

卵巢癌生物标志物的糖链谱研究进展*

薛添¹⁾ 李艳红²⁾ 李铮^{1)**}

(¹⁾ 西北大学生命科学学院功能糖组学实验室, 西安 710069; (²⁾ 第四军医大学唐都医院妇产科, 西安 710038)

通讯作者简介

李铮, 男, 1967年12月出生, 西北大学教授, 博士生导师, 陕西省第二批“三秦学者”。2000年毕业于西安交通大学生命科学与技术工程系, 获博士学位。2001年获德国学术交流中心(DAAD)特别生物科学计划奖学金, 在德国癌症研究中心(DKFZ)从事博士后工作。2004年就职于西北大学生命科学学院。目前已建立了一套完整的糖组学研究技术和方法, 主编了我国第一部糖组学实验技术专著(获2012年度国家科学技术学术著作出版基金资助)。近五年以通讯作者发表SCI收录论文40篇, 以第一发明人申请发明专利26项, 其中已授权17项, 获得计算机软件著作权3项, 获得陕西高等学校科学技术一等奖1项。主持科技部国际科技合作计划、国家高技术研究发展计划(863)项目等11项国家级和省部级科研项目。

摘要 糖类抗原 125(CA125)被认为是卵巢癌诊断的“金标准”, 但在临床应用中普遍存在着特异性不高的问题。肿瘤形成和发展过程中常伴有糖基化修饰异常和糖链结构的改变, 不同的肿瘤具有特异的异常糖链结构。近年来, 借助凝集素芯片、多重质谱分析等糖蛋白组学和糖组学研究技术, 发现不同来源 CA125 的 O-糖链和 N-糖链结构存在着明显的微观不均一性, 以这些特征性糖链结构为标志物, 可以显著提高 CA125 对卵巢癌的诊断特异性。在过去的 10 年, 研究者们除对 CA125 糖链结构和糖基化模式做了深入的研究外, 还利用糖组的研究方法, 直接对来自卵巢癌患者血液、体液(腹水、囊泡液等)中糖蛋白的糖链做了精细的结构解析, 结果显示, 可有效鉴别卵巢癌患者和健康志愿者的特异性 N-糖链结构, 有可能成为灵敏度高和特异性好的卵巢癌生物标志物。卵巢癌生物标志物研究发展的总趋势是从传统的对蛋白质的定性和定量研究, 逐步转向于对标志物糖基化修饰和特异性糖链结构的鉴定以及定量分析。本文从糖组学的视角, 对卵巢癌标志物糖组学的研究现状及发展趋势进行了综述和展望。

关键词 卵巢癌, 糖组学, 糖基化, 标志物

学科分类号 Q7

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0135

卵巢癌(ovarian cancer, OC)是常见的女性生殖系统肿瘤之一, 与其他常见女性肿瘤相比较, 卵巢肿瘤具有以下显著的特点: a. 组织学类型繁多。在最新版《WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs》中将卵巢肿瘤分为 14 种组织学类型, 而同一组织学类型的卵巢肿瘤中往往又同时存在恶性、交界性和良性 3 种不同的病理亚型^[1]。b. 发病率、死亡率高, 预后差、存活率低。卵巢癌在全球常见癌症中居第六位, 常见女性癌症中居第五位, 死亡人数在导致全球女性死亡的主要癌症中列第七位^[2-5], 近年来, 卵巢癌发病率在中国呈上升趋势, 预计 2016 年中国卵巢癌发病率将达到 6.43/10 万人^[6]。c. 分布广泛, 发达地区

发病率是欠发达地区的 2.2~3.7 倍^[7-9]。d. 缺乏明显的鉴别性体征和筛查方法、早期诊断困难。临床研究表明, 早期阶段(I/II)确诊的卵巢癌患者 5 年生存率可达 90%以上, 然而, 约 70%~85%的患者在确诊时都已处于晚期阶段(III/IV期), 平均 5 年存活率仅有 20%~35%^[10-13], 致使卵巢癌成为病死率最高的妇科恶性肿瘤^[14]。鉴于患者的生存率与确诊时的疾病分期密切相关, 早期检测成为提高卵巢癌患者生存期的关键^[15]。因此, 研究和发现新的早期

* 国家自然科学基金资助项目(81372365)。

** 通讯联系人。

Tel: 029-88304104, E-mail: zhengli@nwu.edu.cn

收稿日期: 2017-04-10, 接受日期: 2017-09-04

检测标志物始终是卵巢癌研究的重要课题。

经多年不懈的研究探索，相继发现了包括糖类抗原 125 (CA125)、人附睾蛋白 4 (HE4)、Mesothelin^[16]、Osteopontin^[17]、Prostasin (KLK6)^[18-20]等数十种卵巢癌血清肿瘤标志物^[21]。卵巢癌肿瘤标志物的使用，大幅降低了卵巢癌患者的死亡率^[22]。但在使用中发现，这些肿瘤标志物都有特异性不理想的问题。

在细胞恶变和肿瘤发展的过程中，糖基化异常是一个普遍现象，而且这种改变常早于糖蛋白表达量的变化^[23]。鉴于目前所发现的卵巢癌标志物都是糖蛋白，因此对其糖基化模式和糖链结构做精细的解析，从中寻找或发现新的肿瘤标志物，成为近年来卵巢癌标志物研究的新热点，并已取得不少研究成果。本文以糖组学的视角，对卵巢癌标志物糖组学的研究现状及发展趋势进行了综述和展望。

1 卵巢癌标志物 CA125 的糖链结构

CA125 为高分子质量糖蛋白，有大量的 N-糖链和 O-糖链的修饰。CA125 被美国 FDA 批准为 2 种卵巢癌标志物之一^[24]，被认为是卵巢癌诊断的“金标准”^[25]。但也存在特异性较差的问题^[26-28]，卵

巢炎性疾病、卵巢良性肿瘤及某些卵巢外癌症均可引起 CA125 水平的异常升高^[29-35]。所以改进和提高 CA125 对卵巢癌的辨识能力具有重要意义。

1.1 CA125 的 O-糖链结构解析

CA125 的 O-糖链属黏蛋白型 O-糖基化，糖链通过 GalNAC 与 Thr/Ser 连接，O-糖链结构比 N-糖链简单，但连接方式比 N-糖链复杂，因此 O-糖链结构的解析也更困难和复杂，如图 1 所示。利用凝集素结合和糖基序列分析^[36]对不同来源 CA125 (pf-CA125: 卵巢癌患者腹水; cl-CA125/oc-CA125: 卵巢癌细胞系; af-CA125: 人羊膜液; pl-CA125: 人胎盘来源的妊娠相关 CA125; hs-CA125: 人血清)做糖链结构解析，数据显示，O-糖链是 CA125 的优势糖链，多数为高唾液酸化和(或)岩藻糖基化，最多携带 2 个岩藻糖，或 2 个唾液酸，或 2 个岩藻糖+2 个唾液酸。糖链核心结构有 2 类，一类含单和双唾液酸化的核心 1 (Gal β 1-3GalNAc)，另一类含核心 2 组分(Gal β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc)，有单或双岩藻糖基化及唾液酸化等形式，也发现少量含硫酸化核心 2 的 O-糖链，决定性结构为 Gal β 1-3GalNAc 和 (Gal β 1-3GlcNAc β 1-6)GalNAc^[37-40]。

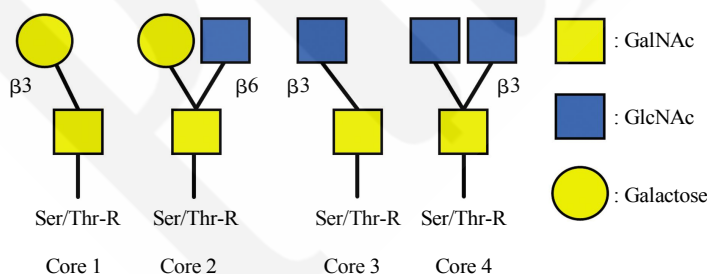


Fig. 1 Core schematic structure of O-glycan

图 1 O-糖链核心结构示意图

尽管卵巢癌患者和健康对照间 O-糖链的基本结构无显著性差异^[40]，但不同来源 CA125 O-糖链上存在不同糖型，有明显的异质性。如 cl-CA125/oc-CA125 O-糖链的核心 2 上含核心 1 的单天线分支结构，此点与众不同，af-CA125 O-糖链除核心结构外，还带岩藻糖基化外臂，而 pl-CA125 携带的是 α 2, 3 和 α 2, 6 连接的单和双唾液酸的 O-糖链，以及少量高甘露糖化 O-糖链。另有研究报告，pf-CA125 的 O-糖链比正常卵巢细胞的 O-糖链要短一些，推测 pf-CA125 上有截短型的 O-糖链，唾液酸化程度也更高。此外，O-糖链基本结构相同的 af-CA125 与 oc-CA125 的糖类

组成明显不同，甚至同一来源的 CA125 O-糖链上也存在糖异构体^[38, 41]。

凝集素 WGA 和 RCA(特异识别 GlcNAc 末端 Gal)对 af-CA125 结合活性很强，对 oc-CA125 亲和力微弱^[38]。用一组识别不同唾液酸结构的凝集素 (Siglec)对 CA125 做检测，结果显示，7 种 Siglec 均可与非癌性的 pl-CA125 特异性结合，Siglec-2、Siglec-3 优先识别 pf-CA125，结合强度也远大于 pl-CA125，Siglec-9、Siglec-10 对 cl-CA125 有高度选择性^[42]，这种差异性显示了不同来源 CA125 O-糖链结构的微观不均一性。

肿瘤抗原表位的改变时常会呈现蛋白骨架正

常, 而糖基化异常的现象^[43-44]. 与正常卵巢 CA125 相比, pf-CA125 O-糖链典型的改变是: 复杂型 O-糖链分支核心 2 或 4 缺失、核心 1 (Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GalNAc α , ST 和 Gal β 1-3GalNAc α , T) 过表达; 产生核心 1 截短的 O-糖链 (Neu5Ac α 2-6GalNAc α , STn) 和 GalNAc α (Tn)^[38,41,45]. pf-CA125 的糖基化异常, 常见的还有唾液酸化和岩藻糖基化增加并携带岩藻糖基化的外臂^[37,46-48].

CA125 的 O-糖链的特征性差异, 具有重要的意义, 检测 CA125 的糖基化变化, 可能会为卵巢癌患者提供特异性更强的生物标志物^[40].

1.2 卵巢癌 CA125 的 N-糖链结构解析

尽管 O-糖链是卵巢癌 CA125 的优势糖链, 但在卵巢癌 CA125 N 端亚单位, 除典型的 O-糖基化结构域外, 也含有 N-糖基化结构域, 如图 2 所示, 具备 N-糖基化条件^[49-50]. 在 pf-CA125 和 cl-CA125 上可检测到高甘露糖型 (Man₅-Man₉GlcNAc₂) 和复杂型 (NeuAc₀₋₁Fuc₀₋₂Hex₅₋₇HexNAc₄₋₇)N-糖链. 其中复杂型 N-糖链占 80% 以上, 并富含单岩藻糖. 复杂型 N-糖链以单天线和平分型双天线结构为主, 也

存在含岩藻糖基化核心的三/四天线结构糖链, 在 pf-CA125 上还可检测到高唾液酸化的复杂型和杂交型 N-糖链^[37,39-40,51-52]. 而 pl-CA125 以多天线结构的 N-糖链为主, 高甘露糖型 N-糖链含量低, 核心结构中也缺乏 GlcNAc, 且不含复杂型或杂交型 N-糖链^[40,51].

表 1 列出的是卵巢癌细胞系 H0-8910 培养上清液与正常卵巢组织 CA125 分子的 N-糖链结构的分析结果. 可以看出, 在卵巢癌来源 CA125 上多天线复杂型和平分型复杂型 N-糖链明显减少, 只有前者的 1/10. 无/有核心岩藻糖复杂型双天线 N-糖链、高甘露糖型 N-糖链及杂合型及含平分型 GlcNAc 残基结构的 N-糖链则显著增加^[53].

Table 1 N-glycan structural analysis and comparison of different resource CA125

表 1 不同来源 CA125 分子 N-糖链的结构分析比较^{b)}

| N-糖链结构 | 卵巢癌来源 /% | 正常卵巢来源 /% |
|----------------------|----------|-----------|
| 多天线复杂型和平分型复杂型 | 5.1 | 51.4 |
| 无核心岩藻糖双天线复杂型 | 36.3 | 14.2 |
| 有核心岩藻糖双天线复杂型 | 17.9 | 9.5 |
| 高甘露糖型 | 8.9 | 1.5 |
| 杂合型及含平分型 GlcNAc 残基结构 | 31.8 | 10.4 |

^{b)}表中数据来源于 Chen Y B. Chin J Lab Med, 2007, 30(2): 209-210

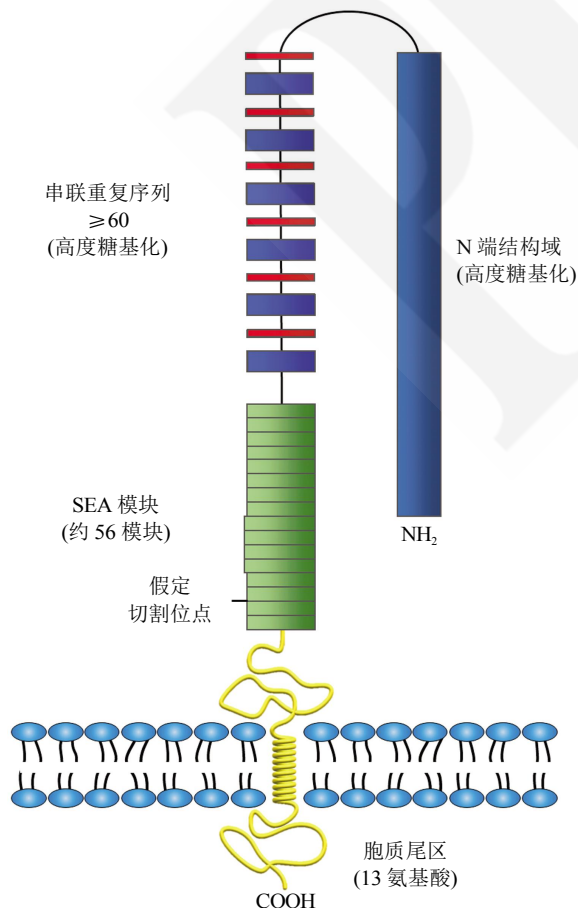


Fig. 2 General architecture of CA125 mucin

图 2 CA125 结构示意图

糖基化异常是癌症发生的一个标志^[54-57], 异常的糖基化模式可以作为恶性卵巢肿瘤的诊断标志物^[58-61]. 与健康对照相比, 卵巢癌患者 CA125 分子 N-糖链糖基化异常主要表现为双天线结构和高单唾液酸化 N-糖链增加, 糖链中岩藻糖基化核心水平升高, 而非岩藻糖基化 N-糖链减少. 组织学研究也表明, 相对于良性和交界性卵巢肿瘤, 卵巢癌来源的 CA125 携带更多的 Tn 抗原, 利用 Tn-CA125 诊断卵巢癌, ROC 曲线下面积 (AUC) 值达到 0.86, 明显优于单纯检测 CA125 (AUC=0.70)^[62]. 以 CA125 的 N-糖链糖型为标志物不仅可以区分良性卵巢肿瘤和卵巢癌, 还可明显提高诊断效率^[52].

糖组的研究结果表明, 以特征性糖链结构的异常作为提高现有血清肿瘤标志物的靶标, 而不只是单纯地检测 CA125 的总蛋白浓度差异, 不但可以有效地提升 CA125 对卵巢疾病的辨识能力、改善对卵巢癌诊断的特异性和敏感性, 并且有助于卵巢癌的早期诊断^[40,58].

2 卵巢癌血液、体液标本中糖链标志物的糖链谱研究

在过去 10 年, 研究者们除对 CA125 糖链结构和糖基化模式做了深入的研究外, 还利用糖组学的研究方法, 直接从卵巢癌患者血液、体液(腹水、囊泡液等)中分离和富集与卵巢癌相关的糖蛋白、糖肽或糖链, 做精细的结构解析, 希望能从中发现具有临床鉴别诊断价值的特征性糖链结构, 作为新

的卵巢癌肿瘤标志物。

2.1 卵巢癌患者血清中糖链标志物的筛选鉴定

研究揭示, 释放于卵巢癌患者血清中的糖蛋白或糖链上可以普遍观察到糖基化的改变, 由此生成了许多非常重要的肿瘤糖链生物标志物^[63-66]。Kim 等^[67-68]应用纳米高效液相色谱 - 芯片 - 飞行时间质谱技术(nanoHPLC-chip-TOF-MS time-of-flight mass spectrometer)^[69-70], 对健康女性(对照)、上皮性卵巢癌(EOC)和卵巢低恶性潜能肿瘤(LMP)患者的血清

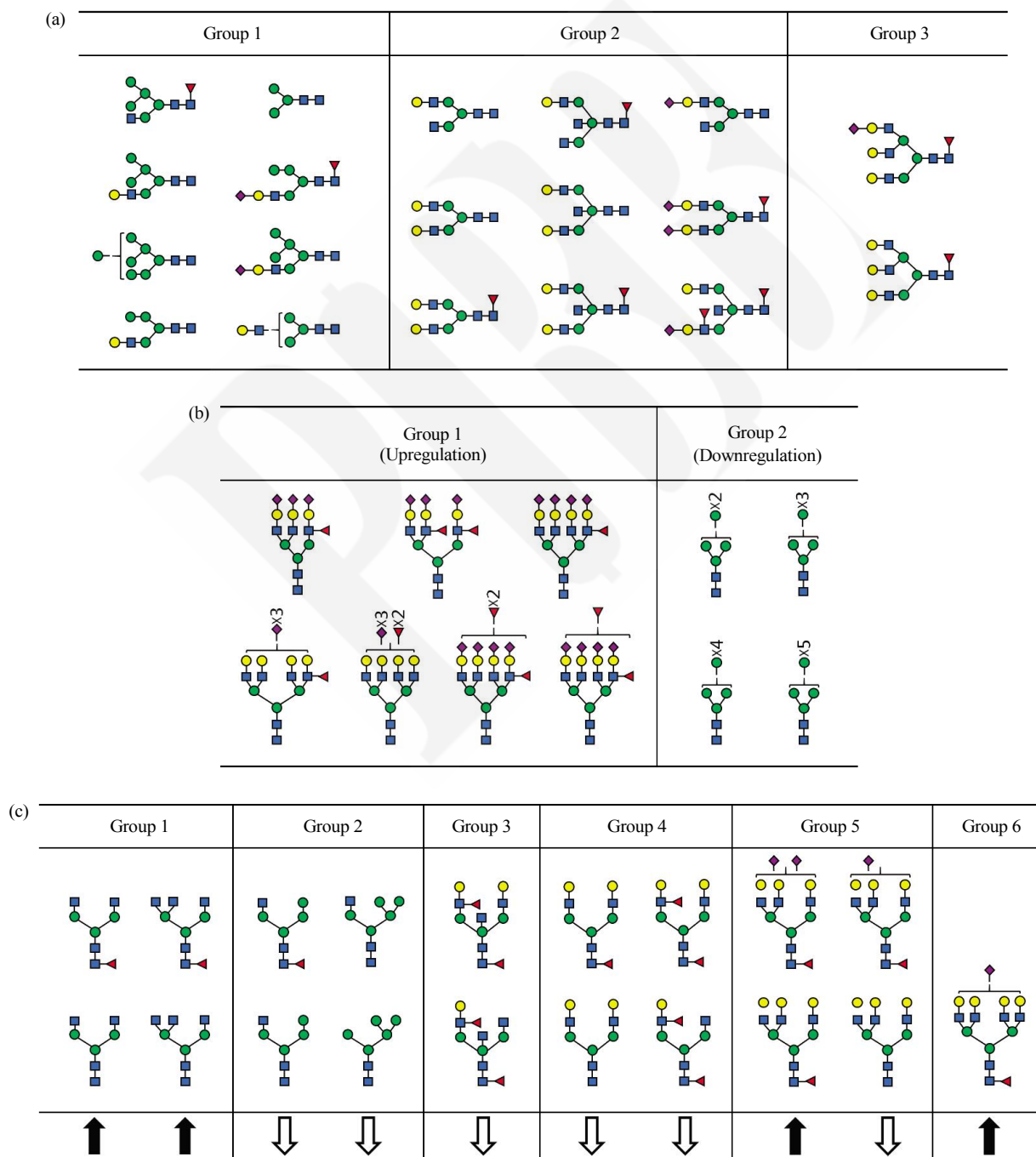


Fig. 3 Glycans structure and classification diagrams

图 3 糖链结构及分类示意图

糖蛋白做糖组学研究中, 鉴定出多种卵巢癌特异的 N-糖链, 并依据其结构特性细分为 3 组(图 3a). 其中组 1 和组 2 N-糖链在 EOC 患者中的表达水平降低, 组 1 主要是高甘露糖和杂交型 N-糖链, 组 2 为至少含 1 个半乳糖残基的双天线 N-糖链, 有或没有岩藻糖和平分 N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)残基修饰, 如果 2 个天线都是半乳糖基化的, 则其中 1 个可被唾液酸修饰.

留一法交叉验证, 以特异性 N-糖链为标志物, 对卵巢癌的鉴别敏感度达 86%、特异性为 95.8%. 此前, Karina 等^[71]在术前上皮性卵巢癌者血清中鉴定出 1 组特异性 N-糖链, 其中 4 种为高甘露糖型 N-糖链, 7 种为复杂型岩藻糖基化 N-糖链(图 3b). 与健康对照相比较, EOC 患者 N-糖链天线含岩藻糖基化结构较多, 在三天线和四天线唾液酸化糖链上尤为明显. 这组 N-糖链标志物对原发性 EOC 诊断的敏感度为 97%、特异性达 98.4%. 而 CA125 检测的敏感度和特性分别为 97%和 88.9%. 类似的

研究结果见诸多篇文献^[72-73]. 其中 Kronewitter 等^[74]采用血清 N-糖链分离、MALDI-FTICR 质谱分析、GlycoLyzer 软件进行生物信息学评价的技术路线, 从来自卵巢癌发现集(含 1 410 个糖链)中鉴定出了 19 种候选糖链标志物(图 3c). 在卵巢癌患者血清中结构为 (Hex3HexNAc4、Hex3HexNAc4Fuc1、Hex3HexNAc5、Hex3HexNAc5Fuc1)的一组中性糖链、尤其是 FA2 糖链(Hex3HexNAc4Fuc1)^[65]明显增加, 这与卵巢癌患者血清 IgG 和全血清检测到结果一致^[75]. 比较不同实验室的研究结果(图 3、图 4a 和图 4b) 可以看出, 存在于卵巢癌患者血清中的 N-糖链标志物在结构及其表达量(上调或下调)有高度的相似性, 共同的特点是含唾液酸的糖链(Hex5HexNAc4NeuAc1)表达上调, 不含唾液酸的中性糖链(Hex5HexNAc4)表达下调. 在对单个 N-糖链结构丰度的分析中, 观察到四天线糖链(aF2A4G4、aF3A4G4)的丰度和 β 1, 6-GlcNAc 在卵巢癌血清中显著增加^[52, 76].

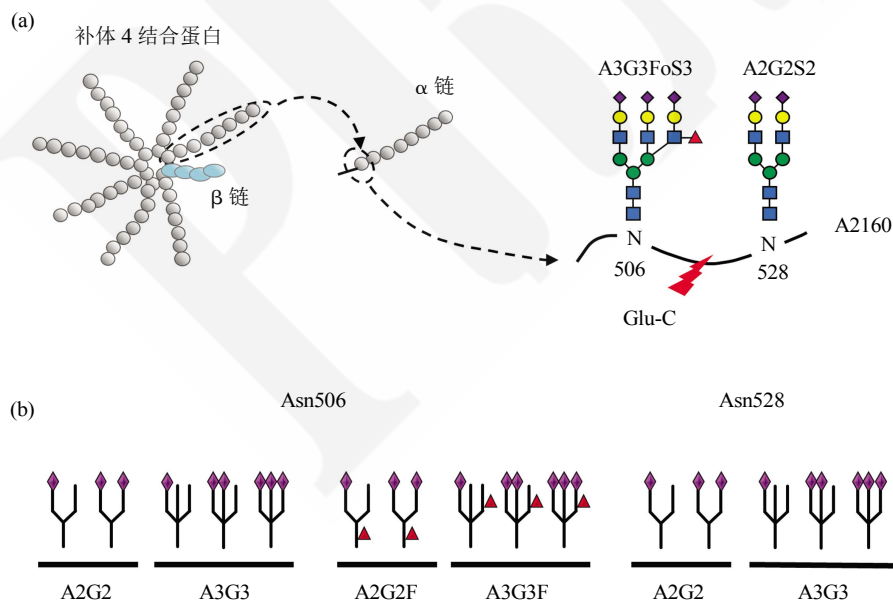


Fig. 4 The C4BP, A1260 and N-glycan structural diagram (red rhombus: sialic acid, gray triangle: fucose)

图 4 C4BP、A1260 及其 N-糖链结构示意图(紫色菱形: 唾液酸, 红色三角: 岩藻糖)

初步的研究显示, 特异性的血清 N-糖链结构, 能够有效地鉴别卵巢癌和健康对照, 有可能为卵巢癌的检测提供具有更高准确性、灵敏度和特异性的生物标志物^[77-78].

2.2 卵巢癌患者腹水中糖链标志物的筛选鉴定

癌性腹水是卵巢恶性肿瘤最常见的并发症之

一, 据统计超过 80%的卵巢癌晚期患者会产生胸腹水^[79]. 在营养丰富的腹腔环境中癌细胞大量增殖. 产生和分泌了大量糖蛋白代谢产物^[80-81], 其中包括 CA125^[82-83]、触珠蛋白^[84-86]、纤连蛋白^[87-88]、腓骨蛋白^[89-90]、内腔蛋白^[91]、 α -1 抗胰蛋白酶和 α -1-抗胰凝乳蛋白酶^[92]等多种与卵巢癌相关的糖蛋白.

因此, 卵巢患者腹水可以为糖链标志物的筛选研究提供来源方便且丰富的样本.

Miyamoto 等^[93]用凝集素 ConA 和 WGA 分别从卵巢癌患者腹水富集糖蛋白, 经肽-N-糖苷酶 F (PNGase F) 酶解, 释放糖链, nanoHPLC-chip-TOF or qTOF MS 做糖链结构分析. 发现在卵巢癌患者腹水中存在着大量高岩藻糖基化和唾液酸化的复杂型和杂合型糖链. 并在两份卵巢癌患者腹水(Asc1 和 Asc412)和对照血清(SS)中分别鉴别出 77 种、67 种和 51 种结构不同的糖链. 其中 Asc1 中有 12 种独特的糖链, Asc412 有 3 种独特的糖链, 有 13 种糖链是两种腹水中共有的, 而在对照血清中未检测到, 最终从中筛选出 4 种卵巢癌特异的 N-糖链(H6N5、H6N5F1S1、H6N5F2S3 和 H7N6F1S1).

但当前的同类研究, 多数还处于蛋白质水平^[94-95]. Garibaycerdenares 等^[96]采用 2-D 电泳分离、MALDI-TOF 分析的技术路线, 试图从卵巢癌腹水中发现能够作为肿瘤标志物的差异蛋白, 结果发现在墨西哥卵巢癌患者腹水和癌组织中高岩藻糖基化的触珠蛋白 α 亚型数量增加, 并与晚期卵巢癌相关, 可以作为评测病程进展的生物标志物. Huang 等^[97]在先天性化疗抗性的卵巢癌患者腹水中成功鉴定出 11 种差异蛋白, 其中 3 种蛋白上调, 8 种蛋白下调. 验证实验证实, 11 种差异蛋白中, 血浆铜蓝蛋白的表达在先天性化疗药物抗性和敏感的卵巢癌患者腹水样品间存在显著差异, 可作为卵巢癌化疗药物治疗反应和预后监测的生物标志物.

从腹水样品中筛选卵巢癌的糖蛋白或糖链生物标志物, 主要的优势是采样量大, 静脉采血量一个人通常不超过 4~5 ml, 腹水的采集量可在几 ml 到 1L 以上, 更重要的是, 卵巢癌患者腹水蛋白种类超过了 2 500 种^[94], 因此腹水中的肿瘤抗原也远比血液中丰富, 更有利于肿瘤生物标志物的分离和筛选. 其缺点在于, 腹水一般产生于病程的晚期, 限制了在卵巢癌早期检测中的应用. 另有文献报道, 卵巢癌患者腹水中 CA125 的含量高出血清中 CA125 临界值(cut off=35U/ml)的 20~100 倍, 但同时在良性卵巢肿瘤患者腹水样本中也检测到高滴度的 CA125, 且二者无显著性差异^[95].

3 其他来源的卵巢癌糖链标志物

3.1 免疫球蛋白(Ig)

免疫球蛋白(Ig)是存在于人体血液和体液中最重要的高丰度糖蛋白之一, 在机体获得性体液免疫

中起着关键作用. 已有研究发现, 与 Ig 相关的糖基化异常与自身免疫病以及多种恶性肿瘤的发病机理密切相关^[98-102], 这种相关性也直接影响到卵巢癌糖链标志物的研究.

早期研究证明, 卵巢癌患者血清中的肿瘤反应性免疫球蛋白中存在糖基化异常的 IgG 群, 异常的糖基序被定位于 IgG 的 Fc 端上^[103]. N-糖链糖组学谱揭示, 卵巢癌患者 IgG 群含不同程度唾液酸化和岩藻糖基化的三分支和四分支结构的 N-糖链丰度显著增加, 而平分型 N-糖链水平明显降低, 同时观察到 N-糖链上无半乳糖基化结构水平升高, 并且糖链上含独立的岩藻糖残基^[104].

新近的研究对卵巢癌患者 Ig 糖基化异常做了更深入的解析, 发现在 IgG 上有 15 个糖肽与上皮性卵巢癌(EOC)相关. N-糖链 4N4F1、H5N4、H5N4F1、H4N5F1、H5N5F1 和 H5N4F1S1 在 EOC 患者血清中降低, 并存在无乳糖基化的 N-糖链(H3N4F1), 这些结果与先前的研究一致. 同时还发现卵巢癌患者含单和双半乳糖基化 N-糖链的 IgG 水平通常降低^[75].

来自 EOC 患者血清的 IgA 有 10 种 N-糖肽的水平异常. IgA1/2 的 N^{144/131} 位点带 1 个或不带唾液酸, 含无岩藻糖基化双天线 N-糖链的几种糖肽水平分别增加, 而双唾液酸化 N-糖链的糖肽水平未同步发生显著的改变. 在 IgA2 的 N²⁰⁵ 位点上, 含平分型 N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)双天线 N-糖链的糖肽水平通常降低. 在 EOC 患者血清中 IgM 有 5 个糖肽的水平增加. 含 2 个高甘露糖型 N-糖链结构(H7N2 和 H8N2)的糖肽, 在位点 N⁴³⁹ 处只有 1 个高甘露糖表达异常. 位点 N²⁰⁹ 上携带双天线单或双唾液酸、带或不带平分型 GlcNAc N-糖链结构的糖肽表达增强^[105].

EOC 患者血清中的免疫球蛋白 IgA, IgG 和 IgM 上存在多种差异表达的糖肽, 显示其在 EOC 诊断中的潜力, 其中 IgG1N-糖链 H5N5F1 的检测对卵巢癌和对照组的鉴别力最强(分辨率 88.6%, AUC=0.94)^[105]. Qian 等^[106]对 3 个最重要的 IgG N-糖链 G0(带 2 个半乳糖基)、G1(带 1 个半乳糖基)、和 G2(无半乳糖基)做相对定量, 利用公式根据 G0/(G1+G2 \times 2)计算 IgG 半乳糖基化程度的相对比率, 以此指标与 CA125 组合, 对卵巢癌和良性卵巢肿瘤的检测, ROC 分析表明特异性从 65.2%(单独的检测 CA-125)提高到 84.6%, 灵敏度为 90%.

对免疫球蛋白位点特异性糖基化特征的研究,

不仅有助于进一步阐述 Ig 糖基化异常在卵巢癌中的生物功能特性, 并且能提高检测灵敏度和诊断特异性。

3.2 外泌体和囊泡

外泌体(exosome)和囊泡(vesicles, EV)都是由细胞分泌产生细胞外囊泡状结构, 可携带多种生物活性分子。以外泌体和囊泡作为卵巢癌诊断标志物已有广泛的研究, 并展现出独特的优势: 血浆中含量丰富($10^8 \sim 10^{13}$ 个/ml); 极其稳定(在各种冷冻、冷藏和解冻条件下可保存数年); 具肿瘤特异性、含量与肿瘤分期和治疗效果相关^[107-110]。

研究报告, 在卵巢癌细胞系的外泌体中蛋白质数量多达 2 230 种^[111], 其中半乳凝集素 3 结合蛋白(galectin-3 binding protein, LGALS3BP), 被认为是鉴别正常细胞和卵巢癌来源外泌体和 EV 的特异性标志物^[111-112]。因此, 目前外泌体和 EV 糖蛋白的糖组学研究中也多以 LGALS3BP 为对象。研究显示, 复杂型 N-糖链是卵巢癌外泌体糖蛋白的优势糖链, 并带有较高的唾液酸化, 同时也存在携带 N-乙酰葡萄糖胺的平分型 N-糖链^[113]。在卵巢癌细胞 OVMz 和 SKOV3 的 EVs 具有特异性的 N-糖链标志, 其复杂型 N-糖链有 $\alpha 2, 3$ -连接的唾液酸、岩藻糖、平分型 GlcNAc 和二乙酰乳糖二胺(lacdiNAc)结构, 此外, 还检测到含 T-抗原的 O-糖链^[114]。由于同样的结构也存在于浆液性和子宫内膜样卵巢癌患者糖蛋白的 N-糖链上, 因此它被认为是潜在的卵巢癌糖链标志物^[111, 115-116]。

3.3 补体 4 结合蛋白

补体 4 结合蛋白(C4b-binding protein, C4BP)是经典补体激活途径中重要的调节因子, 一般由 5~7 条完全相同的 α 链组成和 1 条 β 链组成, 肽链通过偶极性 α 螺旋区和二硫键之间的相互作用连接于 C 端结构域^[117-118]。C4BP 作为特异性的血清生物标志物已应用于人和动物疾病的检测^[119-120]。Sogawa 等^[121]使用串联质谱标签(tandem mass tag labelling)和 LC-MS/MS 对胰腺导管腺癌(PDAC)患者血清做筛选鉴定, 发现 PDAC 患者血清中 C4BPA(补体 4 结合蛋白 α -链)水平显著高于健康对照、胰腺炎和其他恶性肿瘤, 例如胆管癌患者, 鉴别诊断实验 ROC 曲线 AUC 为 0.86, 优于传统标志物 CA19-9 (AUC=0.84), 由此确认 C4BPA 是 PDAC 早期检测的血清生物标志物。相对于单纯的 C4BPA 检测, 以 C4BA N-糖链结构为靶点, 无疑会具有更好的特异性。Mikami 等^[122]对来自 134 例

EOC 和非癌症患者, 超过 100 000 个血清糖蛋白糖链结构做质谱分析, 从中鉴定出 A2160, 补体 4 结合蛋白完全唾液酸化的 α 链为 EOC 候选标志物, 糖链分析和多肽测序显示, A1260 具有 2 个 N-糖基化结合位点(Asn506 和 Asn528), 2 个糖基化位点可结合 11 个己糖、9 个己糖胺(HexNAc)、5 个 N-乙酰神经氨酸和 1 个岩藻糖(图 4a), 在 Asn506 位点上可连接 4 种糖链: A2G2(双天线 N-糖链)、A3G3(三天线 N-糖链)、A2G2F(含 1 个岩藻糖的双天线 N-糖链)和 A3G3F(含 1 个岩藻糖的三天线 N-糖链), Asn528 位点只连接 2 种 N-糖链 A2G2 和 A3G3(图 4b)。

对血清标本检测特异性的评估实验证实, α 链完全唾液酸化的 A1260 比 α 糖链部分唾液酸化的 A1260 对 EOC 诊断的精度更高, 如, Asn 506 位携带含 3 个唾液酸、三天线 N-糖链(完全唾液酸化)其 AUC 值明显高于 N-糖链部分唾液酸化的。同样, Asn528 位携带含 2 个唾液酸 N-糖链(完全唾液酸化)的 A1260, 其 AUC 也明显高于仅携带单唾液酸化的, 充分表明唾液酸化水平是影响 A1260 检测特异性的关键因素。

4 问题与展望

缺少特异敏感的早期诊断标志物是卵巢癌病死率长期居高不下的的重要原因之一, 如何进一步提高和改善检测的敏感度和特异性, 减少假阳性是卵巢癌生物标志物研究的重要课题。伴随肿瘤形成和发展过程中产生的各种糖基化修饰异常和糖链结构的改变常具有独特的肿瘤特异性, 由此也成为肿瘤生物标志物研究的新靶点。

近年来, 借助高通量凝集素芯片、多重质谱分析等糖蛋白组学和糖组学研究技术的迅猛发展和推广普及, 卵巢癌生物标志物的研究也从传统的对蛋白质的定性、定量研究, 逐步转向于对标志物复杂糖基化修饰体系的研究以及对标志物糖链的结构鉴定和定量分析, 开展了许多探索性的尝试和研究。通过对糖基化模式和糖链结构差异性的研究, 提高和改善了 CA125 等经典肿瘤标志物对卵巢癌的鉴别诊断效能, 发现和筛选出一批有潜力的卵巢癌糖链标志物, 扩大了卵巢癌肿瘤标志物研究的样本来源。利用糖链谱分析技术开展卵巢癌肿瘤标志物的研究已成为普遍的共识和发展趋势。

因糖基化修饰的多样性、糖链结构的复杂性, 卵巢癌标志物的糖链谱研究在基础性和技术层

面仍然面临许多需要解决的问题。例如：如何深化糖链结构的性质、结构与功能的基础性研究；如何建立健康女性血液和体液糖蛋白和糖链结构异质性数据库；如何建立特异性好、简便易行的糖蛋白、糖肽及糖链的分离富集技术和适用于临床检验的快速、高通量的检测方法等，都是研究者当前面临和需要付出艰苦努力去解决的问题。

参 考 文 献

- [1] Kurman R J, Carcangiu M L, Herrington C S. WHO classification of tumours of the female reproductive organs. 4th. Lyon: IRAC, 2014, **12**: 6-12
- [2] Razi S, Ghoncheh M, Mohammadianhafshejani A, *et al.* The incidence and mortality of ovarian cancer and their relationship with the Human Development Index in Asia. *Cancer*, 2016, **10**: 1-11
- [3] Chornokur G, Amankwah E K, Schildkraut J M, *et al.* Global ovarian cancer health disparities. *Gynecologic Oncology*, 2013, **129**(1): 258-264
- [4] Coleman R L, Monk B J, Sood A K, *et al.* Latest research and treatment of advanced-stage epithelial ovarian cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2013, **10**(4): 211-224
- [5] Alvarez R D, Karlan B Y, Strauss J F. "Ovarian cancers: Evolving paradigms in research and care" : Report from the Institute of Medicine. *Gynecologic Oncology*, 2016, **141**(3): 413-415
- [6] Wang B, Liu S, Zheng R, *et al.* Time trends of ovarian cancer incidence in China. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2014, **15**(1): 191-193
- [7] Lowe K A, Chia V M, Taylor A, *et al.* An international assessment of ovarian cancer incidence and mortality. *Gynecologic Oncology*, 2013, **130**(1): 107-114
- [8] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 2015, **136**(5): 359-386
- [9] Tewari K S, Monk B J. *The 21st Century Handbook of Clinical Ovarian Cancer*, 2015: 1-290
- [10] Howlader N. AMNM. SEER cancer statistics review, 1975-2012. Bethesda: National Cancer Institute, 2015: 1-118
- [11] Levine D A, Karlan B Y. Evolving approaches in research and care for ovarian cancers: a report from the national academies of sciences, engineering, and medicine. *JAMA*, 2016, **315**(18): 1943-1944
- [12] Karlan B Y, Alvarez R D, Rd S J. Evolving paradigms in research and care in ovarian cancers. *Obstetrics and Gynecology*, 2016, **128**(4): 771-774
- [13] Mcphail S, Johnson S, Greenberg D, *et al.* Stage at diagnosis and early mortality from cancer in England. *British Journal of Cancer*, 2015, **112**(1): 108-115
- [14] Siegel R, Ma J, Zou Z, *et al.* Cancer statistics, 2014. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2014, **64**(1): 9-29
- [15] WEI S, LI H, Zhang B. The diagnostic value of serum HE4 and CA-125 and ROMA index in ovarian cancer. *Biomedical Reports*, 2016, **5**: 41-44
- [16] Hassan R, Ho M. Mesothelin targeted cancer immunotherapy. *European Journal of Cancer*, 2008, **44**(44): 46-53
- [17] Kim J H, Skates S J, Uede J, *et al.* Osteopontin as a potential diagnostic biomarker for ovarian cancer. *JAMA*, 2002, **287**(13): 1671-1679
- [18] Zhang Z, Chan D W. The road from discovery to clinical diagnostics: lessons learned from the first FDA-cleared *in vitro* diagnostic multivariate index assay of proteomic biomarkers. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 2010, **19**(12): 2995-2999
- [19] Mok S C, Chao J, Skates S, *et al.* Prostatein, a potential serum marker for ovarian cancer: identification through microarray technology. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 2001, **93**(19): 1458-1464
- [20] Yang F, Hu Z, Chen Y, *et al.* Diagnostic value of KLK6 as an ovarian cancer biomarker: a meta-analysis. *Biomedical Reports*, 2016, **4**(6): 681-686
- [21] Narasimhan K, Changqing Z, Choolani M. Ovarian cancer proteomics: many technologies one goal. *Proteomics Clinical Applications*, 2008, **2**(2): 195-218
- [22] Malvezzi M, Carioli G, Rodriguez T, *et al.* Global trends and predictions in ovarian cancer mortality. *Annals of Oncology*, 2016, **27**(11): 2017-2025
- [23] Sørensen A L, Reis C A, Tarp M A, *et al.* Chemoenzymatically synthesized multimeric Tn/STn MUC1 glycopeptides elicit cancer-specific anti-MUC1 antibody responses and override tolerance. *Glycobiology*, 2006, **16**(2): 96-107
- [24] Gutman S, Kessler L G. The US Food and Drug Administration perspective on cancer biomarker development. *Nature Reviews Cancer*, 2006, **6**(7): 565-571
- [25] Zhang B, Cai F F, Zhong X Y. An overview of biomarkers for the ovarian cancer diagnosis. *European Journal of Obstetrics Gynecology & Reproductive Biology*, 2011, **158**(2): 119-123
- [26] Lancaster J. The O-glycan pathway is associated with *in vitro* sensitivity to gemcitabine and overall survival from ovarian cancer. *International Journal of Oncology*, 2012, **14**(3):56-71
- [27] Moore R G, Jabre-Raughley M, Brown A K, *et al.* Comparison of a novel multiple marker assay vs the Risk of Malignancy Index for the prediction of epithelial ovarian cancer in patients with a pelvic mass. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 2010, **203**(3): 1-6
- [28] Kurosaki A, Hasegawa K, Kato T, *et al.* Serum folate receptor alpha (FRA) as a biomarker for ovarian cancer: Implications for diagnosis, prognosis and predicting its local tumor expression. *International Journal of Cancer*, 2016, **138**(8): 1994-2002
- [29] Medeiros L R, Rosa D D, Rosa M I D, *et al.* Accuracy of CA 125 in the diagnosis of ovarian tumors: a quantitative systematic review. *European Journal of Obstetrics Gynecology & Reproductive Biology*, 2009, **142**(2): 99-105

- [30] Núñez J. Carbohydrate antigen 125: An emerging prognostic risk factor in acute heart failure. *Heart*, 2007, **93**(6): 716–721
- [31] Rauh-Hain J A, Krivak T C, Del Carmen M G, *et al.* Ovarian cancer screening and early detection in the general population. *Reviews in Obstetrics & Gynecology*, 2011, **4**(1): 15–21
- [32] Norum L F, Erikstein B, Nustad K. Elevated CA 125 in breast cancer-A sign of advanced disease. *Tumor Biology*, 2001, **22** (4): 223–228
- [33] Miralles C, Orea M, España P, *et al.* Cancer antigen 125 associated with multiple benign and malignant pathologies. *Annals of Surgical Oncology*, 2003, **10**(2): 150–154
- [34] Yu B, Xu P Z, Wang Q W, *et al.* Clinical value of tumour specific growth factor (TSGF) and carbohydrate antigen-125 (CA-125) in carcinoma of the endometrium. *Journal of International Medical Research*, 2009, **37**(3): 878–883
- [35] Homma S, Satoh H, Kagohashi K, *et al.* Production of CA125 by human lung cancer cell lines. *Clinical and Experimental Medicine*, 2004, **4**(3): 139–141
- [36] 李铮. 糖组学研究技术. 北京: 高等教育出版社, 2015: 1–331
Li Z. *Research Techniques on Glycomics*. Beijing: Higher Education Press, 2015: 1–331
- [37] Bojana M, Miroslava J. Analysis of the protein and glycan parts of CA125 antigen from human amniotic fluid. *Archives of Biological Sciences*, 2007, **59**(2): 97–103
- [38] Jankovic M M, Milutinovic B S. Glycoforms of CA125 antigen as a possible cancer marker. *Cancer Biomarkers*, 2008, **4**(1): 35–42
- [39] Kui W N, Easton R L, Panico M, *et al.* Characterization of the oligosaccharides associated with the human ovarian tumor marker CA125. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, **278**(31): 619–634
- [40] Saldova R, Struwe W, Wynne K, *et al.* Exploring the glycosylation of serum CA125. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, **14**(8): 636–654
- [41] Karlsson N G, McGuckin M A. O-Linked glycome and proteome of high-molecular-mass proteins in human ovarian cancer ascites: Identification of sulfation, disialic acid and O-linked fucose. *Glycobiology*, 2012, **22**(7): 918–929
- [42] Mitic N, Milutinovic B, Jankovic M. Assessment of sialic acid diversity in cancer- and non-cancer related CA125 antigen using sialic acid-binding Ig-like lectins (Siglecs). *Disease Markers*, 2012, **32**(3): 187–194
- [43] Taylor-Papadimitriou J, Burchell J M, Plunkett T, *et al.* MUC1 and the immunobiology of cancer. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 2002, **7**(2): 209–221
- [44] Wandall H H, Blixt O M. Cancer biomarkers defined by autoantibody signatures to aberrant O-glycopeptide epitopes. *Cancer Research*, 2010, **70**(4): 306–313
- [45] Akita K, Yoshida S, Ikehara Y, *et al.* Different levels of sialyl-Tn antigen expressed on MUC16 in patients with endometriosis and ovarian cancer. *International Journal of Gynecological Cancer Official Journal of the International Gynecological Cancer Society*, 2012, **22**(4): 531–538
- [46] Zhang X, Wang Y, Qian Y, *et al.* Discovery of specific metastasis-related N-glycan alterations in epithelial ovarian cancer based on quantitative glycomics. *PLoS One*, 2014, **9**(2): 145–148
- [47] Abbott K L. Glycomic analysis of ovarian cancer: past, present, and future. *Cancer Biomarkers*, 2011, **8**(4–5): 273–280
- [48] Wandall H H, Blixt O M. Cancer biomarkers defined by autoantibody signatures to aberrant O-glycopeptide epitopes. *Cancer Research*, 2010, **70**(4): 306–313
- [49] Yin B W, Lloyd K O. Molecular cloning of the CA125 ovarian cancer antigen: identification as a new mucin, MUC16. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, **276**(29): 371–375
- [50] Bouanene H, Miled A. Conflicting views on the molecular structure of the cancer antigen CA125/MUC16. *Disease Markers*, 2010, **28**(6): 385–394
- [51] Jankovic M M, Tapuskovic B S. Molecular forms and microheterogeneity of the oligosaccharide chains of pregnancy-associated CA125 antigen. *Human Reproduction*, 2005, **20**(9): 32–38
- [52] Hong-Xia Gong MFJW. Assessment of new biomarkers for ovarian carcinoma with serum N-glycan profiling. *Int J Clin Exp Pathol*, 2016, **9**(2): 15–27
- [53] Bao Y, Chen Y L. Comparison of N-glycan structure of CA125 in ovarian cancer and normal ovarian tissue. *Chin J Lab Med*, 2007, **30**(2): 209–210
- [54] Hakomori S, Cummings R D. Glycosylation effects on cancer development. *Glycoconjugate Journal*, 2012, **29**(8–9): 565–566
- [55] Cecilian F, Pocacqua V. The acute phase protein alpha1-acid glycoprotein: a model for altered glycosylation during diseases. *Current Protein & Peptide Science*, 2007, **8**(1): 91–108
- [56] Mehta R, Suvana D, Mustafa C P, *et al.* Role of soluble transferrin receptors study in hepatocellular carcinoma with underlying cirrhosis. *Indian Journal of Cancer*, 2004, **42**(42): 2–15
- [57] Song E Y, Kim K A, Kim Y D, *et al.* Elevation of serum asialo- α 1 acid glycoprotein concentration in patients with hepatic cirrhosis and hepatocellular carcinoma as measured by antibody-lectin sandwich assay. *Hepatology Research*, 2003, **26**(4): 311–317
- [58] Tuccillo F M, de Laurentiis A, Palmieri C, *et al.* Aberrant glycosylation as biomarker for cancer: focus on CD43. *Biomed Research International*, 2014, **2014**: 1–13
- [59] Li B, An H J, Kirmiz C, *et al.* Glycoproteomic analyses of ovarian cancer cell lines and sera from ovarian cancer patients show distinct glycosylation changes in individual proteins. *Journal of Proteome Research*, 2008, **7**(9): 76–88
- [60] Leiserowitz G S, Lebrilla C, Miyamoto S, *et al.* Glycomics analysis of serum: a potential new biomarker for ovarian cancer. *International Journal of Gynecological Cancer*, 2008, **18** (3): 470–475
- [61] Abbott K L, Pierce J M. Lectin-based glycoproteomic techniques for the enrichment and identification of potential biomarkers. *Methods Enzymol*, 2010, **480**: 461–476
- [62] Van Elssen C H, Frings P W, Bot F J, *et al.* Expression of aberrantly glycosylated Mucin-1 in ovarian cancer. *Histopathology*, 2010, **57**(4): 597–606

- [63] Arnold J N, Saldova R, Galligan M C, *et al.* Novel glycan biomarkers for the detection of lung cancer. *Journal of Proteome Research*, 2011, **10**(4): 17–25
- [64] Kyselova Z, Mechref Y, Kang P, *et al.* Breast cancer diagnosis and prognosis through quantitative measurements of serum glycan profiles. *Clinical Chemistry*, 2008, **54**(7): 66–75
- [65] Gornik O, Royle L, Harvey D J, *et al.* Changes of serum glycans during sepsis and acute pancreatitis. *Glycobiology*, 2007, **17**(12): 21–32
- [66] Kyselova Z, Mechref Y, Al Bataineh M M, *et al.* Alterations in the serum glycome due to metastatic prostate cancer. *Journal of Proteome Research*, 2007, **6**(5): 1822–1832
- [67] Kim K, Ruhaak L R, Nguyen U T, *et al.* Evaluation of glycomic profiling as a diagnostic biomarker for epithelial ovarian cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 2014, **23** (4): 11–21
- [68] Kim Y, Jeong H, Jang K, *et al.* Rapid and high-throughput analysis of N-glycans from ovarian cancer serum using a 96-well plate platform. *Analytical Biochemistry*, 2009, **391**(2): 51–53
- [69] De Leoz M L, Gaerlan S C, Strum J S, *et al.* Lacto-N-tetraose, fucosylation, and secretor status are highly variable in human milk oligosaccharides from women delivering preterm. *Journal of Proteome Research*, 2012, **11**(9): 62–72
- [70] Lee H, Garrido D, Mills D A, *et al.* Hydrolysis of milk gangliosides by infant-gut associated bifidobacteria determined by microfluidic chips and high-resolution mass spectrometry. *Electrophoresis*, 2014, **35**(11): 42–50
- [71] Karina B, Biskup K, Braicu E I, *et al.* Serum glycome profiling: a biomarker for diagnosis of ovarian cancer. *Journal of Proteome Research*, 2013, **12**(9): 56–63
- [72] Nagaraj V J, Eaton S, Thirstrup D, *et al.* Piezoelectric printing and probing of lectin nano probe arrays for glycosylation analysis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, **375**(4): 26–30
- [73] Malykh Y N, Schauer R, Shaw L. N-glycolylneuraminic acid in human tumours. *Biochimie*, 2001, **83**(7): 23–34
- [74] Kronewitter S R, De Leoz M L, Strum J S, *et al.* The glycozyler: automated glycan annotation software for high performance mass spectrometry and its application to ovarian cancer glycan biomarker discovery. *Proteomics*, 2012, **12**(15–16): 23–38
- [75] Saldova R, Royle L, Radcliffe C M, *et al.* Ovarian cancer is associated with changes in glycosylation in both acute-phase proteins and IgG. *Glycobiology*, 2007, **17**(12): 44–56
- [76] Schwedler C, Kaup M, Weiz S, *et al.* Identification of 34 N-glycan isomers in human serum by capillary electrophoresis coupled with laser-induced fluorescence allows improving glycan biomarker discovery. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2014, **406**(28): 85–93
- [77] Aldredge D, An H J, Tang N, *et al.* Annotation of a serum N-glycan library for rapid identification of structures. *Journal of Proteome Research*, 2012, **11**(3): 58–68
- [78] Hua S, Williams C C, Dimapasoc L M, *et al.* Isomer-specific chromatographic profiling yields highly sensitive and specific potential N-glycan biomarkers for epithelial ovarian cancer. *Journal of Chromatography A*, 2013, **1279**: 54–67
- [79] Jacobs I J, Menon U. Progress and challenges in screening for early detection of ovarian cancer. *Molecular & Cellular Proteomics Mcp*, 2004, **3**(4): 55–66
- [80] Davidson B, Espina V, Steinberg S M, *et al.* Proteomic analysis of malignant ovarian cancer effusions as a tool for biologic and prognostic profiling. *Clinical Cancer Research An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 2006, **12** (1): 91–99
- [81] Qian W J, Jacobs J M, Liu T, *et al.* Advances and challenges in liquid chromatography-mass spectrometry based proteomic profiling for clinical applications. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2006, **5**(5): 27–44
- [82] Nowara E, Badora-Rybicka A, Swiderska K, *et al.* The Ca125 concentration in intraperitoneal fluid as a prognostic factor in ovarian cancer patients with refractory malignant ascites. *Journal of Tumor*, 2016, **4**(5–6): 74–77
- [83] Sikaris K A. CA125--a test with a change of heart. *Heart Lung & Circulation*, 2011, **20**(20): 34–40
- [84] Zhao C, Annamalai L, Guo C, *et al.* Circulating haptoglobin is an independent prognostic factor in the sera of patients with epithelial ovarian cancer. *Neoplasia*, 2007, **9**(1): 1–7
- [85] Ahmed N, Barker G, Oliva K T, *et al.* Proteomic-based identification of haptoglobin-I precursor as a novel circulating biomarker of ovarian cancer. *British Journal of Cancer*, 2004, **91**(1): 29–40
- [86] Horick N K, Mok S C, Ye B, *et al.* Haptoglobin-alpha subunit as potential serum biomarker in ovarian cancer: identification and characterization using proteomic profiling and mass spectrometry. *Clinical Cancer Research*, 2003, **9**(8): 4–11
- [87] Rocha H A, Franco C R, Trindade E S, *et al.* Fucan inhibits Chinese hamster ovary cell(CHO) adhesion to fibronectin by binding to the extracellular matrix. *Planta Medica*, 2005, **71**(7): 28–33
- [88] Note E S. Table of contents. *Warren Buffett*, 2007, **3**(4): 1–44
- [89] Katsaros D. Estrogen induction and overexpression of fibulin-1C mRNA in ovarian cancer cells. *Oncogene*, 2002, **21**(7): 97–107
- [90] Shen Y, Shen Y, Kuie T S. Signal transduction pathways modulated by fibulin-1 C and 1D in human ovary cancer cells//*Bit Life Sciences*. Shanghai: BIT Life Sciences' 1st Annual World Cancer Congress, 2008: 501
- [91] Amankwah E K, Wang Q, Tsai Y Y, *et al.* Abstract 2854: Genetic variation in stromal genes decorin and lumican and susceptibility to serous ovarian cancer. *Cancer Research*, 2011, **70**(8): 28–54
- [92] Forsyth S, Horvath A, Coughlin P. A review and comparison of the murine alpha1-antitrypsin and alpha1-antichymotrypsin multigene clusters with the human clade A serpins. *Genomics*, 2003, **81**(3): 36–45
- [93] Miyamoto S, Ruhaak L R, Stroble C, *et al.* Glycoproteomic analysis of malignant ovarian cancer ascites fluid identifies unusual glycopeptides. *Journal of Proteome Research*, 2016, **15**(9): 58–76

- [94] Gortzakuzan L, Ignatchenko A, Evangelou A I, *et al.* A proteome resource of ovarian cancer ascites: integrated proteomic and bioinformatic analyses to identify putative biomarkers. *Journal of Proteome Research*, 2008, **7**(1): 39–51
- [95] Sogabe M, Nozaki H, Tanaka N, *et al.* Novel glyco-biomarker for ovarian cancer that detects clear cell carcinoma. *Journal of Proteome Research*, 2014, **13**(3): 24–35
- [96] Garibaycerdenares O L, Hernándezramírez V I, Osoriotrujillo J C, *et al.* Proteomic identification of fucosylated haptoglobin alpha isoforms in ascitic fluids and its localization in ovarian carcinoma tissues from Mexican patients. *Journal of Ovarian Research*, 2014, **7**(1): 1–9
- [97] Huang H, Li Y, Liu J, *et al.* Screening and identification of biomarkers in ascites related to intrinsic chemoresistance of serous epithelial ovarian cancers. *PLoS One*, 2012, **7**(12): 24–31
- [98] Huhn C, Selman M H, Ruhaak L R, *et al.* IgG glycosylation analysis. *Proteomics*, 2009, **9**(4): 882–913
- [99] Kodar K, Stadlmann J, Klaamas K, *et al.* Immunoglobulin G Fc N-glycan profiling in patients with gastric cancer by LC-ESI-MS: relation to tumor progression and survival. *Glycoconjugate Journal*, 2012, **29**(1): 57–66
- [100] Bones J, Byrne J C, O Donoghue N, *et al.* Glycomic and glycoproteomic analysis of serum from patients with stomach cancer reveals potential markers arising from host defense response mechanisms. *Journal of Proteome Research*, 2011, **10**(3): 46–65
- [101] Vasseur J A, Goetz J A, Jr A W, *et al.* Smoking and lung cancer-induced changes in N-glycosylation of blood serum proteins. *Glycobiology*, 2012, **22**(12): 684–708
- [102] Ruhaak L R, Nguyen U T, Stroble C, *et al.* Enrichment strategies in glycomics-based lung cancer biomarker development. *Proteomics-Clinical Applications*, 2013, **7**(9–10): 64–76
- [103] Gerçel-Taylor Ç, Bazzett L B, Taylor D D. Presence of aberrant tumor-reactive immunoglobulins in the circulation of patients with ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, 2001, **81**(1): 71–76
- [104] Alley W R, Vasseur J A, Goetz J A, *et al.* N-linked glycan structures and their expressions change in the blood sera of ovarian cancer patients. *Journal of Proteome Research*, 2012, **11**(4): 282–300
- [105] Ruhaak L R, Kim K, Stroble C, *et al.* Protein-specific differential glycosylation of immunoglobulins in serum of ovarian cancer patients. *Journal of Proteome Research*, 2016, **15**(3): 2–10
- [106] Qian Y, Wang Y, Zhang X, *et al.* Quantitative analysis of serum IgG galactosylation assists differential diagnosis of ovarian cancer. *J Proteome Research*, 2013, **12**(9): 4046–4055
- [107] Runz S, Keller S, Rupp C, *et al.* Malignant ascites-derived exosomes of ovarian carcinoma patients contain CD24 and EpCAM. *Gynecologic Oncology*, 2007, **107**(107): 63–71
- [108] LI Q L, Bu N, Yu Y C, *et al.* Ex vivo experiments of human ovarian cancer ascites-derived exosomes presented by dendritic cells derived from umbilical cord blood for immunotherapy treatment. *Clinical Medicine Oncology*, 2008, **2**(2): 614–674
- [109] Liang B, Peng P, Chen S, *et al.* Characterization and proteomic analysis of ovarian cancer-derived exosomes. *Journal of Proteomics*, 2013, **80**(6): 71–82
- [110] Dorayappan K D P, Wallbillich J J, Cohn D E, *et al.* The biological significance and clinical applications of exosomes in ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, 2016, **142**(1): 199–205
- [111] Liang B, Peng P, Chen S, *et al.* Characterization and proteomic analysis of ovarian cancer-derived exosomes. *Journal of Proteomics*, 2013, **80**(6): 71–82
- [112] Went P T, Lugli A, Meier S, *et al.* Frequent EpCam protein expression in human carcinomas. *Human Pathology*, 2004, **35**(1): 22–28
- [113] Cristina Escrevente NGSK. Sialoglycoproteins and N-glycans from secreted exosomes of ovarian carcinoma cells. *PLoS One*, 2013, **8**(10): 31–35
- [114] Gomes J, Gomes-Alves P, Carvalho S, *et al.* Extracellular vesicles from ovarian carcinoma cells display specific glycosignatures. *Biomolecules*, 2015, **5**(3): 41–61
- [115] Machado E, Kandzia S, Carilho R, *et al.* N-Glycosylation of total cellular glycoproteins from the human ovarian carcinoma SKOV3 cell line and of recombinantly expressed human erythropoietin. *Glycobiology*, 2011, **21**(3): 76–86
- [116] Batista B S, Eng W S, Pilobello K T, *et al.* Identification of a conserved glycan signature for microvesicles. *Journal of Proteome Research*, 2011, **10**(10): 24–33
- [117] Kask L, Hillarp A, Ramesh B, *et al.* Structural requirements for the intracellular subunit polymerization of the complement inhibitor C4b-binding protein. *Biochemistry*, 2002, **41**(30): 49–57
- [118] Hofmeyer T, Schmelz S, Degiacomi M T, *et al.* Arranged sevenfold: structural insights into the C-terminal oligomerization domain of human C4b-binding protein. *Journal of Molecular Biology*, 2013, **425**(8): 2–17
- [119] Ma J, Luo X, Wu Q, *et al.* Circulation levels of acute phase proteins in patients with Takayasu arteritis. *Journal of Vascular Surgery*, 2010, **51**(3): 6–9
- [120] Zadura A F, Theander E, Blom A M, *et al.* Complement inhibitor C4b-binding protein in primary Sjögren's syndrome and its association with other disease markers. *Scandinavian Journal of Immunology*, 2009, **69**(4): 74–80
- [121] Sogawa K, Takano S, Iida F, *et al.* Identification of a novel serum biomarker for pancreatic cancer, C4b-binding protein α -chain (C4BPA) by quantitative proteomic analysis using tandem mass tags. *British Journal of Cancer*, 2016, **115**(8): 949–956
- [122] Mikami M, Tanabe K, Matsuo K, *et al.* Fully-sialylated α -chain of complement 4-binding protein: diagnostic utility for ovarian clear cell carcinoma. *Gynecologic Oncology*, 2015, **139**(3): 20–28

Progress in The Study of Glycosylation of Ovarian Cancer Biomarkers*

XUE Tian¹⁾, LI Yan-Hong²⁾, LI Zheng^{1)**}

¹⁾ Laboratory for Functional Glycomics, College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China;

²⁾ Department of Obstetrics and Gynecology, Tangdu Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China)

Abstract CA125 is a gold standard for the diagnosis of ovarian cancer, however, its specificity is still relatively low in clinical application. Tumor formation and development process is often accompanied by abnormal glycosylation modification and changes in glycan structures. The different tumors have specifically abnormal glycan structures. In recent years, the technologies in glycoproteomics and glycomics, such as lectin microarrays and multiple mass spectrometry, are used to discover the small discrepancies of N- and O-linked glycan structures in CA125 of the different sources. These abnormal glycan structures could increase the specificity of CA125 for the diagnosis of ovarian cancer. In the past decade, the technologies of glycome were also used to directly analyze the subtle glycan structures in the serum and body fluid (ascites, vesicle fluid, *etc.*) from patients with ovarian cancer. The results showed that the N-linked glycan structures can effectively identify ovarian cancer patients and healthy volunteers, which may be new biomarkers with better sensitivity and specificity for the diagnosis of ovarian cancer. Trends in the development of biomarkers for ovarian cancer shifted from qualitative and quantitative studies of proteins, to identification and quantitative analysis of glycosylation modification and glycan structures of biomarkers. Taking the perspective of glycomics, the status and development trend of ovarian cancer biomarkers are reviewed and discussed in this paper.

Key words ovarian cancer, glycomics, glycosylation, biomarker

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0135

* This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (81372365).

**Corresponding author.

Tel: 86-29-88304104, E-mail: zhengli@nwu.edu.cn

Received: April 10, 2017 Accepted: September 4, 2017