

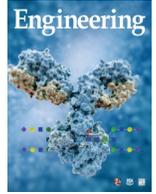


ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Engineering

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/eng](http://www.elsevier.com/locate/eng)



Research  
Glycomedicine—Article

## 结直肠癌、间质和正常结肠黏膜显微解剖区域 N-糖组的显著多样性

Di Wang<sup>a,#</sup>, Katarina Madunić<sup>a,b,#</sup>, Tao Zhang<sup>a</sup>, Guinevere S.M. Lageveen-Kammeijer<sup>a</sup>, Manfred Wuhrer<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Center for Proteomics and Metabolomics, Leiden University Medical Center, Leiden 2300 RC, Netherlands

<sup>b</sup> Copenhagen Center for Glycomics, Department of Cellular and Molecular Medicine, University of Copenhagen, Copenhagen 2200, Denmark

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 30 May 2022

Revised 5 August 2022

Accepted 14 August 2022

Available online 12 November 2022

#### 关键词

结直肠癌

肿瘤

多孔石墨化碳液相色谱质谱法

N-糖组学

抗体反应

### 摘要

异常糖基化被认为是结直肠癌(CRC)的一个标志。虽然细胞系和血清的N-糖基化已经被广泛研究,但由于肿瘤的异质性和N-聚糖结构的复杂性,组织中肿瘤相关N-聚糖的分析受到阻碍。为了克服这些障碍,本文提出了一项使用激光捕获显微切割技术的研究,该研究可以在很大程度上分解来自异质性组织,包括癌细胞、间质细胞和健康黏膜细胞不同区域的不同N-糖组特征。采用多孔石墨化碳液相色谱-电喷雾电离串联质谱法对N-聚糖糖醇进行分析,实现了对同分异构体的分化和结构表征。总共鉴定出116个N-聚糖,它们在癌症、间质和正常黏膜中呈现显著的表达差异。与健康黏膜相比,癌细胞显示 $\alpha$ 2-6唾液酸化单触角的N-聚糖增加,以及平分型N-聚糖减少。此外,特异性唾液酸化和携带(sialyl)-Lewis<sup>AX</sup>抗原的N-聚糖只在癌症中表达。与癌症相比,间质显示出较低水平的寡聚甘露糖苷和单触角N-聚糖、Lewis<sup>AX</sup>表位和硫酸盐化,以及(核心)岩藻糖基化和 $\alpha$ 2-3唾液酸化表达的增加。本研究揭示了CRC和对组织中不同细胞类型的不同N-糖组谱,并证明为发现癌症相关聚糖而对它们进行单独分析的必要性。

© 2022 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## 1. 引言

结直肠癌(CRC)是全球第三大最常见的癌症(占总病例的10.2%),也是癌症死亡的第二大原因(占癌症死亡总数的9.2%)[1]。虽然由于实施了人口筛查,高度发达国家的CRC发病率和死亡率正在稳定或下降,但发达国家的发病率和死亡率仍在迅速上升[2–3]。对于传统的治疗方法,如化疗、放疗和手术,其成功的可能性有限,因为大多数肿瘤是在疾病已经处于晚期时被诊断出来的[4]。此外,筛选方法在侵入性、低灵敏度、特异性以及高成本方面仍存在局限性[5–6]。近年来,通过识别癌细

胞上的特定分子靶点来选择性消除癌细胞的方法引起了人们的关注。然而,由于肿瘤的异质性,治疗失败率和耐药性仍然很高[4],表明需要确定新的特异性靶点来开发新的癌症治疗方法。

一个有前景的方向是异常糖基化的研究,异常糖基化是癌症的标志[7]。更具体地说,N-糖基化表达的改变似乎在各种癌症包括CRC的发生和发展中发挥着重要作用,并参与许多生物学过程,包括细胞信号传递、细胞黏附、免疫调节、血管生成、转移和浸润[8–9]。糖基化的变化可能是由于相应的糖基转移酶(GT)和糖苷酶的表达或活性失调,导致异常聚糖结构的不完整或新合成[10–11]。

\* Corresponding author.

E-mail address: [m.wuhrer@lumc.nl](mailto:m.wuhrer@lumc.nl) (M. Wuhrer).

# These authors contributed equally to this work.

先前的研究表明, N-聚糖的形成是由N-乙酰氨基葡萄糖转移酶(GnT)-III [由 $\beta$ -1,4-甘露糖基-糖蛋白4- $\beta$ -N-乙酰氨基葡萄糖转移酶(MGAT3)编码]催化形成, 其高表达有助于抑制癌细胞转移[5,12]。相比之下, GnT-V [由 $\alpha$ -1,6-甘露糖蛋白6- $\beta$ -N-乙酰氨基葡萄糖转移酶(MGAT5)编码, 负责N-聚糖上 $\beta$ 1-6 N-乙酰氨基葡萄糖(GlcNAc)分支的形成]是一种与GnT-III直接竞争的癌症相关酶[13]。此外, 研究发现 $\alpha$ 2-6唾液酸化的高表达和唾液酸-Lewis(sLe)结构参与癌细胞转移并与CRC预后不良有关[14-15]。

随着质谱分析技术(MS)的发展, CRC的N-糖基化在近十年内得到了广泛的研究。Balog等[5]使用亲水相互作用液相色谱(HILIC-LC)组合[而不是基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)]分析了13对CRC组织和相应对照的结肠组织中以2-氨基苯甲酸标记的N-聚糖, 揭示了硫酸化N-聚糖、少聚甘露糖苷型N-聚糖和具有sLe结构的N-聚糖水平的增加, 以及肿瘤组织中平分型N-聚糖水平的降低。另一项研究使用多孔石墨化碳液相色谱(LC)电喷雾电离串联质谱(PGC-LC-ESI-MS/MS)(负电离模式)揭示寡聚甘露糖苷型、复合型和少聚甘露糖苷型N-聚糖, 以及 $\alpha$ 2,6-唾液酸化N-聚糖的过表达, 而研究发现CRC组织中复合N-聚糖与 $\alpha$ 2-3唾液酸化N-聚糖相对于相邻的非致瘤组织是下调的[16]。此外, Coura等[17]发现与正常结肠组织相比, CRC组织中寡聚甘露糖苷型、双触角低半乳糖基化和分支结构的N-聚糖的表达更高。这些研究使用了均质肿瘤组织, 在进行糖组学分析之前没有对感兴趣的特定细胞进行富集。虽然这种分析可以掩盖细胞特异性糖组学特征, 特别是在免疫细胞和间质高度浸润的肿瘤组织中, 但与正常上皮细胞相比, 在CRC II期的空间分辨MS成像中发现了类似的模式, 其中唾液酸化和寡聚甘露糖苷型N-聚糖含量较高, 岩藻糖基化和高度分支的N-聚糖水平较低[2]。

最近的一项研究表明, 癌症的N-糖组学特征扩散到肿瘤浸润前方的周围间质[2]。肿瘤间质由各种非肿瘤细胞组成, 包括成纤维细胞、免疫细胞、内皮细胞[18], 以及结缔组织。肿瘤中间质的比例被认为是CRC II期和III期患者的一个强有力的预后因素[19]。因此, 为了研究间质在CRC发病机制中的作用, 并在CRC组织中寻找特定的癌症相关聚糖, 聚糖分子的空间解析和对聚糖同分异构体的详细结构进行阐明是先决条件。为了克服LC-MS研究中肿瘤组织的异质性, Hinneburg等[20]使用激光捕获显微切割(LCM)技术从肝肿瘤和周围健康组织中提取细胞, 然后采用PGC-nanoLC-ESI-MS/MS糖组学方法

对肝脏N-和O-糖组进行深入表征。基于这种方法, 本文做了较大的调整, 以确保96孔板更高的通过率, 并揭示了CRC特异性N-聚糖特征。最近, 本文研究团队通过使用LCM联合PGC-nanoLC-ESI-MS/MS发现, 两个高度特异性sLe/Le核心O-聚糖在CRC与健康结肠上皮的分化中发挥了重要作用[21]。

本文研究了CRC、间质和正常结肠黏膜不同区域的N-糖基化, 发现了特异性的CRC肿瘤相关碳水化合物类抗原(TACA)。最近发表的一项关于CRC O-糖组学特征研究所使用的队列也采用了该方法[21]。简而言之, 本文利用LCM从原发肿瘤、肿瘤间质和相应的健康结肠黏膜的特定上皮区域富集细胞。采用优化的高通量工作流程, 从LCM福尔马林固定石蜡包埋(FFPE)组织中释放N-聚糖。随后, 在PGC-LC-ESI-MS/MS平台上, 使用负电离模式对释放的N-聚糖进行测量。该方法能够有效地分离和解析N-聚糖同分异构体。共鉴定出116个N-聚糖, 这些聚糖在癌症、间质和正常黏膜中表现出不同的表达。此外, 还将所揭示的N-糖基化图谱与先前发表的基因表达数据相结合, 提出了一种CRC N-聚糖表达的生物合成途径。

## 2. 材料和方法

### 2.1. 材料

三氟乙酸(TFA)、 $\text{NaBH}_4$ 、盐酸(HCl)、DL-二硫苏糖醇(DTT)、阳离子交换树脂Dowex 50W-X8、苏木精、三羟甲基氨基甲烷、碳酸氢铵(ABC)、乙酸铵和聚乙烯吡咯烷酮40(PVP-40)均来自SigmaAldrich公司(美国)。氯化钠(NaCl)、乙醇(EtOH)和甲醇(MeOH)均来自Merck公司(德国)。固相萃取(SPE)散装吸附剂(S\*纯提取-清洁SPE散装包装材料, 38-125  $\mu\text{m}$ )来自BGB Analytik Benelux B.V.公司(荷兰)。乙腈LC-MS级购自Biosolve公司(荷兰)。冰乙酸和氢氧化钾来自Honeywell Fluka公司(美国)。PNGaseF(大肠杆菌中脑膜炎脓毒性黄杆菌重组)来自Roche公司(德国)。500  $\mu\text{L}$ 粘接帽管和MembraneSlide 1.0聚萘二甲酸乙二醇酯(PEN)购自Carl Zeiss Microscopy公司(德国)。96孔聚丙烯(PP)过滤板购自Orochem Technologies公司(美国)。96孔PP微孔板和MultiScreen<sup>®</sup><sub>HTS</sub> 96多孔板(孔径0.45 m, 含高蛋白结合膜[疏水聚偏二氟乙烯(PVDF)膜])来自Millipore公司(荷兰)。用于所有溶剂制备和洗涤步骤的Milli-Q水均由ELGA系统(Veolia, 荷兰)生成, 保持在18 M $\Omega$ 以上。

## 2.2. FFPE组织的切片和染色

匿名的人CRC组织从荷兰莱顿大学医学中心(Leiden University Medical Center, LUMC)的病理科获取。在最近发表的研究成果[21]中也使用了相同的队列研究。所有样本都以编码的方式处理,根据国家伦理准则(*Code for proper secondary use of human tissue*, 荷兰医学科学学会联合会),同意增加“选择-退出”系统以进一步用于编码人体组织的科学研究,除非有特殊情况。选择原发性结肠肿瘤(1T~12T)、来自同一患者的配对正常结肠黏膜(1C~12C)和来自不同患者肝脏的6个转移组织(15M~21M)进行分析。用切片器将石蜡组织块切成10  $\mu\text{m}$ 厚的切片,并安装在聚萘二甲酸乙二醇酯(PEN)膜载玻片上进行LCM检测。另外,将5  $\mu\text{m}$ 厚的切片安装在载玻片上,用于苏木精和伊红(H&E)染色。载玻片以37  $^{\circ}\text{C}$ 干燥过夜,于4  $^{\circ}\text{C}$ 下保存。

LCM的PEN载玻片首先用二甲苯脱蜡,进行三次共持续5 min,然后用绝对乙醇洗涤2 min。随后,将载玻片短暂浸入85%乙醇中再水化,然后加入70%乙醇和蒸馏水。用苏木精染色20 s后,用Milli-Q水洗涤2 min。然后依次将载玻片浸泡在70%乙醇、85%乙醇、绝对乙醇中;最后在室温(RT)下干燥,于4  $^{\circ}\text{C}$ 下保存。经H&E染色的FFPE载玻片和用于目标区域内LCM的相应组织的载玻片由最近发表的工作[21]中的补充材料提供。

## 2.3. 病理学家注释

病理学家在H&E载玻片上标记了肿瘤和正常上皮区域。通过对H&E染色载玻片上的腺体形成进行显微镜检查来评估分化等级。

## 2.4. 激光捕获显微分割

简而言之,根据病理学家指出的目标区域,通过LCM将选定的组织切片区域切除。使用PALM Robo软件(德国)进行LCM,样品被采集在500  $\mu\text{L}$ 的粘接帽管中,以供后续使用。每个样本总共获得了20 000~25 000个细胞。为了获得相当数量的细胞用于分析,三个组织切片的面积约为2500  $\mu\text{m}^2$ ,都用于细胞计数。每个细胞的平均面积被用来推断获得20 000个细胞所需的面积。由于健康的结肠黏膜细胞被免疫细胞包围,而免疫细胞不能通过LCM方法有效地与上皮细胞分离,因此从不同的正常结肠组织中分离淋巴滤泡,然后将这些滤泡聚集在一起,获得肠道相关免疫细胞的聚糖图谱(Imppool)。此外,仅对间质含量高的肿瘤(4TS、6TS、7TS、ST7、11TS、12TS、19MS和21MS)收集包含间质区域的单独样本。

## 2.5. 从组织中释放N-聚糖

为使N-聚糖从组织中释放出来,将100  $\mu\text{L}$ 由100  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris HCl、0.1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  DTT、100  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl和1%十二烷基硫酸钠(SDS)组成的裂解缓冲液加入粘接帽中,将含有组织块的混合物转移到1.5 mL的Eppendorf管中。将样品放置在冰上,使用输出功率为2/10的Branson超声棒检测三次,每次持续15 s,每个循环之间有20 s冷却时间。随后,样品在99  $^{\circ}\text{C}$ 下孵育1 h,振荡速率为400  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 。分别用100  $\mu\text{L}$  70%乙醇和100  $\mu\text{L}$  Milli-Q水对PVDF膜孔进行预处理。在上样前,用另外5  $\mu\text{L}$ 的70%乙醇再湿润膜。冷却后,将100  $\mu\text{L}$ 的组织裂解液装入PVDF膜板孔中,并在室温下振荡20 min。膜板以500g离心力进行离心(其中g为相对离心力),用100  $\mu\text{L}$ 的Milli-Q水洗涤以去除未结合的物质。为了堵塞膜,在孔中加入40  $\mu\text{L}$  0.5% PVP-40的Milli-Q水,然后在摇床上孵育5 min。接下来,用2 $\times$ 100  $\mu\text{L}$ 磷酸盐缓冲盐水(PBS)、2 $\times$ 100  $\mu\text{L}$  10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  ABC和2 $\times$ 100  $\mu\text{L}$  Milli-Q洗涤膜板。然后,在每个样品孔中加入10  $\mu\text{L}$ 的Milli-Q,浸泡膜,防止酶混合物通过膜,然后在摇床上孵育5 min。每个孔中加入15  $\mu\text{L}$ 含有2个单位(U) N-糖苷酶F的N-糖苷酶F混合物和13  $\mu\text{L}$  Milli-Q,37  $^{\circ}\text{C}$ 孵育15 min,释放N-聚糖。在37  $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育前,在每个孔中加入15  $\mu\text{L}$ 的Milli-Q,以防止膜干燥。

## 2.6. N-聚糖的回收、还原和纯化

释放的N-聚糖的回收、还原和纯化按照前面所述的方法[22-23]进行。简而言之,通过1000g离心2 min来收集释放的N-聚糖。用3 $\times$ 30  $\mu\text{L}$ 的水清洗PVDF膜孔,并收集过滤液。随后,将20  $\mu\text{L}$ 、100  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的乙酸铵(pH = 5)加入到收集的N-聚糖中,然后在室温下孵育1 h,以水解释放的糖基胺,然后将样品置于35  $^{\circ}\text{C}$ 的真空下进行干燥。将20  $\mu\text{L}$ 、1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaBH<sub>4</sub>与50  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钾混合液加入至每个样品孔,可还原N-聚糖,然后在加湿的塑料盒中于50  $^{\circ}\text{C}$ 下孵育3 h。为了猝灭反应,每个孔中加入3  $\mu\text{L}$ 冰乙酸,然后进行脱盐步骤。通过在96孔过滤板的每个孔中加入100  $\mu\text{L}$ 含有Dowex(50W-X8)的强阳离子交换树脂浆与MeOH的混合液(50/50, V/V),实现柱自填充;通过加入3 $\times$ 100  $\mu\text{L}$ 的1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸、3 $\times$ 100  $\mu\text{L}$ 的MeOH、3 $\times$ 100  $\mu\text{L}$ 的Milli-Q对柱进行预处理。将样品装入预处理柱上,用2 $\times$ 40  $\mu\text{L}$ 的Milli-Q洗涤。在35  $^{\circ}\text{C}$ 下真空干燥收集的含有N-聚糖的过滤液和洗涤液。在干燥过程中,通过加入3 $\times$ 100  $\mu\text{L}$ 的甲醇来去除剩余的硼酸盐。最后,将60  $\mu\text{L}$ 的散装吸附剂Carbo-

graph 浆填入 96 孔过滤板中，制备了多孔石墨化碳 (PGC)-SPE 柱。在含 0.1% TFA 的水中加入  $3 \times 100 \mu\text{L}$  的 80% 乙腈，然后加入  $3 \times 100 \mu\text{L}$  的 0.1% TFA 进行预处理。样品上样后，用  $3 \times 80 \mu\text{L}$  的 0.1% TFA 洗涤预处理柱。用  $3 \times 40 \mu\text{L}$  的 60% 乙腈和 0.1% TFA 洗脱 N-聚糖，并真空干燥。

### 2.7. 用 PGC-nanoLC-ESI-MS/MS 分析释放的 N-聚糖

干燥后的样品在  $12 \mu\text{L}$  的 Milli-Q 中重新溶解。在 Dionex Ultimate3000 nanoLC 系统测量 N-聚糖，该系统配备自填充 Hypercarb PGC 柱 ( $5 \mu\text{m}$  粒径,  $320 \mu\text{m} \times 30 \text{mm}$ ) 和自填充 Hypercarb PGC 纳米柱 ( $3 \mu\text{m}$  粒径,  $100 \mu\text{m} \times 100 \text{mm}$ )，与一个 amaZon 电子转移裂解 (ETD) 加速电喷雾电离 (ESI) 离子阱质谱仪 (Bruker Bruker, 美国) 联用。为了分析 N-聚糖，将  $5.0 \mu\text{L}$  的样品注入系统，并用 2.0% 的溶剂 A ( $10.0 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  ABC) 以  $6.0 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$  的上样流量在捕集柱上进行捕集；用纳米柱进行多级分离：以 2.0%~9.0% 的缓冲液 B (60.0% 乙腈与  $10 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  ABC 混合) 分离 1 min；然后以  $0.6 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$  的流速在 80 min 的时间跨度内以 9.0%~49.0% 的缓冲液 B 进行分离。用 95% 的缓冲液 B 洗涤 PGC 柱 10 min。采用 CaptiveSpray 源 (Bruker Daltonics Inc., 美国) 在负离子模式下施加 1000 V 的毛细管电压进行电离。干燥气体 ( $\text{N}_2$ ) 的温度设置为  $280 \text{ }^\circ\text{C}$ ，流量为  $3 \text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 。喷雾器气体 ( $\text{N}_2$ ) 富含异丙醇，保持在 3 psi (1 psi =  $6.895 \text{ kPa}$ )，如前所述[24]。在负离子模式下，在  $m/z$  范围为 500~1850 内获得质谱，智能参数的目标质量设置为  $m/z$  1200。质谱是由前三个前驱体碰撞诱导解离产生的。

### 2.8. 数据处理和统计分析

提取的离子色谱图是通过包含在 Bruker Data 分析软件 (5.0 版) 中每个 N-聚糖的前三个同位素生成的。曲线下的面积用于峰值积分。相对定量是根据样本内所有观察到的 N-聚糖的总面积 (信噪比大于等于 6) 计算的，并归一化到 100%。使用 “R” 软件 (4.0.5 版) 中的 “tidyverse” “readxl” “caret” “gridExtra” “ggpubr” “pcaMethods” “Rcpm” “ggrepel” “Rcpm” “data.table” “ComplexUpset” “ggplot2” “UpSetR” 和 “tidyHeatmap” 进行数据分析和可视化。采用 Wilcoxon-Mann-Whitney 非参数统计核验证组间差异，并采用 Benjamini-Hochberg 法对  $p$  值进行多重检验调整。

### 2.9. 基因表达数据

基因表达数据来自 132 例显微解剖的 CRC 和配对的正常结肠上皮细胞，这些数据来自基因表达综合数据库

(Gene Expression Omnibus, GEO)，标识符为 GSE21815。大量 CRC 组织的基因表达数据来自于 firebrowse.org 网站的癌症基因组图谱 (TCGA) 数据集。

## 3. 结果

### 3.1. 结直肠癌、间质和正常结肠黏膜中 N-聚糖特征的差异

研究的 N-聚糖从 LCM 组织区域释放，该区域来自 12 名 CRC 患者的原发肿瘤 (1T~12T) 和这 12 名患者相应的正常结肠 (1C~12C)，以及另外 6 名肝转移患者的 6 个转移性 CRC (15M~21M) (详细的临床信息见附录 A 中的表 S1)。本文还分析了具有高间质含量的癌症的间质区域，共检测到 116 个 N-聚糖，其中含有 3~14 个单糖 (见附录 A 中的表 S2)。结直肠癌与健康对照组正常黏膜之间的 N-聚糖表达存在显著差异。

在 N-聚糖和糖基化特征不同表达的驱动下，癌症、间质和正常黏膜之间出现了明显的差异 (图 1)。为深入了解它们相同的结构成分，根据 N-聚糖类型，如 “复合型” “杂合型” 和 “寡聚甘露糖苷型”，以及根据糖组学特征，如 “唾液酸化” “岩藻糖基化” 和 “硫酸化”，对鉴定出的 N-聚糖类型进行分类。所选的硫酸化 N-聚糖的质谱如附录 A 中的图 S1 所示。具有  $\text{Man}_{0-4}\text{GlcNAc}_2\text{Fuc}_{0-1}$  的 N-聚糖被指定为 “少聚甘露糖苷型”，而只包含三个甘露糖和一个触角的 N-聚糖被认为是一个单独的类别，称为 “单触角型”。触角的性状代表了附着在核心结构 3/6 臂甘露糖上的 GlcNAc 的数量；唾液酸化和岩藻糖基化性状也以类似的方式设计。更多信息见附录 A 中的表 S2。大多数癌症样本 (蓝色) 聚集在评分图的靠下部分 [图 1 (a)]，显示了高水平的  $\alpha 2-6$ -唾液酸化；少聚甘露糖苷型、单触角和三触角 N-聚糖； $\text{sLe}^{\text{A/X}}$  的表位表达；磷酸化 [图 1 (b)]。单触角 N-聚糖的高表达强烈地驱动了癌症样本的分离，相对丰度中位数为 2.8% (见附录 A 中的表 S3)。此外， $\text{sLe}^{\text{A/X}}$  表位仅在癌症样本 6T、3T 和 16M 中表达，相对丰度分别为 5.0%、3.0% 和 0.3% (见附录 A 中的表 S3)。相比之下，正常黏膜样本聚集在评分图右上方 [见图 1 (a) 级附录 A 中的表 S3]，主要是由平分型 N-聚糖的高表达 (中位数 14%) 驱动，而癌症和间质区域显示相对较低的丰度 (中位数分别为 4% 和 5%) [见图 1 (b) 及附录 A 中的表 S3]。此外， $\alpha 2-3$  唾液酸化、核心岩藻糖基化以及双触角和复合 N-聚糖的糖基化特征有助于间质样品的分离 (见图 1 及附录 A 中的图 S2)。间质样本的  $\alpha 2-3$  唾液酸化、核心岩藻糖基化和杂合型 N-聚糖的中位数相对丰度分别为 32%、44% 和 76%，而癌症样本的为 12%、



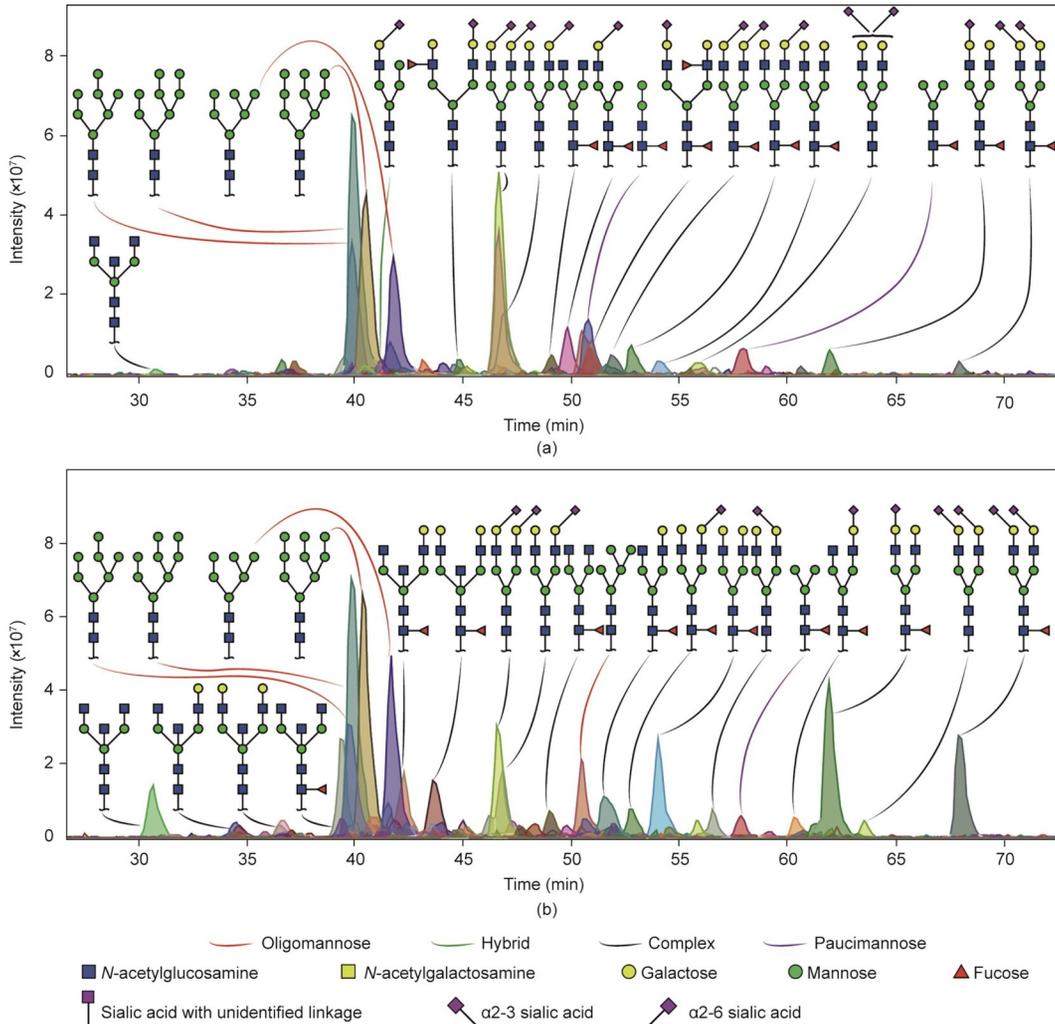


图2. 来自同一患者的腺癌 (a) 和正常结肠黏膜 (b) 的N-聚糖图谱示例。(a) 从患者11中获得的腺癌的特征是单触角N-聚糖和携带末端 $Le^{A_X}$ 表位的N-聚糖的高表达。此外, 与来自同一患者的正常结肠黏膜 (b) 相比, 携带 $\alpha$ 2-6唾液酸的复合N-聚糖的表达更高, 表明携带 $\alpha$ 2-3唾液酸的平分型和复合N-聚糖的表达更高。

成H5N4F2S1 [图4 (e)]在癌症中相对频率最高, 为39% (18人中有7个), 然后是H5N3F1S1a [图4 (c)]、H6N5F1a [图4 (j)]和H7N3Su1 [图4 (m)], 分别为17%。特别是, 图4 (n)中所示的5种N-聚糖中至少有一种在89%的癌症中被发现, 而在正常的结肠黏膜中没有被检测到 (见附录A中的表S7)。

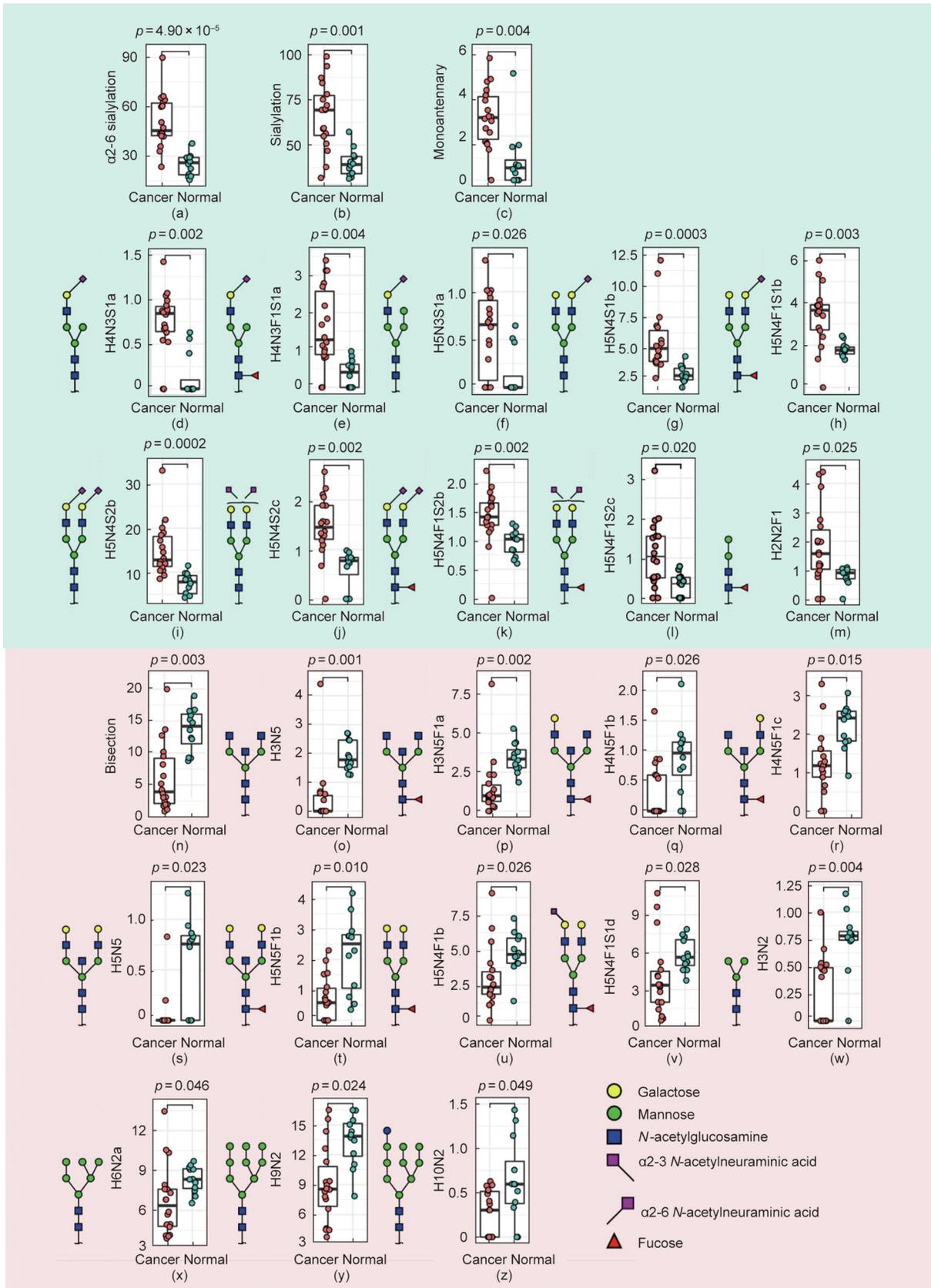
### 3.3. 结直肠癌与间质之间的糖基化差异明显

间质作为肿瘤环境的主要成分, 被认为与恶性进展有关[18]。与癌症相比, 寡聚甘露糖苷型、单触角和触角岩藻糖基化N-聚糖以及携带 $Le^{A_X}$ 表位和硫酸盐化的N-聚糖的丰度在间质样品中显著降低[图5 (a)中的 (i) ~ (v)]。与癌症相比, 在间质中检测到8个N-聚糖, 其相对丰度较低; 其中包括6个寡聚甘露糖苷型聚糖H5N2b、H6N2b、H6N2a、H7N2a/b、H8N2b和H9N2 [见图5 (a)中的 (vi) ~ (xi)及附录A中的表S8], 以及少聚甘露糖

苷型N-聚糖H3N2F1和杂合型N-聚糖H6N3Su1a [见图5 (a)中的 (xii)和 (xiii)及附录A中的表S8]。相比之下, 间质的特点是复合型N-聚糖水平增强, 具有 $\alpha$ 2-3唾液酸化、核心岩藻糖基化、双触角N-聚糖的糖基化特征和半乳糖基化特征[图5 (b)中的 (i) ~ (viii)]。与癌症相比, 共检测到11个个体的N-聚糖在间质中具有更高的相对丰度[图5 (b)中的 (i) ~ (xix)]。值得注意的是, 这些N-聚糖中的大多数携带一个或多个 $\alpha$ 2-3连接唾液酸。

### 3.4. 特异性结直肠癌亚型的糖基化

进一步研究CRC不同亚型 (腺癌、转移癌、黏液腺癌和神经内分泌癌; 见附录A中的图S4)的糖基化特征。更具体地说, 包含11种复合型和一种寡聚甘露糖苷型N-聚糖的12种N-聚糖仅在腺癌中被观察到[见附录A中的图S4 (a)和 (c)]。7个岩藻糖基化N-聚糖仅在黏液腺



**图3.** CRC中N-聚糖的相对丰度和糖基化特征显著上调 (a) ~ (m) 和下调 (n) ~ (z)。 (a) ~ (c) N-糖基化特征, 即 $\alpha$ -2-6唾液酸化 (a)、唾液酸化 (b) 和单触角聚糖 (c), 以及10个N-聚糖 (d) ~ (m) {两个单触角 [ (d)、(e) ]、一个杂合型 (f)、6个复合型 [ (g) ~ (l) ] 和一个少聚甘露糖苷型 (m) 聚糖} 显著上调。相反, 与结肠直肠癌相比, 正常黏膜中平分型N-聚糖 (n) 和12个N-聚糖 [ (o) ~ (z) ] 的表达更高。采用Wilcoxon-Mann-Whitney非参数统计检验检验组间差异。Benjamini-Hochberg修正后的 $p$ 值显示在每个箱线图的上部。Y轴表示单个聚糖的相对丰度值和糖基化特征。

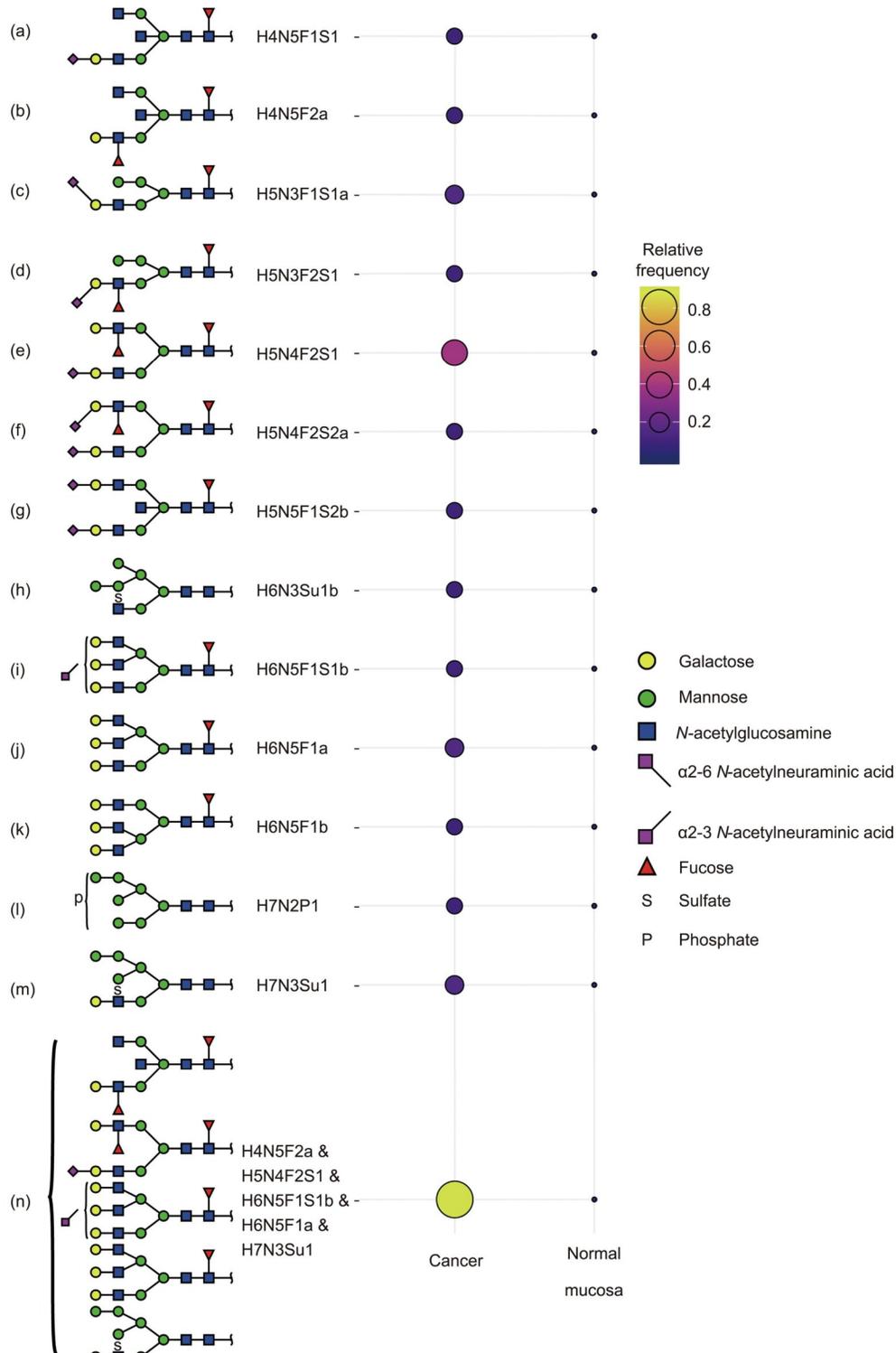


图4. 对CRC敏感性最高的N-聚糖。(a) ~ (m) N-聚糖仅在两个或多个CRC样本中被检测到，而在正常结肠黏膜中未被检测到。(n) 在89%的CRC样本中，至少检测到图中5个N-聚糖中的一个[携带sLe<sup>A/X</sup>/Le<sup>A/X</sup>表位或显示三触角]。

癌中表达，其中4个N-聚糖具有sLe<sup>A/X</sup>/Le<sup>A/X</sup>表位[见附录A中的图S4 (a) 和 (d)]。此外，sLe<sup>A/X</sup>表位仅在CRC的N-聚糖中被检测到，而一个含有Le<sup>B/Y</sup>表位的单触角N-聚糖仅在神经内分泌癌中被检测到[见附录A中的图S4

(a) 和 (d)]。值得注意的是，仅在两个N-聚糖上发现Le<sup>B/Y</sup>表位，并且该表位只在腺癌中表达[见附录A中的表S3和图S4 (d)]。

为了探讨基于N-糖组学特征的各种CRC特征的分配，

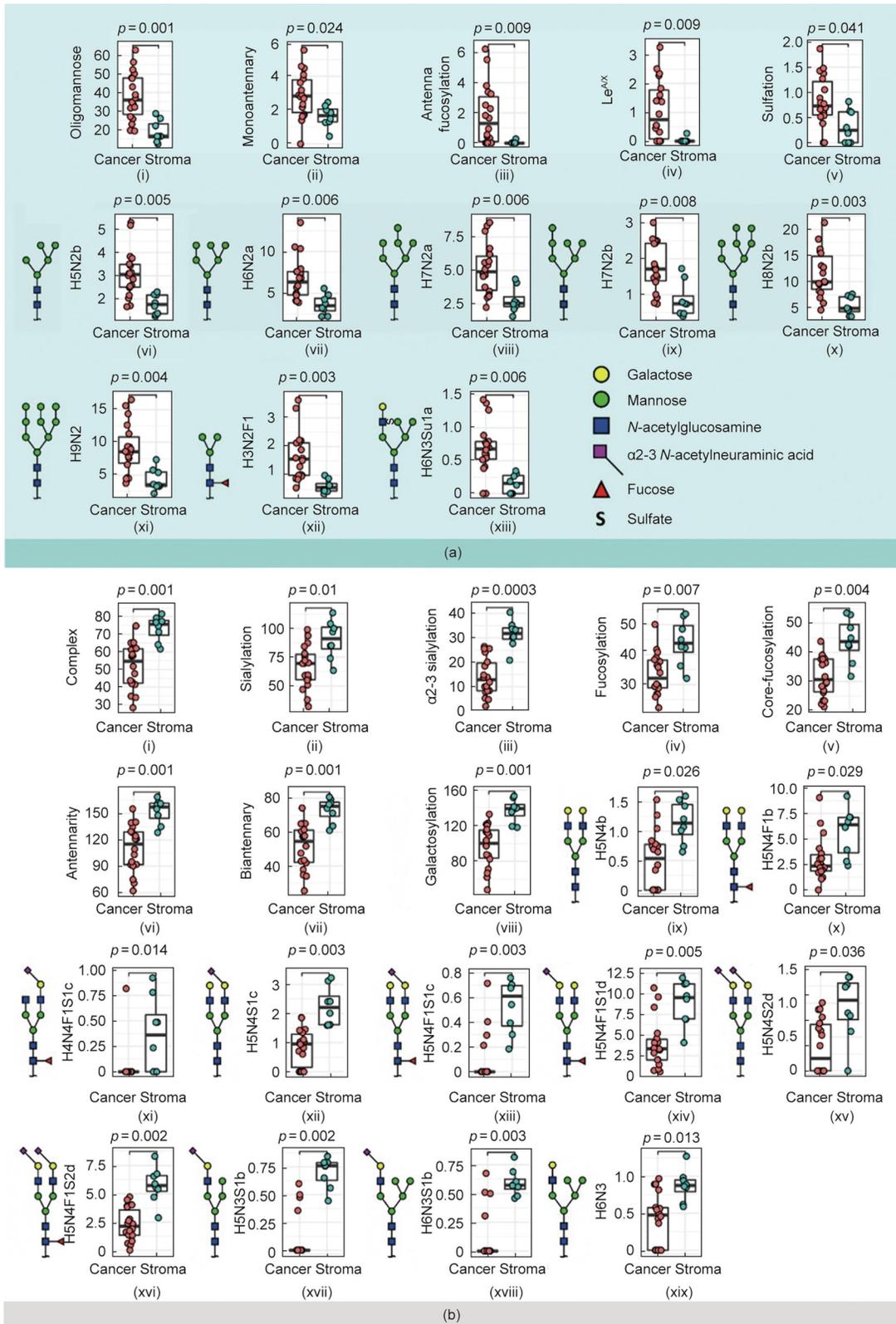


图5. 在结肠直肠癌和癌症间质中，N-聚糖的相对丰度及上调的糖基化特征。(a) N-糖基化特征（蓝色）：(i) oligomannoside型，(ii) 单触角，(iii) 触角岩藻糖基化，(iv)  $Le^{A\alpha}$ ，(v) 硫酸化。此外，8种N-聚糖包括6种寡聚甘露糖昔型[(vi)~(xi)]、一种少聚甘露糖昔型(H3N2F1)(xii)和一种杂合型(H6N3Su1a)硫酸化(xiii) N-聚糖在结肠直肠癌中显著上调。与癌症相比，间质特征（灰色）(b)是复合型聚糖(i)、 $\alpha$ 2-3唾液酸化[(ii)、(iii)]、核心岩藻糖基化[(iv)、(v)]、触角聚糖[(vi)、(vii)]和半乳糖基化(viii)高表达；还有11个N-聚糖[(ix)~(xix)]主要表达 $\alpha$ 2-3唾液酸化。采用Wilcoxon-Mann-Whitney非参数统计检验验证组间差异。Benjamini-Hochberg修正后的 $p$ 值显示在每个箱线图的上面。Y轴表示单个聚糖的相对丰度值和糖基化特征。

进行了主成分分析 (PCA) (见附录 A 中的图 S5 和图 S6)。硫化和磷酸化有助于 *Dukes* 分期 D 的大多数样本的分组, 尽管其他 *Dukes* 分期之间没有明显的聚集 [见附录 A 中的图 S5 (a) 和 (b)]。然而, 大多数覆盖 *Dukes* 分期 C 和分期 D (位于评分图右侧) 的浸润性癌主要是由寡聚甘露糖苷型和少聚甘露糖苷型 N-聚糖、硫酸化及其 Le 表位表达所驱动 [见附录 A 中的图 S5 (a) ~ (c)]。相同分化级别和肿瘤/间质比值的肿瘤没有出现簇性聚集 [见附录 A 中的图 S5 (d) 和图 S6 (d)]。评分图下方可见黏液腺癌 (3T 和 2T), 反映了  $sLe^{AX}$  和  $\alpha 2-6$  唾液酸化的高表达 [见附录 A 中的图 S6 (c)、图 S7 和表 S9]。寡聚甘露糖苷型 N-聚糖和  $Le^{BY}$  表位在来自大细胞神经内分泌癌的样本 5T 中的丰度较高。值得注意的是, 具有微卫星不稳定性 (MSI) 的癌症从微卫星稳定性 (MSS) 癌症中分离出来, 这归因于  $sLe^{AX}/Le^{AX}$ 、 $\alpha 2-6$  唾液酸化、少聚甘露糖苷型和单触角 N-聚糖, 以及触角岩藻糖基化的表达增加 [图 6

(a) 和 (b)]。然而, 这些差异并没有统计学意义。

### 3.5. 结直肠癌中 N-聚糖的生物合成途径

通过使用观察到的 CRC 的 N-糖基化特征, 并将 N-糖组学数据与之前发表的 CRC 的基因表达变化进行整合 (见附录 A 的图 S8 和表 S10) [25], 构建了 N-聚糖在结 CRC 中表达的生物合成途径 (图 6)。CRC 中单触角 N-聚糖的升高可能是由于用于编码  $\alpha 1-2$  甘露糖苷酶的  $MAN2N2$  的高表达, 该酶负责对六分支 N-聚糖上的  $\alpha 1-2$  甘露糖残基进行修剪 (见图 6 及附录 A 中的图 S8)。 $\alpha 2-6$  唾液酸化的高表达与  $ST6GAL1$  的高表达相一致。 $MGAT2/4B/5/5B$  的相对高表达与 CRC 中三触角/四触角 N-聚糖的表达相对应 (见图 6 及附录 A 中的图 S8)。值得注意的是, 在 CRC 中发现了  $MGAT3$  的上调, 其相应的 GT 将  $GlcNAc$  添加到 N-聚糖核心的  $\beta$ -甘露糖中, 产生平分型 N-聚糖。然而, 在 CRC 糖组中观察到平分型的 N-聚糖显著下调 (见图 6 及附录 A 中的图 S8)。

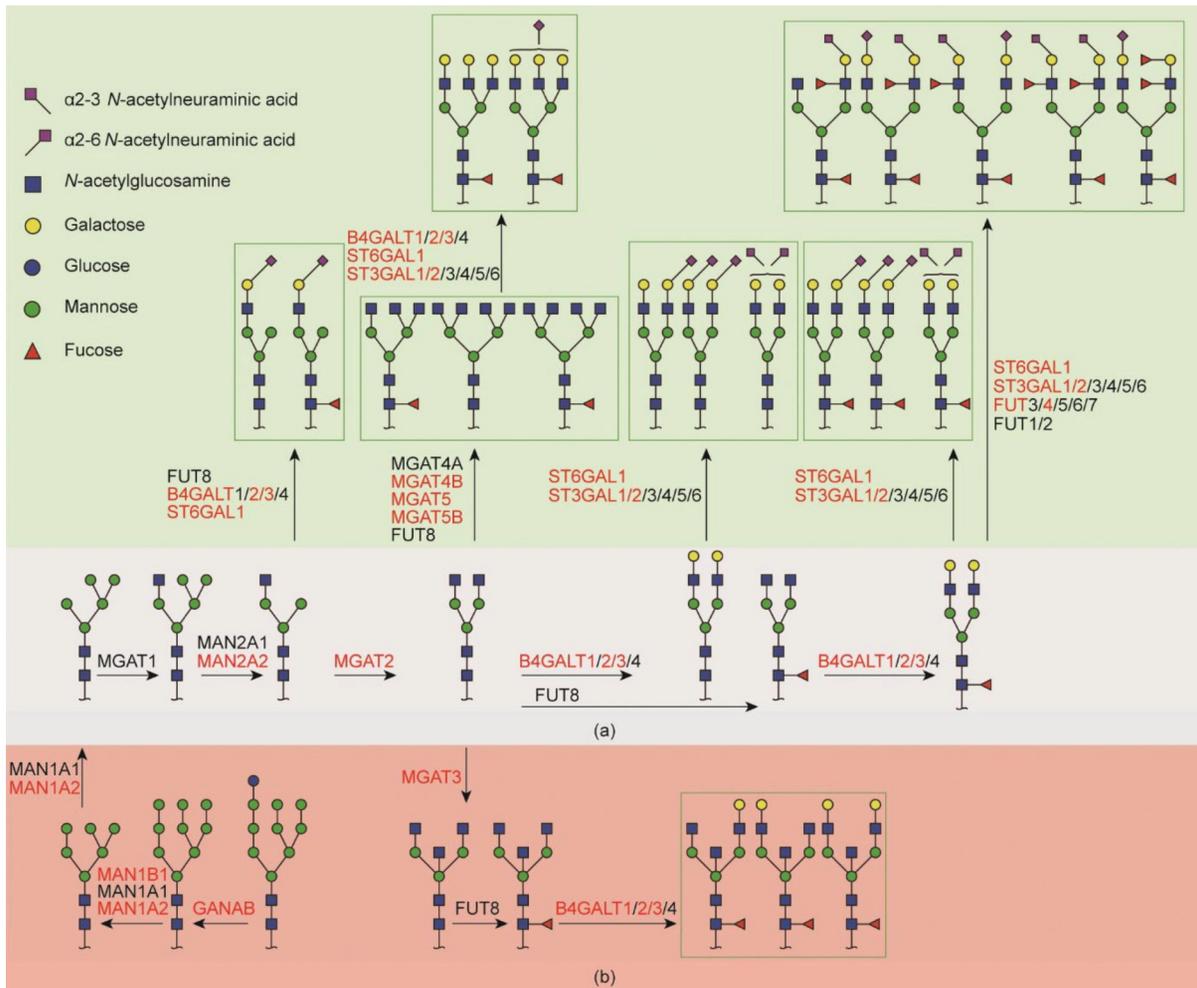


图 6. 本研究提出的生物合成模型描述了结直肠癌和正常结肠黏膜 N-糖基化差异的特征。N-聚糖在癌症 (a) 和正常黏膜 (b) 中的高相对丰度和特异性表达, 并结合编码参与 N-聚糖生物合成的相应 GT 的基因。在癌症中表达上调的 GT 基因显示为红色。

## 4. 讨论

肿瘤特异性糖基化特征的检测可能会受到肿瘤微环境中细胞异质性（如成纤维细胞和免疫细胞）的阻碍。本研究为了克服这一问题，进行了LCM研究，在从肿瘤微环境中排除非肿瘤细胞的同时获得了富集的癌细胞。因此，分别获得癌细胞和间质的糖基化特征，以及与黏膜下层和肌肉细胞等其他层分离的正常结肠黏膜的糖基化特征。发现癌症、间质和正常黏膜的N-聚糖图谱存在差异。与正常黏膜相比，癌细胞中 $\alpha$ 2-6唾液酸化和单触角N-聚糖的表达显著增加，平分型N-聚糖丰度减少，这与之前的研究[5,14,16,26]一致。

总之，研究表明，在CRC的发展过程中，特异性GT的表达和活性发生了改变[27]。本文发现癌症和正常黏膜中N-聚糖的高表达或特异性表达（见附录A中的图S8），并提出了一个与CRC相关的N-聚糖生物合成途径（图6）。为此，利用了公开的基因表达数据集[25]中参与N-聚糖生物合成的GT的表达差异。总的来说，*ST6GAL1*基因编码GT（负责将唾液酸添加在 $\alpha$ 2-6连接的半乳糖上），在CRC中显著上调，这与本研究癌症组织中的N-聚糖 $\alpha$ 2-6唾液酸化的过表达一致（见图3及附录A中的图S8）。既往研究表明，*ST6GAL1* GT在CRC癌症组织中的表达和活性增强，并与转移和低生存率相关[28–31]。此外，CRC和乳腺癌中的 $\alpha$ 2-6唾液酸化已被发现有助于减少细胞-细胞黏附和增加浸润性[14,32]。有趣的是，研究表明， $\alpha$ 2-3唾液酸化的增强主要出现在CRC早期阶段（I和II期），而 $\alpha$ 2-6唾液酸化在转移性肿瘤中高表达[28–29, 33]。在本研究中，癌症和正常黏膜在已鉴定的N-聚糖的 $\alpha$ 2-3唾液酸化方面没有差异。然而，与癌症样本相比，本研究确实发现间质中 $\alpha$ 2-3唾液酸化的表达更高（图5）。

在本研究中，与健康的黏膜和间质相比，癌症样本中的单触角N-聚糖水平更高（图3和图5）。研究发现，与健康对照组相比，癌症样本中的单触角N-聚糖H4N3S1a和H4N3F1S1a（均具有 $\alpha$ 2-6唾液酸化）有统计学意义的增加（图3）。先前的一项研究调查了直肠腺瘤和直肠腺癌之间糖基化的差异，发现单触角N-聚糖在直肠腺癌中的表达比在直肠腺瘤中更常见[34]。此外，在另一项比较CRC和健康结肠的研究[5]中也检测到了这种结构，该研究发现一个组成为H4N3F2Su的单触角N-聚糖在CRC中过表达。尽管处于一个相对较低的丰度，单触角N-聚糖被发现在CRC组织的空间分辨MS成像中是增加的[2]。一项关于 $\alpha$ 1,2-甘露糖苷酶mRNA表达的调查显示，与正常黏膜相比，GT MAN1A2和GT MAN1B1在癌症组织中

显著高表达；这也可能导致癌症组织中特异性单触角N-聚糖的表达增加，以及特异性寡聚甘露糖苷型N-聚糖下调（见附录A中的图S8）。然而，这一发现与之前的研究结果不太一致，即CRC中N-聚糖升高，而CRC和健康结肠中MAN1A2和MAN1B1的表达没有显著差异[35]。据推测，LCM的应用可能会导致这些有争议的结果。与健康对照组相比[36]，上皮性卵巢癌患者的单唾液酸化单触角N-聚糖显著减少。因此，单触角N-聚糖可以被认为是CRC相关糖基化特征的一部分。

在本研究中，CRC与正常黏膜中寡聚甘露糖苷型N-聚糖的表达无显著差异。同样，空间分辨的MS成像仅显示了CRC II期中寡聚甘露糖苷型N-聚糖过表达的趋势[2]。在CRC中观察到寡聚甘露糖苷型N-聚糖H6N2a和H9N2的下调，这一发现与之前报道的CRC中寡聚甘露糖苷型N-聚糖过表达的结果相反[34,37–38]。由较短的分裂/复制时间导致的不完全聚糖合成被认为是CRC组织中寡聚甘露糖苷型聚糖积累的原因之一[12]。虽然LCM被用于富集正常结肠黏膜细胞，但本文未能将它们与周围的免疫细胞浸润完全分离。另一种CRC组织的空间分辨质谱图显示结肠黏膜中寡聚甘露糖苷型N-聚糖的下调[38]，表明本研究中大多数寡聚甘露糖苷型N-聚糖可能来自上皮细胞微环境。为了研究这一点，本文对结肠淋巴滤泡进行了显微切割，以解读免疫细胞（ImPool）的糖基化的表达；然而，观察到寡聚甘露糖苷型N-聚糖的低表达。虽然这一发现表明，免疫细胞并没有在很大程度上导致寡聚甘露糖苷型N-聚糖在正常结肠黏膜样本的高表达，但不能排除这个可能性，因为与该组织相比，肠道相关免疫细胞群最有可能存在于滤泡不同成熟期。

少聚甘露糖苷型N-聚糖以前被认为在哺乳动物中并不常见[39]。然而，最近的研究发现，少聚甘露糖苷型N-聚糖的升高与各种人类癌症有关，包括CRC [34,39–40]。在本研究中，CRC和健康正常黏膜之间的少聚甘露糖苷型N-聚糖有没有统计学差异；然而，本研究确实观察到一种特殊的少聚甘露糖苷型N-聚糖H2N2F1的表达显著升高（图3）。这一发现与另一项研究一致，该研究也报道了与健康的结肠相比，该N-聚糖在CRC中过表达[5]。有趣的是，已知这种N-聚糖可以修饰多种人类中性粒细胞蛋白[39]。本研究发现，与健康黏膜相比，CRC中截短的少聚甘露糖苷型N-聚糖（H3N2）表达下调（图3）。其他研究也描述了截短的少聚甘露糖苷型N-聚糖如H3N2F1在人类癌症中增加[39,41–43]。少聚甘露糖苷型N-聚糖在癌症发生和发展中的生物合成和作用有待进一步研究。

岩藻糖基转移酶FUT3-7和FUT3-9参与了sLe<sup>x</sup>/Le<sup>x</sup>表位

的生物合成[44]。既往报道显示，它们在结直肠癌进展中发挥重要作用，包括增强肿瘤细胞的黏附和运动，导致转移[45]。此外，研究人员还发现了sLe<sup>x</sup>抗原可用作E-选择素配体，与CRC的不良预后相关[45]。本文发现N-聚糖表达sLe<sup>Ax</sup>表位仅在CRC中表达，尽管在三例患者中被检测到。FUT4表达的变化已被发现与多个细胞过程有关，包括细胞膜运输、细胞周期和主要的致癌信号通路[46]。FUT4的高表达刺激肺癌细胞的浸润、迁移和上皮-间充质转化[46]，因此FUT4被认为是肺癌转移的预后预测因子和治疗靶点。与相应的黏膜相比，CRC中FUT4的表达增加[30]。因此，FUT4在CRC中的高表达可能是sLe<sup>Ax</sup>生物合成的关键介质（见图5及附录A中的图S8）。另外，Le<sup>Ax</sup>表位（与预后不良相关）在正常结肠黏膜和CRC中均存在[15]。然而，N-聚糖携带末端Le<sup>Ax</sup>表位，在CRC中被检测到[图4（b）、（c）]。同样地，特异性Le<sup>Ax</sup>N-聚糖已被证明在CRC中过表达。然而，携带Le<sup>Ax</sup>的N-聚糖在总体上没有显著的过表达。

在LCM和TCGA数据集中，在CRC中均观察到编码GnT-V的MGAT5基因的上调（见附录A中的S8）。这与之前的研究结果[30,47]一致。GnT-V负责在 $\alpha$ 1-6连接的甘露糖中添加N-乙酰氨基葡萄糖，形成复合型N-聚糖的 $\beta$ 1-6分支（似乎促进癌症转移）[27,48]。然而，本文没有检测到三触角/四触角N-聚糖在糖组学水平上有统计学意义的增加，尽管在一些CRC样本中显示了更高的表达。然而，在CRC中特异性检测到三种核心岩藻糖基化的三触角N-聚糖，而在正常结肠黏膜中确没有表达[图4（i）~（k）]。先前的研究发现，在各种癌症中，具有 $\beta$ 1-6分支和MGAT5的N-聚糖表达增加，并与恶性肿瘤和不良预后相关[12,49–50]，但本文基于质谱的N-糖组学分析不支持这一发现[5]。此外，本文的MS成像研究显示，与正常结肠黏膜相比，CRC中三触角N-聚糖减少[2]。相比之下，由MGAT3基因编码的GnT-III参与了癌症抑制，并负责将具有 $\beta$ 1-4连接的GlcNAc转移到N-聚糖的核心 $\beta$ -甘露糖残基上，形成一个平分型聚糖[27,51]。在CRC中观察到平分型GlcNAc N-聚糖的显著下调（图3）；虽然根据LCM数据集发现MGAT3在癌症中表达上调，但TCGA数据集显示在癌症中表达下调（见附录A中的图S8）。

癌症相关糖基化特征曾被报道扩散到恶性肿瘤周围的间质中[2]。间质由免疫细胞、癌症相关成纤维细胞以及细胞外基质组成，形成肿瘤微环境的基本组成，支持恶性细胞生长和转移[52]。在本研究中，核心岩藻糖基化、 $\alpha$ 2-3唾液酸化和复合型N-聚糖在间质中的表达比在癌症

中更高，其中单触角结构、带Le<sup>Ax</sup>表位的N-聚糖和硫酸化N-聚糖的丰度明显更高。同样，通过CRC间质区的MS成像，发现复合型N-聚糖的表达量较高[2]。在癌症和间质之间发现的N-聚糖图谱的明显差异，表明了肿瘤区域特异性MS和感兴趣的细胞类型的富集对特异性糖组学分析的重要性。然而，与早期阶段相比，从间质区域分离晚期癌细胞变得更具挑战性，因为分散的癌细胞通过组织的不同层浸润，这可能会影响LCM富集的重现性和准确性。本研究为未来更大规模的研究铺平了道路，重点关注间质特异性糖基化特征和解读间质糖基化和癌症进展之间的潜在联系。

## 5. 结论

本研究使用PGC-LC-ESI-MS/MS对CRC进行了深入的N-糖基化分析，并与来自同一患者的健康结肠黏膜进行了比较。分别对原发性和转移性CRC的上皮区域、相应的肿瘤间质和正常结肠上皮区域的N-糖组进行研究，使用LCM来富集来自不同区域的细胞。在癌症、间质和正常黏膜之间发现了N-糖基化的显著差异。与健康黏膜相比，CRC中 $\alpha$ 2-6唾液酸化和单触角N-聚糖显著过表达，而平分型N-聚糖表达下调。糖基化的改变是由参与N-聚糖生物合成的相应GT的表达所支持的。在间质样本中观察到寡聚甘露糖苷型和单触角N-聚糖、Le<sup>Ax</sup>表位和硫酸化的下调，以及核心岩藻糖基化和 $\alpha$ 2-3唾液酸化表达的增加。同一肿瘤中不同类型细胞间糖基化发生改变，这一发现有助于进一步加深对CRC发展过程中糖基化变化的理解。

## Acknowledgements

The work was supported by the China Scholarship Council. The authors thank Dr. Oleg A. Mayboroda and Dr. Marco R. Bladergroen for their assistance with statistics.

## Compliance with ethics guidelines

Di Wang, Katarina Madunić, Tao Zhang, Guinevere SM Lageveen-Kammeijer, and Manfred Wührer declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.eng.2022.08.016>.

## References

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018;68(6):394–424.
- [2] Boyaval F, van Zeijl R, Dalebout H, Holst S, van Pelt G, Fariña-Sarasqueta A, et al. N-glycomic signature of stage II colorectal cancer and its association with the tumor microenvironment. *Mol Cell Proteomics* 2021;20:100057.
- [3] Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut* 2017;66(4):683–91.
- [4] Costa AF, Campos D, Reis CA, Gomes C. Targeting glycosylation: a new road for cancer drug discovery. *Trends Cancer* 2020;6(9):757–66.
- [5] Balog CIA, Stavenhagen K, Fung WLJ, Koeleman CA, McDonnell LA, Verhoeven A, et al. N-glycosylation of colorectal cancer tissues: a liquid chromatography and mass spectrometry-based investigation. *Mol Cell Proteomics* 2012;11(9):571–85.
- [6] Davies RJ, Miller R, Coleman N. Colorectal cancer screening: prospects for molecular stool analysis. *Nat Rev Cancer* 2005;5(3):199–209.
- [7] Pinho SS, Reis CA. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nat Rev Cancer* 2015;15(9):540–55.
- [8] Munkley J, Elliott DJ. Hallmarks of glycosylation in cancer. *Oncotarget* 2016;7(23):35478–89.
- [9] Magalhães A, Duarte HO, Reis CA. Aberrant glycosylation in cancer: a novel molecular mechanism controlling metastasis. *Cancer Cell* 2017;31(6):733–5.
- [10] Qiu Y, Patwa TH, Xu L, Shedden K, Misk DE, Tuck M, et al. Plasma glycoprotein profiling for colorectal cancer biomarker identification by lectin glycoarray and lectin blot. *J Proteome Res* 2008;7(4):1693–703.
- [11] Peixoto A, Relvas-Santos M, Azevedo R, Santos LL, Ferreira JA. Protein glycosylation and tumor microenvironment alterations driving cancer hallmarks. *Front Oncol* 2019;9:380.
- [12] Zhao YY, Takahashi M, Gu JG, Miyoshi E, Matsumoto A, Kitazume S, et al. Functional roles of N-glycans in cell signaling and cell adhesion in cancer. *Cancer Sci* 2008;99(7):1304–10.
- [13] Gu J, Nishikawa A, Tsuruoka N, Ohno M, Yamaguchi N, Kangawa K, et al. Purification and characterization of UDP-N-acetylglucosamine:  $\alpha$ -6-D-mannose  $\beta$  1 – 6N-acetylglucosaminyltransferase (N-acetylglucosaminyltransferase V) from a human lung cancer cell line. *J Biochem* 1993;113(5):614–9.
- [14] Park JJ, Lee M. Increasing the  $\alpha$ 2, 6 sialylation of glycoproteins may contribute to metastatic spread and therapeutic resistance in colorectal cancer. *Gut Liver* 2013;7(6):629–41.
- [15] Konno A, Hoshino Y, Terashima S, Motoki R, Kawaguchi T. Carbohydrate expression profile of colorectal cancer cells is relevant to metastatic pattern and prognosis. *Clin Exp Metastasis* 2002;19(1):61–70.
- [16] Sethi MK, Kim H, Park CK, Baker MS, Paik YK, Packer NH, et al. In-depth N-glycome profiling of paired colorectal cancer and non-tumorigenic tissues reveals cancer-, stage- and EGFR-specific protein N-glycosylation. *Glycobiology* 2015;25(10):1064–78.
- [17] Coura MMA, Barbosa EA, Brand GD, Bloch Jr C, de Sousa JB. Identification of differential N-glycan compositions in the serum and tissue of colon cancer patients by mass spectrometry. *Biology* 2021;10(4):343.
- [18] Van Pelt GW, Sandberg TP, Morreau H, Gelderblom H, van Krieken JHJM, Tollenaar RAEM, et al. The tumour–stroma ratio in colon cancer: the biological role and its prognostic impact. *Histopathology* 2018;73(2):197–206.
- [19] Huijbers A, Tollenaar RAEM, Pelt GWv, Zeestraten ECM, Dutton S, McConkey CC, et al. The proportion of tumor – stroma as a strong prognosticator for stage II and III colon cancer patients: validation in the VICTOR trial. *Ann Oncol* 2013;24(1):179–85.
- [20] Hinneburg H, Korać P, Schirmeister F, Gasparov S, Seeberger PH, Zoldoš V, et al. Unlocking cancer glycomes from histopathological formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) tissue microdissections. *Mol Cell Proteomics* 2017;16(4):524–36.
- [21] Madunić K, Mayboroda OA, Zhang T, Weber J, Boons GJ, Morreau H, et al. Specific (sialyl-)Lewis core 2 O-glycans differentiate colorectal cancer from healthy colon epithelium. *Theranostics* 2022;12(10):4498–512.
- [22] Zhang T, Madunić K, Holst S, Zhang J, Jin C, ten Dijke P, et al. Development of a 96-well plate sample preparation method for integrated N- and O-glycomics using porous graphitized carbon liquid chromatography-mass spectrometry. *Mol Omics* 2020;16(4):355–63.
- [23] Jensen PH, Karlsson NG, Kolarich D, Packer NH. Structural analysis of N- and O-glycans released from glycoproteins. *Nat Protoc* 2012;7(7):1299–310.
- [24] Madunić K, Wagt S, Zhang T, Wührer M, Lageveen-Kammeijer GSM. Dopant-enriched nitrogen gas for enhanced electrospray ionization of released glycans in negative ion mode. *Anal Chem* 2021;93(18):6919–23.
- [25] Kogo R, Shimamura T, Mimori K, Kawahara K, Imoto S, Sudo T, et al. Long noncoding RNA *HOTAIR* regulates polycomb-dependent chromatin modification and is associated with poor prognosis in colorectal cancers. *Cancer Res* 2011;71(20):6320–6.
- [26] Fernández-Rodríguez J, Feijoo-Carnero C, Merino-Trigo A, Páez de la Cadena M, Rodríguez-Berrocal FJ, de Carlos A, et al. Immunohistochemical analysis of sialic acid and fucose composition in human colorectal adenocarcinoma. *Tumour Biol* 2000;21(3):153–64.
- [27] Taniguchi N, Kizuka Y. Glycans and cancer: role of N-glycans in cancer biomarker, progression and metastasis, and therapeutics. *Adv Cancer Res* 2015;126:11–51.
- [28] Gessner P, Riedl S, Quentmaier A, Kemmner W. Enhanced activity of CMP-NeuAc: Gal $\beta$ 1-4GlcNAc: $\alpha$ 2,6-sialyltransferase in metastasizing human colorectal tumor tissue and serum of tumor patients. *Cancer Lett* 1993;75(3):143–9.
- [29] Dall'Olivo F, Malagolini N, di Stefano G, Minni F, Marrano D, Serafini-Cessi F. Increased CMP-NeuAc: Gal $\beta$ 1,4GlcNAc-R  $\alpha$ 2, 6 sialyltransferase activity in human colorectal cancer tissues. *Int J Cancer* 1989;44(3):434–9.
- [30] Petretti T, Kemmner W, Schulze B, Schlag PM. Altered mRNA expression of glycosyltransferases in human colorectal carcinomas and liver metastases. *Gut* 2000;46(3):359–66.
- [31] Seales EC, Jurado GA, Brunson BA, Wakefield JK, Frost AR, Bellis SL. Hypersialylation of  $\beta$ <sub>1</sub> integrins, observed in colon adenocarcinoma, may contribute to cancer progression by up-regulating cell motility. *Cancer Res* 2005;65(11):4645–52.
- [32] Lin S, Kemmner W, Grigull S, Schlag PM. Cell surface  $\alpha$ 2,6 sialylation affects adhesion of breast carcinoma cells. *Exp Cell Res* 2002;276(1):101–10.
- [33] Vierbuchen MJ, Fruechtnicht W, Brackrock S, Krause KT, Zienkiewicz TJ. Quantitative lectin-histochemical and immunohistochemical studies on the occurrence of  $\alpha$ (2, 3) - and  $\alpha$ (2, 6) -linked sialic acid residues in colorectal carcinomas. Relation to clinicopathologic features. *Cancer* 1995;76(5):727–35.
- [34] Kaprio T, Satomaa T, Heiskanen A, Hokke CH, Deelder AM, Mustonen H, et al. N-glycomic profiling as a tool to separate rectal adenomas from carcinomas. *Mol Cell Proteomics* 2015;14(2):277–88.
- [35] Chatterjee S, Ugonotti J, Lee LY, Everest-Dass A, Kawahara R, Thaysen-Andersen M. Trends in oligomannosylation and  $\alpha$ 1,2-mannosidase expression in human cancers. *Oncotarget* 2021;12(21):2188–205.
- [36] Dědová T, Braicu EI, Sehoul J, Blanchard V. Sialic acid linkage analysis refines the diagnosis of ovarian cancer. *Front Oncol* 2019;9:261.
- [37] Zhang D, Xie Q, Wang Q, Wang Y, Miao J, Li L, et al. Mass spectrometry analysis reveals aberrant N-glycans in colorectal cancer tissues. *Glycobiology* 2019;29(5):372–84.
- [38] Boyaval F, Dalebout H, Van Zeijl R, Wang W, Fariña-Sarasqueta A, Lageveen-Kammeijer GSM, et al. High-mannose N-glycans as malignant progression markers in early-stage colorectal cancer. *Cancers* 2022;14(6):1552.
- [39] Tjondro HC, Loke I, Chatterjee S, Thaysen-Andersen M. Human protein paucimannosylation: cues from the eukaryotic kingdoms. *Biol Rev Camb Philos Soc* 2019;94(6):2068–100.
- [40] Holm M, Nummela P, Heiskanen A, Satomaa T, Kaprio T, Mustonen H, et al. N-glycomic profiling of colorectal cancer according to tumor stage and location. *PLoS One* 2020;15(6):e0234989.
- [41] Holst S, Deuss AJM, van Pelt GW, van Vliet SJ, Garcia-Vallejo JJ, Koeleman CAM, et al. N-glycosylation profiling of colorectal cancer cell lines reveals association of fucosylation with differentiation and caudal type homebox 1 (CDX1)/villin mRNA expression. *Mol Cell Proteomics* 2016;15(1):124–40.
- [42] Chen H, Deng Z, Huang C, Wu H, Zhao X, Li Y. Mass spectrometric profiling reveals association of N-glycan patterns with epithelial ovarian cancer progression. *Tumour Biol* 2017;39(7):1010428317716249.
- [43] Wang X, Deng Z, Huang C, Zhu T, Lou J, Wang L, et al. Differential N-glycan patterns identified in lung adenocarcinoma by N-glycan profiling of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue sections. *J Proteomics* 2018;172:1–10.

- [44] Miyoshi E, Moriwaki K, Nakagawa T. Biological function of fucosylation in cancer biology. *J Biochem* 2008;143(6):725–9.
- [45] Paschos KA, Canovas D, Bird NC. The engagement of selectins and their ligands in colorectal cancer liver metastases. *J Cell Mol Med* 2010;14(1–2):165–74.
- [46] Lu HH, Lin SY, Weng RR, Juan YH, Chen YW, Hou HH, et al. Fucosyltransferase 4 shapes oncogenic glycoproteome to drive metastasis of lung adenocarcinoma. *EBioMedicine* 2020;57:102846.
- [47] Buckhaults P, Chen L, Fregien N, Pierce M. Transcriptional regulation of *N*-acetylglucosaminyltransferase V by the *src* oncogene. *J Biol Chem* 1997;272(31):19575–81.
- [48] Nagae M, Kizuka Y, Mihara E, YuKitago, Hanashima S, Ito Y, et al. Structure and mechanism of cancer-associated *N*-acetylglucosaminyltransferase-V. *Nat Commun* 2018;9(1):3380.
- [49] Zhao Y, Sato Y, Isaji T, Fukuda T, Matsumoto A, Miyoshi E, et al. Branched *N*-glycans regulate the biological functions of integrins and cadherins. *FEBS J* 2008;275(9):1939–48.
- [50] Murata K, Miyoshi E, Kameyama M, Ishikawa O, Kabuto T, Sasaki Y, et al. Expression of *N*-acetylglucosaminyltransferase V in colorectal cancer correlates with metastasis and poor prognosis. *Clin Cancer Res* 2000;6(5):1772–7.
- [51] Brockhausen I, Narasimhan S, Schachter H. The biosynthesis of highly branched *N*-glycans: studies on the sequential pathway and functional role of *N*-acetylglucosaminyltransferases I, II, III, IV, V and VI. *Biochimie* 1988;70(11):1521–33.
- [52] Raffaghello L, Dazzi F. Classification and biology of tumour associated stromal cells. *Immunol Lett* 2015;168(2):175–82.