

## O-GlcNAc 糖基化修饰和 Akt1 对胃癌细胞体外增殖及侵袭力的影响

章诺贝<sup>1</sup>, 陈新<sup>2△</sup>

(南昌大学第二附属医院:1. 消化科;2. 核医学科 330006)

**[摘要]** **目的** 探讨 O-连接 N-乙酰氨基葡萄糖(O-GlcNAc)糖基化修饰对胃癌细胞体外增殖及侵袭力的影响,并评价 Akt1 在 O-GlcNAc 糖基化促进胃癌细胞体外增殖及侵袭过程中的作用。**方法** 通过使 O-GlcNAc 转移酶(OGT)过表达(过表达 OGT 组)或沉默表达(沉默 OGT 组)及使用 O-GlcNAc 水解酶(OGA)特异性抑制剂 Thiamet-G(抑制剂组)下调 O-GlcNAc 水解酶活性(抑制剂组)等构建 O-GlcNAc 糖基化水平升高或降低的细胞模型;采用 MTT 法检测各组胃癌细胞增殖活力;软琼脂集落形成实验观察各组胃癌细胞集落形成;Transwell 细胞迁移实验各组胃癌细胞体外迁移和侵袭能力;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测各组胃癌细胞 Akt1 活性;Thiamet-G 处理 Akt1 表达沉默(沉默 Akt1 组)的胃癌细胞以评价 Akt1 在 O-GlcNAc 糖基化促进胃癌细胞侵袭中的作用;利用 Thiamet-G 处理 Akt1 过表达(过表达 Akt1 组)的胃癌细胞以进一步验证 Akt1 在 O-GlcNAc 糖基化调控胃癌细胞侵袭性过程中的作用。**结果** O-GlcNAc 糖基化水平升高可促进胃癌细胞增殖并显著提高细胞集落形成、体外迁移和侵袭的能力;Akt1 活性被由 O-GlcNAc 糖基化水平升高所介导的 Ser473 磷酸化上调而激活;Thiamet-G 诱导的细胞侵袭性被 Akt1 shRNA 所抑制;Akt1 高表达可进一步促进由 Thiamet-G 诱导的细胞侵袭性增强。**结论** O-GlcNAc 糖基化可部分通过 Akt1 途径增强胃癌细胞的体外增殖及侵袭力。

**[关键词]** 胃肿瘤;肿瘤浸润;细胞增殖;O-GlcNAc 糖基化;Akt1**[中图分类号]** R735.7**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2017)08-1027-05

## Effects of O-GlcNAcylation modification and Akt1 on proliferation and invasion of gastric cancer cells

Zhang Nuobei<sup>1</sup>, Chen Xin<sup>2△</sup>

(1. Department of Gastroenterology; 2. Department of Nuclear Medicine, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the influence of O-GlcNAcylation on proliferation and invasion of gastric cancer cells and evaluate the role of Akt1 on O-GlcNAcylation promoting cells proliferation and invasion in gastric cancer. **Methods** Build the cell model; O-GlcNAc glycosylation levels rise or fall. The cell viability was determined by MTT. To investigate whether O-GlcNAcylation affected colony formation ability of gastric cancer cells, soft agar colony assays were carried out. Cell migration or invasion was using transwell chambers. The expression of Akt1 was detected through Western blot. Thiamet-G was used to evaluate the role of Akt1 on O-GlcNAcylation regulating invasion in gastric cancer. **Results** O-GlcNAcylation increased the gastric cancer cells proliferation ability, colony formation ability, migration and invasion ability in vitro. Akt1 was activated by Ser473 phosphorylation upregulation through O-GlcNAcylation. Akt1 shRNA inhibited the cell invasive which induced by Thiamet-G. Akt1 overexpression was promoted by Thiamet-G-induced cell invasion. **Conclusion** O-GlcNAcylation enhanced oncogenic phenotypes possibly partially involving Akt1.

**[Key words]** stomach neoplasms; neoplasm invasiveness; cell proliferation; O-GlcNAcylation; Akt1

O-连接 N-乙酰氨基葡萄糖(O-Linked N-acetylglucosamine, O-GlcNAc)糖基化是细胞核与细胞质蛋白的丝氨酸和苏氨酸残基以 O-GlcNAc 修饰的一种高丰度可逆性翻译后修饰方式,它被认为能够调节细胞内蛋白质的功能及活性<sup>[1]</sup>。调控 O-GlcNAc 转换的酶只有两种:催化靶标蛋白分子添加 GlcNAc 基团的 O-GlcNAc 转移酶(O-GlcNAc transferase, OGT)和去除蛋白质分子中糖基的 O-GlcNAc 水解酶(O-GlcNAcase, OGA)。O-GlcNAc 糖基化广泛参与多种细胞生物学进程,如转录、细胞生长、细胞增殖、细胞周期进程、细胞凋亡、信号转导、代谢及细胞运动等<sup>[1]</sup>。

磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)家族通过参与多个信号通路从而调控细胞功能。PI3K 活化产生的脂质产物 3,4-二磷酸磷脂酰肌醇[PI(3,4)P<sub>2</sub>]和 3,4,5-三磷酸磷脂酰肌醇[PI(3,4,5)P<sub>3</sub>]作为第 2 信使结合并激活细胞内的靶蛋白,形成信号级联复合物,最终调控细胞的增殖、分化、生存和迁移<sup>[2]</sup>。Akt 是

一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,是 PI3K 的下游分子。Akt 至少有 3 个家族成员: Akt1、Akt2 和 Akt3,每个成员均在调节细胞功能中发挥各自的作用。PI3K/Akt 信号通路在肿瘤的发生、发展中发挥重要的作用<sup>[2]</sup>。

胃癌是最常见的癌症之一,也是癌症相关性死亡的最常见原因之一。在过去的几十年中,其发病率、诊断方法和治疗手段均已发生了重要变化,但胃癌患者的预后仍然很差,尤其是在发病晚期<sup>[3]</sup>。因此,有必要进一步探讨与胃癌恶性程度相关的潜在机制。

为了确定 O-GlcNAc 糖基化是否参与调控胃癌的进展,笔者利用使胃癌细胞的 OGT 过表达、OGA 抑制或 OGT 表达沉默等策略来改变 O-GlcNAc 糖基化水平,并对细胞增殖、迁移、侵袭等与恶性表型相关的细胞生物学功能进行检测。

## 1 材料与方法

## 1.1 材料

**1.1.1 细胞** 人胃癌细胞株 AGS(ATCC CRL-1739<sup>TM</sup>,美国),人胃癌细胞株 SGC-7901(凯基生物技术有限公司,江苏南京),Phoenix2<sup>TM</sup>-Ampho 包装细胞(Allele 生物技术公司,美国)。

**1.1.2 试剂** 10%胎牛血清(Wisent 公司,加拿大),RPMI-1640 培养基(Gibco 公司,美国),FuGENE 6、蛋白酶抑制剂混合物 Flag 标记的人核/质 OGT(ncOGT)表达载体 pCMV-Flag-OGT(Sigma 公司,美国),脂质体 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000、遗传霉素(Invitrogen 公司,美国),携带豆蔻酰化 HA-标记 Akt1(MAH)的 pLNCX 逆转录病毒载体(Addgene 公司,美国),聚凝胺、Immobilon-P 膜(Millipore 公司,美国),PUGNAc(研究化学用品公司,加拿大),细胞裂解缓冲液(P0013,碧云天生物技术公司,江苏),O-GlcNAc 单克隆抗体(RL2,亲和生物试剂公司,美国),Akt1 单抗、磷酸化-Akt1 单抗(细胞信号技术公司,美国),OGT 多克隆抗体  $\alpha$ 、GAPDH 多抗(圣克鲁斯公司,美国),RevertAid<sup>TM</sup> 第一链 cDNA 合成试剂盒(国际 Fermentas 公司,立陶宛),Transwell 小室(6.5 mm,Corning 公司,美国),基质胶(1 mg/mL;BD 生物科学公司,美国),总 RNA 提取试剂盒(A&A 生物技术公司,波兰),电化学发光(ECL)检测试剂盒(Amersham 生物科学公司,英格兰),蛋白 A 磁珠(通用电气医疗集团,美国)。

**1.1.3 仪器** TaqMan<sup>®</sup> 基因表达分析系统(应用生物系统公司,美国),Rainbow 酶标仪(Tecan 公司,奥地利)。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养和处理** 人胃癌细胞株 AGS 和 SGC-7901 在含有 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中进行培养。所有细胞都在饱和湿度的 37 °C 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,细胞用 5  $\mu$ mol/L 的 Thiamet-G 处理 48 h 或指定时间用于蛋白免疫印迹法(Western blot)或计数并传代用于侵袭性试验。

**1.2.2 OGT 或 Akt1 过表达细胞株的构建** Flag 标记的人 ncOGT 表达载体 pCMV-Flag-OGT,用于构建 OGT 过表达细胞株(过表达 OGT 组)。使用脂质体 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 按照制造商的说明书进行细胞转染。携带豆蔻酰化 HA-标记 Akt1(MAH)的 pLNCX 逆转录病毒载体用于豆蔻酰化 HA-标记 Akt1 过表达细胞株(过表达 Akt1 组)的构建。Phoenix2<sup>TM</sup>-Ampho 包装细胞被用作病毒载体。选用 FuGENE 6 作为 MAH 细胞的转染试剂。胃癌细胞用含 10  $\mu$ g/mL 聚凝胺的 Phoenix2<sup>TM</sup>-Ampho 包装细胞的过滤培养基(病毒上清液)感染 3 次。选用遗传霉素作为 MAH 细胞的选择剂。

**1.2.3 OGT 或 Akt1 组 RNA 干扰细胞株的构建** 将以人 OGT mRNA 编码序列为靶标的小干扰 RNA(siRNA)用于抑制 AGS 和 SGC-7901 细胞中 OGT 的表达(沉默 OGT 组)。shOGT 靶向序列是 5'-GGA TGC TTA TAT CAA TTT AGG-3'。用一段 shRNA 寡核苷酸作为对照,靶向序列为:5'-ACG TGA CAC GTT CGG AGA ATT-3'。设计靶向人 Akt1 mRNA 序列编码区的 siRNA 并用于抑制 AGS 和 SGC-7901 细胞中 Akt1 的表达。靶向序列:干扰 Akt1-1,5'-GCT ACT TCC TCC TCA AGA ACG-3';干扰 Akt1-2,5'-GGA CGG GCA CAT CAA GAT AAC-3';对照为 5'-ACG TGA CAC GTT CGG AGA ATT-3'。将合成的寡核苷酸退火并克隆到 Age I/EcoR I 双酶切的 pLKO.1-puro 慢病毒载体。基于 pLKO.1-puro 载体的慢病毒通过  $\Delta$ 3.2 和 VSV-G 质粒共转染至 HEK293T 细胞包装生成。初感染的细胞用 8  $\mu$ g/mL 的嘌呤霉素选择 2 周。

**1.2.4 实时荧光定量 PCR(RT-PCR)** 用总 RNA 提取试剂

盒按照制造商的说明书提取细胞总 RNA。取 1  $\mu$ g 细胞总 RNA 使用 RevertAid<sup>TM</sup> 第一链 cDNA 合成试剂盒按照试剂盒说明书逆转录获得第一链 cDNAs。使用 TaqMan<sup>®</sup> 基因表达分析系统按照制造商的说明书进行 cDNA 实时扩增。采用荧光 FAM 标记的探针及编码 Akt1 和内参 GAPDH 基因的序列特异性引物进行扩增。经 GAPDH 表达水平归一化的 Akt1 表达的倍数差异用公式  $2^{\Delta\Delta Ct}$  进行计算。siRNA 处理细胞的 mRNA 相对量以未经处理细胞 mRNA 量的百分比表示。

**1.2.5 细胞增殖实验** 用噻唑蓝(MTT)染料转化来评估细胞增殖。按  $1 \times 10^4$ /孔将细胞接种至 96 孔板。让细胞生长 24 或 48 h 后,每孔加入 20  $\mu$ L MTT(5 mg/mL 的 PBS 溶液)。在 37 °C 经过 4 h 的孵育后,加入 200  $\mu$ L 二甲基亚砷裂解细胞。使用 Rainbow 酶标仪测量 570 nm 吸光度(A)值。

**1.2.6 集落形成能力试验** 将细胞  $5 \times 10^3$  重悬于 1 mL 的顶层琼脂培养基(添加 0.4%琼脂的细胞培养基)。然后将细胞悬液覆盖到 6 孔板中 1.5 mL 底层琼脂培养基(添加 0.8%琼脂的细胞培养基)上,设置 3 个复孔。每 4 天向板中加入新鲜的培养基用作饲养层。2 周后,在 40 倍光镜下选择 6 个视野进行集落计数。每个样本进行 3 次独立实验。

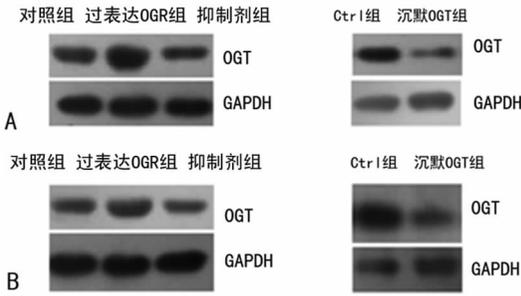
**1.2.7 细胞迁移和侵袭试验** 细胞迁移试验用带 8  $\mu$ m 微孔膜的 Transwell 小室完成。将小室插入 Transwell 仪器。进行细胞侵袭试验时,将小室用基质胶包被。下室用 600  $\mu$ L 含或不含 OGA 抑制剂的细胞条件培养液填充。将细胞  $5 \times 10^4$  用 100  $\mu$ L 含 1%小牛血清的 RPMI-1640 培养基重悬后置于有或无 OGA 抑制剂的上室。20 h 后,在 100 倍光镜下选取 6 个视野,对碳酸酯膜底面上出现结晶紫染色的细胞进行计数。侵袭试验中的孵化时间延长至 24 h。

**1.2.8 Western blot 分析** 用含有蛋白酶抑制剂混合物和 5  $\mu$ mmol/L PUGNAc(一种 OGA 抑制剂)的细胞裂解缓冲液裂解细胞后获取细胞总蛋白,用于 Western blot 分析和免疫沉淀。蛋白质样品(50  $\mu$ g)用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)在还原态下进行分离,并转移至 Immobilon-P 膜。检测用抗体有:O-GlcNAc 单克隆抗体,Akt1 单抗,磷酸化-Akt1 单抗(Ser473),HA-标记单抗,OGT 多克隆抗体和 GAPDH 多抗;用 ECL 检测试剂盒检测。在免疫沉淀中,细胞裂解产物与特异性抗体和蛋白 A 磁珠在 4 °C 轻柔混合 3 h。免疫沉淀物用裂解缓冲液清洗,用 SDS 样品缓冲液洗脱,之后用 SDS-PAGE 分离。检测磷酸化 Akt1 时,细胞裂解物中的 Akt1 蛋白用 Akt1 抗体免疫沉淀。

**1.3 统计学处理** 所有实验重复至少 3 次。采用 SPSS13.0 软件分析数据,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,各指标都先做方差分析,差异有统计学意义后,作两两比较 LSD-*t* 检验,检验水准  $\alpha=0.05$ ,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 胃癌细胞株的 O-GlcNAc 糖基化水平被升高或降低** 为了探讨 O-GlcNAc 糖基化是否对胃癌恶性程度具有重要的作用,以过表达 OGT 或抑制 OGA(5  $\mu$ mmol/L Thiamet-G 处理,抑制剂组)来提高胃癌细胞株 AGS 和 SGC-7901 的 O-GlcNAc 糖基化水平,并通过沉默 OGT 表达来降低 O-GlcNAc 糖基化水平。(1)与未经任何处理的 AGS 和 SGC-7901 细胞(对照组)相比,过表达 OGT 组与经 Thiamet-G 处理(抑制剂组),在 24 h 后,O-GlcNAc 糖基化水平有效升高。(2)与对照组相比,感染 CGT siRNA 的沉默 OGT 组 AGS 和 SGC-7901 细胞中 OGT 蛋白表达和 O-GlcNAc 糖基化水平均显著降低,见图 1。



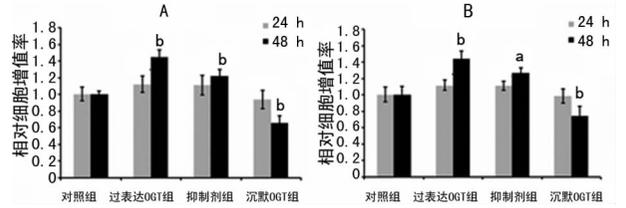
A: AGS 细胞; B: SGC-7901.

图 1 OGT 过表达和 OGA 受抑制或沉默 OGT 表达 O-GlcNAc 修饰水平降低

**2.2 O-GlcNAc 糖基化促进胃癌细胞的增殖活力** 各组细胞相应处理 24 h 和 48 h 后,用 MTT 法检测细胞增殖率。结果表明,与对照组细胞相比,处理 24 h 的胃癌细胞株 AGS 和 SGC-7901 的增殖率受 O-GlcNAc 糖基化的影响并不明显。然而,48 h 后与对照组细胞相比,过表达 OGT 组、抑制剂组 AGS 和 SGC-7901 细胞株增殖率分别增加约 45%、22% 和 44%、27%。相反,沉默 OGT 组两种细胞的增殖率分别降低约 34% 和 25%,见图 2。

**2.3 O-GlcNAc 糖基化增强胃癌细胞集落形成能力** 软琼脂

集落试验表明,与对照组细胞相比,两种细胞中抑制剂组细胞集落形成能力增加;同时,与对照组细胞相比,沉默 OGT 组细胞集落形成能力降低,见图 3。

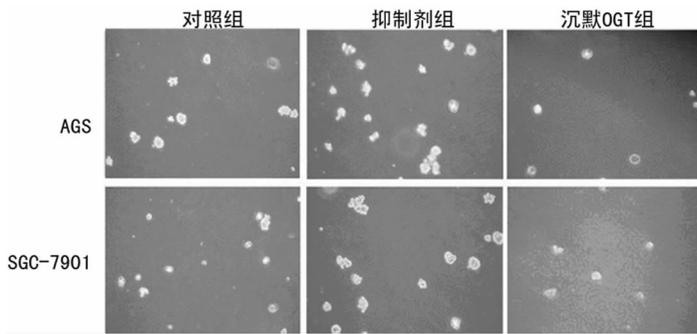


A: AGS 细胞; B: SGC-7901 细胞; a:  $P < 0.05$ ; b:  $P < 0.01$ , 与对照组比较。

图 2 O-GlcNAc 修饰可促进胃癌细胞增殖

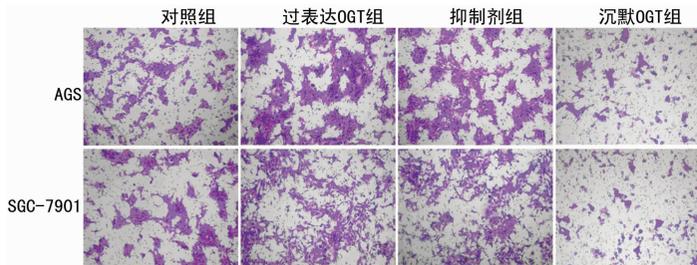
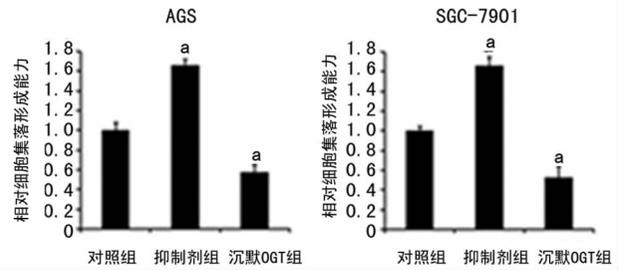
**2.4 O-GlcNAc 糖基化促进胃癌细胞迁移** 迁移试验显示,与对照组细胞相比,过表达 OGT 组和抑制剂组细胞迁移能力增加,而沉默 OGT 组细胞的迁移能力明显抑制,见图 4。

**2.5 O-GlcNAc 糖基化增强胃癌细胞侵袭性** O-GlcNAc 糖基化在胃癌细胞转移中的作用也通过 24 h 体外侵袭试验进行检测。结果表明,与对照组细胞相比,过表达 OGT 和抑制剂组的侵袭性增强,相反,沉默 OGT 组细胞侵袭性明显受抑制,见图 5。



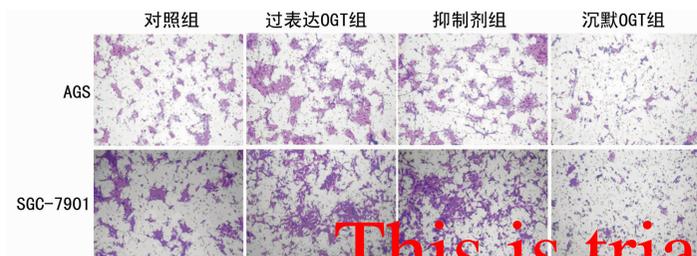
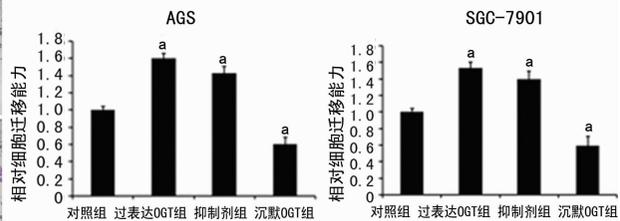
a:  $P < 0.01$ , 与对照组比较。

图 3 O-GlcNAc 糖基化可增强胃癌细胞集落形成能力



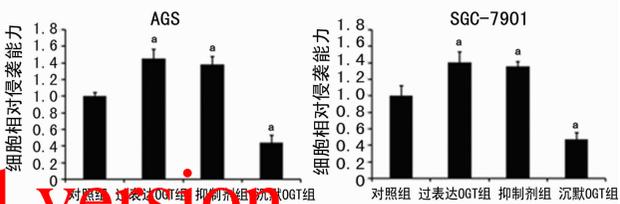
a:  $P < 0.01$ , 与对照组比较。

图 4 O-GlcNAc 糖基化可促进胃癌细胞体外迁移

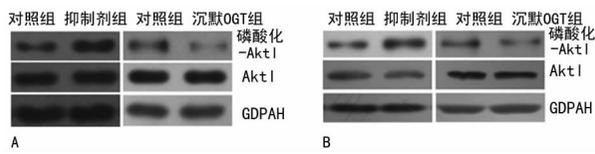


a:  $P < 0.01$ , 与对照组比较。

图 5 O-GlcNAc 糖基化可促进胃癌细胞体外侵袭性



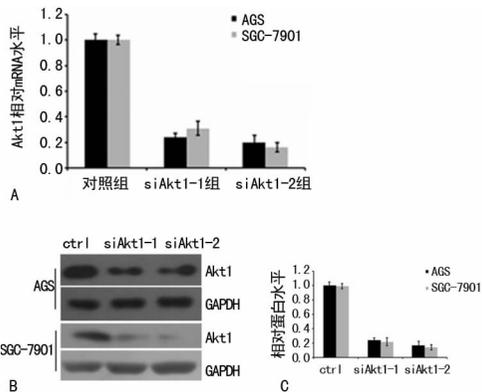
**2.6** 上调 O-GlcNAc 糖基化会提高 Akt1 Ser473 位点磷酸化水平 与对照组细胞相比,抑制剂组细胞 Akt1 Ser473 位点磷酸化水平增加 (AGS:  $t = 2.764, P = 0.031$ ; SGC-7901:  $t = 2.586, P = 0.027$ ),沉默 OGT 组细胞的 Ser473 位点磷酸化水平降低 (AGS:  $t = 2.694, P = 0.029$ ; SGC-7901:  $t = 2.766, P = 0.027$ ),见图 6。



A: AGS 细胞; B: SGC-7901 细胞。

图 6 O-GlcNAc 糖基化对胃癌细胞侵袭性的调控与 PI3K/Akt1 信号通路有关

**2.7** 胃癌细胞中 Akt1 蛋白的沉默 为了评价 Akt1 在 O-GlcNAc 糖基化调控胃癌细胞侵袭性中的作用,本研究用两个 siRNA (干扰 Akt1-1 和干扰 Akt1-2) 下调 AGS 和 SGC-7901 细胞株中 Akt1 的表达水平。对照细胞则转染非沉默乱序 RNA (Ctrl 组)。用实时 RT-PCR 和 Western blot 分析评估 RNAi 的沉默效果。两个 siRNA 均可明显降低 Akt1 mRNA 水平和蛋白表达水平 (图 7)。然而,与 siAkt1-1 比较, siAkt1-2 在降低 Akt1 水平上更为有效,因此其被选择用于后续实验 (沉默 Akt1 组)。



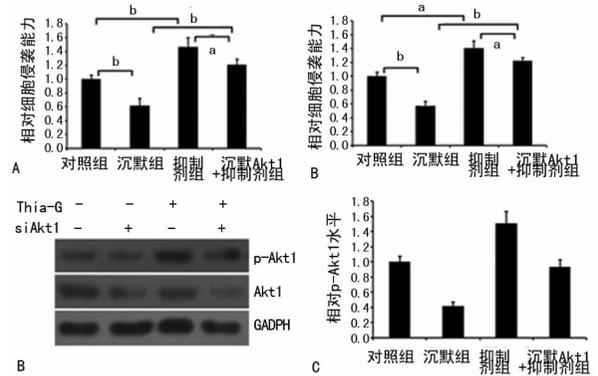
A: Akt1 mRNA 分析图; B: Akt1 Western blot 图。

图 7 siRNA 沉默胃癌细胞 Akt1 基因的表达

**2.8** Akt1 沉默可阻断 O-GlcNAc 糖基化对胃癌细胞侵袭性的促进作用 Akt1 表达沉默的 AGS 细胞株用  $5 \mu\text{mol/L}$  Thiamet-G 处理以评估 Akt1 对 O-GlcNAc 糖基化增强胃癌细胞侵袭性的影响。结果表明, Akt1 表达沉默可显著减弱由 Thiamet-G 处理所诱导的细胞侵袭性,但其侵袭性仍然高于仅转染 Akt1 shRNA 的细胞。换言之, Thiamet-G 能恢复 Akt1 表达沉默胃癌细胞的侵袭性,但仍相对低于仅被 Thiamet-G 处理的细胞而又相对高于对照组细胞 (图 8C、D)。Western blot 分析 (图 8B) 结果显示了 Akt1 蛋白水平及其 Ser473 位点磷酸化水平。在 SGC-7901 细胞株也得到了类似结果 (图 8B)。

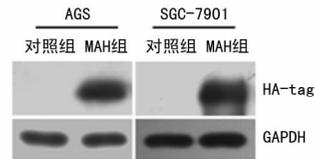
**2.9** Akt 信号通路激活可增强 O-GlcNAc 糖基化对胃癌细胞侵袭性作用 为进一步验证 Akt1 在 O-GlcNAc 糖基化调控胃癌细胞侵袭性过程中的作用,笔者向 AGS 和 SGC-7901 细胞株转染携带 HA-标记豆蔻酰化 Akt1 (MAH 组) 的表达载体。发现相对于对照组细胞, MAH 组细胞株显示出高水平的 Akt1 表达 (图 9A)。将 MAH 细胞用  $5 \mu\text{mol/L}$  Thiamet-G 处

理后检测其侵袭性,结果表明, Akt1 过表达可进一步增强由 Thiamet-G 所诱导的细胞侵袭性 (图 9B), 此结果进一步支持了上述关于 Akt1 与 O-GlcNAc 糖基化一齐促进胃癌细胞侵袭性相关的结论。



A: AGS 细胞侵袭性试验分析图; B: AGS 细胞 Western blot; C: Western blot 分析图;  $a: P < 0.05, b: P < 0.01$ 。

图 8 沉默 Akt1 基因表达可阻遏 O-GlcNAc 糖基化对胃癌细胞侵袭性的促进作用



A: Western blot; B: Western blot 分析图。  $a: P < 0.05, b: P < 0.01$ 。

图 9 促进 Akt1 基因表达可增强 O-GlcNAc 糖基化对胃癌细胞侵袭性的促进作用

### 3 讨论

胃癌在最常见恶性肿瘤类型中排第 4 位,而且是最常见的癌症死亡原因之一。尽管早期胃癌的临床治疗已经取得了重大成效,但晚期胃癌患者的长期存活率仍然相当有限。晚期或转移性胃癌的 5 年生存率是仅为  $5\% \sim 20\%$ ,中位生存期少于 1 年<sup>[4]</sup>。因此,调控胃癌发生、发展的确切分子机制有待进一步探索。

研究发现, O-GlcNAc 糖基化在多种人类癌症的发生、发展中发挥关键作用。许多原癌基因和抑癌基因如 c-Fos、c-Jun、c-Myc、pRB 和 p53 均被 O-GlcNAc 修饰<sup>[5]</sup>。Gu 等<sup>[6]</sup>发现, O-GlcNAc 和 OGT 蛋白表达水平在高转移性乳腺癌细胞系中显著升高;此外, Mi 等<sup>[7]</sup>也指出, 乳腺肿瘤组织中 O-GlcNAc 表达水平明显高于与之配对的相邻组织。以上研究结果提示,高 O-GlcNAc 糖基化水平可能参与乳腺肿瘤的发生发展。另外,还有报道指出, O-GlcNAc 与胰腺癌、前列腺癌、卵巢癌恶性程度的调控相关<sup>[8-10]</sup>。综上所述, O-GlcNAc 糖基化对肿瘤的发生发展起到关键的调控作用。

然而, O-GlcNAc 糖基化同胃癌的关系目前尚不清楚。在本研究中,笔者分析了 O-GlcNAc 糖基化在胃癌发生、发展中

的作用。本研究结果表明,O-GlcNAc 糖基化通过促进体外细胞增殖、锚定非依赖性生长、迁移和侵袭进而增强胃癌恶性程度。不过,胃癌细胞的增殖在 O-GlcNAc 糖基化水平升高或降低处理 24 h 并未受到显著影响(图 2),而细胞的迁移能力和侵袭性在 O-GlcNAc 糖基化升高或降低处理 24 h 却均被促进或抑制,这提示细胞迁移能力和侵袭性受 O-GlcNAc 糖基化的调控可能并不依赖于其对细胞活力的影响。而在处理 48 h 后,O-GlcNAc 糖基化则表现出对细胞增殖的调控作用。这些结果提示,O-GlcNAc 糖基化水平升高可能会启动和促进胃癌的形成和转移。并且,一系列有关 O-GlcNAc 糖基化在肿瘤发展中作用的研究均支持了本研究结果<sup>[5-11]</sup>。

作为一种应激传感器,O-GlcNAc 糖基化水平在受不同应激作用的多种哺乳动物细胞株中出现迅速且动态性升高,细胞借此重建其代谢和信号途径以促进生存<sup>[12]</sup>。肿瘤细胞的异常代谢或生长由多种形式的刺激和应激作用引起,它们包括活性氧、细胞外基质成分、基底膜、营养缺乏、缺氧和免疫系统攻击。O-GlcNAc 糖基化可通过增强 FOXO4 转录活性从而保护细胞免受氧化应激损伤<sup>[13]</sup>。此外,通过降低 OGT 表达水平或阻断己糖胺生物合成途径(hexosamine biosynthetic pathway, HBP)来降低 O-GlcNAc 糖基化能够使细胞对凋亡刺激更加敏感<sup>[12]</sup>。因此,O-GlcNAc 糖基化水平升高也可能有利于胃癌细胞抵抗凋亡刺激,从而加速肿瘤的形成和发展。

PI3K/Akt 信号通路可通过多种途径传递侵袭和转移信号并且还参与多种因素诱导的肿瘤血管生成过程。PI3K 通过与 E-钙黏蛋白、 $\beta$ -连环蛋白及血管内皮生长因子受体 2(VEGFR-2)相互作用从而参与血管内皮生长因子(VEGF)介导的内皮细胞信号,进而激活 PI3K/Akt 通路;此外,VEGFR-2 和  $\alpha$ V $\beta$ 3 复合体也可通过 PI3K 依赖信号通路介导内皮细胞的黏附和迁移<sup>[14]</sup>;PI3K/Akt 还能够通过促进由肿瘤坏死因子诱导的内皮细胞迁移从而调节肿瘤血管生成<sup>[15]</sup>。有报道指出,O-GlcNAc 糖基化的上调会通过增加 Akt1 活性从而促进甲状腺未分化癌细胞的增殖<sup>[16]</sup>。本研究发现 O-GlcNAc 糖基化能提高胃癌细胞的侵袭性。Akt1 表达沉默可减弱由 Thiamet-G 所诱导的细胞侵袭性,但其侵袭性仍然仅高于 Akt1 表达沉默的细胞(图 8A、C)。此外,Akt1 过表达还能够增强由 Thiamet-G 所诱导的细胞侵袭性。以上结果提示,O-GlcNAc 糖基化可部分经 Akt1 调节胃癌细胞侵袭性,不过,还可能还有其他信号通路或蛋白质参与该调控过程。细胞表面 E-钙黏蛋白的减少和细胞黏附的减弱可能是 O-GlcNAc 糖基化诱导乳腺癌转移的潜在分子机制<sup>[7]</sup>。肌动蛋白结合蛋白-人肌动蛋白素(cofilin)在 OGT 的作用下发生 O-GlcNAc 糖基化,并在由 OGT 调控的细胞迁移过程中发挥关键的介导作用<sup>[17]</sup>。在乳腺癌细胞三维细胞侵袭过程中,cofilin 的 Ser-108 位点的 O-GlcNAc 糖基化是其正确定位于乳腺癌细胞前缘侵袭性伪足的必要条件<sup>[17]</sup>。近年来,越来越多的证据表明,O-GlcNAc 糖基化的靶标蛋白和 O-GlcNAc 调节的信号通路与肿瘤发生、发展有关<sup>[8-11]</sup>。因此,有必要进一步深入研究以更好地理解由 O-GlcNAc 糖基化诱导的胃癌侵袭的潜在机制。此外,Akt 至少包括 3 个家族成员:Akt1、Akt2 和 Akt3,每个成员在调节细胞功能中均发挥各自作用。除 Akt1 外,其他 Akt 家族成员的活性变化对 O-GlcNAc 糖基化调控细胞恶性的影响仍有待阐明。

总之,本研究提供的以上证据表明,O-GlcNAc 糖基化能够影响胃癌的恶性程度。显然,理解异常 O-GlcNAc 糖基化与

肿瘤生物学行为之间的明确关系必将有利于癌症的诊断和治疗。

## 参考文献

- [1] Hart GW, Housley MP, Slawson C. Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins [J]. *Nature*, 2007, 446(7139): 1017-1022.
- [2] Arboleda MJ, Lyons JF, Kabbinnar FF, et al. Overexpression of AKT2/protein kinase B beta leads to up-regulation of beta 1 integrins, increased invasion, and metastasis of human breast and ovarian cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(1): 196-206.
- [3] Herrero R, Park JY, Forman D. The fight against gastric cancer-the IARC Working Group report [J]. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2014, 28(6): 1107-1114.
- [4] Kamangar F, Dores GM, Anderson WF. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world [J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24(14): 2137-2150.
- [5] Kamemura K, Hayes BK, Comer FI, et al. Dynamic interplay between O-glycosylation and O-phosphorylation of nucleocytoplasmic proteins: alternative glycosylation/phosphorylation of THR-58, a known mutational hot spot of c-Myc in lymphomas, is regulated by mitogens [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(21): 19229-19235.
- [6] Gu Y, Mi W, Ge Y, et al. GlcNAcylation plays an essential role in breast cancer metastasis [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(15): 6344-6351.
- [7] Mi W, Gu Y, Han C, et al. O-GlcNAcylation is a novel regulator of lung and colon cancer malignancy [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1812(4): 514-519.
- [8] Banerjee S, Sangwan V, McGinn O, et al. Triptolide-induced cell death in pancreatic cancer is mediated by O-GlcNAc modification of transcription factor Sp1 [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(47): 33927-33938.
- [9] Kamigaito T, Okaneya T, Kawakubo M, et al. Overexpression of O-GlcNAc by prostate cancer cells is significantly associated with poor prognosis of patients [J]. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 2014, 17(1): 18-22.
- [10] de Queiroz RM, Madan R, Chien J, et al. Changes in O-linked N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) homeostasis activate the p53 pathway in ovarian cancer cells [J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(36): 18897-18914.
- [11] Ma Z, Vosseller K. Cancer metabolism and elevated O-GlcNAc in oncogenic signaling [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(50): 34457-34465.
- [12] Sohn KC, Lee KY, Park JE, et al. OGT functions as a catalytic chaperone under heat stress response; a unique defense role of OGT in hyperthermia [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 323(3): 1045-1051.
- [13] Ho SR, Wang K, Whisenant TR, et al. O-GlcNAcylation enhances FOXO transcriptional regulation (下转第 1035 页)

另一因素就是保存温度,甲状腺在离体后理论上就形成了“热缺血”损伤,借鉴其他器官移植研究,为了减少“热缺血”损伤,通常将待移植器官保存在 0~4 °C 灌注液中,因此本研究将离体甲状腺保存在 4 °C 生理盐水中,30 min 后,甲状腺细胞形态未见明显改变,电镜下也只有少量线粒体肿胀、嵴断裂;而在室温保存 30 min 后,甲状腺细胞开始肿胀、空泡变性增多,电镜下细胞核变形、不规则,线粒体极度肿胀、减少。再者为体外临时保存的时间,有研究在甲状腺延时自体移植中证明保存时间是移植成功率的关键因素,同样本实验也观察到甲状腺组织在体外保存 30 min 后开始出现空泡变性,细胞核变形,细胞内线粒体肿胀、嵴断裂等细胞失活表现的变化。

甲状腺作为内分泌腺体,其作用就是分泌 PTH,从而调节机体钙、磷代谢,进行自体移植后体内循环的血 PTH、血钙能间接地反映移植后功能恢复情况,而切除后的病理检查更是直接、客观地反映出细胞存活与否。从 D、E、F 3 组实验结果:甲状腺自体移植均存活,实验动物血钙、血 PTH 均在逐渐的上升恢复,术后第 7 天时,D 组恢复最快,E 组次之,F 组最慢;病理结果:D、E 组甲状腺细胞均大量存活,而 F 组甲状腺细胞部分健存于肌肉组织中。可以看出:不同的体外保存方式对甲状腺自体移植后的存活情况是有影响的。

甲状腺手术中甲状腺的自体移植是避免术后永久性甲状腺功能减退的重要方法,术中甲状腺体外临时保存是移植过程中的重要环节,从实验可以看出体外保存时间、温度都是影响其活性的重要因素,那么在临床工作中应该尽量减少其在体外保存时间。因此,笔者建议对术中可疑甲状腺组织务必及时送检,同时联系病理科做到优先处理,在等待结果的过程中应保存在 4 °C 生理盐水中,并尽量在 30 min 内进行移植,最大程度地维持其细胞活性,对于术中明确是甲状腺组织的可以不再经病理确认,立即移植以提高自体移植的成活率。

## 参考文献

- [1] Jung KW, Won YJ, Kong HJ, et al. Cancer statistics in Korea: incidence, mortality, survival, and prevalence in 2012[J]. *Cancer Res Treat*, 2015, 47(2): 127-141.
- [2] 刘玉琴,张书全,陈万青,等. 中国 2003-2007 年甲状腺癌发病死亡现状及流行趋势分析[J]. *中华流行病学杂志*, 2012, 33(10): 1044-1048.
- [3] Yoshida A. Guidelines for the management of thyroid tumors [J]. *Nihon Geka Gakkai Zasshi*, 2012, 113(6): 507-511.
- [4] 孙荣昊,李超,樊晋川,等. 中央区淋巴清扫术对初治分化型甲状腺癌临床价值的 Meta 分析[J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2014, 49(2): 157-164.
- [5] 张海添,陆云飞,廖清华,等. 甲状腺手术中显露喉返神经价值的 Meta 分析[J]. *中华普通外科杂志*, 2005, 20(4): 204-206.
- [6] 孙辉,刘晓莉,连丽新,等. 喉返神经术中监测的原理与应用[J]. *中国医学文摘(耳鼻咽喉科学)*, 2012, 27(3): 137-140.
- [7] 孙辉. 甲状腺及甲状腺旁腺手术中神经电生理监测临床指南(中国版)[J]. *中国实用外科杂志*, 2013, 8(6): 470-474.
- [8] Dionigi G, Barczynski M, Chiang FY, et al. Why monitor the recurrent laryngeal nerve in thyroid surgery? [J]. *J Endocrinol Invest*, 2010, 33(11): 819-822.
- [9] Giordano D, Valcavi R, Thompson GB, et al. Complications of central neck dissection in patients with papillary thyroid carcinoma: results of a study on 1087 patients and review of the literature[J]. *Thyroid*, 2012, 22(9): 911-917.
- [10] 朱精强. 甲状腺手术中甲状腺旁腺保护专家共识[J]. *中国实用外科杂志*, 2015, 35(7): 731-736.
- [11] Wells SA, Gunnells JC, Shelburne JD. Transplantation of the parathyroid glands in man: clinical indications and results[J]. *Surg*, 1975(78): 34-44.
- [12] Reeve T, Thompson NW. Complications of thyroid surgery: how to avoid them, how to manage them, and observations on their possible effect on the whole patient[J]. *World J Surg*, 2000, 24(8): 971-975.
- [13] Testini M, Rosato L, Avenia N, et al. The impact of single parathyroid gland autotransplantation during thyroid surgery on postoperative hypoparathyroidism: a multicenter study[J]. *Transplant Proc*, 2007, 39(1): 225-230.
- [14] De Menezes Montenegro FL, Custódio MR, Arap SS, et al. Successful implant of long-term cryopreserved parathyroid glands after total parathyroidectomy [J]. *Head Neck*, 2007, 29(3): 296-300.
- [15] Barreira CE, Cernea CR, Brandão LG, et al. Effects of time on ultrastructural integrity of parathyroid tissue before cryopreservation [J]. *World J Surg*, 2011, 35(11): 2440-2444.
- [16] 刘仁斌. 经裸鼠中间过渡胎儿甲状腺同种移植[D]. 广州: 中山医科大学, 1992.

(收稿日期: 2016-10-18 修回日期: 2016-12-10)

(上接第 1031 页)

- lination in response to stress[J]. *FEBS Lett*, 2010, 584(1): 49-54.
- [14] Tan PH, Xue SA, Manunta M, et al. Effect of vectors on human endothelial cell signal transduction: implications for cardiovascular gene therapy[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26(3): 462-467.
- [15] Zhang R, Xu Y, Ekman N, et al. Etk/Bmx transactivates vascular endothelial growth factor 2 and recruits phosphatidylinositol 3-kinase to mediate the tumor necrosis factor-induced angiogenic pathway [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(51): 51267-51276.
- [16] Krzeslak A, Józwiak P, Lipińska A. Down-regulation of  $\beta$ -N-acetyl-D-glucosaminidase increases Akt1 activity in thyroid anaplastic cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2011, 26(3): 743-749.
- [17] Huang X, Pan Q, Sun D, et al. O-GlcNAcylation of cofilin promotes breast cancer cell invasion [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(51): 36418-36425.

(收稿日期: 2016-10-22 修回日期: 2016-12-20)