

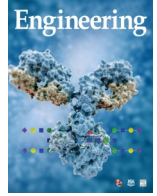


ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Engineering

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



Research
Glycomedicine—Article

基于正交质谱的N-糖组谱揭示哈夫病潜在病原学

刘思^a, 刘圆圆^a, 林佳静^a, 刘笔锋^a, 何振宇^b, 吴晓旻^{b,*}, 刘欣^{a,*}

^a The Key Laboratory for Biomedical Photonics of the MOE at Wuhan National Laboratory for Optoelectronics—Hubei Bioinformatics and Molecular Imaging Key Laboratory, Systems Biology Theme, Department of Biomedical Engineering, College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China

^b Wuhan Center for Disease Control & Prevention, Wuhan 430015, China

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 May 2022

Revised 12 September 2022

Accepted 29 September 2022

Available online 15 November 2022

关键词

哈夫病
全血清
IgG 抗体
N-糖基化
疾病病原学

摘要

食用煮熟的小龙虾可能导致哈夫病(HD),该病被认为是由不明毒素引起的,而病因尚不清楚。N-糖组的剖析将有助于破译疾病的分子机制,而HD相关的糖基化从未被探索过。2019—2020年,本研究团队招募了来自武汉市疾病预防控制中心的90份HD患者和对照组血清样本。本文中,采用基于高通量的正交质谱对HD中血清和血清衍生的免疫球蛋白G(IgG) N-糖组谱进行了表征。数据显示,HD与总血清糖蛋白的核心岩藻糖基化和单半乳糖基化升高有关。血清IgG水平是诊断HD患者的良好指标。此外,IgG的差异半乳糖基化和唾液酸化与HD密切相关。值得注意的是,IgG1和IgG2的半乳糖基化和唾液酸化的变化具有亚类特异性。有意义的是,IgG2或IgG3/4的唾液酸化和半乳糖基化改变与HD的临床标志物密切相关。本研究揭示了差异化IgG N-糖基化与HD的关联,为这种罕见疾病的病因提供了新的见解。

© 2022 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

哈夫病(HD)是一种不明原因的肌痛和横纹肌溶解综合征,发生在食用熟海鲜后24 h内[1]。HD于1924年在波罗的海首次被发现,此后患者呈上升趋势[2]。最近,这种疾病在越来越多的国家或地区传播,包括日本[3]和中国[4]。一般来说,食用水煮海鲜如小龙虾是导致HD的主要原因[5]。关于HD的病因,更容易被接受的观点是,一种不明的热稳定毒素在进入体内时靶向横肌的损伤,进而导致横纹肌溶解,并伴有肌酸激酶(CK)和其他肌肉细胞酶的释放。然而,经过70多年的调查和研究,人们对它的致病机制或病因仍然知之甚少。鉴于该病的逐渐蔓

延及其预防和监测的难度,探索潜在的分子机制对未来HD的诊断和治疗具有重要意义。

HD患者的常见症状是肌痛和横纹肌溶解,其临床表现包括肾功能异常、多器官衰竭和长期肌病[6]。许多研究报道了蛋白质糖基化在肌肉疾病发病机制中的重要作用[7]。此外,可以检测与糖基化变化相关的器官损伤以及循环中的异常聚糖结构,并作为疾病监测的生物标志物[8]。事实上,聚糖组成也会影响健康和疾病中的肾功能[9],而对HD发展与糖基化改变之间的关系尚不清楚。了解糖基化变化可以揭示疾病的潜在分子机制并挖掘可能的疾病标志物。

研究发现血清总糖蛋白的糖基化与炎症反应和疾病进

* Corresponding authors.

E-mail addresses: dennis_602@sina.com (X. Wu), xliu@mail.hust.edu.cn (X. Liu).

2095-8099/© 2022 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): 63–73

引用本文: Si Liu, Yuanyuan Liu, Jiajing Lin, Bi-Feng Liu, Zhenyu He, Xiaomin Wu, Xin Liu. Novel Insight into the Etiology of Haff Disease by Mapping the N-Glycome with Orthogonal Mass Spectrometry. *Engineering*, <https://doi.org/10.1016/j.eng.2022.09.012>

展高度相关,揭示N-聚糖对疾病分层的潜在价值[10]。值得注意的是,进一步表征靶糖蛋白的糖组谱可以提高诊断性能,并能更好地了解糖复合物在几乎所有生理学和病理生理学方面的基本作用[11–13]。鉴于HD很可能是由食物毒素引起的急性疾病[14],因此推测它与这种疾病发展中的免疫调节反应有关。基于此,本文对完整的免疫学特征进行了表征,包括两种补体成分(C3和C4)以及三种主要免疫球蛋白(IgG、IgA和IgM)。值得注意的是,IgG具有中和病原体或毒素的能力[15]。此外,作为血清中最丰富的糖蛋白,IgG参与人体的获得性免疫反应和免疫调节[16]。IgG糖基化参与炎症反应的调节,并与疾病进展密切相关[17]。对HD中IgG糖组谱的深入解析将揭示这种罕见疾病的免疫学特征,为潜在的分子机制提供新的线索。

事实上,IgG有4个亚类,分别是IgG1、IgG2、IgG3和IgG4,每个亚类都有独特的特征和不同的效应功能。IgG1演示物对所有Fc γ R受体(Fc γ R)具有最高的亲和力,是抗体依赖性细胞毒性(ADCC)和抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)的有效激活剂[18]。IgG2对Fc γ RIIA的H131形式具有高亲和力,但对其他Fc γ R的亲和力较弱。IgG2在防御某些细菌感染方面起着重要作用[19]。作为一种有效的促炎抗体,IgG3表现出对大多数Fc γ R的高亲和力,并且由于其半衰期较短,可能会限制过度的炎症反应。IgG4仅对Fc γ RI具有高亲和力,但对其他所有受体都很弱,这是在非感染性环境中反复或长期暴露于抗原或在治疗性蛋白质的免疫应答中的主要抗体亚类[20]。由于不同IgG亚类的功能不同,因此有必要进一步表征HD患者中亚类特异性IgG N-糖组谱。

本研究通过绘制不同水平的免疫谱和N-糖组进行了比较研究,旨在揭示小龙虾致HD的致病机制,并为HD检测或监测提供潜在的标志物。为了全面分析HD中潜在的血清学指标,采用高通量基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS; AB SCIEX, Canada)分析HD患者和正常患者的血清N-糖组。此外,使用商业化试剂盒测量了5种免疫蛋白的水平。考虑健康对照组(HC)和HD之间IgG浓度的显著差异,进一步研究了IgG N-糖组和亚类特异性IgG糖基化。这项研究表明HD与糖基化变化之间存在很强的相关性,特别是对于IgG N-糖基化来说,为这种罕见疾病的病因提供了新的见解。

2. 材料与方法

2.1. 研究人群

样本来自武汉疾病预防控制中心。这些受试者是从吃

小龙虾后出现HD症状的个体中收集的。同时,还收集了年龄和性别与HD患者的年龄及性别相匹配的健康人的血清样本。参与者了解后续实验研究,并在相关知情材料上签名。该研究按照1975年《赫尔辛基宣言》进行,所有实验内容均经华中科技大学专业伦理委员会和武汉市疾病预防控制中心批准。详细的样品信息如表1。5种常见HD标志物的血清学检测显示血清水平显著变化,包括天冬氨酸转氨酶(AST)、丙氨酸转氨酶(ALT)、肌酸激酶(CK)和乳酸脱氢酶(LDH)。

表1 涉及本研究的样本临床信息。IQR:四分位距;AST:天冬氨酸氨基转移酶;ALT:丙氨酸转氨酶;CK:肌酸激酶;LDH:乳酸脱氢酶

Clinical characteristic	Normal (N = 46)	HD (N = 44)	P value
Age (years), median (IQR)	34 (30, 37)	34 (30, 40)	0.23
Gender (male) (proportion)	18 (39.1%)	14 (31.8%)	0.47
Symptom (proportion)			
Weakness	—	15 (34.1%)	—
Myalgia	—	32 (72.7%)	—
Nausea	—	6 (13.6%)	—
Abdominal pain	—	7 (15.9%)	—
Diarrhea	—	4 (9.1%)	—
Chest pain	—	9 (20.5%)	—
Dyspnea	—	10 (22.7%)	—
Back or body pain	—	26 (59.1%)	—
Hematuria	—	0	—
Neuron numbness	—	3 (6.8%)	—
Serological test, median (IQR)			
AST (U·L ⁻¹)	0–40	91.0 (60.0, 99.5)	—
ALT (U·L ⁻¹)	0–40	39.0 (29.0, 110.0)	—
CK (U·L ⁻¹)	18–198	3660.0 (1664.5, 13749.8)	—
LDH (U·L ⁻¹)	101–245	193.0 (174.0, 227.0)	—
Creatinine (umol·L ⁻¹)	44–133	47.0 (38.7, 60.4)	—

IQR: inter-quartile range; AST: aspartate amino transferase; ALT: alanine aminotransferase; LDH: lactate dehydrogenase; U: unit.

2.2. 血清中免疫五项水平测定

人IgG、IgA、IgM、补体成分3(C3)和补体成分5(C5)定量试剂盒购自罗氏诊断公司(Indianapolis,美国)。根据制造商的说明,通过自动分析仪(TBA-30FR; Toshiba,日本)使用免疫比浊测定分析它们的血清浓度。

2.3. IgG抗体的分离与纯化

基于亲和层析的原理,利用含有Protein G填料(Hi-trap Protein G; GE Healthcare,美国)的预装柱并借助自动化的蛋白纯化仪(AKTA plus; GE Healthcare),以磷酸

盐溶液 ($0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS, $\text{pH} = 7.4$) 为蛋白结合缓冲液, 甲酸溶液 ($0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{pH} = 2.5$) 为洗脱缓冲液分离血清中 IgG。将中和缓冲液添加到纯化的级分中以保持 IgG 成分稳定。采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测 IgG 的浓度, 并通过 SDS-PAGE 检测 IgG 纯度。为了避免 IgG 蛋白溶解缓冲液干扰后续 N-聚糖的酶切, 进一步利用含有 SephadexG-25 Superfine 树脂的预装柱 (Hitrap Desalting Column, GE Life Science) 对 IgG 溶液进行脱盐, 收集纯化的 IgG 溶液, 冷冻干燥后保存于低温冰箱。

2.4. N-聚糖释放与化学衍生

与之前报道步骤类似, 利用糖蛋白 N-聚糖酶切试剂盒 (New England Biolabs, 美国), 以反应体系为 $100 \text{ }\mu\text{L}$ 配比蛋白溶液与 PNGaseF 酶切缓冲液, 经过蛋白溶解、变性后, 采用 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴过夜酶切方法, 释放血清或 IgG 的 N-聚糖[21]。简而言之, $10 \text{ }\mu\text{L}$ 血清与纯化的 IgG 溶于超纯水中使其体积达到 $94 \text{ }\mu\text{L}$, 依次加入 $3.6 \text{ }\mu\text{L}$ PNGaseF 缓冲液与 $2.4 \text{ }\mu\text{L}$ 蛋白变性缓冲液。经过高通量的震动仪 (Thermo-Shaker; Ningbo Hinotek Technology Co., Ltd, 中国) 高温变性后冷却至室温, 然后加入 $12 \text{ }\mu\text{L}$ 10% NP-40, 最后加入 PNGaseF 酶。 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜后, 酶切后的聚糖-蛋白混合物经过以多孔石墨化碳 (PGC) 为填料的固相萃取, 收集分离的 N-聚糖溶液, 蒸发浓缩。为了避免在 MALDI-MS 测试过程中唾液酸的损失, 根据之前的研究, 通过甲酰胺化对聚糖进行了衍生化[22]。简而言之, 将样品溶解在含有 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲胺盐酸盐和 $0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ N-甲基吗啉的 $25 \text{ }\mu\text{L}$ 二甲基亚砜 (DMSO; Sigma-Aldrich, 美国) 中, 然后加入含有 $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (7-氮杂苯并三唑-1-基氧基) 三吡咯烷六氟磷酸磷 (PyAOP; Sigma-Aldrich) 的 $25 \text{ }\mu\text{L}$ DMSO。将混合物在室温下孵育 30 min 。化学衍生后的 IgG N-聚糖经过以微晶纤维素 (MCC) 为填料的固相萃取纯化, 然后收集脱盐的 N-聚糖溶液, 蒸发浓缩[23]。

2.5. IgG 糖肽富集

根据最近的研究[24], 通过胰蛋白酶消化获得 IgG 糖肽, 然后通过基于 MCC 的 SPE 富集糖肽。将干燥的 IgG 溶解在 $100 \text{ }\mu\text{L}$ 新鲜制造的 $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 碳酸氢铵中, 然后在恒温摇床中变性。以 1:50 的比例将胰蛋白酶加入样本中后, 将混合物在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 下孵育过夜。在将样品装入 MCC 柱之前, SPE 管 (BonnaAgela Technologies Inc., 中国) 用 3 mL 超纯水预洗 (Rephile Bioscience, 美国), 并用含 0.1% 三氟乙酸 (TFA; Sigma-Aldrich) 的相同体积的 80% 乙腈平衡 (can; Merck KGaA, 德国)。将糖肽用 1 mL 超

纯水洗脱并通过蒸发浓缩, 储存在 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 下直至使用。

2.6. MALDI-TOF-MS 分析

血清和 IgG 衍生的 N-聚糖经 SPE 纯化后, 通过 5800 MALDI-TOF-MS 分析每个样品的糖组谱。除质荷比 (m/z) 设置外, 类似的参数调整或试剂使用如前所述[21]。简而言之, 将样品溶解在 50% 乙腈中, 将其中的十分之一添加到 MALDI 板中。置于空气中干燥后, 将等量的 $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 2,5-二羟基苯甲酸 (Sigma-Aldrich) [含 $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸钠 (Sigma-Aldrich)] 添加到样本中。IgG 和血清 N-聚糖的 m/z 范围分别设定为 $1000\sim 3000$ 和 $1000\sim 4500$ 。对每个样品点总共施加了 1000 次激光射击。数据是在正离子反射器模式下使用 5800 质谱仪 (AB Sciex) 采集的。为了克服批次效应, 将所有样品随机点样到板上, 每个点重复三次。运用糖生物学工具 GlycoMod, 并参考已发表的文献[25–27]鉴定聚糖结构。此外, N-聚糖结构也已通过 PGC-nano-LC-ESI-MS/MS 分析得到证实[21–22]。所有聚糖结构均通过 GlycoWorkBench 2.1 软件进行可视化。

2.7. Nano-LC-ESI-MS/MS 分析

考虑 IgG 糖蛋白组学分析在疾病中的重要性[28], LC-MS 被进一步用于分析 HD 中亚类特异性 IgG 糖基化。为避免批次效应, 所有临床样本随机重复注射三次。有关糖肽分析的详细信息已在以前的研究[24]中进行描述。在 NanoLC Ultra 系统 (Agilent Technologies, 美国) 上使用捕集柱 (Beijing Proteomics Front, 中国) 和分析柱 (Beijing Proteomics Front) 以 C18 为固定相实现分离。糖肽在上样泵和梯度泵的流速下分别以 5% 乙腈/ 0.1% TFA 的水 (缓冲液 A) 和 5% 水/ 0.1% TFA 的乙腈线性梯度洗脱, 流速分别为 $2.0 \text{ }\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 和 $0.3 \text{ }\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 。使用三重 TOF 5600 系统 (AB Sciex) 在正离子和高灵敏度模式下进行 ESI-MS 和碰撞激活解离串联质谱法 (CID MS/MS) 分析 (IDA)。采用信息依赖采集 (IDA) 模式收集信息。

2.8. 数据处理与统计分析

来自 MALDI-TOF-MS 和 LC-MS 的数据分别通过 Data Explorer 和 PeakView 软件进行预处理, 并以 txt 表格导出。通过 MATLAB 解决方案中自主编写的代码, 可以自动快速地处理所有导出的 MS 数据, 并集成用于后续的分析。MALDI-TOF-MS 数据由 Mass_Master 处理[29], LC-MS 数据由 AreaProportion_Simple 处理[24]。通过 Mann-Whitney U 检验检查正常对照组和 HD 患者血清 IgG 浓度和聚糖谱的显著差异。错误发现率 (FDR) 使用 Benjami-

ni-Hochberg (B-H) 程序控制, FDR 设置为 0.05 [30], 且调整后的 P 值小于 0.05 被认为差异显著。随后, 对于显著性差异的变量, 进行受试者操作特性曲线 (ROC) 分析以评估诊断性能。通过 OPLS-DA 分析, 还测试了不同类型的糖基化对 HD 发展的贡献率。Mann-Whitney U 检验和 ROC 分析由 GraphPad Prism 8 进行; OPLS-DA 通过 SIM-CA 13.0 执行。

3. 结果

3.1. 免疫五项水平

与对照组相比可知, HD 患者的所有免疫学指标均有所下降[图 1 (a)], 特别是对于 C3、IgG 和 IgM, 表明在

HD 患者中体液免疫系统可能受到抑制。ROC 分析显示, IgG 浓度在区分 HD 与对照组时获得了 0.71 的中等准确曲线下面积 (AUC) 评分, 灵敏度为 60.5%, 特异性为 72.0% [图 1 (b)], 证明 IgG 浓度对这种疾病的重要性。

3.2. 表征全血清与 IgG N-糖组谱

本文的研究流程图如图 2 所示。基于亲和层析原理, 运用 Protein G 柱分离 HC 和 HD 血清中的 IgG [见附录 A 中的图 S1 (a) ~ (c)], 并通过体积排阻色谱仪脱盐[见附录 A 中的图 S1 (d)]。IgG 成分的纯度通过 SDS-PAGE 评估[见附录 A 中的图 S1 (e)]。为了避免在 MALDI-TOF-MS 分析过程中唾液酸化聚糖中所含的唾液酸的损失, 质谱检测之前进行羧基的甲酰胺化。为了评估该方法的重复性, 通过随机分析三种正常血清样品进行日间和日

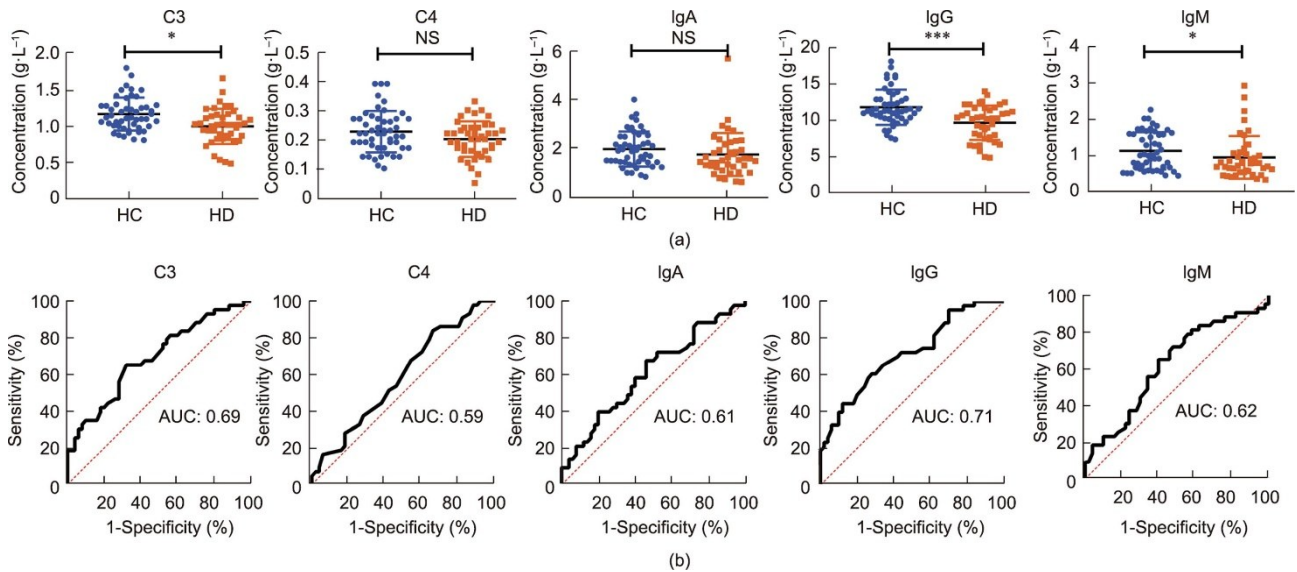


图 1. 评估血清中免疫五项对哈夫病患者与健康人的区分能力。(a) 散点图描述健康人与哈夫病患者不同指标间的差异; (b) ROC 曲线评估不同指标的诊断效果。Mann-Whitney U 检验后通过 Benjamini-Hochberg 多重校正显著性, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$, **** $P < 0.001$ 。

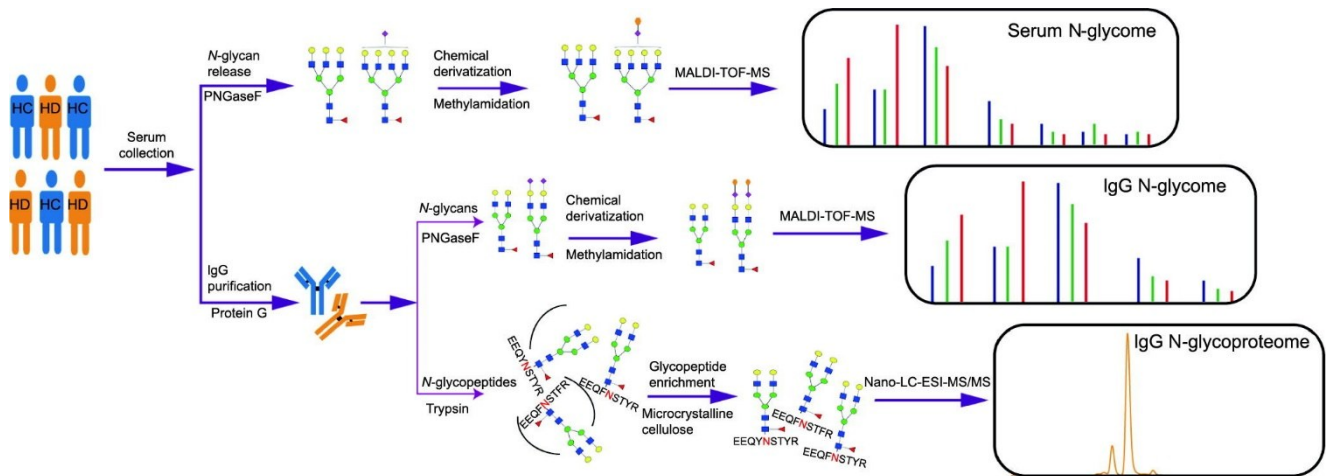


图 2. 全面表征血清与 IgG N-糖组流程图。随机选择不同组血清样品进行样本预处理及 MALDI-TOF-MS 分析。IgG 抗体通过商业化 Protein G 亲和层析柱纯化后, 利用 MALDI-TOF-MS 分析其 N-聚糖, 利用 nano-LC-ESI-MS/MS 分析亚型特异性 N-糖基化。

内质量控制，显示5种主要N-聚糖的系数方差(CV)小于20% (见附录A中的图S2)。健康人与HD患者具有代表性的MALDI-TOF-MS图谱或基峰色谱图(BPC)如图3所示。鉴定出55个血清聚糖，包括比较常见的54种N-聚糖(见附录A中的表S1)与一个不常见的单唾液酸聚糖(H3N3S1)。本研究结果与以往文献[10,25,31]一致，涵盖

所有典型的聚糖特征，包括高甘露糖型、复合型和杂合型聚糖。此外，28种IgG N-聚糖(见附录A中的表S2)与47种亚型特异性的IgG N-聚糖(见附录A中的表S3)被鉴定，此结果与前述报道[21,24]一致。通过将具有相同聚糖结构的N-聚糖组合在一起来计算糖基化(见附录A中的表S4~S6)，包括高甘露糖基化(Man)、平分型N-乙酰

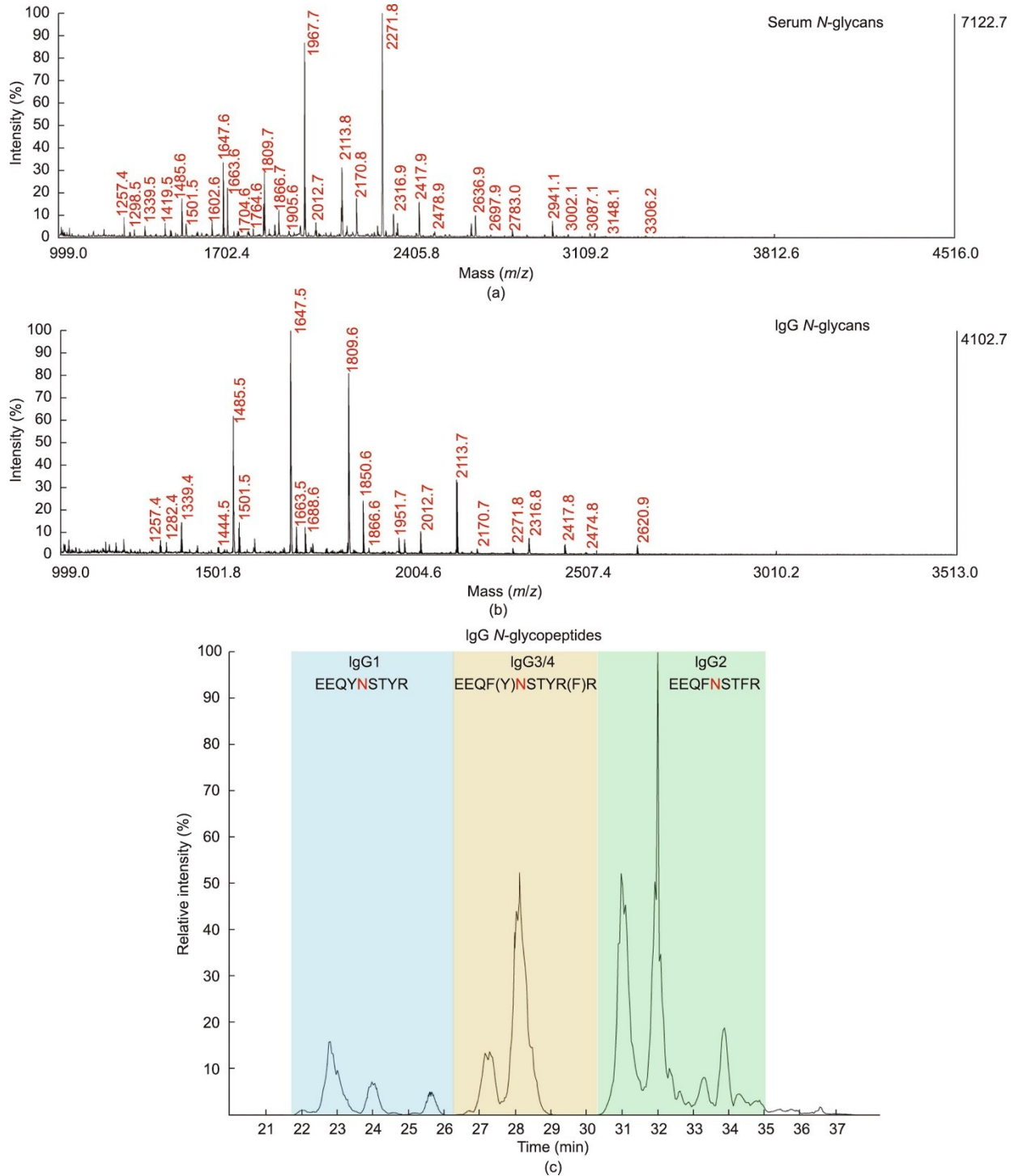


图3. 健康人与哈夫病患者代表性N-糖组图谱。(a) 代表性血清N-聚糖MALDI-TOF-MS图谱；(b) 代表性IgG N-聚糖MALDI-TOF-MS图谱；(c) 代表性nano-LC-ESI-MS/MS亚型特异性IgG N-聚糖基峰色谱图。

葡糖胺化 (B)、岩藻糖基化 (F)、半乳糖基化 (G) 和唾液酸化 (S)。

3.3. 哈夫病与血清 N-糖基化的相关性

从两个角度分析了 HD 患者的糖基化差异, 包括聚糖特征和单个聚糖。在聚糖特征方面, 统计分析显示 HD 患者两种不同类型的血清 N-糖基化发生显著变化[见图 4 (a) 及附录 A 中的表 S7]。具体而言, 与对照组相比, HD 患者的总岩藻糖基化和单半乳糖基化明显增加。进一步的分析显示, 这两种糖基化类型预测 HD 的值不具备准确度 ($AUC < 0.70$), 但它们的 AUC 评分几乎接近准确度[图 4 (b)]。为了探索这种疾病的潜在聚糖指标, 本文分析了 HD 中单个聚糖谱, 显示 HC 和 HD 之间的 N-聚糖没有显著差异。然而, 由于 H3N3S1、H4N5F1 和 H5N4S2 的聚糖组成在患者中差异表达, 因此它们可能在 HD 进展中发挥重要作用 (见附录 A 中的图 S3、表 S8), 这需要进一步研究 HD 队列中的血清 N-糖组。

3.4. 哈夫病中 IgG N-糖组的变化

如图 5 (a) 与附录 A 中的图 S4 所示, 中性平分型 N-

乙酰葡糖胺化 (B neutral) 在 HD 患者中显著上调, 而酸性平分型 N-乙酰葡糖胺化与总的平分型 N-乙酰葡糖胺化无明显变化。此外, IgG 非半乳糖基化与半乳糖基化在 HD 患者中分别显著性上调与下调。同时, 与对照组相比, HD 患者的 IgG 唾液酸化降低, 尤其是单唾液酸化。进一步的 ROC 分析显示中性平分型 N-乙酰葡糖胺化、总的非半乳糖基化和单唾液酸化获得中等准确的 AUC 评分[图 5 (b)]。这些发现可以通过对单个 IgG N-聚糖的进一步分析来获得 (见附录 A 中的表 S9), 显示显著变化的中性平分型 N-聚糖、无半乳糖基化 N-聚糖和单唾液酸化 N-聚糖。

3.5. 亚型特异性的 IgG N-糖组在哈夫病中的变化

对不同亚类中 IgG 糖肽的结构进行了分类, 并计算了 HD 中不同糖基化的变化 (表 2)。IgG1 的唾液酸化在 HD 中明显上调。此外, 患者双天线唾液酸化 (A2S) 也显著增加, 证明了唾液酸化在疾病发病机制中的重要性。此外, 研究发现 HD 中 IgG2 的唾液酸化明显增加, 特别是对于双天线聚糖上每半乳糖唾液酸化 (A2GS), 表明唾液酸的变化与半乳糖的影响无关。由于与对照组相比, 总 IgG 的唾液酸化在 HD 患者中略有减少, 因此这种变化可能是

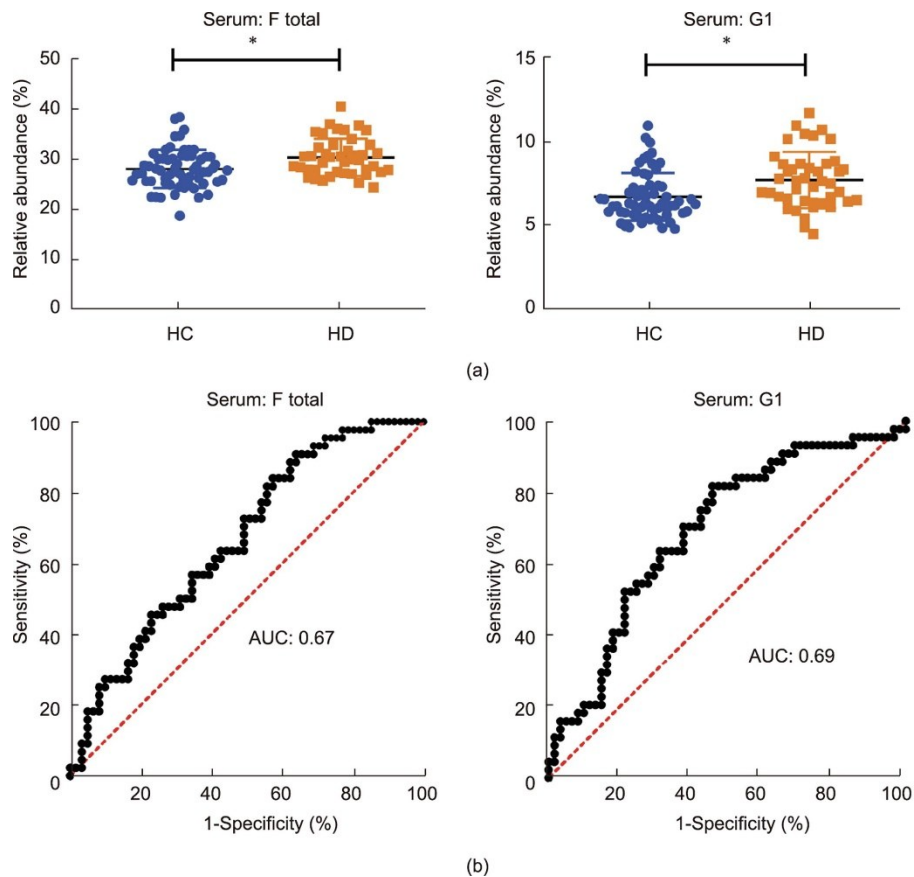


图 4. 健康人与哈夫病患者中血清 N-糖基化水平。每个点代表一个独立样本。Mann-Whitney U 检验后通过 Benjamini-Hochberg 多重校正显著性, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.005$, $****P < 0.001$ 。

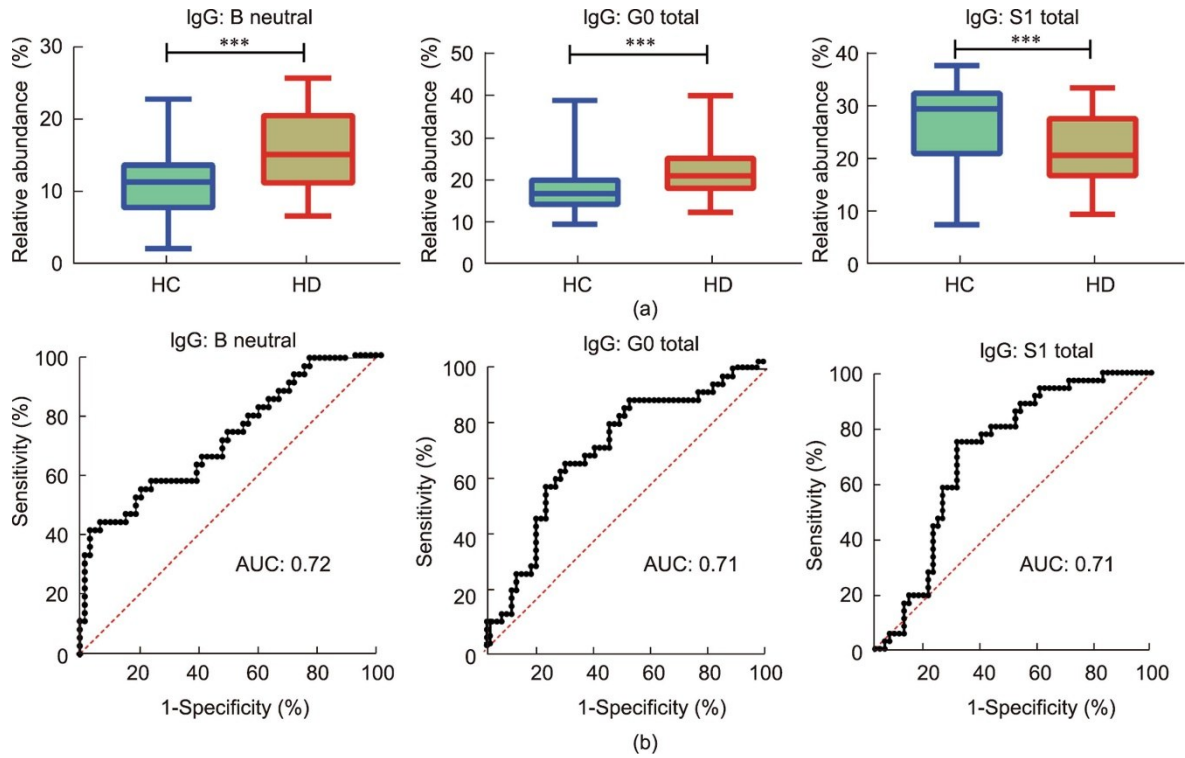


图5. 健康人与哈夫病患者中IgG N-糖基化水平。(a) 箱线图描述三种IgG聚糖特征在健康人和哈夫病患者中显著变化；(b) ROC曲线评估三种IgG N-糖基化的诊断效果。Mann-Whitney U 检验后通过Benjamini-Hochberg多重校正显著性, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.005$, $****P < 0.001$ 。

亚类特异性的。HD患者IgG3/4的总的G1和G0分别显著增加和减少。此外, IgG3/4的双触角岩藻糖基化半乳糖基化(A2FG)也过表达, 表明IgG半乳糖基化与HD之间存在很强的相关性。

3.6. 常用临床检测指标与N-糖基化水平的相关性

本研究中, 观察到AST和ALT水平的改变与亚类特异性IgG N-糖基化的变化密切相关(见表3及附录A中的图S5)。具体而言, IgG2的唾液酸化与AST呈正相关($r = 0.72, P = 0.0439$)。IgG2中双天线聚糖每个天线半乳糖基化(A2G; $r = 0.80, P = 0.0314$)和双半乳糖基化(G2; $r = 0.81, P = 0.0275$)与ALT呈正相关, 而IgG2的无乳糖基化与ALT呈负相关($r = -0.78, P = 0.0396$)。此外, IgG3/4中总的双半乳糖(G2)($r = 0.89, P = 0.0079$)和岩藻糖基化修饰的半乳糖基化(A2FG)($r = 0.90, P = 0.0051$)与ALT呈正相关。

4. 讨论

本研究中, HD的潜在机制首先在N-糖组的水平被阐述。同时, 通过测定血清中免疫五项来表征HD的免疫学特征。作为血清中含量最高的糖蛋白, IgG在HD中发生显著变化, 可能作为疾病进展的标志物。鉴于IgG在适应

性免疫学中的关键作用, 本研究数据可能证明HD发展中的免疫反应。重要的是, IgG的效应功能在不同的亚类中是不同的, 并且受附着的聚糖的调节[32], 因而需要对该病中的IgG N-糖组进行进一步研究。聚糖几乎参与疾病中所有基本的分子和细胞过程, 全面揭示糖组谱可以提高人们对发病机制的理解[33]。因此, 本研究试图通过表征血清、血清来源的IgG和亚类特异性IgG中的N-糖组谱来破译HD的潜在病因。

据报道, HD是由未知的热稳定毒素引起的, 其入侵会导致CK急剧增加[34–35]。显著升高的CK已被列为诊所和实验室HD诊断和检测的标准[36], 然而人们对疾病患者在血清水平上的另一个分子变化知之甚少。最近的研究通过肝功能测试, 证明HD患者的特定酶也增加了[37], 提示HD和胃肠病之间的区别。除消化系统外, 针对与有害底物相关的食物抗原的免疫反应在疾病的发展中起着重要作用[38]。目前, 本文研究团队正试图探索完整的免疫学特征, 以及这种变化是否可能是检测HD的其他标准。本研究的数据显示HD患者的C3和C4降低, 这与运动员获得较低水平的C3和C4的观察结果一致[39]。由于剧烈运动对HD的贡献, 对运动诱导的HD的进一步研究有助于揭示疾病特异性分子机制。事实上, 研究结果表明补体系统激活参与了小龙虾诱导的HD。与健康对照组相比,

表2 统计分析健康人与哈夫病患者的亚型特异性IgG N-糖基化。SD: 标准差; CI: 置信区间。具有显著性差异的数值加粗表示

Glycan features	HC		HD		<i>P</i>	<i>P</i> _{adj}
	Mean ± SD	Mean ± SD	95% CI			
IgG1						
G0	25.80 ± 9.19	23.23 ± 8.27	(-1.220, 6.340)	0.180	0.230	
G1	42.86 ± 6.66	42.15 ± 6.45	(-2.130, 3.540)	0.620	0.620	
G2	31.34 ± 11.94	34.61 ± 9.91	(-8.040, 1.490)	0.176	0.230	
S	10.72 ± 6.49	14.40 ± 8.15	(-6.840, -0.520)	0.023	0.110	
B	15.76 ± 5.60	18.29 ± 7.31	(-5.380, 0.310)	0.079	0.180	
F	90.22 ± 5.52	88.78 ± 4.92	(-0.830, 3.700)	0.210	0.240	
A2G	52.22 ± 10.22	55.21 ± 8.48	(-7.070, 1.090)	0.149	0.230	
A2S	5.32 ± 3.24	7.13 ± 4.05	(-3.380, 0.230)	0.025	0.110	
A2GS	0.10 ± 0.06	0.13 ± 0.06	(-0.050, 0.003)	0.081	0.180	
IgG2						
G0	31.83 ± 8.43	31.01 ± 7.76	(-2.690, 4.330)	0.642	0.640	
G1	43.02 ± 3.00	41.96 ± 4.35	(-0.540, 2.660)	0.190	0.437	
G2	25.15 ± 8.68	27.04 ± 8.22	(-5.540, 1.770)	0.310	0.465	
S	14.49 ± 6.29	17.10 ± 5.34	(-5.150, -0.080)	0.440	0.495	
B	13.34 ± 3.10	12.54 ± 3.16	(-0.550, 2.150)	0.243	0.437	
F	97.49 ± 1.52	97.01 ± 2.00	(-0.280, 1.240)	0.216	0.437	
A2G	46.04 ± 8.44	47.44 ± 7.66	(-4.890, 2.100)	0.428	0.495	
A2S	7.54 ± 3.19	9.08 ± 2.87	(-2.860, -0.230)	0.022	0.099	
A2GS	0.16 ± 0.05	0.19 ± 0.04	(-0.050, -0.010)	0.004	0.036	
IgG 3/4						
G0	43.02 ± 11.91	34.72 ± 14.32	(2.640, 13.960)	0.005	0.020	
G1	27.93 ± 8.35	35.16 ± 13.72	(-12.230, -2.230)	0.005	0.020	
G2	29.05 ± 10.77	30.12 ± 12.13	(-6.010, 3.870)	0.667	0.889	
S	10.24 ± 5.97	10.38 ± 5.24	(-2.580, 2.290)	0.905	0.905	
A2FB	18.80 ± 5.50	16.43 ± 8.91	(-0.790, 5.530)	0.139	0.371	
A2FG	43.01 ± 10.56	47.70 ± 11.36	(-9.420, 0.040)	0.052	0.832	
A2FS	5.12 ± 2.99	5.19 ± 2.62	(-1.290, 1.150)	0.905	0.905	
A2FGS	0.12 ± 0.05	0.11 ± 0.04	(-0.010, 0.030)	0.496	0.832	

*P*_{adj}: adjusted *P* value; SD: standard deviation; CI: confidence interval; G0: agalactosylated glycans; G1: monogalactosylated glycans; G2: digalactosylated glycans; A2G: galactosylation per antenna on diantennary glycans; A2S: sialylation per antenna on diantennary glycans; A2GS: sialylation per galactose on diantennary glycans; A2FG: biantennary fucosylated galactosylation; A2FB: bisection of fucosylated diantennary glycans; A2FS: sialylation per antenna on fucosylated diantennary glycans; A2FGS: sialylation per galactose on fucosylated diantennary glycans.
Significant difference is in bold.

IgA、IgM 和 IgG 水平在 HD 患者中一致降低，表明来自免疫生态位的免疫球蛋白在 HD 进展期间受到抑制。这一结果在某种程度上与先前的报道一致，即有氧运动触发了免疫球蛋白的从头合成[40]，表明 HD 对免疫系统的负面影响。根据该报道，即 IgG 的减少或缺失使个体易发生复发性感染[41]，本文假设 HD 与传染病的分子机制相似。重要的是，与健康对照组相比，类风湿性关节炎

(RA) 患者的血清 IgG 浓度较低[42]，暗示 HD 和自身免疫性疾病之间可能存在相似性。这是第一个显示 HD 患者体液免疫特征的证据，IgG 水平可能与 HD 诊断的临床标准相辅相成。

本研究数据显示，HD 患者血清的岩藻糖基化和半乳糖基化升高，但评分缺乏区分 HD 患者和对对照组的信息。此外，由于总血清的复杂性，对于哪种蛋白质糖基化发生变化或分泌了什么代谢产物等问题还尚不明确，表明 IgG N-糖组分析在该疾病中的优先级。值得注意的是，之前的研究表明，环境毒素可能导致免疫反应并参与生理活动，导致 IgG 糖基化改变[43]。考虑糖基化对免疫应答中 IgG 效应功能的巨大影响，本文对 HD 中的 IgG 糖组进行了全面的研究。研究结果显示，IgG 中上调的平分型 *N*-乙酰葡糖胺化和无半乳糖基化以及唾液酸化减少与 HD 密切相关，并且至少获得中等准确的 HD 诊断性能。IgG 糖基化的程度可能激活 ADCC 或参与炎症作用[44–45]，展示 HD 发展的潜在过程。特别是，IgG 唾液酸化与树突状细胞特异性细胞间黏附分子-3 捕获性非整合素 (DC-SIGN) 的碳水化合物区域结合，随后激活抗体介导的抗炎信号通路[46]。由于 ADCC 或补体依赖性细胞毒性 (CDC) 活性的激活以及疾病进展中上调 IgG 唾液酸化的抗炎作用[47]，预计 HD 关联 IgG 介导的炎症或补体介导的免疫反应。同样，IgG 的岩藻糖基化减少显著提高了对 FcγRIIIA 记录因子的亲和力并降低了 ADCC 活性[48]。同时，IgG 无半乳糖基化显著增加、半乳糖基化降低，这与炎症和其他类型疾病一致[49]。尽管在疾病患者中观察到中性平分型 *N*-乙酰葡糖胺化增加，但平分型 GlcNAc 对 ADCC 活性的影响归因于核心岩藻糖的空间位阻[50]。因此，关于 IgG 平分型 *N*-乙酰葡糖胺化在 HD 进展中的作用的进一步研究具有重要意义。总体而言，这些结果表明异常的 IgG 糖基化与 HD 的发展之间存在关联，表明 HD 与促炎作用有关。

IgG 糖基化在疾病中的功能意义受到亚类特异性变化的影响，如不同研究模型[51]所示。深入了解亚类特异性 IgG 糖基化在健康和疾病中的特征可能为疾病发病机制和疾病特异性分层提供重要的新见解[52]。在本文中，探讨了对照组和 HD 患者之间不同 IgG 亚类的聚糖谱分析。有意义的是，IgG1 和 IgG2 的唾液酸化在 HD 中上调，这与总 IgG N-糖组的变化形成鲜明对比。结果可能表明 HD 中总 IgG 糖基化和亚类特异性 IgG N-糖基化之间的功能差异。然而，IgG3/4 的非半乳糖基化和单半乳糖基化在 HD 中显著降低和增加，与总 IgG N-糖组的趋势相反，表明 IgG 半乳糖基化的变化可能是亚类特异性的。因此，亚类特异性糖基化谱在揭示疾病背后的潜在机制方面具有一定的优越性。

表3 Pearson相关性分析IgG N-糖基化与临床常用针对HD检测的血清标记物之间关系。CI:置信区间。加粗表示具有显著性差异的数值

Variables	AST				ALT				CK				LDH				Creatinine			
	r	95% CI	R ²	P value	r	95% CI	R ²	P value	r	95% CI	R ²	P value	r	95% CI	R ²	P value	r	95% CI	R ²	P value
Total IgG N-glycosylation																				
F total	-0.03	-0.6495, 0.6089	0	0.9270	0.17	-0.5546, 0.7510	0.03	0.6560	0.18	-0.4136, 0.6638	0.03	0.561	0.16	-0.4877, 0.6925	0.03	0.642	-0.30	-0.7479, 0.3260	0.09	0.3350
F neutral	-0.16	-0.7170, 0.5228	0.03	0.6600	-0.23	-0.7749, 0.5138	0.05	0.5550	-0.11	-0.6203, 0.4731	0.01	0.732	0.11	-0.5279, 0.6633	0.01	0.758	0.16	-0.4584, 0.6703	0.02	0.6270
F sialo	-0.03	-0.6472, 0.6114	0	0.9350	0.27	-0.4807, 0.7919	0.07	0.4830	0.09	-0.4888, 0.6076	0.01	0.782	0.28	-0.3809, 0.7552	0.08	0.398	-0.28	-0.7381, 0.3456	0.08	0.3700
B total	-0.06	-0.6665, 0.5897	0	0.8620	-0.38	-0.8339, 0.3796	0.14	0.3130	-0.05	-0.5869, 0.5129	0	0.863	-0.19	-0.7074, 0.4652	0.03	0.582	0.30	-0.3274, 0.7473	0.09	0.3370
B neutral	-0.07	-0.6675, 0.5885	0	0.8580	-0.36	-0.8270, 0.3983	0.13	0.3390	-0.13	-0.6384, 0.4495	0.02	0.660	-0.18	-0.7020, 0.4735	0.03	0.604	0.29	-0.3373, 0.7423	0.09	0.3550
B sialo	-0.28	-0.7729, 0.4252	0.08	0.4350	-0.44	-0.8533, 0.3205	0.19	0.2400	-0.04	-0.5785, 0.5223	0	0.896	-0.10	-0.6598, 0.5323	0.01	0.772	0.30	-0.3323, 0.7448	0.09	0.3460
G0 total	-0.27	-0.7702, 0.4307	0.07	0.4460	-0.34	-0.8189, 0.4192	0.12	0.3720	0.45	-0.1294, 0.8039	0.21	0.119	-0.01	-0.6075, 0.5921	0	0.972	-0.08	-0.6275, 0.5149	0.01	0.7960
G1 total	0.13	-0.5427, 0.7032	0.02	0.7160	0.19	-0.5448, 0.7571	0.03	0.6300	0.25	-0.3467, 0.7054	0.06	0.405	0.23	-0.4261, 0.7310	0.05	0.490	-0.38	-0.7820, 0.2506	0.14	0.2260
G2 total	0.36	-0.3495, 0.8064	0.13	0.3080	0.65	-0.0290, 0.9172	0.42	0.0593	-0.18	-0.6677, 0.4079	0.03	0.546	0.23	-0.4277, 0.7301	0.05	0.493	-0.16	-0.6707, 0.4579	0.02	0.6250
S total	-0.04	-0.6533, 0.6047	0	0.9120	-0.10	-0.7150, 0.6062	0.01	0.8040	-0.30	-0.7311, 0.2991	0.09	0.317	-0.16	-0.6909, 0.4902	0.02	0.648	0.31	-0.3201, 0.7508	0.10	0.3250
S1 total	-0.01	-0.6360, 0.6231	0	0.9770	-0.07	-0.6992, 0.6259	0	0.8670	-0.30	-0.7304, 0.3004	0.09	0.319	-0.04	-0.6260, 0.5724	0	0.903	0.42	-0.2030, 0.8008	0.18	0.1740
S2 total	-0.06	-0.6632, 0.5936	0	0.8750	-0.11	-0.7214, 0.5979	0.01	0.7780	-0.29	-0.7235, 0.3137	0.08	0.342	-0.29	-0.7601, 0.3709	0.09	0.379	0.13	-0.4771, 0.6569	0.02	0.6800
IgG1 N-glycosylation																				
G0	-0.31	-0.8321, 0.5066	0.09	0.4580	-0.62	-0.9360, 0.2501	0.38	0.1380	0.23	-0.4297, 0.7289	0.05	0.498	-0.32	-0.8130, 0.4338	0.10	0.396	0.11	-0.5610, 0.6897	0.01	0.7700
G1	-0.39	-0.8596, 0.4310	0.15	0.3350	-0.47	-0.9024, 0.4420	0.22	0.2920	0.38	-0.2836, 0.7984	0.15	0.248	0.44	-0.3154, 0.8548	0.19	0.235	0.14	-0.5393, 0.7056	0.02	0.7060
G2	0.46	-0.3631, 0.8793	0.21	0.2530	0.74	-0.0350, 0.9583	0.54	0.0585	-0.40	-0.8045, 0.2680	0.16	0.229	-0.06	-0.6938, 0.6321	0	0.888	-0.16	-0.7188, 0.5200	0.03	0.6530
S	0.44	-0.3801, 0.8747	0.20	0.2710	0.61	-0.2700, 0.9333	0.37	0.1490	-0.08	-0.6461, 0.5493	0.01	0.825	-0.24	-0.7778, 0.5084	0.06	0.543	0.04	-0.6072, 0.6510	0	0.9210
B	-0.12	-0.7614, 0.6372	0.02	0.7730	-0.25	-0.8441, 0.6197	0.06	0.5890	0.17	-0.4806, 0.6973	0.03	0.622	0.24	-0.5030, 0.7806	0.06	0.531	0.02	-0.6183, 0.6407	0	0.9600
F	0.13	-0.6327, 0.7646	0.02	0.7590	-0.30	-0.8585, 0.5864	0.09	0.5160	0.24	-0.4193, 0.7348	0.06	0.475	0.22	-0.5218, 0.7705	0.05	0.574	0.23	-0.4663, 0.7514	0.05	0.5210
A2G	0.40	-0.4272, 0.8608	0.16	0.3300	0.71	-0.0957, 0.9530	0.50	0.0748	-0.34	-0.7803, 0.3273	0.12	0.308	0.10	-0.6035, 0.7171	0.01	0.796	-0.14	-0.7058, 0.5391	0.02	0.7060
A2S	0.42	-0.3995, 0.8692	0.18	0.2940	0.61	-0.2661, 0.9338	0.37	0.1470	-0.08	-0.6482, 0.5467	0.01	0.817	-0.23	-0.7744, 0.5146	0.05	0.557	0.04	-0.6044, 0.6536	0	0.9110
A2GS	0.24	-0.5564, 0.8094	0.06	0.5610	0.42	-0.4840, 0.8920	0.18	0.3440	0	-0.5988, 0.6009	0	0.996	-0.34	-0.8186, 0.4200	0.11	0.373	0.14	-0.5379, 0.7066	0.02	0.7020
IgG2 N-glycosylation																				
G0	-0.62	-0.9219, 0.1504	0.38	0.1010	-0.78	-0.9654, -0.0593	0.60	0.0396	0.24	-0.4229, 0.7328	0.06	0.483	-0.23	-0.7742, 0.5150	0.05	0.558	0.33	-0.3816, 0.7931	0.11	0.3570

Variables	AST				ALT				CK				LDH				Creatinine				
	<i>r</i>	95% CI	<i>R</i> ²	<i>P</i> value	<i>r</i>	95% CI	<i>R</i> ²	<i>P</i> value	<i>r</i>	95% CI	<i>R</i> ²	<i>P</i> value	<i>r</i>	95% CI	<i>R</i> ²	<i>P</i> value	<i>r</i>	95% CI	<i>R</i> ²	<i>P</i> value	
G1	-0.14	-0.7703, 0.02	0.02	0.7350	-0.54	-0.9197, 0.29	0.29	0.2090	0.47	-0.1838, 0.22	0.147	0.05	-0.6328, 0	0.890	0.24	-0.4596, 0.06	0.5060				
		0.6243				0.3565				0.8337				0.6933		0.7551					
G2	0.57	-0.2241, 0.33	0.1400	0.81	0.1435,	0.65	0.0275	-0.33	-0.7778, 0.11	0.316	0.17	-0.5539, 0.03	0.654	-0.33	-0.7950, 0.11	0.3500					
		0.9096				0.9707				0.3330				0.7515		0.3770					
S	0.72	0.0318, 0.52	0.0439	0.59	-0.2996, 0.34	0.1670	-0.08	-0.6463, 0.01	0.825	0.34	-0.4189, 0.12	0.371	-0.30	-0.7820, 0.09	0.3990						
		0.9452				0.9290			0.5491		0.8190			0.4062							
B	-0.34	-0.8421, 0.11	0.4130	-0.54	-0.9200, 0.30	0.2070	-0.04	-0.6234, 0	0.913	-0.30	-0.8046, 0.09	0.430	-0.35	-0.8039, 0.12	0.3170						
		0.4814				0.3549			0.5752		0.4532			0.3559							
F	0.16	-0.6146, 0.03	0.7070	-0.23	-0.8393, 0.05	0.6130	0.47	-0.1791, 0.22	0.143	0.35	-0.4129, 0.12	0.362	-0.28	-0.7722, 0.08	0.4380						
		0.7766				0.6299			0.8351		0.8214			0.4266							
A2G	0.60	-0.1852, 0.36	0.1180	0.80	0.1134,	0.64	0.0314	-0.29	-0.7577, 0.08	0.388	0.20	-0.5329, 0.04	0.600	-0.33	-0.7945, 0.11	0.3520					
		0.9163				0.9689			0.3757		0.7642			0.3783							
A2S	0.65	-0.1002, 0.42	0.0808	0.60	-0.2803, 0.36	0.1550	-0.31	-0.7677, 0.10	0.352	0.07	-0.6216, 0.01	0.853	-0.04	-0.6514, 0	0.9190						
		0.9292				0.9318			0.3551		0.7027			0.6068							
A2GS	0.55	-0.2577, 0.30	0.1610	0.33	-0.5609, 0.11	0.4660	-0.23	-0.7288, 0.05	0.498	-0.03	-0.6793, 0	0.944	0.25	-0.4533, 0.06	0.4920						
		0.9032				0.8682			0.4299		0.6484			0.7585							
IgG 3/4 N-glycosylation																					
G0	-0.25	-0.8125, 0.06	0.5470	-0.63	-0.9388, 0.40	0.1260	0.22	-0.4381, 0.05	0.517	-0.12	-0.7253, 0.01	0.762	0.27	-0.4320, 0.07	0.4480						
		0.5503				0.2277			0.7240		0.5925			0.7696							
G1	-0.11	-0.7546, 0.01	0.8010	-0.19	-0.8261, 0.04	0.6780	-0.04	-0.6239, 0	0.911	-0.20	-0.7644, 0.04	0.599	0.26	-0.4460, 0.07	0.4760						
		0.6466				0.6551			0.5747		0.5325			0.7624							
G2	0.39	-0.4364, 0.15	0.3430	0.89	0.3998,	0.79	0.0079	-0.18	-0.7049, 0.03	0.592	0.35	-0.4108, 0.12	0.358	-0.58	-0.8862, 0.34	0.0785					
		0.8579				0.9831			0.4691		0.8223			0.0774							
S	-0.42	-0.8669, 0.17	0.3040	0	-0.7535, 0	0.9980	-0.11	-0.6668, 0.01	0.744	0.02	-0.6507, 0	0.952	0.11	-0.5587, 0.01	0.7630						
		0.4075				0.7526			0.5234		0.6771			0.6914							
A2FB	-0.15	-0.7730, 0.02	0.7230	0.48	-0.9055, 0.23	0.2770	0.15	-0.4919, 0.02	0.653	0	-0.6667, 0	0.991	0.01	-0.6230, 0	0.9760						
		0.6202				0.4285			0.6897		0.6615			0.6362							
A2FG	0.38	-0.4448, 0.14	0.3550	0.90	0.4754,	0.82	0.0051	-0.25	-0.7371, 0.06	0.466	0.28	-0.4704, 0.08	0.463	-0.52	-0.8660, 0.27	0.1240					
		0.8551				0.9860			0.4152		0.7968			0.1631							
A2FS	-0.42	-0.8669, 0.17	0.3040	0	-0.7535, 0	0.9980	-0.11	-0.6668, 0.01	0.744	0.02	-0.6507, 0	0.952	0.11	0.5587,	0.01	0.7630					
		0.4075				0.7526			0.5234		0.6771			0.6914							
A2FGS	-0.47	-0.8830, 0.22	0.2380	-0.16	-0.8163, 0.03	0.7250	0.01	-0.5947, 0	0.981	0.09	-0.6096, 0.01	0.815	0.16	-0.5251, 0.02	0.6670						
		0.3486				0.6719			0.6050		0.7124			0.7154							

F neutral: neutral fucosylation; F sialo: sialylated fucosylation; F total: total fucosylation; B neutral: neutral bisection; B sialo: sialylated bisection; B total: total bisection; G0 total: total agalactosylation; G1 total: total monogalactosylation; G2 total: total digalactosylation; S total: total sialylation; S1 total: total mono-sialylation; S2 total: total disialylation. *r*: correlation coefficient; *R*²: regression square.

Significant difference is in bold.

本研究中受试者的临床特征显示, AST和ALT的显著增加显著影响肝功能。考虑肝功能异常与糖基化变化之间的强烈关联[52], 预计这一变化可能会导致糖组的水平变化。事实上, 本文观察到IgG2或IgG3/4的半乳糖基化和唾液酸化与血清的两个常见指标AST或ALT水平密切相关。

通过整合本研究结果和IgG亚类的生物学功能, 提出了HD可能的致病机制。具体而言, 食用水煮小龙虾后,

一种不明原因的毒素进入我们的身体, 其化学成分诱导继发免疫反应。由毒素中所含的抗原触发, B细胞经历抗体类别转换, 特别是对于IgG。鉴于HD患者的IgG蛋白水平显著降低, 可能是低丙种球蛋白血症, 推测IgG1主要有助于总IgG水平, 因为IgG1是最丰富的亚类。下调的IgG1通过唾液酸化介导的ADCC参与炎症信号通路。同样, 作为次级丰度亚类, IgG2缺乏导致对病原体的易感性增加, 病原体也受到唾液酸化失调的调节。较低水平

的IgG3/4伴随着对抗原的抗体反应，导致由差异半乳糖基化调节的效应功能降低。IgG3的半衰期较短且相对短期的毒素暴露可能会中和IgG上调半乳糖基化的抗炎活性。简而言之，小龙虾衍生的毒素共同激活体液免疫反应，诱导IgG亚类缺陷介导的炎症活动（由IgG1/2的差异唾液酸化和IgG3/4的半乳糖基化调节）。

总之，这项研究表明，在区分HD患者和HC方面，IgG N-糖组比总血清N-糖组具有更高的诊断价值。IgG核心岩藻糖基化、半乳糖基化和唾液酸化的聚糖特征与临床症状标志物密切相关，对HD具有良好的诊断性能。HD的N-糖组特征首次被全面表征，提高了人们对这种不明原因的罕见疾病病因的理解。因而，需要进一步更大规模的研究来探讨糖基化与HD发生之间的因果关系，以揭示这种疾病的潜在分子机制。

致谢

感谢国家重大研发计划(2022YFC3400800)、国家自然科学基金(81827901)、中国博士后面上基金(2021M691144)、武汉预防医学科研专项(MY19M01),以及湖北省卫生健康委员会2019年度预防专项重大项目(WJ2019H303)的资助。

Authors' contribution

Si Liu, study concept and design, drafting of the manuscript, analysis and interpretation of data, statistical analysis; Yuanyuan Liu and Jiajing Lin, research performance and acquisition of data; Bi-Feng Liu, critical revision of the manuscript for important intellectual content, administrative support; Zhenyu He, administrative support, provision of study material or patients; Xiaomin Wu, study concept and design, administrative support, provision of study material or patients; Xin Liu, study concept and design, critical revision of the manuscript for important intellectual content, administrative support. All authors read and approved the final manuscript.

Compliance with ethics guidelines

Si Liu, Yuanyuan Liu, Jiajing Lin, Bi-Feng Liu, Zhenyu He, Xiaomin Wu, and Xin Liu declare that they

have no conflict of interest or financial conflicts.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.eng.2022.09.012>.

References

- [1] Diaz JH. Global incidence of rhabdomyolysis after cooked seafood consumption (Haff disease). *Clin Toxicol* 2015;53(5):421–6.
- [2] Buchholz U, Mouzin E, Dickey R, Moolenaar R, Sass N, Mascola L. Haff disease: from the Baltic Sea to the US shore. *Emerg Infect Dis* 2000;6(2):192–5.
- [3] Taniyama S, Sagara T, Nishio S, Kuroki R, Asakawa M, Noguchi T, et al. Survey of food poisoning incidents in Japan due to ingestion of marine boxfish and their toxicity. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 2009;50(5):270–7. Japanese.
- [4] Huang X, Li Y, Huang Q, Liang J, Liang C, Chen B, et al. A past Haff disease outbreak associated with eating freshwater pomfret in south China. *BMC Public Health* 2013;13(1):447.
- [5] Giannoglou GD, Chatzizisis YS, Misirli G. The syndrome of rhabdomyolysis: pathophysiology and diagnosis. *Eur J Intern Med* 2007;18(2):90–100.
- [6] Chan TY. The emergence and epidemiology of Haff disease in China. *Toxins* 2016;8(12):359.
- [7] Dang K, Jiang S, Gao Y, Qian A. The role of protein glycosylation in muscle diseases. *Mol Biol Rep* 2022;49(8):8037–49.
- [8] Paton B, Suarez M, Herrero P, Canela N. Glycosylation biomarkers associated with age-related diseases and current methods for glycan analysis. *Int J Mol Sci* 2021;22(11):5788.
- [9] Reilly C, Stewart TJ, Renfrow MB, Novak J. Glycosylation in health and disease. *Nat Rev Nephrol* 2019;15(6):346–66.
- [10] Reiding KR, Ruhaak LR, Uh HW, El Bouhaddani S, van den Akker EB, Plomp R, et al. Human plasma N-glycosylation as analyzed by matrix-assisted laser desorption/ionization-fourier transform ion cyclotron resonance-MS associates with markers of inflammation and metabolic health. *Mol Cell Proteomics* 2017;16(2):228–42.
- [11] Zhang Y, Jiao J, Yang P, Lu H. Mass spectrometry-based N-glycoproteomics for cancer biomarker discovery. *Clin Proteomics* 2014;11(1):18.
- [12] Adameczyk B, Tharmalingam T, Rudd PM. Glycans as cancer biomarkers. *Biochim Biophys Acta* 2012;1820(9):1347–53.
- [13] Hart GW, Wells L. Glycoproteomics: making the study of the most structurally diverse and most abundant post-translational modifications more accessible to the scientific community. *Mol Cell Proteomics* 2021;20:100086.
- [14] Gao X, Song X, Zuo R, Yang D, Ji C, Ji H, et al. Ionophore toxin maduramicin produces haff disease-like rhabdomyolysis in a mouse model. *Int J Environ Res Public Health* 2020;17(21):7882.
- [15] Plotkin SA. Correlates of protection induced by vaccination. *Clin Vaccine Immunol* 2010;17(7):1055–65.
- [16] Anthony RM, Wermeling F, Ravetch JV. Novel roles for the IgG Fc glycan. *Ann N Y Acad Sci* 2012;1253(1):170–80.
- [17] Cobb BA. The history of IgG glycosylation and where we are now. *Glycobiology* 2020;30(4):202–13.
- [18] Wang X, Mathieu M, Brezski RJ. IgG Fc engineering to modulate antibody effector functions. *Protein Cell* 2018;9(1):63–73.
- [19] Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol* 2014;5:520.
- [20] Van Helden PM, van den Berg HM, Gouw SC, Kaijen PH, Zuurveld MG, Mauser-Bunschoten EP, et al. IgG subclasses of anti-FVIII antibodies during immune tolerance induction in patients with hemophilia A. *Br J Haematol* 2008;142(4):644–52.
- [21] Liu S, Cheng L, Fu Y, Liu BF, Liu X. Characterization of IgG N-glycome profile in colorectal cancer progression by MALDI-TOF-MS. *J Proteomics* 2018;181:225–37.
- [22] Liu X, Qiu H, Lee RK, Chen W, Li J. Methylamidation for sialoglycomics by MALDI-MS: a facile derivatization strategy for both α 2,3- and α 2,6-linked sialic acids. *Anal Chem* 2010;82(19):8300–6.

- [23] Zhang Q, Feng X, Li H, Liu BF, Lin Y, Liu X. Methylamidation for isomeric profiling of sialylated glycans by nanoLC-MS. *Anal Chem* 2014;86(15):7913–9.
- [24] Liu S, Fu Y, Huang Z, Liu Y, Liu BF, Cheng L, et al. A comprehensive analysis of subclass-specific IgG glycosylation in colorectal cancer progression by nanoLC-MS/MS. *Analyst* 2020;145(8):3136–47.
- [25] Kang P, Mechref Y, Novotny MV. High-throughput solid-phase permethylation of glycans prior to mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2008; 22(5):721–34.
- [26] Zhang Z, Westhlin M, Bondt A, Wuhler M, Standal T, Holst S. Serum protein N-glycosylation changes in multiple myeloma. *Biochim Biophys Acta, Gen Subj* 2019;1863(5):960–70.
- [27] Liu Y, Wang C, Wang R, Wu Y, Zhang L, Liu BF, et al. Isomer-specific profiling of N-glycans derived from human serum for potential biomarker discovery in pancreatic cancer. *J Proteomics* 2018;181:160–9.
- [28] Kao D, Danzer H, Collin M, Groß A, Eichler J, Stambuk J, et al. A monosaccharide residue is sufficient to maintain mouse and human IgG subclass activity and directs IgG effector functions to cellular Fc receptors. *Cell Rep* 2015;13(11):2376–85.
- [29] Liu S, Yu Y, Liu Y, Lin J, Fu Y, Cheng L, et al. Revealing the changes of IgG subclass-specific N-glycosylation in colorectal cancer progression by high-throughput assay. *Proteomics Clin Appl* 2021;15(2–3):e2000022.
- [30] Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc* 1995;57(1):289–300.
- [31] Bladergroen MR, Reiding KR, Hipgrave Ederveen AL, Vreeker GC, Clerc F, Holst S, et al. Automation of high-throughput mass spectrometry-based plasma N-glycome analysis with linkage-specific sialic acid esterification. *J Proteome Res* 2015;14(9):4080–6.
- [32] Liu S, Liu X. IgG N-glycans. *Adv Clin Chem* 2021;105:1–47.
- [33] Pinho SS, Reis CA. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nat Rev Cancer* 2015;15(9):540–55.
- [34] Pei P, Li XY, Lu SS, Liu Z, Wang R, Lu XC, et al. The emergence, epidemiology, and etiology of haff disease. *Biomed Environ Sci* 2019;32(10): 769–78.
- [35] Stanley M, Chippa V, Aeddula NR, Quintanilla Rodriguez BS, Rhabdomyolysis AR. *StatPearls*. Treasure Island: StatPearls Publishing; 2022.
- [36] Cabral BMI, Edding SN, Portocarrero JP, Lerma EV. Rhabdomyolysis. *Dis Mon* 2020;66(8):101015.
- [37] Ahmad SC, Sim C, Sinert R. Elevated liver enzymes as a manifestation of haff disease. *J Emerg Med* 2019;57(6):e181–3.
- [38] Florsheim EB, Sullivan ZA, Khoury-Hanold W, Medzhitov R. Food allergy as a biological food quality control system. *Cell* 2021;184(6):1440–54.
- [39] Kostrzewa-Nowak D, Kubaszewska J, Nowakowska A, Nowak R. Effect of aerobic and anaerobic exercise on the complement system of proteins in healthy young males. *J Clin Med* 2020;9(8):2357.
- [40] Dumić J, Cvetko A, Abramović I, Šupraha Goreta S, Perović A, Njire Bratičević M, et al. Changes in specific biomarkers indicate cardiac adaptive and anti-inflammatory response of repeated recreational SCUBA diving. *Front Cardiovasc Med* 2022;9:855682.
- [41] Nimmerjahn F, Ravetch JV. Four keys to unlock IgG. *J Exp Med* 2021;218(3): E20201753.
- [42] Ohmi Y, Ise W, Harazono A, Takakura D, Fukuyama H, Baba Y, et al. Sialylation converts arthritogenic IgG into inhibitors of collagen-induced arthritis. *Nat Commun* 2016;7(1):11205.
- [43] Liu J, Liu S, Huang Z, Fu Y, Fei J, Liu X, et al. Associations between the serum levels of PFOS/PFOA and IgG N-glycosylation in adult or children. *Environ Pollut* 2020;265(Pt A):114285.
- [44] Nimmerjahn F, Ravetch JV. Translating basic mechanisms of IgG effector activity into next generation cancer therapies. *Cancer Immunol* 2012;12:13.
- [45] Gornik O, Pavić T, Lauc G. Alternative glycosylation modulates function of IgG and other proteins—implications on evolution and disease. *Biochim Biophys Acta* 2012;1820(9):1318–26.
- [46] Sondermann P, Pincetic A, Maamary J, Lammens K, Ravetch JV. General mechanism for modulating immunoglobulin effector function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110(24):9868–72.
- [47] Schwab I, Nimmerjahn F. Intravenous immunoglobulin therapy: how does IgG modulate the immune system? *Nat Rev Immunol* 2013;13(3):176–89.
- [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] Gudelj I, Lauc G, Pezer M. Immunoglobulin G glycosylation in aging and diseases. *Cell Immunol* 2018;333:65–79.
- [50] Nishima W, Miyashita N, Yamaguchi Y, Sugita Y, Re S. Effect of bisecting GlcNAc and core fucosylation on conformational properties of biantennary complex-type N-glycans in solution. *J Phys Chem B* 2012;116(29):8504–12.
- [51] Jennewein MF, Alter G. The immunoregulatory roles of antibody glycosylation. *Trends Immunol* 2017;38(5):358–72.
- [52] Verhelst X, Dias AM, Colombel JF, Vermeire S, Van Vlierberghe H, Callewaert N, et al. Protein glycosylation as a diagnostic and prognostic marker of chronic inflammatory gastrointestinal and liver diseases. *Gastroenterology* 2020;158(1): 95–110.