

免疫球蛋白糖链结构异常和自身免疫性疾病

张文利 燕 秋 朱正美*

(大连医科大学生物化学教研室, 大连 116023)

摘要 免疫球蛋白在人体体液免疫中发挥巨大作用, 而其均为糖蛋白. 免疫球蛋白中与蛋白质相连的寡糖链结构及组成对其功能有很大影响, 当寡糖链糖基化异常时, 可导致一些自身免疫性疾病. 从 IgA 肾病和类风湿性关节炎的结构基础、分子机制、酶学基础、临床意义等方面对这两类自身免疫性疾病的发病机制与糖基化异常之间的密切相关性予以详细论述, 为这两类疾病在临床上建立一种特异、灵敏的血清学检测方法提供了理论基础, 开辟了一条新途径.

关键词 免疫球蛋白, 自身免疫性疾病, N-糖链, O-糖链, IgA 肾病, 类风湿性关节炎, 糖基化

学科分类号 R392

免疫球蛋白 (Ig) 是参与人体体液免疫的生力军, 通常有 IgG、IgM、IgA、IgD、IgE 等五类^[1]. 免疫球蛋白均以糖蛋白的形式存在, 其寡糖链按其结合方式, 分为三种: N-糖链 (GlcNAc-Asn-X-Ser/Thr), O-糖链 (GalNAc-Ser/Thr), GPI 锚连的糖链 (蛋白质羧基端-磷酸乙醇胺-糖-磷酸肌醇). 免疫球蛋白的寡糖链不仅在维持空间构象, 稳定糖蛋白的结构及保护其免受某些蛋白酶裂解等有重要作用; 而且寡糖亦能改变某些蛋白质的抗原特性, 从而使机体对其产生自身免疫应答, 导致自身免疫性疾病.

1 自身免疫性疾病与 Ig 糖基化

在某些条件下, 机体免疫系统识别和排除抗原

性异物的反应, 超出了一定的限度, 对自身组织和器官造成病理损伤导致自身免疫性疾病. 在免疫系统中, 参与细胞识别的绝大多数分子都是糖基化的, 其中的糖链起重要作用, 例如, 淋巴细胞的靶向作用, 粘附, 归巢和激活, 及白细胞在血管内的滚动等都是由细胞表面糖——凝集素相互作用始动或控制的^[2]. 近年, 对异常的糖链结构和自身免疫性疾病之间内在关系的研究兴趣日趋浓厚, 同时也发现了不少的自身免疫性疾病和 Ig 糖链结构改变密切相关^[3].

由表 1 可见, Ig 异常糖基化成分增多或减少会带来相应的自身免疫性疾病的病理变化. 本文主要对类风湿性关节炎和 IgA 肾病予以详细说明.

Table 1 Alteration of Ig glycosylation in autoimmune disease
表 1 自身免疫性疾病的 Ig 糖基化改变

自身免疫性疾病	糖基化缺陷或异常	潜在相关性
类风湿性关节炎 (RA)	IgG 的 G ₀ 糖型水平增多	RA 动物模型证明 IgG 的 G ₀ 糖型和其发病机理相关
系统性红斑狼疮 (SLE)	IgG 的 G ₀ 糖型水平增多	具有 SLE 父母在妊娠末期 IgG ₀ 增高与子女的先天性心脏病相关
IgA 肾病	IgA1 铰链区 O-糖链末端缺失半乳糖	增加 IgA1 聚合以及 IgG-IgA1 复合物形成
自身免疫性溶血性贫血	红血球上洗脱下的 IgG 的 G ₀ 糖型低于正常水平	红细胞自身抗体参与 Fc 介导的抗体依赖性细胞毒作用能力与 IgG ₀ 水平成反比

2 异常的糖链结构和某些自身免疫性疾病

2.1 IgA 的 O-糖链结构异常和 IgA 肾病

2.1.1 简介: IgA 肾病 (IgA nephropathy, IgAN) 是肾小球病变的常见形式, 在日本约占整个肾小球

病的 50%, 欧洲为 10% ~ 30%, 中国则占 20%, 通常男性发病率比女性高 2~3 倍以上^[4]. 该病主

* 通讯联系人.

Tel: 0411-4720616, E-mail: zmhu@mail.dlptt.ln.cn

收稿日期: 2000-07-21, 接受日期: 2000-08-23

要表现为在肾小球系膜上有多聚 IgA 免疫复合物沉积. 近年对 IgAN 病人的长期随访和观察, 发现它预后较差, 约 30%~35% 的 IgAN 病人会发展为慢性肾衰和晚期肾病, 其余的则长期蛋白尿或血尿^[4].

2.1.2 IgA1 O-糖链: 血清中的 IgA 主要有 IgA1 和 IgA2 两种亚型^[5]. IgA1 是高度糖基化的, 约有 8% 的糖^[5], 在铰链区富含 Ser/Pro/Thr 氨基酸^[2], 其中约有 4~5 个 O-糖化位点, 形成 O-糖链簇, 主要含有唾液酸化 GalGalNAc 糖链^[6]. 然而, IgA2 由于铰链区基因缺陷, 故没有铰链区, 因此也不具有 O-糖链^[7]. 目前, 对 IgA1O-糖链的具体结构尚无明确报道, 但经唾液酸酶水解去除唾液酸后, 采用特异凝集素结合分析的方法表明了其具有如下结构^[8]: NeuNAc^{α2} → ³Gal^{β1} → ³GalNAc^{α1} → °Ser (Thr). 已经发现 IgA1 O-糖链对维持其正常生理功能有重要作用^[2]: a. 有助于延长肽链的结构; b. 使免疫球蛋白具有一定的刚性结构, 整个分子结构更趋稳定; c. 保护铰链区免受蛋白酶的裂解等.

2.1.3 分子机制: 1989 年 Andre 等^[9]首次报道了 IgAN 患者血清中的 IgA1 O-糖链结构异常. 随后经凝集素分析及质谱分析进一步证实了这种异常的 O-糖链是缺失末端 Gal、而暴露出次末端的 GalNAc, 并且该异常结构可能是导致 IgA1 免疫复合物在肾脏中沉积的原因之一^[10]. 近年许多实验表明 IgA1 末端 Gal 缺失与 IgAN 的发病有关, 如: a. Tomana 等^[8]从 IgA 肾病患者血清中分离出免疫复合物, 经结构分析表明: IgA1 铰链区 O-糖链缺失半乳糖, 暴露出含有 GalNAc 的抗原决定簇, 它能被体内已有的 IgA1 和 IgG 抗体识别; b. 铰链区靠近 CH₂ 结构域的效应位点, 在 IgA1 功能上是非常重要的. IgA1 要通过白细胞的 Fcα 受体 (FcR) 的配基介导免疫应答, 而该配基恰位于 CH₂ 结构域顶部, 毗邻铰链区^[11]. 利用体外定点诱变产生的突变 IgA1 的实验, 结果表明铰链区的糖链参与 IgA1 和 FcR 的相互作用, 而结构异常的糖链则影响受体和配基之间的作用^[5]. 由于人肾系膜细胞上有 FcR 存在^[11], 故这种作用可能和 IgA1 在肾脏中的沉积有关; c. IgA1 的清除是由 O-糖链所介导的, 因为 O-糖链末端 D-Gal 是肝细胞中脱唾液酸糖基化蛋白质受体 (ASGPR), 正常人循环中的 IgA1 免疫复合物能与 ASGPR 的配基结合而被清除掉, 但 IgA 肾病患者, 由于 O-糖链结构异常而不能与 ASGPR 的配基结合, 以致 IgA1 免疫复合物

在血清中滞留^[7,10]. d. 异常的糖链还可影响 IgA1 受体和补体的作用^[12].

2.1.4 酶学基础: 据 Mestecky 等报道 β1、3-半乳糖基转移酶的缺陷是 IgA 沉积的基本原因之一. 目前, 已经很肯定的是糖链结构异常和 B 淋巴细胞的激活二者有较大的相关性^[10]. 表 2 中的结果说明 IgAN 病人 B 淋巴细胞 β1、3-半乳糖基转移酶的活性明显低于正常人, 但 T 细胞却无差异^[12].

Table 2 A difference of β1、3-galactosyltransferase activity in B and T lymphocyte between normal and IgAN serum

表 2 正常人及 IgAN 患者的 B、T 淋巴细胞 β1、3-半乳糖基转移酶活性比较

	IgAN (AU/μg)	正常人 (AU/μg)	P (显著性)
B 淋巴细胞	6.2 ± 0.71	9.5 ± 1.03	0.018
T 淋巴细胞	3.3 ± 0.48	2.9 ± 0.35	无

2.1.5 临床意义: 目前, IgAN 临床常规的实验室检查包括血清 IgA 水平及补体 C3 水平测定. 二者均缺乏对 IgAN 诊断的特异性, 并且与病情、肾病理及愈后判定等无明显相关性. 确诊 IgAN 的唯一方法是行肾活检穿刺术, 以进行光镜、免疫荧光及电镜分析. 肾活检是一种创伤性手术, 既有一定危险性, 又可引起血尿等术后并发症. 而血清中异常 IgA1 先于临床症状出现, 并直接反映了肾损伤程度, 与病情复发、治疗疗效观察及愈后判断均密切相关, 因而认为是理想的诊断和评价 IgAN 的客观指标.

2.2 IgG 的 N-糖链结构异常和类风湿性关节炎

2.2.1 简介: 类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是以关节进展性破坏为主并累及其他多种脏器的自身免疫性疾病, 其发病率约 1%~3%, 女性的发病率为男性的 2~3 倍. 该病从发病初期的关节红肿、疼痛、晨僵等可发展成严重的关节损伤、破坏^[13], 严重影响了 RA 病人的工作能力和生活质量, 并造成很大的社会和经济负担, 被医学界称为“不死的癌症”. 类风湿性关节炎目前尚无早期特异性诊断指标, 一般从发病到确诊约需 36 周, 若未及时诊治, 平均寿命缩短 10~15 年, 70% 患者可致残, 故发展建立一种早期特异的诊断方法则为当务之急.

2.2.2 IgG N-糖链: 每分子 IgG 含有 2 条存在于 Fc 段 CH₂ 结构域的 N-糖链, 与肽链 Asn297 相连接的, 结构呈单天线, 双天线, 四天线等不同形

式,但多数为图1所示的双天线结构^[14]:

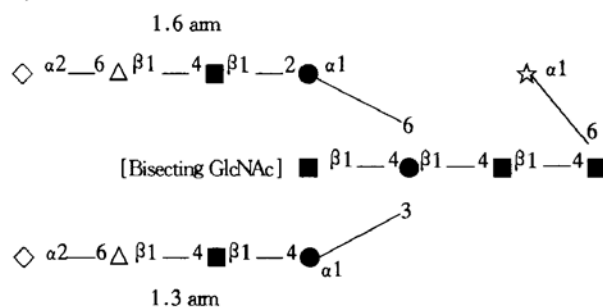


Fig. 1 Bi-antenna structure of N-linked oligosacchride in IgG molecular

图1 IgG N-糖链的双天线结构图

●: 甘露糖; ■: N-乙酰葡萄糖胺; ☆: 果糖;
△: 半乳糖; ◇: 唾液酸.

在体内存在的 IgG N-糖链仅 10% 含 1 个 NeuAc (唾液酸), 含 2 个 NeuAc 的糖链未见报道^[15]. 按双天线结构末端糖基组成不同, IgG 分子可分为三种糖型: IgG₂ 型 (双天线末端都具有 Gal), IgG₁ 型 (双天线末端缺失一个 Gal), IgG₀ 型 (双天线末端均缺失 Gal). 因 IgG 的 N-糖链包含在 CH₂ 结构域的内部^[2], 对维持 CH₂ 结构域的空间形状, 保证其不易被某些蛋白酶水解并完成正常的生理功能方面有更大的作用, 如在相同的条件下, 木瓜蛋白酶更易将末端缺失半乳糖的 IgG 水解成 Fc 段和 Fab 段^[2].

2.2.3 分子机制: 1976 年, Mullinax 等^[16]首次报道了在 RA 病人和正常人中 IgG 的糖型组分不同, 10 年后才分析证明 RA 病人的 IgG₀ 糖型比例增高^[17]. 随后, 对于 IgG 糖链结构异常与类风湿性关节炎病理之间的直接相关性得到进一步的肯定. 利用核磁共振 (NMR)^[14] 分析进一步证明 RA 病人与正常人血清中 IgG Fc 段的糖型组成不同 (表 3), 其 G₀ 型比例明显增高. 此外, 利用 II 型胶原诱导产生自身抗体的小鼠动物模型证明注入 IgG₀ 成分高的免疫球蛋白, 能引起小鼠关节产生 RA 病理变化^[18], 同时, 对该动物模型血清中的 IgG₀ 经时监控检测, 发现 IgG₀ 在疾病早期即大量出现^[19], 进一步证实了 IgG₀ 与 RA 病理间的相关性.

IgG 的 N-糖链末端 Gal 的存在与否对 IgG 功能有重要影响, 如 a. 缺失末端 Gal 的 IgG 可成为一种自身抗原, 被免疫系统识别而产生自身抗体. 后者可和带有 G₀ 糖链的 IgG 生成免疫复合物沉积于关节腔内, 引起炎症^[15]. b. 体内的甘露糖结合蛋

白 (MBP) 可识别缺失 Gal 而外露的 GlcNAc 糖基, MBP 和 IgG Fc 段结合, 激活补体^[2]. 体外分析表明多聚 IgG₀ 能通过多价结合到 MBP 上而激活经典的补体途径^[20]. 此外, 在关节腔内 IgG₀ 与 MBP 水平都很高, RA 病人由异常 IgG 糖链始动的补体激活的机制在关节腔内可能更具重要性^[2]. c. X 射线衍射和核磁共振研究发现: IgG N-糖链的 Gal 缺失后, Fc 段的某些抗原决定簇暴露, 此暴露肽段具有凝集素性质, 又可和抗体的糖链结合. 加上 G₀ 糖型的活动性较 G₁, G₂ 糖型的大, 也使暴露的 GlcNAc 更易被 MBP 或免疫系统识别. 这些由 IgG 糖链结构异常引起的变化都可能是 IgG 形成免疫复合物而引起关节炎的分子机制.

Table 3 IgG glycoform composition analysis by NMR in control and RA serum

表 3 RA 病人与正常人血清中 IgG 糖型组分的 NMR 分析

糖型组成 ¹⁾ (%)	IgG Fc 段	
	正常人	RA 病人
G ₀	26.0 ± 2.4	56.2 ± 3.0
G ₁	46.5 ± 1.5	29.8 ± 1.2
G ₂	27.5 ± 4.0	15.0 ± 4.2

¹⁾表示 IgG 的各种糖型占总的 IgG 的比例.

2.2.4 酶学基础: RA 病人 B 细胞中 β1, 4-半乳糖基转移酶 (β1, 4-Gal T) 活性降低, 可能是引起 IgG 中糖链缺失 Gal 的分子机制. 用等电聚焦电泳分析 β1, 4-GalT, 发现类风湿性关节炎病人血清中该酶活性组分与正常人的不同. 利用放射性分析 B 淋巴细胞 β1, 4-Gal T 活性 (表 4), 结果表明 RA 病人 B 细胞中该酶对 UDP-GAL 的 K_m 值大约是正常人的 3 倍, 而 AsAgIgG (asialo-agalacto-humanIgG) 受体间则没有差异. 因而, 可能在 RA 病人 B 细胞中 β1, 4-Gal T 对 UDP-GAL 亲和力比正常人低, 而使 IgG 分子的 N-糖链末端半乳糖化降低^[14].

Table 4 the K_m of β1, 4-Gal T in B lymphocyte homogenate of normal and RA

表 4 正常人与 RA 病人 B 细胞中 β1, 4-Gal T 的 K_m 值比较

	AU/μg	
	B 细胞匀浆	
	正常人 ¹⁾	RA 病人
糖链供体 (UDP-GAL)	15.2 ± 3.3	42.7 ± 3.8
糖链受体 (AsAgIgG)	39.4 ± 3.4	37.6 ± 3.4

¹⁾AU/μg 为每 μg 蛋白酶活性单位数.

2.2.5 临床意义: 对于 RA 的早期诊断具有重要意义, 因 IgG₀ 先于 RA 临床症状出现, 并且 IgG₀ 增高, RA 患者炎症加重, 与 RA 病理和病情复发密切相关。类风湿因子 (RF) 是诊断 RA 最常用的实验室指标, 然而在 RA 的早期诊断中是不可靠的, 因为某些系统性红斑狼疮 (SLE) 及反应性关节炎患者 RF 也可以异常。RF 及 IgG₀ 阳性对 RA 的预测率各为 80% 左右, 如果 IgG₀ 增高同时 RF (1/40) 阳性二者结合, 则预测率可达 94%^[21]。另外, 还可依据 RA 患者 IgG₀ 增高与炎症加重的相关性, 对疾病活动性予以判断、分期, 便于做到“对症治疗”; 此外, 为了研究患者首次就诊 IgG₀ 浓度能否预测 RA 预后, Bodman-Smith^[22] 用差异功能分析 (DFA) 对两组 RA 患者进行调查。结果表明同 RF、ESR、握力等指标相比, IgG₀ 是最有力的预测指标。IgG₀ 水平同首次发作时握力患者年龄性别相结合, 两组预测力分别达到 95% 和 78%。因此, 测定患者首次就诊 IgG₀ 浓度对预测 RA 预后具有重要临床价值。

3 结束语

自身免疫性疾病临床检测方法的特异性, 一直缺乏令人满意的结果。目前, 由于发现该类疾病与特定的异常糖链结构之间的关系, 依据特异凝集素与糖链结合的原理, 设计凝集素的分析方法。利用不同方法标记的凝集素, 用酶联免疫吸附 (ELISA) 方法, 可以对 Ig 的异常糖链进行定性及定量检测; 在了解糖链结构异常和自身免疫性疾病间具有内在联系的基础上, 将糖生物学和免疫学的技术原理有机结合, 无疑可对许多自身免疫性疾病发病机理, 早期诊断及临床治疗提供新的方法, 开辟新的途径。

参 考 文 献

- 燕 秋, 朱正美. 免疫球蛋白的糖链与自身免疫疾病. 生命的化学, 1999, **19** (3): 118~ 120
- Yan Q, Zhu Z M. Chemistry of Life, 1999, **19** (3): 118~ 120
- Rudd P M, Wormald M R, Dwek R A. Glycosylation and the immune system. Trends in Glycoscience and Glycotechnology, 1999, **11** (57): 1~ 22
- Delves P J. The Role of Glycosylation in autoimmune disease. Autoimmunity, 1998, **27** (4): 239~ 253
- Galla J H. IgA nephropathy. Kidney International, 1995, **47**: 377~ 387
- Allen A C. Abnormal glycosylation of IgA: is it related to the pathogenesis of IgA nephropathy? Nephrol Dial Transplant, 1995, **10** (7): 1121~ 1124
- Van den Stree P, Rudd P M, Dwek R A, *et al.* Concepts and principles of O-linked glycosylation. Crit Rev Biochem Mol Biol, 1998, **33** (3): 151~ 208
- Rocatello D, Picciotto G, Torchio M, *et al.* Removal systems of in immunoglobulin A and immunoglobulin A containing complexes in IgA nephropathy and cirrhosis patients: the role of asialoglycoprotein receptors. Lab Invest, 1993, **69** (6): 714~ 723
- Tomana M, Novak J, Julian B A, *et al.* Circulating immune complexes in IgA nephropathy consist of IgA1 with galactose-deficient hinge region and antiglycan antibodies. J Clin Invest, 1999, **104** (1): 73~ 81
- Andre P M, Le Pogamp P, Chevet D. Impairment of jacalin binding to serum IgA1 in IgA nephropathy. J Clin Lab Anal, 1990, **4** (2): 115~ 119
- Kokubo T, Hashizume K, Iwase H, *et al.* Humoral immunity against the proline-rich peptide epitope of the IgA1 hinge region in IgA nephropathy. Nephrol Dial Transplant, 2000, **15** (1): 28~ 33
- Gomez-Guerrero C, Gonzalez E, *et al.* Evidence for a specific IgA receptor in rat and human mesangial cell. J Immunol, 1993, **151** (12): 7172~ 7181
- Allen A C, Topham P S, Harper S J, *et al.* Leucocyte beta 1, 3 galactosyltransferase activity in IgA nephropathy. Nephrol Dial Transplant, 1997, **12** (4): 701~ 706
- Graciela S, Alarcon M D. Predictive Factors in Rheumatoid Arthritis. The American Journal Medicine, 1997, **103** (6A): 19~ 24
- Kobata A. Function and pathology of the sugar chains of human immunoglobulin G. Glycobiology, 1990, **1** (1): 5~ 8
- 陈惠黎. 糖生物学的结构和功能. 上海: 上海医科大学出版社, 1996. 127~ 130
- Chen H L. Function and Structure of Glycobiology. Shanghai: Shanghai Medical University Publishing Company, 1996. 127~ 130
- Mullinax F, Hymes A J, Mullinax G L. Molecular site and enzymatic origin of IgG galactose deficiency in rheumatoid arthritis and SLE. Arthritis Rheu, 1976, **19**: 918
- Parekh R B, Dwek R A, Sutton B J, *et al.* Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG. Nature, 1985, **316** (6027): 452~ 457
- Dwek R A, Leeouch A C, Wormald M R. Glycobiology: The function of sugar in the IgG molecule. J Anat, 1995, **187** (pt2): 279~ 292
- Rademacher T W, Williams P, Dwek R A. Agalactosyl glycoforms of IgG autoantibodies are pathogenic. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, **91** (13): 6123~ 6127
- Malhotra R, Wormald M R, Rudd P M, *et al.* Glycosylation changes of IgG associated with rheumatoid arthritis can activate complement via the mannose-binding protein. Nature Medicine, 1995, **1**: 237~ 243
- Young A, Sumar N, Bodman K, *et al.* Agalactosyl IgG-an aid to differential diagnosis in early synovitis. Arthritis Rheum, 1991, **34** (11): 1425~ 1429
- Bodman-Smith K, Sumar N, Sinclair H, *et al.* Agalactosyl IgG [Gal (0)] An analysis of its clinical utility in the long-term follow-up of patients with rheumatoid arthritis. British Journal of Rheumatology, 1996, **35** (11): 1063~ 1066

Aberrant Glycosylation of the Immunoglobulins in Autoimmune Diseases

ZHANG Wen-Li, YAN Qiu, ZHU Zheng-Mei*

(Department of Biochemistry, Dalian Medical University, Dalian 116024, China)

Abstract The immunoglobulins (Igs), most of them are glycoprotein, play an important role on humoral immune. The structure, composition of oligosaccharide conjugated with protein directly effect the function of Ig. For example, abnormal oligosaccharide can result in some autoimmune diseases. The correlation between autoimmune disease mechanism such as IgAN and RA and aberrant glycosylation is given detailedly in structure, molecular mechanism, enzyme and clinic etc. And provide the theory basis on building a sensitive and specific diagnosing method.

Key words immunoglobulins, autoimmune diseases, N-linked oligosaccharide, O-linked oligosaccharide, IgA nephropathy, rheumatoid arthritis, glycosylation

* Corresponding author. Tel: 86-411-4720616, E-mail: zmhu@mail.dlptt.ln.cn

Received: July 21, 2000 Accepted: August 23, 2000