



空军军医大学
Air Force Medical University

分类号 Q28
U D C 616-006
密 级 公开

硕士学位论文

糖基转移酶 V 催化 CD147 分子 N-糖基化修饰促进肝癌转移的机制研究

崔 建

培 养 类 别 全日制
学 位 类 型 学术学位
一级学科(专业类) 生物学
二级学科(专业) 细胞生物学
研 究 方 向 细胞生物学与分子医学
指 导 教 师 蒋建利 教授
培 养 单 位 基础医学院细胞生物学教研室

二〇一八年五月

独创性声明

秉承学校严谨的学风与优良的科学道德，本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，不包含本人或他人已申请学位或其他用途使用过的成果。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了致谢。

申请学位论文与资料若有不实之处，本人承担一切相关责任。

论文作者签名：_____日期：_____

保护知识产权声明

本人完全了解空军军医大学有关保护知识产权的规定，即：研究生在校攻读学位期间论文工作的知识产权单位为空军军医大学。本人保证毕业离校后，发表论文等使用本论文工作成果时第一署名单位仍然为空军军医大学。学校可以公布论文的全部或部分内容（含电子版，保密内容除外），可以采用影印，缩印或其他复制手段保存论文；学校有权允许论文被查阅和借阅，并在校园网上提供论文内容的浏览和下载服务。同意学校将论文加入《中国优秀博硕士学位论文全文数据库》和编入《中国知识资源总库》等，并可浏览和下载，同时享受《中国优秀博硕士学位论文全文数据库出版章程》规定的相关权益。

论文作者签名：_____导师签名：_____日期：_____

目 录

缩略语表	1
中文摘要	2
ABSTRACT	6
前 言	11
文献回顾	12
一、N-糖基化在肿瘤中的作用与应用	12
二、CD147 分子及其糖基化修饰参与肿瘤侵袭转移的作用机制	18
正 文	23
第一部分 CD147 分子的 $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支水平与肝癌的临床分期和转移的相关性	23
1 材料	23
2 方法	26
3 结果	32
4 讨论	38
第二部分 GnT-V 催化的 CD147 分子 $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支修饰参与肝细胞的 EMT 过程	40
1 材料	40
2 方法	42
3 结果	45
4 讨论	48
第三部分 CD147 分子的 $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支修饰影响 CD147 和 integrin $\beta 1$ 相互作用	50
1 材料	50
2 方法	52
3 结果	55
4 讨论	59
第四部分 PI3K/Akt 信号通路对 GnT-V 的正反馈调控	61
1 材料	61
2 方法	63
3 结果	63
4 讨论	65
小 结	68
附 录	81
个人简历和研究成果	82
致 谢	83

缩略语表

缩略词	英文全称	中文全称
BSA	bovine serum albumin	牛血清蛋白
ECM	extracellular matrix	细胞外基质
ER	endoplasmic reticulum	内质网
EMT	epithelial-mesenchymal transition	上皮-间质细胞转化
Fut-8	fucosyltransferase-8	岩藻糖基转移酶-8
Gal-3	galectin-3	半乳糖凝集素-3
GnT-V	N-acetylglucosaminyltransferase V	糖基转移酶 V
HG-CD147	high-glycosylated CD147	高度糖基化的 CD147
LCA	Lens culinaris agglutinin	小扁豆凝集素
LG-CD147	low-glycosylated CD147	低糖基化的 CD147
MMP	matrix metalloproteinase	基质金属蛋白酶
PBS	phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
PHA-L	Phaseolus vulgaris leucoagglutinin	菜豆血球凝集素
PLA	In situ proximity ligation assay	原位邻位连接技术
PVDF	polyvinylidene difluoride	聚偏氟乙烯
TGF	transforming growth factor	转化生长因子
WT	wild type	野生型

糖基转移酶 V 催化 CD147 分子 N-糖基化修饰促进肝癌转移的机制研究

硕士研究生：崔建

导师：蒋建利 教授

空军军医大学基础医学院细胞生物学教研室，西安 710032

资助基金项目：国家 973 计划课题（2015CB553701），国家自然科学基金（81402383）

中文摘要

恶性肿瘤细胞表面糖蛋白糖基化修饰的异常变化，对肿瘤细胞的侵袭、转移、以及耐药等过程具有重要影响。我们实验室筛选鉴定的肿瘤相关抗原 CD147 分子，又称细胞外基质金属蛋白酶诱导因子，是分子量约为 43-66kDa 的单次跨膜糖蛋白，在包括肝癌在内多种恶性肿瘤中高表达，是重要的抗肿瘤药物靶点。CD147 分子通过不同的机制参与肿瘤细胞的生长代谢，浸润转移，血管生成等恶性行为，促进肿瘤进展。研究表明，高度的糖基化修饰是 CD147 分子的重要特征之一。前期的研究发现 CD147 分子具有三个 N-糖基化位点：分别位于第 44、152、186 位天冬酰胺，其中 Asn152 位糖基化修饰影响其细胞质膜定位。CD147 分子的糖基化修饰是由一系列高甘露糖型及复杂型分支的 N-糖基化成分组成，其中高糖基化形式包含 β 1, 6 N-乙酰氨基葡萄糖 (GlcNAc) 分支的寡聚糖。 β 1, 6 N-乙酰氨基葡萄糖分支是糖基转移酶 V (GnT-V) 催化形成的产物，大量研究结果表明，这种分支结构是参与肿瘤转移和恶性转化的关键糖结构。那么 GnT-V 催化的 CD147 分子 β 1, 6 N-乙酰氨基葡萄糖分支修饰在肝癌进展中是否具有重要意义？如果有，其促进肝癌进展的分子机制是什么？目前尚未见报道。本课题拟通过临床组织样本分析进一步明确 CD147 分子的 β 1, 6 N-乙酰氨基葡萄糖修饰在肝癌进展中的意义；阐明 GnT-V 催化 CD147 分子糖

基化修饰在肝癌进展中的功能及其分子机制，并为基于 CD147 分子的肝癌诊断和治疗提供新的思路。据此，我们展开以下四部分实验：

第一部分，CD147 分子的 $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支水平与肝癌的临床分期和转移的相关性

首先通过免疫组织化学染色法，我们发现 CD147 分子及 $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支在肝癌组织中的表达显著高于癌旁组织。基于此结果，我们构建原位邻位连接（Proximity Ligation Assay, PLA）技术，检测肝癌组织中 CD147 分子的 $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支修饰。利用 PLA 技术我们分析了 51 例肝细胞肝癌病人 CD147 的 $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支修饰与临床资料的相关性，结果表明 CD147 的 $\beta 1, 6$ 分支修饰水平与肝癌病人的巴塞罗那分期显著相关，晚期(C 期)肝癌组织中 CD147 的 $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支修饰显著高于其在低转移的早期(0-A 期)肝癌组织中的表达。进一步我们的体外肝癌细胞功能实验结果表明，与纯化的天然 CD147 分子相比，应用纯化的无 $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支修饰的 CD147 分子刺激肝癌细胞 Huh-7 和 HepG2，实时定量 PCR 结果显示 CD147 诱导细胞外基质金属蛋白酶（matrix metalloproteinase, MMPs）*MMP-1*, *MMP-2*, *MMP-9* 的能力明显下降。因此，CD147 的 $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支修饰水平与肝细胞肝癌的转移呈正相关。

第二部分，GnT-V 催化的 CD147 分子 $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支修饰参与肝癌细胞的上皮-间质转化（epithelial-mesenchymal transition, EMT）过程

首先我们在肝癌进展过程的不同组织中发现 GnT-V 的表达与 E-cadherin 的表达呈负性相关，与 N-cadherin 表达正相关，表明 GnT-V 的表达与 EMT 有关。然后我们利用 TGF- $\beta 1$ 诱导的肝细胞 QZG 发生 EMT，糖基转移酶 GnT-V 的表达上调，其编码基因 *MGAT5* 以及催化产物 $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支的水平增高。我们实验室之前的研究结果表明，CD147 分子在肝癌细胞的 EMT 过程中表达上调，那么是否 CD147 分子的 $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支修饰参与肝癌细胞的 EMT 过程？本研究应用免疫蛋白印记技术，采用高糖基化 CD147（HG-CD147）与低糖基化 CD147 分子（LG-CD147）的比值衡量 CD147 的 N-糖基化变化，证实 HG-CD147 在 EMT 过程中升高。进一步利用 PLA 和凝集素印记法检测在诱导 EMT 后 CD147 分子的 $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支修饰的变化，结果显示在 EMT 过程中，CD147 分子的 $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支修饰是表达上调的。进一步印证第一部分结论，CD147 分

子的 $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支修饰促进肝癌转移。

第三部分, CD147 分子的 $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支影响 CD147 和 integrin $\beta 1$ 相互作用

CD147 分子与 integrin $\beta 1$ 的相互作用促进肿瘤的转移, 那么其 $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支修饰是否影响二者的相互作用呢? 首先我们构建了融合 eGFP 的糖基化位点三点全突变(3Q-CD147)和野生型(WT-CD147)的 CD147 质粒, 并转入 HEK293T 细胞, Co-IP 检测 CD147 分子与 integrin $\beta 1$ 相互作用, 免疫蛋白印记结果表明突变糖基化位点后, integrin $\beta 1$ 与 CD147 分子相互作用减弱。为了探究在肝癌细胞中 $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支如何影响 CD147 分子促进转移的功能, 我们用抑制剂苦马豆碱 swainsonine 或者 si-MGAT5 干涉片段处理肝癌细胞来抑制 $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支合成, PLA 检测结果显示 CD147 和 integrin $\beta 1$ 相互作用明显减弱。这些结果表明, $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支修饰增强 CD147 和 integrin $\beta 1$ 相互作用。进一步我们干涉 $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支的糖配体 Galectin-3, 免疫蛋白印记结果表明下调 Gal-3 后, CD147 与 integrin $\beta 1$ 的相互作用明显减弱, 进一步证实了 CD147 分子的 $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支修饰对 CD147 分子和 integrin $\beta 1$ 相互作用的促进作用。

第四部分, PI3K/Akt 信号通路对 GnT-V 的正反馈调控

我们已有研究结果表明 CD147 分子和 integrin $\beta 1$ 相互作用活化下游 PI3K/Akt 信号通路, 第三部分结果表明 GnT-V 影响 CD147 分子和 integrin $\beta 1$ 的相互作用, 那么 GnT-V 是否会影响 PI3K/Akt 信号通路? 我们研究发现抑制 $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支之后, PI3K/Akt 信号减弱。这说明 GnT-V 可影响 PI3K 通路, 那么反过来 PI3K/Akt 是否可以调控 GnT-V 的表达呢? 我们应用 Akt 抑制剂 LY294002 处理 HepG2 和 Huh-7 细胞, 免疫蛋白印记和实时定量 PCR 结果均显示 GnT-V 表达下降, 表明 PI3K/Akt 调控 GnT-V 的表达及其催化的糖基化。因此, 基于上述实验结果, 我们提出一个正反馈环路: GnT-V 的表达通过影响 CD147 分子与 integrin $\beta 1$ 的相互作用调控 PI3K/Akt 信号通路, PI3K/Akt 信号通路又可正反馈上调 GnT-V 的表达。

综上所述, 我们的研究发现 GnT-V 催化的 CD147 分子的 $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支糖基化修饰促进肝癌转移。首先我们明确 CD147 分子的 $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支糖基化修饰与肝癌病人临床分期和转移的相关性, 并通过进一步的功能

研究阐明了 GnT-V 催化的 CD147 分子糖基化修饰在 EMT 过程表达上调。其促进转移的具体机制是：CD147 分子的 $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支糖修饰通过影响其与 integrin $\beta 1$ 的相互作用，从而影响下游 PI3K 信号通路的活化，PI3K 信号通路又能正反馈调控 GnT-V 的表达。

关键词：

肝细胞肝癌；N-糖基化；CD147；肿瘤转移；糖基转移酶 V

N-glycosylation of CD147 by N-acetylglucosaminyltransferase V promotes HCC metastasis

Candidate for master: Cui Jian

Supervisor: Jiang Jianli

Department of Cell Biology, School of Basic Medical Sciences, Air Force Medical
University, Xi'an 710032, China

Sponsored Programs: National Basic Research Program of China (2015CB553701),
National Natural Science Foundation of China (81402383)

Abstract

A common feature of malignant tumors is a significant change in the glycosylation of the cell surface. The roles of glycans in cancer have been highlighted by the fact that alterations in glycosylation regulate the development and progression of cancer, serving as important biomarkers and providing a set of specific targets for therapeutic intervention. CD147, also known as extracellular matrix metalloproteinase inducer, is a single transmembrane glycoprotein with a molecular weight of approximately 43-66 kDa, identified as tumor drug target in our laboratory, which is highly expressed in a variety of human malignancies, including liver cancer. CD147 is involved in many processes occurring in cancer through different mechanisms and promotes tumor progression: such as tumor cell growth, metabolism, invasion, metastasis, angiogenesis, drug resistance and resistance to death. CD147 is highly glycosylated, contains three N-linked glycosylation sites (Asn44, Asn152 and Asn186), which contribute to both the high-glycosylated form (~40-60 kDa) and the low-glycosylated form (~32 kDa). While our previous research found that CD147 from human lung cancer tissue contained a series of high-mannose and

complex-type N-linked glycan structures. Moreover, CD147 contains a high percentage of β 1, 6 GlcNAc glycans. β 1, 6-branched N-linked glycans are the product of UDP-acetylglucosamine α -mannose β 1, 6-N-acetylglucosamine transferase (glycosyltransferase V, GnT-V). β 1, 6-branched N-linked glycans is defined as key glycan in tumor metastasis and malignant transformation. What is the significance of CD147- β 1, 6-branched N-linked glycosylation in tumor progression? Does this modification affect the function of CD147 and how does it affect the function of CD147? The answers to these questions help us to further unveil the mystery of the importance of CD147 in tumors and provide a theoretical basis for drug development. Based on this, we expand the following four parts of the experiment:

Part I: The correlation between CD147- β 1, 6 branching levels and clinical stage and metastasis in HCC

In our research, we first detected the high expression level of β 1, 6-branched glycans in liver cancer by immunohistochemistry and immunofluorescence. We used PLA technique to detect the CD147- β 1, 6 branching levels was also highly expressed in 51 patients with HCC. Next, we evaluated the clinical relevance of CD147- β 1, 6 branching levels in 51 patients with HCC, only Barcelona clinic liver cancer (BCLC) stage was related to the level of CD147 β 1,6-branched glycans. Next, we further analyzed the correlation between BCLC stage and CD147- β 1, 6-branched glycans. Tissues from patients with stage C disease were markedly positive for CD147- β 1, 6-branched N-glycans, whereas only weak signals were observed in tissues from patients with stage 0-A disease, this modification increased as the staging progressed. These results indicate that the level of CD147 β 1, 6-branched glycans is linked to HCC metastasis and progression. Furthermore, we next assessed the effect of GnT-V-mediated glycosylation of CD147 on the invasive properties of HCC cells. To determine the effect of β 1, 6-branched N-glycosylation, we stimulated Huh-7 and HepG2 cells with purified nature or with mutant CD147 with defective β 1, 6-branched N-glycosylation, and then analyzed MMP expression. Real-time PCR showed that MMP-1, MMP-2 and MMP-9 were reduced in cells treated with mutant CD147 (defective β 1, 6-branched N-glycosylation) compared to

cells treated with nature CD147, suggesting that GnT-V-mediated glycosylation increases CD147-mediated HCC cell invasion.

Part II: Upregulation of β 1, 6 GlcNAc glycans on CD147 in hepatocytes during TGF- β 1-induced EMT

Firstly, we examined the expression of GnT-V and Ecadherin in serial sections of hepatocellular carcinoma tissue array by IHC. The reciprocal pattern of GnT-V and Ecadherin, consistent pattern of GnT-V and Ecadherin expression were observed in clinical specimens. Which supports the involvement of EMT in GnT-V expression. In our research, We found GnT-V-mediated glycosylation was elevated in QZG cells when EMT was induced by TGF- β 1. CD147 was upregulated in QZG cells during TGF- β 1-induced EMT. Previous research showed that the expression of CD147 was upregulated during EMT in liver cells, so we wonder if CD147- β 1, 6 N-glycosylation was involved in EMT of liver cell? To further determine whether CD147 glycosylation is associated with EMT, we analyzed the ratio of high-glycosylated/low-glycosylated protein by western blotting. The increase of the ratio suggested the upregulation of CD147 N-glycosylation. Next, we detected the levels of β 1, 6 GlcNAc glycans using PLA and lectin blotting after TGF- β 1-induced EMT. We observed an increase in CD147- β 1, 6 branching after TGF- β 1 treatment. Base on it, it indicates that a correlation between GnT-V-mediated glycosylation expression and EMT. These finding was consistent with the part I result.

Part III: CD147- β 1, 6 GlcNAc glycans promote the interaction between CD147 and integrin β 1

CD147 interacts integrin β 1 to promote cancer metastasis, we wonder whether CD147- β 1, 6 GlcNAc glycans play a role in the interaction. To assess the contribution of N-glycosylation to the interaction with integrin β 1, we constructed WT-CD147-GFP and 3Q-CD147-GFP plasmids. After transfection into HEK293T cells, a strong green fluorescence signal was observed by fluorescence microscopy. When integrin β 1 was immunoprecipitated from cell lysates, the precipitated GFP levels were much lower in 3Q-293T cells than in WT-293T cells. The reverse was also true, suggesting that 3Q-CD147 is less efficient at binding integrin β 1 than WT-CD147, and indicating that the

binding of CD147 to integrin $\beta 1$ is affected by N-glycosylation. We next analyzed the interaction of integrin $\beta 1$ and CD147 by PLA. When $\beta 1, 6$ GlcNAc glycan synthesis was inhibited by swainsonine or si-*MGAT5*, there was a decrease in the ability of CD147 to bind integrin $\beta 1$. To further confirm the role of $\beta 1, 6$ GlcNAc glycans in this interaction, we silenced *LGALS3* gene expression using siRNA. As determined by Co-IP and western blotting, si-*LGALS3* reduced the interaction between CD147 and integrin $\beta 1$ compared to control. These findings clearly establish the importance of $\beta 1, 6$ GlcNAc glycans for the binding of CD147 to integrin $\beta 1$, consistent with the previous result that CD147- $\beta 1$, 6-branched glycans are associated with metastasis.

Part IV: The PI3K/Akt signaling pathway is involved in the regulation of GnT-V expression

CD147 interacts with integrin $\beta 1$ and activates the PI3K/Akt pathway. The part III shows that GnT-V affects the interaction between CD147 and integrin $\beta 1$, and whether GnT-V will regulate the PI3K pathway? To determine whether they regulate the downstream PI3K pathway, we analyzed activation of downstream proteins, including FAK, paxillin and Akt. Depletion of $\beta 1, 6$ -branched N-glycans impaired PI3K pathway activation and the subsequent activation of p-FAK, p-paxillin and p-Akt. To investigate whether GnT-V is linked to the PI3K pathway, we treated HepG2 and Huh-7 cells with LY294002, a PI3K inhibitor. Western blotting and qPCR showed that GnT-V and Gal-3 were decreased by LY294002. Taken together, activation of the PI3K/Akt pathway is involved in the regulation of GnT-V expression and deletion of GnT-V-mediated N-glycosylation impairs the PI3K/Akt pathway.

Based on the findings of this study, we revealed that N-glycosylation by N-acetylglucosaminyltransferase V enhances the interaction of CD147 with integrin $\beta 1$ and promotes HCC Metastasis. First, we identified correlation between BCLC stage and CD147- $\beta 1, 6$ -branched glycans of liver cancer patients, and further elucidated that the GnT-V-mediated glycosylation of CD147 promote EMT process of hepatocytes. The mechanism is that the modification of the CD147 affects its interaction with integrin $\beta 1$, affects the activation of the downstream PI3K signaling pathway, which in turn regulates

the expression of GnT-V by the positive feedback of the PI3K signaling pathway.

Key words:

N-glycosylation, CD147, metastasis, protein-protein interaction, biomarker

前 言

恶性肿瘤细胞的糖基化普遍发生变化^[1]，影响蛋白质的正确折叠、维持蛋白的稳定性、受体激活、信号转导等蛋白质的生物学功能，从而影响肿瘤细胞的侵袭、转移、耐药等过程^[2]。与肿瘤相关的最常见修饰有唾液酸化， β 1, 6 N-乙酰氨基葡萄糖分支和核心岩藻糖基化，其中 β 1, 6 N-乙酰氨基葡萄糖分支增加与癌症转移密切相关^[3]。CD147 分子是一种肿瘤相关的跨膜糖蛋白，属于免疫球蛋白超家族^[4]。作为细胞外基质金属蛋白酶 MMPs 的诱导因子，CD147 在肿瘤细胞表面的表达异常增高，并与肿瘤侵袭和不良预后相关^[5]。在肝细胞肝癌中，CD147 与肿瘤的发生发展，EMT 和化疗耐药密切相关^[6]。CD147 分子是一个高度糖基化的蛋白，含有三个 N 连接的糖基化位点（Asn44，Asn152 和 Asn186），N-糖链几乎占分子量的一半^[7]。前期研究发现糖基转移酶 GnT-V 可催化 CD147 分子发生 β 1, 6 N-乙酰氨基葡萄糖分支修饰，但这种修饰对 CD147 分子功能的影响并不清楚。这种与转移相关的糖成分是否影响 CD147 分子的功能，如何影响其功能，都有待研究。研究 CD147 分子的 β 1, 6 N-乙酰氨基葡萄糖分支修饰在肝癌进展中的意义和分子机制，对靶向 CD147 分子的肝癌诊疗具有重要意义。

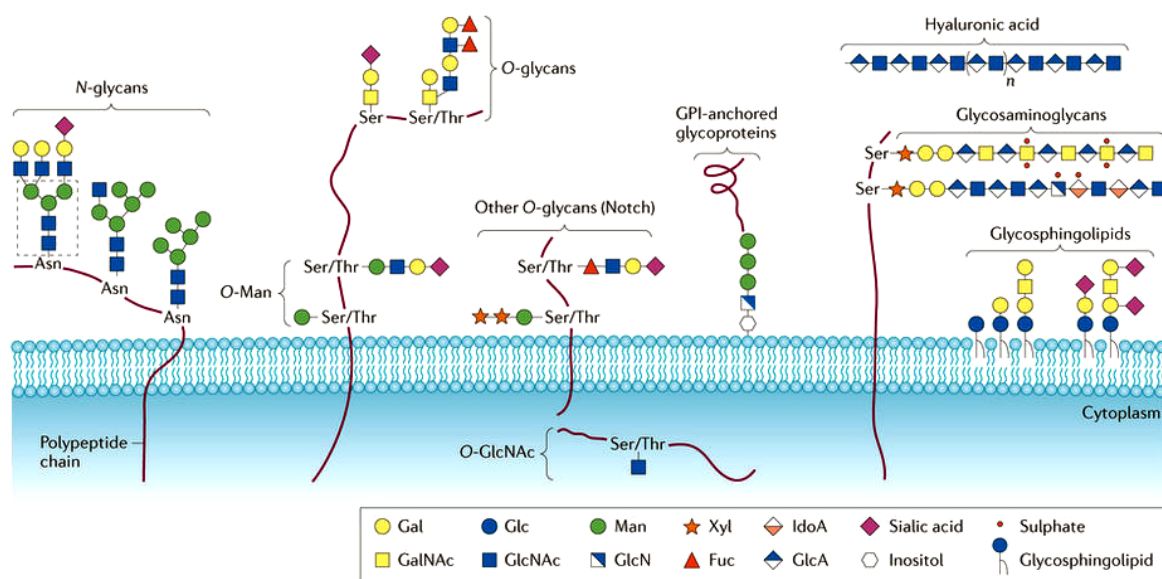
文献回顾

一、N-糖基化在肿瘤中的作用与应用

1. 糖基化修饰及其功能

蛋白的糖基化修饰是一种常见的翻译后修饰^[8]。大多数细胞表面受体都发生糖基化，丰富的糖苷结合修饰膜蛋白的胞外段^[9]。糖蛋白上的寡糖是由糖基转移酶催化，从核糖苷供体转移到受体上^[10, 11]。根据连接蛋白的方式不同，糖苷分为 N-连接（乙酰氨基葡萄糖与天冬酰胺 Asn 的酰胺侧链结合）和 O-连接（N-乙酰氨基半乳糖通过与苏氨酸 Thr/丝氨酸 Ser 的羟基结合）^[12]。N-连接的糖基化始于内质网，在高尔基体中结束，O-连接的糖基化在高尔基复合体中进行^[1]。所有 N-连接的聚糖都含有五糖 Man α 1-6 (Man α 1-3) Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc 作为共同的核心结构，如图 1 所示^[3]。根据寡糖加到核心的结构和位置的不同，将 N-聚糖分为三类：复合型，高甘露糖型和混合型，复合型在三种 N-糖分类中结构差异最大^[9]。高尔基体中的 N-糖加工过程与糖苷酶和糖基转移酶相关：分支聚糖如二分的 N-乙酰葡萄糖氨或 β 1,6 N-乙酰氨基葡萄糖分支是 N-乙酰葡萄糖氨基转移酶 III 和 V (GnT-III, GnT-V) 的催化产物^[2]。这些分支结构与各种生物学功能密切相关，如细胞黏附，迁移和癌症转移^[13]。唾液酸转移酶催化的唾液酸化能终止糖基化的成熟，唾液酸在生理条件下携带负电荷^[14]，并位于糖链末端，唾液酸可能抑制分子间及细胞的相互作用^[15]。

糖基化位点上糖链结构的多样性引起糖蛋白功能的变化^[3]。一般认为糖基化修饰可以避免非特异性的蛋白-蛋白之间的相互作用，增加蛋白酶的保护以及增强糖蛋白的稳定性。一些聚糖影响受体蛋白的构象，调控受体-配体的结合^[15-17]。蛋白质的糖基化可以影响蛋白质的折叠，细胞内运输，蛋白定位以及降解速率，影响细胞间的相互作用以及细胞与细胞外基质蛋白和可溶性信号分子的相互作用^[18]。



Nature Reviews | Cancer

图 1 哺乳动物细胞中常见的糖基化修饰^[5]

糖苷通过天冬酰胺连接（N-连接）或与丝氨酸/苏氨酸连接（O-连接）到多肽骨架上，使蛋白发生糖基化。与 Ser/Thr 连接的 N-乙酰半乳糖氨形成粘蛋白型 O-糖基化通常存在于分泌蛋白或者膜相关蛋白上。N-糖基化发生在共有肽序列 Asn-X-Ser/Thr 中（其中 X 代表任何氨基酸）。N-聚糖共有-一个共同的五糖核心区域（在图中突出显示为一个虚线框），可以多样化-为高甘露糖型，混合或复杂类型，并进一步被 N-乙酰氨基葡萄糖，半乳糖和唾液酸修饰末端结构。

2. 肿瘤细胞的糖基化改变

与正常细胞相比，肿瘤细胞的糖基化修饰发生显著变化，从而导致糖蛋白结构和功能的变化^[2]。这种异常的糖基化修饰具有位点特异性，蛋白特异性以及细胞特异性的特点^[19, 20]。造成肿瘤细胞异常糖基化有多重因素：a，糖基转移酶的异常表达，分子伴侣的功能异常以及糖苷酶的活性改变引起糖成分变化^[21, 22]；b，多肽以及新生糖链三级结构的变化；c，受体底物的多样性，核苷酸糖供体以及辅因子的多样性^[23]；d，高尔基复合体中相关糖基转移酶的表达和定位的变化^[24]。

在肿瘤细胞异常糖基化改变中，唾液酸化，岩藻糖基化，O-连接糖苷以及 O-连接、N-连接的糖苷分支修饰最为常见，如图 2 所示^[3]。在肿瘤细胞中，糖苷广泛参与肿瘤细胞基本生物学过程，如炎症，免疫耐受，细胞间黏附，细胞-基质间相互作用，细胞内外的信号传导通路，细胞内代谢等，如图 3 所示^[3]。而且，糖基化修饰可通过影响蛋白的构象和空间结构，调控肿瘤相关糖蛋白的功能，从而影响肿瘤进展^[25]。

阐明糖基化修饰在肿瘤进展中的功能和意义可为肿瘤的诊断和治疗提供新的线索。

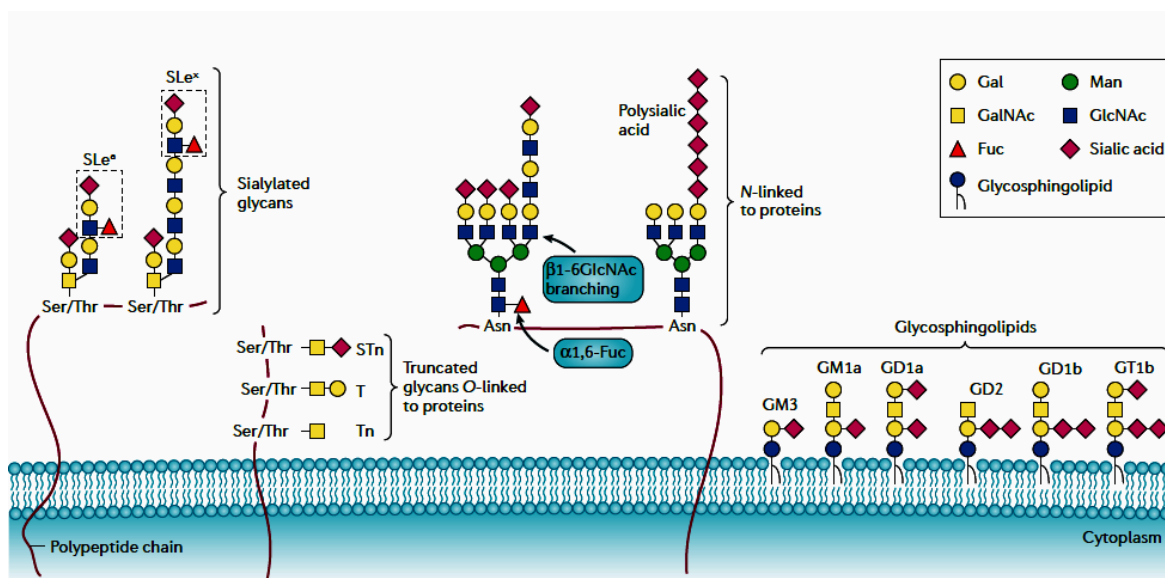


图 2 重要的肿瘤相关糖成分^[3]

肿瘤特异性糖苷被认为是肿瘤细胞的标志物。最常见的肿瘤异常的糖基化有唾液酸化，GnT-V 催化的 β 1,6 N-乙酰氨基葡萄糖分支和核心岩藻糖。

(1) 糖基化参与肿瘤细胞黏附。肿瘤恶性转化的其中一个过程是肿瘤细胞间黏附能力下降，浸润周围组织^[26]。E-钙黏素作为一个高糖基化的跨膜蛋白，是主要的肿瘤上皮细胞黏附分子。糖苷通过影响 E-钙黏素的功能从而影响肿瘤细胞间黏附^[27]。比如糖基转移酶 GnT-V 催化的 E-钙黏素发生异常的糖基化，引起 E-钙黏素错误折叠从而导致黏附功能失调，增强下游的侵袭转移信号^[28]。而糖基转移酶 GnT-III（与 GnT-V 之间存在底物竞争的关系）催化的 E-钙黏素的糖基化能抑制其内吞，增强黏附功能，抑制肿瘤转移^[29]。此外，肿瘤细胞异常高表达唾液酸，唾液酸化的肿瘤相关抗原促进肿瘤细胞从瘤块中分离，促进肿瘤的转移^[30]。临床上，唾液酸化的抗原高表达被认为是转移和不良预后的关键标志^[31]。

(2) 糖基化修饰参与细胞-基质间相互作用及其下游信号通路。细胞外基质（extracellular matrix, ECM）由糖蛋白、胶原、葡萄糖氨聚糖（GAGs）以及蛋白聚糖动态复杂排列而成^[3]。硫酸类肝素蛋白聚糖（HSPGs）存在于 ECM 中调节细胞的生长分化，控制胚胎形成，血管生成和稳态^[32]。HSPGs 上含有不同的 GAGs，定位不同的 HSPGs 含有不同的糖苷。一些肿瘤中，蛋白糖苷过表达调控蛋白受体的活化，

如 HER2、EGFR、MET 以及 TGF- β ^[33]。硫酸乙酰肝素能够影响各种信号分子相互作用，增强其溶解性，增强相互作用，促进下游信号的转导^[34, 35]。另一个重要的与基质依赖的细胞运动相关的膜受体 CD44，是透明质酸的主要受体，其糖基化对透明质酸配体识别与结合，调控肿瘤细胞信号通路具有显著作用^[36]。此外透明质酸酶在肿瘤转移中起到多重作用：降解肿瘤周围的 ECM，促使肿瘤细胞分离，降解基底膜促进肿瘤细胞侵袭^[37]。

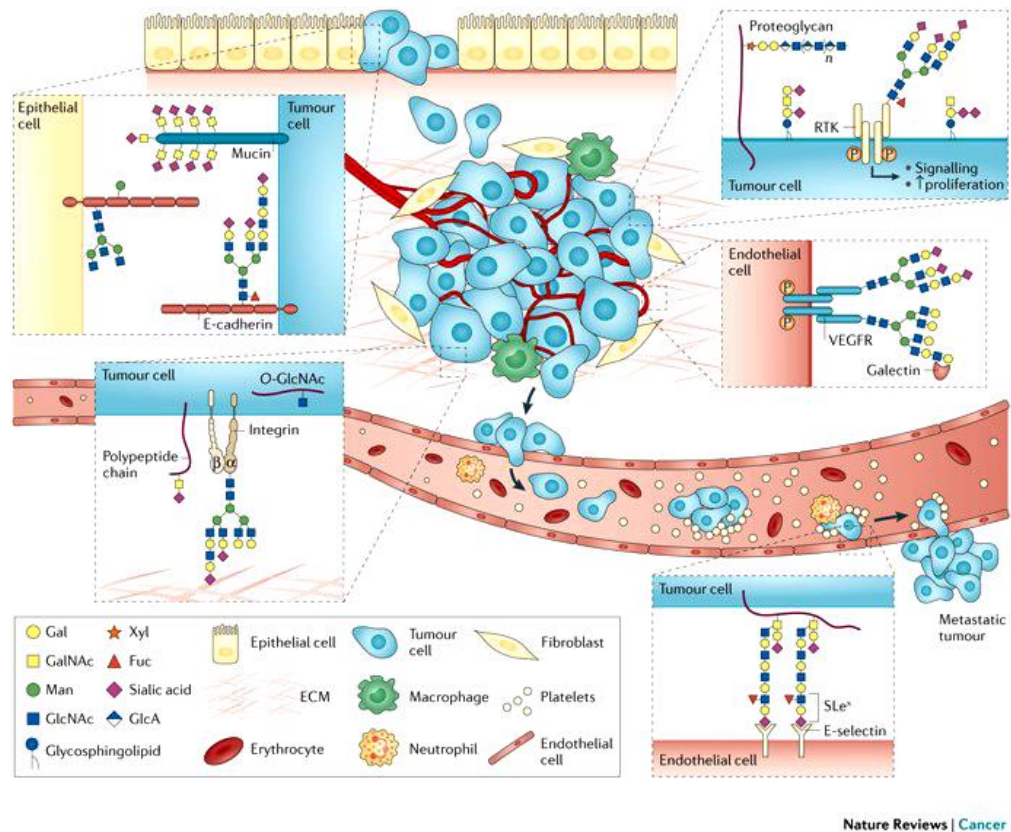


图 3 糖基化修饰在肿瘤发生发展中的作用^[3]

在肿瘤进展的过程中，聚糖会干扰细胞间黏附，影响肿瘤细胞的侵袭转移。如糖基转移酶 GnT-V 催化的 β 1, 6-N-乙酰氨基葡萄糖分支修饰 E-cadherin，降低细胞间黏附并促进肿瘤细胞侵袭。GnT-III 催化的 E-cadherin 糖基化修饰结构具有维持蛋白的稳定性和抑制肿瘤进展的作用。异常的 O-糖基化也与肿瘤细胞的侵袭有关。在肿瘤细胞迁移过程中，整联蛋白的 O-连接和 N-连接的糖基化修饰都发生改变。末端唾液酸化干扰细胞与细胞外基质间相互作用，促进迁移和侵袭。血管内皮生长因子受体（VEGFR）异常糖基化调节其与半乳糖凝集素的相互作用，从而调控肿瘤血管生成。肿瘤相关碳水化合物决定簇唾液酸化 Lewis x (SLe^x) 和 SLe^a 可作为黏附受体（如 E-selectin, P-selectin, L-selectin）的配体促进癌细胞黏附和转移。Fuc，岩藻糖；Gal，半乳糖；GlcA，葡萄糖醛酸；Man，甘露糖；RTK，受体酪氨酸激酶；Xyl，木糖。

(3) 糖基化修饰调控肿瘤细胞代谢及其相关信号通路。肿瘤细胞代谢一个显著特征是从氧化磷酸化转变为有氧糖酵解，葡萄糖消耗速率增加^[38]。肿瘤细胞胞质中的葡萄糖的增加，不仅增强糖酵解作用还增强代谢分支通路的糖代谢，比如氨基己糖（HBP）合成途径，从而为 O-糖基化提供丰富的底物，进而增强糖基化修饰^[1]。糖基化修饰增强促进肿瘤细胞的增殖，侵袭转移等恶性表型^[39-41]。Lau 等人提出了一种代谢调节细胞增殖，阻滞和分化之间转化机制：复合型 N-聚糖的数量以及分支糖的表达程度导致这种转化^[42]。通过 HBP 途径的代谢速率的变化能够调节 N-糖分支与半乳凝集素-3 的相互作用从而影响细胞表面受体的稳定性以及存活时间^[43]。研究发现抑制 GnT-V 或者 N-乙酰氨基葡萄糖表达，减弱 EGFR 信号通路，补充氨基己糖或者回复表达后，信号通路状态得到回复，这也说明肿瘤细胞中的 N-糖基化与代谢相关^[42]。

(4) 糖基化修饰参与肿瘤的免疫耐受。糖基化修饰参与肿瘤细胞编程调控肿瘤免疫应答，通过各种凝集素（如半乳凝集素，C-型凝集素等）结合糖苷，调控免疫应答过程，如病原识别，从而重塑免疫应答过程^[44]。糖苷特异性抗体可以通过补体依赖的细胞毒性杀伤肿瘤细胞^[45]。此外肿瘤细胞表面异常的 O-糖基化会增强抗体依赖的细胞毒性作用（ADCC）^[46]。

(5) 糖基化修饰与肿瘤的诊断和治疗。随着糖基化研究的深入，异常糖基化的糖蛋白检测已作为特异性肿瘤标志物，应用于临床肿瘤诊断中。例如，甲胎蛋白的岩藻糖基化检测已用于肝癌诊断；还有唾液酸化的抗原检测如 CA-199，前列腺特异性抗原 PSA 等已广泛运用于肿瘤的临床辅助诊断^[24, 47, 48]。在治疗方面，糖基化修饰影响抗体药物的稳定性，安全性，以及生物活性。对 Fc 段融合单克隆抗体起作用的主要糖成分有唾液酸，岩藻糖，半乳糖，甘露糖^[49]。核心岩藻糖影响抗体的 ADCC 活性，去岩藻糖化可以显著提高抗体与 FcγRIIIa 的亲合力及 ADCC 活性，半乳糖化增加抗体与补体的结合，增强抗体的补体依赖的细胞毒性作用^[50]。

3. GnT-V 催化的 β1, 6 N-乙酰氨基葡萄糖分支糖基化在肿瘤中的研究进展

肿瘤细胞常见的异常糖基化是 β1, 6 N-乙酰氨基葡萄糖分支表达增加^[51, 52]。N-乙酰氨基葡萄糖分支由糖基转移酶 GnT-V 特异性催化，其表达增加与编码的 GnT-V 的 *MGAT5* 基因表达活性增加有关^[52]。*MGAT5* 的活化受到肿瘤细胞中活化的

RAS-RAF-MAPK 信号通路的调控^[51]。这种糖分支是半乳糖凝集素 galectin-3 的配体，形成凝集素-糖苷基序^[53]。半乳糖凝集素在肿瘤中具有重要作用，影响细胞的恶性转型，肿瘤细胞的存活，血管生成以及肿瘤转移^[53]。研究表明，这种糖基化修饰的增加导致细胞间以及细胞-基质间的黏附作用减弱，促进肿瘤的运动和侵袭能力。GnT-III (由 *MGAT3* 编码) 催化 $\beta 1, 4$ N-乙酰氨基葡萄糖分支的形成，与 GnT-V 竞争共同底物，具有抑制肿瘤转移的作用^[54]。如图 4 所示，GnT-III 和 GnT-V 竞争同一底物，具有相反作用：GnT-III 抑制肿瘤转移，GnT-V 促进肿瘤转移^[1]。免疫组化染色分析发现在肝癌以及肾脏肿瘤中 *MGAT5* 的表达与转移预后相关^[55]。在细胞中过表达 *MGAT5*，导致细胞失去接触抑制，增强肿瘤细胞的侵袭和转移能力；下调肿瘤细胞的 *MGAT5*，能够抑制肿瘤生长和转移^[56]。此外，研究发现糖基转移酶 GnT-V 的表达与 EMT 有关^[57-60]。EMT 过程中，GnT-V 表达上调^[57, 58]，GnT-V 的过表达促进 TGF- $\beta 1$ 诱导 EMT 的发生，从而增强各种肿瘤的恶性转移表型^[60, 61]。然而，也有报道得到相反的结果，即 GnT-V 抑制肺癌细胞 EMT 的发生^[62]。那么在肝癌发生 EMT 过程中，GnT-V 表达究竟是如何变化呢？

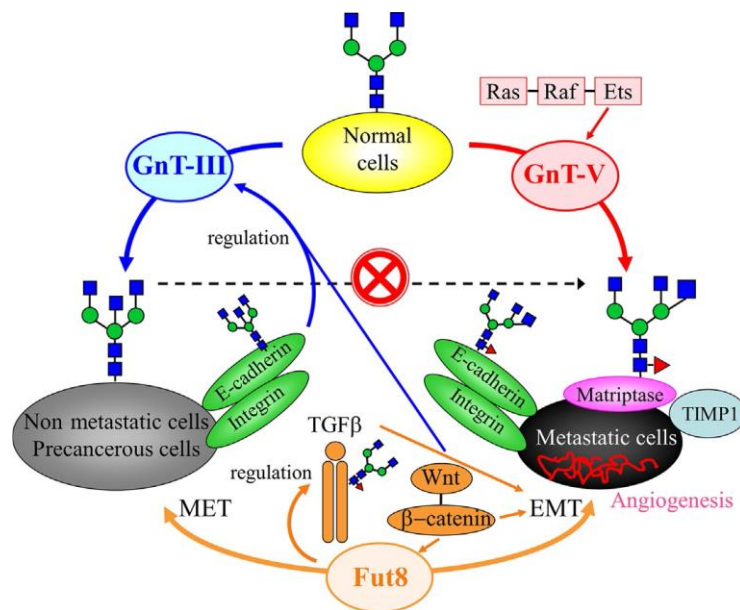


图 4 GnT-III 和 GnT-V 对肿瘤转移的相互调控作用^[42]

GnT-III 和 GnT-V 在肿瘤转移中起到相反作用，这两种酶在上皮间质转化（EMT）和间充质上皮转变（MET）过程中的作用也是相反的。一些糖蛋白，如 Matriptase，TIMP1 和黏附分子等的糖基化修饰受到这两种酶的催化。

二、CD147 分子及其糖基化修饰参与肿瘤侵袭转移的作用机制

CD147 分子是属于免疫球蛋白超家族的跨膜糖蛋白，在多种肿瘤细胞上普遍高表达^[63-65]。它在不同的物种中有不同命名，包括 EMMPRIN^[66]，hBasigin^[67]，M6^[68] 和 HAb18G^[4]；大鼠 OX-47^[69]和 CE9^[70]；小鼠 gp42^[71]和 basigin-1^[72]；鸡 HT7^[73]，神经纤维素^[74]和 5A11^[75]。大量研究表明，CD147 分子参与各种生理过程，如精子发生和受精，神经网络和视网膜发育^[76-79]；以及疾病的发展，包括动脉粥样硬化，类风湿性关节炎，寄生虫和病毒感染以及肿瘤进展^[80-84]。人的 CD147 分子通过可变剪切产生四种异构体：basigin-1，basigin-2，basigin-3，basigin-4^[85]。常见的异构体有含有两个 IgG 结构域的 basigin (basigin-2)，视网膜特异表达的具有三个 IgG 结构域的 basigin-1 (如图 5 所示)。本研究关注的是广泛表达的 basigin-2。

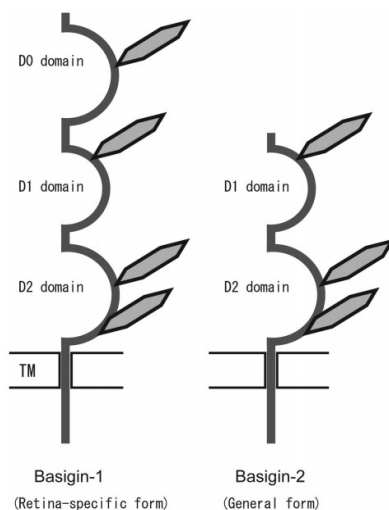


图 5 两种 BSG 异构体 basigin-1 和 basigin-2 的示意图^[86-88]

Basigin-1 胞外具有 3 个 IgG 结构域，Basigin-2 含有两个 IgG 结构域

作为 MMP 的诱导因子，CD147 分子异常高表达于各种肿瘤中，诱导肿瘤细胞产生 MMPs，促进肿瘤的侵袭与转移，是不良预后的标志^[5, 65, 89-93]。免疫组织化学染色分析发现 CD147 分子在人肝细胞肝癌中表达明显高于正常肝组织，其表达在肝硬化以及肝癌组织中的阳性率均达 80% 以上^[63, 94, 95]。在肝细胞肝癌中 CD147 分子的表达与肿瘤的发生发展，血管生成，肿瘤转移，化疗耐药，促进 EMT 等恶性过程有关^[5, 96-98]。作为一种黏附分子，CD147 分子通过结合与肿瘤和炎症相关分子相互作用来发挥作用，如整合蛋白 integrin^[99]、单羧酸转运蛋白 (MCTs)^[100]、亲

环素类^[101]、窖蛋白 (caveolin-1)^[102]和选择素 (E-selectin)^[103]等。临床试验证实，CD147 分子是一个有效的抗肿瘤靶点。针对 CD147 分子的抗体 $^{131}\text{I-HAbF(ab')}_2$ 成功上市，能有效治疗原发性肝细胞肝癌，延长病人寿命^[104, 105]。

CD147 分子是一个高度糖基化的蛋白，除 Fadool JM 等报道鸡的视网膜神经和上皮组织的 5A11、HT7 抗原同时含有 N-连接和 O-连接的寡糖外^[106]，其余研究均表明 CD147 分子是一种 N-糖基化蛋白。在不同的物种、组织以及细胞中，CD147 分子的糖基化形式有很大的不同，因此导致蛋白分子量的变化很大^[7]。非糖基化的 CD147 分子量为 27kDa，糖基化形式的 CD147 分子量为 43-66kDa，N-连接的糖组分几乎占成熟 CD147 分子量的一半^[107]。先前我们实验室根据生物信息学预测结合位点突变证明，CD147 分子 N-连接糖链位于胞外段 (ECD) 氨基酸序列的第 44 位、第 152 位和第 186 位天冬酰氨上，其中糖基化位点 N44 位于第一个 Ig 样结构域，而 N152 和 N186 位于 CD147 分子的第二个 Ig 样结构域，如图 6^[7, 108]所示。通过质谱解析结构发现，在肺癌中 CD147 分子的 N-糖基化修饰为高甘露糖型和复

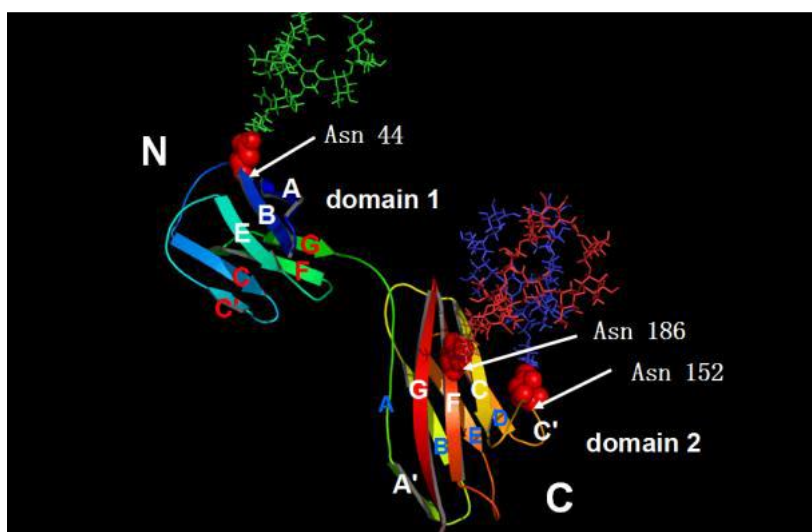


图 6 CD147 的胞外段三个糖基化位点的模拟图^[7]

生物信息学预测结合位点突变证明，CD147 分子 N-连接糖链位于胞外段 (ECD) 氨基酸序列的第 44 位、第 152 位和第 186 位天冬酰氨上，其中糖基化位点 N44 位于第一个 Ig 样结构域，而 N152 和 N186 位于 CD147 的第二个 Ig 样结构域。红色球代表 CD147 分子的糖基化位点。

杂型，高糖基化 CD147 分子 (HG-CD147) N-糖基化修饰为复杂型，低糖基化修饰的 CD147 (LG-CD147) N-糖基化修饰为高甘露糖型^[7]。根据蛋白糖基化的一般过程，我们推论 CD147 分子在内质网上完成初步糖基化，形成未成熟的高甘露糖型 (LG-CD147)，然后转运到高尔基复合体中，进一步通过一系列糖基转移酶催化形成复杂型糖链 (HG-CD147)，转运到细胞膜发挥作用。有研究表明在肝癌细胞的质膜上，只有完全糖基化的 HG-CD147 才能被检测到^[7]。作为跨膜蛋白，细胞质膜上的 CD147 分子被认为是其发挥功能的主要形式^[109]。糖成分分析发现，CD147 分子上的糖组分有：核心岩藻糖基转移酶 (Fut-8) 催化的核心岩藻糖，GnT-V 催化的 β 1, 6 N-乙酰氨基葡萄糖分支，糖基转移酶 GnT-IVa 催化的 GlcNAc β 1, 4 分支以及 α -2, 6 唾液酸糖基转移酶催化的唾液酸，如图 7 所示^[7, 103, 109, 110]。CD147 分子的 N-糖基化修饰在许多方面调节其生物学功能，包括影响蛋白质成熟和定位至细胞膜，促进寡聚化并促进 MMP 产生以及肿瘤转移^[111]。此外，CD147 分子的 N-糖基化也可能通过影响与其他蛋白的相互作用来发挥相应的生物学效应。

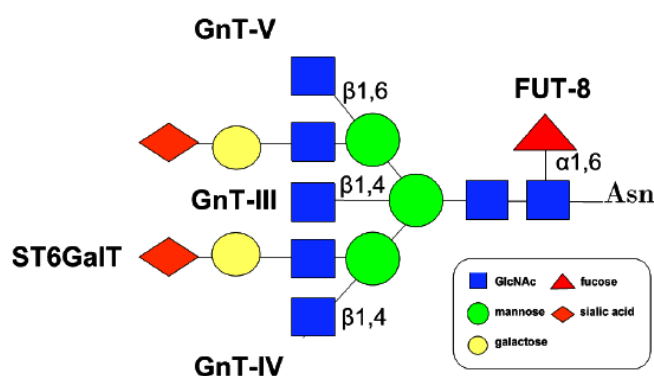


图 7 CD147 分子 潜在的 N-糖基化修饰结构以及其对应的糖基转移酶^[7]

GnT: N-乙酰氨基葡萄糖转移酶; FUT:岩藻糖基转移酶; ST6GalT: α -2,6 唾液酸糖基转移酶

(1) N-糖基化在 CD147 分子诱导 MMP 分泌和促进 CD147 分子同型寡聚中的作用

肿瘤细胞的天然 CD147 蛋白，真核表达的 CD147 蛋白能够诱导 MMP 分泌，去糖基化的 CD147 不能诱导 MMP 的产生^[112, 113]。另外，Sun 等人发现通过纯化的去糖基化 CD147 分子不能诱导产生 MMP-1 和 MMP-2^[114]。我们的研究比较了糖基化和非糖基化 CD147 的功效，发现两者均产生 MMPs，但真核 CD147 分子比原核重组 CD147 分子更有效地刺激 MMPs 的产生，说明 N-糖基化修饰增强 CD147 分子的活

性^[7]。Papadimitropoulou A 等人最近进行的一项研究表明，比较了 CD147 的 ECD 诱导 MMP-2 的能力，CD147 分子的 I 结构域和 II 结构域在糖基化和非糖基化形式中都证明只有糖基化形式的 CD147 分子能刺激 MMP-2 产生^[115]。像其他含有 Ig 样结构域的分子一样，CD147 分子也有同源相互作用。CD147 分子的同型寡聚是发挥功能的重要活性形式^[116, 117]。天然真核 CD147 蛋白在溶液中完全以寡聚形式存在，原核 CD147 在溶液中大部分以单体形式存在，只有小部分能够形成寡聚体^[7]。原核 CD147 分子虽然不依赖于糖基化修饰进行寡聚，但糖基化修饰促进真核 CD147 分子形成寡聚体。这说明 N-糖基化修饰能促进可溶性 CD147 分子的寡聚，从而维持蛋白的高级空间构象，保持其诱导 MMPs 分泌的活性^[95]。

(2) N-糖基化在 CD147 分子的蛋白折叠及向质膜转运中的作用

作为跨膜蛋白，质膜上的 CD147 分子和少量细胞外分泌的 CD147 分子均能够诱导 MMP 分泌^[7]。目前研究表明 CD147 分子从细胞表面分泌存在两种可能机制：囊泡脱落和蛋白水解切割，分别产生全长可溶性的 CD147 分子以及缺乏跨膜区或胞质结构域的 CD147 分子^[118-120]。细胞膜上的 CD147 分子和细胞条件培养基中的 CD147 分子都是成熟完全糖基化的形式^[7, 121]，这表明 CD147 分子的糖基化可能对其向细胞表面的转运至关重要。定点突变实验证实，Asn152 上的初始 N-糖基化在内质网中 CD147 分子的质量控制中起关键作用，并且影响其细胞膜定位以及蛋白活性^[122]。我们推测 Asn152 上的 N-糖基化修饰可能直接参与蛋白质折叠或影响蛋白质折叠中 CD147 蛋白和分子伴侣之间的相互作用（如 calnexin, calreticulin 和 BiP）^[122]。鉴于不同物种间三个糖基化位点的高度保守性，各个糖基化位点的功能尚待研究。突变糖基化位点 Asn152 导致异常糖基化的 CD147 分子滞留在内质网中，通过内质网相关蛋白降解（endoplasmic reticulum-associated degradation, ERAD）途径降解^[122]。在正常情况下，LG-CD147 连续转录^[123]，保证 CD147 分子和其他蛋白分子的相互作用以及蛋白质功能的发挥。Tyler 等人进一步阐述了过量的 LG-CD147 的 ERAD 途径，通过质谱分析发现 ER 中的内源性 LG-CD147 是蛋白酶体的底物，通过 OS-9 / SEL1L / Hrd1 途径降解^[124]。

(3) N-糖基化在影响 CD147 分子与其他蛋白质相互作用中的作用

糖基化修饰参与蛋白质相互作用，CD147分子的N-糖基化也调节其与伴侣分子相互结合^[1]。Kato N等人研究发现在肾炎患者白细胞浸润过程中，嗜中性粒细胞的细

胞表面的CD147分子与E-选择素结合，此过程CD147分子的糖基化修饰起到重要作用，抑制CD147分子的N-糖修饰后削弱这种相互作用^[103]。Tang W等的研究表明CD147分子的去糖基化引起CD147分子和小窝蛋白-1之间的相互作用增强，表明CD147分子的糖基化抑制其与小窝蛋白-1的相互作用^[109]。CD147分子的N-糖基化修饰能否影响CD147与其他蛋白质如整联蛋白、MCT和亲环蛋白的相互作用？目前仍有待研究。

多项研究证实，CD147的异常N-糖基化修饰在肿瘤的恶性进展中发挥重要作用^[111, 125]。如Jia L等人发现抑制小鼠肝癌细胞CD147的糖基化使MMP-11的表达下调，细胞的黏附能力下降，而且与较低或者无淋巴结转移能力的肝癌细胞相比，较高淋巴结转移能力的肝癌细胞的HG/LG比值更高^[126]。Beesley AH等人还发现HG-CD147与急性淋巴细胞白血病的复发密切相关^[127]。CD147分子的异常糖基化修饰与人类白血病的多药耐药性相关^[128]。鉴于CD147分子作为高度糖基化的蛋白在肿瘤中的重要作用，揭示其肿瘤相关N-糖组分的功能，以及异常的N-糖基化修饰影响CD147促进肿瘤进展的机制将具有重要意义。

正 文

第一部分 CD147 分子的 $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支水平与肝癌的临床分期和转移的相关性

在肿瘤发生发展过程中， $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支表达异常升高，这种糖成分结构是参与肿瘤转移以及恶性转型的关键糖结构^[51]。CD147 分子是一个高度 N-糖基化修饰的跨膜蛋白， $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支是其糖修饰的一种^[7]。作为 MMP 诱导因子，CD147 分子主要通过诱导 MMPs 分泌促进肿瘤细胞的侵袭转移^[7, 114]。目前对 CD147 N-糖基化修饰的研究集中于不同糖基化形式的 CD147 对诱导 MMPs 分泌的意义^[111]，而具体的糖修饰对其功能的影响以及内在的分子机制并不清楚。研究 $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支对 CD147 分子功能的影响以及生物学意义，为靶向 CD147 分子的肿瘤诊疗提供了一种新的策略。

1 材料

1.1 细胞系

人肝细胞肝癌 HepG2 细胞来源于美国 ATCC。人肝细胞肝癌 Huh-7 细胞来源于日本 JCRB 细胞库。

1.2 主要仪器

6 孔、12 孔、24 孔培养板（美国 Costar 公司）

细胞培养箱（Thermo Fisher 公司）

细胞计数仪（美国 Invitrogen 公司）

Dish（NEST 公司）

倒置显微镜（日本 Olympus 公司）
PVDF 膜（0.45 μm ，美国 Millipore 公司）
Mini Trans-Blot 转移电泳槽（美国 Bio-Rad 公司）
Western 化学发光检测系统（日本 Kodak 公司）
垂直电泳槽，电泳仪（美国 Bio-Rad 公司）
荧光显微镜（日本 Olympus 公司）
NanoDrop 2000 超微量分光光度计（Thermo Fisher 公司）
激光共聚焦显微镜（日本 Nikon 公司）
-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱（日本 SANYO 公司）
Delta 320 pH 计（梅特勒-托利多公司）
PCR 仪（美国 Bio-Rad 公司）
Agilent Mix3005p 实时荧光定量 PCR 仪（美国安捷伦公司）

1.3 主要缓冲液

0.1M 磷酸盐缓冲液（10 \times PBS，pH 调至 6.86）

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	37.3g
$\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$	4.3g
NaCl	72g

TBST 溶液（10 \times TBS，pH 7.5）

20 mM Tris	2.42g
0.5 M NaCl	8.0g 定容至 1L，加 500 μL Tween-20

电泳缓冲液（5 \times ）

SDS	5g
Gly	94g
Tris	15.1g

电转缓冲液

Tris	3.03g
甘氨酸	14.4g
CH_3OH	100mL 定容至 1L

1.4 主要试剂

试剂 (货号)	生产商
胎牛血清	杭州四季青公司
RPMI-1640 培养基	Gibco 公司
蛋白 Marker	NEB 公司
Matrigel	BD 公司
Anti-Biotin 鼠单抗[Hyb-8] (ab201341)	Abcam 公司
DMEM 高糖培养基	Sigma 公司
胰酶细胞消化液	
β -巯基乙醇	
苦马豆碱 (s9263)	
Avidin-HRP (A3151)	
生物素化的凝集素 PHA-L (B-1115)	Vector 公司
凝集素 LCA (B-1045)	
Trizol	Invitrogen 公司
Lipofectamine TM 2000	
免疫组织化学染色试剂盒	
Alexa Fluor [®] 488-conjugated donkey anti-rabbit IgG (A21206)	Pierce 公司
Alexa Fluor [®] 555-conjugated donkey anti-mouse IgG (A31570)	
PMSF	杭州华安生物技术有限公司
RIPA 细胞裂解液	
SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒	
CD147 兔多抗	本实验室制备
HAb18G 鼠单抗 (IgG1)	
α -tubulin 鼠单抗	
反转录试剂盒 (R6934-01)	Omega, Bio-Tek
SYBR [®] Premix Ex Taq TM (DRR081A)	Takara

2 方法

2.1 细胞培养

人肝癌细胞 HepG2 和 Huh-7 细胞用 DMEM 培养基培养。培养基中加入 10% 的胎牛血清，2 mM 谷氨酰胺，100 $\mu\text{g/ml}$ 青霉素和 100 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素。细胞置于 37 $^{\circ}\text{C}$ ，5% CO_2 孵箱内培养，隔天换液一次，视生长状况 3-4 天传代。

细胞 RNA 干涉实验步骤如下：

- 1) 铺种细胞 (Huh-7 和 HepG2)。消化生长状态良好的对数期细胞，以 5×10^5 个细胞/孔的密度种到 6 孔板里，加入含有 10% 胎牛血清的完全培养基，培养过夜。第二天观察细胞贴壁是否充分及生长状况。
- 2) 至细胞贴壁完全时，取 5 μL LipofectamineTM 2000 加入到 250 μL 不含血清的 DMEM 中，混匀，室温放置 5min。同时，将 75 pmol siRNA 加入到 250 μL 不含血清的 DMEM 中，混匀，室温放置 5min。
- 3) 混合含有 LipofectamineTM2000 以及 siRNA 培养基，室温放置 20min。
- 4) 将准备好的细胞弃去培养基，用不含血清的 DMEM 洗两次，然后将混匀的干涉片段加入到 6 孔板中，37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 6h。
- 5) 更换含有 10% 胎牛血清的 DMEM 继续培养，48h 后用作后续实验分析。

干涉片段信息如下：

ShRNAs(supplier)	Sequence
MGAT5 pool (ON-TARGET plus, Dharmacon Smart Pool library, Lafayette, CO, USA)	ON-TARGET plus SMART pool siRNA j-011334-09, <i>MGAT5</i> Target Sequence: CAUAAUUCAUUGGCGGAAA
	ON-TARGET plus SMART pool siRNA j-011334-10, <i>MGAT5</i> Target Sequence: AUGAAAGACAUGUGGCGUU
	ON-TARGET plus SMART pool siRNA j-011334-11, <i>MGAT5</i> Target Sequence: CAAAUUAUGCCCAAUCGAA
Control Nonspecific siRNA GenePharma (Shanghai, China)	ON-TARGET plus SMART pool siRNA j-011334-12, <i>MGAT5</i> Target Sequence: CCUGGAAGCUAUCGCAAAU sense, 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'
	antisense, 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'

2.2 蛋白免疫印迹 Western blotting

1) 蛋白样品制备

- A 消化收集 6 孔板中生长良好的细胞至 Ep 管，离心 1000r/min，5min，PBS 洗一遍后离心，弃上清。加入适量裂解液，冰上裂解 30min，4℃离心 12000r/min 15min，收集蛋白上清于新的 1.5ml Ep 管中，做好标记。
- B 根据说明书进行 BCA 蛋白定量，用裂解液 RIPA 调齐样品蛋白浓度。
- C 蛋白样品加入 loading buffer 混匀，煮沸 5min 使蛋白变性，低速离心后置于冰上准备上样。

2) 配制凝胶，上样，SDS-PAGE 电泳。

- A 清洗玻璃板和配套梳齿，晾干备用。根据蛋白分子量大小选择配制分离胶的浓度。组合胶板，加入分离胶，室温约 30min 后，分离胶凝固（低温凝胶时间延长）。然后灌入 5% 的分离胶，小心插入梳齿，避免产生气泡。
- B 装配电泳槽，加入电泳液，小心拔下梳齿。将混匀的等体积蛋白样品小心加至胶孔中，防止蛋白溢出泳道。用彩虹蛋白 marker 隔开重复样品。
- C SDS-PAGE 电泳，80V 电压约 30min 后样品进入分离胶；后以 120V 的电压电泳 90min 使蛋白 Marker 完全分开。

3) 转膜

- A 根据蛋白分子量以及蛋白 marker 切胶，后置入电转液中。剪取合适大小的 PVDF 膜和滤纸，分别放入甲醇和转膜液中待用。
- B 在转膜夹板中依次放入三层滤纸，SDS-PAGE 胶，PVDF 膜，三层滤纸。压平，防止胶和 PVDF 膜接触面出现气泡。按 PVDF 膜朝向正极的方向装配，配置好后以冰浴恒压 100V 转膜，转膜时间根据蛋白分子量大小而定（一般恒压 100V，1kDa/min）

4) 封闭

转膜结束后，标记 PVDF 膜，后放入 5% 脱脂奶粉的 TBST 室温封闭 60min。

5) 孵育一抗

- A 根据抗体说明书，用 TBST 稀释抗体：鼠抗 α -tubulin、HAb18G，兔多抗 CD147，4℃过夜。
- B 洗膜。用 TBST 洗膜 3 次，每次 10min。

6) 孵育二抗

A 按照一定比例稀释 HRP 标记的二抗，室温孵育 60min。

B 用 TBST 洗膜，每次 10min，洗 3 次。

7) ECL 发光

避光配制发光液，发光。

2.3 实时定量 PCR

1) 按照说明书提取总 RNA

A 消化细胞，离心，除去细胞碎片。

B 加入 1mL TRIZOL，室温孵育 2-3min。

C 加入 0.2mL 氯仿，剧烈振荡 15s，冰上孵育 10min。

D 4℃离心 15min，12000g/min。

E 转移不超过 80%的水相至新的离心管中，加入 1/3 体积的无水乙醇，剧烈涡旋 15s。

F 反复转移上清（每次不超过 700μL）至完全加到 HiBind RNA 柱子内，室温离心 30-60s。

G 300μL RNA Wash Buffer I，离心弃流穿。加 400μL RNA Wash Buffer I，离心弃流穿。

H 加 500μL RNA Wash Buffer II，离心后加 500μL RNA Wash Buffer II，最大转速离心 2min。

I RNA 洗脱，加入 30-50μL DEPC 水，室温放置 2min 后最大转速离心。

Nano Drop 定量。

2) 反转录

用 Takara 反转录试剂盒进行反转录，反应体系 10μL。

试剂	体积 (μL)
5×PrimeScript Buffer	2
PrimeScript RT Enzyme Mix	0.5
Oligo dT Primer (50μM)	0.5
Random 6 mers (100μM)	0.5
RNase Free dH ₂ O	6.5-x
RNA	x
Total	10

程序如下。

温度	时间
37°C	15min
85°C	5s
4°C	5min
10°C	∞

3) 实时定量 PCR

按照 SYBR Premix Ex Taq (Takara) 进行操作, 结果分析用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法^[129]。MGAT5 的引物由北京华大基因合成。引物 GAPDH, MMP-1, MMP-2, MMP-9 实验室前期在上海生工合成^[130]。

基因名称	引物序列
MGAT5	上游 5'- ACTCTTGGACCATCCTGGGT -3'
	下游 5'- CCGTCCACTGAGGATACCAT -3'

反应体系为 25 μ L

试剂	体积 (μ L)
SYBR Premix Ex Taq	10
cDNA	2
Primer Forward	1
Primer Reward	1
dH ₂ O	11
Total	25

2.5 原位邻位连接技术 (in situ PLA)

使用 Sigma-Aldrich 的 Duolink 试剂盒进行实验。

1) 样品预处理

石蜡组织标本脱蜡, 抗原修复; Dish 培养的细胞用预冷的无菌 PBS 清洗一次, 4% 多聚甲醛室温固定 15min。

2) 封闭

加入山羊血清, 放入 37°C 恒温孵箱封闭 30min。

3) 孵育一抗

弃去封闭液，按合适比例稀释抗体（兔抗 CD147, PHA-L, Anti-biotin），一抗 4℃ 过夜。

4) PLA probe 孵育

A 样品室温放置 30min。用抗体稀释液按 1: 5 稀释比例稀释两种 PLA probe，低速离心混匀。40μL 反应体系：8μL probe PLUS 母液+8μL probe MINUS 母液+24 μL 抗体稀释液。

B 洗一抗。用 washing buffer A 在摇床上摇洗一抗，每次 5min，洗 2 次。

C 加 PLA probe。37℃ 恒温孵育 60min。

5) 连接

A 用高纯水按 1: 5 稀释比例稀释连接母液。40μL 反应体系：8μL 连接母液+31 μL 高纯水。

B 弃去 PLA probe。Washing buffer A 摇床摇洗两次，每次 5min。

C 向稀释好的连接母液中加入连接酶并离心混匀（40μL 反应体系：1μL 连接酶+39μL 连接溶液）。

D 向样品中加入连接-连接酶溶液，37℃ 孵育 30min。

6) 扩增

从此步骤起，开始避光。

A 用高纯水按 1: 5 稀释比例稀释扩增母液。40μL 反应体系：8μL 扩增母液+31.5 μL 高纯水。

B 弃去连接液，摇床摇洗两次，每次 2min。

C 向稀释好的扩增母液中加入聚合酶，离心混匀（40μL 反应体系：0.5μL 扩增酶+39.5μL 扩增溶液）。

D 向样品中加入扩增-聚合酶溶液，37℃ 孵育 150min。

7) 核染色

A Washing buffer B 洗 2 次，每次 10min。

B 0.01×Washing buffer B 洗 1min，洗一次。

C 室温避光干燥样品，约 60min。

D 加入最小体积的 Duolink In Situ Mounting Medium with DAPI。此过程避免气

泡产生。

8) 成像

用 PBS: 甘油=1:1 封片。放在荧光显微镜下观察，拍照。

9) 分析

用 Duolink ImageTool 分析成像照片，统计。

2.8 免疫荧光

1) 用无菌 PBS 将种好细胞的 Dish 浸洗三次，每次 5min。

2) 固定。用 4% 的多聚甲醛固定细胞 15min，PBS 浸洗 3 次，每次 5min。

3) 封闭。山羊血清室温封闭 60min。

4) 孵育一抗，4℃过夜。PBS 洗三次，每次 5min。

5) 按比例稀释二抗，37℃孵育 180min。PBS 洗三次，每次 5min。

6) 复染核。加入稀释好的 DAPI，室温染 30min。PBS 洗三次，每次 5min。

7) 观察并拍照。

2.9 免疫组化

HCC 病例样本来源于第二军医大学上海东方肝胆医院，所有的病人都签订知情同意书。所有与病人相关的实验都符合第四军医大学伦理学声明规定。

1) 烤片。60℃过夜，或者 80℃烘烤 120min。

2) 脱蜡浸水。二甲苯 (15min×3)，无水乙醇 (5min×2)，95% 乙醇 (5min)，95% 乙醇 (5min)，90% 乙醇 (2 min)，85% 乙醇 (2 min)，75%乙醇 (2 min)，自来水稍冲洗 (5 min)。

3) 抗原修复。高压锅煮沸抗原修复液，放入切片，待高压锅上汽后计时 2min 后，停止加热，自然冷却至室温。

4) 自来水冲洗 5min，内源性过氧化物酶封闭液封闭 10min。

5) 自来水冲洗 5min→PBS 浸泡 5min→山羊血清室温封闭 20min。

6) 一抗 4℃过夜。

7) PBS 洗三次，每次 5min。加广谱二抗 (试剂 B)，室温 20min。

8) PBS 洗三次，每次 5min。加三抗 (HRP-streptavidin)，室温 20min。

9) PBS 洗三次，每次 5min。

10) DAB 显色，自来水轻洗终止显色。

- 11) 苏木素染核 10min, 自来水冲洗
- 12) 分化。1% HCl-75% 乙醇分化 3s, 自来水冲洗 5min。
- 13) 返蓝。PBS 浸洗 5min, 自来水洗 2min。
- 14) 脱水透明。75% 乙醇(2min), 85% 乙醇(2min), 90% 乙醇(2min), 95% 乙醇(2min), 95% 乙醇(5min), 无水乙醇(5min×2), 二甲苯(5min×2)。
- 15) 中性树脂封片, 显微镜下观察。

2.10 Transwell 侵袭实验

- 1) 冰上融化 Matrix 胶, 用无血清的 DMEM 按一定比例稀释 Matrix 胶, 将其放在 24 孔板内的 Transwell 小室中央, 在 37℃ 放置 3h 使其凝固。
- 2) 消化对数期细胞, 用无血清培养基重悬计数。每孔铺 5×10^4 个细胞, 24 孔板内加入含有 10% 胎牛血清的 DMEM, 37℃ 培养。
- 3) 24h 后, 取出小室, 用棉签轻轻擦净未穿过的细胞。95% 乙醇固定 5min, 0.4% 结晶紫染色 15min。
- 4) 用清水洗净小室, 擦干。
- 5) 随机选取视野, 镜下计数, 统计分析。

2.11 统计分析

所有的实验至少重复 3 次, 结果用 mean ± SD 形式表示。用 SPSS 软件和 GraphPad Prism 5 软件进行统计分析。数据分析采用 t 检验或者 ANOVA 方法, 当 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 CD147 $\beta 1$, 6 N-乙酰氨基葡萄糖分支修饰在肝癌中高表达

CD147 分子作为一个肿瘤相关抗原, 高表达于癌与癌旁组织中(图 1.1A)。我们先前研究中发现肺癌组织中的 CD147 主要包含核心岩藻糖和 $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支这两种糖成分, 而在肝细胞肝癌上 CD147 的 N-糖成分构成并不清楚^[7]。我们选取 14 例肝细胞肝癌病人样本进行凝集素组织化学染色发现, 在肝细胞肝癌组织上, $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支修饰高表达, 而核心岩藻糖低表达甚至不表达(图 1.1A)。这一结果印证前人的研究: 核心岩藻糖在肝细胞肝癌上表达不具有普遍性^[1]。

在癌旁组织中，这两种糖成分均是高表达的。所以我们选取 $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支进行进一步研究。免疫荧光的结果表明， $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支和 CD147 分子在肝癌细胞中均为高表达，且二者存在共定位（图 1.1B）。为了在肝癌组织中原位检测 CD147 分子的糖基化修饰，我们在实验室首次成功运用原位邻位连接技术（*in situ* PLA）定量检测 CD147 分子的 $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支修饰^[131, 132]。PLA 实验的结果表明，在肝癌组织中 CD147 分子的 $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支呈强阳性信号（图 1.1C）。

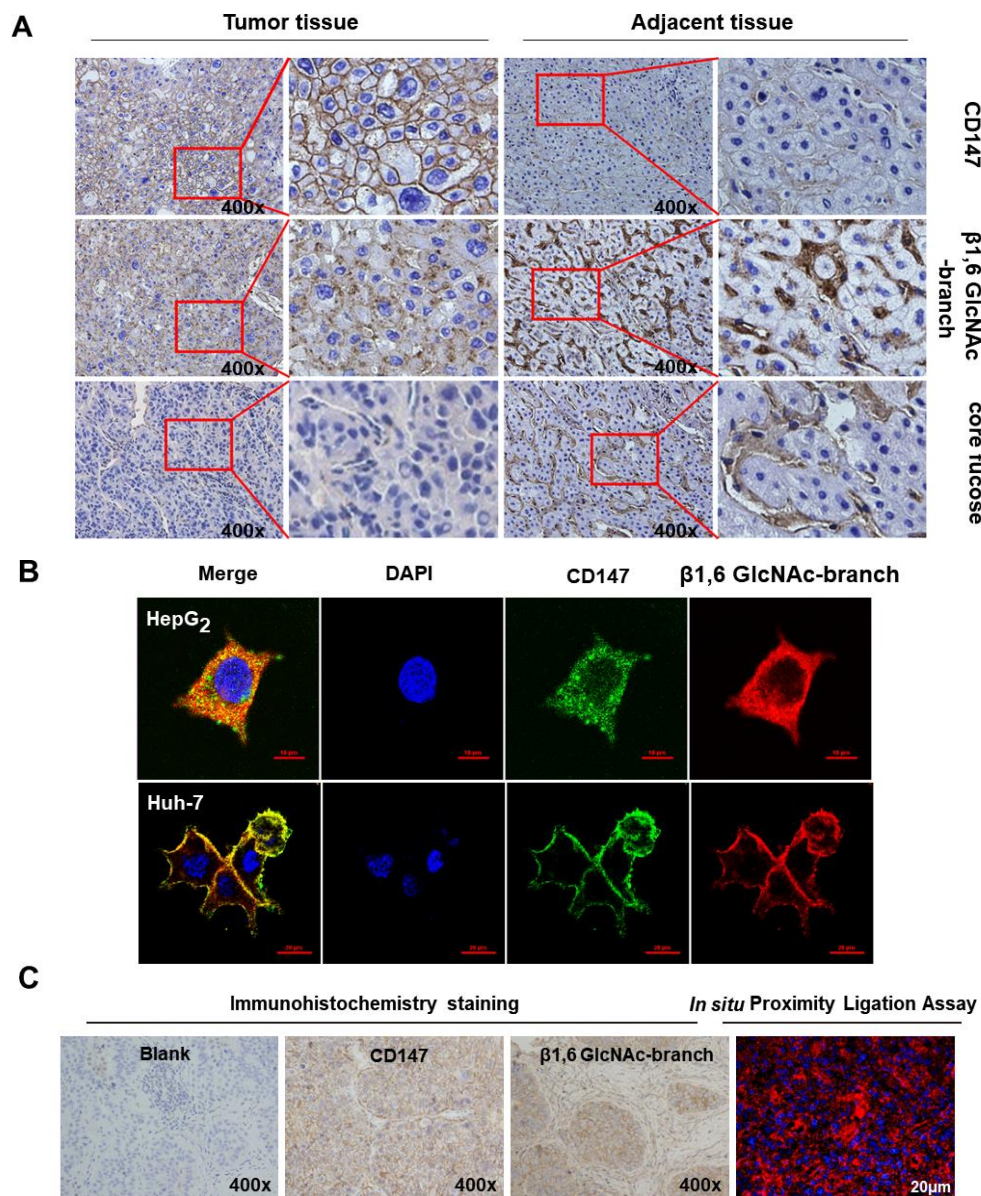


图 1.1 CD147- $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支修饰在肝癌组织和细胞中高表达

(A) 免疫组化染色代表图: HAb18G/CD147, β 1, 6 N-乙酰氨基葡萄糖分支以及核心岩藻糖在肝细胞肝癌组织以及癌旁组织中表达 (放大倍数 400 \times , $n=14$)。14 例肝癌组织均均为 β 1, 6 N-乙酰氨基葡萄糖分支阳性, 1 例肝癌组织核心岩藻糖阳性。所有的癌旁组织都表达 β 1, 6 N-乙酰氨基葡萄糖分支和核心岩藻糖。(B) 免疫荧光检测肝癌细胞 HepG2 和 Huh-7 上的 CD147 分子(绿色)以及 β 1, 6 N-乙酰氨基葡萄糖分支(红色)的表达 (HepG2 标尺=10 μ m, Huh-7 标尺=20 μ m)。(C) 对同一例肝癌组织分别进行免疫组化染色和原位邻位连接 (*in situ* PLA) 分析, 免疫组化结果显示 HAb18G/CD147 分子和 β 1, 6 N-乙酰氨基葡萄糖分支的表达, PLA 荧光信号结果显示 CD147 分子的 β 1, 6 N-乙酰氨基葡萄糖分支修饰 (免疫组化放大倍数 400 \times , 免疫荧光标尺= 20 μ m)。

3.2 CD147 分子的 β 1, 6 N-乙酰氨基葡萄糖分支与肝癌临床分期和转移的相关性

为了研究 CD147 的 β 1, 6 N-乙酰氨基葡萄糖分支修饰在肝癌恶性进展中的意义, 我们选取了 51 例肝癌病人标本进行 PLA 染色, 定量分析 CD147 的 β 1, 6 N-乙酰氨基葡萄糖分支的表达, 并统计分析其表达与肝癌病人的性别, 年龄, 肿瘤大小, 个数, 门静脉血栓 (PVT), 巴塞罗那分期 (BCLC), 血清甲胎蛋白 (AFP) 等临床资料的相关性。统计结果表明, CD147 分子的 β 1, 6 N-乙酰氨基葡萄糖分支的表达与肝癌病人的 BCLC 分期显著正相关 (表 1, $P=0.016$)。进一步分析发现 CD147 分子的 β 1, 6 N-乙酰氨基葡萄糖分支表达水平与其恶性转移程度呈正相关。高转移的 BCLC 分期 C 期的肝癌组织中 CD147 分子的 β 1, 6 N-乙酰氨基葡萄糖分支表达显著高于其在 0-A 期的低转移肝癌组织中的表达 ($P=0.002$, 图 1.2A), 而且这种修饰程度与肿瘤的进展程度有关 (图 1.2B)。结果表明, CD147- β 1, 6 N-乙酰氨基葡萄糖分支修饰可能促进肝癌的进展和转移。

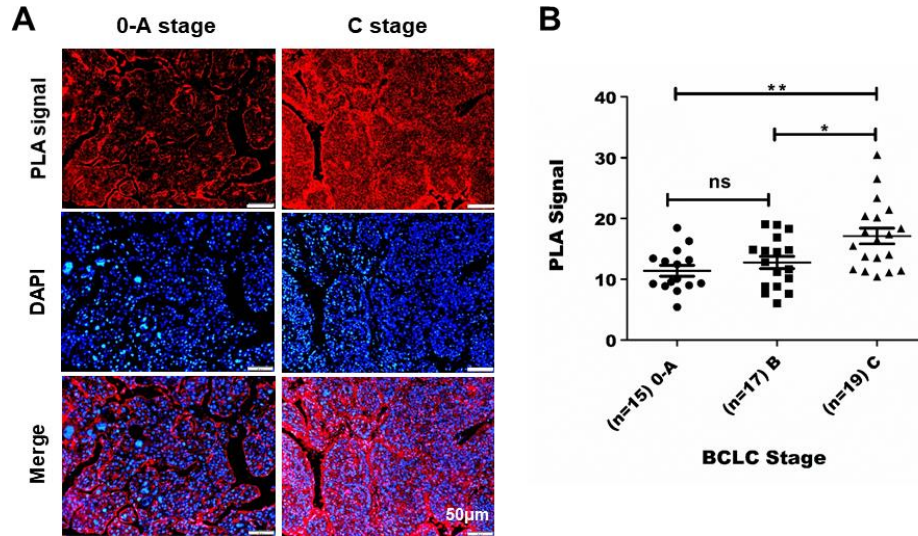


图 1.2 PLA 技术检测 CD147- β 1, 6 N-乙酰氨基葡萄糖组分在不同 BCLC 分期的肝癌组织样本中的表达

(A) 原位邻位连接检测肝细胞肝癌组织不同分期(0-A 期, C 期)的 CD147 分子的 β 1, 6 N-乙酰氨基葡萄糖分支的代表图, 红色: PLA 信号, 蓝色: DAPI。标尺=50 μ m。(B) 统计分析比较肝癌组织不同 BCLC 分期的 PLA 信号(即 CD147 的 β 1, 6 N-乙酰氨基葡萄糖分支的表达情况)。数据分析采用 One-way ANOVA 方法, * P <0.05, ** P <0.01。

3.3 糖基转移酶 GnT-V 催化的 CD147 分子 β 1, 6 N-乙酰氨基葡萄糖组分促进 HCC 细胞侵袭的功能研究

为进一步证实 CD147- β 1, 6 N-乙酰氨基葡萄糖分支修饰可能促进肝癌的侵袭转移, 我们在肝癌细胞中检测了 GnT-V 催化的 CD147 分子糖基化修饰对细胞侵袭功能的影响。在肝癌细胞 HepG2 和 Huh-7 中加入 1 μ g/mL 苦马豆碱(抑制 β 1, 6 N-乙酰氨基葡萄糖分支的合成)处理 48h (图 1.3A), 或者用干涉片段瞬时干涉 *MGAT5*, 细胞的侵袭能力明显下降(图 1.3B, C), 再一次证实 β 1, 6 N-乙酰氨基葡萄糖分支与肝癌的转移相关。为进一步检测 β 1, 6 N-乙酰氨基葡萄糖分支对 CD147 分子促转移功能的影响, 我们分别纯化 HepG2 和 Huh-7 细胞中用苦马豆碱抑制糖合成的 CD147 蛋白以及未加处理的天然 CD147 蛋白, 再用纯化的蛋白作用于肝癌细胞, 实时定量 PCR 检测 MMPs 的基因表达(图 1.3D, E)。实时定量结果显示: 与天然的 CD147 相比, 苦马豆碱处理后的 CD147 蛋白刺激 *MMP-1*, *MMP-2* and *MMP-9* 的分泌能力明显下降。这说明: CD147 分子的 β 1, 6 N-乙酰氨基葡萄糖分支促进肝癌细

胞的侵袭转移。

表 1 CD147-β1, 6 N-乙酰氨基葡萄糖分支修饰与肝癌病人临床资料的相关性 (n=51)

Variable	PLA Signal CD147/PHA-L	
	Median (Minimum-Maximum)	<i>P</i> value
Sex		
Male (n=38)	13.48 (5.41-30.48)	0.375
Female (n=11)	11.43 (8.07-18.37)	
Age (Years)		
<50 (n=22)	11.63 (5.41-30.80)	0.829
≥50 (n=15)	12.8 (6.04-20.40)	
Liver cirrhosis		
Yes (n=30)	13.64 (5.41-30.48)	0.335
No (n=19)	11.43 (7.59-20.40)	
BCLC stage		
0-A (n=15)	10.05 (5.41-17.65)	0.016
B-C (n=36)	14.60 (6.04-30.48)	
PVT		
Yes (n=9)	13.54(10.42-20.40)	0.242
No (n=26)	12.00 (6.04-26.54)	
Number of tumors		
<3 (n=44)	12.63 (5.41-30.48)	0.133
>3 (n=5)	15.49 (13.54-18.37)	
Tumor size (cm)		
≤5 (n=19)	12.46 (5.41-18.45)	0.080
>5 (n=31)	14.28 (6.04-30.48)	
Serum AFP (μg/l)		
≤25 (n=10)	12.06 (7.59-18.32)	0.178
>25 (n=38)	13.80 (5.41-30.48)	

统计学分析组间差异用 Wilcoxon 符号秩检验。

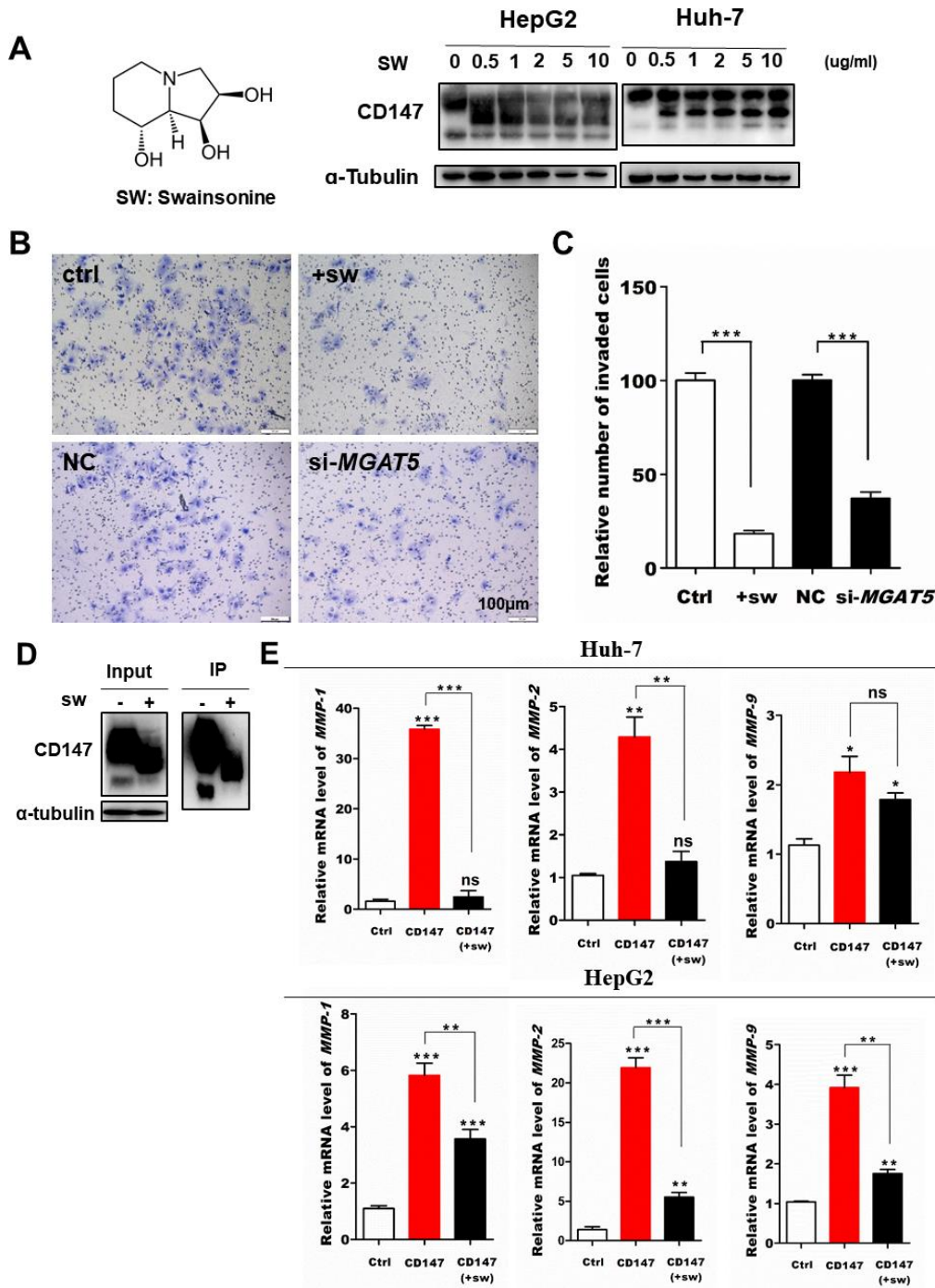


图 1.3 CD147- β 1, 6 N-乙酰氨基葡萄糖分支促进 HCC 细胞的侵袭转移

(A) 左: 苦马豆碱的化学结构。右: 不同浓度苦马豆碱的作用下 CD147 分子的表达。(B-C) 苦马豆碱作用及干涉 *MGAT5* 对 Huh-7 细胞侵袭能力的影响。(B) 侵袭小室实验的代表性结果图 (C) 加入 1 μ g/ml 苦马豆碱 48 h 抑制 β 1, 6 N-乙酰氨基葡萄糖分支, 以及干涉 *MGAT5* 对 Huh-7 细胞的侵袭能力影响的统计结果。(D) 免疫沉淀法纯化肝癌细胞 (Huh-7 混合 HepG2) 中, 加入苦马豆碱处理和未加处理的 CD147 蛋白, Western-blot 检测 CD147 分子的表达。(E) 向生长

良好的 HepG2 和 Huh-7 细胞中分别加入 1 $\mu\text{g/ml}$ 纯化的加苦马豆碱及未加苦马豆碱作用的 CD147 蛋白, 作用 24 h 后, 实时定量 PCR 分别检测 *MMP-1*, *MMP-2* and *MMP-9* 的 mRNA 水平 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)。

4 讨论

GnT-V 催化的 $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支与肿瘤的转移密切相关^[3], 在我们的 Transwell 侵袭实验中也证实了这一点 (图 1.3B, C)。在胃癌研究中发现, GnT-V 的表达对 E-cadherin 的定位以及功能具有重要影响^[131]。GnT-V 催化 E-cadherin 发生 $\beta 1, 6$ 分支糖修饰引起 E-cadherin 错误组配及黏附功能失调, 影响细胞间黏附及其下游信号通路, 在肿瘤的侵袭转移中发挥重要作用^[3]。抑制 E-cadherin 糖基化位点上的这种糖基化修饰有助于增强 E-cadherin 的功能^[131]。肿瘤相关抗原 CD147 分子作为 GnT-V 催化的受体蛋白之一, 那么 CD147 分子的 $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖在肝癌中是否具有重要意义? 目前尚不清楚。我们的研究首次运用邻位原位连接技术, 在肝癌组织中原位定量检测 CD147 分子的 $\beta 1, 6$ 分支糖组分, 并证实其在肝癌组织中是高表达的 (图 1.1C)。在此基础上我们分析了 CD147 分子的 $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖修饰与肝癌病人的临床资料的相关性, 结果发现 CD147 分子的 $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖修饰程度与肝癌的巴塞罗那分期呈正相关, 这一结果提示 CD147- $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖修饰与肝癌进展密切相关, 其修饰可能起到促进肝癌转移的功能。我们在肝癌细胞系上的功能实验进一步证实了这一结论: $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖修饰的 CD147 分子可以通过诱导基质金属蛋白酶分泌促进肿瘤细胞的侵袭转移。

肿瘤糖生物学相关研究显示, 肝癌患者血清中甲胎蛋白发生高度岩藻糖基化, 这对肝癌的诊断具有重要价值。核心岩藻糖基化的甲胎蛋白 (AFP-L3) 已成为肝癌的临床早期诊断的特异性检测指标。在我们研究中, 利用 PLA 技术在肝癌组织原位检测 CD147 分子的肿瘤相关糖组分, 发现 CD147- $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖修饰与肝癌进展密切相关, 这一结论有助于研发基于 CD147 分子的更特异的新型肝癌早期诊断及预后的标志物。进一步我们可以研究在临床样本上分析 CD147 分子的 $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支糖组分与病人预后 (生存、复发) 的相关性, 明确 CD147 分子 $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支与转移相关的特异性, 从而研发特异性针对 CD147 分

子的 $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支的抗体, 有利于运用免疫组化技术更便捷的进行临床早期诊断, 或运用抗体的封闭作用对肝癌进行精准治疗。在我们研究中, 明确 CD147 分子的 $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖修饰的意义和功能, 这对针对有效的肝癌药物靶点 CD147 的治疗具有重要意义。

第二部分 GnT-V 催化的 CD147 分子 β 1, 6 N-乙酰氨基葡萄糖分支修饰参与肝细胞的 EMT 过程

EMT 作为肿瘤进展过程中的关键驱动因素,通常认为与肿瘤的转移有关^[133, 134]。近年来发现 β 1, 6 N-乙酰氨基葡萄糖分支表达与 EMT 有关^[1]。有研究表明 EMT 过程中, GnT-V 表达上调^[57, 58], 也有相反的报道指出 GnT-V 抑制肺癌细胞 EMT 的发生^[62]。我们实验室先前的研究发现 CD147 分子能促进 EMT 的发生, 而且在 EMT 过程中 CD147 的表达升高^[5]。那么在 EMT 的过程中 CD147 分子的 β 1, 6 N-乙酰氨基葡萄糖分支表达是否上调, 是否参与 EMT 过程? 本部分实验内容主要研究这个问题。

1 材料

1.1 细胞系

人永生化的肝细胞 QZG 来源于中国科学院上海细胞库。

1.2 主要仪器

6 孔、12 孔、24 孔培养板 (美国 Costar 公司)

Dish (NEST 公司)

倒置显微镜 (日本 Olympus 公司)

PVDF 膜 (0.45 μ m, 美国 Millipore 公司)

垂直电泳槽和电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司)

Mini Trans-Blot 转移电泳槽 (美国 Bio-Rad 公司)

Western 化学发光检测系统 (日本 Kodak 公司)

荧光显微镜 (日本 Olympus 公司)

PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司)

Agilent Mix3005p 实时荧光定量 PCR 仪 (美国安捷伦公司)

流式细胞仪（美国 BD 公司）

1.4 主要试剂

试剂（货号）	生产商
胎牛血清	杭州四季青公司
RPMI-1640 培养基	Gibco 公司
蛋白 Marker	NEB 公司
BCA 蛋白定量试剂盒	Pierce 公司
E-cadherin 鼠单抗（610182）	BD 公司
Trizol	Invitrogen 公司
TGF- β 1（100-210）	Prepro Tech
Vimentin 兔多抗（10366-1-AP）	Proteintech
反转录试剂盒（R6934-01）	Omega, Bio-Tek
SYBR® Premix Ex Taq™（DRR081A）	Takara
DMEM 高糖培养基	Sigma 公司
胰酶细胞消化液	
β -巯基乙醇	
苦马豆碱（s9263）	
Avidin-HRP（A3151）	
GnT-V 鼠多抗	
Anti-Biotin 鼠单抗[Hyb-8]（ab201341）	Abcam 公司
GnT-V 鼠多抗（ab87977）	
荧光标记的凝集素 PHA-L（FL-1111,）	Vector 公司
生物素化的凝集素 PHA-L（B-1115）	
PMSF	杭州华安生物技术有限公司
RIPA 细胞裂解液	
SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒	
N-cadherin 兔多抗（ER0503）	
CD147 兔多抗	本实验室制备
HAb18G 鼠单抗（IgG1）	
α -tubulin 鼠单抗	

2 方法

2.1 细胞培养

人肝细胞 QZG 用 RPMI-1640 培养基培养, 培养基中加入 10% 的胎牛血清, 2 mM 谷氨酰胺, 100 $\mu\text{g/ml}$ 青霉素和 100 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素。细胞置于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 孵箱内培养, 隔天换液一次, 视生长状况 3-4 天传代。

2.2 蛋白免疫印迹

- 1) 蛋白样品制备, BCA 定量, SDS-PAGE 电泳, 转膜, 封闭的具体步骤参照第一部分。
- 2) 一抗孵育, 按照合适的比例稀释 GnT-V, E-cadherin, N-cadherin, vimentin, α -Tubulin, anti-CD147, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 后续步骤同第一部分。

2.3 实时定量 PCR

具体步骤参照第一部分。*MGAT5* 的引物由北京华大基因合成。引物 *GAPDH*, 实验室前期在上海生工合成。

基因名称	引物序列
<i>MGAT5</i>	上游 5'-ACTCTTGGACCATCCTGGGT-3'
	下游 5'-CCGTCCACTGAGGATACCAT-3'

2.4 流式细胞术

- 1) 收集细胞, PBS 悬浮细胞并计数。
- 2) PBS 洗两次, 避光加入荧光标记的 PHA-L (1:500), 孵育 30min。
- 3) PBS 洗两次, 离心。
- 4) 加入 300 μL 的 PBS, 上机检测。

2.5 原位邻位连接技术

具体操作步骤参照第一部分

2.6 Crosslink Immunoprecipitation

使用 Thermo Scientific 试剂盒 (26147) 进行此部分实验。

- 1) 将抗体结合到 Protein A/G Plus 树脂
 - A 准备 2ml 1 \times Coupling Buffer (纯水稀释 20 \times Coupling Buffer) 备用。
 - B 轻悬瓶底获得均一的 Pierce Protein A/G Plus 树脂悬浮液。用截短的中枪头吸

- 取 40 μ L 树脂加入 Pierce 离心柱中，将柱子放入微量离心管中，1000 \times g 离心 1min，弃流穿。
- C 用 1 \times Coupling Buffer 洗两次，离心，弃掉流穿液。盖上底塞。
- D 准备 50 μ g CD147 的抗体 HAb18G 进行交联。(100 μ L 体系: 10 μ L 的 HAb18G (5 μ g/ μ L) +5 μ L 20 \times Coupling Buffer+85 μ L 纯水) 将抗体溶液加入含有树脂的离心柱中，旋紧螺旋盖，放于旋转器上室温旋转 60min。
- E 去盖离心，保留流穿。用 100 μ L 1 \times Coupling Buffer 洗树脂一次，离心弃流穿。然后用 300 μ L 1 \times Coupling Buffer 洗树脂两次，弃流穿。
- 2) 交联抗体
- A 配制 2.5Mm DSS (用 DMSO 稀释 DSS, DSS: DMSO=1: 10)。
- B 盖上底盖，向柱内加入 50 μ L 反应溶液旋紧螺旋盖 (50 μ L 溶液体系: 2.5 μ L 20 \times Coupling Buffer, 9 μ L 2.5Mm DSS, 38.5 μ L 纯水)。旋转器室温旋转 60min。
- C 将柱子放于收集管中，离心。加 50 μ L 洗脱液并离心。
- D 终止交联反应。用 100 μ L 洗脱液洗两次，每次洗后离心弃流穿。
- E 用 200 μ L 预冷的 IP lysis/Wash Buffer 洗两次备用，每次洗后离心。
- 3) 蛋白裂解液制备
- A 收集细胞悬液并离心 1000 \times g 5min，弃碎片。PBS 重悬细胞后离心。
- B 加入适量 IP lysis/Wash Buffer 震荡混合，然后放于冰上裂解 30min。
- C 13000 \times g 离心 15min，将蛋白上清转移至新的收集管中，BCA 蛋白定量后放于冰上备用。
- 4) 裂解液预处理
- A 向新的离心柱中加适量的对照树脂 (每毫克蛋白裂解液加入 80 μ L 空白树脂处理)，离心。
- B 向含有对照树脂的离心柱中加入裂解液，室温旋转 30min。
- C 1000 \times g 离心 1min，收集流穿备用。
- 5) 抗原免疫沉淀
- A 将交联抗体的柱子盖上底塞，向柱内加入 300-600 μ L 裂解液 (BCA 定量蛋白量约为 500-1000 μ g)，旋紧螺旋盖，4 $^{\circ}$ C 旋转过夜。
- B 去盖离心收集流穿，留作后续分析结果。

C 将柱子置于新的收集管中，用 200 μ L IP lysis/Wash Buffer 洗一次，1 \times TBS 洗 4-6 次，每次洗后离心弃流穿。后用 200 μ L IP lysis/Wash Buffer 洗两次，洗后离心，再用 100 μ L Condition Buffer 洗一次。

6) 抗原洗脱

A 将柱子放于新的收集管中，加入 10 μ L 洗脱液离心。

B 向柱内加 50 μ L 洗脱液(在需要洗脱高浓度蛋白的情况下，适量减少洗脱液)，室温孵育 5min。

C 离心收集洗脱液，分析洗脱下来的抗原。然后用免疫蛋白印记和凝集素印记检测。

2.7 凝集素印记

1) 蛋白样品制备

A 消化收集生长状态良好细胞。

B 加 RIPA 裂解液冰上裂解 30min，4 $^{\circ}$ C 离心 12000r/min 15min，转移上清。

C BCA 蛋白定量，调齐蛋白浓度。

D 加 Loading Buffer，煮沸变性。

2) SDS-PAGE 电泳

A 凝胶配制。

B 加样电泳。80V，30min；120V，150min。

3) 转膜，步骤同前。以 100V 电压转膜 60min。

4) 封闭。含有 3%BSA 的 PBS 封闭 60min。

5) 用封闭液稀释生物素化的 PHA-L，4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBST 摇洗三次，每次 10min。

6) 按比例 1:1000 稀释生物素化的 HRP，室温孵育 60min，TBST 洗三次，每次 10min。

7) ECL 发光。

2.8 免疫组化染色

具体方法同第一部分。组织芯片扫描由谷歌生物公司完成。组织芯片扫描仪扫描成像，完成后利用 Quant center 软件进行分析。组织切片上所有的深棕色为强阳性，棕黄色为中度阳性，浅黄色为弱阳性，蓝色细胞核为阴性。进而对每个组织点进行识别分析出强阳性，中度阳性，弱阳性及阴性的面积（单位：像素），阳性的百分比，及最后进行 H-score 的评分。

2.9 统计学分析

所有的实验至少重复3次,结果用 mean±SD 形式表示。用 SPSS 软件和 GraphPad Prism 5 软件进行统计分析。数据分析采用 t 检验方法,当 $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 肝癌进展过程中 GnT-V, E-cadherin 和 N-cadherin 的表达相关性

为证实 GnT-V 的表达与 EMT 有关,我们首先用免疫组化的方法检测不同肝癌进展过程(正常人肝、肝硬化、远端/癌旁/肝癌原发灶(临床 1 期 2 期 3 期 4 期)、肝癌转移灶)的组织芯片的 GnT-V 和 E-cadherin 以及 N-cadherin 的表达情况。如图 2.1A, B 所示, GnT-V 的表达与 E-cadherin 表达整体呈负性相关,相对于高表达 GnT-V 的情况下,低表达 GnT-V 时的 E-cadherin 表达相对较高。同时,我们发现 GnT-V 的表达与 N-cadherin 表达整体呈正相关, GnT-V 高表达时, N-cadherin 的表达相对较高。这一结果提示 GnT-V 的表达可能与 EMT 过程有关。

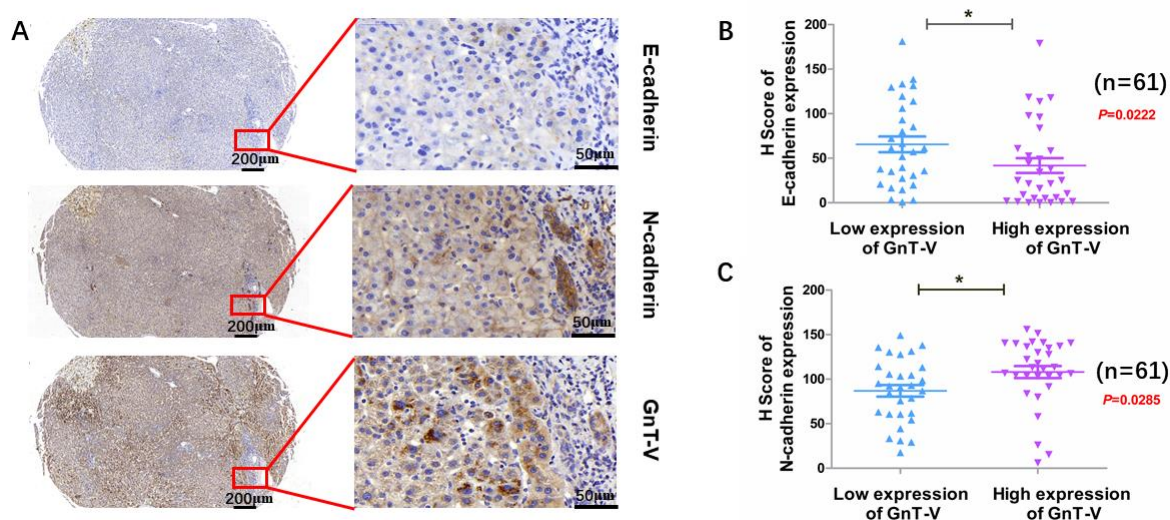


图 2.1 肝癌进展过程中 GnT-V, E-cadherin 和 N-cadherin 的表达情况

(A) 同一例组织上表达 GnT-V, E-cadherin 和 N-cadherin 的免疫组化染色代表图。(B) 统计分析 (A) 结果, 分析肝癌进程中的 GnT-V 与 E-cadherin 表达情况。GnT-V 的表达与 E-cadherin 表达整体趋势相反。用 GnT-V 免疫组化染色评分 H Score 的中位数将标本分为低表达 GnT-V (\leq 中位数), 高表达 GnT-V ($>$ 中位数) 两组。(n=61, $P=0.0222<0.05$)。(C) 统计分析 (A) 结果,

分析肝癌进程中的 GnT-V 与 N-cadherin 表达情况。GnT-V 的表达与 E-cadherin 表达整体趋势一致。(n=61, $P=0.0285<0.05$)。

3.2 肝细胞发生 EMT 过程中 GnT-V 及其催化产物表达增加

用 2.5 ng/ml 细胞因子 TGF- β 1 刺激人的永生化肝细胞 QZG 24h, 细胞上皮标志物 E-cadherin 表达下调, N-cadherin 和 vimentin 表达上调, 证实 QZG 细胞发生上皮间质转化, 免疫蛋白印记结果显示 GnT-V 的蛋白表达水平上调 (图 2.2A)。进一步我们用实时定量 PCR 检测其编码基因 *MGAT5* 的 mRNA 在此过程中的变化, 结果表明 *MGAT5* 表达上调 (图 2.2B)。然后我们用荧光标记的凝集素 PHA-L 标记细胞表面 GnT-V 的催化产物 β 1, 6 N-乙酰氨基葡萄糖分支修饰, 流式细胞仪检测其表达, 结果表明 β 1, 6 N-乙酰氨基葡萄糖分支水平与 GnT-V 的基因、蛋白水平变化一致 (图 2.2C, D)。以上结果说明, TGF- β 1 诱导 QZG 细胞发生 EMT, 糖基转移酶 GnT-V 及其催化的 β 1, 6 N-乙酰氨基葡萄糖分支修饰表达上调。

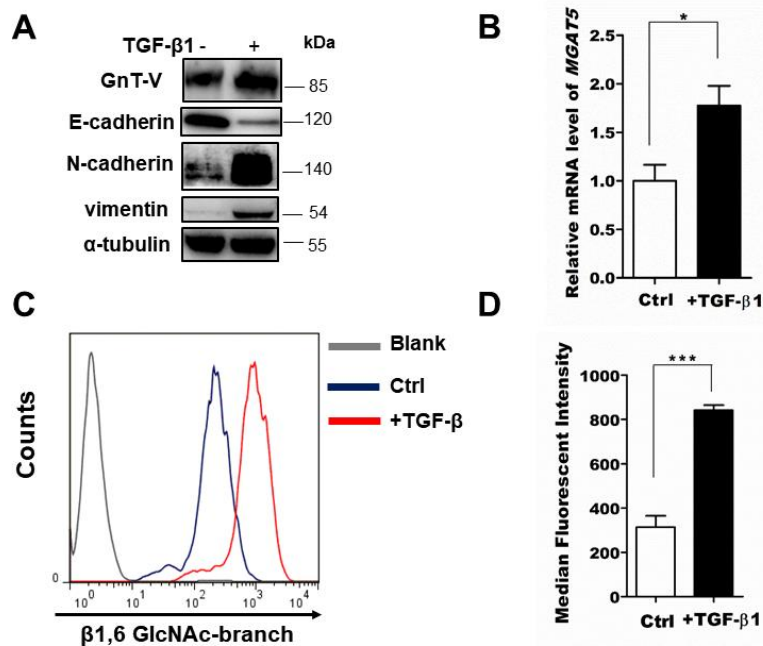


图 2.2 糖基转移酶 GnT-V 及催化产物在 TGF- β 1 诱导肝细胞发生 EMT 时表达上调

(A) 2.5 ng/ml TGF- β 1 处理细胞 24h 后, Western blotting 检测 E-cadherin, N-cadherin, vimentin 和糖基转移酶 GnT-V 表达情况。(B) 2.5 ng/ml TGF- β 1 处理细胞 24h, 实时定量 PCR 检测 GnT-V 的编码基因 *MGAT5* 的 mRNA 表达情况。GAPDH 作为内参。(C) 2.5 ng/ml TGF- β 1 刺激细胞 24h, 用荧光标记的凝集素 PHA-L 标记细胞膜表面 β 1, 6 N-乙酰氨基葡萄糖分支, 流式细胞仪检

测其表达。(D) 流式检测荧光强度的统计结果 (* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$)。

3.3 肝细胞发生 EMT 过程中 CD147 分子的糖基化水平增加

我们先前的研究发现 TGF- β 1 诱导肝细胞发生 EMT 过程中 CD147 的表达上调, 在本研究中, 我们用免疫蛋白印记法再一次证实这一结论 (图 2.3 A, B)。然后我们用 HG-CD147/LG-CD147 比衡量 CD147 分子的 N-糖基化修饰在 EMT 过程中的变化。三次以上重复实验, 灰度扫描统计分析发现 CD147 的 N-糖基化修饰水平在 EMT 过程中上调, HG-CD147 表达增加 (图 2.3 C)。

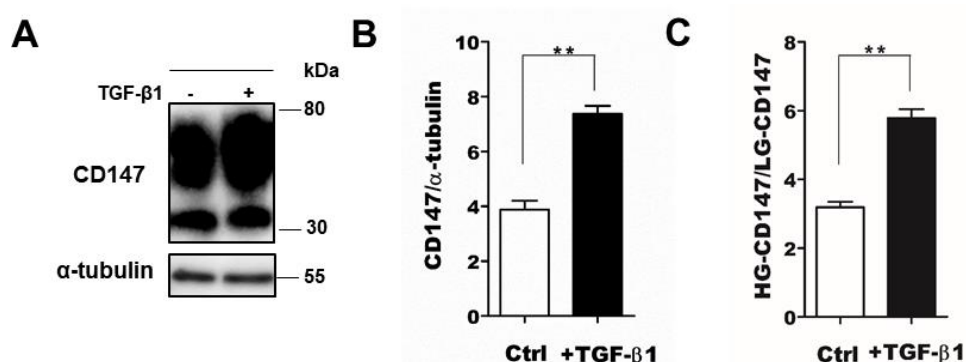


图 2.3 TGF- β 1 诱导肝细胞发生 EMT 过程中 CD147 分子的 N-糖基化水平表达上调

(A) Western blotting 检测 TGF- β 1 诱导 QZG 细胞发生 EMT 前后 CD147 分子的表达。(B) 对免疫印迹法检测 CD147 蛋白水平表达的统计结果。(C) TGF- β 1 诱导 QZG 细胞发生 EMT 的高糖基化 CD147 (HG-CD147)/低糖基化 CD147 (LG-CD147) 统计结果 (* $P<0.05$, ** $P<0.01$)。

3.3 肝细胞发生 EMT 过程中 CD147 分子的 β 1, 6 N-乙酰氨基葡萄糖分支表达增加

为进一步检测糖基转移酶 GnT-V 催化的 CD147 分子的 β 1, 6 N-乙酰氨基葡萄糖分支修饰的表达, 我们采用 PLA 技术原位检测 QZG 细胞在 TGF- β 1 诱导前后的糖分支表达, 红色亮点代表其修饰。结果发现 TGF- β 1 诱导 QZG 细胞发生 EMT 后, CD147- β 1, 6 N-乙酰氨基葡萄糖分支修饰表达明显升高 ($P<0.001$, 图 2.4 A, B)。然后我们用免疫沉淀 (IP) 纯化 CD147 分子, 蛋白免疫印迹以及凝集素印记检测到 CD147 分子及其 β 1, 6 N-乙酰氨基葡萄糖修饰明显增加 (图 2.4 C)。以上结果说明, TGF- β 1 诱导肝细胞发生 EMT 过程中, CD147 分子的 β 1, 6 N-乙酰氨基葡萄糖分支表达上调。

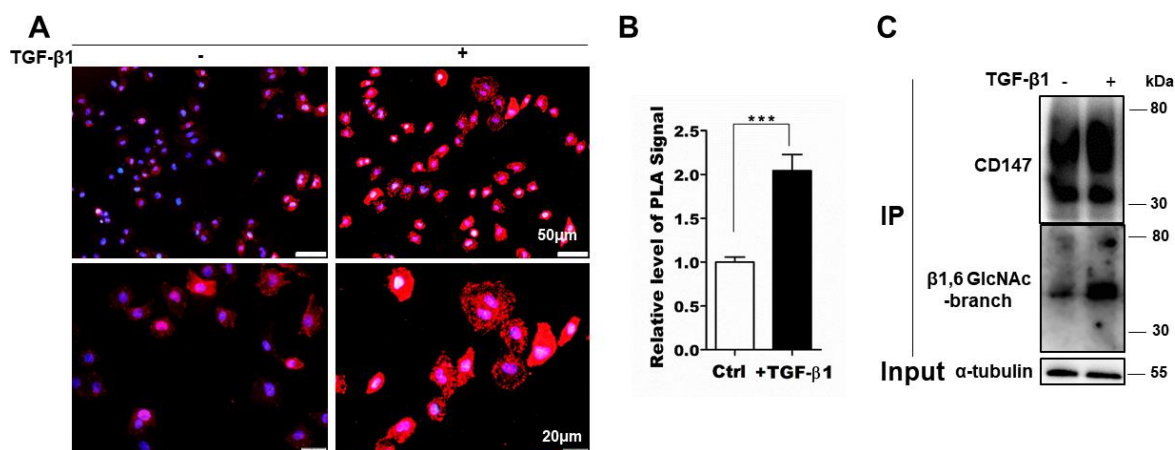


图 2.4 TGF- β 1 诱导肝细胞发生 EMT 过程中，CD147- β 1, 6 N-乙酰氨基葡萄糖分支修饰表达上调

(A) 2.5ng/mL 的 TGF- β 1 诱导 QZG 24h, PLA (原位邻位连接技术) 检测诱导前后 CD147 分子的 β 1, 6 N-乙酰氨基葡萄糖分支修饰的代表图 (B) 对原位邻位连接结果的统计图。(C) 免疫沉淀结合蛋白免疫印迹检测 TGF- β 1 诱导 QZG 发生 EMT 前后 CD147 分子的表达 (上), 免疫沉淀结合凝集素印记检测 CD147 分子的 β 1, 6 N-乙酰氨基葡萄糖分支的表达 (下) (** $P < 0.001$)。

4 讨论

上皮间质转化是肿瘤转移过程中的重要环节^[135], 大量研究发现糖基转移酶 GnT-V 的表达与 EMT 相关^[1]。有研究表明 EMT 过程中, GnT-V 表达上调^[57, 58], GnT-V 的过表达促进 TGF- β 1 诱导 EMT 的发生, 从而增强各种肿瘤的恶性转移表型^[60, 61]。然而, 也有相反的报道指出 GnT-V 抑制肺癌细胞 EMT 的发生^[62]。我们对肝癌进展的不同组织免疫组化染色分析发现, GnT-V 与 E-cadherin 表达整体呈负相关, 与 N-cadherin 表达呈正相关。这表明了 GnT-V 参与 EMT 过程。先前的研究表明 E-cadherin 受到 GnT-V 的催化, 过表达 GnT-V 抑制 E-cadherin 的功能从而促进肿瘤细胞的转移^[131]。在此研究中, 我们从表达的角度说明 GnT-V 的表达与 E-cadherin 呈负相关, 侧面证明其具有促进转移的功能。

然后我们利用 TGF- β 1 诱导人肝细胞 QZG 构建 EMT 模型, 发现糖基转移酶 GnT-V 及其催化产物 β 1, 6 N-乙酰氨基葡萄糖分支表达增加。我们的实验明确了在肝细胞发生 EMT 的过程中糖基转移酶 GnT-V 及其催化的糖基化修饰是表达上调的。实验室先前研究表明, 在肝癌进展过程中 CD147 分子能够促进 EMT 发生, 且在 EMT

过程中，CD147 分子在转录水平表达上调^[5]。本研究检测了 CD147 分子在 TGF- β 1 诱导 EMT 过程中其 N-糖基化修饰的变化，结果表明高糖基化的 CD147(HG-CD147) 在 EMT 过程中上调。进一步的研究表明，主要是 HG-CD147 中的 β 1, 6 N-乙酰氨基葡萄糖分支参与 EMT 过程。以往对 GnT-V 通过催化底物蛋白（包括 CD147 分子在内）的糖基化修饰参与 EMT 的意义和具体机制研究并未见报道，我们猜测在 EMT 过程中，GnT-V 促进肿瘤细胞 EMT 过程的重要机制，就是通过催化包括 CD147 分子在内的底物蛋白的 β 1, 6 N-乙酰氨基葡萄糖分支修饰，从而影响这些 EMT 相关蛋白的功能及下游信号通路，进而促进肿瘤转移。

本部分研究进一步验证并从机制上阐述了在本研究内容的第一部分中 CD147 分子 β 1, 6 N-乙酰氨基葡萄糖修饰促进肝癌转移的功能。我们的研究首次揭示了 GnT-V 通过糖基化修饰影响其靶蛋白的功能促进肿瘤细胞 EMT 及肿瘤转移的分子机制，并从糖修饰的角度解释 CD147 分子促进 EMT 发生的新机制。

第三部分 CD147 分子的 $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支修饰影响 CD147 和 integrin $\beta 1$ 相互作用

前两部分的结果证实CD147分子的 $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支修饰促进肝癌侵袭转移，那么其分子机制是什么？我们之前的研究表明肝癌细胞中CD147分子和 integrin $\beta 1$ 存在相互作用，且二者的相互作用对肝癌细胞的骨架重排和运动迁移有重要意义^[136]。只有高糖基化的CD147才能正确定位到细胞膜上^[7, 122]，与 integrin $\beta 1$ 发生相互作用。糖生物学研究发现，N-糖基化修饰会影响蛋白间的相互作用^[2]。CD147分子的N-糖基化修饰是否会影响其与 integrin $\beta 1$ 的相互作用，以及如何影响其与 integrin $\beta 1$ 的相互作用是本部分的研究重点。

1 材料

1.1 细胞系

人源胚胎肾细胞 HEK293T 来源于美国 ATCC，人肝细胞肝癌 HepG2 细胞来源于美国 ATCC，人肝细胞肝癌 Huh-7 细胞来源于日本 JCRB 细胞库。

1.2 质粒

质粒 WT-eGFP-N1-CD147 和 N44Q/N152Q/N186Q (3Q)-eGFP-N1-CD147 由本实验室黄婉副教授构建。

1.3 主要仪器

6 孔、12 孔、24 孔培养板（美国 Costar 公司）

细胞计数仪（美国 Invitrogen 公司）

倒置显微镜（日本 Olympus 公司）

共聚焦培养皿 Dish（NEST）

PVDF 膜 (0.45 μm , 美国 Millipore 公司)

垂直电泳槽和电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司)

Mini Trans-Blot 转移电泳槽 (美国 Bio-Rad 公司)

Western 化学发光检测系统 (日本 Kodak 公司)

荧光显微镜 (日本 Olympus 公司)

1.4 主要试剂

试剂 (货号)	生产商
胎牛血清	杭州四季青公司
RPMI-1640 培养基	Gibco 公司
蛋白 Marker	NEB 公司
BCA 蛋白定量试剂盒	Pierce 公司
卡那霉素	北京鼎国生物技术有限公司
LipofectamineTM2000	Invitrogen 公司
生物素化的凝集素 PHA-L (B-1115)	Vector 公司
DMEM 高糖培养基	Sigma 公司
胰酶细胞消化液	
β -巯基乙醇	
苦马豆碱 (s9263)	
Anti-Biotin 鼠单抗[Hyb-8] (ab201341)	Abcam 公司
integrin β 1 (ab52971)	
GFP (sc-9996)	Santa Cruz 公司
galectin-3 (Gal-3) (sc-20157)	
CD147 兔多抗	本实验室制备
HAb18G 鼠单抗 (IgG1)	
α -tubulin 鼠单抗	
PMSF	杭州华安生物技术有限公司
RIPA 细胞裂解液	
SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒	

2 方法

2.1 细胞培养

人源胚胎肾细胞HEK293T用RPMI-1640 培养基培养；人肝癌细胞HepG2 和 Huh-7 细胞用DMEM培养基培养。培养基中加入10%的胎牛血清，2 mM 谷氨酰氨，100 $\mu\text{g/ml}$ 青霉素和 100 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素。细胞置于37 $^{\circ}\text{C}$ ，5% CO_2 孵箱内培养，隔天换液一次，视生长状况3-4天传代。

2.2 细胞转染

2.2.1 质粒转染

1) 挑单克隆，LB 培养基（卡那霉素抗性）孵育，恒温 37 $^{\circ}\text{C}$ 剧烈摇菌 12-16h，扩增。

2) 质粒提取。按照说明书提取质粒。

A 取 1.5ml-5ml 菌液以 10000 $\times\text{g/min}$ 的转速室温离心 1min。

B 加入 250 μL Solution I/RNase A 重悬细菌，并上下颠倒震荡。

C 加入 250 μL Solution II，轻轻混匀并上下颠倒数次，获得清澈的裂解液，然后孵育 2min。

D 加入 350 μL Solution III 并立即颠倒震荡数次，得到白色沉淀。

E 13000 $\times\text{g/min}$ 室温离心 10min。

F 组装 HiBind Miniprep Column I，并将上清转移入内。10000 $\times\text{g/min}$ 室温离心 1min。

G 加 500 μL Buffer HB，室温 10000 $\times\text{g/min}$ 离心 1min，弃流穿。加 700 μL DNA Wash Buffer，10000 $\times\text{g/min}$ 离心 1min，重复一次。

H 13000 $\times\text{g/min}$ 离心 2min，干燥柱子。

I 向柱内加 30 μL -50 μL 的 Elution Buffer，室温放置 1-2min，13000 $\times\text{g/min}$ 离心 1min，收集洗脱液。

J 紫外分光光度计测定 DNA 的纯度和含量，准备转染。

3) 质粒转染

A 铺种细胞。消化生长状态良好的对数期 HEK293T 细胞，以 5×10^5 个细胞/孔的密度种到 6 孔板里，加入含有 10%胎牛血清的完全培养基 RPMI-1640，培养过夜。第二天观察细胞贴壁是否充分及生长状况。

- B 至细胞贴壁完全时,取 5 μ L LipofectamineTM2000 加入到 250 μ L 不含血清的 RPMI-1640 中,混匀,室温放置 5min。同时,将 5 μ g 质粒加入到 250 μ L 不含血清的 RPMI-1640 中,混匀,室温放置 5min。
- C 混合含有 LipofectamineTM2000 以及含有质粒的培养基,室温放置 20min。
- D 将准备好的细胞弃去培养基,用不含血清的 RPMI-1640 洗两次,然后将混匀的干涉片段加入到 6 孔板中,37 $^{\circ}$ C 培养 6h。
- E 更换含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 继续培养,48h 后用作后续实验分析。

2.2.2 干涉片段转染

具体方法见第一部分。干涉片段信息如下。

ShRNAS(supplier)	Sequence
GenePharma (Shanghai, China)	siRNA <i>LGALS3</i> -Homo-469: 5'-3': CUCGCAUGCUGAUAAACAUTT AUUGUUAUCAGCAUGCAGGTT
	siRNA <i>LGALS3</i> -Homo-567: 5'-3': CCACGCUCAAUGAGAACATT UGUUCUCAUUGAAGCGUGGTT'
GenePharma (Shanghai, China)	control nonspecific siRNA sense, 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3' antisense, 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'

2.3 免疫共沉淀 Co-IP

1) 抗体固定化

- A 将加强型 Aminolink 偶联树脂和试剂平衡至室温,稀释准备 1 \times coupling buffer 备用。
- B 轻轻晃动 Aminolink 偶联树脂瓶,获得均一的悬浮液,使用截短枪头加入 50 μ L 的树脂,置于微量离心管中,1000g/min 的转速离心 1min,弃流穿。
- C 200 μ L 1 \times coupling buffer 洗涤树脂,1000g/min 离心 1min,弃流穿。滤纸吸去底部剩余液体,插入底盖。
- D 将 20 μ L 抗体溶液调整至 400 μ L 后,将抗体稀释液添加至含有树脂的离心柱中,在通风橱内,加入硼氢化钠(每 200 μ L 体系加入 3 μ L 硼氢化钠)溶液。
- E 室温下,旋转孵育 90-120min,确保悬浮液在孵育过程中处于悬浮状态。

- F 离心收集流穿，验证抗体结合效率。然后加入 200 μ L 1 \times coupling buffer，离心弃流穿并重复一次。
- G 加 200 μ L 淬灭缓冲液并离心，滤纸吸去底部剩余液体，插入底盖。加 200 μ L 淬灭缓冲液，3 μ L 硼氢化钠，盖上螺旋盖上下混匀，孵育 15min。
- H 离心弃流穿，200 μ L 1 \times coupling buffer 洗涤两次，洗后离心
- I 150 μ L washing buffer 洗六次，每次洗后离心。

2) 免疫共沉淀（除非另有说明，所有的免疫沉淀操作在 4 $^{\circ}$ C 进行）

- A 200 μ L IP Lysis 洗涤树脂两次，离心弃流穿。滤纸吸去底部液体，插入底盖，将诱饵目的蛋白复合物以及对照样品加入到含有树脂的柱子中，旋紧螺旋盖，室温旋转孵育 1-2h 或者 4 $^{\circ}$ C 过夜。
- B 去盖离心，保留流穿。用 200 μ L 的 IP Lysis 洗涤样品两次，每次洗后离心。
- C 为保证洗脱效果，用 200 μ L 的 1 \times PBS 洗 4-6 次，每次洗后离心。
- D 免疫共沉淀洗脱：将离心柱放于一个新的离心管中，加 10 μ L 洗脱缓冲液离心。
- E 保持离心柱与收集管中，加入 50 μ L 洗脱缓冲液，室温静置 5min（不要盖上离心柱）。
- F 离心获得 60 μ L 蛋白溶液，加入 15 μ L 5 \times loading buffer，100 $^{\circ}$ C 恒温金属浴 5min，离心混匀后用作蛋白免疫印记分析。

2.4 蛋白免疫印记

- 1) 蛋白样品制备，BCA 定量，SDS-PAGE 电泳，转膜，封闭的具体步骤参照第一部分。
- 2) 一抗孵育，按照合适的比例稀释 integrin β 1，GFP， α -Tubulin，galectin-3，anti-CD147，4 $^{\circ}$ C 孵育过夜，后续步骤同第一部分。

2.5 原位邻位连接实验

具体步骤参照第一部分

2.6 统计学分析

所有的实验至少重复 3 次，结果用 mean \pm SD 形式表示。用 SPSS 软件和 GraphPad Prism 5 软件进行统计分析。数据分析采用 t 检验方法，当 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 CD147 的 N-糖基化修饰影响 CD147 和 integrin $\beta 1$ 的相互作用

CD147 是一个跨膜蛋白分子，具有三个糖基化位点（N44 位，N152 位，N186 位），且均位于 CD147 的胞外段。该蛋白分子胞外段与 integrin $\beta 1$ 结合发挥促进肿瘤细胞转移的功能^[97]。为检测 N-糖基化修饰是否影响 CD147 和 integrin $\beta 1$ 的相互作用，我们将构建的野生型 WT-CD147-eGFP 和三个糖基化位点均突变的 3Q-CD147-eGFP 质粒转入到 HEK293T 细胞中（图 3.1A），通过免疫共沉淀检测野生型 CD147 以及糖基化位点均突变的 CD147 和 integrin $\beta 1$ 间的相互作用。等量的质粒转入细胞后，根据绿色荧光强度来判断其转染效率，荧光显示其转染效率基本一致（图 3.1B）。我们用 integrin $\beta 1$ 的抗体进行免疫沉淀，转入糖基化位点突变质粒组中与 integrin $\beta 1$ 共沉淀的 CD147 分子明显少于转入野生组，反之，我们以 GFP（代表外源 CD147）抗体进行免疫沉淀，突变糖基化位点组中与 CD147 分子共沉淀的 integrin $\beta 1$ 明显少于 WT 组（图 3.1C）。以上结果表明，突变糖基化位点减弱 CD147 和 integrin $\beta 1$ 的相互作用。

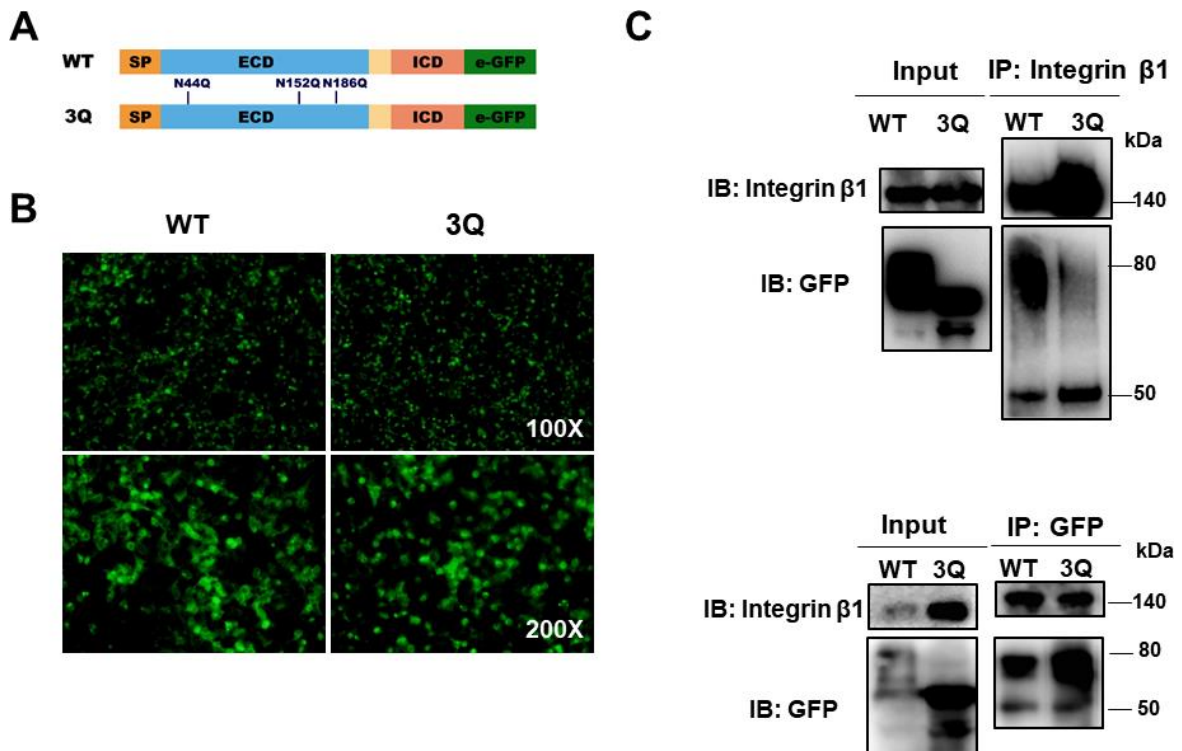


图 3.1 CD147 的 N-糖基化修饰影响 CD147 和 integrin $\beta 1$ 的相互作用

(A) CD147 分子的蛋白结构及突变其三个糖基化位点的示意图。野生型 (WT) 蛋白全长分为

胞外段 (ECD) 和胞内段 (ICD); SP, 信号肽; TM, 跨膜区。突变其三个 N-糖基化位点(3Q) 均位于胞外段 (N44Q、N152Q、N186Q)。(B) HEK293T 细胞转染质粒 WT-CD147-GFP 和 3Q-CD147-GFP, 观察绿色荧光蛋白所代表的转入质粒的表达及转染效率。为保证转染效率一致, 相同密度的 293T 细胞中转入等量的 WT-CD147-GFP 和 3Q-CD147-GFP 质粒, 绿色荧光强度代表其在 293T 细胞中的表达情况。(C) Co-IP 法检测突变 CD147 分子的三个糖基化位点对 CD147 和 integrin 相互作用的影响。上: 左侧为 input, 右侧为 IP。用 integrin β 1 抗体进行免疫沉淀, 检测沉淀下来的 integrin β 1 蛋白。再用 GFP 抗体进行免疫印迹, 检测与 integrin β 1 相互作用的 CD147-eGFP 蛋白。1/10 细胞裂解液作为 input 蛋白。下: 左侧为 input, 右侧为 IP。用 GFP 抗体进行免疫沉淀, 检测沉淀下来的 CD147-eGFP 蛋白。再用 integrin β 1 抗体进行免疫印迹, 检测与 CD147 相互作用的 integrin β 1 蛋白。1/10 细胞裂解液作为 input 蛋白。结果表明, 突变 CD147 的三个糖基化位点后, CD147 和 integrin 相互作用减弱。

3.2 CD147 分子的 β 1, 6 N-乙酰氨基葡萄糖分支影响 CD147 和 integrin β 1 的相互作用

为进一步检测 CD147 分子的 β 1, 6 N-乙酰氨基葡萄糖分支修饰是否影响 CD147 与 integrin β 1 的相互作用, 我们利用原位邻位连接技术在肝癌细胞 HepG2 和 Huh-7 上直接测定了二者的相互作用。加入苦马豆碱处理肝癌细胞 48h, 抑制 CD147 的 β 1, 6 N-乙酰氨基葡萄糖分支修饰合成。结果发现与对照组相比, 抑制糖分支合成后二者相互作用 (红色荧光点多少代表相互作用的强弱) 明显减弱, 且具有统计学差异 (图 3.2A, B)。当我们转染 siRNA 干涉糖基转移酶编码基因 *MGAT5*, 抑制糖基转移酶的表达, 也具有相似的效果: 与无关干涉组相比, 干涉 *MGAT5* 基因后 CD147 和 integrin β 1 二者间相互作用受到抑制 (图 3.2C, D)。以上结果说明, CD147 分子的 β 1, 6 N-乙酰氨基葡萄糖分支糖修饰促进 CD147 分子与 integrin β 1 的相互作用。

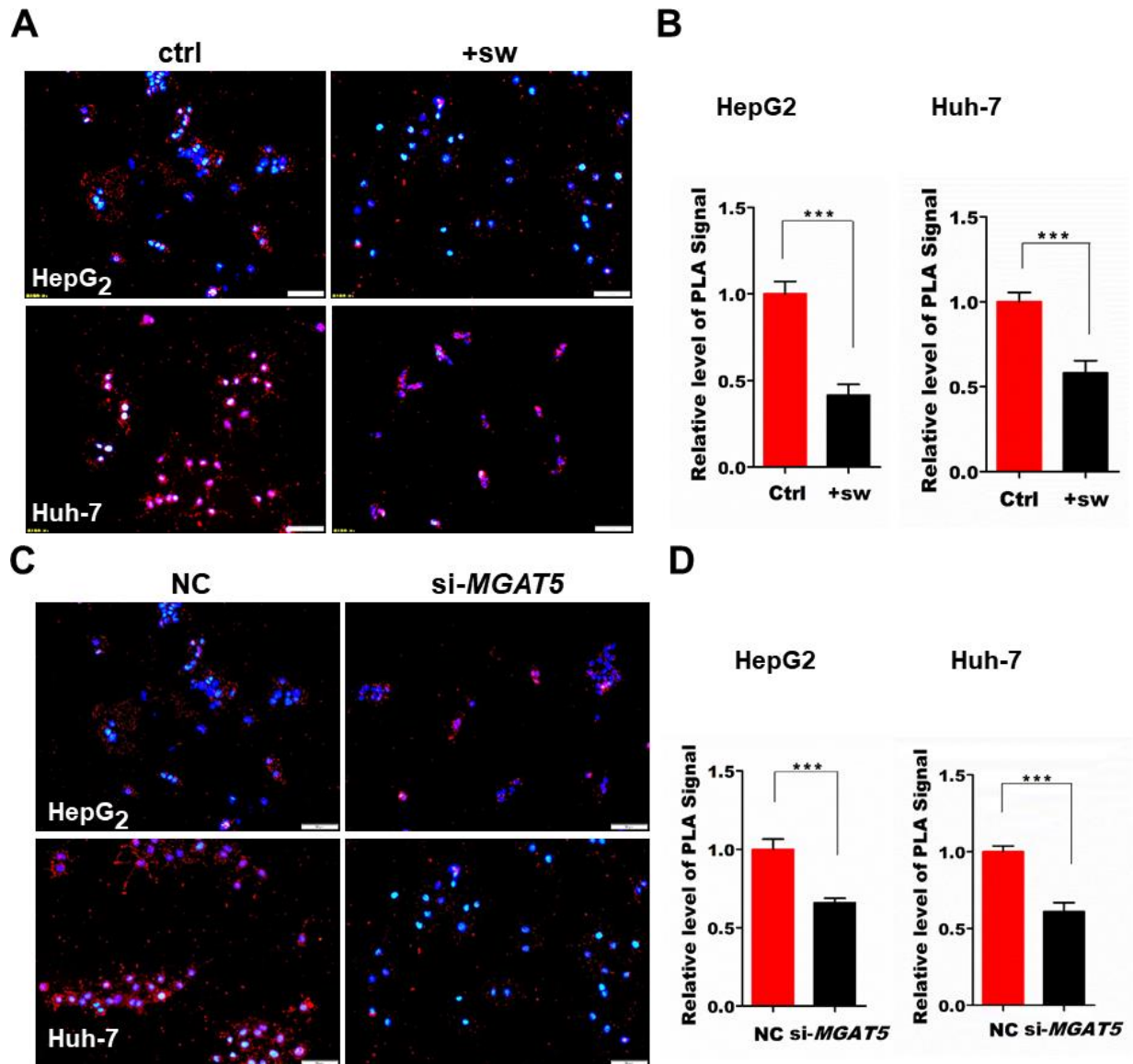


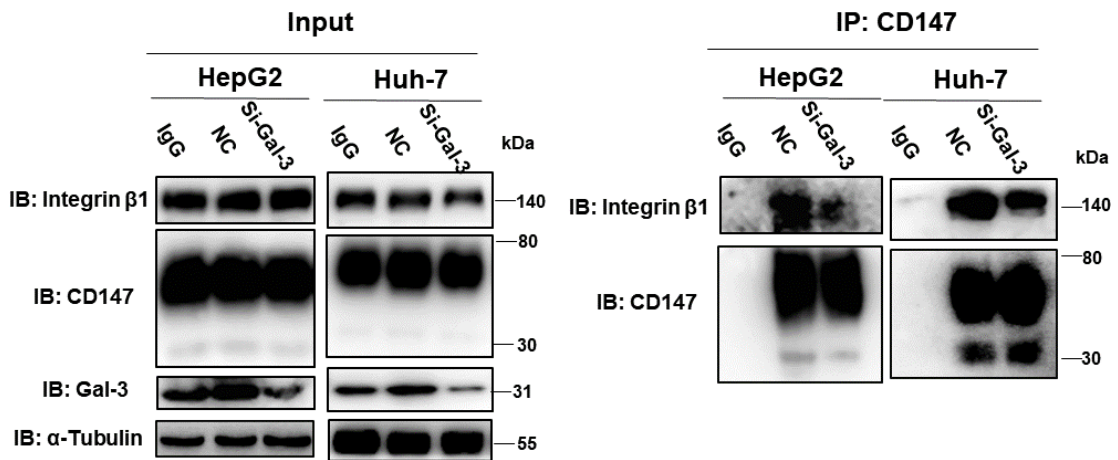
图 3.2 抑制 $\beta 1,6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支合成影响 CD147 和 integrin $\beta 1$ 的相互作用

(A-B) 原位邻位连接法检测 $1 \mu\text{g/ml}$ 苦马豆碱 (sw) 处理肝癌细胞 48h, 抑制 $\beta 1,6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支的合成对 CD147 和 integrin $\beta 1$ 分子相互作用的影响。(A) 原位邻位连接实验的代表性荧光结果图。红色荧光点的多少代表相互作用的强弱。(B) 对红色荧光 (CD147 和 integrin $\beta 1$ 分子相互作用) 的统计结果 (标尺 = $50 \mu\text{m}$)。 (C-D) 原位邻位连接法检测干扰糖基转移酶 V 的编码基因 *MGAT5* 对 CD147 和 integrin $\beta 1$ 分子相互作用的影响。(C) 原位邻位连接实验的代表性荧光结果图。红色荧光点的多少代表相互作用的强弱。(D) 对红色荧光 (CD147 和 integrin $\beta 1$ 分子相互作用) 的统计结果 (标尺 = $50 \mu\text{m}$)。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

3.3 糖配体 Galectin-3 影响 CD147 和 integrin $\beta 1$ 的相互作用

β 1, 6 N-乙酰氨基葡萄糖分支一般与半乳糖凝集素 galectin-3 结合形成胞外半乳糖凝集素糖蛋白基序发挥功能^[53]。为进一步明确 β 1, 6 N-乙酰氨基葡萄糖分支在 CD147- integrin β 1 相互作用中的作用, 我们干涉肝癌细胞 HepG2 和 Huh-7 中的半乳糖凝集素 galectin-3 编码基因 *LGALS3* 的表达, 然后用免疫共沉淀的方法检测 CD147 和 integrin β 1 的相互作用情况。结果如图 3.3A, B 所示, 与无关干涉组相比, 干涉 *LGALS3* 基因后, 肝癌细胞中 CD147 分子和 integrin β 1 之间的相互作用明显受到抑制。我们首先用 CD147 的抗体进行免疫沉淀, 再用 integrin β 1 的抗体进行免疫印迹检测与 CD147 分子结合的 integrin β 1, 结果表明干涉组与 CD147 分子结合的 integrin β 1 明显少于对照组(图 3.3A)。反之, 以 integrin β 1 的抗体进行免疫沉淀, 再用 CD147 的抗体检测与 integrin β 1 结合的 CD147 蛋白, 结果也表明干涉组中与 integrin β 1 结合的 CD147 蛋白明显少于对照组 (图 3.3B)。这些结果进一步证实了 β 1, 6 N-乙酰氨基葡萄糖分支影响 CD147 分子与 integrin β 1 的相互作用。

A



B

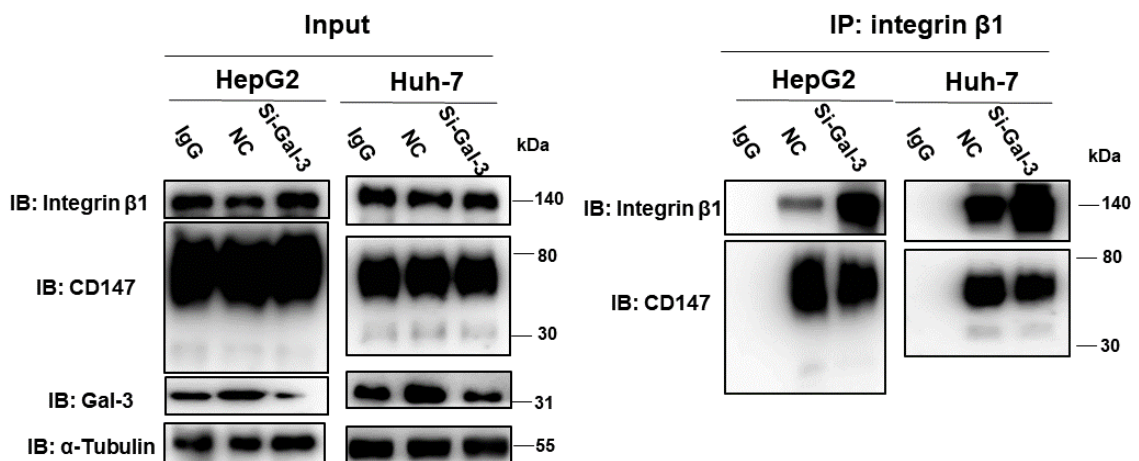


图 3.3 干涉 galectin-3 后对 CD147 和 integrin $\beta 1$ 相互作用的影响

(A-B) 干涉肝癌细胞 HepG2 和 Huh-7 的 $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支的糖配体 galectin-3 (Gal-3), CO-IP 分析 CD147 和 integrin $\beta 1$ 相互作用。(A) 左侧 input 样品的 western blotting 检测, 检测 integrin $\beta 1$, CD147, Gal-3, tubulin 的表达; 右侧: HAb18G/CD147 为诱饵的免疫沉淀, 检测抓下来的 integrin $\beta 1$, CD147。用 HAb18G 进行免疫沉淀, 检测沉淀下来的 CD147 蛋白。再用 integrin $\beta 1$ 的抗体进行免疫印迹, 检测与 CD147 相互作用的 integrin $\beta 1$ 分子。(B) 左侧: input 样品的 western blotting 检测, 检测 integrin $\beta 1$, CD147, Gal-3, tubulin 的表达; 右侧: 用 integrin $\beta 1$ 的抗体进行免疫沉淀, 检测沉淀下来的 integrin $\beta 1$ 蛋白。再用 HAb18G 进行免疫印迹, 检测与 integrin $\beta 1$ 相互作用的 CD147 分子。以 integrin $\beta 1$ 为诱饵的免疫沉淀, 检测抓下来的 CD147, integrin $\beta 1$ 。A, B 中 input 上样量为 1/10 的细胞裂解液, IgG 的 input 为干涉组和 NC 组的等量混合。Input 蛋白上样量为 1/10 的细胞裂解液, IgG 的 input 为干涉组和 NC 组的等量混合。

4 讨论

糖生物学研究表明 N-糖基化修饰影响蛋白间的相互作用^[118, 103, 137]。CD147 分子与 integrin $\beta 1$ 相互作用调控 integrin 依赖的通路活化以及 FAK 的活化, 从而引起下游信号 Rac/Ras/Raf/ERK 和 PI3K/Akt 通路的活化, 进而增强肝细胞肝癌的恶性转移的潜能^[136]。目前有研究表明 N-糖基化修饰影响 integrin $\beta 1$ 与其他蛋白的结合^[137, 138], 但具体的机制如哪种糖成分发挥作用并未报道。在我们的研究中, 我们把关注点放在糖成分 $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支上。结果发现这种修饰能影响 CD147 分子与 integrin $\beta 1$ 的相互作用。抑制 $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支修饰的发生, 能有效抑制二者的相互作用; 同时干涉 $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支配体, 也出现类似的结果。这些结果表明 CD147 分子上 $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支的存在能增强 CD147 分子和 integrin $\beta 1$ 的相互作用。然而, 需要指出的是, 利用苦马豆碱抑制 $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支的合成, 不仅仅是抑制了 CD147 分子上的这种糖基化修饰, 对所有 GnT-V 的底物糖蛋白的糖修饰都起到抑制作用。但结合 CD147 糖基化位点突变的结果, 我们证实了 CD147 分子的糖基化修饰能影响二者的相互作用。此外, PLA 技术原位检测 CD147 分子和 integrin $\beta 1$ 的相互作用强弱, 直接证明 CD147 分子和 integrin $\beta 1$ 的相互作用受到 $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支的影响。

之前的研究报道, integrin $\beta 1$ 结合在 CD147 分子的 RGD 区域。在前文 3.1 部分中也得到体现。当完全突变 CD147 分子的 N-糖基化位点后, CD147 分子和 integrin $\beta 1$ 相互作用明显减弱, 但二者之间仍存在相互作用 (图 3.1C)。这说明 CD147 分子的 N-糖基化修饰是影响二者相互作用的重要因素, 但不是唯一的决定因素。结合之前的研究, 我们认为除了 CD147 分子与 integrin $\beta 1$ 的直接相互作用外, CD147 分子上的 $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支的存在可能起到辅助 (共受体) 作用, 即 CD147 分子上的 $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支修饰的存在会增强两分子间的相互作用。CD147- $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支通过促进 CD147 分子与 integrin $\beta 1$ 的相互作用, 从而促进肿瘤转移, 进一步解释了本研究的前两部分结果。

本部分实验发现了 CD147 分子上 $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支修饰促进肝癌转移的新机制, 为研发小分子化学药物或特异性抗 CD147 分子糖修饰的抗体提供了理论支持: 靶向 CD147 分子的糖基化修饰, 抑制 CD147 分子与 integrin $\beta 1$ 的相互作用, 从而抑制肿瘤转移。这为基于 CD147 分子的抗肿瘤治疗提供了新思路。

第四部分 PI3K/Akt 信号通路对 GnT-V 的正反馈调控

CD147 分子和 integrin $\beta 1$ 相互作用激活与细胞迁移相关 FAK-Paxillin 以及下游 PI3K-Akt 信号通路，从而促进细胞迁移^[136]。前文的实验结果已经证实 GnT-V 催化的糖基化修饰影响 CD147 分子和 integrin $\beta 1$ 相互作用，那么这种 $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支修饰会不会影响 PI3K/Akt 信号通路呢？PI3K/Akt 信号通路调控多种基因的表达，包含一些参与 EMT 过程的基因，如 Snail, GSK-3 β 等^[5, 139]。第二部分证实 GnT-V 的表达与 EMT 有关，那么细胞迁移相关的 PI3K/Akt 信号通路对 GnT-V 的表达有无影响？本部分研究内容重点解决这两个问题。

1 材料

1.1 细胞系

人肝细胞肝癌细胞系：HepG2 和 Huh-7 细胞

1.2 主要仪器

6 孔、12 孔、24 孔培养板（美国 Costar 公司）

细胞培养箱（德国 Heraeus 公司）

细胞计数仪（美国 Invitrogen 公司）

YJ875SA 超净台（吴江市净化设备总厂）

倒置显微镜（日本 Olympus 公司）

酶标仪（美国 Bio-Rad 公司）

PVDF 膜（0.45 μm ，美国 Millipore 公司）

垂直电泳槽和电泳仪（美国 Bio-Rad 公司）

Mini Trans-Blot 转移电泳槽（美国 Bio-Rad 公司）

NanoDrop 2000 超微量分光光度计（Thermo Fisher 公司）

PCR 仪（美国 Bio-Rad 公司）

Agilent Mix3005p 实时荧光定量 PCR 仪（美国安捷伦公司）

1.3 主要试剂

试剂（货号）	生产商
胎牛血清	杭州四季青公司
RPMI-1640 培养基	Gibco 公司
蛋白 Marker	NEB 公司
BCA 蛋白定量试剂盒	Pierce 公司
FAK（610087）	BD 公司
galectin-3 (Gal-3)（sc-20157）	Santa Cruz 公司
反转录试剂盒（R6934-01）	Omega, Bio-Tek 公司
SYBR® Premix Ex Taq™（DRR081A）	Takara
DMEM 高糖培养基	Sigma 公司
胰酶细胞消化液	
β-巯基乙醇	
苦马豆碱（s9263）	
p-Akt（Ser 473）（587F11）	CST 公司
Akt（9272s）	
p-paxillin（2541s）	
PI3K 抑制剂（LY294002）	
integrin β1（ab52971）	Abcam 公司
p-FAK（ab4804）	
GnT-V（ab87977）	
HAb18G 鼠单抗（IgG1）	本实验室制备
α-tubulin 鼠单抗	
PMSF	杭州华安生物技术有限公司
RIPA 细胞裂解液	
SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒	

2 方法

2.1 细胞培养

具体步骤参照正文第一部分方法。

2.2 蛋白免疫印迹

- 1) 蛋白样品制备, BCA 定量, SDS-PAGE 电泳, 转膜, 封闭的具体步骤参照第一部分。
- 2) 一抗孵育, 按照合适的比例稀释 integrin β 1, GnT-V, α -Tubulin, galectin-3, HAb18G, FAK/p-FAK, Akt/p-Akt, Paxilin/p-Paxilin, 4°C孵育过夜, 后续步骤同第一部分。

2.3 实时定量 PCR

- 1) 提取总 RNA, 反转录具体步骤参照第一部分。
- 2) 实时定量 PCR。

MGAT5, *LGAL-3* (*Gal-3*) 的引物由北京华大基因合成。引物 *GAPDH* 同第一部分。具体操作步骤同第一部分。

基因名称	引物序列
<i>MGAT5</i>	上游 5'-ACTCTTGGACCATCCTGGGT-3'
	下游 5'-CCGTCCACTGAGGATACCAT-3'
<i>LGALS3</i>	上游 5'-GCTTCTGGGTCAAAGGACCA-3'
	下游 5'-GTCCCACAGGTTGTCACACA-3'

2.4 数据分析

所有的实验至少重复 3 次, 结果用 mean \pm SD 形式表示。用 SPSS 软件和 GraphPad Prism 5 软件进行统计分析。数据分析采用 t 检验方法, 当 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 PI3K/Akt 信号通路对 GnT-V 的正反馈调控

第三部分实验结果表明 CD147- β 1, 6 N-乙酰氨基葡萄糖分支影响 CD147 分子和 integrin β 1 的相互作用。以往的研究表明 CD147 分子和 integrin β 1 相互作用活化下游 PI3K/Akt 信号通路。为检验 GnT-V 是否调控 PI3K 下游信号通路, 我们检测了包括 FAK、paxillin 和 Akt 在内的下游蛋白的活化。在肝癌细胞株 HepG2 和 Huh-7 中, 用苦马豆碱抑制 β 1, 6 N-乙酰氨基葡萄糖分支合成后, 免疫印迹的结果表明 p-FAK, p-paxillin 和 p-Akt 的表达均下调 (图 4.1)。我们的结果与之前文献在乳腺癌中的报道一致^[39, 140]。综上结果表明糖基转移酶 GnT-V 催化的 β 1, 6 N-乙酰氨基葡萄糖分支修饰能够调控 PI3K 通路。

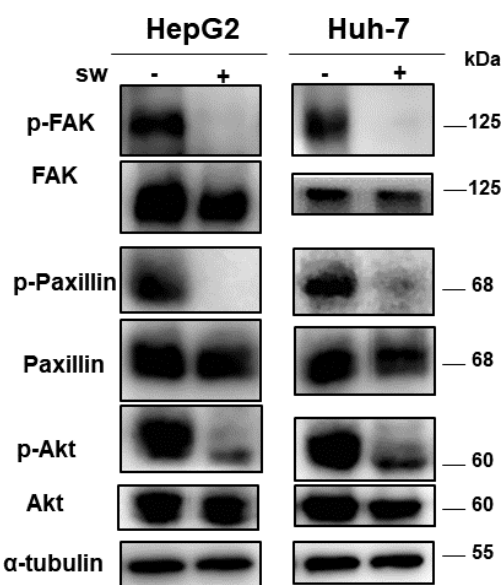


图 4.1 抑制 β 1, 6 N-乙酰氨基葡萄糖分支后对 PI3K 信号通路下游分子表达和活化的影响

肝癌细胞 HepG2 和 Huh-7 加入 1 μ g/mL 苦马豆碱 (sw) 处理 48h 后, Western blotting 检测 PI3K 信号通路下游分子 FAK、paxillin 和 Akt 的表达和活化。结果表明磷酸化的 FAK、paxillin 和 Akt 均表达下调。

3.2 PI3K/Akt 信号通路调控 GnT-V 的表达

为探究 PI3K/Akt 信号通路是否可正反馈调控 GnT-V, 我们在 HepG2 和 Huh-7 细胞加入 10 μ mol/L PI3K 抑制剂 LY294002 处理 24h^[141], 免疫蛋白印记和实时定量 PCR 分析检测 GnT-V 的表达。结果表明抑制 PI3K 通路后 GnT-V 的蛋白和基因表达均有下调 (图 4.2A-B)。此外, 加入抑制剂 LY294002 后, 随着磷酸化的 Akt 和 CD147

分子的糖基化水平的下调, $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支的糖配体 galectin-3 的蛋白和基因表达也明显下调 (图 4.2A 和 C)。以上结果说明 PI3K/Akt 信号通路能正反馈调控糖基转移酶 GnT-V 的表达。

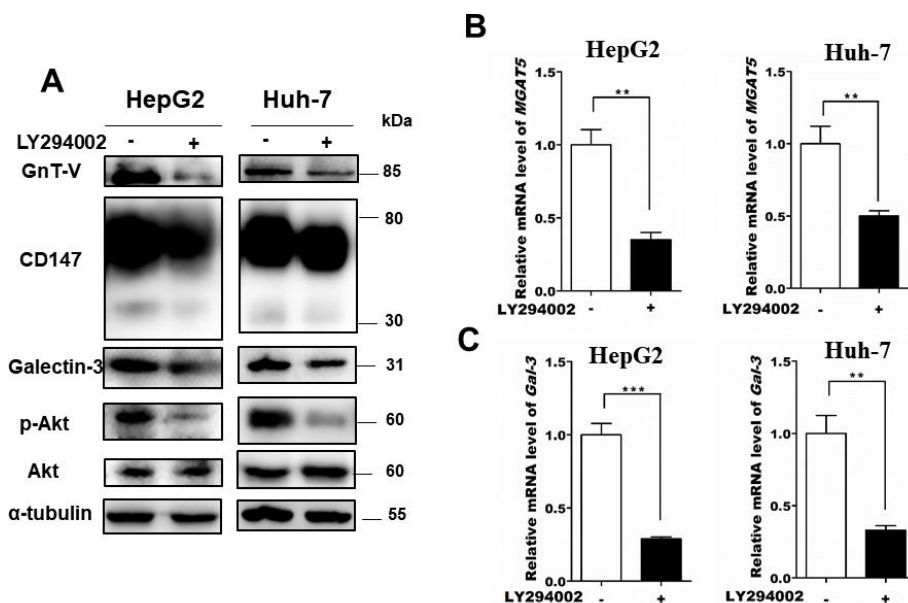


图 4.2 抑制 PI3K/Akt 信号通路对 GnT-V 表达的影响

(A) PI3K 信号通路抑制剂 LY294002 作用于肝癌细胞 HepG2 和 Huh-7 (10 $\mu\text{mol/l}$ LY294002 处理细胞 24 h), Western blotting 检测糖基转移酶 GnT-V、CD147、galectin-3、p-Akt 的蛋白表达。(B) PI3K 信号通路抑制剂 LY294002 作用于肝癌细胞 HepG2 和 Huh-7 (10 $\mu\text{mol/l}$ LY294002 处理 24h), 实时定量 PCR 检测糖基转移酶 GnT-V 的 mRNA 水平表达情况。(C) LY294002 作用于肝癌细胞 HepG2 和 Huh-7 后, 实时定量 PCR 检测糖配体 LGALS3 (*Gal-3*)的 mRNA 表达。(* $P<0.05$; ** $P<0.01$)。

4 讨论

大量证据表明活化的 FAK-paxillin 以及 FAK-PI3K 信号通路参与具有恶性转移特性的肿瘤细胞的侵袭转移过程^[142]。我们实验室先前研究发现 CD147 分子的表达能够通过活化 PI3K 信号通路, 增强肝癌细胞的恶性转移潜能^[5, 143]。CD147 与 integrin $\beta 1$ 的相互作用活化下游 FAK-PI3K 信号, 而且本研究第三部分结果表明 $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支促进 CD147 与 integrin $\beta 1$ 间的相互作用。因此, 理论上抑制 $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支的合成能够抑制 PI3K 信号通路的活化。我们在肝癌细胞 Huh-7

和 HepG2 细胞上证实了这一假设。苦马豆碱处理肝癌细胞抑制 $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支的合成后, PI3K/Akt 信号通路也得到抑制, 这一结果与之前的报道相一致^[140]。另外, PI3K 信号通路能够调控 EMT 过程^[59]。在 EMT 过程中, 糖基转移酶 GnT-V 以及 CD147- $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支的表达上调, 那么 PI3K/Akt 对 GnT-V 催化的糖基化修饰是否也有调控呢? 在我们的研究中发现, 抑制 PI3K 信号通路后, GnT-V 的表达以及 CD147 的 N-糖基化表达下调, 这说明 PI3K/Akt 信号通路能够调控 GnT-V 的表达及其催化的糖基化修饰。在 EMT 过程中, 糖基转移酶 GnT-V 以及 CD147- $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支的表达上调, 进一步增强其与 integrin $\beta 1$ 的相互作用, 从而促进 PI3K/Akt 信号通路的活化, 增强 HCC 细胞的侵袭转移特性。然而需要说明的是, 糖基转移酶 GnT-V 催化所有糖蛋白的 $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖基化, 不仅仅是 CD147 的糖基化。在我们的研究中, 我们以 CD147 分子为靶蛋白进行研究, 数据表明 $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支影响糖蛋白与其他蛋白的相互作用以及其生物学功能。已有关于编码 GnT-V 的 *MGAT5* 基因的研究中^[51], 有关 PI3K 信号通路对 *MGAT5* 的表达调控鲜有报道。我们的研究首次发现在肝癌中 PI3K 信号通路可调控糖基转移酶 GnT-V 的表达, 从而为 GnT-V 的表达调控提供了新的线索。

基于我们的实验结果, 我们提出一种模型来解释 GnT-V 在促进 HCC 进展中的分子机制 (图 4.3)。在肝癌细胞的 EMT 过程中, 转录因子在肿瘤细胞中聚集从而活化 GnT-V 的表达。膜表面糖蛋白分子如 CD147- $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖基化水平增加, 从而改变对肿瘤微环境的应答。这些改变引起细胞行为的改变, 促进转移潜能。此外 $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支能够影响 CD147 分子和 integrin $\beta 1$ 之间的相互作用以及相关的下游信号通路活化。而且 PI3K/Akt 信号通路与糖基转移酶 GnT-V 相互调控, 形成一个正反馈调控环路 (图 4.3), 促进肝癌细胞侵袭转移。

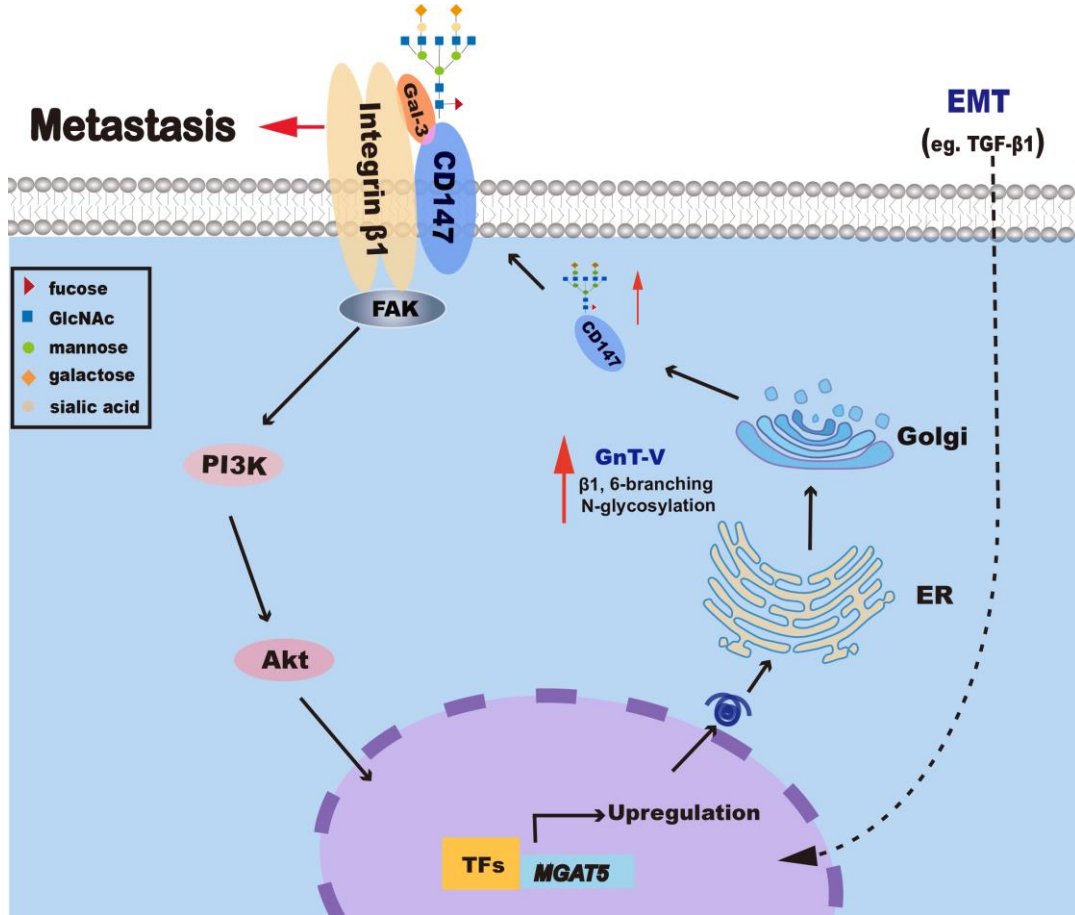


图 4.3 PI3K/Akt 信号通路与 GnT-V 之间形成正反馈环路促进肿瘤转移

EMT 发生过程中，肿瘤细胞中的转录因子（TFs）转位到核中活化糖基转移酶 GnT-V 的表达。GnT-V 表达上调引起细胞表面分子（包括 CD147）的 $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支修饰增加，通过影响 CD147 分子和 integrin $\beta 1$ 之间的相互作用以及相关的下游信号通路活化，改变肿瘤微环境从而促进转移。PI3K/Akt 信号通路可正向调控 GnT-V 的表达；同时，抑制 GnT-V 催化的 $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支合成时，PI3K/Akt 信号受到抑制。

小 结

1. CD147 分子的 $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支促进肝细胞肝癌的进展及转移。
2. GnT-V 催化的 CD147 分子的 $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖组分参与肝癌细胞的上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 过程。
3. CD147 分子的 $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖分支促进 CD147 分子和 integrin $\beta 1$ 的相互作用, 并活化下游 PI3K/Akt 信号通路。
4. PI3K/Akt 信号通路与 GnT-V 之间存在正反馈调控环路。

我们的研究从翻译后修饰的角度阐述了 CD147 分子促进 HCC 转移的新机制, 揭示了 GnT-V 催化的 CD147 分子的 $\beta 1, 6$ N-乙酰氨基葡萄糖修饰在促进肝细胞肝癌进展过程中的意义及其分子机制, 为靶向 CD147 分子的肝细胞肝癌的个性化诊疗提供了新的策略。

参考文献

- [1] Taniguchi N, Kizuka Y. Glycans and cancer: role of N-glycans in cancer biomarker, progression and metastasis, and therapeutics[J]. *Adv Cancer Res*, 2015, 126: 11-51.
- [2] Stowell S R, Ju T, Cummings R D. Protein glycosylation in cancer[J]. *Annu Rev Pathol: Mech*, 2015, 10(1): 473-510.
- [3] Pinho S S, Reis C A. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications[J]. *Nat Rev Cancer*, 2015, 15(9): 540-555.
- [4] Jiang J L, Zhou Q, Yu M K, et al. The involvement of HAb18G/CD147 in regulation of store-operated calcium entry and metastasis of human hepatoma cells[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(50): 46870-46877.
- [5] Wu J, Ru N, Zhang Y, et al. HAb18G/CD147 promotes epithelial-mesenchymal transition through TGF- β signaling and is transcriptionally regulated by Slug[J]. *Oncogene*, 2011, 30(43): 4410-4427.
- [6] Wu B, Cui J, Yang X, et al. Cytoplasmic fragment of CD147 generated by regulated intramembrane proteolysis contributes to HCC by promoting autophagy[J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(e2925).
- [7] Huang W, Luo W, Zhu P, et al. Modulation of CD147-induced matrix metalloproteinase activity: role of CD147 N-glycosylation[J]. *Biochem J*, 2013, 449(2): 437-448.
- [8] Apweiler R, Hermjakob H, Sharon N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1473(1): 4-8.
- [9] Oliveira-Ferrer L, Legler K, Milde-Langosch K. Role of protein glycosylation in cancer metastasis[J]. *Semin Cancer Biol*, 2017, 44: 141-152.
- [10] Schachter H. Biosynthetic controls that determine the branching and microheterogeneity of protein-bound oligosaccharides[J]. *Biochem Cell Biol*, 1986, 64(3): 163-181.
- [11] Kukuruzinska M A, Lennon K. Protein N-glycosylation: molecular genetics and functional significance[J]. *Crit Rev Oral Biol Med*, 1998, 9(4): 415-448.
- [12] Van den Steen P, Rudd P M, Dwek R A, et al. Concepts and principles of O-linked

glycosylation[J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 1998, 33(3): 151-208.

[13] Kobata A, Amano J. Altered glycosylation of proteins produced by malignant cells, and application for the diagnosis and immunotherapy of tumours. [J]. *Immunol Cell Biol*, 2005, 83(4): 429-439.

[14] Semel A C, Seales E C, Singhal A, et al. Hyposialylation of integrins stimulates the activity of myeloid fibronectin receptors[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(36): 32830-32836.

[15] Bellis S L. Variant glycosylation: an underappreciated regulatory mechanism for beta1 integrins. [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1663(1-2): 52-60.

[16] Zhao Y, Sato Y, Isaji T, et al. Branched N-glycans regulate the biological functions of integrins and cadherins[J]. *FEBS J*, 2008, 275(9): 1939-1948.

[17] Gu J, Isaji T, Sato Y, et al. Importance of N-glycosylation on alpha5beta1 integrin for its biological functions[J]. *Biol Pharm Bull*, 2009, 32(5): 780-785.

[18] Kiermaier E, Moussion C, Veldkamp C T, et al. Polysialylation controls dendritic cell trafficking by regulating chemokine recognition[J]. *Science*, 2016, 351(6269): 186-190.

[19] Kannagi R, Yin J, Miyazaki K, et al. Current relevance of incomplete synthesis and neo-synthesis for cancer-associated alteration of carbohydrate determinants--Hakomori's concepts revisited[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1780(3): 525-531.

[20] Buckhaults P, Chen L, Fregien N, et al. Transcriptional regulation of N-acetylglucosaminyltransferase V by the src oncogene. [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(31): 19575-19581.

[21] Schietinger A, Philip M, Yoshida B A, et al. A mutant chaperone converts a wild-type protein into a tumor-specific antigen[J]. *Science*, 2006, 314(5797): 304-308.

[22] Aryal R P, Ju T, Cummings R D. The endoplasmic reticulum chaperone Cosmc directly promotes in vitro folding of T-synthase[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(4): 2456-2462.

[23] Neskovic N M, Espinosa D L M A, Roussel G, et al. UDP-galactose: ceramide galactosyltransferase in cultured oligodendrocytes: an enzymological and immunological study[J]. *Int J Dev Neurosci*, 1988, 6(6): 535-546.

[24] Kellokumpu S, Sormunen R, Kellokumpu I. Abnormal glycosylation and altered Golgi structure in colorectal cancer: dependence on intra-Golgi pH[J]. *FEBS Lett*, 2002, 516(1-3): 217-224.

[25] Helenius A, Aebi M. Intracellular functions of N-linked glycans. [J]. Science, 2001, 291(5512): 2364-2369.

[26] Reticker-Flynn N E, Bhatia S N. Aberrant Glycosylation Promotes Lung Cancer Metastasis through Adhesion to Galectins in the Metastatic Niche[J]. Cancer Discov, 2015, 5(2): 168-181.

[27] Paredes J, Figueiredo J, Albergaria A, et al. Epithelial E- and P-cadherins: Role and clinical significance in cancer[J]. BBA-Rev Cancer, 2012, 1826(2): 297-311.

[28] Guo H, Lee I, Kamar M, et al. N-acetylglucosaminyltransferase V expression levels regulate cadherin-associated homotypic cell-cell adhesion and intracellular signaling pathways. [J]. The Journal of biological chemistry, 2003, 278(52): 52412-52424.

[29] Ihara S, Miyoshi E, Ko J H, et al. Prometastatic effect of N-acetylglucosaminyltransferase V is due to modification and stabilization of active matrilysin by adding beta 1-6 GlcNAc branching[J]. J Biol Chem, 2002, 277(19): 16960-16967.

[30] Pinho S S, Reis C A, Gartner F, et al. Molecular plasticity of E-cadherin and sialyl lewis x expression, in two comparative models of mammary tumorigenesis[J]. PLoS One, 2009, 4(8): e6636.

[31] Nakamori S, Kameyama M, Imaoka S, et al. Increased expression of sialyl Lewisx antigen correlates with poor survival in patients with colorectal carcinoma: clinicopathological and immunohistochemical study[J]. Cancer Res, 1993, 53(15): 3632-3637.

[32] Kim S H, Turnbull J, Guimond S. Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor[J]. J Endocrinol, 2011, 209(2): 139-151.

[33] Wade A, Robinson A E, Engler J R, et al. Proteoglycans and their roles in brain cancer[J]. FEBS J, 2013, 280(10): 2399-2417.

[34] Cecchi F, Pajalunga D, Fowler C A, et al. Targeted disruption of heparan sulfate interaction with hepatocyte and vascular endothelial growth factors blocks normal and oncogenic signaling[J]. Cancer Cell, 2012, 22(2): 250-262.

[35] Tan K W, Chong S Z, Wong F H, et al. Neutrophils contribute to inflammatory lymphangiogenesis by increasing VEGF-A bioavailability and secreting VEGF-D[J]. Blood, 2013, 122(22): 3666-3677.

[36] English N M, Lesley J F, Hyman R. Site-specific de-N-glycosylation of CD44 can activate

hyaluronan binding, and CD44 activation states show distinct threshold densities for hyaluronan binding[J]. *Cancer Res*, 1998, 58(16): 3736-3742.

[37] Bharadwaj A G, Kovar J L, Loughman E, et al. Spontaneous metastasis of prostate cancer is promoted by excess hyaluronan synthesis and processing[J]. *Am J Pathol*, 2009, 174(3): 1027-1036.

[38] Warburg O. On the origin of cancer cells[J]. *Science*, 1956, 123(3191): 309-314.

[39] Lau K S, Partridge E A, Grigorian A, et al. Complex N-glycan number and degree of branching cooperate to regulate cell proliferation and differentiation[J]. *Cell*, 2007, 129(1): 123-134.

[40] Magalhães A, Duarte H O, Reis C A. Aberrant Glycosylation in Cancer: A Novel Molecular Mechanism Controlling Metastasis[J]. *Cancer Cell*, 2017, 31(6): 733-735.

[41] Cheng C, Ru P, Geng F, et al. Glucose-Mediated N-glycosylation of SCAP Is Essential for SREBP-1 Activation and Tumor Growth[J]. *Cancer Cell*, 2015, 28(5): 569-581.

[42] Lau K S, Partridge E A, Grigorian A, et al. Complex N-glycan number and degree of branching cooperate to regulate cell proliferation and differentiation[J]. *Cell*, 2007, 129(1): 123-134.

[43] Taniguchi N. A sugar-coated switch for cellular growth and arrest[J]. *Nat Chem Biol*, 2007, 3(6): 307-309.

[44] Rabinovich G A, Toscano M A. Turning 'sweet' on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation[J]. *Nat Rev Immunol*, 2009, 9(5): 338-352.

[45] Ragupathi G, Liu N X, Musselli C, et al. Antibodies against tumor cell glycolipids and proteins, but not mucins, mediate complement-dependent cytotoxicity[J]. *J Immunol*, 2005, 174(9): 5706-5712.

[46] Lavrsen K, Madsen C B, Rasch M G, et al. Aberrantly glycosylated MUC1 is expressed on the surface of breast cancer cells and a target for antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity[J]. *Glycoconj J*, 2013, 30(3): 227-236.

[47] Sato Y, Nakata K, Kato Y, et al. Early recognition of hepatocellular carcinoma based on altered profiles of alpha-fetoprotein. [J]. *New Engl J Med*, 1993, 328(25): 1802-1806.

[48] Gilgunn S, Conroy P J, Saldova R, et al. Aberrant PSA glycosylation--a sweet predictor of prostate cancer[J]. *Nat Rev Urol*, 2013, 10(2): 99-107.

[49] Liu L. Antibody Glycosylation and Its Impact on the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Monoclonal Antibodies and Fc-Fusion Proteins[J]. *J Pharm Sci*, 2015, 104(6): 1866-1884.

[50] Berger M, Kaup M, Blanchard V. Protein Glycosylation and its impact on biotechnology[M].

Adv Biochem Eng Biot, Hu W S, Zeng A P, 2012: 127, 165-185.

[51] Dennis J W, Laferte S, Waghome C, et al. Beta 1-6 branching of Asn-linked oligosaccharides is directly associated with metastasis. [J]. Science, 1987, 236(4801): 582-585.

[52] Hakomori S. Glycosylation defining cancer malignancy: new wine in an old bottle[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(16): 10231-10233.

[53] Lakshminarayan R, Wunder C, Becken U, et al. Galectin-3 drives glycosphingolipid-dependent biogenesis of clathrin-independent carriers[J]. Nat Cell Biol, 2014, 16(6): 592.

[54] Yoshimura M, Nishikawa A, Ihara Y, et al. Suppression of lung metastasis of B16 mouse melanoma by N-acetylglucosaminyltransferase III gene transfection[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(19): 8754-8758.

[55] Liu Y, Liu H, Liu W, et al. beta1,6-N-acetylglucosaminyltransferase V predicts recurrence and survival of patients with clear-cell renal cell carcinoma after surgical resection[J]. World J Urol, 2015, 33(11): 1791-1799.

[56] Seberger P J, Chaney W G. Control of metastasis by Asn-linked, beta1-6 branched oligosaccharides in mouse mammary cancer cells[J]. Glycobiol, 1999, 9(3): 235-241.

[57] Xu Q, Akama R, Isaji T, et al. Wnt/ β -Catenin signaling down-regulates N-Acetylglucosaminyltransferase III expression[J]. J Biol Chem, 2011, 286(6): 4310-4318.

[58] Maupin K A, Sinha A, Eugster E, et al. Glycogene expression alterations associated with pancreatic cancer epithelial-mesenchymal transition in complementary model systems[J]. PLoS One, 2010, 5(9): e13002.

[59] Khan G J, Gao Y, Gu M, et al. TGF-beta1 causes EMT by regulating N-Acetyl glucosaminyl transferases via downregulation of Non-Muscle Myosin II-A through JNK/P38/PI3K pathway in lung cancer[J]. Curr Cancer Drug Tar, 2017.

[60] Terao M, Ishikawa A, Nakahara S, et al. Enhanced epithelial-mesenchymal transition-like phenotype in N-Acetylglucosaminyltransferase V transgenic mouse skin promotes wound healing[J]. J Biol Chem, 2011, 286(32): 28303-28311.

[61] Kamada Y, Mori K, Matsumoto H, et al. N-Acetylglucosaminyltransferase V regulates TGF-beta response in hepatic stellate cells and the progression of steatohepatitis[J]. Glycobiol, 2012, 22(6): 778-787.

[62] Li N, Xu H, Fan K, et al. Altered β 1,6-GlcNAc branched N-glycans impair TGF- β -mediated epithelial-to-mesenchymal transition through Smad signalling pathway in human lung cancer[J]. *J Cell Mol Med*, 2014, 18(10): 1975-1991.

[63] Li Y, Xu J, Chen L, et al. HAb18G (CD147), a cancer-associated biomarker and its role in cancer detection[J]. *Histopathology*, 2009, 54(6): 677-687.

[64] Muramatsu T. Basigin (CD147), a multifunctional transmembrane glycoprotein with various binding partners[J]. *J Biochem*, 2016, 159(5): 481-490.

[65] Grass G D, Dai L, Qin Z, et al. CD147: regulator of hyaluronan signaling in invasiveness and chemoresistance[J]. *Adv Cancer Res*, 2014, 123: 351-373.

[66] Biswas C, Zhang Y, Decastro R, et al. The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily[J]. *Cancer Res*, 1995, 55(2): 434-439.

[67] Miyauchi T, Masuzawa Y, Muramatsu T. The basigin group of the immunoglobulin superfamily: complete conservation of a segment in and around transmembrane domains of human and mouse basigin and chicken HT7 antigen[J]. *J Biochem*, 1991, 110(5): 770-774.

[68] Kasinrerker W, Fiebiger E, Stefanova I, et al. Human leukocyte activation antigen M6, a member of the Ig superfamily, is the species homologue of rat OX-47, mouse basigin, and chicken HT7 molecule[J]. *J Immunol*, 1992, 149(3): 847-854.

[69] Fossum S, Mallett S, Barclay A N. The MRC OX-47 antigen is a member of the immunoglobulin superfamily with an unusual transmembrane sequence[J]. *Eur J Immunol*, 1991, 21(3): 671-679.

[70] Nehme C L, Cesario M M, Myles D G, et al. Breaching the diffusion barrier that compartmentalizes the transmembrane glycoprotein CE9 to the posterior-tail plasma membrane domain of the rat spermatozoon[J]. *J Cell Biol*, 1993, 120(3): 687-694.

[71] Altruda F, Cervella P, Gaeta M L, et al. Cloning of cDNA for a novel mouse membrane glycoprotein (gp42): shared identity to histocompatibility antigens, immunoglobulins and neural-cell adhesion molecules[J]. *Gene*, 1989, 85(2): 445-451.

[72] Ochrietor J D, Moroz T P, van Ekeris L, et al. Retina-specific expression of 5A11/Basigin-2, a member of the immunoglobulin gene superfamily[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44(9): 4086-4096.

[73] Fadool J M, Linser P J. Differential glycosylation of the 5A11/HT7 antigen by neural retina and epithelial tissues in the chicken[J]. *J Neurochem*, 1993, 60(4): 1354-1364.

[74] Schlosshauer B, Herzog K H. Neurothelin: an inducible cell surface glycoprotein of blood-brain barrier-specific endothelial cells and distinct neurons[J]. *J Cell Biol*, 1990, 110(4): 1261-1274.

[75] Fadool J M, Linser P J. 5A11 antigen is a cell recognition molecule which is involved in neuronal-glia interactions in avian neural retina[J]. *Dev Dyn*, 1993, 196(4): 252-262.

[76] Ochrietor J D, Moroz T P, van Ekeris L, et al. Retina-specific expression of 5A11/Basigin-2, a member of the immunoglobulin gene superfamily[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44(9): 4086-4096.

[77] Agrawal S M, Yong V W. The many faces of EMMPRIN-roles in neuroinflammation[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1812(2): 213-219.

[78] Bi J, Li Y, Sun F, et al. Basigin null mutant male mice are sterile and exhibit impaired interactions between germ cells and Sertoli cells[J]. *Dev Biol*, 2013, 380(2): 145-156.

[79] Iacono K T, Brown A L, Greene M I, et al. CD147 immunoglobulin superfamily receptor function and role in pathology[J]. *Exp Mol Pathol*, 2007, 83(3): 283-295.

[80] Jia J, Wang C, Shi Z, et al. Inhibitory effect of CD147/HAb18 monoclonal antibody on cartilage erosion and synovitis in the SCID mouse model for rheumatoid arthritis[J]. *Rheumatology*, 2009, 48(7): 721-726.

[81] Joghetaei N, Stein A, Byrne R A, et al. The extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN, CD147) - a potential novel target in atherothrombosis prevention? [J]. *Thromb Res*, 2013, 131(6): 474-480.

[82] Watanabe A, Yoneda M, Ikeda F, et al. CD147/EMMPRIN acts as a functional entry receptor for measles virus on epithelial cells[J]. *J Virol*, 2010, 84(9): 4183-4193.

[83] Tang Y, Nakada M T, Kesavan P, et al. Extracellular matrix metalloproteinase inducer stimulates tumor angiogenesis by elevating vascular endothelial cell growth factor and matrix metalloproteinases. [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(8): 3193-3199.

[84] Dai J, Dou K, Wang C, et al. The interaction of HAb18G/CD147 with integrin alpha 6 beta 1 and its implications for the invasion potential of human hepatoma cells[J]. *BMC Cancer*, 2009, 9(337).

[85] 廖成功. Basigin选择性剪接体的鉴定及其在肝癌增殖和侵袭中的功能[D]. 第四军医大学,

2010.

[86] Jr. Belton R J, Chen L, Mesquita F S, et al. Basigin-2 is a cell surface receptor for soluble basigin ligand[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(26): 17805-17814.

[87] Liao C, Kong L, Song F, et al. Characterization of basigin isoforms and the inhibitory function of basigin-3 in human hepatocellular carcinoma proliferation and invasion[J]. *Mol Cell Biol*, 2011, 31(13): 2591-2604.

[88] Ochrietor J D, Moroz T P, van Ekeris L, et al. Retina-specific expression of 5A11/Basigin-2, a member of the immunoglobulin gene superfamily. [J]. *Invest Ophth Vis Sci*, 2003, 44(9): 4086-4096.

[89] Liu F, Cui L, Zhang Y, et al. Expression of HAb18G is associated with tumor progression and prognosis of breast carcinoma[J]. *Breast Cancer Res Tr*, 2010, 124(3): 677-688.

[90] Sidhu S S, Nawroth R, Retz M, et al. EMMPRIN regulates the canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway, a potential role in accelerating lung tumorigenesis[J]. *Oncogene*, 2010, 29(29): 4145-4156.

[91] Xu J, Xu H Y, Zhang Q, et al. HAb18G/CD147 functions in invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma[J]. *Mol Cancer Res*, 2007, 5(6): 605-614.

[92] Muramatsu T. Basigin: a multifunctional membrane protein with an emerging role in infections by malaria parasites[J]. *Expert Opin Ther Tar*, 2012, 16(10): 999-1011.

[93] Kanekura T, Chen X. CD147/basigin promotes progression of malignant melanoma and other cancers[J]. *J Dermatol Sci*, 2010, 57(3): 149-154.

[94] Riethdorf S, Reimers N, Assmann V, et al. High incidence of EMMPRIN expression in human tumors[J]. *Int J Cancer*, 2006, 119(8): 1800-1810.

[95] Zhang D W, Zhao Y X, Wei D, et al. HAb18G/CD147 promotes activation of hepatic stellate cells and is a target for antibody therapy of liver fibrosis[J]. *J Hepatol*, 2012, 57(6): 1283-1291.

[96] Tang J, Guo Y, Zhang Y, et al. CD147 induces UPR to inhibit apoptosis and chemosensitivity by increasing the transcription of Bip in hepatocellular carcinoma[J]. *Cell Death Differ*, 2012, 19(11): 1779-1790.

[97] Wu J, Li Y, Dang Y Z, et al. HAb18G/CD147 Promotes radioresistance in hepatocellular carcinoma cells: a potential role for integrin β 1 signaling[J]. *Mol Cancer Ther*, 2015, 14(2): 553-563.

[98] Zhao P, Zhang W, Wang S, et al. HAb18G/CD147 promotes cell motility by regulating annexin II-activated RhoA and Rac1 signaling pathways in hepatocellular carcinoma cells[J]. *Hepatology*, 2011,

54(6): 2012-2024.

[99] Dai J Y, Dou K F, Wang C H, et al. The interaction of HAb18G/CD147 with integrin alpha6beta1 and its implications for the invasion potential of human hepatoma cells[J]. BMC Cancer, 2009, 9: 337.

[100] Chen H, Wang L, Beretov J, et al. Co-expression of CD147/EMMPRIN with monocarboxylate transporters and multiple drug resistance proteins is associated with epithelial ovarian cancer progression[J]. Clin Exp Metastas, 2010, 27(8): 557-569.

[101] Yurchenko V, Constant S, Bukrinsky M. Dealing with the family: CD147 interactions with cyclophilins. [J]. Immunol, 2006, 117(3): 301-309.

[102] Iacono K T, Brown A L, Greene M I, et al. CD147 immunoglobulin superfamily receptor function and role in pathology[J]. Exp Mol Pathol, 2007, 83(3): 283-295.

[103] Kato N, Yuzawa Y, Kosugi T, et al. The E-Selectin ligand Basigin/CD147 is responsible for neutrophil recruitment in renal ischemia/reperfusion[J]. J Am Soc Nephrol, 2009, 20(7): 1565-1576.

[104] Xu J, Shen Z, Chen X, et al. A Randomized controlled trial of Licartin for preventing hepatoma recurrence after liver transplantation[J]. Hepatology, 2007, 45(2): 269-276.

[105] Chen Z, Mi L, Xu J, et al. Targeting radioimmunotherapy of hepatocellular carcinoma with iodine (131I) metuximab injection: clinical phase I/II trials. [J]. Int J Radiat Oncol, 2006, 65(2): 435-444.

[106] Fadool J M, Linser P J. Differential glycosylation of the 5A11/HT7 antigen by neural retina and epithelial tissues in the chicken[J]. J Neurochem, 1993, 60(4): 1354-1364.

[107] Yu X, Jiang J, Li L, et al. The glycosylation characteristic of hepatoma-associated antigen HAb18G/CD147 in human hepatoma cells. [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2006, 38(11): 1939-1945.

[108] Yu X, Hu T, Du J, et al. Crystal structure of HAb18g/CD147-implications for immunoglobulin superfamily homophilic adhesion[J]. J Biol Chem, 2008, 283(26): 18056-18065.

[109] Tang W. Links between CD147 function, glycosylation, and caveolin-1[J]. Mole Biol Cell, 2004, 15(9): 4043-4050.

[110] Fan J, Wang S, Yu S, et al. N-acetylglucosaminyltransferase IVa regulates metastatic potential of mouse hepatocarcinoma cells through glycosylation of CD147[J]. Glycoconj J, 2012, 29(5-6): 323-334.

[111] Bai Y, Huang W, Ma L, et al. Importance of N-Glycosylation on CD147 for its biological

functions[J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(4): 6356-6377.

[112] Hanna S M, Kirk P, Holt O J, et al. A novel form of the membrane protein CD147 that contains an extra Ig-like domain and interacts homophilically[J]. *BMC Biochem*, 2003, 4: 17.

[113] Jia J, Wang C, Shi Z, et al. Inhibitory effect of CD147/HAb18G monoclonal antibody on cartilage erosion and synovitis in the SCID mouse model for rheumatoid arthritis[J]. *Rheumatology*, 2009, 48(7): 721-726.

[114] Sun J, Hemler M E. Regulation of MMP-1 and MMP-2 production through CD147/extracellular matrix metalloproteinase inducer interactions[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(5): 2276-2281.

[115] Papadimitropoulou A, Mamalaki A. The glycosylated IgII extracellular domain of EMMPRIN is implicated in the induction of MMP-2[J]. *Mol Cell Biochem*, 2013, 379(1-2): 107-113.

[116] Hanna S M, Kirk P, Holt O J, et al. A novel form of the membrane protein CD147 that contains an extra Ig-like domain and interacts homophilically[J]. *BMC Biochem*, 2003, 4: 17.

[117] Cui H, Guo T, Wang S, et al. Dimerization is essential for HAb18G/CD147 promoting tumor invasion via MAPK pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 419(3): 517-522.

[118] Taylor P M, Woodfield R J, Hodgkin M N, et al. Breast cancer cell-derived EMMPRIN stimulates fibroblast MMP2 release through a phospholipase A (2) and 5-lipoxygenase catalyzed pathway[J]. *Oncogene*, 2002, 21(37): 5765-5772.

[119] Sidhu S S, Mengistab A T, Tauscher A N, et al. The microvesicle as a vehicle for EMMPRIN in tumor-stromal interactions[J]. *Oncogene*, 2004, 23(4): 956-963.

[120] Egawa N, Koshikawa N, Tomari T, et al. Membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP/MMP-14) cleaves and releases a 22-kDa extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) fragment from tumor cells[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(49): 37576-37585.

[121] Yoshida S, Shibata M, Yamamoto S, et al. Homo-oligomer formation by basigin, an immunoglobulin superfamily member, via its N-terminal immunoglobulin domain[J]. *Eur J Biochem*, 2000, 267(14): 4372-4380.

[122] Li J, Huang W, Lin P, et al. N-linked glycosylation at Asn152 on CD147 affects protein folding and stability: promoting tumour metastasis in hepatocellular carcinoma[J]. *Sci Rep*, 2016, 6(1): 35210.

[123] Fanelli A, Grollman E F, Wang D, et al. MCT1 and its accessory protein CD147 are differentially regulated by TSH in rat thyroid cells. [J]. *Am J Physiol*, 2003, 285(6): E1223-E1229.

- [124] Tyler R E, Pearce M M P, Shaler T A, et al. Unassembled CD147 is an endogenous endoplasmic reticulum-associated degradation substrate[J]. *Mol Biol Cell*, 2012, 23(24): 4668-4678.
- [125] 黄婉. CD147分子N-糖基化修饰的功能研究及其在肿瘤进展中的意义[D]. 第四军医大学, 2012.
- [126] Jia L, Zhou H, Wang S, et al. Deglycosylation of CD147 down-regulates Matrix Metalloproteinase-11 expression and the adhesive capability of Murine hepatocarcinoma cell HcaF in vitro[J]. *IUBMB Life*, 2006, 58(4): 209-216.
- [127] Beesley A H, Weller R E, Kees U R. The role of BSG (CD147) in acute lymphoblastic leukaemia and relapse[J]. *Br J Haematol*, 2008, 142(6): 1000-1002.
- [128] Zhang Z, Zhao Y, Jiang L, et al. Glycomic alterations are associated with multidrug resistance in human leukemia[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012, 44(8): 1244-1253.
- [129] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [130] Fu Z G, Wang L, Cui H Y, et al. A novel small-molecule compound targeting CD147 inhibits the motility and invasion of hepatocellular carcinoma cells[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(8): 9429-9447.
- [131] Carvalho S, Catarino T A, Dias A M, et al. Preventing E-cadherin aberrant N-glycosylation at Asn-554 improves its critical function in gastric cancer[J]. *Oncogene*, 2016, 35(13): 1619-1631.
- [132] Caldieri G, Barbieri E, Nappo G, et al. Reticulon 3-dependent ER-PM contact sites control EGFR nonclathrin endocytosis[J]. *Science*, 2017, 356(6338): 617-624.
- [133] Nieto M A, Huang R Y, Jackson R A, et al. EMT: 2016[J]. *Cell*, 2016, 166(1): 21-45.
- [134] Lambert A W, Pattabiraman D R, Weinberg R A. Emerging biological principles of metastasis[J]. *Cell*, 2017, 168(4).
- [135] Thiery J P, Acloque H, Huang R Y J, et al. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease[J]. *Cell*, 2009, 139(5): 871-890.
- [136] Li Y, Wu J, Song F, et al. Extracellular membrane-proximal domain of HAb18G/CD147 binds to metal ion-dependent adhesion site (MIDAS) motif of integrin $\beta 1$ to modulate malignant properties of Hepatoma Cells[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(7): 4759-4772.
- [137] Cai X, Thinn A, Wang Z, et al. The importance of N-glycosylation on beta3 integrin ligand

binding and conformational regulation[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 4656.

[138] Hou S, Hang Q, Isaji T, et al. Importance of membrane-proximal N-glycosylation on integrin $\beta 1$ in its activation and complex formation[J]. *FASEB J*, 2016, 30(12): 4120-4131.

[139] Xu W, Yang Z, Lu N. A new role for the PI3K/Akt signaling pathway in the epithelial-mesenchymal transition. [J]. *Cell Adhes Migr*, 2015, 9(4): 317-324.

[140] Guo H, Johnson H, Randolph M, et al. Specific posttranslational modification regulates early events in mammary carcinoma formation[J]. *P Nat Acad Sci USA*, 2010, 107(49): 21116-21121.

[141] Wu J, Lu M, Li Y, et al. Regulation of a TGF- $\beta 1$ -CD147 self-sustaining network in the differentiation plasticity of hepatocellular carcinoma cells[J]. *Oncogene*, 2016, 35(42): 5468-5479.

[142] Xue G, Hemmings B A. PKB/Akt-dependent Regulation of cell motility[J]. *J Nat Cancer I*, 2013, 105(6): 393-404.

[143] Tang J, Wu Y M, Zhao P, et al. Overexpression of HAb18G/CD147 promotes invasion and metastasis via $\alpha 3\beta 1$ integrin mediated FAK-paxillin and FAK-PI3K-Ca²⁺ pathways[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65(18): 2933-2942.

附 录

Journal of Pathology

J Pathol 2018; 245: 41–52

Published online 30 March 2018 in Wiley Online Library

(wileyonlinelibrary.com) DOI: 10.1002/path.5054

ORIGINAL PAPER

N-glycosylation by N-acetylglucosaminyltransferase V enhances the interaction of CD147/basigin with integrin β 1 and promotes HCC metastasisJian Cui¹✉, Wan Huang¹, Bo Wu², Jin Jin¹, Lin Jing¹, Wen-Pu Shi¹, Zhen-Yu Liu¹, Lin Yuan¹, Dan Luo¹, Ling Li¹, Zhi-Nan Chen^{1*} and Jian-Li Jiang^{1*}¹ Cell Engineering Research Centre and Department of Cell Biology, State Key Laboratory of Cancer Biology, Fourth Military Medical University, Xi'an, PR China² State Key Laboratory of Proteomics, Beijing Proteome Research Center, Beijing Institute of Radiation Medicine, Collaborative Innovation Center for Cancer Medicine, Beijing, PR China

*Correspondence to: Jian-Li Jiang or Zhi-Nan Chen, Cell Engineering Research Centre and Department of Cell Biology, State Key Laboratory of Cancer Biology, Fourth Military Medical University, 169 Chang Le West Road, Xi'an, 710032, PR China. E-mail: jiangjl@fmmu.edu.cn; zhinanchen@fmmu.edu.cn

†These authors contributed equally to this work.

Abstract

While the importance of protein N-glycosylation in cancer cell migration is well appreciated, the precise mechanisms by which N-acetylglucosaminyltransferase V (GnT-V) regulates cancer processes remain largely unknown. In the current study, we report that GnT-V-mediated N-glycosylation of CD147/basigin, a tumor-associated glycoprotein that carries β 1,6-N-acetylglucosamine (β 1,6-GlcNAc) glycans, is upregulated during TGF- β 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), which correlates with tumor metastasis in patients with hepatocellular carcinoma (HCC). Interruption of β 1,6-GlcNAc glycan modification of CD147/basigin decreased matrix metalloproteinase (MMP) expression in HCC cell lines and affected the interaction of CD147/basigin with integrin β 1. These results reveal that β 1,6-branched glycans modulate the biological function of CD147/basigin in HCC metastasis. Moreover, we showed that the PI3K/Akt pathway regulates GnT-V expression and that inhibition of GnT-V-mediated N-glycosylation suppressed PI3K signaling. In summary, β 1,6-branched N-glycosylation affects the biological function of CD147/basigin and these findings provide a novel approach for the development of therapeutic strategies targeting metastasis.

© 2018 The Authors. The Journal of Pathology published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of Pathological Society of Great Britain and Ireland.

Keywords: N-glycosylation; basigin; EMMPRIN; CD147; metastasis; protein–protein interaction; epithelial to mesenchymal transition

Received 20 October 2017; Revised 28 January 2018; Accepted 6 February 2018

No conflicts of interest were declared.

Introduction

Accumulating evidence shows that aberrant glycosylation occurs frequently in cancer [1,2]. Alterations in glycosylation patterns regulate cancer development and progression, serve as important biomarkers, and provide a set of specific targets for diagnosis and therapeutic intervention [3–6]. The modifications most often associated with cancer include sialylation, β 1,6-GlcNAc-branched N-glycans, and core fucosylation [7]. Increased GlcNAc-branched N-glycan levels result from increased activity of N-acetylglucosaminyltransferase V (GnT-V) encoded by the mannoside acetylglucosaminyltransferase 5 (MGAT5) gene and are closely associated with cancer metastasis [8]. For example, an increase in GnT-V-dependent N-glycan modifications enhances the

invasiveness of glioma, colon cancer, and gastric cancer cells by regulating cell adhesion [1,9], whereas core fucosylation, catalyzed by fucosyltransferase VIII, is involved in the expression of cancer biomarkers [10].

CD147, also known as basigin or EMMPRIN, is a tumor-associated transmembrane glycoprotein that belongs to the immunoglobulin superfamily [11–13]. As an extracellular inducer of MMPs, basigin is aberrantly expressed on the cell surface of various tumors and correlates with aggressive disease and poor prognosis [12,14,15]. In hepatocellular carcinoma (HCC), CD147/basigin is closely associated with carcinogenesis, EMT, and chemoresistance [16–19]. Mature CD147/basigin is highly glycosylated; N-glycosylation accounts for almost half of the molecular weight [20,21]. CD147/basigin contains three N-linked glycosylation sites (Asn44, Asn152, and Asn186), which contribute

© 2018 The Authors. The Journal of Pathology published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of Pathological Society of Great Britain and Ireland. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

致 谢

时间荏苒，不觉三年。愧光阴虚度，无所长进，忝列师门，常觉不安。幸师门宽厚，未因愚而弃，得以完成硕士求学。

诚挚地感谢陈志南院士将我领进科学的殿堂，给我提供广阔的研究平台，传授宝贵的科研经验。陈院士治学严谨，实事求是，开拓进取的精神是我一生学习的榜样。

衷心地感谢我的导师蒋建利教授传道受业解惑。在这三年期间，老师给予了我谆谆教诲和悉心关怀。导师在我的课题设计，结果分析，文章写作以及发表过程中都给予了细心的指导，使得学业最终幸有所长。导师的博学慎思，审问笃行，是我学习的榜样。师恩浩荡，无以言表。

衷心感谢黄婉副教授将我领进科研的大门，师姐在我的课题设计，结果分析，文章写作及发表过程中都给予了细心的指导。

非常感谢史文璞硕士研究生，金进硕士研究生，冯转硕士研究生，陈若博士研究生，荆琳博士研究生，罗丹博士研究生，袁林博士研究生，董妍硕士研究生，孙唐娜硕士研究生，左佳蕙硕士研究生给予的支持和鼓励，十分感激。

真诚感谢李玲教授，边惠洁教授，宋斐副教授，唐娟副教授在课题设计方面给予的指导。感谢姚西英实验师，徐力青实验师，王彬实验师，孙秀璇实验师，南刚实验师，冯飞实验师在实验操作给予的帮助。

感谢实验室崔洪勇博士，汪世婕博士，李凡妮博士，刘振禹博士研究生，李主春硕士研究生，董曦文硕士研究生，程媛媛硕士研究生，樊新宇硕士研究生，王珂硕士研究生，陆蒙博士研究生，雍遇乐博士研究生，刘泽坤博士研究生，李浩博士研究生，和已经毕业的吴波博士，徐宝卿博士，周洋硕士和李江华硕士，在实验上的无私帮助。

在硕士学习期间，我还得到很多老师、同学及朋友的关怀与帮助，无法一一列举，表示深深的谢意。

特别感谢我的父母的支持以及多年的付出与陪伴，使我得以安心完成学业，给

我一路前行无所畏惧的勇气。

最后感谢自己，感谢自己不忘初心，坚持不懈，在一次次失败面前不放弃，得以顺利完成我的硕士学业。