

GSTO1在卵巢癌组织中的表达及其N-糖基化位点突变对上皮性卵巢癌细胞生物学行为的影响

李红^{1,2}, 于盼盼², 赵邹宇^{1,2}, 孙崇凤^{1,2}, 乔慧^{1,2}, 杨萍^{1,2,3}

(1. 石河子大学第一附属医院妇科, 新疆 石河子 832008; 2. 石河子大学医学院, 新疆 石河子 832008; 3. 新疆生产建设兵团医院妇科, 新疆 乌鲁木齐 830001)

[摘要] **目的:** 探讨谷胱甘肽S-转移酶Omega-1蛋白(GSTO1)在上皮性卵巢癌(EOC)组织中的表达及其与患者临床病理特征和预后的关系,并探讨其N-糖基化修饰对卵巢癌A2780和SKOV3细胞生物学行为的影响,阐明其可能的机制。**方法:** 利用GENT2数据库分析卵巢癌组织和正常卵巢上皮组织中GSTO1 mRNA表达水平。收集于石河子大学第一附属医院妇科就诊并手术的88例EOC患者临床信息,采集组织样本,定期随访患者预后情况,记录患者总生存期(OS)和无进展生存期(PFS)。采用免疫组织化学法检测EOC患者组织中GSTO1蛋白表达情况,分析其与患者临床病理特征及预后的关系。采用单因素和多因素Cox回归分析评估影响EOC患者预后的危险因素。采用质谱分析比较卵巢癌高转移ES-2细胞与亲本SKOV3细胞中GSTO1蛋白的N-糖基化修饰差异,NetNGlyc 1.0 server数据库鉴定其修饰位点。使用衣霉素抑制细胞整体N-糖基化,将卵巢癌A2780和SKOV3细胞分为对照组、二甲亚砜(DMSO)组及衣霉素组。采用慢病毒转染方式稳定构建不同N-糖基化修饰水平的卵巢癌A2780和SKOV3细胞,分为NC组、WT组、N55Q组、N135Q组、N190Q组和N3Q组。采用5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(EdU)实验检测各组细胞增殖率,Transwell小室实验检测各组迁移细胞数和侵袭细胞数;Western blotting法检测各组细胞中GSTO1蛋白和上皮-间充质转化(EMT)相关蛋白E-钙黏蛋白(E-cadherin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)及波形蛋白(Vimentin)表达水平。**结果:** GENT2数据库,与正常卵巢上皮组织比较,卵巢癌组织中GSTO1 mRNA表达水平明显升高($P<0.01$)。免疫组织化学法,EOC患者肿瘤组织中GSTO1蛋白高表达者66例,低表达者22例。EOC患者肿瘤组织中GSTO1蛋白高表达与FIGO分期、淋巴管间隙浸润和肿瘤直径有关联($P<0.05$)。单因素和多因素Cox回归分析,FIGO高分期、有淋巴结转移和GSTO1高表达均是影响EOC患者OS)及PFS的独立危险因素。质谱分析,与亲本SKOV3细胞比较,卵巢癌高转移ES-2细胞中GSTO1 N-糖基化修饰水平明显升高($P<0.05$),且其N-糖基化修饰位点分别为Asn55、Asn135和Asn190。与对照组比较,衣霉素组A2780和SKOV3细胞中GSTO1蛋白表达水平明显降低($P<0.05$);与WT组比较,N135Q、N190Q和N3Q组A2780及SKOV3细胞中GSTO1蛋白表达水平明显降低($P<0.05$)。与WT组比较,N135Q、N190Q和N3Q组A2780及SKOV3细胞增殖率明显降低($P<0.05$)。与WT组比较,N55Q、N135Q、N190Q和N3Q组A2780及SKOV3细胞的迁移细胞数和侵袭细胞数均明显降低($P<0.05$)。与WT组比较,N3Q组A2780和SKOV3细胞中E-cadherin蛋白表达水平明显升高($P<0.05$),N190Q和N3Q组A2780及SKOV3细胞中N-cadherin蛋白和Vimentin蛋白表达水平明显降低($P<0.05$)。**结论:** GSTO1在EOC组织和细胞中呈高表达且与患者不良预后相关,其N-糖基化位点突变可抑制卵巢

[收稿日期] 2025-04-25 [录用日期] 2025-07-06

[基金项目] 国家自然科学基金地区科学基金项目(82360541);人才发展基金-兵团临床医学研究中心-兵团妇产疾病临床医学研究中心项目(CZ001230);天山英才科技创新领军人才-高层次领军人才项目(2022TSYCLJ0055)

[作者简介] 李红(1992—),女,安徽省淮南市人,在读硕士研究生,主要从事妇科肿瘤方面的研究。

[通信作者] 杨萍,教授,主任医师,博士研究生导师(E-mail: pingy2018@163.com)

©《吉林大学学报(医学版)》编辑部,开放获取遵循CC BY-NC-ND协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

癌细胞增殖、迁移、侵袭和EMT进程。

[关键词] 上皮性卵巢癌; 谷胱甘肽S-转移酶Omega-1蛋白; N-糖基化; 细胞迁移; 细胞侵袭; 细胞增殖; 上皮-间充质转化

[中图分类号] R737.33 **[文献标志码]** A

Expression of GSTO1 in ovarian cancer tissue and effect of N-glycosylation site mutations on biological behaviors of epithelial ovarian cancer cells

LI Hong^{1,2}, YU Panpan², ZHAO Zouyu^{1,2}, SUN Chongfeng^{1,2}, QIAO Hui^{1,2}, YANG Ping^{1,2,3}

(1. Department of Gynecology, First Affiliated Hospital, Shihezi University, Shihezi 832008, China;

2. School of Medicine, Shihezi University, Shihezi 832008, China; 3. Department of Gynecology, Xinjiang Production and Construction Corps Hospital, Urumqi 830001, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the expression of glutathione S-transferase Omega-1 protein (GSTO1) in epithelial ovarian cancer (EOC) tissue and its relationship with the clinicopathological characteristics and prognosis of the patients, and to investigate the effect of its N-glycosylation modification on the biological behaviors of ovarian cancer A2780 and SKOV3 cells, and to clarify its possible mechanism. **Methods:** GENT2 database was used to analyze the expression levels of *GSTO1* mRNA in ovarian cancer tissue and normal ovarian epithelial tissue. The clinical information of 88 EOC patients who visited and underwent surgery in the Department of Gynecology of the First Affiliated Hospital of Shihezi University was collected, the tissue samples were collected, and the prognosis of the patients was followed up regularly. Immunohistochemical method was used to detect the expression of GSTO1 protein in ovarian tissue of EOC patients, and its relationship with the clinicopathological characteristics and prognosis of the patients was analyzed. Univariate and multivariate Cox regression analyses were used to evaluate the risk factors affecting the prognosis of EOC patients. Mass spectrometry was used to compare the difference in N-glycosylation modification of GSTO1 protein between highly metastatic ovarian cancer ES-2 cells and parental SKOV3 cells, and NetNGlyc 1.0 server database was used to identify its modification sites. Tunicamycin was used to inhibit the overall N-glycosylation of cells, and ovarian cancer A2780 and SKOV3 cells were divided into control group, dimethyl sulfoxide (DMSO) group, and tunicamycin group. The ovarian cancer A2780 and SKOV3 cells with different levels of N-glycosylation modification were stably constructed by lentiviral transfection and divided into NC group, WT group, N55Q group, N135Q group, N190Q group, and N3Q group. 5-Ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) assay was used to detect the proliferation rates of the cells in various groups; Transwell chamber assay was used to detect the numbers of migration cells and invasion cells in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of GSTO1 protein and epithelial-mesenchymal transition (EMT)-related proteins E-cadherin, N-cadherin, and Vimentin in the cells in various groups. **Results:** According to GENT2 database, compared with normal ovarian epithelial tissue, the expression level of *GSTO1* mRNA in ovarian cancer tissue was significantly increased ($P < 0.01$). Immunohistochemical staining results showed that there were 66 cases with high expression of GSTO1 and 22 cases with low expression of GSTO1 in tumor tissues of EOC patients. The high expression of GSTO1 protein in tumor tissue of EOC patients was associated with FIGO stage, lymphovascular space invasion, and tumor diameter ($P < 0.05$). The univariate and multivariate Cox regression analyses results showed that high FIGO stage, lymph node metastasis, and high GSTO1 expression were independent risk factors affecting the overall survival (OS) and progression-free survival

(PFS) of EOC patients. The mass spectrometry results showed that compared with parental SKOV3 cells, the level of N-glycosylation modification of GSTO1 in highly metastatic ovarian cancer ES-2 cells was significantly increased ($P<0.05$), and its N-glycosylation modification sites were Asn55, Asn135, and Asn190, respectively. Compared with control group, the expression levels of GSTO1 protein in A2780 and SKOV3 cells in tunicamycin group were significantly decreased ($P<0.05$). Compared with WT group, the expression levels of GSTO1 protein in A2780 and SKOV3 cells in N135Q, N190Q, and N3Q groups were significantly decreased ($P<0.05$). Compared with WT group, the proliferation rates of A2780 and SKOV3 cells in N135Q, N190Q, and N3Q groups were significantly decreased ($P<0.05$). Compared with WT group, the numbers of migration cells and invasion cells of A2780 and SKOV3 cells in N55Q, N135Q, N190Q, and N3Q groups were significantly decreased ($P<0.05$). Compared with WT group, the expression levels of E-cadherin protein in A2780 and SKOV3 cells in N3Q group were significantly increased ($P<0.05$), and the expression levels of N-cadherin protein and Vimentin protein in A2780 and SKOV3 cells in N190Q and N3Q groups were significantly decreased ($P<0.05$).

Conclusion: GSTO1 is highly expressed in EOC tissue and cells and is associated with poor prognosis of patients. Mutation of its N-glycosylation sites can inhibit the proliferation, migration, invasion, and EMT process of ovarian cancer cells.

KEYWORDS Epithelial ovarian cancer; Glutathione S-transferase Omega-1 protein; N-glycosylation; Cell migration; Cell invasion; Cell proliferation; Epithelial-mesenchymal transition

卵巢癌是死亡率最高的妇科恶性肿瘤^[1]。2020年数据^[2]显示：全世界每年有30多万名妇女罹患卵巢癌，约有15.2万名妇女死于卵巢癌，其中上皮性卵巢癌（epithelial ovarian cancer, EOC）是来源于输卵管上皮或卵巢的恶性程度较高的肿瘤，占有卵巢恶性肿瘤病理类型的85%以上。尽管手术、放疗、化疗和免疫抑制剂等联合治疗可有效降低卵巢癌的病死率，但其5年生存率仍低于50%^[3]。蛋白质糖基化是指在糖基转移酶的作用下将糖转移至蛋白质且与蛋白质上的氨基酸残基形成糖苷键的过程^[4]，主要包括N-糖基化和O-糖基化。研究^[5]显示：N-糖基化可影响肿瘤细胞免疫逃逸和耐受、增殖、侵袭及转移等过程，抑制甘露糖苷酶MAN1A1 N-糖基化可抑制卵巢癌在腹膜内扩散。谷胱甘肽S-转移酶Omega-1（glutathione S-transferase Omega-1, GSTO1）是属于谷胱甘肽转移酶（glutathione S-transferase, GST）家族的蛋白，可调控细胞代谢和凋亡过程^[6]，并在卵巢癌的进展中发挥重要作用^[7]。本课题组前期质谱分析结果表明在卵巢癌中存在GSTO1蛋白N-糖基化修饰，而GSTO1 N-糖基化位点突变对EOC恶性生物学影响的研究尚未见报道。因此，本研究检测GSTO1在EOC和正常输卵管上皮组织中的表达情况，分析其与患者临床病理特征及预后的关系，并通过构建不同GSTO1 N-糖基化修饰水平的卵巢癌

细胞系探讨其N-糖基化位点。

1 资料和方法

1.1 研究对象 选取2010年4月—2019年12月在石河子大学第一附属医院妇科就诊和手术的88例EOC患者为研究对象，同期收集26例非EOC行全子宫切除术的同期患者正常输卵管上皮组织作为对照组。收集88例EOC患者的临床病理特征信息，采用卡方检验比较患者年龄、FIGO分期、肿瘤类型、分化程度、有无淋巴血管间隙浸润（lymphovascular space invasion, LVSI）、有无淋巴结转移（lymph node metastasis, LNM）、肿瘤大小及糖类抗原125（carbohydrate antigen 125, CA125）水平。对研究对象进行术后随访，术后随访时间截至2024年7月28日，记录研究对象肿瘤复发和死亡等情况。本研究方案符合石河子大学第一附属医院伦理委员会所制定的伦理学标准并获得批准（审批号：KJ2023-368-01）。所有研究对象对研究知情，均签署知情同意书。

1.2 数据库分析卵巢癌组织中GSTO1 mRNA表达水平和GSTO1 N-糖基化位点 使用GENT2 (<http://gent2.appex.kr/gent2>)数据库下载卵巢癌组织和正常对照组织数据并分析GSTO1 mRNA的表达。在首页检索框点击Search-Gene profile，在Keyword一栏输入GSTO1，点击Search进行查询，下载Download expression data中所有泛癌的数据。

筛选出卵巢癌及正常输卵管上皮组织数据,分析GSTO1 mRNA在卵巢癌组织和对照组织中表达情况。

利用NetNGlyc 1.0 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)分析GSTO1可能存在的N-糖基化位点氨基酸序列。打开网站首页,在序列窗口中输入目的蛋白质氨基酸序列,设置阈值为0.5,点击Search进行查询,下载数据,筛选出GSTO1 N-糖基化修饰位点的数据并分析GSTO1 N-糖基化位点。

1.3 细胞、主要试剂和仪器 本研究所需卵巢癌细胞系A2780和SKOV3购自河南商城北纳创联生物科技有限公司。本课题组送检的3对卵巢癌高转移ES-2细胞及其亲本SKOV3细胞的组织样本由华中科技大学同济医学院附属协和医院王泽华教授团队馈赠。样本是以高转移ES-2细胞和亲本SKOV3细胞为成瘤细胞,通过手术原位移植方式(surgical orthotopic implantation, SOI)构建卵巢癌原位异种移植瘤模型,从而获得高转移细胞(ES-2细胞)及亲本(SKOV3)细胞组织^[8]。GSTO1 N-糖基化定点突变慢病毒购自上海吉玛制药技术有限公司, GSTO1抗体、E-钙黏蛋白(E-cadherin)抗体、N-钙黏蛋白(N-cadherin)抗体和波形蛋白(Vimentin)抗体均购自英国Abcam公司,兔种属来源二抗和鼠种属来源二抗均购自北京中杉金桥公司, Transwell小室和Matrigel基质胶均购自美国康宁公司, 5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU)细胞增殖检测试剂盒购自安徽白鲨生物科技有限公司, 衣霉素购自美国伯乐公司, McCoy's 5A培养基购自武汉博士德生物工程有限公司。电泳仪(型号:1165800)和电转仪(型号:1703935)均购自美国伯乐公司。

1.4 免疫组织化学法检测卵巢癌组织和正常输卵管上皮组织中GSTO1蛋白表达情况 取研究对象手术切除后的卵巢癌组织和正常输卵管上皮组织切片,经脱蜡、水化、抗原热修复,双氧水中避光10 min后,滴加GSTO1一抗(1:200稀释),置于4℃冰箱过夜。次日晨将组织切片于37℃恒温箱孵育30 min后,加入二抗(1:500稀释),室温孵育30 min,3,3'-二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)显色后再用苏木精复染,不同梯度乙醇脱水后用中性树胶封片。于显微镜下观察GSTO1蛋白在卵巢癌组织及正常输卵管上皮组织中的表达情况。免疫组织化学法检测结果由3位具有高级职称

的病理医师进行评分,评分标准:0%≤阳性细胞占比≤25%为1分,25%<阳性细胞占比≤50%为2分,50%≤阳性细胞占比≤75%为3分,75%<阳性细胞占比≤100%为4分;染色强度评分,无染色为0分,浅黄色为1分,中黄色为2分,棕黄色为3分。总评分=阳性细胞占比评分×染色强度评分。经观察,GSTO1蛋白在EOC组织癌细胞胞浆染色,评分<6分的组织切片作为GSTO1蛋白低表达组,评分≥6分作为GSTO1蛋白高表达组^[9]。

1.5 EOC患者生存分析 根据EOC患者术后随访情况,记录患者总生存期(overall survival, OS)和无进展生存期(progression-free survival, PFS)。采用Kaplan-Meier法绘制GSTO1高表达组和低表达组EOC患者的生存曲线。为明确EOC患者预后的影响因素,将患者临床病理特征,包括患者FIGO分期、分化程度、肿瘤大小、有无LVSI、有无LNM及GSTO1蛋白表达情况,分别纳入单因素Cox比例风险回归模型进行分析。随后,将单因素Cox比例风险回归分析结果中 $P<0.05$ 的变量进一步纳入多因素Cox比例风险回归模型,筛选EOC患者OS和PFS的独立影响因素。

1.6 质谱分析技术鉴定N-糖基化修饰位点 按照深圳华大基因股份有限公司提供的样本处理方法,将3对卵巢癌高转移ES-2细胞及其亲本SKOV3细胞的组织样本进行处理。随后,由深圳华大基因股份有限公司利用液相色谱串联质谱(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)技术进行蛋白质定量分析及N-糖基化修饰位点鉴定(检测序号:F19FTSNWWLJ7959_J200109064)。所使用的质谱仪器为Triple TOF 5600,以原始下机数据作为输入文件,配置相应参数及数据库。使用MaxQuant软件进行差异修饰肽段和差异修饰蛋白的定量分析、N-糖基化修饰蛋白和位点分析及差异表达基因的功能富集分析等相关分析。

1.7 细胞培养、转染和分组 将对数生长期且细胞状态良好的A2780和SKOV3细胞消化后均匀铺在6孔细胞培养板中,待其生长融合度为70%后,将A2780和SKOV3细胞各分为3组,即对照组、DMSO组和衣霉素组(浓度为 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)。上述方法处理细胞24 h,用于后续Western blotting分析。

将对数生长期且细胞状态良好的A2780和SKOV3细胞计数消化后,以每孔 1×10^5 个细胞的密度均匀铺在6孔细胞培养板中培养,24 h后观察,

待其生长融合度达60%后,将A2780和SKOV3细胞各分为6组:阴性对照(negative control,NC)组,每孔加入2.5 μg GSTO1空载体慢病毒进行细胞转染;取5 μg GSTO1 N-糖基化位点野生型(wild type,WT)慢病毒转染细胞,作为WT组;3个GSTO1 N-糖基化修饰单一位点突变组,即N55Q组、N135Q组和N190Q组,每孔分别加入5 μg GSTO1 N-糖基化修饰位点突变慢病毒Asn55、Asn135及Asn190进行转染;GSTO1 N-糖基化修饰3个位点共同突变组(N3Q组),同时加入5 μg Asn55、Asn135及Asn190进行转染。转染约12 h后,更换10%培养基(含嘌呤霉素)用于筛选上述转染后的卵巢癌细胞。采用荧光显微镜观察各组细胞慢病毒的转染情况,计算转染效率。转染效率=绿色荧光细胞数/细胞总数 $\times 100\%$ 。荧光显微镜下荧光阳性细胞占比 $>90\%$ 表示转染成功。收集各组转染成功的A2780和SKOV3细胞用于后续实验。

1.8 EdU染色检测各组细胞增殖率 提前1 d取对数生长期且细胞状态良好的各组转染慢病毒后的A2780和SKOV3细胞,计数消化后,以每孔6 000个细胞的密度铺于96孔细胞培养板中。待细胞恢复正常形态后,加入EdU工作液并置于培养箱培养2 h,加入甲醛(37%)固定后,由100 μL 含Triton X-100的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)孵育后再加入Click反应液(每孔100 μL)避光培养。每孔加入1 $\times$ Hoechst33342溶液100 μL ,避光培养。于显微镜下拍照,计算各组EdU阳性细胞率,以EdU阳性细胞率代表细胞增殖率。EdU阳性细胞率=EdU阳性细胞数/总细胞数 $\times 100\%$ 。实验重复3次。

1.9 Transwell小室实验检测转染后各组迁移细胞数和侵袭细胞数 迁移实验:取对数生长期且细胞状态良好的各组转染后细胞,计数消化后,于Transwell上室中加入200 μL 细胞悬液(含 2×10^4 个细胞),下室加入600 μL McCoy's 5A培养基(20%血清),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育48 h后,将细胞在4%多聚甲醛中固定,经PBS缓冲液清洗后加入结晶紫染色。

侵袭实验:在Transwell上室中加入细胞悬液之前,在小室底部先加入基质胶,其余操作同迁移实验。于显微镜下拍照并计数,分别记录各组迁移细胞数和侵袭细胞数。实验重复3次。

1.10 Western blotting法检测各组细胞中GSTO1蛋白和上皮间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)相关蛋白表达水平 取未转染的

SKOV3和A2780细胞及转染后各组细胞,加入细胞裂解液(苯甲基磺酰氟:放射免疫沉淀试验裂解液=1:99),用微量紫外分光光度计法测定蛋白浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)法检测,电泳电转结束后将聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜于室温封闭2 h,最后将PVDF膜分别放入含GSTO1(1:1 000)、 α -tubulin(1:1 000)、E-cadherin(1:1 000)、N-cadherin(1:1 500)和Vimentin(1:1 000)一抗的脱脂奶粉中,4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜。次日PVDF膜经含吐温的Tris缓冲盐溶液(Tris-buffered saline with Tween, TBST)浸洗后于对应种属的二抗(1:20 000)中室温孵育2 h。经TBST缓冲液浸洗后,于化学发光成像仪中曝光。采用Image J软件分析各目的蛋白条带灰度值,计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/ α -tubulin蛋白条带灰度值。所有实验重复3次。

1.11 统计学分析 采用SPSS 26.0和GraphPad Prism 7.0软件进行统计学分析。计数资料以 $n(\%)$ 表示。采用 χ^2 检验或连续性修正法分析GSTO1蛋白表达与EOC患者临床病理特征参数的关系。各组EdU阳性细胞率、迁移和侵袭细胞数及各组细胞中GSTO1蛋白和EMT相关蛋白表达水平均符合正态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间样本均数比较采用单因素方差分析,组间样本均数两两比较采用LSD- t 检验,2组间样本均数比较采用两独立样本 t 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 卵巢癌组织和正常卵巢上皮组织中GSTO1 mRNA及蛋白表达水平 GENT2数据库数据分析结果显示:与10例正常卵巢上皮组织比较,186例卵巢癌组织中GSTO1 mRNA表达水平明显升高($P<0.01$)。见图1。研究纳入的88例EOC患者年龄中位数为52岁;FIGO分期中,I期患者36例,II期患者12例,III期患者39例,IV期1例;浆液性腺癌患者65例,其他肿瘤类型患者23例;肿瘤低分化患者17例,中分化患者9例,高分化患者62例;有LVSI患者24例,无LVSI患者64例;有LNM患者29例,无LNM患者59例;肿瘤直径 ≤ 8 cm的患者46例,肿瘤直径 >8 cm患者42例;患者CA125水平 ≤ 200 U $\cdot\text{mL}^{-1}$ 者48例,CA125水平

>200 U·mL⁻¹者为40例。见表1。免疫组织化学蛋白高表达者66例(75%), GSTO1蛋白低表达者22例(25%)。见图2。

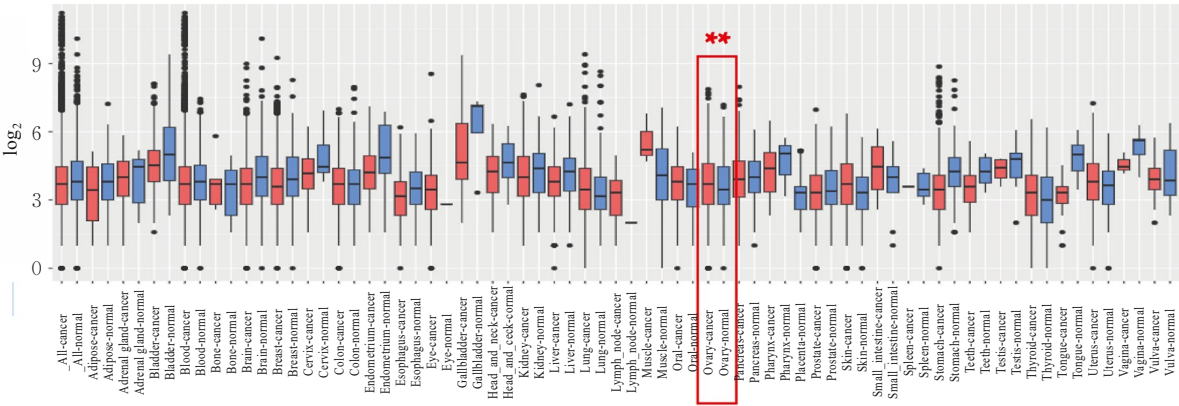


图1 GENT2数据库中GSTO1 mRNA在卵巢癌组织中的表达情况
Fig. 1 Expression of GSTO1 mRNA in ovarian cancer tissue from GENT2 database

表1 88例EOC患者基线资料
Tab. 1 Baseline data of 88 patients with EOC n[(η/%)]

Characteristic	Number
Age(year)	
≤52	48 (54.5)
>52	40 (45.5)
FIGO Stage(2014)	
I	36 (41.0)
II	12 (13.6)
III	39 (44.3)
IV	1 (1.1)
Pathological type	
Plasmacytoid cancer	65 (73.9)
Mucinous carcinoma	7 (8.0)
Clear cell carcinoma	6 (6.8)
Endometrioid cancer	9 (10.2)
Mixed epithelial carcinoma	1 (1.1)
Grade	
Low	17 (19.3)
Middle	9 (10.2)
High	62 (70.5)
LVSI	
Yes	24 (27.3)
No	64 (72.7)
LNM	
Yes	29 (33.0)
No	59 (67.0)
Size(cm)	
≤8	46 (52.3)
>8	42 (47.7)
CA125(U·mL ⁻¹)	
≤200	48 (54.5)
>200	40 (45.5)

2.2 不同临床病理特征EOC患者卵巢组织中GSTO1蛋白表达情况 GSTO1低和高表达组EOC患者的肿瘤直径、FIGO分期及有无LNM比较有明显差异 ($P<0.05$), 2组患者年龄、肿瘤类型、CA125水平和有无LVSI比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表2。

2.3 EOC患者肿瘤组织中GSTO1表达水平与患者预后的关系 所有EOC患者的术后中位随访时间为58(14~171)个月, 其中有5例(5.6%)失访, 39例(44.3%)复发, 30例(34.1%)死亡。Kaplan-Meier生存分析结果显示: 与GSTO1蛋白低表达组比较, GSTO1蛋白高表达组患者OS和PFS明显降低 ($P<0.05$)。见图3。单因素Cox回归模型结果显示: 影响EOC患者OS的因素包括FIGO高分期、肿瘤直径大、有LNM和GSTO1高表达; 影响EOC患者PFS的关键因素有FIGO高分期、肿瘤直径大、有LNM和GSTO1高表达 ($P<0.05$)。多因素Cox回归模型显示: FIGO高分期、有LNM和GSTO1高表达均是影响EOC患者OS及PFS的独立危险因素。见表3和4。

2.4 GSTO1 N-糖基化修饰位点 质谱分析结果显示: 共鉴定到显著差异修饰蛋白201个, 其中显著上调修饰蛋白126个, 显著下调修饰蛋白75个(图4A); 得到其所修饰位点的 motif 分布图(图4B)。利用KEGG数据库对上述鉴定到的蛋白进行功能富集分析, 结果表明: 上述蛋白主要富集在代谢通路和肿瘤相关通路(图4C); 这些通路中有3个具有显著差异的 N-糖基化修饰蛋白, 即

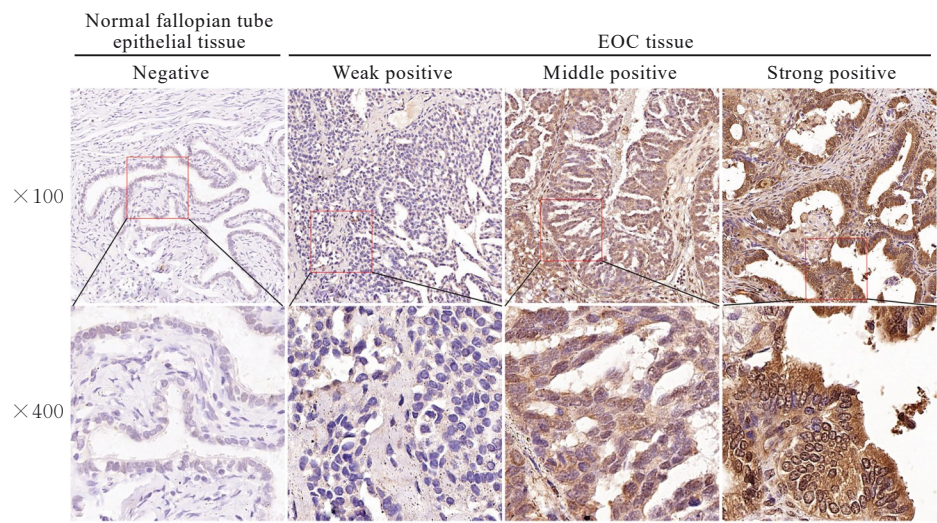


图2 GSTO1蛋白在EOC组织和正常输卵管上皮组织中的表达情况(免疫组织化学法)
Fig. 2 Expressions of GSTO1 protein in EOC tissue and normal fallopian tube epithelial tissue (Immunohistochemistry)

表2 不同临床病理特征EOC患者卵巢组织中GSTO1蛋白表达情况

Tab. 2 Expressions of GSTO1 protein in ovarian tissue of EOC patients with different clinicopathological characteristics [n(η/%)]

Characteristic	n	GSTO1		χ^2	P
		Low	High		
Age(year)				0.244	0.621
≤52	48	13(27.1)	35(72.9)		
>52	40	9(22.5)	31(77.5)		
FIGO Stage(2014)				6.111	0.013
I - II	48	17(35.4)	31(64.6)		
III - IV	40	5(12.5)	35(87.5)		
Pathological type				0.491	0.484
Plasmacytoid cancer	65	15(23.1)	50(76.9)		
Adenocarcinoma	23	7(30.4)	16(69.6)		
Grade				0.024	0.876
Low	17	4(23.5)	13(76.5)		
Other divisions	71	18(25.4)	53(74.6)		
CA125(U·mL ⁻¹)				0.244	0.621
≤200	48	13(27.1)	35(72.9)		
>200	40	9(22.5)	31(77.5)		
Size(cm)				26.783	<0.001*
≤8	46	22(47.8)	24(52.2)		
>8	42	0(0.0)	42(100.0)		
LVI				4.889	0.027
Yes	24	10(41.7)	14(58.3)		
No	64	12(18.8)	52(81.2)		
LNM				0.017	0.896
Yes	29	7(24.1)	22(75.9)		
No	59	15(25.4)	44(74.6)		

*: The P value of Fisher's exact test was chosen because of extreme value (0). Other divisions: Moderately differentiated and highly differentiated.

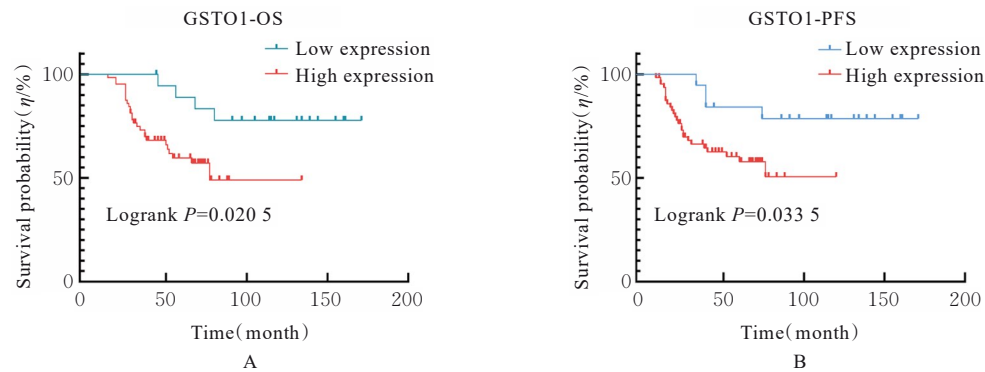


图3 GSTO1蛋白低表达组和GSTO1蛋白高表达组EOC患者的OS(A)及PFS(B)

Fig. 3 OS(A) and PFS(B) of EOC patients in GSTO1 protein low expression group and GSTO1 protein high expression group

表3 EOC患者OS影响因素的单因素和多因素Cox回归分析

Tab. 3 Univariate and multivariate Cox regression analyses of influencing factors of OS in EOC patients

Characteristic	Univariate Cox analysis			Multivariate Cox analysis		
	HR	95%CI	P	HR	95%CI	P
FIGO stage (Ⅲ-Ⅳ vs Ⅰ-Ⅱ)	9.948	4.037—24.510	0.001	14.272	3.509—58.042	0.001
Grade (High vs low)	1.719	0.600—4.928	0.919			
Size (>8 cm vs ≤8 cm)	4.698	2.030—10.873	0.001	0.516	0.113—2.345	0.392
LVI (Positive vs negative)	1.999	0.974—4.103	0.059			
LNM (Positive vs negative)	3.271	1.582—6.764	0.001	3.397	1.606—7.183	0.001
GSTO1 (High vs low)	3.376	1.138—10.017	0.028	4.881	1.024—23.270	0.029

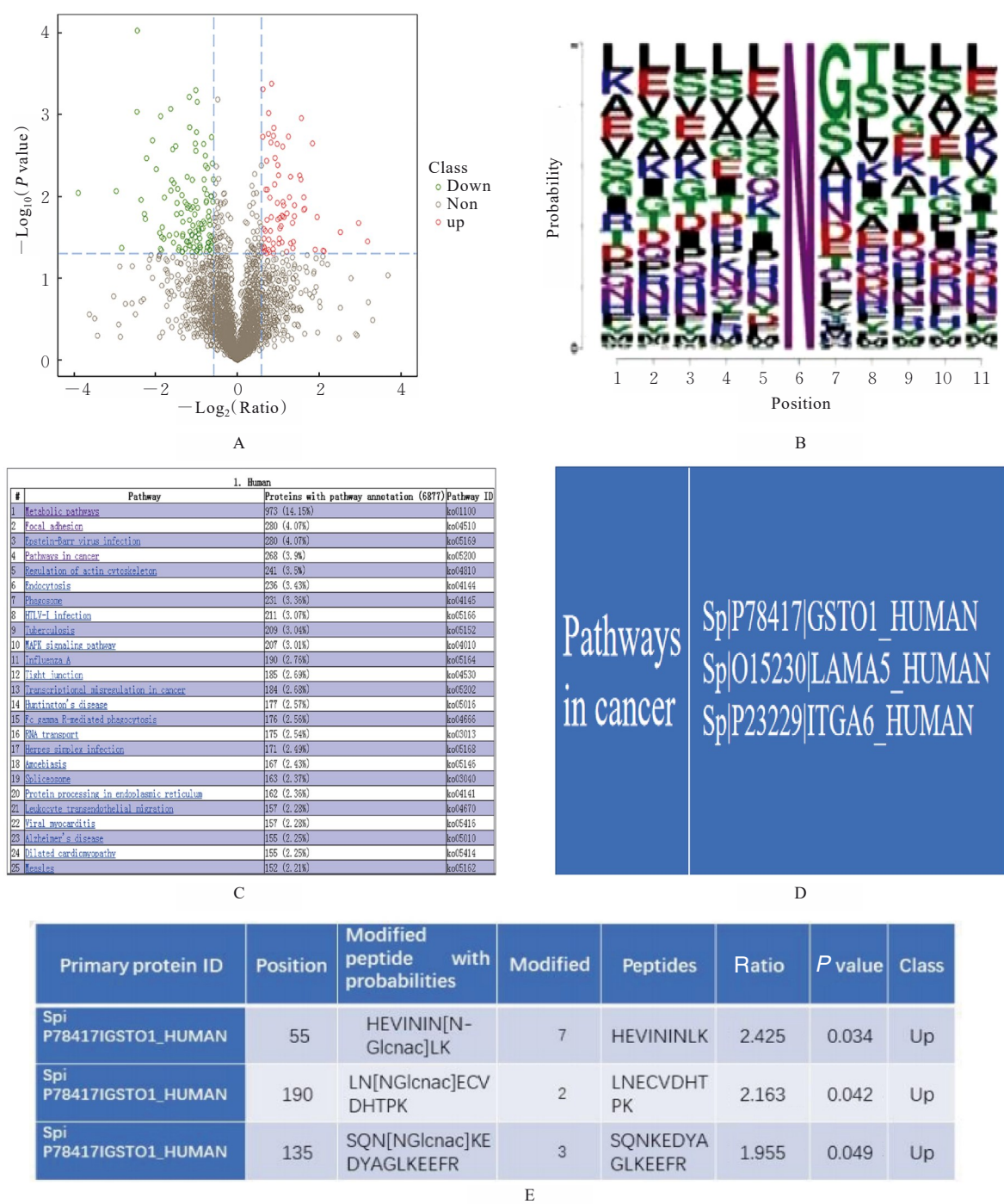
表4 EOC患者PFS影响因素的单因素和多因素Cox回归分析

Tab. 4 Univariate and multivariate Cox regression analyses in influencing factors of PFS in EOC patients

Characteristics	Univariate Cox analysis			Multivariate Cox analysis		
	HR	95%CI	P	HR	95%CI	P
FIGO stage (Ⅲ-Ⅳ vs Ⅰ-Ⅱ)	8.109	3.765—17.462	0.001	8.468	2.765—25.933	0.001
Grade (High vs low)	1.427	0.597—3.408	0.424			
Size (>8 cm vs ≤8 cm)	4.864	2.349—10.069	0.001	0.669	0.193—2.320	0.526
LVI (Positive vs negative)	1.483	0.776—2.834	0.233			
LNM (Positive vs negative)	2.306	1.220—4.358	0.010	2.583	1.335—14.588	0.005
GSTO1 (High vs low)	4.782	1.695—13.488	0.003	4.119	1.163—14.588	0.028

GSTO1、LAMA5和ITGA6（图4D）。LC-MS/MS分析结果发现：GSTO1在卵巢癌高转移细胞中存在3个显著上调的N-糖基化修饰位点，分别为Asn55、Asn135和Asn190（图4E）。利用NetNGlyc 1.0 server生物信息学网站检测GSTO1蛋白的N-糖基化修饰位点，发现3个潜在修饰位点（N135， $P=0.620$ ；N190， $P=0.670$ ；N55， $P=0.670$ ）具有较高的阳性率。见图5。该预测结果与质谱分析检测到的GSTO1 N-糖基化修饰位点一致。综上，卵巢癌中存在GSTO1 N-糖基化修饰，其修饰位点分

别为Asn55、Asn135和Asn190。
2.5 抑制N-糖基化后各组细胞中GSTO1蛋白表达水平 Western blotting法结果显示：与对照组比较，衣霉素组A2780和SKOV3细胞中GSTO1蛋白表达水平均明显降低（ $P<0.05$ ）。见图6。
2.6 转染后各组细胞中GSTO1蛋白表达水平 与NC组比较，WT组A2780细胞中GSTO1蛋白表达水平明显升高（ $P<0.05$ ）。与WT组比较，N135Q、N190Q和N3Q组A2780及SKOV3细胞中GSTO1蛋白表达水平均明显降低（ $P<0.05$ ）。



A: Volcano plot of differential proteins between highly metastatic ovarian cancer cells and parental cells; B: Motif distribution of protein N-glycosylation modification sites; C: KEGG enrichment analysis of differential proteins; D: N-glycosylation modification proteins that are significantly different in the pathways in cancer; E: Specific sites of N-glycosylation modification of GSTO1 protein.

图 4 GSTO1 N-糖基化修饰位点鉴定

Fig. 4 Identification of GSTO1 N-glycosylation modification sites

见图 7。

2.7 转染后各组细胞增殖率 与 WT 组比较，N135Q、N190Q 和 N3Q 组 A2780 细胞及 SKOV3 细胞增殖率均明显降低 ($P<0.05$)。见图 8。

2.8 转染后各组迁移细胞数和侵袭细胞数 迁移实

验结果显示:与 WT 组比较,N55Q、N135Q、N190Q 和 N3Q 组 A2780 细胞及 SKOV3 细胞的迁移细胞数均明显降低 ($P<0.001$)。

侵袭实验结果显示:与 WT 组比较，N55Q、N135Q、N190Q 和 N3Q 组 A2780 细胞及 SKOV3

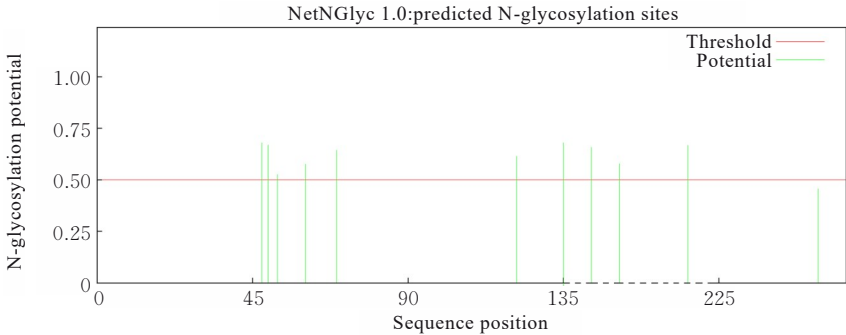
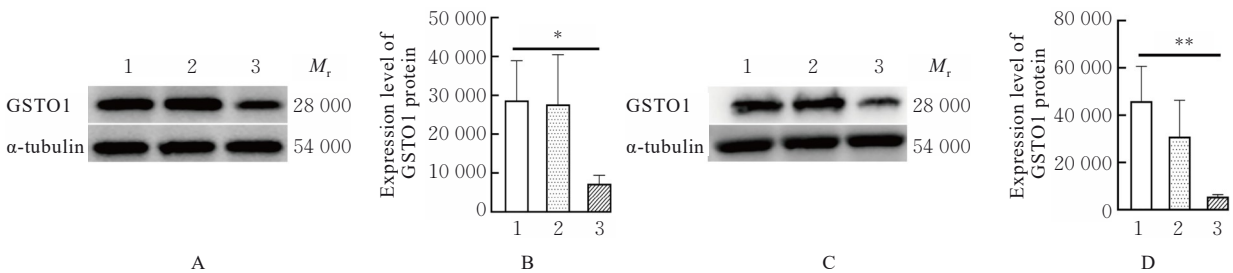


图 5 GSTO1 N-糖基化位点预测

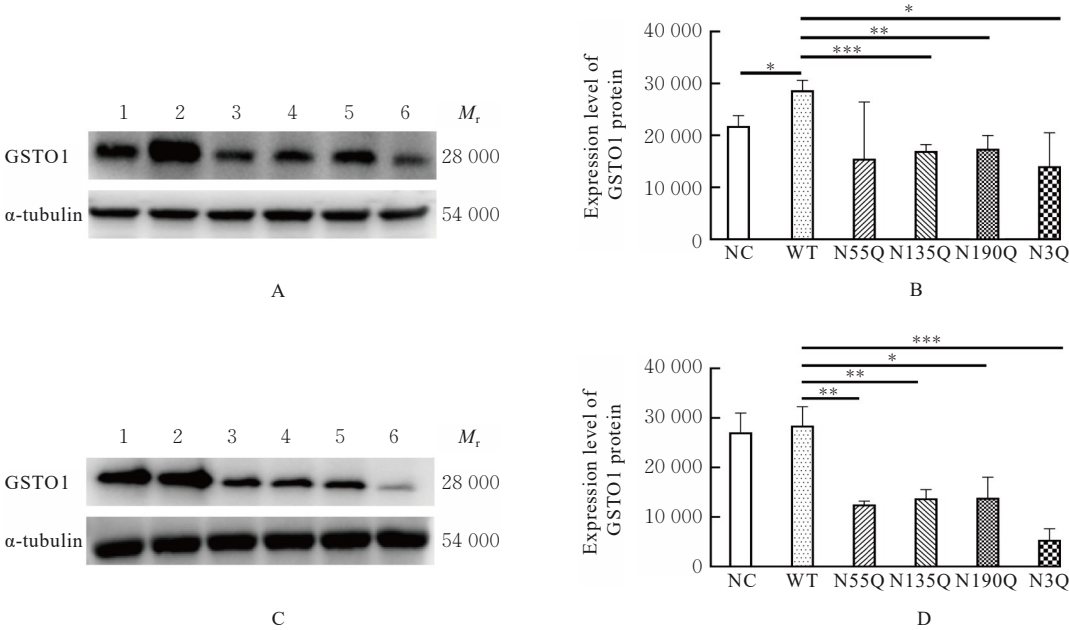
Fig. 5 Prediction of GSTO1 N-glycosylation sites



A, B: A2780 cells; C, D: SKOV3 cells. Lane 1: Control group; Lane 2: DMSO group; Lane 3: Tunicamycin group. 1: Control group; 2: DMSO group; 3: Tunicamycin group. * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

图 6 Western blotting 法检测各组细胞中 GSTO1 蛋白表达电泳图(A、C)和直条图(B、D)

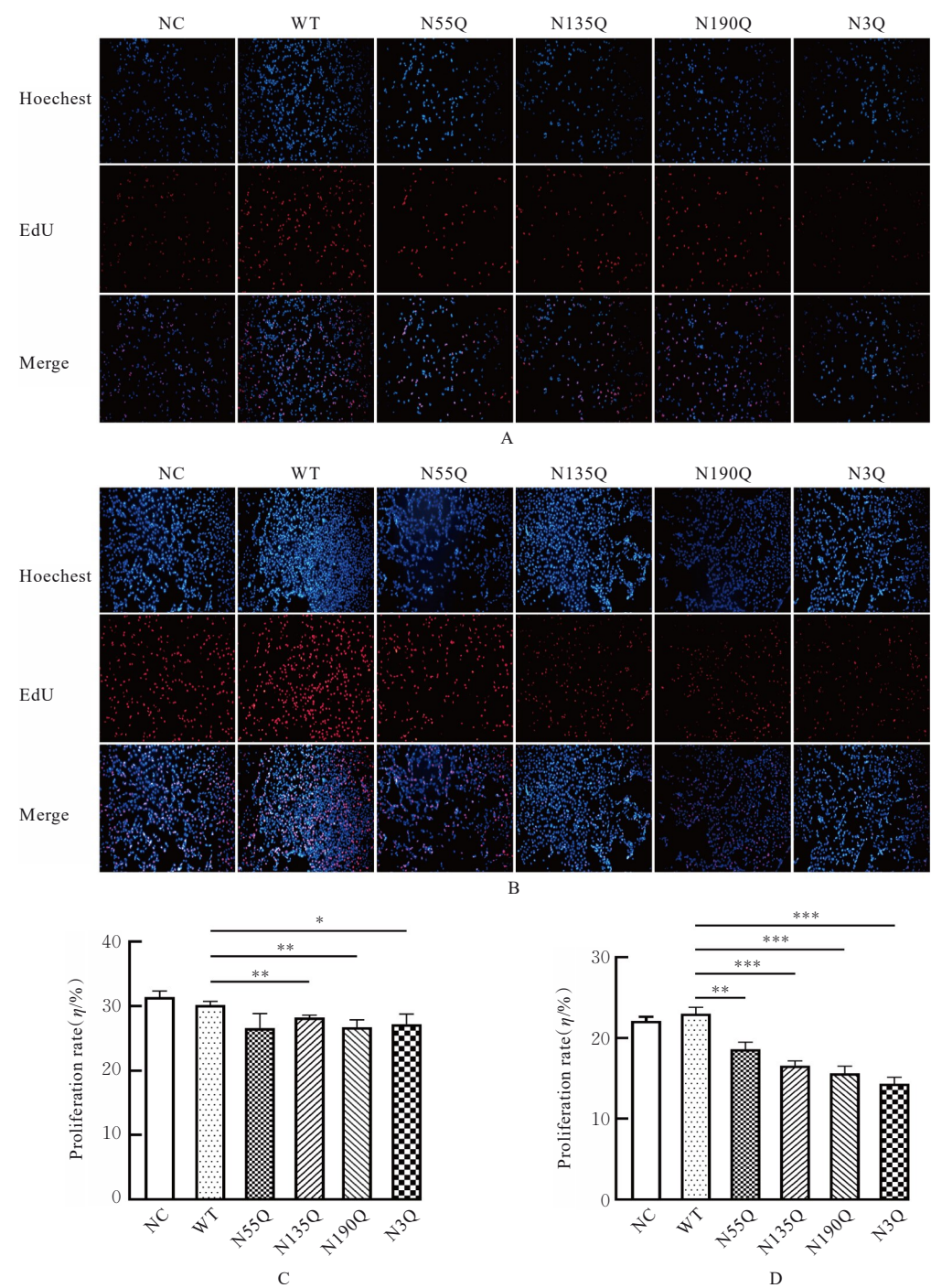
Fig. 6 Electrophoregrams(A, C) and histograms(B, D) of expressions of GSTO1 protein in cells in various groups detected by Western blotting method



A, B: A2780 cells; C, D: SKOV3 cells. Lane 1: NC group; Lane 2: WT group; Lane 3: N55Q group; Lane 4: N135Q group; Lane 5: N190Q group; Lane 6: N3Q group. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

图 7 Western blotting 法检测转染后各组细胞中 GSTO1 蛋白表达电泳图(A、C)和直条图(B、D)

Fig. 7 Electrophoregrams(A, C) and histograms(B, D) of expressions of GSTO1 protein in cells in various groups after transfection detected by Western blotting method



A,B: $\times 100$; A,C: A2780 cells; B,D: SKOV3 cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

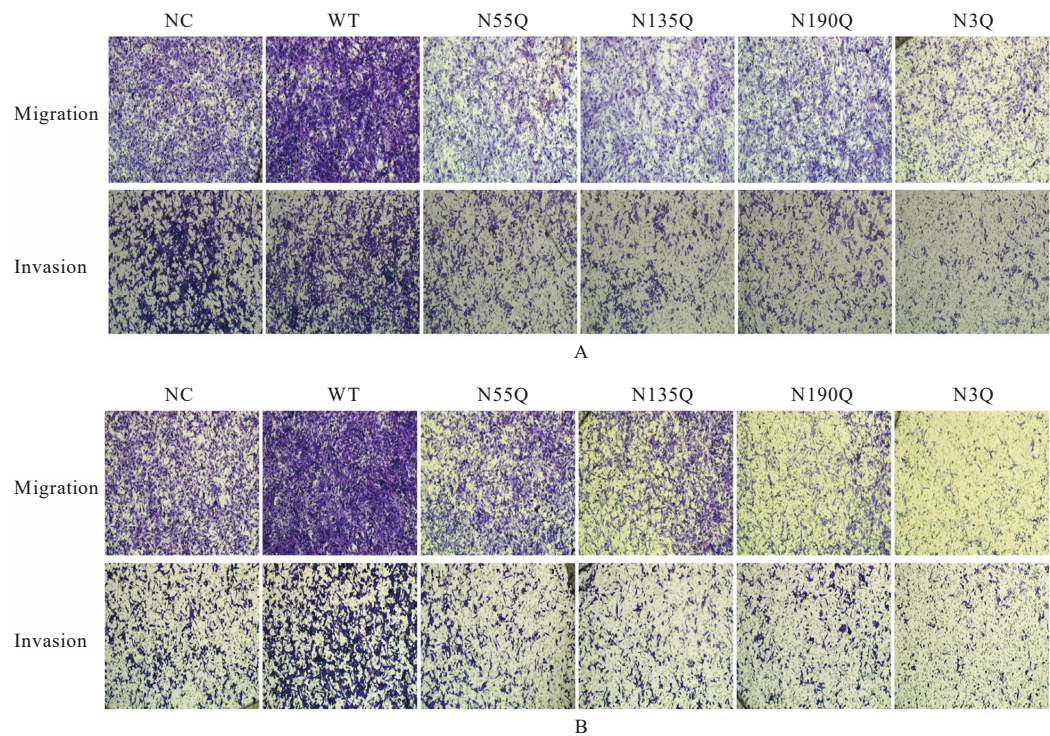
图8 各组细胞中EdU阳性表达情况(A,B)和细胞增殖率(C,D)

Fig. 8 EdU positive expression in cells(A,B) and proliferation rates of cells(C,D) in various groups

细胞的侵袭细胞数均明显降低 ($P < 0.001$)。见图9和表5。

2.9 转染后各组细胞中E-cadherin、N-cadherin和Vimentin蛋白表达水平 与WT组比较, N3Q组A2780和SKOV3细胞中E-cadherin蛋白表达水平均明显升高 ($P < 0.05$), N55Q、N135Q、N190Q

和N3Q组A2780细胞中N-cadherin蛋白及SKOV3细胞中N-cadherin和Vimentin蛋白表达水平均明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$), N55Q、N190Q和N3Q组A2780细胞中Vimentin蛋白表达水平均明显降低 ($P < 0.05$)。见图10。



A: A2780 cells; B: SKOV3 cells.

图9 Transwell小室实验检测各组细胞迁移和侵袭情况(结晶紫, $\times 100$)

Fig. 9 Migration and invasion of cells in various groups detected by Transwell chamber assay(Crystal violet, $\times 100$)

表5 各组迁移细胞数和侵袭细胞数

Tab. 5 Numbers of migration and invasion cells in various groups ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Group	A2780 cells		SKOV3 cells	
	Number of migration cells	Number of invasion cells	Number of migration cells	Number of invasion cells
NC	657.33 $\pm$ 16.04	605.67 $\pm$ 14.57	851.67 $\pm$ 17.56	289.00 $\pm$ 16.53
WT	1 421.33 $\pm$ 14.05	799.33 $\pm$ 16.01	1 435.33 $\pm$ 12.50	636.00 $\pm$ 18.00
N55Q	505.33 $\pm$ 14.29*	386.67 $\pm$ 11.02*	848.33 $\pm$ 13.50*	272.00 $\pm$ 15.10*
N135Q	480.67 $\pm$ 16.01*	272.00 $\pm$ 14.11*	626.00 $\pm$ 8.00*	175.33 $\pm$ 12.22*
N190Q	467.00 $\pm$ 17.52*	292.00 $\pm$ 14.00*	396.00 $\pm$ 18.33*	186.33 $\pm$ 18.50*
N3Q	369.67 $\pm$ 15.50*	124.33 $\pm$ 9.45*	164.00 $\pm$ 17.09*	103.33 $\pm$ 13.32*

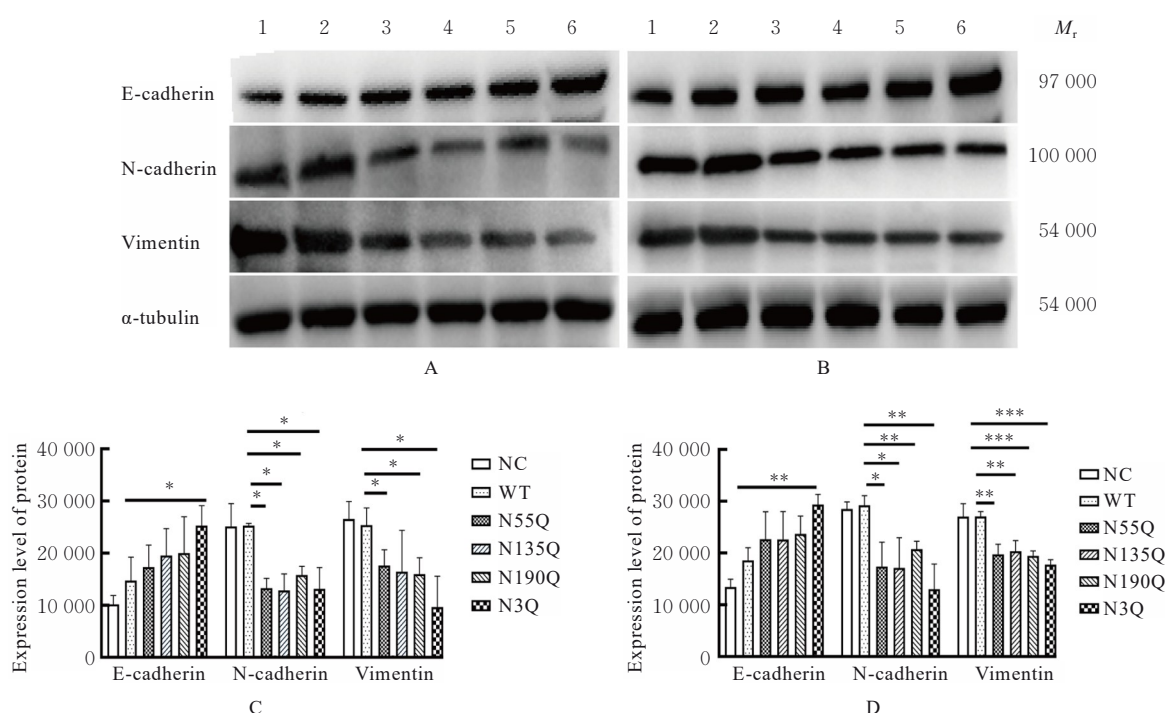
* $P<0.001$ vs WT group.

3 讨论

卵巢癌是妇科肿瘤中死亡率最高的恶性肿瘤^[10],虽然肿瘤细胞减灭术、术后放化疗、程序性死亡配体1(programmed death-ligand 1, PD-L1)抑制剂及PARP抑制剂[poly(adp-ribose) polymerase inhibitor, PARPi]在临床上的应用可提高患者的生存率,其术后复发率高及对铂类等化疗药物耐药性导致其5年的生存率仅为47%^[10],因此,寻找有效的卵巢癌早期诊断及新的治疗靶点药物尤为重要。

GSTO1是GST家族的成员之一,在体内主要

负责催化与解毒和抗氧化相关的反应,亦发现其在人体组织中广泛表达^[11],并参与多种癌症的发生发展。已有研究证实GSTO1基因的多态性可增加睾丸生殖细胞肿瘤^[12]、乳腺癌及结肠癌^[13]发展的风险。WANG等^[13]报道GSTO1在皮肤恶性黑色素瘤(cutaneous malignant melanoma, CMM)中高表达,且其与CMM不良预后相关。本课题组研究^[6]亦发现GSTO1在宫颈癌组织中呈高表达,且是影响宫颈癌预后的重要因素。本研究首先通过GENT2数据库发现GSTO1 mRNA在卵巢癌组织中高表达,随后通过人体组织和细胞水平验证GSTO1蛋



A,C: A2780 cells; B,D: SKOV3 cells. Lane 1:NC group; Lane 2:WT group; Lane 3:N55Q group; Lane 4:N135Q group; Lane 5:N190Q group; Lane 6:N3Q group. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

图10 各组细胞中EMT相关蛋白表达电泳图(A,B)和直条图(C,D)

Fig. 10 Electrophoregrams (A, B) and histograms (C, D) of expressions of EMT-related proteins in cells in various groups

白在EOC中高表达。本研究发现:GSTO1蛋白高表达与EOC患者FIGO分期、有无LVSI和肿瘤大小有关联,FIGO分期高、无LVSI和肿瘤直径 >8 cm者,肿瘤组织中GSTO1蛋白表达水平较高,表明GSTO1蛋白表达水平可能与EOC严重程度有密切关联,其阳性表达提示患者预后不良。单因素和多因素Cox回归分析结果显示:FIGO高分期、有LNM和GSTO1高表达是影响EOC患者预后的独立危险因素,表明患者GSTO1蛋白表达水平升高、FIGO分期高或出现LNM时,EOC患者的生存时间明显缩短。以上结果均表明GSTO1高表达可能与EOC进展和患者不良预后相关,因此GSTO1可能是EOC治疗的潜在靶点。

蛋白质糖基化是一种广泛存在的翻译后修饰。研究^[14]表明:异常蛋白糖基化在细胞死亡逃避、持续增殖信号传导和化疗耐药中起关键作用,抑制4F2hc糖基化过程可诱导胰腺导管腺癌对铁死亡的敏感性进而抑制其进展。研究^[15]发现:蛋白质糖基化参与肿瘤细胞迁移、血管生成、凋亡^[6]及内皮细胞黏附相关等过程,异常糖基化蛋白可影响EMT、迁移、侵袭和肿瘤细胞外渗等过程。本研

究构建了不同GSTO1 N-糖基化修饰水平的慢病毒,转染细胞并进行培养,采用Western blotting法检测转染后各组A2780和SKOV3细胞中GSTO1蛋白表达水平,结果显示:GSTO1 N-糖基化位点突变组的2种细胞中GSTO1蛋白表达水平均明显低于WT组,这表明Asn135、Asn190和Asn55是GSTO1 N-糖基化修饰位点,N-糖基化与维持蛋白的表达水平相关。此外,本研究结果显示:与WT组比较,GSTO1 N-糖基化位点突变组卵巢癌细胞的迁移、侵袭及增殖能力均降低。上述结果提示GSTO1 N-糖基化参与卵巢癌的进展,并发挥重要作用。

EMT是指具有上皮特征的细胞转化为间充质细胞的过程,这是参与癌症转移的主要机制之一^[16-17]。EMT在伤口愈合、癌细胞转移和耐药中起重要作用^[18],E-cadherin、N-cadherin及Vimentin作为EMT的关键蛋白,在EMT过程中发挥着重要作用^[19-22]。本研究结果显示:GSTO1 N-糖基化位点突变可上调E-cadherin表达,下调N-cadherin和Vimentin表达,说明GSTO1 N-糖基化位点突变可抑制EMT影响卵巢癌进展。

综上所述,GSTO1蛋白在EOC细胞中高表达

并与EOC患者不良预后有关联。GSTO1 N-糖基化位点突变可能影响EOC细胞增殖、迁移、侵袭和EMT转化能力。GSTO1 N-糖基化位点突变有望作为EOC新的治疗靶点。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

李红参与研究设计、数据分析和论文撰写,于盼盼和赵邹宇参与实验指导及数据采集,孙崇凤参与样本收集和论文审阅,乔慧参与临床患者信息采集和随访,杨萍参与研究设计和论文指导。

[参考文献]

- [1] LOKMAN N A, RICCIARDELLI C, STEPHENS A N, et al. Diagnostic value of plasma annexin A2 in early-stage high-grade serous ovarian cancer[J]. *Diagnostics*, 2021, 11(1): 69.
- [2] ZHANG R Q, SIU M K Y, NGAN H Y S, et al. Molecular biomarkers for the early detection of ovarian cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(19): 12041.
- [3] FERNÁNDEZ L P, SÁNCHEZ-MARTÍNEZ R, VARGAS T, et al. The role of glycosyltransferase enzyme GCNT3 in colon and ovarian cancer prognosis and chemoresistance[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 8485.
- [4] AN H J, FROELICH J W, LEBRILLA C B. Determination of glycosylation sites and site-specific heterogeneity in glycoproteins [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2009, 13(4): 421-426.
- [5] ZHANG J, DIJKE PTEN, WUHRER M, et al. Role of glycosylation in TGF- β signaling and epithelial-to-mesenchymal transition in cancer [J]. *Protein Cell*, 2021, 12(2): 89-106.
- [6] 于盼盼, 杨 萍, 孙倩玉, 等. 宫颈癌组织GSTO1的表达与宫颈癌预后的相关性分析及其N-糖基化对宫颈癌恶性生物学行为的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2023, 58(12): 2002-2010.
- [7] SIMIC P, CORIC V, PLJESA I, et al. The role of glutathione transferase omega-class variant alleles in individual susceptibility to ovarian cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(9): 4986.
- [8] GUO J, CAI J, ZHANG Y X, et al. Establishment of two ovarian cancer orthotopic xenograft mouse models for *in vivo* imaging: a comparative study [J]. *Int J Oncol*, 2017, 51(4): 1199-1208.
- [9] 孙崇凤, 杨 萍, 侯纪帅, 等. STT3A和STT3B在上皮性卵巢癌中的表达及与预后的关系[J]. *实用医学杂志*, 2023, 39(16): 2062-2070.
- [10] YANG C, XIA B R, ZHANG Z C, et al. Immunotherapy for ovarian cancer: adjuvant, combination, and neoadjuvant[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 577869.
- [11] XU Y B, BANKHEAD A 3rd, TIAN X L, et al. Deletion of glutathione S-transferase omega 1 activates type I interferon genes and downregulates tissue factor[J]. *Cancer Res*, 2020, 80(17): 3692-3705.
- [12] PETROVIC M, SIMIC T, DJUKIC T, et al. The polymorphisms in *GSTO* genes (*GSTO1* rs4925, *GSTO2* rs156697, and *GSTO2* rs2297235) affect the risk for testicular germ cell tumor development: a pilot study[J]. *Life*, 2023, 13(6): 1269.
- [13] WANG L K, YUE H L, PENG X J, et al. GSTO1 regards as a meritorious regulator in cutaneous malignant melanoma cells[J]. *Mol Cell Probes*, 2019, 48: 101449.
- [14] MA H, CHEN X L, MO S W, et al. Targeting N-glycosylation of 4F2hc mediated by glycosyltransferase B3GNT3 sensitizes ferroptosis of pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Cell Death Differ*, 2023, 30(8): 1988-2004.
- [15] HE L N, GUO Z J, WANG W J, et al. FUT2 inhibits the EMT and metastasis of colorectal cancer by increasing LRP1 fucosylation[J]. *Cell Commun Signal*, 2023, 21(1): 63.
- [16] 井玉莹, 杨凯歌, 程仪婷, 等. EZH2通过EMT促进食管鳞状细胞癌的恶性生物学行为[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2025, 50(2): 155-166.
- [17] PARK M, KIM D, KO S, et al. Breast cancer metastasis: mechanisms and therapeutic implications[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(12): 6806.
- [18] BABAEI G, AZIZ S G, JAGHI N Z Z. EMT, cancer stem cells and autophagy; The three main axes of metastasis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 133: 110909.
- [19] 张 哲, 罗怡欣, 陈 卓, 等. 中性粒细胞源性外泌体在乳腺癌细胞侵袭、转移中的作用[J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2025, 60(4): 484-487.
- [20] 王姜婷, 孙 恺, 高 谋, 等. SIRT7调控上皮-间质转化对胶质瘤细胞增殖和迁移的作用[J]. *解放军医学杂志*, 2025, 50(1): 57-68.
- [21] 李瑛花, 杨 娟. LncRNA RP11-499E18.1对卵巢癌细胞恶性生物学行为的影响[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2025, 50(1): 1-10.
- [22] 王发辉, 邓青春, 林佳佳, 等. GATA3介导 miR-21/PTEN轴对子宫内膜癌细胞增殖、侵袭的影响[J]. *实用医学杂志*, 2024, 40(15): 2069-2074.