

人肝癌细胞系的糖蛋白质组学研究*

周海君¹⁾ 刘银坤^{1)**} 崔杰峰¹⁾ 金红²⁾

魏黎明²⁾ 樊惠芝²⁾ 郭坤¹⁾ 杨芑原²⁾

¹⁾复旦大学附属中山医院肝癌研究所, 教育部“癌变和侵袭原理”重点实验室, 上海 200032;

²⁾复旦大学蛋白质组学研究中心, 化学系, 上海 200433)

摘要 糖基化是最重要的蛋白质翻译后形式之一, 糖基化蛋白的糖链部分影响着蛋白质的折叠和稳定性以及其生物学功能. 许多恶性肿瘤组织与正常组织相比已显示出蛋白质糖基化的差异. 采用蛋白质组学分析方法结合先进的糖蛋白荧光染色技术, 研究了正常人肝细胞系 (Chang Liver) 和人肝癌细胞系 (Hep3B) 糖蛋白糖基化的差异. 首先用细胞裂解法提取细胞总蛋白质, 进行双向电泳 (2-DE), 然后用 pro-Q Emerald 488 糖蛋白荧光染料进行糖蛋白染色, 得到两种细胞系糖基化蛋白表达谱, 经 2-DE 分析软件 Dymension 分析 2-DE 图像, 比较糖蛋白的糖基化程度, 并对糖基化蛋白进行质谱鉴定. 结果显示正常人肝细胞表达 (74±2) 个 ($n=3$), 而人肝癌细胞系表达 (78±3) 个糖蛋白 ($n=3$). 两者匹配的糖蛋白质点 31 个, Hep3B 表达而 Chang Liver 不表达的糖蛋白质点 47 个, Chang Liver 表达而 Hep3B 不表达的糖蛋白质点 43 个. 两种细胞系糖基化程度存在明显差异, 与正常人肝细胞相比, 肝癌细胞发生糖基化改变的糖蛋白有 25 个, 其中糖基化水平上调的有 10 个, 下调的有 15 个, 质谱鉴定出 12 个发生糖基化改变的糖蛋白. 这些结果显示蛋白质糖基化改变可能在肝癌的发生和发展中起一定作用.

关键词 肝癌细胞, 糖基化蛋白, 糖蛋白染色, 双向电泳

学科分类号 Q53

蛋白质糖基化是一种重要的翻译后修饰, 约有一半以上的蛋白质是发生糖基化的^[1]. 越来越多的文献报道显示, 糖基化作为一种主要的翻译后修饰对蛋白质功能有着重要影响, 如: 对蛋白质的折叠、运输、定位起着重要作用^[2]. 在许多疾病的发生、发展过程中糖蛋白的糖基化程度都发生了改变. 在目前临床应用的肿瘤筛查标志物中绝大部分是糖蛋白, 特别是有些糖基化发生改变的糖蛋白已应用于人类疾病的诊断、分期和预后评估, 如: 甲胎蛋白异质体^[3]. 由于蛋白质糖基化的研究相当复杂, 糖链结构分析费时费力, 使得糖蛋白质组研究一直滞后. 多元蛋白质组学技术是近两年发展起来的显示蛋白质糖基化或磷酸化修饰的一种方法, 即采用 Pro-Q300 或 488 荧光染料 (基于过碘酸氧化的原理) 染色 2-D 胶上糖蛋白的糖链部分, 然后用 SYPRO Ruby 荧光染料 (只染色蛋白质部分) 对同一块 2-D 胶的总蛋白质进行染色, 此方法允许在同一块 2-D 胶上平行地观察糖基化改变和蛋白质表达水平的改变. 另外这种染色方法灵敏度可达 1ng/点,

线性定量范围宽, 可达 3 个数量级, 可进行精确的定量比较. 蛋白质-蛋白质的变异小, 质谱兼容性好, 这些特点均明显优于银染和考马斯亮蓝染色^[4~6]. 肝癌是人类死亡率极高的恶性肿瘤, 其发生发展机制至今尚未阐明. 本研究即采用多元蛋白质组学技术结合 2-DE、MALDI-TOF-MS/MS 生物质谱技术对正常人肝细胞系 Chang Liver 和人肝癌细胞系 Hep3B 的蛋白质糖基化改变进行比较研究.

1 材料和方法

1.1 试剂

RPMI1640 和 DMEM 培养基购自 Gibco 公司; 尿素、IPG 缓冲液、Pharmylte、溴酚蓝、IPG 胶条 (7 cm, 3~10 NL)、十二烷基磺酸钠、丙烯酰胺、

*国家重点基础研究发展计划(973)(001CB510205, 2004CB520802)和国家高技术研究发展计划(863)(2002BA711A11).

** 通讯联系人.

Tel: 021-64041990-2501, E-mail: ykliu@zshospital.com

收稿日期: 2005-07-12, 接受日期: 2005-08-29

N, N 甲叉双丙烯酰胺、过硫酸铵和 TEMED 均购自 Amersham Pharmacia 公司; 二硫苏糖醇(DTT)、硫脲购自 Sigma 公司; CHAPS、碘乙酰胺购自 Fluka 公司; Pro-Q Emerald 488 和 SYPRO Ruby 荧光染料购自 Molecular Probes 公司; 测序级胰蛋白酶购自 Roche 公司; 乙腈购自 Merck 公司; 其他常用试剂为国产分析纯。

1.2 细胞总蛋白质抽提

正常人肝细胞系 Chang Liver 和人肝癌细胞系 Hep3B 由美国康奈尔大学惠赠, 加入含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基中, 常规传代培养。待细胞处于对数生长期时, 经胰酶消化后, 1×10^7 个细胞用 500 μ l 裂解液 (7 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 4% CHAPS, 40 mmol/L Tris, 65 mmol/L DTT, 1% Pharmylte, 1 mmol/L PMSF) 重悬细胞, 4℃振荡破碎 1 h, 4℃ 20 000 g 离心 1 h, 收集上清, -70℃保存备用。

1.3 双向电泳 (2-DE)

等电聚焦 (IEF) 用 IPGphor 水平电泳仪 (Amersham Pharmacia 公司) 进行, 选用 7 cm 干胶条 (PH3-10 NL), 泡胀上样 200 μ g。IEF 参数设置: 300 V 1 h, 1 000 V 1 h, 5 000 V 1.5 h, 5 000 V 至总 Vh 达 37 000 Vh。IEF 结束后, 胶条经两步平衡转移至第二向电泳。第二向电泳用 Mini Protean III 电泳仪 (Bio-Rad), 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 进行。

1.4 糖蛋白及总蛋白质的连续染色

2-D 胶电泳后经固定、洗胶、氧化、洗胶、Pro-Q Emerald 488 染液染色, 洗胶后用 Taphoon9400 激光扫描仪 (Amersham Bioscience) 成像, 选择激发波长为 488 nm, 发射滤光波长为 520 nm。成像后再经 SYPRO Ruby 染色, 洗胶后用 Molecular Image FX 分子成像系统 (Bio-Rad), 选择激发波长为 532 nm 的激光源, 发射滤光波长为 555 nm。

1.5 图像分析及统计学处理

用 2-DE 分析软件 Dymension (Sygene 公司, 英国) 进行背景扣除、标准化、点探测、匹配以及糖基化和蛋白质表达水平的定量比较, 此软件对不同样本蛋白质点的定量比较采用 Students' t test, 可自动计算出两个样本蛋白质点比较的 P 值, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

1.6 MALDI-TOF-MS/MS 质谱鉴定

从胶上将蛋白质点切下, 用 50% 的乙腈 /

50 mmol/L 的重碳酸铵脱色, 100% 的乙腈脱水干燥后, 加入 20 mg/L 的胰蛋白酶 37℃ 孵育过夜。50% 乙腈 / 0.1% 三氟乙酸抽提肽段置于 96 孔板中, 氮气吹干。0.8 μ l 基质反复吹打干燥的肽段, 点样于 MALDI-TOF 质谱靶板上, 用一个 20 kV 的加速电压进行质谱分析, 开始获取数据。得到的肽指纹图数据检索 IPI 数据库, 确定蛋白质。

2 结 果

2.1 正常人肝细胞和人肝癌细胞系糖基化蛋白表达谱的构建

用 2-DE 结合 Pro-Q Emerald 488 糖蛋白染色技术, 获得正常人肝细胞 Chang Liver 和人肝癌细胞系 Hep3B 糖基化蛋白表达谱 (图 1a 和 b)。Dymension 软件探测到 Chang Liver 糖蛋白质点 (74 ± 2) 个 ($n=3$), Hep3B 糖蛋白质点 (78 ± 3) 个 ($n=3$), 两者匹配的糖蛋白质点 31 个, Hep3B 表达而 Chang Liver 不表达的糖蛋白质点 47 个, Chang Liver 表达而 Hep3B 不表达的糖蛋白质点 43 个。

2.2 正常人肝细胞和人肝癌细胞系总蛋白质表达谱的构建

Pro-Q Emerald 488 糖蛋白染色后的 2-D 胶再继续进行 SYPRO Ruby 总蛋白质染色, 获得正常人肝细胞 Chang Liver 和人肝癌细胞系 Hep3B 总蛋白质表达谱 (图 1c 和 d)。Dymension 软件探测到 Chang Liver 蛋白质点 (140 ± 4) 个 ($n=3$), Hep3B 蛋白质点 (142 ± 3) 个 ($n=3$), 两者与相应的糖蛋白表达谱相比较, 匹配的蛋白质点分别为 66 个和 67 个, 即 Chang Liver 有 66 个糖蛋白质点可对应到总蛋白质图谱中, 而 Hep3B 有 67 个点可对应到总蛋白质图谱中。

2.3 蛋白质糖基化改变的分析

利用 2-DE 分析软件 Dymension 对 Hep3B 和 Chang Liver 的糖基化蛋白表达谱进行定量和统计学分析, 发现同一蛋白质点而糖基化有显著差异的糖蛋白质点为 25 个, 均 $P < 0.05$, 其中糖基化水平上调的有 10 个, 下调的有 15 个。已经质谱鉴定出的 12 种糖蛋白的糖基化改变情况见表 1, 其中与 Chang Liver 相比 Hep3B 有 5 个糖蛋白糖基化程度增高, 7 个糖蛋白糖基化程度下降, 统计学结果用 P1 代表。为了解这些糖蛋白的蛋白质表达水平有何改变, 用 Dymension 软件对 Hep3B 和 Chang Liver 的总蛋白质表达谱进行同样的分析, 统计学结果用 P2 代表。发现大部分糖蛋白的蛋白质表达水平也有

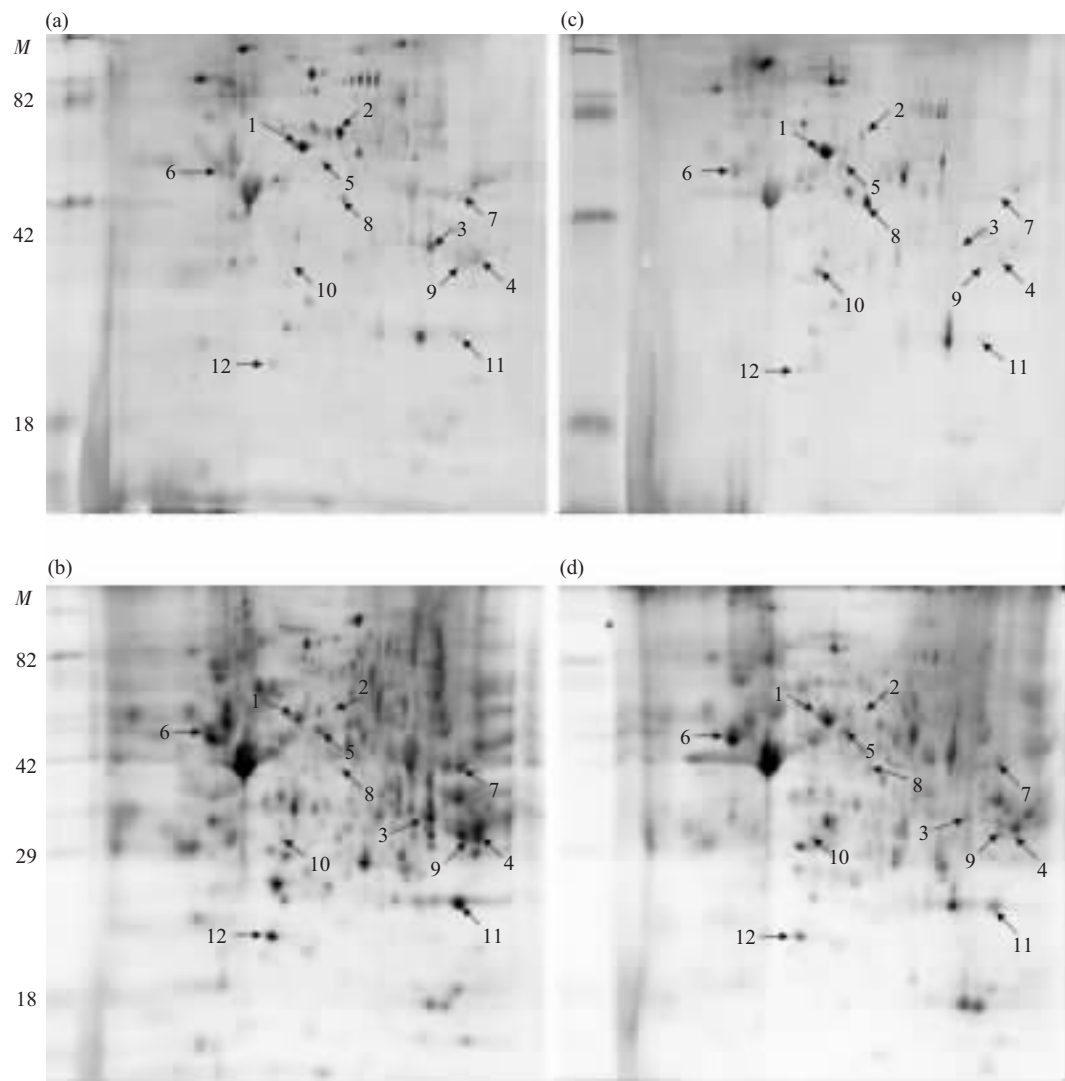


Fig. 1 Analysis of glycosylation status and protein expression level of glycoproteins in normal human liver cell lines Chang Liver and human hepatocellular carcinoma cell lines Hep3B

Proteins were separated by 2-DE gel electrophoresis, glycoproteins revealed by Pro-Q Emerald 488 dye followed by total proteins staining of the same gel using SYPRO Ruby stain. (a) Glycoprotein profile obtained from Chang Liver. (b) Total proteins profile obtained from Chang Liver. (c) Glycoprotein profile obtained from Hep3B. (d) Total proteins profile obtained from Hep3B.

Table 1 Identified of glycoproteins with altered glycosylation in both cell lines by MALDI-TOF-MS/MS and quantitative comparison of glycosylation status and protein expression level of the glycoproteins

Spot number	Glycoprotein	Theoretical M/ku	Protein score	Peptides matched	Glycosylation level in Hep3B	P1	P2
1	Protein disulfide isomerase A3 precursor	56.74	256	20	↑ *	0.022 3	0.012 8
2	UDP-N-actetylglucosamine pyrophosphorylase 1	56.99	75	10	↓ **	0.010 0	0.018 4
3	Annexin A2	40.38	230	13	↓ **	0.004 0	0.011 2
4	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	36.03	106	6	↓ *	0.048 0	0.022 9
5	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein	49.19	255	10	↑ *	0.039 7	0.003 9
6	Tubulin beta-5 chain	49.63	235	14	↑ **	0.029 3	0.936 3
7	Phosphoglycerate kinase 1	44.58	121	12	↓ **	0.000 1	0.001 2
8	DnaJ homolog subfamily B member 11	40.48	119	9	↑ **	0.000 1	0.006 3
9	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	36.03	96	5	↓ **	0.001 7	0.000 2
10	Cathepsin D precursor	44.52	111	3	↑ **	0.000 6	0.157 5
11	Peroxiredoxin 1	22.09	134	9	↓ **	0.001 7	0.000 1
12	Peroxiredoxin 2 isoform b	15.97	425	6	↓ **	0.001 1	0.008 1

P1 and P2 were obtained from Students' *t* test using Dymention software. P1 were obtained by analyzing glycoprotein staining 2-DE gels and P2 obtained by analyzing total protein staining 2-DE gels. * *P*<0.05, ** *P*<0.01.

相应变化,即蛋白质表达水平随糖基化程度的上调和下调有相应改变.但微管蛋白 $\beta 5$ 链和 Cathepsin D 前体这两种糖蛋白的蛋白质表达水平没有相应变化,均 $P>0.05$.图 2 是几个糖基化程度有明显改变的糖蛋白的点放大图.其中糖蛋白染色显示糖基化程度,而总蛋白染色显示蛋白质表达水平,可以看出不是所有的糖蛋白,其糖基化程度和蛋白质表达水平的改变是一致的.

2.4 糖基化蛋白的质谱鉴定

采用 MALDI-TOF-MS/MS 质谱鉴定糖基化发

生改变的糖蛋白,共鉴定出 12 种糖蛋白(表 1).这些糖蛋白包括:微管蛋白、蛋白二硫化异构酶 A3、UDP-N-乙酰葡萄糖胺焦磷酸化酶、内质网相关 DnaJ 蛋白 3、核不均一核蛋白 H、Annexin A2、Proxinredoxin2、磷酸甘油醛激酶、组织蛋白酶 D、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、Proxinredoxin1 前体.其中蛋白质点 4 和 9 均为甘油醛-3-磷酸脱氢酶,考虑为不同的翻译后修饰导致同一种蛋白质等电点和分子质量的变化,这也是糖基化蛋白在 2-DE 图谱中常见的表现.

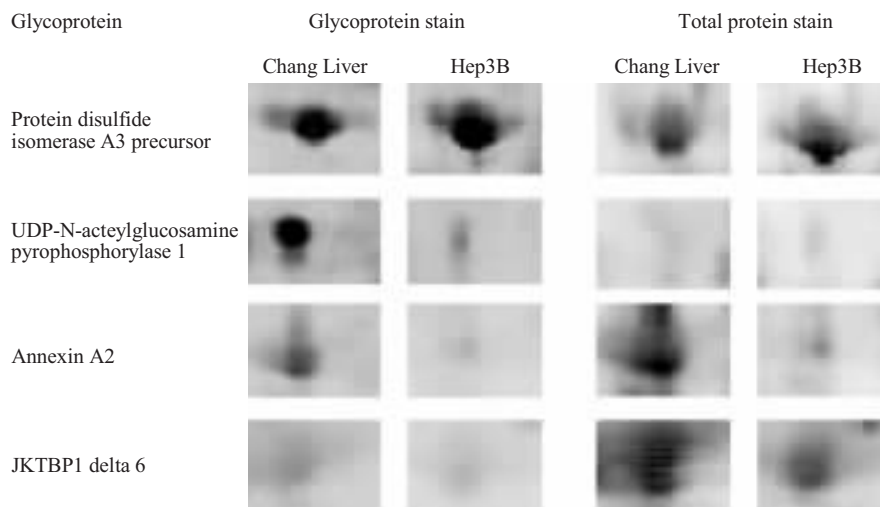


Fig. 2 Enlarged images of several glycoprotein spots

3 讨 论

传统研究糖蛋白和总蛋白质的方法是:同时跑两块 2-D 胶,一块胶用于电转印到 PVDF 膜上,在膜上用过碘酸氧化或凝集素亲和方法来染色糖蛋白,另一块胶则用银染或 SYPRO Ruby 荧光染料染色总蛋白质,但这种方法最大不足是糖蛋白图谱很难对应总蛋白质图谱,因不是同一块胶,要求有很高的重复性才行,另外糖基化程度很高的糖蛋白因分子质量太大,很难电转印到膜上,加之操作步骤繁多,无法进行准确的定量分析^[7].最近的研究显示,以荧光为基础的蛋白质检测方法在定量的精确性、探测敏感性以及下游质谱鉴定的兼容性方面大大地超过传统的考马斯亮蓝和银染.本研究利用 Pro-Q Emerald 488 糖蛋白荧光染料和 SYPRO Ruby 蛋白荧光染料对同一块 2-DE 胶进行连续染色,来

分析正常人肝细胞和人肝癌细胞系蛋白质糖基化程度和相应蛋白质表达水平的差异. Pro-Q Emerald 488 糖蛋白染色是基于过碘酸氧化的原理,先将糖链中的醇基氧化成醛基,然后染色时此荧光染料与醛基结合,染色的强度与糖基的多少成正相关,此染料的线性定量范围宽,可以进行定量比较研究^[8].实验结果显示:正常人肝细胞和人肝癌细胞系糖基化蛋白质表达谱明显不同,应用 Dymension 软件进行定量比较和统计学分析显示:与正常人肝细胞相比,人肝癌细胞中微管蛋白、蛋白二硫化异构酶 A3、核不均一核蛋白 H、内质网相关 DnaJ 蛋白 3、组织蛋白酶 D 前体这些糖蛋白的糖基化程度明显增高,UDP-N-乙酰葡萄糖胺焦磷酸化酶、Annexin A2、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、Proxinredoxin1、Proxinredoxin2、磷酸甘油醛激酶的糖基化程度明显降低.而相应的蛋白质表达水平

除微管蛋白和组织蛋白酶 D 前体外, 均有相应的增高或降低. 鉴于糖基化和蛋白质表达水平的变化不一致, 推测微管蛋白和组织蛋白酶 D 前体这两种糖蛋白的糖链结构可能发生变化. 但糖基化和蛋白质表达水平变化一致的糖蛋白, 其糖链结构也可能发生改变, 因糖链的分支位点变化、单糖连接键的改变、单个糖基的变换以及单糖的同分异构型等等在糖蛋白染色中可能不会有明显的改变, 而这些糖链结构的改变可能对糖蛋白功能有很大的影响. 这些也体现了糖基化分析是相当复杂和困难的. 对糖基化进一步的研究, 应包括以下几方面: a. 糖基化位点; b. 糖含量; c. 其糖基化位点连接的是经过较少加工的高甘露糖型糖链还是经过充分加工的复杂型糖链等. 其中 a, b 可以用糖苷内切酶 PNGase 和糖苷外切酶 Endo H 结合胰蛋白酶酶解糖蛋白后进行串联质谱鉴定, 而 c 可以选用相应的凝集素 ConA 和 DSA 等对其进行分型或应用 ESI-MS/MS 进行分析^[8,9]. 另外对 SWISSPORT 数据库检索确认这些糖基化改变的糖蛋白功能主要是: 参与细胞各种运动, 催化蛋白质中二硫键的重排, 糖和糖原代谢, mRNA 的加工和运输, 作为分子伴侣参与其他蛋白质的功能, 参与胞内蛋白质的分解等, 还有一些未知功能的糖蛋白. 这些糖蛋白中除 UDP-N-乙酰葡萄糖胺焦磷酸化酶、磷酸甘油醛激酶、内质网相关 DnaJ 蛋白 3 与肿瘤的相关性未见报道外, 其他蛋白质均有报道, 如: 组织蛋白酶 D 在人类乳腺癌、胰腺癌, Proxinredoxin1 在食道癌、膀胱癌、非小细胞肺癌、胰腺癌, Proxinredoxin2 在食道癌, Annexin A2 在原发结肠癌、口腔上皮细胞癌, 核不均一核蛋白在肺癌, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶在食道癌、白血病, 蛋白二硫化异构酶 A3 在胃癌中都有上调或下调的表达, 但目前这些蛋白质糖基化的改变与肿瘤的相关性研究尚未见报道^[10,11].

我们的研究结果显示, 多元蛋白质组学染色技术结合蛋白质组学分析方法, 能够平行有效地展示糖基化蛋白质及其相应总蛋白质在 2-D 胶上的分布格局, 并能评估蛋白质的糖基化程度和蛋白质表达水平的变化, 这可以作为糖蛋白质组学研究的一个

初步的技术平台. 这些结果也显示了人肝癌细胞与正常肝细胞相比蛋白质糖基化的确存在差异, 这些信息可能对阐明肝癌的发生机制以及寻找诊断的预测标志和治疗的靶标有潜在的价值.

参 考 文 献

- Hagglund P, Bunkenborg J, Elortza F, *et al.* A new strategy for identification of N-glycosylated proteins and unambiguous assignment of their glycosylation sites using HILIC enrichment and partial deglycosylation. *J Proteome Res*, 2004, **3** (3): 556~566
- Helenius A, Aebi M. Intracellular functions of N-linked glycans. *Science*, 2001, **291** (5512): 2364~2369
- 张秀明, 李键斋, 魏明竟, 等. 现代临床生化检验学. 北京: 人民军医出版社, 2001. 536~668
Zhang X M, Li J Z, Wei M J, *et al.* Modern Clinic Biochemical Docimasiology. Beijing: People Surgeon Press, 2001. 536~668
- Wu J, Lenchik N J, Pabst M J, *et al.* Functional characterization of two-dimensional gel-separated proteins using sequential staining. *Electrophoresis*, 2005, **26** (1): 225~237
- Kanninen K, Goldsteins G, Auriola S, *et al.* Glycosylation changes in Alzheimer's disease as revealed by a proteomic approach. *Neurosci Lett*, 2004, **367** (2): 235~240
- Hart C, Schulenberg B, Steinberg T H, *et al.* Detection of glycoproteins in polyacrylamide gels and on electroblots using Pro-Q Emerald 488 dye, a fluorescent periodate Schiff-base stain. *Electrophoresis*, 2003, **24** (4): 588~598
- Schulenberg B, Beechem J M, Patton W F. Mapping glycosylation changes related to cancer using the multiplexed proteomics technology: a protein differential display approach. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2003, **793** (1): 127~139
- Maley F, Trimble R B, Tarentino A L, *et al.* Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases. *Anal Biochem*, 1989, **180** (2): 195~204
- Charlwood J, Skehel J M, Camilleri P. Analysis of N-linked oligosaccharides released from glycoproteins separated by two-dimensional gel electrophoresis. *Anal Biochem*, 2000, **284** (1): 49~59
- Takeshi T, Kazuyuki M, Seiko Y, *et al.* Identification of altered protein expression and post-translational modifications in primary colorectal cancer by using agarose two-dimensional gel electrophoresis. *Clin Cancer Res*, 2004, **10** (6): 2007~2014
- Rochefort H, Capony F, Garcia M. Cathepsin D: a protease involved in breast cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev*, 1990, **9** (4): 321~331

Glycoproteomics Investigation of Human Hepatocellular Carcinoma Cell Lines*

ZHOU Hai-Jun¹⁾, LIU Yin-Kun^{1)**}, CUI Jie-Feng¹⁾, JIN Hong²⁾,

WEI Li-Ming²⁾, FAN Hui-Zhi²⁾, GUO Kun, YANG Peng-Yuan²⁾

¹⁾Liver Cancer Institute, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China;

²⁾Department of Chemistry, Fudan University, Shanghai 200433, China)

Abstract Glycosylation is one of the most important forms of post-translational modification of proteins. Glycan influences folding and stability of proteins and their biological functions. A berrant glycosylation has been associated with many malignant tumor. Proteomic analysis methods combined with Pro-Q Emerald glycoprotein staining technology was applied to investigate the glycosylation difference of glycoprotein between normal human liver cell lines and hepatocellular carcinoma cell lines. Total proteins were extracted by using cell-splitting methods, then subjected to two-dimension electrophoresis(2-DE). After that, 2-DE gel were stained with Pro-Q Emerald glycoprotein stain. Glycoprotein patterns of both cell lines were obtained. Glycosylation status of glycoproteins were quantificationally compared by using Dymention software and glycoproteins with altered glycosylation were identified with mass spectrometry. Results showed that (74 ± 2) glycoproteins ($n = 3$) were detected in normal human liver cell lines whereas (78 ± 3) glycoproteins ($n = 3$) were detected in human hepatocellular carcinoma cell lines. There were 31 matched glycoproteins between both cell lines. Glycoprotein patterns had distinct difference between normal human liver cells and human hepatocellular carcinoma cells. 25 glycoproteins presented glycoslytion changes in human hepatocellular carcinoma cells comparing with normal human liver cells. Among such glycoproteins, glycosylation level of 10 glycoproteins were up-regulated whereas glycosylation level of 15 glycoproteins were down-regulated and 12 of these glycoproteins had been identified by mass spectrometry. These results imply that glycosylation changes may play key roles in occurrence and development of liver cancer.

Key words hepatocellular carcinoma, glycoprotein, glyprotein stain, 2-DE

*This work was supported by grants from National Basic Research Program of China (001CB510205, 2004CB520802) and Hi-Tech Research and Development Program of China (2002BA711A11).

**Corresponding author . Tel: 86-21-64041990-2501, E-mail: ykliu@zshospital.com

Received: July 12, 2005 Accepted: August 29, 2005