

ALKBH5 对人肝癌细胞上皮间质转化的影响

孙姚承¹, 汤建军¹, 魏来², 杭苏宁²,
仓杰², 王梦涛², 奚剑波¹

(1. 江苏大学附属武进医院/徐州医科大学武进临床学院 普通外科, 江苏 常州, 213002;

2. 江苏大学医学院, 江苏 镇江, 212013)

摘要: **目的** 探讨 ALKBH5 对肝癌细胞迁移、侵袭能力及上皮间质转化(EMT)的影响。**方法** 选择手术切除的肝癌标本 50 例, 分析 ALKBH5 与临床病理学参数的关系。设计 ALKBH5 短发夹核糖核酸(shRNA)序列, 构建 pLKO.1-TRC vector 载体, 慢病毒感染肝癌细胞 HepG2 和 SMMC7721, 嘌呤霉素筛选并培养稳定低表达 ALKBH5 细胞株; 检测 ALKBH5 mRNA 及 ALKBH5 蛋白质水平干扰效率; Transwell 实验检测细胞的迁移及侵袭; 蛋白质免疫印迹(Western blot)检测细胞 EMT 相关蛋白的影响。**结果** 肝癌中 ALKBH5 蛋白表达与分化程度、临床分期存在相关性($P < 0.05$), 与血清甲胎蛋白(AFP)水平、肿瘤大小、年龄、性别均无相关性($P > 0.05$); 下调肝癌细胞 ALKBH5 表达, 对照组和实验组 HepG2 细胞迁移数目分别为(123 ± 22)、(335 ± 21)个, 侵袭数目分别为(118 ± 29)、(282 ± 17)个; 对照组和实验组 SMMC7721 细胞迁移数目分别为(220 ± 27)、(453 ± 23)个, 侵袭数目分别为(200 ± 11)、(388 ± 20)个, 2 组间差异均有统计学意义($P < 0.05$)。下调 ALKBH5 表达后, E-钙黏蛋白(E-cadherin)表达水平降低, 波形蛋白(Vimentin)、锌指结构转录抑制因子(Snail)表达水平增高。**结论** ALKBH5 扮演了抑癌基因的角色, 下调 ALKBH5 表达能够促进肝癌细胞的迁移、侵袭及 EMT。

关键词: 肝癌; RNA m6A 去甲基酶; ALKBH5; 迁移; 侵袭; 上皮间质转化

中图分类号: R 735.7; R 657.3 文献标志码: A 文章编号: 1672-2353(2022)15-069-06 DOI: 10.7619/jcmp.20220435

Effects of ALKBH5 on epithelial-mesenchymal transition in human hepatoma cell

SUN Yaocheng¹, TANG Jianjun¹, WEI Lai², HANG Suning²,
CANG Jie², WANG Mengtao², XI Jianbo¹

(1. Department of General Surgery, Wujin Hospital Affiliated to Jiangsu University, Wujin

Clinical College of Xuzhou Medical University, Changzhou, Jiangsu, 213002;

2. Medical College of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu, 212013)

Abstract: Objective To investigate the effects of ALKBH5 on migration, invasion and epithelial-mesenchymal transformation (EMT) of hepatoma cells. **Methods** A total of 50 hepatocellular carcinoma specimens were selected. The relationship between ALKBH5 and clinicopathological parameters was analyzed. ALKBH5 short hairpin RNA (shRNA) sequence was designed, pLKO.1-TRC vector was constructed, then lentivirus was used to infect HepG2 and SMMC7721 cells. Puromycin screened and cultured ALKBH5 cell lines with stable low expression. Interference efficiency of ALKBH5 mRNA and ALKBH5 protein levels were detected. Transwell assay was used to detect the migration and invasion of cells. Western blot was used to detect the effects of EMT-associated proteins. **Results** ALKBH5 protein expression was correlated with differentiation degree and clinical stage ($P < 0.05$), but not with serum alpha-fetoprotein (AFP) level, tumor size, age and gender ($P > 0.05$). The expression of ALKBH5 was down-regulated, and the migration number of HepG2 cells in control group and experimental group was (123 ± 22) and (335 ± 21), respectively; the number of invasions was (118 ± 29) and (282 ± 17), respectively; the migration number of SMMC7721 cells in control group and experimental

收稿日期: 2022-02-14

基金项目: 江苏省常州市科技计划项目(CJ20190005); 江苏省常州市卫生健康青苗人才培养工程(CZQM2021027);

江苏省常州市卫生健康委科技项目(WZ201933); 江苏省常州市武进区科技计划(社会发展)项目(WS201930、WS202010)

通信作者: 奚剑波, E-mail: 1059898131@qq.com

group was (220 ± 27) and (453 ± 23), respectively; the number of invasions was (200 ± 11) and (388 ± 20), respectively, and the differences among all groups were statistically significant ($P < 0.05$). After down-regulated ALKBH5 expression, E-cadherin protein expression was decreased, and the expression level of Vimentin and Snail protein increased ($P < 0.05$). **Conclusion** ALKBH5 plays the role of tumor suppressor gene, and down-regulated ALKBH5 expression can promote migration, invasion and EMT of hepatoma carcinoma cells.

Key words: hepatocellular carcinoma; RNA m6A demethylase; ALKBH5; migration; invasion; epithelial-mesenchymal transition

肝细胞癌(以下简称肝癌)是最常见的恶性肿瘤之一,也是导致癌症相关性死亡的主要原因^[1]。肝癌起病隐匿,70%~80%的肝癌患者确诊时已是晚期,经诊断后平均存活时间仅约6个月,5年总生存率低于19%^[2]。目前,临床治疗肝癌的主要方法有外科手术肝脏切除、介入治疗、肝移植、化疗等,外科手术肝脏切除为首选治疗方法^[3]。但肝癌患者肝切除后5年复发率高,其初期症状不明显,不能早期筛查,多数发现时已处于中晚期,且已无手术指征^[4]。当前肝癌治疗效果不佳,是由于其肿瘤形成的分子机制尚不清楚。因此,临床人员亟需揭示肝癌发生发展的机制,寻找有效的治疗方式以改善肝癌患者预后。

N6-甲基腺嘌呤(m6A)修饰普遍存在于各种类别的RNA中,其中以信使RNA较为多见,表观转录组学研究^[5]发现,其丰度水平直接影响转录后的表达。ALKBH5作为m6A修饰中非常重要的一个元件,其与多种肿瘤的临床预后有关,通过不同的分子机制影响肿瘤的进程。但ALKBH5在肝癌进程中的作用尚未阐明,故本研究挖掘了ALKBH5的表达与临床各项指标参数的内在关系,成功构建shRNA干扰质粒,筛选出稳定低表达ALKBH5的细胞株,探讨ALKBH5对肝癌细胞生物学功能中迁移、侵袭及上皮间质转化(EMT)作用的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞培养及转染:本实验中所用的正常肝细胞系LO2以及2种肝癌细胞系SMMC-7721、HepG2由江苏大学附属武进医院中心实验室保存,所用培养基为DMEM与10%胎牛血清混合而成,在恒温、恒湿培养箱内孵育。在www.sigmaaldrich.cn/网站找到验证后的shALKBH5 oligos序列,上游序列5'-CCGGAAAGGCTGTTGGCATC AATACTCGAGTATTGATGCCAACAGCCTTCTTTT

TG-3',下游序列5'-AATTCAAAAAGAAAGGCTG TTGGCATCAATACTCGAGTATTGATGCCAACAGC CTTTC-3'。按照慢病毒包装试剂盒说明书,使用pLKO.1-TRC载体质粒、穿梭质粒psPAX2和包装质粒pMD2.G共同构建相应质粒,同时把干扰质粒sh-EGFP/sh-ALKBH5及其他2种质粒共转染入293T细胞,转染4~6h后更换为培养基,放入温箱孵育,细胞培养2d后,吸管吸取富含慢病毒颗粒的培养基液体备用。

转染前24h,取适当的处于对数生长期的细胞消化,用完全培养基重悬后将数量合适的细胞接种至6孔板中(大约为 5×10^5 个/孔),保证细胞在孔中分布均匀。转染前30min,吸管吸去培养皿中原有液体,加入新鲜的DMEM培养基,要求不含有抗生素及血清。根据分组配制慢病毒转染液,加入相应培养孔中,轻轻晃动混匀,置37℃,5%CO₂、饱和湿度下继续进行培养。4~6h后吸管吸去培养皿中原有液体,培养箱中继续孵育24~48h。

1.1.2 主要试剂:DMEM、反转录试剂盒、ECL试剂盒均由美国Thermo公司生产;兔抗人EMT抗体试剂盒购自美国Cell Signaling公司;Lipofectamine™2000购自美国Invitrogen公司;30%丙烯酰胺购自中国上海Takara公司产品;Tris-HCl(pH值8.8、pH值6.8)为中国康为世纪公司产品;Marigel基质胶购自美国BD公司;2×SYBR Green实时定量PCR预混合溶液购自美国Biorworld公司;Transwell小室购自美国Corning公司;鼠抗人β-Tubulin购自美国Santa Cruz公司;RNA抽提Trizol试剂由Takara中国大连有限公司生产;胎牛血清购自美国Gibco公司;PVDF膜购自美国Millipore公司;引物合成购自南京金斯瑞生物科技有限公司;鼠抗人ALKBH5抗体购自美国Sigma公司。

1.1.3 纳入病例:本实验采集2016年1月—2020年1月江苏大学附属武进医院收治的50例

肝癌患者的肝癌组织,所有患者均签署知情同意书。纳入标准:在本科进行手术治疗者,手术病理结果为肝细胞癌者;术前预计生存时间大于 3 月者。排除标准:已接受肝癌手术治疗者;已接受肝动脉化疗栓塞术(TACE)治疗或化疗者;合并其他恶性肿瘤疾病者。具体实施计划、方案经医院伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR): 细胞 RNA 提取的步骤参考 Trizol 试剂说明书,随后进行 PCR 建立实时扩增曲线。qRT-PCR 反应条件:98 °C 预变性 30 s;98 °C 变性 10 s;56 °C 退火 30 s;72 °C 延伸 10 s,所有步骤 40 个循环,合成产物置于冰上保存。ALKBH5 上游引物序列 5'-CACATCCTGGAAGGCAGCAA-3',下游引物序列 5'-CCCCCAAAGTGGTGTATCC-3'。GAPDH 上游引物序列 5'-TGGGGAAGGTGAAGGTCGG-3',下游引物序列 5'-CTGGAAGATGGTGATGGGA-3'。本实验将目的基因表达量作为 1,数据结果用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示,GAPDH 作为内参,所有样品均有复孔,3 次独立实验。

1.2.2 蛋白质免疫印迹(Western blot):转染 48 h 后收集对照组与实验组细胞,100 °C 煮沸 10 min,12 000 转/min 离心 5 min。10% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),分离后的蛋白质在低温调节为 300 mA 电流移动黏附到膜上;转膜 2 h 后,将膜取出,常温下 5% 脱脂牛奶封闭 1 h,洗膜缓冲液(TBST)洗膜 2 次,根据分子量切下目标蛋白所处膜,一抗 4 °C 孵育过夜;洗膜 3 次完成后,常温下二抗孵育 1 h,结束后洗膜 3 次。滤纸吸干所有液体,滴上适量 ECL 发光液涂抹均匀,拍照、显影、储存。

1.2.3 Transwell 迁移及侵袭实验:对照组和实验组细胞分别转染相应质粒,48 h 后以 0.25% 胰蛋白酶消化,磷酸盐缓冲液(PBS)洗 2 次,600 转/min 离心 4 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 1×10^6 细胞种入 Transwell 小室上层(迁移实验不含基质胶,侵袭实验含有基质胶),小室下层加入 500 μ L 含血清的 DMEM,置于细胞培养箱孵育。36 ~ 48 h 后将小室取出,吸尽培养基,将小室于 4% 多聚甲醛固定 20 min,结晶紫染色 30 min,观察拍照,计数细胞迁移数,结果取平均值。

1.2.4 免疫组化:切片烤片并脱蜡,柠檬酸盐修

复抗原封闭,一抗 4 °C 孵育过夜,二抗免疫显色试剂 37 °C 孵育 30 min, DAB 染色,苏木精复染,乙醇去水,中性胶密封,高倍显微镜视野下结合色泽强弱和阳性细胞所占总细胞数百分比实行半定量检测。不着色为 0 分,淡黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,黄褐色则为 3 分;阳性细胞数 < 5% 为 0 分,5% ~ 25% 为 1 分, > 25% ~ 50% 为 2 分, > 50% ~ 75% 为 3 分, > 75% ~ 100% 为 4 分。评分相乘作为分组标准,0 分为阴性,1 ~ 4 分为弱阳性,5 ~ 8 分为阳性,9 ~ 12 分为强阳性。

1.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism 5 进行统计学分析,实验所得数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,临床病理特征分析行 Fisher's 确切概率法,独立样本行 *t* 检验,组间比较行单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ALKBH5 蛋白水平与肝癌患者临床病理特征的关系

根据免疫组化半定量将标本分为高表达组(阳性和强阳性)、低表达组(阴性和弱阳性)。ALKBH5 表达与临床分期、肿瘤分化程度存在相关性($P < 0.05$),与血清甲胎蛋白(AFP)水平、肿瘤大小、年龄、性别均无相关性($P > 0.05$),见表 1。

表 1 ALKBH5 蛋白水平与肝癌患者临床病理特征的关系

临床病理因素	ALKBH5 蛋白表达		<i>P</i>	
	高(<i>n</i> = 21)	低(<i>n</i> = 29)		
年龄	< 60 岁	7	12	0.768 5
	≥ 60 岁	14	17	
性别	男	12	17	1.000 0
	女	9	12	
肿瘤大小	< 5 cm	16	17	0.237 8
	≥ 5 cm	5	12	
血清甲胎蛋白	< 25 ng/mL	10	10	0.392 7
	≥ 25 ng/mL	11	19	
分化程度	高分化	14	6	0.001 5
	中低分化	7	23	
TMN 分期	I、II 期	14	10	0.043 8
	III、IV 期	7	19	

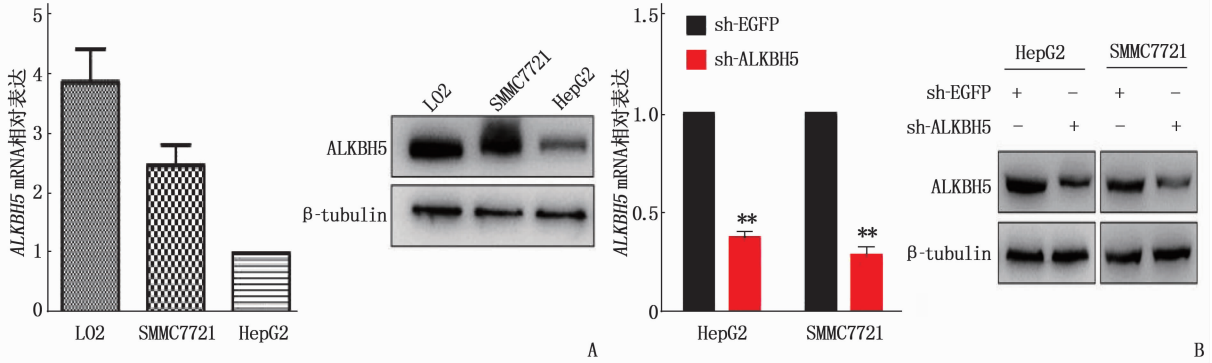
2.2 ALKBH5 在肝癌细胞中的表达及获得稳定低表达细胞株

qRT-PCR 结果显示,在肝癌细胞系 HepG2、SMMC7721 中,ALKBH5 mRNA 相对表达量分别为 1、(2.47 ± 0.35);人正常肝细胞 LO2 中

ALKBH5 mRNA 相对表达量为 (3.87 ± 0.55)。Western blot 检测结果见图 1A。

为了获得稳定低表达的细胞株, 将已感染慢病毒的细胞用高浓度嘌呤霉素筛选, 后将存活的细胞以低浓度嘌呤霉素维持培养至对数生长期, 收获蛋白质及总 RNA。HepG2 和 SMMC7721 细

胞实验组 (sh-ALKBH5) ALKBH5 蛋白质水平低于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); HepG2 和 SMMC7721 细胞干扰组 ALKBH5 mRNA 水平分别为 (0.38 ± 0.03)、(0.29 ± 0.04), 均低于对照组 (sh-EGFP), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 干扰效果明显。见图 1B。



A: ALKBH5 在肝癌细胞中的表达情况; B: ALKBH5 在肝癌细胞中敲低效率验证。与对照组比较, ** $P < 0.01$ 。

图 1 在肝癌细胞中 ALKBH5 mRNA 表达和 ALKBH5 蛋白表达

2.3 下调 ALKBH5 基因促进 HepG2 和 SMMC7721 细胞迁移、侵袭

Transwell 迁移试验显示, HepG2 细胞中对照组和实验组的每高倍镜视野 (200 倍) 下穿透细胞数为 (123 ± 22)、(335 ± 21) 个; SMMC7721 细胞中对照组和实验组的每高倍镜视野 (200 倍) 下穿透细胞数为 (220 ± 27)、(453 ± 23) 个。Transwell 侵袭试验显示, HepG2 细胞中对照组和实验组的穿透细胞数为 (118 ± 29)、(282 ± 17) 个; SMMC7721 细胞中对照组和实验组的穿透细胞数为 (200 ± 11)、(388 ± 20) 个, 2 组间差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 2。由此表明, 下调 ALKBH5 基因, 肝癌细胞 HepG2 和 SMMC7721 细胞迁移和侵袭能力受到促进。

2.4 下调 ALKBH5 基因促进 HepG2 和 SMMC7721 细胞上皮间质转化 (EMT)

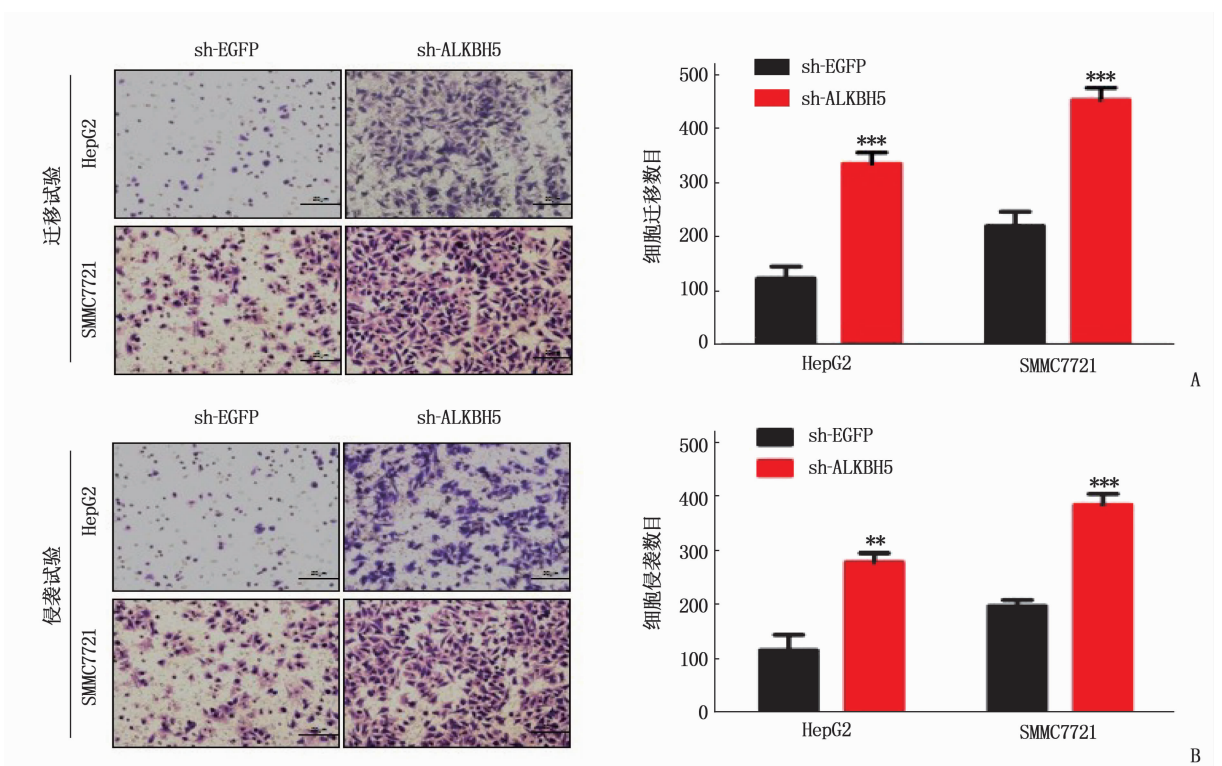
下调 ALKBH5 表达水平后, Western blot 检测结果显示, 上皮表型标志物 E-cadherin 蛋白表达水平降低, 间质表型标志物 Vimentin、Snail 蛋白表达水平增高, 说明下调 ALKBH5 表达水平促进了肝癌细胞的 EMT。见图 3。

3 讨论

N6-甲基腺嘌呤修饰是众多转录后调控事件的一种, 与其他 RNA 修饰相比, 动态可逆性调控使其具有独特的生物学功能^[6]。最新的 m6A 修饰测序技术^[7-9]发现, 大量 m6A 修饰位于长链的

外显子和终止密码子附近, m6A 修饰和其他 mRNA 转录后的加工修饰过程类似, 如剪接除去内含子、3'-端加上多聚核苷酸、5'-端加上 m⁷GTP 的结构等, 均是通过 m6A 甲基转移酶复合物来实现转录后的修饰^[10]。m6A 修饰的调控是通过一些被称为“书写器” (writer) 的甲基转移酶, 如甲基转移酶样 3 (METTL3)、Wilms' 肿瘤蛋白 1 相关蛋白 (WTAP) 和甲基转移酶样 14 (METTL14), 一些被称为“擦除器” (eraser) 的脱甲基酶, 如脂肪量和肥胖相关基因 (FTO) 和 ALKBH5, 以及一些被称为“阅读器” (reader) 的识别蛋白, 如 YTH 结构域 m6A RNA 结合蛋白 1 (YTHDF1)、YTH 结构域 m6A RNA 结合蛋白 2 (YTHDF2), 以实现动态可逆的平衡^[11]。研究^[12-15]显示, 参与 m6A 修饰的各种元件一直被认为和癌症的发病有密切关系, 如 WTAP 是白血病的一个关键性抗原; FTO 基因突变会增高结直肠癌、子宫内膜癌、胃癌的发病风险, 前列腺癌、乳腺癌、胰腺癌的发生也与 FTO 等位基因的变异有直接关系; METTL3 的磷酸化作用可以导致细胞 DNA 损伤和肿瘤形成。近年来研究^[16]指出, m6A 修饰在癌症的初始阶段和转移复发过程中扮演了非常重要的角色。

ALKBH5 作为 m6A 修饰中非常重要的一个元件, 与多种肿瘤的临床预后有关, 通过不同的分子机制影响肿瘤进程。研究^[17]发现, ALKBH5 过表达能够降低干性基因胚胎干细胞关键因子 (NANOG) mRNA 甲基化的水平, 增加 NANOG 的



A: Transwell 实验检测下调 *ALKBH5* 对 HepG2 和 SMMC7721 细胞迁移能力的影响; B: Transwell 实验检测下调 *ALKBH5* 对 HepG2 和 SMMC7721 细胞侵袭能力的影响。与 sh-EGFP 比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 2 下调 *ALKBH5* 对 HepG2 和 SMMC7721 细胞迁移、侵袭能力的影响

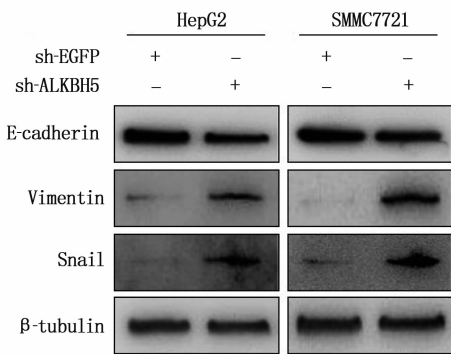


图 3 下调 *ALKBH5* 对 HepG2 和 SMMC7721 细胞 EMT 相关蛋白表达的影响

本研究发现,肝癌中 *ALKBH5* 蛋白表达与分化程度、临床分期存在负相关,与性别、年龄、肿瘤大小、血清 AFP 水平均无相关性,提示 *ALKBH5* 与肝癌的临床预后密切相关; *ALKBH5* 在 2 种肝癌细胞株中差异性表达,且显著低于正常肝细胞 LO2。本研究分别选择 2 种不同的肝癌细胞系 (HepG2 和 SMMC7721 细胞) 进行基因沉默实验,以探讨 *ALKBH5* 对肝癌细胞的影响;在此基础上,进一步检测了细胞迁移、侵袭能力变化。结果表明,抑制 *ALKBH5* 表达, HepG2 和 SMMC7721 细胞的迁移和侵袭能力显著增强,说明 *ALKBH5* 对于肝癌的迁移、侵袭作用有显著影响,但其具体作用机制仍然不清楚。

EMT 是一个特有过程,上皮细胞经过一系列的分子生物改变,逐渐失去排列极性、细胞与细胞间存在紧密连接、附着力等特征,由不能移动的上皮细胞转变成为具有迁移、侵袭的能力的间质细胞。EMT 是肿瘤转移过程中的重要限速环节,在肿瘤的侵袭和转移进程中发挥重要作用^[20]。本研究表明,下调 *ALKBH5* 表达水平后,上皮表型标志物 E-cadherin 蛋白表达水平降低,间质表型标志物 Vimentin、Snail 蛋白表达水平增高。E-cadherin 的主要功能是维持上皮细胞形态完整性,其

表达以及乳腺癌干细胞的丰度,诱导缺氧表型的发生;在乳腺癌干扰 *ALKBH5* 的水平后,裸鼠体内肿瘤形成的能力明显减弱^[17]。另一研究^[18]发现, *ALKBH5* 高表达与脑恶性胶质患者的临床预后有关, *ALKBH5* 通过提高叉头框转录因子 M1 (*FoxM1*) 起始区域内去甲基化水平,增高了 *FoxM1* 转录后表达,诱导了胶质母细胞瘤的干性, *ALKBH5-FoxM1* 轴在增殖及体内成瘤过程中发挥关键性的作用。在胰腺癌中, *ALKBH5* 可作用于 LncRNA *KCNK15-AS1*, 进而抑制肿瘤细胞的迁移能力^[19], 但其对肝癌细胞的影响及作用的相关报道较少。

是存在于人和动物上皮的一种钙依赖性细胞黏附分子; E-cadherin 可以在多个环节影响肿瘤侵袭转移, 表达减少或缺失可导致细胞失去原有的形态, 细胞间相互融合能力下降, 进而移动性增加; 在上皮性肿瘤中, 突破上皮和基底膜的限制, 通过内渗进入周围组织细胞转移或侵入淋巴管血管, 这些血液循环肿瘤细胞到达目的区域后, 借助间质上皮过程完成侵略过程, 故 E-cadherin 是防止肿瘤向恶性转化、发生侵袭转移的一种保护性因子^[21]。Snail 在病理状态 (尤其是癌症中) 常呈现过度表达状态, 研究^[22]发现, Snail 的核转运参与调节 EMT, 可以特异性识别 E-cadherin 的启动子区域后结合, 在转录水平抑制其表达, 继而启动 EMT。同时, Snail 可以联合 SMAD 同源物 3/SMAD 同源物 4 (Smad3/Smad4) 影响蛋白激酶 B (AKT) 与 E-cadherin 结合, 表达水平受到核转录因子- κ B (NF- κ B)、转化生长因子- β /Smad (TGF- β /Smad)、磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)、糖原合酶激酶-3 (GSK-3 β) 等多条复杂的信号通路调节, 并促进肿瘤细胞的迁移、侵袭和转移。本研究未探讨 ALKBH5 抑制 EMT 过程的信号通路及具体机制, 还需进一步深入研究。

综上所述, ALKBH5 与临床预后密切相关, 且能够显著抑制肝癌细胞迁移、侵袭及 EMT, 提示 ALKBH5 作为一种抑癌基因参与肝癌的发生发展过程, 但其具体分子机制有待进一步研究。同时, 通过靶向药物来逆转肝癌细胞的转移复发有望为肝癌治疗提供新思路。

参考文献

[1] 徐嘉庆, 李锦貌. 肿瘤相关中性粒细胞与肝癌发展的相关性研究进展[J]. 实用临床医药杂志, 2021, 25(13): 129-132.

[2] 应倩, 汪媛. 肝癌流行现状和趋势分析[J]. 中国肿瘤, 2020, 29(3): 185-191.

[3] 李友炳, 江家骥. 原发性肝癌系统治疗新进展[J]. 肝脏, 2021, 26(4): 349-352.

[4] LIANG T B. Progress and perspectives on adjuvant therapy after curative resection of hepatocellular carcinoma[J]. Zhonghua Wai Ke Za Zhi, 2021, 59(10): 801-806.

[5] SUN D Y, YANG H, FAN L M, et al. m6A regulator-mediated RNA methylation modification patterns and immune microenvironment infiltration characterization in severe asthma[J]. J Cell Mol Med, 2021, 25(21): 10236-10247.

[6] ZHOU Y, YANG J, TIAN Z, et al. Research progress concerning m6A methylation and cancer[J]. Oncol Lett, 2021, 22(5): 775.

[7] DOMINISSINI D, MOSHITCH-MOSHKOVITZ S, SCHWARTZ S, et al. Topology of the human and mouse m6A RNA

methylomes revealed by m6A-seq[J]. Nature, 2012, 485(7397): 201-206.

- [8] MEYER K D, SALETTORE Y, ZUMBO P, et al. Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3'UTRs and near stop codons[J]. Cell, 2012, 149(7): 1635-1646.
- [9] SCHWARTZ S, AGARWALA S D, MUMBACH M R, et al. High-resolution mapping reveals a conserved, widespread, dynamic mRNA methylation program in yeast meiosis[J]. Cell, 2013, 155(6): 1409-1421.
- [10] GAN H L, HONG L, YANG F L, et al. Progress in epigenetic modification of mRNA and the function of m6A modification[J]. Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao, 2019, 35(5): 775-783.
- [11] LIU X D, WANG H Y, LIU B C, et al. The latest research progress of m6A modification and its writers, erasers, readers in infertility: a review[J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 681238.
- [12] YANG L L, ZHAO R R, JIANG R Y, et al. The expression of WTAP gene in acute myeloid leukemia and its clinical significance[J]. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi, 2021, 29(3): 653-660.
- [13] MELSTROM L, CHEN J J. RNA N6-methyladenosine modification in solid tumors: new therapeutic frontiers[J]. Cancer Gene Ther, 2020, 27(9): 625-633.
- [14] WEI H, LI Z, LIU F, et al. The role of FTO in tumors and its research progress[J]. Curr Med Chem, 2022, 29(5): 924-933.
- [15] MAITY A, DAS B. N6-methyladenosine modification in mRNA: machinery, function and implications for health and diseases[J]. FEBS J, 2016, 283(9): 1607-1630.
- [16] ZHOU Y, YANG J, TIAN Z, et al. Research progress concerning m6A methylation and cancer[J]. Oncol Lett, 2021, 22(5): 775.
- [17] ZHANG C Z, SAMANTA D, LU H Q, et al. Hypoxia induces the breast cancer stem cell phenotype by HIF-dependent and ALKBH5-mediated m6A-demethylation of NANOG mRNA[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2016, 113(14): E2047-E2056.
- [18] ZHANG S C, ZHAO B S, ZHOU A D, et al. m6A demethylase ALKBH5 maintains tumorigenicity of glioblastoma stem-like cells by sustaining FOXM1 expression and cell proliferation program[J]. Cancer Cell, 2017, 31(4): 591-606. e6.
- [19] HE Y, HU H, WANG Y D, et al. ALKBH5 inhibits pancreatic cancer motility by decreasing long non-coding RNA KCNK15-AS1 methylation[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 48(2): 838-846.
- [20] BABAIE G, AZIZ S G G, JAGHI N Z Z. EMT, cancer stem cells and autophagy; The three main axes of metastasis[J]. Biomed Pharmacother, 2021, 133: 110909.
- [21] 贾皓, 张璐, 任莉, 等. EMT 分子标志物在肝癌细胞系中的表达及其意义[J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2019, 40(4): 537-541.
- [22] MUQBIL I, WU J, ABOUKAMEEL A, et al. Snail nuclear transport: the gateways regulating epithelial-to-mesenchymal transition[J]. Semin Cancer Biol, 2014, 27: 39-45.