

•短篇论著•

胃癌组织中 METTL3 的表达及其与患者临床病理特征及预后的关系

吴 萌 杜佳璇 公小纪

【摘要】 目的 探讨胃癌患者组织中甲基化转移酶 3 (METTL3) 的表达水平, 并分析其与患者临床病理特征及预后的关系。**方法** 选择 2022 年 1 月至 2022 年 12 月河北港口集团有限公司秦皇岛中西医结合医院收治的 30 例胃癌患者作为研究对象, 收集手术切除的胃癌组织和癌旁正常组织 (距离肿瘤组织边缘 > 5 cm)。采用免疫组织化学染色法 (SP 法) 检测组织中 METTL3 和甲胎蛋白 (AFP) 水平, 并分析胃癌组织中 METTL3 的阳性表达率与患者临床病理特征的关系。采用 Spearman 相关性分析法探讨胃癌组织中 METTL3 与 AFP 水平的关系。采用电话和门诊复查的方式对所有入组患者自手术日起进行为期 3 个月的随访, 计算无病生存 (DFS) 率。采用 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线, 以 Log-rank 检验分析 METTL3 的表达与胃癌患者预后的关系。采用单因素及多因素 Cox 比例风险回归模型分析探讨胃癌患者预后的影响因素。**结果** SP 法染色结果显示, 胃癌组织中 METTL3 的阳性表达率为 86.67%, AFP 的阳性表达率为 76.67%, 均显著高于癌旁正常组织 (33.33%、30.00%), 差异均有统计学意义 ($\chi^2=17.778, P=0.000; \chi^2=13.125, P=0.000$)。Spearman 相关性分析结果显示, 胃癌组织中 METTL3 与 AFP 水平呈显著正相关 ($r=0.558, P=0.021$)。低分化、有淋巴结转移、浸润深度为 T3~T4 期者的胃癌组织中 METTL3 的阳性表达率分别高于中高分化、无淋巴结转移、浸润深度为 T1~T2 期者, 组间差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05)。METTL3 阳性表达者的 DFS 率显著低于阴性表达者, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。多因素 Cox 比例风险回归模型分析结果显示, TNM 分期、远处转移、浸润深度、脉管侵犯、METTL3 均是影响胃癌患者预后的独立危险因素 (P 均 < 0.05)。**结论** 胃癌组织中 METTL3 的表达显著上调, 且其与患者的临床病理特征和预后密切相关, 其可能可以成为早期胃癌诊断和预后预测的新生物标志物。

【关键词】 胃癌; 甲基化转移酶 3; 甲胎蛋白; 临床病理特征; 预后

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-534X. 2024. 03. 010

根据全球疾病负担研究 (GBD) 数据库显示, 2019 年中国胃癌发病人数为 612 821 例, 死亡人数为 421 539 例^[1]。近年来中国的胃癌发病率和病死率均呈下降趋势, 但其目前仍是威胁中国居民生命健康的重要原因^[2]。胃癌的发病机制尚未完全明确, 研究发现 RNA 甲基化调节在胃癌的发生和进展过程中起着重要作用^[3]。N⁶-甲基腺苷 (m⁶A)

是一种 RNA 甲基化修饰, 在 RNA 剪切、翻译和降解等生物学过程中发挥重要调节作用。研究表明, m⁶A RNA 甲基化调节因子的异常表达与多种肿瘤的发生和预后密切相关^[4]。贾丽娟等^[5]的研究表明, m⁶A RNA 甲基化调节因子在胃癌组织中异常表达, 其引发的 m⁶A 甲基化修饰失调可影响胃癌细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡等生物学行为, 从而参与胃癌的发生和进展过程。甲基化转移酶 3 (METTL3) 是 m⁶A RNA 甲基化修饰的主要调节因子。研究表明, 与正常胃黏膜上皮细胞 GES-1 相比, 胃癌细胞 AGS 中 METTL3 的表达水平显著升高^[6]。目前关

作者单位: 066003 河北港口集团有限公司秦皇岛中西医结合医院消化科 (吴萌); 066100 河北秦皇岛, 潘娜茜国际医院内科 (杜佳璇); 066199 河北秦皇岛, 北戴河医院病案室 (公小纪)

于 METTL3 与胃癌预后关系的报道尚少。甲胎蛋白 (AFP) 是一种被用于胃癌诊断和监测的辅助指标。研究表明,血清 AFP 水平是影响 AFP 阳性胃癌患者预后的独立危险因素^[7]。本研究检测了胃癌患者组织中 METTL3 和 AFP 水平,并分析其与患者临床病理特征及预后的关系,以期进一步明确两者在胃癌发生、进展过程中的作用。

1 研究对象与方法

1.1 研究对象

选择 2022 年 1 月至 2022 年 12 月河北港口集团有限公司秦皇岛中西医结合医院收治的 30 例胃癌患者作为研究对象,收集手术切除的胃癌组织和癌旁正常组织(距离肿瘤组织边缘>5 cm)。纳入标准:(1) 年龄 18~80 岁;(2) 经胃镜及病理检查初次确诊为胃癌^[8];(3) 均行腹腔镜胃癌根治术治疗;(4) 术前未接受放射治疗、化学治疗等抗肿瘤治疗;(5) 预计生存期≥3 个月;(6) 术后均采用 FOLFOX4 方案治疗。排除标准:(1) 有心、肝、肾等脏器功能不全;(2) 合并其他部位原发性肿瘤;(3) 妊娠期或哺乳期妇女;(4) 既往有胃肠道手术史;(5) 合并感染性疾病、免疫系统疾病或血液系统疾病。

30 例胃癌患者中,男性 16 例,女性 14 例;年龄≥60 岁者 18 例,<60 岁者 12 例;BMI≥24 kg/m² 者 13 例,<24 kg/m² 者 17 例;肿瘤最大径>5 cm 者 14 例,≤5 cm 者 16 例;分化程度为低分化者 14 例,中高分化者 16 例;TNM 分期为 I~II 期者 14 例,III~IV 期者 16 例;浸润深度为 T1~T2 期者 15 例,T3~T4 期者 15 例;17 例有淋巴结转移,14 例有远处转移,10 例有脉管侵犯;根据 Lauren 分型标准^[9],其中肠型 12 例,弥漫型 18 例。本研究经医院医学伦理委员会审批通过,患者及其家属均知情并由患者本人签署知情同意书。

1.2 主要试剂

鼠抗人 METTL3 单克隆抗体购自武汉艾美捷科技有限公司,货号 H00056261-M。鼠抗人 AFP 单克隆抗体购自上海钰博生物科技有限公司,货号 YB-23815。正常山羊血清封闭液购自北京百奥莱博科技有限公司,货号 WE0320-BWR。经辣根过氧化物酶标记的山羊抗人 IgG (H+L) 购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司,货号 33501ES60。DAB 显色试剂盒购自上海联迈生物工程有限公司,货号 LM-0323。

1.3 组织中 METTL3 和 AFP 水平检测

采用免疫组织化学染色法(SP 法)检测组织中 METTL3 和 AFP 水平。术中获取胃癌组织和癌旁正常组织制成标本(厚度为 0.3 cm),置于 4% 多聚甲醛中固定 10 h。经蒸馏水清洗 15 min,乙醇梯度脱水,二甲苯透明 2 次,每次 20 min;石蜡包埋,连续切取 4~6 μm 厚度切片;65 °C 烘箱加热 30 min,二甲苯脱蜡,滴加 3% 过氧化氢酶,室温反应 10 min;PBS 溶液冲洗 3 次,每次 5 min;滴加正常山羊血清封闭液,室温反应 20 min;去除多余液体,分别滴加鼠抗人 METTL3 单克隆抗体和鼠抗人 AFP 单克隆抗体,4 °C 孵育过夜;PBS 溶液冲洗 3 次,每次 5 min;滴加经辣根过氧化物酶标记的山羊抗人 IgG (H+L),室温孵育 30 min;PBS 溶液冲洗 3 次,每次 5 min;DAB 显色 6 min,充分水洗;苏木素复染 1 min,充分水洗;1% 盐酸乙醇溶液分化,1% 氨水反蓝,充分水洗;乙醇梯度脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,在显微镜下观察并拍照。

经 SP 法染色后,METTL3 阳性颗粒呈棕黄色,主要定位于细胞核;AFP 阳性颗粒呈棕黄色,主要定位于细胞质。每个标本随机选择 10 个高倍视野(×400)观察染色强度及阳性细胞占比。阳性细胞占比评分标准:无阳性细胞记为 0 分,阳性细胞占比 1%~10% 记为 1 分,11%~50% 记为 2 分,51%~75% 记为 3 分,76%~100% 记为 4 分。染色强度评分标准:无着色记为 0 分,淡黄色记为 1 分,棕黄色记为 2 分。总评分=阳性细胞占比评分+染色强度评分,总评分≥3 分判定为阳性表达,<3 分判定为阴性表达。

1.4 随访

采用电话和门诊复查的方式对所有入组患者自手术日起进行为期 3 个月的随访,随访频率为每个月 1 次。当 CT 检查结果提示有肺部、肝脏等转移时,行 MRI、PET/CT 或穿刺活组织检查,并且以 CT 检查时间作为转移时间。随访截至 2023 年 3 月 31 日或发生复发、转移,计算无病生存(DFS)率。

1.5 统计学方法

应用 SPSS 20.0 软件对数据进行统计学分析。计数资料以例(%)表示,总例数<40 或最小理论频数<1,采用 Fisher 确切概率法检验;总例数≥40 且最小理论频数为 1~5,采用校正卡方检验;总例数≥40 且最小理论频数>5,采用非校正卡方检验。采用 Spearman 相关性分析法探讨胃癌组织

中 METTL3 与 AFP 水平的关系。采用 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线,以 Log-rank 检验分析 METTL3 的表达与胃癌患者预后的关系。采用单因素及多因素 Cox 比例风险回归模型分析探讨胃癌患者预后的影响因素。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胃癌组织与癌旁正常组织中 METTL3 和 AFP 水平比较

SP 法染色结果显示,胃癌组织中 METTL3 的阳性表达率为 86.67%,AFP 的阳性表达率为 76.67%,均显著高于癌旁正常组织 (33.33%、

30.00%),差异均有统计学意义 ($\chi^2=17.778, P=0.000; \chi^2=13.125, P=0.000$)。见图 1。Spearman 相关性分析结果显示,胃癌组织中 METTL3 与 AFP 水平呈显著正相关 ($r=0.558, P=0.021$)。

2.2 胃癌组织中 METTL3 的表达与患者临床病理特征的关系

由表 1 可知,低分化、有淋巴结转移、浸润深度为 T3~T4 期者的胃癌组织中 METTL3 的阳性表达率分别高于中高分化、无淋巴结转移、浸润深度为 T1~T2 期者,组间差异均有统计学意义 (P 均 <0.05)。

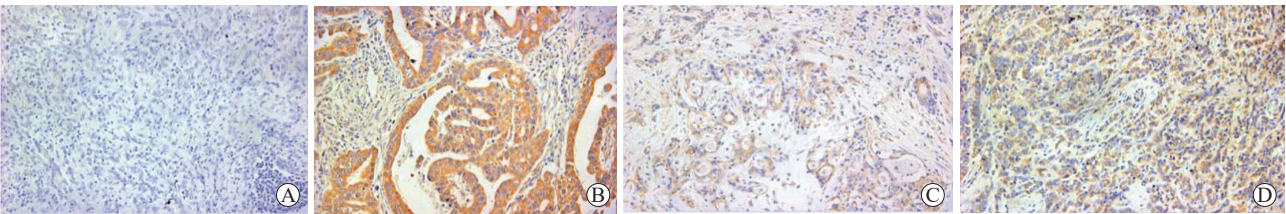


图 1 胃癌组织中 METTL3 和 AFP 表达 SP 法 $\times 400$ A 胃癌组织中 METTL3 阴性表达 B 胃癌组织中 METTL3 阳性表达 C 胃癌组织中 AFP 阴性表达 D 胃癌组织中 AFP 阳性表达

表 1 胃癌组织中 METTL3 的表达与患者临床病理特征的关系

项目	例数 (n=30)	METTL3 阳性表达率 / 例 (%)	χ^2 值	P 值
年龄			0.433	0.511
≥ 60 岁	18	15 (83.33)		
< 60 岁	12	11 (91.67)		
性别			0.021	0.886
男性	16	14 (87.50)		
女性	14	12 (85.71)		
BMI			1.885	0.170
$\geq 24 \text{ kg/m}^2$	13	10 (76.92)		
$< 24 \text{ kg/m}^2$	17	16 (94.12)		
肿瘤最大径			0.871	0.351
$> 5 \text{ cm}$	14	13 (92.86)		
$\leq 5 \text{ cm}$	16	13 (81.25)		
分化程度			4.039	0.044
低分化	14	14 (100.00)		
中高分化	16	12 (75.00)		
TNM 分期			1.489	0.222
I~II 期	14	11 (78.57)		
III~IV 期	16	15 (93.75)		
淋巴结转移			6.036	0.014
有	17	17 (100.00)		
无	13	9 (69.23)		
远处转移			0.871	0.351
有	14	13 (92.86)		
无	16	13 (81.25)		
浸润深度			4.615	0.032
T1~T2 期	15	11 (73.33)		
T3~T4 期	15	15 (100.00)		
脉管侵犯			2.308	0.129
有	10	10 (100.00)		
无	20	16 (80.00)		
Lauren 分型			2.356	0.125
肠型	12	9 (75.00)		
弥漫型	18	17 (94.44)		

2.3 胃癌组织中 METTL3 的表达与患者预后的关系

所有入组患者的中位随访时间为 2.11 个月，无失访病例。由图 2 可知，METTL3 阳性表达者的 DFS 率显著低于阴性表达者，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

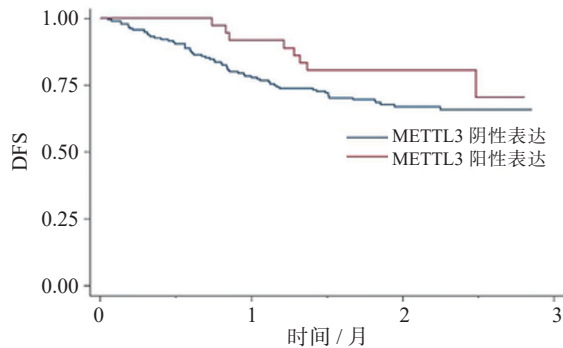


图 2 胃癌组织中 METTL3 的表达与患者预后的关系

2.4 胃癌患者预后的影响因素分析

单因素 Cox 比例风险回归模型分析结果显示，肿瘤最大径、分化程度、TNM 分期、淋巴结转移、远处转移、浸润深度、脉管侵犯、METTL3 均是胃癌患者预后的影响因素 (P 均 < 0.05)。将上述单因素分析中差异有统计学意义的项目作为自变量，以胃癌患者术后复发、转移情况作为因变量，纳入多因素 Cox 比例风险回归模型分析，结果显示 TNM 分期、远处转移、浸润深度、脉管侵犯、METTL3 均是影响胃癌患者预后的独立危险因素 (P 均 < 0.05)。见表 2。

3 讨论

近年来早期胃癌的诊断技术已有了较大进展，但由于早期胃癌缺乏特异性症状和体征，患者确诊时往往已处于中晚期，手术治疗效果不明显或已失去手术机会，给患者及其家属带来较大的心理和经济负担^[10]。胃癌的发病机制是一个复杂的

表 2 影响胃癌患者预后的单因素和多因素 Cox 比例风险回归模型分析

项目	单因素分析			多因素分析		
	HR 值	95%CI	P 值	HR 值	95%CI	P 值
肿瘤最大径 (> 5 cm)	1.483	0.511~1.619	0.046	1.113	0.648~1.346	0.167
分化程度 (低分化)	1.658	0.483~1.735	0.041	1.216	0.576~1.872	0.145
TNM 分期 (Ⅲ~Ⅳ期)	5.343	2.571~8.984	< 0.001	4.582	2.986~7.527	< 0.001
淋巴结转移 (有)	2.263	0.879~1.659	0.034	1.897	0.731~2.353	0.068
远处转移 (有)	3.492	1.628~8.372	0.002	2.854	1.433~6.593	0.014
浸润深度 (T3~T4 期)	10.873	3.765~20.583	< 0.001	8.462	2.436~14.368	< 0.001
脉管侵犯 (有)	8.462	3.749~13.694	< 0.001	6.327	3.081~11.482	< 0.001
METTL3 (阳性表达)	9.879	4.690~14.694	< 0.001	7.493	3.583~12.391	< 0.001

过程，涉及多种因素。研究表明，RNA 甲基化修饰参与了多种肿瘤的发生和进展过程，其不仅可调节 RNA 的翻译和稳定性，还可影响肿瘤细胞凋亡和细胞周期调控^[11]。 m^6A RNA 是一种广泛存在于真核生物中的 RNA 修饰， m^6A RNA 甲基化调节因子在多种肿瘤中异常表达，且与患者预后密切相关^[12-13]。

METTL3 是一种 RNA 甲基化转移酶，其在乳腺癌、肝细胞癌组织中表达上调^[14-15]。郑松楠等^[16]的研究表明，METTL3 对多组织类型的消化道肿瘤的发生和进展均具有重要调控作用。本研究采用 SP 法检测胃癌组织和癌旁正常组织中 METTL3 的表达水平，结果显示胃癌组织中 METTL3 的阳性表达率显著高于癌旁正常组织，这提示 METTL3 高表达与胃癌的发生密切相关。AFP 是一种在胚

胎发育时期特异性表达的蛋白质，正常情况下在成人體內只有极少量存在。研究表明，AFP 高表达可能与胃癌细胞的增殖、侵袭和迁移等恶性生物学行为有关^[17]。本研究结果显示，胃癌组织中 AFP 的阳性表达率为 76.67%，高于癌旁正常组织；此外，Spearman 相关性分析结果显示，胃癌组织中 METTL3 与 AFP 水平呈显著正相关，这提示 METTL3 可能通过调节 AFP 表达，影响胃癌细胞的恶性生物学行为，进而参与胃癌的发生和进展过程。

本研究结果显示，低分化、有淋巴结转移、浸润深度为 T3~T4 期者的胃癌组织中 METTL3 的阳性表达率分别高于中高分化、无淋巴结转移、浸润深度为 T1~T2 期者，这提示 METTL3 可能参与了胃癌的发生过程。然而，本研究发现 METTL3

的表达水平与胃癌患者的 TNM 分期、远处转移情况、脉管侵犯情况、Lauren 分型均无关,与以往的研究结果不符^[18],这可能与本研究样本量较少有关。研究表明,METTL3 高表达提示肝细胞癌患者预后不良^[19]。本研究的随访结果显示,METTL3 阳性表达者的 DFS 率显著低于阴性表达者,提示 METTL3 高表达与胃癌预后不良有关,与 Wang 等^[20]的报道相符。多因素 Cox 比例风险回归模型分析结果显示,TNM 分期、远处转移、浸润深度、脉管侵犯、METTL3 均是影响胃癌患者预后的独立危险因素,这提示 METTL3 有可能成为胃癌预后的预测指标,进而为胃癌治疗提供新靶点。

综上所述,胃癌组织中 METTL3 的表达显著上调,且其与患者的临床病理特征和预后密切相关,其可能成为胃癌早期诊断和预后预测的新生物标志物。本研究尚存在不足之处,一方面样本量较小,未能明确 METTL3 的表达与胃癌患者的 TNM 分期、远处转移、脉管侵犯、Lauren 分型等的关系;另一方面,本研究的随访时间较短,在分析 METTL3 与胃癌预后的关系中,其检验效能可能降低,拟在今后扩大样本量并延长观察时间,作进一步的分析。

参考文献

- 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.
- 邱海波,曹素梅,徐瑞华. 基于 2020 年全球流行病学数据分析中国癌症发病率、死亡率和负担的时间趋势及与美国和英国数据的比较[J]. 癌症, 2022, 41(4): 165-177.
- Song P, Tayier S, Cai Z, et al. RNA methylation in mammalian development and cancer[J]. Cell Biol Toxicol, 2021, 37(6): 811-831.
- An Y, Duan H. The role of m⁶A RNA methylation in cancer metabolism[J]. Mol Cancer, 2022, 21(1): 14.
- 贾丽娟,张云强. m⁶A 甲基化修饰在胃癌中的研究进展[J]. 中国肿瘤临床, 2021, 48(18): 950-957.
- 李亚,李潇,董青,等. 新加良附方抑制胃癌 AGS 细胞增殖迁移及其初步生物信息学分析[J]. 北京中医药大学学报, 2022, 45(11): 1110-1118.
- 徐开盛,李永柏,黄进堂,等. 甲胎蛋白阳性胃癌的临床病理特征与预后分析[J]. 中华普通外科杂志, 2021, 36(8): 585-590.
- 中华医学会肿瘤学分会,中华医学会杂志社. 中华医学会胃癌临床诊疗指南(2021 版)[J]. 中华医学杂志, 2022, 102(16): 1169-1189.
- 刘苗,王英南,赵群,等. 不同 Lauren 分型胃癌的临床病理特征及影响胃癌根治术后复发的危险因素分析[J]. 中国肿瘤, 2019, 28(12): 941-950.
- Kono Y, Kanzaki H, Iwamuro M, et al. Reality of gastric cancer in young patients: the importance and difficulty of the early diagnosis, prevention and treatment[J]. Acta Med Okayama, 2020, 74(6): 461-466.
- Zhang M, Song J, Yuan W, et al. Roles of RNA methylation on tumor immunity and clinical implications[J]. Front Immunol, 2021, 12(1): 641507.
- 裴雨晴,崔巍. m⁶A RNA 甲基化在肿瘤中的研究进展[J]. 中华医学杂志, 2020, 100(7): 556-560.
- Liang Y, Zhan G, Chang KJ, et al. The roles of m⁶A RNA modifiers in human cancer[J]. J Chin Med Assoc, 2020, 83(3): 221-226.
- 张华,张良,姚方辉,等. METTL3 在乳腺癌组织中的表达及临床意义[J]. 中国现代普通外科进展, 2022, 25(3): 169-173.
- 周腾飞,任子夫,陈超爽. METTL14 在肝细胞癌中的表达及临床意义[J]. 南方医科大学学报, 2020, 40(4): 567-572.
- 郑松楠,蔡梦迪,董科显,等. m⁶A 甲基化酶 METTL3 在消化系统肿瘤中的研究进展[J]. 国际遗传学杂志, 2021, 44(2): 85-89.
- Liu D, Li B, Yan B, et al. The clinicopathological features and prognosis of serum AFP positive gastric cancer: a report of 16 cases[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2020, 13(9): 2439-2446.
- Su Z, Xu L, Dai X, et al. Prognostic and clinicopathological value of m⁶A regulators in human cancers: a meta-analysis[J]. Aging (Albany NY), 2022, 14(21): 8818-8838.
- Liu J, Sun G, Pan S, et al. The Cancer Genome Atlas (TCGA) based m⁶A methylation-related genes predict prognosis in hepatocellular carcinoma[J]. Bioengineered, 2020, 11(1): 759-768.
- Wang Q, Chen C, Ding Q, et al. METTL3-mediated m⁶A modification of HDGF mRNA promotes gastric cancer progression and has prognostic significance[J]. Gut, 2020, 69(7): 1193-1205.

(收稿日期: 2023-09-14)

(本文编辑: 周骏)