消化系统疾病

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000962

GM130对胃癌细胞 O- 糖基化及细胞粘附能力的影响

苏琳茜，冯阳阳，管停宏，张婉玉，易永芬
（重庆医科大学基础医学院病理学教研室、分子医学与肿瘤研究中心，重庆 400016）

【摘 要】**目的**：初步探讨沉默高尔基体基质蛋白 130（golgi matrix protein 130，GM130）基因对胃癌细胞 MKN-45 O-糖基化及细胞粘附能力的影响。**方法**：通过 siRNA 干扰胃癌细胞中 GM130 的表达水平，用 Lipofectamine 2000 将 GM130-siRNA 转染入 MKN-45 细胞。实验分为 GM130-siRNA 组、阴性对照组和空白对照组。分别用 qRT-PCR 和 Western blot 检测转染后各组中 GM130、N-乙酰氨基半乳糖转移酶 2（polypeptide N-acetylgalactosaminyl transferase 2，ppGalNAc-T2）、核心 1β3 半乳糖基转移酶（core 1 synthase，glycoprotein-N-acetylgalactosamine 3-β-galactosyltransferase1，C1Gal-T1）、β-半乳糖 α-2，3-唾液酸转移酶 1（beta-galactoside alpha-2，3-sialyltransferase，ST3Gal-1） mRNA 和蛋白表达的变化。应用凝集素流式细胞术检测 3 组细胞中 α2，3 唾液酸残基糖链结构的表达水平。肿瘤细胞与内皮细胞粘附实验及基质胶粘附实验检测细胞粘附能力。**结果**：qRT-PCR 和 Western blot 结果显示 GM130 基因与蛋白水平明显受到抑制，表明转染成功；GM130-SiRNA 组 C1Gal-T1、ST3Gal-1 的 mRNA 和蛋白表达水平均明显降低（P 均<0.05），ppGalNAc-T2 在 3 组中无明显变化（P>0.05），α2，3 唾液酸糖链结构的表达量降低（P<0.05），细胞粘附能力下降（P<0.05）。**结论**：在 MKN-45 细胞中，下调 GM130 后，可能通过下调 C1Gal-T1、ST3Gal-1 的表达影响胃癌细胞 O-糖基化，降低肿瘤细胞粘附能力。

【关键词】沉默高尔基体基质蛋白 130；RNA 干扰；胃癌；糖基化；粘附
【中图分类号】R735.2 【文献标志码】A 【收稿日期】2016-01-15

Effect of GM130 on O-linked glycosylation and adhesion of human gastric cancer cell line MKN-45

Su Linqian，Feng Yangyang，Guan Tinghong，Zhang Wanyu，Yi Yongfen
（*Teaching and Research Section of Pathology，College of Basic Medicine，Molecular Medicine and Cancer Research Center，Chongqing Medical University*）

【Abstract】***Objective***：To preliminarily investigate the effect of RNA interference targeting GM130 on O-linked glycosylation and adhesion of human gastric cancer cell line MKN-45. ***Methods***：GM130-siRNA was transfected into human gastric cancer cell line MKN-45 with Lipofectamine 2000. The experiment had three groups：GM130-siRNA group，negative control group and blanck control group. The expressions of GM130，ppGalNAc-T2，C1Gal-T1，ST3Gal-1 at mRNA and protein levels in the MKN-45 cells were analyzed by real-time PCR and Western blot. The expressions of α2，3-linked sialic acid residues in MKN-45 cell surface were detected by flow cytometry. The changes in the adhesion of the transfected cells were tested with matrigel adhesion and tumor cell adhere to the vascular endothelial cell assay. ***Results***：The real-time PCR and Western blot results showed that the mRNA and protein expression levels of GM130 decreased significantly in gastric cancer cell line MKN-45 transfected with GM130-siRNA，indicating a successful transfection. Compared with those in blank and negative control groups，both the mRNA transcription and protein expression levels of C1Gal-T1，ST3Gal-1 in MKN-45 cells transfected with GM130-siRNA decreased significantly（P<0.05），but those of ppGalNAc-T2 were not significantly affected（P>0.05）. The expression levels of α2，3-linked sialic acid residues were decreased（P<0.05），and the cell adhesion was apparently reduced（P<0.05）. ***Conclusion***：The GM130 may play an important role in O-linked glycosylation of MKN-45；the molecular mechanism might be associated with down-regulating C1Gal-T1，ST3Gal-1 expression and downregulation of GM130 decreasd gastric cancer cell adhesion.

【Key words】golgi matrix protein 130；RNA interference；gastric cancer；glycosylation；adhesion

作者介绍：苏琳茜，Email：592514861@qq.com，研究方向：肿瘤病理学。
通信作者：易永芬，Email：yiyongfen1953@aliyun.com。
基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：30672431）；高等学校博士学科点专项科研基金资助项目（编号：20060631006）。
优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160513.1606.070.html（2016-05-13）

胃癌是常见的消化道恶性肿瘤，虽然近年来胃癌发病率和死亡率有下降趋势，但我国是胃癌的高发地区，诊断和治疗形势仍不容乐观[1]。胃癌早期症状和体征并不典型，发现时多已是晚期。高尔基体基质蛋白 130（golgi matrix protein 130，GM130）是一种紧密附着于高尔基膜的富含卷曲螺旋结构的外周膜蛋白，分子量为 130 kD，它在高尔基池的堆叠和高尔基结构的维持上起着重要作用[2]。GM130 与细胞周期进程、细胞极性的保持、细胞运动和侵袭等细胞功能密切相关，GM130 还参与蛋白糖基化的调控[3]。

蛋白糖基化是一种重要的蛋白质翻译后修饰，糖基化修饰对蛋白质的结构和功能有重要影响，并参与细胞粘附、分子运输、受体激活、信号转导等多种关键的生物进程[4]。蛋白糖基化主要包括 O-糖基化和 N-糖基化，O-糖基化主要是在高尔基体中进行的，第一步是单糖 N-乙酰半乳糖胺（GalNAc）连接到丝氨酸和苏氨酸残基，是由多肽 N-乙酰氨基半乳糖转移酶家族（ppGalNAc-Ts）催化发生的，在此基础上，C1Gal-T1 催化将半乳糖 Gal 添加至GalNAc 残基上形成 core1 结构即 T 抗原，T 抗原在唾液酸酶 ST3Gal-1 的催化作用下形成唾液酸化 T 抗原（sialyl T），肿瘤细胞表面通常表现出异常糖基化，这些细胞表面的异常糖链结构与肿瘤细胞的粘附、侵袭、迁移等密切相关[5]。ppGalNAc-T2、C1Gal-T1、ST3Gal-1 是 O-糖基化中 3 种关键的糖基转移酶，均定位于高尔基体[6-7]，ppGalNAc-T2 是 ppGalNAc-Ts 家族中的一员，已有研究表明，ppGalNAc-T2 在胃癌细胞SGC7901 中高表达，ppGalNAc-T2 高表达细胞的粘附、侵袭能力降低[8]。课题组前期研究发现，GM130 在低分化胃癌组织和细胞中呈高表达，与胃癌的侵袭迁移相关[9-10]。凝集素是一类糖结合蛋白，能专一地识别某一特定的糖基序列与之结合，朝鲜槐凝集素能与细胞表面的 α2,3 唾液酸残基糖链结构特异性结合[11]。本课题通过 GM130 特异的 siRNA 下调胃癌 MKN-45 细胞中 GM130 mRNA 和蛋白的表达，初步探讨下调 GM130 对胃癌细胞 O-糖基化及细胞粘附能力的影响，有望为 GM130 成为胃癌基因治疗的分子靶点提供新的实验依据，为阐明胃癌发生发展机制奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

人胃癌细胞株 MKN-45，人脐静脉血管内皮细胞（human umbilical vein endothelial cells，HUVEC）由重庆医科大学附属第一医院乳腺外科实验室馈赠。Lipofectamine 2000 转染试剂购自美国 Invitrogen 公司；RPMI1640 培养基、DMEM 高糖培养基、胰蛋白酶购自美国 Hyclone 公司；胎牛血清、Opti-MEM 购自 Gibco 公司；Trizol 试剂盒、逆转录试剂盒、荧光定量PCR 试剂盒（SYBR Green Ⅱ）均购自 TaKaRa 公司；GM130-siRNA、Negative control siRNA 由上海吉玛基因公司合成；兔抗人 GM130 多克隆抗体购自 Abcam 公司；兔抗人 GalNT2（pp-GalNAc-T2）多克隆抗体和兔抗人 SIAT4A（ST3Gal-1）多克隆抗体均购自 GeneTex 公司；兔抗人 C1GalT1 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司；辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 购自北京中杉金桥生物技术公司；Matrigel 胶购自 Bio-Rad 公司；凝集素 MAL Ⅱ购自 Vector 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 MKN-45 细胞用含 10%胎牛血清、1×10^5 U/L 青霉素及 1×10^5 U/L 链霉素的 RPMI1640 培养基，HUVEC 用含 10%胎牛血清、1×10^5 U/L 青霉素及 1×10^5 U/L 链霉素的 DMEM 培养基，置于 37 ℃、5%CO_2 的培养箱中培养，2~3 d 传代 1 次。

1.2.2 瞬时转染 GM130-siRNA-519 为前期由本实验室筛选出的对 GM130 基因抑制效果最好的小 RNA 干扰片段，正义链：5'-CUGGACUCCAGCUAUGUAATT-3'，反义链：5'-UUACAUAGCUGGAGUCCAGTT-3'；阴性对照组（NC-siRNA）：正义链 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'，反义链 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'；按 Lipofectamine 2000转染试剂说明书转染，转染前 1 d，将 MKN-45 细胞按照 2×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔培养板内，置于 37 ℃、5%CO_2 培养箱中培养，当细胞达 40%~50%融合时，转染 GM130-siRNA 和 NC-siRNA（阴性对照组），并设空白对照组。

1.2.3 MKN-45 细胞中 GM130、ppGalNAc-T2、C1Gal-T1、ST3Gal-1 基因 mRNA 转录水平的检测 采用 qRT-PCR 法，转染 24 h 后，用 Trizol 试剂提取各组细胞总 RNA，测定其浓度及纯度，逆转录合成 cDNA，以其为模板，进行荧光定量 PCR 扩增，每个样品均设 3 个复孔。引物由生工生物工程（上海）股份有限公司合成，以 β-actin 为内参，引物序列见表 1。反应条件为：95 ℃预变性 1 min；95 ℃ 5 s，60 ℃ 30 s，72 ℃ 30 s，共 39 个循环。采用 Ct 值比较相对定量法处理数据，以 $2^{-\Delta\Delta G}$ 表示。

1.2.4 MKN-45 细胞中 GM130、ppGalNAc-T2、C1Gal-T1、ST3Gal-1 蛋白表达水平的检测 采用 Western blot 法。转染 48 h 后，用 RIPA 裂解液分别提取 3 组细胞（GM130-siRNA、

阴性对照、空白对照）的总蛋白，BCA 法测定其蛋白浓度。取样经 10%SDS-PAGE 分离后，将蛋白电转至 PVDF 膜上，用5%脱脂奶粉封闭 2 h，分别加入 GM130 抗体(1:1 000)、GalNT2(1:500)、SIAT4A(1:500)、C1GalT1(1:1 000)和 β-actin 抗体(1:2 000)，4 ℃孵育过夜，再加入含有辣根过氧化物酶 HPR 标记的二抗(1:2 000)孵育 2 h，ECL 化学发光显影。采用 Quantity One 软件测定条带的灰度值，以目的蛋白与 β-actin 条带的灰度值的比值表示目的蛋白的相对表达量。

表 1 引物序列

Tab.1 Sequences of primers for qRT-PCR

基因	引物序列(5'→3')	产物长度(bp)
GM130	上游:GGCTCTCTCTGCTGTCTCCA	118
	下游:GTCCTCATTGCTTTGGGTGT	
ppGalNAc-T2	上游:AGCGTCAGTTAGGCACACCT	108
	下游:CAAGACACAGGGAGGAGCAT	
C1Gal-T1	上游:TTCATTGGAACCGTATCAGG	159
	下游:CTGGGCAAGTGTGAGAACC	
ST3Gal-1	上游:TCTACCACCCAGCCTTCATC	121
	下游:AAGTCCACCTCATCGCAGAC	
β-actin	上游:CCTTCTACAATGAGCTGCGT	147
	下游:CCTGGATAGCAACGTACATG	

1.2.5 α2,3 唾液酸残基糖链结构的表达水平的检测 转染 48 h 后，收集 3 组细胞(GM130-siRNA、阴性对照、空白对照)，1×10^6 个/管，TPBS 洗 2 次，1 000 r/min 离心 5 min，加入 500 μl 凝集素缓冲液，将细胞吹打均匀，加入生物素化的凝集素 MALII，37 ℃ 孵育 120 min，TPBS 洗 2 次，1 000 r/min 离心 5 min，加入 500 μl 亲和素缓冲液，将细胞吹打均匀，加入 PE 标记的亲和素，于 37 ℃孵育 60 min；TPBS 洗 2 次，1 000 r/min 离心 5 min，加入 400 μl 含 1% BSA 的 PBS 缓冲液，流式细胞仪检测各组细胞荧光强度。

1.2.6 基质胶粘附实验 用无血清 1640 培养基将 Matrigel 配制成 10 μg/ml 的人工基底膜胶，按每孔 50 μl 铺入 96 孔板中(3 块板，各培养板均分为 3 组，每组 3 孔)，置于超净工作台中风干过夜。次日，每孔加入适量无血清 1640 培养基放置 60 min，洗去多余未粘附的 Matrigel 胶。收集已转染 48 h 后的 3 组细胞(GM130-siRNA、阴性对照、空白对照)，按 4×10^3 个/孔接种于 96 孔板中，置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中分别培养 30、60、90 min。在相应时间点弃去培养基，用 PBS 洗 3 遍，将未粘附细胞洗去。每孔加入 100 μl 甲醇，于室温固定 15 min，然后向每孔加入 100 μl Hoechst33258 染液，染色 15 min，用双蒸水洗去多余染液。于倒置显微镜下计数细胞数量并拍照。

1.2.7 胃癌细胞与内皮细胞粘附实验 取呈对数生长的 HUVEC，按每孔 5×10^4 个接种于 96 孔板中，于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养长成单层，每组设 3 个平行孔。转染 48 h 后，将 3 组细胞(GM130-siRNA、阴性对照、空白对照)按 5×10^4 个/孔接种于内皮细胞，37 ℃、5%CO_2 培养箱中孵育 30 min，弃去培养液，用 10%小牛血清的 1640 培养液清洗 2 遍，洗去未粘附胃癌细胞。向每孔加入 100 μl 配制好的 0.25%Rose Bengal 染色液，室温孵育 5 min 后吸去染料，用含 10%小牛血清的 1640 培养液清洗 2 次。然后每孔加入配制的 95%乙醇:PBS(1:1)溶液 200 μl，于室温孵育约 30 min。在显微镜下观察培养板内细胞情况并拍照，于酶标仪上测定 570 nm 波长下细胞的吸光度(absorbance，A)值，A 值代表粘附后的肿瘤细胞，以只含内皮细胞孔调零。肿瘤细胞 A 值=内皮细胞和肿瘤细胞 A 值-内皮细胞 A 值。每组细胞设 3 个平行复孔，取均值。

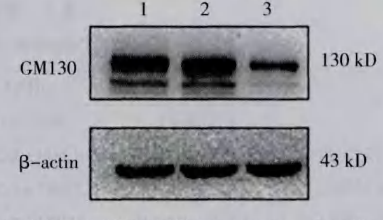
1.3 统计分析

应用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析，实验数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，多组间的比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD-t 检验，检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 GM130 沉默后明显下调胃癌细胞 MKN-45 中 GM130 mRNA 和蛋白的表达

将 GM130-siRNA 转入 MKN-45 细胞后，与阴性对照组和空白对照组相比，GM130 siRNA 组中 GM130 mRNA 和蛋白的表达明显下调(P=0.007、P=0.001)，而阴性对照组和空白对照组中 GM130 mRNA 和蛋白的表达无明显差异(P=0.552、P=0.734)，见图 1、表 2。表明 GM130-siRNA 组 GM130 的表达明显下调，转染成功。



1:空白对照组；2:阴性对照组；3:GM130-siRNA 组

图 1 Western blot 检测各组中 GM130 蛋白的表达

Fig.1 Expression of GM130 protein detected by Western blot

表 2 各组中 GM130 mRNA 及蛋白相对表达水平($\bar{x}\pm s$，n=3)

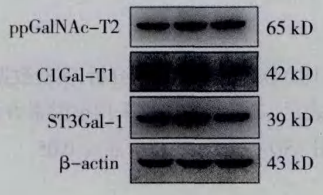
Tab.2 Expression of GM130 mRNA and protein in each group ($\bar{x}\pm s$，n=3)

组别	mRNA	蛋白相对表达量
空白对照组	2.636±0.194	1.325±0.253
阴性对照组	2.378±0.811	1.271±0.183
GM130-siRNA组	0.752±0.254[ab]	0.390±0.057[ab]
F 值	12.350	24.520
P 值	0.007	0.001

注：a，与空白对照组比较，P<0.05；b：与阴性对照组比较，P<0.05

2.2　沉默 GM130 对 MKN-45 细胞 ppGalNAc-T2、C1Gal-T1、ST3Gal-1 mRNA 转录水平及蛋白表达的影响

qRT-PCR 和 Western blot 检测结果显示，与阴性对照组和空白对照组相比，GM130-siRNA 组 C1Gal-T1、ST3Gal-1 mRNA 及蛋白表达明显下降，差异均具有统计学意义（P 均<0.05）；阴性对照组与空白对照组相比，差异无统计学意义（P 均>0.05）；3 组细胞 ppGalNAc-T2 mRNA 及蛋白表达水平无明显差异（P=0.801、P=0.298），见图 2、表 3。表明沉默 GM130 基因后，C1Gal-T1、ST3Gal-1 mRNA 及蛋白表达水平明显下调，而 ppGalNAc-T2 mRNA 及蛋白表达水平无明显变化。



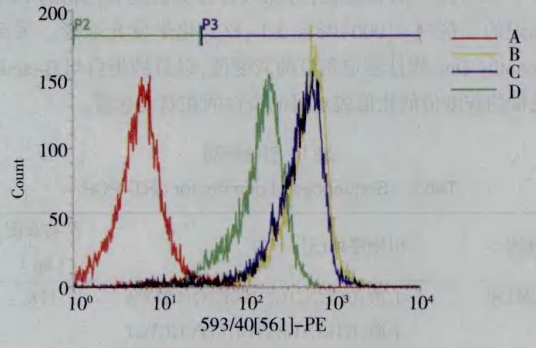
1：空白对照组；2：阴性对照组；3：GM130-siRNA 组

图 2　ppGalNAc-T2、C1Gal-T1、ST3Gal-1 蛋白在各组中的表达

Fig.2　Expression of ppGalNAc-T2, C1Gal-T1, ST3Gal-1 proteins in each group

2.3　GM130 表达下调对 MKN-45 细胞 α2,3 唾液酸残基的表达水平的影响

流式结果显示，GM130-siRNA 组、阴性对照组、空白对照组荧光强度分别为（528.333 ± 32.868）、（486.667 ± 30.436）、（178.667 ± 34.239），组间单因素方差分析有统计学意义（F=103.272，P=0.000）。GM130-siRNA 组与阴性对照组和空白对照组比差异具有统计学意义（P=0.000、P=0.000），阴性对照组与空白对照组间无统计学差异（P=0.168），见图 3。表明 GM130 下调后，胃癌细胞表面 α 2,3 唾液酸残基的表达明显下调。



A：未染色空白对照；B：空白对照组；
C：阴性对照组；D：GM130-siRNA 组

图 3　流式细胞术检测胃癌细胞表面 α 2,3 唾液酸残基糖链的表达变化

Fig.3　Expression of α2,3-linked sialic acid residues in MKN-45 cells detected by flow cytometry

2.4　GM130 表达下调对 MKN-45 细胞粘附的影响

基质胶粘附实验结果显示，GM130-siRNA 组细胞粘附数在不同时间点（30、60、90 min）均明显低于阴性对照组和空白对照组（P<0.05），而阴性对照组和空白对照组间差异不明显（P>0.05），见表 4、图 4。表明沉默 GM130 基因后，胃癌细胞的粘附能力明显降低。

表 3　各组中不同 mRNA 及蛋白的表达水平（$\bar{x} \pm s$）

Tab.3　Different mRNA and proteins expression in each group（$\bar{x} \pm s$）

组别	mRNA			蛋白相对表达量		
	C1Gal-T1	ST3Gal-1	ppGalNAc-T2	C1Gal-T1	ST3Gal-1	ppGalNAc-T2
空白对照组	1.924 ± 0.264	1.609 ± 0.222	1.048 ± 0.356	0.990 ± 0.168	0.796 ± 0.068	1.018 ± 0.068
阴性对照组	1.924 ± 0.089	1.487 ± 0.265	1.060 ± 0.337	1.095 ± 0.116	0.781 ± 0.035	0.931 ± 0.073
GM130-siRNA组	1.031 ± 0.220[ab]	0.974 ± 0.044[ab]	0.912 ± 0.152[ab]	0.393 ± 0.058[ab]	0.524 ± 0.091[ab]	0.961 ± 0.067[ab]
F 值	18.979	8.346	0.231	28.634	14.782	1.493
P 值	0.003	0.018	0.801	0.001	0.005	0.298

注：a，与空白对照组比较，P<0.05；b：与阴性对照组比较，P<0.05

表 4　各组细胞在细胞外基质的粘附情况

Tab.4　Expression of matrigel adhesion assay of the MKN-45 cell's adhesive ability

组别	30 min	60 min	90 min
空白对照组	76.400 ± 17.952	164.600 ± 10.164	213.400 ± 18.036
阴性对照组	69.000 ± 13.472	165.200 ± 10.281	202.800 ± 12.091
GM130-siRNA组	37.000 ± 10.909[ab]	108.400 ± 11.104[ab]	133.400 ± 8.820[ab]
F 值	10.562	48.037	51.560
P 值	0.002	0.000	0.000

注：a，与空白对照组比较，P<0.05；b：与阴性对照组比较 P<0.05

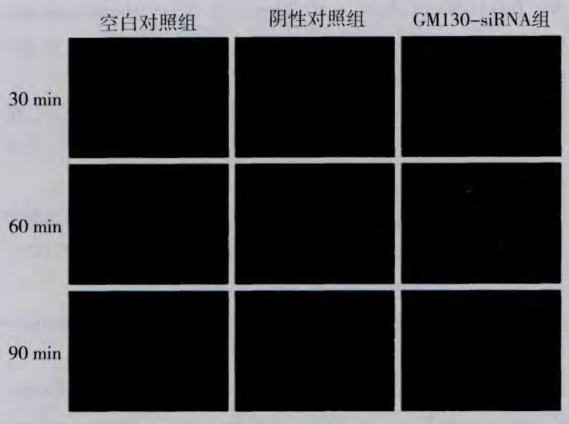
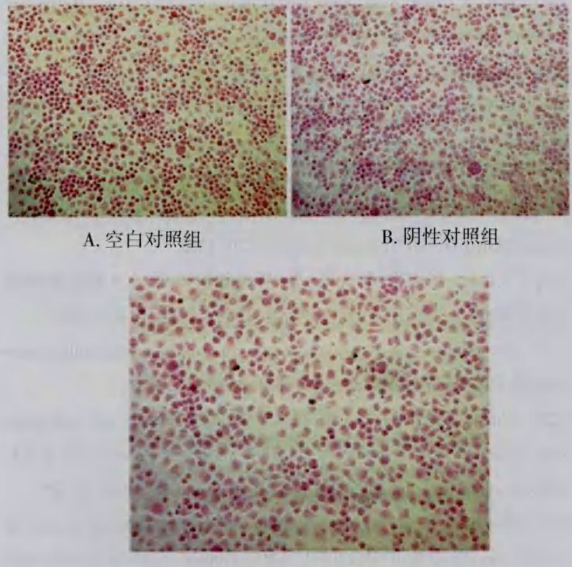


图 4　基质胶粘附实验检测 GM130 对 MKN-45 细胞粘附的影响（100×）

Fig.4　Effect of GM130 on the adhesion of MKN-45 cells tested by matrigel adhesion assay（100×）

2.5　GM130 表达下调对 MKN-45 细胞与血管内皮细胞粘附的影响

肿瘤细胞与内皮细胞粘附实验结果显示，GM130-siRNA 组、阴性对照组、空白对照组细胞与内皮细胞粘附率（A 值）分别为（0.046 ± 0.011）、（0.124 ± 0.018）、（0.116 ± 0.015），组间单因素方差分析有统计学意义（F=41.588，P=0.000）。GM130-siRNA 组粘附率 A 值与阴性对照组和空白对照组相比，差异有统计学意义（P=0.000、P=0.000），而阴性对照组和空白对照组间无明显差异（P=0.437）。见图 5。表明沉默 GM130 基因后，胃癌细胞与内皮细胞粘附力明显降低。



A. 空白对照组　　B. 阴性对照组

C. GM130-siRNA 组

图 5　各组细胞与内皮细胞的粘附情况（100×）

Fig.5　Expression of adhesion test of the MKN-45 cell's adhesive ability after transfection（100×）

3　讨　论

高尔基体是由多个扁平囊泡堆叠形成的具有高度极性的细胞器，其主要功能是对蛋白质进行加工、分类，并运输至细胞特定的部位或细胞外发挥作用。GM130 定位于高尔基体顺面膜囊，调节内质网到高尔基体的运输，并与其配对蛋白 P115、giantin、GRASP65 和 Rab GTPases 相互作用共同维持高尔基体的结构[3]。Puthenveedu 等[12]研究表明，沉默 GM130 能够抑制高尔基堆的横向池状融合，打乱分泌蛋白和膜蛋白糖基化相关高尔基体酶的均匀分布。新近研究发现 GM130 在多种肿瘤的发生发展过程中发挥着重要作用。GM130 能够介导上皮细胞间质转型以及胃癌细胞的侵袭[13]；下调 GM130 可以诱导肺癌细胞自噬，降低肺癌细胞侵袭力，抑制小鼠肺癌模型中肿瘤血管的生成和肿瘤的生长[14]；Chen 等[15]通过 siRNA 沉默 SOK1 基因能导致GM130 的表达上调，增强乳腺癌细胞株 MCF-7 的迁移能力。本课题组前期研究发现，在 MKN-45 细胞中下调 GM130 基因，能降低胃癌细胞的增殖、侵袭和转移能力[10]。此外，GM130 还与宫颈癌[16]、前列腺癌[17]等肿瘤的侵袭、迁移相关。

已有相关文献报道，GM130 参与蛋白糖基化的调控。Chang 等[14]研究表明，下调 GM130 使抗 O-链接 N-乙酰葡萄糖胺单克隆抗体 RL2 明显下降。Petrosyan 等[18]研究表明，GM130 对 C1Gal-T1 在高尔基体中的转运和定位起着重要作用。目前国内外有关 GM130 与糖基化关系的报道相对较少，GM130 对糖基化的具体调控机制尚不明确。本研究通过 siRNA 干扰沉默 GM130 基因，发现下调 GM130 后 O-糖基化相关糖基转移酶 C1Gal-T1、ST3Gal-1 的 mRNA 和蛋白表达水平明显降低，而 ppGalNAc-T2 的 mRNA 和蛋白表达水平无明显变化，提示 GM130 可能通过下调 C1Gal-T1 和 ST3Gal-1 影响蛋白 O-糖基化。唾液酸是细胞膜上糖蛋白、糖脂的重要组成成分，唾液酸残基糖链结构常常在肿瘤细胞表面呈过表达，是一种广谱的肿瘤标志物用于肿瘤的诊断[19]。王风玲等[20]研究发现，α2,3 唾液酸残基糖链结构在低分化胃癌组织中呈高表达，并与胃癌的侵袭深度显著相关。本研究通过凝集素流式细胞术检测胃癌细胞表面 α2,3 唾液酸残基糖链结构的表达

情况，结果显示下调 GM130 后，胃癌细胞表面 α2,3 唾液酸残基的表达量明显降低，说明 GM130 可能通过影响肿瘤细胞表面糖链结构而影响肿瘤的发生发展。粘附分子是一类糖蛋白，经过糖基化修饰后发挥其功能[21]。粘附分子调节细胞与细胞间，细胞与细胞外基质间的粘附作用[22]。Baschieri 等[23]研究发现下调GM130 能诱导粘附分子 E-cadherin 表达的下调。本研究发现，下调 GM130 后，MKN-45 细胞的粘附能力下降，GM130 参与细胞粘附调控的具体机制还有待进一步研究。

综上所述，本研究显示 GM130 对胃癌细胞 O-糖基化的调控可能与糖基转移酶 C1Gal-T1 和ST3Gal-1 相关，GM130 可能通过参与蛋白糖基化的调控影响肿瘤的发生发展。同时 GM130 与胃癌细胞的粘附作用密切相关，它可能通过促进胃癌细胞与细胞外基质及与内皮细胞间的粘附能力来促进胃癌的发生发展。在后续研究中，应深入探讨 GM130 参与糖基化调控的具体机制以及其影响胃癌细胞粘附能力的分子机制，为进一步研究 GM130 在胃癌的发生发展中的作用奠定理论基础。

参 考 文 献

[1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108.

[2] Nakamura N, Rabouille C, Watson R, et al. Characterization of a cis-Golgi matrix protein, GM130[J]. J Cell Biol, 1995, 131(6): 1715-1726.

[3] Nakamura N. Emerging New Roles of GM130, a cis-Golgi Matrix Protein, in Higher Order Cell Functions[J]. Journal of Pharmacological Sciences, 2010, 112(3): 255-264.

[4] Ohtsubo K, Marth JD. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease[J]. Cell, 2006, 126(5): 855-867.

[5] Reis CA, Osorio H, Silva L, et al. Alterations in glycosylation as biomarkers for cancer detection[J]. J Clin Pathol, 2010, 63(4): 322-329.

[6] Petrosyan A, Holzapfel MS, Muirhead DE, et al. Restoration of compact Golgi morphology in advanced prostate cancer enhances susceptibility to galectin-1-induced apoptosis by modifying mucin O-glycan synthesis[J]. Mol Cancer Res, 2014, 12(12): 1704-1716.

[7] Zhou YH, Hang SY, Qiu HJ, et al. UDP-GalNAc: polypeptide α-N-acetygalactosaminyltransferase2 Localized on Both cis and trans Side of Golgi Stacks in SGC7901 Cells[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2009, 36(1): 49-57.

[8] Hua D, Shen L, Xu L, et al. Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2 regulates cellular metastasis-associated behavior in gastric cancer[J]. Int J Mol Med, 2012, 30(6): 1267-1274.

[9] 陈 婕，牟 玲，易永芬. 高尔基体基质蛋白 130、14-3-3ζ、整合素 α3 在中、低分化胃癌组织的表达及意义[J]. 重庆医科大学学报，2014，39(12)：1679-1685.

[10] 冯阳阳，陈 婕，牟 玲，等. 抑制 GM130 表达对胃癌细胞增殖_侵袭及迁移能力的影响[J]. 第三军医大学学报，2015，37(12)：1217-1221.

[11] Wu AM, Lisowska E, Duk M, et al. Lectins as tools in glycoconjugate research[J]. Glycoconj J, 2009, 26(8): 899-913.

[12] Puthenveedu MA, Bachert C, Puri S, et al. GM130 and GRASP65-dependent lateral cisternal fusion allows uniform Golgi-enzyme distribution[J]. Nat Cell Biol, 2006, 8(3): 238-248.

[13] Zhao JQ, Yang C, Guo SJ, et al. GM130 regulates epithelial-to-mesenchymal transition and invasion of gastric cancer cells via snail[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(9): 10784-10791.

[14] Chang SH, Hong SH, Jiang HL, et al. GOLGA2/GM130, cis-Golgi matrix protein, is a novel target of anticancer gene therapy[J]. Mol Ther, 2012, 20(11): 2052-2063.

[15] Chen XD, Cho CY. Downregulation of SOK1 promotes the migration of MCF-7 cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 407(2): 389-392.

[16] Brandstaetter H, Kendrick-Jones J, Buss F. Myo1c regulates lipid raft recycling to control cell spreading, migration and Salmonella invasion[J]. J Cell Sci, 2012, 125(8): 1991-2003.

[17] Lu PH, Yu CC, Chiang PC, et al. Paclitaxel Induces Apoptosis Through Activation of Nuclear Protein Kinase C-δ and Subsequent Activation of Golgi Associated Cdk1 in Human Hormone Refractory Prostate Cancer[J]. The Journal of Urology, 2011, 186(6): 2434-2441.

[18] Petrosyan A, Ali MF, and Cheng PW. Glycosyltransferase-specific Golgi-targeting mechanisms[J]. J Biol Chem, 2012, 287(45): 37621-37627.

[19] Inagaki Y, Song P, Tang W, et al. Cancer-associated carbohydrate antigens for clinical diagnostic markers--its effectiveness and limitations[J]. Drug Discov Ther, 2015, 9(2): 129-132.

[20] 王风玲，崔淑香，解砚英，等. 胃癌细胞表面 _2_3 唾液酸糖链结构的检测及意义[J]. 中国肿瘤临床，2008，35(24)：1403-1406.

[21] Pu QH, Yu C. Glycosyltransferases, glycosylation and atherosclerosis[J]. Glycoconj J, 2014, 31: 605-611.

[22] Zhong XM, Drgonova J, Li CY, et al. Human cell adhesion molecules: annotated functional subtypes and overrepresentation of addiction-associated genes[J]. Ann N Y Acad Sci, 2015, 1349: 83-95.

[23] Baschieri F, Confalonieri S, Bertalot G, et al. Spatial control of Cdc42 signalling by a GM130-RasGRF complex regulates polarity and tumorigenesis[J]. Nat Commun, 2014(5): 4839.

（责任编辑：冉明会）