

宫颈癌组织 GSTO1 的表达与宫颈癌预后的相关性分析 及其 N-糖基化对宫颈癌恶性生物学行为的影响

于盼盼^{1,2}, 杨萍^{1,2}, 孙倩玉^{1,2}, 高玮睿^{1,2}, 赵邹宇^{1,2}, 孙崇凤^{1,2}

摘要 目的 研究谷胱甘肽 S-转移酶 Omega-1 (GSTO1) 在宫颈癌组织中的表达及其与患者生存时间的相关性,并探究 GSTO1 N-糖基化对宫颈癌细胞增殖、迁移、侵袭和上皮间质转化的影响。方法 用免疫组化检测 82 例宫颈癌患者癌组织中 GSTO1 的表达水平,分析 GSTO1 表达与临床病理特征的相关性。Kaplan-Meier 法绘制生存曲线,评估宫颈癌组织中 GSTO1 的表达对患者生存时间的影响;单因素和多因素 Cox 回归分析评估影响宫颈癌预后的独立危险因素;NetNG-lyc 1.0 Server 数据库预测 GSTO1 潜在的 N-糖基化修饰位点 (Asn55、Asn135、Asn190);在宫颈癌细胞 (HeLa) 中转染 GSTO1 55 位、135 位和 190 位 N-糖基化突变载体以及 GSTO1 野生型载体和空载体,嘌呤霉素筛选稳定转染细胞;Western blot 实验检测慢病毒干扰效果;EdU 增殖实验、划痕愈合实验和 Transwell 实验检测 GSTO1 N-糖基化定点突变对 HeLa 细胞增殖、迁移和侵袭的影响;Western blot 实验检测 GSTO1 N-糖基化定点突变对 HeLa 细胞上皮间质转化的影响。结果 免疫组化结果显示 GSTO1 在宫颈癌组织中高表达;GSTO1 在间质浸润深度 $\geq 1/2$ 、有淋巴脉管间隙浸润、有淋巴结转移的宫颈癌组织中的表达率更高 ($P < 0.05$),且 GSTO1 高表达与较差的总生存时间相关;GSTO1 N-糖基化定点突变后,HeLa 细胞的增殖、迁移和侵袭的细胞个数均减少 ($P < 0.01$);Western blot 结果显示 GSTO1 N-糖基化定点突变抑制 HeLa 细胞上皮间质转化。结论 宫颈癌组织中 GSTO1 表达与患者间质浸润深度、淋巴脉管间隙浸润和淋巴结转移有关,且与患者较短的生存时间相关。GSTO1 N-糖基化定点突变能够抑制 HeLa 细胞的增殖、转移和上皮间质转化。

关键词 GSTO1;宫颈癌;N-糖基化;生存时间;增殖;侵袭;上皮间质转化

中图分类号 R 711.74

2023-10-17 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:82072893);石河子大学成果转化与技术推广计划项目(编号:CGZH201701);中国医学科学院中央级公益性科研院所基本科研业务费项目(编号:2020-PT330-003)

作者单位:¹ 石河子大学第一附属医院妇科,石河子 832000

² 国家卫生健康委中亚高发防治重点实验室,石河子 832000

作者简介:于盼盼,女,硕士研究生;

杨萍,女,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: pingy2018@163.com

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)12-2002-09
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.12.003

宫颈癌是恶性肿瘤之一,严重威胁全球妇女健康^[1],每年超过 30 万人死于宫颈癌^[2]。目前,宫颈癌筛查、接种 HPV 疫苗等可明显降低宫颈癌患者的发病率,但其转移、复发仍是宫颈癌患者的重要死因^[3]。糖基化是蛋白质翻译后修饰中最常见的类型之一,主要包括 N-糖基化和 O-糖基化^[4]。研究^[5]显示,蛋白质糖基化与宫颈癌的发生发展有关。谷胱甘肽 S-转移酶 Omega-1 (glutathione S-transferase omega-1, GSTO1) 是一种谷胱甘肽转移酶,对细胞代谢及凋亡具有调节作用^[6]。临床研究^[7]显示,GSTO1 基因多态性与 HPV 感染易感性和宫颈癌的发生有明显的相关性。数据库预测 GSTO1 蛋白存在多个潜在的 N-糖基化修饰位点。该研究旨在探索宫颈癌组织肿瘤细胞中 GSTO1 的表达水平与宫颈癌患者临床病理特征和预后的相关性及其 N-糖基化对宫颈癌细胞增殖、侵袭、转移和上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 临床病理资料 选择 2010 年 11 月—2019 年 12 月石河子大学第一附属医院妇科诊断和手术治疗的 82 例 I - II 期 (FIGO 分期, 2018) 宫颈癌患者作为研究对象,另收集相近时间段内 33 例因子宫良性疾病行全子宫切除术患者作为对照。82 例宫颈癌患者中,年龄 < 50 岁 42 例,年龄 ≥ 50 岁 40 例; I 期 48 例, II 期 34 例;鳞癌 65 例,腺癌 17 例;高中分化 72 例,低分化 10 例;肿瘤直径 < 2 cm 32 例,肿瘤直径 ≥ 2 cm 50 例;间质浸润深度 (deep stromal invasion, DSI) $< 1/2$ 者 42 例, $\geq 1/2$ 者 40 例;有淋巴脉管间隙浸润 (lymph vascular space invasion, LVSI) 21 例,无 LVSI 61 例;有淋巴结转移 (lymph node metastasis, LNM) 12 例,无 LNM 70 例。对患者行术后随

访,记录患者总生存时间(overall survival, OS)。OS是指手术日至死亡日或末次随访日期的时间。该研究经由石河子大学第一附属医院伦理委员会审查并批准(批号:KJ2020-065-01),所有患者均知情同意后纳入本研究。

1.1.2 主要材料与仪器 宫颈癌细胞株 HeLa(货号:XF0314)购于上海复祥生物科技有限公司;GSTO1 N-糖基化定点突变慢病毒(货号:220519DZ)购自上海吉玛公司;GSTO1 抗体(货号:201986)以及 E-钙黏蛋白抗体(货号:40772)、N-钙黏蛋白抗体(货号:76011)和波形蛋白抗体(货号:72547)购自英国 Abcam 公司;DMEM 培养基(货号:C11995500BT)、胎牛血清(货号:10099141)购自德国 Gibco 公司;胰蛋白酶(货号:SH30042.01B)购自美国海克隆公司;细胞迁移侵袭 Transwell 小室(货号:3422)、Matrigel 基质胶(货号:354234)购自美国康宁公司;EdU 细胞增殖检测试剂盒(货号:K1075)和 TBS 粉末(货号:AR0144)购自安徽白鲨生物科技有限公司;嘌呤霉素(货号:107R0440)、Tween-20(货号:85113)和二甲基亚砜(DMSO;货号:D8370)购自北京索莱宝公司;衣霉素(货号:B7417)购自美国伯乐公司;兔种属来源二抗(货号:ZB-2305)和鼠种属来源二抗(货号:ZB-2305)购自北京中杉金桥公司;电泳仪(型号:165-8001)和转膜仪(型号:170-3935)购自美国伯乐公司;倒置显微镜(型号:IX73P2F)购自日本奥林巴斯公司;化学发光成像仪(型号:5200)购自上海 Chemscope 公司。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析 利用生物信息学数据库 GENT2(<http://gent2.appep.kr/gent2/>)分析 GSTO1 mRNA 表达情况。根据 NetNGlyc 1.0 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)预测 GSTO1 潜在的 N-糖基化修饰的氨基酸序列。

1.2.2 苏木精-伊红染色与免疫组化 石蜡切片经过脱蜡、水化处理,苏木精浸染 5 min 后分化 6 s,然后蓝化 5 min,最后用伊红浸洗 1 min,水洗不变色后烘干封片。石蜡切片经脱蜡、水化后处理,8 min 高温高压抗原热修复,置于过氧化物中避光 10 min,滴加 GSTO1 一抗(1:100)4℃冰箱过夜,然后滴加二抗(1:500)室温孵育 30 min,DBA 显色后再用苏木精复染,最后用中性树胶封片。GSTO1 蛋白在宫颈癌组织肿瘤细胞的胞浆中着色,免疫组化染色的结果由 3 位年资较高的病理科医师进行评分,根据强度分数和百分比分数的乘积计算肿瘤细胞染色强

度评分分级,评分 0~6 分者属于低表达或不表达,评分 7~16 分属于高表达^[8]。

1.2.3 细胞转染 本实验按照慢病毒转染说明书所示步骤进行。将宫颈癌细胞 HeLa 铺入 6 孔板中,待细胞融合度至 50%~60% 时加入含有 GSTO1 55 位 N-糖基化突变载体基因序列(N55Q 组)、135 位 N-糖基化突变载体基因序列(N135Q 组)和 190 位 N-糖基化突变载体基因序列(N190Q 组)以及 GSTO1 野生型载体基因序列(WT 组)和空载体基因序列(Vector 组),去除原有培养基,按每孔 1 ml 加入不完全培养基。大概 12~16 h 更换为完全培养基,待细胞融合度达到 80% 左右时更换含嘌呤霉素(1 μg/ml)的完全培养基连续筛选 7 d,筛选成功表达 GSTO1 N-糖基化 55 位、135 位、190 位定点突变以及 GSTO1 野生型和空载体的细胞用于后续实验。

1.2.4 EdU 增殖实验 将转染后各组细胞均匀铺入 96 孔板中(5 000 个/孔),24 h 后用 EdU 工作液孵育 2 h,然后在 3.7% 甲醛中固定 15 min。在室温下加入含 0.5% Triton[®] X-100 的 PBS 通透液孵育 20 min,每孔加入 100 μl Click 反应液,室温暗处培养 30 min,最后每孔加入 100 μl 的 1×Hoechst33342 溶液,室温暗处培养 30 min。显微镜下拍照,判断细胞增殖能力。

1.2.5 划痕愈合实验 将转染后各组细胞均匀接种在 6 孔板中,待细胞融合度达到 80% 以上时,用移液枪的枪头垂直于 6 孔板底部划线,清洗除去脱落细胞,然后用完全培养基继续培养。最后,在 0、48 h 时用倒置显微镜拍照,比较细胞的迁移能力。

1.2.6 Transwell 实验 将 200 μl 转染后各组细胞悬液(包含 2×10^4 个细胞)加入上室,下室加入 800 μl 含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基,恒温孵育 48 h,去除原有培养基,在 4% 多聚甲醛固定液中将细胞固定 15 min,PBS 清洗后加入结晶紫染色 30 min。最后,在倒置显微镜下随机选取多个不同视野拍照并计数,比较细胞的迁移能力。此外,Transwell 实验还用于测定细胞侵袭能力,在上室加入细胞悬液之前,在小室的底部先加入基质胶,其余操作均与细胞迁移实验相同。

1.2.7 Western blot 实验 将宫颈癌 HeLa 细胞接种于 6 孔板中,待细胞融合度达到 80% 时,分别用衣霉素(浓度 0.1 μg/ml)、DMSO 处理 24 h 后提取总蛋白质,进行 Western blot 实验。衣霉素用 DMSO 进行稀释,因此以 DMSO 组作为试剂对照组,以宫颈癌 HeLa 原株细胞作为空白对照。取出转染后各

组长满细胞的6孔板,除去原有培养基,加入细胞裂解液(RIPA:PMSF=99:1),提取细胞内总蛋白质。每组蛋白样品取10 μl,行SDS-PAGE检测,电泳结束后蛋白由凝胶传递至PVDF膜,然后与5%脱脂奶粉一起封闭2h,最后将PVDF膜分别放入含有GSTO1(1:2000)、EMT相关抗体E-cadherin(1:3000)、N-cadherin(1:2000)和Vimentin(1:2000)的脱脂奶粉中,在4℃下孵育过夜。第二天,取出PVDF膜,用TBST缓冲液浸洗30min(平均5min/次),随后置于对应种属的二抗(1:20000)中,室温下继续孵育2h。最后,置于化学发光成像仪中,按照流程曝光并保存图片,统计灰度值并比较蛋白表达的差异。本研究所有Western blot实验,均进行3次重复实验并统计结果。

1.3 统计学处理 运用SPSS 23.0软件构建数据库和进行统计分析。计数资料用发生率的百分比表示,组间比较采用卡方检验;计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示;符合正态分布的数据组间比较采用t检验,不符合正态分布的数据采用秩和检验;采用Kaplan-Meier生存曲线及Log-rank检验分析GSTO1表达与患者总生存时间的关系;单因素和多因素Cox回归分析用来评估影响宫颈癌预后的独立危险因素。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GSTO1在宫颈癌组织中的表达 首先,利用生物信息学数据库GENT2检索GSTO1在宫颈癌组织和正常宫颈组织中表达的差异,结果显示114例宫颈癌组织样本中GSTO1 mRNA的表达明显高于11例正常宫颈组织($P < 0.01$)(图1A)。免疫组化结果显示82例宫颈癌患者组织样本中GSTO1高表达组有53例(64.6%),低表达组(阴性和低表达者)有29例(35.4%);33例对照的正常宫颈组织上皮细胞中GSTO1均呈阴性表达,二者比较差异具有统计学意义($\chi^2 = 39.562, P < 0.001$)(图1B-M)。

2.2 GSTO1表达与宫颈癌患者临床病理特征的关系 DSI $\geq 1/2$ 、有LVSI、有淋巴结转移的宫颈癌患者肿瘤细胞中GSTO1高表达率高于DSI $< 1/2$ 、无LVSI、无淋巴结转移的宫颈癌患者肿瘤细胞,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

2.3 GSTO1高表达对宫颈癌患者预后的影响 随访纳入研究的82例宫颈癌患者,随访截止时间是2022年10月25日,中位随访时间为60个月(9~144个月),其中12例(14.6%)失访,13例(15.8%)

表1 GSTO1在宫颈癌组织肿瘤细胞中的表达与患者临床病理特征的关系[n(%)]

病理特征	n	宫颈癌组织中GSTO1的表达水平		χ^2 值	P值
		低表达	高表达		
年龄(岁)					
<50	42	15(35.7)	27(64.3)	0.005	0.964
≥ 50	40	14(35.0)	26(65.0)		
FIGO(2018)分期				0.231	0.631
I期	48	18(37.5)	30(62.5)		
II期	34	11(32.4)	23(67.6)		
肿瘤类型				0.317	0.547
鳞癌	65	22(33.8)	43(66.2)		
腺癌	17	7(41.2)	10(58.8)		
分化程度				1.176	0.278
中高分化	72	27(37.5)	45(62.5)		
低分化	10	2(20.0)	8(80.0)		
肿瘤大小(cm)				0.635	0.426
<2	32	13(40.6)	19(59.4)		
≥ 2	50	16(32.0)	34(68.0)		
DSI				5.655	0.017
<1/2	42	20(47.6)	22(52.4)		
$\geq 1/2$	40	9(22.5)	31(77.5)		
LVSI				5.448	0.019
有	21	3(14.3)	18(85.7)		
无	61	26(42.6)	35(57.4)		
淋巴结转移				4.494	0.034
有	12	1(8.3)	11(91.7)		
无	70	28(40.0)	42(60.0)		

复发,12例(14.6%)死亡。Kaplan-Meier生存曲线显示,GSTO1高表达组的5年累计OS率(37.7%,20/53)低于GSTO1低表达组的OS率(55.2%,16/29),差异有统计学意义($P = 0.029$)。见图2A。单因素Cox回归分析结果显示,FIGO分期($HR: 5.678, 95\% CI: 1.583 \sim 20.366, P = 0.008$)、间质浸润深度($HR: 3.806, 95\% CI: 1.061 \sim 13.659, P = 0.040$)、淋巴结转移($HR: 0.147, 95\% CI: 0.051 \sim 0.424, P < 0.001$)和GSTO1表达是影响宫颈癌患者OS($HR: 7.763, 95\% CI: 1.013 \sim 59.484, P = 0.049$)的关键因素。见表2。多因素Cox回归分析显示,FIGO分期($HR: 4.125, 95\% CI: 1.112 \sim 15.308, P = 0.034$)、DSI($HR: 6.113, 95\% CI: 1.329 \sim 28.112, P = 0.020$)和淋巴结转移($HR: 4.749, 95\% CI: 0.596 \sim 37.835, P = 0.001$)是影响宫颈癌患者OS的独立危险因素。见表2。

2.4 宫颈癌HeLa细胞中GSTO1 N-糖基化定点突变对GSTO1表达量的影响 根据NetNGlyc 1.0 Server数据库预测GSTO1潜在的N-糖基化修饰的氨基酸序列,其中N55($P = 0.67$)、N135($P = 0.62$)、N190($P = 0.69$)位N-糖基化修饰的阳性率

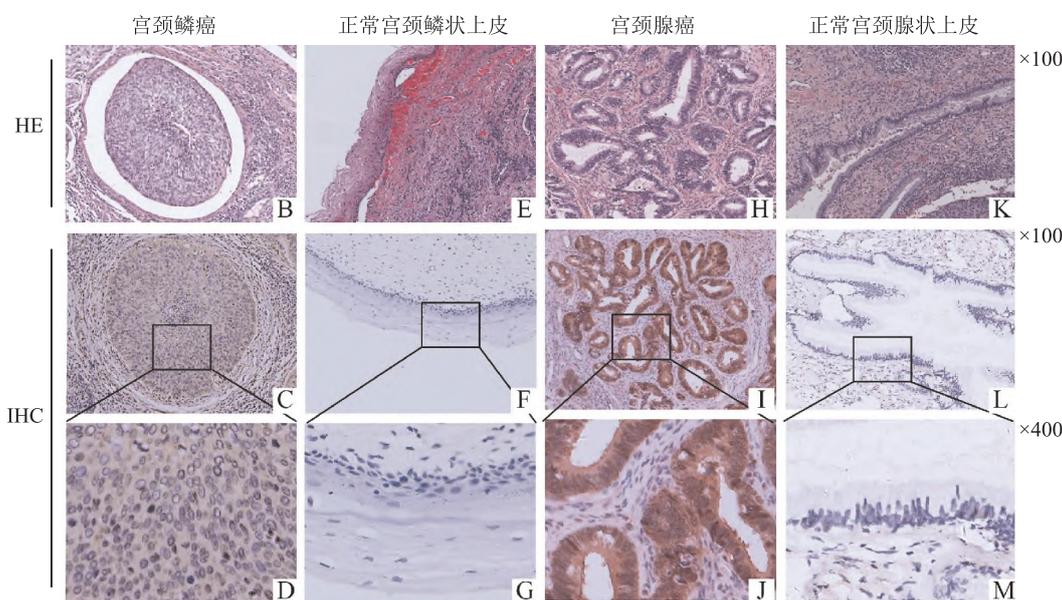
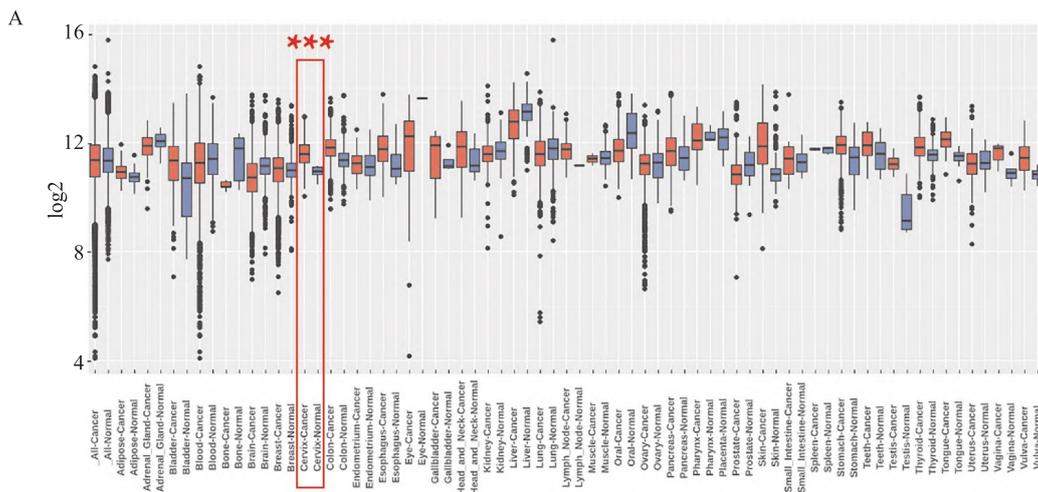


图1 正常宫颈组织和宫颈癌组织中 GSTO1 的 mRNA 和蛋白质表达情况

A: GSTO1 mRNA 在宫颈癌组织肿瘤细胞中的表达; B - D: 宫颈鳞癌; E - G: 正常宫颈鳞状上皮; H - J: 宫颈腺癌; K - M: 正常宫颈腺状上皮; 与正常宫颈组织组比较: *** $P < 0.001$

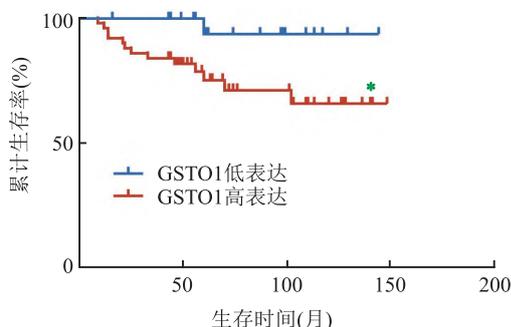


图2 宫颈癌肿瘤细胞中 GSTO1 不同表达的宫颈癌患者的生存曲线

与 GSTO1 低表达组比较: * $P < 0.05$

较高(图 3C)。用 N-糖基化抑制剂衣霉素处理宫颈癌 HeLa 细胞, Western blot 检测结果发现衣霉素 ($0.01 \mu\text{g/ml}$) 能够抑制癌细胞中 GSTO1 的蛋白表达 ($t = 5.203, P < 0.05$) (图 3A - B)。构建 GSTO1 N-糖基化定点突变载体(图 3D), 通过慢病毒转染获得稳定表达 GSTO1 N-糖基化定点突变的宫颈癌 HeLa 细胞, Western blot 检测其 GSTO1 的蛋白表达量, 结果显示 N-糖基化定点突变组 GSTO1 的蛋白表达量明显降低 ($t_{N55Q} = 4.272, t_{N135Q} = 4.325, t_{N190Q} = 5.713$, 均 $P < 0.05$) (图 3E - F)。

表2 宫颈癌患者 OS 的单变量和多变量 Cox 回归分析结果

指标	单因素分析			多因素分析		
	HR	95% CI	P 值	HR	95% CI	P 值
年龄(<50岁 vs ≥50岁)	2.157	(0.707 ~ 6.578)	0.177			
FIGO 分期(I期 vs II期)	5.678	(1.583 ~ 20.366)	0.008	4.125	(1.112 ~ 15.308)	0.034
肿瘤类型(鳞癌 vs 腺癌)	1.869	(0.577 ~ 6.061)	0.297			
分化程度(中高分化 vs 低分化)	1.488	(0.331 ~ 6.694)	0.605			
肿瘤大小(<2 cm vs ≥2 cm)	2.435	(0.678 ~ 8.742)	0.173			
间质浸润深度(<1/2 vs ≥1/2)	3.806	(1.061 ~ 13.659)	0.040	6.113	(1.329 ~ 28.112)	0.020
LVSI(有 vs 无)	0.619	(0.207 ~ 1.851)	0.391			
淋巴结转移(有 vs 无)	0.147	(0.051 ~ 0.424)	0.000	0.071	(0.016 ~ 0.319)	0.001
GSTO1(低表达 vs 高表达)	7.763	(1.013 ~ 59.484)	0.049	4.749	(0.596 ~ 37.853)	0.141

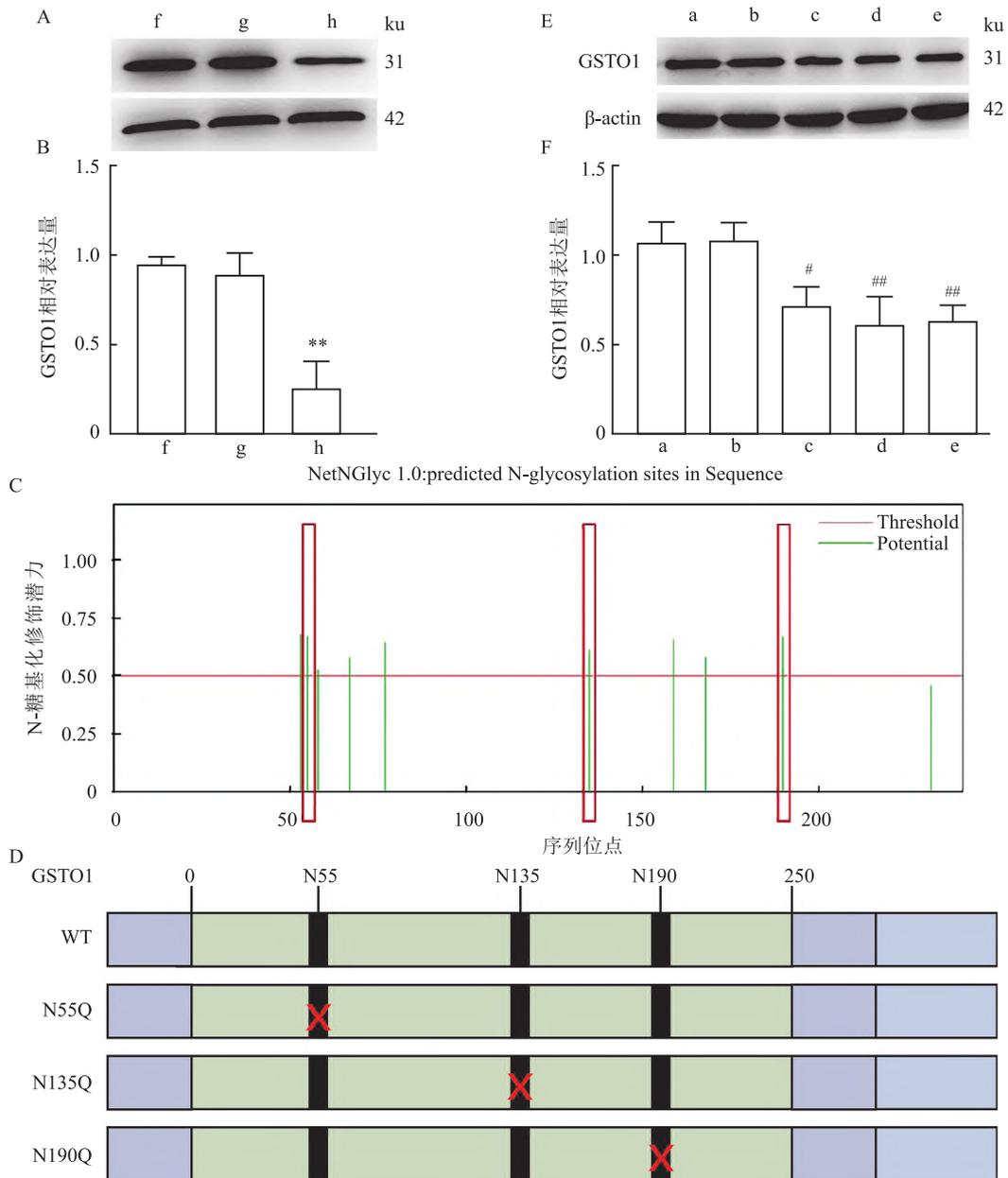


图3 GSTO1 N-糖基化定点突变对 GSTO1 表达量的影响

A、B: 衣霉素处理后 GSTO1 的蛋白表达及灰度值统计分析柱状图; C: NetNGlyc 1.0 预测 GSTO1 潜在的 N-糖基化修饰位点; D: GSTO1 N-糖基化定点突变载体的构建; E、F: N-糖基化定点突变后 GSTO1 的蛋白表达及灰度值统计分析柱状图; a: Vector 组; b 组: WT 组; c: N55Q 组; d: N135Q 组; e: N190Q 组; f: 宫颈癌 HeLa 原株细胞组; g: DMSO 组; h: 衣霉素组; 与 DMSO 组比较: * $P < 0.01$; 与 WT 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

2.5 GSTO1 N-糖基化定点突变对宫颈癌 HeLa 细胞的增殖、迁移和侵袭能力的影响 EdU 增殖实验结果表明,与 Vector 组相比,N55Q、N135Q、N190Q 三个突变组的细胞增殖能力下降($t_{N55Q} = 5.20, t_{N135Q} = 4.77, t_{N190Q} = 6.51$, 均 $P < 0.001$) (图 4A - B)。Transwell 侵袭和迁移实验结果显示,与野生型相比,GSTO1 N-糖基化定点突变对 HeLa 细胞迁移($t_{N55Q} = 8.89, t_{N135Q} = 10.68, t_{N190Q} = 17.55$, 均 $P < 0.001$)

和侵袭($t_{N55Q} = 14.80, t_{N135Q} = 5.644, t_{N190Q} = 9.810$, 均 $P < 0.001$)能力具有抑制作用(图 4C - E)。同时,划痕愈合实验结果显示,与野生型相比,突变组细胞迁移愈合能力降低($t_{N55Q} = 8.22, t_{N135Q} = 5.36, t_{N190Q} = 11.66$, 均 $P < 0.001$) (图 4F - G)。

2.6 GSTO1 N-糖基化定点突变对宫颈癌 HeLa 细胞的 EMT 转化的影响 HeLa 细胞中转染 GSTO1 N-糖基化定点突变的慢病毒,Western blot 检测 EMT

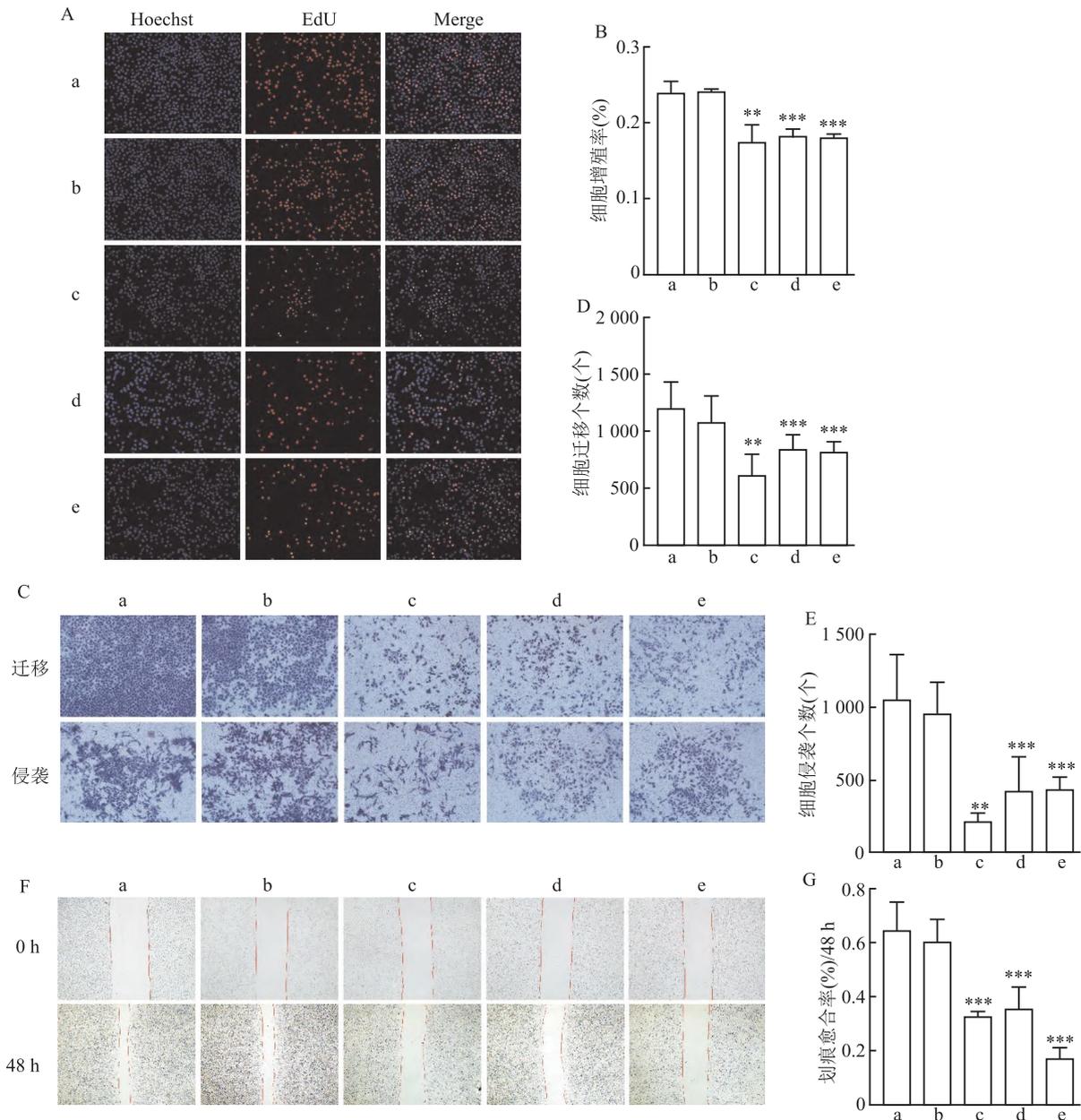


图4 GSTO1 N-糖基化定点突变对宫颈癌细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响

A: EdU 增殖实验荧光图 $\times 100$; B: EdU 增殖实验检测的 GSTO1 N-糖基化定点突变宫颈癌细胞增殖率统计分析柱状图; C: Transwell 细胞迁移和侵袭实验白光图,结晶紫染色 $\times 100$; D - E: Transwell 细胞迁移和侵袭实验统计分析柱状图; F: 划痕愈合实验白光图 $\times 100$; G: 划痕愈合实验统计分析柱状图; a: Vector 组; b 组: WT 组; c: N55Q 组; d: N135Q 组; e: N190Q 组; 与 WT 组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

标志因子 E-钙黏蛋白、N-钙黏蛋白和波形蛋白的表达发现,与野生型相比,GSTO1 N-糖基化定点突变均明显增强 E-钙黏蛋白 ($t_{N55Q} = 163.70, t_{N135Q} = 61.22, t_{N190Q} = 153.40$,均 $P < 0.001$) 的表达,同时均明显抑制 N-钙黏蛋白 ($t_{N55Q} = 2.49, t_{N135Q} = 8.87, t_{N190Q} = 10.24$,均 $P < 0.05$) 和波形蛋白 ($t_{N55Q} = 2.05, t_{N135Q} = 4.32, t_{N190Q} = 4.81$,均 $P < 0.05$) 的表达。见图 5A-B。

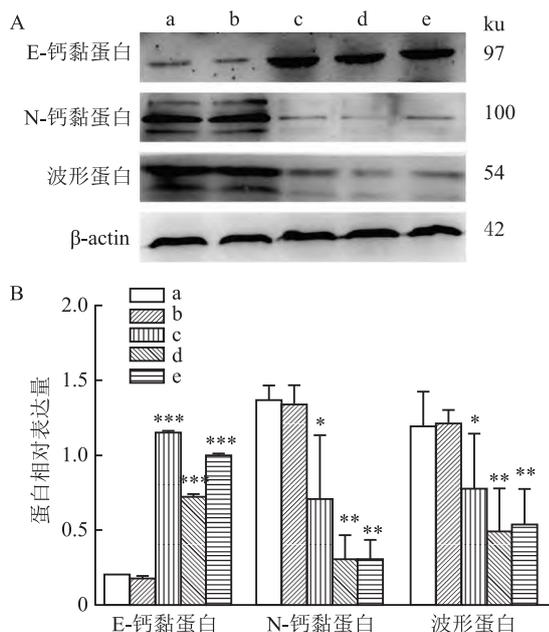


图5 GSTO1 N-糖基化定点突变后 EMT 标志因子的蛋白表达及灰度值统计分析柱状图

a: Vector 组; b 组: WT 组; c: N55Q 组; d: N135Q 组; e: N190Q 组; 与 WT 比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

3 讨论

在世界范围内,宫颈癌位居女性恶性肿瘤第 4 位^[9],尽管宫颈癌的诊疗策略有所改善,但是宫颈癌的病死率仍在逐年增加,肿瘤侵袭与转移对宫颈癌的治疗具有阻碍作用。

GSTO1 是 GST 家族中 Omega 类的成员之一,具有独特的半胱氨酸位点和多种还原酶活性^[10]。GSTO1 在结直肠癌^[11]、非小细胞肺癌^[12]、皮肤恶性黑色素瘤^[10] 等恶性肿瘤中高表达。其中研究^[11]表明敲除结直肠癌肿瘤细胞的 GSTO1 可以提高其顺铂化疗效果,可能成为结直肠癌化学治疗的靶点。在非小细胞肺癌中,GSTO1 可激活 JAK/STAT3 信号通路,促进癌细胞的增殖、侵袭、转移并抑制其凋亡^[12]。此外,GSTO1 可通过 EMT 促进皮肤黑色素

瘤肿瘤细胞的侵袭转移^[10]。本研究结果表明,与正常组织相比,GSTO1 在宫颈癌组织肿瘤细胞中表达较高,其高表达与宫颈癌患者的 DSI、LVS1 和淋巴结转移等临床病理特征显著相关,且 FIGO 分期、DSI、淋巴结转移和 GSTO1 高表达是影响宫颈癌患者预后的关键因素。因此,GSTO1 可能是一个潜在的靶点,可用于预测宫颈癌预后以及恶性程度,为肿瘤的诊疗带来了新思路。

蛋白质糖基化在恶性肿瘤等疾病中具有重要的意义,糖基化通过多种复杂的信号通路决定肿瘤性质。肿瘤细胞的凋亡、迁移、血管生成和肿瘤细胞外基质的黏附等均与糖基化有关^[13]。本研究证实 GSTO1 的 3 个 N-糖化修饰位点,即 Asn55、Asn135、Asn190,并且发现突变其中任意一个糖基化位点均会导致 GSTO1 的表达水平降低,提示 N-糖基化对于维持其表达水平密切相关。最新研究^[14]报道,SGK196 在乳腺癌细胞中主要发生 N-糖基化修饰,且 SGK196 N-糖基化通过 PI3K/AKT/GSK3 β 信号通路发挥调控功能,在乳腺癌的侵袭和转移中发挥抑制作用。本研究通过 EdU 增殖实验、划痕愈合实验和 Transwell 实验表明,GSTO1 N-糖基化定点突变对宫颈癌细胞的增殖及侵袭迁移能力具有明显的抑制作用。以上均提示 N 糖基化修饰可参与不同肿瘤的增殖和转移。

EMT 是肿瘤转移过程中的重要机制之一。在肿瘤侵袭转移中,EMT 可以促进肿瘤细胞转变成成为具有间充质特征的细胞,从而赋予肿瘤细胞更强的侵袭和转移能力。通过调控 EMT 的分子机制可以有效地抑制肿瘤细胞的侵袭转移,从而达到治疗肿瘤的效果。E-钙黏蛋白、N-钙黏蛋白和波形蛋白是 EMT 过程中的三个关键分子,它们分别代表了上皮细胞和间充质细胞的特征,在调控细胞形态和功能转变方面具有重要作用,对于 EMT 的发生和发展有着重要的意义^[15]。本研究通过 Western blot 实验发现,去除 GSTO1 N-糖基化修饰,可以增加 E-钙黏蛋白的表达,抑制 N-钙黏蛋白和波形蛋白的表达,表明 GSTO1 N-糖基化定点突变可抑制宫颈癌细胞的 EMT 转化。

本研究揭示了 GSTO1 在宫颈癌组织肿瘤细胞中高表达及其与患者的不良预后相关。此外,GSTO1 N-糖基化参与宫颈癌的增殖和转移并且可能影响癌细胞中 EMT 的转化,这对于探讨宫颈癌侵袭转移发生的机制,寻求宫颈癌防治新策略,具有重要指导意义。但目前本研究尚未明确 GSTO1 N-糖基化

在宫颈癌侵袭转移过程中作用的特定分子机制,因此,未来需要进一步探究。

参考文献

- [1] 李超,姚莉,宗玲,等. 晚期宫颈癌治疗进展[J]. 安徽医科大学学报,2021,56(3):501-4.
- [2] Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, et al. Cancer statistics for the year 2020: an overview[J]. Int J Cancer,2021,149(4):778-89.
- [3] 朱雨婷,周曙光,田璐,等. CD47 的表达与宫颈病变程度的相关性分析[J]. 安徽医科大学学报,2023,58(1):67-72.
- [4] Wang Y N, Lee H H, Hsu J L, et al. The impact of PD-L1 N-linked glycosylation on cancer therapy and clinical diagnosis[J]. J Biomed Sci,2020,27(1):77.
- [5] Xu Z, Zhang Y, Ocansey D K W, et al. Glycosylation in cervical cancer: new insights and clinical implications[J]. Front Oncol, 2021,11:706862.
- [6] Sokulsky L A, Goggins B, Sherwin S, et al. GSTO1-1 is an upstream suppressor of M2 macrophage skewing and HIF-1 α -induced eosinophilic airway inflammation[J]. Clin Exp Allergy, 2020,50(5):609-24.
- [7] Zamani S, Sohrabi A, Rahnamaye-Farzami M, et al. Glutathione S-transferase omega gene polymorphism as a biomarker for human papilloma virus and cervical cancer in Iranian women[J]. J Turk Ger Gynecol Assoc,2018,19(4):193-200.
- [9] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin,2021,71(3):209-49.
- [8] 孙倩玉. 谷胱甘肽 S-转移酶 Omega1 对宫颈癌细胞侵袭迁移及增殖能力的影响[D]. 石河子:石河子大学,2022.
- [10] Wang L K, Yue H L, Peng X J, et al. GSTO1 regards as a meritorious regulator in cutaneous malignant melanoma cells[J]. Mol Cell Probes,2019,48:101449.
- [11] Paul S, Bhardwaj M, Kang S C. GSTO1 confers drug resistance in HCT-116 colon cancer cells through an interaction with TNF α IP3/A20[J]. Int J Oncol,2022,61(5):136.
- [12] Wang K, Zhang F L, Jia W. Glutathione S-transferase ω 1 promotes the proliferation, migration and invasion, and inhibits the apoptosis of non-small cell lung cancer cells, via the JAK/STAT3 signaling pathway[J]. Mol Med Rep,2021,23(1):71.
- [13] Zhang W, Yang Z, Gao X, et al. Advances in the discovery of novel biomarkers for cancer: spotlight on protein N-glycosylation[J]. Biomark Med,2020,14(11):1031-45.
- [14] Xu C, Zhang M, Bian L, et al. N-glycosylated SGK196 suppresses the metastasis of basal-like breast cancer cells[J]. Oncogenesis,2020,9(1):4.
- [15] Huang Y, Hong W, Wei X. The molecular mechanisms and therapeutic strategies of EMT in tumor progression and metastasis[J]. J Hematol Oncol,2022,15(1):129.

Correlation analysis of GSTO1 expression in cervical cancer tissue with prognosis and the impact of N-glycosylation on the malignant biological behavior of cervical cancer

Yu Panpan^{1,2}, Yang Ping^{1,2}, Sun Qianyu^{1,2}, Gao Weirui^{1,2}, Zhao Zouyu^{1,2}, Sun Chongfeng^{1,2}

(¹Dept of Obstetrics and Gynecology, First Affiliated Hospital, School of Medicine, Shihezi University, Shihezi 832000; ²The NHC Key Laboratory of Prevention and Treatment of Central Asia High Incidence Diseases, First Affiliated Hospital, School of Medicine, Shihezi University, Shihezi 832000)

Abstract Objective To investigate the expression of (glutathione S-Transferase Omega-1, GSTO1) in cervical cancer tissue and its correlation with patient survival time, and to explore the impact of GSTO1 N-glycosylation on proliferation, migration, invasion, and epithelial-mesenchymal transition of cervical cancer. **Methods** By using immunohistochemistry, the expression levels of GSTO1 in tumor cells of 82 cervical cancer patients were detected, and the correlation between GSTO1 expression and clinical pathological features was analyzed. Kaplan-Meier method was used to plot survival curves and evaluate the impact of GSTO1 expression in cervical cancer tissues on patient survival time. Univariate and multivariate Cox regression analyses were performed to assess the independent prognostic factors influencing cervical cancer prognosis. The NetNGlyc 1.0 Server database predicted potential N-glycosylation modification sites of GSTO1 (Asn55, Asn135, Asn190). The cervical cancer cells (HeLa) were transfected with GSTO1 N-glycosylation site mutation vectors at positions 55, 135, and 190, as well as GSTO1 wild-type vector and empty vector. Stable transfected cells were selected using puromycin. Western blot experi-

甲基-β-环糊精通过限制脂质代谢抑制横纹肌肉瘤细胞的增殖、迁移和侵袭

胡亚飞, 阚晨, 汪思应

摘要 目的 探讨抑制脂质合成对人骨骼横纹肌肉瘤细胞的影响及其分子机制。方法 采用肿瘤基因表达数据库检查人骨骼肌细胞(HSMC)和人骨骼横纹肌肉瘤细胞脂质合成相关基因固醇调节元件结合蛋白1(SREBP1)和角鲨烯环氧化酶(SQLE)mRNA表达水平并通过qRT-PCR验证。通过细胞增殖实验选出脂质抑制剂甲基-β-环糊精(mβCD)的细胞处理浓度。分别将3株人骨骼横纹肌肉瘤细胞(RD、SJCRH30和A673)作为对照组,1 mmol/L mβCD处理的三株人骨骼横纹肌肉瘤细胞分别作为实验组。平板克隆实验、软琼脂集落形成实验、细胞迁移及侵袭实验和裸鼠成瘤实验检测对照组和mβCD处理组人骨骼横纹肌肉瘤细胞增殖、迁移、侵袭和肿瘤生长的变化。通过脂质组学及三酰甘油(TG)分析探究mβCD抑制人骨骼横纹肌肉瘤细胞恶性的分

子机制。结果 相对于HSMC,人骨骼横纹肌肉瘤细胞脂质合成相关基因SREBP1、SQLE表达增高($P < 0.001$);与对照组相比,mβCD组人骨骼横纹肌肉瘤细胞的增殖、平板克隆、迁移侵袭和集落形成能力减弱($P < 0.05$);裸鼠肿瘤体积和肿瘤质量增加也减少($P < 0.05$);脂质组学和TG试剂盒检测结果发现,与对照组相比,mβCD组TG含量降低($P < 0.01$)。结论 mβCD可能通过降低TG等脂质代谢过程从而抑制人骨骼横纹肌肉瘤细胞的增殖、迁移和侵袭等恶性生物学行为。

关键词 横纹肌肉瘤;脂质合成;脂质代谢;三酰甘油;甲基-β-环糊精

中图分类号 R 738.7

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)12-2010-09
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.12.004

2023-09-14 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:82102573)

作者单位:安徽医科大学基础医学院病理生理学教研室,合肥 230032

作者简介:胡亚飞,女,硕士研究生;

汪思应,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: sywang@ahmu.edu.cn

阚晨,男,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: chenkan@ahmu.edu.cn

横纹肌肉瘤(rhabdomyosarcoma,RMS)是儿童中最常见的软组织肉瘤。RMS总发病率约为4.5/100万^[1]。近年来,随着手术、化疗技术的提高以及新型抗癌药物的出现,RMS的治疗水平显著提升,但仍有复发和预后不良的情况出现^[2-3]。有研究表明^[4],脂质代谢重编程参与多种肿瘤发生发展的进程,但其在肉瘤中的作用尚不清楚。从脂质代谢重

ments were performed to assess the effectiveness of lentiviral interference. The effects of GSTO1 N-glycosylation site mutations on proliferation, migration, and invasion of HeLa cells were evaluated using EdU proliferation assay, wound healing assay, and Transwell assay. The effect of GSTO1 N-glycosylation site mutations on the epithelial-mesenchymal transition of HeLa cells was detected using the Western blot experiment. **Results** Immunohistochemistry results revealed high expression of GSTO1 in cervical cancer tissues. The expression rate of GSTO1 was significantly higher in cervical cancer tissues with deep stromal invasion $\geq 1/2$, lymphovascular space invasion, and lymph node metastasis ($P < 0.05$). Moreover, high expression of GSTO1 was associated with poorer overall survival. After N-glycosylation site-specific mutation of GSTO1, the cell count of proliferation, migration, and invasion in HeLa cells significantly decreased ($P < 0.05$). The Western blot results showed that N-glycosylation site mutation of GSTO1 significantly inhibited the epithelial-mesenchymal transition of HeLa cells. **Conclusion** The expression of GSTO1 in cervical cancer tissues is associated with stromal infiltration depth, lymphovascular space invasion and lymph node metastasis, and it is also correlated with shorter patient survival time. Site-specific mutations in GSTO1 N-glycosylation significantly inhibit the proliferation, migration and epithelial-mesenchymal transition of HeLa cells. **Key words** GSTO1; cervical cancer; N-glycosylation; survival time; proliferation; invasion; epithelial-mesenchymal transition