

不同转移潜能膀胱癌细胞糖组相对定量分析*

杨刚龙 张甲戌 刘昌梅 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 膀胱癌是发生在膀胱黏膜组织上的一种恶性肿瘤, 是泌尿系统中最常见的恶性肿瘤, 早期(非肌层浸润型膀胱癌)阶段的诊断和治疗是降低膀胱癌死亡率的最有效方式. 肿瘤的发生过程与糖链表达的改变有着密切的关系, 而定量分析膀胱癌发生过程中糖链的表达变化尚未有研究. 本研究以 2 株人膀胱正常上皮细胞系(HCV29、HUCV1), 1 株非肌层浸润性膀胱癌细胞系(KK47), 和 3 株浸润性膀胱癌细胞系(YTS1、J82、T24)为研究材料, 应用本室建立的利用乙酰肼修饰糖链唾液酸, 以及 [$^{12}\text{C}_6$]- 和 [$^{13}\text{C}_6$]- 苯胺同位素修饰糖链还原性末端技术, 然后利用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS), 进行膀胱上皮细胞不同病理状态的糖组相对定量分析. 从 6 株细胞中共鉴定出 52 种 N- 连接糖链结构, 并定量分析了不同类型的糖链在不同细胞中的分布差异, 发现唾液酸化、岩藻糖化的 N- 连接糖链在膀胱癌肿瘤细胞恶化过程中呈现显著升高的趋势, 同时平分型糖链和高甘露糖型 N- 连接糖链也呈表达升高趋势, 说明这些糖链结构的表达变化与膀胱癌发生关系密切, 从而有助于进一步阐明膀胱癌发生过程中糖链相关的分子机理.

关键词 膀胱癌, N- 连接糖链, 定量糖组学, 稳定同位素标记, MALDI-TOF/TOF-MS

学科分类号 Q81

DOI: 10.16476/j.pibb.2015.0228

膀胱癌在世界范围内最常见实体瘤排名中位于第四位, 也是国内最常见的泌尿系统肿瘤之一. 大约有 90% 的膀胱癌为膀胱尿路上皮癌, 按照其生长方式和预后通常分为非肌层浸润性和肌层浸润性两类. 非肌层浸润性膀胱癌早期诊断会有较好的预后, 但其复发率高达 60%~70%, 居所有实体瘤之首^[1]. 目前临床使用的膀胱癌诊断标志物为组织多肽抗原(TPA)和癌胚抗原(CEA), 这两种标志物的特异性较差, 在肝癌、胃癌、肺癌以及膀胱癌等多种癌症中表达都会升高, 而且这些标志物往往在癌症晚期才能被鉴定到, 导致错过了癌症治疗的最佳时期, 因此临床上亟需找到早期诊断和治疗膀胱癌的办法. 目前, 科学家在研究中也发现了一些与膀胱癌发展和转移相关的生物分子, 如抑癌基因类(TP53、P21、P16 等)、凋亡标志物类(BCL2、BAX、Caspase3 等)、生长因子类(EGFR、VEGF、FGFR3 等)、蛋白标志物类(COX2、Gelsolin 等)以及一些细胞黏附因子等^[2].

在肿瘤形成的早期, 细胞的蛋白质糖基化修饰会发生明显变化, 这种变化与恶性肿瘤细胞发生转

移时的信号传导密切相关, 因此肿瘤早期细胞分泌的糖蛋白质可能成为临床诊断肿瘤的生物标志物. 蛋白质的糖基化修饰是细胞中最重要的翻译后修饰之一, 哺乳动物中超过一半以上的蛋白质都发生了糖基化, 并且广泛分布于各种体液、组织和细胞中^[3]. 细胞中的糖蛋白质几乎参与了生命活动的每一个过程, 如受精、生长、胚胎发育、分化、免疫系统维持等^[4], 且与许多疾病, 如炎症、老化、癌细胞异常增殖及转移等的发病机制紧密关联^[5]. 因此, 糖蛋白质及其糖基化修饰在疾病中, 特别是肿瘤的发生、发展以及转移过程中具有重要作用.

近年来, 糖组学技术被广泛应用于多种癌症发病机制和标志物发现的研究, 利用糖组学技术也发现了多种与癌症发展密切相关的糖蛋白质或者糖

* 国家自然科学基金青年科学基金(81402115)和江苏省自然科学基金(BK20140172)资助项目.

** 通讯联系人.

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

收稿日期: 2015-07-24, 接受日期: 2015-09-25

链. Bigbee 等通过酰肼化学分离鉴定糖肽方法, 联合串联质谱分析了非小细胞肺癌患者的血清糖蛋白质, 发现有来自 22 个糖蛋白质在肺癌患者和健康人中具有明显差异^[6]. Hancock 等利用多重凝集素亲和色谱层析、SDS-PAGE、等电点聚焦以及抗体芯片等技术联合蛋白质质谱检测技术分析了乳腺癌患者和健康人糖蛋白质, 发现了 α 1B 糖蛋白、补体 C3、 α 1 抗胰蛋白酶和转铁蛋白等乳腺癌临床诊断的潜在标志物^[7]. Zhang 等^[8]利用 iTRAQ 同位素标记的蛋白质定量方法, 结合酰肼化学分离和质谱定量分析技术, 确定组织蛋白酶 L 和骨膜蛋白在侵袭性前列腺癌组织中高表达. 杨刚龙等^[9]前期在肝细胞癌糖组学的研究中, 利用凝集素 ConA-磁性微粒复合物分离糖蛋白, 共鉴定到 106 个糖蛋白质和 40 个糖链结构, 实现了同时对糖蛋白质和其糖链结构的鉴定分析. 因此, 通过糖组学手段筛选癌症诊断标志物, 对其在癌症发生和发展的分子机制中, 将极大地促进癌症临床诊断技术的发展, 也越来越受到众多国内外科研工作者的重视.

目前, 利用糖组学技术手段研究膀胱癌的报道并不多, 在仅有的几篇报道中, 美国 Goodison 等采用凝集素亲和层析和质谱鉴定技术分离并鉴定了膀胱癌患者和健康人尿液中糖蛋白质, 鉴定出 186 个糖蛋白质, 并且发现了一些与膀胱癌发展密切相关的糖蛋白质, 如 α 1B 糖蛋白等^[10]. Takeuchi 等^[11]采用糖印迹技术结合 MALDI-TOF/TOF-MS 质谱鉴定技术定性分析了膀胱癌血清和尿液中的 N-连接和 O-连接糖链, 发现有 16 个 N-连接糖链在膀胱癌中特异高表达, 而鉴定的 11 个 O-连接糖链在健康者和癌症患者中没有发现明显差异. 另外杨刚龙等^[12]在前期工作中结合凝集素芯片技术、凝集素印迹技术、凝集素细胞染色技术以及同位素苯胺标记技术分析了人正常膀胱上皮细胞 HCV29、人膀胱非肌层浸润性膀胱癌细胞 KK47 中糖链表达变化, 发现唾液酸化的路易斯酸、末端半乳糖或 N-乙酰半乳糖胺以及高甘露糖在 KK47 中高表达. 以上对膀胱癌糖组的研究进行了初步探索, 但是上述研究多是从糖蛋白质的蛋白水平进行定量研究, 糖链水平的研究主要还是以定性分析为主, 缺少相对乃至绝对定量的分析. 另外我们前期的研究利用细胞株较少, 不能较为真实地反应膀胱癌发生过程中糖链的变化情况.

因此, 本研究将以人正常膀胱上皮细胞 HCV29、HUCV1、人膀胱非肌层浸润性膀胱癌细

胞 KK47 和浸润性膀胱癌细胞 YTS1、J82、T24 等多种细胞为研究对象, 利用同位素苯胺标记技术和质谱定量分析等技术, 定量分析多种不同转移潜能膀胱癌细胞之间糖链结构的变化, 以揭示膀胱癌发病的糖链分子机制, 并为膀胱癌的早期诊断和临床治疗的研究提供新策略.

1 材料与方法

1.1 细胞培养和蛋白质提取

人正常膀胱上皮细胞 HCV29、人膀胱非肌层浸润性膀胱癌细胞 KK47 和浸润性膀胱癌细胞 YTS1 细胞均由美国华盛顿大学 Sen-itiroh Hakomori 教授馈赠. 人正常膀胱上皮细胞 HUCV1、浸润性膀胱癌细胞 J82 和 T24 细胞购自武汉普诺赛(Procell)生命科技有限公司. 细胞培养基为: 含有 10% 胎牛血清(Gibco BRL, USA)和 1%双抗(Gibco BRL)的 RPMI-1640(Gibco BRL)完全培养基. 培养条件为: 37℃, 5% CO₂. 当细胞密度达到 90%时, 离心收集细胞, 用 1×PBS 多次冲洗细胞, 然后加入适量含 1% PMSF 和 0.1%抑肽酶的组织蛋白抽提试剂(Thermo Scientific); 冰上孵育 30 min 后, 4℃ 14 000 g 离心 15 min; 取上清, 然后用 BCA 蛋白质浓度测定试剂盒(Beyotime biotechnology, China)测定蛋白质浓度, -80℃保存备用.

1.2 糖蛋白质糖链唾液酸结构的乙酰肼修饰及 N-连接糖链的释放

将 1 mg 蛋白质溶液加入 10 ku 超滤膜中 14 000 g 离心 15 min 浓缩, 弃去流出液; 加入 300 μ l 8 mol/L 尿素, 14 000 g 离心 15 min, 重复 2 次; 加入 150 μ l 10 mmol/L DTT 溶液混匀, 于 56℃孵育 45 min, 14 000 g 离心 15 min, 弃流出液; 加入 150 μ l 20 mmol/L IAM 溶液混匀, 避光室温反应 20 min, 14 000 g 离心 15 min, 弃流出液; 加入 150 μ l 超纯水混匀, 14 000 g 离心 15 min, 重复 3 次; 清洗完成后向滤膜中加入 100 μ l 1 mol/L 乙酰肼, 20 μ l 1 mol/L 盐酸, 20 μ l 2 mmol/L EDC, 混匀, 120 r/min, 室温反应 4 h, 14 000 g 离心 15 min, 弃流出液, 加入 150 μ l 40 mmol/L NH₄HCO₃ 溶液, 混匀后 14 000 g 离心 15 min, 重复 3 次; 取出超滤管, 转移至洁净的收集管中, 加入用 300 μ l 40 mmol/L NH₄HCO₃ 溶液溶解的 1 μ l PNGase F, 充分吹吸混匀, 置于 37℃恒温培养箱内静置孵育 10~12 h 酶切 N-连接糖链; 酶切完成

后 14 000 *g* 离心 15 min, 收集流出液, 加入 150 μ l 超纯水至超滤膜中, 14 000 *g* 离心 15 min, 重复 1 次, 收集合并流出液即糖链, 离心浓缩仪冷冻干燥。

1.3 N-连接糖链的除盐(Clean up)处理

用亲水凝胶 Sepharose 进行释放的 N- 连接糖链的除盐处理^[13]。取 1.5 ml 的离心管, 加入 100 μ l Sepharose 4B, 加入 1:1 的甲醇: 水(*v/v*) 1 ml, 充分混匀, 9 000 *g* 离心 5 min, 弃上清, 重复 3 次; 加入 5:1:1 的正丁醇: 甲醇: 水(*v/v*) 1 ml, 充分混匀, 9 000 *g* 离心 5 min, 弃上清, 重复 3 次, 获得预处理好的 Sepharose 4B 凝胶。用 500 μ l 的 5:1:1 正丁醇: 甲醇: 水(*v/v*)溶解 N- 连接糖链样品, 样品加入预处理好的 Sepharose 4B 凝胶中, 充分混匀, 于 80 r/min 室温振荡反应 1 h; 反应后 9 000 *g* 离心 5 min, 小心吸取弃去上清, 用 1 ml 的 5:1:1 正丁醇: 甲醇: 水(*v/v*)溶液重复清洗 3 次; 用 500 μ l 的 1:1 甲醇: 水(*v/v*)溶液在 140 r/min 摇床室温振荡 20 min, 洗脱 N- 连接糖链, 反应完成后 9 000 *g* 离心 5 min, 收集上清液, 重复洗脱 1 次, 冷冻干燥。

1.4 $^{13}\text{C}_6$ -和 $^{13}\text{C}_6$ -苯胺的糖链唾液酸末端修饰

获得的 6 种细胞糖蛋白质糖链分别进行苯胺同位素标记^[12]。本研究中, 用 $^{13}\text{C}_6$ - 苯胺标记非浸润性膀胱癌细胞 KK47 的 N- 连接糖链还原端, 其余 5 种细胞均用 $^{12}\text{C}_6$ - 苯胺标记 N- 连接糖链的还原端。即向 KK47 的 N- 连接糖链中加入 10 μ l $^{13}\text{C}_6$ - 苯胺溶液, 25 μ l 1 mol/L NaCNBH₃(溶于 7/3(*v/v*)的 DMSO/ 乙酸溶液), 同时向正常膀胱上皮细胞 HUCV1 和 HCV29, 以及具有浸润性的膀胱癌细胞 YTS1、T24、J82 的 N- 连接糖链中加入 10 μ l 的 $^{12}\text{C}_6$ - 苯胺溶液, 25 μ l 1 mol/L NaCNBH₃; 充分吹吸混匀后 75℃ 反应 30 min; 反应完成后将 $^{13}\text{C}_6$ - 苯胺和 $^{12}\text{C}_6$ - 苯胺标记的样品按照 1:1 的比例混合, 然后在离心浓缩仪上冷冻干燥, 再如 1.3 节步骤进行 N- 连接糖链除盐处理。

1.5 N-连接糖链样品的 MALDI-TOF-质谱解析

用 5 μ l 甲醇: 水(1:1, *v/v*)溶解糖链, 混匀, 2 μ l 上样至 MTP Anchorchip 384 点的靶板上; 待样品干燥结晶后, 再加 2 μ l 含 1 mmol/L NaCl 的 DHB 基质, 干燥结晶; 用 MALDI-TOF/TOF-MS (UltrafleXtreme, Bruker Daltonics)进行检测, 测定参数如下: 分子质量校准, 标准多肽混合物; 分子

质量测定范围, 700~4000; 离子模式, 阳离子。

1.6 N-连接糖链结构注释及数据分析

将糖链质谱数据在 FlexAnalysis 软件中打开, 取信噪比大于 5, 且被至少 3 次鉴定到的质谱峰做后续分析。将所得糖链的 *m/z* 和信号强度结果导出成 txt 格式。结合 Glycoworkbench 软件同时手动分析糖链结构, 分析参数为: 选择 GlycomeDB 数据库, 离子选择[M+Na]⁺, 电荷最多为+1, 前体离子容忍度为 1 u, 碎片离子容忍度为 0.5 u。利用 GraphPads Prism 软件, 对目标糖链进行统计分析, 检验各对照组糖链表达情况在不同糖型中的分布, 推断在膀胱癌细胞恶性演进过程中 N- 连接糖链的变化规律。

2 结果与分析

2.1 不同转移潜能膀胱癌细胞 N-连接糖链糖组图谱分析

细胞蛋白糖基化与肿瘤的发生以及恶性程度演进密切相关, 要了解肿瘤中蛋白质糖基化异常改变的相关机制并确认潜在的 N- 连接糖链肿瘤标志物, 首先要对这些特异性 N- 连接糖链的结构进行鉴定、筛选和解析。在糖链结构解析方法中, 质谱具有高灵敏性和高分辨率等优点, 通过质谱对糖链样品进行检测, 可以获得糖链的分子质量及相对丰度, 进而通过二级质谱获得不同糖链结构的断裂结构, 从而获悉糖链的部分组成、序列信息、分支情况等, 同时结合生物信息获得可能的糖链结构^[14]。我们将来源于 6 株膀胱细胞的 N- 连接糖链的唾液酸结构通过乙酰肼进行修饰保护, 然后用 $^{13}\text{C}_6$ - 苯胺标记 KK47 细胞的糖链还原端, 以 $^{12}\text{C}_6$ - 苯胺标记其他细胞糖链还原端, 通过 MALDI-TOF/TOF-MS 的一级质谱分析获得了不同转移潜能膀胱癌细胞的 N- 连接糖链质谱图(图 1)。对来源于 3 组浸润性的膀胱癌细胞 YTS1、J82、T24 与非肌层浸润性细胞 KK47 的 N- 连接糖链进行对比, 同时也对来源于 2 组正常人健康膀胱上皮细胞 HUCV1、HCV29 与 KK47 的 N- 连接糖链进行对比, 获得如图 1 所示对比不同转移潜能膀胱癌细胞的 N- 连接糖链糖组图谱。选取信噪比大于 5, 至少鉴定到 3 次, 且每次鉴定到的峰同时被 2 种同位素苯胺修饰的 N- 连接糖链, 经同位素修饰的分子质量在质谱图上显示出差距为(6.000 $\pm$ 0.200) u 的成对质谱峰, 作为有效数据进行定量分析。

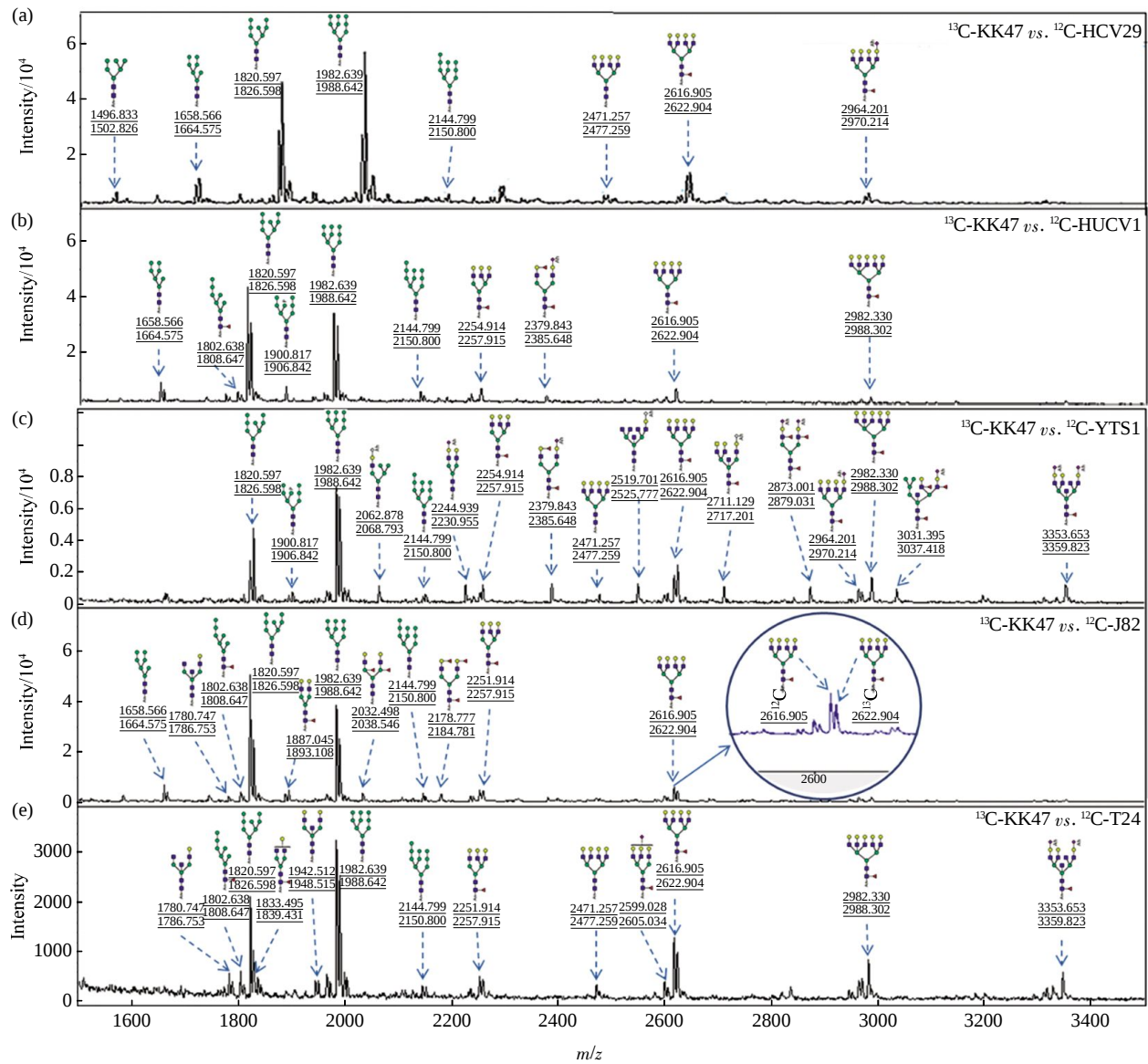


Fig. 1 MALDI-TOF-MS spectra of stable isotope labeled N-glycans from KK47 and HCV29, HUCV1, YTS1, J82 and T24 cells

Partial information for the identified derivatized N-linked glycans of HCV29 *vs.* KK47 (a), HUCV1 *vs.* KK47 (b), YTS1 *vs.* KK47(c), J82 *vs.* KK47(d), and T24 *vs.* KK47(e). The labeled N-glycans are shown as a doublet with a 6 u difference between two cell lines.

2.2 N-连接糖链序列结构的解析

根据质谱检测所获得的谱图以及分析软件 FlexAnalysis 采集数据, 然后按照同位素标记分子质量差选取出对比峰的 m/z 和相对强度. 利用糖链结构分析软件 GlycoWorkbench, 结合糖链的一级和二级图谱结果, 参考 GlycomeDB 糖链数据库, 查找出对应分子质量所可能出现的所有糖链结构, 结合已鉴别的人类细胞中 N- 连接糖链结构特点,

得出各组细胞中糖链的结构. 根据以上筛选原则, 我们从不同膀胱癌细胞中共鉴定出 52 种苯胺同位素标记的 N- 连接糖链, 并获得了其可能的糖链结构. 然后通过质谱检测到的同位素成对质谱峰强度比值(Intensity Ratio)进行相对定量分析, 以确定该糖链在不同转移潜能膀胱癌细胞中的表达水平(表 1). 从结果中我们可以明显看到, 不同糖链结构在不同细胞中表达水平的差异, 如质荷比(m/z)为

3310.948 等 N- 连接糖链在膀胱癌细胞中高表达, 在正常膀胱上皮细胞 HCV29、HUCV1 中则没有检测到.

Table 1 Annotation and quantitative analysis by MALDI-TOF/TOF-MS of N-linked glycan structures in HCV29, HUCV1, KK47, YTS1, J82, and T24 cells

[illegible]

Continued

Experimental spectrum m/z			Glycan structure ¹⁾	Average intensity ratio				
Spe 1	Spe 2	Distance		KK47/ HUCV1	KK47/ HCV29	YTS1/ KK47	J82/ KK47	T24/ KK47
2032.498	2038.546	6.048		0.59239	—	—	0.35327	1.07855
2062.878	2068.793	5.914		—	—	3.02792	—	—
2106.152	2112.140	5.988		—	1.34259	—	0.75909	1.18509
2125.474	2131.498	6.025		0.65879	1.05046	—	0.43283	—
2144.799	2150.800	6.001		0.57053	2.38555	0.86671	0.63474	0.96760
2178.777	2184.781	6.004		0.38622	—	—	—	—
2194.109	2200.107	5.998		—	—	—	—	1.23474
2224.939	2230.955	6.016		—	—	3.54425	—	—
2233.648	2239.658	6.010		2.63599	—	—	1.06230	1.52752
2251.914	2257.915	6.001		5.52974	0.82616	0.44699	1.08668	1.98748
2266.433	2272.520	6.086		—	—	—	—	0.99101
2293.431	2299.291	5.86		—	0.66924	—	—	—
2379.643	2385.648	6.005		0.36052	0.97452	—	—	—
2386.979	2392.992	6.013		—	—	3.46592	—	—
2471.257	2477.259	6.002		1.84471	1.17369	1.02459	1.04630	1.66325
2519.706	2525.777	6.071		3.02640	—	—	—	—

Continued

Experimental spectrum m/z			Glycan structure ¹⁾	Average intensity ratio				
Spe 1	Spe 2	Distance		KK47/ HUCV1	KK47/ HCV29	YTS1/ KK47	J82/ KK47	T24/ KK47
2549.017	2555.095	6.078		—	—	3.71565	—	—
2580.965	2586.975	6.010		1.35267	—	—	1.03214	1.67756
2599.028	2605.034	6.005		2.65444	0.94128	0.87760	0.78495	2.12739
2616.905	2622.904	5.999		6.53986	1.15237	0.67631	0.73059	1.83185
2632.539	2638.530	6.020		—	—	0.97911	—	1.91454
2672.309	2678.249	5.940		—	0.65989	—	—	—
2683.492	2689.535	6.043		—	0.98409	—	0.91940	1.59354
2711.129	2717.201	6.072		—	—	4.15462	—	—
2818.209	2824.245	6.037		—	0.82616	1.59610	—	—
2873.001	2879.031	6.030		—	—	5.01091	—	—
2946.221	2952.235	6.015		1.71386	—	1.07359	0.38150	1.19925
2964.201	2970.214	6.014		2.71043	—	1.16402	0.55699	1.64515
2982.330	2988.302	5.971		—	—	—	3.29718	1.49909
3031.395	3037.418	6.023		—	—	—	—	2.36447

Experimental spectrum <i>m/z</i>				Continued				
			Glycan structure ¹⁾	Average intensity ratio				
Spe 1	Spe 2	Distance		KK47/ HUCV1	KK47/ HCV29	YTS1/ KK47	J82/ KK47	T24/ KK47
3035.134	3041.199	6.065		—	0.94128	0.16319	—	—
3146.946	3152.934	5.988		0.42273	—	—	—	—
3292.995	3298.986	5.991		1.23957	—	—	0.99725	0.61045
3310.948	3316.855	5.907		0.97370	1.95405	1.74017	0.87286	1.46242
3329.376	3335.379	6.003		—	—	0.47023	0.97292	—
3347.222	3353.240	6.017		—	—	—	1.77904	—
3353.653	3359.823	6.170		—	—	4.91082	—	—
3659.270	3665.113	5.843		—	—	—	—	0.71426

¹⁾ Monosaccharides are represented according to MS-tools from EUROCarbDB (■: GlcNAc; ●: Man; ●: Gal; ▲: Fuc; ◆: Neu5Ac; ◇: Neu5Gc; ☆: Xyl.) ²⁾ "—"Means not detected in the cell pools.

2.3 不同糖型的 N-连接糖链在不同转移潜能膀胱癌细胞中的比较分析

我们将鉴定到的 52 种 N- 连接糖链分为高甘露型糖链(high-mannose)、平分型糖链(bisected)、二天线型糖链(biantennary)、多天线型糖链(multi-antennary)和杂合型糖链(hybrid)等 5 类. 由于在多种癌症中糖链结构中唾液酸和岩藻糖的变化具有规律性, 因此我们针对性地列选了唾液酸化糖链(sialylated glycans)和岩藻糖化糖链(fucosylated glycans). 为了准确、直观地分析质谱获得的各种类型的 N- 连接糖链在各细胞中表达水平的变化,

使用 GraphPad Prism 5 对不同类型的 N- 连接糖链分别进行分析. 对高甘露型糖链、平分型糖链、二天线型糖链、多天线型糖链、唾液酸化糖链和岩藻糖化糖链 6 种表达显著的糖型做统计学处理, 以期发现不同糖型的糖链在膀胱癌发生过程中的规律, 从而了解 N- 连接糖链与膀胱癌之间的关系. 从图 2 中可以看出不同类型的 N- 连接糖链在不同膀胱癌细胞中有较明显的变化. 高甘露糖的整体表达水平在膀胱癌细胞中部分上调(图 2a), 而平分型糖链、唾液酸化和盐藻糖化糖链则在各膀胱癌细胞中有比较显著的上调趋势, 且浸润性膀胱癌如 YTS1

比非浸润性膀胱癌细胞 KK47 中的表达量更高(图 2b, e, f). 另外, 双天线型和多天线型糖链在膀胱癌发生前后没有观察到明显变化(图 2c, d). 由此可以明确, 平分型糖链、唾液酸化以及岩藻糖化的糖链与膀胱癌的发生过程密切相关. 由于糖链不是基因最直接的产物, 其合成是在糖基转移酶和糖苷

酶共同催化合成的^[15], 因此推测平分型糖链的表达上调与催化该结构生成的关键酶 N-乙酰氨基葡萄糖转移酶Ⅲ表达上升有关, 岩藻糖化糖链的表达升高则与岩藻糖基转移酶表达水平升高相关, 而唾液酸的表达异常则可能与唾液酸转移酶和唾液酸苷酶的协调作用有关.

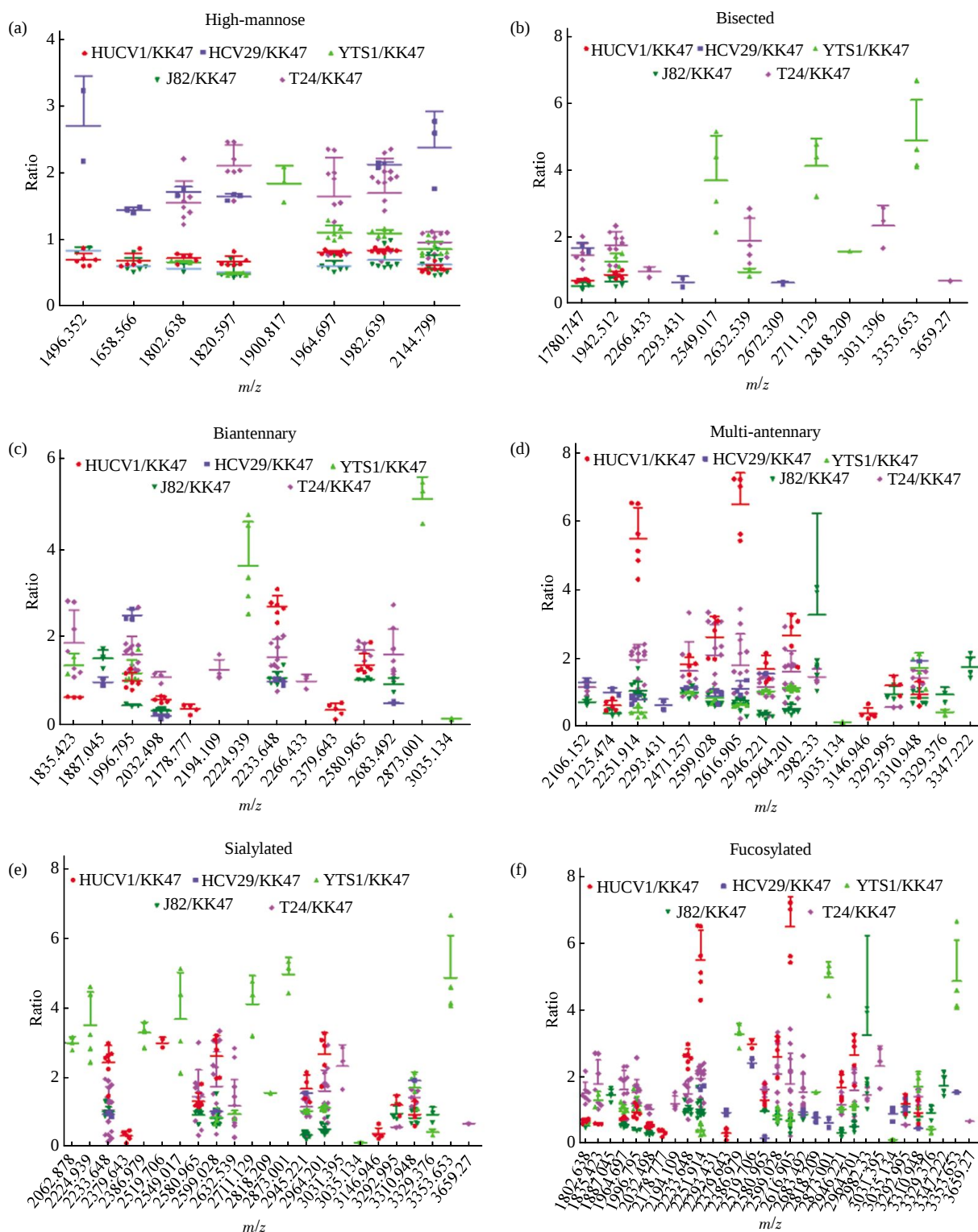


Fig. 2 Quantitative analysis of six glycopattern of the N-glycans in bladder cancer cells

(a) High-mannose. (b) Bisecting. (c) Biantennary. (d) Multi-antennary. (e) Sialylated. (f) Fucosylated.

3 讨 论

糖基化修饰的异常变化是肿瘤发生早期的最主要的生物分子表现, 其变化可以导致肿瘤细胞具有更强的转移性和侵袭性^[16]。另外, 有大量研究表明糖复合物在膀胱癌发生过程中具有重要作用。例如神经节苷脂 GM₃ 可以抑制膀胱癌细胞的增殖, 已经成为潜在的治疗膀胱癌的药物^[17], 钙黏蛋白在膀胱癌发生过程中其 N-连接糖基化修饰发生了改变^[18], 透明质酸可以促进膀胱癌的肿瘤转移而且已经被列为临床膀胱癌的诊断标志物^[19]。这些研究结果已经初步发现了一些糖类物质和膀胱癌之间的关系, 但是对于糖类物质在膀胱癌发生过程中的重要作用还没有系统的研究。而糖组学技术(如芯片技术和质谱技术等)可以用于深入广泛地研究糖类物质在膀胱癌发生过程中的作用。

本研究通过前期建立的同位素苯胺标记 N-连接糖链的质谱定量技术, 对 2 个正常膀胱组织细胞 HUCV1、HCV29, 1 个非浸润性的膀胱癌细胞 KK47, 以及 3 个具有浸润性的膀胱癌细胞 YTS1、J82、T24 的 N-连接糖链进行定量分析, 获得了膀胱细胞的 N-连接糖链的谱图, 共鉴定和注释了 52 种 N-连接糖链及其最可能的糖链结构。通过对糖链在不同对照组中的定量分析对比, 确定了 N-连接糖链在不同浸润性膀胱癌细胞中的表达差异, 为进一步探索有效的膀胱癌分子标志物开拓了新的思路。对获得的糖链结构进行糖型分析后发现, 高甘露糖型、唾液酸化和岩藻糖化 N-连接糖链膀胱癌细胞中高表达, 并推测与唾液酸化糖链合成相关的唾液酸糖基转移酶以及与岩藻糖化合成相关的岩藻糖基转移酶中高表达, 为研究相关糖基转移酶表达的变化提供了信息基础。然而, 在这些发生普遍上调的代表性糖型中也存在个别糖链的变化表现出不一致的现象, 其原因可能是糖链的表达变化不仅仅依赖单独的一两种酶催化合成, 在膀胱癌肿瘤恶化中, 与唾液酸化糖链合成相关的唾液酸转移酶以及与岩藻糖化糖链合成相关的岩藻糖苷酶在表现出活性增强的时候, 个别糖链也可能因自身糖基修饰位点、其他酶反应的抑制等因素而使唾液酸转移酶、岩藻糖苷酶的过表达受限。我们推测通过阐明这些抑制复杂型糖过表达的分子机理有可能为防止膀胱癌肿瘤恶化提供一定的指导意义。

总之, 该研究成果为进一步对膀胱癌相关的糖组学研究提供了一个细胞水平的定量分析参考。我

们认为, 为进一步揭示膀胱癌肿瘤恶性演进与其糖组的关系, 可以从大量的临床样本, 如组织、血清、尿液等水平上, 进行对比分析, 筛选出最可能的分子标志物。另外, 可以根据特异性改变的糖链结构, 选择相关的糖基转移酶对应基因, 利用基因编辑技术或 RNA 干扰等技术进行基因转换或沉默, 以增强或减弱对应糖链的表达, 进一步探讨 N-连接糖链结构与膀胱癌发生之间的分子机制。

参 考 文 献

- [1] Goodison S, Rosser C J, Urquidí V. Bladder cancer detection and monitoring: assessment of urine- and blood-based marker tests. *Molecular Diagnosis & Therapy*, 2013, **17**(02): 71-84
- [2] Cheng L, Davison D D, Adams J, *et al.* Biomarkers in bladder cancer: translational and clinical implications. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2014, **89**(01): 73-111
- [3] Zielinska D F, Gnäd F, Wiśniewski J R, *et al.* Precision mapping of an *in vivo* N-glycoproteome reveals rigid topological and sequence constraints. *Cell*, 2010, **141**(05): 897-907
- [4] Hart G W, Copeland R J. Glycomics hits the big time. *Cell*, 2010, **143**(05): 672-676
- [5] Lau K S, Partridge E A, Grigorian A, *et al.* Complex N-glycan number and degree of branching cooperate to regulate cell proliferation and differentiation. *Cell*, 2007, **129**(01): 123-134
- [6] Zeng X, Hood B L, Sun M, *et al.* Lung cancer serum biomarker discovery using glycoprotein capture and liquid chromatography mass spectrometry. *Journal of Proteome Research*, 2010, **9** (12): 6440-6449
- [7] Zeng Z, Hincapie M, Haab B B, *et al.* The development of an integrated platform to identify breast cancer glycoproteome changes in human serum. *Journal of Chromatography A*, 2010, **1217** (19): 3307-3315
- [8] Tian Y, Bova G S, Zhang H. Quantitative glycoproteomic analysis of optimal cutting temperature-embedded frozen tissues identifying glycoproteins associated with aggressive prostate cancer. *Analytical Chemistry*, 2011, **83**(18): 7013-7019
- [9] Yang G, Cui T, Wang Y, *et al.* Selective isolation and analysis of glycoprotein fractions and their glycomes from hepatocellular carcinoma sera. *Proteomics*, 2013, **13**(09): 1481-1498
- [10] Kreunin P, Zhao J, Rosser C, *et al.* Bladder cancer associated glycoprotein signatures revealed by urinary proteomic profiling. *Journal of Proteome Research*, 2007, **6**(07): 2631-2639
- [11] Takeuchi M, Amano M, Kitamura H, *et al.* N- and O-glycome analysis of serum and urine from bladder cancer patients using a high-throughput glycoblotting method. *Journal of Glycomics & Lipidomics*, 2013, **03**(01): 100108
- [12] Yang G, Tan Z, Lu W, *et al.* Quantitative glycome analysis of N-glycan patterns in bladder cancer vs normal bladder cells using an integrated strategy. *Journal of Proteome Research*, 2015, **14**(02): 639-653
- [13] 杨刚龙, 马恬然, 李 静. 基于超滤膜辅助的糖蛋白全 N-连接糖

- 链的富集和质谱分析. 生物化学与生物物理进展, 2014, **41**(4): 403-408
- Yang G L, Ma T R, Li Z. Prog Biochem Biophys, 2014, **41**(4): 403-408
- [14] Raman R, Raguram S, Venkataraman G, *et al.* Glycomics: an integrated systems approach to structure-function relationships of glycans. Nature Methods, 2005, **2**(11): 817-824
- [15] Prescher J A, Bertozzi C R. Chemical technologies for probing glycans. Cell, 2006, **126**(5): 851-854
- [16] Hakomori S. Glycosylation defining cancer malignancy: new wine in an old bottle. Proc Natl Acad Sci USA. 2002, **99**(16): 10231-10233
- [17] Wang H, Isaji T, Satoh M, *et al.* Antitumor effects of exogenous ganglioside GM3 on bladder cancer in an orthotopic cancer model. Urology, 2013, **81**(01): 210 e11-5
- [18] Przybyło M, Hoja-Lukowicz D, Lityńska A, *et al.* Different glycosylation of cadherins from human bladder non-malignant and cancer cell lines. Cancer Cell International, 2002, **02**(06): 1-5
- [19] Toole B P, Zoltan-Jones A, Misra S, *et al.* Hyaluronan: a critical component of epithelial-mesenchymal and epithelial-carcinoma transitions. Cells Tissues Organs, 2005, **179**(01-02): 66-72

Quantitative Analysis of N-Glycome of Different Bladder Cancer Cells*

YANG Gang-Long, ZHANG Jia-Xu, LIU Chang-Mei, GUAN Feng**

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

Abstract The bladder cancer, which is a kind of a malignant tumor in the bladder mucosa, is the most common malignancy tumor in the urinary system. Diagnosis at an early (nonmuscle-invasive) stage is the best way to reduce the mortality rate. Tumor malignancy is closely associated with alterations of glycan expression, but glycosylation status in bladder cancer has not been well studied. Four bladder cancer cell lines (KK47, YTS1, J82, T24) and two normal bladder mucosa cell line (HCV29, HUCV1) were used in our study. We developed a kind of labeling method to derivatize the sialic acid and derivatized the reducing terminal using [$^{12}\text{C}_6$]- or [$^{13}\text{C}_6$]-aniline, and the derivatized glycans were quantitatively analyzed by Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF/TOF MS). Finally, 52 N-glycans of the bladder cancer were identified. And the sialic acid as well as the fucosylated in the bladder cancer were found significantly over-expressed. At the same time, the bisecting and high-mannose glycan were also high-expressed in the bladder cancer cells. This study provides some referential significance for the future study on the glycomics of bladder cancer.

Key words bladder cancer, N-glycan, quantitative glycomics, stable isotope labelling, MALDI -TOF/TOF-MS

DOI: 10.16476/j.pibb.2015.0228

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation for Young Scientists of China (81402115) and The National Science Foundation of Jiangsu Province, China (BK20140172).

**Corresponding author.

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

Received: July 24, 2015 Accepted: September 25, 2015