

岩藻糖糖链与肝癌细胞的迁移作用*

吴兴中** 陈迎风

(复旦大学医学院生物化学与分子生物学系, 上海 200032)

摘要 通过凝集素印迹转移电泳和亲和层析技术, 对岩藻糖糖基化蛋白在肝癌细胞中的作用进行了研究. 在化学诱发的大鼠肝癌过程中, 分子质量在 23 ku 到 40 ku 范围内与荆豆凝集素 (UEA) 及扁豆凝集素 (LCA) 结合的岩藻糖糖基化蛋白显著减少, 诱癌至 17~20 周这些条带重新恢复, 而分子质量为 80 ku 的条带却在诱癌过程中逐周增加. 比较高、低转移性肝癌细胞的岩藻糖糖基化蛋白, 发现高转移性肝癌细胞具有多种增强的条带. 利用橘果粉胞凝集素 (AAL) 和 LCA 亲和层析柱分离了这些岩藻糖糖基化糖蛋白, 并用这些糖蛋白直接作用于肝癌细胞, 发现 AAL-糖蛋白具有显著抑制肝癌细胞迁移的作用, 迁移细胞数从对照的 $(100 \pm 4.9)\%$ 下降到 $(48.1 \pm 2.5)\%$ ($P < 0.01$), LCA-糖蛋白也有类似作用. 用胰酶和木瓜蛋白酶水解蛋白质部分后, 形成的糖肽抑制肝癌细胞迁移的作用并不改变, 甚至增强. 此外直接用肝癌转移灶的组织测定了岩藻糖转移酶活性, 发现 $\alpha 1, 6$ 岩藻糖基转移酶活性显著比正常肝组织高, 而 $\alpha 1, 3$ 岩藻糖基转移酶活性没有显著的改变. 用系列凝集素分析发现这些糖链主要能结合伴刀豆凝集素 A, 也能结合 E-型及 L-型植物凝集素, 显示这种糖蛋白的糖链可能含有较多的高甘露糖型. 这些结果提示糖链在诱癌过程中结构有了改变, 使之在肝癌细胞的迁移和转移中起重要作用.

关键词 岩藻糖链, 肝癌细胞迁移, 岩藻糖基转移酶

学科分类号 Q53

岩藻糖广泛参与各种糖链的构成, 和唾液酸类似, 一般认为是糖链合成的终末残基, 接上岩藻糖基后, 该糖链就不再继续合成. 而且岩藻糖基可参与构成某些重要粘附分子的糖链结构, 在肿瘤的转移机制上起重要作用^[1,2]. 在临床肝癌病人中, 岩藻糖糖苷酶的活性异常, 这显然与肝癌细胞中含有岩藻糖的糖链结构改变有关. 岩藻糖糖链结构改变也可能与肝癌细胞的某些恶性行为有关, 如岩藻糖糖基还直接参加一些重要结构成分, 如 Lewis 抗原决定簇 (如 Le^a、Le^x、sLe^a 和 sLe^x) 的构成^[1], 影响肝癌细胞迁移和转移倾向^[2]. 本文主要研究岩藻糖糖链与肝癌细胞迁移作用的关系.

1 材料与方法

1.1 材料

Sepharose 4B 为 Pharmacia 公司产品, 荆豆凝集素 (UEA)、粉胞果凝集素 (AAL)、扁豆凝集素 (LCA) 以及生物素标记的各种凝集素均购自 Vector 公司. 氰基硼氢化钠、视黄酸 (RA)、二乙基亚硝胺 (DEN)、 α -L-岩藻糖、小牛血清白蛋白 (BSA)、丙烯酰胺、对硝基磷酸苯 (PNPP)、二巯苏糖醇 (DTT)、胰酶、木瓜蛋白酶等购自 Sigma 公司. 维甲酰胺为本课题组自行合成. Transwell 转移培养皿和 96 孔培养板购自 Corning-Costar 公

司. 生物素标记的荆豆凝集素 (biotin-UEA) 和生物素标记的扁豆凝集素 (biotin-LCA) 以及亲和素标记的碱性磷酸酶 (avidin-AP) 均购于 Vector 公司. 5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸 (BCIP), 硝基四氮唑蓝 (NBT) 为 Amersco 公司产品.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: SMMC-7721 细胞株为人肝癌细胞, 引自中国科学院生物化学与细胞生物研究所, RPMI 1640、DMEM 培养基为 GIBCO 公司产品, 含 8% 小牛血清. 诱导实验: 试验组加 3×10^{-6} mol/L 维甲酰胺, 对照组加等量无水乙醇. 单个细胞克隆培养: SMMC-7721 细胞培养后, 用 1640 培养基稀释成 0.5×10^4 个/ml, 取 4 ml 该细胞, 加入 1 ml 3% 琼脂 (煮沸灭菌 3~5 min, 冷却至 40℃) 混匀后倒入 6 孔培养皿 (直径 35 mm, 琼脂终浓度 0.6%). 数日后挑选 16 个生长旺盛细胞密集的集落分别于液体培养基中生长. 筛选迁移能力较强的集落.

* 国家自然科学基金资助项目 (30070183) 和上海市教委重点学科基金资助项目 (B9808010).

** 通讯联系人.

Tel: 021-54237697, E-mail: xz_wu@shmu.edu.cn

收稿日期: 2002-04-24, 接受日期: 2002-05-28

1.2.2 DEN 诱发大鼠肝癌: 雌性 Wistar 大鼠每周喂以 70 mg/kg 的 DEN^[3], 隔周杀鼠制备肝组织标本, 挑选病变组织制备膜组分标本。

1.2.3 细胞膜组分的提取: 收集培养的肝癌细胞或肝癌组织。经洗涤后, 加入 1 ml pH 7.2 0.1 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液 (含 0.32 mol/L 蔗糖、1 mmol/L 的 DTT、PMSF 和 EGTA), 制备匀浆。先以 800 g 离心 15 min, 去除沉淀部分, 上清以 100 000 g 离心 1 h, 沉淀溶于 0.1 ml pH 7.2 0.1 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液 (含 2 mmol/L DTT、1 mmol/L PMSF 和 EGTA) 中。

1.2.4 凝集素印迹转移: 提取的细胞膜组分标本首先进行蛋白质定量。然后准确取等蛋白质含量 (100 μ g/槽) 的标本上样于 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE), 电泳后转移于硝酸纤维素薄膜, 经含有 3% BSA 的 TBST (含 10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 150 mmol/L NaCl, 0.05% Tween-20) 室温下浸泡 2 h。然后加入生物素标记的凝集素 (UEA 或 LCA), 使 10 ml TBST 中含 100 μ g 标记的凝集素, 室温下震荡 2 h。膜片以 10 倍体积的 TBST 洗涤 3 次, 再加入亲和素标记的碱性磷酸酶 (1:100 稀释), 室温下震荡 1 h, TBST 洗涤 3 次, 最后加入碱性磷酸酶缓冲液及其底物 (BCIP 和 NBT) 显色。

1.2.5 肝癌细胞表面岩藻糖链测定: 肝癌细胞培养于 96 孔板中, 每孔中培养细胞数目为 3×10^4 , 1640 培养基中含有 8% 的小牛血清。培养后弃上清液, 用磷酸缓冲液 (PBS) 洗涤 2 次后, 加入生物素标记的 UEA 或 LCA, 室温下作用 1 h。用 PBS 洗涤后, 加入亲和素标记的碱性磷酸酶, 作用 1 h 后洗涤, 最后加入对硝基磷酸苯, 显色后, 450 nm 波长测定吸光度。

1.2.6 含岩藻糖糖蛋白的提取: 利用氰基硼氢化钠还原法制备亲和层析柱。Sephrose 4B 经 NaOH 和环氧氯丙烷 40 $^{\circ}$ C 下作用 2 h 抽干后, 依次与浓氨水和戊二醛作用。然后加入氰基硼氢化钠, 继续作用 2 h, 再将胶转入含有 LCA 凝集素的碳酸缓冲液 (pH 9.0), 4 $^{\circ}$ C 下作用 2 h 后抽干, 依次与浓氨水和戊二醛作用。然后加入氰基硼氢化钠继续作用 2 h, 再将胶转入 LCA 凝集素的碳酸缓冲液 (pH 9.0), 4 $^{\circ}$ C 过夜后加入 0.2 mol/L 甘氨酸。AAL-Sepharose 4B 亲和柱为日本东京大学馈赠。亲和柱经平衡后, 上样标本为细胞膜组分可溶解蛋白质, 经循环 2 次后, 用 0.15 mol/L NaCl, 10 mmol/L Tris-HCl

pH 7.2 的缓冲液洗脱至 $A_{280} < 0.001$, 再用含 1 mmol/L α -L-岩藻糖洗脱, 收集吸附峰, 标本冷冻干燥, 透析脱盐后 -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.7 糖链分析: 上述分离的岩藻糖蛋白经蛋白质定量, 并经神经氨酸酶作用。每孔加 1.5 μ g 岩藻糖蛋白 (溶于 100 μ l 碳酸缓冲液), 包被于 96 孔板, 4 $^{\circ}$ C 过夜, PBS 洗板 2 次。用含 2.5 % BSA 的 PBS 封闭 2 h。洗板后加入生物素标记的凝集素如 Con A, PHA-E, PHA-L 等, 室温下 2 h。洗板后加亲和素-碱性磷酸酶作用 1 h, 用底物 PNPP 显色, 于酶标仪 450 nm 波长读数。

1.2.8 肝癌细胞迁移试验: 肝癌细胞悬液稀释成 2×10^4 /ml, 培养于 Transwell 转移培养皿中, 每个培养皿含 2×10^3 个细胞。Transwell 转移培养皿上室为含有 0.15% BSA 的 DMEM 培养基, 下室为含有 0.5 % 胎牛血清的 DMEM。测定组的上室加入亲和层析柱 (AAL-Sepharose 4B, LCA-Sepharose 4B) 提取的糖蛋白, 配制成浓度为 20 mg/L 的贮存液。然后分别用培养基稀释成 2 mg/L、1.0 mg/L、0.5 mg/L、0.25 mg/L 和 0.125 mg/L 工作液, 直接加于转移培养皿上室, 与 2×10^3 的 7721-k3 肝癌细胞在 37 $^{\circ}$ C 共同培养 6 h, 获取最适稀释度。对照组不加糖蛋白, 阴性对照组下室为 0.5% BSA。放置 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 孵箱 6 h, 取出 Transwell 转移培养皿上室, 弃培养基, 并用棉签轻轻擦去微孔膜上面的细胞, 然后经固定后, 结晶紫染色, 镜下计数网膜下面的细胞数。

1.2.9 岩藻糖糖链对肝癌细胞迁移的抑制作用: 分离的岩藻糖蛋白稀释成浓度为 0.02 g/L 的贮存液, 用胰酶和木瓜蛋白酶消化提取的岩藻糖蛋白后, 100 $^{\circ}$ C 15 min, 然后分别用培养基稀释成与上述 (1.2.8) 相同的浓度, 直接加于转移培养皿上室, 再与 2×10^3 的 7721-k3 肝癌细胞 37 $^{\circ}$ C 共同培养 6 h, 以膜下面细胞的数量多少表示迁移能力变化。

1.2.10 岩藻糖基转移酶测定: 先建立动物转移模型。于裸鼠脾脏组织内注射 5×10^6 个肝癌细胞, 70 天以后杀裸鼠取肝脏和淋巴结转移灶组织, 提取细胞匀浆作为酶标本。 α 1, 6 岩藻糖基转移酶 (1, 6FT) 活性根据文献 [4] 测定, 底物由日本大阪大学赠送。 α 1, 3 岩藻糖基转移酶 (1, 3FT) 活性测定使用 Gal β 1, 4GlcNAc β 1, 3Gal β 1, 4Glc 作为底物, 底物荧光采用 Takara 标记试剂盒, 用高效液相色谱仪 (岛津 SPD-6AV) 测定产物峰。

2 结 果

2.1 肝癌诱发过程中含岩藻糖糖蛋白的改变

我们对 DEN 诱发的肝癌组织细胞膜提取物进行凝集素印迹转移试验, 对转移至硝酸纤维膜上的糖蛋白分别用 UEA 和 LCA 进行检测. 与诱癌零周 (对照组) 的肝组织比较, 在 UEA-印迹转移的结果中, 诱癌后的肝癌组织糖蛋白中分子质量为 23 ku、25 ku、27 ku、32.2 ku 和 40 ku 的条带均明显减少, 分子质量为 27.5 ku 的蛋白质条带在诱癌后甚至消失, 但 80 ku 的条带却在诱癌后逐周增强, 至 17~20 周最强 (图 1). 在 LCA-印迹转移的结果中, 分子质量在 11 ku、12 ku、18 ku、28 ku、35 ku 和 37 ku 的蛋白质条带 LCA 结合量在诱癌后可见减少, 尤其在诱癌 1~9 周减少较为明显, 在 15~17 周时回升, 在分子质量 80 ku 条带处, 也可见 LCA 结合量逐周升高, 至 15~17 周条带最深, 升高达 2.34 倍.

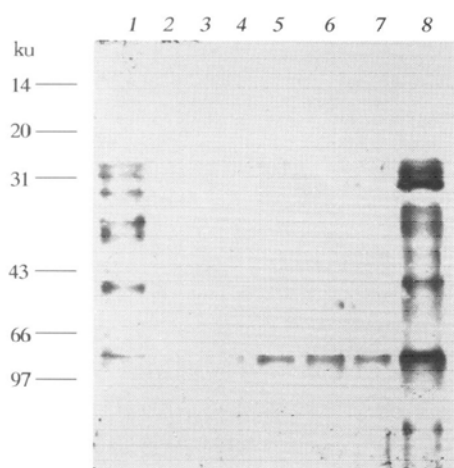


Fig. 1 *Ulex europaeus* agglutinin Western blot analysis of the membrane glycoproteins from rat hepatocarcinoma cells induced by *N*-nitrosodiethylamine from week 0 to week 17

1: week 0; 2: week 1; 3: week 3; 4: week 5; 5: week 7; 6: week 9; 7: week 11; 8: week 17.

2.2 高低不同转移能力的肿瘤细胞中岩藻糖蛋白的表达

我们分别对高转移性肝癌细胞 (高转移肝癌病人标本), 和两例低转移性肝癌细胞及其癌旁组织的膜糖蛋白进行比较分析. 在 UEA-blot 结果中发现高转移性肝癌出现较多的条带, 包括分子质量为 18 ku、21 ku、23 ku、25 ku、26 ku、31.5 ku、37 ku、41.5 ku、50 ku、58 ku、75 ku 和 110 ku

等岩藻糖蛋白条带, 而两例低转移性肝癌及其癌旁组织条带很少, 癌旁组织仅见 94 ku 的条带, 肝癌组织只有微弱的 110 ku 条带. LCA-blot 结果却不一样, 高转移性肝癌与低转移性肝癌都有很多的蛋白质条带, 进行比较后, 发现高转移性肝癌出现了低转移性没有的条带, 如 14.5 ku、19.5 ku、25.5 ku, 有些条带则明显加深, 如 46 ku、57 ku、68 ku、85 ku 等, 与癌旁组织相比较, 肝癌细胞出现 17 ku、26 ku、80 ku 的条带, 而癌旁组织缺如.

2.3 单个细胞克隆培养

SMMC-7721 细胞培养后, 用 1640 培养基稀释成 0.2×10^4 个/ml, 在含有终浓度为 0.6% 琼脂的 6 孔培养皿中培养. 数日后挑选 16 个生长旺盛细胞密集的集落分别于液体培养基中生长. 结果获得一个迁移能力较强的单克隆集落细胞, 称为 7721-k3 细胞, 以下实验均用该单克隆细胞进行.

2.4 抑制肝癌细胞转移时岩藻糖链的改变

我们教研室前期实验已观察到维甲酸可以诱导肝癌细胞中 nm23-H 基因的表达, 抑制肝癌细胞的转移行为^[5]. 它的衍生物维甲酰胺对肝癌细胞的迁移能力和侵袭能力具有更强的抑制作用. 在抑制肝癌细胞迁移能力和侵袭能力的同时, 这些肝癌细胞表面的岩藻糖糖链显著减少, 与对照相比, 不管是 UEA 还是 LCA 的结合量均显著下降. 最早在作用 6 h 后, UEA 和 LCA 结合量就显著下降, 并随着作用时间的延长, 抑制加深, UEA 和结合量更少 (表 1).

Table 1 Expression inhibition of fucosylated sugar chains on liver cancer cells (7721-k3) by retinamide

	UEA binding (A_{450})	LCA binding (A_{450})
control	0.117 $\pm$ 0.012	0.136 $\pm$ 0.010
6 h	0.106 $\pm$ 0.006 ¹⁾	0.119 $\pm$ 0.007 ¹⁾
18 h	0.093 $\pm$ 0.008 ¹⁾	0.109 $\pm$ 0.005 ¹⁾
24 h	0.092 $\pm$ 0.004 ¹⁾	0.0995 $\pm$ 0.006 ¹⁾
36 h	0.066 $\pm$ 0.004 ¹⁾	0.077 $\pm$ 0.006 ¹⁾

¹⁾ $P < 0.01$, $n = 12$.

2.5 岩藻糖糖肽对肝癌细胞迁移能力的影响

利用 LCA 和 AAL 凝集素亲和层析柱, 我们提取 7721 肝癌细胞膜蛋白可溶部分. α -L-岩藻糖洗脱的样品经冷冻干燥和脱盐, 蛋白质定量后调整至 20 mg/L, 作为贮存液, 分别以 2~0.125 mg/L 的

工作液加入 Transwell 转移培养皿上室, 与肝癌细胞培养 6 h, 计数微孔膜下面的细胞 (表 2). 提取的岩藻糖糖蛋白对 7721-k3 细胞的迁移能力具有显著的抑制, 并随着作用浓度的减小, 膜下的细胞数逐渐增多 (表 3). AAL 亲和柱和 LCA 亲和柱提取的样品都有抑制作用, 但经 AAL 亲和层析柱提取的含岩藻糖糖蛋白具有更强的迁移抑制能力. 为了分析这种迁移抑制作用究竟是由于糖链部分起作用, 还是蛋白质部分起作用, 我们对上述样品分别用胰酶和木瓜蛋白酶进行水解 72 h, 再 100 °C 15 min 处理, 发现 AAL-糖肽仍然具有很强的抑制迁移作用, 而且与经蛋白酶处理前相似, LCA 糖肽比 AAL 糖肽的抑制作用较弱, 但比水解前加强

(表 2 和表 3).

Table 2 Suppression of liver cancer cell migration by the fucosylated glycoproteins isolated by AAL and LCA lectin affinity column and the glycopeptide thereof

	Inhibition/ %		
	Control	Isolated by AAL	Isolated by LCA
glycoprotein (0.5 mg·L ⁻¹)	100 ± 4.9	48.1 ± 2.5 ¹⁾	70.3 ± 3.5
glycopeptide	100 ± 4.9	49.4 ± 5.8 ¹⁾	55.0 ± 3.4 ¹⁾

The cells were cultured for 6 h. Glycopeptide refers to the glycoconjugates in which the AAL-glycoprotein and LCA-glycoprotein were digested by tryptan and pepsin respectively. ¹⁾ $P < 0.01$, $n = 5$.

Table 3 Dose dependent suppression of liver cancer cell migration by fucosylated glycoproteins and the glycopeptide

ρ /mg·L ⁻¹	Inhibition by glycoproteins/ %		ρ /mg·L ⁻¹ ¹⁾	Inhibition by glycopeptide/ %	
	Isolated by AAL	Isolated by LCA		Isolated by AAL	Isolated by LCA
0 (control)	100	100	0 (control)	100	100
0.125	56.0	89.0	0.125	75.7	70.9
0.25	47.6	84.5	0.25	57.1	58.1
0.5	32.1	56.3	0.5	38.6	63.6
1.0	21.4	51.5	1.0	4.3	27.3
2.0	3.6	22.5	2.0	0	2.0

Glycopeptide refers to the glycoconjugates in which the AAL-glycoprotein and LCA-glycoprotein were digested by tryptan and pepsin. ¹⁾ The mass concentration (ρ) of glycopeptide is corresponding to that of glycoprotein. $n = 2$.

2.6 岩藻糖糖基转移酶活性的改变

建立肝癌细胞的动物转移模型, 肝癌细胞经脾脏组织注射以后, 12 只裸鼠中 4 只有肝脏的转移, 5 只裸鼠有腹腔淋巴结的转移. 采取这些裸鼠转移灶癌组织, 直接进行了岩藻糖基转移酶活力的测定

(表 4), 转移灶的肝癌组织主要是 $\alpha 1, 6$ FT 酶活性升高较明显, $\alpha 1, 3$ FT 活性与正常肝组织无显著性差别, 但是这些组织标本均比肝癌细胞株细胞的酶活性低得多.

Table 4 Fucosyltransferase activities in normal liver tissues and metastasis tissues

	pmol/ mg·h			
	Normal liver tissues	Metastasis liver mass	Metastasis lymph nodes	Hep3B cells
$\alpha 1, 6$ FT	6.35 ± 1.69	13.82 ± 3.64 ¹⁾	26.07 ± 10.03	177.40 ± 5.04
$\alpha 1, 3$ FT	11.68 ± 0.93	9.62 ± 4.81 ²⁾	8.74 ± 0.58	47.17 ± 4.12

Compared with normal liver tissues, ¹⁾ $P = 0.0222$, ²⁾ $P = 0.2175$. $n = 4$.

2.7 岩藻糖糖链结构分析

为了解对肝癌细胞迁移有抑制作用的岩藻糖糖链的结构特点, 把经过亲和层析柱获得的岩藻糖基化糖蛋白包被于 96 孔板上, 洗涤后分别与生物素

标记的 Con A, L-PHA, E-PHA, UEA 与 LCA 相结合, 然后与亲和素标记的碱性磷酸酶结合而显色. 如表 5 所示, 各种样品结合 Con A 比较高, 其次为 LCA 结合率较高, 说明多数的糖链可能都含有高

甘露糖和核心岩藻糖。用 LCA 亲和柱分离的糖蛋白具有更高的 L-PHA 结合率, 在低转移性肝癌细胞, 这种含岩藻糖糖链的糖蛋白与 L-PHA 和 E-PHA 的结合量较高, UEA 的结合量也有较显著

的改变。AAL 柱吸附的糖链在高转移性肝癌 UEA 结合量较高, 而 LCA 柱吸附的 UEA 结合量则较低 (表 5)。

Table 5 Lectin binding analysis of the fucosylated sugar chains in the isolated glycoproteins

	Con A	L-PHA	E-PHA	UEA	LCA
From cells with high metastasis					
AAL-glycoprotein	0.232 ± 0.021	0.138 ± 0.014 ¹⁾	0.154 ± 0.009	0.143 ± 0.015 ¹⁾	0.214 ± 0.010
LCA-glycoprotein	0.240 ± 0.016	0.151 ± 0.008 ¹⁾	0.145 ± 0.009 ¹⁾	0.130 ± 0.005 ¹⁾	0.214 ± 0.012
From cells with low metastasis					
AAL-glycoprotein	0.238 ± 0.017	0.151 ± 0.008 ¹⁾	0.160 ± 0.018	0.120 ± 0.005 ¹⁾	0.214 ± 0.012
LCA-glycoprotein	0.260 ± 0.020	0.181 ± 0.024 ¹⁾	0.211 ± 0.012 ¹⁾	0.177 ± 0.036 ¹⁾	0.227 ± 0.014

The values in the table are A₄₅₀ values which represent the affinity to lectins. ¹⁾ P < 0.05. The comparison was made between hepatoma cells with high and low metastasis potentiality. n = 6.

3 讨 论

岩藻糖残基可参与多种类型的糖链结构, 一般为糖链合成的终末结构, 一旦转移岩藻糖基以后, 糖链一般不再继续合成。肝癌病人的岩藻糖苷酶活性很高, 同时岩藻糖糖基转移酶也有不同的改变, 这些酶的共同作用可以改变肝癌细胞表面的糖链结构, 以适应肿瘤细胞的功能需要。我们利用亚硝胺诱发的大鼠肝癌模型, 分别观察从诱癌零周至诱癌 20 周的肝组织细胞膜糖蛋白中, 含岩藻糖的糖蛋白的表达情况。结果表明分子质量在 23~40 ku 范围内的岩藻糖糖蛋白在诱癌后 3 周开始即明显减少, 但是分子质量 80 ku 的糖蛋白却在诱癌后逐周增加。无论是在 UEA 还是在 LCA 结合的糖蛋白都有相同的情况。由于 LCA 则主要与 N 型糖链核心岩藻糖基结合, UEA 可与其他 L-岩藻糖基结合或 O 型糖链岩藻糖基, 所以 80 ku 的糖蛋白糖链可能含有核心岩藻糖结构, 既有 N 型糖链又有 O 型糖链, 有可能是大鼠的甲胎蛋白 (AFP)^[6]。比较高低转移性肝癌细胞, 发现高转移性肝癌细胞有较多的 UEA 和 LCA 结合蛋白的表达, 而低转移性肝癌以及癌周组织较少, 说明高转移性肝癌细胞表面糖链具有增多的岩藻糖基结构特征, 推测这种结构可能与肝癌细胞的转移行为有关。为证实这种推测, 我们应用维甲酸抑制肝癌的迁移能力之后, 观察细胞表面 UEA 和 LCA 的结合率, 结果作用 6 h 以后就明显下降。外侧链中的岩藻糖一般是

以 α 1, 3/4 键接于半乳糖或 N-乙酰氨基葡萄糖基上, 主要由 α 1, 3/4 岩藻糖基转移酶的催化生成。这些糖基可参与一些重要的寡糖链结构如 Lewis 血型抗原 (Lewis 抗原能识别选择蛋白质及相结合的配体, 并介导白细胞、内皮细胞、血小板之间的黏附^[7,8], 在肿瘤细胞与内皮细胞的黏附过程中起重要作用^[8~10])。本实验直接测定转移灶肝癌组织的 1, 3FT 活性, 并没有发现明显的改变, 可能我们采用的方法仅能反映 α 1, 3FT III、IV、V 和 VI, 不清楚 α 1, 3FT VII、IX 及 α 1, 4FT 酶活性的改变。同时, 转移灶的肝癌组织 α 1, 6FT 酶活性明显比没有转移的肝组织高, α 1, 6FT 主要催化生成核心岩藻糖 (α 1, 6 键), 这提示肝脏转移可能需要有核心岩藻糖以促使癌细胞的黏附。核心岩藻糖主要与 LCA 结合, 这种结构可见于多种糖蛋白如 α ATP、整联蛋白等。文献 [6] 提示 α 1, 6FT 可以使 AFP 糖基化, 但过高表达反会使整合蛋白等过度糖基化, 而妨碍肝癌细胞在脾内注射后向肝脏转移^[11]。为进一步了解岩藻糖糖链在肝癌转移中的作用, 我们用 AAL 亲和层析柱分离糖蛋白, 并用蛋白酶处理成糖肽结构, 发现对肝癌细胞的迁移实验中具有浓度依赖性的抑制作用, 这种抑制可能是通过竞争性抑制作用, 因为外源性高浓度岩藻糖链干扰了细胞膜上的相应糖基, 结果使迁移能力受抑制。根据 Con A, E-PHA, 和 L-PHA 的结合情况分析, 这些岩藻糖链可能含有较多的高甘露糖型糖链。

参 考 文 献

- Kimura H, Shinya N, Nishihara S, *et al.* Distinct substrate specificities of five human α 1, 3 fucosyltransferase for *in vivo* synthesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, **237**: 131~ 137
- 刘 飞, 陈继华, 赵家宏, 等. 人肝癌中 Lewis 抗原、 α 1, 3 岩藻糖转移酶与转移倾向. *生物化学与生物物理学报*, 2000, **32** (2): 115~ 120
Liu F, Chen J H, Zhao J H, *et al.* *Acta Biochim Biophys*, 2000, **32** (2): 115~ 120
- Wu X Z, Lu H, Zhou L, *et al.* Changes of phosphatidylethanolamine specific phospholipase C in hepato carcinogenesis and in the proliferation and differentiation of rat liver cancer cells. *Cell Biol Int*, 1997, **21** (6): 375~ 381
- Uozumi N, Teshima T, Yamamoto T, *et al.* A fluorescent assay method for GDP-L-Fuc: N-acetyl-beta-D-glucosaminide α 1, 6-fucosyltransferase activity, involving high performance liquid chromatography. *J Biochem (Tokyo)*, 1996, **120** (2): 385~ 392
- Liu F, Qi H L, Chen H L. Effects of all-trans retinoic acid epidermal growth factor in the expression of nm23-H1 in human hepatocarcinoma cells. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2000, **126** (2): 85~ 90
- Noda K, Miyoshi E, Uozumi N, *et al.* Gene expression of 1, 6 fucosyltransferase in human hepatoma tissues: a possible implication for increased fucosylation of -fetoprotein. *Hepatology*, 1998, **28** (4): 944~ 952
- Norman K E, Auderson G P, Kolb H C, *et al.* Sialyl lewis x (sLe x) and an sLe x mimetic, CGP69669A, disrupt E-Selectin-dependent leukocyte rolling *in vivo*. *Blood*, 1998, **91** (2): 475~ 483
- Groce K, Freedman S J, Furie B C, *et al.* Interaction between soluble P-selectin and soluble P-selectin glycoprotein ligand 1: equilibrium binding analysis. *Biochemistry*, 1998, **37** (47): 16472~ 16480
- Weston B W, Hiller K M, Mayben J P, *et al.* Expression of human α 1, 3 fucosyltransferase antisense sequences inhibits selectin-mediated adhesion and liver metastasis of colon carcinoma cells. *Cancer Res*, 1999, **59** (9): 2127~ 2135
- Klopfack A G, Laskowska A, Jolanta A P, *et al.* Role of sialyl lewis a in adhesion of colon cancer cells: The antisense RNA approach. *Eur J Biochem*, 1998, **253** (1): 309~ 318
- Miyoshi E, Noda K, Ko J H, *et al.* Overexpression of α 1, 6 fucosyltransferase in hepatoma cells suppress intrahepatic metastasis after splenic injection in athymic mice. *Cancer Res*, 1999, **59** (9): 2237~ 2243

Fucosylated Oligosaccharides in The Migration of Hepatoma Cells*

WU Xing-Zhong**, CHEN Ying-Feng

(Department of Biochemistry, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract The roles of fucosylated glycoproteins and oligosaccharides in hepatoma cells were studied by means of fucosylation analysis. It was noted that the protein bands between 23 ku and 40 ku which bound to ulex europaeus agglutinin (UEA) and lens culinaris agglutinin (LCA) reduced significantly until 20 weeks when the liver mass formed, but the band at 80 ku became denser week after week during the course of rat hepatocarcinogenesis induced by N-nitrosodiethylamine. In comparison to the hepatoma cells with low metastatic potential, high metastatic hepatoma cells were found more protein bands binding to UEA and LCA within a broad range of molecular mass. Fucosyltransferase activities were furthermore investigated in the metastatic tissues of hepatoma. It was observed that the activity of 1, 6 fucosyltransferase in metastatic liver mass was significantly higher than those of liver tissues without metastasis. Therefore, the fucosylated glycoproteins were isolated and directly used for the treatment of 7721-k3 hepatoma cells. Interestingly the glycoprotein isolated by aleuria aurantia lectin (AAL) and LCA chromatography significantly inhibited the migration of 7721-k3 hepatoma cells. Glycopeptides digested from the glycoproteins above still have the same inhibitory effects on 7721-k3 cells or even stronger. Results by a series of lectin binding analysis showed that these oligosaccharides had a strong affinity to concanavalin A and bound to L-type and E-type phaseolus vulgaris agglutinin as well. This evidence suggested that the fucosylated oligosaccharides might change into high mannose type in hepatocarcinogenesis and played an important role in hepatoma cell migration and metastasis.

Key words hepatoma cell migration, fucosylation, fucosyltransferase

* This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (30070183) and Key Subject Foundation of Shanghai Municipal Education Committee (B9808010).

** Corresponding author. Tel: 86-21-54237697, E-mail: xz_wu@shmu.edu.cn Received: April 24, 2002 Accepted: May 28, 2002