DOI:10.16016/j.2097-0927.202310077

半乳糖上调内皮细胞 Siglec-9 聚糖配体水平抑制巨噬细胞活性

吴妮婷,摄渊婷,刘红梅,李 瑾,贾 乙 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)药学与检验医学系药剂学教研室

[摘要] **目的** 探究半乳糖对人原代肺动脉内皮细胞上唾液酸特异性 Ig 样凝集素-9(sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectin 9, Siglec-9)聚糖配体表达的影响及作用机制。**方法** 采用流式细胞术确定内皮细胞表面 Siglec-9 聚糖配体的表达并鉴定该聚糖配体末端糖苷键类型;分别用左旋葡萄糖、葡萄糖、N-乙酰基葡萄糖、甘露糖、N-乙酰基甘露糖、半乳糖、唾液酸、蔗糖处理内皮细胞 48 h,采用流式细胞术检测内皮细胞 Siglec-9 聚糖配体的表达;将内皮细胞分为对照组和半乳糖组($n=3$),Western blot、流式细胞术、免疫荧光分析半乳糖对内皮细胞 Siglec-9 聚糖配体表达的影响;α2-3,6,8 唾液酸酶处理内皮细胞后,Western blot 检测半乳糖对内皮细胞 Siglec-9 聚糖配体恢复时间的影响;半乳糖处理内皮细胞后,Western blot 检测分析细胞内唾液酸合成关键酶(GNE、NANS、NANP、CMAS、NPL 以及 ST3Gals)表达水平,并用 RT-qPCR 验证相关蛋白的 mRNA 表达;siRNA 敲低 NANP、CMAS 及 ST3Gal-Ⅲ,Western blot 检测内皮细胞 Siglec-9 聚糖配体水平变化;巨噬细胞与内皮细胞共培养实验分析 Siglec-9 聚糖配体的增加对巨噬细胞的凋亡与吞噬能力的影响。**结果** 内皮细胞上表达有 Siglec-9 聚糖配体且该配体为末端结构为 α2-3 连接的唾液酸糖蛋白;与对照组比较,半乳糖组内皮细胞上该聚糖配体表达水平显著增加($P<0.01$),但半乳糖的添加对该配体的自我恢复时间无影响;与对照组比较,半乳糖处理的内皮细胞中 NANP、CMAS、ST3Gal-Ⅲ 表达水平升高($P<0.05$,$P<0.01$),且 RT-qPCR 验证结果与其一致;抑制内皮细胞中 NANP、CMAS、ST3Gal-Ⅲ 的表达后,内皮细胞 Siglec-9 聚糖配体水平下降($P<0.01$)。共培养实验中,与未处理组比较,半乳糖处理的内皮细胞促进巨噬细胞凋亡增加($P<0.01$),并导致其吞噬能力减弱($P<0.05$)。**结论** 半乳糖通过 NANP-CMAS-ST3Gal-Ⅲ 通路上调内皮细胞 上 Siglec-9 聚糖配体水平,从而抑制巨噬细胞活性。

[关键词] 半乳糖;内皮细胞;唾液酸特异性 Ig 样凝集素-9 聚糖配体;唾液酸合成关键酶;巨噬细胞
[中图法分类号] R343.23; R322.12; R329.25 [文献标志码] A

Galactose up-regulates the level of Siglec-9 glycan ligand in endothelial cells to inhibit macrophage activity

WU Niting, SHE Yuanting, LIU Hongmei, LI Jin, JIA Yi Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy and Laboratory Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect and mechanism of galactose on the expression of sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectin 9 (Siglec-9) glycan ligand on human primarily cultured pulmonary artery endothelial cells. **Methods** The expression of Siglec-9 glycan ligand on the endothelial cell surface and the type of glycosidic bonds at the end of this ligand were identified by flow cytometry. Endothelial cells were treated with L-glucose, glucose, N-acetylglucose, mannose, N-acetylmannose, galactose, sialic acid and sucrose for 48 h, and the expression of Siglec-9 glycan ligand in endothelial cells was detected by flow cytometry. The endothelial cells were divided into the control group and the galactose group ($n=3$). Western blotting, flow cytometry, and immunofluorescence assay were employed to investigate the impact of galactose on the Siglec-9 glycan ligand in endothelial cells. After α2-3,6,8 sialidase treatment for endothelial

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81973319)
[通信作者] 贾 乙,E-mail:jy@tmmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

cells, Western blotting was used to detected the effect of galactose on the recovery time of Siglec-9 glycan ligand in endothelial cells. Endothelial cells were treated with galactose, Western blotting was used to detect and analyze the expression levels of intracellular sialic acid synthetases (GNE, NANS, NANP, CMAS, NPL and ST3Gals), and the mRNA expression levels of the relevant proteins were verified by RT-qPCR. Western blotting was used to detect the changes of Siglec-9 glycan ligand level in endothelial cells after siRNA knockdown in NANP, CMAS and ST3Gal-Ⅲ. The effect of the increase of Siglec-9 ligand on apoptosis and phagocytosis of macrophages was analyzed by macrophage co-culture experiments. **Results** Endothelial cells showed the expression of Siglec-9 ligand and the ligand was a sialic acid glycoprotein linked to α 2-3 sialic acid at the end. Compared with the control group, the expression level of this ligand on endothelial cells in the galactose group was increased significantly ($P<0.01$), but the addition of galactose had no effect on the self-recovery time of the ligand. Compared with the control group, the expression levels of NANP, CMAS and ST3Gal-Ⅲ in endothelial cells treated with galactose were increased ($P<0.05$, $P<0.01$), respectively. The results of RT-qPCR verification were consistent with those results. After the expression of NANP, CMAS or ST3Gal-Ⅲ was inhibited, the level of Siglec-9 glycan ligand in endothelial cells was decreased ($P<0.01$). In the co-culture experiment, compared with the untreated group, galactose-treated endothelial cells promoted the apoptosis of macrophages ($P<0.01$) and reduced their phagocytosis ($P<0.05$). **Conclusion** Galactose up-regulates the level of Siglec-9 glycan ligand on endothelial cells through the NANP-CMAS-ST3Gal-Ⅲ pathway, thereby inhibiting the activity of macrophages.

[**Key words**] galactose; endothelial cells; Siglec-9 glycan ligand; sialic acid synthase; macrophage

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81973319). Corresponding author: JIA Yi, E-mail: jy@tmmu.edu.cn

内皮细胞是血液和血管壁之间的重要屏障,其表面被糖蛋白和蛋白聚糖组成的糖萼层覆盖,内皮糖萼具有多种生物功能,包括调节物质交换/运输、细胞黏附以及维持血管稳态[1-2]。研究证实,血脂异常、高血压、高血糖等因素会引起血管内皮糖萼损伤,糖萼的丢失或降解可能导致局部血管扩张、通透性改变,进而诱发炎症,导致内皮稳态的失衡[3-4],这些变化是许多疾病(包括动脉粥样硬化)的病理生理学基础[5-6]。动脉粥样硬化会导致心肌梗死、脑卒中等多种严重心脑血管疾病,其病死率居各类疾病之首[7]。目前,学术界广泛认可动脉粥样硬化是一种血管慢性炎症性疾病。其中,血管内皮功能障碍导致的单核-巨噬细胞的浸润和泡沫细胞的形成是动脉粥样硬化的关键启动步骤,且炎症反应会伴随疾病发展的全过程[8]。但现有应用于改善内皮功能障碍、降低心血管事件发生率的抗炎药物具有较大局限性[9-10],亟须探索维持血管局部炎症稳态的新靶点及干预手段。

唾液酸特异性 Ig 样凝集素(sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectin, Siglec)是一个唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素家族,通过识别以唾液酸为末端的聚糖配体来调节先天性和适应性免疫系统中细胞的功能[11-12]。Siglec-9(人源,小鼠同系物为 Siglec-E)表达于人单核/巨噬细胞、中性粒细胞等髓系免疫细胞上,与聚糖配体结合后激活,通过募集 SHP-1 和 SHP-2 显著抑制细胞过度炎症反应[13]。Siglec-9 特异性识别末端结构为唾液酸 Lewis-x(SLex, Neu5Acα2-3Galβ1-4[Fucα1-3]GlcNAc)的聚糖配体,而不同细胞上的聚糖配体可表现为不同糖蛋白或者糖脂[9]。课题组前期已证实,内皮细胞上存在 Siglec-9/E 聚糖配体,且在脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)的炎症刺激下,该聚糖配体表达水平上调,维持血管局部炎症稳态[14]。但目前对 Siglec-9/E 配体表达变化的机制研究尚不够深入,尤其是对能够调节该配体表达水平的有临床应用前景的干预手段尚缺乏报道。本研究使用人原代肺动脉内皮细胞,旨在从该聚糖配体的合成底物中筛选出能够调节其表达水平的单糖,并阐明其分子机制,从糖生物学角度以维持血管局部炎症稳态为方向,以调节内皮细胞上 Siglec-9 聚糖配体表达水平作为动脉粥样硬化全新干预靶点并为探索干预策略提供理论和实验室支持。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

人原代肺动脉内皮细胞和人急性单核白血病细胞(tohoku hospital pediatrics-1, THP-1)购自 ATCC 细胞库,原代内皮细胞专用培养基购自赛百慷上海生物技术有限公司;半乳糖购自中国上海麦克林生化科技有限公司;RIPA 裂解液、SDS-PAGE 凝胶快速配制试剂

盒、抗荧光淬灭封片、FITC-山羊抗人 IgG Fc 抗体均购自上海碧云天生物技术有限公司;α2-3,6,8 唾液酸酶购自美国 New England BioLabs 公司;重组人 Siglec-9 Fc 蛋白购自美国 R&D 公司;重组人 Siglec-9 蛋白购自美国 MedChemExpress 公司;PE-抗人 IgG Fc 重组抗体购自美国 Biolegend 公司;ST3Gal-Ⅰ/Ⅱ/Ⅲ/Ⅳ/Ⅴ抗体购自英国 Abcam 公司;GNE、NANS、NANP、CMAS、NPL 抗体均购自美国 Thermofisher 公司;NANP siRNA(h)、CMAS siRNA(h)、ST3Gal-Ⅲ siRNA(h)购自美国 Santa Cruz 公司;EZ-Red 大肠杆菌荧光颗粒-PE 购自美国 Biovision 公司;流式细胞仪型号为 BD Accrui™C6(美国);激光共聚焦显微镜型号为 Zeiss LSM 900;显影仪型号为 GelView 6000 Pro。

1.2 *方法*

1.2.1 细胞培养 配置完全培养基:在内皮细胞基础培养基中加入 10%的胎牛血清、1%青-链霉素(双抗)、1%谷氨酰胺、1%内皮细胞生长因子(endothelial cell growth supplement,ECGS)、1%肝素钠,用于培养内皮细胞,当细胞密度达到 80%左右传代。培养箱设置为 37 ℃、5%CO_2。

1.2.2 流式细胞术鉴定 Siglec-9 聚糖配体末端糖苷键类型 收集重悬上述培养好的内皮细胞,按 10^6 个/100 μL 加入 0.5 μL MAL Ⅱ Biotinylated 4 ℃孵育 30 min。DPBS 洗涤 3 次后,加入 1 μL APC-streptavidin 和 1 μL FITC-SNA,室温避光孵育 20 min。DPBS 清洗并过 70 μm 细胞筛后,使用流式细胞仪检测。

1.2.3 流式细胞术检测内皮细胞 Siglec-9 聚糖配体表达以及不同糖对其表达水平的影响 将内皮细胞(1×10^5 个/mL)接种于 12 孔板中($n=3$),并进行以下分组:对照组、左旋葡萄糖组(20 μmol/L)、葡萄糖组(20 μmol/L)、N-乙酰基葡萄糖组(20 μmol/L)、半乳糖组(20 μmol/L)、甘露糖组(20 μmol/L)、N-乙酰基甘露糖组(20 μmol/L)、唾液酸组(20 μmol/L)、蔗糖组(20 μmol/L),然后将 12 孔板放置于 37 ℃培养箱中培养 48 h。收集各组细胞,每 100 μL 体积加入 8 μL 重组人 Siglec-9 Fc 蛋白,4 ℃孵育 1 h。DPBS 洗涤 3 次后,加入 PE-抗人 IgG Fc 重组抗体,室温避光孵育 20 min。DPBS 清洗,并过 70 μm 细胞筛后,使用流式细胞仪检测。

1.2.4 免疫荧光法 将内皮细胞(5×10^4 个/mL)接种于已放置细胞爬片的 24 孔板中,对内皮细胞进行以下分组:对照组、半乳糖(12.5、25、50 μmol/L)组,然后置于 37 ℃培养箱中培养 48 h。多聚甲醛固定 15 min,DPBS 清洗 3 次。5%山羊血清室温封闭 1 h。加入重组人 Siglec-9 Fc 蛋白,4 ℃孵育过夜。DPBS 清洗 3 次,加入 FITC-山羊抗人 IgG Fc 抗体,室温避光孵育 2 h。DPBS 清洗 3 次,捞片,抗荧光淬灭封片剂封片,激光共聚焦显微镜下观察拍照。

1.2.5 Western blot 测定内皮细胞 Siglec-9 聚糖配体以及配体合成关键酶表达水平 唾液酸酶处理内皮细胞:将内皮细胞接种于 24 孔板中,加入含有 300 U α2-3,6,8 唾液酸酶的培养基后,于 37 ℃培养箱中培养 12 h,DPBS 清洗后,进行后续实验。收集处理好的各组内皮细胞,加入 RIPA 细胞裂解液,于冰上裂解 20 min 后,12 000 r/min 离心 10 min,取上清,BCA 法测定蛋白质含量并调平。样品 100 ℃加热 10 min,SDS 凝胶电泳,转膜,5%脱脂牛奶封闭 2 h。随后分别用 ST3Gal-Ⅰ/Ⅱ/Ⅲ/Ⅳ/Ⅴ抗体,GNE、NANS、NANP、CMAS、NPL 抗体 4 ℃孵育过夜,PBST 清洗 3 次后加入相应二抗,室温孵育 1 h,PBST 清洗 3 次,发光液显影后采集图片。

1.2.6 RT-qPCR 验证内皮细胞内 *NANP/CMAS/ST3Gal-*Ⅲ的 mRNA 水平 半乳糖处理内皮细胞 0、12、24、36、48 h 后,根据 TIANGEN 公司 RNA Easy Fast 动物组织/细胞总 RNA 提取试剂盒的操作指南提取 RNA;然后根据 TaKaRa 公司的反转录试剂盒的操作指南进行反转录,获得 cDNA;最后以 cDNA 为模板根据 TaKaRa 公司的 RT-qPCR 试剂盒说明书进行操作,引物序列见表 1。以 GAPDH 作为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行数据的计算。

1.2.7 siRNA 实验 采用 Santa Cruz siRNA 转染试剂,根据试剂说明书将 *NANP siRNA*、*CMAS siRNA*、*ST3Gal-*Ⅲ siRNA 以及对照 siRNA 分别转染内皮细胞,抑制 *NANP/CMAS/ST3Gal-*Ⅲ在细胞中的表达。

表 1 RT-qPCR 引物序列

基因	引物序列(5′→3′)
GAPDH	正向:AGCGTCAAAGGTGGAGGAGTG
	反向:TCAAGAAGGTGGTGAAGCAGG
NANP	正向:AAAGGTGGTGCAGCCAATAGA
	反向:TCTGTCTGTCCCCATTCGTTAAT
CMAS	正向:ACCTGGCAGCCCTAATTCTG
	反向:TCGAAACCCATACACTCTGGAA
*ST3Gal-*Ⅲ	正向:GCCTGCTGAATTAGCCACCAA
	反向:GCCCACTTGCGAAAGGAGT

1.2.8 流式细胞术检测与内皮细胞共培养后巨噬细胞的凋亡与吞噬能力 半乳糖处理内皮细胞 48 h,同时 THP-1 用佛波酯刺激分化为巨噬细胞。将巨噬细胞消化下来,按 1×10^5 个/mL 接种于 12 孔板中与内皮细胞共培养 24 h。将细胞分组为:巨噬细胞组、巨噬细胞+内皮细胞组、巨噬细胞+半乳糖处理的内皮细胞

组,巨噬细胞+半乳糖处理后重组 Siglec-9 蛋白封闭的内皮细胞组。

凋亡检测:消化离心收集各组细胞,每 100 μL 体积加 1.5 μL PE-CD11b,避光孵育 20 min。PBS 清洗 1 次,采用 APC-AnnexinV/7-AAD 双染法,流式细胞仪检测巨噬细胞凋亡情况。

吞噬能力检测:在共培养 22 h 时,每孔加入 3 μL EZ-Red 大肠杆菌荧光颗粒-PE(EZ-Red *E. coil* PE),消化收集各组细胞,每 100 μL 体积加 1.5 μL CD11b 避光孵育 20 min。PBS 清洗后,200 μL PBS 重悬过滤,流式细胞仪检测各组巨噬细胞吞噬荧光颗粒的情况。

1.3　统计学分析

采用 GraphPad Prism 8.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,2 组间比较采用 Student's t 检验,检验水准 $\alpha=0.05$。

2　结果

2.1　内皮细胞表达 Siglec-9 聚糖配体

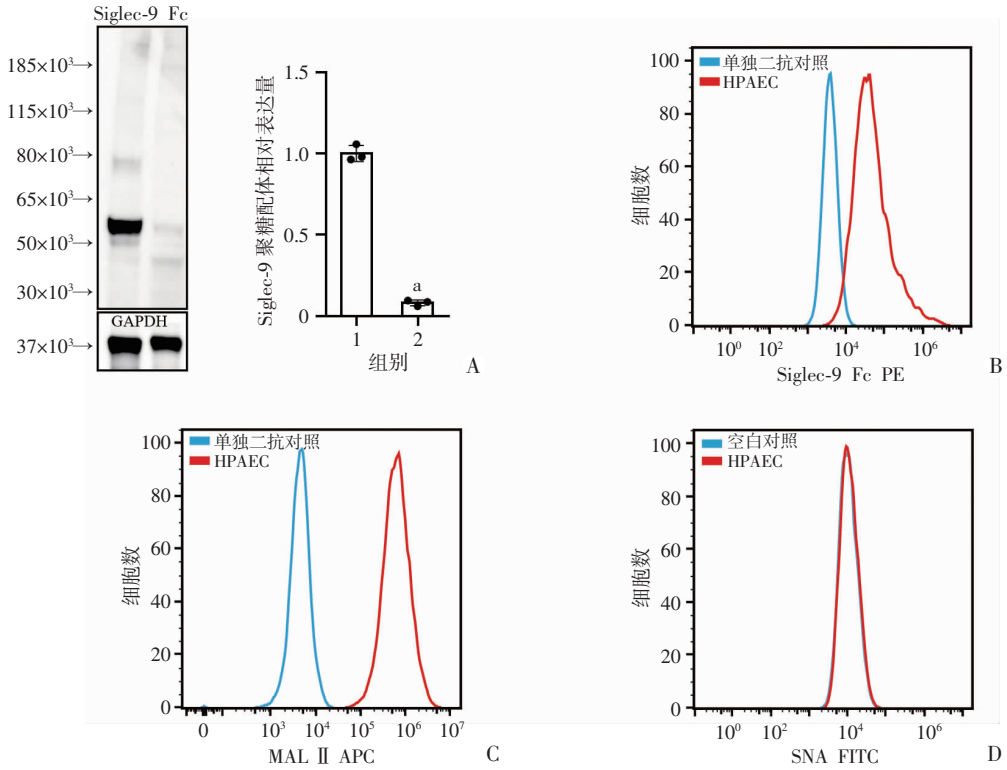
Western blot 检测结果显示,内皮细胞上 Siglec-9 聚糖配体的相对质量约为 60×10^3,且经过 α2-3,6,8 唾液酸酶处理后该条带信号消失($P<0.01$,图 1A)。流式细胞术检测结果验证该配体在内皮细胞细胞膜表面表达(图 1B),且 MAL Ⅱ 和 SNA 染色结果显示,该聚糖配体是末端结构为 α2-3 连接的唾液酸糖蛋白(图 1C、D)。

2.2　半乳糖能上调内皮细胞表面 Siglec-9 聚糖配体的表达

流式细胞术检测不同糖刺激内皮细胞 Siglec-9 聚糖配体表达水平。结果显示,与对照组比较,半乳糖组、甘露糖组、N-乙酰基甘露糖组以及唾液酸组刺激内皮细胞 Siglec-9 聚糖配体显著升高,且半乳糖组升高趋势最显著($P<0.01$,图 2A)。流式细胞术检测结果显示,随着半乳糖给予的浓度增高,内皮细胞表面 Siglec-9 聚糖配体表达水平也逐渐升高($P<0.01$,图 2B)。Western blot 和细胞免疫荧光检测结果与上述结果一致(图 2C、D)。

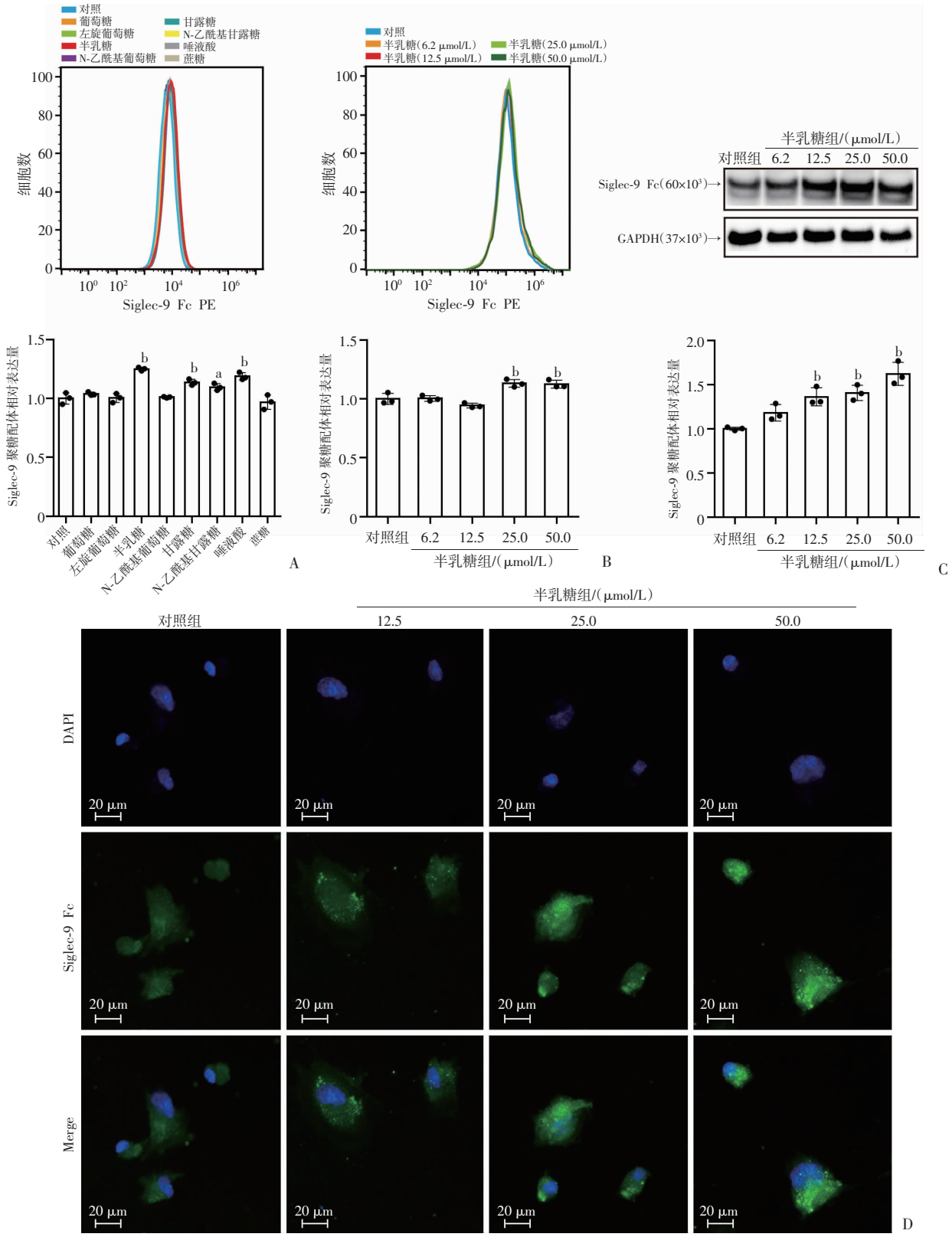
2.3　半乳糖不影响内皮细胞上 Siglec-9 聚糖配体恢复时间

为进一步探究半乳糖对内皮细胞表面 Siglec-9 聚糖配体的影响,用唾液酸酶切除内皮细胞表面 Siglec-9 聚糖配体后,再加入含半乳糖的培养基继续培养 0、3、6、12 h。结果显示,聚糖配体会在 6 h 后恢复正常水平,且在短时间内添加半乳糖不会影响内皮细胞上 Siglec-9 聚糖配体恢复的时间(图 3)。



A:Western blot 检测内皮细胞 Siglec-9 聚糖配体的表达水平　1:对照组;2:唾液酸酶组;a:$P<0.01$,与对照组比较;B:流式细胞术检测内皮细胞 Siglec-9 聚糖配体的表达水平;C、D:MAL Ⅱ 和 SNA 染色流式细胞术鉴定内皮细胞 Siglec-9 聚糖配体的末端糖链连接结构

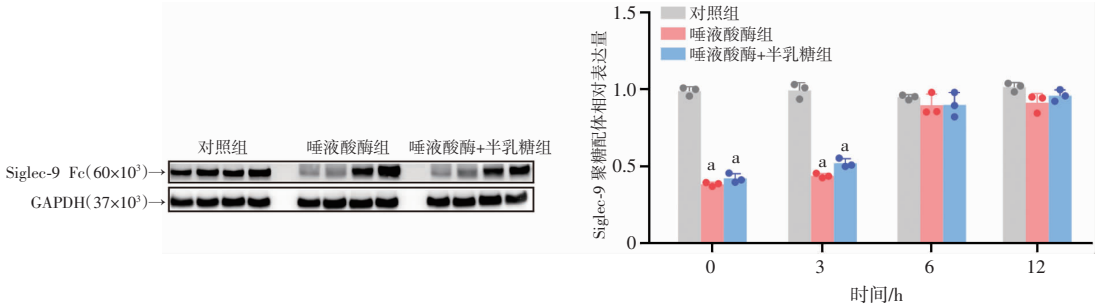
图 1　内皮细胞表达 Siglec-9 聚糖配体($n=3$,$\bar{x}\pm s$)



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较

A:流式细胞术检测不同糖(20 μmol/L)处理 48 h 对内皮细胞 Siglec-9 聚糖配体表达的影响;B:流式细胞术检测不同浓度半乳糖处理 48 h 对内皮细胞 Siglec-9 聚糖配体表达的影响;C:Western blot 检测不同浓度半乳糖处理 48 h 对内皮细胞 Siglec-9 聚糖配体表达的影响;D:细胞免疫荧光检测不同浓度半乳糖处理 48 h 后内皮细胞 Siglec-9 聚糖配体表达

图 2 半乳糖上调内皮细胞 Siglec-9 聚糖配体的表达($n=3$,$\bar{x}\pm s$)

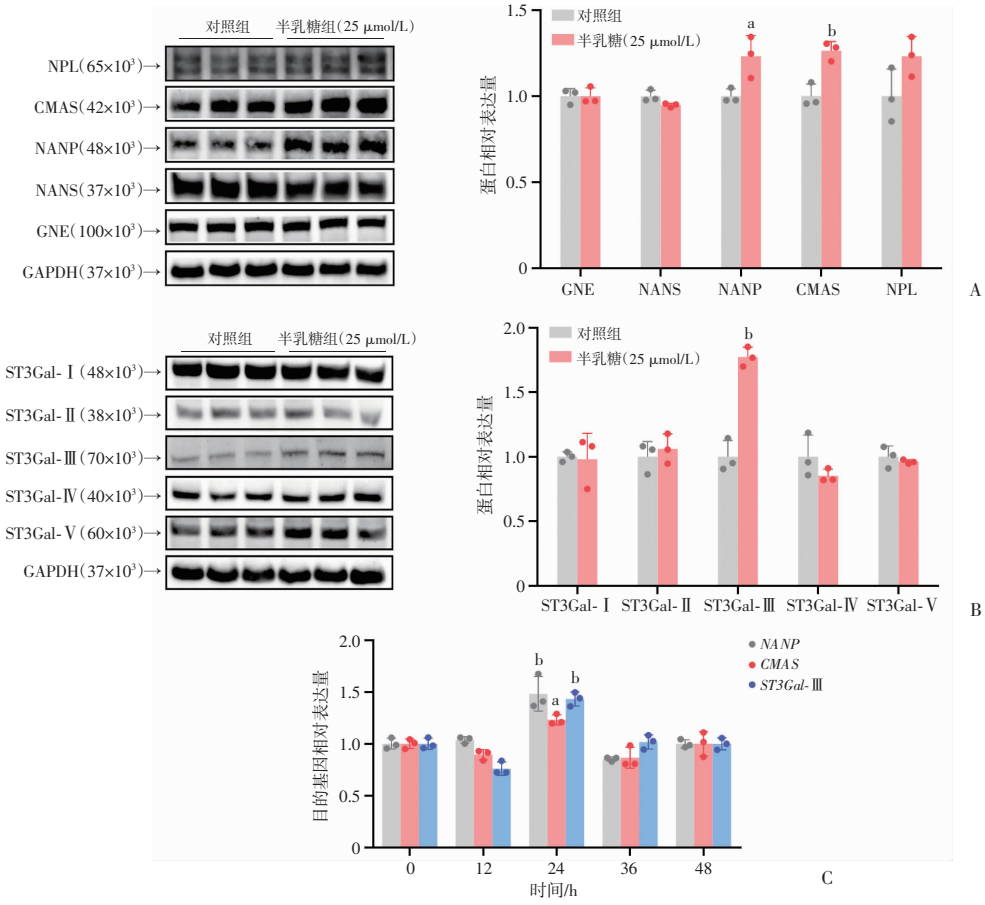


a:$P<0.01$,与对照组比较

图 3 半乳糖对内皮细胞上 Siglec-9 聚糖配体恢复时间的影响($n=3$,$\bar{x}\pm s$)

2.4 半乳糖处理后,内皮细胞 Siglec-9 聚糖配体合成关键酶的表达增加

与对照组比较,半乳糖组唾液酸生物合成的关键酶中,胞质中的 N-乙酰神经氨酸磷酸酶(N-acetylneuraminic acid phosphatase, NANP)、细胞核中的胞苷单磷酸 N-乙酰神经氨酸合成酶(cytidine monophosphate N-acetylneuraminic acid synthetase, CMAS),以及高尔基体内的 ST-β-半乳糖苷 α-2,3-唾液酸转移酶 3(ST3 beta-galactoside alpha-2, 3-sialyltransferase 3, ST3Gal-Ⅲ)的表达显著升高(图 4A、B)。RT-qPCR 验证相关酶基因在给予内皮细胞半乳糖 24 h 时有显著上调(图 4C),提示半乳糖能通过上调内皮细胞内 Siglec-9 聚糖配体合成的关键酶的表达来升高 Siglec-9 聚糖配体本身的表达。



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较

A:Western blot 检测内皮细胞内 Siglec-9 聚糖配体合成酶(GNE、NANS、NANP、CMAS、NPL)的表达水平;B:Western blot 检测内皮细胞内唾液酸转移酶(ST3Gal-Ⅰ、ST3Gal-Ⅱ、ST3Gal-Ⅲ、ST3Gal-Ⅳ、ST3Gal-Ⅴ)的表达水平;C:RT-qPCR 验证相关上调关键酶(NANP、CMAS、ST3Gal-Ⅲ)基因的 mRNA 水平

图 4 半乳糖对内皮细胞 Siglec-9 聚糖配体合成关键酶的影响($n=3$,$\bar{x}\pm s$)

2.5 敲低 NANP、CMAS、ST3Gal-Ⅲ的表达逆转了内皮细胞上 Siglec-9 聚糖配体水平的升高

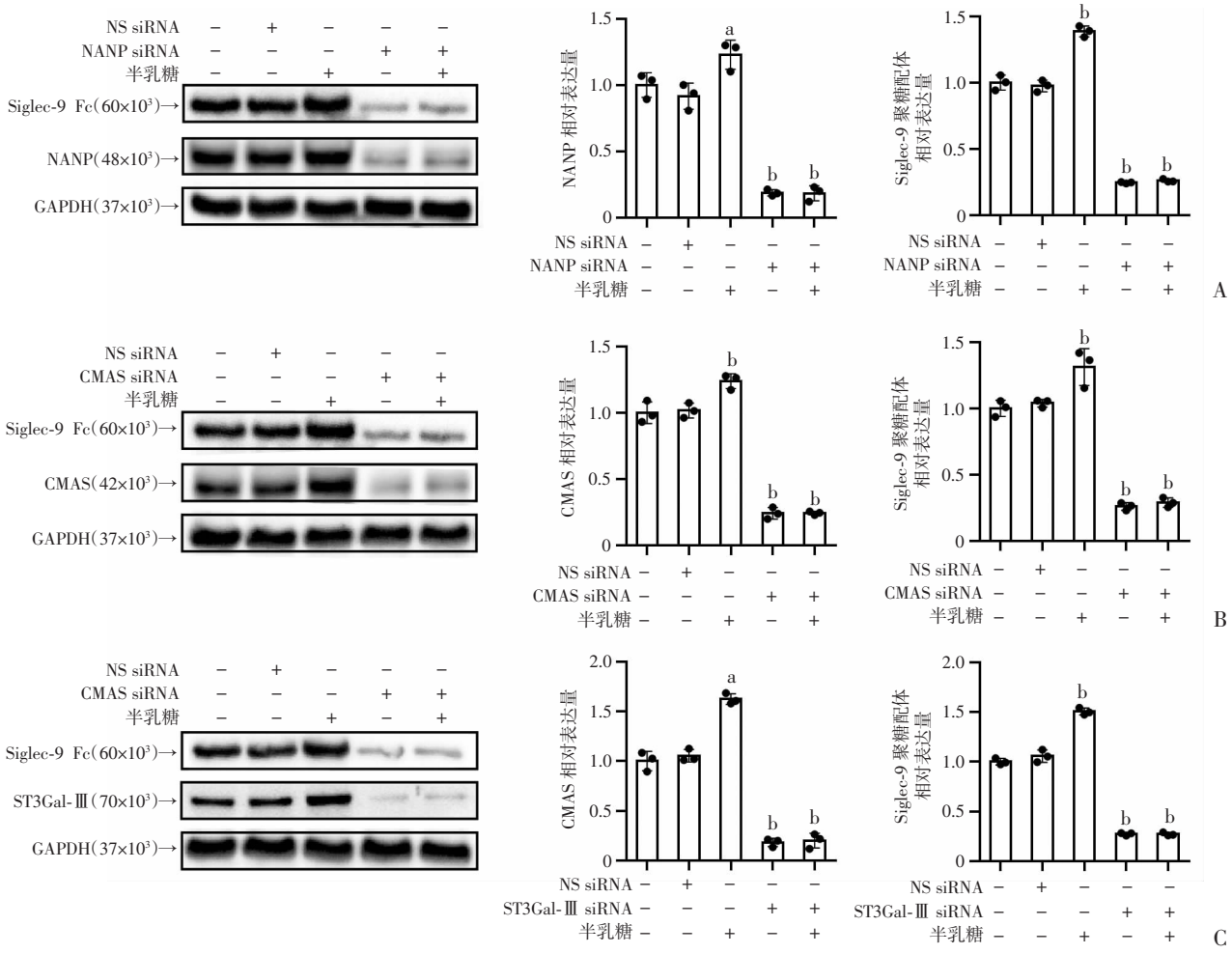
为了进一步证明 NANP、CMAS、ST3Gal-Ⅲ在 Siglec-9 聚糖配体中的调节作用,用 siRNA 干扰技术分别敲低内皮细胞 NANP、CMAS、ST3Gal-Ⅲ的表达后,给予半乳糖刺激 48 h,Western blot 检测其敲低效率以及内皮细胞上 Siglec-9 聚糖配体的表达量。结果表明,与对照组比较,抑制 NANP、CMAS 或 ST3Gal-Ⅲ的表达均导致内皮细胞上 Siglec-9 聚糖配体的表达水平下降,半乳糖的添加并不能逆转这一变化($P<0.01$,图 5)。

2.6 内皮细胞 Siglec-9 聚糖配体表达增加抑制共培养巨噬细胞活性

为研究内皮细胞 Siglec-9 聚糖配体表达变化对共培养巨噬细胞活性影响,用半乳糖诱导内皮细胞 Siglec-9 聚糖配体表达增加后,将其与巨噬细胞共培养 24 h,流式细胞术检测巨噬细胞凋亡情况和吞噬能力。结果显示:与未加半乳糖的共培养组比较,内皮细胞表面 Siglec-9 聚糖配体表达上调后,导致巨噬细胞凋亡增加($P<0.01$,图 6A),吞噬能力明显减弱($P<0.05$,图 6B)。利用重组 Siglec-9 蛋白封闭内皮细胞上的 Siglec-9 聚糖配体后,逆转了共培养的巨噬细胞的凋亡和吞噬能力的变化。

3 讨论

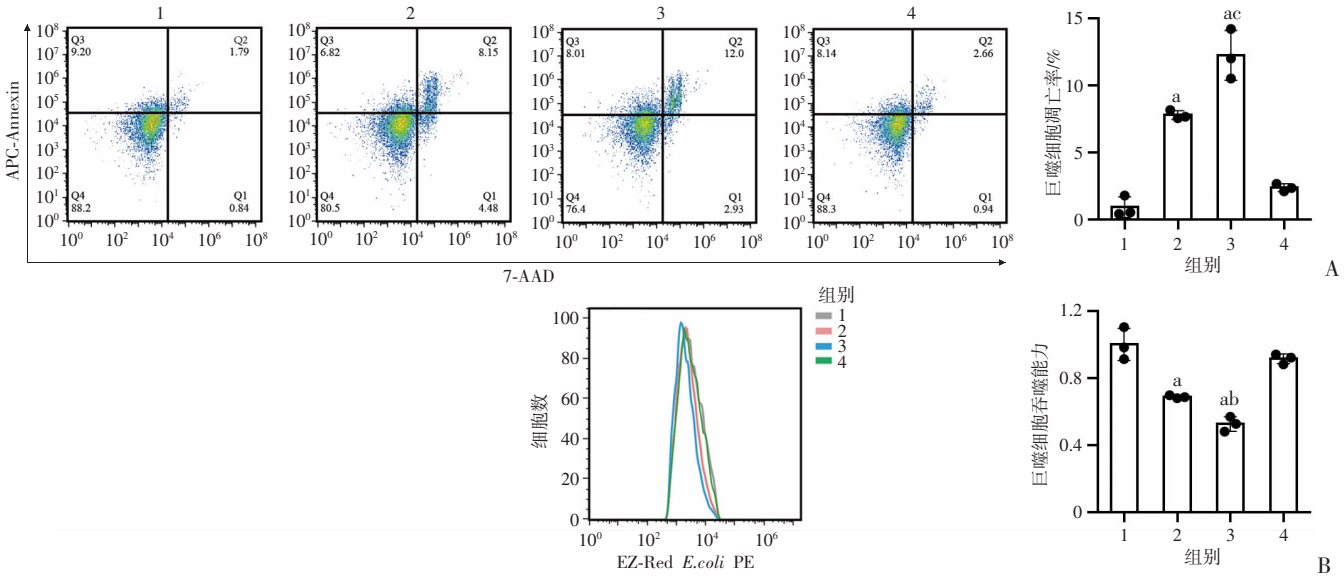
内皮糖萼覆盖全身所有血管的管腔表面,主要由糖胺聚糖、唾液酸聚糖以及糖蛋白构成,在血管的调节、保护以及减弱白细胞黏附等方面起着关键作用[15]。病理条件下,内皮糖萼的功能障碍会诱导血管炎症性疾病的发展[16-17]。而炎症是动脉粥样硬化发展的驱动力,因此,靶向炎症途径可以为预防和治疗动脉粥样硬



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较

A:siRNA 敲低内皮细胞内 NANP 后,Western blot 检测 NANP 和 Siglec-9 聚糖配体的表达水平;B:siRNA 敲低内皮细胞内 CMAS 后,Western blot 检测 CMAS 和 Siglec-9 聚糖配体的表达水平;C:siRNA 敲低内皮细胞内 ST3Gal-Ⅲ后,Western blot 检测 ST3Gal-Ⅲ和 Siglec-9 聚糖配体的表达水平

图 5 NANP、CMAS、ST3Gal-Ⅲ对内皮细胞上 Siglec-9 聚糖配体水平的调节作用($n=3$,$\bar{x}\pm s$)



1:巨噬细胞组;2:巨噬细胞+内皮细胞组;3:巨噬细胞+半乳糖处理的内皮细胞组;4:巨噬细胞+半乳糖处理后重组 Siglec-9 蛋白封闭的内皮细胞组; a: $P<0.01$,与对照组比较;b: $P<0.05$,c: $P<0.01$,与巨噬细胞+内皮细胞组比较

A:流式细胞术检测与内皮细胞共培养后的巨噬细胞凋亡程度;B:流式细胞术检测与内皮细胞共培养后的巨噬细胞的吞噬能力

图 6 内皮细胞 Siglec-9 聚糖配体表达增加抑制共培养巨噬细胞活性($n=3,\bar{x}\pm s$)

化提供新的途径[18]。Siglec-9 聚糖配体作为内皮糖萼的重要组成部分[4],其表达水平的变化对维持内皮糖萼完整性以及血管局部炎症稳态有重要生理意义。

现有研究证实,Siglec-9 与聚糖配体结合后,会传导一系列抑制性信号[19],例如,抑制中性粒细胞与巨噬细胞活化[20-21]。最新研究发现,人肥大细胞上也存在 Siglec-9 及其聚糖配体的表达,靶向 Siglec-9 能抑制肥大细胞释放促炎介质的能力,减轻过敏反应[22]。Siglec-9 通过识别其聚糖配体来调节免疫细胞功能,所以配体是激活 Siglec-9 的必要条件。研究表明,不同组织器官中的 Siglec-9 聚糖配体表现各异,在生理或病理过程中发挥着重要作用,例如 Glycophorin A,作为红细胞上 Siglec-9 聚糖配体维持外周血液循环中性粒细胞“静默”的作用[21],以及本课题组前期发现的 MUC5B,作为气管上皮细胞上 Siglec-9/E 聚糖配体参与呼吸道炎症过程[23]。也有研究发现,人工合成的 Siglec-9 聚糖配体可抑制与 COVID-19 相关的中性粒细胞活化[24]。以上结果提示,Siglec-9 聚糖配体表达水平的调节方式有两种,一种是外源性配体的添加[24],另一种是从内部调节。课题组前期研究证实,可以通过 UDP-葡萄糖 4-差向异构酶(UDP-galactose-4-epimerase,GALE)或 NF-κB 通路上调人/鼠内皮细胞上 Siglec-9/E 聚糖配体的表达水平,抑制血管局部炎症反应[14,25]。基于前期研究,本研究继续寻找新的调节内皮细胞 Siglec-9 聚糖配体表达水平的手段。

唾液酸作为 Siglec-9 聚糖配体的关键组成部分,其合成酶和转移酶在调控细胞 Siglec-9 聚糖配体水平上有重要作用。唾液酸从合成到添加至细胞聚糖末端一共分为 3 个步骤:唾液酸合成、唾液酸 CMP 化以及 CMP-唾液酸的转移运输。GNE、NANS、NPL、NANP 均为唾液酸合成路线上的关键酶,CMAS 负责将唾液酸活化为 CMP-唾液酸,只有活化的唾液酸才能作为糖基供体被唾液酸转移酶所利用,连接到特定糖脂或糖蛋白的糖链末端[26-28]。本研究结果进一步确定血管内皮细胞上 Siglec-9 聚糖配体是末端结构为 α2-3 连接的唾液酸糖蛋白。与对照组比较,半乳糖处理的内皮细胞上 Siglec-9 聚糖配体表达水平升高,同时细胞中唾液酸合成路线中最后一步的 NANP,活化唾液酸的 CMAS 以及唾液酸转移酶 ST3Gal-Ⅲ在 mRNA 和蛋白水平均显著上调。这与研究报道的 ST3Gal-Ⅲ调节小鼠 Siglec-F 配体形成抑制嗜酸性粒细胞肺炎的结果一致[29-30],且 CMAS 高表达与癌症细胞的高唾液酸化以免疫逃避密切相关[31-32]。而外加的半乳糖不能缩短被唾液酸酶切除后内皮细胞上聚糖配体恢复的时间。这可能是由于内皮细胞 Siglec-9 聚糖配体仅需 6 h 即可恢复正常水平,但外源性半乳糖的掺入后,引

起聚糖配体上调的一系列信号传导需要更长的时间,即聚糖配体合成关键酶的 mRNA 水平在 24 h 时检测到有显著上调。以上结果提示,半乳糖上调内皮细胞 Siglec-9 聚糖配体的方式不是直接在切除唾液酸后暴露的半乳糖残基上原位添加唾液酸,而可能是通过唾液酸聚糖合成途径,促进内皮细胞膜蛋白上糖链的新生的方式导致聚糖配体的增加。

在共培养体系中,半乳糖处理后的内皮细胞增加了巨噬细胞的凋亡,并一定程度地抑制了巨噬细胞的吞噬作用。原因可能是激活 Siglec-9 可以抑制巨噬细胞活性并诱导巨噬细胞凋亡,这与既往研究结果相似,红细胞上的聚糖配体(glycophorin A)与中性粒上 Siglec-9 结合同样会诱导人中性粒细胞凋亡[21,33]。

由于单核-巨噬细胞的黏附和浸润是血管炎症的关键启动步骤,因此维持内皮糖萼完整性、减少单核-巨噬细胞黏附浸润是预防和治疗动脉粥样硬化等血管炎症疾病的有效靶点[5, 9, 15]。本研究发现,内皮细胞上 Siglec-9 聚糖配体的表达通过半乳糖刺激而增加,抑制巨噬细胞的免疫应答,可能为抑制血管局部炎症反应提供潜在的新策略。但长期大剂量摄入半乳糖会导致肝肾毒性[34-35],如何提高其调节 Siglec-9 聚糖配体水平效率和安全性以作为临床应用的有效干预手段,需要在结构优化改造等方面进行更深入的探索。

参考文献:

[1] XIAO W S, OLDHAM W M, PRIOLO C, *et al*. Immunometabolic endothelial phenotypes: integrating inflammation and glucose metabolism[J]. Circ Res, 2021, 129(1): 9-29. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.120.318805.

[2] FOOTE C A, SOARES R N, RAMIREZ-PEREZ F I, *et al*. Endothelial glycocalyx[J]. Compr Physiol, 2022, 12(4): 3781-3811. DOI: 10.1002/cphy.c210029.

[3] SITIA S, TOMASONI L, ATZENI F, *et al*. From endothelial dysfunction to atherosclerosis[J]. Autoimmun Rev, 2010, 9(12): 830-834. DOI: 10.1016/j.autrev.2010.07.016.

[4] AHN S J, MASTER E L, GRANADOS S T, *et al*. Impairment of endothelial glycocalyx in atherosclerosis and obesity[J]. Curr Top Membr, 2023, 91: 1-19. DOI: 10.1016/bs.ctm.2023.02.001.

[5] HARDING I C, MITRA R, MENSAH S A, *et al*. Endothelial barrier reinforcement relies on flow-regulated glycocalyx, a potential therapeutic target[J]. Biorheology, 2019, 56(2/3): 131-149. DOI: 10.3233/BIR-180205.

[6] DELGADILLO L F, LOMAKINA E B, KUEBEL J, *et al*. Changes in endothelial glycocalyx layer protective ability after inflammatory stimulus[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2021, 320(2): C216-C224. DOI: 10.1152/ajpcell.00259.2020.

[7] GBD 2019 Diseases and Injuries Collaborators. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019[J]. Lancet (London, England), 2020, 396(10258): 1204-1222. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30925-9

[8] LIBBY P. The changing landscape of atherosclerosis[J]. Nature, 2021, 592(7855): 524-533. DOI: 10.1038/s41586-021-03392-8.

[9] XU S W, ILYAS I, LITTLE P J, *et al*. Endothelial dysfunction in atherosclerotic cardiovascular diseases and beyond: from mechanism to pharmacotherapies[J]. Pharmacol Rev, 2021, 73(3): 924-967. DOI: 10.1124/pharmrev.120.000096.

[10] Libby P. Inflammation in Atherosclerosis—No Longer a Theory[J]. Clin Chem, 2021, 67(1): 131-142. DOI: 10.1093/clinchem/hvaa275.

[11] DUAN S T, PAULSON J C. Siglecs as immune cell checkpoints in disease[J]. Annu Rev Immunol, 2020, 38: 365-395. DOI: 10.1146/annurev-immunol-102419-035900.

[12] ANGATA T, VARKI A. Discovery, classification, evolution and diversity of Siglecs[J]. Mol Aspects Med, 2023, 90: 101117. DOI: 10.1016/j.mam.2022.101117.

[13] GONZALEZ-GIL A, LI T A, KIM J, *et al*. Human sialoglycan ligands for immune inhibitory Siglecs[J]. Mol Aspects Med, 2023, 90: 101110. DOI: 10.1016/j.mam.2022.101110.

[14] LIU H M, ZHENG Y, ZHANG Y X, *et al*. Immunosuppressive Siglec-E ligands on mouse aorta are up-regulated by LPS *via* NF-κB pathway[J]. Biomedecine Pharmacother, 2020, 122: 109760. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.109760.

[15] HU Z P, CANO I, D'AMORE P A. Update on the role of the endothelial glycocalyx in angiogenesis and vascular inflammation[J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 734276. DOI: 10.3389/fcell.2021.734276.

[16] BUTLER M J, DOWN C J, FOSTER R R, *et al*. The pathological relevance of increased endothelial glycocalyx permeability[J]. Am J Pathol, 2020, 190(4): 742-751. DOI: 10.1016/j.ajpath.2019.11.015.

[17] GAUDETTE S, HUGHES D, BOLLER M. The endothelial glycocalyx: structure and function in health and critical illness[J]. J Vet Emerg Crit Care (San Antonio), 2020, 30(2): 117-134. DOI: 10.1111/vec.12925.

[18] HENEIN M Y, VANCHERI S, LONGO G, *et al*. The role of inflammation in cardiovascular disease[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(21): 12906. DOI: 10.3390/ijms232112906.

[19] AVRIL T, FLOYD H, LOPEZ F, *et al*. The membrane-proximal immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif is critical for the inhibitory signaling mediated by Siglecs-7 and-9, CD33-related Siglecs expressed on human monocytes and NK cells[J]. J Immunol, 2004, 173(11): 6841-6849. DOI: 10.4049/jimmunol.173.11.6841.

[20] LIZCANO A, SECUNDINO I, DÖHRMANN S, *et al*. Erythrocyte sialoglycoproteins engage Siglec-9 on neutrophils to suppress activation[J]. Blood, 2017, 129(23): 3100-3110. DOI: 10.1182/blood-2016-11-751636.

[21] MATSUMOTO T, TAKAHASHI N, KOJIMA T, *et al*. Soluble Siglec-9 suppresses arthritis in a collagen-induced arthritis mouse model and inhibits M1 activation of $RAW_{264.7}$ macrophages[J]. Arthritis Res Ther, 2016, 18(1): 133. DOI: 10.1186/s13075-016-1035-9.

[22] MIRALDA I, SAMANAS N B, SEO A J, *et al*. Siglec-9 is an inhibitory receptor on human mast cells invitro[J]. J Allergy Clin Immunol, 2023, 152(3): 711-724. e14. DOI: 10.1016/j.jaci.2023.04.007.

[23] SCHLEIMER R P, SCHNAAR R L, BOCHNER B S. Regulation of airway inflammation by Siglec-8 and Siglec-9 sialoglycan ligand expression[J]. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2016, 16(1): 24-30. DOI: 10.1097/ACI.0000000000000234.

[24] DELAVERIS C S, WILK A J, RILEY N M, *et al*. Synthetic siglec-9 agonists inhibit neutrophil activation associated with COVID-19[J]. ACS Cent Sci, 2021, 7(4): 650-657. DOI: 10.1021/acscentsci.0c01669.

[25] ZHANG Y X, ZHENG Y, LI J, *et al*. Immunoregulatory Siglec ligands are abundant in human and mouse aorta and are up-regulated by high glucose[J]. Life Sci, 2019, 216: 189-199. DOI: 10.1016/j.lfs.2018.11.049.

[26] CHENG B, CHEN X. Chemical labeling and analysis of sialoglycans[J]. Chin Sci Bull, 2020, 65(27): 2984-2997. DOI: 10.1360/tb-2020-0207.

[27] MALIEKAL P, VERTOMMEN D, DELPIERRE G, *et al*. Identification of the sequence encoding N-acetylneuraminate-9-phosphate phosphatase[J]. Glycobiology, 2006, 16(2): 165-172. DOI: 10.1093/glycob/cwj050.

[28] SELLMEIER M, WEINHOLD B, MÜNSTER-KÜHNEL A. CMP-sialic acid synthetase: the point of constriction in the sialylation pathway[J]. Top Curr Chem, 2015, 366: 139-167. DOI:10.1007/128_2013_477.

[29] KIWAMOTO T, BRUMMET M E, WU F, *et al*. Mice deficient in the St3gal3 gene product α2, 3 sialyltransferase (ST3Gal-Ⅲ) exhibit enhanced allergic eosinophilic airway inflammation[J]. J Allergy Clin Immunol, 2014, 133(1): 240-247. e1-3. DOI: 10.1016/j.jaci.2013.05.018.

[30] SUZUKAWA M, MILLER M, ROSENTHAL P, *et al*. Sialyltransferase ST3Gal-Ⅲ regulates Siglec-F ligand formation and eosinophilic lung inflammation in mice[J]. J Immunol, 2013, 190(12): 5939-5948. DOI: 10.4049/jimmunol.1203455.

[31] BOELAARS K, GOOSSENS-KRUIJSSEN L, WANG D, *et al*. Unraveling the impact of sialic acids on the immune landscape and immunotherapy efficacy in pancreatic cancer[J]. J Immunother Cancer, 2023, 11(11): e007805. DOI: 10.1136/jitc-2023-007805.

[32] O'DAY E M, IDOS G E, HILL C, *et al*. Cytidine monophosphate *N*-acetylneuraminic acid synthetase enhances invasion of human triple-negative breast cancer cells[J]. Onco Targets Ther, 2018, 11: 6827-6838. DOI: 10.2147/OTT.S177639.

[33] CHEN Z, BAI F F, HAN L, *et al*. Targeting neutrophils in severe asthma via siglec-9[J]. Int Arch Allergy Immunol, 2018, 175(1/2): 5-15. DOI: 10.1159/000484873.

[34] LAI K, ELSAS L J, WIERENGA K J. Galactose toxicity in animals[J]. IUBMB Life, 2009, 61(11): 1063-1074. DOI: 10.1002/iub.262.

[35] SALEH D O, MANSOUR D F, HASHAD I M, *et al*. Effects of sulforaphane on D-galactose-induced liver aging in rats: role of keap-1/nrf-2 pathway[J]. Eur J Pharmacol, 2019, 855: 40-49. DOI: 10.1016/j.ejphar.2019.04.043.

(收稿:2023-10-20;修回:2023-11-29)

(编辑 张 维)