

O-糖基转移酶介导的O-糖基化在卵巢癌细胞迁移过程中的作用及其机制研究

晋凤珍¹ 于超² 杨竹^{1*}

(¹重庆医科大学第二附属医院妇产科, 重庆 400010; ²重庆医科大学生命科学研究院, 重庆 400016)

摘要 探讨O-GlcNAc糖基转移酶(OGT)介导的O-GlcNAc糖基化在卵巢癌细胞迁移过程中的作用及其分子机制。采用RNAi基因干扰技术, 干扰OGT基因的表达, 构建低表达O-GlcNAc糖基化的卵巢癌HO-8910PM细胞模型; 采用O-GlcNAc糖苷酶(OGA)抑制剂PUGNAc或Thiamet G诱导, 构建高表达O-GlcNAc糖基化的卵巢癌OVCAR3细胞模型; 通过qPCR和Western blot法验证细胞模型的有效性; 通过体外细胞迁移实验观察O-GlcNAc糖基化对卵巢癌细胞迁移的影响; 并通过qPCR法进一步检测不同的细胞模型中基质金属蛋白酶-2(MMP-2)和MMP-9的表达。结果显示, 在HO-8910PM细胞中, 干扰OGT基因的表达, 可以降低MMP-2和MMP-9的mRNA水平, 抑制HO-8910PM细胞的迁移。综上, OGT介导的O-GlcNAc糖基化可以通过调节MMP-2和MMP-9的表达参与调控卵巢癌细胞的迁移。

关键词 OGT; OVCAR3; HO-8910PM; 基质金属蛋白酶-2; 基质金属蛋白酶-9

A Study on the Effect and Mechanism of O-GlcNAc Transferase Mediated O-Glycosylation in Ovarian Cancer Cell Migration

Jin Fengzhen¹, Yu Chao², Yang Zhu^{1*}

(¹The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China; ²Institute of Life Science, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract In present study, we explore the effect and molecular mechanism of O-GlcNAc transferase (OGT) mediated O-Glycosylation in the ovarian cancer cell migration. We established low-expressed O-Glycosylation ovarian cancer HO-8910PM cell models induced with OGT gene interference and high-expressed O-Glycosylation ovarian cancer OVCAR3 cell models induced with OGA inhibitors; the expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), MMP-9, OGT and total O-Glycosylation level were detected by qPCR and Western blot assays; the migration of ovarian cancer cells were observed using transwell cell migration assays *in vitro*. Our results showed that the migration ability of OVCAR3 cells was obviously enhanced by OGA inhibition and the migration potential of HO-8910PM cells was dramatically reduced by OGT interference; the mRNA levels of MMP-2 and MMP-9 in HO-8910PM cells were significantly reduced by OGT interference. In summary, we describe a novel role for the

收稿日期: 2012-12-17 接受日期: 2012-12-26

国家自然科学基金(批准号: 81070222)和重庆市自然科学基金(批准号: CSTC2009BA5083)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-68485589, Fax: 023-68486294, E-mail: cqyangz@vip.163.com

Received: December 17, 2012 Accepted: December 26, 2012

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81070222) and the Natural Science Foundation of Chongqing (Grant No.CSTC2009BA5083)

*Corresponding author. Tel: +86-23-68485589, Fax: +86-23-68486294, E-mail: cqyangz@vip.163.com

网络出版时间: 2013-03-12 17:16 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130312.1716.001.html>

O-Glycosylation mediated by OGT in the migration of human ovarian cancer cells through, in part, increasing the expression of *MMP-2* and *MMP-9* mRNA levels.

Key words OGT; OVCAR3; HO-8910PM; MMP-2; MMP-9

卵巢癌是妇科常见的恶性肿瘤之一,在妇科恶性肿瘤中发病率居第三位,但由于缺乏特异的早期诊断指标,很多病患确诊时已发生远处转移,致使其致死率在妇科恶性肿瘤中居高不下。癌细胞的远处转移是多步骤多因素的过程,但其具体的分子机制尚不清楚。

近年来, O-GlcNAc糖基化与肿瘤转移相关性的研究正在成为此领域研究中的热点。有研究发现, O-GlcNAc糖基化可以增强乳腺癌细胞的侵袭和迁移^[1]。

也有文献报道, O-GlcNAc糖基化在肺癌和结肠癌转移过程中发挥着重要的作用^[2]。另外, O-GlcNAc糖基化还参与了前列腺癌转移过程的调控^[3]。这说明, O-GlcNAc糖基化修饰与肿瘤的转移密切相关。

O-GlcNAc糖基化,是一种常见的蛋白翻译后修饰方式,它是指在O-GlcNAc糖基转移酶(O-GlcNAc transferase, OGT)的催化作用下,在靶蛋白的丝/苏氨酸残基上添加一个N-乙酰葡萄糖胺^[4-5],并且添加了N-乙酰葡萄糖胺之后的糖链不能再被进一步修饰;而O-GlcNAc糖苷酶(O-GlcNAcase, OGA)可以催化水解糖蛋白上的O-GlcNAc糖链;尿苷二磷酸-N-乙酰葡萄糖胺(UDP-GlcNAc)是O-GlcNAc糖基化修饰的直接供体。PUGNAc^[6-8]和Thiamet G^[2]是OGA潜在的特异性抑制剂,可以诱导靶蛋白的O-GlcNAc糖基化水平增高。研究表明,许多癌基因和抑癌基因都可以被O-GlcNAc糖基化修饰,包括p53^[9-11]、c-myc^[12-13]、IKK^[14-16]和Snail^[17];而这些蛋白的O-GlcNAc糖基化失常与肿瘤的发生发展密切相关^[18]。虽然近几年来已经有研究表明,功能蛋白的O-GlcNAc糖基化在多种肿瘤(包括:乳腺癌、前列腺癌、结直肠癌、肺癌、肝癌以及白血病等)的发生发展转移侵袭过程中都发挥着重要的作用^[1-3,18-23],但是关于O-GlcNAc糖基化在卵巢癌转移过程中的作用研究还未见报道。因此,本课题利用RNAi基因干扰技术,干扰OGT基因的表达,构建低表达O-GlcNAc糖基化的卵巢癌细胞模型;利用OGA抑制剂PUGNAc或Thiamet G诱导,构建高表达O-GlcNAc糖基化的卵巢癌细胞模型;并通过体外细胞实验,探讨功能蛋白

的O-GlcNAc糖基化在卵巢癌细胞迁移过程中的作用及其可能的分子机制,为临床上卵巢癌治疗新靶点的发现提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

RPMI 1640培养基购自美国Gibco公司,胎牛血清(FBS)购自杭州四季青生物有限公司,RIPA裂解液和丝氨酸蛋白酶抑制剂(PMSF)、酪氨酸蛋白酶抑制剂(Tyr)、苏/丝氨酸蛋白酶抑制剂(Thr/Ser)购自美国CST公司(蛋白酶抑制剂的使用浓度均为1%,由1 g的蛋白酶抑制剂冻干粉末加入100 mL超纯水溶解稀释而成),细胞裂解液(TRIZOL)和PCR扩增试剂盒购自大连宝生物工程有限公司(TaKaRa),脱脂奶粉购自中国伊利有限公司,ECL化学发光试剂和PVDF膜(0.45 μm)购自美国Millipore公司, RNA逆转录试剂盒购自美国Genecopoeia生物有限公司,BCA蛋白定量试剂盒购自北京博迈德发展科技有限公司,牛血清白蛋白(BSA)和OGA抑制剂PUGNAc(PUG)购自美国Sigma公司,OGA抑制剂Thiamet G(TM)购自美国Cayman公司,化学合成siRNA由上海吉玛生物有限公司设计合成,Effectene化学转染试剂购自美国QIAGEN公司,兔源抗β-actin抗体购自美国CST公司,兔源抗-OGT抗体购自美国Santa Cruz生物技术有限公司,鼠源抗-O-GlcNAc(RL2克隆)购自美国Abcam公司,辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG二抗、山羊抗小鼠IgM二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司,96孔板、24孔板、6孔板以及8 μm孔径(直径6 mm)不带基质胶的Transwell小室均购自美国Costar公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人源浆液性卵巢癌OVCAR3(OV)细胞由本实验室液氮保存,人源浆液性卵巢癌HO-8910PM(PM)细胞由重庆医科大学生物医学工程系医学超声工程研究所赠。所有的细胞均培养于含10% FBS的RPMI 1640培养基(含10⁵ U/L青霉素,10⁵ U/L链霉素)中,于37 °C、5% CO₂饱和湿度培养箱中培养。

1.2.2 细胞药物处理 将生长至对数期的OV细胞

去上清, 磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗2次, 加入OGA的抑制剂(50 $\mu\text{mol/L}$ 的PUG或5 $\mu\text{mol/L}$ 的TMG)进行处理。药物作用12 h后收集细胞, 提取细胞总RNA或细胞总蛋白采用qPCR或Western blot法检测各项指标, 或者收集细胞离心后用无血清RPMI 1640培养基重悬, 细胞计数, 进行后续的细胞迁移实验。

1.2.3 细胞转染 化学合成干扰RNA转染严格遵循QIAGEN公司的Effectene化学转染试剂说明书进行操作, 将终浓度为80 nmol/L的空白对照化学合成siRNA(NC-siRNA, siC)或OGT干扰化学合成siRNA(OGT-siRNA, siO)转染PM细胞, 并于6孔板或50 mL一次性细胞培养瓶中培养, 于转染后48, 72 h收集细胞, 提取细胞总RNA或细胞总蛋白检测各项指标, 或者收集细胞离心后用无血清RPMI 1640培养基重悬, 细胞计数, 进行后续的细胞迁移实验。

1.2.4 细胞划痕实验 将OV细胞和PM细胞接种于24孔板中(10^5 /孔), 待细胞生长至80%融合度时, 各孔细胞用10 μL 灭菌枪头划3条直线, PBS漂洗2次, 每孔加入800 μL 无血清RPMI 1640培养基进行培养, 36 h后, 每孔细胞随机选取5个视野, 100 \times 倒置显微镜下采集图像, 每组设3个复孔, 重复3次实验。

1.2.5 Transwell-细胞迁移实验 将OV细胞和PM细胞以100 μL 无血清RPMI 1640培养基含 5×10^4 细胞浓度接种于Transwell小室上室, 下室加入600 μL 含10% FBS的RPMI 1640培养基进行培养, 36 h后取出小室, 用棉签擦去小室滤膜上层细胞, PBS漂洗3次, 将小室放入4%多聚甲醛固定15 min, PBS漂洗3次, 置苏木精中染色20 min, PBS洗净背景色。每孔细胞随机选取5个视野, 100 \times 倒置显微镜下采集图像, 每组设3个复孔, 重复3次实验。

1.2.6 qPCR分析 使用TaKaRa公司的RNA提取试剂盒提取细胞总RNA, 使用紫外分光光度计570 nm波长下测定RNA浓度。RNA逆转录反应严格按照Genecopoeia逆转录试剂盒说明书进行操作: 取1 μg 的RNA进行逆转录反应, 逆转录条件如下: 37 $^{\circ}\text{C}$, 60 min; 85 $^{\circ}\text{C}$, 5 min。在qPCR反应中, 所使用引物如下: 人源OGT上游: 5'-GAA CAG GGA AAC ATT GAA GAG G-3', 下游: 5'-AGT AGG CAT CAG CAA AGG TAG G-3'; 人源MMP-2上游: 5'-CGA ATC CAT GAT GGA GAG GC-3', 下游: 5'-TCC GTC CTT ACC GTC AAA GG-3'; 人源MMP-9上游: 5'-TCT TCC CCT TCA CTT TCC TG-3', 下游: 5'-CCC ACT TCT TGT CGC

TGT C-3'; 人源 β -actin上游: 5'-ACG GCA TCG TCA CCA ACT G-3', 下游: 5'-GAG CCA CAC GCA GCT CAT T-3'。qPCR扩增体系严格按照伯乐iQTM SYBR Green Supermix扩增试剂盒说明书进行操作, 扩增条件如下: 94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min, 1个循环; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 39个循环; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s。扩增条件如下: 94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min, 1个循环; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 39个循环; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s。

1.2.7 Western blot分析 收集细胞, 离心去上清。加入200 μL 细胞裂解液(含1% Tyr抑制剂、1% Thr/Ser抑制剂、1% PMSF)冰上裂解细胞30 min, 每5 min涡旋振荡一次, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min离心15 min, 提取蛋白, 采用BCA蛋白定量法测定蛋白浓度, 按4:1的比例加入5 \times 上样buffer, 混匀, 沸水煮10 min, -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。根据目的蛋白分子量大小, 配置不同浓度的SDS-PAGE凝胶, 每孔上样蛋白量为50 μg , 电泳后电转至0.45 μm 的PVDF膜, 5%脱脂牛奶37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭1 h, 再分别与抗OGT、O-GlcNAc(RL2)和 β -actin等抗体孵育, 4 $^{\circ}\text{C}$ 缓慢摇动过夜。一抗孵育12 h后, 用TBST漂洗3次, 每次10 min。再与辣根过氧化物酶偶联的二抗37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h。漂洗后, 用ECL化学发光法, 在Chem GelDoc成像仪(Bio-Rad, USA)采集图像。

1.2.8 细胞计数和统计学分析 采用Image-proplus 6.0软件对倒置荧光显微镜电子采集到的图片进行细胞计数, 以计算迁移细胞数量或相对比值。每个实验至少重复3次, 应用SPSS 12.0软件进行统计学分析, 结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 t 检验分析, 多组间比较用方差分析法处理数据。以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 人源浆液性卵巢癌OV细胞和PM细胞迁移能力的检测

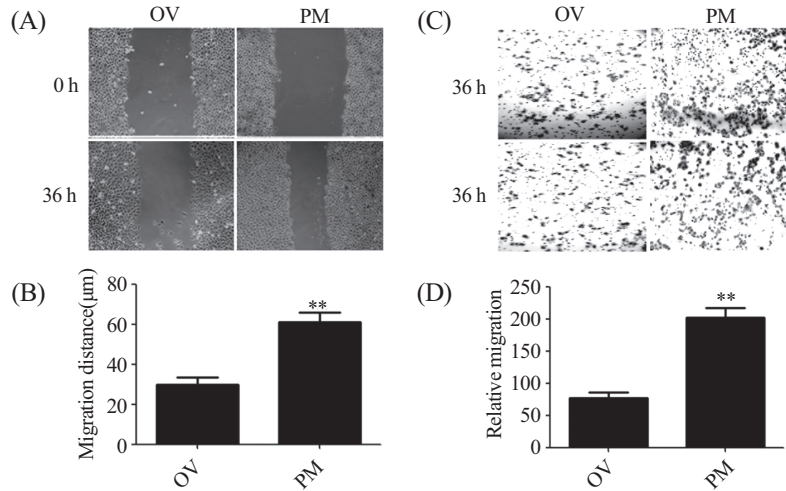
有文献报道, OV细胞为低迁移性卵巢癌细胞株, 而PM细胞为高迁移性卵巢癌细胞株。为了验证OV细胞和PM细胞的迁移能力, 我们采用细胞划痕实验观察到: OV细胞的迁移能力较低, 而PM细胞的迁移能力较高(图1A和1B)。同时, 通过Transwell-细胞迁移实验显示, OV细胞的迁移能力明显低于PM细胞(图1C和1D)。

2.2 OV细胞和PM细胞中OGT和蛋白O-GlcNAc糖基化水平的检测

为了了解OV细胞和PM细胞中蛋白的O-GlcNAc

糖基化水平, 我们采用qPCR法检测OV细胞和PM细胞中OGT的mRNA表达水平。结果显示, 与OV细胞相比, PM细胞中OGT的mRNA水平较高(图2A)。同时, 通过Western blot法检测OV细胞和PM细胞中OGT和蛋白的O-GlcNAc糖基化水平, 我们发现, 与OV细胞相比, PM细胞中蛋白的O-GlcNAc糖基化水

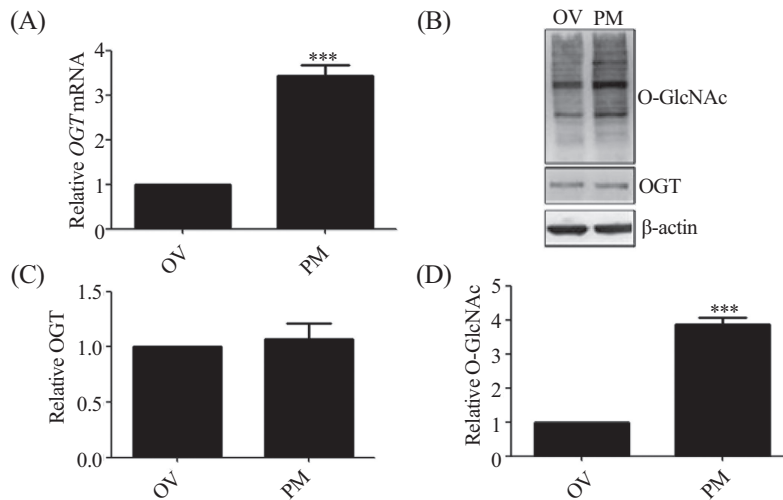
平也较高(图2B和2D); 而OV细胞和PM细胞中OGT的蛋白表达水平则无明显差异(图2B和2C)。以上实验结果说明, 卵巢癌细胞迁移能力的高低与功能蛋白的O-GlcNAc糖基化水平的高低具有相关性, 这提示功能蛋白的O-GlcNAc糖基化可能参与卵巢癌细胞迁移过程的调控。



A: 细胞划痕实验: OV细胞和PM细胞划痕, 于划痕0 h和36 h采集图像; C: Transwell-细胞迁移实验: OV细胞和PM细胞接种于Transwell上室, 于接种36 h后对Transwell小室滤膜下层的细胞进行固定染色并采集图像; B,D: 细胞迁移实验相对定量结果。 ** $P < 0.01$, 与OV组相比。

A: wound healing assay: OV and PM cells were wounded. Photographs were taken immediately (0 h) and at 36 h after wounding; C: Transwell cell migration assay: OV and PM cells were plated in the upper chamber and allowed to grow for 36 h in serum-free medium. The cells that migrated to the undersurface of the polycarbonate membranes were fixed and stained; B,D: the cell migration assays were scanned and quantified. ** $P < 0.01$ compared with OV group.

图1 OV细胞和PM细胞迁移能力的检测
Fig.1 The migration of OV and PM cells



A: qPCR检测OV细胞和PM细胞中OGT的mRNA水平; B:Western blot检测OV细胞和PM细胞中OGT和蛋白的O-GlcNAc糖基化水平; C,D: 3次独立Western blot分析实验的相对定量结果, 横坐标表示组别, 纵坐标表示OGT或O-GlcNAc与β-actin灰度分析的比值。误差线表示3次独立实验的误差分析, *** $P < 0.005$, 与OV组相比。

A: OGT mRNA level were determined by qPCR assay in OV and PM cells; B: OGT and total O-Glycosylation level were detected by Western blot assay in OV and PM cells; C,D: Western blots were scanned and quantified. Data present densitometric analyses of OGT and O-GlcNAc relative to β-actin for $n=3$ independent experiments. Error bars indicate S.E.M. for $n=3$. *** $P < 0.005$ compared with OV group.

图2 OV细胞和PM细胞中OGT和蛋白O-GlcNAc糖基化水平的检测
Fig.2 Expression of OGT and total O-Glycosylation level in OV and PM cells

2.3 高O-GlcNAc糖基化的OV细胞模型的构建

为了有效构建高O-GlcNAc糖基化的OV细胞模型,我们采用PUG或TMG诱导方法,通过qPCR和Western blot法检测50 $\mu\text{mol/L}$ 的PUG或5 $\mu\text{mol/L}$ 的TMG处理OV细胞12 h, OV细胞中OGT和蛋白的O-GlcNAc糖基化水平。如图3B和3D所示,与未处理组相比, PUG处理组和TMG处理组OV细胞中蛋白的O-GlcNAc糖基化水平均增高;而OGT的mRNA和蛋白水平均无明显变化(图3A和3C)。以上实验结果证明,采用PUG或TMG诱导方法构建的高O-GlcNAc糖基化的OV细胞模型是有效的。

2.4 低O-GlcNAc糖基化的PM细胞模型的构建

为了有效构建低O-GlcNAc糖基化的PM细胞模型,我们采用RNAi基因干扰技术,通过qPCR和Western blot法检测OGT-siRNA转染PM细胞,对PM细胞中OGT和蛋白的O-GlcNAc糖基化水平的影响。qPCR结果显示,与未处理组相比, siO转染组PM细胞中OGT的mRNA水平明显降低(图4A)。同时,Western blot结果显示,与未处理组相比, siO转染组PM细胞中OGT和蛋白的O-GlcNAc糖基化水平均有不同程度的降低(图4B-4D)。以上实验结果证明,采用RNAi基因干扰技术构建的低O-GlcNAc糖基化的

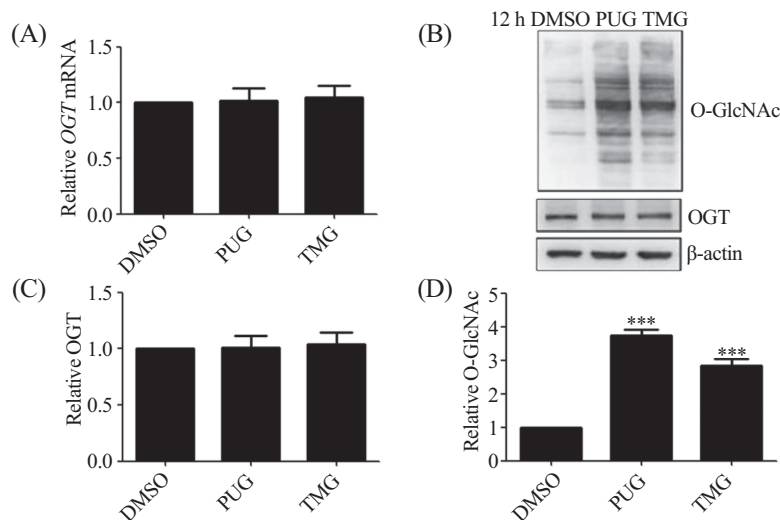
PM细胞模型是有效的。

2.5 功能蛋白的O-GlcNAc糖基化对卵巢癌细胞迁移的影响

以往研究报道,在某些肿瘤(如结肠癌、乳腺癌、肺癌和肝癌等)中,特别是中晚期肿瘤, O-GlcNAc糖基化明显增强;而在某些情况下, O-GlcNAc糖基化还与肿瘤的侵袭、转移密切相关^[1-3,18-23]。在前期实验中,我们的实验结果也证实功能蛋白的O-GlcNAc糖基化与卵巢癌细胞的迁移密切相关。为进一步探究功能蛋白的O-GlcNAc糖基化在卵巢癌细胞迁移过程中的作用,我们采用PUG或TMG诱导,构建高O-GlcNAc糖基化的OV细胞模型,采用siRNA诱导的OGT基因干扰,构建低O-GlcNAc糖基化的PM细胞模型;通过体外Transwell-细胞迁移实验,我们发现,与未处理组相比, PUG处理组和TMG处理组OV细胞的迁移能力均明显增强(图5A和5B);同时,与未处理组相比, siO转染组PM细胞的迁移能力明显减弱(图5A和5C)。以上实验结果说明,功能蛋白的O-GlcNAc糖基化可以促进卵巢癌细胞的迁移。

2.6 功能蛋白的O-GlcNAc糖基化对卵巢癌细胞中MMP-2和MMP-9表达的影响

有研究证明,在前列腺癌PC3-ML细胞中, O-GlcNAc

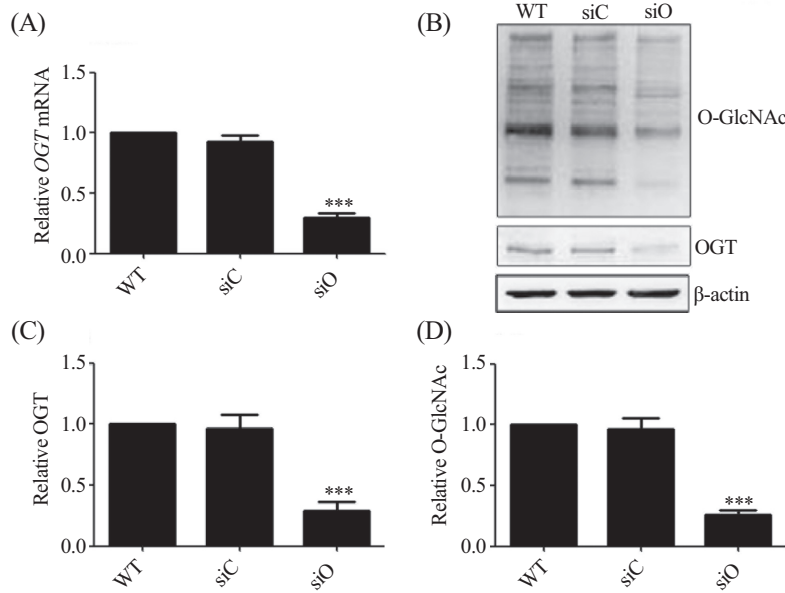


A: PUG或TMG处理OV细胞12 h, qPCR检测OV细胞中OGT的mRNA水平; B: PUG或TMG处理OV细胞12 h, Western blot检测OV细胞中OGT和蛋白的O-GlcNAc糖基化水平; C,D: 3次独立Western blot分析实验的相对定量结果,横坐标表示组别,纵坐标表示OGT或O-GlcNAc与 β -actin灰度分析的比值。误差线表示3次独立实验的误差分析,*** $P < 0.005$,与DMSO组相比。

A: OV cells were stimulated with PUG or TMG for 12 h. Expression of OGT mRNA was determined by qPCR assay; B: OV cells were stimulated with PUG or TMG for 12 h. Expression of OGT and total O-Glycosylation level were determined by Western blot assay; C,D: Western blots were scanned and quantified. Data present densitometric analyses of OGT and O-GlcNAc relative to β -actin for $n=3$ independent experiments. Error bars indicate S.E.M. for $n=3$, *** $P < 0.005$ compared with OV group.

图3 PUG或TMG处理的OV细胞中OGT和蛋白O-GlcNAc糖基化水平的检测

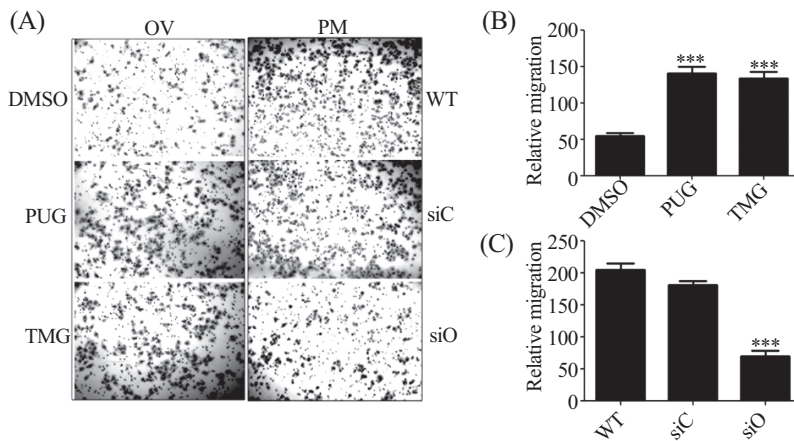
Fig.3 OGT and total O-Glycosylation level in OV cells treated with PUG or TMG



A: siO转染PM细胞48 h, qPCR检测PM细胞中OGT的mRNA水平; B: siO转染PM细胞72 h, Western blot检测PM细胞中OGT和蛋白的O-GlcNAc水平; C,D: 三次独立Western blot分析实验的相对定量结果, 横坐标表示组别, 纵坐标表示OGT或O-GlcNAc与β-actin灰度分析的比值。误差线表示3次独立实验的误差分析, *** $P < 0.005$, 与WT组相比。

A: expression of *OGT* mRNA were determined by qPCR assay in PM cells after a 48 h transfection with siO; B: expression of OGT and total O-Glycosylation level were determined by Western blot assay in PM cells after a 72 h transfection with siO; C,D: Western blots were scanned and quantified. Data present densitometric analyses of OGT and O-GlcNAc relative to β-actin for $n=3$ independent experiments. Error bars indicate S.E.M. for $n=3$, *** $P < 0.005$ compared with WT group.

图4 siO转染的PM细胞中OGT和蛋白O-GlcNAc糖基化水平的检测
Fig.4 OGT and total O-Glycosylation in PM cells infected with siO



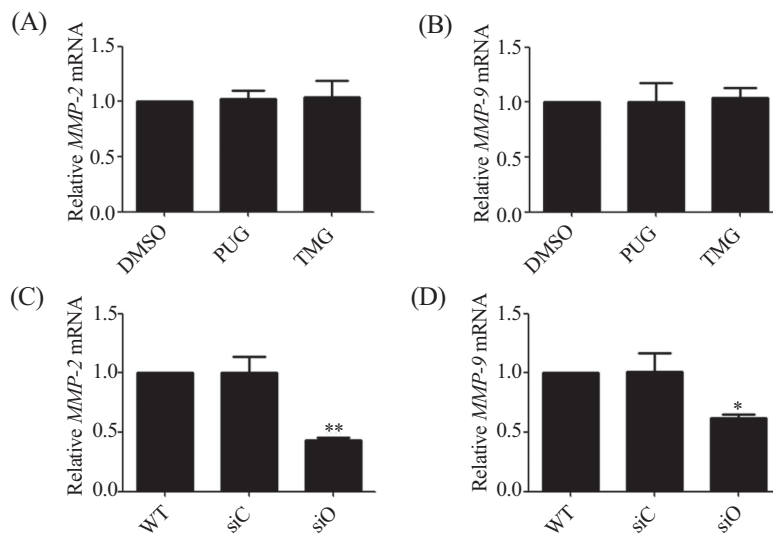
A: PUG或TMG处理OV细胞12 h或siO转染PM细胞72 h, Transwell-细胞迁移实验检测细胞的迁移能力; B,C: Transwell-细胞迁移实验相对定量结果。误差线表示3次独立实验的误差分析, *** $P < 0.005$, 与未处理DMSO组或WT组相比。

A: migration of OV cells treated with PUG or TMG at 12 h or PM cells infected with siO at 72 h were assessed by Transwell cell migration assay; B,C: Transwell cell migration assays were scanned and quantified. Error bars indicate S.E.M. for $n=3$, *** $P < 0.005$ compared with DMSO group or WT group.

图5 PUG或TMG处理的OV细胞以及siO转染的PM细胞的迁移能力的检测
Fig.5 Migration of OV cells treated with PUG or TMG and PM cells infected with siO

糖基转移酶可以通过上调MMP-2和MMP-9的表达促进前列腺癌细胞的侵袭和迁移^[3]。为进一步证实MMP-2和MMP-9是否参与O-GlcNAc糖基化对卵巢癌细

胞迁移过程的调控, 我们采用PUG或TMG诱导, 构建高O-GlcNAc糖基化的OV细胞模型, 采用siRNA诱导的OGT基因干扰, 构建低O-GlcNAc糖基化的



A: PUG或TMG处理12 h, qPCR检测OV细胞中MMP-2的mRNA水平; B: PUG或TMG处理12 h, qPCR检测OV细胞中MMP-9的mRNA水平; C: siO转染48 h, qPCR检测PM细胞中MMP-2的mRNA水平; D: siO转染48 h, qPCR检测PM细胞中MMP-9的mRNA水平。误差线表示3次独立实验的误差分析, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与DMSO或WT组相比。

A: expression of *MMP-2* mRNA were determined by qPCR assay in OV cells treated with PUG or TMG at 12 h; B: expression of *MMP-9* mRNA were determined by qPCR assay in OV cells treated with PUG or TMG at 12 h; C: expression of *MMP-2* mRNA were determined by qPCR assay in PM cells infected with siO at 72 h; D: expression of *MMP-9* mRNA were determined by qPCR assay in PM cells infected with siO at 72 h. Error bars indicate S.E.M. for $n=3$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with DMSO group or WT group.

图6 PUG或TMG处理的OV细胞以及siO转染的PM细胞中MMP-2和MMP-9的mRNA水平的检测

Fig.6 Expression of *MMP-2* and *MMP-9* mRNA in OV cells treated with PUG or TMG and in PM cells infected with siO

PM细胞模型; 通过qPCR, 我们发现, 与未处理组相比, PUG处理组和TMG处理组OV细胞中MMP-2和MMP-9的mRNA水平均无明显变化(图6A和6B); 而与未处理组相比, siO转染组PM细胞中MMP-2和MMP-9的mRNA水平均明显降低(图6C和6D)。以上实验结果说明, 在卵巢癌细胞中, 干扰OGT基因的表达, 可以使PM细胞中MMP-2和MMP-9的mRNA水平降低。

3 讨论

卵巢癌是妇科常见的恶性肿瘤, 由于缺乏特异的早期诊断指标, 其致死率在妇科恶性肿瘤中居第一位。卵巢癌致死率高, 主要是因为其发病隐匿, 早期缺乏特异性症状和体征, 约70%的病例在确诊时已属晚期并且已发生远处转移。临床上卵巢癌以手术治疗和化学疗法为主, 但晚期伴有远处转移的卵巢癌已失去了最佳手术时机, 即使能手术, 术后亦易复发。由此可见, 寻找抑制卵巢癌转移的分子靶点以及有效预防和/或抑制卵巢癌的侵袭与转移是临床治疗卵巢癌成败的关键^[6]。

以往关于肿瘤转移机制的研究主要集中在基

因转录水平, 蛋白翻译水平以及功能蛋白的磷酸化修饰方面。近年来, O-GlcNAc糖基化与肿瘤转移相关性的研究正在成为此领域研究中的热点。有研究发现, O-GlcNAc糖基化可以增强乳腺癌细胞的侵袭和迁移能力^[1]。也有文献报道, O-GlcNAc糖基化在肺癌和结肠癌转移过程中发挥着重要的作用^[2]。另外, O-GlcNAc糖基化还参与调控前列腺癌的转移过程^[3]。这说明, O-GlcNAc糖基化修饰与肿瘤的转移密切相关。

O-GlcNAc糖基化, 是一种常见的动态的可逆的蛋白翻译后修饰方式^[16-17], 它是指在氧连接的 β -N-乙酰葡萄糖胺基转移酶(OGT)的催化作用下, 在靶蛋白的丝/苏氨酸残基上添加一个N-乙酰葡萄糖胺^[4-5], 并且添加了N-乙酰葡萄糖胺之后的糖链不能再被进一步修饰。已经证明, O-GlcNAc糖基化可以通过调节蛋白与蛋白之间的相互作用以及蛋白的活性、定位、降解等从而调控蛋白的生物学功能^[24-25]。另外, O-GlcNAc糖基化参与了一系列的生物学过程, 例如信号传导、转录、细胞周期的调控以及新陈代谢等等^[26-27]。与此同时, 研究表明, 许多癌基因和抑癌基因都可以被O-GlcNAc糖基化修饰,

包括p53^[9-11]、c-myc^[12-13]、IKK^[14-16]和Snail^[17];而这些蛋白的O-GlcNAc糖基化失常与肿瘤的发生发展密切相关^[18]。虽然近几年来已经有研究表明,功能蛋白的O-GlcNAc糖基化在多种肿瘤(包括:乳腺癌、前列腺癌、结直肠癌、肺癌、肝癌以及白血病等)的发生发展、转移侵袭过程中发挥着重要的作用^[1-3,18-23],但是关于O-GlcNAc糖基化在卵巢癌转移过程中的作用研究还未见报道。因此,本课题重点就功能蛋白的O-GlcNAc糖基化在卵巢癌细胞迁移过程中的作用及其可能的分子机制进行了初步研究。

在本研究中,我们首先采用细胞划痕实验和Transwell-细胞迁移实验检测人浆液性卵巢癌OV细胞和PM细胞的迁移能力;另外,通过qPCR和Western blot方法检测OV细胞和PM细胞中OGT和蛋白O-GlcNAc糖基化的表达水平。我们发现,与OV细胞相比,PM细胞的迁移能力较高,且细胞中OGT的mRNA水平和蛋白O-GlcNAc糖基化水平也较高,这提示卵巢癌细胞迁移能力的高低与细胞中蛋白O-GlcNAc糖基化水平的高低具有相关性;而OV细胞和PM细胞中OGT的蛋白水平则无明显差异。有文献报道,OGT催化活性的高低依赖于底物UDP-GlcNAc的浓度,UDP-GlcNAc是己糖胺生物合成路径(HBP)的终产物,而HBP是糖代谢的一个重要分支^[2],糖代谢的调节过程是一种负反馈调节。我们的实验结果证明:与OV细胞相比,PM细胞中OGT的mRNA水平较高,这说明与OV细胞相比,PM细胞中OGT的催化活性较高,因此,我们推测PM细胞中OGT的高催化活性是使其O-糖基化水平较高的主要原因,而O-糖基化水平升高的同时,可以反馈性地调节OGT的催化活性,使其回复到一个相对稳定状态,也就是所谓的负反馈调节,从而使OGT的蛋白水平也达到一个相对稳定状态,因此,OV细胞和PM细胞中OGT的蛋白水平无明显差异。为进一步探究O-GlcNAc糖基化在卵巢癌细胞迁移过程中的作用,我们采用PUG或TMG诱导,构建高表达O-GlcNAc糖基化的OV细胞模型,采用RNAi基因干扰技术,干扰OGT基因的表达,构建低表达O-GlcNAc糖基化的PM细胞模型;通过体外细胞迁移实验证明,功能蛋白的O-GlcNAc糖基化可以促进卵巢癌细胞的迁移。

基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)是一类锌离子依赖型蛋白水解酶,根据底物特异性和结构相似性可分为多种亚类:(1)间质胶原酶;(2)

明胶;(3)基质降解酶;(4)MT-MMPs,由于MMPs具有降解基底膜和细胞外基质(ECM)的作用,故在维持细胞外基质的生理动态平衡过程中及在肿瘤细胞突破基底膜和ECM的屏障中起重要作用。在肿瘤的浸润和转移过程中,当MMPs活性上调时,则促进ECM降解,从而破坏细胞基底膜,促进肿瘤的浸润和转移^[28]。研究发现,在脑胶质瘤、乳腺癌、肝癌、直肠癌、肺癌以及头颈部鳞癌等恶性肿瘤中都有MMPs的过量表达^[29-32],肿瘤细胞可通过分泌MMPs降解细胞外基质,促进肿瘤的浸润和转移并影响患者的转归及预后^[33]。MMP-2和MMP-9为胶原酶,作用底物为细胞外基质的主要成分IV型胶原纤维组织,有研究发现,干扰OGT基因的表达,可以使MMP-2和MMP-9的mRNA和蛋白水平均降低,从而抑制前列腺癌细胞的侵袭、血管生成和转移,而OGT在介导前列腺癌细胞的侵袭、血管生成和转移中发挥着关键的作用^[3]。由此,我们推测,功能蛋白的O-GlcNAc糖基化对卵巢癌细胞迁移过程的调控可能与MMP-2和MMP-9的表达有关。为了验证我们的假设,我们采用PUG或TMG诱导,构建高表达O-GlcNAc糖基化的OV细胞模型,采用siRNA诱导的OGT基因干扰,构建低表达O-GlcNAc糖基化的PM细胞模型;通过qPCR实验证明,在PM细胞中,干扰OGT基因的表达,可以使MMP-2和MMP-9的mRNA水平降低,而在OV细胞中,PUG或TMG诱导,MMP-2和MMP-9的mRNA水平均无明显变化。PUG和TMG是OGA的特异性抑制剂,其作用原理是通过降低OGA酶的催化活性进而使蛋白的O-糖基化水平升高,而与OGT的表达以及催化活性无关,因此,在OV细胞中,PUG或TMG诱导,MMP-2和MMP-9的mRNA水平均无明显变化。由此,我们推测,在卵巢癌细胞中,OGT介导的O-GlcNAc糖基化水平升高,可以通过使MMP-2和MMP-9的表达升高,从而促进卵巢癌细胞的迁移。在后期实验中,我们将通过构建OGT过表达质粒和OGA干扰质粒,进一步探究OGT在卵巢癌细胞迁移过程中的作用及其分子机制。

β -连环蛋白是Wnt信号传导途径的重要组成部分,也是构成黏附连接的E-钙粘蛋白(E-cadherin)/连环蛋白(catenin)复合物的胞内重要成分^[34],是E-cadherin/catenin复合物功能的重要调控点。E-cadherin/catenin复合物是细胞黏附迁移过程中最重要的调控

分子。有文献报道, O-糖基化可以通过减少细胞表面E-cadherin的表达从而促进乳腺癌发生肺转移^[1]。也有研究发现, β -连环蛋白是可以发生O-GlcNAc糖基化修饰的^[1,8], 并且 β -连环蛋白的O-GlcNAc糖基化可以抑制其核定位以及转录活性^[8]。这些研究提示, E-cadherin/catenin复合物中各成分的表达以及O-糖基化在调控卵巢癌细胞迁移过程中可能发挥着关键的作用。为了进一步探究O-GlcNAc糖基化参与卵巢癌细胞迁移过程的具体调控机制, 在后期研究中, 我们将通过qPCR和Western blot实验检测E-cadherin/catenin复合物中各成分的表达, 并采用免疫沉淀实验分析不同卵巢癌细胞模型中E-cadherin/catenin复合物的相互作用以及各成分的O-GlcNAc糖基化水平; 并通过基因点突变方法验证位点特异性的O-GlcNAc糖基化在卵巢癌细胞迁移过程中的作用及其分子机制。

综上, 我们的研究发现OGT介导的O-GlcNAc糖基化可以通过上调MMP-2和MMP-9的表达, 促进卵巢癌细胞的迁移; 同时, 我们推测E-cadherin/catenin复合物在卵巢癌细胞迁移过程中可能发挥着关键的作用。OGT介导的O-GlcNAc糖基化可能成为卵巢癌治疗的新靶点。

参考文献 (References)

- 1 Y Gu, Mi W, Ge Y, Liu H, Fan Q, Han C, *et al.* GlcNAcylation plays an essential role in breast cancer metastasis. *Cancer Res* 2010; 70(15): 6344-51.
- 2 Mi W, Gu Y, Han C, Liu H, Fan Q, Zhang X, *et al.* O-GlcNAcylation is a novel regulator of lung and colon cancer malignancy. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1812(4): 514-9.
- 3 Lynch TP, Ferrer CM, Jackson SR, Shahriari KS, Vosseller K, Reginato MJ. Critical role of O-GlcNAc transferase in prostate cancer invasion, angiogenesis and metastasis. *J Biol Chem* 2012; 287(14): 11070-81.
- 4 Park SY, Ryu J, Lee W. O-GlcNAc modification on IRS-1 and Akt2 by PUGNAc inhibits their phosphorylation and induces insulin resistance in rat primary adipocytes. *Exp Mol Med* 2005; 37(3): 220-9.
- 5 Fulop N, Marchase RB, Chatham JC. Role of protein O-linked N-acetylglucosamine in mediating cell function and survival in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 2007; 73(2): 288-97.
- 6 Kikkawa F, Matsuzawa K, Arii Y, Kawai M, Kobayashi I, Nakashima N, *et al.* Randomized trial of cisplatin and carboplatin versus cisplatin, vinblastine and bleomycin in ovarian cancer. *Gynecol Obstet Invest* 2000; 50(4): 269-74.
- 7 Kwak TK, Kim H, Jung O, Lee SA, Kang M, Kim HJ, *et al.* Glucosamine treatment-mediated O-GlcNAc modification of paxillin depends on adhesion state of rat insulinoma INS-1 cells. *J Biol Chem* 2010; 285(46): 36021-31.
- 8 Sayat R, Leber B, Grubac V, Wiltshire L, Persad S. O-GlcNAcylation of β -catenin regulates its nuclear localization and transcriptional activity. *Exp Cell Res* 2008; 314(15): 2774-87.
- 9 Chou TY, Hart GW, Dang CV. c-Myc is glycosylated at threonine 58, a known phosphorylation site and a mutational hot spot in lymphomas. *J Biol Chem* 1995; 270(32): 18961-5.
- 10 Chou TY, Dang CV, Hart GW. Glycosylation of the c-Myc transactivation domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92(10): 4417-21.
- 11 Kawauchi K, Araki K, Tobiume K, Tanaka N. Loss of p53 enhances catalytic activity of IKK β through O-linked beta-N-acetylglucosamine modification. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(9): 3431-6.
- 12 Erturk-Hasdemir D, Broemer M, Leulier F, Lane WS, Paquette N, Hwang D, *et al.* Two roles for the *Drosophila* IKK complex in the activation of Relish and the induction of antimicrobial peptide genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(24): 9779-84.
- 13 Lee HH, Jan LY, Jan YN. *Drosophila* IKK-related kinase Ik2 and Katanin p60-like 1 regulate dendrite pruning of sensory neuron during metamorphosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(15): 6363-8.
- 14 Park SY, Kim HS, Kim NH, Ji S, Cha SY, Kang JG, *et al.* Snail1 is stabilized by O-GlcNAc modification in hyperglycaemic condition. *EMBO J* 2010; 29(22): 3787-96.
- 15 Caldwell SA, Jackson SR, Shahriari KS, Lynch TP, Sethi G, Walker S, *et al.* Nutrient sensor O-GlcNAc transferase regulates breast cancer tumorigenesis through targeting of the oncogenic transcription factor FoxM1. *Oncogene* 2010; 29(19): 2831-42.
- 16 Jochmann R, Thureau M, Jung S, Hofmann C, Naschberger E, Kremmer E, *et al.* O-linked N-acetylglucosaminylation of Sp1 inhibits the human immunodeficiency virus type 1 promoter. *J Virol* 2009; 83(8): 3704-18.
- 17 Ozcan S, Andrali SS, Cantrell JE. Modulation of transcription factor function by O-GlcNAc modification. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1799(5/6): 353-64.
- 18 Slawson C, Zachara NE, Vosseller K, Cheung WD, Lane MD, Hart GW. Perturbations in O-linked beta-N-acetylglucosamine protein modification cause severe defects in mitotic progression and cytokinesis. *J Biol Chem* 2005; 280(38): 32944-56.
- 19 Wang Z, Banerjee S, Kong D, Li Y, Sarkar FH. Down-regulation of Forkhead Box M1 transcription factor leads to the inhibition of invasion and angiogenesis of pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 2007; 67(17): 8293-300.
- 20 Shi Y, Tomic J, Wen F, Shaha S, Bahlo A, Harrison R, *et al.* Aberrant O-GlcNAcylation characterizes chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2010; 24(9): 1588-98.
- 21 Gu Y, Ande SR, Mishra S. Altered O-GlcNAc modification and phosphorylation of mitochondrial proteins in myoblast cells exposed to high glucose. *Arch Biochem Biophys* 2011; 505(1): 98-104.
- 22 Yehezkel G, Cohen L, Kliger A, Manor E, Khalaila I. O-Linked beta-N-Acetylglucosaminylation(O-GlcNAcylation) in primary and metastatic colorectal cancer clones and effect of N-Acetyl-beta-D-glucosaminidase silencing on cell phenotype and transcriptome. *J Biol Chem* 2012; 287(34): 28755-69.
- 23 Zhu Q, Zhou L, Yang Z, Lai M, Xie H, Wu L, *et al.* O-GlcNAcylation plays a role in tumor recurrence of hepatocellular carcinoma.

- ma following liver transplantation. *Med Oncol* 2011; 29(2): 985-93.
- 24 Zachara NE, Hart GW. The emerging significance of O-GlcNAc in cellular regulation. *Chem Rev* 2002; 102(2): 431-8.
- 25 Zeidan Q, Hart GW. The intersections between O-GlcNAcylation and phosphorylation: Implications for multiple signaling pathways. *J Cell Sci* 2010; 123(Pt 1): 13-22.
- 26 Chatham JC, Not LG, Fulop N, Marchase RB. Hexosamine biosynthesis and protein O-glycosylation: the first line of defense against stress, ischemia, and trauma. *Shock* 2008; 29(4): 431-40.
- 27 Hart GW, Housley MP, Slawson C. Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. *Nature* 2007; 446(7139): 1017-22.
- 28 Kim J, Yu W, Kovalski K, Ossowski L. Requirement for specific proteases in cancer cell intravasation as revealed by a novel semiquantitative PCR-based assay. *Cell* 1998; 94(3): 353-62.
- 29 Curran S, Murray GI. Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *J Pathol* 1999; 189(3): 300-8.
- 30 Zucker S, Lysik RM, Zarrabi MH, Moll U. M, 92,000 type IV collagenase is increased in plasma of patients with colon cancer and breast cancer. *Cancer Res* 1993; 53(1): 140-6.
- 31 Yamamoto M, Mohanam S, Sawaya R, Fuller GN, Seiki M, Sato H, *et al.* Differential expression of membrane-type matrix metalloproteinase and its correlation with gelatinase A activation in human malignant brain tumors *in vivo* and *in vitro*. *Cancer Res* 1996; 56(2): 384-92.
- 32 Deryugina EI, Luo GX, Reisfeld RA, Bourdon MA, Strongin A. Tumor cell invasion through matrigel is regulated by activated matrix metalloproteinase-2. *Anticancer Res* 1997; 17(5A): 3201-10.
- 33 O-charoenrat P, Modjtahedi H, Rhys-Evans P, Court WJ, Box GM, Eccles SA. Epidermal growth factor-like ligands differentially up-regulate matrix metalloproteinase 9 in head and neck squamous carcinoma cells. *Cancer Res* 2000; 60(4): 1121-8.
- 34 Nelson WJ, Nusse R. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* 2004; 303(5663): 1483-7.