

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2007)03-0214-03

仙台病毒载体对未成熟树突状细胞蛋白表达的影响

易发平^{1,2,3}, 张平波⁴, 郭风劲¹, 马永平^{1,2}, 宋方洲^{1,2,3} (¹重庆医科大学生物化学与分子生物学教研室, ²重庆市生物化学与分子药理学重点实验室, ³临床检验诊断学省部共建教育部重点实验室, 重庆 400016; ⁴日本九州大学遗传资源中心, 福冈 日本 812-8581)

Protein changes in immature dendritic cells infected with sendai virus vector

YI Fa-Ping^{1,2,3}, ZHANG Ping-Bo⁴, GUO Feng-Jin¹, MA Yong-Ping^{1,2}, SONG Fang-Zhou^{1,2,3}

¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, Chongqing University of Medical Sciences, ²Chongqing Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Pharmacology, ³Key Laboratory of Clinical Laboratory Diagnostics of Ministry of Education, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China, ⁴Institute of Genetic Resources, Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan

【Abstract】 AIM :To investigate the protein changes in immature dendritic cells (DC) infected with sendai virus vector. **METHODS** :The total cellular proteins were collected and determined in the immature DC infected with sendai virus vector and the control ones uninfected with it. They were separated using 2-dimensional gel electrophoresis (2-DE) and visualized by silver staining. Digital images were analyzed by PDQuest software. The differentially expressed protein spots were picked and digested in gel, followed by identification with peptide mass fingerprinting (PMF) using MALDI-TOF MS. **RESULTS** :More than 40 protein spots disappeared in 2-DE of the treated group. Among them 5 protein spots that were apparently not expressed were identified by PMF. **CONCLUSION** :Protein expression decreased in DC infected with sendai virus vector.

【Keywords】 sendai virus vector ; dendritic cell ; proteomic

【摘要】目的 :研究仙台病毒载体对未成熟树突状细胞 (DC)蛋白质表达的影响. 方法 :提取转染仙台病毒载体的树突状细胞和对照细胞的总蛋白,定量. 双向凝胶电泳分离蛋白质组分,胶体银染色,PDQuest 进行图像分析后选取差异点,胶内酶解后 MALDI-TOF MS 进行肽指纹图谱鉴定. 结果 :图像分析结果显示,处理组 2-DE 图缺少了 40 个以上的蛋白

收稿日期 2006-01-19 ; 接受日期 2006-03-25

基金项目 国家自然科学基金(30371479) ;重庆市骨干教师资助计划 (渝教人 200415)

通讯作者 宋方洲. Tel (023)68485958 Email fzsongcq@163.com

作者简介 易发平. 博士生(导师宋方洲),讲师. Tel (023)68485991

Email yfpxy@163.com

点,对其中明显没有表达的 5 个蛋白点进行了鉴定. 结论 :仙台病毒载体感染未成熟树突状细胞可引起蛋白表达的减少.

【关键词】 仙台病毒载体 树突状细胞 蛋白质组

【中图分类号】 R392 **【文献标识码】** A

0 引言

随着人类基因组计划的成功实施,各国科学家将生命科学的战略重点转到以阐明人类基因组整体功能为目标的功能基因组学上. 蛋白质作为生命活动的“执行者”,自然成为新的研究焦点. 以二维电泳 (2-DE)为核心的蛋白分离技术和以质谱方法为主的蛋白质鉴定等技术体系已基本成熟. 树突状细胞 (DC)是至今发现最强的抗原递呈细胞,在国内外都已将其作为肿瘤疫苗应用于基因治疗. 仙台病毒载体是细胞质型 RNA 载体,对各种动物细胞有较高的感染效率,它本身不进入细胞核内,在细胞质中进行基因表达,在理论上不存在改变细胞核内染色体的危险性,与以往的载体相比具有更高的安全性. 我们通过蛋白质组学方法来研究仙台病毒感染树突状细胞后蛋白表达变化,为联合运用树突状细胞和仙台病毒进行基因治疗方案的设计提供了实验依据.

1 材料和方法

1.1 材料 C57BL/6 小鼠 6~8 周龄,雌性,由日本 SLC 株式会社培育. IPG 胶条购于 Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden), trypsin (测序级)购于 Promega (Madison, WI, USA), CHAPS, DTT, TEMED, BIS 购于 BIO-RAD, TFA 购于 Sigma,其余试剂采用国产分析纯.

1.2 方法 参照文献 [1] 方法培养 C57BL/6 小鼠来源的 DC. 小鼠骨髓细胞,在含 IL-4 25 U/mL, GM-CSF 250 U/mL 的 1640 培养基中于 37℃ 的 CO₂ 培养箱培养,第 4 日更换一半培养基,第 7 日回收细胞. 每 1 × 10⁶ 细胞加 100 μL 1640 培养基,感染仙台病毒 (感染重数, multiply of infection, moi = 40), 37℃ 1 h, 收集细胞. 用醋酸镁缓冲液冲洗收集到的细胞数次,参照文献 [2] 方法提取蛋白,并测定蛋白浓度,样品

于 -70℃ 冻存备用. 双向电泳参照 Amersham 公司技术手册, 18 cm pH 3 ~ 10 胶条, 上样体积 350 μL, 上样量 100 μg, 一向等电聚焦设置 50 V 12 h, 500 V 1 h, 1000 V 1 h, 4000 V 1 h, 6000 V 1 h, 8000 V 10 h. 胶条分别在含 10 g/L DTT 和 40 g/L IAA 的平衡液 (50 mmol/L Tris-HCl pH 8.8, 6 mol/L 尿素, 300 g/L 甘油, 20 g/L SDS) 中平衡 15 min 后进行第二向 SDS-PAGE 电泳, 300 g/L 的丙烯酰胺, 银染法检测蛋白. 重复 3 次.

染色后的双向电泳凝胶照相后用 PDQuest 软件 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) 进行图像分析. 包括确定蛋白点的分子量、等电点和斑点匹配, 切取重复性较好的差异蛋白点, 经过脱色、胰酶酶解、浓缩后进行质谱分析. 取 1 μL 样品于点样盘, 加入等体积基质, 室温干燥后用带有 PerSeptive Biosystem MALDI-TOF Voyager-DE RP Biospectrometry 工作站 (Applied Biosystems, Framingham, MA) 的 MALDI-TOF MS 分析. 所得肽指纹图谱用 SWISS-PROT. 2005.01.06 和 NCBI nr. 2005.01.06 数据库进行搜索.

2 结果

仙台病毒感染未成熟 DC 后双向电泳图谱有差 (图 1). 与对照 (未成熟 DC 全蛋白 2-DE 图谱) 比较, 通过 PDQuest 软件分析发现, 感染后的 DC 蛋白斑点明显减少, 达 40 个以上. 蛋白质分子量在 M_r (3.0 ~ 6.6) × 10⁴, pI 值主要分布于 5.5 ~ 9.2 间. 对其中明显未表达的 5 个蛋白点作 MALDI-TOF MS 分析, 得到图 2. 通过数据库搜索, 结合 2-DE 图谱上相应蛋白质的分子量、pI 值, 确定它们分别为小鼠钙粒蛋白 B, 磷酸丙糖异构酶, 乳酸脱氢酶 C 链, 钙磷脂结合蛋白 I 和白细胞介素 11 受体 β 链 (表 1).

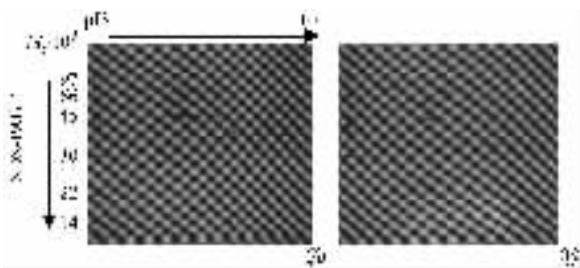


图 1 未成熟 DC (A) 和仙台病毒载体转染后的 DC (B) 的双向电泳图

3 讨论

钙粒蛋白 B 参与翻译后调控, 目前有关其功能的研究报道甚少. 钙粒蛋白家族与一些肿瘤的发展

相关, 而且主要存在于胞浆中. 磷酸丙糖异构酶存在于细胞质基质中. 其功能是在糖酵解代谢途径中催化磷酸二羟丙酮与 3-磷酸甘油醛之间的相互转化, 并在光合作用、糖异生等代谢途径中也催化同一反应. 已有大量的原细菌、真细菌和真核生物 TIM 的研究报导.

表 1 仙台病毒载体转染未成熟 DC 后差异蛋白鉴定结果

蛋白点	1	2	3	4	5
得分	1756	426000	1076	49770	16800
匹配数	6(8)	11(17)	8(14)	13(25)	8(12)
覆盖率 (%)	42.0	47.0	28.0	47.0	20.0
分子量理论值	13049	26713	35912	38735	46721
等电点理论值	6.6	6.9	8.4	7.0	6.1
Swiss-Prot 接受号	P31725	P17751	P00342	P10107	P70225
NCBI nr 接受号	6677837	56972171	7305229	113945	31560577
蛋白质名称	钙粒蛋白 B	磷酸丙糖异构酶	乳酸脱氢酶 C 链	钙磷脂结合蛋白 I	IL-11 受体 β 链
蛋白质功能	翻译后调控	物质代谢	糖酵解	调节磷脂酶 A2 活性	IL-11 受体
蛋白质家族	钙粒蛋白	磷酸丙糖异构酶	乳酸脱氢酶	钙磷脂结合蛋白	I 型细胞因子受体
基因登录号	20202	21991	16833	16952	16158

乳酸脱氢酶也存在于细胞质基质中. 其功能是在乳酸发酵过程中使丙酮酸还原成乳酸. 钙磷脂结合蛋白 I 是钙磷脂结合蛋白超家族中的成员, 作为表皮生长因子受体酪氨酸激酶的底物, 通过阻断 mRNA 的合成而抑制磷脂酶 A2 的表达. 具有多种生物学功能, 并在多种肿瘤发生早期出现表达水平的改变, 尽管目前具体的机制还不清楚, 但它为研究肿瘤的发生、发展、早期诊断、治疗提供了新的线索. 白细胞介素 11 由骨髓基质细胞产生, 分子量约为 M_r 2.3 × 10⁴, 是造血微环境中一个多功能的调节因子. 其受体是一种膜蛋白.

上述 5 种蛋白在仙台病毒载体感染后的 DC 中明显没有表达, 而通过细胞因子诱导的未成熟 DC 中许多蛋白表达是明显上调的^[3], 包佳玲等用结核分枝杆菌感染人源 DC 也发现有 4 种蛋白是明显上调的^[4]. 这可能是因为仙台病毒的遗传物质是 RNA, 只在细胞质中表达, 因此抑制了存在于细胞质中的蛋白表达. 我们用敲出了仙台病毒复制序列后来感染未成熟 DC 的蛋白分析中也证实了这一点, 以后将陆续报道. 最近 Sandra 等^[5]也发现用不同的细胞因子诱导 DC, 其蛋白表达差异很大.

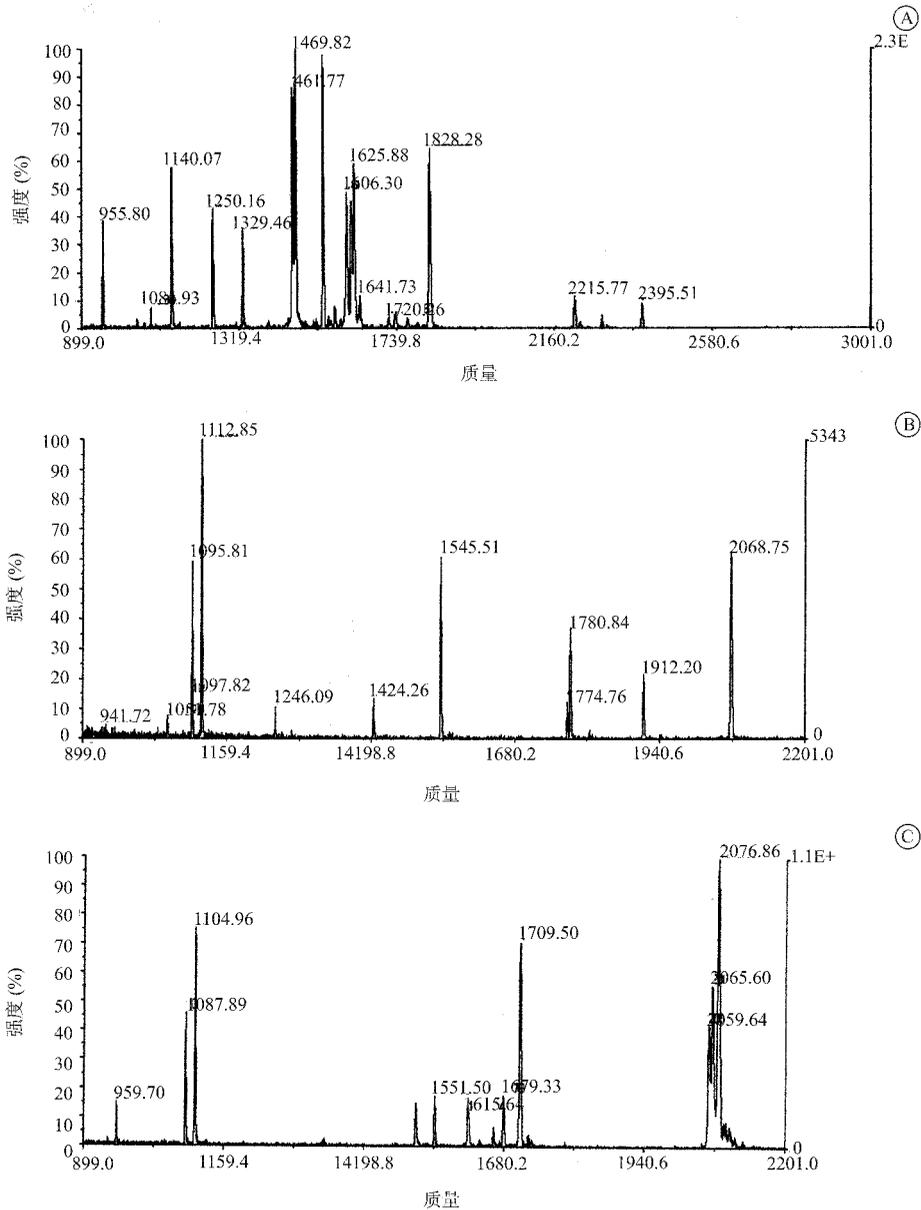


图2 蛋白点A、B和C的肽指纹图谱

致谢 日本九州大学张玲博士对本实验细胞培养部分提供了大力帮助,特此致谢。

【参考文献】

- [1] 蔡莉, 惠延年, 王琳, 等. TGF- β_2 对树突状细胞表型和功能的影响[J]. 第四军医大学学报, 2003, 24(13): 1156-1158.
- [2] Zhang PB, Kohji Y, Yoich A, et al. Proteomic Studies of Isoforms of the P25 Component of Bombyx mori Fibroin[J]. Biosci, Biotechnol, Biochem, 2005, 69(11): 2086-2093.
- [3] Tang Z, Saltzman A. Understanding human dendritic cell biology through gene profiling[J]. Inflamm Res, 2004, 53: 424-441.
- [4] 包佳玲, 乐军, 田野苹, 等. 结核分枝杆菌感染人源树突状细胞的蛋白质表达谱[J]. 微生物学报, 2005, 45(3): 415-419.
- [5] Sandra RP, Vitor MF, Glauce GG, et al. Changes in the proteomic profile during differentiation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells stimulated with granulocyte macrophage colony stimulating factor/interleukin-4 and lipopolysaccharide[J]. Proteomics, 2005, 5: 1186-1198.

编辑 许昌泰