

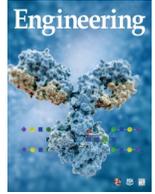


ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Engineering

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



Research
Glycomedicine—Article

系统性红斑狼疮患者的血清IgG糖链特征

潘胡丹^{a,b,#}, 王静蓉^{a,#}, 梁勇^c, 王灿坚^d, 田瑞敏^{a,e}, 叶华^f, 张晓^g, 吴沅峰^h, 邵苗^f, 张瑞军^f, 肖瑶^a, 李智ⁱ,
张光峰^g, 周华^a, 王艺霖^{e,i}, 王晓双^h, 栗占国^{f,*}, 刘维^{h,*}, 刘良^{a,b,e,*}

^a State Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Syndrome, the Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China

^b Guangdong-Hong Kong-Macau Joint Lab on Chinese Medicine and Immune Disease Research, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510000, China

^c Peng Cheng Laboratory, Shenzhen 518055, China

^d National Engineering Research Center of Chinese Medicine Solid Preparation Manufacturing Technology, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

^e State Key Laboratory of Quality Research in Chinese Medicine & Macau Institute for Applied Research in Medicine and Health, Macau University of Science and Technology, Macao 999078, China

^f Department of Rheumatology and Immunology, Peking University People's Hospital, Beijing 100044, China

^g Guangdong General Hospital, Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China

^h The First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

ⁱ Zhuhai Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Zhuhai 519020, China

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 September 2022

Revised 2 January 2023

Accepted 11 January 2023

Available online 8 March 2023

关键词

系统性红斑狼疮

N-糖链

诊断指标

摘要

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是一种发病机制不明、临床表型异质性大的自身免疫性疾病。目前已有的SLE血清生物标志物灵敏度或特异性有限,使得SLE的早期精准诊断存在困难。在本研究中,通过对389例SLE患者及304例健康对照者进行深入的糖组学分析,鉴定出血清免疫球蛋白G(IgG)上的两种N-糖链能够作为SLE的诊断生物标志物。在容易与SLE混淆的其他系统性自身免疫性疾病(如类风湿性关节炎、原发性干燥综合征或系统性硬化症)中,这两种生物标志物没有出现显著变化,提示这两种N-糖链生物标志物对诊断SLE具有特异性。值得注意的是,这两种N-糖链生物标志物被证明是自身抗体非依赖性的,并且适用于所有阶段的SLE患者。基于片段特异性糖链分析和糖肽分析,发现这两种N-糖链生物标志物位于IgG上的Fc区域,并与疾病活动性密切相关。而酶学分析结果则提示,SLE患者体内一系列糖转移酶的失调可能是观察到的糖链产生变化的原因。研究结果为基于血清IgG糖基化和SLE潜在的新致病因素的高效人群筛查提供了新的思路。

© 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

自身免疫性疾病影响着全球5%~10%的人口[1–2],有大量证据表明,近几十年来,这类疾病的发病率呈持续上升态势。尽管在管理这些患者方面取得了许多进展,但

仍仅有不到50%的患者达到了临床缓解,且缺乏个性化的有效治疗方法[3]。对自身免疫性疾病在早期及轻症阶段就进行治疗常可取得更好的疗效。因此,早筛早诊、精确治疗往往能使患者有更高的缓解率。然而,目前尚缺乏高灵敏度和高特异性的生物标志物。

* Corresponding authors.

E-mail addresses: li99@bjmu.edu.cn (Z. Li), fengshiliuwei@163.com (W. Liu), lliu@gzucm.edu.cn (L. Liu).

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): 89–98

引用本文: Hudan Pan, Jingrong Wang, Yong Liang, Canjian Wang, Ruimin Tian, Hua Ye, Xiao Zhang, Yuanhao Wu, Miao Shao, Ruijun Zhang, Yao Xiao, Zhi Li, Guang-feng Zhang, Hua Zhou, Yilin Wang, Xiaoshuang Wang, Zhanguo Li, Wei Liu, Liang Liu. Serum IgG Glycan Hallmarks of Systemic Lupus Erythematosus. *Engineering*, <https://doi.org/10.1016/j.eng.2023.01.006>

系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE) 是一种常见的自身免疫性疾病, 其临床表现具有异质性[4–6]。SLE与其他系统性自身免疫性疾病, 如类风湿性关节炎 (RA)、原发性干燥综合征 (pSS)、系统性硬化症 (SSc) 等具有相似的症状[7–8], 因此很难将SLE患者与其他自身免疫性疾病患者区分开来。此外, 目前用于分类SLE的自身抗体[如抗核抗体 (ANA)、抗双链DNA (dsDNA) 抗体、抗Sm抗体等]也与其他自身免疫性疾病和炎症有关 (例如, 在20世纪30年代末, 抗dsDNA抗体首次在细菌感染患者中被检测到[9])。由此可见, 这些自身抗体生物标志物对SLE的特异性较低 (<60%) [10]。寻找鉴别SLE与其他易混淆疾病的理想指标, 对于SLE的早期诊断和避免不可逆的靶器官损害具有重要意义。

抗体亲和力的差异受免疫球蛋白G (IgG) 可结晶片段 (Fc) 结构域与相应的Fc受体 (FcR) 相互作用的影响, 进而导致不同的免疫应答[11]。IgG的Fc结构域存在一个保守的N-糖基化位点[11]。连接到该位点的N-糖链是高度多样化的[12], 其结构会随着生物和环境因素以及疾病状况的变化而变化, 尤其是SLE等自身免疫性疾病[13]。糖链维持着Fc的四级结构和稳定性[14–15]。IgG上的低糖链也存在与凝集素结合的糖链表位[16]。更重要的是, Fc糖链是抗体与白细胞 (包括巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、自然杀伤细胞和淋巴细胞) 上表达的各类受体最佳结合所必需的[17]。IgG糖基化对多种效应功能有很大影响, 包括抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)、补体 (C3a或C5a) 依赖性细胞毒性 (CDC)、抗体依赖性细胞吞噬 (ADCP) 以及由受体介导的其他形式的免疫调节[18]。Fc糖链的修饰通过调整I型和II型Fc γ 受体 (Fc γ R) 的平衡来影响抗体功能, 并随后调节免疫激活过程中可招募的效应细胞及其功能[19]。因此, Fc糖链在免疫稳态中起着核心作用。Fc糖链修饰的失调可导致免疫耐受丧失、自身免疫性疾病的产生以及对感染性疾病的易感性增加[20]。

由于N-糖链在自身免疫性疾病中的核心作用, SLE患者血清的IgG糖基化改变有望作为SLE诊断的潜在生物标志物。然而, 由于糖链检测技术上的限制, 在以往的研究中没有发现高度特异性的诊断性N-糖链生物标志物[21]。而在本实验室中, 开发了一种基于二氧化钛-多孔石墨化碳 (TiO₂-PGC) 微流控芯片的深度糖组学研究方法[22]。这种方法能实现对通常具有重要生物学意义的低丰度及微量酸性糖链的定量分析[22]。在本研究中, 采用这种深度糖组学研究方法对389例SLE患者和304例健康对照者 (healthy controls, HC) 的血清IgG进行分析, 以鉴

定出高性能的SLE血清N-糖链诊断指标。

2. 方法

2.1. 研究对象

2.1.1. 样本来源

SLE患者分别来自北京大学人民医院 ($n = 226$)、天津中医药大学第一附属医院 ($n = 82$)、广东省人民医院 ($n = 81$)。pSS患者分别来自北京大学人民医院 ($n = 30$)、天津中医药大学第一附属医院 ($n = 15$)、广东省人民医院 ($n = 4$)。SSc患者分别来自北京大学人民医院 ($n = 23$) 和广东省人民医院 ($n = 3$)。RA患者均来自天津中医药大学第一附属医院 ($n = 33$)。HC受试者分别来自珠海市中西医结合医院 ($n = 270$)、北京大学人民医院 ($n = 50$)、广东省人民医院 ($n = 42$) 和天津中医药大学第一附属医院 ($n = 48$)。所有受试者均签署知情同意书, 并获得当地相关医院伦理委员会批准 (2015PHB219-01)。

2.1.2. 系统性红斑狼疮患者基本情况

本研究共分析了来自6个独立队列 (包括一个训练数据集和5个验证数据集) 的389例SLE患者和304例HC受试者。SLE患者的平均病程为5年。训练数据集包括133例SLE患者和89例HC受试者。SLE患者的平均年龄为(37.3 ± 13.0)岁, 与HC受试者的平均年龄[(37.9 ± 13.4)岁]相当。该数据集分别包含91.7%的女性SLE患者和92.1%的女性HC受试者。第一个验证数据集包括58例SLE患者和39例与SLE患者年龄、性别相匹配的HC受试者; 第二个验证数据集包括36例SLE患者和36例与SLE患者年龄、性别相匹配的HC受试者; 第三个验证数据集包括53例SLE患者和50例与SLE患者年龄、性别相匹配的HC受试者; 第四个验证数据集包括59例SLE患者和42例与SLE患者年龄、性别相匹配的HC受试者; 第五个验证数据集包括50例SLE患者和48例与SLE患者年龄、性别相匹配的HC受试者。所有SLE患者均符合1997年修订的美国风湿病学会 (American College of Rheumatology, ACR) 分类标准[23]。附录A中的数据集S1提供了SLE患者和HC受试者的详细信息。

2.1.3. 类风湿关节炎患者基本情况

纳入符合2010年ACR/欧洲抗风湿病联盟 (EULAR) RA分类标准的RA患者样本 ($n = 33$) 和与其年龄、性别相匹配的HC受试者样本 ($n = 32$) [24]。详细信息见附录A中的数据集S2。

2.1.4. 原发性干燥综合征患者基本情况

本研究共纳入 49 例 pSS 患者和 49 例与其年龄、性别相匹配的 HC 受试者，如附录 A 中的数据集 S2 所示。pSS 患者诊断根据 2016 年 ACR/EULAR 关于 pSS 的分类标准[25]。

2.1.5. 系统性硬化症患者

本研究共纳入 26 例 SSc 患者和 25 例与其年龄、性别相匹配的 HC 受试者，如附录 A 中的数据集 S2 所示。根据 ACR/EULAR 关于 SSc 的诊断分类标准纳入 SSc 患者[26]。

按照同样的程序从医院获得了人血清样本，所有样品在使用前均被保存在 -80°C 环境中。

2.2. IgG N-糖链的分析

在 96 孔过滤板中加入 $50\ \mu\text{L}$ 预洗的 Protein A Sepharose 4 Fast Flow beads (GE Healthcare, Sweden)、 $250\ \mu\text{L}$ 结合缓冲液和 $10\ \mu\text{L}$ 血清以分离 IgG。样品在摇床上室温孵育 15 min 后，以 $1000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min。然后用 $250\ \mu\text{L}$ 结合缓冲液洗涤两次。随后用 $200\ \mu\text{L}$ 洗脱缓冲液将 IgG 洗脱两次，放入新的 V 型底收集板中，再加入 $30\ \mu\text{L}$ 中和缓冲液进行中和。缓冲液交换后，用截留分子量为 30 K 的离心过滤装置浓缩得到的 IgG 样品。每个患者样本采集 IgG $50\ \mu\text{g}$ ，用 $100\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 碳酸氢铵缓冲液稀释至终浓度为 $1\ \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ，然后加入 $0.5\ \mu\text{L}$ PNGase F (New England Biolabs, USA)。经 37°C 孵育 16 h 后，将酶促反应样品装载到预处理好的 C18 滤芯上，用 $1.0\ \text{mL}$ 蒸馏水洗脱释放 N-糖链。将流通液与水洗脱液混合，快速真空干燥，在 $100\ \mu\text{L}$ 蒸馏水中重构后进行分析。随后，使用本研究建立的 TiO_2 -PGC 芯片三重四极杆质谱 (QQQ-MS; Agilent, USA) 方法对 N-糖链进行定量分析。在 Agilent 1260 Infinity HPLC Chip LC 系统上完成 N-糖链的色谱分离，该系统配备了定制的 TiO_2 -PGC 芯片。在 Agilent 6490 iFunnel QQQ-MS 上采用多反应监测 (MRM) 以正离子模式对 N-糖链进行定量分析。

2.3. 糖基转移酶的测定

对于与鉴定的生物标志物相关的糖基转移酶，即 N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 I (GnTI)、GnTII、GnTIII、GnTIV、GnTV、唾液酸转移酶 (ST)、 α -甘露糖链酶 (αM)、岩藻糖基转移酶 8 (FUT8) 和半乳糖基转移酶 (GalT)，根据制造商的说明使用市售的酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒 (Meimian Biotech, China) 进行测定。

2.4. 统计学分析

在糖组学分析中，使用 MRM 技术检测每种 N-糖链的水平，该技术因在复杂混合物中具有可靠的定量分析能力而受到重视。在 MRM 方法中，目标化合物通过两个选择步骤 (选择前体离子和产物离子) 来检测目标化合物，这两个选择步骤滤除了外渗背景离子，从而具有较高的检测灵敏度。在这种情况下，多次进样的主要误差来自于不同采集时间获得的信号响应 (反映为峰面积) 的变化。这种变化通常通过使用归一化或标准化方法加以纠正。在本文的分析中，计算了每个 N-糖链的相对丰度，以便进行进一步的统计分析，计算公式如下：

$$\text{单个糖链的相对丰度} = (\text{单个糖链的峰面积} / \text{所有糖链的峰面积之和}) \times 100\%$$

相对丰度本身是一种归一化值，可以通过多次测试消除变异，这种归一化丰度在糖组学研究中被广泛使用。

在 Wilcoxon 秩和检验中，双侧 p 值低于 0.05 为差异有统计学意义。连续变量以均数 \pm 标准差 (SD) 表示。样本量未事先用统计学方法确定。所有数据点均纳入分析。在方法上，在使用 WEKA 软件时采用了不同的特征评估方法以防止偶然性结论，包括特征选择方法中的相关性评估器、增益比评估器、信息增益评估器和 relief-F 评估器，以及不同的分类方法，如逻辑回归 (LR) 和支持向量机。LR 模型表现出最好的性能，因此是本研究选择的主要模型。ComBat 方法[27] (在 R 软件包 “SVA” [28] 中实现) 使用经验贝叶斯框架来调整批次处理效果。对于已鉴定的 N-糖链生物标志物，使用单个标志物和组合预测因子的受试者工作特征 (receiver operating characteristic, ROC) 曲线分析 (在 R 软件包 “pROC” [29] 中实现) 评估 N-糖链生物标志物的诊断价值。截止值根据分析中使用公式 (敏感性+特异性-1) 生成的最大值进行设置。采用 DeLong 等[30]提出的方法获得 AUC 的 95% 置信区间 (95% CI) 以及基于 ROC 曲线的敏感性和特异性。此外，通过将误诊率设置为 0.05，对多重检验的 p 值进行校正。所有统计分析均采用 RStudio 1.0.153 版本 (RStudio incorporated corporation, USA) 进行。

3. 结果

3.1. SLE 患者 IgG 糖链的特征

采用基于 TiO_2 -PGC 芯片、飞行时间质谱 (TOF-MS) 和 QQQ-MS 联用的一种成熟的深度糖组学研究方法，对 389 例 SLE 患者和 304 例与其年龄、性别相匹配的健康对照者的血清 IgG 进行了糖谱分析 (见附录 A 中的表 S1)

[22]。招募了符合 ACR 1997 年修订的 SLE 诊断标准的患者[23]。初始队列包括 133 例 SLE 患者和 89 例通过多中心合作招募的匹配对照，而随后的验证队列包括 4 个验证集的 256 例 SLE 患者（见附录 A 中的表 S1）。

在 SLE 患者中，共鉴定出 114 种不同的 IgG 糖链组成，即 53 种中性 N-糖链和 61 种酸性 N-糖链。在一个训练集和 5 个验证集中检测了无半乳糖基化糖链（G0）、单半乳糖基化糖链（G1）和双半乳糖基化糖链（G2）的丰度。结果显示，这些糖链在 SLE 患者中发生了改变，这与先前的文献报道（见表 1 和附录 A 中的图 S1~S3）基本一致[21]。在 SLE 患者中也观察到内层 β -N-乙酰葡萄糖胺（GlcNAc）上岩藻糖基化的减少和平分型 N-乙酰葡萄糖胺的增加（见表 1 和图 1 以及附录 A 中的图 S4 和 S5），这两种糖型都有助于免疫反应的激活[19,31]。在本研究中，与 HC 受试者相比，SLE 患者的 IgG 唾液酸化水平呈下降趋势（见附录 A 中的表 S1 和图 S6）。

3.2. SLE 患者的 N-糖链生物标志物

有研究报道， α M-II 缺陷会诱导小鼠产生一种类似人类 SLE 的自身免疫性疾病[32]，这表明 SLE 患者体内可能存在特异性的 N-糖链生物标志物。为了识别 SLE 的单个 N-糖链生物标志物，在 WEKA 软件中使用基于相关性的特征子集选择方法（CfsSubsetEval）来选择信息丰富的 N-糖链。在训练集（SLE 患者， $n = 133$ ；HC 受试者， $n = 89$ ）中，4 种中性 N-糖链和 8 种酸性 N-糖链被初步表征为 SLE 分类的潜在生物标志物。然后，分别使用这 12 种生物标志物生成诊断模型，使用 LR 评估其灵敏度和特异性。根据 ROC 曲线分析，12 种 N-糖链的灵敏度值为 46.6%~83.5%，特异性值为 67.4%~100.0%，AUC 值为 0.702~0.895（见附录 A 中的表 S2），差异极显著（ $P < 0.0001$ ，Wilcoxon 秩和检验）（见附录 A 中的图 S7）。进一步在 5 个验证集（验证集一：SLE 患者， $n = 58$ ；HC 受试者， $n = 39$ 。验证集二：SLE 患者， $n = 36$ ；HC 受试者， $n = 36$ 。验证集三：SLE 患者， $n = 53$ ；HC 受试者， $n = 50$ 。验证集四：SLE 患者， $n = 59$ ；HC 受试者， $n = 42$ 。验证集五：SLE 患者， $n = 50$ ；HC 受试者， $n = 48$ ）（见附录 A 中的表 S2）中检测了这 12 种 N-糖链生物标志物，结果与来自训练集的结果一致。12 种生物标志物中的两种，即 4_4_1_0-a 和 4_3_1_1-b [图 1 (a) 和 (b)] 被证明对 SLE 具有相对较高的预测能力。两种糖链均具有较高的 AUC (0.765~0.902)、灵敏度 (72.9%~87.9%) 和特异性 (75.0%~88.1%) [图 1 (c) 和 (d)]。与 HC 受试者相比，SLE 患者的生物标志物 4_4_1_0-a 水平显著降低，而生物标志物 4_3_1_1-b 水平则显著升高 ($p < 0.0001$) [图 1 (e) 和 (f)]。在训练集和验证集中，这两种 N-糖链生物标志物的组合显示出更高的 AUC、灵敏度和特异性（见附录 A 中的表 S2）。

者， $n = 36$ 。验证集三：SLE 患者， $n = 53$ ；HC 受试者， $n = 50$ 。验证集四：SLE 患者， $n = 59$ ；HC 受试者， $n = 42$ 。验证集五：SLE 患者， $n = 50$ ；HC 受试者， $n = 48$ ）（见附录 A 中的表 S2）中检测了这 12 种 N-糖链生物标志物，结果与来自训练集的结果一致。12 种生物标志物中的两种，即 4_4_1_0-a 和 4_3_1_1-b [图 1 (a) 和 (b)] 被证明对 SLE 具有相对较高的预测能力。两种糖链均具有较高的 AUC (0.765~0.902)、灵敏度 (72.9%~87.9%) 和特异性 (75.0%~88.1%) [图 1 (c) 和 (d)]。与 HC 受试者相比，SLE 患者的生物标志物 4_4_1_0-a 水平显著降低，而生物标志物 4_3_1_1-b 水平则显著升高 ($p < 0.0001$) [图 1 (e) 和 (f)]。在训练集和验证集中，这两种 N-糖链生物标志物的组合显示出更高的 AUC、灵敏度和特异性（见附录 A 中的表 S2）。

3.3. N-糖链在疾病鉴别诊断中的作用

为了进一步确定这两种 N-糖链生物标志物的特异性，检测了在对 ANA 同样有较高敏感性的其他常见系统性自身免疫性疾病（如 RA、pSS 和 SSc）患者体内这两种 N-糖链生物标志物的水平变化[33]。使用 TiO₂-PGC 芯片及 QQQ-MS 方法检测了 RA、pSS、SSc 患者以及与其年龄、性别相匹配的 HC 受试者的血清样本（见附录 A 中的表 S3、S4、S5）。尽管 IgG 糖基化的改变被认为与 RA、pSS 和 SSc 的发展有关[34-35]，但这些疾病中单个 N-糖链的改变与 SLE 中的不同。首先，在 RA [图 2 (a)、(b)]、pSS [图 2 (c)、(d)] 和 SSc [图 2 (e)、(f)] 患者中，两种 SLE 生物标志物 4_4_1_0-a 和 4_3_1_1-b 的丰度与各自相应的 HC 受试者相比没有显著变化，因此对 RA、pSS 和 SSc 的分类能力较低（见附录 A 中的表 S6）。在之前的研究中发现 RA 特异性 N-糖链生物标志物[22]与 SLE 生物标志物不同。还鉴定了 pSS 和 SSc 的高性能 N-糖链生物标志物，这些生物标志物在结构上与 SLE 和 RA 的生物标志物均不同（见附录 A 中的表 S8 和 S9）。这些发现表明，IgG 的糖基化

表 1 SLE 患者 IgG 糖基化的分级能力

Glycosylation types	Training set			Validation set 1			Validation set 2			Validation set 3			Validation set 4			Validation set 5		
	AUC	Sensitivity	Specificity	AUC	Sensitivity	Specificity	AUC	Sensitivity	Specificity	AUC	Sensitivity	Specificity	AUC	Sensitivity	Specificity	AUC	Sensitivity	Specificity
G0	0.621	37.6%	85.4%	0.606	74.1%	51.3%	0.689	52.8%	80.6%	0.486	15.1%	94.0%	0.759	50.8%	92.9%	0.545	58.0%	58.3%
G1	0.744	68.4%	69.7%	0.685	41.4%	89.7%	0.608	33.3%	91.7%	0.655	64.2%	66.0%	0.756	57.6%	85.7%	0.493	48.0%	60.4%
G2	0.560	31.6%	83.2%	0.559	65.5%	59.0%	0.662	44.4%	91.7%	0.527	22.6%	90.0%	0.730	50.8%	88.1%	0.572	44.0%	79.2%
Fucosylation	0.718	54.9%	87.6%	0.828	79.3%	69.2%	0.643	36.1%	97.2%	0.578	45.3%	72.0%	0.449	8.5%	100.0%	0.720	76.0%	64.6%
Bisecting	0.727	62.4%	73.0%	0.780	74.1%	79.5%	0.676	66.7%	66.7%	0.589	81.1%	44.0%	0.754	72.9%	71.4%	0.500	14.0%	97.9%
GlcNAc																		
Sialylation	0.570	22.6%	93.3%	0.463	51.7%	56.4%	0.566	25.0%	88.9%	0.524	24.5%	90.0%	0.653	49.2%	83.3%	0.530	40.0%	72.9%

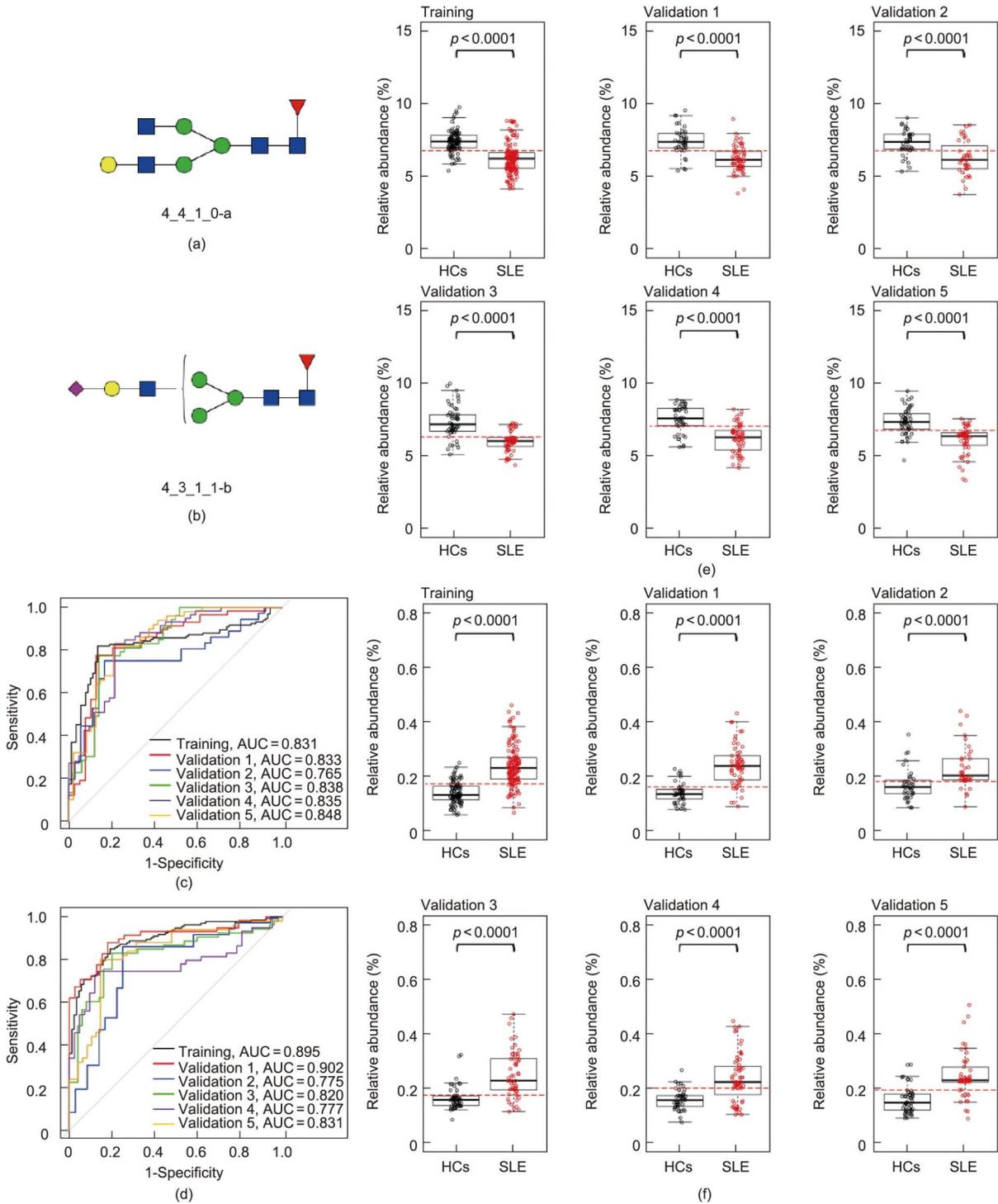


图1. 两种潜在的SLE N-糖链生物标志物的分类性能和相对丰度。(a)、(b) 本研究中鉴定的用于SLE分类的N-糖链生物标志物的结构：(a) 4_4_1_0-a结构；(b) 4_3_1_1-b结构。(c)、(d) SLE和HC分类的ROC曲线，其中(c)代表4_4_1_0-a，(d)代表4_3_1_1-b。(e)、(f) SLE患者和HC受试者中两种N-糖链生物标志物的相对丰度箱线图，其中(e)代表4_4_1_0-a，(f)代表4_3_1_1-b。

特征在不同的风湿病条件下有不同的改变。

3.4. 鉴定的IgG N-糖链生物标志物与SLE临床表型的相关性分析

补体系统在SLE中起着双重作用：既与发病机制，又

与疾病进展相关[36–37]。据报道，N-糖基化改变可促进促炎性甘露糖依赖的糖链配体的产生，从而激活和裂解补体3 (C3) 和C4 [38]。因此，本研究分析了这两种N-糖链与多种SLE表型的相关性。与之前的报道一致，4_3_1_1-b在C3和C4水平较低的患者中显著上调，而4_4_1_0-a

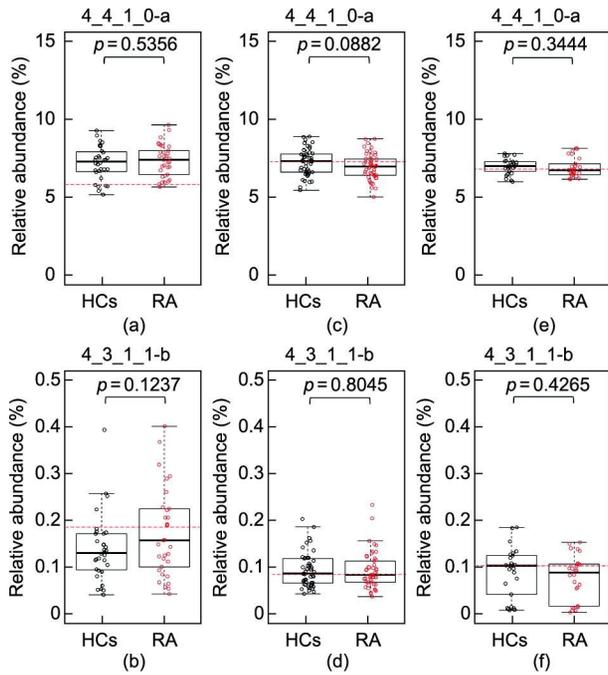


图2. 两种潜在的SLE N-糖链生物标志物在RA、pSS和SSc中的相对丰度。(a)、(b) RA患者及相应HC受试者中糖链4_4_1_0-a和4_3_1_1-b的相对丰度；(c)、(d) pSS患者及相应HC受试者中两种潜在N-糖链生物标志物的相对丰度；(e)、(f) SSc患者及相应HC受试者中两种潜在N-糖链生物标志物的相对丰度。

则没有上调[图3 (a) 和 (b)]。值得注意的是，4_3_1_1-b (一种唾液酸化的IgG糖链) 也随着红细胞沉降率(ESR)的增加而上调[图3 (c)]，提示该指标可预测疾病活动情况。这一发现与增加唾液酸化的IgG糖链可减轻自身抗体引发的炎症的报道不一致[39]。因此，本研究发现表明唾液酸化的拓扑结构信息可能会影响IgG的功能。一些唾液酸化的糖链，包括糖链峰17 (glycan peak 17, GP17)、GP19和GP21也被报道在SLE患者中升高[21]。

鉴定的N-糖链生物标志物(4_4_1_0-a和4_3_1_1-b)与血清自身抗体滴度之间没有相关性，包括ANA [图3 (d)]、抗双链DNA (抗dsDNA) [图3 (e)]、抗核糖核蛋白(抗RNP) (见附录A中的图S10)和抗Smith (抗Sm) (见附录A中的图S10)。这表明这些糖链是独立于自身抗体的诊断生物标志物，可能在SLE的发病机制中充当“开关”或“调节因子类似物”的角色。此外，本研究中未观察到器官特异性 (见附录A中的图S11)。因此，这两种N-糖链生物标志物可能与触发SLE的常见系统机制有关。

还根据病程将患者分为4个亚组，即新诊断的 (小于1个月； $n = 41$)、1个月至5年的 ($n = 73$)、5年至10年的 ($n = 33$) 和10年以上的 ($n = 42$)，并比较不同病程患者

中两种已鉴定N-糖链的相对丰度。与HC相比，无论病程长短，N-糖链4_4_1_0-a和4_3_1_1-b均有显著差异[图3 (f)]。在新诊断的SLE患者的样本中，糖链4_4_1_0-a的相对丰度与病程较长的患者相似[图3 (f)]。在新诊断的SLE患者和病程较长的患者的样本中未检测到糖链4_3_1_1-b的显著差异[图3 (f)]，表明这两种糖链可以作为不同病程的SLE患者的诊断生物标志物。

3.5. 确定鉴定的N-糖链生物标志物在IgG上的位点

为了进一步确认两个N-糖链生物标志物的位点，使用FabRICATOR (IdeS; Genovis, USA) 酶切IgG以生成F(ab')₂和Fc/2片段，然后使用IgG-Fc亲和介质 (ThermoFisher, USA) 和IgG重链恒定区1 (CH1) 亲和介质 (ThermoFisher) 分离IgG-F(ab')₂和IgG-Fc。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 显示F(ab')₂和Fc/2完全分离。对分离得到的Fc和F(ab')₂释放的N-糖链进行分析。在Fc片段上检测到中性N-糖链(4_4_1_0-a)，而在Fc片段上主要检测到酸性N-糖链(4_3_1_1-b)。在IgG-F(ab')₂片段上发现了少量4_3_1_1-b (约占Fc片段上相应糖链的14%) (见附录A中的图S12)。

为了确定N-糖链与SLE之间的功能相关性，开发了一种高灵敏度检测亚类和位点特异性糖肽的MRM方法，并从人血清中共鉴定出83种IgG-Fc衍生糖肽[40]。在12种潜在的SLE相关N-糖链中，共有6种在Fc区域被鉴定出来。值得注意的是，通过使用超高效液相色谱四极杆TOF-MS (UHPLC-Q-TOF-MS) 进行糖肽分析，证实了两个高性能N-糖链生物标志物(4_4_1_0-a和4_3_1_1-b)附着在IgG-Fc区域 (图4)。

采用UHPLC-QQQ-MS对IgG-Fc糖肽G1F (4_4_1_0) 和1111 (4_3_1_1) 进行定量分析，检测到来自不同IgG亚类的G1F (4_4_1_0) 糖型的糖肽，而1111 (4_3_1_1) 糖型的糖肽仅在IgG2和IgG3亚类中被检测到 (图4)。

3.6. N-糖链在SLE中的功能分析

尽管对糖链改变与疾病发病之间的因果关系尚不清楚，但在SLE的全基因组关联研究中已经发现了几个与IgG糖链组成相关的基因，包括IKZF1、BACH2和HLA-DQA2 [41]。编码 α M-II的单个基因突变会导致类似人类SLE的系统性自身免疫性疾病，并导致促炎甘露糖依赖性糖配体的产生[32]。此外， α M-II缺陷小鼠的N-糖链水平也发生了改变，表现为复合型N-糖链的减少和诱导产生特异性杂合型N-糖链[32,42]。因此，检测了复合型 and 杂合型糖链的变化，观察到杂合型N-糖链的积累和复合型

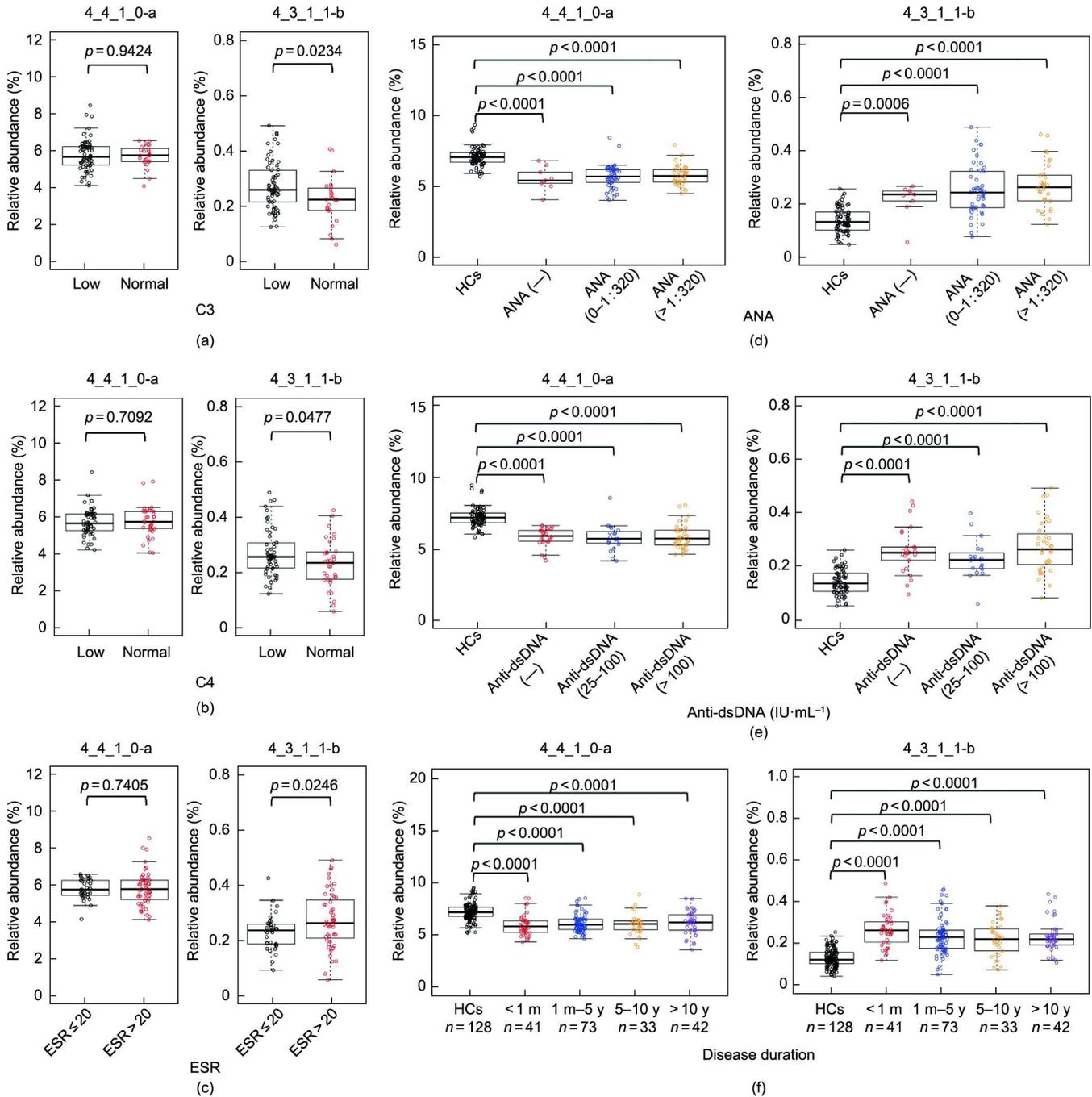


图 3. 鉴定的N-糖链生物标志物与疾病表型的相关性分析。(a) 两种糖链在C3水平较低 ($<0.79 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) 或正常的SLE患者中的表现和相对丰度；(b) 两种糖链在C4水平低 ($<0.16 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) 或正常的SLE患者中的表现和相对丰度；(c) 两种糖链在血沉正常 ($\leq 20 \text{ mm}\cdot\text{h}^{-1}$) 或偏高 ($>20 \text{ mm}\cdot\text{h}^{-1}$) 的SLE患者中的表现和相对丰度；(d) 两种糖链在ANA阴性、低浓度 ($\leq 1:320$) 或高浓度 ($>1:320$) 的SLE患者中的表现和相对丰度；(e) 两种糖链在抗dsDNA抗体阴性、低浓度 ($25\sim 100 \text{ IU}\cdot\text{mL}^{-1}$) 或高浓度 ($>100 \text{ IU}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的SLE患者中的表现及相对丰度；(f) 两种糖链在不同病程 [<1 个月 (m)、 $1 \text{ m}\sim 5$ 年 (y)、 $5\sim 10$ 年、 >10 年] SLE患者中的相对丰度。

N-糖链的减少[图5 (a)], 这表明在SLE患者中, 杂合型N-糖链向复合型N-糖链的转化受到了抑制。此外, 检测了SLE患者体内糖基转移酶的变化, 结果显示SLE患者血清GnTIII水平显著降低, 而GnTI、GnTV、FUT8和GalT的水平则显著升高。GnTIII、GnTIV、ST、 αM 水平没有明显变化[图5 (b)]。

4. 讨论

SLE的临床表型多种多样。尽管对SLE的认识取得了一些进展, 但仍无法将单一的临床、实验室或病理特征作为疾病分类或诊断的金标准[43]。越来越多的证据表明, 蛋白质糖基化与SLE的发病密切相关。活动性SLE患者

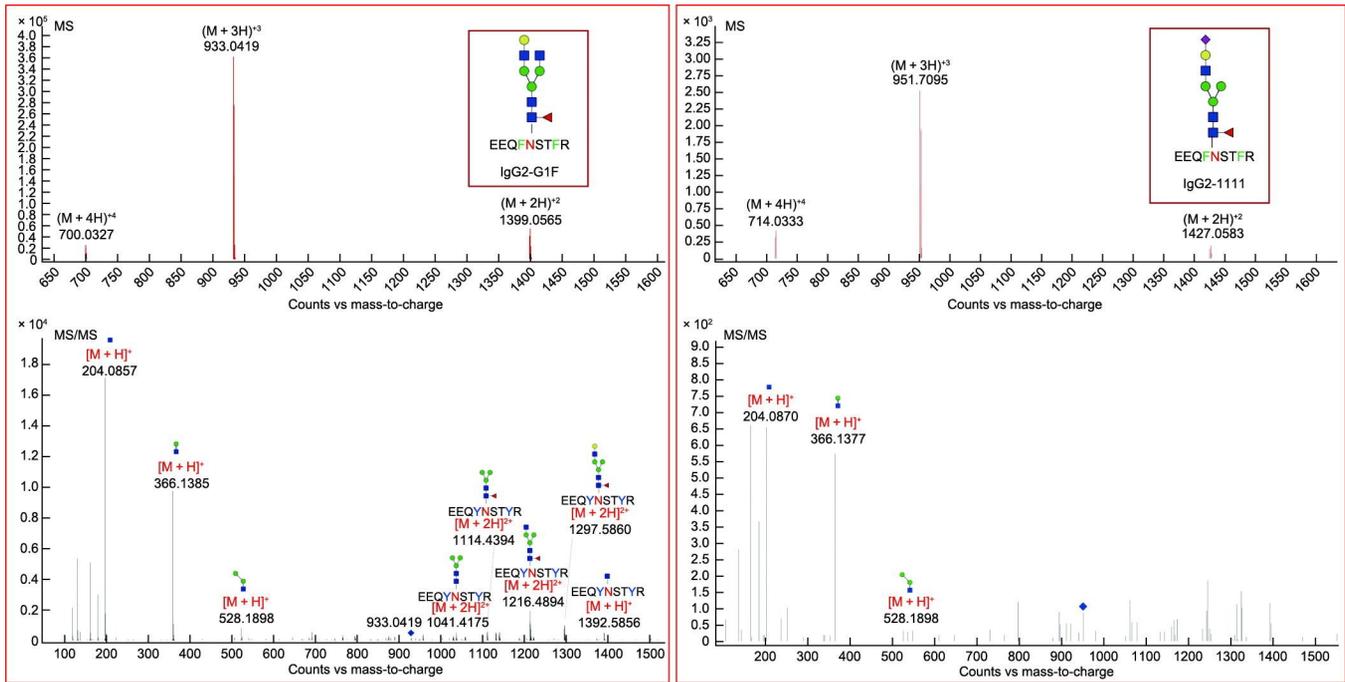


图4. 两种高潜力的N-糖链生物标志物(4_4_1_0-a和4_3_1_1-b)在IgG2上的糖肽质谱(MS)和串联质谱(MS/MS)图谱。单糖符号以功能糖组学联合会为准。蓝色方块: N-乙酰氨基葡萄糖; 黄色圆圈: 半乳糖; 绿色圆圈: 甘露糖; 红色三角形: 岩藻糖; 紫色菱形: N-乙酰神经氨酸。

的天然循环总IgG复合物通常具有暴露的岩藻糖基残基, 这些岩藻糖基残基可与可溶性凝集素结合[44]。抗dsDNA IgG1的岩藻糖基化程度与SLE疾病活动密切相关[45]。 α M-II的缺乏会减少复合型N-糖链分支, 增加杂合型N-糖链, 并在小鼠中诱导类似于人类SLE的自身免疫性疾病[42]。总IgG N-糖链中的平型N-乙酰葡萄糖胺也与SLE的疾病活动度呈正相关[46]。这些结果表明, IgG的糖基化具有作为疾病诊断生物标志物的潜力, 并影响SLE的发病机制。

本文研究结果证明了N-糖链在SLE中的诊断能力。受益于新发现的N-糖链生物标志物(4_4_1_0-a和4_3_1_1-b), 对于症状不典型的SLE患者可能获得精准诊断, 最终可能有助于控制疾病的发展和降低死亡率。研究发现, 糖链4_3_1_1-b在补体水平低的患者中显著上调, 提示其作为炎症指标的潜在作用。所选择的糖链与器官特异性和血清自身抗体滴度(包括ANA、抗dsDNA、抗RNP和抗Sm)之间没有相关性, 表明这些糖链是独立于自身抗体的SLE诊断标志物。本文研究结果也支持了一种假设, 即每种风湿性疾病很可能与特定的N-糖链变化有关, 正如之前在类风湿关节炎、强直性脊柱炎和银屑病关节炎的研究中所观察到的那样[22,47]。

IgG Fc结构域上的N-糖链组成可通过影响Fc与各种Fc受体(如Fc γ R)的结合能力来调节抗体的效应功能[48]。Fc糖基化失调可导致免疫耐受丧失和症状性自身免

疫[49]。因此, 在SLE中, 位于Fc区N-糖链的改变可能导致IgG与Fc γ R结合发生改变, 从而影响疾病的发展。在本研究中, 确定了两种特异性SLE N-糖链生物标志物主要附着在IgG-Fc区域。此外, 首次证明GnTII在SLE患者体内的抑制作用, 并展示了由此导致的N-糖链谱的改变, 从而为疾病的发病机制提供了新的见解。然而, 由于IgG的糖型极其多样, 特异性N-糖链在SLE中的确切功能仍有待阐明。糖工程学的进展可能为进一步的功能研究提供一种有用的策略, 用于生产聚糖定义和位点选择性修饰的抗体[50], 还需要更多的功能实验(如完整抗体的酶促糖链重塑)来阐明N-糖链生物标志物与SLE发病机制之间的联系。

尽管在自身免疫性疾病中IgG糖基化的改变已被证实了近40年, 但目前关于如何将现有的IgG糖基化的知识转化为临床应用仍是一个重大挑战。造成这一困难的主要原因之一是, 单个蛋白质的糖组学也是非常复杂的, 尤其是存在大量低丰度但具有高度生物活性的糖链。本课题组开发了一种基于微流控TiO₂-PGC芯片的深度糖组学研究方法, 实现了对低丰度、痕量甚至超痕量糖链进行灵敏检测。这项技术极大地提高了血清IgG糖组学分析的“深度”, 从而允许发现诊断、治疗反应和预后的低丰度生物标志物。一旦鉴定出疾病中的特异性糖链, 特异性糖链的制备或生物合成及相应的检测试剂盒将实现糖基化作为疾病生物标志物而得到更广泛的应用。

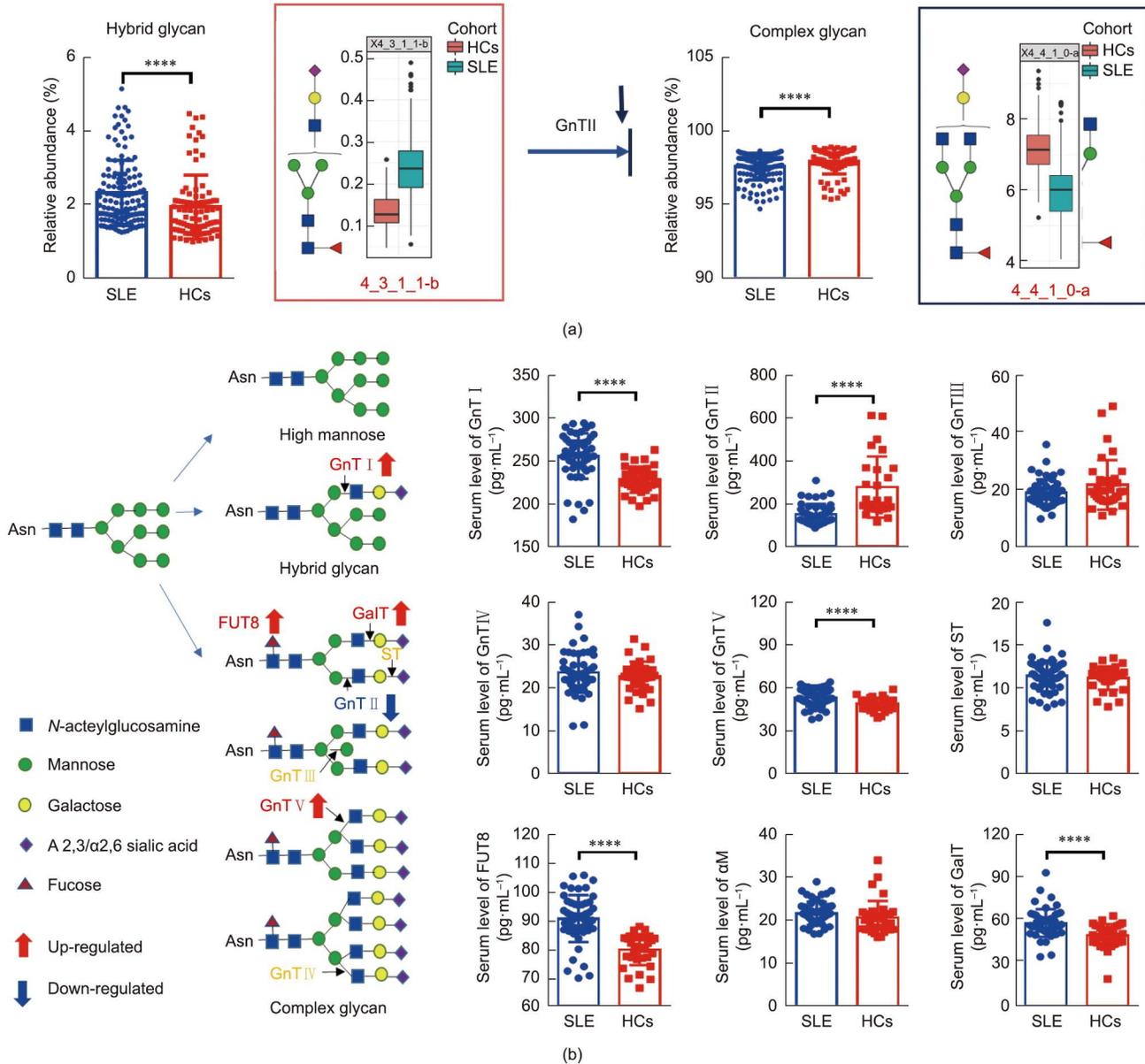


图5. N-糖链与SLE之间潜在的功能相关性。(a) 杂合型N-糖链和复合型N-糖链在SLE中的变化；(b) SLE患者与HC受试者相比糖基转移酶的水平差异 (SLE, $n = 48\sim 53$; HC, $n = 27\sim 37$)。

5. 结论

本研究明确了血清N-糖链特征性生物标志物可用于SLE诊断，也可与类似SLE的自身免疫性疾病（RA、SSc、pSS等）相鉴别，这可能为进一步发现SLE发病新机理提供新思路。

致谢

感谢北京大学人民医院、天津中医药大学第一附属医院、广东省人民医院、珠海市中西医结合医院的各位医生为

本研究提供的宝贵帮助。本研究得到澳门科技发展基金（0003/2019/AKP、0094/2018/A3 和 0010/2020/A1）、广东省基础与应用基础研究基金会（2020B1515130005）、广州中医药大学粤港澳中医药与免疫疾病研究联合实验室（2020B1212030006）的资助。

Authors' contribution

Conceptualization, Liang Liu, Wei Liu, and Zhanguo Li; Methodology, Hudan Pan, Jingrong Wang, Yong Liang, Canjian Wang, and Hua Zhou; Data analysis, Canjian

Wang and Yong Liang; Sample collection, Hudan Pan, Wei Liu, Hua Ye, Xiao Zhang, Yuanhao Wu, Zhi Li, Miao Shao, Ruijun Zhang, Yao Xiao, Guangfeng Zhang, and Xiaoshuang Wang; Writing, Hudan Pan and Jingrong Wang; Manuscript revision, Liang Liu and Jingrong Wang; Supervision, Liang Liu; Funding acquisition, Liang Liu.

Compliance with ethics guidelines

Hudan Pan, Jingrong Wang, Yong Liang, Canjian Wang, Ruimin Tian, Hua Ye, Xiao Zhang, Yuanhao Wu, Miao Shao, Ruijun Zhang, Yao Xiao, Zhi Li, Guangfeng Zhang, Hua Zhou, Yilin Wang, Xiaoshuang Wang, Zhan-guo Li, Wei Liu, and Liang Liu declare that they have no conflict 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.2023.01.006>.

References

- Ramos-Casals M, Brito-Zerón P, Kostov B, Sisó-Almirall A, Bosch X, Buss D, et al. Google-driven search for big data in autoimmune geoepidemiology: analysis of 394,827 patients with systemic autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 2015;14(8):670–9.
- Mitratza M, Klijs B, Hak AE, Karadaun JWPF, Kunst AE. Systemic autoimmune disease as a cause of death: mortality burden and comorbidities. *Rheumatology* 2021;60(3):1321–30.
- Giacomelli R, Afeltra A, Alunno A, Bartoloni-Bocci E, Berardicurti O, Bombardieri M, et al. Guidelines for biomarkers in autoimmune rheumatic diseases—evidence based analysis. *Autoimmun Rev* 2019;18(1):93–106.
- Wahren-Herlenius M, Dörner T. Immunopathogenic mechanisms of systemic autoimmune disease. *Lancet* 2013;382(9894):819–31.
- Tofighi T, Morand EF, Touma Z. Systemic lupus erythematosus outcome measures for systemic lupus erythematosus clinical trials. *Rheum Dis Clin North Am* 2021;47(3):415–26.
- Agmon-Levin N, Mosca M, Petri M, Shoenfeld Y. Systemic lupus erythematosus one disease or many? *Autoimmun Rev* 2012;11(8):593–5.
- Rasmussen A, Radfar L, Lewis D, Grundahl K, Stone DU, Kaufman CE, et al. Previous diagnosis of Sjögren’s Syndrome as rheumatoid arthritis or systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 2016;55(7):1195–201.
- Scherlinger M, Guillotin V, Truchetet ME, Contin-Bordes C, Sisirak V, Duffau P, et al. Systemic lupus erythematosus and systemic sclerosis: all roads lead to platelets. *Autoimmun Rev* 2018;17(6):625–35.
- Rekvi OP. The anti-DNA antibody: origin and impact, dogmas and controversies. *Nat Rev Rheumatol* 2015;11(9):530–40.
- Ippolito A, Wallace DJ, Gladman D, Fortin PR, Urowitz M, Werth V, et al. Autoantibodies in systemic lupus erythematosus: comparison of historical and current assessment of seropositivity. *Lupus* 2011;20(3):250–5.
- Subedi GP, Barb AW. The structural role of antibody N-glycosylation in receptor interactions. *Structure* 2015;23(9):1573–83.
- Cobb BA. The history of IgG glycosylation and where we are now. *Glycobiology* 2020;30(4):202–13.
- Wang W. Glycomedicine: the current state of the art. *Engineering*. In press.
- Mimura Y, Church S, Ghirlando R, Ashton PR, Dong S, Goodall M, et al. The influence of glycosylation on the thermal stability and effector function expression of human IgG1-Fc: properties of a series of truncated glycoforms. *Mol Immunol* 2000;37(12–13):697–706.
- Mimura Y, Sondermann P, Ghirlando R, Lund J, Young SP, Goodall M, et al. Role of oligosaccharide residues of IgG1-Fc in FcγRIIb binding. *J Biol Chem* 2001;276(49):45539–47.
- Malhotra R, Wormald MR, Rudd PM, Fischer PB, Dwek RA, Sim RB. Glycosylation changes of IgG associated with rheumatoid arthritis can activate complement via the mannose-binding protein. *Nat Med* 1995;1(3):237–43.
- Bournazos S, Ravetch JV. Diversification of IgG effector functions. *Int Immunol* 2017;29(7):303–10.
- Arnold JN, Wormald MR, Sim RB, Rudd PM, Dwek RA. The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Annu Rev Immunol* 2007;25(1):21–50.
- Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol* 2008;8(1):34–47.
- Zhou X, Motta F, Selmi C, Ridgway WM, Gershwin ME, Zhang W. Antibody glycosylation in autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 2021;20(5):102804.
- Vučković F, Krištić J, Gudelj I, Teruel M, Keser T, Pezer M, et al. Association of systemic lupus erythematosus with decreased immunosuppressive potential of the IgG glycome. *Arthritis Rheumatol* 2015;67(11):2978–89.
- Wang JR, Gao WN, Grimm R, Jiang S, Liang Y, Ye H, et al. A method to identify trace sulfated IgG N-glycans as biomarkers for rheumatoid arthritis. *Nat Commun* 2017;8(1):631.
- Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997;40(9):1725.
- Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, 3rd. Bingham CO, et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum* 2010;62(9):2569–81.
- Shiboski CH, Shiboski SC, Seror R, Criswell LA, Labetoulle M, Lietman TM, et al.; International Sjögren’s Syndrome Criteria Working Group. 2016 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism classification criteria for primary Sjögren’s Syndrome: a consensus and data-driven methodology involving three international patient cohorts. *Arthritis Rheumatol* 2017;69(1):35–45.
- Van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, Johnson SR, Baron M, Tyndall A, et al. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American College of Rheumatology/European League against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum* 2013;65(11):2737–47.
- Johnson WE, Li C, Rabinovic A. Adjusting batch effects in microarray expression data using empirical Bayes methods. *Biostatistics* 2007;8(1):118–27.
- Leek JT, Johnson WE, Parker HS, Jaffe AE, Storey JD. The SVA package for removing batch effects and other unwanted variation in high-throughput experiments. *Bioinformatics* 2012;28(6):882–3.
- Robin X, Turck N, Hainard A, Tiberti N, Lisacek F, Sanchez JC, et al. pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. *BMC Bioinformatics* 2011;12(1):77.
- DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics* 1988;44(3):837–45.
- Abès R, Teillaud JL. Impact of glycosylation on effector functions of therapeutic IgG. *Pharmaceuticals* 2010;3(1):146–57.
- Chui D, Sellakumar G, Green R, Sutton-Smith M, McQuistan T, Marek K, et al. Genetic remodeling of protein glycosylation *in vivo* induces autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(3):1142–7.
- Pisetsky DS. Antinuclear antibody testing—misunderstood or misbegotten? *Nat Rev Rheumatol* 2017;13(8):495–502.
- Axford JS. Glycosylation and rheumatic disease. *Biochim Biophys Acta* 1999;1455(2–3):219–29.
- Axford JS. Glycosylation and rheumatic disease. *Adv Exp Med Biol* 1998;435:163–73.
- Walport MJ. Complement and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res* 2002;4(Suppl 3):S279–93.
- Leffler J, Bengtsson AA, Blom AM. The complement system in systemic lupus erythematosus: an update. *Ann Rheum Dis* 2014;73(9):1601–6.
- Noris M, Remuzzi G. Overview of complement activation and regulation. *Semin Nephrol* 2013;33(6):479–92.
- Anthony RM, Ravetch JV. A novel role for the IgG Fc glycan: the anti-

- inflammatory activity of sialylated IgG Fcs. *J Clin Immunol* 2010;30(Suppl 1): S9–14.
- [40] Yau LF, Liu J, Jiang M, Bai G, Wang JR, Jiang ZH. An integrated approach for comprehensive profiling and quantitation of IgG-Fc glycopeptides with application to rheumatoid arthritis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2019;1122–1123:64–72.
- [41] Lauc G, Huffman JE, Pučić M, Zgaga L, Adameczyk 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.
- [42] Green RS, Stone EL, Tenno M, Lehtonen E, Farquhar MG, Marth JD. Mammalian N-glycan branching protects against innate immune self-recognition and inflammation in autoimmune disease pathogenesis. *Immunity* 2007;27(2):308–20.
- [43] Kiriakidou M, Ching CL. Systemic lupus erythematosus. *Ann Intern Med* 2020; 172(11):ITC81–96.
- [44] Seeling M, Brückner C, Nimmerjahn F. Differential antibody glycosylation in autoimmunity: sweet biomarker or modulator of disease activity? *Nat Rev Rheumatol* 2017;13(10):621–30.
- [45] Sjöwall C, Zapf J, von Löhneysen S, Magorivska I, Biermann M, Janko C, et al. Altered glycosylation of complexed native IgG molecules is associated with disease activity of systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2015;24(6):569–81.
- [46] Han J, Zhou Z, Zhang R, You Y, Guo Z, Huang J, et al. Fucosylation of anti-dsDNA IgG1 correlates with disease activity of treatment-naïve systemic lupus erythematosus patients. *EBioMedicine* 2022;77:103883.
- [47] Wang J, et al. Serum IgG N-glycans act as novel serum biomarkers of ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2018;78(5):705–7.
- [48] Li T, DiLillo DJ, Bournazos S, Giddens JP, Ravetch JV, Wang LX. Modulating IgG effector function by Fc glycan engineering. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017; 114(13):3485–90.
- [49] Wang TT. IgG Fc Glycosylation in human immunity. *Curr Top Microbiol Immunol* 2019;423:63–75.
- [50] Wang LX, Tong X, Li C, Giddens JP, Li T. Glycoengineering of antibodies for modulating functions. *Annu Rev Biochem* 2019;88(1):433–59.