

# 葡萄糖氨基转移酶 3 在胆管癌细胞增殖和转移中的作用

杜芳倩 解宇威 高瑞谦 朱呈瞻

(青岛大学附属医院肝胆胰外科, 山东 青岛 266003)

**[摘要]** **目的** 探讨葡萄糖氨基转移酶 3(GCNT3)在胆管癌(cholangiocarcinoma, CCA)细胞增殖和转移中的作用。**方法** 基于癌症基因组图谱(TCGA)平台分析 CCA 患者肿瘤组织和癌旁正常组织中 GCNT3 mRNA 表达水平。通过免疫组织化学(IHC)染色实验检测 CCA 患者肿瘤组织与癌旁正常组织中 GCNT3 蛋白表达水平。将人胆管癌 QBC939 细胞分为 A、B 组,人胆管癌 HUCCT1 细胞分为 C、D 组,A、C 组转染阴性对照慢病毒,B、D 组转染 GCNT3 过表达慢病毒;再将 QBC939 细胞分为 E、F 组,HUCCT1 细胞分为 G、H 组,E、G 组转染 siNC,F、H 组转染 siGCNT3。通过 RT-qPCR 技术和 Western blot(WB)实验检测各组细胞中 GCNT3 mRNA 及蛋白表达水平;通过 CCK-8、平板克隆、细胞划痕及 Transwell 实验评估各组细胞的增殖与迁移能力。**结果** 基于 TCGA 平台分析结果显示,CCA 患者肿瘤组织中 GCNT3 mRNA 表达水平显著高于癌旁正常组织( $t=9.46, P<0.05$ )。IHC 染色实验结果显示,CCA 患者肿瘤组织中 GCNT3 的表达水平显著高于癌旁正常组织。RT-qPCR 和 WB 实验结果显示,B 组与 A 组相比,D 组与 C 组相比,细胞中 GCNT3 mRNA 和蛋白的相对表达水平均显著升高( $t=2.96\sim 32.77, P<0.05$ );F 组与 E 组相比,H 组与 G 组相比,细胞中 GCNT3 mRNA 和蛋白的相对表达水平均显著降低( $t=10.06\sim 243.80, P<0.05$ )。细胞功能实验结果显示,B 组与 A 组相比,D 组与 C 组相比,细胞的增殖、迁移能力均显著升高( $t=3.52\sim 8.94, P<0.05$ );F 组与 E 组相比,H 组与 G 组相比,细胞的增殖、迁移能力均显著降低( $t=3.07\sim 12.87, P<0.05$ )。**结论** GCNT3 在 CCA 患者肿瘤组织中呈高表达状态,其可增强 CCA 细胞的增殖和迁移能力。

**[关键词]** 胆管肿瘤;N-乙酰氨基葡萄糖转移酶类;细胞增殖;细胞运动;信号传导;基因表达调控;肿瘤

**[中图分类号]** R735.8

**[文献标志码]** A

## Role of glucosaminyl (N-acetyl) transferase 3 in the proliferation and metastasis of cholangiocarcinoma cells

DU Fangqian, XIE Yuwei, GAO Ruiqian, ZHU Chengzhan (Department of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266003, China)

**[ABSTRACT]** **Objective** To investigate the role of glucosaminyl (N-acetyl) transferase 3 (GCNT3) in the proliferation and metastasis of cholangiocarcinoma (CCA) cells. **Methods** The Cancer Genome Atlas (TCGA) database and immunohistochemistry (IHC) were used to analyze and detect the expression levels of GCNT3 mRNA and protein in CCA tumor tissues and adjacent normal tissues, respectively. Human CCA QBC939 cells were divided into groups A and B, and human CCA HUCCT1 cells were divided into groups C and D, which were transfected with negative control lentivirus and GCNT3-overexpressing lentivirus, respectively. QBC939 cells were further divided into groups E and F, and HUCCT1 cells were divided into groups G and H, which were transfected with siNC and siGCNT3, respectively. Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) and Western blot assay were used to detect the expression levels of GCNT3 mRNA and protein in each group. The proliferation and migration abilities of CCA cells were evaluated using CCK-8 assays, colony formation assays, scratch assays, and Transwell assays. **Results** TCGA analysis showed that GCNT3 mRNA expression in CCA tissues was significantly higher than that in adjacent normal tissues ( $t=9.46, P<0.05$ ). IHC results indicated that GCNT3 expression in CCA tissues was significantly higher than that in adjacent normal tissues. RT-qPCR and Western blot assay showed that the relative expression levels of GCNT3 mRNA and protein were significantly increased in group B compared with group A, and in group D compared with group C ( $t=2.96\sim 32.77, P<0.05$ ); the relative expression levels of GCNT3 mRNA and protein were significantly decreased in group F compared with group E, and in group H compared with group G ( $t=10.06\sim 243.80, P<0.05$ ). Cell functional experiments showed that the proliferation and migration abilities of CCA cells were significantly increased in group B compared with group A, and in group D compared with group C ( $t=3.52\sim 8.94, P<0.05$ ); the proliferation and migration abilities of cells were significantly reduced in group F compared with group E, and in group H compared with group G ( $t=3.07\sim 12.87, P<0.05$ ). **Conclusion** GCNT3 is highly expressed in CCA tissues and can promote the proliferation and migration of CCA cells.

**[KEY WORDS]** Bile duct neoplasms; N-acetylglucosaminyl-

**[收稿日期]** 2025-11-29; **[修订日期]** 2026-04-20  
**[基金项目]** 山东省自然科学基金项目(ZR2024LZL014)  
**[通信作者]** 朱呈瞻, Email: zhuchengz@qduhospital.cn

transferases; Cell proliferation; Cell movement; Signal transduction; Gene expression regulation; Neoplastic

胆管癌(cholangiocarcinoma,CCA)是一种源自胆管上皮细胞的高度恶性肿瘤,其特征包括病情隐匿、发展迅速以及预后不良等<sup>[1-2]</sup>。由于早期缺乏特异性临床表现,大部分 CCA 患者在被确诊时已经发展至中晚期,常常伴随着肿瘤细胞局部浸润和远处转移,失去了进行根治性手术的机会<sup>[2]</sup>。尽管近年来在影像学诊断、手术及综合治疗方面已取得一定进展,但 CCA 患者的整体治疗效果仍不理想。糖基化异常是肿瘤发生发展的重要分子特征。葡萄糖氨基转移酶 3(GCNT3)是一种  $\beta$ -1,6-N-乙酰葡萄糖胺转移酶,定位于高尔基体,主要参与 O-连接型糖链分支结构的形成,从而调控细胞表面糖链组成及相关生物学功能<sup>[3]</sup>。既往研究提示,GCNT3 在多种肿瘤中异常表达,并可以通过影响肿瘤细胞的黏附<sup>[4-5]</sup>、迁移<sup>[6-7]</sup>以及信号转导<sup>[8-9]</sup>参与肿瘤进展。然而,GCNT3 在 CCA 中的表达特征及其生物学功能目前尚未明确。本研究旨在探讨 GCNT3 对 CCA 细胞增殖和迁移能力的影响,并为进一步寻找 CCA 的诊断及治疗靶点提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

人 CCA 细胞株 QBC939 和 HUCCT1 细胞购自中国科学院上海细胞库。GCNT3 过表达慢病毒及其阴性对照购自上海吉凯基因有限公司。小干扰 RNA siGCNT3 及其空载体 siNC 购自苏州吉玛基因股份有限公司。GCNT3 抗体、GAPDH 抗体购自武汉爱博泰克生物科技有限公司。二抗购自艾比玛特生物医药(上海)有限公司。GAPDH 引物和 GCNT3 引物购自深圳华大基因股份有限公司。

1.2 GCNT3 基因的泛癌分析和基因集富集分析(GSEA)

从癌症基因组图谱(TCGA, <https://portal.gdc.cancer.gov>)平台获取 GCNT3 在 33 种癌症患者肿瘤组织中的 mRNA 表达谱,并分析 CCA 患者肿瘤组织和癌旁正常组织中 GCNT3 mRNA 表达水平。而后基于与 GCNT3 表达显著相关的基因,采用 WebGestalt (<https://www.webgestalt.org/>)在线分析平台进行 GSEA。

1.3 免疫组织化学(IHC)染色实验检测 CCA 患者肿瘤组织与癌旁正常组织中 GCNT3 蛋白表达水平

收集青岛大学附属医院经术后病理确诊的 5 例原发性 CCA 患者的肿瘤组织及癌旁正常组织石蜡切片,进行 IHC 染色。其中,抗体孵育条件为 GC-

NT3 一抗(1 : 200)于 4 ℃下孵育过夜,相应二抗(1 : 300)于室温下孵育 1 h。置于共聚焦显微镜下观察并采集图像,将出现棕黄色或棕褐色信号判定为 GCNT3 蛋白表达阳性。

1.4 细胞分组与处理

将 QBC939 细胞和 HUCCT1 细胞接种于含有 10%胎牛血清和 1%青霉素/链霉素的 DMEM 培养基(完全培养基)中,置于 37 ℃、含体积分数 0.05 CO<sub>2</sub>的培养箱中培养。待细胞生长状态稳定以后,接种于 6 孔板中进行培养,待细胞融合度达 50%~60%时,将 QBC939 细胞分为 A 组、B 组和 E 组、F 组,HUCCT1 细胞分为 C 组、D 组和 G 组、H 组,A、C 组细胞感染阴性对照慢病毒,B、D 组细胞感染 GCNT3 过表达慢病毒,感染复数均为 20;E、G 组的细胞转染 siNC,F、H 组的细胞转染 siGCNT3,均为 100 pmol/孔。所有细胞转染完成后,再继续培养 48 h,用于后续实验。

1.5 RT-qPCR 技术检测各组细胞中 GCNT3 mRNA 表达水平

收集转染后的 A~H 组细胞,提取总 RNA 并逆转录为 cDNA,使用 RT-qPCR 试剂盒于 Roche LightCycler 480 II 系统中检测。以 GAPDH 作为内参基因,采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup>法对各组细胞中 GCNT3 mRNA 的相对表达水平进行定量分析。引物序列见表 1。

表 1 引物名称及序列

| 名称    | 序列                             | 长度(bp) |
|-------|--------------------------------|--------|
| GAPDH | F:5'-GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG-3' | 22     |
|       | R:5'-ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA-3' | 22     |
| GCNT3 | F:5'-CACCAGACTGTGAGCACTTC-3'   | 20     |
|       | R:5'-CATACACAGCTCGCGTAGCCT-3'  | 21     |

1.6 Western blot(WB)实验检测各组细胞中 GCNT3 蛋白的相对表达水平

收集转染后的 A~H 组细胞并提取总蛋白,使用 10% SDS-PAGE 凝胶进行电泳分离,转膜、封闭后,分别加入 GCNT3 一抗(1 : 1 000)、GAPDH 一抗(1 : 1 000)4 ℃孵育过夜,次日加入对应二抗(1 : 10 000)室温孵育 1 h。采用 ECL 化学发光试剂进行条带显影并对蛋白条带灰度值进行定量分析。以 GAPDH 为内参,计算各组细胞中 GCNT3 的相对表达水平。

1.7 CCK-8 实验检测各组细胞的细胞活力

收集转染后的 A~H 组细胞,按每孔约 2 000 个细胞的密度接种于 96 孔板中,置于 37 ℃培养箱

内分别培养 24、48、72、96 h 后,弃去原培养基,向各孔加入 100  $\mu$ L 含 10% CCK-8 的工作液,继续孵育 30 min 后检测各孔在 450 nm 波长下的吸光度值,并计算细胞活力。

### 1.8 平板克隆实验检测各组细胞的增殖能力

收集转染后的 A~H 组细胞,按每孔约 500 个细胞的密度接种于 6 孔板中,置于培养箱内持续培养约 14 d,当多数孔板中克隆数超 30 个时,用甲醇固定各孔内细胞 15~20 min,去除固定液后,加入 0.1% 结晶紫染色 2 h,用 PBS 清洗后拍照,而后使用 ImageJ 软件对细胞克隆数目进行计数。

### 1.9 细胞划痕实验检测各组细胞的迁移能力

取转染后的 A~H 组细胞,接种到 6 孔板中,当细胞密度达到约 90% 时,使用 200  $\mu$ L 的无菌移液器吸头,在细胞孔板的底部沿着与尺子垂直的方向画线,加入 2 mL DMEM 培养基继续培养。在划痕后第 0、48 小时置于光学显微镜下观察并拍照,分别测量两个时间点时细胞划痕区域宽度,并计算各组细胞迁移率。

### 1.10 Transwell 实验检测各组细胞的迁移能力

将转染后的 A~H 组细胞置于 DMEM 培养基中,每组取  $1 \times 10^5$  个细胞,以 350  $\mu$ L DMEM 培养基重悬后加入 Transwell 小室(孔径 8  $\mu$ m)上层,下层加入 550  $\mu$ L 含 30% 胎牛血清的 DMEM 培养基,置于培养箱中培养 11 h 后。加入甲醇溶液进行固定,然后加入 0.1% 结晶紫染色 0.5 h。用 PBS 洗涤小室并擦去内侧细胞后,使用倒置显微镜观察,并使用 ImageJ 软件计算各组细胞迁移数目。

### 1.11 统计学处理

使用 SPSS 27.0 和 GraphPad Prism 10.0 软件对实验数据进行统计分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间差异比较采用独立样本  $t$  检验,多组在不同时间点之间的比较则采用重复测量设计的方差分析,进一步两两比较采用 Tukey's HSD 检验。所有实验均独立重复 3 次,以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 CCA 患者肿瘤组织中 GCNT3 的表达情况

基于 TCGA 数据库的泛癌分析结果显示,与癌旁正常组织相比,GCNT3 在 CCA、乳腺癌、肾癌等 9 种肿瘤患者的肿瘤组织中显著高表达( $P < 0.05$ )。进一步分析结果显示,CCA 患者肿瘤组织与癌旁正常组织中 GCNT3 mRNA 的相对表达水平分别为

$3.59 \pm 1.91$  和  $0.26 \pm 0.41$ ,与癌旁正常组织相比,CCA 患者肿瘤组织中 GCNT3 mRNA 表达水平显著升高( $t = 9.46, P < 0.05$ )。IHC 染色实验结果显示,与癌旁正常组织相比,CCA 患者肿瘤组织当中 GCNT3 的表达水平显著升高。见图 1。GSEA 结果显示,CCA 患者肿瘤组织中 GCNT3 高表达与 ERBB 信号通路激活显著相关。

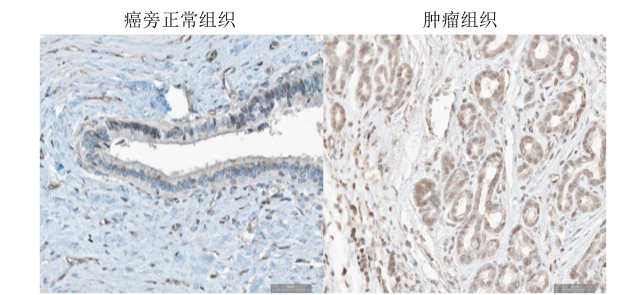


图 1 CCA 患者肿瘤组织与癌旁正常组织中 GCNT3 表达水平比较(IHC 染色,放大 400 倍)

### 2.2 各组细胞中 GCNT3 mRNA 和蛋白相对表达水平比较

RT-qPCR 和 WB 检测结果显示,与 A 组相比,B 组细胞中 GCNT3 mRNA 和蛋白相对表达水平显著升高( $t = 16.97、5.37, P < 0.01$ );与 C 组相比,D 组细胞中 GCNT3 mRNA 和蛋白相对表达水平显著升高( $t = 32.77、2.96, P < 0.05$ );与 E 组相比,F 组细胞中 GCNT3 mRNA 和蛋白相对表达水平显著降低( $t = 243.80、10.06, P < 0.01$ );与 G 组相比,H 组细胞中上述指标均显著降低( $t = 66.30、10.92, P < 0.01$ )。见图 2、表 2。

### 2.3 各组细胞的细胞活力比较

重复测量设计的方差分析结果显示,时间、分组及两者间的交互作用均对细胞活力产生显著性影响( $F_{\text{时间}} = 794.49 \sim 2\,515.41, F_{\text{组别}} = 102.73 \sim 817.55, F_{\text{交互}} = 22.54 \sim 98.36, P < 0.05$ )。各组细胞培养不同时间点时细胞活力均有显著性差异( $F = 400.15 \sim 1\,506.19, P < 0.05$ )。其中,第 24~96 小时各时间点上 B 组细胞活力均显著高于 A 组( $q = 8.70 \sim 16.96, P < 0.01$ );第 24~96 小时各时间点上 D 组细胞活力均显著高于 C 组( $q = 9.73 \sim 26.00, P < 0.01$ );第 72、96 小时 F 组细胞活力均显著低于 E 组( $q = 6.12、13.49, P < 0.01$ );第 24~96 小时各时间点上 H 组细胞活力均显著性低于 G 组( $q = 4.43 \sim 22.07, P < 0.05$ )。见图 3。

### 2.4 各组细胞的增殖能力比较

平板克隆实验结果显示,A、B 组细胞的克隆形成数目分别为( $12.67 \pm 3.06$ )、( $22.33 \pm 1.16$ )个,B

组显著多于 A 组( $t=5.13, P<0.01$ );C 组、D 组细胞的克隆形成数目分别为( $33.67\pm3.22$ )、( $76.33\pm11.24$ )个,D 组显著多于 C 组( $t=6.32, P<0.01$ )。E 组和 F 组细胞的克隆形成数目分别为( $68.67\pm$

$22.03$ )、( $23.33\pm13.01$ )个,F 组显著少于 E 组( $t=3.07, P<0.05$ );G 组、H 组细胞的克隆形成数目分别为( $220.00\pm26.23$ )、( $142.70\pm10.07$ )个,H 组显著少于 G 组( $t=4.77, P<0.01$ )。见图 4。

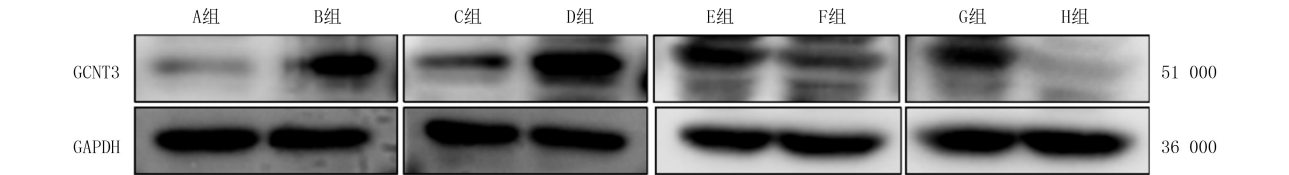


图 2 A~H 组细胞中 GCNT3 蛋白表达水平比较

表 2 A~H 组细胞中 GCNT3 mRNA 和蛋白相对表达水平比较( $n=3, \bar{x}\pm s$ )

| 指标         | A 组       | B 组       | C 组       | D 组        | E 组       | F 组       | G 组       | H 组       |
|------------|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| GCNT3 mRNA | 1.00±0.07 | 4.59±0.36 | 1.00±0.03 | 13.34±0.65 | 1.00±0.01 | 0.01±0.00 | 1.00±0.03 | 0.00±0.00 |
| GCNT3 蛋白   | 1.00±0.04 | 1.87±0.28 | 1.01±0.13 | 1.77±0.43  | 1.00±0.00 | 0.73±0.05 | 1.00±0.00 | 0.64±0.06 |

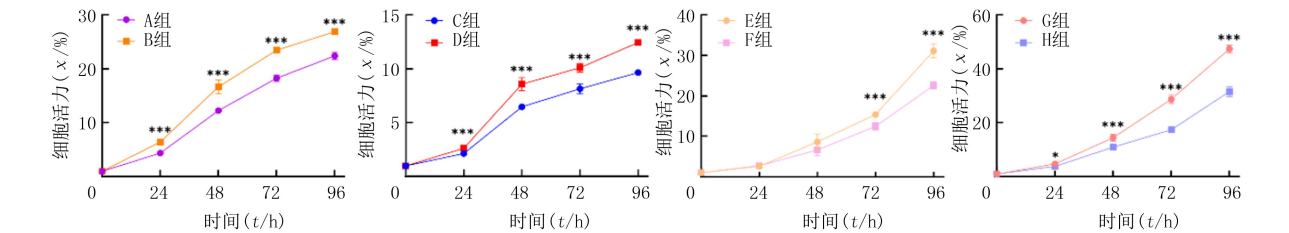


图 3 各组细胞的细胞活力比较

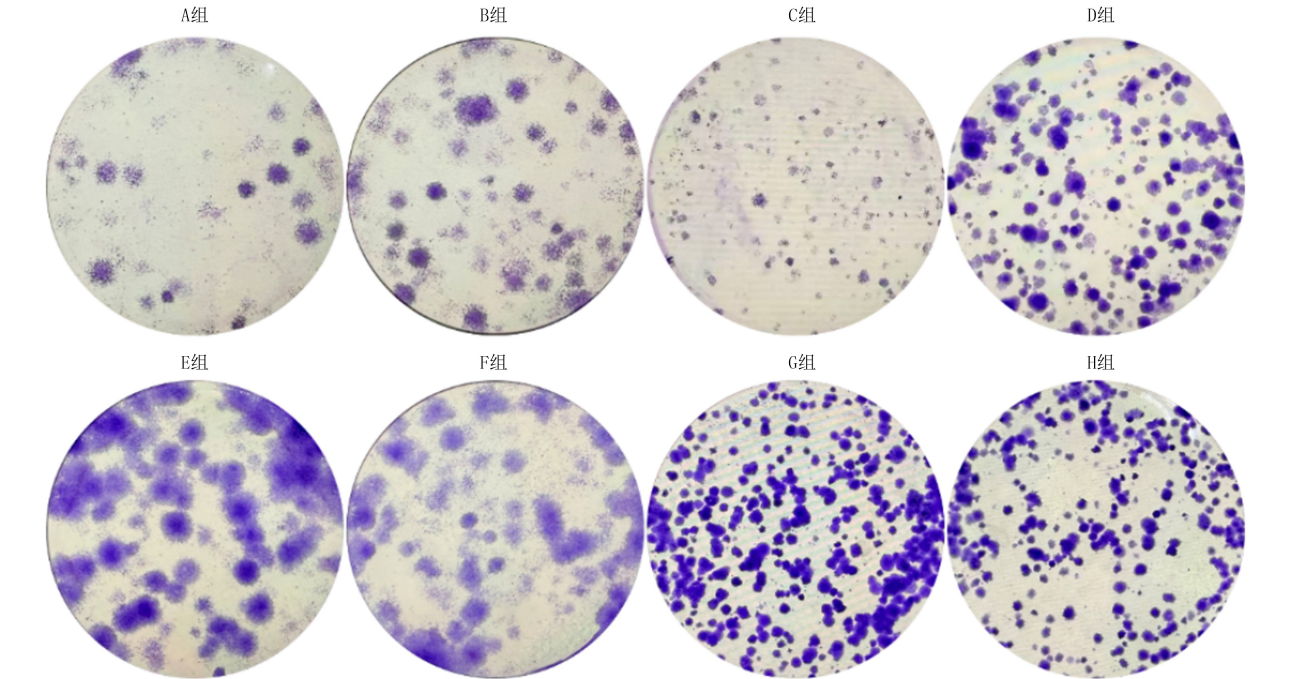


图 4 各组细胞的增殖能力比较(结晶紫染色)

2.5 各组细胞的迁移能力比较

细胞划痕实验结果显示,A、B 组细胞迁移率分别为( $34.67\pm38.70$ )%、( $58.58\pm5.57$ )%,B 组显著高于 A 组( $t=6.11, P<0.05$ );C、D 组细胞迁移率分别为( $30.95\pm3.98$ )%、( $39.95\pm1.96$ )%,D 组显

著高于 C 组( $t=3.52, P<0.05$ )。E、F 组细胞迁移率分别为( $47.70\pm5.93$ )%、( $28.97\pm4.69$ )%,F 组显著低于 E 组( $t=4.29, P<0.05$ );G、H 组细胞迁移率分别为( $34.53\pm2.35$ )%、( $18.78\pm2.40$ )%,H 组显著低于 G 组( $t=8.14, P<0.01$ )。见图 5。

Transwell 实验结果显示,A、B 组细胞迁移数目分别为(650.00±50.00)、(1 417.00±212.60)个,B 组显著多于 A 组( $t=6.08,P<0.01$ );C、D 组细胞迁移数目分别为(533.30±38.19)、(866.70±52.04)个,D 组显著多于 C 组( $t=8.94,P<0.01$ )。

E、F 组细胞迁移数目分别为(1 055.00±72.63)、(423.30±107.70)个,F 组显著少于 E 组( $t=8.42,P<0.01$ );G、H 组细胞迁移数目分别为(1 147.00±45.37)、(645.00±50.00)个,H 组显著少于 G 组( $t=12.87,P<0.01$ )。见图 6。

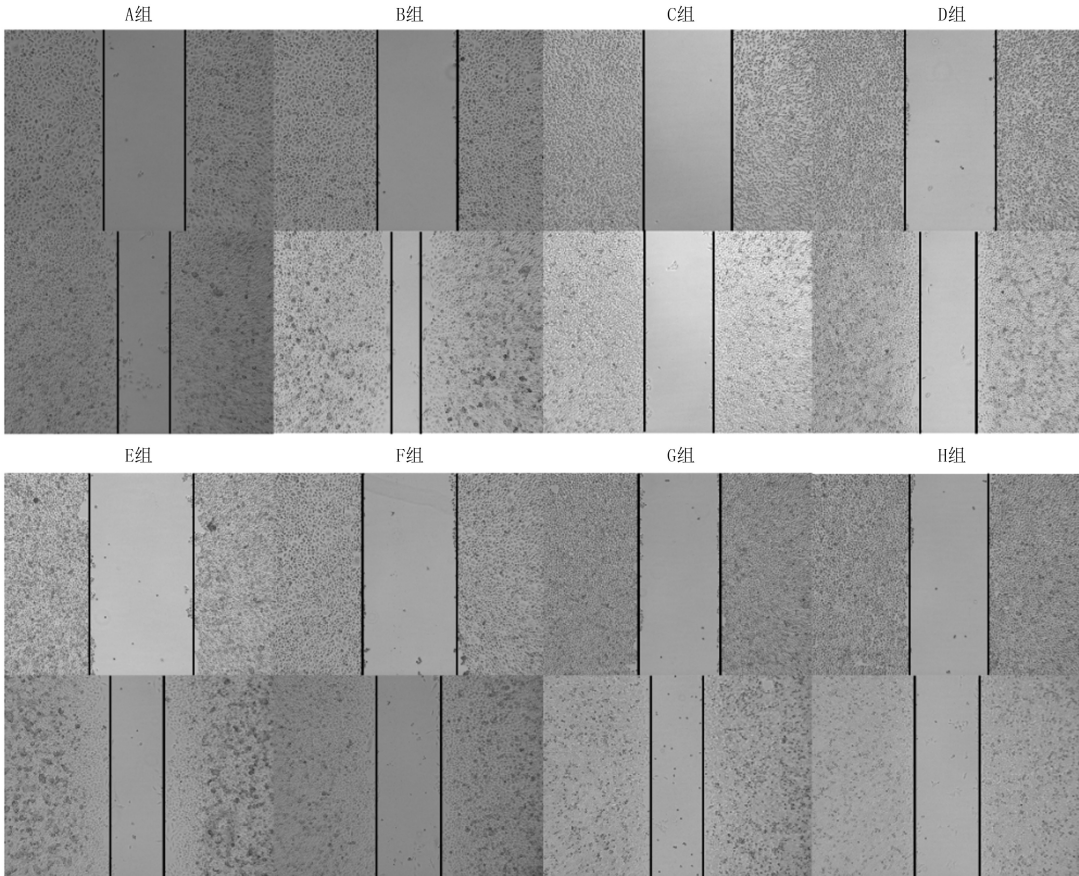


图 5 各组细胞的迁移能力比较(划痕实验,放大 40 倍)

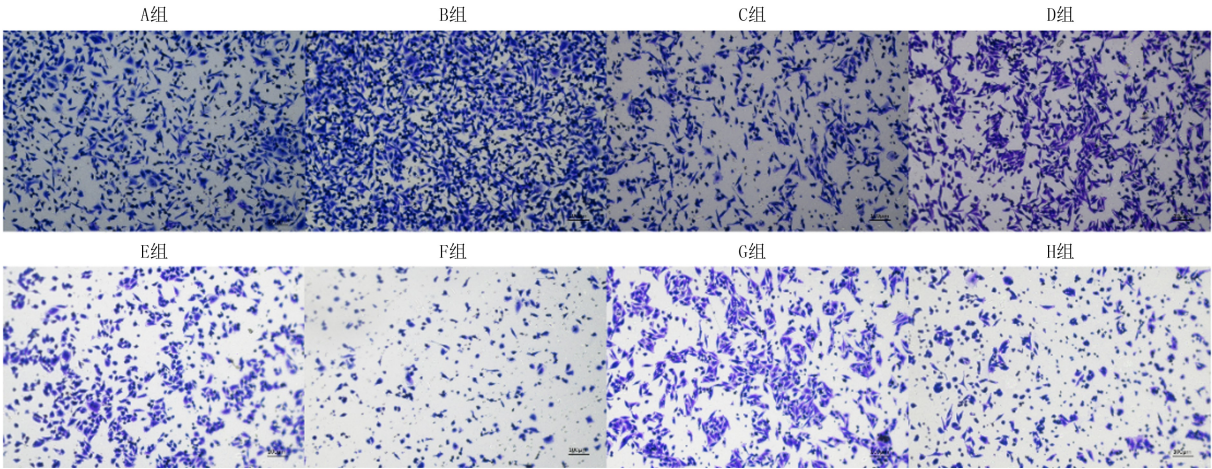


图 6 各组细胞的迁移能力比较(Transwell 实验,结晶紫染色,放大 100 倍)

3 讨 论

CCA 是一类来源于胆管上皮细胞的高侵袭性恶性肿瘤<sup>[1]</sup>,依据其病灶的解剖学部位分为肝内型

CCA、肝门型 CCA 以及远端型 CCA<sup>[10]</sup>。CCA 具有起病隐匿、早期缺乏特异性临床表现、肿瘤侵袭性强等特点,多数患者在确诊时已处于中晚期阶段,常伴随局部浸润或远处转移,预后普遍较差。尽管近年

来 CCA 的手术方式、分子靶向治疗及免疫治疗等均已取得一定进步,但由于其分子异质性强、对治疗反应差,总体治疗效果仍然有限,患者长期生存率尚未得到显著改善<sup>[2]</sup>。因此,深入解析 CCA 发生、发展及转移过程中的分子调控机制,寻找新的关键调控因子和潜在治疗靶点,仍是当前 CCA 研究领域有待解决的重要问题。

GCNT3 是一种  $\beta$ -1,6-N-乙酰葡萄糖胺转移酶,在 O-连接型糖链分支结构的形成过程中发挥着重要作用<sup>[11]</sup>。作为糖基化修饰相关关键酶之一,GCNT3 能够通过调节蛋白糖基化状态影响细胞黏附、信号转导及肿瘤微环境稳态,从而参与肿瘤发生发展的多个环节。近年来,越来越多研究发现,GCNT3 在多种恶性肿瘤组织中呈异常高表达状态,包括乳腺癌<sup>[12]</sup>、肾癌<sup>[13]</sup>和肝细胞癌<sup>[14]</sup>等。同时,GCNT3 还被认为与非小细胞肺癌<sup>[15]</sup>、胰腺癌<sup>[16]</sup>以及胃癌<sup>[17]</sup>患者的不良预后密切相关,提示其可能具有潜在的诊断及预后评估价值。已有研究证实,GCNT3 在肿瘤细胞增殖、侵袭、迁移、上皮-间质转化(EMT)及化疗耐药等恶性生物学行为中具有重要的调控作用。在乳腺癌中,GCNT3 能够通过激活 PI3K/AKT 信号通路促进肿瘤细胞增殖及迁移,并增强其侵袭能力,同时影响细胞凋亡过程<sup>[12]</sup>。此外,在肝细胞癌中,GCNT3 能够通过 PI3K/AKT 和 MUC13/GSK3- $\beta$ / $\beta$ -catenin 等信号轴促进肿瘤进展,并诱导 EMT 相关表型形成<sup>[7-8]</sup>。另有研究表明,GCNT3 可与鼻咽癌细胞中的锌指 E-box 结合同源盒蛋白 1(ZEB1)形成复合物,进一步促进细胞迁移及 EMT 进程<sup>[18]</sup>。在黑色素瘤中,GCNT3 可增强黑色素瘤细胞黏附分子(MCAM)稳定性,并且增强 S100 钙结合蛋白 A8/A9(S100A8/A9)介导的细胞运动能力,从而促进肿瘤细胞转移<sup>[19]</sup>。此外,GCNT3 还与结直肠癌、卵巢癌、胰腺癌等多种肿瘤对化疗药物的耐受性形成密切相关<sup>[20-21]</sup>。尽管目前关于 GCNT3 在多种肿瘤中的促癌作用已有较多报道,但其在 CCA 发生、进展及远处转移中的具体作用及分子机制尚未完全阐明。因此,进一步探讨 GCNT3 在 CCA 中的生物学功能及其潜在调控机制,对于 CCA 新型诊断标志物及治疗靶点的探索具有重要意义。

本研究中,基于 TCGA 数据库的泛癌分析及 IHC 染色结果显示,与癌旁正常组织相比,GCNT3 在 CCA 患者肿瘤组织中呈高表达状态,提示其可能参与 CCA 发生发展相关生物学过程。GSEA 结

果显示,CCA 患者肿瘤组织中 GCNT3 的高表达与 ERBB 信号通路激活显著相关<sup>[22]</sup>,提示 GCNT3 可能通过调控 ERBB 相关下游信号转导参与 CCA 细胞的恶性进展。已有研究表明,ERBB 信号通路在肿瘤细胞增殖与转移<sup>[23-24]</sup>、免疫逃逸<sup>[25]</sup>以及化疗耐药<sup>[26]</sup>过程中发挥重要作用,其异常激活与恶性肿瘤的不良预后密切相关<sup>[26]</sup>。然而,GCNT3 与 ERBB 信号通路之间的具体调控机制目前尚未完全明确,仍需进一步通过体内外实验加以验证。

本研究进一步在人 CCA 细胞株 QBC939 和 HUCCT1 细胞中对 GCNT3 的功能进行验证,通过分别对两种细胞感染 GCNT3 过表达慢病毒或小干扰 RNA siGCNT3,从而过表达或敲低其 GCNT3 水平。RT-qPCR 技术和 WB 实验检测结果显示两种细胞中的 GCNT3 均成功过表达或敲低。克隆形成和 CCK-8 实验结果显示,过表达 GCNT3 可显著增强 QBC939 和 HUCCT1 细胞的增殖能力;而敲低 GCNT3 可显著削弱上述两种细胞的增殖能力。Transwell 实验和细胞划痕实验结果显示,过表达 GCNT3 可显著增强 QBC939 和 HUCCT1 细胞的迁移能力;而敲低 GCNT3 可显著削弱其迁移能力。以上结果从细胞功能层面支持了 GCNT3 在 CCA 进展中的潜在致癌作用,提示 GCNT3 可通过促进肿瘤细胞的增殖和迁移,进而促进 CCA 进展。

本研究仍存在一定局限性。首先,本研究主要基于体外细胞实验,尚缺乏动物模型的验证,后续需通过构建小鼠皮下成瘤及原位 CCA 模型以进一步验证 GCNT3 在 CCA 中的作用;其次,本研究尚未深入分析 GCNT3 的上下游相关信号通路,未来研究可以结合 ERBB 相关通路进一步明确 GCNT3 在 CCA 进展中的具体分子机制,从而探讨 GCNT3 在 CCA 进展中的临床意义及其作为潜在治疗靶点的可行性。

综上所述,GCNT3 在 CCA 患者肿瘤组织中呈高表达状态,其可增强 CCA 细胞的增殖和迁移能力。本研究有望为 CCA 相关分子机制及靶向治疗的研究提供新思路。

**伦理批准和知情同意:**本研究涉及的所有试验均已通过青岛大学附属医院医学伦理委员会的审核批准(文件号 QYFYWZLL50142)。所有试验过程均遵照《赫尔辛基宣言》的条例进行。受试对象或其亲属已经签署知情同意书。

**作者声明:**杜芳倩、朱呈瞻参与了研究设计,杜芳倩、解宇威、高瑞谦、朱呈瞻参与了论文的写作和修改。所有作者均阅读并同意发表该论文,且均声明不存在利益冲突。

[参考文献]

[1] BANALES J M, MARIN J J G, LAMARCA A, et al. Cholangiocarcinoma 2020: The next horizon in mechanisms and management[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2020,17(9):557-588.

[2] MACARULLA T, NEUZILLET C, PRAGER G W, et al. Opportunities and approaches to optimising advanced cholangiocarcinoma outcomes in the era of targeted therapies: A narrative review[J]. *Oncol Ther*, 2025,13(4):939-962.

[3] WAUTIER J L, SCHMIDT A M. Protein glycation: A firm link to endothelial cell dysfunction[J]. *Circ Res*, 2004,95(3):233-238.

[4] RAO C V, JANAKIRAM N B, MADKA V, et al. Small-molecule inhibition of GCNT3 disrupts mucin biosynthesis and malignant cellular behaviors in pancreatic cancer[J]. *Cancer Res*, 2016,76(7):1965-1974.

[5] RAO C V, JANAKIRAM N B, MOHAMMED A. Molecular pathways: Mucins and drug delivery in cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2017,23(6):1373-1378.

[6] YAMAMOTO D, SASAKI K, KOSAKA T, et al. Functional analysis of GCNT3 for cell migration and EMT of castration-resistant prostate cancer cells[J]. *Glycobiology*, 2022,32(10):897-908.

[7] WANG Y D, FANG X S, XIE H, et al. GCNT3 promotes hepatocellular carcinoma progression and EMT by activating the PI3K/AKT pathway[J]. *Biochem Genet*, 2025,63(3):2423-2437.

[8] QIU K, WU T T, DONG B Z, et al. GCNT3 regulated MUC13 to promote the development of hepatocellular carcinoma through the GSK3 $\beta$ / $\beta$ -catenin pathway[J]. *Dig Liver Dis*, 2024,56(9):1572-1581.

[9] LIU J J, ZHANG Y, YU C X, et al. Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 2A downregulates GCNT3 *via* the TGF- $\beta$ 1/sm $\alpha$ d-mTORC1 signaling axis[J]. *J Virol*, 2021,95(10):e02481-e02420.

[10] GAO R Q, WEI B, LI K, et al. Metastatic microenvironment of extrahepatic cholangiocarcinoma[J]. *Int J Surg*, 2026,112(2):4452-4466.

[11] YEH J C, ONG E, FUKUDA M. Molecular cloning and expression of a novel beta-1, 6-N-acetylglucosaminyltransferase that forms core 2, core 4, and I branches[J]. *J Biol Chem*, 1999,274(5):3215-3221.

[12] LI Y F, REN Z, WU T, et al. GCNT3 promotes the proliferation, apoptosis, invasion, and migration of breast cancer through the PI3K/AKT pathway[J]. *Transl Cancer Res*, 2024,13(11):6381-6393.

[13] KEN B T, IMLER E, PANGILINAN J, et al. Whole-transcriptome sequencing identified gene expression signatures associated with aggressive clear cell renal cell carcinoma[J]. *Genes Cancer*, 2018,9(5-6):247-256.

[14] LIU T H, ZHANG S, CHEN J, et al. The transcriptional profiling of glycogenes associated with hepatocellular carcinoma metastasis[J]. *PLoS One*, 2014,9(9):e107941.

[15] LI Q, RAN P Z, ZHANG X Y, et al. Downregulation of N-acetylglucosaminyltransferase GCNT3 by miR-302b-3p decreases non-small cell lung cancer (NSCLC) cell proliferation, migration and invasion[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018,50(3):987-1004.

[16] GUPTA R, LEON F, THOMPSON C M, et al. Global analysis of human glycosyltransferases reveals novel targets for pancreatic cancer pathogenesis[J]. *Br J Cancer*, 2020,122(11):1661-1672.

[17] LUO Y, CHEN X, HU E, et al. Transcriptome analysis revealed the molecular signatures of cisplatin-fluorouracil combined chemotherapy resistance in gastric cancer[J]. *Georgian Med News*, 2023(345):6-18.

[18] CHEN Y J, ZHANG Y, DUO S, et al. Study on the regulatory mechanism of latent membrane protein 2A on GCNT3 expression in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Virus Genes*, 2024,60(4):347-356.

[19] SUMARDIKA I W, CHEN Y Y, KONDO E, et al.  $\beta$ -1, 3-galactosyl-*O*-glycosyl-glycoprotein  $\beta$ -1, 6-*N*-acetylglucosaminyltransferase 3 increases MCAM stability, which enhances S100A8/A9-mediated cancer motility[J]. *Oncol Res*, 2018,26(3):431-444.

[20] 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.

[21] HE Y G, ZHU Y N, WANG W W, et al. Clinical efficacy and chemoresistance analysis of precision neoadjuvant chemotherapy for borderline resectable pancreatic cancer: A prospective, single-arm pilot study[J]. *Int J Surg*, 2025,111(5):3269-3280.

[22] LIAO Y X, WANG J, JAEHNIG E J, et al. WebGestalt 2019: Gene set analysis toolkit with revamped UIs and APIs [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019,47(W1):W199-W205.

[23] LI W, LIANG X, WU X R, et al. RHBDD1 promotes cervical cancer progression by activating the EGFR/PI3K/AKT signaling pathway[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2026,780:110777.

[24] CHAO Y J, WANG H C, CHEN Y L, et al. TBC1D23 drives lymphatic metastasis in pancreatic ductal adenocarcinoma by altering EGFR cell surface dynamics and signaling[J]. *Cell Oncol (Dordr)*, 2026,49(2):65.

[25] LIU Y, WANG N N, LI Z H, et al. Mitofusin-2 suppresses tumor immune escape through EGFR/STAT3-mediated PD-L1 transcription[J]. *Cell Death Dis*, 2026,17(1):364.

[26] ABBAS N, MOURAD M, SMAILY H, et al. EGFR signaling in colorectal cancer: Novel therapeutic strategies, predictive biomarkers, and counteracting treatment resistance[J]. *Int J Mol Sci*, 2026,27(7):3265.

(本文编辑 李京蔓)