

文章编号 1006-8147(2023)01-0015-06

论 著

Fus 依赖 ac⁴C 修饰调控促进宫颈癌细胞增殖

金泽源, 李咏梅

(天津医科大学基础医学院病原生物学系, 天津 300070)

摘要 目的:探讨 Fus RNA 结合蛋白(Fus)影响宫颈癌细胞增殖的机制。方法:通过 MTT 实验观察 Fus 对宫颈癌细胞 HeLa 增殖的影响;采用 RT-qPCR 和 Western 印迹观察人 N-乙酰转移酶 10(NAT10)对 Fus 表达的影响;利用 RNA 免疫沉淀实验(RIP)检测 Fus mRNA 的富集情况;通过 RNA 稳定性实验观察 NAT10 对 Fus mRNA 稳定性的影响;基于生物信息学软件 PACES 预测 Fus mRNA 上的 ac⁴C 修饰位点,构建含有 Fus mRNA 上 ac⁴C 修饰位点的野生型和突变型的 EGFP 报告质粒,利用 EGFP-reporter 实验和乙酰化 RIP(ac⁴C-RIP)确定 Fus mRNA 上发生 ac⁴C 修饰位点;最后通过挽救实验观察 NAT10 介导 Fus 对宫颈癌细胞增殖的影响。结果:Fus 促进宫颈癌 HeLa 细胞增殖($t_{Fus}=14.06$, $t_{shR-Fus}=5.74$, 均 $P<0.05$);Fus 蛋白和 mRNA 的表达水平随 NAT10 表达增加而增加($t_{NAT10}=10.71$, $t_{shR-NAT10-1}=13.17$, $t_{shR-NAT10-2}=7.65$, 均 $P<0.05$);RIP 实验结果提示 Fus mRNA 与 NAT10 蛋白间存在相互作用($t=4.20$, $P<0.05$),且 NAT10 过表达细胞中 Fus mRNA 具有较高 ac⁴C 修饰水平($t=30.62$, $P<0.05$);另外,相对于载体对照细胞, NAT10 过表达细胞中 Fus mRNA 的稳定性增高($P<0.01$);发现 Fus mRNA 的 925~939 序列中的胞嘧啶为 ac⁴C 修饰位点;挽救实验结果显示 NAT10 介导 Fus 促进宫颈癌细胞的增殖($t=9.67$, 6.71 , $P<0.05$)。结论:Fus mRNA 被 NAT10 催化发生 ac⁴C 修饰, Fus 表达水平被上调,继而促进宫颈癌细胞的增殖。

关键词 宫颈癌; ac⁴C; Fus; NAT10

中图分类号 R737.33

文献标志码 A

Fus promotes cell proliferation by ac⁴C-modification in cervical cancer cells

JIN Ze-yuan, LI Yong-mei

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

Abstract Objective: To explore the mechanism of Fus RNA binding protein(Fus) in the promotion of cervical cancer cell proliferation.

Methods: The effects of Fus on cervical cancer cell proliferation were observed using MTT assays. Western blotting analysis and RT-qPCR were used to detect the influence of human N-acetyltransferase 10(NAT10) on expression levels of Fus. RNA immunoprecipitation assay(RIP) was detected the enrichment of Fus mRNA. RNA half-life assay was conducted to determine the effect of NAT10 on the stability of Fus mRNA. Based on the searching results of the possible ac⁴C-modification sites on Fus mRNA through PACES bioinformatics software, the EGFP reporter plasmids containing the possible wild-type or mutant ac⁴C-modification sites were constructed. EGFP-reporter assay and ac⁴C-RIP assay were used for the identification of ac⁴C modification sites on Fus mRNA. Lastly, the effect of NAT10 mediated Fus on the proliferation of cervical cancer cells was observed by rescue experiment. **Results:** Fus promoted cell proliferation of HeLa cells ($t_{Fus}=14.06$, $t_{shR-Fus}=5.74$, all $P<0.05$). The expression level of Fus protein and mRNA was increased with NAT10 expression($t_{NAT10}=10.71$, $t_{shR-NAT10-1}=13.17$, $t_{shR-NAT10-2}=7.65$, all $P<0.05$). The results of RIP experiment indicated that there was an interaction between Fus mRNA and NAT10 protein($t=4.20$, $P<0.05$), and Fus mRNA in NAT10 overexpression cells had a higher ac⁴C modification level($t=30.62$, $P<0.05$). In addition, the stability of Fus mRNA in NAT10 overexpression cells was higher than that in vector control cells($P<0.01$). Furthermore, cytosine in 925~939 sequence of Fus mRNA was ac⁴C modified site. The rescue experiment results showed that NAT10 mediated Fus to promote the proliferation of cervical cancer cells ($t=9.67$, 6.71 , both $P<0.05$). **Conclusion:** Fus mRNA can be ac⁴C modified by NAT10, which resulting in the enhancement of Fus expression and the promotion of cell proliferation in cervical cancer cells.

Key words cervical cancer; ac⁴C; Fus; NAT10

宫颈癌是世界范围内第四大女性好发肿瘤^[1]。根据 GLOBOCAN 2020 统计, 宫颈癌在 33 个国家都是女性癌症死亡的主要原因, 发展中国家女性宫颈癌死亡率高于发达国家(12.4/10 万比 5.2/10 万)^[2]。

作者简介 金泽源(1995-), 男, 硕士在读, 研究方向: 病原生物学;
通信作者: 李咏梅, E-mail: liym@tmu.edu.cn。

因此, 宫颈癌致病机制的研究及新型治疗靶点的筛选对于其临床治疗具有十分重要的意义。N⁴-acetylcytidine(ac⁴C)是广泛存在于原核与真核生物细胞内的 RNA 胞嘧啶 4 号 C 上的-NH₂ 发生的乙酰化修饰, 主要由乙酰转移酶及其同系物催化发生, 是十分重要的 RNA 表达调控因素^[3]。近期研究显

示,真核细胞 mRNA 上存在的大量 ac⁴C 修饰可以明显延长 mRNA 半衰期并促进其翻译^[4]。Fus RNA 结合蛋白(Fus RNA binding protein, Fus)是一种 RNA 结合蛋白,参与转录调节、RNA 剪接^[5]、RNA 转运、DNA 修复^[6]和损伤反应等过程^[7]。Fus 高表达与肺癌^[8]、胃癌^[9]、前列腺癌^[10]等肿瘤的发生、发展之间也存在关联,但 Fus 在宫颈癌中的作用机制尚不明确。本研究对 N-乙酰转移酶 10 (NAT10)在宫颈癌细胞中对 Fus mRNA 的 ac⁴C 修饰和促进癌细胞增殖的作用与机制进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 实验材料 人宫颈癌细胞系 HeLa 购自 ATCC 细胞库。DMEM 培养液和 Opti-MEM 培养液均购自 GIBCO BRL。EGFP、GAPDH、Fus 抗体均购自中国天津赛尔生物技术有限公司,NAT10 抗体购自 Abcam (中国)。Lipofectamine²⁰⁰⁰ 购自 Invitrogen。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 HeLa 细胞均用含有 10% FBS、100 IU/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的 DMEM 培养液培养,在 37℃、5%CO₂ 的恒温培养箱中培养。

1.2.2 过表达质粒构建 以 HeLa 细胞 mRNA 逆转录的 cDNA 为模板进行 PCR,PCR 程序为:预变性:95℃ 3 min,变性:95℃ 15 s,退火:57℃ 15 s,延伸:72℃ 2 min,循环 35 次,再延伸:75℃ 5 min,降温至 4℃。通过琼脂糖凝胶电泳回收 PCR 产物中的目的条带,NAT10 回收 3.1 kb 条带,Fus 回收 1.5 kb 条带,并分别克隆入 pCD3×Flag-KBE 和 pcDNA3×Flag 载体中。然后,通过测序进一步确认,通过 RT-qPCR 和 Western 印迹验证质粒有效性。

1.2.3 敲降质粒构建 设计并合成 Fus 和 NAT10 的 shRNA 引物。在 95℃退火 5 min,退火产物室温静置 2 h,将退火产物克隆入 pSilencer 2.1-U6 neo 载体中,通过测序进一步确认,通过 RT-qPCR 和 Western 印迹验证质粒有效性。

1.2.4 细胞转染 转染前 1 d 进行细胞转代,转染时细胞密度 70%左右,转染质粒量与 Lipofectamine²⁰⁰⁰ 的比例一般为 1 μg:0.8 μL。用 Opti-DMEM 培养液进行转染。转染后 6 h 换完全培养液继续培养。在转染 36 h 收取 RNA 样品,转染 48 h 收取蛋白样品。

1.2.5 Western 印迹实验 加入 5×蛋白上样缓冲液的蛋白样品沸水浴 5 min,-20℃冰置 5 min。蛋白上样量为 20 μL/样品,恒压 100 V 垂直电泳 90 min。恒流 350 mA 转膜 90 min,将蛋白转印到 PVDF 膜上。转膜结束后,用 5% Blotto 将 PVDF 膜室温封闭 2 h。一抗的比例分别为:NAT10(1:2 000)、Fus

(1:200)、GAPDH(1:5 000)、Flag(1:2 000)。二抗加入比例为:羊抗兔-HRP(1:2 000)、羊抗鼠-HRP(1:2 000)。滴加 ECL 化学发光液,暗室中用感蓝光胶片进行曝光,将胶片晾干后,分析结果并拍照,GAPDH 表达量为内参蛋白。

1.2.6 RT-qPCR 实验 用 Trizol 裂解细胞,并用氯仿(5:1)抽提 RNA,无水乙醇沉淀 RNA,晾干乙醇后 RNase-Free Water 溶解 RNA,测定 RNA 浓度及 OD_{260/280}。取 0.75 μg RNA 进行逆转录反应,逆转录反应应用 HiScript II Q RT SuperMix for qPCR 逆转录试剂盒(诺唯赞)进行,体系配制与反应程序按说明书进行操作。取 1 μL RT 产物进行 qPCR,反应体系为:2×Syber Green 7.5 μL、1 μL RT 产物、上下游 qPCR 引物各 1 μL、DDW 4.5 μL,每样做 3 个复孔。罗氏 LightCycler480 II 进行检测,反应程序为:预变性:94℃ 10 min,变性 94℃ 30 s、退火 56℃ 30 s、延伸 72℃ 30 s,40 个循环。qPCR 引物序列见表 1。

1.2.7 RNA 免疫沉淀实验(RIP) 使用 Magna RIP 试剂盒(Merck Millipore)按照说明书进行实验,自行配置苯酚-氯仿-异戊醇(125:24:1)抽提液,并准备 Flag 抗体和 ac⁴C 抗体。取 2 μL RIP 沉淀下来的 RNA 进行逆转录,通过 RT-qPCR 进行定量分析。qPCR 引物序列见表 1。

1.2.8 RNA 半衰期实验 细胞转染对照质粒和 NAT10 过表达质粒 30 h 后进行药物处理,用 1 μg/mL 放线菌素 D 分别处理 0、2、4、6 h,在转染 36 h 后一起收取样品提取 RNA,通过 RT-qPCR 进行定量分析,β-actin 作为内参基因。

1.2.9 EGFP-reporter 实验 首先利用生物信息学网站 PACES 预测 Fus mRNA(Genbank:NM_004960.4)中 ac⁴C 修饰位点,并根据预测的位点设计合成含有其 ac⁴C 修饰位点的 DNA 片段引物及突变位点的片段引物,经退火成双链后插入 EGFP 编码区下游,构建 Fus 的 ac⁴C 修饰 EGFP 报告载体。引物序列见表 1。质粒构建成功后转染 HeLa 细胞,通过 EGFP 荧光强度鉴定质粒有效性。将 pCD3×flag-NAT10 与 pEGFP-Fus-ac⁴C 报告质粒(0.5 μg:0.5 μg)共转入 HeLa 细胞中,48 h 后荧光显微镜下检测 EGFP 荧光强度,从而筛选 Fus mRNA 上的 ac⁴C 修饰位点。以上实验各组同时共转染等量的 pRFP-C,以 RFP 荧光强度作为评价各组转染效率的内参。

1.2.10 MTT 实验 细胞转染 48 h 后,将细胞消化下来并进行计数,在 96 孔板中每孔种入 5 000 个细胞,每个复孔做 5 个复孔,在 37℃、5%CO₂ 进行培养。48 h 后每孔加入 10 μL MTT 试剂,37℃孵育 5 h

后,弃去培养液,每孔加入 100 μ L DMSO,120 r/min 摇床上避光振荡 5 min,用酶标仪测量 570 nm 波长的吸光度。

1.3 统计学处理 实验均重复 3 次,应用 Graphpad Prism 8、Image J 等软件进行数据分析。正态分布的计量数据均以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,组间比较采用双侧 *Student-t* 检验, $P<0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 Fus 促进宫颈癌细胞增殖 首先验证 Fus 的过表达及敲降质粒的有效性,结果发现,Fus 的过表达及敲降质粒在 mRNA (图 1A, $t_{Fus}=11.92$; $t_{shR-Fus}=14.22$, 均 $P<0.05$) 和蛋白水平 (图 1B) 均可有效调节 Fus 的表达;继而,MTT 实验结果显示,过表达 Fus 可以使 HeLa 细胞的增殖能力上调 1 倍 ($t=14.06$, $P<0.05$),而敲降 Fus 会使 HeLa 细胞的增殖能力下降 0.3 倍 (图 1C, $t=5.74$, $P<0.05$)。

2.2 Fus mRNA 的稳定性受 NAT10 调控 当 NAT10 过表达时,Western 印迹结果表明 Fus 蛋白表达水平升高 (图 2A),qPCR 结果表明 Fus mRNA 表达水平 ($t_{NAT10}=10.71$, $P<0.05$) 也被上调;而当 NAT10 表达下调时,Fus 在蛋白水平和 mRNA 水平 ($t_{shR-NAT10-1}=13.17$; $t_{shR-NAT10-2}=7.65$, 均 $P<0.05$) 均被下调 (图 2B)。继而,RIP 实验结果显示,Fus mRNA 与

NAT10 蛋白间存在相互作用 (图 2C, $t=4.2$, $P<0.05$)。RNA 半衰期实验检测结果显示过表达 NAT10 可明显延长 Fus mRNA 的半衰期 (图 2D, $P<0.05$)。

2.3 Fus mRNA 中存在 NAT10 介导调控的 ac⁴C 修饰位点 利用生物信息学网站 PACES^[11] 预测得到 Fus mRNA 中存在两个可能发生 ac⁴C 修饰的 motif,分别位于 748~762 和 925~939,并据此设计并构建了分别含有这两个候选结合位点及相应突变位点的 EGFP 报告载体 (图 3A)。EGFP-reporter 实验结果显示,与 EGFP 空白质粒组相比,925~939 位点野生型组的 EGFP 荧光强度明显增加,而突变体组的 EGFP 荧光强度明显降低,野生型组和突变体组的 EGFP 表达水平具有明显差异 ($t=42.75$, $P<0.05$);而插入了 748~762 的野生型组与突变型组的 EGFP 荧光强度无明显差异 ($t=0.60$, $P=0.61$) (图 3B、C)。ac⁴C-RIP 实验进一步说明,在 NAT10 过表达 HeLa 细胞中 Fus mRNA 925~939 序列上存在 ac⁴C 修饰位点富集情况 (图 3D, $t=30.62$, $P<0.05$)。

2.4 NAT10 介导 Fus 促进宫颈癌细胞增殖 通过挽救实验检测 Fus 对 NAT10 促进宫颈癌细胞增殖的影响,结果显示,敲降 Fus 可明显抑制过表达 NAT10 对 HeLa 细胞增殖的促进作用 (图 4, $t=9.67$ 、 6.71 , 均 $P<0.05$)。

表 1 引物序列

Tab 1 Sequence of each primer

引物名称	引物序列(5'→3')
Fus-sense	GCGGGATCCATGGCCTCAAACGATTATAC
Fus-antisense	CTGCGCTCGAGATACGGCTCTCCCTGCGATC
shR-Fus-Top	GATCCGTGACCGTGGTGGCTTCAATACTCGAGTATTGAAGCCACCACGGTCACCTTTTGA
shR-Fus-Bot	AGCTTCAAAAAGTGACCGTGGTGGCTTCAATACTCGAGTATTGAAGCCACCACGGTCACG
NAT10-Frd- (KpnI)	GCGGGTACCATGCATCGGAAAAAGGTGGAT
NAT10-Rev- (EcoRI)	GCGGAATTCTATTCTTCGCGCTTCAGTTTC
NAT10-shR1-Top	GATCCGCAATTGTACACAGTGACTATCTCGAGATAGTCACTGTGTACAATTGCTTTTGA
NAT10-shR1-Bot	AGCTTCAAAAAGCAATTGTACACAGTGACTATCTCGAGATAGTCACTGTGTACAATTGCGG
NAT10-shR2-Top	GATCCGATCCAGACTTTGGTGGTCTGCTCGAGCAGACCACCAAAAGTCTGGATCTTTTGA
NAT10-shR2-Bot	AGCTTCAAAAAGATCCAGACTTTGGTGGTCTGCTCGAGCAGACCACCAAAAGTCTGGATCG
Fus-ac4C-748-Top	GATCCCGCGCGCGCGCGCGCGG
Fus-ac4C-748-Bot	AATTCGCGCGCGCGCGCGCGG
Fus-ac4C-748-Mut-Top	GATCCTGGTGGTGGTGGTGGG
Fus-ac4C-748-Mut-Bot	AATTCGCGCGCGCGCGCGCGG
Fus-ac4C-925-Top	GATCCCAACAACACCATCTTG
Fus-ac4C-925-Bot	AATTCAGATGGTGTGTTGG
Fus-ac4C-925-Mut-Top	GATCC TAAGAATACTATGTTG
Fus-ac4C-925-Mut-Bot	AATTCACATAGTATTCTTAG
NAT10-qPCR-Frd	GGGATTGGCCTGCACGATA
NAT10-qPCR-Rev	GGCTCCATGACCACATCCTT
qPCR-Fus-Forward	TCAATCCTCCATGAGTAGTGCT
qPCR-Fus-Reverse	CACGGTCCTGCTGTCCATA
qPCR- β -actin-Forward	CGTGACATTAAGGAGAAGCTG
qPCR- β -actin-Reverse	CTAGAAGCATTTGCGGTGGAC
Fus-925-ac4C-qPCR-Sense	ACCGTGGTGGCTTCAATA
Fus-925-ac4C-qPCR-anti-sense	CTTGAAGTAATCAGCCACA

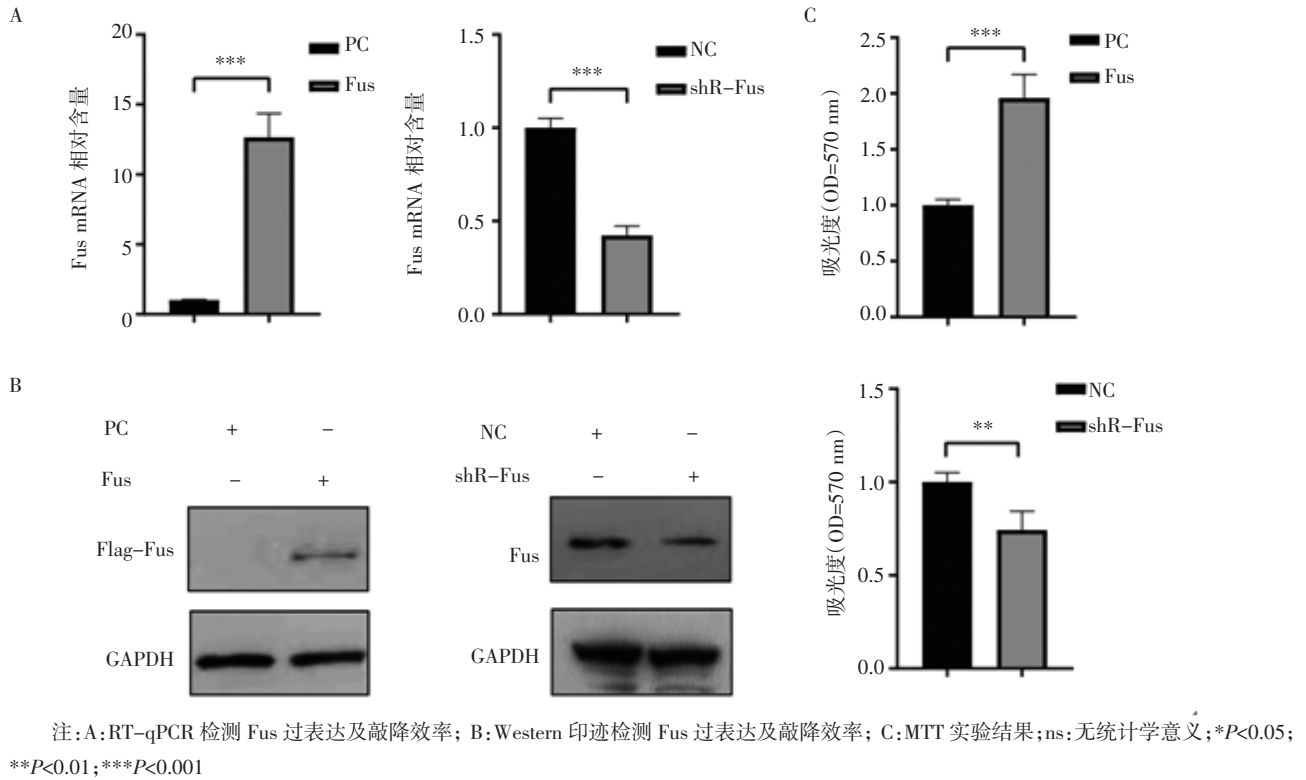


图 1 Fus 促进宫颈癌细胞增殖

Fig 1 Fus promoted the proliferation of cervical cancer cells

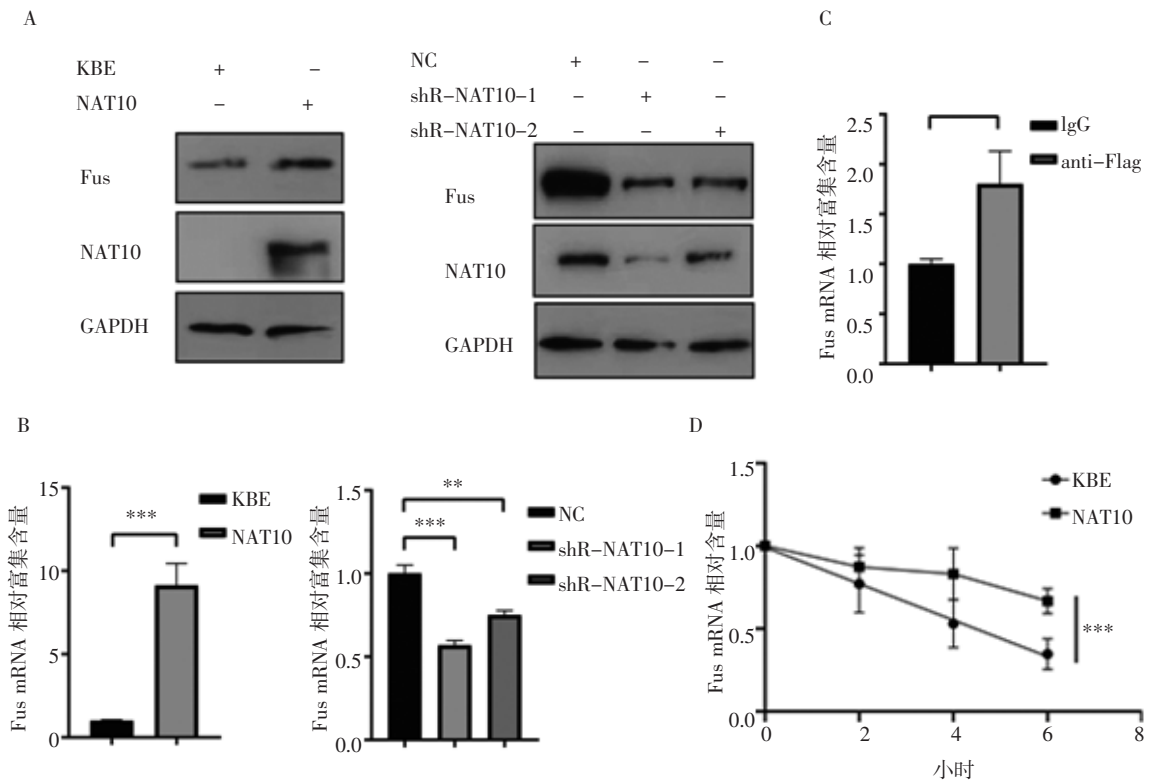
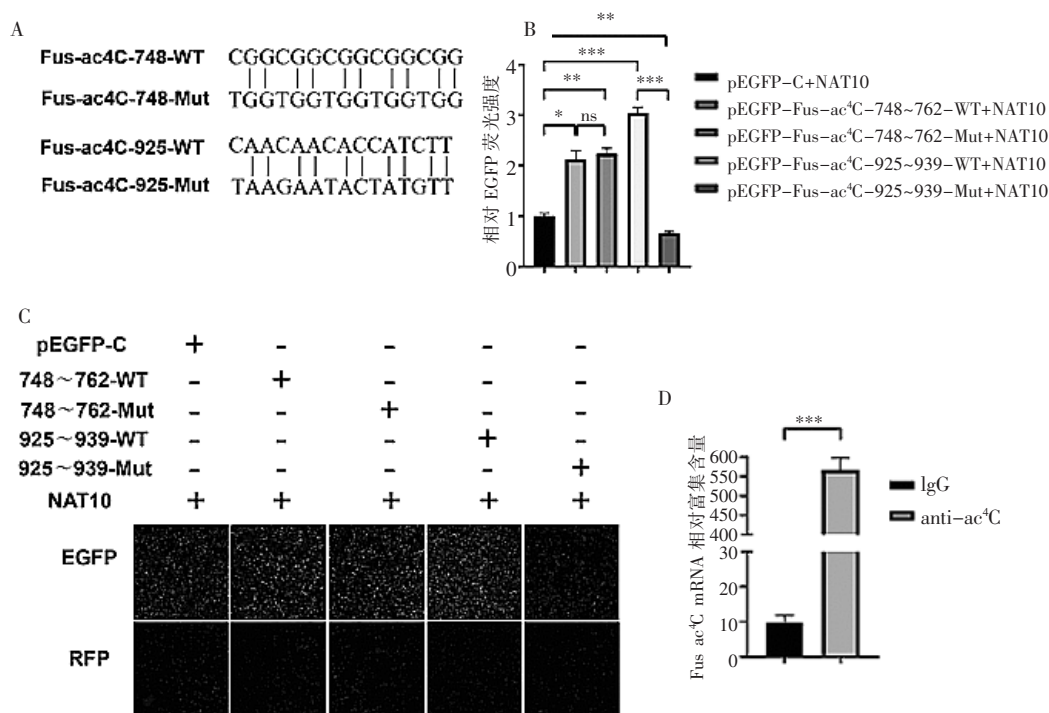


图 2 Fus mRNA 的稳定性受 NAT10 调控

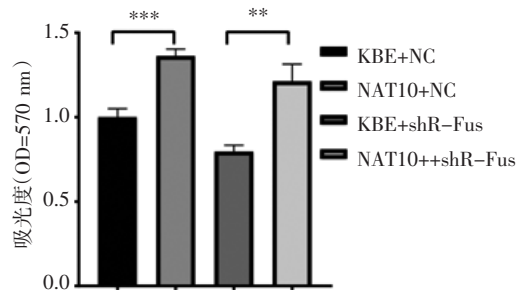
Fig 2 The stability of NAT10 mRNA regulated by NAT10



注:A:PACES 网站预测 Fus mRNA 上的乙酰化位点;B、C:EGFP-reporter 实验观察在 NAT10 与 Fus 的 EGFP 报告质粒共转染 HeLa 细胞中,Fus mRNA 上不同乙酰化位点野生型和突变体的 EGFP 荧光表达情况;D:ac⁴C -RIP 实验验证 ac⁴C 位点;ns: 无统计学意义;* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

图3 Fus mRNA 上乙酰化位点的筛选与验证

Fig 3 Prediction and validation of ac⁴C sites on Fus mRNA



注:** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

图4 NAT10 介导 Fus 促进宫颈癌细胞增殖

Fig 4 NAT10 promoted Fus-mediated cell proliferation in HeLa cells

3 讨论

宫颈癌是我国女性的高发肿瘤之一,高危型 HPV 感染在生物学和流行病学上已被确定为宫颈癌的主要原因^[12]。然而,持续的高危 HPV 感染并不足以使宫颈上皮细胞发生永生化和癌变,而表观遗传修饰,诸如 m6A 修饰^[13]、m1A 修饰^[14]、m5C^[15]修饰等均会诱导宫颈癌的恶性进展,在宫颈癌发生、发展中发挥着重要作用^[16]。本研究发现宫颈癌细胞 Fus mRNA 中存在 NAT10 介导的 ac⁴C 修饰调控,从而 Fus 表达上调,促进宫颈癌细胞增殖。

Fus 属于 FET/TET 蛋白家族,是一种多功能 DNA、RNA 结合蛋白^[17]。Fus 不但可以与 microRNA、

circRNA 和 lncRNA 结合并参与 RNA 的剪切修饰,也可以与靶 mRNA 的 3' UTR 结合调控 mRNA 稳定性和翻译^[18]。Fus 异常表达与肿瘤细胞增殖之间存在密切关联。例如,Fus 与环状 RNA circSPARC 结合,通过激活 STAT3 信号通路促进结直肠癌发展^[19]。Fus 也可以在长链 RNA Has_circ_0026628 辅助下与 SP1 mRNA 相互作用,并延长 SP1 mRNA 半衰期,SP1 继而触发 Wnt/ β -catenin 信号通路而促进结直肠癌发展^[20]。Fus 还可以通过稳定 MAP4K1 mRNA 促进胃癌发展^[9]。本研究结果表明 Fus 可以促进宫颈癌细胞的增殖。这与 Fus 在其他肿瘤中报道的促癌结果相一致。

ac⁴C 是一种进化上相对保守的化学修饰,ac⁴C 修饰会延长 mRNA 半衰期并促进其翻译,及增加蛋白翻译准确性^[21]。ac⁴C 与多种人类疾病,如肿瘤^[22]、心肌梗死^[23]发生、发展与预后高度相关。NAT10 是一种依赖于 ATP 的 RNA 乙酰基转移酶,是真核细胞中催化 mRNA 发生 ac⁴C 修饰的已知关键酶^[24]。已有文献报道 NAT10 促进宫颈癌细胞增殖^[25]。本研究首先证明了过表达 NAT10 可升高 Fus 在 mRNA 和蛋白水平的表达,且过表达 NAT10 会明显上调 Fus mRNA 的 ac⁴C 修饰水平,并且会明显增加 Fus mRNA 稳定性。然后,笔者利用 PACES 网站预测和

EGFP 报告系统预测确定了 Fus mRNA 上 ac⁴C 修饰位点,发现 925~939 段是 Fus mRNA 发生 NAT10 介导 ac⁴C 修饰的潜在靶序列。综合这些结果说明, NAT10 可以使 Fus mRNA 发生 ac⁴C 修饰,从而上调其表达。至于另一预测的 Fus mRNA ac⁴C 修饰位点(748~762 段),与 EGFP 空白质粒组相比,克隆入野生型 748~762 序列乙酰化修饰位点和克隆入突变型 748~762 序列乙酰化修饰位点的 EGFP 报告质粒所表达的 EGFP 荧光强度明显增强。但野生型和突变型所表达 EGFP 荧光强度并无明显差异,其原因尚不清楚,此结果显示 748~762 序列并非 ac⁴C 修饰位点,有待今后进一步研究。最后笔者通过功能挽救实验表明了 NAT10 通过 Fus 介导发挥促进宫颈癌增殖的作用。

综上所述, Fus mRNA 在宫颈癌细胞中存在 NAT10 介导的 ac⁴C 修饰调节,进而 Fus 表达被上调,促进了宫颈癌细胞增殖。本研究为理解宫颈癌的发生、发展提供新的实验依据,也可能为宫颈癌的诊断与治疗提供了新的研究靶点,具有潜在的临床应用意义。

参考文献:

- [1] BUSKWOFFIE A, DAVID-WEST G, CLARELARE C A. A review of cervical cancer: incidence and disparities [J]. J Natl Med Assoc, 2020, 112(2): 229-232.
- [2] 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.
- [3] TANIGUCHI T, MIYAUCHI K, SAKAGUCHI Y, et al. Acetate-dependent tRNA acetylation required for decoding fidelity in protein synthesis [J]. Nat Chem Biol, 2018, 14(11): 1010-1020.
- [4] ARANGO D, STURGILL D, ALHUSAINI N, et al. Acetylation of cytidine in mRNA promotes translation efficiency [J]. Cell, 2018, 175(7): 1872-1886.
- [5] ANDERSSON M K, STÅHLBERG A, ARVIDSSON Y, et al. The multifunctional FUS, EWS and TAF15 proto-oncoproteins show cell type-specific expression patterns and involvement in cell spreading and stress response [J]. BMC cell biology, 2008, 9: 37.
- [6] ZINSZNER H, SOK J, IMMANUEL D, et al. TLS (FUS) binds RNA *in vivo* and engages in nucleo-cytoplasmic shuttling [J]. J Cell Sci, 1997, 110(Pt 15): 1741-1750.
- [7] WARREN J L, KENDRA L C, GEOFFREY G H. TLS, EWS and TAF15: a model for transcriptional integration of gene expression [J]. Brief Funct Genomic Proteomic, 2006, 5(1): 8-14.
- [8] LIU S, YANG N, JIANG X, et al. Fus-induced circular RNA ZNF609 promotes tumorigenesis and progression via sponging miR-142-3p in lung cancer [J]. J Cell Physiol, 2021, 236(1): 79-92.
- [9] WU Q, MA J, MENG W, HUI P, et al. DLX6-AS1 promotes cell proliferation, migration and EMT of gastric cancer through FUS-regulated MAP4K1 [J]. Cancer Biol Ther, 2020, 21(1): 17-25.
- [10] HAILE S, LAL A, MYUNG J K, et al. FUS/TLS is a co-activator of androgen receptor in prostate cancer cells [J]. PLoS One, 2011, 6(9): e24197.
- [11] ZHAO W, ZHOU Y, CUI Q, et al. PACES: prediction of N4-acetylcytidine (ac⁴C) modification sites in mRNA [J]. Sci Rep, 2019, 9: 11112.
- [12] MUÑOZ N, CASTELLSAGUÉ X, BERRINGTON DE GONZALEZ A, et al. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer [J]. Vaccine, 2006, 24 (Suppl 3): 1-10.
- [13] MA X, LI Y, WEN J, et al. m⁶A RNA methylation regulators contribute to malignant development and have a clinical prognostic effect on cervical cancer [J]. Am J Transl Res, 2020, 12(12): 8137-8146.
- [14] WANG Q, ZHANG Q, HUANG Y, et al. m¹A regulator TRMT10C predicts poorer survival and contributes to malignant behavior in gynecological cancers [J]. DNA Cell Biol, 2020, 39(10): 1767-1778.
- [15] YU J, LIANG L L, LIU J, et al. Development and validation of a novel gene signature for predicting the prognosis by identifying m5C modification subtypes of cervical cancer [J]. Front Genet, 2021, 12: 733715.
- [16] SAAVEDRA K P, BREBI P M, ROA J C. Epigenetic alterations in preneoplastic and neoplastic lesions of the cervix [J]. Clin Epigenetics, 2012, 4(1): 13.
- [17] BERTOLOTI A, LUTZ Y, HEARD D J, et al. hTAF(II)68, a novel RNA/ssDNA-binding protein with homology to the pro-oncoproteins TLS/FUS and EWS is associated with both TFIID and RNA polymerase II [J]. EMBO J, 1996, 15(18): 5022-5031.
- [18] LAGIER-TOURENNE C, POLYMERIDOU M, CLEVELAND D W. TDP-43 and FUS/TLS: emerging roles in RNA processing and neurodegeneration [J]. Hum Mol Genet, 2010, 19(R1): R46-R64.
- [21] Janknecht R. EWS-ETS oncoproteins: the linchpins of Ewing tumors [J]. Gene, 2005, 19(363): 1-14.
- [19] TOL J, KOOPMAN M, CATS A, et al. Chemotherapy, bevacizumab, and cetuximab in metastatic colorectal cancer [J]. N Engl J Med, 2009, 360(6): 563-572.
- [20] YU Y, PENG K, LI H, et al. SP1 upregulated FoxO3a promotes tumor progression in colorectal cancer [J]. Oncol Rep, 2018, 39(5): 2235-2242.
- [21] BRUENGER E, KOWALAK J A, KUCHINO Y, et al. 5S rRNA modification in the hyperthermophilic archaea Sulfolobus solfataricus and Pyrodicticum occultum [J]. FASEB J, 1993, 7(1): 196-200.
- [22] ITO S, HORIKAWA S, SUZUKI T, et al. Human NAT10 is an ATP-dependent RNA acetyltransferase responsible for N4-acetylcytidine formation in 18 S ribosomal RNA (rRNA) [J]. J Biol Chem, 2014, 289(52): 35724-35730.
- [23] WANG K, ZHOU LY, LIU F, et al. PIWI-interacting RNA HAAPIR regulates cardiomyocyte death after myocardial infarction by promoting NAT10-Mediated ac⁴C acetylation of Tfec mRNA [J]. Adv Sci (Weinh), 2022: e2106058.
- [24] DOMINISSINI D, RECHACI G. N4-acetylation of cytidine in mRNA by NAT10 regulates stability and translation [J]. Cell, 2018, 175(7): 1725-1727.
- [25] 张雪, 汤华. 乙酰转移酶 10 通过介导盘状蛋白结构域受体 1 mRNA 的 ac⁴C 乙酰化修饰促进宫颈癌细胞的恶性行为 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2022, 38(5): 603-613.

(2022-05-26 收稿)