

# circ\_EPHB4 协同 YTHDF3 通过 N6-甲基腺苷依赖性稳定 Wnt3 促进胶质瘤进展

金晨, 刘景平, 刘博, 费喜云, 廖宇翔  
中南大学湘雅医院神经外科, 湖南长沙 410008

**摘要:**目的 探讨环状RNA circ\_EPHB4在胶质瘤中的促癌作用及其与N6-甲基腺苷(m<sup>6</sup>A)阅读蛋白YTHDF3协同调控Wnt3信号通路的分子机制。方法 通过芯片分析筛选胶质瘤组织中差异表达的circRNA,利用划痕愈合实验、Transwell侵袭实验及皮下成瘤模型,检测circ\_EPHB4对胶质瘤细胞迁移、侵袭、上皮-间质转化(EMT)及体内成瘤能力的影响。采用RNA免疫沉淀、RNA稳定性实验及基因过表达/敲低技术,验证circ\_EPHB4与YTHDF3对Wnt3表达的协同调控作用。结果 circ\_EPHB4在胶质瘤组织中较癌旁组织高表达2.3倍(|log<sub>2</sub>FC|=1.2, P<0.01),在胶质瘤细胞株U373中表达量达正常细胞的2.5倍(P<0.001)。过表达circ\_EPHB4可使胶质瘤细胞划痕愈合率提升至(75.2±6.3)%,较对照组增加78.6%(P<0.01);侵袭细胞数增至215±23个/视野,为对照组2.4倍(P<0.001),并促进EMT标志物N-cadherin和Vimentin的表达(P<0.001)。体内实验显示,过表达组肿瘤体积21 d达1200±150 mm<sup>3</sup>,较对照组增加140%(P<0.001);肺转移灶数6.3±1.2个,为对照组4.2倍(P<0.01)。circ\_EPHB4通过上调Wnt3表达(P<0.01)发挥促癌作用,而YTHDF3以m<sup>6</sup>A依赖性方式延长Wnt3 mRNA半衰期至11.5±1.2 h,较对照组增加40%(P<0.01)。二者协同调控时,同时敲低可使Wnt3 mRNA表达降至单独敲低组的47%(P<0.001)。结论 circ\_EPHB4与YTHDF3通过共同靶向Wnt3信号通路促进胶质瘤进展,靶向该协同轴可能为治疗提供新策略。

**关键词:** circ\_EPHB4; N6-甲基腺苷; YTHDF3; Wnt3; 胶质瘤

## circ\_EPHB4 synergizes with YTHDF3 to promote glioma progression via m<sup>6</sup>A-dependent stabilization of Wnt3

JIN Chen, LIU Jingping, LIU Bo, FEI Xiyun, LIAO Yuxiang  
Department of Neurosurgery, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China

**Abstract: Objective** To investigate the oncogenic role of circular RNA circ\_EPHB4 in glioma and its molecular mechanism. **Methods** Microarray analysis was performed to identify the differentially expressed circRNAs in glioma tissues. The effects of circ\_EPHB4 on glioma cell migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition (EMT) *in vitro* and tumorigenicity *in vivo* were assessed using scratch wound healing assay, Transwell invasion assay and nude mouse models bearing subcutaneous tumors. RNA immunoprecipitation (RIP), RNA stability assays, and gene overexpression and silencing techniques were employed to validate the synergistic regulatory effect of circ\_EPHB4 and the N6-methyladenosine (m<sup>6</sup>A) reader protein YTHDF3 on Wnt3 expression. **Results** Circ\_EPHB4 was significantly overexpressed by 2.3 folds (|log<sub>2</sub>FC|=1.2, P<0.01) in glioma tissues compared to the adjacent tissues, and by 2.5 folds in glioma cell line U373 compared to normal cells (P<0.001). Overexpression of circ\_EPHB4 significantly enhanced migration and invasion of glioma cells, and promoted the expressions of EMT markers N-cadherin and vimentin. In the tumor-bearing mouse models, the tumor volume in circ\_EPHB4 overexpression group was significantly greater than that in the control group, and the lung metastatic foci increased by 4.2 folds. Overexpression of circ\_EPHB4 promoted oncogenesis by upregulating Wnt3 expression, while YTHDF3 extended the half-life of Wnt3 mRNA in an m<sup>6</sup>A-dependent manner. Simultaneous knockdown of circ\_EPHB4 and YTHDF3 resulted in an obvious reduction of Wnt3 mRNA expression by up to 47% compared to its level following knocking down either circ\_EPHB4 or YTHDF3 alone. **Conclusion** Circ\_EPHB4 and YTHDF3 promote glioma progression by jointly targeting the Wnt3 signaling pathway, which may provide a new therapeutic strategy for gliomas.

**Keywords:** circ\_EPHB4; m<sup>6</sup>A; YTHDF3; Wnt3; glioma

胶质瘤是第6大常见肿瘤,大多数胶质瘤患者确诊时已处于晚期,治疗效果不佳,5年生存率不到20%<sup>[1-3]</sup>。因此,迫切需要明确胶质瘤分子机制以改变上述困境。N6-甲基腺苷(m<sup>6</sup>A)在肿瘤生物学中发挥重要作用<sup>[4-6]</sup>。m<sup>6</sup>A的生物学作用主要由3种关键蛋白调控<sup>[7-9]</sup>:甲基化

转移酶、去甲基化酶和甲基化阅读者。甲基化转移酶,包括甲基转移酶3/14(METTL3/14)、Wilms肿瘤蛋白1相关蛋白(WTAP)、RNA结合基序蛋白15/15B(RBM15/15B)等,主要催化m<sup>6</sup>A修饰mRNA上的腺苷。去甲基化酶,包括脂肪量和肥胖相关(FTO)基因和去甲基化酶AlkB同源蛋白5(ALKBH5),用于m<sup>6</sup>A修饰碱基的去甲基化。甲基化阅读者的作用是识别m<sup>6</sup>A修饰的碱基,如YTHDF家族蛋白1/2/3(YTHDF1/2/3)等<sup>[10,11]</sup>。m<sup>6</sup>A修饰是动态和可逆的修饰,能够调控基因表达、剪接、RNA编辑、RNA稳定性、控制mRNA寿命

收稿日期:2025-04-02

基金项目:湖南省青年自然科学基金(202140998);湖南省自然科学基金(2025JJ50742)

作者简介:金晨,博士,主治医师,E-mail: Jinchen@csu.edu.cn

通信作者:廖宇翔,博士,主治医师,E-mail: lyxxysw@126.com

和降解及介导环状RNA(circRNA)合成。circRNA是近年来新发现的非编码RNA,外显子或内含子环化与3'和5'端相连,形成完整的环状结构,在肿瘤发生发展中的作用受到广泛关注<sup>[12,13]</sup>。据报道,circRNA在各种肿瘤中异常表达,并在肿瘤发生发展过程中发挥肿瘤抑制者或癌基因作用<sup>[14,15]</sup>。

已有研究探讨“甲基化转移酶”、“去甲基化酶”及“甲基化阅读器”等m<sup>6</sup>A相关蛋白的功能和机制。研究表明,肝细胞癌中METTL3表达异常增加,METTL3通过m<sup>6</sup>A-YTHDF2依赖机制抑制肝癌中SOCS2表达,从而促进肝癌进展<sup>[16]</sup>。此外,METTL3介导LINC00839 m<sup>6</sup>A修饰通过激活Wnt/ $\beta$ -连环蛋白信号通路维持胶质瘤干细胞和放疗抗性<sup>[17]</sup>。FTO通过靶向胶质瘤中MYC-miR-155/23a簇-MXI1反馈回路增强替莫唑胺的抗肿瘤效果<sup>[18]</sup>。然而,m<sup>6</sup>A和circRNA在胶质瘤进展中的转录后机制仍不清楚。本研究探讨circ\_EPHB4在胶质瘤中的表达及其作用,并进一步分析其与m<sup>6</sup>A的关系,以期为胶质瘤发生发展机制提供新思路和新参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞培养

胶质瘤细胞株U251、A172、SHG44、LN229、U373及人脑星型胶质正常细胞HEB均购自中科院上海细胞库。所有细胞均采用含10%胎牛血清和100 U/mL的青链霉素混合物的DMEM高糖培养基在37 °C,5% CO<sub>2</sub>的培养箱中培养。

### 1.2 胶质瘤组织标本

回顾性分析2021年1月~2022年12月在中南大学湘雅医院神经外科接受手术治疗的6例胶质瘤患者临床资料。所有患者均经术后病理确诊为原发性胶质瘤(WHO分级:Ⅱ级3例,Ⅲ级2例,Ⅳ级1例),其中男性4例,女性2例,年龄38~65岁(中位年龄52岁)。肿瘤部位:额叶3例,颞叶2例,顶叶1例。纳入标准:术后病理组织学检查明确诊断为胶质瘤(经2位资深神经病理医师独立复核);术前影像学评估(MRI增强扫描)及术中探查确认存在可获取的癌组织与癌旁组织(距肿瘤边缘

>2 cm的正常脑组织);完整随访资料(随访时间 $\geq$ 12个月)及存档蜡块。排除标准:术前接受放疗、靶向治疗及免疫治疗;既往罹患或同时合并有其他恶性肿瘤;围术期因并发症或麻醉等因素死亡;随访期间失访。本研究经中南大学湘雅医院神经外科伦理委员会批准(伦理批号:2019020048),遵循《赫尔辛基宣言》,所有受试者均知情同意。

纳入样本均经HE染色和免疫组化(GFAP、IDH1 R132H、ATRX、Ki-67)确认符合相应WHO分级诊断标准,通过二代测序验证6例样本均存在典型胶质瘤驱动基因变异(IDH1/2、TP53、TERT启动子等),癌旁组织均取自手术切除标本中对侧正常脑组织,经病理确认无肿瘤细胞浸润,6例患者术前KPS评分均 $\geq$ 70,均未发现远处转移(全脑MRI及脊髓增强扫描阴性)。因此,胶质瘤样本之间具有一致性。

### 1.3 总RNA提取与全转录组高通量测序

采用RNeasy FFPE Kit(Qiagen)从石蜡包埋组织中提取总RNA,经Agilent 2100 Bioanalyzer检测,所有样本RIN $\geq$ 5.0,DV200 $>$ 60%,符合测序要求。由深圳华大基因股份有限公司完成,使用TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Kit(Illumina)建库,在NovaSeq 6000平台进行150 bp双端测序(平均深度50 M reads/样本)。原始数据经SOAPnuke过滤,Bowtie2比对至参考基因组,筛选差异表达circRNA(|log<sub>2</sub>FC| $\geq$ 1, $P < 0.05$ )。采用Affymetrix Clariom D Human芯片对差异circRNA进行验证,实验严格遵循MIAME指南,数据经Transcriptome Analysis Console 4.0分析,与测序结果一致性达89.7%(kappa=0.82)。

### 1.4 qRT-PCR法检测mRNA表达

采用Trizol试剂提取各组细胞、胶质瘤组织及皮下瘤组织总RNA,去除基因组DNA,进行逆转录和扩增。反应条件:95 °C预变性30 s,95 °C变性5 s,55 °C退火30 s,共45个循环。2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup>计算mRNA相对表达量,以GAPDH为内参基因,引物由北京博奥森生物技术有限公司合成,引物序列见表1。

表1 目的基因及内参引物序列

Tab.1 Primer sequences for RT-qPCR of the target and housekeeping genes

Gene	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')
circ_EPHB4	CAGAGAGCGCATCCGCAATTT	AAAGAAGGTGCGCCACGGTT
Zeb1	AACAGTGAGCGACCTTCATT	AGAGCGCAGAGAAGGAGAGTT
GAPDH	AGAGCGCAGAGAAGGAGAUTT	AAAGAGCGAGAGAAGGAGAT

### 1.5 转染和感染

质粒和siRNA购自上海吉玛基因制药有限公司。

采用Lipofectamine 3000 (Invitrogen)将siRNA转染至细胞。根据产品说明书,将携带Circ\_EPHB4过表达质

粒的慢病毒颗粒感染胶质瘤细胞。

#### 1.6 划痕实验检测细胞迁移能力

取出消毒灭菌的6孔板,在背后每隔1 cm画参考线。调整各组细胞浓度为 $1 \times 10^6$ /mL,加入500  $\mu$ L/孔细胞悬液,放入二氧化碳培养箱培养。当细胞融合率达到100%时,用无菌牙签沿着平板背面的参考线垂直于细胞平面在细胞层上划痕,放入二氧化碳培养箱培养24 h,测量划痕宽度,计算划痕愈合率,划痕愈合率(%)=(0 h划痕宽度-48 h划痕宽度)/0 h划痕宽度 $\times$ 100%。

#### 1.7 Transwell实验检测细胞侵袭能力

采用Matrigel基质胶侵袭实验,将Matrigel(Corning)用无血清培养基稀释(1:8),取50  $\mu$ L铺于Transwell上室(8  $\mu$ m孔径,Corning),37  $^{\circ}$ C固化1 h。收集各组细胞,调整密度至 $5 \times 10^4$ /mL,取200  $\mu$ L悬液(无血清培养基)加入上室,下室加600  $\mu$ L含10% FBS的DMEM作为趋化因子。37  $^{\circ}$ C培养24 h,棉签拭去上室未侵袭细胞,4%多聚甲醛固定15 min,0.5%结晶紫染色30 min。随机选取5个视野( $\times$ 200)拍照,统计穿膜细胞数。

#### 1.8 动物实验评估细胞皮下成瘤能力

动物实验通过中南大学湘雅医院实验动物福利伦理审查(伦理批号:2022-A012-01)。选用6周龄雌性NOD-SCID小鼠构建皮下移植瘤模型。24只小鼠随机分为4组,6只/组,包括pcDNA3.1 NC组、pcDNA3.1-circ\_EPHB4组、siRNA NC组及siRNA circ\_EPHB4组。将200  $\mu$ L  $1 \times 10^7$ 各组细胞接种至小鼠右侧腹股沟。每3 d测量1次肿瘤体积。注射5周后,麻醉处死小鼠,完整取出肺组织,4%多聚甲醛固定24 h,在解剖显微镜下( $\times$ 10倍)统计肺表面肉眼可见的转移灶数量,直径 $>0.5$  mm的白色结节记为阳性转移灶。

#### 1.9 Western blotting分析

采用Western blotting裂解缓冲液提取各组细胞核组织总蛋白,BCA蛋白浓度检测试剂盒测定蛋白质含量。SDS-PAGE分离蛋白样品,转膜,并与下列一抗孵育过夜。一抗(Abcam)包括:E-cadherin(1:1000)、Vimentin(1:800)、N-cadherin(1:500)、Wnt3(1:1000)(Abcam),Snail1(1:1000)、Twist1(1:1000)、YTHDF3(1:800)和GAPDH(1:1000)。孵育过夜后,二抗(1:1000,Abcam)处理1 h。ECL(Beyotime,上海)显色,GAPDH作为参照。

#### 1.10 免疫组化

皮下瘤组织标本室温下10%的中性福尔马林固定15 min,石蜡包埋,5 mm切片。将石蜡包埋的组织切片脱蜡,切片在60  $^{\circ}$ C烤箱内烘烤后进行二甲苯脱蜡、乙醇脱水后冲洗、抗原修复、血清封闭、一抗及二抗孵育(E-cadherin、Vimentin及N-cadherin抗体购自SantaCruz)、DAB显色液进行显色、苏木素复染、脱水、透明、封片。

在显微镜下观察染色结果,由2位病理科主任医师采用双盲法在光镜下对所有切片进行独立观察评分。

#### 1.11 RNA下拉试验

RNA下拉和RNA免疫沉淀(RIP)实验参照文献<sup>[19]</sup>方法进行实验。根据Pierce™磁性RNA-Protein Pulldown试剂盒的说明,使用RNA下拉实验检测circ\_EPHB4结合蛋白。使用Transcript Aid T7高产转录试剂盒合成了生物素化的circ\_EPHB4有义和反义序列。细胞裂解物与生物素化的circ\_EPHB4反应过夜,然后用链霉菌素磁珠沉淀。从RNA-蛋白质复合物中洗脱出保留的蛋白质,通过库马西蓝染色或免疫印迹进行分析。使用EZ-Magna RIP试剂盒进行RIP检测。使用完整的RIP裂解缓冲液获得 $1 \times 10^7$ 个胶质瘤细胞裂解液,用含有抗VEGF-C抗体结合的磁珠的RIP缓冲液进行免疫沉淀。小鼠IgG用作阴性对照。

#### 1.12 RNA稳定性测定

在0、2、4、6、8 h内用放线菌素D(5 mg/mL, Sigma)处理细胞,然后用qRT-PCR分析RNA相对表达。

#### 1.13 统计学分析

采用SPSS25.0进行统计学分析。计量数据均以均值 $\pm$ 标准差表示。组间比较采用t检验和单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 circ\_EPHB4在胶质瘤中表达异常升高

6对胶质瘤及癌旁组织芯片检测显示,6个胶质瘤组织中hsa-circ\_0004018表达高于相应癌旁组织(图1A)。qRT-PCR检测显示,胶质瘤组织中hsa-circ\_0004018表达高于相应癌旁组织( $P < 0.001$ ,图1B),胶质瘤细胞株U251、A172、SHG44、LN229、U373中hsa-circ\_0004018表达也高于人脑星型胶质正常细胞HEB( $P < 0.05$ ,图1C),circ\_0004018即circ\_EPHB4。

### 2.2 circ\_EPHB4促进胶质瘤细胞迁移、侵袭和上皮间质转化(EMT)

qRT-PCR检测显示,携带circ\_EPHB4质粒的慢病毒转染后,SHG44细胞中circ\_EPHB4表达升高,而转染circ\_EPHB4 siRNA后,U373细胞中circ\_EPHB4表达降低( $P < 0.01$ ,图2A)。划痕愈合实验显示,cir\_EPHB4表达敲低后,U373细胞迁移能力降低,而cir\_EPHB4过表达后,SHG44细胞迁移能力增加(图2B)。Transwell实验显示,cir\_EPHB4表达敲低后,U373细胞迁移侵袭能力增加,而cir\_EPHB4过表达后,SHG44细胞侵袭能力增加(图2C)。此外,过表达circ\_EPHB4后,SHG44细胞E-Cadherin表达减少,N-Cadherin和Vimentin表达增加,circ\_EPHB4表达敲低后,U373细胞E-Cadherin表达增加,N-Cadherin和Vimentin表达减少( $P < 0.05$ ,图2D、E)。

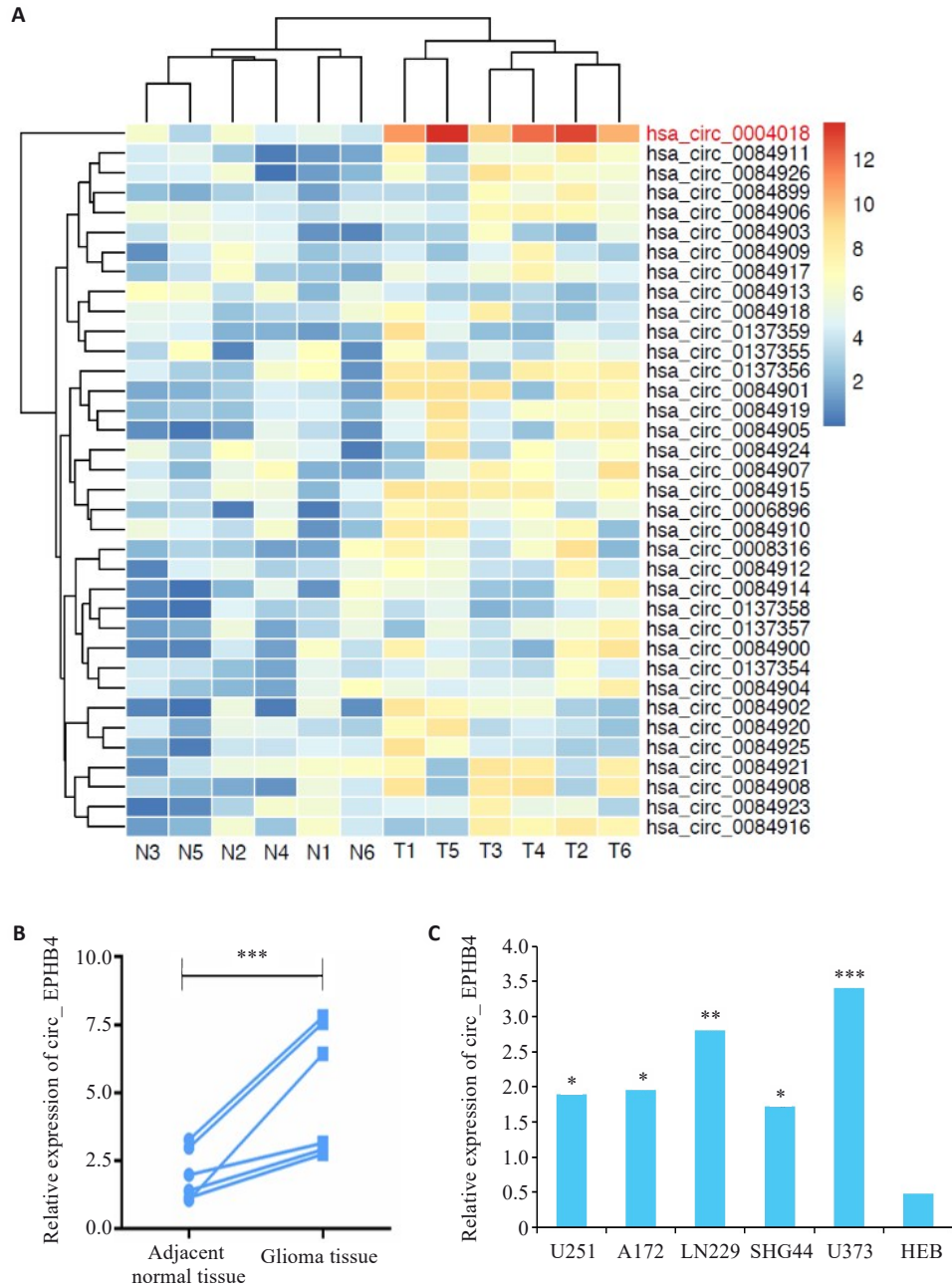


图1 circ\_EPHB4在胶质瘤中表达上调

Fig.1 circ\_EPHB4 is upregulated in glioma. A: Differential RNA expression analysis shows increased circ\_EPHB4 expression in glioma. B: qRT-PCR confirms increased expression of circ\_EPHB4 in glioma (\*\* $P < 0.001$ ). C: circ\_EPHB4 expressions are significantly higher in glioma cell lines U251, A172, SHG44, LN229, and U373 than in normal human brain astrocyte HEB cells. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs HEB.

### 2.3 circ\_EPHB4促进胶质瘤细胞体内成瘤及转移

与相应的对照组相比,circ\_EPHB4过表达组肺转移瘤、肿瘤体积和重量增加,circ\_EPHB4敲低组都降低,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ,图3A~C)。免疫组化结果显示,circ\_EPHB4过表达后,皮下瘤组织E-Cadherin表达减少,N-Cadherin和Vimentin表达增加,而circ\_EPHB4敲低组皮下瘤组织E-Cadherin表达增加,N-Cadherin和Vimentin表达减少( $P < 0.01$ ,图3D,E)。

### 2.4 circ\_EPHB4通过上调Wnt3表达促进胶质瘤细胞转移

蛋白质免疫印迹检测结果显示,circ\_EPHB4过表达促进Wnt3表达(图4A)。划痕愈合及Transwell分析显示,circ\_EPHB4过表达促进胶质瘤细胞迁移和侵袭,但Wnt3敲低能够逆转这一过程(图4B,C)。免疫组化实验证明,circ\_EPHB4过表达可以增加E-Cadherin表达,降低N-Cadherin和Vimentin表达,而Wnt3敲低可以逆转这些结果(图4D)。

### 2.5 YTHDF3通过m6A依赖性方式增强Wnt3 mRNA的稳定性

RNA免疫沉淀实验显示,U373和SHG44细胞,

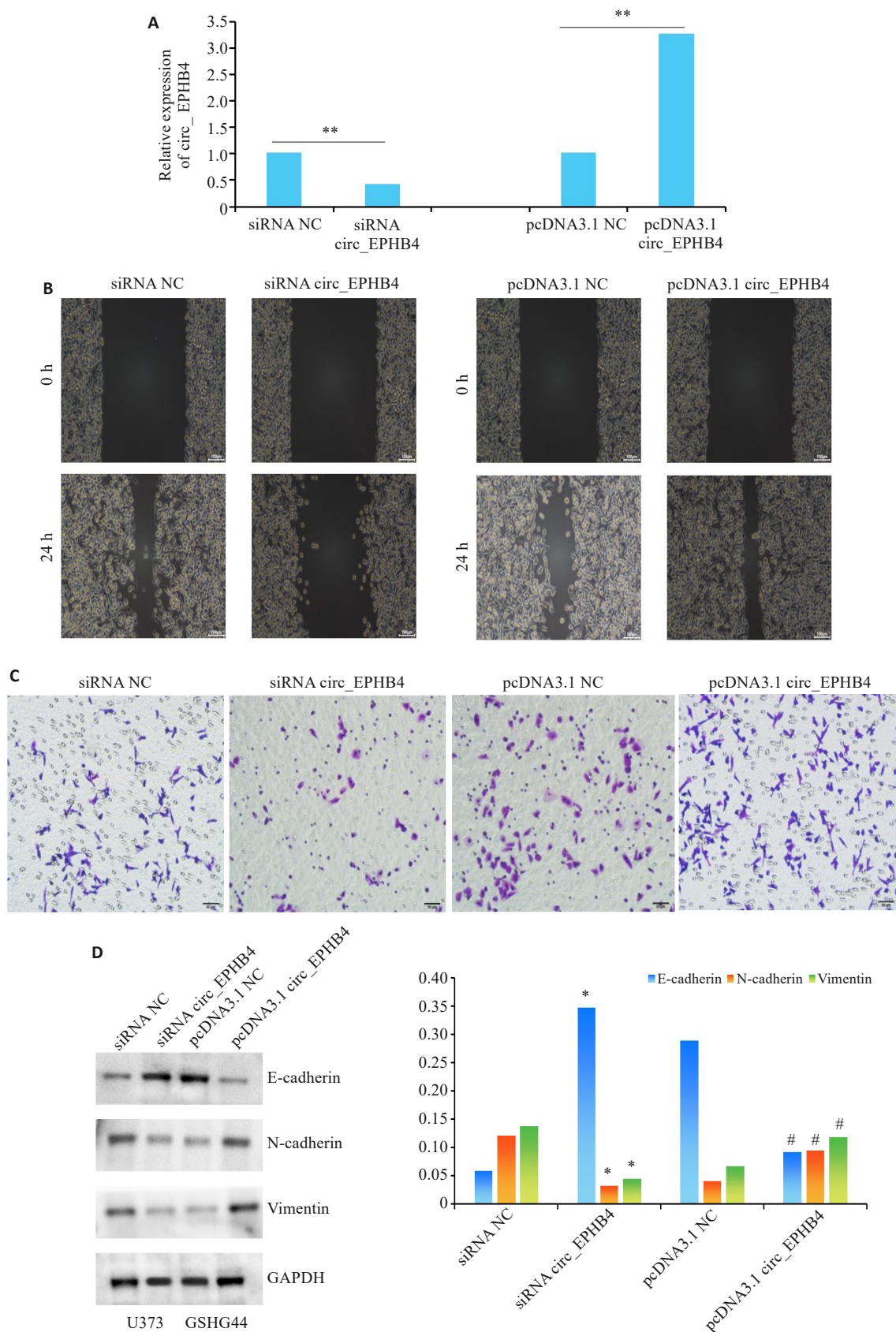


图2 circ\_EPHB4促进胶质瘤细胞迁移、侵袭和EMT

Fig.2 circ\_EPHB4 promotes glioma cell migration, invasion, and EMT. **A:** qRT-PCR of circ\_EPHB4 expression in glioma cells after transfection with circ\_EPHB4-overexpressing plasmids or circ\_EPHB4 siRNA (\*\* $P < 0.01$ ). **B:** Scratch wound healing assay for evaluating glioma cell migration ability following circ\_EPHB4 overexpression or knockdown (scale bar = 100  $\mu\text{m}$ ). **C:** Transwell invasion assay for assessing glioma cell invasion ability after transfection (scale bar = 50  $\mu\text{m}$ ). **D:** Western blotting of EMT-related proteins (E-cadherin, N-cadherin and vimentin) in glioma cells following circ\_EPHB4 overexpression or knockdown. Data are presented as  $\text{Mean} \pm \text{SD}$  from 3 independent experiments. \* $P < 0.05$  vs siRNA NC; # $P < 0.05$  vs pcDNA3.1 NC.

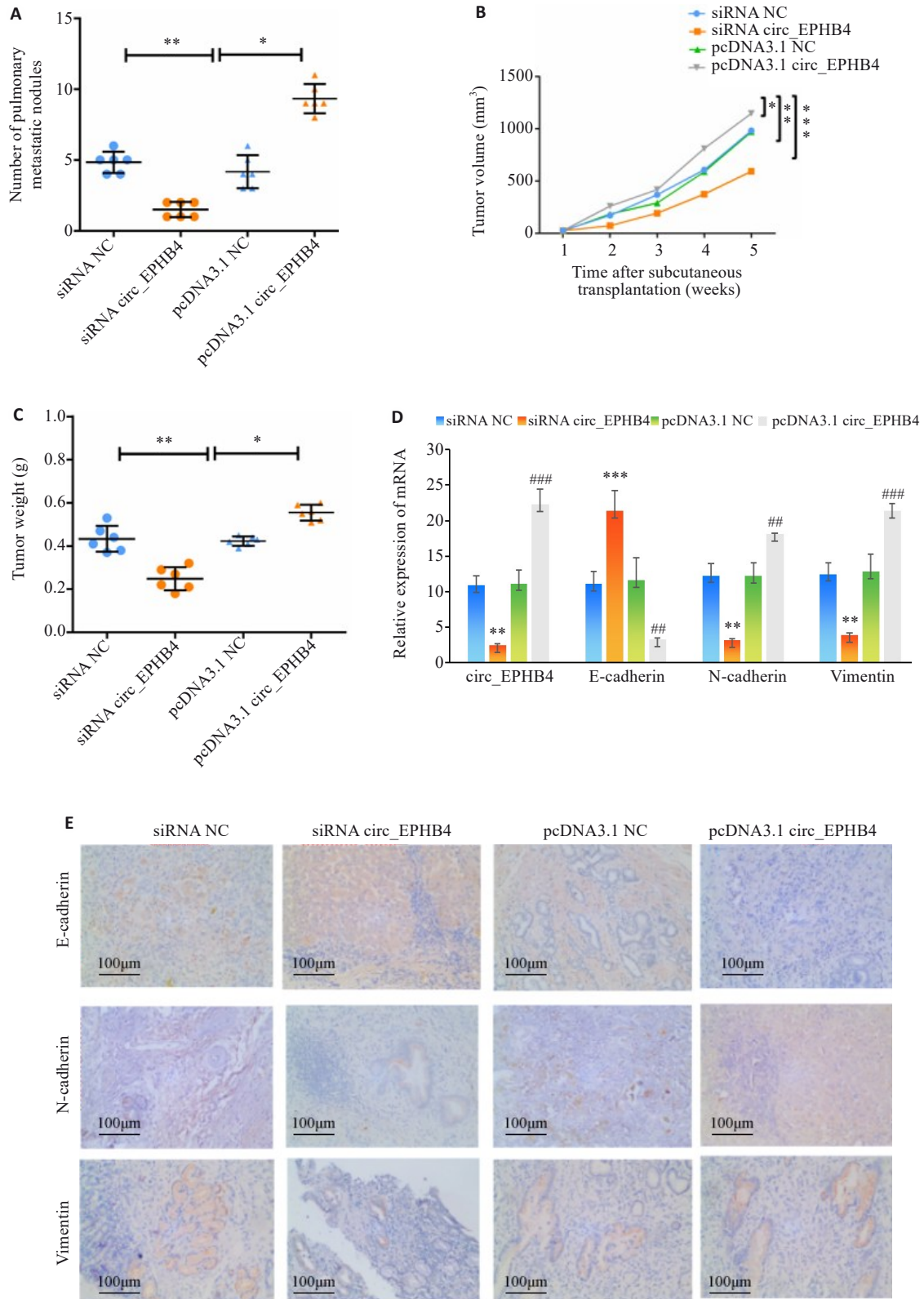


图3 circ\_EPHB4促进胶质瘤细胞体内成瘤及转移

Fig3 circ\_EPHB4 promotes tumorigenesis and metastasis of glioma cells in nude mice. **A**: Number of pulmonary metastatic nodules in each group. **B**: Subcutaneous tumor volume at different time points in each group. **C**: Subcutaneous tumor weight in each group (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ). **D**: qRT-PCR analysis of mRNA expressions of E-cadherin, N-cadherin, vimentin) in subcutaneous tumors. **E**: Immunohistochemical analysis of protein expressions of E-cadherin, N-cadherin, and vimentin in subcutaneous tumors from each group. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs siRNA NC group; ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$  vs pcDNA3.1 NC group.

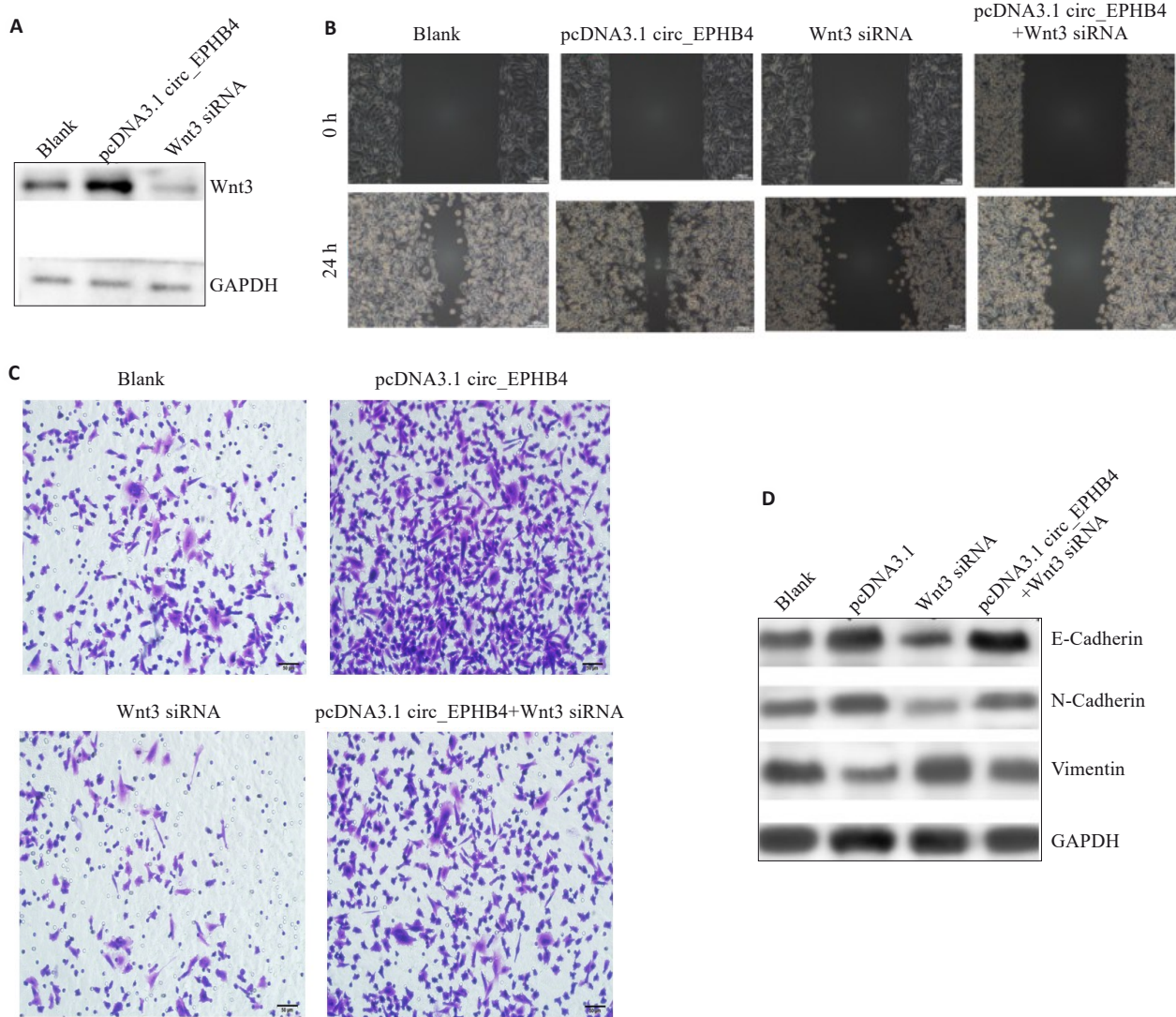


图4 circ\_EPHB4通过上调Wnt3表达促进胶质瘤细胞转移

Fig.4 circ\_EPHB4 promotes glioma cell metastasis by upregulating Wnt3 expression. **A:** Overexpression of circ\_EPHB4 enhances Wnt3 expression, and circ\_EPHB4 knockdown suppresses Wnt3 expression. **B:** Scratch wound healing assay for evaluating the effect of Wnt3 knockdown on glioma cell migration following circ\_EPHB4 overexpression (scale bar=50 μm). **C:** Transwell invasion assay for assessing the impact of Wnt3 knockdown on invasion ability of circ\_EPHB4-overexpressing glioma cells (scale bar=50 μm). **D:** Western blotting for evaluating the effects of Wnt3 knockdown on expressions of E-cadherin, N-cadherin and vimentin in circ\_EPHB4-overexpressing glioma cells.

YTHDF3与Wnt3 mRNA相互作用( $P < 0.001$ ,图5A)。U373和SHG44细胞然后YTHDF3表达敲低后,Wnt3表达也减少(图5B)。StarBase数据库的TCGA样本中,YTHDF3与Wnt3表达呈正相关(图5C)。而circ\_EPHB4表达敲低的U373细胞中,YTHDF3和Wnt3 mRNA间的相互作用减弱,circ\_EPHB4过表达的SHG44细胞中,YTHDF3和Wnt3 mRNA间的相互作用不受影响(图5D)。在circ\_EPHB4表达敲低的U373细胞中,再敲低YTHDF3表达后,Wnt3 mRNA表达降低,而circ\_EPHB4过表达的SHG44细胞中,再敲低YTHDF3表达后,Wnt3 mRNA表达仍然降低( $P < 0.05$ ,图5E)。

### 3 讨论

circRNA作为一类特殊的非编码RNA,因其独特

的环状结构和稳定性,在肿瘤发生发展中的作用日益受到关注<sup>[15, 20, 21]</sup>。本研究发现,circ\_EPHB4在胶质瘤组织和细胞系中显著高表达,这一结果与既往关于circRNA在肿瘤中异常表达的研究报道一致<sup>[22, 23]</sup>。本研究通过系统功能实验证实circ\_EPHB4能够显著增强胶质瘤细胞的迁移、侵袭能力和EMT过程,体内实验中,circ\_EPHB4过表达促进了皮下肿瘤的形成和肺转移发生。这些发现不仅拓展了对circRNA在胶质瘤中作用的认识,也为开发新的治疗靶点提供了实验依据。本研究首次将circ\_EPHB4与Wnt3信号通路联系起来,发现circ\_EPHB4通过上调Wnt3表达促进胶质瘤的恶性进展,这一发现为理解circRNA如何调控经典信号通路提供了新线索。

在深入探讨circ\_EPHB4的作用机制时,本研究发

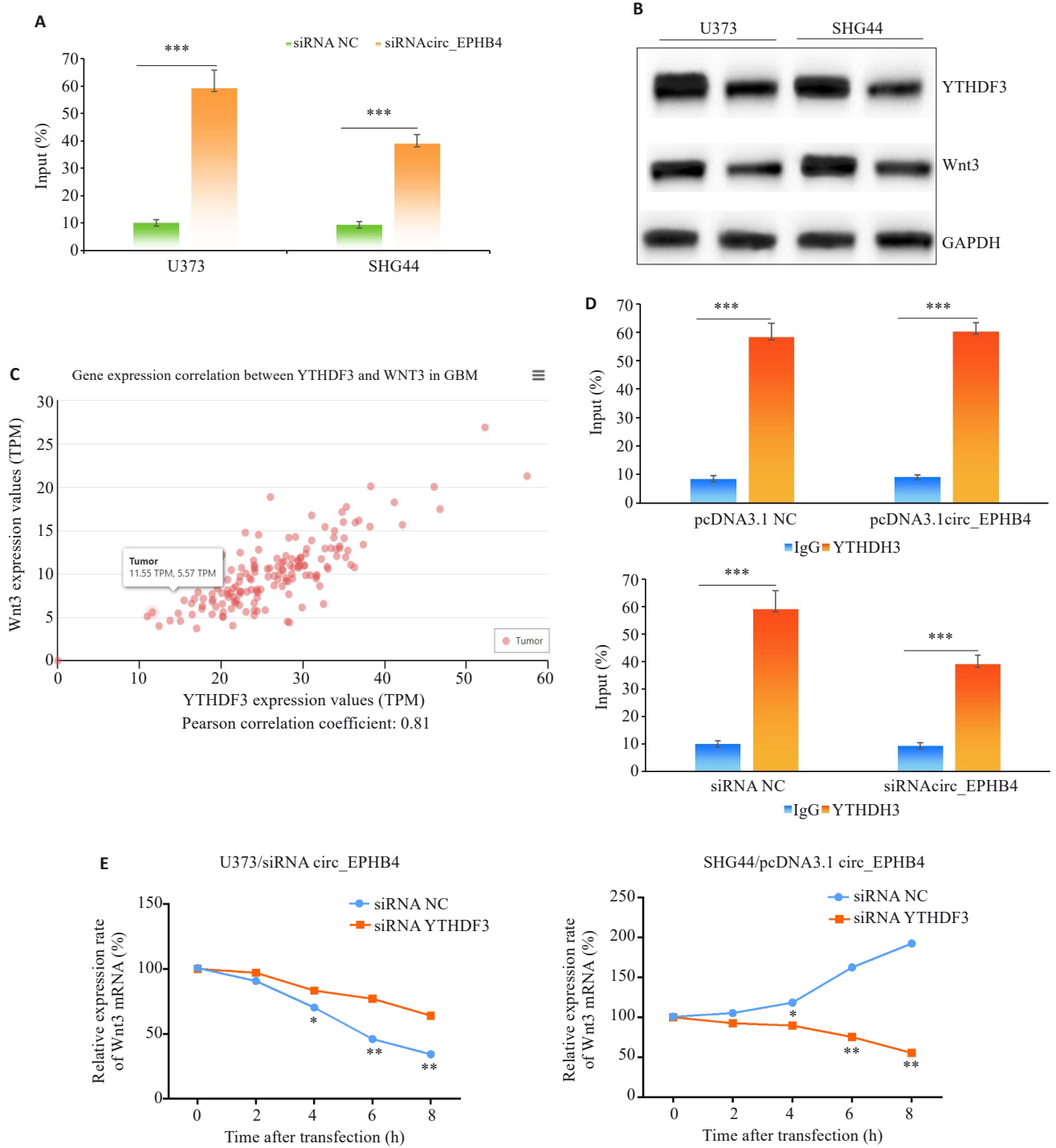


图5 YTHDF3通过m6A依赖性方式增强Wnt3 mRNA的稳定性

Fig. 5 YTHDF3 enhances Wnt3 mRNA stability in an m6A-dependent manner. **A:** Direct interaction between YTHDF3 and Wnt3 mRNA in U373 and SHG44 cells. **B:** Effect of YTHDF3 knockdown on Wnt3 expression. **C:** Positive correlation between YTHDF3 and Wnt3 expression in the StarBase database. **D:** Effect of circ\_EPHB4 on the interaction between YTHDF3 and Wnt3 RNA. **E:** Effect of combined knockdown of circ\_EPHB4 and YTHDF3 on Wnt3 mRNA expression. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

现,虽然 circ\_EPHB4能够影响Wnt3表达水平,但其作用机制可能并非直接调控。考虑到m6A修饰在RNA代谢中的重要作用<sup>[4, 10, 24-26]</sup>,本研究进一步探讨了m6A阅读蛋白YTHDF3在其中的作用,结果显示,YTHDF3能够以m6A依赖性的方式结合并稳定Wnt3 mRNA,这与近期关于YTHDF家族蛋白功能的研究结果相

符<sup>[16, 27, 28]</sup>。然而,值得注意的是,circ\_EPHB4过表达或敲低并未显著改变YTHDF3的蛋白表达水平,这提示,circ\_EPHB4与YTHDF3间存在复杂的相互作用关系。进一步分析发现 circ\_EPHB4 敲低减弱了YTHDF3与Wnt3 mRNA的相互作用,表明 circ\_EPHB4可能在空间上促进了YTHDF3与Wnt3 mRNA

的结合,或者通过其他间接方式影响了这一过程。这种协同作用模式为我们理解非编码RNA与m6A阅读蛋白之间的功能联系提供了新思路。

从分子机制角度来看,circ\_EPHB4可能通过多种方式参与调控Wnt3的表达。首先,作为一种环状RNA,circ\_EPHB4可以作为miRNA的海绵,通过竞争性结合特定的miRNA来解除其对Wnt3 mRNA的抑制作用。其次,circ\_EPHB4可以直接或间接地影响了Wnt3基因的转录过程,或者通过结合特定的RNA结合蛋白来稳定Wnt3 mRNA。此外,本研究还发现,circ\_EPHB4通过影响m6A修饰的分布或效率间接调控YTHDF3对Wnt3 mRNA的识别和结合。这些潜在的机制虽然还需要进一步的实验验证,但已经描绘出了一个复杂的调控网络,其中circ\_EPHB4、YTHDF3和Wnt3形成了一个功能协同的调控单元。

本研究具有一定的转化价值。胶质瘤作为一种高度恶性的脑肿瘤,目前治疗效果仍然不理想<sup>[29-31]</sup>。circ\_EPHB4的高表达与胶质瘤的恶性表型密切相关,提示circ\_EPHB4是有价值的预后标志物。更重要的是,针对circ\_EPHB4-YTHDF3-Wnt3这一协同轴的干预可能为胶质瘤治疗提供新策略。例如,开发特异性的circ\_EPHB4抑制剂,或者靶向阻断YTHDF3与Wnt3 mRNA的相互作用,都可能成为潜在的治疗方向。此外,考虑到m6A修饰的可逆性,探索m6A修饰酶在这一通路中的作用也可能为治疗提供新的靶点。

本研究还存在一些局限性。首先,虽然本研究证实了circ\_EPHB4与YTHDF3在功能上的协同作用,但对其具体的分子机制还需要更深入的探究。例如,circ\_EPHB4是否直接与YTHDF3蛋白相互作用?它是否影响了Wnt3 mRNA上特定位点的m6A修饰水平?这些问题都需要通过更精细的实验设计来解答。其次,本研究临床样本量相对较小,未来需要通过更大规模的临床研究来验证circ\_EPHB4的预后价值。本研究在动物实验中,主要观察了皮下成瘤模型的结果,未来需要建立更接近临床情况的原位模型来验证这些发现。

未来有几个重要的研究方向值得关注。首先,可通过高通量测序技术全面分析circ\_EPHB4的结合蛋白和靶RNA,绘制其分子互作图谱。其次,可深入研究circ\_EPHB4对m6A修饰组的影响,探索其在表观转录组调控中的作用。第三,开发针对circ\_EPHB4的特异性抑制剂,并评估其在临床前模型中的治疗效果。最后,开展多中心临床研究,评估circ\_EPHB4作为诊断标志物或治疗靶点的临床价值。

综上所述,本研究初步阐明了circ\_EPHB4在胶质瘤中的促癌作用及其与YTHDF3协同调控Wnt3表达的分子机制。虽然circ\_EPHB4与YTHDF3之间并非

简单的上下游调控关系,但二者在功能上的协同作用为理解胶质瘤的发生发展提供了新的视角。这些发现不仅丰富了对非编码RNA和RNA修饰相互作用的认识,也为开发新的胶质瘤治疗策略提供了理论依据。未来的研究应该着眼于深入解析这一协同调控网络的具体分子机制,并探索其临床转化应用的潜力,为改善胶质瘤患者的预后做出贡献。

**Declaration of interests:** The authors declare no competing interests.

#### 参考文献:

- [1] Ludwig K, Kornblum HI. Molecular markers in glioma[J]. J Neurooncol, 2017, 134(3): 505-12.
- [2] 翟贝,魏灯,王萍. tRNA修饰在胶质瘤中的研究进展[J]. 中国肿瘤临床, 2024, 51(11): 567-71.
- [3] 贾金曦,姚春旭,刘畅,等. 脑胶质瘤患者术后远期预后影响因素分析[J]. 实用癌症杂志, 2024, 39(3): 514-7.
- [4] Liu ZX, Li LM, Sun HL, et al. Link between m6A modification and cancers[J]. Front Bioeng Biotechnol, 2018, 6: 89.
- [5] Zhang G, Cheng C, Wang X, et al. N6-Methyladenosine methylation modification in breast cancer: current insights[J]. J Transl Med, 2024, 22(1): 971.
- [6] Rui Y, Zhang H, Yu K, et al. N<sup>6</sup>-methyladenosine regulates *Cilia* elongation in cancer cells by modulating HDAC6 expression[J]. Adv Sci: Weinh, 2025, 12(2): e2408488.
- [7] Chen XH, Guo KX, Li J, et al. Regulations of m6A and other RNA modifications and their roles in cancer[J]. Front Med, 2024, 18(4): 622-48.
- [8] Qin L, Zeng X, Qiu X, et al. The role of N6-methyladenosine modification in tumor angiogenesis[J]. Front Oncol, 2024, 14: 1467850.
- [9] Saluja S, Ganguly S, Singh J, et al. Aberrant overexpression of m6A writer and reader genes in pediatric B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia (B-ALL)[J]. Transl Oncol, 2025, 56: 102403.
- [10] Zhao Y, Feng F, Guo QH, et al. Role of succinate dehydrogenase deficiency and oncometabolites in gastrointestinal stromal tumors[J]. World J Gastroenterol, 2020, 26(34): 5074-89.
- [11] Li J, Han Y, Zhang HM, et al. The m6A demethylase FTO promotes the growth of lung cancer cells by regulating the m6A level of USP7 mRNA[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 512(3): 479-85.
- [12] Dong J, Zeng Z, Huang Y, et al. Challenges and opportunities for circRNA identification and delivery[J]. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2023, 58(1): 19-35.
- [13] Chen X, Lu Y. Circular RNA: biosynthesis *in vitro* [J]. Front Bioeng Biotechnol, 2021, 9: 787881.
- [14] Patop IL, Kadener S. circRNAs in cancer[J]. Curr Opin Genet Dev, 2018, 48: 121-7.
- [15] Hanan M, Soreq H, Kadener S. CircRNAs in the brain[J]. RNA Biol, 2017, 14(8): 1028-34.
- [16] Chen M, Wei L, Law CT, et al. RNA N6-methyladenosine methyltransferase-like 3 promotes liver cancer progression through YTHDF2-dependent posttranscriptional silencing of SOCS<sub>2</sub>[J]. Hepatology, 2018, 67(6): 2254-70.

- [17] Yin J, Ding F, Cheng Z, et al. METTL3-mediated m6A modification of LINC00839 maintains glioma stem cells and radiation resistance by activating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling[J]. *Cell Death Dis*, 2023, 14(7): 417.
- [18] Xiao L, Li X, Mu Z, et al. FTO inhibition enhances the anti-tumor effect of temozolomide by targeting MYC-miR-155/23a cluster-MX11 feedback circuit in glioma. *Cancer Res*. 2020. 80(18): canres.0132.2020.
- [19] Zheng W, Li J, Zhou X, et al. The lncRNA XIST promotes proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells by targeting miR-337[J]. *Arab J Gastroenterol*, 2020, 21(3): 199-206.
- [20] Patop IL, Wüst S, Kadener S. Past, present, and future of circRNAs [J]. *EMBO J*, 2019, 38(16): e100836.
- [21] Yu T, Wang Y, Fan Y, et al. CircRNAs in cancer metabolism: a review [J]. *J Hematol Oncol*, 2019, 12(1): 90.
- [22] Yang R, Cui J. Advances and applications of RNA vaccines in tumor treatment[J]. *Mol Cancer*, 2024, 23(1): 226.
- [23] Yi Q, Feng JG, Lan WW, et al. CircRNA and lncRNA-encoded peptide in diseases, an update review[J]. *Mol Cancer*, 2024, 23(1): 214.
- [24] Zhang S, Zhang P, Wu A, et al. Downregulated M6A modification and expression of circRNA\_103239 promoted the progression of glioma by regulating the miR-182-5p/MTSS1 signalling pathway [J]. *J Cancer*, 2023, 14(18): 3508-20.
- [25] Dai YH, Zhao SH, Chen HL, et al. RNA methylation and breast cancer: insights into m6A, m7G and m5C[J]. *Mol Biol Rep*, 2024, 52(1): 27.
- [26] Lin ZY, Wan AH, Sun L, et al. N6-methyladenosine demethylase FTO enhances chemo-resistance in colorectal cancer through SIVA1-mediated apoptosis[J]. *Mol Ther*, 2023, 31(2): 517-34.
- [27] Zhang C, Huang S, Zhuang H, et al. YTHDF2 promotes the liver cancer stem cell phenotype and cancer metastasis by regulating OCT4 expression *via* m6A RNA methylation[J]. *Oncogene*, 2020, 39(23): 4507-18.
- [28] Chang H, Yang J, Wang Q, et al. Role of N6-methyladenosine modification in pathogenesis of ischemic stroke[J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2022, 22(3): 295-303.
- [29] Li L, Zhang T, Xiao M, et al. Brain macrophage senescence in glioma [J]. *Semin Cancer Biol*, 2024, 104/105: 46-60.
- [30] Davidson CL, Vengoji R, Jain M, et al. Biological, diagnostic and therapeutic implications of exosomes in glioma[J]. *Cancer Lett*, 2024, 582: 216592.
- [31] Yin JL, Liu G, Zhang Y, et al. Gender differences in gliomas: From epidemiological trends to changes at the hormonal and molecular levels[J]. *Cancer Lett*, 2024, 598: 217114.

(编辑:林萍)