

• 临床研究 •

## 糖基化基因构建的IgA肾病风险预测模型及免疫细胞浸润分析

陈梦星<sup>1</sup>, 宗慧敏<sup>2</sup>, 张 洋<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>南京医科大学附属南京医院(南京市第一医院)肾内科, 江苏 南京 210006; <sup>2</sup>南京医科大学附属江宁医院肾内科, 江苏 南京 211100

**[摘要]** 目的: 筛选IgA肾病(IgA nephropathy, IgAN)糖基化相关基因并分析免疫细胞浸润情况。方法: 基因表达综合数据库(Gene Expression Omnibus, GEO)中下载IgAN数据集, 筛选糖基化相关差异基因并进行功能分析, 通过最小绝对收缩和选择算子(least absolute shrinkage and selection operator, LASSO)、支持向量机递归特征消除(support vector machine recursive feature elimination, SVM-RFE)和随机森林树算法进一步筛选糖基化相关最优特征基因(the optimal feature gene, OFG), 并运用免疫组织化学染色、Western blot和Nephroseq v5外部数据库验证OFG差异表达。基于OFG绘制IgAN预测列线图, 分析免疫细胞浸润, 构建ceRNA网络。结果: 经过筛选首次报道了3个OFG,  $\alpha$ -N-乙酰神经氨酸 $\alpha$ -2, 8-唾液酸转移酶1(ST8  $\alpha$ -N-acetylneuraminidase  $\alpha$ -2, 8-sialyltransferase 1, ST8SIA1)、硫酸软骨素合酶1(chondroitin sulfate synthase 1, CHSY1)和磷脂酰肌醇N-乙酰氨基葡萄糖转移酶亚基H(phosphatidylinositol N-acetylglucosaminyl transferase subunit H, PIGH), 构建的列线图模型提示OFG对IgAN发生有较好的预测价值。免疫细胞浸润分析显示, 和对照组相比, IgAN组CD8<sup>+</sup>T细胞、CD4<sup>+</sup>幼稚T细胞、活化CD4<sup>+</sup>记忆T细胞、静息树突状细胞以及静息肥大细胞等浸润显著增加, 而幼稚B细胞、浆细胞、静息CD4<sup>+</sup>记忆T细胞、活化肥大细胞和中性粒细胞等浸润明显减少。OFG与活化CD4<sup>+</sup>记忆T细胞、静息CD4<sup>+</sup>记忆T细胞、CD4<sup>+</sup>幼稚T细胞、幼稚B细胞等相关。验证实验结果也表明与微小病变性肾病相比, IgAN中CHSY1和PIGH表达水平显著下降, 而ST8SIA1表达水平显著增加。值得注意的是, 糖尿病肾病和微小病变性肾病中OFG的表达水平差异无统计学意义。此外, 成功构建了一个包含117个lncRNA、67个miRNA和3个OFG的ceRNA网络。结论: ST8SIA1、CHSY1和PIGH可能是诊断和治疗IgAN的潜在靶点, 结合浸润细胞免疫和ceRNA网络, 为IgAN的研究提供了新的视角。

**[关键词]** IgA肾病; 糖基化; 免疫细胞浸润分析; 生物信息学

**[中图分类号]** R692.3

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2024)12-1671-11

**doi:** 10.7655/NYDXBNSN240290

### Risk prediction model of IgA nephropathy constructed by glycosylation genes and analysis of immune cell infiltration

CHEN Mengxing<sup>1</sup>, ZONG Huimin<sup>2</sup>, ZHANG Yang<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Nephrology, the Affiliated Nanjing Hospital of Nanjing Medical University(Nanjing First Hospital), Nanjing 210006; <sup>2</sup>Department of Nephrology, the Affiliated Jiangning Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 211100, China

**[Abstract]** **Objective:** This study aimed to exploration of glycosylation - related genes and immune infiltration analysis of IgA nephropathy(IgAN). **Methods:** IgAN datasets were obtained from the GEO database. Then differentially expressed glycosylation-related genes and functional enrichment analyses were identified. Next, optimal feature genes (OFGs) were selected using least absolute shrinkage and selection operator (LASSO), support vector machine recursive feature elimination (SVM - RFE), and random forest algorithms. The expression of OFGs in IgAN were validated by immunohistochemistry staining, Western blot, and the Nephroseq v5 database. OFGs were further used to create a nomogram model, compare immune cell infiltration and construct a ceRNA network. **Results:** After screening, three OFGs of ST8  $\alpha$ -N-acetylneuraminidase  $\alpha$ -2, 8-sialyltransferase 1(ST8SIA1), chondroitin sulfate synthase 1(CHSY1) and phosphatidylinositol N-acetylglucosaminyl transferase subunit H(PIGH) were first reported. The nomogram

**[基金项目]** 国家自然科学基金(82000693)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: feiyangdebei@163.com

model showed that OFGs had good predictive value for IgAN occurrence. Compared to normal samples, IgAN showed increased infiltration of CD8<sup>+</sup>T cells, naive CD4<sup>+</sup> T cell, memory activated CD4<sup>+</sup> T cells, resting dendritic cells, and resting mast cells, while naive B cells, plasma cells, memory resting CD4<sup>+</sup> T, activated mast cells, and neutrophils were reduced. OFGs were associated with memory activated CD4<sup>+</sup> T cells, memory resting CD4<sup>+</sup> T cells, naive CD4<sup>+</sup> T cell, naive B cells, etc. The validation experiments also revealed that the expression levels of CHSY1 and PIGH were significantly decreased, while the expression level of ST8SIA1 was significantly increased in IgAN compared with minimal change nephropathy. Of note, the expression levels of OFGs in diabetic nephropathy and minimal change nephropathy were not statistically different. A ceRNA network consisting of 117 lncRNAs, 67 miRNAs, and 3 OFGs was constructed. **Conclusion:** ST8SIA1, CHSY1, and PIGH were identified as potential targets for diagnosis and treatment of IgAN. In conjunction with immune cell infiltration and ceRNA network, these results offer a novel perspective for future research on IgAN.

[Key words] IgA nephropathy; glycosylation; immune infiltration analysis; bioinformatics

[J Nanjing Med Univ, 2024, 44(12): 1671-1681]

IgA 肾病(IgA nephropathy, IgAN)是全球最常见的原发性肾小球肾炎,是慢性肾脏疾病的重要病因。其临床表现轻重不一,表现出多种临床特征如血尿、蛋白尿、肾病综合征和肾功能损害等<sup>[1]</sup>。由于缺乏特效治疗方法,30%~40%的IgAN患者会在20~30年后发展为终末期肾病<sup>[2]</sup>。目前IgAN的发病机制尚不明确,迫切需要深入探究IgAN的发病机制并寻找可靠的预测因子和模型。

近年来,多项研究表明IgAN患者的血清和肾脏系膜区均可检测到半乳糖缺乏的IgA1(galactose-deficient IgA1, Gd-IgA1)<sup>[2]</sup>。而目前围绕Gd-IgA1的“四重打击学说”被广泛认为是IgAN的发病机制,即由于IgA1 铰链区异常的O-糖基化导致Gd-IgA1 增加,诱导特异性抗体产生,并形成循环免疫复合物沉积至肾小球系膜区,最终引发肾小球损伤和肾功能减退<sup>[3]</sup>。IgAN肾脏病理改变包括系膜细胞增生、内皮细胞增生、节段性肾小球硬化、新月体形成和肾小管萎缩/间质纤维化等<sup>[4]</sup>。肾纤维化是多种慢性肾脏疾病逐渐加重并进展为不同程度肾功能衰竭的必经之路,IgAN在进展过程中会出现不同程度的肾纤维化,如节段性肾小球硬化、肾小管萎缩/间质纤维化。然而,目前IgAN的发病机制尚不十分清楚。蛋白质糖基化是翻译后修饰的一种重要形式,将糖链共价连接到蛋白质、脂质和碳水化合物等生物大分子上,从而实现其生物学功能<sup>[5]</sup>。根据不同类型的糖苷键,蛋白质可以发生N-糖基化、O-糖基化、C-糖基化等多种形式的修饰,这些修饰影响蛋白质的结构和性质稳定,并在细胞信号转导、免疫调节、肿瘤发生转移中发挥重要作用<sup>[6-8]</sup>。糖基化不仅可以通过O-糖基化修饰IgA1,导致异常的IgA1产生,促进Gd-IgA1在肾脏的沉积,作为一种广泛的表观遗传学修饰,可发生在任何细胞的内质网与高尔基体,

包括多种类型的糖基化,如N-糖基化、O-糖基化,少见的有C-糖基化、S-糖基化,作为蛋白翻译后修饰的重要手段之一,可能通过调节炎症、细胞凋亡、DNA损伤修复、上皮间质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)等多种机制,参与组织损伤。尽管已有一些研究初步揭示了蛋白质糖基化与IgAN之间的关系,然而关于广泛的糖基化修饰在IgAN病理损伤发病机制中所扮演的角色仍缺乏全面认识。因此,探索潜在的糖基化修饰相关基因及其表达变化对IgAN的诊断、预后和治疗具有重要意义。

本研究采用生物信息学方法筛选出3个糖基化相关最优特征基因(the optimal feature gene, OFG): ST8  $\alpha$ -N-乙酰神经氨酸  $\alpha$ -2, 8-唾液酸转移酶 1(ST8  $\alpha$ -N-acetyl-neuraminide  $\alpha$ -2, 8-sialyltransferase 1, ST8SIA1)、硫酸软骨素合酶 1(chondroitin sulfate synthase 1, CHSY1)和磷脂酰肌醇 N-乙酰氨基葡萄糖转移酶亚基 H(phosphatidylinositol N-acetylglucosaminyl transferase subunit H, PIGH),并通过免疫组织化学染色、Western blot 和 Nephroseq v5 外部数据库验证,绘制IgAN发生预测列线图。此外,基于差异表达基因和 OFG 进行功能和通路富集分析,并比较免疫细胞浸润和构建 ceRNA 网络,进一步探究 OFG 在 IgAN 中的作用,这些结果为 IgAN 的研究提供了新的视角。

## 1 对象和方法

### 1.1 对象

本研究从基因表达综合数据库(Gene Expression Omnibus, GEO, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)中下载3个数据集GSE116626、GSE115857和GSE93798,总计包括127例IgAN和36例正常人肾小球样本。从糖基化基因数据库(GlycoGene DataBase, GGDB,

https://acgg.asia/ggdb2/)中收集糖基化相关基因。验证样本集来源于2022年南京医科大学附属南京医院进行肾活检术的15例患者的肾组织石蜡切片和冻存肾组织,其中5例为IgAN患者,5例为糖尿病肾病患者,5例为微小病变性肾病患者。该研究已获得医院伦理委员会批准(KY20231214-KS-02)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 筛选糖基化相关差异表达基因(differential expression genes related to glycosylation, DEGRG)

筛选 DEGRG 并进行基因本体论(Gene Ontology, GO)富集分析和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路分析。通过“limma”R包分析糖基化相关基因的差异表达,依据 $P < 0.05$ 和 $\log_2FCI \geq 0.5$ 筛选 DEGRG。随后通过“heatmap”R包绘制前20个 DEGRG 的热图。利用“clusterProfiler”R包进行GO富集分析,Enrichr数据库(https://maayanlab.cloud/Enrichr/)进行KEGG分析。

### 1.2.2 筛选糖基化相关 OFG

本研究采用最小绝对收缩和选择算子(least absolute shrinkage and selection operator, LASSO)回归,支持向量机递归特征消除(support vector machine recursive feature elimination, SVM-RFE)和随机森林(random forest, RF)3种算法筛选糖基化相关特征基因并取交集得到 OFG。使用“glmnet”R包进行 LASSO 回归分析,利用“e1071”R包进行 SVM-RFE 算法分析,并借助“randomforest”R包构建 RF。取交集的重叠基因作为 OFG 后,利用“glmnet”R包构建 Logistic 回归模型,“pROC”R包绘制受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线计算单个 OFG 和总体的曲线下面积(area under the curve, AUC),评估诊断 OFG 的价值。

### 1.2.3 构建列线图模型

运用“rms”R包构建基于 OFG 的列线图模型预测 IgAN 的发生。研究还绘制校准曲线评估实际曲线和预测曲线的一致性,绘制决策分析曲线评估模型的预测价值。

### 1.2.4 OFG 的功能分析

采用“ClusterProfiler”R包进行基因集富集分析(gene set enrichment analysis, GSEA),以 MSigDB 数据库(https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb)中的标志基因集作为背景基因,利用 KEGG 数据库对 OFG 进行功能注释。通过 GENEMANIA 网站(https://genemania.org/search/)构建基因-基因交互作用网络,识别 OFG 的潜在相互作用。

### 1.2.5 免疫细胞浸润分析

CIBERSORT 是一种基于线性支持向量回归的新型反卷积算法,常用来计算22种浸润免疫细胞的相对比例和动态调节过程<sup>[9]</sup>。采用“CIBERSORT”R包分析 IgAN 和正常样本中22种免疫细胞浸润程度的差异,绘制小提琴图。同时,利用“ggplot2”R包绘制 OFG 与免疫细胞相关性的热图。

### 1.2.6 构建 ceRNA 网络

使用数据库 miRanda (http://www.micro-rna.org/)、TargetScan (http://www.targetscan.org/vert\_71/) 和 miRDB (http://mirdb.org) 分别筛选与 OFG 互作的 miRNA,选择3个数据库都能预测到的 miRNA,并从 SpongeScan 数据库 (http://spongescan.rc.ufl.edu) 筛选与上述 miRNA 互作的 lncRNA。根据 ceRNA 理论构建 lncRNA-miRNA-mRNA 调控网络,并将结果导入 Cytoscape 3.9.1 软件进行可视化。

### 1.2.7 免疫组织化学检测

IgAN、糖尿病肾病和微小病变性肾病患者肾活检组织石蜡切片脱蜡水化,微波修复抗原,采用 SP 免疫组化试剂盒,检测指标包括 ST8SIA1(24918-1-AP, Proteintech 公司,美国)、CHSY1(abs148621, 上海爱必信公司)和 PIGH(CSB-PA238046, 武汉华美生物公司),抗体均为 1:100 稀释,DAB 显色 2~5 min,显微镜下观察,控制着色时间,苏木素复染,所有操作按照说明书进行。采用 Image-Pro Plus 6.0 软件进行半定量分析:通过测量每张图片的累积光密度值(integrated option density, IOD)值以及区域面积(area)值,再计算出平均光密度值(mean density)即 mean density=IOD/area。每个样本的5个随机区域平均光密度的平均值即为此样本的值,每组取5个样本,取平均值。

### 1.2.8 Western blot

取冻存的肾活检组织,加适量裂解液后匀浆、离心,取上清液检测蛋白浓度。取等量组织蛋白样本,变性后进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE),转入聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜,5%脱脂牛奶室温封闭1 h,然后分别与特异性抗体4℃孵育过夜(所用抗体同免疫组织化学检测,1:500稀释),TBST 洗膜,再与辣根过氧化物酶标记的二抗室温下孵育2 h,洗膜,ECL 化学发光法曝光。以 $\beta$ -actin(1:500)作为内参,测定蛋白相对表达水平。

### 1.2.9 Nephroseq v5 外部数据库验证

为了进一步验证 OFG 的差异表达,分析

Nephroseq v5 外部数据库 (<http://v5.nephroseq.org/>) 中 IgAN 肾组织和对照组中 OFG 的表达差异。

### 1.3 统计学方法

所有统计分析均采用 R4.3.2 和 GraphPad Prism 10 软件。根据数据是否服从正态分布和方差齐性,符合正态分布的多组数据,使用单因素方差分析进行分析,不符合正态分布的多组数据,则使用非配对 *t* 检验或 Mann-Whitney *U* 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 筛选 DEGRG

从 GEO 数据库中获得 127 例 IgAN 和 36 例正常

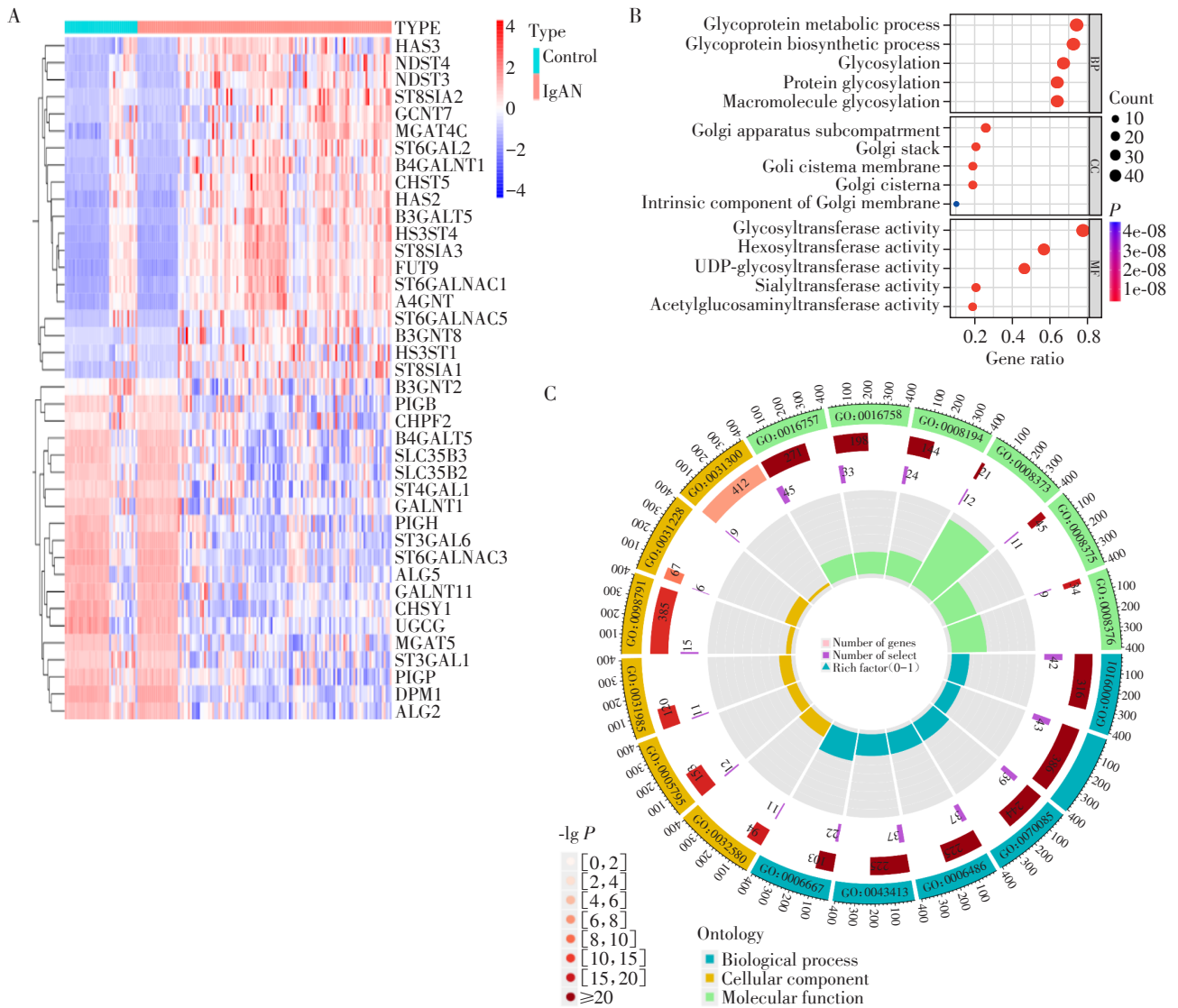
人肾组织基因表达数据(表 1),从数据集中提取糖基化相关基因的表达水平,通过 Wilcoxon 秩和检验分析差异,筛选出 58 个 DEGRG,绘制热图显示排名前 20 的上调和下调基因(图 1A)。

### 2.2 DEGRG 的 GO 和 KEGG 富集分析

为了深入探索 DEGRG 的生物学功能展开 GO 和 KEGG 分析。在分子功能中,DEGRG 主要与糖基

表 1 数据集详细信息

Dataset	Platform	IgAN(n)	Control(n)
GSE116626	GPL14951	52	7
GSE115857	GPL14951	55	7
GSE93798	GPL22945	20	22



A: The heatmap of the top 20 upregulated and downregulated DEGRGs. B: The bubble diagram of GO analysis for DEGRGs. C: The circle diagram of GO analysis for DEGRGs.

图 1 糖基化相关差异表达基因及其功能富集分析

Figure 1 Differentially expressed glycosylation-related genes and their functional enrichment analysis

转移酶活性、己糖基转移酶活性、UDP-葡萄糖基转移酶活性等糖基转移酶活性相关;在GO生物学过程中,DEGRG主要富集在糖蛋白代谢过程、糖蛋白生物合成过程、糖基化等;在细胞定位中,DEGRG主要分布在高尔基体亚室、高尔基体堆栈和高尔基体膜等(图1B、C)。KEGG富集结果进一步表明DEGRG主要在鞘糖脂生物合成、黏蛋白O-聚糖生物合成和黏多糖生物合成等通路中发挥作用(表2)。

### 2.3 筛选 OFG

根据LASSO和SVM-REF算法,分别确定了24个和18个DEGRG作为IgAN的特征基因(图2A~D)。

随后,利用RF算法根据特征重要性排序选取排名前10的基因作为特征基因(图2E、F)。通过对3种算法结果取交集,得到了ST8SIA1、CHSY1和PIGH作为OFG(图2G)。ROC曲线显示3个OFG的AUC均>0.7(图2H),Logistic回归模型的AUC为0.838(图2I),提示OFG具有良好的诊断价值,能够很好地区分IgAN和正常样本。

### 2.4 列线图模型

基于OFG构建列线图,可根据每个特征基因的评分,计算综合得分以预测IgAN的发生风险(图3A)。校准曲线表明,诊断IgAN的实际曲线接近理

表2 糖基化相关差异表达基因的KEGG分析

Table 2 KEGG pathway enrichment analysis of differentially expressed glycosylation-related genes

Pathway	P	Adjusted P	Gene number
Glycosphingolipid biosynthesis	<0.001	<0.001	14
Mucin type O-glycan biosynthesis	<0.001	<0.001	12
Glycosaminoglycan biosynthesis	<0.001	<0.001	9
Other types of O-glycan biosynthesis	<0.001	<0.001	8
N-Glycan biosynthesis	<0.001	<0.001	8
Glycosylphosphatidylinositol-anchor biosynthesis	<0.001	<0.001	6
Various types of N-glycan biosynthesis	<0.001	<0.001	4

想曲线,提示了列线图具有可靠的预测价值(图3B)。在决策分析曲线中,高危阈值时红线仍高于灰线,表明基于列线图的预测可能使IgA患者获益(图3C)。上述结果提示,OFG在IgAN的发病机制中发挥着重要作用。

### 2.5 OFG 功能分析

如图1A所示,和正常样本相比,在IgAN中CHSY1和PIGH呈现低表达,而ST8SIA1呈高表达。GSEA分析结果显示PIGH低表达时主要在细胞因子受体相互作用、神经活性配体受体相互作用和嗅觉传导通路中发挥作用;而CHSY1低表达和ST8SIA1高表达时主要富集在神经活性配体受体相互作用和嗅觉传导通路中(图4A~C)。为了进一步研究OFG在IgAN中的分子机制,利用GENEMINA数据库筛选潜在的相互作用基因并进行功能富集分析。结果表明,富集度最高的5个功能分别为硫酸软骨素蛋白聚糖生物合成过程、硫酸软骨素代谢过程、硫酸软骨素蛋白聚糖代谢过程、蛋白聚糖生物合成过程和糖胺聚糖生物合成过程(图4D)。

### 2.6 免疫细胞浸润分析

运用CIBERSORT算法评估IgAN和正常样本之间22种免疫细胞浸润程度的差异(图5A)。相对对

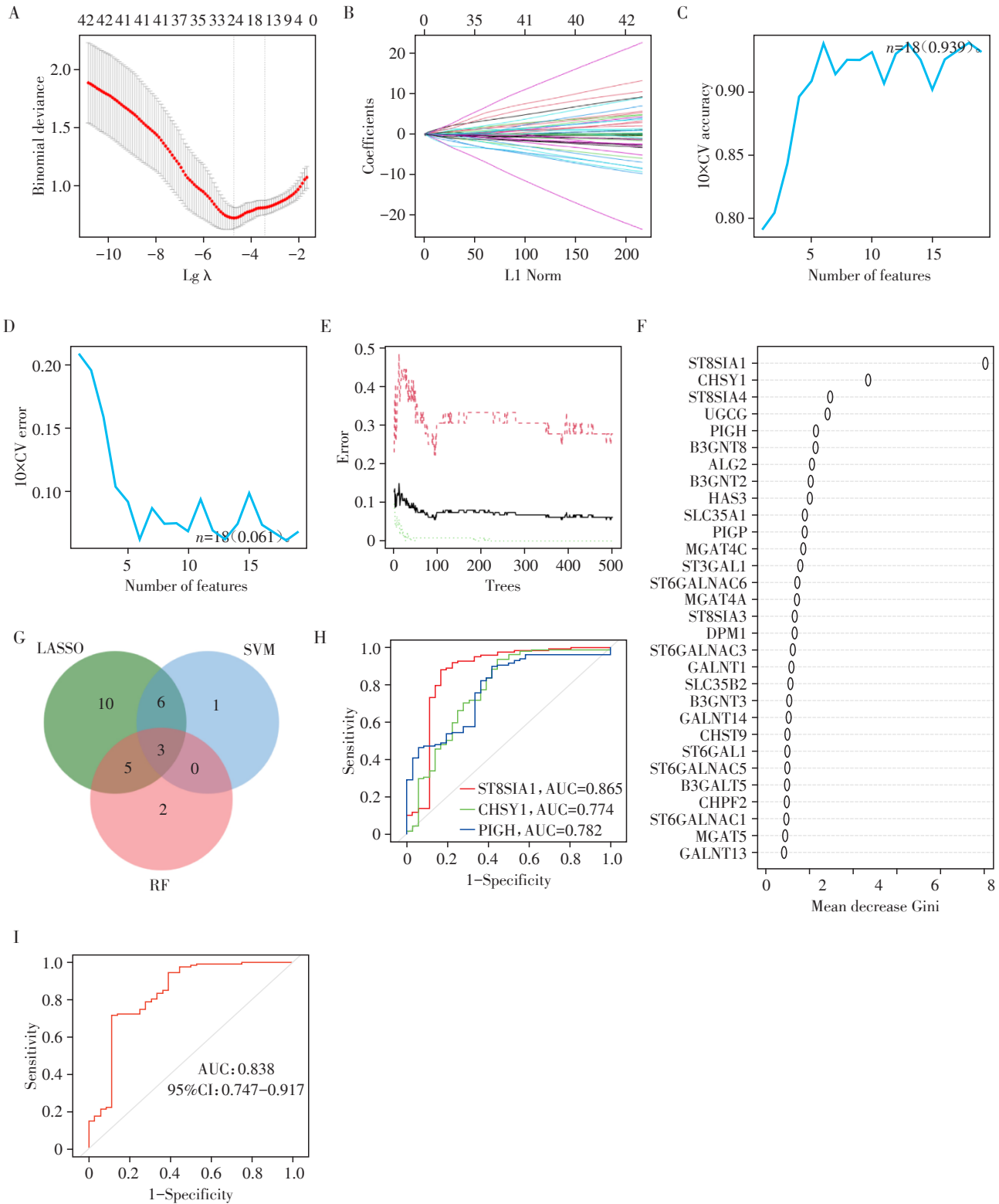
照组,IgAN组CD8<sup>+</sup>T细胞、CD4<sup>+</sup>幼稚T细胞、活化CD4<sup>+</sup>记忆T细胞、静息树突状细胞以及静息肥大细胞浸润显著增加,而幼稚B细胞、浆细胞、静息CD4<sup>+</sup>记忆T细胞、活肥大细胞和中性粒细胞浸润明显减少。进一步评估OFG和免疫细胞相关性中发现,在上述差异浸润的免疫细胞中,活化CD4<sup>+</sup>记忆T细胞、静息CD4<sup>+</sup>记忆T细胞、CD4<sup>+</sup>幼稚T细胞、幼稚B细胞、中性粒细胞等与3种OFG均存在一定相关性( $P < 0.05$ ,图5B)。其中,ST8SIA1与活化CD4<sup>+</sup>记忆T细胞呈显著正相关,与幼稚B细胞呈显著负相关;PIGH与静息CD4<sup>+</sup>记忆T细胞呈显著正相关,与CD4<sup>+</sup>幼稚T细胞呈显著负相关;CHSY1与幼稚B细胞呈显著正相关,与活化CD4<sup>+</sup>记忆T细胞呈显著负相关。

### 2.7 ceRNA 网络

根据miRanda、TargetScan和miRDB数据库筛选了174个与OFG相互作用的miRNA,再从SpongeScan数据库筛选了与miRNA相互作用的117个lncRNA,最终构建了一个包含117个lncRNA、67个miRNA和3个OFG的ceRNA,并通过Cytoscape软件进行可视化展示(图6)。

### 2.8 验证 OFG

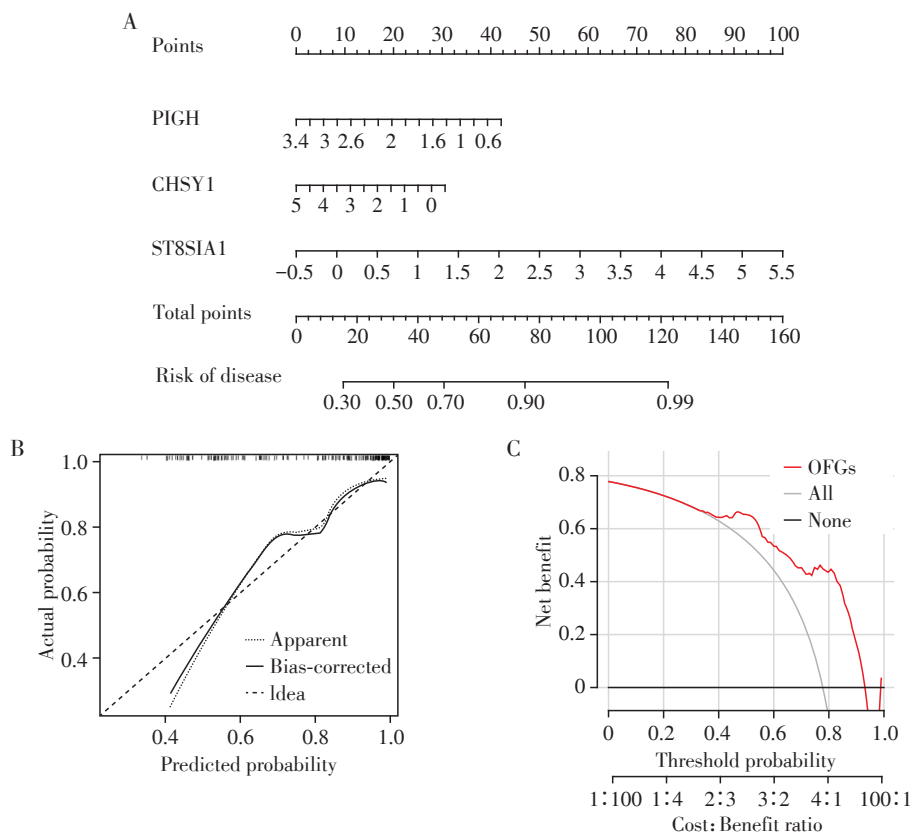
IgAN、糖尿病肾病、微小病变性肾病的肾组织



A: Selection of tuning parameter lambda in LASSO regression analysis using ten-fold cross-validation. B: LASSO coefficient profiles of diagnostic genes. C: Line graph shows the cross-validated accuracy in the SVM-RFE model. D: Line graph shows the cross-validated error in the SVM-RFE model. E: The effect of the number of decision trees on the error rate. F: The importance of the top 30 DEGRGs in the RF model. G: Venn diagram demonstrates the intersection of diagnostic markers obtained from the three algorithms. H: The AUC for IgAN samples was determined using a logistic regression model. I: ROC curves of the OFGs.

图2 糖基化相关最优特征基因的筛选和验证过程

Figure 2 The screening and validation process of the optimal feature genes related to glycosylation



A: Nomogram model for predicting IgAN risk based on OFGs. B: Construction of calibration curve. C: Construction of decision analysis curve.

图3 基于最优特征基因预测IgAN风险的列线图

Figure 3 Nomogram model for predicting IgAN risk based on the optimal feature genes

切片和冰冻肾组织分别进行免疫组织化学检测和Western blot以进一步验证(图7A~F)。两次实验结果均显示,与微小病理性肾病相比,IgAN中CHSY1和PIGH表达水平显著下降,而ST8SIA1表达水平显著增加。值得注意的是,糖尿病肾病和微小病理性肾病中OFG的表达水平差异无统计学意义,提示OFG对IgAN有潜在的诊断价值。此外,根据Nephroseq v5数据库中OFG在IgAN肾组织和正常样本之间的表达水平进行统计学分析,再一次验证了其差异表达(图7G~I)。

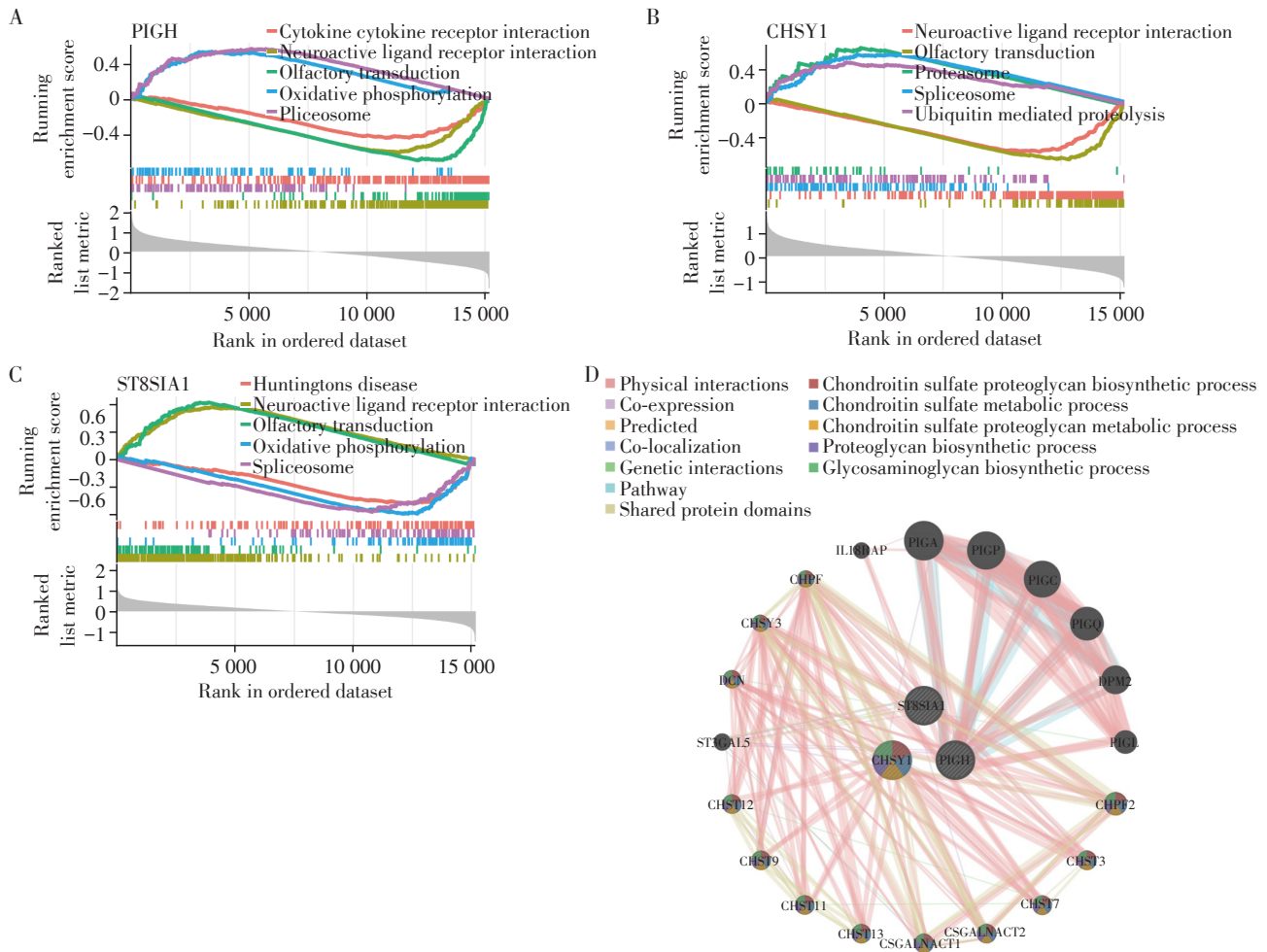
### 3 讨论

目前,诊断IgAN的金标准仍然依赖于有创的肾穿刺活检,但存在出血和感染等风险,限制了其在临床中的广泛应用。因此,越来越多的研究致力于寻找合适的IgAN诊断标志物。然而,这些候选标志物的灵敏度和特异度均不高。近年来研究发现,异常糖基化与多种免疫性疾病有关,如系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎等<sup>[10]</sup>,但目前IgAN中的糖基化研究仅局限在Gd-IgA1中,因此深入探索IgAN中新

的糖基化相关基因及其机制非常重要,如能找到灵敏度和特异度更高的诊断标志物,将推动靶向治疗。

本研究从GGDB网站下载糖基化相关基因,根据GEO数据库中IgAN数据集筛选出58个DEGRG。GO分析结果显示这些DEGRG主要定位在高尔基体,与糖蛋白代谢合成和糖基转移酶活性等功能有关。KEGG分析结果表明DEGRG主要富集在鞘脂生物合成、黏蛋白O-聚糖生物合成和黏多糖生物合成等通路。这些结果进一步阐明了糖基化相关基因在IgAN中潜在的作用机制。随后,通过LASSO、SVM-REF和RF 3种算法确定了3个重叠基因(CHSY1、PIGH和ST8SIA1)作为OFG。基于OFG绘制预测IgAN发生的列线图,校准曲线和决策曲线均提示该模型优秀的预测作用。此外,肾组织免疫组织化学检测和Western blot证实OFG可鉴别IgAN与其他肾脏疾病,具有良好的诊断价值。

CHSY-1是一种催化硫酸软骨素合成的糖基转移酶,硫酸软骨素是糖胺聚糖的家族成员,与核心蛋白共价连接形成硫酸软骨素蛋白聚糖<sup>[11]</sup>。研究表明硫酸软骨素可通过减少核因子- $\kappa$ B核转位、



A: GSEA of PIGH. B: GSEA of CHSY1. C: GSEA of ST8SIA1. D: The gene-gene interaction network for OFGs.

图4 最优特征基因的功能富集分析

Figure 4 Functional enrichment analyses of the optimal feature genes

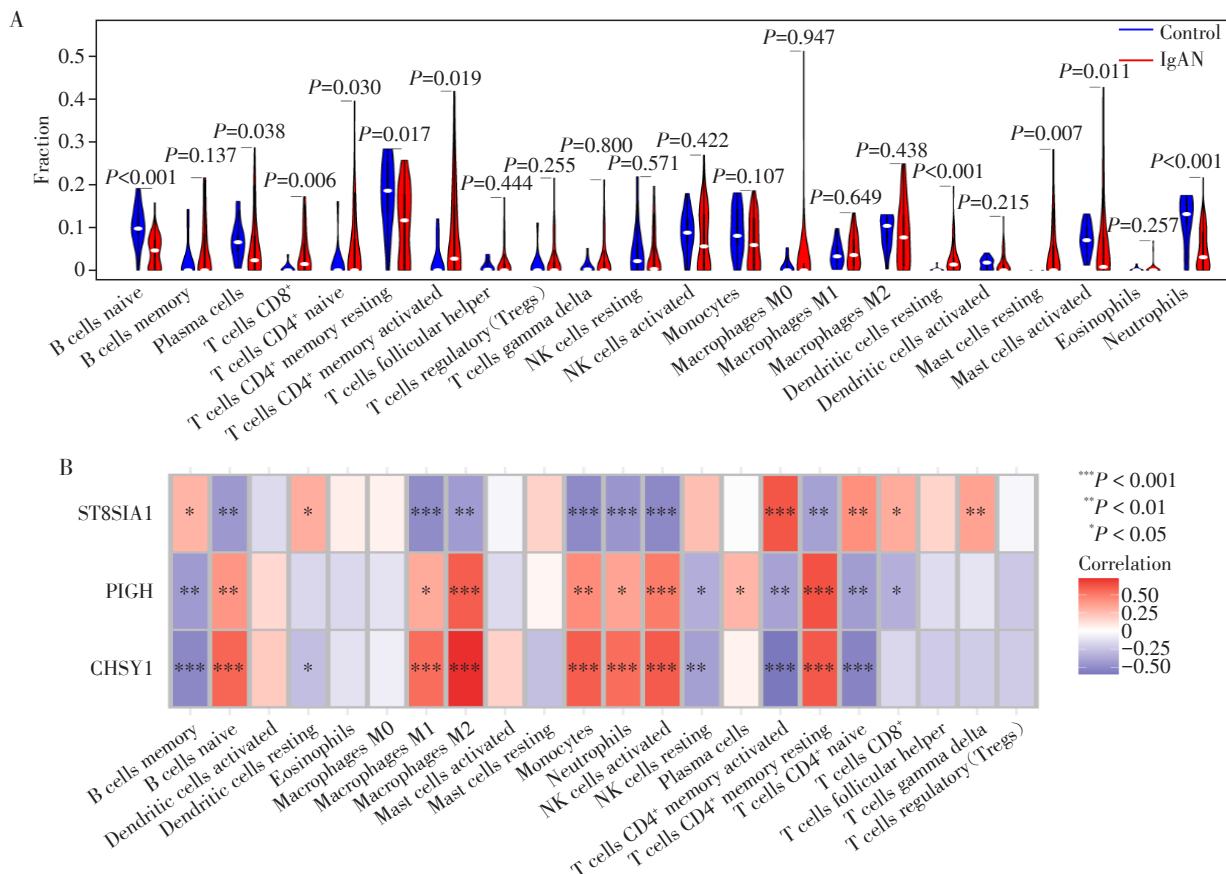
白介素-1 $\beta$ 、肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、一氧化碳合酶-2和环氧化酶-2等免疫因子表达实现显著的免疫调节作用<sup>[12]</sup>。Ceol等<sup>[13]</sup>还发现在嘌呤霉素肾病中,糖胺聚糖可以通过显著减少巨噬细胞浸润和转化生长因子- $\beta$ 的表达来延缓肾病进展。这些结果提示硫酸软骨素可能通过下调炎症因子的表达在免疫介导的肾病中发挥保护作用。IgAN与异常的黏膜免疫反应和慢性炎症密切相关,CHSY-1在IgAN中表达降低,提示硫酸软骨素的缺失是IgAN发生和发展的一个重要因素。

PIGH是糖基化磷脂酰肌醇-N-乙酰氨基葡萄糖苷转移酶活性的重要组成部分,在糖基化磷脂酰肌醇的合成中起着至关重要的作用<sup>[14]</sup>。糖基化磷脂酰肌醇是许多细胞膜结合蛋白的锚定物,其生物合成障碍常导致生长发育迟缓、智力障碍、癫痫和其他神经系统异常等<sup>[14]</sup>。本研究显示PIGH在IgAN中表达水平降低,然而目前尚无研究揭示PIGH和肾

脏疾病的关联,有待进一步研究。

ST8SIA1是唾液酸转移酶ST8SIA亚家族的6个成员之一,又被称为神经节苷脂(ganglioside, GD)3合成酶,是GD3和GD2生物合成中唯一的关键酶<sup>[15-16]</sup>。Sarkar等<sup>[16]</sup>发现ST8SIA1可以调节EMT,促进乳腺癌细胞的侵袭和转移。抑制ST8SIA1可下调FAK/Akt/mTOR和Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路,增加三阴性乳腺癌对化疗的敏感性<sup>[16]</sup>。然而,ST8SIA1在IgAN中的确切作用机制尚不清楚。本研究结果首次表明ST8SIA1在IgAN中显著上调,可能通过在神经活性配体受体相互作用和嗅觉传导等通路在IgAN中发挥作用,是一个潜在的生物标志物。

目前,已有大量文献表明,肾组织中的免疫细胞浸润在IgAN的发生发展过程中发挥着至关重要的作用。本研究结果显示OFG可能通过上调CD4<sup>+</sup>幼稚T细胞、活化CD4<sup>+</sup>记忆T细胞等,下调静息CD4<sup>+</sup>记忆T细胞、幼稚B细胞、中性粒细胞等在



A: Comparison of immunological microenvironments in IgAN and normal glomeruli samples. B: Differential study of the immunological micro-environments caused by OFGs.

图5 免疫细胞浸润分析

Figure 5 Analysis of the immune cell infiltration

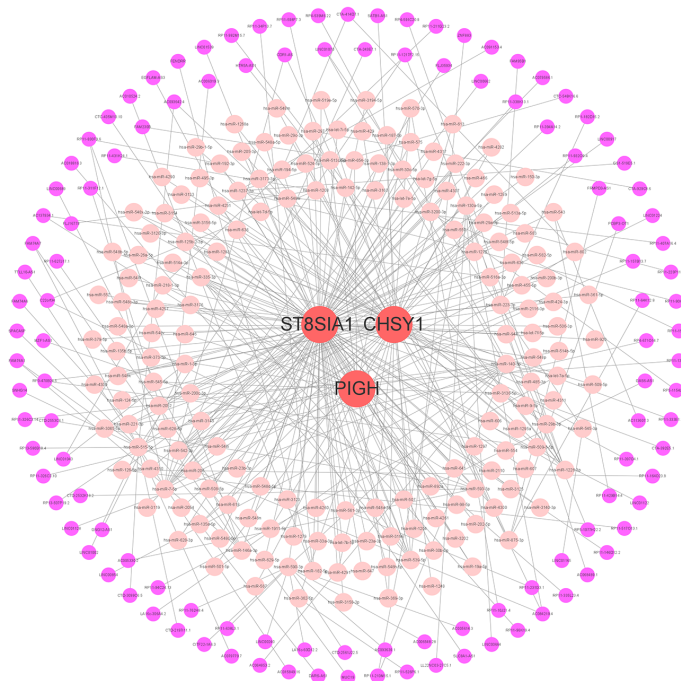
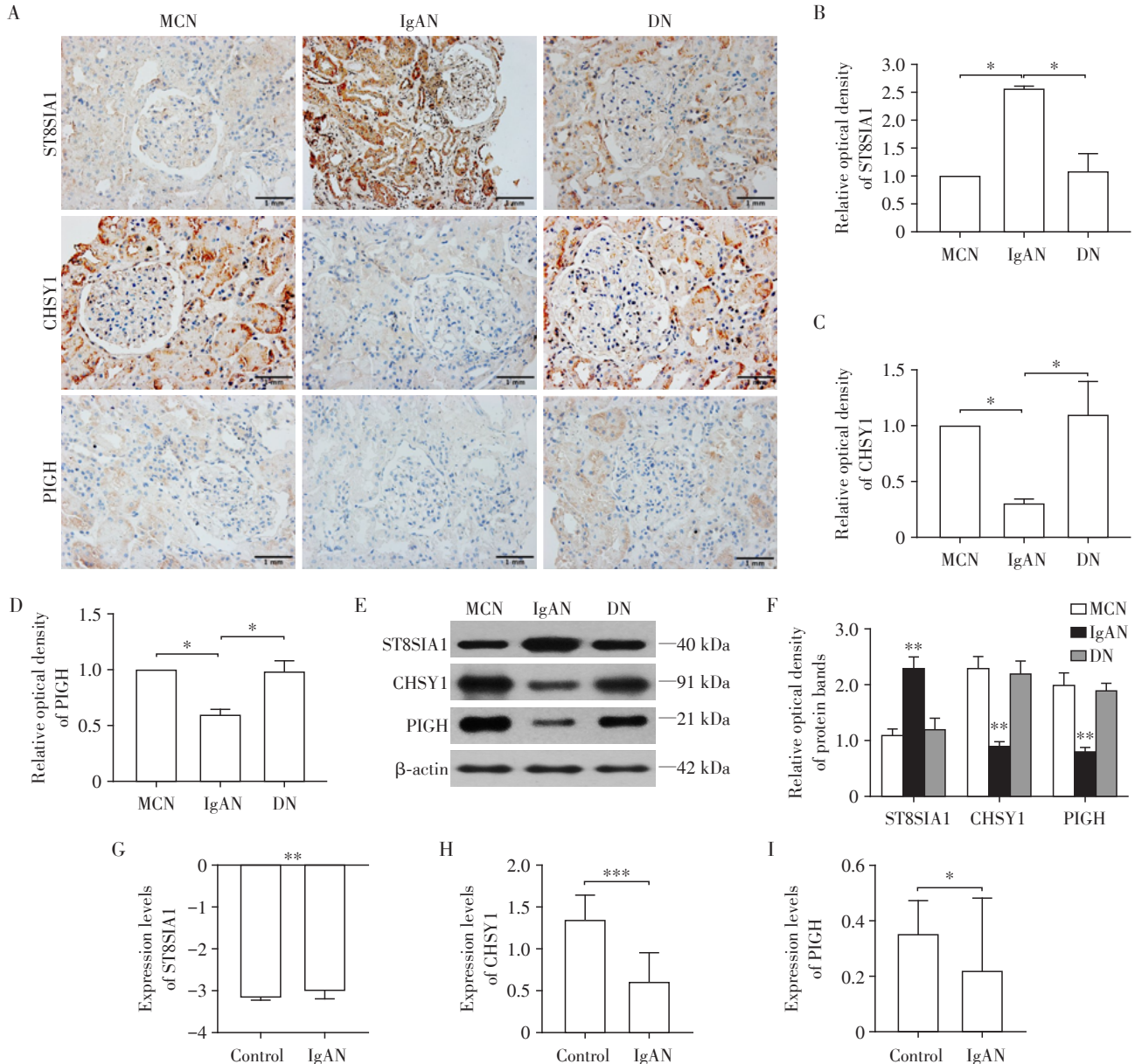


图6 IgAN的lncRNA-miRNA-mRNA网络

Figure 6 lncRNA-miRNA-mRNA network of IgAN



A: ST8SIA1, CHSY1, and PIGH protein expression were measured by immunohistochemical staining ( $\times 400$ ). B-D: The values of semiquantitative analysis for the positive areas in each protein (B: ST8SIA1; C: CHSY1; D: PIGH),  $^*P < 0.05$  ( $n=5$ ). E: The protein expression of ST8SIA1, CHSY1 and PIGH were measured by Western blot. F: The histogram of the densitometric scans of the protein bands, normalized by comparison with  $\beta$ -actin. Compared with the MCN group,  $^{**}P < 0.01$  ( $n=5$ ). G-I: Expression levels of ST8SIA1 (G), CHSY1 (H) and PIGH (I) in IgAN and normal kidney tissue in the Nephroseq v5 database,  $^*P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$ ,  $^{***}P < 0.001$  ( $n=5$ ). MCN: minimal change nephropathy; IgAN: IgA nephropathy; DN: diabetic nephropathy.

图7 ST8SIA1、CHSY1和PIGH在IgAN中的表达情况

Figure 7 The expression of ST8SIA1, CHSY1 and PIGH in IgAN

IgAN中发挥作用机制。CD4<sup>+</sup>幼稚T细胞是一类未经抗原刺激的T细胞,可在收到抗原提呈细胞的激活信号后,根据不同的细胞因子环境分化为不同功能的辅助T细胞<sup>[17]</sup>。Künzli等<sup>[17]</sup>报道CD4<sup>+</sup>记忆T细胞分布于全身各个部位,不仅保护组织免受再次感染和肿瘤,还参与过敏、自身免疫、移植物排斥和慢性炎症。幼稚B细胞是处于分化阶段的B细胞,该阶段细胞在接触特定抗原后会发育成浆细胞或记

忆细胞<sup>[18]</sup>。中性粒细胞是人体免疫的第一道防线,与其他免疫细胞广泛作用,在炎症感染、肿瘤、免疫等多种疾病中发挥作用<sup>[19]</sup>。然而,这些免疫细胞在IgAN中的作用机制尚不清楚,需要进一步研究来阐明。

miRNA和lncRNA广泛参与IgAN的发病机制,与IgAN的严重程度相关<sup>[20-22]</sup>。因此本研究构建了一个ceRNA网络,并鉴定出117个lncRNA和67个

miRNA作为潜在的OFG调控因子。

综上所述,本研究首次报道了CHSY1、PIGH和ST8SIA1作为糖基化相关OFG,在IgAN的诊断中具有潜在预测价值,可能通过神经活性配体受体相互作用和嗅觉传导等通路,调节免疫细胞等发挥作用,未来需要更多深入的体内和体外实验验证。

#### [参考文献]

- [1] SCHENA F P, NISTOR I. Epidemiology of IgA nephropathy: a global perspective [J]. *Semin Nephrol*, 2018, 38(5):435-442
- [2] FLOEGE J, WIED S, RAUEN T. Assessing prognosis in IgA nephropathy[J]. *Kidney Int*, 2022, 102(1):22-24
- [3] SUZUKI H, NOVAK J. IgA glycosylation and immune complex formation in IgAN [J]. *Semin Immunopathol*, 2021, 43(5):669-678
- [4] 宋丹丹,孙连芹,朱敬凤,等.维生素D缺乏与IgA肾病患者肾脏预后的关系[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2023, 43(1):53-59
- [5] STAUDACHER E, VAN DAMME E J M, SMAGGHE G. Glycosylation-the most diverse post-translational modification[J]. *Biomolecules*, 2022, 12(9):1313
- [6] DE VELLIS C, PIETROBONO S, STECCA B. The role of glycosylation in melanoma progression[J]. *Cells*, 2021, 10(8):2136
- [7] ESMAIL S, MANOLSON M F. Advances in understanding N - glycosylation structure, function, and regulation in health and disease[J]. *Eur J Cell Biol*, 2021, 100(7/8):151186
- [8] LI J J, GUO B, ZHANG W Q, et al. Recent advances in demystifying O - glycosylation in health and disease [J]. *Proteomics*, 2022, 22(23/24):e2200156
- [9] CHEN B B, KHODADOUST M S, LIU C L, et al. Profiling tumor infiltrating immune cells with CIBERSORT [J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1711:243-259
- [10] ZĄBCZYŃSKA M, LINK-LENCZOWSKI P, POCHĘC E W. Glycosylation in autoimmune diseases [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2021, 1325:205-218
- [11] LIU J J, TIAN Z W, LIU T Z, et al. CHSY1 is upregulated and acts as tumor promotor in gastric cancer through regulating cell proliferation, apoptosis, and migration[J]. *Cell Cycle*, 2021, 20(18):1861-1874
- [12] LUAN J J, PENG X D, LIN J, et al. The therapeutic potential of chondroitin sulfate in *Aspergillus fumigatus* keratitis [J]. *Mol Immunol*, 2022, 147:50-61
- [13] CEOL M, VIANELLO D, SCHLEICHER E, et al. Heparin reduces glomerular infiltration and TGF -beta protein expression by macrophages in puromycin glomerulosclerosis[J]. *J Nephrol*, 2003, 16(2):210-218
- [14] TREMBLAY-LAGANIÈRE C, KAIYRZHANOV R, MARROFIAN R, et al. PIGH deficiency can be associated with severe neurodevelopmental and skeletal manifestations[J]. *Clin Genet*, 2021, 99(2):313-317
- [15] METER D, RACETIN A, VUKOJEVIĆ K, et al. A lack of GD3 synthase leads to impaired renal expression of connexins and Pannexin1 in St8sia1 knockout mice[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(11):6237
- [16] SARKAR T R, BATTULA V L, WERDEN S J, et al. GD3 synthase regulates epithelial-mesenchymal transition and metastasis in breast cancer[J]. *Oncogene*, 2015, 34(23):2958-2967
- [17] KÜNZLI M, MASOPUST D. CD4<sup>+</sup> T cell memory[J]. *Nat Immunol*, 2023, 24(6):903-914
- [18] WEISEL N M, JOACHIM S M, SMITA S, et al. Surface phenotypes of naive and memory B cells in mouse and human tissues[J]. *Nat Immunol*, 2022, 23(1):135-145
- [19] NÉMETH T, SPERANDIO M, MÓCSAI A. Neutrophils as emerging therapeutic targets [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2020, 19(4):253-275
- [20] WU J J, ZHANG H, WANG W W, et al. Plasma microRNA signature of patients with IgA nephropathy[J]. *Gene*, 2018, 649:80-86
- [21] SHEN M, PAN X Y, GAO Y J, et al. LncRNA CRNDE exacerbates IgA nephropathy progression by promoting NLRP3 inflammasome activation in macrophages[J]. *Immunol Invest*, 2022, 51(5):1515-1527
- [22] GUO N, ZHOU Q, HUANG X, et al. Identification of differentially expressed circulating exosomal lncRNAs in IgA nephropathy patients [J]. *BMC Immunol*, 2020, 21(1):16

[收稿日期] 2024-03-21  
(本文编辑:陈汐敏)