

肝癌转移相关的核心岩藻糖基化蛋白质表达谱的研究*

代智¹⁾ 刘银坤^{1)**} 崔杰峰¹⁾ 冯钜涛¹⁾ 宋海燕¹⁾

陈洁¹⁾ 孙瑞霞¹⁾ 李娜²⁾ 申华莉²⁾ 张予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 通过比较研究不同转移潜能肝癌细胞系中核心岩藻糖基化蛋白质表达谱的差别, 筛查与转移相关的重要糖蛋白. 用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、双向电泳(2-DE)和凝集素印迹技术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 3 种不同转移潜能人肝癌细胞系 Hep3B、MHCC97L 和 MHCC97H 的核心岩藻糖基化蛋白质表达图谱. 比较研究发现, 不同转移潜能肝癌细胞呈现不同的 SDS-PAGE/LCA 凝集素印迹图谱, MHCC-97H 和 MHCC-97L 在 35~45 ku 和 45~60 ku 间出现了 Hep3B 未见的条带. 在核心岩藻糖基化蛋白质表达图谱中, Hep3B、MHCC97L 和 MHCC97H 分别平均检测到 (55±7) 个蛋白质点($n=3$), (60±6)个蛋白质点($n=3$), (61±4)个蛋白质点($n=3$); 以各自双向电泳图谱为参考胶, Hep3B、MHCC97L 和 MHCC97H 分别与其匹配的平均匹配点数为(25±3)个($n=3$), (30±4)个($n=3$), (28±3)个($n=3$). 该图谱中, 与 Hep3B 相比, MHCC97L 有 13 个点未匹配, 其中 9 个点为 Hep3B(-)/MHCC97L(+); MHCC97H 有 9 个点未匹配, 其中 6 个点为 Hep3B(-)/MHCC97H(+), MALDI-TOF-MS/MS 可鉴定出 Annexin1、Keratin 8 等 12 种差异蛋白质. 这些结果证实了不同转移潜能的肝癌细胞有明显的核心岩藻糖基化糖蛋白差异性表达. 提示肝癌转移可能与这些差异糖蛋白及其核心岩藻糖基化有关.

关键词 肝癌细胞, 核心岩藻糖蛋白, 基质辅助激光解吸飞行时间串联质谱, 扁豆凝集素, 糖蛋白质组学

学科分类号 Q513*.2, R735.7

肝细胞癌(HCC)是一种多因素诱发, 多基因参与的常见恶性肿瘤. 手术切除被公认为根治肝癌的最好手段, 但术后 5 年内仍有 50%以上患者出现转移复发, 严重影响患者预后. 肝癌筛查是提高患者预后和预测转移复发的关键.

核心岩藻糖基化被认为是糖蛋白糖链合成的终末反应, 可参与构成某些重要黏附分子的糖链结构, 在肿瘤转移方面起重要作用^[1,2]. 核心岩藻糖是在 α 1,6 岩藻糖基转移酶的作用下, 将岩藻糖转移至糖链最内侧的 N-乙酰氨基葡萄糖上形成的, 能与扁豆凝集素(LCA)结合, 存在于 α ATP、整连蛋白等多种糖蛋白中. 研究表明, 肝癌诱发过程中, 核心岩藻糖基化蛋白质表达改变显著^[3]. 同时, 某些蛋白质异常岩藻糖基化也可能妨碍肝癌细胞脾内注射后肝内转移的过程^[4]. 本研究利用我所建成的不同转移潜能的人原发性肝细胞肝癌细胞系, 即高转移潜能的 MHCC97H (97H) 和低转移潜能的 MHCC97L(97L)(Sun 等 1996 年, Tian 等 1999 年), 同时选择基本不转移的 Hep 3B 作为参照细胞和已建好的蛋白质组学的平台技术, 比较研究与肝癌转

移相关的核心岩藻糖基化糖蛋白的差异性表达.

1 材料和方法

1.1 试剂

RPMI1640 和 DMEM 培养基购自 Gibco 公司; 二硫苏糖醇(DTT)、尿素、CHAPS、IPG 缓冲液、Pharmylte、溴酚蓝、IPG 胶条(7 cm, 3~10NL)、十二烷基磺酸钠(SDS)、丙烯酰胺、N,N 甲叉双丙烯酰胺、过硫酸铵和 TEMED 均购自 Amersham Pharmacia 公司; 硫脲购自 Sigma 公司; 碘乙酰胺购自 Fluka 公司; 生物素标记的扁豆凝集素(Biotin-LCA)及亲和素标记的辣根过氧化物酶(Avidin-HRP)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; 考马斯亮蓝染色及其

*国家高技术“863”计划资助项目(2002BA711A11)和国家重点基础研究发展规划项目(973)(2001CB510205, 2004CB520802).

** 通讯联系人.

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

收稿日期: 2004-11-30, 接受日期: 2004-12-31

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

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; 人肝癌细胞系 MHCC97H、MHCC97L 用含 10%胎牛血清的高糖 DMEM 培养基常规传代培养, 待细胞处于对数生长期时, 经胰酶消化后, 按每 100 μ l 裂解液中(7 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 4% CHAPS, 20 mmol/L Tris, 65 mmol/L DTT, 1% Pharmylte, 1 mmol/L PMSF) 3×10^6 个细胞比例重悬细胞, 4℃振荡破碎 45 min, 4℃ 20 000 g 离心 45 min, 收集上清, -70℃保存备用.

1.4 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 270 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-聚丙烯酰胺凝胶电泳. 考马斯亮蓝 R-250 染色或立即放入转膜缓冲液 (2.5 mmol/L Tris, 19.2 mmol/L 甘氨酸, 0.01% SDS, 20% 甲醇) 中平衡.

1.5 蛋白质印迹 (Western blotting)

恒流 360 mA, 转膜 90 min 后, 将 PVDF 膜放置于 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, 加入 Biotin-LCA, 终浓度为 6 mg/L, 37℃孵育 1 h. TTBS (150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris·HCl pH 7.5, 0.1% Tween-20) 洗 3 次, 各 10 min. 加入 Avidin-HRP, 终浓度为 0.8 mg/L, 37℃孵育 1 h, TTBS 洗 3 次, 各 10 min, 然后经化学发光检测.

1.6 图像分析

染色后的 2-D 胶及化学发光胶片用 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 蛋白质的质谱鉴定

Etan Spotpicker 自动切胶仪将凝胶上与胶片相匹配的蛋白质斑点切下, 置于 96 孔板中, 进行胶

内酶解, 然后用 60 μ l 提取液 (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 分子量; MS/MS 容许差异, 1 分子量.

1.8 糖基化位点预测

应用 NetNGlyc 1.0 软件分析^[5].

2 结 果

2.1 肝癌细胞核心岩藻糖基化蛋白的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

不同转移潜能的肝癌细胞 MHCC-97H, MHCC-97L 和 Hep3B 的总蛋白经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离和考马斯亮蓝显色后的电泳图谱呈现蛋白质条带并无明显的差异 (图 1b). 但经转膜和用 LCA 凝集素结合的染色方法得到的核心岩藻糖基化糖蛋白的图谱则表现明显不同的差异, 与 Hep3B 相比, MHCC-97H 和 MHCC-97L 条带数较多, 这些差异条带主要集中在 35~45 ku 和 45~

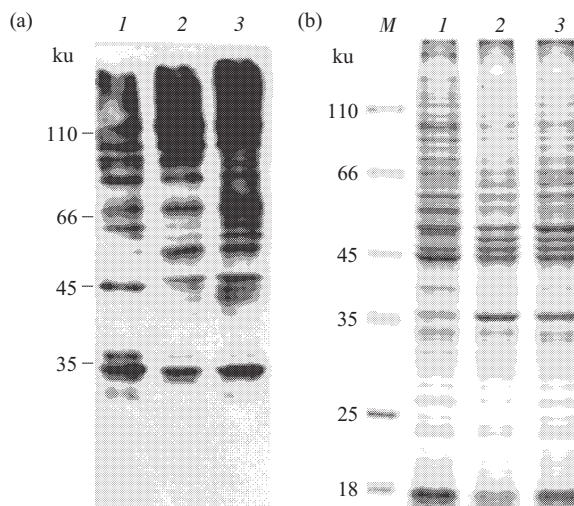


Fig.1 Comparision of core fucosylated glycoprotein expression profiles of three cultured HCC cell lines with different metastasis potentials with SDS-PAGE followed by LCA lectin blot analysis

(a) 20 μ g of proteins extracted from Hep3B cells (lane 1), MHCC97-L (lane 2) and MHCC97-H (lane 3) were electrophoresed on a 10% acrylamide gel, and LCA blot analysis was then performed. (b) the proteins visualized by coomassie blue staining indicate equal amounts of protein loaded in each lane.

60 ku (图 1a). 说明高低不同转移潜能肝癌细胞蛋白质的核心岩藻糖基化存在明显的差异. 转移 HCC 细胞 (97L、97H) 的蛋白核心岩藻糖基化程度远比 Hep 3B 高.

2.2 肝癌细胞核心岩藻糖蛋白表达谱

为进一步筛查与肝癌转移相关的核心岩藻糖蛋白, 我们在双向电泳的基础上做了 LCA 印迹实验, 建立了高低不同转移潜能的肝癌细胞核心岩藻糖基

化蛋白质表达谱 (图 2b). 图 2b 中, Hep3B、MHCC97L 和 MHCC97H 分别平均检测到 (55 ± 7) 个蛋白质点 $(n=3)$, (60 ± 6) 个蛋白质点 $(n=3)$, (61 ± 4) 个蛋白质点 $(n=3)$. 以各自 2-DE-考马斯亮蓝染色图谱为参考胶 (图 2a), Hep3B、MHCC97L 和 MHCC97H 分别与其匹配的平均匹配点数为 (25 ± 3) 个 $(n=3)$, (30 ± 4) 个 $(n=3)$, (28 ± 3) 个 $(n=3)$, 图 2 中, 与 Hep3B 相比, MHCC97L 有 13 个点未匹配, 其中 9 个点为 Hep3B(-)/MHCC97L(+), MHCC97H 有 9 个点未匹配, 其中 6 个点为 Hep3B(-)/MHCC97H(+). 提示核心岩藻糖基化糖蛋白在 Hep3B、MHCC97L 和 MHCC97H 中的差异表达与肝癌转移相关.

2.3 核心岩藻糖基化糖蛋白的 MALDI-TOF-MS/MS 鉴定

应用 MALDI-TOF-MS/MS 对高低不同转移潜能的肝癌细胞核心岩藻糖蛋白表达谱中与 2-DE 参考胶相匹配的所有蛋白质斑点进行鉴定, 共鉴定 36 种蛋白质 (表 1).

在检测到的核心岩藻糖基化糖蛋白中, 97H 特有的是 annexin 1 (spot 31)、hnRNP A/B (spot 33), 同时发现 PDZ 和 LIM domain 1 (spot 20) 只在高转移潜能的 97H 中不表达. 97L 特有的为 HSP70 1 (spot 12)、HSP70 9 (spot 13)、H 型 LDH A 链 (spot 18)、PP4-X 蛋白 (spot 19) 和蛋白酶体亚单位; Hep3B 特有的有 RNA 结合蛋白 4 (spot 35) 和 hnRNP X (spot 36); 细胞角蛋白 8 (spot 15)、电子转运黄素蛋白 (spot 25) 和一未知蛋白质 (spot 26) 是在转移的 97L 和 97H 共同表达的糖蛋白. 提示这些差异糖蛋白可能与相应细胞的转移潜能有关.

2.4 糖基化位点预测

经 NetNGlyc 1.0 软件分析预测以上 12 种差异糖蛋白, 发现除 protein PP4-X 外都含有潜在的糖基化位点, 但个数不一, 分别为 heat shock 70 ku protein 1 (6 个), heat shock 70 ku protein 9 (2 个), keratin 8 (4 个), chain A, human heart L-lactate dehydrogenase H chain (2 个), PDZ 和 LIM domain 1 (4 个), annexin I (1 个), unnamed protein product (2 个), chain A, three-dimensional structure of human electron transfer flavoprotein to 2.1 Å resolution (2 个), hnRNP A/B (1 个), RNA binding motif protein 4 (1 个), poly(rC) binding protein 1 (5 个). 以 keratin 8 和 PDZ 和 LIM domain 1 预测结果见图 3 和图 4.

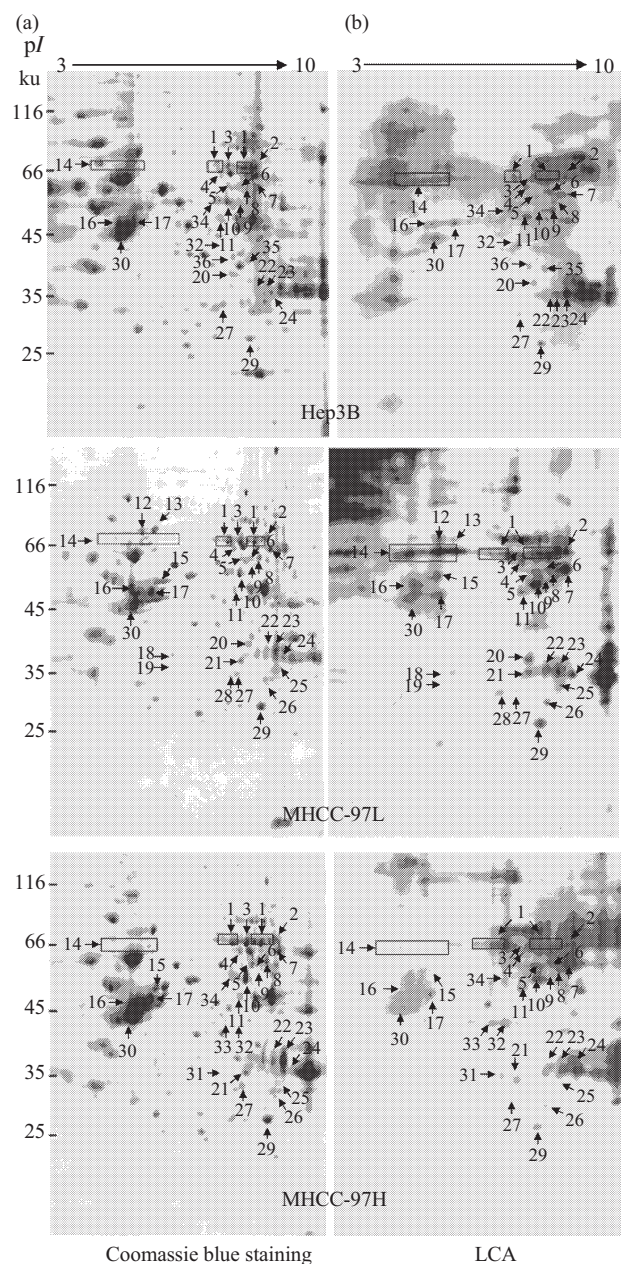


Fig.2 Comparison of core fucosylated glycoprotein expression profiles of three cultured HCC cell lines with different metastasis potentials with 2DE separation followed by LCA lectin blot analysis

270 μ g total cellular proteins extracted from HCC cell lines with different metastasis potentials. The gels were stained with a coomassie blue staining kit (a series) and with LCA blot analysis (b series).

Table 1 Identification of core-fucosylated glycoprotein of cultured HCC cell lines with different metastasis potentials by MALDI-TOF-MS/MS

Number	Protein name	Protein score	Coverage rate/%	M/ku	pI	97H	97L	Hep3B
1	Lamin A/C isoform 2, 70 ku lamin	471	55	65.10	6.40	+	+	+
2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	179	39	60.15	6.65	+	+	+
3	Stress-induced-phosphoprotein 1	274	43	62.60	6.40	+	+	+
4	Chaperonin containing TCP1, subunit 6A (zeta 1)	253	45	57.99	6.23	+	+	+
5	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	243	43	59.23	6.42	+	+	+
6	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2	111	23	55.77	6.44	+	+	+
7	UDP-glucose dehydrogenase	163	45	54.99	6.73	+	+	+
8	Unknown (protein for MGC:2115)	108	29	54.14	7.95	+	+	+
9	Annexin A11	184	24	54.36	7.53	+	+	+
10	Aldehyde dehydrogenase 1	208	34	54.80	6.30	+	+	+
11	Enolase 1, phosphopyruvate hydratase	118	34	47.14	7.01	+	+	+
12	Heat shock 70 ku protein 1	292	45	70.85	5.37	-	+	-
13	Heat shock 70 ku protein 9	333	46	73.63	5.87	-	+	-
14	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K isoform a	134	45	51.00	5.19	+	+	+
15	Keratin 8, type II cytoskeletal	420	54	53.72	5.36	+	+	-
16	Unknown (protein for IMAGE:3533309)	249	51	41.16	5.67	+	+	+
17	Similar to Keratin, type I cytoskeletal 20 Chain A, Human Heart L-Lactate	267	70	48.46	5.52	+	+	+
18	Dehydrogenase H chain, ternary complex with nadh and oxamate	76	41	36.48	5.72	-	+	-
19	Protein PP4-X	166	47	36.03	5.65	-	+	-
20	PDZ and LIM domain 1 (elfin)	233	70	36.05	6.56	-	+	+
21	Annexin I, annexin I (lipocortin I)	337	51	38.69	6.57	+	+	-
22	Annexin A2, annexin II	89	43	38.58	7.57	+	+	+
23	Hypothetical protein DKFZp434G1930.1	79	42	37.57	9.23	+	+	+
24	Aldo-keto reductase family 1, member C1, dihydrodiol dehydrogenase 1	93	43	36.77	8.02	+	+	+
25	Unnamed protein product	53	35	45.29	8.96	+	+	-
26	Chain A, Three-Dimensional structure of human Electron transfer flavoprotein To 2.1 A Resolution	59	38	33.08	6.95	+	+	-
27	Unknown (protein for MGC: 19561)	90	26	35.79	8.16	+	+	+
28	Proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 1	106	37	29.58	6.15	-	+	-
29	Chain A, triosephosphate isomerase (Tim) (E.C.5.3.1.1) complexed with 2-phosphoglycolic acid	151	63	26.52	6.51	+	+	+
30	Actin,beta	144	42	40.98	5.56	+	+	+
31	Annexin I; annexin I (lipocortin I)	141	36	38.69	6.57	+	-	-
32	Acyl-coenzyme A dehydrogenase, C-2 to C-3 short chain	75	26	44.30	8.13	+	-	+
33	Similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	67	22	30.57	7.68	+	-	-
34	Aldehyde dehydrogenase 1	286	35	54.80	6.3	+	-	+
35	RNA binding motif protein 4	211	49	40.29	6.61	-	-	+
36	Ppoly(rC) binding protein 1, heterogenous nuclear ribonucleoprotein X	90	15	37.50	6.66	-	-	+

Sequence coverage: the percent of identified sequence with PMF data to the complete sequence of the known protein. “+” / “-” : represents the “existence” / “absent” of the identified core-fucosylated glycoprotein in the corresponding HCC cell lines.

(Threshold=0.5)

SeqName	Position	Potential	Jury agreement	N-Glyc result
Sequence	69 NQSL	0.5498	(6/9)	+
Sequence	272 NRSR	0.5130	(4/9)	+
Sequence	313 NISR	0.5791	(9/9)	++
Sequence	408 NMSI	0.5544	(7/9)	+

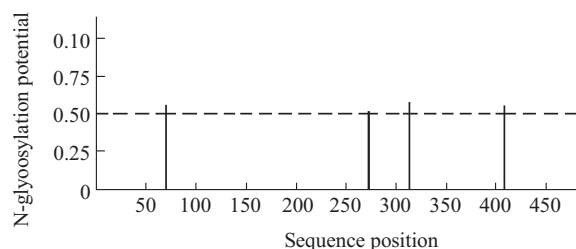


Fig.3 Prediction of N-glycosylation sites in keratin 8 sequence

—: potential; - - - -: threshold.

(Threshold=0.5)

SeqName	Position	Potential	Jury agreement	N-Glyc result
Sequence	57 NTSN	0.4497	(5/9)	-
Sequence	60 NMTH	0.5976	(7/9)	+
Sequence	76 NLTL	0.7383	(9/9)	++
Sequence	121 NRSA	0.6411	(8/9)	+
Sequence	155 NISN	0.6740	(8/9)	+

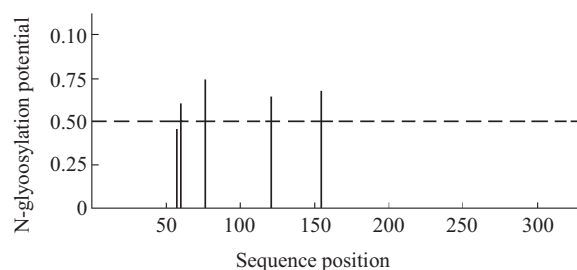


Fig.4 Prediction of N-glycosylation sites in PDZ and LIM domain 1 sequence

—: potential; - - - -: threshold.

3 讨 论

目前, 肝癌的基础研究主要集中于肝癌转移复发的分子机制探讨和肝癌转移的分子标志物研究. 蛋白质组学研究直接从生物功能的执行者——蛋白质着手, 动态、定量分析肝癌转移过程中蛋白质结

构和数量的改变, 从而筛出有临床标志意义的关键蛋白质分子, 如一些与肝癌恶变相关的蛋白质就是通过比较人肝癌细胞和正常肝细胞蛋白质组学的差异中获得的^[6].

糖基化修饰在蛋白质翻译后修饰中最为普遍, 大约 50% 以上的蛋白质都有糖基化发生^[7]. 核心岩藻糖普遍存在于很多糖蛋白中^[8]. 糖蛋白的岩藻糖基化水平随机体状态的改变而改变. 如血浆铜蓝蛋白和转铁蛋白在正常状态下其核心岩藻糖基化水平很低^[9], 但在恶化状态下则增加^[10], 另有报道表明, 转化细胞或肿瘤细胞的岩藻糖基化水平增加^[11]. 本研究发现肝癌细胞转移潜能不同, 蛋白质的核心岩藻糖基化水平也不同, 如 MHCC-97H 和 MHCC-97L 中出现了 35~45 ku 和 45~60 ku 的差异条带, 说明随肝癌转移潜能的增加, 蛋白质的核心岩藻糖基化水平也增加, 同时也预示增加的岩藻糖基化蛋白可能与肝癌转移有关. 为进一步验证以上推论, 本研究又将双向电泳技术和凝集素免疫印迹技术结合, 建立了肝癌细胞核心岩藻糖蛋白表达谱, 并利用 MALDI-TOF-MS/MS 对表达谱上与双向电泳图谱相匹配的蛋白质斑点进行了验证, 共鉴定 36 种蛋白质, 其中 keratin 8, annexin I 等 12 种差异糖蛋白可能与肝癌转移相关. 对这些差异糖蛋白进行归类, 发现有与能量代谢有关的黄素蛋白, 有与细胞骨架相关的角蛋白 8, 有与细胞信号传导、凋亡有关的膜联蛋白 1, 有与 RNA 复制有关的 RNA 结合蛋白, 这些蛋白质 (除膜联蛋白 1 外) 能否在肝癌转移复发中发挥作用尚未见报道.

膜联蛋白是 annexins 蛋白家族的一员, 它与调节细胞骨架的胞内信号传导、促进肿瘤的发生有关^[12], 此外它还可通过影响钙粘着蛋白的表达, 调节细胞的集落形成能力以及细胞间的黏附能力^[13]. Cui 等^[14]发现该蛋白质在人肝癌高转移细胞 MHCC97H 中高表达, 并已进一步验证了其于肝癌的转移相关. 本研究发现, 它的核心岩藻糖基化也可能参与了促进肝癌转移的过程.

糖蛋白质组学是对蛋白质的糖链组成及其功能研究的一门有发展前景的新学科. 目前, 国内外尚未见有系统研究细胞内全部或某类糖蛋白质组的方法. 其原因主要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, 它已广泛用于研究细胞内相关糖基转移酶表达水平的改变及其生物学意义^[4]. 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糖蛋白, 如本研究鉴定的 protein PP4-X 就缺乏潜在的糖基化位点. 尽管如此, 凝集素在糖生物学的研究中仍然具有不可替代的位置. 应用质谱技术对所鉴定的蛋白质进行糖基化位点测定和糖链结构分析可以弥补凝集素非特异性这一缺陷, 这部分工作尚在进行中. 此外, 通过多种凝集素联合应用, 建立各类糖蛋白表达谱, 以期发现同种糖蛋白在不同表达谱中的糖型表现, 亦可解决这一问题. 相信本方法的建立将为糖蛋白质组学的研究做出贡献.

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 of the sialyl Lewis x and Lewis x epitopes. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, **237** (1): 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 Sin*, 2000, **32** (2): 115~120
- 吴兴中, 陈迎凤. 岩藻糖糖链与肝癌细胞的迁移作用. *生物化学与生物物理进展*, 2002, **29** (6): 932~937
Wu X Z, Chen Y F. *Prog Biochem Biophys*, 2002, **29** (6): 932~937
- Miyoshi E, Noda K, Ko J H, *et al.* Overexpression of α -1,6 fucosyltransferase in hepatoma cells suppresses intrahepatic metastasis after splenic injection in athymic mice. *Cancer Res*, 1999, **59** (9): 2237~2243
- Gupta R, Jung E, Brunak S. Prediction of N-glycosylation sites in human proteins. In preparation, 2005
- Yu L R, Zeng R, Shao X X, *et al.* Identification of differentially expressed proteins between human hepatoma and normal liver cell lines by two-dimensional electrophoresis and liquid chromatography ion trap mass spectrometry. *Electrophoresis*, 2000, **21**(14): 3058~3068
- Varki A, Cummings R, Esko J, *et al.* *Essentials of Glycobiology*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999. 653
- Wilson J R, Willams D, Schachter H. The control of glycoprotein synthesis: N-acetylglucosamine linkage to a mannose residue as a signal for the attachment of L-fucose to the asparagine-linked N-acetylglucosamine residue of glycopeptide from α 1-acid glycoprotein. *Biochem Biophys Res Commun*, 1976, **72** (3): 909~916
- Shimizu H, Ochiai K, Ikenaka K, *et al.* Structures of N-linked sugar chains expressed mainly in mouse brain. *J Biochem*, 1993, **114**(3): 334~338
- Miyoshi E, Noda K, Yamaguchi Y, *et al.* The α 1-6-fucosyltransferase gene and its biological significance. *Acta Biochim Biophys Sin*, 1999, **1473** (1): 9~20
- Campion B, Leger D, Wieruszkeski J M, *et al.* Presence of fucosylated triantennary, tetraantennary and pentaantennary glycans in transferrin synthesized by the human hepatocarcinoma cell line Hep G2. *Eur J Biochem*, 1989, **184** (2): 405~413
- Paweletz C P, Ornstein D K, Roth M J, *et al.* Loss of annexin I correlates with early onset of tumorigenesis in esophageal and prostate carcinoma. *Cancer Res*, 2000, **60** (22): 6293~6297
- Frey B M, Reber B F, Vishwanath B S, *et al.* Annexin I modulates cell functions by controlling intracellular calcium release. *FASEB J*, 1999, **13** (15): 2235~2245
- Cui J F, Liu Y K, Pan B O, *et al.* Differential proteomic analysis of human hepatocellular carcinoma cell line metastasis-associated proteins. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2004, **130** (10): 615~622

Core-fucosylated Glycoproteomics Correlated With The Metastasis of Hepatoma*

DAI Zhi¹⁾, LIU Yin-Kun^{1)**}, CUI Jie-Feng¹⁾, FENG Ju-Tao¹⁾, SONG Hai-Yan¹⁾, CHEN Jie¹⁾,
SUN Rui-Xia¹⁾, LI Na²⁾, SHEN Hua-Li²⁾, ZHANG Yu¹⁾, YANG Peng-Yuan²⁾

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

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

Abstract In order to comparatively analyze the core-fucosylated glycol-proteome expression profile of hepatocellular carcinoma cell lines (HCC) with different metastasis potentials, some key glycoprotein correlated with the metastasis of hepatoma were screened. Using SDS-PAGE, 2-DE followed by LCA lectin blot, differential display maps of core-fucosylated glycol-proteome were generated and analyzed, and then the glycoproteins were identified by a matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS/MS). 1-DE lectin blot showed that MHCC97-H and MHCC97-L, which were established by authors' institute and had higher metastasis potentials than Hep3B, displayed numerous bands. From the core-fucosylated glycol-proteomics expression profiles, (55 $\pm$ 7) spots in Hep3B ($n=3$), (60 $\pm$ 6) spots in MHCC97-L($n=3$), and (61 $\pm$ 4) spots in MHCC97-H ($n=3$) were detected. Matched with individual 2-DE maps, the core-fucosylated glycol-proteomics expression profiles showed that there were (25 $\pm$ 3) detected spots in Hep3B($n=3$), (30 $\pm$ 4)

detected spots in MHCC97-L and (28±3) detected spots in MHCC-97H ($n=3$). There were 13 unmatched spots between the expression profile of Hep3B and MHCC97-L, and 9 unmatched spots between Hep3B and MHCC97-H. The 12 differential glycoproteins were identified by MALDI-TOF-MS/MS. Individually differential core-fucosylated glycoproteomics expression profiles existed in HCC with different metastasis potentials. All the results suggested that the metastasis of HCC might be correlated with these differential glycoproteins.

Key words hepatocellular carcinoma cell, core-fucosylated glycoprotein, MALDI-TOF-MS/MS, lens culinaris agglutinin, glycoproteomics

*This work was supported by grants from The State 863 High Technology R&D Project of China (2002BA711A11) and the Special Funds for Major State Basic Research of China (2001CB510205, 2004CB520802).

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

Received: November 30, 2004 Accepted: December 31, 2004