

黏液性/浆液性胰腺囊性肿瘤囊液蛋白质糖基化差异表达研究

汪颖¹⁾ 孙玉发²⁾ 柴宁莉¹⁾ 徐伟²⁾ 冯佳¹⁾ 王向东¹⁾
唐平¹⁾ 杨晶¹⁾ 张伟¹⁾ 令狐恩强^{1)*}

(¹⁾ 解放军总医院消化内科, 北京 100853; ²⁾ 军委联合参谋部警卫局卫生保健处, 北京 100034)

摘要 随着影像学技术的进步, 胰腺囊性病变(恶性胰腺囊性病变包括黏液性囊腺瘤(mucinous cystic neoplasm, MCN)和导管内乳头状黏液瘤(intraductal papillary mucinous neoplasm, IPMN)以及黏液性囊腺癌(mucinous cystic adenocarcinoma, MCA)的检出率有所提高, 但是区分囊性病变的良恶性仍然是一个难题. 本研究根据外科手术病理结果及囊液液基细胞结果, 从 120 例经 CT 或 MRI 方法诊断为胰腺囊性肿瘤患者中选取 35 例样本, 其中胰腺黏液性囊腺瘤(MCN)组 17 例与浆液性囊腺瘤(serous cystic neoplasm, SCN)组 18 例, 通过超声内镜下细针穿刺(endoscopic ultrasonography-guided fine needle aspiration, EUS-FNA)方法吸取囊液, 采用凝集素芯片分析蛋白质糖链谱差异. 经 *t* 检验结果表明, MCN 组与 SCN 组相比, 6 种凝集素, STL、WGA、BPL、DBA、PTL-I 及 MAL-I, 识别的糖链结构二者之间存在明显差异($P < 0.05$), 其中凝集素 BPL、DBA、WGA、STL 识别的糖链结构在 MCN 囊液中呈高表达($R > 2.0$), 例如 DBA 特异识别的 Tn 抗原表达的增多, 可能与肿瘤上皮细胞分泌的黏蛋白增多密切相关. 而凝集素 PTL-I、MAL-I 特异识别 Gal β -1、4GlcNAc 结构以及 GalNAc α -1、3Gal 结构在 MCN 囊液中表达降低($R < 0.5$). 通过凝集素印记法检测了 STL 和 BPL 分别于 MCN、SCN 囊液中蛋白的结合情况, 结果表明 STL 和 BPL 与囊液中的糖蛋白结合明显强于 SCN 组. 本文通过比较 MCN 和 SCN 糖蛋白糖谱表达差异, 寻找胰腺囊性肿瘤诊断和肿瘤良恶性评估的新方法, 同时为探索胰腺囊性肿瘤发生发展机制和治疗的潜在靶点奠定基础.

关键词 黏液性囊腺瘤, 浆液性囊腺瘤, 凝集素芯片, 糖基化, 黏蛋白

学科分类号 Q7

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0247

随着影像学技术的进步及人们健康意识的提高, 隐匿性疾病检出率逐年提高. 胰腺囊性肿瘤(pancreatic cystic neoplasms, PCNs)属隐匿性发病早期无明显体征, 其以腺管或腺泡上皮增生、分泌物潴留形成囊肿为主要特征, 在所有原发性胰腺肿瘤中约占 1%~5%^[1]. 2010 版 WHO 肿瘤分类将胰腺囊性肿瘤细分为黏液性肿瘤: 黏液性囊性肿瘤(mucinous cystic neoplasm, MCN)、导管内乳头状瘤(intraductal papillary mucinous neoplasm, IPMN)和非黏液性肿瘤: 浆液性囊性肿瘤(serous cystic neoplasm, SCN)、实性假乳头状瘤(solid pseudopapillary neoplasm, SPN)^[2]. 其中, 恶性胰腺囊性病变包括黏液性囊腺瘤(MCN)和导管内乳头状黏液瘤(IPMN)以及黏液性囊腺癌(mucinous cystic adenocarcinoma, MCA), 而浆液性囊腺瘤(SCN)则

多为良性病变^[3]. 目前, 单从影像学鉴别囊性病变良恶的准确性仍较低, 同时常用的血清学肿瘤标志物 CEA、CA19-9、CA72-4 以及 CA153 等, 在鉴别癌前病变方面特异性、敏感性较低^[4-5]. 病理组织学检查仍是目前临床诊断的金标准, 但鉴于组织学检查固有的缺陷, 如损伤性检查、不能动态检测等, 寻求微创性的早期诊断方法是防控疾病恶变的关键. 超声内镜下细针穿刺活检(endoscopic ultrasonography-guided fine needle aspiration, EUS-FNA)能够为胰腺囊性肿瘤的诊断提供直观的第一手资料^[6-9].

* 通讯联系人.

Tel: 010-55499294, E-mail: linghuenqiang@vip.sina.com

收稿日期: 2016-09-17, 接受日期: 2016-11-04

蛋白质糖基化是一种重要的翻译后修饰,许多转录因子、核小孔蛋白、热休克蛋白、RNA 聚合酶 II、致癌基因翻译产物以及多种酶中都发现了糖基化修饰.越来越多的文献报道显示,糖基化对蛋白质的结构和功能有着重要影响,如调控蛋白质的折叠、运输及定位等^[10],在生命过程中蛋白质糖基化的作用举足轻重,如免疫保护、病毒的复制、细胞生长、细胞与细胞之间的黏附、炎症的产生等^[11].疾病的发生、发展过程中糖蛋白的糖基化都发生了改变, Kinali 等^[12]通过对糖基转移酶活性的鉴定,发现了导致肌肉营养失调的新机制.目前临床应用的肿瘤筛查标志物中绝大部分是糖基化蛋白,特别是有些糖基化发生改变的糖基化蛋白已应用于人类疾病的诊断、分期和预后评估,如:美国食品和药品管理局(FDA)在 2005 年将核心岩藻糖基化的甲胎蛋白(AFP-L3)确定为肝癌患者诊断和预后的指标^[13].

凝集素芯片是依据某种凝集素识别特定糖链结构的特点设计而成,其作为一种快速、灵敏、高通量的研究糖蛋白糖谱的技术,已被广泛应用^[14].各种不同植物来源的凝集素被固定于醛基化、环氧化或经其他方式修饰后的玻璃片基上以制成凝集素片,再与荧光标记后的糖蛋白检测样品进行孵育,进而能检测样品中的特定糖链结构^[15].Noriko 等分析了胰腺癌组织特异 N-糖链,发现在胰腺癌患者的血清中带有岩藻糖基化修饰的结合珠蛋白的含量增加,初步探讨了 α -1,6-岩藻糖和 β -1,4-半乳糖修饰的结构可用于检测胰腺癌组织的构想^[16].2014 年 Gbormittah 等^[17]通过对 10 对例黏液性与非黏液性肿瘤囊液穿刺,运用蛋白质组学质谱鉴定的方法寻找其中差异蛋白.目前鲜有针对 PCNs 蛋白质糖基化的相关研究,本文通过比较 MCN 和 SCN 糖蛋白糖谱表达差异,寻找胰腺囊性肿瘤诊断和肿瘤良恶性评估的新方法,同时为探索胰腺囊性肿瘤发生发展机制和治疗的潜在靶点奠定基础.

1 材料与方法

1.1 入组病人筛选流程

选取 2015 年 4 月~2016 年 5 月,经医院伦理委员会通过(批准文号: S2014-108-01),排除恶性肿瘤病史,严重心肺功能不全,出凝血功能障碍,前期经影像学诊断明确,解放军总医院消化内科联合肿瘤外科病区收治 PCNs 120 例,其中外科手术行病理诊断共 61 例, EUS-FNA 穿刺 104 例,其中

8 例有病理诊断.最终既行手术又抽出足量囊液入组 MCN 为 17 例, SCN 为 18 例(图 1).

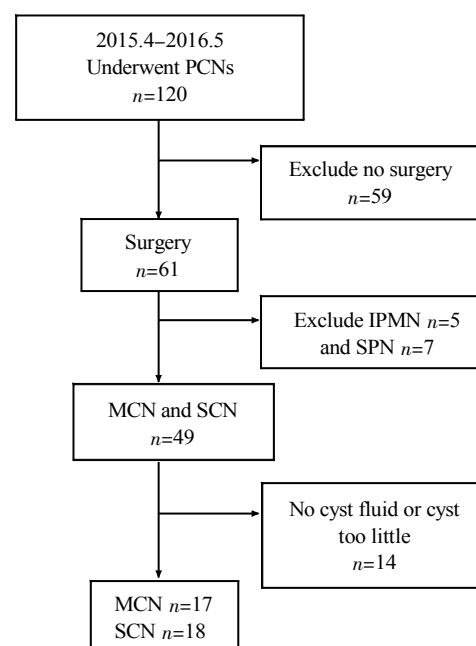


Fig. 1 The flow chart of patients selection

1.2 主要试剂及仪器

蛋白酶抑制剂 cocktail 购自美国 abcam 公司, Cy3 荧光染料购自美国 Amersham 公司, NanoDrop2000c 分光光度计购自美国 Thermo 公司.凝集素芯片(包含有 37 种凝集素)由西北大学功能糖组学实验室制备,晶芯 SmartArray48 点样仪购自北京博奥生物公司,生物芯片扫描仪 4000B 购自美国 Axon 公司. 19G 穿刺针购自波士顿公司, 22G 穿刺针购自库克公司. GF-UE260-AL5/GF-UM200 超声内镜及 EU-ME2 超声内镜主机均购自日本 Olympus 公司.

1.3 EUS-FNA 肿瘤穿刺抽提囊液

患者给予静脉麻醉、口咽插管通气下,在超声内镜(EUS)引导下使用穿刺针,对发现的可疑病灶,避开腹腔脏器及血管等重要结构,选择最合适穿刺路径将 19G 或 22G 穿刺针刺入病变,连接负压注射器保持恒定的负压抽提囊液.吸引出囊液由专人负责分装到 1.0 ml 冻存管中,每管按 1:100 比例加入蛋白酶抑制剂,轻轻震荡溶解后送至生物标本库低温冰箱-80℃存储.每次进行实验时取出冻存管,溶化后进行实验.

1.4 荧光标记样本蛋白质

35 例囊液样本各取相应体积(内含 100 μg 总蛋

白)与 100 μ l 0.1 mol/L Na_2CO_3 (pH 9.3)缓冲液混匀, 混合液与 Cy3 荧光染料室温孵育 3 h. 用 Sephadex G-25 柱分离纯化 Cy3 标记的蛋白质, 并用分光光度计测定收集液中被标记蛋白质的浓度.

1.5 凝集素芯片及数据分析

凝集素芯片操作的简要步骤如下: 在封闭缓冲液中 25℃ 封闭 1 h, 用 10 mmol/L PBST, 10 mmol/L PBS 各洗 2 次, 每次 5 min, 甩干; MCN 组和 SCN 组个例样本各取 5 μ g 标记后蛋白质, 分别与孵育缓冲液混合, 与芯片室温孵育 3 h, 后重复上述清洗步骤, 甩干; GenPix 4000B 芯片扫描仪扫描芯片^[18]. 用 GenePix 3.0 软件从扫描结果图中获取荧光信号强度值和背景值等信息进行分析. 可获得 MCN 组和 SCN 组凝集素芯片上每个点的荧光信号值. 该款芯片中每种凝集素对应 3 个重复点, 即实际每种凝集素重复检测 3 次, 均获得 3 个信号数据, 抽取中值, 即每个凝集素对应一个中值. 计算每个凝集素的中值所占 37 种凝集素中值之和的比例完成数据归一化. 每个样本做 3 次重复. 凝集素归一化荧光强度表示为 3 次重复的均值 $\pm$ 标准偏差. 计算每个凝集素在实验组比对照组归一化数值的 ratio 值(R)来比较蛋白质糖基化的相对变化, $R>2$ 为高表达或 $R<0.5$ 为低表达^[19]. 数据同时利用

SPSS19 进行 t 检验分析.

1.6 凝集素印迹

30 μ g 蛋白质样本先经 SDS-PAGE 凝胶电泳. 电泳结束后, 取出凝胶, 在转膜缓冲液中漂洗数秒. PVDF 膜使用前先用无水甲醇预处理 5 min 后转至转膜缓冲液中平衡好后使用. 取出凝胶使用 TE 70PWR 半干转膜仪按照每平方厘米 PVDF 膜电流 0.8 mA, 恒流转膜 1.5 h. 转膜完毕后, 立即把 PVDF 膜放置到预先准备好的 TBST 中清洗 2 次, 每次 10 min, 洗去膜上残留的转膜缓冲液. 然后转入 Carbo-free 封闭液中, 在摇床上轻摇 1 h 封闭. 封闭结束后, 直接将 Cy5 荧光标记的凝集素按终浓度 2 mg/L 加入 Carbo-free 封闭液中, 在摇床上轻摇 4℃ 避光过夜. TBST 清洗膜 3 次, 每次 10 min, 然后在 Storm 840 凝胶成像系统中设置 PMT 为 800, 红色荧光通道 (635 nm 激发波长 /650LP 发射波长) 下扫描图像^[10]. Image J 软件读取蛋白质条带灰度值.

2 结 果

2.1 MCN、SCN 囊液蛋白糖基化

经 GenePix3.0 软件分析芯片扫描图(图 2), 结果表明: a. MCN 组和 SCN 组中, Jacalin、LEL、

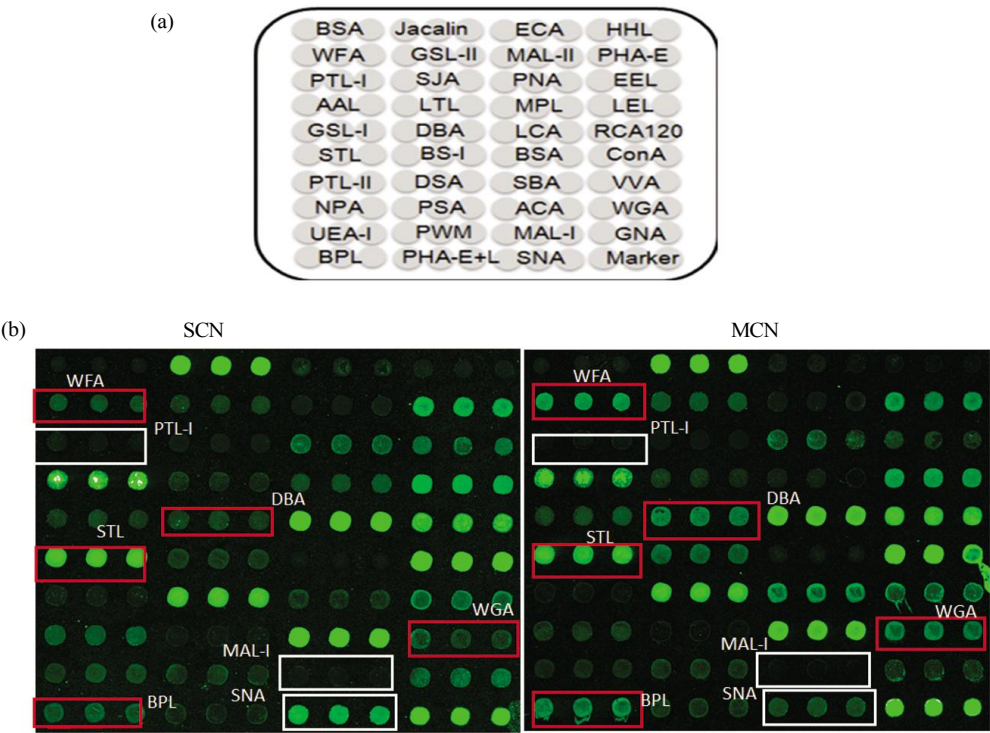


Fig. 2 Difference in expression of glycan-binding protein between SCN and MCN detected by carbohydrate microarray (a) Lectin microarrays: the BSA is used as negative control and the Marker is used as positive control. (b) Representative MCN and SCN lectin microarrays: red boxes show higher signal lectins in MCN than in SCN, while white boxes show lower signal lectins in MCN than in SCN.

LCA、ConA 以及 ACA 的信号强度均值均大于 0.05, 表明其特异性识别的以高甘露糖和核心岩藻糖型结构为主, LEL 和 ConA 识别的高甘露糖型 N-糖链, Jacalin 识别的 Gal β 1-3GalNAc α -Ser/Thr(T) 和 GalNAc α -Ser/Thr(Tn), ACA 识别的 Gal β 1-3GalNAc α -Ser/Thr(T antigen), 在两类胰腺瘤囊液中表达量均较高. b. 凝集素 WFA 识别的 terminating in GalNAc α / β 1-3/6Gal 结构, STL 识别的 trimers and tetramers of GlcNAc 和 core (GlcNAc) 的 N-糖链结构只在 MCN 组样本中具有较高表达量. c. 凝集素 PTL- I 识别的 GalNAc、GalNAc α -1、3Gal、GalNAc α -1, 3Gal β -1, 3/4Glc, 凝集素 MAL- I 识别的 Gal β -1, 4GlcNAc 结构只在 SCN 组样本中表达量升高(图 3).

2.2 糖谱差异分析

为了比较 MCN 及 SCN 囊液蛋白糖基化的差异, 筛选可有效区分两类胰腺囊腺瘤的糖链结构, 随后计算了两组间均值的比值(ratio value, R). 本研究中, $R > 2.0$ 表示该凝集素识别的糖链结构在 MCN 组较 SCN 组中显著升高; $R < 0.5$ 表示信号值在 MCN 组较 SCN 组中显著降低, 而 R 介于 0.5 与 2 之间则表示两组数据无明显差异. 将 MCN 组和 SCN 组中每个凝集素点的均值通过 SPSS 19 进行 t 检验分析, 通过比值分析发现, 在 MCN 组中较 SCN 组中 $R > 2.0$ 的凝集素为 STL、WGA、BPL 及 DBA; $R < 0.5$ 为 PTL- I、MAL- I (表 1).

a. MCN 组中 STL、WGA、BPL 及 DBA 的结合信号明显高于 SCN 组($R > 2.0$, $P < 0.05$), 这也表明 STL 识别的 trimers and tetramers of GlcNAc 和 core (GlcNAc) 的 N-糖链结构以及 WGA 识别的多价唾液酸结构和 BPL, DBA 识别的

Gal β 1-3GalNAc、Terminal GalNAc 和 Tn antigen 结构在该组 MCN 组中表达量明显增加(图 4).

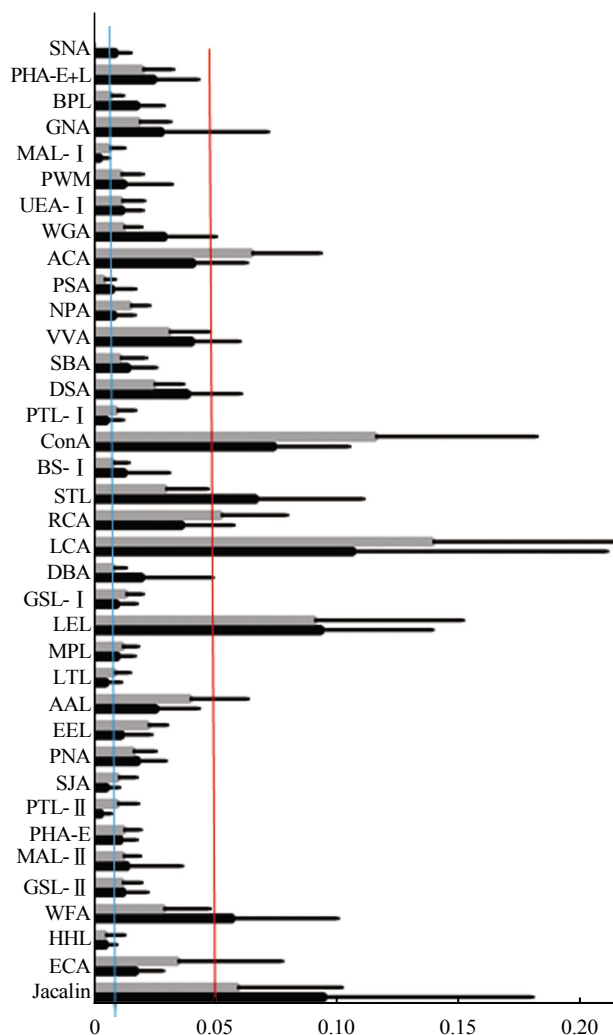


Fig. 3 Normalized signal strength analysis in the MCN and SCN group

The X-axis represents the relative fluorescence intensity. Average signal strength > 0.05 means high expression. Average signal strength < 0.01 means low expression. ■ : MCN; □ : SCN.

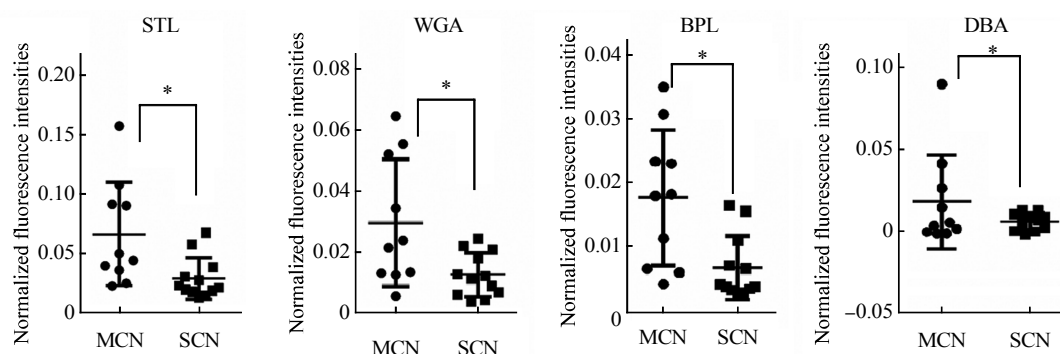


Fig. 4 Lectin recognized glycopatterns are significantly higher in the MCN than in the SCN

Scatter diagrams of lectins ($R > 2.0$): STL, WGA, BPL, DBA. * $P < 0.05$.

Table 1 Alterations in the glycopattern between MCN and SCN detected by lectin microarray analysis, based on the data for significant differences

Abbreviation	Lectin	Specificity	MCN	SCN	Ratio
STL	Solanum	Trimers and tetramers of GlcNAc, core (GlcNAc)	0.067	0.029	2.272
	Tuberosum Lectin	of N-glycan, oligosaccharide containing GlcNAc and MurNAc			
WGA	Wheat Germ Agglutinin	Multivalent Sia and (GlcNAc) _n	0.029	0.012	2.385
BPL	Bauhinia Purpurea Lectin	Galβ1-3GalNAc, Terminal GalNAc	0.018	0.007	2.587
DBA	Dolichos Biflorus Agglutinin	αGalNAc, Tn antigen, GalNAcα1-3 ((Fucα1-2)) Gal (blood group A antigen)	0.020	0.008	2.474
PTL- I	Psophocarpus Tetragonolobus Lectin I	GalNAc, GalNAcα-1, 3Gal, GalNAcα-1, 3Galβ-1, 3/4Glc	0.003	0.010	0.310
MAL- I	Maackia Amurensis Lectin I	Galβ-1, 4GlcNAc	0.003	0.006	0.392

The ratio value between 0.5~2 was considered as insignificant difference between the two groups of samples. The ratio value > 2.0 was considered as significantly higher in MCN than in SCN. The ratio values < 0.5 was considered as significantly lower in MCN than in SCN.

b. PTL- I 和 MAL- I 这两种凝集素在 SCN 组中信号值更高($R<0.5$, $P<0.05$), 进而可推测 PTL- I 识别的 GalNAc、GalNAcα-1, 3Gal、GalNAcα-1, 3Galβ-1, 3/4Glc 和 MAL- I 识别的 Galβ-1, 4GlcNAc 结构以及结构在 SCN 组囊液中显著高表达(图 5).

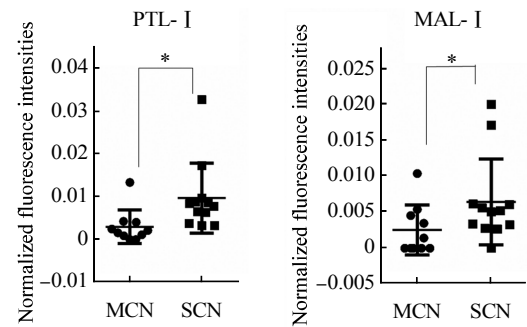


Fig. 5 Lectin recognized glycopatterns are significantly lower in the MCN than in the SCN
Scatter diagrams of lectins ($R < 0.5$): PTL- I , MAL- I . * $P < 0.05$.

2.3 凝集素印迹验证 MCN、SCN 囊液中相关差异表达的糖链结构

为了验证 MCN、SCN 囊液中差异表达糖链, 凝集素印迹法检测了两种凝集素(STL 和 BPL)分别与 MCN、SCN 囊液中蛋白的结合情况. STL 染色结果显示, 从分子质量 10~260 ku 范围内分别有 2 条明显的蛋白质条带和数条微弱的条带(图 6). STL 与 MCN 中的囊液糖蛋白中分子质量约为 60 ku 和 50 ku 的 2 条蛋白质条带(白框勾勒)的结合要明显强于与 SCN 囊液中糖蛋白的结合. 而 BPL 与 MCN 中的囊液糖蛋白中分子质量约为 120 ku 的蛋白质条带(白框勾勒)的结合要明显强于与 SCN 囊液中糖蛋白. STL 识别的 trimers and tetramers of GlcNAc, core(GlcNAc) of N-glycan, oligosaccharide containing GlcNAc and MurNAc 以及 BPL 识别的 Galβ1-3GalNAc, Terminal GalNAc, 在 MCN 囊液样本中信号增强, 表明其特异性识别的末端 GalNAc, Galβ1-3GalNAc(T antigen)糖链表达量在二者之间存在差异. 这与囊液的凝集素芯片结果一致.

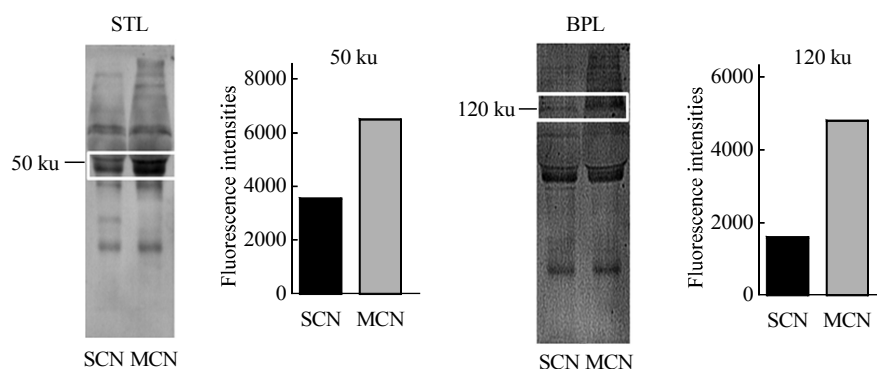


Fig. 6 Lectin blotting analysis was performed with STL and BPL staining

3 讨 论

糖基化是蛋白质翻译后修饰最重要的方式之一, 细胞中 80% 以上的膜蛋白具有糖基化现象, 生成 N-/O- 糖基化修饰的蛋白质^[16, 20]. N- 糖基化修饰发生在天冬酰胺的残基上, 其共同的序列是: 天冬酰胺-X-丝氨酸/苏氨酸 (Asn-X-Ser/Thr, 其中 X 可以是除脯氨酸的任何氨基酸), 在内质网和高尔基体中经过一系列复杂的修饰, 最终在糖蛋白上形成含 5~15 个糖的糖链结构^[21]. 一些细胞表面分泌的蛋白质即为 N- 糖基化修饰的糖蛋白, 如 (促)红细胞生成素和免疫球蛋白类. 不同于 N- 糖基化, O- 糖基化只在高尔基体中发生, 它是在酶的作用下将半乳糖胺 (GalNAc) 连接到蛋白质的丝氨酸/苏氨酸 (Ser/Thr) 残基上. 一旦半乳糖胺连接到蛋白质上后, 其他糖分子随即增加到 O- 糖链上, 使糖链得到延伸, 这些糖分子包括: 半乳糖、岩藻糖、N- 乙酰葡萄糖胺和唾液酸等, 从而形成不同 O- 连接型寡糖结构^[22]. 通常 O- 糖基化比 N- 糖基化形成的糖链短. 细胞表面结合和分泌的黏蛋白 (mucoprotein, MUC) 就是一种 O- 糖基化糖蛋白, 至少有 17 种黏蛋白亚型已经被证实: MUC1、MUC2、MUC3A、MUC3B、MUC4、MUC5AC、MUC5B、MUC6、MUC7、MUC8、MUC12、MUC13、MUC15、MUC16、MUC17、MUC19 和 MUC20^[23-24]. Gbormittah 等^[17]曾对黏液性囊腺瘤中囊液运用 nano-LC-MS/MS 质谱分析方法鉴定出黏蛋白 MUC2、MUC6 显著升高, 而黏蛋白 MUC1 和 MUC4 过表达发生在许多腺瘤中, 包括胰腺癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、结肠癌等^[25].

本研究通过 EUS-FNA 微创的方法取胰腺囊腺瘤分泌的囊液进行分析, 寻找其囊液中蛋白质的糖基化差异, 以达到良好的鉴别诊断的目的, 以期对胰腺癌的癌前病变 - 黏液性囊腺瘤进行早期防控. 通过凝集素芯片这类较为成熟的检测方法, 我们发现 BPL 在 MCN 囊液样本中信号增强, 表明其特异性识别的末端 GalNAc、Gal β 1-3GalNAc (T antigen) 糖链表达量发生变化. DBA 特异性识别 Tn antigen、GalNAc α 1-3((Fuc α 1-2))Gal, T 抗原是 O- 糖链的一种不完全延伸形式, 在正常组织中表达量较低, 但在胰腺黏液性肿瘤囊液中有较为广泛的表达, 与肿瘤的发生、发展及预后密切相关^[26]. Zheng 等^[27]报道, 联合 O- 糖链的 blood group H antigen (BGH)、WGA 和 MUC5AC, 诊断黏液性胰腺囊性肿瘤准确率达 93%. Tn 抗原在乳腺癌和卵巢癌组织中发生高表达, 且与不良预后相关^[28]; 相似的是 T/Tn 抗原结构在低分化胃癌组织中也发生高表达^[29]. 此外, Li 等^[30]报道细胞表面半乳糖结构改变可诱导 Huh7 肝癌细胞上皮细胞 - 间充质转化 (epithelial mesenchymal transition, EMT) 过程. 麦胚凝集素 (WGA) 特异性识别 GlcNAc 聚合体和多价唾液酸, 本研究中 WGA 识别的多价 Sia 结构在 MCN 囊液中表达升高, 此前 Gbormittah 等^[17]对胰腺囊性肿瘤囊液分析发现, 在 MCN 中麦胚凝集素升高同时 MUC5AC 明显增多, 联合 CA19-9 诊断黏液性胰腺囊性肿瘤特异性达 86%, 敏感性达 87%. STL 可与 GlcNAc 的 2~4 聚体结合. 同时 STL 识别的 N- GlcNAc 结构在 MCN 囊液样本中特异性表达升高, 为后续研究提供了全新的切入点.

总之, 研究胰腺囊性肿瘤相关糖蛋白糖链的变

化, 有助于寻找灵敏度和准确度更高的肿瘤标志物, 进一步揭示胰腺囊性肿瘤进展的糖生物学机制, 并为研发新的治疗方法提供有价值信息。

致谢 感谢西北大学生命科学学院李铮教授及中国科学院生物物理研究所杨福全教授对论文提供帮助。

参 考 文 献

- [1] Lee K S, Sekhar A, Rofsky N M, *et al.* Prevalence of incidental pancreatic cysts in the adult population on MR imaging. *The American Journal of Gastroenterology*, 2010, **105**(9): 2079–2084
- [2] 汪 颖, 令狐恩强, 郭宇航. 胰腺囊性肿瘤的诊断研究进展. *中华胃肠内镜电子杂志*, 2015, **2**(2): 3–5
Wang Y, LingHu E Q, Guo Y H. *Chin J Gastrointestinal Endoscopy (Electronic Edition)*, 2015, **2**(2): 3–5
- [3] Oppong K W, Dawwas M F, Charnley R M, *et al.* EUS and EUS-FNA diagnosis of suspected pancreatic cystic neoplasms: Is the sum of the parts greater than the CEA?. *Pancreatology*, 2015, **15**(5): 531–537
- [4] Brugge W R. Diagnosis and management of cystic lesions of the pancreas. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, 2015, **6**(4): 375–388
- [5] Farrell J J. Diagnosis and management of pancreatic cystic neoplasms: current status and future directions. *Gut and Liver*, 2015, **9**(5): 571–589
- [6] Qi X, Zhao X, Su J, *et al.* Malignant transformation and overall survival of morphological subtypes of intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas: A network meta-analysis. *European Journal of Internal Medicine*, 2015, **26**(8): 652–657
- [7] Shoichiro A, Tanaka J D M, Charles W C, *et al.* Intracystic biopsy and diagnosis of intraductal papillary mucinous neoplasm *via* SpyGlass pancreatoscopy. *The Ochsner Journal*, 2015, **15**(4): 452–454
- [8] Sultan M, Karanovic D, Chalhoub W, *et al.* Gastric duplication cyst with elevated amylase: an unusual presentation mimicking pancreatic cystic neoplasm. *ACG Case Reports Journal*, 2015, **2**(2): 86–88
- [9] 汪 颖, 胡 景, 李沛林. 胃肠间质瘤的诊疗进展. *中华胃肠内镜电子杂志*, 2014, **1**(2): 12–14
Wang Y, Hu J, Li P L, *et al.* *Chin J Gastrointestinal Endoscopy (Electronic Edition)*, 2014, **1**(2): 12–14
- [10] Qin Y N, Zhong Y G, Zhu M, *et al.* Age- and sex-associated differences in the glycoproteins of human salivary glycoproteins and their roles against influenza A virus. *Journal of Proteome Research*, 2013, **12**(6): 2742–2754
- [11] Qin Y N, Zhong Y G, Dang L, *et al.* Alteration of protein glycosylation in human hepatic stellate cells activated with transforming growth factor-beta1. *Journal of Proteomics*, 2012, **75**(13): 4114–4123
- [12] Kinali M, Beeson D, Pitt M C, *et al.* Congenital myasthenic syndromes in childhood: diagnostic and management challenges. *J Neuroimmunol*, 2008, **201**(202): 6–12
- [13] Food and Drug Administration H. Medical devices; immunology and microbiology devices; classification of AFP-L3% immunological test systems. Final rule. *Fed Regist*, 2005, **70**(191): 57748–57750
- [14] Yu H, Zhu M, Qin Y N, *et al.* Analysis of glycan-related genes expression and glycan profiles in mice with liver fibrosis. *Journal of Proteome Research*, 2012, **11**(11): 5277–5285
- [15] 李铮. 糖组学研究技术. 高等教育出版社, 2015
Li Z. *Technology for Glycomics*, Higher Education Press, 2015
- [16] Okuyama N I Y, Nakano M, Nakagawa T, *et al.* Fucosylated haptoglobin is a novel marker for pancreatic cancer: a detailed analysis of the oligosaccharide structure and a possible mechanism for fucosylation. *Int J Cancer*, 2006, **118**(11): 2803–2808
- [17] Gbormittah F O, Haab B B, Partyka K, *et al.* Characterization of glycoproteins in pancreatic cyst fluid using a high-performance multiple lectin affinity chromatography platform. *Journal of Proteome Research*, 2014, **13**(1): 289–299
- [18] Qin Y N, Zhong Y G, Ma T, *et al.* Alteration of liver glycoproteins during cirrhosis and tumor progression induced by HBV. *Glycoconjugate Journal*, 2016, **33**(2): 125–136
- [19] 钟耀刚, 秦鑫敏, 杜昊骥. 肝癌细胞系差异性表达的糖结合蛋白研究. *生物化学与生物物理进展*, 2014, **41**(11): 1173–1181
Zhong Y G, Qin Y N, Du H Q, *et al.* *Biochem Biophys*, 2014, **41**(11): 1173–1181
- [20] Haab B B, Porter A, Yue T, *et al.* Glycosylation variants of mucins and CEACAMs as candidate biomarkers for the diagnosis of pancreatic cystic neoplasms. *Annals of Surgery*, 2010, **251**(5): 937–945
- [21] Melo S A, Luecke L B, Kahlert C, *et al.* Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature*, 2015, **523**(7559): 177–182
- [22] Guo X, Zhan X, Li Z, *et al.* Molecular analyses of aspirated cystic fluid for the differential diagnosis of cystic lesions of the pancreas: a systematic review and meta-analysis. *Gastroenterology Research and Practice*, 2016, **2016**: 3546085
- [23] Jones M, Zheng Z, Wang J, *et al.* Impact of next-generation sequencing on the clinical diagnosis of pancreatic cysts. *Gastrointest Endosc*, 2016, **83**(1): 140–148
- [24] Frampton A E, Stebbing J, Gall T M, *et al.* Activating mutations of GNAS and KRAS in cystic fluid can help detect intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 2015, **15**(3): 325–328
- [25] Park J W, Jang J Y, Kang M J, *et al.* Mucinous cystic neoplasm of the pancreas: is surgical resection recommended for all surgically fit patients?. *Pancreatology*, 2014, **14**(2): 131–136
- [26] Qin Y N, Zhong Y G, Yang G L, *et al.* Profiling of concanavalin A-binding glycoproteins in human hepatic stellate cells activated with transforming growth factor-beta1. *Molecules*, 2014, **19**(12): 19845–19867
- [27] Zheng C, Km B, Brian F, *et al.* Specific glycoforms of MUC5AC and endorepellin accurately distinguish mucinous from

- nonmucinous pancreatic cysts. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2013, **12**(10): 2724–2734
- [28] Kusakari T K M, Mandai M. C-erbB-2 or mutant Haras induced malignant transformation of immortalized human ovarian surface epithelial cells *in vitro*. *British Journal of Cancer*, 2003, **89**(12): 2293–2298
- [29] De Minicis S S E, Uchinami H, Kluwe J, *et al.* Gene expression profiles during hepatic stellate cell activation in culture and *in vivo*. *Gastroenterology*, 2007, **132**(5): 1937–1946
- [30] Li S, Mo C, Peng Q, *et al.* Cell surface glycan alterations in epithelial mesenchymal transition process of Huh7 hepatocellular carcinoma cell. *PloS One*, 2013, **8**(8): e71273

Difference in Glycosylation Between MCN and SCN in Pancreatic Cystic Neoplasm

WANG Ying¹⁾, SUN Yu-Fa²⁾, CHAI Ning-Li¹⁾, XU Wei²⁾, FENG Jia¹⁾, WANG Xiang-Dong¹⁾,
TANG Ping¹⁾, YANG Jing¹⁾, ZHANG Wei¹⁾, LINGHU En-Qiang^{1)*}

¹⁾ Department of Gastroenterology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China;

²⁾ Department of Health Care, Central Guard Bureau, Beijing 100034, China)

Abstract With the progress of imaging technology, the detection rate of malignant pancreatic cystic including mucinous cystic neoplasm (MCN), intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN), mucinous cystic adenocarcinoma (MCA) have increased, but the distinction between benign and malignant lesions remains a problem. This study is based on the results of surgical pathology and cystic fluid cytology in 35 cases from 120 cases diagnosed by CT or MRI in patients with pancreatic cystic tumor samples. Of the 35 cases, 17 are from the MCN group and 18 are from the serous cystic adenoma (SCN) group. The liquid samples are gained through fine needle biopsy under endoscopic ultrasonography (endoscopic ultrasonography-guided fine needle aspiration, EUS-FNA). A lectin microarray was used to character the altered glycosylation between MCN and SCN. The *t* test results show that 6 lectins (STL, WGA, BPL, DBA, PTL- I and MAL- I) showed different binding signals between two groups ($P < 0.05$). Among these, STL, WGA, BPL and DBA exhibited increased binding signals in the MCN cyst (the ratio value > 2.0), which indicated the abundance of Tn antigen in MCN group was higher than that in SCN group. It may correlated with a significant increase in the mucin secretion of cancer epithelial cells. Conversely, the glycopatterns of GalNAc α -1, 3Gal and Gal β -1, 4GlcNAc identified by PTL - I and MAL - I were decreased in MCN group when compared with SCN group (ratio values < 0.5). In order to investigate precisely alterations of glycopatterns associated with MCN and SCN, SDS-PAGE and lectin blotting analysis was performed with STL and BPL staining. The binding signals of this glycoprotein were significantly higher in MCN than that in SCN groups.

Key words mucinous cystic neoplasm, serous cystic neoplasm, lectin microarrays, glycosylation, mucins

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0247

*Corresponding author.

Tel: 86-10-55499294, E-mail: linghuenqiang@vip.sina.com

Received: September 17, 2016 Accepted: November 4, 2016