

本文引文格式:喻大军,李靖,王彬彬,等.基于单细胞测序探索 *METTL1* 与胃癌恶性进展的关联性研究[J].右江民族医学院学报,2023,45(5):709-714.

【论著与临床报道】

## 基于单细胞测序探索 *METTL1* 与胃癌恶性进展的关联性研究

喻大军,李靖,王彬彬,李志祥,王凯,杨杰

(蚌埠医学院第一附属医院肿瘤外科,安徽 蚌埠 233004)

**摘要:**目的 利用单细胞测序分析胃癌免疫治疗关联性基因,并体外实验验证其与胃癌细胞恶性进展关联性。方法 使用单细胞测序和 GESA 寻找差异基因,通过相关预后基因构建随机森林模型,通过预测分析对该模型进行了验证, IHC 检测 *METTL1* 在胃癌患者中的表达,RT-PCR 检测沉默 *METTL1* 后的效率,CCK-8、细胞克隆和 EDU 实验检测沉默 *METTL1* 对胃癌细胞增殖效率的影响。**结果** TCGA 数据库和 IHC 结果均显示 *METTL1* 在胃癌组织中高表达。*METTL1* 高表达的患者比 *METTL1* 低表达的患者生存率更高( $P=0.042$ )。*METTL1* 及其相关预后基因构建的随机森林模型具有较好的预测价值( $AUC=0.863$ )。CCK-8、细胞克隆和 EDU 实验显示沉默 *METTL1* 抑制了胃癌细胞的增殖。**结论** 单细胞测序筛选的基因所构建的随机森林模型对预测胃癌患者的生存和免疫治疗敏感性具有较高的预测价值,且 *METTL1* 参与胃癌细胞恶性进展过程。

**关键词:** *METTL1*; 单细胞测序; 胃肿瘤; 增殖

中图分类号: R735.2

文献标识码: A

文章编号: 1001-5817(2023)05-0709-06

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2023.05.003

### Study on the association between *METTL1* and malignant progression of gastric carcinoma based on single-cell sequencing

Yu Dajun, Li Jing, Wang Binbin, Li Zhixiang, Wang Kai, Yang Jie

(Department of Surgical Oncology, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233000, Anhui, China)

**Abstract:** **Objective** To analyze the immunotherapy-associated genes of gastric carcinoma (GC) by single-cell sequencing, and to verify their correlation with malignant progression of GC cells in vitro. **Methods** Single-cell sequencing and GESA were used to explore the differential genes, random forest model was constructed by related prognostic genes, and then the model was validated by predictive analysis. The expression of *METTL1* was detected with IHC in patients with GC, the efficiency was detected with RT-PCR after silencing *METTL1*, and CCK-8, cell clone, and EDU experiments were used to detect the effect of silencing *METTL1* on the proliferation efficiency of GC cells. **Results** Both database and IHC results showed that *METTL1* was highly expressed in GC tissues. Patients with high *METTL1* expression had a higher survival rate than those with low *METTL1* expression ( $P=0.042$ ). The random forest model constructed by *METTL1* and its related prognostic genes had good predictive value ( $AUC=0.863$ ). CCK-8, cell clone, and EDU experiments showed that silencing *METTL1* inhibited the proliferation of GC cells. **Conclusion** The random forest model constructed by the genes screened with single-cell sequencing has high predictive value to predict the survival and immunotherapy sensitivity in patients with GC, and *METTL1* is involved in the malignant progression of GC cells.

**Key words:** *METTL1*; single-cell sequencing; gastric tumor; proliferation

基金项目:安徽省教育厅重点项目(KJ2021A0729)

第一作者简介:喻大军(1979-),男,硕士,主任医师,研究方向:消化道肿瘤基础与临床,E-mail:yudajun545876@126.com

胃癌是世界上第五常见的癌症,也是第三常见的癌症相关死亡原因<sup>[1]</sup>。而胃癌的发病率逐年增高,已经成了危害中国人民生命健康的威胁之一<sup>[2-3]</sup>。尽管系统治疗包括病理方法和分子靶向药物的生物标志物检测,但 5 年生存率仅为 31.5%<sup>[4]</sup>。因此,寻找一种生物标志物来提高临床疗效显得十分必要。单细胞 RNA 测序,也被称为 scRNA-seq,是一种将组织分解成单个细胞以区分肿瘤细胞和非癌细胞并分析表达模式以推断亚克隆的方法<sup>[5]</sup>。scRNA-seq 是一种有潜力用于研究转移性癌细胞的方法,从原始位置转移的癌细胞的整体水平表达模式会因其扩散到的局部组织而改变,而通过 scRNA-seq 探索癌症发病因素,已经成了研究热点<sup>[6-7]</sup>,甲基转移酶-1 蛋白(methyltransferase like-1 protein, METTL1)是一种甲基转移酶,可催化真核生物 mRNA 的 n7-甲基鸟苷(m7G)修饰<sup>[8]</sup>。越来越多的证据揭示了 METTL1 的致癌潜力<sup>[9]</sup>。然而 METTL1 在胃癌中的作用少见报道,因此结合单细胞测序结果并探索 METTL1 的功能显得十分关键。

## 1 材料和方法

1.1 scRNA-seq 数据采集及预处理 从 Gene Expression Omnibus (GEO, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)数据库中找到 GSE163558 数据集,收集 6 例胃癌患者 10 份样本共 42 968 个细胞的 scRNA-seq 数据,基于 Illumina NovaSeq 6000,读取深度为 10 倍基因组学。首先,从样本中去除不符合以下质量控制要求的低质量细胞:①排除在少于 3 个细

胞中发现的基因;②总检测基因少于 200 个的细胞被排除;③表达少于 10%的线粒体基因的细胞被排除在外。使用线性回归模型来标准化遗留细胞的基因表达水平,采用主成分分析法进行降维。然后,使用均匀流形逼近和投影(UMAP)方法对所有单元,进行聚类分类分析,并使用原始的 15 个 pc 对数据进行降维。在单细胞 RNA-seq 研究中,各组之间的差异表达基因(DEGs)是进行 GSEA 富集分析的基础。

1.2 METTL1 与随机森林模型构建 胃癌( $n = 433$ )的 Bulk RNA 测序(RNA-seq)从 GEO 数据库(GSE84437)中检索,通过 IPA 软件鉴定 METTL1 相关基因。采用了一种被称为随机森林(RF)方法的机器学习技术进行生存分析,以确定来自预后相关特征的哪些基因可能具有预后价值。RF 方法涉及开发大量的决策树或分类树,然后将其用于对某个输入数据向量进行分类的任务。射频技术采用从初始数据集派生的各种自举和随机分裂样本,以构建每个单独的决策树。为了从预后相关特征中确定哪些基因可能具有预后意义,使用 RF 方法进行了生存分析。

1.3 RT-PCR 实验 用 Trizol(上海碧云天生物技术有限公司)从细胞中分离总 RNA,并稀释到 DNase/RNase-free 水中。定量后,使用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 将总 RNA(每个样品 2  $\mu\text{g}$ )逆转录为 cDNA。最后使用 SYBRGreen PCR Master Mix 进行实时 PCR 检测目的基因的表达水平。以 GAPDH 作为对照。本研究引物序列购自生物工程(上海)股份有限公司,见表 1。

表 1 PCR 序列信息

基因	正向序列	反向序列
METTL1	5'-GGCAACGTGCTCACTCCAA-3'	5'-CACAGCCTATGTCTGCAAAC-3'
GAPDH	5'-CGGAGTCAACGGATTGGTTCGTAT-3'	5'-AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC-3'

1.4 细胞培养和转染 从武汉细胞库获得 GSE-1、AGS、MNK-45、HGC27 和 MGC-803 细胞系,所有细胞在 1640 培养液[abs9484,爱必信(上海)生物科技有限公司]中培养。构建沉默 METTL1 的小干扰 RNA 后,利用 Lipofectamine 3000[L3000008,赛默飞世尔科技有限公司]转染载体。载体序列如下:正义:5'-CACCGCGGTAGTAGCGCTTCTGGGG-3';反义:5'-AAACCCCAAGAGCGCTACTACCGC-3'。

1.5 CCK-8 实验 CCK-8 试剂检测细胞增殖活性;将细胞接种于 96 孔板,密度为 5 000 个细胞/孔。在 37  $^{\circ}\text{C}$  和 5% $\text{CO}_2$  的培养箱中培养。孵育 1 d、2 d、3 d 后,每孔加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 试剂。37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1~2 h 后,在酶标仪上读取 450 nm 处的吸光度。

1.6 EDU 实验 将各组处理后的细胞种植于 12 孔板中,随后按照 EDU 试剂盒(C0078S,上海碧云天生物技术有限公司)说明书,以 RPIM1640 培养基稀释成 2X EDU 工作液,37.5  $^{\circ}\text{C}$  孵育。接下来,细胞洗涤 3 次,用 4%多聚甲醛处理并固定,用通透液(P0095,上海碧云天生物技术有限公司)重新洗涤 3 次。根据说明配制反应溶液,然后加入细胞中。用 DAPI 染色液配置细胞,在荧光显微镜下拍摄图像。

1.7 免疫组化 收集蚌埠医学院第一附属医院病理确诊为胃癌患者的癌旁和癌组织样本,并在病理科制作成免疫组化蜡块,随后把组织切成样片,取出切片后,取抗原,加入 3%过氧化氢浸泡。在此切片上,快速加入免疫阻断溶液进行阻断,然后用一抗(14994-1-

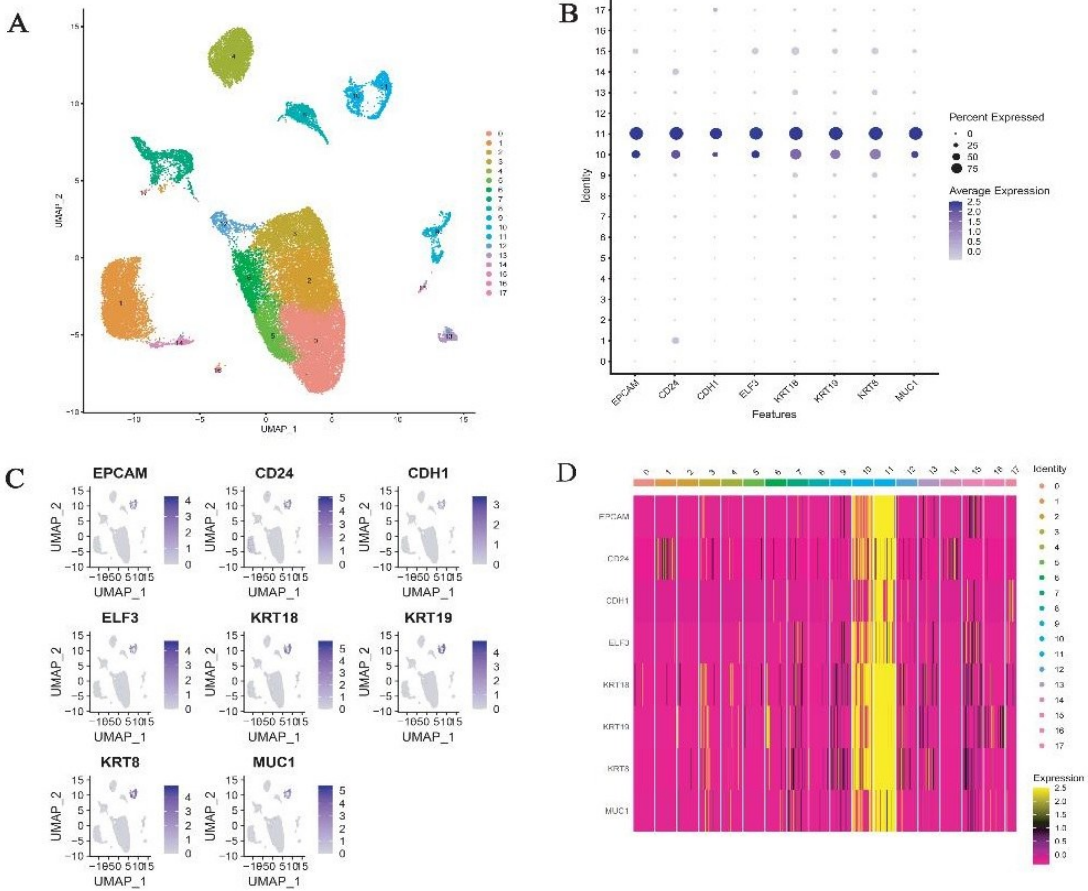
AP,武汉三鹰生物技术有限公司)进行处理。最后将盖片风干,在荧光显微镜下拍摄切片。

1.8 统计学方法 使用 R(4.1.1)编程语言进行统计研究。采用 Kaplan-Meier 法和 log-rank 检验对不同组的总生存率进行分析和比较。单因素 t 检验用于评估两组间的差异。多组间差异分析采用单因素方差分析(ANOVA)。P < 0.05 认为差异有统计学意义。

### 2 结果

2.1 单细胞测序寻找癌细胞分区趋势 为了确定数

据源的可靠性,首先分析了来自数据库(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi)的胃癌单细胞数据。结果发现胃癌(gastric cancer,GC)单细胞序列数据可分为 18 组(见图 1A)。10 组和 11 组的肿瘤相关基因(EPCAM、CD24、CDH1、ELF3、KRT18、KRT19、KRT8 和 MUC1)的高表达,表明 10 组和 11 组的肿瘤细胞差异较大(见图 1B)。分布图如图 1C 和热图如图 1D 所示。



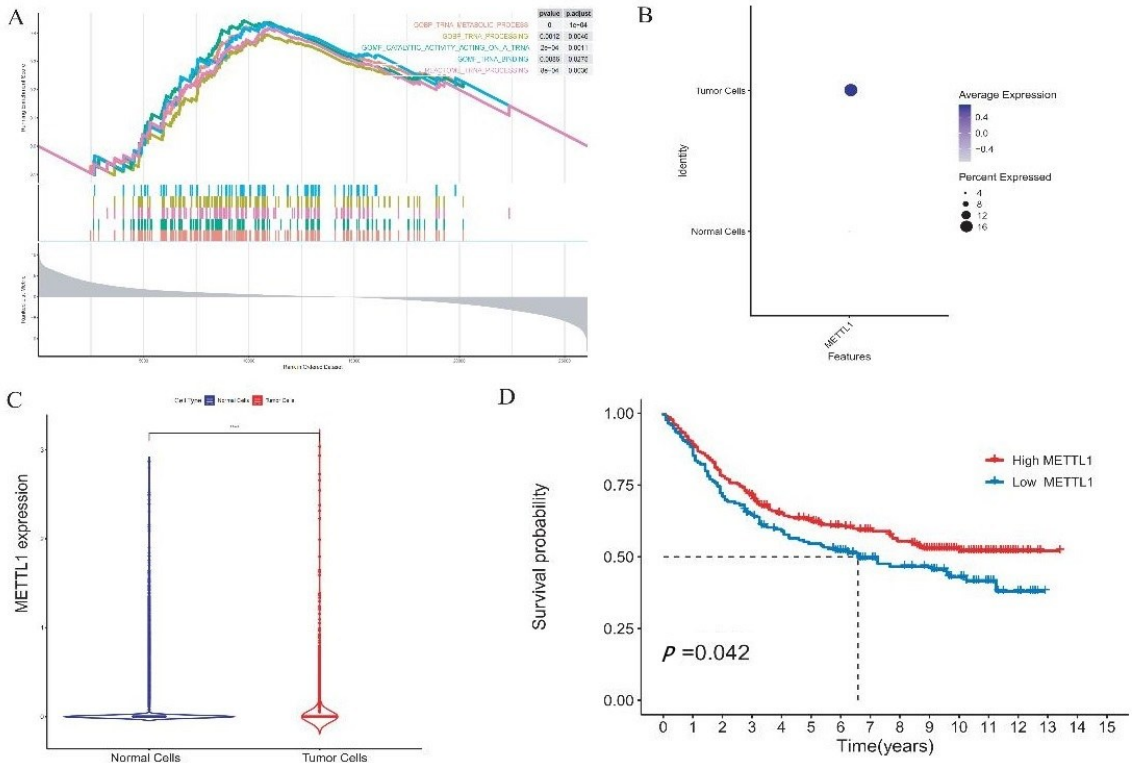
注:A.单细胞序列将胃癌组织划分为 18 个亚组;B.10/11 亚群中表达的不同基因; C.这些差异基因的位置;D.差异基因表达的热图。

图 1 单细胞序列

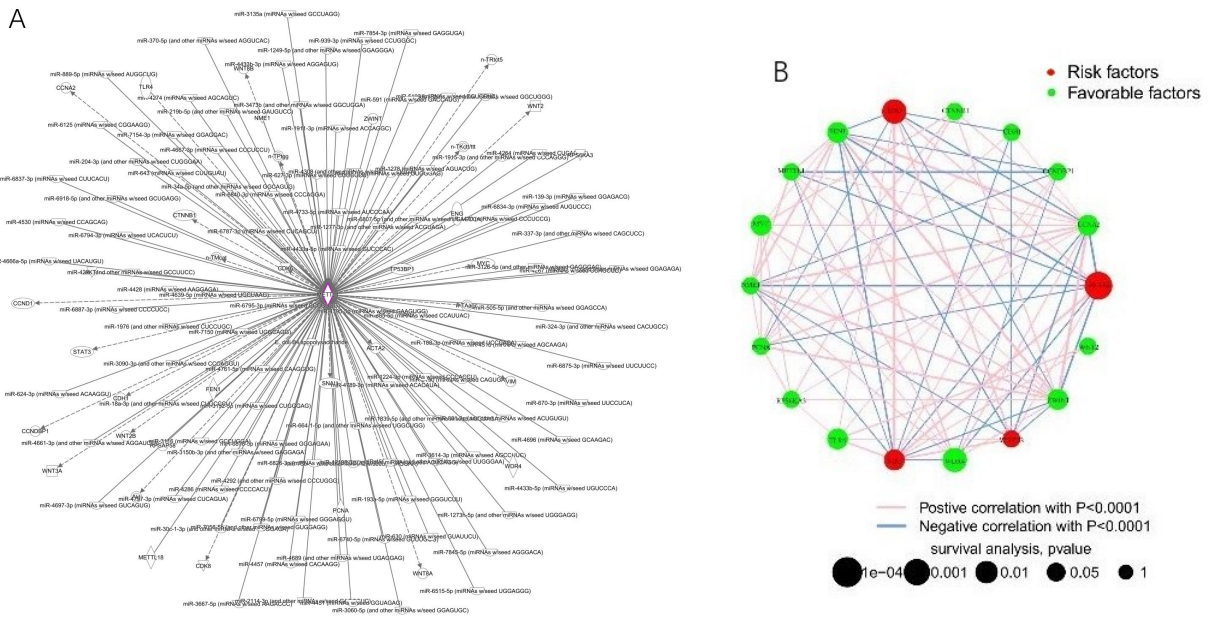
2.2 差异基因筛选 为了进一步确定肿瘤中异常表达的基因,本研究使用基因集富集分析(gene set enrichment analysis,GSEA)来比较肿瘤和正常组织之间的差异。研究结果发现,与正常组织相比,肿瘤组织中 tRNA 相关信号通路活跃(见图 2A)。同时,也从 GSE84437 的肿瘤组织中发现了 METTL1 基因过表达(见图 2B 和 2C)。生存分析显示,METTL1 高表达的患者比 METTL1 低表达的患者生存率更高(见图 2D)。

2.3 差异基因构建 RF 模型并检测效率 接下来,为

了进一步发现潜在的调控机制,本研究通过独创性途径分析(ingenuity pathway analysis,IPA)发现 METTL1 相关基因,挑选出预后基因并在网络图中呈现(见图 3A、图 3B)。为了更好地研究模型,根据训练组中最佳截断值将患者分为高危组和低危组(见图 4A)。同样的方法也适用于试验组(见图 4B)和所有数据集患者(见图 4C)。与死亡风险较低的患者相比,死亡风险较高的个体预后较差(见图 4D~图 4F)。在高风险患者和低风险患者之间发现的预后相关基因的表达变化以热图的形式呈现(见图 4G~图 4I)。



注:A. 基因集富集分析显示 tRNA 相关通路存在差异表达;B. *METTL1* 在 GC 细胞中的表达较高; C. *METTL1* 在肿瘤细胞和正常细胞间的表达情况;D. *METTL1* 在不同表达水平下的生存曲线。  
图 2 *METTL1* 的表达



注:A. *METTL1* 及其相关基因的网络;B. 相关预后基因网络。

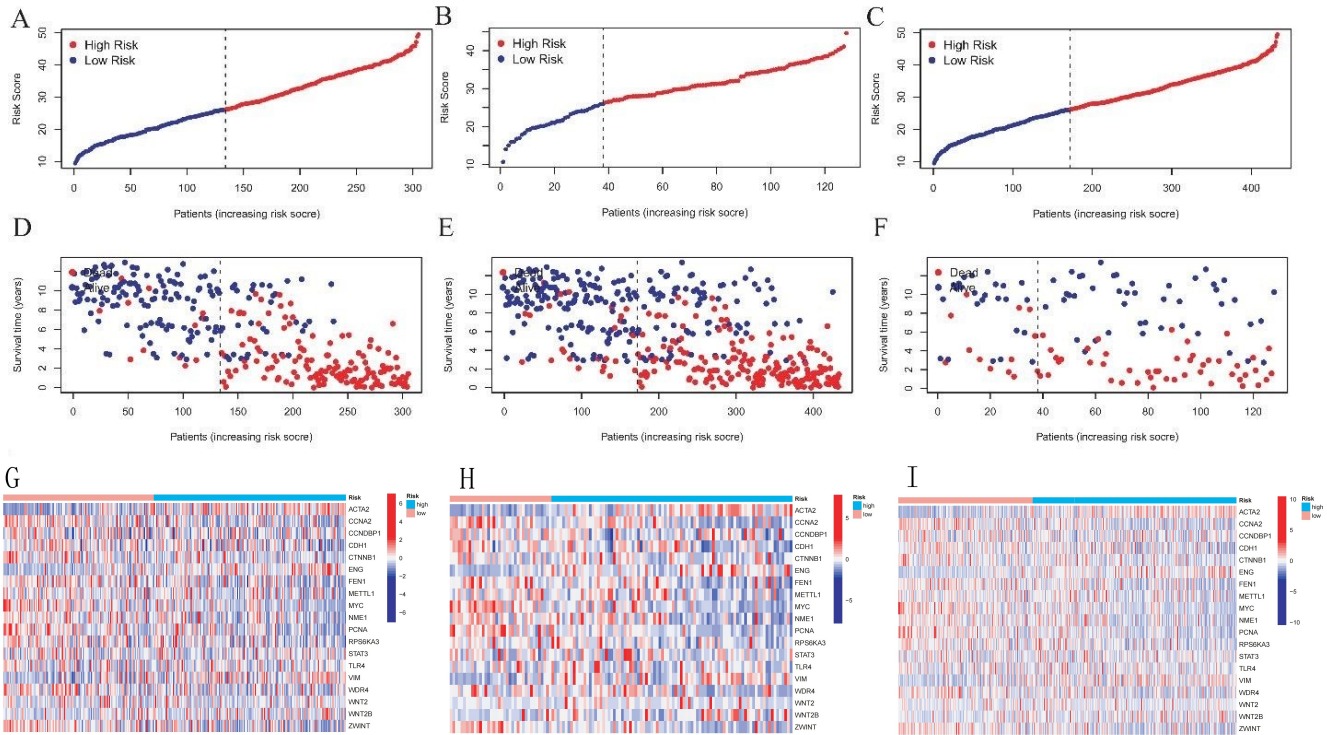
图 3 相关基因与随机森林模型

2.4 沉默 *METTL1* 抑制了胃癌细胞增殖 免疫组化(immunohistochemistry, IHC)结果显示, *METTL1* 在胃癌组织中表达升高(见图 5A)。RT-PCR 检测显示 *METTL1* 在 AGS 中表达最高(见图 5B), 随后 PCR 检测沉默载体构建效率(见图 5C)。随后 CCK-8、克隆实验和 EDU 实验结果显示, 相较于 NC 组, si-*METTL1* 组的增殖效率降低, 且差异具有统计学意义( $P$

$<0.05$ ), 见图 5D~图 5F。

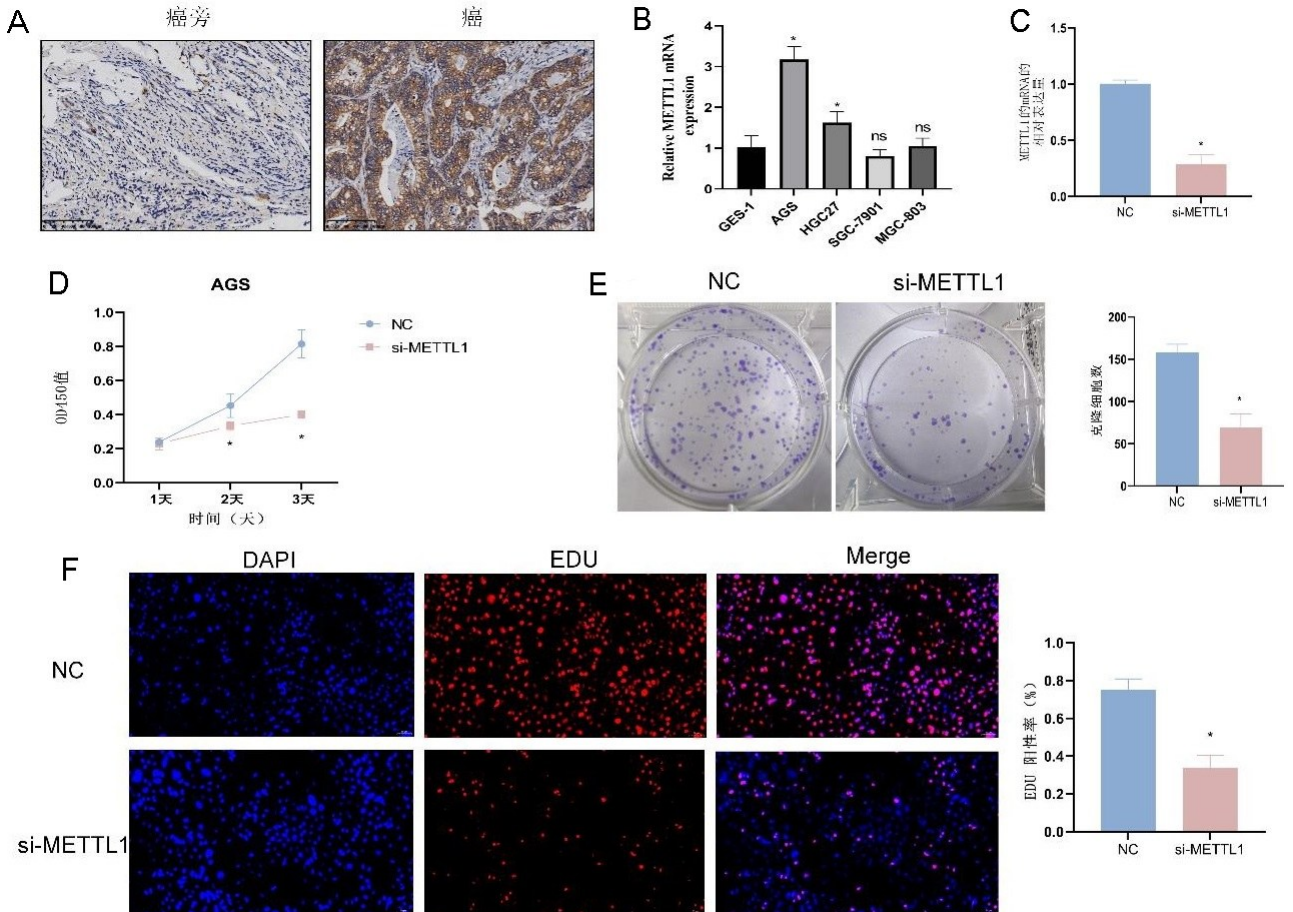
### 3 讨论

研究表明, 癌症的异质性是癌症诊断和治疗的重要问题<sup>[10]</sup>, scRNA-seq 领域的最新发展使得检测源自原代组织的异常细胞间相互作用、化疗耐药性和免疫抑制微环境成为可能, 这些都是癌症研究的重要方面。原发性乳腺癌细胞从肿瘤细胞和免疫细胞中分离出



注: A. 训练组、B. 试验组和 C 全患者的风险评分分布及中位数; D. 训练组、E. 试验组和 F 全患者的 OS 状态、OS 和风险评分分布; G. 训练组、H. 试验组和 I 全组患者高危、低危预后基因热图。

图 4 不同亚组的不同风险评分的分数分析



注: A. 免疫组化检测 *METTL1* 在胃癌患者癌与癌旁组织的表达; B. RT-PCR 检测 *METTL1* 在胃癌细胞系中的表达; C. RT-PCR 检测沉默 *METTL1* 载体的构建效率; D~F. CCK-8、细胞克隆和 EDU 实验检测 NC 组和 si-*METTL1* 组中 AGS 细胞的增殖情况。\*  $P < 0.05$ 。

图 5 沉默 *METTL1* 抑制了 AGS 细胞的增殖

来,并对实验结果进行比较,并构建有效的预后模型<sup>[11]</sup>。研究人员发现原发性胶质母细胞瘤存在较大的特异的异质性分化,表明存在不同的调控信号和治疗方案的可能<sup>[12]</sup>。KIM B S 等<sup>[13]</sup>收集的 scRNA-seq 数据将肿瘤内 SNV KRASG12D 与肺腺癌细胞的表达异质性联系起来,这就能够在抗癌治疗反应的背景下解释亚群。就肿瘤内部的癌细胞而言,聚类分析结果显示了大量的 GC 异质性。

在这项研究中使用单细胞测序来筛选 GC 患者的差异表达基因。同时,基于 *METTL1* 相关预后基因构建随机森林预后模型,并通过随机森林模型预测预后基因与肿瘤预后关系,作为构建预后风险评估模型的基础。在训练集和测试集进一步验证了该模型,发现在预测患者具有较好的风险评分,从而证实了该模型良好的预测能力。*METTL1* 可作为预测肿瘤预后反应的一种新的生物标志物。

*METTL1* 是一种 tRNA 和 miRNA 修饰酶,在哺乳动物细胞中催化 tRNA 和 miRNA 的 n7-甲基鸟苷 (m7G) 修饰<sup>[14-15]</sup>。近年来,有多项研究阐明了 *METTL1* 在人类恶性肿瘤中的作用。既往研究表明,*METTL1* 在肝癌、结直肠癌、肺癌等人类恶性肿瘤中发挥着重要的生物学功能,例如 *METTL1* 在肝细胞癌中显示出致癌活性,而在结直肠癌中,它作为肿瘤抑制因子。此外,*METTL1* 的过表达也通过调节 miR-149-3p/S100A4/p53 轴增加结直肠癌细胞对顺铂的化疗敏感性<sup>[16-18]</sup>。这些结果表明<sup>[19]</sup>,维持高水平的功能性 tRNA 可能对 *METTL1* 在癌细胞中的作用至关重要。本研究中发现 *METTL1* 在胃癌 AGS 和 HGC27 细胞中高表达,且抑制 *METTL1* 后抑制了胃癌细胞增殖过程。既往研究表明<sup>[19]</sup>,通过全基因组 CRISPR-Cas9 筛选,*METTL1* 在胃癌中也有显著表达,具有成为治疗该疾病的治疗靶点的潜力。因此,*METTL1* 作为一种新的标志物,在预测 GC 患者预后情况有重要价值,但具体的作用机制有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2019[J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(1): 7-34.
- [2] 曹毛毛,李贺,孙殿钦,等. 2000—2019 年中国胃癌流行病学趋势分析[J]. 中华消化外科杂志, 2021, 20(1): 102-109.
- [3] 赵鹤,魏晓敏,尹素凤. 1988—2017 年中国居民胃癌死亡趋势分析[J]. 实用预防医学, 2020, 27(12): 1468-1471.
- [4] HOSODA K, KATADA C, ISHIDO K, et al. Neoadjuvant chemotherapy plus surgery for high-risk advanced gastric cancer: long-term results of KDOG1001 trial[J]. Langenbecks Arch Surg, 2020, 405(6): 777-785.
- [5] MÜLLER S, DIAZ A. Single-cell mRNA sequencing in cancer research: integrating the genomic fingerprint[J]. Front Genet, 2017, 8: 73.
- [6] SATHE A, GRIMES S M, LAU B T, et al. Single-cell ge-

omic characterization reveals the cellular reprogramming of the gastric tumor microenvironment[J]. Clin Cancer Res, 2020, 26(11): 2640-2653.

- [7] JANG B S, HAN W, KIM I A. Tumor mutation burden, immune checkpoint crosstalk and radiosensitivity in single-cell RNA sequencing data of breast cancer[J]. Radiother Oncol, 2020, 142: 202-209.
- [8] ZENG X Z, LIAO G R, LI S M, et al. Eliminating *METTL1*-mediated accumulation of PMN-MDSCs prevents hepatocellular carcinoma recurrence after radiofrequency ablation[J]. Hepatology, 2023, 77(4): 1122-1138.
- [9] CHENG W L, GAO A L, LIN H, et al. Novel roles of *METTL1*/*WDR4* in tumor via m7G methylation[J]. Mol Ther Oncolytics, 2022, 26: 27-34.
- [10] GUO X Y, ZHANG Y Y, ZHENG L T, et al. Global characterization of T cells in non-small-cell lung cancer by single-cell sequencing[J]. Nat Med, 2018, 24(7): 978-985.
- [11] AZIZI E, CARR A J, PLITAS G, et al. Single-cell map of diverse immune phenotypes in the breast tumor microenvironment[J]. Cell, 2018, 174(5): 1293-1308. e36.
- [12] PATEL A P, TIROSH I, TROMBETTA J J, et al. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma[J]. Science, 2014, 344(6190): 1396-1401.
- [13] KIM B S, CLINTON J, WANG Q, et al. Targeting ST2 expressing activated regulatory T cells in Kras-mutant lung cancer[J]. Oncoimmunology, 2020, 9(1): 1682380.
- [14] LI X Y, WANG S L, CHEN D H, et al. Construction and validation of a m7G-related gene-based prognostic model for gastric cancer[J]. Front Oncol, 2022, 12: 861412.
- [15] MA X, QIU S P, TANG X, et al. TSPAN31 regulates the proliferation, migration, and apoptosis of gastric cancer cells through the *METTL1*/*CCT2* pathway[J]. Transl Oncol, 2022, 20: 101423.
- [16] TIAN Q H, ZHANG M F, ZENG J S, et al. *METTL1* overexpression is correlated with poor prognosis and promotes hepatocellular carcinoma via *PTEN*[J]. J Mol Med (Berl), 2019, 97(11): 1535-1545.
- [17] LIU Y, ZHANG Y S, CHI Q, et al. Retraction notice to "Methyltransferase-like 1 (*METTL1*) served as a tumor suppressor in colon cancer by activating 7-methylguanosine (m7G) regulated let-7e miRNA/HMGA2 axis" [Life Sci. 249 (2020) 117480][J]. Life Sci, 2022, 306: 120765.
- [18] WANG C, WANG W, HAN X D, et al. Methyltransferase-like 1 regulates lung adenocarcinoma A549 cell proliferation and autophagy via the *AKT*/*mTORC1* signaling pathway[J]. Oncol Lett, 2021, 21(4): 330.
- [19] ZENG Z, ZHANG X, JIANG C Q, et al. Identifying novel therapeutic targets in gastric cancer using genome-wide CRISPR-Cas9 screening[J]. Oncogene, 2022, 41(14): 2069-2078.

收稿日期: 2023-07-03; 修回日期: 2023-07-31