

基于凝集素芯片的不同转移潜能 肝癌细胞膜蛋白糖谱比较*

王念^{1, 2)} 康晓楠^{1, 2)} 刘银坤^{1, 2)**} 郭坤¹⁾ 崔杰峰¹⁾
 孙瑞霞¹⁾ 陈洁¹⁾ 赵燕¹⁾ 陈培¹⁾

(¹⁾复旦大学中山医院肝癌研究所, 上海 200032; ²⁾复旦大学生物医学研究院癌症研究中心, 上海 200032)

摘要 评估采用凝集素芯片技术寻找肝癌细胞表面侵袭和转移相关特征性糖谱的适用性。首先选取一对模式细胞株(中华仓鼠卵巢细胞 CHO 和其 N-乙酰葡萄糖胺转移酶 I 缺陷株 Lec1)验证凝集素芯片系统的可靠性。然后通过凝集素芯片比较正常肝细胞 L02、非转移肝癌细胞 Hep3B、高转移肝癌细胞 HCCLM3 的细胞表面糖谱, 同时采用细胞凝集素组织化学的方法验证芯片结果。细胞 Hep3B 和 L02 相比, 对凝集素 PHA-L、ConA、AAL、MPL 的亲合作用增强而对凝集素 WGA 的亲合作用减弱, 提示在肝癌细胞表面可能出现了增多的复杂寡糖分支、高甘露糖、末端岩藻糖、黏蛋白 T 抗原和减少的 N-乙酰葡萄糖胺和/或多价唾液酸结构。细胞 HCCLM3 和 Hep3B 相比, 对凝集素 LCA、MAL-I、MAL-II、WGA、PHA-E 的亲合作用增强而对凝集素 RCA-I 的亲合作用减弱, 提示在高转移肝癌细胞 HCCLM3 的表面可能出现了增多的核心岩藻糖、唾液酸(主要是 α 2-3 链接方式)、N-乙酰葡萄糖胺、平分型 GlcNAc 结构以及减少的末端 β 1-4 链接半乳糖结构。细胞凝集素组织化学的结果支持芯片结果。研究证明, 凝集素芯片技术是解析生物学进程中糖谱改变的适用工具。

关键词 凝集素芯片, 肝癌, 糖, 转移

学科分类号 R735.7, Q53

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00120

肝癌是世界上恶性程度最高的肿瘤之一, 由于较高的转移率和复发率, 病人 5 年生存率低, 预后较差^[1]。包括肝癌细胞在内, 绝大多数的肿瘤细胞膜蛋白都经过糖基化修饰, 而且在肿瘤的侵袭转移进程中, 某些糖基化修饰会随着疾病进程发生改变, 因此, 寻找这些特征性改变的糖链结构对于肿瘤的早期诊断、进程监测、预后评估以及治疗靶点的寻找都能提供重要信息。虽然当前已经有许多糖分析技术用于寻找糖修饰的改变, 比如质谱技术(mass spectrometry)、亲和色谱技术(affinity chromatography)、核磁共振(nuclear magnetic resonance)等, 但是它们都不能以高通量的方式解析糖谱。凝集素芯片是 2005 年出现的一种新的糖分析技术^[2], 可以同时检测一系列糖链和凝集素的结合谱图。它通常是将各种植物凝集素以一定的空间距离固定在固体支撑物上, 再用荧光标记的样本去检测芯片。也可固定荧光标记的凝集素, 用未标记的样本去探测芯片, 但后者需要更为复杂的荧光检测系统^[3]。我们实验室建立了一种凝胶基质的凝

集素芯片, 包含 13 种和肿瘤进程相关的凝集素。在我们早期工作中, 用它成功地区分出不同来源的甲胎蛋白 AFP 的 N-糖谱^[4]。在本次工作中, 采用凝集素芯片比较了正常肝细胞、非转移肝癌细胞以及高转移肝癌细胞表面糖结构, 寻找肿瘤侵袭和转移相关的特征性糖链谱图。

1 材料与方法

1.1 材料

凝集素购自美国 Vector 公司, Cy3-monofunctional dye 购自美国 GE 公司。天然膜蛋白提取试剂盒 ProteoExtract™ Native Membrane Extraction Kit 购自德国 Merk 公司。凝胶基质芯片购自北京博奥公司。芯片点样仪 Smart Arrayer-48

* 国家高技术研究发展计划(863)(2006AA02A308)和国家重大传染病防治专项资助项目(2008ZX10002-021, -017)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 021-64041990-2501, E-mail: liu.yinkun@zs-hospital.sh.cn

收稿日期: 2009-03-01, 接受日期: 2009-05-22

和荧光扫描仪 LuxScan 3.0 由北京博奥公司提供。中华仓鼠卵巢细胞 CHO 和其糖基转移酶缺陷株 Lec1 购自中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所。正常人肝细胞株 L02 为复旦大学中山医院肝癌研究所保存。非转移人肝癌细胞株 Hep3B 由美国康奈尔大学惠赠。高转移人肝癌细胞株 HCCLM3 为复旦大学中山医院肝癌研究所构建。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和收集。CHO 细胞用 Ham’s F12K 培养液培养，Lec1 和 Hep3B 细胞用 α -MEM 培养液培养，L02 细胞用 RPMI1640 培养液培养，HCCLM3 细胞用 DMEM 培养液培养。所有培养液中均添加 10%胎牛血清，置于含 5%CO₂ 的细胞培养箱培养。待细胞生长至 $5\times10^6\sim10\times10^6$ 时，经 PBS 清洗 2 次，加入 2 ml 0.5 mol/L PBS 配制的 EDTA，孵育 10 min 后，加样器枪头吹打收集细胞，500 g, 4℃ 离心 10 min。再经 PBS 清洗 2 次去除 EDTA，细胞重悬于 200 μ l PBS 备用。

1.2.2 细胞膜蛋白荧光标记。Cy3-monofunctional dye 1 支加入 50 μ l DMSO，充分吹打混匀后，取 10 μ l 染料 /DMSO 混和液加入到 200 μ l 细胞悬液中混匀，4℃ 避光孵育 2 h 标记细胞表面膜蛋白，

每 20 min 搅拌 1 次避免细胞成团。标记完成后，用天然膜蛋白提取试剂盒配置的洗涤缓冲液清洗 3 次，每次 1 ml 去除多余的染料，吸尽液体，液氮速冻终止标记反应，将样品储存于 -80℃ 备用。

1.2.3 膜蛋白提取。依照天然膜蛋白提取试剂盒用法说明书提取膜蛋白。首先加入 10 μ l Protease inhibitor cocktail，并快速加入 2 ml 提取缓冲液 I，加样器枪头混匀细胞悬液，4℃ 孵育 10 min，轻微震荡，避免细胞沉淀成团。随后 16 000 g，4℃ 离心 15 min，吸走上清即为非膜蛋白成分。沉淀部分再次加入 5 μ l Protease inhibitor cocktail，并快速加入 1 ml 提取缓冲液 II，4℃ 孵育 30 min，轻微震荡，再经 16 000 g，4℃ 离心 15 min，上清即为膜蛋白。

1.2.4 凝集素芯片点制。13 种肿瘤相关的凝集素分别以 1 g/L 的浓度溶于点样液，经芯片点样仪点制在凝胶基片上。凝集素列表及其特异性结合的糖链见表 1。每个点的直径是 150 μ m，两点之间间距 400 μ m，每种凝集素重复点 4 个点。点样之后，将凝胶芯片置于孵箱，湿度大于 80%，25℃ 抽真空过夜固定点制的凝集素。

Table 1 Lectins used in the array and their carbohydrates binding specificities

Lectins	Sugar binding specificity
Aleuria aurantia lectin (AAL)	Terminal α Fuc and $\pm$ Sia-Le ^x
Concanavalin A (ConA)	α -Man (inhibited by presence of bisecting GlcNAc)
Datura stramonium lectin (DSA)	> Biantennary, (GlcNAc) _n , polyLacNAc and LacNAc(NA3, NA4)
Lens culinaris agglutinin (LCA)	Fuc α 1-6GlcNAc and α -Man, α -Glc
Maackia amurensis lectin I (MAL I)	Sia α 2-3Gal
Maackia amurensis lectin II (MAL II)	Sia α 2-3Gal
Maclura pomifera lectin (MPL)	Gal β 1-3GalNAc α -Thr/Ser(T)and GalNAc α -Thr/ Ser (Tn)
Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L)	Tetraantennary, complex oligosaccharides
Phaseolus vulgaris erythroagglutinin (PHA-E)	NA2 and bisecting GlcNAc
Phaseolus vulgaris erythroagglutinin (PHA)	Both of them
Ricinus communis agglutinin I (RCA I)	Lac/LacNAc
Sambucus nigra lectin (SNA)	Sia α 2-6Gal/GalNAc
Wheat germ agglutinin (WGA)	(GlcNAc) _n and multivalent Sia

1.2.5 凝集素芯片杂交。芯片经 100 μ l 0.1% Tris-HCl 室温孵育 1 h 封闭非特异结合位点，然后用 0.1%TBS-Tween 20 溶液清洗 3 次，每次 5 min。水平式离心机 1 500 r/min 离心 3 min 甩干液体。10 μ g Cy3 标记的膜蛋白悬于 TBS (1 mmol/L Ca²⁺,

2 mmol/L Mg²⁺)中，总体积 40 μ l，加入每格芯片围栏，室温振摇孵育 2 h，以利于标记的膜蛋白和芯片上的凝集素结合。孵育完毕，0.1% TBS-Tween 20 溶液清洗 3 次，每次 15 min，之后浸入 PBS 中 5 min，洗去未结合的蛋白质。最后 1 500 r/min 离

心 3 min 甩干液体。

1.2.6 凝集素芯片扫描和分析. 用荧光扫描仪 LuxScan 3.0 扫描膜蛋白和凝集素芯片的结合信号, 每个点的荧光信号读数减去背景荧光读数之后所得的值纳入后续统计学分析. 采用中位值矫正的方法对不同芯片的荧光读数进行荧光偏差矫正. 矫正后的值每 4 个重复点计算均值和离均差, 再经 SAM version 2.10 软件进行 t 检验分析, 倍数改变 ≥ 1.5 和 $P < 0.01$ 的两组样本差异被认为具有显著性意义.

1.2.7 细胞凝集素组织化学. 肝癌细胞株 L02、Hep3B、HCCLM3 在 24 孔板里培养, 至 60%~80% 融合时进行实验. 首先, 细胞用冷的多聚甲醛固定 15 min, PBS 洗 3 次后, 分别每孔加入生物素标记的 ConA、LCA、WGA、RCA-I 和 PHA-E (5 mg/L, 用含 5% BSA 的 PBST 配制), 室温振摇孵育 30 min 后, PBS 清洗 3 次. 再加入 Streptavidin-Alexa fluor 488 (1:1 000, 用含 5% BSA 的 PBST 稀释), 室温振摇孵育 30 min, PBS 清洗 3 次. 最后, 细胞和 DAPI (300 nmol/L, 用 PBS 配制) 室温孵育 5 min, 经 PBS 清洗 3 次后, 荧光倒置显微镜下观察. 所有拍摄细胞图像的显微镜设置条件均相同.

2 结 果

2.1 细胞株 CHO 和 Lec1 的细胞表面糖谱差异证明芯片系统可靠

图 1a、1b 分别显示的是凝集素芯片的点印模式和单糖信号表示图. 我们首先扫描了 CHO 的细胞表面糖谱, 观察到较强的对凝集素 PHA-L、MAL-I、MAL-II 的结合信号和相对较弱的对 PHA-E 和 SNA 的结合信号. 比较 CHO 和 Lec1 细胞, 发现后者表现出对凝集素 PHA-L、PHA-E 的亲合减弱与对凝集素 ConA 的亲合增强作用 (图 2a、2b). 这些结果与文献报道相符. 我们将同一个样本前后 3 次进行芯片检测, 以及采用不同批次制备的样品在同一次芯片系统进行检测, 都得到了重复的芯片数据.

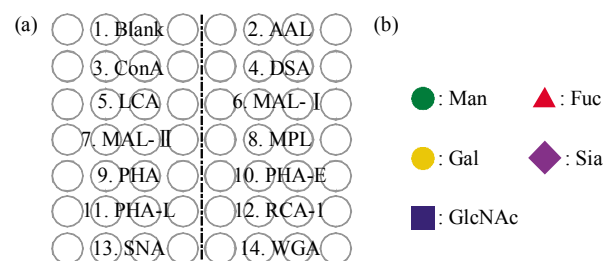


Fig. 1 Lectin microarray system

(a) Lectin microarray format. (b) Monosaccharide symbols used in this article.

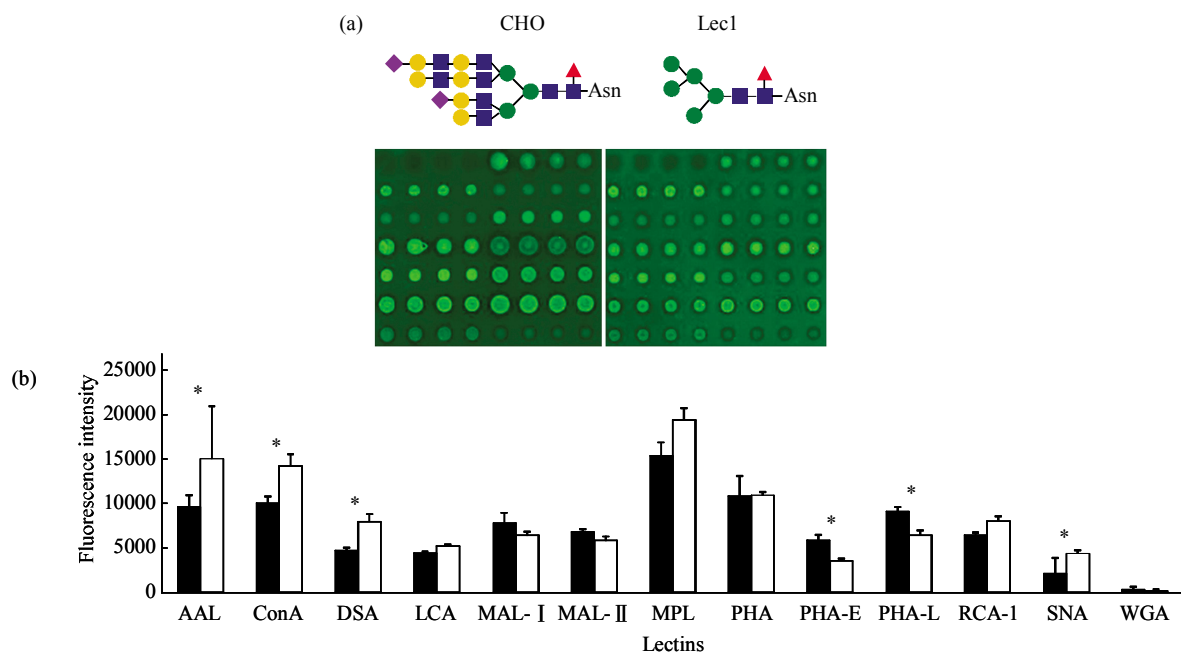


Fig. 2 Validation of the lectin array system

(a) Predicted representative structures of N-glycans synthesized in the cell lines are shown by monosaccharide symbols. Cy3-labeled CHO, Lec1 membrane proteins were allowed to bind with lectin array and bound membrane proteins were detected by the fluorescent scanner. (b) Differential profiling of CHO and its glycosylation-defective mutants Lec1. Data are the $\bar{x} \pm s$ of quadruple determinants and analyzed as described in **Materials and methods**. * $P < 0.01$. ■: CHO; □: Lec1.

2.2 正常肝细胞株 L02 和非转移肝癌细胞株 Hep3B 细胞表面糖谱比较

采用凝集素芯片比较正常肝细胞 L02 和肝癌细胞株 Hep3B，发现，肝癌细胞表面表现出对凝集素 PHA-L、ConA、AAL 以及 MPL 的亲

能出现了复杂寡糖分支、高甘露糖结构、末端岩藻糖结构、黏蛋白 T 抗原结构增加和 N- 乙酰葡萄糖胺结构和 / 或多价唾液酸结构减少(图 3a, 3b)。采用生物素标记的凝集素 ConA、LCA、WGA，通过细胞表面凝集素组织化学的方法验证芯片的结果(图 3c)，二者一致，证明芯片结果是可靠的。

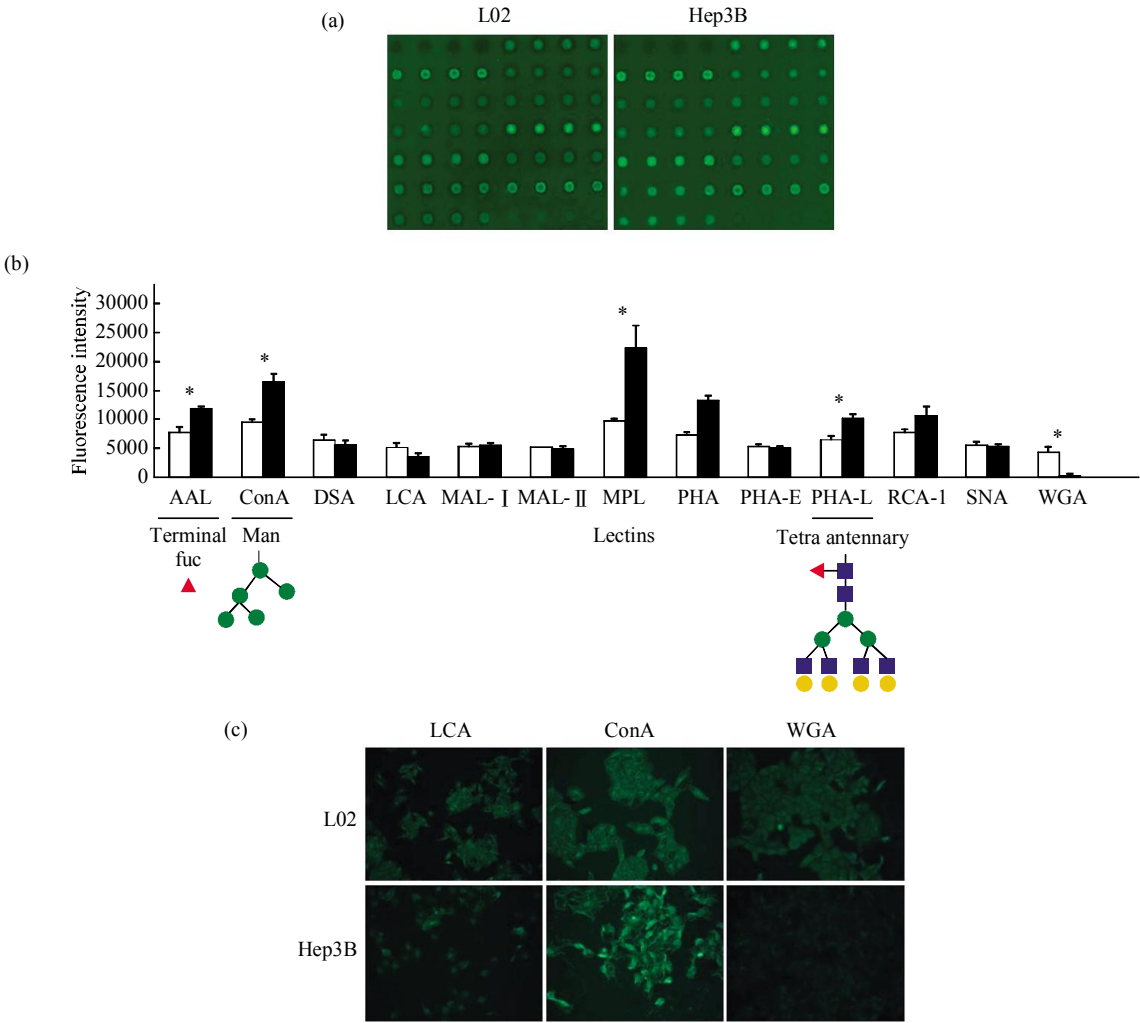


Fig. 3 Different glycan profiling on cell surface between L02 and Hep3B

(a) Cy3-labeled L02 and Hep3B membrane proteins were allowed to bind with lectin microarray. Bound membrane proteins were scanned with fluorescent scanner. (b) Differential glycan profiling of L02 and Hep3B from lectin array. Data are the $\bar{x} \pm s$ of quadruple determinants and analyzed as described in **Materials and methods**. Predicted representative structures synthesized in the 2 cell lines are shown by monosaccharide symbols. * $P < 0.01$. □: L02; ■: Hep3B. (c) Validation of microarray results for L02, Hep3B by means of fluoresceinated lectin staining.

2.3 非转移肝癌细胞株 Hep3B 和高转移肝癌细胞株 HCCLM3 细胞表面糖谱比较

采用凝集素芯片比较非转移肝癌细胞株 Hep3B 和高转移潜能肝癌细胞 HCCLM3 细胞表面糖谱，发现，高转移株 HCCLM3 表现出对凝集素 LCA、MAL- I、MAL- II、WGA 和 PHA-E 亲和作用的增强以及对凝集素 RCA- I 亲和作用的减弱

(图 4a, 4b)，提示在 HCCLM3 细胞表面可能存在增多的核心岩藻糖、唾液酸(主要是 $\alpha 2-3$ 链接方式)、N- 乙酰葡萄糖胺、平分型 GlcNAc 以及减少的末端 $\beta 1-4$ 链接半乳糖结构。选取生物素标记的凝集素 LCA、PHA-E 和 RCA-I，通过细胞表面凝集素组织化学的方法验证芯片结果(图 4c)，二者一致，证明芯片结果是可靠的。

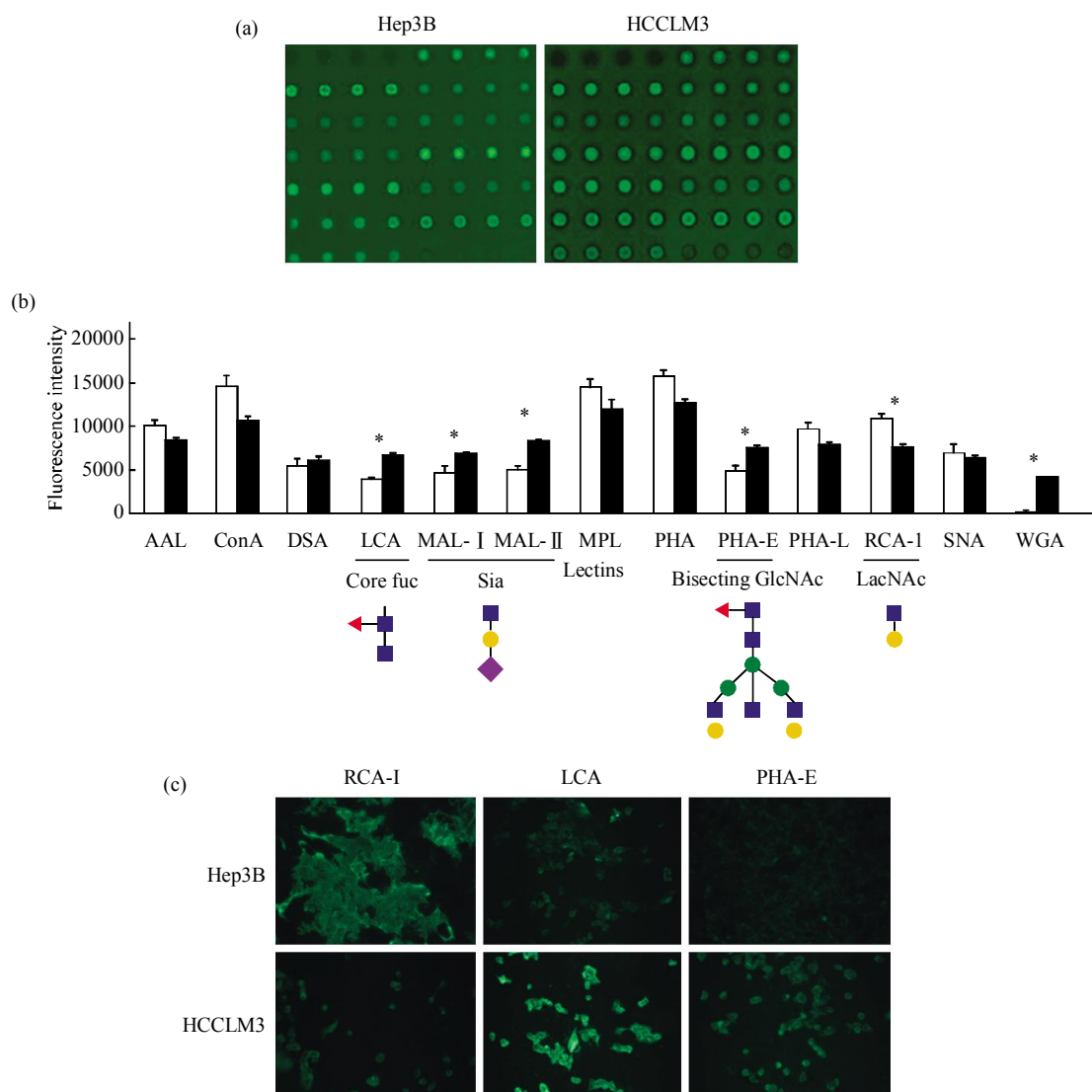


Fig. 4 Different glycan profiling on cell surface between Hep3B and HCCLM3

(a) Cy3-labeled Hep3B and HCCLM3 membrane proteins were allowed to bind with lectin microarray. Bound membrane proteins were scanned with fluorescent scanner. (b) Differential glycan profiling of Hep3B and HCCLM3 from lectin array. Data are the $\bar{x} \pm s$ of quadruple determinants and analyzed as described in **Materials and methods**. Predicted representative structures synthesized in the 2 cell lines are shown by monosaccharide symbols. * $P < 0.01$. □: Hep3B; ■: LM3. (c) Validation of microarray results for Hep3B and HCCLM3 by means of fluoresceinated lectin staining.

3 讨 论

继基因组学、蛋白质组学之后，糖组学作为一门新兴的学科正日益受到人们关注。糖组学是对糖链组成及功能进行研究的一门新学科，其研究内容主要分为三部分：结构糖组学、功能糖组学以及生物信息学。其中结构糖组学的研究主要聚焦在质谱技术的发展，但是质谱在区分糖异质体时仍然存在困难，而且不能以高通量的方式提供糖结构信息。结构糖组学的另一可选途径是“基于凝集素的糖谱”，即通过凝集素亲和技术提取样本的核心糖谱

信息。凝集素是生物体内天然的糖链解码器，具有对特定糖链专一的结合能力，而且在区分糖异质体方面存在可观的优势。将多种凝集素按一定模式固定在基质上，再用样本去探测，根据凝集素和样本的结合情况就可以推测样本所携带的多种糖链的谱图。基于此种背景，凝集素芯片作为质谱技术的互补技术诞生了。

我们实验室建立了一种凝胶基质的凝集素芯片。它通过物理吸附作用固定点样的凝集素，由于没有共价键的产生，不会破坏凝集素的三维立体结构。同时凝胶基质为蛋白质分子提供亲水的环境，

最大程度保持点样凝集素的亲和活性. 在我们的早期工作中我们检测了几种糖蛋白标准品的糖谱, 并比较了脐血来源的 AFP 和肝癌来源的 AFP 的 N-糖谱差异. 本次工作中尝试将凝集素芯片应用于更为复杂的生物样本的糖谱比较, 评估凝集素芯片解析疾病相关糖谱信息的适用性.

首先, 为了验证凝集素芯片系统是否可行, 选用了两株模式细胞 CHO 和 Lec1. Lec1 是 CHO 的 N-乙酰葡萄糖胺转移酶 I (N-acetylglucosaminyltransferase I) 缺陷株, 二者有已知的细胞表面特征性的糖链改变. 据文献报道, CHO 表达复杂寡糖且 3、4 天线结构多于平分型 GlcNAc 结构^[5,6], 我们在芯片上相应地观察到对凝集素 PHA-L 的亲合作用强于 PHA-E. CHO 的另一特征性糖链结构是高表达 α 2-3 链接唾液酸, 低表达 α 2-6 链接唾液酸^[9], 在芯片上, 则观察到对凝集素 MAL- I、MAL- II 的强亲和信号和对凝集素 SNA 的弱亲和信号. 另外, Lec1 细胞由于缺少 N-乙酰葡萄糖胺转移酶 I, 理论上会比 CHO 细胞减少表达复杂寡糖分支和杂合型寡糖, 而以增多表达甘露糖链作为补偿^[7,8], 在芯片上相应可以观察到对凝集素 PHA-L、PHA-E 亲和作用的减弱和对 ConA 亲和作用的增强. 这些结果表明, 通过凝集素芯片我们不但捕捉到细胞表面的糖链特征, 还成功鉴别出两株细胞间精细的糖链谱图差异. 由此, 可以将凝集素芯片进一步应用于比较不同肝细胞表面的糖链结构差异, 寻找肿瘤侵袭和转移相关的特征性糖谱.

已有大量的研究证明, 糖链的变化与肝癌的发生发展密切相关, 其中最常见的是 N-糖链分支的增加, 肿瘤细胞中增加的 N-糖链分支主要是 β 1-6 分支. β 1-6 分支结构的增加是由生成这一结构的糖基转移酶 N-acetylglucosaminyl-transferases-V (Mgat5) 的表达量或是活性增加所致^[9]. 最早的研究发现, 在小鼠肺表皮细胞株中增加 Mgat5 的基因表达可引起细胞生长接触抑制消失, 出现肿瘤样生长特性. 对于 Mgat5 的作用机制, 近年来认为 Mgat5 所生成的糖链结构可以与它的高亲和力配体 galectin 结合. 当 Mgat5 表达增加后导致生长因子如 EGF 和 TNF- β 的受体在细胞表面驻留, 持续传递细胞生长信号引起恶变^[10]. 另外有研究表明, Mgat5 酶活性的增加与癌基因 *v-src*、T24-H-*ras* 等的表达相关, 这些癌基因的下游通路, 尤其是 Ras-Raf-Ets 信号通路能够上调 Mgat5 基因的转

录^[11,12]. 凝集素 PHA-L 特异性地识别 β 1-6 分支结构, 在芯片中观察到 PHA-L 对 Hep3B 细胞的亲和作用强于 L02, 提示芯片捕捉到了这一经典的肿瘤相关糖链. 另有研究表明, α -甘露糖结构和末端岩藻糖结构的增加可能也和肿瘤的恶性表型相关. 在人肝癌和大鼠肝癌的 GGT 都曾报道出现增多的甘露糖结构修饰, 而 ConA 包被的红细胞也只能结合恶性肿瘤上皮细胞, 不结合正常细胞^[13]. 此外, 在人肝癌血清中发现, 转铁蛋白 Transferrin、 α -酸性糖蛋白以及触珠蛋白都出现了增多的末端岩藻糖修饰^[14,15], 提示这种糖链的增加也可能是肝癌的特征性改变. T 抗原 / Tn 抗原是肿瘤细胞表面特有的黏蛋白相关的一种糖抗原标记, 可以为凝集素 MPL 识别. T 抗原 / Tn 抗原的表达改变在结肠癌和乳腺癌报道较多, 在肝癌中受关注较少, 我们通过芯片发现在 Hep3B 细胞中 T 抗原 / Tn 抗原表达增多, 为这方面的研究提供了参考数据. 凝集素 WGA 主要是结合 (GlcNAc)_n 结构以及多价唾液酸. 我们在 Douglas's 组和 Bramwell 组的报道中找到了和芯片结果吻合的证明: 一种分子质量为 105 ku 的 WGA 结合糖蛋白家族在正常细胞中表达, 而在癌症细胞中消失. 另一种异常的和肿瘤恶性相关的 100 ku 的膜糖蛋白和 WGA 结合减弱, 但和 ConA 结合增强^[16,17].

肝癌的转移与黏附密切相关. 肝癌细胞从原发病灶游出后, 必须在运行通道中与被侵袭部位的细胞识别黏附才能播散和转移. 而糖的一个基本功能则是介导细胞间或是细胞和基质的黏附作用. 与肿瘤黏附转移密切相关的糖链最重要的就是唾液酸, 唾液酸的改变在许多肿瘤发生转移时都有报道, 如肝癌、结肠癌、黑色素瘤等. 研究发现, 具有高转移潜能的 B16 黑色素细胞在唾液酸表达受抑制后, 转移潜能丧失^[18]. 唾液酸化修饰的增高可能减少肿瘤细胞对细胞基质的黏附^[19], 以利于癌细胞从原发部位脱落进入血液, 而一旦进入血液, 又可以通过细胞表面的 sLe 抗原和白细胞或血小板的选凝素识别结合以利于肿瘤的血行转移, 也可以和被侵袭部位的内皮细胞的选凝素黏附识别, 利于肿瘤细胞的种植定居^[20,21]. 另外有报道, 肝癌的淋巴结转移也是和唾液酸密切相关的^[22]. 血管黏附蛋白 -1 (VAP-1) 是一种唾液酸修饰的糖蛋白, 它介导肿瘤细胞和淋巴组织的黏附, 而这种黏附作用是唾液酸依赖性的^[23]. 在我们的研究中发现, HCCLM3 对识别唾液酸结构的凝集素 MAL- I、MAL- II 和

WGA 的亲合增加, 提示细胞表面出现增多的唾液酸结构, 应证了唾液酸和肿瘤转移的相关性. α 1-6 岩藻糖增加也是肝癌发生转移的另一重要糖基化改变之一. α 1-6 岩藻糖修饰的 AFP, 作为比单独的 AFP 更特异的诊断指标, 早在 1996 年起就已经应用于肝癌的早期诊断, 并且预示着病人具有更高的转移可能性^[24, 25]. α 1-6 岩藻糖结构的增加主要是由糖基转移酶 Fut8 的表达量或是活性的增高引起, 近年也有报道 GDP- 岩藻糖转运子 (GDP-fuc transporter) 是导致肝癌中岩藻糖表达增加的关键分子^[26]. 另外, 增高表达的平分型 GlcNAc 结构在一些肿瘤中亦见报道, 例如肝癌和脑癌^[27, 28], 然而也有报道增加平分型 GlcNAc 结构的表达可以抑制肿瘤的转移^[29]. 在我们的研究中, 芯片筛出 HCCLM3 细胞出现增多的平分型 GlcNAc 结构, 采用生物素标记的 PHA-E 进行细胞凝集素组织化学检测, 证明芯片结果是可靠的. 除此之外, 在 HCCLM3 表面还观察到对 RCA-I 亲和作用的减弱. RCA-I 结合 β 1-4 末端半乳糖结构, 可能是由于高转移肝癌细胞表面增加的唾液酸修饰遮蔽了半乳糖结合的位点, 导致对 RCA-I 的亲合减少^[30].

通过凝集素芯片技术, 我们成功地捕获了 3 株肝细胞的细胞表面整体糖链谱图, 并鉴别出可能与侵袭和转移相关的一系列特征性糖谱, 这些糖链为临床筛选肝癌侵袭及转移相关的糖标记提供了参考. 研究充分证明凝集素芯片是解析肿瘤进程中糖修饰改变的适用工具. 当然, 凝集素芯片是一项新生的技术, 尚有许多不足和有待优化的地方. 比如凝集素不能给出精确的糖链结构, 只能通过凝集素推测糖链信息, 再者芯片虽然可以包含很多种凝集素, 但尚不能捕捉到生物样本的全部糖链信息, 部分特异的糖链结构还没有已知的凝集素可以去识别. 这些都有待于进一步定义凝集素的特异性, 并且联合生物信息学研发更多的基础数据. 随着科学研究的不断进步, 相信在不久的将来, 凝集素芯片技术会有广阔的应用空间, 用于解析各种生命进程中发生改变的糖谱信息.

参 考 文 献

- Jemal A, Thomas A, Murray T, *et al.* Cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*, 2002, **52**(1): 23~47
- Angeloni S, Ridet J L, Kusy N, *et al.* Glycoprofiling with microarrays of glycoconjugates and lectins. *Glycobiology*, 2005, **15**(1): 31~41
- Koshi Y, Nakata E, Yamane H, *et al.* A fluorescent lectin array using supramolecular hydrogel for simple detection and pattern profiling for various glycoconjugates. *J Am Chem Soc*, 2006, **128** (32): 10413~10422
- Chen P, Liu Y K, Kang X N, *et al.* Identification of N-glycan of alpha-fetoprotein by lectin affinity microarray. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2008, **134**(8): 851~860
- Sasaki H, Bothner B, Dell A, *et al.* Carbohydrate structure of erythropoietin expressed in Chinese hamster ovary cells by a human erythropoietin cDNA. *J Biol Chem*, 1987, **262**(25): 12059~12076
- Lee J, Sundaram S, Shaper N L, *et al.* Chinese hamster ovary (CHO) cells may express six beta4-galactosyl -transferases (beta 4GalTs). Consequences of the loss of functional beta 4GalT-1, beta4GalTs-6, or both in CHO glycosylation mutants. *J Biol Chem*, 2001, **276**(17): 13924~13934
- Robertson M A, Etchison J R, Robertson J S, *et al.* Specific changes in the oligosaccharide moieties of VSV grown in different lectin-resistnat CHO cells. *Cell*, 1978, **13**(3): 515~526
- Chen W, Stanley P. Five Lec1 CHO cell mutants have distinct Mgat1 gene mutations that encode truncated N-acetylglucosaminyltransferase I. *Glycobiology*, 2003, **13**(1): 43~50
- Ito Y, Miyoshi E, Sakon M, *et al.* Elevated expression of UDP-N-acetylglucosamine: alphanmannoside beta1, 6 N-acetylglucosaminyltransferase is an early event in hepatocarcinogenesis. *Int J Cancer*, 2001, **91**(5): 631~637
- Lau K S, Dennis J W. N-Glycans in cancer progression. *Glycobiology*, 2008, **18**(10): 750~760
- Chen L, Zhang W, Fregien N, *et al.* The her-2/neu oncogene stimulates the transcription of N-acetylgluco- saminyltransferase V and expression of its cell surface oligosaccharide products. *Oncogene*, 1998, **17**(16): 2087~2093
- Kang R, Saito H, Ihara Y, *et al.* Transcriptional regulation of the N-acetylglucosaminyltransferase V gene in human bile duct carcinoma cells (HuCC-T1) is mediated by Ets-1. *J Biol Chem*, 1996, **271**(43): 26706~26712
- Furmanski P, Phillips P G, Lubin M. Cell surface interactions with concanavalin A: determination by micro -hemadsorption. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1972, **140**(1): 216~219
- Miyoshi E, Nakano M. Fucosylated haptoglobin is a novel marker for pancreatic cancer: detailed analyses of oligosaccharide structures. *Proteomics*, 2008, **8**(16): 3257~3262
- Hashimoto S, Asao T, Takahashi J, *et al.* Alpha1-acid glycoprotein fucosylation as a marker of carcinoma progression and prognosis. *Cancer*, 2004, **101**(12): 2825~2836
- Hixson D C, McEntire K D, Obrink B. Alterations in the expression of a hepatocyte cell adhesion molecule by transplantable rat hepatocellular carcinomas. *Cancer Res*, 1985, **45**(8): 3742~3749
- Bramwell M E, Harris H. An abnormal membrane glycoprotein associated with malignancy in a wide range of different tumours. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 1978, **201**(1142): 87~106
- Gorelik E, Duty L, Anaraki F, *et al.* Alterations of cell surface carbohydrates and inhibition of metastatic property of murine melanomas by alpha 1,3 galactosyltransferase gene transfection. *Cancer Res*, 1995, **55**(18): 4168~4173
- Dennis J, Waller C, Timpl R, *et al.* Surface sialic acid reduces

- attachment of metastatic tumour cells to collagen type IV and fibronectin. *Nature*, 1982, **300**(5889): 274~276
- 20 Roos E. Cellular adhesion, invasion and metastasis. *Biochim Biophys Acta*, 1984, **738**(4): 263~284
 - 21 Biancone L, Araki M, Araki K, *et al.* Redirection of tumor metastasis by expression of E-selectin *in vivo*. *J Exp Med*, 1996, **183**(2):581~587
 - 22 Schneider F, Kemmner W, Haensch W, *et al.* Overexpression of sialyltransferase CMP-sialic acid: Galbeta1, 3-GalNAc-R alpha6-Sialyltransferase is related to poor patient survival in human colorectal carcinomas. *Cancer Res*, 2001, **61**(11): 4605~4611
 - 23 Yoong K F, McNab G, Hubscher S G, *et al.* Vascular adhesion protein-1 and ICAM-1 support the adhesion of tumor-infiltrating lymphocytes to tumor endothelium in human hepatocellular carcinoma. *J Immunol*, 1998, **160**(8): 3978~3988
 - 24 Yamashita F, Tanaka M, Satomura S, *et al.* Prognostic significance of Lens culinaris agglutinin A-reactive alpha-fetoprotein in small hepatocellular carcinomas. *Gastroenterology*, 1996, **111**(4): 996~1001
 - 25 Aoyagi Y, Isokawa O, Suda T, *et al.* The fucosylation index of alpha-fetoprotein as a possible prognostic indicator for patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 1998, **83**(10): 2076~2082
 - 26 Moriawaki K, Noda K, Nakagawa T, *et al.* A high expression of GDP-fucose transporter in hepatocellular carcinoma is a key factor for increases in fucosylation. *Glycobiology*, 2007, **17**(12): 1311~1320
 - 27 Mori S, Aoyagi Y, Yanagi M, *et al.* Serum N-acetylglucosaminyltransferase III activities in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*, 1998, **13**(6): 610~619
 - 28 Rebbaa A, Chou P M, Vucic I, *et al.* Expression of bisecting GlcNAc in pediatric brain tumors and its association with tumor cell response to vinblastine. *Clin Cancer Res*, 1999, **5**(11): 3661~3668
 - 29 Yoshimura M, Nishikawa A, Ihara Y, *et al.* Suppression of lung metastasis of B16 mouse melanoma by N-acetylglucosaminyltransferase III gene transfection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**(19): 8754~8758
 - 30 Green E D, Baenziger J U. Oligosaccharide specificities of Phaseolus vulgaris leucoagglutinating and erythroagglutinating phytohemagglutinins. Interactions with N-glycanase-released oligosaccharides. *J Biol Chem*, 1987, **262**(25): 12018~12029

Membrane Protein Glycanprofiling of Hepatocellular Carcinoma Cell With Different Metastatic Potential by Lectin Microarray*

WANG Nian^{1,2)}, KANG Xiao-Nan^{1,2)}, LIU Yin-Kun^{1,2)**}, GUO Kun¹⁾, CUI Jie-Feng¹⁾,
SUN Rui-Xia¹⁾, CHEN Jie¹⁾, ZHAO Yan¹⁾, CHEN Pei¹⁾

⁽¹⁾ Liver Cancer Institute and Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China;

⁽²⁾ Institute of Biomedical Science, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract To perform an evaluation of the usefulness of lectin microarray approach for the identification of characteristic glycan profilings related to different aggressive and metastatic potentials between liver cell lines. At first, CHO and its glycosyltransferase-defective mutants Lec1 were chose to validate the feasibility of the lectin microarray system, then the difference of the glycan profiling on cell surface of L02 (normal control), Hep3B (no metastasis) and HCCLM3 (high metastatic potential) cell lines was characterized by lectin microarray. Comparing with L02, Hep3B showed increased affinity for PHA-L, ConA, AAL, MPL and decreased signals for WGA. HCCLM3 presented elevated signals for LCA, MAL- I , MAL- II , WGA, PHA-E and decreased signals for RCA-I with contrast to Hep3B. The results of fluoresceinated lectin staining of cells with biotinylated LCA, WGA, PHA-E and RCA-I support some observation from array. Lectin microarray was an applicable and useful tool in identifying the glycan profiling changes that accompany the biological processes.

Key words lectin microarray, hepatocellular carcinoma, carbohydrates, metastasis

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00120

*This work was supported by grants from Hi-Tech Research and Development Program of China (2006AA02A308) and China National Key Projects for Infectious Disease(2008ZX10002-021, -017).

**Corresponding author.

Tel: 86-21-64041990-2501, E-mail: liu.yinkun@zs-hospital.sh.cn

Received: March 1, 2009 Accepted: May 22, 2009