·论著·

METTL3介导Cry2 m^{6}A甲基化修饰促进人肝细胞癌Huh-7细胞乐伐替尼耐药

张喜华[1],何前进[1],郝泉水[2],李珊[2],李秀芳[2]
(黄冈市中心医院 1.肝胆外科;2.麻醉科,湖北 黄冈 438000)

摘要 目的 探讨隐花色素蛋白2(Cry2)及其N6-甲基腺苷(m^{6}A)甲基化修饰在人肝细胞癌(HCC)细胞乐伐替尼耐药中的作用。**方法** 体外培养人HCC细胞系Huh-7及其乐伐替尼耐药细胞株(Huh-7/LR)。向Huh-7/LR细胞中转染si-Cry2、oe-Cry2、si-甲基转移酶样蛋白3(METTL3)、oe-METTL3以及干扰阴性对照(si-NC)和过表达空载(Vector)质粒,将未转染质粒的Huh-7/LR细胞作为对照。采用MTT法检测细胞对乐伐替尼的药物敏感性;流式细胞术检测各组细胞凋亡率;比色法检测细胞中RNA m^{6}A甲基化水平;甲基化RNA免疫共沉淀法检测各组细胞中Cry2 RNA m^{6}A甲基化水平;实时定量PCR和Western blotting检测各组细胞中*Cry2*和*METTL3* mRNA和蛋白表达水平。**结果** 与Huh-7比较,Huh-7/LR细胞对乐伐替尼的敏感性显著降低($P<0.05$),耐药指数为6.320;同时,Huh-7/LR细胞中*Cry2* mRNA和蛋白表达水平较Huh-7细胞显著降低($P<0.01$),m^{6}A甲基化水平和METTL3蛋白表达水平显著升高(均$P<0.05$)。过表达Cry2可显著增强Huh-7/LR细胞对乐伐替尼的敏感性,并促进细胞凋亡(P均<0.05)。沉默*METTL3*可显著降低Huh-7/LR细胞Cry2 m^{6}A甲基化水平($P<0.01$),上调*Cry2* mRNA和蛋白表达水平,提高Huh-7/LR细胞对乐伐替尼的敏感性,促进细胞凋亡(P均<0.05),*METTL3*过表达则呈现相反的作用结果。然而,沉默*Cry2*可显著逆转*METTL3*基因沉默对Huh-7/LR细胞乐伐替尼的增敏作用($P<0.05$)。**结论** METTL3介导Cry2 m^{6}A甲基化水平升高导致Cry2表达下调,进而促进人HCC细胞乐伐替尼耐药。

关键词 肝细胞癌;乐伐替尼;隐花色素蛋白2;N6-甲基腺苷甲基化;耐药
中图分类号 R735.7 **文献标志码** A **文章编号** 0258-4646(2026)05-0416-07
网络出版地址 https://link.cnki.net/urlid/21.1227.R.20260515.1537.012
DOI:10.12007/j.issn.0258-4646.2026.05.006

METTL3-mediated Cry2 m^{6}A methylation modification promotes lenvatinib resistance in human hepatocellular carcinoma Huh-7 cells

ZHANG Xihua[1], HE Qianjin[1], HAO Quanshui[2], LI Shan[2], LI Xiufang[2]
(1. Department of Hepatobiliary Surgery, Huanggang Central Hospital, Huanggang 438000, China; 2. Department of Anesthesiology, Huanggang Central Hospital, Huanggang 438000, China)

Abstract Objective To investigate the effects of cryptochrome 2 (Cry2) and its N6-methyladenosine (m^{6}A) methylation modification on lenvatinib resistance in human hepatocellular carcinoma (HCC) cells. **Methods** Human HCC cell line Huh-7 and its lenvatinib-resistant cells (Huh-7/LR) were cultured in vitro. si-Cry2, oe-Cry2, si-methyltransferase-like protein 3 (METTL3), oe-METTL3 interference negative control (si-NC), and empty overexpression vector (Vector) plasmids were transfected into Huh-7/LR cells. The control group consisted of Huh-7/LR cells that were not transfected with the plasmid. The drug sensitivity of each group was assessed using the MTT assay. The rate of apoptosis in each group was determined by flow cytometry. The methylation level of RNA m^{6}A in the cells was detected using colorimetry. The m^{6}A methylation levels of Cry2 in each group were analyzed using the methylation RNA immunoprecipitation method. The mRNA and protein expression levels of Cry2 and METTL3 in each group were measured by real-time quantitative PCR and Western blotting, respectively. **Results** When compared to Huh-7 cells, the sensitivity of Huh-7/LR cells to lenvatinib was found to be significantly decreased ($P<0.05$), resulting in a drug resistance index of 6.320. Simultaneously, there was a significant decrease seen in the mRNA and protein expression levels of Cry2 in these cells ($P<0.01$). Additionally, the methylation level of RNA m^{6}A and protein expression level of METTL3 were significantly elevated ($P<0.05$). Overexpression of *Cry2* significantly augmented the sensitivity of the Huh-7/LR cells to lenvatinib and facilitated apoptosis (all $P<0.05$). Silencing *METTL3* notably attenuated the methylation of Cry2 m^{6}A in Huh-7/LR cells ($P<0.01$), upregulated the mRNA and protein expression levels of Cry2, increased the sensitivity of Huh-7/LR cells to lenvatinib, and

基金项目:湖北省卫生健康委科研项目(WJ2021M086)
作者简介:张喜华(1984-),男,主治医师,硕士.
通信作者:李秀芳,E-mail:583922508@qq.com
收稿日期:2025-02-21
网络出版时间:2026-05-18 16:11:26

promoted apoptosis (all $P < 0.05$). Conversely, overexpressing *METTL3* exerted an opposing effect. However, silencing *Cry2* effectively reversed the sensitizing effect of *METTL3* silencing to lenvatinib in Huh-7/LR cells. **Conclusion** METTL3 facilitates the elevation of Cry2 m^{6}A methylation levels, thus resulting in the downregulation of Cry2 expression and consequently promoting resistance to lenvatinib in human HCC cells.

Keywords hepatocellular carcinoma; lenvatinib; cryptochrome 2; N6-methyladenosine; drug resistance

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)早期症状隐匿,多数患者在确诊时已发展为局部晚期肿瘤或出现远端转移[1-2]。分子靶向药物是晚期HCC患者的主要治疗手段[2-3]。乐伐替尼是一种多靶点受体酪氨酸激酶抑制剂,属于HCC一线靶向药物[4]。然而,HCC患者对乐伐替尼耐药的现象越来越常见[5]。N6–甲基腺苷(N6-methyladenosine, m^{6}A)甲基化是一种真核生物常见的RNA修饰方法。RNA m^{6}A甲基化对RNA代谢的调控异常与人类恶性肿瘤耐药有关[6]。有研究[7]显示,m^{6}A甲基化修饰在HCC靶向药物耐药细胞中上调,抑制相关基因的m^{6}A甲基化水平可提高细胞的药物敏感性。隐花色素蛋白2(cryptochrome 2, Cry2)是生物钟基因家族的核心成员之一[8],其在HCC组织中的表达下调,并与患者的低生存率相关[9]。过表达Cry2可抑制HCC细胞HepG2的增殖[10]。然而,Cry2是否参与调节HCC靶向药耐药尚不明确。因此,本研究旨在探讨Cry2的m^{6}A甲基化水平与HCC乐伐替尼耐药细胞药物敏感性之间的关系,以期为临床HCC患者克服乐伐替尼耐药问题提供潜在治疗靶点。

1　材料与方法

1.1　细胞和主要试剂

人HCC细胞系Huh-7购自中国科学院分子细胞科学卓越创新中心;乐伐替尼耐药细胞株(lenvatinib resistance Huh-7, Huh-7/LR)购自中国典型培养物保藏中心。乐伐替尼(美国Med Chem Express公司),DMEM高糖培养基、胎牛血清(美国Gibco公司),噻唑蓝(methyl thiazol tetrazolium, MTT)试剂盒(北京索莱宝科技有限公司),lipofectamine 2000(美国Invitrogen公司),Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒(上海碧云天生物技术股份有限公司),EpiQuik m^{6}A RNA Methylation Quantification Kit(美国Epigentek公司),m^{6}A甲基化RNA免疫沉淀试剂盒(广州锐博生物技术有限公司),逆转录试剂盒、qPCR SYBR Green Master Mix[翌圣生物科技(上海)股份有限公司],兔抗人Cry2抗体、兔抗人甲基转移酶样蛋白(methyltransferase-like protein, METTL)3抗体、兔抗人METTL14抗体、兔抗人Wilms瘤1相关蛋白(Wilms' tumor 1-associating protein, WTAP)抗体、兔抗人病毒样m^{6}A相关甲基转移酶(vir like m^{6}A methyltransferase associated, VIRMA)抗体、兔抗人甘油醛–3–磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)(英国abcam公司)。Cry2干扰质粒(si-Cry2)和过表达质粒(oe-Cry2)、METTL3干扰质粒(si-METTL3)和过表达质粒(oe-METTL3)以及对应阴性对照质粒均由上海吉玛制药技术有限公司提供。

1.2　细胞转染及分组

采用含10%胎牛血清DMEM高糖培养基培养Huh-7细胞和Huh-7/LR细胞。转染前,将Huh-7/LR细胞接种于6孔细胞培养板中培养至细胞汇合度达到75%左右,采用无血清培养基分别稀释质粒和lipofectamine 2000转染试剂,分别将si-Cry2、oe-Cry2、si-METTL3、oe-METTL3以及干扰阴性对照(si-NC)和过表达空载(Vector)质粒和转染试剂混合后,加入至细胞中混匀,将细胞分为Vector组、oe-Cry2组、oe-METTL3组、si-NC组、si-METTL3组、si-Cry2组和si-Cry-2+si-METTL3组,另将未经转染的Huh-7/LR细胞设置为对照组。继续培养48 h后,采用实时定量PCR和Western blotting检测转染效率。

1.3　MTT

将细胞以3×10^3/孔的密度接种于96孔细胞培养板中,采用不同浓度(0、0.5、1、5、10、20、40、60、80 μmol/L)的乐伐替尼处理各组细胞48 h,随后加入10 μL MTT溶液避光孵育2 h,再加入100 μL二甲基亚砜低速震荡10 min,在酶标仪上490 nm波长处测定吸光度(absorbance, A)值,计算细胞增殖抑制率、半数抑制浓度(50% inhibitor concentration, IC_{50})和耐药指数(resistance index, RI)。细胞增殖抑制率(%)=(1–$A_{加药孔}/A_{不加药孔}$) × 100,再根据细胞增殖抑制率计算

IC_{50}值；RI=耐药细胞IC_{50}值/亲本细胞IC_{50}值。

1.4　流式细胞术

将细胞以1×10^4/孔的密度接种于6孔细胞培养板中，加入或不加入1 μmol/L乐伐替尼干预细胞48 h。收集细胞，加入200 μL Annexin V-FITC和10 μL碘化丙啶染色液避光孵育20 min，置于流式细胞仪中检测各组细胞凋亡率。

1.5　比色法

采用TRIzol提取细胞总RNA。根据试剂盒说明书操作，向检测孔中加入80 μL结合缓冲液和1 μL总RNA，混匀后于37 ℃中密封孵育90 min。利用试剂盒里的试剂设置阴性对照孔和阳性对照孔。洗涤细胞，依次加入50 μL捕获抗体和50 μL检测抗体进行孵育。再加入50 μL增强剂和100 μL显影剂显影。最后，在酶标仪上检测450 nm波长处的A值。RNA m^6A甲基化水平(%)=[($A_{样本孔}-A_{阴性对照孔}$)/200]/[($A_{阳性对照孔}-A_{阴性对照孔}$)/2] × 100。

1.6　实时定量PCR

采用TRIzol提取细胞总RNA，采用逆转录试剂盒将总RNA逆转录合成cDNA。采用qPCR SYBR Green Master Mix进行扩增检测：95 ℃ 10 min，95 ℃ 15 s，60 ℃ 20 s，72 ℃ 30 s，40个循环。引物序列如下：*Cry2*，正向5'-GACGTGGGTAAGAGATCCGC-3'，反向5'-ATG TAAGGGGTGGCTTCTGC-3'；*METTL3*，正向5'-AGATGGGGTAGAAAGCCTCCT-3'，反向5'-TGGTCAGCATAGGTTACAAGAGT-3'；*GAPDH*，正向5'-ACAACTTTGGTAT CGTGGAAGG-3'，反向5'-GCCATCACGCCACAGTTTC-3。以*GAPDH*为内参，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算细胞中*METTL3*和*Cry2* mRNA相对表达量。

1.7　甲基化RNA免疫沉淀法

根据试剂盒说明书操作，采用TRIzol提取各组细胞总RNA，随后进行片段化处理。采用抗m^6A抗体制备抗m^6A磁珠，与片段化的RNA充分混匀2 h。利用磁力架收集磁珠，然后洗脱和回收m^6A甲基化富集的RNA溶液。最后采用实时定量PCR检测RNA溶液中*Cry2* RNA m^6A表达水平。

1.8　Western blotting

收集各组细胞，加入RIPA裂解液提取细胞总蛋白。蛋白浓度测定后，SDS-PAGE电泳、转膜、封闭。将膜与一抗（METTL3、METTL14、WTAP和VIRMA抗体按照1 ∶ 1 000稀释，Cry2和GAPDH抗体按照1 ∶ 2 000稀释）于4 ℃中孵育过夜，再与二抗于室温中孵育1 h。在膜上滴加发光试剂于暗室中显影曝光。采用ImageJ软件分析蛋白条带灰度值，计算目的蛋白相对表达量。

1.9　统计学分析

采用SPSS 23.0软件进行分析。符合正态分布的数据以$\bar{x} \pm s$表示。2组比较采用独立样本t检验。多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用LSD-t检验。$P < 0.05$为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　Cry2在Huh-7/LR细胞中低表达

随着乐伐替尼干预浓度的升高，Huh-7细胞和Huh-7/LR细胞的增殖率逐渐降低，在同一浓度乐伐替尼干预下，Huh-7/LR细胞的增殖率显著高于Huh-7细胞（$P < 0.05$，图1A）。乐伐替尼处理Huh-7细胞的IC_{50}为6.301 μmol/L，乐伐替尼处理Huh-7/LR细胞的IC_{50}为39.822 μmol/L，Huh-7/LR细胞对乐伐替尼的RI为6.320。与Huh-7细胞比较，Huh-7/LR细胞中*Cry2* mRNA和蛋白表达水平均显著降低（$P < 0.01$，图1B、1C）。

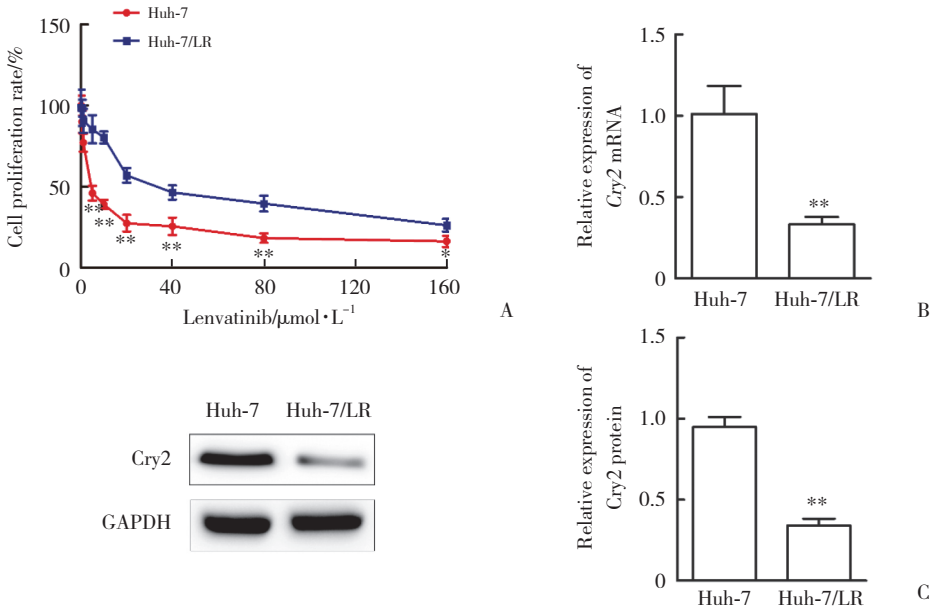
2.2　Cry2过表达增强Huh-7/LR细胞对乐伐替尼的敏感性

与对照组比较，oe-Cry2组Huh-7/LR细胞中*Cry2* mRNA和蛋白表达水平均显著升高（$P < 0.01$，图2A、2B）。不同浓度乐伐替尼处理48 h，oe-Cry2组Huh-7/LR细胞IC_{50}值（16.907 μmol/L）较对照组（40.718 μmol/L）显著降低（图2C）。在相同干预条件下，与对照组比较，oe-Cry2组Huh-7/LR细胞凋亡率显著升高（$P < 0.01$）。与0 μmol/L乐伐替尼干预的对照组比较，1 μmol/L乐伐替尼干预的对照组Huh-7/LR细胞凋亡率无显著变化（$P > 0.05$），而oe-Cry2组Huh-7/LR细胞凋亡率显著升高（$P < 0.01$，图2D）。

2.3　Huh-7/LR细胞中m^6A甲基化水平升高

与Huh-7细胞比较，Huh-7/LR细胞中RNA m^6A甲基化水平（0.20 ± 0.03 vs. 0.36 ± 0.05）和m^6A甲基转移酶METTL3蛋白表达水平显著升高（$P < 0.01$），而METTL14、WTAP和VIRMA等蛋白表达水平差异无统计学意义（$P > 0.05$）。见图3。

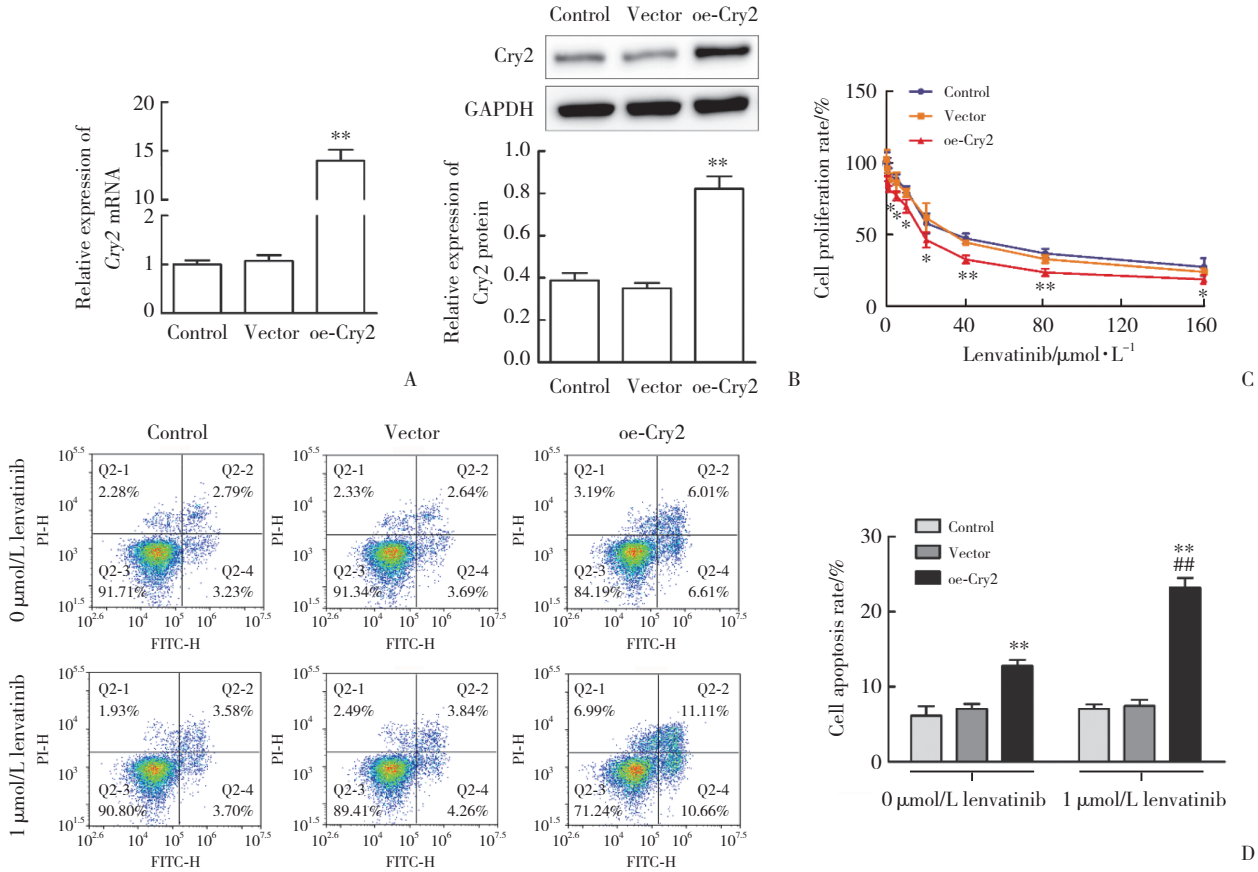
2.4　METTL3调控Huh-7/LR细胞中Cry2 m^6A甲基化



A, cell proliferation of the Huh-7 and Huh-7/LR cells was detected using MTT assay; B, C, mRNA and protein expression levels of Cry2 in the Huh-7 and Huh-7/LR cells were measured using real-time quantitative PCR and Western blotting. *P < 0.05, **P < 0.01 vs. Huh-7 cells.

图1　Huh-7细胞和Huh-7/LR细胞增殖率以及细胞中*Cry2* mRNA和蛋白表达水平比较

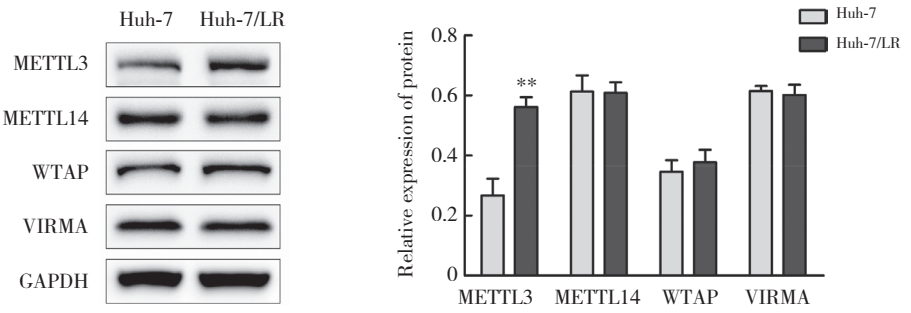
Fig.1　Comparison of proliferation rate and *Cry2* mRNA and protein expression levels in the Huh-7 and Huh-7/LR cells



A, B, mRNA and protein expression levels of Cry2 in the Huh-7/LR cells were measured using real-time quantitative PCR and Western blotting; C, cell proliferation of the Huh-7/LR cells was detected using the MTT assay; D, apoptosis rate of Huh-7/LR cells was assessed using flow cytometry. *P < 0.05, **P < 0.01 vs. control group; ## P < 0.01 vs. oe-Cry2 group without lenvatinib.

图2　各组Huh-7/LR细胞中*Cry2* mRNA和蛋白表达水平以及细胞增殖率和凋亡率比较

Fig.2　Comparison of the expression levels of *Cry2* mRNA and protein, cell proliferation rate, and apoptosis rate in the Huh-7/LR cells of each group



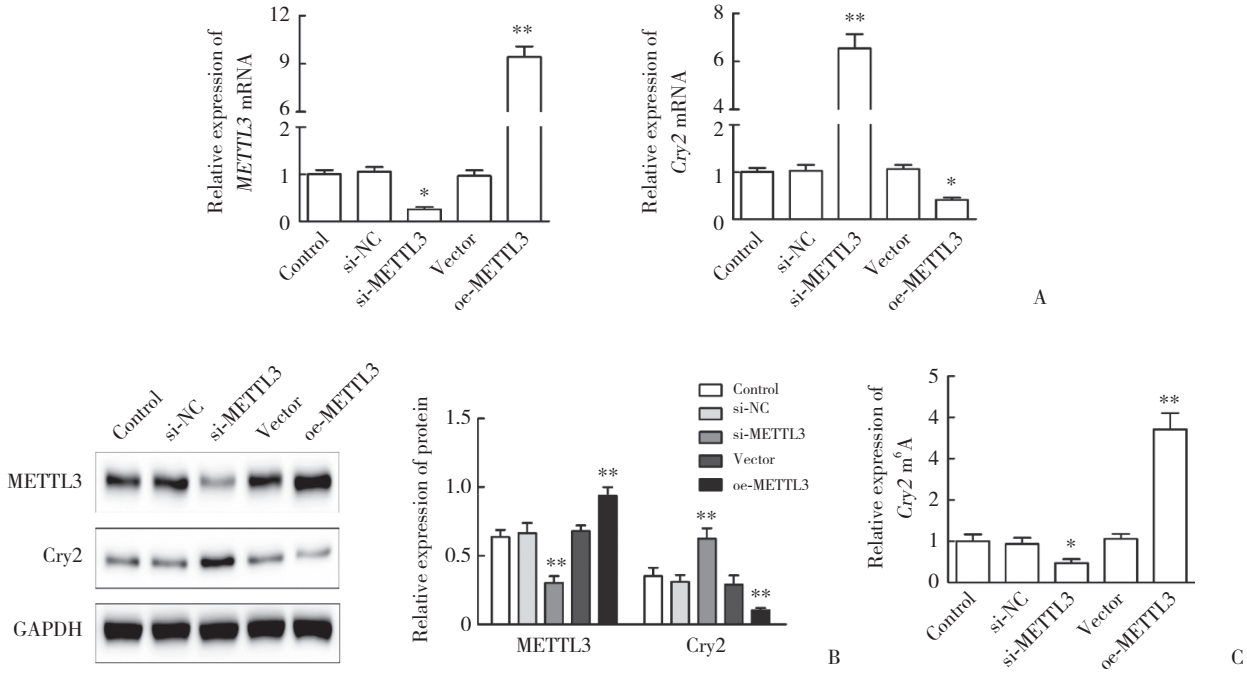
** $P < 0.01$ vs. Huh-7 cells.

图3　Huh-7细胞和Huh-7/LR细胞中m^{6}A甲基转移酶蛋白表达水平比较

Fig.3　Comparison of m^{6}A methyltransferase protein expression levels in the Huh-7 and Huh-7/LR cells

与对照组比较，si-METTL3组Huh-7/LR细胞中*METTL3* mRNA和蛋白表达水平及Cry2 m^{6}A甲基化水平显著降低（$P < 0.05$），而*Cry2* mRNA和蛋白表达水平显著升高（$P < 0.05$），oe-METTL3组Huh-7/LR细胞中*METTL3* mRNA和蛋白表达水平及Cry2 m^{6}A甲基化水平显著升高（$P < 0.01$），而*Cry2* mRNA和蛋白表达水平显著降低（$P < 0.05$），见图4。

2.5　沉默*METTL3*通过上调Cry2逆转Huh-7/LR细胞耐药



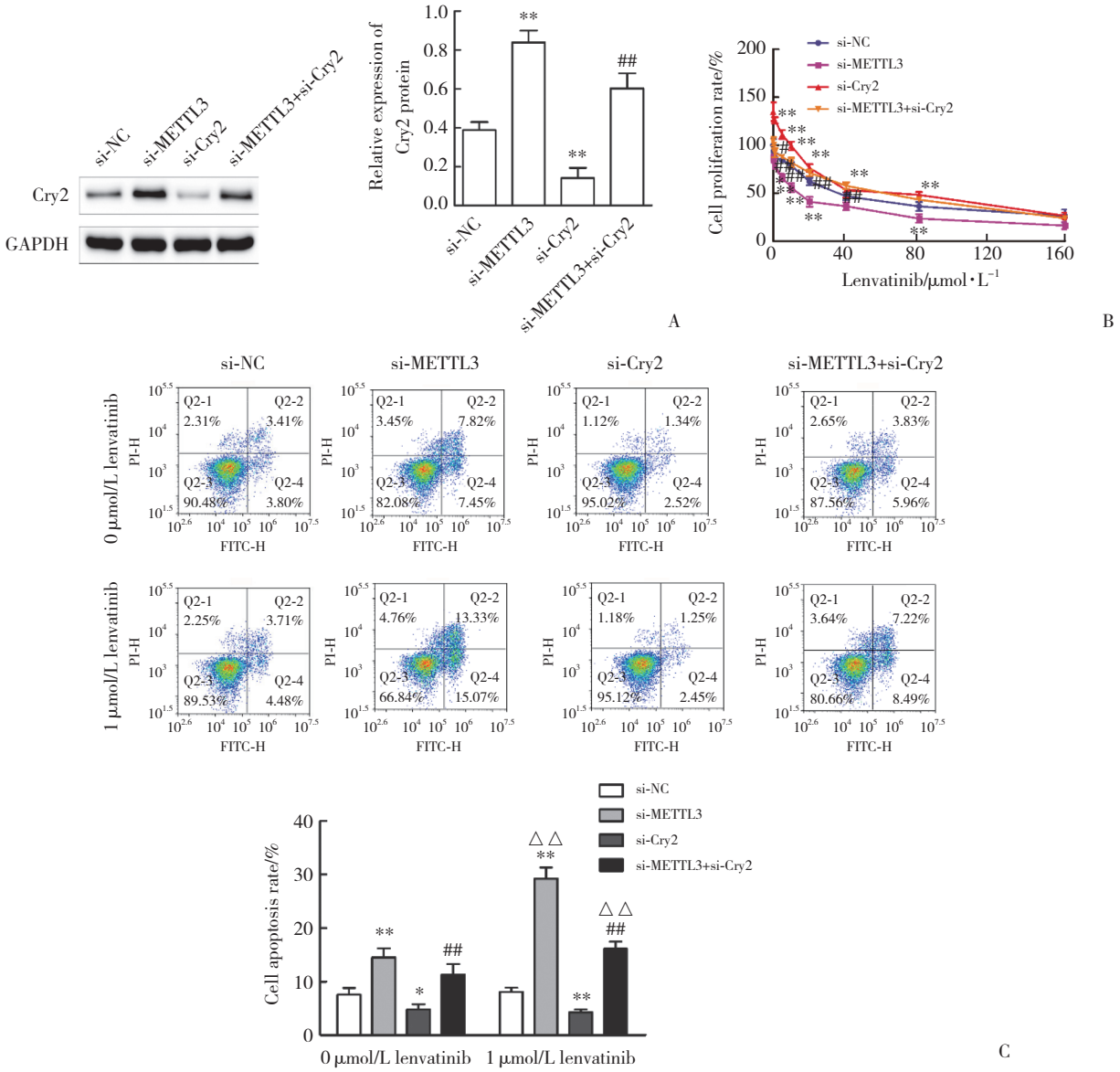
A-B，mRNA and protein expression levels of METTL3 and Cry2 in the Huh-7/LR cells were detected using real-time quantitative PCR and Western blotting；C，methylation level of Cry2 m^{6}A in the Huh-7/LR cells was assessed using methylation RNA immunoprecipitation. * $P < 0.05$，** $P < 0.01$ vs. control group.

图4　各组Huh-7/LR细胞中*METTL3*、*Cry2* mRNA和蛋白表达水平以及Cry2 m^{6}A甲基化水平比较

Fig.4　Comparison of the expression levels of *METTL3* and *Cry2* mRNA and protein and the methylation level of Cry2 m^{6}A in the Huh-7/LR cells of each group

与si-NC组比较，si-METTL3组Huh-7/LR细胞中Cry2蛋白表达水平显著升高（$P < 0.01$），si-Cry2组Cry2蛋白表达水平显著降低（$P < 0.01$）；与si-METTL3组比较，si-METTL3+si-Cry2组细胞中Cry2蛋白表达水平显著降低（$P < 0.01$，图5A）。随着乐伐替尼干预浓度的增加，Huh-7/LR细胞增殖率逐渐降低（图5B）。与si-NC组（39.03 μmol/L）相比，si-METTL3组IC_{50}值（12.03 μmol/L）降低，si-Cry2组IC_{50}值（63.76 μmol/L）升高；与si-METTL3组相比，si-METTL3+si-Cry2组IC_{50}

(53.67 μmol/L)升高。在相同乐伐替尼浓度处理条件下，与si-NC组比较，si-METTL3组细胞凋亡率显著升高($P<0.01$)，si-Cry2组细胞凋亡率显著降低($P<0.05$)；与si-METTL3组比较，si-METTL3+si-Cry2组细胞凋亡率显著降低($P<0.01$)。与0 μmol/L乐伐替尼干预的相同组比较，1 μmol/L乐伐替尼干预后的si-METTL3组和si-METTL3+si-Cry2组Huh-7/LR细胞凋亡率显著升高($P<0.01$，图5C)。



A，protein expression level of Cry2 in Huh-7/LR cells was detected using Western blotting；B，Huh-7/LR cell proliferation was assessed using the MTT assay；C，apoptosis rate of Huh-7/LR cells was measured using flow cytometry. *$P<0.05$，**$P<0.01$ vs. si-NC group；##$P<0.01$ vs. si-Cry2 group；△$P<0.05$，△△$P<0.01$ vs. the same group without lenvatinib.

图5　各组Huh-7/LR细胞中Cry2蛋白表达水平、细胞增殖率和凋亡率比较

Fig.5　Comparison of the expression levels of Cry2 protein，cell proliferation rate，and apoptosis rate in Huh-7/LR cells of each group

3　讨论

研究[11]显示，Cry2在HCC组织和细胞中低表达，过表达Cry2可抑制HCC细胞的增殖和迁移。另有研究[12]发现，在乐伐替尼治疗后的裸鼠肝癌移植瘤中，Cry2的表达下调。本研究中，Cry2在乐伐替尼耐药细胞株Huh-7/LR中的表达水平显著低于亲本细胞株Huh-7。当上调Huh-7/LR细胞中Cry2表达水平后，耐药株细胞对乐伐替尼的敏感性上升。因此，推测Cry2低表达可能参与HCC细胞乐伐替尼耐药形成过程。

m^{6}A甲基化修饰是目前最普遍的RNA修饰形式之一，该过程由3种类型的调节因子执行：甲基转移酶、去甲基化酶和m^{6}A结合蛋白。m^{6}A甲基化修饰在HCC耐药过程中发挥重要作用[7]。METTL3是甲基转移酶的核心蛋白之一，METTL3以m^{6}A依赖的方式调节RNA的表达，参与HCC的发生、发展和耐药[13-14]。本研究发现，乐伐替尼耐药细胞株Huh-7/LR中RNA m^{6}A甲基化水平升高，METTL3蛋白表达上调，而其他m^{6}A甲基转移酶METTL14、WTAP和VIRMA蛋白则无明显变化。提示METTL3介导的m^{6}A甲基化修饰在Huh-7/LR细胞中异常活跃，但Huh-7/LR细胞中Cry2低表达是否与高水平的m^{6}A甲基化修饰有关还需进一步明确。

m^{6}A甲基化修饰是一个动态可逆的过程，参与调节mRNA的稳定性和降解。研究[15]显示，降低Cry2甲基化水平导致Cry2表达增加，可以抑制食管鳞癌的生长和转移。消除Cry2启动子甲基化、增加Cry2表达有助于降低乳腺癌患者转移复发风险[16]。本研究中，抑制METTL3表达可降低Huh-7/LR细胞中Cry2甲基化水平，从而导致Cry2表达水平升高；而当METTL3过表达时，Huh-7/LR细胞中Cry2甲基化水平升高，Cry2表达水平降低，这些结果提示Huh-7/LR细胞中Cry2低表达可能是由METTL3介导的m^{6}A甲基化修饰所致。此外，本研究还发现，沉默*METTL3*可增强耐药株Huh-7/LR细胞对乐伐替尼的敏感性，而沉默*Cry2*则可部分逆转*METTL3*基因沉默对Huh-7/LR细胞乐伐替尼的增敏作用。

综上所述，Cry2在Huh-7/LR细胞中表达下调，抑制METTL3介导的m^{6}A甲基化修饰可增加Cry2的表达，从而提高细胞对乐伐替尼的敏感性。本研究初步揭示了HCC乐伐替尼耐药的部分机制，为逆转HCC乐伐替尼耐药提供了重要的方向。然而，本研究结果尚未揭示Cry2调控HCC细胞药敏性的具体途径。在后续研究中，课题组将以Cry2调控外排相关转运蛋白表达为方向，探讨Cry2参与HCC靶向药耐药形成的分子机制。

参考文献：

[1] LI J，WANG X，REN MD，et al. Advances in experimental animal models of hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Med，2023，12 (14)：15261-15276. DOI：10.1002/cam4.6163.

[2] FAN Z，ZHOU PC，JIN BH，et al. Recent therapeutics in hepatocellular carcinoma [J]. Am J Cancer Res，2023，13 (1)：261-275.

[3] FAIVRE S，RIMASSA L，FINN RS. Molecular therapies for HCC：looking outside the box [J]. J Hepatol，2020，72 (2)：342-352. DOI：10.1016/j.jhep.2019.09.010.

[4] HIRAOKA A，KUMADA T，ATSUKAWA M，et al. Prognostic factor of lenvatinib for unresectable hepatocellular carcinoma in real-world conditions-multicenter analysis [J]. Cancer Med，2019，8 (8)：3719-3728. DOI：10.1002/cam4.2241.

[5] GUO JH，ZHAO JJ，XU QR，et al. Resistance of lenvatinib in hepatocellular carcinoma [J]. Curr Cancer Drug Targets，2022，22 (11)：865-878. DOI：10.2174/1568009622666220428111327.

[6] XUE HG，MA YF，GUAN KW，et al. The role of m^{6}A methylation in targeted therapy resistance in lung cancer [J]. Am J Cancer Res，2024，14 (6)：2994-3009. DOI：10.62347/LXOS2662.

[7] KUANG Y，CHENG Y，WANG J，et al. KIAA1429 mediates epithelial mesenchymal transition in sorafenib-resistant hepatocellular carcinoma through m^{6}A methylation modification [J]. Cancer Med，2023，12 (6)：7222-7233. DOI：10.1002/cam4.5432.

[8] YU YM，LI YH，ZHOU L，et al. Cryptochrome 2 (*CRY2*) suppresses proliferation and migration and regulates clock gene network in osteosarcoma cells [J]. Med Sci Monit，2018，24：3856-3862. DOI：10.12659/MSM.908596.

[9] LIANG YF，WANG SX，HUANG X，et al. Dysregulation of circadian clock genes as significant clinic factor in the tumorigenesis of hepatocellular carcinoma [J]. Comput Math Methods Med，2021，2021：8238833. DOI：10.1155/2021/8238833.

[10] 许静，孙诚谊，喻超，等. CRY2过表达对肝癌细胞增殖及生物钟基因、蛋白表达的影响 [J]. 山东医药，2019，59 (8)：5-8. DOI：10.3969/j.issn.1002-266X.2019.08.002.

[11] 李超，袁鹏，颜昭勇，等. CRY2分子对肝癌细胞生长和转移的影响 [J]. 现代生物医学进展，2017，17 (36)：7030-7035，7084. DOI：10.13241/j.cnki.pmb.2017.36.007.

[12] 汪朦朦，熊枝繁，何晓晓，等. 乐伐替尼对裸鼠皮下人肝癌细胞移植瘤生长及生物钟基因表达水平的影响 [J/OL]. 中华普通外科学文献 (电子版)，2019，13 (2)：90-96. DOI：10.3877/cma.j.issn.1674-0793.2019.02.002.

[13] PAN F，LIN XR，HAO LP，et al. The role of RNA methyltransferase METTL3 in hepatocellular carcinoma：results and perspectives [J]. Front Cell Dev Biol，2021，9：674919. DOI：10.3389/fcell.2021.674919.

[14] 王朔，柯炜炜，卢再鸣. 甲基转移酶3在肝细胞癌中的研究进展 [J]. 中国医科大学学报，2023，52 (1)：86-89，93. DOI：10.12007/j.issn.0258-4646.2023.01.017.

[15] XUE JJ，YI JY，ZHU XL. Knockdown of UCHL3 inhibits esophageal squamous cell carcinoma progression by reducing CRY2 methylation [J]. Hum Cell，2022，35 (2)：528-541. DOI：10.1007/s13577-021-00660-7.

[16] LIU LL，SHEN H，WANG Y. CRY2 is suppressed by FOXM1 mediated promoter hypermethylation in breast cancer [J]. Biochem Biophys Res Commun，2017，490 (1)：44-50. DOI：10.1016/j.bbrc.2017.06.003.

(编辑　于　溪)