内膜癌变与辅助生殖技术 DOI：10.13406/j.cnki.cyxb.003658

GALNT4介导的TYRO3糖基化对子宫内膜癌的恶性生物学行为的影响

朱一麟，高雪梅，孟红娟，刘　艳
（武汉市中西医结合医院妇产科，武汉　430022）

【摘　要】目的：探讨多肽GalNAc转移酶4（GalNAc transferases，GALNT4）通过介导蛋白酪氨酸激酶受体（protein tyrosine kinase receptor，TYRO3）糖基化影响子宫内膜癌（endometrial carcinoma，ECa）的恶性生物学行为的分子机制。**方法：**研究人群包括从106例ECa患者中收集的福尔马林固定石蜡包埋的ECa组织样本制作组织微阵列。分析GALNT4表达与患者诊断时的年龄、疾病阶段、淋巴血管侵犯、生存结局的关系。人ECa细胞系Ishikawa和RL95-2转染GALNT4-特异性siRNA或GALNT4质粒以敲低或上调GALNT4表达。采用si-TYRO3处理GALNT4过表达的Ishikawa细胞。通过Transwell实验测量了细胞的迁移、侵袭能力。将GALNT4过表达或敲低的Ishikawa细胞注射到NOD/SCID小鼠脾脏中以诱导肝转移，分析肝转移病灶数量。**结果：**ECa组织中GALNT4的表达较正常组织增加（$P<0.05$）。GALNT4低表达组和GALNT4高表达组在年龄、组织学类型、国际妇产联盟（International Federation of Gynecology and Obstetrics，FIGO）分期存在差异（$P<0.05$）。GALNT4表达水平与OS呈负相关，HR为2.610（95%CI=1.094~6.226）（$P<0.05$）。GALNT4高表达组的总生存期低于GALNT4低表达组（$P<0.05$）。与Vector组相比，GALNT4组Ishikawa和RL95-2细胞迁移和侵袭细胞数增加（$P<0.05$）。与si-NC组相比，si-GALNT4#1、si-GALNT4#2组Ishikawa和RL95-2细胞的迁移、侵袭细胞数降低（$P<0.05$）。与Vector组相比，GALNT4组Ishikawa细胞肝转移病灶数量增加（$P<0.05$）。相反，与si-NC组相比，si-GALNT4#1、si-GALNT4#2组Ishikawa细胞肝转移病灶数量减少（$P<0.05$）。与GALNT4+si-NC组相比，GALNT4+si-TYRO3组Ishikawa细胞的迁移、侵袭细胞数降低（$P<0.05$）。**结论：**GALNT4在ECa组织中过表达，并与不良预后相关。机制研究显示，GALNT4促进ECa细胞迁移、侵袭的行为部分是通过修饰TYRO3的O-糖基化和蛋白稳定性实现。

【关键词】多肽GalNAc转移酶4；蛋白酪氨酸激酶；子宫内膜癌；糖基化
【中图分类号】R737.33　　**【文献标志码】**A　　**【收稿日期】**2024-01-08

Impact of TYRO3 glycosylation mediated by GalNAc transferase 4 on the malignant biological behavior of endometrial carcinoma

Zhu Yilin，Gao Xuemei，Meng Hongjuan，Liu Yan
（*Department of Obstetrics and Gynecology，Wuhan Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine*）

【Abstract】*Objective*：To investigate the molecular mechanism of action of the polypeptide GalNAc transferase 4（GALNT4）on the malignant biological behavior of endometrial carcinoma（ECa）by mediating the glycosylation of receptor tyrosine kinase TYRO3. ***Methods*：**Formalin-fixed paraffin-embedded ECa tissue samples were collected from 106 ECa patients to prepare tissue microarrays. The association of the expression of GALNT4 with the age at diagnosis，disease stage，lymphovascular invasion，and survival outcome was analyzed. Human ECa cell lines Ishikawa and RL95-2 were transfected with GALNT4-specific siRNA or GALNT4 plasmid to knockdown or upregulate the expression of GALNT4，and Ishikawa cells with GALNT4 overexpression were treated with si-TYRO3. Transwell assay was used to assess the migration and invasion abilities of cells. Ishikawa cells with GALNT4 overexpression or knockdown were injected into the spleen of NOD/SCID mice to induce liver metastasis，and the number of liver metastatic lesions was analyzed. ***Results*：**The expression level of GALNT4 in ECa tissue was significantly higher than that in normal tissue（$P<0.05$）. There were significant differences in age，histological type，and FIGO stage between the low-expression GALNT4 group and the high-expression GALNT4 group（$P<0.05$）. The expression level of GALNT4 was negatively correlated with overall survival（hazard ratio=2.610，95%CI=1.094-6.226，$P<0.05$）. The high-expression GALNT4 group had a significantly shorter overall survival time than the low-expression GALNT4 group（$P<0.05$）. Compared with the Vector group，the GALNT4 group had significant increases in the migration and invasion of Ishikawa and RL95-2 cells（$P<0.05$）. Compared with the si-NC group，the si-GALNT4#1 and si-GALNT4#2 groups had significant reductions in the migration and invasion of Ishikawa and RL95-2 cells（$P<0.05$）. Compared with the Vector group，the GALNT4 group had a significant increase in the number of liver metastatic le-

作者介绍：朱一麟，Email：xuvcngfhf960084@163.com，研究方向：妇科肿瘤。
基金项目：湖北省自然科学基金青年资助项目（编号：2022CFB991）。
优先出版：https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20241212.1408.008（2024-12-13）

sions due to Ishikawa cells (P<0.05), and on the contrary, compared with the si-NC group, the si-GALNT4#1 and si-GALNT4#2 groups had a significant reduction in the number of liver metastatic lesions (P<0.05). Compared with the GALNT4+si-NC group, the GALNT4+si-TYRO3 group had a significant reduction in the migration and invasion of Ishikawa cells (P<0.05). ***Conclusion***: GALNT4 is overexpressed in ECa tissue and is associated with poor prognosis. The mechanism study shows that GALNT4 promotes the migration and invasion of ECa cells partly by modifying the O-glycosylation and protein stability of TYRO3.

【Key words】polypeptide GalNAc transferase 4; protein tyrosine kinase; endometrial carcinoma; glycosylation

子宫内膜癌（endometrial carcinoma，ECa）是最常见的妇科恶性肿瘤，在发展中国家的发病率和病死率均有所增加[1]。一些ECa患者可以通过手术完全治愈，但晚期ECa患者的预后总是很差，需要更有效的临床治疗策略[2]。因此，迫切需要找到新的诊断标记和确定治疗靶点来改善ECa的治疗。糖基化改变影响许多细胞特性，包括细胞增殖、凋亡、分化、黏附、迁移、侵袭和免疫反应[3]。哺乳动物细胞中蛋白质糖基化的两种主要形式是N-连接和O-连接。其中，最丰富的O-糖基化类型是N-乙酰氨基半乳糖（N-acetylgalactosamine，GalNAc）型O-糖基化，由GalNAc转移到丝氨酸（S）或苏氨酸（T）残基的羟基以形成Tn抗原（GalNAc-α-S/T）介导[4]。GalNAc型O-糖基化反应由一大家族的多肽GalNAc转移酶（GalNAc transferases，GALNTs）催化，该家族由20个成员组成，即GALNT1-20[5]。GALNT酶以时空依赖的方式在各种组织中差异表达[6]。许多报告已经证明了GalNAc型O-聚糖和GALNT基因的生物功能和在癌症中的重要性[7]。其中，GALNT4已被报道为乳腺癌的诊断标志物，并可能通过调节纤联蛋白的O-糖基化来调节乳腺癌的肿瘤发生[8]。GALNT4调节死亡受体O-糖基化并控制肿瘤细胞对促凋亡配体Apo2L/TRAIL的敏感性[9]。然而，目前关于GALNT4在ECa中的生物学功能仍不清楚。课题组前期通过GEPIA在线数据库分析显示GALNT4在ECa中的表达明显增加，并且其表达与患者预后密切相关。因此，本研究在前期发现的基础上进一步通过病理分析和体外实验探索GALNT4介导的糖基化修饰在ECa恶性生物学行为中的分子机制。

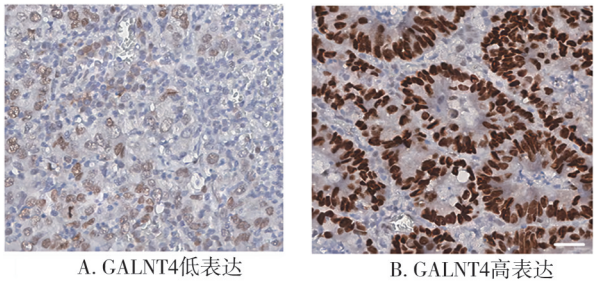
1 材料与方法

1.1 材料

研究人群包括从106例ECa患者中收集的福尔马林固定石蜡包埋的ECa组织样本制作组织微阵列，分布为30个国际妇产联盟（International Federation of Gynecology and Obstetrics，FIGO）1~2级（低级别）子宫内膜样癌（low grade endometrioid carcinoma，LEMC）（28.3%）、28个FIGO 3级（高级别）子宫内膜样癌（high grade endometrioid carcinoma，HEMC）（26.4%）、31个浆液性癌（serous cancers，SC）（29.2%）和17个透明细胞癌（clear cell carcinoma，CCC）（16%）。2例妇科病理学家对所有病理切片进行了复查，并确认了初步诊断和组织学分级。记录每个样本的患者诊断时的年龄、疾病阶段、是否存在淋巴血管侵犯、生存结局。这项研究得到了本中心伦理委员会的批准（审批号：2021006），并获得患者的知情同意。

1.2 方法

1.2.1 TMA与免疫组织化学染色 使用Leica Bond RX自动化系统（德国Leica Biosystems公司）对载玻片进行染色。用Dewax Solution（德国Leica公司）在自动化系统上对载玻片进行脱蜡2次，每次15 min，然后在100%-85%-75%乙醇中再水合，并在室温下在3% H_2O_2中浸泡10 min。抗原在97 ℃的柠檬酸缓冲液中提取30 min，并用封闭缓冲液（上海碧云天公司）封闭1 h。将小鼠抗人GALNT4多克隆抗体（美国Invitrogen公司）用Dako抗体稀释剂（美国Carpenteria公司）以1∶200的稀释比稀释，并与抗原孵育15 min。使用MaxVision Ⅱ试剂盒进行第二抗体孵育（美国MXB公司）。用苏木精复染裁片，脱水并盖玻片。使用Leica Bond Polymer Refined检测系统进行评估。通过将阳性染色细胞的百分比乘以核染色强度来计算H-score（范围：0~300）。强度被量化为0（无染色）、1+（弱染色）、2+（中度染色）和3+（强染色），频率被量化为细胞表现出染色的百分比。然后，根据每个强度级别的染色细胞的百分比来计算H-scores=1×（%细胞染色强度为1+）+2×（%细胞染色强度为2+）+3×（%细胞染色强度为3+）。染色代表图见图1。



A. GALNT4低表达　　B. GALNT4高表达

注：比例尺=50 μm

图1 ECa组织中GALNT4表达

1.2.2 细胞培养 人ECa细胞系Ishikawa和RL95-2购自美国典型培养物保藏中心。将细胞培养在含有10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 g/mL链霉素的DMEM培养基（美国Gibco公司）中。

1.2.3 转染与质粒构建 对于瞬时敲除，使用2种独立的

GALNT4-特异性 siRNA、蛋白酪氨酸激酶受体（protein tyrosine kinase receptor，TYRO3）-特异性 siRNA（美国 Invitrogen 公司）和非靶向 siRNA（美国 Invitrogen 公司）（最终浓度为 10 nmol/L）转染 Ishikawa 和 RL95-2 细胞 48 h。针对 GALNT4 的 siRNA 为 si-GALNT4#1：5'-CAGCAGGGAACUAAGCCUCGACA-3'和 si-GALNT4#2：5'-UGUCGAGUUAGUUCCCUGCUG-3'。抗 TYRO3 的 siRNA 为 si-TYRO3：5'-GAGCGGGAAUUUGGAGAACA-3'。非靶向 siRNA（si-NC）为 5'-CACACCUGCCAUGUCGACUGGUUU-3'。使用慢病毒感染系统在 ECa 细胞中过表达 GALNT4。从用 20 μg GALNT4/TRIPdU3 IRES-GFP（GALNT4）或 TRIPdU3 IRES-GFP 空质粒（15 μg psPAX2 和 6 μg VSVG，Vector）转染 Ishikawa 和 RL95-2 细胞。转染后 48 h，通过蛋白质印迹分析证实了 GALNT4 的过表达。

1.2.4 蛋白质印迹分析、凝集素下拉测定和蛋白质降解分析 将处理的细胞在 RIPA 裂解缓冲液（上海碧云天公司）中制备匀浆，随后使用 BCA 蛋白质测定试剂盒测定蛋白质浓度（上海碧云天公司）。蛋白质在 8%SDS/PAGE 凝胶上分离，并转移到 PVDF 膜上。用 5% 牛血清白蛋白（BSA；美国 Bio-Rad 公司）封闭 1 h，将膜与一级抗体在 4 ℃过夜。抗 GAPDH 的抗体购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司。抗 GALNT4、TYRO3 的抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司。然后将膜与辣根过氧化物酶缀合的第二抗体孵育，并使用 ECL 试剂（美国 GE Healthcare Life Sciences 公司）检测蛋白质。通过凝集素下拉分析 O-聚糖的变化。将 300 μg 总细胞裂解物与 Vicia Vilosa 凝集素（VVA）琼脂糖珠（美国 Vector Laboratories 公司）在 4 ℃孵育过夜。用 PBS 洗涤后，对被拉下的蛋白质进行蛋白质印迹分析。为了分析蛋白酶体依赖性降解，用 2 mmol/L 苄基-a-GalNAc（美国 Sigma 公司）处理细胞 24 h。收集总细胞裂解物，使用蛋白质印迹分析检测 TYRO3 和负载对照 GAPDH。

1.2.5 Transwell 检测细胞迁移、侵袭能力 将处理的细胞（2×10^4 个/孔）接种在无 Matrigel 基质或预涂有 100 μL 1 μg/μL Matrigel 基质（美国 BD Biosciences 公司）的 Transwell 室（美国 Corning 公司）中用于迁移、侵袭测定。分别将无血清培养基和完全培养基添加到上室和下室。孵育 24 h 后，迁移、侵袭的细胞用 4% 多聚甲醛固定，1% 结晶紫染色，显微镜下拍照。

1.2.6 实验动物模型 SPF 级 5 周龄雌性非肥胖糖尿病/严重联合免疫缺陷（NOD/SCID）小鼠购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。所有小鼠饲养在无病原体环境下。将小鼠分为 5 组，每组 6 只：Vector 组、GALNT4 组、si-NC 组、si-GALNT4#1 组、si-GALNT4#2 组。将经转染处理的 Ishikawa 细胞（2×10^6）注射到小鼠的脾脏中。在 6 周时处死小鼠，测量肝脏中的转移性肿瘤，并通过免疫组化分析转移病灶中 GALNT4 表达情况。

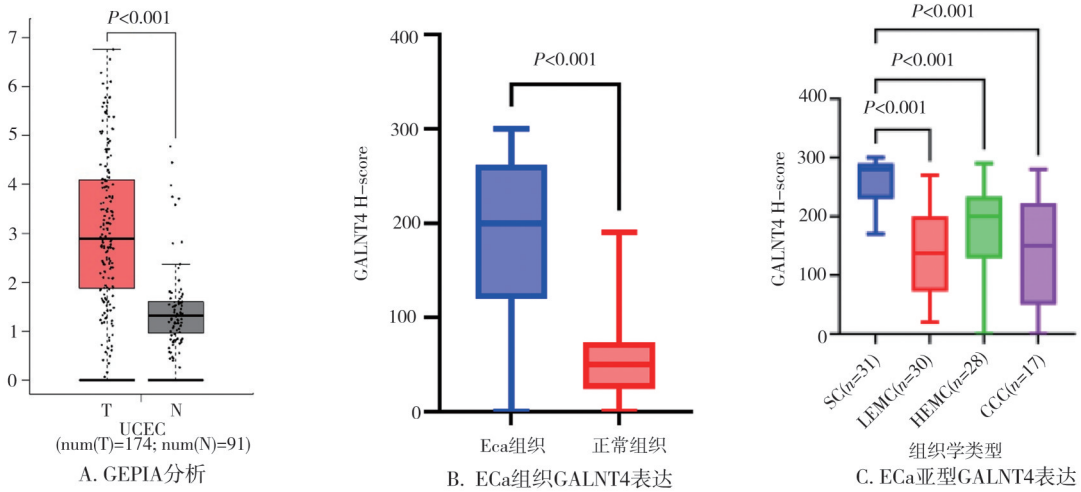
1.3 统计学方法

使用 SPSS 22.0 和 GraphPad Prism 9 进行统计分析。计量资料用均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，比较采用独立样本 t 检验；计数资料用例数（百分比）表示，采用卡方检验，单因素方差分析比较多个实验组之间的差异。使用 Kaplan-Meier 方法绘制生存曲线，通过时间-事件数据的对数秩检验比较总生存率。独立样本 t 检验和单因素方差分析用于分析体外和体内实验的组间差异。检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 GALNT4 在 ECa 组织中的表达情况及其与临床特征的关系

基于 GEPIA 在线数据库和临床样本分析显示，ECa 肿瘤组织中 GALNT4 的表达较正常组织增加（t=2.445，P=0.015，t=22.462，P<0.001）（图 2A、B）。在临床样本中，通过免疫组织化学分析 GALNT4 在不同 ECa 组织学类型中的表达情况，SC 中 GALNT4 的表达高于 HEMC、CCC 和 LEMC（F=20.220，P<0.001）（图 2C）。根据 GALNT4 表达水平的中位数，将患者分为低表达组（n=46）和高表达组（n=60）。GALNT4 低表达组和 GALNT4 高表达组在年龄、组织学类型、FIGO 分期差异有统计学意义（t=2.372，P=0.020；F=31.506，P<0.001；F=7.584，P=0.008）（表 1）。



注：T，肿瘤；N，正常；CCC，透明细胞癌；HEMC，高级别子宫内膜样癌；LEMC，低级别子宫内膜样癌；SC，浆液癌

图 2 ECa 组织中 GALNT4 的异常表达

表 1　GALNT4 的表达与临床特征的关系（n,%;$\bar{x}\pm s$）

特征	GALNT4 低表达组（n=46）	GALNT4 高表达组（n=60）	t/χ^2 值	P 值
年龄（岁）	62.07 ± 9.51	66.95 ± 11.21	2.372	0.020
组织学类型			31.506	<0.001
SC	2(4.30)	29(48.30)		
LEMC	22(47.80)	8(13.30)		
HEMC	11(23.90)	17(28.30)		
CCC	11(23.90)	6(10.00)		
FIGO 分期			7.584	0.008
Ⅰ	28(60.90)	24(40.00)		
Ⅱ	5(10.87)	9(15.00)		
Ⅲ	8(17.39)	21(35.00)		
Ⅳ	5(10.87)	6(10.00)		
淋巴血管侵犯			1.005	0.316
否	29(63.00)	32(53.30)		
是	17(37.00)	28(46.70)		

2.2　GALNT4 蛋白表达与不良疾病结局相关

晚期癌症的中位疾病生存期为 48.5 个月。由于有限的临床随访，无法估计患者的早期疾病生存率。通过调整诊断时的年龄、组织学亚型、FIGO 分期和淋巴血管侵犯进行反向剔除，GALNT4 表达水平与 OS 呈负相关，HR 为 2.610（95%CI=1.094~6.226）（P<0.05）（表 2）。Kaplan-Meier 曲线分析显示，GALNT4 高表达组的总生存期低于 GALNT4 低表达组差异有统计学意义（P<0.05）（图 3）。

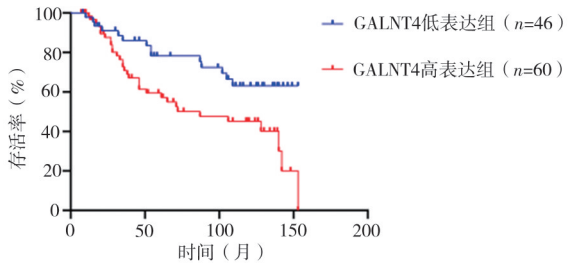


图 3　Kaplan-Meier 曲线分析 GALNT4 表达与总生存期的关系

2.3　GALNT4 过表达促进 ECa 细胞的迁移和侵袭

因为转移是癌症死亡的关键决定因素，因此我们集中研究 GALNT4 对 ECa 细胞迁移和侵袭的影响。蛋白质印迹分析证实在 GALNT4 质粒转染的 Ishikawa 和 RL95-2 细胞中 GALNT4 过表达（图 4A）。与 Vector 组相比，GALNT4 组 Ishikawa 和 RL95-2 细胞迁移和侵袭细胞数增加（P<0.05）（图 4B~G）。在 Ishikawa 和 RL95-2 细胞中用不同的 siRNAs 敲低 GALNT4（图 4H）。与 si-NC 组相比，si-GALNT4#1、si-GALNT4#2 组 Ishikawa 和 RL95-2 细胞的迁移、侵袭细胞数显著降低（P<0.05）（图 4I~N）。这些结果表明 GALNT4 表达的沉默足以抑制 ECa 细胞（包括 Ishikawa、RL95-2）的迁移和侵袭。

2.4　GALNT4 对 NOD/SCID 小鼠肿瘤转移的影响

为了研究 GALNT4 过表达对体内肿瘤转移的影响，将 GALNT4 过表达或敲低的 Ishikawa 细胞注射到 NOD/SCID 小鼠脾脏中以诱导肝转移。结果显示，与 Vector 组相比，GALNT4 组 Ishikawa 细胞肝转移病灶数量明显增加（P<0.05），并且转移病灶中 GALNT4 染色强度明显增加（P<0.05）（图 5A~C）。相反，与 si-NC 组相比，si-GALNT4#1、si-GALNT4#2 组 Ishikawa 细胞肝转移病灶数量明显减少，差异有统计学意义（P<0.05），并且转移病灶中 GALNT4 染色强度降低，差异有统计学意义（P<0.05）（图 5D~F）。

2.5　TYRO3 参与 GALNT4 促进 ECa 细胞的迁移、侵袭

已知纤连蛋白由大量修饰的 GalNAc 型 O-聚糖组成。为了证明携带 O-聚糖的 TYRO3 是否被 GalNAc 型 O-聚糖修饰，用苄基-α-GalNAc 处理 ECa 细胞以抑制 O-聚糖延伸。结果显示苄基-α-GalNAc 降低了 RL95-2 和 Ishikawa 细胞中 TYRO3 的分子量（图 6A），表明 TYRO3 携带 O-聚糖。为了证明 GALNT4 可以在 TYRO3 上添加 O-聚糖，本研究进行了长柔毛野豌豆外源凝集素（VVA）下拉试验。已知 VVA 特异性识别丝氨酸或苏氨酸残基上的 GalNAc，结果显示 Ishikawa 和 RL95-2 细胞中 GALNT4 敲除明显降低了 TYRO3 上的 GalNAc（图 6B），表明 GALNT4 可以在 TYRO3 上产生 O-聚糖，并调节 ECa 细胞中 TYRO3 蛋白的水平。

在用或不用 TYRO3siRNAs 处理的 GALNT4 过表达的 Ishikawa 细胞中进行了 Transwell 实验。结果显示，与 GALNT4+si-NC 组相比，GALNT4+si-TYRO3 组 Ishikawa 细胞的迁移、侵袭细胞数明显降低，差异有统计学意义（P<0.05）（图 6C~E）。

表 2　多变量 Cox 比例风险回归模型分析影响 ECa 患者生存的影响因素

指标	β	SE	Wald χ^2	P	HR	95%CI 下限	95%CI 上限
SC（参考）			5.132	0.162			
LEMC	−1.000	0.621	2.592	0.107	0.368	0.109	1.243
HEMC	−1.410	0.695	4.117	0.042	0.244	0.062	0.953
CCC	−0.800	0.623	1.649	0.199	0.449	0.133	1.523
FIGO 分期Ⅰ期（参考）			5.483	0.140			
Ⅰ	−0.194	0.726	0.072	0.789	0.823	0.198	3.419
Ⅱ	−2.140	1.065	4.039	0.044	0.118	0.015	0.948
Ⅲ	0.215	0.649	0.110	0.740	1.240	0.347	4.428
淋巴血管侵犯	−1.518	0.519	8.558	0.003	0.219	0.079	0.606
年龄	0.084	0.024	12.116	0.000	1.088	1.037	1.140
GALNT4	0.959	0.444	4.676	0.031	2.610	1.094	6.226

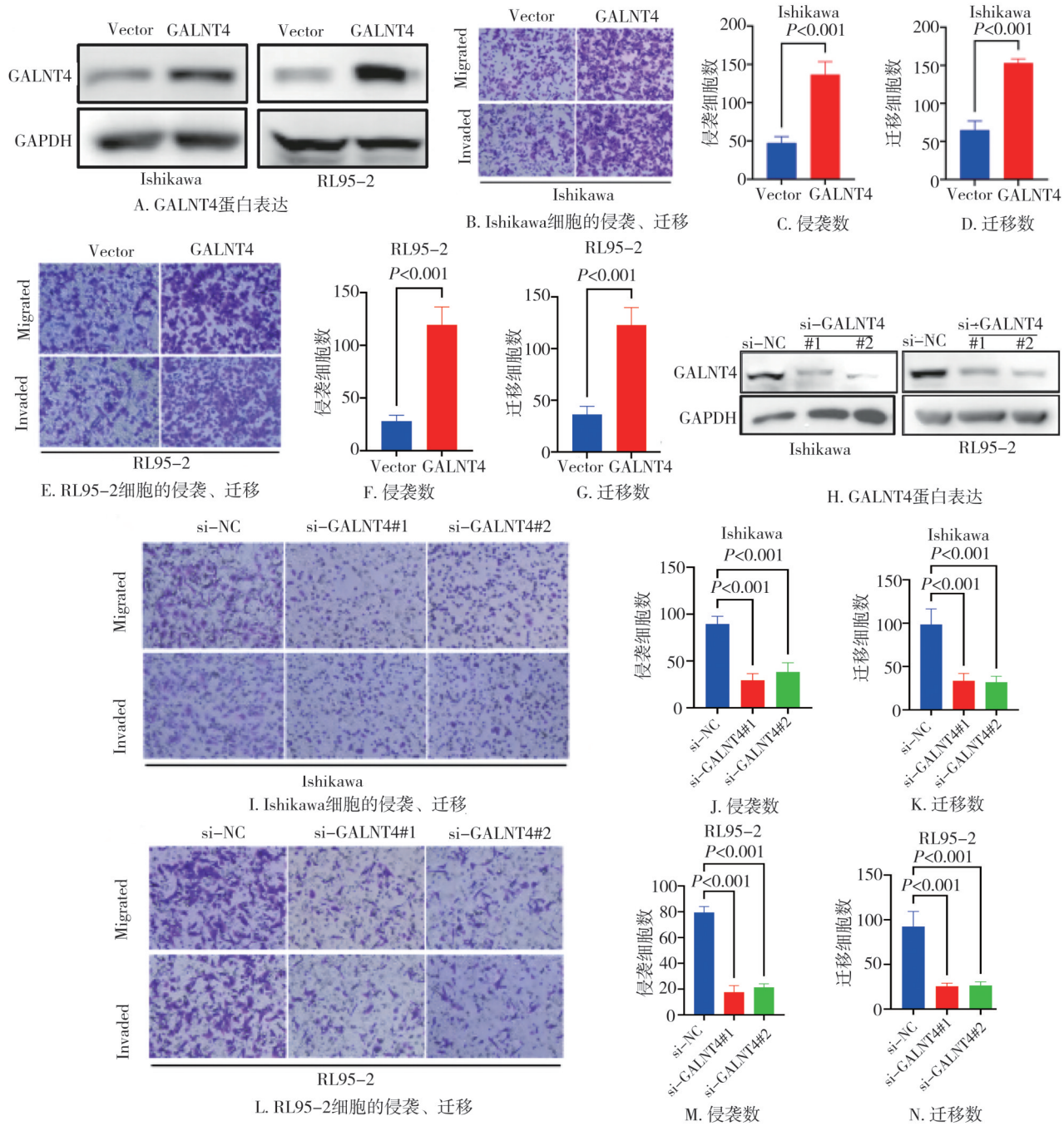
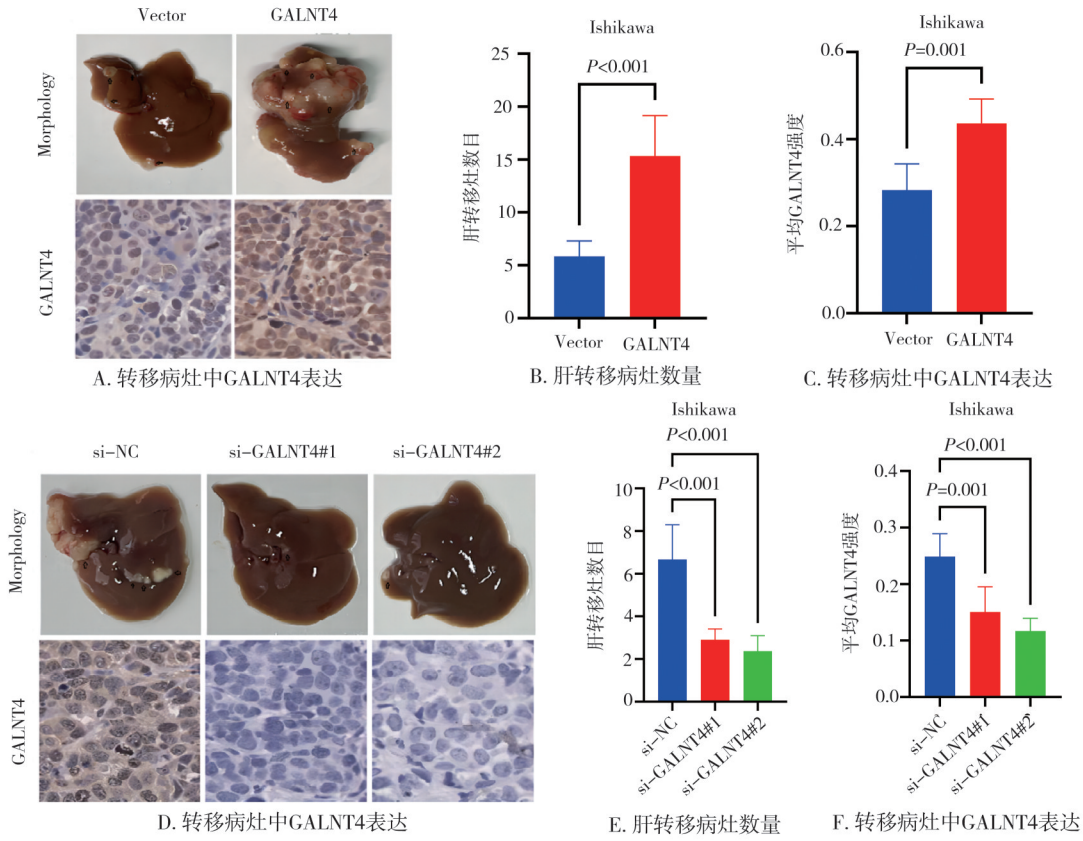


图4　GALNT4促进ECa细胞的迁移和侵袭

3　讨　论

GalNAc型O-糖基化和GALNT基因家族的20个成员在调节细胞行为中起着至关重要的作用。先前的研究表明，GALNT4在多种恶性肿瘤中上调，包括肝细胞癌、乳腺癌和膀胱癌，并且与肿瘤进展密切相关[10-11]。然而，GALNT4在ECa中的功能和详细的分子机制仍然是未知的。在目前的研究中，本研究证实GALNT4表达在ECa中普遍上调，并且与患者的年龄、组织学类型、FIGO分期密切相关。此外，GALNT4高表达对ECa患者预后产生不利影响，表明GALNT4可能介导ECa的恶性生物学行为。在体外实验中，GALNT4过表达促进ECa细胞迁移和侵袭，在体内促进肝脏转移。相反，沉默GALNT4抑制了这些恶性行为。在机制方面，本研究证明了TYRO3是GALNT4的一种新的蛋白底物，GALNT4主要通过蛋白酶体依赖途径调节TYRO3降解。此外，GALNT4介导的ECa细胞的迁移、侵袭几乎被TYRO3的siRNAs阻断，表明TYRO3是GALNT4介



注：箭头指示肿瘤位置

图5　GALNT4对NOD/SCID小鼠肿瘤转移的影响

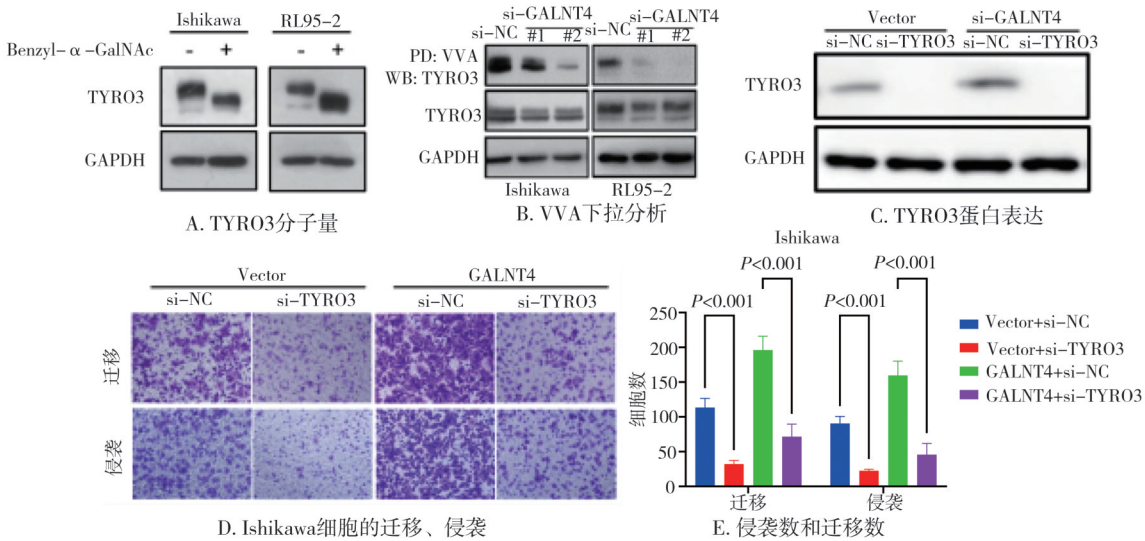


图6　TYRO3参与GALNT4促进ECa细胞的迁移、侵袭

导的迁移、侵袭的关键决定因素。这项研究为GALNT4-TYRO3轴在ECa进展的发病机制中的作用提供了新的见解。

TAM（TYRO3、AXL和MERTK）家族受体酪氨酸激酶（TAM family of receptor tyrosine kinases，RTKs）在多种癌症中异常表达，并且基于其在癌症细胞和促肿瘤免疫细胞中的不同功能，已被确定为有前景的治疗靶点[12]。其中，TYRO3表达与多种实体癌的转移风险增加和低存活率相关，包括乳腺癌、非小细胞肺腺癌、卵巢癌、透明细胞肾癌和胰腺癌[13-14]。在ECa中，TYRO3被认为是ECa生存率差和对抗EGFR治疗耐药的预测因子[15]。此外，

TYRO3也在成纤维细胞、血管细胞和几种免疫细胞中表达并发挥关键作用[16-17]。因此，TYRO3是癌症治疗的新兴目标。与以前的报道一致，本研究通过遗传学方法抑制TYRO3的表达显著逆转GALNT4过表达介导的ECa细胞的迁移、侵袭。因此，本研究提出GALNT4介导的ECa迁移、侵袭至少部分是通过激活TYRO3实现。此外，由于RTKs中TYRO3、AXL和MERTK的结构相似，因此AXL、MERTK可能也有助于GALNT4介导的迁移、侵袭。虽然GALNT4如何调节AXL和MERTK的详细机制仍有待进一步研究，但有理由预计所有TAM受体具有相似的功能，并可能参与GALNT4介导的迁移、侵袭行为。它们对细胞迁移、侵袭性的相对贡献可能取决于它们在ECa细胞中的表达水平。

据报道，GALNT亚型对具有GalNAc的肽和糖肽表现出不同的受体底物特异性，即：肽上GalNAc部分的序列组成决定了由单个GALNTs起始的O-糖苷键[18]。本研究发现，GALNT4介导的O-糖基化通过蛋白酶体降解途径调节TYRO3蛋白的稳定性。据报道，全长TYRO3（TYRO3-FL）的蛋白酶体依赖性降解与TYRO3细胞内结构域的产生相结合，TYRO3-ICD可以调节癌症相关基因的表达，并被认为是TYRO3的配体非依赖性功能之一[19]。由于本研究不能在ECa细胞中检测到足够量的磷酸TYRO3表达，无法解答GALNT4是否可以调节TYRO3的配体依赖性激活。此外，本研究发现用苄基-α-GalNAc抑制O-糖基化导致TYRO3的分子量降低，并且GALNT4的敲低降低了TYRO3的总水平，而TYRO3的分子量没有明显变化。原因可能是TYRO3上有多个O-糖基化位点，但GALNT4仅在这些位点的一部分上启动O-糖基化。因此，很有可能其他GALNT酶也能糖基化ECa细胞中的TYRO3。这些发现为GalNAc型O-糖基化在TAM受体生物学中的意义提供了新的见解，对了解癌症、心血管、自身免疫和神经元疾病的病理机制非常重要。

总之，本研究证明了GALNT4在ECa组织中过表达，并与不良预后相关。机制研究显示，GALNT4促进ECa细胞迁移、侵袭的行为部分是通过修饰TYRO3的O-糖基化和蛋白稳定性实现。这项研究强调了GalNAc型O-糖基化在TAM受体中的功能意义。

参 考 文 献

[1] Crosbie EJ, Kitson SJ, McAlpine JN, et al. Endometrial cancer[J]. Lancet, 2022, 399(10333): 1412-1428.

[2] Wang T, Jiang RA, Yao YS, et al. Endometrial cytology in diagnosis of endometrial cancer: a systematic review and meta-analysis of diagnostic accuracy[J]. J Clin Med, 2023, 12(6): 2358.

[3] Lin SS, Cao Y, Zhu K, et al. Identification of a novel prognostic signature based on N-linked glycosylation and its correlation with immunotherapy response in hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatocell Carcinoma, 2023, 10: 1749-1765.

[4] Sanz-Martinez I, Pereira S, Merino P, et al. Molecular recognition of GalNAc in mucin-type O-glycosylation[J]. Acc Chem Res, 2023, 56(5): 548-560.

[5] Wandall HH, Nielsen MAI, King-Smith S, et al. Global functions of O-glycosylation: promises and challenges in O-glycobiology[J]. FEBS J, 2021, 288(24): 7183-7212.

[6] Thompson N, Wakarchuk W. O-glycosylation and its role in therapeutic proteins[J]. Biosci Rep, 2022, 42(10): BSR20220094.

[7] Beaman EM, Carter DRF, Brooks SA. GALNTs: master regulators of metastasis-associated epithelial-mesenchymal transition (EMT)?[J]. Glycobiology, 2022, 32(7): 556-579.

[8] Berkel C, Cacan. The expression of O-linked glycosyltransferase GALNT7 in breast cancer is dependent on estrogen-, progesterone-, and HER2-receptor status, with prognostic implications[J]. Glycoconj J, 2023, 40(6): 631-644.

[9] Gao Y, Luan X, Melamed J, et al. Role of glycans on key cell surface receptors that regulate cell proliferation and cell death[J]. Cells, 2021, 10(5): 1252.

[10] Yu SA, Sun L, Peng L, et al. BarH-like homeobox 2 suppresses cell proliferation, invasion, and angiogenesis in hepatocellular carcinoma by activating N-acetylgalactosaminyltransferase 4[J]. Mol Biotechnol, 2023: 2456-2558.

[11] Liang DY, Gao Q, Meng ZX, et al. Glycosylation in breast cancer progression and mammary development: molecular connections and malignant transformations[J]. Life Sci, 2023, 326: 121781.

[12] DeRyckere D, Huelse JM, Earp HS, et al. TAM family kinases as therapeutic targets at the interface of cancer and immunity[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2023, 20(11): 755-779.

[13] Hsu PL, Chien CW, Tang YA, et al. Targeting BRD3 eradicates nuclear $TYRO_3^-$ induced colorectal cancer metastasis[J]. Sci Adv, 2023, 9(15): eade3422.

[14] Park M, Kuen DS, Park J, et al. TYRO3 blockade enhances anti-PD-1 therapy response by modulating expression of CCN1 in tumor microenvironment[J]. J Immunother Cancer, 2023, 11(1): e006084.

[15] Akin DF, Özkan D. Molecular profiling of TAM tyrosine kinase receptors and ligands in endometrial carcinoma: an in silico-study[J]. J Obstet Gynecol, 2023, 62(2): 311-324.

[16] Lin JZ, Lin N. Three oxidative stress-related genes that associate endometrial immune cells are considered as potential biomarkers for the prediction of unexplained recurrent implantation failure[J]. Front Immunol, 2022, 13: 902268.

[17] Daly RJ, Scott AM, Klein O, et al. Enhancing therapeutic anticancer responses by combining immune checkpoint and tyrosine kinase inhibition[J]. Mol Cancer, 2022, 21(1): 189.

[18] Ballard CJ, Paserba MR, Paul Daniel EJ, et al. Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase (GalNAc-T) isozyme surface charge governs charge substrate preferences to modulate mucin type O-glycosylation[J]. Glycobiology, 2023, 33(10): 817-836.

[19] Mikolajczyk A, Mitula F, Popiel D, et al. Two-front war on cancer-targeting TAM receptors in solid tumour therapy[J]. Cancers, 2022, 14(10): 2488.

（责任编辑：周一青）

本文引用格式：

朱一麟，高雪梅，孟红娟，等. GALNT4介导的TYRO3糖基化对子宫内膜癌的恶性生物学行为的影响[J]. 重庆医科大学学报，2025，50(2)：217-223.