

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.06.011

· 临床研究 ·

乳腺癌组织 N-连接糖链的分析

虞迪^a, 和晓涵^b, 杨刚龙^b (江南大学 a. 无锡医学院; b. 糖化学与生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

[摘要] **目的:** 解析乳腺癌组织的特异性糖链结构, 为乳腺癌的早期诊断提供可能标志物。 **方法:** 收集 2014 年 5 月至 2014 年 9 月在陕西省肿瘤医院乳腺科手术切除的乳腺癌患者组织标本 15 例及距癌组织边缘 3~5 cm 的癌旁组织标本 5 例, 另选取乳腺小叶增生组织标本 4 例, 提取组织蛋白质, 利用滤膜辅助的糖蛋白糖链释放方法获得 N-连接糖链, 应用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF/TOF-MS) 技术分析乳腺癌组织、癌旁组织和正常乳腺组织中糖蛋白 N-连接糖链类型分布和含量变化情况。 **结果:** 乳腺癌组织、癌旁组织和正常乳腺组织中分别鉴定到 38、34 和 22 个糖链。与癌旁组织及正常乳腺组织相比, 癌旁组织中复杂型、高甘露糖型、平分型、岩藻糖化和二天线型糖链的含量除高甘露糖型明显升高外, 其他均显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。乳腺癌组织中相对分子质量分别为 1 580.455 和 1 742.490 的 2 种高甘露糖型 N-糖链的含量显著高于正常乳腺组织 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 相对分子质量分别为 1 647.473 和 1 850.583 的 2 种复杂型 N-糖链的含量则显著低于正常乳腺组织 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。这 4 种糖链经 ROC 曲线分析显示具有较高检测准确性 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。 **结论:** 发现的 4 种乳腺癌组织特异性的 N-糖链有成为早期诊断和靶向治疗标志物的潜力。

[关键词] 乳腺癌; N-连接糖链; 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱; 肿瘤标志物

[中图分类号] R737.9

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2016)06-0801-05

Analysis of N-linked glycans in breast carcinoma

YU Di^a, HE Xiaohan^b, YANG Ganglong^b (a. Wuxi School of Medicine; b. The Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology of Education Ministry, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze structures of specific glycans in breast carcinoma, in order to provide potential early diagnostic markers for breast carcinoma. **Methods:** Fifteen specimens of breast carcinoma and five specimens of tissues adjacent to the carcinoma margin 3-5 cm surgical resected from the patients with breast cancer who were hospitalized in Department of Galactophore, Tumor Hospital of Shaanxi Province during May 2014 to September 2014 were collected. In addition, four specimens of breast lobular hyperplasia tissues were selected. Tissue proteins were extracted. Using filter membrane assisted method for the release of glycoprotein glycans, N-linked glycans were obtained. Type distributions and content changes of glycoprotein N-linked glycans in breast carcinoma, adjacent breast carcinoma and normal breast tissues were analyzed by matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF/TOF-MS) technique. **Results:** Thirtyeight, thirty four and twentytwo N-linked glycans were respectively identified in the breast cancer tissues, the adjacent tissues, and the normal breast tissues. Comparing with the paracarcinoma tissues and the normal breast tissues, contents of complex, high mannose, bisecting, fucosylated and two antenna types of N-linked glycans in the breast carcinoma tissues significantly decreased except for that content of high mannose type N-linked glycans obviously increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). In the breast carcinoma tissue, contents of two types of high mannose type N-linked glycans, relative molecular masses of that were 1 580.455 and 1 742.490 respectively, were significantly higher than those in the normal breast tissues ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and contents of two types of complex type N-linked glycans, relative molecular masses of that were 1 647.473 and 1 850.583 respectively, were obviously lower than those in the normal breast

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金资助项目 (No. 81402115)。Project supported by the National Science Foundation for Young Scientists of China (No. 81402115)

[作者简介] 虞迪 (1988 -), 女, 江苏无锡人, 硕士, 主要从事抗肿瘤研究, E-mail: jndxyd1988@163.com

[通信作者] 杨刚龙 (YANG Ganglong, corresponding author), E-mail: glyanglife@jiangnan.edu.cn

[优先发表] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20161110.1445.018.html>

tissues ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). ROC curve analysis showed that the 4 kinds of N-linked glycans have high detection accuracy ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion:** Four types of specific N-linked glycans found in the breast carcinoma could be expected to become potential markers for early diagnosis and target therapy of the breast carcinoma.

[**Key words**] breast carcinoma; N-linked glycans; matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF/TOF-MS); tumor marker

[Chin J Cancer Biother, 2016, 23(6): 801-805. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.06.011]

乳腺癌(breast cancer)是一种严重影响妇女身心健康甚至危及生命的最常见的恶性肿瘤之一^[1-2]。目前乳腺癌治疗方法主要有手术、放化疗和生物治疗等,但是其临床疗效尚不理想^[3-5]。乳腺癌是乳腺上皮细胞中 DNA、蛋白质和糖链等生物大分子发生变化,导致组织结构紊乱、细胞连接松散,癌细胞很容易脱落游离而播散全身,形成早期的远端转移^[6]。蛋白质翻译后修饰具有多样性,而其中最普遍、多样的是蛋白质的糖基化,大约有一半以上的天然蛋白质都是经过糖基化修饰的糖蛋白^[7]。为了深入研究糖基化糖链的功能,糖生物学家在 20 世纪末提出了糖组学的概念^[8]。在机体的病变过程中,细胞表面糖复合物上的糖链往往会发生结构和数量上的变化,而糖链异常则可引起相关疾病^[9]。目前,机体组织细胞的异常糖基化已成为细胞恶变和肿瘤发展的普遍特征^[10]。针对目前临床上用于乳腺癌检测的标志物存在灵敏度和特异性有限且无法实现高通量检测的缺点,本研究利用质谱技术对比分析乳腺癌组织、癌旁组织和正常乳腺组织 N-糖链变化,意在筛选乳腺癌发生发展过程中改变的 N-连接糖链,并探索可用于乳腺癌诊断的特征性 N-连接糖链,探讨乳腺癌组织中糖链结构变化规律及其在乳腺癌发生发展中的作用。

1 资料与方法

1.1 标本来源

收集 2014 年 5 月至 2014 年 9 月在陕西省肿瘤医院乳腺科手术切除的乳腺癌组织标本 15 例,同时取距离同一癌组织边缘 3~5 cm 的癌旁组织标本 5 例,另选取正常乳腺组织标本 4 例(确诊为小叶增生)。组织标本的收集均与患者签署知情同意书,并获得医院伦理委员会批准。

1.2 主要试剂与仪器

琼脂糖微珠(Sepharose CL-4B)购自 Sigma 公司,抑肽酶、组织蛋白质提取试剂盒(T-PER)均购自赛默飞(Thermo Scientific)公司,PNGase F 酶购自美国纽英伦生物技术公司。超滤管购自密理博(Millipore)公司,基质辅助激光解析电离飞行时间质谱仪

(MALDI-TOF/TOF-MS)购自美国布鲁克道尔顿(BrukerDaltonics)公司。

1.3 滤膜辅助的糖蛋白糖链释放法获取乳腺组织中 N-连接糖链

以 BCA 法测定组织匀浆蛋白浓度,1 mg 蛋白溶液加入 10 kD 超滤管离心浓缩,用 DTT 和 IAM 分别对蛋白质进行还原和烷基化处理。加入 100 μ l 40 mmol/L NH_4HCO_3 溶解的 PNGaseF,37 $^{\circ}\text{C}$ 静置孵育 12 h,离心收集流出液,冷冻干燥后用 Sepharose 4B 琼脂糖微珠法对 N-连接糖链进行除盐处理^[11]。

1.4 MALDI-TOF/TOF-MS 质谱仪解析乳腺癌组织蛋白样本中 N-连接糖链结构

用 UltrafleXtreme MALDI-TOF/TOF-MS 质谱仪解析乳腺组织全蛋白 N-连接糖链。以反射阳性离子模式鉴定, N_2 激光(337 nm)激发,相对分子质量检测范围为 700~6 800。二级质谱分析用 LIFT 进行断裂。FlexAnalysis V3 获取糖链质谱图和原始数据,利用 GlycoWorkbench 2 分析糖链结构。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 16.0 软件,对所选糖链含量进行方差分析(ANOVA),用 ROC 曲线对具有统计学意义的特异性糖链进行分析,确定其是否具有用于临床诊断的价值。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同乳腺组织中不同类型 N-连接糖链的数量分布

MALDI-TOF/TOF-MS 技术检测结果(表 1)显示,在乳腺癌组织、癌旁组织和正常乳腺组织中分别鉴定到 38、34 和 22 个糖链,并且只在乳腺癌组织中鉴定到 6 个特异性糖链。

2.2 不同乳腺组织中不同类型 N-连接糖链含量的差异

N-糖链根据分子量大小、天线的个数和糖链含量进行比较可以预示疾病进程的一些总趋势^[11]。本实验将乳腺组织中解析的 N-连接糖链分为复杂型、杂合型、高甘露糖型、岩藻糖化、平分型、二天线型、三天线型和四天线型后,累加每个样本中各类型

糖链含量的值,再进行方差分析,结果(表2)显示,在复杂型、岩藻糖化和平分型糖链中,正常乳腺组织和癌旁组织的面积显著高于乳腺癌组织(均 $P < 0.05$),癌旁组织面积略低于正常乳腺组织但无统计学意义($P > 0.05$)。高甘露糖型中,正常乳腺组织和癌旁组织的面积显著低于乳腺癌组织($P < 0.05$),癌旁组织面积略高于正常乳腺组织但无统计学意义($P > 0.05$)。二天线型糖链的正常乳腺组织面积显著高于乳腺癌组织($P < 0.05$)但与癌旁组织差异无统计学意义($P > 0.05$)。以上结果提示,如果糖蛋白质复杂糖链修饰被抑制,而其合成前体糖链在组织中的大量累积可能与乳腺癌发生有关。

表1 不同乳腺组织中不同类型 N-糖链数量的分布

Tab. 1 Quantitative distribution of different type N-linked glycans in various breast tissues

Glycan type	Basic structure	Distribution(n)			Total
		Normal	Para-cancer	Cancer	
Complex		15	22	24	61
Hybrid		2	5	3	10
High-mannose		5	7	11	23
Total		22	34	38	94

■GlcNAc ○=Man

表2 不同类型糖链在不同组织中含量的 ANOVA 分析结果

Tab. 2 Contents of different type N-linked glycans in various tissues analyzed by ANOVA

Glycan type	Normal tissue	Para-cancertissue	Cancertissue
Complex	0.829 ± 0.033 **	0.765 ± 0.054 **	0.613 ± 0.114
Hybrid	0.032 ± 0.044	0.018 ± 0.015	0.034 ± 0.015
High-mannose	0.153 ± 0.079 *	0.193 ± 0.046 *	0.301 ± 0.102
Biantennary	0.347 ± 0.069 *	0.311 ± 0.028	0.260 ± 0.055
Triantennary	0.013 ± 0.023	0.021 ± 0.013	0.032 ± 0.022
Tetra-antennary	0.000	0.000 ± 0.004	0.019 ± 0.006
Fucosylated	0.665 ± 0.069 **	0.652 ± 0.066 **	0.468 ± 0.128
Bisecting	0.468 ± 0.067 **	0.399 ± 0.085 **	0.271 ± 0.111

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs cancer tissue

2.3 乳腺组织中 4 种 N-连接糖链具有乳腺癌组织特异性

将重复性较好出现率较高的 16 种糖链作为分析对象,PCA 分析结果(表3)显示,在每个因子中贡献率较高的有 7 种糖链,相对分子质量为 1 256.366、1 485.466、1 580.455、1 647.473、1 742.490、1 850.583 和 1 904.549;对其所含以上 7 种 N-糖链的相对峰面积分析显示,乳腺癌组织中的 2 种高甘露糖型 N-糖链的含量显著高于正常乳腺组织($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);另外 2 种复杂型 N-糖链的含量则显著低于正常乳腺组织($P < 0.01$)。将癌旁组织和乳腺正常组织归为一组后对这 4 种糖链进行 ROC 曲线分析,结果(表4、图1)显示,该 4 种糖链中相对分子质量 1 580.455 和 1 850.583 的糖链具有较高准确性,其灵敏度为 88.90%,特异性分别为 88.90% 和 90.00%,其有很高的候选肿瘤标志物的潜力。剩余 2 种相对分子质量为 1 647.473、1 742.490 的糖链也具有一定准确性($P < 0.05$ 或

$P < 0.01$),也有可能成为潜在的肿瘤标志物。

3 讨论

目前认为,机体组织细胞的异常糖基化已成为细胞恶变和肿瘤发展的普遍特征。例如,某些肿瘤细胞利用糖蛋白表面的糖链掩盖自身的抗原表位,从而造成肿瘤细胞的侵袭与转移;又如,N-糖链中 β -1,6 分支的增加,这是 N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 V(GnT-V)表达增高以及活性增强的结果,而 GnT-V 过表达可增强肿瘤细胞的迁移和侵袭能力,并使得原来非肿瘤性的细胞产生肿瘤的行为^[12]。糖类抗原的高表达还表现为过表达特征的糖蛋白和糖脂,如包含 O-糖链的黏蛋白(mucin)的高表达,它已经作为乳腺癌、结肠癌等的标志物。目前所找到的肿瘤标志物很多都是糖蛋白,且抗原决定簇为多糖,由此可见检测糖链结构变化可用于诊断肿瘤。因此,对于恶性肿瘤组织蛋白特征性糖链结构与功能的深入研究,还可为筛选肿瘤的生物标志物和开发新的

表 3 不同乳腺组织 N-糖链含量差异的 PCA 和 ANOVA 分析结果

Tab. 3 Content differences of N-linked glycanin various breast tissues analyzed by PCA and ANOVA

No	Type	Molecular mass	Normal	Para-cancer	Cancer
1	High-mannose	1 580.455	0.000	0.018 ± 0.039	0.068 ± 0.093 * *
2	High-mannose	1 742.490	0.037 ± 0.038	0.049 ± 0.015	0.098 ± 0.045 *
3	Complex	1 647.473	0.129 ± 0.033	0.156 ± 0.013	0.099 ± 0.038 *
4	Complex	1 850.583	0.090 ± 0.021	0.058 ± 0.015	0.028 ± 0.021 * *
5	High-mannose	1 256.366	0.025 ± 0.035	0.019 ± 0.019	0.037 ± 0.022
6	Complex	1 485.466	0.044 ± 0.038	0.043 ± 0.025	0.037 ± 0.027
7	High-mannose	1 904.549	0.065 ± 0.046	0.053 ± 0.012	0.081 ± 0.024

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs normal tissue

表 4 不同乳腺组织中含有明显差异的 4 种糖链的 ROC 曲线分析

Tab. 4 ROC curve analysis of 4 kinds of N-glycans with obvious different contents in various breast tissues

Type	Structure	Molecular mass	AUC	95%CI	P	Cut-off point	Sensitivity (%)	Specificity (%)
High-mannose		1580.455	0.890	0.720-1.00	0.005	0.028	88.900	88.900
High-mannose		1742.490	0.880	0.720-1.00	0.007	0.066	77.800	88.900
Complex		1 647.473	0.810	0.600-1.00	0.022	0.104	66.700	100.00
Complex		1 850.583	0.940	0.840-1.00	0.001	0.052	88.900	90.000

■=GlcNAc; ●=Man; ●=Gal; ▲=Fuc

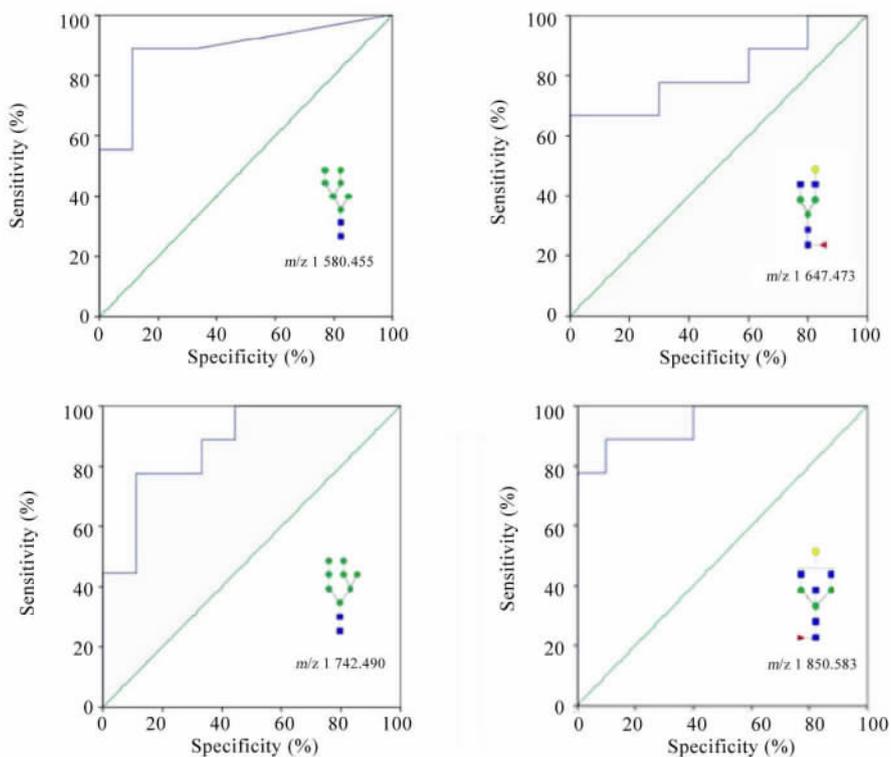


图 1 差异显著的 4 种特异性 N-连接糖链的 ROC 曲线分析结果

Fig.1 ROC curve analysis of 4 kinds of N-linked glycans with significant differences

药物靶标奠定基础。

目前临床上用于乳腺癌检测的标志物存在灵敏度和特异性有限并无法实现高通量检测的缺点^[13]。本研究通过质谱技术对乳腺癌患者的癌组织、癌旁组织和乳腺正常组织中 N-糖链进行检测分析,获得了乳腺组织 44 种 N-糖链的谱图,利用 ANOVA 和 ROC 曲线独立性主成分分析后挑选的代表性 N-糖链进行评测,共发现了 4 种含量明显差异的 N-连接糖链具有诊断意义,其相对分子质量分别为 1 580. 455、1 647. 473、1 742. 490 和 1 850. 583,其中首位的 1 850. 583 N-糖链其检测乳腺癌的灵敏度为 88. 90%、特异性为 90. 00%,显示其最有可能成为潜在的乳腺癌诊断标志物。本研究还发现高甘露糖型糖链在乳腺癌组织中含显著增高,符合“高甘露糖含量上升是乳腺癌的一个共性”的规律^[14]。同时,在乳腺癌组织中复杂型糖链、岩藻糖化的糖链含量却有所下降。有研究^[15]报道,在小鼠乳腺癌组织细胞中岩藻糖化的糖链经质谱、凝集素芯片和免疫组化分析后表达都下降,但是岩藻糖化相关基因 *Fut8* 的表达经 RT-PCR 和糖基因芯片检测并无显著变化。此外,平分型糖链在癌组织中的含量也低于乳腺正常组织和癌旁组织,这可能是由于 N-乙酰氨基葡萄糖转移酶Ⅲ(GnT-Ⅲ)表达异常所致,GnT-Ⅲ与 GnT-V 功能相反,主要参与肿瘤转移的抑制作用^[16]。

综上所述,本实验利用质谱技术对乳腺组织 N-连接糖链进行分析,得到特异性的乳腺癌组织标志性糖峰,其有可能成为潜在的乳腺癌诊断标志物。

[参 考 文 献]

- [1] 郑莹, 吴春晓, 张敏璐. 乳腺癌在中国的流行状况和疾病特征 [J]. 中国癌症杂志, 2013, 23(8): 561-569. DOI: 10. 3969/j. issn. 1007-3969. 2013. 08. 001.
- [2] YAMAAN S, TIFFANY L, ARPITA V, et al. Applications of nanomedicine in breast cancer detection, imaging, and therapy [J]. J Nanosci Nanotechnol, 2014, 14(1): 913-923. DOI: 10. 1166/jnn. 2014. 8755.
- [3] HAYASHI N, NAKAMURA S, TOKUDA Y, et al. Serum Her2 levels determined by two methods in patients with metastatic [J]. Int J Clin Oncol, 2012, 17(1): 55-62. DOI: 10. 1007/ s10147-011-0253-z.
- [4] MARTY M, COGNETTI F, MARANINCHI D, et al. Randomized phase II trial of the efficacy and safety of trastuzumab combined with docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer administered as first-line treatment: the M77001 study group [J]. J Clin Oncol, 2005, 23(19): 4265-4274. DOI: 10. 1200/ JCO. 2005. 04. 173.
- [5] ZVIA A, OOLEG U K, GENADIY V, et al. Dickkopf1 regulates fate decision and drives breast cancer stem cells to differentiation: an experimentally supported mathematical model [J/OL]. PLoS One, 2011, 6(9): e24225 [2015-12-20]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0024225>. DOI: 10. 1371/journal.pone.0024225.
- [6] AN J, LV J, QIAO J, et al. Constitutive expression of Bcl-2 induces epithelial-mesenchymal transition in mammary epithelial cells [J]. BMC Cancer, 2015, 15(1): 1-8. DOI: 10. 1186/ s12885-015-1485-5.
- [7] APWEILER R, HERMIAKOB H, SHARON N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database [J]. Biochim Biophys Acta, 1999, 1473(1): 4-8. DOI: 10. 1016/ S0304-4165(99) 00165-8.
- [8] FEIZI T. Progress in deciphering the information content of the 'glycome' - a crescendo in the closing years of the millennium [J]. Glycoconj J, 2000, 17(7/8/9): 553-565. DOI: 10. 1023/ A: 1011022509500.
- [9] HART G W, COPELAND R J. Glycomics hits the big time [J]. Cell, 2010, 143(5): 672-676. DOI: 10. 1016/j. cell. 2010. 11. 008.
- [10] HEERBOTH S, HOUSMAN G, LEARY M, et al. EMT and tumor metastasis [J/OL]. Clin Transl Med, 2015, 4(1): 1-13 [2016-02-25]. <http://clintransmed.springeropen.com/articles/10.1186/s40169-015-0048-3>. DOI: 10. 1186/ s40169-015-0048-3.
- [11] YANG G, TANG Z, LU W, et al. Quantitative glycome analysis of N-glycan patterns in bladder cancer vs normal bladder cells using an integrated strategy [J]. J Proteome Res, 2015, 14(2), 639-653. DOI: 10. 1021/ pr5006026.
- [12] GOETZ J A, MECHEERF Y, KANG P, et al. Glycomic profiling of invasive and non-invasive breast cancer cells [J]. Glycoconj J, 2009, 26(2): 117-131. DOI: 10. 1007/ s10719-008-9170-4.
- [13] LACERDA L, DEBEB B G, SMITH D, et al. Mesenchymal stem cells mediate the clinical phenotype of inflammatory breast cancer in a preclinical model [J]. Breast Cancer Res, 2015, 17(1): 1-17. DOI: 10. 1186/ s13058-015-0549-4.
- [14] YEHIA M, YUNLI H, ALDO G, et al. Defining putative glycan cancer biomarkers by MS [J]. Bioanalysis, 2012, 4(20): 2457-2469. DOI: 10. 4155/ bio. 12. 246.
- [15] TAN Z, LU W, YANG G, et al. Altered N-Glycan expression profile in epithelial-to-mesenchymal transition of NMuMG cells revealed by an integrated strategy using mass spectrometry and glyco-gene and lectin microarray analysis [J]. J Proteome Res, 2014, 13(6): 2783-2795. DOI: 10. 1021/ pr401185z.
- [16] SCHACHTER H. Biosynthetic controls that determine the branching and microheterogeneity of protein-bound oligosaccharides [J]. Biochem Cell Biol, 1986, 64(3): 163-181. DOI: 10. 1139/ o86-026.

[收稿日期] 2016 - 06 - 12 [修回日期] 2016 - 10 - 25

[本文编辑] 阮芳铭