

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.06.007

· 基础研究 ·

## 下调 GnTIVa 表达对肝癌 Hca-F 细胞增殖及侵袭的影响

樊建慧<sup>1</sup>,汪淑晶<sup>1</sup>,于生金<sup>1,2</sup>,何静娜<sup>1</sup>,郑伟龙<sup>1</sup>,张嘉宁<sup>1</sup>(1. 大连医科大学糖生物学研究所 生物化学与分子生物学教研室,辽宁大连 116044; 2. 辽东学院 医学院 基础医学部,辽宁 丹东 118003)

**[摘要]** **目的:**探讨慢病毒介导的 N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 IVa (N-acetylglucosaminyltransferase IVa, GnTIVa) 表达下调对小鼠肝癌 Hca-F 细胞体外增殖及侵袭能力的影响。**方法:**针对 GnTIVa 的编码基因 *Mgat4a*, 构建含 shRNA 干扰序列的慢病毒表达载体 pl3.7/Mgat4a-shRNA 并包装慢病毒颗粒, 感染 Hca-F 细胞。RT-PCR 及流式细胞术分别检测 Mgat4a-shRNA 重组慢病毒感染对 Hca-F 细胞 *Mgat4a* mRNA 及 GnTIVa 表达的影响, CCK-8 法和 Transwell 侵袭实验分别检测 Mgat4a-shRNA 重组慢病毒感染在体外对 Hca-F 细胞增殖和侵袭能力的影响。**结果:**慢病毒能够高效感染小鼠肝癌细胞 Hca-F, Mgat4a-shRNA 组感染效率达 72%。与 Hca-F 细胞和 Mock-shRNA 组相比, Mgat4a-shRNA 组细胞内 *Mgat4a* mRNA [ $(0.53 \pm 0.2)$  vs  $(2.97 \pm 0.2)$ ],  $(2.90 \pm 0.1)$ ; 均  $P < 0.05$ ] 和 GnTIVa [ $(47.80 \pm 2.25)$  vs  $(394.61 \pm 5.27)$ ],  $(378.61 \pm 4.38)$ ; 均  $P < 0.05$ ] 表达显著降低; 增殖能力[细胞增殖抑制率:  $(46.9 \pm 0.02)\%$  vs  $(0.82 \pm 0.03)\%$ ,  $0, P < 0.01$ ] 和体外侵袭能力[穿过滤膜的细胞数:  $(18 \pm 3)$  vs  $(42 \pm 4)$ ],  $(38 \pm 3)$  个, 均  $P < 0.05$ ] 显著下降。**结论:**慢病毒介导 shRNA 下调 GnTIVa 的表达能够抑制小鼠肝癌细胞 Hca-F 的增殖及体外侵袭。

**[关键词]** N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 IVa; 肝癌; 增殖; Hca-F 细胞; 侵袭; 慢病毒; RNAi

**[中图分类号]** R735.7; R730.54

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2013)06-0673-06

## Effects of down-regulation of lentivirus-mediated GnTIVa on the proliferation and invasion of mouse hepatoma Hca-F cells

Fan Jianhui<sup>1</sup>, Wang Shujing<sup>1</sup>, Yu Shengjin<sup>1,2</sup>, He Jingna<sup>1</sup>, Zheng Weilong<sup>1</sup>, Zhang Jianing<sup>1</sup>(1. Institute of Glycobiology, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Dalian Medical University, Dalian 116044, Liaoning, China; 2. Department of Basic Medical Sciences, Medical College of Eastern Liaoning University, Dandong 118000, Liaoning, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of down-regulation of lentivirus-mediated N-acetylglucosaminyltransferase IVa (GnTIVa) on the proliferation and invasion of mouse hepatoma Hca-F cells *in vitro*. **Methods:** Expression plasmid pl3.7/Mgat4a-shRNA with interference shRNA sequences gene target *Mgat4a* gene, were encoding GnTIVa was constructed. The RNAi lentiviral particles were packaged to infect Hca-F cells. The effect of Mgat4a-shRNA infection on the *Mgat4a* mRNA and GnTIVa expression of Hca-F cells was detected by RT-PCR and flowcytometry, respectively. The effect of recombinant lentiviral infection on the proliferation and invasion capability of Hca-F cells was determined by CCK-8 and transwell assay *in vitro*, respectively. **Results:** The mouse hepatoma Hca-F cells could be infected by the lentivirus with a high efficiency, and the infection efficiency of Mgat4a-shRNA group reached 72%. Compared with the Hca-F cells and Mock-shRNA group, the *Mgat4a* mRNA ( $[0.53 \pm 0.2]$  vs  $[2.97 \pm 0.2]$ ,  $[2.90 \pm 0.1]$ ;  $P < 0.05$ ) and GnTIVa ( $[47.80 \pm 2.25]$  vs  $[394.61 \pm 5.27]$ ,  $[378.61 \pm 4.38]$ ) expression of the Mgat4a-shRNA group was significantly decreased, and the cell proliferation (inhibitory rate  $[46.9 \pm 0.02]\%$  vs  $[0.82 \pm 0.03]\%$ ,  $0$ ; all  $P < 0.01$ ) and invasion

**[基金项目]** 国家重点基础研究发展计划(973计划)资助项目(No. 2012CB822103);国家自然科学基金资助项目(No. 31000372, 31170774)。Project supported by the National Key Basic Research Development Program (973 Program) of China (No. 2012CB822103), and the National Natural Science Foundation of China (No. 31000372, 31170774)

**[作者简介]** 樊建慧(1979-),男,河北省保定市人,博士,讲师,主要从事肿瘤糖生物学研究。E-mail: fanjh@dlmedu.edu.cn

**[通信作者]** 张嘉宁(Zhang Jianing, corresponding author), E-mail: jnzhang@dlmedu.edu.cn

**[网络出版]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20131031.0956.001.html>

(invasive cell numbers:  $[18 \pm 3]$  vs  $[42 \pm 4]$ ,  $[38 \pm 3]$ , all  $P < 0.05$ ) capability were inhibited significantly. **Conclusion:** Down-regulation of lentivirus-mediated GnTIVa expression inhibits the proliferation and invasion of mouse hepatoma Hca-F cells *in vitro*.

[ **Key words** ] N-acetylglucosaminyltransferase IVa; hepatoma; proliferation; Hca-F cell; invasion; lentivirus; RNA interference

[ Chin J Cancer Biother, 2013, 20(6): 673-678 ]

原发性肝癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,根治性切除术后患者的 5 年复发率和转移率较高,因此成为肝癌临床治疗的难题。筛选和鉴定肝癌转移相关基因,是当今肝癌研究中的重点。糖蛋白的复合型 N-聚糖及其分支(又称天线)的数量和结构与多种肿瘤发生发展及转移密切相关<sup>[1-4]</sup>。N-乙酰氨基葡萄糖转移酶(N-acetylglucosaminyltransferases, GnTs)是催化糖蛋白复合型 N-糖链分支合成的关键酶。研究<sup>[5-6]</sup>发现,不同 GnTs 的表达与肿瘤转移相关,如 GnT III 的表达抑制肿瘤转移, GnT V 的表达则促进肿瘤转移。由 *Mgat4a* 基因编码的 GnTIVa 催化  $\beta$ -1,4 糖苷键连接的三天线 N-糖链分支结构的合成,其与肿瘤的关系研究较少。本研究观察慢病毒介导的 shRNA 下调 *Mgat4a* 的表达对小鼠肝癌 Hca-F 细胞增殖及侵袭的抑制作用,为慢病毒介导靶向调控 GnTIVa 的表达在肝癌基因治疗中的应用提供实验基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料及细胞培养

慢病毒表达质粒 pI3.7、包装质粒 pMD2.G 和 psPAX2 购自 Addgene 公司。293T 细胞购自中科院上海细胞库,具有高淋巴管转移能力的小鼠肝癌细胞 Hca-F 由本实验室保存。DNA oligo 由上海吉玛生物公司合成。Lipofectamine™ 2000 和 TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司,限制性内切酶 *Not* I、*Xba* I 购自 TaKaRa 公司。DNA 测序由 TaKaRa 公司完成。由 GnTIVa 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司。293T 细胞和 Hca-F 细胞分别用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基和 RPMI 1640 培养基置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中常规培养。

### 1.2 重组慢病毒的包装、生产及浓缩

针对 *Mgat4a* 基因序列(Genebank NM\_173870, 7054 bp),设计含干扰序列的 DNA oligo(shRNA),经退火(95 °C 4 min, 70 °C 10 min, 缓慢降温至室温)形成双链 shRNA,克隆至慢病毒表达载体 pI3.7,命名为 pI3.7/*Mgat4a*-shRNA。用 Lipofectamine™ 2000 将测序正确的重组慢病毒表达载

体与包装载体 pMD2.G、psPAX2 共同转染 293T 细胞,包装 *Mgat4a*-shRNA 慢病毒颗粒。以慢病毒空载体 pI3.7 与包装载体包装 Mock-shRNA 病毒作为对照。24 h 后于倒置荧光显微镜下观察慢病毒表达载体中 GFP 的表达情况。48 h 后收集病毒上清并浓缩。

### 1.3 流式细胞术检测 *Mgat4a*-shRNA 重组慢病毒对 Hca-F 细胞的感染率

将处于对数生长期的 Hca-F 细胞接种于六孔培养板,每孔细胞数约  $1 \times 10^5$  个,当细胞生长至 70% 汇合时,用含有 *Mgat4a*-shRNA 的重组慢病毒颗粒及含有对照空载体 pI3.7 的慢病毒 Mock-shRNA 感染 Hca-F 细胞,每孔加入 10  $\mu$ l 病毒原液(滴度为  $1 \times 10^8$  TU/ml),同时加入聚凝胺(polybrene)至 8  $\mu$ g/ml 以提高感染效率。次日,去除含病毒的培养基,更换为完全培养基,常规培养 48 h。以野生型 Hca-F 细胞作为对照。荧光倒置显微镜下观察 GFP 在 Hca-F 细胞的表达,并利用流式细胞术检测 GFP 表达情况,以 GFP 表达阳性细胞百分率表示病毒感染率。

### 1.4 RT-PCR 检测 *Mgat4a*-shRNA 重组慢病毒感染对 Hca-F 细胞 *Mgat4a* mRNA 表达的影响

取 *Mgat4a*-shRNA 组及 Mock-shRNA 组 Hca-F 细胞,慢病毒感染 48 h 后收获细胞, PBS 洗涤,用 TRIzol 提取细胞总 RNA,以 RT-PCR 检测 *Mgat4a* mRNA 表达情况。*Mgat4a* 引物序列如下:上游引物 5'-CAGCTAGCATGAGGCTCCGAAATGGAAC-3',下游引物 5'-GAGGTACCCACTGGTGACTTTAATATG-3',以野生型 Hca-F 细胞作为对照。反应条件:94 °C 预变性 5 min, 94 °C、30 s, 55 °C、30 s, 72 °C、90 s, 共 35 个循环,最后 72 °C 延伸 10 min。取 5  $\mu$ l 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统观察、拍照,并保存图片,检测 *Mgat4a* mRNA 表达情况。

### 1.5 流式细胞术检测 *Mgat4a*-shRNA 重组慢病毒感染对 Hca-F 细胞 GnTIVa 蛋白表达的影响

收集对数生长期的 *Mgat4a*-shRNA 组、Mock-shRNA 组和 Hca-F 细胞,调节单细胞悬液密度为  $1 \times 10^6$  个/ml。各组均加入 GnTIVa 多克隆抗体,充分混匀,37 °C 避光反应 1 h,用 PBS 缓冲液洗涤 3

次并重悬各组细胞。加入 TRITC 标记的 IgG 二抗, 37 °C 避光反应 30 min, 离心去除上清液, 以清除未结合红色荧光标记抗体。重悬细胞后行流式细胞术检测各组 GnTIVa 表达情况, 分析 Mgat4a-shRNA 重组慢病毒感染对 Hca-F 细胞 GnTIVa 表达的影响。

### 1.6 CCK-8 法检测下调 GnTIVa 表达对 Hca-F 细胞增殖的影响

取对数生长期 Mgat4a-shRNA 组、Mock-shRNA 组和 Hca-F 细胞, 调整细胞密度为  $3 \times 10^5$  个/ml, 96 孔培养板中每孔加入 100  $\mu$ l 细胞悬液。将培养板在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 72 h, 期间每隔 12 h 用 CCK-8 法检测各组细胞增殖情况。检测时, 向每孔中加入 10  $\mu$ l CCK-8 溶液, 继续将培养板在培养箱中孵育 1 h, 然后用酶标仪测定每个孔在 450 nm 处的光密度 (*D*) 值, 每个时间点设三个复孔, 取平均值计算增殖抑制率。以加入相应量细胞培养基及 CCK-8 溶液但没有加入细胞的孔作为空白对照。

### 1.7 Transwell 实验检测下调 GnTIVa 表达对 Hca-F 细胞体外侵袭能力的影响

在 4 °C 解冻基质胶, 预冷过夜带滤膜的小杯 (transwell 小室) 后, 每个小室加入 50  $\mu$ g 基质胶, 置于超净台内干燥过夜, 紫外照射 2 h, 同时小室中加入少量无血清培养基水化。Mgat4a-shRNA 组、

Mock-shRNA 组和 Hca-F 细胞用无血清的培养基培养 24 h 后, 用含 0.1% BSA 的无血清的培养基重新悬浮, 调整细胞密度约  $3 \times 10^5$  个/ml。取 100  $\mu$ l 细胞悬液加入上室, 500  $\mu$ l 培养基加入下室, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 孵箱培养 48 h 后取出带滤膜小杯, 用棉签小心擦掉上膜细胞。小杯中加入 PBS 洗涤 2 次, 0.1% 的结晶紫染色。镜检, 每个滤膜数 5 个视野 (400 $\times$ ), 取均值计数, 拍照分析。

### 1.8 统计学处理

计量数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析, 组间比较采用 *t* 检验。以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 慢病毒感染肝癌细胞 Hca-F

慢病毒表达载体 pIL3.7 携带并表达的 GFP 在荧光显微镜下显示绿色荧光。倒置荧光显微镜下观察, 结果 (图 1A) 显示, Mock-shRNA 组和 Mgat4a-shRNA 组细胞均呈现绿色荧光, 说明包装生产的慢病毒可以成功感染 Hca-F 细胞。流式细胞术检测结果 (图 1B) 显示, Mock-shRNA 组和 Mgat4a-shRNA 组感染效率分别为 67% 和 72%。

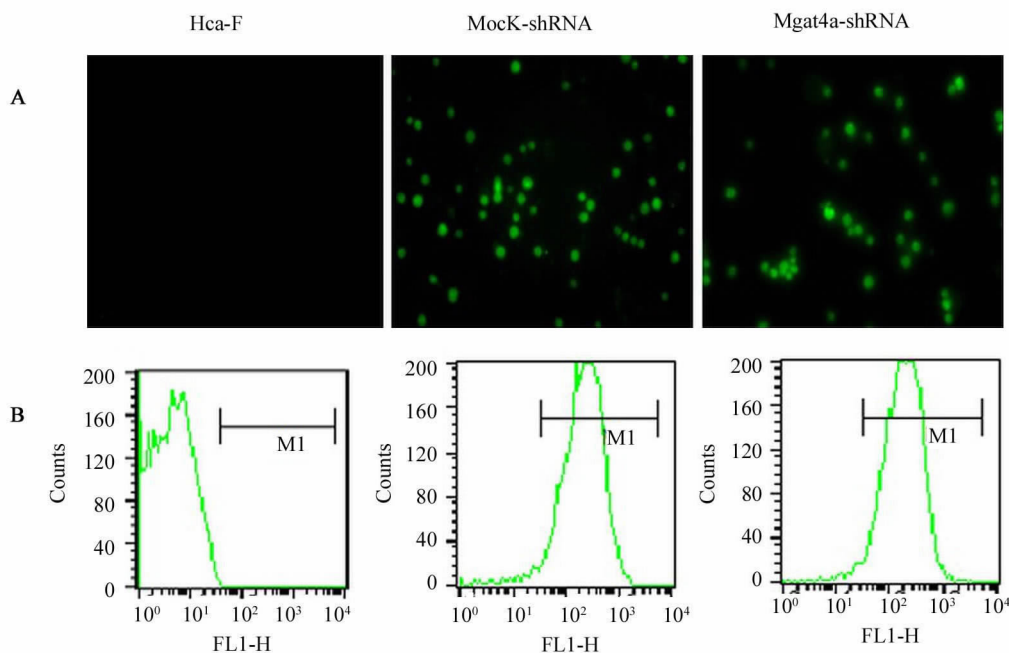


图 1 Hca-F 细胞中慢病毒感染效率的检测 (×100)

Fig. 1 Detection of infection efficiency of lentivirus in Hca-F cells (×100)

A: Fluorescence microscope; B: Flow cytometry

### 2.2 慢病毒介导 shRNA 下调 Hca-F 细胞 *Mgat4a* mRNA 和蛋白的表达

RT-PCR 结果(图 2A)显示, *Mgat4a*-shRNA 组 Hca-F 细胞 *Mgat4a* mRNA 的表达与 Hca-F 细胞和 Mock-shRNA 组相比明显下降, 差异具有统计学意义[ (0.53 ± 0.2) vs (2.97 ± 0.2)、(2.90 ± 0.1) ], 均  $P < 0.05$  ]。流式细胞术检测结果(图 2B)证实, *Mgat4a*-shRNA 组 GnTIVa 表达较 Hca-F 细胞和 Mock-shRNA 组明显下调[ (47.80 ± 2.25) vs (394.61 ± 5.27)、(378.61 ± 4.38) ], 均  $P < 0.05$  ]。

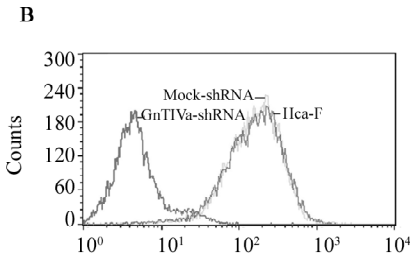
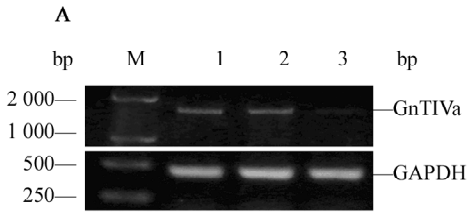


图 2 *Mgat4a*-shRNA 慢病毒感染下调 Hca-F 细胞 GnTIVa 表达

Fig. 2 GnTIVa expression of Hca-F cells down-regulated by *Mgat4a*-shRNA lentivirus infection

A: RT-PCR; B: FCM; M: DL2000 Marker; 1: HCA-F cells; 2: Mock-shRNA group; 3: *Mgat4a*-shRNA group

### 2.3 下调 GnTIVa 表达抑制 Hca-F 细胞增殖

CCK-8 法检测结果(图 3)显示, 慢病毒转染后, 与 Mock-shRNA 组和 Hca-F 细胞相比, *Mgat4a*-shRNA 组细胞活性和生长速度明显降低。在慢病毒感染 72 h 后, 与 Mock-shRNA 组和 Hca-F 细胞相比, *Mgat4a*-shRNA 组细胞增殖抑制率最高[ (46.9 ± 0.02)% vs (0.82 ± 0.03)%、0 ], 均  $P < 0.01$  ]。结果提示, 下调 GnTIVa 表达能够抑制肝癌细胞 Hca-F 增殖。

### 2.4 下调 GnTIVa 表达抑制 Hca-F 细胞体外侵袭能力

体外基质胶侵袭实验结果(图 4)显示, Hca-F 组和 Mock-shRNA 组均能观察到大量穿过滤膜的细胞, *Mgat4a*-shRNA 组仅有少数细胞穿过滤膜。与 Hca-F 细胞及 Mock-shRNA 组比较, *Mgat4a*-shRNA 组每平方毫米穿过滤膜的 Hca-F 细胞数明显减少[ (18 ± 3) vs (42 ± 4)、(38 ± 3)个 ], 均  $P < 0.05$  ]。

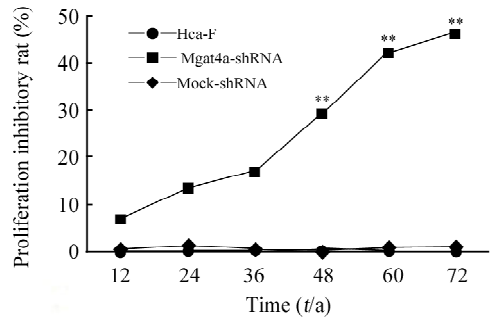


图 3 *Mgat4a*-shRNA 慢病毒感染抑制 Hca-F 细胞的增殖

Fig. 3 Cell proliferation of Hca-F cells inhibited by *Mgat4a*-shRNA lentivirus infection

\*\*  $P < 0.01$  vs Hca-F cells group and Mock-shRNA group

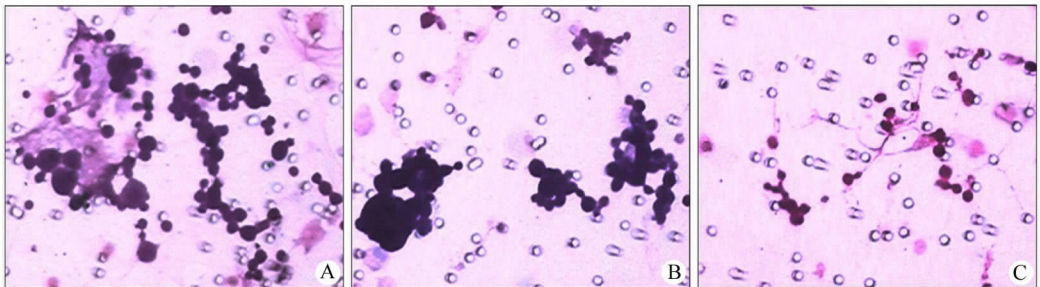


图 4 下调 GnTIVa 表达抑制 Hca-F 细胞的体外迁侵袭能力( ×400 )

Fig. 4 Invasion capability of Hca-F cells suppressed by down-regulating the expression of GnTIVa ( ×400 )

A: Hca-F; B: Mock-shRNA; C: *Mgat4a*-shRNA

### 3 讨论

研究发现,到目前为止,至少有 7 种不同的 N-乙酰氨基葡萄糖转移酶(GnT I-IX)参与了细胞内糖蛋白 N-聚糖分支结构(又称天线)的催化合成<sup>[7-11]</sup>。由 *Mgat4* 基因编码的 GnTIV 是 N-乙酰氨基葡萄糖转移酶家族成员之一,它的主要作用是在高尔基体中催化 N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)通过  $\beta$ -1,4 糖苷键与 N-聚糖核心中  $\alpha$ -1,3 连接的甘露糖(Man)相连,从而形成复合型 N-糖链中三天线或四天分支结构。GnTIV 至少有两种同工酶(GnTIVa 和 GnTIVb)参与了  $\beta$ -1,4 糖链分支结构的生成。研究<sup>[12]</sup>证实,GnTIVa 的酶活性远远高于 GnTIVb,在 N-聚糖中  $\beta$ -1,4 分支结构的合成中发挥主要作用。因此,普遍认为生物体内糖蛋白上复合型 N-糖链的  $\beta$ -1,4 分支结构主要由 GnTIVa 催化合成。已有研究发现,GnTIV 参与了肿瘤生成和肿瘤细胞分化过程,如在绒毛膜癌患者体内,人绒毛膜促性腺激素分子中连接在 Man  $\alpha$ -1-3 上的  $\beta$ -1,4 聚糖分支结构出现异常,并且 GnTIV 的酶活性增高<sup>[13]</sup>;在人肝癌组织当中,GnTIV 的酶活性增高现象也有报道<sup>[14]</sup>。在哺乳动物细胞内,复合型 N-聚糖分支天线的数量与 GnTs 之间的关系研究较多,尤其是对于 GnTIII 和 GnTV 的研究,发现两者具有截然相反的生物学活性。*Mgat5* 基因编码的 GnTV 参与了细胞与基质的黏附和细胞的迁移、侵袭,进而促进肿瘤的生成和转移<sup>[15]</sup>;然而,由 *Mgat3* 基因编码的 GnTIII 催化平分支聚糖分支结构的形成,拮抗 GnTV 的作用<sup>[16-18]</sup>。目前,GnTIVa 在肝癌转移中的作用研究很少,本研究对 GnTIVa 表达变化对小鼠肝癌 Hca-F 细胞增殖和侵袭的影响做了初步探讨。

小鼠 Hca-F 细胞是由腹水型肝癌 H22 细胞中筛选出的具有高淋巴管转移能力的转移株,小鼠足垫接种转移率高达 90%,是研究肝癌淋巴管转移的理想模型。本课题组前期的研究<sup>[19]</sup>发现,Hca-F 细胞中 GnTIVa 的表达量远远高于无转移潜能的小鼠肝癌细胞 Hepa1-6。因此,本研究构建慢病毒系统干扰 GnTIVa 在 Hca-F 细胞中的表达,结果显示,与对照组相比,针对 GnTIVa 的慢病毒 shRNA 能够明显下调 *Mgat4a* mRNA 及蛋白在 Hca-F 中的表达,并且下调 *Mgat4a* 表达能显著抑制肝癌细胞 Hca-F 增殖和侵袭。以上结果提示,在 Hca-F 中下调 *Mgat4a* 的表达能抑制肝癌细胞的增殖和侵袭。

根据 GnTs 催化复合型 N-糖链的作用模式,GnTIVa 催化合成的 N-糖链分支结构依然可以作为

其他 GnTs 的底物。值得注意的是,Real-time PCR 技术检测到在 Hca-F 细胞中 GnTIVa 表达下调后,GnTIII 和 GnTV 的表达明显改变(结果未发表)。由此推测,GnTIVa 可能与其他 GnTs 相互作用,对 N-聚糖分支结构的合成产生更重要的影响。*Mgat3* 基因位于 2 号染色体 q12,*Mgat5* 在染色体中的位置(2q21)与 *Mgat4a* 十分相近<sup>[9]</sup>。并且,研究<sup>[21]</sup>发现,*Mgat4* 多个外显子与 *Mgat3* 和 *Mgat5* 相似。另外,对于 GnTIV 氨基酸序列的分析显示,人类和小鼠 GnTIV 之间的同源性为 94%<sup>[22]</sup>。以上研究提示,不同的 GnTs 在复合型 N-聚糖分支结构的合成中的作用可能有先后顺序关系,或者它们可能共享相同转录因子以调控不同 GnTs 的转录起始过程,其具体的作用机制需要进一步的研究。

综上,本研究通过慢病毒介导成功下调 GnTIVa 在肝癌 Hca-F 细胞中的表达,并证实其表达下调能够抑制 Hca-F 细胞的体外增殖和侵袭能力,为后续对 *Mgat4a* 基因在糖蛋白 N-聚糖分支合成中的作用及其参与肝癌淋巴管转移的机制研究奠定实验基础。

### [参考文献]

- [1] Bones J, Mittermayr S, O'Donoghue N, et al. Ultra performance liquid chromatographic profiling of serum N-glycans for fast and efficient identification of cancer associated alterations in glycosylation [J]. *Anal Chem*, 2010, 82(24): 10208-10215.
- [2] Isaji T, Kariya Y, Xu Q, et al. Functional roles of the bisecting GlcNAc in integrin-mediated cell adhesion [J]. *Methods Enzymol*, 2010, 480: 445-459.
- [3] Saldova R, Reuben JM, Abd Hamid UM, et al. Levels of specific serum N-glycans identify breast cancer patients with higher circulating tumor cell counts [J]. *Ann Oncol*, 2010, 22(5): 1113-1119.
- [4] Taniguchi N, Korekane H. Branched N-glycans and their implications for cell adhesion, signaling and clinical applications for cancer biomarkers and in therapeutics [J]. *BMB Rep*, 2011, 44(12): 772-781.
- [5] Zhao Y, Nakagawa T, Itoh S, et al. N-acetylglucosaminyltransferase III antagonizes the effect of N-acetylglucosaminyltransferase V on  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 integrin-mediated cell migration [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(43): 32122-32130.
- [6] Guo HB, Liu F, Zhao JH, et al. Down-regulation of N-acetylglucosaminyltransferase V by tumorigenesis- or metastasis-suppressor gene and its relation to metastatic potential of human hepatocarcinoma cells [J]. *J Cell Biochem*, 2000, 79(3): 370-385.
- [7] Yoshida A, Minowa MT, Takamatsu S, et al. A novel second isoenzyme of the human UDP-N-acetylglucosamine:  $\alpha$ 1,3-D-mannoside  $\beta$ 1,4-N-acetylglucosaminyltransferase family: cDNA cloning, expression, and chromosomal assignment [J]. *Glycoconj J*, 1998, 15(12): 1115-1123.

- [ 8 ] Tan J, D'Agostaro AF, Bendiak B, et al. The human UDP-N-acetylglucosamine: Alpha-6-D-mannoside-beta-1, 2- N-acetylglucosaminyltransferase II gene ( MGAT2 ). Cloning of genomic DNA, localization to chromosome 14q21, expression in insect cells and purification of the recombinant protein [ J ]. Eur J Biochem, 1995, 231( 2 ): 317-328.
- [ 9 ] Saito H, Nishikawa A, Gu J, et al. cDNA cloning and chromosomal mapping of human N-acetylglucosaminyltransferase V + [ J ]. Biochem Biophys Res Commun, 1994, 198( 1 ): 318-327.
- [ 10 ] Ihara Y, Nishikawa A, Tohma T, et al. cDNA cloning, expression, and chromosomal localization of human N-acetylglucosaminyltransferase III ( GnT-III ) [ J ]. J Biochem, 1993, 113( 6 ): 692-698.
- [ 11 ] Kumar R, Yang J, Larsen RD, et al. Cloning and expression of N-acetyl-glucosaminyltransferase I, the medial Golgi transferase that initiates complex N-linked carbohydrate formation [ J ]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990, 87( 24 ): 9948-9952.
- [ 12 ] Oguri S, Yoshida A, Minowa MT, et al. Kinetic properties and substrate specificities of two recombinant human N-acetylglucosaminyltransferase-IV isozymes [ J ]. Glycoconj J, 2006, 23( 7/8 ): 473-480.
- [ 13 ] Mizuochi T, Nishimura R, Derappe C, et al. Structures of the asparagine-linked sugar chains of human chorionic gonadotropin produced in choriocarcinoma. Appearance of triantennary sugar chains and unique biantennary sugar chains [ J ]. J Biol Chem, 1983, 258( 23 ): 14126-14129.
- [ 14 ] Yamashita K, Koide N, Endo T, et al. Altered glycosylation of serum transferrin of patients with hepatocellular carcinoma [ J ]. J Biol Chem, 1989, 264( 5 ): 2415-2423.
- [ 15 ] Zhao Y, Li J, Xing Y, et al. N-acetylglucosaminyltransferase V mediates cell migration and invasion of mouse mammary tumor cells 4T07 via RhoA and Rac1 signaling pathway [ J ]. Mol Cell Biochem, 2008, 309( 1/2 ): 199-208.
- [ 16 ] Pinho SS, Figueiredo J, Cabral J, et al. E-cadherin and adherens-junctions stability in gastric carcinoma: Functional implications of glycosyltransferases involving N-glycan branching biosynthesis, N-acetylglucosaminyltransferases III and V [ J ]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1830( 3 ): 2690-2700.
- [ 17 ] Xu Q, Isaji T, Lu Y, et al. Roles of N-acetylglucosaminyltransferase III in epithelial-to-mesenchymal transition induced by transforming growth factor  $\beta$ 1 ( TGF- $\beta$ 1 ) in epithelial cell lines [ J ]. J Biol Chem, 2012, 287( 20 ):16563-16574.
- [ 18 ] Pinho SS, Oliveira P, Cabral J, et al. Loss and recovery of Mgat3 and GnT-III Mediated E-cadherin N-glycosylation is a mechanism involved in epithelial-mesenchymal-epithelial transitions [ J ]. PLoS One, 2012, 7( 3 ):e33191.
- [ 19 ] Fan J, Wang S, Yu S, et al. N-acetylglucosaminyl transferase IVa regulates metastatic potential of mouse hepatocarcinoma cells through glycosylation of CD147 [ J ]. Glycoconj J, 2012, 29( 5/6 ): 323-334.
- [ 20 ] Koyama N, Miyoshi E, Ihara Y, et al. Human N-acetylglucosaminyltransferase III gene is transcribed from multiple promoters. [ J ] Eur J Biochem, 1996, 238( 3 ): 853-861.
- [ 21 ] Saito H, Gu J, Nishikawa A, et al. Organization of the human N-acetylglucosaminyltransferase V gene [ J ]. Eur J Biochem, 1995, 233( 1 ):18-26.
- [ 22 ] Oguri S, Minowa MT, Ihara Y, et al. Purification and characterization of UDP-N-acetylglucosamine: Alpha1, 3-D-mannoside beta1, 4-N-acetylglucosaminyltransferase ( N-acetyl-glucosaminyltransferase-IV ) from bovine small intestine [ J ]. J Biol Chem, 1997, 272( 36 ): 22721-22727.
- [ 收稿日期 ] 2013 - 05 - 26 [ 修回日期 ] 2013 - 10 - 30  
[ 本文编辑 ] 黄静怡

· 科技动态 ·

## 应用质谱和色谱鉴定 STING 配体 cGAMP 的结构

绝大多数生物实验技术的目的可分为三类:制备提纯、定性鉴定和定量检测。现代质谱和色谱可实现以上三种需求,服务于科研和生产。质谱的基本原理是利用分子的质量,在电磁场中分离检测样品,通过检索数据库获得样品组分的信息。现代质谱仪的灵敏度日渐增高,在生物医学领域的研究中,可除做定性和定量检测。色谱法根据所采用的介质,可分为纸色谱法、薄层色谱法、气相色谱法、液相色谱法。在生物医学领域研究中,应用最多的是高效液相色谱,特别是反相高效液相色谱。

内质网居留蛋白 STING( stimulator of interferon genes )是免疫系统启动内源性和外源性 DNA 触发的 I 型干扰素通路所必须的关键性分子,除了在识别 DNA 中的重要作用外,还可以作为细胞内环二苷的直接受体,而环二苷是细菌成分中的第二信使。最近发现,DNA 识别依赖于 cGAMP( cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate )合成酶 cGAS( cGAMP synthase )。cGAS 同 DNA 结合后,会合成一个环二苷分子,进而结合并活化 STING。

2013 年 6 月发表在 *Nature* 杂志上的一篇文章介绍,研究人员首先用液相色谱分离过表达 cGAS 的细胞的裂解液组分,比对胞内 cGAS 的产物 cGAMP 与人工合成 cGAMP 的出峰。然后用核苷酸内切酶切割该产物,用薄层色谱和质谱两种方法确定了该产物中环二苷键结构的可能性,确定 cGAS 的产物结构是 Gp( 2'-5' )Ap( 3'-5' ),并非之前 *Science* 上有关论文提出的对称型结构。同时,还在不同的细胞体系中确定了这种非对称的 cGAMP 确实能够直接与 STING 结合,并激活其下游信号通路。

作者利用质谱和高效液相色谱技术,鉴定了 cGAS 合成的 STING 活化因子 cGAMP 的结构,纠正了之前文献中的相关报道;同时,展示了质谱和色谱技术在免疫学研究中的应用,比如如何鉴定和发现某些感染免疫过程中新的活性分子。

[ 郁茜 摘译, 韩超峰 审阅. Ablasser A, Goldeck M, Hornung V, et al. *Nature*, 2013, 498( 7454 ): 380-384. ]