



平分型糖链的结构与功能

关 锋¹, 丰晶晶¹, 卫 玮¹, 李 想², 谭增琦²

(1. 西北大学 生命科学学院, 陕西 西安 710069; 2. 西北大学 医学院, 陕西 西安 710069)

摘要 平分型 N-乙酰氨基葡萄糖 GlcNAc (Bisecting N-acetylglucosamine, bisecting GlcNAc) 结构是指 GlcNAc 以 β 1,4-连接的方式连接到五糖核心的甘露糖(Man)上,是一种特殊的 N 糖基化修饰。平分型 GlcNAc 修饰参与多种生物过程,如细胞黏附、受精和胎儿发育、神经发生、免疫反应和肿瘤发展等。主要介绍平分型 GlcNAc 结构的形成过程,概述平分型 GlcNAc 修饰在神经系统、免疫反应、肿瘤发展和转移的生物学功能,并总结了解析平分型 GlcNAc 结构的技术进展,为相应生物学研究及药物开发提供科学参考。

关键词 平分型 N-乙酰氨基葡萄糖;MGAT3;N 聚糖;质谱

中图分类号:Q53 **DOI:**10.16152/j.cnki.xdxbr.2024-05-006

The structure and function of bisecting GlcNAc

GUAN Feng¹, FENG Jingjing¹, WEI Wei¹, LI Xiang², TAN Zengqi²

(1. College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China;

2. School of Medicine, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract The bisecting N-acetylglucosamine (GlcNAc) structure, characterized by β 1,4-linked GlcNAc attached to the core β -mannose residue, represents a distinctive form of N-glycosylation modification. Bisecting GlcNAc modification is implicated in numerous biological processes such as cell adhesion, fertilization and embryonic development, neurogenesis, immune responses, and tumorigenesis. This review elucidates the formation mechanisms of bisecting GlcNAc structure and highlights its diverse biological functions in the nervous system, immune response, tumor metastasis and development. Furthermore, it provides an overview of the technological advances in analyzing bisecting GlcNAc structure, providing scientific references for corresponding biological research and drug development.

Keywords bisecting GlcNAc; MGAT3; N-glycan; mass

糖基化作为一种最常见的蛋白翻译后修饰,能够影响蛋白质的折叠、稳定性以及蛋白质的分选和转运等生理过程^[1]。哺乳动物细胞蛋白质的糖基化方式主要包括 N-糖基化和 O-糖基化。N 糖基化起始于内质网,含有 Glc₃Man₉GlcNAc₂ 的寡聚糖首先在磷酸多萜醇载体上组装,然后在糖基转移酶的催化下转移到新生蛋白质 Asn 残基上(糖

基化基序为 Asn-X-Ser/Thr,其中“X”是除脯氨酸之外的任何氨基酸),然后经内质网特异性糖苷酶加工,形成高甘露型糖蛋白,随后转移到高尔基体中进行进一步的加工和修饰。O 糖基化是在高尔基体中进行的,由不同的糖基转移酶催化寡糖链连接在蛋白质 Ser/Thr 的羟基上。N 糖基化具有相同的五糖核心结构(Man₃GlcNAc₂),根据

收稿日期:2024-08-06

基金项目:国家自然科学基金(82172828,32071274)

第一作者:关锋,男,博士,教授,博士生导师,从事肿瘤糖生物学研究,guanfeng@nwu.edu.cn。

其结构特征,又可以分为3种类型:①高甘露糖型,即五糖核心外只有Man 残基延伸。②复合型,在五糖核心外侧的两个Man 上仅连接GlcNAc,由GlcNAc 发起的“天线”延伸核心。根据GlcNAc 发起“天线”的多少,可以将N-糖链分为二天线、三天线、四天线型等结构。③杂合型,其中Man 延伸核心的Man α 1-6 支链,一个或两个GlcNAc 发起的“天线”延伸Man α 1-3 支链^[2]。

在肿瘤患者中,由于催化糖链合成的糖基转移酶或糖苷酶表达失调,致使异常聚糖结构的形成,进而影响肿瘤的发生和发展。研究表明,慢性粒细胞白血病中 β -半乳糖苷 α -2,3-唾液酸转移酶4(ST3Gal4)的升高,促进肿瘤耐药性的产生^[3];分支型 β 1,6-GlcNAc 促进乳腺癌细胞的迁移和侵袭^[4]。综上,糖链结构的变化以及其表达位置的不同,决定了它们参与和介导细胞黏附、细胞迁移以及细胞内信号通路的不同潜能,深入探究糖链结构在肿瘤发生发展中的作用机制,能够促进新的肿瘤治疗策略的开发。

平分型GlcNAc 糖链是复合型及杂合型N 糖链的一种特殊结构,由 β 1,4-N-乙酰葡萄糖胺基转移酶3(β 1,4-Nacetylglucosaminyltransferase 3, MGAT3 或GnT-III)催化将GlcNAc 以 β 1,4-连接的方式连接到五糖核心的Man 上,形成平分型结构(见图1)。可阻止N-聚糖分支糖基转移酶(包括GlcNAcT-II、GlcNAcT-IV 和GlcNAcT-V)以及核心岩藻糖基转移酶FUT8 的后续作用。

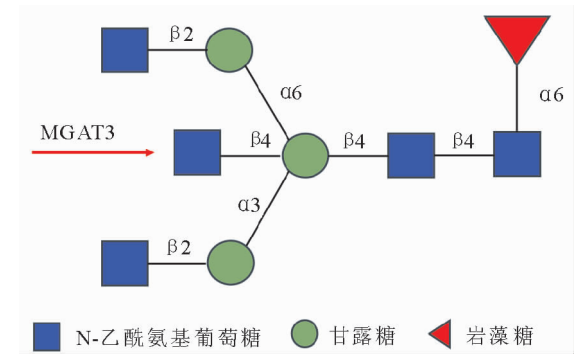


图1 平分型GlcNAc 结构示意图

Fig. 1 The schematic diagram of bisecting GlcNAc structure

平分型GlcNAc 糖链的添加能够抑制促进N 聚糖分支转移酶(GnT II, GnTIV 和GnT-V)以及岩藻糖基转移酶(FUT8)的作用,从而抑制N-糖链的分支和延伸。表明平分型GlcNAc 糖链的添加,导致细胞表面N-聚糖表达谱的显著改变,调

控了寡糖链的生物合成过程。据此推测,MGAT3 的表达参与各种生物过程,如细胞黏附,受精和胎儿发育,神经发生以及肿瘤转移和发展。本文将重点讨论平分型GlcNAc 糖链的结构和功能以及其在疾病进程中的作用,并总结其分析方法。

1 平分型糖链的概述

MGAT3 是负责合成平分型GlcNAc 的关键糖基转移酶,最初在鸡输卵管中发现,并从大鼠肾脏中纯化出来^[5]。MGAT3 mRNA 的表达具有组织特异性,脑和肾脏中表达水平最高,导致脑和肾脏中平分型GlcNAc 修饰水平也相应较高^[6]。

MGAT3 在寡糖链的生物合成过程中起到调节作用。相对于N-聚糖上其他类型的GlcNAc 支链,平分型GlcNAc 具有独特的结构属性。MGAT3 缺陷小鼠,N 聚糖末端修饰显著增加,包括核心岩藻糖基化修饰和唾液酸化修饰^[7]。而平分型GlcNAc 结构形成则抑制糖链的延伸,同时会对其他促进糖链分支的酶产生明显的干扰。促分支型N-糖链形成的糖基转移酶MGAT5 在肿瘤组织中活性较高,使肿瘤组织中糖蛋白的N-糖链上更多携带 β 1,6-GlcNAc 支链^[8]。携带 β 1,6-GlcNAc 支链的N-糖链可以优先被 β -1,4-半乳糖基转移酶和 β -1,3-半乳糖基转移酶加工,从而形成多聚N-乙酰氨基乳糖(poly-LacNAc)结构,并进一步修饰成参与癌症转移的基序,例如唾液酸化的LewisX(sLeX)等^[9]。另外,蛋白结构模拟和晶体学研究表明,平分型GlcNAc 结构倾向于形成后折构象,其中 α 1,6-甘露糖臂翻转回还原端,限制了支链结构的构象,因此显著影响分支型糖链结构的延伸^[10]。这些特征表明了平分型GlcNAc 对N-聚糖的整体结构和构象具有重要影响。

2 平分型GlcNAc 的生理功能

2.1 在神经系统中的功能

平分型GlcNAc 结构在神经系统中发挥着重要功能^[11]。Shimizu 等发现,平分型GlcNAc 在小鼠大脑、小脑和脑干中含量丰富^[12]。Shigeta 等研究发现,增强MGAT3 的表达,整联蛋白 β 1(integrin β 1)上平分型GlcNAc 修饰水平升高,促进神经发生^[13]。Yasuhiko Kizuka 等研究发现,平分型GlcNAc 结构在大脑中含量丰富,能够调节

神经元发育,增强平分型 GlcNAc 表达促进神经突触的生长^[14]。因此,平分型 GlcNAc 在神经系统中表达丰富,影响神经发生,并参与突触生长的调节,在神经系统中发挥着关键作用。

此外,平分型 GlcNAc 修饰还影响了阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)的发生和发展。Stefan Gaunitz 等发现,AD 患者海马体 and 大脑皮层中的 N-聚糖谱发生了变化。AD 患者的海马体中平分型 GlcNAc 的表达减少,抑制大脑神经突触生长和记忆形成过程,进而影响 AD 患者大脑的功能^[15]。 β 位点淀粉样蛋白前体蛋白裂解酶-1(β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme-1, BACE1)是催化淀粉样蛋白 β (A β)产生,形成 A β 沉积,是 AD 发展的关键事件。研究发现,BACE1 上存在平分型 GlcNAc 修饰。在 AD 患者大脑中,BACE1 上的平分型 GlcNAc 修饰增加,突变其平分型 GlcNAc 修饰位点后,促使其从早期内体转移到溶酶体而降解,进而导致 A β 分泌的减少,表明调控平分型 GlcNAc 修饰是治疗 AD 的潜在靶点^[16]。其他与 AD 相关的蛋白上也存在平分型 GlcNAc 修饰。例如,Tau 蛋白是一种胞质蛋白,在正常情况下不会被 N-糖基化,但在 AD 患者大脑中,Tau 蛋白发生 N-糖基化修饰。聚糖分析表明,从 AD 脑中分离的 Tau 蛋白平分型 GlcNAc 修饰增加^[17]。另外,在 AD 患者的脑脊液中也观察到平分型 GlcNAc 修饰的增加。对 242 名主观认知障碍(subjective cognitive impairment, SCI)、轻度认知障碍(mild cognitive impairment, MCI)及 AD 患者的脑脊液的研究显示,MCI 和 AD 中平分型 GlcNAc 修饰的糖蛋白比 SCI 更丰富^[17]。总之,平分型 GlcNAc 在神经系统中高表达并发挥关键作用,并且平分型 GlcNAc 表达与 AD 高度相关。阐明平分型 GlcNAc 修饰在 AD 进程中的作用对于开发早期 AD 诊断生物标志物和了解 AD 发展的早期阶段至关重要,有助于设计新的 AD 治疗策略。

2.2 在免疫反应的功能

糖蛋白上的平分型 GlcNAc 修饰对于免疫反应的发生具有重要生理意义。例如,慢性粒细胞白血病细胞系 K562 细胞自然状态容易被自然杀伤细胞(natural killer cell)杀死。Yoshimura M 等发现在 K562 细胞中过表达 MGAT3, K562 细胞便获得了对 NK 细胞的抗性^[18]。本课题组研究发现低平分型 GlcNAc 修饰更能稳定 Lgals3bp 的表

达,进而促进巨噬细胞向 M1 极化,提示了平分型糖链结构重塑巨噬细胞的潜能^[19]。此外,Shathili A M 等发现,当 CD52 蛋白上平分型 GlcNAc 修饰较低时,唾液酸修饰增加,进而促进了其生物活性,抑制 T 细胞活化^[20]。因此,平分型 GlcNAc 修饰通过调节肿瘤细胞对 NK 细胞的敏感性、促进巨噬细胞向 M1 极化和调节 T 细胞的活化等方式,影响着免疫细胞的功能和免疫反应的发生。

IgG 是免疫系统中的重要分子,IgG 结构由两个相同的重链和两个相同的轻链组成,形成 Y 形结构,其中可变区域(Fab 区)负责抗原识别,而恒定区域(Fc 区)介导免疫效应。IgG 通常通过补体和细胞 IgG-Fc γ 受体(Fc γ R)调节其免疫功能^[21]。N-糖基化是 IgG 的主要翻译后修饰,在调节 IgG 的免疫功能中起着重要作用。IgG 分子上糖基化修饰可以影响其稳定性、免疫活性、抗体依赖性细胞毒性及补体活化等免疫功能^[22]。例如,IgG 在 Fc 区域 Asn297 位含有高度保守的 N-糖链^[21],这个位点的 N-糖链由不同水平的岩藻糖,半乳糖和唾液酸组成,也包含平分型 GlcNAc 结构^[23]。Fc-聚糖对 IgG 的生物活性有影响,例如,Fc 上的平分型 GlcNAc 修饰能够显著增强其与 Fc γ R III 的亲和力,从而提高治疗性单克隆抗体的功效,并诱导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性。Ruhaak LR 等发现,IgG 的平分型 GlcNAc 水平降低与人类寿命有关^[21]。在多发性硬化症(multiple sclerosis, MS)患者组的脑脊液中,平分型 GlcNAc 水平升高,岩藻糖基化和半乳糖基化水平降低,从而增强了 IgG 的 Fc 效应功能。对 IgG 和 IgA 连接聚糖的表征研究表明,在自身免疫疾病中,聚糖的表达可能存在差异。例如,在年龄低于 50 岁的 Lambert-Eaton 肌无力综合征(一种自身免疫疾病)患者中,IgG1 和 IgG2 上平分型 GlcNAc 的水平增加^[24],这表明特定的聚糖类型可能是这些免疫疾病的潜在生物标志物。

2.3 对肿瘤发展与转移的影响

平分型 GlcNAc 修饰在调控肿瘤进展过程中发挥着重要作用,例如平分型 GlcNAc 修饰可以调控乳腺癌进程。顾建国团队发现,GnT-III 通过抑制 P 糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)表达来负调控化疗耐药性^[25]。本课题组研究发现,在人乳腺癌 MCF-7 细胞中过表达 MGAT3 可以抑制低氧诱导的 EMT 现象^[26];继而发现乳腺癌细胞来源胞外囊泡对受体细胞迁移能力的调控,依赖于表面

整合蛋白 $\beta 1$ 的平分型 GlcNAc 修饰水平^[27]。另外,平分型 GlcNAc 修饰还参与调控黑色素瘤的发展。过表达 MGAT3 促进 B16 小鼠黑色素瘤的肺转移,平分型 GlcNAc 修饰 CD44,增强了其与透明质酸的相互作用,促进了黑色素瘤的生长和转移^[28]。本课题组发现骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndromes, MDS)以及急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)患者的基质细胞中平分型 GlcNAc 表达显著下调,使黑色素瘤细胞黏附因子 MCAM 表达增强,并抑制 MCAM 膜定位,与恶性克隆细胞膜蛋白 CD13 结合减弱,抑制 ERK 信号通路的激活,抑制髓系恶性克隆细胞生长^[29]。这些结果表明,平分型 GlcNAc 修饰在肿瘤转移和发展中起重要作用,可以作为肿瘤标志物或靶标进行深入研究。

3 平分型 GlcNAc 糖链结构的检测

3.1 气相色谱-质谱联用(Gas Chromatography-Mass Spectrometry, GC-MS)

GC-MS 是检测平分型 GlcNAc 结构的常用方法。首先将聚糖样品进行 PMAA 衍生化处理(partially methylated alditol acetates, PMAA),经 NaBD₄ 还原处理、氮气干燥后,再用乙酸酐进行乙酰化处理。经过处理后的样品通过气相色谱(GC)分离,通过质谱(MS)进行检测和分析^[30]。可以通过 GC-MS 确定平分型 GlcNAc 结构特征性的信号。需要注意的是,上述反应效率会影响平分型 GlcNAc 结构的定量,因此需要进行标准化控制。

3.2 $\beta 1,4$ -半乳糖基转移酶反应

$\beta 1,4$ -半乳糖基转移酶能将半乳糖(Gal)从尿苷二磷酸半乳糖(UDP-Gal)转移到复合型和杂合型天线的 GlcNAc 上,形成 Gal $\beta 1,4$ GlcNAc 的二糖单元^[31],但平分型 GlcNAc 并非该酶的底物。因此可以通过 $\beta 1,4$ -半乳糖基转移酶反应,利用质谱检测该酶反应前后聚糖质荷比差异确定平分型 GlcNAc 结构的存在。该方法操作简单,结果清晰,但容易存在假阳性。例如,Zou 等发现 GlcNAcMan₃GlcNAc₂ 也能发生半乳糖基化^[32],因此将半乳糖基转移酶反应的方法与上面提到的方法 GC-MS 相结合,以进一步确认糖链中平分型 GlcNAc 结构。

3.3 多级质谱(MSn)

多级质谱(MSn)与 GC-MS 检测相似,通过识别平分型 GlcNAc 结构的特征性信号来完成平分型 GlcNAc 结构的检测。在 MSn 方法中,Orbitrap MS 用于多次碎裂,有助于靶向识别平分型 GlcNAc 结构^[33]。相比于其他方法,MSn 方法不需要额外的样品处理,但高度依赖于 MS 分析仪器和操作人员的技术水平。通常只有丰度较高的糖链才能在 MSn 模式下获得多次碎裂的良好信号。

3.4 糖肽水平的检测方法

MS 技术除了可以检测平分型 GlcNAc 结构外,还能确认糖肽上的 N 糖基化位点以及其连接糖链结构。可以使用植物血凝素-E(PHA-E)富集糖肽中的平分型 GlcNAc,然后进行质谱分析,但其灵敏度和特异性较低^[34]。Liuyi Dang 等人报道了一种识别完整糖肽上平分型 GlcNAc 的新方法^[35],该方法通过识别两个特征 Y 离子[peptide + HexNAc₃Hex₁]或者[peptide + HexNAc₃Hex₁Fuc₁]来鉴定平分型 GlcNAc 结构的存在。在高能碰撞解离模式下,通过使用低能碎裂,可以产生特征 Y 离子[pep + N₃H]或[pep + N₃HF],通过检测该特征离子的存在,可以鉴定完整糖肽上平分的 N-糖链^[35](见图2)。该方法可以同时获得糖基化异质性的精确信息,包括修饰位点及其连接的糖链结构,有助于靶蛋白的功能研究。但该方法的精确性受到多个参数的影响,例如糖肽结构。此外,该方法对质谱分析仪提出了更高的要求,但糖基化的分析覆盖范围有限,因此必须获得有关质谱二级谱图中肽和聚糖的足够信息才能进行鉴定。

4 糖肽质谱的数据分析

利用质谱技术对生物样品中糖类物质进行高通量测序后,通常能获取大量质谱数据,已有多种快速可靠解析糖链结构的软件及算法,如 pGlyco^[36]、MSFragger-Glyco^[37]、StrucGP^[38]、Glyco-Decipher^[39]等,可以利用这些解析糖链结构的软件,根据平分型 GlcNAc 特征 Y 离子[pep + N₃H]/[pep + N₃HF],分析平分型 GlcNAc 修饰的糖蛋白,进而了解其功能以及在疾病进程中的作用。糖链的复杂性为分析糖链质谱数据带来了诸多挑战,成为糖链质谱分析技术进一步发展的主要瓶颈,进而影响了糖组学领域的整体进步。为了突破这一瓶颈,需要不断探索和创新,以减轻这些挑

战对糖链质谱分析技术发展的制约。

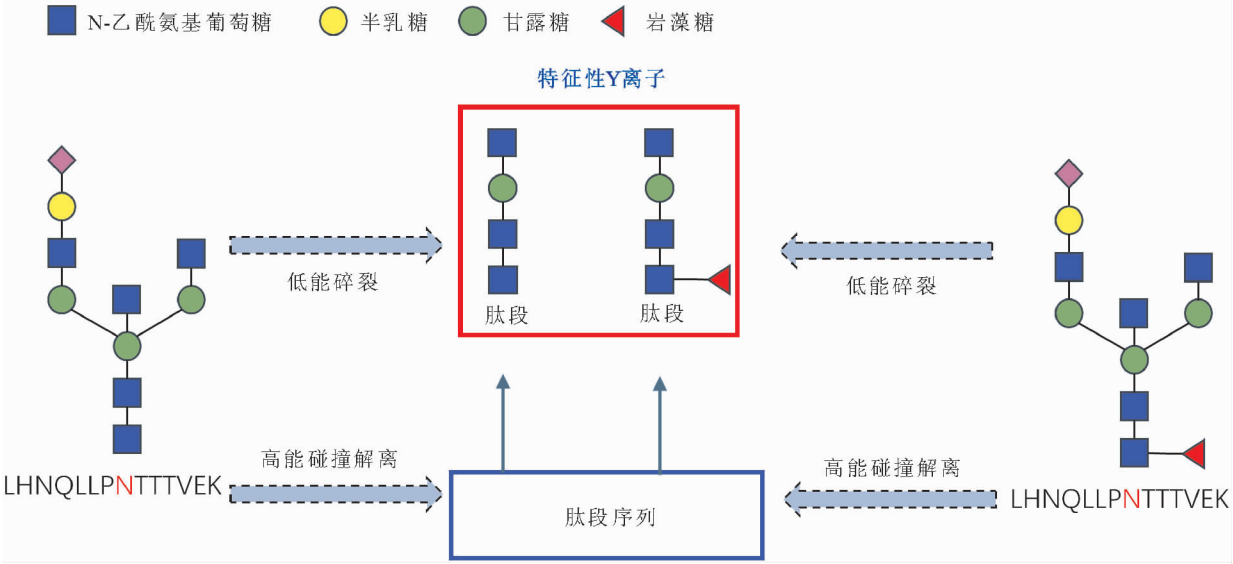


图2 平分型 GlcNAc 结构的鉴定

Fig. 2 Identification of Bisected GlcNAc Structure

5 结语

本文介绍了平分型 GlcNAc 的形成过程,总结了其在神经系统、免疫反应及肿瘤发生发展和转移中的生物学功能;介绍了一系列用于分析平分型 GlcNAc 结构的技术,并分析了它们的优势和局限性,为平分型 GlcNAc 的生物学研究及药物开发提供科学参考。

参考文献

[1] KOE J C, PARKER S J. The posttranslational regulation of amino acid transporters is critical for their function in the tumor microenvironment [J]. Curr Opin Biotechnol, 2024, 85:103022.

[2] LIN Y, LUBMAN D M. The role of N-glycosylation in cancer [J]. Acta Pharmaceutica Sinica B, 2024, 14 (3): 1098-1110.

[3] ZHOU H M, LI Y, LIU B, et al. Downregulation of miR-224 and let-7i contribute to cell survival and chemoresistance in chronic myeloid leukemia cells by regulating ST3GAL IV expression [J]. Gene, 2017, 626: 106-118.

[4] XIAO J, GAO Y, YANG F M, et al. β 1,6 GlcNAc branches-modified protein tyrosine phosphatase alpha enhances its stability and promotes focal adhesion formation in MCF-7 cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 482(4): 1455-1461.

[5] NISHIKAWA A, IHARA Y, HATAKEYAMA M, et

al. Purification, cDNA cloning, and expression of UDP-N-acetylglucosamine: Beta-D-mannoside beta-1, 4N-acetylglucosaminyltransferase III from rat kidney [J]. J Biol Chem, 1992, 267(25): 18199-18204.

[6] MIYOSHI E, UOZUMI N, NODA K, et al. Expression of alpha1-6 fucosyltransferase in rat tissues and human cancer cell lines [J]. Int J Cancer, 1997, 72 (6): 1117-1121.

[7] NAKANO M, MISHRA S K, TOKORO Y, et al. Bisecting GlcNAc is a general suppressor of terminal modification of N-glycan [J]. Mol Cell Proteomics, 2019, 18(10): 2044-2057.

[8] KIZUKA Y, TANIGUCHI N. Enzymes for N-glycan branching and their genetic and nongenetic regulation in cancer [J]. Biomolecules, 2016, 6(2):25-46.

[9] YAMADERA S, NAKAMURA Y, INAGAKI M, et al. Linagliptin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation in human U937 monocytes [J]. Inflammation and Regeneration, 2018, 38: 13-20.

[10] NAGAE M, KANAGAWA M, MORITA-MATSUMOTO K, et al. Atomic visualization of a flipped-back conformation of bisected glycans bound to specific lectins [J]. Scientific Reports, 2016, 6: e22973.

[11] PRADEEP P, KANG H, LEE B. Glycosylation and behavioral symptoms in neurological disorders [J]. Translational Psychiatry, 2023, 13(1): 154-164.

[12] CHEN Q S, TAN Z Q, GUAN F, et al. The essential functions and detection of bisecting GlcNAc in cell biology[J]. Frontiers in Chemistry, 2020, 8: 511-521.

[13] SHIGETA M, SHIBUKAWA Y, IHARA H, et al. be-

- tal, 4-N-Acetylglucosaminyltransferase III potentiates beta1 integrin-mediated neuritogenesis induced by serum deprivation in Neuro2a cells [J]. *Glycobiology*, 2006, 16(6): 564-571.
- [14] KIZUKA Y, TANIGUCHI N. Neural functions of bisecting GlcNAc[J]. *Glycoconj J*, 2018, 35(4): 345-351.
- [15] GAUNITZ S, TJERNBERG L O, SCHEDIN-WEISS S. The N-glycan profile in cortex and hippocampus is altered in Alzheimer disease [J]. *J Neurochem*, 2021, 159(2): 292-304.
- [16] KIZUKA Y, KITAZUME S, TANIGUCHI N. N-glycan and Alzheimer's disease[J]. *Biochim Biophys Acta, Gen Subj*, 2017, 1861(10): 2447-2454.
- [17] SCHEDIN-WEISS S, GAUNITZ S, SUI P, et al. Glycan biomarkers for Alzheimer disease correlate with T-tau and P-tau in cerebrospinal fluid in subjective cognitive impairment [J]. *FEBS J*, 2020, 287(15): 3221-3234.
- [18] YOSHIMURA M, IHARA Y, OHNISHI A, et al. Bisecting N-acetylglucosamine on K562 cells suppresses natural killer cytotoxicity and promotes spleen colonization[J]. *Cancer Res*, 1996, 56(2): 412-418.
- [19] HE X, WANG B, DENG W, et al. Impaired bisecting GlcNAc reprogrammed M1 polarization of macrophage [J]. *Cell Communication and Signaling: CCS*, 2024, 22(1): 73-83.
- [20] SHATHILI A M, BANDALA-SANCHEZ E, JOHN A, et al. Specific sialoforms required for the immune suppressive activity of human soluble CD52[J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 1967-1979.
- [21] DEKKERS G, PLOMP R, KOELEMAN C A M, et al. Multi-level glyco-engineering techniques to generate IgG with defined Fc-glycans [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 36964.
- [22] YANG S, CUI M, LIU Q F, et al. Glycosylation of immunoglobulin G in tumors: Function, regulation and clinical implications [J]. *Cancer Letter*, 2022, 549: 215902.
- [23] PAN H Y, WU Z Y, ZHANG H P, et al. Identification and validation of IgG N-glycosylation biomarkers of esophageal carcinoma [J]. *Frontiers in Immunology*, 2023, 14: 981861.
- [24] SELMAN M H J, NIKS E H, TITULAER M J, et al. IgG fc N-glycosylation changes in Lambert-Eaton myasthenic syndrome and myasthenia gravis[J]. *J Proteome Res*, 2011, 10(1): 143-152.
- [25] SONG W L, LIANG C X, SUN Y H, et al. Expression of GnT-III decreases chemoresistance via negatively regulating P-glycoprotein expression; Involvement of the TNFR2-NF- κ B signaling pathway [J]. *J Biol Chem*, 2023, 299(4): 103051.
- [26] CHENG L, CAO L, WU Y, et al. Bisecting N-acetylglucosamine on EGFR inhibits malignant phenotype of breast cancer via down-regulation of EGFR/Erk signaling[J]. *Frontiers in Oncology*, 2020, 10(1): 929-942.
- [27] TAN Z Q, CAO L, WU Y R, et al. Bisecting GlcNAc modification diminishes the pro-metastatic functions of small extracellular vesicles from breast cancer cells [J]. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2020, 10(1): e12005.
- [28] SHENG Y, YOSHIMURA M, INOUE S, et al. Remodeling of glycoconjugates on CD44 enhances cell adhesion to hyaluronate, tumor growth and metastasis in B16 melanoma cells expressing beta1,4-N-acetylglucosaminyltransferase III [J]. *Int J Cancer*, 1997, 73(6): 850-858.
- [29] FENG J J, WANG Y, LI B X, et al. Loss of bisecting GlcNAcylation on MCAM of bone marrow stroma determined pro-tumoral niche in MDS/AML [J]. *Leukemia*, 2023, 37(1): 113-121.
- [30] RAVIDÀ A, CWIKLINSKI K, ALDRIDGE A M, et al. Fasciola hepatica surface tegument: Glycoproteins at the interface of parasite and host[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2016, 15(10): 3139-3153.
- [31] CHEN Q, PANG P C, COHEN M E, et al. Evidence for differential glycosylation of trophoblast cell types [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2016, 15(6): 1857-1866.
- [32] ZOU G Z, OCHIAI H, HUANG W, et al. 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]. *J Am Chem Soc*, 2011, 133(46): 18975-18991.
- [33] ALLAM H, AOKI K, BENIGNO B B, et al. Glycomic analysis of membrane glycoproteins with bisecting glycosylation from ovarian cancer tissues reveals novel structures and functions [J]. *J Proteome Res*, 2015, 14(1): 434-446.
- [34] NAGAE M, SOGA K, MORITA-MATSUMOTO K, et al. Phytohemagglutinin from *Phaseolus vulgaris* (PHA-E) displays a novel glycan recognition mode using a common legume lectin fold [J]. *Glycobiology*, 2014, 24(4): 368-378.
- [35] DANG L Y, SHEN J C, ZHAO T, et al. Recognition

of Bisecting N-glycans on intact glycopeptides by two characteristic ions in tandem mass spectra [J]. *Anal Chem*, 2019, 91(9): 5478-5482.

[36] LIU M Q, ZENG W F, FANG P, et al. pGlyco 2.0 enables precision N-glycoproteomics with comprehensive quality control and one-step mass spectrometry for intact glycopeptide identification [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 438-451.

[37] LU L C, RILEY N M, SHORTREED M R, et al. O-Pair Search with MetaMorpheus for O-glycopeptide characterization [J]. *Nat Methods*, 2020, 17(11): 1133-1138.

[38] SHEN J C, JIA L, DANG L Y, et al. StrucGP: de novo structural sequencing of site-specific N-glycan on glycoproteins using a modularization strategy [J]. *Nat Methods*, 2021, 18(8): 921-929.

[39] FANG Z, QIN H Q, MAO J W, et al. Glyco-Decipher enables glycan database-independent peptide matching and in-depth characterization of site-specific N-glycosylation [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 1900-1914.

(编辑 亢小玉)