

人健康肝组织核心岩藻糖基化蛋白质的 鉴定及生物信息学分析*

代智¹⁾ 樊嘉^{1,2)**} 周俭¹⁾ 柏斗胜¹⁾ 邱双健¹⁾
康晓楠²⁾ 崔杰峰¹⁾ 郭坤¹⁾ 李岩¹⁾ 刘银坤^{1,2)**}

(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⁾复旦大学生物医学研究院, 上海 200032)

摘要 糖蛋白质组学方法鉴定人健康肝组织核心岩藻糖基化蛋白质, 将有助于发现肝癌、慢性肝病相关异常核心岩藻糖基化蛋白质。应用凝集素亲和层析技术、双向电泳(2-DE)联合基质辅助激光解吸飞行时间串联质谱(MALDI-TOF-MS/MS)分析, 建立人健康肝组织核心岩藻糖基化蛋白表达谱, 图谱均点数为(130±3)个, 挖取 90 个蛋白质点进行质谱鉴定, 数据库搜索及去冗余后, 共鉴定 53 种蛋白质, 主要分布于 pI 5~9, 分子质量为 10~100 ku 区域处。Gene Ontology 分类发现它们参与体内代谢等过程, 应用 NetNGlyc 对它们进行糖基化位点预测, 并通过蛋白质免疫沉淀联合凝集素亲和印迹对其中的结合珠蛋白前体, α 烯醇化酶的核心岩藻糖基化进行了再验证。以上结果提示, 凝集素层析、2-DE 联合 MALDI-TOF-MS/MS 分析是一种鉴定某种特定类型糖蛋白的高通量检测方法, 所建立的表达谱可用于发现疾病发生、发展中相关的异常核心岩藻糖基化蛋白质。

关键词 核心岩藻糖蛋白, 扁豆凝集素, 亲和层析, 糖蛋白质组学, 人健康肝组织
学科分类号 Q513+2, R333.4, Q503

人类肝脏蛋白质组计划(HLPP)旨在建立肝脏的生物表达图谱, 以更好地理解肝脏功能, 同时为肝病的诊疗提供新的策略^[1]。鉴于蛋白质翻译后修饰(PTM)在调节分子间相互作用、蛋白质细胞内定位及稳定性方面发挥重要作用, 目前, 探究蛋白质修饰谱已为人类蛋白质组织(HUPO)所重视。

核心岩藻糖基化修饰普遍存在于糖蛋白中, 肌体处于病理状态时, 蛋白质核心岩藻糖基化水平通常发生改变。Hutchinson 等^[2-4]报道, α 1, 6 岩藻糖基转移酶在肝癌组织中的活性高于其癌旁组织, 致使患者体内核心岩藻糖基化水平较正常时明显增加, 其中, 甲胎蛋白的高度岩藻糖基化, 在临床上可作为肝癌早期诊断标志物^[5]。此外, 我们发现肝癌转移可能与某些糖蛋白如 CK8 等异常核心岩藻糖基化有关^[6, 7]。可见, 鉴定健康肝脏中发生核心岩藻糖基化的蛋白质意义重大, 它有助于发现肝癌、慢性肝病相关异常核心岩藻糖基化蛋白质。

本研究应用扁豆凝集素(LCA)亲和层析、双向电泳(2-DE)联合基质辅助激光解吸飞行时间串联质

谱(MALDI-TOF-MS/MS)首次鉴定人健康肝组织核心岩藻糖基化蛋白, 并依据 3 个主要的 Gene Ontology 种类, 即生物过程、分子功能和细胞内定位对它们分类分析。

1 材料和方法

1.1 试剂

二硫苏糖醇(DTT)、尿素、CHAPS、IPG 缓冲液、Pharmylte、溴酚蓝、IPG 胶条(7 cm, 3~10 NL)、十二烷基磺酸钠(SDS)、过硫酸铵和 TEMED 均购自 GE Healthcare 公司; 丙烯酰胺、

* 国家高技术研究发展计划资助项目(863)(2007AA02Z479), 上海市医学领军人才资助项目(LJ06004), 高等学校博士学科点专项科研基金资助项目(20070246112)和复旦大学青年科学基金资助项目(EYF152008)。

** 通讯联系人。

樊嘉. Tel: 021-64041990-2136, E-mail: jiafan99@yahoo.com

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

收稿日期: 2007-09-17, 接受日期: 2008-02-20

N, N 甲叉双丙烯酰胺和硫脲购自 Sigma 公司; 碘乙酰胺购自 Fluka 公司; LCA-agarose、生物素标记的 LCA(biotin-LCA)、亲和素标记的辣根过氧化物酶(avidin-HRP)和 α - 甲基甘露糖购自 Vector 公司; 乙腈购自 Merck 公司; 测序级胰蛋白酶购自 Roche 公司; ECL 化学发光试剂购自 Pierce 公司; 银染及其他常用试剂为国产分析纯.

1.2 仪器

湿式电转仪和 IPGPhor 水平电泳仪购自 Amersham Pharmacia 公司; 4700 Proteomics Analyzer 质谱仪购自 ABI 公司.

1.3 样品制备

正常人肝组织标本来自于本所肝移植供肝(所有供肝者都知情, 并同意参加此项研究). 取 2 g 左右组织, 加生理盐水冲洗, 尽量去除血及明显血管, 略剪碎后置入研钵内, 用液氮充分研磨组织至粉末状, 分装加入有 1 ml 细胞裂解液(50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L $MgCl_2$, 1 mmol/L $CaCl_2$, 1 % Nonidet P-40 和蛋白酶抑制剂)的离心管中, 4℃ 充分振荡混匀 45 min, 4℃ 20 000 g 离心 45 min, 收集上清, 用 Bradford 法测定蛋白质浓度, -70℃ 贮存备用.

1.4 LCA 亲和层析

用 20 倍体积的平衡缓冲液(细胞裂解液)冲洗 LCA-agarose, 以除去储存液, 然后按柱床体积 2 cm $\times$ 0.6 cm 装柱, 经平衡缓冲液流洗 10 个柱体积(流速为 0.5 ml/min)备用. 将提取的总蛋白(约 20 mg)加至 LCA 固相凝集素亲和层析柱, 平衡缓冲液流洗 10 个柱床体积(流速为 0.5 ml/min), 在 A_{280} 降至基线后用 400 mmol/L α - 甲基甘露糖洗脱, 每管收集 1.5 ml, A_{280} 降到 0.1 以下终止洗脱. 收集 A_{280} 较高的样品, 利用超滤的方法进行浓缩, Bradford 法测定蛋白质浓度, -70℃ 贮存备用.

1.5 双向电泳(2-DE)

按 Amersham Pharmacia 公司双向电泳手册进行. 蛋白质上样量 60 μ g(125 μ l), 以 25~30 kVh 进行电泳, IEF 结束后, IPG 胶条在平衡 I 液[6 mol/L 尿素, 50 mmol/L Tris, 30 % (体积比)甘油, 2 % SDS, 1 % DTT]和平衡 II 液(前 4 种组分同上, 2.5 % 碘乙酰胺)各平衡 15 min 后, 移至 10 % 均匀胶上进行 SDS-PAGE 垂直电泳. 恒流为 7.5 mA/gel, 运行 45 min 后, 电流调升至 15 mA/gel, 继续电泳直至溴酚蓝到分离胶底部, 然后进行质谱兼容快速银染.

1.6 图像分析

染色后的 2-D 胶用 Imagescanner 扫描仪投射扫描获取图像, 经 ImageMaster 软件行斑点检测、匹配等分析.

1.7 蛋白质谱的鉴定

Ettan Spotpicker 自动切胶仪将凝胶上的蛋白质斑点切下, 置于 96 孔板中, 加入脱色液 100 μ l (30 mmol/L 铁氰化钾: 100 mmol/L 硫代硫酸钠= 1 : 1), 脱色 15 min $\times$ 2 次. 然后用 100 μ l 去离子水洗胶粒, 10 min $\times$ 3 次. 分两次加入 100% 乙腈, 直至胶粒变白后进行胶内酶解, 然后用 60 μ l 提取液 (0.1% TFA, 50 % 乙腈)提取肽段, 吹干后, 于不锈钢靶上点样. 基质辅助激光解吸飞行时间串联质谱 (MALDI - TOF - MS / MS) 采用 4700 Proteomics Analyzer, 反射模式, 正离子谱测定. 所得肽指纹图谱及肽序列采用 Mascot 搜索引擎搜索 NCBI 数据库. 参数设置: 种类, Homo Sapien; 酶, 胰蛋白酶, 允许一个漏切位点; 肽段质量容许差异, 2 分子质量; MS/MS 容许差异, 1 分子质量.

1.8 生物信息学处理

应用 NetNGlyc 1.0 软件进行 N-糖基化位点预测分析, 依据 3 个主要的 Gene Ontology 种类, 即细胞内定位、生物过程和分子功能分别对它们分类, 并绘制构成图.

1.9 免疫沉淀

正常人肝组织经生理盐水冲洗后, 加入 1 ml 免疫沉淀裂解缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 150 mmol/L NaCl, 0.1 % Nonidet P-40, 5 mmol/L EDTA, 5 mmol/L EGTA, 15 mmol/L $MgCl_2$, 60 mmol/L β - 磷酸甘油, 0.1 mmol/L 正钒酸钠, 0.1 mmol/L NaF, 0.1 mmol/L 苯甲酰胺, 蛋白酶抑制剂), 振荡混匀后, 轮转 1 h, 离心收集上清, 与 15 μ l protein G-agarose 轮转 1 h, 离心收集上清, 分别与 3 μ g 鼠抗人结合珠蛋白和 α - 醛缩酶单克隆抗体 4℃ 摇动反应 4 h, 然后加入 60 μ l protein G-agarose 轮转过夜, 经裂解液洗涤 3 次, 加入 15 μ l 2 $\times$ SDS 上样缓冲液, 煮沸 5 min 后, 上样进行 10 % SDS-PAGE, 然后用 LCA 亲和印迹对结合珠蛋白和 α - 醛缩酶的寡糖链结构进行分析.

1.10 LCA 亲和印迹

恒流 360 mA, 转膜 90 min 后, 将 PVDF 膜置于 30 ml 封闭液 (150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 0.1% Tween-20, 2% BSA) 中, 4℃ 封闭过夜. 弃封闭液, 37℃ 下与 6 mg/L

biotin-LCA 共同孵育 1 h. TTBS(150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 0.1 % Tween-20)洗 3 次, 然后与 0.8 mg/L Avidin-HRP 共同孵育 1 h, ECL 化学发光检测.

2 结 果

2.1 正常人肝组织 LCA 凝集素亲和层析分析

LCA 对 N-糖链最内侧 N-乙酰氨基葡萄糖上的核心岩藻糖基有很强亲和力^[8~10], LCA 亲和层析方法可用于分离和浓缩组织内核心岩藻糖基化蛋白. 正常人肝脏组织中提取的总蛋白经 LCA 亲和层析柱分离为两个组分(图 1). 峰 I 所示为总蛋白经层析柱后, 平衡液洗脱得到的柱不结合组分, 由非核心岩藻糖基化蛋白构成; 峰 II 所示 α -甲基甘露糖洗脱后得到的柱结合组分, 由核心岩藻糖基化蛋白构成.

为检测层析的分离效果, 将两组分和总蛋白进行 SDS-PAGE, 发现通过亲和层析使得 LCA 结合的低丰度糖蛋白得到富集(图 1b), 例如柱结合组分在 40 ku 处呈现一条蛋白质浓集的条带, 而柱不结合组分和总蛋白中则不显著.

2.2 正常人肝组织核心岩藻糖基化蛋白表达谱的建立及比较分析

LCA 层析组分及总蛋白进行 2-DE 分离, 获得 3 个蛋白银染图谱(图 2a). 其中, 组份 II (Fractions II)

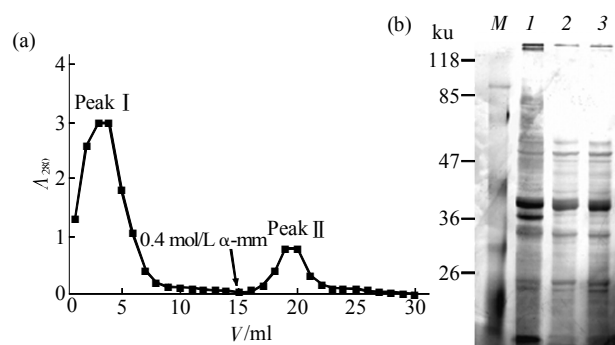


Fig. 1 1-DE map of LCA Chromatographic fractions from human normal liver tissues

(a) Representative profile of a LCA chromatography of human normal liver tissues. Peak I : mainly non α 1-6-fucosylated proteins; Peak II : fraction enriched in α 1-6-fucosylated proteins. (b) 1-DE of a human normal liver total tissue (lane 3), chromatographic fraction I (lane 2) and fraction II (lane 1). α -mm: methyl α -D-mannopyranoside.

对应的即为正常人肝组织核心岩藻糖蛋白表达谱, 经 ImageMaster 软件检测到蛋白质点(130 ± 3)个; 总蛋白和非核心岩藻糖基化蛋白表达谱中, 分别检测到蛋白质点(650 ± 20)个和(500 ± 10)个. 图谱中部分差异蛋白区域用虚线框标出, 即 Box1-4 (图 2a). 由 Box2 和 Box4 放大图谱(图 2b)可见, 点 2、3、4、7、24 和 25 在 LCA 结合组分中强度均远大于总蛋白和 LCA 不结合组分中的相应蛋白质点强度, 说明这些核心岩藻糖基化蛋白质经过层析柱后得到了富集.

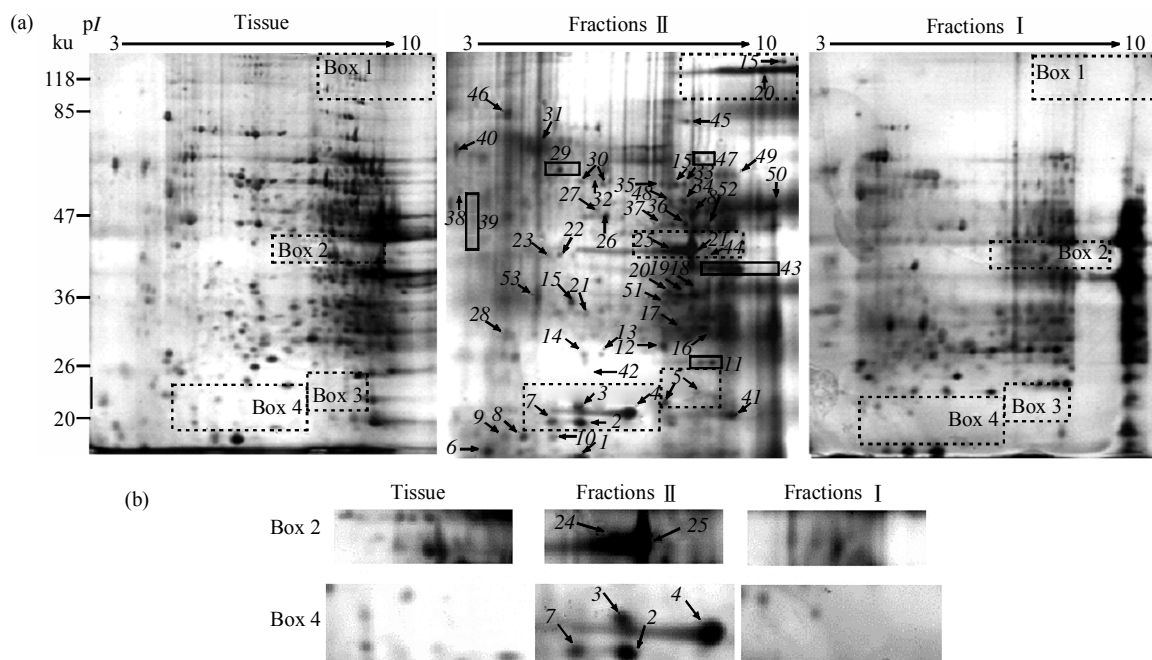


Fig. 2 α 1-6-fucosylated glycoprotein 2-DE map of human normal liver tissues and LCA chromatographic Fractions

(a) Representative silver-stained 2D-PAGE of total liver tissues and LCA chromatographic fractions I (mainly non α 1-6-fucosylated proteins) and II (enriched in α 1-6-fucosylated proteins). (b) Enlargement of Boxes 2 and 4 from representative 2D-maps of total liver tissues and chromatographic Fractions I and II.

2.3 正常人肝组织核心岩藻糖基化蛋白的 MALDI-TOF-MS/MS 鉴定

正常人肝组织核心岩藻糖基化蛋白表达谱中共

切取到 90 个蛋白质点, 应用 MALDI-TOF-MS/MS 进行鉴定, 通过数据库搜索、分析比对及去冗余后, 共鉴定 53 种蛋白质(表 1)。它们主要分布于等

Table 1 Identification of α 1-6-fucosylated glycoproteins in human normal liver tissues by MALDI-TOF-MS/MS

Spot(No.)	Protein name	Accession number	Protein score	Mr (ku)/pI	Coverage rate(%)	Fucosylation
1	Splice isoform beta of tripartite motif protein 5	IPI00394972	68	46.01/5.96	22%	Not found
2	PREDICTED: CTAGE family, member 6	IPI00455073	75	87.85/5.09	13%	Not found
3	Zinc finger protein 334 isoform b	IPI00399317	66	74.95/9.35	13%	Not found
4	Splice isoform 3 of spectrin beta chain, erythrocyte	IPI00237806	91	242.58/5.20	13%	Not found
5	Peroxiredoxin 1	IPI00000874	86	22.10/8.27	37%	Not found
6	Cytochrome b-5 isoform 2	IPI00182933	102	11.26/5.02	82%	Not found
7	Superoxide dismutase	IPI00218733	67	16.11/5.87	32%	Not found
8	Splice isoform B of zinc finger protein 268	IPI00216187	81	89.57/9.17	19%	Not found
9	RNA polymerase II transcription factor S III subunit A2	IPI00376867	84	83.90/9.76	18%	Not found
10	Ferritin light chain	IPI00375676	86	28.40/6.00	34%	Not found
11	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial precursor	IPI00022314	80	24.71/8.35	33%	Not found
12	OTTHUMP00000028841	IPI00478327	79	22.62/10.43	40%	Not found
13	Splice isoform 1 of CCG1-interacting factor B	IPI00063827	78	22.33/5.94	35%	Not found
14	16 ku protein	IPI00477062	61	15.91/10.24	40%	Not found
15	PREDICTED: similar to ribosomal protein L7	IPI00457083	83	33.79/10.33	31%	Not found
16	Similar to triosephosphate isomerase (TIM)	IPI00383071	91	26.93/8.21	36%	Not found
17	Leucine zipper protein 1	IPI00395737	89	120.23/8.78	18%	Not found
18	Splice isoform 1 of plectin 1	IPI00014898	99	531.41/5.73	8%	Not found
19	Hypothetical protein FLJ42514	IPI00446247	90	22.91/11.39	52%	Not found
20	Structural maintenance of chromosome 1-like 1 protein	IPI00291939	134	143.14/7.51	19%	Not found
21	KIAA0692 protein	IPI00478953	65	87.40/6.37	13%	Not found
22	NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1	IPI00220342	80	30.97/5.53	31%	Not found
23	NPD014 protein, isoform 2	IPI00025342	69	33.52/11.79	22%	Not found
24	HP protein	IPI00431645	117	31.36/8.48	39%	Found ^[10]
25	Haptoglobin precursor	IPI00478493	102	45.18/6.13	29%	Found ^[10]
26	Aminoacylase-1	IPI00009268	126	45.86/5.77	42%	Not found
27	Antithrombin III variant	IPI00032179	67	52.66/6.11	16%	Found ^[11]
28	Nebulin	IPI00418175	85	348.75/9.14	9%	Not found
29	Protein disulfide-isomerase A3 precursor	IPI00025252	132	56.75/5.98	34%	Not found
30	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial precursor	IPI00006663	123	56.35/6.63	27%	Not found
31	Carboxylesterase 2 isoform 1	IPI00332828	84	68.85/6.03	17%	Not found
32	Mitochondrial ribosomal protein L30 isoform b	IPI00514005	62	15.18/10.33	35%	Not found
33	LAP3 protein	IPI00419237	99	56.10/8.03	31%	Not found
34	Alpha enolase	IPI00465248	237	47.01/6.99	41%	Not found
35	Pericentrin 2	IPI00479143	95	377.85/5.39	8%	Not found
36	Splice isoform DPI of desmoplakin	IPI00013933	83	331.57/6.44	8%	Not found
37	Plectin 7	IPI00398776	89	512.29/5.61	7%	Not found
38	Splice isoform 1 of calumenin precursor	IPI00014537	79	37.08/4.47	16%	Not found
39	Reticulocalbin 1 precursor	IPI00015842	104	38.87/4.86	27%	Not found
40	Calreticulin precursor	IPI00020599	94	48.11/4.29	22%	Not found
41	Phosphatidylethanolamine-binding protein	IPI00219446	107	20.91/7.42	56%	Not found
42	57 ku protein	IPI00479902	76	56.53/5.09	17%	Not found
43	Fructose-bisphosphate aldolase B	IPI00218407	147	39.32/8.06	37%	Not found
44	Splice isoform 1 of arginase 1	IPI00291560	70	34.71/6.72	25%	Not found
45	Serotransferrin precursor	IPI00022463	78	77.00/6.81	16%	Found ^[12]
46	78 ku glucose-regulated protein precursor	IPI00003362	224	72.29/5.07	40%	Not found
47	Catalase	IPI00465436	89	59.59/6.95	22%	Not found
48	Similar to kendrin	IPI00412869	109	364.96/5.40	9%	Not found
49	Aspartate aminotransferase, mitochondrial precursor	IPI00018206	60	47.45/9.14	16%	Not found
50	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial	IPI00001539	86	41.90/8.32	29%	Not found
51	mRNA turnover protein 4 homolog	IPI00106491	63	27.54/8.34	32%	Not found
52	Gamma-taxilin	IPI00019994	65	60.57/7.21	15%	Not found
53	Myosin heavy chain, skeletal muscle, fetal	IPI00001753	62	222.87/5.67	7%	Not found

电点 pI 5~9, 分子质量 10~100 ku 区域处. 除 haptoglobin precursor, antithrombin III variant, 和 serotransferrin precursor 已证实为核心岩藻糖基化蛋白质外, 其他蛋白质核心岩藻糖基化均为首次发现.

2.4 正常人肝组织核心岩藻糖基化蛋白的生物信息学分析

按照 Gene Ontology 三种分类方式对所有鉴定

的蛋白质分类绘图, 细胞定位分类中发现分布于细胞器的蛋白质占 28%(图 3a), 其中, 线粒体和内质网为最多, 分别占 34%和 33%, 其次为胞浆, 占 13%. 生物学过程分类中发现参与体内代谢和细胞生理过程的蛋白质分别占 33%和 17% (图 3b). 分子功能分类中发现参与结合反应和催化反应的蛋白质分别占 37%和 30%(图 3c).

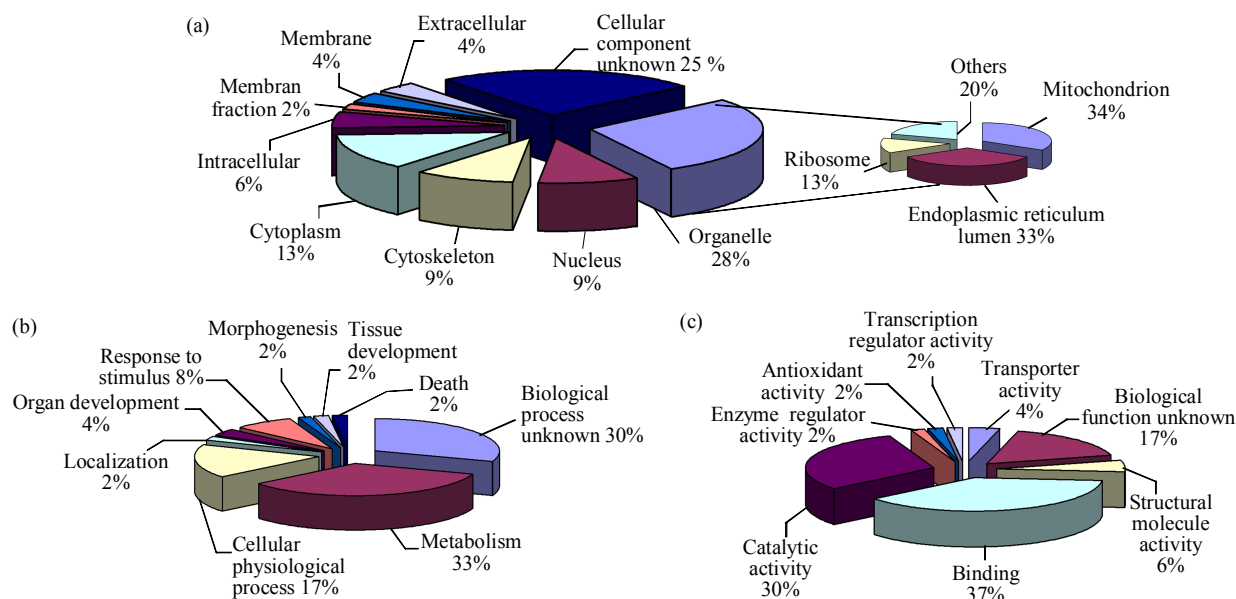


Fig. 3 Class analysis for the identified α 1-6-fucosylated proteins from human normal liver tissues
(a) Pie map classified as cellular component. (b) Pie map classified as biological process. (c) Pie map classified as molecular function.

2.5 α -醛缩酶和结合珠蛋白核心岩藻糖基化的再验证

为了进一步证实正常人肝组织中蛋白质的核心岩藻糖基化, 从所鉴定的蛋白质中选择两个蛋白质, 结合珠蛋白和 α -醛缩酶, 应用免疫沉淀从组织中提取并纯化这些蛋白质, LCA 凝集素印迹检测它们的岩藻糖基化情况. 结果发现, 结合珠蛋白和 α -醛缩酶在正常人肝组织中都有核心岩藻糖基化发生, 且前者岩藻糖基化程度较后者高(图 4).

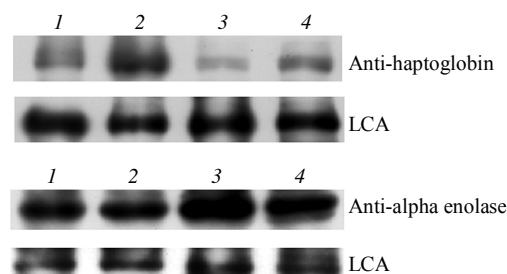


Fig. 4 Validation of fucosylation of haptoglobin and alpha enolase in human normal liver tissues

15 μ g of purified haptoglobin and alpha enolase from four normal liver tissue samples were electrophoresed on a 10 % acrylamide gel, and electro-transferred onto the membrane, followed by LCA lectin blotting.

3 讨 论

糖蛋白质组学是研究蛋白质的糖链组成及其功能的一门有发展前景的新学科. 建立蛋白质糖基化修饰谱的共性平台技术, 寻找有重要生物功能的糖蛋白, 是目前国内外糖组学研究的趋势. 质谱、亲和层析、毛细管电泳、HPLC、芯片和微流板技术已成为糖组学和糖蛋白质组学研究中的有用工具, 但仍然未见有系统研究细胞内全部或某类糖蛋白质组的方法, 其原因在于无法找到一种能特异地与细胞内全部糖蛋白或某类糖蛋白结合的物质. 鉴于凝集素有与糖链内某些特殊结构的高亲和能力, 我们将凝集素层析, 2-DE, 蛋白质免疫沉淀, 凝集素印迹和 MALDI-MS/MS 结合建立了可用于某类糖蛋白检测的糖蛋白质组学方法, 它不同于放射自显影技术和基于荧光的糖蛋白检测技术, 具有系统、安全和高通量的特点.

核心岩藻糖基化修饰普遍存在于糖蛋白中, 它能调节蛋白质与糖链之间的相互作用, 在肿瘤恶化中发挥重要作用. 某些外分泌蛋白如 α ₁ 抗胰蛋白

酶和转铁蛋白,在生理状态下其核心岩藻糖基化水平很低^[13,14],但在恶化状态下则增加.甲胎蛋白的高度岩藻糖基化,在临床上又可作为肝癌早期诊断标志物.可见阐明机体正常状态下发生岩藻糖基化的蛋白质意义重大.LCA与该糖基有很强的亲和力,可以很简单地鉴定蛋白质是否有核心岩藻糖基化的发生,应用LCA纯化核心岩藻糖基化蛋白及推断蛋白质寡糖链结构的相关报道^[15]很多.但由于凝集素有非特异结合的两面性,所以筛选出的糖蛋白可能有些并非是糖蛋白,对所鉴定蛋白质的糖基化进一步验证至关重要.我们对以上53种蛋白质进行糖基化位点预测分析,结果发现它们都具有潜在的糖基化位点.此外,我们又应用免疫沉淀联合LCA凝集素印迹进一步检测它们的岩藻糖基化情况,结果表明所鉴定的蛋白质均为核心岩藻糖基化蛋白.

本研究应用LCA亲和层析和2-DE将总蛋白分为核心岩藻糖基化蛋白及非核心岩藻糖基化蛋白,并建立了核心岩藻糖基化蛋白的表达谱,由53种蛋白质组成.它们主要分布于pI 5~9,分子质量10~100 ku区域处,主要参与体内代谢等过程,在结合及催化反应中发挥重要作用.为了详尽阐述这些蛋白质的生物学功能,将它们共分为8类.首先是酶类,其中有参与糖酵解、能量代谢及氨基酸代谢的酶,它们通过调节能量代谢在肿瘤生长和恶化中扮演重要角色,包括:triosephosphate isomerase, alpha enolase, fructose-bisphosphate aldolase B, aspartate aminotransferase, 3-ketoacyl-CoA thiolase, arginase, LAP3 protein and aminoacylase-1.此外,还有参与氧化还原反应的酶,如过氧化氢酶和超氧化物歧化酶,它们通过抑制由氧自由基诱发的氧化应激反应而减少肌体的氧化损伤.其次是参与结合反应的蛋白质,其中包括与蛋白质结合、与核酸结合、与肌动蛋白结合、与离子结合等.蛋白质-蛋白质相互作用对于了解细胞内生物过程至关重要,因为许多蛋白质在信号传导、基因调节、细胞周期调控中发挥生物学效应都需要其他蛋白质和调节因子的参与^[16~18].本研究中, tripartite motif protein 5, CTAGE family member 6, pericentrin 2, chromosome 1-like 1 protein and 78 ku glucose-regulated protein precursor 即属于蛋白质-蛋白质结合反应类. DNA-蛋白质结合最常发生于真核生物转录调节过程中,与DNA结合的锌指蛋白,如锌指蛋白334和268在其中发挥着重要作

用. OTTHUMP00000028841 是一个与RNA结合的蛋白质,主要参与基因表达的翻译后调控.此外,通过与肌动蛋白结合、与离子结合参与生理过程的蛋白质也属于结合反应类,它们是 haptoglobin precursor, serotransferrin precursor reticulocalbin 1 precursor 等.除参与代谢反应的酶和结合反应的蛋白质外,所鉴定的蛋白质还分为结构蛋白、转运蛋白、转录调节因子、抗氧化酶、酶活性调节因子及某些未知功能的蛋白质,如结构蛋白(splice isoform DPI of desmoplakin)在维持肝脏细胞骨架结构中发挥重要作用,而酶活性调节因子 antithrombin III 作为丝氨酸蛋白酶抑制剂影响血凝过程的发生.

在所鉴定的53种核心岩藻糖基化蛋白中,有8种蛋白质存在变异体形式,即同种蛋白质在2-DE中对应多个蛋白质点(图2a),它们是 protein disulfide-isomerase A3 precursor, peroxiredoxin 1, superoxide dismutase [Mn], structural maintenance of chromosome 1-like 1 protein, reticulocalbin 1 precursor, fructose-bisphosphate aldolase B, catalase and aldehyde dehydrogenase. 这些蛋白质点的出现可能是不同的翻译后修饰或mRNA前体选择性剪切造成的.此外,同以往研究结果一致,我们还发现了5种公认的糖蛋白,它们是 haptoglobin precursor, antithrombin III variant 和 serotransferrin precursor, reticulocalbin 1 precursor, calumenin precursor, 而前3种又是公认的核心岩藻糖基化蛋白,这证实了本研究方法的可信性.

结合珠蛋白(haptoglobin precursor)是一种急性期蛋白质,它能与血红蛋白结合,防止体内铁的丢失而减少肾损害.它的分子质量为90 ku,是由两个 α 和两个 β 亚基组成的四聚体,亚基间通过二硫键相连.在新合成的结合珠蛋白中有相当量是以它的多肽前体的形式被分泌的^[19],如在肝脏分泌的糖蛋白中就富含该蛋白质的前体.蛋白糖基化的差异往往造成该蛋白质等电点和分子质量的改变, Wilson 等^[20]运用2-D手段发现在正常血清中结合珠蛋白有不同唾液酸化的形式.在原发性肝癌、肝硬化、卵巢癌、结肠癌和胰腺癌等很多疾病中,结合珠蛋白有岩藻糖基化形式的出现^[21,22],岩藻糖基化的结合珠蛋白可作为一种诊断标志物.本研究发现,它在正常人肝脏组织中也有核心岩藻糖基化的发生,并且强度很大(图4).

本研究首次报道正常人肝组织中核心岩藻糖基化蛋白,通过与恶变组织的蛋白核心岩藻糖基化情

况比对分析, 能提供更有意义的肿瘤标志物, 也将有助于深刻理解肿瘤的发生和发展.

参 考 文 献

- Zheng J J, Gao X, Beretta L, *et al.* The human liver proteome project (HLPP) workshop during the 4th HUPO world congress. *Proteomics*, 2006, **6** (6): 1716~1718
- Hutchinson W L, Du M Q, Johnson P J, *et al.* Fucosyltransferases: differential plasma and tissue alterations in hepatocellular carcinoma and cirrhosis. *Hepatology*, 1991, **13** (4): 683~688
- Comunale M A, Lowman M, Long R E, *et al.* Proteomic analysis of serum associated fucosylated glycoproteins in the development of primary hepatocellular carcinoma. *J Proteome Res*, 2006, **5** (2): 308~315
- Noda K, Miyoshi E, Uozumi N, *et al.* High expression of alpha-1-6 fucosyltransferase during rat hepatocarcinogenesis. *Int J Cancer*, 1998, **75** (3): 444~450
- Miyoshi E, Noda K, Yamaguchi Y, *et al.* The alpha1-6-fucosyltransferase gene and its biological significance. *Biochim Biophys Acta*, 1999, **1473** (1): 9~20
- 代智, 刘银坤, 崔杰峰, 等. 肝癌转移相关的核心岩藻糖基化蛋白质表达谱的研究. *生物化学与生物物理进展*, 2005, **32**(5): 442~447
Dai Z, Liu Y K, Cui J F, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2005, **32**(5): 442~447
- 代智, 刘银坤, 郭坤, 等. CK8 寡糖链结构及翻译水平改变与人肝癌细胞转移相关性研究. *生物化学与生物物理进展*, 2007, **34**(2): 196~202
Dai Z, Liu Y K, Guo K, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2007, **34**(2): 196~202
- Miyoshi E, Noda K, Ko J H, *et al.* Overexpression of alpha1-6 fucosyltransferase in hepatoma cells suppresses intrahepatic metastasis after splenic injection in athymic mice. *Cancer Res*, 1999, **59**(9): 2237~2243
- Dai Z, Liu Y K, Cui J F, *et al.* Identification and analysis of altered alpha1, 6-fucosylated glycoproteins associated with hepatocellular carcinoma metastasis. *Proteomics*, 2006, **6**(21): 5857~5867
- Ang I L, Poon T C, Lai P B, *et al.* Study of serum haptoglobin and its glycoforms in the diagnosis of hepatocellular carcinoma: a glycoproteomic approach. *J Proteome Res*, 2006, **5** (10): 2691~2700
- Demelbauer U M, Plematl A, Josic D, *et al.* On the variation of glycosylation in human plasma derived antithrombin. *Chromatogr A*, 2005, **1080**(1): 15~21
- Satomi Y, Shimonishi Y, Hase T, *et al.* Site-specific carbohydrate profiling of human transferrin by nano-flow liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2004, **18**(24): 2983~2988
- Saitoh A, Aoyagi Y, Asakura H. Structural analysis on the sugar chains of human alpha 1-antitrypsin: presence of fucosylated biantennary glycan in hepatocellular carcinoma. *Arch Biochem Biophys*, 1993, **303**(2): 281~287
- Yamashita K, Ideo H, Ohkura T, *et al.* Sugar chains of serum transferrin from patients with carbohydrate deficient glycoprotein syndrome. Evidence of asparagine-N-linked oligosaccharide transfer deficiency. *J Biol Chem*, 1993, **268**(8): 5783~5789
- Noda K, Miyoshi E, Uozumi N, *et al.* Gene expression of alpha1-6 fucosyltransferase in human hepatoma tissues: a possible implication for increased fucosylation of alpha-fetoprotein. *Hepatology*, 1998, **28**(4): 944~952
- Papin J, Subramaniam S. Bioinformatics and cellular signaling. *Curr Opin Biotechnol*, 2004, **15**(1): 78~81
- Tucker C L, Gera J F, Uetz P. Towards an understanding of complex protein networks. *Trends Cell Biol*, 2001, **11**(3): 102~106
- Wang J H. Protein recognition by cell surface receptors: physiological receptors versus virus interactions. *Trends Biochem Sci*, 2002, **27** (3): 122~126
- Misumi Y, Tanaka Y, Ikehara Y. Biosynthesis, intracellular processing and secretion of haptoglobin in cultured rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 1983, **114**(2): 729~736
- Wilson N L, Schulz B L, Karlsson N G, *et al.* Sequential analysis of N- and O-linked glycosylation of 2D-PAGE separated glycoproteins. *J Proteome Res*, 2002, **1**(6): 521~529
- Okuyama N, Ide Y, Nakano M, *et al.* Fucosylated haptoglobin is a novel marker for pancreatic cancer: a detailed analysis of the oligosaccharide structure and a possible mechanism for fucosylation. *Int J Cancer*, 2005, **118**(11): 2803~2808
- Thompson S, Turner G A. Elevated levels of abnormally-fucosylated haptoglobins in cancer sera. *Br J Cancer*, 1987, **56**(5): 605~610

Characterization of Core-fucosylated Glycoproteins From Human Normal Liver Tissues*

DAI Zhi¹⁾, FAN Jia^{1,2)**}, ZHOU Jian¹⁾, BAI Dou-Sheng¹⁾, QIU Shuang-Jian¹⁾, KANG Xiao-Nan¹⁾,
CUI Jie-Feng¹⁾, GUO Kun¹⁾, Li Yan¹⁾, LIU Yin-Kun^{1,2)**}

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

²⁾ Institute of Biomedical Sciences, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract In order to establish and analyze core-fucosylated glycoprotein profiles of human normal liver tissues, which could contribute to the finding of more aberrantly fucosylated glycoproteins related to liver diseases, based on the approach, “lectin affinity chromatography, 2-DE and MALDI-MS/MS”, the lens culinaris agglutinin (LCA) affinity glycoprotein profiles from human normal liver tissues were obtained, in which 130±3 protein spots were detected. Altogether, 90 silver-stained spots in the 2-DE map were cut out, destained and subjected to in-gel tryptic digestion, and 53 proteins were identified by MALDI-TOF MS/MS. These proteins, mainly in the middle range (pI 5~9, M 10~100 ku), were found to participate in the metabolism and play crucial roles in binding and catalytic reactions. Putative N-linked glycosylation consensus sequence, i.e., -N-X-S/T-, was applied to evaluate glycosylation of all the identified proteins. Furthermore, protein immunoprecipitation combined with lectin blot was used to further validate fucosylation of the identified possible candidate proteins, haptoglobin and alpha enolase. All the results suggested that lectin affinity chromatography and 2-DE in combination with MALDI-MS/MS enabled the identification of all the specific subsets of glycoprotein, and the database could give us a help when searching for some aberrantly core-fucosylated glycoproteins associated with some diseases.

Key words core-fucosylated glycoprotein, lens culinaris agglutin, affinity chromatography, glycoproteomics, liver

*This work was supported by grants from The State High Technology R &D Project of China (2007AA02Z479), Program for Outstanding Medical Academic Leader (LJ06004), Specialized Research Fund for The Doctoral Program of Higher Education (20070246112) and Youth Fund of Fudan University (EYF152008).

**Corresponding author .

FAN Jia. Tel: 86-21-64041990-2136, E-mail: jiafan99@yahoo.com

LIU Yin-Kun. Tel: 86-21-64041990-2501, E-mail: ykliu@zshospital.com

Received: September 17, 2007 Accepted: February 20, 2008