

文章编号: 1004-0374(2011)07-0685-10

糖基化与免疫

章晓联

(武汉大学基础医学院免疫学系, 病毒学国家重点实验室, 武汉 430071)

摘要: 蛋白质糖基化或聚糖影响免疫细胞和免疫分子的结构与功能, 影响机体对抗原的应答反应。聚糖主要有三种免疫功能: 首先, 糖链对其所连接的糖蛋白起一定稳定作用, 保护糖蛋白免受蛋白酶的降解、以及 MHC: 多肽复合体的装配及折叠等; 其二, 聚糖及其凝集素受体的相互作用在信号转导、抗原提呈、控制细胞发育与分化中起调控作用; 第三, 糖链的一些区域可作为抗原识别表位, 调控固有免疫和适应性免疫应答。主要介绍了聚糖在抗原提呈和稳定、信号转导、免疫自稳、自身免疫、固有免疫和适应性免疫等中的功能, 以及与免疫相关疾病, 如炎症反应、自身免疫性疾病、肿瘤、器官移植排斥、感染性疾病和遗传性疾病的相关性。此外, 针对聚糖和糖基转移酶的一些药物分子的治疗应用前景也将一并介绍。

关键词: 糖基化; 免疫; 聚糖; 凝集素; 免疫相关疾病

中图分类号: Q53; R592.3

文献标志码: A

Glycosylation and immunity

ZHANG Xiao-Lian

(Department of Immunology, State Key Laboratory of Virology, School of Medicine, Wuhan University, Wuhan 430071, China)

Abstract: Glycosylation or glycans not only influence the structures and functions of immune cells or immune molecules, but also control host immune responses to foreign antigens. The glycans have three major roles: firstly, the sugars confer stability on the proteins to which they are attached, protecting them from proteases and non-specific protein-protein interactions. Secondly, interactions between glycans and lectins play key roles in signal transduction, antigen presenting, control of cell development and differentiation. Thirdly, specific regions of the oligosaccharide chains provide recognition epitopes, which influence and modulate innate and adaptive immune responses. In this review, the roles of glycans and interactions between cell-, pathogen-surface glycans and lectins in immune system and immune-related diseases, such as inflammatory, autoimmune diseases, cancers, organ transplant rejection, infection diseases, and genetic diseases, are discussed. The potential therapeutic significance of the information is also mentioned.

Key words: glycosylation; immunity; glycan; lectin; immune-related disease

糖基化是蛋白质翻译中或翻译后的一种重要的加工过程, 在肽链合成的同时或合成后, 在酶的催化下糖链被接到肽链上的特定糖基化位点, 称为蛋白质糖基化。连接到肽链上的糖链又称为聚糖。蛋白质糖基化的种类主要有 N- 聚糖 (N-glycan)、O- 聚糖 (O-glycan)、糖基磷脂酰肌醇 (phosphatidylinositol glycan, GPI) 等。机体 90% 的蛋白质为具有 N- 聚糖的 N- 糖蛋白。N- 聚糖合成是在内质网中, 新合成的核心多糖单位 $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ 连接到新生的

多肽链中氨基酸序列为 X-Ser/Thr 中 Asn 的氮原子上, 随后经一系列糖蛋白加工酶最终产生三种 N-

收稿日期: 2011-03-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(81025008); 国家重大传染病专项(2008ZX10003-005); 国家重点基础研究发展计划(“973”项目)(2009CB522507)

通信作者: E-mail: zhangXL65@sina.com; Tel: 027-68759986

聚糖：典型的高甘露糖型 (high-mannose), 杂合型 (hybrid) 和复杂型 (complex) N- 聚糖 (图1)。O- 连接聚糖主要是聚糖中的 GalNAc 糖基连接到 Ser/Thr 的氧原子上, 哺乳类的 4 种主要核心 O- 聚糖的结构与合成见图 2。

几乎所有参与机体固有免疫和适应性免疫的关键分子 (包括免疫球蛋白、CD 分子和黏附分子、可溶性和膜型凝集素受体、细胞因子及其受体、补体, 以及 T-、B- 细胞受体和 MHC 等) 均是糖蛋白。与免疫分子合成相关的转录因子也属糖蛋白。另外,

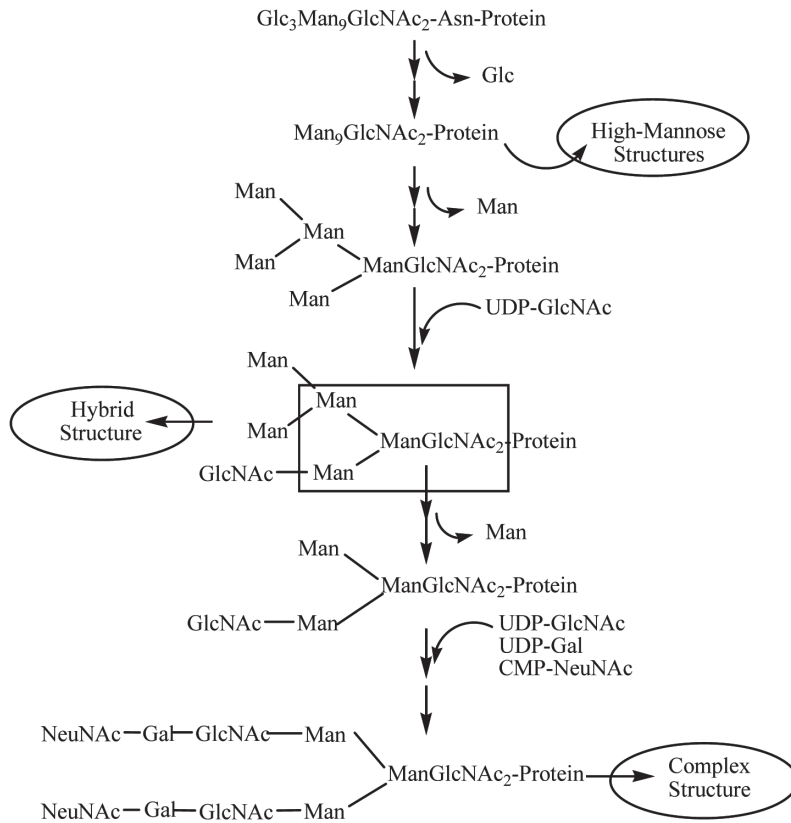


图1 糖蛋白N-聚糖的加工

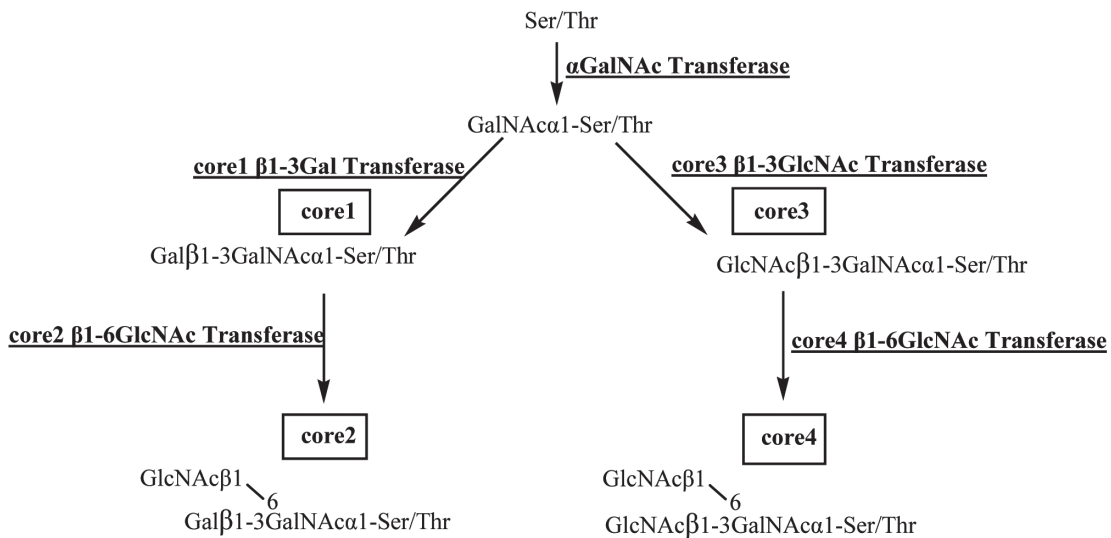


图2 O-聚糖核心结构的形成

许多病毒和细菌等病原体表面也均是糖蛋白。

糖免疫学 (glycoimmunology) 主要是研究聚糖及结合糖链的凝集素 (lectins) 的相关免疫学的一门学科。20 世纪以来, 糖基化与免疫系统的相关性研究在国际上逐渐受到重视, 如 2001 年 3 月 23 日的 Science 上有关 “Glycosylation and the immune system” 的专刊; 2007 年 8 月发表在 Immunity 上的文章证实了 N- 聚糖在固有免疫系统的识别、炎症和自身免疫性疾病中的功能^[1]; 2001 年 3 月发表在 Cell 上的文章 “Glycosylation, immunity and autoimmunity”^[2]; 2008 年 6 月发表在 Nature Immunology 上的 “Proteoglycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses”^[3]; 2009 年发表在 Nature 上的 “Turing ‘sweet’ on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation”^[4]; 2010 年发表在 Cell 上的 “Glycomics hits the big time”^[5] 的专题报道。2011 年 3 月 6—11 日专门在加拿大 Lake Louise 召开了糖免疫学的国际讨论会 (New Frontiers at the Interface of Immunity and Glycobiology), 说明国际上对糖免疫学这门免疫学与糖生物学交叉的前沿学科发展的高度重视^[6]。

1 聚糖影响免疫分子的折叠、成熟、包装、抗原提呈和稳定

聚糖在大多数细胞表面构成物理屏障, 具有识别、保护和稳定作用, 如可保护多肽链免受蛋白酶或抗体的识别。聚糖也参与内质网中新合成的多肽链的适当折叠, 以及蛋白质的可溶性和空间构象的维持。如果糖蛋白不能正确地糖基化, 则不能正确折叠; 如 CD4 分子有 4 个 N- 糖基化位点, 只有全部糖基化时, CD4 分子才能正确折叠, 并表达于 T 细胞膜上。

糖基化作用和 MHC: 多肽复合体的装配及折叠密切相关。在内质网中, 未组装的 MHC 重链 (H) 上的 N- 聚糖上的寡糖, 首先需与内质网分子伴侣钙联素 (calnexin, Clx) 或钙网素 (calreticulin, CRT) 相互作用。如人类 HLA 分子在合成组装过程中, HLA 肽链上天门冬酰胺 (Asn68) 位点连接的寡糖 GlcMan9GlcNAc2 与 Clx 相结合后, 二巯基氧化酶 (ERp57) 才能通过 Clx, 帮助 MHC 重链链内二硫键的形成。通过糖基、钙联素或钙网素, 以及 TAP 和 Tapasin 帮助形成成熟 MHC: 多肽复合体, 起到质量控制作用, 帮助 MHC: 多肽复合体在内质网中装配折叠成熟并转运至高尔基体, 成熟的 MHC:

多肽转运至抗原提呈细胞表面, 供 CD4⁺T 或 CD8⁺T 细胞的识别。由此可见糖以及与糖相互作用的分子伴侣在蛋白质的折叠中起着重要作用。

聚糖在抗原提呈中也起着重要作用。糖基化结构在改变蛋白质或肽的三维结构的同时, 还可通过改变肽表位与 MHC-I 类分子的结合及与 TCR 交互作用影响细胞免疫。如 Apostolopoulos 等^[7] 报道利用合成的 GalNAc 修饰 MUC1 糖肽, 研究发现此糖肽与 MHC-I 结合, 比起未用糖修饰的多肽与 MHC-I 的结合力大 100 多倍, 其中 GalNAc 起着重要作用。又如 B 细胞的 HLA-DR 链上第 96 位氨基酸从脯氨酸突变为丝氨酸 (Pro96 → Ser96), 从而使第 94 位的天冬氨酸 (Asp) 产生了一个新的 N- 糖基化位点, 会使 B 细胞的抗原提呈功能丧失, 从而影响 B 细胞与 T 细胞的相互作用。Backlund 等^[8] 报道利用合成的糖基化 II 型胶原蛋白多肽和未修饰的多肽, 发现在严重类风湿关节炎 (RA) 病人中 T 细胞仅识别糖基化的 II 型胶原蛋白多肽, 表明糖基化也影响 T 细胞抗原表位。

研究还报道一些 N- 糖基化作用可抑制蛋白酶对糖蛋白的降解, 延长免疫分子的寿命, 如 N- 糖基化作用可抑制天门冬酰胺特异的半胱氨酸内肽酶 (asparagine-specific cysteine endopeptidase) 对糖蛋白分子的降解, 从而保护糖蛋白分子或免疫分子。在内质网中, 葡萄糖苷酶 (glucosidase I/II)、甘露糖苷酶 I (mannosidase I) 以及葡萄糖基转移酶 (glucosyl transferase) 帮助未折叠的糖蛋白进一步折叠, 而错误折叠的糖蛋白将在内质网中降解。

2 聚糖与凝集素的相互识别调控固有免疫与适应性免疫

许多不同的病原体, 包括细菌、病毒、真菌等表面的聚糖均被固有免疫系统凝集素受体所识别。聚糖通常是微生物和病原体识别的靶分子, 也是免疫系统识别自己与非己等的重要靶分子, 机体通过固有免疫识别受体分子 (pattern receptor, PRR) 的模式识别作用, 通过识别糖来介导一些重要的固有免疫功能, 从而进一步调控适应性免疫应答。

如许多 C 型凝集素受体 (C-type lectin receptors, CLR 通常是一类 Ca²⁺ 依赖的碳水化合物结合蛋白) 表达在固有免疫细胞上, 特别是树突状细胞 (dendritic cell, DC) 和巨噬细胞, 这些抗原提呈细胞 (antigen presenting cell, APC) 是清除病原体的第一道防线, 它们随后启动适应性免疫应答。C- 型凝集

素识别的聚糖有时不是病原体特有的,有些相似的聚糖也存在于哺乳动物和人体中,从而容易引起自身免疫性疾病。但有些聚糖是病原体特有的聚糖,如 pseudo-Lewis^y是一种被 DC-SIGN(DC-specific ICAM-3 grabbing non-integrin) 识别的病原体特有的聚糖;结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*) 表面细胞壁的成分 ManLAM 也是结核菌特有的聚糖,被 DC 和单核巨噬细胞上的 C 型凝集素所识别。

DC 细胞表达的 C-型凝集素甘露糖受体(MR, CD206)、DC-SIGN(CD209)、MGL(CD301)、Dectin-1 和 langerin(CD207) 等参与聚糖介导的病原体的识别和抗原传递至 MHCII/III¹(图 3)。C-型凝集素作为病原体识别受体,不仅有利于抗原的提呈,还刺激和活化抗原特异的 T 细胞。如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*) 表面的 Lewis^x(CD15) 和 Lewis^y(CD147) 聚糖抗原以及脂多糖 O-抗原靶向结合 DC 细胞的 DC-SIGN 诱导 T 细胞分化为 Th2 型细胞,从而调控适应性免疫应答。

已知有 20 多种病原体在进化中从宿主细胞获得唾液酸整合到自身糖复合物中。病原体的这些唾液酸化的糖链对于它们生存于哺乳宿主细胞中起着关键作用,被宿主认为是自身的成分而逃逸宿主免疫系统的攻击。Siglecs(sialic acid-binding immunoglobulin superfamily lectins) 是一类特异结合唾液酸(sialic acid) 的免疫球蛋白样凝集素 Siglec-1、Siglec-5、Siglec-7 等参与宿主与病原体的相互作用,如 *Neisseria meningitidis*、*Campylobacter jejuni*、*Trypanosoma synfrome*、*Streptococcus group B* 等。病原体结合 Siglec-1 导致病原体的内吞和巨噬细胞对病原体的摄取增加(图 3)。

凝集素 galectins 具有共同的结构空间和保守的约 130 个氨基酸的碳水化合物识别结构域(CRD),识别含有半乳糖的 Gal-(1-4)-GlcNAc 的二糖结构。在哺乳类已发现了 15 种 galectin,包括 galectin-1~15。galectin 通过与病原体或细胞表面富含 -半乳糖(-galactoside) 的聚糖相互作用而影响免疫应答。如 galectin-3 结合 *Leishmania major* 的糖脂结构而导致 galectin-3 的 N-端的降解,使 galectin-3 不能多聚化和形成网状结构;又如 galectin-9 也识别 *L. major* 糖脂结构,该结合促进聚糖依赖的细菌与巨噬细胞的相互作用;另外 galectin-3 作为 PRR 识别存在于 helminth 寄生虫表面的 LacdiNAc 聚糖。galectin-3 介导的配体聚集可启动中性粒细胞的吞噬作用,并释放活性氧和蛋白酶,以及趋化因子

IL-8。galectin-3 的表达改变肥大细胞的组胺与 IL-4 的释放。相反 galectin-1 抑制肥大细胞的脱颗粒,阻断中性粒细胞趋化至炎症部位,促进细胞的凋亡。galectin-9 结合到特异糖蛋白 TIM3 后有利于单核细胞来源的 DC 的成熟(图 3),若结合到 Th1 上的 Tim3 后刺激 T 细胞凋亡。galectin-1 和(或) galectin-3 结合巨噬细胞上 CD98 后活化巨噬细胞。

综上所述,galectin 作为多功能分子调节不同固有免疫细胞功能,或者调节细胞因子和黏附分子的表达或调节 T 细胞免疫反应;相反,大部分 C-型凝集素和 Siglec 则作为抗原提呈受体,有利于提呈 MHC-抗原至 T 细胞。所有这些凝集素均能作为强有力的信号分子,正向或负向调节 DC 分化以及 T 细胞反应。

除上述外,聚糖对免疫系统和免疫应答的影响还表现在以下几个方面。(1) 在补体凝集素活化途径中,甘露糖结合的凝集素(mannan binding lectin, MBL) 或胶原纤维凝集素(ficolin) 分别直接识别多种病原微生物表面甘露糖或 N-乙酰葡萄糖胺,进而依次活化和激活补体级联酶促反应的活化途径。(2) 糖基化作用与补体介导的细胞裂解相关。在补体经典途径、旁路途径和补体凝集素途径中,最终均形成膜攻击复合物 MAC,攻击细菌等病原体使其裂解。在宿主细胞表面通常具备补体抑制物,如通过 GPI 定位的糖蛋白(CD55; DAF, decay accelerating factor; CD59) 均能结合 C8/C9 以阻止膜攻击复合物 MAC 的形成。如果补体过量地刺激,如在类风湿性关节炎患者中,会饱和患者组织液中的 CD55/DAF,导致不适当的细胞裂解和炎症症状^[9]。(3) B 细胞识别天然抗原的受体 BCR 复合物由 mIg 与 Ig α /Ig β 组成,糖基化影响 CR 复合物的结构与识别功能。mIg 糖基化程度过低,会使 mIg 立体构象改变而失去刚性;而糖基化过度,又会遮住 mIg 的抗原结合位点,影响与抗原的结合。X 线衍射研究 Ig 的三维结构,发现人 IgG Fc 的空间构象是靠连接于第 297 位天冬氨酸上的 N-聚糖链,靠多肽与糖链及糖链-糖链间的相互作用来维系的^[10-12]。

3 聚糖与细胞黏附、发育以及信号转导

多个研究表明 Core 2 O-聚糖对白细胞选择素配体的形成以及白细胞的黏附起关键作用。中性粒细胞结合到 P-、L- 和 E-选择素依赖于 Core 2 O-聚糖的不同长度和序列结构(图 4),如其中 Core 2 O-聚糖分支末端唾液酸化的路易斯寡糖(sialyl Le^x)

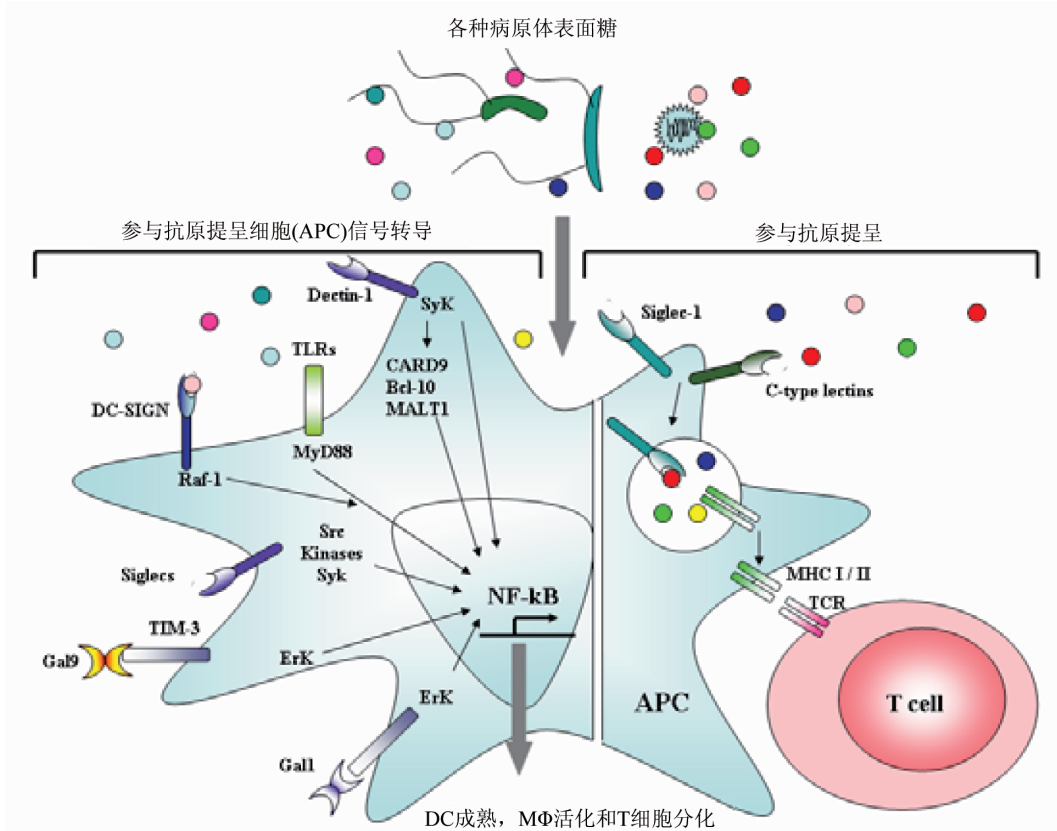
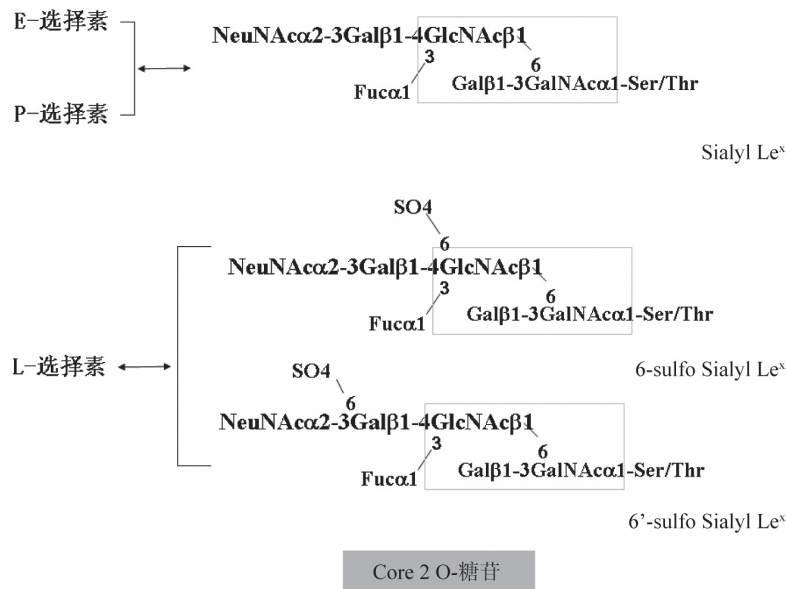


图3 糖结合蛋白参与APC与病原体相互作用而导致抗原提呈和信号转导^[3]



所有选择素的配体寡聚糖结构是sialyl Le^x、6-sulfo sialyl Le^x和6'-sulfo sialyl Le^x^[13]。

图4 Core 2 O-聚糖是选择素配体的关键结构

是E-、P-选择素的配体。其中P-和L-选择素仅仅结合在O聚糖配体，如在PSGL-1、GlyCAM-1和CD43上的O-聚糖配体，但是E选择素既结合O-

聚糖上的sialyl Le^x，又结合N-聚糖上的sialyl Le^x^[13]。
O-聚糖的改变与T细胞的发育也密切相关。Core 2 O-聚糖不表达在成熟的胸腺髓质的T细胞

中,但表达在未成熟的皮质胸腺细胞中 T 细胞表面标记 CD43 分子中。CD43 的表达水平是不变的,起变化的是负责合成 Core 2 O-聚糖的 C2GnT 酶的表达水平。C2GnT 酶的表达水平与胸腺皮质和髓质中的 O-糖基化水平变化呈现平行的相关性。这说明了负责合成 Core 2 O-聚糖的 C2GnT 酶的表达是负责胸腺中皮质 T 细胞向髓质 T 细胞成熟过程的开关^[11,13]。

复杂型 N-聚糖的分支糖链的不同程度可以调节细胞的增殖和分化^[14-16]。2007 年 4 月 6 日发表在 Cell 上的文章阐述了细胞表面的 N-聚糖调节细胞的增殖和分化;2007 年 8 月发表在 Nature Immunology 上的文章发现 Th1、Th2 和 Th17 细胞的不同聚糖结构调节它们对细胞死亡的敏感性^[16]。

聚糖影响 T 细胞的信号转导表现在以下几个方面:(1)在 TCR $\alpha\beta$ -CD3 复合物中,CD3 δ 链中两个 N-糖链中的一个为高甘露糖型,另一个为复杂型;而在 TCR $\gamma\delta$ -CD3 复合物中,CD3 δ 链中的两个 N-糖链均为复杂型,这些差异可能导致在 TCR 对抗原识别中 TCR $\alpha\beta$ 与 TCR $\gamma\delta$ 的信号转导不同;(2)T 细胞表面若缺乏 1,6-GlcNAc 的 N-聚糖,TCR 则更有效地聚集一起,导致更敏感的受体信号产生,因而负责 1,6-GlcNAc 分支糖合成的酶——N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 V(N-GlcNAc-transferase V)可调节 T 细胞的功能;(3)许多 T 细胞表面糖蛋白为 O-聚糖,例如 IL-2 受体、GCSF(granulocyte colon stimulating factor)等均是 O-糖基化的,O-糖基化的缺少可导致 IL-2 受体等的识别功能和信号转导的变化^[17]。

几乎所有细胞因子都是糖蛋白,糖基化对于调节细胞因子信号转导也起着重要作用。如本课题组最近发现只有 N-糖基化状态下的 IL-24 才能刺激小鼠中性粒细胞产生 IL-12 和 IFN- γ ,从而刺激活化 CD8⁺T,在小鼠体内发挥抗胞内菌鼠伤寒沙门菌感染的作用,而非糖基化的 IL-24 的这些功能均下降^[18]。又如生长因子受体(growth factor receptor, GFR)只有糖基化形式才能结合生长因子,是依赖糖基化形式起作用的^[17]。

C-型凝集素 Dectin-1 在识别 β -glucan 聚糖结构后,启动激活 Syk 酪氨酸激酶通路并活化 p38、Erk、JNK 以及转录因子 NF- κ B,在该信号通路中调节固有免疫基因表达不依赖于 TLR。DC-SIGN 介导的信号活化与 Dectin-1 不同,其依赖于 TLR 来诱导 NF- κ B。凝集素 Siglec-1、2 和 Galectin-1 可

结合 APC 和 B 细胞上的聚糖,并影响 BCR 的信号转导,特别是 galectin-1 可以诱导 IL-10 的产生。

不仅机体细胞和免疫分子的聚糖影响信号转导,病原体表面的聚糖也影响信号转导。如结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*)表面细胞壁的成分 ManLAM 中的高甘露糖结构靶向结合单核巨噬细胞或 DC 细胞表面的 MR 和 DC-SIGN,诱导信号活化导致抗炎因子如 IL-10 的表达^[19]。

4 聚糖识别控制免疫系统的自稳(Homeostasis)

凝集素与免疫细胞表面不同糖基化状态的蛋白结合而参与调节免疫细胞和免疫自稳。许多研究已表明内源性的凝集素 galectin 结合 T 细胞表面糖基化的 CD45、CD43 或 TIM-3 而抑制效应性 T 细胞,并诱导 T 细胞凋亡;或 C-型凝集素通过与聚糖的相互作用发生于耐受型 APCs 上 MGL 与效应性 T 细胞的 CD45。C-型凝集素、galectin 和 Siglecs 能识别不同 N-糖基化状态下的 CD43、CD45 和 MUC-1。galectin-3、DC-SIGN 和 ICAM-3 可调节在 APC 与 T 细胞间形成的突触(Synapse)。凝集素 galectin-1、-9 可改变 APC 和 B 细胞的功能,并影响 BCR 的信号转导,可诱导 IL-10 的产生,从而促进调节性 T 细胞的扩增,通过识别 N-聚糖诱导 Th1 和 Th17 的凋亡,并有利于 Th2 型反应。

除了 N-聚糖外,近年研究表明,O-聚糖在免疫自稳中也起着重要作用。在 O-糖基化过程中, α -(2,3)唾液酸转移酶 I [α -(2,3)sialyltransferase I] 催化唾液酸加到 Core 1 O-聚糖上, α -(2,3)唾液酸转移酶 I 缺失 (St3galI) 后,会组成性暴露未唾液酸化的 Core 1 O-聚糖,从而会导致 CD8⁺T 细胞凋亡,微生物感染后 CD8⁺T 抗感染功能消失。因而,细胞表面 O-聚糖的不同唾液酸化可作为开关,控制免疫反应、炎症反应或免疫耐受。

5 聚糖与炎症反应和自身免疫疾病

N-聚糖和 O-聚糖的异常表达与多种免疫相关疾病密切相关(表 1)。类风湿性关节炎或类风湿病属于自身免疫性疾病。类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis)中免疫球蛋白 G(immunoglobulin G, IgG)分子糖基化的变化是导致类风湿病的病因。IgG 占免疫球蛋白的 80%。在所有人的 IgG 重链 Fc 区发现有一个保守的 N-糖基化位点,X 射线晶体分析确定 IgG 上带有二天线的复杂型 N-聚糖。类风湿病人的 IgG 糖链中的半乳糖含量低于正常人的含

表1 一些异常糖基化与免疫相关疾病

异常糖基化	免疫相关疾病	参考文献
异常N-聚糖		
异常N-聚糖	RA和SLE	[20]
降低水平的N糖蛋白DAF和CD59	炎症反应和RA	[9,17]
在N-糖蛋白合成中Mgat5水平下降	自身免疫性疾病	[20,21]
多天线N-糖链末端出现多聚唾液酸	Wilms瘤, 小细胞肺癌、淋巴瘤	[12]
在N-糖蛋白合成中Mgat5水平增加	胰腺癌、胆管癌、白血病等	[12, 21]
异常O-聚糖		
T细胞上CD43表达低唾液酸化的core2 O-聚糖	爱滋病(AIDS)	[22]
core2 O-聚糖的异常表达	T-cell 白血病	[22-23]
T细胞的core2 O-聚糖的异常表达	WAS	[24]
在人结肠癌细胞中表达高水平的core2 O-聚糖	结肠癌	[11,17]
IgA异常O-聚糖	IgA 肾病	[11,17]
II型胶原蛋白的T细胞表位是O糖基化修饰的	RA	[25]
Tn抗原异常表达, core1 O-聚糖下调	Tn 综合征	[26]
黏蛋白O糖基化改变	胰腺癌	[11,27]

RA, rheumatoid arthritis, 类风湿性关节炎; SLS, systemic lupus erythematosus, 系统性红斑狼疮; CDG, carbohydrate-deficient glycoprotein syndromes, 碳水化合物缺乏糖蛋白综合征; Mgat5, GlcNAcT-V, 糖基转移酶; WAS, Wiskott-Aldrich syndrome, Wiskott-Aldrich综合征; Tn, O-linked N-acetylgalactosamine, GalNAc α 1-O-Ser/Thr.

量, 表现为类风湿关节炎症状的患者, IgG 铰链区的聚糖常缺少其中一个或两个末端半乳糖残基。这种由于缺乏半乳糖的 IgG 引起构象的变化, 使人体将其识别为异物, 在血管、关节等处发生免疫复合物的沉积, 从而引发类风湿病。

在一些炎症性自身免疫疾病患者, 如系统性红斑狼疮患者中, 效应 T 细胞与正常健康人的 T 细胞的糖基化状态是不同的, 患者 T 细胞表面具有暴露的末端 GalNAc 和 Gal- β (1-4)-GlcNAc 结构, 并且这种异常的糖基化水平在患者中显著上调, 凝集素 MGL 和 galectins 与这些糖结构相互作用, 下调 TCR 介导的信号转导, 并影响 T 细胞的 CD45 的磷酸酶功能。已有多项研究表明, galectin-1 在几种自身免疫疾病模型中均能抑制慢性炎症, 并驱动 Th2 细胞因子的产生。galectin-1 专门结合 Th1 和 Th17 效应 T 细胞表面聚糖, 从而导致 T 细胞死亡, 而 Th2 细胞表面表达 α 2,6 唾液酸的糖蛋白, 因而不能与 galectin-1 结合。与 galectin-1 相似, galectin-2 也诱导活化的 T 细胞凋亡, 从而改善炎症性肠病。另外 galectin-9 特异结合 Th1 的受体 TIM-3, 在自身免疫神经炎症性体内模型中选择性地减弱 Th1 反应。近来研究表明 galectin-1 与 TIM-3 相互作用同时也与 DC 的 TLR 作用而刺激组织炎症反应^[3-4]。另外 galectin-4 还能导致 CD4⁺T 的活化, 刺激 IL-6 分泌而加剧炎症反应。而 galectin-1 通过提高 IL-10 而诱导免疫耐受, 抑制炎症性反应和自身免疫疾病。

galectin-1 和 IL-10 在 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞中过度表达, 从而起到免疫抑制作用^[3-4]。

C-型凝集素在自身免疫性疾病中也发挥重要作用。靶向结合未成熟 DC 上的 MR 的糖肽能抑制实验性自身免疫性脑脊髓炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) 的发生, 而无糖基化的肽却诱导严重的 EAE。又如 Siglec-1 (sialoadhesin) 在炎症性巨噬细胞中上调, 并且在 sialoadhesin 缺失的小鼠中由于减少巨噬细胞和 T 细胞向炎症部位的流动而减弱炎症反应的发生。

6 聚糖与肿瘤免疫

大量研究表明糖基化改变与肿瘤免疫逃逸、肿瘤发生与转移密切相关。肿瘤细胞的聚糖或肿瘤细胞分泌的糖蛋白表达的改变导致了肿瘤细胞与正常细胞不同的糖基化水平。糖基化的改变可导致细胞黏附的丧失, 导致肿瘤细胞侵袭到远处的能力增强。癌变细胞表达唾液酸水平常常出现增高的趋势, 还可出现多聚唾液酸及多聚唾液酸的内酯化, 并常发生唾液酸的 9-O-乙酰化^[11]。而与唾液酸结合的凝集素 selectins 介导细胞黏附和侵袭增强。如 Tn (GalNAc-a-Ser/Thr, CD175)、sialy Tn (N-acetylneuraminic acid-a6-GalNAc-a-Ser/Thr, CD175s)、Thomsen-Friedenreich disaccharide [Gal-(1-3)-GalNAc, CD176] 以及唾液酸化的 Lewis 抗原 (CD15s) 均在恶性肿瘤细胞中高表达, 并常作为肿瘤诊断和预后的标记分子。这些糖

抗原的单抗常用于诊断肿瘤的生长和恶性程度,检测疾病状态和治疗的效果^[11]。

唾液酸化的增加是由于复杂型 N-聚糖分支的增加造成的,而分支结构的增加是由于 GlcNAc 转移酶 V 活性的提高,该酶可将 1,6-连接的 GlcNAc 添加到典型的二天线结构,形成三天线结构。在额外的多天线分支添加上唾液酸,有助于说明这些细胞表面唾液酸化的增加。利用苦马豆素 (swainsonine), N-连接聚糖加工的抑制剂,能降低细胞表面唾液酸化复杂型 N-连接聚糖的水平,该抑制剂还可以使肿瘤细胞在体内外的生长和转移性能逆转。本课题组最近采用特异抑制 GlcNAc 转移酶 V 的小分子发夹 RNA 抑制乳腺癌细胞表面的 1,6-连接的三天线 N-聚糖结构,能在体内外明显抑制乳腺癌细胞的生长,并能刺激 CD4⁺T 细胞的活性^[21],这些研究表明肿瘤细胞表面的复杂型 N-连接聚糖介导了肿瘤的免疫逃逸。

7 糖抗原与器官移植

近来还发现,肿瘤相关的糖抗原,如 MUC-1 常常作为 DC 细胞上 C-型凝集素如 DC-SIGN、MGL 的特异配体,影响 C-型凝集素的信号转导和 DC 的分化,因而调控固有免疫和适应性免疫。小鼠和人的体内外研究表明,高亲和力的抗体或糖可作为疫苗靶向载体,结合到 DC 细胞上的 C-型凝集素,刺激抗原特异性 T 细胞反应和肿瘤特异性免疫反应。靶向 C-型凝集素不仅提供 DC 特异的靶分子,同时还有利于 MHC 或 CD1 介导的抗原提呈。

猪常选择为人的器官移植供体,因为猪的数量大,其器官易得,供体来源丰富,并且猪体内感染人类的病毒较少。但猪的器官作为移植物植入人体内时,对人是异源性抗原,会产生超急性排斥反应。

目前大量研究表明,引起异种器官移植超急性排斥反应的物质,是由人体内天然存在的抗体与糖抗原分子结合引起的。这种糖抗原分子存在于猪血管内皮细胞表面,主要为 Gal α -(1-3)-Gal 和 Gal- α -(1-3)-Gal- β (1-4)-GlcNAc-R。

人体内不存在 Gal α -(1-3)-Gal 糖分子,但是人很容易感染含有这种糖分子的微生物,这样体内就产生了识别这种糖的天然抗体。人体内这种天然抗体与糖分子结合是人-猪异种器官移植的主要障碍。那么,抑制这种结合就可能使人类跨越异种器官移植的主要障碍,从而实现利用器官移植挽救生命的目的。

首先人们曾试图除去人体内的天然抗体。由于天然抗体存在于人的血液中,于是将血液从患者体内取出,通过装有糖抗原的过滤仪器过滤,天然抗体与糖分子结合会留在仪器中,余下的血液再回输患者体内,相当于天然抗体被从血液中过滤掉。如此经过多次过滤,再进行器官移植,在一定程度上延长了移植体的存活率。但在人体内循环的天然抗体恢复得很快,要完全去掉它很困难。

另一种方法是采用转基因技术,改造猪血管内皮细胞表面糖分子的结构,如移植 α -(1,3)-半乳糖基转移酶,以求抑制和消除 Gal α -(1,3)-Gal 糖分子生成,进一步抑制天然抗体与糖分子的结合。当转基因猪体内 Gal α -(1,3)-Gal 的生成停止或被抑制时,转基因猪的器官就没有了 Gal α -(1,3)-Gal 糖抗原分子,再将转基因猪的器官移植入人体就可避免超急性排斥,从而克服人-猪异种移植的主要障碍。

8 细菌和病毒糖生物学

细菌和病毒表面具有丰富聚糖,能被固有免疫系统 PRR 所识别,从而调节适应性免疫应答。如人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 和丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 病毒表面均具有丰富的 N-聚糖^[28-29],能被宿主 DC 表面的 DC-SIGN 识别活化或抑制 DC 细胞;或被游离的凝集素 MBL/ficolin 所识别,启动补体凝集素途径的活化,进一步调节适应性免疫。如国际上一些报道包括本课题组研究发现,改变 HCV 病毒包膜糖蛋白 E1/E2 的 N-糖基化均能刺激或抑制 B 细胞和 T 细胞介导的免疫应答^[30-31];又如 Shan 等^[32]报道 HIV-1 病毒的 gp120 的甘露糖在诱导 DC 细胞产生免疫抑制反应中, HIV-1 的 gp120 的甘露糖与 DC 的 DC-SIGN 结合诱导 DC 细胞产生 IL-10 为主的免疫抑制细胞因子,去除甘露糖的 gp120 不增加 IL-10 的产生,并可增强其免疫原性。

另一方面,细菌和病毒表面还具有凝集素,介导与宿主细胞表面糖结合。许多细菌毒素是凝集素,如引发霍乱的霍乱毒素 (cholera toxin)、引发多种食物中毒的大肠杆菌毒素 (*Escherichia coli* enterotoxin)、百日咳病因的百日咳毒素 (pertussis toxin)、痢疾病因的志贺毒素 (Shiga toxin)、致病性大肠杆菌的纤毛或称菌毛 (pilus)、引发伤寒肠热症的伤寒沙门菌的纤毛和来源于大肠杆菌的志贺样 Vero 细胞毒素 (verotoxin) 等,如致病性大肠杆菌的菌毛可与细胞表面含甘露糖的结构结合。细菌利用凝集素与宿主

细胞表面聚糖结合, 还黏附在宿主细胞表面含糖的结构上。这种黏附作用可能是导致细菌感染的病因。

许多病毒表面糖蛋白也是凝集素, 如流感病毒和多瘤肿瘤病毒表面的凝集素与含有唾液酸配体结合。流感病毒颗粒表面有两个糖蛋白, 一个叫血凝素 (haemagglutinin), 其主要与细胞表面带有半乳糖连接的末端唾液酸配体结合; 另一个表面糖蛋白叫神经氨酸酶 (NA), 是负责释放在被侵袭细胞中新合成的病毒毒粒。研究发现人 A 型流感病毒 A/PR/8/43 株特异结合末端序列为唾液酸 2,3 半乳糖, B 型流感病毒 B/Lee/40 株特异结合末端序列为唾液酸 2,6 半乳糖, 而 C 型流感病毒不与上述两种糖结合。糖链在流感病毒感染中的作用与结合特异性的特点, 对于流感病毒的诊断、预防与治疗具有重大意义。

9 结论和展望

由于糖链不像核酸与蛋白质那样有合成的模版, 有一定规律可循, 还有许多糖结构和聚糖的生物学功能还是不清楚, 特别是对免疫相关的糖结构与功能进展缓慢而困难, 还有许多谜底有待探索。如果解析清楚了细胞表面糖结构, 以及结构与功能的关系将会产生巨大的生物医学和药物学应用价值。近些年由于新技术的运用, 包括聚糖芯片技术、新型亲和层析技术的快速发展加速了这些研究进展。阐明宿主细胞中聚糖与凝集素相互作用机制, 及其对固有免疫和适应性免疫、免疫耐受和自稳的影响, 确定凝集素及其特异聚糖配体, 将能有效处理慢性炎症、病毒性感染、自身免疫疾病和肿瘤等。如本课题组最近发现利用机体的内源性补体凝集素 *ficolin* 结合病毒表面丰富的 N-聚糖, 可以有效抵抗丙型肝炎病毒 HCV 的感染^[33]。有关糖基化抑制剂已经应用于一些疾病的治疗, 如作为消炎药, 阻断炎症反应和抵抗 HIV 感染; 还可以作为抗肿瘤药、抗凝血药以及抗免疫排斥药, 用于器官移植排斥反应的抑制; 还可用于低抗糖尿病以及治疗由于聚糖导致的自身免疫性疾病等。

综上所述, 进一步解析糖链结构, 发掘聚糖与凝集素的免疫功能, 对于解决人类众多疑难疾病, 对于生命科学中这一最前沿学科的发展均具有重大和深远的意义。

【参 考 文 献】

[1] Green RS, Stone EL, Tenno M, et al. Mammalian N-glycan

branching protects against innate immune self-recognition and inflammation in autoimmune disease pathogenesis, *Immunity*, 2007, 308: 308-20

[2] Lowe JB. Glycosylation, Immunity, and autoimmunity. *Cell*, 2001, 104: 809-12

[3] van Kooyk Y, Rabinovich GA. Protein-glycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2008, 9: 593-601

[4] Rabinovich GA, Toscano MA. Turning 'sweet' on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation. *Nat Rev Immunol*, 2009, 9: 338-52

[5] Hart GW, Copeland RJ. Glycomics hits the big time. *Cell*, 2010, 143: 672-6

[6] Helenius A, Aebi M. Intracellular function of N-linked glycans. *Science*, 2001, 291: 2364-9

[7] Apostolopoulos V, Yuriev E, Ramsland PA, et al. A glycopeptide in complex with MHC class I uses the GalNAc residues as an anchor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 15029-34

[8] Backlund J, Carlsen S, Hoger T, et al. Predominant selection of T cells specific for the glycosylated collagen type II epitope (263-270) in humanized transgenic mice and in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 9960-5

[9] Richie GE, Moffatt BE, Sim RB, et al. Glycosylation and the complement system. *Chem Rev*, 2002, 102: 305-20

[10] Rudd PM, Elliott T, Cresswell P, et al. Glycosylation and the immune system. *Science*, 2001, 291: 2370-6

[11] Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al. *Essentials of Glycobiology*[M]. 2nd edition. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009

[12] Sperandio M, Gleissner CA, Ley K. Glycosylation in immune cell trafficking. *Immune Rev*, 2009, 230: 97-113

[13] Tsuboi S, Fukuda M. Roles of O-linked oligosaccharides in immune responses. *Bioessays*, 2001, 23: 46-53

[14] Lau KS, Partridge EA, Grigorian A, Silvescu CI, et al. Complex N-glycan number and degree of branching cooperate to regulate cell proliferation and differentiation. *Cell*, 2007, 129: 123-34

[15] Wormald MR, Sharon N. Carbohydrates and glycoconjugates roles for glycosylation: signal transduction, control of cell development and differentiation, and innate immunity. *Curr Opin Struct Biol*, 2001, 12: 567-8

[16] Toscano MA, Bianco GA, Ilarregui JM, et al. Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death. *Nat Immunol*, 2007, 8: 825-34

[17] Zhang XL. Roles of glycans and glycopeptides in immune system and immune-related diseases. *Curr Med Chem*, 2006, 13: 1141-7

[18] Ma Y, Chen H, Wang Q, et al. IL-24 protects against *Salmonella typhimurium* infection by stimulating early neutrophil Th1 cytokine production, which in turn activates CD8+T cells. *Eur J Immunol*, 2009, 39: 1-12

[19] Garg A, Barnes PF, Roy S, et al. Mannose-capped lipoarabinomannan- and prostaglandin E2-dependent

- expansion of regulatory T cells in human *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Eur J Immunol*, 2008, 38: 459-69
- [20] Green RS, Stone EL, Tenno M, et al. Mammalian N-glycan branching protects against innate immune self-recognition and inflammation in autoimmune disease pathogenesis. *Immunity*, 2007, 30: 308-20
- [21] Li DQ, Li Y, Wu X, et al. Knockdown of Mgat5 inhibits breast cancer cell growth with activation of CD4+T cells and macrophages. *J Immunol*. 2008, 180: 3158-65
- [22] Lefebvre J, Giordanengo V, Limouse M, et al. Altered glycosylation of leukosialin, CD43, in HIV-1-infected cells of the CEM line. *J Exp Med*, 1994, 180: 1609-17
- [23] Brockhausen I, Kuhns W, Schachter H, et al. Biosynthesis of O-glycans in leukocytes from normal donors and from patients with leukemia: increase in O-glycan core 2 UDP-GlcNAc:Gal beta 3 GalNAc alpha-R (GlcNAc to GalNAc) β (1-6)-N-acetylglucosaminyltransferase in leukemic cells. *Cancer Res*, 1991, 51: 1257-63
- [24] Huang MM, Tsuboi S, Wong A, et al. Expression of human Wiskott-Aldrich syndrome protein in patients' cells leads to partial correction of a phenotypic abnormality of cell surface glycoproteins. *Gene Therapy*, 2000, 7: 314-20
- [25] Backlund J, Carlsen S, Hoger T, et al. Predominant selection of T cells specific for the glycosylated collagen type II epitope (263-270) in humanized transgenic mice and in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 9960-5
- [26] Berger EG. Tn-syndrome. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1455: 255-68
- [27] Wu YM, Nowack DD, Omenn GS, et al. Mucin glycosylation is altered by pro-inflammatory signaling in pancreatic-cancer cells. *J Proteome Res*, 2009, 8: 1876-86
- [28] Cole KS, Steckbeck JD, Rowles JL, et al. Removal of N-linked glycosylation sites in the V1 region of simian immunodeficiency virus gp120 results in redirection of B-cell responses to V3. *J Virol*, 2004, 78: 1525-39
- [29] Vigerust DJ, Shepherd VL. Virus glycosylation: role in virulence and immune interactions. *Trends Microbiol*, 2007, 15: 211-8
- [30] Liu M, Chen H, Luo F, et al. Deletion of N-glycosylation of hepatitis C virus envelope protein E1 enhances specific cellular and humoral immune responses. *Vaccine*, 2007, 25: 6572-80
- [31] Li PF, Wan Q, Feng Y, et al. Engineering of N-glycosylation of hepatitis C virus envelope protein E2 enhances T cell responses for DNA immunization. *Vaccine*, 2007, 25: 1544-51
- [32] Shan M, Klasse PJ, Banerjee K, et al. HIV-1 gp120 mannose induces immunosuppressive responses from dendritic cells. *PLoS Pathog*, 2007, 3: e169
- [33] Liu J, Ali MA, Shi Y, et al. Specifically binding of L-ficolin to N-glycans of HCV envelope glycoproteins E1 and E2 leads to complement activation. *Cell Mol Immunol*, 2009, 6: 235-44