

• 综 述 •

血清 IgG N-聚糖在肿瘤辅助诊断中的研究现状*

许轶涵¹, 李 晨¹, 郭钊培¹, 郭智浩¹, 廖雅楠¹ 综述, 曹颖平^{2△} 审校

1. 福建医科大学医学技术与工程学院, 福建福州 350000; 2. 福建医科大学
附属协和医院检验科, 福建福州 350000

摘 要: 免疫球蛋白(Ig)在人体抵抗外部感染和对自身异常细胞的监控、清除中扮演重要角色, 位于 IgG Fc 段的 N-聚糖在调节 IgG 的炎症活性上起到了重要作用, 并且 IgG N-聚糖成分和分布的变化与疾病的发生发展密切相关。近年来, 随着对 IgG N-聚糖研究的深入, 大量的研究发现 IgG N-聚糖的变化与恶性肿瘤的发生发展和转归存在关联, 其有望成为一种用于恶性肿瘤诊断、鉴别、疗效观察和预后判断的全新生物标志物。本文就 IgG N-聚糖的生物学特性、检测方法和研究进展作一综述。

关键词: 免疫球蛋白 G; 恶性肿瘤; N-聚糖; 肿瘤标志物; 糖基化

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2021.07.026 **中图法分类号:** R73

文章编号: 1673-4130(2021)07-0877-04 **文献标志码:** A

Research status of serum IgG N-glycans in the assistant diagnosis of tumor*

XU Yihan¹, LI Chen¹, GUO Zhaopei¹, GUO Zhihao¹, LIAO Ya'nan¹, CAO Yingping^{2△}

1. School of Medical Technology and Engineering, Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian 350000, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Union Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian 350000, China

Abstract: Immunoglobulin (Ig) plays an important role in fight against external infections and clearance of abnormal cells in our body. N-glycan in the Fc segment of IgG acts a pivotal part in regulating the inflammatory activity of IgG. Moreover, the changes of IgG N-glycan composition and distribution are closely related to the occurrence and progression of the disease. In recent years, with the further research on IgG N-glycan, a large number of studies have found that the change of IgG N-glycan is related to the occurrence, development and outcome of malignant tumors. It is expected to be a new biomarker for the diagnosis, differentiation, efficacy observation and prognosis estimation of malignant tumors. This paper reviews the biological characteristics, detection methods and research progress of IgG N-glycan.

Key words: immunoglobulin G; malignant tumor; N-glycan; tumor marker; glycosylation

癌症一直是人类健康的一大威胁。在中国, 肺癌、肝癌、胃癌、食管癌和结直肠癌等恶性肿瘤的发病率和病死率正在逐年上升^[1]。研究表明, 癌症的早期筛查、早期诊断、早期治疗对患者的五年生存率有积极意义^[2]。但由于绝大多数癌症的早期症状不够典型, 不能根据传统的癌症筛查手段及时作出诊断, 导致治疗方法受限。因此, 能在癌症早期就为诊断提供帮助的肿瘤标志物对提高患者的治疗和生存质量有重要意义。

在过去的十几年中, 研究者们报道了大量与癌症

发生发展密切相关的生物分子, 其中不乏一些高特异度、高灵敏度的肿瘤分子标志物, 这些分子标志在肿瘤的早期诊断、疗效观察和预后判断中有重要作用^[3]。N-聚糖作为一种重要的翻译后修饰蛋白, 近年来也进入了研究者的视野, 其在肿瘤细胞中的免疫逃避、血管生成和细胞间的信号传导过程中扮演着重要角色^[4]。免疫球蛋白(Ig)G 作为体内最重要的 Ig 之一, 更是与癌症的发生发展息息相关。大量的研究报道了疾病患者, 特别是罹患恶性肿瘤的患者体内 IgG N-聚糖存在着明显的改变^[5-17], 从这些发现可以

* 基金项目: 福建省科技创新联合项目(2017Y9051); 福建省卫生计生科研人才培养项目(2017-CX-20); 福建省本科教育教学改革项目(FB-JG20180225); 福建医科大学教改重点项目(J18002)。

△ 通信作者, E-mail: caoyingping@aliyun.com。

本文引用格式: 许轶涵, 李晨, 郭钊培, 等. 血清 IgG N-聚糖在肿瘤辅助诊断中的研究现状[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(7): 877-880.

看出,通过检测 IgG N-聚糖水平和组成的变化对肿瘤的早期辅助诊断意义重大。

1 IgG N-聚糖的生物学特性

大约有 20% 的人血清 IgG 存在 N-聚糖, N-聚糖主要存在于其 Fc 段 C_H2 区的 Asn-297 上^[18]。组成 N-聚糖糖链的单糖残基有岩藻糖、甘露糖、唾液酸、半乳糖、葡萄糖、N-乙酰葡萄糖胺和 N-乙酰半乳糖胺等,生物体内的 N-聚糖结构均以三甘露糖为核心,向外形成“天线”,根据“天线”的不同, N-聚糖分为高甘露糖型、复杂型和混合型 3 种^[19]。IgG 的 Fc 段介导了吞噬过程、黏附过程、细胞毒性作用及超敏反应等,其功能的正常发挥依赖于该区域的适当糖基化, Fc 段 N-聚糖发生改变即可影响相应的功能^[20]。目前,研究发现了肿瘤患者 IgG N-聚糖存在明显改变,在肿瘤的发生发展过程中,这些改变使 IgG 和其他依赖 FcγR 的细胞功能出现异常,并与其他因素共同导致了肿瘤的发生^[4,21]。

虽然 N-聚糖的组成在生物体不同状态下存在高度变异性,但是相同状态下的不同个体的血清 N-聚糖糖谱却十分相似^[22]。这使得特定疾病状态下的 N-聚糖糖谱可以依据其中几个典型个体进行绘制,以此研讨疾病 IgG N-聚糖糖谱与健康个体的区别。相同状态下的 IgG N-聚糖糖谱具有重现性,致使检测 IgG N-聚糖的变化用以辅助肿瘤诊断成为可能。

2 IgG N-聚糖的检测方法

一个好的方法学是研究和检测 IgG N-聚糖的基础,但通常情况下, N-聚糖在血清中是低丰度的,而它们又不能像核酸一样被扩增,使丰度提升几个数量级以便于检测,因而寻找更高效的提取方法和更低检测限的检测手段也成了研究方向^[3]。近年来,随着检测技术的快速发展,生物质谱被大量运用于 N-聚糖研究,如基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱^[6]、液相色谱串联三重四极杆质谱^[23]及毛细管电泳质谱^[24]等,生物质谱技术因其所具有的高通量、高灵敏的特性而受到了研究者的青睐。除了质谱技术,还有一部分研究者选择使用色谱技术对 IgG N-聚糖进行分析^[5]。LU 等^[25]则建立了一种基于凝集素和毛细管凝胶电泳的 N-聚糖分析技术,可以快速地分析标本中双天线 N-聚糖,大大缩短了标本筛查所需的时间。

人体内含有多种多样的蛋白质,如果在检测前不对标本进行处理,人体内所含的高丰度蛋白足以掩盖糖蛋白信息,所以在 N-聚糖进样分析前,适当地对 N-聚糖进行分离和纯化是十分有必要的。目前获得高纯度 N-聚糖的一般流程如下:首先将 IgG 从血清标本中分离,此前的研究较多使用聚丙烯酰胺凝胶电泳

对血清中的 IgG 进行分离,但目前绝大多数的研究使用一种名为蛋白 A 或蛋白 G 的细菌蛋白来分离 IgG,其具有和各种 IgG 结合的特性,可以快速、特异地分离血清中的 IgG,目前已被商品化并广泛运用^[17]。接着进行糖链的释放,方法主要有肼解法和酶解法。肼解法不仅仅可以用来释放 N-聚糖,也可以用来释放 O-聚糖,这项技术所需要的条件十分苛刻,而且会导致 N-乙酰葡萄糖胺残基上的 N-乙酰基基团的丢失,后续还要再进行 N-乙酰化^[26]。酶解法条件相对肼解法更加温和,在进行酶切之前要对 IgG 进行变性处理,方便之后的酶切操作,变性手段有热变性和化学变性 2 种,使用二硫苏糖醇和碘乙酰胺进行化学变性是大多数研究采用的方法^[13]。酶切法所用的酶主要是胰蛋白酶^[13]和 PNGase F 酶^[26]。有研究发现, PNGase F 酶在酶切 N-聚糖时,不同聚糖的释放速率有所不同,所以在应用 PNGase F 酶对 N-聚糖进行释放时,应适当延长反应时间,以免造成结果的偏差^[27]。糖链释放完成后,将对含有 N-聚糖的标本进行脱盐和富集,目前从标本中富集 N-聚糖的方法主要有凝集素亲和层析法、亲水性层析法和氧化肼化学法等,有研究比较了这几种方法对质谱结果的影响,发现使用氧化肼化学法提取 N-聚糖标本,质谱的信号强度更高^[28]。但基于色谱原理的亲水性层析法由于具有安全、方便和易于商品化的特点,目前被大多数研究采用^[6]。

3 IgG N-聚糖在癌症辅助诊断中的研究进展

随着 IgG N-聚糖的检测技术逐渐成熟、完善,有关 IgG N-聚糖的改变与疾病之间的关联的研究也逐渐深入。目前已经取得了一定成果,下面将从几个癌症入手,阐述 IgG N-聚糖与癌症的研究进展。

3.1 肺癌

肺癌作为全世界死亡率最高的恶性肿瘤,每年造成数以百万计的患者死亡^[29]。研究人员对此进行了大量的研究,并发现了较多有价值的成果。ZHANG 等^[7]分离并分析了疾病特异性 IgG N-聚糖,发现了几组与肺癌相关的岩藻糖基化比值改变,可以作为区分非小细胞肺癌和良性肺部疾病的个性化生物标志物。FARKAS 等^[8]在他们的研究中发现具有双天线结构并有核心岩藻糖基化和无乳糖基化的 N-聚糖可以用于鉴别慢性阻塞性肺疾病和肺癌,而具有三天线结构并有岩藻糖和半乳糖基化的 N-聚糖水平在肺癌患者的血清 IgG 中明显升高。KOMAROMY 等^[9]则系统地总结了 IgG N-聚糖在慢性阻塞性肺疾病和肺癌中特异的改变,主要是半乳糖基化水平明显降低,唾液酸化和具有高度分支结构的 N-聚糖水平升高。这些发现体现了 IgG N-聚糖在肺癌和肺慢性疾

病中有着明显的区别,在肺癌和肺慢性疾病中的鉴别和诊断上有着不容忽视的价值。

3.2 结直肠癌 结直肠癌同样也是世界范围内,特别是在日本和欧洲地区发病率较高的恶性肿瘤之一,并且发病率逐年上升^[30]。SIMURINA 等^[10]研究发现,患有慢性肠部疾病比如克罗恩病和溃疡性结肠炎的患者,血清 IgG Fc 段的半乳糖基化水平较低。ZOU 等^[11]研究发现,结直肠癌患者血清 IgG 的 N-乙酰葡萄糖胺水平升高,而半乳糖基化、岩藻糖基化和唾液酸化水平降低,并且选取了 11 个具有差异的 N-聚糖建立了一套特异、高效的筛选方法用来区分结直肠癌患者和健康个体。LIU 等^[12]研究发现 9 个 IgG N-聚糖在疾病组与对照组之间存在差异表达,推测核心岩藻糖基化、唾液酸化和唾液酸核心岩藻糖基化可能与结直肠癌的发生有关,并且还发现了 5 种不同 IgG N-聚糖在不同分期的患者中存在区别。这些研究表明 IgG N-聚糖在慢性肠炎与结直肠癌的鉴别、诊断及预后判断上有着极大的潜力。

3.3 胃癌 胃癌是最具侵袭性的胃肠道恶性肿瘤之一,成为中国发病率第二高的癌症^[1]。ZHANG 等^[13]分析了 443 例胃部良性疾病患者和 403 例胃癌患者的血清 Ig,发现胃部良性疾病患者血清中疾病特异性 IgG1 中的 5 种 N-聚糖和 IgG2 的半乳糖基化、唾液酸化性与疾病相关,且 IgG2 G2FN/G1FN 对胃部良性疾病和胃癌有较好的区分能力。QIN 等^[14]研究发现,胃癌患者在腹膜转移前后血清 IgG N-聚糖糖谱存在不同,腹膜转移时唾液酸化和岩藻糖基化水平升高,而中性糖基化、单半乳糖基化和分支 GlcNAc 水平降低,表明 IgG N-聚糖改变可以作为预测晚期胃癌患者是否存在腹膜转移的可靠指标。这些发现表明 IgG N-聚糖的改变有望作为胃癌早期诊断和鉴别的有力指标。

3.4 其他癌症 除了上述的几种癌症,也有研究人员研究了其他癌症的 IgG N-聚糖糖基化改变。GE-BREHIWOT 等^[15]研究发现了 17 个复杂型 IgG N-聚糖在早期(I 期和 II 期)乳腺癌患者中有较高的表达和诊断潜力,这些 Ig N-聚糖多为核心岩藻糖基化、多分支和唾液酸化结构。O'FLAHERTY 等^[16]研究发现将 IgG N-聚糖与 CA125 相结合可以提高预测上皮性卵巢癌的灵敏度,并且建立了一套辅助诊断方法,其在早期卵巢癌的选择性和特异性上都要优于目前用于卵巢癌的生物标志物 CA125。QIN 等^[17]研究发现神经母细胞瘤患者血清 IgG 的糖基化中半乳糖基化水平明显高于健康个体,这个发现有望为小儿神经母细胞瘤的辅助诊断提供极大的便利。

大量癌症与 IgG N-聚糖改变之间的关联被发现,有力地体现了检测 IgG N-聚糖在特定癌症的早期诊断、鉴别、疗效观察和预后判断上的潜力,有望为临床提供更多个体化检验的选择,满足患者精准诊断、精准治疗的需求。

4 小 结

随着 IgG N-聚糖与癌症关系的研究逐渐深入,已经有大量的证据表明了 IgG N-聚糖改变与肿瘤的发生发展和转归存在密切的关联。这些发现均提示着通过检测人血清 IgG N-聚糖的改变可以用于肿瘤患者的辅助诊断、疗效观察和预后判断,其作为一种非侵入性、高通量的检测项目,有利于肿瘤患者的早期筛查、早期诊断和早期治疗,为肿瘤患者争取更多的时间,也让临床医生在设计治疗方案时能够有更多的选择。随着更多癌症与 IgG N-聚糖改变的关联被探明、更大样本量的分析和检测方法的改进、完善,未来检测 IgG N-聚糖作为肿瘤辅助诊断手段将拥有更大的潜力和更广阔的前景。

参考文献

- [1] WU C, LI M, MENG H, et al. Analysis of status and countermeasures of cancer incidence and mortality in China[J]. Sci China Life Sci, 2019, 62(5): 640-647.
- [2] MANDELBAUM R S, KLAR M, TAKIUCHI T, et al. Fertility-sparing treatment for early-stage epithelial ovarian cancer: contemporary oncologic, reproductive and endocrinologic perspectives [J]. J Obstet Gynaecol Res, 2020, 46(8): 1263-1281.
- [3] WU L, QU X. Cancer biomarker detection: recent achievements and challenges[J]. Chem Soc Rev, 2015, 44(10): 2963-2997.
- [4] PINHO S S, REIS C A. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications[J]. Nat Rev Cancer, 2015, 15(9): 540-555.
- [5] HOU H, XU X, SUN F, et al. Hyperuricemia is associated with immunoglobulin G N-glycosylation: a community-based study of glycan biomarkers[J]. OMICS, 2019, 23(12): 660-667.
- [6] LEE S B, BOSE S, AHN S H, et al. Breast cancer diagnosis by analysis of serum N-glycans using MALDI-TOF mass spectroscopy[J]. PLoS One, 2020, 15(4): e0231004.
- [7] ZHANG D, LI X, LIU X, et al. Disease-specific IgG Fc glycosylation ratios as personalized biomarkers to differentiate non-small cell lung cancer from benign lung diseases[J]. Proteomics Clin Appl, 2020, 14(1): e1900016.
- [8] FARKAS A, MÉSZÁROS B, SZARKA M, et al. Modeling of the desialylated human serum N-glycome for molecular diagnostic applications in inflammatory and malign

- nant lung diseases[J]. *Curr Mol Med*, 2020, 20(10): 765-772.
- [9] KOMAROMY A, REIDER B, JARVAS G, et al. Glyco-protein biomarkers and analysis in chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer with special focus on serum immunoglobulin G[J]. *Clin Chim Acta*, 2020, 506(1): 204-213.
- [10] ŠIMURINA M, DE-HAAN N, VUCKOVIC F, et al. Glycosylation of immunoglobulin G associates with clinical features of inflammatory bowel diseases[J]. *Gastroenterology*, 2018, 154(5): 1320-1333.
- [11] ZOU Y, HU J, JIE J, et al. Comprehensive analysis of human IgG Fc N-glycopeptides and construction of a screening model for colorectal cancer[J]. *J Proteomics*, 2020, 213(1): 103616.
- [12] LIU S, CHENG L, FU Y, et al. Characterization of IgG N-glycome profile in colorectal cancer progression by MALDI-TOF-MS[J]. *J Proteomics*, 2018, 181(1): 225-237.
- [13] ZHANG D, CHEN B, WANG Y, et al. Disease-specific IgG Fc N-glycosylation as personalized biomarkers to differentiate gastric cancer from benign gastric diseases[J]. *Sci Rep*, 2016, 6(1): 25957.
- [14] QIN R, YANG Y, QIN W, et al. The value of serum immunoglobulin G glycome in the preoperative discrimination of peritoneal metastasis from advanced gastric cancer[J]. *J Cancer*, 2019, 10(12): 2811-2821.
- [15] GEBREHIWOT A G, MELKA D S, KASSAYE Y M, et al. Exploring serum and immunoglobulin G N-glycome as diagnostic biomarkers for early detection of breast cancer in Ethiopian women[J]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1): 588.
- [16] O'FLAHERTY R, MUNIYAPPA M, WALSH I, et al. A robust and versatile automated glycoanalytical technology for serum antibodies and acute phase proteins: ovarian cancer case study[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2019, 18(11): 2191-2206.
- [17] QIN W, PEI H, QIN R, et al. Alteration of serum IgG galactosylation as a potential biomarker for diagnosis of neuroblastoma[J]. *J Cancer*, 2018, 9(5): 906-913.
- [18] AURER I, LAUC G, DUMIC J, et al. Aberrant glycosylation of IgG heavy chain in multiple myeloma[J]. *Coll Antropol*, 2007, 31(1): 247-251.
- [19] BERGER M, KAUP M, BLANCHARD V. Protein glycosylation and its impact on biotechnology[J]. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2012, 127(1): 165-185.
- [20] ARNOLD J N, WORMALD M R, SIM R B, et al. The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins[J]. 2007, 25(1): 21-50.
- [21] RODRIGUES J G, BALMANA M, MACEDO J A, et al. Glycosylation in cancer: selected roles in tumour progression, immune modulation and metastasis[J]. *Cell Immunol*, 2018, 333(1): 46-57.
- [22] GORNIK O, WAGNER J, PUCIC M, et al. Stability of N-glycan profiles in human plasma[J]. *Glycobiology*, 2009, 19(12): 1547-1553.
- [23] SHIAO J Y, CHANG Y T, CHANG M C, et al. Development of efficient on-bead protein elution process coupled to ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry to determine immunoglobulin G subclass and glycosylation for discovery of bio-signatures in pancreatic disease[J]. *J Chromatogr A*, 2020, 1621(1): 461039.
- [24] GIORGETTI J, D'ATRI V, CANONGE J, et al. Monoclonal antibody N-glycosylation profiling using capillary electrophoresis-mass spectrometry: assessment and method validation[J]. *Talanta*, 2018, 178(1): 530-537.
- [25] LU G, HOLLAND L A. Profiling the N-glycan composition of IgG with lectins and capillary nanogel electrophoresis[J]. *Anal Chem*, 2019, 91(2): 1375-1383.
- [26] HUH N C, SELMAN M H, RUHAAK L R, et al. IgG glycosylation analysis[J]. *Proteomics*, 2009, 9(4): 882-913.
- [27] HUANG Y, ORLANDO R. Kinetics of N-glycan release from human immunoglobulin G (IgG) by PNGase F: all glycans are not created equal[J]. *J Biomol Tech*, 2017, 28(4): 150-157.
- [28] KOTSIAS M, BLANAS A, VAN VLIET S J, et al. Method comparison for N-glycan profiling: towards the standardization of glycoanalytical technologies for cell line analysis[J]. *PLoS One*, 2019, 14(10): e0223270.
- [29] MAO Y, YANG D, HE J, et al. Epidemiology of lung cancer[J]. *Surg Oncol Clin N Am*, 2016, 25(3): 439-445.
- [30] TORRE L A, SIEGEL R L, WARD E M, et al. Global cancer incidence and mortality rates and trends-an update[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2016, 25(1): 16-27.

(收稿日期: 2020-08-02 修回日期: 2020-12-17)