·肿瘤专栏·

WTAP介导的GRIA3异常表达促进胃癌发生

韩玉茗,刘艳玲,司 祎,于卫芳,刘 婷*
(河北医科大学第一医院胃肠病诊疗中心,河北 石家庄 050031)

[摘要] **目的** 明确Wilms瘤1相关蛋白(Wilms′ tumor 1-associated protein,WTAP)在体内对胃癌发病的作用,并筛选其在胃癌发病中的下游靶基因。**方法** 构建裸鼠异种移植瘤模型,在体内水平验证WTAP在胃癌发生中的作用。在WTAP敲低的HGC-27胃癌细胞中进行转录组测序并筛选WTAP的潜在下游靶基因。采用实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应(quantitative real-time PCR,qRT-PCR)检测谷氨酸离子型受体AMPA型亚基3(Glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 3,GRIA3)在36例胃癌患者癌组织及癌旁正常组织以及胃癌细胞系中的表达水平,通过免疫组织化学染色检测胃癌配对组织中GRIA3的蛋白表达水平。通过免疫荧光共染及qRT-PCR检测WTAP与GRIA3在胃癌细胞中的共定位及互作情况。通过细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8,CCK-8)及Transwell迁移实验探究GRIA3对胃癌细胞功能的影响。**结果** 在体实验显示,与对照组相比,WTAP敲低组肿瘤体积、重量及Ki-67表达水平均显著降低,差异有统计学意义(均$P<0.05$)。通过转录组测序、生物信息学分析及文献检索,初步筛选出GRIA3为WTAP的潜在下游靶基因,qRT-PCR结果显示,GRIA3在胃癌组织中的表达显著高于癌旁正常组织($P<0.05$),在胃癌细胞系中的表达亦明显高于正常胃黏膜上皮细胞(均$P<0.05$),免疫组织化学的结果提示其在胃癌组织中的表达亦高于癌旁正常组织($P=0.005$)。免疫荧光染色及qRT-PCR结果显示,WTAP主要在细胞核、细胞质中表达,GRIA3主要在细胞质、细胞膜中表达,WTAP与GRIA3在细胞质中存在明显的共定位,且GRIA3表达受WTAP调控。CCK-8及Transwell结果显示敲低GRIA3可抑制胃癌细胞的增殖、迁移能力。**结论** WTAP在体内可促进胃癌生长,GRIA3与WTAP在胃癌细胞中共定位并作为WTAP的下游靶基因在胃癌组织和细胞系中均高表达,敲低GRIA3可抑制胃癌细胞的增殖、迁移能力,二者在胃癌进展中可能发挥关键作用。

[关键词] 胃肿瘤;WTAP;GRIA3;肿瘤进展 doi:10.3969/j.issn.1007-3205.2026.08.002
[中图分类号] R735.2 [文献标志码] A [文章编号] 1007-3205(2026)08-0875-10

WTAP-mediated abnormal expression of GRIA3 promotes gastric carcinogenesis

HAN Yu-ming, LIU Yan-ling, SI Yi, YU Wei-fang, LIU Ting*
(*Gastroenterology Diagnosis and Treatment Center, the First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang* 050031, *China*)

[**Abstract**] **Objective** To clarify the role of Wilms' tumor 1-associated protein (WTAP) in the pathogenesis of gastric cancer (GC) *in vivo* and to screen for its downstream target genes in GC. **Methods** A nude mouse xenograft tumor model was established to validate the role of WTAP in GC tumorigenesis *in vivo*. Transcriptome sequencing was performed in WTAP-knockdown HGC-27 GC cells to screen for potential downstream target genes of WTAP. Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect the expression levels of glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 3 (GRIA3) in cancer tissues and adjacent normal tissues from 36 GC patients as well as in GC cell lines. Immunohistochemical staining was performed to assess GRIA3 protein expression in paired GC tissues. The co-localization and interaction between WTAP and GRIA3 in GC cells were examined by immunofluorescence co-staining and qRT-PCR. The effects of GRIA3 on the function of GC

[收稿日期]2026-01-26
[基金项目]河北省政府资助临床医学优秀人才培养项目(ZF2024134);河北省自然科学基金精准医学创新发展联合基金培育项目(H2025206524);河北省自然科学基金青年科学基金项目(C类)(H2025206172)
[作者简介]韩玉茗(1999—),女,河北张家口人,河北医科大学第一医院医师,医学硕士,从事消化内科相关疾病诊治研究。
*通信作者。E-mail: 59103696@hebmu.edu.cn

cells were investigated by cell counting kit-8 (CCK-8) and Transwell migration assays. **Results** In vivo experiments showed that compared with the control group, the WTAP-knockdown group exhibited significantly reduced tumor volume, weight, and Ki-67 expression levels, with statistical significance (all $P<0.05$). Through transcriptome sequencing, bioinformatics analysis, and literature review, GRIA3 was preliminarily identified as a potential downstream target gene of WTAP. qRT-PCR results revealed that GRIA3 expression was significantly higher in GC tissues than in adjacent normal tissues ($P < 0.05$), and also markedly higher in GC cell lines than in normal gastric mucosal epithelial cells (all $P<0.05$). Immunohistochemistry results indicated that GRIA3 protein expression was elevated in GC tissues compared with adjacent normal tissues ($P=0.005$). Immunofluorescence co-staining and qRT-PCR showed that WTAP was mainly expressed in the nucleus and cytoplasm, whereas GRIA3 was predominantly localized in the cytoplasm and cell membrane; clear co-localization of WTAP and GRIA3 was observed in the cytoplasm, and GRIA3 expression was regulated by WTAP. CCK-8 and Transwell migration assays confirmed that GRIA3 knockdown inhibited the proliferation and migration of GC cells. **Conclusion** WTAP promotes gastric cancer growth in vivo. GRIA3 colocalizes with WTAP in gastric cancer cells and serves as a downstream target gene of WTAP, showing high expression in both gastric cancer tissues and cell lines. Knockdown of GRIA3 inhibits the proliferation and migration of gastric cancer cells, suggesting that both may play critical roles in gastric cancer progression.

[**Key words**] stomach neoplasms; WTAP; GRIA3; tumor progression

胃癌在全球及我国范围内均属于高发且高致死率的恶性肿瘤，是严重威胁人类健康的重要公共卫生问题[1-2]。研究[3]表明，胃癌的发生和进展是一个多因素、多步骤参与的复杂过程，其核心机制涉及癌基因激活与抑癌基因失活的动态失衡，并受到遗传改变、表观遗传调控及环境暴露等多重因素的共同影响。其中，表观遗传学调控在胃癌发生发展中的作用日益受到关注。近年来，N6-甲基腺苷（N6-methyladenosine，m6A）RNA甲基化修饰作为真核mRNA中最常见、最丰富的内部修饰形式之一[4]，已成为肿瘤分子机制研究的重要热点。研究[5]显示，m6A修饰是由多种蛋白协同参与的动态可逆过程，主要包括甲基化转移酶、去甲基化酶和阅读蛋白3大类关键调控因子[6]，共同决定mRNA的剪接、稳定性、翻译及降解等生物学行为。Wilms瘤1相关蛋白（Wilms′ tumor 1-associated protein，WTAP）是m6A甲基化转移酶复合物的重要组成成分，被认为是该复合物的第三个核心因子。WTAP可作为桥接蛋白与甲基转移酶样蛋白3（methyltransferase-like 3，METTL3）和甲基转移酶样蛋白14相互作用，从而调控m6A甲基化修饰在RNA上的定位与沉积[7]。WTAP在多种人类恶性肿瘤中异常表达并参与肿瘤发生发展过程。然而，WTAP介导的m6A修饰在胃癌中的作用及其分子机制尚未完全阐明。课题组前期体外实验[8]已证实，WTAP在胃癌细胞中发挥显著促肿瘤作用：敲低WTAP可明显抑制胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力，而WTAP过表达则呈相反效应。基于上述研究基础，本文进一步从体内水平验证WTAP在胃癌发病中的作用，并系统探讨其下游靶基因在胃癌中的表达特征及其与WTAP之间的潜在调控关系。阐明WTAP及其下游靶基因在胃癌中的功能与机制，有望为揭示胃癌发生发展的分子基础及寻找新的诊疗靶点提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本研究选取2020—2023年于河北医科大学第一医院胃肠外科进行外科手术切除的胃癌患者36例，同时留取每例患者的胃癌组织及癌旁正常组织，所选取胃癌组织均由术后病理组织学证实为胃癌，所有癌旁正常组织均由术后病理组织学证实为正常胃组织。同时，所有患者均无其他恶性肿瘤病史，所有患者术前均未接受放化疗、靶向药物、免疫治疗。

本研究已获河北医科大学第一医院伦理委员会批准（批准文号：【2023】研审第S00961号）。

1.2 细胞株和主要试剂 胃癌细胞株（MKN74、HGC-27）、正常胃黏膜上皮细胞株（GES-1）均购自武汉诺普赛生物科技有限公司，经STR鉴定无污染。WTAP抗体、谷氨酸离子型受体AMPA型亚基3（glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 3，GRIA3）抗体购自中国Proteintech公司，荧光二抗购自上海碧云天生物技术有限公司，BALB/c裸鼠购自北京华阜康生物科技有限公司，GRIA3引物、WTAP引物购自生工生物工

程（上海）股份有限公司，胎牛血清、RPMI 1640培养基购自美国Gibco公司，1%青霉素—链霉素与G-418遗传霉素硫酸盐均购自北京索莱宝公司，Lipofectamine 2000购自美国Invitrogen公司，WTAP短发夹RNA（small hairpin RNA，shRNA）及GRIA3小干扰RNA（small interfering RNA）siRNA-GRIA3委托广州复能基因有限公司合成，CCK-8试剂购自南京诺唯赞公司，Transwell迁移小室购自美国康宁公司，4%多聚甲醛及结晶紫均购自北京索莱宝公司。

1.3　细胞培养、转染及稳株筛选　所用细胞（GES-1、MKN74、HGC-27）均在含10%胎牛血清、1%青霉素—链霉素的RPMI 1640培养基中培养，在37 ℃含5%二氧化碳的恒温恒湿培养箱中培养细胞。WTAP shRNA的有效序列为：GGCAAGTACACAGATCTTAAC。当细胞融合度达到80%～90%时，按照Lipofectamine 2000的说明书在HGC-27细胞中转染WTAP shRNA及siRNA-GRIA3，6 h后终止转染。在转染siRNA-GRIA3后进行后续CCK-8实验及Transwell迁移实验。在转染WTAP shRNA后48 h进行稳定敲低细胞株筛选：将细胞培养基替换为含有600 mg/L G-418的不含其他抗生素的培养基，待显微镜下观察到克隆形成时，将培养液中G-418浓度调整至300 mg/L，之后继续进行细胞培养直至第10天。后续进行WTAP表达水平检测以确认稳转株构建成功。

1.4　裸鼠皮下成瘤实验　从北京华阜康生物科技有限公司购入5周龄雄性BALB/c裸鼠10只，随机分为对照组和敲低组，每组5只。裸鼠饲养于无特定病原体（specific pathogen-free，SPF）级动物房，室温维持在约22 ℃，光/暗周期为12 h/12 h，自由摄取饮水和饲料。采用稳定转染shRNA-NC或shRNA-WTAP的HGC-27胃癌细胞建立对照组与WTAP敲低组模型，将细胞按5×10^6个/100 μL（RPMI-1640培养基）配制后，皮下注射于裸鼠左后肢侧。自接种后第4天起，每2天测量一次肿瘤长径与短径，并按公式V=长径×短径^2/2计算肿瘤体积。当肿瘤体积接近1 000 mm^{3}时处死裸鼠，取出肿瘤组织称重，并以10%中性福尔马林固定后进行石蜡包埋和切片，用于后续HE及免疫组织化学分析。

1.5　苏木精—伊红（hematoxylin and eosin，HE）染色　石蜡包埋组织切片置于60 ℃烤箱中烘烤过夜后备用。切片经二甲苯脱蜡，并依次通过无水乙醇及不同梯度乙醇溶液进行水化，随后用蒸馏水充分冲洗。切片置于苏木素染液中染色适当时间后，用自来水冲洗至流水变清，并进行分化及返蓝处理，使细胞核呈现清晰的蓝紫色。随后将切片置于伊红染液中复染，使细胞质及胞外基质呈现粉红色。染色完成后，切片经梯度乙醇脱水、二甲苯透明，最后采用中性树胶封片。于光学显微镜下观察组织形态学改变并进行拍照记录。

1.6　免疫组织化学染色　石蜡包埋的肿瘤组织标本连续切片，置于60 ℃烤箱中烘烤过夜备用。Ki-67与GRIA3作为检测指标，抗体工作浓度依据抗体说明书并结合相关文献及课题组前期预实验确定为1∶2 500及1∶500。石蜡切片经65 ℃烤片后，依次在二甲苯和不同梯度乙醇中进行脱蜡与水化，随后以蒸馏水及PBS缓冲液充分清洗。采用乙二胺四乙酸抗原修复液进行热修复，切片在高压条件下加热后自然冷却至室温，再以PBS缓冲液漂洗。随后滴加内源性过氧化物酶阻断剂，于室温孵育以阻断内源性过氧化物酶活性。切片加入Ki-67一抗与GRIA3一抗，4 ℃孵育过夜；次日回温后经PBS清洗，依次加入反应增强液及酶标二抗，在规定条件下孵育。采用DAB显色体系进行显色反应，显色完成后以自来水终止反应，并进行苏木素复染、分化及返蓝处理。切片经梯度乙醇脱水、二甲苯透明后，使用中性树胶封片。在光学显微镜下对染色结果进行观察与评估，采用双盲法，根据染色强度及阳性细胞比例进行半定量评分，并以两项评分乘积作为最终判定依据。

1.7　转录组测序　分别于转染shRNA-NC或shRNA-WTAP 24 h后收集HGC-27胃癌细胞，提取细胞总RNA。所有RNA样本经质量检测均无污染且浓度及完整性符合测序要求，分别归为对照组和敲低组。RNA文库构建及转录组测序委托华大基因股份有限公司（中国深圳）完成，采用DNBSEQ测序平台，共检测6个样本，每个样本平均获得约6.70 G的测序数据。原始测序数据首先经SOAPnuke软件进行质量控制，去除低质量及污染序列，筛选后数据质量达标（Q30≥90%）。随后利用HISAT2将高质量序列比对至参考基因组，并进行基因及转录本的表达定量分析。同时对转录组数据的整体特征进行评估，包括转录本覆盖度、随机性检验及基因组区域分布分析。基于二级质控后的数据，采用FPKM/TPM方法进行

基因表达量标准化，通过主成分分析（principal component analysis，PCA）及样本间相关性分析评估样本重复性与数据异质性，并使用DESeq2/edgeR算法筛选差异表达基因。差异表达基因的筛选阈值为：|log2差异倍数|>1，Q值<0.01。

1.8 实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应（quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction，qRT-PCR） 胃癌组织及胃癌细胞的总RNA提取均采用RNA-easy裂解液法完成。组织样本自-80 ℃冰箱取出后置于冰上，称重并剪取部分组织，加入RNA-easy裂解液及研磨珠，经低温组织研磨仪充分匀浆；细胞样本以PBS清洗后直接加入RNA-easy裂解液裂解。裂解液经加水稀释、离心、异丙醇沉淀、75%乙醇洗涤后获得RNA沉淀，空气干燥后以无菌去离子水溶解。采用紫外分光光度计检测RNA纯度和浓度，A260/280与A260/230均为1.8～2.2且浓度符合要求的样本用于后续实验。

按试剂盒说明书进行mRNA逆转录反应，反应体系中以Oligo（dT）为引物，将总RNA逆转录为cDNA，反应条件为37 ℃ 15 min、85 ℃ 5 s，反应结束后对cDNA进行稀释备用。qPCR采用SYBR Green体系进行，在反应体系中加入特异性引物及cDNA模板，于实时荧光定量PCR仪上进行扩增，反应条件为95 ℃预变性5 min，随后以95 ℃ 10 s、60 ℃ 1 min的反应条件进行45个循环。以β-actin作为内参基因，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$方法计算目标基因mRNA的相对表达量。所有实验均至少重复3次以验证结果的可靠性。

1.9 细胞免疫荧光染色 将HGC-27细胞接种于6孔板内铺有无菌盖玻片的孔中，置于培养箱中培养，待细胞充分贴壁（约24 h）后进行后续实验。取出6孔板，用PBS轻柔清洗3次。随后加入4%多聚甲醛固定细胞20 min，去除固定液后以PBS清洗。采用0.1% Triton X-100对细胞进行通透处理，室温孵育20 min后以PBS清洗。加入2%牛血清白蛋白（bovine serum albumin，BSA）封闭液于室温封闭30 min以减少非特异性结合。按1∶100比例分别稀释WTAP与GRIA3一抗并混合，将盖玻片倒扣于混合一抗液上，4 ℃避光孵育过夜。次日取出切片回温后以PBS清洗，随后加入按1∶500稀释并混合的荧光标记二抗（山羊抗兔及山羊抗鼠）室温避光孵育1 h。经PBS清洗后，采用DAPI对细胞核进行染色。最终使用抗荧光淬灭封片液封片。采用荧光显微镜观察并采集图像。结果判定中，WTAP蛋白阳性表达呈绿色荧光，GRIA3蛋白阳性表达呈红色荧光，DAPI标记的细胞核呈蓝色荧光，WTAP与GRIA3共定位区域呈黄色荧光。

1.10 CCK-8实验 各组细胞以每孔1×10^3个细胞的密度均匀接种于96孔板中，加入完全培养基进行培养。分别于接种后24、48、72及96 h，每孔加入10 μL CCK-8试剂，继续孵育2 h。使用Promega GloMax发光检测仪（Promega，麦迪逊，威斯康星州，美国）测定各孔在450 nm波长处的吸光度。

1.11 Transwell迁移实验 将3×10^4个细胞悬浮于200 μL无血清培养基中，加入Transwell装置的上室。下室加入700 μL完全培养基以诱导细胞向下迁移。培养48 h后，用棉签去除聚碳酸酯膜上室侧的细胞。将小室用PBS洗涤2次，然后以4%多聚甲醛固定30 min，再以0.1%结晶紫染色20 min。染色后再次用PBS洗涤以去除多余结晶紫。随机选取3个视野进行拍照，并使用Image J软件对染色细胞进行计数。

1.12 统计学方法 应用SPSS 27.0统计软件分析数据。符合正态分布的计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，比较采用t检验；非正态分布的计量资料以M（QR）表示，比较采用Wilcoxon秩和检验。多组间计量资料比较采用单因素方差分析、多因素方差分析、重复测量方差分析、SNK-q检验。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 敲低WTAP可在体内水平抑制胃癌的生长 为了在体内水平证实WTAP在胃癌发生中的作用，我们首先构建了稳定敲低WTAP及相应对照组胃癌细胞。qRT-PCR结果提示，与对照组相比，敲低组WTAP的表达水平降低，差异有统计学意义（$P<0.05$），见表1。随后将上述2组细胞分别

表1 对照组与敲低组稳转细胞株WTAP mRNA表达水平

Table 1 The expression levels of WTAP in the control group and the knockdown group of stable cell lines

（$n=6,\bar{x}\pm s$）

组别	WTAP mRNA相对表达量
对照组	1.001±0.049
敲低组	0.623±0.033
t值	9.083
P值	<0.001

注射至裸鼠皮下，建立肿瘤异种移植模型。结果发现相较于对照组，敲低组的瘤体体积更小（图1），组间、时点间、组间·时点间交互作用差异均有统计学意义（$P<0.05$），见表2，重量更轻，见表3。随后使用qRT-PCR的方法对瘤体组织中WTAP的表达水平进行检测，结果提示敲低组中WTAP的表达明显降低，差异均有统计学意义（$P<0.05$），见表4。HE染色结果显示皮下瘤组织形态结构紊乱（图2），免疫组织化学染色结果显示敲低WTAP后，瘤体内部增殖标志物Ki-67的表达水平也下降（图3、表5）。上述结果表明敲低WTAP可在体内抑制胃癌的生长。



图1　裸鼠荷瘤模型

Figure 1　Nude mouse tumor model

2.2　WTAP下游靶基因GRIA3在胃癌中高表达

为了进一步探究WTAP在胃癌发生中的作用机制，

表2　裸鼠肿瘤体积变化情况

Table 2　Changes in tumor volume in nude mice

（$n=6,\bar{x}\pm s,\mathrm{mm}^3$）

组别	第4天	第6天	第8天	第10天	第12天	第14天	第16天	第18天
对照组	18.90±4.47	36.94±8.67	56.27±14.50	84.39±21.90	145.76±30.78	254.19±37.00	489.42±99.40	696.97±110.52
敲低组	2.72±0.90	4.71±1.46	7.04±1.07	9.58±1.59	20.12±4.20	38.35±7.62	57.96±12.03	96.70±21.20
组间				F值=52.760	P值<0.001			
时点间				F值=88.230	P值<0.001			
组间·时点间				F值=32.150	P值<0.001			

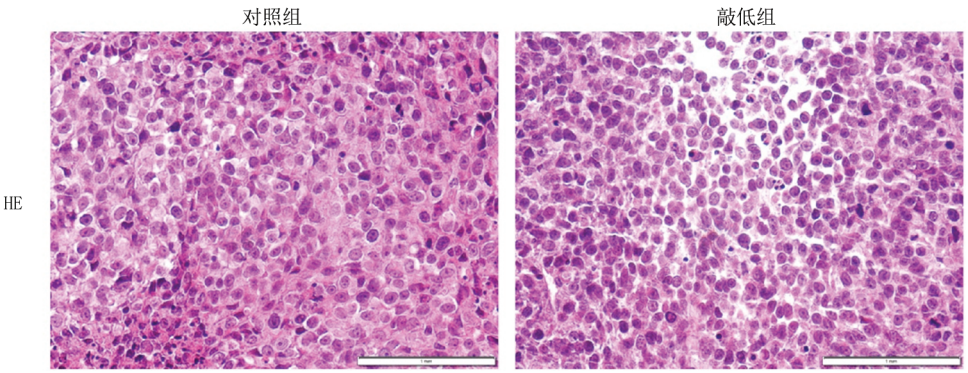


图2　裸鼠皮下瘤组织HE染色（×400）

Figure 2　HE staining of subcutaneous tumor tissues in nude mice（×400）

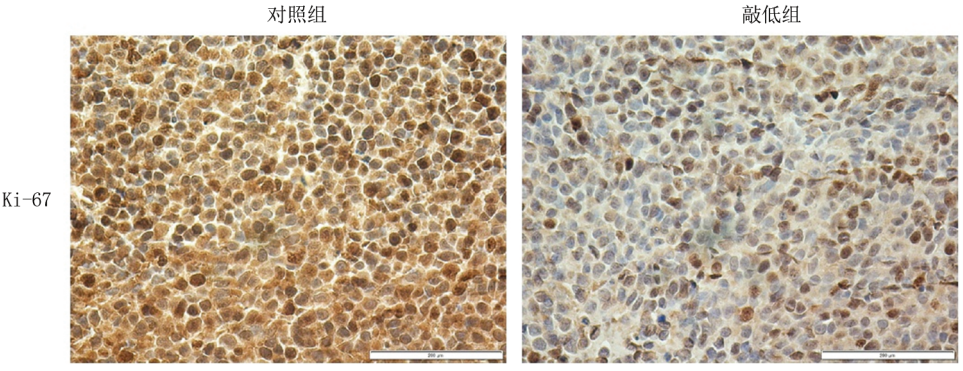


图3　裸鼠皮下瘤组织免疫组织化学染色（×400）

Figure 2　Immunohistochemical staining of subcutaneous tumor tissues in nude mice（×400）

表3　裸鼠肿瘤重量情况

Table 3　Tumor weight in nude mice

（n=6，$\bar{x}\pm s$，g）

组别	肿瘤重量
对照组	0.760±0.190
敲低组	0.082±0.021
t值	7.982
P值	＜0.001

表4　对照组与敲低组皮下瘤组织WTAP表达水平

Table 4　The expression levels of WTAP in the subcutaneous tumor tissues of the control group and the knockdown group

（n=6，$\bar{x}\pm s$）

组别	WTAP相对表达量
对照组	1.001±0.040
敲低组	0.529±0.010
t值	16.190
P值	＜0.001

表5　裸鼠瘤体组织免疫组织化学染色定量分析结果

Table 5　Quantitative analysis results of immunohistochemical staining of tumor tissues in nude mice

（n=6，$\bar{x}\pm s$，分）

组别	Ki-67免疫组织化学评分
对照组	7.833±1.344
敲低组	2.333±0.471
t值	8.636
P值	＜0.001

本研究在敲低WTAP前后的HGC-27细胞中进行转录组测序。测序结果显示，敲低WTAP前后共有299个基因的表达水平发生了显著变化，包括123个上调基因和176个下调基因（图4），而这176个下调的基因中有15个基因的差异倍数超过2倍（图5）。随后通过生信分析（NCBI：https：//www. ncbi. nlm. nih. gov/，GEPIA2：http：//gepia2. cancer-pku. cn/，GeneCards：https：//www. genecards. org/）、文献查阅等综合分析，筛选出WTAP下游的3个潜在靶基因：CDH10、GRIA3、RIMS4（图5）。最后进一步在胃癌组织

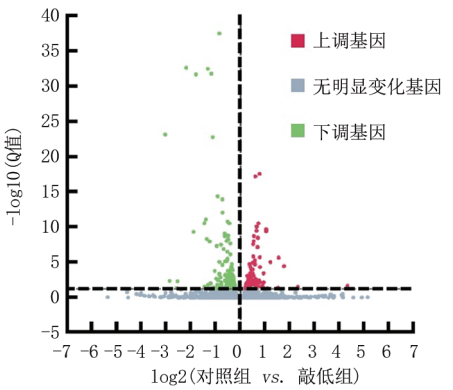


图4　差异表达基因火山图

Figure 4　Volcano plot of differentially expressed genes

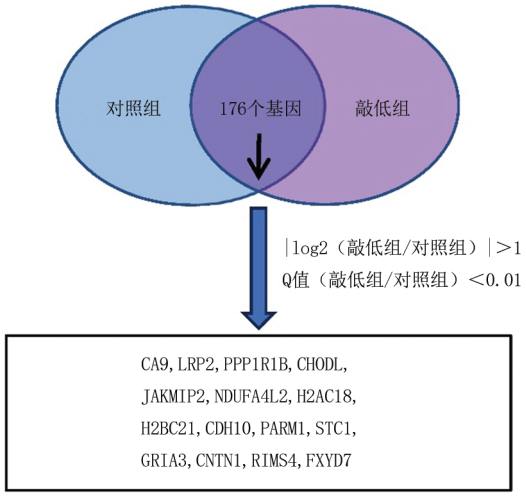


图5　敲低组显著下调基因及候选靶基因

Figure 5　Significantly downregulated genes and candidate target genes in the knockdown group

及细胞中对三者的表达水平进行检测，结果显示仅GRIA3在胃癌细胞（HGC-27、MKN74）及胃癌组织中的mRNA表达水平均升高，差异有统计学意义（P<0.05），见表6、表7。基于TCGA-

表6　GES-1、HGC-27、MKN74细胞中GRIA3 mRNA相对表达量

Table 6　The relative expression levels of GRIA3 mRNA in GES-1, HGC-27, and MKN74 cells

（n=3，$\bar{x}\pm s$）

组别	GRIA3 mRNA相对表达量
GES-1组	1.005±0.120
HGC-27组	548.581±19.346*
MKN74组	1.290±0.117#
F值	958.700
P值	＜0.0001

*P值＜0.05与GES-1组比较　#P值＜0.05与HGC-27组比较（SNK-q检验）

STAD队列的生存分析曲线显示GRIA3高表达组胃癌患者的生存率明显低于低表达组（图6）。胃癌配对组织的免疫组织化学染色也提示，GRIA3蛋白在胃癌组织中的表达显著高于癌旁正常组织（图7、表8）。因此，本研究将GRIA3初步确定为WTAP的潜在下游靶基因。

表7　人胃癌及癌旁正常组织中GRIA3的mRNA表达水平

Table 7　The mRNA expression level of GRIA3 in human gastric cancer tissues and adjacent normal tissues

（n=36，$\bar{x}\pm s$）

组别	GRIA3表达水平
胃癌组织	2.453±0.693
癌旁正常组织	1.054±0.136
t值	11.710
P值	＜0.001

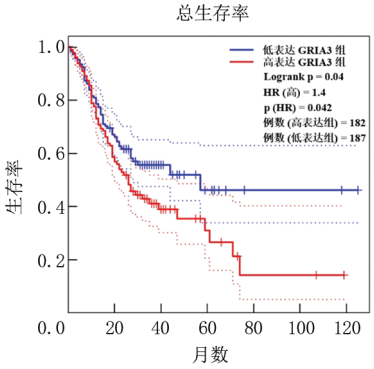


图6　高、低表达GRIA3胃癌患者生存曲线

Figure 6　Survival curves of gastric cancer patients with high and low expression of GRIA3

表8　胃癌配对样本中GRIA3免疫组织化学染色定量分析结果

Table 8　Quantitative analysis results of GRIA3 immunohistochemical staining in paired samples of gastric cancer

（n=5，$\bar{x}\pm s$，分）

组别	GRIA3免疫组织化学评分
癌旁正常组织	2.333±0.471
胃癌组织	7.667±1.247
t值	5.657
P值	0.005

2.3　WTAP与GRIA3在胃癌细胞中存在共定位　为了进一步探究WTAP与GRIA3是否存在相互作用，本研究在野生型HGC-27胃癌细胞进行WTAP与GRIA3的免疫荧光染色，结果显示WTAP主要在细胞核、细胞质中表达，GRIA3主要在细胞质与细胞膜中表达，且二者存在共定位（图8）。上述结果提示WTAP可能与GRIA3在胃癌细胞中存在相互作用关系。

2.4　GRIA3表达受WTAP调控　在WTAP与GRIA3存在共定位的基础上，为了进一步探究GRIA3表达是否受到WTAP的调控，设计并进行了qRT-PCR实验。结果提示，当HGC-27细胞中WTAP的表达水平下调之后，GRIA3的表达水平也随之下调（表9），说明在胃癌细胞中，WTAP与GRIA3不仅存在空间上的共定位关系，而且二者之间还存在着上下游的调控关系。

2.5　敲低GRIA3可抑制胃癌细胞的增殖、迁移能力　为进一步探究GRIA3在胃癌进展中扮演何种角色，本研究进行了敲低GRIA3后的细胞功能实验。首先，qRT-PCR结果提示，siRNA-GRIA3-1916序列对GRIA3的敲低效率最佳（表10）。因此选定其用于后续细胞功能实验验证。CCK-8实验的结果表明，当胃癌细胞系HGC-27中GRIA3的表达水平下降之后，细胞的增殖能力受到抑制（表11）。Transwell迁移实验的结果表明，当敲低GRIA3后，胃癌细胞的迁移能力亦受到抑制（图9、表12），即敲低胃癌细胞中GRIA3可抑制细胞的增殖、迁移能力。

3　讨　论

近年来，随着我国消化道肿瘤精准筛查和规范化诊疗体系的不断完善，胃癌的早诊早治水平显著提高。然而，晚期胃癌患者的总体生存率和预后仍不理想，依然构成重要的公共卫生问题[9]。当前，胃癌的发生发展机制尚未完全阐明，其过程受多种因素共同调控，包括癌基因激活与抑癌基因失活的动态失衡、遗传与表观遗传异常以及

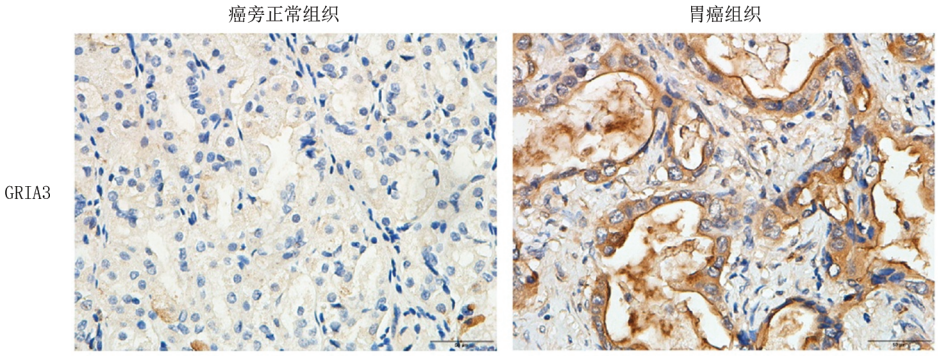


图7　胃癌配对样本中GRIA3免疫组织化学染色（×400）

Figure 7　Immunohistochemical staining of GRIA3 in paired samples of gastric cancer

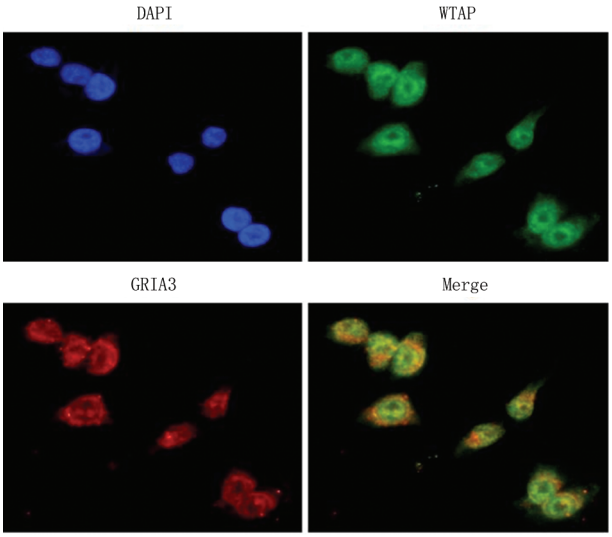


图8　WTAP与GRIA3在胃癌细胞中存在共定位(×400)

Figure 8　Co-localization of WTAP and GRIA3 in gastric cancer cells

表9　qRT-PCR检测WTAP、GRIA3 mRNA相对表达量

Table 9　Detection of relative expression levels of WTAP and GRIA3 mRNA by qRT-PCR

(n=3,$\bar{x}\pm s$,)

组别	WTAP mRNA相对表达量	GRIA3 mRNA相对表达量
对照组	1.000±0.014	1.000±0.027
敲低组	0.381±0.003	0.541±0.008
t值	59.820	23.170
P值	<0.001	<0.001

表10　siRNA-GRIA3序列筛选

Table 10　siRNA-GRIA3 sequence screening

(n=3,$\bar{x}\pm s$)

组别	GRIA3 mRNA相对表达量
si-NC组	1.000±0.009
si-GRIA3-647组	0.504±0.005*
si-GRIA3-806组	0.456±0.017*
si-GRIA3-1417组	0.408±0.005*
si-GRIA3-1916组	0.365±0.011*
F值	1 264.000
P值	<0.001

*P值<0.05与si-NC组比较(SNK-q检验)

环境因素等。其中，表观遗传调控中的m6A RNA修饰因其在调控mRNA稳定性、剪接、翻译和降解等方面的重要作用，已成为近年来包括胃癌在内多种恶性肿瘤研究的热点[10]。m6A修饰主要由甲基化转移酶、去甲基化酶和阅读蛋白3类关键因子协同调控[11]。

WTAP是m6A甲基转移酶复合物的重要组成部分，在多种恶性肿瘤中被证实具有促癌作用。既往研究[12]表明，WTAP在原发性肝细胞癌中高表达，并可在体内外促进肝癌细胞生长，其表达水平与患者生存密切相关，可能作为潜在的独立预后因子；在鼻咽癌中，WTAP表达明显升高，且其过表达与不良预后相关[13]；在结直肠癌中，WTAP不仅促进肿瘤细胞增殖并抑制凋亡，还可通过介导FLNA的m6A修饰和转录后调控发挥促癌作用[14]；此外，WTAP与YTHDC1协同调控血管内皮生长因子，从而促进结直肠癌血管生成和肿瘤进展[15]。以上研究均提示WTAP在多种恶性肿瘤中具有关键的促癌功能。然而，WTAP介导的m6A修饰在胃癌发生发展中的具体分子机制仍有待进一步阐明。本研究团队前期体外实验[8]已证实WTAP在胃癌中发挥促肿瘤作用，本研究进一步通过裸鼠成瘤实验验证了WTAP在体内亦可促进胃癌生长。通过对WTAP敲低胃癌细胞进行转录组测序并结合生物信息学分析、文献检索等综合分析，本研究初步筛选出GRIA3作为WTAP的潜在下游靶基因。

谷氨酸是中枢神经系统中最主要的兴奋性神经递质，其通过Ca^{2+}依赖性释放并与不同类型受体结合，从而介导多种细胞内信号转导过程[16]。谷氨酸受体主要分为离子型和代谢型两大类，其中离子型谷氨酸受体包括N-甲基-d-天冬氨酸受体（N-methyl-D-aspartate receptors，NMDAR）、氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑丙酸酯受体（alpha-amino-3-hydroxy-5-methy14-isoxazolepropionic acid receptors，AMPAR）和红藻氨酸盐型受体（kainate receptors，KAR）3种亚型[17]。离子型谷氨酸受体及其亚基的异常表达在肿瘤细胞增殖、侵袭和迁移中发挥重要作用。例如，在胶质瘤中，敲低AMPAR亚基GluR1可抑制肿瘤细胞增殖，而敲低GluR2则相反[18-19]；在KAR相关研究[20]中，GRIK3在胃癌中高表达，并与患者不良预后密切相关，是预测胃癌预后的独立因素；在NMDAR相关研究[21-23]中，NR2A可抑制胃癌细胞增殖，而GRINA在结直肠癌和胃癌中均呈高表达状态，并通过激活磷脂酰肌醇3-激酶（phosphatidylinositol 3-kinase，PI3K）/蛋白激酶B（protein kinase B，Akt）/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白（mammalian target of rapamycin，mTOR）通路和糖酵解促进肿瘤进展。

GRIA3编码AMPA型谷氨酸受体亚基之一，主要定位于细胞质膜[24]。既往研究[25]显示，AMPA受体过表达可显著促进胶质瘤细胞的迁移

表11　CCK-8实验检测GRIA3对胃癌细胞增殖能力影响

Table 11　The CCK-8 assay assessing the effect of GRIA3 on the proliferation ability of gastric cancer cells

（n=4，$\bar{x}\pm s$）

组别	24 h	48 h	72 h	96 h
对照组	0.102±0.003	0.295±0.001	0.822±0.058	1.426±0.052
敲低GRIA3组	0.047±0.002	0.152±0.006	0.376±0.032	0.806±0.013
组间		F值=648.800	P值<0.001	
时点间		F值=1 398.000	P值<0.001	
组间·时点间		F值=111.800	P值<0.001	

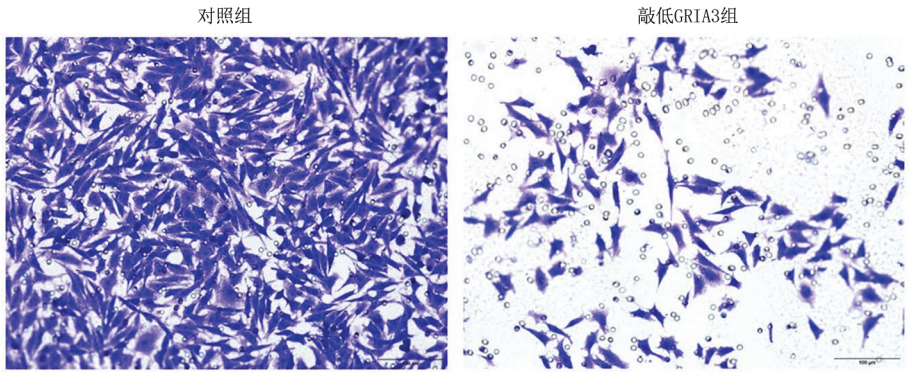


图9　Transwell迁移实验检测GRIA3对胃癌细胞增殖能力影响（×200）

Figure 9　Transwell migration assay assessing the effect of GRIA3 on the migration ability of gastric cancer cells

表12　Transwell迁移实验定量分析结果

Table 12　Quantitative analysis results of the Transwell migration assay

（n=3，$\bar{x}\pm s$，个）

组别	每200×视野迁移细胞数量
对照组	820.000±26.191
敲低GRIA3组	224.333±22.096
t值	24.580
P值	<0.001

和增殖，但GRIA3在胃癌中的作用尚缺乏系统研究。本研究显示，GRIA3在胃癌组织及胃癌细胞系中显著高表达，且公共数据库分析显示GRIA3高表达患者的生存率明显降低，提示GRIA3可能在胃癌中发挥促肿瘤作用。进一步的免疫荧光共定位实验显示，WTAP与GRIA3在胃癌细胞中主要共定位于细胞膜和细胞质，这一空间分布特征为二者可能存在功能关联提供了重要依据。qRT-PCR结果提示GRIA3的表达受到WTAP的调控，后续的细胞功能实验则提示GRIA3可显著影响胃癌细胞的增殖、迁移能力，提示WTAP-GRIA3轴在胃癌进展中可能发挥关键作用。

当然，本研究仍存在一定局限性：尚未通过免疫共沉淀、功能补救等实验进一步证实WTAP与GRIA3之间的直接调控关系。上述问题将在后续研究中进一步深入探讨，以增强研究结论的严谨性和说服力。

综上所述，本研究证实WTAP在体内具有显著促癌作用，GRIA3在胃癌组织和细胞中高表达，并与WTAP呈共定位关系，且其表达受WTAP调控。GRIA3的表达水平可影响胃癌的增殖、迁移能力，提示两者在胃癌进展中可能发挥关键作用。本研究从m6A表观遗传调控与谷氨酸受体信号通路的交叉层面，为阐明胃癌分子机制提供了新的理论依据和研究方向。

[参考文献]

[1] Han B, Zheng R, Zeng H, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2022[J]. J Natl Cancer Cent, 2024, 4(1): 47-53.

[2] Sundar R, Nakayama I, Markar SR, et al. Gastric cancer[J]. Lancet, 2025, 405(10494): 2087-2102.

[3] Li P, Huang Y, Jiang W, et al. Gastric cancer occurrence and heterogeneity: Integration of clinical data, multi-omics and tumor microenvironment[J]. Future Oncol, 2026, 22(6): 741-754.

[4] Fu Y, Dominissini D, Rechavi G, et al. Gene expression regulation mediated through reversible m6A RNA methylation[J]. Nat Rev Genet, 2014, 15(5): 293-306.

[5] Jia G, Fu Y, Zhao X, et al. N6-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO[J]. Nat Chem Biolo, 2011, 7(12): 885-887.

[6] Stoilov P, Rafalska I, Stamm S. YTH: A new domain in nuclear proteins[J]. Trends Biochem Sci, 2002, 27(10):

495-497.

[7] Liu J, Yue Y, Han D, et al. A METTL3-METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N6-adenosine methylation [J]. Nat Chem Biolo, 2014, 10(2): 93-95.

[8] Han S, Jiang H, Wang J, et al. WTAP-mediated N6-methyladenosine modification promotes gastric cancer progression by regulating MAP2K6 expression[J]. J Cancer, 2025, 16(5): 1420-1437.

[9] Patel AK, Sethi NS, Park H. Gastric cancer: A review[J]. JAMA, 2026, 335(5): 439-450.

[10] Chen Q, Lu H, Li D, et al. RNA m(6)A modification is a driver and therapeutic target in gastric cancer [PP/OL]. Cell Biol Toxicol, 42(1): 53.

[11] Li P, Fang X, Huang D. Exploring m6A modifications in gastric cancer: From molecular mechanisms to clinical applications[J]. Eur J Med Res, 2025, 30(1): 98.

[12] 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.

[13] Li ZX, Zheng ZQ, Yang PY, et al. WTAP-mediated m(6)A modification of lncRNA DIAPH1-AS1 enhances its stability to facilitate nasopharyngeal carcinoma growth and metastasis [J]. Cell Death Differ, 2022, 29(6): 1137-1151.

[14] Huang L, Shao J, Xu X, et al. WTAP regulates autophagy in colon cancer cells by inhibiting FLNA through N6-methyladenosine[J]. Cell Adh Migr, 2023, 17(1): 1-13.

[15] Ye M, Chen J, Yu P, et al. WTAP activates MAPK signaling through m6A methylation in VEGFA mRNA-mediated by YTHDC1 to promote colorectal cancer development [J]. FASEB J, 2023, 37(8): e23090.

[16] de Groot J, Sontheimer H. Glutamate and the biology of gliomas[J]. Glia, 2011, 59(8): 1181-1189.

[17] 李淑兰, 刘凤莲, 王学斌, 等. 谷氨酸及其受体在脑内的存在作用与谷氨酸的神经毒性[J]. 中国临床康复, 2004, 8(22): 4553-4555.

[18] de Groot JF, Piao Y, Lu L, et al. Knockdown of GluR1 expression by RNA interference inhibits glioma proliferation [J]. J Neurooncol, 2008, 88(2): 121-133.

[19] Beretta F, Bassani S, Binda E, et al. The GluR2 subunit inhibits proliferation by inactivating Src-MAPK signalling and induces apoptosis by means of caspase 3/6-dependent activation in glioma cells[J]. Eur J Neurosci, 2009, 30(1): 25-34.

[20] Gong B, Li Y, Cheng Z, et al. GRIK3: A novel oncogenic protein related to tumor TNM stage, lymph node metastasis, and poor prognosis of GC[J]. Tumour Biol, 2017, 39(6): 1010428317704364.

[21] Yan Z, Li P, Xue Y, et al. Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate-associated protein 1 promotes colorectal cancer cell proliferation and metastasis, and is negatively regulated by miR-296-3p [J]. Mol Med Rep, 2021, 24(4): 700.

[22] Xu DH, Li Q, Hu H, et al. Transmembrane protein GRINA modulates aerobic glycolysis and promotes tumor progression in gastric cancer[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2018, 37(1): 308.

[23] Watanabe K, Kanno T, Oshima T, et al. The NMDA receptor NR2A subunit regulates proliferation of MKN45 human gastric cancer cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 367(2): 487-490.

[24] Mayer ML. Glutamate receptor ion channels[J]. Curr Opin Neurobiol, 2005, 15(3): 282-288.

[25] Ishiuchi S. [New roles of glutamate receptors in glias and gliomas][J]. Brain Nerve, 2009, 61(7): 753-764.

（本文编辑：何祯）