

上海交通大学

SHANGHAI JIAO TONG UNIVERSITY

学士学位论文

BACHELOR'S THESIS



论文题目： AMOT 在肝癌中 O-糖基化水平的检测与研究

学生姓名： 卞知玄

学生学号： 5147409022

专 业： 医学检验技术

指导教师： 潘秋辉

学院（系）： 医学院

AMOT 在肝癌中 O-糖基化水平的检测与研究

摘要

目的: 血管生成抑制素结合蛋白 (Angiomotin, AMOT) 作为 Hippo 信号通路的核心因子之一, 在肿瘤中具有抑制、促进的双重作用, 而其在肝癌发生发展中的作用尚不清楚。本课题对 AMOT 在肝癌细胞中 O-GlcNAc 糖基化修饰水平进行检测, 并初步探究其与 YAP 的相互作用关系。**方法:** 通过免疫共沉淀、免疫印迹实验 (Western Blot) 检测肝癌细胞株 Bel-7402 与 SMMC-7721 中 AMOT 的 O-GlcNAc 糖基化修饰水平; 通过免疫沉淀结合 O-GlcNAc 糖基化修饰位点酶标实验确认 AMOT 发生 O-GlcNAc 糖基化修饰; 通过免疫共沉淀和 Western Blot 实验检测 AMOT 与 O-GlcNAc 转移酶存在结合, 存在 O-GlcNAc 修饰位点; 不同浓度的葡萄糖 (5.5 至 50mM) 处理 Bel-7402 与 SMMC-7721 肝癌细胞株 24h 或用 GlcNAc (4mM) 与 PuGNAc (25mM) 处理细胞后通过 Western Blot 和免疫沉淀实验探究葡萄糖浓度与 AMOT 蛋白表达水平、O-GlcNAc 糖基化修饰水平和磷酸化修饰水平之间的关系; 慢病毒稳定转染 Bel-7402 与 SMMC-7721 肝癌细胞株, 使其 AMOT 表达敲减, 通过免疫荧光实验观察葡萄糖浓度与 AMOT、YAP 细胞亚定位之间的联系。**结果:** AMOT 在肝癌细胞中发生 O-GlcNAc 糖基化修饰, AMOT 与 OGT 直接或间接结合, 并存在 O-GlcNAc 修饰位点; 高葡萄糖浓度可增强 AMOT 蛋白表达水平、O-GlcNAc 糖基化修饰水平, 而抑制其 Ser175 磷酸化修饰水平; 高葡萄糖浓度下 AMOT 可促进 YAP 的细胞核聚集。**结论:** 高葡萄糖浓度上调 AMOT 的 O-GlcNAc 糖基化修饰而下调其 Ser175 磷酸化修饰水平, 进而改变 YAP 亚细胞定位, 促进 YAP 核聚集以增强 YAP 促进细胞增殖和肿瘤发生的能力。因此, 阻断 YAP 和 AMOT 之间的相互作用可能有助于开发与糖尿病相关的肝癌的治疗策略。

关键字: AMOT, O-GlcNAc 糖基化修饰, Hippo 信号通路, 肝癌发生发展, 细胞亚定位

O-GLCNACYLATION OF AMOT IN LIVER CANCER

ABSTRACT

Objective: Angiomotin (AMOT), one of the core factors of Hippo signaling pathway, has a dual role in suppressing or promoting tumors, but its functions in liver cancer development remains unclear. This study examined the O-GlcNAcylation level of AMOT in liver cancer cell lines and explored its underlying interaction with YAP. **Methods:** The O-GlcNAcylation of AMOT in Bel-7402 and SMMC-7721 cells was detected by immunoprecipitation and Western blotting. Immunoprecipitation and enzymatic labelling of O-GlcNAc sites were used to confirm the occurrence of the O-GlcNAcylation of AMOT. The combination of AMOT and O-GlcNAc transferase and O-GlcNAc site were detected by co-immunoprecipitation and Western blotting. Bel-7402 and SMMC-7721 cells were treated with different concentrations of glucose (5.5 to 50 mM) and PuGNAc (25 mM) with or without GlcNAc (4 mM), then the AMOT protein, O-GlcNAcylation, and phosphorylation were investigated by Western blotting and immunoprecipitation. Lentivirus stable transfection via AMOT-sh1 and -sh2 plasmids was used in Bel-7402 and SMMC-7721 cells to knock down the expression of AMOT, and the relationship between glucose concentration and subcellular localization of AMOT and YAP was observed by immunofluorescence. **Results:** AMOT is O-GlcNAcylated in liver cancer cells, and there was a binding between AMOT and O-GlcNAc transferase. High glucose increased the expression of AMOT protein and O-GlcNAcylation, and inhibited its phosphorylation level at Ser175. Moreover, high glucose regulated YAP localization at nucleus via AMOT. **Conclusions:** High glucose upregulated the O-GlcNAcylation of AMOT and down-regulated the phosphorylation of YAP, which changed YAP subcellular localization and promoted YAP translocating to the nucleus and enhanced the ability of YAP to promote cell proliferation and tumorigenesis. Therefore, blocking the interaction between YAP and AMOT may contribute to the therapeutic strategies for diabetes-related liver cancer.

Key words: AMOT, O-GlcNAcylation, Hippo signaling pathway, Liver tumorigenesis, Subcellular localization

目录

第一章 绪论.....	1
1.1 引言.....	1
1.2 O-GlcNAc 糖基化修饰研究进展	1
1.3 AMOT 的研究进展	2
第二章 材料与方法.....	3
2.1 材料.....	3
2.1.1 细胞株.....	3
2.1.2 细胞培养相关试剂.....	3
2.1.3 免疫共沉淀实验相关试剂.....	3
2.1.4 Western Blot 实验相关试剂.....	3
2.1.5 O-GlcNAc 糖基化修饰位点酶标实验相关试剂	3
2.1.6 慢病毒包装实验相关试剂.....	3
2.1.7 免疫荧光实验相关试剂.....	4
2.1.8 主要仪器.....	4
2.2 方法.....	4
2.2.1 细胞实验.....	4
2.2.2 免疫共沉淀实验.....	4
2.2.3 Western Blot 检测蛋白	5
2.2.4 O-GlcNAc 糖基化修饰位点酶标实验	7
2.2.5 质粒转化与抽提.....	7
2.2.6 慢病毒包装.....	8
2.2.7 免疫荧光实验.....	8
第三章 结果.....	10
3.1 AMOT 在肝癌细胞中发生 O-GlcNAc 糖基化修饰.....	10
3.1.1 AMOT 存在 O-GlcNAc 修饰位点.....	10
3.1.2 酶标记实验发现 AMOT 发生 O-GlcNAc 糖基化修饰.....	10
3.1.3 AMOT 与 OGT 存在结合	11
3.2 HG 可增强 AMOT 的 O-GlcNAc 糖基化修饰水平.....	12
3.3 HG 通过 AMOT 调节 YAP 细胞亚定位.....	13
第四章 讨论.....	14
第五章 结论.....	16
参考文献.....	17
致谢	21

第一章 绪论

1.1 引言

肝癌 (Liver cancer) 指发生于肝脏的恶性肿瘤, 是全世界最常见的恶性肿瘤之一, 其预后严重不良, 已经严重威胁到人们的身体健康与生命安全^[1]。肝癌在东南亚和非洲等发展中国家与地区发病率较高, 与西方发达国家酒精性脂肪性肝炎导致的肝癌不同, 在这些地区肝癌的主要发病原因为感染乙型肝炎病毒和接触黄曲霉毒素^[2, 3]。肝癌目前已成为第五大常见癌症, 也是全球癌症相关死亡的第二大病因^[1]。

糖尿病是肝癌发生发展的一个重要促进因素^[4], 由于糖尿病和肝癌的患病率在世界范围内大幅增加, 所以针对糖尿病如何促进肝癌的潜在分子机制的研究十分必要。肝脏是葡萄糖代谢的重要器官, 并且高血糖症是糖尿病的主要特征之一。然而, 高血糖是否和如何刺激肝脏肿瘤发生尚不明确^[5]。

1.2 O-GlcNAc 糖基化修饰研究进展

O-GlcNAc 糖基化修饰 (O-GlcNAcylation) 是广泛发生在细胞内的一种重要的蛋白翻译后修饰^[6], 它是由单个 N-乙酰葡萄糖胺 (N-acetylglucosamine, GlcNAc) 通过 O-糖苷键连接到蛋白质丝氨酸或苏氨酸羟基上, 是糖基化修饰的一种特殊类型^[7]。氨基己糖生物合成通路 (Hexosamine biosynthesis pathway, HBP) 是一种营养敏感性通路, HBP 利用糖、谷氨酰胺、乙酰辅酶 A 以及二磷酸尿苷, 在细胞内经 O-GlcNAc 转移酶 (O-GlcNAc transferase, OGT) 催化, 将 O-糖苷键从 HBP 终产物尿苷二磷酸-N-乙酰葡萄糖胺 (UDP-N-acetylglucosamine, UDP-GlcNAc) 转移并连接至蛋白质的丝氨酸和苏氨酸残基的羟基上, 而葡萄糖胺酶 (O-GlcNAcase, OGA) 则具有相反作用^[8, 9]。与经典的糖基化修饰不同, O-GlcNAc 糖基化修饰更像磷酸化修饰, 与生物及疾病过程相关联。O-GlcNAc 糖基化修饰不是发生在高尔基体与内质网中, 而是胞质与核质中, 因此被 O-GlcNAc 糖基化修饰的蛋白质多为核蛋白或胞浆蛋白^[10]。

高血糖 (High glucose, HG) 是糖尿病的主要特征之一, 能够加速肝脏的肿瘤发生。研究表明, 在 HG 促进肝癌的过程中, 高级糖基化终产物特异性受体 (AGER) 被视为一种刺激物, 能激活 HBP, 上调靶蛋白的 O-GlcNAc 糖基化修饰水平^[11]。

很多与肿瘤发生发展相关的蛋白都被证明具有 O-GlcNAc 修饰现象, 例如 C-Myc, P53, AKT, IKK β 等。原癌基因 c-Myc 的 Thr58 位会发生 O-GlcNAc 糖基化修饰, 竞争性抑制该位点的磷酸化修饰, 增加 c-Myc 的稳定性^[12]。在 NF- κ B 通路中, O-GlcNAc 糖基化修饰通过调节 P65, IKK β 等多个关键蛋白, 上调该通路的活性, 使肿瘤细胞凋亡能力下降^[13, 14]。不难推测, O-GlcNAc 修饰可能通过调节特定的肿瘤相关蛋白的活性, 参与肿瘤形成的调控。

有研究表明, 高血糖可以促进 c-Jun 发生 O-GlcNAc 糖基化修饰进而促进肝癌发生发展^[11]。另一研究报道, O-GlcNAc 糖基化修饰可以上调 YES 相关蛋白 (Yes-associated protein, YAP) 的表达, 增强其稳定性。YAP 是 Hippo 信号通路的下游转录调节因子, 也是肝癌中潜在的致癌因子。O-GlcNAc 糖基化修饰以 YAP 依赖性方式诱导肝癌细胞的转化表型。YAP 的 O-GlcNAc 位点在 Thr241 处, 突变该位点可降低 YAP 发生 O-GlcNAc 糖基化修饰, 减弱其稳定性和促癌能力, 同时增加 YAP 的磷酸化修饰水平。抑制 YAP O-GlcNAc 糖基化可能为治疗高葡萄糖相关性肝癌提供帮助^[15]。然而, 在肝癌发生发展过程中, 是否有其他的关键蛋白发生 O-GlcNAc 糖基化修饰仍有待研究。

1.3 AMOT 的研究进展

血管生成抑制素结合蛋白 (Angiomotin, AMOT) 首先被鉴定为可与血管抑素结合的蛋白, 通过减少紧密连接和改变肌动蛋白动力学功能来增强内皮细胞的运动能力^[16-18]。AMOT 蛋白家族有三个成员: AMOT (p80 和 p130 亚型), AMOT 样蛋白 1 (Amot-like protein 1, AMOTL1) 和 Amot 样蛋白 2 (Amot-like protein 2, AMOTL2)。

AMOT 蛋白在内皮细胞血管形成和迁移、上皮细胞紧密连接、极性和上皮-间充质转变的调节中起重要作用^[19]。而且, 这些蛋白可调节癌细胞的增殖和迁移。在大多数癌症中, AMOT 家族成员促进癌细胞的增殖和侵袭, 然而, 在胶质母细胞瘤、卵巢癌和肺癌中, AMOT 抑制癌细胞的生长。

Hippo 信号通路是由进化上保守的激酶级联反应构成的, 并在一定程度上掌控细胞命运, 包括肿瘤发生^[20]。该途径由哺乳动物 STE20 样蛋白激酶 (mammalian STE20-like kinases 1/2, MST1/2)-salvador 家族 WW 结构域蛋白 (salvador1, SAV1) 复合物与大型肿瘤抑制因子 (large tumor suppressor kinase 1/2, LATS1/2)-MOB 激酶激活剂 (MOB kinase activator 1 A/B, MOB1A/B) 复合物组成核心蛋白激酶链, 其中 MST1/2 激酶在与 WW45 相互作用时使 LATS1/2 磷酸化。磷酸化的 LATS1/2 可直接磷酸化转录共激活因子 YAP 和 YAP 的并系同源基因 TAZ (Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif)。YAP 的磷酸化能抑制其进入细胞核, 在细胞核中 YAP 可与其他转录因子形成转录活性复合物, 以驱动促增殖或抗凋亡基因的表达。该过程已证实与包括肝癌在内的多种肿瘤的形成密切相关^[21]。

研究发现, AMOT 家族蛋白是 Hippo 信号通路 LATS1/2 激酶的新底物。LATS1/2 可磷酸化 AMOT-p130。磷酸化抑制 AMOT-p130 与微丝之间的结合, 并抑制微丝与黏着斑的形成, 从而在体外抑制血管内皮细胞的迁移。这表明 AMOT-p130 是 LATS1/2 的直接底物, 并且介导 Hippo 信号通路在内皮细胞迁移和血管生成中的重要功能。另一方面 AMOTL2 作为 YAP 的靶基因, 通过负反馈来抑制 YAP 的活性, 维持 Hippo 信号通路在体内的稳态。AMOT 家族蛋白招募 YAP/TAZ 到紧密连接或到肌动蛋白细胞骨架, 抑制 YAP/TAZ 进入细胞核发挥转录活性^[22]。AMOT 除了可以直接与 YAP/TAZ 相互作用抑制转录活性, 还可以通过激活 LATS1/2 激酶来抑制 YAP/TAZ 的活性。AMOT 可以作为骨架蛋白与 LATS1/2、YAP 相互作用, 促进 YAP 的磷酸化, 抑制 YAP 的作用^[23]。

研究表明肝损伤后, AMOT 的缺失阻碍胆管上皮细胞的增殖和肿瘤发生。AMOT-p130 通过抑制 YAP 和 LATS1/2 之间的相互作用来促进 YAP 的核聚集并由此导致 Nf2 缺陷细胞增殖^[24]。在肝癌细胞中, AMOT-p130 的表达增加了细胞核中 YAP, CTGF 和 Cyr61 的表达, 并作为 YAP 辅因子起作用, 阻止 YAP 磷酸化并增强其对促进肿瘤发生的特定基因集的活性^[24, 25]。总之, AMOT-p130 通过增强 YAP 的活性而在肝癌中起癌基因的作用。

综上所述, 十分有必要对例如 AMOT 这样的 Hippo 信号通路中的核心蛋白是否发生 O-GlcNAc 糖基化修饰进行研究, 如果 AMOT 存在 O-GlcNAc 糖基化修饰的现象, 它可能是糖尿病 (高葡萄糖) 诱发肝癌的一种重要机制。

第二章 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 细胞株

肝癌细胞株 Bel-7402、SMMC-7721，肾脏细胞株 HEK-293T。

2.1.2 细胞培养相关试剂

10%的胎牛血清 (Gibco)、青链霉素混合双抗 (Gibco)、DMEM/HIGH GLUCOSE 培养基 (HyClone)、胰蛋白酶消化液 (Gibco)、磷酸缓冲盐溶液 (PBS, 生工生物)、葡萄糖 (Sigma-Aldrich)、PUGNAc (Sigma-Aldrich)、GlcNAc (Sigma-Aldrich)、二甲亚砜 DMSO (Sigma-Aldrich)、10cm 细胞培养皿 (Corning)、移液管 (eppendorf)。

2.1.3 免疫共沉淀实验相关试剂

PBS 缓冲液 (生工生物)、Western/IP 细胞溶解液 (碧云天)、proteinA/G 琼脂糖珠 (Novex)、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (碧云天)、抗 O-GlcNAc 抗体 (Abcam, #ab2739)、抗-AMOT 抗体 (Santa Cruz, #sc-166924)。

2.1.4 Western Blot 实验相关试剂

Western/IP 细胞溶解液 (碧云天)、BCA 蛋白定量试剂盒 (Thermo)、pH8.8 Tris-HCl (碧云天)、pH6.8 Tris-HCl (碧云天)、30% Acr-Bis (碧云天)、10%SDS (生工生物)、过硫酸铵 (AP, 碧云天)、四甲基乙二胺 (TEMED, 碧云天)、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (碧云天)、预染蛋白 marker (Thermo, #26616)、甘氨酸 (生工生物)、Tris (生工生物)、无水乙醇 (上海凌峰化学试剂)、甲醇 (上海凌峰化学试剂)、吐温 (生工生物)、脱脂奶粉 (生工生物)、ECL 发光试剂盒 (BIO-RAD)、显影定影试剂盒 (碧云天)、医用 X 射线胶片 (Carestream)、X 射线摄影暗盒 (广东粤华医疗器械)、抗 O-GlcNAc 抗体 (Abcam, #ab2739)、抗 MST 抗体 (Abcam, #ab124787)、抗 LATS 抗体 (Abcam, #ab70565)、抗 SAV 抗体 (Abcam, #ab105105)、抗 MOB 抗体 (Cell Signaling Technology, CST, #13730)、抗 YAP 抗体 (Abcam, #ab52771)、抗 AMOT 抗体 (Abcam, #ab85143)、抗 GAPDH 抗体 (CST, #5174)、抗 OGT 抗体 (Abcam, #ab177941)、兔抗 (CST, #7074S)、鼠抗 (CST, #7076S)。

2.1.5 O-GlcNAc 糖基化修饰位点酶标实验相关试剂

Click-iT™ O-糖基化酶标记试剂盒 (Invitrogen, 主要包括: UDP-GalNAz、Gal-T1Y289L、反应缓冲液、MnCl₂)、酶标记后糖基检测试剂盒 (Invitrogen, 主要包括: 生物素、四甲基-6-羧基罗丹明 TAMRA、反应缓冲液、CuSO₄)、辣根过氧化物酶标记链霉亲和素 (碧云天)、抗 TAMRA 抗体 (Invitrogen, #A6397)。

2.1.6 慢病毒包装实验相关试剂

AMOT-sh1、-sh2、pCMV-dR8.74、pMD2-VSVG (之前研究所得)、质粒小提试剂盒 (TIANGEN)、感受态大肠埃希菌 (TAKARA)、LB 培养基 (胰蛋白胨、氯化钠、酵母提取

物、琼脂粉, 生工生物)、Lipofectamine-2000 (Invitrogen)、Polybrene (Santa Cruz)、嘌呤霉素 (索莱宝)、0.45 μ m 细菌滤器 (Corning)。

2.1.7 免疫荧光实验相关试剂

PBS 缓冲液 (生工生物)、4%多聚甲醛 (生工生物)、Triton X100 (生工生物)、ProLong® Gold antifade reagent with DAPI (Invitrogen)、显微镜载玻片 (世泰)、细胞爬片 (Nest)、24 孔细胞培养皿 (Corning)、抗 AMOT 抗体 (Santa Cruz, #sc-166924)、抗 YAP 抗体 (Abcam, #ab52771)。

2.1.8 主要仪器

CO₂ 培养箱 (Panasonic)、倒置显微镜 (上海缔伦)、超净工作台 (苏州净化)、GL-802B 微型台式真空泵 (海门其林贝尔)、电热恒温培养箱 (上海森信)、5424R 台式高速冷冻离心机 (Eppendorf)、MiniSpin 小型台式离心机 (Eppendorf)、WH986 静音混合器 (海门其林贝尔)、TS-8 转移摇床 (海门其林贝尔)、酒精灯、玻璃珠、恒温震荡器 (苏州培英)、NanoDrop2000 (Thermo)、立式灭菌器 (SHINVA)、JCS-11002W 电子天平 (瑞安英衡)、干式恒温金属浴 (上海净信)、多功能微孔板检测仪 (BioTek)、垂直电泳槽 (Tanon)、转移电泳槽 (Tanon)、EPS300 电泳仪 (Tanon)、激光共聚焦显微镜 (Zeiss)、-80°C 超低温冰箱 (New Brunswick Scientific)、医用冰箱 (海尔)。

2.2 方法

2.2.1 细胞实验

(1) 细胞培养与传代

肝癌细胞株 Bel-7402 与 SMMC-7721 使用 DMEM/HIGH GLUCOSE 完全培养基 (包含 10%胎牛血清和 1 $\times$ 青链霉素混合双抗) 在 10cm 细胞培养皿中进行培养, 每日观察细胞生长状态, 每 3 天更换一次培养基, 同时保证细胞紧贴培养皿底部生长, 约 3-4 天后, 观察到 80-90%贴壁细胞融合时进行传代。传代时, 吸去上清培养基, 加入 2mL 1 $\times$ PBS 缓冲液清洗一次, 加入 1-2mL 胰蛋白酶消化液, 消化液的量以恰巧盖住细胞为好, 不宜过多, 控制细胞消化时间大约为 1min 左右, Bel-7402 细胞消化时间可稍久。期间用倒置显微镜观察消化后的细胞状态, 若发现胞质有回缩, 细胞之间不再连接成片, 表明此时消化适度, 吸弃消化液后加入 2mL 新鲜完全培养基来终止消化, 最后使用 1mL 移液枪将贴壁细胞吹下, 轻轻吹打混匀细胞, 使其成为细胞悬液。新培养皿中加入 9-10mL 新鲜完全培养基后加入 1mL 细胞悬液, 置于 37°C、5%CO₂ 培养箱培养。

(2) 细胞处理

细胞用葡萄糖 (终浓度为 5.5 至 50mM)、PuGNAc (终浓度 25mM)、GlcNAc (终浓度 4mM) 处理 24h 后, 收集细胞进行后续实验。

2.2.2 免疫共沉淀实验

(1) 收集 24-48h 前预处理的肝癌细胞株 Bel-7402 与 SMMC-7721, 为去除培养基中残留的血清蛋白, 用 PBS 洗涤后再次离心收集细胞沉淀。预先配好已加入蛋白酶抑制剂的细胞裂解缓冲液, 加入 550 μ L 该缓冲液于细胞沉淀中, 混匀, 冰上裂解 30min 后, 4°C, 15,000rpm 高速离心 10min, 吸取溶解有蛋白质的上清液, 弃去破碎细胞沉淀;

(2) 预留 50 μ L 上清裂解液准备作为 input 以备后续 WB 测定。取 2 μ L 抗体加入到剩余

500 μ L 上清裂解缓冲液中；

(3) 取 protein A/G 琼脂糖珠各 10 μ L, 用 300 μ L 裂解缓冲液洗涤 3 次, 每次洗涤后 3,000 rpm, 离心 3min, 弃上清；

(4) 将洗涤好的 20 μ L 琼脂糖珠加到上述已含有抗体的细胞裂解液缓冲液中, 4 $^{\circ}$ C, 于静音混合器中轻轻摇晃孵育过夜, 使 protein A/G 琼脂糖珠与抗体偶联；

(5) 免疫沉淀反应后, 在 4 $^{\circ}$ C 以 3,000 rpm 离心 3min, 将琼脂糖珠离心至管底；小心吸去上清（可使用磁铁在管底吸住琼脂糖珠），用 500 μ L 裂解缓冲液冲洗琼脂糖珠 3-4 次, 充分去除非特异性结合的蛋白质, 以保证抗体所捕获蛋白质的纯度；最后加入 15 μ L 1 $\times$ SDS 蛋白上样缓冲液, 沸水煮 5 min；

(6) SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 分析确定结合蛋白。

(7) 该实验涉及的抗体有：抗 O-GlcNAc 抗体、抗-AMOT 抗体

2.2.3 Western Blot 检测蛋白

(1) 蛋白提取

使用 1 $\times$ PBS 缓冲液清洗细胞 1 次, 胰蛋白酶消化液消化细胞, 细胞培养液终止消化, 将细胞收集于 1.5mL EP 管内, 3,000rpm 离心 3min, 再用 1 $\times$ PBS 缓冲液洗涤 1 次, 吸弃上清液体, 防止残留培养基中的血清蛋白干扰细胞中的蛋白提取；

每管根据所收集的细胞数量加入 200 μ L-400 μ L 细胞裂解液, 在冰上裂解 30min 后, 4 $^{\circ}$ C、15,000rpm 离心 15min, 将上清转至干净 EP 管, 放置冰盒中备用。

(2) 蛋白定量

1) 在 96 孔板内按照顺序加入 2 μ L 蛋白液, 18 μ L ddH₂O 补足至 20 μ L。根据 BCA 蛋白定量试剂盒说明书制备所需的反应液, 在 1.5mL EP 管中, 将 A 液与 B 液按 50:1 比例混匀, 以 200 μ L/孔加入 96 板中；

2) 将试剂盒内牛血清蛋白标准品（浓度为 2mg/mL），参照下表（表 1）稀释 10 倍；

表 1 牛血清蛋白配比法

试剂名称	体积 (μ L)						
蛋白质标准品	0	1	2	4	8	16	20
ddH ₂ O	20	19	18	16	12	4	0
BCA 工作液	200	200	200	200	200	200	200
蛋白浓度 (μ g/ μ L)	0	0.1	0.2	0.4	0.8	1.6	2

3) 轻轻摇晃混匀后于 37 $^{\circ}$ C 烘箱放置 30min, 在多功能微孔板检测仪上检测 562nm 波长处的吸光度值；

4) 以蛋白浓度 (μ g/ μ L) 为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制蛋白标准曲线, 按照标准品浓度与对应吸光度计算出拟合标准曲线的公式。将样本吸光度值带入公式, 乘以稀释倍数 10, 计算样本浓度, 以相同蛋白质量计算出个蛋白上样量；

(3) 蛋白变性

标记 1.5 mL EP 管, 将样本与 6 $\times$ SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液按照 5:1 的比例混合, 100 $^{\circ}$ C 金属浴加热变性 10min。样本 -20 $^{\circ}$ C 或 -80 $^{\circ}$ C 可放置 1-2 周, 或在 4 $^{\circ}$ C 短时间存放, 避免反复冻融；

(4) SDS-PAGE 电泳

1) 先轻轻擦拭 1.5mm 玻璃板（玻璃板边缘需无损坏, 磨砂面完整），去除板上杂质（杂蛋白），用蒸馏水冲洗晾干备用；

2) 灌胶与上样：

- a.将洁净无水的两片玻璃板对齐，形成空腔，插入塑料凹槽中，磨砂玻璃板箭头向上，确保下端齐平，置于制胶架上夹紧，下端紧贴密封胶条；
- b.按下表（表2）配制分离胶，充分混匀后灌入玻璃板中，再用无水乙醇压平胶面；

表2 分离胶配制法（20 mL）

试剂名称	体积（mL）
蒸馏水	7.9
30%Acr-Bis（29:1）	6.7
Tris-HCl pH 8.8	5.0
10%SDS	0.2
10%AP（过硫酸铵）	0.2
TEMED	0.008

- c.静置30-40min后观察胶面变化，当看到水与凝固的胶面有清晰的折光界限时，表明胶已完全凝固，倒掉无水乙醇，倒扣晾干；
- d.按下表（表3）配制浓缩胶，充分混匀后灌胶；

表3 浓缩胶配制法（15 mL）

试剂名称	体积（mL）
蒸馏水	10.2
30%Acr-Bis(29:1)	2.55
Tris-HCl pH 6.8	1.95
10%SDS	0.15
10%AP(过硫酸铵)	0.15
TEMED	0.015

- e.将梳子插入浓缩胶中（可预先沾湿梳子），插入时要保持水平，小心避免气泡的出现，同时小心分离胶飞溅。静置40min-1h待胶完全凝固后，轻轻将梳子拔出（若不立即使用凝胶，可不拔出梳子，将胶放至水中，于4℃冰箱可保存一周）；

- f.将玻璃板安装到垂直电泳槽上，玻璃板低的一面朝向槽内侧，卡住胶条，防止漏液。若只有一块玻璃板则另一面装上配套的塑料板。加入新鲜配制的电泳液*，使缓冲液没过凝胶。根据计算出的所需加入的样本体积进行上样；

*配制1L电泳液：Tris 3.03g、甘氨酸18.8g、SDS 1g，用dH₂O定容至1L；

- g.电泳：按照目的蛋白的大小调整电泳的电压和时间，为避免蛋白条带弥散，上样后应尽快电泳。开始时80V，等出现若干条时Marker（蛋白条带开始进入分离胶）时，将电压提升到120V继续电泳，待蛋白Loading提示样本已至SDS-PAGE胶最底部，停止电泳；

（5）转膜（湿转）

- 1)在电泳时即可开始准备下一步操作：转膜液配制：Tris 6.06g、甘氨酸28.8g、甲醇400mL，加dH₂O定容至2L，充分混匀。剪合适大小的NC膜，并在膜左上角做好对应蛋白标记。准备一个容器，倒入转膜液，将NC膜、滤纸、转膜三明治海绵垫泡于转膜液中预平衡；

- 2)取胶：取出凝胶，根据蛋白标记位置切胶；

- 3)转膜：按顺序安装转膜三明治：阳极面（白色）朝上，阴极面（黑色）朝下，然后依次由下往上放入两层海绵垫、两层滤纸、凝胶、NC膜、两层滤纸和一层海绵垫，各层之间不可留有气泡，夹紧架子，将转膜三明治放入转膜槽中。将转膜电泳槽置于冰水（准备若

干冰袋)中,恒流电200mA,转膜1h。一般1KD的蛋白转膜1min,不同蛋白的要求不同,时间过长蛋白容易穿膜到达滤纸层,时间不足则蛋白转移不彻底,影响后续实验;

(6) 封闭及杂交

1) 封闭:转膜完成后,将膜用镊子小心取出,浸没于5%脱脂奶粉(2.5g脱脂奶粉加入50mL PBST中, PBST为含1%吐温的PBS溶液)封闭液中,在摇床上室温封闭2h;

2) 结合一抗:根据抗体使用说明书调整一抗浓度,一般为1:1000,根据膜的大小调整一抗稀释液(封闭液)的使用量,一般3个孔的蛋白需要200 μ L稀释液,使一抗均匀覆盖在膜上,室温下孵育1h;本部分实验使用的抗体包括:抗O-GlcNAc抗体、抗MST抗体、抗LATS抗体、抗SAV抗体、抗MOB抗体、抗YAP抗体、抗AMOT抗体、抗GAPDH抗体;

3) 洗涤:用PBST洗去膜上残余一抗,在摇床上洗涤三次,每次5min;

4) 结合二抗:根据一抗来源选择二抗,一般为抗兔、抗鼠二抗,按1:2000稀释,并选择HRP标记的抗体,室温下孵育1h或4 $^{\circ}$ C过夜;

5) 洗涤:用PBST洗去膜上残余二抗,在摇床上洗涤三次,每次5min;

(7) 化学发光法检测

1) 试剂准备:

a.显影液配制:在5L的大烧杯中加入约3L预热的蒸馏水,加入显影剂A,迅速搅拌,待充分溶解后加入显影剂B,两者均完全溶解后定容至3785mL,过滤备用,宜避光保存;

b.定影液配制:另准备5L的大烧杯,加入2L预热的蒸馏水,加入定影剂A,完全溶解后加入定影剂B和定影剂C,定容至3785mL(1加仑)。待冷却后,过滤备用。20-25 $^{\circ}$ C室温保存,显影液一个月有效期内,定影液两个月有效期内;

2) 发光:在暗盒中贴上透明塑料薄膜,将NC膜贴在薄膜上。按ECL发光试剂盒说明书将ECL显色A液和B液按1:1比例混匀,将混合溶液均匀滴加在膜上(量与抗体稀释液体积一致),静置5min,待二抗HRP酶与ECL试剂反应发光,吸去液体,用另外一层塑料薄膜密封,挤出薄膜间残留的发光液;

3) 曝光:于暗室中,X射线胶片5张同时放入胶片夹,等待5-10min,取出胶片完全浸没在显影液内,将胶片一张张分开浸洗,显影40s,接着在清水中充分浸洗,以便完全洗去显影液。随后浸没在定影液内,定影2min,取出后清水冲洗,以充分洗去各种残留溶液。晾干,扫描条带。以GAPDH为内参,分析不同样本之间蛋白表达差异。

2.2.4 O-GlcNAc 糖基化修饰位点酶标实验

(1) 将利用抗AMOT抗体通过免疫共沉淀方法获得的蛋白质,溶解于16 μ L反应液中,反应液中含20mM HEPES、pH7.9、50mM NaCl、1mM PuGNAc、5mM含蛋白酶和磷酸酶抑制剂的MnCl₂;

(2) 利用Click-iT™糖基化酶标系统把蛋白标记上含有叠氮基的乙酰半乳糖基团。这个反应步骤中,反应缓冲液中加入2 μ L Gal-T1Y289L和2 μ L UDP-GalNAz。最终20 μ L的反应液4 $^{\circ}$ C孵育过夜。标记之后,这些蛋白用Click-iT™蛋白分析系统按照说明书要求的操作进行与生物素-炔衍生物或TAMRA-炔衍生物的反应。最后,将这些蛋白溶解于蛋白上样缓冲液中,金属浴100 $^{\circ}$ C煮10min后进行WB;

(3) 生物素或TAMRA标记的样本通过HRP标记的链霉亲和素或抗TAMRA抗体进行检测。

2.2.5 质粒转化与抽提

(1) 质粒转化

1) 试剂准备:配制液体LB培养基,5mL/玻璃管(1%胰蛋白胨、1%氯化钠、0.5%酵母

提取物), 固体LB培养基, 25mL/培养皿 (2%琼脂粉、1%胰蛋白胨、1%氯化钠、0.5%酵母提取物)。液体LB培养基分装后高压; 固体LB培养基高压后加入氨苄青霉素, 分装入培养皿;

2) 转化: 取感受态大肠埃希菌DH5 α 于冰上融化, 1 μ L质粒 (AMOT-sh1、-sh2、pCMV-dR8.74、pMD2-VSVG) 加入25 μ L DH5 α 中, 冰敷30min; 预先打开42 $^{\circ}$ C水浴锅, 将EP管置于海绵管架中, 热休克1.5min, 冰上冷休克2min; 将180 μ L SOC培养基加入EP管中, 150r, 37 $^{\circ}$ C于恒温振荡器中摇菌45min-1h; 在预先配好的固体LB培养皿中倒3-5颗玻璃珠, 将转化后的菌液加入培养皿, 晃动珠子, 使液体平铺于皿底; 将培养皿正放于37 $^{\circ}$ C培养箱内30min, 再倒置培养过夜;

3) 细菌扩增: 次日将细菌生长的菌落置于4 $^{\circ}$ C冰箱中。将氨苄青霉素加入液体LB培养基试管中, 挑取菌落于培养基中, 180r, 37 $^{\circ}$ C于恒温振荡器中摇菌过夜 (注意氨苄青霉素的有效时间为14-16h);

(2) 质粒抽提

按照质粒小提试剂盒说明书抽提细菌质粒, 并使用NanoDrop2000检测质粒DNA浓度和纯度, A260/A280比值在1.8-2.0之间为符合要求。

2.2.6 慢病毒包装

(1) 铺板: 慢病毒转染前1天, 将HEK-293T细胞铺于六孔板中, 细胞密度90%以上。

(2) 第二天, 按下表 (表4) 配制A、B液

表4 A、B液配制方法

	试剂名称	六孔板 (每孔)
A 液	无血清无双抗 DMEM	320 μ L
	目标质粒	2 μ g
	pCMV-dR8.74	1.325 μ g
	pMD2-VSVG	0.6625 μ g
B 液	无血清无双抗 DMEM	320 μ L
	Lipofectamine-2000	10 μ L

A、B液各自在室温下孵育5min; 将AB液混合均匀, 在室温下孵育20min后以每孔640 μ L加入HEK-293T细胞中, 4-6h后用正常含血清和双抗的完全培养基替代转染培养基;

(3) 第三天, 转染24h、48h后用一次性针筒吸取HEK-293T细胞中含有病毒颗粒的培养基, 并用0.45 μ m细菌滤器过滤, 过滤后的病毒可立即使用, 或于-80 $^{\circ}$ C冻存数年;

(4) 感染靶细胞:

1) 需要感染的靶细胞 (Bel-7402、SMMC-7721) 按照要求在感染前一天铺于六孔板内, 细胞密度需达到80-90%;

2) 按体积加入1 $\times$ polybrene (每1mL病毒加入25 μ L polybrene), 混匀, 室温孵育5min后加入靶细胞, 加入新鲜完全培养基1mL;

4) 感染24h后, 用含有嘌呤霉素的培养基替代感染培养基, 根据细胞对嘌呤霉素的敏感性筛选1-3天。需要铺一孔没做过处理的Bel-7402、SMMC-7721, 加入嘌呤霉素, 若这个孔里的细胞死了, 而包病毒的细胞仍有存活, 说明慢病毒包装成功。

2.2.7 免疫荧光实验

(1) 准备细胞爬片

将Nest 801007细胞爬片在75%的酒精中洗涤去除细菌, 用PBS洗涤2次去除残留的酒精,

放于事先加入适当培养基的24孔细胞培养皿中,将细胞悬液垂直滴于细胞爬片上,过夜生长。样本准备2份,细胞悬液中细胞不宜过多,否则看不到单个细胞。

(2) 取出细胞爬片,用PBS浸洗3次,每次3min;用4%的多聚甲醛固定爬片15min, PBS浸洗玻片3次,每次3min;用含有0.2%Triton X-100和1% BSA的PBS作为透膜封闭液,室温通透和封闭1h;吸干封闭液,再清洗3次,用透膜封闭液按照1:100的比例稀释一抗,稀释好的一抗滴加在玻片上然后放入湿盒,4℃孵育1h;本部分实验所用一抗分别为:抗AMOT抗体和抗YAP抗体。

(3) PBS浸洗爬片3次,每次3min,用吸水纸吸干爬片上多余的液体后滴加稀释好的荧光二抗(1: 500稀释),在湿盒中室温避光孵育1h, PBS再次浸洗3次,每次5min。用含DAPI的封片剂封片,然后用透明指甲油固定玻片,防止封片液过多导致玻片移动,最后在激光共聚焦显微镜下观察细胞染色情况。

第三章 结果

3.1 AMOT 在肝癌细胞中发生 O-GlcNAc 糖基化修饰

3.1.1 AMOT 存在 O-GlcNAc 修饰位点

为研究Hippo信号传导和O-GlcNAc糖基化修饰之间的关系,在Bel-7402和SMMC-7721肝癌细胞系中使用抗O-GlcNAc抗体进行了免疫共沉淀实验。内源性存在O-GlcNAc修饰位点的蛋白通过抗O-GlcNAc抗体免疫沉淀下来,与之存在直接或间接结合的蛋白同时被沉淀下来,利用Hippo信号通路核心因子抗体:抗MST抗体、抗LATS抗体、抗SAV抗体、抗MOB抗体、抗YAP抗体和抗AMOT抗体检测该核心因子是否存在O-GlcNAc修饰位点。如图1.1所示,除YAP外,在免疫共沉淀产物中检测到AMOT,而没有检测到MST, LATS, SAV和MOB等其他Hippo信号核心因子。表明Hippo信号通路核心因子YAP和AMOT同时出现在糖基化蛋白复合物中,提示二者可能有直接或间接结合,并可能存在糖基化修饰。

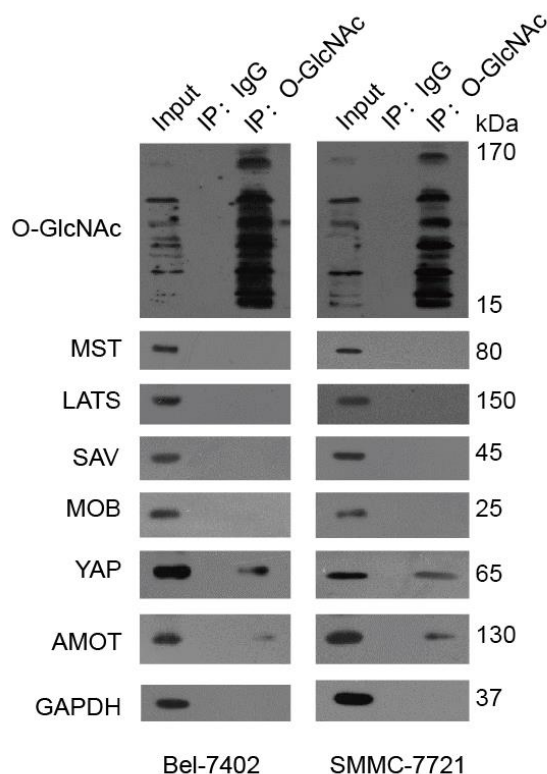


图1.1 Hippo信号通路核心因子YAP和AMOT可能存在O-GlcNAc修饰位点

3.1.2 酶标记实验发现 AMOT 发生 O-GlcNAc 糖基化修饰

O-GlcNAc 的酶标记实验原理为: UDP-叠氮基半乳糖底物(UDP-GalNAz)可通过[3+2]叠氮化物-炔环加成的化学反应来标记 O-GlcNAc 糖基化修饰的蛋白质。在 β -1,4-半乳糖转移酶(Y289L GalT)的作用下,UDP-GalNAz 中的半乳糖可转移到 O-GlcNAc 的 4 位羟基上,而 UDP-GalNAz 中的叠氮基可与生物素-炔衍生物或四甲基-6-羧基罗丹明(TAMRA)-炔衍

生物中的炔基通过加成反应相结合^[26]，后续可通过 HRP 标记的链霉亲和素和抗 TAMRA 抗体来检测生物素和 TAMRA，以此检测目的蛋白是否发生 O-GlcNAc 糖基化修饰。实验中先在 Bel-7402 和 SMMC-7721 肝癌细胞系中利用抗 AMOT 抗体通过免疫沉淀实验将 AMOT 蛋白沉淀下来，再利用 Click-iT™ O-GlcNAc 糖基化的酶标记试剂盒检测 AMOT 是否发生 O-GlcNAc 糖基化修饰。如图 1.2 所示，WB 实验结果显示 HRP 标记的链霉亲和素和抗 TAMRA 抗体有明显条带，表明 AMOT 确实发生了 O-GlcNAc 糖基化修饰。

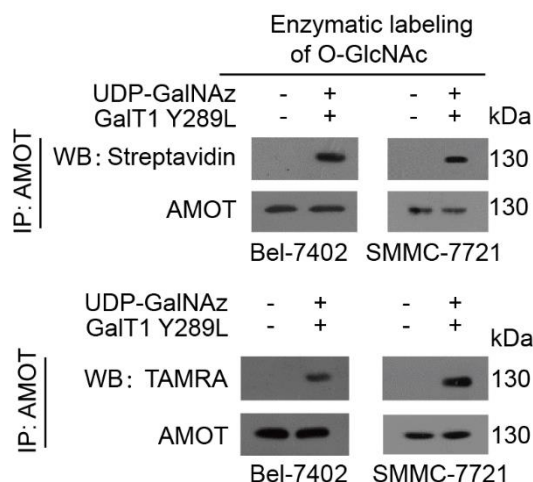


图 1.2 酶标记实验显示 AMOT 发生 O-GlcNAc 糖基化修饰

3.1.3 AMOT 与 OGT 存在结合

OGT 是唯一刺激 O-GlcNAc 糖基化的内源性酶，在 Bel-7402 和 SMMC-7721 肝癌细胞株中利用抗 AMOT 抗体通过免疫沉淀实验，将 AMOT 及与其相互结合的蛋白共同沉淀下来，再利用抗 OGT 抗体和抗 O-GlcNAc 抗体，通过 WB 检测其与 AMOT 的结合情况。如图 1.3 所示，免疫沉淀产物中存在 OGT，表明其与 AMOT 存在结合关系，同时 IP 实验结果表明免疫沉淀复合物中存在 O-GlcNAc 修饰的 O-GlcNAc 糖基化蛋白。

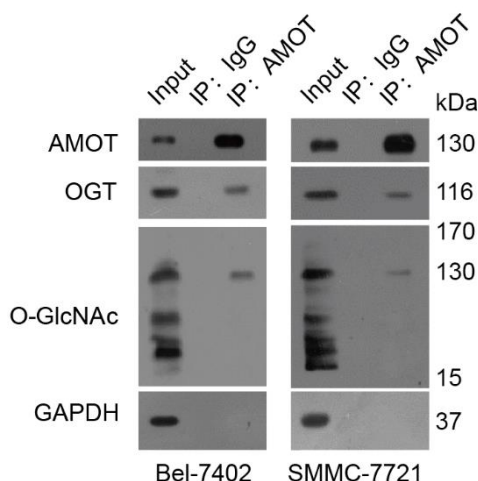


图 1.3 AMOT 与 OGT 之间存在结合

3.2 HG 可增强 AMOT 的 O-GlcNAc 糖基化修饰水平

HG 是肝脏肿瘤发生的重要刺激因子之一^[11, 15, 27], 其与 AMOT 发生 O-GlcNAc 糖基化修饰之间的联系尚不清楚。

将 Bel-7402 和 SMMC-7721 细胞在含有所示浓度葡萄糖的培养基中培养 24h。然后通过 WB 检测 AMOT 蛋白表达水平和磷酸化水平, 其中所用的抗-p-AMOT 抗体 (EMD Millipore, #ABS1045) 是特异针对 AMOT Ser175 磷酸化位点的抗体。结果发现与正常葡萄糖水平 (5.5 mM) 相比, 增加葡萄糖水平 (15-50 mM) 可导致剂量依赖性 AMOT 蛋白水平升高, 而降低 AMOT Ser175 的磷酸化水平 (如图 2A 所示), 即 HG 诱导 AMOT 蛋白表达, 同时降低 AMOT Ser175 的磷酸化修饰水平。

PuGNAc 是 O-GlcNAc 去修饰的糖苷酶 OGA 的抑制剂, GlcNAc 是 O-GlcNAc 糖基化修饰中的底物, 用含或不含 GlcNAc (4mM) 的 PuGNAc (25mM) 处理 Bel-7402 和 SMMC-7721 细胞 24h 后, 通过 WB 测量 AMOT 表达水平和磷酸化水平。结果显示 AMOT 蛋白表达水平升高, 而其 Ser175 磷酸化水平下降 (如图 2B 所示), 即 PuGNAc 和 GlcNAc 诱导 AMOT 蛋白表达, 同时降低 AMOT Ser175 的磷酸化修饰水平。

将 Bel-7402 和 SMMC-7721 细胞在含有所示浓度的葡萄糖的培养基中培养 24h。内源性 AMOT 通过抗 AMOT 抗体免疫沉淀下来。将每个免疫沉淀产物中的 AMOT 水平调整到相同的含量, 通过 WB 使用抗 O-GlcNAc 抗体检测 O-GlcNAc 糖基化修饰的 AMOT, 结果显示通过增加葡萄糖浓度 (如图 2C 所示) 和用 PuGNAc 处理 (或额外增加 GlcNAc) (如图 2D 所示), 可以增强 AMOT 的 O-GlcNAc 糖基化修饰水平。

这些实验结果均表明, AMOT 的表达和 O-GlcNAc 糖基化水平均受 HG 正调控。

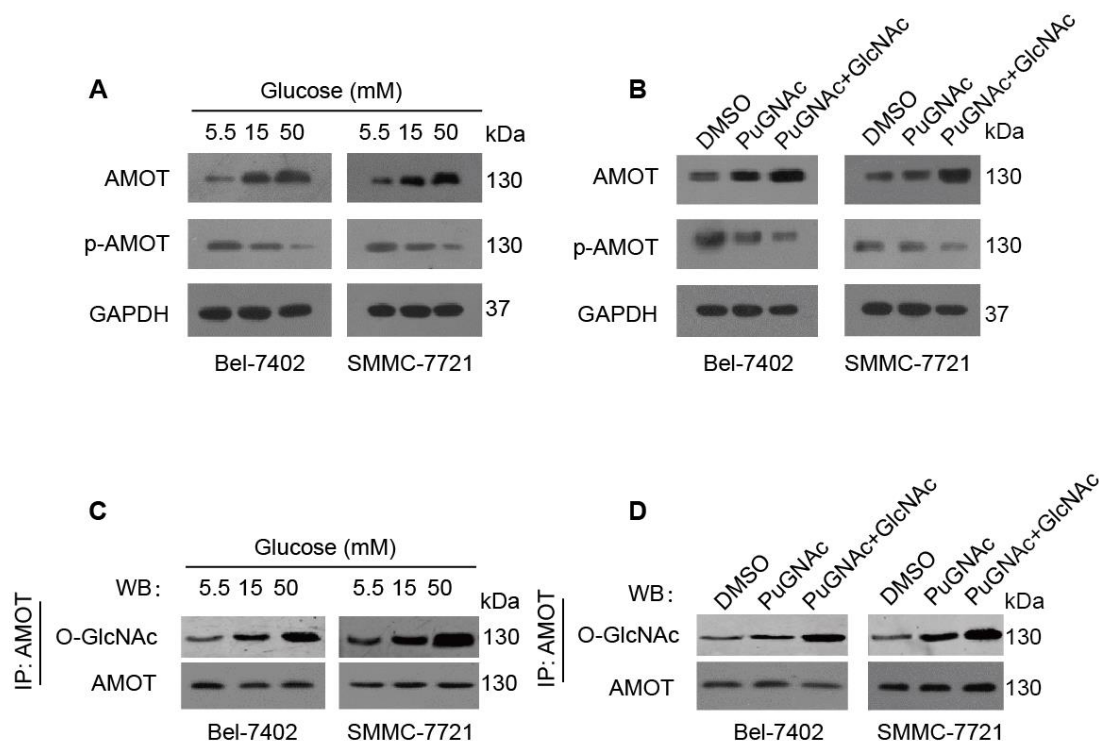


图 2 HG 正向调控 AMOT 蛋白表达水平及其 O-GlcNAc 糖基化修饰水平

3.3 HG 通过 AMOT 调节 YAP 细胞亚定位

据研究报道 YAP 主要在细胞核中发挥其致癌作用^[28]。为了确定 HG 和 AMOT 在 YAP 的亚细胞定位中的作用，实验引入了两个独立的靶向 AMOT 的小发卡 shRNA，以不会干扰细胞内源性基因的 GFP-shRNA 序列作为阴性对照，如图 3A 所示，将 AMOT-sh1、-sh2 以稳定转染方式感染细胞，敲减 Bel-7402 和 SMMC-7721 细胞中 AMOT 的表达水平。然后用正常浓度（5.5mM）或高浓度（15mM）的葡萄糖处理细胞 24h。通过免疫荧光实验利用激光共聚焦显微镜观察发现在正常浓度（5.5 mM）葡萄糖水平下，YAP 和 AMOT 定位于细胞质和细胞核中，而 AMOT 的敲低促进了 YAP 易位至细胞核。另一方面，在高浓度（15mM）葡萄糖水平下，YAP 和 AMOT 均浓缩在细胞核中，而当 AMOT 被敲除时，YAP 的细胞质定位增强（如图 3B 所示，比例尺为 20 μm ）。这些结果表明 HG 以 AMOT 依赖的方式刺激 YAP 核聚集。

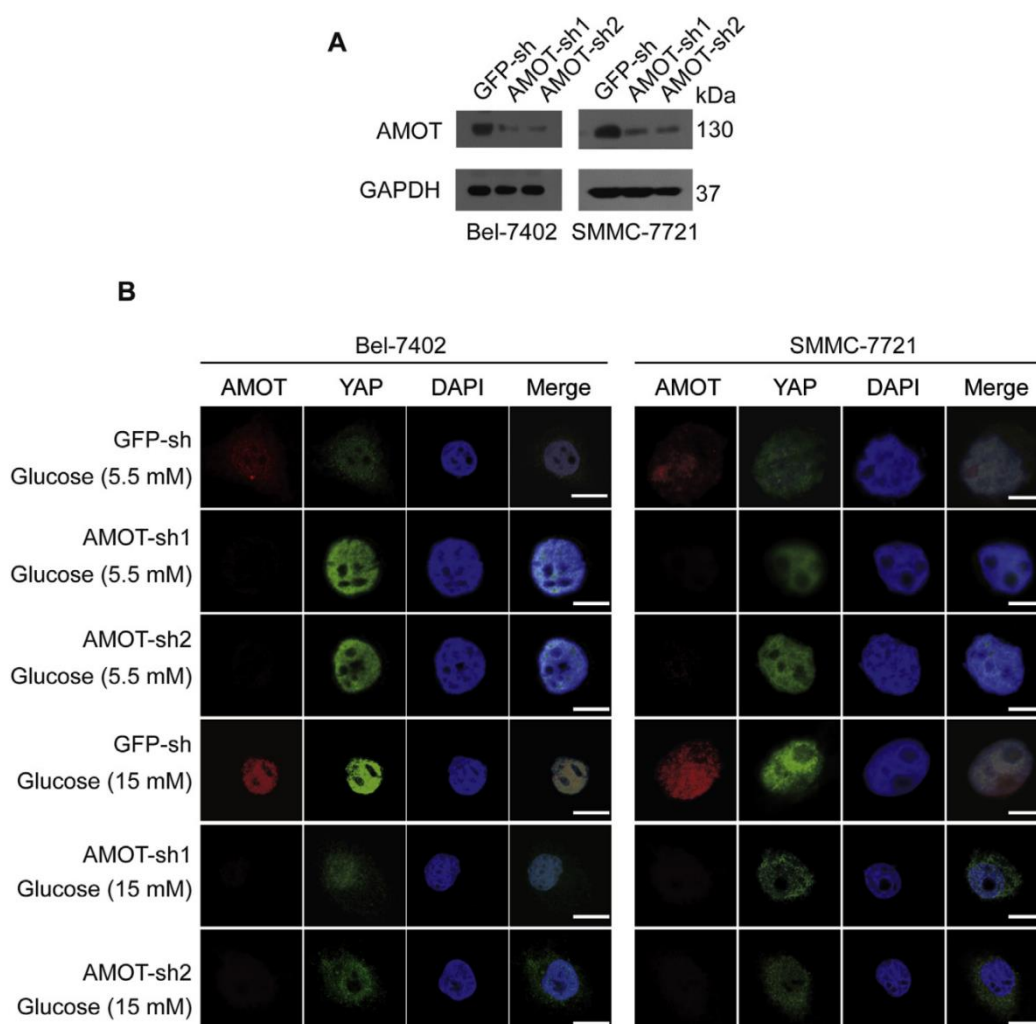


图3 HG通过AMOT促进YAP核聚集

第四章 讨论

本研究通过多个方面实验表明 AMOT 在肝癌细胞中发生 O-GlcNAc 糖基化修饰, 其修饰水平受 HG 正向调控, 在高浓度葡萄糖水平下, 其 O-GlcNAc 糖基化修饰水平升高, 而在低浓度葡萄糖水平下相反。同时发现 HG 可通过 AMOT 促进 YAP 核聚集, 高浓度葡萄糖水平下 AMOT 的敲减导致 YAP 在细胞质中滞留, 即 AMOT 促进 YAP 的致癌作用。

之前的研究表明 YAP 在 Thr 241 处发生 O-GlcNAc 糖基化修饰, 对于肝脏肿瘤发生发展至关重要^[15]。Guan 研究显示 Hippo 肿瘤抑制信号通路通过 YAP 磷酸化诱导 YAP 的细胞质滞留和降解, 而 AMOT 家族蛋白可通过减少 YAP 紧密连接位点, 减弱 YAP 的磷酸化修饰, 抑制 YAP 的核聚集和其靶基因的表达, 敲减 AMOT 家族蛋白 AMOTL2 导致 YAP 激活, TAZ 也以类似的方式受 AMOT 调控, 这揭示了 AMOT 是 Hippo 通路中的另一个核心因子^[22], 在本研究中免疫共沉淀、WB、酶标记实验均显示在肝癌中 AMOT 可发生 O-GlcNAc 糖基化修饰, 且该种修饰与 AMOT Ser175 的磷酸化修饰竞争相同或相近的修饰位点, 相互拮抗。新的研究证据表明, O-GlcNAc 糖基化水平在肝癌中显著上调, 组蛋白脱乙酰基酶-1 (HDAC1) 发生 O-GlcNAc 糖基化修饰后可显著促进肝癌细胞增殖侵袭, 而其 O-GlcNAc 糖基化修饰位点突变后, 可显著抑制肝癌发生发展^[29]。OGT 作为唯一的 O-GlcNAc 糖基转移酶, 是 O-GlcNAc 糖基化修饰发生中最重要的关键酶, 其在肿瘤中表达水平也显著上升, 有报道称通过转录组测序在非酒精性脂肪肝病相关的肝细胞癌组织中发现 OGT 表达水平显著上调, 并促进肿瘤生长和转移, 可视为原癌基因^[30]。研究同时表明 O-GlcNAc 糖基化修饰是肝脏肿瘤发生发展的重要刺激因子之一^[15, 29, 30]。本研究中, 免疫共沉淀实验表明 AMOT 与 OGT 之间存在结合; O-GlcNAc 糖基化酶标记检测由于是在体外对 O-GlcNAc 进一步修饰, 并不涉及到细胞识别的倾向性问题, 因此更利于衡量修饰的变化程度, 酶标记实验结果显示 AMOT 发生了 O-GlcNAc 糖基化修饰。这些实验均进一步提示 O-GlcNAc 可能通过修饰 Hippo 信号通路中的核心因子 AMOT 发挥其致癌作用。

AMOT 是一种致癌基因还是一种抑癌基因仍存在争议。先前的研究报道了相互矛盾的结果, AMOT 在不同的研究中表现出对 YAP 刺激或抑制的双重作用, 并且 AMOT 过表达刺激不同肿瘤中 YAP 的细胞核内聚集与细胞质滞留^[22, 24], 而在肝癌中 AMOT-p130 通过增强 YAP 的活性起癌基因的作用^[24]。本研究结果显示高葡萄糖水平可上调 AMOT 蛋白表达, 促进 YAP 核聚集, 是 YAP 的激活剂; 在正常血糖水平下敲减 AMOT 可促进 YAP 核聚集, 这表明正常血糖水平下 AMOT 是 YAP 的抑制剂。因此, AMOT 是以葡萄糖水平依赖的方式对 YAP 行使调节作用的。

此外, 一项研究提到, AMOT 在丝氨酸 Ser 175 处的磷酸化修饰使得由 AMOT、YAP 和 Merlin 组成的复合物转移到细胞膜上, 与紧密连接蛋白 Pals1/PATJ 和 E-钙粘蛋白相关联。相反地, 低磷酸化修饰的 AMOT 将复合物转移到细胞核中, 促进 YAP 和 TEAD 的缔合, 诱导 YAP 靶基因的转录激活并促进 YAP 依赖性细胞增殖^[31]。有趣的是, 在本研究中, AMOT 的磷酸化在高葡萄糖水平时受到抑制, O-GlcNAc 糖基化水平升高, 促进 AMOT 和 YAP 转移到细胞核中以行使肿瘤促进功能。因此, AMOT 的磷酸化水平与 O-GlcNAc 糖基化水平成相反变化趋势, 且与 YAP 和 AMOT 的亚细胞定位密切相关。

O-GlcNAc 糖基化和磷酸化往往竞争相同或附近的位点, O-GlcNAc 糖基化在某种程度上类似于磷酸化: 在蛋白质的丝氨酸和/或苏氨酸侧链上发生修饰, 并随细胞活性变化发生修饰/去修饰循环。O-GlcNAc 糖基化和磷酸化显示出复杂的相互作用: 它们可竞争地占据同一底物上的单个位点或邻近位点, 或者非竞争性地占据底物上的不同位点。磷酸化调节 O-GlcNAc 糖基化过程中的酶, 而 O-GlcNAc 糖基化控制磷酸化相关酶^[32]。AMOT Ser175 是一个关键的磷酸化位点, 这种磷酸化通过改变 YAP 亚细胞定位来抑制 YAP 促进细胞增殖和肿瘤发生的能力^[31]。本研究观察到 O-GlcNAc 糖基化修饰的刺激剂(HG, PuGNAc 和 GlcNAc)

能够抑制 AMOT Ser175 的磷酸化。因此,我们认为 AMOT 中的 O-GlcNAc 糖基化修饰位点可能正好位于 Ser175 或其附近的位点,使得该位点的磷酸化水平下降,进一步促进 YAP 核聚集而激活 YAP 靶基因转录,促进肝癌发生发展。不过,O-GlcNAc 糖基化修饰的具体位点还需使用质谱和点突变质粒来进行确认。

综上所述,本研究通过免疫沉淀及酶标记实验证明 Hippo 信号通路的核心因子 AMOT 发生了 O-GlcNAc 糖基化修饰,而该糖基化修饰是与 AMOT 的磷酸化修饰相互竞争的,且受 HG、PuGNac 和 GlcNAc 的调节,提高葡萄糖浓度、加入 O-GlcNAc 糖基化促进剂 PuGNac 和 GlcNAc 后可显著提高糖基化修饰水平而降低磷酸化修饰水平。同时,通过免疫荧光实验表明,HG 可通过 AMOT 促进 YAP 核聚集而行使其下一步的促癌功能,不过该部分尚缺少相应的 AMOT 介导 YAP 促癌的功能试验,只能从理论上说明在肝癌中 AMOT 起癌基因的作用。

本实验表观阐明了在肝癌细胞中,AMOT 发生了 O-GlcNAc 糖基化修饰,高葡萄糖浓度下促进该修饰而抑制其 Ser175 磷酸化修饰,揭示了 AMOT 对高血糖浓度下 YAP 的刺激作用。因此,阻断 YAP 和 AMOT 之间的相互作用可能有助于开发与糖尿病相关的肝癌的治疗策略。而 AMOT 与 YAP 之间相互作用的具体机制仍有待深入研究。

第五章 结论

本研究通过免疫沉淀及 O-GlcNAc 酶标记实验证明 Hippo 信号通路的核心因子 AMOT 发生了 O-GlcNAc 糖基化修饰, 而该糖基化修饰是与 AMOT 的 Ser175 磷酸化修饰相互竞争的, 且受 HG、PuGNAc 和 GlcNAc 的调节, 提高葡萄糖浓度、加入 O-GlcNAc 糖基化促进剂 PuGNAc 和 GlcNAc 后可显著提高糖基化修饰水平而降低磷酸化修饰水平。同时, 通过免疫荧光实验表明, HG 可通过 AMOT 促进 YAP 核聚集而行使其下一步的促癌功能, 高浓度葡萄糖水平下 AMOT 的敲减导致 YAP 在细胞质中滞留, 即 AMOT 促进 YAP 的致癌作用。

综上所述, HG 上调 AMOT 的 O-GlcNAc 糖基化修饰水平而下调其 Ser175 磷酸化修饰水平, 进而改变 YAP 亚细胞定位, 促进 YAP 核聚集以增强 YAP 促进细胞增殖和肿瘤发生的能力。

本研究还存在如下不足: 未能深入探究 HG 促 AMOT 发生 O-GlcNAc 糖基化修饰后肝癌细胞在细胞增殖、侵袭转移、克隆形成、肿瘤转化表型等方面功能的改变, 只通过 YAP 的核聚集间接说明 AMOT 的致癌作用; 未进一步研究 YAP 及 YAP 依赖的转录因子与 AMOT 之间的相互作用机制。这也将成为今后重要的研究方向。

参考文献

- [1]C. Are, B. Meyer, A. Stack, H. Ahmad, L. Smith, B. Qian, T. Song and S. Chowdhury.Global trends in the burden of liver cancer.Journal Of Surgical Oncology.2017;115:591–602
- [2]Y. Zhang, J.-S. Ren, J.-F. Shi, NiLi, Y.-T. Wang, C. Qu, Y. Zhang and M. Dai.International trends in primary liver cancer incidence from 1973 to 2007.BMC Cancer.2015;15:94
- [3]M. Kudo.Surveillance, Diagnosis, Treatment, and Outcome of Liver Cancer in Japan.Liver Cancer.2015;4:39–50
- [4]B. Mukherjeea, S. Bhattacharya, S. Chakraborty, B. S. Satapathy, N. S. Dey and T. K. Shaw.Is Type 2 Diabetes Mellitus a Predisposal Cause for Developing Hepatocellular Carcinoma?Current Diabetes Reviews.2015;11(2):64-70
- [5]T. Y. Ryu, J. Park and P. E. Scherer.Hyperglycemia as a risk factor for cancer progression.DIABETES & METABOLISM JOURNAL.2014;38(5):330-336
- [6]K. Vaidyanathan, S. Durning and L. Wells.Functional O-GlcNAc modifications: implications in molecular regulation and pathophysiology.Critical reviews in biochemistry and molecular biology.2014;49(2):140–163
- [7]P. T. Radermacher, F. Myachina, F. Bosshardt, R. Pandey, D. Mariappa, H.-A. J. Müller and C. F. Lehner.O-GlcNAc reports ambient temperature and confers heat resistance on ectotherm development.PNAS.2014;111(15):5592–5597
- [8]J. A. Groves, A. Lee, G. Yildirim and N. E. Zachara.Dynamic O-GlcNAcylation and its roles in the cellular stress response and homeostasis.Cell Stress and Chaperones.2013;18:535–558
- [9]Y. Fardini, V. Dehennaut, T. Lefebvre and T. Issad.O-GlcNAcylation: a new cancer hallmark?Front Endocrinol (Lausanne).2013;4:99
- [10]F. I. Comer and G. W. Hart.O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins dynamic interplay between O-GlcNAc and O-phosphate.The Journal Of Biological Chemistry.2000;275(38):29179–29182
- [11]Y. Qiao, X. Zhang, Y. Zhang, Y. Wang, Y. Xu, X. Liu, F. Sun and J. Wang.High Glucose Stimulates Tumorigenesis in Hepatocellular Carcinoma Cells Through AGER-Dependent O-GlcNAcylation of c-Jun.Diabetes.2016;65:619–632
- [12]H. M. Itkonen, S. Minner, I. J. Guldvik, M. J. Sandmann, M. C. Tsourlakis, V. Berge, A. Svindland, T. Schlomm and I. G. Mills.O-GlcNAc transferase integrates metabolic pathways to regulate the stability of c-MYC in human prostate cancer cells.Tumor and Stem Cell Biology.2013;73(16):5277–5287
- [13]W. H. Yang, S. Y. Park, H. W. Nam, D. H. Kim, J. G. Kang, E. S. Kang, Y. S. Kim, H. C. Lee, K. S. Kim and J. W. Cho.NFκB activation is associated with its O-GlcNAcylation state under hyperglycemic conditions.PNAS.2008;105(45):17345–17350
- [14]K. Kawauchi, K. Araki, K. Tobiume and N. Tanaka.Loss of p53 enhances catalytic activity of IKKβ through O-linked β-N-acetyl glucosamine modification.PNAS.2008;106(9):3431–3436
- [15]X. Zhang, Y. Qiao, Q. Wu, Y. Chen, S. Zou, X. Liu, G. Zhu, Y. Zhao, Y. Chen, Y. Yu, Q. Pan, J. Wang and F. Sun.The essential role of YAP O-GlcNAcylation in high-glucose-stimulated liver tumorigenesis.Nature Communications.2017;8:15280

- [16]B. Troyanovsky, T. Levchenko, G. Månsson, O. Matvienko and L. Holmgren. Angiomotin: an angiostatin binding protein that regulates endothelial cell migration and tube formation. *The Journal of Cell Biology*. 2001;152(6):1247–1254
- [17]A. Bratt, O. Birot, I. Sinha, N. V. ki, K. Aase, M. Ernkvist and L. Holmgren. Angiomotin regulates endothelial cell-cell junctions and cell motility. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. 2005;280(41):34859–34869
- [18]X. Dai, P. She and F. Chi. Phosphorylation of angiomotin by Lats1/2 kinases inhibits F-actin binding, cell migration and angiogenesis. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. 2013;288(47):34041–34051
- [19]M. Lv, Y. Shen, J. Yang and S. Li. Angiomotin Family Members: Oncogenes or Tumor Suppressors? *International Journal of Biological Sciences*. 2017;13(6):772–781
- [20]B. Zhao. The Hippo pathway in organ size control, tissue regeneration and stem cell self-renewal. *Nature cell biology*. 2011;13(8):877–883
- [21]W. Kim, S. K. Khan, Y. Liu, R. Xu, O. Park, Y. He, B. Cha, B. Gao and Y. Yang. Hepatic Hippo signaling inhibits protumoural microenvironment to suppress hepatocellular carcinoma. *Gut*. 2017;0:1–12
- [22]B. Zhao, L. Li, Q. Lu, L. H. Wang, C.-Y. Liu, Q. Lei and K.-L. Guan. Angiomotin is a novel Hippo pathway component that inhibits YAP oncoprotein. *GENES & DEVELOPMENT*. 2010;25:51–63
- [23]S. W. Chan, C. J. Lim, Y. F. Chong, A. V. Pobbati, C. Huang and W. Hong. Hippo pathway-independent restriction of TAZ and YAP by angiomotin. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 2011;286(9):7018–7026
- [24]C. Yi, Z. Shen, A. Stemmer-Rachamimov, N. Dawany, S. Troutman, L. C. Showe, Q. Liu, A. Shimono, M. Sudol, L. Holmgren, B. Z. Stanger and J. L. Kissil. The p130 isoform of angiomotin is required for Yap-mediated hepatic epithelial cell proliferation and tumorigenesis. *Sci Signal*. 2014;6(291):ra77
- [25]M. Lv, S. Li, F. Wang, X. Wang, C. Luo, J. Yang, X. Zhang, P. Liu, Y. Shen and J. Yang. Angiomotin promotes renal epithelial and carcinoma cell proliferation by retaining the nuclear YAP. *Oncotarget*. 2016;7(11):12393–12403
- [26]P. M. Clark, J. F. Dweck, D. E. Mason, C. R. Hart, S. B. Buck, E. C. Peters, B. J. Agnew and L. C. Hsieh-Wilson. Direct In-Gel Fluorescence Detection and Cellular Imaging of O-GlcNAc-Modified Proteins. *Journal Of The American Chemical Society*. 2008;130(35):11576–11577
- [27]B. Yao, Y. Xu, Jiayi Wang, Y. Zhao, G. Zhu, F. Sun, Z. Li and H. Yuan. Reciprocal regulation between O-GlcNAcylation and tribbles pseudokinase 2 (TRIB2) maintains transformative phenotypes in liver cancer cells. *Cellular Signalling*. 2016;28:1703–1712
- [28]Peng-DaGuo, Xing-XingLu, Wen-JuanGan, X.-M. Li, Xiao-ShunHe, ShenZhang, Q.-H. Ji, F. Zhou, Y. Cao, Jing-RuWang, J.-M. Li and HuaWu. RAR γ Downregulation Contributes to Colorectal Tumorigenesis and Metastasis by Derepressing the Hippo–Yap Pathway. *Cancer Research* 2016;76:3813–3825
- [29]G. Zhu, T. Tao, D. Zhang, X. Liu, H. Qiu, L. Han, Z. Xu, Y. Xiao, C. Cheng and A. Shen. O-GlcNAcylation of histone deacetylases 1 in hepatocellular carcinoma promotes cancer progression. *Glycobiology*. 2016;26(8):820–833

- [30]W. Xu, X. Zhang, J.-l. Wu, LiFu, K. Liu, D. Liu, G. G. Chen, P. B.-s. Lai, N. Wong and J. Yu.O-GlcNAc transferase promotes fatty liver-associated liver cancer through inducing palmitic acid and activating endoplasmic reticulum stress.Journal of Hepatology.2017;67:310–320
- [31]S. Moleirinho, S. Hoxha, V. Mandati, G. Curtale, S. Troutman, U. Ehmer and J. L. Kissil.Regulation of localization and function of the transcriptional co-activator YAP by angiomin. eLife.2017;6:e23966
- [32]Q. Zeidan and G. W. Hart.The intersections between O-GlcNAcylation and phosphorylation: implications for multiple signaling pathways.Journal of Cell Science 2010;123(1):13-22

英汉缩略语表

英文缩写	英文全称	中文名称
AMOT	Angiomotin	血管生成抑制素结合蛋白
HBP	Hexosamine Biosynthetic Pathway	氨基己糖生物合成通路
GlcNAc	N-acetylglucosamine	N-乙酰葡萄糖胺
PuGNAc	O-amino-N-phenylcarbamate	O-氨基-N-苯氨基甲酸甲酯
OGT	O-GlcNAc Transferase	O-GlcNAc 糖基转移酶
UDP	Uridine 5'-diphosphate	二磷酸尿苷
HG	High Glucose	高葡萄糖
IP	Immunoprecipitation	免疫沉淀
YAP	Yes-associated Protein	YES 相关蛋白
IF	Immunofluorescence	免疫荧光
Ser	Serine	丝氨酸
HRP	Horseradish Peroxidase	辣根过氧化物酶
TAMRA	Tetramethylrhodamine	四甲基罗丹明
Gal-T1Y289L	Mutant β -1,4-galactosyltransferase	β -1,4-半乳糖基转移酶突变体
WB	Western Blot	蛋白免疫印迹
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate	十二烷基磺酸钠
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine	N,N,N',N'-四甲基乙二胺
PBS	Phosphate Buffer Solution	磷酸缓冲液
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane	三羟甲基氨基甲烷
BSA	Bovine Serum Albumin	牛血清白蛋白

致谢

时光荏苒，伴随毕业论文的完成，四年的大学生活圆满地落下帷幕。

在这论文完成之际，首先我要诚挚感谢本课题指导老师潘秋辉教授在这半年来对我的悉心指导，从毕业论文的选题、实验的规划设计与实施到论文撰写，每一步倾注了潘老师的大量心血。潘老师具有广博的专业知识，循循善诱的高尚师德，忙于检验科的日常事务，却仍不乏热情、一丝不苟、精益求精的科研精神，其严于律己、平易近人的人格魅力深深触动了我，不仅让我掌握了基本的研究方法，更领悟了许多为人处事的道理。我的另一位带教老师王佳谊老师对我的热忱指导与无私帮助，使我受益匪浅，每次遇到问题，王老师都会与我共同商讨解决，其对于科研的敏锐思考令我深深敬佩。这两位老师不仅支持我的研究学习，在思想、生活上也给予我无微不至的关怀，在此谨向他们致以崇高的敬意和真诚的谢意。

此外，我也要感谢这次毕业论文完成过程中为我提供诸多帮助的师兄师姐们，刚进实验室时的我实验操作不够规范熟练，是他们不厌其烦地指导我、纠正我，不仅让我尽快掌握各种实验技能，更让我对未来的科研工作充满信心。

还要感谢瑞金临床医学院检验系的各位老师在过去四年的学习生活中为我提供的帮助与支持。感谢在背后一直默默支持我的父母，正是他们的支持才能让我义无反顾地投入到喜爱的科学研究工作中。

最后我要感谢上海第十人民医院检验科给我提供的平台，感谢十院检验科主任孙奋勇教授在学习工作中给予我的教诲和帮助。正是因为这些老师对我的严格要求、帮助和包容，我才能顺利圆满地完成此次毕业论文。