

Alk B 同源蛋白 5 去除前 mRNA 加工因子 6 的 mRNA 甲基化修饰调控肝细胞癌的细胞增殖

邹岩¹, 李辉², 姜桂春², 谢艳敏^{1*}

1.辽宁省肿瘤医院 内镜中心, 辽宁 沈阳 110042

2.辽宁省肿瘤医院 护理部, 辽宁 沈阳 110042

【摘要】 目的 探讨 Alk B 同源蛋白 5(Alk B homolog 5, ALKBH5)在肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的细胞增殖中的作用。方法 通过癌症基因组图谱数据库分析 *ALKBH5* 和前 mRNA 加工因子 6 (pre-mRNA processing factor 6, *PRPF6*)在 HCC 组织中的表达水平。采用实时荧光定量聚合酶链反应和蛋白质印迹法检测 *ALKBH5* 和 *PRPF6* 在 HCC 细胞系(Huh7 和 Hep3B)中的 mRNA 和蛋白表达水平。荧光原位杂交确定 ALKBH5 和 PRPF6 在 HCC 细胞系(Huh7 和 Hep3B)中的亚细胞定位。在免疫沉淀复合物中检测 *PRPF6* 的 N6-甲基腺苷甲基化水平。通过过表达和敲低基因表达的方法,将 Huh7 细胞和 Hep3B 细胞分别进行转染,分组为 sh-NC 组(阴性对照转染细胞)、sh-ALKBH5 实验组(ALKBH5 干扰序列转染细胞)、sh-ALKBH5+ex-PRPF6 实验组(ALKBH5 干扰序列转染+PRPF6 pcDNA 3.1 过表达质粒转染细胞),并采用 CCK-8 和染色增殖试验检测各组细胞的增殖情况。裸鼠异种移植瘤实验验证 ALKBH5 和 PRPF6 在体内的生物学功能。蛋白质印迹法检测各组细胞中 AKT/mTOR 通路相关蛋白的表达水平。结果 HCC 细胞中 *ALKBH5* 的表达上调,可以去除 *PRPF6* 的甲基化修饰。体外和体内实验结果显示,ALKBH5 可通过调节 PRPF6 的表达参与 HCC 细胞的恶性增殖。此外,敲低 *ALKBH5* 会抑制丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(serine-threonine kinase, AKT)和哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)的磷酸化,而 *PRPF6* 的过表达则有助于 AKT 和 mTOR 的磷酸化。结论 ALKBH5 能促进 HCC 细胞的增殖,相关机制是通过 ALKBH5/PRPF6/AKT/mTOR 轴实现的。

【关键词】 Alk B 同源蛋白 5; 前 mRNA 加工因子 6; N6-甲基腺苷; 肝细胞癌; 增殖

Alk B homolog 5 regulates the proliferation of hepatocellular carcinoma cells by targeting pre-mRNA processing factor 6 through mRNA demethylation

Zou Yan¹, Li Hui², Jiang Guichun², Xie Yanmin^{1*}

1.Endoscopy Center, Liaoning Province Cancer Hospital & Institute, Shenyang 110042, Liaoning, China

2.Nursing Department, Liaoning Province Cancer Hospital & Institute, Shenyang 110042, Liaoning, China

*Corresponding author: Xie Yanmin, E-mail: xieyanmin@cancerhosp-ln-cmu.com

【Abstract】 Objective This study intends to explore the role of Alk B homolog 5 (ALKBH5) in proliferation of hepatocellular carcinoma (HCC) cells. **Method** The expression levels of *ALKBH5* and pre-mRNA processing factor 6 (*PRPF6*) in HCC tissues were analyzed via the cancer genome atlas database. Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction and western-blot were used to determine the mRNA and protein expression levels of *ALKBH5* and *PRPF6* in HCC cell lines (Huh7 and Hep3B). Fluorescence in situ hybridization determined the subcellular localization of ALKBH5 and PRPF6 in HCC cell lines (Huh 7 and Hep3B). The N6-methyladenosine methylation level of *PRPF6* was detected in the immunoprecipitation complex. By up-regulation and knockdown of the gene expression, Huh7 cells and Hep3B cells were transfected respectively and were divided into sh-NC group (negative control transfected cells), sh-ALKBH5 group (short hairpin-ALKBH5 transfected cells) and sh-ALKBH5+ex-PRPF6 group (short hairpin-ALKBH5 transfected + overexpressed pcDNA 3.1-PRPF6 transfected cells). Then, CCK-8 assay and dyeing

基金项目:2021年度辽宁省自然科学基金项目(LD212118)

*通信作者:谢艳敏, E-mail: xieyanmin@cancerhosp-ln-cmu.com

proliferation test were used to determine the proliferation of the cells in different groups. Tumor xenograft in nude mice checked the biological function of ALKBH5 and PRPF6 *in vivo*. Besides, the expression levels of AKT/mTOR pathway related proteins in the cells of different groups were detected by western-blot. **Result** ALKBH5 was up-regulated in HCC cells, which could remove the methylation modification of PRPF6. *In vitro* and *in vivo* experiments have showed that ALKBH5 could participate in the malignant proliferation of HCC cells by regulating the expression of PRPF6. Moreover, the knockdown of ALKBH5 could inhibit the phosphorylation of serine -threonine kinase (AKT) and mammalian target of rapamycin (mTOR), while the overexpression of PRPF6 contributed to the phosphorylation of AKT and mTOR. **Conclusion** ALKBH5 can promote the proliferation of HCC cells, and the related mechanism is achieved through the ALKBH5/PRPF6/AKT/mTOR axis.

【Key words】 Alk B homolog 5; Pre -mRNA processing factor 6; N6 -methyladenosine; Hepatocellular carcinoma; Proliferation

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)作为全球最常见的恶性肿瘤之一, 在中国的发病率和死亡率分别位居第5和第2位^[1]。诊断延误和转移概率高是其主要特点。由于早期症状不典型, 大多数HCC患者在诊断时已进入晚期, 手术机会较少。尽管在多学科治疗和靶向治疗方面取得了进展, 但HCC患者的5年生存率仍然相对较低。因此, 加深对HCC发生发展的认识, 寻找新的生物标志物或治疗靶点迫在眉睫^[2]。

表观遗传学是指基因组通过与环境相互作用影响基因表达进而稳定遗传, 但是不影响DNA一级序列的遗传模式, 其主要包括DNA甲基化、组蛋白修饰、染色质重塑和RNA修饰^[3]。目前研究对DNA和蛋白质修饰的表观遗传调控有了较为透彻的认识, 但RNA修饰仍是一个相对未知的领域。N6-甲基腺苷(N6-methyladenosine, m6A)是指腺嘌呤第6个氮原子的甲基化修饰, 是哺乳动物mRNA中最常见的表观转录组修饰形式^[4]。m6A修饰最早于20世纪70年代发现, 但直到最近几年蛋白质组学和高通量检测技术的发展, m6A修饰才与疾病、发育、细胞过程相关联, 成为重要的致癌因素。

许多因素动态调节mRNA的m6A修饰。甲基转移酶样蛋白3/14(methyltransferase-like protein 3/14, METTL 3/14)等甲基转移酶通过形成甲基转移酶复合物来催化m6A在特定RNA碱基上的修饰^[5]。作为脱甲基酶的脂肪量和肥胖相关蛋白(fat mass and obesity-associated protein, FTO)以及Alk B同源蛋白5(Alk B homolog 5, ALKBH5)用于去除mRNA上的m6A修饰^[6]。m6A结合蛋白可以特异性识别m6A修饰, 进而调节mRNA代谢^[7]。YTH N6-甲基腺苷RNA结合蛋白(YTH N6-

methyladenosine RNA binding protein, YTHDF)家族是第一个被证实的m6A结合蛋白, YTHDF1可以识别mRNA的m6A修饰并加速翻译过程^[8]。YTHDF2识别m6A修饰后, 会促进mRNA向细胞质加工体转移, 加速mRNA降解, 抑制蛋白质翻译^[9]。这些m6A相关蛋白在肿瘤中的异常表达与肿瘤的发生发展有关。

在这项研究中, 我们发现ALKBH5在HCC细胞中过表达并调节前mRNA加工因子6(pre-mRNA processing factor 6, PRPF6)的m6A甲基化修饰, 它们协同调节HCC细胞的生长, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 细胞培养与转染

采用加入10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的DMEM培养基培养人HCC细胞系(Huh7和Hep3B)和人肝永生化细胞系(THLE-3)(自中国医科大学获得)。

ALKBH5干扰序列(short hairpin-ALKBH5, sh-ALKBH5)、无义序列(short hairpin-normal control, sh-NC)购自美国Thermo Fisher公司, PRPF6 pcDNA 3.1过表达质粒(overexpressed pcDNA3.1-PRPF6, ex-PRPF6)由上海吉凯公司合成。HCC细胞分为sh-NC组(阴性对照组)、sh-ALKBH5实验组、sh-ALKBH5+ex-PRPF6实验组。然后按照Lipofectamine® RNAiMAX试剂的说明进行转染。2条干扰序列分别为sh-ALKBH5#1, 5'-CACCGCTGCAAGTTCAGTTCAGCTTCAAGAGAGCTTGAAGTGGAACTTGCAGC-3'; sh-ALKBH5#2, 5'-CACCGACTGTGCTCAGTGGATATGCTTCAAGAGAGCATATCCACTGAGCACAGTC-3'。

1.2 实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)

使用 TRIzol 试剂(碧云天,中国)提取总RNA,并检测 RNA 的纯度及浓度。反转录和 PCR 均严格按照 TAKARA 公司说明书进行,以 β -actin 作为内参进行相对定量,每组设 3 个复孔,罗氏实时定量荧光 PCR 仪进行检测。引物序列如下: PRPF6, 5'-CGCGGGAGAACATTCCTACA-3' 和 5'-GTGATGGCTCGGTCGATGAT-3'; ALKBH5, 5'-TG AAGCTCATGCAAACACC-3' 和 5'-CCCCAAAGTGGTGGTATCC-3'; β -actin, 5'-CTCCATCCTGGCC TCGCTGT-3' 和 5'-GCTGTCACCTTCACCGTTCC-3'。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算两者的相对表达量, $\Delta Ct = Ct_{\text{marker}} - Ct_{\beta\text{-actin}}$ 。

1.3 蛋白质印迹法

用 RIPA 裂解和提取缓冲液(Thermo Fisher, 美国)提取样品中的总蛋白质,然后在 4 °C 下以 14 000 g 离心 15 min。然后将上清液通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶,并转移到聚偏二氟乙烯膜上。将膜在脱脂奶粉中于室温下封闭 1 h,并在 4 °C 下与一抗孵育过夜。之后,将膜与辣根过氧化物酶偶联的山羊抗兔抗体一起孵育。通过化学发光底物(Thermo Fisher, 美国)对条带进行可视化,并通过 ImageJ 对蛋白质条带的灰度进行半定量。本研究使用以下抗体:抗 ALKBH5 抗体(1:1000, Abcam, 美国)、PRPF6(1:1500, Abcam, 美国)和抗 β -肌动蛋白抗体(1:1500, Santa Cruz, 美国)。

1.4 荧光原位杂交(fluorescent in situ hybridization, FISH)

4%甲醛固定 Huh7 和 Hep3B 细胞 15 min。然后用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)洗涤细胞,用胃蛋白酶和乙醇处理。FISH 按照 RiboTM 荧光原位杂交试剂盒(RiboBio, 中国)的说明进行。标记的 ALKBH5(蛋白)和 PRPF6(mRNA)探针通过 ECLIPSE Ni 显微镜(Nikon, 日本)进行检测和观察。

1.5 mRNA 甲基化检测

为了测量 PRPF6 mRNA 水平,使用 Magna RIP RNA 结合蛋白免疫沉淀试剂盒(Millipore, 美国)进行 RNA 免疫沉淀。分别从 Huh7 和 Hep3B 细胞中提取 200 ng 总 RNA,并按照制造商的说明使用 m6A RNA 甲基化定量试剂盒(Epigentek, 美

国)进行检测。

1.6 CCK-8 增殖活力测定

使用 CCK-8 试剂盒(同仁化学研究所,日本)测定细胞增殖活力。分别将 sh-NC 组、sh-ALKBH5#1 组、sh-ALKBH5#1+ex-PRPF6 组的 Huh7 和 Hep3B 细胞(5×10^3 个/孔, 200 μ l)接种于 96 孔板中。在 37 °C 孵育 24、48、72 和 96 h 后,分别向对应孔中加入 20 μ l CCK-8 溶液,再孵育 1 h 后,使用分光光度法在 450 nm 光密度处测量吸光度,根据吸光度值绘制生长曲线检测细胞增殖情况。

1.7 5-乙炔基-2'-脱氧尿苷 (5-Ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU) 染色增殖试验

使用 EdU 检测试剂盒(RiboBio, 中国)测量 HCC 细胞增殖。将转染的细胞与 50 μ mol/L EdU 一起孵育 2 h。此外,细胞核用 4',6-二脒基-2 苯基吡啶(Sigma, 美国)染色。最后,用荧光显微镜观察 EdU 阳性细胞。

1.8 异种移植肿瘤模型实验

本实验采用的裸鼠 4~6 周龄,体重 18~22 g,共 15 只。所有裸鼠在无特定病原体级屏障系统中饲养并进行实验。饲养室相对湿度为(55 \pm 10)%,温度为(22 \pm 2) °C,光照 12 h 明暗交替,裸鼠饲养用的饲料为钴 60 辐射灭菌过的大小鼠专用颗粒饲料。收集对数期生长的 HCC 细胞(Huh7 细胞),消化后用 PBS 重悬,形成密度为 1×10^7 个/ml 的单细胞悬液。细胞总共分为三组:第 1 组,sh-NC 转染 Huh7 细胞;第 2 组,sh-ALKBH5#1 转染 Huh7 细胞;第 3 组,sh-ALKBH5#1+ex-PRPF6 转染 Huh7 细胞。将上述细胞悬液经皮下注射至裸鼠腋窝(每组细胞注射 5 只),终剂量为 200 μ l,建立异种移植肿瘤模型,接种成功率 100%。建模 12 d 后开始测量肿瘤直径。使用游标卡尺测量裸鼠肿瘤的最大直径(L)和最小直径(W)。每 3 天测量 1 次肿瘤直径,并使用以下等式计算肿瘤体积(V): $V = (L \times W^2) / 2$ 。动物实验程序经辽宁省肿瘤医院动物看护与使用委员会批准(批准号:20201208-2)。

1.9 生物信息学分析和统计分析

我们使用 GEPIA 数据库(<http://gepia.cancer-pku.cn/>)分析癌症基因组图谱(the cancer genome atlas, TCGA)的转录组数据。Starbase 数据库(<http://starbase.sysu.edu.cn/>)预测 ALKBH5 和 PRPF6 之间的潜在相互作用^[10-11]。所有数据均进行 3 次重复实验。统计分析采用 SPSS 24.0 软件完成,计量资

料呈正态分布,用均数±标准差表示,组间比较采用 *t* 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ALKBH5 在 HCC 中过表达

RT-qPCR 和蛋白质印迹法检测 ALKBH5 在 HCC 细胞(Huh7 和 Hep3B)和肝细胞系(THLE-3)中的相对表达水平。结果显示 ALKBH5 的 mRNA 和蛋白在 HCC 细胞中的表达均上调 ($P<0.05$,图 1A 和 1B)。随后,我们分析了 ALKBH5 在 TCGA 数据库的 HCC 组织转录组数据中的表达。在 TCGA 数据库中,共有 HCC 肿瘤组织样本 369 例,癌旁正常组织样本 50 例,其中 50 对为癌旁正常组织和肿瘤组织的成对匹配样本。TCGA 数据库的分析结果显示,HCC 组织中 ALKBH5 的表达水平也高于癌旁正常组织($P<0.05$,图 1C)。

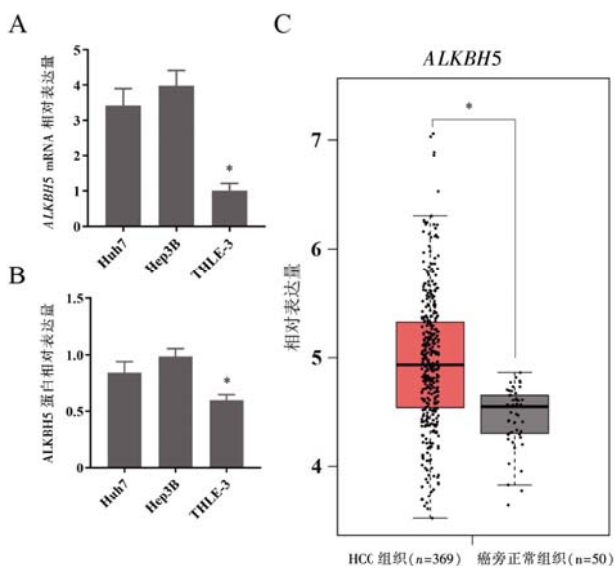


图 1 ALKBH5 在肝细胞癌中过度表达

注:A,ALKBH5 的 mRNA 在 HCC 细胞中过表达;B,ALKBH5 蛋白在 HCC 细胞中过表达;C,ALKBH5 基因在 HCC 组织(癌症基因组图谱的 HCC 组织转录组数据)中上调; $P<0.05$ 。

2.2 ALKBH5 调节 PRPF6 的 m6A 甲基化

我们通过 Starbase 数据库预测能够与 ALKBH5 结合的 mRNA。其中,PRPF6 是 ALKBH5 的潜在靶标。我们检测了 HCC 细胞中 PRPF6 的表达及相应的 m6A 甲基化水平。与 ALKBH5 一样,PRPF6 的 mRNA 和蛋白在 HCC 细胞中的表达也上调($P<0.05$,图 2A 和 2B)。此外,PRPF6 水平在 TCGA 数据库的 HCC 相关数据中也过表达 ($P<0.05$,

图 2C)。随后,我们使用 ALKBH5 的干扰序列来敲低其表达(图 2D),序列 #1 具有更佳的敲低效果,因此被用于后续实验研究。随着 HCC 细胞中 ALKBH5 表达的敲低,PRPF6 的 mRNA 和蛋白表达水平都有所下降(图 2E 和 2F)。

FISH 检测 ALKBH5(蛋白)和 PRPF6(mRNA)的亚细胞定位,荧光显微镜显示两个分子之间存在明显的共定位(图 2G),这提示着两者之间可能存在相互作用。为了探究 ALKBH5 调节 PRPF6 表达的机制,我们首先探讨了 ALKBH5 是否针对 PRPF6 的 mRNA 进行 m6A 去甲基化。与 THLE-3 细胞相比,PRPF6 在 HCC 细胞中的 m6A 水平较低 ($P<0.05$,图 2H)。在抑制 ALKBH5 的表达后,PRPF6 的 m6A 水平上升($P<0.05$,图 2I)。这提示 ALKBH5 可以去除 PRPF6 的 m6A 修饰并解释了 PRPF6 在 HCC 细胞中的致癌效应。

2.3 ALKBH5 和 PRPF6 影响 HCC 细胞增殖

我们通过回复实验验证 ALKBH5 和 PRPF6 在 HCC 细胞中的生物学功能。首先我们确认 PRPF6 的过表达质粒(ex-PRPF6)可以上调 PRPF6 的表达(图 3A)。CCK-8 试验显示 sh-ALKBH5 可抑制 HCC 细胞的增殖,ex-PRPF6 可以抵消 sh-ALKBH5 抑制癌细胞增殖的作用(图 3B)。我们随后通过 EdU 试验验证了这一结论,在 ALKBH5 敲低后,HCC 细胞的荧光强度降低,PRPF6 过表达后 HCC 细胞的荧光强度恢复(图 3C 和 3D)。这进一步验证了 ALKBH5 和 PRPF6 在 HCC 细胞增殖中的作用。

2.4 ALKBH5 和 PRPF6 在体内的生物学功能

我们通过异种移植肿瘤模型实验验证 ALKBH5 和 PRPF6 在体内的生物学功能。实验结束时每组小鼠肿瘤肿块的图像见图 4A。注射 sh-ALKBH5#1 细胞的小鼠死亡时的平均肿瘤体积为 $(589.30 \pm 51.20) \text{ mm}^3$,注射 sh-NC 细胞的小鼠的平均肿瘤体积为 $(1142.61 \pm 58.25) \text{ mm}^3$,表明敲低 ALKBH5 可以限制肿瘤的体积。而过表达的 PRPF6 可以逆转这种现象,sh-ALKBH5#1+ex-PRPF6 组肿瘤的体积为 $(970.20 \pm 58.12) \text{ mm}^3$ (图 4B)。同样,敲低 ALKBH5 也限制了肿瘤重量 [sh-ALKBH5#1 组 $(0.71 \pm 0.03) \text{ g}$ 比 sh-NC 组 $(1.63 \pm 0.20) \text{ g}$, $P<0.05$],过表达的 PRPF6 逆转了这种情况 [sh-ALKBH5#1+ex-PRPF6 组 $(1.49 \pm 0.1) \text{ g}$ 比 sh-ALKBH5#1 组 $(0.71 \pm 0.03) \text{ g}$, $P<0.05$],见图 4C。

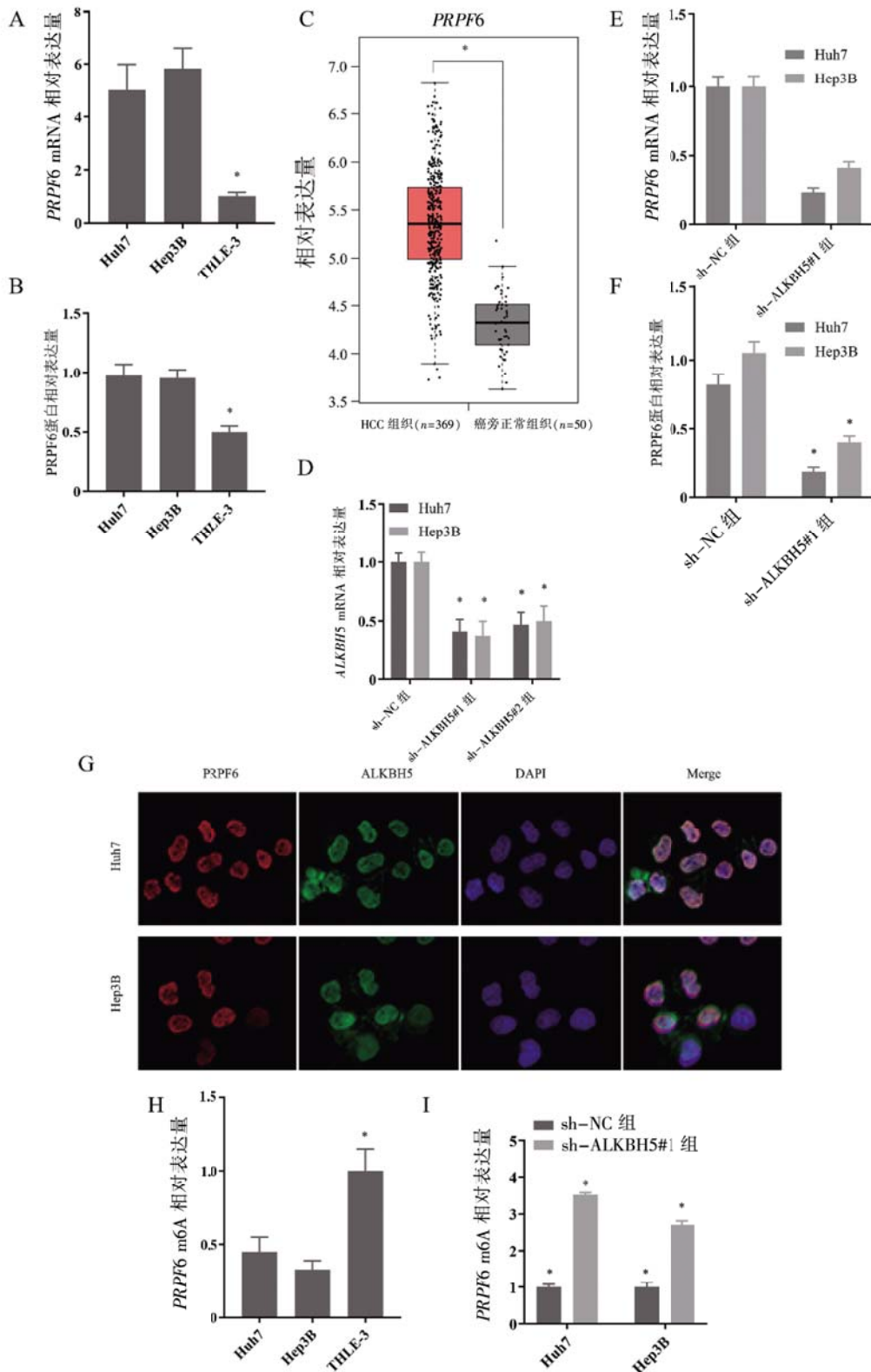


图2 ALKBH5调节PRPF6的表达

注:A, PRPF6 mRNA 在 HCC 细胞中过表达; B, PRPF6 蛋白在 HCC 细胞中过表达; C, PRPF6 基因在 HCC 组织(癌症基因组图谱的 HCC 组织转录组数据)中上调; D, 实时荧光定量聚合酶链反应验证 ALKBH5 干扰序列的敲降效率, sh-ALKBH5#1 和 sh-ALKBH5#2 为 ALKBH5 的 2 条干扰序列; E, sh-ALKBH5 抑制 PRPF6 mRNA 的表达; F, sh-ALKBH5 抑制 PRPF6 蛋白的表达; G, 荧光原位杂交检测显示 ALKBH5 和 PRPF6 共定位于细胞核中($\times 20$); H, PRPF6 在 HCC 细胞中具有较低的 m6A 水平; I, sh-ALKBH5 上调 HCC 细胞中 PRPF6 的 m6A 水平。* $P < 0.05$ 。

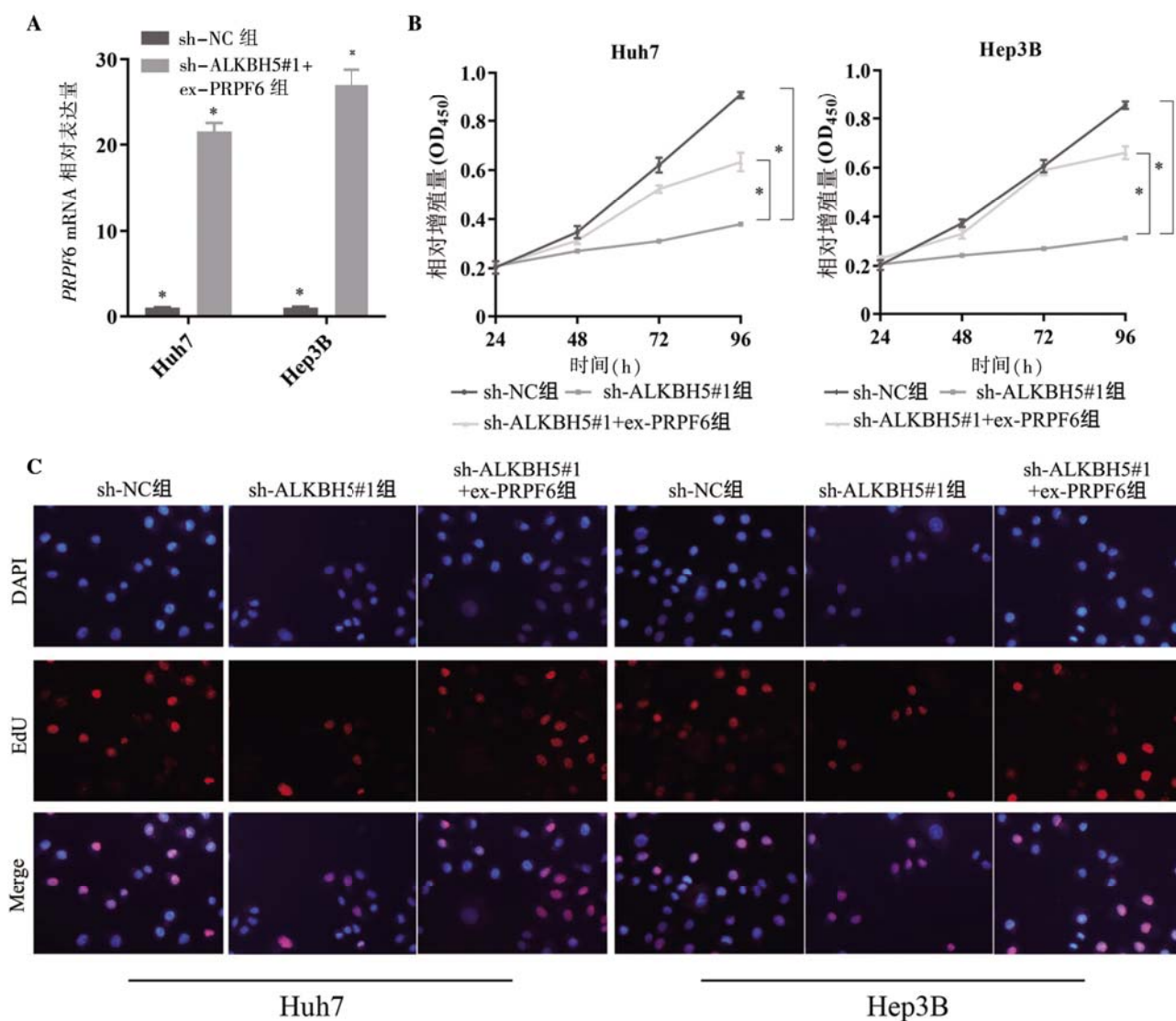


图3 ALKBH5 和 PRPF6 共同促进 HCC 细胞增殖

注:A, ex-PRPF6 上调 HCC 细胞中 PRPF6 的表达;B, CCK-8 试验评估三组(sh-NC 组、sh-ALKBH5#1 组和 sh-ALKBH5#1+ex-PRPF6 组)中 HCC 细胞(Huh 和 Hep3B)的增殖情况;C, Edu 试验(4',6-二脒基-2 苯基吲哚染色 $\times 20$)评估三组(sh-NC 组、sh-ALKBH5#1 组和 sh-ALKBH5#1+ex-PRPF6 组)中 HCC 细胞(Huh 和 Hep3B)的增殖情况。* $P < 0.05$ 。

2.5 ALKBH5 和 PRPF6 可以调节 HCC 细胞中的 AKT/mTOR 通路

为了进一步探讨 ALKBH5 和 PRPF6 诱导 HCC 细胞增殖的机制,我们分析了 ALKBH5 和 PRPF6 对 AKT/mTOR 通路的影响。通过蛋白质印迹法分别检测 sh-NC 组、sh-ALKBH5#1 组和 sh-ALKBH5#1 组+ex-PRPF6 组对丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (serine-threonine kinase, AKT)、磷酸化 AKT (phosphorylated-AKT, p-AKT)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR)、p-mTOR 表达的影响。结果显示,敲低 ALKBH5 不会影响 AKT 和 mTOR 的表达 (图 5A、5B、5D),但

它可以抑制 AKT 和 mTOR 的磷酸化 (图 5A、5C、5E)。随着 PRPF6 的过表达,AKT 和 mTOR 的磷酸化表达相应增加 (图 5A、5C、5E)。提示 ALKBH5 调控 AKT/mTOR 通路的激活是通过 PRPF6 实现的,而激活的 AKT/mTOR 通路参与了 HCC 细胞的增殖。

3 讨论

HCC 的形成是一个包括多基因激活、多步骤、多阶段的动态过程。在其发展的不同阶段,不同的成分和基因参与其中。通过研究可能参与 HCC 发生发展的各种基因、机制和成分,有助于我们加深

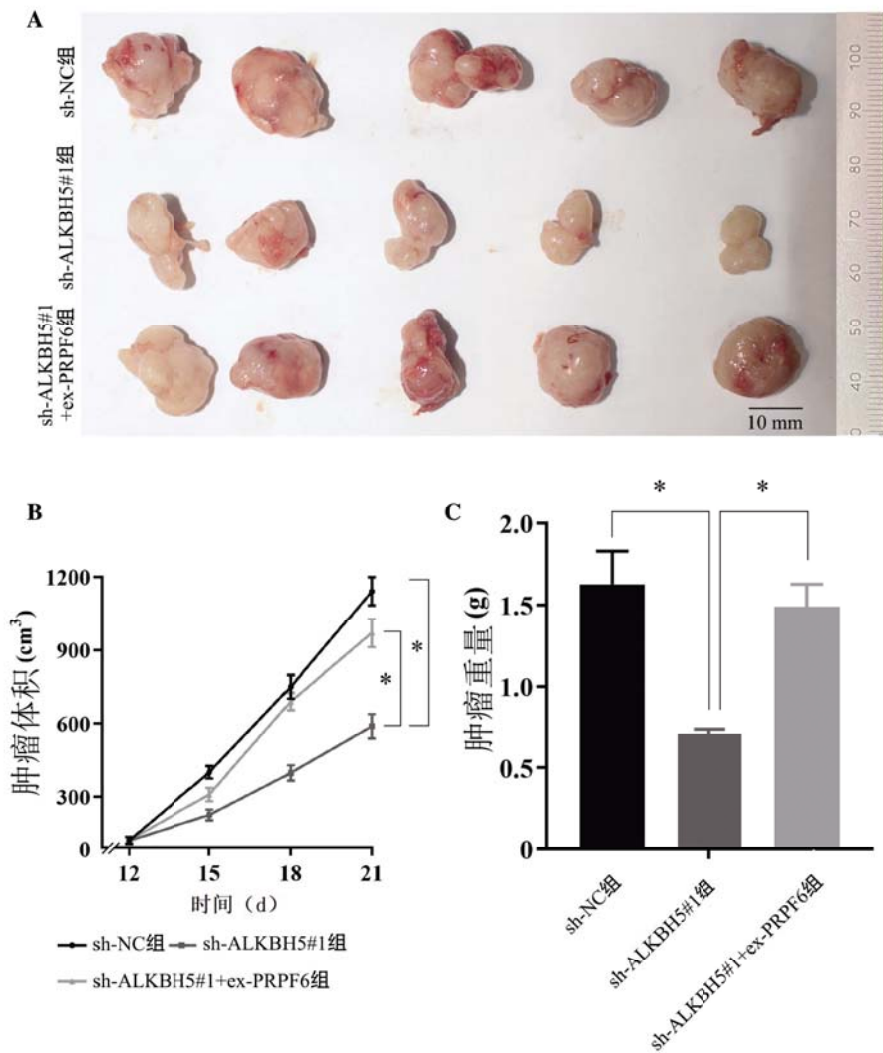


图4 ALKBH5和PRPF6对异种移植小鼠模型成瘤的影响

注:A,实验结束时各组肿瘤肿块的照片;B,各组小鼠体内肿瘤体积的变化曲线;C,各组小鼠的平均肿瘤重量。* $P < 0.05$ 。

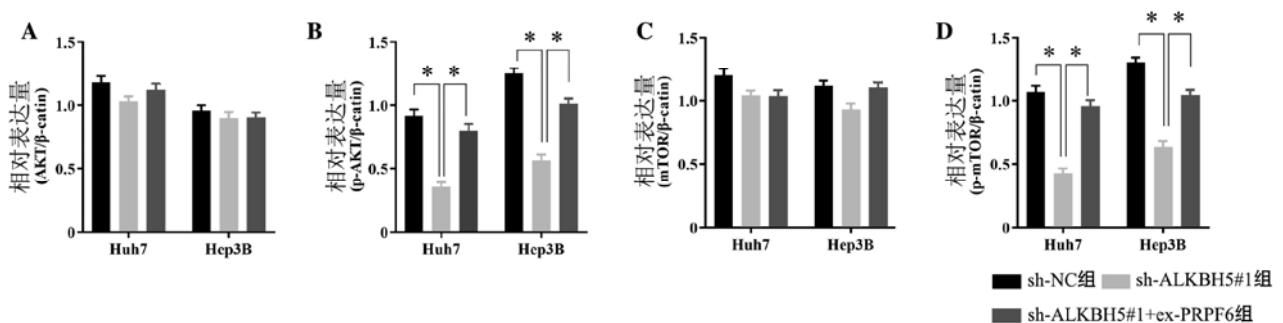


图5 ALKBH5和PRPF6调控AKT/mTOR通路

注:A,敲低ALKBH5和过表达PRPF6不影响AKT的表达;B,敲低ALKBH5抑制了AKT的磷酸化,过表达PRPF6逆转了这一现象;C,敲低ALKBH5和过表达PRPF6不影响mTOR的表达;D,敲低ALKBH5抑制了mTOR的磷酸化,过表达PRPF6逆转了这一现象。* $P < 0.05$ 。

对HCC的认识。近年来,RNA的m6A甲基化修饰受到越来越多的关注。目前研究表明,RNA的m6A甲基化修饰参与了几乎所有的细胞生物学过

程,如细胞发育、细胞增殖与凋亡、细胞迁移、侵袭等^[12]。而且,m6A甲基化的失调与多种肿瘤密切相关^[13]。2003年研究首次发现了ALKBH5的去甲基

化作用^[14],这直接证明 m6A 的过程是动态可逆的。ALKBH5 是第一个被证实的去甲基化酶,它属于 α -酮戊二酸依赖性双加氧酶家族,并以 Fe(II)和 α -酮戊二酸依赖性方式参与 m6A 修饰。ALKBH5 在癌症的发生发展中发挥了复杂而“矛盾”的作用。它选择性地促进了急性髓系白血病的进展,并能够维持干细胞的自我更新^[15];但是 ALKBH5 也可以通过抑制 YTHDFs 和 miR-107/LATS2 介导的 Yes 关联蛋白(Yes-associated protein, YAP)活性来抑制肿瘤转移^[16]。因此,有必要进一步确定 ALKBH5 在特定肿瘤中的作用。

在本研究中,我们通过生物信息学分析和相关实验验证发现 ALKBH5 可以调控 PRPF6 的甲基化。PRPF6 参与 mRNA 的预剪接,并在剪接体形成过程中充当 U5 和 U4/U6 核微小核糖核蛋白颗粒(small nuclear ribonucleoprotein particles, snRNP)之间的桥接因子^[17]。PRPF6 可以作为具有多个功能域的雄激素受体(Androgen receptor, AR)共激活剂,与 AR 结合,将转录激活和剪接联系起来^[18]。它可以通过优先剪接与生长调节相关的基因来驱动结肠癌的增殖^[19]。还有研究表明,AR 可通过不依赖配体的方式激活 AKT/mTOR 通路^[20]。

我们随后分析了 ALKBH5 对 PRPF6 的调节作用,ALKBH5 可以去除 PRPF6 的 m6A 甲基化修饰,使 PRPF6 保持高水平的表达。抑制 ALKBH5 后,PRPF6 的表达明显下降,甲基化水平升高。此外,体内和体外实验均证实 ALKBH5 以 PRPF6 依赖性方式影响 HCC 细胞的恶性增殖。这可能是通过 ALKBH5 和 PRPF6 的协同激活 AKT/mTOR 通路来实现的。

基于本研究结果,我们认为 ALKBH5 降低了 PRPF6 的 m6A 甲基化水平,从而促进了 HCC 细胞的增殖。本研究为揭示 HCC 发生发展中 m6A 甲基化发挥的作用提供了新的理论依据。其细微的调节机制和治疗意义将在后续研究中继续进行探讨。

参考文献

- [1] 叶世青,郭夏晴,桂雄斌,等.原发性肝癌介入治疗进展[J/CD].消化肿瘤杂志(电子版),2021,13(4):298-302.
- [2] 甄秀梅,黄力毅.光动力疗法治疗原发性肝癌的进展及机制研究[J/CD].消化肿瘤杂志(电子版),2022,14(1):5-10.
- [3] ZHAO Y, CHEN Y, JIN M, et al. The crosstalk between m(6)A RNA methylation and other epigenetic regulators: a novel perspective in epigenetic remodeling [J]. Theranostics, 2021,11(9):4549-4566.
- [4] AN Y, DUAN H. The role of m6A RNA methylation in cancer metabolism[J]. Mol Cancer, 2022,21(1):14.
- [5] SCHÖLLER E, WEICHMANN F, TREIBER T, et al. Interactions, localization, and phosphorylation of the m(6)A generating METTL3-METTL14-WTAP complex [J]. Rna, 2018,24(4):499-512.
- [6] HAN Z, WANG X, XU Z, et al. ALKBH5 regulates cardiomyocyte proliferation and heart regeneration by demethylating the mRNA of YTHDF1 [J]. Theranostics, 2021,11(6):3000-3016.
- [7] HE L, LI H, WU A, et al. Functions of N6-methyladenosine and its role in cancer[J]. Mol Cancer, 2019,18(1):176.
- [8] YE J, WANG Z, CHEN X, et al. YTHDF1-enhanced iron metabolism depends on TFRC m(6)A methylation [J]. Theranostics, 2020,10(26):12072-12089.
- [9] FEI Q, ZOU Z, ROUNDTREE IA, et al. YTHDF2 promotes mitotic entry and is regulated by cell cycle mediators[J]. PLoS Biol, 2020,18(4):e3000664.
- [10] SUN T, WU R, MING L. The role of m6A RNA methylation in cancer [J]. Biomed Pharmacother, 2019,112:108613.
- [11] YANG J, LI J, SHAO P, et al. starBase: a database for exploring microRNA-mRNA interaction maps from Argonaute CLIP-Seq and Degradome-Seq data [J]. Nucleic Acids Res, 2011,39(Database issue):D202-209.
- [12] SCARROW M, CHEN N, SUN G. Insights into the N(6)-methyladenosine mechanism and its functionality: progress and questions[J]. Crit Rev Biotechnol, 2020,40(5):639-652.
- [13] WANG T, KONG S, TAO M, et al. The potential role of RNA N6-methyladenosine in Cancer progression [J]. Mol Cancer, 2020,19(1):88.
- [14] ZHENG G, DAHL JA, NIU Y, et al. ALKBH5 is a mammalian RNA demethylase that impacts RNA metabolism and mouse fertility[J]. Mol Cell, 2013,49(1):18-29.
- [15] SHEN C, SHENG Y, ZHU A, et al. RNA Demethylase ALKBH5 Selectively Promotes Tumorigenesis and Cancer Stem Cell Self-Renewal in Acute Myeloid Leukemia [J]. Cell Stem Cell, 2020,27(1):64-80.e69.
- [16] JIN D, GUO J, WU Y, et al. m(6)A demethylase ALKBH5 inhibits tumor growth and metastasis by reducing YTHDFs-mediated YAP expression and inhibiting miR-107/LATS2-mediated YAP activity in NSCLC[J]. Mol Cancer, 2020,19(1):40.

- [17] GOTO K, ZHAO Y, SAITO M, et al. Activation function-1 domain of androgen receptor contributes to the interaction between two distinct subnuclear compartments [J]. J Steroid Biochem, 2003,85 (2-5): 201-208.
- [18] SONG H, SUN N, LIN L, et al. Splicing factor PRPF6 upregulates oncogenic androgen receptor signaling pathway in hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Sci, 2020,111(10):3665-3678.
- [19] ADLER AS, MCCLELAND ML, YEE S, et al. An integrative analysis of colon cancer identifies an essential function for PRPF6 in tumor growth [J]. Genes Dev, 2014,28(10):1068-1084.
- [20] ZHANG H, LI X, YANG Y, et al. Significance and mechanism of androgen receptor overexpression and androgen receptor/mechanistic target of rapamycin cross-talk in hepatocellular carcinoma [J]. Hepatology, 2018,67 (6):2271-2286.

收稿日期:2023-09-19