶(eraser)以及结合蛋白(reader)调控。当肿瘤发生时,m6A 甲基化修饰的稳态被破坏,这些"编码器","消码器"及"读码器"表达改变及其意义至今尚不清楚。YTHDF2,作为 m6A 甲基化修饰最主要的 reader,可结合到靶基因的 mRNA 上并影响其 mRNA 稳定性,从而调控基因表达,肿瘤发生与发展等一系列生物学过程^[11,12]。但 YTHDF2 在肝癌发生发展中的表达却尚未有定论,因此本文旨在探讨 YTHDF2 在肝癌组织中的表达及其临床意义,为肝癌的防治提供新的策略。

1 材料与方法

1.1 临床组织样本和试剂

1.1.1 正常肝组织,癌旁肝组织和肝癌组织样本 本研究所用到的 20 对肝癌及癌旁组织样本和组织芯片样本均来自东方肝胆外科医院国家肝癌样本库,所有临床样本性质均被病理检查证实,且采样前已通过病人知情同意和医院伦理审查委员会批准。

1.1.2 试剂 RIPA 裂解液(强),BCA 定量试剂盒,5X loading buffer,抗体稀释液(碧云天公司);SDS-PAGE 胶试剂来自(雅酶公司);无 RNA 酶水,Tween-20,脱脂奶粉(上海生工生物);0.22 μm PVDF 膜(美国 Millipore 公司);TRIzol RNA 提取试剂(美国 Invitrogen 公司);反转录及实时荧光定量 PCR 试剂(takara 公司);鼠抗人 ACTB 抗体(美国 abcam)和兔抗人 YTHDF2 抗体(CST 公司);羊抗鼠及羊抗兔二抗(美国 LI-CO 公司);无水乙醇,甲醇,异丙醇,氯仿,PBS 等试剂(博光生物)。

表 1 实时荧光定量 PCR 所用引物

Table 1 Quantitative Real Time PCR primer sequences

Genes	Sequences
YTHDF2 F	5'-CAACGGTTGCATCTGCATATCCT-3'
YTHDF2 R	5'-TCTTAGGACTCCTAGTACTTTACT-3'
18S RNA F	5'-GGAGAGGGAGCCTGAGAAACG-3'
18S RNA R	5'-TTACAGGGCCTCGAAAGAGTCC-3'

1.2 实验方法及步骤

1.2.1 组织蛋白及 RNA 提取方法 蛋白提取:临床组织样本

剪成小碎片,按照每 50 mg 组织加入 300 μL 的 RIPA 裂解液,研磨匀浆,充分裂解,均在冰上操作;裂解后,置于 4 ℃ 离心机中,14000 r/min (下同)离心 10 min;吸取上清转移至新的 Ep 管中,加入 5× loading buffer 充分混匀,100 ℃ 加热 10 min,并用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。RNA 提取:取 50 mg 左右组织样本,置于无 RNase 的 Ep 管,加入钢珠和 1 mL TRIzol 试剂,100 Hz 组织破碎仪研磨 180 s,4 ℃,离心 5 min;全程在冰上操作,裂解液加入 200 μL 氯仿,充分震荡 20 s 后,室温静置 3 min,离心 15 min;吸取 400 μL 无色上清置于新 Ep 管中,加入等体积异丙醇,充分颠倒混匀,室温静置 10 min,再次离心 10 min;弃上清,加入 1 mL 80%乙醇上下颠倒混匀,离心 5 min;小心弃上清,室温静置 3 min,挥发乙醇;用适量 DEPC 水溶液 RNA 沉淀,用 Nanodrop 测量 RNA 样本浓度。所提取的蛋白和 RNA 样均保存于 -80 ℃ 冰箱中。

1.2.2 Western blot 实验 取 20 μg 总蛋白依据目的蛋白分子量大小选择相应浓度的下层胶,所有实验操作均依据 PAGE 凝胶速制试剂盒说明书。配胶后,依次进行电泳,转膜;使用 5% BSA 的 PBST 溶液,室温封闭 2 h;1:1000 的 YTHDF2 和 1:2000 的 ACTB 抗体稀释液 4 ℃ 孵育过夜,PBST 溶液洗三次,每次 5 min;1:5000 的羊抗鼠及羊抗兔二抗稀释液室温孵育 1 h,PBST 溶液洗三次,每次 5 min。Odyssey 扫描仪显示结果,并以灰度值进行相对定量分析。

1.2.3 反转录 PCR 和 qRT-PCR 实验 反转录:取 1000 ng RNA 在 20 μL 反转录体系按照说明书设置 PCR 反应条件:37 ℃ 15 min,85 ℃ 5 s,4 ℃,配制溶液过程所使用的试剂耗材均为无 RNase,在冰上操作。qRT-PCR 反应:取 2 μL 合成的 cDNA 在冰上按照说明书配制 20 μL 预混液,并以 95 ℃ 10 min;95 ℃ 5 s,60 ℃ 15 s,72 ℃ 20 s 循环 40 次。本研究以 18S RNA 为内参,所用引物序列如下表,每个样本分别进行生物学重复和技术重复各三次,最终结果采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行相对定量计算。

1.2.4 芯片免疫组织化学实验 利用本课题组前期制作的肝癌组织芯片,60 ℃ 烘箱烘烤 20 min,依次经过二甲苯(10 min)--二甲苯(10 min)--无水乙醇(5 min)--95%乙醇(5 min)--75%乙醇(5 min)进行水化处理。将芯片浸入加热至抗原修复液中,高温高压煮两分钟,待自然冷却后取出;PBS 溶液冲洗三次,每次 5 min;吸干 PBS 后,5%BSA 于 37 ℃ 封闭 30 min;吸去封闭液,滴加一抗,4 ℃ 孵育过夜;PBS 洗三次,每次 5 min;滴加二抗,37 ℃ 孵育 30 min;去除二抗稀释液,PBS 洗三次,每次 5 min。滴加 DAB 显色液,反应 10 min,显微镜连续观察,适时终止反应;加入苏木素精染液染色 15 min,自来水缓慢冲洗 5 min;5%盐酸酒精分化 15 min,自来水冲 30 min,显微镜下观察直至胞核和核内染色质清晰;伊红染色 5 min;梯度脱水,二甲苯透明处理两次,共 10 min;滴加中性树脂后,盖玻片封固。两位高年资的病理科医生判读结果:在未知分组的情况下,高倍镜下随机选取五个不同视野按照 H-Score 评分法,即以染色

强度和阳性细胞比例乘积进行评分; YTHDF2 主要在胞质中, 染色强度以胞质无染色 0 分; 浅黄色 1 分; 深黄色 2 分; 棕褐色 3 分。阳性细胞比例 1-25 % 1 分; 阳性细胞比例 26-50 % 2 分; 阳性细胞比例 51-75 % 3 分; 阳性细胞比例 76-100 % 4 分, 半定量分析芯片免疫组织化学结果。

1.2.5 GEPIA 和 TIMER 数据库分析方法 GEPIA 分析 YTHDF2 在肝癌和癌旁肝组织中的表达: (1)"Expression DIY: Boxplot"; (2)"Gene: YTHDF2; |Log2FC|Cutoff:1; |p-value |Cutoff:0.1"; (3)"Data Selections: LIHC"; (4)"Matched Normal Data: Match TCGA Normal and GTEx Data"。

K-M 生存分析: (1)"GEPIA Survival; Survival Plots"; (2)"Gene: YTHDF2; Methods; Overall Survival & Disease Free Survival"; (3)"Group Cutoff: Quartile; Cutoff-High: 75% ; Cutoff-Low: 25%"; (4)"Hazard Ratio (HR): YES; 95% Confidence Interval: YES; Axis Units: Months"; (5)"Data Selection: LIHC"。

TIMER 肿瘤免疫评估资源数据库分析 YTHDF2 在肝癌免疫微环境中的表达情况: (1)"Gene Symbol: YTHDF2; Cancer Types: LIHC"; (2)"Immune Infiltrates: B cell; CD+8 T Cell; CD+4 T Cell; Macrophage; Neutrophil; Dendritic Cell"; (3)"Survival: Cancer Types: LIHC; Immune Infiltrates: B cell; CD+8 T Cell; CD+4 T Cell; Macrophage; Neutrophil; Dendritic Cell; Gene Symbol: YTHDF2"。

1.3 统计学分析

本实验的数据分析及作图采用 GraphPad Prism 8.0.1 软件处理, 相关实验数据均以均数 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SD)表示, 肝癌和癌旁肝组织采用配对 t 检验进行比较, *: $P<0.05$, **: $P<0.01$, ***: $P<0.001$ 。

2 结果

2.1 YTHDF2 在肝癌组织和癌旁肝组织中的 mRNA 水平表达情况

qRT-PCR 检测 20 对肝癌组织和癌旁肝组织 YTHDF2 的表达情况, 结果显示: 肝癌组织 YTHDF2 的 mRNA 水平表达明显高于癌旁肝组织, 且差异具有统计学意义($P<0.001$), 见图1。

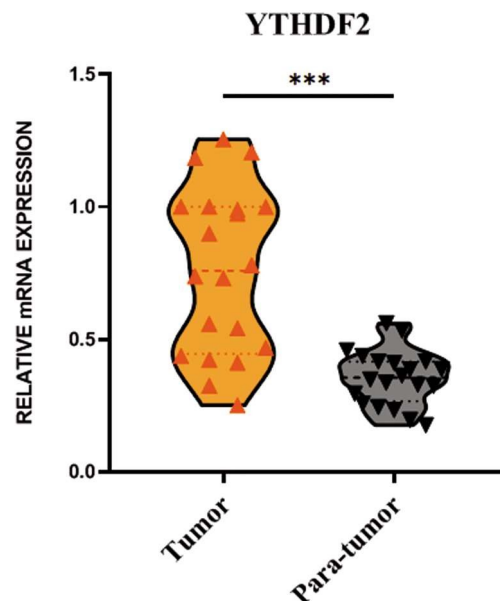


图1 YTHDF2 在肝癌和癌旁肝组织中 mRNA 水平的表达情况

(*** $P<0.001$)

Fig.1 The mRNA expression of YTHDF2 in HCC tissue and para-tumor tissue(*** $P<0.001$)

2.2 YTHDF2 在肝癌组织和癌旁肝组织中的蛋白水平表达情况

20 对肝癌和癌旁肝组织 Western blot 结果显示: YTHDF2 在肝癌组织中蛋白表达水平显著高于癌旁肝组织, 且差异具有统计学意义($P<0.001$), 见图2。40 对肝癌和癌旁肝组织的组织芯片免疫组织化学结果也表明: YTHDF2 在肝癌组织中的表达水平明显高于癌旁肝组织, 半定量分析差异结果具有统计学意义($P<0.05$), 见图3。

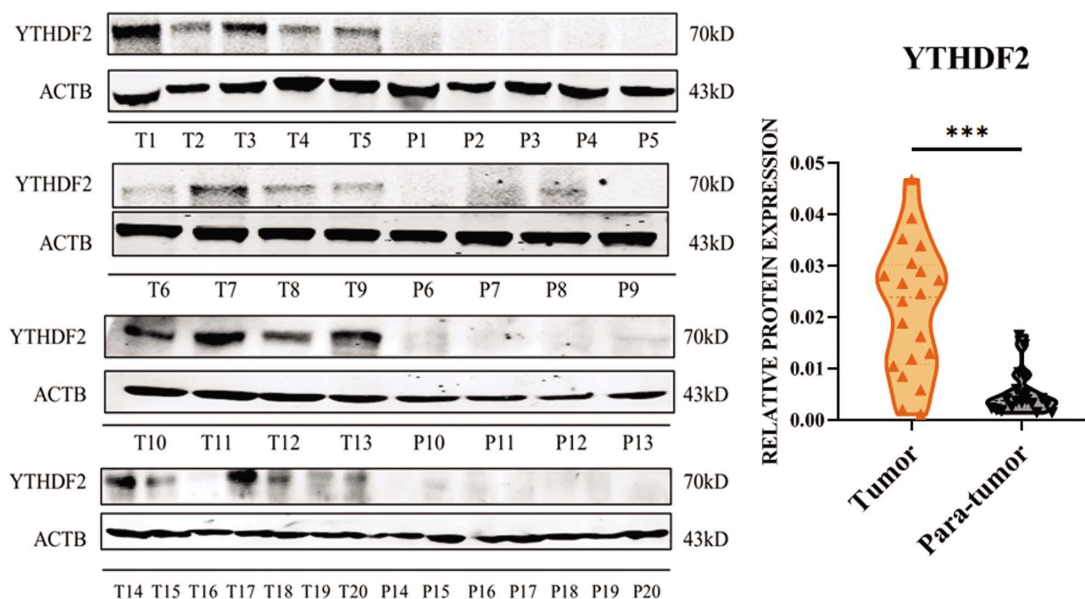


图2 YTHDF2 在肝癌组织和癌旁肝组织中蛋白水平的表达情况($n=20$, *** $P<0.001$)

Fig.2 The protein expression of YTHDF2 in HCC tissue and para-tumor tissue($n=20$, *** $P<0.001$)

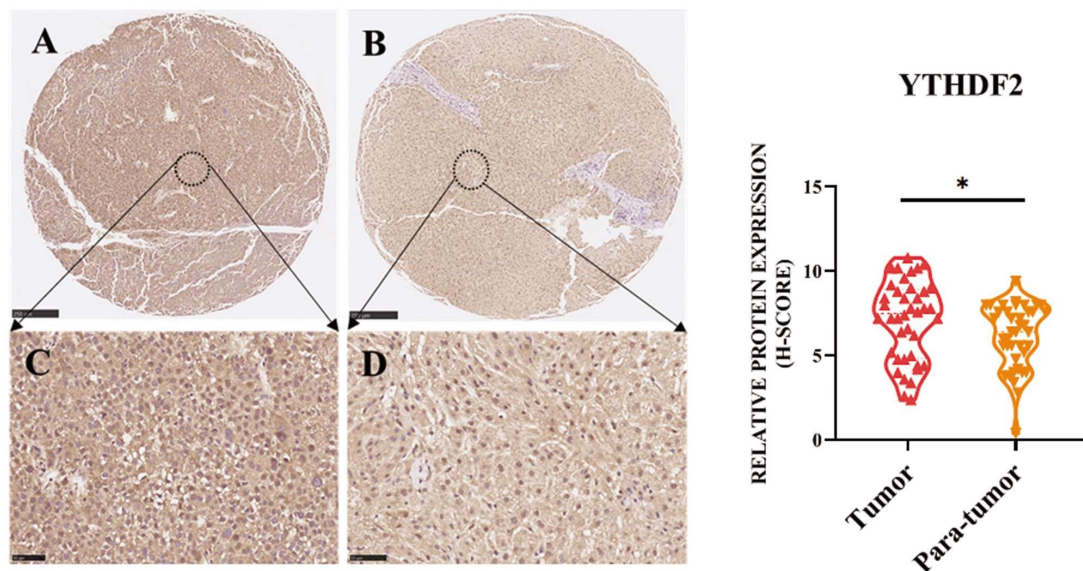


图3 YTHDF2在40对肝癌和癌旁肝组织芯片的表达情况(A图:肝癌组织100倍;B图:癌旁肝组织100倍;C图:肝癌组织400倍;D图:癌旁肝组织400倍, $n=40$, $*P<0.05$)

Fig.3 The expression of YTHDF2 in microarray with 40 pairs of HCC tissue and para-tumor tissue (A: HCC tissue, 100x; B: para-tumor tissue, 100x; C: HCC tissue, 400x; D: para-tumor tissue, 400x, $n=40$, $*P<0.05$)

2.3 YTHDF2在肝癌中的表达与临床预后的相关性

通过 GEPIA 数据库分析验证 YTHDF2 在肝癌中的表达情况及其对临床预后的影响,结果相符,见图4:YTHDF2在肝癌组织表达水平高于正常肝组织,且在肝癌不同分期中均高表达,Stage III期最明显,YTHDF2在肝癌不同分期中表达水平均高于正常肝组织($P=0.0206$);K-M生存分析显示:YTHDF2高表达患者的OS和DFS均较差($P=0.00027$ 和 $P=0.013$);最后,TIMER数据库分析显示:YTHDF2在肝癌免疫微环境中与各类免疫细胞呈正相关($P<0.05$),肝癌患者的累积存活率不受免疫细胞的影响($P>0.05$),但YTHDF2高表达对患者的生存预后具有不良影响($P=0.007$)。

3 讨论

虽然肝癌的发病率和死亡率近年来已有明显的降低,但肝癌患者术后的OS和DFS仍然较低,预后较差。探究肝癌发生发展的分子生物学机制,可以为肝癌的靶向治疗提供新的策略,从而达到精准治疗肝癌的目的,改善患者的预后和总体生存时间,因此也一直是肝癌领域的研究热点^[13]。而m6A甲基化修饰作为最常见的RNA修饰方式之一,可在转录后水平调控基因表达;其相关的酶或蛋白在肝癌发生发展的功能近年来也被学者广泛探讨。例如,马^[14]等研究发现肝癌组织中m6A修饰水平相比癌旁肝组织是降低的,且m6A甲基转移酶METTL14在肝癌组织中表达水平降低,而同作为甲基转移酶核心的METTL3等mRNA表达无差异,K-M生存分析显示METTL14低表达组患者预后更差;机制研究发现METTL14可通过微处理蛋白(DGCR8)促进miR-126的加工,从而发挥抑制肿瘤转移的功能。相反,陈^[15]等研究发现METTL3在肝癌中高表达,通过m6A-YTHDF2途径介导SOCS2的mRNA降解,从而促进肝癌的发生发展。两课题组结果分歧的原因可能如下:HCC细胞系和临床样本的异质性,mRNA转录本的处理和m6A检测方法不一致等。这也表明m6A甲基化修饰相关酶或蛋白在肝

癌发生发展的机制仍不明确,需要进一步的研究。另外,KI-AA1429,WTAP,FTO,YTHDF1等均有研究表明在肝癌组织中高表达,与患者预后具有明显相关性^[3,16-18]。

关于YTHDF2在肝癌发生发展中的功能研究,目前尚未有定论:侯^[9]等研究发现肝癌组织中总RNA的m6A修饰减少,但mRNA的m6A修饰增加,可能是因为在肝癌组织中下调表达的YTHDF2所导致的。他们认为YTHDF2通过影响IL-11和SERPINE2的mRNA稳定性,从而发挥抑制肝癌发生的作用;生存分析表示低表达YTHDF2的患者预后更差。而另一项研究,杨^[20]等发现YTHDF2在肝癌组织中是高表达的,且与miR-145表达呈负相关,且YTHDF2的表达与肝癌的恶性程度有关,进一步研究发现肝癌患者中下调的miR-145可作用于YTHDF2的mRNA抑制其表达,从而发挥抑制肝癌发生的作用。YTHDF2在肝癌中的表达水平存在分歧,笔者认为除课题组间使用的肝癌组织样本不同以外,原因还可能包括取样位置差异以及检测表达水平的方法差异,例如有的课题组只检测样本的mRNA水平差异;有的课题组通过Western blot检测或者免疫组织化学检测YTHDF2的蛋白水平差异,从而造成结果不完全一致。而本文研究采用qRT-PCR,Western blot和免疫组织化学等方法检测,发现YTHDF2在肝癌组织中的mRNA和蛋白水平均显著高表达,并通过GEPIA数据库验证得出YTHDF2相比于正常肝组织,在肝癌组织中的确是高表达的,且在临床不同分期中均高于正常肝组织,stage III期最为显著;K-M生存分析结果表明YTHDF2高表达患者的OS和DFS预后均较差。本文基于临床样本,采用多种不同的方法从mRNA和蛋白两个维度来检测YTHDF2在肝癌组织中的表达水平,并通过大样本量、数据可靠的数据库验证,更全面地探究YTHDF2在肝癌中的表达情况,结果更为可靠。

另外,通过TIMER数据库分析YTHDF2与肝癌免疫微环境的相关性时,笔者发现YTHDF2虽然与各类免疫细胞显著相关,说明YTHDF2在一定程度上激活了机体产生对抗性的

免疫反应,但这种防御程度仍然不足以发挥抑制肿瘤发生的作用,且对患者的生存预后没有影响,患者的累积生存率与免疫细胞无相关性,免疫细胞的激活与 YTHDF2 在肝癌发生发展的联系与功能仍需要进一步研究。综上,虽然 m6A 相关研究的

广度和深度持续推进,但也逐渐出现了许多矛盾与分歧。这些结论如同“盲人摸象”^[21],突出了 m6A 修饰及其调控因子在肝癌发生发展中的复杂性,亟待更广更深入的研究来阐明。

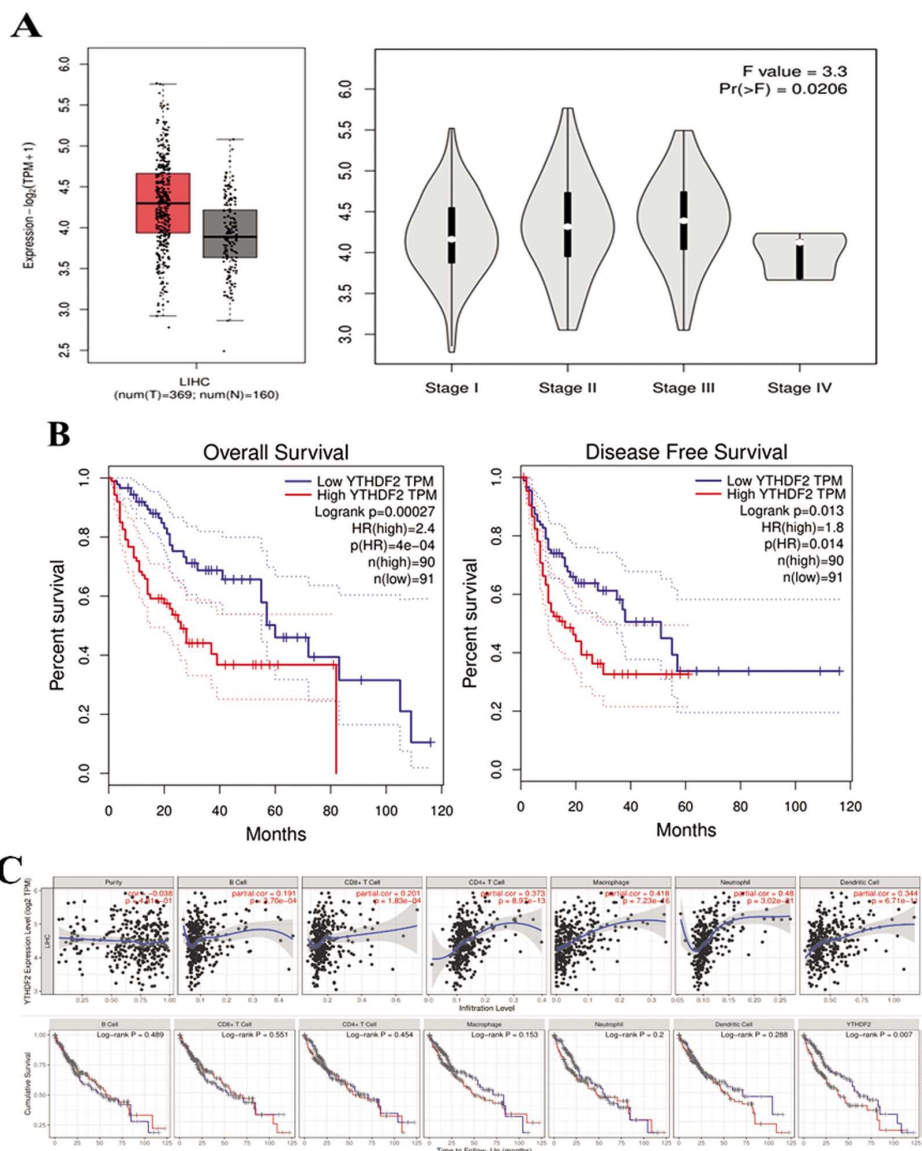


图4 YTHDF2 肝癌表达情况与临床预后的相关性

(A 图: YTHDF2 在肝癌中及临床各期的表达情况; B 图: YTHDF2 与肝癌患者 K-M 生存分析; C 图: YTHDF2 表达与肿瘤免疫的相关性)

Fig.4 The correlation between YTHDF2 expression in HCC and clinical prognosis

(A: Expression of YTHDF2 at various clinical stages in HCC; B: K-M survival analysis of YTHDF2 in HCC patients; C: The correlation between YTHDF2 expression and tumor immunity)

参考文献(References)

- [1] Fomer Alejandro, Reig María, Bruix Jordi. Hepatocellular carcinoma [J]. Lancet, 2018, 391(10127): 1301-1314
- [2] Zhao Boxuan-simen, Wang Xiao, Beadell Alana-V, et al. mA-dependent maternal mRNA clearance facilitates zebrafish maternal-to-zygotic transition[J]. Nature, 2017, 542(7642): 475-478
- [3] Chen Meng-nuo, Wong Chun-ming. The emerging roles of N6-methyladenosine (m6A) deregulation in liver carcinogenesis[J]. Molecular cancer, 2020, 19(1): 44-55
- [4] Wang Tian-yi, Kong Shan, Tao Mei, et al. The potential role of RNA N6-methyladenosine in Cancer progression [J]. Molecular cancer, 2020, 19(1): 88-105
- [5] He Liu-er, Li Hui-yu, Wu An-qi, et al. Functions of N6-methyladenosine and its role in cancer[J]. Molecular cancer, 2019, 18(1): 176-190
- [6] Xu Ke-chen, Sun Yu-chao, Sheng Bai-xiang, et al. Role of identified RNA N6-methyladenosine methylation in liver [J]. Analytical biochemistry, 2019, 578(1): 45-50
- [7] Yu Si-hui, Li Xi, Liu Shi-yu, et al. N-Methyladenosine: A Novel RNA Imprint in Human Cancer [J]. Frontiers in oncology, 2019, 9(1): 1407-1418
- [8] Wang Shao-yun, Chai Pei-wei, Jia Ruo-bing, et al. Novel insights on mA RNA methylation in tumorigenesis: a double-edged sword [J].

- Molecular cancer, 2018, 17(1): 101-110
- [9] Roignant Jean-yves, Soller Matthias. mA in mRNA: An Ancient Mechanism for Fine-Tuning Gene Expression [J]. Trends in genetics, 2017, 33(6): 380-390
- [10] Ronald Desrosiers, Karen Friderici, Fritz Rottman. Identification of methylated nucleosides in messenger RNA from Novikoff hepatoma cells [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1974, 71(10): 3971-3975
- [11] Wang Xiao, Lu Zhi-ke, Gomez Adrian, et al. N6-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability [J]. Nature, 2014, 505(7481): 117-120
- [12] Dai Dong-jun, Wang Han-ying, Zhu Li-yuan, et al. N6-methyladenosine links RNA metabolism to cancer progression [J]. Cell death & disease, 2018, 9(2): 124-136
- [13] Augusto Villanueva. Hepatocellular Carcinoma[J]. The New England journal of medicine, 2019, 380(15): 1450-1462
- [14] Ma Jin-zhao, Yang Fu, Zhou Chuan-chuan, et al. METTL14 suppresses the metastatic potential of hepatocellular carcinoma by modulating N(6)-methyladenosine-dependent primary MicroRNA processing[J]. Hepatology, 2017, 65(2): 529-543
- [15] Chen Meng-nuo, Wei Lai, Law Cheuk-Ting, et al. RNA N6-methyladenosine methyltransferase-like 3 promotes liver cancer progression through YTHDF2-dependent posttranscriptional silencing of SOCS2 [J]. Hepatology, 2018, 67(6): 2254-2270
- [16] Li Jie, Zhu Li-jun, Shi Yan-hong, et al. m6A demethylase FTO promotes hepatocellular carcinoma tumorigenesis via mediating PKM2 demethylation[J]. American journal of translational research, 2019, 11(9): 6084-6092
- [17] Cheng Xiao, Li Ming, Rao Xi, et al. KIAA1429 regulates the migration and invasion of hepatocellular carcinoma by altering m6A modification of ID2 mRNA [J]. OncoTargets and therapy, 2019, 12(1): 3421-3428
- [18] Zhao Xian-guang, Chen Yang, Mao Qi-qi, et al. Overexpression of YTHDF1 is associated with poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma[J]. Cancer biomarkers: section A of Disease markers, 2018, 21(4): 859-868
- [19] Hou Jia-jie, Zhang He, Liu Jun, et al. YTHDF2 reduction fuels inflammation and vascular abnormalization in hepatocellular carcinoma [J]. Mol Cancer, 2019, 18(1): 163-179
- [20] Yang Zhe, Li Jiong, Feng Guo-xing, et al. MicroRNA-145 Modulates N(6)-Methyladenosine Levels by Targeting the 3'-Untranslated mRNA Region of the N(6)-Methyladenosine Binding YTH Domain Family 2 Protein [J]. The Journal of biological chemistry, 2017, 292(9): 3614-3623
- [21] Huang Hui-lin, Weng Heng-you, Chen Jian-jun. mA Modification in Coding and Non-coding RNAs: Roles and Therapeutic Implications in Cancer[J]. Cancer cell, 2020, 37(3): 270-288

(上接第 1622 页)

- [23] Hangauer MJ, Viswanathan VS, Ryan MJ, et al. Drug-tolerant persister cancer cells are vulnerable to GPX4 inhibition [J]. Nature, 2017, 551(7679): 247-250
- [24] Tsoi J, Robert L, Paraiso K. Multi-stage Differentiation Defines Melanoma Subtypes with Differential Vulnerability to Drug-Induced Iron-Dependent Oxidative Stress [J]. Cancer Cell, 2018, 33(5): 890-904.e5
- [25] Tranchant R, Quétel L, Tallet A, et al. Co-occurring Mutations of Tumor Suppressor Genes, LATS2 and NF2, in Malignant Pleural Mesothelioma[J]. Clin Cancer Res, 2017, 23(12): 3191-3202
- [26] Doll S, Proneth B, Tyurina YY, et al. ACSL4 dictates ferroptosis sensitivity by shaping cellular lipid composition [J]. Nat Chem Biol, 2017, 13(1): 91-98
- [27] Gkouvatsos K, Papanikolaou G, Pantopoulos K. Regulation of iron transport and the role of transferrin [J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1820(3): 188-202
- [28] Mizuno T, Murakami H, Fujii M, et al. YAP induces malignant mesothelioma cell proliferation by upregulating transcription of cell cycle-promoting genes[J]. Oncogene, 2012, 31(49): 5117-5122
- [29] Wang S, Li H, Wang G, et al. Yes-associated protein (YAP) expression is involved in epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma[J]. Clin Transl Oncol, 2016, 18(2): 172-177
- [30] Yuan Y, Li D, Li H, et al. YAP overexpression promotes the epithelial-mesenchymal transition and chemoresistance in pancreatic cancer cells[J]. Mol Med Rep, 2016, 13(1): 237-242