

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.03.010

· 临床研究 ·

β -1,6 N-乙酰氨基葡萄糖转移酶2在胃癌组织中的表达及其临床意义

谭晓龙, 朱君, 杨涛, 吴峰阶(滨州医学院附属医院 胃肠外科, 山东 滨州 256603)

[摘要] **目的:**探讨 β -1,6 N-乙酰氨基葡萄糖转移酶2(GCNT2)基因在胃癌(GC)组织中的表达及其在GC发生、发展和诊断及预后中的作用。**方法:**利用TIMER、GEPIA2、Oncomine和UALCAN等数据库数据,以及2018年1月至2019年12月滨州医学院附属医院手术切除的25例GC患者的癌和配对癌旁组织标本,分析GCNT2基因在GC组织中的表达及其在GC诊断和预后中的价值,利用LinkedOmics、GSEA和ssGSEA分析GCNT2所涉及的主要信号通路及其与免疫浸润之间的相关性。将pc-GCNT2及其阴性对照质粒转染进胃癌SGC-7901和BGC-823细胞,用克隆形成实验和Transwell实验检测GCNT2对GC细胞增殖和侵袭的影响,WB法检测细胞中GCNT2、STAT3和PD-L1蛋白的表达水平。**结果:**GCNT2 mRNA在GC组织中的表达水平显著低于癌旁组织($P<0.05$ 或 $P<0.01$),其表达水平与患者预后显著相关($P<0.05$),其对GC诊断有较高的价值。GCNT2在GC组织中的甲基化状态显著高于癌旁组织,GCNT2基因参与的生物过程主要是参与细胞形态发生的成分、细胞间黏附、多细胞生物信号和突触传递等。单基因GSEA分析发现,GCNT2在GC中主要抑制IL-6/JAK/STAT3、IL-2/STAT5信号通路和炎症反应、 α/γ 干扰素响应与NF- κ B表达等。GCNT2的表达与GC组织的免疫浸润具有显著相关性。过表达GCNT2可显著抑制GC细胞的增殖和侵袭能力(均 $P<0.01$),降低细胞中STAT3和PD-L1的表达水平(均 $P<0.01$)。**结论:**GCNT2基因在GC组织中低表达,与GC的诊断及预后显著相关,其主要通过抑制IL-6/JAK/STAT3和免疫相关致癌信号通路而在GC的发生、发展中发挥重要的作用。

[关键词] β -1,6 N-乙酰氨基葡萄糖转移酶;胃癌;SGC-7901细胞;BGC-823细胞;诊断;预后

[中图分类号] R735.2;R730.2;R730.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2022)03-0230-09

Expression of β -1,6 glucosaminyl (N-acetyl) transferase 2 in gastric cancer and its clinical significance

TAN Xiaolong, ZHU Jun, YANG Tao, WU Fengjie (Department of Gastrointestinal Surgery, the Affiliated Hospital of Binzhou Medical University, Binzhou 256603, Shandong, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression level of glucosaminyl (N-acetyl) transferase 2 (GCNT2) in gastric cancer (GC) tissues and its role in the occurrence, development, diagnosis and prognosis of GC. **Methods:** By using TIMER, GEPIA2, Oncomine and UALCAN databases as well as clinical specimens of GC tissues and paired para-cancerous tissues from 25 GC patients who had surgical resection in the Affiliated Hospital of Binzhou Medical University from January 2018 to December 2019, the expression level of GCNT2 gene in GC tissues and its diagnostic and prognostic value in GC were analyzed. The main signal pathways that GCNT2 involved in and the correlation of GCNT2 with immune infiltration were analyzed by LinkedOmics, GSEA and ssGSEA. pc-GCNT2 and its negative control plasmids were transfected into gastric cancer SGC-7901 and BGC-823 cells. Colony formation assay and Transwell assay were used to detect the effect of GCNT2 on the proliferation and invasion of GC cells. WB method was used to detect the protein expression of GCNT2, STAT3 and PD-L1 in transfected cells. **Results:** The expression level of GCNT2 mRNA in GC tissues was significantly lower than that in para-cancerous tissues ($P<0.05$), and its expression level was significantly correlated with the prognosis of patients ($P<0.05$), which is of high value in the diagnosis of GC. The methylation status of GCNT2 in GC tissues was significantly higher than that in para-cancerous tissues. The biological processes that GCNT2 gene involved in were mainly cell morphogenesis, intercellular adhesion, multicellular biological signals and synaptic transmission, etc. Single gene GSEA analysis showed that GCNT2 mainly inhibited IL-6/JAK/STAT3 and IL-2/STAT5 signaling pathways, inflammatory response, α/γ interferon response and NF- κ B expression in GC. There was a significant correlation between the expression of GCNT2 and immune infiltration in GC tissues. Over-expression of GCNT2 significantly inhibited the proliferation and invasion of GC cells (all $P<0.01$), and down-regulated the expression of STAT3 and PD-L1 (all $P<0.01$). **Conclusion:** GCNT2 is significantly lowly expressed in gastric cancer tissues, and is significantly related to the diagnosis and prognosis of GC patients. GCNT2 plays an important role in the occurrence and

[基金项目] 山东省自然科学基金资助项目(No.ZR2017LH050)

[作者简介] 谭晓龙(1988—),男,硕士,主治医师,主要从事胃肠肿瘤治疗相关研究,E-mail: tianxiaolong62@163.com

[通信作者] 吴峰阶,E-mail: 273836270@qq.com

development of GC mainly through inhibiting IL-6/JAK/STAT3 signaling pathway and immune-related carcinogenic signaling pathway.

[Key words] glucosaminyl (N-acetyl) transferase 2 (GCNT2); gastric cancer (GC); SGC-7901 cell; BGC-823 cell; diagnosis; prognosis

[Chin J Cancer Biother, 2022, 29(3): 230-238. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.03.010]

胃癌(gastric cancer, GC)是常见的消化道恶性肿瘤之一,其发病率和病死率分别居全球恶性肿瘤的第六位和第二位^[1-2]。GC的发生和发展是由于多种因素导致的多阶段、多基因参与的复杂过程,包括炎症、饮食等多种外部因素和基因突变等内部因素的综合作用^[3-5]。近年来,GC的化疗、放疗和免疫治疗等技术手段得到了很大的发展,但由于GC患者早期症状不明显和缺少特异性生物标志物,以及其发生和发展的机制尚不明确等,使得GC的预后较差,5年生存率不足30%^[5-7]。因此,寻找影响GC发生和发展的生物标志物尤为重要。研究^[8-10]结果表明,糖基化是调控细胞间和细胞内信号转导、运输、免疫反应以及肿瘤发生和发展的关键因素。 β -1,6 N-乙酰氨基葡萄糖转移酶[glucosaminyl (N-acetyl) transferase 2, GCNT2]是GCNT家族中的一员,是诱导I型血型抗原合成的关键糖基转移酶。GCNT2在结直肠癌、黑色素瘤、前列腺癌、食管癌和乳腺癌等恶性肿瘤组织和细胞中异常表达,发挥着重要的作用^[11-14],GCNT2可以作为早期肿瘤的诊断标志物^[15],但其在GC中的研究报道鲜见。本研究基于基因表达综合(Gene Expression Omnibus, GEO)数据库、肿瘤基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)数据库和Kaplan-Meier Plotter数据库的GC数据进行综合分析,探讨GCNT2在GC组织中的表达及其预后意义,同时利用免疫浸润等生物信息学技术分析GCNT2在GC发生和发展中的作用;体外实验验证过表达GCNT2对GC细胞增殖和侵袭的影响,以期阐明GC发生和发展机制提供参考依据。

1 资料与方法

1.1 数据来源及分析方法

本研究的分析数据主要来源于TCGA、GEO、Oncomine (<http://www.oncomine.org>), GEPIA (<http://gepia2.cancer-pku.cn/>)和TIMER等数据库^[16-17]。通过GEPIA2、Oncomine等数据库数据^[18-25]分析,获得GCNT2在GC组织和癌旁组织中的表达差异。利用UALCAN (<http://ualcan.path.uab.edu>)数据库^[19],获得在不同组织学分级和淋巴结转移等临床病理特征下GC组织中GCNT2的表达差异。pROC软件包^[26]用于分析GCNT2 mRNA在ROC曲线下的面积,以探讨其在GC诊断中的价值。对GSE84437数据集中433例GC数据进行评估后获取GCNT2的表达水平与GC患者的总生存(OS)之间的相关性^[27]。

利用MEXPRESS(<https://mexpress.be/>)数据库^[28-29]与LinkedOmics(<http://www.linkedomics.org/login.php>)数据库分别分析GCNT2表达与其启动子甲基化的相关性和GCNT2的功能富集分析(gene set enrichment analysis, GSEA)^[30]。使用GSEA V3.0 (<http://software.broadinstitute.org/gsea/msigdb/index.jsp>)从分子签名数据库(MSigDB)获得基因集(h.all.v6.2.entrez.gmt)和ClusterProfiler包进行分析及结果的可视化^[31-32],以 $P < 0.05$ 和错误发现率(false discovery rate, FDR) < 0.05 表示具有统计学意义。单样本基因集富集分析(single-sample gene set enrichment analysis, ssGSEA)可以将免疫细胞群表达的基因特征应用于个体肿瘤标本^[33],在R软件中利用Gsva包^[34]通过ssGSEA方法^[35-36]对免疫细胞的浸润水平进行量化。研究中使用的反卷积方法用于分析24种免疫细胞中GCNT2的表达水平与各免疫细胞浸润程度之间的相关性,以及GCNT2的表达水平与411个免疫相关基因之间的相关性。

1.2 组织标本、细胞系及主要试剂

收集2018年1月至2019年12月滨州医学院附属医院手术治疗的25例GC患者的癌及配对癌旁组织标本,所有患者术前均未进行过放疗或化疗。其中,男性18例、女性7例;年龄 < 60 岁11例,65岁及以上14例;高分化程度19例,发生淋巴结转移者16例。人GC细胞系SGC-7901和BGC-823细胞由滨州医学院附属医院保留并传代培养。

GCNT2过表达质粒及引物序列由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,逆转录试剂盒、转染试剂Lipofectamine 2000、Trasnwel 小室均购自美国Promega公司,TRIzol试剂、电化学发光试剂购自北京索莱宝科技有限公司,胎牛血清(FBS)购自美国BI公司,RPMI 1640培养液购自美国Gibco公司,兔抗人GCNT2、STAT3和PD-L1及鼠抗人GAPDH单克隆抗体均购自Proteintech公司,辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔IgG二抗购自美国KPL公司。

1.3 细胞培养及转染

研究所用细胞系均在添加10% FBS的RPMI 1640培养基中,于37℃、5%CO₂加湿培养箱中培养。将对数生长期SGC-7901和BGC-823细胞接种于6孔板中,接种密度以过夜培养后细胞汇合度为60%~70%为标准。按照Lipofectamine 2000说明书的方法,分别将过表达GCNT2(pc-GCNT2)及其阴性对照(pc-NC)的质粒转染至SGC-7901和BGC-823细胞。

1.4 qPCR法检测GC组织和细胞中GCNT2的表达

按照 TRIzol 试剂说明书方法,分别提取 GC 组织和细胞中总 RNA。将总 RNA 逆转录成 cDNA,再以 cDNA 为模板进行 qPCR 检测。GCNT2 引物序列上游为 5'-TGTTCTGCTCTATGCCAAA-3',下游为 5'-TTAGCAAACAGGCTTGGTGAAT-3'; GAPDH 引物序列上游为 5'-GATCGAATTAAACCTTATCGT CGT-3',下游为 5'-AGCAGCAGAACTTCCACTC GGT-3'。qPCR 反应条件:95 °C 30 s 预变性;95 °C 12 s,62 °C 30 s,72 °C 延伸 40 s,共 40 个循环。以每个荧光信号达到阈值时经历的循环次数作为 Ct 值,以 GAPDH 作为 GCNT2 的内参, $\Delta Ct=Ct(GCNT2)-Ct(GAPDH)$,GCNT2 的相对表达量以 $2^{-\Delta Ct}$ 表示。

1.5 克隆形成实验检测 GC 细胞的克隆形成能力

将转染后细胞常规消化并重悬于培养液中,调整细胞密度后分别接种于 6 孔板(5×10^3 个/孔)中,常规培养 7 d。用 4% 多聚甲醛溶液固定 30 min,0.1% 结晶紫染色 30 min,光学显微镜下计数克隆形成数(大于 50 个细胞计为 1 个克隆),并计算克隆形成率(克隆数/接种细胞数 $\times 100\%$)。

1.6 Transwell 实验检测 GC 细胞的侵袭能力

转染后的 SGC-7901 和 BGC-823 细胞培养 24 h 后常规消化并重悬于培养液中,调整细胞密度为 1×10^5 个/mL。将细胞悬液以 100 μ L/孔接种预铺 matrigel 胶的 Transwell 小室的上室中,下室中加入 750 μ L/孔完全培养液,在培养箱中常规培养 24 h 后用 4% 多聚甲醛溶液固定,0.1% 结晶紫染色 30 min。用棉签擦去上室面残余细胞,在倒置相差显微镜下计数侵袭细胞数,以此反映细胞的侵袭能力。

1.7 WB 法检测 GCNT2 过表达对 GC 细胞中 STAT3 和 PD-L1 蛋白表达水平的影响

按照蛋白提取试剂盒操作流程抽提细胞总蛋白。取适量蛋白样品进行 10% SDS-PAGE,并将蛋白转 PVDF 膜后,在 2.5% 脱脂奶粉中室温封闭 1.5 h,加入 GCNT2(1:1 000)、STAT3(1:2 000)和 PD-L1

(1:1 000)及 GAPDH(1:20 000)单克隆抗体,4 °C 过夜。TBST 洗膜 3 次(5 min/次),加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG(1:10 000),室温下处理 1.5 h,洗膜后滴加电化学发光剂曝光、显影,用 ImageJ 软件分析蛋白条带的灰度值。

1.8 统计学处理

qPCR 法、克隆形成、Transwell 和 WB 等实验均独立重复 3 次。采用 SPSS 21.0 和 R 4.0 统计软件对实验数据进行统计学分析,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,GCNT2 在 GC 组织及相应癌旁组织中的表达差异采用两独立样本比较 *t* 检验,且为双侧检验,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GCNT2 mRNA 在 GC 组织中低表达

对 TIMER 和 GEPIA 数据库中的 GC 数据分析,结果显示 GCNT2 mRNA 在 GC 组织中表达水平显著低于癌旁组织($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$,图 1A、图 2A),且其表达水平与 GC 患者的淋巴结转移(图 2B)和组织学分级(图 2C)显著相关(均 $P < 0.01$)。进一步利用 Oncomine 数据库中的多数据集进行 GCNT2 mRNA 表达水平分析,结果均表明,GCNT2 mRNA 在 GC 组织中的表达水平显著低于癌旁组织(图 3A~E)。同时,在本院收集的 25 例 GC 组织标本中验证发现,GCNT2 mRNA 在 GC 组织中的表达水平显著低于癌旁组织($P < 0.01$,图 1B)。

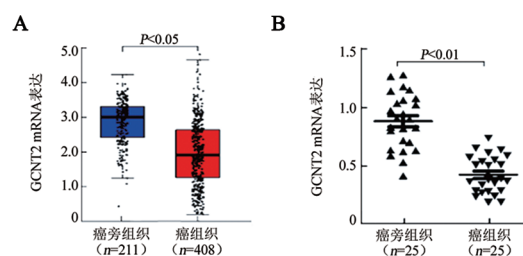
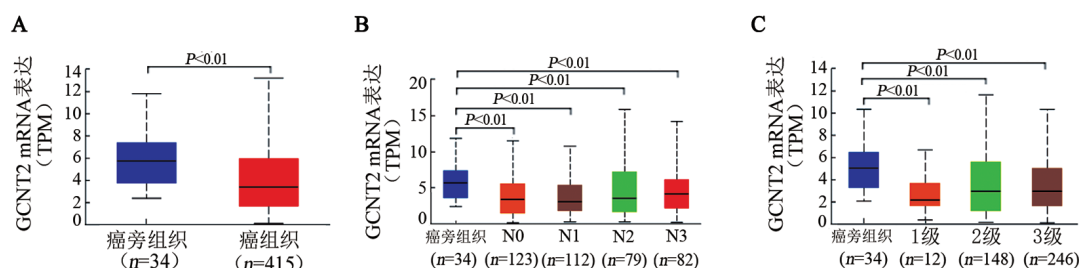
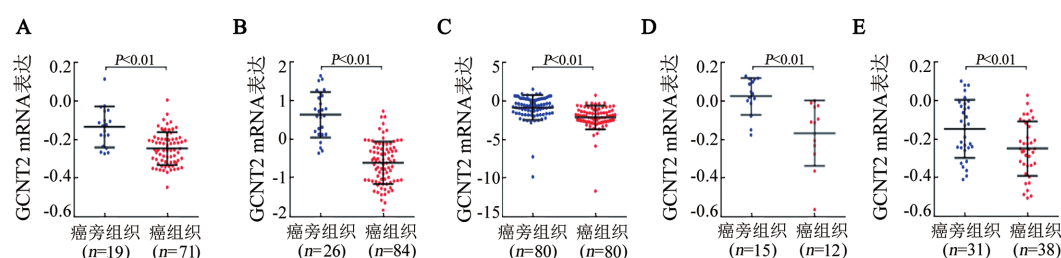


图1 数据库(A)和GC标本(B)中GCNT2 mRNA的表达水平



A: GCNT2 mRNA 在 GC 及癌旁组织中的表达; B: 不同淋巴结转移状态 GC 组织中 GCNT2 mRNA 表达(N0: 无淋巴结转移; N1: 1~3 个淋巴结转移; N2: 4~9 个淋巴结转移; N3: ≥ 10 个淋巴结转移); C: 不同组织分级 GC 组织中 GCNT2 mRNA 表达

图2 GCNT2 mRNA 在 GC 不同临床病理亚型组织中的表达水平(UALCAN 数据库)



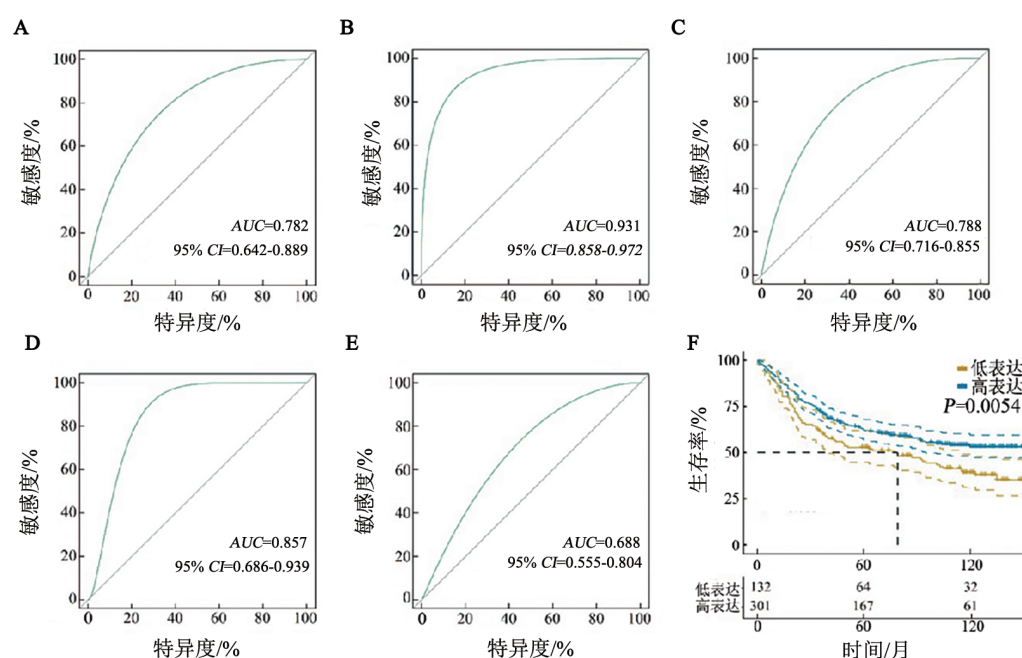
A~E: 数据分别引自CHO等^[21]、CHEN等^[24]、CUI等^[23]、WANG等^[25]和D'RRICO等^[22]的研究

图3 多个数据集中GCNT2 mRNA在GC组织和癌旁组织中的表达

2.2 GCNT2 mRNA表达水平与GC患者诊断和预后评价中的价值

利用pROC软件包分析5个数据集中GCNT2 mRNA区分GC患者和健康人的能力,结果(图4A~E)显示在5个数据集中其ROC曲线下面积(AUC)和95%可信区间(95% CI)分别为0.782 (0.642~0.889)、0.931 (0.858~0.972)、0.788 (0.716~

0.855)、0.857 (0.686~0.939)和0.688 (0.555~0.804),表明GCNT2 mRNA对GC患者有较好的诊断价值。进一步分析GCNT2 mRNA的表达水平与GC患者预后之间的相关性,利用GSE84437数据集中433例GC数据进行生存分析结果(图4F)表明,GCNT2 mRNA高表达与GC患者的OS呈显著正相关($P < 0.01$)。



A-E: 数据分别引自CHO等^[21]、CHEN等^[24]、CUI等^[23]、WANG等^[25]和D'RRICO等^[22]研究;F: 生存曲线

图4 GCNT2 mRNA在GC诊断与预后中的ROC曲线和生存曲线

2.3 GC中GCNT2甲基化水平升高

利用MEXPRESS数据库分析结果显示,在探针ID cg14112601位点上,GCNT2基因在肿瘤组织中的甲基化水平显著高于癌旁组织($P < 0.05$,图5),表明GCNT2 mRNA在GC组织中表达水平降低可能是由其高甲基化所致。

2.4 GCNT2涉及的生物学功能及参与的主要信号通路

利用LinkedOmics数据库进行GCNT2的功能富集分析。Spearman检验以分析GCNT2和GC组织中

差异表达的基因之间的相关性(图6A;红色代表正相关基因,绿色代表负相关基因)。热图显示了与GCNT2正相关和负相关的前50个基因(图6B、C)。功能富集分析表明,这些与GCNT2的基因参与的生物过程主要是参与细胞形态发生的成分、细胞间黏附、多细胞生物信号、突触传递以及tRNA代谢过程等(图6D)。所参与的分子功能及细胞成分主要是环状核苷酸结合、细胞因子受体活性、类异戊二烯结合、核糖体的结构成分、转运复合体以及线粒体内膜等(图6E、F)。其参与的KEGG信号通路主要是药物

代谢、化学致癌作用、cAMP信号通路、DNA复制、细胞周期以及氨酰基-tRNA的生物合成等信号通路(图6G)。

为深入分析GCNT2在GC发生和发展中所发挥的作用,利用GEO数据库中GSE62254数据集的300例GC患者的数据进行GSEA分析,结果显示,GCNT2在GC中主要通过抑制IL-6/JAK/STAT3信号通路、IL-2/STAT5信号通路、炎症反应信号通路、 α/γ 干扰素响应信号通路,以及NF- κ B信号通路而在GC的发生和发展中发挥重要的作用。

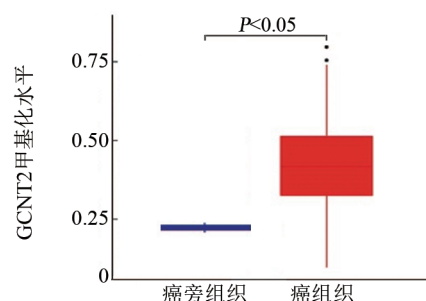
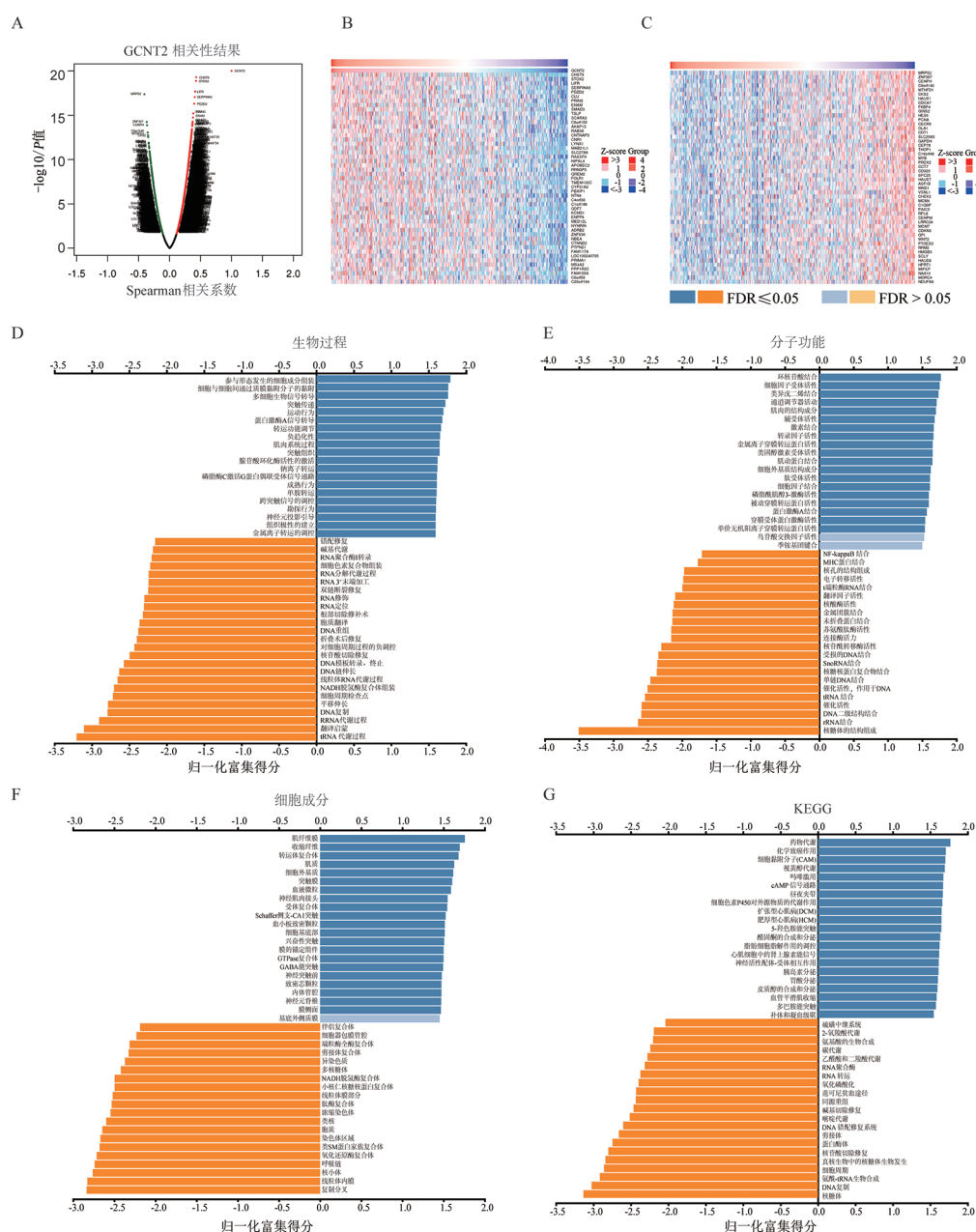


图5 GCNT2在GC组织中的甲基化水平



A:GC中GCNT2表达差异性火山图;B和C:关于GC中与GCNT2正相关和负相关基因的热图(红色为正相关、蓝色为负相关基因);D:生物过程;E:分子功能;F:细胞成分;G:KEGG通路分析

图6 GC中GCNT2差异表达涉及的基因功能及通路分析结果(LinkedOmics数据库)

2.5 GCNT2 mRNA表达与GC组织免疫浸润之间的相关性

GSEA分析结果发现,GCNT2 mRNA主要通过抑制免疫炎症相关信号通路而在GC的发生和发展中发挥着重要的作用。因此,利用ssGSEA免疫量化了GSE62254数据集中300例GC患者基因表达谱数据。相关性分析发现,GCNT2 mRNA的表达水平与B细胞和CD8⁺T细胞等多数免疫细胞的浸润程度呈显著正相关(均 $P<0.01$),而与Th2细胞和Treg细胞等免疫细胞的浸润程度呈显著负相关(均 $P<0.05$,图7A)。进一步分析GCNT2 mRNA的表达水平与免疫相关基因之间的相关性,结果显示GCNT2 mRNA的表达水平与112个免疫相关基因的表达呈显著正相关($P<0.05$),与25个免疫相关基因呈显著负相关($P<0.05$,图7B)。

2.6 过表达GCNT2可显著抑制GC细胞的增殖和侵袭能力

qPCR法检测结果显示,与pc-NC组相比,pc-GCNT2组SGC-7901和BGC-823细胞中GCNT2的mRNA表达水平显著升高(SGC-7901: 5.021 ± 0.442 vs 0.974 ± 0.021 , $P<0.05$; BGC-823: 4.141 ± 0.661 vs 1.441 ± 0.136 , $P<0.01$),证明细胞转染成功。

克隆形成实验结果(图8A)显示,过表达GCNT2的SGC-7901和BGC-823细胞的克隆形成数目均明显减少(均 $P<0.01$)。Transwell实验结果(图8B)显示,过表达GCNT2后,SGC-7901和BGC-823细胞的侵袭能力均显著减弱(均 $P<0.01$)。WB实验结果(图8C)显示,过表达GCNT2的细胞中STAT3和PD-L1的表达水平均显著降低(均 $P<0.01$)。实验结果表明,过表达GCNT2主要通过IL-6/JAK/STAT3信号通路抑制GC细胞的增殖和侵袭能力。

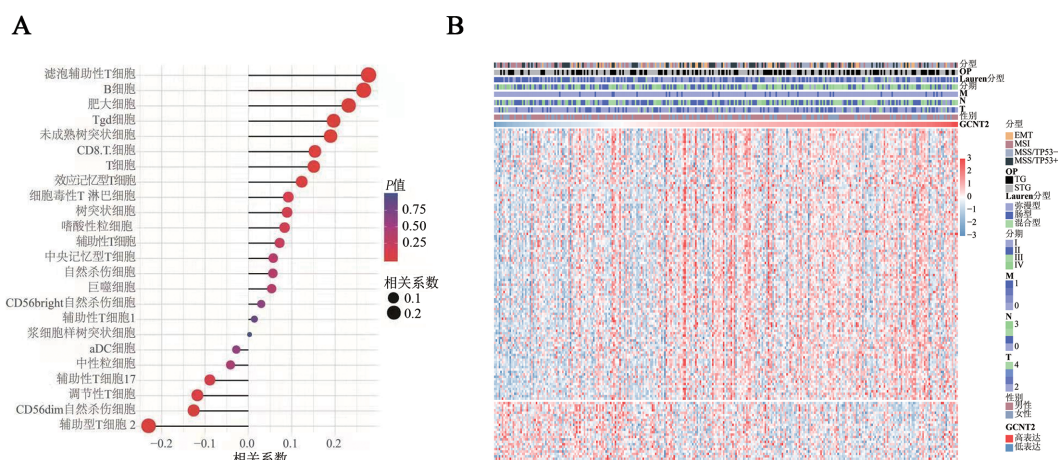
3 讨论

NAKAMURA等^[11]研究发现,GCNT2在结直肠癌组织中显著低表达,且与结直肠癌患者的淋巴结转移显著相关,机制研究发现GCNT2的低表达可能是由于其启动子的高甲基化所致。CHAO等^[37]研究表明,表皮生长因子诱导的上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)可以诱导GCNT2的表达水平上调,同时显著抑制结肠癌细胞miR-199a/b-5p的表达水平,进而增强结肠癌细胞的恶性相关特征。也有研究结果^[12]发现,GCNT2在黑色素瘤细胞中的表达水平显著低于正常黑色素细胞,且其表达水平与临床进展呈负相关,GCNT2的缺失促进黑色素瘤异种移植瘤的生长,促进克隆形成并提高细胞的增殖率,相反,GCNT2过表达显著降低黑色素瘤异种移

植瘤的生长,抑制克隆形成并促进细胞凋亡。

PENG等^[14]研究发现,GCNT2在食管癌组织中高表达,过表达GCNT2显著促进食管癌细胞的迁移和侵袭,GCNT2高表达患者的OS率明显低于GCNT2低表达患者,GCNT2可能通过EMT进程影响食管癌的发生和发展。ZHANG等^[38]研究发现,GCNT2在人和小鼠来源的高度转移性乳腺癌细胞系以及基底样乳腺肿瘤组织中显著高表达,GCNT2的表达水平也与乳腺癌患者中的转移表型显著相关。功能研究结果表明,GCNT2的异常表达可通过EMT进程促进体外细胞迁移和侵袭及体内乳腺癌细胞的肺转移。MIKAMI等^[39]研究表明,高表达GCNT2组前列腺癌患者的OS率显著低于低表达GCNT2组前列腺癌患者,且沉默GCNT2的表达则显著抑制前列腺癌细胞的迁移和侵袭。同样,NONAKA等^[13]研究发现,在缺氧条件下,前列腺癌细胞中GCNT2的表达水平显著上调,影响前列腺癌的发生和发展。PEREZ等^[40]发现,GCNT2可能是黑色素瘤潜在的诊断和治疗标志物。

本研究利用多数据集综合分析以及临床样本验证发现,GCNT2在GC组织中的表达水平显著低于癌旁组织,且其表达水平与GC患者的诊断和预后显著相关。甲基化分析发现,GC组织中的甲基化状态显著高于正常组织,说明GCNT2在GC组织中的低表达可能是由于其启动子区域的高甲基化所致。功能富集分析发现,GCNT2基因参与的生物过程主要是参与细胞形态发生、细胞间黏附、多个细胞生物信号、突触传递以及tRNA代谢过程等,所参与的分子功能及细胞成分主要是环状核苷酸结构、细胞因子受体活性、核糖体的结构成分以及转运复合体以及线粒体内膜;单基因GSEA分析发现,GCNT2在GC中主要通过抑制IL6/JAK/STAT3、IL-2/STAT5、炎症反应、 α/γ 干扰素响应以及NF- κ B等信号通路。免疫分析发现,GCNT2的表达水平与B细胞和CD8⁺T细胞等多数免疫细胞的浸润程度显著正相关,而与Th2细胞和Treg细胞等免疫细胞的浸润程度显著负相关,且其表达水平与多数免疫相关基因的表达呈显著正相关,而与少量免疫相关基因呈负相关,且过表达GCNT2后STAT3和PD-L1的表达水平显著下降。本研究结果说明,GCNT2的在GC组织中的低表达可能是由于启动子区域的高甲基化所致,而高表达GCNT2主要通过抑制IL6/JAK/STAT3信号通路和免疫相关致癌信号通路以及促进B细胞和CD8⁺T细胞等免疫细胞的活性而在GC的发生和发展中发挥着重要的作用,提示GCNT2可能是GC细胞进行免疫治疗的新靶点。



A:GCNT2的表达水平与24中免疫细胞之间的相关性;B:GCNT2的表达水平与免疫相关基因之间的相关性
图7 GCNT2表达水平与GC组织中免疫浸润之间的相关性

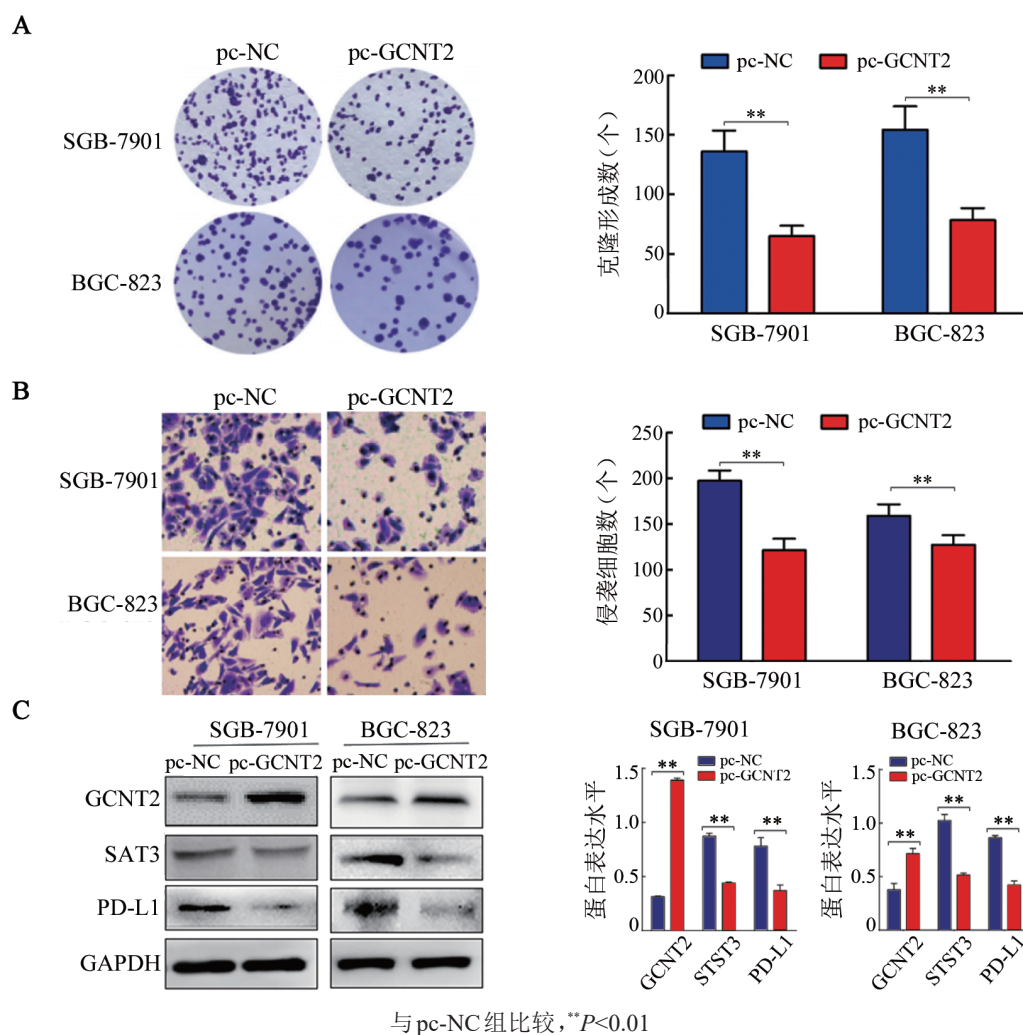


图8 过表达GCNT2对GC细胞增殖(A)和侵袭(B, ×400)能力及相关蛋白(C)表达的影响

综上所述,GCNT2在GC中可以作为GC诊断和预后的标志物。GCNT2在GC中主要发挥抑癌作用,可能是由于激活免疫细胞而发挥抑癌作用。基于本研究主要基因数据库挖掘以及生物信息学分析结果,课题组将进行体内体外实验,分析验证GCNT2在

GC免疫微环境中的作用,以期GC的诊疗提供新的思路。

[参考文献]

[1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, *et al.* Global cancer

- statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424. DOI:10.3322/caac.21492.
- [2] CAVATORTA O, SCIDA S, MIRAGLIA C, *et al*. Epidemiology of gastric cancer and risk factors[J]. *Acta Biomed*, 2018, 89(8-S): 82-87. DOI:10.23750/abm.v89i8-s.7966.
- [3] CAO L, CHEN Y, ZHANG M, *et al*. Identification of hub genes and potential molecular mechanisms in gastric cancer by integrated bioinformatics analysis[J/OL]. *PeerJ*, 2018, 6: e5180[2021-05-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6033081/>. DOI: 10.7717/peerj.5180.
- [4] KIM J H, KIM S S, LEE J H, *et al*. Early detection is important to reduce the economic burden of gastric cancer[J/OL]. *J Gastric Cancer*, 2018, 18(1): 82-89[2021-05-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5881013/>. DOI:10.5230/jgc.2018.18.e7.
- [5] ALEXANDROV L B, NIK-ZAINAL S, SIU H C, *et al*. A mutational signature in gastric cancer suggests therapeutic strategies[J/OL]. *Nat Commun*, 2015, 6: 8683[2021-05-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4918743/>. DOI:10.1038/ncomms9683.
- [6] MILLER K D, NOGUEIRA L, MARIOTTO A B, *et al*. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019[J]. *CA Cancer J Clin*, 2019, 69(5): 363-385. DOI:10.3322/caac.21565.
- [7] ROUKOS D H, KAPPAS A M. Perspectives in the treatment of gastric cancer[J]. *Nat Clin Pract Oncol*, 2005, 2(2): 98-107. DOI: 10.1038/ncponc0099.
- [8] STOWELL S R, JU T Z, CUMMINGS R D. Protein glycosylation in cancer[J]. *Annu Rev Pathol*, 2015, 10: 473-510. DOI: 10.1146/annurev-pathol-012414-040438.
- [9] OHTSUBO K, MARTH J D. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease[J]. *Cell*, 2006, 126(5): 855-867. DOI:10.1016/j.cell.2006.08.019.
- [10] CERLIANI J P, BLIDNER A G, TOSCANO M A, *et al*. Translating the 'sugar code' into immune and vascular signaling programs[J]. *Trends Biochem Sci*, 2017, 42(4): 255-273. DOI:10.1016/j.tibs.2016.11.003.
- [11] NAKAMURA K, YAMASHITA K, SAWAKI H, *et al*. Aberrant methylation of GCNT2 is tightly related to lymph node metastasis of primary CRC[J]. *Anticancer Res*, 2015, 35(3): 1411-1421.
- [12] SWEENEY J G, LIANG J, ANTONOPOULOS A, *et al*. Loss of GCNT2/I-branched glycans enhances melanoma growth and survival[J/OL]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 3368[2021-05-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6105653/>. DOI:10.1038/s41467-018-05795-0.
- [13] NONAKA M, FUKUDA M N, GAO C, *et al*. Determination of carbohydrate structure recognized by prostate-specific F77 monoclonal antibody through expression analysis of glycosyltransferase genes[J/OL]. *J Biol Chem*, 2014, 289(23): 16478-16486[2021-05-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4047414/>. DOI:10.1074/jbc.M114.559047.
- [14] PENG F, HE Q, CHENG C, *et al*. GCNT2 induces epithelial-mesenchymal transition and promotes migration and invasion in esophageal squamous cell carcinoma cells[J]. *Cell Biochem Funct*, 2019, 37(1): 42-51. DOI:10.1002/cbf.3371.
- [15] ANDERGASSEN U, LIESCHE F, KÖLBL A C, *et al*. Glycosyltransferases as markers for early tumorigenesis[J/OL]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 792672[2021-05-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4486746/>. DOI:10.1155/2015/792672.
- [16] LI T W, FAN J Y, WANG B B, *et al*. TIMER: a web server for comprehensive analysis of tumor-infiltrating immune cells[J/OL]. *Cancer Res*, 2017, 77(21): e108-e110[2021-05-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6042652/>. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-17-0307.
- [17] LI T W, FU J X, ZENG Z X, *et al*. TIMER2.0 for analysis of tumor-infiltrating immune cells[J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(W1): W509-W514. DOI:10.1093/nar/gkaa407.
- [18] TANG Z F, LI C W, KANG B X, *et al*. GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses[J/OL]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(W1): W98-W102[2021-05-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5570223/>. DOI:10.1093/nar/gkx247.
- [19] CHANDRASHEKAR D S, BASHEL B, BALASUBRAMANYA S A H, *et al*. UALCAN: a portal for facilitating tumor subgroup gene expression and survival analyses[J/OL]. *Neoplasia*, 2017, 19(8): 649-658[2021-05-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5516091/>. DOI:10.1016/j.neo.2017.05.002.
- [20] RHODES D R, KALYANA-SUNDARAM S, MAHAVISNO V, *et al*. OncoPrint 3.0: genes, pathways, and networks in a collection of 18, 000 cancer gene expression profiles[J/OL]. *Neoplasia*, 2007, 9(2): 166-180[2021-05-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1813932/>. DOI:10.1593/neo.07112.
- [21] CHO J Y, LIM J Y, CHEONG J H, *et al*. Gene expression signature-based prognostic risk score in gastric cancer[J/OL]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(7): 1850-1857[2021-05-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3078023/>. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-10-2180.
- [22] D'ERRICO M, DE RINALDIS E, BLASI M F, *et al*. Genome-wide expression profile of sporadic gastric cancers with microsatellite instability[J]. *Eur J Cancer*, 2009, 45(3): 461-469. DOI:10.1016/j.ejca.2008.10.032.
- [23] CUI J, CHEN Y B, CHOU W C, *et al*. An integrated transcriptomic and computational analysis for biomarker identification in gastric cancer[J/OL]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(4): 1197-1207[2021-05-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3045610/>. DOI:10.1093/nar/gkq960.
- [24] CHEN X, LEUNG S Y, YUEN S T, *et al*. Variation in gene expression patterns in human gastric cancers[J/OL]. *Mol Biol Cell*, 2003, 14(8): 3208-3215[2021-05-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC181561/>. DOI:10.1091/mbc.e02-12-0833.
- [25] WANG Q, WEN Y G, LI D P, *et al*. Upregulated INHBA expression is associated with poor survival in gastric cancer[J]. *Med Oncol*, 2012, 29(1): 77-83. DOI:10.1007/s12032-010-9766-y.
- [26] ROBIN X, TURCK N, HAINARD A, *et al*. pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves[J/OL]. *BMC Bioinformatics*, 2011, 12: 77[2021-05-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3068975/>. DOI: 10.1186/1471-2105-12-77.
- [27] SZÁSZ A M, LÁNCZKY A, NAGY Á, *et al*. Cross-validation of survival associated biomarkers in gastric cancer using transcriptomic data of 1, 065 patients[J/OL]. *Oncotarget*, 2016, 7(31): 49322-49333[2021-05-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5226511/>. DOI:10.18632/oncotarget.10337.

- [28] KOCH A, DE MEYER T, JESCHKE J, *et al.* MEXPRESS: visualizing expression, DNA methylation and clinical TCGA data [J/OL]. BMC Genomics, 2015, 16: 636[2021-05-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4549898/>. DOI:10.1186/s12864-015-1847-z.
- [29] KOCH A, JESCHKE J, VAN CRIEKGINGE W, *et al.* MEXPRESS update 2019[J/OL]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(W1): W561-W565 [2021-05-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6602516/>. DOI:10.1093/nar/gkz445.
- [30] VASAIKAR S V, STRAUB P, WANG J, *et al.* LinkedOmics: analyzing multi-omics data within and across 32 cancer types [J/OL]. Nucleic Acids Res, 2018, 46(D1): D956-D963[2021-05-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5753188/>. DOI:10.1093/nar/gkx1090.
- [31] SUBRAMANIAN A, TAMAYO P, MOOTHA V K, *et al.* Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles[J/OL]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(43): 15545-15550[2021-05-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1239896/>. DOI:10.1073/pnas.0506580102.
- [32] YU G C, WANG L G, HAN Y Y, *et al.* clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters[J/OL]. OMICS, 2012, 16(5): 284-287[2021-05-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3339379/>. DOI:10.1089/omi.2011.0118.
- [33] BARBIE D A, TAMAYO P, BOEHM J S, *et al.* Systematic RNA interference reveals that oncogenic KRAS-driven cancers require TBK1[J/OL]. Nature, 2009, 462(7269): 108-112[2021-05-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2783335/>. DOI:10.1038/nature08460.
- [34] HÄNZELMANN S, CASTELO R, GUINNEY J. GSVA: gene set variation analysis for microarray and RNA-seq data[J/OL]. BMC Bioinformatics, 2013, 14: 7[2021-05-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3618321/>. DOI:10.1186/1471-2105-14-7
- [35] BINDEA G, MLECNIK B, TOSOLINI M, *et al.* Spatiotemporal dynamics of intratumoral immune cells reveal the immune landscape in human cancer[J]. Immunity, 2013, 39(4): 782-795. DOI:10.1016/j.immuni.2013.10.003.
- [36] LI G Z, WANG Z, ZHANG C B, *et al.* Molecular and clinical characterization of TIM-3 in glioma through 1, 024 samples[J/OL]. Oncoimmunology, 2017, 6(8): e1328339[2021-05-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5593703/>. DOI:10.1080/2162402X.2017.1328339.
- [37] CHAO C C, WU P H, HUANG H C, *et al.* Downregulation of miR-199a/b-5p is associated with GCNT2 induction upon epithelial-mesenchymal transition in colon cancer[J]. FEBS Lett, 2017, 591(13): 1902-1917. DOI:10.1002/1873-3468.12685.
- [38] ZHANG H J, MENG F Y, WU S, *et al.* Engagement of I-branching β -1, 6-N-acetylglucosaminyltransferase 2 in breast cancer metastasis and TGF- β signaling[J/OL]. Cancer Res, 2011, 71(14): 4846-4856 [2021-05-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3903410/>. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-11-0414.
- [39] MIKAMI J, TOBISAWA Y, YONEYAMA T, *et al.* I-branching N-acetylglucosaminyltransferase regulates prostate cancer invasiveness by enhancing α 5 β 1 integrin signaling[J/OL]. Cancer Sci, 2016, 107(3): 359-368[2021-05-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4814258/>. DOI:10.1111/cas.12859.
- [40] PEREZ M, CHAKRABORTY A, LAU L S, *et al.* Melanoma-associated glycosyltransferase GCNT2 as an emerging biomarker and therapeutic target[J]. Br J Dermatol, 2021, 185(2): 294-301. DOI:10.1111/bjd.19891.

[收稿日期] 2021-05-19

[修回日期] 2022-01-12

[本文编辑] 党瑞山