

引用:纪宏秀,刘正鑫,玄红专,等. 蜂胶乙醇提取物对结肠癌 HCT116 细胞 m6A 甲基化的影响[J]. 聊城大学学报(自然科学版),2025,38(6):988-996.

Citation:JI Hongxiu, LIU Zhengxin, XUAN Hongzhuan, WANG Meng. Effect of ethanol extract of propolis on m6A methylation in colon cancer HCT116 cells[J]. Journal of Liaocheng University (Natural Science Edition), 2025,38(6):988-996.

文章编号 1672-6634(2025)06-0988-09

DOI 10.19728/j.issn1672-6634.2025010013

蜂胶乙醇提取物对结肠癌 HCT116 细胞 m6A 甲基化的影响

纪宏秀,刘正鑫,玄红专,王猛

(聊城大学 农业与生物学院,山东 聊城 252059)

摘要 为探究中国蜂胶乙醇提取物(EECP)通过 N6-甲基腺嘌呤(m6A)修饰水平对结肠癌细胞(HCT116)的增殖抑制影响及其作用机制,研究通过不同浓度 EECP(25、50、100 $\mu\text{g/mL}$)处理 HCT116 细胞,利用 CCK-8 法检测细胞增殖活性,斑点杂交实验检测细胞总 RNA 的 m6A 修饰水平,实时荧光定量 PCR(reverse transcription real-time quantitative PCR,RT-qPCR)和 Western blot 分别检测甲基转移酶样 3(Methyltransferase-like 3,METTL3)、甲基转移酶样 14(Methyltransferase-like 14,METTL14)、Wilms 肿瘤 1 关联蛋白(Wilms Tumor 1-Associating Protein,WTAP)和脂肪量和肥胖相关蛋白(Fat Mass and Obesity-associated Protein,FTO)的 mRNA 和蛋白表达水平。结果表明,随着 EECP 处理浓度的升高,HCT116 细胞中总 RNA m6A 修饰水平明显降低($p < 0.05$),FTO、WTAP 和 METTL3 表达水平降低,而 METTL14 的表达水平增加,差异有统计学意义($p < 0.05$)。综上所述,EECP 可引起 HCT116 细胞中 m6A 及相关酶水平表达改变,提示 EECP 可能通过调控 m6A 甲基化发挥抗结肠癌作用。

关键词 结肠癌;蜂胶;m6A;HCT116

中图分类号 R285

文献标志码 A

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



Effect of ethanol extract of propolis on m6A methylation in colon cancer HCT116 cells

JI Hongxiu, LIU Zhengxin, XUAN Hongzhuan, WANG Meng

(College of Agriculture and Biology, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China)

Abstract This study investigates the inhibitory effects and underlying mechanisms of ethanol extract of Chinese propolis (EECP) on the proliferation of human colorectal cancer cells (HCT116) through modulation of N6-methyladenosine (m6A) RNA methylation. HCT116 cells were treated with varying concentrations of EECP (25, 50, and 100 $\mu\text{g/mL}$). Cell proliferation was assessed using the CCK-8 assay, while the global m6A modification levels of total RNA were measured by dot blot analysis. The mRNA and protein expression levels of Methyltransferase-like 3 (METTL3), Methyltransferase-like 14 (METTL14), Wilms Tumour 1-Associating Protein (WTAP) and Fat Mass and Obesity-associated Protein (FTO) were evaluated.

收稿日期:2025-01-16

基金项目:国家自然科学基金项目(31700471,82002961);山东省现代农业产业技术体系项目(SDAIT-24-05)资助

通信作者:王猛,男,汉族,博士,副教授,研究方向:蜂产品的研究与开发,E-mail:mengw1986@yeah.net.

ted using real-time quantitative PCR (RT-qPCR) and Western blot, respectively. The results demonstrated that increasing concentrations of EECF significantly reduced the total RNA m6A levels in HCT116 cells ($p < 0.05$). Additionally, EECF treatment led to decreased expression levels of FTO, WTAP and METTL3, while METTL14 expression was significantly upregulated ($p < 0.05$). In conclusion, EECF induces alterations in m6A methylation and related enzyme expression in HCT116 cells, suggesting that EECF may exert anti-colorectal cancer effects by regulating m6A methylation.

Keywords colon cancer; propolis; m6A; HCT116

0 引言

结肠癌(colorectal cancer, CRC)是全球范围内最常见的恶性肿瘤之一,其发病率和死亡率均居高不下。据 2020 年 GLOBOCAN 数据显示,亚洲的结肠癌发病率排名第三,在所有癌症发病率中约占 10.2%,而结肠癌在全球癌症死亡率中占比约为 9.5%,是全球第二大致死癌症^[1]。尽管新型化疗药物奥沙利铂以及靶向药物及免疫治疗正不断被临床广泛应用,患者的生存期得到了显著改善,但晚期结肠癌患者愈后仍不理想等。因此,临床上寻找安全有效用于改进结肠癌治疗的药物至关重要,在这其中,蜂胶作为传统的一味中药而逐渐受到研究者的青睐。蜂胶是西方蜜蜂采集植物树脂及芽孢并混入其上颚腺、蜡腺分泌物加工而成的具有芳香气味的胶黏性物质。作为一种天然活性物质,研究发现其具有广泛的生物学活性,如抗肿瘤、抗氧化、抑菌、抗炎、降血糖、免疫调节等^[2],尤其是抗肿瘤方面逐渐成为近年来国内外研究的重点和热点之一。例如,有研究指出杨树蜂胶提取物对人急性髓系白血病细胞系 HL60、人单核细胞白血病 THP-1、人骨肉瘤 MG63 等具有明显的细胞毒性和抗癌活性^[3];山东蜂胶的乙醇提取物通过调控上皮间质转化抑制胰腺癌 Panc-1 细胞迁移,使其在 G2/M 期阻滞^[4]。

RNA m6A 是在甲基转移酶的催化下, RNA 的腺苷 6 位的 N 原子上插入一个甲基基团的化学修饰现象。近年来发现, RNA m6A 作为真核细胞 RNA 上一种普遍的表观遗传修饰,其参与了 RNA 剪接、转运以及稳定性调控,因而在干细胞分化、癌症发生以及胚胎发育等多种生命过程中发挥重要调控作用^[5]。现有报道已知该过程受到甲基转移酶(如 METTL3/14、WTAP)、去甲基化酶(如 FTO、ALKBH5)和 m6A 阅读蛋白(如 YTHDF1 等)的共同调控。甲基转移酶催化 mRNA 中的腺苷酸发生 m6A 修饰,去甲基化酶则负责去除已发生的 m6A 修饰,阅读蛋白则识别这些修饰,进而调控 RNA 降解、miRNA 加工等下游过程^[6]。

近年来的研究表明,在不同类型的癌症发展过程中, m6A 可能发挥促进或抑制的不同作用。例如,在急性骨髓性白血病中, METTL3 和 METTL14 可促进 MYC 等基因翻译, FTO 则通过下调 m6A 水平调控靶基因 mRNA 合成,影响细胞分化^[7];在胶质瘤中, METTL3 的作用存在争议,与不同细胞系的基因异质性有关^[8];在胃癌中, METTL3 通过增加 HDGF mRNA 稳定性促进血管生成和糖酵解,而 ALKBH5 则通过降低 lncRNA NEAT1 的甲基化促进侵袭和转移。 METTL3 作为 m6A 的“writer”,在结直肠癌中以 m6A-IGF2BP2/3 依赖性方式发挥功能性癌基因的作用^[9];而 METTL14 则被证明是一种肿瘤抑制因子,通过不同的分子机制减少结直肠癌的增殖和肿瘤转移。此外, YTHDF1 等“reader”蛋白在结肠癌中的表达也与肿瘤细胞的增殖、转移及对化疗药物的耐药性密切相关^[10],但目前尚未有研究探讨蜂胶是否通过调节 m6A 修饰发挥抗癌作用。

本研究旨在以结肠癌细胞系 HCT116 为模型,通过不同浓度的蜂胶乙醇提取物(EECF)处理,分析蜂胶对 HCT116 细胞增殖、凋亡及调控 m6A 修饰方面的影响,揭示 EECF 抑制结肠癌细胞增殖的分子机制,为进一步结肠癌辅助治疗或开发新的靶向药物提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

中国杨属型蜂胶采集自河南省南阳市;人结肠癌细胞(HCT116)由济宁医学院精准医学研究院李艳平博士慷慨赠予;DMEM 培养基来源于美国 Hyclone 公司;胎牛血清(FBS)购于浙江天杭生物科技股份有限公司

公司;青链霉素混合液、胰蛋白酶从北京索莱宝科技有限公司获得;CCK-8 细胞增殖检测试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(P0010)、一抗 m6A(AF7407,1 : 1 000)购自上海碧云天生物技术有限公司;Hoechst33258 购于美国 Sigma 公司;Trizol 购于翌圣生物科技股份有限公司;PerfectStart[®] Uni RT&-qPCR Kit 和 TransStart[®] Top Green qPCR SuperMix 试剂盒购于北京全式金生物技术股份有限公司;引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成;一抗 Bcl-2(A19693,1 : 1 000)、Bax(A11931,1 : 1 000)、METTL3(A19079,1 : 1 000)、METTL14(A8530,1 : 1 000)、FTO(A20992,1 : 1 000)、WTAP(A14695,1 : 1 000)、 β -actin(AC004,1 : 5 000)以及二抗 HRP Goat Anti-Rabbit IgG(AS014,1 : 5 000)、HRP Goat Anti-Mouse IgG(AS003,1 : 5 000)均购于武汉爱博泰克生物科技有限公司。

1.2 蜂胶乙醇提取物的制备

对采集的粗蜂胶进行拣选和筛分,去除杂质并破碎至直径小于 1 cm。将粗蜂胶与 95%乙醇(v/v)按 1 : 4 的重量比混合,超声处理 30 min。随后,2 次真空浓缩并冷却,得到固体蜂胶乙醇提取物。最后,利用大孔树脂柱进行纯化,使用 95%乙醇(v/v)洗脱,收集纯化液,得到高纯度的蜂胶提取物。

1.3 细胞培养

HCT116 细胞在含有 10%胎牛血清和 1%青霉素-链霉素的 DMEM 培养基中培养。培养条件为 37 ℃、5% CO₂,细胞置于恒温细胞培养箱内进行培养。

1.4 细胞活力测定

取对数生长期的 HCT116 细胞以每孔 5×10^3 个的密度铺板于 96 孔板中。待细胞生长至 80%汇合时,加入不同浓度的 EECp(0、25、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)分别处理 12、24、36 h。随后,每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,孵育 1 h,测定 450 nm 波长下的 OD 值。

1.5 细胞划痕实验

取对数生长期的 HCT116 细胞以每孔 5×10^5 个的密度均匀铺板于 6 孔板中,在细胞生长到约 80%后,使用无菌移液管尖端进行划痕,PBS 缓冲液洗涤两次后,加入不同浓度的 EECp(0、25、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)分别处理 24、36 h。随后,在倒置显微镜(Olympus IX73,日本)下观察,随机选取视野拍照并使用 Image J 软件进行处理和分析。

1.6 Hoechst 染色

取对数生长期的 HCT116 细胞以每孔 5×10^5 个的密度均匀铺板于 6 孔板中,待细胞生长至 80%汇合时,加入不同浓度的 EECp(0、25、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)处理 36 h。PBS 缓冲液洗涤两次后,每孔加入 500 μL Hoechst 染色液,孵育 30 min,随后弃染色液,在倒置荧光显微镜进行观察,随机选取视野拍照并使用 Image J 软件进行处理和分析。

1.7 RNA 提取及 RT-qPCR

使用 Trizol 提取细胞中的总 RNA,并通过 NanoDrop One 分光光度计(赛默飞世尔科技公司,美国)检测 RNA 浓度及纯度。cDNA 的合成采用 PerfectStart[®] Uni RT&-qPCR 试剂盒完成,随后使用 TransStart[®] Top Green qPCR SuperMix 试剂盒在 CFX96 实时定量 PCR 系统(BIO-RAD)上进行 qPCR 扩增。使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法, β -actin 作为内参基因进行目的基因相对水平的计算,引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences

基因 Gene	上游引物 Forward (5'-3')	下游引物 Reverse (5'-3')
METTL3	ATACTACAACAGCCAAGGAACAATC	AAGGAAAGAGCAGTCACCTAAAG
METTL14	CAAAGGAACTGTGAAGCGTAG	TCCAAATAGATGAAGGCGTC
FTO	GCTTGAAGACACTTGGCTCC	CCTCAGATACACTGCTGGCTT
WTAP	ACAATGGTAGACCCAGCGA	CGTAAACTTCCAGGCACTCAG
β -actin	ATCTGGCACCACCTTCTAC	AGCACAGCCTGGATAGCAA

1.8 斑点印迹(Dot blot)

取总 RNA 700 ng,在 95 °C 金属浴中变性 3 min 后,点样于聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上。随后将 PVDF 膜置于 37 °C 中静置 30 min。用封闭液封闭 1 h 后,加入一抗稀释液,4 °C 孵育过夜。TBST 缓冲液洗涤 3 次后,加入二抗稀释液,室温孵育 1 h,再次用 TBST 缓冲液洗涤三次后,使用 ECL 底物孵育并用化学发光成像仪显影,Image J 软件处理并分析结果。

1.9 细胞总蛋白提取及蛋白免疫印迹(Western blot)

使用预冷的 PBS 缓冲液清洗细胞 3 次,加入适量 RIPA 裂解液,在冰上裂解 30 min,离心后收集上清液,根据说明书,使用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。加入 5×SDS 上样缓冲液,100 °C 金属浴加热裂解 10 min。取样进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),随后将蛋白转移至 PVDF 膜上,封闭液封闭 1 h 后,加入一抗稀释液,4 °C 孵育过夜。TBST 缓冲液洗涤 3 次后,加入二抗稀释液,室温孵育 1 h,再次用 TBST 洗涤三次后,使用 ECL 底物孵育并用化学发光成像仪显影,Image J 软件处理并分析结果。

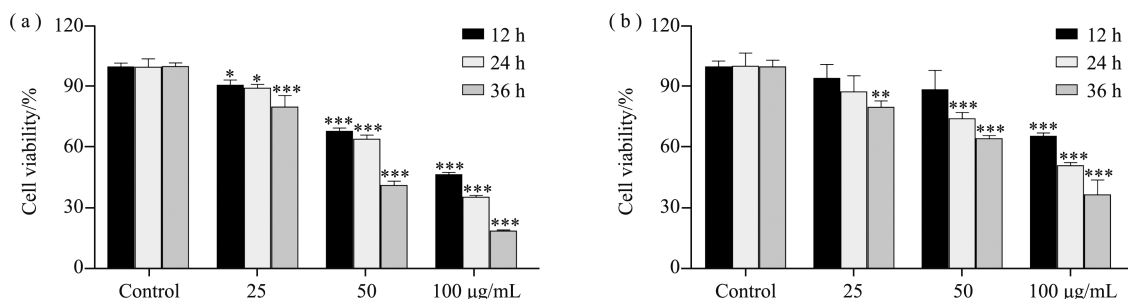
1.10 统计分析

采用 GraphPad Prism 8 软件进行数据分析,实验数据以平均值±标准误(SEM)表示,所有实验数据至少进行三次生物学重复。显著性差异通过 *t* 检验或单因素方差分析(ANOVA)确定, $p < 0.05$ 视为有统计学意义。

2 结果

2.1 EECF 对结肠癌细胞活性的检测

为探究 EECF 对结肠癌细胞存活率的影响,本研究采用 CCK-8 试剂盒检测了 EECF 对 HCT116 和 LOVO 细胞系的抑制作用。实验结果显示,EECF 对两种结肠癌细胞的增殖抑制均呈现显著的时间和剂量依赖性。如图 1(a)所示,在 HCT116 细胞中,低浓度 EECF(25 µg/mL)处理 12 h 即可显著抑制细胞活性,24 和 36 h 后细胞存活率分别降低 10%和 20%。中浓度 EECF(50 µg/mL)处理 12、24 和 36 h 后,细胞存活率分别下降 32%、36%和 59%。高浓度 EECF(100 µg/mL)的抑制作用更为显著,相同时间点处理后细胞存活率分别降低 53%、64%和 81%。如图 1(b)所示,EECF 对 LOVO 细胞也表现出抑制趋势。低浓度 EECF(25 µg/mL)处理 36 h 后显著抑制细胞活性。中浓度 EECF(50 µg/mL)处理 24 h 和 36 h 后,细胞存活率分别降低 21%和 30%。高浓度 EECF(100 µg/mL)处理 12、24 和 36 h 后,细胞存活率分别下降 34%、48%和 60%。上述结果表明,EECF 对 HCT116 和 LOVO 细胞均具有显著的增殖抑制作用,且其抑制效果随作用时间延长和浓度增加而增强。除此之外,我们实验室前期的研究基础已经对蜂胶在多个肿瘤类型中的抗癌效果进行了深入研究。例如,蜂胶对肝癌细胞系 HepG2^[11]、乳腺癌细胞系 MCF-7 和 MDA-MB-231^[12]的抑制作用得到了显著验证。这些研究结果表明,EECF 不仅能够有效抑制这些不同类型癌细胞的生长,还可能通过不同的分子机制发挥抗肿瘤作用。因此,EECF 的多靶点抗癌效果为其作为潜在的抗肿瘤



注: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 。(a) EECF 对 HCT116 细胞细胞活力的影响;(b) EECF 对 LOVO 细胞活力的影响。

图 1 EECF 对结肠癌细胞 HCT116、LOVO 存活率的影响

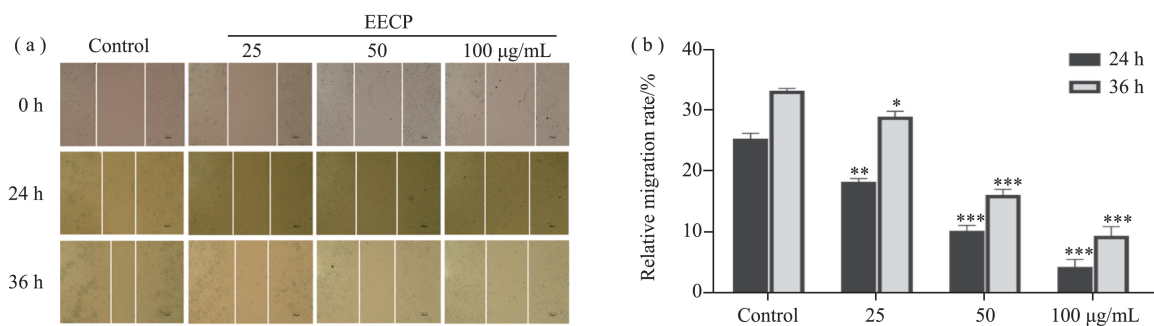
Fig. 1 Effect of EECF on the survival of colon cancer cells HCT116, LOVO

瘤候选物提供了有力的实验依据,并进一步支持其在不同癌症治疗中的应用前景。

基于以上结果,本研究选择 25、50、100 $\mu\text{g/mL}$ 三个浓度,以及 24 h 的处理条件作为后续实验条件。鉴于 HCT116 细胞对 EECp 的敏感性更高,后续实验将以其作为结肠癌研究的代表性细胞模型。

2.2 EECp 对 HCT116 细胞迁移的影响

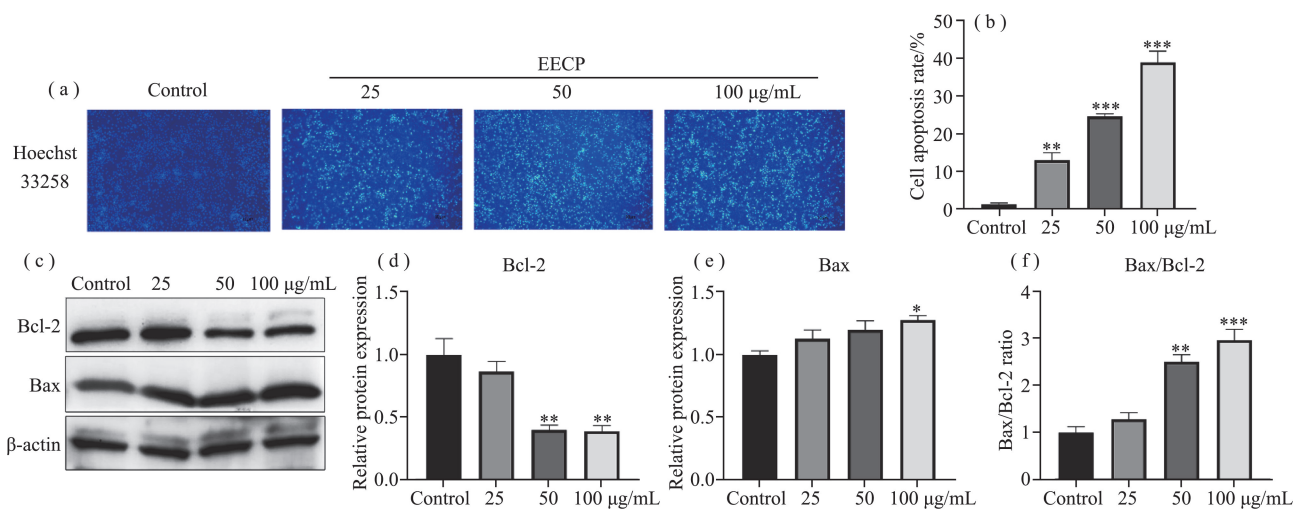
癌细胞迁移是癌症扩散和转移的关键过程。为了探究 EECp 对 HCT116 迁移的影响,通过划痕实验进行评估。结果如图 2(a)所示,未用 EECp 处理时,细胞明显迁移,当不同浓度 EECp 处理后明显抑制了迁移速度。如图 2(b)可以看出,统计显示处理 24 h 后,各组 EECp 加药组与对照组相比,迁移率分别下降了 8%,16%,22%,处理 36 h 后,各组 EECp 加药组与对照组相比,迁移率分别下降了 5%,18%,24%。这意味着 EECp 显著抑制了 HCT116 的迁移,且呈剂量依赖性。



注: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 。(a) 细胞划痕检测 EECp 对 HCT116 细胞迁移的影响;(b) EECp 对 HCT116 细胞迁移结果量化图。

图 2 EECp 对 HCT116 细胞划痕的影响

Fig. 2 Effect of propolis on the scratching of HCT116 cells



注: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 。(a) Hoechst 染色检测 EECp 对 HCT116 细胞凋亡的影响;(b) Hoechst33258 染色凋亡细胞量化图;(c) EECp 对 HCT116 细胞中凋亡蛋白表达条带图;(d) EECp 对 HCT116 细胞中 Bax 表达量量化图;(e) EECp 对 HCT116 细胞中 Bcl-2 表达量量化图;(f) EECp 对 HCT116 细胞中 Bax/Bcl-2 表达量量化图。

图 3 EECp 对 HCT116 细胞凋亡的影响

Fig. 3 Effect of propolis on apoptosis in HCT116 cells

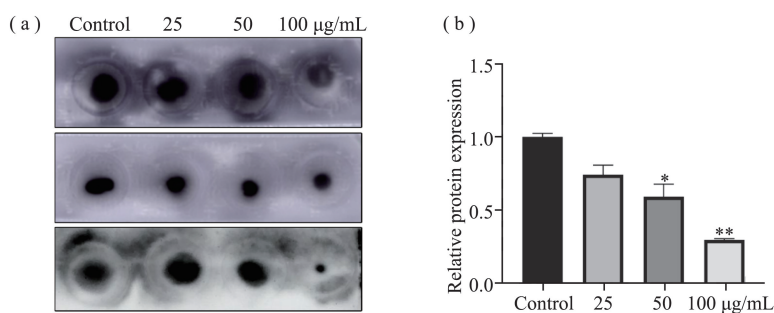
2.3 EECp 对 HCT116 细胞凋亡的影响

癌细胞凋亡在癌症治疗中起着至关重要的作用,促进癌细胞凋亡已成为癌症治疗的重要策略^[13]。为了探究 EECp 对 HCT116 细胞凋亡的影响,我们首先通过 Hoechst 33258 染色进行评估。结果如图 3(a~b)所示,对照组中细胞呈均匀蓝色荧光,形态正常。低浓度 EECp 处理细胞出现少量致密的浓染颗粒并发出蓝色荧光,随着 EECp 浓度的增高,细胞核呈现致密或碎块状浓染现象的比例显著增多,这意味着 EECp 促进细胞凋亡。

在细胞凋亡的调控中,Bcl-2 和 Bax 之间的相互作用至关重要。为了探究 EECF 是否通过调控 Bcl-2 和 Bax 的表达来诱导 HCT116 细胞凋亡,采用 Western Blot 检测它们的蛋白表达。如图 3(c~e),与对照组相比,EECP(50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)显著降低了 Bcl-2 的蛋白表达水平,且高浓度 EECF 上调了 Bax 的蛋白表达。图 3(f)展示了 Bax/Bcl-2 的比值,进一步证明了 EECF 通过抑制 Bcl-2 而促进 Bax 的蛋白表达,诱导细胞凋亡。这些数据表明,EECP 通过抑制 Bcl-2 和促进 Bax 的蛋白表达,诱导细胞凋亡。

2.4 EECF 作用 HCT116 细胞后 m6A 修饰水平变化

m6A 修饰物在癌症的发生、发展、转移、代谢、治疗抵抗和免疫逃避以及癌症干细胞自我更新和肿瘤微环境中发挥重要作用。为了探究 EECF 对 HCT116 细胞 m6A 修饰水平的影响,采用 Dot blot 进行检测。结果如图 4(a)所示,与对照组相比 EECF(50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)显著降低了 HCT116 中 m6A 整体修饰水平,且呈剂量依赖性。如图 4(b)可以看出,各组 EECF 加药组与对照组相比,m6A 总 RNA 含量分别降低了 26%,41%,71%。



注: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 。(a) DOT Blot 检测 EECF 对 HCT116 细胞总 RNA m6A 修饰水平的影响;(b) EECF 对 HCT116 细胞 m6A 修饰水平量化图。

图 4 细胞总 RNA m6A 修饰水平

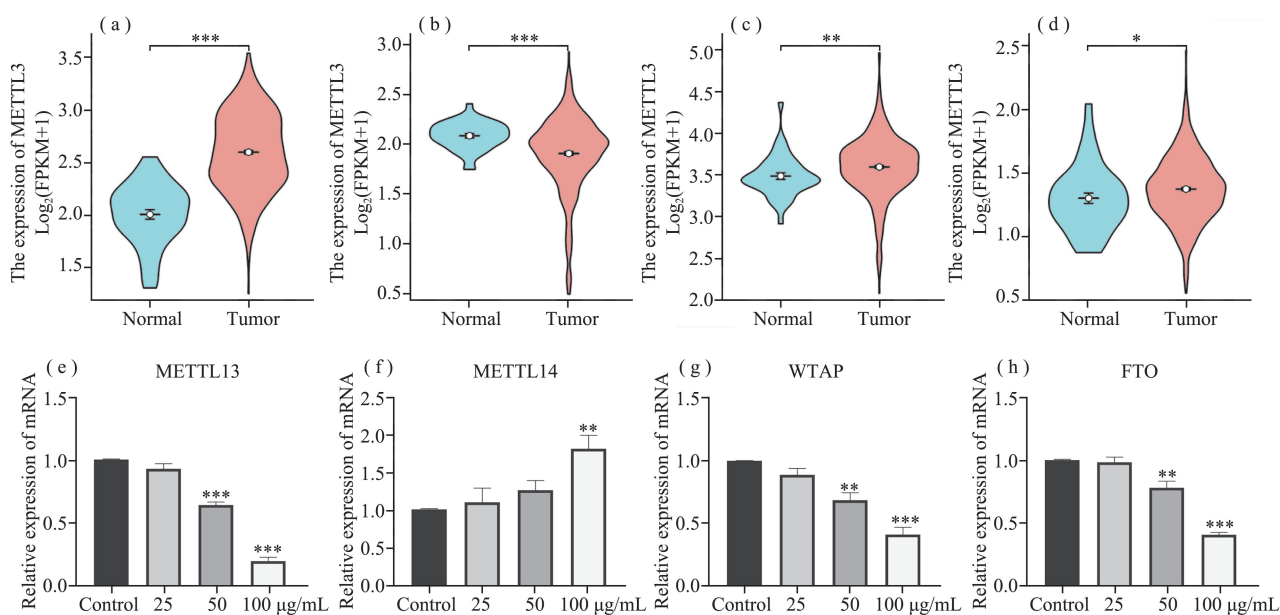
Fig. 4 Total cellular RNA m6A modification level

2.5 EECF 对 HCT116 细胞 m6A 相关基因的影响

在 m6A 甲基化修饰过程中,METTL3、METTL14、WTAP 和 FTO 发挥重要作用。为了探究它们在结肠癌组织中的表达情况,本研究中首先通过检索 TCGA 数据库中结肠癌 RNA-seq 的有关数据,去除了无临床信息及重复数据,共计 495 例样本被纳入到分析中。结果如图 5(a~d)所示,在结肠癌组织中 METTL3、WTAP 和 FTO 基因高表达,而 METTL14 基因表达水平显著低于癌旁组织。随后,为了进一步探究 EECF 对 HCT116 细胞中 METTL3、METTL14、FTO 和 WTAP 表达的影响,通过 RT-qPCR 检测它们的基因表达。结果如图 5(e~h),与对照组相比,中高浓度 EECF(50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)显著下调了 FTO、WTAP 和 METTL3 的基因表达水平,且呈剂量依赖性。此外,高浓度 EECF 显著上调了 METTL14 的表达。这意味着 EECF 可能通过抑制 FTO、WTAP 和 METTL3 的基因表达,并促进 METTL14 的表达,调控 m6A 甲基化修饰,从而抑制 HCT116 细胞增殖。

2.6 EECF 对 HCT116 细胞 m6A 甲基化修饰有关蛋白表达的影响

Western Blot 检测结果图 6(a)也证明,与对照组相比,EECF 作用后降低了 METTL3、FTO、WTAP 的蛋白表达水平,并增加了 METTL14 的蛋白表达水平。图 6(b)所示为,与对照组相比,当 EECF 处理浓度为 25 和 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,METTL3 蛋白表达水平没有显著性变化;当处理浓度达 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,METTL3 蛋白表达水平下调了 46%。图 6(c)所示为 METTL14 蛋白水平在三个 EECF 处理组中均显著性上调,与对照组相比分别上调了 24%,42%,56%。图 6(d-e)所示为 FTO 和 WTAP 蛋白,结果显示随着 EECF 处理浓度的提升,两者的蛋白表达水平均显著性下调,在 EECF 处理浓度达 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,下调最为显著,相比对照组分别下调了 50%和 62%。



注: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 。(a) *METTL3* 表达图; (b) *METTL14* 表达图; (c) *WTAP* 表达图; (d) *FTO* 表达图; (e) EECp 对 HCT116 细胞中 *METTL3* 表达量图; (f) EECp 对 HCT116 细胞中 *METTL14* 表达量图; (g) EECp 对 HCT116 细胞中 *WTAP* 表达量图; (h) EECp 对 HCT116 细胞中 *FTO* 表达量图。

图 5 EECp 对 HCT116 细胞 m6A 相关基因的影响

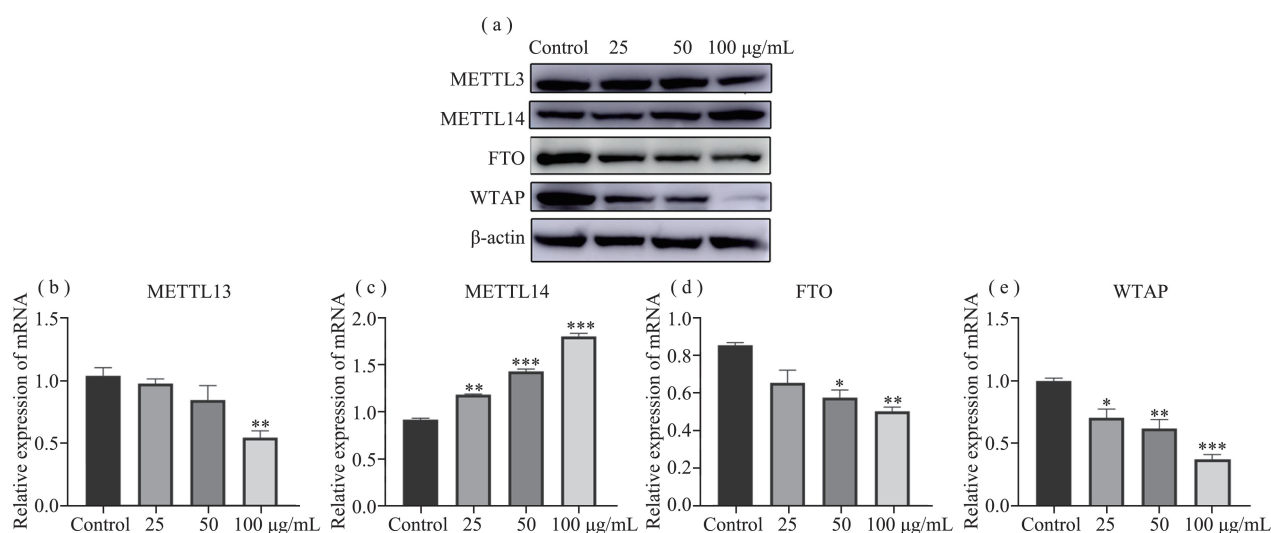
Fig. 5 Effect of propolis on m6A-related genes in HCT116 cells

3 讨论

结肠癌的发生发展是一个复杂的过程,包含了大量的遗传学(如涉及上皮细胞基因组)和表观遗传学(如上皮细胞与其内环境)等方面的变化^[14]。临床研究表明,结肠癌细胞可直接浸润到周围临近的正常组织和器官,也可以通过血行转移、淋巴道等进行扩散,因而具有高复发率和不良预后等特点,目前已经成为威胁人类生命健康的重要恶性疾病之一^[15]。传统的治疗结肠癌的手段主要包括手术切除、放疗和服用化疗药物等,但这些措施常常给患者带来极大的副作用^[16]。因此寻找新型有效安全且副作用小的药物用以治疗或辅助治疗结肠癌具有重要意义。在之前的诸多研究中,已经证明蜂胶具有显著的抗癌、抗炎、抗氧化等生理功效^[17]。尤其是在抑制癌细胞增殖方面,有研究针对蜂胶作用于胃癌细胞^[18]、人白血病细胞^[19]、乳腺癌细胞^[20]、肺癌细胞^[21]等研究发现,蜂胶能通过诱导癌细胞凋亡来抑制其增殖。本研究中通过向结肠癌细胞中添加一定浓度的蜂胶,可显著性地抑制结肠癌细胞的活性及迁移,同时,研究结果也表明这种抑制效果可能是通过诱导细胞凋亡来实现的,这一结论与上述研究一致。

N6-甲基腺嘌呤是真核生物 RNA 上最常见的一种修饰,研究证明 m6A 修饰在多种肿瘤疾病中常常出现异常,其参与了肿瘤细胞的增殖、转移、侵袭等多个过程,与肿瘤的发生发展密切相关^[22]。在 m6A 修饰过程中, *METTL3* 是被认为是起催化作用的核心成分, *METTL14* 则通过与 *METTL3* 形成异源二聚体,催化修饰反应过程,而 *WTAP*、*ZC3H13* 等则通过参与组成甲基转移酶来调控 m6A 修饰水平;去甲基化过程中, *FTO* 是首次被证明的细胞核内 m6A 去甲基化修饰的酶^[23]。多种研究均表明结直肠癌中具有异常表达的 m6A 甲基化修饰。例如有研究指出 *METTL3* 的高表达可能与结直肠癌患者具有较差的预后相关,即 *METTL3* 通过高表达调控甲基化修饰水平来促进结直肠癌的发生和发展^[24]。本研究通过 TCGA 数据研究发现,肿瘤组织相比正常组织中,其 *METTL3* 呈现异常高的表达,EECP 处理结肠癌细胞也发现, *METTL3* 的表达随 EECp 处理浓度的增加而呈现降低的现象。总体研究趋势与上述相一致。然而,也有研究指出 *METTL3* 的高表达可通过调节 p38/ERK 通路抑制癌细胞的增殖、迁移和侵袭,这提示了 *METTL3* 在结直肠癌发生发展中可能存在双重作用^[25]。目前,尚未有明确的假说对这种现象进行解释。 *METTL14* 作为 *METTL3* 的结构支撑,研究表明其主要呈现抑癌的表型,即 *METTL14* 的高表达能抑制癌症的发生发

展^[26]。在本研究中,TCGA 数据分析发现肿瘤组织中具有低水平的表达,且 EECF 处理后,METTL14 表达量得到显著性提升,也与抑癌效果相一致。此外,作为调节 m6A 修饰的重要一员,WTAP 可调节 Wnt 通路,在肝癌、胃癌等多种恶性肿瘤中均表现出明显的促癌作用^[27-28]。而与此同时,FTO 作为一种去甲基化修饰的重要酶,研究发现其可通过调节细胞信号分子促进结直肠癌的发展^[29],这些结果均与本研究的有关数据相一致,表明了 EECF 可以调控 m6A 甲基化修饰酶相关基因来影响结肠癌细胞的增殖。但是,对 m6A 修饰来说似乎是一个较为矛盾的集合体,结合本研究数据及既往的有关研究,呈现出:一方面与促进甲基化有关 METTL3 和 WTAP 在肿瘤细胞/组织中异常高表达,而 METTL14 却低表达;另一方面,去甲基化酶 FTO 的表达趋势却与 METTL3 和 WTAP 近乎一致。虽然本研究发现经 EECF 处理后,细胞内具有更低水平的 m6A 修饰水平,但对上述各种修饰蛋白的变化却不能进行完美的阐释,因而推测 RNA 的 m6A 总体修饰水平似乎不是衡量癌细胞增殖或抑制的良好指标,而与 m6A 修饰有关的各个因子却因为可以调节各个重要的细胞通路来影响癌细胞增殖或凋亡,因而有望成为抑癌或治疗结肠癌的重要分子靶标,相关调控机制有待进一步深入的研究。



注: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 。(a) m6A 相关酶蛋白表达条带图;(b) METTL3 蛋白表达量量化图;(c) METTL14 蛋白表达量量化图;(d) FTO 蛋白表达量量化图;(e) WTAP 蛋白表达量量化图。

图6 EECF 对 HCT116 细胞 m6A 甲基化修饰有关蛋白表达

Fig. 6 Effect of propolis on protein expression related to m6A methylation modification in HCT116 cells

参 考 文 献

- [1] BRAY F, LAVERSANNE M, SUNG H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA: Cancer Journal for Clinicians, 2024, 74(3): 229-263.
- [2] 胡福良. 蜂胶的化学成分、质量控制及生物学活性研究进展[J]. 经济动物学报, 2017, 21(4): 187-196.
- [3] CAMPOCCIA D, RAVAIOLI S, SANTI S, et al. Exploring the anticancer effects of standardized extracts of poplar-type propolis: In vitro cytotoxicity toward cancer and normal cell lines[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2021, 141: 111895.
- [4] TAO L, CHEN X, ZHENG Y, et al. Chinese propolis suppressed pancreatic cancer panc-1 cells proliferation and migration via hippo-YAP pathway[J]. Molecules (Basel, Switzerland), 2021, 26(9): 1-6.
- [5] BOULIAS K, GREER E L. Biological roles of adenine methylation in RNA[J]. Nature Reviews Genetics, 2023, 24(3): 143-160.
- [6] 郝亚娟, 刘颖斌. RNA m6A 甲基化修饰酶调控肿瘤的功能及其抑制剂的研究进展[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2021, 41(6): 809-814.
- [7] 杨晶晶, 张夏玮, 栾松华, 等. RNA 甲基转移酶 METTL3 在急性髓系白血病发生发展及耐药中的研究进展[J]. 解放军医学院学报, 2024, 45(5): 567-571.
- [8] 陶乃溶. METTL3 对胶质瘤细胞增殖及侵袭影响的实验研究[D]. 沈阳: 沈阳医学院, 2022.
- [9] ZHANG X. Regulation of ALKBH5 in different immune environment[J]. Bioprocess, 2023, 13(4): 174-186.

- [10] GU C, SHI X, DAI C, et al. RNA m(6)A modification in cancers: molecular mechanisms and potential clinical applications[J]. *Innovation* (Cambridge (Mass)), 2020, 1(3): 100066.
- [11] HUI L, JUNYA L, WENWEN Y, et al. Bioactive components and mechanisms of poplar propolis in inhibiting proliferation of human hepatocellular carcinoma HepG2 cells[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2021, 144: 112364-112364.
- [12] XUAN H, LI Z, YAN H, et al. Antitumor activity of Chinese propolis in human breast cancer MCF-7 and MDA-MB-231 cells[J]. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine: eCAM*, 2014, 2014: 280120.
- [13] WENDLOCHA D, KUBINA R, KRZYKAWSKI K, et al. Selected flavonols targeting cell death pathways in cancer therapy: the latest achievements in research on apoptosis, autophagy, necroptosis, pyroptosis, ferroptosis, and cuproptosis[J]. *Nutrients*, 2024, 16(8):1-8.
- [14] 刘莉, 张嘉, 缪小平. 结直肠癌的环境及遗传影响因素研究进展[J]. *中华流行病学杂志*, 2020, 41(10): 1745-1750.
- [15] SIEGEL R L, GIAQUINTO A N, JEMAL A. Cancer statistics, 2024[J]. *CA: Cancer Journal for Clinicians*, 2024, 74(1): 12-49.
- [16] MAIDA M, MACALUSO F S, IANIRO G, et al. Screening of colorectal cancer: present and future[J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2017, 17(12): 1131-1146.
- [17] CHANG H, YUAN W, WU H, et al. Bioactive components and mechanisms of Chinese poplar propolis alleviates oxidized low-density lipoprotein-induced endothelial cells injury[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2018, 18(1): 142-150.
- [18] JIANG X S, XIE H Q, LI C G, et al. Chinese Propolis Inhibits the Proliferation of Human Gastric Cancer Cells by Inducing Apoptosis and Cell Cycle Arrest[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020: 2743058.
- [19] YILMAZ U C, BAGCA B G, KARACA E, et al. Evaluation of the miRNA profiling and effectiveness of the propolis on B-cell acute lymphoblastic leukemia cell line[J]. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 2016, 84: 1266-1273.
- [20] MARIANA K P, SIREGAR K, SYAIFIE P H, et al. Uncovering the anti-breast cancer activity potential of east Kalimantan propolis by In vitro and bioinformatics analysis[J]. *Heliyon*, 2024, 10(13): e33636.
- [21] 孔令米, 刘会, 李俊雅, 等. 中国蜂胶及其主要组分对两种肺癌细胞作用及机制研究[J]. *中国蜂业*, 2020, 71(5): 63-66.
- [22] FU Y, DOMINISSINI D, RECHAVI G, et al. Gene expression regulation mediated through reversible m(6)A RNA methylation[J]. *Nat Rev Genet*, 2014, 15(5): 293-306.
- [23] 刘婧依, 李冰, 徐恩盼, 等. m6A 修饰在结直肠肿瘤发生发展中的研究进展及潜在治疗价值[J]. *世界华人消化杂志*, 2021, 29(23): 1373-1381.
- [24] LI T, HU P S, 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): 112-119.
- [25] 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: 4391-4402.
- [26] CHEN X, XU M, XU X, et al. METTL14-mediated N6-methyladenosine modification of SOX4 mRNA inhibits tumor metastasis in colorectal cancer[J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 106-114.
- [27] CHEN Y, PENG C, CHEN J, et al. WTAP facilitates progression of hepatocellular carcinoma via m6A-HuR-dependent epigenetic silencing of ETS1[J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 127-132.
- [28] LI H, SU Q, LI B, et al. High expression of WTAP leads to poor prognosis of gastric cancer by influencing tumour-associated T lymphocyte infiltration[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(8): 4452-4465.
- [29] SHEN X P, LING X, LU H, et al. Low expression of microRNA-1266 promotes colorectal cancer progression via targeting FTO[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(23): 8220-8226.

(责任编辑:刘庆松)