

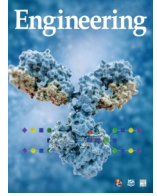


ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Engineering

journal homepage: www.elsevier.com/locate/eng



Research
Glycomedicine—Article

血清免疫球蛋白 G N-糖基的高通量分析——一种消化道癌症的非侵入性生物标志物

刘鹏程^{a, #}, 王小兵^{b, #}, 顿爱社^{c, #}, 李昱潼^{b, #}, 李厚强^a, 王璐^a, 张怡春^a, 李灿灿^d, 张金霞^d, 张晓雨^e, 马立兴^f, 侯海峰^{f, g, *}

^a School of Public Health, Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250117, China

^b State Key Laboratory of Molecular Oncology, National Cancer Center/National Clinical Research Center for Cancer/Cancer Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100021, China

^c School of Stomatology, Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250117, China

^d Beijing Key Laboratory of Clinical Epidemiology, School of Public Health, Capital Medical University, Beijing 100069, China

^e Beijing Sanbo Brain Hospital, Capital Medical University, Beijing 100093, China

^f Department of Gastroenterology, The Second Affiliated Hospital of Shandong First Medical University, Taian 271000, China

^g Department of Epidemiology, School of Public Health, Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250117, China

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 September 2022

Revised 20 February 2023

Accepted 21 February 2023

Available online 7 April 2023

关键词

消化道癌症

糖基化

免疫球蛋白 G

诊断生物标志物

摘要

免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG) 的 N-糖基化在炎症性疾病的发展中起着重要作用。本研究旨在评价 IgG N-糖基在消化道 (GI) 癌症亚型中的诊断效能。从中国医学科学院肿瘤医院招募 749 名消化道癌症患者, 包括食管癌 (esophageal cancer, EC)、胃癌 (gastric cancer, GC)、结肠直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 和胰腺癌 (pancreatic cancer, PC) 患者。采用亲水交互高效液相色谱-超高效液相色谱 (Hydrophilic interaction liquid chromatography using ultra-performance liquid chromatography, HILIC-UPLC) 分析血浆中 IgG 的 N-糖基构成。采用 Bio-Plex 悬液芯片系统检测方法 (Bio-Rad) 进行炎症因子检测。采用典型相关分析 (canonical correlation analysis, CCA) 探索糖基和炎症因子之间的相关性。采用 Lasso 回归和 logistic 回归模型, 基于检测到的糖基谱建立可用于区分消化道癌症患者和健康人群的诊断模型。与健康对照组相比, EC、GC、CRC 和 PC 患者的唾液酸化和半乳糖基化水平降低, 而二萘分 N-乙酰葡萄糖胺糖基化水平在消化道癌症患者中升高。此外, 只有 PC 患者具有低水平的岩藻糖基化。消化道癌症组的白介素 (IL)-1 β 、IL-31 和可溶性 CD40 配体 (sCD40L) 水平均高于对照组。IgG N-糖基的组成与炎症因子相关 ($r=0.556$)。基于糖基的模型表现出良好的诊断效能, EC、GC、CRC 和 PC 的受试者工作特征曲线下面积 (AUC) 分别为 0.972、0.871、0.867 和 0.907。这些研究结果表明, IgG N-糖基化在调节消化道肿瘤的发病机制中发挥了重要作用。血清 IgG N-糖基可以作为潜在的非侵入性辅助消化道癌症临床诊断的方法。

© 2023 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

消化道 (gastrointestinal, GI) 癌症, 包括消化道 (口

腔、咽喉、食道、胃、结直肠、阑尾) 和消化器官 (胰腺、肝胆) 癌, 是最常见的恶性肿瘤, 其死亡人数约占全球所有癌症死亡人数的 39% [1]。在中国, 2020 年报道的

* Corresponding author.

E-mail address: hfhhou@sdfmu.edu.cn (H. Hou).

These authors contributed equally to this work.

2095-8099/© 2023 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 license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

英文原文: *Engineering* 2023, 26(7): 44–53

引用本文: Pengcheng Liu, Xiaobing Wang, Aishe Dun, Yutong Li, Houqiang Li, Lu Wang, Yichun Zhang, Cancan Li, Jinxia Zhang, Xiaoyu Zhang, Lixing Ma, Haifeng Hou. High-Throughput Profiling of Serological Immunoglobulin G N-Glycome as a Noninvasive Biomarker of Gastrointestinal Cancers. *Engineering*, <https://doi.org/10.1016/j.eng.2023.02.008>

新增癌症患者（近450万）中，478 508人（10.47%）患胃癌（gastric cancer, GC），555 477人（12.16%）患结肠癌（colorectal cancer, CRC），324 422人（7.10%）患食管癌（esophageal cancer, EC）[2]。消化道癌症给医疗保健系统带来沉重负担[3]。早期诊断和早期治疗对癌症管理具有重要的临床意义，然而常用的非侵入性诊断方法尚缺乏足够的准确性。

糖基化是一种酶催化的翻译后修饰形式；在糖基化过程中，寡糖被转移到生物大分子（如蛋白质和脂质）上的特定位点并一起形成糖缀合物（即糖蛋白和糖脂）[4–6]。研究表明，在癌症患者的肿瘤组织和生物体液中可以检测到糖基化的改变。糖基化特征随着恶性转化和肿瘤进展的过程而发生变化[7–8]。因此，多种血清糖蛋白已被广泛用作肿瘤标志物，如消化道癌症的糖类抗原19-9（carbohydrate antigen 19-9, CA19-9）检测、肝癌的甲胎蛋白（alpha-fetoprotein, AFP）检测、结肠癌的癌胚抗原（carcinoembryonic antigen, CEA）检测、卵巢癌的糖类抗原（carbohydrate antigen 125, CA125）检测和前列腺癌的前列腺特异性抗原（prostate-specific antigen, PSA）检测[9]。然而，这些生物标志物缺乏足够的灵敏度或特异度[10]。此外，在临床工作中也已经对癌症特异性细胞表面糖蛋白进行了研究，主要用作治疗靶点，但还不能作为人群水平高通量筛选的诊断生物标志物。因此，进一步开展肿瘤发生过程中起调节作用的血清学糖蛋白及其检测技术的探索，对消化道癌症的诊断和不同癌症的区分具有重要意义。

免疫球蛋白G（immunoglobulin G, IgG）是体液免疫的主要成分之一，也是人血浆中含量最丰富的免疫球蛋白（约占血清免疫球蛋白的75%以上），在疾病和炎症反应中起着至关重要的作用[11–12]。每个IgG分子在重链Fc片段的天冬酰胺297（asparagine 297, Asn-297）处包含两个N-连接糖基化位点，此位点是保守糖基化位点[13]。Fc片段的N-糖基通过影响Fc γ 受体结合的亲和力来调节IgG效应分子的功能[4,14–15]。IgG糖基化诸多生理或病理变化具有特异性反应，但在健康个体中保持相对稳定[16]。研究发现，通过检测糖缀合物，可以显示癌症相关IgG糖基化的特征，在肝癌、结肠癌、胃癌、肺癌和卵巢癌中均有报道[17–20]。

糖组学分析与癌症关系研究已取得了一定进展，本次研究进一步分析了血清IgG N-糖基化在4种消化道癌症（即EC、GC、CRC）和胰腺癌（pancreatic cancer, PC）中的特征，并评估了基于糖基的模型诊断消化道癌症及其亚型的效能。

2. 材料与方法

2.1. 研究对象

本研究采用病例对照研究，纳入了2018年10月至2020年1月期间在中国医学科学院肿瘤医院收治的749名消化道癌症患者（见附录A中的图S1）。其中，EC患者100例，GC患者121例，CRC患者328例，PC患者200例。同时，招募了112名年龄相仿的健康参与者作为对照。

癌症患者的纳入标准如下：①通过组织活检的组织病理学检查诊断为EC（ICD-10编码C15）、GC（C16）、CRC（C18）和PC（C25）的患者；②组织学诊断标准符合世界卫生组织（WHO）消化道肿瘤分类（第4版）[21]；③无其他严重的躯体或精神障碍；④未参加其他临床试验。排除标准：①患有严重传染病和心血管疾病，如冠心病（I25.1）和脑卒中（I64）；②精神障碍患者（F99）；③拒绝参加本研究的患者。

该研究方案经中国医学科学院国家癌症中心/肿瘤医院伦理委员会批准（No.NCC1839）。所有问卷调查和生化指标检测均获得研究对象或其家属的知情同意。

2.2. 血液样本的采集和储存

禁食12 h后通过静脉穿刺收集血液样本。分离的血浆和血清分别用于IgG N-糖基的检测和常规生化指标检测。所有收集的血液样品在8 h内处理并储存在-80 °C直至进行进一步测量。

2.3. 人口统计学和临床变量的测量

人口统计学资料是通过与参与者或其家人的面对面访谈获得的。采用全自动生化分析仪（Hitachi, Tokyo, Japan）对非抗凝管收集的血清进行生化指标检测，包括：空腹血糖（fasting blood glucose, FBG）、血清总胆固醇（serum total cholesterol, TC）、高密度脂蛋白胆固醇（high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C）、低密度脂蛋白胆固醇（low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C）、甘油三酯（triglyceride, TG）（表1）。

2.4. 癌症生物标志物和炎症细胞因子分析

采用免疫化学发光法（AutoLumo A2000Plus, China）测定循环CA19-9和CEA水平。CA19-9的正常范围为0~37 U·mL⁻¹，CA19-9>37 U·mL⁻¹的受试者被定义为异常[22]。血清学CEA水平分为两组：正常（≤5.0 ng·mL⁻¹）和升高（>5.0 ng·mL⁻¹）[23]。

为了确定消化道癌症中炎症因子的水平，随机选择了

表1 研究对象的一般资料

Variables	Controls (n=112)	GC (n=121)	CRC (n=328)	EC (n=100)	PC (n=200)	P*	Adjusted P**
Sex (men/women)	42/70	98/23 ^a	194/134 ^{ab}	81/19 ^{ac}	111/89 ^{a,b,d}	1.430×10 ⁻¹³	3.146×10 ⁻¹³
Age	57.45±2.91	56.46±10.78	58.79±11.73	59.25±8.89	58.68±11.48	0.778	0.778
FBG (mmol·L ⁻¹)	5.91 (5.60, 6.08)	5.01 (4.52, 5.58) ^a	5.16 (4.70, 5.84) ^a	4.86 (4.46, 5.57) ^{ac}	5.67 (5.08, 6.98) ^{b,c,d}	1.049×10 ⁻²³	5.770×10 ⁻²³
TC (mmol·L ⁻¹)	4.76 (4.16, 5.36)	4.27 (3.60, 4.73) ^a	4.31 (3.62, 4.98) ^a	4.31 (3.88, 4.92) ^a	4.17 (3.52, 5.07) ^a	7.137×10 ⁻⁶	9.813×10 ⁻⁶
HDL-C (mmol·L ⁻¹)	1.38 (1.14, 1.67)	1.08 (0.89, 1.35) ^a	1.11 (0.91, 1.35) ^a	1.17 (0.98, 1.47) ^{a,b,c}	1.04 (0.65, 1.31) ^{a,b,c,d}	5.921×10 ⁻¹⁴	1.628×10 ⁻¹³
LDL-C (mmol·L ⁻¹)	2.64 (2.26, 3.07)	2.65 (2.08, 3.12)	2.75 (2.19, 3.20)	2.77 (2.32, 3.22)	2.41 (1.79, 2.97) ^{a,b,c,d}	3.733×10 ⁻⁴	4.563×10 ⁻⁴
TG (mmol·L ⁻¹)	1.20 (0.92, 1.54)	1.16 (0.88, 1.52)	1.22 (0.88, 1.73)	1.07 (0.84, 1.36)	1.27 (0.93, 2.05) ^{b,c,d}	0.005	0.006
CA19-9	7.63 (5.11, 10.70)	9.23 (5.15, 18.95) ^a	12.56 (7.50, 25.31) ^{ab}	8.68 (4.90, 14.08) ^c	66.88 (11.89, 529.83) ^{a,b,c,d}	6.378×10 ⁻³⁶	7.016×10 ⁻³⁵
CEA	1.53 (1.21, 2.00)	1.78 (1.04, 3.73) ^a	3.07 (1.48, 8.37) ^{ab}	2.04 (1.19, 2.97) ^{ac}	2.76 (1.80, 6.40) ^{ab,d}	1.266×10 ⁻¹⁹	4.642×10 ⁻¹⁹
Hyperglycemia (n, %)							
Presence	26 (23.2%)	16 (13.2%)	62 (18.9%)	16 (16.0%)	78 (39.0%) ^{a,b,c}	2.302×10 ⁻⁸	4.220×10 ⁻⁸
Absence	86 (76.8%)	105 (86.8%)	266 (81.1%)	84 (84.0%)	122 (61.0%)		
Dyslipidemia (n, %)							
Presence	29 (25.9%)	53 (43.8%) ^a	155 (47.3%) ^a	34 (34.0%) ^c	109 (54.5%) ^{a,d}	6.799×10 ⁻⁶	9.813×10 ⁻⁶
Absence	83 (74.1%)	68 (56.2%)	173 (52.7%)	66 (66.0%)	91 (45.5%)		

* P value of comparison between five groups; ** false discovery rate (FDR) adjusted P value using the Benjamini-Hochberg procedure, where *post hoc* comparisons were performed and adjusted with the Benjamini-Hochberg method;

^a Statistically significant compared with controls.

^b Statistically significant compared with GC.

^c Statistically significant compared with CRC.

^d Statistically significant compared with EC.

45名EC患者、45名GC患者、45名CRC患者和48名健康对照者来测试9种血清炎症因子，即白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-4、IL-6、IL-17A、IL-17F、IL-31、IL-33、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和可溶性CD40配体 (soluble CD40 ligand, sCD40L)。采用Bio-Plex悬液芯片系统检测方法 (Bio-Rad, USA) 进行炎症因子检测[24]。

2.5. IgG N-糖基分析

血浆IgG的分离和IgG Fc N-连接聚糖的释放按照先前建立的方法进行[25–26]。将100 μ L血浆样品添加到96孔蛋白G提取板 (BIA Separations, Slovenia) 中用于IgG分离。分离的IgG样品用1 mL的0.1 mol·L⁻¹甲酸变性，并立即用1 mol·L⁻¹碳酸氢铵中和。对于N-糖基释放，将4 μ L PNGase F酶加入IgG样品中，并在37 °C水浴中孵育18 h。

将释放的N-糖基用2-氨基苯甲酰胺 (2-aminobenzamide, 2-AB) 标记，然后转移到65 °C的烘箱中孵育3 h。采用亲水交互高效液相色谱-超高效液相色谱 (hydrophilic interaction liquid chromatography using ultra-performance liquid chromatography, HILIC-UPLC) 检测。该方法共检测到24个糖基峰 (glycan peak, GP)，其结构通过参考质

谱建立的数据库得到鉴定[27]。计算每个糖基峰的面积占所有糖基积分面积的百分比，作为每种糖基结构的测量值。此外，使用上述24个直接测量的糖基数值进一步计算54种糖基衍生指标，包括唾液酸糖基化、二等分N-乙酰葡萄糖胺 (N-acetylglucosamine, GlcNAc) 糖基化、半乳糖基化和岩藻糖基化指标 (见附录A中的表S1) [28]。

2.6. 统计分析

使用Kolmogorov-Smirnov检验对连续性数据进行正态性检验。符合正态分布的计量资料数据用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 来表示，不符合正态分布的计量资料数据则用中位数 (median, M) 和四分位数间距 (inter-quartile range, IQR) 来表示。采用单因素方差分析 (ANOVA) 分析正态分布变量的组间差异；否则，进行非参数检验 (即Kruskal-Wallis检验)。使用Benjamini-Hochberg方法进行多重比较校正来控制错误发现率 (false discovery rate, FDR)。分类变量以率或构成比 (%) 表示，并通过卡方检验 (χ^2 test) 进行分析。采用典型相关分析 (canonical correlation analysis, CCA) 探索24种糖基结构 (x) 和炎症因子 (y) 之间的整体相关性。通过典型载荷鉴别对典型变量具有影响的变量，使用大于0.30的绝对值来定义载

荷[29]。采用聚类分析，以进一步探索与消化道癌症相关的炎症因子[30]。

将研究对象按7:3随机分成训练集和验证集，使用训练集建立基于糖基结构的消化道癌症诊断模型，使用验证集进行模型的内部验证[31]。在模型的构建过程中，为了避免模型过度拟合以及有效控制模型的复杂性，使用最小绝对收缩和选择算子法（least absolute shrinkage and selection operator, LASSO）在24个初始糖基中筛选与消化道癌症相关的指标。然后将使用LASSO筛选出的具有统计学差异的糖基带入多变量logistic回归分析，并获得调整后的比值比（odds ratio, OR）和95%置信区间（confidence interval, CI）。使用筛选出的糖基构建每种消化道癌症的诊断模型。采用受试者工作特征（receiver operator characteristic, ROC）曲线评估该模型的效能，并计算曲线下面积（area under the curve, AUC）值、敏感性和特异性。使用软件SPSS 25.0（IBM, USA）和R 4.1.1进行统计分析。使用R软件工具包“glmnet”进行LASSO回归分析。使用R软件工具包“pROC”和GraphPad Prism（GraphPad Software, Inc., USA）生成ROC曲线和AUC值。以 $P < 0.05$ （双侧检验）作为检验水准。

3. 结果

3.1. 研究对象基本情况

749名消化道癌症患者（平均年龄58岁；男性484名，女性265名）和112名健康体检人群的人口统计学资料、生化指标和临床特征列于表1及附录A中的表S2~S11和图S2、图S3。各癌症组与对照组在年龄上没有统计学上的显著差异。与健康对照组相比，EC、GC、CRC和PC患者的血清TC和HDL-C水平降低。EC组、GC组和CRC组的FBG均显著低于对照组。GC、CRC和PC患者的血脂异常患病率高于对照组。此外，PC患者的高血糖患病率高于GC、CRC和对照组。

3.2. 癌症标志物检测结果

健康对照组CA19-9水平为 $7.63 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ （IQR: 5.11, 10.70），低于GC（ $M = 9.23$; IQR: 5.15, 18.95）、CRC（ $M = 12.56$; IQR: 7.50, 25.31）和PC（ $M = 66.88$; IQR: 11.89, 529.83）组。对照组CEA水平为 $1.53 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ （IQR: 1.21, 2.00），低于EC（ $M = 2.04$; IQR: 1.19, 2.97）、GC（ $M = 1.78$; IQR: 1.04, 3.73）、CRC（ $M = 3.07$; IQR: 1.48, 8.37）和PC（ $M = 2.76$; IQR: 1.80, 6.40）组。

3.3. 炎症因子水平检测结果

4组消化道癌症患者的IL-1 β 、IL-31、sCD40L和TNF- α 的炎症因子水平高于对照组（见附录A中的表S12~S22）。与EC组相比，PC患者血浆IL-31、sCD40L、TNF- α 水平升高。IL-4、IL-6、IL-17A、IL-17F和IL-33水平在4组之间未观察到统计学差异。

通过聚类分析以确定消化道癌症和对照组炎症因子的表达模式。消化道癌症的个体具有相似的炎症因子表达模式，消化道癌症患者的sCD40L和IL-31炎症因子水平高于健康对照组（图1）。

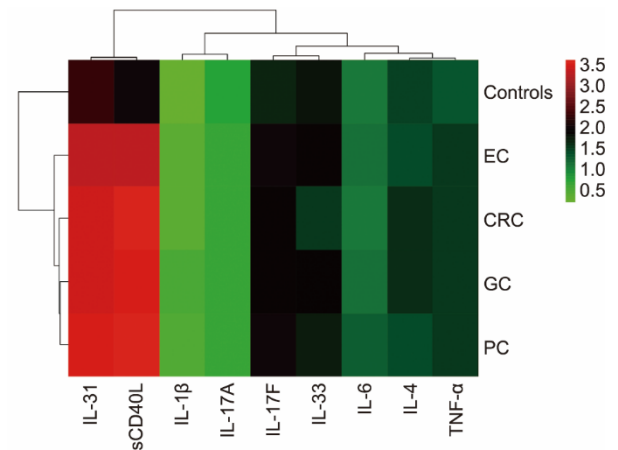


图1. 炎症因子与消化道癌症患者的聚类分析。

3.4. 消化道癌症血浆IgG N-糖基

使用HILIC-UPLC分析确定了24个IgG直接糖基指标。其中，有21种直接糖基指标在EC、GC、CRC、PC和对照组之间存在统计学差异（见表2及附录A中的图S4~S7）。利用直接糖基指标的测量结果进一步计算54个衍生糖基的特征[28]。4种消化道癌症组和对照组之间的54个衍生糖基指标中有48个存在统计学差异（见附录A中的表S23~S33）。

此外，为了探索IgG N-糖基在消化道癌症发展中的调节作用，计算了4种主要糖基化特征水平，即半乳糖基化（galactosylation）、岩藻糖基化（fucosylation）、唾液酸化（sialylation）及二等分N-乙酰葡萄糖胺（bisecting GlcNAc）糖基化水平（见附录A中的表S34）[13]。

3.4.1. 半乳糖基化水平

在EC中非半乳糖基化（G0）的糖基结构所占百分比为37.37%，在GC中为36.00%，在CRC中为36.78%，在PC中为36.85%，高于对照组（31.42%）（表3）。半乳糖基化指标包括末端具有一个半乳糖（G1）和两个半乳糖（G2）的糖链[6]。G1在EC、GC、CRC和PC组的丰度分

表2 24个IgG N-糖基化直接测量指标比较

Glycans	Controls (n=112)	GC (n=121)	CRC (n=328)	EC (n=100)	PC (n=200)	P*	Adjusted P**
GP1	0.15 (0.08, 0.27)	0.10 (0.07, 0.18) ^a	0.28 (0.19, 0.42) ^{a,b}	0.18 (0.14, 0.27) ^{a,b,c}	0.21 (0.14, 0.31) ^{a,b,c}	1.657×10 ⁻⁴⁰	1.326×10 ⁻³⁹
GP2	0.35 (0.21, 0.52)	0.51 (0.40, 0.74) ^a	0.65 (0.42, 1.06) ^{a,b}	0.65 (0.45, 0.95) ^{a,b}	0.61 (0.39, 0.82) ^{a,c}	5.033×10 ⁻¹⁷	1.726×10 ⁻¹⁶
GP3	0.28 (0.19, 0.45)	0.24 (0.18, 0.35) ^a	0.20 (0.15, 0.27) ^{a,b}	0.16 (0.11, 0.21) ^{a,b,c}	0.24 (0.16, 0.38) ^{a,c,d}	4.292×10 ⁻¹⁷	1.717×10 ⁻¹⁶
GP4	19.58 (15.69, 22.39)	22.46 (19.56, 26.49) ^a	22.77 (19.53, 27.04) ^a	22.67 (19.31, 27.00) ^a	22.71 (18.67, 26.56) ^a	5.021×10 ⁻¹⁰	9.022×10 ⁻¹⁰
GP5	0.35 (0.19, 0.48)	0.10 (0.05, 0.22) ^a	0.28 (0.16, 0.49) ^b	0.22 (0.14, 0.30) ^{a,b,c}	0.27 (0.17, 0.42) ^{b,d}	1.126×10 ⁻²⁴	6.756×10 ⁻²⁴
GP6	4.31 (3.77, 5.16)	5.22 (4.60, 5.92) ^a	5.30 (4.46, 6.19) ^a	5.56 (4.74, 6.63) ^a	5.33 (4.43, 6.16) ^a	6.343×10 ⁻¹³	1.691×10 ⁻¹²
GP7	0.39 (0.26, 0.61)	0.42 (0.33, 0.54)	0.44 (0.31, 0.60)	0.40 (0.28, 0.59)	0.42 (0.29, 0.55)	0.409	0.409
GP8	18.66 (17.71, 19.75)	17.94 (17.02, 19.37) ^a	18.12 (17.05, 19.15) ^a	17.66 (16.80, 18.75) ^a	17.97 (16.94, 18.96) ^a	1.163×10 ⁻⁴	1.551×10 ⁻⁴
GP9	9.88 (8.81, 10.63)	9.39 (8.62, 10.36)	9.60 (8.80, 10.55)	9.21 (8.42, 10.02) ^{a,c}	9.51 (8.58, 10.60)	0.017	0.020
GP10	4.19 (3.54, 4.63)	4.40 (3.84, 4.97) ^a	4.65 (3.92, 5.31) ^{a,b}	5.10 (4.34, 5.56) ^{a,b,c}	4.56 (3.83, 5.14) ^{a,d}	5.263×10 ⁻¹⁰	9.022×10 ⁻¹⁰
GP11	1.05 (0.79, 1.47)	0.90 (0.73, 1.25) ^a	0.67 (0.56, 0.84) ^{a,b}	0.62 (0.53, 0.73) ^{a,b,c}	0.93 (0.78, 1.15) ^{c,d}	4.955×10 ⁻⁴⁵	1.189×10 ⁻⁴³
GP12	0.69 (0.46, 0.98)	0.72 (0.50, 0.91)	0.68 (0.44, 0.97)	0.77 (0.56, 1.04)	0.65 (0.45, 0.88)	0.191	0.199
GP13	0.49 (0.29, 0.66)	0.33 (0.24, 0.44) ^a	0.34 (0.25, 0.45) ^a	0.28 (0.22, 0.34) ^{a,b,c}	0.33 (0.25, 0.46) ^{a,d}	8.456×10 ⁻¹¹	1.845×10 ⁻¹⁰
GP14	15.12 (12.69, 17.55)	13.31 (11.64, 15.20) ^a	12.76 (10.46, 14.63) ^a	13.22 (11.08, 15.42) ^a	12.74 (10.58, 15.13) ^a	1.761×10 ⁻¹⁰	3.522×10 ⁻¹⁰
GP15	1.42 (1.15, 1.61)	1.34 (1.16, 1.54)	1.31 (1.08, 1.52) ^a	1.37 (1.09, 1.65)	1.29 (1.03, 1.53) ^a	0.021	0.024
GP16	3.12 (2.85, 3.41)	2.96 (2.65, 3.23)	3.04 (2.72, 3.41)	3.07 (2.68, 3.44)	3.12 (2.69, 3.44)	0.111	0.121
GP17	0.78 (0.67, 0.94)	0.92 (0.78, 1.04) ^a	0.89 (0.77, 1.04) ^a	1.03 (0.87, 1.18) ^{a,b,c}	0.95 (0.80, 1.13) ^{a,b,c}	6.785×10 ⁻¹²	1.628×10 ⁻¹¹
GP18	10.48 (8.96, 12.51)	9.21 (7.98, 10.50) ^a	8.56 (7.16, 10.16) ^a	9.40 (7.95, 11.24) ^{a,c}	9.01 (7.40, 10.61) ^a	1.918×10 ⁻¹³	5.754×10 ⁻¹³
GP19	1.90 (1.67, 2.16)	2.02 (1.72, 2.27)	2.18 (1.96, 2.43) ^{a,b}	2.01 (1.75, 2.26) ^c	2.11 (1.85, 2.40) ^a	2.697×10 ⁻⁹	4.315×10 ⁻⁹
GP20	0.12 (0.08, 0.17)	0.12 (0.07, 0.18)	0.05 (0.02, 0.08) ^{a,b}	0.06 (0.04, 0.10) ^{a,b,c}	0.07 (0.04, 0.11) ^{a,b,c}	1.035×10 ⁻⁴¹	1.242×10 ⁻⁴⁰
GP21	0.63 (0.40, 0.75)	0.92 (0.70, 1.26) ^a	0.92 (0.79, 1.10) ^a	0.97 (0.77, 1.10) ^a	0.99 (0.80, 1.21) ^{a,c}	4.134×10 ⁻²⁴	1.984×10 ⁻²³
GP22	0.18 (0.13, 0.24)	0.22 (0.16, 0.28) ^a	0.21 (0.14, 0.28) ^a	0.19 (0.14, 0.24) ^b	0.19 (0.14, 0.26)	0.007	0.009
GP23	1.94 (1.71, 2.34)	1.83 (1.59, 2.20)	1.78 (1.52, 2.19) ^a	1.60 (1.31, 1.92) ^{a,b}	1.76 (1.43, 2.09) ^{a,b,d}	5.592×10 ⁻⁸	8.388×10 ⁻⁸
GP24	2.27 (1.99, 2.63)	2.29 (1.95, 2.62)	2.40 (2.06, 2.71)	2.02 (1.69, 2.40) ^{a,b,c}	2.25 (1.95, 2.70) ^{c,d}	7.240×10 ⁻⁷	1.022×10 ⁻⁶

* P value of comparison between five groups; ** FDR adjusted P value using the Benjamini-Hochberg procedure, where *post hoc* comparisons were performed and adjusted with the Benjamini-Hochberg method;

^a Statistically significant compared with controls.

^b Statistically significant compared with GC.

^c Statistically significant compared with CRC.

^d Statistically significant compared with EC.

表3 主要糖基特征的比较

Summary glycans	Controls (n=112)	GC (n=121)	CRC (n=328)	EC (n=100)	PC (n=200)	P*	Adjusted P**
Fucosylation	95.49 (94.30, 96.43)	95.46 (94.15, 95.97)	95.08 (94.23, 95.94)	95.24 (94.16, 95.82)	94.96 (94.06, 95.73) ^a	0.022	0.022
Bisecting GlcNAc	15.92 (14.83, 17.40)	17.10 (15.67, 18.35) ^a	17.31 (15.74, 19.05) ^a	17.68 (15.68, 18.93) ^a	17.09 (15.57, 18.90) ^a	3.053×10 ⁻⁵	4.580×10 ⁻⁵
Sialylation	21.63 (19.98, 24.28)	20.93 (18.97, 22.78) ^a	20.22 (18.36, 22.31) ^a	20.70 (18.64, 23.07) ^a	20.86 (18.06, 23.24) ^a	1.322×10 ⁻⁴	1.586×10 ⁻⁴
Galactosylation							
G0	31.42 (26.35, 35.97)	36.00 (32.55, 41.49) ^a	36.78 (32.50, 41.21) ^a	37.37 (31.83, 41.39) ^a	36.85 (31.89, 41.46) ^a	6.644×10 ⁻⁴	3.986×10 ⁻¹²
G1	44.47 (42.86, 45.86)	42.90 (40.85, 44.39) ^a	42.98 (40.95, 44.27) ^a	42.22 (40.85, 43.97) ^a	43.05 (40.63, 44.61) ^a	2.094×10 ⁻⁹	4.188×10 ⁻⁹
G2	22.93 (19.32, 26.78)	20.40 (17.17, 22.87) ^a	19.30 (15.70, 22.32) ^a	19.75 (16.58, 23.44) ^a	18.99 (16.02, 23.66) ^a	1.071×10 ⁻⁹	3.213×10 ⁻⁹

G0, agalactosylation; G1, monogalactosylation; G2, digalactosylation; *P value of comparison between five groups; ** FDR adjusted P value using the Benjamini-Hochberg procedure, where *post hoc* comparisons were performed and adjusted with the Benjamini-Hochberg method.

^a Statistically significant compared with controls.

别为 42.22%、42.90%、42.98% 和 43.05%，低于对照组（分别为 19.75%、20.40%、19.30% 和 18.99%）也低于对照组（44.47%）。此外，EC、GC、CRC 和 PC 患者的 G2 丰度（分别为 19.75%、20.40%、19.30% 和 18.99%）也低于对照组（22.93%）。

3.4.2. 唾液酸化水平

EC、GC、CRC 和 PC 组的唾液酸化水平分别为 20.70%、20.93%、20.22% 和 20.86%，均低于对照组 (21.63%) (表 3)。

3.4.3. 二等分 *N*-乙酰葡萄糖胺糖基化水平

在 EC (17.68%)、GC (17.10%)、CRC (17.31%) 和 PC (17.09%) 患者中，二等分 GlcNAc 糖基化水平高于对照组 (15.92%) (表 3)。

3.4.4. 岩藻糖基化水平

PC 患者的岩藻糖基化水平 (94.96%) 低于对照组 (95.49%) (表 3)。

这些发现表明了消化道癌症患者中半乳糖基化和唾液酸化水平降低，而二等分 GlcNAc 糖基化水平升高。半乳糖基化、唾液酸化、二等分 GlcNAc 糖基化和岩藻糖基化主要特征的多元回归分析结果见附录 A 中的表 S35~S38 及方框 S1。

3.5. 血浆 IgG N-糖基与消化道癌症的相关分析

在校正性别、FBG、TC、HDL-C 和血脂异常患病率后，有 4 种糖基结构与 EC 相关：GP10 (OR: 7.371; 95% CI: 2.301, 23.608; $P = 0.001$)；GP11 (OR: 5.943×10^{-6} ; 95% CI: 3.061×10^{-8} , 0.001; $P = 0.001$)；GP14 (OR: 0.758; 95% CI: 0.607, 0.948; $P = 0.015$) 和 GP23 (OR: 0.195; 95% CI: 0.055, 0.697; $P = 0.012$) (见附录 A 中的表 S39)。同时，性别、FBG、TC、HDL-C 和血脂异常患病率无统计学差异。

GC 的 logistic 回归分析显示，GP5 (OR: 4.489×10^{-4} ; 95% CI: 1.817×10^{-5} , 0.011; $P < 0.001$)，GP6 (OR: 2.652; 95% CI: 1.625, 4.326; $P < 0.001$)、性别 (OR: 0.190; 95% CI: 0.070, 0.519; $P = 0.001$)、FBG (OR: 0.585; 95% CI: 0.435, 0.787; $P < 0.001$) 和 TC (OR: 0.438; 95% CI: 0.257, 0.745; $P = 0.002$) 存在统计学差异 (见附录 A 中的表 S40)。

对于 CRC，两个糖基和三个协变量具有统计学意义：GP2 (OR: 12.941; 95% CI: 3.840, 43.616; $P < 0.001$)；GP20 (OR: 1.305×10^{-10} ; 95% CI: 3.535×10^{-14} , 4.818×10^{-7} ; $P < 0.001$)；性别 (OR: 0.428; 95% CI: 0.203, 0.901; $P = 0.026$)；FBG (OR: 0.647; 95% CI: 0.496, 0.844; $P = 0.001$)；和 HDL-C (OR: 0.222; 95% CI: 0.087, 0.566; $P = 0.002$) (见附录 A 中的表 S41)。

4 个糖基和一个协变量与 PC 相关：GP17 (OR: 53.358; 95% CI: 9.165, 310.659; $P < 0.001$)；GP19 (OR:

3.855; 95% CI: 1.506, 9.869; $P = 0.005$)；GP20 (OR: 3.076×10^{-5} ; 95% CI: 1.251×10^{-7} , 0.008; $P < 0.001$)；GP23 (OR: 0.115; 95% CI: 0.046, 0.286; $P < 0.001$) 和 HDL-C (OR: 0.061; 95% CI: 0.022, 0.175; $P < 0.001$) (见附录 A 中的表 S42)。

3.6. 血浆 IgG N-糖基与血清炎症因子的相关分析

IgG N-糖基的组成与炎症因子相关，典型相关系数 (r) 为 0.556 ($P = 0.005$) (图 2)。6 种糖基结构 (GP1、GP2、GP4、GP14、GP15 和 GP18) 与 sCD40L、IL-31、TNF- α 、IL-17A 和 IL-6 相关。此外，在 GP18 和典型变量之间观察到强关联，载荷为 0.497，炎症因子中具有最高典型载荷的响应变量是 sCD40L，载荷为 -0.669。

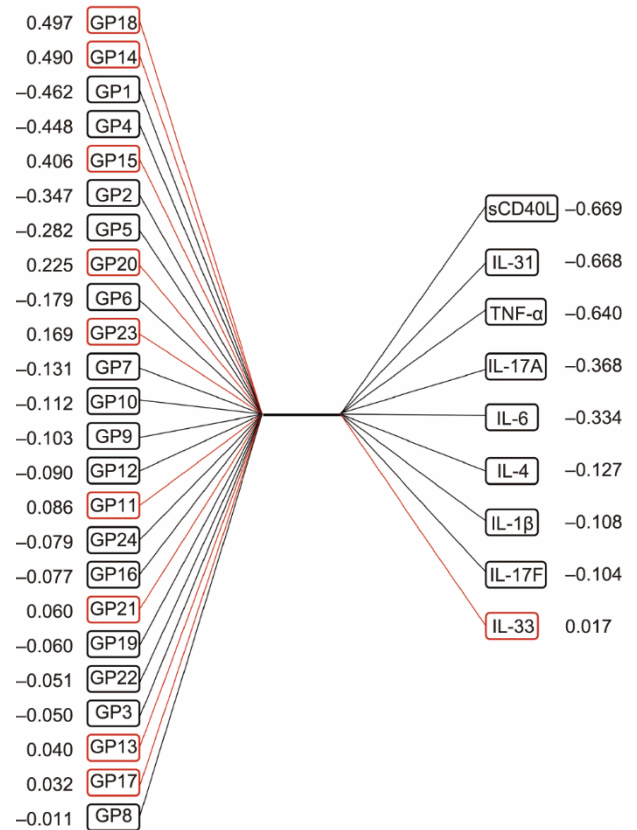


图 2. IgG N-糖基直接指标变量组与炎症因子指标组典型变量典型结构图。相关系数高于 0.30 时被认为显著相关，正相关关系标记为红色方框，负相关关系标注为黑色方框。

3.7. 消化道癌症血浆 IgG N-糖基生物标志物的筛选

通过 Lasso 回归和 logistic 回归分析建立基于 24 个糖基化直接测量指标的消化道癌症判别模型，其中 4 个糖基 (GP10、GP11、GP14 和 GP23) 用于 EC 的诊断 [图 3 (a)]；通过 ROC 曲线分析评估该判别模型的诊断效能 [图 4 (a)]。糖基模型的 AUC 值为 0.972 (95% CI: 0.945, 0.998)，敏感性为 95.3%，特异性为 95.0%，表明基于糖

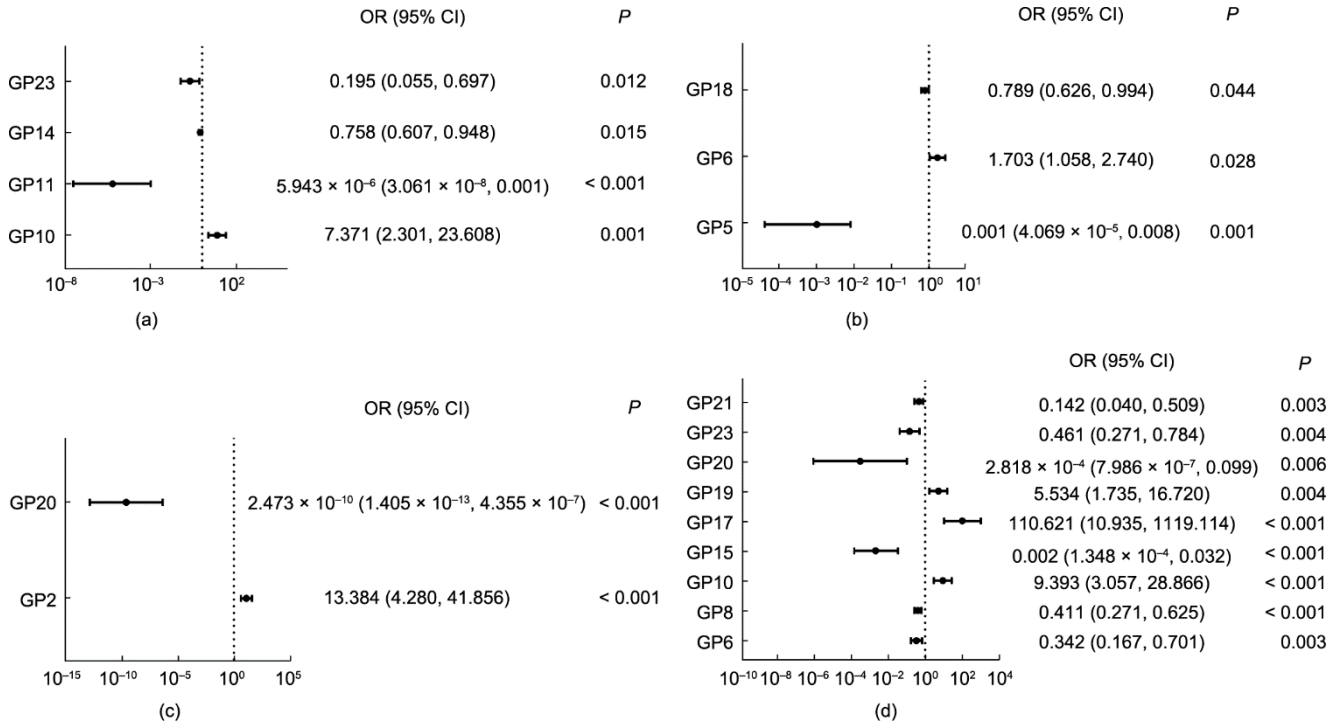


图3. IgG N-糖基直接指标与消化道癌症的相关性分析。(a) 食管癌 (EC); (b) 胃癌 (GC); (c) 结直肠癌 (CRC); (d) 胰腺癌 (PC)。

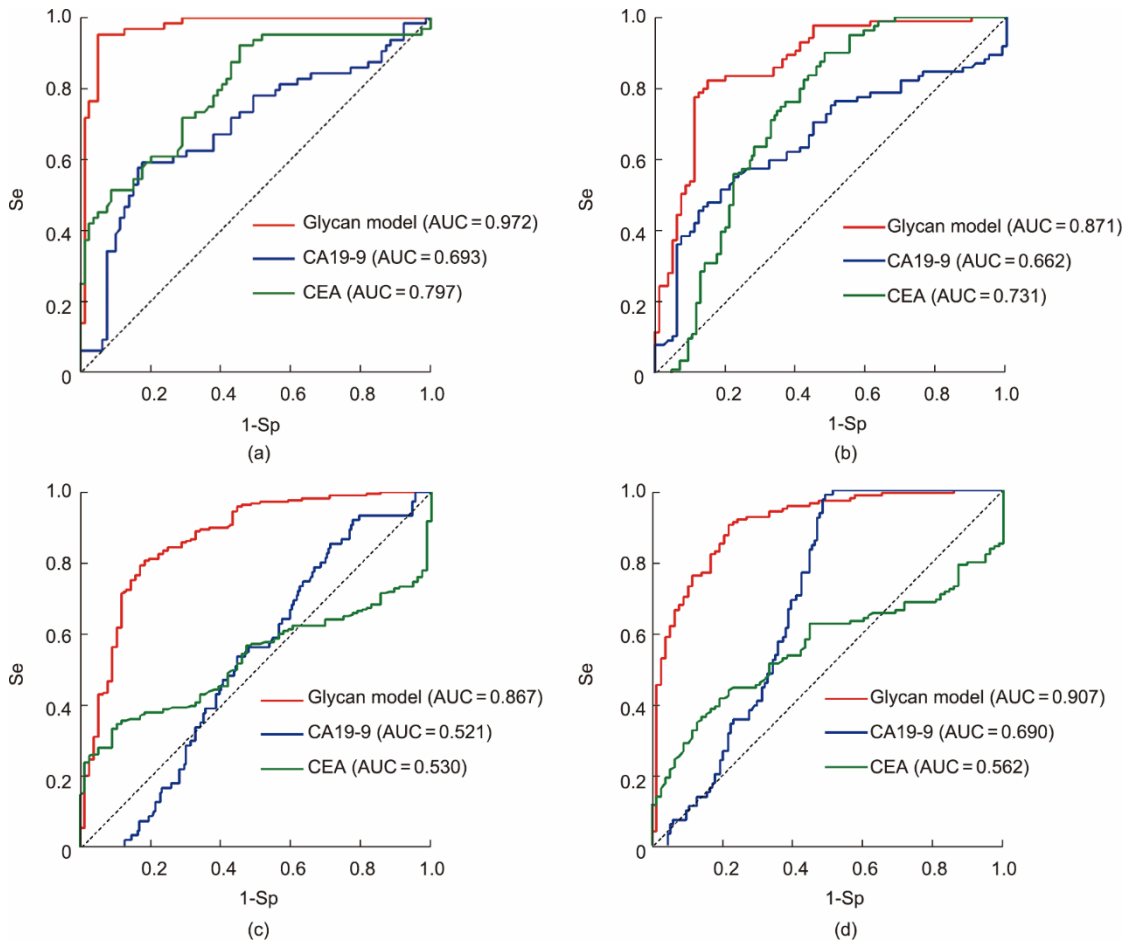


图4. 利用 logistic 回归的 IgG N-糖基直接指标组成的模型诊断消化道癌症与对照组的 ROC 曲线分析。(a) 食管癌模型; (b) 胃癌模型; (c) 结直肠癌模型; (d) 胰腺癌模型。

基的模型高于CA19-9的诊断效能 (AUC = 0.693; 95% CI: 0.603, 0.783) 和 CEA (AUC = 0.797; 95% CI: 0.723, 0.871)。

三种糖基结构 (GP5、GP6和GP18) 用于GC的诊断 (AUC: 0.871; 95% CI: 0.815, 0.926), 与CA19-9 (AUC: 0.662; 95% CI: 0.577, 0.747)、CEA (AUC: 0.731; 95% CI: 0.653, 0.810) 相比, 基于糖基的模型诊断效能更好[图3 (b) 和图4 (b)]。

与CA19-9 (AUC: 0.521; 95% CI: 0.453, 0.590) 和 CEA (AUC: 0.530; 95% CI: 0.466, 0.594) 的诊断效能相比, 由GP2和GP20组成的CRC诊断模型具有更高的性能 (AUC: 0.867; 95% CI: 0.816, 0.917) [图3 (c) 和图4 (c)]。

此外, 9种糖基结构 (GP6、GP8、GP10、GP15、GP17、GP19、GP20、GP21和GP23) 对PC的诊断效果

(AUC: 0.907; 95% CI: 0.865, 0.949) 也明显优于CA19-9 (AUC: 0.690; 95% CI: 0.620, 0.759) 和CEA (AUC: 0.562; 95% CI: 0.486, 0.639) [图3 (d) 和图4 (d)]。

在验证集中, 基于糖基模型的EC、GC、CRC和PC的AUC分别为0.991 (95% CI: 0.977, 0.999)、0.874 (95% CI: 0.791, 0.957)、0.856 (95% CI: 0.785, 0.928) 和0.872 (95% CI: 0.800, 0.944) (图5)。

3.8. 不同分期消化道癌症的IgG N-糖基比较

早期和晚期消化道癌症患者的糖基特征相似 (见附录A中的表S43~S46)。

3.9. 早期和晚期消化道癌症的诊断模型

本研究将临床I-II期定义为早期, III-IV期定义为晚期 (见附录A中的图S3)。基于24个直接糖基指标建立了

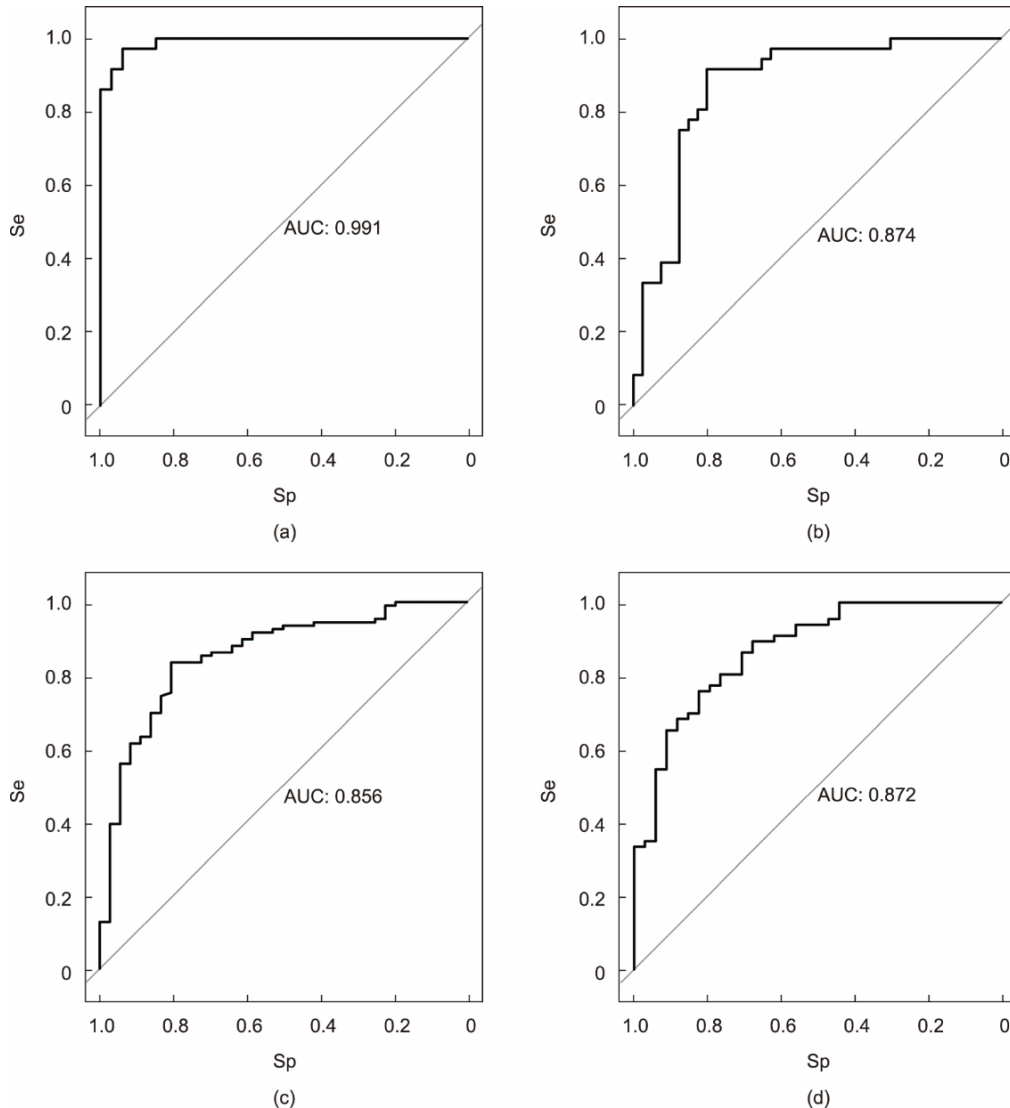


图5. 内部验证集的ROC曲线。(a) 食管癌; (b) 胃癌; (c) 结直肠癌; (d) 胰腺癌。

早期EC的诊断模型，其中包括4个糖基（GP11、GP21、GP23和GP24）（见附录A中的表S47）。同时，选择三种糖基（GP11、GP17和GP23）建立了晚期EC的诊断模型（见附录A中的表S47）。

关于GC的亚组分析，两种糖基（GP5和GP6）用于早期GC的诊断，并且使用两种糖基（GP4和GP5）构建晚期GC的诊断模型（见附录A中的表S48）。关于CRC，4种糖基（GP8、GP10、GP11和GP20）用于早期癌症的诊断，并选择两种糖基（GP2和GP18）用于晚期癌症的诊断（见附录A中的表S49）。此外，两种糖基（GP2和GP13）用于早期PC的诊断，6种糖基（GP7、GP8、GP17、GP18、GP20、GP23）用于晚期PC的诊断（见附录A中的表S50）。模型内部验证的详细信息见附录A中的图S8。

4. 讨论

高通量的基因组学和蛋白质组学实验产生的大量数据有助于对癌症的理解，但迄今为止，经过充分验证且临床上有用的生物标志物却非常稀缺。除了基因组学和蛋白质组学，新兴的糖基组学领域在医学和癌症研究中也变得越来越重要[32]。IgG Fc片段的糖基结构（半乳糖基化、唾液酸化、二等分GlcNAc和岩藻糖基化）参与炎症性疾病的病理生理过程，并为炎症性疾病（包括癌症）的早期诊断和靶向治疗提供潜力（见附录A中的表S51）[9,25,28,33–34]。

本研究通过基于HILIC-UPLC的高通量方法全面分析了4种消化道癌症（EC、GC、CRC和PC）中的血清学IgG N-糖基图谱。证明了消化道癌症患者中IgG半乳糖基化和唾液酸化水平的减少以及二等分GlcNAc糖基化水平的增加。IgG N-糖基的这些改变导致炎症因子（如IL-1 β 、IL-31、sCD40L和TNF- α ）的病理性增加，并促进消化道癌症的进展。此外，IgG N-糖基化特征有能力成为消化道癌症诊断和从健康个体中区分亚型的潜在生物标志物，其诊断性能明显高于常规临床应用的血清学生物标志物，如CA19-9和CEA。因此，IgG N-糖基的高通量检测方法有望应用于消化道癌症的早期诊断和靶向治疗。

肿瘤发生的机制受急性和慢性炎症的调控[35–36]。多种分子，尤其是促炎细胞因子（如IL-1 β 、IL-6和TNF- α ）参与了癌症的发展[37–40]。研究表明，IgG N-糖基可调节炎症和自身免疫性疾病中的促炎和抗炎平衡[15,41–43]。在当前的研究中，确定了消化道癌症相关IgG N-糖基与炎性细胞因子之间的整体相关性，与之前在消化道原

发性肿瘤患者调查中的发现一致[44]。这些发现强调了IgG N-糖基化在调节炎症反应中的作用。

IgG唾液酸化也称为N-乙酰神经氨酸（Neu5Ac），通过调节抗体依赖性细胞毒性（ADCC）的促炎和抗炎平衡，在IgG的抗炎特性中发挥重要作用[45–47]。在IgG N-糖基的发展过程中，末端唾液酸残基与半乳糖共价结合，导致在自然杀伤（NK）细胞上连接Fc γ RIIIa的能力降低，从而通过ADCC降低炎症活性[48–49]。唾液酸糖基化结构的缺失会影响IgG的功能，从抗炎作用转变为促炎作用。与本研究的发现一致，唾液酸化的减少也与消化道癌症有关[7–8,50–51]。

半乳糖基化可促进IgG与抑制性Fc γ RIIb受体的亲和力进而增加抗炎活性[52]。IgG半乳糖基化的减少（称为无半乳糖基化）可以暴露GlcNAc残基，从而增加了与甘露糖结合凝集素（MBL）的结合，然后导致补体依赖细胞毒作用（complement-dependent cytotoxicity, CDC）活性上调，从而引发炎症[5,52–54]。人体免疫系统是对抗癌症最重要的防御系统，在识别和清除新生肿瘤细胞方面起着至关重要的作用。研究表明，补体在各种肿瘤微环境中被广泛激活，导致肿瘤的发生和生长[55]。与本研究的发现一致，已在GC和CRC患者中检测到IgG半乳糖基化水平的升高，表明IgG半乳糖基化在癌症发展中发挥重要的作用[8,51,54,56–58]。研究还表明，半乳糖基化与TNF- α 和C反应蛋白（CRP）等促炎细胞因子的增加密切相关[59–60]。本研究观察到EC、GC、CRC和PC患者的TNF- α 水平升高，证明IgG的半乳糖基化在癌症炎症过程的上调中起着至关重要的作用。

核心岩藻糖基化由于其通过ADCC的抗体治疗肿瘤的机制而被广泛研究。IgG结构上的岩藻糖基化通过减少Fc γ RIIIa与NK细胞的亲和力来抑制ADCC，同时下调IgG的促炎特性[61–62]。N-糖基上不含核心岩藻糖的IgG具有高达100倍的ADCC活性增强[63]。在本研究中，观察到PC患者的岩藻糖基化水平降低，这与另一项关于中国PC患者的研究结果相一致，其中岩藻糖基化、唾液酸化和半乳糖基化水平降低[7]。此外，较低的岩藻糖基化IgG促进单核细胞分泌的促炎细胞因子（包括IL-1 β 、IL-6和TNF- α ）的产生[64]。同样，富含岩藻糖基化结构的IgG减少了TNF- α 和IL-6的产生，从而产生抗炎活性[65]。本研究显示消化道癌症患者的TNF- α 、IL-1 β 、IL-31和sCD40L水平高于对照组，因此支持上述发现[66–68]。

关于IgG的二等分GlcNAc糖基化，该糖基部分通过增加对Fc γ RIIIa的亲和力来调节ADCC，从而导致IgG的

促炎功能[47,69]。这种炎症进展平衡的破坏被认为在肿瘤的发展中发挥重要作用[62,70]。在本研究中,观察到EC、GC、CRC和PC患者中二等分GlcNAc糖基化水平的增加,这与之前报道的类似发现一致[7,50,54,57]。一项体外实验表明,二等分GlcNAc糖基化水平的减少与IL-21水平的增加有关[71]。然而,在本研究参与者的血清中未检测到IL-21值。

尽管ADCC是抗肿瘤的关键途径,但未证明异常IgG N-糖基诱导的ADCC上调与更好的诊断相关。研究发现,IgG N-糖基中半乳糖基化水平的降低、唾液酸化水平的降低和二等分GlcNAc糖基化水平的升高与CRC患者的预后较差有关[51]。

大量血清学生物标志物已被研究用于监测癌症的临床进展或确定治疗方案。尽管这些肿瘤生物标志物中的一些在疾病管理中起着重要作用,但由于敏感性或特异性不足,它们作为诊断工具的用途有限。目前,IgG N-糖基检测以非侵入性方法在炎症和免疫疾病的诊断中发挥了较高的准确性[72]。荧光标记的N-糖基的HILIC分析与UPLC分析的结合被证明是一种有价值的方法[27]。在本研究中,IgG N-糖基化的高通量分析呈现出高AUC值,分别为0.972、0.871、0.867和0.907,用于区分EC、GC、CRC和PC。与前列腺癌、肺癌和膀胱癌中的研究结果一致[73–75],本研究结果证明了IgG N-糖基化在消化道癌症早期诊断中的作用。

本研究仍存在几个应该解释的局限性。首先,本研究为病例对照研究设计,在推断IgG N-糖基化与疾病之间因果关系时受到限制。其次,尽管糖基化可以反映对癌症的主要病因学影响,但本研究并未测量环境和生活方式因素,而这些因素在癌症的发展中起着重要作用。

总之,本文的研究结果表明,IgG唾液酸化和半乳糖基化的减少,以及二等分GlcNAc的增加,可能在消化道癌症的癌变和进展中发挥重要作用。血清学IgG N-糖基化可作为非侵入性辅助消化道癌症亚型临床诊断的潜在候选者。据了解,本研究是首个对EC、GC、CRC和PC患者IgG N-糖基谱进行综合比较的报道,该研究为识别消化道癌症的新诊断生物标志物提供了机会。

致谢

本研究得到山东省自然科学基金(ZR2022MH082)、国家自然科学基金(81872682)项目资助。感谢首都医科大学王友信教授给予的指导。

Compliance with ethics guidelines

Pengcheng Liu, Xiaobing Wang, Aishe Dun, Yutong Li, Houqiang Li, Lu Wang, Yichun Zhang, Cancan Li, Jinxia Zhang, Xiaoyu Zhang, Lixing Ma, and Haifeng Hou declare that they have no conflicts 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.2023.02.008>.

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] Cao W, Chen H, Yu YW, Li N, Chen W. Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: a secondary analysis of the global cancer statistics 2020. *Chin Med J (Engl)* 2021; 134(7):783–91.
- [3] Feng RM, Zong YN, Cao SM, Xu RH. Current cancer situation in China: good or bad news from the 2018 Global Cancer Statistics? *Cancer Commun (Lond)* 2019; 39(1):22.
- [4] Schwab I, Nimmerjahn F. Intravenous immunoglobulin therapy: how does IgG modulate the immune system? *Nat Rev Immunol* 2013; 13(3):176–89.
- [5] Wang J, Huang C, Zhou J, Zhao K, Li Y. Causal link between immunoglobulin G glycosylation and cancer: a potential glyco-biomarker for early tumor detection. *Cell Immunol* 2021; 361:104282.
- [6] Kljaković-Gašpić Batinjan M, Petrović T, Vučković F, Hadžibegović I, Radovani B, Jurin I, et al. Differences in immunoglobulin G glycosylation between influenza and COVID-19 patients. *Engineering*. In press.
- [7] Shih HC, Chang MC, Chen CH, Tsai IL, Wang SY, Kuo YP, et al. High accuracy differentiating autoimmune pancreatitis from pancreatic ductal adenocarcinoma by immunoglobulin G glycosylation. *Clin Proteomics* 2019; 16:1.
- [8] Kodar K, Stadlmann J, Klaamas K, Sergeyev B, Kurtenkov O. Immunoglobulin G Fc N-glycan profiling in patients with gastric cancer by LC-ESI-MS: relation to tumor progression and survival. *Glycoconj J* 2012; 29(1):57–66.
- [9] Pinho SS, Reis CA. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nat Rev Cancer* 2015; 15(9):540–55.
- [10] Duffy MJ, van Dalen A, Haglund C, Hansson L, Holinski-Feder E, Klapdor R, et al. Tumour markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines for clinical use. *Eur J Cancer* 2007; 43(9):1348–60.
- [11] Scott DW, Vallejo MO, Patel RP. Heterogenic endothelial responses to inflammation: role for differential N-glycosylation and vascular bed of origin. *J Am Heart Assoc* 2013; 2(4):e000263.
- [12] Kaneko Y, Nimmerjahn F, Ravetch JV. Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science* 2006; 313(5787): 670–3.
- [13] Huffman JE, Pučić-Baković M, Klarić L, Hennig R, Selman MH, Vučković F, et al. Comparative performance of four methods for high-throughput glycosylation analysis of immunoglobulin G in genetic and epidemiological research. *Mol Cell Proteomics* 2014; 13(6):1598–610.
- [14] Ha S, Ou Y, Vlasak J, Li Y, Wang S, Vo K, et al. Isolation and characterization of IgG1 with asymmetrical Fc glycosylation. *Glycobiology* 2011; 21(8): 1087–96.
- [15] Reily C, Stewart TJ, Renfrow MB, Novak J. Glycosylation in health and disease. *Nat Rev Nephrol* 2019; 15(6):346–66.
- [16] Gornik O, Wagner J, Pucić M, Knezević A, Redžić I, Lauc G. Stability of N-

- glycan profiles in human plasma. *Glycobiology* 2009;19(12):1547–53.
- [17] Ren S, Zhang Z, Xu C, Guo L, Lu R, Sun Y, et al. Distribution of IgG galactosylation as a promising biomarker for cancer screening in multiple cancer types. *Cell Res* 2016;26(8):963–66.
- [18] Yi C, Weng H, Zhou F, Fang M, Ji J, Cheng C, et al. Elevated core-fucosylated IgG is a new marker for hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *OncoImmunology* 2015;4(12):e1011503.
- [19] Qian Y, Wang Y, Zhang X, Zhou L, Zhang Z, Xu J, et al. Quantitative analysis of serum IgG galactosylation assists differential diagnosis of ovarian cancer. *J Proteome Res* 2013;12(9):4046–55.
- [20] Vučković F, Theodoratou E, Taçi K, Timofeeva M, Vojta A, Štambuk J, et al. IgG glycome in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2016;22(12):3078–86.
- [21] Fléjou JF. [WHO Classification of digestive tumors: the fourth edition]. *Ann Pathol* 2011;31 Suppl 5:S27–31.
- [22] Serdarevic N. The comparison between different immunoassays for serum carbohydrate antigen (CA 19-9) concentration measurement. *Acta Inform Med* 2018;26(4):235–9.
- [23] Tie J, Cohen JD, Wang Y, Christie M, Simons K, Lee M, et al. Circulating tumor DNA analyses as markers of recurrence risk and benefit of adjuvant therapy for stage III colon cancer. *JAMA Oncol* 2019;5(12):1710–7.
- [24] Jeschke MG, Kulp GA, Kraft R, Finnerty CC, Mlcak R, Lee JO, et al. Intensive insulin therapy in severely burned pediatric patients: a prospective randomized trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;182(3):351–9.
- [25] Hou H, Xu X, Sun F, Zhang X, Dong H, Wang L, et al. Hyperuricemia is associated with immunoglobulin G N-glycosylation: a community-based study of glycan biomarkers. *OMICS* 2019;23(12):660–7.
- [26] Pucić M, Knezević A, Vidic J, Adamczyk B, Novokmet M, Polasek O, et al. High throughput isolation and glycosylation analysis of IgG-variability and heritability of the IgG glycome in three isolated human populations. *Mol Cell Proteomics* 2011;10(10):M111.010090.
- [27] Liu D, Xu X, Li Y, Zhang J, Zhang X, Li Q, et al. Immunoglobulin G N-glycan analysis by ultra-performance liquid chromatography. *J Vis Exp* 2020; 155: e60104.
- [28] Hou H, Yang H, Liu P, Huang C, Wang M, Li Y, et al. Profile of immunoglobulin G N-glycome in COVID-19 patients: a case-control study. *Front Immunol* 2021;12:748566.
- [29] Liu D, Zhao Z, Wang A, Ge S, Wang H, Zhang X, et al. Ischemic stroke is associated with the pro-inflammatory potential of N-glycosylated immunoglobulin G. *J Neuroinflammation* 2018;15:123.
- [30] Liu D, Li Q, Dong J, Li D, Xu X, Xing W, et al. The association between normal BMI with central adiposity and proinflammatory potential immunoglobulin G N-glycosylation. *Diabetes Metab Syndr Obes* 2019; 12: 2373–85.
- [31] Huang G, Jin Q, Tian X, Mao Y. Development and validation of a carotid atherosclerosis risk prediction model based on a Chinese population. *Front Cardiovasc Med* 2022;9:946063.
- [32] Wang W. Glycomedicine: the current state of the art. *Engineering*. doi: 10.1016/j.eng.2022.03.009.
- [33] Lauc G, Pezer M, Rudan I, Campbell H. Mechanisms of disease: the human N-glycome. *Biochim Biophys Acta* 2016;1860(8):1574–82.
- [34] Šimurina M, de Haan N, Vučković F, Kennedy NA, Štambuk J, Falck D, et al.; Inflammatory Bowel Disease Biomarkers Consortium. Glycosylation of immunoglobulin G associates with clinical features of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2018;154(5):1320–33.e10.
- [35] Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature* 2008;454(7203):436–44.
- [36] Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; 420(6917): 860–67.
- [37] Elinav E, Nowarski R, Thaiss CA, Hu B, Jin C, Flavell RA. Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. *Nat Rev Cancer* 2013;13(11):759–71.
- [38] Berković M, Cacev T, Zjacić-Rotkvić V, Kapitanović S. TNF- α promoter single nucleotide polymorphisms in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Neuroendocrinology* 2006;84(5):346–52.
- [39] Pavel ME, Hassler G, Baum U, Hahn EG, Lohmann T, Schuppan D. Circulating levels of angiogenic cytokines can predict tumour progression and prognosis in neuroendocrine carcinomas. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005; 62(4): 434–43.
- [40] Tebbutt NC, Giraud AS, Inglese M, Jenkins B, Waring P, Clay FJ, et al. Reciprocal regulation of gastrointestinal homeostasis by SHP2 and STAT-mediated trefoil gene activation in gp130 mutant mice. *Nat Med* 2002; 8(10): 1089–97.
- [41] Böhm S, Schwab I, Lux A, Nimmerjahn F. The role of sialic acid as a modulator of the anti-inflammatory activity of IgG. *Semin Immunopathol* 2012; 34(3):443–53.
- [42] Menni C, Gudelj I, Macdonald-Dunlop E, Mangino M, Zierer J, Bešić E, et al. Glycosylation profile of immunoglobulin G is cross-sectionally associated with cardiovascular disease risk score and subclinical atherosclerosis in two independent cohorts. *Circ Res* 2018;122(11):1555–64.
- [43] Pagan JD, Kitaoka M, Anthony RM. Engineered sialylation of pathogenic antibodies in vivo attenuates autoimmune disease. *Cell* 2018; 172(3):564–77. e13.
- [44] Tramentozzi E, Ruli E, Angriman I, Bardini R, Campora M, Guzzardo V, et al. Grp94 in complexes with IgG is a soluble diagnostic marker of gastrointestinal tumors and displays immune-stimulating activity on peripheral blood immune cells. *Oncotarget* 2016;7(45):72923–40.
- [45] Dall’Olio F, Vanhooren V, Chen CC, Slagboom PE, Wuhrer M, Franceschi C. N-glycomic biomarkers of biological aging and longevity: a link with inflammaging. *Ageing Res Rev* 2013;12(2):685–98.
- [46] Zhang X, Yuan H, Lyu J, Meng X, Tian Q, Li Y, et al. Association of dementia with immunoglobulin G N-glycans in a Chinese Han population. *NPJ Aging Mech Dis* 2021;7(1):3.
- [47] Zou G, Ochiai H, Huang W, Yang Q, Li C, Wang X. Chemoenzymatic synthesis and Fc γ receptor binding of homogeneous glycoforms of antibody Fc domain. Presence of a bisecting sugar moiety enhances the affinity of Fc to Fc γ IIIa receptor. *J Am Chem Soc* 2011;133(46):18975–91.
- [48] Russell AC, Šimurina M, Garcia MT, Novokmet M, Wang Y, Rudan I, et al. The N-glycosylation of immunoglobulin G as a novel biomarker of Parkinson’s disease. *Glycobiology* 2017;27(5):501–10.
- [49] Ackerman ME, Crispin M, Yu X, Baruah K, Boesch AW, Harvey DJ, et al. Natural variation in Fc glycosylation of HIV-specific antibodies impacts antiviral activity. *J Clin Invest* 2013;123(5):2183–92.
- [50] Wu Z, Pan H, Liu D, Zhou D, Tao L, Zhang J, et al. Association of IgG glycosylation and esophageal precancerosis beyond inflammation. *Cancer Prev Res (Phila)* 2021;14(3):347–54.
- [51] Theodoratou E, Taçi K, Agakov F, Timofeeva MN, Štambuk J, Pučić-Baković M, et al. Glycosylation of plasma IgG in colorectal cancer prognosis. *Sci Rep* 2016;6:28098.
- [52] Karsten CM, Pandey MK, Figge J, Kilchenstein R, Taylor PR, Rosas M, et al. Anti-inflammatory activity of IgG1 mediated by Fc galactosylation and association of Fc γ RIIB and dectin-1. *Nat Med* 2012;18(9):1401–6.
- [53] Gornik O, Pavić T, Lauc G. Alternative glycosylation modulates function of IgG and other proteins—implications on evolution and disease. *Biochim Biophys Acta* 2012;1820(9):1318–26.
- [54] Zhang D, Chen B, Wang Y, Xia P, He C, Liu Y, et al. Disease-specific IgG Fc N-glycosylation as personalized biomarkers to differentiate gastric cancer from benign gastric diseases. *Sci Rep* 2016;6:25957.
- [55] Ding P, Xu Y, Li L, Lv X, Li L, Chen J, et al. Intracellular complement C5a/C5aR1 stabilizes β -catenin to promote colorectal tumorigenesis. *Cell Rep* 2022; 39(9):110851.
- [56] Liu S, Huang Z, Zhang Q, Fu Y, Cheng L, Liu B, et al. Profiling of isomer-specific IgG N-glycosylation in cohort of Chinese colorectal cancer patients. *Biochim Biophys Acta, Gen Subj* 2020;1864(3):129510.
- [57] Zhong A, Qin R, Qin W, Han J, Gu Y, Zhou L, et al. Diagnostic significance of serum IgG galactosylation in CA19-9-negative pancreatic carcinoma patients. *Front Oncol* 2019;9:114.
- [58] Qin R, Yang Y, Chen H, Qin W, Han J, Gu Y, et al. Prediction of neoadjuvant chemotherapeutic efficacy in patients with locally advanced gastric cancer by serum IgG glycomics profiling. *Clin Proteomics* 2020;17(1):4.
- [59] Collins ES, Galligan MC, Saldova R, Adamczyk B, Abrahams JL, Campbell MP, et al. Glycosylation status of serum in inflammatory arthritis in response to anti-TNF treatment. *Rheumatology (Oxford)* 2013;52(9):1572–82.
- [60] Croce A, Firuzi O, Altieri F, Eufemi M, Agostino R, Priori R, et al. Effect of infliximab on the glycosylation of IgG of patients with rheumatoid arthritis. *J Clin Lab Anal* 2007;21(5):303–14.
- [61] Dekkers G, Treffers L, Plomp R, Bentlage AEH, de Boer M, Koeleman CAM, et al. Decoding the human immunoglobulin G-glycan repertoire reveals a spectrum of Fc-receptor- and complement-mediated-effector activities. *Front Immunol* 2017;8:877.
- [62] Martin TC, Šimurina M, Ząbczyńska M, Martinic Kavur M, Rydlewska M, Pezer M, et al. Decreased immunoglobulin G core fucosylation, a player in antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, is associated with autoimmune thyroid diseases. *Mol Cell Proteomics* 2020;19(5):774–92.
- [63] Lauc G, Huffman JE, Pučić M, Zgaga L, Adamczyk B, Mužinić A, et al. Loci

- associated with N-glycosylation of human immunoglobulin G show pleiotropy with autoimmune diseases and haematological cancers. *PLoS Genet* 2013;9(1): e1003225.
- [64] Chakraborty S, Gonzalez J, Edwards K, Mallajosyula V, Buzzanco AS, Sherwood R, et al. Proinflammatory IgG Fc structures in patients with severe COVID-19. *Nat Immunol* 2021;22(1):67–73.
- [65] Chang CC, Cheng JJ, Lee IJ, Lu MK. Purification, structural elucidation, and anti-inflammatory activity of xylosyl galactofucan from *Armillaria mellea*. *Int J Biol Macromol* 2018;114:584–91.
- [66] Man SM. Inflammasomes in the gastrointestinal tract: infection, cancer and gut microbiota homeostasis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2018;15(12):721–37.
- [67] Donlon NE, Davern M, O’Connell F, Sheppard A, Heeran A, Bhardwaj A, et al. Impact of radiotherapy on the immune landscape in oesophageal adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2022;28(21):2302–19.
- [68] Valenzuela P, Oaxaca D, Di Desidero T, Parra K, Rodriguez G, Manciu M, et al. Pharmacodynamic biomarkers in metronomic chemotherapy: multiplex cytokine measurements in gastrointestinal cancer patients. *Clin Exp Med* 2021; 21(1):149–59.
- [69] Irvine EB, Alter G. Understanding the role of antibody glycosylation through the lens of severe viral and bacterial diseases. *Glycobiology* 2020;30(4):241–53.
- [70] Fuster MM, Esko JD. The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. *Nat Rev Cancer* 2005;5(7):526–42.
- [71] Wang J, Balog CIA, Stavenhagen K, Koeleman CAM, Scherer HU, Selman MHJ, et al. Fc-glycosylation of IgG1 is modulated by B-cell stimuli. *Mol Cell Proteomics* 2011;10(5):M110.004655.
- [72] Wang H, Li X, Wang X, Liu D, Zhang X, Cao W, et al. Next-generation (glycomic) biomarkers for cardiometabolic health: a community-based study of immunoglobulin G N-glycans in a Chinese Han population. *OMICS* 2019; 23(12):649–59.
- [73] dos Santos JM, Joiakim A, Kaplan DJ, Putt DA, Bakovic GP, Servoss SL, et al. Levels of plasma glycan-binding auto-IgG biomarkers improve the accuracy of prostate cancer diagnosis. *Mol Cell Biochem* 2021;476(1):13–22.
- [74] Pan J, Yu L, Wu Q, Lin X, Liu S, Hu S, et al. Integration of IgA and IgG autoantigens improves performance of biomarker panels for early diagnosis of lung cancer. *Mol Cell Proteomics* 2020;19(3):490–500.
- [75] Sheng Z, Liu Y, Qin C, Liu Z, Yuan Y, Yin H, et al. Involvement of cancer-derived IgG in the proliferation, migration and invasion of bladder cancer cells. *Oncol Lett* 2016;12(6):5113–21.