

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.17.001

• 基础研究 •

m6A 去甲基化酶 ALKBH5 对上皮性卵巢癌恶性生物学行为的影响
及其作用机制研究 *王 充 杨诗敏 张春晓 周冬梅 向江东 席晓薇[△]

(上海交通大学医学院附属第一人民医院妇产科 上海 201620)

摘要 目的: ALKBH5 最近被证明是与各种癌症相关的 RNA N6-甲基腺苷(m6A)去甲基转移酶之一,但其在上皮性卵巢癌中的作用缺乏研究。本研究旨在探讨 ALKBH5 在上皮性卵巢癌中的机制。方法: 利用蛋白免疫印迹、免疫组化检测 ALKBH5 在卵巢癌细胞和组织中的表达情况,并分析其与临床病理特征和预后关系;通过慢病毒感染构建 ALKBH5 稳定过表达或敲减卵巢癌细胞系,采用 CCK-8、平板克隆、划痕、Transwell 迁移和侵袭等实验研究 ALKBH5 对细胞增殖、迁移及侵袭能力的影响;通过蛋白免疫印迹和斑点印迹实验,探究 ALKBH5-HIF-1 α 环的相互作用情况。结果: ALKBH5 在卵巢癌细胞系和卵巢癌组织中高表达,ALKBH5 蛋白在卵巢癌组织中的表达与 CA125 水平、FIGO 分期和组织学类型相关,且高表达的 ALKBH5 水平与较差的预后相关。通过慢病毒感染构建出可靠的 ALKBH5 敲减/过表达稳转细胞系,CCK-8、平板克隆实验表明敲减 ALKBH5 降低卵巢癌细胞体外增殖速率和集落形成,划痕、Transwell 迁移和侵袭实验表明敲减 ALKBH5 可抑制卵巢癌细胞体外迁移和侵袭能力。与对照组相比,过表达 ALKBH5 增强卵巢癌细胞体外增殖速率、集落形成、迁移和侵袭能力。进一步的实验发现 ALKBH5 和 HIF-1 α 互相促进表达。结论: m6A 去甲基化酶 ALKBH5 在上皮性卵巢癌中高表达且与预后相关,通过促进卵巢癌细胞增殖、迁移及侵袭发挥致癌基因的作用。因此,抑制 ALKBH5 的表达可能是靶向治疗上皮性卵巢癌的潜在策略。

关键词: m6A; ALKBH5; 上皮性卵巢癌**中图分类号:** R-33; R737.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2023)17-3201-10Effects of m6A Demethylase ALKBH5 on the Malignant Biological
Behavior and Mechanism Action of Epithelial Ovarian Cancer*WANG Chong, YANG Shi-min, ZHANG Chun-xiao, ZHOU Dong-mei, XIANG Jiang-dong, XI Xiao-wei[△]

(Department of Obstetrics and Gynecology, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai, 201620, China)

ABSTRACT Objective: ALKBH5 has recently been identified as one of the RNA N6-methyladenosine (m6A) demethylases associated with various types of cancer. However, its role in epithelial ovarian cancer remains unclear. This study aimed to investigate the mechanism of ALKBH5 in epithelial ovarian cancer. **Methods:** The expression of ALKBH5 in ovarian cancer cells and tissues was detected by western blotting and immunohistochemistry, respectively. The online Kaplan-Meier survival analysis was used to explore the correlation between ALKBH5 and ovarian cancer prognosis and to analyze its relationship with clinicopathological features and prognosis. Stable ovarian cancer cell lines with overexpression or knockdown of ALKBH5 were constructed by lentivirus infection. The function of ALKBH5 was investigated in vitro by using CCK-8, colony formation assay, wound healing assay, Transwell migration and invasion assay and other experimental methods to study the effects of ALKBH5 on cell proliferation, migration and invasion. Ovarian cancer cells were treated with hypoxia and the interaction between ALKBH5-HIF-1 α loop was explored by western blotting and dot blotting experiments. **Results:** ALKBH5 was highly expressed in ovarian cancer cell lines and ovarian cancer tissues. The expression of ALKBH5 protein in ovarian cancer tissues was correlated with CA125 level, FIGO stage and histological type, and high expression of ALKBH5 level was associated with poor prognosis. Reliable ALKBH5 knockdown/overexpression stable cell lines were constructed by lentivirus infection. CCK-8 and colony formation assay showed that knockdown of ALKBH5 reduced the proliferation rate and colony formation of ovarian cancer cells in vitro. Wound healing and Transwell migration and invasion assay showed that knockdown of ALKBH5 inhibited the migration and invasion abilities of ovarian cancer cells in vitro. In vitro experiments confirmed that ALKBH5 promoted proliferation, migration and invasion in ovarian cancer. Compared with the control group, overexpression of ALKBH5 enhanced the proliferation rate, colony formation, migration and invasion abilities of ovarian cancer cells in vitro. Further experiments revealed that ALKBH5 and

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81772767)

作者简介: 王充(1998-),男,硕士研究生,主要研究方向: 妇科肿瘤,表观遗传, E-mail: wang-chong@sjtu.edu.cn

[△] 通讯作者: 席晓薇(1963-),女,硕士生导师,教授,主要研究方向: 妇科肿瘤, E-mail: xixiaowei@sjtu.edu.cn

(收稿日期: 2023-03-06 接受日期: 2023-03-28)

HIF-1 α positively regulated each other's expression. **Conclusions:** m6A demethylase ALKBH5 is highly expressed and associated with prognosis in epithelial ovarian cancer, and plays an oncogenic role by promoting ovarian cancer cell proliferation, migration and invasion. Therefore, inhibiting the expression of ALKBH5 may be a potential strategy for targeted therapy of epithelial ovarian cancer.

Key words: m6A; ALKBH5; Epithelial ovarian cancer

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R737.31 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2023)17-3201-10

前言

近年来, 卵巢癌在科学研究和临床治疗上有了新的进展, 取得了巨大的进步, 但它仍然是最致命的妇科癌症, 5 年生存率仅为 47%^[1]。由于卵巢癌诊治晚、易复发等原因, 治疗效果仍无法令人满意。RNA N6-腺苷酸甲基化(N6-methyladenosine, m6A) 是一种最常见的、可逆的 RNA 修饰方式^[2], 通过影响 RNA 的成熟、出核、剪切、翻译等过程, 调控下游基因表达, 这些基因可能影响癌细胞的启动^[3], 增殖^[4], 分化^[5], 转移^[6]和代谢重编程^[7]。

ALKBH5 通过去除关键 RNA 上的 m6A 修饰^[8], 诱发各种恶性肿瘤的形成和发展^[9,10]。近年来, 越来越多的研究表明, ALKBH5 在肿瘤中扮演着重要的角色。ALKBH5 是一个 RNA 去甲基化酶, 它能够在 RNA 分子上去除甲基基团, 从而影响 RNA 的转录、翻译和降解等过程^[11]。ALKBH5 的异常表达与多种肿瘤的发生和发展密切相关, 其中包括卵巢癌。一项研究检查了浆液性卵巢癌中 AlkB 家族成员的表达谱, 并发现高表达 ALKBH5 的病例有着较短的总体生存期(Overall Survival, OS) 和无进展生存期(Progression-Free Survival, PFS)^[12]。本研究选取卵巢癌细胞和卵巢癌组织进行检测, 探究 ALKBH5 在卵巢癌中的表达水平, 评估其作为一种生物标志物在卵巢癌诊断和预后评估中的潜在价值, 为卵巢癌的病理生理机制提供重要的数据和线索。通过改变 ALKBH5 的表达以观察其对卵巢癌细胞增殖、迁移及侵袭能力的影响, 确定其在卵巢癌中的作用和机制, 为卵巢癌的治疗探寻新的靶点和策略。基于上述研究结果, 评价 ALKBH5 在卵巢癌发生发展中的生物学作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞 SKOV3、Hey、HO8910、A2780 等人卵巢癌细胞株以及正常卵巢上皮细胞 IOSE80 由上海市第一人民医院妇产科实验室保存。

1.1.2 组织样本 该组织样本来源于上海市第一人民医院于 2017 年 3 月至 2022 年 3 月收集的卵巢癌患者手术标本库。标本入选标准包括: 1、术前未接受放化疗; 2、初次手术; 3、两名病理专家独立诊断为卵巢癌。排除标准包括: 1、年龄小于 18 岁的患者; 2、二次手术或术前接受放化疗; 3、同时伴有其他组织类型的肿瘤或者有恶性肿瘤史。

1.1.3 主要试剂 胎牛血清、DMEM 高糖培养基 (Gibco); 0.25% 胰蛋白酶、青霉素-链霉素溶液 (吉诺生物); RIPA 裂解液、loading buffer、BCA 试剂盒 (碧云天); 配胶试剂盒、蛋白 marker (雅酶); PVDF 膜、NC 膜 (Millipore); 一抗试剂: ALKBH5 (义翘神州)、HIF-1 α (Abcam)、 β -actin (CST)、Tublin (Abcam)、m6A

(Abclonal); HRT 二抗羊抗兔、羊抗鼠均购于 Abcam 公司; CCK-8 试剂盒 (Dojindo); ALKBH5 敲减/过表达慢病毒 (吉凯基因); TRIzol、RNA 逆转录试剂盒、引物设计、PCR SYBR Green (新贝公司); 亚甲基蓝 (国药公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将冻存的细胞株取出放在冰上解冻, 用 1 $\times$ PBS 缓冲液洗涤 1 次。将细胞株接种在含有 10% FBS 和 1% 的青霉素/链霉素的 DMEM 培养基中, 培养皿放在含 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 培养箱中, 细胞密度为 1 $\times$ 10⁴/cm²。当细胞密度达到 80-90% 时, 用 0.25% 胰酶-EDTA 消化液将细胞剥离, 进行细胞传代, 传代倍数不超过 10 次。将细胞培养至 80-90% 密度, 加入 10% DMSO 保存于液氮中, 进行细胞存储。

1.2.2 免疫组化 将玻片进行脱蜡、水化和抗原修复。随后, 使用山羊血清进行封闭, 将稀释后的一抗抗体加入孵育, 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育。第二天, 将玻片在室温孵育 2 小时与二抗结合。使用 DAB 染色 1-5 分钟, 并用蒸馏水洗涤。苏木精溶液再次染色 3-5 分钟, 使用低到高浓度梯度乙醇脱水。最后, 将玻片浸泡在二甲苯溶液中两次, 每次 10 分钟, 并密封。使用数字切片扫描仪观察和拍照。

1.2.3 蛋白免疫印迹实验 (Western Blot, WB) 取对数生长期细胞株, 使用 RIPA 裂解细胞, 离心裂解液, 通过 BCA 法检测蛋白浓度。剩余上清与 loading buffer 混合 100 $^{\circ}$ C 加热 5 分钟, 之后将样品加入 SDS-PAGE 凝胶中进行电泳分离, 分离后转膜至 PVDF 膜, 封闭液室温封闭 30 分钟。一抗稀释至相应比例 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次; 二抗稀释至相应比例室温孵育 1 小时, TBST 洗 3 次。ECL 显影液显影, Image J 软件分析半定量分析。

1.2.4 慢病毒感染 按照说明书, 将细胞与适当浓度病毒上清共同孵育 24 小时后, 加 2 μ g/mL 的嘌呤霉素进行筛选稳定敲减细胞系。通过 WB 实验验证敲减效率。

1.2.5 CCK-8 实验 将对数生长期的细胞消化、离心、计数后, 接种 100 μ L 细胞悬液至 96 孔板中, 每个孔的细胞密度为 4 $\times$ 10⁴ 个细胞/mL, 每组设置 5 个复制孔。观察细胞在培养箱中的附着情况, 当细胞完全附着在底部时, 标记为 0 小时, 并分别在 0 小时、24 小时、48 小时和 72 小时加入 10 μ L 的 CCK-8 溶液到每个孔中, 然后将板子放回培养箱中继续培养 2 小时。使用酶标仪在 450 nm 处测量每个孔的吸光度值, 并绘制生长曲线。

1.2.6 细胞划痕实验 将对数生长期的细胞消化、离心、计数后, 接种 4 $\times$ 10⁵ 个细胞于 6 孔板内, 显微镜观察细胞汇合率达 100%, 用 200 μ L 枪头沿直尺均一用力在孔底划痕, PBS 清洗漂浮细胞, 换用不含 FBS 的培养基继续培养。0 小时、24 小时后倒置显微镜下同位置拍照, Image J 软件计算划痕面积。

1.2.7 平板克隆实验 将对数生长期的细胞消化、离心、计数

后,以 1000 个细胞 / 孔的密度接种于 6 孔板中,并进行常规培养 14 天。之后,使用 4 %多聚甲醛固定处理 15 分钟,结晶紫处理 15 分钟染色,拍照记录并计数。

1.2.8 Transwell 迁移及侵袭实验 将对数生长期的细胞消化、离心,用无血清培养基将细胞重悬计数,以 1×10^4 个细胞 / 孔的密度接种于 Transwell 小室的上室内,并在下室加入 600 μ L 完全培养基,之后,使用 4 %多聚甲醛固定处理 15 分钟,结晶紫处理 15 分钟染色,显微镜下拍照记录并计数。侵袭实验提前将基质胶铺在 Transwell 小室的上室内,并培养箱中凝固 30 分钟,后续步骤同迁移实验。

1.2.9 Dot Blot 实验 NC 膜上画长宽为 1 cm $\times$ 1 cm 正方形小格。总 RNA 稀释至 500 ng/ μ L,每个点 2 μ L。包被点样后,37 摄氏度孵育半个小时,紫外照射 20 分钟。封闭液封闭 1 小时。将 m6A 一抗稀释到合适的工作液浓度,4 $^{\circ}$ C 过夜孵育。TBST 洗膜 5 分钟,重复 5 次。二抗工作液,孵育 30 分钟。TBST 洗膜 5 分钟重复 5 次。ECL 显色。显色后将条带置于亚甲蓝溶液孵育过夜,取出拍照。

1.2.10 实时定量链式聚合酶反应 (qRT-PCR) RNA 提取参考 TRIzol 提取手册,之后分别参考逆转录试剂盒手册将 RNA 逆转录成 cDNA,再按照 PCR SYBR Green 操作手册进行实验,选用 β -actin 作为内参,每个实验重复 3 次。

引物序列如下:

ALKBH5;Forward,5'-CCAGCTATGCTTCAGATCGCCT-3'
Reverse,5'-GGTTCTCTTCTTGTCCATCTCC-3'
 β -actin; Forward,5'-CTCCATCCTGGCCTCGCTGT-3'
Reverse,5'-GCTGTCACTTCACCGTTCC-3'

1.3 统计学分析

使用 Graphpad 9.3 软件进行图表制作,SPSS 25.0 软件进行统计分析。对于两组数据的差异比较,使用 t 检验进行分析。相关性分析使用卡方检验。对于多组数据之间的差异比较,使用 One-way ANOVA 进行分析。 $P < 0.05$ 有统计学意义

2 结果

2.1 ALKBH5 在上皮性卵巢癌组织中表达情况

免疫组化技术探究了 ALKBH5 在上皮性卵巢癌和正常卵巢组织中的表达情况。研究结果显示,ALKBH5 在上皮性卵巢癌组织中的高表达比例为 76.10% (51/67),低表达比例为 23.88% (16/67);而在正常卵巢组织中,ALKBH5 无高表达,低表达比例为 100% (7/7)。通过统计学分析,得出了 ALKBH5 在上皮性卵巢癌中高表达的结论,并且这种差异是具有统计学意义的($P=0.0009$)。表明 ALKBH5 在上皮性卵巢癌中可能具有重要的作用,可能与该疾病的发生和发展有关。

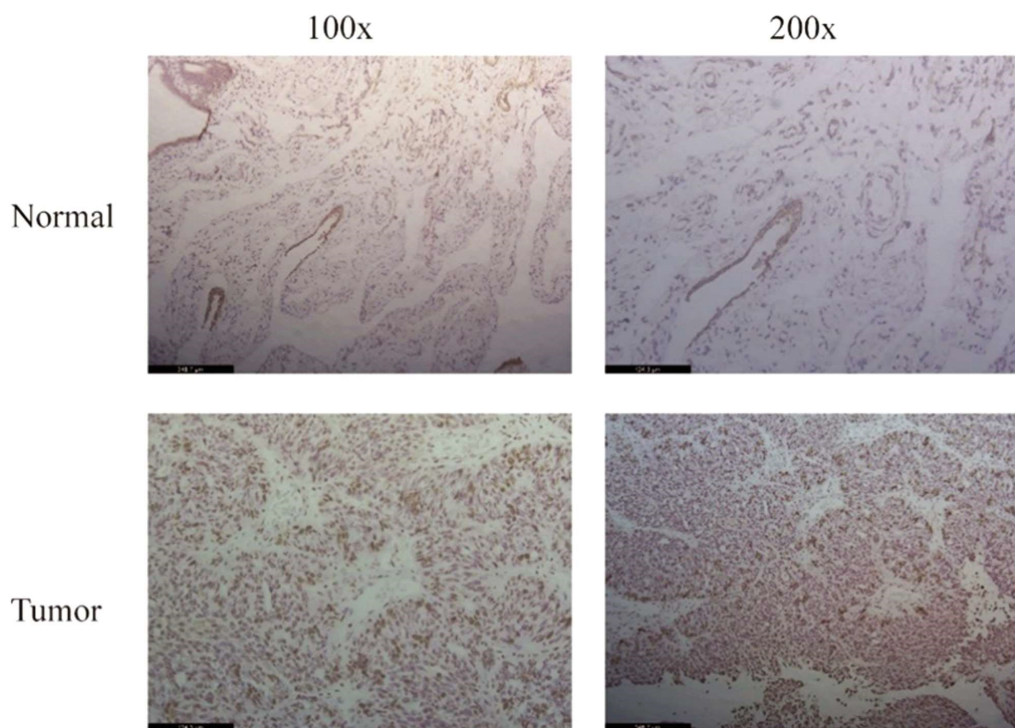


图 1 免疫组化分析 ALKBH5 在上皮性卵巢癌及正常卵巢上皮组织内的表达情况

Fig.1 Immunohistochemical analysis of ALKBH5 expression in epithelial ovarian cancer and normal ovarian epithelial tissues

表 1 ALKBH5 在正常卵巢上皮组织及上皮性卵巢癌组织内的表达情况

Table 1 Expression of ALKBH5 in normal ovarian epithelial tissues and epithelial ovarian cancer tissues

Groups	Total number	ALKBH5 expression		P-value
		High	Low	
EOC	67	51	16	0.0009
Normal	7	7	0	

2.2 ALKBH5 与上皮性卵巢癌临床病理特征及预后的关系

进一步探究 ALKBH5 和卵巢癌患者临床病理特征的关系。如表 2 所示,ALKBH5 蛋白在卵巢癌组织中的表达与 CA125 水平有关,CA125 水平 ≥ 30.2 U/mL 的患者中,高表达 ALKBH5 蛋白的比例(98.039%)高于 CA125 水平 < 30.2 U/mL 的患者(81.250%),差异具有统计学意义($P=0.013$)。ALKBH5 蛋白在卵巢癌组织中的表达受 FIGO 分期的影响,III-IV 期的患者中高表达 ALKBH5 蛋白的比例(92.157%)高于 I-II 期患者(37.500%),差异具有统计学意义($P=0.004$)。ALKBH5 蛋白在卵巢癌组织中的表达与组织学类型有关,浆液性卵巢癌中高表达 ALKBH5 蛋白的比例(96.078%)高于其他组织学类型患

者(18.750%),差异具有统计学意义($P=0.049$)。在年龄、HE4 水平和肿瘤直径方面,高表达 ALKBH5 蛋白的比例与低表达组之间没有显著差异($P>0.05$)。

选择 Kaplan-Meier 数据库 (Kaplan-Meier Plotter,<https://www.kmplot.com>)在线分析人卵巢癌 RNA-seq 数据集,纳入数据集中 614 例病例,使用 Kaplan-Meier 生存分析 ALKBH5 表达情况与卵巢癌患者预后总生存期(Overall Survival, OS)的关系。使用网站自动最佳选择 cutoff value 进行分析,如图 2, ALKBH5 高表达 165 例,低表达 449 例。低表达组患者中位生存时间为 19 月,而高表达组患者中位生存时间为 13 月。两组之间存在显著差异, (logRank $P<0.001$)。

表 2 ALKBH5 表达与卵巢癌临床病理特征的相关性

Table 2 Correlation of ALKBH5 expression with clinicopathological features of ovarian cancer

Characteristics	Groups	Total number n(%)	ALKBH5 expression		P-value
			High n(%)	Low n(%)	
FIGO stage	I-II	10(14.925)	4(7.843)	6(37.500)	0.004**
	III-IV	57(85.075)	47(92.157)	10(62.500)	
Age(years)	≥ 60	34(50.746)	26(50.980)	8(50.000)	0.945
	< 60	33(49.254)	25(49.020)	8(50.000)	
CA125(U/mL)	≥ 30.2	63(94.030)	50(98.039)	13(81.250)	0.013*
	< 30.2	4(5.970)	1(1.961)	3(18.750)	
HE4(Pmol/L)	≥ 140	51(76.119)	40(78.431)	11(68.750)	0.428
	< 140	16(23.881)	11(21.569)	5(31.250)	
Histological	others	5(7.463)	2(3.922)	3(18.750)	0.049*
	serous	62(92.537)	49(96.078)	13(81.250)	
Tumordiameter(cm)	≥ 5	41(61.194)	32(62.745)	9(56.250)	0.642
	< 5	26(38.806)	19(37.255)	7(43.750)	

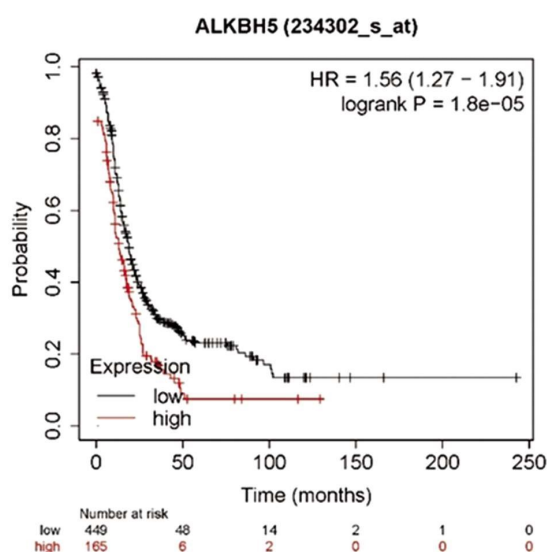


图 2 Kaplan-Meier 分析 ALKBH5 表达水平与上皮性卵巢癌患者总生存期 OS 的关系

Fig. 2 Kaplan-Meier analysis of the relationship between ALKBH5 expression levels and overall survival OS in patients with epithelial ovarian cancer

2.3 ALKBH5 在上皮性卵巢癌细胞系表达情况

为了探究 ALKBH5 在卵巢癌细胞系表达情况,筛选适合后续实验的细胞系。选取正常人卵巢上皮细胞系 IOSE80 及四种常用的人卵巢癌细胞系,分别为 SKOV3, A2780, HEY, HO8910。通过 Western blot 检测五种细胞内 ALKBH5 蛋白表达情况,以 β -actin 为内参,结果显示四种卵巢癌细胞中 ALKBH5 蛋白均有表达,且除细胞 Hey 外,其余细胞 ALKBH5 蛋白水平均高于正常人卵巢上皮细胞系 IOSE80(图 3A,B),从高到底依次为 SKOV3, HO8910, A2780, Hey。

接着提取五种细胞总 RNA, Real time RT-PCR 检测 ALKBH5 基因表达,对上述五种细胞内 ALKBH5 mRNA 表达情况进行测定。其中表达量最高的依然是 SKOV3 细胞(图 3C),但不同于蛋白检测结果,4 种卵巢癌细胞的 ALKBH5 mRNA 表达水平均高于正常卵巢上皮细胞。从高到底依次为 SKOV3, HO8910, Hey, A2780。

2.4 人卵巢癌细胞系 ALKBH5 敲减/过表达稳转细胞系构建

转染分别构建 ALKBH5 稳定敲减的 SKOV3 细胞系 (SKOV3/shALKBH5) 及对照细胞系 (SKOV3/Scramble), 和

ALKBH5 稳定过表达的 A2780 细胞(A2780/Lv-ALKBH5)及对照细胞系(A2780/Lv-ALKBH5)。筛选出稳定过表达 / 敲减的细胞系后, Western blot 检测不同组别细胞 ALKBH5 表达量。如图 4 所示, A2780/Lv-ALKBH5 细胞较 A2780/Vector 细胞 ALKBH5 表达水平明显上调 ($P=0.0009$, $P<0.05$)。

SKOV3/shALKBH5 细胞组 ALKBH5 蛋白水平较 SKOV3/Scramble 组细胞显著下降($P=0.003$, $P<0.05$), 且根据 image J 软件半定量分析发现下降水平较高(约为 18%), 差异具有统计学意义, 构建出可靠的 ALKBH5 敲减 / 过表达稳转细胞系, 细胞可用于后续实验。

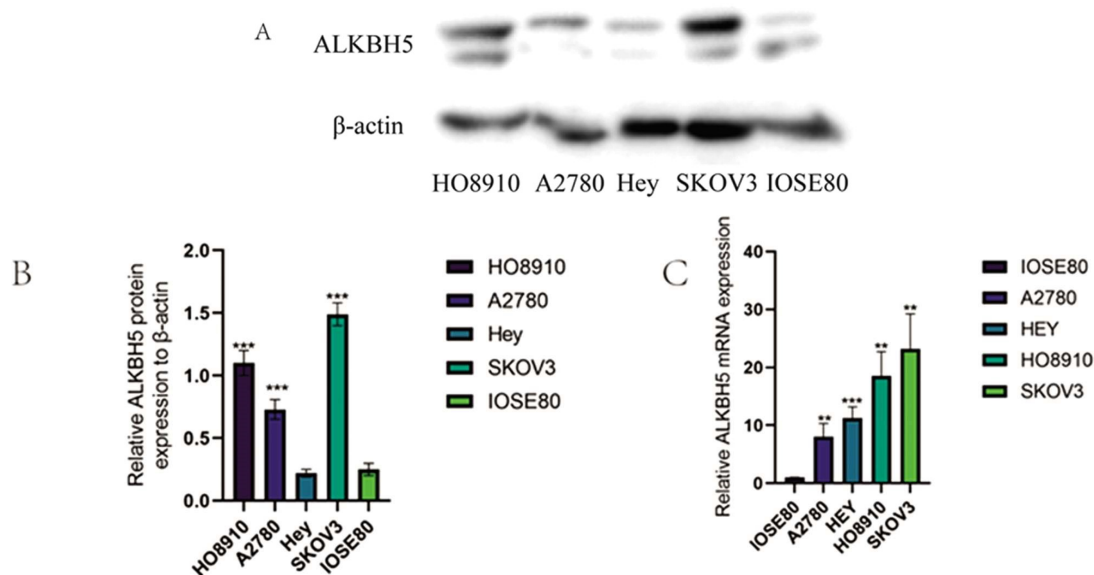


图3 ALKBH5 在卵巢正常上皮细胞和卵巢癌各细胞株表达水平。A. Western blot 检测 ALKBH5 蛋白在 4 种卵巢癌细胞株及正常卵巢上皮细胞内的表达情况。B. 蛋白半定量结果分析(以 Hey 为对照组细胞)。C. ALKBH5 mRNA 在 4 种卵巢癌细胞株及正常卵巢上皮细胞内的表达情况(以 Hey 为对照组细胞) ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

Fig.3 Expression levels of ALKBH5 in normal ovarian epithelial cells and ovarian cancer cell lines. A. Western blot detection of ALKBH5 protein expression in four ovarian cancer cell lines and normal ovarian epithelial cells. B. Analysis of protein semi-quantitative results(control cell: Hey). C. Expression of ALKBH5 mRNA in four ovarian cancer cell lines and normal ovarian epithelial cells(control cell: Hey). ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

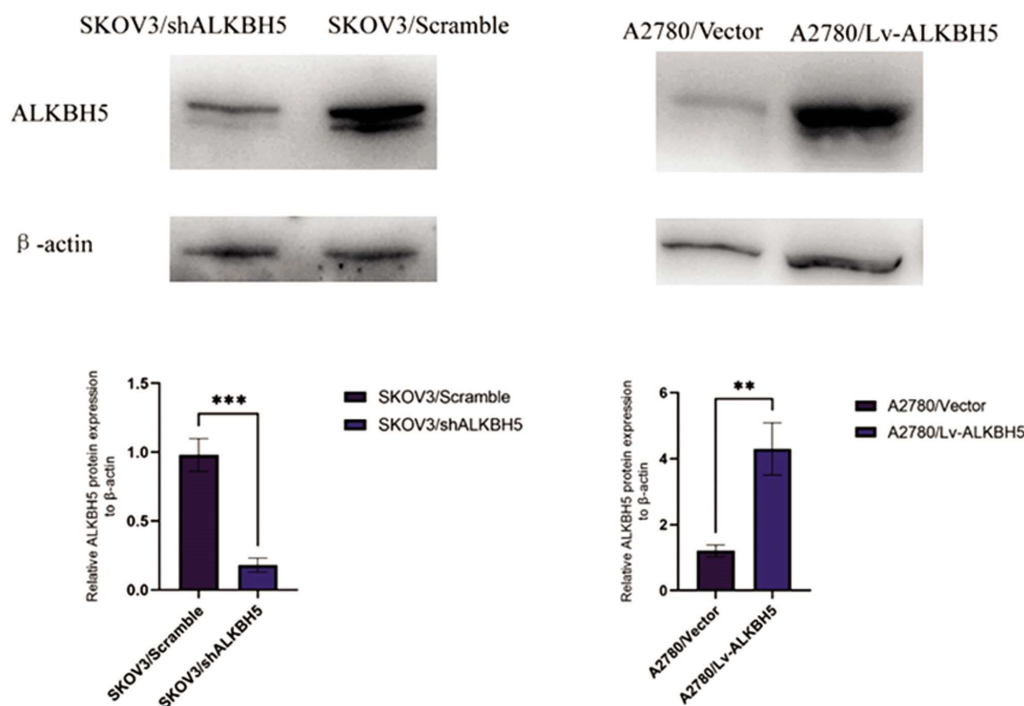


图4 ALKBH5 蛋白在 ALKBH5 敲减 / 过表达稳转细胞系表达水平。 ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

Fig.4 Expression levels of ALKBH5 protein in ALKBH5 knockdown/overexpression stable transient cell lines. ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

2.5 ALKBH5 影响卵巢癌细胞体外增殖速率和集落形成

潜力无限的复制能力是肿瘤细胞的特征之一, 为了探究

ALKBH5 在卵巢癌增殖生长中发挥的作用, 实验分别采用 CCK-8、平板克隆形成实验检测 ALKBH5 基因过表达 / 敲减

对卵巢癌细胞体外增殖速率和集落形成能力的影响。首先细胞培养箱连续培养筛选后的敲减细胞和过表达细胞及其对照细胞,并定期对 ALKBH5 蛋白表达量检测,以保证敲减 / 过表达的稳定性。之后,按照前述实验步骤使用稳转株细胞进行平板克隆形成实验。结果显示,在接种同样数目细胞的情况下,经过 2 周时间,A2780/Lv-ALKBH5 细胞形成的克隆数目明显多于 A2780/Vector 细胞(图 5A,C),差异具有统计学意义($P=0.001$, $P<0.05$)。而 SKOV3/shALKBH5 细胞克隆形成数较 SKOV3/Scramble 明显较少(图 5B,D),差异具有统计学意义

($P=0.015$, $P<0.05$)。

通过 CCK-8 实验测定各组细胞 0 h、24 h、48 h、72 h 时间点吸光度值(OD 值),以比较细胞体外增殖的速率,结果如图 5 E、F 所示。在 A2780 细胞系中,过表达 ALKBH5 基因显著促进 A2780 细胞的增殖,与对照细胞相比,增殖能力显著增强(72 h 时, $P=0.0002$, $P<0.05$)。在 SKOV3 细胞系中,敲减 ALKBH5 抑制细胞增殖,与对照细胞 SKOV3/Scramble 相比,SKOV3/shALKBH5 细胞增殖能力显著下降(72 h 时, $P=0.003$, $P<0.05$)。差异均具有统计学意义。

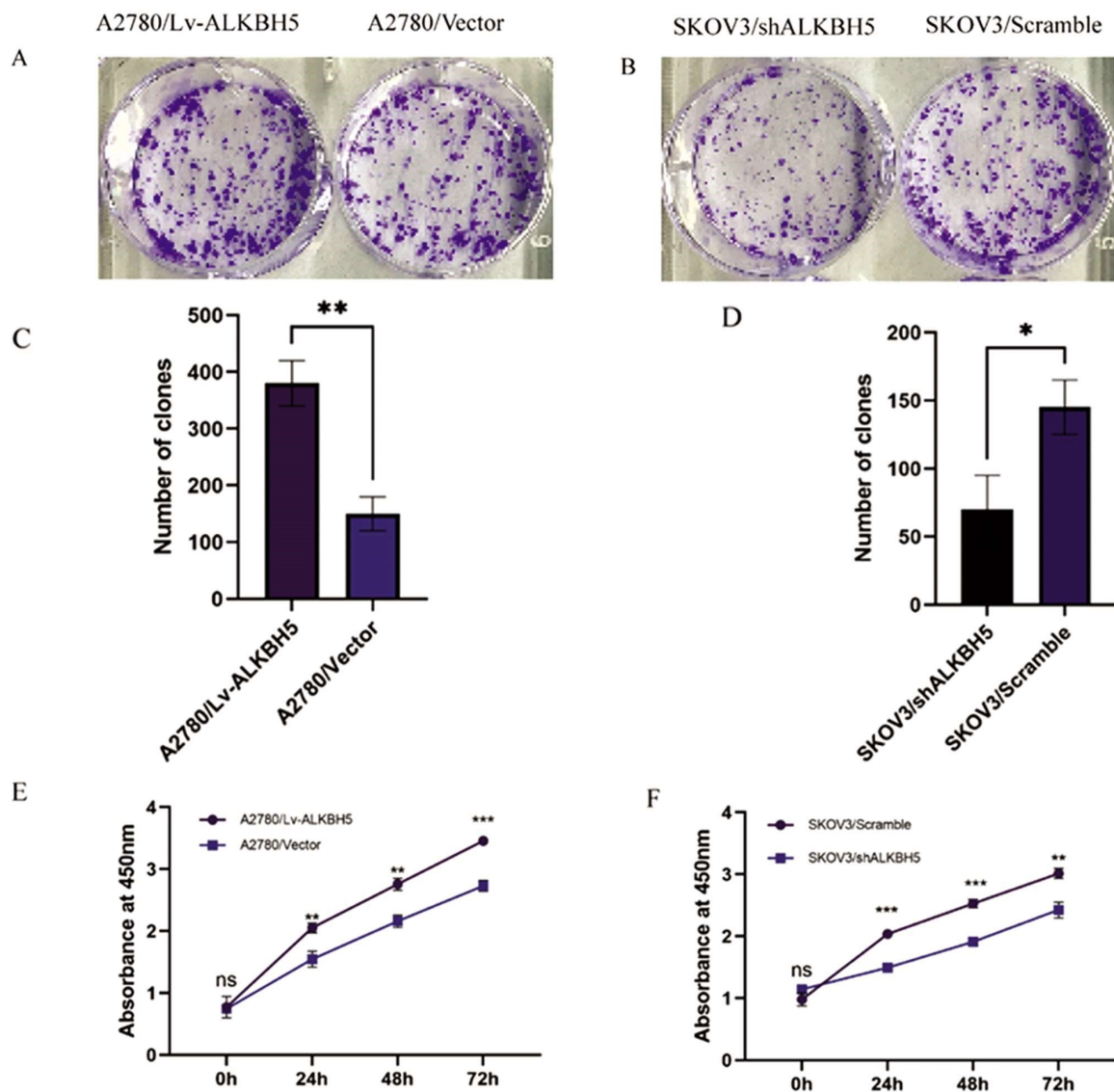


图 5 ALKBH5 蛋白表达水平变化对细胞增殖能力的影响。A,C.过表达 ALKBH5 的 A2780 细胞及对照平板克隆形成实验及克隆数目统计分析结果;B,D.敲减 ALKBH5 的 skov3 细胞及对照平板克隆形成实验及克隆数目统计分析结果;E. CCK-8 实验检测连续体外培养 3 天过表达 ALKBH5 的 A2780 细胞及对照细胞的 OD 值(450 nm);F. CCK-8 实验检测连续体外培养 3 天敲减 ALKBH5 的 skov3 细胞及对照细胞的 OD 值(450 nm)。ns 为无统计学差异, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

Fig.5 Effect of changes in ALKBH5 protein expression level on cell proliferation ability. A,C. Clonogenesis assay of A2780 cells and control plates overexpressing ALKBH5 and statistical analysis of clone number; B,D. Clonogenesis assay of skov3 cells and control plates knocking down ALKBH5 and statistical analysis of clone number; E. CCK-8 assay of continuous in vitro The OD values of A2780 cells and control cells overexpressing ALKBH5 for 3 days in culture (450 nm)F. The OD values of skov3 cells and control cells knocking down ALKBH5 for 3 days in continuous in vitro culture (450 nm) by CCK-8 assay.ns means no significance, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

2.6 ALKBH5 影响卵巢癌细胞体外迁移和侵袭能力

为了探究 ALKBH5 对卵巢癌细胞体外迁移和侵袭能力的

影响,采用 Transwell 迁移、侵袭实验及划痕实验进行探究。实验结果表明,ALKBH5 敲减组细胞迁移、侵袭能力明显低于对

照组细胞 (图 6A,B), 在迁移实验中, 与对照细胞 SKOV3/Scramble 相比, SKOV3/shALKBH5 细胞迁移能力显著下降 ($P=0.003, P<0.05$), 侵袭能力也明显降低 ($P=0.009, P<0.05$)。而 ALKBH5 过表达组细胞迁移、侵袭能力明显高于对照细胞 (图 6A,C), 差异具有统计学意义 ($P_{\text{Migration}}=0.001$,

$P_{\text{Invasion}}=0.003, P<0.05$)。进一步通过划痕实验探究 ALKBH5 敲减对上皮性卵巢癌细胞迁移能力影响, 在同样铺板细胞密度下, 划痕 24 h 后, SKOV3/Scramble 细胞相对 SKOV3/shALKBH5 愈合率显著增高 (图 6D,E), 差异具有统计学意义。

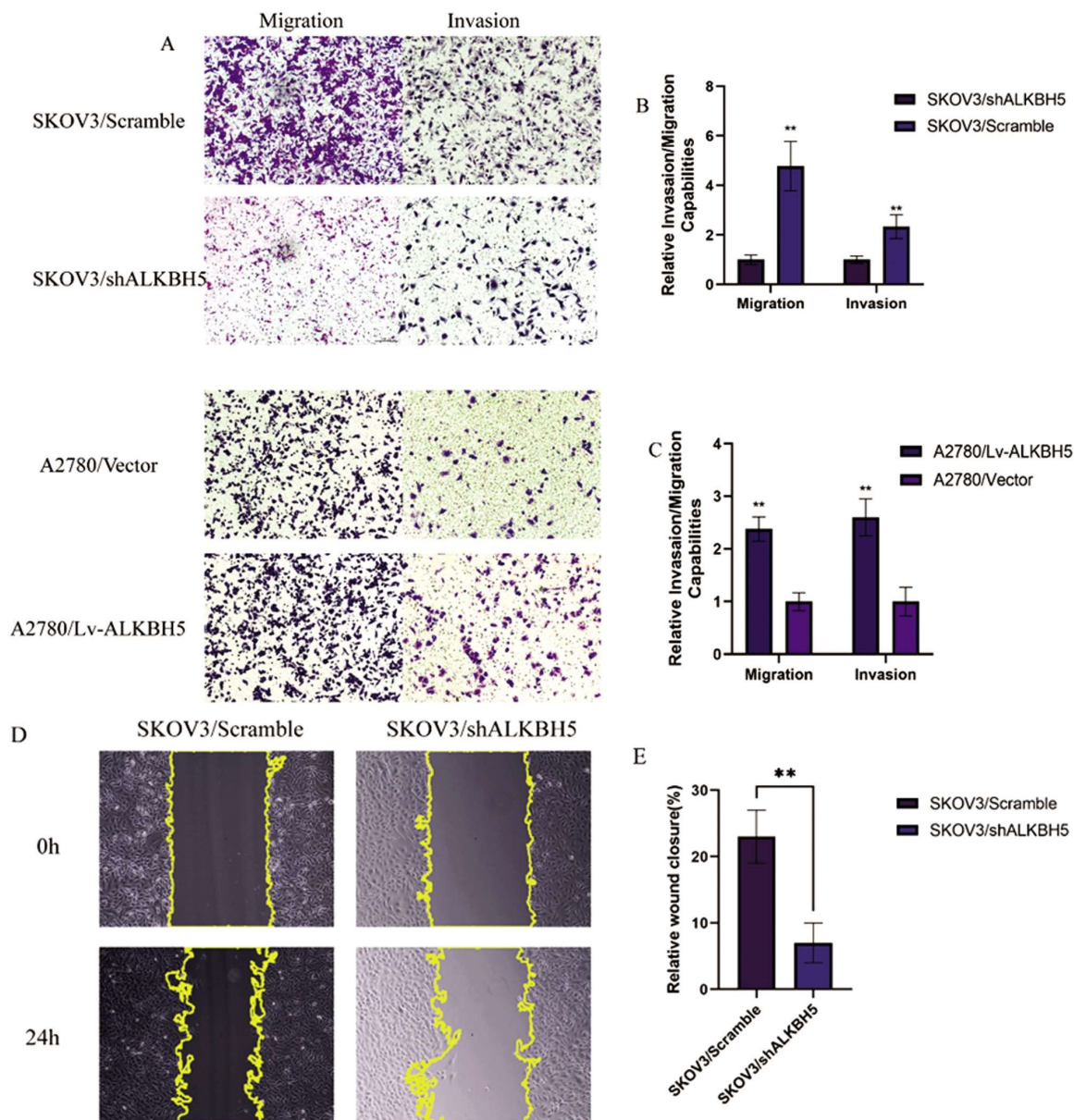


图 6 ALKBH5 对人卵巢癌细胞体外迁移和侵袭能力的影响。A-C. Transwell 迁移和侵袭实验比较 ALKBH5 敲减 / 过表达细胞与对照细胞体外迁移和侵袭的代表性照片及统计分析; D-E. 划痕实验比较 SKOV3/Scramble 对比 SKOV3/shALKBH5 愈合能力的代表性照片。

Fig.6 Effect of ALKBH5 on migration and invasion ability of human ovarian cancer cells in vitro. A-C. Representative photographs and statistical analysis of Transwell migration and invasion assay comparing ALKBH5 knockdown/primary expressing cells with control cells in vitro; D-E. Scratch assay comparing SKOV3/Scramble comparing SKOV3/shALKBH5 Representative photographs of healing ability.

2.7 HIF-1 α 和 ALKBH5 之间存在正反馈环路

为了探究缺氧状态下卵巢癌细胞 ALKBH5 表达情况, 首先通过将野生型 A2780 细胞在乏氧培养箱 (1%O₂) 中培养, 提供乏氧环境, 促进缺氧转录因子 HIF-1 α 表达水平。通过提取缺氧组和对照组细胞总蛋白, 观察 HIF-1 α 和 ALKBH5 表达水平变化。如图所示, 与对照组相比, 以 Tublin 为内参, 缺氧组内的 HIF-1 α 蛋白水平显著升高, ALKBH5 蛋白水平显著升高 (图

7A)。提取缺氧组和对照组总 RNA, 进行 Dot Blot 实验, 发现缺氧组整体 RNA m6A 甲基化修饰水平下降 (图 7B)。据此推测, 在卵巢癌细胞中, 缺氧状态下 HIF-1 α 表达升高促进卵巢癌细胞中 m6A 去甲基化酶 ALKBH5 表达。值得注意的是, 对过表达 ALKBH5 的 A2780 细胞系进行 Western Blot 检测。发现在 ALKBH5 蛋白表达量升高后, HIF-1 α 蛋白量也显著提升 (图 7C)。提示 HIF-1 α 和 ALKBH5 之间存在正反馈环路。

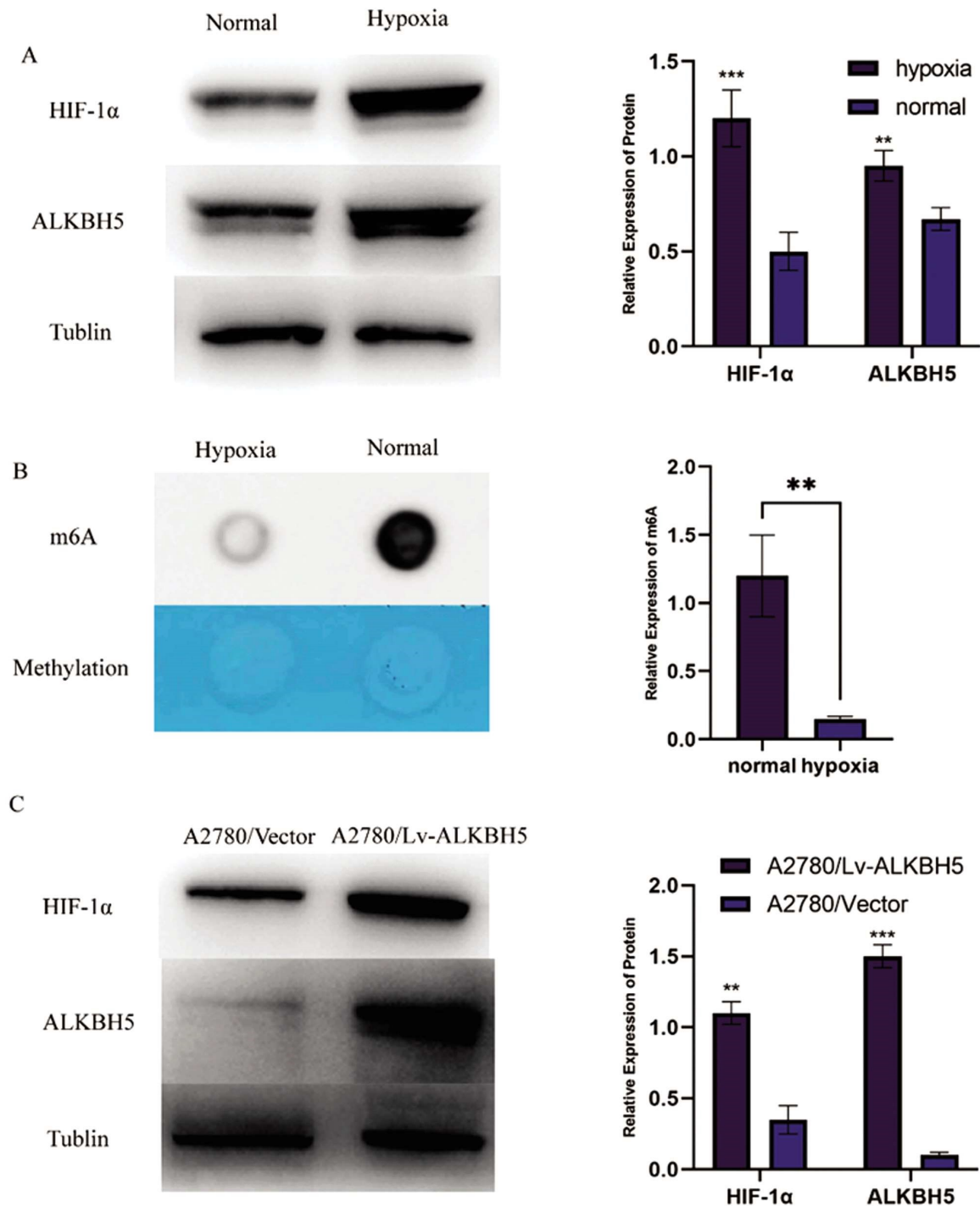


图 7 HIF-1α 和 ALKBH5 之间存在正反馈环路 A. 野生型 A2780 细胞在乏氧培养箱(1%O₂)中培养和正常培养对比 ALKBH5、HIF-1α 蛋白表达情况 B. DOT BLOT 实验检测野生型 A2780 细胞在乏氧培养箱(1%O₂)中培养和正常培养对比 RNA m6A 修饰情况 C. 过表达 ALKBH5 的 A2780 细胞与对照细胞对比 ALKBH5、HIF-1α 蛋白表达情况 ***P*<0.01, ****P*<0.001。

Fig.7 Positive feedback loop between HIF-1α and ALKBH5 A. Comparison of ALKBH5, HIF-1α protein expression in wild type A2780 cells cultured in a depleted oxygen incubator (1% O₂) and normal culture B. DOT BLOT assay to detect wild type A2780 cells cultured in a depleted oxygen incubator (1% O₂) and normal culture compared to RNA m6A modification C. Comparison of ALKBH5 and HIF-1α protein expression in A2780 cells overexpressing ALKBH5 and control cells***P*<0.01, ****P*<0.001.

3 讨论

上皮性卵巢癌(EOC)是卵巢恶性肿瘤中占比最高的病理类型,占比达 95%以上^[13]。另外,非上皮性癌症占卵巢癌的 5%,主要包括生殖细胞和性系间质肿瘤,以及罕见的小细胞癌和卵巢肉瘤^[13]。由于 EOC 相对于其他卵巢癌组织学的高发病率和

死亡率,EOC 是当前卵巢癌研究的重点方向。ALKBH5 基因位于 17 号染色体 p11.2 区域,编码的蛋白 ALKBH5 属于 AlkB 蛋白家族,由 394 个氨基酸残基组成^[14]。该蛋白在 Fe²⁺ 和 α-酮戊二酸辅酶的辅助下能够直接去除 m6A 中的甲基。近年来,将 ALKBH5 与多种恶性肿瘤发病机制联系起来的研究迅速出现,为 ALKBH5 的功能提供了新的见解。ALKBH5 在大多数癌症

中具有明显的致癌作用^[15-18],可以成为癌症治疗的新治疗靶点。ALKBH5 在非小细胞肺癌中异常上调,并且与患者生存率降低紧密相关^[19]。本研究表明,ALKBH5 在上皮性卵巢癌组织及细胞系中呈高表达状态,并且与上皮性卵巢癌患者的 FIGO 分期、病理类型及术前 CA125 水平相关,同时高表达 ALKBH5 患者的总生存期低于低表达 OPN 患者。据此推测 ALKBH5 在卵巢癌中可能发挥致癌基因的作用,可能与该疾病的发生和发展有关。ALKBH5 在卵巢癌中的表达水平与患者的预后密切相关。

ALKBH5 可以调节癌症中的表观转录组,导致细胞增殖,存活,侵袭和转移,药物敏感性,癌症干细胞状态和癌症免疫力的改变。与非癌组织相比较 ALKBH5 在乳腺癌中高表达^[20]。ALKBH5 的沉默抑制了乳腺癌细胞的存活、克隆形成和迁移,证实了 ALKBH5 在该恶性肿瘤中的致癌特性^[20]。ALKBH5 可以通过减少 TIMP3 mRNA 的稳定性和翻译水平来促进 NSCLC 细胞的增殖并降低细胞凋亡^[19]。ALKBH5 在胃癌中过度表达,并降低 lncRNA NEAT1 的 m6A 水平,导致 NEAT1 表达上调,从而促进胃癌的侵袭和转移^[21]。鉴于目前缺乏关于 ALKBH5 与卵巢癌的相关报道,研究通过筛查卵巢癌细胞内 ALKBH5 表达量,并构建了 ALKBH5 稳定过表达和稳定敲减的细胞系,进一步进行了一系列体内外实验。实验结果表明,ALKBH5 过表达增强了细胞的增殖能力和克隆形成数,而 ALKBH5 敲减则减弱了这些能力。划痕实验和 Transwell 迁移实验结果显示,ALKBH5 敲减组细胞迁移距离和侵袭能力均低于对照组,上调 ALKBH5 的表达则增强了这些能力。这些结果表明 ALKBH5 在卵巢癌中具有致癌基因功能,能够显著促进卵巢癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力。

缺氧是各种癌症的一个共同特征,并与化学放射性抵抗,侵袭性和血管生成有关^[22]。卵巢癌与缺氧之间存在密切关系^[23,24]。在肿瘤生长过程中,由于肿瘤细胞增殖速度过快,导致肿瘤内部缺氧现象普遍存在。缺氧环境会激活一系列的信号通路,例如 HIF-1 α (hypoxia-inducible factor 1- α) 信号通路,从而促进卵巢癌的发展和进展^[25,26]。HIF-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α) 是一种转录因子,在低氧条件下可以被激活,并能够通过调节多个基因的表达来促进肿瘤的生长、进展和耐药性^[20, 27-29]。因此,HIF-1 α 被认为是肿瘤发生和发展的重要因素,是肿瘤治疗的重要靶点之一。HIF-1 α 可用于预测肿瘤进展,过表达 HIF-1 α 与临床生存率低相关^[30]。HIF-1 α 与肿瘤血管生成和卵巢癌侵袭性有关^[31]。HIF-1 α 功能丧失导致肿瘤生长、血管形成和转移减少,而 HIF-1 α 功能增加则具有相反的功能^[32]。研究在缺氧的卵巢癌细胞中发现了高表达的 HIF-1 α 和 ALKBH5,同样在过表达 ALKBH5 卵巢癌细胞也发现了二者的同步升高,提示 HIF-1 α 和 ALKBH5 之间存在正反馈环路。在乳腺癌中发现乳腺癌细胞暴露在低氧环境中,刺激了 HIF-1 α 依赖性的 ALKBH5 的表达,从而提高乳腺癌干细胞的表型^[19]。据此推测,在上皮性卵巢癌中 HIF-1 α 以转录因子的形式促进 ALKBH5 的转录,进而促进 ALKBH5 蛋白的表达。而 ALKBH5 过表达后,通过 m6A 修饰的形式增强 HIF-1 α mRNA 的稳定性,进而提高其表达水平。ALKBH5 可能通过与 HIF-1 α 形成的环路促进卵巢癌的有氧糖酵解进而影响卵巢癌的恶性生物学行为。

综上所述,本研究结果表明 ALKBH5 可促进卵巢癌细胞

的增殖、迁移和侵袭能力,其机制可能与示 HIF-1 α 和 ALKBH5 之间存在正反馈环路有关,但是深入的分子生物学机制则有待进一步研究,从而为今后探索卵巢癌新的靶向治疗提供理论依据和研究思路。

参考文献(References)

- [1] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2017, 67 (1): 7-30
- [2] Jiang X, Liu B, 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
- [3] Müller S, Glaß M, Singh A K, et al. IGF2BP1 promotes SRF-dependent transcription in cancer in a m6A-and miRNA-dependent manner [J]. Nucleic acids research, 2019, 47(1): 375-390
- [4] Liu J, Eckert M A, Harada B T, et al. m6A mRNA methylation regulates AKT activity to promote the proliferation and tumorigenicity of endometrial cancer[J]. Nature cell biology, 2018, 20 (9): 1074-1083
- [5] Chen J, Zhang Y C, Huang C, et al. m6A regulates neurogenesis and neuronal development by modulating histone methyltransferase Ezh2 [J]. Genomics, proteomics & bioinformatics, 2019, 17(2): 154-168
- [6] Ma J, Yang F, Zhou C, et al. METTL14 suppresses the metastatic potential of hepatocellular carcinoma by modulating N6-methyladenosine- dependent primary MicroRNA processing [J]. Hepatology, 2017, 65(2): 529-543
- [7] Shen C, Xuan B, Yan T, et al. m6A-dependent glycolysis enhances colorectal cancer progression[J]. Molecular cancer, 2020, 19: 1-19
- [8] Liang L, Xu J, Wang M, et al. LncRNA HCP5 promotes follicular thyroid carcinoma progression via miRNAs sponge [J]. Cell death & disease, 2018, 9(3): 372
- [9] Wei C, Wang B, Peng D, et al. Pan-cancer analysis shows that ALKBH5 is a potential prognostic and immunotherapeutic biomarker for multiple cancer types including gliomas [J]. Frontiers in immunology, 2022, 13: 1428
- [10] Dong F, Qin X, Wang B, et al. ALKBH5 facilitates hypoxia-induced paraspeckle assembly and IL8 secretion to generate an immunosuppressive tumor microenvironment [J]. Cancer research, 2021, 81(23): 5876-5888
- [11] Lan Q, Liu P Y, Haase J, et al. The critical role of RNA m6A methylation in cancer[J]. Cancer research, 2019, 79(7): 1285-1292
- [12] Cai Y, Wu G, Peng B, et al. Expression and molecular profiles of the AlkB family in ovarian serous carcinoma [J]. Aging (Albany NY), 2021, 13(7): 9679
- [13] Zheng G, Dahl J A, Niu Y, et al. ALKBH5 is a mammalian RNA demethylase that impacts RNA metabolism and mouse fertility [J]. Molecular cell, 2013, 49(1): 18-29
- [14] Torre L A, Trabert B, DeSantis C E, et al. Ovarian cancer statistics, 2018[J]. CA: a cancer journal for clinicians, 2018, 68(4): 284-296
- [15] Yu H, Yang X, Tang J, et al. ALKBH5 inhibited cell proliferation and sensitized bladder cancer cells to cisplatin by m6A-CK2 α -mediated glycolysis[J]. Molecular Therapy-Nucleic Acids, 2021, 23: 27-41
- [16] Zhang C, Zhi W I, Lu H, et al. Hypoxia-inducible factors regulate pluripotency factor expression by ZNF217-and ALKBH5-mediated

- modulation of RNA methylation in breast cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(40): 64527
- [17] Shriwas O, Priyadarshini M, Samal S K, et al. DDX3 modulates cisplatin resistance in OSCC through ALKBH5-mediated m6A-demethylation of FOXM1 and NANOG [J]. *Apoptosis*, 2020, 25: 233-246
- [18] Chao Y, Shang J, Ji W. ALKBH5-m6A-FOXM1 signaling axis promotes proliferation and invasion of lung adenocarcinoma cells under intermittent hypoxia [J]. *Biochemical and biophysical research communications*, 2020, 521(2): 499-506
- [19] Zhu Z, Qian Q, Zhao X, et al. N6-methyladenosine ALKBH5 promotes non-small cell lung cancer progress by regulating TIMP3 stability[J]. *Gene*, 2020, 731: 144348
- [20] Zhang C, Samanta D, Lu H, et al. Hypoxia induces the breast cancer stem cell phenotype by HIF-dependent and ALKBH5-mediated m6A-demethylation of NANOG mRNA [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2016, 113(14): E2047-E2056
- [21] Zhang J, Guo S, Piao H, et al. ALKBH5 promotes invasion and metastasis of gastric cancer by decreasing methylation of the lncRNA NEAT1 [J]. *Journal of physiology and biochemistry*, 2019, 75: 379-389
- [22] Manoochehri Khoshinani H, Afshar S, Najafi R. Hypoxia: a double-edged sword in cancer therapy[J]. *Cancer investigation*, 2016, 34(10): 536-545
- [23] Chen Y, Liu L, Xia L, et al. TRPM7 silencing modulates glucose metabolic reprogramming to inhibit the growth of ovarian cancer by enhancing AMPK activation to promote HIF-1 α degradation [J]. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2022, 41 (1): 1-19
- [24] Chen X, Lan H, He D, et al. Multi-omics profiling identifies risk hypoxia-related signatures for ovarian cancer prognosis [J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 645839
- [25] Vaupel P, Mayer A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome [J]. *Cancer and Metastasis Reviews*, 2007, 26: 225-239
- [26] Klemba A, Bodnar L, Was H, et al. Hypoxia-mediated decrease of ovarian cancer cells reaction to treatment: significance for chemo-and immunotherapies [J]. *International journal of molecular sciences*, 2020, 21(24): 9492
- [27] Jiang Y, Wan Y, Gong M, et al. RNA demethylase ALKBH5 promotes ovarian carcinogenesis in a simulated tumour microenvironment through stimulating NF- κ B pathway[J]. *Journal of cellular and molecular medicine*, 2020, 24(11): 6137-6148
- [28] Pu X, Gu Z, Gu Z. ALKBH5 regulates IGF1R expression to promote the proliferation and tumorigenicity of endometrial cancer[J]. *Journal of Cancer*, 2020, 11(19): 5612
- [29] Hanahan D, Weinberg R A. Hallmarks of cancer: the next generation [J]. *cell*, 2011, 144(5): 646-674
- [30] Daponte A, Ioannou M, Mylonis I, et al. Prognostic significance of hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1alpha) expression in serous ovarian cancer: an immunohistochemical study [J]. *BMC cancer*, 2008, 8: 1-10
- [31] Duan L, Tao J, Yang X, et al. HVEM/HIF-1 α promoted proliferation and inhibited apoptosis of ovarian cancer cells under hypoxic microenvironment conditions [J]. *Journal of Ovarian Research*, 2020, 13(1): 1-11
- [32] Semenza G L. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics[J]. *Oncogene*, 2010, 29(5): 625-634