文章编号:1000-5404(2011)14-1437-04

论著

小鼠骨髓来源未成熟树突状细胞蛋白表达的分析

易发平,焦庆昉,符少月,卜友泉,刘革力,宋方洲 (重庆 400016,重庆医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室,分子医学与肿瘤研究中心)

[摘要] **目的** 利用双向电泳和质谱技术对小鼠骨髓来源未成熟树突状细胞(dendritic cells,DC)表达的蛋白质进行分析。**方法** IL-4 和 GM-CSF 诱导未成熟 DC 的分化,提取细胞总蛋白,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蛋白点,胶内酶解后 MALDI-TOF MS 进行肽指纹图谱鉴定,MS-Fit 分析质谱数据。**结果** 细胞生长情况和表面标志物检测表明获得了高纯度的未成熟 DC。图像分析结果显示,DC 中检测到了(660±10)个蛋白点,主要分布在相对分子质量 28×10^3 ~ 100×10^3,等电点 5.0~9.0 之间。鉴定了 87 个蛋白点,其中与未成熟 DC 免疫调节功能相关的蛋白质有 40 个(45.98%);与大分子代谢相关的有 37 个(42.53%)。**结论** 成功分离到了约 660 个小鼠骨髓来源未成熟 DC 表达的蛋白质,鉴定出了其中 87 个蛋白。

[关键词] 树突状细胞;蛋白质组;双向电泳;肽指纹质谱
[中图法分类号] R338.12;R341;R394-33 [文献标志码] A

Protein expression analysis of immature mouse bone marrow-derived dendritic cells

Yi Faping, Jiao Qingfang, Fu Shaoyue, Bu Youquan, Liu Geli, Song Fangzhou (Department of Biochemistry and Molecular Biology, Molecular Medicine and Cancer Research Center, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

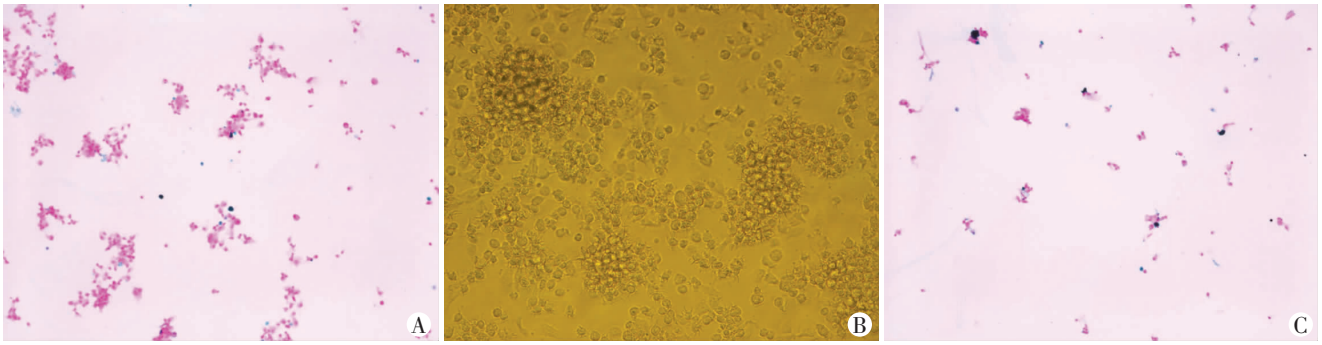
[**Abstract**] **Objective** To analyze the proteins of immature mouse bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs) by 2-dimentional electrophoresis (2-DE) and peptide mass fingerprinting. **Methods** Interleukin-4 (IL-4) and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) were employed to induce differentiation of mouse bone marrow cells into immature mouse BMDCs. Proteins were extracted from the DCs, separated by 2-DE, stained by improved silver method, analyzed by PDQuest software, and identified by peptide mass fingerprinting and MS-Fit. **Results** High-purity immature mouse BMDCs were obtained, as confirmed by detecting cell growth condition and surface markers. Image analysis result showed that 660±10 protein spots were separated and mainly distributed in a relative molecular weight range of $(28-100)\times10^3$ and an isoelectric point range of 5.0-9.0. Among the 87 identified spots, 40 (45.98%) were related to immunoregulation function of immature DCs and 37 (42.53%) to macromolecular metabolism. **Conclusion** Six hundred and sixty proteins are separated from immature mouse BMDCs, and 87 proteins are identified.

[**Key words**] dendritic cells;proteome;2-dimentional electrophoresis;peptide mass fingerprinting

Supported by the National Natural Science Foundation of China(30800945) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2008BB5225). Corresponding author: Song Fangzhou, Tel: 86-23-68485958, E-mail: fzsongcq@163.com

树突状细胞(dendritic cells, DC)是机体中功能最强的专职抗原递呈细胞,控制着体内免疫反应的过程,在免疫应答(包括抗肿瘤免疫反应)中处于中心位置,已成为免疫学及相关学科的研究热点[1]。根据其来源,DC 分为髓系和淋巴系两类。处于未成熟期的髓系 DC 具有极强的抗原内吞和加工处理能力,还能分泌一些趋化因子,但其激活初始 T 细胞的能力较弱[2-3]。未成熟 DC 能表达膜受体 FcγRⅡ、甘露糖受体以及细胞因子 TNF-α、IL-1、IL-6、IL-15 等[4]。为了探讨 DC 在细胞凋亡和免疫反应方面的作用机制,人们采用基因表达系列分析技术(SAGE)、芯片、差异展示、cDNA 克隆、RNAi 等技术,对未成熟 DC 在细胞凋亡方面的基因表达进行了研究[5-6]。采用比较蛋白质组学方法,人们鉴定了一些人源和鼠源 DC 在细胞凋亡和免疫应答过程中的蛋白质,但得到的蛋白点都不多。本研究通过细胞因子诱导骨髓细胞定向分化成未成熟 DC,采

[基金项目] 国家自然科学基金(30800945);重庆市自然科学基金(CSTC 2008BB5225)
[通信作者] 宋方洲,电话:(023)68485958,E-mail:fzsongcq@163.com



A:培养3 d(LM ×200);B:培养4 d(倒置显微镜 ×200);C:培养7 d(LM ×100)

图1 未成熟DC培养及细胞形态观察结果

用双向电泳和质谱技术体系,分离、鉴定未成熟DC表达的蛋白质。

1 材料与方法

1.1 材料

细胞因子重组鼠粒-白介素-4(recombinant murine granulocyte-interleukin-4,rmIL-4)、重组鼠粒-巨细胞集落刺激因子(recombinant murine granulocyte-macrophage colony stimulating factor,rmGM-CSF)购自Peprotech公司。PE-CY5标记的仓鼠抗小鼠CD11c抗体和大鼠抗小鼠CD86、CD40、MHCⅡ(IA/IE)购自eBioscience公司。IPG干胶条购自Amersham Pharmacia Biotech。蛋白酶抑制剂购自Bio-Rad。胰蛋白酶(trypsin)购自Promega,三氟乙酸(TFA)购自Sigma。

6~8周龄健康雌性C57BL/6小鼠10只,体质量(18±2)g,由重庆医科大学实验动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及鉴定 C57BL/6小鼠骨髓细胞按5×10^5/孔接种于6孔板,5 ml/孔。用加入了IL-4 25 U/ml、GM-CSF 250 U/ml的10% RPMI1640培养基于37 ℃、5% CO_2培养箱培养。隔日半量换液,每日在倒置显微镜下观察细胞形态。分别在第3、7天采用原位凋亡检测(TACS)法检测细胞生长情况。第7天回收细胞,收集低黏附细胞,流式细胞仪检测细胞表面标志物。

1.2.2 蛋白质提取 胰酶处理收集到的细胞,醋酸镁缓冲液洗涤数次,加入适量的裂解液{7 mol/L尿素,2% 3-[3-(胆酰胺基丙基)二甲氨基]丙磺酸盐(CHAPS),65 mmol/L二硫苏糖醇(DTI),0.5% IPG buffer,蛋白酶抑制剂},超声破碎,14 000 r/min 4 ℃离心15 min,收集上清,并测定蛋白浓度,样品于-70 ℃冻存备用。

1.2.3 双向凝胶电泳及图像分析 双向凝胶电泳参照Amersham公司技术手册,18 cm pH值为3~10胶条,样品上样量100 μg,上样体积350 μl,一向等电聚焦条件设置:50 V12 h,500 V1 h,1 000 V1 h,4 000 V1 h,6 000 V1 h,8 000 V10 h(总和为90 000 Vh)。胶条经平衡后进行第2向聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。银染法显色,重复3次。对2-DE蛋白图谱扫描成像,分辨率为1 024×1 024。PDQuest软件计算出蛋白点,同时确定每个蛋白点的相对分子质量、等电点和斑点匹配。

1.2.4 蛋白点的MALDI-TOF质谱分析及鉴定 切取选择的蛋白点,经脱色、脱水、真空干燥、胰酶酶解、真空浓缩、MALDI-TOF MS分析。所得肽指纹图谱进行蛋白质数据库检索,检索工具为MS-Fit,物种选择为小鼠。

2 结果

2.1 未成熟DC生长情况及表型鉴定

在细胞因子rmIL-4和rmGM-CSF的诱导培养下,小鼠骨髓细胞在第3天开始大量分化成DC(图1A),第4天即可见到DC的集落出现(图1B),第7天可见DC出现凋亡(图1C)。于第7天收集DC,流式细胞仪检测未成熟DC表面标志物。结果显示,CD40与CD11c、CD86与CD11c、MHCⅡ与CD11c双阳性表达率分别为34.5%、39.53%、55.35%,均呈低水平表达,而CD11c为71.19%,呈高水平表达,符合未成熟DC表面标志物表达情况。

2.2 2-DE图像分析

来源于小鼠骨髓的未成熟DC所表达的蛋白经3次以上2-DE,在相同条件下都得到了高度一致的电泳图,检测到了(660±10)个蛋白点,主要分布在相对分子质量28×10^3~100×10^3,等电点5.0~9.0之间(图2)。

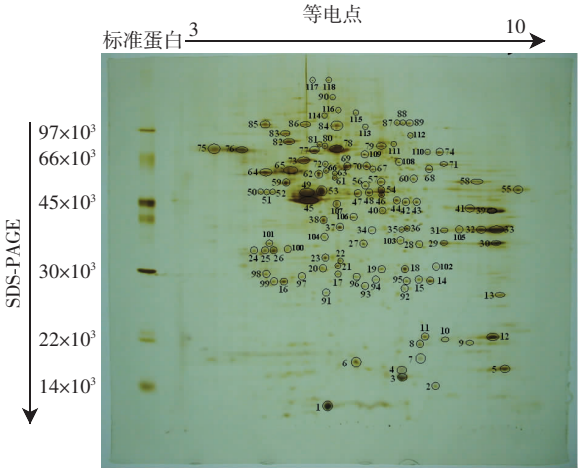


图2 未成熟DC表达蛋白的2-DE结果 (上样量100 μg)

2.3 相关蛋白点鉴定

对表达量较高的118个蛋白点按相对分子质量从小到大和等电点从低到高进行编号(图2),切取相应蛋白点作MALDI-TOF

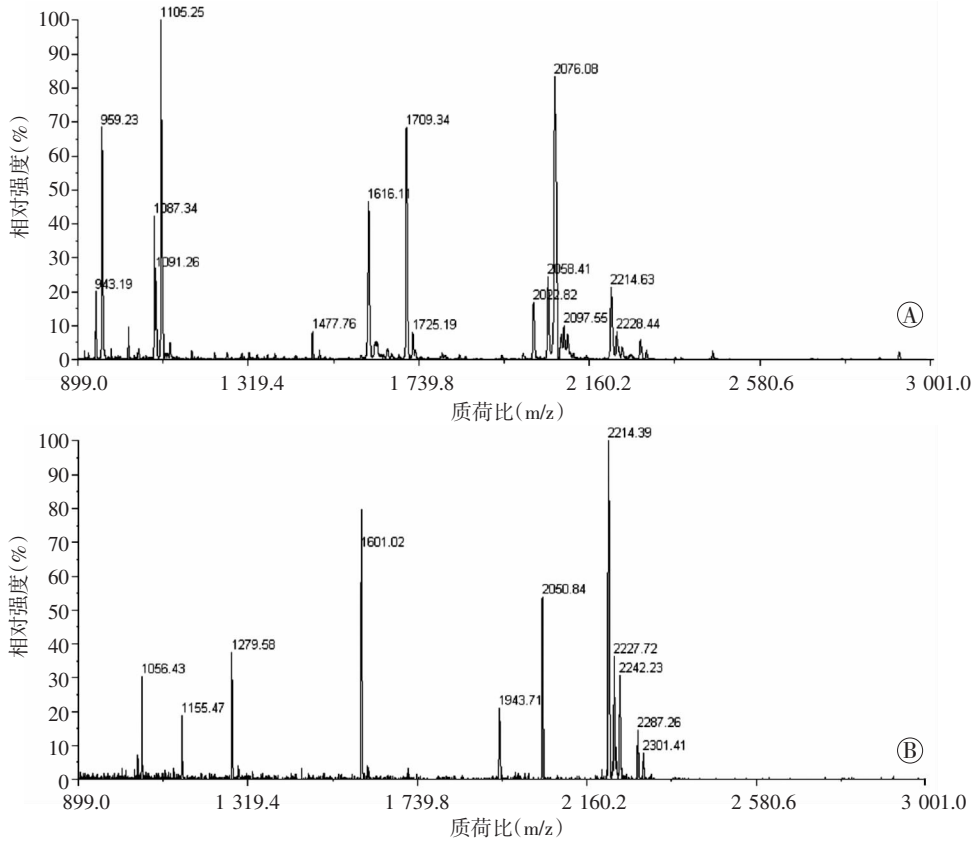


图 3　蛋白点 7(A)和 10(B)的肽指纹图

分析。其中有 87 个蛋白点得到了较好的质谱图(图 3),有 31 个蛋白点可能是量太少的原因,没有得到可用的质谱图。通过数据库搜索,并结合双向电泳图谱中各蛋白点的等电点、相对分子质量对 87 个蛋白质进行鉴定,并按功能分类。与未成熟 DC 免疫调节功能相关的蛋白质有 40 个(45.98%);与大分子代谢相关的有 37 个(42.53%)。具体的分类结果:与蛋白质代谢相关的蛋白有 32 个,细胞防御相关的蛋白有 15 个,转录调节因子有 11 个,信号转导相关的蛋白有 8 个,细胞凋亡相关的蛋白有 7 个,核酸代谢相关的蛋白有 6 个,细胞周期相关的蛋白有 3 个,细胞结构蛋白有 3 个,RNA 结合蛋白 1 个,其他蛋白 1 个(表 1)。

3　讨论

双向电泳是蛋白质组研究中分离蛋白质的关键技术。本实验中分析了 118 个蛋白点,但最终只获得了 87 个蛋白点的质谱。少数蛋白点有轻微横向拖尾现象,可能是这些蛋白质为糖蛋白或者丰度太高所造成。有极少数的高分子蛋白点(相对分子质量大于 100 × 10^3)出现竖向拖尾,可能是因为这些蛋白质的溶解度不好所引起。目前商品化的 IPG 胶条大多 pH 在 3.0 ~ 10.0。因此,双向电泳在分离糖蛋白、高丰度蛋白和难溶蛋白质以及极酸、极碱蛋白时仍有很大局限性[7]。低丰度蛋白目前解决的方法是通过亚细胞分级和蛋白

表 1　小鼠骨髓未成熟 DC 表达蛋白的鉴定结果

功能分类	蛋白点	蛋白质名称	相对分子质量/等电点	蛋白接收号	覆盖率(%)
细胞防御	2	半胱氨酸蛋白酶抑制物 F 前体	16 380/8.8	O89098	31.0
	3	免疫球蛋白重链 V 区前体	15 071/8.8	P01783	47.0
	18	自然杀伤细胞受体 D	26 710/8.9	O54709	29.0
	22	Ras 相关蛋白 Rab-32	25 069/6.2	Q9CZE3	26.0
	25	免疫球 G 蛋白 Fc 受体Ⅱβ 亚基	36 696/6.2	P08101	20.0
	28	乙酰化酶 2	33 702/5.6	P50295	21.0
	31	杀伤细胞凝集素样受体	30 843/8.2	Q60652	15.0
	34	组织蛋白酶 H 前体	37 185/8.7	P49935	22.0
	40	组织相容性抗原 α 链前体	41 647/6.6	P04223	18.0
	47	丝/苏氨酸蛋白激酶	48 176/6.3	Q9Z2W1	14.0
	53	肿瘤相关蛋白 1 前体	47 548/6.2	Q61114	19.0
	64	黑色瘤抑制活性蛋白 2	57 777/4.0	Q91ZV0	17.0
	73	白细胞介素 1 受体	66 698/6.4	P13504	13.0
	82	Ra 反应因子前体	79 896/5.5	P98064	12.0
	85	盘状区受体 2 前体	96 483/5.3	Q62371	10.0
细胞凋亡	26	类 Bcl-2 蛋白 14	36 992/7.1	Q9CPT0	19.0
	38	凋亡蛋白 4 前体	42 756/6.6	P70343	13.0
	41	凋亡反应锌指蛋白	44 230/6.1	Q61103	21.0
	56	肿瘤坏死因子受体 19 前体	45 295/5.6	Q9JLL3	12.0
	60	钙依赖蛋白激酶	55 838/5.7	Q8VBY2	14.0
	67	凋亡蛋白 8 前体	55 357/5.1	O89110	19.0
	80	热休克蛋白 70	73 529/5.9	P38647	24.0

仅列出与细胞防御和凋亡直接相关的蛋白点

质预分级、提高加样量(已达到1~15 mg)以及应用敏感性检测方法,来提高其敏感性。虽然在2-DE中得到了一定程度的解决,但往往会受到取材的限制,如需进行质谱分析还是很困难[8]。

来源于小鼠骨髓的未成熟DC表达的蛋白质经2-DE分离得到了约660个蛋白点,这明显少于细胞实际表达的蛋白数量,提示对细胞进行全蛋白质组分析时需要大规模制备样品。MALDI-TOF MS分析了118个蛋白点,最终鉴定了87个蛋白点。其中,与未成熟DC免疫调节功能相关的蛋白质有40个,占45.98%;与大分子代谢相关的有37个,占42.53%。尽管鉴定出了一些细胞因子(IL-1、Bcl-2等),但对于已有报道的一些细胞因子(如TNF-α、IL-6、IL-15)却没有发现,这可能是因为我们上样量太少(100 μg)或者其在DC中的表达很低,也可能是小分子,因此用银染法染色不能检出或蛋白量不足以进行质谱分析。

蛋白点1的实验结果中相对分子质量为12×10^3,等电点为6.1。经多次重复实验,仍未出现理想的肽指纹图谱,仅有2 456.92和2 788.57两个质谱峰,这可能是该蛋白在氨基酸组成上比较特殊。鉴定结果为与人胞苷脱氢酶有同源性的蛋白。蛋白点6得到的肽指纹图谱较好,鉴定结果为小鼠胞苷脱氢酶。由此可见,不同物种的同一蛋白质由于相对分子质量和等电点不同,因此在2-DE图中的位置也不相同。氨基酸组成上的差异,导致质谱分析得到的肽指纹图谱也不同。

蛋白点9和10尽管在2-DE图上位置不同,质谱分析得到的肽指纹图谱中有9个峰质荷比(m/z)比较接近,分别是蛋白点9的1 047.43、1 056.47、1 135.75、1 156.33、1 279.70、1 601.20、1 617.03、2 213.98、2 228.32;蛋白点10的1 046.20、1 056.47、1 135.35、1 155.52、1 279.56、1 600.95、1 616.46、2 213.98、2 227.72。用MS-Fit工具搜索结果都是肽脯氨酰顺反异构酶(环孢素A结合蛋白)。由此可见,在双向电泳过程中,蛋白质是可能发生修饰的,其结果是在2-DE图上得到不同位置的蛋白点。

细胞中蛋白质表达的种类和数量决定了它的功能。DC中表达的蛋白质主要参与细胞结构、蛋白质折叠和定位、信号转导、细胞凋亡和细胞防御等。肌动蛋白是真核细胞中最丰富的蛋白质,提供细胞的支撑架构以及某些细胞活动的必要生长力[9]。它不仅根据化学信号,还可以根据外力来改变自身的生长速度[10]。热休克蛋白70s(HSP70s)家族除参与蛋白质的折叠外,还参与蛋白质的组装、跨膜、分泌与降解[11]。HSP70s通常结合的是一些短肽,一般含7个左右的氨基酸残基,不同成员对不同的靶蛋白质起作用。HSP70s具有高度保守的ATPases活性,通过与HSP40之间的相互作用而激活。HSP70在caspase凋亡途径中发挥着关键作用,参与了Bcl-2家族抗凋亡功能的调节,抑制HSP70的表达能显著抑制胃癌细胞和宫颈癌细胞的生长[12-13]。caspase蛋白酶家族属于半胱氨酸酶类,与细胞因子成熟和细胞凋亡有关,在死亡受体介导的细胞凋亡中起着中心的作用[14]。cystatin家族在免疫调节中有重要作用[15]。cystatin C在抗原呈递过程中恒定链的降解和MHC的转运起了不可忽视的调控作用。DC通过调控MHCⅡ分子的胞内转运和胞膜表达来调节其抗原呈递能力。

参考文献:

[1] Chauvin C, Josien R. Dendritic cells as killers: mechanistic aspects and potential roles[J]. J Immunol, 2008, 181(1): 11-16.

[2] Drutman S B, Trombetta E S. Dendritic cells continue to capture and present antigens after maturation *in vivo*[J]. J Immunol, 2010, 185(4): 2140-2146.

[3] Elia A R, Cappello P, Puppo M, *et al*. Human dendritic cells differentiated in hypoxia down-modulate antigen uptake and change their chemokine expression profile[J]. J Leukoc Biol, 2008, 84(6): 1472-1482.

[4] Elftman M D, Norbury C C, Bonneau R H, *et al*. Corticosterone impairs dendritic cell maturation and function[J]. Immunology, 2007, 122(2): 279-290.

[5] Ok M, Latge J P, Baeuerlein C, *et al*. Immune responses of human immature dendritic cells can be modulated by the recombinant Aspergillus fumigatus antigen Aspf1[J]. Clin Vaccine Immunol, 2009, 16(10): 1485-1492.

[6] Sioud M. Does our current understanding of immune tolerance, autoimmunity, and immunosuppressive mechanisms facilitate the design of efficient cancer vaccines? [J]. Scand J Immunol, 2009, 70(6): 516-525.

[7] Rabilloud T, Vaezzadeh A R, Potier N, *et al*. Power and limitations of electrophoretic separations in proteomics strategies[J]. Mass Spectrom Rev, 2009, 28(5): 816-843.

[8] Rabilloud T, Chevallet M, Luche S, *et al*. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: past, present and future[J]. J Proteomics, 2010, 73(11): 2064-2077.

[9] Reisler E, Egelman E H. Actin structure and function: what we still do not understand[J]. J Biol Chem, 2007, 282(50): 36133-36137.

[10] Higashida C, Suetsugu S, Tsuji T, *et al*. G-actin regulates rapid induction of actin nucleation by mDia1 to restore cellular actin polymers[J]. J Cell Sci, 2008, 121(Pt 20): 3403-3412.

[11] Sharma D, Masison D C. Hsp70 structure, function, regulation and influence on yeast prions[J]. Protein Pept Lett, 2009, 16(6): 571-581.

[12] 张滨, 姜政, 李彦, 等. RNA干扰Hsp70基因表达抑制胃癌细胞增殖[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(12): 1164-1167.

[13] 韩建红, 赖国旗, 陈妮, 等. HSP70 siRNA对宫颈癌HeLa细胞HSP70表达及细胞增殖与凋亡的影响[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(4): 342-345.

[14] Kumar S. Caspase function in programmed cell death[J]. Cell Death Differ, 2007, 14(1): 32-43.

[15] Schulte S, Sun J, Libby P, *et al*. Cystatin C deficiency promotes inflammation in angiotensin Ⅱ-induced abdominal aortic aneurisms in atherosclerotic mice[J]. Am J Pathol, 2010, 177(1): 456-463.

(**收稿**:2010-12-12;**修回**:2011-02-28)

(编辑 栾 嘉)