文章编号:1000-5404(2007)01-0015-03

论著

仙台病毒复制序列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],郭凤劲[1,3],马永平[1,2],宋方洲[1,2,3] (重庆医科大学:[1]基础医学院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 812-8581)

提 要:目的 研究仙台病毒载体复制序列对未成熟树突状细胞(dendritic cells, DC)蛋白质表达的影响,为联合运用二者进行基因治疗提供依据。**方法** 提取去除仙台病毒复制序列载体(Sev/△F)、完全序列载体(SeV)转染未成熟DC的总蛋白,定量。双向凝胶电泳分离蛋白质组分,胶体银染显色,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,Sev/△F感染后的DC明显比SeV感染后的DC表达蛋白点多,其中有不少蛋白表达量也明显上调。**结论** 仙台病毒载体感染未成熟DC后引起蛋白表达的减少,这与SeV的复制序列有关。

关键词:仙台病毒载体;复制序列;树突状细胞;蛋白质组
中图法分类号:R338.12; R373; R394.3 **文献标识码**:A

Effect of sendai virus replication sequence on protein changes in immature dendritic cells

YI Fa-ping[1,2,3], ZHANG Ping-bo[4], GUO Feng-jin[1,3], MA Yong-ping[1,2], SONG Fang-zhou[1,2,3] ([1]Department of Biochemistry and Molecular Biology, [2]Biochemistry and Molecular Pharmacology of Chongqing City, [3]Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics, Ministry of Education, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; [4]Institute of Genetic Resources, Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan)

Abstract: **Objective** To investigate the protein change in immature dendritic cells (DC) exposed to sendai virus replication sequence. **Methods** The total cellular proteins expressed in DC infected with Sev/△F or SeV were collected and quantitated, then separated by two-dimensional gel electrophoresis and visualized by silver staining. Digital images were analyzed by PDQuest software. The differentially expressed protein spots were picked, digested in gel and subjected to peptide mass fingerprinting using MALDI-TOF MS. **Results** Protein spots in 2-DE gel for DC treated by Sev/△F were more than that by SeV, among which a lot of proteins increased. **Conclusion** It was relevant to the replication sequence that proteins decreased in dendritic cells infected with sendai virus vector.

Key words: sendai virus vector; replication sequence; dendritic cells; proteomic

树突状细胞(dendritic cells,DC)是至今发现最强的抗原递呈细胞,是启动、调控和维持免疫应答的中心环节[1],利用DC来增强机体特异性抗肿瘤免疫能力的研究,已成为肿瘤生物治疗的重要课题。如果将抗原引入未成熟DC,使之变为成熟DC,则在临床应用上更为理想。仙台病毒属于副粘病毒科,副粘病毒属,经过多次改良成为可以投入人体使用的基因治疗用病毒载体。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,具有更高的安全性[2],在眼部疾患、癌症、艾滋病、SARS等多种疾病进行研究和临床开发[3]。蛋白质组研究技术已被应用到生命科学的各个领域。我们通过蛋白质组学方法来研究仙台病毒复制序列对未成熟DC蛋白表达的影响,为联合运用DC和仙台病毒载体进行基因治疗方案的设计提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

IPG胶条购于amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden),trypsin(测序级)购于Promega (Madison, WI, USA),双向

基金项目:国家自然科学基金(30371479),重庆市骨干教师资助计划(200415)
Supported by the National Natural Science Foundation of China 30371479) and the Funds for the Talent Teachers of Chongqing (200415)
作者简介:易发平(1974-),男,重庆市人,博士研究生,讲师,主要从事分子生物学及蛋白质组学方面的研究。E-mail: yfpxy@163.com
通讯作者:宋方洲,电话:(023)68485958,E-mail:fzsongcq@163.com
收稿日期:2006-01-23;修回日期:2006-05-24

电泳试剂购于 BIO-RAD,TFA 购于 Sigma,其余试剂采用国产分析纯。

C57BL/6 小鼠,6～8 周龄,体质量 18.0 g,2 只,雌性,由日本 SLC 株式公司培育。

1.2 方法

1.2.1 未成熟 DC 的培养 小鼠骨髓细胞,用加入了 IL-4 25 U/ml,GM-CSF 250 U/ml 的 10% RPMI1640 培养基于 37 ℃,CO_2 培养箱培养,第 4 天更换一半培养基,第 7 天回收细胞。

1.2.2 仙台病毒载体转染未成熟 DC 每 1×10^6 细胞加 100 μl 10% RPMI1640 培养基,感染仙台病毒[去除病毒复制序列载体(Sev/△F)、完全序列载体(SeV)](感染重数,moi = 40),37 ℃ 1 h。加入 10 ml 不含血清的 RPMI1640,混匀。收集细胞再培养 1 d。

1.2.3 样品制备 胰酶处理收集到的 2 组细胞,醋酸镁缓冲液洗涤数次,加入适量的裂解液(7 mol/L 尿素,2% CHAPS,65 mmol/L DTI,0.5 % IPG 缓冲液,蛋白酶抑制剂),提取蛋白并测定其浓度,于 -70℃冻存备用[4]。

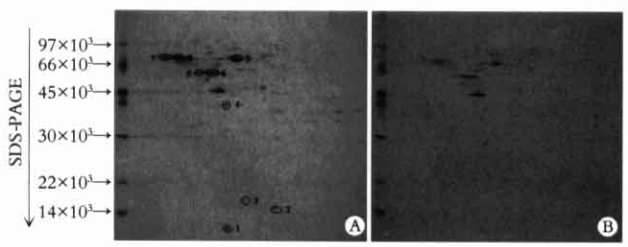
1.2.4 双向凝胶电泳 双向电泳参照 Amersham 公司技术手册,18 cm pH 3～10 胶条,上样体积 350 μl,上样量 100 μg,一向等电聚焦设置 50 V 12 h;500 V 1 h;1 000 V 1 h;4 000 V 1 h;6 000 V 1 h;8 000 V 10 h。胶条经平衡后进行 SDS-PAGE 电泳,银染法检测蛋白,重复 3 次。

1.2.5 差异蛋白点的 MALDI-TOF 质谱分析及鉴定 凝胶照相后用 PDQuest 软件分析,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、MALDI-TOF MS 分析。所得肽指纹图谱进行数据库检索,检索工具为 MS-Fit。

2 结果

2.1 Sev/△F、SeV 感染 DC 双向电泳图谱差异

Sev/△F、SeV 感染 DC 后双向电泳图谱差异见图 1。通过 PDQuest 软件分析显示,Sev/△F 感染后的 DC 明显比 SeV 感染后的 DC 表达蛋白点多,其中有不少蛋白表达量也明显上调。蛋白质分子量主要处于 40 $\times10^3$ ～70 $\times10^3$,pI 值主要分布于 4.8～8.0。对其中明显表达上调的 9 个蛋白点作 MALDI-TOF MS 分析。



1-9:明显表达上调的 9 个蛋白点;A:Sev/△F 感染未成熟 DC 双向电泳图;B:SeV 感染未成熟 DC 双向电泳图

图 1 Sev/△F 和 SeV 转染的 DC 双向电泳图

2.2 差异蛋白的肽指纹质谱分析和数据库搜索

Sev/△F 感染 DC 后比对照明显表达上调的 9 个蛋白点作肽指纹图谱分析。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,鉴定出了其中 8 个差异蛋白点。这 8 个蛋白点分别为小鼠钙粒蛋白 B、蛋白磷酸酶 1 抑制子 14A 亚基、鸟苷酸结合蛋白,α-2 亚基、蛋白酪氨酸激酶、锌指蛋白、Fas 相关因子 1、抑长蛋白 6 前体、70×10^3 热休克蛋白。

3 讨论

差异蛋白点 1 实验分子量为 12×10^3,pI 为 6.1。经多次重复实验,仍未出现理想的肽指纹图谱,仅有 2 456 和 2 788 两个质谱峰,这可能是该蛋白在氨基酸组成上比较特殊。

仙台病毒结构蛋白 P 和 L 构成复合体,与结构蛋白 NP 和模板 RNA 共同作用,完成转录和复制过程。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。蛋白磷酸酶与蛋白激酶相对应存在,共同构成了磷酸化与去磷酸化这一重要的蛋白质活性的开关系统。仙台病毒结构蛋白中,L 蛋白除了在转录和复制的起始、延伸、终止以及 mRNA 的甲基化、戴帽、多 A 化发挥酶的作用外,还具有 2 个蛋白激酶所拥有的 ATP 结合点,负责 NP 和 P 蛋白的特殊磷酸化。NP 蛋白的羧基末端(负极)区还包括许多磷酸化氨基酸。去除复制序列后,游离的 NP、P 和 L 蛋白会增加,导致蛋白磷酸酶浓度增加,从而使其抑制子表达增加。

鸟苷酸结合蛋白(G 蛋白)是由 α、β、γ 亚单位组成的异构三聚体。α 亚单位有很高的与鸟苷酸结合的亲和力和特异性,并具有内源性 GTP 酶的活性。去除复制序列的仙台病毒,转录活性增强,结构蛋白分子增多。锌指蛋白 238 具有转录抑制功能[5]。由于 HN 蛋白具有血凝和神经氨酸酶活性[6],这可能会影响细胞内信号通道传递,从而引起 G 蛋白表达的上调。

蛋白酪氨酸激酶是一类催化 ATP 上 γ-磷酸转移到蛋白酪氨酸残基上的激酶,能催化多种底物蛋白质酪氨酸残基磷酸化,在细胞生长、增殖、分化中具有重要作用[7]。受仙台病毒的刺激,DC 的生长、增殖和分化受到影响,酪氨酸蛋白激酶表达上调,同时,抑长蛋白的表达也上调。抑长蛋白 6 前体还是酪氨酸蛋白激酶受体 AXL, TYRO3 和 MER 的配体。Fas 作为一种普遍表达的受体分子,可出现于多种细胞表面。Fas 相关因子 1 只能增强但不能启动细胞凋亡[8]。热休克蛋白家族能够在 Fas 死亡受体途径、JNK/SAPK 途径等多个水平发挥调节作用。

用不同的细胞因子诱导 DC,同一蛋白的表达可表

现为上调或下调[9]。虽然 Sev/△F 对比 SeV 转染 DC 后这 9 个蛋白点表达上调，但相对于未转染的 DC 蛋白表达而言，却是下调的。这除了与仙台病毒复制序列有关外，是否还与其结构蛋白和载体上的外源基因相关，有待于进一步研究，我们也将陆续报告。

（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] Schott M, Scherbaum W A. Immunotherapy and gene therapy of thyroid cancer[J]. Minerva Endocrinol, 2004, 29(4): 175 - 187.

[2] Kawashita Y, Fujioka H, Ohtsuru A, *et al*. The efficacy and safety of gene transfer into the porcine liver *in vivo* by HVJ (Sendai virus) liposome [J]. Transplantation, 2005, 80(11): 1623 - 1629.

[3] Griesenbach U, Inoue M, Hasegawa M, *et al*. Sendai virus for gene therapy and vaccination [J]. Curr Opin Mol Ther, 2005, 7(4): 346 - 352.

[4] Zhang P, Yamamoto K, Aso Y, *et al*. Proteomic studies of isoforms of the P25 component of Bombyx mori fibroin [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2005, 69(11): 2086 - 2093.

[5] Dreier B, Fuller R P, Segal D J, *et al*. Development of zinc finger domains for recognition of the 5′-CNN-3′ family DNA sequences and their use in the construction of artificial transcription factors [J]. J Biol Chem, 2005, 280(42): 35588 - 35597.

[6] Segawa H, Inakawa A, Yamashita T, *et al*. Functional analysis of individual oligosaccharide chains of Sendai virus hemagglutinin- neuraminidase protein [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2003, 67(3): 592 - 598.

[7] Mahabeleshwar G H, Das R, Kundu G C. Tyrosine kinase, p56lck-induced cell motility, and urokinase-type plasminogen activator secretion involve activation of epidermal growth factor receptor/extracellular signal regulated kinase pathways [J]. J Biol Chem, 2004, 279(11): 9733 - 9742.

[8] Song E J, Yim S H, Kim E, *et al*. Human Fas-associated factor 1, interacting with ubiquitinated proteins and valosin-containing protein, is involved in the ubiquitin-proteasome pathway [J]. Mol Cell Biol, 2005, 25(6): 2511 - 2524.

[9] Pereira S R, Faca V M, Gomes G G, *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(5): 1186 - 1198.

（编辑　龙　亮）

（上接 4 页）

术后治疗：人工周期治疗 3 个月，即雌、孕激素序贯法。于术后 2 d 开始服用雌激素 1 mg，每晚 1 次，连服 20 d，于服雌激素后 10 d 加用甲羟孕酮，每日 10 mg，连用 3 个周期[3]。

2　结果

随访 1 年，21 例月经全部恢复正常，其中 13 例患者已妊娠，占 61.9%。剩下 8 例中输卵管阻塞 5 例，男方精液常规检查异常 2 例，1 例恢复月经后未来院随访。

3　讨论

宫腔黏连通常发生在妊娠子宫损伤后，特别是分娩或流产后 1 ~ 4 周内刮宫常常造成内膜基底损伤裸露，纤维瘢痕形成使子宫腔缩窄、扭曲、变形。本组 21 例中来源于妊娠后刮宫 18 例，占 85.7%。近年来生殖器感染的发生率增高，由感染引起宫腔黏连的几率也增高，本组 3 例无宫腔操作史，这无疑与感染有密切关系。

传统的宫腔黏连分离法是用扩宫棒扩张，扩张后放宫内节育器。这种手术非但自目而且不能完全恢复原来的宫腔形态，再黏连的发生率高，而宫腔镜将诊断与治疗融于一体。对于膜性黏连、纤维性黏连于宫腔镜下分离或手术剪除，术毕于宫腔放置气体导尿管防止再黏连，使患者恢复月经来潮，以达到生育的目的。术后用雌孕激素行人工周期序贯治疗，促进子宫内膜生长。

上环防止宫腔再黏连的弊端：对不孕症患者需取环增加宫腔操作史。无尾丝的环容易发生再次宫颈黏连，而有尾丝的环易导致上行性感染，引起急性或亚急性盆腔炎发作。环作为异物刺激宫腔及子宫内膜，可引起慢性炎症反应及子宫内膜损伤，产生的前列腺素能引起子宫内膜白细胞及巨噬细胞增多，子宫腔液体成分发生改变，产生无菌性炎症反应[3]。

临床观察发现，气囊导尿管宫腔镜在宫腔黏连致不孕治疗中具有以下优点：①宫腔镜明确了解宫腔内的情况，并在镜下进行分离。②因子宫是有腔的肌性器管，容量约 5 ml[3]。气囊导尿管有气囊，注入生理盐水后有水囊形成可以扩张宫腔，且持续 2 周，让子宫内膜修复，防止宫腔再黏连。③导尿管为圆形防止颈管黏连。④取出气囊导尿管时，只需抽出气囊内液体，不需进入宫腔，容易操作。

综上所述，在因宫腔黏连致不孕的治疗中，采用宫腔镜下分离宫腔黏连后，气囊导尿管扩张宫腔防治再黏连，术后配合人工周期治疗 3 个月，方法简单，疗效好，值得临床推广。

关键词：气囊导尿管；宫腔镜；宫腔黏连
中图法分类号：R713.7　　文献标识码：B

参考文献：

[1] 冯缵冲，邵敬於. 实用宫腔镜学[M]. 上海：上海医科大学出版社，1999：68.

[2] 罗丽兰. 不孕与不育[M]. 北京：人民卫生出版社，1998：192.

[3] 乐　杰. 妇产科学[M]. 第6版. 北京：人民卫生出版社，2004：334 - 388.

（编辑　汪勤俭）