

·基础研究·

METTL3通过m6A甲基化修饰影响葡萄膜黑色素瘤细胞增殖、迁移和侵袭

王美岚, 赵天齐, 师 齐, 郝莉莉, 刘 莲
(暨南大学附属第一医院眼科, 广东广州 510630)

摘 要:【目的】探讨 *METTL3* 对葡萄膜黑色素瘤细胞的恶性生物学行为影响, 并验证其是否和 N6-甲基腺苷 (m6A) 甲基化相关。【方法】用慢病毒转染构建敲低、过表达 *METTL3* 以及点突变 m6A 相关催化位点的葡萄膜黑色素瘤细胞模型, 通过 Transwell 了解细胞迁移、侵袭情况, 利用 CCK-8 检测细胞增殖能力, 流式细胞仪分析细胞凋亡及周期的变化。【结果】敲低 *METTL3* 的 C918 和 MUM-2B 细胞在增殖、迁移和侵袭能力方面明显下降 ($P < 0.001$), 细胞凋亡率增加, 两种细胞中 G1 期的比例显著上升, 而 S 期细胞的比例显著下降; 过表达 *METTL3* 的 C918 和 MUM-2B 细胞在增殖、迁移和侵袭能力方面明显增强 ($P < 0.001$), 细胞凋亡率减少; C918 细胞中处于 G1 期的细胞比例显著下降, 而 S 期细胞的比例显著上升; MUM-2B 细胞周期的比例没有明显变化; 点突变 m6A 相关催化位点后细胞的增殖、迁移和侵袭能力下降, 细胞凋亡率增加; MUM-2B 细胞中 G1 期细胞的百分比显著提高, S 期细胞的百分比显著下降, G2 期细胞的百分比稍下降; C918 细胞中 G1 期细胞的百分比显著提高, S 期和 G2 期细胞比例无明显变化。【结论】葡萄膜黑色素瘤细胞的增殖、侵袭和转移能力与 *METTL3* 的表达呈正相关, 细胞凋亡率与 *METTL3* 的表达呈负相关; *METTL3* 含量的变化对不同细胞的周期干扰不一; *METTL3* 对葡萄膜黑色素瘤细胞的增殖、迁移和侵袭的相关影响和 m6A 甲基化修饰相关。

关键词: 葡萄膜黑色素瘤; 甲基转移酶样蛋白 3; N6-甲基腺苷; 增殖; 侵袭

中图分类号: R77

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2025)04-0628-11

DOI: 10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2025.0409

METTL3 Regulates the Proliferation, Migration, and Invasion of Uveal Melanoma Cell via Modifying m6A Methylation

WANG Meilan, ZHAO Tianqi, SHI Qi, HAO Lili, LIU Lian

(Department of Ophthalmology, The First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510630, China)

Correspondence to: LIU Lian, E-mail: liulianbb@163.com; HAO Lili, E-mail: haoli1121@126.com

Abstract:【Objectives】To investigate the effect of *METTL3* on the malignant biological behaviors of uveal melanoma cells and to verify whether this effect is related to m6A methylation.【Methods】Uveal melanoma cell models with *METTL3* knockdown, overexpression, and point mutations at m6A-related catalytic sites were constructed via lentivirus transfection. Transwell assays were used to assess cell migration and invasion; CCK8 assays were used to measure cell proliferation and flow cytometry was used to analyze apoptosis and cycle changes.【Results】The proliferation, migration and invasion abilities of C918 and MUM-2B cells with *METTL3* knockdown were significantly decreased ($P < 0.001$), while the apoptosis rate was increased. The proportion of cells in G1 phase significantly increased, whereas the proportion in the S phase significantly decreased. Cells overexpressing *METTL3* showed significantly enhanced proliferation,

收稿日期: 2025-04-07

录用日期: 2025-06-01

基金项目: 广州市科技计划项目(202201020015, 2025A04J3477)

作者简介: 王美岚, 第一作者, 研究方向: 眼肿瘤, E-mail: wml9803@163.com; 刘莲, 通信作者, 主任医师, 研究方向: 眼肿瘤, E-mail: liulianbb@163.com; 郝莉莉, 共同通信作者, 研究方向: 眼肿瘤和视神经疾病, E-mail: haoli1121@126.com

migration and invasion abilities ($P < 0.001$), along with a decreased apoptosis rate. In C918 cells, the proportion of cells in G1 phase decreased significantly, while the proportion in S phase increased significantly. The cell cycle distribution of MUM-2B cells did not change remarkably. Following point mutation of m6A-related catalytic sites, cell proliferation, migration and invasion decreased, and the apoptosis rate increased. In MUM-2B cells, the percentage of cells in G1 phase significantly increased; the percentage in S phase significantly decreased and the percentage in G2 phase slightly decreased. In C918 cells, the percentage of G1 phase cells significantly increased, with no significant changes in the proportions of S and G2 phases. 【Conclusions】 The proliferation, invasion and metastasis of uveal melanoma cells were positively correlated with the expression of *METTL3*, while the apoptosis rate was negatively correlated. Changes in *METTL3* levels differentially affect the cell cycles in different cell lines. The effects of *METTL3* on the proliferation, migration and invasion of uveal melanoma cells are related to m6A methylation modification.

Key words: uveal melanoma; methyltransferase-like protein 3; N6-methyladenosine; proliferation; invasion

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2025, 46(4): 628-638]

葡萄膜黑色素瘤(uveal melanoma, UM)是成人最常见的原发性眼内恶性肿瘤,发现时常已转移到各种器官组织,包括肝脏、软组织、骨骼、肺、皮肤和淋巴结,转移机制尚不清楚^[1-3]。N6-甲基腺苷(m6A)作为真核RNA和非编码RNA主要的表观遗传修饰在RNA代谢的许多方面起着重要作用,已发现异常的m6A修饰与肿瘤进展有关^[4]。有报道指出,m6A甲基转移酶3(methyltransferase-like 3, *METTL3*)作为m6A甲基转移酶在癌症进展中起关键作用^[5],但*METTL3*在UM中的具体作用目前尚缺乏深入研究。本研究旨在了解*METTL3*是否影响UM细胞的增殖、迁移和侵袭能力,并验证其机制是否和m6A甲基化修饰相关,从而为阐明UM疾病进展的分子机制提供相关理论依据。

1 材料与方 法

1.1 主要实验材料

人葡萄膜黑色素瘤细胞系C918细胞、MUM-2B细胞(凯基生物技术股份有限公司);胎牛血清、1640培养基(普诺赛,中国);*METTL3*(三鹰生物,中国);敲除、过表达*METTL3*慢病毒(艾基生物,中国);Transwell小室(Corning,美国);BCA蛋白浓度检测试剂盒(碧云天生物,中国);质量分数10% SDS-PAGE凝胶快速制备试剂盒、10×SDS-PAGE电泳缓冲液(雅酶生物,中国);质量分数0.25%胰蛋白酶消化液、增强的化学发光试剂盒(enhanced chemiluminescence Kit, ECL)发光试剂盒(新赛美

生物,中国);Matrigel基质胶(Corning,美国);Tween-20、嘌呤霉素(北京索莱宝,中国);山羊抗鼠二抗、山羊抗兔二抗(中杉金桥生物,中国);RT-qPCR试剂盒(Takara,日本)。

1.2 慢病毒包装

使用10 μg质粒、3 μg PMD2G质粒和6 μg PSPAX2质粒的混合物转染HEK293T细胞。6 h后用新鲜的完全培养基替换培养基。在转染后48 h和72 h收集含病毒的上清液,通过0.22 mm醋酸纤维素过滤器过滤。将浓缩慢病毒和培养基加入到转导前24 h接种的细胞中,并将细胞在含病毒培养基中维持48 h。转染48 h后在荧光显微镜下观察增强的绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein fluorescence, EGFP)标记的细胞,评估细胞转染效率约为90%。使用2 μg/mL的嘌呤霉素在两周内选择稳定的转化体,通过Western Blot测定确认。

1.3 细胞转染

1.3.1 细胞准备 将状态良好的目的细胞接种到6孔板,放入37 °C,体积分数5% CO₂培养箱中培养过夜。选取细胞汇合率介于30%至50%之间的样本进行病毒感染。

1.3.2 病毒感染 感染前从冰箱取出病毒冻融,吸去细胞原有培养基,每孔加入1 mL体积新鲜培养液和适量病毒液,同时加入1 μg/mL polybrene,慢病毒感染4 h后补足至2 mL体积。

1.3.3 换液 感染后第2天(约24 h),吸去含有病毒的培养液,换上新鲜的完全培养液,继续37 °C培养。

1.3.4 荧光观察 感染后48 h通过荧光显微镜观察EGFP表达效率。一般感染后72 h可达到表达高峰。对于携带嘌呤霉素抗性基因的病毒,换上含适当浓度嘌呤霉素的新鲜完全培养液,筛选稳定转导的细胞株。

1.4 qRT-PCR

慢病毒转染构建 *METTL3* 敲低和过表达稳转株2 d后,从C918和MUM-2B细胞中提取总RNA。使用Prime Script RT预混液生成cDNA,而SYBR Premix ExTaq™试剂盒用于qRT-PCR。使用LightCycler 480 II系统进行RNA检测, β -actin作为内参。*METTL3*、N-cadherin和 β -actin的引物如下(5' -3'):*METTL3* (F-GAAGAAGTTGCTACACCACCTCTCTG; R-CATCTTGAGTGGCAGGAGCATCTG); N-cadherin (F-CTAACTGTGACCGATAAGGATCAACCC; R-ACTAACCCGTCGTTGCTGTTTGG),使用 $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ 方法测定相对RNA表达水平。

1.5 蛋白免疫印迹实验

使用RIPA裂解缓冲液提取细胞裂解物中的总蛋白,使用BCA蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度;将变性后的蛋白样品加至SDS-聚丙烯酰胺凝胶中,进行电泳分离(120 V, 60 min);将蛋白转移至PVDF膜上(300 mA, 90 min);将PVDF膜置于质量分数5%脱脂奶粉溶液中,室温下摇床封闭1 h;一抗(1:1 000, Cell Signalling Technology),4℃孵育过夜。使用Tween-20缓冲液冲洗膜3次,每次5 min,二抗室温下孵育1 h。利用Image J对目标蛋白条带进行灰度分析,以 β -actin或GAPDH条带灰度值进行标准化。

1.6 细胞增殖能力检测

将对照组和*METTL3*敲低组的葡萄膜黑色素瘤细胞收集,并使用PBS洗涤两次。将细胞悬浮于含10% FBS的完全培养基中,调整细胞密度至 5×10^3 个细胞/100 μ L。将100 μ L细胞悬液加入96孔板的每个孔中,每组设置4个复孔,并在37℃、体积分数5% CO₂孵箱中培养至细胞贴壁。每隔24 h、48 h取出96孔板,在每孔中加入10 μ L细胞增殖能力检测(CCK-8)试剂,轻轻混匀后置于孵箱中继续培养2 h。孵育结束后,使用酶标仪在450 nm波长下测定每孔的吸光度(OD值),记录各时间点的吸光度以评估细胞活性。

1.7 Transwell迁移实验

在Transwell小室内加入100 μ L不含血清的培养基,收集各组细胞,细胞浓度稀释至每100 μ L含 2×10^5 个细胞。将100 μ L细胞悬液小心地加入到每个Transwell小室的上层。在小室下层的24孔板中加入600 μ L含10% FBS的完全培养基,将含有Transwell小室的24孔板置于37℃、体积分数5% CO₂孵箱中孵育24 h。将小室浸入含40 g/L多聚甲醛的固定液中固定20 min,并在PBS中洗涤3次。用质量分数0.1%结晶紫溶液染色15 min,将未迁移的细胞用棉签擦去。在显微镜下观察小室下表面的迁移细胞,随机选择5个视野用Image J计数染色的细胞数目,并计算平均值。

1.8 Transwell侵袭实验

在24孔板内放入孔径为8 μ m的Transwell小室。向Transwell小室内加入80 μ L用培养基稀释8倍的基质胶,随后放入培养箱30 min以上。在每个Transwell小室内加入100 μ L无血清培养基;收集各组细胞,使用PBS洗涤并重悬于不含血清的培养基中。调整细胞浓度至每100 μ L含 2×10^5 个细胞。将100 μ L细胞悬液小心地加入到每个Transwell小室的上层。在小室下层的24孔板中加入600 μ L含10% FBS的完全培养基,作为化学趋化剂,以促进细胞迁移。将含有Transwell小室的24孔板置于37℃、体积分数5% CO₂孵箱中孵育24 h后,移除Transwell小室,将未迁移的上层细胞用棉签轻轻擦去。将小室浸入含40 g/L多聚甲醛的固定液中固定20 min,并在PBS中洗涤3次。加入质量分数0.1%结晶紫溶液染色15 min,之后用PBS洗涤干净,去除多余染色剂。在显微镜下观察小室下表面的迁移细胞,随机选择五个视野用Image J计数染色的细胞数目,并计算平均值。分析不同组间细胞迁移数量的差异。

1.9 流式细胞术凋亡分析

收集细胞悬液,离心(335.4 \times g, 5 min),弃去上清液,保留细胞沉淀。将细胞沉淀重悬于1 mL的PBS中再次离心去除残余液体。使用Annexin V-APC/7-AAD双染色法,按照说明书每个样本加入相应浓度的染料并混匀。在避光条件下,室温下孵育10~15 min。将悬液转移至流式细胞仪管中,流

式细胞仪使用488 nm和638 nm波长激发,检测荧光信号。通过FlowJo对所得数据进行分析,分析细胞在不同凋亡阶段的分布比例。

1.10 流式细胞周期分析

收集细胞后,以 $335.4\times g$ 离心5 min,弃去上清液。加入300 μL PBS和700 μL 无水乙醇,固定细胞,固定后的细胞悬液应立即置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中过夜。室温下以 $335.4\times g$ 离心5 min,弃去上层溶液,使用500 μL PBS重新悬浮细胞,再次以 $335.4\times g$ 离心5 min。将400 μL Blue染料加入每个样本中,避光室温孵育30 min。使用FACS Calibur流式细胞仪,以405 nm波长记录荧光,通过Cell Quest Pro软件进行结果分析。

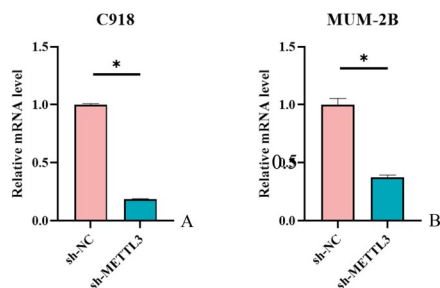
1.11 统计学分析

应用Image J-win64及GraphPad Prism9.0软件对实验结果进行分析与作图。结果3次重复。使用独立样本 t 检验来分析组间差异的统计学显著性。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 敲低METTL3抑制UM细胞的增殖、迁移和侵袭

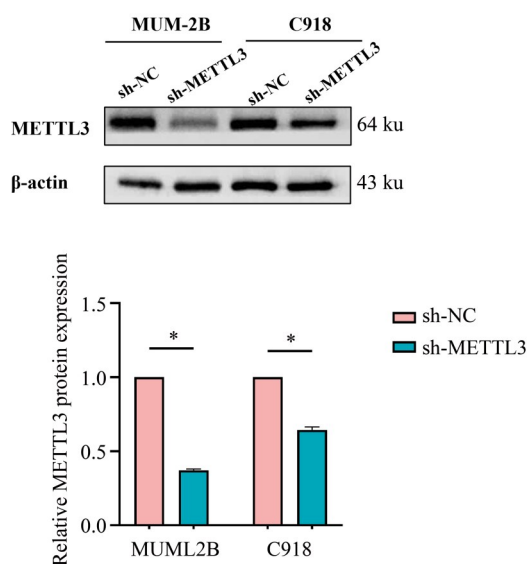
为了评估METTL3在UM中的作用,使用敲低METTL3靶点的慢病毒,对C918细胞系和MUM-2B细胞系进行转染,构建稳定表达细胞株。qRT-PCR和WB分析显示:与空载转染的对照组(sh-NC)相比,METTL3 RNA和蛋白水平因转染而下调(图1-2)。



A: C918, $n=3$, $t=117.900$, compared with sh-NC, $*P<0.001$. B: MUM-2B, $n=3$, $t=18.940$, compared with sh-NC, $*P<0.001$.

图1 qRT-PCR检测sh-METTL3细胞中METTL3 RNA表达水平变化

Fig. 1 qRT PCR detection of changes in METTL3 RNA expression levels in sh-METTL3 cells



$n=3$, $t_1=96.350$, $t_2=24.550$, $*P<0.001$, compared with sh-NC.

图2 Western Blot检测sh-METTL3细胞中METTL3蛋白含量变化情况

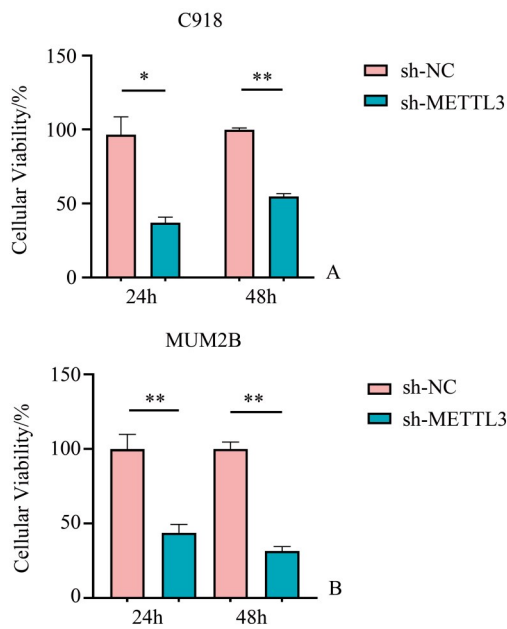
Fig. 2 Western Blot detection of changes in METTL3 protein content in sh-METTL3 cells

对敲低METTL3的C918和MUM-2B细胞进行CCK8实验和transwell实验,显示敲低METTL3的细胞在增殖(图3)、迁移和侵袭能力方面明显下降(图4)。

通过流式细胞术分析检测细胞凋亡和细胞周期,结果显示:敲低METTL3后,UM细胞系(MUM-2B和C918)的细胞凋亡比例增加(图5),表明METTL3表达减少可诱导细胞凋亡。两组细胞中处于G1期的细胞比例显著上升,而S期细胞的比例显著下降;C918细胞中G2期细胞的比例没有明显变化,而MUM-2B细胞中G2期细胞的比例则显著减少(图6)。METTL3基因敲低导致细胞周期大部分停滞在G1期,一部分停滞在S期,这一结果意味着UM细胞中METTL3水平下降可能通过使细胞周期在G1/S期停滞来抑制细胞的增殖。

2.2 过表达METTL3促进UM细胞的增殖、迁移和侵袭

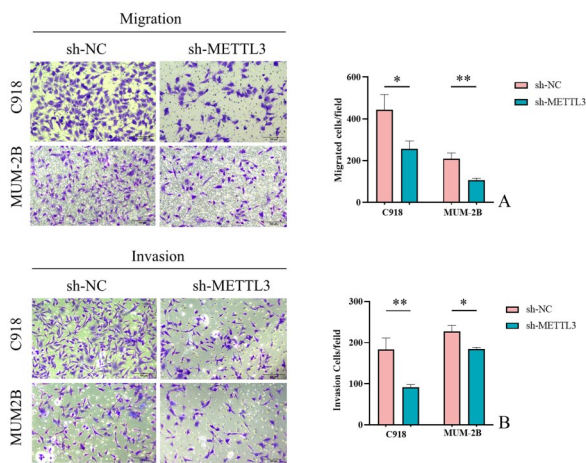
为了进一步探索METTL3对葡萄膜黑色素瘤细胞的恶性生物学行为影响,我们在C918细胞系和MUM-2B细胞系中用Lv-NC、Lv-METTL3慢病毒转染细胞,通过嘌呤霉素筛选建立了METTL3过表达Lv-METTL3(实验组)及Lv-NC(对照组)的稳定表达细胞株,并在qRT-PCR和Western blot实验



A: C918, $n=3$, $t_1=8.186$, $t_2=37.960$, compared with sh-NC. B: MUM-2B, $n=3$, $t_1=9.929$, $t_2=24.700$, compared with sh-NC, * $P<0.01$, ** $P<0.001$.

图3 sh-METTL3细胞体外增殖能力变化情况

Fig. 3 Changes in the in vitro proliferation ability of sh-METTL3 cells



A: Migration $\times 20$, Scale bar= 100 μm , $n=3$, $t_1=3.966$, $t_2=5.984$, compared with sh-NC. B: Invasion $\times 20$, Scale bar= 100 μm , $n=3$, $t_1=5.556$, $t_2=4.818$, compared with sh-NC. * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

图4 sh-METTL3细胞体外迁移、侵袭能力变化情况

Fig. 4 Changes in migration and invasion ability of sh-METTL3 cells in vitro

中验证了其在RNA水平以及在蛋白水平表达显著增多(图7-图8),差异具有统计学意义($P<0.05$)。

将过表达METTL3细胞进行CCK8实验和

transwell实验,结果显示:过表达METTL3可以显著增强细胞的增殖能力(图9);过表达METTL3组发现更多的细胞穿过小室,表明METTL3的上调显著提高了细胞的侵袭以及迁移能力(图10)。

通过流式细胞术分析检测细胞凋亡和细胞周期是否变化,结果显示:过表达METTL3后,细胞凋亡比例减少(图11),意味着METTL3表达增加可抑制细胞凋亡。C918细胞中处于G1期的细胞比例显著下降,而S期细胞的比例显著上升;MUM-2B细胞周期的比例没有明显变化(图12)。

2.3 点突变m6A相关催化位点减弱UM细胞的增殖、迁移和侵袭

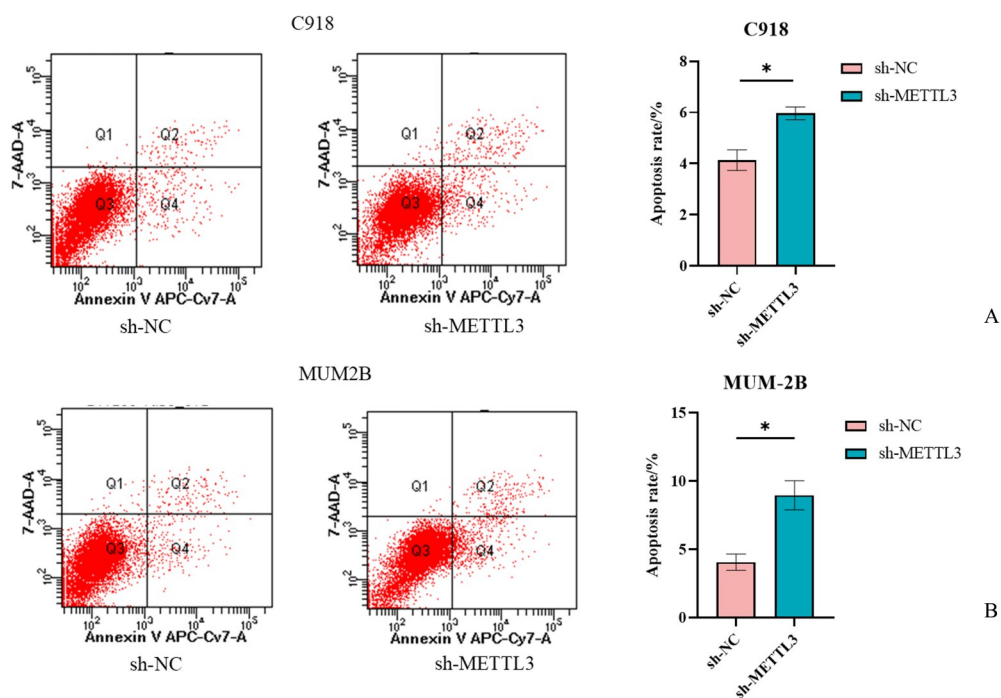
METTL3作为重要的m6A甲基化转移酶,为了明确本实验中METTL3是否通过促进甲基化修饰来达到相应作用,我们使用含有m6A相关催化位点突变的慢病毒转染C918细胞系和MUM-2B细胞系,并用嘌呤霉素筛选得到稳定表达的细胞系。CCK8实验检测结果显示,与正常组及高表达METTL3的UM细胞相比,点突变METTL3催化位点后细胞的增殖能力明显下降(图13)。

Transwell实验结果表明,与过表达METTL3组相比,METTL3的催化位点突变使得UM细胞的迁移和侵袭能力下降(图14),提示METTL3的甲基化催化活性在葡萄膜黑色素瘤的恶性进展中起到相关作用。

流式细胞术检测细胞周期和细胞凋亡情况发现,细胞点突变m6A相关催化位点后细胞凋亡比例增加(图15);MUM-2B细胞中G1期细胞的百分比显著提高,S期细胞的百分比显著下降,G2期细胞的百分比稍下降;C918细胞中G1期细胞的百分比显著提高,S期和G2期细胞比例无明显变化(图16)。

3 讨论

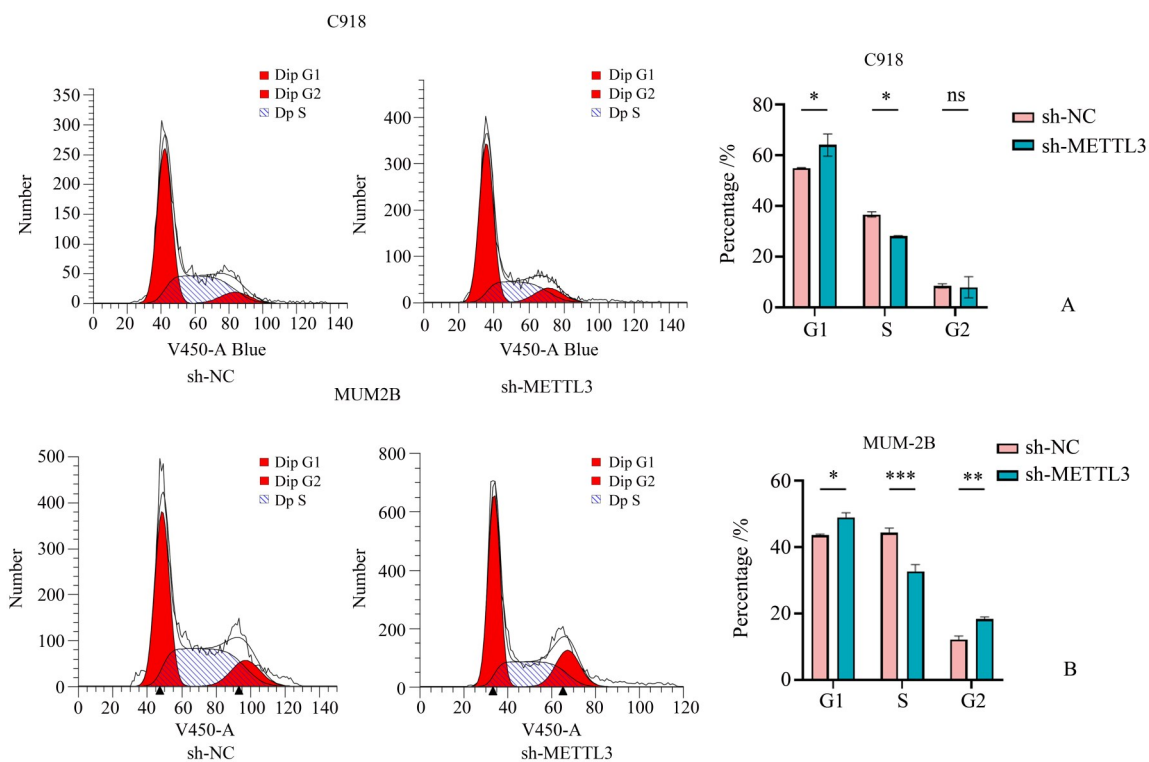
m6A修饰对基因功能进行异常的表现遗传调控在人类肿瘤发生和癌症进展中起着至关重要的作用,在多种肿瘤发生过程中可以观察到m6A出现失调^[6-10]。METTL3能够参与m6A修饰的动态和可逆过程,通过影响癌基因和肿瘤抑制基因的表达来调节多种癌症的发生和进展。它在不同癌症类



A: C918, $n=3$, $t=6.670$, compared with sh-NC, $*P<0.01$. B: MUM-2B, $n=3$, $t=6.914$, compared with sh-NC group, $*P<0.01$.

图5 流式细胞仪检测处理后的sh-METTL3细胞凋亡变化情况

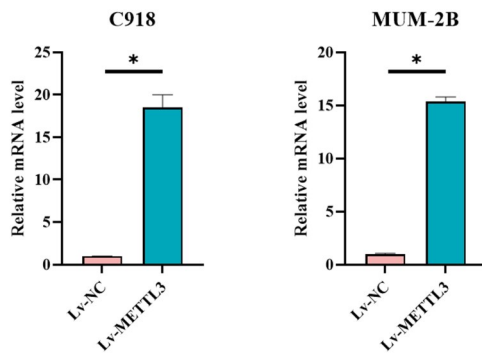
Fig. 5 Flow cytometry detection of apoptosis changes in sh-METTL3 cells after treatment



A: C918, $n=3$, $F=12.280$, compared with sh-NC. B: MUM-2B, $n=3$, $F=43.430$, compared with sh-NC. ns: no significance, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$.

图6 流式细胞仪检测处理后的sh-METTL3细胞周期变化情况

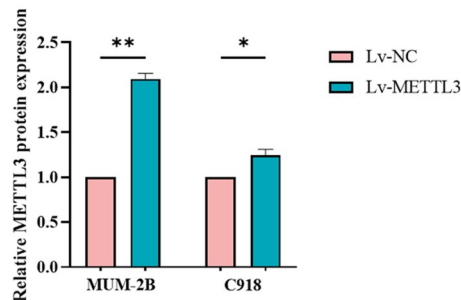
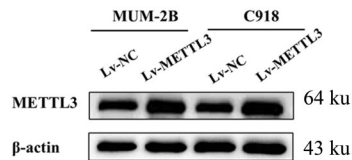
Fig. 6 Flow cytometry detection of cell cycle changes in sh-METTL3 cells after treatment



A: C918, $n=3$, $t=20.510$, compared with Lv-NC. B: MUM-2B, $n=3$, $t=58.950$, compared with Lv-NC. * $P<0.001$.

图7 qRT-PCR检测Lv-METTL3细胞中METTL3 RNA表达水平变化

Fig. 7 qRT PCR detection of changes in METTL3 RNA expression levels in Lv-METTL3 cells



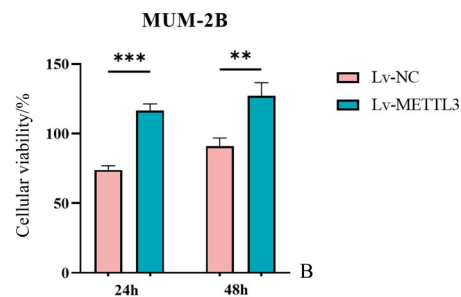
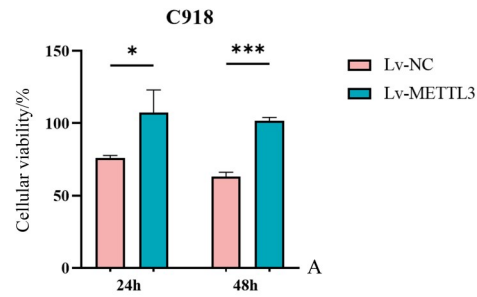
$n=3$, $t_1=24.760$, $t_2=5.185$, compared with Lv-NC, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

图8 Western Blot检测Lv-METTL3细胞中METTL3蛋白表达量变化情况

Fig. 8 Western Blot detection of changes in METTL3 protein expression in Lv-METTL3 cells

型中的作用存在差别,在急性髓性白血病、乳腺癌和结直肠癌中具有致癌作用^[11-14],但在胶质母细胞瘤中却起抑制作用^[15],这表明METTL3介导的m6A修饰在癌症中的确切作用相当复杂^[16]。

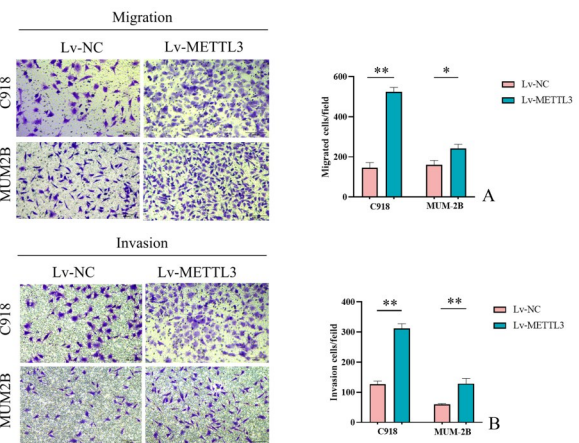
葡萄膜黑色素瘤作为一种起源于眼部葡萄膜的恶性肿瘤,其高侵袭性和迁移性是导致患者预后不良的主要因素。虽然近年来对METTL3在不同类型癌症中的作用有了较多的研究,但其在葡萄膜黑色素瘤中的具体功能仍不十分明确。



A: C918, $n=3$, $t_1=3.412$, $t_2=16.900$, compared with Lv-NC. B: MUM-2B, $n=3$, $t_1=12.890$, $t_2=5.685$, compared with Lv-NC. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

图9 CCK8实验检测过表达METTL3细胞的体外增殖能力变化情况

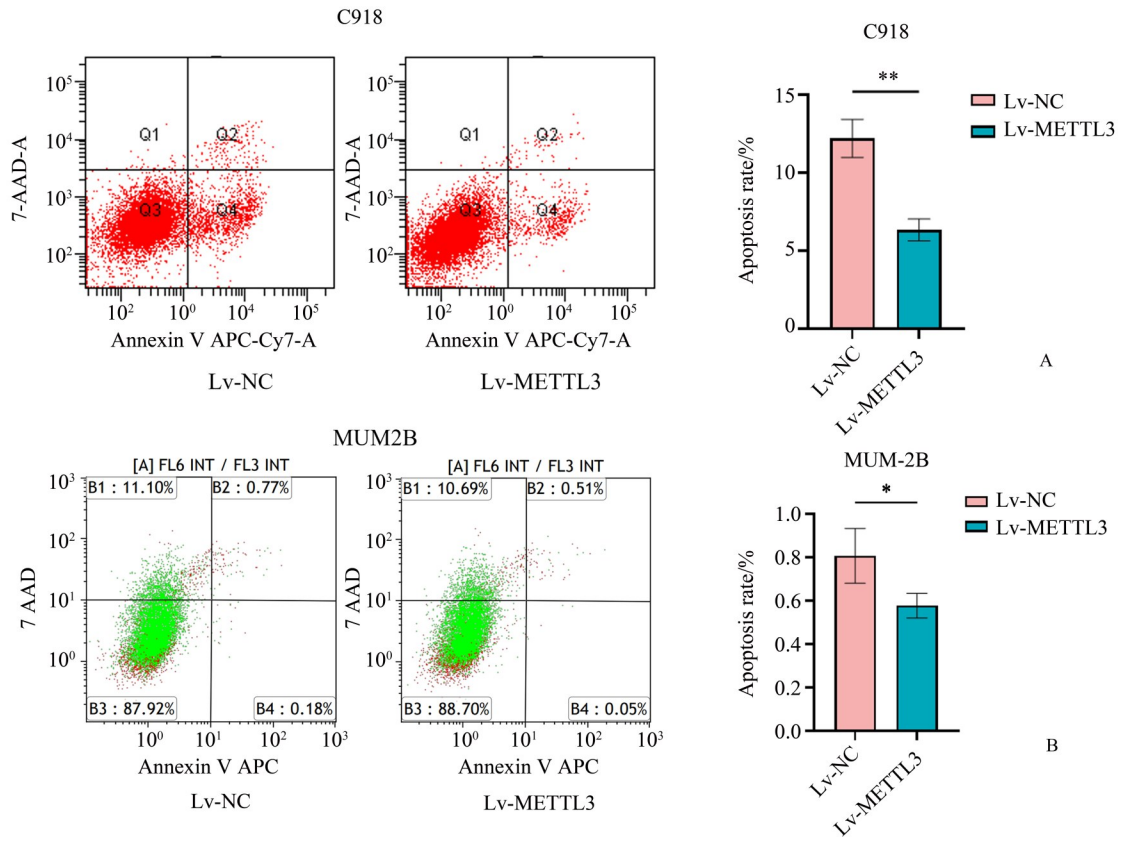
Fig. 9 CCK8 experiment detects changes in the in vitro proliferation ability of METTL3 overexpressing cells



A: Migration $\times 20$, Scale bar= 100 μm , $n=3$, $t_1=18.890$, $t_2=4.701$, compared with Lv-NC. B: Invasion $\times 20$, Scale bar= 100 μm , $n=3$, $t_1=16.990$, $t_2=6.846$, compared with Lv-NC. * $P<0.01$, ** $P<0.001$.

图10 Transwell迁移实验检测过表达METTL3细胞体外迁移和侵袭能力变化情况

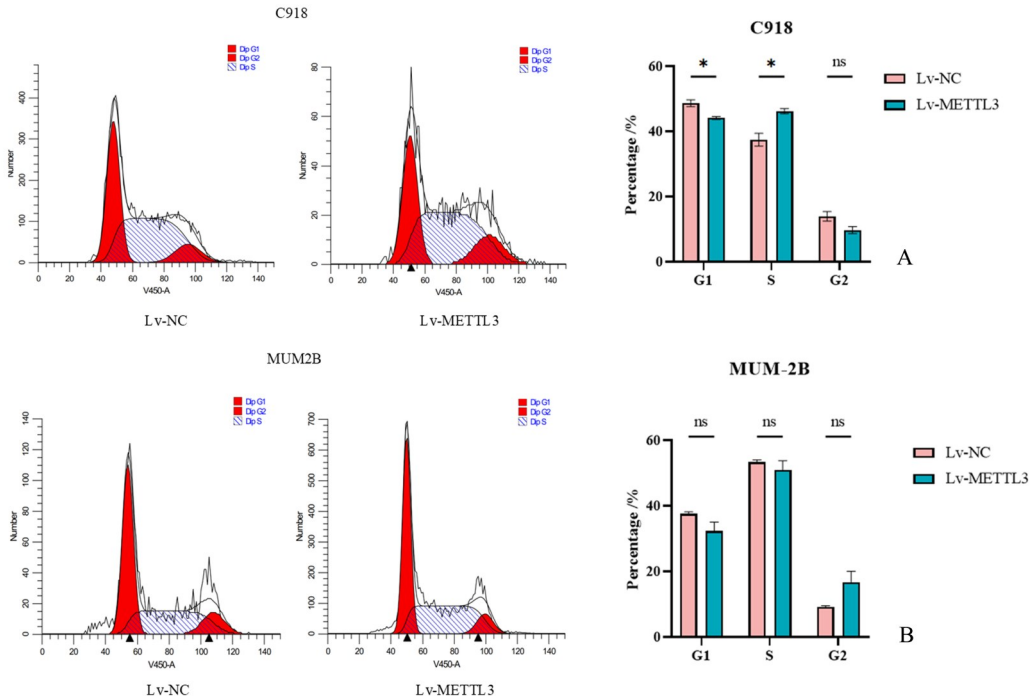
Fig. 10 Transwell migration assay detects changes in the in vitro migration and invasion ability of METTL3 overexpressing cells



A: C918, $n=3$, $t=7.234$, compared with Lv-NC, $*P<0.01$. B: MUM-2B, $n=3$, $t=2.870$, compared with Lv-NC, $*P<0.05$.

图 11 流式细胞仪检测过表达 METTL3 细胞凋亡变化情况

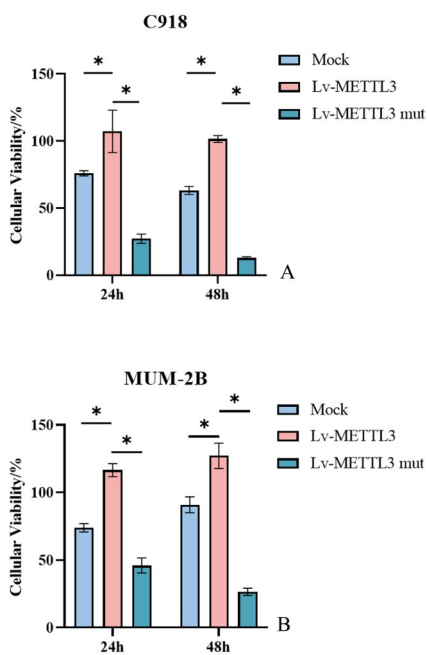
Fig. 11 Flow cytometry detection of apoptosis changes in METTL3 overexpressing cells



A: C918, $n=3$, $F=38.430$, compared with Lv-NC, $*P<0.05$. B: MUM-2B, $n=3$, compared with Lv-NC, ns: no significance.

图 12 流式细胞仪检测过表达 METTL3 细胞周期变化情况

Fig. 12 Flow cytometry detection of cell cycle changes in overexpressing METTL3 cells

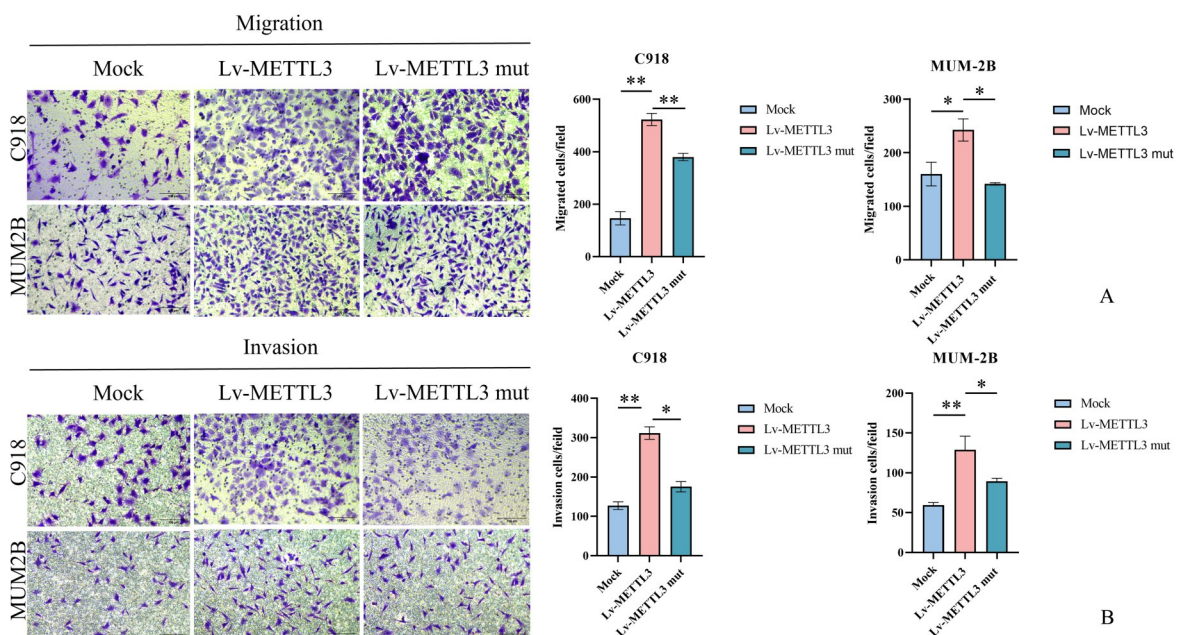


A: C918, $n=3$, $F=5.860$, compared with Lv-METTL3. B: MUM-2B, $n=3$, $F=30.370$, compared with Lv-METTL3. $*P<0.001$.

图 13 CCK8 实验检测细胞点突变 m6A 相关催化位点后体外增殖能力变化情况

Fig. 13 CCK8 experiment detects the changes in in vitro proliferation ability of cells after detecting the m6A related catalytic site of point mutations

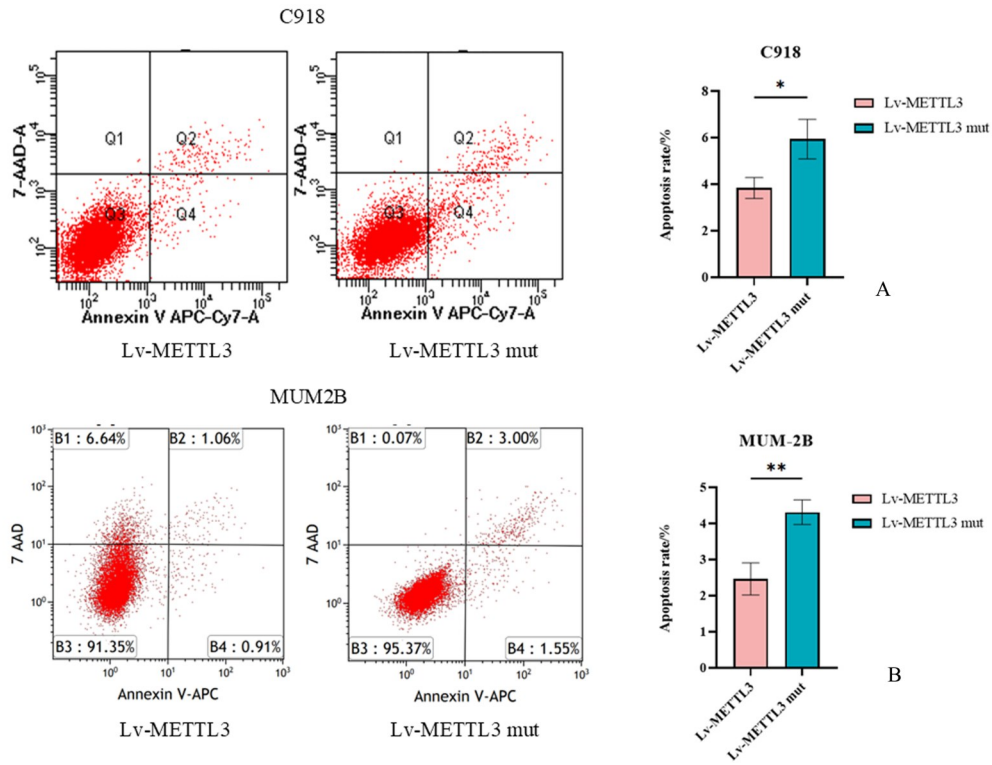
已有研究显示 RNA 甲基转移酶复合物 (*METTL3* 和 *METTL14*) 在 UM 细胞和临床标本中的表达显著增加, 表明 *METTL3* 在 UM 的发展中发挥作用, 这些酶负责完成 m6A 修饰的基本甲基化过程^[17]。在本研究中, 我们发现 *METTL3* 的敲低显著抑制了葡萄膜黑色素瘤细胞的增殖、迁移和侵袭能力, 表明 *METTL3* 在 UM 的侵袭转移中发挥促进作用。过表达 *METTL3* 的实验结果进一步支持了 *METTL3* 在肿瘤进展中的关键作用。通过引入 *METTL3* 作用的 m6A 相关催化位点突变, 可以使得 *METTL3* 的甲基化活性显著降低, 发现突变 m6A 相关催化位点可以导致细胞增殖能力明显下降。这个结果强调了 *METTL3* 的甲基转移活性对于其调控肿瘤细胞生物学特性的重要性, 表明 *METTL3* 通过催化 m6A 甲基化过程影响 RNA 修饰功能, 从而促进癌细胞的增殖与生长。流式细胞术分析细胞周期后发现, 细胞周期在 G1 期发生阻滞, 进一步解释了细胞增殖能力受抑的原因。其中, MUM-2B 细胞中 G2 期比例也明显下降, 提示 *METTL3* 可能在该细胞系中调控多个周期关键节点。



A: Migration $\times 20$, Scale bar = 100 μm , $n=3$, compared with Lv-METTL3, C918 $F=234.100$, $**P<0.001$, MUM-2B $F=27.950$, $*P<0.01$. B: Invasion $\times 20$, Scale bar = 100 μm , $n=3$, compared with Lv-METTL3, C918 $F=157.600$, MUM-2B $F=33.790$. $*P<0.01$, $**P<0.001$.

图 14 Transwell 侵袭实验检测细胞点突变 m6A 相关催化位点后体外迁移能力变化情况

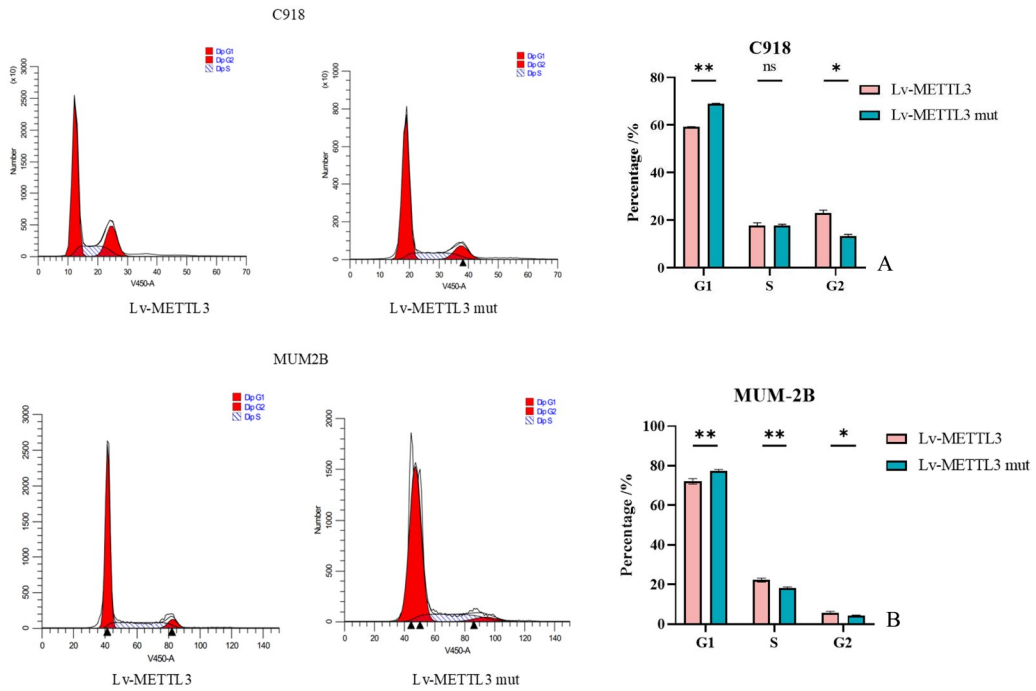
Fig. 14 Transwell invasion assay detects changes in in vitro migration ability of m6A related catalytic sites in cells with point mutations



A: C918, n=3, t=3.778, compared with Lv-METTL3, *P<0.05. B: MUM-2B, n=3, t=5.715, compared with Lv-METTL3, **P<0.01.

图15 流式细胞仪检测点突变METTL3催化活性位点处理后的细胞凋亡变化情况

Fig. 15 Detection of apoptotic changes in cells treated with METTL3 catalytic active site mutation using flow cytometry



A: C918, n=3, F=156, compared with Lv-METTL3. B: MUM-2B, n=3, F=190.000, compared with Lv-METTL3. ns: no significance *P<0.05, **P<0.001.

图16 流式细胞仪检测点突变METTL3催化活性位点处理后的细胞周期变化情况

Fig. 16 Cell cycle changes after treatment with METTL3 catalytic active site mutation detected by flow cytometry

通过本研究,我们揭示了 *METTL3* 在葡萄膜黑色素瘤细胞中可能促进致癌基因翻译,并进一步探讨其可能的机制。然而,本实验仅采用细胞体外培养进行实验,未能完全模拟体内环境,难以评估葡萄膜黑色素瘤体内进展。因此,未来

的研究应在体内实验中进一步明确 *METTL3* 通过 m6A 调控的分子通路,特别是在葡萄膜黑色素瘤的转移过程中,探讨其与肿瘤免疫逃逸、细胞代谢等因素的关联。

参考文献

- [1] Rodrigues M, Koning LD, Coupland SE, et al. So Close, yet so far: discrepancies between uveal and other melanomas. a position paper from UM cure 2020 [J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(7): 1032.
- [2] Fallico M, Raciti G, Longo A, et al. Current molecular and clinical insights into uveal melanoma (Review) [J]. *Int J Oncol*, 2021, 58(4): 10.
- [3] Damato B. Ocular treatment of choroidal melanoma in relation to the prevention of metastatic death – a personal view [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2018, 66: 187–199.
- [4] Zhao LY, Song J, Liu Y, et al. Mapping the epigenetic modifications of DNA and RNA [J]. *Protein Cell*, 2020, 11(11): 792–808.
- [5] Lin S, Choe J, Du P, et al. The m(6)A methyltransferase *METTL3* promotes translation in human cancer cells [J]. *Mol Cell*, 2016, 62(3): 335–345.
- [6] Chelmicki T, Roger E, Teissandier A, et al. m6A RNA methylation regulates the fate of endogenous retroviruses [J]. *Nature*, 2021, 591(7849): 312–316.
- [7] Jia R, Chai P, Wang S, et al. m6A modification suppresses ocular melanoma through modulating HINT2 mRNA translation [J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 161.
- [8] Wang J, Wang J, Gu Q, et al. The biological function of m6A demethylase ALKBH5 and its role in human disease [J]. *Cancer Cell Int*, 2020, 20: 347.
- [9] Wan W, Ao X, Chen Q, et al. *METTL3/IGF2BP3* axis inhibits tumor immune surveillance by upregulating N6-methyladenosine modification of PD-L1 mRNA in breast cancer [J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 60.
- [10] 刘芳远, 冯学敏, 季晓磊, 等. 肝癌基于 m6A 甲基化调节基因对肝癌分型及预后建模 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2022, 30(9): 962–969.
- [11] Liu FY, Feng XM, Ji XL, et al. Cluster classification and clinical prognostic modeling based on m6A RNA methylation regulators in liver cancer [J]. *Chin J Hepatol*, 2022, 30(9): 962–969.
- [12] Vu LP, Pickering BF, Cheng Y, et al. The N6-methyladenosine (m6A)-forming enzyme *METTL3* controls myeloid differentiation of normal hematopoietic and leukemia cells [J]. *Nat Med*, 2017, 23(11): 1369–1376.
- [13] Cai X, Wang X, Cao C, et al. HBXIP-elevated methyltransferase *METTL3* promotes the progression of breast cancer via inhibiting tumor suppressor let-7g [J]. *Cancer Lett*, 2018, 415: 11–19.
- [14] Li T, Hu PS, Zuo Z, et al. *METTL3* facilitates tumor progression via an m6A-IGF2BP2-dependent mechanism in colorectal carcinoma [J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 112.
- [15] 张世慧, 齐秋晨, 李培龙, 等. *METTL3* 介导的 m6A 修饰在结直肠癌奥沙利铂耐药中的作用研究 [J]. *重庆医科大学学报*, 2022, 47(8): 941–947.
- [16] Zhang SH, Qi QC, Li PL, et al. Role of N6-methyladenosine mediated by methyltransferase-like 3 in oxaliplatin resistance of colorectal cancer [J]. *J Chongqing Med Univ*, 2022, 47(8): 941–947.
- [17] Cui Q, Shi H, 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.
- [18] Chen M, Wei L, Law CT, 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.
- [19] Tusup M, Kundig T, Pascolo S. Epitranscriptomics of cancer [J]. *World J Clin Oncol*, 2018, 9(3): 42–55.

(编辑 余菁)