

OST-B通过介导GDF15糖基化修饰促进肺癌细胞增殖

杨翠¹ 杜明远² 刘鑫男¹ 田娜³ 徐湛¹ 李鹤成^{2*} 戴雪喻^{1*} 李斌^{1*}

(¹上海交通大学医学院上海市免疫学研究所, 上海 200025; ²上海交通大学医学院附属瑞金医院胸外科, 上海 200025; ³上海交通大学医学院附属第六人民医院风湿免疫科, 上海 200233)

摘要 该研究旨在探讨OST-B在GDF15糖基化修饰中的关键作用及其对肺癌细胞增殖的影响。通过生物信息学分析和临床样本验证, 发现GDF15蛋白高丰度与肺癌不良预后密切相关。利用质谱鉴定蛋白修饰位点并结合体外糖基化实验, 确定GDF15在第70位天冬酰胺残基上存在N-糖基化修饰。在肺癌细胞A549细胞系中敲低GDF15后引入同义突变的GDF15野生型和糖基化位点突变型, CCK-8结果显示GDF15的糖基化修饰显著影响其促进肿瘤增殖的能力。进一步的质谱结果和Co-IP实验双重验证了GDF15与OST-B介导的糖基转移酶复合体(包括RPN1、DDOST和STT3B)之间的相互作用。通过敲低OST-B核心催化亚基STT3B, 发现糖基化修饰的GDF15蛋白丰度显著下降, 证明GDF15的N-糖基化修饰由OST-B介导。进一步通过蛋白合成抑制剂CHX和OST抑制剂NGI-1处理, 表明糖基化修饰能够提高GDF15蛋白的稳定性。对A549细胞系进行CCK-8、克隆形成和划痕实验, 结果显示NGI-1显著抑制了细胞的增殖和迁移。过表达GDF15后, NGI-1的抗肿瘤作用进一步减弱, 敲低GDF15后NGI-1的抑制效应更加显著。这些都表明, 除GDF15外, NGI-1的抗肿瘤效应还存在着其他作用途径。综上所述, 该研究揭示了OST-B通过糖基化修饰稳定GDF15, 并指出GDF15在肿瘤细胞增殖中的关键作用, 为肺癌的早期诊断和靶向治疗提供了新的思路。

关键词 GDF15; 糖基化; 肺癌

OST-B Promotes Lung Cancer Cell Proliferation by Mediating GDF15 Glycosylation Modification

YANG Cui¹, DU Mingyuan², LIU Xinnan¹, TIAN Na³, XU Zhan¹, LI Hecheng^{2*}, DAI Xueyu^{1*}, LI Bin^{1*}

(¹Center for Immune-Related Diseases at Shanghai Institute of Immunology, Department of Immunology and Microbiology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China; ²Department of Thoracic Surgery, Ruijin Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200025, China; ³Department of Rheumatology and Immunology, Shanghai Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200233, China)

Abstract This study aims to investigate the critical role of OST-B in the glycosylation modification of GDF15 and its impact on the proliferation of lung cancer cells. Bioinformatics analysis and clinical sample validation revealed that GDF15 is closely associated with poor prognosis in lung cancer. Using mass spectrometry to identify protein modification sites and *in vitro* glycosylation assays, this article confirmed that GDF15 undergoes N-glycosylation at the asparagine residue at position 70. After knocking down GDF15 in the lung cancer cell line A549, this article introduced the synonymous mutant GDF15 wild-type and glycosylation site mutant. CCK-8 assay

收稿日期: 2024-11-21

接受日期: 2025-02-14

国家自然科学基金(批准号: 32130041、82441047、82241222)资助的课题

*通信作者。Tel: 021-63846590-776783, E-mail: lihecheng2000@hotmail.com; daixueyu@shsmu.edu.cn; binli@shsmu.edu.cn

Received: November 21, 2024

Accepted: February 14, 2025

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.32130041, 82441047, 82241222)

*Corresponding authors. Tel: +86-21-63846590-776783, E-mail: lihecheng2000@hotmail.com; daixueyu@shsmu.edu.cn; binli@shsmu.edu.cn

results showed that the glycosylation modification of GDF15 significantly affects its ability to promote tumor proliferation. Further peptide/protein QE identification and CO-IP experiments validated the interaction between GDF15 and multiple subunits of the oligosaccharyltransferase complex, including RPN1, DDOST, and STT3B. Knock-down of the core catalytic subunit STT3B of OST-B led to a significant decrease in the glycosylated GDF15 protein level, confirming that the N-glycosylation of GDF15 is mediated by OST-B. Moreover, using the protein synthesis inhibitor CHX and the OST inhibitor NGI-1, this article demonstrated that glycosylation enhances the stability of GDF15. CCK-8, colony formation, and wound healing assays in A549 cells showed that NGI-1 significantly suppressed cell proliferation and migration. Overexpression of GDF15 attenuated NGI-1's antitumor efficacy, whereas *GDF15* knockdown potentiated its inhibitory effects, demonstrating that NGI-1 exerts its antitumor activity through pathways beyond GDF15 regulation. In conclusion, this study reveals that OST-B stabilizes GDF15 through glycosylation modification, and GDF15 plays a key role in tumor cell proliferation. These findings provide new insights and directions for targeted therapy in lung cancer.

Keywords GDF15; glycosylation; lung cancer

肺癌是全球发病率和死亡率最高的恶性肿瘤,其最主要的病理类型是非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)^[1]。尽管近年来靶向治疗和免疫治疗领域取得一些进展,肺癌的复杂性和异质性仍导致部分患者预后较差^[2]。因此,探索肺癌的发病机制和寻找新的治疗靶点具有重要的临床意义。生长分化因子15(growth differentiation factor 15, GDF15)是TGF- β 超家族的成员,主要参与细胞应激和炎症反应^[3]。GDF15在多种肿瘤中的表达显著上调,研究表明它能够促进肿瘤细胞增殖、迁移和耐药,且与患者的不良预后密切相关^[4]。作为一种糖蛋白,GDF15的糖基化修饰可能在肿瘤的发生与发展中发挥作用。糖基化作为一种重要的蛋白质翻译后修饰,可以影响蛋白质的结构、稳定性、活性和定位等^[5-6],蛋白质异常糖基化与多种疾病密切相关^[7]。转移酶OST-B是N-糖基化的核心酶,催化高甘露糖聚糖转移到蛋白质上^[8]。已有研究发现,GDF15在第70位点的天冬酰胺残基上的N-糖基化能够激活EGFR信号通路,导致前列腺癌AR抑制剂耐药^[9]。然而,目前尚不清楚GDF15的糖基化修饰在肺癌中的具体作用机制。本研究旨在探讨OST-B通过糖基化修饰稳定GDF15,从而促进肿瘤细胞增殖的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 本实验中使用的细胞株HEK-293T和人非小细胞肺癌细胞系A549细胞均购自美国ATCC

细胞库(American Type Culture Collection, ATCC)。

1.1.2 质粒 本实验所用的质粒PcDNA3.1-Ha、PcDNA3.1-Flag、PcDNA3.1-Ha-RPN1、PcDNA3.1-Ha-DDOST、PcDNA3.1-Flag-GDF15、pLKO.1-GFP、pCMV-VSV-G和pCMV-dR8.9均来自本实验质粒库,pCMV-STT3B(human-Toxic-opt)-3 $\times$ HA-Neo购自武汉淼灵生物科技有限公司。

1.1.3 实验试剂和仪器 实验所用试剂和仪器如表1和表2所示。

1.2 方法

1.2.1 临床样本处理 本研究所用病人样本来自上海交通大学医学院附属瑞金医院胸外科,该研究方案已获上海交通大学医学院附属瑞金医院伦理委员会批准(批准号: 2021-224)。患者所取肿瘤组织与肺组织均保存在冻存管中,暂存于液氮。样本收集称重后转移至1.5 mL EP管内,按10 μ L/mg加入RIPA裂解液,每管中放入2颗3 mm研磨珠。转移至4 $^{\circ}$ C预冷的组织研磨仪中,设置程序: 60 Hz, 运行60 s, 间隔30 s, 重复8次。研磨完成后转移至冰上裂解30 min。12 000 r/min、4 $^{\circ}$ C离心15 min, 取上清液转移至新EP管中, 加入5 $\times$ 蛋白上样缓冲液, 95 $^{\circ}$ C加热10 min, 样品保存于-80 $^{\circ}$ C。

1.2.2 细胞培养 本实验用到的工具细胞主要为HEK-293T细胞系, 非小细胞肺癌细胞系为A549细胞系, 培养基为DMEM培养基, 内含10% FBS, 培养条件为5% CO₂、37 $^{\circ}$ C恒温培养。当细胞密度达到90%时, 细胞需传代或冷冻, 或者直接收取用于后续实验。

表1 实验所用主要试剂

Table 1 Main reagents used in the experiments

试剂	公司	货号
Reagent	Company	Catalog
FBS (fetal bovine serum)	Procell	164210-500
DMEM	Gibco	C11995500BT
RPMI 1640	Gibco	C22400500BT
Opitim	Gibco	31985070
Penicillin-streptomycin, liquid	Gibco	15140122
Anti-GDF15-antibody	Abcam	EPR19939
Anti-GDF15-antibody	Santa Cruz	sc-377195
Anti-STT3B-antibody	Proteintech	15323-1-AP
Monoclonal ANTI-FLAG M2 antibody	Sigma-Aldrich	F3165-1MG
Anti-HA antibody	Sigma-Aldrich	H6908
Protein A/G PLUS-agarose	Santa Cruz	sc-2003
Anti-DYKDDDDK magnetic beads	Cytoch	PM0011
Anti-HA magnetic beads	Cytoch	PM0009
Lipofectamine 3000 transfection reagent	Invitrogen	L3000075
Endo H	New England Biolabs	P0702S
PNGase F	New England Biolabs	P0704S
DMSO	Sigma-Aldrich	472301
NGI-1 (ML414)	MCE	HY-117383
CCK-8	Life-iLab	AC111L054
Crystal violet	BBi	E607309-0100

表2 实验所用主要仪器

Table 2 Main instruments used in the experiments

仪器	公司
Instrument	Company
T100 PCR thermal cycler	Bio-Rad
Centrifuge 5425/5425 R	Eppendorf
Centrifuge 5920 R	Eppendorf
Inverted microscope	Excelitas
Ph Meter	Mettler Toledo
Tanon chemi dog ULTRA	Tanon
Tanon MINI space 1000	Tanon
Multimode microplate reader	Molecular Devices
Tissue homogenizer	Servicebio

1.2.3 质粒构建 PcDNA3.1-Flag-GDF15点突变质粒通过点突变克隆构建。PcDNA3.1-Ha-RPN1, PcDNA3.1-Ha-DDOST质粒通过从调节性T细胞基因组 cDNA中提取目的基因片段,通过同源重组的方式构建到PcDNA3.1-Ha载体上(表3)。GDF15和STT3B的 shRNA敲低序列由Invitrogen Block-iT RNAi Designer设计,我们再将其克隆到pLKO.1-GFP载体上。实验中所设计酶均购自 New England

Biolabs公司。

1.2.4 质粒转染 细胞于前一天铺板于6孔板中,待细胞贴壁良好,密度达到60%~70%时完成转染。对于PEI转染,以6孔板一个孔为例,首先换成预热的1 mL OptiMEM培养基,在1.5 mL EP管中加入100 μL OptiMEM培养基,加入总量不超过4 μg的质粒,按照质粒量:PEI体积=1:3的比例加入对应量的PEI,轻弹1.5 mL EP管混匀,静置10~15 min,随后加

表3 质粒构建引物序列

Table 3 Primer sequences for plasmid construction

引物 Primer	序列(5'→3') Sequence (5'→3')
GDF15-N70A-F	GCT AAC CAG GCT GCG GGC CGC CCA GAG CTG GGA AGA TTC G
GDF15-N70A-R	CGA ATC TTC CCA GCT CTG GGC GGC CCG CAG CCT GGT TAG C
RPN1-F	ACT AGT CCA GTG TGG TGG AAT TCA TGG AGG CGC CAG CCG CCG GC
RPN1-R	CAG GTA CGT CGT ATG GGT ACT CGA GCA GGG CAT CCA GGA TGT GGT CGA TCT TGG TGA CCA GCT CCT
DDOST-F	CTA GTC CAG TGT GGT GGA ATT CAT GGA GCC CAG CAC CGC GGC CC
DDOST-F	CAG GTA CGT CGT ATG GGT ACT CGA GGT CGG ACT TCT CCT TCT CCT TCA TGT GCA AGA AGA CGA TGC TGA AG
GDF15-sh1-F	CCG GGC TAC AAT CCC ATG GTG CTC ACT CGA GTG AGC ACC ATG GGA TTG TAG CTT TTT G
GDF15-sh1-R	AAT TCA AAA AGC TAC AAT CCC ATG GTG CTC ACT CGA GTG AGC ACC ATG GGA TTG TAG C
GDF15-sh2-F	CCG GGA TGA CTT GTT AGC CAA AGA CCT CGA GGT CTT TGG CTA ACA AGT CAT CTT TTT G
GDF15-sh2-R	AAT TCA AAA AGA TGA CTT GTT AGC CAA AGA CCT CGA GGT CTT TGG CTA ACA AGT CAT C
STT3B-sh1-F	CCG GGC AGG TAA AGT GAG GAA ACA TCT CGA GAT GTT TCC TCA CTT TAC CTG CTT TTT G
STT3B-sh1-R	AAT TCA AAA AGC AGG TAA AGT GAG GAA ACA TCT CGA GAT GTT TCC TCA CTT TAC CTG C
STT3B-sh2-F	CCG GGC AGT ATC TGA GAG ACC GAT TCT CGA GAA TCG GTC TCT CAG ATA CTG CTT TTT G
STT3B-sh2-R	AAT TCA AAA AGC AGT ATC TGA GAG ACC GAT TCT CGA GAA TCG GTC TCT CAG ATA CTG C

入6孔板。4~6 h后, 吸出OptiMEM, 换成完全培养基继续培养36~48 h。对于Lipofectamine 3000 Transfection Reagent脂质体转染, 按照说明书进行转染。

1.2.5 GDF15的体外糖基化分析 使用Endo H酶和PNGase F酶处理细胞裂解物。在细胞裂解上清中加入10× 糖蛋白变性缓冲液, 100 °C煮10 min使蛋白充分变性, 添加Endo H酶和PNGase F酶以及相关缓冲液, 37 °C孵育1 h, 然后用5× 蛋白上样缓冲液终止反应, 100 °C煮10 min, 样品保存于-20 °C。

1.2.6 免疫共沉淀 收集检测细胞的总蛋白溶液, 加入一定量的IP抗体, 4 °C低速(20~40 r/min)旋转孵育过夜, 每份样品加入12 μL Protein A/G PLUS-Agarose, 4 °C低速旋转孵育1 h, 加入1 mL RIPA清洗凝珠, 3 000 r/min正向离心2 min, 反向离心30 s, 重复5次以去除非特异性结合, 最后加入20 μL 2× 蛋白上样缓冲液95 °C煮10 min, 样品保存于-20 °C。

1.2.7 WB(Western blot)检测 将待检测的细胞收集于EP管中, PBS清洗1次, 加入一定量的RIPA冰上裂解30 min提取总蛋白, 4 °C、12 000 r/min离心15 min, 取上清加入2× 蛋白上样缓冲液, 95 °C煮10 min, 样品保存于-20 °C。根据蛋白分子量大小选择SDS-PAGE胶的浓度(8%~15%)和固相载体(PVDF膜或NC膜), 蛋白转移到特定载体上后, 用5%的脱脂牛奶常温封闭1 h, 一抗4 °C孵育过夜, TBST清洗3次,

二抗常温孵育1 h, TBST清洗3次。所有抗体均按说明书的比例进行稀释。最后使用超敏型化学发光检测试剂盒检测得到的条带。

1.2.8 蛋白修饰位点鉴定 将经考马斯亮蓝染色清晰可见的目的条带胶条切成1 mm×1 mm×1 mm左右大小胶粒, 经过一系列步骤胶内酶解获得肽段, 用液相色谱流动相A相溶解肽段后使用EASY-nLC 1200超高效液相系统进行分离, 数据采集模式使用数据依赖型扫描(DDA)程序, 二级质谱数据使用Proteome Discoverer 2.4进行检索, 最后得到蛋白质修饰位点鉴定结果。

1.2.9 多肽/蛋白质QE鉴定分析 将跑胶所得整条泳道使用蛋白质内切酶对蛋白质多肽样品进行酶解, 然后使用LCMSMS(nanoLC-QE)对酶解后的样品进行分析。最后使用质谱匹配软件MASCOT对LCMSMS 数据进行分析, 获得目标蛋白质多肽分子的定性鉴定信息。质谱测试原始文件(raw file)用搜索引擎MaxQuant 1.6.14检索相应的数据库, 最后得到鉴定的蛋白质结果。

1.2.10 慢病毒包装和目的细胞的感染 待HEK-293T密度达到85%时转染慢病毒质粒, 质粒体系为1 mL OptiMEM培养基、12 μg质粒载体、9 μg pCMV-dR8.9、3 μg pCMV-VSV-G、72 μL PEI, 静置15 min后加入5 mL OptiMEM, 4~6 h后换成完全培

培养基, 24 h后换液, 48 h和72 h后收取病毒液, 加入5×PEG8000浓缩病毒, 4℃摇晃过夜, 4℃低温3 700 r/min离心2 h后用完全培养基重悬, 于-80℃保存。感染目的细胞时将病毒液和培养基按一定比例加入细胞中, 12~24 h后换完全培养基继续培养, 48 h后进行细胞分选获取感染成功的细胞。

1.2.11 CCK-8实验 将细胞按5 000个/孔接种于96孔板中, 随后使用不同浓度的NGI-1处理细胞, 在培养第0、12、24、36 h向各孔加10 μL CCK-8试剂, 继续培养1.4 h, 用酶标仪测定波长为450 nm处的吸光度(*D*)值。

1.2.12 划痕实验 使用Ibidi Culture-Insert进行划痕实验, 每孔加3×10⁴个细胞, 待细胞贴壁良好后密度达到90%以上拔出插件, 按不同浓度(0、5、10 μmol/L)的NGI-1处理细胞, 在培养第0、12、24 h使用显微镜拍摄照片, 使用ImageJ计算迁移速率。

1.2.13 克隆形成实验 将细胞按1 500个/孔接种于6孔板中, 随后使用不同浓度的NGI-1处理细胞, 培养一周后, 用多聚甲醛常温固定10 min, 随后用结晶紫常温染色5~10 min, 使用全自动凝胶成像系统(Tanon)拍摄照片。

1.2.14 生物学信息分析 使用GEPIA2网站提供的数据库对*GDF15*基因在癌症中的RNA数据进行分析; 使Prognoscan网站提供的数据库对*GDF15*基因表达与癌症预后的关系进行分析; 使用Correlation Analyzer网站基于相关性的基因组富集分析(corGSEA)发现*GDF15*的共表达通路。

1.3 统计学分析

本文数据采用GraphPad Prism 8软件进行数据分析。本实验涉及实验数据是从至少3个独立实验中收集的数据平均值±标准差($\bar{x}\pm s$)进行分析, 采用双因素方差分析和Dunnett多重比较检验, 两组数据比较使用独立样本*t*检验。本文中所有数据的统计学差异均表示为ns: $P>0.05$; * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$; **** $P<0.0001$ 。

2 结果

2.1 *GDF15*与肺癌的预后密切相关

为了评估*GDF15*对肿瘤生长的影响, 我们基于TCGA和GTEx数据库中的肿瘤及正常样本进行了基因表达分析。结果显示, *GDF15*的mRNA水平在多种肿瘤中均显著上调(图1A)。进一步分析单一数

据库的数据表明, *GDF15*高表达的肿瘤患者总生存期(overall survival, OS)较短, 预后较差(图1B)。此外, 通过收集肺癌的肿瘤组织和癌旁组织临床样本进行WB分析, 结果显示肿瘤组织中的*GDF15*蛋白丰度明显高于癌旁组织(图1C)。这些结果表明, *GDF15*的高表达与肺癌患者的不良预后密切相关, 进一步探讨其分子机制具有重要的临床意义。

2.2 *GDF15*第70位点糖基化促进肿瘤增殖

为了探讨*GDF15*蛋白的翻译后修饰与肿瘤进展的关系, 我们首先在HEK-293T细胞中过表达*GDF15*-Flag, 富集带有Flag标签的*GDF15*蛋白, 并通过质谱分析检测其翻译后修饰位点。结果显示, *GDF15*在第70位点的天冬酰胺残基上存在N-糖基化修饰(图2A)。随后, 我们构建了N70A-Flag点突变质粒, 将第70位点的天冬酰胺替换为丙氨酸, 发现该突变导致*GDF15*蛋白的分子量约降低3 kDa(图2B)。通过EndoH酶和PNGase F酶消化细胞裂解物, WB结果显示*GDF15*条带明显下降, 且与点突变后的分子量相符(图2C)。其中, EndoH酶是一种重组糖苷酶, 能够去除N-糖蛋白中的高甘露糖和某些杂合型寡糖结构, 而PNGase F酶则能去除几乎所有类型的N-连接寡糖。根据两种酶处理的结果推测, *GDF15*第70位点的糖链主要为高甘露糖型或杂合型糖链。此外, 在过表达*GDF15*的肺癌细胞系A549中也检测到*GDF15*的糖基化修饰(图2D), 并且肺癌患者组织中*GDF15*的分子量与糖基化条带一致, 进一步推测肺癌组织中的*GDF15*同样为糖基化形式。以上结果表明, *GDF15*是一个糖蛋白, 并且其第70位点(天冬酰胺)存在N-糖基化修饰。

为了研究*GDF15*糖基化在肺癌细胞中的功能, 我们利用shRNA在肺癌细胞A549中敲低*GDF15*, 并过表达同义突变的野生型*GDF15*(WT-OE)和糖基化位点突变型*GDF15*(N70A-OE)。WB结果显示, 过表达野生型*GDF15*可显著提高其蛋白表达水平, 而过表达糖基化位点突变型*GDF15*的蛋白水平介于野生型和对照之间(图2E)。CCK-8实验结果表明, 敲低*GDF15*显著抑制A549细胞增殖, 过表达*GDF15*-WT增强了促增殖作用, 然而过表达*GDF15*-N70A仅部分恢复了促增殖能力(图2F)。综上所述, *GDF15*第70位点的糖基化修饰是其促进肿瘤增殖的关键因素。

2.3 寡糖转移酶OST-B参与*GDF15*的糖基化修饰

为了进一步探究*GDF15*的糖基化修饰酶, 我们

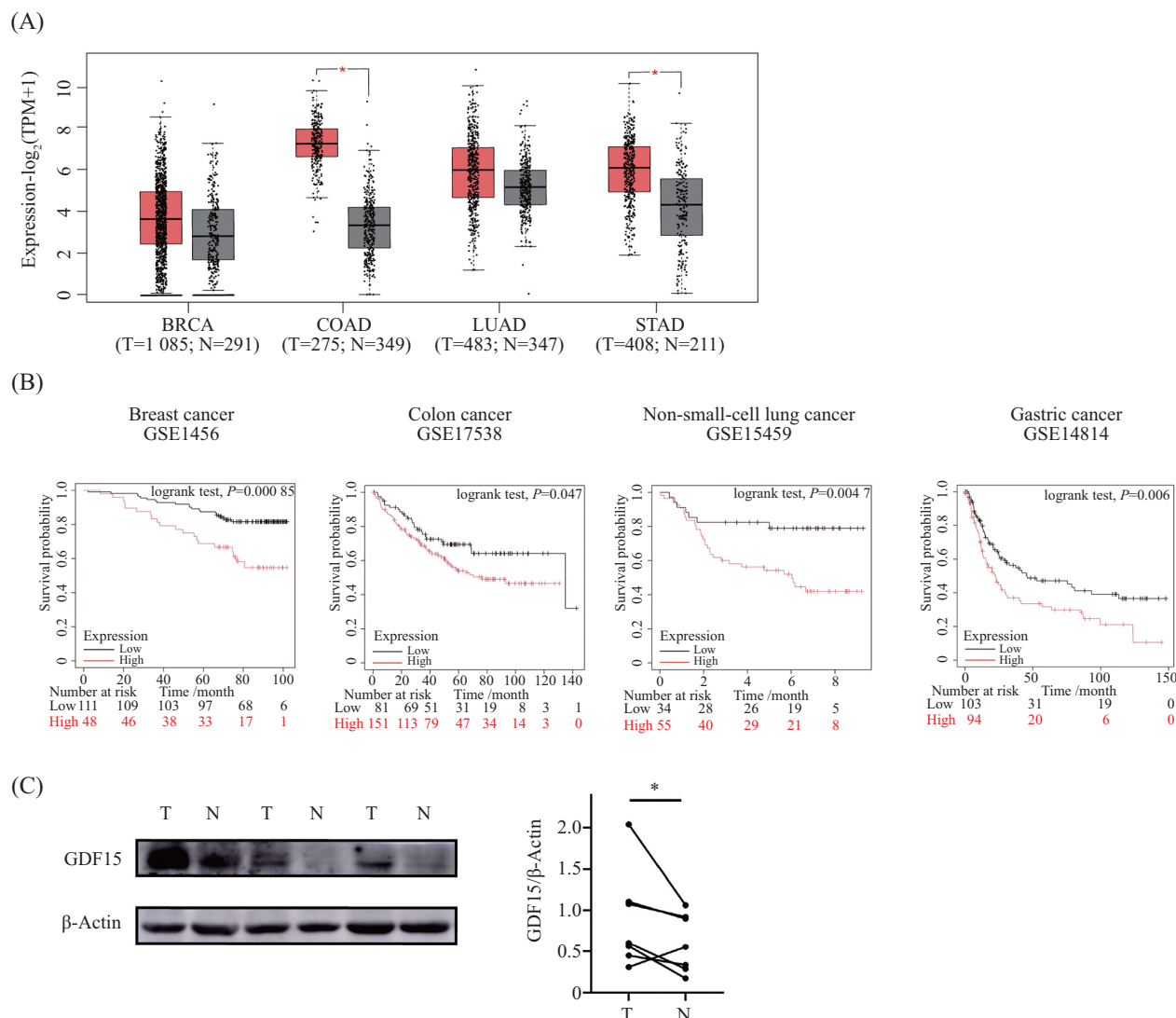
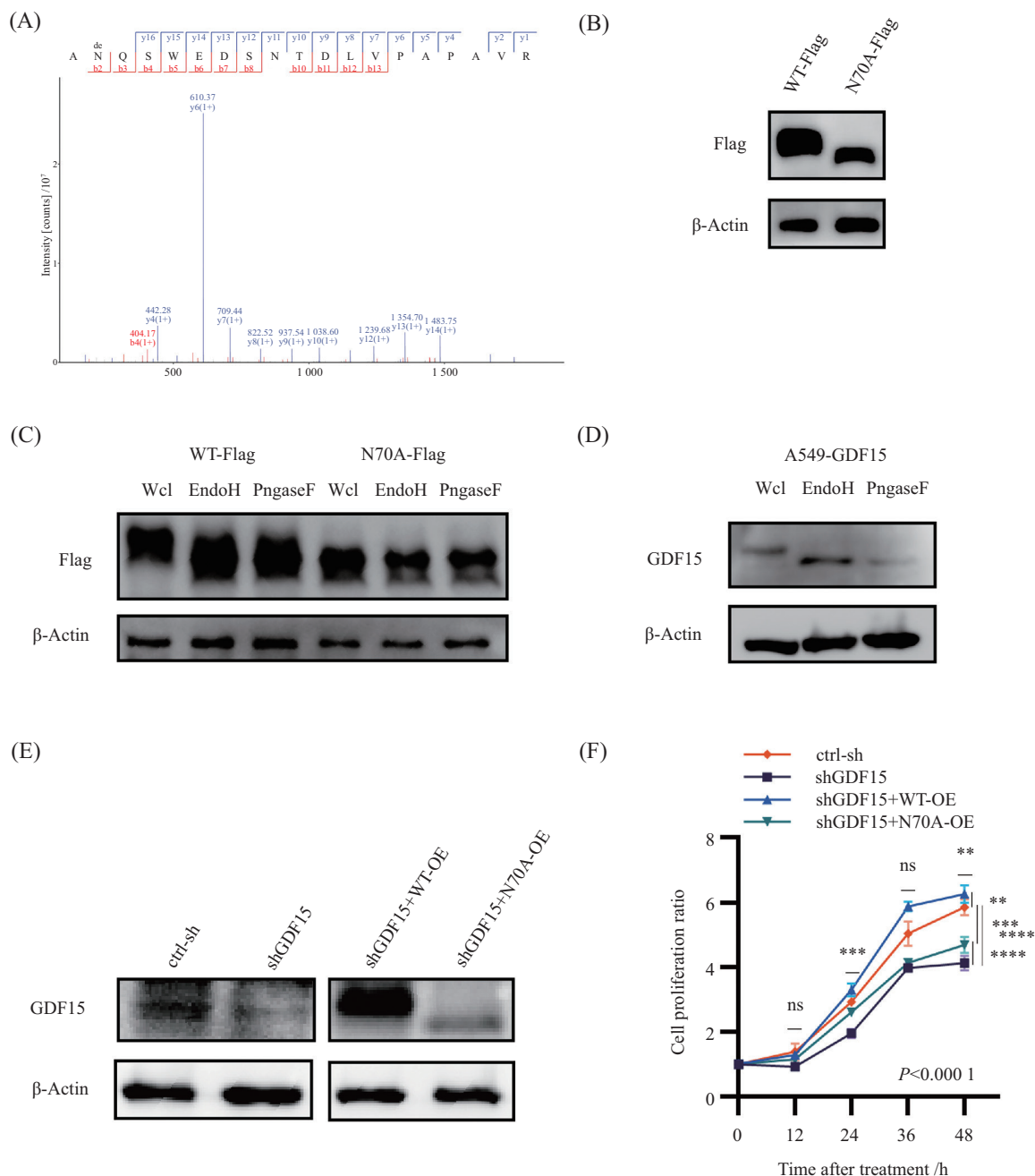


图1 GDF15与肺癌预后呈负相关
Fig.1 GDF15 is negatively correlated with lung cancer prognosis
 A: 数据库分析肺癌患者肿瘤和癌旁组织的 $GDF15$ mRNA 表达水平, 采用配对 t 检验进行统计学分析, $*P<0.05$; B: $GDF15$ 表达水平与肿瘤患者的总生存期之间的关系, 自动选用最佳截取值, 采用对数秩检验进行统计学分析; C: WB 检测肺癌患者肿瘤组织和癌旁组织的 $GDF15$ 蛋白表达水平, 采用配对 t 检验进行统计学分析, $n=5$, $*P<0.05$ 。BRCA: 乳腺浸润癌; COAD: 结肠癌; LUAD: 肺腺癌; STAD: 胃癌; T: 肿瘤组织; N: 正常组织。
 A: database analysis of $GDF15$ mRNA expression levels in tumor and adjacent non-tumor tissues of lung cancer patients, $*P<0.05$; B: relationship between $GDF15$ expression levels and overall survival in cancer patients; C: WB detection of $GDF15$ protein expression levels in tumor and adjacent non-tumor tissues of lung cancer patients, $n=5$, $*P<0.05$. BRCA: breast invasive carcinoma; COAD: colon adenocarcinoma; LUAD: lung adenocarcinoma; STAD: stomach adenocarcinoma; T: tumor; N: normal.

首先利用 AlphaFold 3 进行蛋白质结构预测, 发现 $GDF15$ 与寡糖转移酶 OST-B 结合后, 其构象发生了显著变化, 而与 OST-A 结合则未观察到构象变化(图 3A)。这一结果提示, $GDF15$ 可能通过 OST-B 添加糖链。OST-A 和 OST-B 分别为两种不同类型的寡糖转移酶, 它们在蛋白质的 N-糖基化过程中都发挥重要作用。结构分析显示, 除催化亚基 STT3 外, OST-A 与 OST-B 共享其他六个复合物。进一步的研究中, 我们在 HEK-293T 细胞中过表达 $GDF15$ -Flag, 并通

过质谱分析检测其相互作用蛋白。质谱结果表明, $GDF15$ 与 OST 复合体的亚基 DDOST 和 RPN1 存在相互作用(表 4)。在 A549 细胞中敲低 OST-B 催化亚基 $STT3B$ 后, WB 分析显示, 虽然去掉糖基化的 $GDF15$ 蛋白所在的条带(分子量小 3 kDa)没有因此增多, 但是具有糖基化修饰的 $GDF15$ 所在的条带的蛋白丰度降低。这可能是由于无糖基化的 $GDF15$ 蛋白的稳定性快速下降、无法被检测到, 从而导致了敲低 $STT3B$ 后只是导致糖基化 $GDF15$ 蛋白的量的减少,



A: 质谱技术分析GDF15的糖基化; B: WB检测GDF15-WT和N70A突变体的蛋白分子量; C: WB检测用糖苷酶处理GDF15-WT和N70A的蛋白分子量; D: WB检测过表达GDF15-Strep中A549的GDF15糖基化; E: WB检测敲低*GDF15*后过表达GDF15-WT和GDF15-N70A的GDF15蛋白水平; F: 敲低*GDF15*后过表达GDF15-WT和GDF15-N70A的CCK-8结果。Wcl: 全细胞裂解液; EndoH: 糖苷内切酶H; PNGaseF: 去糖基化酶。 ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, ns: $P > 0.05$ 。

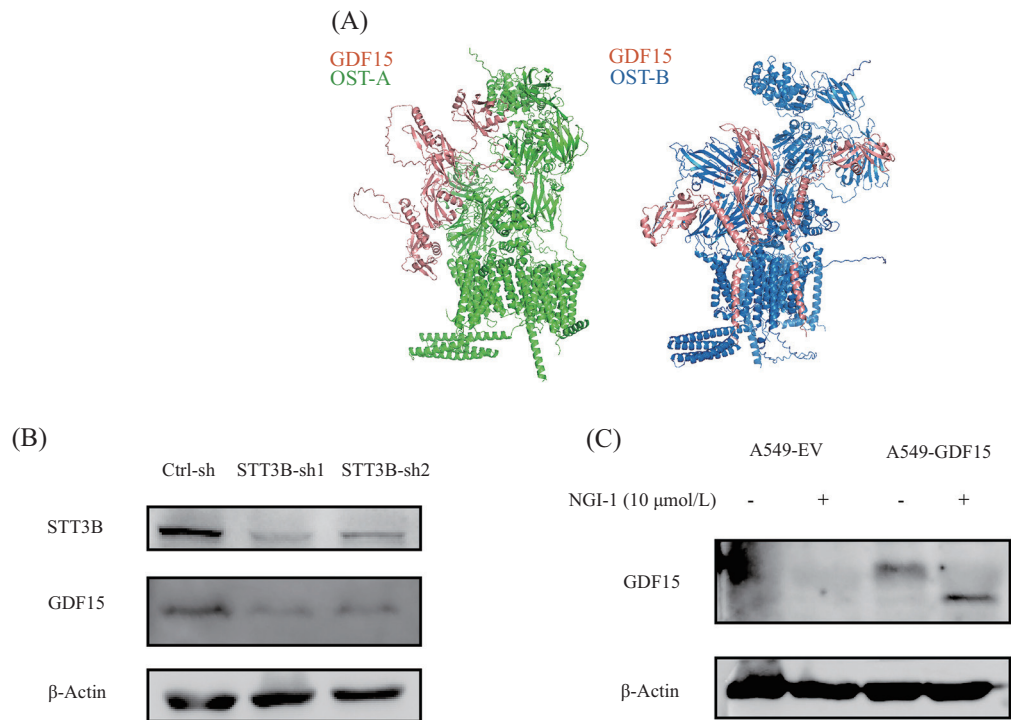
A: mass spectrometry analysis of GDF15 glycosylation; B: WB analysis of protein molecular weight for GDF15-WT and N70A mutants; C: WB analysis of protein molecular weight for GDF15-WT and N70A treated with glycosidase; D: WB analysis of GDF15 glycosylation in A549 cells overexpressing GDF15-Strep; E: WB analysis of GDF15 protein levels overexpressing of GDF15-WT and GDF15-N70A after knocking down *GDF15*; F: CCK-8 assay results of overexpression of GDF15-WT and GDF15-N70A after knocking down *GDF15*. Wcl: whole cell lysis; EndoH: endoglycosidase H; PNGaseF: peptide N-glycosidase F. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, ns: $P > 0.05$.

图2 GDF15第70位点糖基化促进肿瘤增殖

Fig.2 GDF15 glycosylation at the 70th site promotes tumor proliferation

糖基化水平未见显著变化(图3B)。同时,通过使用靶向OST催化亚基STT3的抑制剂NGI-1处理过表达GDF15的A549细胞,发现GDF15的分子量显著下

降(图3C),进一步验证了OST-B在GDF15糖基化中的关键作用。为了验证这些发现,我们使用标签抗体进行免疫共沉淀,证明RPN1(图4A)和DDOST(图



A: AlphaFold3预测的GDF15分别和寡糖转移酶OST-A、OST-B的蛋白复合物结构, GDF15: 灰粉色; OST-A: 绿色; OST-B: 蓝色; B: WB检测在A549细胞内敲除OST-B的催化亚基STT3B后的GDF15蛋白水平; C: WB检测在过表达GDF15的A549细胞内使用STT3B抑制剂NGI-1后GDF15的蛋白水平。

A: AlphaFold3 predicts the protein complex structure of GDF15 with oligosaccharide transferases OST-A and OST-B, GDF15: gray-pink; OST-A: green; OST-B: blue; B: WB analysis of GDF15 protein levels in A549 cells after knockout of the catalytic subunit STT3B of OST-B; C: WB analysis of GDF15 protein levels in A549 cells overexpressing GDF15 after treatment with STT3B inhibitor NGI-1.

图3 寡糖转移酶OST-B介导了GDF15的N-糖基化

Fig.3 Oligosaccharide transferase OST-B mediates the N-glycosylation of GDF15

表4 与GDF15可能存在相互作用的蛋白肽段信息的质谱分析数据

Table 4 The mass spectrometry analysis data of peptide segments from proteins that may interact with GDF15

序列	基因名	得分	强度
Sequence	Gene names	Score	Intensity
ATSFLLALEPELEAR	<i>RPN1</i>	125.220	2 673 400
SGGASHSELIHNLR	<i>PCMT1</i>	101.390	291 600 000
ELGSECIEFDEEK	<i>DDOST</i>	67.153	14 762 000
YVSSLTEEISK	<i>LMAN1</i>	66.621	33 600 000

4B)与GDF15存在较强的相互作用。此外,Co-IP实验也显示,STT3B(图4C)与GDF15的相互作用较弱。这可能是由于STT3B是OST-B的催化亚基,而DDOST和RPN1是OST的结合亚基。这些结果进一步印证了蛋白质谱分析中未检测到STT3B的合理性。综上所述,寡糖转移酶OST-B通过多个亚基与GDF15的相互作用,成功催化了GDF15的糖基化修饰。

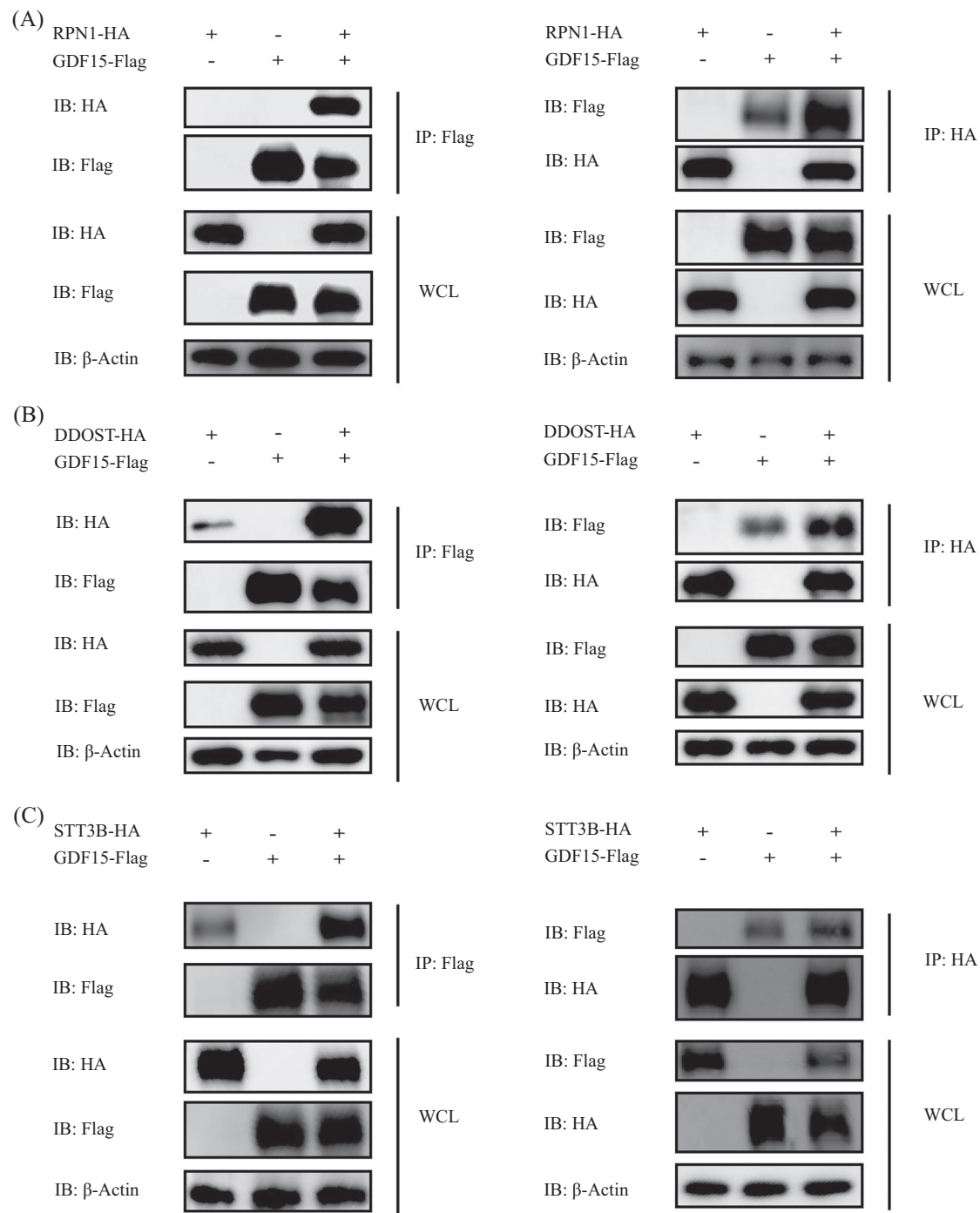
2.4 GDF15的糖基化使GDF15蛋白更稳定

为了探讨GDF15的糖基化是否影响蛋白的稳

定性,我们在蛋白合成抑制剂CHX处理下进行了实验,结果显示,N70A突变体的GDF15蛋白降解速率明显加快(图5A)。在CHX处理的同时,加入NGI-1能够显著降低GDF15的分子量,并加速其降解过程(图5B)。进一步使用不同浓度和处理时间的NGI-1,WB分析结果显示,GDF15蛋白在不同条件下呈现不同程度的去糖基化(图5C和图5D)。这些结果表明,GDF15的糖基化修饰显著提高了其蛋白稳定性。

2.5 NGI-1抑制A549增殖和迁移

为了探讨NGI-1对肺癌细胞增殖和迁移的影

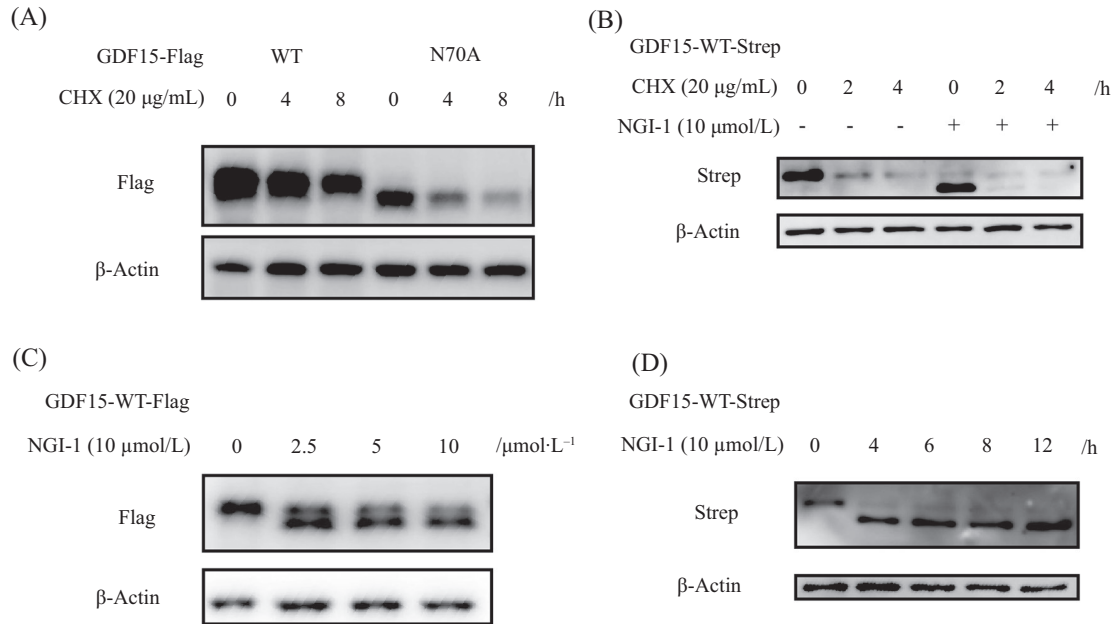


A: GDF15和OST-B亚基RPN1的Co-IP结果; B: GDF15和OST-B亚基DDOST的Co-IP结果; C: GDF15和OST-B亚基STT3B的Co-IP结果。
A: Co-IP results of GDF15 and OST-B subunit RPN1; B: Co-IP results of GDF15 and OST-B subunit DDOST; C: Co-IP results of GDF15 and OST-B subunit STT3B.

图4 OST-B复合体的多个亚基和GDF15存在相互作用
Fig.4 Multiple subunits of the OST-B complex interact with GDF15

响,我们选用A549细胞系,分别进行CCK-8、克隆形成及划痕愈合实验。克隆形成实验结果显示,NGI-1处理组的克隆数量显著减少,表明NGI-1显著抑制了肺癌细胞的克隆形成能力(图6A)。CCK-8实验结果进一步证明,NGI-1处理组显著抑

制了肿瘤细胞的增殖,并且这种抑制作用呈剂量依赖性(图6B)。在划痕愈合实验中,NGI-1处理组也表现出明显的迁移抑制作用(图6C)。以上结果表明,NGI-1能够有效抑制肺癌细胞的增殖和迁移。



A: 使用CHX梯度时间处理瞬时转染GDF15-WT和GDF15-N70A的HEK-293细胞系, 并进行WB分析; B: 在DMSO和NGI-1处理条件下, 使用CHX梯度时间处理过表达GDF15-Strep的HEK-293细胞系, 并进行WB分析; C: NGI-1梯度浓度处理瞬时转染GDF15-Flag的293细胞系; D: NGI-1梯度浓度处理过表达GDF15-Strep的293细胞系, 并进行WB分析。

A: treatment of transiently transfected GDF15-WT and GDF15-N70A in HEK-293 cells with CHX gradient over time, followed by WB analysis; B: treatment of HEK-293 cells overexpressing GDF15-Strep with DMSO and NGI-1, followed by CHX gradient over time, and WB analysis; C: treatment of transiently transfected GDF15-Flag 293 cells with a gradient of NGI-1 concentration, followed by WB analysis; D: treatment of 293 cells overexpressing GDF15-Strep with a gradient of NGI-1 concentration, followed by WB analysis.

图5 GDF15的糖基化增加蛋白稳定性

Fig.5 Glycosylation of GDF15 increases protein stability

2.6 NGI-1的抗肿瘤作用部分依赖于GDF15的糖基化

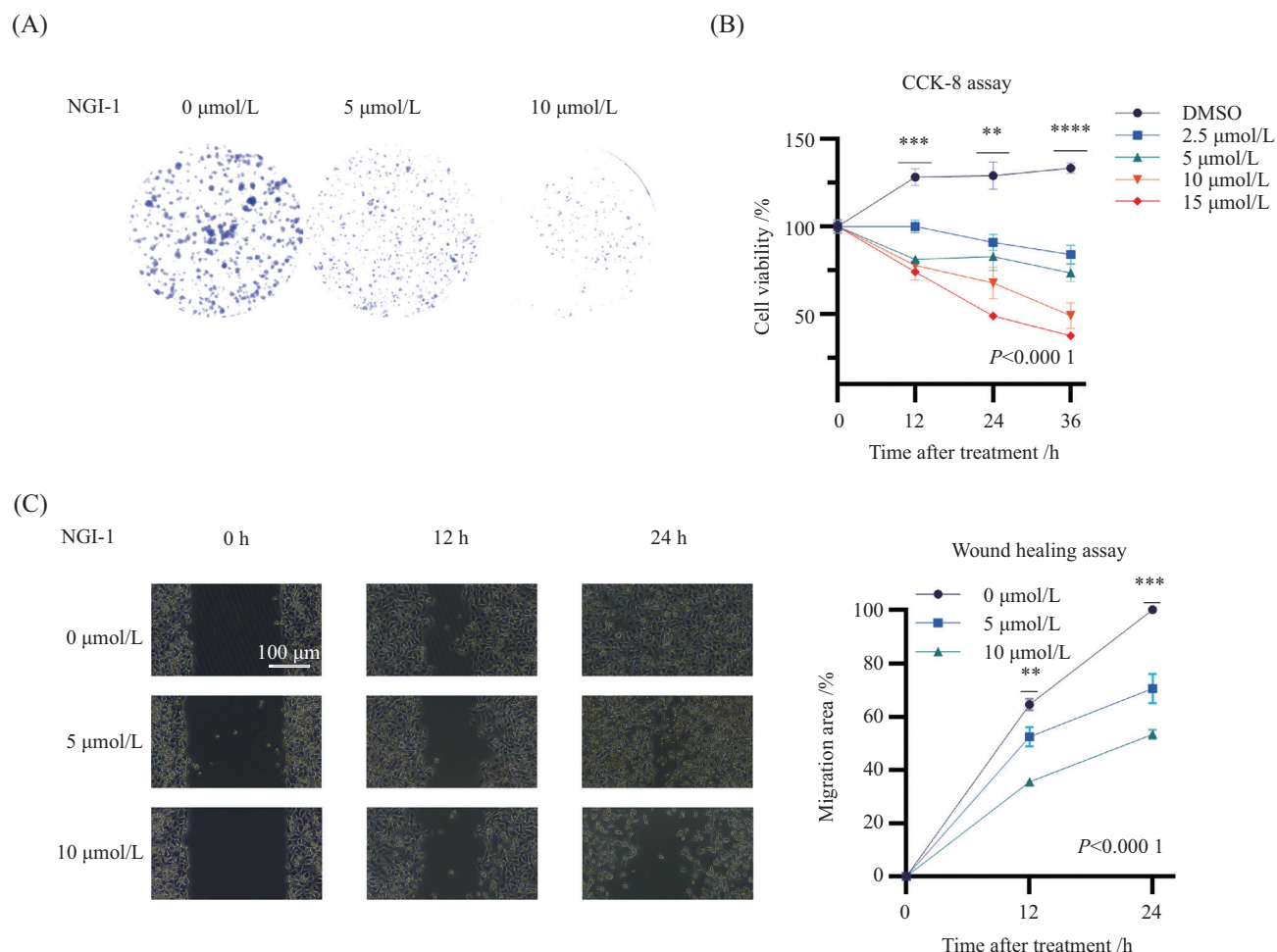
为了进一步探讨NGI-1的抗肿瘤效果是否依赖于GDF15, 我们首先用NGI-1处理已过表达了GDF15的A549细胞, CCK-8实验结果显示, 过表达GDF15后, A549细胞的增殖能力显著增强(图7A), 而NGI-1处理后, GDF15过表达所引起的增殖效应消失(图7B和图7C)。同时, WB结果显示NGI-1处理后GDF15去糖基化(图3D), 这一结果提示, NGI-1的抗肿瘤效应部分依赖于GDF15的糖基化。进一步通过敲低GDF15和STT3B, CCK-8实验显示, 两者的敲低均抑制了肿瘤细胞的增殖, 但敲低STT3B的细胞增殖抑制作用更为显著(图7D), 可能是由于STT3B影响A549增殖还通过其他下游途径。此外, 敲低GDF15后联合NGI-1处理, 肿瘤细胞的增殖能力进一步降低(图7E和图7F), 提示除了GDF15外, NGI-1的抗肿瘤作用中还存在着其他途径。

3 讨论

肺癌是目前全球发病率和死亡率最高的癌症,

常常在治疗选择有限的晚期才被诊断出来, 因此提高早期诊断的特异性和敏感性至关重要^[10]。目前, 早期分子诊断主要依赖于常规血清标志物, 如癌胚抗原、鳞状细胞癌抗原、神经特异性烯醇化酶和细胞角蛋白片段19, 然而这些标志物的诊断效能存在一定局限性^[11-12]。近年来, 随着糖生物学的研究, 将肿瘤衍生的异常糖蛋白作为早期癌症的诊断标准开辟了临床诊疗的新思路, 目前异常糖链蛋白已经在临床上有所应用^[13-14]。

蛋白质糖基化是一种重要的翻译后修饰, 指的是糖链(寡糖)通过共价键连接到蛋白质的特定氨基酸残基上, 通常发生在天冬酰胺(N-糖基化)或丝氨酸/苏氨酸(O-糖基化)上。糖基化不仅影响蛋白质的结构、稳定性和功能, 还在细胞信号转导、蛋白质折叠、免疫应答和细胞间相互作用等生物学过程中发挥关键作用^[15]。在肿瘤的发生与发展中, 异常的糖基化修饰常常与肿瘤的进展、转移、免疫逃逸及耐药性密切相关^[13]。肿瘤细胞往往表现出异常的糖基化模式, 例如糖基化酶的表达上调或下调, 导致糖基化结构的改变。这些变化不仅可以增强肿瘤细胞



A: 不同浓度NGI-1处理A549细胞的克隆形成实验; B: 不同浓度NGI-1处理A549细胞的CCK-8增殖实验; C: 不同浓度NGI-1处理A549细胞的划痕实验。采用双因素方差分析和Dunnett多重比较检验。 $**P<0.01$, $***P<0.001$, $****P<0.0001$ 。

A: clonal formation assay of A549 cells treated with different concentrations of NGI-1; B: CCK-8 proliferation assay of A549 cells treated with different concentrations of NGI-1; C: scratch assay of A549 cells treated with different concentrations of NGI-1. Two-Way ANOVA and Dunnett's multiple comparison test were used. $**P<0.01$, $***P<0.001$, $****P<0.0001$.

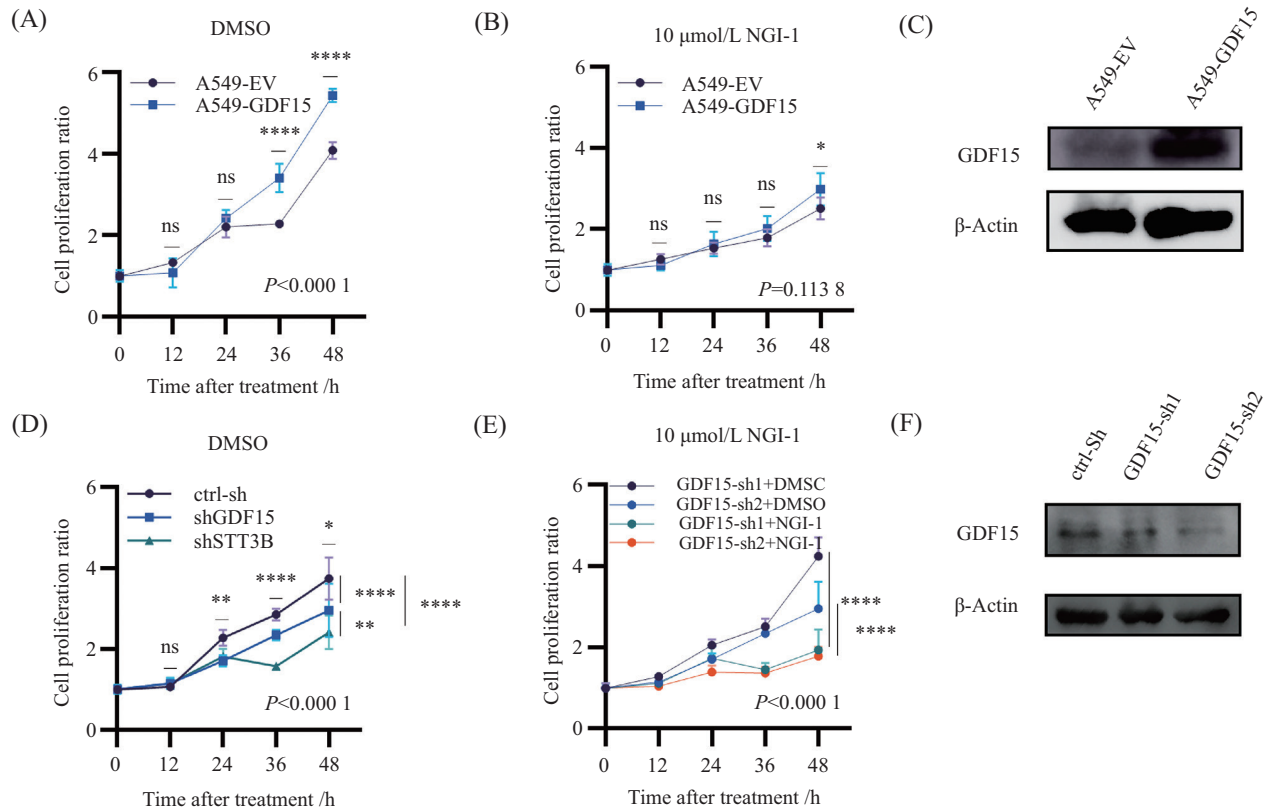
图6 NGI-1抑制A549增殖和迁移

Fig.6 NGI-1 inhibits the proliferation and migration of A549

的生长、侵袭和转移能力,还能影响肿瘤细胞对治疗的反应^[16-17]。因此,蛋白质的糖基化修饰在肿瘤的诊断、预后评估和靶向治疗中具有重要潜力。

GDF15作为一个应激糖蛋白,在炎症、肿瘤、缺氧等情况下都会上调^[18]。在多种癌症中,循环血清中GDF15的水平可能高出近200倍,并与较差的预后密切相关,这表明GDF15有望作为癌症进展的标志物^[19]。癌细胞分泌的GDF15与TGF- β II型受体结合,通过SMAD2/3信号促进转移^[20-21]。此外,GDF15与ErbB2形成复合物并激活PI3K/AKT和MAPK通路,促进癌细胞增殖和迁移^[22-23]。在肺癌中,补体C5a驱动的KLF5-GCN5-GDF15轴在非小细胞肺癌增殖中起着关键作用^[24];CDP138通过GDF15正向调

节TGF- β /Smad信号通路以促进放射抗性和转移^[25]。有临床研究表明,非小细胞肺癌肿瘤组织中GDF15表达水平增加与抗PD-L1疗效反应较差相关^[26]。尽管GDF15在多种癌症中的信号通路已被广泛研究,但其翻译后修饰与疾病的研究仍较为匮乏,仅泛素化和糖基化两种修饰被研究报道^[9,27]。本研究旨在探讨GDF15的糖基化修饰在肺癌中的作用,并评估其作为临床诊疗靶点的潜力。首先,我们通过生物信息学的分析和临床标本的WB检测证实,肺癌组织中的GDF15蛋白水平高于癌旁组织,与既往研究相一致^[25,28]。已有研究报道,在前列腺癌症中存在GDF15的糖基化修饰^[9],同样地,在肺癌中也发现了GDF15的糖基化修饰。更进一步的是,我们首



A: DMSO处理过表达GDF15的A549细胞的CCK-8结果; B: NGI-1处理过表达GDF15的A549细胞的CCK-8结果; C: WB检测A549细胞中GDF15的过表达效率; D: 在A549中敲低*STT3B*和*GDF15*的CCK-8结果; E: DMSO和NGI-1处理敲低*GDF15*的A549细胞的CCK-8结果; F: WB检测A549细胞中*GDF15*的敲低效率。采用双因素方差分析和Dunnnett多重比较检验。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$, ns: $P > 0.05$ 。

A: CCK-8 assay of GDF15-overexpressing A549 cells treated with DMSO; B: CCK-8 assay of GDF15-overexpressing A549 cells treated with NGI-1; C: Western blot analysis of GDF15 overexpression efficiency in A549 cells; D: CCK-8 assay of A549 cells with *STT3B* and *GDF15* knockdown; E: CCK-8 assay of *GDF15*-knockdown A549 cells treated with DMSO or NGI-1; F: Western blot analysis of *GDF15* knockdown efficiency in A549 cells. Two-Way ANOVA and Dunnnett's multiple comparison test were used. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$, ns: $P > 0.05$ 。

图7 NGI-1的抗肿瘤效果部分依赖于GDF15的糖基化

Fig7. The antitumor activity of NGI-1 is partially dependent on the glycosylation of GDF15

次证实催化GDF15糖基化的核心酶是寡糖转移酶OST-B。

OST抑制剂NGI-1已被证明能够破坏EGFR的N-糖基化,并降低其受体的激活,从而有效治疗EGFR突变型的非小细胞肺癌^[29]。同时,NGI-1还能阻断表皮调节素EREG的糖基化,导致其降解并抑制PD-L1,协同PD-L1抗体治疗可增强鳞状细胞癌的免疫疗效^[30]。在此背景下,我们探讨了NGI-1是否还可能影响GDF15的糖基化。结果表明,NGI-1通过抑制STT3B的酶活性,影响GDF15的蛋白稳定性,从而抑制肺癌细胞的增殖和迁移。未来的研究可以通过小鼠模型进一步验证NGI-1在体内的疗效。

有趣的是,靶向OST的抑制剂NGI-1处理GDF15过表达的细胞系, WB结果可以显著看到分子量的降低,但是敲低*STT3B*后仅能看到糖基化GDF15蛋白

的减少,对此我们有两种推断:(1) OST-B不是GDF15的唯一糖基化修饰酶,或GDF15还存在其他的糖基化位点;(2) 非糖基化的GDF15降解速度很快,NGI-1处理2 h后就几乎看不到条带,所以这很可能是没有看到非糖基化条带的原因。此外,质谱结果并未显示GDF15和催化亚基STT3A或STT3B的结合, Co-IP结果也显示其结合能力较弱,可以大胆推测OST-B修饰的模式是通过某几个亚基结合靶蛋白,再由催化亚基执行催化功能的。OST的结构目前已经被解析报道,后续可以验证GDF15和OST的剩余4个辅助亚基的相互作用,分别为: RPN2、MAGT1、DAD1、OST4,以及探究STT3A是否会催化GDF15的相互作用。

目前GDF15的抗体也在临床进行多项实验, GDF15单克隆抗体 Ponsegromab已被报道可以通

过抑制GDF15信号转导缓解多种癌症引发的恶病质^[28,31-32]。最新的研究发现,GDF-15阻断抗体Visugromab能够克服抗PD-1/PD-L1疗法的耐药,改善非小细胞肺癌和尿路上皮癌部分患者的治疗反应^[33]。我们的研究提供了一种新的思路,通过抑制GDF15的糖基化从而影响其功能。未来可以进一步探讨NGI-1与其他治疗策略的联合应用,特别是在免疫治疗或靶向治疗中的潜力。

综上所述,本研究揭示了GDF15糖基化修饰在肺癌中的关键作用,尤其是OST-B通过催化亚基STT3B促进GDF15的糖基化,从而稳定其蛋白质并促进肿瘤细胞的增殖。我们的研究不仅为GDF15作为肺癌治疗靶点提供了新的思路,也为糖基化在肿瘤发生发展中的作用提供了新的视角。未来的研究可以进一步探讨通过调控GDF15糖基化或OST-B活性来开发新的靶向治疗策略,以期肺癌患者提供更有有效的治疗选择。后续研究还应着眼于GDF15的糖基化、磷酸化和泛素化等翻译后修饰的相互作用,探索这些修饰如何协同调控GDF15功能,并影响肿瘤细胞的增殖、迁移及免疫逃逸。此外,研究GDF15糖基化与其分泌特性之间的关系也十分必要,有望将GDF15发展为肿瘤标志物,为肺癌的诊疗提供有效帮助。

参考文献 (References)

- [1] LEITER A, VELUSWAMY R R, WISNIVESKY J P. The global burden of lung cancer: current status and future trends [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2023, 20(9): 624-39.
- [2] MEYER M L, FITZGERALD B G, PAZ-ARES L, et al. New promises and challenges in the treatment of advanced non-small-cell lung cancer [J]. *Lancet*, 2024, 404(10454): 803-22.
- [3] WANG D, DAY E A, TOWNSEND L K, et al. GDF15: emerging biology and therapeutic applications for obesity and cardiometabolic disease [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2021, 17(10): 592-607.
- [4] TSAI V W, HUSAINI Y, SAINSBURY A, et al. The MIC-1/GDF15-GFRAL pathway in energy homeostasis: implications for obesity, cachexia, and other associated diseases [J]. *Cell Metabolism*, 2018, 28(3): 353-68.
- [5] CHATHAM J C, ZHANG J, WENDE A R. Role of O-linked N-acetylglucosamine protein modification in cellular (patho) physiology [J]. *Physiol Rev*, 2021, 101(2): 427-93.
- [6] MEHBOOB M Z, LANG M. Structure, function, and pathology of protein O-glucosyltransferases [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(1): 71.
- [7] LIN Y, LUBMAN D M. The role of N-glycosylation in cancer [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2024, 14(3): 1098-110.
- [8] RAMÍREZ A S, KOWAL J, LOCHER K P. Cryo-electron microscopy structures of human oligosaccharyltransferase complexes OST-A and OST-B [J]. *Science*, 2019, 366(6471): 1372-5.
- [9] WANG R, WEN P, YANG G, et al. N-glycosylation of GDF15 abolishes its inhibitory effect on EGFR in AR inhibitor-resistant prostate cancer cells [J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(7): 626.
- [10] BOGOS K, KISS Z, TAMÁSI L, et al. Improvement in lung cancer survival: six-year survival analysis of patients diagnosed between 2011 and 2016 in Hungary [J]. *J Clin Oncol*, 2020, 38(15 suppl): e21582.
- [11] 郭艺彤, 杨卫华. 异常糖基化在肺癌中的应用进展[J]. *临床肺科杂志*(GUO Y T, YANG W H. Advances in the application of aberrant glycosylation in lung cancer [J]. *Journal of Clinical Pulmonary Medicine*), 2023, 28(10): 1571-5.
- [12] REN F, FEI Q, QIU K, et al. Liquid biopsy techniques and lung cancer: diagnosis, monitoring and evaluation [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2024, 43(1): 96.
- [13] HE M, ZHOU X, WANG X. Glycosylation: mechanisms, biological functions and clinical implications [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2024, 9(1): 194.
- [14] LI M Y, LIU L Z, DONG M. Progress on pivotal role and application of exosome in lung cancer carcinogenesis, diagnosis, therapy and prognosis [J]. *Mol Cancer*, 2021, 20(1): 22.
- [15] WU X, XU M, GENG M, et al. Targeting protein modifications in metabolic diseases: molecular mechanisms and targeted therapies [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 220.
- [16] LIU H M, MA L L, CAO B, et al. Progress in research into the role of abnormal glycosylation modification in tumor immunity [J]. *Immunol Lett*, 2021, 229: 8-17.
- [17] NIE H, JU H, FAN J, et al. O-GlcNAcylation of PGK1 coordinates glycolysis and TCA cycle to promote tumor growth [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 36.
- [18] SIDDIQUI J A, POTHURAJU R, KHAN P, et al. Pathophysiological role of growth differentiation factor 15 (GDF15) in obesity, cancer, and cachexia [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2022, 64: 71-83.
- [19] WELSH J B, SAPINOSO L M, KERN S G, et al. Large-scale delineation of secreted protein biomarkers overexpressed in cancer tissue and serum [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(6): 3410-5.
- [20] LI L, ZHANG R, YANG H, et al. GDF15 knockdown suppresses cervical cancer cell migration *in vitro* through the TGF- β /Smad2/3/Snail1 pathway [J]. *FEBS Open Bio*, 2020, 10(12): 2750-60.
- [21] XU J, KIMBALL T R, LORENZ J N, et al. GDF15/MIC-1 functions as a protective and antihypertrophic factor released from the myocardium in association with SMAD protein activation [J]. *Circ Res*, 2006, 98(3): 342-50.
- [22] YAMAGUCHI K, LEE S H, ELING T E, et al. Identification of nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene (NAG-1) as a novel downstream target of phosphatidylinositol 3-kinase/AKT/GSK-3 β pathway [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(48): 49617-23.
- [23] LI S, MA Y M, ZHENG P S, et al. GDF15 promotes the proliferation of cervical cancer cells by phosphorylating AKT1 and Erk1/2 through the receptor ErbB2 [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 80.
- [24] ZHAO C, LI Y, QIU W, et al. C5a induces A549 cell proliferation

- tion of non-small cell lung cancer via GDF15 gene activation mediated by GCN5-dependent KLF5 acetylation [J]. *Oncogene*, 2018, 37(35): 4821-37.
- [25] LU Y, MA J, LI Y, et al. Correction: CDP138 silencing inhibits TGF- β /Smad signaling to impair radioresistance and metastasis via GDF15 in lung cancer [J]. *Cell Death Dis*, 2024, 15(7): 549.
- [26] AKDOGAN O, OGUT B, SUTCUOGLU O, et al. The impact of the expression level of growth differentiation factor 15 in tumor tissue on the response to immunotherapy in non-small cell lung cancer [J]. *BMC Cancer*, 2024, 24(1): 954.
- [27] GU X, SONG Y, LIU X, et al. METTL14-mediated m6A modification of TUG1 represses ferroptosis in alzheimer's disease via inhibiting GDF15 ubiquitination [J]. *Front Biosci*, 2024, 29(8): 298.
- [28] GROARKE J D, CRAWFORD J, COLLINS S M, et al. Ponsegromab for the treatment of cancer cachexia [J]. *N Engl J Med*, 2024, 391(24): 2291-303.
- [29] LOPEZ SAMBROOKS C, BARO M, QUIJANO A, et al. Oligosaccharyltransferase inhibition overcomes therapeutic resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors [J]. *Cancer Res*, 2018, 78(17): 5094-106.
- [30] XU S, WANG H, ZHU Y, et al. Stabilization of EREG via STT3B-mediated N-glycosylation is critical for PDL1 upregulation and immune evasion in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Int J Oral Sci*, 2024, 16(1): 47.
- [31] GROARKE J D, CRAWFORD J, COLLINS S M, et al. Phase 2 study of the efficacy and safety of ponsegromab in patients with cancer cachexia: PROACC-1 study design [J]. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2024, 15(3): 1054-61.
- [32] CRAWFORD J, CALLE R A, COLLINS S M, et al. A phase Ib first-in-patient study assessing the safety, tolerability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of ponsegromab in participants with cancer and cachexia [J]. *Clin Cancer Res*, 2024, 30(3): 489-97.
- [33] MELERO I, DE MIGUEL LUKEN M, DE VELASCO G, et al. Neutralizing GDF-15 can overcome anti-PD-1 and anti-PD-L1 resistance in solid tumours [J]. *Nature*, 2025, 637(8048): 1218-27.