

不同性别人群免疫球蛋白G N-糖基化结构谱型比较

孙扬 王友信 张杰 于鑫玮 盖思齐 王皓 董晶 郭秀花 王崑

100069 北京,首都医科大学临床流行病学北京市重点实验室,公共卫生学院(孙扬、王友信、张杰、于鑫玮、盖思齐、王皓、郭秀花); 100050 北京,首都医科大学宣武医院体检中心(董晶); WA6027 澳大利亚珀斯,埃迪斯科文大学医学科学院(王崑)

通信作者:王崑, Email:wei.wang@ecu.edu.au; 郭秀花, Email:guoxiuh@ccmu.edu.cn

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2016.10.018

【摘要】 目的 对不同性别人群的免疫球蛋白G(IgG) N-糖基结构谱型进行分析比较。**方法** 采用整群抽样,以2012年1—6月在北京市宣武医院体检的669名居民为研究对象,留取空腹静脉血5 ml,对IgG N-糖基进行分离、纯化、标记后,采用超高压液相色谱串联质谱法对IgG N-糖基进行检测,最终得到24个色谱峰,每个峰代表不同的糖基结构。不同性别人群的糖基结构比较采用两独立样本 t 检验或非参数检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。**结果** 669名参与者中男性235人(35.13%),女性434人(64.87%),平均年龄为(44.23±9.82)岁。女性核心岩藻糖基化水平 F^n ($Z=-2.192, P=0.028$)高于男性;女性半乳糖基化水平 $G0^n$ ($Z=-7.898, P<0.001$)、 $G1^n$ ($Z=-2.343, P=0.019$)低于男性,而 $G2^n$ ($Z=-8.414, P<0.001$)水平高于男性;女性唾液酸化水平 $F^{total}S1/F^{total}S2$ ($Z=-5.049, P<0.001$)、 $FS1/FS2$ ($Z=-3.336, P=0.001$)高于男性。**结论** IgG N-糖基结构水平可能与性别有关。

【关键词】 IgG N-糖基化; 性别

基金项目:国家自然科学基金(81530087,81373099)

Comparison of gender specific structure profiles of immunoglobulin G N-glycans Sun Yang, Wang Youxin, Zhang Jie, Yu Xinwei, Ge Siqi, Wang Hao, Dong Jing, Guo Xiuhua, Wang Wei
Beijing Key Laboratory of Clinical Epidemiology, School of Public Health, Capital Medical University, Beijing 100069, China (Sun Y, Wang YX, Zhang J, Yu XW, Ge SQ, Wang H, Guo XH); Center for Physical Examination, Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China (Dong J); School of Medical Sciences and Health, Edith Cowan University, Joondalup WA6027, Australia (Wang W)
Corresponding authors: Wang Wei, Email: wei.wang@ecu.edu.au; Guo Xiuhua, Email: guoxiuh@ccmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To analyze and compare the gender specific structure profiles of immunoglobulin G(IgG) N-glycans and provide evidence to understand the distribution of the structure of IgG N-glycans in general population. **Methods** A cluster sampling was conducted to randomly select 669 participants from Beijing Xuanwu Hospital during January–June 2012. Venous blood sample (5 ml) was collected from each participant with vacuum negative pressure tube containing EDTA. Plasma IgG N-glycome was determined using ultra-performance liquid chromatography (UPLC) on Waters BEH Glycan chromatography column and mass spectrometry after the separation, purification and labeling. Finally, we got 24 chromatographic peaks. Each peak represented a different carbohydrate structure. Independent sample t -test or nonparametric test were used to compare the gender specific difference, $P<0.05$ was regarded as significant. **Results** A total of 669 healthy participants were included, including 235 men (35.13%) and 434 women (64.87%). The average age of the participants was (44.23±9.82) years. The core fucosylation level and the galactosylation level of females were higher than those of males [F^n ($Z=-2.192, P=0.028$), $G0^n$ ($Z=-7.898, P<0.001$), $G1^n$ ($Z=-2.343, P=0.019$), $G2^n$ ($Z=-8.414, P<0.001$)], but $F^{total}S1/F^{total}S2$ ($Z=-5.049, P<0.001$) and $FS1/FS2$ ($Z=-3.336, P=0.001$) of females were higher than those of males, indicating a higher saliva acidification level in males than in females. **Conclusion** IgG N-glycosylation levels might be gender dependent.

【Key words】 IgG *N*-glycosylation; Gender

Fund programs: National Natural Science Foundation of China (81530087, 81373099)

糖基化(Glycosylation)是一种普遍的蛋白质翻译后修饰现象,可发生于绝大多数膜蛋白和分泌蛋白上^[1],不仅反映细胞的类型和状态,也参与细胞的生长、分化、凋亡、信号转导和致癌突变等全部生物学行为^[2-5]。免疫球蛋白G(IgG)由于其Fc段297位上高度保守的*N*-糖基化位点和能够参与免疫炎症反应的功能特点,成为研究蛋白质糖基化的完美模型^[6]。全基因组关联研究也显示,单个蛋白质的糖链结构分析更能准确地反映糖基化的功能^[7]。已有研究显示,IgG Fc段糖基化修饰的改变可调节其免疫功能^[8],主要糖基的增加或缺乏可增加IgG的遗传异质性^[9]。如末端半乳糖基化和甘露糖残基可影响补体C1q与IgG的结合,从而加强补体依赖的细胞毒作用;而核心岩藻糖基化的增加能够加强IgG与受体FcγRIIIa的结合,从而降低抗体依赖的细胞毒作用^[10]。本研究检测了北京宣武医院669名体检对象的IgG *N*-糖基结构,并对不同性别人群糖基化水平进行比较,为深入开展疾病与糖基化的关联性研究提供基础资料。

对象与方法

1. 研究对象:选取2012年1—6月在北京宣武医院体检的人群,共913人。按照纳入排除标准:排除有呼吸系统、心血管系统、消化系统、泌尿生殖系统及心理疾病的患者;过去2周内未服用过任何药物。最后纳入669人。

2. 样本采集及处理:使用乙二胺四乙酸二钠(EDTA)真空采血管采集研究对象晨起空腹肘部外周静脉血液样本,按照样本编号顺序、平稳地置于离心机内,4℃ 3 000 r/min离心10 min,迅速吸取上层血浆样本5 ml(根据离心后上层血浆量而定),分装于5个1.5 ml离心管,置于-80℃低温冰箱中保存。

3. 糖基检测:采用Huffman等^[11]于2014年发表的超高压液相色谱法串联质谱法,采用2-AB荧光染料对糖链进行标记,并通过超高压液相色谱进行分离。最终分离出24个色谱峰,每个峰代表1种或多种糖基结构,其结构信息由质谱仪测得。在24个测得的色谱峰基础上,经过计算得到54个糖基衍生结构,每个糖基结构均有一个包含两个*N*-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)和3个甘露糖的中心结构,F代表核心岩藻糖,M代表甘露糖,A表示分支甘露糖,B表示支链乙酰葡萄糖胺,G表示半乳糖,S表示唾液酸分子,

字母后的数字表示糖的数量,total表示24个直接测得的糖基结构中所有包含相应糖基的结构浓度之和。

4. 统计学分析:采用SAS 9.4软件进行统计学分析,因为样本量<2 000,采用Shapiro-Wilk *W*检验对糖基分布进行正态性检验,正态分布资料以 \bar{x} 、*s*描述,不同性别人群IgG糖基化比较采用两独立样本*t*检验;非正态分布资料以*M*(*Q_R*)描述,不同性别IgG糖基化比较采用非参数检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。糖基衍生结构均不服从正态分布,组间比较采用非参数检验。

结 果

1. 人口学指标:669名健康参与者的平均年龄为(44.23±9.82)岁。其中,男性235人(35.13%),平均年龄为(43.99±11.60)岁;女性434人(64.87%),平均年龄为(44.36±8.72)岁。

2. IgG *N*-糖基结构谱型分布:对IgG *N*-糖基结构的分布进行正态性检验,结果显示,只有GP8、GP9、GP14、GP16服从正态分布($P>0.05$),见表1。

3. *N*-糖基结构的性别比较:正态分布的IgG *N*-糖基结构的性别比较见表2,偏态分布的IgG *N*-糖基结构的性别比较见表3。GP1、GP2、GP4、GP5、GP6、GP8、GP10、GP11、GP19、GP24均为男性高于女性;GP12、GP13、GP14、GP15、GP17、GP18为女性高于男性。根据各个色谱峰代表的糖基结构,经过不同公式的计算,得出有生物学意义的糖基衍生结构。女性 F^n 水平高于男性,差异有统计学意义($P=0.028$);女性 $G0^n$ ($P<0.001$), $G1^n$ ($P=0.019$)低于男性,而 $G2^n$ ($P<0.001$)水平高于男性,差异均有统计学意义; $F^{total}S1/F^{total}S2$ ($P<0.001$),女性 $FS1/FS2$ ($P=0.001$)高于男性,且差异均有统计学意义。见表4。

讨 论

本研究显示,在24个液相色谱峰中,只有GP8、GP9、GP14、GP16服从正态分布($P>0.05$)。提示在临床应用中,医学参考值范围的计算方法应考虑具体某种糖基含量在人群中分布的不同而不同。

性别比较分析, F^n 水平在女性中高于男性,且差异有统计学意义($P=0.028$),提示女性核心岩藻糖基化水平高于男性;女性 $G0^n$ ($P<0.001$)、 $G1^n$ ($P=$

表1 IgG N-糖基结构正态性分布检验($n=669$)

糖基结构	结构说明	W值	P值
GP1	FA1	0.771	<0.001
GP2	A2	0.906	<0.001
GP4	FA2	0.962	<0.001
GP5	M5	0.909	<0.001
GP6	FA2B	0.958	<0.001
GP7	A2G1	0.945	<0.001
GP8	FA2[6] G1	0.998	0.620
GP9	FA2[3] G1	0.999	0.944
GP10	FA2[6] BG1	0.976	<0.001
GP11	FA2[3] BG1	0.990	<0.001
GP12	A2G2	0.926	<0.001
GP13	A2BG2	0.925	<0.001
GP14	FA2G2	0.999	0.883
GP15	FA2BG2	0.990	<0.001
GP16	FA2G1S1	0.998	0.562
GP17	A2G2S1	0.926	<0.001
GP18	FA2G2S1	0.988	<0.001
GP19	FA2BG2S1	0.968	<0.001
GP20	未确定结构	0.902	<0.001
GP21	A2G2S2	0.976	<0.001
GP22	A2BG2S2	0.811	<0.001
GP23	FA2G2S2	0.977	<0.001
GP24	FA2BG2S2	0.990	<0.001

注:每个糖基结构均有一个包含两个N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)和3个甘露糖的中心结构,F代表核心岩藻糖,M代表甘露糖,A表示分支甘露糖,B表示支链乙酰葡萄糖胺,G表示半乳糖,S表示唾液酸分子,字母后的数字表示糖的数量,GP后的数值为超高压液相色谱法分离出的色谱峰面积比; $P>0.05$ 为符合正态分布;GP3由于数值不稳未纳入分析

0.019)低于男性,而G2ⁿ($P<0.001$)水平高于男性,差异均有统计学意义,因此,从整体水平上看,女性

表2 不同性别人群正态分布的IgG N-糖基结构比较

糖基结构	男性($n=235$)		女性($n=434$)		t值	P值
	\bar{x}	s	\bar{x}	s		
GP8	18.85	1.69	18.37	1.70	3.512	<0.001
GP9	9.74	1.43	9.57	1.43	1.450	0.147
GP14	16.82	3.17	19.10	3.44	-8.413	<0.001
GP16	3.07	0.53	3.06	0.51	0.273	0.785

的半乳糖基化水平高于男性; $F^{total}S1/F^{total}S2$ ($P<0.001$), $FS1/FS2$ ($P=0.001$)在女性中高于男性,且差异均有统计学意义,提示男性唾液酸化水平高于女性。以上结果表明,IgG N-糖基结构水平可能存在性别决定性,在糖基标志物的发展过程中应加以区别,同时,当研究具体疾病对IgG N-糖基化的发生发展的影响时,性别因素应作为混杂因素进行校正,或进行分层分析。

有研究显示,IgG糖基化可能调节IgG与Fc γ R受体及C1q补体的结合^[12],从而引起机体炎症反应,而大部分疾病都是通过炎症反应的发病机制影响生物体的功能和健康^[13]。因此,研究IgG的糖基化对于揭示疾病发生发展过程具有重要意义。

超高压液相色谱串联质谱的方法实现了对IgG N-糖链的高通量检测,为糖基化对疾病发生发展的影响奠定了基础。这些糖基结构的分析为下一步特异糖链的结构解析奠定了基础,并为糖链结构与生物学功能研究提供了新的思路。而不同性别人群糖基结构差异提示蛋白质的糖基化修饰水平可能有性

表3 不同性别人群偏态分布的IgG N-糖基结构比较

糖基结构	男性($n=235$)				女性($n=434$)				Z值	P值
	最小值	最大值	M值	Q _k 值	最小值	最大值	M值	Q _k 值		
GP1	0.02	0.40	0.08	0.04	0.02	0.47	0.06	0.05	-5.104	<0.001
GP2	0.05	1.27	0.41	0.26	0.08	1.32	0.28	0.20	-6.887	<0.001
GP4	6.90	38.26	16.67	5.26	4.68	37.63	14.17	5.61	-6.930	<0.001
GP5	0.13	0.59	0.24	0.08	0.07	0.71	0.22	0.08	-3.635	<0.001
GP6	1.62	7.96	4.20	1.58	1.30	7.57	3.40	1.18	-8.295	<0.001
GP7	0.15	1.72	0.56	0.35	0.16	1.64	0.54	0.30	-1.818	0.069
GP10	2.68	10.54	4.99	1.45	2.11	8.21	4.79	1.20	-2.397	0.017
GP11	0.36	1.09	0.69	0.22	0.32	1.14	0.65	0.16	-3.841	<0.001
GP12	0.29	2.99	0.88	0.51	0.26	3.58	1.00	0.62	-3.211	0.001
GP13	0.22	0.90	0.45	0.15	0.16	1.31	0.48	0.15	-2.854	0.004
GP15	0.79	3.27	1.86	0.53	0.65	3.33	1.99	0.59	-3.714	<0.001
GP17	0.54	2.06	0.99	0.32	0.48	2.57	1.02	0.34	-2.143	0.032
GP18	5.52	20.86	11.16	3.18	5.75	24.95	13.16	3.75	-8.014	<0.001
GP19	1.24	3.21	1.92	0.49	1.10	3.29	1.86	0.42	-2.853	0.004
GP20	0.12	0.99	0.35	0.18	0.13	1.25	0.35	0.16	-0.816	0.414
GP21	0.34	1.46	0.72	0.26	0.32	1.58	0.70	0.22	-1.214	0.225
GP22	0.02	0.32	0.10	0.05	0.02	0.63	0.10	0.05	-1.048	0.294
GP23	0.50	3.43	1.73	0.95	0.53	4.13	1.80	0.88	-0.898	0.369
GP24	0.53	3.21	1.71	0.64	0.56	3.91	1.59	0.59	-2.597	0.009

表 4 IgG N-糖基衍生结构比较的主要结果

糖基衍生结构	男性				女性				Z 值	P 值
	最小值	最大值	M 值	Q _n 值	最小	最大	M 值	Q _n 值		
唾液酸化										
F ^{total} S1/F ^{total} S2	2.85	12.93	4.78	1.79	2.90	12.48	5.35	1.89	-5.049	<0.001
FS1/FS2	4.19	27.63	8.34	3.68	4.02	23.15	8.98	3.54	-3.336	0.001
半乳糖基化										
G0 ⁿ	13.80	53.52	27.47	6.80	10.08	55.69	23.80	7.68	-7.898	<0.001
G1 ⁿ	35.94	53.98	45.39	2.88	35.85	50.72	45.02	3.03	-2.343	0.019
G2 ⁿ	9.84	44.11	25.92	6.84	8.18	50.23	30.46	8.71	-8.414	<0.001
岩藻糖基化										
F ^{n total}	90.45	98.54	96.67	1.52	91.42	98.41	96.64	1.51	-0.539	0.590
F ⁿ	72.80	89.12	81.40	4.52	71.81	89.93	81.78	3.34	-2.192	0.028

注: total 表示包含所有相应糖的结构浓度之和; n 表示不带电荷的糖基结构

别决定性,这也为大量开展蛋白质糖基化水平检测提供基础信息,从而为疾病的诊断预测提供科学依据。

利益冲突 无

参 考 文 献

[1] Lauc G. Sweet secret of the multicellular life [J]. Biochim Biophys Acta, 2006, 1760 (4) : 525-526. DOI: 10.1016/j.bbagen.2005.12.010.

[2] Hakamata W, Miura K, Hirano T, et al. Identification of a novel glycan processing enzyme with *exo*-acting β -glucosidase activity in the Golgi apparatus using a new platform for the synthesis of fluorescent substrates [J]. Bioorg Med Chem, 2015, 23 (1) : 73-79. DOI:10.1016/j.bmc.2014.11.023.

[3] Ko SY, Lin YP, Lin YS, et al. Advanced glycation end products enhance amyloid precursor protein expression by inducing reactive oxygen species [J]. Free Radic Biol Med, 2010, 49 (3) : 474-480. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.05.005.

[4] Gewinner C, Hart G, Zachara N, et al. The coactivator of transcription CREB-binding protein interacts preferentially with the glycosylated form of Stat5 [J]. J Biol Chem, 2004, 279 (5) : 3563-3572. DOI: 10.1074/jbc.M306449200.

[5] Saroha A, Biswas S, Chatterjee BP, et al. Altered glycosylation and expression of plasma alpha-1-acid glycoprotein and haptoglobin in rheumatoid arthritis [J]. J Chromatogr B, 2011, 879 (20) : 1839-1843. DOI: 10.1016/j.jchromb.2011.04.024.

[6] Gornik O, Pavić T, Lauc G. Alternative glycosylation modulates function of IgG and other proteins-implications on evolution and disease [J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1820 (9) : 1318-1326. DOI: 10.1016/j.bbagen.2011.12.004.

[7] Lauc G, Essafi A, Huffman JE, et al. Genomics meets glycomics-the first GWAS study of human N-Glycome identifies HNF1 α as a master regulator of plasma protein fucosylation [J]. PLoS Genet, 2010, 6 (12) : e1001256. DOI: 10.1371/journal.pgen.1001256.

[8] Zauner G, Selman MHJ, Bondt A, et al. Glycoproteomic analysis of antibodies [J]. Mol Cell Proteomics, 2013, 12 (4) : 856-865. DOI: 10.1074/mcp.R112.026005.

[9] Li X, Wu J, Ptacek T, et al. Allelic-dependent expression of an activating Fc receptor on B cells enhances humoral immune responses [J]. Sci Transl Med, 2013, 5 (216) : 216ra175. DOI: 10.1126/scitranslmed.3007097.

[10] Quast I, Lünemann JD. Fc glycan-modulated immunoglobulin G effector functions [J]. J Clin Immunol, 2014, 34 Suppl 1: S51-55. DOI: 10.1007/s10875-014-0018-3.

[11] Huffman JE, Pučić-Baković M, Klarić L, et al. Comparative performance of four methods for high-throughput glycosylation analysis of immunoglobulin G in genetic and epidemiological research [J]. Mol Cell Proteomics, 2014, 13 (6) : 1598-1610. DOI: 10.1074/mcp.M113.037465.

[12] Zauner G, Selman M, Bondt A, et al. Glycoproteomic analysis of antibodies [J]. Mol Cell Proteomics, 2013, 12 (4) : 856-865. DOI: 10.1074/mcp.R112.026005. Epub 2013 Jan 16.

[13] Novokmet M, Lukic E, Vuckovic F, et al. Changes in IgG and total plasma protein glycomes in acute systemic inflammation [J]. Sci Reports, 2014, 4: 4347. DOI: 10.1038/srep04347.

(收稿日期: 2016-06-12)

(本文编辑: 万玉立)