

## 原发性肝细胞癌患者血清 N-糖组的表达分析

赵云鹏<sup>1</sup>, 高春芳<sup>1\*</sup>, 房萌<sup>1</sup>, 孙树汉<sup>2</sup>, 刘艳<sup>1</sup>, 陈冬梅<sup>1</sup>, 蔡美琳<sup>1</sup>

(1. 第二军医大学东方肝胆外科医院实验诊断科, 上海 200438; 第二军医大学基础部医学遗传学教研室, 上海 200433)

**[摘要]** **目的:**通过对原发性肝细胞癌(HCC)与正常人血清 N-糖组图谱比较分析,寻找异常峰,为寻求新的 HCC 肿瘤标志物奠定基础。**方法:**收集乙型肝炎病毒(HBV)感染的 HCC 患者( $n=100$ )及健康献血员( $n=130$ )血清,采用基于 DNA 测序仪的毛细管电泳技术,检测每份标本中荧光标记的 N-糖组分。**结果:**每份血清均得到具有 11 个峰的图谱,峰值经校正后量化,HCC 组较对照组峰 1、2、9、11 升高,峰 6、8、10 降低( $P<0.05$ );且部分峰值变化与肿瘤标志物甲胎蛋白、HBV DNA 载量、临床肝功能指标存在相关性。**结论:**HCC 组血清 N-糖组图谱较正常对照组存在明显的差异,这种变化有望为临床疾病诊断提供依据。

**[关键词]** N-糖组;癌,肝细胞;电泳,毛细管**[中图分类号]** R 735.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)12-1280-04

## Expression of N-glycome in sera of patients with hepatocellular carcinoma

ZHAO Yun-peng<sup>1</sup>, GAO Chun-fang<sup>1\*</sup>, FANG Meng<sup>1</sup>, SUN Shu-han<sup>2</sup>, LIU Yan<sup>1</sup>, CHEN Dong-mei<sup>1</sup>, CAI Mei-lin<sup>1</sup> (1. Department of Laboratory Medicine, Eastern Hepatobiliary Hospital, Shanghai 200438, China; 2. Department of Medical Genetics, College of Basic Medicine Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To compare the expression profiles of serum glycomics between hepatocellular carcinoma(HCC) patients and normal adults, in an attempt to search for new biomarkers for HCC. **Methods:** Serum samples were obtained from HCC patients with hepatitis B virus(HBV) infection ( $n=100$ ) and normal adults( $n=130$ ). Profiles of serum N-glycome were determined by capillary electrophoresis (CE) based on DNA sequencing equipment. **Results:** Each sample had a profile with 11 peaks; the peaks were adjusted and quantified. Peaks 1, 2, 9, and 11 in HCC group were higher than those in the control group; peaks 6, 8 and 10 were lower in HCC group than those in control group ( $P<0.05$ ). The changes of peak values of several peaks were correlated with tumor markers such as alpha-fetoprotein(AFP), HBV DNA copies, albumin and prothrombin time. **Conclusion:** N-glycome profiles in serum are significantly different between HCC patients and normal adults, which may provide evidence for clinical diagnosis of HCC.

**[KEY WORDS]** N-glycome; carcinoma, hepatocellular; electrophoresis, capillary

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(12):1280-1283]

目前原发性肝癌在全球恶性肿瘤死亡率中居第三位,在我国恶性肿瘤死亡率中居第二位。每年因肝病死亡人数约为 30 万人,其中 50%为原发性肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)<sup>[1]</sup>。HCC 起病多较隐匿,早期一般多无临床症状,或仅有肝炎的症状与体征,很难早期发现。一旦出现典型的临床表现,如肝区疼痛、消瘦、黄疸或腹水等,通常已经发展到中晚期,而失去了进行根治性手术的机会。目前 HCC 的早期诊断仍是临床一大难题,病理组织学检查仍是诊断的金标准,然而组织学检查存在其固有的缺陷,而非损伤性检查虽然方便、经济、可以重复进行,但单项指标检测的特异性、敏感性均不高。血清甲胎蛋白(AFP)是目前唯一被广泛接受用于肝癌诊断及其术后监测的肿瘤标志物,但其敏感度低于 70%~80%<sup>[2]</sup>。临床迫切需要寻求新的经济而有效的非创伤性诊断指标进行辅助诊断。血清中

除浆细胞产生的免疫球蛋白外,绝大部分糖蛋白由肝细胞合成,糖基化的改变可以反映肝脏功能的改变。但一直以来,糖基化分析由于存在技术瓶颈,难以在临床研究中采用。糖蛋白包括组成型糖蛋白(含 N-糖链或 O-糖链)、可调型糖蛋白、非酶催化的糖化蛋白质,研究手段包括荧光辅助糖电泳(FACE)、糖微点矩阵<sup>[3]</sup>、荧光糖结合物探针、毛细管电泳、X-线衍射、核磁共振(NMR)、高效液相色谱法(HPLC)、飞行时间质谱、前沿亲和层析等<sup>[4-5]</sup>。目前的一些糖组学研究仅限于糖蛋白的 N-糖链,并

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30571774);上海市科学委员会登山计划(064119522)。Supported by National Natural Science Foundation of China (30571774) and Mountaineering Program Foundation of Science and Technology Committee of Shanghai(064119522)。

**[作者简介]** 赵云鹏,硕士生。E-mail:jane124600@163.com

\* Corresponding author. E-mail:gaocf1115@yahoo.com

具有相对成熟的方法, 基于 DNA 测序仪的毛细管电泳技术发展迅速, 已经有报道将之应用于临床血样 N-糖组的分析<sup>[6]</sup>。

本研究通过毛细管电泳技术, 对 HCC 组与正常组的血清 N-糖组图谱进行比较, 以寻求新的 HCC 肿瘤标志物。

## 1 资料和方法

**1.1 血清标本的收集** 收集 2006 年 5—12 月间我院 100 例住院患者血清。患者符合以下入选标准: (1) 均为乙型肝炎病毒 (HBV) 感染的 HCC 患者; (2) 术后病理标本均经本院病理科专家确诊为 HCC 且未发生转移; (3) 排除人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV), 肝炎病毒丙型 (hepatitis C virus, HCV)、丁型 (hepatitis D virus, HDV)、戊型 (hepatitis E virus, HEV) 和梅毒 (syphilis) 等除 HBV 感染之外的其他病原感染; (4) 排除自身免疫性肝病、酒精性肝病、药物性肝病和 Wilson 病。每例患者临床血常规、生化、肿瘤标志物、HBV 标志物、DNA 载量等数据的采集与血清收集同期进行, 血清采集均在患者未接受任何治疗之前完成。患者主要信息见表 1。对照组血清采自 130 名上海市血液中心健康献血员。

表 1 伴有 HBV 感染的 100 例 HCC 患者特征分析

Tab 1 Characteristics of 100 Chinese HCC patients with HBV infection

Index	Value
Gender male (%)	90 (N=100)
Age (t/year)	53.19 ± 8.88 (N=100)
HBV DNA (copy)	1.09 × 10 <sup>6</sup> ± 3.98 × 10 <sup>6</sup> (N=61)
HBsAg <sup>+</sup> (%)	79 (N=100)
HBeAg <sup>+</sup> (%)	25 (N=100)
HBeAb <sup>+</sup> (%)	65 (N=100)
HbAb <sup>+</sup> (%)	91 (N=100)
AST (α <sub>B</sub> /U · L <sup>-1</sup> )	80.76 ± 70.68 (N=99)
ALT (α <sub>B</sub> /U · L <sup>-1</sup> )	66.48 ± 60.43 (N=99)
GGT (α <sub>B</sub> /U · L <sup>-1</sup> )	215.50 ± 255.96 (N=99)
Albumin (ρ <sub>B</sub> /g · L <sup>-1</sup> )	39.61 ± 5.16 (N=99)
Total bilirubin (c <sub>B</sub> /μmol · L <sup>-1</sup> )	34.10 ± 52.32 (N=89)
Total serum protein (ρ <sub>B</sub> /g · L <sup>-1</sup> )	72.52 ± 6.57 (N=89)
AFP (ρ <sub>B</sub> /ng · ml <sup>-1</sup> )	523.09 ± 466.29 (N=95)

AST: Aspartate aminotransferase; ALT: Alanine aminotransferase; GGT: Gamma-glutamyl transferase; AFP: Alpha-fetoprotein

**1.2 方法** 以毛细管凝胶电泳模式分离糖蛋白中释放出的完整寡糖, 由于糖蛋白中各种糖的含量低、成分复杂, 所以必须采用灵敏的荧光标记试剂与糖形成复合物, 利用高灵敏度的激光诱导荧光技术进行检测。其测定原理主要包括以下 3 个步骤: 糖蛋白中与天冬酰胺连接 (N2 连接) 的寡糖的释放, 用 APTS (8-amino-1,3,6-pyrenetrisulfonic acid) 荧光标记及去唾液酸; 毛细管凝胶电泳分离检测<sup>[6]</sup>。

**1.3 试剂与仪器** peptide-N-glycosidase F (PNGase F)、10% NP40 购自 New England Biolabs 公司 (英国); 标记染料 APTS 与寡糖标准品购自 Beckman Coulter 公司 (美国); 唾液酸酶 (arthrobacter ureafaciens sialidase) 购自 Roche 公司 (瑞士); 氰基硼氢化钠 (NaBH<sub>3</sub>CN) 购自 Sigma 公司 (美国); 99.99% 十二烷基硫酸钠 (SDS) 由 Boehringer Ingelheim 公司 (德国) 提供; 碳酸氢铵、乙酸钠、柠檬酸 (化学纯) 选用上海试剂四厂生产的试剂。仪器采用美国生物应用公司 (ABI) 3130 测序仪, 应用 GeneScan 软件分析结果。

**1.4 实验步骤** 参考 Callewaert 等<sup>[7]</sup> 报道的应用糖组学技术诊断代偿、失代偿肝硬化的方法。具体操作如下: (1) 寡糖的释放, 2 μl 血清加入含有 2 μl 缓冲液 (10 mmol/L NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) 和 3 μl 水的 PCR 反应管中, 95℃ 加热 5 min 后 4℃ 放置 15 min, 加入 3 μl PNGase F (2.2 U/μl, pH 8.3, 3.33% NP40) 37℃ 孵育 3 h, 4℃ 冷浴后加入 100 μl 水, 标记为 D 管。(2) 标记寡糖, 从 D 管吸取 6 μl 溶液加入一新的 PCR 管中, 开盖 60℃ 烘干 60 min, 加入 2 μl 标记溶液 (20 mmol/L 的 APTS 与 1 mol/L 的 NaBH<sub>3</sub>CN 之比为 1:1), 37℃ 孵育 16 h, 加 200 μl 水终止反应, 标记为 L 管。(3) 去唾液酸, 从 L 管取 2 μl 溶液加入一新的 PCR 管中, 加入 3 μl 0.25 mU 去唾液酸酶在 37℃ 孵育过夜, 加 160 μl 水振荡混匀, 标记为 DE 管。(4) 取 DE 管 10 μl 溶液用 ABI 3130 测序仪进行片段分析, 数据经 GeneScan 软件分析。经由上述过程处理, 每份血清标本均可测得具有 11 个峰左右的糖组图谱 (图 1), 将峰值量化, 最终采用内参校正后的数据。

**1.5 统计学处理** 应用 SPSS 11.0 软件对研究数据进行统计分析。数据用  $\bar{x} \pm s$  表示。两组均数的显著性检验采用 *t* 检验。两指标间相关性分析: 双变量正态分布资料采用直线相关法, 非参数相关

分析采用 Spearman 相关分析。 $P < 0.05$  为有显著性差异。

表 2 HCC 组及正常对照组 N-糖组分析结果

Tab 2 Analysis N-linked glycomics in HCC patients and healthy controls

Peak	Normal control ( $\bar{x} \pm s, N=130$ )	HCC ( $\bar{x} \pm s, N=99$ )	t value	P value
1	7.59±3.58	11.61±5.20	1.98	<0.05
2	1.38±1.13	1.91±0.92	1.98	<0.05
3	7.06±3.34	7.21±1.64	0.38	>0.05
4	4.49±2.22	4.70±0.94	0.89	>0.05
5	40.73±15.42	38.20±7.71	1.63	>0.05
6	22.64±10.85	18.98±3.37	3.25	<0.05
7	6.95±3.37	6.77±1.96	0.51	>0.05
8	7.59±3.27	4.75±1.83	7.77	<0.01
9	2.20±1.57	3.87±1.55	8.04	<0.01
10	1.64±0.99	0.58±0.28	1.68	<0.05
11	0.72±0.53	1.36±0.65	8.26	<0.01

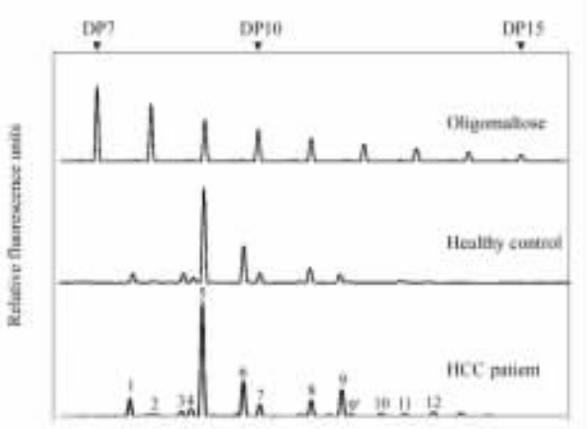


图 1 HCC 组与正常对照组 N-糖组图谱

Fig 1 Profiles of N-linked glycomics in HCC patients and healthy controls

2 结果

2.1 HCC 组与对照组 N-糖组 11 个峰值比较分析 两组均值比较, HCC 组第 1、2、9、11 峰的峰值较对照组升高 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ); 第 6、8、10 峰的峰值较对照组降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。结果详见表 2。

2.2 各峰值与患者临床实验室特征的相关性分析 结果详见表 3。与肿瘤标志物 AFP 相关性密切的是第 6 峰, 相关系数  $r = 0.235 (P < 0.05)$ ; 而第 8 峰与 DNA 载量的对数成负相关, 相关系数  $r = -0.302 (P < 0.05)$ 。其中与常规肝功能相关的为第 1、2、8、9、11 峰, 如第 1、2 峰与白蛋白成负相关, 相关系数分别为  $-0.529, -0.321 (P < 0.01)$ 。第 8 峰与白蛋白成正相关, 相关系数  $r = 0.272 (P < 0.01)$ ; 第 9、11 峰与 GGT 成正相关, 相关系数分别为  $0.270, 0.225 (P < 0.05)$ 。

表 3 N-糖组图谱中峰值与临床实验室指标相关性分析

Tab 3 Correlation analysis between N-glycome profile and parameters of patients

Peak	Statistics	Age (N=99)	ALB (N=98)	PT (N=95)	AST/ALT (N=98)	GGT (N=98)	LogDNA (N=60)	AFP (N=94)
1	r value		-0.529	0.463	0.261		0.308	
	P value		0.000	0.000	0.009		0.017	
2	r value	0.265	-0.321	0.393				
	P value	0.008	0.001	0.000				
3	r value		-0.214	0.395			0.269	0.297
	P value		0.034	0.000			0.037	0.004
4	r value							
	P value							
5	r value		0.386	-0.499			-0.385	-0.296
	P value		0.000	0.000			0.002	0.005
6	r value						0.256	0.235
	P value						0.049	0.023
7	r value	0.008		0.267				
	P value	0.023		0.009				
8	r value		0.272	-0.396			-0.302	
	P value		0.007	0.000			0.019	
9	r value				0.208	0.270		
	P value				0.040	0.007		
10	r value							
	P value							
11	r value					0.225		
	P value					0.026		

ALB; Albumin; PT; Prothrombin time; AST; Aspartate aminotransferase; ALT; Alanine aminotransferase; GGT; Gamma-glutamyl transferase; AFP; Alpha-fetoprotein

### 3 讨 论

众所周知,糖、蛋白质、核酸是涉及生命活动本质的三类重要生物分子。在生命活动的过程中,糖作为能量物质及结构物质的作用早已被人们所熟悉。随着分子生物学及细胞生物学的发展,糖的其他诸多生物功能不断被认识。糖链具有信号标记、参与细胞免疫、组成血型抗原、作为恶性细胞标记、提高蛋白或脂质的亲水性、保护并修饰蛋白质等多种功能<sup>[8-9]</sup>。在肝病由炎症、纤维化到癌变的过程中均有糖类物质结构和功能的改变,如由于聚糖代谢酶类活力的改变或缺陷,可使糖复合物中的糖链数量和结构产生异常,最终导致细胞功能失常,甚至出现恶性表现。糖链结构异常还可能被机体免疫系统识别,引起细胞免疫和体液免疫应答,并激发自身免疫反应及免疫调节功能紊乱,介导细胞毒性反应,引起肝细胞的损伤。所以糖复合物中糖链数量和结构变化与 HCC 关系密切。有文献报道在肝病状态下,一些糖蛋白分子的糖基化水平、糖基化位点、数量等与正常肝组织中的成分都存在差异,并由此影响其在体内的代谢和功能,因此血清糖蛋白中 N-糖基化图谱可反映肝细胞功能的变化<sup>[10-12]</sup>。但一直以来糖链结构的复杂性和研究技术的缺乏一直是糖生物学研究的障碍。2004 年 *Nature Medicine* 上发表的一篇应用糖组学技术诊断代偿、失代偿肝硬化的研究论文,首次提出了应用糖生物学技术能显著提高肝硬化非创性诊断敏感性和特异性的观点<sup>[7]</sup>。这是一种新的基于毛细管电泳技术来检测荧光标记寡糖的方法。本研究就是利用这一新的技术来探讨 HCC 患者血清较正常人血清中 N-糖基化图谱是否存在差异,能否反映疾病的状态。从而有望得到一全新无创伤性的 HCC 肿瘤标志物。

本研究通过对 HCC 患者组 N-糖基化图谱与正常组对照,一方面发现 HCC 疾病组中出现某些峰值的变化,另一方面还发现一些峰值的变化与临床常用肝脏肿瘤标志物、病毒学标志物及生化常规诊断指标也存在一定的相关性,并具有统计学意义,提示在 HCC 发生、发展过程中蛋白的糖基化发生了变化,这种变化有望为临床诊断提供依据,其明确诊断价值尚有待于临床大样本及随访研究证实。在后续的研究中,我们将通过高效液相色谱法(HPLC)等技术手段确定各峰所代表的寡糖结构,比较

Callewaert 等<sup>[7]</sup>研究肝纤维化时明确的几个峰的结构,发现其中变化的规律,寻找 N-糖峰值及特定糖组分变化与 HCC 发生、发展的相关性,在此基础上,初步确认具有疾病诊断意义的峰,采用受试者工作特征曲线(ROC)等多种方法,进一步评价其在 HCC 诊断中的灵敏度(sensitivity)和特异性(specificity),并与目前临床广泛应用的肝癌标志物 AFP 相比较,确定联合应用经典肿瘤标志物与 N-糖组分析对提高诊断特异性与敏感性的价值。

在后续研究中,我们还将研究 N-糖组的这种变化与肝细胞生物学行为变化的相关性,进一步在细胞学水平探索糖生物学改变在 HCC 发生及早期诊断中的应用价值。

### [参 考 文 献]

- [1] Lopez L J, Marrero J A. Hepatocellular carcinoma[J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2004, 20: 248-253.
- [2] Soresi M, Magliarisi C, Campagna P, et al. Usefulness of alpha-fetoprotein in the diagnosis of hepatocellular carcinoma[J]. *Anticancer Res*, 2003, 23: 1747-1753.
- [3] Hirabayashi J. Oligosaccharide microarrays for glycomics[J]. *Trends Biotechnol*, 2003, 21: 141-143.
- [4] Hirabayashi J. Lectin-based structural glycomics: glycoproteomics and glycan profiling[J]. *Glycoconj J*, 2004, 21: 35-40.
- [5] Ratner D M, Adams E W, Disney M D, et al. Tools for glycomics: mapping interactions of carbohydrates in biological systems[J]. *Chembiochem*, 2004, 5: 1375-1383.
- [6] Callewaert N, Geysens S, Molemans F, et al. Ultrasensitive profiling and sequencing of N-linked oligosaccharides using standard DNA-sequencing equipment[J]. *Glycobiology*, 2001, 11: 275-281.
- [7] Callewaert N, Vlierberghe H V, Hecke A N, et al. Noninvasive diagnosis of liver cirrhosis using DNA sequencer-based total serum protein glycomics[J]. *Nat Med*, 2004, 10: 429-434.
- [8] 蒋燕灵, 王克夷. 正在来临的糖组学[J]. *生命的化学*, 2000, 6: 286-287.
- [9] 金城. 糖生物学: 基因组学和蛋白质组的延伸[J]. *科技前沿与学术评论*, 2001, 2: 31-35.
- [10] Lee S L, Evers S, Roeder D, et al. Mannose receptor-mediated regulation of serum glycoprotein homeostasis [J]. *Science*, 2002, 295: 1898-1901.
- [11] Ashwell G, Harford J. Carbohydrate-specific receptors of the liver[J]. *Annu Rev Biochem*, 1982, 51: 531-554.
- [12] McFarlane I G, McFarlane B M, Major G N, et al. Identification of the hepatic asialoglycoprotein receptor (hepatic lectin) as a component of liver specific membrane lipoprotein (LSP)[J]. *Clin Exp Immunol*, 1984, 55: 347-351.

[收稿日期] 2007-09-17

[修回日期] 2007-10-23

[本文编辑] 邓晓群