

骨性关节炎患者软骨岩藻糖基化表达的升高

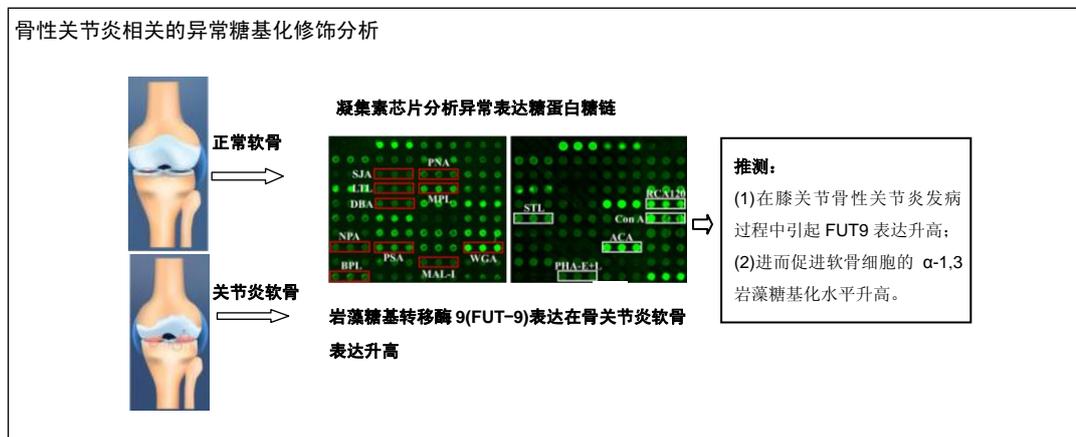
· 研究原著 ·

赵炼¹, 刘韶¹, 李毅², 于汉杰³, 赵宏谋², 梁晓军², 杨杰², 姬维娜² (¹陕西中医药大学, 陕西省咸阳市 712046; ²西安交通大学医学院附属红会医院足踝外科, 陕西省西安市 710000; ³西北大学生命科学学院功能糖组学实验室, 陕西省西安市 710000)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0803

ORCID: 0000-0002-9401-7166(李毅)

文章快速阅读:



赵炼, 男, 1983 年生, 湖南省长沙市人, 汉族, 2015 级陕西中医药大学在读硕士, 医师, 主要从事足踝外科及骨性关节炎的临床及研究。

通讯作者: 李毅, 博士, 主任医师, 西安交通大学医学院附属红会医院足踝外科, 陕西省西安市 710000

中图分类号:R318

文献标识码:A

稿件接受: 2017-10-30



文题释义:

糖基化: 糖基化是蛋白质的一种翻译后修饰, 主要发生在细胞的内质网和高尔基体中。蛋白质的糖基化修饰主要有三个类型: N-连接, O-连接以及 GPI 锚定。其中 N-连接和 O-连接糖基化在生命活动中扮演重要角色。现有的研究表明糖基化修饰的改变不仅伴随着某些疾病的发生发展, 而且对疾病的发展进程具有重要作用。

岩藻糖基化: 岩藻糖基化是糖基化的类型之一, 是指在岩藻糖基转移酶的作用下将岩藻糖转移到糖蛋白的 N 或 O-聚糖中, 形成岩藻糖基化聚糖。已有研究表明岩藻糖基化水平升高是炎症性巨噬细胞的重要特征, 而抑制岩藻糖基化能够减轻炎症。

摘要

背景: 膝关节骨性关节炎关节软骨的退行性病变和炎症是其主要特征, 而有关其软骨异常糖基化修饰的研究尚不完全清楚。

目的: 分析与骨性关节炎相关的异常糖基化修饰。

方法: 利用凝集素芯片技术分析 8 例膝关节骨性关节炎患者和 10 例健康志愿者关节软骨组织以及体外培养的膝关节骨性关节炎软骨细胞和正常软骨细胞糖蛋白糖链谱, 并利用 RT-PCR 以及 Western blot 分析相关糖基转移酶表达水平变化。

结果与结论: ①结果显示 4 种凝集素(PSA, LTL, WGA 和 NPA)识别的 Fuca-1, 3/6GlcNAc 岩藻糖, Multivalent Sia 结构以及 Man α 1-6Man 结构在膝关节骨性关节炎软骨组织和细胞中的丰度明显较高, 而凝集素 Con A 和 PHA-E+L 识别的高甘露糖型 N-聚糖以及多天线结构 N-聚糖在正常软骨组织及细胞中的丰度明显较高;

②膝关节骨性关节炎软骨组织基因表达数据, RT-PCR 以及 Western blot 结果显示参与 α -1, 3 岩藻糖基化的糖基转移酶 FUT9 在膝关节骨性关节炎患者的软骨组织中表达升高; ③推测在膝关节骨性关节炎发病过程中引起 FUT9 表达升高进而促进软骨细胞的 α -1, 3 岩藻糖基化水平升高, 这种变化可能与骨性关节炎的炎症微环境相关。

关键词:

糖蛋白糖链; 岩藻糖基化; 骨性关节炎; 退行性病变; 炎症; 组织构建

主题词:

骨关节炎; 糖基化; 炎症; 组织工程

基金资助:

陕西省自然科学基金研究计划(2013JM4059); 陕西省科学技术研究发展计划项目(2016SF-333); 西安市红会医院博士基金(YJ2012008)

Zhao Lian, Studying for master's degree, Physician, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, Shaanxi Province, China

Corresponding author: Li Yi, M.D., Chief physician, Department of Foot and Ankle Surgery, Xi'an Honghui Hospital, Xi'an Jiaotong University College of Medicine, Xi'an 710000, Shaanxi Province, China

Alterations of fucosylation in human osteoarthritis cartilage

Zhao Lian¹, Liu Shao¹, Li Yi², Yu Han-jie³, Zhao Hong-mou², Liang Xiao-jun², Yang Jie², Ji Wei-na² (¹Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, Shaanxi Province, China; ²Department of Foot and Ankle Surgery, Xi'an Honghui Hospital, Xi'an Jiaotong University College of Medicine, Xi'an 710000, Shaanxi Province, China; ³Laboratory of Functional Glycomics, College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710000, Shaanxi Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Knee osteoarthritis is characterized as cartilage degeneration and inflammation. However, the mechanism related to abnormal glycosylation modification of the cartilage remains unclear.

OBJECTIVE: To study the abnormal glycosylation modification associated with osteoarthritis.

METHODS: The lectin microarray was employed to investigate the glycan profile of the articular cartilage from 8 patients with knee osteoarthritis and 10 healthy volunteers. The alterations of glycopatterns of osteoarthritic and normal chondrocytes *in vitro* were evaluated by lectin microarray. In addition, RT-PCR and western blotting were used to analyze the expression levels of related glycosylation enzymes.

RESULTS AND CONCLUSION: The glycopatterns of Fuca-1, 3/6GlcNAc, multivalent Sia and Man α 1-6Man which identified by lectins of PSA, LTL, WGA and NPA increased in the osteoarthritic cartilage tissues and chondrocytes compared with the controls. In contrast, high mannose type of N-glycan and bi/tri/tetr-antennary N-glycans which recognized by Con A and PHA-E+L exhibited a decrease in osteoarthritic cartilage tissues and chondrocytes. According to the results of RT-PCR and western blot, glycosyltransferase FUT9 up-regulated in osteoarthritic cartilage tissues and chondrocytes, which may contribute to the alteration of α -1,3-fucosylation in osteoarthritic cartilage. We concluded that the high level of α -1,3-fucosylation may be related with inflammatory microenvironment in osteoarthritic cartilage.

Subject headings: Osteoarthritis; Glycosylation; Inflammation; Tissue Engineering

Funding: the Natural Science Research Program of Shaanxi Province, No. 2013JM4059; the Scientific Research and Development Project of Shaanxi Province, No. 2016SF-333; the Doctoral Foundation of Xi'an Honghui Hospital, No. YJ 2012008

0 引言 Introduction

骨性关节炎是一种常见的关节软骨退行性病变，主要特点是关节软骨退行性病变、细胞外基质的减少、软骨下骨的改变和滑膜的炎症反应等。骨性关节炎的发病机制目前还不清楚，性别、肥胖以及糖尿病等因素被认为可能与骨性关节炎的发生相关。已有研究报道金属基质蛋白酶(MMP1, 3, 9, 13等)以及细胞因子(如肿瘤坏死因子, 白细胞介素1和白细胞介素10等)在骨性关节炎软骨组织的表达出现异常, 并在骨性关节炎的发病过程中扮演重要角色^[1]。越来越多的证据表明炎症与骨性关节炎的发生具有密切联系, 一些促炎症因子能激活NF- κ B和MAPK等信号通路, 进而促进骨性关节炎的发生^[2]。越来越多的证据表明, 骨性关节炎是一种多因素诱发疾病, 而目前由于对其发病的机制尚不完全清楚, 因此治疗也多以缓解症状为主, 少数情况下进行手术治疗, 总体而言尚缺乏有效的治疗手段。

糖基化修饰是蛋白质一种重要的翻译后修饰, 对蛋白折叠及功能具有重要作用。细胞表面的糖蛋白糖链在介导细胞-细胞相互作用及细胞-胞外基质相互作用方面发挥重要作用^[3-5]。现有的研究表明, 糖基化修饰的改变与疾病的发生密切相关, 对风湿性关节炎患者血清IgG糖基化的研究结果显示, 风湿性关节炎患者血清IgG的N-聚糖结构发生改变, 并促进了疾病的发展^[6-8]。

Fukuda及其同事^[9]对进展与非进展的骨性关节炎患者血浆N-糖蛋白质组分析, 研究发现, 丛生蛋白、血色素结合蛋白、 α -1酸性糖蛋白2及巨噬细胞刺激蛋白这4种蛋白转录和表达水平在进展性骨性关节炎中均发生变化, 而这4种糖蛋白可作为膝关节骨性关节炎潜在的标志物。研究显示, 糖基转移酶 β 1, 4-GalT-I及E-选凝素在骨性关节炎患者软骨及滑膜组织中的表达明显高于正常对照, 这也提示, 异常表达的糖基转移酶 β 1, 4-GalT-I在骨性关节炎软骨及滑膜组织的炎症进程当中发挥重要作用^[10]。对骨性关节炎软骨细胞的糖蛋白糖链谱的研究显示, O-GlcNAc糖基化在骨性关节炎软骨中的积累增加, 骨性关节炎软骨中蛋白质O-GlcNAc糖基化水平升高可能与软骨退化相关^[11]。

上述的研究显示, 软骨细胞表面糖蛋白糖链结构的改

变及糖相关基因表达水平的变化与骨性关节炎发展密切相关。因此, 实验以骨性关节炎软骨组织及细胞为研究对象, 分析与骨性关节炎相关的异常糖基化修饰, 为骨性关节炎发病的分子机制研究提供帮助。

1 对象和方法 Subjects and methods

1.1 设计 分组对照观察。

1.2 时间及地点 于2016年1月至2017年1月在西安市红会医院及西北大学生命科学学院功能糖组学实验室完成。

1.3 对象 收集西安市红十字会医院足踝外科及关节外科2016年3至10月就诊的经病史、体查、影像学检查符合膝骨性关节炎诊断标准的8例中国北方汉族患者(膝骨关节炎组), 其中男6例, 女2例, 平均年龄57.7(41-72)岁, 平均体质指数23.9(16.8-35.6) kg/m²。

诊断标准: 诊断均由参与研究的医师按骨性关节炎标准确诊。

纳入标准: ①符合膝骨性关节炎诊断标准; ②膝关节X射线片的Kellgren/Lawrence评分 \geq 2分; ③受试者对测试均知情同意。

排除标准: 类风湿性关节炎、感染性关节炎、创伤性关节炎及其他免疫系统疾病的患者。

对照组为2例外伤截肢患者, 8例胫骨平台及股骨远端粉碎骨折患者, 无法复位固定的负重区游离软骨片, 筛选条件为年龄与膝骨关节炎组相近, 从未出现过膝关节疼痛症状, 其中男6例, 女4例, 平均年龄58.1(41-70)岁, 平均体质指数24.5(16.5-30.8) kg/m²。

研究方法经西安市红会医院伦理委员会审定, 并且每个研究对象均签署知情同意书。

1.4 材料 凝集素购自美国 Vectorlabs 公司以及 Sigma-Aldrich 公司, 蛋白提取试剂盒购自美国 Thermo Fisher 公司, 实时荧光定量 PCR 仪购自 BioRad 公司, Cy3-monofunctional dye 购自美国 GE healthcare 公司, SYBR Green 实时荧光定量试剂盒购自大连宝生物公司, 芯片点样仪 Smart Arrayer-48 购自北京博奥生物有限公司, 细胞培养液 RPMI1640 购自美国 Thermo Fisher 公

司, 激光共聚焦扫描仪购自美国AXON公司, 时荧光定量试剂盒(宝生物公司)、Nano photometer购自德国IMPLEN公司, 环氧化芯片片基实验室自制。

1.5 方法

1.5.1 原代软骨细胞分离培养 参照Miguel等^[12]报道的方法分离培养软骨细胞。手术分离膝关节骨性关节炎患者病灶部位以及正常关节软骨组织, 用无菌PBS冲洗软骨组织洗去残留的血液及杂质, 随后将软骨切成1 mm×1 mm大小, 加入0.25%的胰蛋白酶37 °C振荡孵育1 h消化细胞。1 000 r/min离心5 min, 弃上清, PBS洗去胰蛋白酶, 随后加入II型胶原酶37 °C消化8 h。1 000 r/min离心5 min, 弃上清。加胎牛血清终止消化, 加1640培养液5-10 mL混匀; 用100目金属网过滤, 滤液1 000 r/min离心10 min, 弃去上清, 再加含体积分数10%胎牛血清的1640培养液进行孵育培养。

1.5.2 凝集素芯片分析软骨组织及细胞糖蛋白糖链谱

(1)凝集素芯片制备: 使用先前建立的凝集素芯片方法制备凝集素芯片^[13-15]。简要制备方法: 首先将37种凝集素溶于指定的缓冲液中配置成终浓度为1 g/L溶液, 并加入相应的单糖提高凝集素结合特异性。随后使用芯片点样仪Smart Arrayer-48将配制的凝集素溶液点至环氧化片基上, 湿盒避光固定过夜, 37 °C真空干燥, 4 °C避光保存。

(2)蛋白提取及靶标制备: ①组织蛋白提取: 取软骨组织剪成1 mm×1 mm大小, 使用灭菌的PBS冲洗软骨组织, 弃PBS, 加入1 mL预冷的蛋白提取试剂, 匀浆2 min, 冰上孵育1 h。10 000×g离心10 min, 取上清, 加入10 μL蛋白酶抑制剂, BCA蛋白定量, -80 °C分装保存; ②细胞蛋白提取: 弃培养基, 使用5 mL灭菌的PBS冲洗2次, 洗去残留的培养基, 向培养瓶中加入1 mL预冷的蛋白提取试剂, 冰上孵育1 h。使用移液器吹打至溶液澄清。10 000×g离心10 min, 取上清, 加入10 μL蛋白酶抑制剂, BCA蛋白定量, -80 °C分装保存。

(3)凝集素芯片孵育: 取100 μg组织和细胞蛋白, 加等体积0.1 mol/L NaHCO₃(pH 9.3)混匀, 加入5 μL Cy3荧光, 涡旋离心后避光孵育3 h。使用G25分离柱分离荧光标记的蛋白。Nano photometer测量标记后蛋白浓度。用含1% BSA的PBST缓冲液封闭凝集素芯片1 h, PBST清洗2次, PBS清洗2次后甩干。取5 μg荧光标记蛋白与凝集素芯片共孵育3 h。孵育完成后PBST清洗2次, PBS清洗2次后甩干。

(4)凝集素芯片扫描和分析: 用激光共聚焦芯片扫描仪GenePix4000B扫描凝集素芯片, GenePix 6.0软件读取凝集素芯片上的结合信号强度。为消除非特异性吸附的影响, 每个点的荧光信号读数减去背景荧光读数之后所得的值纳入后续统计学分析。将归一化后数据导入EXPANDER软件进行聚类分析。使用Global归一化对芯片数据进行归一化处理, 消除不同芯片之间荧光偏差。比较各组数据, 当foldchange>1.5或< 0.66倍, 且P < 0.05认为存在显著差

异。

1.5.3 骨性关节炎软骨组织糖基因表达 在GEO数据库中查询骨性关节炎软骨基因表达数据(GSE51588)^[16]。分析10例膝关节骨性关节炎患者膝关节外侧平台软骨组织(knee lateral plateau)及5例健康志愿者同部位软骨组织。数据经归一化处理后以差异倍数在1.5倍以上(即比值≥1.5, 或≤0.66倍)并且P < 0.05为标准, 筛选差异表达基因。

1.5.4 RT-PCR验证 使用Trizol试剂分别提取膝关节骨性关节炎及健康志愿者膝关节软骨以及培养的软骨细胞的总RNA。总RNA经琼脂糖凝胶电泳确认无降解后使用PrimeScript RT reagent Kit(TaKaRa)合成cDNA, 随后使用SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II试剂盒进行Real-time PCR实验, 以GAPDH为内参基因, 2^{-ΔΔCt}验证FUT9基因在膝关节骨性关节炎患者与正常关节软骨中的表达差异。引物序列见表1。

表1 Real-time PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences for real-time PCR

基因名	引物序列(5'→3')	引物长度	扩增产物大小(bp)
FUT9	F: CCA TTT GGG CAG ACC TTT GAC	21	107
	R: AGA ACT GCA TGG GAT TTG TTG T	22	
GAPDH	F: CTG GGC TAC ACT GAG CAC C	19	101
	R: AAG TGG TCG TTG AGG GCA ATG	21	

1.5.5 Western blot验证 分别提取软骨组织及细胞总蛋白, BCA定量后取40 μg使用10% SDS-PAGE分离。电泳结束后使用半干转膜仪转膜1 h, 将胶内蛋白转入0.45 μm PVDF膜上。使用含3%BSA的TBST缓冲液封闭PVDF膜1 h, 封闭结束后使用一抗孵育PVDF膜4 °C避光过夜(FUT9多克隆抗体ab176794购自Abcam公司, β-actin单克隆抗体AA132购自碧云天公司)。孵育完成后TBST缓冲液清洗3次, 每次10 min, 随后使用HRP标记二抗孵育PVDF膜1 h, 孵育完成后重复上步清洗步骤, 蛋白成像仪成像分析。

1.6 主要观察指标 关节软骨组织和软骨细胞糖蛋白糖链谱, 及相关糖基转移酶表达水平。

1.7 统计学分析 由第四作者应用Graphpad prism 6软件采用单因素方差分析。

2 结果 Results

2.1 参与者数量分析 纳入膝关节骨性关节炎患者8例, 对照者10例, 全部进入结果分析(见图1)。

2.2 两组基线资料比较 见表2。

2.3 凝集素芯片分析骨性关节炎相关异常糖基化 研究中, 利用凝集素芯片技术比较8例膝关节骨性关节炎患者以及10例正常关节软骨糖蛋白糖链谱, 结果显示: ①凝集素PSA识别的Fuca-1,6GlcNAc结构, LTL识别的Fuca1-3Galβ1-4GlcNAc结构, BPL、PNA、MAL-I以及MPL识别的Galβ1-3GalNAc结构, SJA和DBA识别的Terminal in GalNAc, WGA识别的Multivalent Sia结构以及NPA识别

的Man α 1-6Man结构在膝骨关节炎组中的丰度明显高于健康对照组(图2A); ②凝集素STL识别的 trimers and tetramers of GlcNAc, core (GlcNAc) of N-glycan结构, ACA识别的T antigen结构, RCA120识别的 β -Gal结构, Con A识别的high-Mannose结构以及PHA-E+L识别的 Bisecting GlcNAc, bi-antennary N-glycans, tri-and tetra-antennary complex-type N-glycan糖链结构在健康对照组中的丰度明显高于膝骨关节炎组(图2B); ③HCE聚类分析结果显示, 膝骨关节炎组与健康对照组之间糖蛋白糖链的种类和丰度存在差异, Fuca-1,3/6GlcNAc岩藻糖基化以及较短的O-聚糖Gal β 1-3GalNAc糖链结构在膝骨关节炎组中的丰度较高, 而在健康对照组中, STL, Con A以及PHA-E+L识别的N-聚糖结构明显高于膝骨关节炎组(图2C)。软骨组织之间差异凝集素识别的糖链结构以及差异倍数见表3。

另外, 分别分离膝骨关节炎患者软骨以及正常关节软骨进行体外培养, 待细胞融合度达到80%左右时提取总蛋白, 利用凝集素芯片比较体外培养的关节软骨细胞糖蛋白糖链谱的差异。结果显示, ①凝集素PSA识别的Fuca-1,6GlcNAc结构, LTL识别的Fuca1-3Gal β 1-4GlcNAc结构, RCA120识别的 β -Gal结构, NPA识别的Man α 1-6Man结构, BS-I识别的 α -Gal结构以及WGA识别的Multivalent Sia结构在骨性关节炎软骨细胞中的丰度明显高于正常软骨细胞(图3A); ②在正常软骨细胞中, 凝集素PWM识别的(GlcNAc) $_n$ 结构, EEL识别的Gal α 1-3(Fuca1-2)Gal结构, Con A识别的high-Mannose结构, PHA-E+L识别的 Bisecting GlcNAc, bi-antennary N-glycans, tri-and tetra-antennary complex-type N-glycan结构以及UEA-I识别的Fuca1-2Gal β 1-4Glc(NAc)这些糖链结构的丰度明显高于骨性关节炎软骨细胞(图3B); ③HCE聚类分析结果显示骨性关节炎软骨细胞与正常软骨细胞在糖链分布上也存在差异(图3C)。软骨细胞之间差异凝集素识别的糖链结构以及差异倍数见表4。

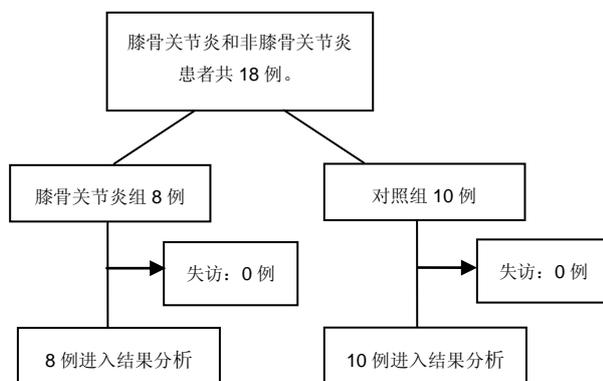


图1 患者分组流程图
Figure 1 Flow chart of the patient assignment

表2 两组患者基线资料比较

项目	膝骨关节炎组 (n=8)	对照组 (n=10)	P 值
性别(男/女, n)	6/2	6/4	
年龄(岁)	57.7(41-72)	58.1(41-70)	> 0.05
体质量指数(kg/m ²)	23.9(16.8-35.6)	24.5(16.5-30.8)	> 0.05

表注: 两组患者性别、年龄、体质量指数比较差异无显著性意义。

表3 膝骨性关节炎软骨组织与正常软骨组织之间差异糖蛋白糖链
Table 3 Abnormal glycopatterns in the osteoarthritic and normal cartilage tissues

凝集素名称	识别糖链结构	差异倍数
PSA	Fuca-1,6GlcNAc	4.05 ^c
BPL	Gal β 1-3GalNAc, Terminal GalNAc	2.62 ^b
PNA	Gal β 1-3GalNAc α -Ser/Thr(T)	2.36 ^b
SJA	Terminal in GalNAc and Gal, anti-A and anti-B human blood group	2.10 ^b
WGA	Multivalent Sia and (GlcNAc) $_n$	2.05 ^a
MAL-I	Gal β 1,4GlcNAc	1.85 ^a
LTL	Fuca1-3Gal β 1-4GlcNAc, Fuca1-anti-H blood group specificity	1.75 ^a
MPL	Gal β 1-3GalNAc, GalNAc	1.73 ^c
DBA	α GalNAc, Tn antigen, GalNAc α 1-3((Fuca1-2))Gal (blood group A antigen)	1.68 ^b
NPA	Man α 1-6Man	1.63 ^a
STL	trimers and tetramers of GlcNAc, core (GlcNAc) of N-glycan, oligosaccharide containing GlcNAc and MurNAc	0.65
ACA	Gal β 1-3GalNAc α -Ser/Thr (T antigen), sialyl-T(ST) tissue staining patterns are markedly different than those obtained with either PNA or Jacalin	0.62 ^b
RCA120	β -Gal, Gal β -1,4GlcNAc (type II), Gal β 1-3GlcNAc (type I)	0.58a
ConA	High-Mannose, Man α 1-6(Man α 1-3)Man, α Mannose, α Glc	0.48 ^b
PHA-E+L	Bisecting GlcNAc, bi-antennary N-glycans, tri- and tetra-antennary complex-type N-glycan	0.43 ^b

表注: ^aP < 0.05; ^bP < 0.01, ^cP < 0.001

表4 膝骨性关节炎软骨细胞与正常软骨细胞之间差异糖蛋白糖链
Table 4 Abnormal glycopatterns in the osteoarthritic and normal chondrocytes

凝集素名称	识别糖链结构	差异倍数
PSA	Fuca-1,6GlcNAc	∞^c
RCA120	β -Gal, Gal β -1,4GlcNAc (type II), Gal β 1-3GlcNAc (type I)	2.06 ^c
NPA	Man α 1-6Man	1.90 ^a
LTL	Fuca1-3Gal β 1-4GlcNAc, Fuca1-anti-H Blood group specificity	1.88 ^b
BS-I	α -Gal, α -GalNAc, Gal α -1,3Gal, Gal α -1,6Glc	1.82 ^c
WGA	Multivalent Sia and (GlcNAc) $_n$	1.81 ^b
PWM	(GlcNAc) $_n$ and polyLacNAc	0.63 ^b
EEL	Gal α 1-3(Fuca1-2)Gal (blood group B antigen)	0.61 ^c
ConA	High-Mannose, Man α 1-6(Man α 1-3)Man, α Mannose, α Glc	0.56 ^c
PHA-E+L	Bisecting GlcNAc, bi-antennary N-glycans, tri- and tetra-antennary complex-type N-glycan	0.54 ^c
UEA-I	Fuca1-2Gal β 1-4Glc(NAc)	0.37 ^b

表注: ^aP < 0.05; ^bP < 0.01, ^cP < 0.001; ∞ : 正常对照物明显结合信号。

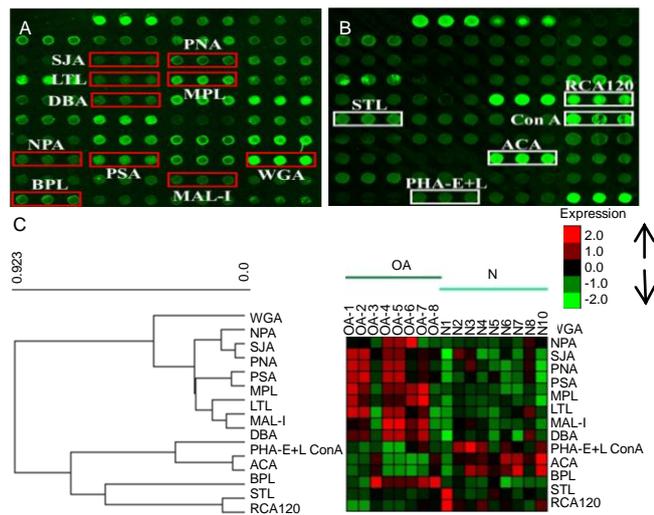


图2 凝集素芯片分析骨性关节炎患者关节软骨异常糖链结构
Figure 2 Glycan profile of the articular cartilage from knee osteoarthritis patients by lectin microarray
图注: 图A为骨性关节炎患者关节软骨糖蛋白糖链谱; B为健康对照组关节软骨糖蛋白糖链谱; C为15种凝集素结合信号聚类分析结果。

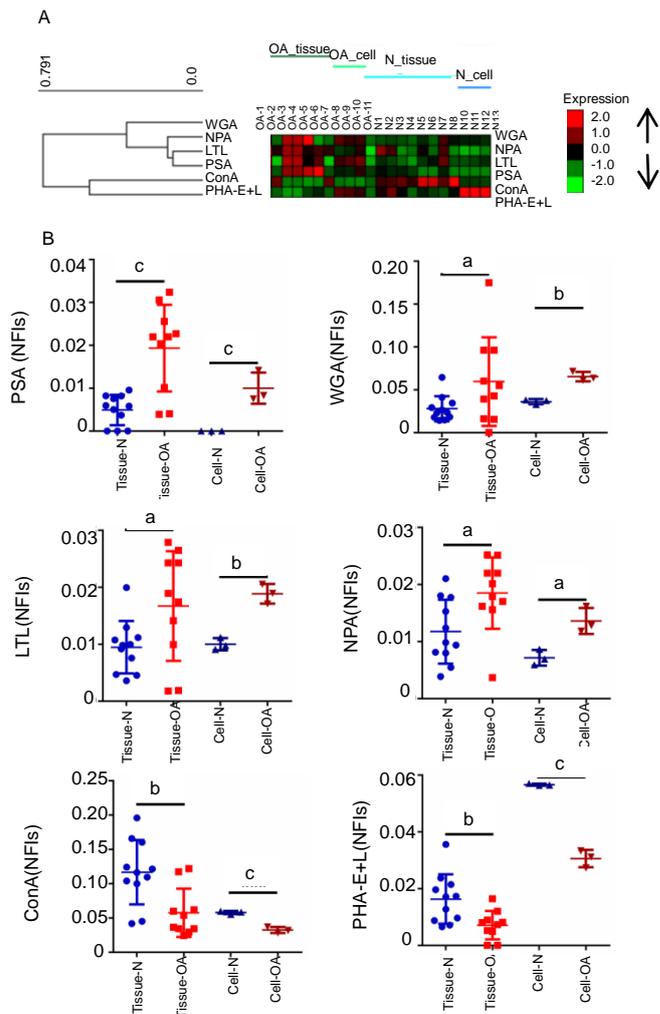


图4 筛选与骨性关节炎相关异常表达糖蛋白糖链
Figure 4 Screening of the abnormal glycosylation associated with osteoarthritis
图注: 图A为6种凝集素结合信号聚类分析结果; B为6种凝集素识别的糖链结构在骨性关节炎软骨组织及细胞中的丰度与正常对照之间存在显著差异。^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, ^c $P < 0.001$ 。Tissue-N: 正常关节软骨组织; Tissue-OA: 骨性关节炎软骨组织; Cell-N: 正常关节软骨细胞; Cell-OA: 骨性关节炎软骨细胞。

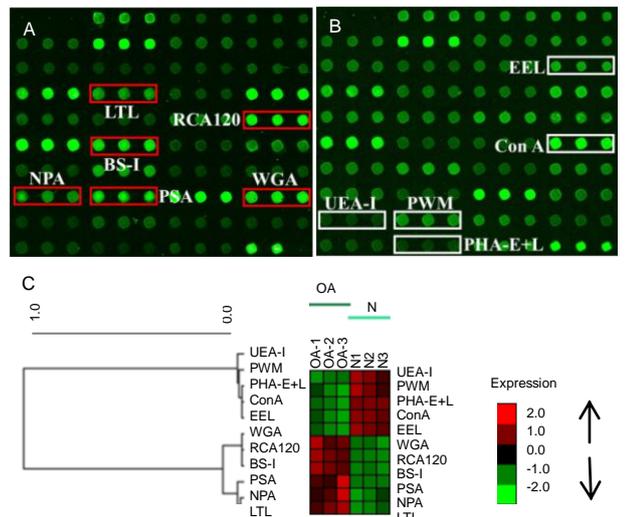


图3 体外培养骨性关节炎关节软骨细胞与正常软骨细胞糖蛋白糖链谱比较
Figure 3 Comparison of the glycopatterns between osteoarthritic and normal chondrocytes *in vitro*
图注: A为骨性关节炎关节软骨细胞糖蛋白糖链谱; B为正常软骨细胞糖蛋白糖链谱; C为11种凝集素结合信号聚类分析结果。

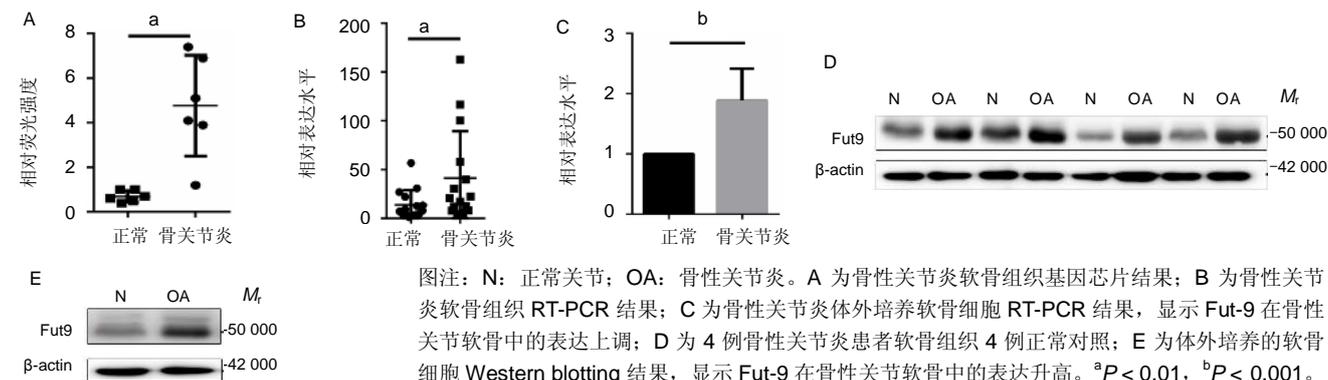


图6 FUT-9在骨性关节炎软骨表达升高
Figure 6 Up-regulated expression level of FUT9 in osteoarthritic cartilage tissues

图注: N: 正常关节; OA: 骨性关节炎。A为骨性关节炎软骨组织基因芯片结果; B为骨性关节炎软骨组织 RT-PCR 结果; C为骨性关节炎体外培养软骨细胞 RT-PCR 结果, 显示 Fut-9 在骨性关节炎软骨中的表达上调; D为4例骨性关节炎患者软骨组织4例正常对照; E为体外培养的软骨细胞 Western blotting 结果, 显示 Fut-9 在骨性关节炎软骨中的表达升高。^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.001$ 。

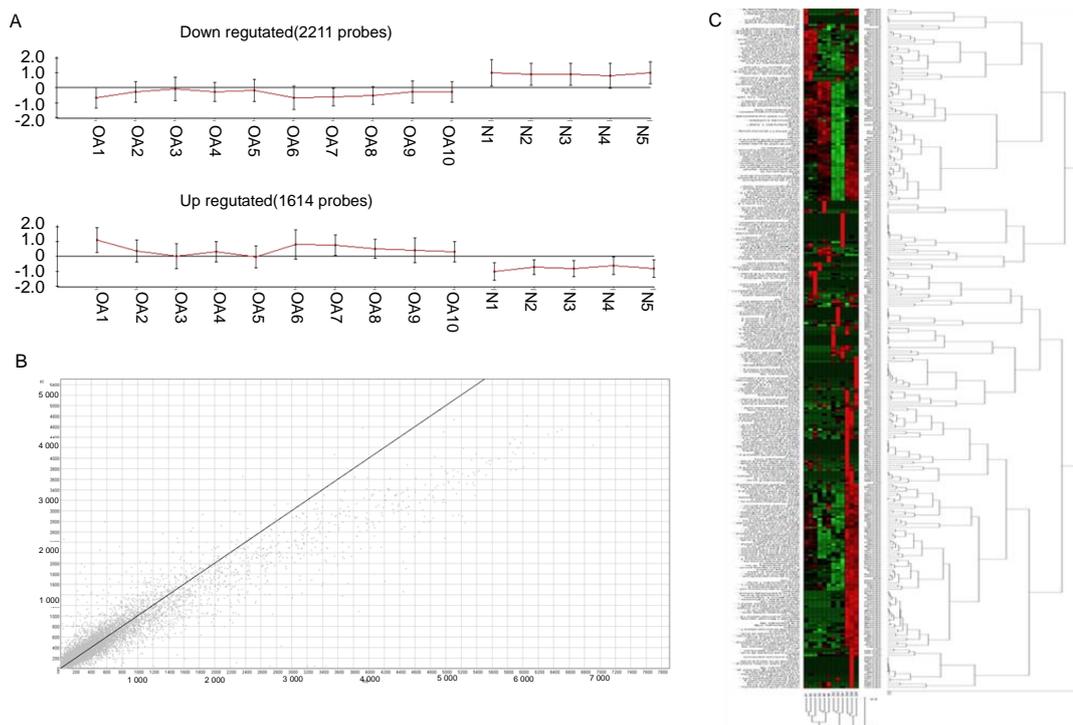


图5 骨性关节炎软骨组织基因表达分析
Figure 5 Expression of related glycosylation enzymes
图注: 图A为NCBI的GEO数据库中膝关节骨性关节炎软骨组织差异表达基因; B为基因表达散点图分析; C为HCE聚类分析骨性关节炎软骨与正常软骨组织基因表达。

结合膝关节骨性关节炎软骨组织以及软骨细胞糖蛋白糖链谱结果,发现4种凝集素(PSA, LTL, WGA和NPA)识别的Fuca-1, 3/6GlcNAc岩藻糖, Multivalent Sia结构以及Mand1-6Man结构在膝关节骨性关节炎软骨组织和细胞中的丰度明显较高,而凝集素Con A和PHA-E+L识别的高甘露糖型N-聚糖以及多天线结构N-聚糖在正常软骨组织及细胞中的丰度明显较高(图4A, B)。这一结果也提示骨性关节炎软骨中Fuca-1, 3/6GlcNAc岩藻糖岩藻糖基化水平以及多家唾液酸结构增加,而经典结构的N-聚糖特别是高甘露糖型N-聚糖以及多天线结构N-聚糖丰度降低。

2.4 膝关节骨性关节炎软骨组织基因表达分析 利用NCBI的GEO数据库中的相关数据分析在膝关节骨性关节炎中差异表达基因。下载膝关节骨性关节炎软骨组织与正常对照软骨组织基因表达数据GSE51588,利用基因芯片分析软件EXPANDER6.0分析筛选在膝关节骨性关节炎中差异表达基因。分析结果显示,膝关节骨性关节炎软骨与正常对照之间基因表达存在明显差异。以foldchange >1.5或<0.6且P<0.05为筛选条件,结果表明,1614个基因在膝关节骨性关节炎组中表达升高,而2211个基因表达降低(图5A)。结合散点图及HCE聚类分析发现骨性关节炎软骨基因表达较正常对照有降低的趋势(图5B, C)。

2.5 膝关节骨性关节炎相关异常糖基化合成通路分析 从上述异常表达基因中筛选参与糖基化修饰的相关基因,发现负责 α -1, 3岩藻糖基化的糖基转移酶FUT9在膝关节骨性关节炎患者的软骨组织中表达升高(图6A)。随后分别从收集的15例膝关节骨性关节炎患者及正常健康志愿者软骨组织以及体外培养的膝关节骨性关节炎软骨细胞及正常软骨细胞提取总RNA,经反转录后使用Real Time-PCR比

较FUT9基因在膝骨关节炎组及正常对照之间的表达差异。RT-PCR结果显示,糖基转移酶FTU9在膝骨性关节炎软骨组织及细胞中的转录水平明显高于正常对照(图6B, C)。

随后,利用Western blot进一步分析FUT9在膝骨关节炎组与正常对照之间的表达差异,结果显示(图6D, E),糖基转移酶FUT9在膝关节骨性关节炎软骨组织以及细胞中的表达明显高于正常对照,这与基因芯片以及RT-PCR结果一致。结合凝集素芯片筛选的与膝关节骨性关节炎相关的异常表达糖蛋白糖链结构,作者推断 α -1, 3岩藻糖基化的糖基转移酶FUT9在膝关节骨性关节炎患者的软骨组织及体外培养的膝关节骨性关节炎软骨细胞中的表达升高,进而引起 α -1, 3岩藻糖基化合成增加导致在膝骨性关节炎软骨组织及细胞中含 α -1, 3岩藻糖的糖蛋白糖链丰度明显高于正常对照。在膝关节骨性关节炎软骨中 α -1, 3岩藻糖基化水平升高可能与慢性炎症反应相关,作者也将在后续研究中进一步分析引起 α -1, 3岩藻糖基化水平升高的分子机制。

3 讨论 Discussion

蛋白质糖基化是一种重要的翻译后修饰,在机体的生命活动中扮演重要角色。现有的研究表明,在疾病的发生发展过程伴随着异常糖基化的发生,如某些糖链结构丰度发生改变和出现一些新的糖链结构^[17]。与此同时,已有研究证明异常糖基化对某些疾病(如肿瘤)的发展具有促进作用^[18]。因此,研究与疾病相关的异常糖基化对疾病的诊断及揭示疾病产生的分子机制具有重要作用,这也是近些年来糖生物学研究的热点之一。

在本实验中,利用凝集素芯片技术比较膝关节骨性关

节炎软骨组织及细胞与正常软骨组织及细胞的糖蛋白糖链谱。结果显示,有10种凝集素(如PSA, BPL和PNA等)在膝关节骨性关节炎软骨组织中的结合信号明显高于正常软骨组织。结合凝集素识别的糖蛋白糖链结构,作者发现 α -1, 3/6岩藻糖,较短的O-聚糖结构(T抗原, Tn 抗原)以及多价唾液酸在膝关节骨性关节炎软骨组织中的表达较高。与之相反的是,凝集素STL, Con A和PHA-E+L识别的高甘露糖型N-聚糖,平分型以及多天线结构N-聚糖等在膝关节骨性关节炎软骨组织中的表达较低。

为进一步研究膝关节骨性关节炎相关异常糖基化,手术分离膝关节骨性关节炎及正常软骨,分离软骨细胞体外培养,随后利用凝集素芯片分析体外培养的膝关节骨性关节炎及正常软骨细胞糖蛋白糖链谱,结果显示,6种凝集素(如PSA, RCA20和LTL等)识别的糖链结构在膝关节骨性关节炎软骨细胞中的表达高于正常软骨细胞,而5种凝集素(如EEL, Con A和PHA-E+L)识别的糖链结构在膝关节骨性关节炎软骨细胞中的表达较低。

结合膝关节骨性关节炎软骨组织及细胞的糖蛋白糖链谱,结果显示,PSA, WGA, LTL和NPA识别的糖链结构在膝关节骨性关节炎软骨组织及细胞的表达均高于正常对照,这一结果表明,在膝关节骨性关节炎发展过程中,软骨细胞糖基化发生了改变表现为 α -1, 3/6岩藻糖基化,多价唾液酸升高以及N-聚糖降低。

结合骨性关节炎软骨组织及细胞的糖蛋白糖链谱,结果显示4种凝集素PSA, LTL, WGA和NPA识别的糖链结构表达升高,而Con A和PHA-E+L识别的糖链表达降低。值得注意的是PSA识别的Fuc α -1, 6GlcNAc结构在骨性关节炎软骨组织和细胞的表达均显著高于正常对照(foldchange > 4.05, $P < 0.001$),而且凝集素LTL识别Fuc α -1, 3GlcNAc糖链也在骨性关节炎软骨和细胞中的表达较高,这也表明 α -1, 3/6岩藻糖基化水平升高是骨性关节炎的重要特征。

研究还存在一定的局限性:首先,纳入研究的临床样本例数较少;其次,岩藻糖基化水平升高对骨性关节炎的作用机制尚未完全清楚。因此,作者也将针对这两点展开后续研究。收集更多临床样本,进一步分析岩藻糖基化水平升高与骨性关节炎的相关性。针对表达上调的Fut-9进行RNA干扰,以及加入岩藻糖配体等方法分析岩藻糖基化水平改变对骨性关节炎软骨以及炎症微环境的影响。

慢性的炎症反应在骨性关节炎的发病过程中具有重要作用,已有研究表明,岩藻糖基化水平与炎症相关^[19]。阚鹏等^[20]的研究显示,类风湿性关节炎患者膝关节滑膜组织FucT-V的表达高于对照组,高表达的FucT-V可能参与炎症反应过程。Li等^[21]对类风湿性关节炎及骨性关节炎患者滑膜组织的分析结果显示,糖链末端的岩藻糖基化与滑膜组织的炎性巨噬细胞相关。Sialyl Lewisx抗原是一个由唾液酸,半乳糖, N-乙酰葡萄糖胺以及岩藻糖组成的四糖结构。

蛋白多糖4(proteoglycan 4)是关节液中的一种高丰度糖蛋白, Jin等^[22]的研究显示,在类风湿性关节炎患者关节液中蛋白多糖4糖基化修饰发生改变, Sialyl Lewisx抗原表达增加,导致与其配体L-选凝素的相互作用增加最终促进多核粒细胞介导的炎症反应(PMN-mediated inflammation)。

2-脱氧D-半乳糖(2-deoxy-d-galactose, 2-d-gal)是岩藻糖基化的合成抑制剂,在小鼠关节炎模型中加入2-D-gal能够抑制M1巨噬细胞的抗原递呈功能,进而缓解关节炎的炎症反应^[21]。Takeshita等^[23]的研究表明类风湿性关节炎患者血清中金属基质蛋白酶3的O-聚糖唾液酸化修饰可以用以评估类风湿性关节炎发展进程。

唾液酸化修饰是糖基化修饰的一种,发生在糖链末端,现有的研究证明唾液酸化水平升高与肿瘤的转移以及炎症微环境相关^[24-27]。唾液酸化水平失调与骨性关节炎和类风湿性关节炎相关,有研究表明,唾液酸化N-聚糖在骨性关节炎软骨组织中的丰度高于未损伤的软骨组织^[28]。此外, Svala等^[29]对骨性关节炎关节滑液的研究结果显示,单唾液酸化O-聚糖核心结构-1(monosialylated Core 1 O-glycans)在骨性关节炎关节滑液中的丰度明显高于正常。

上述结果也显示骨性关节炎软骨唾液酸化可能与炎症相关。在软骨细胞体外培养中加入唾液酸受体能够抑制有ROS诱导引起的软骨降解^[30]。另外,通过提高 α 2, 6-唾液酸表达,可以与半乳凝集素1竞争性结合进而抑制骨性关节炎炎症^[31]。这些研究结果也提示异常改变的糖蛋白糖链不仅是骨性关节炎软骨的特征,而且在骨性关节炎的治疗中潜在的临床应用价值。

研究结果显示,在膝关节骨性关节炎软骨组织及细胞中,凝集素PSA, LTL, WGA和NPA识别的Fuc α -1, 3/6GlcNAc岩藻糖, Multivalent Sia结构以及Man α 1-6Man结构在膝关节骨性关节炎软骨组织和细胞中的丰度明显较高,而凝集素Con A和PHA-E+L识别的高甘露糖型N-聚糖以及多天线结构N-聚糖在正常软骨组织及细胞中的丰度明显较高。

另外, RT-PCR以及Western blot结果也显示膝关节骨性关节炎软骨组织和细胞中参与 α -1, 3岩藻糖基化的糖基转移酶FUT9在膝关节骨性关节炎软骨组织以及细胞中的表达升高,这可能促进膝关节骨性关节炎软骨细胞中 α -1, 3岩藻糖基化水平升高。结合本研究以及文献报道推测膝关节骨性关节炎软骨中 α -1, 3岩藻糖基化合成的增加可能与骨性关节炎的炎症微环境相关。

研究通过对骨性关节炎软骨组织以及细胞的糖蛋白糖链谱分析发现岩藻糖以及唾液酸糖基化水平在骨性关节炎软骨中升高,这一发现也表明关节软骨蛋白糖基化修饰改变是骨性关节炎的一个重要特征。结合作者的发现和文献报道,关节软骨蛋白糖基化修饰的改变可能促进炎症因子的释放,加剧软骨损伤,而改变某些糖基化(如唾液酸化)在软骨中的表达已被证明能够有效的缓解炎症,减轻软骨

的退行性病变。这也提示异常糖基化在骨性关节炎的治疗中具有潜在的应用价值。

作者贡献: 本次研究由李毅设计, 手术取材由李毅、赵宏谋、梁晓军、杨杰完成, 临床材料处理由姬维娜完成、基础实验部分由于汉杰、赵炼、刘韶完成。最终结果评估由李毅、于汉杰实施。

经费支持: 该文章接受了“陕西省自然科学基金研究计划(2013JM4059); 陕西省科学技术研究发展计划项目(2016SF-333); 西安市红会医院博士基金(YJ 2012008)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 临床试验研究的实施符合《赫尔辛基宣言》和医院对人体研究的相关伦理要求。文章的撰写与编辑修改后文章遵守了《观察性临床研究报告指南》(STROBE 指南)。参与实验的患病个体及其家属为自愿参加, 所有供者、受者均对实验过程完全知情同意, 在充分了解本治疗方案的前提下签署“知情同意书”。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经国内小同行外审专家双盲外审, 符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 第一作者对研究和撰写的论文中出现的不良行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 3.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

[1] 孙永生, 娄思权. 骨性关节炎发病分子机制研进展[J]. 中国骨与关节损伤杂志, 2005, 20(8): 571-573.

[2] Goldring MB, Otero M. Inflammation in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2011;23(5):471-478.

[3] Wong C H. Protein glycosylation: new challenges and opportunities. *J Org Chem*. 2005;70(11): 4219-4225

[4] Shental-Bechor D, Levy Y. Folding of glycoproteins: toward understanding the biophysics of the glycosylation code. *Curr Opin Struct Biol*. 2009;19:524-533

[5] Mitra N, Sinha S, Ramya TN, et al. N-linked oligosaccharides as outfitters for glycoprotein folding, form and function. *Trends Biochem Sci*. 2006;31:156-163.

[6] Chou CT. Binding of rheumatoid and lupus synovial fluids and sera-derived human IgG rheumatoid factor to degalactosylated IgG. *Arch Med Res*. 2002;33:541-544.

[7] Watson M, Rudd P M, Bland M, et al. Sugar printing rheumatic diseases: a potential method for disease differentiation using immunoglobulin G oligosaccharides. *Arthritis Rheum*. 1999;42: 1682-1690.

[8] Parekh RB, Dwek RA, Sutton BJ, et al. Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG. *Nature*. 1985;316: 452-457.

[9] Fukuda I, Ishihara T, Ohmachi S, et al. Potential plasma biomarkers for progression of knee osteoarthritis using glycoproteomic analysis coupled with a 2D-LC-MALDI system. *PROTEOME SCI*. 2012;10(1):10-36

[10] Liu W, Cui Z, Wang Y, et al. Elevated expression of β 1,4-galactosyltransferase-1 in cartilage and synovial tissue of patients with osteoarthritis. *Inflammation*. 2012; 35(2): 647-655.

[11] Tardio L, Andrés-Bergós J, Zachara NE, et al. O-linked N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) protein modification is increased in the cartilage of patients with knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2014;22(2):259-263.

[12] Otero M, Favero M, Dragomir C, et al. Human chondrocyte cultures as models of cartilage-specific gene regulation. *Methods Mol Biol*. 2012; 806:301-36.

[13] 简强, 于汉杰, 陈超, 等. 凝集素芯片技术检测糖蛋白方法的建立及初步应用[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2009, 36(2):254-259

[14] Yu H, Zhu M, Qin Y, et al. Analysis of glycan-related genes expression and glycan profiles in mice with liver fibrosis. *J Proteome Res*. 2012;11(11): 5277-85.

[15] Zhong Y, Qin Y, Yu H, et al. Avian influenza virus infection risk in humans with chronic diseases. *Sci Rep*. 2015;5:8971.

[16] Chou CH, Wu CC, Song IW, et al. Genome-wide expression profiles of subchondral bone in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*. 2013;15(6):R190.

[17] Pinho SS, Reis CA. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nat Rev Cancer*. 2015; 15(9): 540-555.

[18] Hakomori S. Glycosylation defining cancer malignancy: new wine in an old bottle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99(16): 10231-10233.

[19] Angata T, Fujinawa R, Kurimoto A, et al. Integrated approach toward the discovery of glyco-biomarkers of inflammation-related diseases. *Ann N Y Acad Sci*. 2012; 1253: 159-169.

[20] 阙鹏, 刘璠, 徐华, 等. α 1,3-岩藻糖基转移酶-V 在类风湿性关节炎滑膜组织中的表达及意义[J]. *江苏医药*, 2015; 41(16): 1923-1925.

[21] Li J, Hsu HC, Ding Y, et al. Inhibition of fucosylation reshapes inflammatory macrophages and suppresses type II collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2014; 66(9): 2368-2379.

[22] Jin C, Ekwall AK, Bylund J, et al. Human synovial lubricin expresses sialyl Lewis x determinant and has L-selectin ligand activity. *J Biol Chem*. 2012; 287(43): 35922-35933.

[23] Takeshita M, Kuno A, Suzuki K, et al. Alteration of matrix metalloproteinase-3 O-glycan structure as a biomarker for disease activity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2016; 18(1): 112.

[24] Büll C, Stoel MA, den Brok MH, et al. Sialic acids sweeten a tumor's life. *Cancer Res*. 2014;74(12):3199-204.

[25] Vajaria BN, Patel KR, Begum R, et al. Sialylation: an Avenue to Target Cancer Cells. *Pathol Oncol Res*. 2016; 22(3): 443-447.

[26] de Visser KE, Coussens LM. The inflammatory tumor microenvironment and its impact on cancer development. *Contrib Microbiol*. 2006; 13: 118-137.

[27] Bassagañas S, Allende H, Cobler L, et al. Inflammatory cytokines regulate the expression of glycosyltransferases involved in the biosynthesis of tumor-associated sialylated glycans in pancreatic cancer cell lines. *Cytokine*. 2015;75(1):197-206.

[28] Briggs MT, Kuliwaba JS, Muratovic D, et al. MALDI mass spectrometry imaging of N-glycans on tibial cartilage and subchondral bone proteins in knee osteoarthritis. *Proteomics*. 2016;16(11-12):1736-1741.

[29] Svala E, Jin C, Rüetschi U, et al. Characterisation of lubricin in synovial fluid from horses with osteoarthritis. *Equine Vet J*. 2017; 49(1):116-123.

[30] Carpintero-Fernandez P, Gago-Fuentes R, Varela-Eirin M, et al. Targeting sialic acid modified receptors as a potential therapy for osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2016;24: S334.

[31] Toegel S, Weinmann D, André S, et al. Galectin-1 Couples Glycobiology to Inflammation in Osteoarthritis through the Activation of an NF- κ B-Regulated Gene Network. *J Immunol*. 2016; 196(4):1910-1921.