

ALKBH5 调控 GEFT 的 m6A 修饰对胆管癌转移及 EMT 的实验研究

王希方^{1a}, 郑伟^{1b}, 马东瑞^{1c}, 何莉^{1a}, 孙晶莹^{1d}, 孙杨^{1e}, 孟莲², 孙超^{1a}

(1. 陕西省人民医院 a. 肿瘤内科; b. 肝胆外科; c. 教学处; d. 中心实验室; e. 统计室, 西安 710068;
2. 石河子大学医学院第一附属医院病理科, 新疆石河子 832008)

摘要: 目的 探究 alkb 同源蛋白 5 (ALKBH5) 调控鸟嘌呤核苷酸交换因子 T (guanine nucleotide exchange factors T, GEFT) 的 m6A 修饰对胆管癌转移和上皮间充质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 的影响。方法 将 HuCCT1 细胞按照转染类别分为 Control 组, NC-sh 组、ALKBH5-sh 组、NC-LV 组、ALKBH5-LV 组、ALKBH5-LV+NC-sh 组和 ALKBH5-LV+GEFT-sh 组。Control 组细胞不进行转染, 使用 Lipofectamine 2000 对其他组细胞分别转染相应的慢病毒。采用 MTT 法检测细胞增殖水平, 流式细胞仪检测细胞凋亡水平, Transwell 实验检测细胞迁移和侵袭水平。采用 RT-qPCR 分析 HuCCT1 细胞中的 ALKBH5, GEFT, Bax, Bcl-2, MMP2, MMP9, E-cadherin, N-cadherin 和 Vimentin 的 mRNA 水平。采用 Western blot 分析 HuCCT1 细胞中的 ALKBH5 和 GEFT 蛋白水平。采用 MeRIP-qPCR 分析 HuCCT1 细胞中 GEFT m6A 甲基化水平。结果 与 Control 组和 NC-sh 组比较, ALKBH5-sh 组 ALKBH5 和 GEFT 的 mRNA 和蛋白水平降低, 相对细胞活力降低, 细胞凋亡率和 Bax mRNA 水平升高, Bcl-2 mRNA 水平降低, 迁移和侵袭细胞数量降低, MMP2 和 MMP9 mRNA 水平降低, E-cadherin mRNA 水平升高, N-cadherin 和 Vimentin 水平降低, GEFT m6A 甲基化水平升高, 差异具有统计学意义 ($F=43.347\sim1\,995.868$, 均 $P<0.001$)。与 Control 组和 NC-LV 组比较, ALKBH5-LV 组 ALKBH5 和 GEFT 的 mRNA 和蛋白水平升高, 相对细胞活力升高, 细胞凋亡率和 Bax mRNA 水平降低, Bcl-2 mRNA 水平升高, 迁移和侵袭细胞数量升高, MMP2 和 MMP9 mRNA 水平升高, E-cadherin mRNA 水平降低, N-cadherin 和 Vimentin 水平升高, GEFT m6A 甲基化水平降低, 差异具有统计学意义 ($F=42.421\sim720.275$, 均 $P<0.001$)。与 ALKBH5-LV+NC-sh 组比较, ALKBH5-LV+GEFT-sh 组 GEFT 的 mRNA 和蛋白水平降低, 相对细胞活力降低, 细胞凋亡率和 Bax mRNA 水平升高, Bcl-2 mRNA 水平降低, 迁移和侵袭细胞数量降低, MMP2 和 MMP9 mRNA 水平降低, E-cadherin mRNA 水平升高, N-cadherin 和 Vimentin 水平降低, 差异具有统计学意义 ($t=7.175\sim77.872$, 均 $P<0.001$)。结论 ALKBH5 和 GEFT 均促进胆管癌细胞的生长和转移, ALKBH5 可能通过调控 GEFT m6A 甲基化修饰来影响胆管癌的转移及 EMT。

关键词: 胆管癌; m6A 甲基化; alkb 同源蛋白; 鸟嘌呤核苷酸交换因子; 上皮间充质转化

中图分类号: R735.8; R730.43 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2023) 04-001-08

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2023.04.001

Experimental Study of GEFT m6A Modification Regulated by ALKBH5 on Cholangiocarcinoma Metastasis and EMT

WANG Xifang^{1a}, ZHENG Wei^{1b}, MA Dongrui^{1c}, HE Li^{1a}, SUN Jingying^{1d}, SUN Yang^{1e}, MENG Lian², SUN Chao^{1a}

(1a. Department of Medical Oncology; b. Department of Hepatobiliary Surgery; c. Teaching Office; d. Central Laboratory; e. Statistical Office, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, China; 2. Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Shihezi University Medical College, Xinjiang Shihezi 832008, China)

Abstract: Objective To explore the effect of m6A modification of guanine nucleotide exchange factor T (GEFT) regulated by alkb homolog 5 (ALKBH5) on metastasis and epithelial-mesenchymal transformation (EMT) of cholangiocarcinoma. **Methods** HuCCT1 cells were divided into control group, NC-sh group, ALKBH5-sh group, NC-LV group, ALKBH5-LV group,

基金项目: 国家自然科学基金 (82060487): GEFT 调控 Rac1/CDC42/ β -catenin 信号通路影响横纹肌肉瘤干细胞生物学特性促进横纹肌肉瘤进展的机制研究; 陕西省自然科学基金基础研究计划项目 (2022JQ-983): hsa-circ-0027308 促进 GEFT 表达参与胆管癌发生发展的机制研究; 西安市科技计划项目 (22YXYJ0133): 去 RNA 甲基化酶 ALKBH5 上调 GEFT 表达促进上皮间质转化参与胆管癌的发生发展。

作者简介: 王希方 (1982-), 男, 硕士, 主治医师, 研究方向: 肿瘤转移机制研究, E-mail: 1yyxwxf205@163.com。

通讯作者: 孙超 (1988-), 女, 硕士, 主治医师, 研究方向: 肿瘤发生发展的分子机制研究, E-mail: sunchaoSX2016@126.com。

ALKBH5-LV+NC-sh group and ALKBH5-LV+GEFT-sh group according to the type of transfection. The cells in control group were not transfected, while the cells in other groups were transfected with lentivirus with Lipofectamine 2000. Cell proliferation was detected by MTT method, apoptosis was detected by flow cytometry, and cell migration and invasion were detected by Transwell test. The mRNA levels of ALKBH5, GEFT, Bax, Bcl-2, MMP2, MMP9, E-cadherin, N-cadherin and Vimentin in cells were detected by RT-qPCR. The protein levels of ALKBH5 and GEFT in cells were detected by Western blot. The methylation level of GEFT m6A in cells was detected by MeRIP-qPCR. **Results** Compared with control group and NC-sh group, ALKBH5 and GEFT mRNA and protein levels decreased, relative cell viability decreased, apoptosis rate and Bax mRNA level increased, Bcl-2 mRNA level decreased, the number of migratory and invasive cells decreased, MMP2 and MMP9 mRNA levels decreased, E-cadherin mRNA level increased, N-cadherin and vimentin levels decreased, GEFT m6A methylation level increased in ALKBH5-sh group, the differences were statistically significant ($F=43.347\sim1\,995.868$, all $P<0.001$). Compared with control group and NC-LV group, ALKBH5 and GEFT mRNA and protein levels increased, relative cell viability increased, apoptosis rate and Bax mRNA level decreased, Bcl-2 mRNA level increased, the number of migratory and invasive cells increased, MMP2 and MMP9 mRNA levels increased, E-cadherin mRNA level decreased, N-cadherin and vimentin levels increased, GEFT m6A methylation level decreased in ALKBH5-sh group, the differences were statistically significant ($F=42.421\sim720.275$, all $P<0.001$). Compared with ALKBH5-LV+NC-sh group, GEFT mRNA and protein levels decreased, relative cell viability decreased, apoptosis rate and Bax mRNA level increased, Bcl-2 mRNA level decreased, the number of migratory and invasive cells decreased, MMP2 and MMP9 mRNA levels decreased, E-cadherin mRNA levels increased, N-cadherin and Vimentin levels decreased in ALKBH5-LV+GEFT-sh group, and the differences were statistically significant ($t=7.175\sim77.872$, all $P<0.001$). **Conclusion** Both ALKBH5 and GEFT promoted the growth and metastasis of cholangiocarcinoma cells. ALKBH5 may affect the metastasis and EMT of cholangiocarcinoma by regulating the methylation of GEFT m6A.

Keywords: cholangiocarcinoma; m6A methylation; ALKBH5; GEFT; epithelial mesenchymal transition

胆管癌(cholangiocarcinoma, CCA)是肝脏第二大原发性恶性肿瘤,约占肝脏原发性恶性肿瘤的5%~30%,其在中国的发病率持续上升^[1-3]。CCA发病时无突出的临床表现,因此初次诊断时多为终末期,目前迫切需要寻找到新的治疗方式^[4]。上皮间充质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)参与CCA的转移和复发,CCA细胞通过EMT获得了更具侵袭性的表型^[6]。因此,通过调节EMT来抑制转移可能是治疗CCA的一个有效策略。鸟嘌呤核苷酸交换因子T(guanine nucleotide exchange factor T, GEFT),也称为Rho鸟嘌呤核苷酸交换因子25,参与癌细胞的增殖、迁移和侵袭等多种过程^[7]。先前的研究表明,GEFT在某些恶性肿瘤中作为潜在的致癌基因发挥作用,例如乳腺癌和横纹肌肉瘤^[8-9]。此外,GEFT的高表达可促进EMT过程^[10]。但GEFT在CCA进展和转移方面的潜在功能和途径尚不清楚。越来越多的证据表明,6-甲基腺苷(6-Methyladenosine, m6A)甲基化作为一种重要的转录后基因调控机制,参与了CCA的发病机制^[11-12]。alkB同源蛋白5(alkB homolog 5, ALKBH5)是一种m6A去甲基化酶,参与m6A修饰的调节,并控制各种细胞过程。ALKBH5介导的m6A去甲基化通过影响RNA代谢中的多种事件(例如mRNA剪切、修饰和翻译等)来调节基因表达。m6A去甲基化酶ALKBH5主要是通过以m6A依赖的方式对致癌基因或抑癌基因进行转

录后调节,在多种人类恶性肿瘤中发挥关键作用。据报道,ALKBH5调节肝内CCA中程序性死亡配体-1(programmed cell death 1 ligand 1, PD-L1)的表达和肿瘤免疫环境^[13]。然而,目前关于m6A参与CCA发病机制的研究仍十分有限。本研究旨在探讨ALKBH5是否通过调控GEFT的m6A修饰水平来影响CCA的转移及EMT。

1 材料与方法

1.1 研究对象 人胆管上皮癌细胞系(HuCCT1)购自美国ATCC。HuCT1细胞培养在添加10g/dl胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的RPMI 1640培养液中于5%(v/v)CO₂, 37℃环境中培养。

1.2 仪器与试剂 RPMI 1640培养液(货号:11875093)和FBS(货号:10100147)购自美国Gibco公司;阴性对照shRNA慢病毒(NC-sh)、ALKBH5 shRNA慢病毒(ALKBH5-sh)、阴性对照过表达慢病毒(NC-LV)、ALKBH5过表达慢病毒(ALKBH5-LV)和GEFT shRNA慢病毒(GEFT-sh)购自吉玛基因。四甲基偶氮唑盐(MTT, 货号:M8180-1)和GEFT(货号:K110033P)一抗购自北京索莱宝科技有限公司。Transwell(8 μm孔径, 货号:3422)购自美国Corning公司;Annexin V-FITC/PI试剂盒(货号:C1062M), Trizol(货号:R0016), RIPA裂解液(货号:P0013D)和BCA蛋白测试盒(货号:P0012)购自碧云天生物技术有限公司。引物购自生工生物。逆转录试剂盒

(货号: RR047Q) 和 TB Green Premix Ex Taq II (货号: RR820B) 购自日本 Takara 公司; β -actin 一抗 (货号: ab8227) 和 HRP 标记的二抗 (货号: ab6721) 购自英国 Abcam 公司; ALKBH5 (货号: 80283) 一抗购自美国 Cell Signaling Technology 公司; PolyA mRNA 纯化试剂盒 (货号: S1560S) 购自美国 New England Biolabs 公司; RNA 甲基化免疫共沉淀试剂盒 (货号: Bes5203-2) 购自广州伯信生物科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养及分组处理: 将 HuCCT1 细胞分为 control 组、NC-sh 组、ALKBH5-sh 组、NC-LV 组、ALKBH5-LV 组、ALKBH5-LV+NC-sh 组和 ALKBH5-LV+GEFT-sh 组。将对数生长期的 HuCCT1 细胞以 2×10^5 个细胞 / 孔的密度接种于 6 孔板, 当细胞达到 60% 融合时, 使用 Lipofectamine 2000 试剂进行转染。control 组细胞正常培养不进行转染处理, NC-sh 组细胞转染阴性对照 shRNA 慢病毒, ALKBH5-sh 组细胞转染 ALKBH5 shRNA 慢病毒, NC-LV 组细胞转染阴性对照过表达慢病毒, ALKBH5-LV 组细胞转染 ALKBH5 过表达慢病毒, ALKBH5-LV+NC-sh 组细胞同时转染 ALKBH5 过表达慢病毒和阴性对照 shRNA 慢病毒, ALKBH5-LV+GEFT-sh 组细胞同时转染 ALKBH5 过表达慢病毒和 GEFT shRNA 慢病毒, 转染时间为 48 h。通过 RT-qPCR 验证转染效率。

1.3.2 细胞增殖测定: HuCCT1 细胞经过转染后, 以 5×10^3 个细胞 / 孔的密度接种于 96 孔板中, 并在 37℃ 条件下培养 48 h, 加入 MTT 继续培养孵育 4 h, 弃上清。加入 DMSO, 室温缓慢摇晃 10 min, 然后于酶标仪 490 nm 处测量吸光度 A 值。

1.3.3 细胞凋亡测定: HuCCT1 细胞经过转染后, 以 1×10^5 个细胞 / 孔的密度接种在 6 孔板中并在 37℃ 培养 48 h, PBS 重悬细胞。取 5×10^4 个 HuCCT1 细胞 8 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入 195 μ l 结合缓冲液, 再依次加入 5 μ l 的 Annexin V-FITC 和 10 μ l 的 PI, 避光孵育 5 min, 使用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.3.4 细胞迁移和侵袭测定: HuCCT1 细胞经过转染后, 取 1×10^4 个 HuCCT1 细胞重悬于 200 μ l 无血清培养液中, 然后添加到 Transwell 上室。将 800 μ l 含 20g/dl FBS 的培养液加入到下室。孵育 48 h 后, 4g/dl 多聚甲醛固定 HuCCT1 细胞 30 min, 1g/dl 结晶紫染色 15 min。显微镜下进行迁移细胞计数。侵袭实验中, 预先使用 50 μ l 的 Matrigel (250 μ g/ml) 包被上室, 其他步骤与迁移实验相同。

1.3.5 RT-qPCR 检测 mRNA 表达水平: 采用 RT-qPCR

检测 HuCCT1 细胞中的 ALKBH5, GEFT, B 淋巴细胞瘤 -2 相关 X 蛋白 (Bcl2-associated X, Bax), B 淋巴细胞瘤 -2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2), 基质金属蛋白酶 2 (matrix metalloproteinase 2, MMP-2), 基质金属蛋白酶 2 (matrix metalloproteinase 9, MMP-9), 上皮型钙黏蛋白 (E-cadherin), 神经型钙黏蛋白 (N-cadherin) 和波形蛋白 (Vimentin) 的 mRNA 表达水平。Trizol 提取各组细胞的总 RNA, 通过 NanoDrop 2000 超微量分光光度计测定总 RNA 的浓度和纯度, 按照逆转录试剂盒进行逆转录反应。使用 TB Green Premix Ex Taq II 在 Bio-Rad CFX96 荧光定量 PCR 仪上进行扩增。扩增条件如下: 95℃ 5 min, 95℃ 10 s, 60℃ 20 s, 72℃ 15 s, 40 次循环。 β -actin 作为内参, 使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对表达量, 引物序列见表 1。

表 1 引物序列	
基因名称	引物碱基序列
ALKBH5	F: 5'-AGGCCAGGAGCTGAGACACA-3'
	R: 5'-CTTCTGGCCTTGCTCCTCC-3'
GEFT	F: 5'-CCCAAGTCAGAGCATGTGGT-3'
	R: 5'-CCCTCAAATCCCGCAATCT-3'
Bax	F: 5'-ATGGGCTGGACATTGGAC-3'
	R: 5'-GGGACATCACTCGCTTCAGT-3'
Bcl-2	F: 5'-TTCTTTGAGTTCGGTGGGG-3'
	R: 5'-AGTTTCCATTCGGCTTCCAG-3'
MMP2	F: 5'-CGGTCGTAGTCTCAGTGCT-3'
	R: 5'-CAAAGGGGTATCCATCGCCA-3'
MMP9	F: 5'-CCCTTGTGCTCTTCCCTGGA-3'
	R: 5'-TCTGCCACCCGACTGTAACC-3'
E-cadherin	F: 5'-CCAAAGCCTCAGGTCATAAACAT-3'
	R: 5'-TGAGATTGATTTGTAGTCACCCAC-3'
N-cadherin	F: 5'-CCATCAAGCCTGTGGGAATC-3'
	R: 5'-GCCGCTTTAAGGCCCTCAT-3'
Vimentin	F: 5'-TCTGGATTCACTCCCTCTGGTT-3'
	R: 5'-ATCGTGATGCTGAGAAGTTTCGT-3'
β -actin	F: 5'-AGCGAGCATCCCCCAAAGTT-3'
	R: 5'-GGGCACGAAGCTCATCATT-3'

1.3.6 Western blot 检测蛋白表达水平: 采用 Western blot 检测 HuCCT1 细胞中的 ALKBH5 和 GEFT 的蛋白表达水平。RIPA 裂解 HuCCT1 细胞提取总蛋白, 通过 BCA 法测定总蛋白浓度, 然后总蛋白 (30 μ g/泳道) 上样, 采用 10g/dl SDS-PAGE 上进行电泳并转移到 PVDF 膜上, 5g/dl 脱脂牛奶封闭 1 h, 然后膜与 ALKBH5 (1: 3 000 稀释), GEFT (1: 3000 稀释)

和 β -actin (1:5 000 稀释) 一抗 4℃ 孵育过夜, 再与 HRP 标记的二抗 (1:5 000 稀释) 室温孵育 1 h, ECL 显影和凝胶成像。 β -actin 作为内参。

1.3.7 甲基化 RNA 免疫共沉淀结合 qPCR 技术 (MeRIP-qPCR) 检测甲基化水平: 采用 MeRIP-qPCR 检测 HuCCT1 细胞中 GEFT m6A 甲基化水平。Trizol 提取各组细胞的总 RNA, 通过 PolyA mRNA 纯化试剂盒纯化总 RNA。将 m6A 抗体和 IgG 的抗体分别添加到免疫共沉淀缓冲液中然后与蛋白质 A/G 磁珠孵育 1 h。将 RNA 和磁珠-抗体复合物加入到免疫共沉淀缓冲液中 4℃ 孵育过夜。使用洗脱缓冲液将结合的 RNA 进行洗脱, 然后用苯酚-氯仿提取纯化, 并进行 qPCR 分析。GEFT m6A 甲基化位点引物序列如下: F: 5'-GTAC GCGGCCTAGAACTGCG-3', R: 5'-GTTTTCGGA CAGTTCGTACAG-3'。 β -actin 作为内参。

1.4 统计学分析 使用 GraphPad Prism 8.0 软件对数据进行统计分析和作图。细胞实验中每组设置 6 个复孔。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用方差分析 (ANOVA), 组间两两比较采用 LSD 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 ALKBH5 和 GEFT 对 HuCCT1 细胞增殖的调

表 2 各组 HuCCT1 细胞中 ALKBH5 和 GEFT 的 mRNA 和蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

项目	control 组	NC-sh 组	ALKBH5-sh 组	NC-LV 组	ALKBH5-LV 组	ALKBH5+NC-sh 组	ALKBH5+GEFT-sh 组	F 值	P 值
ALKBH5 mRNA	1.00 \pm 0.04	0.98 \pm 0.05	0.25 \pm 0.02	1.03 \pm 0.04	6.92 \pm 0.54	7.34 \pm 0.72	6.98 \pm 0.84	315.576	<0.001
GEFT mRNA	1.00 \pm 0.05	1.01 \pm 0.08	0.31 \pm 0.02	0.99 \pm 0.02	4.46 \pm 0.37	4.64 \pm 0.59	0.68 \pm 0.03	283.760	<0.001
ALKBH5 蛋白	1.00 \pm 0.05	1.02 \pm 0.03	0.30 \pm 0.02	1.01 \pm 0.04	4.09 \pm 0.35	3.76 \pm 0.58	4.29 \pm 0.78	117.890	<0.001
GEFT 蛋白	1.00 \pm 0.04	1.02 \pm 0.04	0.31 \pm 0.03	1.02 \pm 0.07	2.82 \pm 0.67	2.95 \pm 0.60	0.63 \pm 0.06	56.405	<0.001

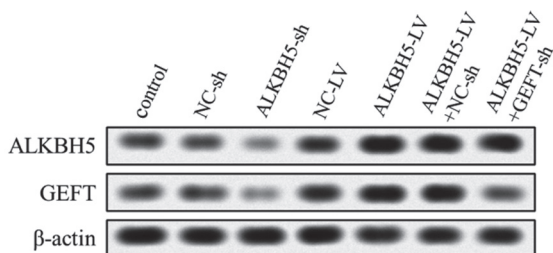


图 1 Western blot 检测各组 HuCCT1 细胞中 ALKBH5 和 GEFT 蛋白表达水平

2.2 ALKBH5 和 GEFT 对 HuCCT1 细胞凋亡的调控作用 见表 3 和图 2。与 Control 组和 NC-sh 组

表 3 各组 HuCCT1 细胞中细胞凋亡相关指标表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

项目	control 组	NC-sh 组	ALKBH5-sh 组	NC-LV 组	ALKBH5-LV 组	ALKBH5+NC-sh 组	ALKBH5+GEFT-sh 组	F 值	P 值
凋亡率 (%)	5.05 \pm 0.48	4.82 \pm 0.40	27.88 \pm 1.10	5.16 \pm 0.58	2.51 \pm 0.02	2.50 \pm 0.03	6.77 \pm 1.09	1 085.899	<0.001
Bax mRNA	1.00 \pm 0.04	0.98 \pm 0.07	5.34 \pm 0.57	0.97 \pm 0.05	0.45 \pm 0.05	0.46 \pm 0.04	1.34 \pm 0.06	361.734	<0.001
Bcl-2 mRNA	1.00 \pm 0.05	1.04 \pm 0.04	0.48 \pm 0.03	1.03 \pm 0.08	4.22 \pm 0.52	4.39 \pm 0.22	0.69 \pm 0.10	293.694	<0.001

控作用 见表 2 和图 1。与 control 组和 NC-sh 组比较, ALKBH5-sh 组的 ALKBH5 mRNA, ALKBH5 蛋白, GEFT mRNA 和 GEFT 蛋白水平均降低, 差异具有统计学意义 ($F=684.705, 756.058, 339.612, 662.205$, 均 $P < 0.001$)。与 control 组和 NC-LV 组比较, ALKBH5-LV 组的 ALKBH5 mRNA, ALKBH5 蛋白, GEFT mRNA 和 GEFT 蛋白水平均升高, 差异具有统计学意义 ($F=720.275, 451.295, 510.924, 42.421$, 均 $P < 0.001$)。与 ALKBH5-LV+NC-sh 组比较, ALKBH5-LV+GEFT-sh 组的 GEFT mRNA 和 GEFT 蛋白水平均降低, 差异具有统计学意义 ($t=16.215, 9.454$, 均 $P < 0.001$)。各组细胞的相对细胞活力差异有统计学意义 ($F=223.258, P < 0.001$)。与 control 组 (100.00% \pm 3.90%) 和 NC-sh 组 (100.57% \pm 3.84%) 比较, ALKBH5-sh 组 (54.31% \pm 5.64%) 的相对细胞活力降低, 差异具有统计学意义 ($F=205.415$, 均 $P < 0.001$)。与 control 组 (100.00% \pm 3.90%) 和 NC-LV 组 (100.54% \pm 3.31%) 比较, ALKBH5-LV 组 (135.12% \pm 4.86%) 的相对细胞活力升高, 差异具有统计学意义 ($F=146.451$, 均 $P < 0.001$)。与 ALKBH5-LV+NC-sh 组 (129.29% \pm 5.35%) 比较, ALKBH5-LV+GEFT-sh 组 (70.67% \pm 5.72%) 的相对细胞活力降低, 差异具有统计学意义 ($t=18.333$, 均 $P < 0.001$)。

比较, ALKBH5-sh 组的细胞凋亡率和 Bax mRNA 水平升高, Bcl-2 mRNA 水平降低, 差异具有统计学意义 ($F=1995.868, 340.917, 321.576$, 均 $P < 0.001$)。与 control 组和 NC-LV 组比较, ALKBH5-LV 组的细胞凋亡率和 Bax mRNA 水平降低, Bcl-2 mRNA 水平升高, 差异具有统计学意义 ($F=71.031, 225.970, 217.678$, 均 $P < 0.001$)。与 ALKBH5-LV+NC-sh 组比较, ALKBH5-LV+GEFT-sh 组的细胞凋亡率和 Bax mRNA 水平升高, Bcl-2 mRNA (0.69 \pm 0.09) 水平降低, 差异具有统计学意义 ($t=9.571, 30.872, 38.331$, 均 $P < 0.001$)。

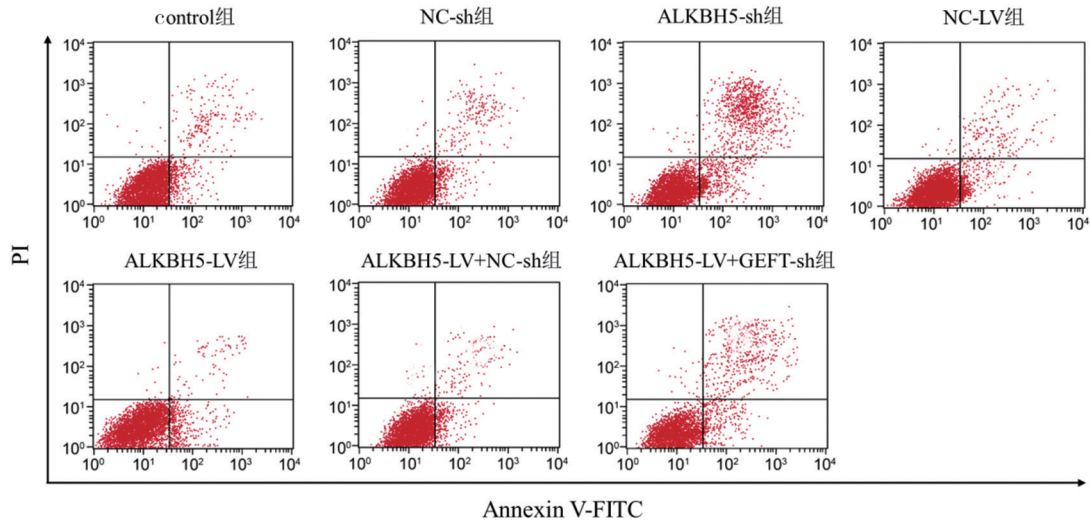


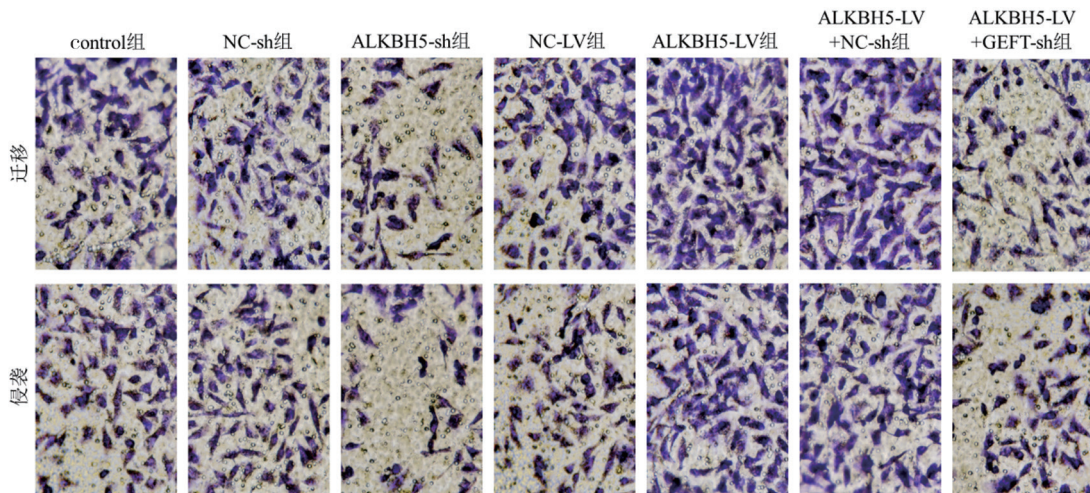
图2 流式细胞仪检测 HuCCT1 细胞凋亡情况

2.3 ALKBH5 和 GEFT 对 HuCCT1 细胞迁移和侵袭的调控作用 见表4和图3。与 control 组和 NC-sh 组比较, ALKBH5-sh 组的迁移和侵袭细胞数量降低, 差异具有统计学意义 ($F=76.763, 43.347$, 均 $P<0.001$)。与 control 组和 NC-LV 组比较, ALKBH5-LV 组的迁移和侵袭细胞数量升高, 差异具有统计学意义 ($F=27.888, 32.804$, 均 $P<0.001$)。与 ALKBH5-LV+NC-sh 组比较, ALKBH5-LV+GEFT-sh 组的迁移和侵袭细胞数量降低, 差异具有统计学意义 ($t=7.704, 7.175$, 均 $P<0.001$)。

与 control 组和 NC-sh 组比较, ALKBH5-sh 组的 MMP2 和 MMP9 mRNA 水平均降低, 差异具有统计学意义 ($F=757.446, 326.983$, 均 $P<0.001$)。与 control 组和 NC-LV 组比较, ALKBH5-LV 组的 MMP2 和 MMP9 mRNA 水平均升高, 差异具有统计学意义 ($F=283.083, 467.846$, 均 $P<0.001$)。与 ALKBH5-LV+NC-sh 组比较, ALKBH5-LV+GEFT-sh 组 MMP2 和 MMP9 的 mRNA 水平均降低, 差异具有统计学意义 ($t=16.255, 23.276$, 均 $P<0.001$)。

表4 各组 HuCCT1 细胞中细胞迁移和侵袭数量及相关指标表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

项目	Control 组	NC-sh 组	ALKBH5-sh 组	NC-LV 组	ALKBH5-LV 组	ALKBH5+NC-sh 组	ALKBH5+GEFT-sh 组	F 值	P 值
迁移细胞数	59.53 ± 7.18	66.09 ± 5.36	29.33 ± 3.15	64.94 ± 4.52	84.76 ± 6.48	82.33 ± 8.10	49.64 ± 6.51	355.181	<0.001
侵袭细胞数	49.59 ± 6.73	53.53 ± 7.28	24.99 ± 1.07	45.66 ± 5.40	70.34 ± 4.70	73.58 ± 9.83	40.05 ± 5.86	58.628	<0.001
MMP2 mRNA	1.00 ± 0.05	0.99 ± 0.03	0.36 ± 0.02	1.01 ± 0.03	2.00 ± 0.13	1.94 ± 0.15	0.81 ± 0.08	42.685	<0.001
MMP9 mRNA	1.01 ± 0.05	0.98 ± 0.06	0.33 ± 0.04	1.01 ± 0.03	2.40 ± 0.15	2.30 ± 0.14	0.78 ± 0.09	459.758	<0.001

图3 ALKBH5 和 GEFT 对 HuCCT1 细胞迁移和侵袭的影响 ($\times 400$ 倍)

2.4 ALKBH5 和 GEFT 对 HuCCT1 细胞 EMT 的调控作用 见表5。与 control 组和 NC-sh 组比

较, ALKBH5-sh 组的 E-cadherin mRNA 水平升高, N-cadherin 和 Vimentin mRNA 水平降低, 差异

具有统计学意义 ($F=201.298, 504.058, 317.305$, 均 $P<0.001$)。与 control 组和 NC-LV 组比较, ALKBH5-LV 组的 E-cadherin mRNA 水平降低, N-cadherin 和 Vimentin 水平升高, 差异具有统计学意义 ($F=617.990, 175.551, 215.997$, 均 $P<0.001$)。与

表5 各组 HuCCT1 细胞中 E-cadherin, N-cadherin 和 Vimentin 的 mRNA 表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

项目	Control 组	NC-sh 组	ALKBH5-sh 组	NC-LV 组	ALKBH5-LV 组	ALKBH5+ NC-sh 组	ALKBH5+ GEFT-sh 组	F 值	P 值
E-cadherin	1.00 ± 0.02	1.02 ± 0.05	5.29 ± 0.74	1.01 ± 0.03	0.43 ± 0.05	0.41 ± 0.01	1.40 ± 0.15	213.718	<0.001
N-cadherin	1.00 ± 0.03	0.98 ± 0.05	0.37 ± 0.03	1.00 ± 0.09	4.72 ± 0.68	4.49 ± 0.11	0.69 ± 0.06	298.279	<0.001
Vimentin	1.00 ± 0.07	0.97 ± 0.04	0.38 ± 0.03	0.98 ± 0.06	3.39 ± 0.39	3.58 ± 0.41	0.69 ± 0.10	216.860	<0.001

2.5 ALKBH5 对 HuCCT1 细胞 GEFT m6A 甲基化修饰的影响 各组细胞的 GEFT m6A 甲基化水平差异具有统计学意义 ($F=232.230, P<0.001$)。与 control 组 (1.00 ± 0.032) 和 NC-sh 组 (1.02 ± 0.028) 比较, ALKBH5-sh 组 (3.42 ± 0.440) 的 GEFT m6A 甲基化水平升高, 差异具有统计学意义 ($F=177.365$, 均 $P<0.001$)。与 control 组 (1.00 ± 0.032) 和 NC-LV 组 (0.99 ± 0.055) 比较, ALKBH5-LV 组 (0.41 ± 0.033) 的 GEFT m6A 甲基化水平降低, 差异具有统计学意义 ($F=399.929$, 均 $P<0.001$)。

3 讨论

m6A 甲基化作为一种重要的转录后基因调控机制, 参与了 CCA 的发病机制^[11-12]。m6A 甲基化失调可引起 RNA 代谢缺陷^[14]。ALKBH5 是一种 m6A 去甲基化酶, 负责将甲基从腺嘌呤上去除, 介导 RNA 的去甲基化修饰过程。ALKBH5 介导的基因转录后调控对于正常生理和病理生理事件都至关重要。研究表明, ALKBH5 可以调节癌症的表观转录组, 引起细胞增殖、存活、侵袭和转移、药物敏感性、癌症干细胞状态和癌症免疫的改变^[15]。在人肝内 CCA 细胞系中, ALKBH5 去除了 PD-L1 mRNA 的 3'UTR 中的 m6A 修饰, 并以 YTH 结构域 N6-甲基腺嘌呤 RNA 结合蛋白 2 依赖性方式减少 PD-L1 降解, 从而促进了 PD-L1 的表达, 抑制了 T 细胞的细胞毒性并介导肝内 CCA 细胞的免疫逃逸^[13]。本研究表明, 下调 ALKBH5 抑制了 HuCCT1 细胞的增殖、迁移和侵袭, 并诱导了细胞凋亡, 升高了促凋亡基因 Bax 的 mRNA 水平, 降低了抗凋亡基因 Bcl-2 的 mRNA 水平, 降低了癌细胞转移相关基因 MMP2 和 MMP9 的 mRNA 水平。而上调 ALKBH5 则效果相反。这些结果提示 ALKBH5 在 CCA 中属于一种致癌基因, 其高表达增加了 CCA 细胞的活性和转移能力。

m6A 修饰可能为 CCA 临床治疗提供新的途径, 但目前关于 m6A 参与 CCA 发病机制的研究仍十分有限, 尚无与 CCA 细胞中 GEFT m6A 修饰有关的

ALKBH5-LV+NC-sh 组比较, ALKBH5-LV+GEFT-sh 组的 E-cadherin mRNA 水平升高, N-cadherin 和 Vimentin mRNA 水平降低, 差异具有统计学意义 ($t=16.598, 77.872, 16.728$, 均 $P<0.001$)。

研究。近年来临床研究发现, GEFT 表达与肿瘤细胞的病理分级和预后相关。GEFT 在横纹肌肉瘤中表达上调, 下调 GEFT 的表达可抑制横纹肌肉瘤细胞增殖、侵袭和迁移, 并诱导细胞凋亡^[8]。GEFT 的过表达可提高横纹肌肉瘤细胞的增殖、迁移和侵袭能力, 抑制细胞凋亡^[10]。与正常肠黏膜相比, 结直肠癌组织中 GEFT 的表达增加, 并且 GEFT 高表达的结直肠癌患者预后较差, GEFT 的高表达与 CRC 中的淋巴结转移相关^[10]。GEFT 在结肠癌等许多恶性肿瘤中均有异常表达^[16], GEFT 的表达与肿瘤细胞的病理分级和预后相关^[17]。本研究结果显示, 下调 ALKBH5 表达水平抑制了 HuCCT1 细胞中 GEFT 的表达, 上调 ALKBH5 表达水平则促进了 GEFT 的表达。进一步研究证实, 下调 GEFT 未影响 HuCCT1 细胞中 ALKBH5 的表达, 但逆转了 ALKBH5 对 HuCCT1 细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡的影响。这些结果证实 ALKBH5 可能通过调控 GEFT 来影响 CCA 的发生发展。

抑制 EMT 是抑制肿瘤转移的关键。EMT 过程中, 上皮细胞失去细胞极性, 上皮细胞骨架发生重组, 失去与基底膜的连接, 同时癌细胞分泌大量 MMP-2 和 MMP-9 降解细胞外基质^[18], 导致癌细胞获得了更高的迁移和侵袭能力^[19]。在 CCA 中 EMT 参与转移和复发, 因此, 通过调节 EMT 来抑制肿瘤转移可能是治疗 CCA 的有效策略。本研究结果显示, 下调 ALKBH5 表达水平抑制了 HuCCT1 细胞的 EMT 过程, 而上调 ALKBH5 表达水平则促进了 EMT 过程。进一步研究证实, 下调 GEFT 逆转了 ALKBH5 对 HuCCT1 细胞 EMT 的影响。这些结果证实 ALKBH5 通过调控 GEFT 来影响 CCA 的 EMT 过程。其他文献报道, GEFT 上调了横纹肌肉瘤细胞中 N-cadherin, Snail, Slug, Twist, Zeb1 和 Zeb2 的表达水平, 并降低了 E-cadherin 的表达水平, GEFT 通过激活 Rac1/Cdc42 PAK 信号通路诱导的 EMT 来加速横纹肌肉瘤细胞的肿瘤发生和转移^[10]。ALKBH5 促进乳腺浸润性导管癌侵袭和转移可能与

增强 EMT 和血管生成有关^[20], 亦支持本研究结果。

m6A 甲基化参与调节 CCA 的 EMT 过程^[11, 21]。

其他文献报道, 横纹肌肉瘤细胞中 GEFT 基因启动子甲基化水平低于正常横纹肌组织^[10]。RNA m6A 甲基化抑制了胶质母细胞瘤中的 EMT 过程, ALKBH5 通过降低 RNA m6A 甲基化水平在体内增强了胶质母细胞瘤的生长并增强了胶质瘤的 EMT 过程^[22]。本研究结果显示, 下调 ALKBH5 表达水平升高了 HuCCT1 细胞 GEFT m6A 甲基化水平, 而上调 ALKBH5 表达水平则降低了 GEFT m6A 甲基化水平。这些结果说明 ALKBH5 可能通过调控 GEFT m6A 甲基化修饰来影响 CCA 的转移及 EMT。

综上所述, 本研究表明 ALKBH5 和 GEFT 均促进 CCA 细胞的生长和转移, ALKBH5 可能通过调控 GEFT m6A 甲基化修饰来影响 CCA 的转移及 EMT 过程。本研究创新性地剖析 ALKBH5 参与 CCA 的 EMT 发生的具体机制, 与 GEFT m6A 甲基化修饰相结合, 进一步深入探索这两者之间的关系, 为深入探究 CCA 发生发展的分子机制打开了新视野。

参考文献:

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, et al. Cancer statistics, 2021 [J]. *Cancer Journal for Clinicians*, 2021, 71(1): 7-33.
- [2] 遆振宇, 高小鹏, 千东维, 等. 血清 sPDL1 水平和外周血 NLR 在判断晚期胆管癌患者生存预后中的意义 [J]. *现代检验医学杂志*, 2019, 34(6): 41-46.
TI Zhenyu, GAO Xiaopeng, QIAN Dongwei, et al. Soluble programmed death-ligand 1(sPDL1) and neutrophil-to-lymphocyte ratio(NLR) predicts prognostic survival in advanced biliary tract cancer patients treated with palliative chemotherapy [J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2019, 34(6): 41-46.
- [3] 肖小平, 郭玲, 张熊. 胆管癌组织 LOXL2 mRNA 与 Tenascin-C mRNA 表达的临床应用研究 [J]. *现代检验医学杂志*, 2017, 32(3): 79-81.
XIAO Xiaoping, GUO Ling, ZHANG Xiong, et al. Clinical application of the expression of LOXL2 mRNA and Tenascin-C mRNA in tissues of the bile duct cancer [J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2017, 32(3): 79-81.
- [4] BEAUFRÈRE A, CALDERARO J, PARADIS V. Combined hepatocellular-cholangiocarcinoma: An update [J]. *Journal of Hepatology*, 2021, 74(5): 1212-1224.
- [5] 陈偲, 李忠辉, 王颖. miR-198 通过靶向 ZEB2 调控 EMT 过程抑制肝癌细胞增殖和迁移的机制研究 [J]. *现代检验医学杂志*, 2022, 37(4): 23-29.
CHEN Si, LI Zhonghui, WANG Ying. Study on the mechanism of miR-198 inhibiting the proliferation and migration of hepatoma cells by regulating EMT process by targeting ZEB2 [J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2022, 37(4): 23-29.
- [6] LIANG Shuhang, GUO Hongrui, MA Kun, et al. A PLCB1-PI3K-AKT signaling axis activates EMT to promote cholangiocarcinoma progression [J]. *Cancer Research*, 2021, 81(23): 5889-5903.
- [7] RATHINAM R, BERRIER A, ALAHARI S K. Role of Rho GTPases and their regulators in cancer progression [J]. *Frontiers in Bioscience (Landmark Ed)*, 2011, 16(7): 2561-2571.
- [8] SHANG Hao, LIU Yang, LI Zhenzhen, et al. MicroRNA-874 functions as a tumor suppressor in rhabdomyosarcoma by directly targeting GEFT [J]. *American Journal of Cancer Research*, 2019, 9(4): 668-681.
- [9] TANG Xiaolong, JIN Rongrong, QU Guojun, et al. GPR116, an adhesion G-protein-coupled receptor, promotes breast cancer metastasis via the G α q-p63RhoGEF-Rho GTPase pathway [J]. *Cancer Research*, 2013, 73(20): 6206-6218.
- [10] LIU Chunxia, ZHANG Liang, CUI Wenwen, et al. Epigenetically upregulated GEFT-derived invasion and metastasis of rhabdomyosarcoma via epithelial mesenchymal transition promoted by the Rac1/Cdc42-PAK signalling pathway [J]. *EBioMedicine*, 2019, 50: 122-134.
- [11] XU Qiongcong, TIEN Yichin, SHI Yinhao et al. METTL3 promotes intrahepatic cholangiocarcinoma progression by regulating IFIT2 expression in an m(6)A-YTHDF2-dependent manner [J]. *Oncogene*, 2022, 41(11): 1622-1633.
- [12] ZHENG Hao, ZHENG Wenjuan, WANG Zhengguang, et al. Decreased expression of programmed death ligand-1 by seven in absentia homolog 2 in cholangiocarcinoma enhances T-cell-mediated antitumor activity [J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 845193.
- [13] QIU Xinyao, YANG Shuai, WANG Shan, et al. M(6)A demethylase ALKBH5 regulates PD-L1 expression and tumor immunoenvironment in intrahepatic cholangiocarcinoma [J]. *Cancer Research*, 2021, 81(18): 4778-4793.
- [14] 伍义文, 曹健斌, 黄维佳, 等. m6A 甲基转移酶 METTL3 介导 miR-127 调控非小细胞肺癌细胞系自噬的机制研究 [J]. *现代检验医学杂志*, 2022, 37(2): 12-16,32.
WU Yiwen, CAO Jianbin, HUANG Weijia, et al. Mechanism of M6A methyltransferase METTL3 mediates miR-127 to regulate autophagy in non-small cell lung cancer cell lines [J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2022, 37(2): 12-16,32.
- [15] QU Jianwei, YAN Haimeng, HOU Yifan, et al. RNA demethylase ALKBH5 in cancer: from mechanisms to therapeutic potential [J]. *Journal of Hematology Oncology*, 2022, 15(1): 8.
- [16] WANG Yuanyuan, ZHANG Bing, GAO Ge, et al. GEFT protein expression in digestive tract malignant tumors and its clinical significance [J]. *Oncology Letters*, 2019, 18(5): 5577-5590.
- [17] WANG Yuanyuan, ZHANG Bing, GAO Ge, et al. Long non-coding RNA LINC00355 promotes the development and progression of colorectal cancer by elevating guanine nucleotide exchange factor T expression via RNA binding protein lin-28 homolog A [J]. *Frontiers in Oncology*, 2020, 10: 582669.
- [18] VALASTYAN S, WEINBERG R A. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms [J]. *Cell*, 2011, 147(2): 275-292.
- [19] ZHANG Chuyi, ZHU Xiaoping, HUA Yifei, et al. YY1 mediates TGF- β 1-induced EMT and pro-fibrogenesis in alveolar epithelial cells [J]. *Respiratory Research*, 2019, 20(1): 249.
- [20] 徐小艳, 王建君, 闫琛, 等. ALKBH5 促进乳腺浸润性导管癌细胞上皮间质转化和血管生成并增强其侵袭和转移 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2021, 37(4): 355-361.

(下转第 21 页)

- et al. Nonfasting triglycerides and risk of myocardial infarction, ischemic heart disease, and death in men and women[J]. JAMA, 2007, 298(3): 299-308.
- [10] NAKAJIMA K, SAITO T, TAMURA A, et al. Cholesterol in remnant-like lipoproteins in human serum using monoclonal anti apo B-100 and anti apo A-I immunoaffinity mixed gels[J]. Clinica Chimica Acta, 1993, 223(1/2): 53-71.
- [11] KULKARNI K R. Cholesterol profile measurement by vertical auto profile method[J]. Clinics in Laboratory Medicine, 2006, 26(4): 787-802.
- [12] JOSHI P H, KHOKHAR A A, MASSARO J M, et al. Remnant lipoprotein cholesterol and incident coronary heart disease: the Jackson heart and framingham offspring cohort studies[J]. Journal of the American Heart Association, 2016, 5(5): e002765.
- [13] KINOSHITA M, KOJIMA M, MATSUSHIMA T, et al. Determination of apolipoprotein B-48 in serum by a sandwich ELISA[J]. Clinica Chimica Acta, 2005, 351(1/2): 115-120.
- [14] TAMURA M, TANAKA A, YUI K, et al. Oxidation of remnant-like particles from serum of diabetic patients, patients with ischemic heart disease and normal subjects[J]. Hormone and Metabolic Research, 1997, 29(8): 398-402.
- [15] MIHAYLOVA B, EMBERSON J, BLACKWELL L, et al. The effects of lowering LDL cholesterol with statin therapy in people at low risk of vascular disease: meta-analysis of individual data from 27 randomised trials[J]. Lancet, 2012, 380(9841): 581-590.
- [16] LOWE R N, VANDE GRIEND J P, SASEEN J J. Statins for the primary prevention of cardiovascular disease in the elderly[J]. The Consultant Pharmacist, 2015, 30(1): 20-30.
- [17] MORA S, WENGER N K, DEMICCO D A, et al. Determinants of residual risk in secondary prevention patients treated with high- versus low-dose statin therapy: the Treating to New Targets (TNT) study[J]. Circulation, 2012, 125(16): 1979-1987.
- [18] VARBO A, BENN M, TYBJÆRG-HANSEN A, et al. Remnant cholesterol as a causal risk factor for ischemic heart disease[J]. Journal of the American College of Cardiology, 2013, 61(4): 427-436.
- [19] LANGSTED A, MADSEN C M, NORDESTGAARD B G. Contribution of remnant cholesterol to cardiovascular risk[J]. Journal of Internal Medicine, 2020, 288(1): 116-127.
- [20] TADA H, KAWASHIRI M A, YAMAGISHI M. Comprehensive genotyping in dyslipidemia: mendelian dyslipidemias caused by rare variants and Mendelian randomization studies using common variants[J]. Journal of Human Genetics, 2017, 62(4): 453-458.
- [21] SAEED A, FEOFANOVA E V, YU Bing, et al. Remnant-Like particle cholesterol, Low-Density lipoprotein triglycerides, and incident cardiovascular disease[J]. Journal of the American College of Cardiology, 2018, 72(2): 156-169.
- [22] TWICKLER T, DALLINGA-THIE G M, CHAPMAN M J, et al. Remnant lipoproteins and atherosclerosis[J]. Current Atherosclerosis Reports, 2005, 7(2): 140-147.
- [23] VARBO A, BENN M, TYBJÆRG-HANSEN A, et al. Elevated remnant cholesterol causes both low-grade inflammation and ischemic heart disease where as elevated low-density lipoprotein cholesterol causes ischemic heart disease without inflammation[J]. Circulation, 2013, 128(12): 1298-1309.
- [24] 杨莉婷, 陈翠, 蒋兴亮. 2型糖尿病患者血清残余胆固醇水平与超敏C反应蛋白表达的相关性研究[J]. 现代检验医学杂志, 2020, 35(4): 45-49.
- YANG Liting, CHEN Cui, JIANG Xingliang. Association between serum remnant cholesterol levels and expression of high sensitive C-reactive protein in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2020, 35(4): 45-49.
- [25] 陈新杰, 邓凌达, 陈海雄, 等. 血清残余脂蛋白胆固醇浓度对冠状动脉粥样硬化斑块的诊断价值[J]. 广东医学, 2022, 43(5): 597-602.
- CHEN Xinjie, DENG Lingda, CHEN Haixiong, et al. The diagnostic significance of serum residual lipoprotein cholesterol concentration for coronary artery vulnerable plaque[J]. Guangdong Medical Journal, 2022, 43(5): 597-602.
- [26] 黄本林. 酶法检测残余脂蛋白胆固醇的性能评价及临床应用研究[D]. 昆明: 昆明医科大学, 2020.
- HUANG Benlin. Performance evaluation and clinical utility of an enzymatic method of the measurement of RLP-C[D]. Kunming: Kunming Medical University, 2020.
- [27] 黄本林, 王宁, 王妮, 等. 估算法和测量法在血清残余脂蛋白胆固醇评估中的比较[J]. 临床检验杂志, 2022, 40(4): 257-261.
- HUANG Ben-lin, WANG Ning, WANG Ni, et al. Comparative analysis of estimated and measured remnant lipoprotein cholesterol in serum[J]. Chinese Journal of Clinical Laboratory Science, 2022, 40(4): 257-261.
- [28] 康小涛, 徐彬彬, 杨向军. 青年急性心肌梗死与残余胆固醇的关系[J]. 岭南心血管病杂志, 2017, 23(1): 11-13, 18.
- KANG Xiaotao, XU Binbin, YANG Xiangjun. Relationship of acute myocardial infarction and remnant cholesterol in youth patients[J]. South China Journal of Cardiovascular Diseases, 2017, 23(1): 11-13, 18.
- [29] NORDESTGAARD B G, LANGSTED A, MORA S, et al. Fasting is not routinely required for determination of a lipid profile: clinical and laboratory implications including flagging at desirable concentration cut-points-a joint consensus statement from the European Atherosclerosis Society and European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine[J]. European Heart Journal, 2016, 37(25): 1944-1958.
- 收稿日期: 2023-02-21 修回日期: 2023-03-19

(上接第7页)

- XU Xiaoyan, WANG Jianjun, YAN Chen, et al. ALKBH5 promotes epithelial mesenchymal transition and angiogenesis of breast invasive ductal carcinoma cells, and enhances cell invasion and metastasis[J]. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2021, 37(4): 355-361.
- [21] CHEN Fengqiu, ZHENG Hao, GU Ting, et al.

Modification of STIM2 by m(6)A RNA methylation inhibits metastasis of cholangiocarcinoma[J]. Annals of Translational Medicine, 2022, 10(2): 40.

- [22] TAO Min, LI Xiaoyu, HE Lei, et al. Decreased RNA m(6)A methylation enhances the process of the epithelial mesenchymal transition and vasculogenic mimicry in glioblastoma[J]. American Journal of Cancer Research, 2022, 12(2): 893-906.

收稿日期: 2023-03-11 修回日期: 2023-05-05