

· 论 著 ·

细粒棘球蚴 14-3-3 重组疫苗免疫小鼠 T 淋巴细胞差异蛋白质组分析*

李宗吉¹, 赵巍^{2△}

(宁夏医科大学:1. 临床检验与血液检验教研室;2. 科技中心, 宁夏银川 750004)

摘要:目的 用蛋白质组学方法分析细粒棘球蚴(Eg)14-3-3 重组疫苗免疫小鼠和磷酸盐缓冲液(PBS)注射小鼠 T 淋巴细胞表达的蛋白质组,建立差异表达蛋白谱。**方法** 以 Eg14-3-3 重组疫苗免疫小鼠为实验组,PBS 注射小鼠为对照组,Eg14-3-3 重组疫苗免疫 2 周后提取两组小鼠脾脏 T 淋巴细胞总蛋白,双向电泳(2-DE)分离总蛋白,比较两组小鼠 T 淋巴细胞的差异表达蛋白质。**结果** 凝胶电泳发现 11 个存在明显差异的蛋白质点,其中 7 个蛋白明显见于实验组小鼠 T 淋巴细胞中,4 个点明显见于对照组小鼠中。**结论** 14-3-3 重组疫苗免疫小鼠与 PBS 注射小鼠 T 淋巴细胞表达蛋白质组有明显差异,差异表达蛋白对疫苗免疫机制的研究及后续的疫苗优化具有重要意义。

关键词:细粒棘球蚴; 14-3-3 重组疫苗; T 淋巴细胞; 差异蛋白质组

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.23.010

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)23-3388-03

Differential proteomic analysis of T lymphocyte in mice immunized with Echinococcus granulosus' 14-3-3 recombinant vaccine*

Li Zongji¹, Zhao Wei^{2△}

(1. Clinical and Hematological Examination Staff Room; 2. the Sci-technology Center, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China)

Abstract: Objective To analyze the differentially expressed proteomics on T lymphocyte in mice immunized with 14-3-3 recombinant vaccine and injected with phosphate buffer solution(PBS). **Methods** Mice immunized with 14-3-3 recombinant vaccine were separated in the experiment group and those injected with PBS were selected in the control group. Two weeks after immunization with 14-3-3 recombinant vaccine, total protein of T lymphocyte isolated from the two groups was collected and separated by using the two dimensional electrophoresis(2-DE). The differentially expressed proteomics were compared. **Results** The 2-DE map shown 11 differentially expressed protein plots, including 7 protein plots spotted in the 2-DE map of T lymphocyte from 14-3-3 recombinant vaccine immunized-mice and 4 protein plots spotted in the 2-DE map of T lymphocyte from PBS injected-mice. **Conclusion** There are differentially expressed proteomics of T lymphocyte in PBS injected-mice and 14-3-3 recombinant vaccine immunized-mice, which could contribute to clarifying the mechanism on protective immunity of 14-3-3 recombinant vaccine and optimizing vaccine strategy for improving vaccine effect.

Key words: Echinococcus granulosus; 14-3-3 recombinant vaccine; T lymphocyte; differential proteome

包虫病是由棘球绦虫的幼虫感染并寄生于人畜体内引发的一种呈世界性分布的人畜共患寄生虫病,该病严重危害人畜健康和经济发展。发展包虫病新型疫苗,进行免疫预防是预防和控制包虫病传播最为理想的方法^[1]。本实验室前期已制备出细粒棘球蚴(Eg)14-3-3 重组蛋白,初步免疫学研究表明该重组蛋白具有良好的抗原性和免疫原性,并在小鼠中可诱导出较高的免疫保护力^[2]。诱导高保护力重组疫苗的免疫保护机制一般认为是依赖 CD4⁺ T 淋巴细胞向 Th1 极化,产生高水平的 γ-干扰素(IFN-γ),进而与巨噬细胞的活化和一氧化氮的产生有关。但是对 T 淋巴细胞活化和向 Th1 分化的分子基础仍然缺乏足够的认识^[3-4]。已知细胞向特异功能细胞分化的机制是该细胞选择性表达特异性蛋白从而使分化后的细胞产生新的功能效应。因此,如果了解了机体在重组疫苗免疫后与无疫苗免疫状态免疫细胞蛋白质组中的所有差异表达蛋白的变化,建立疫苗免疫机制中细胞-细胞、蛋白-蛋白关系网络,揭示免疫细胞蛋白表达的变化,将有利于更深入阐述免疫细胞的功能与

机制,若对差异表达蛋白上、下游分子进一步追溯研究,极有可能发现未知的信号通路。本研究通过开展对 Eg14-3-3 重组疫苗免疫及无疫苗免疫宿主 T 淋巴细胞差异蛋白质组学的研究,全面地分析了解疫苗免疫与无免疫状态下机体 T 淋巴细胞差异表达的蛋白质成分,以期明确宿主 T 淋巴细胞在 Eg 抗感染免疫过程中的分子基础,阐释在复杂的免疫网络中, T 淋巴细胞发挥效应过程中参与免疫应答的特异性分子及免疫反应中潜藏的诸多免疫应答通路和参与分子。

1 材料与方法

1.1 实验动物及材料 6~8 周龄雄性 ICR 小鼠,体质量(18±2)g,共 10 只,购自宁夏医科大学实验动物中心, rEg14-3-3 重组疫苗免疫其中 5 只小鼠(实验组),磷酸盐缓冲液(PBS)注射 5 只小鼠作为对照组,具体免疫方法见已发表文献^[5]。

1.2 仪器与试剂 Miltenyi Biotec 130-095-248 Isolation kit II 免疫磁珠试剂盒, Miltenyi Biotec 130-091-607 小鼠藻红蛋白

* 基金项目:宁夏自然科学基金项目(NZ13069)。 作者简介:李宗吉,女,讲师,主要从事寄生虫分子疫苗及免疫机理研究。 △ 通讯作者, E-mail:zw-6915@163.com。

标记 CD4(CD4-PE) 抗体、Miltenyi Biotec 130-091-792 小鼠异硫氰酸荧光素标记 CD62L(CD62L-FITC) 抗体、Miltenyi Biotec 130-042-201 磁珠分离柱及 MiniMACS Separat 磁珠分离器均购自德国美天旎公司。FACSCanto II 流式细胞仪购自美国 BD 公司。

1.3 方法

1.3.1 脾细胞悬液制备 14-3-3 重组疫苗免疫 2 周后, 免疫小鼠与对照组小鼠各 5 只, 颈椎脱臼处死后, 置 75% 乙醇中消毒 3 min; 无菌取脾, 匀浆, 用 2 mL PBS 冲洗, 200 目尼龙膜过滤, 滤液置 10 mL 离心管, 加 5~10 倍的红细胞裂解液溶解红细胞, 离心 5 min(2 000 r/min), 去上清, 用 PBS 洗 2 次, 离心 5 min(2 000 r/min), 去上清, 8 mL 分离缓冲液重悬浮, 备用。

1.3.2 免疫磁珠分选 T 淋巴细胞 在无菌工作台上将 8 mL 淋巴细胞悬液加入离心管, 300×g 离心 10 min, 弃上清, 用 400 μL 缓冲液重悬浮细胞。加 100 μL CD4⁺ T 淋巴细胞生物素 Cocktail 混合抗体[CD8a、CD45R、CD11b、CD25、CD49b、T 淋巴细胞受体(TCR)γ/δ 及 Ter-119], 混匀后 4 °C 孵育 10 min, 加 300 μL 缓冲液及 200 μL 抗生物素 Microbeads 磁珠, 混匀后 4 °C 孵育 15 min, 加 10 mL 缓冲液在 4 °C 下 300×g 离心 10 min 弃上清后, 用 500 μL 缓冲液重悬浮细胞。将 Miltenyi Biotec 预分选细胞过滤器装配入 LS 分选柱, 并置于 MidiMACS 磁铁分离器中(加 3.5 mL 缓冲液冲洗细胞过滤器及 LS 分选柱备用)。将上述 500 μL 经混合抗体磁珠标记的重悬浮细胞加入预分选过滤器(经 30 μm 孔径的细胞筛过滤, 避免组织块堵塞分选柱), 用 9 mL 缓冲液冲洗分选柱, 将未标记的 CD4⁺ T 淋巴细胞冲洗入分选柱下的干净离心管中(混合抗体免疫磁珠标记的细胞被磁力吸附在分选柱上, 此为磁珠阴性分选方法)。将第一阶段分选出的未标记的 CD4⁺ T 淋巴细胞悬液 300×g 离心 10 min, 弃上清。加入 800 μL 缓冲液重悬浮细胞, 并加入 200 μL 的 CD62L 磁珠混匀后, 4 °C 孵育 15 min, 加 10 mL 缓冲液 300×g 离心 10 min, 弃上清。用 500 μL 的缓冲液重悬浮细胞, 并将悬液加入 MS 分选柱后用 1.5 mL 缓冲液冲洗(CD4⁺ CD62L⁺ T 淋巴细胞被磁力吸附于 MS 分选柱中, 此为磁珠阳性分选)。用 RPM I1640 淋巴细胞培养基重悬培养, 并进行细胞计数与细胞活力鉴定及流式细胞术测定 CD4⁺ CD62L⁺ T 淋巴细胞纯度。

1.3.3 标本蛋白质的提取 取一定量标本组织, 加入液氮在碾钵中进行碾磨, 碾至粉末状样品后, 进行分装, 冻存于 -80 °C 冰箱。取其样品 0.1 g, 加入裂解液 500 μL, 在漩涡混匀器上充分混匀。再加入 50 μg/mL RNase 及 200 μg/mL DNase, 4 °C 放置 15 min。之后 10 000 r/min 离心 30 min, 取上清。用 Bradford 法测定样品中蛋白质浓度。

1.3.4 双向电泳(2-DE)及染色 取出 400 μL 水化上样缓冲液, 加入 100 μL 蛋白 1 样品, 充分混匀。取 IPG 预制胶条(7 cm, pH 3~10), 于室温放置 10 min 后, 加入已混入水化上样缓冲液的样品, 再将 IPG 胶条胶面朝下置于聚焦盘中样品溶液上, 室温放置 40 min。在每根胶条上覆盖 1 mL 矿物油, 防止胶条水化过程中液体的蒸发。将聚焦盘放置于等电聚焦仪中, 设置等电聚焦程序进行第一向电泳。进行完第一向等电聚焦的胶条, 用滤纸吸干胶条上的矿物油及多余样品后, 放置于预先配制的丙烯酰胺凝胶上方, 并加入低熔点琼脂糖封胶液, 将凝胶转移至电泳槽中, 设定电泳程序, 进行第二向十二烷基

硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳。电泳结束后, 取出凝胶, 用考马斯亮蓝染色 2 h, 再用脱色液进行脱色。

1.3.5 图像采集与分析 利用 GS-800 扫描仪的透射模式获取凝胶图像, 之后利用 2-DE 分析软件 PDQuest 分析通过二维电泳分离的蛋白质样品, 分析检测差异表达蛋白。图像分析过程包括蛋白点的检测、量化、背景消减和点的匹配, 蛋白点自动检测后进行编辑, 蛋白点匹配以 T 淋巴细胞凝胶图像作为参考胶, 建立一些匹配点, 然后自动匹配其他蛋白点, 蛋白点等电点和分子量采用二维校正法确定。

2 结果

2.1 分离的 T 淋巴细胞纯度及蛋白量 分选的小鼠脾脏单个核细胞中的 T 淋巴细胞比例为 96.5%, 见图 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。裂解所得细胞总蛋白平均为 60 μg/10⁶ 细胞。

2.2 T 淋巴细胞 2-DE 结果 对照组和实验组小鼠 T 淋巴细胞蛋白质 2-DE 图谱见图 2(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”), 检出蛋白点数分别为 T 淋巴细胞 432、435 个。蛋白等电点和相对分子质量分布范围广, 但多数集中在(16~107)×10³ 区域。对两张图进行匹配比较发现有 7 个蛋白点明显只见于 Eg14-3-3 免疫小鼠 T 淋巴细胞, 而对对照组 T 淋巴细胞未见; 有 4 个蛋白点明显见于对照组 T 淋巴细胞, 而 Eg14-3-3 免疫小鼠组 T 淋巴细胞中未见。具体蛋白点编号、等电点和相对分子质量, 见表 1。

表 1 两组小鼠 T 淋巴细胞测得差异表达蛋白点

序号	相对分子质量(×10 ³)	等电点	蛋白表达变化
7	18.28	5.52	上调
9	28.57	5.74	上调
133	32.34	4.46	上调
156	30.45	8.39	上调
192	36.63	6.38	上调
201	40.66	7.18	上调
212	72.75	8.38	上调
301	25.84	5.32	下调
342	42.45	6.25	下调
403	25.67	8.34	下调
442	71.23	4.23	下调

3 讨论

将蛋白质组学技术应用到寄生虫病相关基础研究始于 20 世纪末, 目前已经发表的关于寄生虫病的蛋白质组学研究资料, 多集中在血吸虫、疟疾、利什曼原虫和弓形虫等寄生虫病, 而 Eg 感染、抗感染、重组疫苗免疫保护及免疫逃避或耐受机制相关蛋白质组研究的报道十分有限^[6-8]。笔者期望通过开展对 Eg 重组疫苗免疫宿主与无疫苗免疫宿主 T 淋巴细胞差异蛋白质组学的研究, 全面地分析了解疫苗免疫后与自然状态下 T 淋巴细胞差异表达的蛋白质成分, 以期明确宿主 T 淋巴细胞在 Eg 抗感染免疫过程中的分子基础, 阐释复杂的免疫网络中, 主要免疫细胞在发挥效应的过程中参与免疫应答的特异性分子及免疫反应中潜藏的诸多免疫应答通路和参与分子。

本课题组前期开展的 Eg14-3-3 保护性(下转第 3392 页)

究证实 CRP 具有调节炎症过程和防御感染性疾病的作用^[12]。临床常将 CRP 作为非特异性标志物,用以评估组织损伤或细胞感染引发炎症反应的严重程度,并将其作为早期鉴别细菌与病毒感染的指标。本研究表明,ADV 感染亦可以引起患儿外周血 CRP 水平的升高,这可能与 ADV 感染后机体免疫系统发生应答反应,炎症因子上调密切相关^[10]。而 RSV 感染并未引起 CRP 水平的上调。

PCT 是一种由甲状腺 C 细胞分泌的降低高钙血症的激素,是无激素活性的降钙素的前肽物质,经细胞内蛋白水解酶水解为降钙素后,可发挥抗炎调节因子等生物学功能。多项研究表明,PCT 在细胞感染时明显升高,而在病毒感染时不升高,这与本研究结果一致^[13]。

综上所述,不同病毒感染引起的疾病,其血细胞常规及 CRP 水平的变化是存在明显差异的,联合血细胞常规、CRP 及呼吸道病毒抗原的检测,进行病毒感染的鉴别诊断,将为临床对疾病的早期诊断,以及治疗计划的制定提供更为全面的临床依据。

参考文献

[1] 刘春艳,肖艳,张辉,等. 儿童急性呼吸道感染病毒感染特点分析[J]. 中国实用儿科杂志,2010,25(8):631-633.
 [2] 王和平,郑跃杰,邓继岩,等. 深圳市儿童医院住院儿童常见呼吸道感染病毒病原学分析[J]. 临床和实验医学杂志,2013,12(21):1722-1724.
 [3] 邓继岩,郑跃杰,袁雄伟,等. 深圳儿童急性下呼吸道感染病原学监测[J]. 中国儿童保健杂志,2007,15(3):249-251.

[4] 李璐,史伟峰,董文. 儿童急性呼吸道感染 9 种病原体检测和流行病学调查[J]. 国际检验医学杂志,2013,34(6):684-685.
 [5] 戴淑惠,任小英. 直接免疫荧光法对儿童呼吸道病毒感染病原学检测的临床意义[J]. 中国医药指南,2014,12(16):147-148.
 [6] 毛晓健,童志杰,洪捷,等. 不同种类病毒感染导致的儿童重症社区获得性肺炎的临床特征比较[J/CD]. 中华妇幼临床医学杂志:电子版,2013,9(3):295-299.
 [7] 周淑新,梁剑虹. 儿童呼吸道合胞病毒感染[J]. 中国全科医学,2011,14(19):2177-2179.
 [8] 宁静. 婴儿毛细支气管炎鼻病毒感染的临床特征[J]. 实用儿科临床杂志,2011,26(16):1271-1272.
 [9] 刘滕颖子,吕星,黄达娜,等. 2011-2012 年深圳市呼吸道腺病毒分子分型及其流行特征[J]. 热带医学杂志,2014,14(1):12-15.
 [10] 蔡玉婵,魏琦,尧荣凤,等. 4 项炎症指标在急性上呼吸道感染中的检测意义[J]. 检验医学与临床,2014,11(20):2847-2849.
 [11] Kawasaki Y, Hosoya M, Katayose M, et al. Correlation between serum interleukin 6 and C-reactive protein concentrations in patients with adenoviral respiratory infection[J]. *Pediatr Infect Dis J*,2002,21(5):370-374.
 [12] 赵金强,徐文丽,李舟. 降钙素原、C-反应蛋白在儿童急性呼吸道感染中的应用价值[J]. 中国卫生检验杂志,2014,24(16):2356-2358.
 [13] 张路军,刘培龙,戴世荣. 血清降钙素原在儿童社区获得性肺炎鉴别诊断中的临床意义[J]. 国际检验医学杂志,2014,35(3):347-348.

(收稿日期:2015-07-29)

(上接第 3389 页)

及重复性实验结果显示,Eg14-3-3 获得 84% 的良好保护性结果,而自然感染组小鼠全部患上肝包虫病^[5]。疫苗免疫 2 周后,即可在小鼠中诱导显著的细胞免疫和体液免疫反应。在疫苗免疫和未免疫状态下,T 淋巴细胞差异表达的蛋白极有可能是决定免疫保护还是免疫抑制的关键所在。本项研究按照本课题组成熟的方法构建小鼠免疫模型,将 ICR 小鼠用 Eg14-3-3 免疫后,分离收集 PBS 注射小鼠和 Eg14-3-3 免疫 2 周后小鼠脾脏和淋巴结 T 淋巴细胞样品,进行差异表达蛋白质组学分析,了解不同免疫状态下小鼠差异表达蛋白质成分并做鉴定分析,研究发现:Eg14-3-3 免疫小鼠与 PBS 注射小鼠存在 11 个差异表达蛋白,其中 7 个蛋白在 14-3-3 免疫小鼠 T 淋巴细胞中表达上调,4 个蛋白质在 PBS 注射小鼠中表达上调。本研究获得了较好的 2-DE 图谱,并初步分析了部分差异表达蛋白点,为后续进一步筛选、鉴定 14-3-3 疫苗免疫与未经免疫的 T 淋巴细胞差异蛋白质奠定了基础。

参考文献

[1] Jiang C. Today's regional distribution of echinococcosis in China [J]. *Chin Med J*,2002,115(8):1244-1247.
 [2] Li ZJ, Wang YN, Wang Q, et al. Echinococcus granulosus 14-3-3 protein: a potential vaccine candidate against challenge with Echinococcus granulosus in mice[J]. *Biomed Environ Sci*,2012,25(3):352-358.

[3] Lightowers MW, Colebrook AL, Gauci CG, et al. Vaccination against cestode parasites: anti-helminth vaccines that work and why [J]. *Vet Parasitol*,2003,115(2):83-123.
 [4] Wenbao Z, Ross AG, Mcmanus DP. Mechanisms of immunity in hydatid disease: implications for vaccine development[J]. *J Immunol*,2008,181(10):6679-6685.
 [5] 李宗吉, 雄英, 孙俊峰, 等. 细粒棘球绦虫(中国大陆株)14-3-3 重组蛋白的免疫保护力[J]. 西安交通大学学报:医学版,2012,33(6):676-679.
 [6] Lefevre T, Thomas F, Schwartz A, et al. Malaria Plasmodium agent induces alteration in the head proteome of their Anopheles mosquito host[J]. *Proteomics*,2007,7(11):1908-1915.
 [7] Guillou FR, Roger E, Moné Y, et al. Excretory-secretory proteome of larval Schistosoma mansoni and Echinostoma caproni, two parasites of Biomphalaria glabrata[J]. *Mol Biochem Parasitol*,2007,155(1):45-56.
 [8] Prieto JH, Koncarevic S, Park SK, et al. Large-scale differential proteome analysis in Plasmodium falciparum under drug treatment [J]. *PLoS One*,2008,3(12):e4098.

(收稿日期:2015-06-25)

