

ALKBH5介导m6A修饰调控Galectin-9促进异位内膜基质细胞侵袭、迁移与增殖的机制研究



王芳¹, 刘恒炜², 梁嘉欣², 王细文²

1. 新疆维吾尔自治区职业病医院妇产科 (乌鲁木齐 830052)

2. 武汉大学中南医院妇科 (武汉 430071)

【摘要】目的 探讨 ALKBH5 对 Galectin-9 的 m6A 修饰作用在子宫内膜基质细胞 (endometrial stromal cells, ESCs) 侵袭、迁移和增殖过程中的潜在影响。**方法** 收集 20 例正常子宫内膜 (normal endometrium, NC) 组织及 20 例子宫内膜异位症患者异位子宫内膜 (ectopic endometrium, EC) 组织, 使用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)、Western blot 及免疫组织化学法检测 ALKBH5 和 Galectin-9 在组织中的表达。同时收集正常增生期子宫内膜组织 10 例并提取原代 ESCs, 通过生物信息学分析、甲基化 RNA 免疫共沉淀 (MeRIP)、RNA 免疫共沉淀 (RIP) 实验探究 ALKBH5 调控 Galectin-9 m6A 水平和 mRNA 表达的作用机制。过表达 ALKBH5 后, 通过 Transwell、细胞计数试剂盒 8 (CCK-8) 法测定各组 ESCs 细胞增殖、迁移、侵袭能力, 研究 ALKBH5 对 ESCs 侵袭、迁移和增殖的影响。**结果** 与 NC 组织相比, EC 组织中 ALKBH5 和 Galectin-9 表达升高 ($P < 0.05$)。过表达 ALKBH5 能够降低 Galectin-9 的 m6A 修饰水平, 增强 Galectin-9 mRNA 的稳定性和表达。过表达 ALKBH5 能够促进 ESCs 侵袭迁移和增殖, 而使用 siRNA 沉默 Galectin-9 可有效逆转 ALKBH5 介导的 ESCs 细胞侵袭、迁移和增殖 ($P < 0.05$)。**结论** ALKBH5 通过降低 Galectin-9 m6A 修饰水平, 上调 Galectin-9 mRNA 表达, 从而促进 ESCs 侵袭、迁移与增殖。

【关键词】 子宫内膜异位症; m6A 修饰; ALKBH5; Galectin-9; 侵袭

Mechanism of ALKBH5 mediated m6A regulation of Galectin-9 in the invasion, migration, and proliferation of endometrial stromal cell

WANG Fang¹, LIU Hengwei², LIANG Jiaxin², WANG Xiwen²

1. Department of Gynecology and Obstetrics, Xinjiang Uygur Autonomous Region Occupational Disease Hospital, Urumqi 830052, China

2. Department of Gynecology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China

Corresponding author: WANG Xiwen, Email: tjhwliu@163.com

DOI: 10.12173/j.issn.1004-5511.202404015

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (82001524); 湖北省自然科学基金 (2020CFB310); 新疆维吾尔自治区自然科学基金 (2021D01A165)

通信作者: 王细文, 博士, 副主任医师, Email: tjhwliu@163.com

yxxz.whuznhmedj.com

【Abstract】Objective To investigate the potential role of ALKBH5-mediated m6A modification of Galectin-9 in the invasion, migration, and proliferation of endometrial stromal cells (ESCs) in endometriosis. **Methods** A total of 20 normal endometrial (NC) specimens and 20 ectopic endometrial (EC) specimens from patients with endometriosis were obtained. The expression of ALKBH5 and Galectin-9 in tissues was detected using immunohistochemistry, qRT-PCR and Western blot. In addition, 10 cases of normal proliferative endometrial tissues were collected and primary ESCs were extracted, and the mechanism of ALKBH5 in regulating the level and mRNA expression of Galectin-9 m6A was investigated by bioinformatics analysis, methylated RNA immunoprecipitation (MeRIP), and RIP assay. After ALKBH5 overexpression, the proliferation, migration, and invasion abilities of ESCs were determined by Transwell and cell counting kit-8 (CCK-8) assays. The effect of ALKBH5 on ESCs invasion, migration, and proliferation was investigated. **Results** Compared with NC tissues, the expression of ALKBH5 and Galectin-9 was increased in EC tissues from patients with endometriosis ($P<0.05$). ALKBH5 overexpression could reduce the m6A modification level of Galectin-9 and enhance the stability and expression of Galectin-9 mRNA. ALKBH5 overexpression promoted the invasion, migration, and proliferation of ESCs, while Galectin-9 knockdown partially reversed the promoting effect of ALKBH5 overexpression on ESCs invasion, migration, and proliferation ($P<0.05$). **Conclusion** ALKBH5 promotes ESCs invasion, migration, and proliferation by promoting Galectin-9 mRNA expression via reducing m6A modification.

【Keywords】 Endometriosis; m6A modification; ALKBH5; Galectin-9; Invasion

子宫内膜异位症 (endometriosis, EMs), 作为育龄期女性常见的慢性疾病之一, 其病理生理机制涉及复杂的分子网络和调控通路^[1-2]。随着近年来 RNA 修饰研究的不断深入, m6A 修饰作为 RNA 甲基化修饰的重要形式, 已逐渐成为生物学领域的研究热点^[3]。作为 m6A 去甲基化酶的关键成员, ALKBH5 通过调控 RNA 的 m6A 修饰水平, 在细胞功能调控和疾病进程中发挥着重要作用^[4]。Galectin-9, 作为一种多功能半乳糖苷结合蛋白, 具有广泛的生物学效应, 它广泛参与调控细胞增殖、凋亡、黏附及侵袭等生物学过程, 并在多种疾病的发生发展中扮演关键角色^[5]。在 EMs 中, Galectin-9 的表达水平显著升高, 提示其可能与疾病的进展和预后密切相关^[6-8]。然而, 关于 Galectin-9 在 EMs 中的具体作用机制, 尤其是其与 m6A 修饰的关系, 目前尚缺乏深入的研究。鉴于此, 本研究旨在探究 ALKBH5 介导 m6A 修饰调控 Galectin-9 表达影响 EMs 进展的作用机制, 为 EMs 发展的分子机制提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 临床样本

本研究纳入 2021 年 9 月至 2023 年 12 月于武汉大学中南医院妇产科就诊的患者。纳入标准: ①育龄女性, 月经周期规律, 术前 6 个月内无妊娠; ②未接受激素治疗, 无刮宫术病史; ③未放置宫内避孕器。排除标准: ①近 6 个月内接受过激素类药物治疗; ②生殖器官发育不良或有其他盆腔病理改变; ③合并严重感染、出血、发热等症状; ④合并严重心、肝、肾、肺或血液、内分泌系统疾病; ⑤合并高血压、糖尿病、自身免疫性疾病、恶性肿瘤或其他慢性疾病。行宫腔镜检查时, 收集 20 例单纯性输卵管性不孕患者正常子宫内膜 (normal endometrium, NC) 样本组织; 对超声诊断有巧克力囊肿的 EMs 患者, 行腹腔镜手术期间收集 20 例异位子宫内膜 (ectopic endometrium, EC) 组织样本。另取正常增生期子宫内膜组织 10 例提取相应原代

子宫内膜基质细胞 (endometrial stromal cells, ESCs)。根据患者报告的末次月经日期推测及标本取下后的组织病理学验证,所有样本均在患者月经周期的增生期采集。所有患者均提前被告知可能出现的风险及注意事项,并签署知情同意书。本研究获得武汉大学中南医院伦理委员会批准(科伦预批 2020070)。所收集临床样本分为两部分处理,一部分浸泡于 4% 多聚甲醛中,并将剩余部分迅速置于液氮中,30 min 内送回实验室进行进一步研究。

1.1.2 实验试剂

胎牛血清(四季青); IV 型胶原酶(美国 Gibco 公司); DMEM/F12 培养基(武汉普诺赛生物公司); Lipofectamine TM3000(美国 Invitrogen 公司); 青霉素-链霉素混合溶液、RIPA 蛋白裂解液、BCA 蛋白定量检测试剂盒、0.25 胰酶消化液(武汉碧云天公司); RNA 免疫共沉淀试剂盒、甲基化 RNA 免疫共沉淀试剂盒(中国伯信生物公司)、PGL3-CMV-LUC-MCS 质粒套装(典君生物公司)、放线菌素 D 粉剂(美国 Selleck 生物公司)、TRIZol 试剂及 RT-qPCR 试剂盒 Mon AmpSYBR Green qPCR Mix(北京擎科生物科技有限公司); HiScript III RT SuperMix 试剂盒(南京诺唯赞生物公司); m6A、ALKBH5 (#16837-1-AP)、Galectin-9 (#17938-1-AP)、Vimentin (#10366-1-AP)、E-cadherin (#20874-1-AP)、 β -actin 抗体 (#66009-1-Ig) 和山羊抗兔 IgG 二抗 (#SA00001-2)(武汉 ProteinTech 公司); Western Blot 一抗稀释液(中国 Biosharp 公司, #BL1060A); 10% PAGE 凝胶试剂盒及 ECL 化学发光底物(上海雅酶生物科技有限公司); PVDF 膜(美国 Millipore); Transwell 小室(美国 Corning 公司); 荧光定量 PCR 机(CFX Connect)(美国 Bio-Rad 公司); 梯度 PCR 仪(ABI Veriti 96well)(美国 Applied Biosystems 公司); 多功能酶标仪(美国 PerkinElmer 公司); 电泳仪和凝胶成像分析仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 原代子宫内膜基质细胞培养

原代人类 ESCs 从正常子宫内膜组织中获取并纯化。将新鲜子宫内膜剪切成 1 mm 大小碎片,然后在 37 ℃、200 转/min 的摇床培养箱中用胶原酶 II (Sigma Aldrich, 中国上海) 消化 1 h。之

后,分别通过 150 μ m 及 37.4 μ m 筛网过滤,留下 ESCs 和红细胞。使用红细胞裂解缓冲液(Beyotime, 中国上海)去除红细胞。最后,通过 120 x g 离心 5 min 纯化 ESCs,随后将其培养在含有 10% 胎牛血清(FBS)(Gibco, 美国加利福尼亚州)和 1% 抗生素(Beyotime, 中国上海,含 100 U $\cdot$ mL⁻¹ 青霉素和 100 μ g $\cdot$ mL⁻¹ 链霉素)的 DMEM/F12 培养基(Gibco, 美国加利福尼亚州)中,培养条件为 37 ℃、5% CO₂ 的湿度。

1.2.2 细胞免疫化学方法鉴定细胞纯度

采用常规方法制备 ESCs 爬片,先经 4% 多聚甲醛固定,再用预冷 PBS 清洗 3 次,并在含 Triton-X100 的 PBS 中渗透。将爬片转移至载玻片,加入内源性过氧化物酶阻断溶液,清洗后添加 10% 胎牛血清孵育。移除血清后,加入 E-cadherin 及 Vimentin 一抗进行孵育,4 ℃下孵育过夜。次日清洗,清洗后加 DAB 显色液,显微镜下观察并记录。

1.2.3 实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应(qRT-PCR)

组织及细胞总 RNA 提取过程参照北京擎科生物科技有限公司提供的 TRIzol 操作指南进行。测定 RNA 的 A260/280 值。使用逆转录试剂盒逆转录成 cDNA 后行 qRT-PCR 检测目的基因表达。反应条件: 50 ℃持续 2 min; 95 ℃预变性,持续 2 min; 95 ℃变性 15 s; 60 ℃退火延伸 30 s,共 40 个循环。使用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法计算目的 mRNA 的表达,实验独立重复 3 次。本研究所使用引物均由北京擎科生物有限公司设计、合成。引物序列见表 1。

表1 qRT-PCR引物序列

Table 1. The primer sequence of qRT-PCR	
基因名称	引物序列
ALKBH5	上游: GCCGCCGAACCTTACCCTGTG
	下游: CCTTCTCAGCGCGGGACACCA
Galectin-9	上游: TCTGGGACTATTCAAGGAGGTC
	下游: CCACTGGAGCTGAGAACGG
β -actin	上游: AGCGAGCATCCCCAAAGTT
	下游: GGGCACGAAGGCTCATCATT

1.2.4 Western blot检测

使用 RIPA 裂解液对细胞和组织进行充分裂解,并使用 BCA 蛋白测定试剂盒测定总蛋白质

浓度。使用 12% SDS-PAGE 凝胶对每个处理组样品中的总蛋白 (30 μg /泳道) 进行电泳分离, 然后转印至 PVDF 膜。将载有目的蛋白的 PVDF 膜用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h。然后在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下与 ALKBH5 (1:1 000 稀释), Galectin-9 (1:1 000 稀释) 和 β -actin (1:5 000 稀释) 一抗孵育过夜。用含 0.1% Tween 20 的 Tris 缓冲盐溶液 (TBST) 洗涤三遍后, 在室温下孵育二抗 1 h。使用 ECL 显影和凝胶成像可视化目标蛋白条带。 β -actin 作为内参。

1.2.5 细胞增殖能力检测 (CCK-8)

将 ESCs 细胞转染后经消化重悬为单细胞悬液, 接种至 96 孔板上, 接种密度为 5×10^3 个/孔, 每孔 100 μL 细胞悬液。分别于 0、24、48 及 72 h 后进行 CCK-8 检测。加入 40 μL CCK-8 试剂, 避光培养 4 h 后, 使用酶标仪于 490 nm 波长处测定 OD 值, 进行统计学分析。

1.2.6 细胞转染

参照操作手册, 使用 Lipofectamine TM3000 分别将 ALKBH5 过表达质粒 (OV-ALKBH5)、空载质粒载体以及 Galectin-9 siRNA 转染入 ESCs, 最终浓度为 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。48 h 后收集细胞, 用于后续研究。siRNA 干扰 Galectin-9 序列 (Galectin-9 siRNA)、ALKBH5 过表达质粒及空载质粒载体购自上海吉凯生物科技有限公司。

1.2.7 细胞侵袭实验

侵袭实验前, 在上室预铺 50 μL Matrigel 基质胶 ($2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育至少 1 h。ESCs 经消化后, 用无血清 DMEM/F12 培养基混匀。计数后, 将细胞浓度设定为 1×10^6 个/mL。随后上室添加 200 μL 细胞悬液, 下室添加 500 μL 含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养基。37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 24 h 后取出小室。用 PBS 清洗小室, 用甲醛固定后使用 0.1% 结晶紫染色 15 min, 并在倒置显微镜下观察并采集图像。

1.2.8 甲基化 RNA 免疫共沉淀实验

采用广州博信生物技术有限公司提供的 MeRIP 试剂盒进行甲基化 RNA 免疫共沉淀 (methylated RNA immunoprecipitation-quantitative PCR, MeRIP-qRT-PCR) 实验。ESCs 经过处理后, 按照前述方法提取细胞 RNA。采用超声波法将提取的 RNA 片段化为长约 300 个核苷酸的片段。随后, 向片段化的 RNA 溶液中加入抗 IgG

抗体 (伯信生物, 4 μg) 或抗 m6A 抗体 (伯信生物, 4 μg), 并在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 4 h 进行免疫共沉淀。向溶液中加入孵育良好的蛋白 A/G 磁珠, 以促进 RNA 的富集。随后使用苯酚-氯仿提取、纯化富集的 RNA, 进行逆转录, 并采用 qRT-PCR 进行定量分析。

1.2.9 RNA 免疫共沉淀

按照伯信生物 RIP 实验试剂盒说明书进行 RNA 免疫共沉淀 (RNA immunoprecipitation, RIP) 操作, 使用 qPCR 对已纯化的 RNA 沉淀复合物进行定量分析。

1.2.10 qPCR 检测 Galectin-9 mRNA 稳定性

使用 $5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 放线菌素 D 将不同处理组的 ESCs 细胞分别处理 0、8、16 和 24 h 后收集细胞样品, 提取总 RNA。随后使用 qPCR 实验检测 Galectin-9 mRNA 表达变化。

1.2.11 免疫组织化学染色

石蜡包埋组织制成 4 μm 切片后, 经脱蜡、水化, 用 pH6.0 枸橼酸钠缓冲液修复抗原, 室温封闭 10 min。随后, 加入 1:200 稀释的 TC-1 一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日, 使用 PBS 冲洗并加入生物素标记的二抗, 室温孵育 1 h。再次 PBS 冲洗后, 加入辣根过氧化物酶标记的链酶亲和素, 室温孵育 10 h。最后, 经 DAB 和苏木素染色, 中性树胶封片。评定结果依据阳性细胞比例与染色强度: 细胞比例 $< 5\%$ 为 0 分, $5\% \sim 25\%$ 为 1 分, $26\% \sim 50\%$ 为 2 分, $51\% \sim 75\%$ 为 3 分, $> 75\%$ 为 4 分; 染色强度未着色为 0 分, 黄色为 1 分, 棕黄色为 2 分, 棕色为 3 分。两者之和 < 2 分为阴性, ≥ 2 分为阳性。光镜下 ($\times 200$) 及光镜下 ($\times 40$) 分别观察免疫组织化学结果, 每项实验至少重复三次。

1.2.12 生物信息学分析

登录 SRAMP 网站 (<http://www.cuilab.cn/sramp>), 选择 “Prediction” 栏目, 将 Galectin-9 mRNA 序列填写后点击 “Submit”, 查询 Galectin-9 mRNA 上潜在的 m6A 修饰位点。

1.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8 软件对实验结果进行统计分析并绘图, 所有数据均以均数和标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。两组间比较采用 Student's *t* 检验, 多组比较采用方差分析 (ANOVA)。 $P < 0.05$

为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 ALKBH5 及Galectin-9 mRNA及蛋白表达

免疫组织化学染色结果显示，与 NC 组织相比，EC 组织中 ALKBH5 及 Galectin-9 的表达均升高（图 1-A）。qRT-PCR 和 Western blot 结果显示，EC 组织的 ALKBH5 及 Galectin-9 的 mRNA 及蛋白表达量显著高于 NC 组织，差异具有统计学意义（ $P < 0.05$ ），详见图 1-B 至图 1-E，表明在 EMs 组织中 ALKBH5 及 Galectin-9 均高表达。

2.2 过表达ALKBH5对子宫内膜基质细胞增殖的影响

首先使用光镜观测原代 ESCs 的形态，并使用免疫细胞化学方法检测上皮细胞表型蛋白（E-cadherin）及间质细胞表型蛋白（Vimentin）来鉴定 ESCs 纯度。结果显示在 ESCs 中，Vimentin 表达强烈，而 E-cadherin 表达强度极低，确认 ESCs 的纯度超过 95%（图 2-A）。qRT-PCR 和 Western blot 结果显示，ALKBH5 过表达组中 ALKBH5 mRNA 和蛋白表达水平显著高于阴

性对照组和空载组（图 2-B、图 2-C）。CCK-8 实验显示过表达 ALKBH5 后，ESCs 的生长速度显著升高（图 2-D），表明 ALKBH5 可以增强 ESCs 的增殖能力。

2.3 过表达ALKBH5对异位内膜基质细胞侵袭、迁移的影响

Transwell 实验结果显示，与阴性对照组及空载组相比，过表达 ALKBH5 后，ESCs 穿过小孔侵袭 / 迁移至下层小室的数量均显著增多（图 3）。

2.4 ALKBH5介导m6A修饰促进Galectin-9蛋白表达

SRAMP 数据库预测 Galectin-9 序列中的 m6A 修饰位点，共发现 63 个位点，其中极高可信度位点 1 个，高可信度位点 27 个（图 4-A）。qRT-PCR 和 Western blot 结果显示，与阴性对照组和空载组相比，ALKBH5 过表达组的 Galectin-9 mRNA 和蛋白表达均显著升高（图 4-B、图 4-C）。MeRIP-qRT-PCR 检测结果显示，Galectin-9 中存在 m6A 修饰，过表达 ALKBH5 后 Galectin-9 的 m6A 修饰水平显著下降（ $P < 0.05$ ）（图 4-D、图 4-E）。在 ESCs 中过

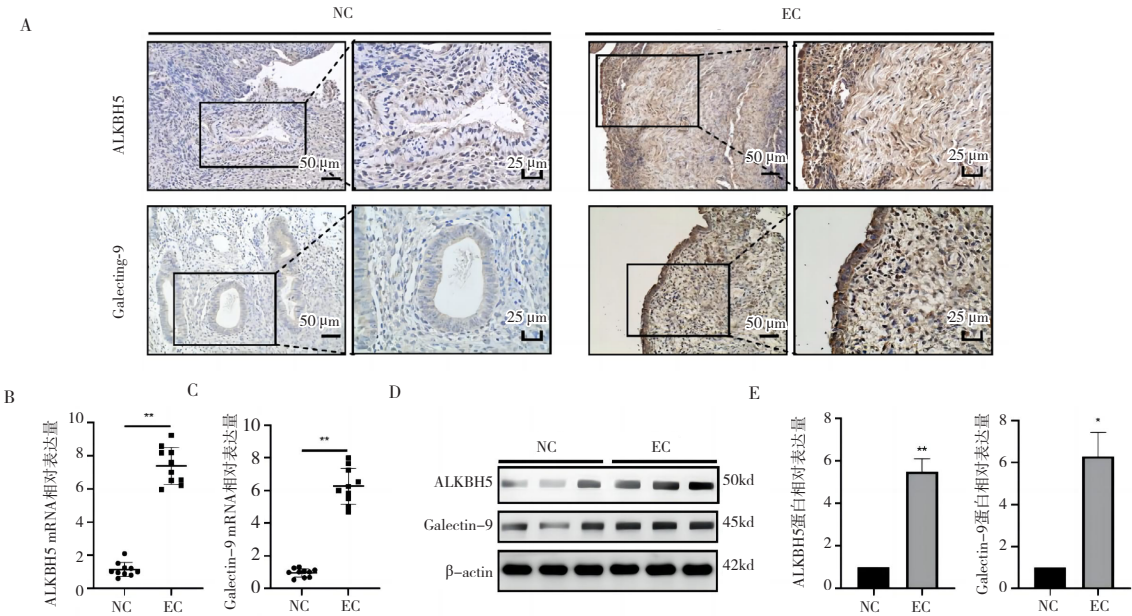


图1 正常子宫内膜组织和异位子宫内膜组织中ALKBH5 及Galectin-9 的表达水平
Figure 1. The expression level of ALKBH5 and Galectin-9 in NC tissue and EC tissue

注：A：免疫组织化学检测ALKBH5及Galectin-9蛋白在不同子宫内膜组织中的表达[放大倍数分别为×200（左图）和×400（右图）]；B：qRT-PCR检测ALKBH5表达；C：qRT-PCR检测Galectin-9 mRNA表达；D：Western blot检测ALKBH5和Galectin-9蛋白表达；E：定量分析ALKBH5及Galectin-9蛋白的两组间表达差异；NC：正常子宫内膜组织；EC：子宫内膜异位症异位子宫内膜组织；* $P < 0.05$ ；** $P < 0.01$ 。

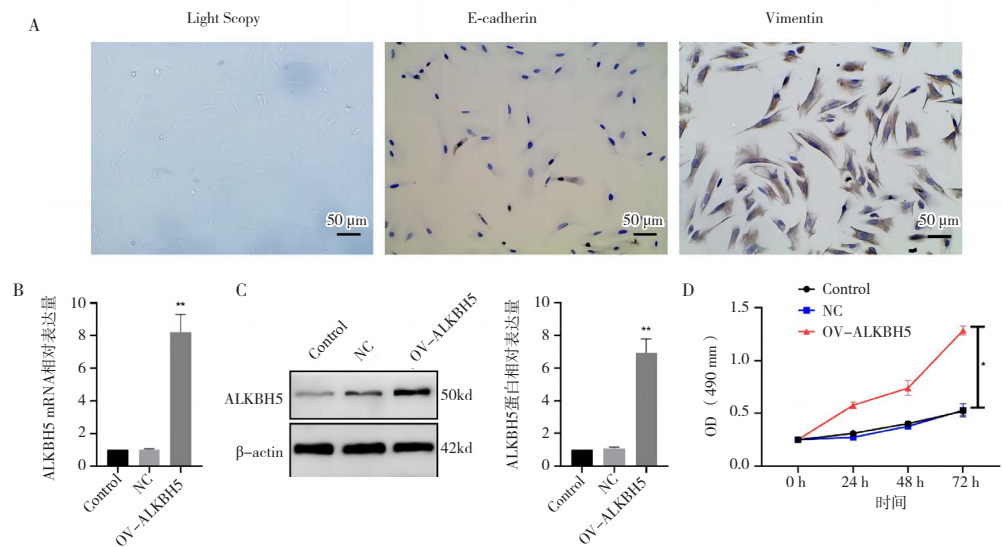


图2 ALKBH5 对子宫内膜基质细胞增殖能力的影响

Figure 2. Effects of ALKBH5 on the proliferation capacity of ESCs

注：A：光镜下观测原代ESCs形态，免疫细胞化学检测原代ESCs中E-cadherin及Vimentin的表达（照片放大倍数为 $\times 200$ ）；B：过表达ALKBH5促进其mRNA表达；C：过表达ALKBH5促进其蛋白表达；D：过表达ALKBH5促进ESCs增殖能力；* $P < 0.05$ ；** $P < 0.01$ 。

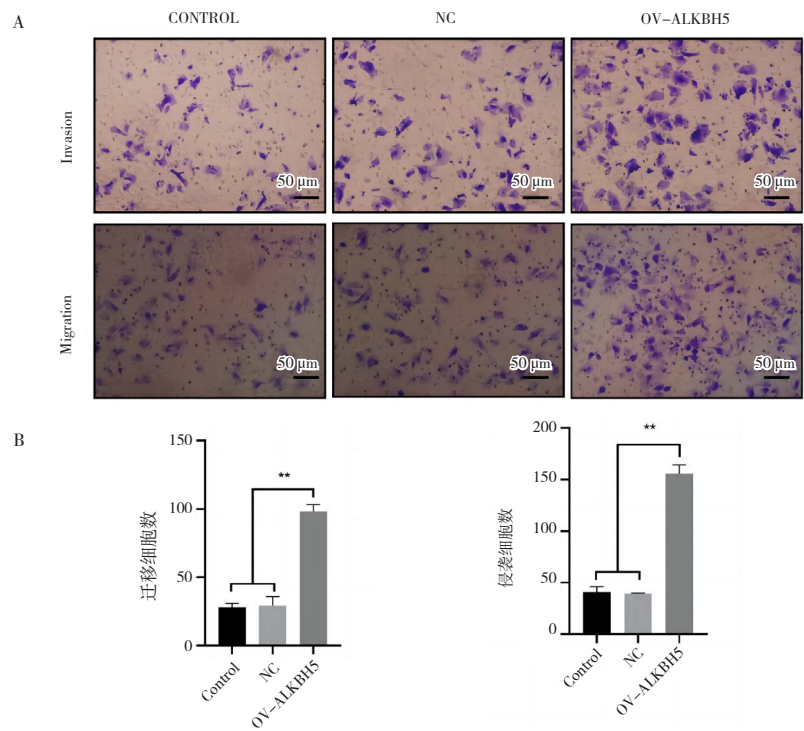


图3 ALKBH5 对子宫内膜基质细胞侵袭和迁移的影响

Figure 3. Effects of ALKBH5 on the invasion and migration of endometrial stromal cells

注：A：Transwell实验检测过表达ALKBH5对ESCs侵袭和迁移能力的影响（照片放大倍数为 $\times 200$ ）；B：定量分析不同组间迁移和侵袭细胞数量；* $P < 0.05$ ；** $P < 0.01$ 。

表达 ALKBH5 后用放线菌素 D 处理指定时间段，检测 Galectin-9 mRNA 稳定性，结果表明与阴性对照组及空载组相比，过表达 ALKBH5 显著增强了 Galectin-9 mRNA 的稳定性（图 4-F）。

2.5 ALKBH5通过Galectin-9介导对子宫内膜基质细胞的侵袭、迁移和增殖的影响

Transwell 实验结果显示，与空载组相比，过表达 ALKBH5 之后，ESCs 的迁移和侵袭能力显

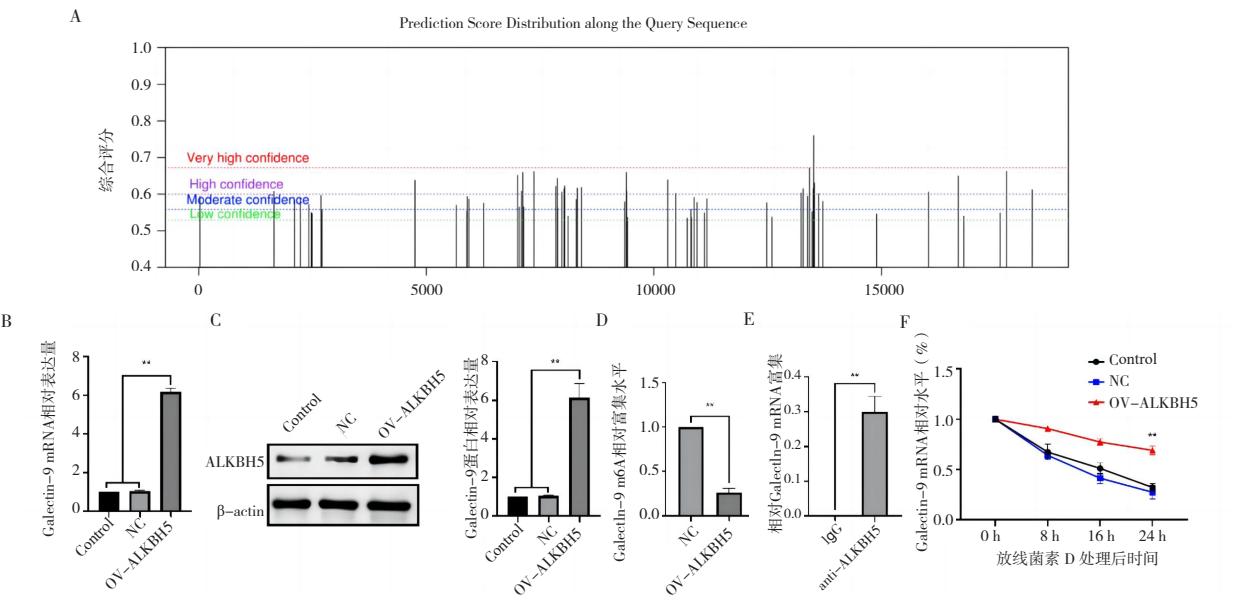


图4 ALKBH5介导m6A修饰调控Galectin-9表达

Figure 4. ALKBH5-mediated m6A modification regulates Galectin-9 expression

注：A：在线软件SRAMP预测Galectin-9 RNA上的m6A位点；B：qRT-PCR检测Galectin-9 mRNA表达；C：Western blotting检测Galectin-9蛋白表达；D：过表达ALKBH5后，MeRIP检测Galectin-9 m6A水平；E：RIP实验检测ALKBH5和Galectin-9的结合；F：使用放线菌素D（5 μg/mL）处理0、8、16和24 h，采用qRT-PCR检测细胞中Galectin-9 mRNA的表达（n=3次独立重复实验）；*P<0.05；**P<0.01。

著增强，而在过表达 ALKBH5 同时使用 siRNA 沉默 Galectin-9 则能够部分逆转过表达 ALKBH5 对 ESCs 侵袭迁移和增殖能力的促进作用（ $P < 0.01$ ，图 5-A、图 5-B）。后续 CCK8 实验证实，沉默 Galectin-9 明显抑制了 ALKBH5 介导的 ESCs 增殖能力（ $P < 0.05$ ，图 5-C）。

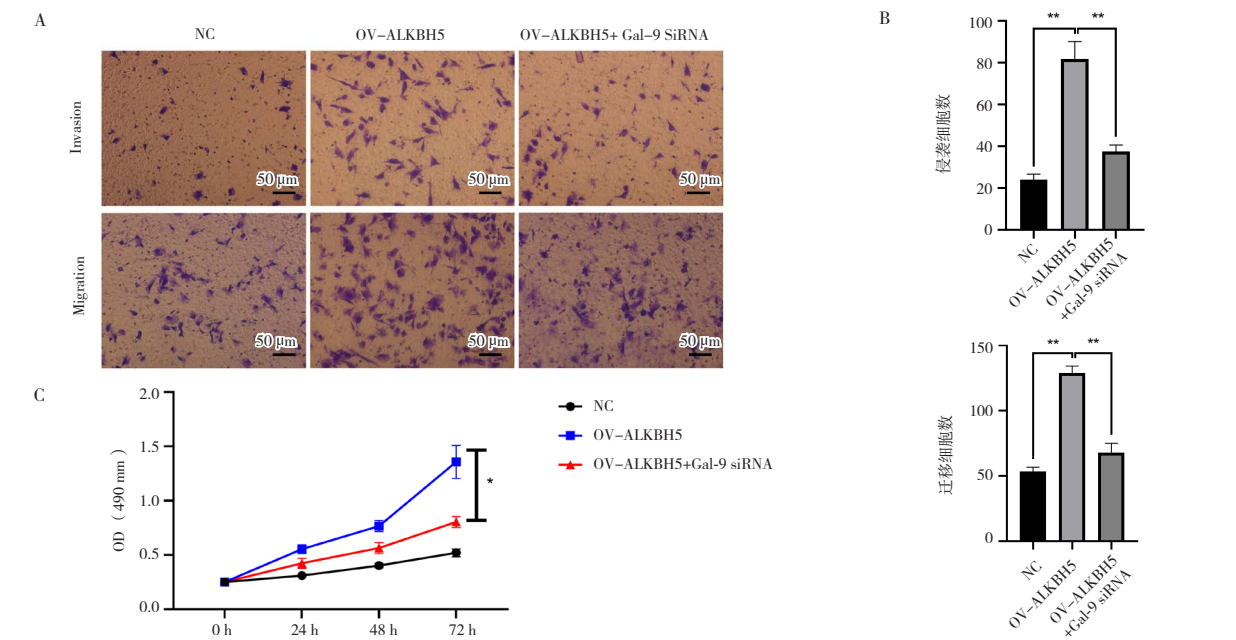


图5 沉默Galectin-9部分逆转过表达ALKBH5对ESCs侵袭迁移和增殖的促进作用

Figure 5. Silencing of Galectin-9 partially reverses the promoting effects of ALKBH5 overexpression on ESCs invasion, migration and proliferation

注：A：Transwell实验检测过表达ALKBH5同时沉默Galectin-9对ESCs侵袭迁移和增殖的影响（照片放大倍数为 ×200）；B：统计分析Transwell实验结果；C：CCK-8实验检测过表达ALKBH5同时沉默Galectin-9对ESCs增殖能力的影响；*P<0.05；**P<0.01。

3 讨论

EMs 作为一种病因不清、机制复杂的妇科常见疾病,其发生发展涉及多种生物学过程,包括细胞的迁移、侵袭、增殖过多和凋亡抵抗等^[9]。正是因为这些生物学特点的存在导致其成为临床治疗难点问题,因此寻找导致 EMs 发生发展的关键调节分子迫在眉睫。

近年来,表观遗传学调控在 EMs 中的作用逐渐受到关注,特别是 RNA 甲基化修饰在基因表达调控中的关键角色^[10-11]。ALKBH5 作为 m6A 去甲基化酶,在 mRNA 生成、调控过程中发挥重要作用。有研究表明,ALKBH5 在乳腺癌、结直肠癌等多种恶性肿瘤中均异常表达,参与恶性肿瘤的发生演进过程,但是关于调控 ALKBH5 表达对 EMs 发生发展的研究还鲜有报道。本研究发现在 EMs 组织中,ALKBH5 的表达水平显著上调,这一发现与既往的研究报道^[12-13]相一致,提示 ALKBH5 表达的上调参与 EMs 的发生发展。作为 m6A 去甲基化酶,ALKBH5 能够降低 RNA 上的 m6A 修饰水平,从而影响 RNA 的稳定性、剪接和翻译等过程^[14]。在肝癌细胞中,ALKBH5 介导的 TIRAP mRNA m6A 去甲基化能够促进辐射诱导的肝纤维化并降低肝细胞癌的放射敏感性^[15]。此外,ALKBH5 可通过 m6A 修饰来上调 ITGB1 表达,进而促进卵巢癌中肿瘤相关淋巴管生成和淋巴结转移^[16]。Shen 等^[17]研究发现 ALKBH5 通过 YTHDF2 依赖的 m6A 修饰来稳定 RAB5A mRNA 表达,进而促进结直肠癌细胞的侵袭迁移和增殖。本研究进一步发现过表达 ALKBH5 能够促进 ESCs 的迁移、侵袭和增殖能力,而沉默 Galectin-9 部分逆转了 ALKBH5 过表达对细胞侵袭、迁移和增殖的促进作用,提示 ALKBH5 对 EMs 增殖、侵袭和迁移能力的影响是通过 Galectin-9 实现的,二者协同作用促进 EMs 的侵袭、迁移和增殖。

Galectin-9 作为一种重要的细胞外基质蛋白,广泛存在于人体组织、器官中,在炎症、肿瘤、免疫、生殖等方面发挥关键作用^[18]。在 EMs 中,Galectin-9 的表达水平异常升高,与疾病的进展密切相关,并有作为 EMs 诊断靶点的潜能^[19]。已有研究表明,在多种疾病模型中 Galectin-9 参与了细胞生物学功能的调控,包括黏附、侵袭、转移、增殖和凋亡^[20-22]。然而,对于 Galectin-9

在 EMs 中异常表达升高的调控机制,目前仍知之甚少。本研究结果显示过表达 ALKBH5 能够上调 Galectin-9 mRNA 表达水平,同时伴随着 Galectin-9 mRNA 的 m6A 甲基化修饰水平降低,这些结果说明 ALKBH5 可能通过调控 Galectin-9 m6A 甲基化修饰,从而增强 Galectin-9 mRNA 的稳定性来影响 EMs 的发生发展。

本研究仍存在一定局限性。首先,尽管本研究揭示了 ALKBH5 对 Galectin-9 mRNA 的 m6A 修饰调控作用,但具体的分子调控机制仍需进一步阐明。研究证实,多种 m6A 阅读蛋白具有保守的 m6A 结合结构域,可以通过识别并结合 m6A 去甲基转移酶所修饰的特定 RNA 序列来调控该基因的表达,进而对下游生物学功能发挥作用^[23]。但是本研究中尚未鉴定出 ALKBH5 调控 Galectin-9 m6A 甲基化修饰的特定阅读蛋白,后续需要进一步实验验证。其次,本研究主要基于体外实验和临床样本的分析,未来还需要在动物模型中进行验证,以更全面地了解 ALKBH5 和 Galectin-9 在 EMs 发病中的作用。最后,EMs 的发生发展涉及多个基因和通路的相互作用,未来研究还需要进一步探讨 EMs 微环境中 ALKBH5 和 Galectin-9 与其他相关因素,诸如雌孕激素水平变化、缺氧微环境以及炎症微环境的关系,以揭示其在 EMs 中的复杂作用机制。未来将继续深入研究 ALKBH5 和 Galectin-9 在 EMs 中的功能及机制。一方面,利用基因编辑技术、RNA 干扰等手段,在细胞水平和动物模型中进一步验证 ALKBH5 对 Galectin-9 的 m6A 修饰调控作用及其对 EMs 发生发展的影响。另一方面,通过高通量测序、生物信息学分析等方法,挖掘与 ALKBH5 和 Galectin-9 相关的信号通路和互作网络,以揭示它们在 EMs 发生发展中的复杂作用机制。

综上所述,本研究揭示了 ALKBH5 以 m6A 依赖方式调控 Galectin-9 的 m6A 水平来改变 Galectin-9 的表达水平,进而促进 ESCs 的增殖、迁移和侵袭,从而参与 EMs 的发生发展。这一机制提示 ALKBH5/ Galectin-9 轴可能是 EMs 诊断和治疗的一个潜在有效的关键生物标志物。

参考文献

- 1 Horne AW, Missmer SA. Pathophysiology, diagnosis,

- and management of endometriosis[J]. *BMJ*, 2022, 379: e070750. DOI: [10.1136/bmj-2022-070750](https://doi.org/10.1136/bmj-2022-070750).
- 2 姚奏英, 叶玲红, 陈青微, 等. 化瘀消癥颗粒口服联合止痛消癥颗粒保留灌肠、GnRH-a 治疗复发性子宫内异位症临床观察[J]. *药物流行病学杂志*, 2023, 32(2): 178–187. [Yao ZY, Ye LH, Chen QW, et al. Clinical observation on oral Huayuxiaozheng granules combined with Zhitongxiaozheng granules retention-enema and GnRH-a in the treatment of recurrent endometriosis[J]. *Chinese Journal of Pharmacoepidemiology*, 2023, 32(2): 178–187.] DOI: [10.19960/j.issn.1005-0698.202302008](https://doi.org/10.19960/j.issn.1005-0698.202302008).
 - 3 Sendinc E, Shi Y. RNA m6A methylation across the transcriptome[J]. *Mol Cell*, 2023, 83(3): 428–441. DOI: [10.1016/j.molcel.2023.01.006](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2023.01.006).
 - 4 Wang J, Wang J, Gu Q, et al. The biological function of m6A demethylase ALKBH5 and its role in human disease[J]. *Cancer Cell Int*, 2020, 20: 347. DOI: [10.1186/s12935-020-01450-1](https://doi.org/10.1186/s12935-020-01450-1).
 - 5 Rodrigues CF, Santos FA, Amorim LAA, et al. Galectin-9 is a target for the treatment of cancer: a patent review[J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 254(Pt 1): 127768. DOI: [10.1016/j.ijbiomac.2023.127768](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.127768).
 - 6 Brubel R, Bokor A, Pohl A, et al. Serum Galectin-9 as a noninvasive biomarker for the detection of endometriosis and pelvic pain or infertility-related gynecologic disorders[J]. *Fertil Steril*, 2017, 108(6): 1016–1025. e2. DOI: [10.1016/j.fertnstert.2017.09.008](https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.09.008).
 - 7 Jarollahi S, Chaichian S, Jarollahi A, et al. The diagnostic accuracy of Galectin-9 for diagnosis of endometriosis in comparison with laparoscopy[J]. *J Reprod Infertil*, 2022, 23(4): 271–278. DOI: [10.18502/jri.v23i4.10812](https://doi.org/10.18502/jri.v23i4.10812).
 - 8 Meggyes M, Szereday L, Bohonyi N, et al. Different expression pattern of TIM-3 and galectin-9 molecules by peripheral and peritoneal lymphocytes in women with and without endometriosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(7): 2343. DOI: [10.3390/ijms21072343](https://doi.org/10.3390/ijms21072343).
 - 9 Saunders PTK, Horne AW. Endometriosis: etiology, pathobiology, and therapeutic prospects[J]. *Cell*, 2021, 184(11): 2807–2824. DOI: [10.1016/j.cell.2021.04.041](https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.04.041).
 - 10 Koninckx PR, Ussia A, Adamyan L, et al. Pathogenesis of endometriosis: the genetic/epigenetic theory[J]. *Fertil Steril*, 2019, 111(2): 327–340. DOI: [10.1016/j.fertnstert.2018.10.013](https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.10.013).
 - 11 Jiang L, Zhang M, Wu J, et al. Exploring diagnostic m6A regulators in endometriosis[J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(24): 25916–25938. DOI: [10.18632/aging.202163](https://doi.org/10.18632/aging.202163).
 - 12 Li X, Xiong W, Long X, et al. Inhibition of METTL3/m6A/miR126 promotes the migration and invasion of endometrial stromal cells in endometriosis[J]. *Biol Reprod*, 2021, 105(5): 1221–1233. DOI: [10.1093/biolre/iaab152](https://doi.org/10.1093/biolre/iaab152).
 - 13 Lin X, Dai Y, Gu W, et al. The involvement of RNA N6-methyladenosine and histone methylation modification in decidualization and endometriosis-associated infertility[J]. *Clin Transl Med*, 2024, 14(2): e1564. DOI: [10.1002/ctm2.1564](https://doi.org/10.1002/ctm2.1564).
 - 14 Qu J, Yan H, Hou Y, et al. RNA demethylase ALKBH5 in cancer: from mechanisms to therapeutic potential[J]. *J Hematol Oncol*, 2022, 15(1): 8. DOI: [10.1186/s13045-022-01224-4](https://doi.org/10.1186/s13045-022-01224-4).
 - 15 Chen Y, Zhou P, Deng Y, et al. ALKBH5-mediated m6A demethylation of TIRAP mRNA promotes radiation-induced liver fibrosis and decreases radiosensitivity of hepatocellular carcinoma[J]. *Clin Transl Med*, 2023, 13(2): e1198. DOI: [10.1002/ctm2.1198](https://doi.org/10.1002/ctm2.1198).
 - 16 Sun R, Yuan L, Jiang Y, et al. ALKBH5 activates FAK signaling through m6A demethylation in ITGB1 mRNA and enhances tumor-associated lymphangiogenesis and lymph node metastasis in ovarian cancer[J]. *Theranostics*, 2023, 13(2): 833–848. DOI: [10.7150/thno.77441](https://doi.org/10.7150/thno.77441).
 - 17 Shen D, Lin J, Xie Y, et al. RNA demethylase ALKBH5 promotes colorectal cancer progression by posttranscriptional activation of RAB5A in an m6A-YTHDF2-dependent manner[J]. *Clin Transl Med*, 2023, 13(5): e1279. DOI: [10.1002/ctm2.1279](https://doi.org/10.1002/ctm2.1279).
 - 18 Moar P, Tandon R. Galectin-9 as a biomarker of disease severity[J]. *Cell Immunol*, 2021, 361: 104287. DOI: [10.1016/j.cellimm.2021](https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2021).
 - 19 Suszczyk D, Skiba W, Pawłowska A, et al. Expression of Gal-9 on dendritic cells and soluble forms of TIM-3/Gal-9 in patients suffering from endometriosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(6): 5948. DOI: [10.3390/ijms24065948](https://doi.org/10.3390/ijms24065948).
 - 20 Pally D, Banerjee M, Hussain S, et al. Galectin-9 signaling drives breast cancer invasion through extracellular matrix[J]. *ACS Chem Biol*, 2022, 17(6): 1376–1386. DOI: [10.1021/acscchembio.1c00902](https://doi.org/10.1021/acscchembio.1c00902).
 - 21 Yang R, Sun L, Li CF, et al. Galectin-9 interacts with

PD-1 and TIM-3 to regulate T cell death and is a target for cancer immunotherapy[J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 832. DOI: [10.1038/s41467-021-21099-2](#).

22 Rezaei M, Ghanadian M, Ghezelbash B, et al. TIM-3/Gal-9 interaction affects glucose and lipid metabolism in acute myeloid leukemia cell lines[J]. Front Immunol, 2023, 14: 1267578. DOI: [10.3389/fimmu.2023](#).

23 Mao Z, Wang B, Zhang T, et al. The roles of m6A methylation in cervical cancer: functions, molecular mechanisms, and clinical applications[J]. Cell Death Dis, 2023, 14(11): 734. DOI: [10.1038/s41419-023-06265-2](#).

收稿日期: 2024 年 03 月 02 日 修回日期: 2024 年 04 月 03 日
本文编辑: 桂裕亮 曹 越

引用本文: 王芳, 刘恒炜, 梁嘉欣, 等. ALKBH5介导m6A修饰调控Galectin-9促进异位内膜基质细胞侵袭、迁移与增殖的机制研究[J]. 医学新知, 2024, 34(5): 487-496. DOI: 10.12173/j.issn.1004-5511.202404015

Wang F, Liu HW, Liang JX, et al. Mechanism of ALKBH5 mediated m6A regulation of Galectin-9 in the invasion, migration, and proliferation of endometrial stromal cell[J]. Yixue Xinzhi Zazhi, 2024, 34(5): 487-496. DOI: 10.12173/j.issn.1004-5511.202404015