

# B4GALNT4 促进肺腺癌细胞增殖、迁移和侵袭能力

韩觉明,王晖,吴倩,郑慧玲,朱琳

(山东大学第二医院呼吸与危重症医学科,山东 济南 250031)

**摘要:**目的 评估 4-N-乙酰半乳糖氨基转移酶 4 ( $\beta$ -1, 4-N-acetyl-galactosaminyltransferases IV, B4GALNT4) 在肺腺癌中的作用。方法 通过肿瘤基因图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)数据库分析 B4GALNT4 在肺腺癌中的表达,探讨 B4GALNT4 与肺腺癌患者预后的关系。应用免疫组化和 Western blotting 研究 B4GALNT4 在肺腺癌组织中的表达,通过小干扰 RNA 瞬时转染在 A549 和 H1299 细胞中敲减 B4GALNT4 并进行功能实验,应用 CCK-8、EdU 实验检测肺腺癌细胞的增殖潜力。通过细胞划痕实验、Transwell 迁移和侵袭实验,检测肺腺癌细胞的迁移和侵袭能力。应用 Western blotting 探讨 B4GALNT4 发挥功能的潜在分子机制。结果 TCGA 数据库分析结果显示,与癌旁正常组织相比,B4GALNT4 基因在肺腺癌组织中的表达升高( $P<0.05$ ),且 B4GALNT4 高表达与患者的不良预后相关( $P<0.01$ );免疫组化及 Western blotting 结果显示,肺腺癌组织中 B4GALNT4 蛋白水平较其癌旁正常组织升高;在 A549 和 H1299 细胞系中敲减 B4GALNT4 会抑制肺腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力( $P<0.05$ ),其机制可能与 PI3K/AKT/mTOR 通路密切相关。结论 B4GALNT4 在肺腺癌的发展中可能起到促癌基因的作用,该作用可能通过影响 PI3K/AKT/mTOR 信号通路中关键蛋白的表达水平从而发挥作用。

**关键词:**4-N-乙酰半乳糖氨基转移酶;肺腺癌;增殖;迁移;侵袭;PI3K/AKT/mTOR 信号通路

中图分类号:R734

文献标志码:A

## B4GALNT4 promotes proliferation, migration and invasion of lung adenocarcinoma cells

HAN Jueming, WANG Hui, WU Qian, ZHENG Huiling, ZHU Lin

(Department of Pulmonary and Critical Care Medicine, The Second Hospital of Shandong University, Jinan 250031, Shandong, China)

**Abstract: Objective** To evaluate the role of  $\beta$ -1, 4-N-acetyl-galactosaminyltransferases IV (B4GALNT4) in lung adenocarcinoma. **Methods** The Cancer Genome Atlas (TCGA) database was used to analysis the expression of B4GALNT4 in lung adenocarcinoma, and the relationship between prognosis and the expression level of this gene was explored. Immunohistochemistry and Western blotting were used to detect the expression of B4GALNT4 in lung adenocarcinoma tissues. The functional experiments involved the knockdown of B4GALNT4 in A549 and H1299 cells using transient transfection with small interfering RNA. Subsequently, the proliferative capacity of these lung adenocarcinoma cells was assessed through CCK-8 and EdU assays. Then, cell scratch assay, transwell migration, and invasion assay were utilized to detect the migration and invasion ability of lung adenocarcinoma cells. Western blotting was conducted to uncover the underlying molecular mechanisms in these processes. **Results** The TCGA database showed that compared with adjacent tissues, the B4GALNT4 gene had significantly higher levels in lung adenocarcinoma tissues ( $P<0.05$ ), which was correlated with the poor prognosis of patients ( $P<0.01$ ). Immunohistochemistry and Western blotting showed that B4GALNT4 protein levels were elevated in lung adenocarcinoma tissues compared to adjacent normal tissues. Furthermore, knockdown of B4GALNT4 in A549 and H1299 cell lines significantly inhibited the proliferation, migration, and invasion abilities of lung adenocarcinoma cells ( $P<0.05$ ), and the mechanism might be closely related to the PI3K/AKT/mTOR pathway. **Conclusion** B4GALNT4 might play a role as a pro-oncogene in the development of lung adenocarcinoma, and this role might be mediated by affecting the expression levels of key proteins in the

PI3K/AKT/mTOR signaling pathway.

**Key words:**  $\beta$ -1, 4-N-acetylgalactosaminyltransferases; Lung adenocarcinoma; Proliferation; Migration; Invasion; PI3K/AKT/mTOR signaling pathway

在中国,肺癌是发病率居首位的肿瘤<sup>[1]</sup>。肺腺癌约占所有肺癌的40%,是最常见的类型<sup>[2]</sup>,5年生存率仅为15%<sup>[3]</sup>。目前肺腺癌的发病机制仍不明确,想要提高肺腺癌患者生存率,进一步明确肺腺癌的潜在发病机制尤为重要。

糖基化修饰是一种常见的蛋白质翻译后修饰,既往研究显示,异常的糖基化修饰可以参与肿瘤的增殖、迁移、侵袭、黏附、血液转移和血管生成<sup>[4]</sup>。糖基化修饰类型主要包括N-糖基化和O-糖基化。4-N-乙酰半乳糖氨基转移酶( $\beta$ -1, 4-N-acetyl galactosaminyltransferases, B4GALNTs)包括B4GALNT3和B4GALNT4,并在多种肿瘤中呈高表达,对肿瘤的增殖、侵袭等有调节作用。Baba等<sup>[5]</sup>发现,B4GALNT4能促进食管鳞状细胞癌的增殖、侵袭、黏附和迁移。Fan等<sup>[6]</sup>发现,B4GALNT4通过调控铜增生机制影响前列腺癌细胞的增殖。而在神经母细胞瘤中,B4GALNT3的表达预示着良好的预后,并通过 $\beta$ 1整合素信号抑制细胞的迁移和侵袭<sup>[7]</sup>。但B4GALNT4对肺腺癌增殖、迁移、侵袭的影响还尚未明确。

PI3K/AKT/mTOR信号通路是真核细胞中高度保守的信号转导网络,可促进细胞存活、细胞生长和细胞周期进展。PI3K/AKT/mTOR信号通路是人类癌症中最常激活的信号通路,该通路成分的功能障碍是导致癌症发生和进展的驱动因素<sup>[8]</sup>。多项关于肺腺癌的研究均发现,PI3K/AKT/mTOR信号通路参与肺腺癌的发生及进展<sup>[9-11]</sup>。但目前为止,B4GALNT4在肺腺癌中对PI3K/AKT/mTOR通路的影响尚不清楚。

因此,本研究拟探讨B4GALNT4在肺腺癌中的表达,并进行关于肺腺癌增殖、迁移和侵袭的体外功能实验,旨在考察B4GALNT4影响肺腺癌进展的潜在机制。

## 1 资料与方法

### 1.1 资料

#### 1.1.1 肺腺癌配对组织

所有肺腺癌和癌旁正常组织均来自山东大学第二医院胸外科手术切除的肺腺癌患者。每例患者均经独立病理复查确诊为肺腺癌。共6例患者,其中

男3例,女3例,57~78岁。所有研究均在山东大学第二医院伦理委员会的监督和批准下进行[KY-LL-2023(LW)077],并遵守《赫尔辛基宣言》。研究已获得受试者的知情同意。

#### 1.1.2 实验细胞

人支气管上皮细胞(human bronchial epithelial cells, HBE)以及肺腺癌细胞系(A549、H1299及H1975)均购自武汉Procell生命科技有限公司。所有细胞均置于37℃、5%CO<sub>2</sub>细胞恒温培养孵箱中培养。

#### 1.1.3 主要试剂

RPMI 1640培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自美国Gibco公司,环保型脱蜡透明剂购自武汉赛维尔生物科技有限公司,EDTA抗原修复液购自上海碧云天生物技术有限公司,5%山羊血清购自武汉博士德生物工程有限公司,用于免疫组化的B4GALNT4抗体购自英国Biorbyt公司,通用两步法试剂盒、DAB显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司,中性树脂购自武汉博士德生物工程有限公司,小干扰RNA购自上海吉玛制药有限公司, jetPRIME转染试剂购自法国Polyplus公司,蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂和RIPA缓冲液购自北京索莱宝科技有限公司,10% SDS-PAGE购自上海碧云天生物技术有限公司, PVDF膜和ECL试剂购自美国Millipore公司,用于Western blotting的抗体 $\beta$ -actin、p-AKT、AKT、PI3K、p-mTOR、mTOR及鼠/兔二抗均购自美国CST公司,用于Western blotting的B4GALNT4抗体购自美国Immunoway公司, CCK8试剂购自美国MedChemExpress公司, EdU试剂盒购自广州锐博生物技术有限公司, Matrigel胶购自美国Corning公司。

#### 1.1.4 主要仪器设备

细胞恒温培养孵箱购自美国BD公司,光学显微镜购自日本Olympus公司,电泳仪购自美国Bio-rad公司,显影仪购自上海天能科技有限公司,酶标仪购自瑞士TECAN公司,荧光显微镜购于日本尼康公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 免疫组化

4  $\mu$ m的组织切片在透明剂中脱蜡,并在乙醇中复水,然后进行抗原提取。将玻片置于1×EDTA缓

冲液中,微波照射(500W)15 min,进行抗原回收。用3%过氧化氢处理样品10 min,淬灭内源性过氧化物酶。完成上述步骤后,在载玻片上加入5%山羊血清进行阻断,30 min后,在4℃下用一抗染色过夜(B4GALNT4,1:100)。经过1h的复温阶段后,涂抹二抗,然后在室温下进行1h的DAB处理。用苏木素进行染色,然后将玻片在流动水中冲洗5 min,再用1%盐酸-乙醇分化2 s,直到细胞核恢复蓝色。

表1 siRNAs 序列  
Table 1 siRNAs sequences

名称	正义链/反义链	siRNA 序列
siNC	正义链	5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'
	反义链	5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'
siB4GALNT4-1 siRNA	正义链	5'-GACUGCGAAUUCUAUCATT-3'
	反义链	5'-UGAUAGAAAUCCGCAGUCTT-3'
siB4GALNT4-2 siRNA	正义链	5'-CCUGGAGAAUCCACCAAGUTT-3'
	反义链	5'-ACUUGGUGAAUUCUCCAGGTT-3'

### 1.2.3 Western blotting

分别应用添加了蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的RIPA缓冲液提取总蛋白用来检测目标蛋白的表达。在恒定电压下,将裂解液在10% SDS-PAGE凝胶上分离。凝胶电泳后,立即在恒定电流下将蛋白质转印到PVDF膜(0.45 μm)上。用溶于TBST的5%脱脂牛奶在室温下封闭印记1 h,然后用一抗溶液在4℃下孵育过夜。第2天应用二抗溶液孵育1 h,然后用TBST进行大量清洗。所有印记在清洗后均用ECL试剂检测,并使用天能系统进行显像。

### 1.2.4 CCK-8 实验

将100 μL含有1500个细胞的细胞悬液接种到96孔板中,然后在细胞培养箱中培养。细胞接种24 h后,使用CCK-8试剂孵育1 h,按照说明书测定细胞活力。这一天作为第0天。检测接种后第0、1、2、3、4天的细胞增殖率。在每个时间点,每孔更换100 μL不含FBS的CCK-8培养基,孵育1 h后用酶标仪在450 nm测量OD值。

### 1.2.5 EdU 细胞增殖实验

将100 μL含有500个细胞的细胞悬液接种于96孔板中,在含有10 μmol/L EdU的培养基中预培养2 h。然后去除含EdU的培养基,用4%多聚甲醛在室温条件下固定细胞30 min,并用PBS冲洗细胞两次。经过20 min的0.5% Triton-100透化处理后,按照说明书使用Apollo和Hoechst染料。在尼康显微镜下记录每个视野中的Hoechst染色细胞(蓝色荧光,总细胞数)和EdU阳性细胞(红色荧光)的数量。EdU阳性细胞的百分比按以下公式计算:EdU阳性率=(EdU阳性细胞数/总细胞数)×100%。

最后将组织经乙醇脱水后用中性树脂封片。光学显微镜拍摄图像。

### 1.2.2 小干扰 RNA 转染

siRNA来自GenePharma公司(中国,上海),用于基因沉默。siRNA序列见表1。用jetPRIME转染试剂将siRNA瞬时转染到A549和H1299细胞中。转染48 h后,通过Western blotting验证转染效率。48 h后,收集转染细胞进行功能实验。

### 1.2.6 细胞划痕试验

用于细胞划痕试验的细胞在6孔板中培养,并生长至100%融合。200 μL移液管吸头制造均匀划痕。PBS冲洗两次去除碎屑后,在6孔板中加入不含FBS的培养基。在细胞培养箱中培养0、24 h后,用显微镜(100倍放大率)对损伤区域进行拍照。数据用以下公式量化:细胞迁移百分比=(初始划痕面积-时间t时的划痕面积)/初始划痕面积×100%。

### 1.2.7 Transwell 迁移和侵袭实验

使用8.0 μm的Transwell小室进行Transwell试验。将悬浮在200 μL无FBS培养基中的 $5 \times 10^4$ 个细胞均匀地播种到未涂Matrigel胶或涂有Matrigel胶的上层孔中进行迁移和侵袭试验,并在下层孔中加入700 μL培养基(添加20%FBS)。24 h后用棉签轻轻拭去上层未迁移和未侵袭的细胞,用4%多聚甲醛固定下层的迁移和侵袭细胞,最后用0.1%龙胆紫染色。用显微镜随机拍摄3个染色细胞区域并分析。

### 1.2.8 TCGA 数据库

利用肿瘤基因图谱数据库(The Cancer Genome Atlas, TCGA, <http://cancergenome.nih.gov>)展开研究和分析,查找在癌组织中B4GALNT4基因的表达水平,整理和分析数据。

## 1.3 统计学处理

使用GraphPad Prism 6(美国,GraphPad软件公司)进行数据统计分析和绘图。以Shapiro-Wilk法检验计量资料符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。生存率比较所用的假设检验方法为log-rank检验,不同组之间的比较采用独立样本t检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ (双侧)。

## 2 结果

### 2.1 B4GALNT4 在肺腺癌中高表达并与不良预后相关

TCGA 数据库分析表明,肺腺癌中 B4GALNT4 的 mRNA 相对表达水平高于其对应的癌旁正常组

织中的表达水平 ( $P < 0.05$ )。Kaplan-Meier 生存分析结果表明,高表达 B4GALNT4 的肺腺癌患者的生存率低于低表达 B4GALNT4 的肺腺癌患者 ( $P < 0.01$ )。免疫组化结果表明,B4GALNT4 在肺腺癌中的表达高于其癌旁正常组织。Western blotting 检测发现,B4GALNT4 蛋白在肺腺癌中的表达高于其癌旁正常组织。见图 1。

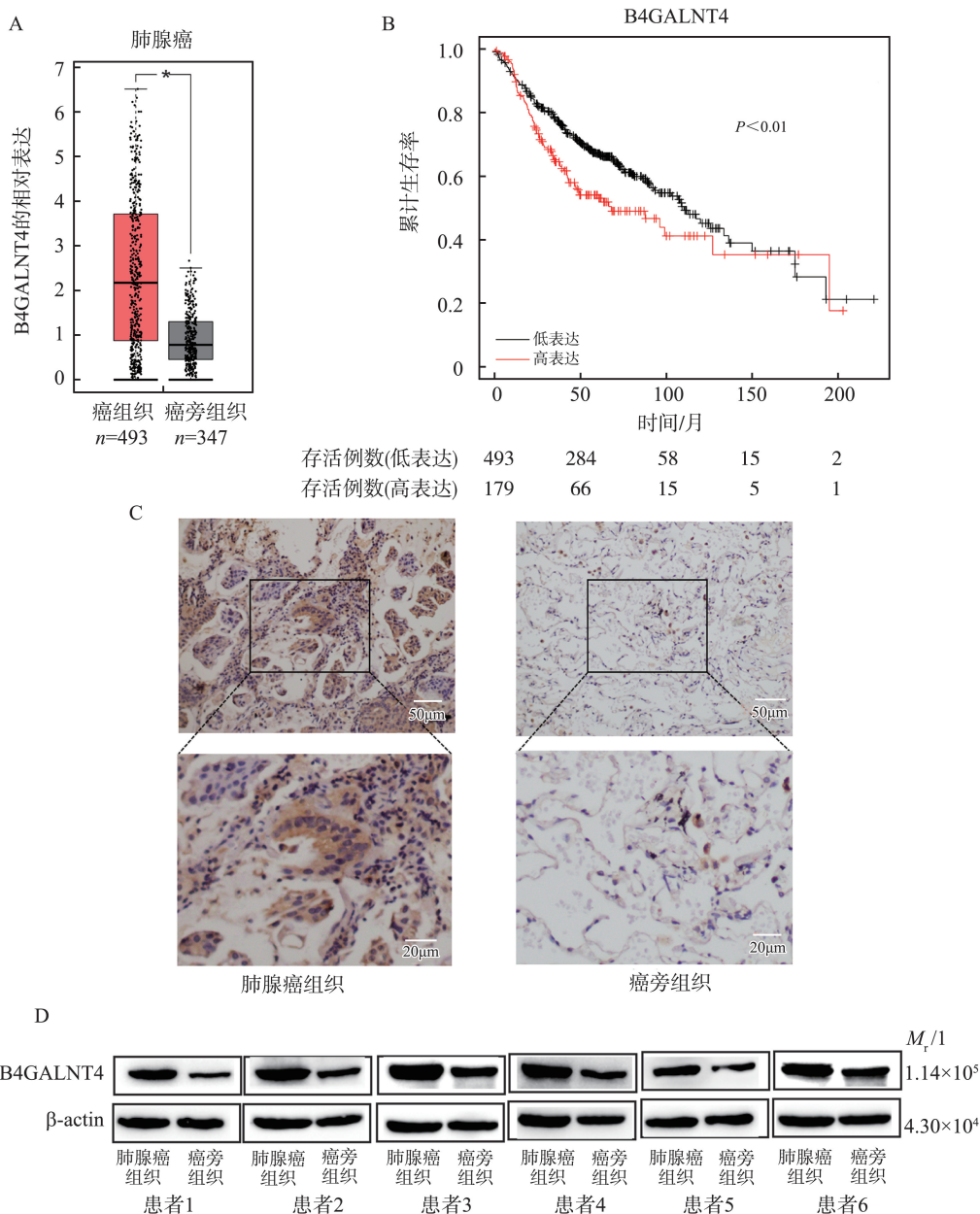


图 1 B4GALNT4 在肺腺癌中高表达并与不良预后相关

A: TCGA 数据库分析表明, B4GALNT4 基因在癌组织中表达水平高于癌旁组织 ( $*P < 0.05$ ); B: TCGA 数据库分析表明, 与 B4GALNT4 基因低表达患者相比, 高表达患者预后更差 ( $P < 0.01$ ); C: 利用免疫组化法对比癌旁组织和癌组织的基因表达情况; D: 利用 Western blotting 检测癌旁组织和癌组织中基因的表达水平。

Figure 1 B4GALNT4 was highly expressed in lung adenocarcinoma and associated with poor prognosis

A: B4GALNT4 gene in cancer tissues was significantly higher than that in the adjacent tissues ( $*P < 0.05$ ), shown by TCGA database; B: The patients with high B4GALNT4 expression had a poorer prognosis compared to those with low B4GALNT4 expression ( $P < 0.01$ ), shown by TCGA database; C: Immunohistochemistry detected B4GALNT4 expression in lung adenocarcinoma and its paracancerous normal tissues; D: Western blotting detected B4GALNT4 expression in 6 pairs of lung adenocarcinoma and paracancerous normal tissues.

## 2.2 敲减 B4GALNT4 可降低肺腺癌细胞的增殖能力

肺腺癌细胞系中,B4GANLT4 的表达水平较肺泡上皮细胞系增高,其中 A549、H1299 细胞系中 B4GALNT4 表达较 H1975 升高,后续选择 A549 和 H1299 细胞系进行 B4GALNT4 的小干扰 RNA 敲

减,先通过 Western blotting 验证了 B4GANLT4 的表达效率。CCK-8 实验表明,随着培养时间的延长,敲减 B4GALNT4 会抑制 A549 和 H1299 细胞的增殖能力( $P<0.01$ , $P<0.001$ );EdU 实验也表明,在 A549 和 H1299 细胞中敲减 B4GALNT4,能降低肺腺癌细胞的增殖能力( $P<0.05$ , $P<0.01$ )。见图 2。

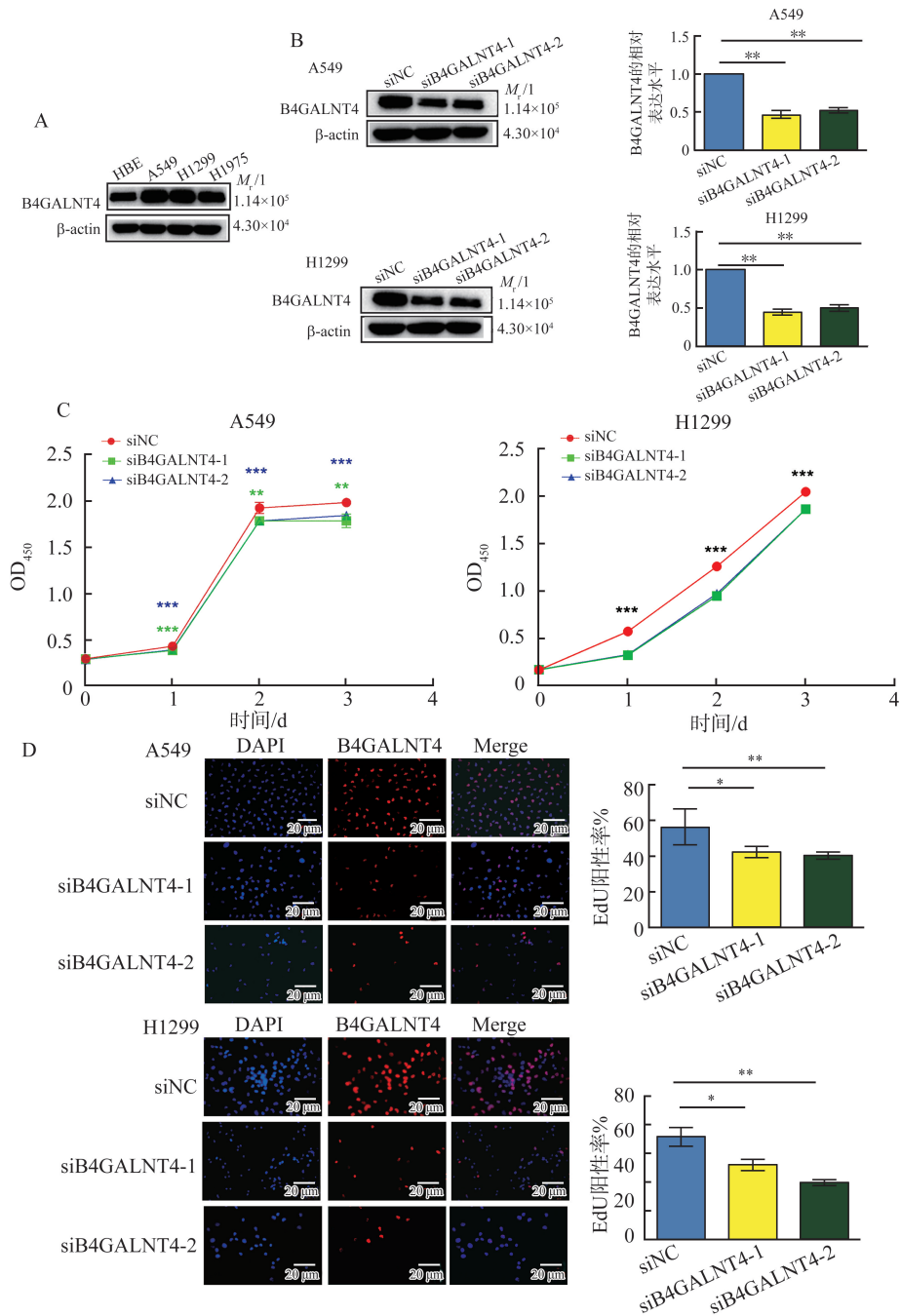


图 2 B4GALNT4 对肺腺癌细胞增殖能力的影响 (\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ )

A: Western blotting 检测 B4GALNT4 在人正常肺上皮细胞 HBE 和肺腺癌细胞系 (A549, H1299, H1975) 中的表达; B: Western blotting 验证小干扰 RNA 的敲减效率; C: CCK-8 检测敲减 B4GALNT4 对 A549、H1299 细胞增殖能力的影响; D: EdU 检测敲减 B4GALNT4 对 A549、H1299 细胞增殖能力的影响。

Figure 2 Effect of B4GALNT4 on the proliferative capacity of lung adenocarcinoma cells (\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ )

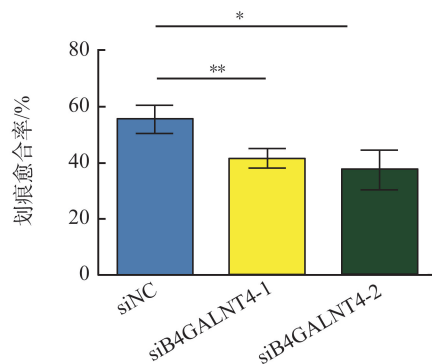
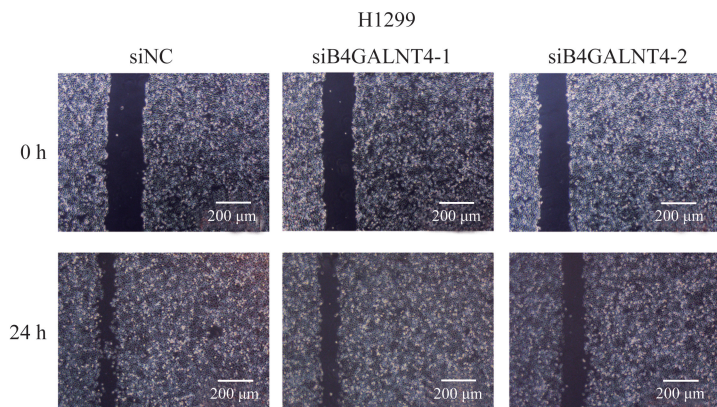
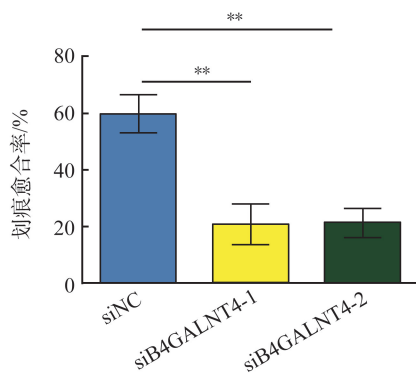
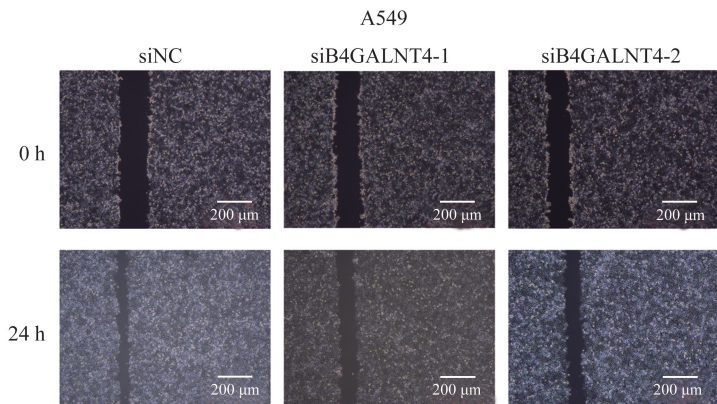
A: The expression of B4GALNT4 in lung adenocarcinoma cell lines (A549, H1299, H1975) and normal lung epithelial cells HBE using Western blotting; B: The knockdown efficiency of small interfering RNA was analyzed and validated by Western blotting; C: CCK-8 was used to explore the effect of knockdown of B4GALNT4 on the proliferation ability of A549 and H1299 cells; D: EdU was used to detect the effect of knockdown of B4GALNT4 on the proliferation ability of A549 and H1299 cells.

### 2.3 敲减 B4GALNT4 可抑制肺腺癌细胞的迁移和侵袭能力

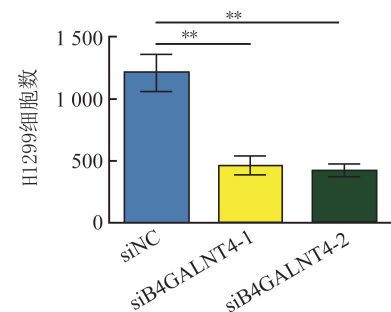
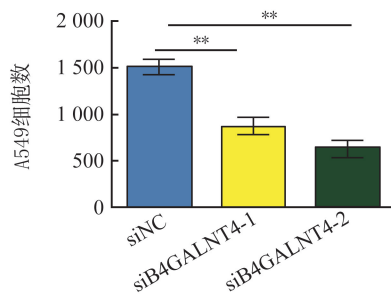
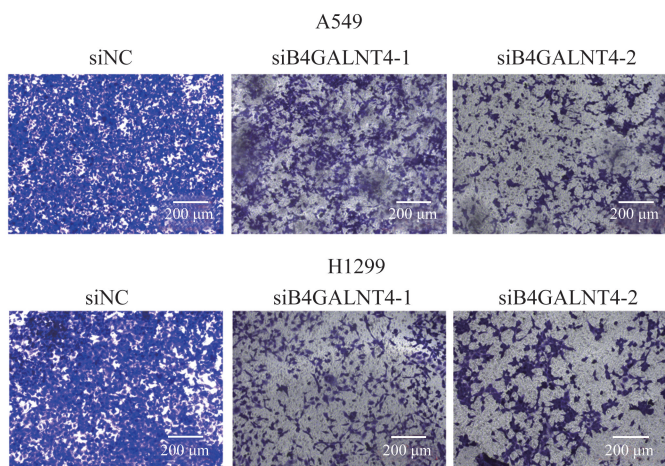
细胞划痕实验发现,在 A549、H1299 细胞中敲减 B4GALNT4 可抑制细胞的迁移能力( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。Transwell 迁移实验亦发现,在 A549、

H1299 细胞中敲减 B4GALNT4 可抑制细胞的迁移能力( $P < 0.01$ )。Transwell 侵袭实验发现,在 A549、H1299 细胞中敲减 B4GALNT4 可抑制细胞的侵袭能力( $P < 0.05$ ,  $P < 0.001$ )。见图 3。

A



B



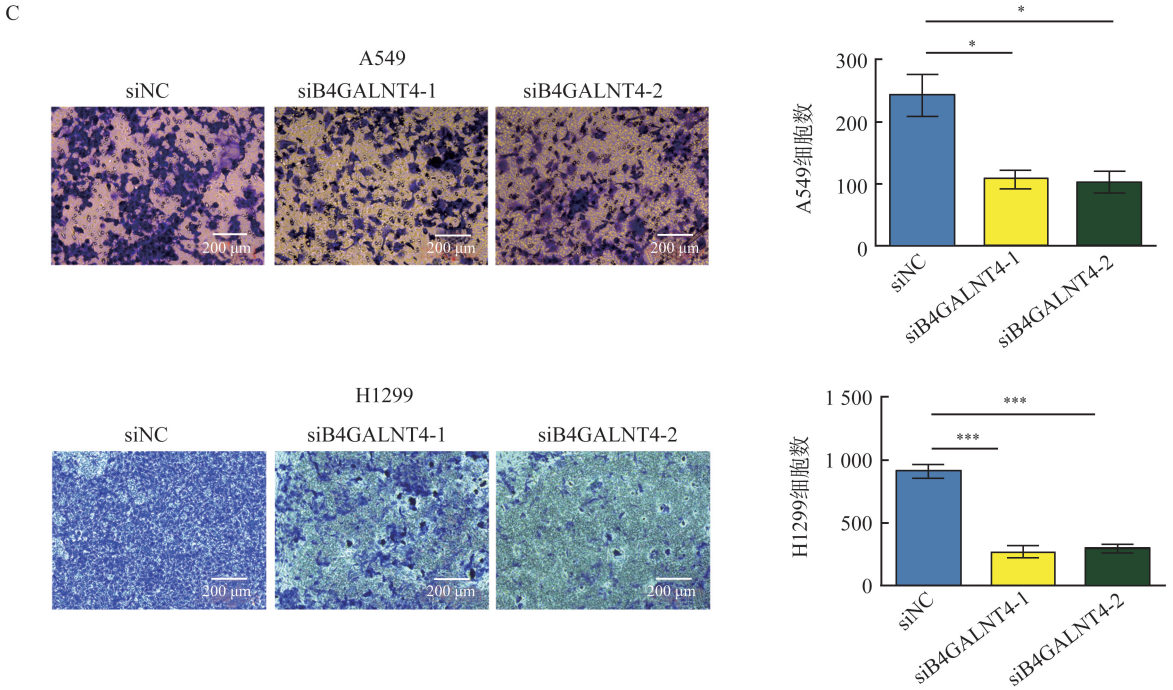


图3 B4GALNT4 对肺腺癌细胞迁移和侵袭能力的影响 (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ )

A: 细胞划痕实验检测 B4GALNT4 对肺腺癌细胞迁移能力的影响; B: Transwell 迁移实验检测 B4GALNT4 对肺腺癌细胞迁移能力的影响; C: Transwell 侵袭实验检测 B4GALNT4 对肺腺癌细胞侵袭能力的影响。

Figure 3 Effect of B4GALNT4 on migration and invasion abilities of lung adenocarcinoma cells (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ )

A: Cell scratch assay detected the effect of B4GALNT4 on the migration ability of lung adenocarcinoma cells; B: Transwell migration assay detected the effect of B4GALNT4 on the migration ability of lung adenocarcinoma cells; C: Transwell invasion assay detected the effect of B4GALNT4 on the invasion ability of lung adenocarcinoma cells.

## 2.4 敲减 B4GALNT4 抑制肺腺癌细胞中 AKT/PI3K/mTOR 通路

上述实验结果表明, B4GALNT4 敲减可以抑制肺腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力, 为了进一步探讨潜在分子机制, 本研究选择一种小干扰 RNA 序列进行机制实验, 通过 Western blotting 检

测了 B4GALNT4 敲减后对 AKT/PI3K/mTOR 通路上 AKT 和 mTOR 的蛋白磷酸化水平的情况。与对照相比, 在 A549 和 H1299 细胞中敲减 B4GALNT4 可降低 AKT 和 mTOR 的磷酸化水平, 降低 PI3K 的表达水平, 总 AKT、总 mTOR 未受明显影响。见图 4。

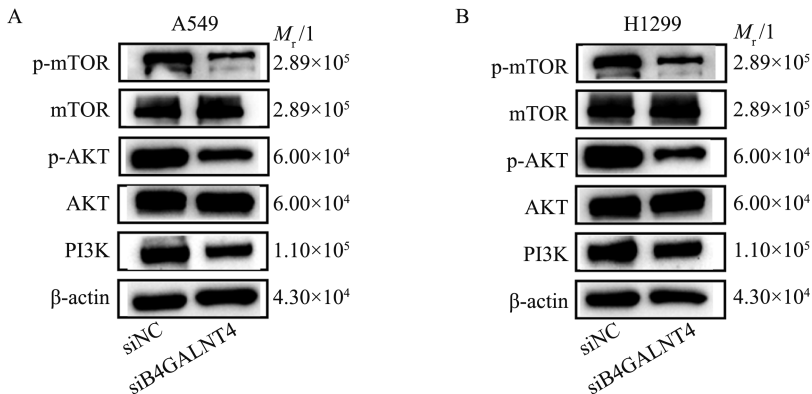


图4 B4GALNT4 对肺腺癌细胞 AKT/PI3K/mTOR 通路的影响

A: 在 A549 细胞中敲减 B4GALNT4 可降低 p-AKT、PI3K 和 p-mTOR 蛋白表达水平; B: 在 H1299 细胞中敲减 B4GALNT4 可降低 p-AKT、PI3K 和 p-mTOR 蛋白表达水平。

Figure 4 Effect of B4GALNT4 on AKT/PI3K/mTOR pathway in lung adenocarcinoma cells

A: Knockdown of B4GALNT4 in A549 cells decreased the expression levels of p-AKT, PI3K, and p-mTOR proteins; B: Knockdown of B4GALNT4 in H1299 cells decreased the expression levels of p-AKT, PI3K and p-mTOR proteins.

### 3 讨论

本研究发现 B4GALNT4 在肺腺癌中具有致癌作用,并阐明了 B4GALNT4 影响肺腺癌增殖、迁移、侵袭的潜在机制。首先通过 TCGA 数据库发现, B4GALNT4 在肺腺癌中表达升高,并与患者的不良预后相关。进一步收集肺腺癌患者的癌与癌旁正常组织,进行免疫组化及 Western blotting 发现,肺腺癌患者的癌组织较癌旁正常组织 B4GALNT4 表达明显增高。在肺上皮细胞系及 3 组肺腺癌细胞系(A549、H1299、H1975)中也发现, B4GALNT4 在肺腺癌细胞系中较 HBE 细胞系高表达。在 A549 细胞及 H1299 细胞中,应用小干扰 RNA 转染技术敲减 B4GALNT4 后,发现 B4GALNT4 表达下调可降低肺腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力。进一步探索 B4GALNT4 对肺腺癌影响的潜在分子机制,发现敲减 B4GALNT4 后, A549 细胞及 H1299 细胞中磷酸化 AKT、磷酸化 mTOR 及 PI3K 蛋白表达均下调,总 AKT、总 mTOR 蛋白表达未受影响,提示敲减 B4GALNT4 可以通过抑制 AKT/PI3K/mTOR 通路起到抑制肺腺癌细胞增殖、迁移和侵袭能力的作用。

B4GALNT4 属于糖基转移酶家族,参与糖蛋白合成,多种细胞膜蛋白、分泌蛋白等均为糖蛋白。研究表明,在胚胎时期活跃而成熟后趋于静止的糖基转移酶一旦被异常激活,可导致细胞表面糖蛋白中糖链结构发生变化,继而导致细胞发生恶变<sup>[12]</sup>。肿瘤细胞表面糖蛋白的结构改变和表达异常与肿瘤细胞的增殖、迁移、侵袭和细胞外基质的黏附有关<sup>[13]</sup>。许多研究也证明,糖基转移酶表达水平异常所导致的异常糖基化通常与肿瘤的侵袭和转移有关<sup>[14-15]</sup>。B4GALNT4 作为糖基转移酶家族中的一员,其表达升高会提高细胞内蛋白质的 LacdiNAc-糖基化水平<sup>[16]</sup>。LacdiNAc 基团和 B4GALNTs 具有组织特异性,在不同部位肿瘤中表达水平不同,且与肿瘤的增殖密切相关。在结肠癌、前列腺癌等肿瘤中, LacdiNAc 基团表达明显上调;而在乳腺癌、胃癌和神经母细胞瘤中, LacdiNAc 基团表达明显减少<sup>[17-19]</sup>。在人类结肠癌中, B4GALNT3 基因表达上调,过表达 B4GALNT3 基因的癌细胞呈现更强的细胞黏附、迁移和侵袭能力<sup>[13]</sup>。本研究发现, B4GALNT4 在肺腺癌中表达升高,并与患者的不良预后相关,并且 B4GALNT4 表达下调抑制肺腺癌的增殖、迁移和侵袭能力。

PI3K/AKT/mTOR 信号通路异常发生在大约

50%的肿瘤中<sup>[20]</sup>,是人类癌症中最常被激活的通路<sup>[21-23]</sup>。此外, PI3K/AKT/mTOR 信号通路在癌症中的过度激活往往是肿瘤发生和进展的基础<sup>[21,24]</sup>。已知该通路中许多成分的异常表达或突变与人类肿瘤发生有关<sup>[25-26]</sup>。例如, PI3K 的基因突变、膜受体(RTK 或 GPCR)的激活、PI3K 上游致癌基因的诱导、激酶(如 PIK3CA)的突变或扩增、肿瘤抑制因子 PTEN 的表达减少或失活,和/或 AKT 基因突变(如 AKT 的扩增和功能增益错义突变),都可能导致癌症的发生和/或进展<sup>[27-30]</sup>。本研究发现,敲减 B4GALNT4 后, A549 细胞及 H1299 细胞中磷酸化 AKT、磷酸化 mTOR 及 PI3K 蛋白表达均下调,总 AKT、总 mTOR 蛋白表达未受影响,提示 PI3K/AKT/mTOR 信号通路可能参与了 B4GALNT4 对肺腺癌增殖、迁移和侵袭的过程。

本研究的不足之处:①肺腺癌患者的病理标本收集过少,未能对肺腺癌患者进行长期随访,缺少真实世界中的预后信息;②在体外研究中,仅在 A549 细胞及 H1299 细胞中应用小干扰 RNA 进行 B4GALNT4 敲减并进行相关功能实验,缺少对 B4GALNT4 过表达之后对于肺腺癌细胞系功能的研究;③仅进行了体外的功能实验,缺乏体内动物研究。后续需要针对上述问题,增加临床病理样本,收集临床相关资料及进行预后分析,并开展进一步的体内及体外研究,进一步说明 B4GALNT4 在肺腺癌中的功能及潜在作用机制。

综上所述,本研究发现 B4GALNT4 敲减可抑制肺腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力, B4GALNT4 在肺腺癌的发展中可能起到促癌基因的作用,该促癌作用可能通过影响 PI3K/AKT/mTOR 信号通路中关键蛋白的表达水平发挥作用。

### 参考文献:

- [1] Wang Y, Yan Q, Fan C, et al. Overview and countermeasures of cancer burden in China[J]. *Sci China Life Sci*, 2023, 66(11): 2515-2526.
- [2] Duma N, Santana-Davila R, Molina JR. Non-small cell lung cancer: epidemiology, screening, diagnosis, and treatment[J]. *Mayo Clin Proc*, 2019, 94(8): 1623-1640.
- [3] Siegel RL, Giaquinto AN, Jemal A. Cancer statistics, 2024[J]. *CA A Cancer J Clinicians*, 2024, 74(1): 12-49.
- [4] Varki A. Biological roles of glycans[J]. *Glycobiology*, 2017, 27(1): 3-49.
- [5] Baba H, Kanda M, Sato Y, et al. Expression and malignant potential of B4GALNT4 in esophageal squamous cell

- carcinoma[J]. *Ann Surg Oncol*, 2020, 27(9): 3247-3256.
- [6] Fan AY, Zhang YY, Cheng JT, et al. A novel prognostic model for prostate cancer based on androgen biosynthetic and catabolic pathways [J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 950094. doi:10.3389/fonc.2022.950094
- [7] Hsu WM, Che MI, Liao YF, et al. B4GALNT3 expression predicts a favorable prognosis and suppresses cell migration and invasion via  $\beta_1$  integrin signaling in neuroblastoma[J]. *Am J Pathol*, 2011, 179(3): 1394-1404.
- [8] Glaviano A, Foo ASC, Lam HY, et al. PI3K/AKT/mTOR signaling transduction pathway and targeted therapies in cancer[J]. *Mol Cancer*, 2023, 22(1): 138. doi:10.1186/s12943-023-01827-6
- [9] Yu FY, Zhao XY, Li MT, et al. SLITRK6 promotes the progression of lung adenocarcinoma by regulating PI3K/AKT/mTOR signaling and Warburg effect[J]. *Apoptosis*, 2023, 28(7/8): 1216-1225.
- [10] Li KY, Quan LL, Huang F, et al. ADAM12 promotes the resistance of lung adenocarcinoma cells to EGFR-TKI and regulates the immune microenvironment by activating PI3K/Akt/mTOR and RAS signaling pathways[J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 122: 110580. doi:10.1016/j.intimp.2023.110580
- [11] Huang SC, Zhao HC, Lou XL, et al. TM6SF1 suppresses the progression of lung adenocarcinoma and M2 macrophage polarization by inactivating the PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2024, 718: 149983. doi:10.1016/j.bbrc.2024.149983
- [12] Moremen KW, Tiemeyer M, Nairn AV. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13(7): 448-462.
- [13] Huang J, Liang JT, Huang HC, et al. Beta1, 4-N-acetylgalactosaminyltransferase III enhances malignant phenotypes of colon cancer cells [J]. *Mol Cancer Res*, 2007, 5(6): 543-552.
- [14] Tan ZQ, Jiang YZ, Liang L, et al. Dysregulation and prometastatic function of glycosyltransferase C1GALT1 modulated by cHP1BP3/miR-1-3p axis in bladder cancer [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, 41(1): 228. doi:10.1186/s13046-022-02438-7
- [15] Liu SQ, Su YJ, Qin MB, et al. Sphingosine kinase 1 promotes tumor progression and confers malignancy phenotypes of colon cancer by regulating the focal adhesion kinase pathway and adhesion molecules[J]. *Int J Oncol*, 2013, 42(2): 617-626.
- [16] 邹瑜琳. 小分子核酸 AS-tRF 通过靶向 B4GALNT4 调节内皮细胞炎症的作用和机制 [D]. 青岛: 青岛大学, 2022.
- [17] Fukushima K, Satoh T, Baba S, et al. Alpha 1, 2-fucosylated and beta-N-acetylgalactosaminylated prostate-specific antigen as an efficient marker of prostatic cancer [J]. *Glycobiology*, 2010, 20(4): 452-460.
- [18] Adamczyk B, Jin CS, Polom K, et al. Sample handling of gastric tissue and O-glycan alterations in paired gastric cancer and non-tumorigenic tissues[J]. *Sci Rep*, 2018, 8: 242. doi:10.1038/s41598-017-18299-6
- [19] Kitamura N, Guo SC, Sato T, et al. Prognostic significance of reduced expression of beta-N-acetylgalactosaminylated N-linked oligosaccharides in human breast cancer [J]. *Int J Cancer*, 2003, 105(4): 533-541.
- [20] Martini M, De Santis MC, Braccini L, et al. PI3K/AKT signaling pathway and cancer; an updated review [J]. *Ann Med*, 2014, 46(6): 372-383.
- [21] Lawrence MS, Stojanov P, Mermel CH, et al. Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types[J]. *Nature*, 2014, 505(7484): 495-501.
- [22] Turdo A, D'Accardo C, Glaviano A, et al. Targeting phosphatases and kinases: how to checkmate cancer[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 690306. doi:10.3389/fcell.2021.690306
- [23] Yuan YQ, Long HZ, Zhou ZW, et al. PI3K-AKT-targeting breast cancer treatments: natural products and synthetic compounds[J]. *Biomolecules*, 2023, 13(1): 93. doi:10.3390/biom13010093
- [24] Zhu KR, Wu YQ, He P, et al. PI3K/AKT/mTOR-targeted therapy for breast cancer [J]. *Cells*, 2022, 11(16): 2508. doi:10.3390/cells11162508
- [25] Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-kinase AKT pathway in human cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(7): 489-501.
- [26] Yu L, Wei J, Liu PD. Attacking the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway for targeted therapeutic treatment in human cancer[J]. *Semin Cancer Biol*, 2022, 85: 69-94. doi:10.1016/j.semcancer.2021.06.019
- [27] Zhou BP, Hu MC, Miller SA, et al. HER-2/neu blocks tumor necrosis factor-induced apoptosis *via* the Akt/NF-kappaB pathway [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(11): 8027-8031.
- [28] Dillon RL, White DE, Muller WJ. The phosphatidylinositol 3-kinase signaling network: implications for human breast cancer [J]. *Oncogene*, 2007, 26(9): 1338-1345.
- [29] Zhang YQ, Ng PK, Kucherlapati M, et al. A pan-cancer proteogenomic atlas of PI3K/AKT/mTOR pathway alterations[J]. *Cancer Cell*, 2017, 31(6): 820-832.
- [30] Ko JH, Um JY, Lee SG, et al. Conditioned media from adipocytes promote proliferation, migration, and invasion in melanoma and colorectal cancer cells[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(10): 18249-18261.