

# 不同转移潜能人肝癌细胞系中 GP73 糖基化修饰水平比较

张舒<sup>1</sup>, 江凯<sup>2</sup>, 茅晓意<sup>3</sup>, 刘银坤<sup>1,2</sup>

1. 复旦大学附属中山医院肝癌研究所;教育部癌变与侵袭原理重点实验室,上海 200032
2. 复旦大学生物医学研究院癌症研究中心,上海 200032
3. 复旦大学基础医学院,上海 200032

**摘要** 利用抗体亲和层析纯化不同转移潜能人肝癌细胞系中的高尔基体蛋白 73(GP73),比较不同转移潜能人肝癌细胞系中 GP73 糖基化修饰水平,为 GP73 成为肝癌标志物提供依据。纯化的 GP73 通过质谱鉴定后,分别进行蛋白印迹(western blot)和凝集素印迹(lectin blot)分析,比较其在不同转移潜能肝癌细胞系的糖基化修饰水平。实验发现,GP73 含有伴刀豆凝集素(ConA)、橙黄网胞盘菌凝集素(AAL)、小扁豆凝集素(LCA)和红腰果 E 型凝集素(PHA-E)识别的糖型,且单位 GP73 的 LCA、PHA-E 识别的岩藻糖和平分型糖型含量在肝癌细胞 Huh7、MHCC97L、MHCC97H、HCCLM3 中有升高趋势。研究表明,单位 GP73 岩藻糖和平分型聚糖结构随肝癌细胞的转移潜能升高而增多。

**关键词** 糖基化;人肝癌细胞系;GP73;凝集素;聚糖

**中图分类号** R34

**文献标志码** A

**doi** 10.3981/j.issn.1000-7857.2014.16.001

## Comparison of GP73 Glycosylation in Human Hepatocellular Carcinoma Cell Lines with Different Metastatic Potential

ZHANG Shu<sup>1</sup>, JIANG Kai<sup>2</sup>, MAO Xiaoyi<sup>3</sup>, LIU Yinkun<sup>1,2</sup>

1. Key Laboratory of Carcinogenesis and Cancer Invasion of Ministry of Education; Liver Cancer Institute, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China
2. Cancer Research Center of Institutes of Biomedical Sciences, Fudan University, Shanghai 200032, China
3. School of Basic Medical Sciences, Fudan University, Shanghai 200032, China

**Abstract** In this study, Golgi protein 73 (GP73) of hepatocellular carcinoma (HCC) cell lines with different metastatic potential was purified by antibody affinity chromatography and the purification result was confirmed by LC-MS/MS, providing more proof for GP73 as a biomarker for HCC. Purified GP73 was then analyzed using western blot and lectin blot to obtain its glycosylation level in HCC cell lines with different metastatic potential. We found that glycan of GP73 can be recognized by ConA, AAL, LCA and PHA-E lectins, while the LCA and PHA-E-reactive fraction of GP73 was increased along with the increasing metastatic potential of HCC cell lines. The glycan level of GP73 was different in HCC cell lines with different metastatic potential, and the content of fucose (recognized by LCA) and bisecting structure (recognized by PHA-E) increased in agreement with the metastatic potential.

**Keywords** glycosylation; hepatocellular carcinoma cell lines; GP73; lectin; glycan

收稿日期:2014-03-21;修回日期:2014-05-07

基金项目:国家重点基础研究计划(973计划)项目(2011CB910604);国家科技重大专项(2012ZX10002009-007);国家高科技发展计划(863计划)项目(2012AA020204)

作者简介:张舒,研究实习员,研究方向为糖生物学,电子信箱:littlezhangshu@gmail.com;江凯(共同第一作者),博士研究生,研究方向为肿瘤蛋白质组学,电子信箱:jk927@163.com;刘银坤(通信作者),教授,研究方向为肿瘤蛋白质组学,电子信箱:liu.yinkun@zs-hospital.sh.cn

引用格式:张舒,江凯,茅晓意,等.不同转移潜能人肝癌细胞系中 GP73 糖基化修饰水平比较[J].科技导报,2014,32(16):15-19.

肝细胞性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是一种多基因、多因素、病理机制复杂的常见恶性肿瘤。临床上主要通过超声检测和患者血清学检测诊断肝癌,然而二者各有缺陷。超声检测敏感性为78%,阳性检出率为73%,但其准确度受操作者的影响;甲胎蛋白(alpha fetal protein, AFP)是现在已应用于肝硬化肝癌诊断的分子标志物,其敏感性为39%~64%,阳性检出率仅为9%~32%<sup>[1]</sup>。所以,非常有必要筛选一种新的更有效的早期肝癌标志物。GP73是一种高尔基体II型膜蛋白,表达于上皮细胞<sup>[2]</sup>。其在正常人肝组织中表达于胆管上皮细胞,在肝细胞中几乎检测不到;而在肝病患者中,GP73的肝细胞表达明显上升。研究已证实GP73可在人血清中检测到,在肝病患者中GP73的血清含量增高。更有意义的是,GP73在肝癌患者血清中含量上升尤为明显,有报道称GP73作为早期肝癌的分子标志物敏感性和特异性会优于AFP,当然还需要高通量的实验来进一步证实<sup>[3]</sup>。Marrero等<sup>[1]</sup>和Drake等<sup>[4]</sup>都发现肝癌患者血清中GP73蛋白含量明显升高。其中Marrero对352例(肝癌144例,肝硬化152例,健康对照56例)血清样本进行蛋白质印迹(western blot)分析,发现GP73检测肝癌的灵敏度为69%,特异性为75%。对于早期肝癌的诊断,GP73的敏感性为62%,而AFP敏感性仅为25%。AFP水平低于20 ng/mL的肝癌患者中,57%的患者GP73水平显著升高。这表明,GP73的应用能够大大提高对AFP阴性的肝癌患者的检出率。

在蛋白质不同的翻译后修饰中,糖基化(glycosylation)最为常见,几乎50%的蛋白质都被认为具有糖基化修饰。糖蛋白聚糖存在着宏观和微观的不均一性,其结构功能变化与疾病发生发展有密切联系。在癌症发生过程中,糖基化改变普遍存在,如能关注糖基化变化,可以提升诊断的特异性和敏感性。因此,从糖基化修饰的状态着手,研究关键糖蛋白在肝病进程中的作用,有重要意义。GP73是一个糖基化蛋白,包含3个潜在N-糖基化位点:Asn109、Asn144、Asn398<sup>[5]</sup>。随着糖生物学技术的发展,已有研究证实将GP73的岩藻糖基化异质体在某些肝癌患者中作为标志物进行检测会优于GP73<sup>[6]</sup>。目前关于GP73糖基化的研究很少,若以“GP73 and glycosylation”为主题在PubMed数据库中搜索,仅搜到3篇文献<sup>[6~8]</sup>。因此,GP73的N-糖基化的研究亟待进行。本研究旨在揭示GP73在肝癌细胞系中的糖基化修饰水平,进而为GP73作为肝癌诊断标志物提供进一步的依据。

## 1 实验设计

目前对GP73的糖基化研究报道很少,这个新的肝癌分子标志物的糖基化修饰在肝癌中的指示作用还不清楚。因此本研究选取不同转移潜能的肝癌细胞,纯化GP73质谱鉴定后,分别进行蛋白质印迹和凝集素印迹分析,比较其在不同转移潜能肝癌细胞系的糖基化修饰水平。

## 2 材料和方法

### 2.1 试剂

RPMI1640和DMEM培养基购自Gibco公司,美国;二硫苏糖醇(DTT)、尿素、CHAPS、Pharmylte、溴酚蓝、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,美国;银染试剂盒(silver stain kit)购自GE公司,美国;三(2-甲酰乙基)膦盐酸盐(TCEP-HCl)、碳酸氢铵、三氟乙酸(TFA)和硫脲购自Sigma公司,美国;碘乙酰胺(IAA)、甲酸(FA)购自Fluka公司,美国;生物素标记的凝集素及亲和素标记的辣根过氧化物酶(Avidin-HRP)购自Vector公司,美国;乙腈(ACN)购自Merck公司,美国;测序级胰蛋白酶购自Roche公司,瑞士;ECL化学发光试剂购自GE公司,美国;考马斯亮蓝染色及其他常用试剂为国产分析纯。

### 2.2 仪器

低温真空干燥仪(SC250, Thermo Savant, Holbrook, 美国); AbSMART高通量膜片孵育系统(艾比玛特公司, 中国); UPLC液相色谱仪(Nano Aquity, Waters公司, 美国); LTQ-Orbitrap质谱仪(XL ETD, Thermo Electron公司, 美国)。

### 2.3 肝癌细胞系

人肝癌细胞系SMMC7721(购于中国科学院细胞研究所)用含10%胎牛血清的高糖1640培养基常规传代培养, Huh7(购于中国科学院细胞研究所)及复旦大学具有自主知识产权的高转移肝癌细胞株:MHCC97L、MHCC97H、HCCLM3、HCCLM6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 μL裂解液中(7 mol/L尿素, 2 mol/L硫脲, 4% CHAPS, 20 mmol/L DTT, 1% Pharmylte, 1 mmol/L PMSF)3×10<sup>6</sup>个细胞比例重悬细胞, 4℃振荡破碎45 min, 收集上清, -70℃保存备用。

### 2.4 GP73纯化

采用冰盐酸冲洗HiTrap柱(GE Healthcare公司, 美国), 偶联抗GP73的抗体(Santa Cruz Biotechnology公司, 美国), 孵育30 min; 经缓冲液洗脱后, 细胞系样本经0.45 μm的膜过滤后上样, 孵育2 h; 泵流速控制在0.2~1 mL/min之间, 用5倍柱体积的平衡缓冲液洗脱; 5倍柱体积洗脱出GP73, 每例样本约1.0 mL, 分3管进行丙酮沉淀, 加入等体积的5× SDS凝胶上样缓冲液, 95℃煮沸, 进行12% SDS-PAGE电泳和银染。

### 2.5 LC-ESI-MS/MS鉴定蛋白

切取胶上的条带进行胶上酶解, 冻干的肽段溶于5% ACN(含0.1% FA), 上样进行在线液质联用分析。采集的质谱数据进行Mascot数据库检索, 搜库参数为: 固定修饰Carbamidomethyl (C); 可变修饰为Oxidation (M); 母离子质量误差为±10 ppm; 串级碎片离子质量误差为±0.3 Da; 酶为trypsin; 允许酶解最大漏切数目为1等。

### 2.6 凝集素和蛋白印迹

纯化得到的GP73经电泳和电转移后, 用封闭液在室温

下封闭转移后的聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride, PVDF) 1 h,用高通量的膜片孵育器对 ConA、AAL、LCA 和 PHA-E 这 4 种凝集素进行实验,终浓度分别为 0.8、0.8、0.8、0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。驱除膜表面的气泡,室温摇动反应 30 min。将 PVDF 膜用 TBST 溶液洗涤 3 次,每次 10 min;加入封闭液稀释的 Avidin-HRP,终浓度为 0.3~0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,室温反应 30 min;使用 ECL 免疫印迹检测试剂,检测凝集素亲和印迹灰度值。PVDF 膜放入一抗二抗去除液中孵育 30 min,放入双蒸水中振荡 10 min,再用双蒸水漂洗 3 次,每次 5 min。使用 anti-GP73 抗体(按体积比 1:200 稀释),进行新一轮检测及 ECL 化学发光,每张 PVDF 膜只重复检测一次。

### 2.7 印迹指数分析

为避免 GP73 蛋白水平差异对聚糖含量的影响,引入印迹指数(blotting index)这一概念,即:印迹指数=GP73 凝集素印迹灰度值/GP73 蛋白质印迹灰度值,通过 Quantity One 软件统计各泳道的灰度值。

## 3 结果

### 3.1 GP73 的纯化和质谱鉴定

本研究建立了抗体亲和层析分离细胞系 GP73 的方法;运用偶联抗 GP73 的 HiTrap NHS 活化柱,从细胞(Huh7、

SMMC7721、MHCC97L、MHCC97H、HCCLM3 和 HCCLM6)总蛋白中纯化 GP73,经 12%SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE polyacrylamide gelelectrophoresis)分离,获得如图 1 所示的 GP73 蛋白条带(以 HCCLM3 细胞中纯化的 GP73 为例)。为确定蛋白纯化结果,将蛋白条带切下,采用胶上 trypsin 酶解,进行 LC-ESI-MS/MS 鉴定。

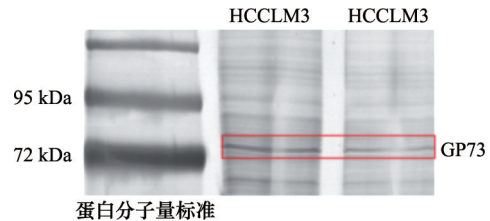
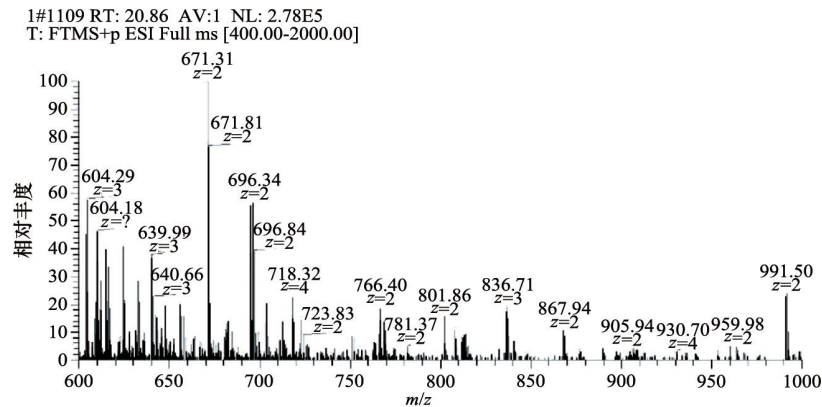


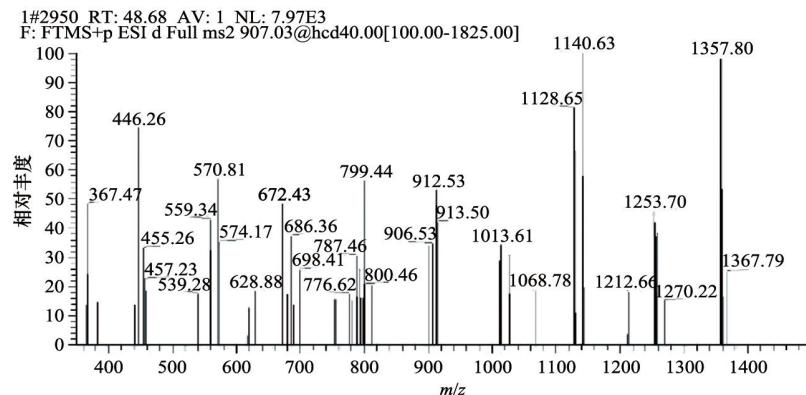
图 1 人肝癌细胞系中 GP73 纯化后银染结果

Fig.1 Purified GP73 from HCC cell line stained with silver

图 2 展示了 GP73 的鉴定信息。由肽段 EETNEIQVVNEEPQR 的 MS 图谱(图 2(a))、肽段 EETNEIQVVNEEPQR( $m/z$  907,  $z=2$ )的 MS/MS 图谱(图 2(b)),确定纯化得到的蛋白质为 GP73,说明采用此抗体亲和层析分离细胞系 GP73 方法的可行性。采用这种方法,分别从等质量的不同转移潜能肝癌细胞系蛋白中纯化 GP73。



(a) 肽段 EETNEIQVVNEEPQR 的 MS 图谱



(b) 肽段 EETNEIQVVNEEPQR( $m/z$  907,  $z=2$ )的 MS/MS 图谱

图 2 LC-ESI-MS/MS 鉴定 GP73 纯化结果

Fig.2 Purification of GP73 was confirmed by LC-MS/MS

### 3.2 转移潜能不同的人肝癌细胞系中GP73的糖基化修饰

应用高通量膜片孵育系统,一次可以运用多种凝集素分别对2组样本纯化后的GP73进行孵育,进行凝集素印迹分析。本研究采用4种凝集素,其中PHA-E识别平分型N-乙酰氨基酸葡萄糖(GlcNAc);LCA识别核心岩藻糖;AAL对含有L-Fuc-聚糖有较宽的特异性;ConA识别高甘露糖型、二天线聚糖、单天线聚糖。结果表明,转移潜能不同的人肝癌细胞系SMMC7721, MHCC97H, HCCLM3和HCCLM6细胞中纯化得到的GP73,含有ConA、AAL、LCA和PHA-E所识别的糖型(图3)。

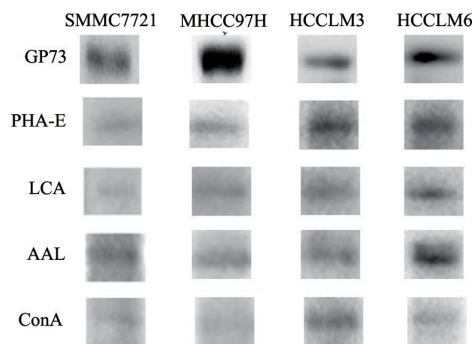


图3 人肝癌细胞系GP73的PHA-E、LCA、AAL和ConA凝集素印迹结果

Fig. 3 The Lectin Blot of GP73 in HCC cell lines recognized by PHA-E, LCA, AAL and ConA lectins

### 3.3 转移潜能不同的人肝癌细胞系中单位GP73上的糖基化修饰水平变化

应用ConA, AAL, LCA和PHA-E这4种凝集素对转移潜能不同的人肝癌细胞系(Huh7, SMMC7721, MHCC97L, MHCC97H, HCCLM3和HCCLM6)中GP73进行印迹分析,为避免GP73蛋白水平的差异对聚糖含量的影响,以GP73结合凝集素的灰度值与其蛋白印迹的灰度值比值(印迹指数)作为衡量单位蛋白中的聚糖含量,发现Huh7, MHCC97L, MHCC97H和HCCLM3中单位GP73对PHA-E和LCA凝集素的亲和力不同,LCA(图4(a))、PHA-E(图4(b))识别的糖型在Huh7, MHCC97L, MHCC97H, HCCLM3中有升高趋势。说明单位GP73在转移潜能不同的人肝癌细胞系中聚糖含量产生变化,并且其岩藻糖和平分型结构的含量随肝癌细胞的转移潜能升高而增多。

## 4 讨论

糖基化是最常见的蛋白质翻译后修饰,大约50%以上的细胞蛋白质都发生了糖基化<sup>[9,10]</sup>,而这种修饰发挥了关键作用。如糖链分支末端出现重复N-乙酰氨基半乳糖结构、唾液酸和岩藻糖含量增加等,这些变化在临床上被用作肿瘤标记物。Amos等<sup>[11]</sup>发现F-9畸胎瘤细胞分化成内胚层细胞时,细胞内和表面的糖蛋白聚糖均发生不同程度岩藻糖糖基化。甲胎蛋白与小扁豆凝集素(LCA)结合的AFP-L3成为检测肝癌的重要标志,反映了其核心岩藻糖的变化<sup>[12]</sup>。肝病中运铁

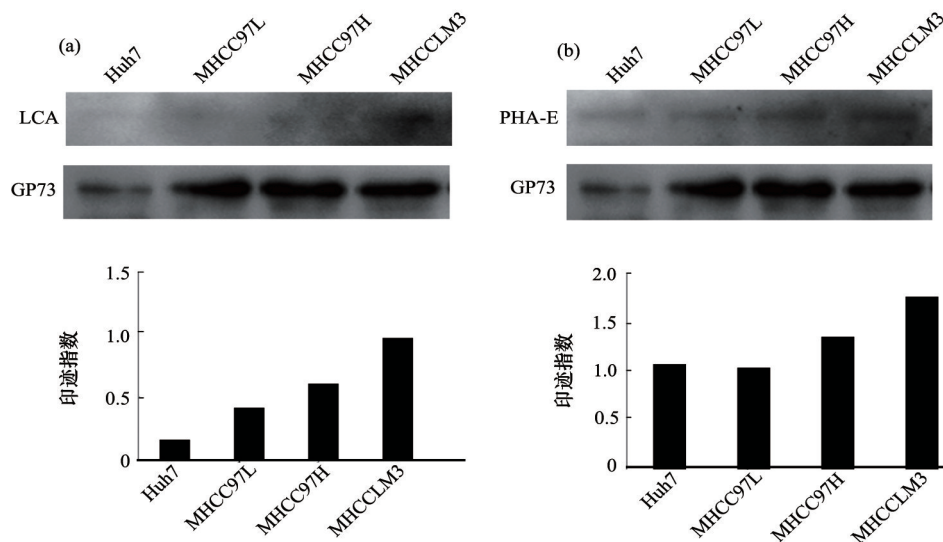


图4 单位GP73中LCA(a)和PHA-E(b)所识别糖型含量随着人肝癌细胞转移潜能的升高而增多

Fig.4 The glycans of GP73 recognized by LCA (a) and PHA-E (b) were increased in agreement with the metastatic potential of HCC cell lines

蛋白出现 $\alpha$ -1,3连接岩藻糖以及核心甘露糖连接的岩藻糖<sup>[13]</sup>。2006年Drake等<sup>[14]</sup>发现GP73诊断肝癌的敏感性和特异性为65%和90%,而GP73的异质体敏感性和特异性则高达90%和100%,因此,血清中这些多岩藻糖化的GP73是更好的肝癌标志物。本研究旨在研究GP73在转移潜能不同人肝癌细胞系中的糖基化修饰表达水平的变化,进而为GP73作为肝癌诊断标志物提供进一步的依据。

本实验所采用的膜片孵育系统,可以高通量一次进行多种凝集素的孵育,能显著减少凝集素的使用量。实验表明,一次可以运用多种凝集素分别对2组样本纯化后的GP73进行孵育,在同一条件下进行凝集素印迹,有利于2组直接进行比较分析,减少实验误差。

岩藻糖是一种单糖,参与许多N-、O-聚糖和糖脂的构成。与哺乳动物细胞内的其他六碳糖相比,它具有2个特殊的结构特征:1)在C<sub>6</sub>位置上缺乏一个羟基;2)它具有L型构象。岩藻糖是在岩藻糖基转移酶(FUT)的催化作用下形成的,该过程需要GDP-岩藻糖作为底物参与。目前,在人类基因组中鉴定到FUT共13种,有不同的底物(聚糖链)专一性,催化岩藻糖连接到相应结构的聚糖链上<sup>[14]</sup>。末端修饰的岩藻糖能赋予聚糖很多独特的功能特性,其在输血反应、凝集素介导的白细胞和内皮的黏附、宿主和微生物相互作用和个体发育等方面发挥重要作用。此外,岩藻糖还参与构成某些重要黏附分子的聚糖结构,与肿瘤转移关系密切。在癌症中发现sialyl Lewis<sup>x</sup>和sialyl Lewis<sup>a</sup>含量增多,许多肿瘤中A和B型血型抗原丢失伴随着H血型抗原和Lewis<sup>x</sup>表达升高<sup>[15,16]</sup>。

平分型N-乙酰葡萄糖胺通过 $\beta$ -1,4-糖苷键连接到复合型或杂合型N-聚糖的 $\beta$ 核心甘露糖上(由GnTIII催化),抑制其他糖基转移酶对N-聚糖进一步加工。研究表明,平分型N-乙酰葡萄糖胺表达增强与HBV相关蛋白分泌减少一致,HBx蛋白通过反式激活作用,激活GnT-III启动子,上调GnT-III基因的表达,导致载脂蛋白B糖基化修饰异常,难以转运甘油三酯及脂肪酸,进而导致脂肪肝等肝细胞损伤的发生<sup>[17-19]</sup>。

本研究发现,单位GP73的岩藻糖和平分型N-乙酰葡萄糖胺含量随着转移潜能的上升而在Huh7, MHCC97L, MHCC97H和HCCLM3细胞中增多,提示GP73的岩藻糖和平分型N-乙酰葡萄糖胺结构可能参与了肝癌转移进程,为GP73作为肝癌分子标志物提供了更多证据。

#### 参考文献(References)

[1] Marrero J A, Romano P R, Nikolaeva O, et al. GP73, a resident Golgi glycoprotein, is a novel serum marker for hepatocellular carcinoma[J]. *Journal of Hepatology*, 2005, 43(6): 1007-1012.

[2] Bachert C, Fimmel C, Linstedt A D. Endosomal trafficking and proprotein convertase cleavage of cis Golgi protein GP73 produces marker for hepatocellular carcinoma[J]. *Traffic*, 2007, 8(10): 1415-1423.

[3] Mao Y, Yang H, Xu H, et al. Golgi protein 73 (GOLPH2) is a valuable serum marker for hepatocellular carcinoma[J]. *Gut*, 59(12): 1687-1693.

[4] Drake R R, Schwegler E E, Malik G, et al. Lectin capture strategies

combined with mass spectrometry for the discovery of serum glycoprotein biomarkers[J]. *Molecular of Cell Proteomics*, 2006, 5(10): 1957-1967.

[5] Hu L, Li L, Xie H, et al. The Golgi localization of GOLPH2 (GP73/GOLM1) is determined by the transmembrane and cytoplasmic sequences [J]. *PLoS One*, 2011, 6(11): e28207.

[6] Norton P A, Comunale M A, Krakover J, et al. N-linked glycosylation of the liver cancer biomarker GP73[J]. *Journal of Cell Biochemistry*, 2008, 104(1): 136-149.

[7] Wang M, Long R E, Comunale M A, et al. Novel fucosylated biomarkers for the early detection of hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention*, 2009, 18(6): 1914-1921.

[8] Block T M, Comunale M A, Lowman M, et al. Use of targeted glycoproteomics to identify serum glycoproteins that correlate with liver cancer in woodchucks and humans[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(3): 779-784.

[9] Morelle W, Michalski J C. Analysis of protein glycosylation by mass spectrometry[J]. *Nature Protocols*, 2007, 2(7): 1585-1602.

[10] Marino K, Bones J, Katlta J J, et al. A systematic approach to protein glycosylation analysis: A path through the maze[J]. *Nature Chemical Biology*, 6(10): 713-723.

[11] Amos B, Lotan D, Lotan R. Increased fucosylation of high-molecular-weight glycoproteins accompanies retinoic-acid-induced differentiation of F-9 embryonal carcinoma cells[J]. *International Journal of Cancer*, 1990, 46(1): 86-94.

[12] Nakagawa T, Miyoshi E, Yakushijin T, et al. Glycomic analysis of alpha-fetoprotein L3 in hepatoma cell lines and hepatocellular carcinoma patients[J]. *Journal of Proteome Research*, 2008, 7(6): 2222-2233.

[13] Yamashita K, Koide N, Endo T, et al. Altered glycosylation of serum transferrin of patients with hepatocellular carcinoma[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1989, 264(5): 2415-2423.

[14] Nishihara S, Iwasaki H, Kaneko M, et al. Alpha1,3-fucosyltransferase 9 (FUT9, Fuc-TIX) preferentially fucosylates the distal GlcNAc residue of polylectosamine chain while the other four alpha1,3FUT members preferentially fucosylate the inner GlcNAc residue[J]. *FEBS Letters*, 1999, 462(3): 289-294.

[15] Orntoft T F, Vestergaard E M. Clinical aspects of altered glycosylation of glycoproteins in cancer[J]. *Electrophoresis*, 1999, 20(2): 362-371.

[16] Kim Y J, Varki A. Perspectives on the significance of altered glycosylation of glycoproteins in cancer[J]. *Glycoconjugate Journal*, 1997, 14(5): 569-576.

[17] Miyoshi E, Ihara Y, Hayashi N, et al. Transfection of N-acetylglucosaminyltransferase III gene suppresses expression of hepatitis B virus in a human hepatoma cell line, HB611[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270(47): 28311-28315.

[18] Kang S K, Chung T W, Lee J Y, et al. The hepatitis B virus X protein inhibits secretion of apolipoprotein B by enhancing the expression of N-acetylglucosaminyltransferase III[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(27): 28106-28112.

[19] 董芳, 肖凡, 魏红山. 平分型GlcNAc糖基化修饰的生物学功能[J]. *医学分子生物学杂志*, 2009, 6(2): 138-143.

Dong fang, Xiao fan, Wei hongshan. Bisecting N-acetylglucosamine and its biological functions[J]. *Journal of Medical Molecular Biology*, 2009, 6(2): 138-143.

(编辑 田恬)