

文章编号 1006-8147(2022)05-0497-06

论 著

CD155 依赖 m⁶A 修饰调控宫颈癌细胞的恶性行为

祁小珍,石立莹

(天津医科大学基础医学院病原生物学教研室 天津 300070)

摘要 目的:探究 CD155 在宫颈癌中的作用和依赖 m⁶A 修饰的调控机制。方法:应用数据库预测宫颈癌细胞中 CD155(PVR)的表达情况,CD155 对患者预后的影响,运用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法测定宫颈癌细胞 HeLa 和宫颈永生细胞 S12 中 CD155 的表达水平。分别运用 MTT、平板克隆、迁移侵袭等实验评估 CD155 对宫颈癌细胞 HeLa 生长、增殖、迁移和侵袭的影响。应用 Western 印迹法测定 E-钙黏蛋白(E-cad)和波形蛋白(Vimentin)的表达水平并评价 CD155 对 EMT 的影响。MeRIP-RT-qPCR 检测 CD155 是否受 m⁶A 调控,Western 印迹法和 qRT-PCR 测定 METTL3 是否影响 CD155 蛋白和 RNA 的表达水平。放线菌素 D 处理细胞后检测 METTL3 对 CD155RNA 半衰期的作用,利用预测网站 m⁶A Target 预测 CD155RNA 甲基化位点的识别者(Reader),运用 Western 印迹法和 qRT-PCR 分析 YTHDF1 是否影响 CD155 蛋白和 RNA 的表达水平,放线菌素 D 处理细胞后检测 YTHDF1 对 CD155RNA 半衰期的作用,RIP-RT-qPCR 实验进一步确定 YTHDF1 和 YTHDF1-mut 对 CD155RNA 下拉能力。结果:CD155 在宫颈癌组织和细胞中表达较高,体内高表达 CD155 的患者生存率较低。相比 S12 细胞,HeLa 细胞中 CD155 的表达增加($t=3.749, P<0.05$)。CD155 的高表达促进了体外宫颈癌细胞的生长($t=3.152, P<0.05$)、增殖($t=3.706, P<0.05$)、迁移($t=5.422, P<0.01$)和侵袭($t=3.599, P<0.05$),抑制 E-cad 的表达促进了 Vimentin 的表达。MeRIP-RT-qPCR 结果显示 CD155RNA 受 m⁶A 调控,METTL3 促进了 CD155 蛋白和 RNA($t=6.725, P<0.05$)的表达,敲降 METTL3 之后 CD155RNA 半衰期降低($t=5.622, 6.063, 5.857$, 均 $P<0.05$)。敲降 YTHDF1 之后 CD155 的蛋白水平降低,CD155RNA 半衰期降低($t=10.93, 5.602, 4.359$, 均 $P<0.05$)。在 YTHDF1 高表达的细胞中,CD155RNA 被有效免疫沉淀($t=4.686, P<0.01$),但在 YTHDF1-mut 转染的细胞中,免疫沉淀结果显示下拉的 CD155RNA 水平明显降低($t=4.462, P<0.05$)。结论:CD155RNA 在 m⁶A 修饰的情况下,被 YTHDF1 特异性识别,进而稳定性增强和翻译增加,CD155 表达增加促进了宫颈癌细胞的恶性行为。

关键词 CD155;宫颈癌;m⁶A;METTL3;YTHDF1

中图分类号 R737.33

文献标志码 A

CD155-dependent m⁶A modification regulates malignant behavior of cervical cancer cells

QI Xiao-zhen, SHI Li-ying

(Department of Pathogen Biology, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract Objective: To explore the role of CD155 in cervical cancer and its regulatory mechanism dependent on m⁶A modification.

Methods: The database was used to predict the expression of CD155 (PVR) in cervical cancer cells, and the effect of CD155 on the prognosis of patients. The expression levels of CD155 in cervical cancer cells HeLa and cervical immortalized cells S12 were determined by real-time quantitative PCR (qRT-PCR). The effects of CD155 on the growth, proliferation, migration, and invasion of cervical cancer cells HeLa were evaluated by MTT, plate cloning, migration and invasion experiments. The expression levels of E-cadherin (E-cad) and vimentin (Vimentin) were determined by Western blotting and the effect of CD155 on EMT process was evaluated. MeRIP-RT-qPCR was used to detect whether CD155 was regulated by m⁶A, and Western blotting and qRT-PCR were used to determine whether METTL3 affected the expression levels of CD155 protein and RNA. Actinomycin D treated cells to detect the effect of METTL3 on the half-life of CD155 RNA, using the prediction website m⁶A Target to predict the recognizer (Reader) of CD155 RNA methylation sites, Western blotting and qRT-PCR were used to analyze whether YTHDF1 affects the expression levels of CD155 protein and RNA, Actinomycin D treated cells to detect the effect of YTHDF1 on the half-life of CD155 RNA, and RIP-RT-qPCR experiment further confirmed the pull-down ability of YTHDF1 and YTHDF1-mut on CD155 RNA. **Results:** CD155 was highly expressed in cervical cancer tissues and cells, and patients with high CD155 expression *in vivo* had a lower survival rate. Compared with S12 cells, the expression of CD155 was increased in HeLa cells ($t=3.749, P<0.05$). High expression of CD155 promoted the growth ($t=3.152, P<0.05$), proliferation ($t=3.706, P<0.05$), migration ($t=5.422, P<0.01$) and invasion ($t=3.599, P<0.05$) of cervical cancer cells *in vitro*, inhibited the expression of E-cad and promoted the expression of Vimentin. MeRIP-RT-qPCR results showed that CD155RNA was regulated by m⁶A, METTL3 promoted the expression of CD155 protein and RNA ($t=6.725, P<0.05$), and knockdown of METTL3 decreased the half-life of CD155RNA ($t=5.622, 6.063, 5.857$, all $P<0.05$). After knockdown of YTHDF1, the protein level of CD155 decreased, and the half-life of CD155 RNA decreased ($t=10.93, 5.602, 4.359$, all $P<0.05$). In cells with high YTHDF1 expression, CD155RNA was efficiently immunoprecipitated ($t=$

作者简介 祁小珍(1993-),女,硕士在读,研究方向:病原生物学;通信作者:石立莹, E-mail: sly.good@126.com。

4.686, $P < 0.01$), but in YTHDF1 -mut transfected cells, the immunoprecipitation results showed that the level of pulled down CD155RNA was significantly reduced ($t = 4.462, P < 0.05$). **Conclusion:** CD155RNA is specifically recognized by YTHDF1 under the condition of m⁶A modification, and then the stability and translation are increased, and the increased expression of CD155 promotes the malignant behavior of cervical cancer cells.

Key words CD155; cervical cancer; m⁶A; METTL3; YTHDF1

宫颈癌与乳腺癌、结直肠癌和肺癌是全球女性四大常见癌症^[1]。近几十年研究表明,表观遗传学中 RNA 转录组学在癌症中发挥重要作用^[2-3]。

N⁶-甲基腺苷(m⁶A)作为真核信使 RNA 中最丰富的修饰,在生物的各种进程中发挥关键性作用,其甲基化转移酶复合物由 METTL3、METTL14、WTAP、RBM15 和 KIAA1429 等组成^[4]。其中 METTL3 是甲基化转移酶复合物中起主要作用的催化亚基。最近的研究显示, METTL3 与宫颈癌的恶性行为及不良预后相关^[5]。YTHDF1 属于 YTH 结构域蛋白家族,是识别 m⁶A 修饰位点重要的阅读器(Reader),主要功能是识别 RNA 上 m⁶A 修饰位点,增强 RNA 的稳定性及提高 RNA 翻译效率。

脊髓灰质炎病毒受体 CD155(PVR)在多数正常组织中低表达而在癌组织中高表达,如结肠癌、肺癌、黑色素瘤和胰腺癌等^[6-9]。最近有文章报道, CD155 的异常表达与宫颈癌的恶性行为和不良预后相关,但 CD155 在宫颈癌细胞中异常表达的调控

机制还有待研究。因此,本文从转录组的方向出发,初步探究在宫颈癌细胞中 CD155 mRNA 甲基化后的表达调控机制。

1 材料和方法

1.1 细胞培养和细胞转染 人宫颈癌细胞 HeLa 和 S12 细胞均购买于 ATCC 细胞库, HeLa 细胞培养液是含有 6% 胎牛血清(FBS)、100 μg/mL 链霉素和 100 IU/mL 青霉素的 RPMI1640(Gibco),细胞培养在 37℃、5%CO₂ 的培养箱中,在细胞密度达到 80% 时进行传代培养。取对数生长期细胞,以 1×10⁵ 个/mL 密度接种至 24 孔板,每孔加入 250 μL 无血清培养基。在细胞密度达到 70%~80% 时,参照脂质体 2000 试剂使用说明进行转染。

1.2 质粒的构建 分别构建 CD155 过表达质粒 pCNAD3-Flag/CD155 和敲降质粒 pSilencer-shR/CD155(pshR-CD155),其对照组分别是 PCDNA3-Flag 和 pSilencer-NC,构建质粒所用引物见表 1。

1.3 Western 印迹实验 HeLa 细胞转染过表达和

表 1 引物序列

Tab 1 Primer sequences

| 名称 | 序列(5'→3') |
|-----------------|--|
| CD155-F | AAGGAAAAAAGCGCCGCAATGGCCGAGCCATGGCCGCC |
| CD155-R | TGCTCTAGATCACCTTGTCCTCTGTCTG |
| pshR-CD55 1#Top | GATCCGGAGTCCAAACGGCTGGAATTCTCGAGAATTCAGCCGTTTGGACTCCTTTTGA |
| pshR-CD55 1#Bot | AGCTTCAAAAAGGAGTCCAAACGGCTGGAATTCTCGAGAATTCAGCCGTTTGGACTCCG |
| pshR-CD55 2#Top | GATCCGGTATCCATCTCTGGCTATGACTCGAGTCATAGCCAGAGATGGATACCTTTTGA |
| pshR-CD55 2#Bot | AGCTTCAAAAAGGTATCCATCTCTGGCTATGACTCGAGTCATAGCCAGAGATGGATACCG |

敲降 CD155 质粒及其对照质粒 48 h 后, RIPA 裂解细胞制备蛋白样品,将蛋白样品在 10% 的 SDS-PAGE 胶上电泳分离后,转移至甲醇预先激活的 PVDF 膜上,5% 脱脂牛奶在室温下封闭 2 h,一抗 Anti-Ecad 4℃ 孵育过夜, TBST 洗膜 4 次,二抗羊抗兔在常温孵育 2 h, TBST 洗膜 4 次,加入发光液室温孵育 1 min 后,进入暗室曝光,根据条带深浅选择合适的曝光时间。

1.4 细胞增殖和克隆实验 按预定分组转染细胞,24 h 后将细胞以 6×10³ 个/mL 的密度接种到 96 孔板中,每个组设置 5 个复孔,分别培养 24、48、72 h 后向每个孔中加入 10 μL MTT,6 h 后吸弃 MTT 后加入 100 μL DMSO,摇床震荡 10 min 后使用酶标

仪检测 490 nm 和 570 nm 处每个孔的光密度(OD)值,进行 3 次独立重复实验后取平均值进行 *t* 检验分析。克隆形成实验预实验后,细胞消化计数,将 5×10² 个细胞接种到 12 孔板中,每个分组 3 个复孔,在完全培养液中培养 14 d,然后弃去培养液,使用结晶紫染色 10 min,冲洗干净后进行计数,使用 Image J 计数并进行分析。

1.5 细胞的迁移实验 细胞转染 24 h 后,消化收集细胞,取 6×10⁴ 个细胞,离心后弃净培养液,使用 200 μL 无血清培养液重悬后加入小室的上方,同时在小室下方的培养板里加入 800 μL 10% 的 1640 完全培养液。放入 37℃、5%CO₂ 的培养箱中,36 h 后弃去上层液体,加入甲醇固定,室温固定 30 min 后

弃去甲醇,在结晶紫中染 10 min,冲洗干净,用棉签擦去上室表面的残余细胞,晾干后取出膜,用中性树脂封片并晾干,在正置显微镜下计数细胞,随机照取 5 张图片,计数迁移细胞数目。

1.6 细胞侵袭实验 将 50 μ L Matrigel 基质胶加入 300 μ L 无血清 1640 培养基中充分吹打混匀,取 50 μ L 混合液平铺在小室内,4 $^{\circ}$ C 放置 30 min,37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 的培养箱放置过夜,取 8×10^4 个细胞,离心后弃净培养液,使用 200 μ L 无血清培养液重悬后加入小室的上方,同时在小室下方的培养板里加入 800 μ L 含 10% 血清的 1640 完全培养液。放入 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 的培养箱中,36 h 后弃去上层液体,加入甲醇,室温固定 30 min,弃去甲醇,在结晶紫中染 10 min,冲洗干净,用棉签擦去上室表面的残余细胞,晾干后取出膜,用中性树脂封片并晾干,正置显微镜下观察,随机照取 3 张图片,计数侵袭细胞数目。

1.7 RNA 免疫共沉淀实验和实时定量逆转录聚合酶链式反应(qRT-PCR) 使用 RIP 试剂盒,按照说明书进行实验,得到 3 组产物:总 RNA(input-RNA)、m⁶A 抗体特异性捕获的 CD155RNA(m⁶A-ip-RNA)、IgG 抗体吸附的非特异性 RNA(IgG-ip-RNA)。Nanodrop2000 测定 RNA 浓度后,进行 qRT-PCR,计算 3 组中 CD155 表达的相对定量,实验重复 3 次。

使用 TRIzol 试剂提取细胞及其他转染组细胞的总 RNA,使用 Nanodrop 2000 测定 RNA 浓度以及 OD260/OD280 的比值,将 RNA 逆转录成 cDNA 进行实验,同时做 3 个复孔取平均值,以 β -actin 为内参,以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算 CD155 表达的相对定量,实验重复 3 次,RT-qPCR 所用引物如表 2。

表 2 qRT-PCR 引物

Tab 2 qRT-PCR primers

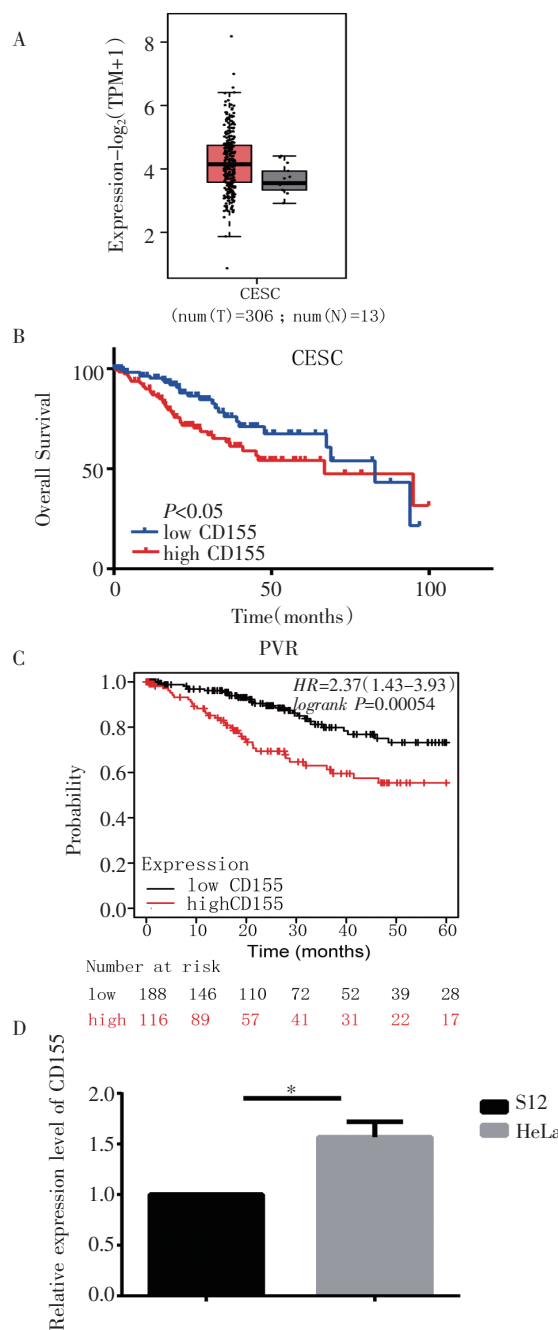
| 名称 | 序列(5'→3') |
|----------------|----------------------|
| CD155-qPCR-For | CTATAATTGGAGCAGACCAT |
| CD155-qPCR-Rev | CGAGCTCCTAGGGCATT |

1.8 生物信息学网站 KM-Plotter (<http://kmplot.com/analysis/index.php?p=service>)、TCGA (<http://www.cbioportal.org/>) 预测 CD155 的预后,GEPIA (<http://gepia.cancer-pku.cn/index.html>) 预测宫颈癌组织中 CD155 的表达情况,m⁶A Target [m⁶A2Target (canceromics.org)] 数据库在线预测 CD155 的识别者。

1.9 统计学处理 采用 GraphPad Prism 和 ImageJ 软件对所得 3 次重复数据进行分析并作图,数据均符合正态分布,采用 *t* 检验进行统计分析, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CD155 在宫颈癌中呈现高表达 与癌旁组织相比,宫颈癌组织中的 CD155 有较高水平(图 1A),并且高水平的 CD155 表达与宫颈癌不良预后相关(图 1B、1C)。在宫颈癌和非宫颈癌细胞系中进行 RT-qPCR,检测 CD155 的 RNA 水平。结果显示,相比于非宫颈癌永生细胞 S12,宫颈癌细胞系 HeLa、C33A 中 CD155 有较高水平的表达($t=3.749, P < 0.05$),见图 1D。

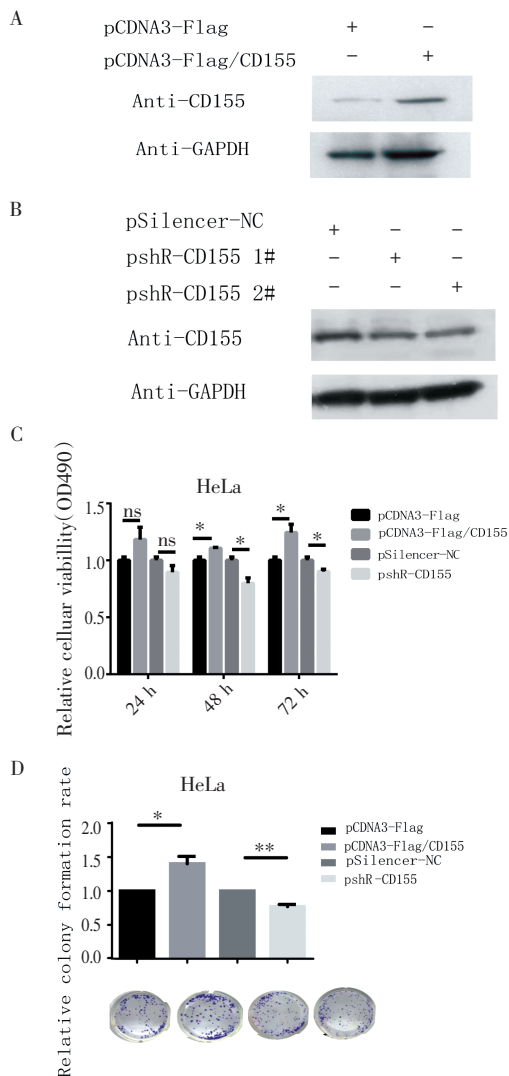


注:A:GEPIA2 数据库宫颈鳞状细胞癌和腺癌(CESC)以及癌旁组织中 CD155 的表达;B:TCGA 数据库中 CD155 预后评价;C:KM-Plotter 网站 CD155 的预后评价;D: 宫颈永生细胞 S12 和宫颈癌细胞 HeLa 中 CD155RNA 表达情况; $P < 0.05$

图 1 CD155 在宫颈癌组织和细胞中的表达情况

Fig 1 Expression of CD155 in cervical cancer tissues and cells

2.2 CD155 提高 HeLa 细胞存活率,使细胞克隆形成增加 Western 印迹实验证明,CD155 过表达质粒 pCD3-Flag/CD155 和 CD155 敲降质粒 pshR-CD155 1# 和 pshR-CD155 2# 是有效的(图 2A、2B)。选取效果最好的敲降质粒 pshR-CD155 2# 进行接下来的实验。过表达 CD155 或者敲降 CD155 后,与对照组相比,细胞存活率表现为升高或降低(图 2C, $t=3.152, P<0.05$)。克隆形成实验结果显示,过表达或敲降 CD155 后,细胞增殖能力增强或减弱(图 2D, $t=3.706, P<0.05$)。



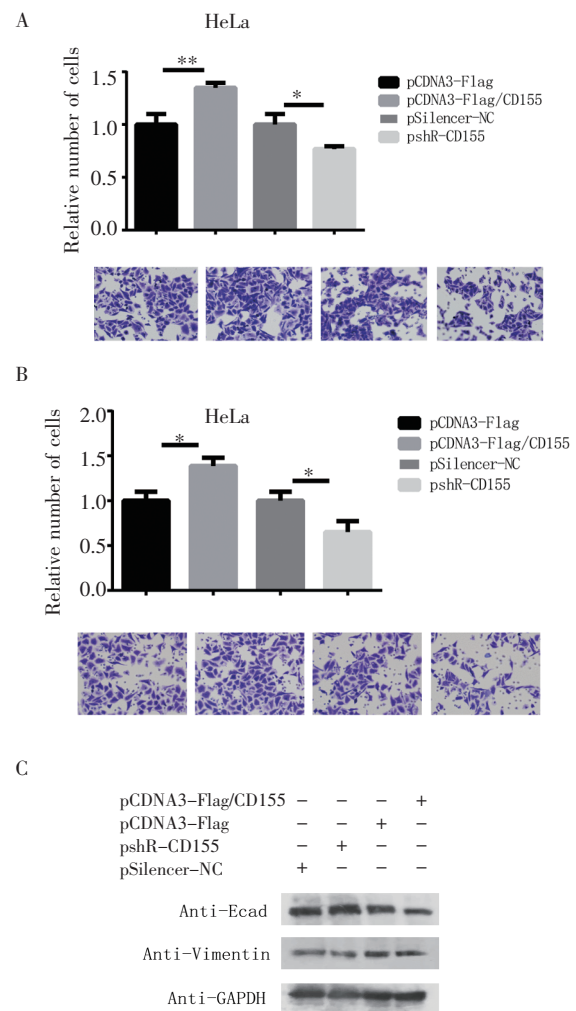
注:A和B:分别验证了CD155过表达和敲降质粒的有效性;C:MTT处理后与对照组相比,过表达CD155和敲降CD155的细胞表现明显的生长差异;D:克隆形成实验,与对照组相比,过表达CD155和敲降CD155的细胞克隆形成率表现明显差异; * $P<0.05$; ** $P<0.01$

图2 CD155对HeLa细胞生长和增殖能力的影响

Fig 2 The effect of CD155 on the growth and proliferation of HeLa cells

2.3 CD155 增强 HeLa 细胞的迁移和侵袭能力,促进 HeLa 细胞的 EMT 进程 过表达或敲降 CD155 质粒转染细胞后,进行小室迁移实验,结果显示,与

对照组相比,转染过表达 CD155 质粒后细胞的迁移能力增强,敲降 CD155 后与对照组相比,细胞的迁移能力减弱(图 3A, $t=5.422, P<0.01$)。在铺设 matrigel 的小室内进行小室迁移实验,与对照组相比,过表达 CD155 后穿过小室的细胞增多,敲降 CD155 后穿膜细胞相对减少(图 3B, $t=3.599, P<0.05$)。过表达 CD155 后,E-cad 表达降低,Vimentin 表达升高,敲降 CD155,E-cad 表达升高,Vimentin 表达降低(图 3C, $t=3.599, P<0.05$)。

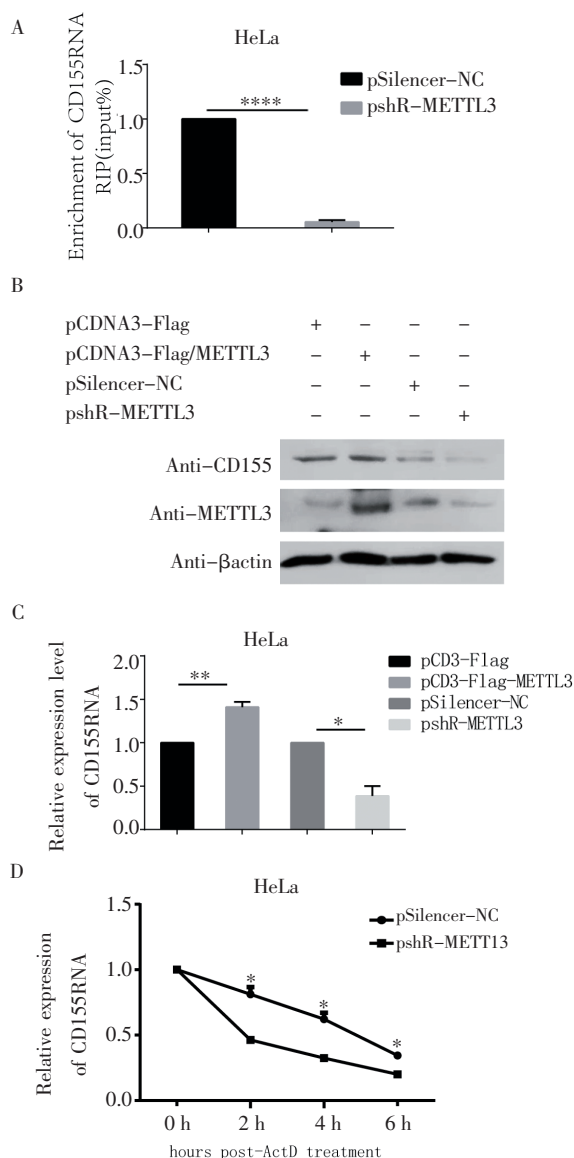


注:A:CD155对HeLa细胞迁移细胞数目的影响;B:CD155对HeLa细胞侵袭细胞数目的影响;A和B均用结晶紫染色,放大倍数20×; * $P<0.05$; ** $P<0.01$;C:CD155对EMT进程相关蛋白表达水平的影响

图3 CD155对HeLa细胞迁移、侵袭能力和细胞EMT进程的影响
Fig 3 The effect of CD155 on HeLa cell migration, invasion ability and cellular EMT process

2.4 宫颈癌细胞中 CD155 的表达受 m⁶A 修饰调控 敲降 METTL3 质粒和它的对照质粒转入 HeLa 细胞中,之后进行 MeRIP-RT-qPCR 实验,与对照组相比,敲降 METTL3 后免疫沉淀物中的 CD155 RNA 的富集明显减少(图 4A)。当 METTL3 过表达或敲降时,

CD155 的 RNA($t=6.725, P<0.05$)和蛋白水平也随之升高或降低(图 4B、4C)。敲降 METTL3 后, CD155RNA 的半衰期降低(图 4D, $t=5.622$ 、 6.063 、 5.857 , 均 $P<0.05$)。



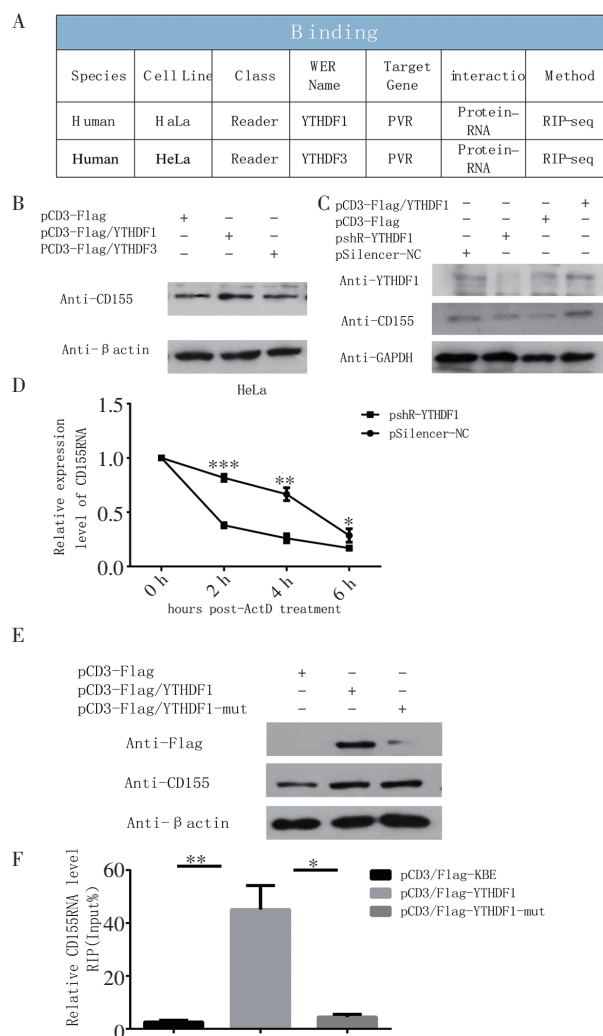
注:A:RNA 甲基化免疫共沉淀技术 MeRIP 检测敲降 METTL3 后细胞中 CD155RNA 的甲基化富集水平,与对照组相比,**** $P<0.0001$; B:Western 印迹检测 METTL3 对 CD155 蛋白的影响;C 和 D:qRT-PCR 检测 METTL3 对 CD155RNA 水平的影响,检测敲降 METTL3 并进行放线菌素 D 处理后 CD155RNA 半衰期的变化,* $P<0.05$,** $P<0.01$

图 4 宫颈癌细胞中 CD155 的表达受 m⁶A 修饰调控的验证

Fig 4 Verification that the expression of CD155 in cervical cancer cells is regulated by m⁶A modification

2.5 CD155 甲基化后 Reader 的鉴定 结果显示, CD155 甲基化后的阅读器可能是 YTHDF1 和 YTHDF3(图 5A),与对照组相比, YTHDF1 比 YTHDF3 明显促进了 CD155 蛋白的表达(图 5B)。与对照组相比,过表达或敲降 YTHDF1, CD155 蛋白的表达随之增加或减少(图 5C)。与对照组相比,敲

降 YTHDF1 后细胞中 CD155RNA 的半衰期呈现降低趋势(图 5D, $t=10.93$ 、 5.602 、 4.359 , 均 $P<0.05$)。pCD3-Flag/YTHDF1 和 pCD3-Flag/YTHDF1mut 质粒都是有效的(图 5E),进行 RIP-RT-qPCR 实验,结果显示,和对照组相比, YTHDF1 组有效富集了 CD155 的 RNA($t=4.686, P<0.01$),但 YTHDF1 mut 组中 CD155RNA 的富集程度不如 YTHDF1 组(图 5F, $t=4.462, P<0.05$)。



注:A:m⁶A Target 预测 CD155 甲基化位点的 Reader;B 和 C Western 印迹验证 Reader YTHDF1 对 CD155 蛋白的表达水平的作用;D:qRT-PCR 检测敲降 YTHDF1 并进行放线菌素 D 处理后 CD155RNA 半衰期的变化;E:Western 印迹检测 YTHDF1 与其甲基化结合位点突变质粒对 CD155 蛋白的影响;F 免疫共沉淀技术 RIP 检测 YTHDF1 与其甲基化结合位点突变质粒对 CD155RNA 的富集情况,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$

图 5 CD155 甲基化后 Reader 的鉴定

Fig 5 Identification of Reader after CD155 methylation

3 讨论

m⁶A 的异常修饰在肿瘤进程中有着重要的作用, m⁶A 修饰参与肝癌和乳腺癌等的迁移侵袭进程^[10-12]。m⁶A 修饰也参与乳腺癌与子宫内膜癌等的

增殖进程^[13-14]。宫颈癌的相关发病机制是一个非常复杂和多种因素相互作用的结果,研究表明 CD155 可以作为宫颈癌不良预后的指标^[15]。本研究发现了一个有意义的机制,即 m⁶A 可能与 CD155 一起参与宫颈癌的发病机制。

目前有研究显示 CD155 在多种肿瘤中高表达并且促进肿瘤的恶性行为,例如 CD155 在肺腺癌、卵巢癌和胶质瘤等癌症中表达异常升高^[16-18]。本实验证明 CD155 促进宫颈癌细胞的恶性行为,这与目前 CD155 与肿瘤关系的研究结果一致。METTL3 在宫颈癌中的作用在目前的文献中说法不一,有的文献显示宫颈癌中 METTL3 的表达升高并且抑制癌症的进程^[19],有的文献显示 METTL3 的表达升高并促进宫颈癌的进程^[20-21]。本研究结果表明宫颈癌细胞中 METTL3 表达较高。

为了探究 CD155 在转录水平上的调控机制,实验证明 METTL3 使 CD155RNA 上的甲基化修饰增加,敲降 METTL3 后 Western 印迹和 RT-qPCR 结果显示 CD155RNA 的翻译效率降低,CD155RNA 稳定性降低。本研究结果表明 METTL3 使 CD155RNA 的 m⁶A 修饰增加,进而促进 CD155 的表达和增强 CD155 的稳定性。目前的研究表明,RNA 被 m⁶A 修饰后,有不同阅读器识别相应的 m⁶A 位点,决定 RNA 的稳定性以及翻译效率^[22]。本研究通过预测及实验证明 CD155 的阅读器是 YTHDF1,并且 YTHDF1 依赖 m⁶A 修饰位点促进 CD155 的表达,这种模式符合 m⁶A 修饰调控方式。最后通过挽救实验进一步证明 METTL3 通过调控 CD155 的表达,促进宫颈癌细胞的恶性行为。

总之,本研究说明了 METTL3 能够使 CD155 RNA 上的 m⁶A 甲基化修饰增加,进而有 YTHDF1 识别 m⁶A 甲基化位点促进 CD155 的表达。未来还可以通过测序进一步找出 CD155RNA 上的甲基化修饰位点。

参考文献:

- [1] ARBYN M, WEIDERPASS E, BRUNI L, et al. Estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2018: a worldwide analysis [J]. *Lancet Glob Health*, 2020, 8(2): e191-e203.
- [2] HE C. Grand challenge commentary: RNA epigenetics? [J]. *Nat Chem Biol*, 2010, 6(12): 863-865.
- [3] DENG X, SU R, WENG H, et al. RNA N⁶-methyladenosine modification in cancers: current status and perspectives [J]. *Cell Res*, 2018, 28(5): 507-517.
- [4] YANG Y, HSU P J, CHEN Y S, et al. Dynamic transcriptomic m⁶A decoration: writers, erasers, readers and functions in RNA metabolism [J]. *Cell Res*, 2018, 28(6): 616-624.
- [5] XU H, WANG H, ZHAO W, et al. SUMO1 modification of methyltransferase-like 3 promotes tumor progression via regulating Snail mRNA homeostasis in hepatocellular carcinoma [J]. *Theranostics*, 2020, 10(13): 5671-5686.
- [6] VU L P, PICKERING B F, CHENG Y, et al. The N⁶-methyladenosine (m⁶A)-forming enzyme METTL3 controls myeloid differentiation of normal hematopoietic and leukemia cells [J]. *Nat Med*, 2017, 23(11): 1369-1376.
- [7] LIN S, CHOE J, DU P, et al. The m⁶A Methyltransferase METTL3 promotes translation in human cancer cells [J]. *Mol Cell*, 2016, 62(3): 335-345.
- [8] VISVANATHA N A, PATIL V, ARORA A, et al. Essential role of METTL3-mediated m⁶A modification in glioma stem-like cells maintenance and radioresistance [J]. *Oncogene*, 2018, 37(4): 522-533.
- [9] HU Y, LI Y, HUANG Y, et al. METTL3 regulates the malignancy of cervical cancer via post-transcriptional regulation of RAB2B [J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 879: 173134.
- [10] DENG X, SU R, WENG H, et al. RNA N⁶-methyladenosine modification in cancers: current status and perspectives [J]. *Cell Res*, 2018, 28(5): 507-517.
- [11] MASSON D, JARRY A, BAURY B, et al. Overexpression of the CD155 gene in human colorectal carcinoma [J]. *Gut*, 2001, 49(2): 236-240.
- [12] NAKAI R, MANIWA Y, TANAKA Y, et al. Overexpression of Nectin-5 correlates with unfavorable prognosis in patients with lung adenocarcinoma [J]. *Cancer Sci*, 2010, 101(5): 1326-1330.
- [13] BEVELACQUA V, BEVELACQUA Y, CANDIDO S, et al. Nectin like-5 overexpression correlates with the malignant phenotype in cutaneous melanoma [J]. *Oncotarget*, 2012, 3(8): 882-892.
- [14] NISHIWADA S, SHO M, YASUDA S, et al. Clinical significance of CD155 expression in human pancreatic cancer [J]. *Anticancer Res*, 2015, 35(4): 2287-2297.
- [15] DOUGALL W C, KURTULUS S, SMYTH M J, et al. TIGIT and CD96: new checkpoint receptor targets for cancer immunotherapy [J]. *Immunol Rev*, 2017, 276(1): 112-120.
- [16] LIU L, WANG Y, GENG C, et al. CD155 Promotes the progression of cervical cancer cells through AKT/mTOR and NF- κ B pathways [J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 655302.
- [17] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249.
- [18] FRIEDLANDER M, GROGAN M U S. Preventative Services Task Force. Guidelines for the treatment of recurrent and metastatic cervical cancer [J]. *Oncologist*, 2002, 7(4): 342-347.
- [19] VONSKY M, SHABAEVA M, RUNOV A, et al. Carcinogenesis associated with human papillomavirus infection. mechanisms and potential for immunotherapy [J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2019, 84(7): 782-799.
- [20] PLUMMER M, PETO J, FRANCESCHI S, et al. Time since first sexual intercourse and the risk of cervical cancer [J]. *Int J Cancer*, 2012, 130(11): 2638-2644.
- [21] MURAKAMI T, TAKASAWA A, TAKASAWA K, et al. Aberrant expression of junctional adhesion molecule-a contributes to the malignancy of cervical adenocarcinoma by interaction with poliovirus receptor/CD155 [J]. *Cancer Sci*, 2021, 112(2): 906-917.
- [22] O'DONNELL J S, MADORE J, LI X Y, et al. Tumor intrinsic and extrinsic immune functions of CD155 [J]. *Semin Cancer Biol*, 2020, 65: 189-196.