

窖蛋白-1通过增强氧连接的 N-乙酰葡萄糖胺糖基转移酶表达诱导小鼠肝癌细胞的迁移和侵袭

王玲燕, 王语涵, 张程, 陈茜茜, 黄煌, 李文利, 张嘉宁*, 刘宇博*
(大连理工大学生命科学与药学院生物学教研室, 辽宁 盘锦 124221)

摘要 窖蛋白-1(caveolin-1, Cav-1)是胞膜窖的主要结构和功能蛋白质,参与调控多种细胞信号转导过程。然而,Cav-1调节蛋白质糖基化修饰和肿瘤转移作用机制尚不明确。本研究在小鼠肝癌细胞中证明,Cav-1能够促进蛋白质的氧连接的 N-乙酰葡萄糖胺(*O*-linked N-acetylglucosamine, *O*-GlcNAc)糖基化及其 *O*-GlcNAc 转移酶(*O*-GlcNAc transferase, OGT)的表达,增强了小鼠肝癌细胞的迁移和侵袭潜能。RT-qPCR、Western 印迹和双荧光素酶报告基因结果显示,Cav-1通过下调转录因子 RUNX2 表达,抑制了 miR24 的转录($P<0.05$)。随后研究结果表明,miR24 能够靶向 *Ogt* mRNA 3'-UTR 并抑制其表达($P<0.05$)。这使得 Cav-1 通过 RUNX2/miR24 正向调控 OGT 的表达和 *O*-GlcNAc糖基化,最终导致小鼠肝癌细胞迁移和侵袭潜能增加。这些结果揭示了 Cav-1 调控糖基转移酶 OGT 表达和蛋白质 *O*-GlcNAc 糖基化的新机制,为肝癌的发生发展机制研究提供了新的理论和实验依据。

关键词 肝癌;窖蛋白-1;糖基转移酶;氧连接的 N-乙酰葡萄糖胺

中图分类号 Q7;Q5

Upregulation of OGT by Caveolin-1 Promotes Mouse Hepatocellular Carcinoma Cells Migration and Invasion

WANG Ling-Yan, WANG Yu-Han, ZHANG Cheng, CHEN Xi-Xi, HUANG Huang, LI Wen-Li, ZHANG Jia-Ning*, LIU Yu-Bo*

(Research Group of Biology, School of Life and Pharmaceutical Sciences, Dalian University of Technology, Panjin 124221, Liaoning, China)

Abstract Caveolin-1 (Cav-1), a major structural protein of caveolae, is implicated in the vesicular uptake processes of transcytosis and cell signaling. However, its role in modulating protein glycosylation and tumor metastasis remains to be further elucidated. In the present study, it was shown that Cav-1 promotes the expression of *O*-GlcNAcylation and *O*-GlcNAc transferase (OGT), and triggers the invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma (HCC) cells. The results of RT-qPCR, Western blot and dual luciferase reporter assay showed that Cav-1 negatively regulated the expression of transcription factor RUNX2 in HCC. Subsequently, this results in attenuate RUNX2-induced transcription of miR24. miR24 suppresses mouse HCC cells invasion and metastasis via directly targeting *Ogt* mRNA 3'UTR. This research provides evidence of Cav-1-mediated OGT expression and *O*-GlcNAc (*O*-linked N-acetylglucosamine) eleva-

收稿日期: 2021-01-15; 修回日期: 2021-03-15; 接受日期: 2021-03-28
国家自然科学基金 (No. 31570802, 31870793) 和中央高校基本科研业务费 (No. DUT20YG130, DUT20YG116) 资助
* 通讯作者 Tel: 0427-2631413; E-mail: liuyubo@dlut.edu.cn; Tel: 0427-2631889; E-mail: jnzhang@dlut.edu.cn
Received: January 15, 2021; Revised: March 15, 2021; Accepted: March 28, 2021
Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31570802, 31870793) and the Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. DUT20YG130, DUT20YG116)
* Corresponding author Tel: 0427-2631413; E-mail: liuyubo@dlut.edu.cn; Tel: 0427-2631889; E-mail: jnzhang@dlut.edu.cn

tion. These data give insight into a novel mechanism of HCC occurrence and development.

Key words hepatocellular carcinoma (HCC); caveolin-1 (Cav-1); *O*-GlcNAc transferase (OGT); *O*-linked N-acetylglucosamine (*O*-GlcNAc)

作为胞膜窖的主要成分和支架蛋白质,窖蛋白-1(caveolin-1, Cav-1)在保持胞膜窖的结构、形状及功能方面发挥作用^[1,2]。窖蛋白-1通过绞手架结构与胞内各种信号分子结合,并参与调节相关信号通路的活性^[3-5]。窖蛋白-1参与包括黏附、迁移、凋亡及衰老等多种生物学过程^[6]。本课题组前期研究表明,窖蛋白-1可通过调控岩藻糖基化修饰增强鼠肝癌细胞的转移^[7-10];窖蛋白-1通过调控唾液酸转移酶 ST6Gal-1 表达影响肝癌细胞的唾液酸化修饰和黏附能力^[8],提示窖蛋白-1能够通过对蛋白质糖基化修饰的调节,在肝癌的发生发展中发挥作用,但其具体调控机制尚未阐明。

氧连接的N-乙酰葡糖胺(*O*-linked N-acetylglucosamine, *O*-GlcNAc)糖基化是一种普遍存在于胞质和核蛋白质的可逆单糖修饰,由*O*-GlcNAc糖基转移酶(*O*-GlcNAc transferase, OGT)催化完成^[9],参与调控包括肿瘤转移在内的多种生理和病理过程^[11, 12]。本文探究了窖蛋白-1调控*O*-GlcNAc糖基化及OGT表达作用机制,并进一步分析了其对小鼠肝癌细胞转移侵袭潜能的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

无淋巴转移潜能小鼠肝癌细胞系 Hepa1-6 购自北京协和医院细胞中心,高淋巴转移潜能小鼠肝癌细胞系 Hca-F 由大连医科大学病理学系建立并保存,稳定过表达窖蛋白-1的 Hepa1-6 细胞(Hepa1-6/Cav-1)由本室构建并保存;高糖 DMEM 及 RPMI 1640 培养基购于 Gibco 公司;RIPA 裂解液(强)、PMSF 均购自碧云天公司;窖蛋白-1、*O*-GlcNAc 糖基转移酶、GAPDH 和 RUNX2 抗体购于 Cell Signaling Technology 公司,*O*-GlcNAc 糖基化抗体(CTD110.6)购于 Bio Legend 公司;ECL 发光液购于 GE healthcare 公司。鼠源 RUNX2 小干扰 RNA 序列购自锐博生物科技有限公司;小鼠表达质粒 pcDNA3.1-Amp-Cav-1、pCMV5-Amp-RUNX2、pCIGP05-Puro-OGT,小鼠敲除质粒 pGPU6-shCav-1、pGPH1-shOGT 为本室保存;miR24 模拟物(mimic)、miR24 抑制物(inhibitor)购自上海吉玛基因。

1.2 细胞培养

细胞复苏后,培养在含 10% 胎牛血清、100 U/

mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素的 DMEM 培养基中,于 37 ℃,5% CO₂,饱和湿度条件下培养。

1.3 细胞转染

Hca-F 为悬浮细胞,本研究采取电穿孔法进行细胞转染以保证转染效率。取 1×10⁶ 个对数生长期 Hca-F 细胞,使用 DMEM 培养基重悬,加入 2 μg 带有相应质粒混匀,转移至 4 mm 电转杯中。电穿孔条件为 250 V,脉冲时程 20 ms,1 次。随后,在 10 mL 含 10% 胎牛血清及双抗的 RPMI1640 培养基中培养。Hepa1-6 采用脂质体转染法,实验操作根据 Invitrogen 公司脂质体转染试剂 Lipofectamine 2000 使用说明书进行。将 Hepa1-6 细胞接种于 6 孔板中,待细胞生长至 75% 汇合度时进行转染。将质粒与 Lipofectamine 2000 相关试剂按比例混合孵育后,将这些 DNA-脂质复合物加入 Hepa1-6 细胞中。随后,在 37 ℃,5% CO₂ 培养箱中培养 24~48 h。miR24 模拟物(mimic)、miR24 抑制物(inhibitor)的细胞转染操作参照上海吉玛基因试剂盒说明书进行。

1.4 细胞划痕实验

取小鼠肝癌细胞以 1×10⁵/孔接种于 6 孔培养板中。待细胞培养至完全融合时,用 10 μL 无菌枪头在每孔单层细胞上划痕。在 0 h、24 h、48 h 时,分别用 PBS 清洗 3 次,在倒置显微镜下观察并拍照记录划痕宽度。

1.5 Transwell 小室分析

取在对数生长期的细胞 1×10⁵,用 100 μL 不含血清的培养基稀释成细胞悬液。在 Transwell 小室的下室中加入 600 μL 含 20% 胎牛血清的培养基,上室中加入之前的细胞悬液,注意排除气泡。于 5% CO₂,37 ℃ 的细胞培养箱中培养 24 h。取出 Transwell 小室的上室,使用 PBS 浸泡清洗 3 次,之后用 100% 甲醇浸泡固定 30 min。用 1% 结晶紫溶液浸泡染色 30 min,使用 PBS 浸泡清洗 3 次。于倒置显微镜下观察,选取 5 个视野拍照并计数。

1.6 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time qPCR)

使用 TRIzol 提取细胞总 RNA,分别使用 PrimeScript miRNA cDNA 合成试剂盒和 PrimeScript RT Master Mix Kit(TaKaRa 公司)将 miRNA 和 mRNA 反转录为 cDNA。以 SYBR Premix Ex Taq II(TaKaRa

公司) 为荧光探针,使用 LightCycler 96PCR 仪 (Roche 公司) 进行实时 Real-time qPCR,定量比较 miRNA 或 mRNA 的表达水平。使用 U6 snRNA 和 GAPDH 分别对 miRNA 和 mRNA 的表达水平进行标准化。GAPDH 上游引物为 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3',下游引物为 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3';OGT 上游引物为 5'-GGACAGACTATGATGACGGATGAAG-3',下游引物为 5'-CATGC-TATGGTGAGGATGGACAGAAG-3';miRNA 的特异性反转录引物由 Ribo 公司设计。

1.7 Western 印迹检测

提取 1×10^7 细胞总蛋白质,采用 BCA 蛋白质定量试剂盒(碧云天公司)进行蛋白质定量。使用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质,将凝胶上的蛋白质转移至 PVDF 膜,使用 5%脱脂奶粉室温封闭 PVDF 膜 2 h。窖蛋白-1、RUNX2、O-GlcNAc 糖基转移酶、O-GlcNAc 一抗稀释比例为 1:1 000,4 ℃ 孵育过夜, TBST 洗涤 PVDF 膜 5 次,对应二抗室温孵育 1 h,洗涤后使用 ECL 发光试剂盒(GE healthcare 公司)进行化学发光。

1.8 双荧光素酶分析

采用 TargetScan7.2 软件 (<http://www.targetscan.org/>) 预测 RUNX2 在 miR24-1 及 miR24-2 启动子区的靶基因位点,并获得位点所在启动子区片段。设计 PCR 扩增引物,miR24-1 上游引物为 5'-TGGGCTGGAGTAAGCAGGTA-3',下游引物为 5'-TCCACATGTGCTGAGTGTCC-3';miR24-2 上游引物为 5'-TCTACATTGGGTAGCCCCCA-3',下游引物为 5'-GGTACACCTCACCACACACA-3'。将 pGL3-miR24-1-promoter 质粒或 pGL3-miR24-2-promoter 质粒与 pCMV-RUNX2 质粒共转染到 293T 细胞中。培养 48 h,使用双荧光素酶报告基因检测试剂盒(美国 Promega)说明书指示,检测双荧光素酶活性。

1.9 统计学方法

计量资料采用 *t* 检验,数据采用平均值 \pm 方差来表, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。统计图表采用 GraphPad Prism 8.0 软件绘制。

2 结果

2.1 小鼠肝癌细胞中窖蛋白-1 与 O-GlcNAc 糖基化水平呈正相关

为了研究窖蛋白-1 在肝癌发展过程中的功能,尤其是窖蛋白-1 与异常 O-GlcNAc 糖基化和 OGT 表达引起的肿瘤转移的关系,本文在小鼠肝癌细胞

Hepa1-6(无 Cav-1 表达)细胞株及稳定过表达窖蛋白-1 的 Hepa1-6(Hepa1-6/Cav-1)细胞株中进行了 qRT-PCR 检测。结果显示,Hepa1-6 细胞过表达窖蛋白-1 后,OGT 的转录水平和蛋白质水平显著提高,且肝癌细胞的 O-GlcNAc 修饰水平也有明显上调(Fig.1)。这些结果表明,窖蛋白-1 的表达与 O-GlcNAc 糖基化呈正相关性,窖蛋白-1 可能通过上调 OGT 转录水平影响 OGT 的表达和胞内蛋白质的 O-GlcNAc 糖基化。

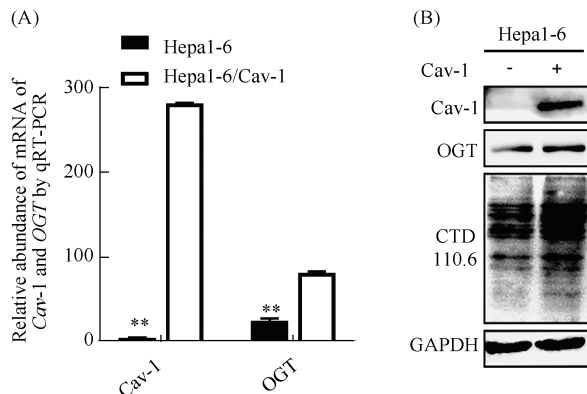


Fig.1 Upregulation of OGT is associated with Cav-1 in mouse HCC cell lines (A) qRT-PCR showed the expression of Cav-1 and OGT after overexpression of Cav-1 in Hepa1-6 cells. (B) Western blotting assays were used to detect the protein levels of Cav-1, OGT and O-GlcNAc after overexpression of Cav-1 in mouse HCC cell line Hepa1-6. Data are expressed as mean \pm SD ($n = 3$), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.2 上调窖蛋白-1 抑制小鼠肝癌细胞中 RUNX2 的表达,抑制促进 miR24 的表达

已有报道显示,窖蛋白-1 可在成骨细胞抑制转录因子 RUNX2 的表达,而 RUNX2 已被证明与肝癌细胞的迁移和侵袭相关。因此本文推测,窖蛋白-1 诱导的 OGT 表达与 RUNX2 有关。为了进一步证明这一推测,本文观察了窖蛋白-1 表达改变对小鼠肝癌细胞中 RUNX2 的影响。结果显示,在无窖蛋白-1 表达的 Hepa1-6 小鼠肝癌细胞中,过表达窖蛋白-1 导致 RUNX2 蛋白表达水平下调(Fig.2A);而在高窖蛋白-1 表达的 Hca-F 小鼠肝癌细胞中,利用 shRNA 敲低窖蛋白-1 的表达,使得 RUNX2 蛋白的表达水平上升(Fig.2B)。这些结果表明,在小鼠肝癌细胞中,窖蛋白-1 能够抑制转录因子 RUNX2 蛋白质水平的表达。

2.3 小鼠肝癌细胞中上调 RUNX2 直接激活 miR24 的转录,抑制 O-GlcNAc 糖基转移酶表达

为了进一步研究窖蛋白-1 介导的 RUNX2 抑制

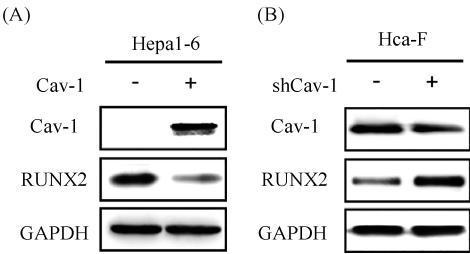


Fig.2 Cav-1 downregulates the expression of RUNX2

(A) Western blotting assays were used to detect the protein levels of Cav-1 and RUNX2 after overexpression of Cav-1 in mouse HCC cell line Hepa1-6. (B) Western blotting assays were used to detect the protein level of Cav-1 and RUNX2 after knockdown of Cav-1 in mouse HCC cell line Hca-F

作用对 OGT 表达的影响, 本文将 RUNX2 的表达质粒转染到 Hepa1-6 中, 并利用 shRNA 敲减 Hca-F 细胞中 RUNX2 的表达。结果显示, 在 Hepa1-6 细胞中, RUNX2 的过表达使 OGT 的蛋白质水平下降, 敲低 RUNX2 表达时, OGT 的表达水平被上调 (Fig. 3A); 同时, 在 Hca-F 细胞中, RUNX2 的下调激活了 OGT 蛋白的表达; 过表达 RUNX2 时, OGT 的表达水平被下调 (Fig. 3B), 这表明 RUNX2 在 OGT 表达中起负调控作用。根据本室已发表研究结果, miR24 可以通过直接靶向 *Ogt* mRNA 3' 非编码区在转录后水平抑制 OGT 的表达^[13]。为了探究转录因子 RUNX2 和 miR24 的关系, 本文首先使用 qRT-PCR 实验检测小鼠肝癌细胞中 RUNX2 对 miR24 表达水平的影响。与对照组相比, Hepa1-6 细胞中 RUNX2 的过表达上调了 miR24 的表达 (Fig. 3C); 在 Hca-F 细胞中, 利用 shRNA 抑制了 RUNX2 的表达后, miR24 表达水平显著下降 (Fig. 3D)。上述结果表明, 转录因子 RUNX2 可能正调控 miR24 的表达。

miR24-1 和 miR24-2 作为 miR24 家族的 2 个成

员, 虽然它们的序列位于不同的染色体上, 但是 miR24-1 转录产生的两组成熟序列与 miR24-2 的两组成熟序列完全相同。为了探究 RUNX2 调控了哪种 miR24 成员的表达, 本文利用 JASPAR (<http://jaspar.genereg.net/>) 在线工具, 分别对 miR24-1 和 miR24-2 启动子的 RUNX2 的结合位点进行了预测 (Table 1)。根据预测位点选取启动子区片段, 并分别克隆构建了 pGL3-miR24-1-promoter 和 pGL3-miR24-2-promoter 质粒。分别将其与 pCMV-RUNX2 质粒共转染到 293T 细胞, 再使用双荧光素酶报告基因实验检测 RUNX2 对报告基因活性的影响。结果表明, RUNX2 过表达显著提高了 pGL3-miR24-1-promoter 和 pGL3-miR24-2-promoter 的报告基因活性 (Fig. 3E)。上述结果表明, 转录因子 RUNX2 能够分别直接与 miR24-1 和 miR24-2 的启动子区结合, 并促进其转录, 进而调控 OGT 的表达。

2.4 窖蛋白-1 通过上调 O-GlcNAc 糖基转移酶的表达增强小鼠肝癌细胞迁移和侵袭潜能

为了进一步确认 RUNX2 激活的 miR24 表达是否参与窖蛋白-1 介导的肝癌细胞迁移和侵袭过程, 本文继续检测了 miR24 类似物 (mimic) 或抑制剂 (inhibitor) 转染至不同的小鼠肝癌细胞, OGT 的表达水平改变。与本室前期在乳腺癌中所获结果一致, Hepa1-6 肝癌细胞中 miR24 抑制剂的转染使 OGT 蛋白表达水平显著增加 (Fig. 4A); 而 miR24 的过表达则显著抑制了 OGT 蛋白的表达 (Fig. 4B), 证明 miR24 确实负调控了 OGT 的表达。为了进一步确认 miR24 是否参与了窖蛋白-1 所介导的 OGT 表达上调, 本文在窖蛋白-1 表达水平较低的 Hepa1-6 小鼠肝癌细胞中, 上调了窖蛋白-1 的表达, 使 miR24 的表达水平下调 (Fig. 4C); 同样的, 在窖蛋白-1 表达

Table 1 RUNX2-binding sites in the miR24-1 and miR24-2 promoters predicted by JASPAR

Promoter	Start position/bp	End position/bp	Sequence	Relative score
miR24-1	-546	-532	TGGTATGTGGTGTGT	0.92
miR24-1	-2 327	-2 313	GCTCTCTGTGGCCTG	0.91
miR24-1	-1 146	-1 132	CTTGGCTGTGGTGTA	0.89
miR24-1	-2 331	-2 323	ATGTGGTCT	0.88
miR24-1	-69	-61	AGGCGGTTT	0.88
miR24-1	-306	-298	ACACCACAC	0.86
miR24-1	-222	-208	AAGGCCACATACTCA	0.86
miR24-2	-962	-954	TTGGGGTT	0.88
miR24-2	-1 039	-1 025	AAATTTTGTGGCTTG	0.87
miR24-2	-959	-945	GGGGTTTTGTTGTTT	0.87
miR24-2	-208	-109	ACTGTGTGTGGTGAG	0.86

水平较高的 Hca-F 小鼠肝癌细胞中,下调了窖蛋白-1 的表达,使 miR24 的表达水平上调 (Fig.4 D)。证明窖蛋白-1 对于 miR24 具有抑制其表达的作用,并且 miR24 能下调 OGT 的表达水平。

为了进一步验证窖蛋白-1 介导的 OGT 表达上调的分子机制,本文在转移潜能不同的 Hepa1-6(低转移潜能)及 Hac-F(高转移潜能)细胞中分别上调或下调了窖蛋白-1 的表达。结果显示,窖蛋白-1 的过表达在 Hepa1-6 细胞中抑制了 RUNX2 表达的同时,也显著降低了 miR24 的转录 (Fig.4C, E)。与此相同,在 Hca-F 细胞中敲减窖蛋白-1 显著增加了 miR24 的转录 (Fig.4D, F)。结合 miR24 对 OGT 表达中的抑制作用,这些结果证明,窖蛋白-1 能够通过抑制转录因子 RUNX2 的表达,上调肝癌细胞 OGT 表达,以及胞内蛋白质的 O-GlcNAc 糖基化水平。

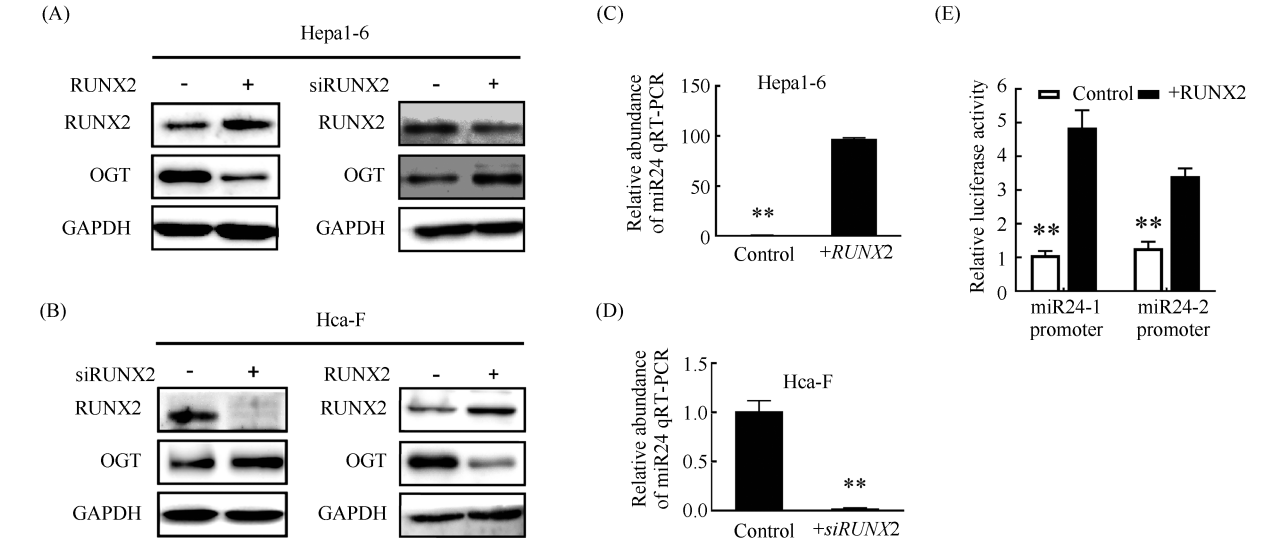


Fig.3 RUNX2 plays a key role in regulating OGT expression by binding to the promoter of miR24 (A) qRT-PCR showed miR24 expression after overexpression of RUNX2 in Hepa1-6 cells. (B) Western blotting assays were used to detect the protein expression levels of RUNX2 and OGT after overexpression of RUNX2 in Hepa1-6 cells. (C) qRT-PCR showed miR24 expression after knockdown of *RUNX2* expression in Hca-F cells. (D) Western blotting assays were used to detect the protein expression levels of RUNX2 and OGT after knockdown of *RUNX2* expression in Hca-F cells. (E) Luciferase assays of reporter activity after co-transfection of either the partial miR24-1 and miR24-2 promoters with the pCMV-RUNX2 plasmid into HCC cells showed that RUNX2 targeted the promoter of miR24. Data are expressed as mean \pm SD ($n = 3$), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3 讨论

胞膜窖和窖蛋白在多种重要的细胞生命过程中发挥关键生理作用,包括水泡运输、胆固醇稳态和信号转导等^[7]。窖蛋白-1除了作为胞膜窖的结构蛋白质外,在肿瘤细胞中同样发挥了很多重要调控作用。据报道,在肝癌细胞中窖蛋白-1的过表达可抑制肝癌细胞凋亡并促进细胞增殖,发挥癌基因样作用^[14]。也有报道证明,窖蛋白-1在其他多种癌症中

另外,本文通过细胞划痕和 Transwell 小室实验,分别检测了窖蛋白-1诱导的 OGT 表达对小鼠肝癌细胞迁移和侵袭能力的影响。与对照组相比,窖蛋白-1的过表达显著促进了 Hepa1-6 细胞的迁移;而在稳定过表达窖蛋白-1的 Hepa1-6 细胞中,利用 shRNA 敲减 *OGT* 的表达,细胞迁移潜能显著减弱 (Fig.4G)。Transwell 小室实验分析表明,窖蛋白-1增加了 Hepa1-6 细胞的侵袭潜能。而相比 Hepa1-6/Cav-1 细胞,下调 OGT 表达后,细胞侵袭潜能显著降低 (Fig.4H)。同样的,在迁移能力较高的 Hca-F 小鼠肝癌细胞中敲低窖蛋白-1 表达,细胞的侵袭潜能降低。在此基础上,过表达 OGT,侵袭潜能显著提高 (Fig.4I)。以上结果表明,窖蛋白-1 可以通过上调 OGT 表达增加胞内蛋白质的 O-GlcNAc 修饰,最终增强小鼠肝癌细胞迁移和侵袭潜能。

可能具有抑癌基因的特征^[15, 16]。尽管窖蛋白-1 在肝癌细胞中有致癌因子的作用,但是其发挥功能的分子机制尚不明确。通过比较 Hape1-6 与 Hepa1-6/Cav-1 细胞的迁移侵袭潜能。本文发现,窖蛋白-1 表达水平与小鼠肝癌细胞的转移潜能呈正相关。窖蛋白-1 可通过抑制转录因子 RUNX2 的表达,负调节 miR24 的转录,从而上调了 OGT 的转录水平和胞内蛋白质的 O-GlcNAc 糖基化,最终导致小鼠肝癌细胞迁移侵袭潜能增加。

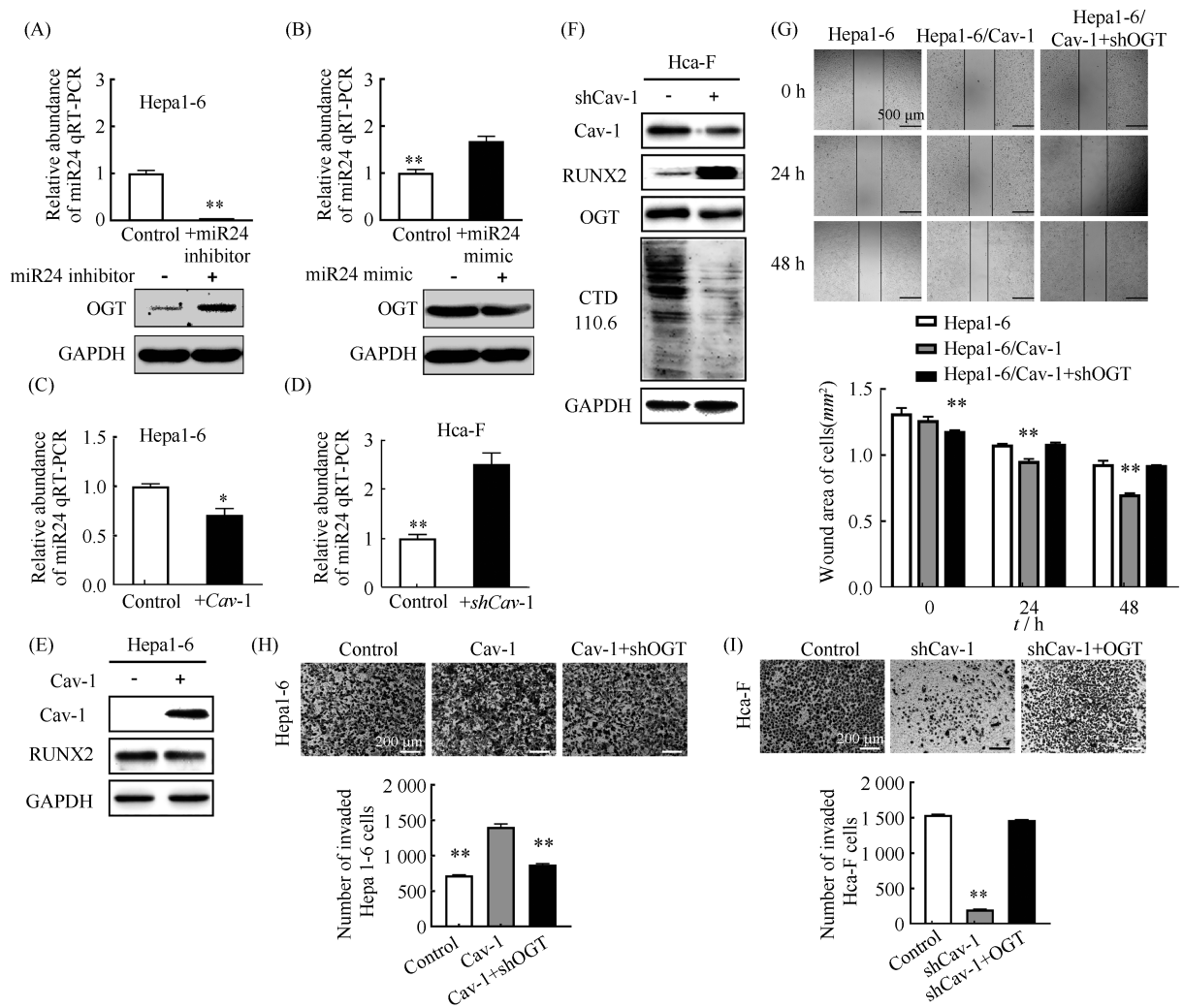


Fig.4 Cav-1 promotes cell migration and invasion by enhancing OGT expression (A) and (B) Altering miR24 expression impacts OGT protein expression in Hepa1-6 and Hca-F cells. Q PCR and immunoblot analysis of OGT expression were performed following treatment with miR24 mimic or inhibitor. (C) qRT-PCR showed miR24 expression after overexpression of *Cav-1* in Hepa1-6 cells. (D) qRT-PCR showed miR24 expression after knockdown of *Cav-1* expression in Hca-F cells. (E) Western blotting assays were used to detect the protein expression levels of Cav-1 and RUNX2 after overexpression of Cav-1 in Hepa1-6 cells. (F) Western blotting assays were used to detect the protein expression levels of Cav-1, RUNX2, OGT and O-GlcNAc after knockdown of *Cav-1* expression in Hca-F cells. (G) and (H) Wound healing assays and Transwell invasion assays showed that the Cav-1 enhanced migration and invasion ability of HCC cells by upregulating OGT. Similarly, knockdown of cellulin-1 expression in HCA-F hepatocellular carcinoma cells with high migration ability was associated with reduced cell invasion potential. On this basis, overexpression of OGT significantly increased the invasion potential (Fig.4I). Data are expressed as mean \pm SD ($n = 3$), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

miR24 是 miR23b-27b-24-1 和 miR23a-27a-24-2 簇中一种保守的微 RNA (microRNA, miRNA), 已被证明可直接靶向 *OgtmRNA* 3' 非编码区, 并降低乳腺癌细胞中 OGT 的转录和蛋白质表达水平^[13]。本文利用报告基因实验, 证明了转录因子 RUNX2 可以分别靶向 miR24-1 和 miR24-2 的启动子区, 并增加 miR24-1 和 miR24-2 的转录。而这一正向调控过程受到窖蛋白-1 的抑制, 使得 Cav-1/RUNX2 形成了调控 miR24 的上游信号通路。

近期研究表明, 异常的蛋白质糖基化与肿瘤的发生和发展密切相关^[17]。细胞蛋白质的 O-GlcNAc 修饰增加是肿瘤细胞的一个普遍特征, 且恶化程度较高的肿瘤细胞 O-GlcNAc 糖基化水平较高^[18]。越来越多的研究表明, 窖蛋白-1 可能与肿瘤中异常糖基化有关。本室前期研究发现, 窖蛋白-1 能够上调肝癌细胞中唾液酸转移酶 ST6Gal1 的表达, 导致细胞表面 $\alpha 2, 6$ 唾液酸修饰显著增多, 最终增强了肝癌细胞黏附作用^[19]。本室还报道了窖蛋白-1 通过

激活 MAPK 信号通路,促进了小鼠肝癌细胞中岩藻糖基转移酶 Pofut1 的转录过程^[19]。尽管上述研究均表明窖蛋白-1 确实与肿瘤中异常的糖基化有关,但窖蛋白-1 调节糖基化水平的具体分子机制尚不清楚。本研究阐明了窖蛋白-1 可通过抑制转录因子 RUNX2 诱导的 miR24 转录过程,影响另一种糖基转移酶 OGT 的表达,研究结果为窖蛋白-1 调控肿瘤细胞中异常糖基化修饰提供了新的理论依据。首先,本研究证明了窖蛋白-1 与 OGT 表达呈正相关。其次,在小鼠肝癌细胞中,免疫印迹分析结果显示,窖蛋白-1 能抑制转录因子 RUNX2 表达,RUNX2 的过表达增强 miR24 的转录,提示 RUNX2 参与了窖蛋白-1 对 miR24 的调控。报告基因结果表明,RUNX2 可以直接靶向 miR24-1 和 miR24-2 启动子区域,并促进 miR24 的转录过程。考虑到 miR24 对 *Ogt* mRNA 中的抑制作用^[13],本文认为窖蛋白-1 通过抑制 RUNX2 诱导的 miR24 转录,促进 OGT 表达并使胞内 *O*-GlcNAc 修饰增强,最终提高了小鼠肝癌细胞的迁移和侵袭潜能(Fig.4)。

最近的研究表明,*O*-GlcNAc 糖基化在癌细胞的侵袭和转移中发挥重要的作用^[9]。例如,HDAC1 的 *O*-GlcNAc 糖基化程度能影响组蛋白的乙酰化水平,抑制 p21 转录,这可能会导致细胞表面 E-钙黏着蛋白水平降低,进而影响肝癌的发生发展进程^[20]。本文的研究结果与这些观点一致,即窖蛋白-1 介导的 OGT 上调,提高了胞内 *O*-GlcNAc 修饰水平,从而增强了小鼠肝癌细胞的侵袭和转移潜能。近期发现,*O*-GlcNAc 糖基化还可通过上调基质金属蛋白酶 1 (matrix metalloproteinase-1, MMP1)、基质金属蛋白酶 1 (matrix metalloproteinase-2, MMP2)、基质金属蛋白酶 3 (matrix metalloproteinase-3, MMP3) 及下调 E-钙黏着蛋白的表达,增强小鼠肝癌细胞的迁移和侵袭能力^[21, 22]。本文推测,窖蛋白-1 诱导的 OGT 表达和 *O*-GlcNAc 修饰上调可能通过类似的途径激活小鼠肝癌细胞的迁移和侵袭,但具体作用机制仍有待进一步研究。

总之,本文证明了小鼠肝癌细胞中窖蛋白-1 增强 OGT 表达和胞内 *O*-GlcNAc 糖基化水平的作用机制,为窖蛋白-1 在肝癌中发挥癌基因样作用提供了新的依据,也使得靶向窖蛋白-1 成为阻断肝癌细胞转移的潜在新策略。

参考文献 (References)

[1] Parolini I, Sargiacomo M, Galbiati F, *et al.* Expression of caveo-

lin-1 is required for the transport of caveolin-2 to the plasma membrane. Retention of caveolin-2 at the level of the Golgi complex[J]. *J Biol Chem*, 1999, **274**(36): 25718-25725

[2] Gai X, Lu Z, Tu K, *et al.* Caveolin-1 Is Up-Regulated by GLI1 and Contributes to GLI1-Driven EMT in Hepatocellular Carcinoma[J]. *PLoS One*, 2014, **9**(1): e84551

[3] Bucci M, Gratton JP, Rudic RD, *et al.* In vivo delivery of the caveolin-1 scaffolding domain inhibits nitric oxide synthesis and reduces inflammation[J]. *Nat Med*, 2000, **6**(12): 1362-1367

[4] Yin H, Liu T, Zhang Y, *et al.* Caveolin proteins: a molecular insight into disease[J]. *Front Med*, 2016, **10**(4): 397-404

[5] Gupta R, Toufaily C, Annabi B. Caveolin and cavin family members: Dual roles in cancer[J]. *Biochimie*, 2014, **107**(Pt B): 188-202

[6] Cohen AW, Hnasko R, Schubert W, *et al.* Role of caveolae and caveolins in health and disease[J]. *Physiol Rev*, 2004, **84**(4): 1341-1379

[7] Jia L, Wang S, Zhou H, *et al.* Caveolin-1 up-regulates CD 147 glycosylation and the invasive capability of murine hepatocarcinoma cell lines[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2006, **38**(9): 1584-1593

[8] Yu S, Fan J, Liu L, *et al.* Caveolin - 1 up - regulates integrin α 2,6 - sialylation to promote integrin α 5 β 1 - dependent hepatocarcinoma cell adhesion[J]. *FEBS Lett*, 2013, **587**(6): 782-787

[9] Yang XY, Qian KV. Protein *O*-GlcNAcylation: emerging mechanisms and functions[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, **18**(7): 452-465

[10] 李静,谭忠平. 葡糖酰胺(*O*-GlcNAc)修饰:细胞内糖基化的前世今生[J].中国生物化学与分子生物学报(Li J, Tan ZP. Intracellular *O*-GlcNAcylation: the One and the Only[J]. *Chin J Biochem Mol Biol*), 2020, **36**(9): 987-1001

[11] Hart GW. Nutrient regulation of signaling and transcription[J]. *J Biol Chem*, 2019, **294**(7): 2211-2231

[12] Schjoldager KT, Narimatsu Y, Joshi HJ, *et al.* Global view of human protein glycosylation pathways and functions[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, **21**(12): 729-749

[13] Liu Y, Huang H, Cao Y, *et al.* Suppression of OGT by microRNA24 reduces FOXA1 stability and prevents breast cancer cells invasion[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, **487**(3): 755-762

[14] Takeda M, Sakaguchi T, Hiraide T, *et al.* Role of caveolin-1 in hepatocellular carcinoma arising from non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Cancer Sci*, 2018, **109**(8): 2401-2411

[15] Fernandez-Rojo MA, Ramm GA. Caveolin-1 Function in Liver Physiology and Disease[J]. *Trends Mol Med*, 2016, **22**(10): 889-904

[16] Martinez-Outschoorn UE, Sotgia F, Lisanti MP. Caveolae and signalling in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2015, **15**(4): 225-237

[17] Singh JP, Zhang K, Wu J, *et al.* *O*-GlcNAc signaling in cancer metabolism and epigenetics [J]. *Cancer Lett*, 2015, **356**(2PtA): 244-250

[18] Ma Z, Vosseller K. Cancer Metabolism and Elevated *O*-GlcNAc in Oncogenic Signaling[J]. *J Biol Chem*, 2014, **289**(50): 34457-34465

[19] Zhang C, Huang H, Zhang J, *et al.* Caveolin-1 promotes invasion and metastasis by upregulating Pofut1 expression in mouse hepatocellular carcinoma[J]. *Cell Death Dis*, 2019, **10**(7): 477

[20] Zhu G, Tao T, Zhang D, *et al.* *O*-GlcNAcylation of histone deacetylase-1 in hepatocellular carcinoma promotes cancer progression[J]. *Glycobiology*, 2016, **26**(8): 820-833

[21] Zhu Q, Zhou L, Yang Z, *et al.* *O*-GlcNAcylation plays a role in tumor recurrence of hepatocellular carcinoma following liver transplantation[J]. *Med Oncol*, 2012, **29**(2): 985-993

[22] Gu Y, Mi W, Ge Y, *et al.* GlcNAcylation plays an essential role in breast cancer metastasis[J]. *Cancer Res*, 2010, **70**(15): 6344-6351