

应用凝集素芯片检测肝癌细胞膜表面糖链变化*

何 群** 李春辉 潘忠诚 王天骄 张玉魁 钟连声 王绍成 赵雨杰**

(中国医科大学生物芯片中心, 教育部细胞生物学重点实验室, 沈阳 110001)

摘要 利用凝集素糖链特异亲和原理构建对细胞膜表面糖链进行即时检测的凝集素芯片体系, 检测肝癌发生过程中细胞膜糖链的变化. 从 H22 细胞系、正常小鼠和肝癌模型鼠肝组织中提取细胞进行荧光标记, 激光扫描仪检测凝集素位点捕获的细胞, 根据凝集素特异亲和性确定细胞膜表面糖表达谱, 显微镜下观察捕获细胞的形态. 对凝集素芯片捕获细胞的最佳条件进行探讨, 用甘露糖抑制试验、流式细胞仪和不同血型红细胞验证了凝集素捕获细胞的特异性. 结果显示: 正常和肝癌小鼠肝细胞膜表面糖链存在较大差异, 正常组只有 PSA、DSL、STL、NPL 凝集素位点捕获到细胞, 实验组只有 LTL 和 DBA 位点没有捕获到细胞, 提示小鼠肝癌组织细胞膜表面糖链显著增加, 细胞膜上唾液酸、乙酰葡萄糖、乙酰半乳糖、甘露糖和半乳糖糖链表达增加, 这些糖链及其相关糖蛋白可能在肝癌的发生和发展中起一定作用. 该凝集素芯片有较好的稳定性和特异性, 可以对细胞膜表面糖链进行动态、即时、通量的检测, 为研究细胞膜表面聚糖在细胞发育和癌变等过程中的变化提供了一个技术平台.

关键词 肝癌, 糖基化, 细胞膜, 凝集素芯片

学科分类号 R392.12, Q73

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00622

细胞表面糖复合物在细胞识别、黏附、通信联络、免疫应答等方面起着重要作用. 细胞表面糖复合物的糖链结构变化与癌变、发育、感染等过程紧密相关^[1-2], 在细胞转化开始和恶变的过程中常发生聚糖表达的改变^[3-5], 研究这些受时间和空间调控的聚糖表达模式, 对了解聚糖在癌变过程中的作用有着重要的意义. 肝癌是人类死亡率较高的恶性肿瘤, 其发生机制至今尚未阐明, 本文建立了对细胞膜表面糖链进行即时、通量检测的凝集素芯片体系, 并应用该芯片对小鼠肝癌细胞株 H22、正常小鼠与肝癌模型鼠肝细胞膜表面糖链进行检测. 该芯片利用凝集素与细胞膜表面糖链结合专一性对细胞进行自动捕获^[6], 由于细胞已经用吖啶橙标记, 通过荧光扫描就可以观察到芯片上哪些凝集素位点捕获到细胞, 根据该位点凝集素与糖链亲和的特异性就可以判断出该细胞膜上的糖链类型, 以探讨肝癌发生过程中细胞膜糖链的变化.

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

凝集素购自 Vector 公司; 牛血清白蛋白(BSA)、

戊二醛、细胞培养液 RPMI1640、胶原酶、二甲基亚硝胺 DEN (N-nitrosodiethylamine) 均购自 Sigma 公司; 红细胞分离液(ELS)、瑞士吉姆萨染色液、吖啶橙购自北京赛驰生物科技公司; 醛基载片(基因公司); C57 小鼠购自中国医科大学实验动物部; 健康人全血由中国医科大学第一附属医院血站提供; H22 细胞株由中国医科大学肿瘤研究所提供; 生物芯片点样仪(MicroGrid II, BioRobotics Ltd, England); 激光共聚焦扫描仪(Gene TAC™ LS IV, USA); 低温离心机(SIGMA, USA); Nikon Microscopoe (ECLIPSE 80i, Japan).

1.2 凝集素芯片的制备

按照文献[6]的方法制备凝集素芯片, 将凝集素溶于 5%甘油的 PB 缓冲液(0.01 mol/L, pH=7.2)

* 国家自然科学基金(20672144)资助项目.

** 通讯联系人. Tel: 024-23251393

何 群. E-mail: hequn@mail.cmu.edu.cn

赵雨杰. E-mail: yjzhao@mail.cmu.edu.cn

收稿日期: 2009-10-23, 接受日期: 2009-12-28

配制点样液,凝集素点样浓度为 $1\ \mu\text{g/L}$,在醛基修饰的芯片载片上制备凝集素点阵, 37°C 湿盒内水化 2 h,放入 4°C 冰箱备用。

1.3 小鼠肝癌模型的建立

将 20 只 C57 小鼠随机分成 2 组,实验组 14 只,对照组 6 只,每组雌雄各半,实验组饲以含 DEN 饮水,前 4 周浓度为 $0.050\ \mu\text{g/L}$,4~12 周以后浓度为 $0.1\ \mu\text{g/L}$,连续 12 周后改为自由饮水,对照组常规饮水^[7]。12 周后随机抽取对照组及实验组动物,观察肝脏形态、颜色、质地,取肝脏标本,4%多聚甲醛缓冲液固定 24 h,常规石蜡包埋,切片,HE 染色,光学显微镜下观察。

1.4 细胞提取

1.4.1 H22 细胞株的培养及其细胞提取。H22 细胞培养于含 10%胎牛血清、青霉素 $100\ \text{U/ml}$ 、链霉素 $60\ \text{mg/L}$ 的 RPMI 1640 培养液中, $5\%\ \text{CO}_2$ 、 37°C 饱和湿度培养,取对数生长期的细胞进行实验,用 $0.25\%\ \text{胶原酶 IV}$ 与 $0.01\%\ \text{EDTA}$ 1:1 的混合液消化为单细胞悬液,加入 $1\%\ \text{吖啶橙}$ 染色 5 min, $1000\ \text{r/min}$ 离心 5 min, RPMI 1640 洗涤细胞去除多余的吖啶橙,重悬细胞,调整浓度为 10^2 个/L,用于后续实验。

1.4.2 红细胞提取。将不同血型抗凝血离心,吸取红细胞部分用 PBS 溶液稀释细胞浓度为 10^2 个/L,备用。

1.4.3 小鼠肝细胞的消化及其提取。分别取实验和对照组小鼠肝组织用肝素 D-hank's 液清洗后剪碎, $0.25\%\ \text{胶原酶 IV}$ (D-hank's 液) 37°C 消化 1 h, $1000\ \text{r/min}$ 离心 8 min,按 1:3 的比例向细胞沉淀中加入 ELS 裂解液去除红细胞,轻轻吹打混匀; $1000\ \text{r/min}$ 离心 5 min, D-hank's 液重悬细胞,加入 $1\%\ \text{吖啶橙}$ 染色 5 min, $1000\ \text{r/min}$ 离心 5 min, RPMI 1640 洗涤细胞去除多余的吖啶橙, RPMI 1640 细胞培养液重悬细胞,制备细胞涂片,余下细胞调整浓度为 10^2 个/L,用于后续实验。

1.5 凝集素芯片孵育

将已经制备好的凝集素芯片放入湿盒内, 37°C 水化 20 min, $0.5\%\ \text{酪蛋白溶液}$ (PB, $0.01\ \text{mol/L}$, $\text{pH} 7.2$) 封闭 10 min, PB 缓冲液 ($0.01\ \text{mol/L}$, $\text{pH} 7.2$) 洗涤 5 min,将准备好的细胞悬液滴加到芯片上, 37°C 孵育 40 min, PBS ($\text{pH} 7.2$) 缓冲液洗涤 5 min, $3\%\ \text{戊二醛}$ (PBS, $\text{pH} 7.2$) 固定 10 min。

1.6 凝集素芯片各位点捕获细胞观察

1.6.1 细胞膜糖链检测。GeneTAC™ LSIV 激光扫描仪扫描检测凝集素芯片上各凝集素位点荧光信号强度,参照凝集素对糖链的亲亲和特异性,确定细胞膜糖链类型。

1.6.2 细胞形态观察。采用常规 HE 染色方法对凝集素芯片上所捕获的细胞进行染色,光学显微镜下观察芯片凝集素位点上所捕获细胞的数量及其形态。

1.7 流式细胞仪检测

提取小鼠肝组织细胞,配置浓度为 $1 \times 10^2 \sim 2 \times 10^2$ 个/L 细胞悬液,分别加入荧光标记的凝集素 FITC-PSA 和 FITC-DBA (终浓度 $0.4\ \text{g/L}$), 37°C 反应 40 min, $900\ \text{r/min}$ 离心 5 min,沉淀用 PBS 清洗 3 遍后用 $0.2\ \text{ml}$ PBS 稀释,流式细胞仪检测细胞的荧光强度。

1.8 芯片捕获到细胞的细胞化学反应

按 1.4 方法提取小鼠肝癌细胞,不经过吖啶橙标记直接滴加到凝集素芯片孵育 40 min, PBS 缓冲液洗涤 5 min,分别将浓度为 $0.4\ \text{g/L}$ FITC 标记的 PSA 和 DBA 滴加到已经捕获到细胞的芯片上, 37°C 反应 40 min, PBS 缓冲液洗涤 5 min,激光扫描仪扫描检测。

2 结 果

2.1 凝集素芯片捕获细胞方法的建立

为了研究凝集素芯片捕获细胞的最佳条件,我们以 BSA 为阴性质控,以 FITC-BSA 为阳性标记点,制备凝集素 ConA 和 JAC 3×3 点阵,用吖啶橙标记的小鼠肝癌细胞株 H22 进行孵育,分别探讨了凝集素芯片封闭条件、最佳孵育时间、孵育温度、芯片的特异性以及凝集素芯片检测的最佳细胞浓度。

2.1.1 封闭条件的确定。凝集素固定后要将芯片上非点样点区域封闭,以防止细胞孵育时标记吖啶橙的细胞与之结合使得芯片背景升高,分别用 $50\ \text{mmol/L}$ 乙醇胺的硼酸缓冲液和 $1\%\ \text{BSA}$ 磷酸缓冲液对芯片进行封闭,用吖啶橙标记的 H22 细胞进行孵育,扫描检测二者的荧光信号强度,比较封闭效果和信噪比。结果发现, $1\%\ \text{BSA}$ 磷酸缓冲液封闭效果略优于乙醇胺 (图 1)。

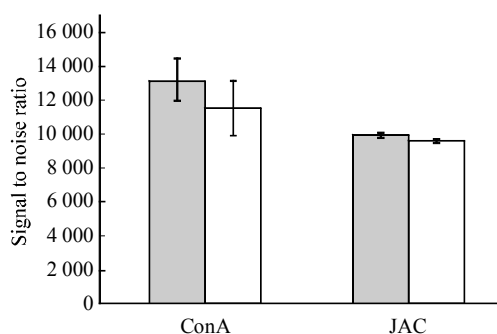


Fig. 1 Effect of blocking buffer

■: BSA; □: Ethanolamine.

2.1.2 最佳孵育时间及其孵育温度的确定. 为了评估细胞悬液在芯片上的最佳孵育条件, 比较了不同时间以及不同温度对孵育效果的影响, 结果显示(图 2): 在 37℃ 时, 随着细胞孵育时间增加, ConA、JAC 捕获到细胞的荧光强度逐渐增强, 40 min 以后, 荧光信号波动不大, 反应达到平台期. 固定孵育时间为 40 min, 检测室温(24℃)和 37℃ 下凝集素捕获细胞的荧光信号, 发现二者没有显著性差别, 37℃ 时荧光信号强度略强一些.

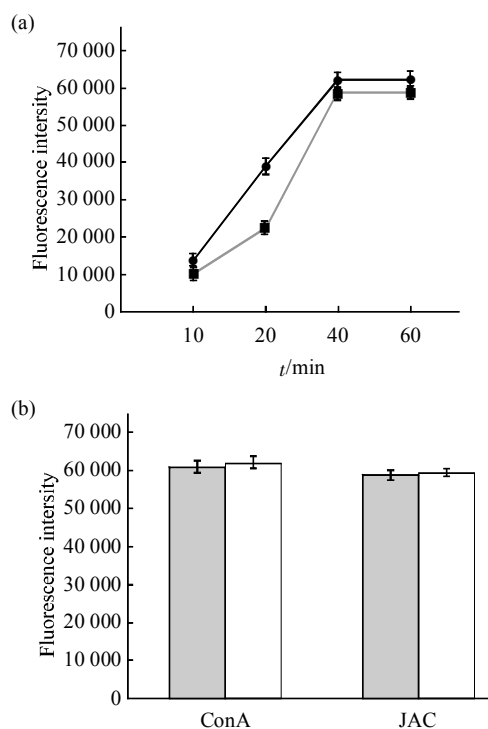


Fig. 2 Effect of incubation time and temperature

(a) Dates are represented for the fluorescence intensity that bound cells labeled with AO by ConA and JAC for 10~60 min, respectively. ●—●: ConA; ■—■: JAC. (b) Data are represented for the fluorescence intensity that bound cells labeled with AO by ConA and JAC at room temperature and 37℃, respectively. ■: Room temperature(24℃); □: 37℃.

2.1.3 最佳细胞孵育浓度. 为了确定芯片上细胞孵育的最佳浓度, 分别将细胞浓度调制到约为 1.0×10^4 个/L、 1.0×10^3 个/L、 1.0×10^2 个/L、10 个/L、1 个/L, 将不同浓度细胞悬液在 37℃ 下孵育 40 min 后, 洗涤, 戊二醛固定, 荧光扫描后常规 HE 染色, 光学显微镜下观察凝集素位点捕获到的细胞数目. 我们观察到, 当凝集素位点直径为 700 μm 左右时, 捕捉细胞达到饱和时细胞数目约为 500 个左右(视细胞大小而定), 当孵育细胞浓度在 $1.0 \times 10^2 \sim 1.0 \times 10^3$ 个/L 时, JAC 和 ConA 位点捕获的细胞基本饱和, 非凝集素位点没有非特异吸附的细胞, 当浓度达到 1.0×10^4 个/L 时, 镜下观察非凝集素位点有未洗掉的非特异吸附细胞, 扫描信号背景较强. 随着孵育细胞浓度的降低, 凝集素各点捕获细胞的个数也降低. 当孵育细胞浓度降至 1.0 个/L 后, JAC 位点捕获细胞数目在 50 个以下, 但仍然可以检测到该点的荧光信号. 结果表明: 孵育细胞悬液的最佳浓度在 $1.0 \times 10^2 \sim 1.0 \times 10^3$ 个/L 左右, 此时可以获得较好的信噪比(图 3).

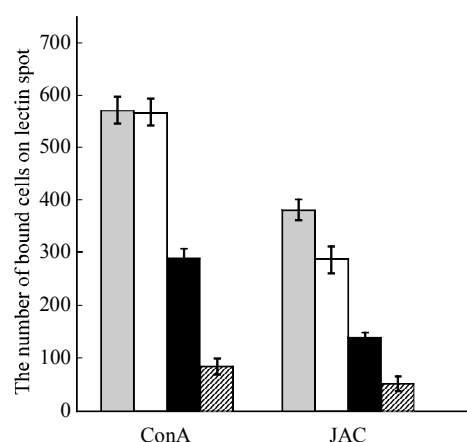


Fig. 3 Effect of incubation concentration of cells

Data are represented for the bound cell number on one lectin spot, in each group from left to right, the cell concentration are: $1.0 \times 10^4/\text{L}$ (□), $1.0 \times 10^3/\text{L}$ (■), $1.0 \times 10^2/\text{L}$ (■), 10/L (▨).

2.1.4 芯片凝集素特异性检测. 为了观察凝集素捕获细胞的特异性, 采用单糖封闭实验进行验证, 配制 0~0.5 mol/L 甘露糖 PBS 溶液, 在芯片上孵育 30 min 后洗涤, 然后加入吖啶橙标记的 H22 细胞, 37℃ 孵育 40 min, 洗涤扫描, 结果发现, ConA 点荧光信号随着甘露糖浓度的增加, 荧光信号逐渐减弱, 当达到 0.2 mol/L 时, ConA 位点基本没有荧光信号, 而 JAC 位点的荧光信号没有受到影响, 表明甘露糖能与 ConA 上的甘露糖结合位点结合, 对

其糖特异结合位点进行封闭, 因此 ConA 位点捕获到的细胞数目随着甘露糖封闭的浓度增加而降低, 直至没有荧光信号(图 4), 表明芯片上固定的凝集素仍然保持对糖链的特异亲和性.

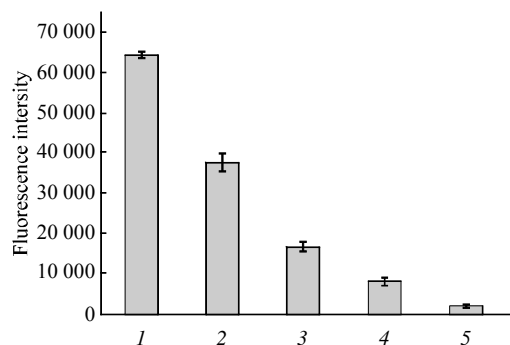


Fig. 4 Effect of Mannose blocking

Blocking assay using 0 to 0.4 mol/L mannose incubation. Dates are represented for the fluorescence intensity that ConA bind with AO labeled H22 cells. 1: 0.001 mol/L; 2: 0.01 mol/L; 3: 0.05 mol/L; 4: 0.1 mol/L; 5: 0.2 mol/L.

2.1.5 芯片检测的重复性. 我们制备 23 种凝集素点阵检测 AO 标记的 H22 细胞, 重复 3 次, 对得到的结果进行数据处理, 检测芯片捕获细胞的荧光强度, 结果显示: 只有 LTL 和 DBA 凝集素位点没有捕获到细胞, 芯片扫描荧光强度的变异系数在 20% 以下, 有较好的重复性(图 5).

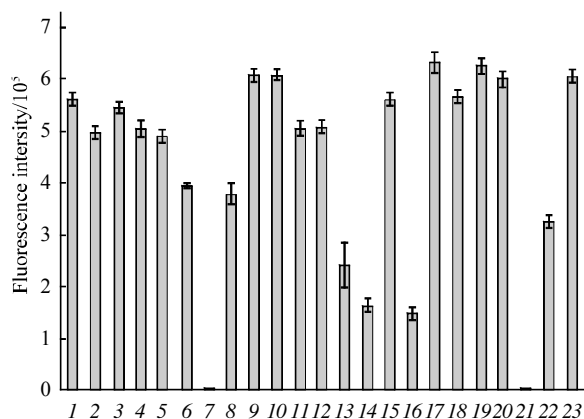


Fig. 5 Glycome profiling of H22 cells during differentiation

1: DAL; 2: PSA; 3: GNA; 4: MPL; 5: WBA; 6: JAC; 7: LTL; 8: SBA; 9: BPL; 10: WFA; 11: MAL-1; 12: AAL; 13: EEL; 14: HHL; 15: SNA; 16: ACA; 17: STL; 18: Suc WGA; 19: NPL; 20: ECL; 21: DBA; 22: WGA; 23: ConA.

2.2 小鼠肝癌模型的建立

正常对照组小鼠在实验期间状态良好. 实验组

第 12 周开始死亡, 死亡 8 只, 剩余的 6 只小鼠, 处死后取出肝脏, 其肝脏表面粗糙不平, 呈现颗粒状. 肝脏的切面可看见灰白色颗粒状的结节, 石蜡包埋切片 HE 染色镜下观察, 肝组织均发生癌变(图 6).

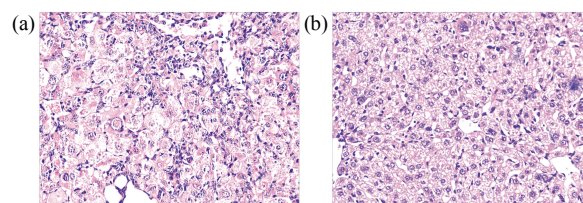


Fig. 6 HE staining of paraffin section from normal and hepatocarcinoma groups

(a) Hepatocarcinoma group. (b) Normal group.

2.3 凝集素芯片对细胞膜糖链检测结果

2.3.1 芯片扫描结果. 凝集素芯片对 H22 细胞系、正常对照组和肝癌模型组小鼠肝细胞膜表面糖链检测结果见表 1. H22 细胞系只有 LTL 和 DBA 两个凝集素位点没有捕获到细胞, 正常组只有 PSA、DSL、STL、NPL 四种凝集素位点捕获到细胞, 且捕获细胞数很少, DSL、STL、NPL 都具 polyLacNAc、Lac/LacNAc 亲和特异性; 肝癌模型组早期取样标本中 MPL、JAC、ACA、EEL、NPL、HHL、SucWGA 几个凝集素位点显示阴性, 后期取样标本检测结果与 H22 细胞系一致, 只有 LTL 和 DBA 两个凝集素位点没有捕获到细胞. 表明肝组织癌变过程中细胞膜表面糖链逐渐增加, 根据凝集素的特异性可以看出: 细胞膜上增加了唾液酸、乙酰葡萄糖、乙酰半乳糖、甘露糖和半乳糖糖链. 亲和岩藻糖的三种凝集素 AAL、LTL、PSA 中, 亲和 L 型岩藻糖的 LTL 没有捕获到细胞, AAL 即亲和末端岩藻糖也亲和末端唾液酸, PSA 即亲和末端岩藻糖也亲和末端甘露糖, 因此, 尚不能明确判断肝病变组织细胞膜上末端岩藻糖型糖链增加.

2.3.2 细胞形态观察. 小鼠肝细胞制备细胞涂片, 对涂片上的细胞和芯片上捕获到的细胞进行 HE 染色, 光学显微镜下观察细胞形态(图 7). 结果发现: 涂片上正常对照组提取的细胞均为浅染, 肝癌模型组可以观察到正常细胞和恶性两种细胞, 两种细胞数量相当; 芯片捕获到的细胞以恶性细胞为主, 也有少量细胞与正常细胞形态相同, 可能是非特异性捕获所致, 也可能在细胞形态尚未发生改变时细胞膜糖链已经开始增加.

Table 1 Lectin used in this study and their specificities and their binding result

Lectin	Specificities	H22	Hepatocarcinoma group	Control group
DSL	(GlcNAc) ₆ polyLacNAc and LacNAc(NA3,NA4)	+	6/6	6/6
PSA	Fucα1,6GlcNAc and α-Man	+	6/6	6/6
GNA	Non-substituted α1,6Man	+	6/6	
MPL	Gal1,3GalNAcα-Thr/Ser(Tn) and GalNAcα-Thr/Ser(Tn)	+	3/6	
WBA	αGalNAc	+	6/6	
JAC	Galβ1,3GalNAcα-Thr/Ser(T) and GalNAcα-Thr/Ser	+	5/6	
LTL	α-L-Fucα1,3GlcNAc,Sia-Le ^x and Le ^x	—	0/6	
SBA	GalNAcα 1-Ser/Thr	+	6/6	
BPL	Galβ1,3GalNAc and NA3,NA4	+	6/6	
WFA	Terminal GalNAc (e.g., GalNAcβ1,4GlcNAc)	+	6/6	
MAL-I	Glcβ1,4GalNAc	+	6/6	
AAL	Terminal α Fuc and Sia- Le ^x	+	6/6	
EEL	Galα1,3[Fucα1,2Gal] > Galα1,3Gal	+	5/6	
HHL	Non-substituted α 1,6Man	+	5/6	
SNA	Siaα2,6Gal	+	6/6	
ACA	Galβ1,3GalNAcα-Thr/Ser(T)	+	5/6	
STL	(GlcNAc) _n and polyLacNAc	+	6/6	6/6
SucWGA	D-GlcNAc	+	5/6	
NPL	Non-substitutedα-1,6Man	+	3/6	
ECL	Lac/LacNAc	+	6/6	6/6
DBA	GalNAcα-Thr/Ser(Tn) and GalNAcα-1,3GalNAc	—	0/6	
WGA	(β-D-GlcNAc) ₆ and multivalent Sia	+	6/6	
ConA	α-Man(inhibited by presence of bisecting GlcNAc)	+	6/6	

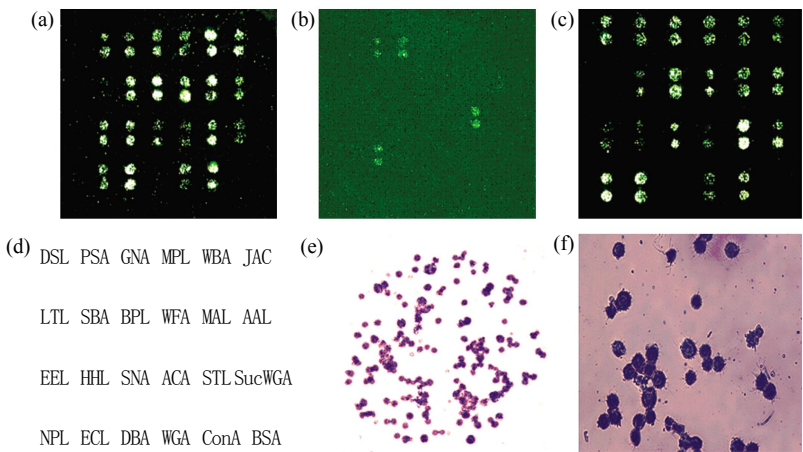


Fig. 7 Glycome profiling

(a~c) Bound cells on the lectin microarray were scanned with fluorescence scanner from left to right: (a) Hepatocarcinoma group. (b) Normal group. (c) H22 cell line. (d) Lectin microarray format. (e, f) Bounded cells extracted from liver cancer group on the lectin microarray under microscope. (e) 100×. (f) 400×.

2.4 凝集素芯片捕获细胞的特异性检测

为了进一步验证凝集素芯片检测结果的准确

性，我们分别用细胞化学实验、流式细胞仪和已知血型红细胞进行验证。

2.4.1 细胞化学实验. 我们选择小鼠肝癌细胞芯片检测结果为阳性的凝集素 PSA 和阴性的凝集素 DBA 作为探针, 用 FITC 荧光标记, 将肝癌细胞提取后不进行吖啶橙荧光标记直接与芯片孵育, 洗涤后分别向芯片上滴加 FITC-PSA 和 FITC-DBA, 30 min 后洗涤、扫描, 结果显示, FITC-PSA 孵育后芯片上捕获到细胞的各点都有荧光信号, 而 FITC-DBA 孵育后的芯片没有荧光信号, 说明细胞膜有与 PSA 结合的糖链而没有与 DBA 结合的糖链, 芯片捕获细胞是源于凝集素的特异性而不是非特异性吸附的结果(图 8a).

2.4.2 流式细胞仪的检测结果. 上述提取的小鼠肝癌模型组肝细胞, 不经荧光标记直接与 FITC-PSA 和 FITC-DBA 混合 30 min 后离心、洗涤、重悬, 流式细胞仪检测, 结果见图 8b, FITC-PSA 流式细胞仪检测结果为阳性, FITC-DBA 流式细胞仪检测结果为阴性, 与凝集素芯片检测结果一致.

2.4.3 红细胞检测. 我们用已知细胞膜表面糖链的不同血型红细胞对芯片检测的可靠性进一步验证, 由于红细胞容易破碎, 没有用荧光素对红细胞进行标记, 凝集素芯片捕获细胞后直接在显微镜下观察, 结果见图 8 c, d. 芯片上捕获到 O 型红细胞的凝集素为: PSA、AAL、WGA、LTL、SucWGA、BPL、WFA, 在个别芯片上 SBA 位点有少许细胞, 这里 PSA、AAL、LTL 都是与岩藻糖亲和的凝集素, AAL 是与末端岩藻糖和唾液酸亲和的凝集素, 这三个位点上凝集素捕获的 O 型血红细胞较多, BPL、WFA、SBA、WGA 位点捕获的 O 型血红细胞很少. 捕获到 B 型红细胞的位点有: WGA、LTL、WFA、WBA、BPL、WGA, 其中 WBA 特异性亲和 Gal, 这与 B 型血红细胞末端 Gal 一致, 除此之外, SBA 位点捕获到很少细胞, 亲和 O 连接半乳糖链 MPL(Gal, 3GalNAc α -Thr/Ser)、JAC(Gal β 1, 3GalNAc α -Thr/Ser(T))位点均未捕获到 B 型

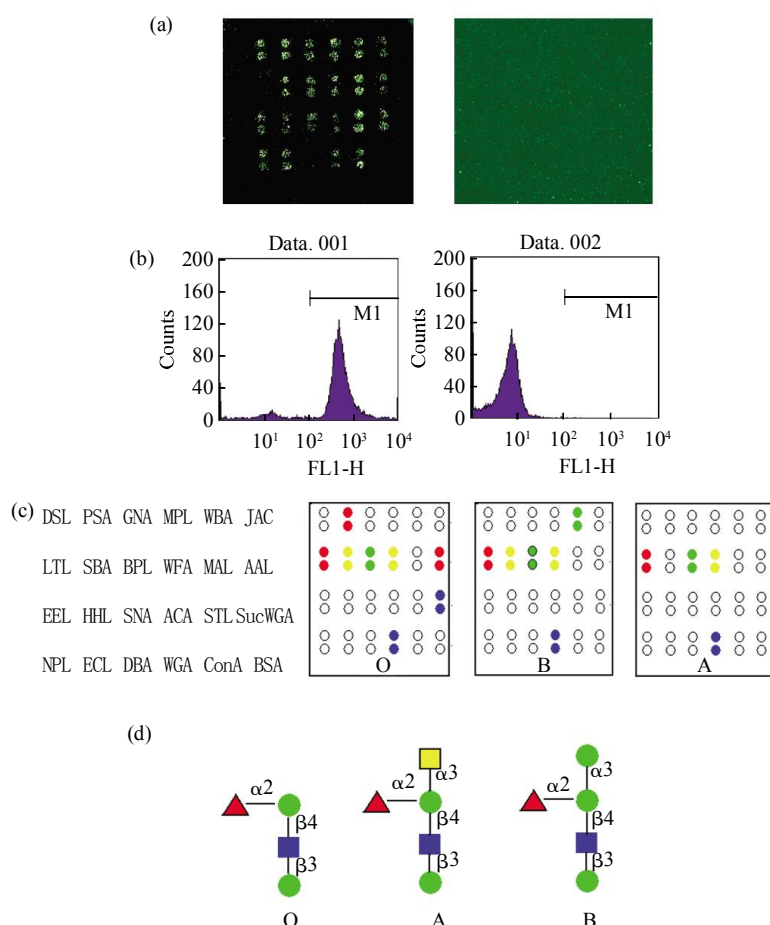


Fig. 8 Specificity assay

(a) Fluorescent intensity of lectin microarray after FITC-lectin incubation with bound cells. Left: FITC-PSA, Right: FITC-DBA. (b) Fluorescent intensity of cells stained with FITC-PSA (left) and FITC-DBA (right) by flow cytometry. (c) Lectin spots with bounded cells after incubation with A, B, O blood type erythrocyte, the color spots are lectins which caught erythrocyte, different colors mean unique carbohydrate, Red: Fuc; Green: Gal; Blue: GlcNAc; Yellow: GalNAc. (d) The carbohydrate structures of A, B, O blood type.

红细胞, 亲和岩藻糖的 PSA、AAL 也有少量细胞. 捕获到 A 型血红细胞凝集素位点有: WFA、BPL、LTL、WGA, WFA 和 SBA 的亲合特异性均为末端 GalNAc, 但 SBA 主要亲和 O 连接糖链, 在本实验中该点没有捕获到 A 型血红细胞. LTL 位点捕获的三种血型细胞都比较多, 其原因可能是 LTL 除了亲和 Fuc 外, 还亲和含 Le^x 类型糖链^[8-9]. 亲和 GalNAc 型糖链的 WFA 和亲和 Gal β 1,3GalNAc 的 BPL 在三种血型中都捕获到细胞, 只是捕获的 O 型血和 B 型血细胞很少, 这可能是细胞膜糖链末端 Fuc 或者 Gal 脱落和凝集素的交叉反应所致, 亲和含 GlcNAc 的复杂糖链的 WGA 在三种红细胞中均呈现较弱的阳性结果, 亲和 Man 和 Sia 的凝集素位点均未捕获到细胞, 实验证明凝集素芯片对细胞膜糖链检测的特异性较好.

洗脱条件对结果的影响: 在红细胞实验中, 我们对洗涤条件对结果的影响进行了观察, 红细胞孵育后, 分别用两种方式对芯片进行洗涤: a. 将芯片反扣在 PBS 溶液中, 依靠重力作用去除非特异吸附细胞; b. 将芯片放入 PBS 溶液中, 在摇床中轻微震荡 3 min. 观察这两种洗涤方法的影响, 结果显示: a. 亲和 Man 和 Sia 的凝集素位点均未观察到捕获的细胞; b. 采用第一种方法洗涤, A、B、O 型血亲和 Fuc 的 PSA、AAL 位点均捕获到细胞, 采用第二种方法洗涤, B 型血 PSA、AAL 有少量细胞, A 型血没有. 结果显示: 对于细胞膜没有的糖链, 洗涤对于芯片特异性吸附作用没有影响; 第二种洗涤方式会洗去一些凝集素亲和力比较弱的细胞.

3 讨 论

蛋白质转录后的修饰作用在蛋白质活化、维持蛋白质功能方面起着重要的作用^[10-11], 细胞膜糖基化修饰是一种常见的翻译后修饰, 大约 50% 以上的蛋白质都发生糖基化, 它对蛋白质功能有极其重要的影响. 肝癌发生发展是一个复杂的过程, 其过程中细胞膜糖蛋白在其免疫、信号传导、细胞迁移等方面的作用一直令人着迷. 由于缺乏合适的技术手段, 尚没有对细胞膜糖链在癌变过程中的变化进行系统的检测. 传统对细胞糖蛋白检测的方法是: 将细胞中糖蛋白提取, 进行电泳或者质谱测定, 或者用凝集素进行分析, 如凝集素沉淀法、凝集素亲和层析法、凝集素亲和电泳法、凝集素酶联免疫吸附实验、凝集素印迹法等. 前者检测方法有几个缺

点: a. 不能对细胞膜上的糖复合物进行即时地检测, b. 提取过程中糖蛋白容易丢失, 也无法对细胞膜糖脂进行检测; 后者每次只能使用一种或者几种凝集素进行检测, 无法进行通量的识别.

2005 年 Angeloni、Carlsson 和 Kuno 小组分别报道了应用凝集素芯片对糖蛋白进行检测, 凝集素芯片作为一种新型的聚糖表达谱分析方法发展起来, Pilobello 和 Rosenfeld 等^[12-13]各自构建了 9 种和 24 种凝集素的芯片对糖蛋白进行检测, 对凝集素芯片的特异性进行了验证, 2007 年 Tateno 等^[14]使用凝集素芯片对哺乳动物细胞膜表面糖链进行了检测, 他们分别对 CHO 及 CHO 糖基化缺陷细胞系、正常小鼠和 β 1, 3-N-乙酰葡萄糖转移酶 II 基因敲除小鼠脾细胞膜表面糖链进行了检测, 以此验证凝集素芯片的特异性, 并对 K562 细胞系分化前后的细胞膜表面糖链变化进行检测, 显示出凝集素芯片在细胞膜表面糖基化检测的优势. 我们将蛋白质芯片技术与凝集素的特殊功能结合起来建立了凝集素芯片技术, 并用小鼠 H22 细胞株验证了凝集素芯片的可行性, 使用 23 种凝集素对小鼠肝癌细胞株 H22 以及小鼠肝癌变过程中细胞膜表面糖链变化进行即时的高通量检测. 为了避免培养细胞系细胞膜可能发生的糖基化改变对实验结果的干扰, 我们用化学试剂诱导的肝癌小鼠模型来验证肝癌病变过程中细胞膜表面糖基化的变化并对 H22 细胞系检测结果进行对比, 正常小鼠肝细胞膜表面只检测到多聚乳糖胺, 这是基质蛋白(如黏连蛋白)的主要成分, 肝癌细胞膜表面糖链显著增加, 细胞膜上增加了唾液酸、乙酰葡萄糖、乙酰半乳糖、甘露糖和半乳糖糖链, 肝癌模型组检测结果与 H22 细胞株基本一致, 表明细胞膜这些糖链的表达增强与细胞癌变过程密切相关. 为了验证凝集素芯片对细胞膜糖链检测的准确性, 我们选择了芯片检测分别为阳性和阴性的 PSA 和 DBA 凝集素作为探针, 用流式细胞仪对细胞膜进行检测, 实验结果与芯片检测结果一致, 同时表明对芯片捕获的细胞可以进一步进行免疫化学检测, 有利于对捕获的细胞进一步分析.

已发现肿瘤细胞膜表面唾液酸含量明显增加^[15-16], 唾液酸含量的增加降低了转移的肿瘤细胞与 IV 型胶原及其纤黏连蛋白的附着. 唾液酸化增加常常表现为唾液酸以特异的 α 2-6 键与外侧乳糖胺或者 O-聚糖的内侧相连, 我们实验验证了这一点. 已有文献报道大鼠肝癌中 Glc 转移酶存在 (GlcNAcT-III), 它催化平分型 GlcNAc 分支的添

加,影响N-聚糖的结构^[7],本实验中细胞膜表面GlcNAc糖链明显增加,实验结果中,实验组肝细胞LTL、DBA位点100%为阴性结果,LTL和AAL都是亲和Fuc α 或者Sia-Le^x的凝集素,但AAL在所有病变标本中都呈现阳性,很可能是细胞膜表面没有L型岩藻糖链存在;DBA可以特异识别老鼠胚胎干细胞的 α -N-GalNAc表位^[8],本实验中与GalNAc β 型亲和的凝集素都为阳性结果,但是DBA呈现阴性结果,提示细胞膜表面没有 α -N-GalNAc型糖链.肝癌模型鼠凝集素检测结果中,MPL(Gal1,3GalNAc α -Thr/Ser(Tn)和GalNAc α -Thr/Ser(Tn))、JAC(Gal β 1,3GalNAc α -Thr/Ser(T)和GalNAc α -Thr/Ser)、ACA(Gal β 1,3GalNAc α -Thr/Ser(T))、EEL(Gal α 1,3[Fuc α 1,2Gal]>Gal α 1,3Gal)、NPL(non-substituted α -1,6Man)、HHL(non-substituted α 1,6Man)SucWGA(D-GlcNAc)几个凝集素位点并非在所有标本中全部显示阳性,考虑到标本取样有时间差异(3周),可认为甘露糖糖链和GalNAc α -Thr/Ser型糖链的增加可能发生在肝癌的晚期.

这种捕获细胞的凝集素芯片的局限性在于:a.与流式细胞仪相比,凝集素芯片不能给出各个位点捕获细胞数目的绝对值;b.只能确定细胞膜的糖链类型,目前尚不能准确确定细胞膜糖链的精细结构;c.目前不能对长期放置后的细胞进行检测;d.凝集素与糖链的亲合力要小于抗原抗体之间的亲合力,芯片捕获细胞后对芯片的清洗可能会洗掉一些表面糖链低水平表达的细胞,故一些细胞膜糖链低表达的情况可能检测不出来.尽管如此,糖封闭实验、流式细胞仪检测和不同血型红细胞捕获几个特异性实验结果表明:该凝集素芯片准确性较好,可用于对细胞膜表面糖链进行动态、即时、通量的检测,为研究细胞膜表面聚糖在细胞发育和癌变等过程中的变化提供了一个新的技术平台.

参 考 文 献

- [1] Betozi C R, Kiessling L L. Chemical glycobiology. Science, 2001, **291**(5512): 2357-2364
- [2] Karlsson K A. Microbial recognition of target-cell glycoconjugates. Curr Opin Struct Biol, 1995, **5**(5): 622-635
- [3] Sumiyoshi M, Ricciuto J, Tisdale A, *et al.* Antiadhesive character of mucin O-glycans at the apical surface of corneal epithelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008, **49**(1):197-203
- [4] Argueso P, Sumiyoshi M. Characterization of a carbohydrate epitope defined by the monoclonal antibody H185: sialic acid O-acetylation on epithelial cell-surface mucins. Glycobiology, 2006, **16** (12): 1219-1228
- [5] Balcan E, Tuglu I, Sahin M, *et al.* Cell surface glycosylation diversity of embryonic thymic tissues. Acta Histochem, 2008, **110**(1):14-25
- [6] 何群,宋春阳,张艳,等.细胞膜表面糖识别芯片的制备及其初步应用.中国医科大学学报,2008,**37**(5): 577-579
He Q, Song C Y, Zhang Y, *et al.* J China Medical University. 2008, **37**(5): 577-579
- [7] 李笑岩,白咸勇,刘同慎,等.二乙基亚硝胺诱发大鼠肝癌模型的建立及病理学改变.滨州医学院学报,2007,**30**(6): 401-406
Li X Y, Bai X Y, Liu T S, *et al.* J Binzhou Medical University, 2007, **30**(6): 401-406
- [8] Kazuo Y, Seiichiro I, Fumiko Y, *et al.* Measurement of the carbohydrate-binding specificity of lectins by a multiplexed bead-based flow cytometric assay. Anal Biochem, 2005, **336**(1): 28-38
- [9] Thomas I, Andreas B, Katharina P, *et al.* Specificity analysis of lectins and antibodies using remodeled glycoproteins. Anal Biochem, 2009, **386**(2): 133-146
- [10] Varki A, Cummings R, Esko J, *et al.* Essentials of Glycobiology. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999: 653
- [11] Dennis J W, Granowsky M, Warren C E. Protein glycosylation in development and disease. Bioessay, 1999, **21**(5):412-421
- [12] Pilobello K T, Krishnamoorthy L, Slavet D, *et al.* Development of a lectin microarray for the rapid analysis of protein glycopatterns. Chem Biochem, 2005, **6**(6): 985-989
- [13] Rosenfeld R, Bangio H, Gervig G J, *et al.* A lectin array-based methodology for the analysis of protein glycosylation. J Biochem Biophys Methods, 2007, **70**(3): 415-426
- [14] Tateno H, Uchiyama N, Kuno A, *et al.* A novel strategy for mammalian cell surface glycome profiling using lectin microarray. Glycobiology, 2007, **17**(10): 1138-1146
- [15] Hendrix M J, Seftor E A, Chu Y W, *et al.* Role of intermediate filaments immigration, invasion and metastsis. Cancer Metastasis Rev, 1996, **15**(4): 507-525
- [16] Miyagi T, Wada T, Yamaguchi K, *et al.* Human sialidase as a cancer marker. Proteomics, 2008, **8**(16): 3303-3311
- [17] Taniguchi N, Yoshimura M, Miyoshi E, *et al.* Remodeling of cell surface glycoproteins by N-acetylglucosaminyltransferase III gene transfection: modulation of metastatic potentials and down regulation of hepatitis B virus replication. Glycobiology, 1996, **6**(7): 691-694
- [18] Nash R, Neves L, Faast R, *et al.* The lectin DBA recognizes glycan epitopes on the surface of murine embryonic stem cells: a new tool for characterizing pluripotent cells and early differentiation. Stem Cells, 2007, **25**(4): 974-982

Glycoprofiling Investigation of Hepatocellular Carcinoma Cell Surface With Lectin Microarray*

HE Qun**, LI Chun-Hui, PAN Zhong-Cheng, WANG Tian-Jiao, ZHANG Yu-Kui,
ZHONG Lian-Sheng, WANG Shao-Cheng, ZHAO Yu-Jie**

(Biochip Center, The Key Laboratory of Cytobiology, Ministry of Education, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract To obtain information of glycan changes on cell surface in hepatocarcinoma progress, a high throughput lectin microarray was established to detect glycans on cell surface based on the principle of lectin to glycan binding affinity. Cells extracted from normal or model mice tissues and H22 cell lines were labeled with fluorescence and caught by lectins through the distinctive binding specificities, bound cells were directly detected by a laser fluorescence scanner to obtain the glycome profile of the cell surface according to the distinctive binding specificities of lectins on microarray and the appearance of bound cells were observed under the microscope. The optimal blocking buffer, optimal incubation time and temperature, optimal cell concentration were studied and specificity of lectin microarray was validated through the mannose blocking assay, flow cytometry and different blood type erythrocyte. High level of diversity of glycoprofiling was present between normal and hepatocarcinoma mice, only PSA, DSL, STL, NPL captured cells in normal group, all lectin captured cells except LTL and DBA in hepatocarcinoma group, the result show that Sia, GluNAc, GalNAc, Man and Gal increased on hepatocarcinoma cell surface. These results imply that these carbohydrates and correlate glycoprotein may play key roles in occurrence and development in liver canceration. The lectin microarray established a stable, real-time and throughout method and provides a novel strategy for study profiling changes of the cell surface glycome on tumor metastasis.

Key words live cancer, glycosylation, cell membrane, lectin array

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00622

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (20672144).

**Corresponding author. Tel: 86-24-23251393

HE Qun. E-mail: hequn@mail.cmu.edu.cn

ZHAO Yu-Jie. E-mail: yjzhao@mail.cmu.edu.cn

Received: October 23, 2009 Accepted: December 28, 2009