2020 年度陈嘉庚科学奖专辑

陈嘉庚青年科学奖——化学科学奖获奖人

陈兴

北京大学化学与分子工程学院教授, 北大-清华生命联合中心高级研究员. 2002年毕业于清华大学化学系, 2007年获加州大学伯克利分校化学博士学位. 在哈佛大学医学院进行博士后研究工作后, 2010年加入北京大学, 2016年晋升为长聘正教授. 研究方向为化学糖生物学.

相关成果名称: 聚糖的化学标记和解析

聚糖是一类在生命过程中与核酸和蛋白质同等重要的生物大分子. 长期以来, 因难以对其进行特异性标记和分析, 聚糖生物功能的揭示一直进展缓慢. 已有的研究结果和临床证据表明, 糖基化的异常往往伴随着神经退行性疾病、代谢疾病、癌症等重大人类疾病的发生与发展. 糖科学的最终目标之一就是加深对相关人类疾病发生机制的理解, 促进有效诊疗手段的开发. 面对糖科学领域长久以来所面临的困难与挑战, 化学新方法被寄予厚望, 化学糖生物学成为了糖科学的主要研究方向之一. 陈兴课题组围绕“活体中聚糖的精确化学标记和功能解析”开展研究. 以化学标记为主要研究方法, 实现从离体到活细胞、再到活体的逐步推进, 力求解决两个科学问题: 动物活体中聚糖的精确化学标记和唾液酸化聚糖的生物功能解析. 在化学生物学方法开发方面, 以活体水平上的分析为重点, 发展了一系列化学标记、成像和组学鉴定的方法, 实现了聚糖的精准标记和解析. 在功能研究方面, 揭示了唾液酸化聚糖在细胞迁移、神经突触连接、肿瘤生长、心肌肥大等重要生理和病理过程中的功能.

唾液酸化聚糖的化学标记和解析

成波, 陈兴*

北京大学化学与分子工程学院, 北京分子科学国家研究中心, 北大-清华生命科学联合中心, 北京大学合成与功能生物分子中心, 生物有机与分子工程教育部重点实验室, 北京 100871

* 联系人, E-mail: xingchen@pku.edu.cn

2020-03-01 收稿, 2020-04-09 修回, 2020-04-15 接受, 2020-04-26 网络版发表

国家重点研发计划(2018YFA0507600)和国家自然科学基金(21425204, 91753206, 21521003)资助

摘要 细胞表面覆盖着一层被称为糖萼的聚糖, 这些聚糖链最末端的单糖通常是唾液酸. 唾液酸化聚糖参与调控各种重要的生理和病理过程. 非天然糖代谢标记为在活细胞和活体水平对唾液酸化聚糖进行分析提供了一个有力方法. 本文首先对非天然糖代谢标记和生物正交化学的发展历史和研究现状做简单的介绍. 接着, 结合本课题组相关工作, 对非天然糖代谢技术在研究上皮-间充质转变、神经干细胞分化、心肌肥大等过程中的动态唾液酸化的研究进展进行介绍和讨论. 为了拓展非天然糖代谢标记的应用, 我们开发了蛋白质特异性聚糖成像、细胞及组织选择性聚糖标记、聚糖拉曼成像、新型非天然糖等工具. 最后对唾液酸化聚糖的化学生物学研究前景进行了展望.

关键词 唾液酸, 非天然糖代谢标记, 生物正交反应, 拉曼成像, 糖蛋白质组学, 脂质体

生命活动的基本单位是细胞, 每个细胞的表面都存在大量的糖分子或聚糖(glycan)^[1]. 细胞表面的聚糖被形象地称为“糖被”或“糖萼”(glycocalyx), 由糖蛋白、糖脂以及糖胺聚糖等组成^[2]. 作为细胞与外界接触的第一道屏障, 糖萼通过分子识别, 在细胞-细胞、细胞-微生物之间的相互作用和通讯中发挥重要的调控作用. 糖萼介导的细胞表面分子识别和相互作用参与调控细胞间识别、信号转导、病原体入侵、癌细胞迁移等一系列重要的生理和病理过程^[3-6].

脊椎动物细胞的聚糖由9种单糖组成, 其糖链的最末端往往是唾液酸(sialic acid, Sia)这一具有特殊化学结构的九碳糖(图1). 唾液酸含有一个羧基, 是细胞表面呈负电性的主要原因之一. 实际上, 唾液酸是一类结构相近的九碳糖的总称, 主要包括N-乙酰神经氨酸(N-acetylneuraminic acid, Neu5Ac)、N-羟乙酰神经氨酸(N-glycolylneuraminic acid, Neu5Gc)、脱氧神经氨酸(ketodeoxy-nonulosonic acid, KDN)^[7]. 由于Neu5Ac最常见, 因此在没

有特别指出的情况下, 唾液酸指的是Neu5Ac.

唾液酸广泛地参与到受精^[8]、骨骼发育^[9]、神经连接^[10]等过程中, 而唾液酸合成和修饰的失调与癌症^[5]、神经系统疾病^[11,12]等重大疾病的发生与发展息息相关. Neu5Ac的合成发生于细胞质中(图1(a)). 双功能酶GNE(尿苷二磷酸-N-乙酰氨基葡萄糖2-表位酶/N-乙酰甘露糖胺激酶)催化尿苷二磷酸-N-乙酰葡萄糖胺(UDP-N-acetylglucosamine, UDP-GlcNAc)转变为N-乙酰甘露糖胺(N-acetylmannosamine, ManNAc)和ManNAc转变为ManNAc-6-P这两步反应^[13,14]. ManNAc-6-P与磷酸烯醇式丙酮酸(phosphoenolpyruvic acid, PEP)反应生成Neu5Ac-9-P^[15], 接着发生脱磷酸反应生成Neu5Ac^[16]. Neu5Ac进入细胞核后被活化为胞苷单磷酸-Neu5Ac(CMP-Neu5Ac)^[17]. 在大部分哺乳动物中, CMP-Neu5Ac在CMAH酶(cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase, 单磷酸胞嘧啶-N-乙酰神经氨酸羟化酶)的作用下转变为CMP-Neu5Gc,

引用格式: 成波, 陈兴. 唾液酸化聚糖的化学标记和解析. 科学通报, 2020, 65: 2984-2997

Cheng B, Chen X. Chemical labeling and analysis of sialoglycans (in Chinese). Chin Sci Bull, 2020, 65: 2984-2997, doi: [10.1360/TB-2020-0207](https://doi.org/10.1360/TB-2020-0207)

图1 唾液酸化聚糖的生物合成路径。(a) 在细胞质中, ManNAc由UDP-GlcNAc转化而来, 经过磷酸化、与PEP缩合、脱磷酸后生成Neu5Ac。Neu5Ac进入细胞核后, 活化生成CMP-Neu5Ac。CMP-Neu5Ac被转运至高尔基体中发生唾液酸化反应, 生成的唾液酸化蛋白被转运到细胞表面。(b) CMP-Neu5Gc在CMAH催化下由CMP-Neu5Ac转变而来。CMP-KDN的从头合成来自甘露糖^[20]

Figure 1 The biosynthetic pathway of sialylated glycans. (a) In the cytoplasm, ManNAc is derived from UDP-GlcNAc. After phosphorylation, condensation with PEP, and dephosphorylation, ManNAc is transformed to Neu5Ac. Neu5Ac enters the nucleus and is activated to generate CMP-Neu5Ac. CMP-Neu5Ac is transported into the Golgi apparatus, where it is used for sialylation. The sialylated proteins are then transported to the cell surface. (b) CMP-Neu5Gc is converted from CMP-Neu5Ac by CMAH. CMP-KDN is *de novo* synthesized from mannose^[20]

人类缺乏CMAH酶活性而不能从头合成Neu5Gc, 但能从食物中获取这种唾液酸^[18]。类似地, CMP-KDN从KDN合成得到, 而KDN的合成前体则是甘露糖(mannose, Man, 图1(b))^[19]。CMP-Sia(CMP-Neu5Ac、CMP-Neu5Gc和CMP-KDN)被转运入高尔基体, 作为糖基供体被唾液酸转移酶(sialyltransferase)所利用, 将唾液酸连接到特定糖脂和糖蛋白的糖链末端。最后, 唾液酸化的糖蛋白和糖脂被运输到细胞表面执行相应的功能。值得一提的是, CMP-Sia是唯一在细胞核中生成的糖基供体, 其他包括UDP-Glc(尿苷二磷酸葡萄糖)等8种糖基供体均在细胞质中生成, 具体原因至今成谜。

在活细胞和活体水平上对唾液酸进行标记、成像和分析, 对于深入理解唾液酸化聚糖的生物学功能至关重要。由于糖基化过程不受中心法则直接调控, 且聚

糖具有结构复杂多变等特点, 唾液酸化聚糖的标记方法十分有限, 亟待发展。经典的标记方法是利用怀槐凝集素(MAL)、接骨木凝集素(SNA)等能够识别唾液酸的凝集素(lectin)^[21]。然而, 凝集素具有特异性差、结合力弱等缺点。在过去的二三十年, 化学生物学的蓬勃发展为解决糖生物学中的难题提供了新途径。针对唾液酸化聚糖的标记, 科学家开发了基于生物正交反应的非天然糖代谢标记策略, 并逐渐成为了在活细胞和活体水平上研究唾液酸化的最主要手段之一。

1 非天然糖代谢标记与生物正交化学

20世纪90年代, 研究者设计并合成了许多唾液酸的类似物作为唾液酸化的抑制剂, 结果意外地发现某些唾液酸结构类似物不但无法抑制唾液酸化聚糖的合

成,反而会被细胞内相关的酶所接受,从而代谢整合到糖链中^[22,23]。基于这一现象,已故德国科学家Werner Reutter团队^[24]从唾液酸生物合成前体ManNAc出发,研究了其类似物*N*-丙酰甘露糖胺(*N*-propanoylmannosamine, ManNProp)在大鼠中的代谢,发现ManNProp在多个器官中被代谢为SiaNProp并整合到聚糖中。受到这些工作的启发,美国科学家Carolyn Bertozzi团队^[25]在20世纪90年代末期,开发了具有化学反应活性的ManNAc类似物*N*-4-氧代戊酰甘露糖胺(*N*-levulinoylmannosamine, ManLev)。ManLev可以代谢转化为SiaLev,进而整合到细胞表面的唾液酸化聚糖。这一过程在细胞表面聚糖引入羰基,实现了细胞表面化学反应性的功能化。例如,羰基与含有肼或羟胺的荧光团或富集标签进行反应,实现细胞表面唾液酸化聚糖的检测和富集^[25]。羰基与肼的偶联反应需在弱酸性下进行,且细胞中存在含有羰基的生物分子,因而需要开发更适用于活细胞的偶联反应。Bertozzi课题组^[26]于2000年报道了施陶丁格偶联反应(Staudinger ligation),即叠氮和三苯基磷的偶联,并将之用于唾液酸化聚糖的代谢标记。含有叠氮的ManNAc衍生物*N*-叠氮乙酰甘露糖胺(*N*-azidoacetylmannosamine, ManNAz)可进入细胞的唾液酸合成通路,在细胞表面聚糖链中引入叠氮唾液酸SiaNAz,接着利用施陶丁格偶联进行功能化修饰。这种策略被称为非天然糖代谢标记(metabolic glycan labeling)、糖代谢工程(metabolic oligosaccharide engineering)或化学报告基因代谢(metabolic chemical reporter)。

可以说,施陶丁格偶联开启了生物正交反应的发展,成为了化学生物学最主要的研究方向之一^[27]。其间,诺贝尔化学奖得主Barry Sharpless团队^[28]于2001年提出了点击化学(click chemistry)的概念,与生物正交化学有许多共同之处。生物正交化学面向生物学应用,是在生理环境中进行的两种非天然基团之间的选择性偶联,要求反应不影响生理功能且不被任何生物分子干扰;点击化学则从化学反应性出发,强调反应条件温和、选择性高且不受其他官能团的影响。值得一提的是,“点击”一词的翻译并不准确,未体现click所形容的“如同将安全带插扣咔哒一声、恰好吻合地插入插孔中”的意思。鉴于点击化学已被广泛使用,本文仍沿用之。2002年,Sharpless课题组^[29]和Meldal课题组^[30]分别独立报道了一价铜离子催化的叠氮-炔基环加成反应(Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition, CuAAC)^[27,29,30]。之后,CuAAC反应以点击化学被熟知,

在化学、生物学、材料科学等诸多领域得到广泛的应用^[31-33]。为克服一价铜的细胞毒性,Bertozzi课题组^[34]开发了环张力触发的叠氮-炔基环加成反应(strain-promoted azide-alkyne cycloaddition, SPAAC),也被称为无铜点击化学(copper-free click chemistry)。无铜点击反应的开发和发展,进一步将生物正交反应和点击化学统一起来,甚至在很多场合下不做特别区分。近年来,科学家开发了一系列新的生物正交反应,并将它们应用到了聚糖之外的生物分子的标记^[35]。得益于生物正交反应的大力开发,唾液酸聚糖的代谢标记可选择多种新的生物正交基团,包括端炔^[36]、烯键^[37]、异腈^[38]、重氮基团^[39]等。叠氮具有体积小、化学性质稳定、正交性好、便于引入等优点,因此使用最为广泛。

非天然糖代谢标记已经成为化学糖生物学领域的代表性技术之一^[40]。这个技术不仅能研究唾液酸化聚糖(图2)^[20,41],也逐渐被拓展到其他糖基化类型的研究中,包括岩藻糖基化、黏蛋白型*O*-糖基化、*O*-GlcNAc糖基化等^[42,43]。通过生物正交反应连接荧光团,可以在活细胞和活体水平对聚糖进行成像观测^[42]。连接生物素等亲和标签,则可实现糖蛋白的富集和组学分析^[44]。与凝集素标记不同,非天然糖通过代谢引入,标记了新生成的聚糖,因此特别适用于研究糖基化的动态变化。本文结合本课题组相关工作,对利用经典非天然糖代谢技术研究唾液酸化动态变化和非天然糖代谢标记技术的开发与拓展这两方面内容,进行简要介绍。

2 唾液酸化的动态变化研究

细胞表面的唾液酸水平是动态变化的^[45]。在发育过程中,唾液酸化需要受到严格的调控。因此,在活细胞水平对唾液酸化的动态变化进行标记、观测和解析,对理解唾液酸化聚糖介导的生物学功能,具有重要的意义。在过去的20年中,ManNAz等非天然单糖多以全乙酰化的形式使用,以增加其跨细胞膜的效率。最近,本课题组^[46,47]发现ManNAz等全乙酰化非天然糖会引起一定的非特异性半胱氨酸修饰,并开发了新一代的部分保护叠氮糖,很好地解决了这一问题。在本文介绍的部分工作中,使用了全乙酰化非天然糖。尽管这些工作中,副反应不影响其结论,但是建议读者以后尽量使用没有副反应的新一代非天然糖。

2.1 上皮-间充质转变过程中的唾液酸化

上皮-间充质转变(epithelial-mesenchymal transi-

图2 唾液酸聚糖的非天然糖代谢标记. 包含有非天然基团X的唾液酸类似物或ManNAc类似物, 被细胞摄取进入唾液酸的生物合成路径, 最终被整合到细胞的唾液酸化聚糖中. 当X为生物正交基团时, 可利用生物正交反应连接特定的功能标签, 对唾液酸化聚糖进行成像和富集鉴定. 非天然糖也可以利用脂质体载体, 通过受体介导的内吞进入细胞, 从而实现细胞选择性的聚糖标记^[20]

Figure 2 Metabolic glycan labeling for sialylated glycans. Unnatural sugars containing a functional group X, either ManNAc or sialic acid analogues, are taken up by cells, enter the sialic acid biosynthetic pathway, and are incorporated into cell-surface sialoglycans. When X is a bioorthogonal group, the corresponding bioorthogonal reaction can be used to introduce functional probes for glycans imaging or enrichment and identification. Unnatural sugars can also be delivered into cells by liposomes through receptor-mediated endocytosis, which enables cell-selective metabolic glycan labeling^[20]

tion, EMT)是胚胎发育和器官形成中的基本过程, 其异常会导致肿瘤等疾病的发生^[48]. 肿瘤细胞表面往往出现唾液酸化水平的上调^[49]. 那么, 细胞表面的唾液酸化是否与EMT过程有关联性, 成为科学家关注的问题^[50]. 为了更好地解答这个问题, 本课题组^[51]利用Ac₄ManNAz对细胞在EMT过程中的唾液酸化水平, 进行了成像观测, 并对EMT过程中新生成的唾液酸化蛋白进行了选择性富集和组学鉴定(图3(a)). 研究发现, 唾液酸化聚糖的水平在EMT过程中先下调, 然后回调, 最终在EMT转变完成后上调. 通过糖蛋白质组学分析, 我们鉴定了EMT过程中表达水平发生改变的唾液酸化蛋白. 其中, 细胞表面受体黏附蛋白整合素β₄的唾液酸化水平发生下调, 影响了整合素的功能. 进一步研究发现, 通过唾液酸转移酶抑制剂降低细胞表面的唾液酸水平, 对EMT过程起到促进作用. 这些结果表明, 唾液酸化聚糖水平在EMT过程中受到严格的调控, 可能在癌细胞转移等相关过程中发挥调节作用.

2.2 神经干细胞分化过程中的唾液酸化

干细胞具有自我更新能力和多潜能性, 在细胞治疗、再生医学等领域具有广阔的应用前景^[52]. 神经干细胞可以分化为神经元和胶质细胞, 有望被用于治疗

神经损伤、神经退行性疾病等^[53]. 原代神经干细胞主要存在于中枢神经系统, 且随着发育过程急剧减少. 因此, 原代神经干细胞的分离具有很大的难度. 而神经干细胞表面特异表达的生物标记物, 对于标记和分离神经干细胞至关重要. 目前已知的神经干细胞表面特异的生物标记物并不多, 找寻新的生物标记物受到了人们的关注. 本课题组^[54]利用非天然糖代谢标记, 在神经干细胞分化过程中对细胞表面的唾液酸聚糖进行了标记、成像和糖蛋白质组学分析. 我们鉴定到一系列在不同分化阶段特有的唾液酸化蛋白. 其中, IgSF8是潜在的神经前体细胞的生物标记物(图3(b))^[54]. 用唾液酸化蛋白作为生物标记物, 给干细胞生物标记物的找寻和开发提供了一个新的思路. 此外, 该技术可被用于找寻其他生物学过程的生物标记物.

2.3 心肌肥大过程中的唾液酸化

在糖基化相关基因突变导致的疾病中, 时常能观察心脏功能异常的表型^[55]. 此外, 唾液酸化异常在心肌肥大中被观测到^[56]. 心肌肥大是一种可能导致心衰的心脏适应性反应. 唾液酸化在心肌肥大等心脏相关疾病中的功能, 引起了科学家的兴趣. 本课题组^[57]利用非天然糖代谢标记, 在大鼠心肌肥大模型中, 用Ac₄Man-

图3 唾液酸化的动态变化和调控。(a) 利用 $Ac_4ManNAz$, 对EMT过程中唾液酸的动态变化进行成像和组学分析^[51]。(b) 原代神经干细胞分化过程中唾液酸化水平的标记和分析。研究发现Igsf8是原代神经前体细胞的细胞表面标志物^[54]。(c) 大鼠心肌肥大过程中唾液酸化聚糖的动态变化观测^[57]。(d) 蛋白特异性的唾液酸化聚糖成像。利用这一技术, 研究了整合素 $\alpha_x\beta_2$ 的唾液酸化修饰^[58]。

Figure 3 Dynamic changes and regulation of sialylation. (a) Imaging and glycoproteomics analysis of sialylation dynamics during EMT using unnatural sugar $Ac_4ManNAz$ ^[51]. (b) Labeling and analysis of sialylation during differentiation of primary neural stem cells. Igsf8 was identified as a cell-surface marker for intermediate progenitor cells^[54]. (c) Visualization of the dynamic changes of sialylated glycans during cardiac hypertrophy in rats^[57]. (d) Protein-specific imaging of sialylated glycans. Sialylation of integrin $\alpha_x\beta_2$ in living cells was studied^[58].

NAz对心脏的唾液酸化聚糖进行了标记。通过对心脏组织的荧光成像, 发现唾液酸化聚糖在细胞表面广泛分布, 并在细胞连接和T-小管处富集(图3(c))。在心肌肥大过程中, 整体唾液酸化水平出现明显的上调。通过化学糖蛋白组学分析, 我们鉴定到一系列在心肌肥大过程中表达水平升高的唾液酸化蛋白, 包括神经细胞黏附

分子1(NCAM1)、T-激肽原(T-kininogens)、 α_2 巨球蛋白(α_2 -macroglobulin)等。这些结果为进一步深入研究唾液酸化在心肌肥大过程中的生物学功能奠定了基础。

3 蛋白特异性的唾液酸化聚糖成像

细胞表面蛋白大部分被唾液酸化聚糖修饰, 对膜

蛋白的结构和功能起到关键的调控作用^[59]。例如,细胞表面EGFR蛋白的唾液酸化和岩藻糖化修饰会抑制EGFR的二聚和激活^[60]。因此,在活细胞水平检测特定蛋白质的糖基化状态,对于理解糖基化如何调控蛋白质功能至关重要。然而,非天然糖代谢标记针对某种糖基化类型,而无法区分不同的蛋白质。当对唾液酸化聚糖进行荧光标记时,理论上所有唾液酸化蛋白都会具有荧光信号,无法研究特定蛋白的功能如何受到唾液酸化的调控。为了解决这个问题,本课题组^[58,61,62]通过同时使用非天然糖代谢标记和蛋白质特异性标记两种化学生物学手段,分别在唾液酸和目标蛋白上连接荧光共振能量转移(FRET)受体和FRET供体。利用有效FRET只能发生在10 nm距离之内这一特性,通过分子内FRET选择性地激发目标糖蛋白上的FRET受体荧光,实现了蛋白特异性的聚糖成像(图3(d))。本课题组^[58]以细胞表面受体蛋白整合素 $\alpha_X\beta_2$ 作为研究对象,对其唾液酸化与蛋白激活之间的关联进行了活细胞水平的成像研究,发现唾液酸化能促进整合素的激活。

4 基于LABOR技术的细胞和组织选择性唾液酸化聚糖标记

4.1 LABOR技术的开发

尽管非天然糖代谢标记被广泛地用于研究糖基化过程,不具备细胞选择性是其局限性之一。非天然糖会被各种细胞所摄取,无法在多细胞体系和活体中,对特定细胞中的糖基化进行标记和研究。而细胞选择性标记的重要性,从基因编码的绿色荧光蛋白所实现的细胞选择性蛋白成像,可见一斑^[63]。为了解决这个问题,本课题组^[64~68]开发了LABOR(liposome-assisted bioorthogonal reporter, 脂质体辅助的生物正交报告基团)技术,实现了细胞选择性的唾液酸化聚糖标记(图4)。LABOR技术利用了靶向性脂质体这一广泛应用的靶向性药物载带体系。我们将含有叠氮的唾液酸类似物9AzSia装载于靶向性脂质体内,利用配体-受体相互作用,实现了靶细胞的选择性唾液酸化聚糖标记。例如,在脂质体的表面修饰叶酸作为配体,可以靶向表面高表达叶酸受体的癌细胞,在混合培养的细胞体系

图4 基于LABOR技术的细胞选择性和组织特异性聚糖标记。(a) LABOR技术的原理。包裹9AzSia的靶向脂质体通过受体介导的内吞进入内含体,并在溶酶体中裂解释放出9AzSia。溶酶体膜上的转运体将9AzSia转运至细胞质,从而实现细胞选择性聚糖标记^[68]。(b) 叶酸受体(FR)高表达细胞的选择性标记^[69]。(c) 同时选择性标记两种细胞的聚糖^[65]。(d) 小鼠肿瘤组织聚糖的靶向性标记^[65]。(e) 小鼠脑部唾液酸化聚糖标记^[66]。Figure 4 Cell-selective and tissue-specific glycan labeling based on LABOR. (a) The mechanism of LABOR. Ligand-targeted liposomes encapsulating 9AzSia are internalized into the endosome via the receptor-mediated endocytosis. The liposomes then enter the lysosome, where 9AzSia is released from liposomes. The transporter on the membrane of lysosomes transports 9AzSia into the cytosol for cell-selective glycan labeling^[68]. (b) Cell-selective metabolic glycan labeling in folate receptor (FR)-overexpressed cells^[69]. (c) Multiplexed labeling of co-cultured cells with two distinct chemical reporters^[65]. (d) Targeted labeling of tumor-associated glycans in living animals^[65]. (e) *In vivo* metabolic labeling of sialoglycans in the mouse brain by using LABOR^[66].

中实现细胞选择性标记(图4(b))^[69]。

4.2 LABOR技术的机理和拓展

我们详细地研究了脂质体载带非天然糖进行代谢标记的机理,并在此基础上开发了更多的基于脂质体的配-受体对,拓展了LABOR的应用范围^[68]。通过成像观测和生化分析发现LABOR是通过唾液酸的回收途径进行代谢标记。通过对带有叶酸配体的脂质体进行荧光修饰,我们利用荧光共定位的方法发现脂质体通过叶酸受体介导的内吞后,依次进入早期胞内体和溶酶体。在溶酶体中,脂质体被破坏并释放非天然唾液酸,接着溶酶体表面的唾液酸转运体将非天然唾液酸转运到细胞质中(图4(a))。基于这一机理,将针对HER2受体的抗体Herceptin、针对proteintyrosine kinase 7蛋白的适配体Sgc8、针对B细胞特异受体CD22的寡糖配体^{BPC}NeuAc和^{POB}NeuAc等引入脂质体表面,实现了对不同种类细胞的选择性唾液酸化聚糖标记^[68]。更进一步地,本课题组^[68]在两种细胞的混合培养体系中,利用两种对应的配体去靶向相应细胞的表面受体,实现了各自的靶向标记,展现了LABOR技术的多样性(图4(c))。

4.3 活体肿瘤组织的聚糖靶向标记

LABOR技术不仅能在细胞培养体系使用,还可以在动物活体中实现组织特异性的聚糖标记。大量的研究表明,肿瘤的发展过程伴随着细胞表面糖基化的改变^[49]。以肿瘤生长过程中的唾液酸化为研究对象,利用LABOR技术,实现了小鼠中肿瘤组织的唾液酸化聚糖的选择性标记^[65]。利用LABOR技术,以B16-F10细胞(高表达整合素 $\alpha_v\beta_3$)和MCF-7细胞为研究对象,本课题组^[65]设计了靶向该整合素的配体分子cRGDyK。在小鼠皮下分别种植两种肿瘤:由高表达整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的B16-F10细胞和不表达 $\alpha_v\beta_3$ 的MCF-7细胞形成的肿瘤。将修饰了 $\alpha_v\beta_3$ 配体cRGDyK并包裹9AzSia的脂质体cRGD-LP-9AzSia,通过尾静脉注射对小鼠中的肿瘤进行标记(图4(d))。成像结果显示,这个方法成功地实现了B16-F10肿瘤的选择性标记。研究发现,随着肿瘤生长,唾液酸化聚糖水平逐渐升高。对肿瘤生长过程中的唾液酸化蛋白进行了定量的组学鉴定和分析,发现了一系列与肿瘤生长相关蛋白的唾液酸化水平被动态调控。

4.4 脂质体标记脑部唾液酸

哺乳动物中,脑部在所有器官中具有最高的唾液酸

含量。唾液酸在脑发育和脑部相关疾病的发生发展中发挥重要功能^[70]。在活体中对脑部的唾液酸化聚糖进行可视化研究,有助于理解脑部疾病和糖基化调控之间的关系。虽然非天然糖可用于在活体中标记唾液酸化聚糖,但是它们无法通过血脑屏障,对脑中的唾液酸化聚糖进行标记。LABOR技术为解决这一问题提供了一种途径。利用能够通过血脑屏障的脂质体,本课题组^[66]成功地将9AzSia运送到脑部,实现了脑部唾液酸化聚糖的代谢标记(图4(e))。通过活体水平的生物正交反应,对脑部的唾液酸化聚糖进行了荧光成像观测。研究发现,唾液酸化聚糖在各种脑细胞的表面广泛存在,且在神经元突触的位置尤其丰富。通过糖蛋白质组学分析鉴定到140个脑部唾液酸修饰的糖蛋白,其中包含多个定位于突触的糖蛋白。利用脉冲-追踪实验发现唾液酸化水平的调控在不同脑区有很大的差异。其中,海马区唾液酸聚糖的生成和降解均明显慢于其他脑区。LABOR技术为在活体中直接观察脑部唾液酸聚糖的动态调控提供了可行的方法,有助于研究唾液酸修饰在神经连接、神经退行性疾病等生理和病理过程中的功能。

5 新型非天然唾液酸的开发及应用

5.1 亚型特异的非天然唾液酸

脊椎动物中存在Neu5Ac、Neu5Gc、KDN等3种唾液酸亚型,其区别在于C-5号位的取代基不同。经典的非天然唾液酸SiaNAz在C-5位置引入生物正交基团,无法区别3种唾液酸亚型。为了研究不同唾液酸亚型的生物学功能,本课题组^[71]在C-9位置进行衍生化,合成了对应3种唾液酸亚型的9AzNeu5Ac、9AzNeu5Gc、9AzKDN等3种叠氮唾液酸(图5(a))。首先,在哺乳动物细胞中利用荧光显微成像和流式细胞术对这3种叠氮唾液酸的代谢标记效率进行了评估。接着,通过化学糖蛋白质组学分析,发现3种叠氮唾液酸的修饰蛋白具有很高的重合度,表明在哺乳动物细胞中这3种非天然唾液酸可能经历相同的唾液酸化途径。最后,利用3种叠氮唾液酸对细胞表面进行了唾液酸亚型特异性的工程化,研究了细菌毒素SubAb和细胞表面不同唾液酸亚型之间的识别能力,发现唾液酸C-5和C-9位的羟基对于SubAb和唾液酸的结合十分关键^[71]。

5.2 双功能非天然唾液酸

唾液酸和唾液酸结合蛋白的相互作用调控一系列

重要的细胞表面识别过程^[71]. 受限于糖和蛋白质相互作用力较弱等原因, 唾液酸结合蛋白的捕捉和鉴定具有很大的挑战性. 在含有一个生物正交反应基团的非天然唾液酸的基础上, 本课题组^[72]开发了含有生物正交反应基团和光交联基团的双功能非天然唾液酸, 用于高效捕捉唾液酸结合蛋白(图5(b)). 此前, 双吡丙啶(dia-

zine, DAz)等光交联基团被连接于唾液酸, 并发现这类含有光交联的非天然唾液酸可以被细胞代谢而整合到唾液酸化聚糖中, 实现了唾液酸与结合蛋白的共价光交联^[73,74]. 基于这些前期研究, 本课题组^[72]设计合成了分别在C-9和C-5有叠氮和双吡丙啶基团的双功能唾液酸9AzSiaNDAz, 证明9AzSiaNDAz能高效地通过代

图 5 新型非天然唾液酸的开发及应用. (a) 9AzNeu5Ac、9AzNeu5Gc和9AzKDN是对应3种唾液酸亚型的非天然唾液酸, 实现了唾液酸亚型特异的生物正交标记^[71]. (b) 双功能唾液酸9AzSiaNDAz和9AzSiaNAI, 可分别用于唾液酸结合蛋白的鉴定和唾液酸化聚糖的双色成像^[72]. (c) 含有生物正交脱除基团的非天然唾液酸Neu5Proc, 可用于细胞表面唾液酸的化学调控^[75]. (d) SialNAz、SialNAI、SialNCy和[D₃]Sia是含有生物正交拉曼基团的非天然唾液酸, 实现了聚糖的生物正交拉曼光谱检测和显微成像^[76]

Figure 5 Development and application of novel unnatural sialic acids. (a) 9-Azido analogues of three sialic acid forms, 9AzNeu5Ac, 9AzNeu5Gc and 9AzKDN, enable metabolic labeling of specific sialoglycoforms^[71]. (b) Bifunctional sialic acids, 9AzSiaNDAz and 9AzSiaNAI, can be used for identification of sialoglycan-binding proteins and two-color imaging of sialoglycans^[72]. (c) Neu5Proc can be used to chemically remodel cell-surface sialic acids through a bioorthogonal elimination reaction^[75]. (d) Bioorthogonal Raman spectroscopy and microscopy of cellular glycans enabled by unnatural sialic acids containing a bioorthogonal Raman reporter, SialNAz, SialNAI, SialNCy and [D₃]Sia^[76]

谢标记引入到细胞表面唾液酸化聚糖中,用于富集唾液酸聚糖结合蛋白.与单功能光交联唾液酸相比,9Az-SiaNDAz无需在唾液酸化蛋白上先加上富集标签,可用于大规模鉴定唾液酸结合蛋白.开发了分别在C-9和C-5有叠氮和端炔的双功能唾液酸9AzSiaNAI,实现了唾液酸化聚糖的双荧光标记和FRET成像^[72].双功能非天然唾液酸通过在一个分子上引入两个官能团,大大地拓展了非天然糖代谢标记功能化细胞表面唾液酸化聚糖的能力.

5.3 含有生物正交消除基团的非天然唾液酸

生物正交反应的开发,受到了化学生物学家很大的关注.最近,陈鹏课题组^[77,78]将生物正交反应从偶联反应拓展到生物正交断裂反应,可用于生物分子的在体原位激活.本课题组^[75]将生物正交消除反应引入到唾液酸化聚糖的非天然糖代谢,用以原位调控唾液酸的电性(图5(c)).我们设计合成了含有生物正交断裂基团的非天然唾液酸*N*-炔丙氧羰基-神经氨酸(Neu5Proc),通过细胞代谢将其引入细胞表面唾液酸化聚糖.接着通过钨催化的生物断键反应,可以有效地将Neu5Proc上的炔丙氧羰基移除,从而产生神经氨酸Neu.细胞表面产生的Neu含有裸露的氨基,中和了部分细胞表面的负电荷,造成了细胞之间的团聚.这种方法有望成为一种控制细胞组装行为的化学方法^[75].

5.4 含有生物正交拉曼基团的非天然糖唾液酸

基于非天然糖代谢的聚糖成像研究,通常是利用生物正交反应标记荧光团从而实现荧光显微成像.通过对各种成像方式的评估,我们注意到拉曼光谱信号可来源于尺寸很小的官能团,其有可能直接通过代谢整合到聚糖中,从而不再依赖于生物正交反应.更重要的是,哺乳动物细胞在1800~2800 cm⁻¹有个“拉曼静默区”,所有的天然生物分子均不在这个区域产生拉曼信号.基于这些思考,本课题组^[76,79,80]首次提出了“生物正交拉曼标记与成像”的概念,将炔基、叠氮、氰基、C-D等生物正交拉曼基团连接于唾液酸,实现了唾液酸化聚糖的代谢标记与直接拉曼成像(图5(d)).相比于荧光基团,拉曼基团尺寸更小,无需生物正交反应等优点,可与荧光技术互补,开拓一系列新的研究体系.

6 总结与展望

核酸、蛋白、聚糖、脂是细胞中的4类生物大分

子.聚糖存在于所有的生物体中,从微生物到人类都有各种糖基化修饰.大量唾液酸存在于哺乳动物细胞表面,对细胞的物理化学性质、生理病理功能都具有必不可少的调节作用,因而受到了糖科学及其他相关领域的重点关注和研究.从研究技术角度上说,针对聚糖的技术和方法比较缺乏,这也导致了对包括唾液酸化聚糖在内的聚糖的功能研究,长久以来困难重重.非天然糖代谢标记技术源于对唾液酸化聚糖的研究,对糖生物学和化学生物学(特别是生物正交反应的开发)都产生了深远的影响.

基因敲除等遗传学手段,无疑是生物功能研究的利器之一.然而,对于唾液酸聚糖,这些技术往往受到限制.例如,唾液酸转移酶多达20余种且功能具有冗余性,几乎无法进行全部敲除.更重要的是,遗传学方法无法对不受基因编码的聚糖进行标记.非天然糖代谢标记从糖代谢通路出发,在活细胞中引入非天然唾液酸,再利用生物正交反应连接荧光探针或富集标签,实现了特定聚糖的检测、富集和组学分析.相比于抗体和凝聚素,非天然糖代谢标记特异性好、灵敏度高,并更适用于活体水平的研究.

从化学的角度思考,唾液酸是一类化学结构十分有趣的单糖.唾液酸相关的化学糖生物学研究,是近年来糖科学快速发展的代表性例子,亦展现出化学与生物学交叉研究的强大潜力.基于唾液酸化聚糖在神经活动、免疫功能调节、肿瘤发展等过程中所扮演的重要角色,非天然糖代谢标记技术将在解决相关生物学问题中得到更加重要的应用.例如,探索长期记忆的形成和唾液酸化之间的关系,研究唾液酸化在肿瘤细胞的免疫逃逸中的作用等,都是非常有意义并且极具挑战性的课题.

聚糖末端的唾液酸存在多种键链方式(包括 α 2,3和 α 2,6等),它们由不同的唾液酸转移酶催化完成.如何在活细胞中实现键链方式特异性的唾液酸代谢标记,需要技术上的新突破.2019年,Bertozzi课题组^[81]针对多肽GalNAc-Ts酶和糖底物之间的正交性所提出的“bump-hole”策略,对解决该问题有一定的启发性.

聚糖研究落后于蛋白质和核酸的现状,越来越受到科学家的重视.交叉学科的迅猛发展为解决这一问题带来了机遇.以非天然糖代谢标记技术为代表的化学生物学方法实现了聚糖的成像和组学分析;新的合成策略为获取结构准确的天然糖类化合物进行功能研究开辟了新途径;精心设计的糖模拟物促进了糖类分

子之间相互作用的研究;糖基化小分子抑制剂的开发推进了活体水平聚糖功能的解析.这些都为研究糖的结构、功能及其调控提供了重要突破口.另外,在规模

化的糖组学、糖蛋白质组学和代谢组学等大数据平台的支持下,很多研究已经从实验室过渡到临床样本,朝向解决相关人类重大疾病、造福于人类健康迈进一步.

参考文献

- Varki A. Glycan-based interactions involving vertebrate sialic-acid-recognizing proteins. *Nature*, 2007, 446: 1023–1029
- Kiessling L L. Chemistry-driven glycoscience. *Bioorg Med Chem*, 2018, 26: 5229–5238
- Crocker P R, Paulson J C, Varki A. Siglecs and their roles in the immune system. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7: 255–266
- Stencel-Baerenwald J E, Reiss K, Reiter D M, et al. The sweet spot: Defining virus-sialic acid interactions. *Nat Rev Microbiol*, 2014, 12: 739–749
- Zhou X M, Yang G L, Guan F. Biological functions and analytical strategies of sialic acids in tumor. *Cells*, 2020, 9: 273
- Yen H Y, Liu Y C, Chen N Y, et al. Effect of sialylation on EGFR phosphorylation and resistance to tyrosine kinase inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 6955–6960
- Angata T, Varki A. Chemical diversity in the sialic acids and related alpha-keto acids: An evolutionary perspective. *Chem Rev*, 2002, 102: 439–469
- Pang P C, Chiu P C N, Lee C L, et al. Human sperm binding is mediated by the Sialyl-Lewisx Oligosaccharide on the zona pellucida. *Science*, 2011, 333: 1761–1764
- van Karnebeek C D M, Bonafé L, Wen X Y, et al. NANS-mediated synthesis of sialic acid is required for brain and skeletal development. *Nat Genet*, 2016, 48: 777–784
- Yamashita T, Wu Y P, Sandhoff R, et al. Interruption of ganglioside synthesis produces central nervous system degeneration and altered axon-glial interactions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 2725–2730
- Simpson M A, Cross H, Proukakis C, et al. Infantile-onset symptomatic epilepsy syndrome caused by a homozygous loss-of-function mutation of GM3 synthase. *Nat Genet*, 2004, 36: 1225–1229
- Park Y E, Kim H S, Choi E S, et al. Limb-girdle phenotype is frequent in patients with myopathy associated with GNE mutations. *J Neurol Sci*, 2012, 321: 77–81
- Stäsche R, Hinderlich S, Weise C, et al. A bifunctional enzyme catalyzes the first two steps in *N*-acetylneuraminic acid biosynthesis of rat liver—Molecular cloning and functional expression of UDP-*N*-acetyl-glucosamine 2-epimerase/*N*-acetylmannosamine kinase. *J Biol Chem*, 1997, 272: 24319–24324
- Lucka L, Krause M, Danker K, et al. Primary structure and expression analysis of human UDP-*N*-acetyl-glucosamine-2-epimerase/*N*-acetylmannosamine kinase, the bifunctional enzyme in neuraminic acid biosynthesis. *FEBS Lett*, 1999, 454: 341–344
- Maliekal P, Vertommen D, Delpierre G, et al. Identification of the sequence encoding *N*-acetylneuraminate-9-phosphate phosphatase. *Glycobiology*, 2006, 16: 165–172
- Li Y, Chen X. Sialic acid metabolism and sialyltransferases: Natural functions and applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 94: 887–905
- Munster-Kuhnel A K, Tiralongo J, Krapp S, et al. Structure and function of vertebrate CMP-sialic acid synthetases. *Glycobiology*, 2004, 14: 43R–51R
- Bardor M, Nguyen D H, Diaz S, et al. Mechanism of uptake and incorporation of the non-human sialic acid *N*-glycolylneuraminic acid into human cells. *J Biol Chem*, 2005, 280: 4228–4237
- Inoue S, Kitajima K. KDN (deaminated neuraminic acid): Dreamful past and exciting future of the newest member of the sialic acid family. *Glycoconj J*, 2006, 23: 277–290
- Cheng B, Xie R, Dong L, et al. Metabolic remodeling of cell-surface sialic acids: Principles, applications, and recent advances. *ChemBioChem*, 2016, 17: 11–27
- Lehmann F, Tiralongo E, Tiralongo J. Sialic acid-specific lectins: Occurrence, specificity and function. *Cell Mol Life Sci*, 2006, 63: 1331–1354
- Schwartz E L, Hadfield A F, Brown A E, et al. Modification of sialic acid metabolism of murine erythroleukemia cells by analogs of *N*-acetylmannosamine. *Biochim Biophys Acta-Mol Cell Res*, 1983, 762: 489–497
- Hadfield A F, Mella S L, Sartorelli A C. *N*-acetyl-D-mannosamine analogues as potential inhibitors of sialic acid biosynthesis. *J Pharm Sci*, 1983, 72: 748–751
- Kayser H, Zeitler R, Kannicht C, et al. Biosynthesis of a nonphysiological sialic acid in different rat organs, using *N*-propanoyl-*D*-hexosamines as precursors. *J Biol Chem*, 1992, 267: 16934–16938
- Mahal L K. Engineering chemical reactivity on cell surfaces through oligosaccharide biosynthesis. *Science*, 1997, 276: 1125–1128
- Saxon E. Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction. *Science*, 2000, 287: 2007–2010
- Bertozzi C R. A decade of bioorthogonal chemistry. *Acc Chem Res*, 2011, 44: 651–653

- 28 Kolb H C, Finn M G, Sharpless K B. Click chemistry: Diverse chemical function from a few good reactions. *Angew Chem Int Ed*, 2001, 40: 2004–2021
- 29 Rostovtsev V V, Green L G, Fokin V V, et al. A stepwise Huisgen cycloaddition process: Copper(I)-catalyzed regioselective “ligation” of azides and terminal alkynes. *Angew Chem Int Ed*, 2002, 41: 2596–2599
- 30 Tornøe C W, Christensen C, Meldal M. Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-Triazoles by regioselective copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *J Org Chem*, 2002, 67: 3057–3064
- 31 Thirumurugan P, Matusiuk D, Jozwiak K. Click chemistry for drug development and diverse chemical-biology applications. *Chem Rev*, 2013, 113: 4905–4979
- 32 Moses J E, Moorhouse A D. The growing applications of click chemistry. *Chem Soc Rev*, 2007, 36: 1249–1262
- 33 Tiwari V K, Mishra B B, Mishra K B, et al. Cu-catalyzed click reaction in carbohydrate chemistry. *Chem Rev*, 2016, 116: 3086–3240
- 34 Agard N J, Prescher J A, Bertozzi C R. A strain-promoted [3 + 2] azide-alkyne cycloaddition for covalent modification of biomolecules in living systems. *J Am Chem Soc*, 2004, 126: 15046–15047
- 35 Lang K, Chin J W. Bioorthogonal reactions for labeling proteins. *ACS Chem Biol*, 2014, 9: 16–20
- 36 Hsu T L, Hanson S R, Kishikawa K, et al. Alkynyl sugar analogs for the labeling and visualization of glycoconjugates in cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 2614–2619
- 37 Patterson D M, Nazarova L A, Xie B, et al. Functionalized cyclopropanes as bioorthogonal chemical reporters. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 18638–18643
- 38 Stairs S, Neves A A, Stöckmann H, et al. Metabolic glycan imaging by isonitrile-tetrazine click chemistry. *ChemBioChem*, 2013, 14: 1063–1067
- 39 Andersen K A, Aronoff M R, McGrath N A, et al. Diazo groups endure metabolism and enable chemoselectivity in cellulose. *J Am Chem Soc*, 2015, 137: 2412–2415
- 40 Bertozzi C R, Kiessling L L. Chemical glycobiology. *Science*, 2001, 291: 2357–2364
- 41 Wratisl P R, Horstkorte R, Reutter W. Metabolic glycoengineering with *N*-acyl side chain modified mannosamines. *Angew Chem Int Ed*, 2016, 55: 9482–9512
- 42 Laughlin S T, Bertozzi C R. Imaging the glycome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 12–17
- 43 Rouhanifard S H, Nordstrøm L U, Zheng T, et al. Chemical probing of glycans in cells and organisms. *Chem Soc Rev*, 2013, 42: 4284–4296
- 44 Palaniappan K K, Bertozzi C R. Chemical glycoproteomics. *Chem Rev*, 2016, 116: 14277–14306
- 45 Hanisch F, Weidemann W, Grossmann M, et al. Sialylation and muscle performance: Sialic acid is a marker of muscle ageing. *PLoS One*, 2013, 8: 1–5
- 46 Qin W, Qin K, Fan X, et al. Artificial cysteine *S*-glycosylation induced by per-*O*-acetylated unnatural monosaccharides during metabolic glycan labeling. *Angew Chem Int Ed*, 2018, 57: 1817–1820
- 47 Hao Y, Fan X, Shi Y, et al. Next-generation unnatural monosaccharides reveal that ESRRB *O*-GlcNAcylation regulates pluripotency of mouse embryonic stem cells. *Nat Commun*, 2019, 10: 4065
- 48 Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15: 178–196
- 49 Fuster M M, Esko J D. The sweet and sour of cancer: Glycans as novel therapeutic targets. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5: 526–542
- 50 Guan F, Handa K, Hakomori S. Specific glycosphingolipids mediate epithelial-to-mesenchymal transition of human and mouse epithelial cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 7461–7466
- 51 Du J, Hong S, Dong L, et al. Dynamic sialylation in transforming growth factor- β (TGF- β)-induced epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem*, 2015, 290: 12000–12013
- 52 Laird D J, von Andrian U H, Wagers A J. Stem cell trafficking in tissue development, growth, and disease. *Cell*, 2008, 132: 612–630
- 53 Temple S. The development of neural stem cells. *Nature*, 2001, 414: 112–117
- 54 Bai Q R, Dong L, Hao Y, et al. Metabolic glycan labeling-assisted discovery of cell-surface markers for primary neural stem and progenitor cells. *Chem Commun*, 2018, 54: 5486–5489
- 55 Jaeken J, Matthijs G. Congenital disorders of glycosylation: A rapidly expanding disease family. *Annu Rev Genom Hum Genet*, 2007, 8: 261–278
- 56 Kimura K, Ieda M, Kanazawa H, et al. Cardiac sympathetic rejuvenation: A link between nerve function and cardiac hypertrophy. *Circ Res*, 2007, 100: 1755–1764
- 57 Rong J, Han J, Dong L, et al. Glycan imaging in intact rat hearts and glycoproteomic analysis reveal the upregulation of sialylation during cardiac hypertrophy. *J Am Chem Soc*, 2014, 136: 17468–17476
- 58 Lin W, Du Y, Zhu Y, et al. A *cis*-membrane FRET-based method for protein-specific imaging of cell-surface glycans. *J Am Chem Soc*, 2014, 136: 679–687
- 59 Roth J. Protein *N*-glycosylation along the secretory pathway: Relationship to organelle topography and function, protein quality control, and cell Interactions. *Chem Rev*, 2002, 102: 285–304

- 60 Liu Y C, Yen H Y, Chen C Y, et al. Sialylation and fucosylation of epidermal growth factor receptor suppress its dimerization and activation in lung cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 11332–11337
- 61 Lin W, Gao L, Chen X. Protein-specific imaging of *O*-GlcNAcylation in single cells. *ChemBioChem*, 2015, 16: 2571–2575
- 62 Lin W, Gao L, Chen X. Protein-specific imaging of posttranslational modifications. *Curr Opin Chem Biol*, 2015, 28: 156–163
- 63 Tsien R. Constructing and exploiting the fluorescent protein paintbox (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Ed*, 2009, 48: 5612–5626
- 64 Xie R, Hong S, Chen X. Cell-selective metabolic labeling of biomolecules with bioorthogonal functionalities. *Curr Opin Chem Biol*, 2013, 17: 747–752
- 65 Xie R, Dong L, Huang R, et al. Targeted imaging and proteomic analysis of tumor-associated glycans in living animals. *Angew Chem Int Ed*, 2014, 53: 14082–14086
- 66 Xie R, Dong L, Du Y, et al. *In vivo* metabolic labeling of sialoglycans in the mouse brain by using a liposome-assisted bioorthogonal reporter strategy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: 5173–5178
- 67 Du Y F, Xie R, Sun Y T, et al. Liposome-assisted metabolic glycan labeling with cell and tissue selectivity. *Methods Enzymol*, 2018, 598: 321–353
- 68 Sun Y, Hong S, Xie R, et al. Mechanistic investigation and multiplexing of liposome-assisted metabolic glycan labeling. *J Am Chem Soc*, 2018, 140: 3592–3602
- 69 Xie R, Hong S, Feng L, et al. Cell-selective metabolic glycan labeling based on ligand-targeted liposomes. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 9914–9917
- 70 Wang B. Sialic acid is an essential nutrient for brain development and cognition. *Annu Rev Nutr*, 2009, 29: 177–222
- 71 Cheng B, Dong L, Zhu Y T, et al. 9-Azido analogues of three sialic acid forms for metabolic remodeling of cell-surface sialoglycans. *ACS Chem Biol*, 2019, 14: 2141–2147
- 72 Feng L, Hong S, Rong J, et al. Bifunctional unnatural sialic acids for dual metabolic labeling of cell-surface sialylated glycans. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 9244–9247
- 73 Han S, Collins B E, Bengtson P, et al. Homomultimeric complexes of CD22 in B cells revealed by protein-glycan cross-linking. *Nat Chem Biol*, 2005, 1: 93–97
- 74 Tanaka Y, Kohler J J. Photoactivatable crosslinking sugars for capturing glycoprotein interactions. *J Am Chem Soc*, 2008, 130: 3278–3279
- 75 Wang J, Cheng B, Li J, et al. Chemical remodeling of cell-surface sialic acids through a palladium-triggered bioorthogonal elimination reaction. *Angew Chem Int Ed*, 2015, 54: 5364–5368
- 76 Lin L, Tian X, Hong S, et al. A bioorthogonal raman reporter strategy for SERS detection of glycans on live cells. *Angew Chem Int Ed*, 2013, 52: 7266–7271
- 77 Li J, Chen P R. Development and application of bond cleavage reactions in bioorthogonal chemistry. *Nat Chem Biol*, 2016, 12: 129–137
- 78 Wang J, Chen P. Development and applications of bioorthogonal cleavage reactions (in Chinese). *Acta Chim Sin*, 2017, 75: 1173–1182 [王杰, 陈鹏. 生物正交剪切反应及其应用. *化学学报*, 2017, 75: 1173–1182]
- 79 Hong S, Chen T, Zhu Y, et al. Live-cell stimulated Raman scattering imaging of alkyne-tagged biomolecules. *Angew Chem Int Ed*, 2014, 53: 5827–5831
- 80 Hong S, Lin L, Xiao M, et al. Live-cell bioorthogonal Raman imaging. *Curr Opin Chem Biol*, 2015, 24: 91–96
- 81 Choi J, Wagner L J S, Timmermans S B P E, et al. Engineering orthogonal polypeptide GalNAc-transferase and UDP-sugar pairs. *J Am Chem Soc*, 2019, 141: 13442–13453

Summary for “唾液酸化聚糖的化学标记和解析”

Chemical labeling and analysis of sialoglycans

Bo Cheng & Xing Chen^{*}

College of Chemistry and Molecular Engineering, Beijing National Laboratory for Molecular Sciences, Peking-Tsinghua Center for Life Sciences, Synthetic and Functional Biomolecules Center, and Key Laboratory of Bioorganic Chemistry and Molecular Engineering of Ministry of Education, Peking University, Beijing 100871, China

^{*} Corresponding author, E-mail: xingchen@pku.edu.cn

Every cell is covered with a dense layer of glycans, which is termed glycocalyx. The outermost monosaccharide of these glycans is often sialic acid, which are a family of nine-carbon monosaccharides. Sialylated glycans play important roles in various physiological and pathological processes, including pathogen invasion, cancer progress, and immune response. Lectins and antibodies have long been used for labeling and detecting sialylated glycans. However, they suffer from low affinity and poor specificity. In the past decades, metabolic glycan labeling (MGL) has emerged as a powerful tool for probing sialylation in live cells and living animals. In the MGL strategy, unnatural sugars containing a bioorthogonal functional group is metabolically incorporated into sialylated glycans by exploiting the underlying glycan biosynthetic pathway. Subsequent bioorthogonal reactions enable conjugation of sialylated glycans with imaging probes or enrichment tags. In this review, we first give a brief introduction on the history and current progress of MGL and bioorthogonal chemistry. Secondly, we discuss the application of MGL in the studies of dynamic changes and regulation of sialylation in various biological processes. Several examples from our research group on the studies of sialylation dynamics in epithelial-mesenchymal transition (EMT), neuronal stem cell differentiation, and cardiac hypertrophy are presented. By metabolic labeling of sialoglycans with ManNAz during EMT, we observed that cellular sialylation was downregulated during EMT, followed by reversion and upregulation. In neuronal stem cells, metabolic labeling of cell-surface sialoglycans has been exploited to discover cell-surface markers. Sialylation in cardiac hypertrophy was investigated by MGL in intact rat hearts, which revealed upregulation of sialylation during hypertrophy. Thirdly, aiming to expand the applications of MGL, we have developed new methods for protein-specific glycan imaging, cell- and tissue-selective glycan labeling, glycan Raman imaging, and novel unnatural sugars. By combining MGL with site-specific protein labeling, we developed a cis-membrane FRET-based methodology to visualize glycans of specific proteins of interest on live cells. Using the protein-specific glycan imaging technique, we found that sialylation of $\alpha_x\beta_2$ integrin is important for its activation. To overcome the limitation that MGL lacks cell-type selectivity, we developed the liposome-assisted bioorthogonal reporter (LABOR) strategy, in which azido sialic acid is encapsulated in ligand-targeted liposomes for cell-selective labeling of sialylated glycans via the receptor-mediated endocytosis. We demonstrated the LABOR strategy by selective labeling of sialoglycans in folate receptor-overexpressed cells. LABOR enables targeted imaging of tumor-associated sialoglycans and brain sialoglycans in living mice. Fourthly, novel unnatural sialic acids have been developed for probing specific sialoglycoforms, identifying sialic acid-binding proteins, remodeling cell-surface sialic acid, and bioorthogonal Raman imaging of sialylated glycans. Finally, we give an outlook on future directions of studying sialobiology using these chemical methods.

sialic acid, metabolic glycan labeling, bioorthogonal reaction, Raman imaging, glycoproteomics, liposome

doi: [10.1360/TB-2020-0207](https://doi.org/10.1360/TB-2020-0207)