

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2019.05.005

· 基础研究 ·

敲低 WTAP 基因对肺腺癌 A549 细胞恶性生物学行为的影响

陶然¹, 王策¹, 殷婷婷², 李宜轩², 张伟华³, 张春泽³, 任君旭¹ (1. 河北北方学院 组织胚胎学教研室, 河北 张家口 075000; 2. 天津中医药大学 研究生院, 天津 300193; 3. 天津市人民医院 肛肠外科, 天津 300000)

[摘要] **目的:** 探讨成肾细胞瘤 1-结合蛋白(Wilms' tumor 1- associating protein, WTAP)对人肺腺癌 A549 细胞增殖、迁移和侵袭的影响。**方法:** 选用人肺腺癌 A549 细胞和 HEK293T, 设计两组 shWTAP 干扰序列, 构建慢病毒载体质粒, 在 HEK293T 细胞中包装慢病毒后感染人肺腺癌 A549 细胞, 对照组感染 277 空载体质粒。用 qPCR 和 WB 实验检测 A549 细胞中 WTAP mRNA 和蛋白的表达水平, 用 BrdU 实验、细胞划痕愈合实验、Transwell 实验分别检测 A549 细胞的增殖、迁移和侵袭能力。**结果:** 成功构建 shWTAP-1 和 shWTAP-2 两种慢病毒质粒, 感染 A549 细胞后, 与对照组比较, A549 细胞中 WTAP mRNA 和蛋白表达水平显著下调 (均 $P < 0.05$), 细胞的增殖、迁移和侵袭能力显著降低 (均 $P < 0.05$)。**结论:** 敲低 WTAP 基因的表达对人肺腺癌 A549 细胞的增殖、迁移和侵袭能力有显著抑制作用, WTAP 基因的表达与肺腺癌的发生发展相关, WTAP 可能是肺腺癌诊疗的一个潜在靶标。

[关键词] 成肾细胞瘤 1-结合蛋白(WTAP); 肺腺癌; A549 细胞; 增殖; 迁移; 侵袭

[中图分类号] R734.2; R730.59; R730.2 [文献标识码] A [文章编号] 1007-385X(2019)05-0512-06

Effect of WTAP gene knockdown on malignant biological behaviors of lung adenocarcinoma A549 cells

TAO Ran¹, WANG Ce¹, YIN Tingting², LI Yixuan², ZHANG Weihua³, ZHANG Chunze³, REN Junxu¹ (1. Department of Histology and Embryology, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, Hebei, China; 2. Graduate School, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China; 3. Department of Anorectal Surgery, People's Hospital of Tianjin City, Tianjin 300000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of Wilms' tumor 1-associating protein (WTAP) on proliferation, migration and invasion of human lung adenocarcinoma A549 cells. **Methods:** Human lung adenocarcinoma cell line A549 and HEK293T cells were chosen for this study. Two sets of shWTAP interference sequences were designed to construct lentiviral vector plasmid. Human lung adenocarcinoma A549 cells were infected after packaging lentivirus in HEK293T cells, and the control group was transfected with 277 empty vector plasmid. The mRNA and protein expression levels of WTAP in A549 cells were detected by qPCR and WB. Changes in proliferation, migration and invasion of A549 cells were detected by BrdU assay, cell scratch healing assay and Transwell assay, respectively. **Results:** Two plasmids, shWTAP-1 and shWTAP-2, were successfully constructed. Compared with the control group, the mRNA and protein expression levels of WTAP were significantly down-regulated in A549 cells with WTAP knockdown (both $P < 0.05$), and the proliferation, migration and invasion ability of cells were significantly decreased (all $P < 0.05$). **Conclusion:** Knockdown of WTAP significantly inhibited the proliferation, migration and invasion of human lung adenocarcinoma A549 cells. The expression of WTAP gene is associated with the occurrence and development of lung adenocarcinoma. WTAP may be a potential target for the diagnosis and treatment of lung adenocarcinoma.

[Key words] Wilms' tumor 1-associating protein (WTAP); lung adenocarcinoma; A549 cell; proliferation; migration; invasion

[Chin J Cancer Biother, 2019, 26(5): 512-517. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.05.005]

[基金项目] 国家重点实验室开放研究课题资助项目 (No.2018094); 天津市卫生和计划生育委员会、天津市中医药管理局重点项目 (No.2017057); 河北省研究生创新资助项目 (No.CXZZSS20181); 天津市卫生健康委员会资助项目 (No.2014kZ053)。Project supported by the National Key Laboratory Open Research Project (No.2018094), the Tianjin Municipal Health and Family Planning Commission and Tianjin Municipal Administration of Traditional Chinese Medicine Key Projects (No. 2017057), the Graduate Innovation Funding Project of Hebei Province (No. CXZZSS20181), and the Tianjin Health and Wellness Committee Project (No.2014kZ053)

[作者简介] 陶然 (1992-), 女, 硕士生, 主要从事肿瘤防治的基础和临床研究, E-mail: zizaitaoran991@qq.com

[通信作者] 任君旭 (REN Junxu, corresponding author), 硕士, 教授, 硕士生导师, 主要从事肿瘤防治的基础研究, E-mail: junxur12@163.com;

张春泽 (ZHANG Chunze, co-corresponding author), 博士, 教授, 硕士生导师, 主要从事肿瘤防治的临床研究, E-mail: zhangchunzetj@163.com

近年来,随着环境因素的影响,中国肺癌的发病率逐年增高,在发生转移的患者的生存率显著降低,因此肺癌的早期诊断和治疗具有重要意义。成肾细胞瘤 1-结合蛋白(Wilms' tumor 1-associating protein, WTAP)在胰腺导管腺癌^[1]、成胶质细胞瘤^[2]、白血病^[3-4]、胆管癌^[5]等癌细胞中呈高表达,影响癌细胞的增殖和迁移等,发挥一定的促癌作用,但在肺癌细胞中的作用尚未见明确报道。WTAP 是一种重要的 RNA 甲基转移酶^[6],同甲基化转移酶 3(methyltransferase-like protein 3, METTL3)和甲基化转移酶 14(methyltransferase-like protein 14, METTL14)一起参与 N6-甲基腺嘌呤(N6-methyladenosine, m6A)的修饰发挥主要功能,参与调控 RNA 翻译、稳定性以及可变剪接等,从而影响人类肿瘤的发生与发展^[7-8]。本课题运用 RNA 干扰技术通过敲低人肺腺癌 A549 细胞中 WTAP 基因,观察对该细胞增殖、迁移、侵袭能力的影响,旨在为深入研究 WTAP 基因功能以及肺腺癌发生发展的机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞系及主要试剂

人肺腺癌 A549 细胞与 HEK293T 细胞均来自本实验室,在 37 °C、5%CO₂、饱和湿度下用含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中培养。

RPMI 1640 培养液、胎牛血清和胰蛋白酶购自 Gibco 公司,质粒 pSuper.retro.puro(pSRP)和慢病毒包装系统来自本实验室,限制性内切酶购自 NEB 公司, *E. coli* T1 和质粒提取试剂盒购自全式金公司,聚乙烯亚胺(polyethylenimine, PEI)购自 Sigma 公司,琼脂糖购自 BIOWEST 公司, RIPA 强效裂解液(含 PMSF)、4×蛋白上样缓冲液和 ECL 超敏化学发光液购自索莱宝公司, Transwell 小室购自 Corning 公司, TRIzol 试剂、普通 DNA 纯化试剂盒、逆转录试剂盒、PCR 试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司, PCR 引物购自金唯智公司, GAPDH 抗体和 WTAP 抗体分别购自爱必信公司和 Abcam 公司,辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔二抗购自全式金公司。

1.2 shWTAP 质粒的构建及其鉴定

根据哺乳动物真核细胞 shRNA 的 Tuschl AA-19 nt 的设计原则,从 WTAP 基因的 mRNA 序列中筛选 1 条 shRNA 靶序列,并合成相应的正义和反义 DNA 模板。利用 Ambion shRNA 在线软件设计了针对 WTAP 的 shWTAP-1: 5' - GATCCCCGCAAGTACACAGATCTTAATTCAAGAGATTAAGATCTGTGTACTTGCC TTTTAA-3', 3' - AGCTTAAAAAGGCAAGTACACAGATCTTAATCTCTTGAATTAAGATCTGTGTACTTG

CCGGG-5', shWTAP-2: 5' - GATCCCCCAGATCTTA- ACTCTAATGATTCAAGAGATCATTAGAGTTAAGA TCTGTTTTTA-3', 3' - AGCTTAAAAACAGATCT- TAACTCTAATGATCTCTTGAATCATTAGAGTTAAG ATCTGGGG-5'。通过 *Bgl* II 与 *Hind* III 酶切将 2 条序列分别连入 pSRP 载体,连接产物转化入 *E. coli* T1 细胞中,得到转化子 pSRP-iWTAP-1 与 pSRP-iWTAP-2,经 *Eco*R I 和 *Xho* I 酶切鉴定。*Eco*R I 酶切成功转化的 pSRP-iWTAP 质粒, T4 DNA polymerase 补平缺口,纯化后 *Xho* I 酶切,回收该 DNA 片段。*Eco*R V 和 *Xho* I 酶切 277 空载质粒,割胶回收与 DNA 片段连接过夜,转化入 *E. coli* T1 细胞中,得到新的转化子 shWTAP-1 与 shWTAP-2,经 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切鉴定。

1.3 WTAP-shRNA 慢病毒的产生与 A549 细胞的感染

用慢病毒包装系统中 3 种质粒 DNA[pGCL-GFP(含绿色荧光蛋白)载体 2.5 μg、pHelper1.0(gag/pol 元件)载体 5 μg、pHelper2.0(VSVG 元件)载体 3 μg]分别加上 shWTAP-1、shWTAP-2、277 空载体质粒各 12 μg 制备成复合物,加入 PEI 试剂转染 HEK293T 细胞,收集 24、48 和 72 h 的细胞上清液,过滤浓缩后同时分别感染到 A549 细胞以产生稳定的细胞系,分别作为 shWTAP-1 组、shWTAP-2 组与空载体对照组。感染当天, A549 细胞汇合度为 70%, 弃去细胞上清液,加入含有聚凝胺(6 μg/ml)的病毒液, 12 h 后观察细胞状态,更换为正常培养基。反复 3 次,荧光显微镜下观察 GFP 的表达情况,收集总蛋白进入后续 Wb 实验。

1.4 qPCR 检测 A549 细胞中 WTAP mRNA 的表达

shWTAP-1 组、shWTAP-2 组和空载体对照组细胞于 100 mm 培养皿中培养至对数生长期,加入 1 ml 的 TRIzol, 室温放置 5 min 后加入 200 μl 氯仿,用力震荡 30 s, 室温放置 3 min; 4 °C、12 000×g 离心 15 min; 从每管中吸取上清液至另 1.5 ml 的 Eppendorf 管中,加入等体积、-20 °C 预冷的异丙醇,混匀后室温沉淀 10 min; 4 °C、12 000×g 离心 10 min 后去上清;加入 1 ml 4 °C 预冷的 75% 乙醇,洗涤沉淀及离心管壁; 4 °C、12 000×g 离心 5 min, 弃上清,室温待乙醇挥发后加入 50 μl RNase-free 水至完全溶解。逆转录合成 cDNA, 反应条件为: 42 °C 1 h、70 °C 10 min、4 °C 1 h。按照 qPCR 试剂说明配制 20 μl 体系 PCR 反应混合液进行扩增, 反应条件为: 95 °C 预变性 10 min、95 °C 变性 30 s、55 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 30 s, 重复 30 个循环, 72 °C 延伸 7 min, 4 °C 保存。GAPDH 引物 F 为 GGTGGTCTCCTCTGACTTCAACA, R 为 GTTGCTGTAGCCAAATTCGTTGT; WTAP 引物 F 为 CCTGGAAGTTTACGCCTGATAG, R 为 CTTACTTGTGGCCTCTGACTG。以 2^{-ΔΔCt} 法计算目的基因 mRNA 的表达量。

1.5 WB实验检测A549细胞中WTAP蛋白的表达

将shWTAP-1组、shWTAP-2组与空载体对照组细胞置于100 mm培养皿中培养至对数生长期,加入600 μ l RIPA强效裂解液(含PMSF)冰上裂解30 min后提取细胞蛋白,根据目的蛋白大小配制合适浓度的浓缩胶与分离胶,采用Bio-Rad电泳装置将总蛋白进行SDS-PAGE分离、转移到PVDF膜上,5%脱脂牛奶室温封闭2 h。加WTAP(1:5 000)和GAPDH(1:5 000)一抗4 $^{\circ}$ C孵育过夜,TBST洗膜3次,加羊抗兔二抗(1:10 000)室温孵育2 h,TBST洗膜3次,ECL超敏发光液均匀滴加于膜上1 min,于显影仪里曝光。

1.6 BrdU实验检测A549细胞的增殖能力

对数生长期的shWTAP-1组、shWTAP-2组与空载体对照组细胞以每孔 1×10^3 细胞数接种于96孔培养板中,设置5个复孔。培养1 d后加入BrdU(终浓度为10 μ mol/L),37 $^{\circ}$ C孵育4 h;弃培养液,加入200 μ l Fix Denat,室温摇床孵育30 min;弃上清,加入抗BrdU抗体(工作浓度1:100),室温摇床孵育1.5 h;弃上清,PBS洗涤3次;加底物反应5 min,再加入1 mol/L H_2SO_4 (每孔25 μ l)终止反应;用酶标仪检测波长在450、690 nm(参考波长)处的光密度(D)值,根据 $D_{450} - D_{690}$ 分析细胞增殖结果。

1.7 划痕愈合实验检测A549细胞的迁移能力

对数生长期的shWTAP-1组、shWTAP-2组与空载体对照组细胞制成 $5 \times 10^8/L$ 细胞悬液铺于6孔板,待细胞生长至80%~90%汇合时,用10 μ l枪头在孔板中央笔直划痕,PBS洗去脱落细胞,加不含胎牛血清的RPMI 1640培养基置于孵育箱培养,于0、36、72 h

摄片,计算划痕两侧细胞迁移距离。划痕迁移率(%)=(0 h划痕宽度-36/72 h划痕宽度)/0 h划痕宽度 \times 100%。

1.8 Transwell实验检测A549细胞的侵袭能力

将对数生长期的shWTAP-1组、shWTAP-2组与空载体对照组的细胞用胰蛋白酶消化后调整细胞密度至 $5 \times 10^8/L$,将200 μ l细胞悬液滴加至预涂有基质胶的Transwell小室的上室,下室预先加入500 μ l含5%胎牛血清的培养基,培养并观察细胞侵袭能力变化。4%多聚甲醛固定15 min后0.1%结晶紫染色,再经PBS洗涤3次,在显微镜下观察上室下表面上、中、下、左、右的5个视野,计数侵袭细胞数。

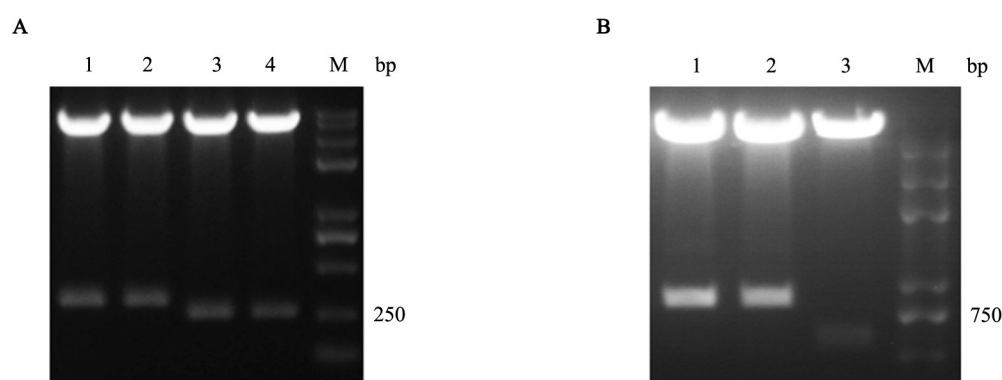
1.9 统计学处理

qPCR、WB以及细胞增殖、迁移、侵袭等实验均重复3次。用统计学软件分析SPSS 22.0对数据进行分析,用Graph Pad Prism 5.0软件作图。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验;计数资料以率(%)表示,采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功构建shWTAP-1和shWTAP-2质粒

EcoR I和*Xho* I酶切pSRP-iWTAP-1、pSRP-iWTAP-2质粒,经1.5%的琼脂糖凝胶电泳得到320 bp的条带,空载体得到260 bp的条带(图1A)。*BamH* I和*Xho* I酶切shWTAP-1、shWTAP-2质粒,经1.5%的琼脂糖凝胶电泳得到800 bp的条带,空载体得到500 bp的条带(图1B)。



A: Enzyme digestion identification of pSRP-iWTAP-1 and pSRP-iWTAP-2;

B: Enzyme digestion identification of shWTAP-1 and shWTAP-2;

1: Sequence 1 constructed plasmid; 2: Sequence 2 constructed plasmid; 3-4: Empty vector plasmid

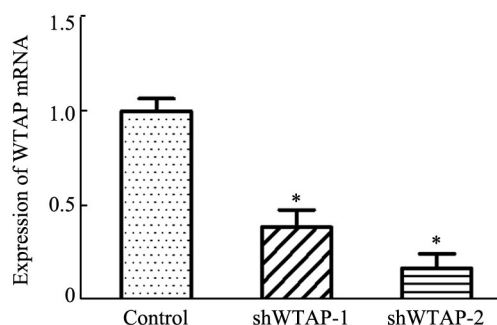
图1 shWTAP质粒的鉴定

Fig.1 Identification of shWTAP plasmids

2.2 shWTAP质粒转染后肺腺癌A549细胞WTAP mRNA的表达水平下调

qPCR检测结果(图2)显示,shWTAP-1组、shWTAP-2组A549细胞中WTAP mRNA表达水平明

显低于空载体对照组($t=6.892, 8.641$, 均 $P<0.05$)。结果表明, shWTAP-1、shWTAP-2 质粒转染后肺腺癌 A549 细胞实现了 WTAP mRNA 水平的下调。



* $P<0.05$ vs Control group

图2 shWTAP 质粒转染后 A549 细胞 WTAP mRNA 的表达水平下调

Fig.2 Down-regulation of WTAP mRNA expression in A549 cells transfected with shWTAP plasmids

2.3 shWTAP 质粒转染后肺腺癌 A549 细胞 WTAP 蛋白的表达水平下调

WB 检测结果(图 3)显示, shWTAP-1 组、shWTAP-2 组 A549 细胞 WTAP 蛋白表达水平明显低于空载体对照组($t=6.735, 7.301$, 均 $P<0.05$)。结果表明, shWTAP-1、shWTAP-2 质粒转染后肺腺癌 A549 细胞实现了 WTAP 蛋白水平的下调。

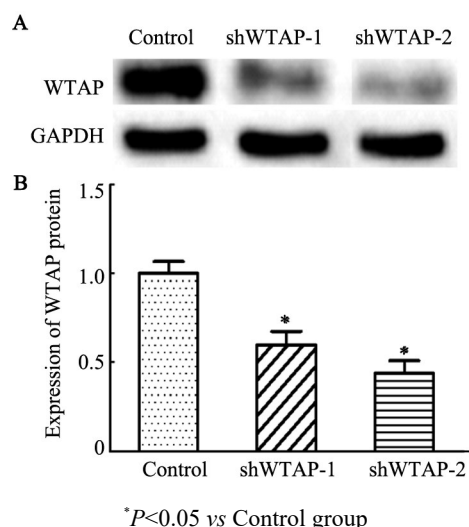
2.4 敲低 WTAP 后肺腺癌 A549 细胞的增殖能力降低

BrdU 实验结果(图 4)显示, 对照组细胞增殖倍数几乎不变, shWTAP-1 组与 shWTAP-2 组增殖倍数明显低于对照组($t=2.742, 3.39$, 均 $P<0.05$)。结果表明, 敲低 WTAP 基因后抑制肺腺癌 A549 细胞的增殖能力。

2.5 敲低 WTAP 后 A549 细胞的迁移能力降低

划痕愈合实验结果(图 5)显示, 72 h 时 shWTAP-

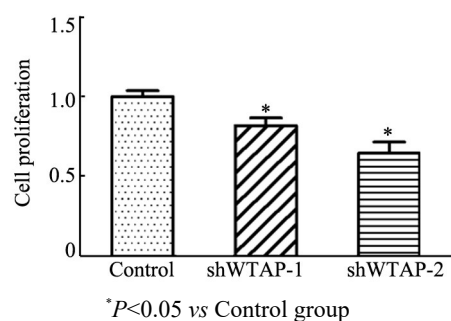
1 组与 shWTAP-2 组 A549 细胞划痕迁移率明显低于对照组($t=3.26, 3.739$, 均 $P<0.05$)。结果表明, 敲低 WTAP 基因后抑制肺腺癌 A549 细胞的迁移能力。



* $P<0.05$ vs Control group

图3 shWTAP 质粒转染后 A549 细胞 WTAP 蛋白的表达水平下调

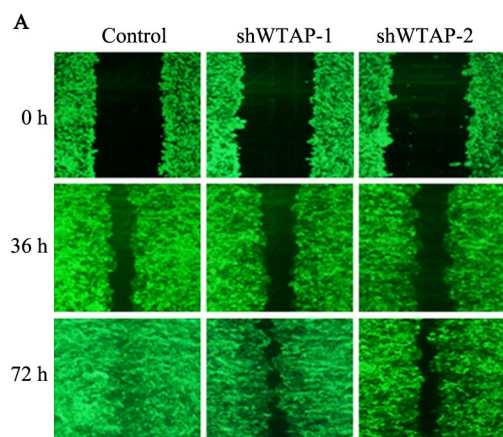
Fig.3 Down-regulation of WTAP protein expression in A549 cells transfected with shWTAP plasmids



* $P<0.05$ vs Control group

图4 敲低 WTAP 后 A549 细胞的增殖能力降低

Fig.4 Decreased proliferative capacity of A549 cells after knocking down WTAP



* $P<0.05$ vs Control group

图5 敲低 WTAP 后 A549 细胞的迁移能力降低

Fig.5 Decreased migration ability of A549 cells after knocking down WTAP

2.6 敲低WTAP后A549细胞的侵袭能力降低

Transwell实验结果(图6)显示,shWTAP-1组与shWTAP-2组侵袭细胞数明显少于对照组($t=8.165$ 、

8.24,均 $P<0.05$)。结果表明,敲低WTAP基因后抑制肺腺癌A549细胞的侵袭。

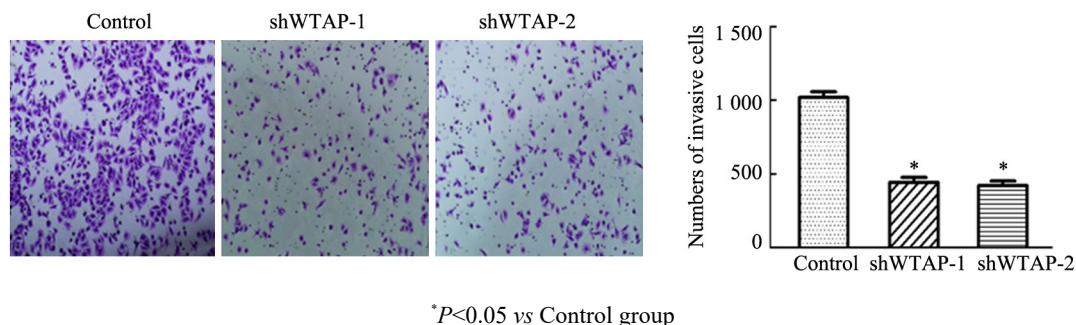


图6 敲低WTAP后A549细胞的侵袭能力降低(结晶紫染色, $\times 100$)

Fig.6 Decreased invasive ability of A549 cells after knocking down WTAP (Crystal violet staining, $\times 100$)

3 讨论

近年来的研究证明,WTAP是一种致癌基因。WTAP经酵母双杂交系统筛选鉴别,位于染色体6q25-27,类似于果蝇fl(2d)同系物,与剪接因子共定位于整个核质和核斑点,并且受放线菌素D的影响^[9]。WTAP在调控细胞增殖、迁移、侵袭等方面虽然具有细胞特异性,但对癌细胞发生发展的作用不容忽视^[10-11]。CHENG等^[12]研究发现,在肾细胞癌中WTAP过表达的细胞其增殖能力亦提高,并且高表达WTAP的患者总体生存率较低,表明WTAP通过物理结合细胞周期蛋白依赖性激酶2(cyclin dependent kinase 2, CDK2)转录物并增强其转录稳定性,从而在肾细胞癌中发挥致癌作用。CHEN等^[13]通过免疫组化实验发现,WTAP在膀胱癌组织中的表达水平显著增加,WTAP蛋白表达阴性的患者与阳性患者的术后复发风险存在明显差异($P<0.05$),推测WTAP在膀胱癌的发生发展中起重要作用。由此可见,WTAP基因在肿瘤组织中往往发挥着促癌作用,并且与肿瘤患者的预后、生存率密切相关。

有研究^[14]报道WTAP主要通过m6A修饰实现一定的生物学效应,m6A修饰是mRNA上最丰富的甲基化修饰,包括甲基化转移酶、去甲基化酶和甲基化识别蛋白等共同参与。其中,甲基化转移酶包括METTL3/14、KIAA1429和WTAP等,主要作用就是催化mRNA上腺苷酸发生m6A修饰,从而影响肿瘤的发生发展。为深入研究WTAP基因靶向治疗肺腺癌的潜在应用价值^[15],本研究利用shRNA技术构建了2种靶向敲低WTAP的重组质粒,对照选用277空载质粒,通过慢病毒转染法分别感染肺腺癌A549细胞,得到稳定感染的细胞株,分别作为shWTAP-1、

shWTAP-2和对照组。首先通过qPCR和Wb实验检测WTAP在mRNA和蛋白水平实现了一定的沉默效应,然后通过BrdU实验、划痕愈合实验、Transwell侵袭实验分别检测了细胞增殖、迁移、侵袭能力的变化,结果发现shWTAP两组细胞的增殖、迁移、侵袭能力明显低于对照组(均 $P<0.05$)。通过以上实验发现,敲低WTAP基因可以抑制肺腺癌A549细胞的恶性生物学行为,从而为WTAP的功能研究提供了新的实验数据^[16]。

综上,在人肺腺癌A549细胞中靶向敲低WTAP基因,细胞的增殖、迁移与侵袭能力均下降,WTAP在肺癌的发生发展过程中产生了一定的影响,但具体的影响机制还有待探索,这是本课题组以后要深入探究的部分,并将结合临床通过基因芯片技术等辅助证明WTAP基因很可能是肺癌治疗的一个新的靶标。

[参考文献]

- [1] LI B Q, HUANG S, SHAO Q Q, et al. WT1-associated protein is a novel prognostic factor in pancreatic ductal adenocarcinoma[J/OL]. *Oncol Lett*, 2017, 13(4): 2531-2538[2019-01-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5403317/>. DOI: 10.3892/ol.2017.5784.
- [2] XI Z, XUE Y X, ZHENG J, et al. WTAP expression predicts poor prognosis in malignant glioma patients[J]. *J Mol Neurosci*, 2016, 60(2): 131-136. DOI:10.1007/s12031-016-0788-6.
- [3] BANSAL H, YIHUA Q, IYER S P, et al. WTAP is a novel oncogenic protein in acute myeloid leukemia[J/OL]. *Leukemia*, 2014, 28(5): 1171-1174[2019-01-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4369791/>. DOI:10.1038/leu.2014.16.
- [4] CASALEGNO-GARDUÑO R, SCHMITT A, WANG X, et al. Wilms' tumor 1 as a novel target for immunotherapy of leukemia[J]. *Transplant Proc*, 2010, 42(8): 3309-3311. DOI:10.1016/j.transproceed.2010.07.034.

- [5] JO H J, SHIM H E, HAN M E, et al. WTAP regulates migration and invasion of cholangiocarcinoma cells[J]. *J Gastroenterol*, 2013, 48(11): 1271-1282. DOI:10.1007/s00535-013-0748-7.
- [6] PING X L, SUN B F, WANG L, et al. Mammalian WTAP is a regulatory subunit of the RNA N6-methyladenosine methyltransferase[J/OL]. *Cell Res*, 2014, 24(2): 177-189[2019-01-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3915904/>. DOI:10.1038/cr.2014.3.
- [7] HE L J, LI J F, WANG X, et al. The dual role of N6-methyladenosine modification of RNAs is involved in human cancers[J/OL]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(10): 4630-4639[2019-01-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6156243/>. DOI:10.1111/jcmm.13804.
- [8] TONG J Y, FLAVELL R A, LI H B. RNA m6A modification and its function in diseases[J]. *Front Med*, 2018, 12(4): 481-489. DOI: 10.1007/s11684-018-0654-8.
- [9] LITTLE N A, HASTIE N D, DAVIES R C. Identification of WTAP, a novel Wilms' tumour 1-associating protein[J]. *Hum Mol Genet*, 2000, 9(15):2231-2239. DOI:10.1093/oxfordjournals.hmg.a018914.
- [10] HORIUCHI K, KAWAMURA T, IWANARI H, et al. Identification of Wilms' tumor 1-associating protein complex and its role in alternative splicing and the cell cycle[J/OL]. *J Biol Chem*, 2013, 288(46): 33292-33302[2019-01-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3829175/>. DOI:10.1074/jbc.M113.500397.
- [11] SORCI M, IANNIELLO Z, CRUCIANI S, et al. METTL3 regulates WTAP protein homeostasis[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(8): 796 [2019-01-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6056540/>. DOI:10.1038/s41419-018-0843-z.
- [12] TANG J Y, WANG F, CHENG G, et al. Wilms' tumor 1-associating protein promotes renal cell carcinoma proliferation by regulating CDK2 mRNA stability[J/OL]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 40[2019-01-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5827993/>. DOI:10.1186/s13046-018-0706-6.
- [13] CHEN L Z, WANG X H. Relationship between the genetic expression of WTAP and bladder cancer and patient prognosis[J/OL]. *Oncol Lett*, 2018, 16(6): 6966-6970[2019-01-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6256415/>. DOI:10.3892/ol.2018.9554.
- [14] DENG X L, SU R, WENG H Y, et al. RNA N6-methyladenosine modification in cancers: current status and perspectives[J/OL]. *Cell Res*, 2018, 28(5): 507-517[2019-01-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5951805/>. DOI:10.1038/s41422-018-0034-6.
- [15] 姜战胜, 潘战宇, 任秀宝. 晚期非小细胞肺癌一线靶向治疗的研究进展[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2017, 24(10): 1129-1133. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2017.10.015.
- [16] LIN S, CHOE J, DU P, et al. The m6A methyltransferase METTL3 promotes translation in human cancer cells[J/OL]. *Mol Cell*, 2016, 62(3): 335-345[2019-01-23]. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.03.021>. DOI:10.1016/j.molcel.2016.03.021.

[收稿日期] 2019-01-25

[修回日期] 2019-03-20

[本文编辑] 党瑞山