

香叶醇调控 ALKBH5 对乳腺癌细胞上皮间质转化的影响

冯燕枝^{1,2}, 李庆辉^{1,2}, 牛冰^{1,2}, 李海平^{1,2}, 叶贝贝^{1,2}

1. 郑州人民医院 乳腺外科, 河南 郑州 450014

2. 河南中医药大学第五临床医学院, 河南 郑州 450014

摘要: **目的** 探讨香叶醇调控烷基化修复蛋白 B 同源物 5 (ALKBH5) 对乳腺癌细胞上皮间质转化的影响。**方法** 以 0、6.25、12.5、25、50、100、200 $\mu\text{g/mL}$ 香叶醇分别处理人乳腺癌 MCF-7 细胞 24 h, 筛选合适的香叶醇处理剂量。MCF-7 细胞分为对照组、香叶醇 (25、50、100 $\mu\text{g/mL}$) 组、香叶醇+空白质粒组、香叶醇+ALKBH5 组, 5-乙炔基-2'脱氧尿嘧啶核苷 (EdU) 染色、CCK-8 法检测细胞增殖; Western blotting 检测细胞中 ALKBH5、神经钙黏蛋白 (N-cadherin)、波形蛋白 (Vimentin)、E-钙黏蛋白 (E-cadherin) 蛋白; Transwell、划痕实验分别检测细胞侵袭、迁移; qRT-PCR 检测细胞中基质金属蛋白酶 (MMP)-9、迁移侵袭增强子 (MIEN1)、MMP-2 mRNA 表达。**结果** 与 0 $\mu\text{g/mL}$ 香叶醇比较, 6.25、12.5、25、50、100、200 $\mu\text{g/mL}$ 香叶醇作用后的 MCF-7 细胞活力均显著降低 ($P < 0.05$), 选取香叶醇质量浓度为 25、50、100 $\mu\text{g/mL}$ 作为后续处理浓度。与对照组比较, 香叶醇 25、50、100 $\mu\text{g/mL}$ 组 MCF-7 细胞 EdU 阳性率、 A_{450} 值、ALKBH5、N-cadherin、Vimentin 蛋白表达、细胞侵袭数、划痕愈合率及 MMP-9、MIEN1、MMP-2 mRNA 表达降低, E-cadherin 蛋白表达升高 ($P < 0.05$)。与香叶醇 100 $\mu\text{g/mL}$ 组、香叶醇+空白质粒组比较, 香叶醇+ALKBH5 组 MCF-7 细胞 EdU 阳性率、 A_{450} 值、ALKBH5、N-cadherin、Vimentin 蛋白表达、细胞侵袭数、划痕愈合率及 MMP-9、MIEN1、MMP-2 mRNA 表达升高, E-cadherin 蛋白表达降低 ($P < 0.05$)。**结论** 香叶醇可能通过下调 ALKBH5 抑制 MCF-7 细胞上皮间质转化, 进而减弱细胞侵袭与迁移能力。

关键词: 香叶醇; 烷基化修复蛋白 B 同源物 5; 上皮间质转化; 乳腺癌; 侵袭

中图分类号: R979.1

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2025)03-0543-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2025.03.002

Effect of geraniol on epithelial mesenchymal transition of breast cancer cells by regulating ALKBH5

FENG Yanzhi^{1,2}, LI Qinghui^{1,2}, NIU Bing^{1,2}, LI Haiping^{1,2}, YE Beibei^{1,2}

1. Department of Breast Surgery, Zhengzhou People's Hospital, Zhengzhou 450014, China

2. the Fifth Clinical College of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450014, China

Abstract: Objective To investigate the effect of geraniol on epithelial mesenchymal transition of breast cancer cells by regulating ALKBH5. **Methods** Human breast cancer MCF-7 cells were treated with 0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$ geraniol for 24 hours, and the appropriate dosage of geraniol was screened. MCF-7 cells were assigned into control group, geraniol (25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$) group, geraniol + blank plasmid set group, and geraniol + ALKBH5 group. EdU staining and CCK-8 method were used to detect cell proliferation. Western blotting was used to detect ALKBH5, N-cadherin, Vimentin, and E-cadherin proteins in cells. Transwell and scratch experiments were used to detect cell invasion and migration, respectively. QRT-PCR was used to measure the mRNA expression of MMP-9, MIEN1, and MMP-2 in cells. **Results** Compared with 0 $\mu\text{g/mL}$ geraniol, the activity of MCF-7 cells after treatment with 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$ geraniol was significantly decreased ($P < 0.05$). The concentration of geraniol was 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ as the subsequent treatment concentration. Compared with control group, the EdU positive rate, A_{450} value, ALKBH5, N-cadherin, Vimentin protein, cell invasion number, scratch healing rate, and MMP-9, MIEN1, MMP-2 mRNA expression of MCF-7 cells in the geraniol 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ groups were reduced, while E-cadherin protein were increased ($P < 0.05$). Compared with the geraniol 100 $\mu\text{g/mL}$ group and geraniol + blank plasmid set group, the EdU positive rate, A_{450} value, ALKBH5, N-cadherin, Vimentin protein, cell invasion number, scratch healing rate, and MMP-9, MIEN1, MMP-2 mRNA expression of MCF-7 cells in geraniol + ALKBH5

收稿日期: 2024-01-22

基金项目: 河南省医学科技攻关计划联合共建项目 (LHGJ20220783, LHGJ20220784)

作者简介: 冯燕枝, 副主任医师, 本科, 研究方向为乳腺外科。E-mail: FM0315ay@163.com

group were increased, while E-cadherin protein were decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Geraniol may inhibit epithelial mesenchymal transition in MCF-7 cells by downregulating ALKBH5, thereby weakening cell invasion and migration abilities.

Key words: geraniol; alkylation repair protein B homolog 5; epithelial mesenchymal transition; breast cancer; invasion

乳腺癌是一种常见的恶性肿瘤,也是全球女性癌症相关死亡的主要原因^[1]。乳腺癌的高转移率和复发率仍然是导致死亡的原因之一^[2]。即使经过标准化治疗,约 20% 的乳腺癌患者发生肿瘤转移,20 年内复发的风险约为 40%^[3]。据报道,上皮间充质转化增强了肿瘤细胞的迁移和侵袭能力,这是肿瘤远处转移的先决条件^[4]。因此,开发药物抑制上皮间充质转化对于乳腺癌的治疗意义重大。香叶醇是一种天然类异戊二烯,以其在癌细胞中广泛的抗癌活性而闻名^[5]。已有研究报道,香叶醇可抑制乳腺癌细胞生长^[6]。相关研究显示,烷基化修复蛋白 B 同源物 5 (ALKBH5) 可促进乳腺浸润性导管癌细胞上皮间质转化^[7]。因此,本研究探究香叶醇对乳腺癌细胞上皮间质转化的影响及分子机制。

1 材料与方法

1.1 细胞来源

人乳腺癌细胞 MCF-7 细胞购自中乔新舟生物科技有限公司。

1.2 主要试剂及仪器

香叶醇(质量分数 96.4%,批号 72515)购自上海晨微生物科技有限公司;ALKBH5 过表达质粒、空白质粒(批号 20231223、20231016)均购自广州艾迪基因科技有限责任公司;CCK-8 试剂盒(批号 HY-K0301)购自美国 MCE 公司;5-乙炔基-2'脱氧尿嘧啶核苷(EdU)染色试剂盒(批号 C01503)购自上海东寰生物科技有限公司;兔源一抗 ALKBH5、神经钙黏蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)、GAPDH、E-钙黏蛋白(E-cadherin)及二抗(批号 ab195377、ab76011、ab8978、ab8245、ab314063、ab6721)均购自英国 Abcam 公司。

BFM-300 荧光显微镜(郑州兆为仪器设备有限公司);ST-360 酶标仪(上海科华仪器厂);DYY-8C 蛋白电泳仪(北京六一仪器厂);CX53 光学显微镜(日本奥林巴斯公司);Q5 荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)。

1.3 香叶醇处理剂量的筛选

将 MCF-7 细胞以 1×10^3 个/ μL 的密度接种于 96 孔板中培养 24 h。用不同质量浓度的香叶醇(0、6.25、12.5、25、50、100、200 $\mu\text{g/mL}$)处理细胞 24 h

后,每孔加 10 μL CCK-8 试剂,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h。在 450 nm 处用酶标仪测量吸光度(A),计算细胞活力,使用 Graphpad Prism 软件计算 IC_{50} 值。

$$\text{细胞活力} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

1.4 细胞培养

MCF-7 细胞分为对照组、香叶醇(25、50、100 $\mu\text{g/mL}$)组、香叶醇+空白质粒组、香叶醇+ALKBH5 组。对照组 MCF-7 细胞正常培养;香叶醇组 MCF-7 细胞分别用 25、50、100 $\mu\text{g/mL}$ 香叶醇处理 24 h;香叶醇+空白质粒组 MCF-7 细胞用 100 $\mu\text{g/mL}$ 香叶醇处理 24 h 的同时还转染空质粒 24 h;香叶醇+OE-ALKBH5 组 MCF-7 细胞用 100 $\mu\text{g/mL}$ 香叶醇处理 24 h 的同时还转染过表达 ALKBH5 24 h。处理结束后开始指标检测。

1.5 MCF-7 细胞的 EdU 染色检测

各组 MCF-7 细胞以 5×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板中,向各孔加 100 μL EdU 溶液孵育 2 h 后,依次用 4%多聚甲醛固定细胞 15 min,0.5% TritonX-100 孵育细胞 10 min,6,4'-二氨基-2-苯基吡啶染色细胞 20 min。观察细胞 EdU 阳性染色情况,并计算 EdU 阳性率。

$$\text{EdU 阳性率} = \text{EdU 阳性细胞数} / \text{总细胞数}$$

1.6 CCK-8 检测 MCF-7 细胞增殖情况

各组 MCF-7 细胞(2×10^5 个/孔)接种于 96 孔板中,按照 1.4 项下各分组进行相应处理后,每孔加入 CCK-8 溶液 10 μL ,在细胞培养箱中继续培养 2 h。并使用酶标仪检测 450 nm 处 A 值,评估细胞增殖情况。

1.7 MCF-7 细胞中 ALKBH5、N-cadherin、Vimentin、E-cadherin 蛋白检测

将各组 MCF-7 细胞用预冷的 RIPA 缓冲液裂解 30 min,BCA 法测定蛋白浓度。每个样品等量的蛋白质用 12% SDS-PAGE 分离,并转移到 PVDF 膜上。用 5%脱脂牛奶阻断膜 1 h 后,将膜与一抗 ALKBH5 (1:2 000)、N-cadherin (1:2 000)、Vimentin(1:3 000)、GAPDH(1:1 000)、E-cadherin (1:3 000)在 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,然后与二抗(1:3 000)在室温下孵育 1 h。增强型化学发光试剂检测蛋白质条带。通过 Image J 软件定量蛋白灰度值。

1.8 Transwell 检测 MCF-7 细胞侵袭情况

取各组 MCF-7 细胞 (5×10^5 个/mL) 悬液 100 μ L 置于基质胶包被的 Transwell 上室中, 再向 Transwell 下室中加入 700 μ L 含 10% 胎牛血清的培养基, 孵育 24 h 后, 用 4% 多聚甲醛固定细胞, 结晶紫染色细胞。通过光学显微镜观察细胞的侵袭情况, 并统计细胞侵袭数。

1.9 划痕实验检测 MCF-7 细胞迁移情况

将各组 MCF-7 细胞 (1×10^5 个) 接种在 24 孔板中, 待细胞融合率达到 100% 后, 用 10 μ L 移液管尖端在细胞单层上制造划痕, 用光学显微镜拍摄细胞培养 0、24 h 时细胞划痕的图片, 并计算划痕愈合率。

1.10 MCF-7 细胞中基质金属蛋白酶 (MMP) -9、迁移侵袭增强子 (MIEN1)、MMP-2 mRNA 表达的检测

使用 Trizol 试剂提取各组 MCF-7 细胞总 RNA, 将 RNA 逆转录为 cDNA 后, 以 cDNA 为模板进行 qRT-PCR 反应。GAPDH 作为内源对照基因, 以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因相对表达量。测定 MMP-9、MIEN1、MMP-2 mRNA 表达量。引物序列: MMP-9 (正向 5'-TGTGTGCTATGTGCACCCTC-3', 反向 5'-TTGGCTTTGGAGGACGACAG-3'); MIEN1 (正向 5'-TGAGAAAGATGTGAGTATTTAC-3', 反向 5'-TGGAA TGACAGGATGATG-3'); MMP-2 (正向 5'-ACAAG TGGTCCGCGTAAAGT-3', 反向 5'-AAACAAGGC TTCATGGGGGC-3'); GAPDH (正向 5'-GGTTGTC TCCTGCGACTTCA-3', 反向 5'-TGGTCCAGGGTT TCTTACTCC-3')。

1.11 统计学分析

采用 SPSS 25.0 软件进行统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析和事后 SNK- q 检验来比较多组之间的差异。

2 结果

2.1 不同质量浓度香叶醇对 MCF-7 细胞活力的影响

与 0 μ g/mL 香叶醇比较, 6.25、12.5、25、50、100、200 μ g/mL 香叶醇作用后的 MCF-7 细胞活力均显著降低, 见表 1。香叶醇对 MCF-7 细胞的 IC_{50} 为 102.43 μ g/mL, 接近于 100 μ g/mL, 故选取香叶醇质量浓度为 25、50、100 μ g/mL 进行后续实验。

2.2 香叶醇对 MCF-7 细胞增殖的影响

与对照组比较, 香叶醇 25、50、100 μ g/mL 组 MCF-7 细胞 EdU 阳性率、 A_{450} 值降低 ($P < 0.05$),

且呈浓度相关性; 与香叶醇 100 μ g/mL 组、香叶醇 + 空白质粒组比较, 香叶醇 + ALKBH5 组 MCF-7 细胞 EdU 阳性率、 OD_{450} 值升高 ($P < 0.05$), 见图 1、表 2。

表 1 不同质量浓度香叶醇对 MCF-7 细胞活力的影响
($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 1 Effects of different concentrations of geraniol on MCF-7 cell viability ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

香叶醇/ (μ g·mL ⁻¹)	细胞活力/%
0	100.00 ± 0.00
6.25	98.81 ± 1.03*
12.5	83.44 ± 4.01*
25	72.23 ± 3.58*
50	65.54 ± 3.34*
100	50.06 ± 2.01*
200	32.24 ± 1.56*

与香叶醇 0 μ g·mL⁻¹ 组比较: * $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs geraniol 0 μ g·mL⁻¹ group.

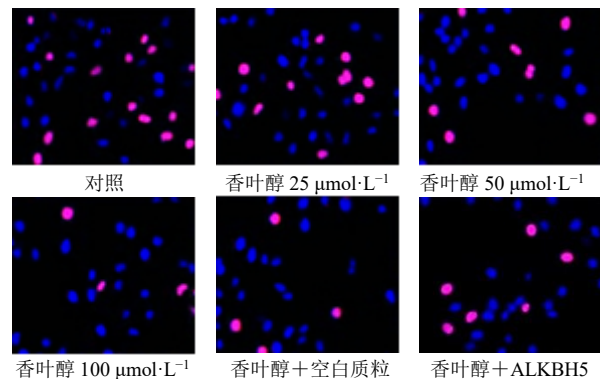


图 1 MCF-7 细胞增殖的 EdU 染色 (×200)

Fig. 1 EdU staining of proliferating MCF-7 cells (×200)

表 2 香叶醇对 MCF-7 细胞 EdU 阳性率、 A_{450} 值的影响
($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 2 Effect of geraniol on EdU positivity and A_{450} value of MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	质量浓度/ (μ g·mL ⁻¹)	EdU 阳性率/%	A_{450} 值
对照	—	35.68 ± 1.86	1.22 ± 0.13
香叶醇	25	29.44 ± 1.91*	1.01 ± 0.08*
	50	21.52 ± 1.04*#	0.83 ± 0.08*#
	100	11.79 ± 0.61*#&	0.41 ± 0.04*#&
香叶醇 + 空白质粒	100	11.83 ± 0.65	0.43 ± 0.04
香叶醇 + ALKBH5	100	20.16 ± 1.08@Δ	0.80 ± 0.08@Δ

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与香叶醇 25 μ g·mL⁻¹ 组比较: # $P < 0.05$;

与香叶醇 50 μ g·mL⁻¹ 组比较: & $P < 0.05$; 与香叶醇 100 μ g·mL⁻¹ 组比较: @ $P < 0.05$; 与香叶醇 + 空白质粒组比较: Δ $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs geraniol 25 μ g·mL⁻¹ group;

& $P < 0.05$ vs geraniol 50 μ g·mL⁻¹ group; @ $P < 0.05$ vs geraniol 100

μ g·mL⁻¹ group; Δ $P < 0.05$ vs geraniol + blank plasmid set group.

2.3 香叶醇对 MCF-7 细胞中 ALKBH5、N-cadherin、Vimentin、E-cadherin 蛋白的影响

与对照组比较, 香叶醇 25、50、100 $\mu\text{g/mL}$ 组 MCF-7 细胞中 ALKBH5、N-cadherin、Vimentin 蛋白相对表达量显著降低, E-cadherin 蛋白相对表达量显著升高 ($P<0.05$); 与香叶醇 100 $\mu\text{g/mL}$ 组、香叶醇+空白质粒组比较, 香叶醇+ALKBH5 组 MCF-7 细胞中 ALKBH5、N-cadherin、Vimentin 蛋白相对表达量显著升高, E-cadherin 蛋白相对表达量显著降低 ($P<0.05$), 见图 2、表 3。

2.4 香叶醇对 MCF-7 细胞侵袭的影响

与对照组比较, 香叶醇 25、50、100 $\mu\text{g/mL}$ 组 MCF-7 细胞侵袭数降低 ($P<0.05$); 与香叶醇 100 $\mu\text{g/mL}$ 组、香叶醇+空白质粒组比较, 香叶醇+ALKBH5 组 MCF-7 细胞侵袭数升高 ($P<0.05$), 见

图 3、表 4。

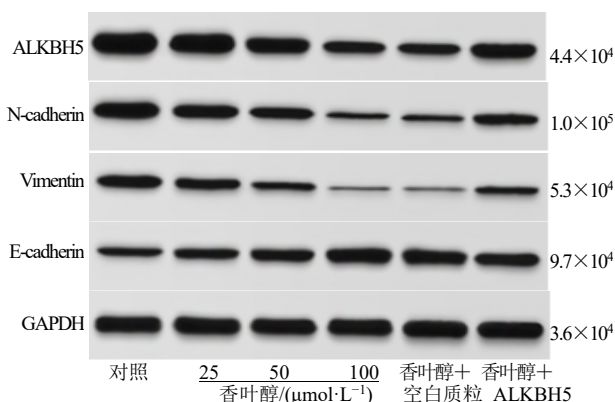


图 2 MCF-7 细胞中 ALKBH5、N-cadherin、Vimentin、E-cadherin 蛋白检测

Fig. 2 Detection of ALKBH5, N-cadherin, Vimentin, E-cadherin proteins in MCF-7 cells

表 3 香叶醇对 MCF-7 细胞中 ALKBH5、N-cadherin、Vimentin、E-cadherin 蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)
Table 3 Effect of geraniol on ALKBH5, N-cadherin, Vimentin, and E-cadherin proteins in MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	质量浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	蛋白相对表达量			
		ALKBH5/GAPDH	N-cadherin/GAPDH	Vimentin/GAPDH	E-cadherin/GAPDH
对照	—	1.63 ± 0.17	1.01 ± 0.11	0.73 ± 0.07	0.41 ± 0.04
香叶醇	25	$1.36 \pm 0.14^*$	$0.83 \pm 0.08^*$	$0.59 \pm 0.05^*$	$0.63 \pm 0.06^*$
	50	$1.05 \pm 0.11^{* \#}$	$0.61 \pm 0.05^{* \#}$	$0.34 \pm 0.03^{* \#}$	$0.79 \pm 0.06^{* \#}$
	100	$0.63 \pm 0.06^{* \# \&}$	$0.22 \pm 0.02^{* \# \&}$	$0.10 \pm 0.01^{* \# \&}$	$0.97 \pm 0.09^{* \# \&}$
香叶醇+空白质粒	100	0.60 ± 0.05	0.23 ± 0.02	0.12 ± 0.01	0.95 ± 0.08
香叶醇+ALKBH5	100	$0.97 \pm 0.08^{\Delta}$	$0.57 \pm 0.05^{\Delta}$	$0.32 \pm 0.03^{\Delta}$	$0.73 \pm 0.06^{\Delta}$

与对照组比较: $^*P<0.05$; 与香叶醇 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组比较: $^{\#}P<0.05$; 与香叶醇 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组比较: $^{\&}P<0.05$; 与香叶醇 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组比较: $^{\Delta}P<0.05$; 与香叶醇+空白质粒组比较: $^{\Delta}P<0.05$ 。

$^*P < 0.05$ vs control group; $^{\#}P < 0.05$ vs geraniol 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ group; $^{\&}P < 0.05$ vs geraniol 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ group; $^{\Delta}P < 0.05$ vs geraniol 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ group; $^{\Delta}P < 0.05$ vs geraniol + blank plasmid set group.

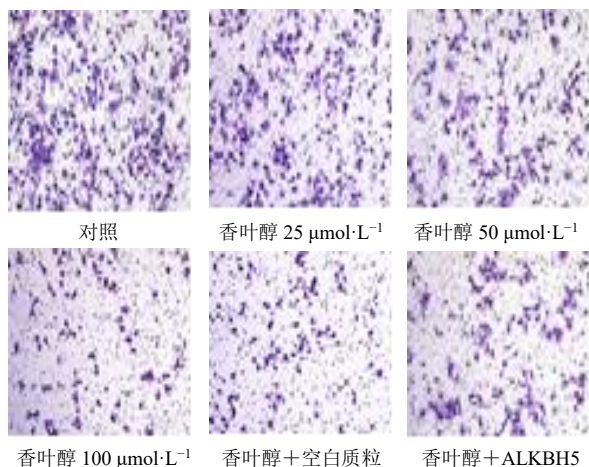


图 3 MCF-7 细胞侵袭的 Transwell 检测 ($\times 200$)

Fig. 3 Transwell assay for MCF-7 cell invasion ($\times 200$)

表 4 香叶醇对 MCF-7 细胞侵袭数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 4 Effect of geraniol on invasion number of MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	质量浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	细胞侵袭数/个
对照	—	86.67 ± 4.19
香叶醇	25	$70.39 \pm 3.52^*$
	50	$58.83 \pm 2.89^{* \#}$
	100	$27.65 \pm 1.37^{* \# \&}$
香叶醇+空白质粒	100	28.15 ± 1.43
香叶醇+ALKBH5	100	$50.52 \pm 2.67^{\Delta}$

与随着组比较: $^*P<0.05$; 与香叶醇 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组比较: $^{\#}P<0.05$; 与香叶醇 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组比较: $^{\&}P<0.05$; 与香叶醇 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组比较: $^{\Delta}P<0.05$; 与香叶醇+空白质粒组比较: $^{\Delta}P<0.05$ 。

$^*P < 0.05$ vs control group; $^{\#}P < 0.05$ vs geraniol 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ group; $^{\&}P < 0.05$ vs geraniol 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ group; $^{\Delta}P < 0.05$ vs geraniol 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ group; $^{\Delta}P < 0.05$ vs geraniol + blank plasmid set group.

2.5 香叶醇对 MCF-7 细胞迁移的影响

与对照组比较, 香叶醇 25、50、100 $\mu\text{g/mL}$ 组 MCF-7 细胞划痕愈合率显著降低 ($P<0.05$); 与香

叶醇 100 $\mu\text{g/mL}$ 组、香叶醇+空白质粒组比较, 香叶醇+ALKBH5 组 MCF-7 细胞划痕愈合率显著升高 ($P<0.05$), 见图 4、表 5。

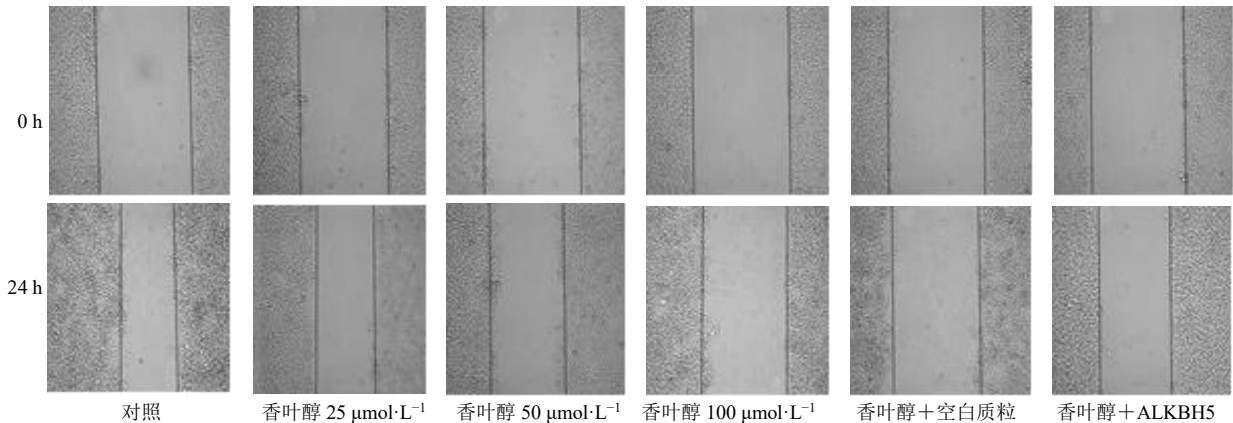


图 4 MCF-7 细胞迁移的划痕实验检测 ($\times 200$)

Fig. 4 Scratch assay detection of MCF-7 cell migration ($\times 200$)

表 5 香叶醇对 MCF-7 细胞划痕愈合率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 5 Effect of geraniol on the healing rate of scratches in MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	质量浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	划痕愈合率/%
对照	—	41.56 ± 2.08
香叶醇	25	$35.69 \pm 1.73^*$
	50	$27.61 \pm 1.34^{* \#}$
	100	$12.69 \pm 0.61^{* \# \&}$
香叶醇+空白质粒	100	11.98 ± 0.57
香叶醇+ALKBH5 组	100	$25.59 \pm 1.21^{\Delta}$

与对照组比较: $^*P<0.05$; 与香叶醇 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组比较: $^{\#}P<0.05$; 与香叶醇 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组比较: $^{\&}P<0.05$; 与香叶醇 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组比较: $^{\Delta}P<0.05$; 与香叶醇+空白质粒组比较: $^{\Delta}P<0.05$ 。

$^*P<0.05$ vs control group; $^{\#}P<0.05$ vs geraniol 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ group; $^{\&}P<0.05$ vs geraniol 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ group; $^{\Delta}P<0.05$ vs geraniol 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ group; $^{\Delta}P<0.05$ vs geraniol + blank plasmid set group.

表 6 香叶醇对 MCF-7 细胞中 *MMP-9*、*MIEN1*、*MMP-2* mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 6 Effect of geraniol on the expression of *MMP-9*, *MIEN1*, and *MMP-2* mRNA in MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	质量浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	<i>MMP-9</i> mRNA	<i>MIEN1</i> mRNA	<i>MMP-2</i> mRNA
对照	—	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
香叶醇	25	$0.86 \pm 0.07^*$	$0.73 \pm 0.07^*$	$0.80 \pm 0.08^*$
	50	$0.64 \pm 0.05^{* \#}$	$0.41 \pm 0.04^{* \#}$	$0.59 \pm 0.05^{* \#}$
	100	$0.31 \pm 0.03^{* \# \&}$	$0.16 \pm 0.01^{* \# \&}$	$0.29 \pm 0.02^{* \# \&}$
香叶醇+空白质粒	100	0.33 ± 0.04	0.14 ± 0.01	0.30 ± 0.03
香叶醇+ALKBH5	100	$0.58 \pm 0.05^{\Delta}$	$0.33 \pm 0.02^{\Delta}$	$0.50 \pm 0.05^{\Delta}$

与对照组比较: $^*P<0.05$; 与香叶醇 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组比较: $^{\#}P<0.05$; 与香叶醇 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组比较: $^{\&}P<0.05$; 与香叶醇 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组比较: $^{\Delta}P<0.05$; 与香叶醇+空白质粒组比较: $^{\Delta}P<0.05$ 。

$^*P<0.05$ vs control group; $^{\#}P<0.05$ vs geraniol 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ group; $^{\&}P<0.05$ vs geraniol 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ group; $^{\Delta}P<0.05$ vs geraniol 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ group; $^{\Delta}P<0.05$ vs geraniol + blank plasmid set group.

2.6 香叶醇对 MCF-7 细胞中 *MMP-9*、*MIEN1*、*MMP-2* mRNA 表达的影响

与对照组比较, 香叶醇 25、50、100 $\mu\text{g/mL}$ 组 MCF-7 细胞中 *MMP-9*、*MIEN1*、*MMP-2* mRNA 表达显著降低 ($P<0.05$); 与香叶醇 100 $\mu\text{g/mL}$ 组、香叶醇+空白质粒组比较, 香叶醇+ALKBH5 组 MCF-7 细胞中 *MMP-9*、*MIEN1*、*MMP-2* mRNA 表达显著升高 ($P<0.05$), 见表 6。

3 讨论

肿瘤转移是乳腺癌患者治疗失败和死亡的重要原因^[8]。肿瘤转移是一个复杂的过程, 涉及包括上皮间质转化在内的多种途径和因素。上皮间充质转化作为一种进化上保守、可逆和动态的细胞过程, 其中上皮细胞逐渐失去细胞间黏附, 经历广泛的细胞骨架重组, 改变上皮细胞形态, 成为具有迁

移和侵袭特性的间充质细胞^[9]。据报道, 经历致癌上皮间充质转化过程的三阴性乳腺癌细胞可促进邻近上皮肿瘤细胞的转移能力, 以 N-cadherin、Vimentin 增加和 E-cadherin 减少为特征^[10]。因此, 抑制上皮间充质转化被认为是抑制乳腺癌进展的有效途径之一。

香叶醇是一种无环单萜类化合物, 具有抗炎、抗癌、抗菌、抗氧化等活性^[11]。据报道, 香叶醇可抑制乳腺癌小鼠肿瘤生长^[12]; 香叶醇可诱导胃癌细胞凋亡^[13]。以上研究证明了香叶醇的抗癌特性。本研究中香叶醇处理可降低 MCF-7 细胞 EdU 阳性率、A₄₅₀ 值、N-cadherin、Vimentin 蛋白表达, 升高 E-cadherin 蛋白表达, 表明香叶醇可抑制 MCF-7 细胞增殖及上皮间质转化, 且呈剂量相关。此外, 上皮间质转化表型作为肿瘤进展的关键机制之一, 表现为肿瘤细胞侵袭和迁移能力增强, 进而导致肿瘤细胞从原发部位向远处转移^[14]。MMP-2 和 MMP-9 作为 MMP 家族成员, 其可通过降解细胞外基质的方式增强细胞的迁移、侵袭行为^[15-16]; MIEN1 是一种迁移和侵袭增强子, 通过诱导迁移细胞前缘的丝状伪足形成, 参与各种癌症的进展^[17]。本研究显示, 香叶醇处理可降低 MCF-7 细胞侵袭数、划痕愈合率及 MMP-9、MIEN1、MMP-2 mRNA 表达, 表明香叶醇均可抑制 MCF-7 细胞侵袭及迁移, 且呈剂量相关性。以上结果提示香叶醇通过抑制细胞上皮间质转化的方式减弱细胞的侵袭、迁移能力, 进而抑制乳腺癌进展。但具体分子机制尚不完全清楚。

ALKBH5 是一种 RNA 去甲基化酶, 其在多种肿瘤中表达异常^[18]。如上调 ALKBH5 可诱导卵巢癌细胞上皮间质转化^[19]; ALKBH5 的过表达促进了宫颈癌转移^[20]; 下调 ALKBH5 可抑制乳腺癌细胞生长和转移^[21]。本研究中, 香叶醇可抑制 MCF-7 细胞中 ALKBH5 蛋白, 且呈剂量相关性, 推测香叶醇可能通过下调 ALKBH5 抑制 MCF-7 细胞上皮间质转化, 进而减弱细胞侵袭与迁移能力。为验证推测, 本实验用 ALKBH5 过表达物 ALKBH5 进行了回复实验, 结果显示, ALKBH5 减弱了高剂量香叶醇对 MCF-7 细胞上皮间质转化、侵袭及迁移的影响。证实了推测的合理性。

综上所述, 香叶醇可能通过下调 ALKBH5 抑制 MCF-7 细胞上皮间质转化, 进而减弱细胞侵袭与迁移能力。该研究可能为乳腺癌治疗的药物开发提供新的参考依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Sun L J, Ouyang N, Shafi S, *et al.* NRF1 Regulates the epithelial mesenchymal transition of breast cancer by modulating ROS homeostasis [J]. *Technol Cancer Res Treat*, 2023, 22: 15330338231161141.
- [2] Zhang J N, Zhang Z, Huang Z L, *et al.* Isoosendanin exerts inhibition on triple-negative breast cancer through abrogating TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition via directly targeting TGF β R₁ [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2023, 13(7): 2990-3007.
- [3] Wang H, Chen X, Jin Y S, *et al.* The role of DYNLT3 in breast cancer proliferation, migration, and invasion via epithelial-to-mesenchymal transition [J]. *Cancer Med*, 2023, 12(14): 15289-15303.
- [4] Shojaei S, Moradi-Chaleshtori M, Paryan M, *et al.* Mesenchymal stem cell-derived exosomes enriched with miR-218 reduce the epithelial-mesenchymal transition and angiogenesis in triple-negative breast cancer cells [J]. *Eur J Med Res*, 2023, 28(1): 516.
- [5] Abo El-Ella D M. Autophagy/apoptosis induced by geraniol through HIF-1 α /BNIP3/Beclin-1 signaling pathway in A549 CoCl₂ treated cells [J]. *Adv Pharm Bull*, 2022, 12(1): 155-162.
- [6] 刘晓鸣, 张媛媛, 林晓蓉, 等. 香叶醇联合冬凌草甲素对 MCF-7 细胞协同抗癌作用及其机理 [J]. *食品科学*, 2022, 43(3): 129-136.
- [7] 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.
- [8] Li F, Wang J, Yan Y Q, *et al.* CD147 promotes breast cancer migration and invasion by inducing epithelial-mesenchymal transition via the MAPK/ERK signaling pathway [J]. *BMC Cancer*, 2023, 23(1): 1214.
- [9] Li B, Huang L, Ruan J. PKMYT1 promotes epithelial-mesenchymal transition process in triple-negative breast cancer by activating notch signaling [J]. *Rev Invest Clin*, 2024, 76(1): 45-59.
- [10] Wu Q H, Leng X J, Ma X L, *et al.* Triptolide reduces MDA-MB-231 cell metastasis by attenuating epithelial-mesenchymal transition through the ROCK/PTEN/Akt axis [J]. *Chem Biodivers*, 2023, 20(12): e202300399.
- [11] Ben Ammar R. Potential effects of geraniol on cancer and inflammation-related diseases: A review of the recent research findings [J]. *Molecules*, 2023, 28(9): 3669.
- [12] El-Ganainy S O, Shehata A M, El-Mallah A, *et al.* Geraniol suppresses tumour growth and enhances chemosensitivity

- of 5-fluorouracil on breast carcinoma in mice: Involvement of miR-21/PTEN signaling [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2023, 75(8): 1130-1139.
- [13] Zhuang K, Tang H L, Guo H Q, *et al.* Geraniol prevents *Helicobacterium pylori*-induced human gastric cancer signalling by enhancing peroxiredoxin-1 expression in GES-1 cells [J]. *Microb Pathog*, 2023, 174: 105937.
- [14] Chen D X, Jiang J, Zhang W, *et al.* Tripartite motif-containing protein 50 suppresses triple-negative breast cancer progression by regulating the epithelial-mesenchymal transition [J]. *Cancer Biol Ther*, 2024, 25(1): 2427410.
- [15] Kassassir H, Papiewska-Pajak I, Kryczka J, *et al.* Platelet-derived microparticles stimulate the invasiveness of colorectal cancer cells via the p38MAPK-MMP-2/MMP-9 axis [J]. *Cell Commun Signal*, 2023, 21(1): 51.
- [16] Sun J, Hu J R, Liu C F, *et al.* ANKRD49 promotes the metastasis of NSCLC via activating JNK-ATF2/c-Jun-MMP-2/9 axis [J]. *BMC Cancer*, 2023, 23(1): 1108.
- [17] Zeng C, Guo J, Wu J J, *et al.* HRD1 promotes non-small cell lung carcinoma metastasis by blocking autophagy-mediated MIEN1 degradation [J]. *J Biol Chem*, 2023, 299(6): 104723.
- [18] Shao Y J, Liu Z H, Song X, *et al.* ALKBH5/YTHDF2-mediated m6A modification of circAFF2 enhances radiosensitivity of colorectal cancer by inhibiting Cullin neddylation [J]. *Clin Transl Med*, 2023, 13(7): e1318.
- [19] Xu X Y, Zhuang X F, Yu H W, *et al.* FSH induces EMT in ovarian cancer via ALKBH5-regulated Snail m6A demethylation [J]. *Theranostics*, 2024, 14(5): 2151-2166.
- [20] Huo F C, Zhu Z M, Du W Q, *et al.* HPV E7-driven ALKBH5 promotes cervical cancer progression by modulating m6A modification of PAK5 [J]. *Pharmacol Res*, 2023, 195: 106863.
- [21] Hu Y, Liu H Y, Xiao X D, *et al.* Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes inhibit triple-negative breast cancer cell stemness and metastasis via an ALKBH5-dependent mechanism [J]. *Cancers*, 2022, 14(24): 6059.

[责任编辑 高源]