

糖鞘脂分析技术及相关疾病研究进展*

杜昊骐 于汉杰 贾丽苑 李 铮**

(西北大学生命科学学院功能糖组学实验室, 西安 710069)

摘要 糖鞘脂是一类广泛分布在动物细胞膜表面的糖脂类物质, 它在调控细胞识别、黏附、增殖以及凋亡等方面均有重要的生物学作用. 本综述主要讨论了在现代分析技术范畴中, 糖鞘脂的鉴定及其糖链结构的分离与解析方面的研究进展和糖鞘脂在癌症等疾病发生发展中所起的生物学功能, 以及糖鞘脂作为疾病治疗靶标的可能性. 随着现代仪器技术, 尤其是质谱技术和色谱-质谱联用技术的发展, 糖鞘脂的分离与检测也进入了高速发展的时代. 目前, 使用质谱技术在肝癌、结直肠癌、乳腺癌等恶性肿瘤的组织样本中均发现了不同种类糖鞘脂不同程度的异常表达. 其中, 岩藻糖基化的糖鞘脂上调表达在众多癌症糖鞘脂检测中尤为突出, 故岩藻糖基化的糖鞘脂可能会成为一类癌症的早期诊断标志物. 近年来, 随着对糖鞘脂理解的不断深入, 糖鞘脂在诸多疾病, 如癌症血管生成过程中的功能研究成为了热点之一. 例如, 从肿瘤细胞表面脱落的大多数糖鞘脂在肿瘤微环境中主要起到了促进血管生成的作用, 而与此相反的是, 另一种结构简单的神经节苷脂 GM3 却起到了抑制血管生成的作用. 本综述汇集了对上述现象在分子水平上的不同解读以及利用此现象对癌症靶向治疗的研究与探索, 并对基于抑制糖鞘脂合成的靶向治疗的发展前景进行了分析展望.

关键词 糖鞘脂, 质谱, 癌症, 血管生成, 靶向治疗

学科分类号 Q5

DOI: 10.16476/j.pibb.2015.0326

在生物细胞表面上, 广泛分布着大量的糖链. 这些糖链的存在对于生命体完成最为基础的生命活动和维持最为稳定的生命状态有着至关重要的意义. 糖链不仅参与调节细胞黏附、免疫应答的过程, 还对于细胞间信号传导有极其重要的作用. 糖类物质在生物体内主要以糖复合物的形式存在, 包括糖蛋白、蛋白聚糖和糖脂. 糖脂是脂类分子与单糖或寡糖的还原末端以糖苷键连接而成的糖复合物. 糖脂分布广泛, 根据其所含有的脂类分子结构的不同, 又可以分为含有神经酰胺和糖链结构的糖鞘脂(glycosphingolipids, GSLs), 以及含有丙三醇或二酰基甘油和糖链结构的甘油糖脂(glycoglycerolipids).

糖组(glycome)是一个生命体、一个器官、一种特定组织或者某个细胞、细胞器在某种条件下所具有的全部糖类物质. 糖组学(glycomics)是研究细胞或生物体内糖类物质的分子结构、微观不均一性、表达调控、与识别分子的相互作用和功能多样性以及与疾病之间关系的一门新兴学科^[1]. 作为糖

组的重要组成部分, 糖鞘脂组学的研究离不开糖组学相关研究技术的发展.

本文从糖鞘脂的鉴定及其糖链结构的分离与解析的研究进展和糖鞘脂在癌症等疾病的发生发展中起到的生物学作用, 以及糖鞘脂作为疾病治疗靶标的可能性等方面进行了综述; 着重探讨了岩藻糖基化的糖鞘脂(如 Globo-H)在癌症中的研究以及 GM3 等重要糖鞘脂在血管生成过程中的生物学作用.

1 糖鞘脂简介

1.1 糖鞘脂的结构与分类

作为研究最为深入和广泛的糖脂, 糖鞘脂的结构已被清晰地认识. 糖鞘脂的主体结构为疏水的神经酰胺(ceramide, Cer)部分和亲水的糖链部分^[2].

* 国家自然科学基金基地建设能力提高项目(J1210063)资助.

** 通讯联系人.

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

收稿日期: 2015-10-17, 接受日期: 2015-11-24

神经酰胺由 1 条含 14C~20C 组成的鞘氨醇和 1 条以酰胺键连接在鞘氨醇氨基的脂肪链构成, 该脂肪链长度为 16C~26C 不等^[3]; 另外, 鞘氨醇的不饱和度常因其物种来源、存在的组织部位和所处的生理状态的多样性有所不同. 糖鞘脂的糖链部分与神经酰胺的伯羟基通过糖苷键相连接. 作为构成糖鞘脂的另一个重要结构, 糖链可以是单糖或者多糖, 且其复杂程度远超过神经酰胺, 它的主要成分有 D- 葡萄糖、D- 半乳糖、L- 岩藻糖、D- 甘露糖、N- 乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)、N- 乙酰半乳糖胺(GalNAc)及唾液酸(sialic acid, SA)等^[4].

根据糖链部分的唾液酸化和硫酸化程度, 糖鞘脂可分为中性糖鞘脂和酸性糖鞘脂两大类. 没有唾液酸结构且无硫酸化糖链的糖鞘脂称为中性糖鞘脂, 而含有唾液酸结构或硫酸化糖链的糖鞘脂称为酸性糖鞘脂. 根据糖链核心结构的不同, 糖鞘脂又可分为 Globo-、Ganglio-、Lacto- 等^[5]系列.

1.2 糖鞘脂的分布以及生物学作用

糖鞘脂主要分布在哺乳动物组织的细胞质膜外小叶及细胞内膜上^[6], 并表现出与组织以及细胞类型特异的糖链谱表达模式^[7]. 糖鞘脂疏水部分的特殊结构能使其更加稳定地嵌入细胞膜双层结构中, 亲水部分则伸向了细胞质膜外, 从而进行一系列生命活动. 糖鞘脂不仅具有上文所述生物体内糖链所具备的功能, 另外还在胚胎发育、细胞分化、受体调配、细胞凋亡以及癌变过程中起到了决定性作用. 因此, 糖鞘脂正逐渐成为糖生物学领域中的一个研究热点. 近年来, 关于糖鞘脂在癌症等疾病中生物学作用的研究成为了新的热点, 这也进一步揭示了糖鞘脂研究对于哺乳动物乃至人类的生命健康具有重大的意义.

2 糖鞘脂的分离和分析技术

糖鞘脂的分离与分析方法学、定性与定量及表征研究, 是深入认识糖鞘脂生物学功能与研究糖鞘脂结构、丰度变化与疾病发生、发展、治疗关系的基础^[8]. 近年来, 随着现代化糖鞘脂分离和分析技术的快速发展, 糖鞘脂的结构及功能研究取得了长足的进步.

2.1 薄层色谱(thin-layer chromatography, TLC)

在诸多研究方法中, 薄层色谱法在 20 世纪 60 年代中期就被开始应用于糖复合物的定性检测中^[9]. TLC 具有设备构造简单、操作步骤方便、可以使用高浓度酸等腐蚀性显色剂显色、展开速率高

和分辨力较强等优点, 并且可以采用糖脂特异性的显色剂以及抗体等进行层析分离后检测, 易于排除非糖脂类化合物的干扰, 实现特异性检测. 其缺点是对复杂物质的分离效果不理想, 因此, 高效薄层色谱法(high performance thin-layer chromatography, HPTLC)应运而生. 与常规 TLC 相比, HPTLC 所使用点样板的基质(一般为硅胶板)的硅胶粒拥有更小的颗粒半径和更好的粒度均匀度. HPTLC 采用了程序多级展开技术, 克服了因吸附剂颗粒小而造成的拖尾现象, 增加了样品在斑点中单位面积的浓度, 从而提高检出灵敏度. 此外, HPTLC 不仅拥有更高的精密度和分离能力, 还拥有点样用量较小的优势. 近 10 年来, 随着人们对 TLC 在缩短分离时间、提高检测灵敏度、加强分离效率、改进定量精度以及扩大应用范围等方面研究的深入, TLC 技术取得了巨大进展, 但是其难以进行定量检测的缺点仍旧制约着 TLC 技术的广泛应用. 因此, 出现了将 TLC/HPTLC 与质谱(mass spectrometry, MS)技术联用的研究方法, 通过薄层色谱和质谱技术的直接联用(TLC-MS), 不需要通过经进一步的纯化, 就能够得到被检测物的相对分子质量和其结构信息^[10].

通过对 TLC-MS 方法的改进, Park 等^[11]首次将液相抽提表面分析技术(liquid extraction surface analysis, LESATM)和 TLC-MS 技术平台, 与电喷雾电离-QSTAR 脉冲 i 四级正交-飞行时间-质谱联用, 而实现了对牛脑酸性糖鞘脂的图谱式分析, 并对 TLC-MS 的条件参数进行优化. 结果表明, 不同条件参数下的 TLC-MS 分析不仅可以精确得出包含了神经节苷脂以及硫苷脂的牛脑酸性糖鞘脂的表达图谱, 还可分析得出样本中的中性糖鞘脂和鞘磷脂的图谱结构. 上述技术平台不仅应用到代谢产物、多肽、血液和组织样本中的分析^[12-16], 而且在分析糖鞘脂时也表现出了样本量需求少、分析物损失小、稳定性高以及能够分析复杂且脆弱样本的良好特性.

另外, 在适当标准品和溶剂的辅助下, HPTLC 不仅能够区分糖链部分结构的差别, 还可以分辨不同的脂肪链结构. Torretta 等^[17]利用 ImagePrep (Bruker Daltonics)设备系统, 建立了利用 HPLC 与基质辅助激光解吸电离质谱(matrix-assisted laser desorption ionization-MS, MALDI-MS)联用的高分辨率系统, 此系统可对含有不同脂肪链结构的糖鞘脂样品进行直接、准确的定量及定性分析. 与染色

和放射性标记方法的不同之处在于, 此方法可区分糖鞘脂不同变体的长、短脂肪链. 此方法将质谱技术与低成本、易于应用的 HPTLC 技术相结合, 为研究者提供了研究特定糖鞘脂存在 / 缺乏状态以及高 / 低表达的方法, 推进了人们正确理解糖鞘脂的生物学作用的进程.

2.2 高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC)

除上文所述的 TLC/HPTLC 技术外, 高效液相色谱法(HPLC)的兴起及其与质谱技术的联用也为糖鞘脂的研究提供了新的思路.

Ito 等^[18]使用高效液相色谱 - 电喷雾电离四极离子阱飞行时间 - 质谱(HPLC-electrospray ionization-quadrupole ion trap-Time of flight-MS, HPLC-ESI-QIT-TOF-MS)及多级串联质谱(MSⁿ)系统对人红细胞中所含 4 种中性糖鞘脂 (LacCer、Gb3Cer、Gb4Cer、IV³αGalNAc-Gb4Cer)进行了研究分析, 结果得到包含了一级、二级、三级质谱的正、负模式离子图谱. 其中, 由正相色谱柱 HPLC-MS 技术以阳离子模式 [M+Na]⁺ 和阴离子模式 [M-H]⁻ 检测上述 4 种糖鞘脂主要分子的相对分子质量, 由二级质谱(MS²)和三级质谱(MS³)检测上述 4 种糖鞘脂的寡糖序列. 然而, 质谱定量结果表明样本中 LacCer 的含量远高于 Gb4Cer, 这与先前所报道的在人红细胞中 Gb4Cer 含量大于 LacCer 的事实相反^[19], 说明了在 HPLC-MS 的定量过程中需要更加稳定的同位素标记的内参物. 与 Kushi 等^[20]所使用的反相柱不同, 该方法所使用的正向色谱柱不仅在上样量需求方面由 0.1 nmol 降至 0.01 nmol, 更能够分离检测出糖链结构以外的神经酰胺部分结构.

除 HPLC-MS 外, 超高效液相色谱法(ultra-high performance liquid chromatography, UHPLC)在近年进入人们的视线, 相比于 HPLC, UHPLC 因其工作硬件可以承受更高的系统压力, 使得 UHPLC 系统可以使用更高级的固相. 颗粒更小的固相不仅可以实现更高的分辨率, 还可大幅缩短分析时间. Moyano 等^[21]使用超高效液相色谱串联多级质谱(UHPLC-MS/MS)法, 对从野生型(WT)和芳香基硫酸酯酶敲除型(ASA-KO)小鼠脑中抽提的硫苷脂进行了定量分析. 结果表明, UHPLC-MS/MS 法在 5~1 000 nmo/L 和 10~1 000 nmo/L 的线性范围内分别对脂肪酸结构为 C18:0, C24:0 以及 C16:0, C24:1 的硫苷脂具有良好的精准度和准确性. 且在 ASA-KO 组中检测到了明显增高的各

种硫苷脂含量. 此研究为细胞或组织中糖鞘脂的代谢、脂筏相关通路以及定量研究奠定了基础.

2.3 质谱

从前文 2.1 和 2.2 中不难看出, 在对糖鞘脂的研究过程中, 无论是 TLC/HPTLC 还是 HPLC/UHPLC 技术, 都离不开与质谱技术的联合. 事实上, 正是质谱技术在近年来的飞速发展极大地拓宽了 TLC/HPTLC 与 HPLC/UHPLC 技术的应用面. 另外, 糖链结构的高度异质性及其广泛存在的同分异构体和研究者对定量分析能力更高层面的追求^[22], 使得质谱技术在糖鞘脂的研究中变得更加不可或缺. 现阶段对于细胞或组织样本中的糖鞘脂质谱分析手段已经得到较为深入的开发和成熟的发展. 总体来讲, 可分为对样本中完整糖鞘脂分子的研究和对糖鞘脂糖链部分的研究两大类.

对于完整糖鞘脂分子的研究技术流程较为统一. 一般来说, 在从组织或细胞样本中进行糖鞘脂的提取^[23]后, 可以分为使用正向色谱柱和反相色谱柱再进行 LC-ESI-MS/MS 分析两条途径. 正向色谱柱 LC-ESI-MS/MS 法在提取糖鞘脂样品时需将样品细胞或组织在一定比例的氯仿、甲醇、水, 或者一定比例的异丙醇、己烷、水中进行超声破碎释放粗脂类, 再在弱碱环境下进行皂化反应以除去甘油糖脂对结果的影响^[24], 进而使用氯仿、甲醇或 Folch 法提取分离糖鞘脂, 即可进行 LC-ESI-MS/MS 研究. 而对于反相色谱柱 LC-ESI-MS/MS 的研究途径, 则需要在超声处理后进行离子交换葡聚糖凝胶(diethylaminoethyl dextran gel, DEAE-dextran gel)柱的分离纯化, 再进行反相色谱柱 LC-ESI-MS/MS 并加以质谱多反应监测技术(multiple reaction monitoring, MRM)以实现糖鞘脂的量化研究. Ikeda 等^[25]利用此方法成功量化研究了小鼠大脑中提取的神经节 - 系列糖鞘脂以及硫苷脂.

而针对糖鞘脂糖链部分的研究, 主要难点在于如何从糖鞘脂分子上分离头部的糖链. 对糖链部分的单独研究, 可以减少结构复杂而多变的神经酰胺异质性的影响^[9]. 通过酶消化法或化学消化法, 可将多糖从糖鞘脂分子上脱离下来. 酶促反应中使用了神经酰胺多糖内切酶(EC 3.2.1.123), 这种从特定的无脊椎动物和细菌中提取的酶^[26-27]可以打断连接神经酰胺和多糖之间的糖苷键, 释放糖链. 此方法不仅能单独研究糖链结构, 也可以排除糖链的干扰, 便于对神经酰胺部分进行脂质组学研究. 化学消化法则是将糖鞘脂通过臭氧氧化处理, 或钨催化的

高碘酸氧化作用以打断鞘氨醇的 C=C 键, 然后用碱处理法进行 β 消除反应^[28-31], 从而实现多糖的释放. 基于 β 消除反应的化学消化法的最大优点在于其实现了对含 C=C 糖鞘脂糖链的非特异性释放. 近年来出现了关于改进化学消化法的报道, Song 等^[32]开发了一种使用中性缓冲液释放糖鞘脂糖链的方法, 其方法是将浓度为 1~10 g/L 的糖鞘脂在一定比例的氯仿/甲醇混合液中经过臭氧处理, 再在中性反应缓冲液中(pH 6.0~8.0)进行纯化处理即可实现糖鞘脂糖链的释放. 所使用的主要成分有磷酸盐、Tris、碳酸铵以及乙酸铵. 这种方法不仅避免了使用碱处理法时产生剥皮反应所带来的副产物, 也对接下来的荧光基团标记、全甲基化、质谱分析等后续糖组学研究打下了坚实的基础.

2.4 生物芯片

尽管在 HPLC、凝集素亲和层析^[33]以及质谱领域都出现了关于糖组学研究的报道, 但是对于细胞、组织或器官中糖组的完全探求仍然非常困难.

生物芯片作为一种新兴的生物技术手段, 在近十年来发展迅速, 成为了研究蛋白质、核酸等生物分子的重要手段, 生物芯片具有高通量、微型化、自动化等优点, 极大地提高了研究效率. 糖芯片作为生物芯片的一类, 其原理是将多种糖链以可溶的方式固定在芯片表面, 作为特异性识别糖结合蛋白(carbohydrate-binding proteins, GBPs)的探针, 通过比较在芯片上所结合不同 GBPs 的信号强度来得出其特异性的强弱. 以此原理为基础, 研究者做出了一些改进, 达到了以糖鞘脂为研究对象的生物芯片研究.

Song 等^[29]将从细胞、组织或器官样本中提取并经过臭氧氧化处理的 GSLs 与一种含有衍生化 2-氨基苯甲酰胺基团的异源双功能荧光染料进行共价结合, 再用多维色谱技术对其进行定量和探针在介质表面的固定, 成功开发了糖鞘脂鸟枪芯片(GSL shotgun microarrays). 而后可选择使用与糖鞘脂糖链能够特异性结合的分子如毒素、抗体或凝集素等进行孵育反应, 即可得出所检测糖鞘脂的糖链图谱. 这也是对具有亲水脂性糖鞘脂分子的首次生物芯片领域的应用. 另外, 利用上述方法, 也可对从糖蛋白上分离得到的 N-糖链或者 O-糖链进行糖组学研究^[34].

糖脂可以作为研究糖类或糖-蛋白质反应的有效工具. Liu 等^[35]基于拟糖脂(neoglycolipid, NGL)

技术开发了一套特殊的糖芯片系统, 该系统原理是从糖蛋白中分离出或人工合成的寡糖与脂类进行还原胺化作用或脲链接反应而形成脂质链接的寡糖探针, 可以与糖结合蛋白发生特异性结合.

3 糖鞘脂在癌症等疾病中的生物学作用研究

分布于细胞膜外层的糖鞘脂往往能够与细胞外环境进行直接接触^[3], 因而在诸多疾病中, 都有糖鞘脂异常表达的报道^[36-43], 如癌症、神经心血管疾病、脂质贮积病、代谢综合征等. 癌症作为对人类健康威胁最大的疾病, 其在糖鞘脂方面的研究是新兴的热点之一.

3.1 糖鞘脂在癌症中的研究进展

3.1.1 岩藻糖基化的糖鞘脂丰度升高是癌症的一个早期现象

长期以来对癌症的研究表明几乎所有人类癌症都伴随着异常糖基化的发生^[44]. 在临床病理学研究中, 某些糖基化表位的异常表达影响了肿瘤的侵袭性和远端转移能力, 这常常与癌症病人的存活率有密切关联. 在多种癌症^[45-50]中, 均已有些糖鞘脂异常累积的报道, 如肝癌、结直肠癌、肾癌乳腺癌及髓性白血病等. GM2、LacCer、Globo-H 和 GD2 等糖鞘脂的异常表达会干扰肿瘤细胞的黏附和信号转导, 从而导致肿瘤细胞运动能力和侵袭力的增强^[51-53]. 对于调控这些糖鞘脂的糖基转移酶和水解酶的活性调节则会显著影响肿瘤细胞的生长^[54], 因此出现了一些针对关键酶的治疗手段. 但由于糖鞘脂合成通路的复杂性和对糖鞘脂的代谢相关知识的缺乏, 以及在肿瘤微环境中其他多种环境因素的改变, 使得癌症具体发病机制仍然是难以解答的.

Zhu 等^[46]利用 ESI-LTQ-MS 技术和 LC/ESI-MS/MS 技术对比了在人乳腺癌组织及其配对癌旁组织中异常表达的糖鞘脂结构. 结果发现, 人乳腺癌组织中异常上调的中性糖鞘脂有 LacCer (m/z 1010.8, 1122.8)、Globo-H(m/z 1838.1, 1950.5)、Fuc-LacCer (m/z 1184.8, 1296.6), 异常下调的有 GlcCer (m/z 806.7, 918.8)和 Gb3 (m/z 1214.9, 1326.9). 通过多种乳腺癌细胞系与其他几种癌症细胞系异常表达的糖鞘脂相对比, 发现 Fuc-LacCer 为乳腺癌中特异性异常表达的糖鞘脂结构. 为了进一步研究乳腺癌的发病机理, 作者在 siRNA 干扰盐藻糖基转移酶 1 (fucosyltransferase, FUT1)表达水平后的乳腺癌细胞系 MDA-MB-453 中检测到了明显下调的 Globo-H 和 Fuc-LacCer 结构, 因此 FUT1 被认为是

影响合成 Globo-H 和 Fuc-LacCer 的关键酶。Holst 等^[45]通过 MALDI-TOF-MS 技术, 在人结直肠癌组织中发现了岩藻糖基化糖鞘脂结构上调, 而乙酰化和硫酸化糖鞘脂表达下调。与癌旁组织相比, Zhu 等^[48]在肝癌组织中发现了某些异常高表达的岩藻糖基化糖鞘脂。其中有 7 种糖鞘脂糖链的末端含有 Fuc α 1-2Gal- 结构。尤其是 Globo-H, 可作为肝癌的潜在诊断标志物。目前虽未见关于 Globo-H 与甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP)作为肝癌临床诊断标志物的性能优劣之对比, 但 Wu 等^[55]对比了双唾液酸化 - 半乳糖化 - 红细胞糖苷脂(disialosyl-galactosyl-globoside, DSGG)、Gb2、岩藻糖基化 GM1 和 AFP 作为诊断标志物在肝癌临床样本中的检测灵敏度, 发现前三者均较 AFP 有 43.98% ~ 90.01% 的灵敏度提升, 这说明了糖鞘脂作为新型癌症临床诊断标志物的巨大潜力和可能性。

Cheng 等^[56]发现 Globo-H 在上皮细胞中可以诱导细胞迁移、细胞间 Ca²⁺ 的转移以及血管生成。且当与 Globo-H 相对丰度较低的乳腺癌组织相比较时, Globo-H 相对丰度较高的乳腺癌组织展现出了更高的致肿瘤性和血管生成密度。另外, 与相对应的正常细胞系相比, Globo-H 结构在多种上皮性肿瘤的癌症细胞系中也都有上调表达^[57-58]。无独有偶, Globo-H 与 Fuc-LacCer 两种糖鞘脂都含有末端为 Fuc α 1-2Gal- 的糖链结构。因此, 岩藻糖基化的发生被认为是癌症的一个早期现象^[59]。由此可见, 岩藻糖化的 Globo-H 不仅在多种癌症中具有成为肿瘤早期标志物的潜力, 还在促血管生成方面发挥了作用。

有报道^[60], 在 NOD/SCID 小鼠体内使用 siRNA 抑制 FUT1 和 FUT2 的表达以降低岩藻糖与特定阶段胚胎抗原 3(stage-specific embryonic antigen-3, SSEA-3)的 α -1, 2- 连接, 从而阻碍 Globo-H 的合成, 并且观察到被抑制的 FUT1 和 FUT2 减缓了乳腺癌干细胞的生长。另外, 基于 Globo-H、SSEA3、SSEA-4 为靶标的癌症疫苗也被报道^[58, 61-62]。因此, Globo-H 是一个理想的癌症检测 / 治疗双重靶标。可以利用此现象对癌症的发病机制以及早期诊断进行更加深入的研究。

3.1.2 多数肿瘤细胞糖鞘脂促进血管生成作用

血管生成在胚胎发育、脉管系统的形成、伤口的愈合和女性经期子宫内膜修复等过程中是不可缺少的一个环节^[63-64]。如若对血管生成缺乏调控, 则会引起血管疾病、肿瘤生长、关节炎和其他一些

炎症。

在肿瘤细胞中, 血源性营养物质由血管输送, 因而血管的生成对于肿瘤的生长和生存是极其重要的。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是一种对于血管内皮细胞具有很强特异性的促细胞分裂素, 它在体内能介导血管生成以及血管透化作用, 并在血管生成的过程中起到了重要的调控作用^[65]。当致癌基因被激活后, *ras*/MAPK 信号通路便会增强编码 VEGF 的 mRNA 表达^[66]。在肿瘤细胞和外皮细胞中穿膜而出进入肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)的 VEGF 与其受体血管内皮生长因子受体 2(vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGF2)结合, 激活了内皮细胞中 PI3K、FAK、Erk1/2 等众多信号通路^[67], 其结果是血管外纤维蛋白凝胶的形成^[68], 这为血管内皮细胞以及肿瘤细胞的生成提供了温床, 最终导致了生长中的肿瘤细胞向基质中的侵入。

一些糖鞘脂在肿瘤远端转移和血管生成过程中起到了重要作用。从肿瘤细胞表面脱落的神经节苷脂分布在肿瘤微环境中, 因此有大量的报道显示癌症病人血清中的神经节苷脂含量有急剧升高^[69]。这些脱落的神经节苷脂具体是如何促进血管生成作用的, 人们尚且未知。关于具体机制的假说有两种^[69](图 1a~c)。一是认为在血管生成过程中, 糖鞘脂与 VEGF 等生长因子以及细胞因子在质膜上均有各自的受体。第二种假想则认为神经节苷脂在微环境中并非参与反应的类细胞因子, 而是作为共受体或调控子来实现对其他生长因子受体的调控。

在第一种假说中, 糖鞘脂在质膜上与其受体及其他组分相互识别、结合而形成了信号转导复合体, 与免疫突触类似, 此种微结构域被命名为糖突触(glycosynapse)。糖突触与脂筏微结构域在组分、理化特性以及生物学作用上都存在较大的区别(表 1)。糖突触以两种假想的工作模式^[70-71]影响着细胞的黏附、信号转导等糖相关的生命活动, 从而实现了对血管生成作用的调控。这两种可能的糖突触结构模式分别为: a. 糖鞘脂在质膜表面聚集成群, 组成“糖鞘脂罩(GSL patch)”贴覆于质膜表面, “糖鞘脂罩”的神经酰胺部分插入磷脂双分子层外叶, 与薄质中的信号传感器(transducer, TD) TDa 与 TDb、PL 跨膜四蛋白交联体(PL tetraspanin, PLTsp)以及生长因子受体(growth factor receptor, GFR)组合成为糖突触, 从而调控血管生成作用。b. 以整合素与含有 α 和 β 2 个亚基的整合素受体(integrin

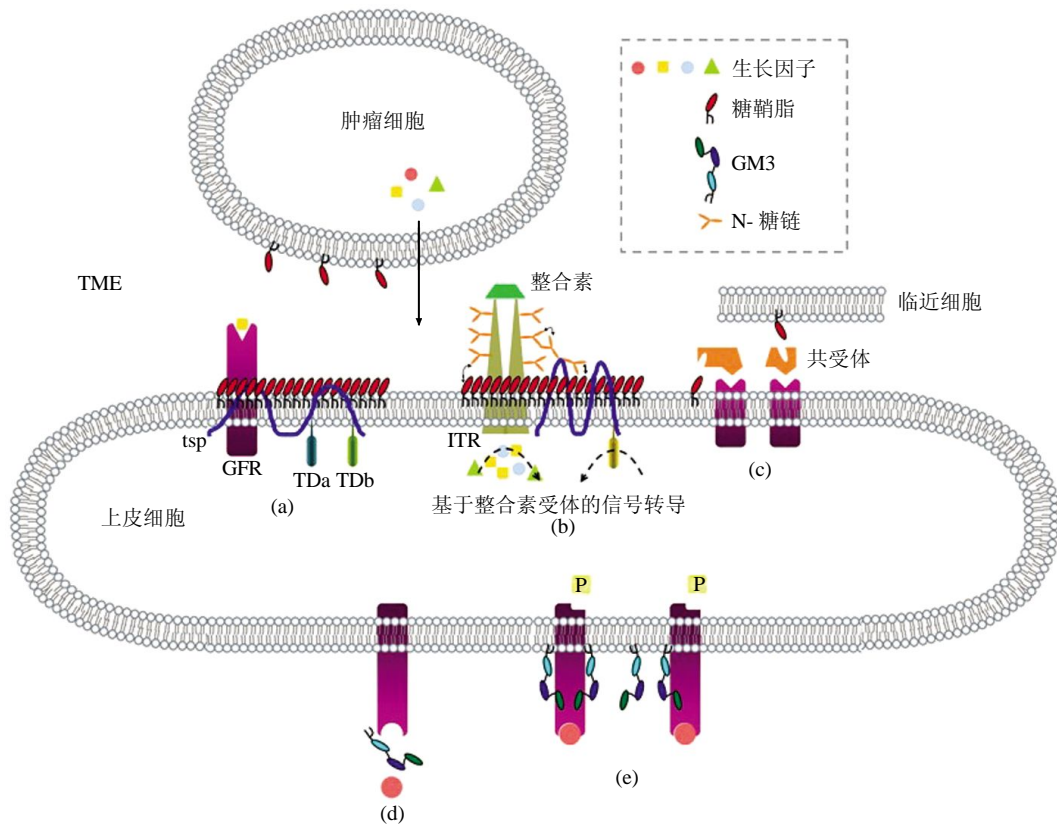


Fig. 1 Hypothetical schematic of GSLs induce/inhibit angiogenesis in TME

图 1 糖鞘脂在肿瘤微环境中促进/抑制肿瘤生成作用假说示意图

糖鞘脂在肿瘤微环境中影响血管生成作用的几种假说. (a) 糖鞘脂在细胞膜表面聚集成为“糖鞘脂罩”, 并与 tsp, GFR, TDa, TDb 组成“糖突触”, 促进血管生成作用. (b) 糖鞘脂在细胞膜表面聚集成为“糖鞘脂罩”, 与整合素及 ITR, tsp, TD 组成“糖突触”, 该微结构域中 N-糖链在信号传导过程中起重要作用. (c) 糖鞘脂与 GFR 作为生长因子的共受体在自身或临近细胞上促进血管生成作用. (d) GM3 通过直接阻碍生长因子与其受体的结合起到抗血管生成的作用. (e) GM3 在质膜上的分布阻碍 GFR 的二聚化和自磷酸化, 从而起到抗血管生成的作用.

Table 1 Contrasting properties between lipid raft and "glycosynapse"

表 1 脂筏与“糖突触”的特征对比

脂筏	糖突触
直径约为 10~100 nm	直径约为 500~1000 nm
机动性高	机动性较低, 甚至不具备机动性
不可溶于 1% Triton X-100	可溶于 1% Triton X-100
不依赖跨膜四蛋白交联体	高度依赖跨膜四蛋白交联体
不参与细胞黏附	参与细胞黏附

脂筏微结构与“糖突触”理化特性的巨大差异导致它们在生物学功能上存在较大差别.

receptor, ITR), 以及跨膜四蛋白交联体和周围环境中的神经节苷脂为主要组件组成此类糖突触.

ITR 和跨膜四蛋白交联体上的 N-糖链对 $\alpha 5$ -和 $\beta 1$ -亚基的链接及稳定性, 以及对 ITR 与跨膜四蛋白交联体的相互作用是至关重要的. 一些跨膜四蛋白交联体(如 CD9)与 ITR 的相互作用则需要某些神经节苷脂的存在^[72], 通过这些神经节苷脂的糖链结构与 ITR 的 α 、 β 亚基上的 N-糖链(如神经节苷脂 GT1b 与 $\alpha 5\beta 1$ 亚基的核心岩藻糖结构相互识别)和跨膜四蛋白交联体上的 N-糖链低相互识别, 以达成糖鞘脂对细胞黏附、血管生成等生命过程的影响.

第二种假说则认为, 糖鞘脂, 尤其是神经节苷脂可能会与配体结合而阻碍生长因子与其配体的结合. 如 GM3 通过与成纤维细胞生长因子受体 (fibroblast growth factor receptor, FGFR) 结合而分

别阻碍了成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)与其受体的结合,以抑制细胞的黏附和血管生成作用.另外,糖鞘脂在胞膜表面作为共受体时,也可以通过结合配体的不同部位来实现对配体-受体结合的促进或抑制.例如,FGF在与其受体连接时的必要辅助物是硫酸乙酰肝素蛋白多糖^[73-74],不能合成硫酸乙酰肝素蛋白多糖的细胞就无法响应FGF的结合.Rusnati等^[75]证实了外源性的GM1作为共受体,将处于同一细胞或两相邻细胞之间的FGF与FGFR呈递在一起.此过程通过模仿硫酸乙酰肝素蛋白多糖呈递FGF的过程,弥补了硫酸肝素缺陷型细胞与FGF2的结合能力.

总的来讲,糖鞘脂并非直接诱导血管生成,而是通过与VEGF、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、血小板源生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)、血小板内皮细胞黏附分子1(platelet endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM-1)^[59]、FGF^[76-77]、前列腺素E1^[78-79]以及Cu²⁺^[80]等多种因素协同作用影响着血管生成.而对糖鞘脂在肿瘤微环境中的具体功能和作用机制,还需研究者的进一步发掘.

3.1.3 GM3: 最简单却最重要的例外

前文综述了一些对血管生成、血管透明化、细胞迁移等癌症发生发展过程有促进作用的糖鞘脂和其可能的机理.然而,GM3作为一种结构最为简单,且在动物细胞膜中大量存在的神经节苷脂,对于癌症的形成与发展却有着与多数糖鞘脂完全相反的抑制作用.

对于GM3在细胞及病理表型方面的探索起步很早.早在20世纪60年代,研究者就在经致癌病毒转化的细胞发现了表达量明显降低的神经节苷脂GM3及其前体LacCer^[81];而编码GM3合成酶——LacCer α 2, 3-唾液酸转移酶的mRNA也在经肿瘤蛋白v-Jun转化的禽类和哺乳动物细胞中检测为下调表达;与此同时,使编码GM3合成酶的mRNA人为地在上述细胞中提高表达量则会导致已癌变的细胞发生向正常细胞表型的逆转现象^[82].这是人们对癌症细胞病理表型中糖鞘脂变化认识的开端.随后在20世纪90年代,Gullino等^[80, 83]通过细胞增殖试验和细胞黏附试验发现,GM3在体外(人神经母细胞瘤细胞系)和体内(兔角膜)相对浓度的变化,会通过影响微血管内皮细胞的运动能力和一些细胞因子的活性来激活或抑制血管生成作用.近十年来,GM3对于血管生成的抑制作用亦有报

道^[84],如Mukherjee等^[85]在人脐静脉内皮细胞和BALBc/J-SCID小鼠体内,首次发现GM3(而非GM3与GD1a)通过与血管内皮生长因子受体2(vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2)结合(图1d),阻挡VEGF与VEGFR2的结合而降低其磷酸化程度并抑制Akt信号通路下游,从而抑制了血管生成作用.

另外有一种假说,其原理基于表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)与血小板源生长因子受体(platelet-derived growth factor receptor, PDGFR)的细胞间信号识别、自磷酸化以及活性的激活需要其自身成为二聚体形式^[86]为前提.而GM3可能通过EGFR以及PDGFR的结合而阻碍了它们自发的二聚体化过程(图1e),所以即使EGFR与PDGFR能够与其配体结合,但被阻挡的自磷酸化仍然成为了抑制血管生成的主要因素.从动力学角度讲,GM3与EGFR的亲合常数为2 $\mu\text{mol/L}$,而EGFR的二聚体化亲合常数为2.4 $\mu\text{mol/L}$,相似的亲合常数也说明了GM3可能是EGFR二聚体化的竞争性抑制剂^[87-88].

数十年来的研究表明,GM3作为一种结构最简单的神经节苷脂,在抗血管生成作用中起到了不可替代的重要作用.然而,GM3在TME中抗血管生成的具体机制以及为何其他同样拥有一个或更多唾液酸的较为复杂的神经节苷脂不能抑制血管生成作用,甚至某些神经节苷脂,如GD1a^[89],还具有促进血管生成的功效,还需人们的进一步研究来解答.尽管如此,GM3能够抑制血管生成的特性在针对肿瘤发展、转移和血管生成方面的靶向治疗中存在巨大的潜力.

3.1.4 糖鞘脂正逐渐成为新的癌症治疗靶标之一

在不同癌症的不同病理分期以及病理分型之间,既有相同的表达水平异常的糖鞘脂结构,也有较为特异性的异常表达的糖鞘脂.而研究者不仅能够将其能发生特异性识别并结合的分子,如与其互补的糖鞘脂、凝集素:包括半乳凝素(galactin)^[90]、选凝素(selectin)^[91]、涎免凝集素(siglec)^[92]以及抗体等作为探针对这些异常表达的糖鞘脂进行定性和定量检测,以达到癌症早期诊断、病理分期/分型的目的,还可以以这些糖鞘脂作为干预治疗的靶点进行治疗手段和靶向药物的开发.

从神经酰胺到单糖与神经酰胺组成的简单糖鞘脂,再到由多个单糖组成的结构复杂且多样化的糖鞘脂,糖鞘脂的合成经过了一系列的合成以及糖基

转移反应(图 2). 近年来, 研究者从糖鞘脂的合成途径中寻找靶向治疗的突破口. 其中有一部分的研究已经证明, 通过干扰合成途径中关键酶的表达均

能够在体外及体内明显改善肿瘤细胞的增殖、远端转移以及血管生成作用.

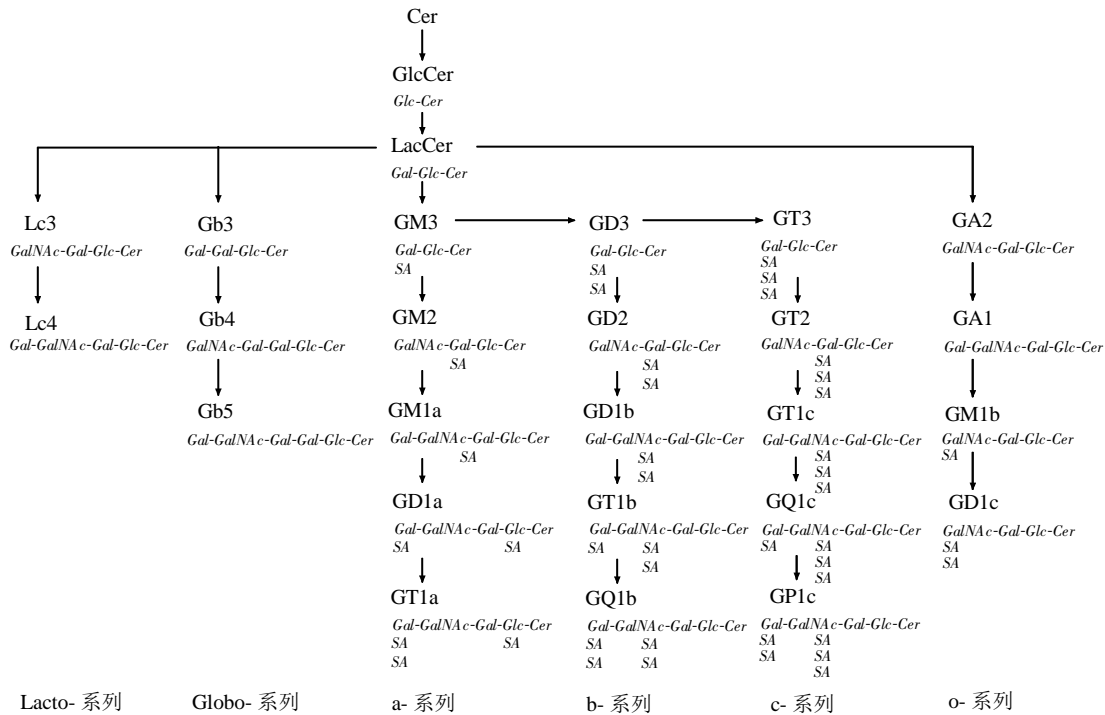


Fig. 2 Schematic of GSL synthesis

图 2 糖鞘脂合成通路示意图

a- 系列、b- 系列、c- 系列、o- 系列、Lacto- 系列和 Globo- 系列中部分常见糖鞘脂的结构及其在糖鞘脂合成通路中的位置. 其中, Cer 为神经酰胺结构, SA 为唾液酸, G 表示神经节苷脂, M、D、T、Q、P 分别表示该糖鞘脂分子中含有 1, 2, 3, 4, 5 个唾液酸, a, b, c 等下标表示在同分异构体中唾液酸与糖链的不同连接位置.

Kolmakova 等^[93]发现 $\beta 1, 4\text{GalT-V}$ 在结肠癌内皮细胞中的表达较正常结肠组织内皮细胞高 4.5 倍, 该酶为结肠癌中上调表达 LacCer 的主要合成酶, 同时 LacCer 在体外和体内对 VEGF 诱导的血管生成都有显著的促进作用. 随后他们分别使用了 D- 苏式 -1- 苯基 -2- 癸酰基氨基 -3- 吗啉代 -1- 丙醇盐酸盐 (D-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol, D-PDMP), 和 D- 苏式 -1- 苯基 -2- 棕榈酰胺 -3- 吗啉代 -1- 丙醇盐酸盐 (D-threo-1-phenyl-2-palmitoylamino-3-morpholino-1-propanol, D-PPMP) 进行体外和体内的干预治疗. D-PDMP 为一种 GlcCer 合成酶(尿苷二磷酸葡萄糖神经酰胺葡萄糖基转移酶)^[47]与 LacCer 合成酶的抑制剂, D-PPMP 为一种特异性更强的 GlcCer 合成酶抑制剂, 结果发现两者均对 LacCer 所诱导的血管生成作用产生了显著的抑制作用.

有趣的是, VEGF 与 LacCer 并不能在无内源

性表达 PECAM-1 的人间皮瘤细胞中刺激血管的生成, 但在有 PECAM-1 表达的人间皮瘤细胞中, VEGF 与 LacCer 均诱导了 PECAM-1 的表达并且刺激血管的生成. 这一结果与 3.1.2 所述神经节苷脂需要与 VEGF、PECAM-1 等多种因子协同作用影响血管生成的结论相一致.

在糖鞘脂合成通路中, 不仅有上述使用化学抑制剂以抑制糖鞘脂合成酶的报道, 还可以通过干扰相应合成酶的 mRNA 来实现糖鞘脂合成量的减少. Rajesh 等^[94]使用 siRNA 对编码 $\beta 1, 4\text{GalT-V}$ 的 mRNA 进行干扰, 也在一定程度上抑制了人主动脉内皮细胞(human aortic endothelial cells, HAEC)中的血管生成. 另外, 糖鞘脂糖链结构的生物物理学特性可以使用与其异性识别的抗体^[95]或凝集素^[96]以降低糖鞘脂在 TME 中促血管生成功效的发挥效率.

3.2 其他疾病的糖鞘脂研究进展

前文主要综述了糖鞘脂在癌症中的研究进展,

在其他疾病如神经性疾病、心血管疾病等疾病中，也有相对较为深入的报道。

Patzel 等^[97]使用反向 C18 柱 HPLC 对遗传性包涵体肌病患者的血浆和成纤维细胞中的糖鞘脂进行全面分析，结果表明中性与酸性糖鞘脂均有明显的丰度提升。Dodge 等^[98]使用正相柱 LC-MS/MS 系统，在患有肌萎缩性脊髓侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)病人脊髓灰质和脊髓白质样本中检测到了明显表达上调的 Cer、GlcCer、GalCer、LacCer、GL3、GM3 和 GM1。另外，通过对特定酶活性的检测，在 ALS 患者组织样本以及 SOD1G93A 小鼠(ALS 的一种遗传性模型小鼠)体内均发现了葡糖脑苷脂酶 1、葡糖脑苷脂酶 2、己糖苷酶、半乳糖神经酰胺酶、 α -半乳糖苷酶和 β -半乳糖苷酶等调控糖鞘脂水解过程关键酶的活性有 3 倍或 3 倍以上的上调。沿此思路，通过对

SOD1G93A 小鼠分别进行 GlcCer 合成的抑制和 GM3 的缓慢灌注，发现对 GlcCer 合成的抑制明显加速了 SOD1G93A 小鼠的疾病发展，而 GM3 的缓慢灌注则明显延缓了 SOD1G93A 小鼠的疾病发展，说明在 ALS 小鼠体内 GlcCer 的积累，以及己糖苷酶活性提升所导致的 GM3 合成量增加可能都是一种延缓疾病发展的代偿性反应。

上述研究证明了糖鞘脂的异常表达在 ALS 中起到的重要作用。此外，糖鞘脂在其他一些神经肌肉疾病^[99-101]的发病机理与调控神经酰胺和糖鞘脂代谢的基因突变有着密不可分的关系。如 I 型遗传性感觉神经病、肌肉萎缩、遗传性痉挛性截瘫等。文中提及的各类疾病中糖鞘脂异常表达信息总结于表 2。糖鞘脂的研究对这些疾病的诊断和治疗都提供了新的方法和思路。

Table 2 Aberrant GSLs in diseases mentioned in this review

表 2 文中所提及疾病异常表达糖鞘脂信息总览

疾病类型	研究样本	研究技术	异常上调表达的糖鞘脂	异常下调表达的糖鞘脂	参考文献
结直肠癌	结直肠癌患者的癌组织与癌旁组织	MALDI-TOF-MS	岩藻糖基化糖鞘脂	硫酸化糖鞘脂、乙酰化糖鞘脂、双唾液酸化神经节苷脂	[45]
肝癌	肝癌患者的癌组织与癌旁组织	MALDI-TOF-MS	岩藻糖基化糖鞘脂、Gb3	Gb4	[46]
肾癌	注射鼠肾癌细胞 BALB/c 小鼠的癌组织与癌旁组织	LC-ESI-MS/MS	LacCer	—	[47]
乳腺癌	乳腺癌患者的癌组织与癌旁组织	ESI-LTQ-MS LC-ESI-MS/MS	Fuc-LacCer、Globo-H	—	[48]
乳腺癌	乳腺癌干细胞与非癌干细胞	ESI-MS HPTLC	GD2、GD3、GM2、CD1a	Gb3	[49]
急性髓性白血病	急性髓性白血病患者和健康志愿者的骨髓	ESI-LIT-MS/MS	GM3、Lc3、nLc4、Gb3	—	[50]
遗传性包涵体肌病	遗传性包涵体肌病患者与健康志愿者的成纤维细胞	NP-HPLC	GM2、GM3、Gb3、Gb4	—	[97]
肌萎缩性脊髓侧索硬化症	肌萎缩性脊髓侧索硬化症患者和健康志愿者的脊髓灰质和脊髓白质	HPLC-MS/MS	GlcCer、LacCer、GM1	—	[98]

表中信息为文中出现的有异常糖鞘脂表达疾病的研究信息，包括研究样本(实验组与对照组)、所使用研究技术及异常表达的糖鞘脂。

4 总结与讨论

本文主要综述了从糖鞘脂组学到某些特定的糖鞘脂在特定疾病中生物学功能的研究进展。从人们

对糖鞘脂结构的认知到糖鞘脂的合成、生物学功能以及在 TME 中的作用机制的探究，促进了糖组学和病理学的完整化进程。

纵观整个糖鞘脂研究的发展历史，不难看出，

对糖鞘脂分离、纯化和定性、定量分析技术的快速进步, 尤其是质谱技术的开发与多元化应用起到了至关重要的作用. 通过色谱与质谱技术的联合使用, 越来越多的糖鞘脂在生物体特定部位、生理以及病理状态下的结构与丰度变化的报道日益涌现. 这为临床研究者针对不同疾病、不同病理状况下所需要做出的应对措施提供了大量的理论依据和潜在的治疗靶标.

尽管涌现出了许多新方法、新思路和一些令人振奋的研究结果, 但是糖组和糖鞘脂组本身具有的高度复杂性仍然决定了研究者有大量困难需要克服. 如质谱技术成本高昂, 且难以获取准确而具体的糖链结构信息和糖苷键的连键方式, 此外, 细胞生物学与分子生物学的研究手段也亟待进步和拓展. 近几年的研究趋势是, 利用糖结合蛋白与固定在生物芯片表面的糖鞘脂探针技术相结合, 以此研究糖鞘脂的糖链结构. 这一定程度上提高了糖鞘脂结构探究的效率和广泛性, 为研究糖鞘脂在细胞间的识别、信号转导和与其他生物分子相互作用机制提供了一定的新思路.

对于糖鞘脂在癌症等疾病中生物学作用以及其作为新兴治疗靶标的研究, 目前正处于一个由结构探究和病理/细胞表型分析向具体生物学作用机制及信号通路研究的转变. 在此过程中, 对糖鞘脂的生物物理学特性的理解和对合成通路的掌握^[102]起到了指导性、决定性作用. 可以预见的是, 在未来一段时间, 基于糖鞘脂合成通路寻找潜在药物治疗靶点的报道会越来越多, 越来越可靠. 但是合成通路、信号通路以及效应分子作用机制的复杂性会在一定程度上使一条通路在被抑制, 取得短暂治疗效果的同时激活其他一条甚至多条通路, 尤其是在以抑制血管生成为目的的靶向治疗当中, 血管本身的多样性和其在 TME 中易于重新组装的特性^[103], 会极大地削弱单一靶向治疗的效果, 甚至使血管上皮细胞产生耐药性^[104]. 为了应对这一现象, 未来癌症靶向治疗的发展趋势将会由单一靶标、基于糖鞘脂合成通路的靶向治疗向多途径、多靶标、综合考虑糖鞘脂的合成和分解代谢途径的联合治疗手段过渡.

参 考 文 献

- [1] 李铮. 糖组学研究技术. 北京: 高等教育出版社, 2015: 2
Li Z. Technology for Glycomics. Beijing: Higher Education Press, 2015: 2
- [2] Cummings R D, Pierce J M. The challenge and promise of glycomics. *Chem Biol*, 2014, **21**(1): 1–15
- [3] Hakomori S. Structure, organization, and function of glycosphingolipids in membrane. *Current Opinion in Hematology*, 2003, **10**(1): 16–24
- [4] 王艳萍, 王 征, 朱 健, 等. 鞘糖脂研究进展. *生命科学*, 2011, **23**(6): 583–591
Wang Y P, Wang Z, Zhu J, *et al.* *Chin Bull Life Sci*, 2011, **23**(6): 583–591
- [5] 朱 峰, 吴雄宇, 林永成. 鞘糖脂的合成研究进展. *有机化学*, 2002, **22**(11): 817–826
Zhu F, Wu X Y, Lin Y C. *Chin J Org Chem*, 2002, **22**(11): 817–826
- [6] Yu X, Feizpour A, Ramirez N G, *et al.* Glycosphingolipid-functionalized nanoparticles recapitulate CD169-dependent HIV-1 uptake and trafficking in dendritic cells. *Nat Commun*, 2014, **20**(5): 413–441
- [7] Wührer M. Glycomics using mass spectrometry. *Glycoconj J*, 2013, **30**(1): 11–22
- [8] Zoldos V, Horvat T, Lauc G. Glycomics meets genomics, epigenomics and other high throughput omics for system biology studies. *Curr Opin Chem Biol*, 2013, **17**(1): 34–40
- [9] Furukawa J, Fujitani N, Shinohara Y. Recent advances in cellular glycomics analyses. *Biomolecules*, 2013, **3**(1): 198–225
- [10] Lee C S, Kim Y G, Joo H S, *et al.* Structural analysis of lipid A from *Escherichia coli* O157:H7:K- using thin-layer chromatography and ion-trap mass spectrometry. *J Mass Spectrom*, 2004, **39**(5): 514–525
- [11] Park H, Zhou Y, Costello C E. Direct analysis of sialylated or sulfated glycosphingolipids and other polar and neutral lipids using TLC-MS interfaces. *J Lipid Res*, 2014, **55**(4): 773–781
- [12] Walworth M J, Stankovich J J, Van Berkel G J, *et al.* Hydrophobic treatment enabling analysis of wettable surfaces using a liquid microjunction surface sampling probe/electrospray ionization-mass spectrometry system. *Anal Chem*, 2011, **83**(2): 591–597
- [13] Walworth M J, Elnaggar M S, Stankovich J J, *et al.* Direct sampling and analysis from solid-phase extraction cards using an automated liquid extraction surface analysis nanoelectrospray mass spectrometry system. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2011, **25**(17): 2389–2396
- [14] Morlock G, Ueda Y. New coupling of planar chromatography with direct analysis in real time mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 2007, **1143**(1–2): 243–251
- [15] Kertesz V, Van Berkel G J. Fully automated liquid extraction-based surface sampling and ionization using a chip-based robotic nanoelectrospray platform. *J Mass Spectrom*, 2010, **45**(3): 252–260
- [16] Jautz U, Morlock G. Efficacy of planar chromatography coupled to (tandem) mass spectrometry for employment in trace analysis. *J Chromatogr A*, 2006, **1128**(1–2): 244–250
- [17] Torretta E, Vasso M, Fania C, *et al.* Application of direct HPTLC-MALDI for the qualitative and quantitative profiling of neutral and acidic glycosphingolipids: the case of NEU3 overexpressing C2C12 murine myoblasts. *Electrophoresis*, 2014, **35**(9): 1319–1328

- [18] Ito E, Waki H, Miseki K, *et al.* Structural characterization of neutral glycosphingolipids using high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry with a repeated high-speed polarity and MSn switching system. *Glycoconj J*, 2013, **30**(9): 881–888
- [19] Sharom F J, Grant C W. A model for ganglioside behaviour in cell membranes. *Biochim Biophys Acta*, 1978, **507**(2):280–293
- [20] Kushi Y, Rokukawa C, Numajir Y, *et al.* Analysis of underivatized glycosphingolipids by high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometry. *Anal Biochem*, 1989, **182**(2): 405–410
- [21] Moyano A L, Li G, Lopez-Rosas A, *et al.* Distribution of C16:0, C18:0, C24:1, and C24:0 sulfatides in central nervous system lipid rafts by quantitative ultra-high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal Biochem*, 2014, **15**(467): 31–39
- [22] Muthing J, Distler U. Advances on the compositional analysis of glycosphingolipids combining thin-layer chromatography with mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev*, 2010, **29**(3): 425–479
- [23] Guan F, Handa K, Hakomori S I. Specific glycosphingolipids mediate epithelial-to-mesenchymal transition of human and mouse epithelial cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106** (18): 7461–7466
- [24] Merrill A H, Jr., Sullards M C, Allegood J C, *et al.* Sphingolipidomics: high-throughput, structure-specific, and quantitative analysis of sphingolipids by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Methods*, 2005, **36**(2): 207–224
- [25] Ikeda K, Shimizu T, Taguchi R. Targeted analysis of ganglioside and sulfatide molecular species by LC/ESI-MS/MS with theoretically expanded multiple reaction monitoring. *J Lipid Res*, 2008, **49**(12): 2678–2689
- [26] Li Y T, Ishikawa Y, Li S C. Occurrence of ceramide-glycanase in the earthworm, *Lumbricus terrestris*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1987, **149**(1): 167–172
- [27] Ashida H, Yamamoto K, Kumagai H, *et al.* Purification and characterization of membrane-bound endoglycosidase from *Corynebacterium* sp. *Eur J Biochem*, 1992, **205**(2): 729–735
- [28] Yowler B C, Stoehr S A, Schengrund C L. Oxidation and base-catalyzed elimination of the saccharide portion of GSLs having very different polarities. *J Lipid Res*, 2001, **42**(4): 659–662
- [29] Song X, Lasanajak Y, Xia B, *et al.* Shotgun glycomics: a microarray strategy for functional glycomics. *Nat Methods*, 2011, **8**(1): 85–90
- [30] Mylvaganam M, Meng L, Lingwood C A. Oxidation of glycosphingolipids under basic conditions: synthesis of glycosyl "serine acids" as opposed to "ceramide acids". Precursors for neoglycoconjugates with increased ligand binding affinity. *Biochemistry*, 1999, **38**(33): 10885–10897
- [31] Hakomori S I. Release of carbohydrates from sphingoglycolipid by osmium-catalyzed periodate oxidation followed by treatment with mild alkali. *J Lipid Res*, 1966, **7**(6): 789–792
- [32] Song X, Smith D F, Cummings R D. Nonenzymatic release of free reducing glycans from glycosphingolipids. *Anal Biochem*, 2012, **429**(1): 82–87
- [33] Fujii Y, Dohmae N, Takio K, *et al.* A lectin from the mussel *Mytilus galloprovincialis* has a highly novel primary structure and induces glycan-mediated cytotoxicity of globotriaosylceramide-expressing lymphoma cells. *J Biol Chem*, 2012, **287**(53): 44772–44783
- [34] Song X, Lasanajak Y, Xia B, *et al.* Fluorescent glycosylamides produced by microscale derivatization of free glycans for natural glycan microarrays. *ACS Chem Biol*, 2009, **4**(9): 741–750
- [35] Liu Y, Childs R A, Palma A S, *et al.* Neoglycolipid-based oligosaccharide microarray system: preparation of NGLs and their noncovalent immobilization on nitrocellulose-coated glass slides for microarray analyses. *Methods Mol Biol*, 2012, **808**(8): 117–136
- [36] Zamfir A D, Serb A, Vukeli Z, *et al.* Assessment of the molecular expression and structure of gangliosides in brain metastasis of lung adenocarcinoma by an advanced approach based on fully automated chip-nanoelectrospray mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2011, **22**(12): 2145–2159
- [37] Svennerholm L, Bostrom K, Fredman P, *et al.* Human brain gangliosides: developmental changes from early fetal stage to advanced age. *Biochim Biophys Acta*, 1989, **1005**(2): 109–117
- [38] Kovbasnjuk O, Mourtazina R, Baibakov B, *et al.* The glycosphingolipid globotriaosylceramide in the metastatic transformation of colon cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**(52): 19087–19092
- [39] Huang J Q, Trasler J M, Igdoura S, *et al.* Apoptotic cell death in mouse models of GM2 gangliosidosis and observations on human Tay-Sachs and Sandhoff diseases. *Hum Mol Genet*, 1997, **6**(11): 1879–1885
- [40] Fujiwaki T, Yamaguchi S, Tasaka M, *et al.* Application of delayed extraction-matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for analysis of sphingolipids in pericardial fluid, peritoneal fluid and serum from Gaucher disease patients. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2002, **776**(1): 115–123
- [41] Barbey F, Brakch N, Linhart A, *et al.* Cardiac and vascular hypertrophy in Fabry disease: evidence for a new mechanism independent of blood pressure and glycosphingolipid deposition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, **26**(4): 839–844
- [42] Ariga T, McDonald M P, Yu R K. Role of ganglioside metabolism in the pathogenesis of Alzheimer's disease—a review. *J Lipid Res*, 2008, **49**(6): 1157–1175
- [43] Aerts J M, Boot R G, Van Eijk M, *et al.* Glycosphingolipids and insulin resistance. *Adv Exp Med Biol*, 2011, **721**(7): 99–119
- [44] Pinho S S, Carvalho S, Marcos-Pinto R, *et al.* Gastric cancer: adding glycosylation to the equation. *Trends Mol Med*, 2013, **19**(11): 664–676
- [45] Holst S, Stavenhagen K, Balog C I, *et al.* Investigations on aberrant glycosylation of glycosphingolipids in colorectal cancer tissues using liquid chromatography and matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). *Mol Cell Proteomics*, 2013, **12**(11): 3081–3093

- [46] Zhu T, Xu L, Xu X, *et al.* Analysis of breast cancer-associated glycosphingolipids using electrospray ionization-linear ion trap quadrupole mass spectrometry. *Carbohydr Res*, 2015, **30** (402): 189–199
- [47] Chatterjee S, Alsaedi N, Hou J, *et al.* Use of a glycolipid inhibitor to ameliorate renal cancer in a mouse model. *PLoS One*, 2013, **8**(5): e63726
- [48] Zhu J, Wang Y, Yu Y, *et al.* Aberrant fucosylation of glycosphingolipids in human hepatocellular carcinoma tissues. *Liver Int*, 2014, **34**(1): 147–160
- [49] Liang Y J, Ding Y, Levery S B, *et al.* Differential expression profiles of glycosphingolipids in human breast cancer stem cells *vs.* cancer non-stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, **110** (13): 4968–4973
- [50] Wang Z, Wen L, Ma X, *et al.* High expression of lactotriaosylceramide, a differentiation-associated glycosphingolipid, in the bone marrow of acute myeloid leukemia patients. *Glycobiology*, 2012, **22**(7): 930–938
- [51] Vandermeersch S, Vanbeselaere J, Delannoy C P, *et al.* Accumulation of GD1alpha Ganglioside in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells Expressing ST6GalNAc V. *Molecules*, 2015, **20** (4): 6913–6924
- [52] Li M, Song L, Qin X. Glycan changes: cancer metastasis and anti-cancer vaccines. *J Biosci*, 2010, **35**(4): 665–673
- [53] Ando T, Ito H, Arioka Y, *et al.* Combination therapy with alpha-galactosylceramide and a Toll-like receptor agonist exerts an augmented suppressive effect on lung tumor metastasis in a mouse model. *Oncol Rep*, 2015, **33**(2): 826–832
- [54] Ersek A, Xu K, Antonopoulos A, *et al.* Glycosphingolipid synthesis inhibition limits osteoclast activation and myeloma bone disease. *J Clin Invest*, 2015, **125**(6): 2279–2292
- [55] Wu C S, Yen C J, Chou R H, *et al.* Cancer-associated carbohydrate antigens as potential biomarkers for hepatocellular carcinoma. *PLoS One*, 2012, **7**(7): e39466
- [56] Cheng J Y, Wang S H, Lin J, *et al.* Globo-H ceramide shed from cancer cells triggers translin-associated factor X-dependent angiogenesis. *Cancer Res*, 2014, **74**(23): 6856–6866
- [57] Eller C H, Chao T Y, Singarapu K K, *et al.* Human cancer antigen globo H is a cell-surface ligand for human ribonuclease 1. *ACS Cent Sci*, 2015, **1**(4): 181–190
- [58] Danishefsky S J, Shue Y K, Chang M N, *et al.* Development of Globo-H cancer vaccine. *Acc Chem Res*, 2015, **48**(3): 643–652
- [59] Birkle S, Zeng G, Gao L, *et al.* Role of tumor-associated gangliosides in cancer progression. *Biochimie*, 2003, **85**(3–4): 455–463
- [60] Chang W W, Lee C H, Lee P, *et al.* Expression of Globo H and SSEA3 in breast cancer stem cells and the involvement of fucosyl transferases 1 and 2 in Globo H synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(33): 11667–11672
- [61] Jeon I, Iyer K, Danishefsky S J. A practical total synthesis of globo-H for use in anticancer vaccines. *J Org Chem*, 2009, **74**(21): 8452–8455
- [62] Huang Y L, Hung J T, Cheung S K, *et al.* Carbohydrate-based vaccines with a glycolipid adjuvant for breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, **110**(7): 2517–2522
- [63] Noonan D M, Benelli R, Albini A. Angiogenesis and cancer prevention: a vision. *Recent Results Cancer Res*, 2007, **174** (1): 219–224
- [64] Chen W, Mao K, Liu Z, *et al.* The role of the RhoA/Rho kinase pathway in angiogenesis and its potential value in prostate cancer (Review). *Oncol Lett*, 2014, **8**(5): 1907–1911
- [65] Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J*, 1999, **13** (1): 9–22
- [66] Grugel S, Finkenzeller G, Weindel K, *et al.* Both v-Ha-Ras and v-Raf stimulate expression of the vascular endothelial growth factor in NIH 3T3 cells. *J Biol Chem*, 1995, **270**(43): 25915–25919
- [67] Nowicki T S, Zhao H, Darzynkiewicz Z, *et al.* Downregulation of uPAR inhibits migration, invasion, proliferation, FAK/PI3K/Akt signaling and induces senescence in papillary thyroid carcinoma cells. *Cell Cycle*, 2011, **10**(1): 100–107
- [68] Nakatake S, Yoshida S, Nakao S, *et al.* Hyphema is a risk factor for failure of trabeculectomy in neovascular glaucoma: a retrospective analysis. *BMC Ophthalmol*, 2014, **26**(14): 55–61
- [69] Dyatlovitskaya E V, Kandyba A G. Sphingolipids in tumor metastases and angiogenesis. *Biochemistry (Mosc)*, 2006, **71** (4): 347–353
- [70] Mitsuzuka K, Handa K, Satoh M, *et al.* A specific microdomain ("glycosynapse 3") controls phenotypic conversion and reversion of bladder cancer cells through GM3-mediated interaction of alpha3beta1 integrin with CD9. *J Biol Chem*, 2005, **280** (42): 35545–35553
- [71] Hakomori S I. The glycosynapse. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**(1): 225–232
- [72] Ono M, Handa K, Sonnino S, *et al.* GM3 ganglioside inhibits CD9-facilitated haptotactic cell motility: coexpression of GM3 and CD9 is essential in the downregulation of tumor cell motility and malignancy. *Biochemistry*, 2001, **40**(21): 6414–6421
- [73] Shu C, Smith S S, Little C B, *et al.* Comparative immunolocalisation of perlecan, heparan sulphate, fibroblast growth factor-18, and fibroblast growth factor receptor-3 and their prospective roles in chondrogenic and osteogenic development of the human foetal spine. *Eur Spine J*, 2013, **22**(8): 1774–1784
- [74] Albrecht-Schgoer K, Schgoer W, Theurl M, *et al.* Topical secretoneurin gene therapy accelerates diabetic wound healing by interaction between heparan-sulfate proteoglycans and basic FGF. *Angiogenesis*, 2014, **17**(1): 27–36
- [75] Rusnati M, Urbinati C, Tanghetti E, *et al.* Cell membrane GM1 ganglioside is a functional coreceptor for fibroblast growth factor 2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**(7): 4367–4372
- [76] Xiao L, Yang S, Hao J, *et al.* Endostar attenuates melanoma tumor growth via its interruption of b-FGF mediated angiogenesis. *Cancer Lett*, 2015, **359**(1): 148–154
- [77] Kim B S, Park J Y, Kang H J, *et al.* Fucoidan/FGF-2 induces

- angiogenesis through JNK- and p38-mediated activation of AKT/MMP-2 signalling. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, **450**(4): 1333-1338
- [78] Takeda S, Tanigawa T, Watanabe T, *et al.* Reduction of prostaglandin transporter predicts poor prognosis associated with angiogenesis in gastric adenocarcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*, 2015, **6**(10): 1111
- [79] Ling L, Zhang S, Ji Z, *et al.* Therapeutic effects of lipo-prostaglandin E1 on angiogenesis and neurogenesis after ischemic stroke in rats. *Int J Neurosci*, 2015, **22**(5): 1-20
- [80] Gullino P M, Ziche M, Alessandri G. Gangliosides, copper ions and angiogenic capacity of adult tissues. *Cancer Metastasis Rev*, 1990, **9**(3): 239-251
- [81] Hakomori S I, Murakami W T. Glycolipids of hamster fibroblasts and derived malignant-transformed cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1968, **59**(1): 254-261
- [82] Mora P T, Brady R O, Bradley R M, *et al.* Gangliosides in DNA virus-transformed and spontaneously transformed tumorigenic mouse cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1969, **63**(4): 1290-1296
- [83] Alessandri G, Cornaglia-Ferraris P, Gullino P M. Angiogenic and angiostatic microenvironment in tumors--role of gangliosides. *Acta Oncol*, 1997, **36**(4): 383-387
- [84] Hakomori S I, Handa K. GM3 and cancer. *Glycoconj J*, 2015, **32**(1-2): 1-8
- [85] Mukherjee P, Faber A C, Shelton L M, *et al.* Thematic review series: sphingolipids. Ganglioside GM3 suppresses the proangiogenic effects of vascular endothelial growth factor and ganglioside GD1a. *J Lipid Res*, 2008, **49**(5): 929-938
- [86] Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*, 1990, **61**(2): 203-212
- [87] Papini N, Anastasia L, Tringali C, *et al.* The plasma membrane-associated sialidase MmNEU3 modifies the ganglioside pattern of adjacent cells supporting its involvement in cell-to-cell interactions. *J Biol Chem*, 2004, **279**(17): 16989-16995
- [88] Meuillet E J, Kroes R, Yamamoto H, *et al.* Sialidase gene transfection enhances epidermal growth factor receptor activity in an epidermoid carcinoma cell line, A431. *Cancer Res*, 1999, **59**(1): 234-240
- [89] Lang Z, Guerrero M, Li R, *et al.* Ganglioside GD1a enhances VEGF-induced endothelial cell proliferation and migration. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, **282**(4): 1031-1037
- [90] Collins P M, Bum-Erdene K, Yu X, *et al.* Galectin-3 interactions with glycosphingolipids. *J Mol Biol*, 2014, **426**(7): 1439-1451
- [91] Shirure V S, Henson K A, Schnaar R L, *et al.* Gangliosides expressed on breast cancer cells are E-selectin ligands. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, **406**(3): 423-429
- [92] Koscielak J. The hypothesis on function of glycosphingolipids and ABO blood groups revisited. *Neurochem Res*, 2012, **37**(6): 1170-1184
- [93] Kolmakova A, Rajesh M, Zang D, *et al.* VEGF recruits lactosylceramide to induce endothelial cell adhesion molecule expression and angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Glycoconj J*, 2009, **26**(5): 547-558
- [94] Rajesh M, Kolmakova A, Chatterjee S. Novel role of lactosylceramide in vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis in human endothelial cells. *Circ Res*, 2005, **97**(8): 796-804
- [95] Desselles A, Chaumette T, Gaugler M H, *et al.* Anti-Gb3 monoclonal antibody inhibits angiogenesis and tumor development. *PLoS One*, 2012, **7**(11): e45423
- [96] Hagerbaumer P, Vieth M, Anders M, *et al.* Lectin histochemistry shows WGA, PHA-L and HPA binding increases during progression of human colorectal cancer. *Anticancer Res*, 2015, **35**(10): 5333-5339
- [97] Patzel K A, Yardeni T, Le Poec-Celic E, *et al.* Non-specific accumulation of glycosphingolipids in GNE myopathy. *J Inher Metab Dis*, 2014, **37**(2): 297-308
- [98] Dodge J C, Treleaven C M, Pacheco J, *et al.* Glycosphingolipids are modulators of disease pathogenesis in amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, **112**(26): 8100-8105
- [99] Zhou J, Tawk M, Tiziano F D, *et al.* Spinal muscular atrophy associated with progressive myoclonic epilepsy is caused by mutations in *ASAH1*. *Am J Hum Genet*, 2012, **91**(1): 5-14
- [100] Dawkins J L, Hulme D J, Brahmabhatt S B, *et al.* Mutations in *SPTLC1*, encoding serine palmitoyltransferase, long chain base subunit-1, cause hereditary sensory neuropathy type I. *Nat Genet*, 2001, **27**(3): 309-312
- [101] Boukhris A, Schule R, Loureiro J L, *et al.* Alteration of ganglioside biosynthesis responsible for complex hereditary spastic paraplegia. *Am J Hum Genet*, 2013, **93**(1): 118-123
- [102] Wennekes T, Van Den Berg R J, Boot R G, *et al.* Glycosphingolipids--nature, function, and pharmacological modulation. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2009, **48**(47): 8848-8869
- [103] Shenoy A K, Lu J. Cancer cells remodel themselves and vasculature to overcome the endothelial barrier. *Cancer Lett*, 2014, **10**(31): 630-632
- [104] Matsui T, Kinugasa Y, Tahara H, *et al.* Possible role of mural cell-covered mature blood vessels in inducing drug resistance in cancer-initiating cells. *Am J Pathol*, 2013, **182**(5): 1790-1799

Advances in Analysis of Glycosphingolipids and Related Diseases*

DU Hao-Qi, YU Han-Jie, JIA Li-Yuan, LI Zheng**

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

Abstract Glycosphingolipids are ubiquitous cell membrane and act significantly in many bioprocesses such as cell adhesion, embryonic development, signal transduction and carcinogenesis. The advances of structural analysis of glycosphingolipids using modern analytical instruments, the separation and identification of glycosphingolipids, as well as the biological functions of glycosphingolipids in the progress of diseases were thoroughly discussed in this review. The analysis of glycosphingolipid has made spectacular progress due to the rapid development of modern analytical technology, especially mass spectrometry and the tandem application of chromatography-mass spectrometry. Presently, the use of mass spectrometry in discovering aberrant levels of multiple glycosphingolipids in various malignancies has indicated that the fucosylated glycosphingolipids elevated in the tumor tissues of hepatocellular carcinoma, colorectal cancer, breast cancer and so on. This phenomenon made fucosylated glycosphingolipid a potentially novel cancer marker for early diagnosis. Furthermore, phenotypic and functional research on glycosphingolipids is becoming a popular aspect of glycolipid study, particularly in the relevancy between glycosphingolipids and angiogenesis. For instance, glycosphingolipids shed from the surface of tumor cells act positively on angiogenesis, nevertheless, GM3, a simple ganglioside, acts reversely as a proangiogenic factor in the tumor microenvironment. This review summarized several cellular hypothesis of the phenomenon above, illustrated the explorations in glycosphingolipid-targeted therapy against malignancies to provide further visions on glycosphingolipid research.

Key words glycosphingolipids, mass spectrometry, cancer, angiogenesis, targeted therapy

DOI: 10.16476/j.pibb.2015.0326

* This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation for Talent Training in Basic Science (J1210063) of China.

**Corresponding author.

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

Received: October 17, 2015 Accepted: November 24, 2015