

肝癌细胞系差异性表达的糖结合蛋白研究*

钟耀刚 秦鑫敏 杜昊骐 党刘毅 李 铮**

(西北大学生命科学学院功能糖组学实验室, 西安 710069)

摘要 糖结合蛋白(glycan-binding protein, GBP)在细胞生命周期中扮演着重要角色, 如细胞识别、运输、免疫、代谢、增殖分化及细胞间的相互作用等。目前, 对 GBP 的改变对细胞生物过程产生影响的研究甚少。本研究用糖芯片技术对肝癌细胞系 HepG2 和正常肝细胞系 L02 表达的 GBP 进行研究; 糖细胞化学验证确定差异表达 GBP 在肝癌细胞系中的变化和分布。结果显示, 8 种糖探针(如 SL、LNT 和 GalNAc 等)和 5 种糖探针(如 Man、Man-9-Glycan, Xyl 等)分别对应的 GBP 在 HepG2 细胞中表达上调或下调。糖细胞化学结果显示: GalNAc 识别的 GBPs 主要表达在 HepG2 的胞膜、中央胞质、核周胞质区域, 而在 L02 的相同区域表达减弱; NeuAc 识别的 GBPs 主要表达在 L02 的胞膜区及核周胞质区, 而在 HepG2 细胞的相同区域表达减弱。这些数据为寻找新的肝癌发病机制和抗肿瘤策略提供了有用信息。

关键词 糖结合蛋白, HepG2, L02, 糖芯片, 糖细胞化学
学科分类号 Q514

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2014.00100

近 10 年来, 人们已经认识到细胞表面糖链与蛋白质相互作用在细胞生命周期中扮演着重要角色, 如细胞间的黏附、细胞识别、信号传递、细胞内吞以及细胞生长、分化和凋亡等, 并参与脊椎动物胚胎发育。这种与糖链相互作用的蛋白质被称为糖结合蛋白(glycan-binding protein, GBP)^[1-2]。目前还不能很好地阐释糖链的功能, 只能通过与其相互作用的 GBP 来阐明其角色。寡糖与蛋白质的连接方式有: N-连接糖基化、O-连接糖基化、C-连接糖基化^[3-4]、S-连接糖基化等形式^[5-6], N-, O-连接糖基化多发生在哺乳动物细胞中。N-连接糖基化是目前研究范围比较广、技术比较成熟的糖基化类型。通常认为 N-连接糖基化形式为天冬氨酸侧链上具有 Asn-X-Ser/Thr 序列(其中 X 一般不能为 Pro), 而 O-连接糖基化为寡糖的半缩醛羟基与丝氨酸、苏氨酸、羟基赖氨酸等结合。O-糖基化也普遍存在于哺乳动物的细胞内, 在细胞的生物过程中发挥重要作用^[7], 如在肿瘤发生时, 一方面蛋白质和脂分子糖基化的异常而导致糖蛋白和糖脂中的糖链发生了结构和数量的改变, 另一方面和这些糖链相互作用的 GBP 表达发生改变^[8-9]。因此, 开展肿瘤相关 GBP 的研究对于阐明肿瘤发生和发展的

分子机制, 寻找和发现新的肿瘤标志物和靶点, 对于肿瘤的诊断和治疗都具有非常重要的意义。

肝癌是全球发病率最高的五大恶性肿瘤之一, 对人类健康造成严重威胁^[10]。在我国肝癌死亡率居恶性肿瘤死亡率的第二位。目前用作肝癌诊断的特异性临床指标——甲胎蛋白(AFP)在检测中存在一定偏差(如假阳性和假阴性等问题), 而病理组织学检测会存在不能动态检测、损伤性检测、取样偏差^[11-12]等问题。因此, 寻找新的肝癌检测标志物, 以便对肝癌进行早期诊断, 提前预控肝癌的发生至关重要。

糖基化是一种重要的蛋白质翻译后修饰, 其主要发生于高尔基体和内质网上。近几年研究表明, 在肝癌发生发展过程中会伴有蛋白糖基化改变的现象^[13-14]。已有研究表明, GnT-III、 α 1-6FT 和 GnT-V 在肝癌患者癌组织及血清中的表达量上升, 是癌症发生时 3 个异常表达的酶, 由于其异常表达

* 国家自然科学基金资助项目 (81372365, 30870549)。

** 通讯联系人。

Tel: 029-88303446, E-mail: zhengli@nwu.edu.cn

收稿日期: 2014-04-09, 接受日期: 2014-06-19

直接影响了肝癌患者体内的糖链系统平衡^[5], 因此常作为肝癌发生的重要诊断指标. 例如, AFP 的 232 位 Asn 处一条 N-糖链结构, 在原发性肝癌检测中发现其能够与凝集素 LCA 结合为 AFP-L3, 在此过程中, α 1-6Fuc 基转移酶活性增强, 将 Fuc 转移到 α 1-6 连接的 GlcNAc 上, 从而导致 AFP 核心岩藻糖结构的改变^[16-17]. 秦等^[18]研究发现在肝纤维化过程中亦有异常糖基化的发生, 如 Gal β 1-3GalNAc α -Ser/Thr (T)/GalNAc 和 GalNAc α -Ser/Thr (Tn) 在激活态肝星状细胞中表达上调. 杨等^[19]通过 ConA-磁性复合微粒技术对甘露糖结合蛋白进行富集分析, 发现超过 57% 的甘露糖结合蛋白与细胞凋亡、癌症进程及大分子的重组有关.

目前, 随着糖生物学与糖组学的进程, 糖芯片技术已成为继基因芯片、蛋白质芯片技术后又一高通量、大规模检测 GBP 的核心技术. 由于其具有高通量、微型化等优点, 可以一次对样本中 GBP 进行检测, 保证了实验的平行性和可靠性. 糖芯片^[20]是研究糖组学以及 GBP 与糖链相互作用的最有效的高通量分析工具, 其潜在的应用范围非常广泛. 例如包括筛选 GBPs、抗体特异性分析、细菌和病毒的黏附以及酶的特性分析等方面. 糖芯片也能帮助研究者发展新的诊断方法和监测疾病状态以及发展治疗疾病的药物, 在大规模筛选糖链和阐明糖链在生物系统中起到的作用方面糖芯片逐渐成为一种标准的研究方法.

本研究用糖芯片技术对肝癌细胞系 HepG2 和 L02 差异性表达的 GBP 进行研究; 糖细胞化学验证确定差异表达 GBP 在肝癌细胞系中的变化和分布. 结果显示 8 种糖探针(如 SL、LNT 和 GalNAc 等)和 5 种糖探针(如 Man、Man-9-Glycan 和 Xyl)分别对应的 GBP 在 HepG2 细胞中表达上调或下调. 组化结果显示: GalNAc 识别的 GBPs 主要表达在 HepG2 的胞膜、中央胞质、核周胞质区域, 而在 L02 的相同区域表达减弱, NeuAc 识别的 GBPs 主要表达在 L02 的胞膜区及核周胞质区, 而在 HepG2 的相同区域表达减弱, 组化结果与糖芯片检测结果保持一致, 这些数据为寻找新的肝癌发病机制和抗肿瘤研究提供了有用信息.

1 实验方法

1.1 细胞培养

肝癌细胞系 HepG2 和 L02 由第四军医大学细

胞工程中心边惠洁教授赠送, 复苏后的 HepG2、L02 细胞转移到 RPMI-1640 培养基(美国 GIBCO 公司, 含 10% 胎牛血清, 1×10^5 U/ml 青霉素及 100 mg/L 链霉素, pH 7.2 左右)中, 置于 5% CO₂ 培养箱(美国 Thermo Forma 公司)中 37°C 恒温培养, 当细胞覆盖面积达 80% 以上时进行后续试验.

1.2 总蛋白提取

分别用 T-PER 组织蛋白提取试剂(美国 PIERCE 公司)对 HepG2 和 L02 的总蛋白进行提取. 步骤简述如下: 贴壁细胞首先用预冷 1×PBS (0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液, 0.15 mol/L NaCl, pH 7.4)轻轻润洗 2 次(洗去不贴壁细胞); 加入适量含蛋白酶抑制剂(美国 Sigma-Aldrich 公司)的 T-PER 试剂(蛋白酶抑制剂以 10 μ l/ml 加入 T-PER 试剂), 在细胞贴壁面上平铺均匀, 冰上静置 15 min; 移液枪反复吹打贴壁细胞, 直至细胞完全破碎混匀; 冷冻离心 4°C 10 000 g, 10 min; 吸取上清并用 Bradford 法(美国 Sigma-Aldrich 公司)对蛋白质定量, 可以立刻使用或转入 -80°C 保存.

1.3 糖芯片的制备

将 N-乙酰半乳糖胺(N-acetyl-D-galactosamine, GalNAc)、N-乙酰神经氨酸(N-acetylneuraminic acid, NeuAc)、半乳糖(galactose, Gal)、葡萄糖(glucose, Glu)、岩藻糖(fucose, Fuc)、木糖(xylose, Xyl)和甘露糖(mannose, Man)等 41 种糖探针(美国 Sigma-Aldrich 公司, 德国 Calbiochem 公司, 加拿大 BBI 公司, 德国 Merck 公司)分别溶于生产商推荐的点样缓冲液中. 牛血清白蛋白(BSA)(德国 Merck 公司)为阴性质控, Cy3(美国 GE Healthcare 公司)标记的 BSA 为位置标记. 晶芯 48 点样系统(博奥晶芯 SmartArrayer48 点样仪)设置每种糖探针重复点样 3 次, 点制于羟基化修饰的玻璃片上(美国 Gold Seal 公司), 每张芯片按照 12×12 的矩阵重复 3 个区^[21]. 41 种糖探针对应的糖链结构列于附件表 S1, 芯片阵列设计见附件图 S1. 点制好的芯片以 50%~60% 湿度孵育过夜, 真空干燥器中 60°C 真空固定 3 h, 备用. 1×PBS 清洗芯片 2 次, 每次 5 min, 甩干. 在芯片杂交盒中加入封闭缓冲液(含 1% BSA, 0.1% Tween-20 的 1×PBS), 杂交箱内以 4 r/min 缓慢旋转, 25°C 封闭 1 h. 封闭好的芯片 1×PBST(含 0.2% Tween-20 的 1×PBS)和 1×PBS 各洗 2 次, 每次 5 min, 甩干备用.

1.4 蛋白质的标记和孵育

各取 HepG2 和 L02 细胞总蛋白 100 μ l (约 100 μ g) 与同体积的 0.1 mol/L Na_2CO_3 缓冲液 (pH 9.3) 混匀, 再与二甲基亚砜 (DMSO) (美国 Sigma-Aldrich 公司) 活化的 Cy3 荧光试剂避光孵育 2 h, 然后用 Sephadex G-25 脱盐柱 (美国 GE Healthcare 公司) 除去游离荧光. 各取等量 Cy3 标记蛋白分别与孵育缓冲液 (含 1% BSA, 100 mmol/L NaCl, 0.1% Tween-20 的 1 \times PBS) 混合至总体积 650 μ l, 置入芯片杂交盒并与封闭好的芯片组装后, 杂交箱内以 4 r/min 缓慢旋转, 室温孵育 3 h. 孵育好的芯片用 1 \times PBST 和 1 \times PBS 各洗 2 次, 每次 5 min, 甩干. GenPix 4000B 芯片扫描仪扫描 (美国 Axon 公司), 设置光电倍增管 PMT 为 70%, 激光强度为 100% 预扫描, 然后选定点样区域, 精确扫描.

1.5 芯片数据获取和分析

通过 GenePix 3.0 软件从扫描图像中获取精确的芯片分析数据. 有效值的选取按照下列方法: 将每种糖探针对应的信号强度值减去该点的背景值, 然后与其 2 倍的背景 SD 值进行比较, 如大于 2 倍的背景 SD 值则认为有效数据. 每张芯片上, 每个糖探针对应了 9 个重复点, 这 9 个重复点的有效数据再进一步求中值, 即每个糖探针对应一个中值. 计算每种糖探针的中值所占 41 种糖探针中值之和的比例完成数据归一化. 每个样本做 3 次重复. 糖探针归一化荧光强度表示为 3 次重复的 $\bar{x} \pm s$. 计算每种糖探针在 HepG2 比 L02 归一化数值的 ratio 值来比较 GBP 的相对变化. 每种糖探针对应的 HepG2 ($n=3$) 和 L02 ($n=3$) 数据同时通过 SPSS 19 进行 t 检验分析. 运用 EXPANDER 6.0 (version 6.0; <http://acgt.cs.tau.ac.il/expander/>) 软件对未归一化有效数据聚类分析, 鉴定表达差异最为明显的糖结合蛋白.

1.6 糖细胞化学

糖细胞化学被用于检测细胞中差异性 GBP 的表达和分部情况. 本实验对传统的组化技术^[18, 22]做了部分改进: 分别将 2×10^5 个 HepG2、L02 细胞接种于铺有无菌盖玻片的 6 孔细胞培养板 (美国 Corning 公司) 中, 培养结束后, 对照组和实验组细胞弃培养液, 加入 2 ml 1 \times PBS 轻轻冲洗 2 次; 4% 多聚甲醛 (美国 Sigma-Aldrich 公司) 固定 15 min 后用 1 \times PBS 清洗 3 次; 4 $^\circ\text{C}$ 条件下用 1% Triton X-100 (美国 Sigma-Aldrich 公司) 处理细胞 10 min, 用 1 \times

PBS 清洗 2 次; 用 5% BSA 封闭 1 h, 然后加入过饱和 Cy3 荧光标记糖链^[23], 4 $^\circ\text{C}$ 避光过夜; DAPI 核染料 (美国 Sigma-Aldrich 公司) 复染细胞 10 min, 1 \times PBS 清洗 3 次, 50% 甘油封片; 激光共聚焦显微镜 FV 1000 (日本奥林巴斯公司) 观察并获取 Cy3 和 DAPI 双通道激光扫描图.

2 实验结果

2.1 糖芯片结合特异性

为了确保糖探针与其识别的 GBP 结合特异性, 将 Cy3 标记的凝集素 ConA (美国 Sigma-Aldrich 公司) (附件图 S2a), AAL (德国 Calbiochem 公司) (附件图 S2b) 分别与糖芯片进行孵育, 结果显示: ConA、AAL 分别与 40 种、7 种糖探针结合, 其中 Mannose 相关糖探针与 ConA 结合的荧光信号比其他糖探针要高, Fucose 相关糖探针与 AAL 结合时显示阳性信号, 其他糖探针结合信号明显降低或者显示阴性信号; 当 D-mannose 与 ConA, D-fucose 与 AAL 竞争性糖芯片孵育时, 其结合信号明显降低或者无阳性信号. 而 Cy3 标记的 BSA 与糖芯片结合无阳性信号 (如附件图 S2a 右侧所示). 由此可得, 糖芯片的结合特异性较好, 能够差异性识别不同类型的 GBP.

2.2 HepG2 和 L02 细胞中的 GBP

GBP 在细胞周期中扮演着重要的角色, 参与多种细胞代谢途径, 如细胞增殖、分化、免疫等过程. 在本研究中, 希望能够了解哪些 GBP 存在于肝癌细胞系中, 这些 GBP 的差异表达又是如何随着肝癌发展进程而变化. 为确保所有 GBP 的结合都在其对应糖探针的线性范围内, 需要绘制每种糖探针与其对应的 GBP 结合曲线. 分别取 1、2 和 3 mg/L Cy3 标记的 HepG2 细胞总蛋白与糖芯片孵育, 结果如附件图 S3a 所示. 其中糖探针 3 α 、6 α -Mannopentaose、Man、Man-9 glycan 和 2 α -Mannobiose 等在 3 mg/L 上样浓度时趋于饱和状态或过饱和状态, 而糖探针 Fuc、LNF-I、B-Pentasaccharide、Xyl、hyaluronic acid 和 Lac 等在 1 mg/L 时无法检测到信号, 其余与糖探针的结合均在线性范围内 (附件图 S3b). 因此, 为了保证糖探针的有效检测范围, 使所有结合均在每种糖探针对应的线性范围内, 最佳上样浓度为 2 mg/L.

使用高通量糖芯片技术分别对肝癌细胞系 HepG2 和 L02 的 GBP 进行研究. 41 种糖探针特异性识别的 GBP 及糖探针对应的归一化荧光强度值

(NFIs)见附件表 S1. 在 HepG2 和 L02 中分别有 24 和 17 种糖探针对应的 NFI 超过 0.025, 其中识别甘露糖型、唾液酸化、半乳糖型 GBP 的糖探针 Man、6 α -Mannobiose、NeuAc、4 β -Gal 等在 HepG2 和 L02 中 NFIs 甚至超过 0.03. 同时, HepG2 中有 2 种糖探针, L02 有 1 种糖探针其 NFIs 小于 0.01. 另外识别透明质酸结构的糖探针 hyaluronic acid 在 HepG2 和 L02 中都无阳性信号.

2.3 HepG2 中差异性表达糖结合蛋白的变化

糖芯片结果显示, HepG2 与 L02 细胞的 GBP 存在明显差异, 图 1a 中黄框标注出 HepG2 和 L02 中显著差异的 GBP, 图 1b 为每个样本重复 3 次后的聚类分析结果, 其中红色部分代表高表达, 绿色部分代表低表达, 黑色部分代表无显著性差异, 通过比较分析, 可根据 HepG2 相对于 L02 的 NFIs 的 ratio 值将糖探针分为 3 类(附件表 S1): a. 在 HepG2 中信号明显增强的糖探针, 即 ratio 值大于

1.5 (基于本研究, ratio 值大于 1.3 视为有效值); b. 没有明显信号变化的糖探针, 即比值接近于 1.0; c. 在 HepG2 中信号明显减弱的糖探针, 即比值小于 0.66. 结果显示: 6 种糖探针属于第一类, 它们是识别唾液酸化糖结合蛋白的 SL, 识别半乳糖结合蛋白的 N-Acetyl-D-lactosamine、3 α , 4 β , 3 α -galactotetraose 和 GalNAc, 以及识别岩藻糖结合蛋白的 LNT、3 α -Fucosyl-N-acetylglucosamine 等. 其中, 糖探针 LNT、N-Acetyl-D-lactosamine、GalNAc 和 3 α , 4 β , 3 α -Galactotetraose 对应的 ratio 值甚至大于 1.5, 同时糖探针 Lewis-Y tetrasaccharide, HA 在 HepG2 中显示无阳性信号, 而 Lewis-Y tetrasaccharide 在 L02 中显示阳性信号. 4 种糖探针属于第三类, 他们是识别甘露糖结合蛋白的糖探针 Man、Man-6-Glycan, 识别葡萄糖结合蛋白的糖探针 Glu, 以及识别木糖结合蛋白的糖探针 Xylose.

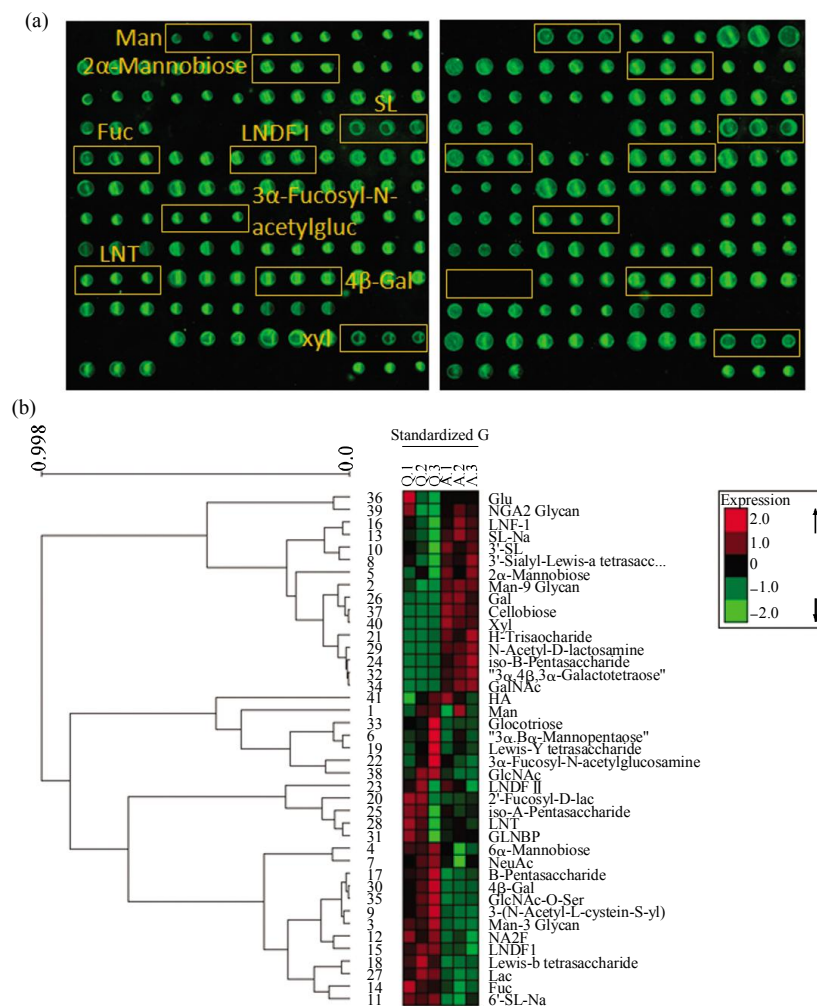


Fig. 1 Glycan-binding protein targeting HepG2 and L02 cells by carbohydrate microarrays

(a) The results of carbohydrate microarray. (b) Heat map and hierarchical clustering of 41 carbohydrates in three biological replicates. Red and green indicate up- and down-regulated GBPs in the HepG2(A1-A3) and L02(Q1-Q3), respectively.

2.4 糖细胞化学验证差异糖结合蛋白

虽然糖芯片显示出肝癌细胞系 HepG2 和 L02 中 GBP 的变化, 但是这些 GBP 在肝癌细胞系中的分布情况并不清楚. 随机选择了 2 种糖探针 NeuAc 和 GalNAc 验证糖芯片结果, 并阐明其特异识别 GBP 在 HepG2 和 L02 细胞中的分布情况. 在细胞中, GBP 被认为主要分布在以下 3 个区域:

胞膜、中央胞质(包括线粒体和中心体)和核周胞质(包括内质网和高尔基体). Cy3 荧光标记的 BSA 作为阴性质控, 单糖抑制实验验证结合特异性. 实验结果显示, Cy3 标记的 BSA 在两种肝癌细胞中均无阳性信号(图 2b 中 a1~a4); NeuAc 和 GalNAc 2 种糖探针的寡糖抑制实验信号明显降低或者显示阴性信号(图 2b 中 b1~b4 和 c1~c4).

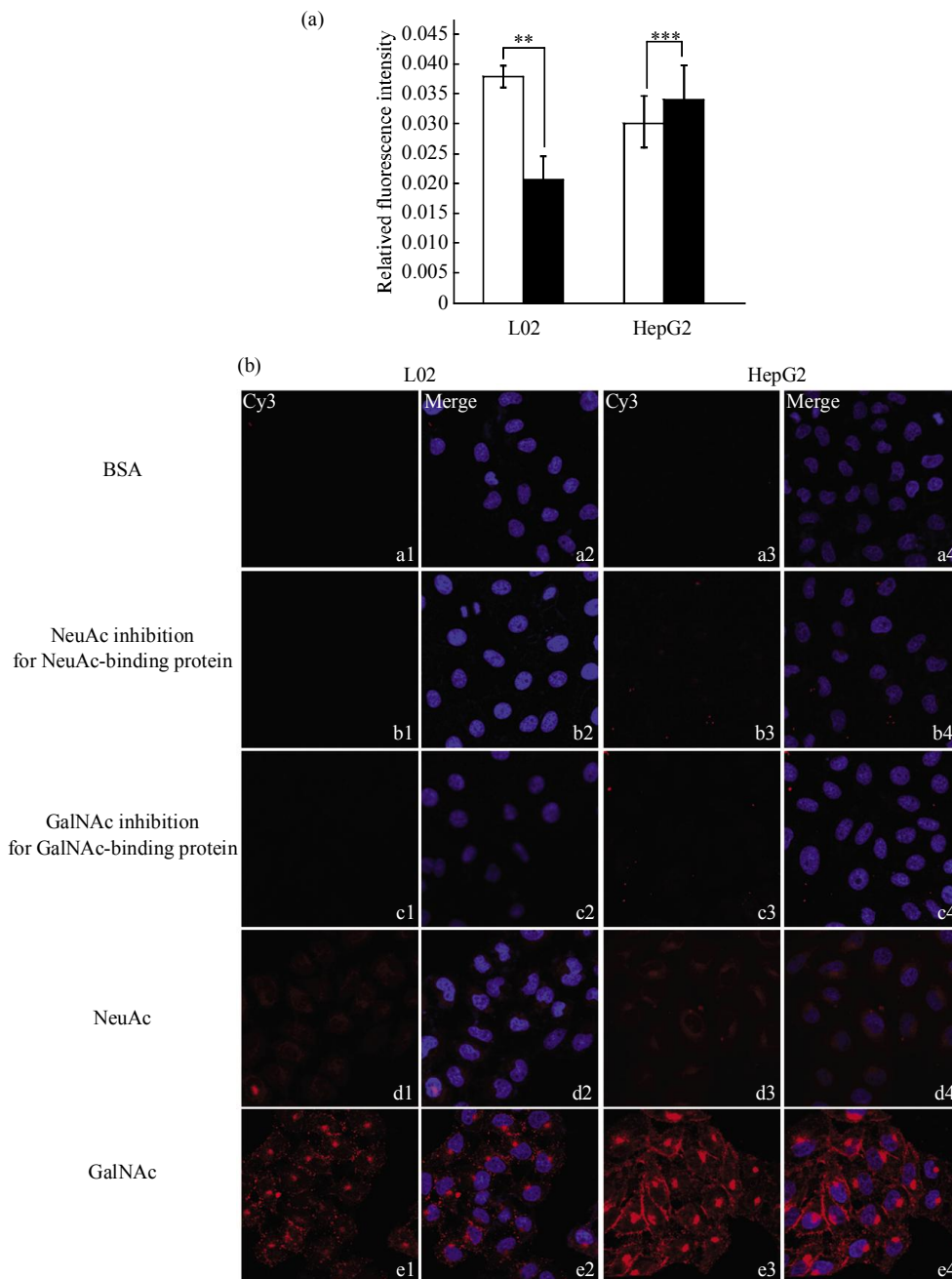


Fig. 2 Validation and localization of altered expression of glycan-binding protein by confocal microscopy (80× objective magnification) in HepG2 and L02 (H/L ratio > 1.5, ratio < 0.67. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.001$)**

(a) Negative control and distribution and expression alteration of O-GalNAc glycosylated proteins. □ : NeuAc; ■ : GalNAc. (b) a1~a4: BSA; b1~b4: NeuAc inhibition NeuAc-binding proteins; c1~c4: GalNAc inhibition GalNAc-binding proteins; d1~d4: NeuAc; e1~e4: GalNAc.

NeuAc 和 GalNAc 2 种糖探针特异性识别 GBP 在 HepG2 和 L02 细胞中的分布结果显示在图 2b 中 d1~d4 和图 2b 中 e1~e4, 并总结在表 1 中. 糖探针 NeuAc(图 2b 中 d1~d4) 识别的 GBPs 主要表达在 L02 的胞膜区及核周胞质区, 而在

HepG2 的相同区域表达减弱; GalNAc(图 2b 中 e1~e4) 识别的 GBPs 主要表达在 HepG2 的胞膜、中央胞质、核周胞质区域, 而在 L02 的相同区域表达减弱, 且阳性信号呈颗粒状分布, 糖细胞化学结果与芯片结果保持一致, 如图 2a 所示.

Table 1 Glycan-binding protein in HepG2 and L02 Cells by histochemistry

Carbohydrate	L02 cell line			HepG2 cell line		
	Cytoplasmic membrane	Central cytoplasm	Perinuclear cytoplasm	Cytoplasmic membrane	Central cytoplasm	Perinuclear cytoplasm
NeuAc	++	±	+++	++	±	++
GalNAc	+++	+	++	+++	++	+++

Binding intensity: +++, Very strong binding; ++, Strong binding; ±, Moderate binding.

3 讨 论

糖结合蛋白(glycan-binding proteins, GBP)通过和糖蛋白糖链或糖脂糖链的相互作用调控细胞间的识别、信号传递、细胞的内吞和细胞内物质的运输、细胞生长、分化及凋亡、外界病原微生物的感染等一些最基本的也是最主要的生物学功能^[24-25]. 目前还没有一套完整的解析与其作用的糖链的方法, 对糖链的研究主要借助于质谱技术^[26-27], 但由于质谱技术自身存在的某些不足, 也不能很好地反映糖链的原始状态. 糖芯片^[20]是研究糖链与糖结合蛋白相互作用及糖组学的最有力的手段, 其根据糖链与 GBP 及糖链间的相互作用, 将不同来源的糖类分子固定于羟基化修饰的玻璃片上, 再用标记好的糖结合蛋白、病毒、细胞、组织等样本进行孵育, 后经一系列处理, 分析检测样本中糖类的变化, 其潜在应用范围甚广, 如抗体特异性分析、GBP 的筛选、病毒对宿主细胞的识别等方面. 由于其具有高通量、快速检测、高灵敏度等优点, 正成为一种大规模筛选糖及阐明糖在机体内作用的标准研究手段. 在本研究中, 使用糖芯片对肝癌细胞系 HepG2 和 L02 差异性表达的 GBP 进行筛选, 用糖细胞化学技术验证糖芯片筛选结果并进一步评估肝癌细胞中 GBP 的分布情况. 在糖探针与 GBP 识别过程中有两个因素值得考虑: a. 糖探针与玻片的固定具有随机性, 且不同的固定方法对糖芯片的灵敏度有一定影响^[28-30]; b. 糖链与 GBP 相互作用时, 其结合力相对较弱, 需要通过多价位点、多个分子相互作

用以及氢键等外力辅助才能提高其结合能力. 一种或两种上述因素造成的影响就可以解释本研究结果中存在的极少数不一致情况. 比如在实验结果中, N-Acetyl-D-lactosamine 对应的 NFIs 在 HepG2 和 L02 中差异明显, 而同样识别乳糖结合蛋白的 Lacose 则没有变化(附件表 S1).

在肝癌的研究中, 蛋白质的糖基化变化在其发生发展过程中普遍存在, 如: 高甘露糖化、岩藻糖化、唾液酸化等, 越来越多的研究表明, 检测某些糖结合蛋白糖基化水平的变化亦能较好地研究这些蛋白质总体水平的变化, 对检测肝癌的发生具有更好的灵敏度和特异性^[31-32]. 在本研究中, 我们检测出肝癌细胞系 HepG2 中识别高甘露糖型、岩藻糖化、唾液酸化糖结合蛋白的探针上调, 这与之前报道的研究结果一致. 该研究指出, 与 L02 相比, 三类糖结合蛋白在 HepG2 中差异表达上调超过 2 倍. 而两类糖结合蛋白在 HepG2 中差异表达下调超过 2 倍. N-糖链是多天线连接于甘露糖核心结构的高度分支寡聚糖, 大多数血清 N-连接糖蛋白都在肝脏和 B 淋巴细胞中合成并分泌, 其中三天线或四天线 N-糖链主要由肝脏合成^[33]. 在本研究中, 平分型 GlcNAc 和双天线 N-糖链识别的 GBP 被检测在 L02 中表达降低, 而在 HepG2 中具有表达上升的趋势, 结果暗示细胞膜上平分型 GlcNAc 和双天线 N-糖链识别的 GBP 表达增多可能与肝癌发生密切相关.

Tn- 抗原 (GalNAc α -Ser/Thr, Tn) 和 T- 抗原 (Gal β 1-3GalNAc α -Ser/Thr, T) 是存在于人类肿瘤细

胞上的特殊糖类抗原, 其表达水平通常与癌症的发生和恶化相关^[34]. 在本研究中, 发现 HepG2 细胞中与识别 Tn 抗原和 T 抗原的糖结合蛋白表达明显增加. 据报道, 在正常状态下, Tn/T 抗原被唾液酸化掩盖或在末尾加上其他糖残基来防止 GBP 的识别和结合^[35-36]. 从本实验结果推测, 在肝癌发生过程中 Tn/T 抗原由于末端的单糖残基逐渐丢失而暴露出来. 同时, GalNAc 识别的 GBP 主要表达在 HepG2 的胞膜、中央胞质、核周胞质区, 而在 L02 的相同区域表达减弱. NeuAc 识别的 GBP 主要表达在 L02 的核周胞质区及胞膜区, 而在 HepG2 的相同区域表达减弱. 这一现象仅仅是巧合还是存在某种内部关联? 本研究发现, GalNAc 和 NeuAc 所识别的 GBP 都可能是 O- 链接的, 之前的研究表明蛋白的 O- 糖基化修饰和各种复杂 O- 糖链的形成都发生在高尔基体, 而这种细胞器正好位于核周胞质区^[37-38]. 同时, 介导细胞间相互作用和细胞信号传导的细胞膜糖蛋白的运输也是通过高尔基体^[39]. 因此推断, 在 HepG2 的细胞膜上表达上调的与 GalNAc 和 NeuAc 对应的 GBP 与细胞信号传导和细胞间信息交换密切相关.

岩藻糖化是一种最常见的糖基化修饰, 通过 α 1-2、 α 1-3/ α 1-4 和 α 1-6 等连键方式将岩藻糖残基加入 N- 糖链、O- 糖链或糖脂上. 岩藻糖基化水平的增加被认为发生在很多病理状态下, 如炎症和癌症^[40-41]. 虽然结果显示, 在 HepG2 中岩藻糖基化糖结合蛋白水平总体呈升高趋势, 但不同连接方式的岩藻糖化糖结合蛋白以不同的方式表达在不同的区域. 如在 HepG2 中, 糖探针 LNF-I、 3α -Fucosyl-N-acetylglucosamine 和 LNT 对应的 GBP 表达增加, 而糖探针 Lewis-Y tetrasaccharide 和 H-Trisaccharide 对应的 GBP 表达减少.

附件 图 S1~S3, 表 S1 见本文网络版附录(<http://www.pibb.ac.cn>)

参 考 文 献

- [1] Muglia C, Mercer N, Toscano M A, *et al.* The glycan-binding protein galectin-1 controls survival of epithelial cells along the crypt-villus axis of small intestine. *Cell Death Dis*, 2011, **2**(2): e163
- [2] Chen W, Smeekens J M, Wu R. A universal chemical enrichment method for mapping the yeast N-glycoproteome by MS. *Mol Cell Proteomics*, 2014, **13**(6): 1563-1572
- [3] Caragea C, Sinapov J, Silvescu A, *et al.* Glycosylation site prediction using ensembles of Support Vector Machine classifiers. *Bmc Bioinformatics*, 2007, **8**(1): 438
- [4] Furmanek A, Hofsteenge J. Protein C-mannosylation: facts and questions. *Acta Biochimica Polonica*, 2000, **47**(3): 781-789
- [5] Stepper J, Shastri S, Loo T S, *et al.* Cysteine S-glycosylation, a new post-translational modification found in glycopeptide bacteriocins. *Febs Letters*, 2011, **585**(4): 645-650
- [6] Oman T J, Boettcher J M, Wang H, *et al.* Sublancin is not a lantibiotic but an S-linked glycopeptide. *Nat Chem Biol*, 2011, **7**(2): 78-80
- [7] Yabu M, Korekane H, Miyamoto Y. Precise structural analysis of O-linked oligosaccharides in human serum. *Glycobiology*, 2014, **24**(6): 542-553
- [8] Kletter D, Singh S, Bern M, *et al.* Global comparisons of lectin-glycan interactions using a database of analyzed glycan array data. *Mol Cell Proteomics*, 2013, **12**(4): 1026-1035
- [9] Jamie H M, Song X Z, Smith D F, *et al.* Preparation and Analysis of Glycan Microarrays. *Curr Protoc Protein Sci*, 2011, CHAPTER: Unit12.10
- [10] Capone F, Guerriero E, Sorice A, *et al.* Synergistic antitumor effect of Doxorubicin and tacrolimus (FK506) on hepatocellular carcinoma cell lines. *Scientific World Journal*, 2014, **20**: 450390
- [11] Chen C H, Lin S T, Kuo C L, *et al.* Clinical significance of elevated alpha-fetoprotein (AFP) in chronic hepatitis C without hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology*, 2008, **55**(85): 1423-1427
- [12] Kreczko S, Lipska A, Wysocka J. Alpha-fetoprotein: diagnostic value in hepatic disorders. *Pol Merkur Lekarski*, 2000, **8**(48): 420-423
- [13] Tuccillo F M, de Laurentiis A, Palmieri C, *et al.* Aberrant Glycosylation as Biomarker for Cancer: Focus on CD43. *Biomed Res Int*, 2014, **2**(13): 1-13
- [14] Meany D L, Chan D W. Aberrant glycosylation associated with enzymes as cancer biomarkers. *Clin Proteomics*, 2011, **8**(1): 7-19
- [15] Ohno M, Nishikawa A, Koketsu M, *et al.* Enzymatic basis of sugar structures of alpha-fetoprotein in hepatoma and hepatoblastoma cell lines: correlation with activities of alpha 1-6 fucosyltransferase and N-acetylglucosaminyltransferases III and V. *Int J Cancer*, 1992, **51**(2): 315-317
- [16] Cheng J, Wang W, Zhang Y, *et al.* Prognostic role of pre-treatment serum AFP-L3% in hepatocellular carcinoma: systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 2014, **9**(1): e87011
- [17] Wang N Y, Wang C, Li W, *et al.* Prognostic value of serum AFP, AFP-L3, and GP73 in monitoring short-term treatment response and recurrence of hepatocellular carcinoma after radiofrequency ablation. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, **15**(4): 1539-1544
- [18] Qin Y N, Zhong Y G, Dang L Y, *et al.* Alteration of protein glycosylation in human hepatic stellate cells activated with transforming growth factor- β 1. *Journal of Proteomics*, 2012, **75**(13): 4114-4123
- [19] Yang G L, Chu W, Zhang H, *et al.* Isolation and identification of mannose-binding proteins and estimation of their abundance in sera from Hepatocellular Carcinoma patients. *Proteomics*, 2013,

- 13: 1–15
- [20] Muthana S M, Gildersleeve J C. Glycan microarrays: powerful tools for biomarker discovery. *Cancer Biomark*, 2014, **14**(1): 29–41
- [21] Nan G, Yan H, Yang G L, *et al.* The hydroxyl-modified surfaces on glass support for fabrication of carbohydrate microarrays. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2009, **10**(1): 138–146
- [22] Yu H J, Zhu M Z, Qin Y N, *et al.* Analysis of glycan-related genes expression and glycan profiles in mice with liver fibrosis. *Journal of Proteome Research*, 2012, **11**(11): 5277–5285
- [23] Heimburg Mo, Song X, Smith D F, *et al.* Preparation and analysis of glycan microarrays. *Curr Protoc Protein Sci*, 2011, **64**(12): 1–29
- [24] Toscano M A, Campagna L, Molinero L L, *et al.* Nuclear factor (NF)- κ B controls expression of the immunoregulatory glycan-binding protein galectin-1. *Mol Immunol*, 2011, **48** (15–16): 1940–1949
- [25] Ajit V, Marilynn E, Richard D C, *et al.* Discovery and classification of glycan-binding proteins. *Essentials of Glycobiology*, 2nd, Chapter 26
- [26] Halim A, Rüetschi U, Larson G, *et al.* LC-MS/MS characterization of O-glycosylation sites and glycan structures of human cerebrospinal fluid glycoproteins. *J Proteome Res*, 2013, **12** (2): 573–584
- [27] Segu Z M, Hussein A, Novotny M V, *et al.* Assigning N-glycosylation sites of glycoproteins using LC/MSMS in conjunction with endo-M/exoglycosidase mixture. *J Proteome Res*, 2010, **9** (7): 3598–3607
- [28] Bohorov O, Andersson-Sand H, Hoffmann J, *et al.* Arraying glycomics: a novel Bi-functional spacer for one-step microscale derivatization of free reducing glycans. *Glycobiology*, 2006, **16**(12): 21–27
- [29] Song E H, Pohl N L B. Carbohydrate arrays: recent developments in fabrication and detection methods with applications. *Curr Opin Chem Biol*, 2009, **13**: 626–632
- [30] Wendeln C, Heile A, Arlinghaus H F, *et al.* Carbohydrate microarrays by microcontact printing. *Langmuir*, 2010, **26** (7): 4933–4940
- [31] Wang P H. Altered glycosylation in cancer: sialic acids and sialyltransferases. *J Cancer Mol*, 2005, **1**(2): 73–81
- [32] Dennis J W, Granovsky M, Warren C E. Glycoprotein glycosylation and cancer progression. *Biochim Biophys Acta*, 1999, **1473** (1): 21–34
- [33] Vanhooren V, Liu X E, Franceschi C, *et al.* N-glycan profiles as tools in diagnosis of hepatocellular carcinoma and prediction of healthy human ageing. *Mech Ageing Dev*, 2009, **130**(1–2): 92–97
- [34] Springer G F. T and Tn, general carcinoma autoantigens. *Science*, 1984, **224**(4654): 1198–1206
- [35] Carrilho C, Cantel M, Gouveia P, *et al.* Simple mucin-type carbohydrate antigens (Tn, Sialosyl-Tn, T and Sialosyl-T) and Gp 230 mucin-like glycoprotein are candidate markers for neoplastic transformation of the human cervix. *Virchows Arch*, 2000, **437**(2): 173–179
- [36] Cazet A, Julien S, Bobowski M, *et al.* Tumour-associated carbohydrate antigens in breast cancer. *Breast Cancer Res*, 2010, **12**(3): 204–215
- [37] Hebert D N, Garman S C, Molinari M. The glycan code of the endoplasmic reticulum: asparagine-linked carbohydrates as protein maturation and quality-control tags. *Trends Cell Biol*, 2005, **15**(7): 364–370
- [38] De Graffenried C L, Bertozzi C R. The roles of enzyme localisation and complex formation in glycan assembly within the golgi apparatus. *Curr Opin Cell Biol*, 2004, **16**(4): 356–363
- [39] Pearse B R, Hebert D N. Lectin chaperones help direct the maturation of glycoproteins in the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta*, 2010, **1803**(6): 684–693
- [40] Miyoshi E, Moriwaki K, Nakagawa T. Biological function of fucosylation in cancer biology. *J Biochem*, 2008, **143**(6): 725–729
- [41] Tanabe K, Deguchi A, Higashi M, *et al.* Outer arm fucosylation of N-glycans increases in sera of hepatocellular carcinoma patients. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, **374**(2): 219–225

Altered Expression of Glycan-binding Protein in Hepatocellular Carcinoma Cell Lines*

ZHONG Yao-Gang, QIN Xin-Min, DU Hao-Qi, DANG Liu-Yi, LI Zheng**

(Laboratory for Functional Glycomics, College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract Glycan-binding protein play important biological roles in biological processes. We use carbohydrate microarray to study the alteration of GBP in hepatocellular carcinoma cell line HepG2 and L02. Carbohydrate histochemistry was used to further validate the GBP and assess the distribution. As a result, 8 carbohydrate probes (*e. g.* SL, LNT, and GalNAc) showed increased signal while 5 carbohydrate probes (*e. g.* Man, Man-9-Glycan, and Xyl) showed decreased signal in HepG2 compared with L02 cell line. Meanwhile, GalNAc staining showed moderate binding to the cytoplasmic membrane, central cytoplasm, and perinuclear cytoplasm in the L02, and the binding intensified in the same regions of the HepG2. NeuAc staining showed moderate binding to the cytoplasmic membrane, and perinuclear cytoplasm in the HepG2, and the binding intensified in the same regions of the L02. In conclusion, the precision alteration of GBP related to HepG2 may provide useful information to find new molecular mechanism of hepatocellular carcinoma and antitumor therapeutic strategies.

Key words carbohydrate microarray, glycan binding protein(GBP), L02/HepG2

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2014.00100

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (81372365, 30870549).

**Corresponding author.

Tel: 86-29-88303446, E-mail: zhengli@nwu.edu.cn

Received: April 9, 2014

Accepted: June 19, 2014

附录

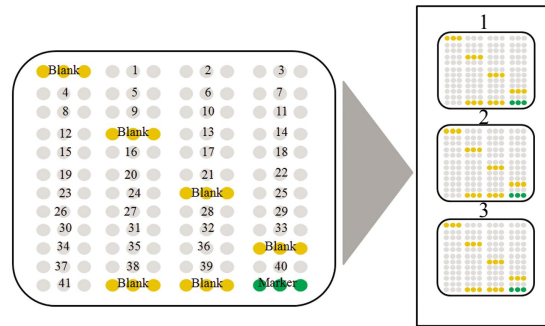


Fig. S1 The layout of carbohydrate microarray
 Gray: carbohydrate. Green: Cy3-BSA; Yellow: negative control.

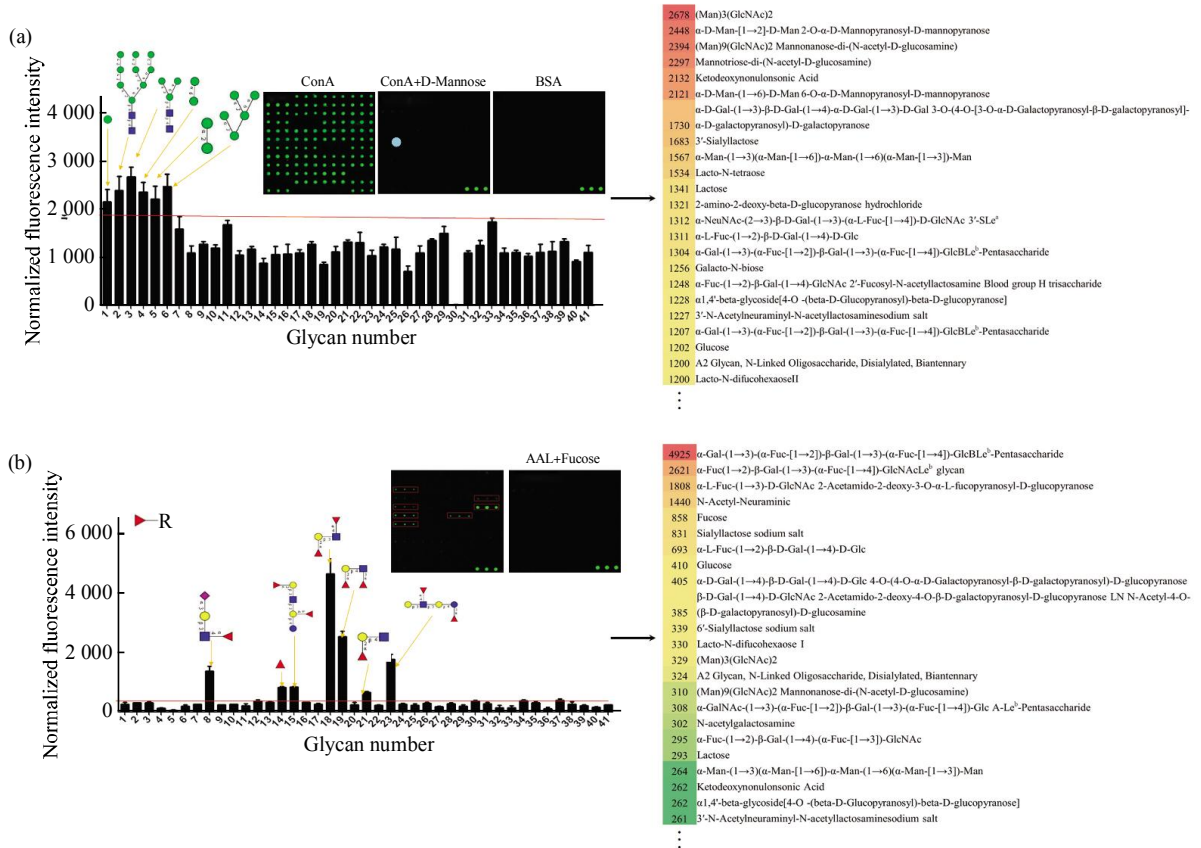


Fig. S2 The specificity of carbohydrate microarray

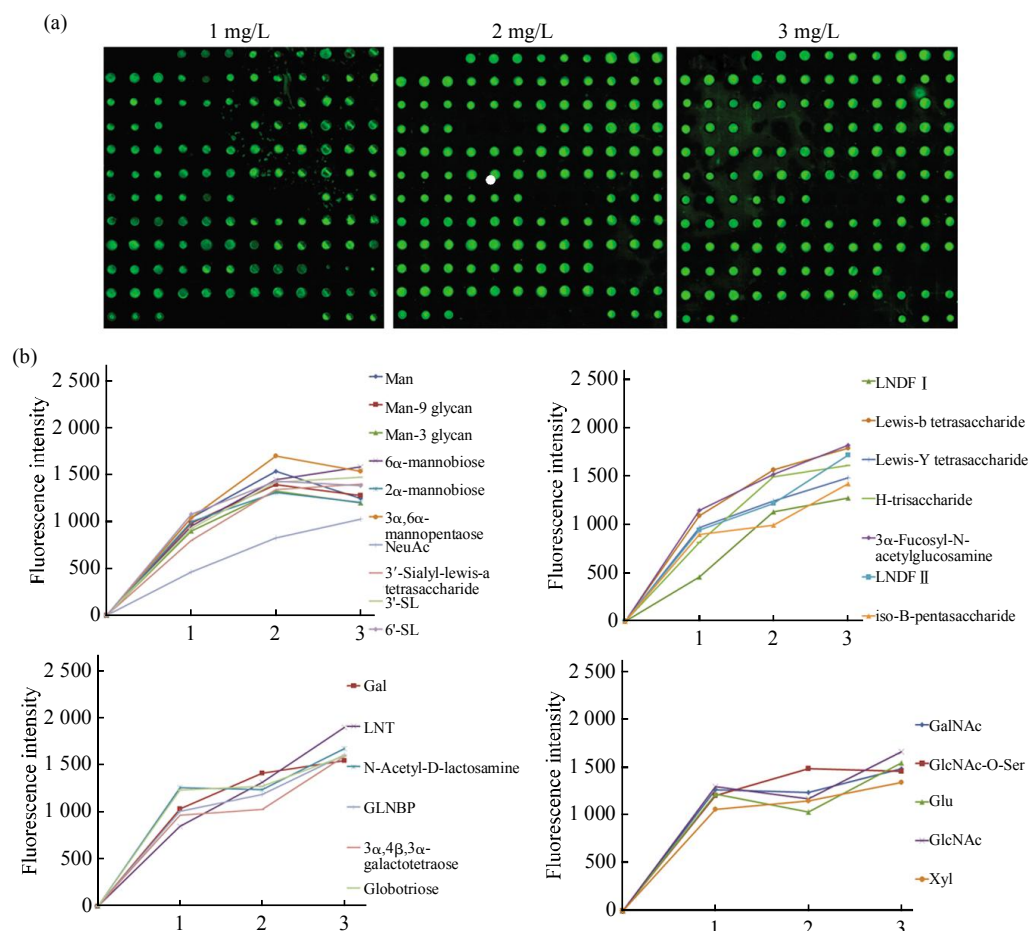


Fig. S3 1 mg/L, 2 mg/L, 3 mg/L of Cy3-labelled total protein extracted from HepG2 diluted with incubation buffer was applied to the carbohydrate microarrays respectively


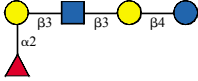



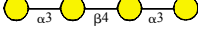






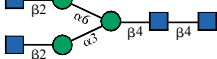

Table S1 Differential Glycan-binding protein between HepG2 and L02 by Carbohydrate microarray analysis based on data of 41 carbohydrates giving significant signals

No.	Common name	Glycan structure	Normalized fluorescent intensity (NFI) \pm SD ^a		H/L ^b Ratio
			L02	HepG2	
1	Man		0.031 \pm 0.0025	0.021 \pm 0.004	0.66
2	Man-9 Glycan		0.025 \pm 0.003	0.015 \pm 0.0009	0.60**
3	Man-3 Glycan		0.031 \pm 0.003	0.024 \pm 0.0007	0.75
4	6 α -Mannobiose		0.032 \pm 0.001	0.027 \pm 0.0031	0.86
5	2 α -Mannobiose		0.022 \pm 0.006	0.026 \pm 0.0043	1.18
6	3 α , 6 α -Mannopentaose		0.022 \pm 0.008	0.023 \pm 0.0042	1.10

Continued

No.	Common name	Glycan structure	Normalized fluorescent intensity (NFI)±SD ^a		H/L ^b Ratio
			L02	HepG2	
7	NeuAc		0.038±0.002	0.030±0.0045	0.79**
8	3'-Sialyl-Lewis-a tetrasaccharide		0.022±0.008	0.025±0.004	1.11
9	3-(N-Acetyl-L-cystein-S-yl		0.027±0.005	0.025±0.0008	0.96
10	3'-SL		0.026±0.005	0.022±0.0020	0.99
11	6'-SL		0.024±0.001	0.026±0.0037	1.12
12	NA2F		0.028±0.002	0.027±0.0023	0.94
13	SL		0.019±0.004	0.026±0.0026	1.39**
14	Fuc		0.023±0.004	0.019±0.0025	0.85
15	LNDF I		0.023±0.002	0.027±0.0033	1.16*
16	LNF-I		0.019±0.008	0.023±0.0039	1.26*
17	B-Pentasaccharide		0.019±0.007	0.024±0.0031	1.25**
18	Lewis-b tetrasaccharide		0.026±0.002	0.024±0.0005	0.91
19	Lewis-Y tetrasaccharide		0.020±0.003	***	***
20	2'-Fucosyl-D-lac		0.021±0.006	0.025±0.0005	1.15
21	H-Trisaccharide		0.029±0.001	0.025±0.0047	0.87
22	3α-Fucosyl-N-acetylglucosamine		0.020±0.008	0.027±0.0035	1.36*
23	LNDF II		0.022±0.009	0.026±0.0074	1.19
24	iso-B-Pentasaccharide		0.028±0.001	0.025±0.0047	0.89
25	iso-A-Pentasaccharide		0.022±0.005	0.026±0.0013	1.17
26	Gal		0.020±0.001	0.021±0.0043	1.03

Continued

No.	Common name	Glycan structure	Normalized fluorescent intensity (NFI)±SD ^a		H/L ^b Ratio
			L02	HepG2	
27	Lac		0.032±0.004	0.024±0.002	0.77*
28	LNT		0.018±0.012	0.024±0.0027	1.57*
29	N-Acetyl-D-lactosamine		0.018±0.0005	0.027±0.0023	1.53*
30	4β-Gal		0.037±0.007	0.028±0.0007	0.76
31	GLNBP		0.022±0.012	0.027±0.0018	1.23
32	3α, 4β, 3α-Galactotetraose		0.019±0.001	0.028±0.0033	1.48*
33	Globotriose		0.028±0.012	0.031±0.001	1.13
34	GalNAc		0.020±0.001	0.034±0.0034	1.64**
35	GlcNAc-O-Ser		0.027±0.007	0.028±0.0016	1.04
36	Glu		0.037±0.013	0.022±0.0002	0.58*
37	Cellobiose		0.021±0.0002	0.029±0.0031	1.35*
38	GlcNAc		0.021±0.01	0.027±0.0029	1.27
39	NGA2 Glycan		0.027±0.009	0.027±0.002	1.01
40	Xyl		0.029±0.0005	0.018±0.0031	0.606*
41	HA	/	***	****	****

^a Signal intensities obtained from 9 repeated blocks in three repeated slides were normalized and averaged, and the ratios of HepG2 *vs.* L02(H/L) were calculated. ^b **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001.