

# 基于CRISPR/Cas9系统筛选影响非小细胞肺癌骨转移的RNA修饰相关基因

杜凤麟<sup>1</sup> 任逸喆<sup>2</sup> 张凌飞<sup>3</sup> 程亚玲<sup>1</sup> 赵明娜<sup>2</sup> 张先洲<sup>2</sup> 刘畅<sup>2</sup> 娄加陶<sup>1,2,4\*</sup>  
(<sup>1</sup>蚌埠医科大学生命科学院, 蚌埠 233030; <sup>2</sup>上海交通大学医学院附属第一人民医院检验医学中心, 上海 200080;  
<sup>3</sup>中国科学院分子细胞科学卓越创新中心/生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031;  
<sup>4</sup>上海交通大学医学院医学技术学院, 上海 200025)

**摘要** 该文探讨了RNA修饰相关基因对非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)骨转移的影响及其机制。构建靶向118个RNA修饰相关基因的CRISPR/Cas9敲除文库, 采用慢病毒感染入NSCLC H460 BM(H460 bone-metastatic)细胞, 经裸鼠髂外动脉注射构建骨转移模型进行体内筛选; 利用高通量测序技术分析体内筛选后细胞中单向导RNA(single guide RNA, sgRNA)的分布, 并应用MAGeCK-RRA算法进行数据分析以鉴定关键基因; 通过siRNA在H460 BM细胞中敲低候选基因METTL3, 采用qRT-PCR和Western blot验证其敲低效率, 并检测上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)相关蛋白表达; 进一步通过敲低与回补并结合qRT-PCR、Western blot及Transwell侵袭实验, 验证EML4在METTL3下游介导EMT进程的功能; 利用TIMER、PanCanSurvPlot等数据库分析METTL3在肺腺癌组织中的表达及预后价值。结果显示, METTL3在阴性筛选中排名首位, 其sgRNA在体内模型中显著耗竭; 敲低METTL3能有效抑制H460 BM细胞的侵袭, 并下调间质标志物N-cadherin和Vimentin蛋白表达, 上调上皮标志物E-cadherin表达, 且显著降低EML4的表达水平; 回补EML4可逆转METTL3敲低介导的EMT抑制及细胞侵袭能力减弱效应, 证实METTL3通过正向调控下游靶基因EML4的表达驱动EMT进程; 生物信息学分析显示, METTL3在肺腺癌组织中的表达水平显著高于正常组织, 且其高表达与患者总生存期较差相关。该研究证实, 基于CRISPR/Cas9的系统性筛选能有效发现功能基因; RNA修饰相关基因METTL3通过上调EML4表达, 进而调控EMT进程, 在NSCLC骨转移中发挥关键作用。

**关键词** CRISPR/Cas9; 非小细胞肺癌; 骨转移; RNA修饰; METTL3; EML4; EMT

## CRISPR/Cas9-Based Screening for RNA Modification-Related Genes Influencing Bone Metastasis in Non-Small Cell Lung Cancer

DU Fenglin<sup>1</sup>, REN Yizhe<sup>2</sup>, ZHANG Lingfei<sup>3</sup>, CHENG Yaling<sup>1</sup>, ZHAO Mingna<sup>2</sup>, ZHANG Xianzhou<sup>2</sup>,  
LIU Chang<sup>2</sup>, LOU Jiatao<sup>1,2,4\*</sup>

(<sup>1</sup>School of Life Sciences, Bengbu Medical University, Bengbu 233030, China; <sup>2</sup>Department of Laboratory Medicine, the First People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200080, China; <sup>3</sup>Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, Center for Excellence in Molecular Cell Science, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China; <sup>4</sup>College of Health Science and Technology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China)

收稿日期: 2025-11-17 接受日期: 2026-03-30

国家自然科学基金面上项目(批准号: 82273380、82273418)资助的课题

\*通信作者。Tel: 18616593001, E-mail: loujiatao@sjtu.edu.cn

Received: November 17, 2025 Accepted: March 30, 2026

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.82273380, 82273418)

\*Corresponding author. Tel: +86-18616593001, E-mail: loujiatao@sjtu.edu.cn

**Abstract** This study employed a CRISPR/Cas9-based systemic screening approach to investigate the role of RNA modification-related genes in bone metastasis of NSCLC (non-small cell lung cancer) and to explore their underlying mechanisms. A CRISPR/Cas9 knockout library targeting 118 RNA modification-related genes was constructed and introduced into human NSCLC H460 BM (H460 bone-metastatic) cells via lentiviral infection. An *in vivo* bone metastasis model was established via external iliac artery injection in nude mice for functional screening. The distribution of sgRNAs (single guide RNAs) in cells after *in vivo* selection was analyzed by high-throughput sequencing, and key genes were identified using the MAGeCK-RRA algorithm. Knockdown of *METTL3* in H460 BM cells using siRNA—verified by qRT-PCR and Western blot, effectively downregulated the expression of EMT (epithelial-mesenchymal transition)-related markers. Furthermore, knockdown and rescue experiments combined with qRT-PCR, Western blot and Transwell invasion assay verified the function of *EML4* in mediating the EMT process downstream of *METTL3*. The expression and prognostic value of *METTL3* in lung adenocarcinoma tissues were analyzed using databases including TIMER and PanCanSurvPlot. Results showed that *METTL3* ranked first in negative selection, with its sgRNAs being significantly depleted in the *in vivo* model. Knockdown of *METTL3* effectively inhibited the migratory ability of H460 BM cells, downregulated the protein expression of EMT mesenchymal markers N-cadherin and Vimentin, and upregulated the expression of epithelial marker E-cadherin. Moreover, further studies demonstrated that *METTL3* drives the EMT process by positively regulating the expression of its downstream target gene *EML4*. Bioinformatics analysis showed that *METTL3* expression was significantly elevated in lung adenocarcinoma tissues compared with normal tissues, and its high expression was associated with poorer overall survival in patients. This study demonstrates that CRISPR/Cas9-mediated systematic screening can effectively identify functional genes involved in NSCLC bone metastasis, and highlights the key role of the RNA modification-related gene *METTL3* in promoting bone metastasis by upregulating *EML4* expression to regulate the EMT process.

**Keywords** CRISPR/Cas9; NSCLC; bone metastasis; RNA modification; *METTL3*; *EML4*; EMT

全球癌症统计结果显示,肺癌不仅是发病率最高的癌症类型,还会引起极高的死亡率<sup>[1]</sup>,而肺癌进展至晚期的转移阶段更是导致癌症相关死亡的主要原因<sup>[2]</sup>。非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)是肺癌的主要病理亚型,占比高达85%<sup>[3]</sup>,晚期NSCLC患者常出现肿瘤远处转移,其中骨转移是最常见的恶性临床症状<sup>[4]</sup>。30%~40%的晚期患者在诊断时已发生骨转移,即使在积极治疗后,骨转移患者的中位生存期也仅有6至8个月<sup>[5]</sup>。因此,针对NSCLC骨转移特异性的治疗方案仍有待研究。

生物分子的化学修饰是调节分子功能的重要方式, RNA表观转录组学是对RNA修饰的研究。目前已证明RNA上存在170多种不同类型的转录后修饰<sup>[6]</sup>。其中, *N*<sup>6</sup>-甲基腺嘌呤(*N*<sup>6</sup>-methyladenosine, m<sup>6</sup>A)、*N*<sup>7</sup>-甲基鸟嘌呤(*N*<sup>7</sup>-methylguanosine, m<sup>7</sup>G)、2'-*O*-甲基化(2'-*O*-methylation, Nm)、假尿嘧啶(pseudouridine, Ψ)、*N*<sup>1</sup>-甲基腺嘌呤(*N*<sup>1</sup>-methyladenosine, m<sup>1</sup>A)和5-甲基胞嘧啶(5-methylcytosine, m<sup>5</sup>C)是参与基因表达调控与细胞生理过程的关键化学标记<sup>[7]</sup>。

RNA修饰的动态调控由特定的“写入器(writer)、擦除器(eraser)和读取器(reader)”蛋白系统协调,通过影响RNA剪接、翻译、运输和稳定性等方面调节生命活动<sup>[8]</sup>。近年来,越来越多的研究表明RNA修饰因子与人类癌症的异常调控相关。在结直肠癌(colorectal cancer, CRC)中, m<sup>6</sup>A的阅读蛋白YTHDC2高表达上调了*HIF1A*等促转移基因的表达,并增强了CRC细胞转移能力<sup>[9]</sup>;在胃癌(gastric cancer, GC)中, YBX1通过其m<sup>5</sup>C读取器功能稳定*ATG9A* mRNA,促进GC细胞保护性自噬,从而提高其在化疗应激下的存活率<sup>[10]</sup>; m<sup>5</sup>C的写入蛋白NSUN2通过甲基化*CDKN1C(p57<sup>Kip2</sup>)* mRNA的3'-UTR区域,导致*p57<sup>Kip2</sup>*下调,进而促进GC细胞增殖<sup>[11]</sup>;此外, NSUN2在GC细胞中还可以充当癌基因,与SUMO-2/3相互作用,维持自身的稳定性并发生核易位,从而增强促癌作用<sup>[12]</sup>。在肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)中, NSUN2通过介导lncRNA H19的m<sup>5</sup>C修饰,促进lncRNA H19与G3BP1特异性结合以致MYC积累,进而促进HCC的发生、发展和低分化<sup>[13]</sup>。在前列腺癌(prostate

cancer, PCa)中, 读取蛋白YBX1通过识别由NSUN2修饰的*TRIM28* mRNA m<sup>5</sup>C位点, 并结合*TRIM28* mRNA来维持其稳定性, 从而促进PCa进展<sup>[4]</sup>。

综上, RNA修饰在肿瘤增殖和转移中扮演重要角色。然而, 目前关于RNA修饰在NSCLC骨转移中的功能机制仍知之甚少。因此, 本研究基于CRISPR/Cas9系统构建了靶向RNA修饰相关writer、eraser和reader蛋白基因的敲除文库, 结合裸鼠骨转移模型, 旨在系统性筛选在NSCLC骨转移中起关键作用的基因, 以期为NSCLC骨转移的机制研究和临床治疗提供新的干预靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞 人胚胎肾细胞HEK-293T及人NSCLC细胞系H460 BM由本实验室保存, H460 BM筛选方法参照本实验室前期A549-BM的建立流程<sup>[4]</sup>。

1.1.2 主要试剂 RPMI 1640培养液(货号: C11875500CP)、胎牛血清(货号: A5669701)及Lipofectamine™ 2000转染试剂(货号: 11668019)购自美国ThermoFisher Scientific公司; METTL3抗体(货号: HY-P80223)购自美国MedChemExpress公司;  $\beta$ -actin抗体(货号: AB2001)购自上海埃必威生物技术有限公司; N-cadherin抗体(货号: 66219-1-Ig)、Vimentin抗体(货号: 80232-1-RR)、E-cadherin抗体(货号: 60335-1-Ig)和EML4抗体(货号: 22709-1-AP)购自武汉三鹰生物技术有限公司; 辣根过氧化物酶标记的绵羊抗小鼠IgG抗体(货号: A6782)、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG抗体(货号: A6154)购自德国Merck公司; E-Poly™转染试剂(货号: DN005)购自北京多纳医药科技有限公司; Transwell小室(货号: 3422)及基质胶(货号: 356234)购自美国Corning公司; PrimeScript RT Reagent Kit(货号: RR047A)和TaKaRa MiniBEST Universal Genomic DNA Extraction Kit Ver.5.0(货号: 9765)购自大连宝生物工程有限公司; Qiagen MinElute Gel Extraction Kit(货号: 28604)购自德国Qiagen公司; 荧光定量PCR试剂盒(货号: Q712-02)购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; CRISPR质粒文库及Magic™一步法CRISPR测序文库构建试剂盒(货号: PK201)购自武汉研美生物科技股份有限公司; siNC、siMETTL3、siEML4、METTL3及EML4 qPCR引物由北京擎科生物科技股

份有限公司合成。

1.1.3 实验动物 本实验使用6周龄健康BALB/c裸鼠, 其购自上海吉辉实验动物饲养有限公司。动物实验获得上海交通大学医学院附属第一人民医院动物伦理委员会批准, IACUC号为2022AWS0020。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HEK-293T使用含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 U/mL链霉素的DMEM培养基, H460 BM使用含相同浓度血清及双抗的RPMI 1640培养基, 均培养于37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养箱。

1.2.2 慢病毒包装及感染复数测定 为包装病毒, 将HEK-293T细胞接种于直径为10 cm的培养皿, 待细胞汇合度达到60%~70%时, 使用Lipofectamine™ 2000转染试剂, 将10.2  $\mu$ g文库质粒、5.1  $\mu$ g pMD2.G质粒和7.8  $\mu$ g psPAX2质粒共转染至细胞。转染4 h后更换为预热的DMEM培养基, 继续培养48 h后收集病毒上清。将收集的上清在4 °C条件下以3 000 r/min离心4 min, 取上清经0.22  $\mu$ m滤器过滤后分装, 于-80 °C保存备用。为测定感染复数, 将H460 BM细胞以每孔 $8 \times 10^4$ 个的密度接种于12孔板。待细胞贴壁后更换培养基, 并分别添加不同体积的病毒液, 具体添加量分别为0  $\mu$ L、2.5  $\mu$ L、5  $\mu$ L、10  $\mu$ L、20  $\mu$ L、40  $\mu$ L、80  $\mu$ L、160  $\mu$ L、200  $\mu$ L、300  $\mu$ L、400  $\mu$ L、500  $\mu$ L、600  $\mu$ L及800  $\mu$ L。感染48 h后, 将各组细胞分别接种到96孔板中, 每个病毒体积设8个重复孔。待细胞贴壁后, 换用含有1  $\mu$ g/mL嘌呤霉素的完全培养基进行筛选。72 h后检测细胞活力, 通过分析细胞活力与病毒添加体积之间的关系, 推算出当感染复数为0.3时所需加入的病毒体积。

1.2.3 文库慢病毒感染H460 BM细胞系 将H460 BM细胞以每孔 $8 \times 10^4$ 个的密度接种于12孔板, 细胞贴壁后加入400  $\mu$ L根据上述测定确定的病毒液。感染48 h后, 使用含1  $\mu$ g/mL嘌呤霉素的完全培养基持续筛选72 h, 以获得稳定的文库细胞。

1.2.4 裸鼠髂外动脉注射 将裸鼠麻醉后固定在木板上, 沿股骨和髌骨之间的皮肤上做0.5 cm的切口, 分离肌肉, 暴露出髂总动脉, 使用31 G胰岛素注射针注射文库细胞悬液, 注射后使用棉签按压注射部位至停止出血, 使用带线弯头针缝合伤口。

1.2.5 骨转移肿瘤细胞基因组提取及sgRNA扩增 采用断颈法处死裸鼠, 取出股骨及胫骨, 将骨头称重后使用骨钳在体视镜下剪碎, 使用MiniBEST Uni-

表1 小干扰RNA序列  
Table 1 Sequences of siRNA

小干扰RNA siRNA	序列(5'→3') Sequence (5'→3')
siNC	UUC UCC GAA CGU GUC ACG U(dT) (dT) ACG UGA CAC GUU CGG AGA A(dT) (dT)
siMETTL3	GAA GAG UGA UAU UUG UAC A(dT) (dT) UGU ACA AAU AUC ACU CUU C(dT) (dT)
siEML4	CGU AAU AAA UUG UCG AAA A(dT) (dT) UUU UCG ACA AUU UAU UAC G(dT) (dT)

表2 qRT-PCR引物序列  
Table 2 qRT-PCR primer sequences

基因名称 Gene name	序列(5'→3') Sequence (5'→3')
<i>ACTB</i>	CAT GTA CGT TGC TAT CCA GGC CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT
<i>METTL3</i>	ACC TAT GCT GAC CAT TAC CAA G CTG TTG GTT CAG AAG GCT CTC
<i>EML4</i>	TGA TGT TTT GAG GCG TCT TG TTG GTT TTC TGT TTG CAC CA

versal Genomic DNA Extraction Kit Ver.5.0(TaKaRa公司)提取基因组。提取的基因组作为sgRNA PCR的模板, PCR使用Magic™一步法CRISPR测序文库构建试剂盒, PCR扩增产物用2%琼脂糖凝胶电泳检测后切胶回收, 胶回收使用Qiagen MinElute Gel Extraction Kit, 回收产物用于高通量测序。

1.2.6 细胞转染 将生长状态良好的H460 BM接种在6孔板中, 待细胞汇合度大于80%时, 使用E-Poly™转染试剂, 按照说明书, 分别将siNC、siMETTL3和siEML4转染入细胞, 每孔siRNA终浓度为50 nmol/L。siNC、siMETTL3、siEML4的序列见表1。

1.2.7 总RNA提取及qRT-PCR检测 细胞转染48 h后, 用TRIzol试剂提取总RNA。使用PrimeScript RT Reagent Kit根据说明书将mRNA逆转录为cDNA。用qRT-PCR检测mRNA表达水平。以*ACTB*作为内参进行数据标准化, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算mRNA的相对表达量。引物序列见表2。

1.2.8 蛋白质免疫印迹(WB) 细胞转染48 h后, 提取总蛋白并于100 °C水浴变性8 min。使用10%聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)在120 V恒压下分离蛋白。通过湿转法将蛋白转移至PVDF膜上, 膜经1% BSA室温封闭1 h后加入一抗(1:1 500) 4 °C孵育过夜。

孵育后用PBST洗涤, 加入HRP标记的二抗(1:5 000), 在室温下孵育1 h。使用化学发光法显影并拍照。

1.2.9 Transwell 使用无血清培养基稀释基质胶后, 取60 μL加入8 μm孔径Transwell上室, 于培养箱中孵育2~3 h使其凝固。凝固后吸弃多余基质胶, 加入100 μL无血清培养基水化30 min, 随后吸弃培养基。每上室接种 $4 \times 10^4$ 个细胞, 下室加入含10% FBS的600 μL培养基, 37 °C培养36 h。培养结束后, 在室温下将小室浸入4%多聚甲醛中固定20 min, 再用0.1%结晶紫染色10 min, 最后用棉签轻轻擦除上室内未侵袭的细胞。

1.2.10 生物信息学分析 通过TIMER3(<https://compbio.cn/timer3/>)<sup>[15]</sup>分析正常组织与肺腺癌组织中的METTL3表达差异, 使用PanCanSurvPlot(<https://smu-onco.shinyapps.io/PanCanSurvPlot/>)在线平台分析METTL3表达量对肺腺癌患者总生存期(overall survival, OS)的影响。

1.2.11 统计学分析 实验数据使用Excel和Graph-Pad Prism 10软件进行统计分析。通过Shapiro-Wilk检验判断数据的正态分布性。符合正态分布的两组间比较采用非配对t检验; 不符合正态分布的两组间比较采用Mann-Whitney U检验。数据以均数±标准差

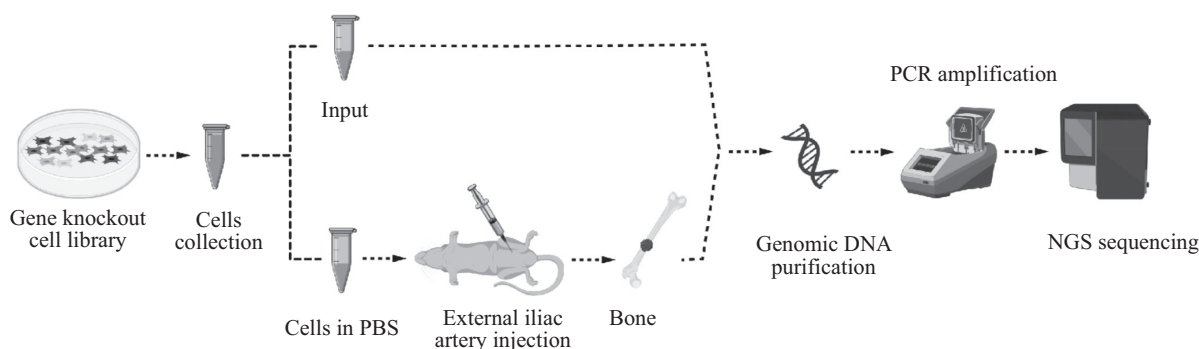


图1 文库筛选技术路线(本图改编自参考文献[16])

Fig.1 Library screening workflow (adapted from reference [16])

( $\bar{x} \pm s$ )表示,  $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 文库筛选流程

为了筛选调控非小细胞肺癌骨转移的RNA修饰相关基因,本研究基于CRISPR/Cas9系统进行文库筛选,文库中包含118个RNA修饰相关基因,每个基因设计了6条sgRNA,共708条sgRNA。首先,使用HEK-293T细胞进行CRISPR文库慢病毒包装,随后以感染复数低于0.3的病毒量感染H460 BM细胞系。病毒感染48 h后,使用1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 嘌呤霉素的完全培养基进行药物筛选。72 h后,汇集文库细胞,一部分作为初始组(input),另一部分通过裸鼠髂外动脉注射(external iliac artery injection)进行体内移植。三周后处死发生骨转移的小鼠,取出股骨近端及胫骨组织提取基因组DNA,用于后续测序等(图1)。

### 2.2 高通量测序数据质量控制

分别取初始组和小鼠组的基因组DNA样本进行sgRNA扩增及高通量测序,检测其sgRNA的分布情况。将原始测序读数中的sgRNA序列与文库参考序列进行比对,结果显示各样本的比对率 $\geq 87.3\%$ ,显著高于常规要求的60%阈值,表明测序数据质量良好(图2A)。进一步分析sgRNA的读数分布特征,结果显示,在初始组中,各sgRNA的读数分布均匀,表明初始文库覆盖良好。经体内筛选后,小鼠组的读数分布波动范围显著增大,表明在骨转移微环境的选择压力下,不同sgRNA出现了显著的富集或耗竭(图2B)。为评估筛选效果,分别统计了靶向文库基因的必需sgRNA(essential sgRNA)与非靶向sgRNA(non-targeting sgRNA)的丰度。结果显示,在体内筛选压力的持续作用下,细胞群体中sgRNA的

分布逐渐失衡,与表型相关的sgRNA丰度发生累积或耗竭。因此与非靶向sgRNA相比,靶向文库基因sgRNA的 $\log_2(\text{FC})$ 变化更加显著,进一步证实了筛选系统的有效性(图2C)。综上所述,测序数据质量可控,且sgRNA分布的变化提示RNA修饰相关基因显著影响了肺癌骨转移进程。

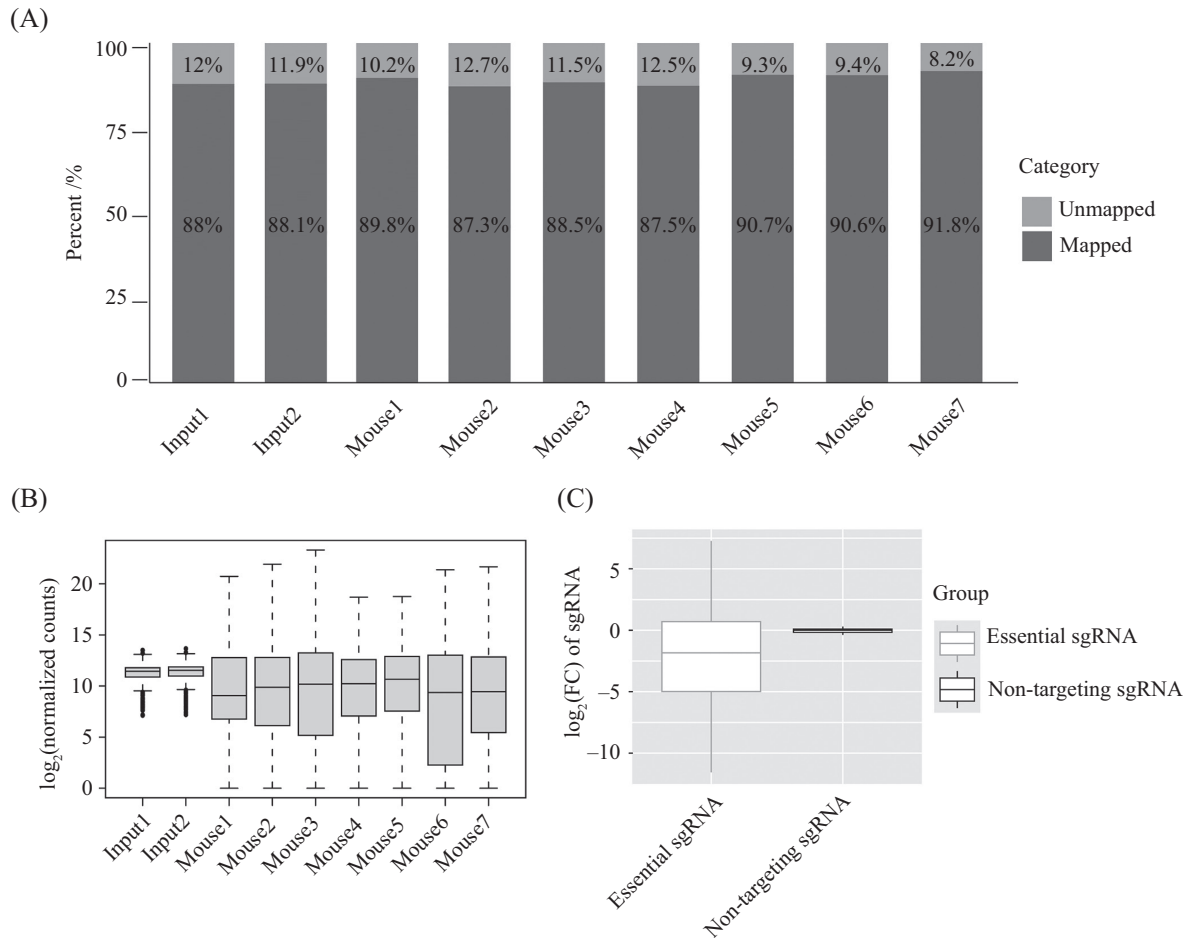
### 2.3 CRISPR筛选结果分析

采用MAGeCK-RRA算法对高通量测序获得的sgRNA计数进行分析,分别从阳性筛选和阴性筛选的角度,计算每个基因的RRA得分、 $P$ 值及错误发现率(false discovery rate, FDR)。RRA得分越小,表明该基因的sgRNA富集或耗竭效应越显著。阴性筛选(即其敲除抑制骨转移,提示基因本身促进转移)排名前10的基因包括METTL3、TRMT61A、RNMT等(图3A),阳性筛选(即其敲除促进骨转移,提示基因本身抑制转移)排名前10的基因包括:CBLL1、ALKBH2、FTSJ3等(图3B)。对sgRNA的 $\log_2(\text{FC})$ 进行分析发现,在阴性筛选中排名首位的METTL3,其sgRNA在体内模型中表现出最显著的耗竭现象(图3C)。以上结果表明,METTL3是潜在的肺癌骨转移关键促进基因。

### 2.4 METTL3促进肺癌转移

进一步分析METTL3的6条sgRNA在初始组与小鼠组中的读数。结果显示,所有sgRNA在小鼠组中均一致性地显著耗竭(图4A)。这表明当METTL3敲低后,H460 BM细胞在骨转移模型中的定植或增殖能力受损。 $\log_2(\text{FC})$ 热图也同样印证这一结果(图4B)。

为深入验证METTL3在肺癌骨转移过程中的作用,我们首先通过siRNA敲低了H460 BM细胞中的METTL3,qRT-PCR及WB结果证实METTL3在mRNA和蛋白水平均被有效敲低(图4C和图4D)。随后,通过蛋白质免疫印迹检测EMT相关标志物发现,



A: 各样本reads与文库sgRNA序列比对的对比率; B: 各样本sgRNA标准化计数分布比较; C: 小鼠组靶向与非靶向文库基因sgRNA的 $\log_2$ (FC)分布比较。

A: mapping rate of sequencing reads from each sample to the sgRNA library; B: comparison of normalized sgRNA count distributions across samples; C:  $\log_2$ (FC) distribution of library gene-targeting and non-targeting sgRNAs in mouse.

图2 高通量测序数据质量控制

Fig.2 Quality control for high-throughput sequencing data

敲低 *METTL3* 导致间质标志物 N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达显著下调, 而上皮标志物 E-cadherin 表达显著上调。而回补 *METTL3* 后, 这些 EMT 相关标志物的表达水平得以恢复 (图 4D)。为探究 *METTL3* 介导的 EMT 对细胞运动能力的影响, 我们进行了 Transwell 侵袭实验。结果显示, *METTL3* 敲除显著抑制了肺癌细胞的侵袭, 而回补 *METTL3* 后, 肺癌细胞的侵袭能力得到恢复 (图 4E 和图 4F)。综上, 这些结果提示 *METTL3* 通过促进 EMT 进程, 从而增强肺癌细胞的侵袭能力。

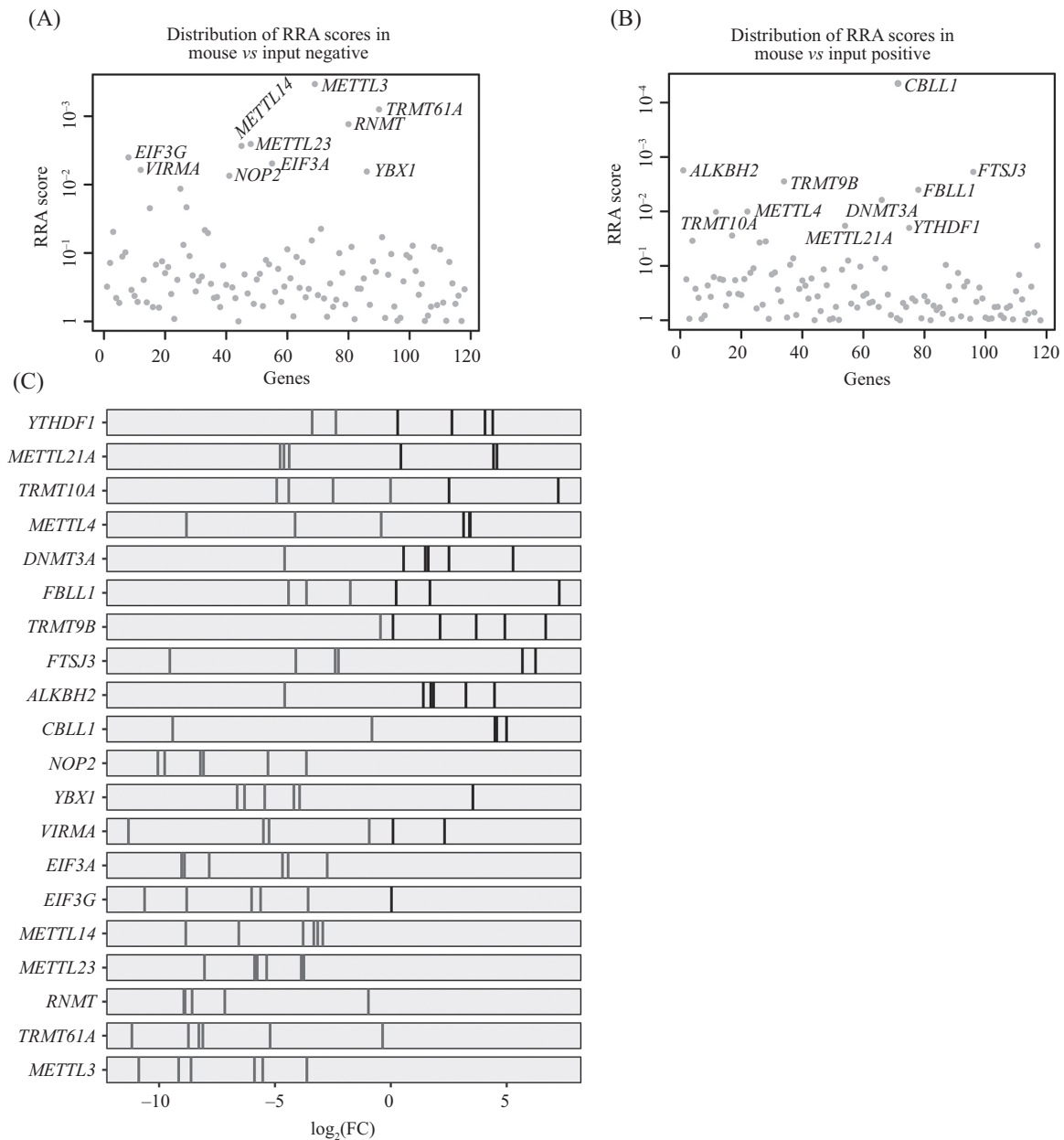
## 2.5 *METTL3* 通过上调 *EML4* 表达促进 EMT 进程

*METTL3* 作为 m<sup>6</sup>A 甲基化酶, 已被报道在肺腺癌中以 m<sup>6</sup>A 依赖的方式上调 *EML4* 的表达, 进而促进肿瘤转移<sup>[17]</sup>。但此促转移效应是否经由 EMT 途径介导尚不清楚。为验证 *METTL3* 对 *EML4* 的调控作用,

我们在 H460 BM 细胞中敲低 *METTL3*, 发现 *EML4* 的蛋白表达水平显著降低, 而回补 *METTL3* 后其表达得以恢复。这证实了在该细胞中 *METTL3* 对 *EML4* 存在正向调控作用 (图 5A)。

为进一步探究 *EML4* 在 EMT 及转移中的功能, 我们使用 siRNA 敲低 *EML4*。qRT-PCR 及 WB 证实 *EML4* 在 mRNA 和蛋白水平均被有效敲低, 敲低 *EML4* 导致间质标志物 N-cadherin 和 Vimentin 的表达显著下调, 而上皮标志物 E-cadherin 的表达显著上调 (图 5B 和图 5C)。Transwell 侵袭实验结果显示, *EML4* 敲低显著抑制了细胞的侵袭 (图 5D 和图 5E)。这些结果提示 *EML4* 可正向调控 EMT 进程并促进细胞侵袭。

为证实 *EML4* 是 *METTL3* 下游的关键效应分子, 我们在 *METTL3* 敲低的背景下回补了 *EML4*。结果显



A: RRA score阴性筛选结果; B: RRA score阳性筛选结果; C: 阴性与阳性筛选分析中排名前10的sgRNA的log<sub>2</sub>(FC)分布。

A: negative selection results based on RRA score; B: positive selection results based on RRA score; C: distribution of log<sub>2</sub>(FC) for the top 10 sgRNAs from the negative and positive selection analyses.

图3 CRISPR文库筛选结果

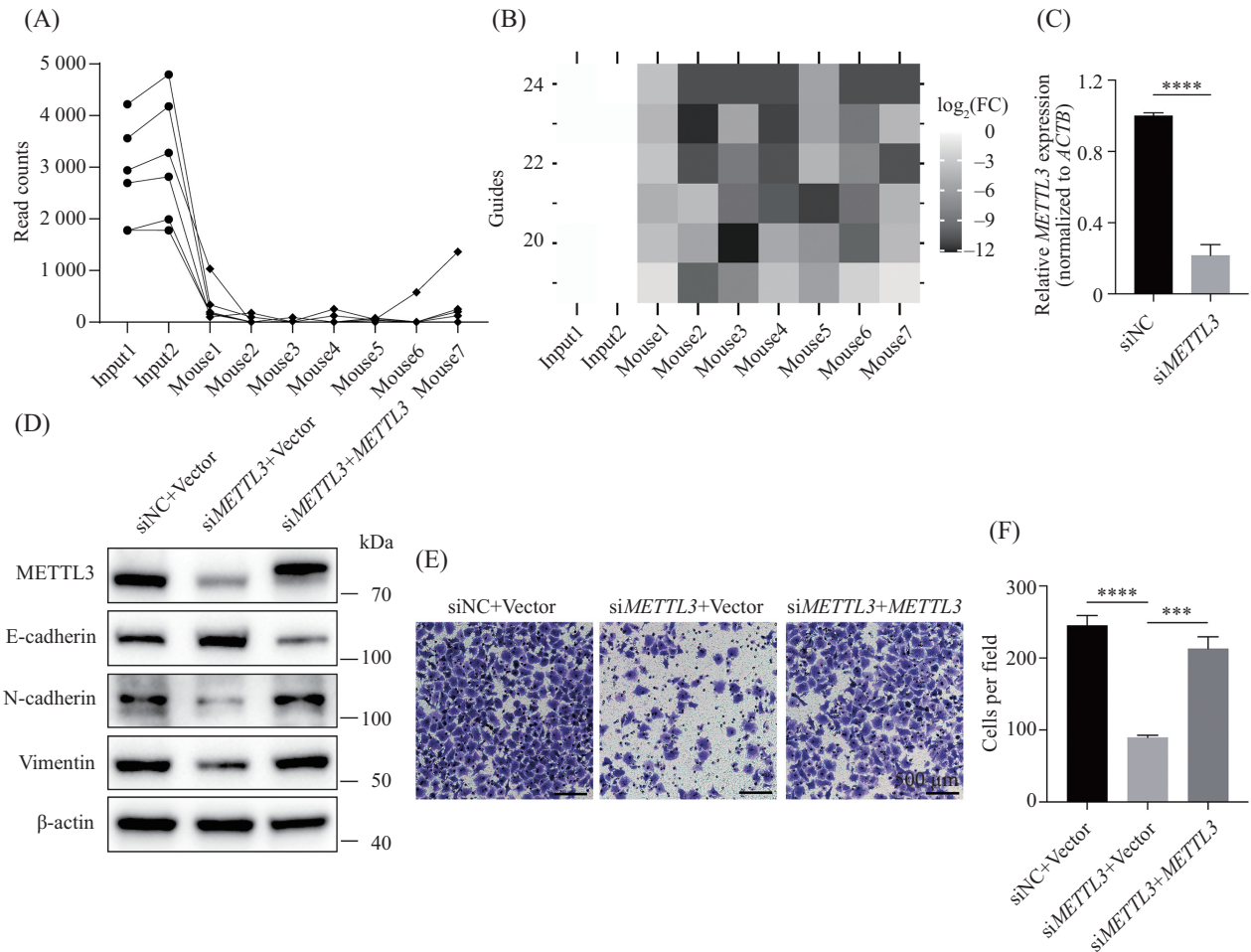
Fig.3 CRISPR library screening results

示, *EML4*的回补成功逆转了由*METTL3*缺失导致的EMT标志物表达改变(图5F), 并且肿瘤侵袭能力得到挽救(图5F和图5G)。综上所述, *METTL3*通过促进其下游靶标*EML4*的表达, 驱动EMT进程, 最终促进肺癌细胞的侵袭与转移。

## 2.6 *METTL3*在肺癌中高表达且与患者不良预后相关

使用TIMER3数据库分析*METTL3*在正常组织

和肺癌组织中的转录水平差异, 发现肺癌组织中*METTL3*的表达水平显著高于正常组织( $P < 0.001$ , 图6A)。为评估其临床意义, 使用PanCanSurvPlot在线平台进行生存分析, 结果显示, *METTL3*高表达与肺癌患者的总生存期缩短显著相关( $P < 0.05$ , 图6B)。综上所述, *METTL3*在肺癌中异常高表达且与患者不良预后相关, 提示其可能作为一个潜在的生物标志物, 可应用于临床诊断和预后风险提示。



A: 各个样本中METTL3不同sgRNA的读数分布比较; B: METTL3不同sgRNA在各样本中的富集水平热图; C: qRT-PCR检测METTL3的干扰效果; D: 蛋白质免疫印迹检测METTL3蛋白水平下调及回补后EMT标志物的蛋白表达水平; E、F: 通过Transwell实验检测METTL3敲低后的细胞侵袭能力, 并对侵袭细胞进行定量分析。\*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ 。

A: distribution of reads counts for different METTL3 sgRNAs across samples; B: heatmap depicting the enrichment levels of individual METTL3 sgRNAs in each sample; C: assessment of METTL3 knockdown efficiency by qRT-PCR; D: expression of EMT markers after METTL3 knockdown or rescue was detected by Western blot; E,F: cell invasion ability after METTL3 knockdown was assessed by Transwell assay, and the invaded cells were quantified. \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ 。

图4 METTL3促进肺癌转移  
Fig.4 METTL3 promotes lung cancer metastasis

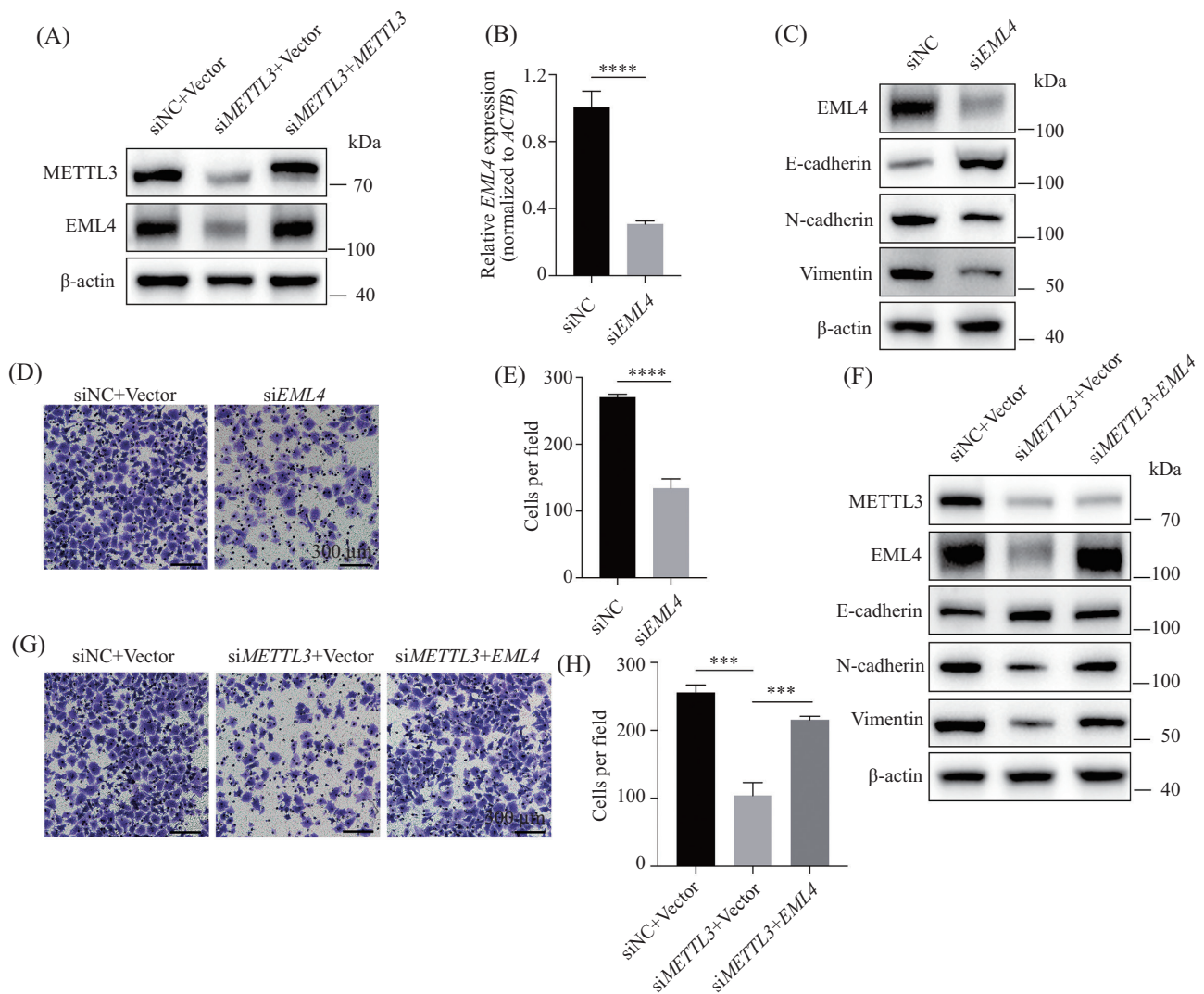
### 3 讨论

肺癌是全球癌症相关死亡的首要病因, 超65%的患者确诊时已发生局部浸润或远处转移<sup>[18]</sup>。骨转移作为其最常见的恶性临床表现, 不仅会引发严重的骨骼相关事件(skeletal-related event, SRE), 如病理性骨折和脊髓压迫, 导致患者生活质量急剧下降, 更会显著缩短其生存期<sup>[19]</sup>。当前骨转移的治疗以双膦酸盐、地诺单抗等抑制骨破坏为主, 无法阻断肿瘤侵袭转移, 仍存在治疗手段有限、预后差的临床困境<sup>[20]</sup>。

癌症最初被认为是由基因突变驱动的微进化

过程<sup>[21]</sup>, 但后续研究发现, 表观遗传调控同样在癌症发展中发挥重要作用。表观遗传作为基因表达的调控者, 主要通过下调肿瘤抑制基因的表达与激活癌基因来发挥生物学功能<sup>[22]</sup>。RNA修饰作为表观遗传学之一, 在多种癌症中被揭示可作为新型诊断及预后标志物, 成为极具潜力的治疗靶点。目前已有多个针对RNA修饰蛋白(RNA-modifying proteins, RMPs)的化学药物正在研发中<sup>[23]</sup>。然而, RNA修饰在NSCLC骨转移中的功能机制并不明确, 仍有待研究。

因此, 为了系统性揭示在NSCLC骨转移中



A: 蛋白质免疫印迹检测METTL3蛋白水平下调及回补后EML4蛋白表达水平; B: qRT-PCR检测EML4的干扰效果; C: Western blot检测EML4蛋白水平下调后EMT标志物的蛋白表达水平; D、E: 通过Transwell实验检测EML4敲低后的细胞侵袭能力, 并对侵袭细胞进行定量分析; F: Western blot检测下调METTL3蛋白水平及回补EML4后EMT标志物的蛋白表达水平; G、H: 通过Transwell实验检测METTL3敲低及回补EML4后的细胞侵袭能力, 并对侵袭细胞进行定量分析。\*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ 。

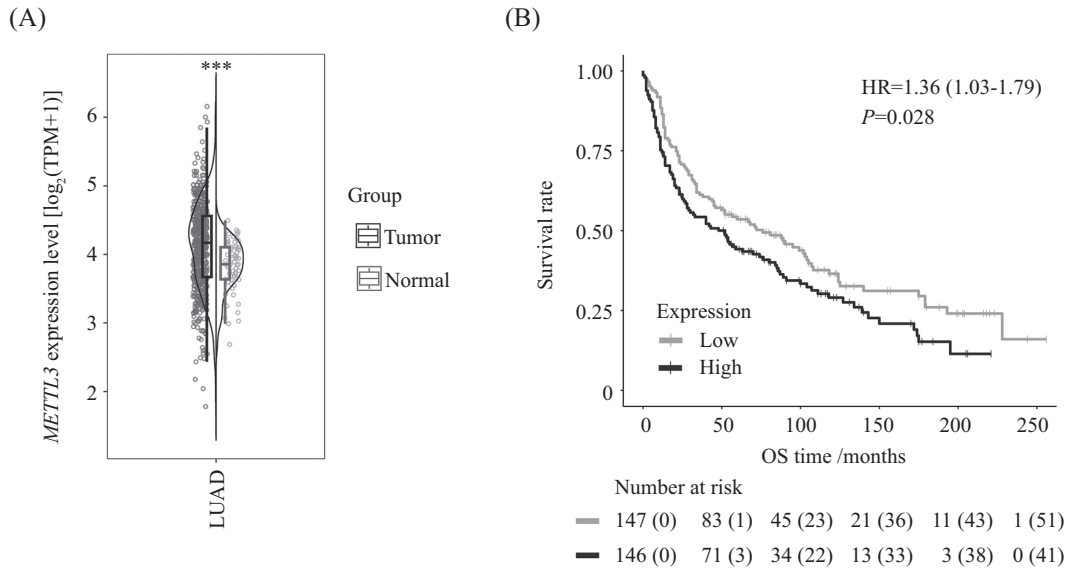
A: EML4 protein expression upon METTL3 knockdown and rescue was detected by Western blot; B: the knockdown efficiency of EML4 was verified by qRT-PCR; C: the protein levels of EMT markers after EML4 knockdown were measured by Western blot; D,E: cell invasion ability after EML4 knockdown was assessed by Transwell assay, and the invaded cells were quantified; F: expression of EMT markers following METTL3 knockdown and subsequent EML4 rescue was analyzed by Western blot; G,H: the invasive capacity of cells upon METTL3 knockdown and EML4 rescue was assessed by Transwell assay, and the invaded cells were quantified. \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ 。

#### 图5 METTL3通过上调EML4表达促进EMT进程

Fig.5 METTL3 promotes EMT progression by upregulating EML4 expression

发挥关键作用的RNA修饰相关基因, 本研究基于CRISPR/Cas9系统进行功能基因筛选。该系统包含Cas9核酸酶和sgRNA, 其原理是sgRNA的5'末端通过碱基互补配对识别特定DNA靶序列, 而Cas9核酸酶结合于sgRNA的3'末端, 在靶DNA互补区域邻近的NGG原型间隔基序(protospacer adjacent motif, PAM)上游约3 bp处引发DNA双链断裂(double strand breaks, DSBs)<sup>[24]</sup>。因此, 通过慢病毒递送靶向不同

基因的sgRNA, 可以高效地并行扰动数千个基因组元件, 实现无偏倚的基因组功能筛选, 以鉴定在特定表型中起重要作用的基因<sup>[25]</sup>。已有研究通过靶向多种免疫激活因子的sgRNA文库进行聚焦性体内的CRISPR筛选, 成功鉴定出调控转移瘤休眠退出的细胞自主性抑制因子<sup>[26]</sup>。基于这一系统的以上优势, 我们设计了靶向编码RNA修饰的writer、eraser和reader蛋白共118个基因的CRISPR文库, 并通过慢



A: *METTL3*在正常组织和肺癌组织中的表达水平差异, 表达量以每百万转录本数(transcripts per million, TPM)为单位, 并经 $\log_2(\text{TPM}+1)$ 转换后展示; B: *METTL3*高表达与低表达的肺癌患者总生存期(OS)分析。\*\*\* $P < 0.001$ 。

A: comparison of *METTL3* expression levels between normal and lung cancer tissues, expression levels are shown as TPM and transformed by  $\log_2(\text{TPM}+1)$ ; B: OS (overall survival) analysis of lung cancer patients with high versus low *METTL3* expression. \*\*\* $P < 0.001$ .

图6 *METTL3*在肺癌中的表达水平及其预后价值分析

Fig.6 Analysis of *METTL3* expression in lung cancer and its prognostic value

病毒载体共递送sgRNA和Cas9的方式, 构建了裸鼠体内骨转移模型进行筛选, 揭示了在NSCLC骨转移中发挥关键作用的RNA修饰相关基因——*METTL3*, 其sgRNA在体内显著耗竭, 且在阴性筛选中排名首位, 提示其可能是促进NSCLC骨转移的关键基因。此外, 本研究筛选结果也揭示了其他有潜力的候选基因, 如阴性筛选中的*TRMT61A*、*RNMT*以及阳性筛选中的*CBLL1*等。这些基因在RNA修饰中发挥不同功能。例如, *TRMT61A*作为tRNA m<sup>1</sup>A修饰的甲基转移酶, 通过介导m<sup>1</sup>A修饰增强一系列关键转录因子*ONECUT2* mRNA的稳定性, 进一步上调*SOS1*的表达, 从而持续激活MAPK/ERK信号通路, 驱动CRC细胞增殖与肿瘤进展<sup>[27]</sup>; *RNMT*作为mRNA帽N<sup>7</sup>-甲基转移酶, 通过催化mRNA帽结构的N<sup>7</sup>位甲基化, 保障关键促癌基因转录本的稳定性与高效翻译, 进而维持PI3K/AKT/mTOR信号通路的异常激活, 驱动*PIK3CA*突变型乳腺癌(breast cancer, BC)细胞的增殖与存活<sup>[28]</sup>; *CBLL1*作为m<sup>6</sup>A甲基转移酶复合物的关键衔接蛋白, 通过参与m<sup>6</sup>A甲基化修饰调控关键肿瘤抑制因子(如*PPL*、*TFEB*、*NTN4*)的mRNA稳定性与表达, 进而抑制PI3K/AKT信号通路及核糖体生物合成, 降低蛋白翻译效率, 并激活免疫相关信号通路, 从而抑制BC细胞增殖、侵袭与转移<sup>[29]</sup>。本研究

基于表型显著性及现有研究基础, 选择排名首位的*METTL3*进行深入机制探索。其他具备转移调控能的候选基因, 将在后续工作中进一步探索。

*METTL3*是催化m<sup>6</sup>A RNA甲基化的核心转移酶, 通过调控mRNA的生物合成、降解及翻译过程, 广泛参与肿瘤的发生发展<sup>[30]</sup>。研究显示, 在急性髓系白血病(acute myelocytic leukemia, AML)中, *METTL3*被招募到致癌基因*SP1*启动子区域, 在*SP1*转录过程中对其进行修饰, 进而调控癌基因*c-MYC*表达<sup>[31]</sup>。此外, *METTL3*还可对*c-MYC*的mRNA直接进行修饰<sup>[32]</sup>, 从而促进AML的发展。在HCC中, *METTL3*通过促进*SOCS2* mRNA降解来驱动肿瘤生长, 并上调*SNAIL*翻译, 使癌细胞发生EMT, 促进肿瘤转移<sup>[33]</sup>。EMT是癌细胞从原发性肿瘤中脱离, 在转移扩散过程中侵袭周围组织并侵入血液和淋巴系统的微血管的关键步骤<sup>[34]</sup>。本研究在H460 BM中下调*METTL3*蛋白水平, 发现EMT相关标志物N-cadherin和Vimentin表达下调, E-cadherin表达上调, 提示其在EMT过程中发挥关键调控作用。*EML4*因*EML4-ALK*易位而广为人知<sup>[35]</sup>。而在肺腺癌中, 其本身可被*METTL3*以m<sup>6</sup>A依赖的方式上调, 进而促进肿瘤细胞转移<sup>[17]</sup>, 本研究同样证明*METTL3*可正向调控*EML4*。进一步研究证实, *EML4*能够促进EMT进

程并增强细胞侵袭能力;且在 *METTL3* 敲低背景下回补 *EML4*, 可有效逆转由 *METTL3* 缺失引起的 EMT 表型抑制及侵袭能力缺陷。这一系列结果揭示了 *METTL3* 通过上调 *EML4* 表达激活 EMT 程序, 进而促进肺癌细胞的侵袭与转移。已有研究表明 *EML4* 可诱导 NSCLC 细胞发生形态学改变<sup>[17]</sup>, 但该形态学变化是否为其激活 EMT 通路的直接机制, 仍有待后续深入探究。同时, 临床分析发现 *METTL3* 在 NSCLC 中高表达, 且与患者不良预后相关, 提示 *METTL3* 可作为分子标志物用于诊断, 具有临床意义。

综上所述, 本研究基于 CRISPR/Cas9 系统利用动物模型进行体内筛选, 更加真实地模拟转移过程中的肿瘤微环境, 并首次系统性地揭示了 *METTL3* 是调控 NSCLC 骨转移的关键基因。实验证实 *METTL3* 通过上调靶基因 *EML4* 的表达, 进而促进 EMT 进程, 且其高表达与肺癌患者不良预后密切相关。同时, 本研究也存在一定的局限性: 首先, 裸鼠缺乏完整免疫系统, 无法完全模拟人体内肿瘤与免疫微环境的复杂互作, 未来需在免疫健全的小鼠模型中进一步验证; 其次, 机制研究主要在 H460 BM 细胞系中进行, 还需要在更多细胞模型及临床样本中验证本研究结论的普适性; 最后, *METTL3*/*EML4* 轴调控 EMT 的具体下游信号通路尚未被完全阐明。因此, 后续研究将在更多模型体系中验证本结论, 并深入探索 *METTL3*/*EML4* 轴调控 EMT 与转移的具体分子机制, 同时对筛选中发现的其他重要候选基因开展功能验证与机制探索, 从而为 NSCLC 骨转移的靶向治疗提供更坚实的理论依据。

### 参考文献 (References)

- 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 J Clin*, 2024, 74(3): 229-63.
- GERSTBERGER S, JIANG Q, GANESH K. Metastasis [J]. *Cell*, 2023, 186(8): 1564-79.
- MIAO D, ZHAO J, HAN Y, et al. Management of locally advanced non-small cell lung cancer: state of the art and future directions [J]. *Cancer Commun*, 2024, 44(1): 23-46.
- ZHAO M N, ZHANG L F, SUN Z, et al. A novel microRNA-182/interleukin-8 regulatory axis controls osteolytic bone metastasis of lung cancer [J]. *Cell Death Dis*, 2023, 14(5): 298.
- CHEN Y Y, WANG P P, FU Y, et al. Inferior outcome of bone metastasis in non-small-cell-lung-cancer patients treated with epidermal growth factor receptor inhibitors [J]. *J Bone Oncol*, 2021, 29: 100369.
- BARBIERI I, KOUZARIDES T. Role of RNA modifications in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2020, 20(6): 303-22.
- ZHANG L D, WEI J B, ZOU Z Y, et al. RNA modification systems as therapeutic targets [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2025(1): 59-78.
- LI Y, JIN H E, LI Q L, et al. The role of RNA methylation in tumor immunity and its potential in immunotherapy [J]. *Mol Cancer*, 2024, 23(1): 130.
- TANABE A, TANIKAWA K, TSUNETOMI M, et al. RNA helicase YTHDC2 promotes cancer metastasis via the enhancement of the efficiency by which *HIF-1 $\alpha$*  mRNA is translated [J]. *Cancer Lett*, 2016, 376(1): 34-42.
- HUANG H X, FANG L, ZHU C M, et al. YBX1 promotes 5-fluorouracil resistance in gastric cancer via m<sup>5</sup>C-dependent ATG9A mRNA stabilization through autophagy [J]. *Oncogene*, 2025, 44(28): 2357-71.
- MEI L, SHEN C, MIAO R, et al. RNA methyltransferase NSUN2 promotes gastric cancer cell proliferation by repressing p57<sup>Kip2</sup> by an m<sup>5</sup>C-dependent manner [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(4): 270.
- HU Y B, CHEN C B, TONG X Y, et al. NSUN2 modified by SUMO-2/3 promotes gastric cancer progression and regulates mRNA m<sup>5</sup>C methylation [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(9): 842.
- SUN Z, XUE S L, ZHANG M Y, et al. Aberrant NSUN2-mediated m<sup>5</sup>C modification of H19 lncRNA is associated with poor differentiation of hepatocellular carcinoma [J]. *Oncogene*, 2020, 39(45): 6906-19.
- WANG Z D, MIERXIATI A, ZHU W K, et al. FOXA1-dependent NSUN2 facilitates the advancement of prostate cancer by preserving TRIM28 mRNA stability in a m<sup>5</sup>C-dependent manner [J]. *NPJ Precis Oncol*, 2025, 9(1): 127.
- CUI H, ZHAO G L, LU Y W, et al. TIMER3: an enhanced resource for tumor immune analysis [J]. *Nucleic Acids Res*, 2025, 53(W1): W534-41.
- JIANG S, LI H Q, ZHANG L W Y, et al. Generic diagramming platform (GDP): a comprehensive database of high-quality biomedical graphics [J]. *Nucleic Acids Res*, 2025, 53(D1): D1670-6.
- WANG S Y, ZENG Y, ZHU L, et al. The N<sup>6</sup>-methyladenosine epitranscriptomic landscape of lung adenocarcinoma [J]. *Cancer Discov*, 2024, 14(11): 2279-99.
- AJONA D, ORTIZ-ESPINOSA S, MORENO H, et al. A Combined PD-1/C5a blockade synergistically protects against lung cancer growth and metastasis [J]. *Cancer Discov*, 2017, 7(7): 694-703.
- MAJOR P P, COOK R J, CHEN B L, et al. Survival-adjusted multiple-event analysis for the evaluation of treatment effects of zoledronic acid in patients with bone metastases from solid tumors [J]. *Support Cancer Ther*, 2005, 2(4): 234-40.
- CLEZARDIN P, COLEMAN R, PUPPO M, et al. Bone metastasis: mechanisms, therapies, and biomarkers [J]. *Physiol Rev*, 2021, 101(3): 797-855.
- ORSOLIC I, CARRIER A, ESTELLER M. Genetic and epigenetic defects of the RNA modification machinery in cancer [J]. *Trends Genet*, 2023, 39(1): 74-88.
- BAYLIN S B, JONES P A. Epigenetic determinants of cancer [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2016, 8(9): a019505.
- ESTEVE-PUIG R, BUENO-COSTA A, ESTELLER M. Writers, readers and erasers of RNA modifications in cancer [J]. *Cancer*

- Lett, 2020, 474: 127-37.
- [24] LIU Z Q, SHI M X, REN Y Q, et al. Recent advances and applications of CRISPR-Cas9 in cancer immunotherapy [J]. *Mol Cancer*, 2023, 22(1): 35.
- [25] HSU P D, LANDER E S, ZHANG F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering [J]. *Cell*, 2014, 157(6): 1262-78.
- [26] HU J, SANCHEZ-RIVERA F J, WANG Z H, et al. STING inhibits the reactivation of dormant metastasis in lung adenocarcinoma [J]. *Nature*, 2023, 616(7958): 806-13.
- [27] ZHANG X T, QIN N, JI F F, et al. RNA m<sup>1</sup>A methyltransferase TRMT61A promotes colorectal tumorigenesis by enhancing ONECUT2 mRNA stability and is a potential therapeutic target [J]. *Cancer Commun*, 2025, 45(12): 1616-44.
- [28] DUNN S, LOMBARDI O, LUKOSZEK R, et al. Oncogenic PIK3CA mutations increase dependency on the mRNA cap methyltransferase, RNMT, in breast cancer cells [J]. *Open Biol*, 2019, 9(4): 190052.
- [29] HARRIS A E, LOTHION-ROY J, THOMPSON R L, et al. Functional and clinical significance of the RNA m<sup>6</sup>A methyltransferase complex in breast cancer [J]. *NPJ Breast Cancer*, 2025, 11(1): 147.
- [30] LIN S B, CHOE J H, DU P, et al. The m<sup>6</sup>A methyltransferase METTL3 promotes translation in human cancer cells [J]. *Mol Cell*, 2016, 62(3): 335-45.
- [31] BARBIERI I, TZELEPIS K, PANDOLFINI L, et al. Promoter-bound METTL3 maintains myeloid leukaemia by m<sup>6</sup>A-dependent translation control [J]. *Nature*, 2017, 552(7683): 126-31.
- [32] VU L P, PICKERING B F, CHENG Y, et al. The N<sup>6</sup>-methyladenosine (m<sup>6</sup>A)-forming enzyme METTL3 controls myeloid differentiation of normal hematopoietic and leukemia cells [J]. *Nat Med*, 2017, 23(11): 1369-76.
- [33] CHEN M N, WEI L, LAW C T, et al. RNA N<sup>6</sup>-methyladenosine methyltransferase-like 3 promotes liver cancer progression through YTHDF2-dependent posttranscriptional silencing of SOCS2 [J]. *Hepatology*, 2018, 67(6): 2254-70.
- [34] CHAFFER C L, SAN JUAN B P, LIM E, et al. EMT, cell plasticity and metastasis [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2016, 35(4): 645-54.
- [35] SABIR S R, YEOH S, JACKSON G, et al. EML4-ALK variants: biological and molecular properties, and the implications for patients [J]. *Cancers*, 2017, 9(9): 118.