

ALKBH5对人胃癌AGS细胞迁移和侵袭的影响

陆 瑛¹ 王大为¹ 何俊波¹ 周 朦¹ 曾 建² 龚爱华² 徐 岷^{1*}

(¹江苏大学附属医院消化内科, 镇江 212013; ²江苏大学医学院, 镇江 212013)

摘要 该研究探讨了6-甲基腺嘌呤(N6-methyladenosine, m⁶A)去甲基酶ALKBH5(alkB homolog 5)对人胃癌AGS细胞迁移和侵袭的影响。通过数据库分析ALKBH5在胃癌组织中的表达水平; Real-time PCR和Western blot检测ALKBH5在胃癌细胞中表达水平; 用sh-EGFP和sh-ALKBH5质粒转染人胃腺癌AGS细胞, Transwell实验检测细胞的迁移和侵袭能力, 细胞划痕实验进一步检测细胞的迁移能力; 用Western blot检测上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)相关蛋白质的变化。结果显示, 弥漫性胃腺癌中ALKBH5的mRNA水平明显低于正常胃组织和其他类型的胃癌组织, 且其基因拷贝数也明显低于正常胃组织。在胃癌细胞系中, AGS细胞ALKBH5蛋白质和mRNA水平最高, sh-ALKBH5干扰能明显促进AGS细胞迁移和侵袭能力, 且下调其上皮指标水平, 而上调间质指标水平。上述结果提示, ALKBH5在胃癌组织中可能是一个抑癌基因, 与胃癌细胞的迁移和侵袭能力负相关。

关键词 ALKBH5; m⁶A去甲基酶; 上皮-间质转化; 胃癌; 细胞迁移; 细胞侵袭

Effects of ALKBH5 on the Abilities of Migration and Invasion in Human Gastric Cancer Cell Line AGS

Lu Ying¹, Wang Dawei¹, He Junbo¹, Zhou Meng¹, Zeng Jian², Gong Aihua², Xu Min^{1*}

(¹Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China;

²School of Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract The aim of this work is to investigate the effects of m⁶A (N6-methyladenosine) demethylase ALKBH5 (alkB homolog 5) on the abilities of migration and invasion in human gastric cancer cell line AGS. The levels of ALKBH5 gene expression in gastric cancer tissues were explored in databases. Real-time PCR and Western blot were used to detect the relative levels of mRNA and protein of ALKBH5 in human gastric cancer cell lines, respectively. Then plasmids sh-EGFP and sh-ALKBH5 were transfected into AGS cells. Transwell assays were used to examine the abilities of cell migration and invasion. The migration rate was measured by wound healing assay. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) markers were detected by Western blot. Compared with normal gastric tissue, mRNA levels and gene copy numbers of ALKBH5 were decreased in high invasiveness diffuse gastric adenocarcinoma. The relative levels of ALKBH5 protein and mRNA were differed in different gastric cancer cells, and were highest in AGS. The down-regulation of ALKBH5 could enhance the abilities of migration and invasion in AGS cells. The relative level of epithelial marker was decreased, and mesenchymal markers were increased in ALKBH5 down-regulated AGS. The results suggested that ALKBH5 might be a tumor suppressor gene and related

收稿日期: 2016-12-18 接受日期: 2017-04-14

国家自然科学基金(批准号: 81672402、81472333、81372718)和江苏省自然科学基金(批准号: BK20131247)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0511-85026370, E-mail: peterxu1974@163.com

Received: December 18, 2016 Accepted: April 14, 2017

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81672402, 81472333, 81372718) and the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (Grant No.BK20131247)

*Corresponding author. Tel: +86-511-85026370, E-mail: peterxu1974@163.com

网络出版时间: 2017-05-27 15:53:11

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170527.1553.010.html>

to the migration and invasion abilities of human gastric cancer cell.

Keywords ALKBH5; m⁶A demethylase; epithelial-mesenchymal transition; gastric cancer; migration; invasion

胃癌(gastric cancer, GC)是全球第五大常见恶性肿瘤,且在男女性癌症死亡率中皆排第三位。东亚和北美分别为胃癌死亡率最高和最低的区域。2012年,在一场涵盖全球范围肿瘤新发病例和死亡病例的调查发现,死于胃癌的人数达到723 000,占总死亡人数的8.8%^[1-2]。尽管在过去的几十年里,胃癌全球发病率大幅下降,但大多数胃癌患者诊断时仍处于中晚期,因此,胃癌各期5年生存率(overall survival, OS)通常低于30%^[1-3]。近年来,癌症的治疗策略逐渐趋于肿瘤分子靶向治疗的研究。上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是指上皮细胞通过特定程序转化为具有间质表型细胞的生物学(运动性和侵袭性)过程^[4]。EMT在胚胎发育、慢性炎症、组织重建、癌症转移和多种纤维化疾病中发挥重要作用^[4-5]。近年的研究越来越关注EMT在组织修复和癌症转移中的作用,认为其是癌症发展和肿瘤转移过程的主要标志性改变^[4,6],并且与癌症的放化疗抵抗有关^[7-8]。

近来研究发现,6-甲基腺嘌呤(N6-methyladenosine, m⁶A)是真核生物mRNA和lncRNA中含量最为丰富的一种修饰碱基。m⁶A影响mRNA的剪接、运输、翻译和降解过程,参与脂肪生成、精子发生、发育、致癌、干细胞再生以及其他生命进程^[9-10]。ALKBH5(alkB homolog 5)是近年来继脂肪量与肥胖相关蛋白(fat mass and obesity associated protein, FTO)之后第二个被发现的mRNA m⁶A去甲基酶,在mRNA加工以及小鼠精子发育等过程中都起着重要的调控作用^[11-13]。近年来的文献表明,ALKBH5能促进乳腺癌肿瘤干细胞(breast cancer stem cell, BCSC)在缺氧微环境下生存。Zhang等^[14]在模拟缺氧环境下,乳腺癌细胞能充分刺激HIF(hypoxia-inducible factor)依赖的ALKBH5表达,从而减少*NANOG*(Nanog homeobox)mRNA的m⁶A甲基化修饰,增加*NANOG*信使RNA的稳定,进而增加*NANOG*蛋白质含量以及乳腺癌干细胞的浓缩富集^[14]。体内ALKBH5水平的变化将会影响mRNA的稳定性而影响基因的表达,从而造成癌变的风险^[14-15]。但ALKBH5作为表观遗传学中的一部分,其与肿瘤的生物学习性,特别是肿

瘤侵袭和转移方面的作用及具体机制尚未被研究透彻。因此,本研究应用细胞和分子生物学技术,检测ALKBH5在胃癌细胞中的表达,并研究其对胃癌细胞迁移和侵袭能力的影响及可能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞与质粒 人正常胃上皮细胞GES-1和胃癌细胞(AGS、BGC-823、SGC-7901、MGC-803)、shEGFP质粒、pLKO.1-puro载体由江苏大学医学院细胞生物学实验室保存。

1.1.2 主要试剂 培养基DMEM和RPMI 1640购自Multicell公司;DME/F-12购自HyClone公司;血清购自Gibco公司;Trizol试剂购自Invitrogen公司;反转录试剂盒购自Thermo公司;限制性内切酶*Age* I、*Eco*R I购自Fermentas公司;鼠抗人 β -tubulin抗体购自Bioworld公司;鼠抗人ALKBH5抗体购自Sigma公司;E-钙黏蛋白(E-cadherin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(vimentin)、转录因子Snail抗体购自Cell Signaling Technology公司;Transwell小室购自Corning公司;基质胶购自BD Pharmingen公司;LipofectamineTM 2000购自Invitrogen公司;2 \times SYBR Green实时定量PCR预混合溶液购自Bioworld公司;结晶紫染色液购自碧云天生物技术有限公司;DH5 α 感受态细胞购自上海斯丹赛生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 ALKBH5干扰质粒的构建 *ALKBH5*干扰序列由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,*ALKBH5*上游序列:5'-CCG GGG AAA GGC TGT TGG CAT CAA TAC TCG AGT ATT GAT GCC AAC AGC CTT TCT TTT TG-3',下游序列:5'-AAT TCA AAA AGA AAG GCT GTT GGC ATC AAT ACT CGA GTA TTG ATG CCA ACA GCC TTT C-3'。上下游引物退火形成带黏性末端的双链。*Eco*R I及*Age* I双酶切pLKO.1-puro载体与退火后双链进行连接,胶回收后将双链DNA与载体连接后转化DH5 α 感受态细胞,挑取单个菌落,提取质粒。所构建质粒经测序正确后用于细胞转染实验。

1.2.2 细胞转染 将胃癌AGS细胞随机分为对照组和实验组,分别转染质粒sh-EGFP和sh-ALKBH5,转染前1 d细胞接种至6孔板,每孔 5×10^5 细胞,质粒转入前1 h,将完全培养基换成无血清培养基。在超净台内放置4个EP管,每管200 μ L无血清培养基,并将EP管做好标记。对照组与实验组分别加入2 μ L sh-EGFP和sh-ALKBH5质粒,按脂质体体积:DNA质量=1:3的比例加入脂质体,静置5 min,随后将脂质体与质粒混合。室温下静置20~30 min,将混合液逐滴均匀加入6孔板中。放入培养箱6 h,将无血清培养基换成完全培养基。

1.2.3 Real-time PCR 按照Trizol试剂说明书提取4种胃癌细胞(AGS、BGC-823、SGC-7901、MGC-803)RNA,反转录成cDNA,分别以cDNA为模板扩增GAPDH和ALKBH5。qRT-PCR反应条件:98 $^{\circ}$ C预变性30 s;98 $^{\circ}$ C变性10 s,56 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸10 s,共40个循环;4 $^{\circ}$ C保存。ALKBH5上游引物序列:5'-CAC ATC CTG GAA GGC AGC AA-3',下游引物序列:5'-CCC CCA AAG TGG TGG TAT CC-3'。GAPDH上游引物序列:5'-TGG GGA AGG TGA AGG TCG G-3',下游引物序列:5'-CTG GAA GAT GGT GAT GGG A-3'。GAPDH作为内参,计算ALKBH5相对表达量(RQ值),计算公式: $\Delta Ct = Ct_{目的基因} - Ct_{内参}$, $\Delta \Delta Ct = \Delta Ct_{实验组} - \Delta Ct_{对照组}$, $RQ = 2^{-\Delta \Delta Ct}$,将对照组的基因mRNA相对表达量作为1。

1.2.4 Western blot 用2 \times 蛋白上样缓冲液裂解正常胃上皮细胞GES-1和4种胃癌细胞(AGS、BGC-823、SGC-7901、MGC-803)。100 $^{\circ}$ C煮沸10 min,12 000 r/min离心5 min。10% SDS-PAGE分离蛋白,300 mA转至PVDF膜。5%脱脂奶粉常温封闭1~2 h, β -tubulin抗体(1:5 000)、ALKBH5抗体(1:1 000)、E-钙黏蛋白(1:1 000)、N-钙黏蛋白(1:1 000)、波形蛋白(1:1 000)和转录因子Snail(1:1 000)均4 $^{\circ}$ C孵育过夜;TBST洗膜3次,每次15 min。室温下鼠抗(1:10 000)、兔抗(1:5 000)孵育1~2 h, TBST洗膜3次,每次15 min。ECL化学发光检测显影,凝胶成像系统拍照。

1.2.5 Transwell迁移实验 对照组和实验组细胞分别转染sh-EGFP和sh-ALKBH5质粒,48 h后0.25%胰酶消化,PBS洗2次,1 000 r/min离心5 min,弃上清液,加600 μ L无血清DMEM重悬细胞,计数板计数细胞,将 5×10^4 细胞种入Transwell小室上层(不含基质胶),小室下层加入500 μ L含血清的DMEM,

24 h后用4%多聚甲醛溶液固定小室30 min,结晶紫染色30 min,观察细胞并拍照,计数细胞迁移数,结果取平均值。

1.2.6 Transwell侵袭实验 对照组和实验组细胞分别转染sh-EGFP和sh-A3LKBH5质粒,48 h后用上述迁移实验方法将计数好的 8×10^4 细胞种入Transwell小室上层(冰上100 μ L无血清DMEM与4 μ L基质胶混合加入小室上层,37 $^{\circ}$ C放置0.5 h成胶),其余操作与迁移实验一致。

1.2.7 细胞划痕实验 将转染后细胞于24孔板贴壁培养,待细胞汇合时,用10 μ L微量移液枪头垂直于板面划痕,PBS洗涤3次后加入含2% Gibco的培养基,在倒置显微镜下观察划痕两侧细胞在0、24、48 h的迁移情况,并拍照分析。

1.3 数据库分析

在Oncomine Main网站(www.oncomine.org)中键入搜索基因名称为ALKBH5,检索分析条件为癌症与正常组织分析,癌症类别为胃癌。选择TCGA Gastric进行DNA的基因拷贝数的数据分析。Data Type选择为mRNA,可以在Chen Gastric进行相应的mRNA表达的数据分析。

1.4 统计分析

应用SPSS 19.0软件进行统计学显著性差异分析,实验所得数据用平均数 \pm 标准差(mean \pm S.D.)表示,采用独立样本t检验和多个样本均数间t检验以及q检验, $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

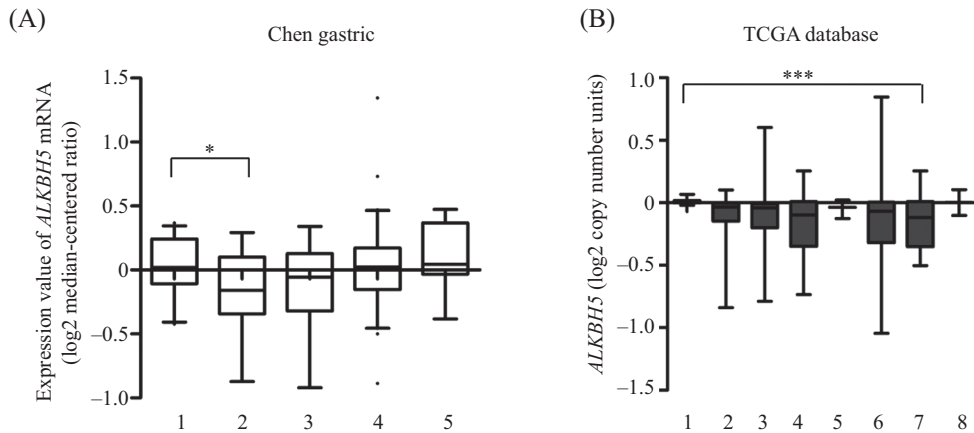
2.1 ALKBH5在胃癌组织中的表达水平

为了探明ALKBH5在胃癌发生、发展中的临床意义,我们首先在Oncomine数据库中分析了正常胃组织与不同类型胃癌组织中ALKBH5 mRNA水平情况,发现在高度侵袭性的弥漫性胃腺癌组织中,ALKBH5的mRNA水平明显降低($P < 0.05$,图1A)。为了进一步探讨mRNA的降低是否由基因拷贝数的变化而引起,继续在TCGA Gastric数据库中分析了正常胃组织与不同类型的胃癌组织中ALKBH5基因拷贝数的变化情况。结果发现,与正常胃组织相比,ALKBH5在6种类型的胃癌组织中(图1B,类型2~7),基因拷贝数也明显减少($P < 0.001$)。这提示,ALKBH5 mRNA水平的降低可能与其基因拷贝数的减少有关。

2.2 ALKBH5在胃癌细胞中的表达模式

为了进一步探讨ALKBH5在胃癌细胞中的生物学作用,我们用Western blot和Real-time PCR分别检测ALKBH5在正常胃上皮细胞GES-1和4种胃癌细胞株

(AGS、BGC-823、SGC-7901、MGC-803)中蛋白质和RNA水平的变化。结果表明,AGS细胞中ALKBH5蛋白质(图2A)和mRNA(图2B)水平相对较高,BGC-823、MGC-803次之,SGC-7901最低。因此,我们后续

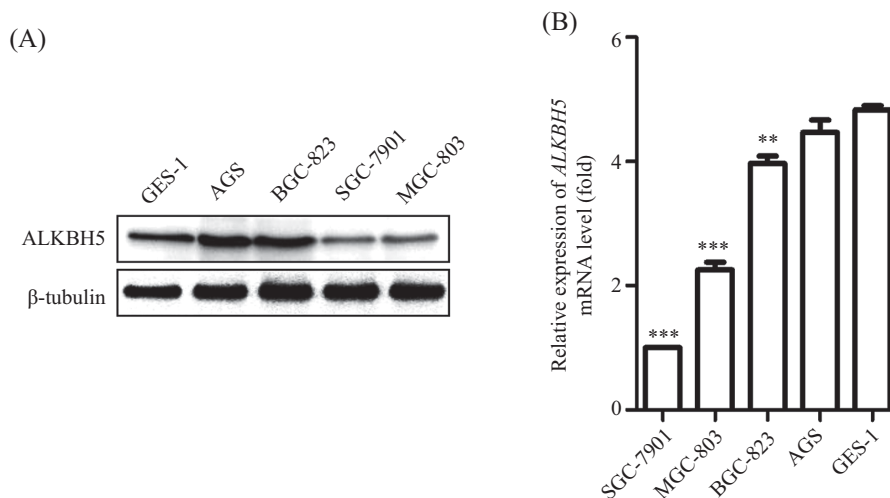


A: 正常胃组织和4种不同类型胃癌组织中ALKBH5的mRNA水平含量; 1: 正常胃组织($n=28$); 2: 弥漫型胃癌($n=12$); 3: 胃腺癌($n=15$); 4: 胃肠型腺癌($n=64$); 5: 胃混合型胃癌($n=8$); $*P<0.05$ 。B: 正常胃组织和7种不同病理类型胃癌组织中ALKBH5的基因拷贝数量; 1: 正常胃组织($n=94$); 2: 弥漫型胃癌($n=45$); 3: 胃腺癌($n=173$); 4: 胃肠型腺癌($n=41$); 5: 胃乳头状腺癌($n=3$); 6: 管状腺癌($n=31$); 7: 胃黏液腺癌($n=12$); 8: 胃印戒细胞癌($n=2$); $***P<0.001$ 。

A: the mRNA levels of ALKBH5 in normal gastric tissues and 4 kinds of gastric cancer tissues. 1: gastric mucosa ($n=28$); 2: diffuse gastric adenocarcinoma ($n=12$); 3: gastric adenocarcinoma ($n=15$); 4: gastric intestinal type adenocarcinoma ($n=64$); 5: gastric mixed adenocarcinoma ($n=8$); $*P<0.05$. B: gene copy numbers of ALKBH5 in normal gastric tissues and 7 kinds of gastric cancer tissues. 1: gastric mucosa ($n=94$); 2: diffuse gastric adenocarcinoma group ($n=45$); 3: gastric adenocarcinoma ($n=173$); 4: gastric intestinal type adenocarcinoma ($n=41$); 5: gastric papillary adenocarcinoma ($n=3$); 6: gastric tubular adenocarcinoma ($n=31$); 7: mucinous gastric adenocarcinoma ($n=12$); 8: signet ring cell gastric adenocarcinoma ($n=2$); $***P<0.001$.

图1 ALKBH5在胃癌组织中的表达水平

Fig.1 The expression levels of ALKBH5 in gastric cancer tissues

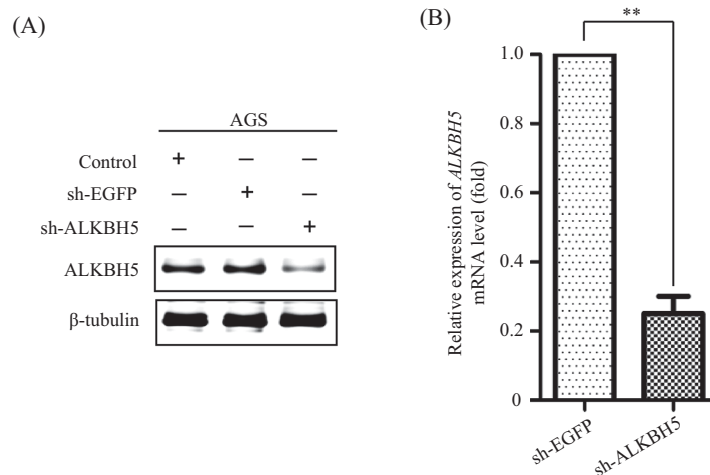


A: 正常胃上皮细胞GES-1和4种胃癌细胞(AGS、BGC-823、SGC-7901、MGC-803)中ALKBH5的蛋白质水平。B: 正常胃上皮细胞GES-1和4种胃癌细胞(AGS、BGC-823、SGC-7901、MGC-803)中ALKBH5的mRNA水平。 $**P<0.01$, $***P<0.001$,与GES-1组比较。

A: relative levels of ALKBH5 protein were detected in GES-1, AGS, BGC-823, SGC-7901, MGC-803 cells. B: relative levels of ALKBH5 mRNA were detected in GES-1, AGS, BGC-823, SGC-7901, MGC-803 cells. $**P<0.01$, $***P<0.001$ compared with GES-1 group.

图2 ALKBH5在胃癌细胞中的表达模式

Fig.2 The expression level of ALKBH5 in gastric cancer cells



A: 空白组、sh-EGFP组和sh-ALKBH5组中ALKBH5的蛋白质水平。B: sh-EGFP组和sh-ALKBH5组中ALKBH5的mRNA水平, ** $P < 0.01$ 。

A: relative levels of ALKBH5 protein were detected in control group, sh-EGFP group and sh-ALKBH5 group. B: relative levels of ALKBH5 mRNA were detected in sh-EGFP and sh-ALKBH5 group, ** $P < 0.01$.

图3 sh-ALKBH5质粒的干扰效率

Fig.3 The efficiency of interference by sh-ALKBH5

选择在AGS细胞中干扰ALKBH5的表达水平,并检测其低表达后对细胞迁移和侵袭能力的影响。

2.3 sh-ALKBH5质粒的干扰效率

在AGS细胞中转染sh-ALKBH5或sh-EGFP后,我们检测了其干扰效率。结果表明,与对照组(sh-EGFP组)相比,实验组(sh-ALKBH5组)AGS细胞中ALKBH5蛋白质相对水平明显降低(图3A)。与对照组(sh-EGFP组)相比,实验组(sh-ALKBH5组)AGS细胞中ALKBH5的mRNA相对水平明显降低($P < 0.01$,图3B),干扰效率近80%。

2.4 干扰ALKBH5促进胃癌细胞的迁移

Transwell迁移实验结果显示,实验组(sh-ALKBH5组)穿膜细胞数明显高于对照组($P < 0.01$,图4A和图4B)。细胞划痕实验结果显示,实验组(sh-ALKBH5组)细胞迁移速度明显高于对照组($P < 0.05$, $P < 0.01$,图4C和图4D)。由此表明,下调ALKBH5的表达可明显促进AGS细胞的迁移。

2.5 干扰ALKBH5促进胃癌细胞的侵袭

Transwell侵袭实验结果显示,实验组穿膜细胞数明显高于对照组($P < 0.01$)。由此表明,下调ALKBH5的表达可明显促进AGS细胞的侵袭(图5)。

2.6 干扰ALKBH5促进胃癌细胞上皮-间质转化

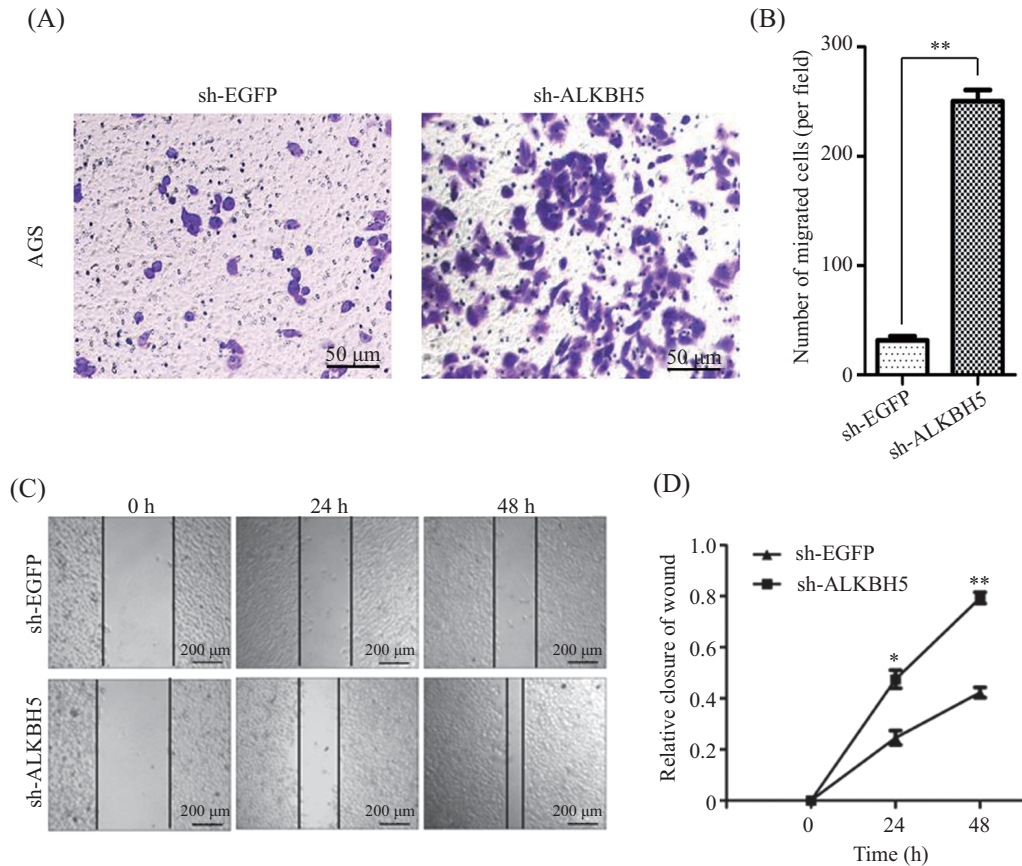
进一步研究发现,在AGS细胞中下调ALKBH5后,与对照组相比,实验组上皮指标(E-钙黏蛋白)表达量减少,而间质指标(N-钙黏蛋白、波形蛋白和Snail)水平增加(图6)。结果表明,下调ALKBH5促进

了胃癌细胞上皮-间质转化。

3 讨论

ALKBH5蛋白质作为mRNA m⁶A去甲基酶,参与mRNA的加工以及降解,并在多种生命过程中都起着重要的调控作用^[11-13]。体内ALKBH5水平的变化将会影响mRNA的降解及稳定性而间接影响基因的表达,从而一定程度上引发癌变的可能^[14-15]。因此,本研究初步探讨了ALKBH5在胃癌细胞迁移和侵袭中的作用。

Laurén分类法则将胃癌分为两种组织学变种:胃肠型胃癌和弥漫性胃腺癌。弥漫性胃癌以原发性遗传为主,受环境影响较小、以中青年患者为主、恶性程度较高、转移能力强、发展快^[16]。我们在Chen Gastric数据库中发现,ALKBH5在侵袭性高的弥漫性胃腺癌中mRNA水平显著降低,而其他类型的胃癌与正常胃组织相比mRNA水平并没有明显差异,提示ALKBH5的低水平可能与胃癌的侵袭与转移相关。随后,我们在TCGA Gastric数据库中发现,其基因拷贝数在不同种类的胃癌中都不同程度地降低,提示ALKBH5很可能扮演抑癌基因的角色。Hüneburg等^[17]通过数据统计指出,1/3的胃癌患者被认为有遗传背景。Koboldt等^[18]报道了卵巢癌患者体细胞存在肿瘤抑制基因显著缺失导致的基因拷贝数的变化,而基因拷贝数变化与肿瘤的发生、发展有着密切的联系^[18]。进一步用sh-ALKBH5质粒

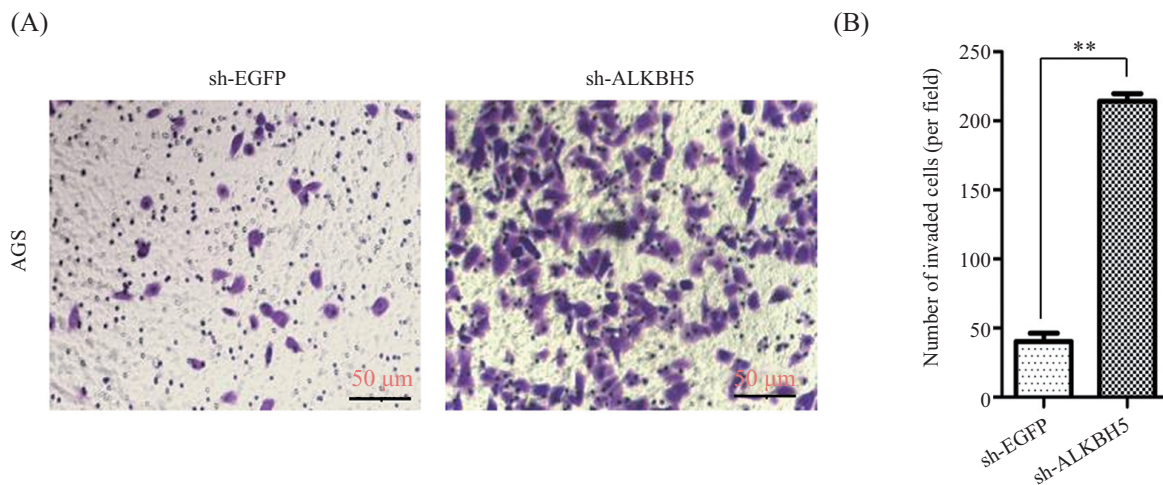


A: Transwell检测穿膜细胞数; B: 计数对照组和实验组视野的平均穿膜细胞数, $**P < 0.01$; C: 细胞划痕实验检测AGS细胞0、24、48 h的迁移情况; D: 计算细胞0、24、48 h的相对迁移距离与0 h的比值(%); $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, 与sh-EGFP组比较。

A: the ability of migration was examined in AGS cell by Transwell assay; B: the graph indicated the average number of migrated cells per field, $**P < 0.01$; C: migration rate of AGS on 0, 24, 48 h were measured by wound healing assay, D: relative percentage of wound closure in AGS on 0, 24, 48 h; $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ vs sh-EGFP group.

图4 干扰ALKBH5促进胃癌细胞的迁移

Fig.4 The down-regulating of ALKBH5 increased the migration ability of gastric cancer cell



A: Transwell检测穿膜细胞数量; B: 计数对照组和实验组视野的平均穿膜细胞数, $**P < 0.01$ 。

A: the ability of invasion was examined by Transwell assay in AGS; B: the graph indicated the average number of invaded cells per field, $**P < 0.01$.

图5 干扰ALKBH5促进胃癌细胞的侵袭

Fig.5 The down-regulating of ALKBH5 increased the invasion ability of gastric cancer cell

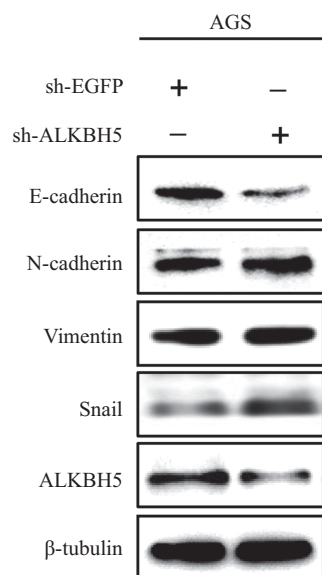


图6 干扰ALKBH5促进胃癌细胞上皮-间质转化

Fig.6 The down-regulating of ALKBH5 increased epithelial mesenchymal transformation in gastric cancer cell

下调ALKBH5的表达后, AGS细胞的迁移和侵袭能力明显上升。这说明, ALKBH5可以抑制胃癌细胞AGS的迁移和侵袭。下调ALKBH5后, 上皮标志物E-钙黏蛋白水平下调, 而间质标志物水平上调, 说明下调ALKBH5后, AGS细胞的上皮-间质转化能力增强, 进一步证实了上述结果。然而, Zhang等^[14]刺激ALKBH5表达增强后, *NANOG* mRNA的m6A甲基化减少, 增加其mRNA的稳定, 进而增加NANOG的蛋白质水平, 从而造成乳腺癌干细胞的浓缩富集。体内ALKBH5含量变化将影响mRNA稳定性而影响基因表达, 进而造成癌变的可能^[14-15], 表明ALKBH5发挥了促进乳腺癌发生的作用。我们推测, ALKBH5在不同组织来源的肿瘤中发挥的作用不完全相同。

由于遗传性弥漫性胃癌(hereditary diffuse gastric cancer, HDGC)以编码E-钙黏蛋白的*CDH1*(cadherin 1)基因发生胚系突变而闻名^[17]。E-钙黏蛋白属于细胞黏附家族, 是跨膜钙离子依赖的黏附蛋白。通过其同源二聚体的细胞黏附功能来保持细胞的分化和表皮细胞的极性以及正常细胞骨架结构^[16-17]。研究证实, 当E-钙黏蛋白功能丧失时, 会影响表皮细胞的极性, 使正常骨架结构消失且出现失调性增生和侵袭性生长的特性^[17,19]。E-钙黏蛋白与上皮-间质转化(EMT)在癌症的形成、侵袭以及其他涉及器官再生的病理过程(如器官纤维化)中起着重要作用^[19-21]。我们的研究表明, 下调ALKBH5后E-钙黏蛋白表

达明显降低。我们推测, 可能是由于干扰ALKBH5后, mRNA的m⁶A去甲基能力减弱, 相对应的甲基能力增强, 那么胃癌细胞内如E-钙黏蛋白的mRNA稳定性下降和降解增多, 导致E-钙黏蛋白减少、表皮细胞的极性改变、正常骨架结构消失, 使其更容易出现侵袭性生长的特性, 故导致EMT能力增强。这也能解释数据库结果中以E-钙黏蛋白减少为特点的弥漫性胃癌内ALKBH5的mRNA水平低但侵袭性强的特征。

综上所述, ALKBH5能抑制胃癌细胞的迁移、侵袭和上皮-间质转化。本研究能一定程度上说明ALKBH5能抑制胃癌的发生、发展及恶性转归, 可能是一种抑癌基因; 希望本研究能给胃癌的诊断和治疗提供一个新思路。然而, ALKBH5抑制胃癌细胞迁移、侵袭、上皮-间质转化的具体作用机制还有待进一步研究。

参考文献 (References)

- 1 Yu J, Zhang Y, Leung LH, Liu L, Yang F, Yao X. Efficacy and safety of angiogenesis inhibitors in advanced gastric cancer: A systematic review and meta-analysis. *J hematol Oncol* 2016; 9(1): 111.
- 2 Fang C, Zan J, Yue B, Liu C, He C, Yan D. Long Noncoding RNA ZFAS1 promotes the progression of colonic cancer by modulating ZEB1 expression. *J Gastroenterol Hepatol* 2016.
- 3 Chen JQ, Kong YY, Weng SS, Dong CX, Zhu LZ, Yang Z, *et al.* Outcomes of surgery for gastric cancer with distant metastases: A retrospective study from the SEER database. *Oncotarget* 2016; 8(3): 4342-51.
- 4 Heerboth S, Housman G, Leary M, Longacre M, Byler S, Lapinska K, *et al.* EMT and tumor metastasis. *Clin Ttransl Med* 2015; 4: 6.
- 5 Nieto MA, Huang RY, Jackson RA, Thiery JP. Emt: 2016. *Cell* 2016; 166 (1): 21-45.
- 6 Figiel S, Vasseur C, Bruyere F, Rozet F, Maheo K, Fromont G. Clinical significance of epithelial-mesenchymal transition (EMT) markers in prostate cancer. *Hum Pathol* 2017; 61: 26-32.
- 7 Kim J, Kong J, Chang H, Kim H, Kim A. EGF induces epithelial-mesenchymal transition through phospho-Smad2/3-Snail signaling pathway in breast cancer cells. *Oncotarget* 2016; 7(51): 85021-32.
- 8 Liu ZC, Chen XH, Song HX, Wang HS, Zhang G, Wang H, *et al.* Snail regulated by PKC/GSK-3beta pathway is crucial for EGF-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) of cancer cells. *Cell Tissue Res* 2014; 358(2): 491-502.
- 9 Zhao BS, He C. Fate by RNA methylation: m6A steers stem cell pluripotency. *Genome Biol* 2015; 16: 43.
- 10 Li F, Kennedy S, Hajian T, Gibson E, Seitova A, Xu C, *et al.* A radioactivity-based assay for screening human m6A-RNA methyltransferase, METTL3-METTL14 complex, and demethylase ALKBH5. *J Biomol Screen* 2016; 21(3): 290-7.

- 11 Xu C, Liu K, Tempel W, Demetriades M, Aik W, Schofield CJ, *et al.* Structures of human ALKBH5 demethylase reveal a unique binding mode for specific single-stranded N6-methyladenosine RNA demethylation. *J Biol Chem* 2014; 289(25): 17299-311.
- 12 Chen W, Zhang L, Zheng G, Fu Y, Ji Q, Liu F, *et al.* Crystal structure of the RNA demethylase ALKBH5 from zebrafish. *FEBS Lett* 2014; 588(6): 892-8.
- 13 Aik W, Scotti JS, Choi H, Gong L, Demetriades M, Schofield CJ, *et al.* Structure of human RNA N(6)-methyladenine demethylase ALKBH5 provides insights into its mechanisms of nucleic acid recognition and demethylation. *Nucleic Acids Res* 2014; 42(7): 4741-54.
- 14 Zhang C, Samanta D, Lu H, Bullen JW, Zhang H, Chen I, *et al.* Hypoxia induces the breast cancer stem cell phenotype by HIF-dependent and ALKBH5-mediated m⁶A-demethylation of NANOG mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016; 113(14): E2047-56.
- 15 Zhang C, Zhi WI, Lu H, Samanta D, Chen I, Gabrielson E, *et al.* Hypoxia-inducible factors regulate pluripotency factor expression by ZNF217- and ALKBH5-mediated modulation of RNA methylation in breast cancer cells. *Oncotarget* 2016; 7(40): 64527-42.
- 16 Chang KK, Cho SJ, Yoon C, Lee JH, Park DJ, Yoon SS. Increased RhoA activity predicts worse overall survival in patients undergoing surgical resection for lauren diffuse-type gastric adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol* 2016; 23(13): 4238-46.
- 17 Hüneburg R, Marwitz T, van Heteren P, Weismüller TJ, Trebicka J, Adam R, *et al.* Chromoendoscopy in combination with random biopsies does not improve detection of gastric cancer foci in CDH1 mutation positive patients. *Endosc Int Open* 2016; 4(12): E1305-10.
- 18 Koboldt DC, Zhang Q, Larson DE, Shen D, McLellan MD, Lin L, *et al.* VarScan 2: Somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome Res* 2012; 22(3): 568-76.
- 19 Shao L, Li H, Chen J, Song H, Zhang Y, Wu F, *et al.* Irisin suppresses the migration, proliferation, and invasion of lung cancer cells via inhibition of epithelial-to-mesenchymal transition. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; 485(3): 598-605.
- 20 Yang Y, Zhang J, Yan Y, Cai H, Li M, Sun K, *et al.* Low expression of Rap1GAP is associated with epithelial-mesenchymal transition (EMT) and poor prognosis in gastric cancer. *Oncotarget* 2017; 8(5): 8057-68.
- 21 Kaowinn S, Kim J, Lee J, Shin DH, Kang CD, Kim DK, *et al.* Cancer upregulated gene 2 induces epithelial-mesenchymal transition of human lung cancer cells via TGF-beta signaling. *Oncotarget* 2017; 8(3): 5092-110.