

# 肝癌时糖蛋白聚糖结构的变化

张舒, 康晓楠, 刘银坤

张舒, 康晓楠, 刘银坤, 复旦大学附属中山医院肝癌研究所  
复旦大学生物医学研究院 上海市 200032

作者贡献分布: 本文由张舒撰写; 康晓楠与刘银坤审校。

通讯作者: 刘银坤, 200032, 上海市医学院路136号, 复旦大学肝癌研究所, 复旦大学附属中山医院. liu.yinkun@zs-hospital.sh.cn  
电话: 021-54237963 传真: 021-54237960

收稿日期: 2008-08-21 修回日期: 2008-11-28

接受日期: 2008-12-01 在线出版日期: 2008-12-28

## Alteration of glycan structure in liver cancer

Shu Zhang, Xiao-Nan Kang, Yin-Kun Liu

Shu Zhang, Xiao-Nan Kang, Yin-Kun Liu, Liver Cancer Institute, Zhongshan Hospital; Institute of Biomedical Sciences, Fudan University, Shanghai 200032, China

Correspondence to: Yin-Kun Liu, Liver Cancer Institute, Zhongshan Hospital, Fudan University, 136 Yixueyuan Road, Shanghai 200032, China. liu.yinkun@zs-hospital.sh.cn

Received: 2008-08-21 Revised: 2008-11-28

Accepted: 2008-12-01 Published online: 2008-12-28

### Abstract

Glycosylation is a common post-translational protein modification, and almost half of all proteins have been estimated to be glycosylated. Protein glycosylation produces lots of glycans and altered glycan structures are associated with physiological and pathological process, including malignant transformation and invasion. This review describes the structure and function of glycans and highlights changes in glycan structure associated with liver cancer.

Key Words: Glycosylation; Glycan structure; Cancer; Liver cancer

Zhang S, Kang XN, Liu YK. Alteration of glycan structure in liver cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(36): 4071-4074

### 摘要

蛋白质糖基化是一种常见的翻译后修饰, 几乎50%的蛋白质都被认为具有糖基化修饰。糖基化作用产生大量聚糖, 其结构变化与许多生理和病理过程相关, 恶性肿瘤的发生侵袭就是其中之一。本文对糖蛋白聚糖的结构和功能进行描述, 并且举例说明与肝癌相关的某些糖蛋白

聚糖结构的变化。

关键词: 糖基化; 聚糖结构; 癌症; 肝癌

张舒, 康晓楠, 刘银坤. 肝癌时糖蛋白聚糖结构的变化. 世界华人消化杂志 2008; 16(36): 4071-4074

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/4071.asp>

### 0 引言

在蛋白质不同的翻译后修饰中, 糖基化作用(glycosylation)最为常见; 几乎50%的蛋白质都被认为具有糖基化修饰<sup>[1]</sup>。糖基化反应是在一系列糖基转移酶催化下进行的, 产生不同的聚糖(glycan)。哺乳动物的聚糖在很多关键的生物学过程中起到重要作用, 比如细胞黏附, 分子运输和清除, 受体激活, 信号转导以及内吞作用等。在生物体发育过程中, 聚糖结构也在变化, 在不同的分化阶段, 聚糖有不同的表达。细胞表面的聚糖变化还与病理条件变化相关, 这包括恶性转化等<sup>[2]</sup>。目前, 聚糖结构变化与癌症关系的研究已引起相当重视, 本文就聚糖结构和功能进行描述, 并说明与肝癌相关的某些糖蛋白聚糖结构的变化。

### 1 糖蛋白聚糖结构

糖蛋白根据寡糖链区(核心)部分与蛋白质连接键的性质, 蛋白质糖基化产生多种聚糖类型, 其中以N-聚糖(N-glycan)、O-聚糖(O-glycan)常见并且研究较多。N-聚糖是与肽链中N-X-S/T(其中X为除脯氨酸外的任何一个氨基酸残基)顺序中天门冬酰胺(N)残基酰胺氮相连的糖链, 均具有共同的五糖核心, 有高甘露糖、复杂型和杂合型三种类型。而O-聚糖是指通过N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)与肽链的S/T残基相连接的聚糖, O-聚糖也可延伸为多种不同核心结构的类型<sup>[3]</sup>。这两种聚糖类型均含有分支并且3D结构不相同<sup>[4]</sup>。

聚糖结构信息包括一级序列和三维结构。一级结构包括聚糖的单糖种类、构型, 糖苷键的构型、位置以及单糖分支点等内容。对于大多数糖而言, 其三维结构难以确定。

### ■背景资料

聚糖因其多变的连接方式和分支结构对于糖蛋白的生物学功能起着至关重要的作用。聚糖结构与疾病特别是肿瘤的关系已被人们所关注, 肿瘤细胞的一些糖蛋白糖基化作用都有所变化, 所以聚糖的结构变化在临床上可以用做肿瘤标志物, 譬如AFP-L3成为检测肝癌的重要标志。

### ■同行评议者

姜春萌, 教授, 大连医科大学附属第二医院消化科

## ■研发前沿

目前对于肝癌以及其他肿瘤相关糖蛋白的聚糖结构变化研究是糖组学领域一个研究热点,但是人类疾病样本的收集,聚糖的分离富集以及现有的分析技术都制约着聚糖结构解析的发展。

## 2 聚糖结构分析方法

对于聚糖的分离富集,目前的技术有:(1)植物凝集素分离法.凝集素可以特异性地富集分离某种聚糖,若将不同的凝集素亲和柱串联排列,可将不同的聚糖富集在不同的柱中,这种技术被称为系列凝集素亲和色谱(serial lectin affinity chromatography, SLAC)<sup>[5]</sup>。(2)酰肼基团修饰微粒或固定硼酸介质分离法.根据聚糖顺式二醇结构氧化成醛基后可以和酰肼基团以共价键结合<sup>[6]</sup>,顺磁性的硅胶微粒若经过酰肼基团的修饰就可以运用于糖蛋白或糖肽的固相萃取<sup>[7]</sup>。硼酸可以和含有1, 2-顺式-二醇结构的物质相互结合,将其固定在介质上可以对混合物中的聚糖进行分离<sup>[8]</sup>。(3)高效阴离子交换色谱-脉冲安培检测器(high performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detector, HPAEC-PAD)能在强碱溶液中分离出非衍生化的单糖或者寡糖.若是衍生糖类,则可以通过高效阴离子交换色谱-荧光检测器(high performance anion exchange chromatography with fluorescence detector, HPAEC-FD)分离。(4)其他的分离仪器比如毛细管电泳(capillary electrophoresis, CE)和荧光辅助糖电泳(fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis, FACE),可以将衍生单糖和寡糖通过聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。

近十年利用高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)和质谱(mass spectrometry, MS)分析聚糖结构取得了很重要的进展.已知结构的标准聚糖经HPLC分离分析后的层析行为用葡萄糖单位(GU)标准化后,构建标准糖谱.将样品各聚糖组分的HPLC行为与标准糖谱进行对比,即可得到相关的结构信息.基质辅助激光解析离子化飞行质谱(matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)和电喷雾电离质谱(electrospray ionization mass spectrometry, ESI-MS)因其独特的“软电离”方式,适用于复杂的聚糖混合物分析.近年来,在线分析技术的发展使得联机技术GC/MS、HPLC/MS、CE/MS和Chip/MS等和串联质谱技术(MSn)日趋完善<sup>[9]</sup>。核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)可以分析毫克级样品的完整寡糖并且不破坏样品<sup>[10]</sup>。

## 3 聚糖结构变化和癌症的关系

1969年, Meezan *et al*<sup>[11]</sup>在研究成纤维细胞的癌变过程中,首次提出在肿瘤细胞的形成过程中

存在聚糖结构的改变.随后,通过凝集素特异性结合正常和癌变细胞聚糖的方法也证实了上述结论<sup>[12-13]</sup>。

若以“glycan in cancer”为检索主题,2000年至今SCI收录相关文献约350多篇.在以往的研究中,加拿大的Brockhausen在O-聚糖变化方面的工作出色,他于99年发表的“Pathways of O-glycan Biosynthesis in Cancer Cells”一文至今已被引用161次.至于N-聚糖和疾病的研究,英国的Turner GA贡献颇多。

聚糖只占整个糖蛋白的小部分,但有重要的生理学功能,他参与蛋白质肽链的折叠、聚合、成熟和运输.聚糖作为肿瘤细胞表面的终端信号在肿瘤转移中具有不可忽视的作用.越来越多的证据表明,聚糖在表达水平上的差异和特殊糖基结构的出现与肿瘤细胞的侵袭和转移有密切关系<sup>[14-15]</sup>。

糖基化的变化包括正常聚糖的表达变化,此外还有一般仅存在于胚胎组织中的聚糖异常表达.这些结构变化大多数是因为肿瘤细胞的高尔基体中糖基化转移酶表达水平的变化而引起的.糖基化转移酶表达水平的变化能导致N-聚糖和O-聚糖核心结构的变化,最常见的变化是N-聚糖结构变大并且分支增多.N-乙酰葡萄糖胺基转移酶V(GlcNAc-TV)活性增强而引起分支增多,进而使得末端唾液酸残基位点增多,这样,唾液酸转移酶相应上调,最终导致整体唾液酸化增多<sup>[16-17]</sup>。

除了聚糖核心结构的变化,癌变过程也伴有末端残基结构的变化.参与连接末端残基到糖链上的糖基化转移酶(比如唾液酸转移酶和岩藻糖转移酶)往往在肿瘤组织中是过表达的,从而导致了某些末端聚糖结构的过表达.比如,在肿瘤细胞中常出现末端聚糖抗原决定簇,包括sialyl Lewis x(sLe<sup>x</sup>), sialylated Tn(sTn)和Lewis y(Le<sup>y</sup>)<sup>[18-20]</sup>。在脑癌、乳腺癌、结肠癌和前列腺癌等一些恶性肿瘤中均能观察到这些抗原决定簇<sup>[21]</sup>。

尽管,这些肿瘤组织中糖基化的改变显而易见,但没有单个的变化能区分正常和癌变的细胞,因为每种癌症组织都伴有一系列聚糖表达的变化<sup>[22]</sup>。通过大量的实验发现,主要的聚糖结构变化可以总结为:高甘露糖型(high-mannose type)的出现或增多;分支数量增多,出现偏二天线;核心岩藻糖(Fuc)或外链岩藻糖数量增多;唾液酸(Sia)数量改变,末端N-乙酰神经氨酸(NeuAc)变化, NeuAc连接键改变;平分支型N-乙

酰葡萄糖胺(bis-GlcNAc)增加或N-乙酰氨基乳糖(N-acetylactosamine)重复顺序出现或增多等<sup>[15]</sup>.

在上述结构变化中, 最常见的是细胞表面 $\beta 1, 6$ 分支结构的变化, 已有实验初步证明了肿瘤转移相关的基因是通过细胞表面的 $\beta 1, 6$ 分支来影响细胞的转移潜能. Neu/her-2是一种与肿瘤转移相关的癌基因, 已发现在许多人类肿瘤组织中有过量表达, Chen *et al*<sup>[23]</sup>将这种癌基因转入NIH3T3细胞中, 转化的NIH3T3中GlcNAc-TV的表达明显增加, 其细胞表面有大量的 $\beta 1, 6$ 分支形成.

#### 4 肝癌相关糖蛋白聚糖结构变化

肝癌则是癌症致死的第2位杀手, 在肝病的癌变过程中同样伴有聚糖结构和功能的改变.

4.1 甲胎蛋白(AFP) 是一种癌胚糖蛋白, 在232位天冬酰胺处含有一条N-糖链. 近来, 与小扁豆凝集素(LCA)结合的AFP-L3成为检测肝癌的重要标志, AFP-L3实际上反映了AFP核心岩藻糖的变化, 在其产生过程中,  $\alpha 1, 6$ 岩藻糖转移酶活性增强, 催化岩藻糖转移以 $\alpha 1, 6$ 键连接于接近的N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)上<sup>[24]</sup>.

4.2  $\alpha 1$ 酸性糖蛋白(AGP) 是肝细胞分泌的一种急性期炎症反应糖蛋白, 含有5条复杂N-糖链. 在正常肝脏中, 其聚糖为二天线结构形式, 肝病的AGP与Con A亲和性降低, 表明二天线式转变为三、四天线形式, 此外, 分支数量, 岩藻糖和唾液酸含量均有变化<sup>[25]</sup>. 肝癌患者血清AGP浓度明显增加<sup>[26]</sup>.

4.3 结合珠蛋白(Hp) 聚糖成分主要存在于 $\beta$ 亚型上, 主要是复杂型的N-聚糖. 这些聚糖以二天线和三天线结构存在, 末端均含有唾液酸残基. 岩藻糖则以 $\alpha 1, 6$ 或 $\alpha 1, 3$ 连接于核心N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc). 采用凝集素亲和纯化, 发现在肝癌患者血清中, 含有 $\alpha 2, 6$ 连接唾液酸化Hp和 $\alpha 1, 6$ 连接岩藻糖化Hp, 并且唾液酸和岩藻糖含量有所变化<sup>[27]</sup>.

4.4 运铁蛋白(Tf) 是一种结合铁的糖蛋白, 在多肽单链的C末端含有两个天冬酰胺糖基化位点. 运铁蛋白聚糖是二天线和三天线结构的混合物, 充分唾液酸化<sup>[28]</sup>. 肝癌时, Tf出现 $\alpha 1, 3$ 连接岩藻糖以及核心甘露糖连接的岩藻糖,  $\alpha 2, 3$ 连接N-乙酰神经氨酸增多, 部分还出现含平分型二天线聚糖结构<sup>[29]</sup>.

4.5 碱性磷酸酶(ALP) 是一种膜结合糖蛋白, 含有N-聚糖. 采用多种凝集素亲和层析, 发现肝癌

组织中的ALP $\beta 1, 6$ 分支结构较多, 核心岩藻糖, bis-GlcNAc结构, 以及 $\alpha 2, 6$ 连接唾液酸等结构均明显增多<sup>[30]</sup>.

4.6  $\gamma$ -谷氨酰转肽酶(GGT) 在人体内具有很重要的生理功能, 对于氨基酸和蛋白质的吸收、分泌和合成都是必须的. 正常人血清内GGT主要来自肝脏, 含有5条N-糖链. 肝癌患者的GGT与正常人相比, 聚糖结构发生了改变. 在转移的肝肿瘤中, 唾液酸含量发生改变, GGT的 $\beta 1, 6$  GlcNAc支链增多<sup>[31]</sup>.

4.7 血清胆碱酯酶(ChE) 是一种含有36个潜在N-糖基化位点的蛋白, 其73%的聚糖结构是以二天线形式存在, 其余为含有分支的三或四天线形式. 岩藻糖连接于核心甘露糖上, 唾液酸连接于非还原性末端的半乳糖. 原发性肝癌、肝硬化患者ChE的果糖粉抱凝集素(AAL)结合率明显高于慢性肝炎患者和正常人<sup>[32]</sup>.

#### 5 结论

尽管糖蛋白聚糖在生理和疾病过程中具有十分重要作用, 但其研究一直没有突破性进展. 究其原因主要有, 从生物材料中很难获得组分均一、结构明确的聚糖; 现有技术对聚糖结构的分析和确定仍是一种低通量工作等. 相信随着分离技术和相关仪器的进一步发展, 糖组学的研究会有新的突破和进展, 利用检测糖蛋白聚糖结构的异常来诊断恶性肿瘤, 为肿瘤诊断开辟一个“糖链标志”的广阔领域.

#### 6 参考文献

- 1 Apweiler R, Hermjakob H, Sharon N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1473: 4-8
- 2 Dwek RA. Glycobiology: Toward Understanding the Function of Sugars. *Chem Rev* 1996; 96: 683-720
- 3 Varki A, Cummings R, Esko J, Freeze H, Hart G, Marth J, 张树政, 朱正美, 王克夷. 糖生物学基础. 北京: 科学出版社, 2003: 6
- 4 Morelle W, Canis K, Chirat F, Faïd V, Michalski JC. The use of mass spectrometry for the proteomic analysis of glycosylation. *Proteomics* 2006; 6: 3993-4015
- 5 Satish PR, Surolia A. Exploiting lectin affinity chromatography in clinical diagnosis. *J Biochem Biophys Methods* 2001; 49: 625-640
- 6 Zhang H, Li XJ, Martin DB, Aebersold R. Identification and quantification of N-linked glycoproteins using hydrazide chemistry, stable isotope labeling and mass spectrometry. *Nat Biotechnol* 2003; 21: 660-666
- 7 Zou Z, Ibisate M, Zhou Y, Aebersold R, Xia Y, Zhang H. Synthesis and evaluation of superparamagnetic silica particles for extraction of

#### ■应用要点

本文对目前研究较多的肝癌相关糖蛋白聚糖结构变化做一综述, 为今后对疾病相关糖蛋白聚糖结构的研究提供参考.



# 同行评价

本文对肝癌时糖蛋白聚糖结构变化进行了比较全面的综述, 内容新, 对科研和临床诊断具有一定价值。

- glycopeptides in the microtiter plate format. *Anal Chem* 2008; 80: 1228-1234
- 8 Yan J, Fang H, Wang B. Boronolactins and fluorescent boronolactins: an examination of the detailed chemistry issues important for the design. *Med Res Rev* 2005; 25: 490-520
- 9 Kameyama A, Kikuchi N, Nakaya S, Ito H, Sato T, Shikanai T, Takahashi Y, Takahashi K, Narimatsu H. A strategy for identification of oligosaccharide structures using observational multistage mass spectral library. *Anal Chem* 2005; 77: 4719-4725
- 10 Brooks SA, Carter TM, Royle L, Harvey DJ, Fry SA, Kinch C, Dwek RA, Rudd PM. Altered glycosylation of proteins in cancer: what is the potential for new anti-tumour strategies. *Anticancer Agents Med Chem* 2008; 8: 2-21
- 11 Meezan E, Wu HC, Black PH, Robbins PW. Comparative studies on the carbohydrate-containing membrane components of normal and virus-transformed mouse fibroblasts. II. Separation of glycoproteins and glycopeptides by sephadex chromatography. *Biochemistry* 1969; 8: 2518-2524
- 12 Turner GA. N-glycosylation of serum proteins in disease and its investigation using lectins. *Clin Chim Acta* 1992; 208: 149-171
- 13 Saussez S, Marchant H, Nagy N, Decaestecker C, Hassid S, Jortay A, Schüring MP, Gabius HJ, Danguy A, Salmon I, Kiss R. Quantitative glycohistochemistry defines new prognostic markers for cancers of the oral cavity. *Cancer* 1998; 82: 252-260
- 14 Meyer T, Hart IR. Mechanisms of tumour metastasis. *Eur J Cancer* 1998; 34: 214-221
- 15 Dube DH, Bertozzi CR. Glycans in cancer and inflammation--potential for therapeutics and diagnostics. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4: 477-488
- 16 Dennis JW, Laferté S, Waghorne C, Breitman ML, Kerbel RS. Beta 1-6 branching of Asn-linked oligosaccharides is directly associated with metastasis. *Science* 1987; 236: 582-585
- 17 Kim YJ, Varki A. Perspectives on the significance of altered glycosylation of glycoproteins in cancer. *Glycoconj J* 1997; 14: 569-576
- 18 Sell S. Cancer-associated carbohydrates identified by monoclonal antibodies. *Hum Pathol* 1990; 21: 1003-1019
- 19 Hakomori S, Zhang Y. Glycosphingolipid antigens and cancer therapy. *Chem Biol* 1997; 4: 97-104
- 20 Taylor-Papadimitriou J, Epenetos AA. Exploiting altered glycosylation patterns in cancer: progress and challenges in diagnosis and therapy. *Trends Biotechnol* 1994; 12: 227-233
- 21 Orntoft TF, Vestergaard EM. Clinical aspects of altered glycosylation of glycoproteins in cancer. *Electrophoresis* 1999; 20: 362-371
- 22 Zhang S, Cordon-Cardo C, Zhang HS, Reuter VE, Adluri S, Hamilton WB, Lloyd KO, Livingston PO. Selection of tumor antigens as targets for immune attack using immunohistochemistry: I. Focus on gangliosides. *Int J Cancer* 1997; 73: 42-49
- 23 Chen L, Zhang W, Fregien N, Pierce M. The her-2/neu oncogene stimulates the transcription of N-acetylglucosaminyltransferase V and expression of its cell surface oligosaccharide products. *Oncogene* 1998; 17: 2087-2093
- 24 Nakagawa T, Miyoshi E, Yakushijin T, Hiramatsu N, Igura T, Hayashi N, Taniguchi N, Kondo A. Glycomic analysis of alpha-fetoprotein L3 in hepatoma cell lines and hepatocellular carcinoma patients. *J Proteome Res* 2008; 7: 2222-2233
- 25 Anderson N, Pollacchi A, Hayes P, Therapondos G, Newsome P, Boyter A, Smith K. A preliminary evaluation of the differences in the glycosylation of alpha-1-acid glycoprotein between individual liver diseases. *Biomed Chromatogr* 2002; 16: 365-372
- 26 Kim KA, Lee EY, Kang JH, Lee HG, Kim JW, Kwon DH, Jang YJ, Yeom YI, Chung TW, Kim YD, Yoon do Y, Song EY. Diagnostic accuracy of serum asialo-alpha1-acid glycoprotein concentration for the differential diagnosis of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Clin Chim Acta* 2006; 369: 46-51
- 27 Ang IL, Poon TC, Lai PB, Chan AT, Ngai SM, Hui AY, Johnson PJ, Sung JJ. Study of serum haptoglobin and its glycoforms in the diagnosis of hepatocellular carcinoma: a glycoproteomic approach. *J Proteome Res* 2006; 5: 2691-2700
- 28 Arndt T. Carbohydrate-deficient transferrin as a marker of chronic alcohol abuse: a critical review of preanalysis, analysis, and interpretation. *Clin Chem* 2001; 47: 13-27
- 29 Yamashita K, Koide N, Endo T, Iwaki Y, Kobata A. Altered glycosylation of serum transferrin of patients with hepatocellular carcinoma. *J Biol Chem* 1989; 264: 2415-2423
- 30 Chen GQ, Zhang Q, Xu YF, Zhang WZ, Guan M, Su B, Liang HQ, Lu Y. [Changes of alkaline phosphatase sugar chains in hepatocellular carcinoma tissue] *Zhonghua Ganzhangbing Zazhi* 2003; 11: 739-741
- 31 Pettersen I, Andersen JH, Bjornland K, Mathisen Ø, Bremnes R, Wellman M, Visvikis A, Huseby NE. Heterogeneity in gamma-glutamyltransferase mRNA expression and glycan structures. Search for tumor-specific variants in human liver metastases and colon carcinoma cells. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1648: 210-218
- 32 Ohkura T, Hada T, Higashino K, Ohue T, Kochibe N, Koide N, Yamashita K. Increase of fucosylated serum cholinesterase in relation to high risk groups for hepatocellular carcinomas. *Cancer Res* 1994; 54: 55-61

编辑 李军亮 电编 何基才