

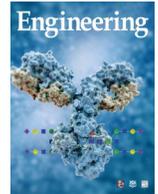


ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Engineering

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



Research
Glycomedicine—Article

流感和 COVID-19 患者之间免疫球蛋白 G 糖基化的差异

Marina Kljaković-Gašpić Batinjan^{a, #}, Tea Petrović^{b, #}, Frano Vučković^b, Irzal Hažibegović^{c, d},
Barbara Radovani^e, Ivana Jurin^c, Lovorka Đerek^f, Eva Huljev^g, Alemka Markotić^{h, i, j}, Ivica Lukšić^k,
Irena Trbojević-Akmačić^b, Gordan Lauc^{b, l}, Ivan Gudelj^{b, e, *}, Rok Čivljak^{g, m}

^a University Hospital Centre Zagreb, Zagreb 10000, Croatia

^b Genos Glycoscience Research Laboratory, Zagreb 10000, Croatia

^c Department of Cardiology, University Hospital Dubrava, Zagreb 10000, Croatia

^d Faculty of Dental Medicine and Health, Josip Juraj Strossmayer University, Osijek 31000, Croatia

^e Department of Biotechnology, University of Rijeka, Rijeka 51000, Croatia

^f Department for Laboratory Diagnostics, University Hospital Dubrava, Zagreb 10000, Croatia

^g Department for Acute Respiratory Infections, University Hospital for Infectious Diseases "Dr. Fran Mihaljević", Zagreb 10000, Croatia

^h Department for Urogenital Infections, University Hospital for Infectious Diseases "Dr. Fran Mihaljević", Zagreb 10000, Croatia

ⁱ Department for Infectious Diseases, School of Medicine, Catholic University of Croatia, Zagreb 10000, Croatia

^j Postdoctoral Study, Faculty of Medicine, University of Rijeka, Rijeka 51000, Croatia

^k Department of Maxillofacial Surgery, University of Zagreb School of Medicine, Dubrava University Hospital, Zagreb 10000, Croatia

^l Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Zagreb 10000, Croatia

^m Department of Infectious Diseases, University of Zagreb School of Medicine, Zagreb 10000, Croatia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 February 2022

Revised 1 August 2022

Accepted 13 August 2022

Available online 6 September 2022

关键词

流感
新冠病毒肺炎
病毒感染
糖基化
免疫球蛋白 G
肺炎

摘要

如果不了解与可结晶片段(Fc)结构域天冬酰胺297相连的N-聚糖发生的变化,就无法充分认识免疫球蛋白G(IgG)在免疫系统调节和对抗传染病中的重要作用。这些聚糖影响抗体稳定性、半衰期、分泌、免疫原性和效应子功能。因此,本研究分析并比较了64名流感患者、77名新冠肺炎(COVID-19)患者和56名健康对照者的总IgG糖组——在单个聚糖结构和衍生糖基化特征[唾液酸化、半乳糖基化、岩藻糖基化和平分型N-乙酰氨基葡萄糖(GlcNAc)]的水平上。本研究表明,已故的COVID-19患者中IgG半乳糖基化和平分型GlcNAc显著减少(其中平分型GlcNAc显示出最显著的减少),而IgG岩藻糖基化则增加。另外,流感患者和COVID-19幸存者中IgG半乳糖基化保持稳定。流感患者的IgG糖基化更具时间依赖性:在疾病的前7天,唾液酸化增加,岩藻糖基化和平分型GlcNAc减少;在接下来的21天内,唾液酸化减少,岩藻糖基化增加(而平分型GlcNAc保持稳定)。COVID-19幸存者和流感患者IgG糖基化变化的相似性可能是对包膜病毒产生充分免疫反应的结果,而在已故COVID-19患者中观察到的变化可能表明其偏差。

©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/>).

* Corresponding author.

E-mail address: ivan.gudelj@uniri.hr (I. Gudelj).

These authors contributed equally to this work.

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): 54–62

引用本文: Marina Kljaković-Gašpić Batinjan, Tea Petrović, Frano Vučković, Irzal Hadžibegović, Barbara Radovani, Ivana Jurin, Lovorka Đerek, Eva Huljev, Alemka Markotić, Ivica Lukšić, Irena Trbojević-Akmačić, Gordan Lauc, Ivan Gudelj, Rok Čivljak. Differences in Immunoglobulin G Glycosylation Between Influenza and COVID-19 Patients. *Engineering*, <https://doi.org/10.1016/j.eng.2022.08.007>

1. 引言

由呼吸道病毒引起的流行病极大地加重了全球健康和社会经济负担，从而影响了数百万人的生活[1-2]。严重急性呼吸综合征冠状病毒-2 (SARS-CoV-2) 和流感病毒都可以引起严重的呼吸道感染，并导致极高的死亡率[3]。然而，与1918年和2009年的流感大流行不同，SARS-CoV-2导致的死亡率严重偏向于70岁以上的人群[4]。此外，据观察，大多数患有严重疾病的新冠病毒肺炎 (COVID-19) 患者在症状出现后8~9天病情变得危重[5-6]，这与适应性免疫反应的激活时间相关[7]。在这方面，抗体可以被认为是适应性免疫系统的可能候选者，它可能是SARS-CoV-2感染期间观察到的临床病程恶化的原因。

通过中和游离感染颗粒来预防流感病毒感染所需要的体液免疫[8-9]。该过程中的关键抗体之一是免疫球蛋白G (IgG)，它是血液循环中最丰富的一类抗体[10]。免疫球蛋白分子由两个区域组成：抗原结合片段 (Fab) 区域和可结晶片段 (Fc) 区域。抗原结合片段负责识别各种病原体的抗原，而片段可结晶区则具有决定对病原体存在的免疫系统反应的有效功能。在Fc IgG区域内，有一个高度进化保守的N-糖基化位点，其N-聚糖影响抗体稳定性并调节IgG效应子功能[11-13]。Fc糖基化的变化可以改变Fc构象，在先天免疫细胞表面及通过与补体级联的相互作用影响与Fc受体的结合[14-17]。因此，从Fc区的N-聚糖中去除核心岩藻糖使得IgG在引发抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 方面的效率提高了50倍，从而提高了其抗病毒活性[17-18]。此外，无岩藻糖基化抗原特异性IgG可能是防御SARS-CoV-2的重要元素[19]。另外，抗刺激IgG的岩藻糖基化与促炎细胞因子白细胞介素6 (IL-6) 和IL-8的巨噬细胞呈负相关，从而促进重症COVID-19患者的炎症[20]。

有趣的是，SARS-CoV-2和流感病毒都是膜上带有糖蛋白的包膜病毒。事实上，从对各种包膜病毒（而非非包膜病毒）的免疫反应表现的研究中得出了一个共同的结果：抗原特异性IgG的无岩藻糖基化[5]。同样，在感染人类免疫缺陷病毒 (HIV) [21]、登革热病毒[22]、巨细胞病毒 (CMV)、麻疹病毒、腮腺炎病毒、乙型肝炎病毒和SARS-CoV-2的人群中也发现了无岩藻糖基化IgG [19]，但这不适用于流感病毒。有趣的是，接种疫苗后没有观察到这些变化，表明无岩藻糖基化IgG反应需要包膜病毒的存在[23]。因此，疫苗接种后IgG糖基化变化的发现不能直接转化为自然感染中糖基化的变化，这进一步证实了研究不同条件下糖基化的必要性。因此，本研究的目的是使

用亲水相互作用液相色谱-超高效液相色谱 (HILIC-UH-PLC) 对从感染SARS-CoV-2和流感病毒的成年患者中纯化的IgG N-聚糖进行深入分析。

2. 材料和方法

2.1. 研究人群

2.1.1. 流感患者

在三个连续的冬季 (2017/2018、2018/2019 和 2019/2020) 期间，本研究在因急性发热性疾病被送往克罗地亚大学传染病医院急性呼吸道感染科 (Department for Acute Respiratory Infection of the University Hospital for Infectious Diseases, Croatia) 的住院患者中招募了64名实验室确诊流感的成年患者 (>18岁)。入院后第1天、第7天和第28天三个时间点采集血样进行IgG分离。本研究还收集了有关严重程度和结果的人口统计、流行病学、临床、实验室、微生物学和其他数据。研究中纳入的患者因急性发热性疾病住院、有或没有呼吸道症状、持续时间不超过7天、病原学确诊为流感、伴或不伴有肺炎，以及在鼻/咽拭子中通过单一逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 实验室确诊为流感患者。被排除在研究之外的患者包括18岁以下的患者；在过去6个月内接受过输血、静脉注射免疫球蛋白或其他血液衍生物治疗的患者；符合以下一项或多项条件的患者：持续7天以上的急性发热性疾病、无流感病毒感染病原学证据的急性发热性疾病、病原学确诊的其他病毒性呼吸道感染和 (或) 细菌合并感染、医疗机构感染、免疫缺陷 (如恶性疾病、化疗、放疗、实体器官和干细胞移植、无脾、自身免疫性疾病和免疫抑制药物)、妊娠、艾滋病病毒感染和结核病。

2.1.2. COVID-19患者

本研究纳入了来自克罗地亚杜布拉瓦大学医院 (University Hospital Dubrava, Croatia) 的77名经聚合酶链反应 (PCR) 确诊的SARS-CoV-2感染成年患者。杜布拉瓦大学医院于2020年11月至2021年6月期间被组建为专门的SARS-CoV-2医院，并保留了所有因SARS-CoV-2住院的不同严重程度患者的前瞻性数据库：①轻度——没有肺炎表现的个体，但伴有其他重要的急性合并症；②中度——有肺炎表现，但不需要有创机械通气的个体；③重症——有双侧肺炎表现，需要入住医院重症监护室，需要有创机械通气的个体；④危重——需要立即进行有创机械通气并入住医院重症监护室，或需要体外循环，或住院期间死亡

的人员。这项研究包括患有轻度、中度、重度和危重疾病的患者，以及有明确证据表明 SARS-CoV-2 感染是住院主要原因的患者。在本研究中，中度和重度疾病的患者首先被合并为一个组，然后根据生存情况分为两组（见附录 A 中的表 S1）。患者在住院期间多次采集血浆，样本采集时间为 2020 年 11 月至 12 月。

2.1.3. 健康人群控制变量

该健康对照组包括 2018 年 6 月至 2020 年 2 月期间从克罗地亚萨格勒布市和萨格勒布县招募的 56 名志愿者，他们没有临床体征/症状或实验室疑似传染病，并且年龄和性别与患者相匹配。用于 IgG 分离的血液样本在三个时间点采集：纳入研究后的第 1 天、第 7 天和第 28 天。研究队列的详细特征如表 1 所示。

对于所有样品，静脉血样品均收集在含有乙二胺四乙酸 (EDTA) 的真空采血管中。首先让样品静置一小时，然后在 $1620g$ ($1g = 9.8 m \cdot s^{-2}$) 下离心 10 min。然后将等份血浆转移至 2 mL 试管中，并以 $2700g$ 离心 10 min；之后，立即将它们储存在 $-20^\circ C$ 直至进行分析。

2.2. IgG 分离、聚糖释放和标记

简而言之，本研究使用 Protein G 96 孔整体板 (BIA Separations, 斯洛文尼亚共和国) 从血浆样品中分离出 IgG [24]。对于流感患者和健康对照组，通过添加十二烷基硫酸钠 (SDS) (Invitrogen, 美国) 并在 $65^\circ C$ 下孵育，使分离的 IgG 变性。用 Igepal-CA630 (Sigma-Aldrich, 美国) 中和过量的 SDS，并在磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中添加 PNGase F (Promega, 美国) 后释放 N-聚糖。释放的 N-聚糖用 2-氨基苯甲酰胺 (2-AB) 标记。使用亲水相互作用液相色谱固相萃取 (HILIC-SPE) 技术从样品中去除游离标记和还原剂。对于前两个流感季节的样品，使用 $0.2 \mu m$ AcroPrep GH Polypro (GHP) 过滤板 (Pall, 美国) 进行 HILIC-SPE 步骤；对于上一个季节的流感样品则使用了 AcroPrep Advance 1 mL $0.2 \mu m$ wwPTFE 板 (Pall)。用超纯水洗脱聚糖并在 $-20^\circ C$ 下保存直至使用。

对于 COVID-19 样品、聚糖释放和标记，本研究使用了 GlycoWorks RapiFluor-MS N-聚糖试剂盒 (Waters, 美

国)。Deriš 等 [25] 详细描述了该分析的方案。简而言之，将干燥的 IgG 洗脱液 (平均质量为 $15 \mu g$) 重悬于超纯水和 5% RapiGest SF 溶液 (Waters) 中。为了使 IgG 变性，将样品在 $99^\circ C$ 下孵育 3 min。使用 GlycoWorks Rapid PNGase F (Waters) 酶促释放样品中的 N-聚糖，并在 $50^\circ C$ 下孵育 5 min。释放的 N-聚糖用 RapiFluor-MS 溶液 (Waters) 标记，并将过滤板在室温下放置 5 min。标记后，将样品与乙腈 (ACN; Honeywell, 美国) 混合，并立即转移至 GlycoWorks HILIC μ Elution 过滤板 (Waters)，然后通过 HILIC-SPE 进行净化程序。用超纯水和超纯水/ACN (15 : 85, *V/V*) 预清洗过滤孔，然后使用多孔板真空歧管 (Pall) 抽真空以去除废物。在 $pH = 7$ (Waters) 下，用 $3 \times 30 \mu L$ SPE 洗脱缓冲液和 $200 mmol \cdot L^{-1}$ 醋酸铵/ACN (95 : 5, *V/V*) 洗脱聚糖，然后用 $310 \mu L$ 样品稀释剂稀释二甲基甲酰胺 (DMF) /ACN (32 : 68, *V/V*) (Waters)。对于每个样品，本研究都将 $40 \mu L$ 样品转移至小瓶中进行 HILIC-UHPLC 分析，而其余样品则储存在 $-20^\circ C$ 下。

2.3. HILIC-UHPLC 分析

在由四元溶剂管理器、样品管理器和荧光 (FLR) 检测器组成的 Acquity UPLC 仪器 (Waters) 上，通过 HILIC 分离荧光标记的 N-聚糖。该仪器由版本为 3471 的 Empower 3 软件 (Waters) 控制。进样前样品保持在 $10^\circ C$ 下，分离温度为 $60^\circ C$ 。2-AB 标记的 N-聚糖在 Waters 聚糖亚乙基桥杂化 (BEH) 酰胺色谱柱 [$100 mm \times 2.1 mm$; 内径 (i.d.), $1.7 \mu m$ BEH 颗粒] 上分离，使用 $100 mmol \cdot L^{-1}$ 甲酸铵 ($pH = 4.4$) 作为溶剂 A，ACN 作为溶剂 B。分离方法使用 25%~38% 线性梯度的溶剂 A (*V/V*)，流速为 $0.40 mL \cdot min^{-1}$ ，分析运行 27 min。激发和发射波长分别设置为 250 nm 和 428 nm。如之前报道的那样，以相同方式将色谱图分为 24 个峰 [24]。

RapiFluor-MS 标记的 N-聚糖在 Waters 聚糖 BEH 酰胺色谱柱 ($100 mm \times 2.1 mm$; i.d., $1.7 \mu m$ BEH 颗粒) 上分离，使用 $50 mmol \cdot L^{-1}$ 、 $pH = 4.4$ 的甲酸铵作为溶剂 A，ACN 作为溶剂 B。分离方法使用线性梯度为 75%~61.5% 的 ACN (*V/V*)，流速为 $0.4 mL \cdot min^{-1}$ ，分析运行时间为 42 min。激发和发射波长分别设置为 256 nm 和 425 nm。

表 1 研究队列的样本数量和人群特征

Characteristics	Samples						
	2018		2019		2020		
	Influenza ($n = 13$)	Control ($n = 35$)	Influenza ($n = 38$)	Control ($n = 0$)	Influenza ($n = 13$)	Control ($n = 21$)	COVID-19 ($n = 77$)
Sex (male)	11	12	29	—	8	4	57
Age (year, median (IQR))	55 (51–69)	39 (32–51)	56 (49–66)	—	41 (34–61)	77 (45–82)	72 (64–77)

获得的色谱图被分成22个峰，Keser等[26]描述了这些峰的聚糖结构。

在这两种情况下，本研究的数据处理都是采用传统积分算法进行自动处理的，之后手动校正每个色谱图以保持所有样品的相同积分间隔。每个峰中聚糖的量表示为总积分面积的百分比。

2.4. 数据分析

如前所述，本研究对UHPLC聚糖数据进行归一化和批量校正，以消除测量中的实验偏差。根据所使用的荧光标记（即2-AB或RapiFluor-MS），色谱图被整合到24或22个直接测量的聚糖结构中，并根据以下公式从直接测量的聚糖中计算出6种衍生性状：

- 对于用2-AB（GP）标记的聚糖：对于半乳糖基化 $G0 = GP1 + GP2 + GP3 + GP4 + GP6$ ，含有一个半乳糖 $G1 = GP7 + GP8 + GP9 + GP10 + GP11$ ，含有两个半乳糖 $G2 = GP12 + GP13 + GP14 + GP15$ ，含有平分型GlcNAc $B = GP3 + GP6 + GP10 + GP11 + GP13 + GP15 + GP19 + GP22 + GP24$ ，含有核心岩藻糖 $F = GP1 + GP4 + GP6 + GP8 + GP9 + GP10 + GP11 + GP14 + GP15 + GP16 + GP18 + GP19 + GP23 + GP24$ 和唾液酸化聚糖 $S = GP16 + GP17 + GP18 + GP19 + GP20 + GP21 + GP22 + GP23 + GP24$ ；对于每个衍生性状，将获得的总和除以所有峰的总和并乘以100。

- 对于用RapiFluor-MS（RFGP）标记的聚糖：对于半乳糖基化 $G0 = RFGP1 + RFGP2 + RFGP3 + RFGP4$ ，含有一个半乳糖 $G1 = RFGP5 + RFGP6 + RFGP7 + RFGP8 + RFGP9 + RFGP10$ ，含有两个半乳糖 $G2 = RFGP11 + RFGP12 + RFGP13$ ，具有平分型GlcNAc $B = RFGP4 + RFGP9 + RFGP10 + RFGP13 + RFGP17 + RFGP20 + RFGP22$ ，具有核心岩藻糖 $F = RFGP1 + RFGP3 + RFGP4 + RFGP7 + RFGP8 + RFGP9 + RFGP10 + RFGP12 + RFGP13 + RFGP14 + RFGP16 + RFGP17 + RFGP21 + RFGP22$ 和唾液酸化聚糖 $S = RFGP14 + RFGP15 + RFGP16 + RFGP17 + RFGP18 + RFGP19 + RFGP20 + RFGP21 + RFGP22$ ；对于每个衍生性状，将获得的总和除以所有峰的总和并乘以100。

这些衍生性状平均了不同个体聚糖结构的特定糖基化特征，因此，它们与个体酶活性和潜在的遗传多态性密切相关。

本研究通过实施线性混合效应模型对观察期内的患者样本进行纵向分析，其中聚糖测量是因变量，时间被建模为固定效应；此外，个体识别（ID）作为随机截距被包

含在模型中，年龄和性别作为额外的协变量。对于每个队列[即健康对照组（C2018和C2020）和流感患者（I2018、I2019和I2020）]，本研究进行了两个纵向线性混合模型（LMM）分析：T1-T2和T2-T3分析。首先对每个队列分别进行分析，然后使用随机效应荟萃分析方法进行组合。本研究进行了两项单独的荟萃分析，一项使用C2018和C2020结果，另一项使用I2018、I2019和I2020结果。在分析之前，通过秩的逆正态变换（R包“GenABEL”，函数rnttransform），将聚糖变量全部转换为标准正态分布[平均值=0，标准差（SD）=1]。在分析中使用秩转换变量可以使不同队列中不同聚糖的估计效果具有可比性，因为转换后的聚糖变量具有相同的标准差。使用Benjamini-Hochberg程序[函数p.adjust(method = “BH”)]控制错误发现率。使用R编程语言（版本4.0.2）对数据进行分析和可视化。

3. 结果

本研究使用HILIC-UHPLC对64名流感患者、77名COVID-19患者和56名健康对照者的PNGase F释放的IgG N-聚糖进行荧光标记和分析。获得的色谱图被整合成峰，其中大部分包含单个N-聚糖结构（见附录A中的图S1）[24]。根据获得的峰，计算出衍生的聚糖特征，代表了具有共同生物合成途径的结构相似的聚糖结构部分。仅对衍生性状进行统计分析，本研究没有观察到健康对照中IgG糖组有任何显著变化（见图1和图2，以及附录A中的图S2和图S3以及表S2）。

3.1. 半乳糖基化

本研究中，代表半乳糖基化水平的衍生性状为G0（所有不含半乳糖的聚糖）、G1（所有含有一种半乳糖的聚糖）和G2（所有含有两种半乳糖的聚糖）。IgG的半乳糖基化似乎对COVID-19非常敏感（见图1和表2，以及附录A中的表S3）。所有与半乳糖基化相关的特征在COVID-19患者中均发生显著变化，并且这些变化取决于COVID-19死亡率（见图3和表3，以及附录A中的表S4）。因此，已故的COVID-19患者中G0增加，而G1和G2减少。相比之下，COVID-19幸存者中IgG半乳糖基化保持相对稳定。同样，流感病毒感染组的半乳糖基化保持稳定（经过多次检测校正后，只有第二个和第三个时间点之间的G1增加仍然具有统计学意义）（见图2和表4，以及附录A中的图S3和表S5）。

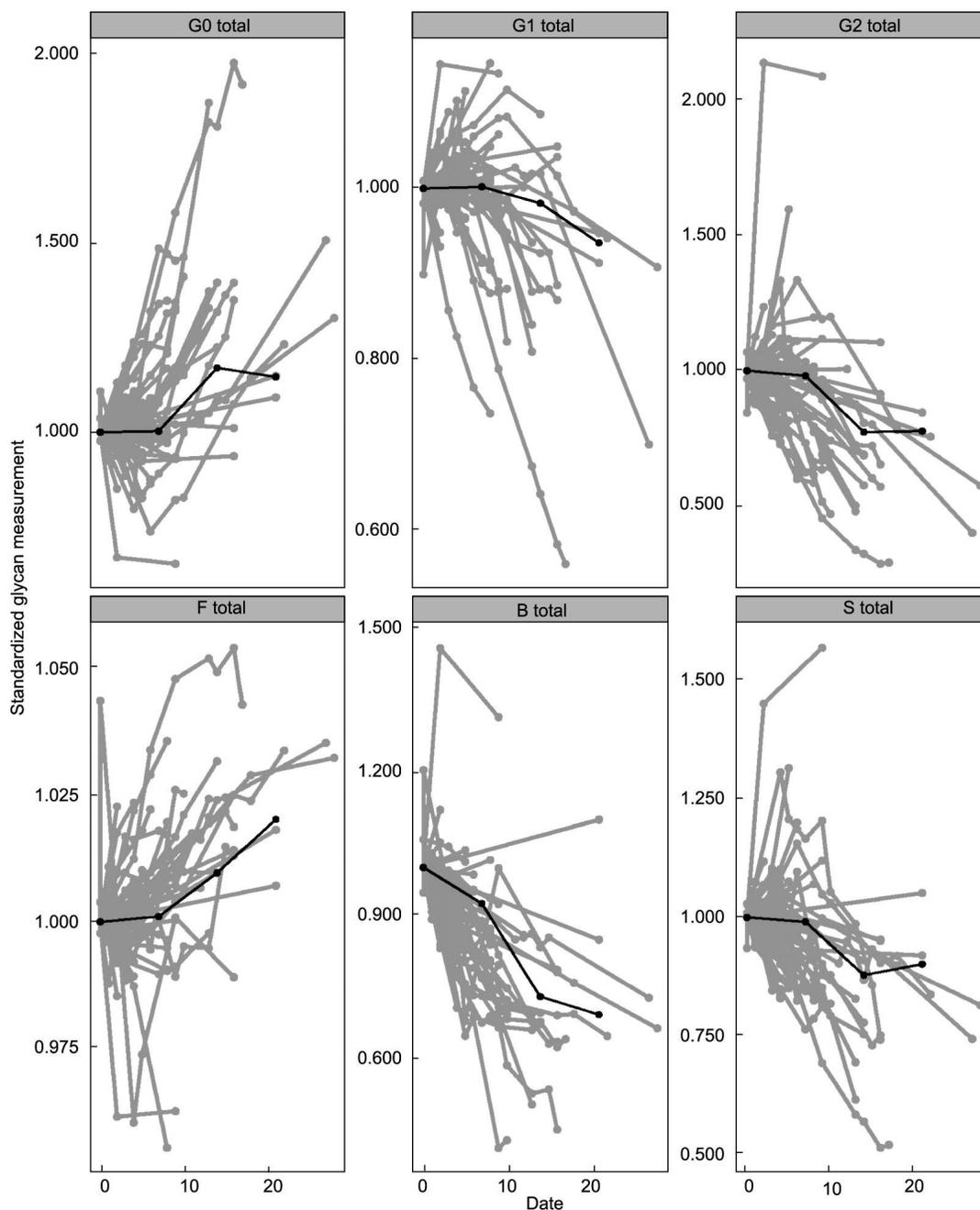


图1. 在 COVID-19 的一个季节期间 IgG 聚糖组成的变化。

3.2. 唾液酸化

本研究在所有患者组中都观察到 IgG N-聚糖末端唾液酸的添加发生了广泛且具有统计学意义的变化（图1和图2）。COVID-19 患者中 IgG 糖组中唾液酸稳步减少（见表2和附录A中的表S3）。然而，在流感病毒感染期间，在所有三个分析季节的第一个和第二个时间点之间观察到唾液酸化增加（这种变化未达到统计显著性；见附录A中的图S3）。在第二个和第三个时间点之间，唾液酸化聚糖结构的比例显著下降（见表4和附录A中的表S5）。

3.3. 岩藻糖基化

流感患者的所有时间点之间核心岩藻糖的存在都发生了很大变化。流感患者的核心岩藻糖水平在第一个和第二个时间点之间下降，但在第二个和第三个时间点之间上升（见图2和表4，以及附录A中的图S4和表S5）。然而，在 COVID-19 患者中，岩藻糖基化随着疾病进展而稳定增加，并且增加程度取决于疾病死亡率（图1和图3）；在死于 COVID-19 的患者组中，岩藻糖基化的增加更明显（见图3和表3以及附录A中的表S4）。

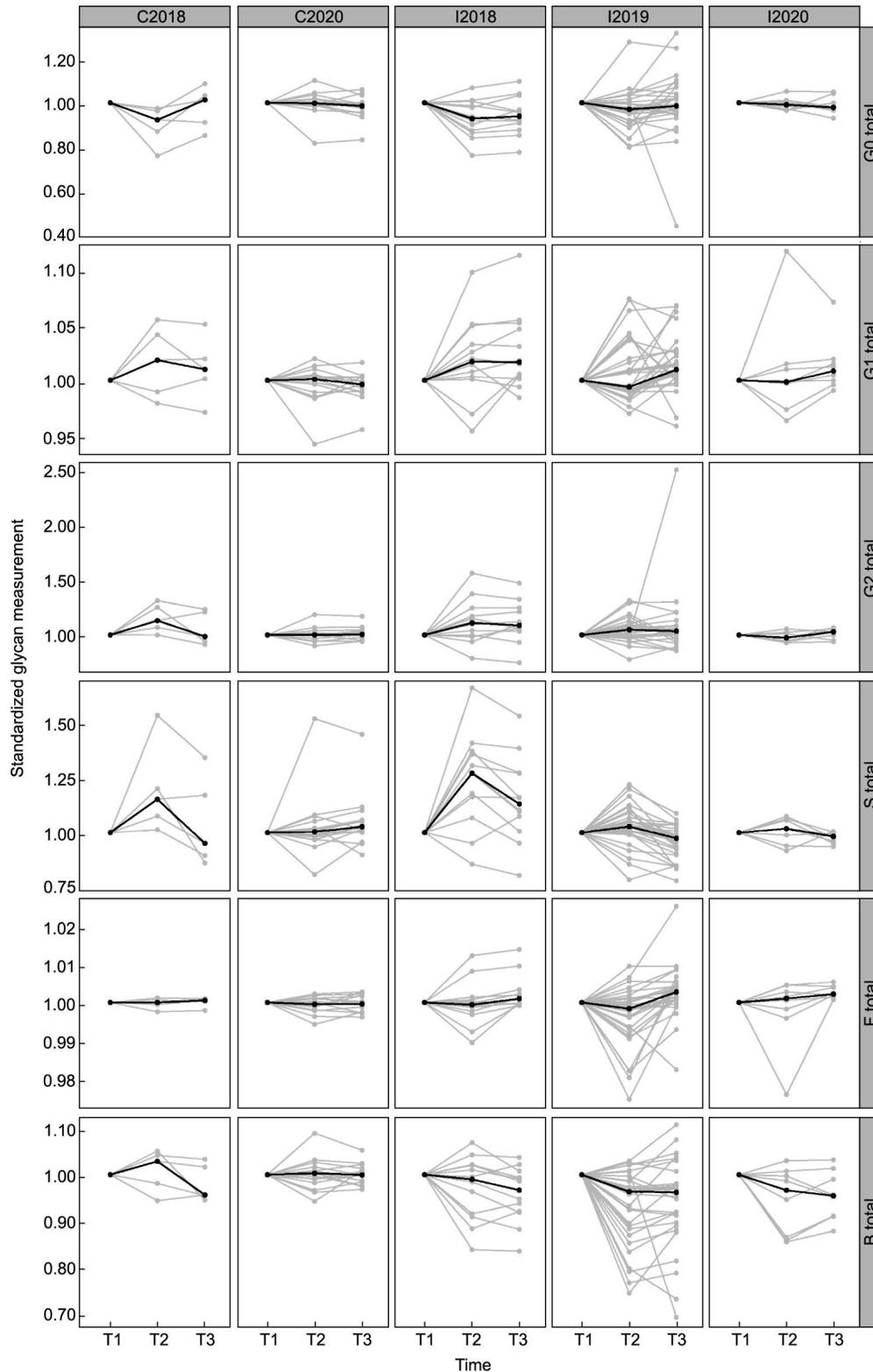


图2. 流感病毒感染三个季节期间IgG聚糖组成的变化。T: 时间点。

3.4. 平分型 GlcNAc 的存在

与岩藻糖基化不同，平分型 GlcNAc 的存在在两种疾病中均显著减少（图1和图2）。在流感患者中，第一和第二时间点之间的减少具有统计学显著性，而平分型 GlcNAc 的

存在存在在第二和第三时间点之间保持稳定（图2和表4以及表S5）。平分型 GlcNAc 存在的减少是 COVID-19 患者中 IgG 糖基化最显著的变化，并且无论疾病死亡率如何，平分型 GlcNAc 都存在（见图1、图3和表3以及附录A中的表S4）。

表2 COVID-19疾病与IgG N-糖组衍生性状变化的关联

Glycan trait	Effect ^a	Standard error	<i>P</i> value	Adjusted <i>P</i> value ^b
G0	0.0504	0.0120	0.0002	0.0003
G1	-0.0320	0.0128	0.0195	0.0195
G2	-0.0546	0.0128	0.0001	0.0003
F	0.0459	0.0105	0.0001	0.0003
B	-0.0857	0.0092	2.4×10^{-13}	1.4×10^{-12}
S	-0.0433	0.0109	0.0005	0.0006

^a Effect: model coefficient (slope) representing the change in a glycan trait (expressed in SD units) per unit of time.

^b Adjustment for multiple testing using the Benjamini–Hochberg procedure.

表3 COVID-19死亡率与IgG N-糖组衍生性状变化的关联

Glycan trait	Effect ^a	Standard error	<i>P</i> value	Adjusted <i>P</i> value ^b
G0	0.0774	0.0237	0.0025	0.0038
G1	-0.0845	0.0263	0.0023	0.0038
G2	-0.0839	0.0247	0.0016	0.0038
F	0.0704	0.0223	0.0025	0.0038
B	-0.0371	0.0200	0.0676	0.0677
S	-0.0467	0.0231	0.0558	0.0669

^a Effect: difference between two model coefficients (slopes), where each coefficient represents the group-specific change in the glycan trait (expressed in SD units) per unit of time.

^b Adjustment for multiple testing using the Benjamini–Hochberg procedure.

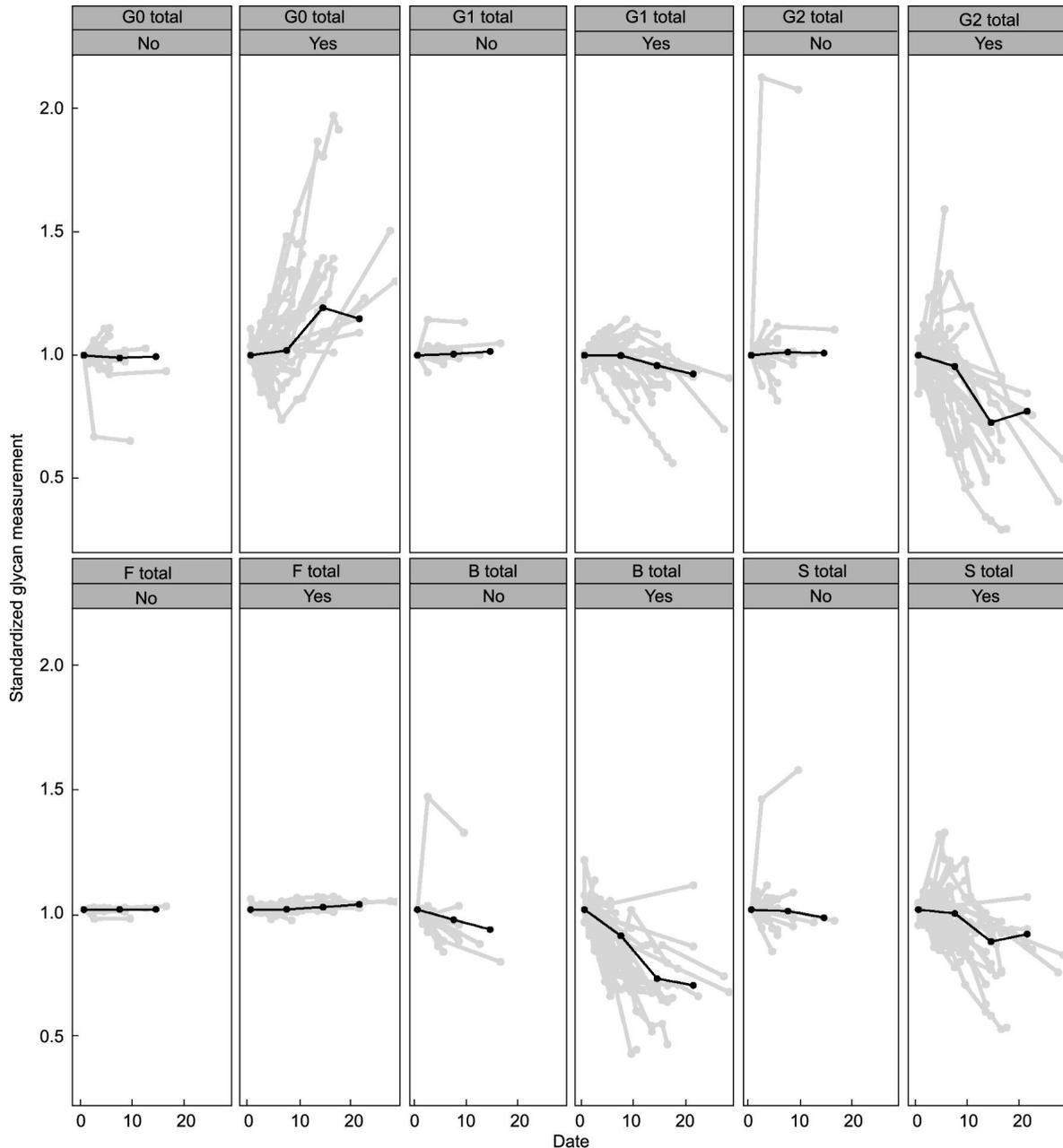


图3. COVID-19幸存者（否）和已故COVID-19患者（是）中IgG聚糖组成的变化。

表4 三个时间点之间流感疾病与IgG N-糖组衍生性状变化的关联

Glycan trait	Time	Effect ^a	Standard error	<i>P</i> value	Adjusted <i>P</i> value ^b
G0	T1-T2	-0.1534	0.0919	0.0950	0.2012
	T2-T3	0.0555	0.0726	0.4446	0.6402
G1	T1-T2	0.1388	0.0594	0.0195	0.0502
	T2-T3	0.1707	0.0674	0.0113	0.0314
G2	T1-T2	0.1223	0.0769	0.1120	0.2123
	T2-T3	0.0695	0.0620	0.2626	0.4491
S	T1-T2	0.2952	0.1687	0.0801	0.1803
	T2-T3	-0.4720	0.0681	4.2×10^{-12}	5.0×10^{-11}
F	T1-T2	-0.2266	0.0707	0.0013	0.0049
	T2-T3	0.4932	0.0768	1.3×10^{-10}	1.2×10^{-9}
B	T1-T2	-0.3693	0.0627	3.8×10^{-9}	2.7×10^{-8}
	T2-T3	0.0006	0.0637	0.9926	0.9926

^a Effect: model coefficient (slope) representing the change in a glycan trait (expressed in SD units) per unit of time.

^b Adjustment for multiple testing using the Benjamini-Hochberg procedure.

4. 讨论

本研究系统地检查了三个感染季节中流感患者IgG糖基化的变化，并将其与在COVID-19患者中观察到的变化进行了比较。这项研究首次探讨了SARS-CoV-2和流感病毒感染之间以及一般流感病毒感染中患者IgG糖基化的差异，目的是为了加深对包膜病毒免疫反应的了解。与包膜病毒免疫反应相关的最突出的IgG糖基化特征是核心岩藻糖基化。尽管二十年来人们都知道IgG N-聚糖中核心岩藻糖基化的缺失会增加ADCC [17]，但最近的研究才发现，核心岩藻糖水平的降低与对包膜病毒的免疫反应和病毒感染严重程度相关[19]。因此，COVID-19的严重程度与较低的抗原特异性IgG岩藻糖基化相关，而总IgG岩藻糖基化保持相对稳定[19]。本研究以及Petrović等[27]最近发表的一项研究中都观察到了COVID-19中总IgG岩藻糖基化的稳定性及其在更严重的COVID-19患者中的增加。然而，这是首次在总IgG水平上观察到流感病毒感染期间患者IgG岩藻糖基化的减少，而不是像最近针对包膜病毒所建议的那样，仅在抗原特异性IgG上观察到[19]。这使本研究结果更接近最近的一项研究，该研究将抗原特异性和总IgG的岩藻糖基化水平与登革热病毒二次感染的疾病严重程度相关联[28]。因此，这些结果表明，与上述最近发表的研究[19]相反，在某些包膜病毒（如流感病毒和登革热病毒）的总IgG上也可能观察到岩藻糖基化的变化。因此，IgG岩藻糖基化的这些差异可能是由涉及不同病毒感染的系统免疫反应的不同分子机制驱动的。事实上，流感

和SARS-CoV-2感染之间的细胞因子环境有所不同[29]。流感病毒感染已被证明会触发多种不同细胞因子的释放，其中干扰素- α (IFN α) 是最突出的细胞因子之一[30]。IFN α 已与IgG聚糖的较低核心岩藻糖基化相关，增加IgG Fc对Fc γ 受体Fc γ RIIIA和Fc γ RIIIB的亲和力，激活Fc γ 受体，从而激活自然杀伤(NK)细胞，进而显著增强ADCC [14,31]。另外，I型和II型IFN级联似乎在SARS-CoV-2感染中失调[29]，这可能是抗原特异性糖基化调节的潜在原因。

本研究发现，与岩藻糖基化相反，半乳糖基化在流感患者和COVID-19幸存者中似乎保持稳定，但在已故的COVID-19患者中发生显著变化，导致半乳糖基化IgG分子丰度更高。IgG N-糖组中半乳糖的损失已经与较高的促炎性IgG功能相关，在与甘露糖结合凝集素结合后，通过旁路途径和（或）凝集素途径触发补体激活[14]。然而，由于流感病毒感染期间没有核心岩藻糖的N-聚糖比例很高，未改变的IgG半乳糖基化可能作为一种控制机制发挥作用，因为它可能通过与抑制性受体Fc γ RIIB结合来启动抗炎信号级联反应[14]。

同样，IgG糖组中平分型GlcNAc的存在与其促炎活性相关[14]，并且本研究发现其在本次研究的两种传染病中均会减少。在COVID-19患者中，IgG糖组的减少至少一部分原因是核心岩藻糖的存在，而且对平分型GlcNAc的添加具有抑制作用[32]。相比之下，在流感病毒感染患者中，观察到IgG N-糖组中核心岩藻糖基化和平分型GlcNAc的添加均减少，尽管预计它们会向相反方向移动[14]。然而，本研究的观察结果（尽管很难解释）与流感疫苗接种后观察到的抗原特异性IgG糖基化变化一致[33-34]。

此外，流感患者在第一个和第二个时间点之间的唾液酸化增加，尽管没有统计学意义，但可能是由抗原特异性IgG的合成驱动[33]。这些唾液酸化IgG抗体是影响流感抗原反应质量的因素之一，通过与II型Fc受体CD23 (C型凝集素) 结合，提高Fc γ RIIIB (一种抑制性I型Fc受体) 在激活的B细胞上的表达[33]。此外，唾液酸对于流感病毒成功附着于细胞是必需的。因此，IgG Fab区域唾液酸化的增加可能会通过模仿唾液酸化受体来阻断这种附着[35]。在流感患者中，唾液酸化最初增加，随后在第二个和第三个时间点之间减少，而在COVID-19患者中，唾液酸化持续减少。这种转变（向更促炎性IgG糖组图谱转变）可能是长期感染过程中通过激活I型Fc γ 受体产生的适应性机制的结果[14,33]。就流感患者而言，这也可能是IgG产生（从浆母细胞转移到记忆B细胞）的结果，正如

在流感疫苗接种后三周观察到的那样[33]。

总而言之，这些IgG糖组变化表明IgG糖基化是一个动态且严格调控的过程，能够微调针对特异性病原体的免疫反应。因此，在流感病毒感染样本中，可以通过降低其岩藻糖基化来增加细胞毒性，而较高的唾液酸化可以中和病毒感染并促进高亲和力和广泛中和的IgG的产生。另外，本研究表明，在COVID-19患者感染期间，总IgG糖组很容易发生变化，并且这些糖组变化不一定与抗原特异性IgG中观察到的变化相同。此外，COVID-19患者中的一些IgG糖基化特征（如岩藻糖基化）并不遵循在流感患者中观察到的IgG糖基化模式。然而，流感患者和COVID-19幸存者之间的IgG糖基化动态重叠程度高于前者 and 已故COVID-19患者之间的重叠程度，说明IgG糖基化具有更明显的促炎特征。这一发现可能表明，COVID-19幸存者的免疫反应与其他包膜病毒的一般免疫反应有些相似，而已故的COVID-19患者的免疫反应则变得更加异常。因此，这些差异可以用作病毒感染期间异常免疫反应的潜在生物标志物。然而，需要进一步的实验来完全阐明本研究中观察到的糖基化变化背后的分子机制。

Acknowledgements

This work was supported by the European Structural and Investment Funds grant for the Croatian National Centre of Competence in Molecular Diagnostics (KK.01.2.2.03.0006); and the Croatian National Centre of Research Excellence in Personalized Healthcare grant (KK.01.1.1.01.0010). This work was also supported by the Human Glycome Project. Equipment and products from Waters and New England Biolabs®, Inc., were used for this research.

Compliance with ethics guidelines

The authors declare the following financial interests/personal relationships, which may be considered as potential competing interests: Gordan Lauc is the founder and owner, and Tea Petrović, Frano Vučković, Irena Trbojević-Akmačić, and Ivan Gudelj are employees of Genos Ltd., a company that specializes in highthroughput glycomics and has several patents in this field. The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed

as a potential conflict of interest. The study was approved by the Ethics Committee of the University Hospital Dubrava and the University Hospital for Infectious Diseases (Ref. No. 01-1490-2-2017), Croatia, and performed in accordance with the *Declaration of Helsinki*. The patients and healthy controls were informed about the purpose of the study and gave their written informed consent.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.eng.2022.08.007>.

References

- [1] Szucs T. The socio-economic burden of influenza. *J Antimicrob Chemother* 1999;44(Suppl B):11–5.
- [2] Suthar S, Das S, Naggure A, Madhurantakam C, Tiwari SB, Gahlot P, et al. Epidemiology and diagnosis, environmental resources quality and socio-economic perspectives for COVID-19 pandemic. *J Environ Manage* 2021;280:111700.
- [3] Piroth L, Cottenet J, Mariet AS, Bonniaud P, Blot M, Tubert-Bitter P, et al. Comparison of the characteristics, morbidity, and mortality of COVID-19 and seasonal influenza: a nationwide, population-based retrospective cohort study. *Lancet Respir Med* 2021;9(3):251–9.
- [4] Petersen E, Koopmans M, Go U, Hamer DH, Petrosillo N, Castelli F, et al. Comparing SARS-CoV-2 with SARS-CoV and influenza pandemics. *Lancet Infect Dis* 2020;20(9):e238–44.
- [5] Wang D, Hu B, Hu C, Zhu F, Liu X, Zhang J, et al. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia. *JAMA* 2020;323(11):1061–9.
- [6] Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus. *Lancet* 2020;395(10223):497–506.
- [7] Thevarajan I, Nguyen THO, Koutsakos M, Druce J, Caly L, van de Sandt CE, et al. Breadth of concomitant immune responses prior to patient recovery: a case report of non-severe COVID-19. *Nat Med* 2020;26(4):453–5.
- [8] Wrarmert J, Koutsonanos D, Li GM, Edupuganti S, Sui J, Morrissey M, et al. Broadly cross-reactive antibodies dominate the human B cell response against 2009 pandemic H1N1 influenza virus infection. *J Exp Med* 2011;208(1):181–93.
- [9] Chiu C, Ellebedy AH, Wrarmert J, Ahmed R. B cell responses to influenza infection and vaccination. *Curr Top Microbiol Immunol* 2015;386:381–98.
- [10] Plebani A, Ugazio AG, Avanzini MA, Massimi P, Zonta L, Monafò V, et al. Serum IgG subclass concentrations in healthy subjects at different age: age normal percentile charts. *Eur J Pediatr* 1989;149(3):164–7.
- [11] 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.
- [12] Vidarsson G, Dekkers G, Rispen T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol* 2014;5:520.
- [13] Kobata A. The N-linked sugar chains of human immunoglobulin G: their unique pattern, and their functional roles. *Biochim Biophys Acta* 2008;1780(3):472–8.
- [14] Gudelj I, Lauc G, Pezer M. Immunoglobulin G glycosylation in aging and diseases. *Cell Immunol* 2018;333:65–79.
- [15] Lux A, Yu X, Scanlan CN, Nimmerjahn F. Impact of immune complex size and glycosylation on IgG binding to human FcγRs. *J Immunol* 2013;190(8):4315–23.
- [16] Czajkowsky DM, Andersen JT, Fuchs A, Wilson TJ, Mekhaieil D, Colonna M, et al. Developing the IVIG biomimetic, hexa-Fc, for drug and vaccine applications. *Sci Rep* 2015;5(1):9256.

- [17] Shields RL, Lai J, Keck R, O'Connell LY, Hong K, Meng YG, et al. Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human FcγRIII and antibody-dependent cellular toxicity. *J Biol Chem* 2002;277(30):26733–40.
- [18] Forthal DN, Gach JS, Landucci G, Jez J, Strasser R, Kunert R, et al. Fc-glycosylation influences Fcγ receptor binding and cell-mediated anti-HIV activity of monoclonal antibody 2G12. *J Immunol* 2010;185(11):6876–82.
- [19] Larsen MD, de Graaf EL, Sonneveld ME, Plomp HR, Nouta J, Hoepel W, et al. Afucosylated IgG characterizes enveloped viral responses and correlates with COVID-19 severity. *Science* 2021;371(6532):eabc8378.
- [20] Hoepel W, Chen HJ, Geyer CE, Allahverdiyeva S, Manz XD, de Taeye SW, et al. High titers and low fucosylation of early human anti-SARS-CoV-2 IgG promote inflammation by alveolar macrophages. *Sci Transl Med* 2021;13(596):eabf8654.
- [21] Ackerman ME, Crispin M, Yu X, Baruah K, Boesch AW, Harvey DJ, et al. Natural variation in Fc glycosylation of HIV-specific antibodies impacts antiviral activity. *J Clin Invest* 2013;123(5):2183–92.
- [22] Wang TT, Sewatanon J, Memoli MJ, Wrammert J, Bournazos S, Bhaumik SK, et al. IgG antibodies to dengue enhanced for FcγRIIIA binding determine disease severity. *Science* 2017;355(6323):395–8.
- [23] Larsen MD, de Graaf EL, Sonneveld ME, Plomp HR, Nouta J, Hoepel W, et al. Afucosylated IgG characterizes enveloped viral responses and correlates with COVID-19 severity. *Science* 2021;371(6532):eabc8378.
- [24] Pucić M, Knezević A, Vidić J, Adamczyk B, Novokmet M, Polašek O, et al. High throughput isolation and glycosylation analysis of IgG-variability and heritability of the IgG glycome in three isolated human populations. *Mol Cell Proteomics* 2011;10(10):010090.
- [25] Deriš H, Cindrić A, Lauber M, Petrović T, Bielik A, Taron CH, et al. Robustness and repeatability of GlycoWorks RapiFluor-MS IgG N-glycan profiling in a long-term high-throughput glycomic study. *Glycobiology* 2021;31(9):1062–7.
- [26] Keser T, Pavić T, Lauc G, Gornik O. Comparison of 2-aminobenzamide, procainamide and RapiFluor-MS as derivatizing agents for high-throughput HILIC-UPLC-FLR-MS N-glycan analysis. *Front Chem* 2018;6:324.
- [27] Petrović T, Alves I, Bugada D, Pascual J, Vučković F, Skelin A, et al. Composition of the immunoglobulin G glycome associates with the severity of COVID-19. *Glycobiology* 2021;31(4):372–7.
- [28] Bournazos S, Vò HTM, Duong V, Auerswald H, Ly S, Sakuntabhai A, et al. Antibody fucosylation predicts disease severity in secondary dengue infection. *Science* 2021;372(6546):1102–5.
- [29] Olbei M, Hautefort I, Modos D, Treveil A, Poletti M, Gul L, et al. SARS-CoV-2 causes a different cytokine response compared to other cytokine storm-causing respiratory viruses in severely ill patients. *Front Immunol* 2021;12:629193.
- [30] Liu Q, Zhou YH, Yang ZQ. The cytokine storm of severe influenza and development of immunomodulatory therapy. *Cell Mol Immunol* 2016;13(1):3–10.
- [31] Giron LB, Colomb F, Papasavvas E, Azzoni L, Yin X, Fair M, et al. Interferon-α alters host glycosylation machinery during treated HIV infection. *EBioMedicine* 2020;59:102945.
- [32] Kurimoto A, Kitazume S, Kizuka Y, Nakajima K, Oka R, Fujinawa R, et al. The absence of core fucose up-regulates GnT-III and Wnt target genes: a possible mechanism for an adaptive response in terms of glycan function. *J Biol Chem* 2014;289(17):11704–14.
- [33] Wang T, Maamary J, Tan G, Bournazos S, Davis C, Krammer F, et al. Anti-HA glycoforms drive B cell affinity selection and determine influenza vaccine efficacy. *Cell* 2015;162(1):160–9.
- [34] Irvine EB, Alter G. Understanding the role of antibody glycosylation through the lens of severe viral and bacterial diseases. *Glycobiology* 2020;30(4):241–53.
- [35] Huang T, Chen X, Zhao C, Liu X, Zhang Z, Li T, et al. Sialylated immunoglobulin G can neutralize influenza virus infection through receptor mimicry. *Oncotarget* 2016;7(13):15606–17.