doi:10.11659/jjssx.11E024083

·基础研究·

N-糖基化调控NANOG在结直肠癌干细胞特性和凋亡中的影响

杨清清[1],曾 宇[2],田 音[1] (1.重庆市渝北区人民医院消化内科,重庆 401120;2.陆军军医大学第一附属医院麻醉科,重庆 400038)

[摘 要] **目的** 探究N-糖基化对NANOG调控结直肠癌干细胞特性的影响。**方法** 对结直肠癌HCT166细胞和LoVo细胞进行磁珠分选筛选出CD133⁺干细胞。采用Lipofectamine™ 3000对结直肠癌干细胞进行质粒转染。MTT法检测细胞活性。肿瘤干细胞成球实验检测干细胞成球直径和成球数量。EdU流式细胞术检测细胞增殖。划痕实验检测细胞迁移能力。Western blot检测细胞凋亡相关蛋白表达水平。**结果** 与WT组相比,MUT组经N-糖基化位点缺失的突变表达载体转染的结直肠癌干细胞细胞活性降低($P<0.05$),增殖和迁移能力减弱($P<0.05$),肿瘤干细胞成球能力降低($P<0.05$),细胞内凋亡水平上升($P<0.05$)。**结论** 人源NANOG羧基端内7个N-糖苷型糖链参与NANOG蛋白的分子质量控制及结直肠癌干细胞的干细胞特性维持,进一步影响结直肠癌干细胞的增殖迁移能力。

[关键词] 结直肠癌干细胞;NANOG;N-糖基化;干细胞特性;增殖;凋亡
[中图分类号] R735.3+5 [文献标志码] A [收稿日期] 2024-11-15

N-glycosylation regulates NANOG affecting stem cell properties and apoptosis of colorectal cancer

YANG Qing-qing[1],ZENG Yu[2],TIAN Yin[1] (1.Department of Gastroenterology,Chongqing Yubei District People's Hospital,Chongqing 401120,China;2.Department of Anesthesiology,the First Hospital Affiliated to Army Medical University,Chongqing 400038,China)

Abstract: Objective To explore the effect of N-glycosylation on the properties of colorectal cancer stem cells regulated by NANOG. **Methods** CD133⁺ stem cells were screened out by magnetic bead sorting on colorectal cancer HCT166 cells and LoVo cells. Plasmid transfection of colorectal cancer stem cells was performed by Lipofectamine™ 3000. MTT assay was used to detect cell activity. Sphere formation assay was used to detect stem cell spheroid diameter and spheroid number. EdU flow cytometry was used to detect cell proliferation. Scratch wound healing assay was used to detect cell migration ability. Western blot was used to detect the expression levels of apoptosis-related proteins. **Results** Compared with the WT group, the activity of colorectal cancer stem cells transfected with a mutant expression vector lacking N-glycosylation sites was reduced($P<0.05$),the proliferation and migration abilities were weakened($P<0.05$),the spherogenic ability of cancer stem cells was reduced($P<0.05$),and the level of intracellular apoptosis was increased in MUT group($P<0.05$). **Conclusion** The seven N-glycosidic sugar chains in the carboxyl terminus of human NANOG are involved in the molecular quality control of NANOG protein and the maintenance of stem cell characteristics of colorectal cancer stem cells,further affecting the proliferation and migration ability of colorectal cancer stem cells.

Keywords: colorectal cancer stem cells; NANOG; N-glycosylation; stem cell characteristics; proliferation; apoptosis

结直肠癌作为全球第三大常见恶性肿瘤,其病死率位居第二[1],在中国更是呈现新发病例快速上升的趋势[2]。手术虽对早期患者是有效的治愈手段,但晚期患者五年生存率仍较低[3],这使得寻找改善晚期结直肠癌患者预后的靶点和策略成为当务之急。

在相关领域的研究中,多能诱导干细胞(induced pluripotent stem cells,iPSCs)作为一类重编程细胞受到了广泛关注。其由终末分化体细胞经特定转录因子诱导,可重新转变为干细胞,具备与胚胎干细胞相似的发育多潜能性[4]。在结直肠癌中,正常和恶性成体细胞保留了重编程为iPSCs的能力,并且肿瘤干细胞(cancer stem cell,CSC)因具有自我更新和形成肿瘤团块的能力,被认为在癌症的各个阶段都起着关键作用[5]。同时,胚胎干细胞核转录因子OCT4、SOX2和NANOG等构成多能性的关键转录网络,对体细胞重编程为多能干性细胞起到重要作用[6]。

NANOG作为一种同源染色体蛋白,在维持细胞多能干性方面发挥着关键作用,其缺失会导致原始内胚层发育缺失。已有研究表明,抑制NANOG基因表达可降低肿瘤致病性和干细胞体外特征,而过表达则可能增强肿瘤细胞干性表达,并且NANOG还可调节肿瘤干细胞的自我更新[7]。此外,N-糖基化作为真核细胞内常见的蛋白质翻译后修饰现象,在免疫反应、蛋白质质量控制等生物调节中意义重大,异常的N-糖

[基金项目] 重庆市自然科学基金(CSTB2022NSCQ-MSX0454)
[通信作者] 田 音,E-mail:tianyindoctor@163.com

基化可作为生物标志物,且与肿瘤发生发展紧密相关[3,8]。然而,NANOG蛋白分子羧基端是否存在N-糖基化,以及其对调控CSC细胞干性和诱导iPSCs分化的作用尚未明确。基于此,本研究聚焦于探究N-糖基化对NANOG调控结直肠癌干细胞特性的影响。以期明确N-糖基化在结直肠癌干细胞中的具体作用,进一步揭示结直肠癌干细胞的特性调控机制,为改善晚期结直肠癌患者的预后提供新的理论依据和潜在的治疗靶点。

1 材料与方法

1.1 细胞和主要试剂

结直肠癌HCT116细胞和LoVo细胞购自上海普诺赛公司。DMEM高糖培养基、胎牛血清购自美国Gibco公司;肿瘤干细胞成球培养基购自上海启达生物。胰酶、PBS缓冲液、DMSO购自武汉Procell。EdU-555细胞增殖检测试剂盒和MTT试剂盒购自上海碧云天生物。NANOG WT质粒及MUT质粒购自南京擎科生物。Lipofectamine™3000质粒转染试剂购自美国Invitrogen。CD133磁珠分选试剂盒及对应二抗购自上海优宁维公司。

1.2 仪器

SYNERGY LX多功能酶标仪购自美国BioTeK公司。CytoFLEX流式细胞仪购自美国Beckman Coulter公司。FL-CKX3倒置显微镜购自日本OLYMPUS公司。GDS-800凝胶成像系统购自美国BIO-RAD公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养及处理 HCT166细胞和LoVo细胞用含10%胎牛血清的DMEM高糖培养基于37 ℃、5% CO_2条件下培养。每隔2~3 d进行换液,待细胞融合度生长至70%后进行传代处理,传代比例为1∶3。

1.3.2 磁珠分选$CD133^+$干细胞 HCT166细胞和LoVo细胞分别以1×10^7/μL的密度重悬离心后,依照CD133磁珠分选试剂盒操作流程依次加入buffer、FcR Blocking Reagent和CD133磁珠试剂,冰上避光孵育。随后使用LS磁珠柱收集$CD133^+$干细胞。

1.3.3 细胞转染 将HCT166干细胞和LoVo干细胞接种至6孔培养板中,在500 μL的无血清培养基中按WT组(NANOG WT)与MUT组(MUT-1、MUT-2、MUT-3、MUT-4、MUT-5、MUT-6、MUT-7)各加入2 μg质粒柔和混匀;在500 μL无血清培养基中加入5 μL Lipofectamine™ 3000柔和混匀,室温放置5 min;将稀释好的NANOG质粒与Lipofectamine™ 3000柔和混匀,室温放置20 min。将NANOG质粒/Lipofectamine™ 3000复合物加到含有细胞的培养板孔中并来回轻柔摇晃;孵育4~6 h后,除去复合物,按上述分组更换为含10%胎牛血清的肿瘤干细胞完全培养基,于37 ℃、5% CO_2培养箱中培养48 h。

1.3.4 MTT检测细胞活性 将HCT166细胞和LoVo细胞分别以1×10^5/mL的密度接种至96孔培养板中,每孔接种100 μL,根据细胞转染步骤按实验分组转染质粒后,吸去培养板中的培养液,每孔加入5 mg/mL新鲜配制的MTT溶液100 μL,培养箱中孵育4 h,再次吸去上清液,每孔加入DMSO溶液200 μL,摇匀后使用多功能酶标仪测定波长490 nm处的光密度(optical density,OD)值。

1.3.5 EdU流式检测细胞增殖 按前述实验步骤转染质粒后,将HCT166细胞和LoVo细胞分别以1×10^7/mL的密度制备成单细胞悬液,按EDU染色试剂盒说明书于流式细胞仪上机检测细胞增殖情况。

1.3.6 肿瘤干细胞成球实验 将HCT166细胞和LoVo细胞分别以1×10^5/mL的密度接种至6孔培养板中,按前述实验步骤转染质粒后,来回轻柔摇晃细胞培养板并更换为无血清肿瘤干细胞完全培养基,于37 ℃、5% CO_2培养箱中培养48 h后,显微镜下每孔拍摄3~5个随机视野计数,并用WZ_Camera软件测量成球直径。

1.3.7 划痕实验检测细胞迁移 将获得细胞制备成单细胞悬液,调整细胞密度为5×10^5/mL,接种2 mL至6孔培养板中,待细胞铺满后笔直划痕,并按前述实验分组进行转染;孵育4~6 h后,更换为含10%胎牛血清的肿瘤干细胞完全培养基,于0 h、24 h取样,拍照。用WZ_Camera软件测量迁移距离。

1.3.8 Western blot检测细胞凋亡相关蛋白 将各组细胞用预冷PBS洗涤3次,加入含PMSF的RIPA裂解液冰上裂解30 min,于4 ℃以12 000 r/min离心15 min;用BCA法测定蛋白浓度并统一调整为2 μg/μL,加入5×上样缓冲液后,于95 ℃变性5 min;配置10% SDS-PAGE凝胶,每孔上样20 μg蛋白,80 V电泳30 min后转为120 V;湿转法将蛋白转至PVDF膜,5%脱脂奶粉室温封闭1 h;分别加入B细胞淋巴瘤/白血病-2(B-cell chronic lymphocytic leukemia/lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2 associated X protein,Bax)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(cysteinyl aspartate-specific protease-3, Caspase-3)、裂解型半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(cleaved cysteinyl aspartate-specific protease-3, cleaved Caspase-3)、聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(poly ADP-ribose polymerase, PARP)一抗(1∶1 000稀释),4 ℃孵育过夜;TBST洗膜后加HRP标记二抗(1∶5 000稀释)室温孵育1 h;ECL化学发光法显影。用Image J软件分析条带灰

度值,并以β-actin为内参计算蛋白相对表达量。

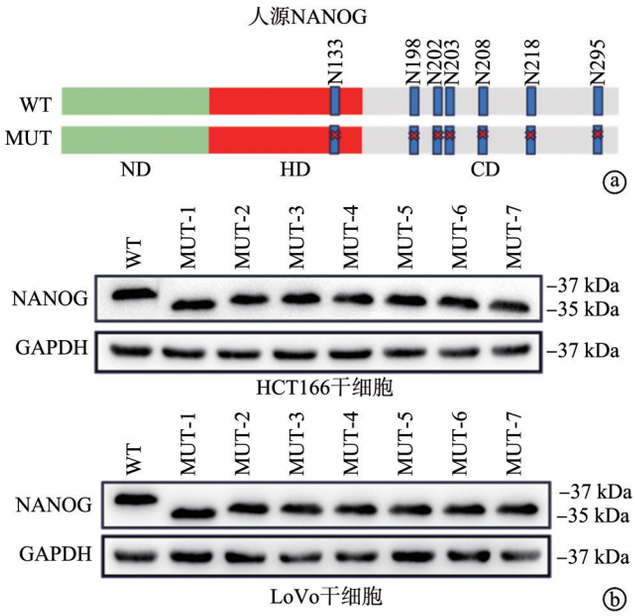
1.4 统计学分析

应用SPSS 22.0统计软件和Graphpad Prizm8进行统计学分析。两组间比较采用独立样本t检验,多组间比较采用单因素方差分析。以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NANOG在结直肠癌干细胞中的NXT基序位点被N-糖基化

为了明确NANOG在结直肠癌细胞中的N-糖基化位点,我们在人源NANOG氨基酸序列中寻找了进化保守的NXT基序。对人源NANOG蛋白305个氨基酸序列进行分析,发现在HD结构域内包含1个N-糖基化位点,在羧基端结构域内包含6个富集的N-糖基化位点(图1a)。为了进一步验证人源NANOG基因碱基段内7个N-糖苷型糖链是否参与NANOG蛋白的分子质量控制,本研究克隆表达编码305个氨基酸的NANOG蛋白,并构建了7个对应N-糖基化位点缺失的突变表达载体,其中编码N-糖基化位点的N-X-T(S)突变为A-X-T(S),再在HCT116以及LoVo结直肠癌CD133$^+$干细胞中构建NANOG-WT细胞模型。Western blot实验显示,由于每一个N-糖苷型糖链的分子量为2 kDa,经突变位点缺失后,7个NANOG-MUT分子量均观察到降低到35 kDa,说明7个潜在位点均存在N-糖基化(图1b)。

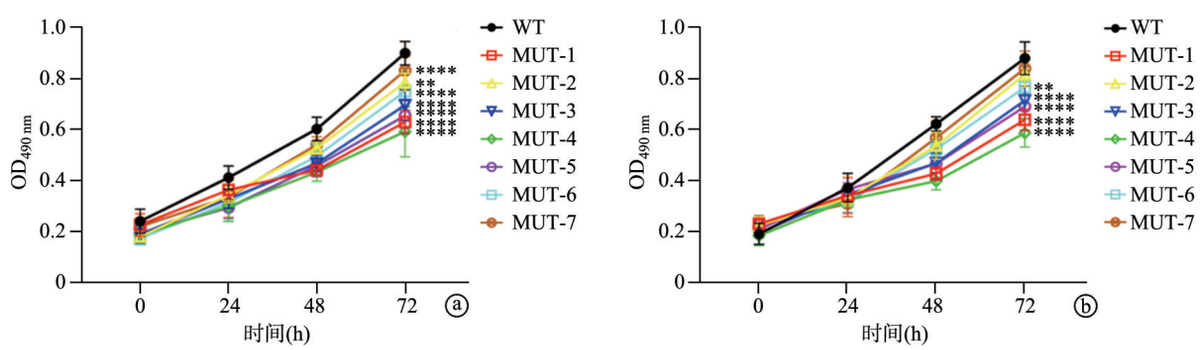


a:N-糖基化位点缺失的突变表达载体构建示意图;b:Western blot检测MUT突变体致NANOG分子质量的变化

图1 NANOG存在N-糖基化位点

2.2 N-糖基化影响NANOG蛋白调控结直肠癌干细胞增殖

MTT实验用于检测NANOG蛋白羧基端7个不同N-糖苷型糖突变体对结直肠癌干细胞活性的影响,结果表明,在HCT116干细胞中,与WT组相比,NANOG蛋白的7个MUT质粒转染组均能显著抑制结直肠癌干细胞活性;在LoVo干细胞中,与WT组相比,除MUT-2、MUT-7质粒抑制效果不明显,其余突变质粒均显著抑制结直肠癌干细胞活性(图2)。EdU流式细胞术结果表明,7个MUT质粒转染组均能不同程度抑制两种肿瘤干细胞的增殖(图3、4)。这些结果说明,NANOG基因羧基端内7个N-糖苷型糖链参与调控结直肠癌干细胞增殖。



a:HCT116干细胞;b:LoVo干细胞 **:与WT组相比,P<0.01;****:与WT组相比,P<0.000 1

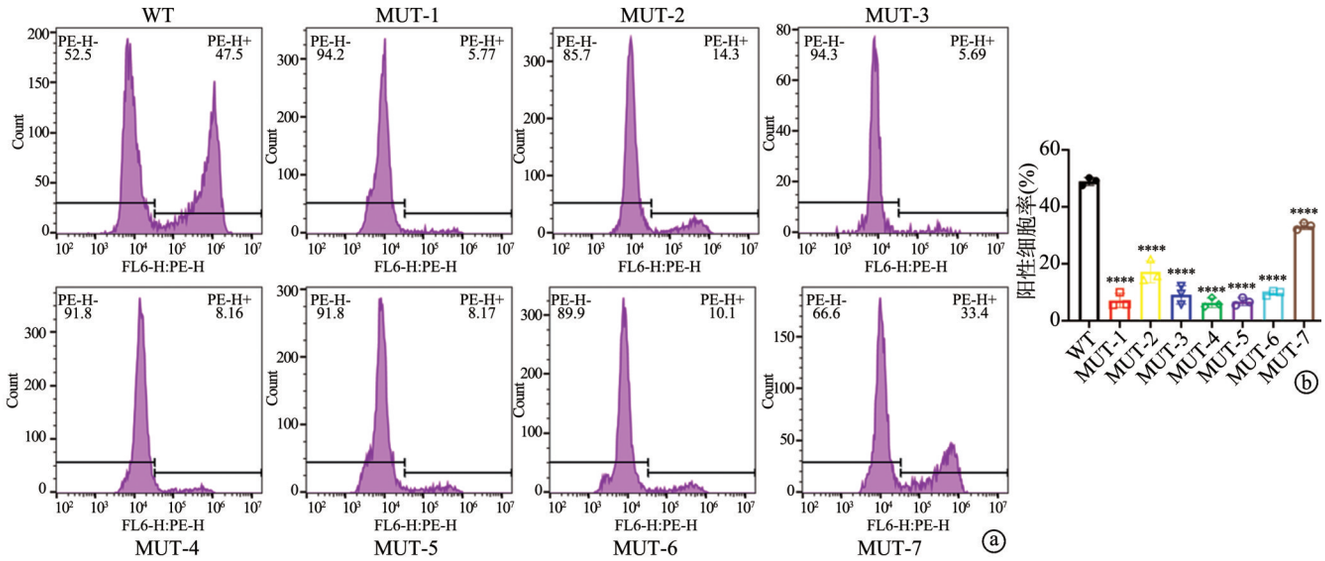
图2 MTT实验示NANOG蛋白的7个MUT质粒抑制结直肠癌干细胞的增殖

2.3 N-糖基化影响NANOG蛋白维持结直肠癌干细胞的干细胞特性

干细胞成球实验结果表明,与WT组相比,转染NANOG蛋白的7个MUT质粒后的HCT116干细胞和LoVo干细胞的干细胞成球直径和成球数量均降低(图5),说明N-糖基化参与NANOG基因维持干细胞特性。

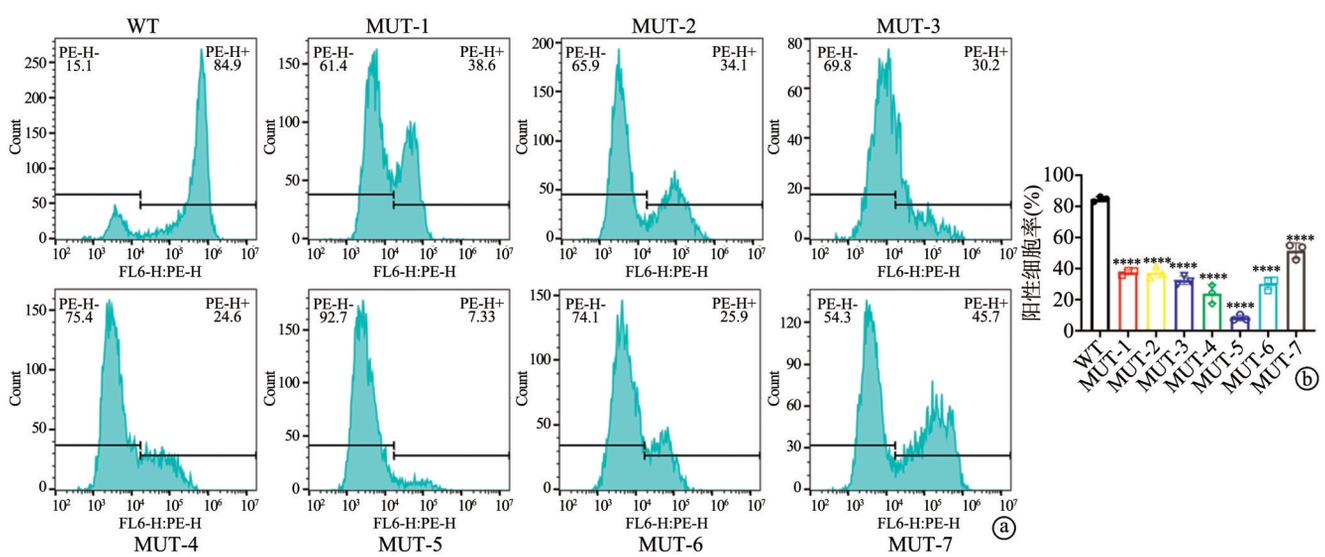
2.4 N-糖基化影响NANOG蛋白调控结直肠癌干细胞迁移能力

细胞迁移实验表明,与WT组相比,NANOG蛋白的7个MUT质粒均能不同程度抑制HCT116干细胞的



a:流式细胞实验;b:流式细胞实验的定量分析 ****:与WT组相比,$P<0.0001$

图3 EdU流式细胞术检测NANOG蛋白的7个MUT质粒抑制HCT166干细胞的增殖



a:流式细胞实验;b:流式细胞实验的定量分析 ****:与WT组相比,$P<0.000\ 1$

图4 EdU流式细胞术检测NANOG蛋白的7个MUT质粒抑制LoVo干细胞的增殖

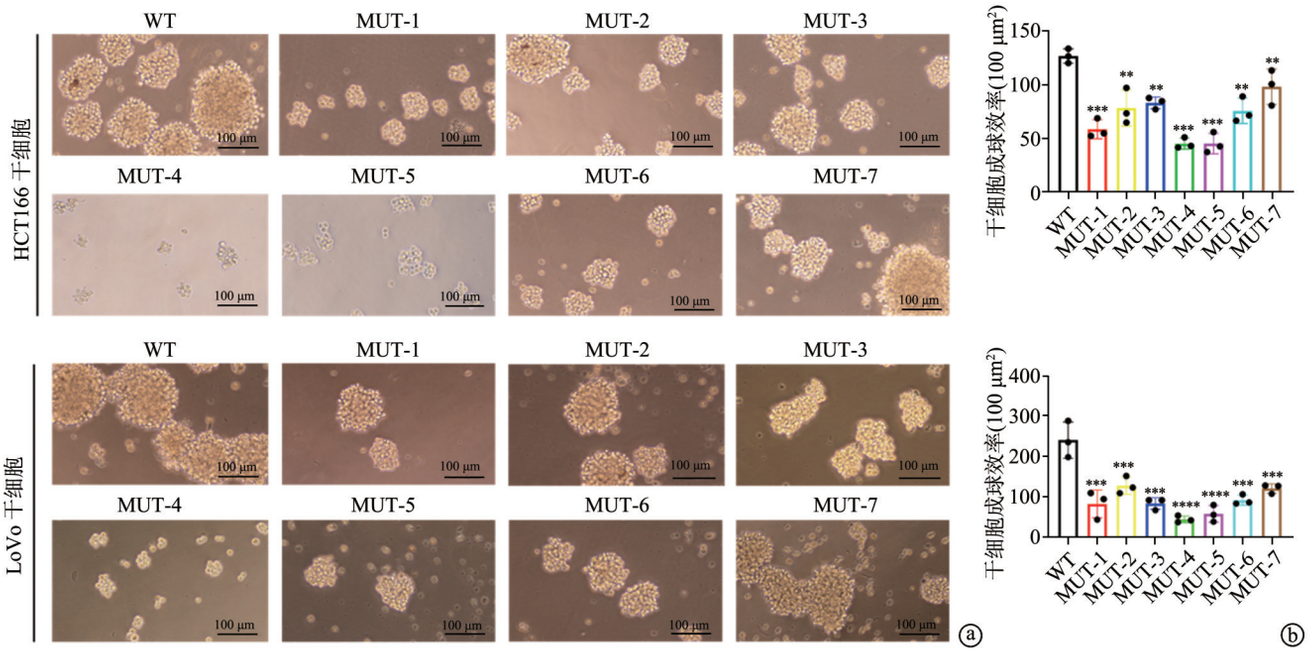
迁移能力(图6)。

2.5 N-糖基化参与调控NANOG蛋白促进结直肠癌干细胞凋亡

Western blot实验结果显示,转染NANOG蛋白的7个MUT质粒后的HCT116干细胞和LoVo干细胞凋亡相关蛋白Bcl-2水平均下降($P<0.05$),Bax水平升高($P<0.05$),见图7,说明N-糖基化参与调控NANOG蛋白促进肿瘤干细胞的凋亡。

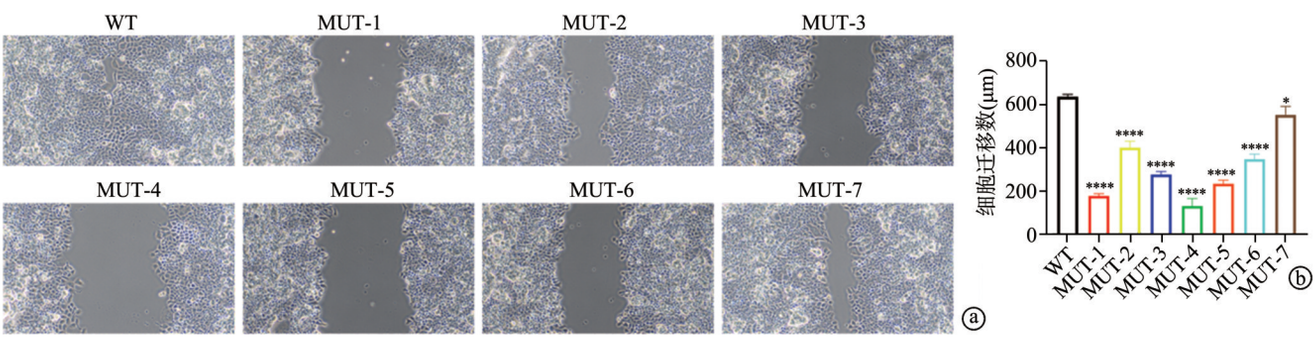
3 讨论

越来越多的证据表明,糖蛋白的非典型糖基化,如截短糖基结构、多分支N-糖基、核心岩藻糖基化和糖基化末端增加与恶性细胞的转化和转移密切相关。近期一项针对结直肠癌的糖蛋白质组学研究进一步揭示,肿瘤组织中存在独特的N-糖基化代谢重编程特征,并且特定膜蛋白在N-糖基化位点的修饰对癌症进展至关重要[9-11]。本研究结果与这一趋势高度吻合:人源NANOG蛋白羧基端存在的7个N-糖苷型糖链对其功能具有关键调控作用。当这些糖链因位点突变而缺失,形成"截短糖基结构"时,干细胞的增殖、成球与迁移能力均显著减弱,细胞内凋亡水平上升,这表明完整的N-糖链是维持NANOG蛋白功能及干细胞恶性表型所必需的。同时,NANOG羧基端密集存在的多个N-糖基化位点提示其可能形成"多分支N-糖基"结构,共同维持蛋白的分子稳定性与功能性构象。值得注意的是,另一项前沿研究开发了一种可同时靶向内



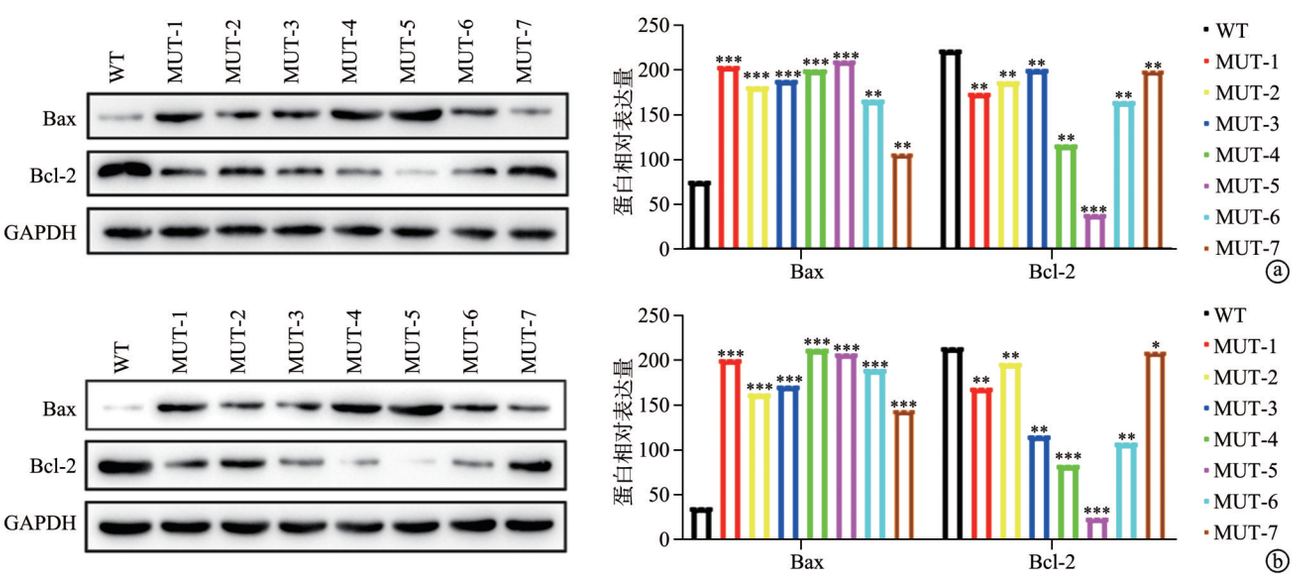
a:成球实验;b:成球实验的定量分析　**:与WT组相比,$P<0.01$;***:与WT组相比,$P<0.001$;****:与WT组相比,$P<0.000\ 1$

图5　干细胞成球实验检测NANOG蛋白的7个MUT质粒抑制HCT116干细胞和LoVo干细胞的干细胞成球效率



a:细胞迁移实验;b:细胞迁移实验的定量分析　*:与WT组相比,$P<0.05$;****:与WT组相比,$P<0.000\ 1$

图6　细胞迁移实验检测NANOG蛋白的7个MUT质粒抑制HCT116干细胞的迁移



a:Western blot检测HCT166干细胞中蛋白表达;b:Western blot检测LoVo干细胞中蛋白表达　*:与WT组相比,$P<0.05$;**:与WT组相比,$P<0.01$;***:与WT组相比,$P<0.001$

图7　Western blot实验示Bax和Bcl-2蛋白表达水平

质网和线粒体的纳米平台,通过诱导细胞器应激成功抑制了结直肠癌细胞的干性,这从干预策略的角度印证了靶向调控癌症干细胞特性的可行性[12-13]。尽管本研究未直接验证核心岩藻糖基化或末端糖基化的具体修饰形式,但糖链完整性丧失所引发的功能缺陷提示,这些精细修饰可能同样参与调控NANOG的生物学活性,进而影响其介导的肿瘤干细胞干性维持与凋亡抵抗。因此,本研究从N-糖基化修饰的角度,为理解NANOG在结直肠癌干细胞中的调控机制提供了新的实验依据,也进一步印证了异常糖基化在肿瘤进展中的重要作用,肿瘤患者和正常患者血清糖蛋白的差异为确定肿瘤生物标记物带来了希望。某些非典型糖蛋白,如甲胎蛋白的核心岩藻糖基化和碳水化合物抗原19-9的硅酰路易斯A抗原,正被临床用作血清学癌症标志物[14]。根据所连接的氨基酸残基,蛋白质糖基化主要分为两种类型:①共价连接到Asn残基上的糖形成典型的共识图案N-X-S/T(X≠P),称为N-糖基化[15];②与丝氨酸或苏氨酸残基侧链羟基相连的O-糖基化[16]。其中N-糖基化是一种翻译后修饰,在决定蛋白质的折叠状态和寡聚化方面起着重要作用。这一过程始于内质网,在内质网中,GlcNAc2Man5-dolichol磷酸酯通过翻转酶从细胞质侧翻转到内质网管腔侧;在GlcNAc2Man5-dolichol磷酸盐上添加4个甘露糖和3个葡萄糖,形成Glc3Man9GlcNAc2-PP-dolichol;该产物的糖分子通过低聚糖基转移酶复合物转移到新生肽链的N-X-S-T序列上;新生糖肽上的3个末端葡萄糖和1个甘露糖被去除,糖肽离开内质网进入高尔基体,进一步修剪和分支,生成具有多种聚糖的糖肽[17]。在NANOG蛋白中,本研究观察到在其HD结构域内包含1个N-糖基化位点,在其羧基端结构域内包含6个富集的N-糖基化位点,进一步通过比较其真核细胞内分子量,明确了7个潜在位点均存在N-糖基化。

NANOG是胚胎干细胞和造血干细胞中的转录因子,在维持干细胞自我更新和多能性能力方面起着核心作用。NANOG可调控癌症发展的各个方面,例如肿瘤细胞的增殖、迁移、上皮间质转化、免疫逃避、耐药性、恶性转化以及癌细胞与周围基质之间的交流[18]。人源NANOG编码305个氨基酸的蛋白质,其中包括N端(氨基酸1~94)、与DNA结合的同源结构域(氨基酸95~154)和C端(氨基酸155~305)结构域。C端结构域由3个区域组成,即上游区域(氨基酸155~195)、富含色氨酸的结构域(氨基酸196~240)和下游区域(氨基酸241~305)[19]。在本研究中,通过构建7个N-糖基化位点缺失的突变表达载体,将编码N-糖基化位点的N-X-T(S)突变为A-X-T(S),并转染至结直肠癌干细胞,发现7个N-糖基化位点均参与NANOG蛋白调控结直肠癌干细胞的干细胞特性。认识NANOG基因表达及其调控是了解早期胚胎发生、多能细胞发育和癌细胞增殖的关键步骤,上述研究表明NANOG蛋白分子羧基端存在N-糖基化,N-糖基化对肿瘤细胞干性具有一定调控作用。

综上所述,人源NANOG羧基端内7个N-糖苷型糖链参与NANOG蛋白的分子质量控制及结直肠癌干细胞的干细胞特性维持,进一步影响结直肠癌干细胞的增殖迁移能力。后续的研究可能会通过体内实验验证N-糖基化对NANOG基因成瘤性的影响,以进一步验证N-糖基化对调控干细胞干性和是否有诱导iPSCs现象的作用。

[参考文献]

[1] Siegel R, Ward E, Brawley O, et al. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(4): 212-236. doi:10.3322/caac.20121.

[2] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249. doi:10.3322/caac.21660.

[3] Najafzadeh B, Asadzadeh Z, Motafakker AR, et al. The oncogenic potential of NANOG: An important cancer induction mediator[J]. J Cell Physiol, 2021, 236(4): 2443-2458. doi::10.1002/jcp.30063.

[4] Aboul-Soud MAM, Alzahrani AJ, Mahmoud A. Induced pluripotent stem cells (ipscs)-roles in regenerative therapies, disease modelling and drug screening[J]. Cells, 2021, 10(9): 2319. doi: 10.3390/cells10092319.

[5] Schwitalla S, Fingerle AA, Cammareri P, et al. Intestinal tumorigenesis initiated by dedifferentiation and acquisition of stem-cell-like properties[J]. Cell, 2013, 152(1-2): 25-38. doi: 10.1016/j.cell.2012.12.012.

[6] Yamanaka S. Pluripotent stem cell-based cell therapy-promise and challenges[J]. Cell Stem Cell, 2020, 27(4): 523-531. dol:10.1016/j.stem.2020.09.014.

[7] Grubelnik G, Boštjančič E, Pavlič A, et al. NANOG expression in human development and cancerogenesis[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2020, 245(5): 456-464. doi:10.1177/1535370220905560.

[8] Sneha S, Nagare RP, Manasa P, et al. Analysis of human stem cell transcription factors[J]. Cell Reprogram, 2019, 21(4): 171-180. doi: 10.1089/cell.2019.0005.

[9] Lefebvre B, Klaus-Heisen D, Pietraszewska-Bogiel A, et al. Role of N-glycosylation sites and CXC motifs in trafficking of medicago truncatula Nod factor perception protein to plasma membrane[J]. J Biol Chem, 2012, 287(14): 10812-10823. doi: 10.1074/jbc.M111.281634.

[10] Ramírez AS, Kowal J, Locher KP. Cryo-electron microscopy structures of human oligosaccharyltransferase complexes OST-A and OST-B[J]. Science, 2019, 366(6471): 1372-1375. doi: 10.1126/science.aaz3505.