

论 著

(临床研究)

细胞因子对 IgA 肾病患者 IgA1 O-糖基化的影响
及相关机制研究

黄 海, 列才华, 梁兰青, 屈 珊, 郭志勇

【摘要】 目的 探讨细胞因子对 IgA 肾病(IgAN)患者 IgA1 O-糖基化的影响,分析相关影响机制。 **方法** 选取 2017 年 4-10 月于新疆军区总医院肾内科就诊的 IgAN 患者 35 例作为 IgAN 组,招募同期于医院就诊的健康志愿者 15 例作为对照组。对 2 组人群的 IgA1 分泌细胞与细胞因子共培养,观察细胞因子对 IgA1 O-糖基化的影响及对 C1GalT1 和 ST6GalNAc-II 酶活性和表达基因的影响;采用 siRNA 敲低技术,干扰 IgA1 分泌细胞中 C1GALT1 和(或)ST6GALNAC2 的表达,验证细胞因子与之相关性;开发基于假设的体外测定,进一步诠释细胞因子对 IgAN 患者 IgA1 O-糖基化的影响机制。 **结果** IL-6 可显著促进 IgA1 的产生($P<0.05$),显著增加 IgA1 半乳糖缺乏($P<0.05$),对 IgAN 患者作用更明显($P<0.05$)。IL-6 显著增加 ST6GalNAc-II 活性($P<0.05$),显著降低 C1GalT1 活性($P<0.01$);IL-6 显著上调 ST6GALNAC2 基因表达,同时显著降低 C1GALT1 和 COSMC 基因表达($P<0.01$),与测定酶活性变化一致。siRNA 干扰技术使每个基因 mRNA 水平降低了 65%~75%。C1GALT1 敲除显著促进 IgAN 细胞和对照组的 IgA1 半乳糖缺乏($P<0.05$);ST6GALNAC2 敲减仅明显降低 IgAN 细胞分泌的 IgA1 半乳糖缺乏($P<0.05$),敲低后分泌的 IgA1 半乳糖含量与对照组相当。IgA1 O-聚糖的有效半乳糖基化可以通过过早的唾液酸化实质性降低。 **结论** 细胞因子 IL-6 通过对 IgAN 患者 ST6GALNAC2 和 C1GALT1 酶的活性及其基因表达调节,上调 IgAN 患者 IgA1 的半乳糖缺乏,进而增加免疫复合物形成和导致疾病恶化。

【关键词】 糖基化;IgA 肾病;免疫球蛋白 A1;O-聚糖

【中图分类号】 R392.8

【文献标志码】 A

【文章编号】 1672-271X(2019)01-0044-05

【DOI】 10.3969/j.issn.1672-271X.2019.01.010

Effects of cytokines on IgA1 O-glycosylation in IgAN and its related mechanisms

HUANG Hai¹, LIE Cai-hua², LIANG Lan-qing², QU Shan², GUO Zhi-yong¹

(1. Department of Nephrology, Changhai Hospital, Naval Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Nephrology, Xinjiang Military Area General Hospital, Urumqi 830002, Xinjiang, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effects of cytokines on IgA1 O-glycosylation in IgAN patients and to analyze the related mechanisms. **Methods** 35 IgAN patients who were admitted to the Department of Nephrology, General Hospital of Xinjiang Military Region from April to October 2017 were selected as IgAN group, and 15 healthy volunteers who were admitted to our hospital at the same time were recruited as Controls group. The co-culture of IgA1-secreting cells from IgAN and Controls co-cultured with cytokines to observe the effects of cytokines on IgA1 O-glycosylation and the differences in cytokines on the activity of C1GalT1 and ST6GalNAc-II and the expression of genes; siRNA knockdown technique was used to interfere with the expression of C1GALT1 and / or ST6GALNAC2 in IgA1-secreting cells from IgAN patients and healthy controls respectively to verify the correlation between cytokines;

基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金(2015211C236)

作者单位:200433 上海,海军军医大学长海医院肾内科(黄 海、郭志勇);830002 乌鲁木齐,新疆军区总医院肾内科(列才华、梁兰青、屈 珊)

通信作者:郭志勇, E-mail:814651597@qq.com

The hypothesis-based in vitro assay was developed to further elucidate the mechanism by which cytokines affect IgA1 O-glycosylation in IgAN patients. **Results** IL-6 significantly increased the production of IgA1 ($P<0.05$), and promoted the expression of IgA1 in patients with IgAN ($P<0.05$); IL-6

significantly increased the secretion of IgA1-galactose in both groups. The effect was more significant ($P < 0.01$). IL-6 significantly increased the activity of ST6GalNAc-II ($P < 0.05$) and significantly decreased the activity of C1GalT1 ($P < 0.01$); IL-6 significantly increased the expression of ST6GALNAC2 gene and significantly decreased the expression of C1GALT1 and COSMC genes ($P < 0.05$). Consistent with the measured changes in enzyme activity. The efficiency of siRNA interference technology reduced the mRNA level of each gene by 65-75%. C1GALT1 knockdown significantly promoted the lack of IgA1-galactose secretion in IgAN patients and healthy control cells ($P < 0.05$), while knockdown of ST6GALNAC2 was only significantly reduced. The amount of IgA1-galactose secreted by IgAN patients was similar to that of healthy controls ($P < 0.05$). Effective galactosylation of IgA1 O-glycans can be substantially reduced by premature sialylation. **Conclusion** The cytokine IL-6 up-regulates IgA1 O-glycosylation in IgAN patients by modulating the activity and gene expression of ST6GALNAC2 and C1GALT1 in patients with IgAN, thereby increasing the formation of immune complexes and leading to disease progression and “hyper-biasidization” of GalNAc may be a mechanism of IgA1 O-glycan galactose deficiency in IgAN patients.

[Key words] glycosylation; IgA nephropathy; IgA1; O-glycans

0 引言

IgA 肾病(IgAN)是世界范围内最常见的原发性肾小球肾炎,也是肾功能衰竭的重要原因之一^[1],其病理表现为肾小球中半乳糖缺陷的 O-聚糖 IgA1(Gd-IgA1)复合物的沉积^[2],活化、刺激系膜细胞增殖和细胞外基质的过度产生,致肾小球损伤^[3]。正常人血清中 IgA1 含有少量或不含半乳糖缺陷的 O-聚糖,IgAN 患者 IgA1 水平升高,半乳糖缺陷的 O-聚糖的 IgA1 比例增高,IgA1 糖基化被改变,最终导致异常免疫复合物的形成^[4]。研究显示 IgAN 的尿尿与黏膜感染相关,并伴有血清肿瘤坏死因子(TNF)和 IL-6 水平升高^[5]。有研究证实,一些细胞因子可影响免疫球蛋白糖基化,如 IL-4 和 IL-5 能改变鼠 IgA1 的 N-糖基化^[6],IL-4 能促进 IgA1 的半乳糖缺陷^[7]。但这些研究都没使用 IgAN 患者自身的 IgA1 细胞,细胞因子与患者 IgA1 的缺陷关系仍不明确,尚未见相关深入报道。本研究旨在探讨细胞因子对 IgA1 O-糖基化的影响。

1 资料与方法

1.1 研究对象的样本采集 选取 2017 年 4-10 月于新疆军区总医院肾内科就诊的 IgAN 患者 35 例作为 IgA 肾病组(IgAN 组),肾活检时收集血清样品;招募同期于本院就诊的健康志愿者 15 例作为对照组,收集血清样本。IgAN 组男 16 例,女 19 例,平均年龄(42.3 ± 5.4)岁;对照组男 7 例,女 8 例,平均年龄(40.5 ± 4.2)岁,2 组在性别、年龄等方面差异无统计学意义。本研究通过医院伦理委员会审核批准(批准号:2017 伦审第 104 号),所有入组患者均签署知情同意书。

1.2 细胞因子对 IgA1 O-聚糖的半乳糖缺乏的影响测定方法

1.2.1 细胞培养和细胞因子治疗 IgAN 组和对照

组 B 细胞提取后用 Epstein-Barr 病毒转染永生,亚克隆进行筛选获得产生 IgA1 细胞系的克隆,培养 7 d 后细胞因子刺激(IL-1, $10 \mu\text{g/mL}$; IL-4, 2 ng/mL ; IL-6, 8 ng/mL ; IL-10, 7.5 ng/mL ; IFN- γ , 7.5 ng/mL ; TGF β , 2 ng/mL ; TNF- α , 1 ng/mL)。对照组不添加任何细胞因子。

1.2.2 ELISA 测量半乳糖缺陷型 IgA1 将山羊抗人 IgA 的 F(ab')₂ 片段包被在 ELISA 平板上。应用系列稀释样品,唾液酸苷酶处理 IgA 以除去唾液酸残基。洗涤后,将样品与分离自 *Helix aspersa* (HAA; Sigma)的生物素标记的 GalNAc 特异性凝集素反应,然后与 HRP-抗生物素蛋白和过氧化物酶底物反应。

1.3 细胞因子对糖基转移酶的影响测定方法

1.3.1 C1GalT1 和 ST6GalNAc-II 酶活性测定 将 $2 \mu\text{g}$ 脱唾液酸化的 Gd-IgA1 骨髓瘤蛋白质作受体, 100 mmol CMP-N-乙酰神经氨酸作供体,用 IgAN 的 10^6 IgA1 生成细胞的 $10 \mu\text{L}$ 高尔基体富集成分作 ST6GalNAc-II 的来源, 37°C 反应 4 h,用 IgAN 或来自对照组 10^6 IgA1 产生细胞作酶来源,和 0.4 mmol UDP-半乳糖作半乳糖供体的 $10 \mu\text{L}$ 高尔基体富集成分, 37°C 反应 4 h,用凝集素 ELISA 标准化的 IgA1 测量 HAA 与 IgA1 蛋白的结合。

1.3.2 qRT-PCR 分析 使用第一链 cDNA 合成试剂盒,将 RNA 反转成 cDNA。SYBR[®] Green Realtime PCR Master Mix 进行荧光标记,ABI7500 实时荧光定量 PCR 仪进行 qRT-PCR 确定 C1GALT1、COSMC 和 ST6GALNAC2 转录物的水平, β -actin 为内参。

1.4 siRNA 敲低对 IgA1 半乳糖缺乏的影响测定方法 C1GALT1 和 ST6GALNAC2 siRNA 处理:将人

C1GALT1 或 ST6GALNAC2 siRNA 转染至 3 例 IgAN 和 3 例健康个体的 EBV 永生化细胞系。即将细胞系接种培养 24 h, 转染前, 300 g 离心 10 min 后收集, 室温下以 $2.5 \times 10^6/100 \mu\text{L}$ 的密度重悬浮, 加入 1.4 μg siRNA, 在 Amaxa nucleofector II 中脉冲转染细胞, 后转移到 24 孔板中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中孵育。转染后 24 h, qRT-PCR 检测敲低效率。

1.5 过早唾液酸化对 IgA1 O-聚糖半乳糖基化的影响测定方法 IgAN 组和对照组 IgA1 的富含高尔基体制剂作为 ST6GalNAc-II 和 C1GalT1 酶的各自来源, 使用 IgAN 组具有 ST6GalNAc-II 高活性的 IgA1 高尔基体富集制剂进行 Gd-IgA1 体外酶唾液酸化, 将预唾液酸化 IgA1 蛋白与 IgAN 组 IgA1 或对照组高尔基体富集制剂中的 C1GalT1 进行半乳糖基化反应。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 14.0 软件进行分析, 所有数据均以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 统计样本每组多于 5 个, 2 组间比较采用 t 检验, 多组间比较采用方差分析, 以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

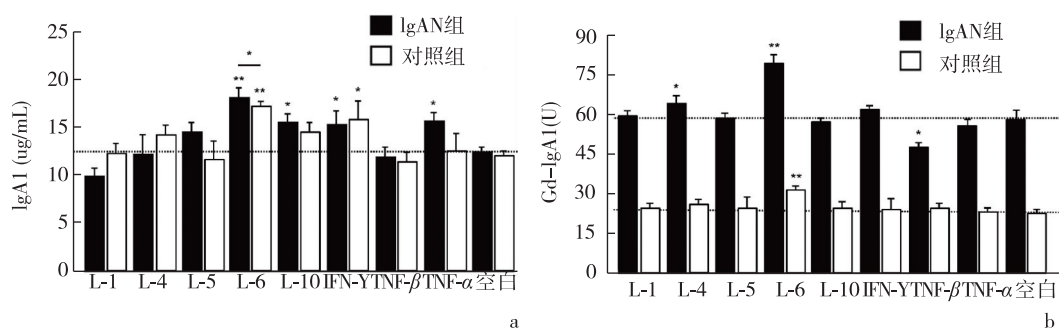
2 结 果

2.1 细胞因子对 IgA1 O-聚糖的半乳糖缺乏的影响 IL-6、IL-10、IFN- γ 和 TNF- α 在一定程度上促进 IgA1 产生 ($P < 0.05$), 其中 IL-6 促进作用最明显 ($P < 0.01$), 对 IgAN 组的促进作用较对照组更明显 ($P < 0.05$)。IL-6 显著增加 2 组 IgA1 的半乳糖缺乏, 其中对 IgAN 组患者分泌的 IgA1 半乳糖缺陷影响更显著 ($P < 0.01$), 而对照组细胞刺激前后分泌的 IgA1 的作用差异也具有统计学意义 ($P < 0.01$)。见图 1。

2.2 细胞因子对糖基转移酶的影响 IL-6 处理增加 ST6GalNAc-II 活性 ($P < 0.05$), 见图 2a, 降低 C1GalT1 活性 ($P < 0.01$), 见图 2b。IL-4 对两种酶活性的作用, 发现 ST6GalNAc-II 活性没有变化, 见图 2a, C1GalT1 活性降低 ($P < 0.05$), 见图 2b。qRT-PCR 发现 IL-6 上调 ST6GALNAC2 基因的表达, 降低 C1GALT1 和 COSMC 基因的表达 ($P < 0.01$), 与测定酶活性变化一致。IL-4 仅降低 C1GALT1 和 COSMC 基因的表达, ST6GALNAC2 表达不受影响, 与测量酶活性变化一致 ($P < 0.05$), 见图 2c。

2.3 siRNA 敲低对 2 组 IgA1 半乳糖缺乏的影响 qRT-PCR 显示, siRNA 干扰技术使每个基因 mRNA 水平降低了 65%~75%, 见图 3a。C1GALT1 敲减促进 IgAN 组和对照组细胞分泌的 IgA1 的半乳糖进一步缺乏 ($P < 0.05$), 见图 3b。ST6GALNAC2 敲减仅降低由 IgAN 组细胞分泌的 IgA1 中的半乳糖缺乏 ($P < 0.05$), 见图 3b, 敲低后, IgAN 组分泌的 IgA1 上的半乳糖含量与对照组相当。以上证实了 C1GalT1 和 ST6GalNAc-II 在 Gd-IgA1 生成中的作用。另外, 通过 IgAN 组患者细胞敲减 ST6GALNAC2 的结果指出唾液酸转移酶的特定作用, 敲减增加了 IgAN 组患者 IgA1 上的半乳糖缺陷未影响对照组, 见图 3b。

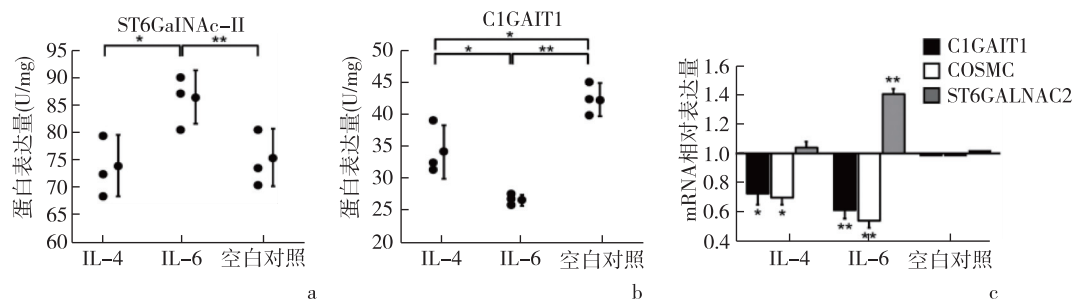
2.4 过早唾液酸化对 IgA1 O-聚糖半乳糖基化的影响 结果显示 Gd-IgA1 蛋白的唾液酸化阻断了随后的半乳糖基化, 见图 4b, 6~9 列, 但唾液酸化阻断并不完全, 因为与 C1GalT1 反应前相比, C1GalT1 反应后 HAA 反应性降低, 见图 4b, 3、7、9 列, 由此可见, IgA1 O-聚糖的有效半乳糖基化可以通过过早的唾液酸化实质性降低。



a: IgA1; b: Gd-IgA1

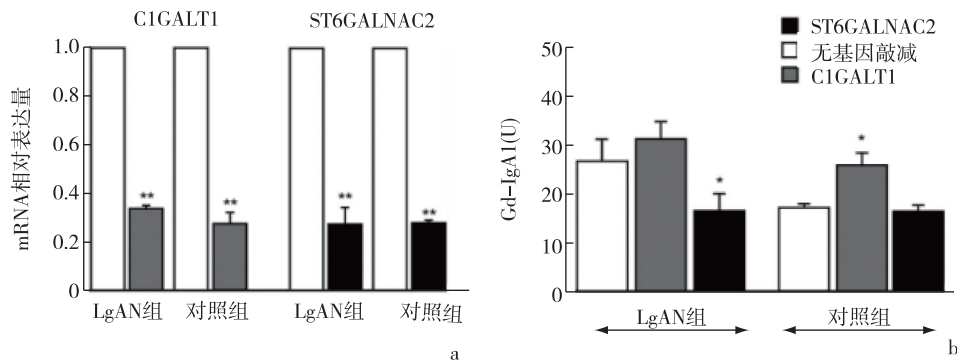
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图 1 细胞因子对 2 组细胞 IgA1 及半乳糖缺乏 IgA1 的影响



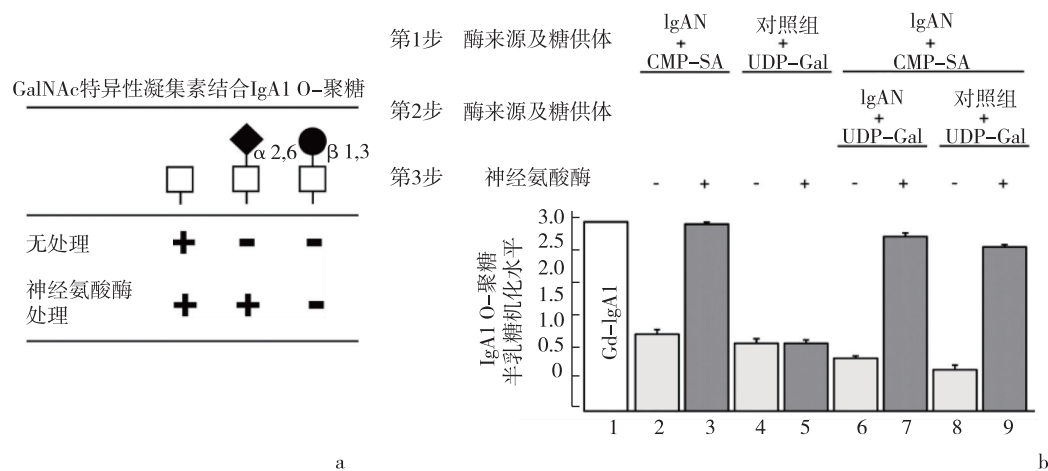
a; ST6GalNAc- II 活性; b; C1GalT1 活性; c; C1GALT1、COSMC、ST6GALNAC2 基因表达
* $P<0.05$ 、** $P<0.01$

图 2 细胞因子对糖基转移酶的表达及活性影响



a; siRNA 对 C1GALT1、ST6GALNAC2 基因表达影响; b; 基因敲减对半乳糖缺乏影响
* $P<0.05$ 、** $P<0.01$

图 3 siRNA 敲低对 2 组 IgA1 半乳糖缺乏的影响



a; 预唾液酸化; b; 预唾液酸化 IgA1 O-聚糖半乳糖基反应结果
1~5: IgAN 组和对照组 IgA1 的富含高尔基体制剂作为 ST6GalNAc-II 和 C1GalT1 酶的各自来源的反应结果; 6~7: 与 IgAN 组 IgA1 的反应结果; 8~9: 与对照组高尔基体富集制剂中的 C1GalT1 的反应结果
图 4 过早唾液酸化降低 IgA1 O-聚糖有效半乳糖基化的体外测定结果

3 讨 论

Gd-IgA1 是由于 IgA1 分泌细胞中 O-聚糖生物合成途径中几种酶的失调而引起^[8]。研究表明血清中 Gd-IgA1 和抗-Gd-IgA1 抗体的水平预示着 IgAN 患者

的临床进展^[9]。研究表明肉眼血尿的出现常与黏膜感染相关, 最常见于上呼吸道或消化系统^[10]。越来越多的证据表明, IgAN 患者的黏膜天然免疫防御遗传异常^[11], 这些黏膜感染可能改变 B 细胞和免疫球蛋白生成细胞, 包括分泌 IgA1 的细胞因子环境。

在本研究中,我们证实了 IL-6 是影响 IgA1 糖基化的最活跃的细胞因子。体外培养增加了 IgA 患者和对照组患者的 Gd-IgA1 的产生及其半乳糖缺乏的程度。然而,IL-6 刺激后,对照组细胞分泌的 IgA1 的半乳糖缺乏程度低于无 IL-6 刺激的 IgAN 患者细胞分泌的 IgA1。这一观察结果与早期的文献 [12] 报道一致,表明 IgA1 O-糖基化通常在不同的免疫应答中有所不同,而 IgAN 患者则产生全谱的 IgA1 O-糖型。在本研究中,IL-6 调节 IgA1 O-糖基化。值得注意的是,IL-6 主要在急性和慢性炎症部位产生,并对局部免疫球蛋白分泌发挥重要的调节作用。例如,上皮细胞将 IL-6 浓度升高到比在循环中观察到的更高的程度^[13]。在我们的测定中使用的 IL-6 的量与通过 LPS 体外刺激的肠上皮细胞产生的量相当。由于 IL-6 是影响免疫球蛋白生成细胞和浆细胞终末分化的主要细胞因子^[14],它可以在多个水平调节黏膜免疫应答,包括分泌的 IgA1 的翻译后修饰。

IgAN 患者细胞敲除 ST6GALNAC2,结果增加了 IgAN 组患者 IgA1 上的半乳糖缺陷,但未影响对照组患者 IgA1 上的半乳糖缺陷。假设 GalNAc 在 IgA1 上的过早唾液酸化可能抑制随后的半乳糖基化,并开发了基于以下假设的体外测定:①GalNAc 特异性凝集素 HAA 结合 Gd-IgA1 末端 GalNAc,不结合唾液酸化或半乳糖化 GalNAc;②神经氨酸酶从唾液酸化的 GalNAc 中去除唾液酸,用于 HAA 结合;③GalNAc 上的半乳糖不受神经氨酸酶影响。使用 IgAN 和对照组 IgA1 分泌细胞的富含高尔基体制剂作为 ST6GalNAc-II 和 C1GalT1 酶的各自来源,使用来自具有 ST6GalNAc-II 高活性的 IgAN 患者 IgA1 分泌细胞的高尔基体富集制剂,进行 Gd-IgA1 体外酶唾液酸化,将预唾液酸化 IgA1 蛋白与 IgAN 患者 IgA1 分泌细胞或对照组的高尔基体富集制剂中的 C1GalT1 进行半乳糖基化反应,结果显示 Gd-IgA1 蛋白的唾液酸化阻断了随后的半乳糖基化,但唾液酸化阻断并不完全,因为与 C1GalT1 反应前相比,C1GalT1 反应后 HAA 反应性降低。因此,IgA1 O-聚糖的有效半乳糖基化可以通过过早的唾液酸化实质性降低,并且 GalNAc 的“过度偏倚化”可能是 IgAN 患者中 IgA1 O-聚糖半乳糖缺乏的机制。

综上所述,我们发现一种常见的细胞因子 IL-6 不仅可以增加 IgA1 的合成,而且可以加重 IgA1

缺乏半乳糖的程度。来自具有 IL-6 的 IgAN 患者的 IgA1 分泌细胞的刺激增强了由 ST6GALNAC2 基因编码的 GalNAc 特异性唾液酸转移酶的活性已经升高,导致末端 GalNAc 的唾液酸化增加。这些变化与 IL-6 驱动的 C1GALT1 和 COSMC 基因表达的降低相结合,促成了 Gd-IgA1 与唾液酸化或末端 GalNAc 的更大合成。总之,这些结果揭示了来自 IgAN 患者的分泌 IgA1 的细胞的细胞内酶途径的内在异常调节,并且鉴定了 IgAN 的未来疾病特异性治疗的潜在靶标。需要进一步的研究来阐明 IgAN 患者 IgA1 产生细胞中 IL-6 信号传导的细节。

[参考文献]

- [1] 王 心,陈 铨. 伴高尿酸血症的原发性 IgA 肾病的临床及病理特征分析[J]. 东南国防医药, 2017, 19(6): 600-603.
- [2] 潘 薇,张 慧,樊均明. 低糖基化 IgA1 与 IgA 肾病的研究进展[J]. 重庆医学, 2016, 45 (4): 548-551.
- [3] 孔荣珍,尹 敏,王艺璇,等. IgA1 分子糖基化异常在 IgA 肾病发病机制中的研究进展[J]. 中国实验诊断学, 2016, 20 (3): 513-516.
- [4] 张 红,周 楠,沈 颖. 异常糖基化 IgA1 抗体在 IgA 肾病诊治中的作用研究进展[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2016, 31(5): 392-394.
- [5] 向 莉. Th1/Th2 细胞因子与肾小球疾病的研究进展[J]. 中华实用医药杂志, 2004, 24(4): 421-425.
- [6] 王 缨,胡贵荣,李弼民. IgA 肾病大鼠肾组织中 TIM-1、IFN- γ 、IL-4 表达的变化及意义[J]. 广东医学, 2017, 38 (4): 505-508.
- [7] Yamada K, Kobayashi N, Ikeda T, *et al.* Down-regulation of core 1 1,3-galactosyltransferase and Cosmc by Th2 cytokine alters O-glycosylation of IgA1 [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2010, 25 (12): 3890-3897.
- [8] 周 楠,张 红,刘小荣,等. 抗糖基化异常免疫球蛋白 A1 抗体免疫球蛋白 G 在儿童 IgA 肾病临床的应用价值[J]. 中华儿科杂志, 2017, 55(9): 663-667.
- [9] Zhao N, Hou P, Lv J, *et al.* The level of galactose-deficient IgA1 in the sera of patients with IgA nephropathy is associated with disease progression[J]. *Kidney Int*, 2012, 82(7): 790-796.
- [10] 杨楠楠. 肠道黏膜免疫功能异常与 IgA 肾病[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2016, 25(5): 470-474.
- [11] 王金泉. IgA 肾病的遗传易感性和黏膜免疫应答异常[J]. 医学研究生学报, 2016, 29(2): 120-125.
- [12] Smith AC, Molyneux K, Feehally J, *et al.* O-Glycosylation of serum IgA1 antibodies against mucosal and systemic antigens in IgA nephropathy[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2006, 17(12): 3520-3528.
- [13] 朱 合,徐道亮,刘昌华,等. IgA 肾病发病机制-IgA1 异常糖基化与免疫异常[J]. 中华肾病研究电子杂志, 2017, 6(4): 182-185.
- [14] 孙红旭,卢 嫣. IgA1 异常糖基化致 IgA 肾病肾系膜细胞增殖[J]. 国际泌尿系统杂志, 2017, 37(5): 783-786.

(收稿日期:2018-03-08; 修回日期:2018-12-26)

(责任编辑:叶华珍; 英文编辑:吕铨烽)