

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.03.004

METTL3 介导 EZH2 m6A 修饰在结直肠癌 5-氟尿嘧啶耐药中的作用机制研究*

韩 刚¹ 曹 羽¹ 张 云¹ 张言言¹ 张 旭¹ 胡 建¹ 龚航军^{1Δ} 刘宁宁² 贾 茹²

(1 上海中医药大学附属曙光医院 胃肠外科 上海 201203; 2 上海中医药大学附属曙光医院 肿瘤科 上海 201203)

摘要 目的:探讨甲基转移酶样蛋白 3(METTL3)在 5-氟尿嘧啶耐药中的作用机制。方法:大剂量间歇诱导法建立 5-FU 耐药细胞株。在耐药组细胞中分别敲减 METTL3 及 EZH2 抑制 GSK343 处理。qPCR 及 Western blot 检测 METTL3 和 EZH2 表达。CCK-8 检测各组细胞增殖情况。m6A 甲基化 RNA 免疫沉淀技术分析 EZH2 mRNA m6A 修饰修饰情况。结果:各药物浓度处理下的耐药组细胞增殖活性与未处理细胞无显著差异($P>0.05$)而原代细胞组肠癌细胞较未处理细胞在 0.5-10 $\mu\text{g/mL}$ 处理下细胞增殖活性显著减低($P<0.01$)。耐药组细胞与原代细胞组相比, METTL3 及 EZH2 表达水平显著升高($P<0.01$)。耐药组细胞 METTL3 敲减后或 GSK343 处理后, 在 0.5 $\mu\text{g/mL}$ -10 $\mu\text{g/mL}$ 浓度间下的细胞增殖活性与 0 $\mu\text{g/mL}$ 处理细胞增殖活性相比显著减低($P<0.05$)。耐药组细胞 METTL3 敲减细胞的 EZH2 表达与对照细胞比, 显著下调 ($P<0.01$)。m6A 甲基化 RNA 免疫沉淀实验显示耐药组细胞 METTL3 敲减细胞的 EZH2 mRNA m6A 修饰水平(m6A 富集度为 $6361.95 \pm 67.47\%$), 较未敲减细胞修饰水平(396.30 ± 57.74)显著减低($P<0.01$)。结论:METTL3 在肠癌细胞 5-FU 耐药抵抗中起到关键作用, 靶向抑制 METTL3 有望成为缓解肠癌耐药的重要分子靶点。

关键词: RNA 甲基化; METTL3; EZH2; 结直肠癌; 5-氟尿嘧啶; 耐药

中图分类号: R-33; R735.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2022)03-418-05

METTL3 Contributes to 5-Fu Resistance via EZH2 m6A Modification in Colorectal Cancer*

HAN Gang¹, CAO Yu¹, ZHANG Yun¹, ZHANG Yan-yan¹, ZHANG Xu¹, HU Jian¹, GONG Hang-jun^{1Δ}, LIU Ning-ning², JIA Ru²

(1 Department of Gastrointestinal Surgery, Shuguang Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai, 201203, China; 2 Department of Oncology, Shuguang Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai, 201203, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the role of METTL3 in 5-fluorouracil resistance. **Methods:** High-dose intermittent induction method was used to establish 5-FU resistant cell lines. Knockdown of METTL3 or EZH2 inhibitor GSK343 treatment were performed in drug-resistant cells. qPCR and Western blot were used to detect the expression of METTL3 and EZH2. CCK-8 was used to detect cell proliferation in each group. The m6A methylated RNA immunoprecipitation was used to analyze the modification of EZH2 mRNA m6A. **Results:** There was no significant difference in the proliferation activity of the drug-resistant group and the untreated cells under the treatment of various drug concentrations ($P>0.05$), however the primary cell group of intestinal cancer cells had a significant decreased proliferation activity compared to untreated cells under 0.5-10 $\mu\text{g/mL}$. Compared with the primary cell group, the expression levels of METTL3 and EZH2 in the drug-resistant group were significantly higher ($P<0.01$). After knockdown of METTL3 or GSK343 in the drug-resistant group, the proliferation activity of cells at a concentration of 0.5 $\mu\text{g/mL}$ -10 $\mu\text{g/mL}$ was significantly lower than that of cells treated with 0 $\mu\text{g/mL}$ ($P<0.05$). Compared with the control cells, the expression of EZH2 in the METTL3 knockdown cells of the drug resistance group was significantly down-regulated ($P<0.01$). The m6A methylated RNA immunoprecipitation experiment showed that the EZH2 mRNA m6A modification level (m6A enrichment of $6361.95 \pm 67.47\%$) of the METTL3 knockdown cells in the drug-resistant group was significantly lower than that of the non-knockdown cells (396.30 ± 57.74) ($P<0.01$). **Conclusion:** METTL3 plays a key role in 5-FU resistance of colorectal cancer cells. Targeted inhibition of METTL3 is expected to become an important molecular target for alleviating resistance of colorectal cancer.

Key words: RNA methylation; METTL3; EZH2; Colorectal cancer; 5-FU; Resistance

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

Article ID: 1673-6273(2022)03-418-05

* 基金项目: 上海中医药大学预算内项目资助(2019LK019); 国家自然科学基金面上项目(81973651)

作者简介: 韩刚(1970-), 男, 主任医师, 研究方向: 胃肠道肿瘤中西医结合治疗及分子靶向治疗, E-mail: hanhang883@126.com

Δ 通讯作者: 龚航军(1965-), 男, 主任医师, 研究方向: 胃肠道肿瘤中西医结合治疗及分子靶向治疗,

电话: 021-20256323, E-mail: hangjung@126.com

(收稿日期: 2021-04-28 接受日期: 2021-05-24)

前言

结直肠癌(Colorectal Cancer, CRC)为我国常见消化道恶性肿瘤之一,其发病率呈逐年上升趋势^[1,2]。5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)为常见抗代谢类化疗药物之一,以5-氟尿嘧啶为基础的化疗是结直肠癌患者术后辅助化疗及晚期患者治疗的常用用药方案^[3]。然而,研究发现高达一半的转移性结直肠癌患者对5-氟尿嘧啶产生耐药性^[4,5]者治疗后的获得性耐药性为临床亟待解决问题,但其机制仍未完全清楚。

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。近年来, METTL3 及 m6A RNA 甲基化为肿瘤研究热点^[6-8]有文献报导 METTL3 可调节 ZESTE 同于 2 增强子 (enhancer of zeste homolog 2, EZH2)m6A RNA 甲基化,并影响其 mRNA 表达^[9];而 EZH2 在肠癌 5-氟尿嘧啶抵抗中起到关键作用^[10-12]。那么, METTL3 是否通过 EZH2 影响肠癌细胞对 5-氟尿嘧啶敏感性呢?目前,尚未有类似研究报导。本研究拟利用 5-FU 诱导耐药细胞模型,阐述 METTL3 及其调控 EZH2 在 5-FU 耐药中的作用机制,为结直肠癌精准治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料

DMEM 及胎牛血清购自美国 GIBCO 公司;5-FU 和 GSK343 购自美国 Sigma 公司;CCK-8 购自上海碧云天生物有限公司、逆转录-实时荧光定量 PCR 试验购自大连宝生物科技股份有限公司、一抗(METTL3、EZH2 及 β -actin)购自美国 CST 公司;m6A 甲基化 RNA 免疫沉淀购自广州锐博生物技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组 本实验利用 5-FU 体外诱导肠癌细胞 HCT116 耐药,获得耐药组细胞和原代细胞组。进一步在耐药组细胞中,进行 2 种处理:1)METTL3 敲减和对照细胞;2)GSK343 处理和对照细胞。

1.2.2 细胞培养及其药物处理 肠癌细胞培养 HCT116 于含 10%胎牛血清和 100 U/mL 青霉素/链霉素的 DMEM 培养基于 37℃、5% CO₂ 条件下培养。细胞培养至 70-80%进行传代。取对数生长期的结直肠癌细胞株 HCT116 培养于含 10 μ g/mL 5-FU 的 DMEM 完全培养液中,置于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中诱导细胞 24 h。当细胞出现凋亡时,用 PBS 清洗 3 次后于不含 5-FU 的 DMEM 完全培养液中培养。待细胞恢复正常生长后,加入浓度递增的 5-FU 反复处理细胞,每次增加 10 μ g/mL,直到细胞被最大 5-FU 浓度(40 μ g/mL)处理后存活视为耐药株构建成功。EZH2 抑制剂 GSK343 按说明书推荐终浓度 4nM 处理肠癌细胞 HCT116。

1.2.3 CCK-8 细胞增殖试验 取对数生长期细胞消化后,接种细胞于 96 孔板,1000 细胞/孔 μ L,37℃,5% CO₂ 环境中孵育 24 h 后吸取上清,分别加入不同浓度 5-FU,每孔终体积为 100 μ L,每个浓度设 6 个复孔。加药 48 h 后,向每孔加入 10 μ L CCK8

溶液,37℃,继续孵育 4 h。在酶标仪 450 nm 处读取各孔的吸光值。

1.2.4 逆转录-实时荧光定量 PCR 试验(RT-qPCR) 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℃ 10 min 后,95℃ 15 s,60℃ 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 β -actin 作为内参照,采用 2^{- Δ Ct} 法计算相对表达倍数变化。其中各基因引物为:METTL3 前向引物:5'-AGA TGG GGT AGA AAG CCT CCT-3'。METTL3 反向引物:5'-TGG TCA GCA TAG GTT ACA AGA GT-3'。EZH2 前向引物:5'-TGC ACA TCC TGA CTT CTG TG-3'。EZH2 反向引物:5'-AAG GGC ATT CAC CAA CTC C-3'。 β -actin 前向引物:5'-CGT GAT GGT GGG CAT GGG TC-3'。 β -actin 反向引物:5'-ACG GCC AGA GGC GTA CAG GG-3'。

1.2.5 免疫印迹试验(Western blot) 收集各组细胞,抽提总蛋白,利用 BCA 法测定总蛋白浓度,以每个泳道 20 μ g 的蛋白样品上样,经 10%变性 SDS PAGE 电泳后,利用电转法将蛋白转移至 PVDF 膜上,置于 5%脱脂奶粉室温封闭 2 h,加入一抗(METTL3、EZH2 及 β -actin),4℃孵育过夜;次日二抗 37℃孵育 1 h;TBS-T 洗膜 3 次,每次 10 min,ECL 发光试剂显影。

1.2.6 siRNA 转染 METTL3 siRNA 及对照序列均购自上海吉玛制药技术有限公司;其中 METTL3 第一条 siMETTL3-1 序列为:5'-GAC UGC UCU UUC CUU AAU A-3';第二条 siMETTL3-1 序列为:5'-GCA AGA ATT CTG TGA CTA T-3';阴性对照 siRNA 为 5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG U 转染试剂采用 Invitrogen Life Technologies 公司的 Lipofectamine 3000。转染步骤按厂商说明书进行。

1.2.7 m6A 甲基化 RNA 免疫沉淀 按厂家试剂盒说明书进行。收集各处理组及对照组 RNA,分别进行 RNA 片段化、抗 m6A 磁珠的制备及免疫沉淀、洗脱步骤获得 m6A 甲基化富集 RNA。采用 1.2.4 方法进行 EZH2 定量分析,2^{- Δ Ct} 法计算 m6A 相对阴性抗体 IgG 的相对富集度%。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件比较不同组别间的差异,2 组独立样本间比较采用独立样本 t-检验;多组间比较采用 Dunnett-t 检验。取 P<0.05 为假设检验有统计学意义的标准。

2 结果

2.1 5-FU 耐药组与原代细胞组中 METTL3 及 EZH2 表达比较

利用 CCK-8 实验检测 5-FU 耐药组及原代细胞组肠癌细胞在 0.1 μ g/mL、0.5 μ g/mL、1 μ g/mL 及 10 μ g/mL 培养 48 h 后的细胞增殖活性,结果发现:各药物浓度处理下的耐药组细胞增殖活性与未处理细胞增殖活性无显著差异(P>0.05)。原代细胞组肠癌细胞在 0.5-10 μ g/mL 处理下细胞增殖活性,较未处理细胞增殖活性显著减低(P<0.01)。

qPCR 结果表明:5-FU 耐药组细胞与原代细胞组相比, METTL3 及 EZH2 表达水平显著升高(P<0.01),见表 2。Western blot 实验也证实耐药组细胞与原代细胞组相比,具有较高表达水平的 METTL3 及 EZH2,见图 1。

表 1 5-FU 耐药组及原代肠癌组细胞不同药物浓度下细胞增殖活性比较
Table 1 Cell viability of 5-FU resistant cells and parental cells at different concentrations of 5-FU

5-FU	5-FU resistant cells			Parental cells		
	A _{450nm}	t*	P*	A _{450nm}	t*	P*
0 μg/mL	0.90± 0.090			0.92± 0.15		
0.1 μg/mL	0.90± 0.092	0.017	>0.99	0.92± 0.13	0.12	0.9998
0.5 μg/mL	0.90± 0.12	0.058	>0.99	0.55± 0.092	5.91	<0.0001
1 μg/mL	0.87± 0.10	0.46	0.97	0.34± 0.042	9.35	<0.0001
10 μg/mL	0.86± 0.082	0.79	0.84	0.33± 0.074	9.62	<0.0001

Note: *different concentrations vs 0 μg/mL.

表 2 5-FU 耐药组及原代肠癌组 HCT116 细胞中 METTL3 及 EZH2 表达水平比较
Table 2 The expression level of METTL3 and EZH2 in 5-FU resistant and parental HCT116 cells

Gene	Parental cells (Fold Change)	5-FU resistant cells (Fold Change)	t*	P*
EZH2	1.00± 0.26	4.52± 0.018	23.73	<0.0001
METTL3	1.00± 0.21	2.22± 0.28	6.11	0.0036

Note: * 5-FU resistant cells vs Parental cells.

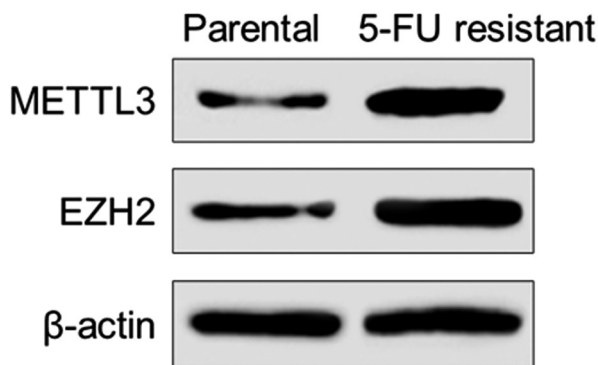


图 1 METTL3 和 EZH2 在原代细胞组和耐药组细胞中的表达比较
Fig.1 The expression of METTL3 and EZH2 in 5-FU resistant and parental HCT116 cells

2.2 耐药组细胞中 METTL3 敲减与对照细胞对 5- 氟尿嘧啶敏感性比较

在耐药组细胞中转染 METTL3 特异性 siRNA: siMETTL3-1 和 siMETTL3-2, 转染后 METTL3 表达如图 2 所示。siMETTL3-2 显著下调 METTL3 表达, 而 siMETTL3-1 敲减效率较低, 故选择 siMETTL3-1 进行后续研究。

CCK-8 检测 5-FU 耐药组中 METTL3 敲减细胞及对照细

胞在不同 5-FU 浓度下细胞增殖活性, 详见表 3。结果表明: 未敲减的对照耐药组仍对 5-FU 耐药, 在 0.1 μg/mL-10 μg/mL 浓度间下的细胞增殖活性与 0 μg/mL 处理细胞增殖活性无显著变化 ($P>0.05$)。与之相反, 耐药组细胞 METTL3 敲减后, 在 0.5 μg/mL-10 μg/mL 浓度间下的细胞增殖活性与 0 μg/mL 处理细胞增殖活性相比, 显著减低 ($P<0.05$), 对 5-FU 敏感性显著增强。

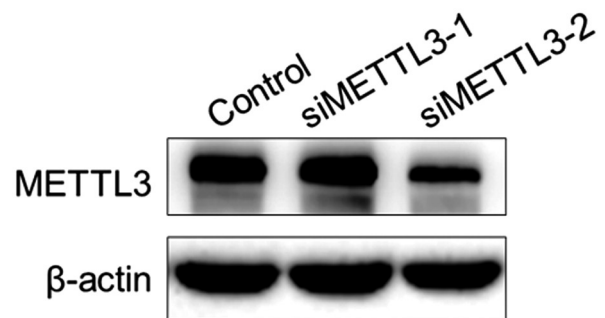


图 2 METTL3 在耐药组细胞中转染 siRNA 后的表达比较
Fig.2 The expression of METTL3 in the control and METTL3 siRNA treated cells

表 3 5-FU 耐药组中 METTL3 敲减细胞及对照细胞在不同药物浓度下细胞增殖活性比较
Table 3 Cell viability of METTL3 knockdown or control 5-FU resistant cells at different concentrations of 5-FU

5-FU	Control			METTL3 knockdown		
	A _{450nm}	t*	P*	A _{450nm}	t*	P*
0 μg/mL	0.84± 0.054			0.97± 0.17		
0.1 μg/mL	0.87± 0.064	0.7954	0.8417	0.85± 0.094	2.119	0.1354
0.5 μg/mL	0.90± 0.057	1.793	0.2439	0.63± 0.079	5.841	<0.0001
1 μg/mL	0.82± 0.069	0.4943	0.9649	0.40± 0.066	9.622	<0.0001
10 μg/mL	0.85± 0.075	0.3415	0.9907	0.28± 0.072	11.68	<0.0001

Note: * different concentrations vs 0 μg/mL.

2.3 耐药组细胞中 EZH2 抑制剂 GSK343 处理与对照细胞对 5-氟尿嘧啶敏感性比较

CCK-8 检测 5-FU 耐药组中 GSK343 处理细胞及对照细胞在不同 5-FU 浓度下细胞增殖活性,详见表 4。结果表明:未处理的对照耐药组仍对 5-FU 耐药,各药物浓度处理细胞的细胞

增殖活性与未处理细胞无显著变化($P>0.05$)。与之相反,药组细胞 GSK343 处理后,在 0.1 $\mu\text{g/mL}$ -10 $\mu\text{g/mL}$ 浓度间的细胞增殖活性即与 0 $\mu\text{g/mL}$ 的活性显著减低($P<0.05$),对 5-FU 敏感性增加。

表 4 5-FU 耐药组中 GSK343 处理细胞及对照细胞在不同药物浓度下细胞增殖活性比较

Table 4 Cell viability of GSK343 treated or control 5-FU resistant cells at different concentrations of 5-FU

5-FU	Control			METTL3 knockdown		
	$A_{450\text{nm}}$	t^*	P^*	$A_{450\text{nm}}$	t^*	P^*
0 $\mu\text{g/mL}$	0.91 $\pm$ 0.080			0.86 $\pm$ 0.068		
0.1 $\mu\text{g/mL}$	0.91 $\pm$ 0.10	0.09510	0.9999	0.70 $\pm$ 0.091	4.442	0.0006
0.5 $\mu\text{g/mL}$	0.92 $\pm$ 0.08	0.07543	0.9999	0.52 $\pm$ 0.034	9.221	<0.0001
1 $\mu\text{g/mL}$	0.95 $\pm$ 0.11	0.8035	0.8372	0.33 $\pm$ 0.074	14.26	<0.0001
10 $\mu\text{g/mL}$	0.89 $\pm$ 0.052	0.4001	0.9834	0.26 $\pm$ 0.036	16.19	<0.0001

Note: * different concentrations vs 0 $\mu\text{g/mL}$.

2.4 耐药组细胞中 METTL3 敲减与对照细胞中 EZH2 表达及 m6A 修饰水平比较

qPCR 及结果 Western blot 实验表明:耐药组细胞 METTL3 敲减细胞的 EZH2 mRNA 表达(相对表达倍数为 0.42 $\pm$ 0.049)与对照细胞(相对表达倍数为 1.00 $\pm$ 0.27)相比,显著下调($t=3.74$, $P=0.020$)。Western blot 实验也证实 METTL3 敲减后可显著下调耐药组细胞的 EZH2 表达,详见图 3。

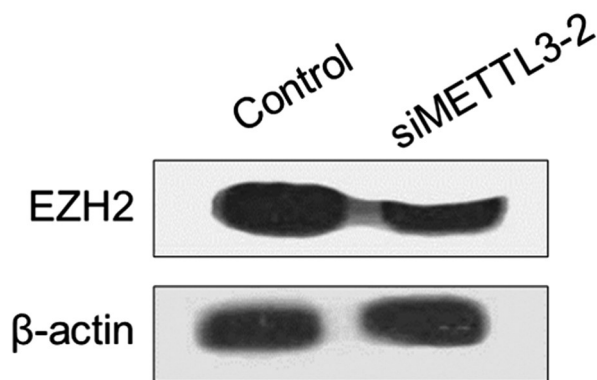


图 3 耐药组 METTL3 敲减细胞及对照细胞中 EZH2 的表达比较
Fig.3 The expression of EZH2 in METTL3 knockdown or control 5-FU resistant cells

m6A 甲基化 RNA 免疫沉淀实验显示耐药组细胞 METTL3 敲减细胞的 EZH2 mRNA m6A 修饰水平(m6A 富集度为 6361.95 $\pm$ 67.47%),较未敲减细胞修饰水平(396.30 $\pm$ 57.74)显著减低($P<0.01$)。

3 讨论

近年研究发现,mRNA 的 m6A 修饰水平异常导致其表达变化在肿瘤发生、发展中起到重要作用^[13-15]。m6A 修饰主要发生在保守基序 DRACH (D 为 A、G 或 U;R 指 G 或 A;H 指 A、C 或 U),并且该修饰在 mRNA 的 5'-UTR、3'-UTR 和终止子附近编码区域富集。m6A 修饰对 mRNA 调控作用过程为:

METTL3 等甲基转移酶等将目标 RNA 进行 m6A 甲基化,FTO 和 ALKBH5 等去甲基化酶去除 m6A 修饰,最后通过 YTHD 家族、HNRNPA2B1 等蛋白进行识别 m6A 甲基化,决定 mRNA 功能。研究发现结直肠癌组织中高表达 METTL3,过表达 METTL3 与临床分期、病理分级及生存预后显著相关。METTL3 可通过靶向调控各种关键分子表达,促进肠癌细胞增殖、转移和侵袭^[16-29],提示 METTL3 在维持结直肠癌恶性表型中起到关键作用。

肠癌患者 5-FU 耐药是临床亟待解决问题,那么 METTL3 是否与 5-FU 耐药相关,目前此类研究报导较少。本研究首先利用大剂量间歇诱导法建立 5-FU 耐药细胞株。此耐药株可在 0.1 $\mu\text{g/mL}$ -10 $\mu\text{g/mL}$ 浓度稳定生长,而原代细胞则在 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 下即出现细胞增殖减弱现象,表明我们成功建立了 5-FU 耐药细胞株。随后,在耐药株与原代细胞 METTL3 表达检测中发现 METTL3 在 5-FU 耐药细胞中显著上调,提示 METTL3 可能在肠癌耐药中起到关键作用。在此耐药细胞株中行 METTL3 敲减,以揭示减低 METTL3 水平对肠癌细胞 5-FU 耐药抵抗产生影响。结果发现:METTL3 敲减耐药株在 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 浓度的 5-FU 下即出现生长抑制现象,证实了 METTL3 与肠癌细胞 5-FU 耐药抵抗密切联系。

那么究竟 METTL3 通过何种方式影响肠癌耐药表型呢?已有研究发现 EZH2 在肠癌细胞 5-FU 耐药中发挥重要作用,EZH2 可通过上调 PUMA、MALAT1 等下游靶分子减低肠癌细胞对 5-FU 敏感性^[10,30]。本研究对肠癌耐药株进行了 EZH2 抑制剂处理,发现抑制 EZH2 后,耐药株对 5-FU 敏感性增强,证实了 EZH2 在维持肠癌 5-FU 耐药中的重要作用。最近研究报导 METTL3 可在食管癌细胞株中调控 EZH2 mRNA 的 m6 甲基化修饰并影响其表达^[9]。据此,我们推测 METTL3 在结直肠癌细胞中也可能通过 EZH2 对 5-FU 抵抗。在耐药株细胞中敲减 METTL3 后,我们发现 EZH2 表达显著下调,表明 METTL3 对 EZH2 调控关系。此外,我们利用 RIP 试验分析 METTL3 敲减后 EZH2 m6 甲基化水平,结果表明 METTL3 敲减后,EZH2 m6

甲基化水平也明显减低,证实了 METTL3 在耐药细胞中对 EZH2 调控作用。

综上所述,本研究发现 METTL3 在肠癌细胞 5-FU 耐药抵抗中起到关键作用,敲减 METTL3 可促进肠癌细胞对 5-FU 敏感性。分子机制上,METTL3 能通过增强 EZH2 mRNA m6 甲基化修饰水平,促进其转录水平。本研究尚有不足之处,METTL3 对 EZH2 mRNA 甲基化调控需要在临床组织标本中进行验证,同时除 EZH2 外,还需通过高通量测序挖掘 METTL3 靶向耐药调控基因,为 METTL3 成为缓解肠癌耐药的重要靶向分子提供实验依据。

参考文献(References)

- [1] Gu KJ, Li G. An Overview of Cancer Prevention: Chemoprevention and Immunoprevention[J]. *J Cancer Prev*, 2020, 25(3): 127-135
- [2] Yu H, Hemminki K. Genetic epidemiology of colorectal cancer and associated cancers[J]. *mutagenesis*. 2020, 35(3): 207-219
- [3] Morse MA, Hochster H, Benson A. Perspectives on Treatment of Metastatic Colorectal Cancer with Immune Checkpoint Inhibitor Therapy[J]. *Oncologist*, 2020, 25(1): 33-45
- [4] Nagourney RA, Evans S, Tran PH, et al. Colorectal cancer cells from patients treated with FOLFOX or CAPOX are resistant to oxaliplatin [J]. *Eur J Surg Oncol*, 2021, 47(4): 738-742
- [5] Sabeti Aghabozorgi A, Moradi Sarabi M, Jafarzadeh-Esfehani R, et al. Molecular determinants of response to 5-fluorouracil-based chemotherapy in colorectal cancer: The undisputable role of micro-ribonucleic acids[J]. *World J Gastrointest Oncol*, 2020, 12(9): 942-956
- [6] Wang Q, Geng W, Guo H, et al. Emerging role of RNA methyltransferase METTL3 in gastrointestinal cancer [J]. *Hematol Oncol*, 2020, 13(1): 57
- [7] Wang T, Kong S, Tao M, et al. The potential role of RNA N6-methyladenosine in Cancer progression[J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 88
- [8] Hu BB, Wang XY, Gu XY, et al. N(6)-methyladenosine (m(6)A) RNA modification in gastrointestinal tract cancers: roles, mechanisms, and applications[J]. *Mol Cancer*, 18(1): 178
- [9] Meng QZ, Cong CH, Li XJ, et al. METTL3 promotes the progression of nasopharyngeal carcinoma through mediating M6A modification of EZH2[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(8): 4328-4336
- [10] Tan X, Zhang Z, Liu P, et al. Inhibition of EZH2 enhances the therapeutic effect of 5-FU via PUMA upregulation in colorectal cancer[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(12): 1061
- [11] Huang S, Wang Z, Zhou J, et al. EZH2 Inhibitor GSK126 Suppresses Antitumor Immunity by Driving Production of Myeloid-Derived Suppressor Cells[J]. *Cancer Res*, 2019, 79(8): 2009-2020
- [12] Wang C, Li X, Zhang J, et al. EZH2 contributes to 5-FU resistance in gastric cancer by epigenetically suppressing FBXO32 expression[J]. *Onco Targets Ther*, 2018, 11(1): 7853-7864
- [13] Huang J, Chen Z, Chen X, et al. The role of RNA N (6)-methyladenosine methyltransferase in cancers [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2021, 23(1): 887-896
- [14] Xu R, Pang G, Zhao Q, et al. The momentous role of N6-methyladenosine in lung cancer[J]. *J Cell Physiol*, 2021, 236(5): 3244-3256
- [15] Zeng C, Huang W, Li Y, et al. Roles of METTL3 in cancer: mechanisms and therapeutic targeting[J]. *J Hematol Oncol*, 2020, 13(1): 117
- [16] Yang Z, Quan Y, Chen Y, et al. Knockdown of RNA N6-methyladenosine methyltransferase METTL3 represses Warburg effect in colorectal cancer via regulating HIF-1alpha[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 89
- [17] Lan H, Liu Y, Liu J, et al. Tumor-Associated Macrophages Promote Oxaliplatin Resistance via METTL3-Mediated m (6)A of TRAF5 and Necroptosis in Colorectal Cancer [J]. *Mol Pharm*, 2021, 18 (3): 1026-1037
- [18] Chen H, Gao S, Liu W, et al. RNA N (6)-Methyladenosine Methyltransferase METTL3 Facilitates Colorectal Cancer by Activating the m(6)A-GLUT1-mTORC1 Axis and Is a Therapeutic Target[J]. *Gastroenterology*, 2021, 160(4): 1284-1300.e16
- [19] Xu J, Chen Q, Tian K, et al. m6A methyltransferase METTL3 maintains colon cancer tumorigenicity by suppressing SOCS2 to promote cell proliferation[J]. *Oncol Rep*, 2020, 44(3): 973-986
- [20] 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
- [21] 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
- [22] Deng R, Cheng Y, Ye S, et al. m (6)A methyltransferase METTL3 suppresses colorectal cancer proliferation and migration through p38/ERK pathways[J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12(1): 4391-4402
- [23] Li T, Hu PS, Zuo Z, et al. METTL3 facilitates tumor progression via an m (6)A-IGF2BP2-dependent mechanism in colorectal carcinoma [J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 112
- [24] Liu X, Liu L, Dong Z, et al. Expression patterns and prognostic value of m (6)A-related genes in colorectal cancer [J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(7): 3972-3991
- [25] Tian J, Ying P, Ke J, et al. ANKLE1 N (6) -Methyladenosine-related variant is associated with colorectal cancer risk by maintaining the genomic stability[J]. *Int J Cancer*, 2020, 146(12): 3281-3293
- [26] 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
- [27] Shen C, Xuan B, Yan T. m (6)A-dependent glycolysis enhances colorectal cancer progression[J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 72
- [28] Yang YY, Yu K, Li L, et al. Proteome-wide Interrogation of Small GTPases Regulated by N6-Methyladenosine Modulators [J]. *Anal Chem*, 2020, 92(14): 10145-10152
- [29] Song P, Feng L, Li J, et al. beta-catenin represses miR455-3p to stimulate m6A modification of HSF1 mRNA and promote its translation in colorectal cancer[J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 129
- [30] Li P, Zhang X, Wang L, et al. MALAT1 Is Associated with Poor Response to Oxaliplatin-Based Chemotherapy in Colorectal Cancer Patients and Promotes Chemoresistance through EZH2 [J]. *Mol Cancer Ther*, 2017, 16(4): 739-751