

# ST3GAL5 通过激活 PPAR 和抑制 PI3K/AKT 途径抑制膀胱癌的恶性生物学行为

谭明辉,郝雨,倪钊,李强,王勤章,欧阳松

**摘要** **目的** 研究 ST3 $\beta$ -半乳糖苷  $\alpha$ -2,3-半乳糖基转移酶 5 (ST3GAL5) 对膀胱尿路上皮癌 (BLCA) 生物学行为的影响和潜在机制。**方法** 利用生物信息分析确定与膀胱癌相关的差异表达基因。然后筛选出合适的膀胱癌细胞系。体外实验通过细胞计数盒-8 (CCK-8)、5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷 (EdU)、菌落形成实验、转孔迁移、流式细胞仪凋亡实验和划痕实验评估 ST3GAL5 对膀胱癌生物学行为的影响。使用癌症基因组图谱 (TCGA) 数据库对 ST3GAL5 基因进行了京都基因和基因组百科全书 (KEGG)、基因集富集分析 (GSEA)。最后,使用 Western-blot 技术验证其增殖和转移的相关通路。**结果** 生物信息学分析和实验测量的结合表明,ST3GAL5 的表达在人类的 BLCA 细胞系中是异常下调的。通过癌症细胞系百科全书 (CCLE) 数据库,成功筛选出 HT-1376 细胞系进行体外实验。实验结果发现上调 ST3GAL5 后膀胱癌的恶性生物学行为被抑制。GSEA 富集分析显示,ST3GAL5 及其共表达的基因通过激活 PPAR 途径和抑制 PI3K/AKT 途径抑制了膀胱癌的细胞增殖、侵袭和转移。Western-blot 实验结果验证了 ST3GAL5 在膀胱癌中过表达后,PPAR 信号通路的关键蛋白出现了明显的增加,PI3K/AKT 信号通路的关键蛋白出现了明显的减少 ( $P < 0.05$ )。**结论** ST3GAL5 基因可能作为膀胱癌的致癌抑制基因,可能通过激活 PPAR 信号通路和抑制 PI3K/AKT 信号通路的相关分子来抑制膀胱癌细胞的增殖、侵袭和转移。

**关键词** 膀胱癌;ST3 $\beta$ -半乳糖苷  $\alpha$ -2,3-半乳糖基转移酶 5;癌症基因组图谱;高通量基因表达;癌症细胞系百科全书;蛋白质印迹;京都基因和基因组百科全书

**中图分类号** R737.14

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2023)09-1458-09  
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.09.005

膀胱癌是泌尿系统最常见的肿瘤类型之一,其发病率和死亡率居首位,膀胱癌的发病率在全球排

名第 9 位,男性第 6 位,女性第 10 位<sup>[1]</sup>。膀胱尿路上皮癌 (bladder urothelial carcinoma, BLCA) 是膀胱癌中最普遍的组织学类型<sup>[2]</sup>,根据浸润深度,BLCA 可分为非肌层浸润型膀胱癌 (non-muscle invasive bladder cancer, NMIBC) 和肌层浸润型膀胱癌 (muscle-invasive bladder cancer, MIBC)<sup>[3]</sup>。与 NMIBC 患者相比,MIBC 患者的 5 年生存率相对较低,预后较差<sup>[4]</sup>。因此,迫切需要探索新的潜在生物标志物和 BLCA 的治疗目标。

研究<sup>[5]</sup>发现,正常细胞的癌变和癌细胞的恶性生物学行为与细胞表面的糖基化水平和唾液酸化水平相关,ST3GAL5 是唾液酸转移酶家族的成员。一些研究<sup>[6,7]</sup>表明,ST3GAL5 的表达与细胞增殖、转移、侵袭和对治疗的反应有关。研究<sup>[8]</sup>发现 ST3GAL5 在膀胱癌中低表达,并与肿瘤分级、T 期和预后恶化显著相关。该研究对 ST3GAL5 影响 BLCA 的恶性生物学行为 (如增殖、侵袭和转移) 的机制进行了细胞表型实验验证。最后,该研究验证参与这一过程的信号通路。

## 1 材料与方法

### 1.1 生物信息学分析

**1.1.1 数据准备** 数据集从高通量基因表达 (gene expression omnibus data base, GEO) 和 TCGA 下载。GEO 包括 GSE120736、GSE13507 和 GSE32894。TCGA 包括 BLCA 数据集。

**1.1.2 差异分组的表达情况** 按照 MIBC 与 NMIBC、高级别膀胱癌与低级别膀胱癌分别进行差异分组,并使用 GEO2R 工具进行差异表达基因分析。通过收集三个膀胱数据集不同亚组的差异表达基因的交集,初步筛选出候选基因集,然后利用 GEO13507 数据集的生存数据进行分析,用来验证候选基因集的生存状况。最后,对所需的目标基因进行筛选。

**1.1.3 目标细胞系的筛选** 通过调用癌症细胞系百科全书 (cancer cell line encyclopedia, CCLE) 数据库中各种癌症细胞系的基因表达量,初步评估 ST3GAL5 在泛腺癌和膀胱癌中的基因表达量,并选

2023-02-14 接收

基金项目:兵团科技攻关项目 (编号:2018AB023);石河子大学第一附属医院博士科研资助基金 (编号:BS202110)

作者单位:石河子大学第一附属医院泌尿外科,石河子 832000

作者简介:谭明辉,男,硕士研究生;

欧阳松,男,博士,副主任医师,责任作者,E-mail:ouyang-song@shzu.edu.cn

择基因表达量最低的目标细胞系进行后续体内检测。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 建立稳定转染的细胞** 通过 CCLE 细胞系数据库分析 ST3GAL5 基因在人类泛癌细胞系中的基因表达水平。该研究筛选了目标人膀胱癌细胞系 HT-1376,用于后续实验。本实验选择的细胞是人膀胱癌细胞系 HT-1376,从 ATCC 细胞库购买,并通过 STR 正确识别。将细胞接种到特殊的培养基中,复苏后在 37 ℃ (5% CO<sub>2</sub>) 的培养箱中培养,每 48 h 更换一次培养基。得到目标过度表达的慢病毒颗粒,浓缩纯化,使用前进行质量检测。设置 NC 组(阴性对照病毒感染的细胞)和 OE 组(ST3GAL5 基因过度表达慢病毒感染的细胞)。

**1.2.2 CCK-8 检测** 细胞计数试剂盒-8 (CCK-8) 试验被用来评估细胞活力和增殖。将细胞系播种到 96 孔板上(2 500 个/孔),并在指定的时间点(0、24、48、72 和 96 h)进行培养。接着,在每个孔中加入 10 μl CCK-8 溶液,并在 37℃ 的黑暗中培养细胞 2 h。之后,在 450 nm 处检测吸光度以评估细胞活力。每个实验重复 3 次。

**1.2.3 5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷(5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU)检测** 使用 EdU 检测试剂盒(Ribobio, 广州, 中国)进行 EdU 检测。将细胞放入 96 孔板(1 × 10<sup>4</sup> 个/孔),用 EdU (50 μmol) 孵育 2 h,并在 4% 甲醛(雷根生物, 北京, 中国)中固定 30 min。随后,用 0.3% TritonX-100(佳研生物, 上海, 中国)透化细胞 10 min,然后用甘氨酸 2 mg/ml(生工生物工程, 上海, 中国)孵化 5 min。细胞与 Apollo 反应混合物反应 30 min。细胞核用 Hoechst 33342 (Invitrogen, 美国)染色 30 min,在显微镜下观察。

**1.2.4 菌落形成试验** 收集 HT-1376 细胞,然后在 6 孔板(Corning, 美国)上播种约 500 个细胞/孔。所有的板都在 37 ℃ 下培养。之后,用甲醇固定板中的细胞,并用 0.5% 的水晶紫进行计数。

流式细胞仪分析细胞凋亡 (Annexin V-PE/7-AAD 双染) 将 NC 组和 OE 组转染的细胞系分别种植在 6 孔板中,每孔 2 ml。用不含 EDTA 的胰蛋白酶消化后,将细胞以 1 000 r/min 离心 5 min,随后重新悬浮在 500 μl 的 PBS 缓冲液中,用 5 μl 的 Annexin V-PE 溶液染色 10 min 和 5 μl 7-ADD 溶液染色 5 min。使用流式细胞仪测量细胞凋亡,并使用 Attune NxT 软件 v2.6 进行分析。

**1.2.5 转孔迁移试验和转孔侵袭试验** 在迁移试

验中,将 2 × 10<sup>5</sup> 个悬浮在 100 μl 无血清 DMEM 中的细胞播种在试验室的上层隔间,在试验室的下层隔间加入 800 μl 含 10% FBS 的 DMEM。同时加入 NC 组细胞或 OE 组细胞,再培养 24 h。之后,用 4% 多聚甲醛固定细胞 30 min,用 0.1% 水晶紫染色。用棉签小心地去除上室的非迁移细胞。用奥林巴斯 IX70 倒置显微镜在五个随机选择的视野中对迁移的细胞进行拍照,用 Image-Pro Plus 6.0 软件对迁移的细胞进行量化。每个实验至少进行 3 次。对于侵袭试验,上层空间预涂有 100 μl 的 Matrigel。所有其他过程都与转孔迁移试验相同。

**1.2.6 基因组富集分析** 使用 R 软件包 TCGAbiolinks 2.21.1 实时抓取 TCGA-BLCA 数据集的 TPM 表达矩阵,同时只筛选原发性膀胱癌样本进行后续分析。首先利用 R 语言对 ST3GAL5 基因进行批量相关分析,计算 ST3GAL5 基因与所有 mRNA 基因的 spearman 相关系数,将 ST3GAL5 基因的所有基因的相关系数从高到低进行排序,最后利用 R 软件包 clusterProfiler 版本在线构建 KEGG-Pathways 通路 GSEA 模型。GSEA 的最小随机置换试验为 20 次,最大随机置换试验为 1 000 次,选择 BH (Benjamini-Hochberg) 方法对归一化富集得分 (NES) 的绝对值 > 1 的 P 值进行校正,校正后的  $P < 0.05$ , FDR 值 < 0.05。0.05 被认为具有统计学意义,其中 NES > 1 或 ES (富集评分) > 0 被定义为基因组激活, NES < -1 或 ES < 0 为基因组抑制。

**1.2.7 Western blot** 用裂解液裂解细胞或组织样品,将样品装入 4-15% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 凝胶 (每道 30 μg 蛋白质) 进行电泳,然后将原蛋白转移到聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜上。接着,将膜与 5% 的 BSA 孵育 1 h 以阻断非特异性信号,然后用 TBST 洗涤 3 次。然后,将膜与抗 PPAR-γ (1 : 1 000)、PTEN (1 : 2 000)、FABP (1 : 1 000)、PEPCK (1 : 1 000)、AKT (1 : 2 000)、pAKT (Ser473) (1 : 1 000) 的初级抗体在 4℃ 下孵育过夜。用 TBST 彻底清洗 3 次后,在室温下用与二级山羊抗兔抗体孵育 1 h,然后用 TBST 清洗 3 次。最后,使用检测试剂盒检测免疫复合物,并通过凝胶成像分析系统进行分析。β-actin 作为内部对照。

**1.3 统计学处理** 本研究所得结果均来自 3 次以上独立实验,其中两独立样本的计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示。首先进行正态分析及方差齐性检验,如果样本的方差具有齐性 ( $P > 0.05$ ),则进行双尾等方差假设  $t$  检验,否则进行双尾异方差假设  $t$  检验,最后

使用 GraphPad Prism 9.0.0 二次绘图。所有实验数据以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 ST3GAL5 基因可作为膀胱癌的验证性差异基因** 从 GEO 数据库中共检索到 3 个目标膀胱癌数据集 GSE13507、GSE32894 和 GSE120736, 用于候选差异基因组的筛选分析。初步筛选出 16 个明显差异表达的基因 (见表 1, 图 1), 按重要性排序为 ST3GAL5、CRTAC1、BCAS1、TESC、NSG1、BTBD16、CTSE、S100A8、SPOCD1、VSIG2、ANXA10、SLC14A1、

表 1 不同膀胱癌数据集中显著不同的基因数

| 数据集       | MIBC vs NMIBC |             |               | 高级别 vs 低级别                                                                                                                              |             |               |
|-----------|---------------|-------------|---------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|---------------|
|           | Sig (n)       | Sig. up (n) | Sig. down (n) | Sig (n)                                                                                                                                 | Sig. up (n) | Sig. down (n) |
| GSE13507  | 176           | 103         | 73            | 179                                                                                                                                     | 96          | 83            |
| GSE31684  | 197           | 116         | 81            | 156                                                                                                                                     | 72          | 84            |
| GSE120736 | 160           | 54          | 106           | 213                                                                                                                                     | 122         | 91            |
| Insect    | 48            | 12          | 36            | 46                                                                                                                                      | 19          | 27            |
| 基因表(16)   | 下调 (13)       |             |               | ST3GAL5, CRTAC1, BCAS1, TESC, NSG1, BTBD16, CTSE, SPOCD1, VSIG2, ANXA10, SLC14A1, HSD17B2, ALDH1L1, HOXB5, CAPNS2, HOXB8, CYP3A5, CLCA4 |             |               |
|           |               |             |               | 上调 (3) S100A8, S100A9                                                                                                                   |             |               |

MIBC: 肌层浸润型膀胱癌; NMIBC: 非肌层浸润型膀胱癌

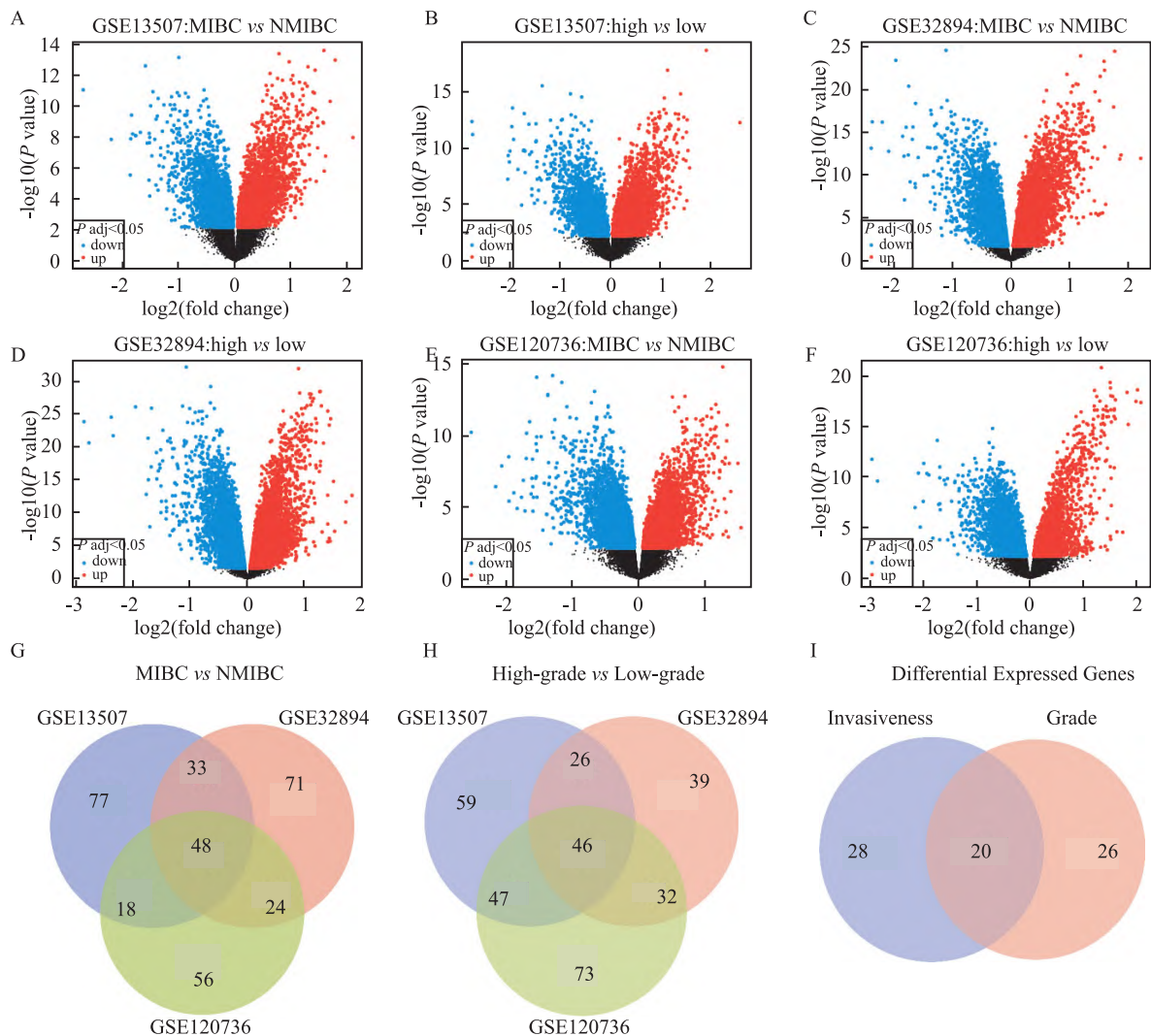


图 1 三组膀胱癌数据集中不同分组后的差异表达基因

A: GSE13507 数据集中 MIBC 对比 NMIBC 的差异基因火山图; B: GSE13507 数据集中高级别膀胱癌与低级别膀胱癌的差异基因火山图; C: GSE32894 数据集中 MIBC 对比 NMIBC 的差异基因火山图; D: GSE32894 数据集中高级别膀胱癌与低级别膀胱癌的差异基因火山图; E: GSE120736 数据集中 MIBC 对比 NMIBC 的差异基因火山图; F: GSE120736 数据集中高级别膀胱癌与低级别膀胱癌的差异基因火山图; G: GSE13507、GSE32894 和 GSE120736 三组膀胱癌数据集中 MIBC 对比 NMIBC 的显著性差异基因交集; H: GSE13507、GSE32894 和 GSE120736 三组膀胱癌数据集中高级别膀胱癌对比低级别膀胱癌的显著性差异基因交集; I: 筛选的差异表达基因在肿瘤侵袭性和肿瘤分级的差异基因交集

HSD17B2、ALDH1L1、HOXB5、CAPNS2、HOXB8、CYP3A5、S100A9 和 CLCA4。其中, S100A8 和 S100A9 明显上调, 其余基因明显下调。GSE13507 的分析显示, ST3GAL5 在膀胱癌中的低表达与 DSS 和 OS 的不良预后显著相关 ( $HR < 1, P < 0.05$ , 表 2)。

表 2 候选基因的预后的 Meta 分析

| 基因名     | OS      |                    | DSS     |                    |
|---------|---------|--------------------|---------|--------------------|
|         | P 值     | HR (95% CI)        | P 值     | HR (95% CI)        |
| ST3GAL5 | 0.032 0 | 0.85 (0.73 ~ 0.99) | 0.000 4 | 0.68 (0.55 ~ 0.84) |
| CRTAC1  | 0.136 7 | 0.93 (0.85 ~ 1.02) | 0.002 3 | 0.80 (0.70 ~ 0.92) |
| BCAS1   | 0.196 2 | 0.90 (0.76 ~ 1.06) | 0.006 6 | 0.74 (0.59 ~ 0.92) |
| TESC    | 0.002 0 | 0.83 (0.73 ~ 0.93) | 0.000 3 | 0.71 (0.59 ~ 0.86) |
| BTBD16  | 0.179 9 | 0.93 (0.83 ~ 1.03) | 0.009 4 | 0.82 (0.71 ~ 0.95) |
| CTSE    | 0.044 5 | 0.88 (0.78 ~ 1.00) | 0.006 9 | 0.75 (0.61 ~ 0.92) |
| S100A8  | 0.000 1 | 1.22 (1.11 ~ 1.34) | 0.000 3 | 1.29 (1.12 ~ 1.48) |
| SPOCD1  | 0.021 7 | 0.88 (0.79 ~ 0.98) | 0.003 2 | 0.79 (0.67 ~ 0.92) |
| VSIG2   | 0.511 1 | 0.95 (0.83 ~ 1.10) | 0.015 9 | 0.81 (0.69 ~ 0.96) |
| ANXA10  | 0.019 5 | 0.90 (0.82 ~ 0.98) | 0.003 9 | 0.81 (0.71 ~ 0.94) |
| SLC14A1 | 0.226 3 | 0.93 (0.82 ~ 1.05) | 0.037 9 | 0.83 (0.70 ~ 0.99) |
| HSD17B2 | 0.120 5 | 0.91 (0.80 ~ 1.03) | 0.010 6 | 0.80 (0.67 ~ 0.95) |
| ALDH1L1 | 0.004 9 | 0.84 (0.74 ~ 0.95) | 0.029 0 | 0.82 (0.68 ~ 0.98) |
| HOXB5   | 0.029 0 | 0.85 (0.74 ~ 0.98) | 0.032 2 | 0.80 (0.65 ~ 0.98) |
| CAPNS2  | 0.175 0 | 0.89 (0.76 ~ 1.05) | 0.096 5 | 0.82 (0.65 ~ 1.04) |
| HOXB8   | 0.091 3 | 0.91 (0.82 ~ 1.02) | 0.053 4 | 0.85 (0.72 ~ 1.00) |
| CYP3A5  | 0.545 0 | 0.96 (0.84 ~ 1.10) | 0.026 6 | 0.81 (0.68 ~ 0.98) |
| S100A9  | 0.000 1 | 1.28 (1.13 ~ 1.45) | 0.001 0 | 1.33 (1.12 ~ 1.57) |
| CLCA4   | 0.983 7 | 1.00 (0.88 ~ 1.13) | 0.089 6 | 0.86 (0.72 ~ 1.02) |

**2.2 ST3GAL5 基因在 MIBC 和高级别膀胱癌组织中表达** 研究从 GEO 独立数据库的多个膀胱癌数据集中分析了 ST3GAL5 在 MIBC 和 NMIBC 组织之间以及高级别和低级别膀胱癌之间的基因定量表达水平的差异。本研究选择了 3 个膀胱癌数据集作为研究对象。61 个 MIBC 组织和 78 个 NMIBC 组织被纳入 GSE120736 数据集; 95 个高级别和 40 个低级别膀胱癌组织被纳入 GSE120736 数据集。GSE13507 数据集包括 62 个 MIBC 组织和 103 个 NMIBC 组织; GSE13507 数据集包括 60 个高级别膀胱癌组织和 105 个低级别膀胱癌组织。GSE32894 数据集包括 93 个 MIBC 组织和 213 个 NMIBC 组织; GSE32894 数据集包括 155 个高级别膀胱癌组织和 151 个低级别膀胱癌组织。所有结果表明, ST3GAL5 的定量基因表达水平在高级别膀胱癌组织中明显下调 ( $P < 0.05$ ), 见图 2A ~ C; ST3GAL5 的定量基因表达水平在 MIBC 组织中明显下调 ( $P < 0.05$ ), 见图 2D ~ F。

**2.3 ST3GAL5 基因在大多数肿瘤细胞系中表达不足** 泛癌分析显示, ST3GAL5 基因在大多数实体癌中的表达水平低于正常组织 (图 3A)。此外, 该研究发现 HT-1376 在所调查的膀胱癌细胞系中表达量最低 (图 3B)。因此, 该研究选择 HT-1376 细胞系进行后续实验。

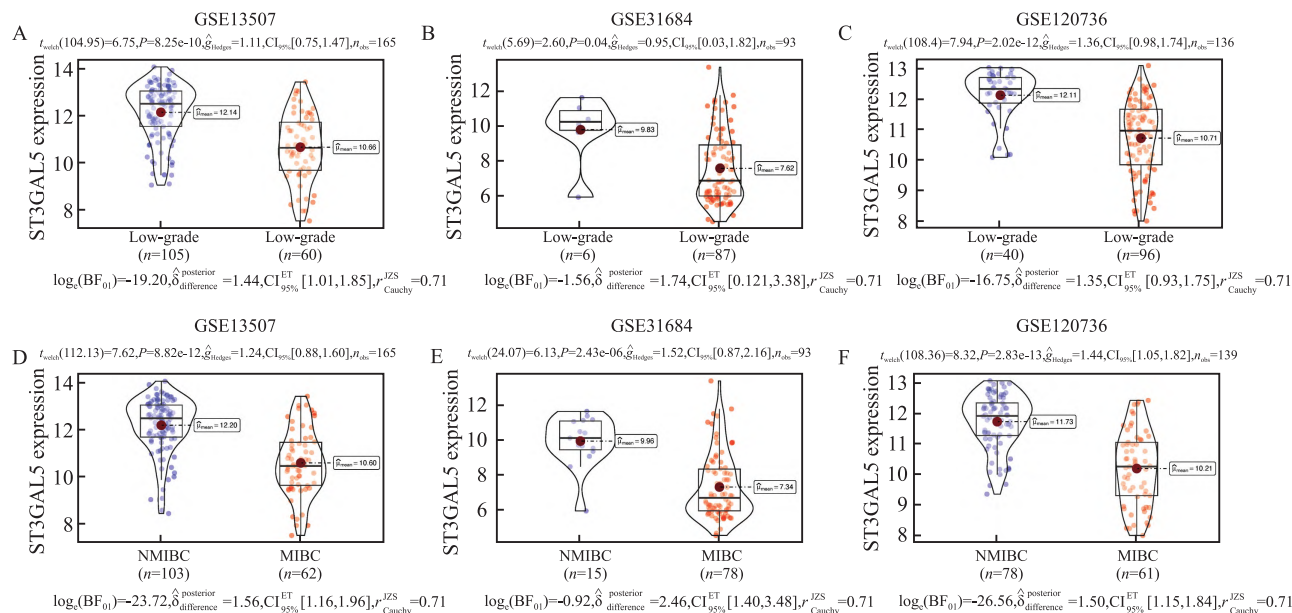


图 2 多个 GEO 数据集

A: GSE13507 数据集中 ST3GAL5 基因在高级别和低级别膀胱癌组织中的表达; B: GSE32894 数据集中 ST3GAL5 基因在高级别和低级别膀胱癌组织中的表达; C: GSE120736 数据集中 ST3GAL5 基因在高级别和低级别膀胱癌组织中的表达; D: GSE13507 数据集中 ST3GAL5 基因在 MIBC 和 NMIBC 组织中的表达; E: GSE32894 数据集中 ST3GAL5 基因在 MIBC 和 NMIBC 组织中的表达; F: GSE120736 数据集中 ST3GAL5 基因在 MIBC 和 NMIBC 组织中的表达

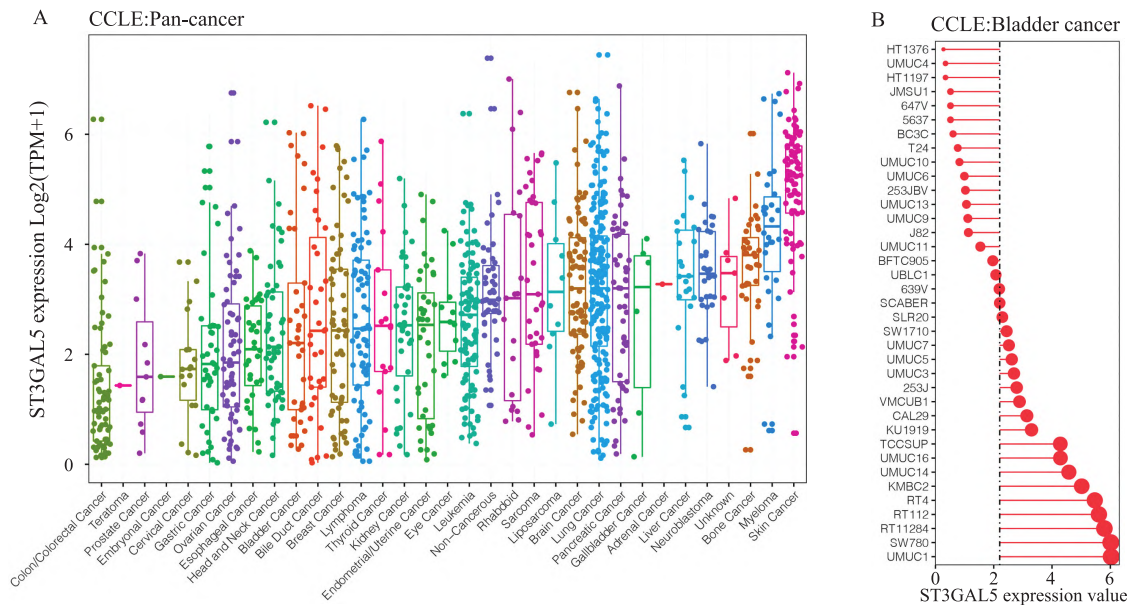


图3 CCLE数据库的泛癌和膀胱癌的基因表达

A:癌症相关的 ST3GAL5 的泛癌分析;B:来自 CCLE 数据库的膀胱癌细胞系中 ST3GAL5 的基因表达水平

## 2.4 ST3GAL5 上调对 HT-1376 细胞的生理能力的影响

**2.4.1 HT-1376 细胞的增殖** 在 CCK-8 实验中,通过测量各组在 450 nm 处的 OD 值来计算膀胱癌细胞的增殖活性,结果显示,OE 组的增殖率明显低于 NC 组,48 h 后两组增殖差异明显,OE 组与 NC 组相比,各时间点的细胞增殖平均抑制率分别为 12.15%、13.58% 和 16.82% ( $P < 0.05$ ,图 4A)。膀胱癌细胞的增殖活性是通过测量浸润性 DNA 复制过程中阳性染色细胞的比例来评估的。结果显示,OE 组的 EdU 阳性染色率明显低于 NC 组(200 倍视野),其中 EdU 阳性率为  $(53.95 \pm 2.42)\%$ ,OE 组为  $(28.60 \pm 0.81)\%$ ,OE 组的平均 EdU 阳性细胞抑制率为 46.99% ( $P = 0.000\ 07$ ,图 4B)。

**2.4.2 HT-1376 细胞的克隆形成能力和细胞存活率** 通过平板克隆形成试验检测 ST3GAL5 在各组膀胱癌细胞中克隆形成的能力,结果显示,OE 组的克隆形成率明显低于 NC 组,NC 组的克隆形成率为  $(30.33 \pm 2.12)\%$ ,OE 组的克隆形成数为  $(10.60 \pm 0.40)\%$ ,OE 组克隆形成的平均抑制率为 65.05% ( $P = 9.22 \times 10^{-5}$ ,图 4C)。结果表明,ST3GAL5 的上调明显抑制膀胱癌细胞的克隆能力。

**2.4.3 HT-1376 细胞凋亡率** 通过流式细胞仪 Annexin V-PE/7-AAD 双染检测 ST3GAL5 诱导膀胱癌细胞凋亡的能力,结果显示,OE 组的凋亡率明显高于 NC 组,其中 NC 组的凋亡率为  $(4.83 \pm 0.41)\%$ ,

OE 组为  $(33.17 \pm 2.64)\%$ 。OE 组的细胞凋亡率比 NC 组增加了约 586.21%。结果表明,ST3GAL5 的上调明显诱导了膀胱癌细胞 HT-1376 的凋亡能力(图 4D)。

**2.4.4 膀胱癌细胞 HT-1376 的转移和侵袭** 通过 transwell 转移侵袭实验考察各组的转移能力。结果显示,OE 组的转移细胞数明显低于 NC 组,NC 组为  $125.22 \pm 2.46$  个细胞,OE 组为  $55.78 \pm 0.77$  个细胞(每 100 倍视野)。OE 组的平均转移抑制率为 55.46% ( $P = 1.25 \times 10^{-6}$ ,图 4E)。OE 组的侵袭细胞数明显低于 NC 组,NC 组为  $80.56 \pm 3.98$  个细胞,OE 组为  $20.78 \pm 1.08$  个细胞(每 100 倍视野)。OE 组的平均细胞侵袭抑制率为 74.21% ( $P = 1.49 \times 10^{-5}$ ,图 4F)。结果表明,ST3GAL5 的上调明显延迟了膀胱癌细胞的转移和侵袭。

**2.5 TCGA-BLCA 数据集中 ST3GAL5 及其共表达基因的 KEGG 通路 GSEA** 利用 TCGA-BLCA 挖掘 ST3GAL5 及其共表达基因在膀胱癌中的潜在信号通路。结果显示,在 KEGG 通路中 PPAR 信号通路被明显激活 ( $NES > 1$ ,校正后  $P < 0.05$ ,图 5A, B),而 PI3K/AKT 信号通路被明显抑制 ( $NES < -1$ ,校正后  $P < 0.05$ ,图 5 A、C)。PPAR 信号通路和 PI3K/AKT 信号通路是与肿瘤增殖和转移相关的经典信号通路。

对 2 组 HT-1376 膀胱癌细胞进行 Western blot 实验,验证 PPAR 和 PI3K/AKT 信号通路的关键蛋

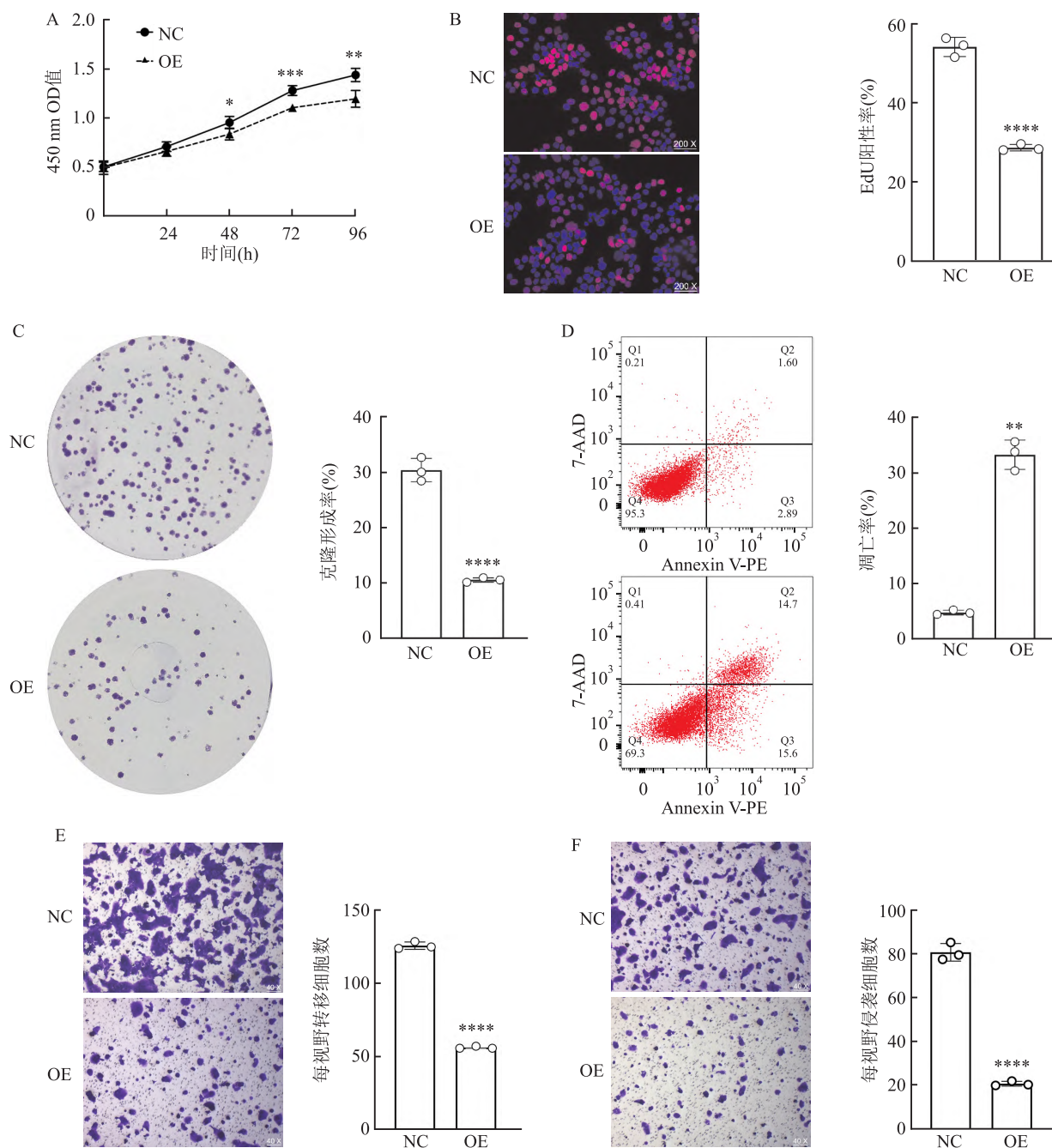


图4 ST3GAL5上调对HT-1376细胞的生理能力的影响

A: CCK-8 实验; B: EdU 试验分析细胞的增殖  $\times 200$ ; C: ST3GAL5 上调 HT-1376 细胞的克隆形成能力和细胞生存能力; D: ST3GAL5 上调后膀胱癌细胞趋势; E: ST3GAL5 上调后 HT-1376 细胞的转移能力  $\times 40$ ; F: ST3GAL5 上调后 HT-1376 细胞的侵袭能力; NC 组: 阴性对照病毒感染细胞  $\times 40$ ; OE 组: ST3GAL5 基因过度表达的慢病毒感染细胞; 与 NC 组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$

白。PPAR 信号通路的关键蛋白为 PPAR- $\gamma$  (基因名 PPARG)、FABP (基因名 FABP4) 和 PEPCK (基因名 PCK1), PI3K/AKT 信号通路的关键蛋白为 PTEN、AKT 和 pAKT (Ser473)。结果显示, 上调 ST3GAL5 后, PPAR 信号通路的关键蛋白明显上调。在 PI3K/AKT 信号通路中, 抑制性蛋白 PTEN 明显上调, 而 AKT 和 pAKT (Ser473) 则明显下调 (图 6)。

### 3 讨论

BLCA 是膀胱癌的常见类型, 约占 90%<sup>[2]</sup>。研究表明, NMIBC 和 MIBC 的蛋白表达谱不同, 具有不同的预后标志和治疗目标<sup>[9]</sup>。目前, BLCA 转移和复发的病因和机制尚不清楚。因此, 探究 BLCA 转移和复发的相关分子机制已成为 BLCA 研究的重点

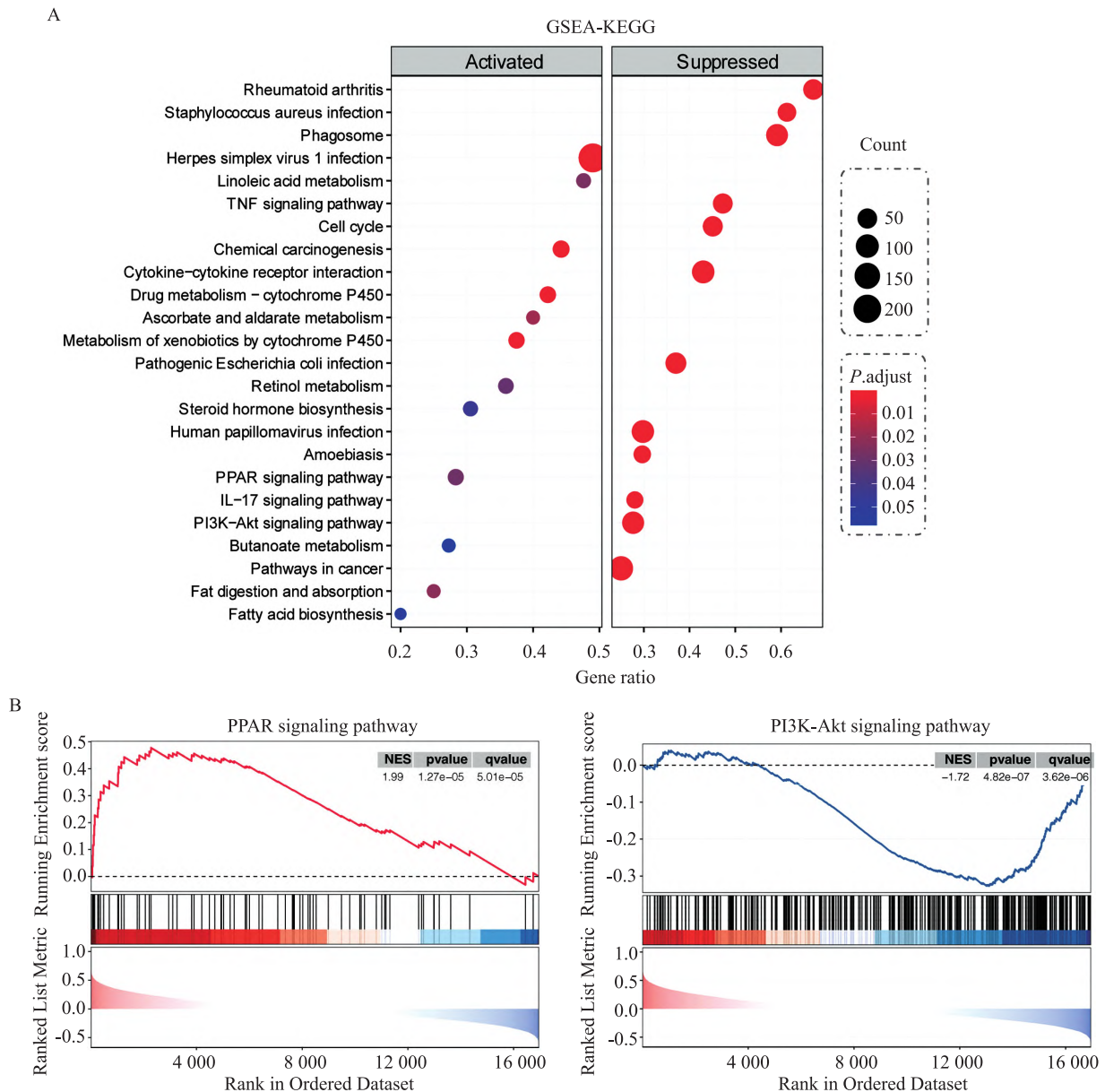


图5 ST3GAL5 及其共表达基因的 GSEA

A: 显著性 KEGG 通路 GSEA 点图, 左侧为激活通路, 右侧为抑制通路; B: KEGG-GSEA 中 PPAR 信号通路富集分数曲线图; C: KEGG-GSEA 中 PI3K/AKT 信号通路富集分数曲线图

和难点。有研究<sup>[10]</sup>表明, 水杨酸化和水杨酸转移酶在癌症的发生、发展和转移中起作用。ST3GAL5 编码的蛋白是一种水杨酸转移酶, 是一种 II 型膜蛋白, 可以催化形成  $\alpha$ -2,3-水杨酸转移酶, 是一种参与细胞分化和细胞粘附的蛋白<sup>[11]</sup>。有研究<sup>[6]</sup>表明, ST3GAL5 的异常表达已在各种癌症中被发现<sup>[8]</sup>。此外, 编码  $\alpha$ -2,3-水杨酸转移酶的 ST3GAL5 通过抑制血管生成和减少细胞运动来抑制肿瘤细胞的增殖<sup>[7]</sup>。在研究<sup>[12]</sup>发现 ST3GAL5 对人类膀胱癌有抗肿瘤作用, 但其机制尚不明确。

本研究首先评估 ST3GAL5 在人膀胱癌组织和

正常膀胱组织中基因表达的定量水平差异, 发现 ST3GAL5 在膀胱癌中呈现明显的下调趋势, 在高级别膀胱癌和 MIBC 患者中明显下调。然后, 评估 ST3GAL5 在泛癌和膀胱癌细胞株中的基因表达的定量水平, 发现 ST3GAL5 在大多数癌症类型中表现出明显的下调趋势, 在 BLCA 患者中明显下调, 并选择细胞株 HT-1376 作为实验细胞。随后成功构建 ST3GAL5 过表达的慢病毒载体及转染。后续通过相关实验探索 ST3GAL5 上调对 BLCA 恶性生物学行为的影响。CCK-8 实验、EdU 实验和细胞集落形成实验的结果显示, ST3GAL5 的上调抑制 HT-1376

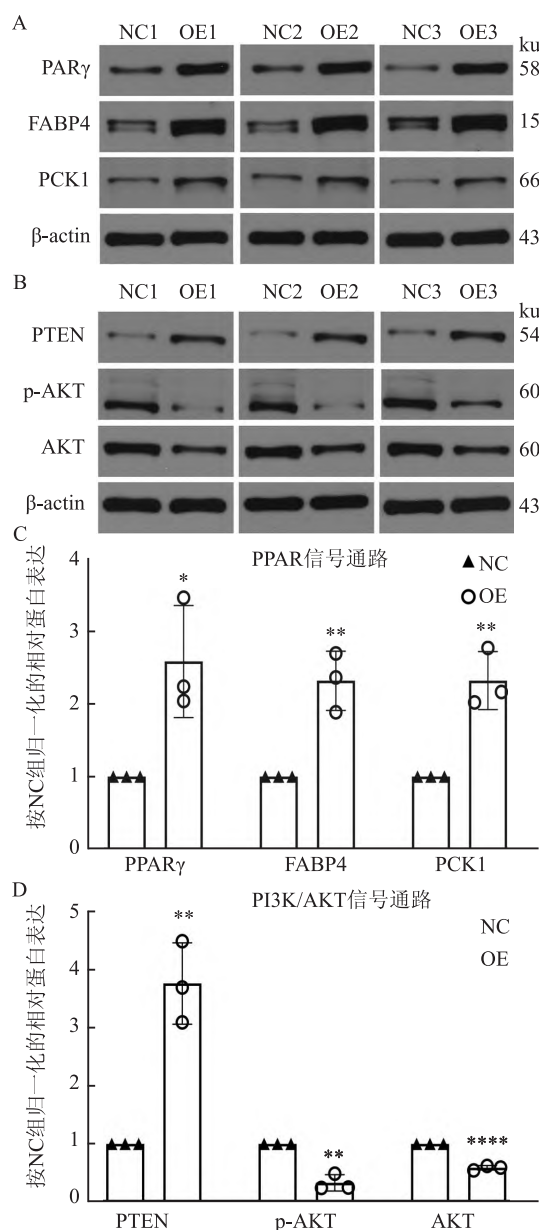


图6 信号通路中的关键蛋白的表达

A: PPAR 信号通路的关键蛋白表达; B: PI3K/AKT 信号通路的关键蛋白表达; C: PPAR 信号通路关键蛋白按 NC 组归一化后的相对蛋白表达; D: PI3K/AKT 信号通路关键蛋白按 NC 组归一化后的相对蛋白表达; 与 NC 组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$

细胞的增殖。流式细胞术结果表明过表达 ST3GAL5 可促进细胞凋亡。Transwell 迁移和侵袭试验的结果显示, ST3GAL5 的上调抑制了 HT-1376 细胞的转移和侵袭能力。结合细胞实验的结果, 可知 ST3GAL5 的上调可能会抑制 BLCA 的癌变进程, 但其内在机制尚不清楚。因此, 该研究通过 TCGA-BLCA 数据集对 ST3GAL5 与所有共同表达的基因进行了相关分析。基因集富集分析结果显示,

ST3GAL5 的上调可与 BLCA 相关疾病明显负相关, 而 KEGG 途径可富集多种肿瘤相关信号途径。分析发现 PPAR 信号通路的明显激活和 PI3K/AKT 信号通路的明显抑制, 这表明 ST3GAL5 可能通过这些癌症相关信号通路及相关共表达基因的相互作用在 BLCA 中发挥潜在的抑癌作用。KEGG 通路分析表明, 关键蛋白 PPAR- $\gamma$ 、FABP 和 PEPCK 参与了 PPAR 信号通路, 而 PI3K/AKT 信号通路的关键蛋白是 PTEN、AKT 和 pAKT(Ser473)。Akt 位于 PI3K 的下游, pAKT 为 AKT 的活化模式, Ser473 是 Akt 重要的磷酸化位点。该研究进行 Western blot 验证, 结果表明, 在 ST3GAL5 上调后, PPAR 信号通路的关键蛋白明显上调。在 PI3K/AKT 信号通路中, 抑制性蛋白 PTEN 明显上调, 而 AKT 和 pAKT(Ser473) 则明显下调。

研究发现 PPAR 信号通路和 PI3K/AKT 信号通路在膀胱癌中具有相互拮抗的作用。Lv et al<sup>[13]</sup> 证明, 通过抑制 PI3K/AKT 信号通路, 激活 PPAR- $\gamma$  信号通路可抑制膀胱癌体内的肿瘤细胞增殖和体外的肿瘤生长活性。Farrow et al<sup>[14]</sup> 证明 PPARG 的上调导致 PTEN 的上调, 抑制 PI3K 信号通路中 AKT 的磷酸化作用, 从而使肿瘤细胞周期停滞。Lv et al<sup>[13]</sup> 发现, 在膀胱癌细胞中使用 PARG 激动剂会导致 PI3K-AKT 通路信号的抑制, 而 PTEN 的表达与 AKT 的激活呈负相关。该研究观察到 PTEN 在 ST3GAL5 过表达组中呈上调状态。因此假设 PTEN 和 PI3K/AKT 信号通路可能是 PPAR 通路下游调节的重要机制, 但还需要进一步的基础实验证实。筛选相关通路并通过 WB 实验初步验证了相关信号通路中关键蛋白的表达。该研究未涉及临床膀胱癌样本, 缺乏动物实验, 缺乏对其在肿瘤发展中信号机制的深入研究。本部分的实验结果的验证将在以后得到完善, 以进一步支持 ST3GAL5 对膀胱癌恶性生物学行为的影响。

### 参考文献

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] Zheng H, Chen C. Downregulation of CacyBP by CRISPR/dCas9-KRAB prevents bladder cancer progression[J]. Front Mol Biosci, 2021, 8: 692941.
- [3] Kadori S, Kojima T, Nishiyama H. The updated points of TNM classification of urological cancers in the 8th edition of AJCC and

- UICC[J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2019, 49(5): 421–5.
- [4] Miyazaki J, Nishiyama H. Epidemiology of urothelial carcinoma [J]. *Int J Urol*, 2017, 24(10): 730–4.
- [5] Utkina N, Yoon S J, Hakomori S I. Glycosyl conjugates of biotinylated diaminopyridine applied for study of carbohydrate-to-carbohydrate interaction[J]. *Glycoconj J*, 2010, 27(6): 601–11.
- [6] Cai H, Zhou H, Miao Y, et al. MiRNA expression profiles reveal the involvement of miR-26a, miR-548l and miR-34a in hepatocellular carcinoma progression through regulation of ST3GAL5 [J]. *Lab Invest*, 2017, 97(5): 530–42.
- [7] Hakomori S I, Handa K. GM3 and cancer [J]. *Glycoconj J*, 2015, 32(1-2): 1–8.
- [8] Ouyang S, Liu JH, Ni Z, et al. Downregulation of ST3GAL5 is associated with muscle invasion, high grade and a poor prognosis in patients with bladder cancer [J]. *Oncol Lett*, 2020, 20(1): 828–40.
- [9] Le Goux C, Vacher S, Schnitzler A, et al. Assessment of prognostic implication of a panel of oncogenes in bladder cancer and identification of a 3-gene signature associated with recurrence and progression risk in non-muscle-invasive bladder cancer [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 16641.
- [10] Takashima S. Characterization of mouse sialyltransferase genes: their evolution and diversity [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2008, 72(5): 1155–67.
- [11] Hui L, Zhang J, Ding X, et al. Identification of potentially critical differentially methylated genes in nasopharyngeal carcinoma: A comprehensive analysis of methylation profiling and gene expression profiling [J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(6): 7171–8.
- [12] Wang H, Isaji T, Satoh M, et al. Antitumor effects of exogenous ganglioside GM3 on bladder cancer in an orthotopic cancer model [J]. *Urology*, 2013, 81(1): 210. e211–5.
- [13] Lv S, Wang W, Wang H, et al. PPAR $\gamma$  activation serves as therapeutic strategy against bladder cancer *via* inhibiting PI3K-Akt signaling pathway [J]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1): 204.
- [14] Farrow B, Evers B M. Activation of PPAR $\gamma$  increases PTEN expression in pancreatic cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 301(1): 50–3.

## ST3GAL5 inhibited malignant biological behavior of bladder cancer by activation of the PPAR pathway and inhibition of the PI3K/AKT pathway

Tan Minghui, Hao Yu, Ni Zhao, Li Qiang, Wang Qinzhang, Ouyang Song

(Dept of Urology, The First Affiliated Hospital, School of Medicine, Shihezi University, Shihezi 832000)

**Abstract** *Objective* To the effects and potential mechanisms of ST3GAL5 on biological behaviors of Bladder Urothelial Carcinoma (BLCA). *Methods* Differentially expressed genes related to bladder cancer were identified using microarray analysis. Suitable bladder cancer cell lines were then screened. *In vitro* experimental measurements, including CCK8, EdU, colony formation assays, transwell migration, flow cytometry apoptosis experiments, scratch assay, were used to evaluate the effects of ST3GAL5 on biological behaviors of BLCA. ST3GAL5 gene Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), gene set enrichment analysis (GSEA) were analyzed using The Cancer Genome Atlas (TCGA) database. Finally, Western blot technology was used to verify the classical proliferation and metastasis related pathway factors. *Results* The combination of bioinformatics analyses and experimental measurements demonstrate that ST3GAL5 expression is aberrantly down-regulated in human cell lines of BLCA. Through Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) database, HT-1376 cell lines were successfully screened for vitro test. Upregulation of ST3GAL5 was found to suppress the malignant biological behaviour of bladder cancer. GSEA enrichment analyses exhibited that ST3GAL5 and its co-expressed genes inhibited cell proliferation, invasion and metastasis of bladder urothelial carcinoma by activation of the PPAR pathway and inhibition of the PI3K/AKT pathway. The results of Western blot experiments verified that the key proteins of the PPAR signaling pathway showed a significant increase and the key proteins of the PI3K/AKT signaling pathway showed a significant decrease ( $P < 0.05$ ) after ST3GAL5 overexpression in bladder cancer. *Conclusion* ST3GAL5 gene might act as an oncogenic suppressor gene in bladder cancer, possibly inhibit the proliferation, invasion and metastasis of bladder cancer cells by activating the PPAR signaling pathway and inhibiting related molecules in the PI3K/AKT signaling pathway.

**Key words** bladder cancer; ST3GAL5; TCGA; GEO; CCLE; Western blot; KEGG