

N6 – 甲基腺苷修饰通过抑制磷酸酶 SHIP2 表达促进砷诱导的皮肤细胞恶性表型

蔡静思琳, 方天禹, 易广名, 吴松轩, 王志妍, 张遵真, 赵田禾

四川大学华西公共卫生学院/华西第四医院 劳动卫生与环境卫生学系, 四川 成都 610041

摘要:目的 探究 m⁶A 修饰是否通过抑制 SHIP2 蛋白表达促进砷诱导的皮肤细胞恶性表型。方法 使用 1 μmol/L 亚砷酸钠连续染毒人皮肤角质形成细胞 22 周, 取染毒 0、4、8 和 22 周的细胞作为长期砷暴露的细胞模型; 使用 3 – 脱氮腺苷 (DAA) 抑制细胞 m⁶A 修饰水平, ELISA 试剂盒检测 SHIP2 蛋白表达量, m⁶A – IP – qPCR 检测 SHIP2 mRNA 上的 m⁶A 修饰水平, RIP – qPCR 检测 m⁶A 阅读蛋白与 SHIP2 mRNA 的结合水平, CCK – 8 实验、划痕愈合实验和软琼脂克隆形成实验用于检测细胞的恶性表型。结果 砷染毒 22 周后, 细胞 SHIP2 蛋白表达量显著降低 ($P < 0.001$), SHIP2 mRNA 上三个特定区域的 m⁶A 修饰水平均升高 (SHIP2 – 1: $P = 0.019$; SHIP2 – 2: $P = 0.024$; SHIP2 – 3: $P = 0.007$), m⁶A 阅读蛋白 YTHDF2 在 SHIP2 mRNA 的三个 m⁶A 修饰区域显著富集 (SHIP2 – 1: $P = 0.004$; SHIP2 – 2: $P = 0.015$; SHIP2 – 3: $P < 0.05$)。染毒 22 周细胞经 DAA 处理后 SHIP2 蛋白表达上调 ($P < 0.001$), SHIP2 mRNA 上的 m⁶A 修饰水平显著降低 (SHIP2 – 1: $P = 0.030$; SHIP2 – 2: $P = 0.034$; SHIP2 – 3: $P = 0.002$), YTHDF2 与 SHIP2 mRNA 的结合明显减弱 (SHIP2 – 1: $P = 0.002$; SHIP2 – 2: $P = 0.004$; SHIP2 – 3: $P < 0.001$)。砷染毒 22 周后细胞的迁移率和软琼脂克隆形成率增加 (迁移率: $P < 0.001$; 软琼脂克隆形成率: $P < 0.001$), DAA 处理后细胞的迁移、增殖及软琼脂克隆形成能力均下降 (迁移率: $P < 0.001$; 增殖率: $P < 0.001$; 软琼脂克隆形成率: $P < 0.001$)。结论 长期砷暴露通过时间依赖性上调细胞总 m⁶A 修饰水平和 SHIP2 mRNA 上的 m⁶A 修饰水平, 增强 m⁶A 阅读蛋白 YTHDF2 与 SHIP2 mRNA 的结合, 进而抑制 SHIP2 表达, 最终促进人皮肤角质形成细胞的恶性表型。

关键词: N6 – 甲基腺苷修饰; 磷脂酰肌醇 5 – 磷酸酶 SHIP2; 亚砷酸钠; 恶性表型

中图分类号: R114 文献标志码: A 文章编号: 1003 – 8507(2026)12 – 2153 – 10

DOI: 10.20043/j.cnki.MPM.202601388

N6 – methyladenosine modification promotes arsenic – induced malignant phenotype of skin cells by inhibiting phosphatase SHIP2 expression

CAI Jing – silin, FANG Tian – yu, YI Guang – ming, WU Song – xuan, WANG Zhi – yan,

ZHANG Zun – zhen, ZHAO Tian – he

Department of Occupational Health and Environmental Hygiene, West China School of Public Health and

West China Fourth Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China

Abstract: **Objective** To investigate whether m⁶A modification promotes arsenic – induced malignant phenotype of skin cells by inhibiting SHIP2 protein expression. **Methods** Human skin keratinocytes were continuously exposed to 1 μmol/L sodium arsenite for 22 weeks, and cells were harvested at 0, 4, 8, and 22 weeks of exposure to establish the long – term arsenic treatment cell models. 3 – deazaadenosine (DAA) was used to inhibit the m⁶A modification in cells. The SHIP2 protein expression level was detected by ELISA kit, the m⁶A modification level of SHIP2 mRNA was detected by m⁶A – IP – qPCR, the binding levels of m⁶A reader to specific m⁶A regions of SHIP2 mRNA was detected by RIP – qPCR, and the malignant phenotype of cells was detected by CCK – 8 assay, scratch healing assay and soft agar colony formation assay, respectively. **Results** Exposure to NaAsO₂ for 22 weeks led to a significant decrease in SHIP2 protein expression ($P < 0.001$). This reduction of SHIP2 protein expression was accompanied by increased m⁶A modification levels on SHIP2 mRNA at three specific regions (SHIP2 – 1: $P = 0.019$; SHIP2 – 2: $P = 0.024$; SHIP2 – 3: $P = 0.007$), and enhanced binding levels of m⁶A reader YTHDF2 to SHIP2 mRNA (SHIP2 – 1: $P = 0.004$; SHIP2 – 2: $P = 0.015$; SHIP2 – 3: $P < 0.05$). Conversely, DAA treatment upregulated SHIP2 protein expression ($P < 0.001$), significantly reduced the m⁶A modification levels on SHIP2

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (82404396); 四川省自然科学基金青年基金 (2024NSFSC1805)

作者简介: 蔡静思琳 (2000—), 女, 硕士在读, 研究方向: 环境卫生

通信作者: 赵田禾, E – mail: zhaotianhe8@163.com

mRNA (SHIP2 - 1: $P = 0.030$; SHIP2 - 2: $P = 0.034$; SHIP2 - 3: $P = 0.002$), and downregulated the binding levels of YTHDF2 to SHIP2 mRNA (SHIP2 - 1: $P = 0.002$; SHIP2 - 2: $P = 0.004$; SHIP2 - 3: $P < 0.001$). HaCaT cells exposed to NaAsO_2 for 22 weeks showed increased efficiency of migration and soft agar colony formation (migration: $P < 0.001$; colony formation: $P < 0.001$), and the cell migration rate, proliferation rate and soft agar colony formation rate were all reduced after DAA treatment (migration: $P < 0.001$; proliferation: $P < 0.001$; colony formation: $P < 0.001$). **Conclusion** Long-term arsenic exposure time-dependently upregulates the total m^6A modification levels of cells and the specific m^6A modification levels on SHIP2 mRNA, which enhances the binding of the m^6A reader YTHDF2 to SHIP2 mRNA, thereby inhibiting SHIP2 protein expression and ultimately promoting the malignant phenotype of human keratinocytes.

Keywords: N6-methyladenosine; Phosphatidylinositol 5-phosphatase SHIP2; Arsenic; malignant phenotype

砷是广泛分布于水、土壤和大气中的 I 类致癌物^[1],其致癌作用的主要靶器官是皮肤,饮用水砷浓度升高与皮肤基底细胞癌和鳞状细胞癌的发病风险增加显著相关^[2]。N6-甲基腺苷(N6-methyladenosine, m^6A)修饰指腺嘌呤第 6 位 N 原子上的甲基化改变,是真核生物 RNA 中最丰富且可逆的甲基化修饰,在 RNA 转录后调控基因表达^[3-4],研究显示砷暴露诱导 m^6A 修饰水平上调是砷致细胞恶性转化过程中的重要环节^[5-6]。 m^6A 修饰编码的表观遗传信息依赖 m^6A 阅读蛋白的解读^[7],YTHDF 结构域家族蛋白(YTH domain family protein)是首先被鉴定出的且研究较为深入的 m^6A 阅读蛋白^[8],能特异性识别并结合靶 mRNA 上的 m^6A 修饰进而调控基因表达^[9]。课题组前期研究发现,砷处理诱导人皮肤角质形成细胞恶性转化过程中,YTHDF2 通过与 m^6A 修饰的抑癌基因 PTEN 的 mRNA 结合抑制 PTEN 蛋白表达,降低 PTEN 对细胞增殖和存活关键信号通路—磷脂酰肌醇 3-激酶(Phosphatidylinositol 3-Kinase, PI3K)/蛋白激酶 B(Protein Kinase B, AKT)信号通路的负调控作用,显著增强细胞的增殖能力^[10-11]。

含 SH2 结构域的肌醇磷酸酶 2 (SH2-Containing Inositol Phosphatase 2, SHIP2) 是一种磷脂酰肌醇 5-磷酸酶,与磷脂酰肌醇-3-磷酸酶类的 PTEN 在结构和功能上都具有相似性^[12]。SHIP2 和 PTEN 都含有中央磷酸酶结构域,可以通过去磷酸化 PI3K 的产物—磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸(PIP3),减少 AKT 被 PIP3 招募到细胞膜上,由此下调 PI3K/AKT 信号通路活性^[13]。已有研究表明, m^6A 修饰水平升高导致的 SHIP2 蛋白表达下调激活了 PI3K/AKT 信号通路,继而促进癌症进展^[14]。然而, m^6A 修饰能否抑制 SHIP2 蛋白表达促进砷诱导的细胞恶性转化尚未见报道。因此,本研究使用亚砷酸钠连续染毒人皮肤角质形成细胞 22 周,通过观察砷暴露过程中 m^6A 修饰水平变化对 SHIP2 蛋白表达和细胞恶性表型的影响,探究 m^6A 修饰是否通过抑制 SHIP2 蛋白表达介导砷的毒作用,为砷致皮肤细胞恶性转化寻找潜在的生物标志物。

1 材料和方法

1.1 研究方法

1.1.1 主要试剂和仪器 永生化人皮肤角质形成细胞系(HaCaT 细胞系,南京凯基生物科技有限公司),亚砷酸钠(NaAsO_2 ,纯度:99.0%,美国 Fluka Chemical 公司),EpiQuik m^6A RNA 甲基化定量试剂盒(美国 Epigentek 公司),3-脱氮腺苷(3-Deazaadenosine, DAA, 美国 APEX BIO 公司), Human Phosphatidylinositol 3, 4, 5 - Triphosphate 5-Phosphatase 2 (SHIP2) ELISA Kit 试剂盒(英国 Abnova 公司),DMEM 高糖培养基和胎牛血清(赛维生物技术有限公司),CCK-8 试剂(北京兰杰柯科技有限公司); Multiskan Go 酶标仪(美国 Thermo Fisher 公司)。

1.2 细胞培养及恶性转化细胞模型建立 永生化人皮肤角质形成细胞(HaCaT 细胞)是被广泛用于研究人类皮肤病变的体外模型。人群流行病学研究表明,0.67~2 $\mu\text{mol/L}$ 饮用水砷暴露与皮肤癌的发生发展密切相关^[15];课题组前期研究显示,1 $\mu\text{mol/L}$ 亚砷酸钠染毒 22 周(约 50 代)可显著增强 HaCaT 细胞的恶性表型^[5,11,16]。因此,本研究使用 1 $\mu\text{mol/L}$ 亚砷酸钠连续处理 HaCaT 细胞 22 周,并保留染毒 0、4、8 和 22 周的细胞(分别对应未转化、可能早期转化、早期转化和恶性转化阶段),建立长期砷暴露诱导恶性转化的 HaCaT 细胞系。对照组(无亚砷酸钠染毒)和亚砷酸钠染毒组细胞均培养于含 10% 胎牛血清的 DME 培养基,培养箱设置为 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 。

1.3 细胞 m^6A 修饰水平检测

1.3.1 细胞总 m^6A 修饰水平检测 采用 EpiQuik m^6A RNA 甲基化定量试剂盒检测细胞总 m^6A 修饰水平,操作步骤参照试剂盒说明书进行,细胞总 m^6A 修饰水平计算公式: $\text{m}^6\text{A}\% = [(\text{OD}_{\text{sample}} - \text{OD}_{\text{NC}}) / \text{S}] / [(\text{OD}_{\text{PC}} - \text{OD}_{\text{NC}}) / \text{P}] \times 100\%$ 。

1.3.2 m^6A -IP-qPCR 检测 SHIP2 mRNA 上特定区域的 m^6A 修饰水平 SHIP2 mRNA 上的 m^6A 修饰位点通过基于序列的 RNA 腺苷甲基化位点预测

(sequence - based RNA adenosine methylation site predictor,SRAMP) 方法进行预测^[5],根据预测结果(表 1),在 SHIP2 mRNA 上选择三个分别包含多个高置信度 m⁶A 修饰位点的特异性区域,并将这 3 个区域命名为 SHIP2 - 1、SHIP2 - 2 和 SHIP2 - 3,针对这三

个区域设计特异性 PCR 引物,再进行 m⁶A - IP - qPCR 实验检测 SHIP2 mRNA 上的 m⁶A 修饰水平,m⁶A - IP - qPCR 参考课题组之前的研究方法进行^[10]。SHIP2 - 1、SHIP2 - 2 和 SHIP2 - 3 区域的特异性引物序列及包含的 m⁶A 修饰位点如表 1 所示。

表 1 SHIP2 - 1、SHIP2 - 2 和 SHIP2 - 3 区域的特异性引物序列及包含的高置信度 m⁶A 修饰预测位点
Table 1 Specific primer sequences for the SHIP2 - 1, SHIP2 - 2 and SHIP2 - 3 regions and contained high - confidence predicted m⁶A modification sites

区域名称	引物序列	m ⁶ A 修饰预测位点
SHIP2 - 1	F: 5' AAGGAGAAGGACCGACTCA3' R: 5' TCCTGCTTGAGTGCTTGTT3'	1421TGTGTTTGAGAAGGAGAAGGACCGGACTCAGCGCAAGGACTTCATCTT TGTCAGTGCCCG1470
SHIP2 - 2	F: 5' GGACCCAGGAGAACTCAGTG3' R: 5' TTCACAGTGATTGCATGGC3'	1681TCTATGTCTTTGGGACCCAGGAGAACTCAGTGGGCGACCGCGAGTGGCT GGACCTACTGCI740
SHIP2 - 3	F: 5' CCAGACTTTCCACCTCCACC3'	3421GCACACTGCCCCCTCCAGACTTTCACCTCCACCACTGCCGGACTCAGCC ATCTTCCTGC3480

1.3.3 细胞 m⁶A 修饰水平抑制方法 3 - Deazaadenosine(3 - 脱氮腺苷,DAA)是广泛应用于研究 m⁶A 调控作用的全局性甲基化抑制剂。DAA 抑制常数(Ki)为 3.9 μmol/L,本研究使用该浓度下的 DAA 溶液处理细胞 24 h,收获 m⁶A 水平抑制后的细胞用于后续实验。

1.4 ELISA 检测 SHIP2 蛋白表达量 使用 Human Phosphatidylinositol 3, 4, 5 - Trisphosphate 5 - Phosphatase 2 (SHIP2) ELISA Kit 试剂盒(英国 Abbeexa 公司)检测细胞 SHIP2 蛋白表达量,操作参照试剂盒说明书进行,采用 Multiskan GO 酶标仪在 450 nm 处测定吸光度(OD)值,根据标准曲线计算各样本中 SHIP2 蛋白的浓度。

1.5 RIP - qPCR 检测 m⁶A 阅读蛋白与 SHIP2 mRNA 上 m⁶A 修饰位点的结合情况 将细胞裂解液置于含蛋白酶和 RNase 抑制剂的多聚核糖体裂解缓冲液中处理后,使用 DNase(20 U)去除基因组 DNA,并在多聚体裂解缓冲液中制备蛋白 A/G 磁珠。原始细胞裂解液首先均分为两组,分别用于独立检测 YTHDF1 与 SHIP2 mRNA 以及 YTHDF2 与 SHIP2 mRNA 的结合情况。随后将每组裂解液再均分为三个等量样本,命名为 YTHDF - IP、IgG - IP 和 Input。两份 YTHDF - IP 裂解液分别与 YTHDF1 特异性抗体(ab220162, Abcam,英国)和 YTHDF2 特异性抗体(ab220163, Abcam,英国)孵育,而 IgG - IP 则与同源 IgG 抗体孵育。4℃孵育过夜后,加入蛋白 A/G 磁珠孵育 1 h 捕获 RNA 蛋白复合物。经多聚核糖体洗涤缓冲液和 DTT 多次洗涤后,使用 DTT 和蛋白酶 K 在 55℃孵育 1 h 洗脱结合的 RNA。提取的 RNA 经逆转录后通过 qPCR 分析。SHIP2 mRNA 上三个特异性 m⁶A 修饰位

点的引物序列见表 1。数据以 Input 组为基准进行标准化,并采用 2^{-ΔΔCt}法计算相对结合水平。

1.6 细胞恶性表型检测

1.6.1 细胞增殖实验 将细胞(2 × 10³个/孔)接种于 96 孔板中,分别在培养 0(细胞贴壁后)、24、48 和 72 h 后弃培养基,PBS 冲洗。每孔加入 100 μl 含 10% CCK - 8 溶液的完全培养基,37℃避光孵育 1.5 h 后使用酶标仪测量 450 nm 波长处吸光度,并以培养 0 h 组的吸光度为基准,计算细胞增殖率。

1.6.2 划痕愈合实验 用记号笔在 6 孔板背面每隔 0.5 cm 画一条横线,再画一条经过孔中心的竖线垂直于所有横线,用于定位划痕位置。将细胞(1 × 10⁵个/孔)接种于 6 孔板,当细胞达到单层汇合状态时,用无菌 200 μl 移液枪头沿孔背面的竖线制造单一划痕,并弃去孔内培养基,PBS 冲洗后每孔加入 2 ml 无血清培养基。使用倒置显微镜对划痕拍照,并使用 ImageJ 软件计算划痕面积,记为 A₀。培养 36 h 后,再对同一位置的划痕拍照并计算面积,面积记为 A₃₆。划痕迁移率(%) = (A₀ - A₃₆) × 100/A₀。

1.6.3 软琼脂克隆形成实验 软琼脂克隆形成实验用于检测细胞的锚定非依赖性生长能力。将 0.6% 的低熔点琼脂以每孔 50 μl 加入 96 孔板铺平并凝固作为底层琼脂,再将每孔接种 100 μl 含有 1 000 个细胞和 0.35% 琼脂的完全培养基,并在 37℃下培养 14 天。倒置显微镜下计数细胞克隆(直径 > 75 μm),软琼脂克隆形成率(%) = (克隆数量/1 000) × 100。

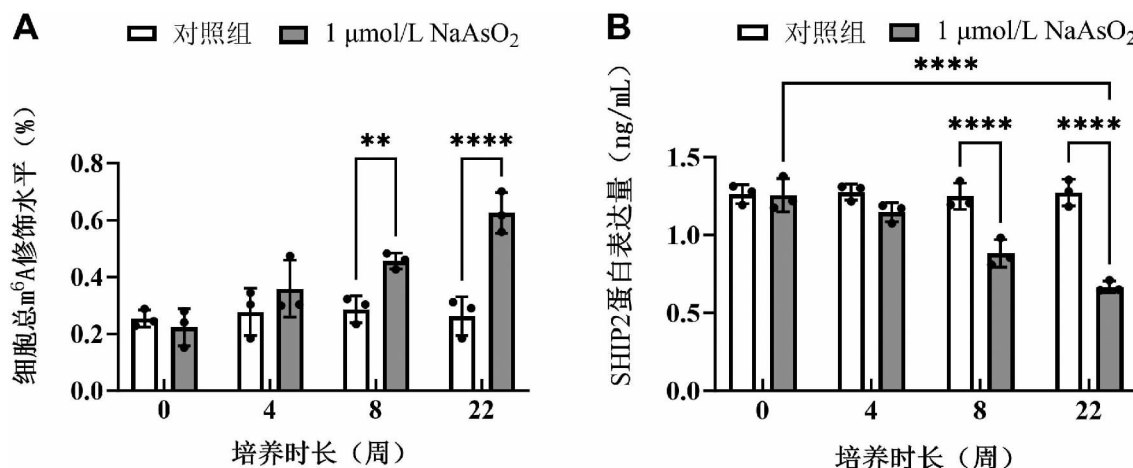
1.7 统计分析 所有实验重复 3 次,经 Shapiro-Wilk 检验符合正态分布的计量资料以(均数 ± 标准差)表示,采用 SPSS 26 进行统计分析。两组独立样本采用 t 检验,三组及三组以上的数据比较使用单因素方差

分析(one-way analysis of variance, ANOVA);不同处理条件和培养周数下的多组数据比较采用双因素方差分析(Two-way ANOVA),检验结果以 q 值与调整后的 P 值表示,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 砷暴露时间依赖性上调细胞总 m^6A 修饰水平,并抑制 SHIP2 蛋白表达 如图 1A 所示,培养 8 周和 22 周时,亚砷酸钠处理组细胞的总 m^6A 修饰水平显

著高于对照组细胞(8 周: $q=4.462, P=0.006$;22 周: $q=9.536, P<0.001$)。图 1B 显示,染毒 22 周细胞的 SHIP2 蛋白表达量约下降至染毒 0 周的细胞的 53.13% ($q=13.570, P<0.001$);培养 8 和 22 周时,染毒组细胞的 SHIP2 蛋白量分别下降至相同培养周数对照组细胞的 70.62% 和 52.46% (8 周: $q=8.450, P<0.001$;22 周: $q=13.940, P<0.001$)。该结果表明,长期砷暴露时间依赖性上调细胞总 m^6A 修饰水平并抑制 SHIP2 蛋白表达。



注:A. 对照组及亚砷酸钠染毒组细胞连续培养 22 周过程中的总 m^6A 修饰水平。B. 对照组及亚砷酸钠染毒组细胞连续培养 22 周过程中的 SHIP2 蛋白表达量。*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, ***: $P<0.001$, ****: $P<0.0001$ 。

图 1 长期砷染毒对细胞总 m^6A 修饰水平和 SHIP2 蛋白表达量的影响

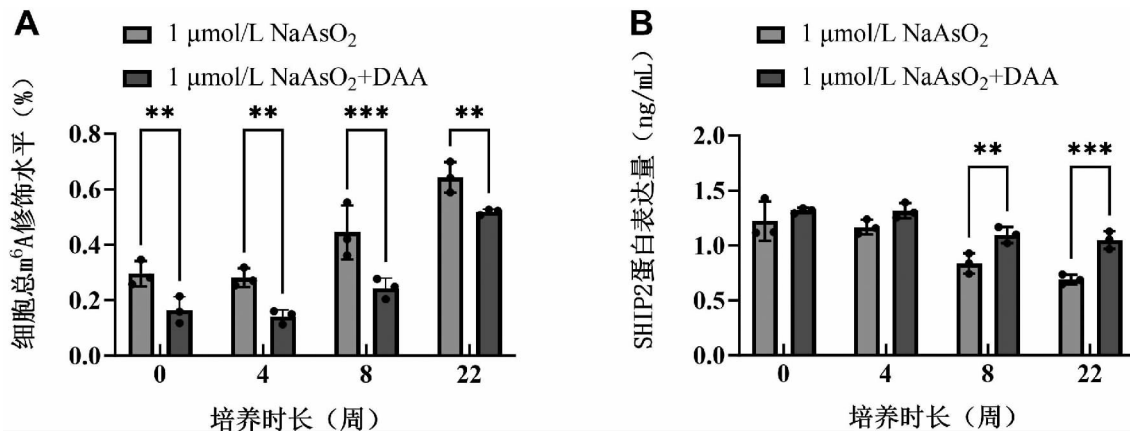
Fig. 1 Effect of long-term arsenic exposure on total m^6A modification levels and SHIP2 protein expression

2.2 DAA 处理抑制细胞总 m^6A 修饰水平并恢复 SHIP2 蛋白表达 如图 2A 所示,亚砷酸钠染毒 0、4、8 和 22 周的细胞经 DAA 处理 24 h 后,总 m^6A 修饰水平均显著下降(0 周: $q=4.539, P=0.006$;4 周: $q=4.812, P=0.004$;8 周: $q=6.920, P<0.001$;22 周: $q=4.291, P=0.008$),表明 DAA 处理能有效降低细胞总 m^6A 修饰水平;图 2B 显示,亚砷酸钠染毒 8 周和 22 周的细胞经 DAA 处理后 SHIP2 蛋白表达水平上升(8 周: $q=5.023, P=0.003$;22 周: $q=6.942, P<0.001$),表明降低细胞总 m^6A 修饰水平能逆转 SHIP2 蛋白表达抑制。

2.3 砷暴露上调 SHIP2 mRNA 的 m^6A 修饰水平, DAA 处理后 SHIP2 mRNA 的 m^6A 修饰水平下降 基于 SRAMP 的预测结果,我们在 SHIP2 mRNA 上选择了三个分别包含多个 m^6A 修饰位点的区域,并将这三个区域分别命名为 SHIP2-1、SHIP2-2 和 SHIP2-3。如 3A 所示,与对照组细胞相比,亚砷酸钠染毒 22 周的细胞中 SHIP2 mRNA 上三个区域的 m^6A 修饰水平均显著升高(SHIP2-1: $t=3.311, P=0.019$;

SHIP2-2: $t=3.168, P=0.024$;SHIP2-3: $t=3.843, P=0.007$);经 DAA 处理后,这三个区域的 m^6A 修饰水平均下降(SHIP2-1: $t=3.048, P=0.030$;SHIP2-2: $t=2.988, P=0.034$;SHIP2-3: $t=4.612, P=0.002$)。该实验结果表明长期砷暴露会上调 SHIP2 mRNA 上的特异性 m^6A 修饰水平,而 DAA 处理能有效抑制砷诱导的 SHIP2 mRNA 上的 m^6A 修饰水平上调。

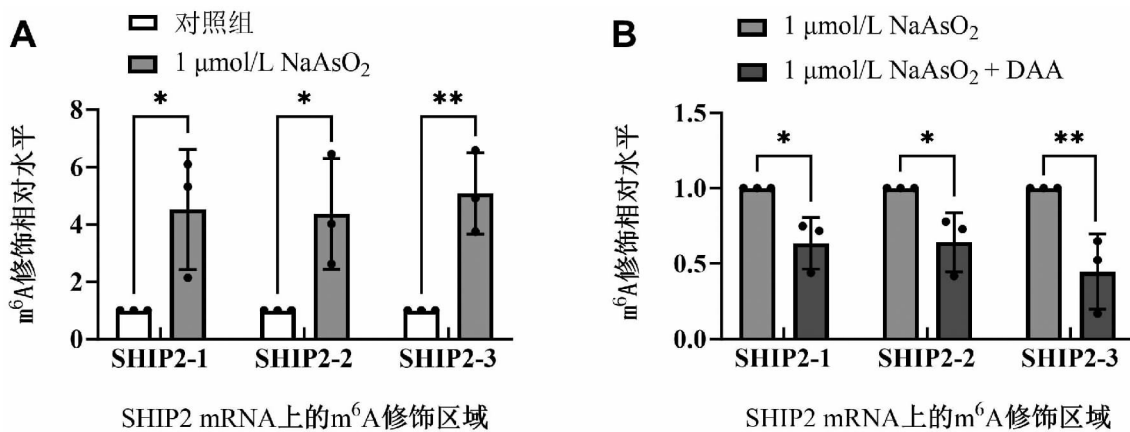
2.4 砷染毒 22 周细胞中 m^6A 阅读蛋白 YTHDF2 在 SHIP2 mRNA 上显著富集 为明确砷暴露下 SHIP2 蛋白表达下调是否与 m^6A 阅读蛋白 YTHDFs 相关,本研究接下来检测了 YTHDFs 与 SHIP2 mRNA 上 m^6A 修饰区域的结合水平。YTHDFs 的主要成员包括 YTHDF1、YTHDF2 和 YTHDF3,考虑到在大多数细胞中,YTHDF3 的主要功能是协同 YTHDF1 和 YTHDF2 调控基因表达^[9],因此 RIP-qPCR 实验仅检测了 YTHDF1 和 YTHDF2 分别与 SHIP2 mRNA 的结合情况。如图 4 所示:YTHDF2 在 SHIP2 mRNA 上的三个 m^6A 修饰区域均显著富集(SHIP2-1: $t=5.816, P=$



注:A. 亚砷酸钠染毒组细胞和 DAA 处理组细胞的总 m⁶A 修饰水平。B. 亚砷酸钠染毒组细胞和 DAA 处理组细胞的 SHIP2 蛋白表达量。*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, ****: $P < 0.0001$ 。

图 2 DAA 处理对细胞总 m⁶A 修饰水平和 SHIP2 蛋白表达量的影响

Fig. 2 Effect of DAA treatment on total m⁶A modification levels and SHIP2 protein expression



注:A. 亚砷酸钠染毒 22 周细胞中 SHIP2 mRNA 上 m⁶A 修饰的相对水平。B. 亚砷酸钠染毒 22 周细胞经 DAA 处理后 SHIP2 mRNA 上 m⁶A 修饰的相对水平。*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, ****: $P < 0.0001$ 。

图 3 亚砷酸钠连续染毒 22 周及 DAA 处理对 SHIP2 mRNA 上 m⁶A 修饰水平的影响

Fig. 3 Effect of long-term arsenic exposure for 22 weeks and DAA treatment on the m⁶A modification levels of SHIP2 mRNA

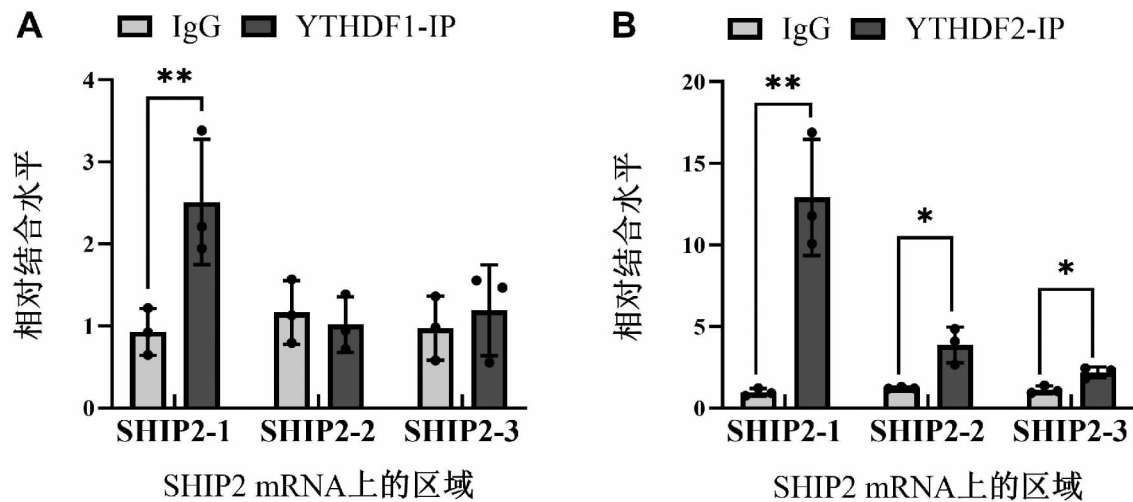
0.004; SHIP2-2: $t = 4.132$, $P = 0.015$; SHIP2-3: $t = 4.551$, $P < 0.05$, 图 4B), 而 YTHDF1 仅在 SHIP2-1 区域富集 (SHIP2-1: $t = 4.028$, $P = 0.005$, 图 4A)。该结果表明在砷染毒 22 周的细胞中, YTHDF2 与 SHIP2 mRNA 的结合水平高于 YTHDF1, 提示 YTHDF2 可能介导了 SHIP2 蛋白表达下调。

2.5 DAA 处理下调 YTHDF2 与 SHIP2 mRNA 的结合水平 如图 5 所示, DAA 处理抑制染毒 22 周细胞中 SHIP2 mRNA 上的 m⁶A 修饰水平后, YTHDF2 与 SHIP2-1、SHIP2-2 和 SHIP2-3 的结合水平均显著下降 (SHIP2-1: $t = 4.513$, $P = 0.002$; SHIP2-2: $t = 3.995$, $P = 0.004$; SHIP2-3: $t = 5.924$, $P < 0.001$), 表明抑制 SHIP2 mRNA 上的 m⁶A 修饰水平能降低 YTHDF2 与 SHIP2 mRNA 的结合。

2.6 m⁶A 修饰对细胞恶性表型的影响

2.6.1 m⁶A 修饰上调细胞迁移能力 如图 6B 所示, 染毒 8 周和 22 周后细胞的迁移能力显著增加 (8 周: $q = 6.478$, $P < 0.001$; 22 周: $q = 13.760$, $P < 0.001$); 连续染毒 8、22 周细胞的迁移率相较于相同培养周数的对照组细胞均上升 (8 周: $q = 6.190$, $P < 0.001$; 22 周: $q = 12.030$, $P < 0.001$); 连续染毒 8 周和 22 周的细胞经 DAA 处理后, 迁移率分别下降至未经 DAA 处理细胞 84.68%、76.17% (8 周: $q = 4.093$, $P = 0.021$; 22 周: $q = 8.104$, $P < 0.001$), 表明砷暴露增强细胞的迁移能力, DAA 处理下调细胞 m⁶A 修饰水平可以抑制砷诱导的细胞迁移能力上升。

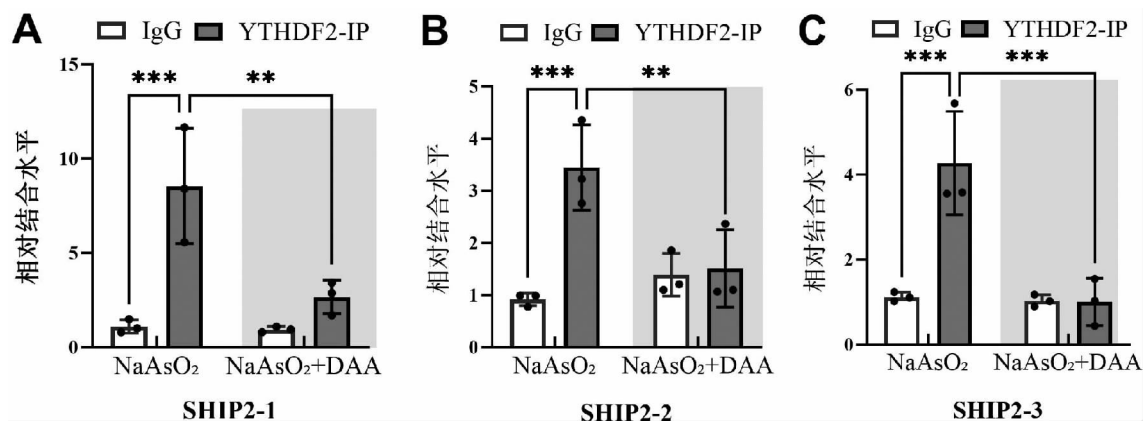
2.6.2 抑制 m⁶A 修饰下调细胞增殖能力 课题组前期研究发现, 长期砷暴露诱导 m⁶A 修饰水平上调会增强细胞增殖能力^[5], 因此本实验使用 DAA 处理细胞, 观察抑制 m⁶A 修饰对细胞增殖能力的影响。



注:A. 亚砷酸钠染毒22周细胞中YTHDF1与SHIP2 mRNA上三个m⁶A修饰区域的相对结合水平。B. 亚砷酸钠染毒22周细胞中YTHDF2与SHIP2 mRNA上三个m⁶A修饰区域的相对结合水平。*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, ****: $P < 0.0001$ 。

图4 亚砷酸钠染毒22周对m⁶A修饰阅读蛋白YTHDFs与SHIP2 mRNA结合水平的影响

Fig. 4 Effect of long-term arsenic exposure for 22 weeks on the binding levels of m⁶A reader proteins YTHDFs to SHIP2 mRNA



注:A-C. 亚砷酸钠染毒22周及DAA处理后细胞中YTHDF2与SHIP2-1、SHIP2-2和SHIP2-3的结合水平。*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, ****: $P < 0.0001$ 。

图5 DAA处理对YTHDF2与SHIP2 mRNA结合水平的影响

Fig. 5 Effect of DAA treatment on the binding levels of YTHDF2 to SHIP2 mRNA

如图7A-B所示,染毒0和4周的细胞经DAA处理后未表现出增殖能力的差异($P > 0.05$);图7C-D显示,染毒8和22周的细胞经DAA处理后增殖率显著下降(8周: $t = 4.964$, $P < 0.001$;22周: $t = 8.704$, $P < 0.001$),这些结果表明下调细胞m⁶A修饰水平可以抑制细胞增殖。

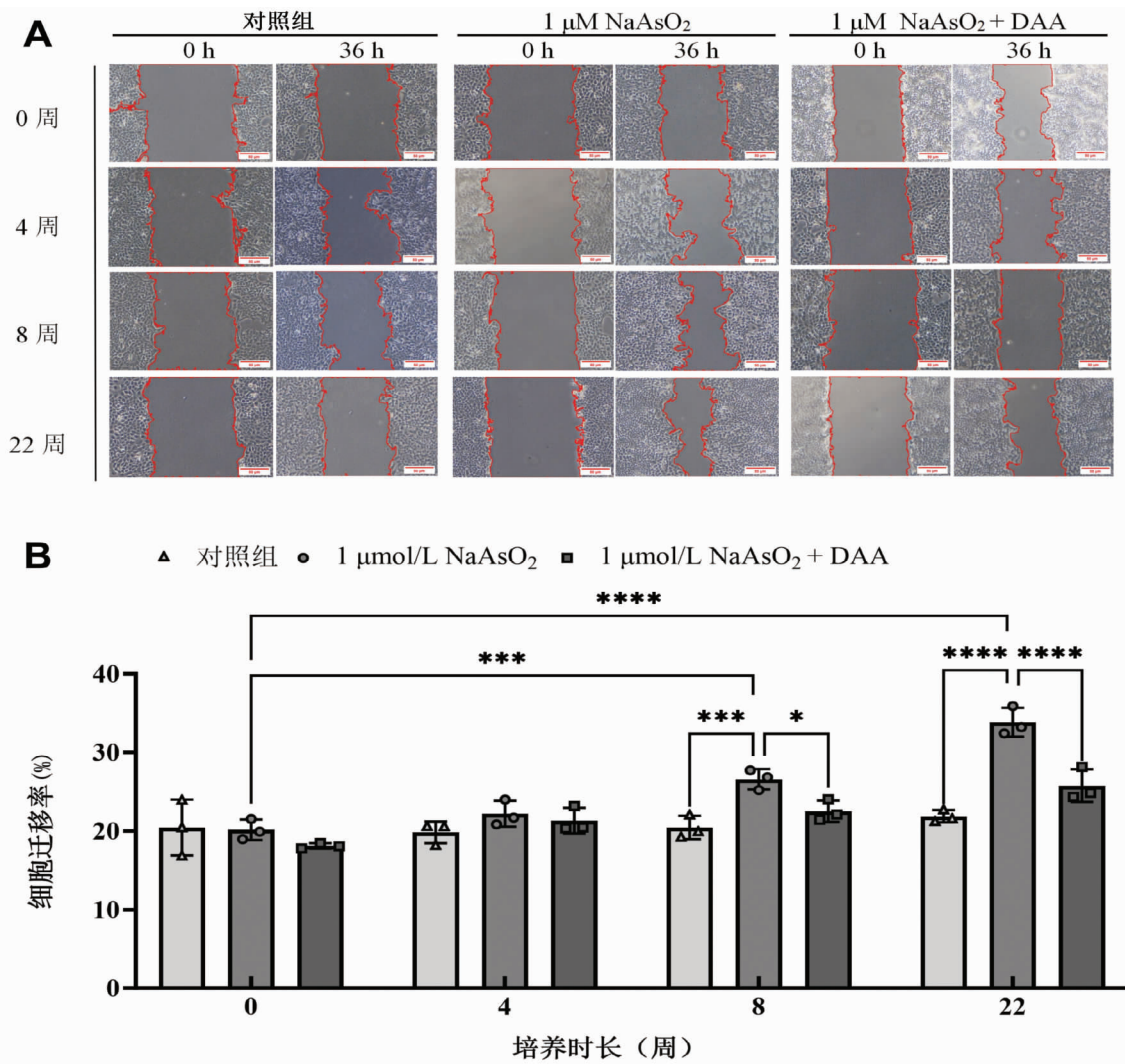
2.6.3 m⁶A修饰上调细胞锚定非依赖性生长能力

如图8B所示,相较于亚砷酸钠染毒0周的细胞,染毒8周和22周细胞的软琼脂克隆形成率显著上升(8周: $q = 6.428$, $P < 0.001$;22周: $q = 15.39$, $P < 0.001$),且染毒22周细胞的软琼脂克隆形成率明显高于染毒8周细胞($q = 8.961$, $P < 0.001$);与相同培养周数的对照组细胞相比,染毒8和22周细胞的软

琼脂克隆形成率明显增加(8周: $q = 4.772$, $P = 0.007$;22周: $q = 13.54$, $P < 0.001$),DAA处理后细胞软琼脂克隆形成率降低(8周: $q = 3.701$, $P = 0.039$;22周: $q = 5.941$, $P < 0.001$)。这些结果表明,亚砷酸钠长期染毒上调了细胞的锚定非依赖性生长能力,DAA处理抑制细胞m⁶A修饰水平可以使锚定非依赖性生长能力下降。

3 讨论

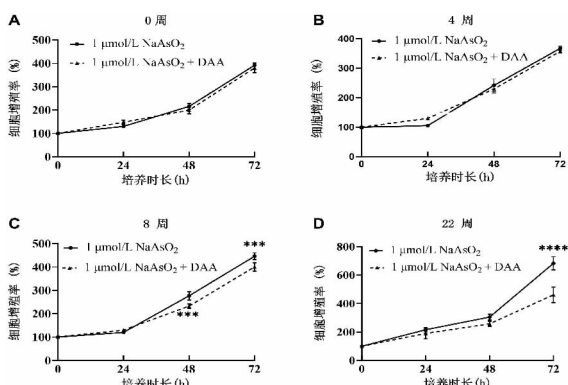
作为被广泛研究的肿瘤调节因子,SHIP2可调控增殖信号PI3K/AKT、胰岛素信号和丝裂原活化蛋白激酶信号MAPK/ERK等多条通路影响癌症进展^[17]。本研究发现,长期砷暴露通过上调m⁶A修饰水平抑



注:A. 对照组、亚砷酸钠染毒组和亚砷酸钠 + DAA 处理组细胞的划痕愈合典型图像,标尺为 50 μm 。B. 对照组、亚砷酸钠染毒组和亚砷酸钠 + DAA 处理组细胞的划痕迁移率。*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, ****: $P < 0.0001$ 。

图 6 亚砷酸钠连续染毒及 DAA 处理对 HaCaT 细胞迁移率的影响

Fig. 6 Effect of long-term arsenic exposure and DAA treatment on migration rate of HaCaT cells



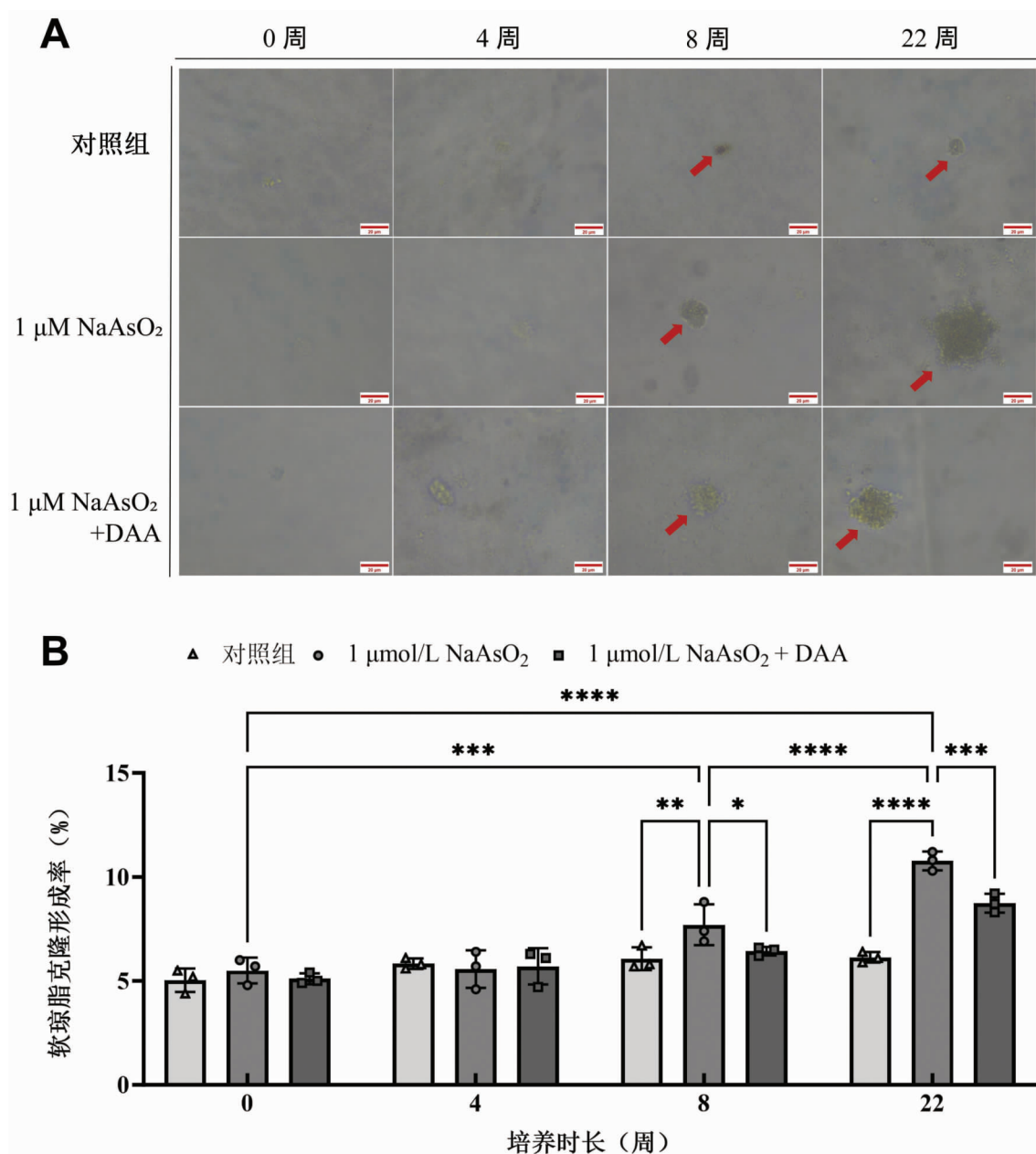
注:A-D 分别为亚砷酸钠连续染毒 0、4、8 和 22 周及 DAA 处理后的细胞增殖率。

图 7 DAA 处理对亚砷酸钠连续染毒 HaCaT 细胞增殖率的影响

Fig. 7 Effect of DAA treatment on proliferation rate of HaCaT cells continuously exposed to arsenic

制 SHIP2 蛋白表达,进而增强 HaCaT 细胞的恶性表型,提示 SHIP2 作为抑癌因子参与了 m⁶A 修饰介导的砷致细胞恶性转化。值得注意的是,有多篇研究报道,SHIP2 在食管鳞状细胞癌(eSCC)^[18]、喉鳞状细胞癌(LSCC)^[19]、PTEN 缺失的胶质母细胞瘤^[20-21]以及乳腺癌^[22]和结直肠癌等多种癌症中^[23]均表现出促癌效应,表明 SHIP2 能以细胞环境依赖的方式发挥对癌症的双重调控作用。

SHIP2 对癌症的双向调控可能与其对 AKT 活性的调节具有亚型特异性相关^[24]。AKT 的亚型主要有 AKT1 和 AKT2,AKT1 作为细胞存活和生长的关键调节因子,在人体各组织中广泛表达;AKT2 是维持葡萄糖稳态和代谢的核心蛋白,在多种癌症中驱动肿瘤细胞的侵袭和转移^[25]。SHIP2 是磷脂酰肌醇 5-磷酸



注:A. 对照组、亚砷酸钠染毒组和亚砷酸钠 + DAA 处理组细胞的软琼脂克隆形成图像,标尺为 20 μm ,红色箭头指示典型的软琼脂克隆。B. 对照组、亚砷酸钠染毒组和亚砷酸钠 + DAA 处理组细胞的软琼脂克隆形成率。*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, ****: $P < 0.0001$ 。

图 8 亚砷酸钠连续染毒及 DAA 处理对 HaCaT 细胞软琼脂克隆形成率的影响

Fig. 8 Effect of long-term arsenic exposure and DAA treatment on soft agar colony formation rate of HaCaT cells

酶,通过去磷酸化 PIP3 的 5-磷酸生成磷脂酰肌醇-3,4-二磷酸(PI(3,4)P₂)^[26],这个过程虽然降低了细胞膜上 PIP3 含量,减少 AKT1 被 PIP3 招募至细胞膜和后续激活,但生成的 PI(3,4)P₂ 对 AKT2 的亲合力与 PIP3 接近,可维持 AKT2 的膜招募与部分激活^[27]。换言之,PI(3,4)P₂ 虽然不像 PIP3 那样提供全亚型、高强度的 AKT 锚定和招募能力,但可以借助 AKT2,以强度下调的方式延续 AKT 信号。因此 SHIP2 高表达既可通过降解 PIP3 抑制 AKT1 发挥抑癌作用,也能通过促进 PI(3,4)P₂ 生成选择性招募

AKT2,维持细胞促生存信号进而发挥促癌作用^[28]。本研究中,DAA 处理挽救 SHIP2 蛋白表达抑制后,细胞恶性表型发生逆转,提示 SHIP2 可能通过减少 AKT1 被招募到细胞膜上进而发挥抑癌作用,接下来的研究中可以继续检测 SHIP2 蛋白表达变化对 PI3K/AKT 信号通路强度的影响,以明确 SHIP2 是否通过调控 PI3K/AKT 信号通路参与 m⁶A 修饰介导的种致癌。

本研究结果显示,长期砷暴露诱导恶性转化过程中细胞总 m⁶A 修饰水平升高,抑制总 m⁶A 修饰水平

可以逆转细胞恶性表型,与前人的研究结果一致^[10]。然而也有研究证实,m⁶A 修饰水平降低同样可促进亚砷酸盐诱导的细胞恶性表型,这归因于 m⁶A 修饰发生在不同功能的靶基因上^[29-30]。m⁶A 修饰对肿瘤进程的调控表现出显著的背景特异性,其最终生物学效应不仅取决于发生 m⁶A 修饰的信号通路,更源于阅读蛋白对特定靶基因上 m⁶A 修饰的差异化解读^[9]。m⁶A 调控机制的复杂性使得细胞总 m⁶A 水平无法精确反映砷致癌的具体病理进程,因此总 m⁶A 修饰水平并不适合作为监测砷诱导皮肤癌的生物标志物。本研究将总 m⁶A 水平细化到特定的 SHIP2 mRNA 分子上来探究 m⁶A 修饰介导砷致癌的机制,观察到下调 SHIP2 mRNA 上的 m⁶A 修饰水平可以有效降低 YTHDF2 与 SHIP2 mRNA 的结合,并挽救 SHIP2 蛋白表达抑制,后续可以继续探索靶向擦除 SHIP2 mRNA 的 m⁶A 修饰能否有效逆转细胞的恶性表型,验证 SHIP2 mRNA 的特异性 m⁶A 修饰是否有潜力作为砷诱导皮肤病变的可靠生物标志物。

综上所述,本研究发现,长期砷暴露通过上调细胞总 m⁶A 修饰水平和 SHIP2 mRNA 上的 m⁶A 修饰水平驱动 m⁶A 阅读蛋白 YTHDF2 与 SHIP2 mRNA 结合,进而抑制 SHIP2 蛋白表达,最终增强 HaCaT 细胞的增殖、迁移和锚定非依赖性生长能力;抑制 m⁶A 修饰可以挽救 SHIP2 蛋白表达下调并逆转细胞恶性表型。研究结果表明 SHIP2 是 m⁶A 修饰介导砷致皮肤细胞恶性转化的重要靶点,提示 SHIP2 mRNA 上的特异性 m⁶A 修饰可能作为砷致皮肤癌的潜在生物标志物。

利益冲突声明 本研究不存在任何利益冲突

参考文献

- [1] 陈湘萍,刘思雨,利浩南,等. 砷的暴露途径及其皮肤损伤机制[J]. 环境卫生学杂志, 2023, 13(9): 701-707.
Chen XP, Liu SY, Li HN, et al. Exposure pathways of arsenic and its mechanisms of skin injury [J]. Journal of Environmental Hygiene, 2023, 13(9): 701-707. (In Chinese)
- [2] Zeng QB, Zhang AH. Assessing potential mechanisms of arsenic - induced skin lesions and cancers: Human and in vitro evidence [J]. Environmental Pollution, 2020, 260: 113919.
- [3] Jiang XL, Liu BY, Nie Z, et al. The role of m⁶A modification in the biological functions and diseases [J]. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2021, 6(1): 74.
- [4] 鄢卓贤,梁鹏飞. 皮肤病中编码 RNA 的 m⁶A 修饰 [J]. 中南大学学报:医学版, 2022, 47(8): 1154-1162.
Yan ZX, Liang PF. m⁶A modification of coding RNA in dermatology [J]. Journal of Central South University (Medical Science), 2022, 47(8): 1154-1162. (In Chinese)
- [5] Zhang Q, Man J, Zhao TH, et al. YTHDF2 promotes arsenic - induced malignant phenotypes by degrading PIDD1 mRNA in human keratinocytes [J]. Chemico - Biological Interactions, 2025, 406: 111352.
- [6] Zhao TH, Sun DL, Zhao MY, et al. N⁶ - methyladenosine mediates arsenite - induced human keratinocyte transformation by suppressing p53 activation [J]. Environmental Pollution, 2020, 259: 113908.
- [7] Chen YB, Zhou ZY, Chen YX, et al. Reading the m⁶A - encoded epitranscriptomic information in development and diseases [J]. Cell & Bioscience, 2024, 14(1): 124.
- [8] Sikorski V, Selberg S, Lalowski M, et al. The structure and function of YTHDF epitranscriptomic m⁶A readers [J]. Trends in Pharmacological Sciences, 2023, 44(6): 335-353.
- [9] Chen L, Gao Y, Xu S, et al. N⁶ - methyladenosine reader YTHDF family in biological processes: structures, roles, and mechanisms [J]. Frontiers in Immunology, 2023, 14: 1162607.
- [10] Zhao TH, Xiong WX, Cai JSI, et al. YTHDF2 phase separation promotes arsenic - induced keratinocyte transformation in a poly - m⁶A - dependent manner by inhibiting translational initiation of the key tumor suppressor PTEN [J]. Journal of Hazardous Materials, 2024, 480: 136243.
- [11] 熊文晓,赵田禾,龙科言,等. YTH 结构域家族蛋白 2 对亚砷酸钠诱导皮肤细胞恶性转化的影响 [J]. 中国医学科学院学报, 2025, 47(3): 333-342.
Xiong WX, Zhao TH, Long KY, et al. Effect of YTH domain family protein 2 on sodium arsenite - induced malignant transformation of skin cells [J]. Acta Academiae Medicinae Sinicae, 2025, 47(3): 333-342. (In Chinese)
- [12] John LH, Naughton FB, Sansom MSP, et al. The role of C2 domains in two different phosphatases: PTEN and SHIP2 [J]. Membranes, 2023, 13(4): 408.
- [13] Csölle MP, Ooms LM, Papa A, et al. PTEN and other PtdIns(3, 4, 5) P₃ lipid phosphatases in breast cancer [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(23): 9189.
- [14] Wang HQ, Wang Y, Lai SH, et al. LINC01468 drives NAFLD - HCC progression through CUL4A - linked degradation of SHIP2 [J]. Cell Death Discovery, 2022, 8(1): 449.
- [15] Tsuji JS, Chang ET, Gentry PR, et al. Dose - response for assessing the cancer risk of inorganic Arsenic in drinking water: the scientific basis for use of a threshold approach [J]. Critical Reviews in Toxicology, 2019, 49(1): 36-84.
- [16] Chen HY, Zhao TH, Sun DL, et al. Changes of RNA N⁶ - methyladenosine in the hormesis effect induced by arsenite on human keratinocyte cells [J]. Toxicology in Vitro, 2019, 56: 84-92.
- [17] Azzi A. SHIP2 inhibition alters redox - induced PI3K/AKT and MAP kinase pathways via PTEN over - activation in cervical cancer cells [J]. FEBS Open bio, 2020, 10(10): 2191-2205.
- [18] Gillet N, Bodart C, Beck B. Pharmacological SHIP2 blockade enhances sensitivity to standard and targeted cancer therapies [J]. Advances in Biological Regulation, 2026, 99: 101130.
- [19] Tang T, Xiao ZY, Shan G, et al. Descending - SHIP2 - mediated radiosensitivity enhancement through PI3K/Akt signaling pathway in laryngeal squamous cell carcinoma [J]. Biomedicine & Pharmacotherapie, 2019, 118: 109392.
- [20] Ramos AR, Ghosh S, Dedobbeleer M, et al. Lipid phosphatases SKIP and SHIP2 regulate fibronectin - dependent cell migration in glioblastoma [J]. FEBS Journal, 2019, 286(6): 1120-1135.
- [21] Mercurio FA, Vincenzi M, Leone MRL. Hunting for novel routes in anticancer drug discovery: peptides against Sam - Sam interactions [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(18): 10397.

- [22] Zhou J, Di MM, Han H. Upregulation of SHIP2 participates in the development of breast cancer via promoting Wnt/ β - catenin signaling[J]. *OncoTargets and Therapy*, 2019, 12: 7067 - 7077.
- [23] Yang J, Fu MY, Ding YG, et al. High SHIP2 expression indicates poor survival in colorectal cancer[J]. *Disease Markers*, 2014, 2014: 218968.
- [24] Pedicone C, Meyer ST, Chisholm JD, et al. TargetingSHIP1 and SHIP2 in cancer[J]. *Cancers*, 2021, 13(4): 890.
- [25] Guerau - De - arellano M, Piedra - Quintero Z L, tsichlis P N. Akt isoforms in the immune system [J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 990874.
- [26] Michael M, McCormick B, Anderson KE, et al. The 5 - phosphatase SHIP2 promotes neutrophil chemotaxis and recruitment [J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 671756.
- [27] Yudushkin I. Control of Akt activity and substrate phosphorylation in cells[J]. *IUBMB Life*, 2020, 72(6): 1115 - 1125.
- [28] Gozzelino L, De Santis MC, Gulluni F, et al. PI (3,4) P2 signaling in cancer and metabolism[J]. *Frontiers in Oncology*, 2020, 10: 360.
- [29] Cui YH, Yang S, Wei JB, et al. Autophagy of the m6A mRNA demethylase FTO is impaired by low - level Arsenic exposure to promote tumorigenesis [J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 2183.
- [30] Gao M, Qi ZJ, Feng WY, et al. m6A demethylation of cytidine deaminase APOBEC3B mRNA orchestrates arsenic - induced mutagenesis[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2022, 298(2): 101563.

收稿日期:2026-01-23

(上接第 2125 页)

- Li HM. Association analysis of obesity and muscle - related indicators with cognitive impairment based on prospective cohort and Mendelian randomization [D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2025. (In Chinese)
- [4] 徐春艳. 新型胰岛素抵抗指标对中国中老年人肌少性肥胖的预测价值: 一项基于 CHARLS 数据库的纵向队列研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2025.
- Xu CY. Predictive value of novel insulin resistance indicators for sarcopenic obesity in Chinese middle - aged and older adults: a longitudinal cohort study based on the CHARLS database [D]. Nanchang: Nanchang University, 2025. (In Chinese)
- [5] Wang C, He SM, Xie GB, et al. Associations of longitudinal trajectories of triglyceride - glucose index combined with classical and novel obesity indices and cardiovascular disease: evidence from a nationwide prospective cohort study in China[J]. *Cardiovascular Diabetology*, 2025, 24(1): 431.
- [6] Yue Y, Li PC, Sun ZY, et al. Association of novel triglyceride - glucose - related indices with incident stroke in early - stage cardiovascular - kidney - metabolic syndrome[J]. *Cardiovascular Diabetology*, 2025, 24(1): 301.
- [7] 陈子婷. 中国老年人群肥胖指标及维生素 D 与衰弱的关联性研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2024.
- Chen ZT. Association of obesity indices and vitamin D with frailty in the Chinese elderly population [D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2024. (In Chinese)
- [8] Wu Y, Liu C, Cao J. Association between triglyceride - glucose index and its composite obesity indexes and cardio - renal disease: analysis of the NHANES 2013 - 2018 cycle [J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2025, 16: 1505808.
- [9] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南(2020 年版)[J]. *中国糖尿病杂志*, 2021, 13(4): 315 - 409.
- Chinese Diabetes Society. Guideline for the prevention and treatment of type 2 diabetes in China (2020 edition)[J]. *Chinese Journal of Diabetes*, 2021, 13(4): 315 - 409. (In Chinese)
- [10] Ley SH, Schulze MB, Hivert MF, et al. Risk factors for type 2 diabetes[M]. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (US), 2018.
- [11] Leitzmann MF, Moore SC, Koster A, et al. Waist circumference as compared with body - mass index in predicting mortality from specific causes[J]. *PLOS One*, 2011, 6(4): e18582.
- [12] Ross R, Neeland IJ, Yamashita SZA, et al. Waist circumference as a vital sign in clinical practice: a Consensus Statement from the IAS and ICCR Working Group on Visceral Obesity[J]. *Nature Reviews Endocrinology*, 2020, 16(3): 177 - 189.
- [13] Feng X, Zhu JH, Hua ZL, et al. Comparison of obesity indicators for predicting cardiovascular risk factors and multimorbidity among the Chinese population based on ROC analysis [J]. *Scientific Reports*, 2024, 14(1): 20942.
- [14] Zheng D, Cai J, Xu S, et al. The association of triglyceride - glucose index and combined obesity indicators with chest pain and risk of cardiovascular disease in American population with pre - diabetes or diabetes [J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2024, 15: 1471535.
- [15] Dang KK, Wang XY, Hu JX, et al. The association between triglyceride - glucose index and its combination with obesity indicators and cardiovascular disease: NHANES 2003 - 2018[J]. *Cardiovascular Diabetology*, 2024, 23(1): 8.
- [16] 孙嘉钰, 刘敏, 张安东, 等. 中国中老年人三酰甘油 - 葡萄糖指数及其衍生指数与慢性病共病的关联研究[J]. *现代预防医学*, 2024, 51(17): 3095 - 3100, 3107.
- Sun JY, Liu M, Zhang AD, et al. Association of triglyceride - glucose index and its derived indices with chronic disease multimorbidity in Chinese middle - aged and older adults [J]. *Modern Preventive Medicine*, 2024, 51(17): 3095 - 3100, 3107. (In Chinese)
- [17] 周倩, 魏洪娟, 周爱霞, 等. 人口老龄化视角下老年共病精准护理的前景展望[J]. *循证护理*, 2025, 11(14): 2850 - 2853.
- Zhou Q, Wei HJ, Zhou AX, et al. The prospect of precision nursing for senile comorbidity from the perspective of population aging[J]. *Evidence - based Nursing*, 2025, 11(14): 2850 - 2853. (In Chinese)
- [18] Liu LL, YuGZ, Ji XH, et al. Associations of six insulin resistance - related indices with the risk and progression of cardio - renal - metabolic multimorbidity: evidence from the UK biobank [J]. *Cardiovascular Diabetology*, 2025, 24(1): 377.
- [19] 赵玉. 老年慢性共病患者社区护理需求现状及影响因素研究[D]. 广州: 暨南大学, 2023.
- Zhao Y. Study on the status and influencing factors of community nursing needs among elderly patients with chronic multimorbidity [D]. Guangzhou: Jinan University, 2023. (In Chinese)

收稿日期:2025-12-24