

CK8 寡糖链结构及翻译水平改变 与人肝癌细胞转移相关性研究*

代 智¹⁾ 刘银坤^{1)**} 郭 坤¹⁾ 孙强玲¹⁾ 卢雯静¹⁾ 杨芄原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 糖组学方法筛查人肝癌细胞转移过程中发挥重要作用的核心岩藻糖基化蛋白质分子, 解析比较筛出的差异蛋白——细胞角蛋白 8(CK8)翻译及糖基化修饰改变与人肝癌细胞转移潜能的关系. 应用双向电泳(2-DE)、凝集素亲和印迹、凝集素亲和沉淀联合质谱分析技术, 筛查并验证与肝癌转移相关的核心岩藻糖基化蛋白; 应用细胞免疫荧光和蛋白质免疫印迹检测 CK8 的蛋白质表达情况; 应用免疫沉淀结合多种凝集素亲和印迹, 推测其与肝癌转移相关的寡糖链结构改变. 研究发现, 3 种不同转移潜能人肝癌细胞 Hep3B、MHCC97-L 和 MHCC97-H 的扁豆凝集素(LCA)亲和印迹表达谱中, 分子质量 55~60 ku、等电点 4~6 区域处有核心岩藻糖基化蛋白呈差异表达, 质谱鉴定为 CK8. LCA 亲和沉淀及蛋白质印迹进一步验证 CK8 异常核心岩藻糖基化与肝癌转移相关; 研究发现, CK8 分布于细胞浆内, 在 MHCC97-L 和 MHCC97-H 细胞中蛋白质表达水平较 Hep3B 高, 在 MHCC97-H 中与 LCA 和蓖麻凝集素(RCA-1)的亲和力较 Hep3B 强. 以上结果提示, 2-DE 和凝集素印迹技术联合 MALDI-TOF-MS/MS 分析可用于筛查疾病过程相关的异常糖基化蛋白质分子, CK8 蛋白水平、核心岩藻糖基化及 β -1,4 末端半乳糖基化的增加均与肝癌细胞转移潜能相关.

关键词 肝癌细胞, 肿瘤转移, CK8, 扁豆凝集素, 核心岩藻糖基化

学科分类号 Q513+.2, R735.7

肝细胞性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)病死率居所有恶性肿瘤的第三位. 发展中国家肝癌发病率占全世界发病率的 81%, 其中, 中国占 54%^[1]. 手术切除被公认为根治肝癌的最好手段, 但肝癌患者术后 5 年内的生存率仍然很低^[2]. 50% 以上患者出现转移复发, 严重影响患者预后, 因而, 肝癌转移相关的研究日益受到关注. 目前, 肿瘤转移复发临床研究的重点在于转移复发的预测指标, 尤其是分子水平指标的探索, 如 Ki-67, E-钙粘连蛋白和血管内皮生长因子等^[3~5]已列为肝癌复发的显著危险因素. 甲胎蛋白的核心岩藻糖基化也作为一种诊断标志物逐渐为临床应用, 它可区分 HCC 和其他慢性肝病, 可见, 异常糖基化的蛋白质可能在肝癌复发的预测中有广阔的应用前景.

细胞角蛋白(cytokeratin, CK)是分布于上皮细胞的中间纤维丝, 它包括至少 20 个成员^[6], 分为酸性细胞角蛋白(I 型细胞角蛋白, 细胞角蛋白 10~20)和碱性细胞角蛋白(II 型细胞角蛋白, 细胞角蛋白 1~9)两个亚家族. CK8 是细胞角蛋白家族

中的一员, 在人黑色素瘤中, 细胞角蛋白过表达与它在体外具有的较高运动和侵袭能力相关^[7].

本实验对复旦大学附属中山医院肝癌研究所建成的不同转移潜能人肝癌细胞系, 即高转移的 MHCC97-H、低转移的 MHCC97-L^[8,9]和基本不转移的 Hep3B 细胞进行研究, 试图发现 CK8 翻译水平及翻译后修饰的改变与人肝癌细胞转移潜能的关系, 为探寻新的肝癌转移标记物及进一步阐明肝癌转移机制奠定良好基础.

1 材料和方法

1.1 试剂

RPMI1640 和 DMEM 培养基购自 Gibco 公司;

*国家重点基础研究发展计划(973)资助项目(001CB510205)和国家高技术研究发展计划(863)资助项目(2004CB520802).

** 通讯联系人.

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

收稿日期: 2006-07-16, 接受日期: 2006-08-26

苯甲基磺酰氟(PMSF)为和光纯药工业株式会社产品;二硫苏糖醇(DTT)、尿素、CHAPS、IPG 缓冲液、Pharmylte、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、Nonidet P-40、Protein G-agarose、4, 6-联脒-2-苯基吡啶(DAPI)和蛋白酶抑制剂均购自 Sigma 公司;碘乙酰胺和 β -磷酸甘油均购自 Fluka 公司;生物素标记的扁豆凝集素(Biotin-LCA)、刀豆凝集素(Biotin-Con A)、蓖麻凝集素(Biotin-RCA-I)、亲和素标记的辣根过氧化物酶(Avidin-HRP)、异硫氰酸荧光素标记的扁豆凝集素(FITC-LCA)、LCA-agarose 和 α -甲基甘露糖均购自 Vector 公司;鼠抗人 CK8 单克隆抗体购自丹麦 Dako 公司;羊抗人 β -actin(C11)多克隆抗体、FITC 标记的兔抗鼠二抗和 HRP 标记的马抗羊 IgG 抗体均购自 Santa Cruz 生物技术公司;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;考马斯亮蓝染色和银染试剂及其他常用试剂为国产分析纯。

1.2 细胞培养和收集

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 RPMI 1640 培养基中,常规传代培养;人肝癌细胞系 MHCC97-H、MHCC97-L 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,胰酶消化,收集。

1.3 荧光细胞化学检测

Hep3B, MHCC97-L 和 MHCC97-H 细胞经胰酶消化后,细胞悬液滴于盖玻片上培养,待细胞贴壁生长后,弃培养液,经 4%多聚甲醛室温下固定 30 min 后,与 10 mg/L FITC-LCA 37℃条件下共同孵育 30 min, PBS 洗涤 4 次后,将 50 μ l DAPI 点滴到盖玻片上,37℃条件下孵育 30 min,使细胞核染成蓝色。检测 CK8 细胞内定位及表达时,用鼠抗人 CK8 (1:100) 单克隆抗体 37℃下孵育 30 min,然后与 FITC 结合的兔抗鼠二抗 (1:500) 共同孵育 30 min,甘油密封,荧光显微镜下观察,同时设阴性对照。

1.4 LCA 亲和沉淀

收集 8×10^7 细胞,经细胞裂解液(100 mmol/L Tris-HCl pH 7.4, 300 mmol/L NaCl, 1% Nonidet P-40 和蛋白酶抑制剂)充分振荡 45 min,于 4℃离心收集上清。然后与 LCA-agarose 摇动反应过夜,

4℃离心收集 LCA-agarose。然后与 200 mmol/L α -甲基甘露糖 4℃共同作用 1.5 h,离心收集上清,重复操作 2 次,上清经超滤浓缩后,测定蛋白质浓度,上样进行 SDS-PAGE 和免疫印迹检测 CK8 表达。

1.5 质谱兼容快速银染

1.5.1 固定:45%乙醇,5%乙酸固定 20~30 min。

1.5.2 水洗 2 次,30~60 min/次。

1.5.3 敏化:0.02%硫代硫酸钠,1~2 min。

1.5.4 水洗 2 次,1 min/次。

1.5.5 银染:浸在预冷的 0.1%硝酸银,20~30 min,水洗 2 次,1 min/次。

1.5.6 显色和终止:显影液(36%甲醛 40 μ l, 2 g 碳酸钠)显出清晰的蛋白质条带,弃显影液,用 5%乙酸终止显影,然后水洗 2~3 次,4℃以下保存。

1.6 双向电泳

具体方法见文献[10]。蛋白质上样量 270 μ g,以 25~30 kVh 进行电泳,IEF 结束后,IPG 胶条在平衡 I 液和 II 液各平衡 15 min 后,进行 SDS-PAGE 垂直电泳,然后考马斯亮蓝 R-250 染色或转膜进行 LCA 亲和印迹。

1.7 LCA 亲和印迹

恒流 360 mA,转膜 90 min 后,将 PVDF 膜置于 30 ml 封闭液(150 ml 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,37℃下与 6 mg/L Biotin-LCA 共同孵育 1 h。TTBS (150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris·HCl pH 7.5, 0.1% Tween-20)洗 3 次,然后与 0.8 mg/L Avidin-HRP 共同孵育 1 h, ECL 化学发光检测。

1.8 图像分析

考马斯亮蓝染色后的 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。

1.9 蛋白质的质谱鉴定

具体方法见文献[10]。

1.10 免疫印迹

蛋白质上样量为 10 μ g,5%聚丙烯酰胺浓缩胶 10 mA 运行到分离胶界面,调至 15 mA,继续电泳。电泳结束,半干法转移至 PVDF 膜,电压为 8~10 V,1 h。5%脱脂奶粉封闭 PVDF 膜 1 h 后,与鼠抗人 CK8 单克隆抗体(1:2 000)或羊抗人 β -actin (1:200)多克隆抗体,室温反应 2 h。然后与 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体 (1:2 000),或 HRP 标记的马抗羊 IgG 抗体 (1:400),室温反应 1 h。

TTBS溶液洗涤后, ECL 化学发光检测.

1.11 免疫沉淀

每 1×10^7 细胞加入 500 μl 免疫沉淀裂解缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 150 mmol/L NaCl, 0.1% Nonidet P-40, 5 mmol/L EDTA, 5 mmol/L EGTA, 15 mmol/L MgCl_2 , 60 mmol/L β -磷酸甘油, 0.1 mmol/L 正钒酸钠, 0.1 mmol/L NaF, 0.1 mmol/L 苯甲酰胺, 蛋白酶抑制剂), 吹吸混匀后, 轮转 1 h, 离心收集上清, 与 15 μl protein G-agarose 轮转 1 h, 离心收集上清, 与 3 μg 鼠抗人 CK8 单克隆抗体 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇动反应 4 h, 然后加入 60 μl

protein G-agarose 轮转过夜, 经裂解液洗涤 3 次, 加入 15 μl 2 $\times$ SDS 上样缓冲液, 煮沸 5 min 后, 上样进行 10% SDS-PAGE, 然后用凝集素对 CK8 的寡糖链结构进行分析.

1.12 寡糖链结构推断

LCA 和 ConA 在进行糖链结构分析时, 操作步骤见 1.7, RCA-1 用于凝集素印迹时, 经电转的 PVDF 膜需在 80 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 与 25 mmol/L 硫酸共同作用 1 h, 以除去末端唾液酸残基^[1]. 3 种凝集素对糖链结构的亲和特性见表 1.

Table 1 Lectins used and their binding specificities

Abbreviation	Origin	Binding preference
LCA	Lens culinaris	Fuc linked to the GlcNAc-Asp of the trimannosyl core
Con A	Concanavalin	Trimannosyl core in biantennary complex-type oligosaccharides
RCA-1	Ricinus communis	Terminal Gal β 1,4 GlcNAc disaccharides

2 结 果

2.1 不同转移潜能人肝癌细胞核心岩藻糖基化蛋白表达的比较研究

LCA 凝集素对 N-糖链最内侧 N-乙酰氨基葡

萄糖上的核心岩藻糖基有很强的亲和力, 应用 LCA 亲和层析方法分离和浓缩不同转移潜能人肝癌细胞核心岩藻糖基化蛋白质, 可用于探寻蛋白质异常核心岩藻糖基化与肝癌转移的关系. 结果见图 1.

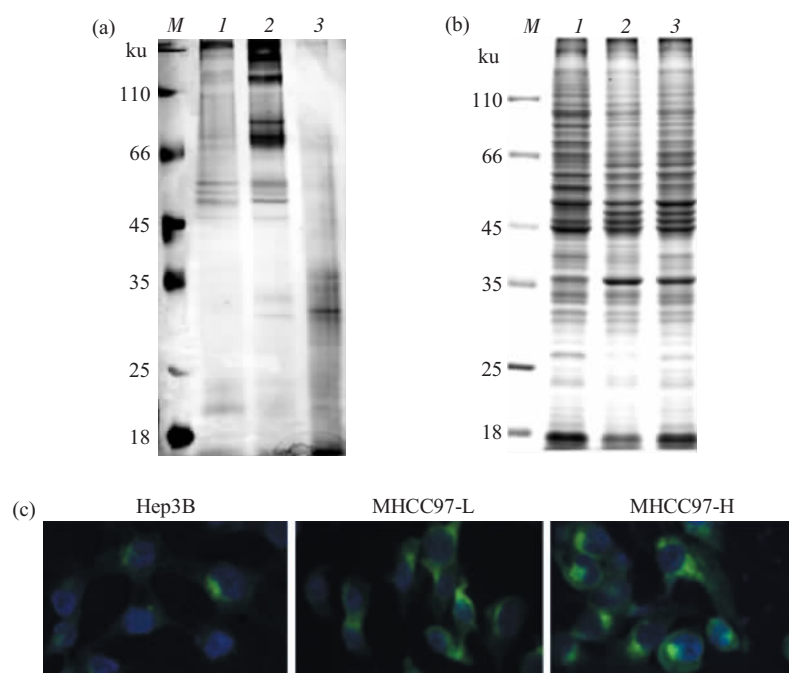


Fig. 1 Comparison of core fucosylated glycoprotein expression and distribution of three cultured HCC cell lines with different metastasis potentials

(a) 20 μg of LCA-bound proteins extracted from HCC cell lines were electrophoresed on a 10% acrylamide gel and visualized by silver staining. (b) Protein expression profiles from HCC cell lines visualized by coomassie blue staining showed no difference. 1: MHCC97-L cells; 2: MHCC97-H; 3: Hep3B; M: Marker. (c) Distribution of core fucosylated glycoprotein in HCC cell lines. Immunofluorescent microscopy (1 000 $\times$).

MHCC97-H, MHCC97-L 和 Hep3B 总蛋白经 SDS-PAGE 分离和考马斯亮蓝染色后的电泳图谱呈现蛋白质条带并无明显差异(图 1b). 但经 LCA 亲和层析分离得到的核心岩藻糖基化蛋白电泳图谱则表现明显不同, 与 Hep3B 相比, MHCC97-H 和 MHCC97-L 条带数较多, 这些差异条带主要集中在 45~60 ku 和 66~110 ku (图 1a). 荧光显微镜分析核心岩藻糖基化蛋白质在转移潜能不同人肝癌细胞中的细胞内定位时, 发现这些差异蛋白质主要定位在核周边的细胞浆内(图 1c), 且随肝癌细胞转移潜能增加, 荧光强度也增强. 说明细胞内蛋白质的核心岩藻糖基化程度随肝癌转移潜能增加而增加, 某些蛋白质增加的核心岩藻糖基化可能与肝癌转移有关.

2.2 筛查与肝癌转移相关的核心岩藻糖基化蛋白

应用 2-DE 联合 LCA 亲和印迹, 建立不同转移潜能人肝癌细胞核心岩藻糖基化蛋白表达谱. ImageMaster 软件对 3 种细胞 LCA 亲和印迹表达谱中蛋白质点进行匹配分析, 结果发现, 分子质量 55~60 ku, 等电点 4~6 区域处有蛋白质点呈差异表达, 该点在 Hep3B 中呈阴性表达, 而在高转移潜能细胞 MHCC97-L 和 MHCC97-H 中呈阳性表达, 同时发现考马斯亮蓝染色胶中相对应的蛋白质点在 3 种细胞中均表达(图 2), 经 MALDI-TOF-MS/MS 鉴定为 CK8.

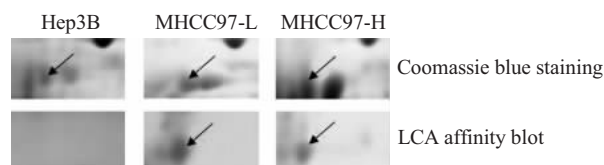


Fig. 2 Differential analysis of LCA affinity blot maps of three cultured HCC cell lines with different metastasis potentials

270 μ g total cellular proteins were extracted from HCC cell lines. The gels were stained with a coomassie blue staining kit and with LCA blot analysis.

2.3 CK8 异常核心岩藻糖基化的再验证

为进一步证实 CK8 异常核心岩藻糖基化与肝癌转移相关, 应用 LCA 亲和沉淀提取不同转移潜能人肝癌细胞的核心岩藻糖基化蛋白, 蛋白质印迹检测 CK8 表达情况. 结果发现, CK8 在 MHCC97-L 和 MHCC97-H 中表达较 Hep3B 高(图 3). 说明它们在高转移潜能人肝癌细胞中的核心

岩藻糖基化程度较 Hep3B 高, 并随肝癌细胞转移潜能增加而增加.



Fig. 3 Determination of CK8 by Western blot on LCA precipitated glycoproteins from HCC cell lines with different metastasis potentials

10 μ g of LCA precipitated glycoproteins from Hep3B, MHCC97-L and MHCC97-H cells were electrophoresed on a 10% acrylamide gel, and blotted onto the membrane, followed by immunoblotting with anti-CK8 antibody.

2.4 CK8 蛋白细胞内定位及表达水平分析

Western blot 检测 CK8 的蛋白质表达水平, 分析它们在转移潜能不同的人肝癌细胞中量的改变, 以探寻它们与肝癌细胞转移潜能的关系. 结果发现, 它们在高转移潜能细胞 MHCC97-L 和 MHCC97-H 中的条带灰度均较 Hep3B 深(图 4), 说明在 MHCC97-L 和 MHCC97-H 中的表达相对较高. 应用免疫荧光分析 CK8 细胞内定位和表达(图 5), 发现它定位于胞浆, 高转移潜能细胞 MHCC97-L 和 MHCC97-H 中的荧光较强, 说明表达水平较高, 而 Hep3B 中荧光几乎不可见.

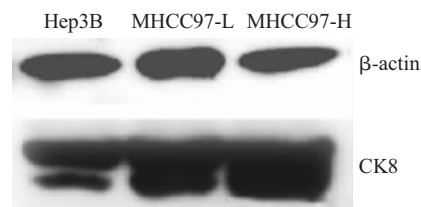


Fig. 4 Western blot analysis for CK8 in HCC cell lines with differently metastatic potentials

10 μ g of proteins extracted from Hep3B, MHCC97-L and MHCC97-H cells were electrophoresed on a 10% acrylamide gel, and blotted onto the membrane, followed by immunoblotting with anti-CK8 antibody.

2.5 CK8 的寡糖链结构推断

应用凝集素 LCA、Con A 和 RCA-1 对不同转移潜能人肝癌细胞系中 CK8 的寡糖链结构进行推断. 结果发现, CK8 在 MHCC97-H 中对 LCA 和 RCA-1 的亲合力较 Hep3B 高, Con A 对 2 种细胞中 CK8 的亲合力则无明显差异(图 6), 说明 CK8 是高甘露糖型 N-连接糖蛋白, 在 MHCC97-H 中有核心岩藻糖和末端半乳糖的增加.

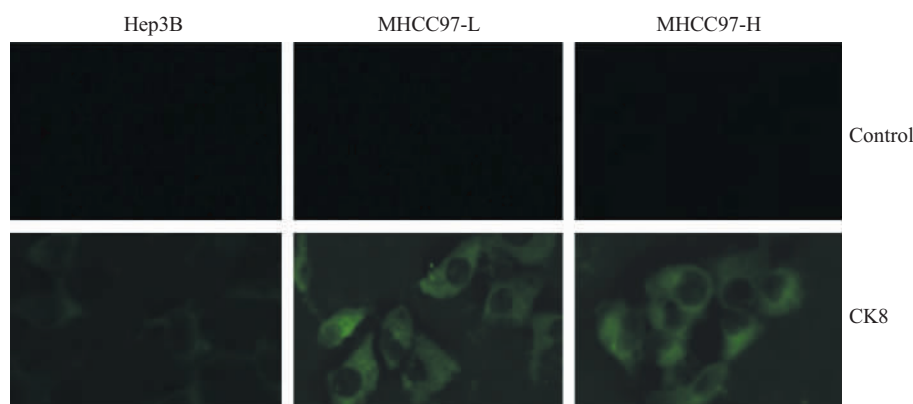


Fig. 5 Immunofluorescence detection of CK8 in HCC cell lines with different metastasis potentials (1 000 ×)

The negative control was performed without adding primary antibody.

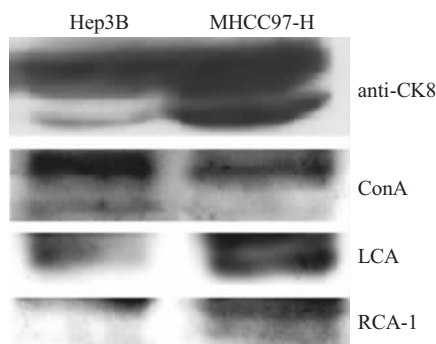


Fig. 6 Analysis of N-glycans of CK8 from HCC cell lines with different metastasis potentials with lectins

1 mg total proteins extracted from Hep3B and MHCC97-H cells were immunoprecipitated with anti-CK8. Immunoprecipitates were electrophoresed on a 10% acrylamide gel, followed by lectin blot analysis and by immunoblotting with anti-CK8 antibody.

3 讨 论

体内有些重要蛋白质在合成后需要加工修饰成活性形式而发挥作用,主要的化学修饰作用有糖基化、羟基化、酰基化与二硫键的形成等,糖基化修饰是一种常见的翻译后修饰,大约 50%以上的蛋白质都有糖基化发生^[12],它对蛋白质功能有着重要影响.肝癌转移是一个复杂过程,它包括细胞粘附、运动增殖、基质降解、血管生成与机体免疫等多个环节,它与细胞表面糖蛋白异常糖基化关系密切^[13,14].据报道,肿瘤细胞恶性转化时,糖蛋白 N-糖链结构发生改变,其中,天冬酰胺连接的寡糖链分枝增加在肿瘤恶化中发挥重要作用,它导致了肿瘤细胞转移潜能的增加^[15].

核心岩藻糖基化被认为是糖蛋白寡糖链合成的终末反应, LCA 可以很简单地鉴定蛋白质是否有核心岩藻糖基化的发生^[16],应用 LCA 推断蛋白寡糖链结构的相关报道^[17]很多.糖复合物中核心岩藻糖的多寡与很多疾病的发生有关,如白细胞粘附缺陷症 / 先天性糖基化障碍 (leukocyte adhesion deficiency/congenital disorder of glycosylation II c, LAD II /CDG II c)^[18].文献表明,肝癌诱发过程中,核心岩藻糖基化蛋白质表达改变显著^[19],而岩藻糖基化蛋白增加可能影响肝癌细胞经裸鼠脾内注射后肝内转移的过程^[20].目前糖蛋白与肿瘤转移关系研究局限于整合素、E-钙粘连素、选凝素、CD44、纤连蛋白、层连蛋白和骨桥蛋白,缺少系统的方法筛查肿瘤转移相关的含某种结构特征的糖蛋白.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 MHCC97-H 和 MHCC97-L 中出现了 45~60 ku 和 66~110 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.为探寻与肝癌细胞转移相关的异常糖基化蛋白质,我们建立了适用于小样本的高通量糖蛋白质组学共性技术平台,即 2-DE、凝集素亲和印迹、凝集素亲和沉淀联合质谱分析技术.在该平台基础上,我们发现 CK8 核心岩藻糖基化差异表达可能与肝癌细胞转移潜能相关.

角蛋白中间丝特异表达在上皮细胞中^[21],其在体内合成后,往往有翻译后修饰的发生,其中包括磷酸化^[22]和糖基化^[23].CK8 是细胞角蛋白家族中的

一员, 其多个位点可发生糖基化^[24]. 在 MHCC97 细胞 LCA 亲和印迹图谱中可见 CK8 的异常核心岩藻糖基化发生 (图 2), 该现象通过 LCA 亲和沉淀联合蛋白免疫印迹又进一步得到证实 (图 3). 应用多种凝集素进一步分析它同肝癌转移相关的糖链结构变化, 结果发现, 无论 MHCC97-H 或 Hep3B 中, CK8 对 ConA 都有较高的亲和力, 说明 CK8 是一种 N-连接高甘露糖型糖蛋白, 而在 MHCC97-H 中它与 LCA 和 RCA-1 的亲和力较 Hep3B 强, 说明它在前者中的核心岩藻糖和 β -1, 4 末端半乳糖较后者有所增加. 产生这种糖链结构改变的原因可能是 CK8 在 MHCC97-H 中得到了异常的糖基化修饰, 使其为凝集素检测到, 而这种修饰可能与肝癌转移相关. 蛋白质在生命过程中发挥重要作用, 不仅伴随化学修饰的改变, 其细胞内蛋白质表达水平、RNA 相对含量往往也发生变化. 如图 4 和 5 所示, 在 MHCC97-H 中 CK8 表达上调也可能是另外一个影响肝癌细胞转移潜能的原因. Hendrix 等^[25]也表明, 在人黑色素瘤中, 细胞角蛋白过表达与它在体外具有的较高运动和侵袭能力相关. 因此, 我们得出了这样结论: CK8 过表达或异常糖基化可能与肝癌转移相关.

目前, 本课题组正在用临床相关的肝癌裸鼠模型做深入研究, 以更好理解 CK8 异常岩藻糖基化在 HCC 转移中的作用, 为肝癌转移复发机制性研究奠定基础, 同时, 掌握与肝癌转移相关差异表达的蛋白质及其翻译后修饰, 有助于新的诊断工具产生, 同时也为这种流行病的治疗提供新的方法.

参 考 文 献

- Parkin D M. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol*, 2001, **2** (9): 533~543
- Jemal A, Thomas A, Murray T, *et al.* Cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 2002, **52** (1): 23~47
- Guzman G, Alagiozian-Angelova V, Layden-Almer J E, *et al.* p53, Ki-67, and serum alpha fetoprotein as predictors of hepatocellular carcinoma recurrence in liver transplant patients. *Mod Pathol*, 2005, **18** (11): 1498~1503
- Huang G T, Lee H S, Chen C H, *et al.* Correlation of E-cadherin expression and recurrence of hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology*, 1999, **46** (27): 1923~1927
- Li X M, Tang Z Y, Qin L X, *et al.* Serum vascular endothelial growth factor is a predictor of invasion and metastasis in hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res*, 1999, **18** (4): 511~517
- Chandler J S, Calnnek D, Quaroni A. Identification and characterization of rat intestinal keratins. *Molecular cloning of cDNAs encoding cytokeratins 8, 19, and a new 492 ku type I cytokeratin (cytokeratin 21) expressed by differentiated intestinal epithelial cells.* *J Biol Chem*, 1991, **266** (18): 11932~11938
- Hendrix M J, Seftor E A, Chu Y W, *et al.* Role of intermediate filaments in migration, invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*, 1996, **15** (4): 507~525
- Tian J, Tang Z Y, Ye S L, *et al.* New human hepatocellular carcinoma (HCC) cell line with highly metastatic potential (MHCC97) and its expressions of the factors associated with metastasis. *Br J Cancer*, 1999, **81** (5): 814~821
- Li Y, Tang Z Y, Ye S L, *et al.* Establishment of cell clones with different metastatic potential from the metastatic hepatocellular carcinoma cell line MHCC97. *World J Gastroenterol*, 2001, **7** (5): 630~636
- 代智, 刘银坤, 崔杰峰, 等. 肝癌转移相关的核心岩藻糖基化蛋白质表达谱的研究. *生物化学与生物物理进展*. 2005, **32** (5): 442~447
- Dai Z, Liu Y K, Cui J F, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2005, **32** (5): 442~447
- Xu S, Zhu X, Zhang S, *et al.* Over-expression of beta-1, 4-galactosyl-transferase I, II, and V in human astrocytoma. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2001, **127** (8): 502~506
- Varki A, Cummings R, Esko J, *et al.* *Essentials of Glycobiology*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999. 653
- Dennis J W, Granowsky M, Warren C E. Protein glycosylation in development and disease. *Bioessay*, 1999, **21** (5): 412~421
- Bironaite D, Nesland J M, Dalen H, *et al.* N-glycans influence the *in vitro* adhesive and invasive behaviour of three metastatic cell lines. *Tumor Biol*, 2000, **21** (3): 165~175
- Dennis J W, Laferte S, Waghorne C, *et al.* Beta 1-6 branching of Asn-linked oligosaccharides is directly associated with metastasis. *Science*, 1987, **236** (4801): 582~585
- Taniguchi N, Ekuni A, Ko J H, *et al.* A glycomic approach to the identification and characterization of glycoprotein function in cells transfected with glycosyltransferase genes. *Proteomics*, 2001, **1** (2): 239~247
- Noda K, Miyoshi E, Uozumi N, *et al.* Gene expression of alpha1-6 fucosyltransferase in human hepatoma tissues: a possible implication for increased fucosylation of alpha-fetoprotein. *Hepatology*, 1998, **28** (4): 944~952
- Sturla L, Fruscione F, Noda K, *et al.* Core fucosylation of N-linked glycans in leukocyte adhesion deficiency/congenital disorder of glycosylation II c (LAD II /CDG II c) fibroblasts. *Glycobiology*, 2005, **15** (10): 924~934
- 吴兴中, 陈迎风. 岩藻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 alpha1-6 fucosyltransferase in hepatoma cells suppresses intrahepatic metastasis after splenic injection in athymic mice. *Cancer Res*, 1999, **59** (9): 2237~2243

- 21 Moll R, Franke W W, Schiller D L, *et al.* The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*, 1982, **31** (1): 11~24
- 22 Steinert P M. The dynamic phosphorylation of the human intermediate filament keratin 1 chain. *J Biol Chem*, 1988, **263** (26): 13333~13339
- 23 King I A, Hounsell E F. Cytokeratin 13 contains O-glycosidically linked N-acetylglucosamine residues. *J Biol Chem*, 1989, **264** (24): 14022~14028
- 24 Chou C F, Smith A J, Omary M B. Characterization and dynamics of O-linked glycosylation of human cytokeratin 8 and 18. *J Biol Chem*, 1992, **267** (6): 3901~3906
- 25 Hendrix M J, Seftor E A, Chu Y W, *et al.* Role of intermediate filaments in migration, invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*, 1996, **15** (4): 507~525

Alteration of CK8 Both in Its Expression Level and Its Glycan Parts Related to HCC Metastatic Ability*

DAI Zhi¹⁾, LIU Yin-Kun^{1)**}, GUO Kun¹⁾, SUN Qiang-Ling¹⁾, LU Wen-Jing¹⁾, YANG Peng-Yuan²⁾

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

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

Abstract A glycomic method was used to screen the aberrantly α 1-6 fucosylated glycoproteins related to HCC metastasis and analyze the alteration of CK8 both in its expression level and its glycan parts associated with metastatic ability. Based on the approach, 2-DE coupled with lectin affinity blot, lectin affinity precipitation followed by MALDI-TOF-MS/MS, the lens culinaris agglutinin (LCA) affinity glycoprotein profiles from MHCC97-L and MHCC97-H cells, two higher metastatic HCC cell lines, were obtained, in which a differentially displayed protein spot was indicated when compared with Hep3B, in the region within 55~60 ku in molecular mass and 4~6 in isoelectric point. The identification result was CK8 by MALDI-TOF-MS/MS. To confirm the relation between increased core-fucosylation of CK8 and HCC metastasis, LCA affinity precipitation was used to extract the α 1-6 fucosylated glycoproteins, followed by Western blot. And it was found that CK8 was highly fucosylated in both MHCC97-L and MHCC97-H cells compared to Hep3B. Immunofluorescence analysis and Western blot were used to detect its intracellular localization and its protein expression levels, indicating that CK8 distributed in cytoplasm and increased protein expressions in MHCC97-L and MHCC97-H cell lines. And further lectin binding studies found that CK8 has a high affinity for Con A in both MHCC97-H and Hep3B cells, indicating that CK8 was a glycoprotein with high-mannose type N-glycans. But the amount of the lectin RCA-1 binding to CK8 was greater in MHCC97-H than Hep3B, suggesting that CK8 contained the increased terminal galactose residues β -1, 4-linked to GlcNAc in MHCC97-H. All the results suggested that the increase of CK8 in its protein expression level, core-fucosylation and terminal gal β 1,4 GlcNAc disaccharides might be related to HCC metastatic ability.

Key words carcinoma hepatocellular, tumor metastasis, CK8, lens culinaris agglutinin, core-fucosylation

*This work was supported by grants from Hi-Tech Research and Development Program of China (2004CB520802) and National Basic Research Program of China (001CB510205).

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

Received: July 16, 2006 Accepted: August 26, 2006