

miR-10b 对 MCF10A 细胞表达 N-糖链 及 O-糖链的影响 *

国 东 郭 佳 武艳丽 关 锋 **

(江南大学糖化学与生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122)

摘要 蛋白质糖基化是蛋白质翻译后修饰之一, 对蛋白质功能有重要的调节作用, 而异常糖基化在肿瘤的发生、发展以及癌细胞转移过程中起到关键作用. MiRNAs 在癌症的发生发展过程中同样起到非常关键的作用, 但其如何影响糖基化进而在肿瘤恶性转化过程中发挥生物学功能的研究甚少. 本文将 miR-10b 在人正常乳腺上皮细胞 MCF10A 中过表达, 利用糖类相关基因芯片系统筛选了发生显著变化的糖基转移酶; 随后利用本实验室建立的 N-糖链及 O-糖链测定方法, 分析糖链水平的表达差异; 最后对关键糖基转移酶基因 *Fut8*、*MGAT3* 及 *OGT* 通过荧光定量 PCR、蛋白质免疫印迹和凝集素免疫印迹进行了验证, 为研究 miR-10b 在乳腺癌中的作用提供更多糖组学方面的理论基础.

关键词 miR-10b, MCF10A, N-糖链, O-糖链

学科分类号 Q81

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0026

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一. 根据中国癌症统计报告显示, 近 10 年来乳腺癌发病呈持续上升趋势, 其中 2015 年约新增 26.86 万例乳腺癌发病病例, 占女性新增癌症病例的 15%, 位居癌症发病之首, 是女性癌症死亡的主要原因^[1].

蛋白质糖基化是动物细胞中最常见的蛋白质翻译后修饰之一^[2], 超过 70% 的蛋白质可发生糖基化修饰, 主要包括 N-糖基化和 O-糖基化, 可通过影响蛋白质空间结构或决定其在细胞内的转运等调节蛋白质的生物学功能. 异常糖基化在肿瘤的发生、发展过程中起关键作用, 可参与癌细胞的信号通路、肿瘤细胞的扩散和侵袭、细胞与基质间的相互作用、血管生成和免疫调节. 异常糖基化主要包括异常唾液酸化、异常岩藻糖化、分支型和平分型 N-糖的改变、截短型 O-糖的异常等. 糖蛋白已成为许多疾病的诊断标志物和治疗靶点, 如前列腺癌中的特异性抗原 PSA^[3]、肝癌中的 AFP^[4]、卵巢癌的肿瘤抗原蛋白 CA125^[5]以及可能作为乳腺癌和前列腺癌治疗靶点的 Globo H^[6]都是糖蛋白. 然而, 大家对蛋白糖基化的研究多集中在肿瘤分子靶标和

生物学功能上, 对于相应糖基转移酶的分子调控机制关注较少.

MiRNAs(microRNAs)是真核生物中内源性的具有调控功能的非编码 RNA, 其成熟体通过碱基互补配对的方式识别靶 mRNA 并根据互补的程度指导沉默复合体降解靶 mRNA 或阻碍靶 mRNA 的翻译. 自 1993 年 Ambros 首次发现 miRNA 以来, miRNAs 的生物学功能不断得到诠释. 科学家发现 miRNAs 在发育、器官形成、增殖及凋亡等许多生物学过程中起到关键作用. MiRNA 在不同的肿瘤中可发生特异性表达, 例如, miR-34a^[7]、miR-21^[8]及 miR-200^[9]等在乳腺癌中异常表达并逐渐成为乳腺癌的诊断和治疗靶标. 其中 miR-10b 在乳腺癌组织和乳腺癌细胞中均显著上调, 可通过抑制

* 国家自然科学基金面上项目(81672537)和江苏省自然科学基金(BK20160173)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 0510-85918126, E-mail: fengguan@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2017-01-17, 接受日期: 2017-02-27

HOXD10 进而上调 RHOC 的表达最终促进细胞的侵袭和转移^[10], 负调控 PTEN 的表达, 并维持 AKT 的持续激活^[11]. 我们推测 miR-10b 的表达可能会影响某些糖基转移酶或糖苷酶的表达, 从而对细胞表达的糖链产生影响.

因此, 本实验将 miR-10b 在人正常乳腺上皮细胞 MCF10A 中过表达, 通过糖基因芯片技术和质谱技术对该模型中糖基转移酶和糖链的变化进行系统分析, 不仅为研究 miR-10b 在乳腺癌中的作用提供更多糖组学方面的理论基础, 也为研究其他 miRNAs 在癌症中的作用提供了更多的思路.

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人正常乳腺上皮细胞 MCF10A 购于上海中国科学院细胞库, 使用 MEGM kit(Lonza, USA)培养, 培养条件为 37℃, 5% CO₂.

1.2 细胞转染

将 MCF10A 细胞接种于培养板或培养皿中, 待细胞密度达到 30%~50%时, 按照 Lipofectamine 2000(Invitrogen, USA)的操作说明将 NC(Negative Control)及 miR-10b(终浓度 100 nmol/L)转染到 MCF10A 细胞中, 经 24~96 h 培养后提取总 RNA 和总蛋白.

1.3 实时荧光定量 PCR

利用 TRIzol(Cwbiotech, China)试剂提取转染 NC 及 miR-10b 的 MCF10A 细胞的总 RNA, 反转成 cDNA, 或利用特异性反转录引物进行反转用于 miRNA 分析. 根据 GenBank 和 miRBase 序列, 设计实时荧光定量 PCR(Quantitative real-time PCR qRT-PCR)引物(表 1). 使用 UltraSYBR Mixture 试剂盒(Cwbiotech)进行 qRT-PCR, 并利用 2^{-ΔΔCt} 法计算目的基因的倍性变化.

Table 1 Primers used in this study

Gene	Primer(5'→3')	Gene	Primer(5'→3')
SULT1A2	F: CCCCCAGACTCTGTTGGAT	OGT	F: CATGGAAGGGGCAGTACAAG
	R: GGCCATGTGGTAGAAGTGGT		R: CTTTGAGCAGGTTCCCCAG
B3GNT5	F: CCCTTGAAATGAAGCTGGAC	B4GALT3	F: CTGAAGATGAATGGCTTCCC
	R: AATTCCTCCACACGGGCAT		R: AGAGATCTTCATCCCAGCCA
ST3Gal1	F: TGGACGGTCACTCAGCCTAT	Fut8	F: TCCATGACCCTAATGGTCTTTT
	R: GGTGGGTACACAACCAGCTT		R: TGTCTGTACTTCATGCGCT
HOXD10	F: CTGAGGTCTCCGTGTCCAGT	ACTB	F: GCACAGAGCCTCGCCTT
	R: TTCTGCCACTCTTTGCAGTG		R: GTTGTGACGACGAGCG
miR-10b	Purchased from Gene Pharma (Suzhou, China)	U6	F: CTCGCTTCGGCAGCACA
			R: AACGCTTCACGAATTTGCGT

1.4 蛋白质免疫印迹和凝集素免疫印迹

用含 1%蛋白酶抑制剂 Cocktail(Sigma-Aldrich, USA)的预冷 T-PER 蛋白裂解液(Thermo Scientific, USA)提取细胞蛋白, 并用 BCA 蛋白质浓度测定试剂盒(Beyotime biotechnology, China)测定蛋白质浓度. 上样 30 μg 蛋白进行电泳, 通过湿转法将蛋白质转到 PVDF 膜上, 5% BSA 中 37℃封闭 1 h 后添加一抗或生物素标记的凝集素, 4℃孵育过夜, TBST 漂洗 4 次后添加辣根过氧化物酶 HRP 标记的二抗 (Beyotime biotechnology) 或按 ABC Kit

(Vector, USA)使用说明操作, 室温孵育 1 h 后 TBST 漂洗 4 次, 最后采用 Pro-Light HRP 化学发光检测试剂(Tiagen, China)显色并用 ChemiDoc™ XRS+成像系统采集图像. 一抗 FUT8 购于 Santa Cruz (USA), MGAT3 和 OGT 购于 abcam (USA), 生物素标记的小扁豆凝集素 (lens culinaris agglutinin, LCA)和植物血凝素 E(phaseolus vulgaris lectin E, PHA-E)购于 Vector, 识别 O-GlcNAc 糖链的抗体购于 Sigma-Aldrich.

1.5 N-糖链的释放及除盐处理

1.5 mg 蛋白经 10 ku 超滤管将离心浓缩后, 加入 8 mol/L 尿素、10 mmol/L DTT 溶液和 20 mmol/L IAM 溶液使蛋白质充分变性溶解, 再经 40 mmol/L 的 NH_4HCO_3 润洗 3 次后将蛋白质转移至新的收集管中, 加入 1 μl PNGase F 酶溶液, 37°C 反应 12 h 后离心收集流出液并冷冻干燥. 随后将冻干样品用 500 μl 5:1:1 的正丁醇: 甲醇: 水(v/v/v)溶解后与预处理过的 Sepharose 4B 凝胶混匀, 室温 80 r/min 振荡反应 1 h 后离心弃上清. 用 1 ml 5:1:1 的正丁醇: 甲醇: 水(v/v/v)溶液重复清洗 3 次后加入 500 μl 的 1:1 甲醇: 水(v/v)溶液, 室温 140 r/min 振荡 20 min 后离心, 收集上清, 经冷冻干燥后用 MALDI-TOF/TOF-MS 进行质谱检测.

1.6 O-糖链的释放、除盐及泛甲基化修饰

2 mg 细胞蛋白经 10 ku 超滤管离心浓缩后, 加入 8 mol/L 尿素、10 mmol/L DTT 溶液和 20 mmol/L IAM 溶液使蛋白质变性溶解后离心弃去流出液, 加入 200 μl 氨水至超滤管后离心, 重复 2 次. 加入 300 μl 28% 的氨水溶解的硼烷氨络合物, 混匀后置 37°C 反应 24 h 后 14 000 g 离心 15 min, 收集流出液, 加入 1 mol/L 的 HCl 中和硼烷氨络合物和氨水并冷冻干燥, 加入 300 μl 的甲醇清洗再冻干, 重复 3 次, 以去掉残留的硼酸残基. 随后用 500 μl 超纯水溶解冻干样品并上样至预处理过的 carbon SPE 柱中, 用 2 ml 超纯水重复清洗柱子 3 次后, 再用 1 ml 0.1% TFA/80% ACN 洗脱, 收集并冻干洗脱液. 向冻干样品中加入 150 μl DMSO 超声 15 min, 加入 200 μl 预处理的 NaOH 和 50 μl 的碘甲烷, 避光振荡 20 min 后加入 1 ml 氯仿和 2 ml 超

纯水进行抽提并离心, 弃上层水相, 再用 2 ml 超纯水进行重复抽提 4 次后将氯仿层用氮气吹干, 冷冻干燥后用 MALDI-TOF/TOF-MS 进行质谱检测.

2 结果与分析

2.1 MCF10A 转染 miR-10b 后糖基因芯片结果

基因芯片技术以其高通量和集成的特点被广泛应用于分子水平上疾病发生机制的研究、病理及预后的诊断. 本文将 miR-10b 转染至 MCF10A 细胞, 利用西北大学李铮教授实验室提供的糖类相关基因芯片(包括糖基转移酶 130 个, 糖苷酶 12 个, 磺基转移酶 48 个和质控点 20 个)系统分析了细胞中糖类相关基因的变化(图 1), 发现差异表达的糖类相关基因 56 个, 其中表达下调的基因 30 个(倍性变化 <0.5), 表达上调的基因 26 个(倍性变化 >1.5), 倍性变化最大的 10 个下调基因和 10 个上调基因如表 2 所示.

为了验证基因芯片结果, 首先检测了过表达 miR-10b 的 MCF10A 细胞中 miR-10b 及其靶基因 *HOXD10* 的表达水平(图 2), 发现 *HOXD10* 表达符合预期. 进一步选取了 3 个上调基因 *OGT*、 *$\beta 4\text{GALT}3$* 及 *Fut8* 和 3 个下调基因 *SULT1A2*、 *$\beta 3\text{GNT}5$* 及 *ST3Gal1* 进行了 qRT-PCR 验证(图 2), 发现其结果与芯片结果一致.

2.2 转染 miR-10b 的 MCF10A 细胞中 N-糖链的质谱分析

N-糖链参与细胞间识别、细胞黏附和信号传导等多种生物学过程. 本实验借助 MALDI-TOF/TOF-MS 分析了 miR-10b 过表达的 MCF10A 细胞中 N-糖链的变化. 利用糖链结构分析软件

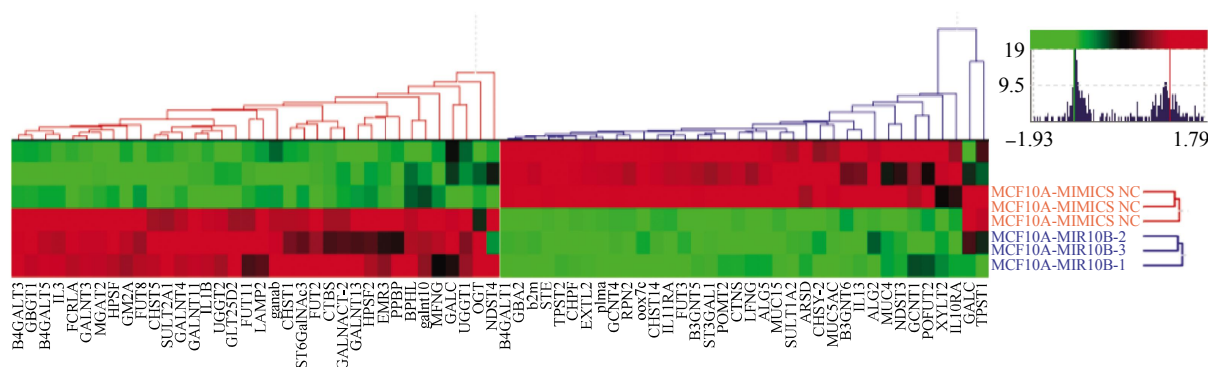


Fig. 1 Differentially expressed glycan-related genes in miR-10b-overexpressed MCF10A cells shown as a heatmap
Red: Genomic activation. Green: Inhibition. Black: No clear link. Gray: Missing data.

Table 2 Change expression of glycan-related genes in miR-10b-overexpressed MCF10A cells			
Gene name	Fold change	Gene description	Locus
Down-regulated genes after miR-10b-overexpression			
<i>SULT1A2</i>	0.06	Sulfotransferase family 1A member 2	NM_001054.3
<i>ALG5</i>	0.11	Dolichyl-phosphate beta-glucosyltransferase N	NM_013338.4
<i>GCNT4</i>	0.12	Glucosaminyl (N-acetyl)transferase 4, core 2	NM_016591.2
<i>EXTL3</i>	0.14	Exostosin like glycosyltransferase 3	NM_001440.3
<i>β3GNT5</i>	0.15	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1, 3-N-acetylglucosaminyltransferase 5	NM_032047.4
<i>β4GALT1</i>	0.19	beta-1, 4-Galactosyltransferase 1	NM_001497.3
<i>ALG2</i>	0.28	ALG2, alpha-1, 3/1, 6-mannosyltransferase	NM_033087.3
<i>XYLT2</i>	0.28	Xylosyltransferase 2	NM_022167.3
<i>ST3Gal1</i>	0.36	ST3 beta-galactoside alpha-2, 3-sialyltransferase 1	NM_003033.3
<i>FUT3</i>	0.41	Fucosyltransferase 3	NM_000149.3
<i>β3GNT6</i>	0.46	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1, 3-N-acetylglucosaminyltransferase 6	NM_138706.4
Up-regulated genes after miR-10b-overexpression			
<i>GBGT1</i>	5.2	Globoside alpha-1, 3-N-acetylgalactosaminyltransferase 1	NM_021996.5
<i>FUT11</i>	4.2	Fucosyltransferase 11	NM_173540.2
<i>FUT2</i>	3.2	Fucosyltransferase 2	NM_000511.5
<i>GALNT11</i>	3	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 11	NM_022087.3
<i>GALNT3</i>	3	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3	NM_004482.3
<i>OGT</i>	2.7	O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase	NM_181672.2
<i>MGAT2</i>	2.1	Mannosyl (alpha-1, 6-)-glycoprotein beta-1, 2-N-acetylglucosaminyltransferase	NM_002408.3
<i>β4GALT5</i>	1.8	beta-1, 4-Galactosyltransferase 5	NM_004776.3
<i>GALNACT-2</i>	1.7	Chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase 2	NM_018590.4
<i>GALNT4</i>	1.7	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 4	NM_003774.4

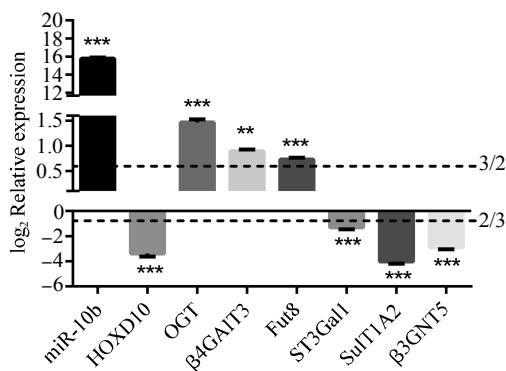


Fig. 2 Expression of HOXD10 and specific glycan-related genes in miR-10b-overexpressed MCF10A cells analyzed by qRT-PCR

log₂ Relative expression > 3/2 was upregulated and log₂ Relative expression < 2/3 was down-regulated. (***P* < 0.01; ****P* < 0.001).

GlycoWorkbench 参考 GlycomeDB 糖链数据库筛选糖链质谱峰(信噪比 >5)并进行结构鉴定和标注(图 3), 共鉴定到 13 种 N-糖链, 其中 7 种糖链在转染 NC 和 miR-10b 的细胞中都可检测到, 离子峰 1950.565、2117.75、3070.1384 对应的糖链在转染 NC 的细胞中特异性表达, 而离子峰 1955.6072、2174.772 和 2182.7878 对应的糖链仅在转染 miR-10b 的细胞中特异性表达. 借助检测到的质谱峰强度比值(intensity ratio)进行相对定量分析并累加不同类型糖链的相对强度(表 3), 发现过表达 miR-10b 的细胞中杂合型(hybrid type)、平分型(bisecting type)、岩藻糖化(fucosylated)、唾液酸化(sialylated)和复合型中三天线型(triantennary type)糖链的相对含量升高, 而高甘露糖型(high-mannose type)和复合型中二天线型(biantennary type)的相对含量降低.

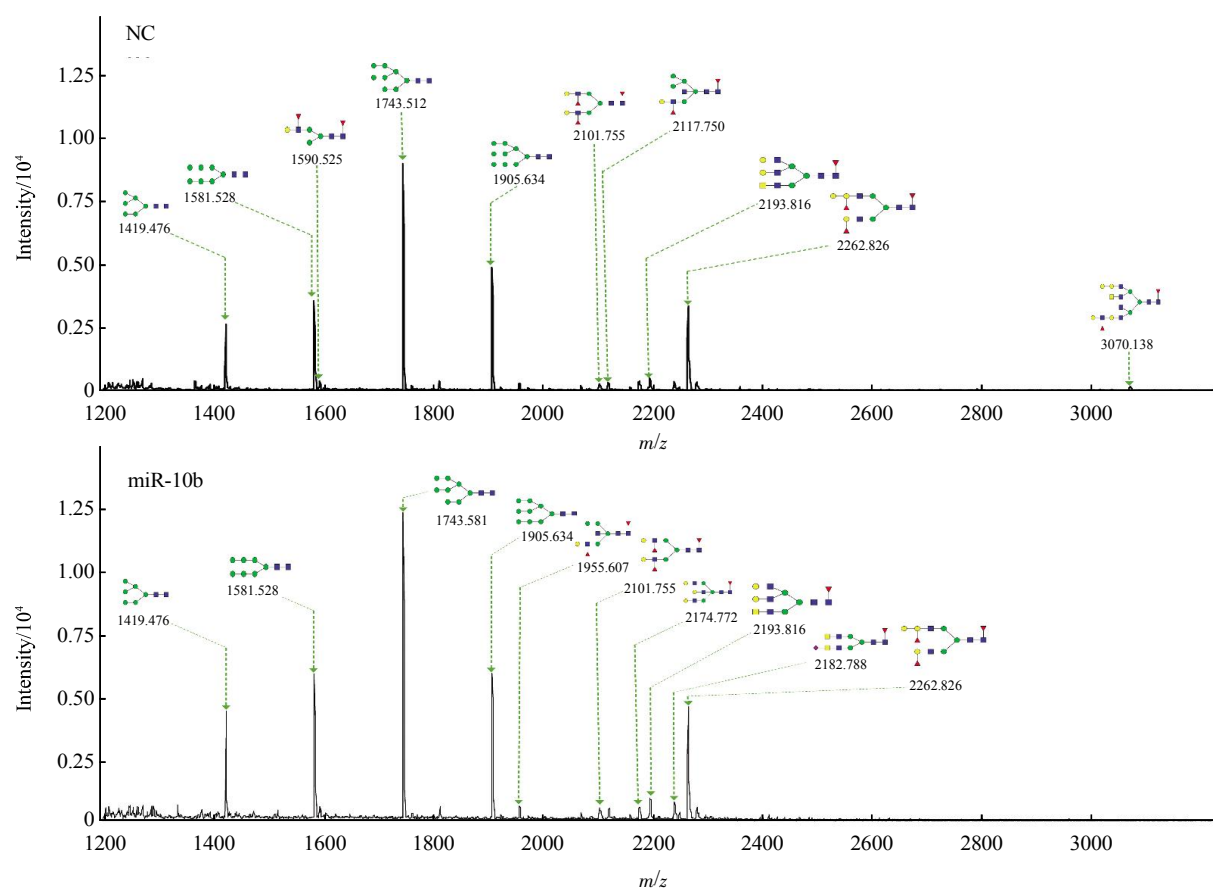


Fig. 3 Alteration of N-glycans in miR-10b-overexpressed MCF10A cells detected by MALDI-TOF-MS

■ : GalNAc; ■ : GlcNAc; ● : Gal; ◆ : Neu5Ac; ▲ : Fuc.

Table 3 Relative variation of different types of N-glycans in miR-10b-overexpressed MCF10A cells

Glycan type	MCF10A	
	NC	miR-10b
Hybrid	15.2%	13.0%
High-mannose	81.3%	79.7%
Complex	17.1%	20.3%
Complex-type glycans:		
Biantennary	16.7%	8.3%
Triantennary	2.1%	4.1%
Tetra-antennary	2.5%	2.5%
Bisecting	3.2%	5.5%
Fucosylated	18.7%	20.3%
Sialylated	0	1.7%

2.3 转染 miR-10b 的 MCF10A 细胞中 O-糖链的质谱分析

采用本实验开发的基于超滤膜辅助的全 O-糖链富集方法对 miR-10b 过表达的 MCF10A 细胞中 O-糖链进行了解析, 利用糖链结构分析软件 GlycoWorkbench 参考 GlycomeDB 糖链数据库筛选

糖链质谱峰(信噪比 >4)并进行结构鉴定和标注(图 4), 共鉴定到 36 种特异的 O-糖链, 并借助检测到的质谱峰强度比值(intensity ratio)进行了相对定量分析, 发现共有的离子峰中 1996.0349、2009.0301 和 2243.1404 显著上调, 1606.8299 和 2230.1452 显著下调(图 5).

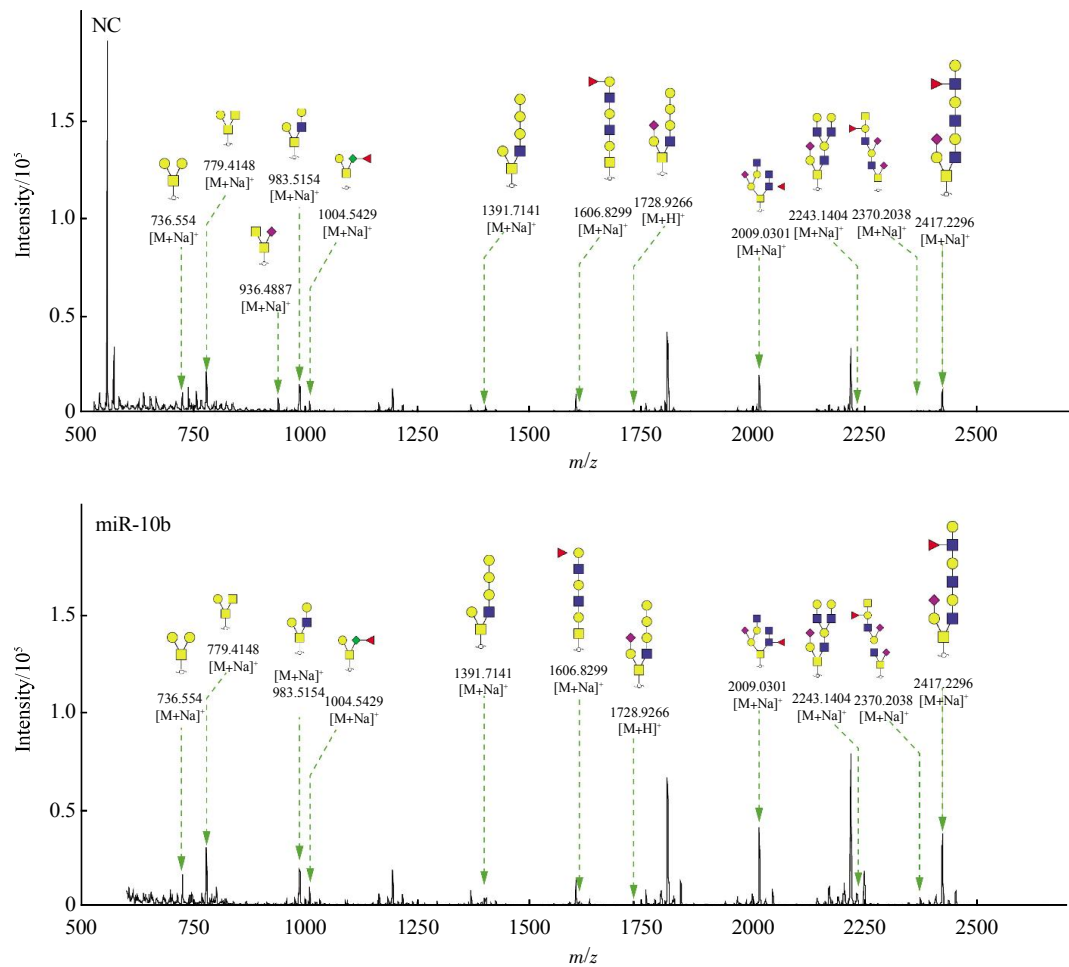


Fig. 4 Alteration of O-glycans in miR-10b-overexpressed MCF10A cells detected by MALDI-TOF-MS

■ : GalNAc; ■ : GlcNAc; ● : Gal; ◆ : Neu5Ac; ▲ : Fuc.

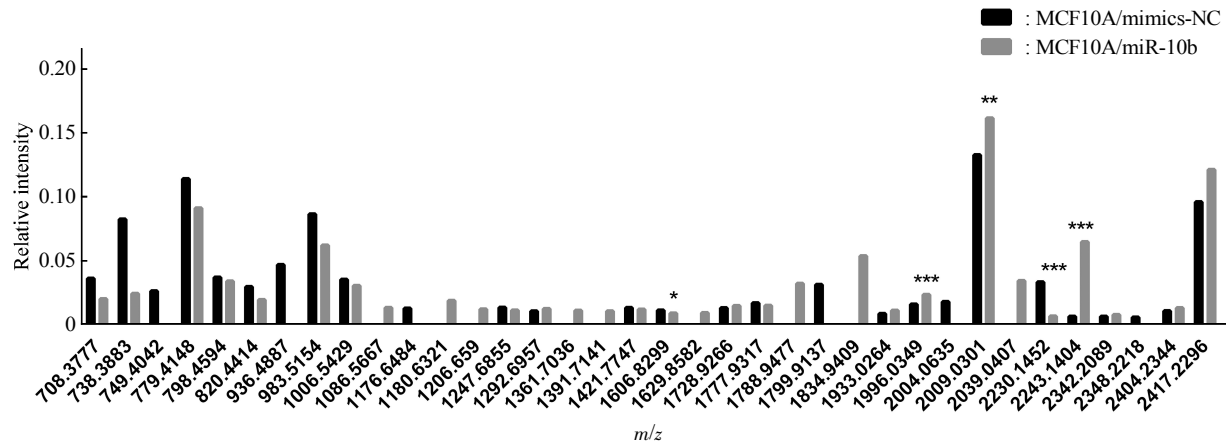


Fig. 5 Relative intensity of different types of m/z in miR-10b-overexpressed MCF10A cells

(**P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001).

2.4 转染 miR-10b 的 MCF10A 细胞中关键糖基转移酶的蛋白及凝集素免疫印迹验证

基于上述质谱分析结果, 本文进一步在蛋白质水平检测了转染 miR-10b 的细胞中特征性糖链(核心岩藻糖化和平型 N-糖链)对应的糖基转移酶 *Fut8* 和 *MGAT3* 的表达变化, 并检测了芯片中发生显著变化的 *OGT* 在蛋白质水平的变化(图 6a), 发现过表达 miR-10b 的细胞中 *FUT8*、*MGAT3* 和 *OGT* 在蛋白质水平显著上调; 同时在蛋白质上样

量一致的条件下(图 6b), 利用特异性识别 Fuc α 1-6GlcNAc (*FUT8*对应的糖链产物)的凝集素 LCA、识别 bisecting GlcNAc (*MGAT3* 对应的糖链产物)的凝集素 PHA-E 及识别 O-GlcNAc 糖链的抗体在糖链水平进行了验证(图 6c), 发现过表达 miR-10b 的细胞中 *FUT8*、*MGAT3* 和 *OGT* 在对应的糖链产物水平显著升高, 与其蛋白质水平的变化基本一致.

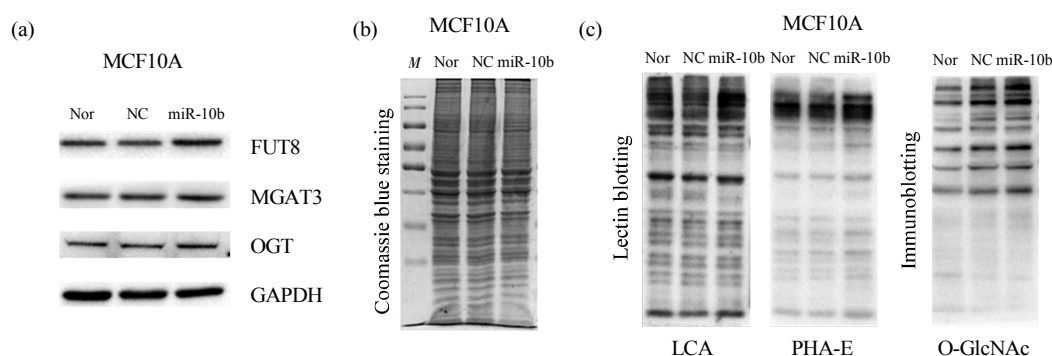


Fig. 6 Altered expression of FUT8, MGAT3 and OGT in miR-10b-overexpressed MCF10A cells

(a) Western blotting analysis. (b) Coomassie blue staining. (c) Lectin blotting and immunoblotting analysis of correspond glycans (Nor: Control; NC: Negative control; M: Marker).

3 讨 论

异常糖基化通过影响癌细胞的信号传导、细胞与基质间的相互作用、血管生成、免疫调节及转移和侵袭等方式在肿瘤的发生发展过程中起到非常关键的作用^[12]. MiRNAs 几乎参与细胞增殖、运动、生存和分化等所有生物学过程^[13], 特定 miRNAs 的异常表达甚至可作为癌症的生物标志和潜在治疗靶标^[14]. 目前只有小部分 miRNAs 的生物学功能得到阐释, miRNAs 作用于糖基化的相关研究甚少.

本实验选取乳腺癌中显著上调的 miR-10b 在人乳腺上皮细胞 MCF10A 细胞中过表达后, 通过糖基因芯片技术和质谱技术系统分析了 miR-10b 对细胞 N-糖链及 O-糖链的表达影响并进行了初步验证. 结果表明 miR-10b 可以通过改变糖基转移酶的表达对糖代谢产生全局的影响. 其中糖基转移酶 *Fut8*、*MGAT3* 及 *OGT* 在转染 miR-10b 后在 mRNA、蛋白质水平以及糖代谢产物水平发生显著的上调. *Fut8* 在乳腺癌^[15]、肝细胞癌^[16]、肺小细胞癌^[17]、结直肠癌^[18]和胰腺癌^[19]等癌症中显著高表达,

通过改变 E-cadherin 及 EGFR 的岩藻糖化程度激活下游信号通路^[20-21]. MiR-26a、miR-34a 和 miR-146a 可结合到 *Fut8* 的 3'UTR 区并下调 *Fut8* 的表达^[16]; *OGT* 的表达在癌症中也显著升高^[22]并与肿瘤组织学分级相关^[23]. MiRNA-423-5p 可下调 *OGT* 及其下游靶基因的表达进而诱导心肌细胞的凋亡^[24]; 而 *Mgat3* 对肿瘤的进程和转移产生不同影响, 过表达 *Mgat3* 既可以抑制黑色素瘤细胞 B1 的肺转移及定植又可以促进向脾的转移^[25-26].

总之, 本研究首次确认了 miR-10b 可以上调糖基转移酶 *Fut8*、*Mgat3* 及 *OGT* 的表达并在糖链水平进行了验证, 未来的工作将着重于 miR-10b 对上述 3 个基因的分子机制的研究, 为研究 miR-10b 在癌症过程中的作用提供更多糖组学方面的理论基础.

参 考 文 献

- [1] Chen W, Zheng R, Baade P D, et al. Cancer statistics in China, 2015. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2016, 66(2): 115-132
- [2] Ohtsubo K, Marth J D. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. Cell, 2006, 126(5): 855-867

- [3] Catalona W J, Smith D S, Ratliff T L, *et al.* Measurement of prostate-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer. *The New England Journal of Medicine*, 1991, **324** (17): 1156–1161
- [4] Sato Y, Nakata K, Kato Y, *et al.* Early recognition of hepatocellular carcinoma based on altered profiles of alpha-fetoprotein. *The New England Journal of Medicine*, 1993, **328**(25): 1802–1806
- [5] Zhang Z, Bast R C, Jr., Yu Y, *et al.* Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer. *Cancer Res*, 2004, **64**(16): 5882–5890
- [6] Eller C H, Chao T Y, Singarapu K K, *et al.* Human cancer antigen globo H is a cell-surface ligand for human ribonuclease 1. *ACS Central Science*, 2015, **1**(4): 181–190
- [7] Si W, Li Y, Shao H, *et al.* MiR-34a inhibits breast cancer proliferation and progression by targeting Wnt1 in Wnt/beta-catenin signaling pathway. *The American Journal of the Medical Sciences*, 2016, **352**(2): 191–199
- [8] De Mattos-Arruda L, Bottai G, Nuciforo P G, *et al.* MicroRNA-21 links epithelial-to-mesenchymal transition and inflammatory signals to confer resistance to neoadjuvant trastuzumab and chemotherapy in HER2-positive breast cancer patients. *Oncotarget*, 2015, **6**(35): 37269–37280
- [9] Teng Y, Mei Y, Hawthorn L, *et al.* WASF3 regulates miR-200 inactivation by ZEB1 through suppression of KISS1 leading to increased invasiveness in breast cancer cells. *Oncogene*, 2013, **33**(2): 203–211
- [10] Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg R A. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature*, 2007, **449**(7163): 682–688
- [11] Bahena-Ocampo I, Espinosa M, Ceballos-Cancino G, *et al.* miR-10b expression in breast cancer stem cells supports self-renewal through negative PTEN regulation and sustained AKT Activation. 2016, **17**(5): 648–658
- [12] Pinho S S, Reis C A. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nature Reviews Cancer*, 2015, **15** (9): 540–555
- [13] Bartel D P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 2009, **136**(2): 215–233
- [14] Osaki M, Takeshita F, Ochiya T. MicroRNAs as biomarkers and therapeutic drugs in human cancer. *Biomarkers: Biochemical Indicators of Exposure, Response, and Susceptibility to Chemicals*, 2008, **13**(7): 658–670
- [15] Yue L, Han C, Li Z, *et al.* Fucosyltransferase 8 expression in breast cancer patients: a high throughput tissue microarray analysis. *Histology and Histopathology*, 2016, **31**(5): 547–555
- [16] Cheng L, Gao S, Song X, *et al.* Comprehensive N-glycan profiles of hepatocellular carcinoma reveal association of fucosylation with tumor progression and regulation of FUT8 by microRNAs. *Oncotarget*, 2016, **7**(38): 61199–61214
- [17] Honma R, Kinoshita I, Miyoshi E, *et al.* Expression of fucosyltransferase 8 is associated with an unfavorable clinical outcome in non-small cell lung cancers. *Oncology*, 2015, **88** (5): 298–308
- [18] Wang M, Wang J, Kong X, *et al.* MiR-198 represses tumor growth and metastasis in colorectal cancer by targeting fucosyl transferase 8. *Scientific Reports*, 2014, **4**(9): 6145
- [19] Wang X, Chen J, Li Q K, *et al.* Overexpression of alpha (1,6) fucosyltransferase associated with aggressive prostate cancer. *Glycobiology*, 2014, **24**(10): 935–944
- [20] Shao K, Chen Z Y, Gautam S, *et al.* Posttranslational modification of E-cadherin by core fucosylation regulates Src activation and induces epithelial-mesenchymal transition-like process in lung cancer cells. *Glycobiology*, 2016, **26**(2): 142–154
- [21] Matsumoto K, Yokote H, Arai T, *et al.* N-Glycan fucosylation of epidermal growth factor receptor modulates receptor activity and sensitivity to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor. *Cancer Science*, 2008, **99**(8): 1611–1617
- [22] Ferrer C M, Sodi V L, Reginato M J. O-GlcNAcylation in cancer biology: linking metabolism and signaling. *Journal of Molecular Biology*, 2016, **428**(16): 3282–3294
- [23] Krzeslak A, Forma E, Bernaciak M, *et al.* Gene expression of O-GlcNAc cycling enzymes in human breast cancers. *Clinical and Experimental Medicine*, 2012, **12**(1): 61–65
- [24] Luo P, He T, Jiang R, *et al.* MicroRNA-423-5p targets O-GlcNAc transferase to induce apoptosis in cardiomyocytes. *Molecular Medicine Reports*, 2015, **12**(1): 1163–1168
- [25] Yoshimura M, Nishikawa A, Ihara Y, *et al.* Suppression of lung metastasis of B16 mouse melanoma by N-acetylglucosaminyltransferase III gene transfection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**(19): 8754–8758
- [26] Sheng Y, Yoshimura M, Inoue S, *et al.* Remodeling of glycoconjugates on CD44 enhances cell adhesion to hyaluronate, tumor growth and metastasis in B16 melanoma cells expressing beta1,4-N-acetylglucosaminyltransferase III. *International Journal of Cancer Journal International du Cancer*, 1997, **73**(6): 850–858

Effect of N-glycan and O-glycan in miR-10b-overexpressed Human Mammary Epithelial Cell MCF10A^{*}

GUO Dong, GUO Jia, WU Yan-Li, GUAN Feng^{**}

(Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry & Biotechnology Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract Protein glycosylation is a common post-translation modification and plays important roles in regulation of protein function. Especially, the abnormal glycosylation plays a critical role in the development and progression of tumor and the metastasis of cancer cells. MiRNAs also play a key role in the development and progression of cancer, but the mechanism how miRNAs affect on the biological functions and induce tumor malignant transformation *via* glycosylation needs further illustrated. In this study, the expression of glycosyltransferases were analyzed using glycan-related gene chip in miR-10b-overexpressed human normal mammary epithelial cells MCF10A. Then, the alteration of N-glycan and O-glycan was analyzed using the methods established in our laboratory. The expression of glycosyltransferase gene *Fut8*, *MGAT3* and *OGT* and corresponding glycans were evaluated by qRT-PCR, Western blotting and lectin blotting. Taken together, our results provide the theoretical basis of glycomics on the role of miR-10b in breast cancer.

Key words miR-10b, MCF10A, N-glycan, O-glycan

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0026

^{*}This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation China (81672537) and The Natural Science Foundation of Jiangsu Province, China (BK20160173).

^{**}Corresponding author.

Tel: 86-510-85918126, E-mail: fengguan@jiangnan.edu.cn

Received: January 17, 2017 Accepted: February 27, 2017