

DOI: 10.16505/j.2095-0136.2019.0007

• 综述 •

血清 N 糖组学标志物诊断乙型和丙型肝炎病毒 相关肝纤维化、肝硬化和肝细胞癌

曹曦, 刘学恩, 庄辉

北京大学医学部基础医学院病原生物学系和感染病中心, 北京 100191

摘要: 人体肝脏是蛋白质合成与修饰的重要场所, 肝脏损伤会影响蛋白质糖基化修饰, 可能导致糖蛋白表面糖基化数量或结构异常, 进而影响其功能。糖蛋白的异常糖基化与患者肝脏纤维化、肝硬化、肝癌密切相关。早期诊断和治疗可阻断肝病进展并改善预后。本文对血清 N 糖组学标志物诊断乙型和丙型肝炎病毒相关肝纤维化、肝硬化和肝癌的研究进展进行了简要综述。

关键词: N-糖组学; 血清生物标记物; 肝纤维化/肝硬化; 肝癌

中图分类号: R446.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 2095-0136 (2019) 03-0228-08

Serum N-glycome profiling as markers for diagnosis of liver fibrosis/ cirrhosis and hepatocellular carcinoma induced by hepatitis B/C viruses

CAO Xi, LIU Xue-en, ZHUANG Hui

Department of Microbiology and Infectious Diseases, School of Basic Medical Sciences,
Peking University Health Science Center, Beijing 100191, China

Corresponding authors: LIU Xue-en, E-mail: xueenliu@bjmu.edu.cn;

ZHUANG Hui, E-mail: zhuangbmu@126.com

Abstract: Liver is an essential organ for proteins biosynthesis and modifications. Abnormalities of liver associated with aberrant glycosylations can influence the structure, quantity and function of sugar chains. Altered patterns of glycosylation have been shown relevant to the progression of liver fibrosis/cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC). Early diagnosis and treatment of liver fibrosis/cirrhosis and HCC are of great clinical significance desirable to block progress of liver diseases and improve the prognosis. Here we summarized recent progresses on serum N-glycome profiling as markers for the diagnosis of liver fibrosis/cirrhosis and HCC induced by hepatitis B/C viruses.

Key words: N-glycomics; Serum biomarker; Liver fibrosis/ cirrhosis; Hepatocellular carcinoma

糖组学是研究细胞或生物体内糖类物质分子结构、表达调控、与糖链识别分子相互作用以及生理功能的科学。继基因组学和蛋白质组学之后, 代谢组学、糖组学和脂质组学被提出, 并广泛应用于新型生物标志物研究。糖类物质与核酸和蛋白质一样, 在生物细胞物质合成、能量代谢和信息传递中同等重要。糖链分子是基因表达的产物, 不仅在受

精、生长发育、分化、细胞间信号传导和维持免疫系统稳态中不可或缺, 而且在疾病状态下如炎症、病原体感染、肿瘤异常增殖与转移中也起着特异性识别与介导作用^[1]。随着糖链的分析仪器与技术快速发展, 对血清中糖链进行快速、高通量的分析成为可能^[2]。

糖基化是蛋白质最为常见的翻译后修饰形式, 在改变蛋白质结构与功能方面起着重要作用, 比如糖基化改变会影响蛋白质等电点、热稳定性、pH 稳定性以及与凝集素相互识别等^[3-4]。而且特定病理状态下, 往往蛋白质种类与数量无明显变化, 但蛋白质糖基化存在较大差异, 例如自身免疫疾病患者体内发现大量 IgG 类抗体糖基化异常等^[5]。N-糖基化与 O-糖基化是最常见的蛋白质糖基化修饰,

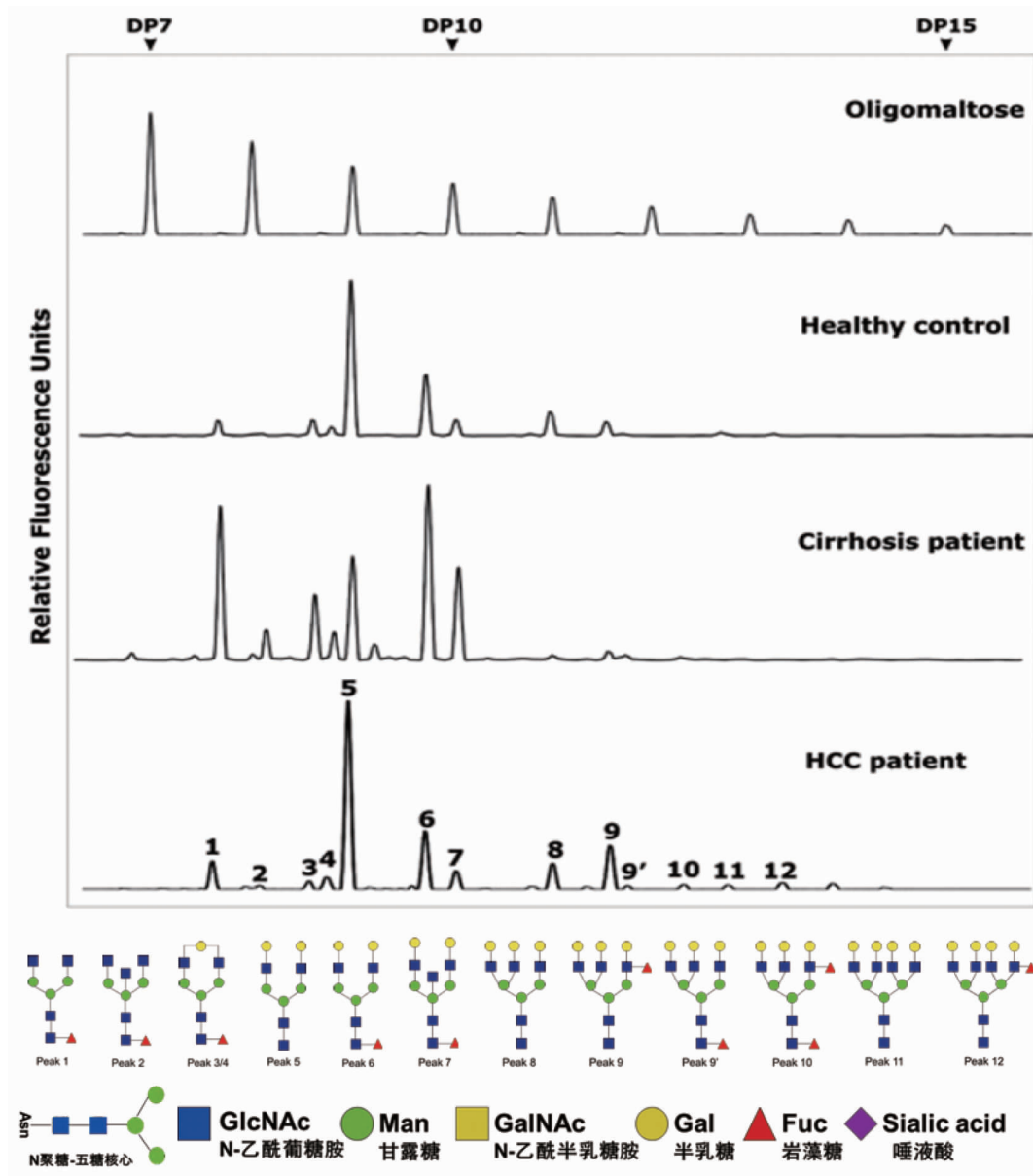
基金项目: 国家“十三五”艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治科技重大专项 (2018ZX10732401)

作者简介: 曹曦, 医学硕士, 主要从事病毒性肝炎相关研究工作

通讯作者: 刘学恩, E-mail: xueenliu@bjmu.edu.cn; 庄辉, E-mail: zhuangbmu@126.com

在人体中 N-糖链种类和数量要多于 O-糖链，更适合做特异性标志物^[2]。N 糖蛋白是指通过 N 糖苷键将 N-聚糖共价连接在蛋白质特定三肽序列 Asn-X-Ser/Thr 中的天冬酰胺，Asn 代表天冬酰胺，Ser/Thr 代表丝氨酸/苏氨酸，X 代表除脯氨酸之外的氨基酸。N 聚糖含有五糖核心（图 1），其核心成分 N-乙酰葡萄糖胺与天冬酰胺共价连接。N 糖蛋白在细胞内的内质网和高尔基体中合成，细胞中

组成 N-聚糖的常见单糖有 N-乙酰葡萄糖胺、葡萄糖、岩藻糖、半乳糖、甘露糖和唾液酸等^[6]，然而这些有限的单糖组分却可以组成数目庞大的 N-糖链家族，图 1 表示人血清中 N-聚糖图谱（基于 DNA 测序仪的荧光标记糖电泳技术：DSA-FACE 法）。人体内血清中 N-糖蛋白主要由肝脏和 B 淋巴细胞合成，N-糖蛋白的聚糖结构与数量的异常往往可以反映肝脏和 B 淋巴细胞病变。



注：Peak1 为二天线无半乳糖基核心 α -1, 6 岩藻糖基化 N 聚糖 (NGA2F)；Peak2 为二天线无半乳糖基核心 α -1, 6 岩藻糖基化平分型 N 聚糖 (NGA2FB)；Peak3/Peak4 为二天线核心 α -1, 6 岩藻糖基化单支链半乳糖基 N 聚糖 (NG1A2F)；Peak5 为二天线 N 聚糖 (NA2)；Peak6 为二天线核心 α -1, 6 岩藻糖基化 N 聚糖 (NA2F)；Peak7 为二天线平分型核心 α -1, 6 岩藻糖基化 N 聚糖 (NA2FB)；Peak8 为三天线 N 聚糖 (NA3)；Peak9 为三天线支链 α -1, 3 岩藻糖基化 N 聚糖 (NA3Fb)；Peak9' 为三天线核心 α -1, 6 岩藻糖基化 N 聚糖 (NA3Fc)；Peak10 为三天线支链 α -1, 3 岩藻糖基化与核心 α -1, 6 岩藻糖基化 N 聚糖 (NA3Fbc)；Peak11 为四天线 N 聚糖 (NA4)；Peak12 为四天线支链 α -1, 3 岩藻糖基化 N 聚糖 (NA4 Fb)。

图 1 血清 N 聚糖图谱 (DSA-FACE 法)^[7]

乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 或丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 慢性感染可导致肝纤维化、肝硬化和肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 的发生。据世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 报告, 2015 年全世界约有 2.57 亿人慢性感染 HBV, 约 7 100 万人慢性感染 HCV; 病毒性肝炎导致 134 万例死亡, 其中慢性肝病为主要死因, 约 72 万例因肝硬化死亡, 约 47 万例因 HCC 死亡^[8]。80% 以上的 HCC 患者经历“肝炎-肝纤维化/硬化-肝癌”过程, 有研究显示^[9]在慢性肝病进展至 HCC 过程中, 患者血清中 N 糖蛋白糖基化修饰发生异常变化, 因此, 应用糖组学技术探索血清中特异性 N-聚糖标志物诊断慢性肝病, 在临床中具有重要应用前景。

1 HBV 和 HCV 相关肝纤维化/肝硬化 N-聚糖变化和 N 糖组学标志物诊断意义

肝纤维化血清学标志物可分为直接标志物和间接标志物两种。直接标志物如透明质酸、层黏连蛋白等, 其区分肝纤维化不同分期作用不明显, 且检测成本较高。间接标志物如天门冬氨酸转氨酶/血小板指数 (APRI)、Fibrotest 等, 对于一些早期与中期纤维化患者, 这些标志物无法准确判断纤维化程度^[10]。影像学技术如瞬时弹性成像等, 对于重度纤维化患者诊断效力较好, 但易受肥胖等因素影响^[11]。有研究发现, 血清 N-聚糖生物标志物在诊断肝纤维化时具有独特的优势。

1.1 肝纤维化/肝硬化患者血清中 N 聚糖及糖基转移酶变化 研究表明^[12] HBV 感染所致的肝纤维化患者血清双天线型 N-聚糖总丰度要高于健康对照组; 同时, 双天线型 (NA2) 与三天线型 (NA3) N-聚糖随着纤维化进展而逐渐下降。Qu 等^[13]运用 DSA-FACE 方法对 128 例慢性乙型肝炎 (乙肝) 患者血清 N-聚糖图谱进行分析, 发现双天线 N-聚糖 peak1 (NGA2F)、peak2 (NGA2FB) 和三天线 N-聚糖 peak8 (NA3) 和 peak9 (NA3Fc) 与纤维化进展密切相关。Vanderschaege 等^[14]应用 DSA-FACE 技术对 400 例 HCV 感染的肝纤维化患者进行血清 N-聚糖图谱分析, 发现 peak2 (NGA2FB) 与 peak8 (NA3) 的比值与纤维化进展呈较好相关性, 并建立诊断肝纤维化模型 $\text{Log}(\text{peak2}/\text{peak8})$, 命名为 GlycoFibroTest。应用 GlycoFibroTest 区分 F0~F1 与 F2~F4 纤维化患者, AUROC 值为 0.75, 若与 $\alpha 2$ 巨球蛋白联

合诊断 AUROC 值可达 0.84。随后研究发现^[13], GlycoFibroTest 在区分 HBV 感染轻中度肝纤维化患者 (S0~S2) 与重度肝纤维化患者时 (S3~S4), AUROC 值为 0.736, cutoff 值为 -0.53, 灵敏度与特异度分别为 50.00% 与 84.09%; 并且在区分肝纤维化 (S0~S3) 与肝硬化 (S4) 时, AUROC 值达到 0.754, cutoff 值为 -0.53 时, 灵敏度与特异度分别为 53.85% 与 86.09%。

N-乙酰葡萄糖氨基转移酶 V (N-acetyl glucosaminyl transferase V, GnT-V) 催化 β -1, 6GlcNAc 糖苷键连接, 促进多天线糖链结构合成; N-乙酰葡萄糖氨基转移酶 III (N-acetyl glucosaminyl transferase III, GnT-III) 主要催化 GlcNAc 基团转移至 N-糖链的甘露糖基上, 形成平分型 GlcNAc 结构。Liu 等^[15]以 CCl_4 诱导小鼠肝纤维化模型, 应用 qRT-PCR 与免疫印迹技术分析发现, 肝纤维化小鼠体内 GnT-V 表达显著上调。另有研究发现, 肝硬化患者肝脏会出现大量再生结节, 结节中 GnT-III 表达增加, 平分型 GlcNAc 结构 N-聚糖水平升高^[16]。

Callewaert 等^[17]对不同病因导致的肝硬化患者研究发现, 肝硬化患者血清 N 聚糖 NA2FB (peak7, 含有平分型 GlcNAc 结构) 水平显著上升, 进而建立诊断肝硬化的血清 N-聚糖模型 GlycoCirrhoTest: $\text{Log}(\text{peak7}/\text{peak8})$, 用以区分代偿性肝硬化与慢性肝病, 其灵敏度达到 79%, 特异度达到 86%, 且在诊断失代偿性肝硬化时灵敏度可达 100%。Kam 等^[18]运用质谱分析技术 (MALDI-TOF-MS) 对 46 例感染 HBV 的肝纤维化患者血清进行分析, 发现了 17 个 N-聚糖特异性改变, 而其中 1 341.5 (二天线核心岩藻糖基化 N-聚糖)、1 829.7 (二天线平分型核心岩藻糖基化 N-聚糖)、1 933.3 (二天线支链唾液酸化 N-聚糖) 和 2 130.3 (二天线平分型 N-聚糖) (m/z) 可用于诊断肝纤维化和肝硬化, 应用这 4 个 N-聚糖建立 Fibro-Glyco 模型, 其诊断肝纤维化和肝硬化的 AUROC 值均为 0.91; 诊断肝纤维化时, 灵敏度与特异度分别为 84% 与 85%, 总准确度为 85%; 诊断肝硬化时, 灵敏度与特异度分别为 83% 与 88%, 总准确度为 85%。

1.2 肝纤维化/肝硬化患者血清蛋白异常糖基化修饰 $\alpha 1$ -酸性糖蛋白 ($\alpha 1$ -acid glycoprotein, AGP) 是 HCC 的诊断标志物, 有研究发现^[19-20] AGP 在慢性丙肝患者血清中表达下调, 且糖基化修饰发生改变。Kuno 等^[21]利用凝集素芯片技术对 125 例慢性

HCV 感染患者血清进行分析,发现 12 种凝集素反映 AGP 糖基化改变,并且与肝纤维化分期相关。应用 DSA、MAL 和 AOL 三种凝集素建立 L_{Comb} 模型诊断肝硬化, AUROC 值为 0.90, cutoff 值为 -2 时,其灵敏度和特异度分别为 95% 和 91%,准确度为 93%。Kuno 等^[22]应用聚糖免疫分析技术对 160 例感染 HCV 的肝纤维化和肝硬化患者开展研究,发现肝脏分泌的巨噬细胞-2 结合蛋白 (macrophages-2 binding protein, M2BP) 表面多天线唾液酸化 N-聚糖结构增加,进而选用凝集素 WFA 特异性结合 M2BP 进行检测,并建立 FastLec-Hepa 模型区分肝纤维化 (F0~F3) 与肝硬化 (F4), AUROC 值可达 0.96,灵敏度为 90%,特异度为 94%。Tawara 等^[23]运用 ELISA 技术对 317 例慢性丙型肝炎患者进行分析发现,岩藻糖基化修饰结合珠蛋白 (fucosylated haptoglobin, Fuc-Hpt) 水平与中度肝纤维化 (F \geq 2) 进展密切相关, M2BP 与重度肝纤维化 (F \geq 3) 进展密切相关,应用这 2 个指标与 APRI 或 FIB-4 联合诊断肝纤维化,可提高诊断效力。另外 Tawara 等^[23]还发现在 Fuc-Hpt 与 M2BP 水平均显著升高的患者中, HCC 累计发病率也显著增加。

2 HBV 和 HCV 相关肝癌的 N-聚糖变化和 N 糖组学标志物诊断意义

2.1 HCC 患者血清 N-聚糖变化和诊断意义

甲胎蛋白 (alpha fetoprotein, AFP) 是临床上检测 HCC 最常用的特异性指标,但存在一定假阳性与假阴性。近年来发现了一些新型 HCC 血清糖蛋白标志物,如 AFP-L3、高尔基蛋白 73 (GP-73) 和磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 (GPC3) 等。AFP-L3 由 AFP 经 α -1, 6 岩藻糖基转移酶催化 Fuc 至 GlcNAc 上,形成核心岩藻糖基化 (Fuc 化) 的 AFP^[24]。应用凝集素 LCA 特异性结合 AFP-L3 进行联合检测,诊断效力要优于 AFP。有研究发现 HCC 患者血清中 GP-73 蛋白水平升高,且其岩藻糖基化 (Fuc 化) 水平增加^[25-26]。Jiang 等^[27]应用液相色谱和质谱 (liquid chromatograph mass spectrometer, LC-MS) 联用技术发现,当细胞中 GP-73 的 Asn144 糖基化位点上 N-糖链丢失后,癌细胞侵袭和转移能力增加。Tommaso 等^[28]对不同病因导致的肝硬化和 HCC 患者 (包括 HBV、HCV 感染和慢性酒精性肝病等) 研究发现, GPC-3 在区分大结节性肝硬化与 HCC 时,灵敏度为 61.4%,特异度为 92%,总准确度为 75.7%。

与分析单一糖蛋白的聚糖特点相比,研究 HCC 患者血清中全部糖蛋白的糖组学图谱变化,可综合反映 HCC 相关多种糖蛋白的糖基化改变,可提供更多的信息。同时,糖组分析也克服了单一蛋白生物标志物的异质性。用一组聚糖改变替代单一指标改变,可全面反映肝脏疾病的特征性改变。在针对 HCC 开展的糖组学研究中,许多研究在患者血清学中发现与 HCC 相关的特异性 N-聚糖变化。

Liu 等^[7]应用 DSA-FACE 技术对 HBV 相关肝硬化和 HCC 患者开展研究,发现支链岩藻糖基化 (Fuc 化) 三天线 N-聚糖 (peak9) 在 HCC 患者血清中丰度显著升高,而核心 Fuc 化平分型双天线 N-聚糖 (peak7) 在肝硬化患者血清中的丰度显著升高,随后建立 GlycoHCCtest: log (peak9/peak7) 模型诊断 HCC, cutoff 值为 -0.34,灵敏度为 61.4%、特异度为 92%、总准确度为 75.7%, AUROC 值为 0.81,高于 AFP (0.78)。Goldman 等^[29]采用 MALDI-TOF-MS 分析技术比较无肝病志愿者、慢性肝病患者与 HCC 患者血清中 N-聚糖之间差异,发现 HCC 患者血清中有 57 种 N-聚糖丰度发生显著变化,应用 3 241.9 (m/z) (三天线支链唾液酸化 N-聚糖)、2 472.9 (m/z) (双天线平分型支链唾液酸化 N-聚糖) 与 4 052.2 (m/z) (四天线支链唾液酸化 N-聚糖) 联合检测 HCC, AUROC 值可达 0.96。有研究显示^[30-31],在 HCC 患者血清中三天线或四天线并伴有 α -1, 3/4 键连接 Fuc 于支链 GlcNAc 结构的 N-聚糖水平升高。Tanabe 等^[30]采用液相色谱和质谱 (LC-MS) 联用技术分析,发现 HCC 患者血清中支链 Fuc 化修饰的 N-聚糖水平升高,并应用 A4G4F0 (四天线支链岩藻糖基化 N 聚糖) 与 A4G4 (四天线 N 聚糖) 比值与血小板 (PLT) 联合诊断 HCC。Zhu 等^[32]应用 MALDI-QIT-TOF MS 技术研究发现,在 HCC 患者血清中分支与核心均 Fuc 化 N-聚糖丰度明显偏高,建立分支与核心均 Fuc 化 N-聚糖与总 N-聚糖比值模型区分 HBV 或 HCV 所致的肝硬化与 HCC, AUROC 值为 1 与 0.821,均高于 AFP (0.815 与 0.750)。Miyahara 等^[33]采用质谱技术分析慢性肝病与 HCC 患者血清,发现 2 336 与 3 195 (m/z) 丰度显著升高,而 1 362、1 708 与 1 914 (m/z) 显著下降;比较单一 N-聚糖诊断 HCC 的效力,3 195 m/z (三天线唾液酸化岩藻糖基化 N-聚糖) 最高, AUROC 值为 0.797;分析多个 N-聚糖联合诊断 HCC 的效果,发现 3 195/1 914 (m/z) 比值区分 HCC 与慢

性肝炎，AUROC 值可达 0.810。Tanabe 等^[34]运用 LC-MS 技术分析发现 $\alpha 1$ 酸性糖蛋白表面 19 个岩藻糖基化 N-聚糖与 HCC 密切相关，其中 7 个 N-聚糖结构为多分支且伴两个及以上岩藻糖基修

饰，进而建立这 7 个 N-聚糖丰度总和与其余 12 个 N-聚糖丰度总和的比值模型来诊断 HCC。表 1 总结了血清 N-聚糖生物标志物诊断 HBV 和 HCV 相关 HCC 的研究结果。

表 1 血清 N-聚糖生物标志物诊断 HBV 和 HCV 相关 HCC

| 研究者, 发表年 (文献) | 研究队列 (病例数) | N-聚糖标志物 (模型) | 诊断 HCC | AUROC | Cutoff 值 | 灵敏度 (%) | 特异度 (%) |
|---------------------------------|---|--|---|----------------------|----------|---------------|-----------|
| Liu 等 ^[9] 2007 | HCC (227); 肝硬化 (80); 健康对照 (130) | GlycoHCCtest: log (peak9/peak7) | 在 HBV 相关肝硬化患者中诊断 HCC | 0.81 | -0.34 | 61.4 | 92 |
| Goldman 等 ^[29] 2009 | HCC (73); 慢性肝病 (52); 非肝病对照 (77) | 3 241.9、2 472.9 与 4 052.2 (m/z) 联合检测模型 | 在 HCV 相关慢性肝病患者中诊断 HCC | 0.96 | | 90.0 | 89 |
| Tanabe 等 ^[30] 2008 | HCC (13); 肝硬化 (9); 健康对照 (10); 非肝病对照 (18) | A4G4F0/A4G4 与 PLT 联合诊断模型 | 在肝硬化患者中诊断 HCC | >0.9 | | | |
| Zhu 等 ^[32] 2014 | HCC (50); 慢性肝病 (40); 健康对照 (14) | Σ glycan F2/ Σ glycans | 在 HBV 相关肝硬化患者中诊断 HCC 在 HCV 相关肝硬化患者中诊断 HCC | 1.00 0.821 | | 100.0 76.0 | 100 75 |
| Miyahara 等 ^[33] 2015 | HCC (114); 慢性肝病 (105); 健康对照 (105) | 3 195/ 1 914 (m/z) 比值 | 在慢性肝病患者中诊断 HCC | 0.810 | | | |
| Tanabe 等 ^[34] 2016 | HCC (42); 慢性肝炎: HBV (27), HCV (26); 健康对照 (27) | Σ MF-AGPs/ Σ SF-AGPs | 以健康人群为对照诊断 HCC 在慢性乙型肝炎患者中诊断 HCC 慢性丙型肝炎患者中诊断 HCC | 0.98 0.93 0.86 | | | |

2.2 HCC 患者术后血清 N-聚糖变化及预测预后
血清 N-聚糖变化不仅与 HCC 的发生密切相关，而且与 HCC 手术治疗存在相关性。Fang 等^[35]运用 DSA-FACE 法对 10 例 HCC 患者术前与术后血清 N-聚糖检测比较，发现术后 HCC 患者血清 N-聚糖 NG1A2F (peak 4) 水平显著上升，而 NA3 (peak 8) 与 NA3Fb (peak 9) 水平显著下降，应用 C score A 模型诊断 HCC 术后，准确度达到 90%，应用 C score B 模型联合 AFP 诊断 HCC 术后，准确度达到 100%。另外通过检测 HCC 患者血清 N-聚糖可以预测患者预后。Kamiyama 等^[36]对 369 例 HCC 手术患者（其中 HBV 感染 176 例，HCV 感染 119 例）进行多年随访研究，平均随访 60.7 (9.8~155.1) 个月，随访期间 115 例患者死亡。采用 MALDI-TOF-MS 技术，分析患者手术前血清 N-聚糖，与健康对照比较，共发现 14 个 N-聚糖在 HCC 患者中特异性表达，其预测 HCC 患者手术后预后的 AUROC 值均大于 0.8。其中 G2890 (三天线核心岩藻糖基化 N 聚糖) 与患者手术后 HCC 复发相关，G2890 水平高的患者，术后 5 年无瘤生存率为 21.3%；G2890 水平低的患者为 35.1%。G3560 (四天线核心岩藻糖基化 N-聚糖) 与患者术后总体生存率相关，G3560 水平高患者

术后 5 年生存率为 40.4%；G3560 低水平患者为 80.5%。这 2 种 N-聚糖可作为预测 HCC 术后生存率和肿瘤复发中的标志物。

2.3 HCC 患者肝组织和肝细胞中相关糖基转移酶表达变化

2.3.1 Gn-T 家族 HCC 患者血清中 N-聚糖的异常糖基化水平升高，主要包括 α -1, 3-支链和 α -1, 6 核心岩藻糖基化 N-聚糖、三天线及以上 N-聚糖、唾液酸化 N-聚糖等^[37]。异常的糖基化修饰与糖基转移酶表达水平密切相关。GnT-V 主要参与 β -1, 6GlcNAc 糖苷键连接多天线 N-聚糖合成，增强细胞表面糖蛋白 CD147 与整合素 β 相互作用能力，与肿瘤细胞高转移能力密切相关^[38-39]。而 Gn-T III 催化合成平分型 GlcNAc 结构，抑制肿瘤细胞生长浸润^[40]。Gn-T III 不仅对于 GnT-V 有拮抗作用^[41]，还可抑制 α -2, 3 SA 结构生成^[42]。Priyambada 等^[43]用不含四环素培养基培养 HBV 感染 HepAD38 细胞，应用定量 PCR (qRT-PCR) 与液相色谱-质谱 (LC-MS) 技术分析，发现 GnT-II、GnT-IVa、GnT-V 和 ST6Gal1 的基因表达上调，GnT-III 与 FUT8 的基因表达下调，并且细胞表面糖蛋白唾液酸化水平增加，推测 HBV 感染 HepAD38 细胞后，病毒复制可能改变细胞表面糖

蛋白糖基化修饰。Kang 等^[44]应用凝集素芯片与基因芯片技术对具有高转移潜能细胞 HCCLM3 和 Hep3B 进行比对分析发现,与 Hep3B 比较,HCCLM3 细胞 18 个基因表达上调,其中包括 GnT-V (MGAT5)、GnT-IVa (MGAT4a)、ST3Gal 和 FUT8 等糖基转移酶的基因表达上调。MGAT5 基因高表达通常与肿瘤浸润转移相关,预示着患者病情恶化^[45]。

GnT-IVa^[46]主要催化合成支链 β -1, 4GlcNAc 糖苷键,研究显示基因 MGAT4a 基因表达上调,可导致 β -1, 4GlcNAc 支链结构增加而平分型 GlcNAc 结构减少,增强肿瘤细胞转移能力。Nie 等^[47]应用 DSA-FACE 和 qRT-PCR 技术,对 88 例 HBV 相关 HCC 患者肿瘤组织、癌旁组织与血清进行分析,发现含支链 β -1, 4GlcNAc 糖苷键三天线 N-聚糖丰度较高,与患者肝组织 GnT-IVa 的基因表达上调相关。若下调基因 MGAT4a 表达,可抑制恶性细胞转移。

2.3.2 FUT 家族 岩藻糖基转移酶 FUT8 (α 1, 6-fucosyltransferase 8, FUT8) 是催化 α -1, 6 核心 Fuc 化合物的关键酶,与肿瘤增殖转移有关^[48]。Xiang 等^[49]运用 RT-qPCR 和 LC-MS 技术对 HCV 感染的 Huh7.5.1 细胞进行分析,发现 α 1, 6-核心岩藻糖基转移酶 FUT8 表达增加,糖蛋白 ANXA2 与 HSP90B1 岩藻糖基化修饰上调。推测 HCV 感染 Huh7.5.1 细胞后,病毒复制可能增强细胞转移能力。Cheng 等^[50]利用 MALDI-TOF-MS 技术,对 2 种不同转移潜能 MHCC97H 与 MHCC97L 细胞进行分析,发现高转移潜能的 MHCC97H 细胞中 FUT8 表达上调。随后采用 FUT8 抑制因子 miR-26a、miR-34a 和 miR-445-3p 抑制 FUT8 表达,发现肿瘤细胞表面糖蛋白结构发生改变,转移能力降低。另有研究发现岩藻糖基转移酶 FUT1 与 FUT2 的表达与肝癌进展密切相关^[51-52], Kuo 等^[52]运用 qRT-PCR 技术对 135 例 HCC 患者癌组织进行分析,发现 FUT1 和 B3GALT5 随着肝癌进展表达增加,并且 FUT1 和 B3GALT5 高表达的患者无复发生存期与总生存期显著缩短。

2.3.3 ST3Gal 与 ST6Gal 唾液酸转移酶 ST3Gal 与 ST6Gal 分别催化 α -2, 3 SA 和 α -2, 6 SA 糖链结构连接,其中 ST3Gal 与细胞黏附作用相关并参与合成 sialyl Lewis 结构,与肿瘤细胞转移和预后不良发生密切相关^[53-54]。Huang 等^[55]运用 LC-MS 分析技术比较 10 例 HCC 患者与 10 例肝硬化患者血清中结合珠蛋白表面 25 个 N-聚糖,发现 10 个

具有 α -2, 6 SA 和支链岩藻糖基化修饰结构的 N-聚糖有着显著性差异。相对于肝硬化患者,HCC 患者血清中 N-聚糖唾液酸化与岩藻糖基化修饰水平特异性升高。Zhao 等^[56]通过质谱分析比较 MHCC97H 与 MHCC97L 细胞,发现在 MHCC97H 细胞中 ST6Gal1 与 ST8SIA2 表达上调,激活 PI3K/Akt 通路增强肿瘤侵袭、转移与产生耐药性。另有研究发现,ST6Gal1 不仅可以通过改变细胞表面糖链结构参与肿瘤细胞转移^[57],还可以通过调控 p38 MAPK 与胱天蛋白酶-3 通路抑制细胞凋亡作用^[58]。上述研究通过分析 HCC 患者体内和体外培养细胞中糖基转移酶异常表达情况,尝试阐明血清中 N-聚糖异常糖基化改变的发生机制。

3 总结及展望

血清 N-糖蛋白的糖基化改变与 HBV 或 HCV 相关肝纤维化/硬化及 HCC 的发生和进展密切相关,如唾液酸基团修饰、岩藻糖基修饰、平分型 N-乙酰葡萄糖胺结构 N-聚糖与多分支结构 N-聚糖等显著增加。应用血清 N-聚糖改变辅助诊断 HBV 或 HCV 相关肝纤维化/硬化及 HCC,大量临床研究结果显示,血清 N-聚糖标志物相当或优于目前临床应用指标。同时,有关糖基转移酶表达水平变化的研究结果,进一步揭示了肝脏病变时糖蛋白 N-聚糖变化的可能机制。通过血清中 N-聚糖检测,既可以较为准确地诊断 HBV 或 HCV 相关肝纤维化、肝硬化与肝癌,又可以及时对患者病情进展进行动态监测。在 HCC 患者接受手术治疗后,分析血清 N-糖蛋白糖基化改变更能及时预知疗效,在临床上具有一定指导意义。

N-聚糖作为标志物在 HBV 或 HCV 相关肝纤维化/硬化及肝癌早期诊断、疾病监测、术后评价中具有潜在的临床应用价值。目前应用质谱法和 DSA-FACE 法等可以对血清 N-聚糖丰度进行检测,但存在操作复杂、设备昂贵、耗时较长、缺少后续处理自动化等一系列问题,需要研发快速、敏感、成本较低、准确性高又易操作的 N-聚糖自动化检测技术。另外,在病因确定(如 HBV 或 HCV 感染)的前提下,应用血清 N-聚糖标志物诊断肝纤维化/肝硬化和 HCC 效果较好,但对于不同病因导致的慢性肝病,如酒精性肝纤维化/肝硬化等,血清 N-聚糖标志物将发生何种改变,还需要进一步研究。

参考文献

- [1] Drake RR. Glycosylation and cancer: moving glycomics to

- the forefront [J]. *Adv Cancer Res*, 2015, 126: 1-10.
- [2] Malaguarnera G, Bertino G, Vacante M, *et al.* Hepatocellular carcinoma markers in the omics era: the glycomic analysis [J]. *Hepatobiliary Surg Nutr*, 2014, 3 (6): 407-409.
- [3] Takegawa Y, Deguchi K, Keira T, *et al.* Separation of isomeric 2-aminopyridine derivatized N-glycans and N-glycopeptides of human serum immunoglobulin G by using a zwitterionic type of hydrophilic-interaction chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1113 (1/2): 177-181.
- [4] Sarter K, Mierke C, Beer A, *et al.* Sweet clearance: involvement of cell surface glycans in the recognition of apoptotic cells [J]. *Autoimmunity*, 2007, 40 (4): 345-348.
- [5] Malaguarnera L, Cristaldi E, Malaguarnera M. The role of immunity in elderly cancer [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2010, 74 (1): 40-60.
- [6] Lan Y, Hao C, Zeng X, *et al.* Serum glycoprotein-derived N-and O-linked glycans as cancer biomarkers [J]. *Am J Cancer Res*, 2016, 6 (11): 2390-2415.
- [7] Liu XE, Desmyter L, Gao CF, *et al.* N-glycomic changes in hepatocellular carcinoma patients with liver cirrhosis induced by hepatitis B virus [J]. *Hepatology*, 2007, 46 (5): 1426-1435.
- [8] WHO. Global hepatitis report, 2017 [EB/OL]. (2017-04-01) [2018-06-01]. <https://www.who.int/hepatitis/publications/global-hepatitis-report2017/en/>.
- [9] Blomme B, Van Steenkiste C, Callewaert N, *et al.* Alteration of protein glycosylation in liver diseases [J]. *J Hepatol*, 2009, 50 (3): 592-603.
- [10] Chen YP, Liang XE. Non-invasive assessment of liver fibrosis: reduce or substitute the need for liver biopsy [J]. *Liver Int*, 2015, 35 (11): 2483.
- [11] Sharma P, Dhawan S, Bansal R, *et al.* The usefulness of transient elastography by FibroScan for the evaluation of liver fibrosis [J]. *Indian J Gastroenterol*, 2014, 33 (5): 445-451.
- [12] Gui HL, Gao CF, Wang H, *et al.* Altered serum N-glycomics in chronic hepatitis B patients [J]. *Liver Int*, 2010, 30 (2): 259-267.
- [13] Qu Y, Gao CF, Zhou K, *et al.* Serum N-glycomic markers in combination with panels improves the diagnosis of chronic hepatitis B [J]. *Ann Hepatol*, 2012, 11 (2): 202-212.
- [14] Vanderschaeghe D, Laroy W, Sablon E, *et al.* GlycoFibroTest is a highly performant liver fibrosis biomarker derived from DNA sequencer-based serum protein glycomics [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2009, 8 (5): 986-994.
- [15] Liu J, Zhang Z, Tu X, *et al.* Knockdown of N-acetylglucosaminyl transferase V ameliorates hepatotoxin-induced liver fibrosis in mice [J]. *Toxicol Sci*, 2013, 135 (1): 144-155.
- [16] Ishibashi K, Nishikawa A, Hayashi N, *et al.* N-acetylglucosaminyltransferase III in human serum, and liver and hepatoma tissues: increased activity in liver cirrhosis and hepatoma patients [J]. *Clin Chim Acta*, 1989, 185 (3): 325-332.
- [17] Callewaert N, Van Vlierberghe H, Van Hecke A, *et al.* Noninvasive diagnosis of liver cirrhosis using DNA sequencer-based total serum protein glycomics [J]. *Nat Med*, 2004, 10 (4): 429-434.
- [18] Kam RK, Poon TC, Chan HL, *et al.* High-throughput quantitative profiling of serum N-glycome by MALDI-TOF mass spectrometry and N-glycomic fingerprint of liver fibrosis [J]. *Clin Chem*, 2007, 53 (7): 1254-1263.
- [19] Bachtiar I, Kheng V, Wibowo GA, *et al.* Alpha-1-acid glycoprotein as potential biomarker for alpha-fetoprotein-low hepatocellular carcinoma [J]. *BMC Res Notes*, 2010, 3: 319.
- [20] Atta M, Cabral M, Santos G, *et al.* Inflammation biomarkers in chronic hepatitis C: association with liver histopathology, HCV genotype and cryoglobulinemia [J]. *Inflamm Res*, 2012, 61 (10): 1101-1106.
- [21] Kuno A, Ikehara Y, Tanaka Y, *et al.* Multilectin assay for detecting fibrosis-specific glyco-alteration by means of lectin microarray [J]. *Clin Chem*, 2011, 57 (1): 48-56.
- [22] Kuno A, Ikehara Y, Tanaka Y, *et al.* A serum "sweet-doughnut" protein facilitates fibrosis evaluation and therapy assessment in patients with viral hepatitis [J]. *Sci Rep*, 2013, 3: 1065.
- [23] Tawara S, Tatsumi T, Iio S, *et al.* Evaluation of fucosylated haptoglobin and mac-2 binding protein as serum biomarkers to estimate liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C [J]. *Plos One*, 2016, 11 (3): e151828.
- [24] Debruyne EN, Delanghe JR. Diagnosing and monitoring hepatocellular carcinoma with alpha-fetoprotein: new aspects and applications [J]. *Clin Chim Acta*, 2008, 395 (1/2): 19-26.
- [25] Kladney RD, Cui X, Bulla GA, *et al.* Expression of GP73, a resident Golgi membrane protein, in viral and nonviral liver disease [J]. *Hepatology*, 2002, 35 (6): 1431-1440.
- [26] Block TM, Comunale MA, Lowman M, *et al.* Use of targeted glycoproteomics to identify serum glycoproteins that correlate with liver cancer in woodchucks and humans [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102 (3): 779-784.
- [27] Jiang K, Li W, Zhang Q, *et al.* GP73 N-glycosylation at Asn144 reduces hepatocellular carcinoma cell motility and invasiveness [J]. *Oncotarget*, 2016, 7 (17): 23530-23541.
- [28] Di Tommaso L, Destro A, Seok JY, *et al.* The application of markers (HSP70 GPC3 and GS) in liver biopsies is useful for detection of hepatocellular carcinoma [J]. *J Hepatol*, 2009, 50 (4): 746-754.
- [29] Goldman R, Ressom HW, Varghese RS, *et al.* Detection of hepatocellular carcinoma using glycomic analysis [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15 (5): 1808-1813.
- [30] Tanabe K, Deguchi A, Higashi M, *et al.* Outer arm fucosylation of N-glycans increases in sera of hepatocellular carcinoma patients [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 374 (2): 219-225.
- [31] Pompach P, Ashline DJ, Brnakova Z, *et al.* Protein and site specificity of fucosylation in liver-secreted glycoproteins [J]. *J Proteome Res*, 2014, 13 (12): 5561-5569.

- [32] Zhu J, Lin Z, Wu J, *et al.* Analysis of serum haptoglobin fucosylation in hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis of different etiologies [J]. *J Proteome Res*, 2014, 13 (6): 2986-2997.
- [33] Miyahara K, Nouse K, Dohi C, *et al.* Alteration of N-glycan profiles in patients with chronic hepatitis and hepatocellular carcinoma [J]. *Hepato Res*, 2015, 45 (9): 986-993.
- [34] Tanabe K, Kitagawa K, Kojima N, *et al.* Multifucosylated alpha-1-acid glycoprotein as a novel marker for hepatocellular carcinoma [J]. *J Proteome Res*, 2016, 15 (9): 2935-2944.
- [35] Fang M, Zhao YP, Zhou FG, *et al.* N-glycan based models improve diagnostic efficacies in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma [J]. *Int J Cancer*, 2010, 127 (1): 148-159.
- [36] Kamiyama T, Yokoo H, Furukawa J, *et al.* Identification of novel serum biomarkers of hepatocellular carcinoma using glycomic analysis [J]. *Hepatology*, 2013, 57 (6): 2314-2325.
- [37] Lan Y, Hao C, Zeng X, *et al.* Serum glycoprotein-derived N- and O-linked glycans as cancer biomarkers [J]. *Am J Cancer Res*, 2016, 6 (11): 2390-2415.
- [38] Mehta A, Norton P, Liang H, *et al.* Increased levels of tetra-antennary N-linked glycan but not core fucosylation are associated with hepatocellular carcinoma tissue [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2012, 21 (6): 925-933.
- [39] Cui J, Huang W, Wu B, *et al.* N-glycosylation by N-acetylglucosaminyltransferase V enhances the interaction of CD147/basigin with integrin beta1 and promotes HCC metastasis [J]. *J Pathol*, 2018, 245 (1): 41-52.
- [40] Kizuka Y, Taniguchi N. Enzymes for N-glycan branching and their genetic and nongenetic regulation in cancer [J]. *Biomolecules*, 2016, 6 (2): 1-12.
- [41] Zhao Y, Nakagawa T, Itoh S, *et al.* N-acetylglucosaminyltransferase III antagonizes the effect of N-acetylglucosaminyltransferase V on alpha3beta1 integrin-mediated cell migration [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281 (43): 32122-32130.
- [42] Lu J, Isaji T, Im S, *et al.* Expression of N-acetylglucosaminyltransferase III suppresses alpha2, 3-sialylation, and its distinctive functions in cell migration are attributed to alpha2, 6-sialylation levels [J]. *J Biol Chem*, 2016, 291 (11): 5708-5720.
- [43] Priyambada SA, Misaki R, Okamoto T, *et al.* Cell surface N-glycan alteration in HepAD38 cell lines expressing hepatitis B virus [J]. *Virus Res*, 2017, 238: 101-109.
- [44] Kang X, Wang N, Pei C, *et al.* Glycan-related gene expression signatures in human metastatic hepatocellular carcinoma cells [J]. *Exp Ther Med*, 2012, 3 (3): 415-422.
- [45] Liu H, Wu Q, Liu Y, *et al.* Prognostic significance of beta1, 6-N-acetylglucosaminyltransferase V expression in patients with hepatocellular carcinoma [J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2015, 45 (9): 844-853.
- [46] Fan J, Wang S, Yu S, *et al.* N-acetylglucosaminyltransferase IVa regulates metastatic potential of mouse hepatocarcinoma cells through glycosylation of CD147 [J]. *Glycoconj J*, 2012, 29 (5/6): 323-334.
- [47] Nie H, Liu X, Zhang Y, *et al.* Specific N-glycans of hepatocellular carcinoma cell surface and the abnormal increase of core-alpha-1, 6-fucosylated triantennary glycan via N-acetylglucosaminyltransferases-IVa regulation [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 16007.
- [48] Zhao Y, Itoh S, Wang X, *et al.* Deletion of core fucosylation on alpha3beta1 integrin down-regulates its functions [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281 (50): 38343-38350.
- [49] Xiang T, Yang G, Liu X, *et al.* Alteration of N-glycan expression profile and glycan pattern of glycoproteins in human hepatoma cells after HCV infection [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2017, 1861 (5 Pt A): 1036-1045.
- [50] Cheng L, Gao S, Song X, *et al.* Comprehensive N-glycan profiles of hepatocellular carcinoma reveal association of fucosylation with tumor progression and regulation of FUT8 by microRNAs [J]. *Oncotarget*, 2016, 7 (38): 61199-61214.
- [51] Chen CT, Liao WY, Hsu CC, *et al.* FUT2 genetic variants as predictors of tumor development with hepatocellular carcinoma [J]. *Int J Med Sci*, 2017, 14 (9): 885-890.
- [52] Kuo HH, Lin RJ, Hung JT, *et al.* High expression FUT1 and B3GALT5 is an independent predictor of postoperative recurrence and survival in hepatocellular carcinoma [J]. *Sci Rep*, 2017, 7 (1): 10750.
- [53] Zhang Z, Wuhrer M, Holst S. Serum sialylation changes in cancer [J]. *Glycoconj J*, 2018, 35 (2): 139-160.
- [54] Ugorski M, Laskowska A. Sialyl Lewis (a): a tumor-associated carbohydrate antigen involved in adhesion and metastatic potential of cancer cells [J]. *Acta Biochim Pol*, 2002, 49 (2): 303-311.
- [55] Huang Y, Zhou S, Zhu J, *et al.* LC-MS/MS isomeric profiling of permethylated N-glycans derived from serum haptoglobin of hepatocellular carcinoma (HCC) and cirrhotic patients [J]. *Electrophoresis*, 2017, 38 (17): 2160-2167.
- [56] Zhao Y, Li Y, Ma H, *et al.* Modification of sialylation mediates the invasive properties and chemosensitivity of human hepatocellular carcinoma [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2014, 13 (2): 520-536.
- [57] Tsai TH, Wang M, Di Poto C, *et al.* LC-MS profiling of N-Glycans derived from human serum samples for biomarker discovery in hepatocellular carcinoma [J]. *J Proteome Res*, 2014, 13 (11): 4859-4868.
- [58] Chen X, Wang L, Zhao Y, *et al.* ST6Gal-I modulates docetaxel sensitivity in human hepatocarcinoma cells via the p38 MAPK/caspase pathway [J]. *Oncotarget*, 2016, 7 (32): 51955-51964.