DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.06.013
第25卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 6
492 2003年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)06-0492-03

人 $CD4^+CD25^+$ T细胞和 $CD4^+CD25^-$ T细胞蛋白质组的双向电泳分析

彭双发[1],吴 军[1],殷剑宁[2],郑峻松[1],王贵波[1],贺伟峰[1],陈希炜[1],易绍萱[1],袁 军[1],解志杰[1] ([1]第三军医大学附属西南医院全军烧伤研究所,重庆 400038;[2]北京华大基因研究中心,北京 101300)

提 要:目的 用双向电泳技术分析人 $CD4^+CD25^+$ T细胞和 $CD4^+CD25^-$ T细胞表达的蛋白质组,建立二者之间的差异表达谱。方法 从人脾脏分选 $CD4^+CD25^+$ T细胞和 $CD4^+CD25^-$ T细胞,用双向电泳技术分析两种细胞蛋白质组的表达差异。结果 分选细胞纯度分别为 $CD4^+CD25^+$ T细胞82.3%,$CD4^+CD25^-$ T细胞96.5%,双向电泳分析发现有4个蛋白点明显仅于 $CD4^+CD25^+$ T细胞检测到表达,有9个蛋白点明显仅于 $CD4^+CD25^-$ T细胞检测到表达。结论 $CD4^+CD25^+$ T细胞和 $CD4^+CD25^-$ T细胞表达蛋白质组有明显差异。

关键词:$CD4^+CD25^+$ 调节性T细胞;蛋白质组;双向电泳
中图法分类号:R392-33;R392.11;R446.62 文献标识码:A

Proteome of human $CD4^+CD25^+$ T cells *vs* $CD4^+CD25^-$ T cells: Comparative analysis by two dimensional electrophoresis

PENG Shuang-fa, WU Jun, YIN Jian-ning, ZHENG Jun-song, WANG Gui-bo, HE Wei-feng, CHEN Xi-wei, YI Shao-xuan, YUAN Jun, XIE Zhi-jie (Institute of Burn Research, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To comparatively analyze the proteomes of human $CD4^+CD25^+$ T cells and $CD4^+CD25^-$ T cells. Methods $CD4^+CD25^+$ T cells and $CD4^+CD25^-$ T cells were isolated from human spleen and their purity was identified. The difference of protein expression in $CD4^+CD25^+$ T cells and $CD4^+CD25^-$ T cells was analyzed by two dimensional electrophoresis. Results The purity of $CD4^+CD25^+$ T cells and $CD4^+CD25^-$ T cells was 82.3% and 96.5%, respectively. By means of two dimensional electrophoresis, there were 4 protein spots exclusively detected in $CD4^+CD25^+$ T cells while 9 protein spots in $CD4^+CD25^-$ T cells. Conclusion There is significant difference between proteomes of human $CD4^+CD25^+$ T cells and $CD4^+CD25^-$ T cells.

Key words: $CD4^+CD25^+$ regulatory T cells; proteome; two dimensional electrophoresis

机体除了存在针对不同抗原的反应性T细胞之外,还存在下调T细胞反应的T细胞(调节性T细胞),该细胞群是维持免疫耐受的重要机制之一。血及外周淋巴组织中天然存在的 $CD4^+CD25^+$ T细胞是一种典型的调节性T细胞,近来该细胞在自身免疫、移植免疫和肿瘤免疫等领域越来越受到瞩目[1]。

虽然该细胞功能肯定,但有不少疑点,如:其免疫调节效应是通过接触性机制抑或细胞因子途径?CD25是T细胞活化的一个标志,$CD4^+CD25^+$ 调节性T细胞与免疫反应后活化的 $CD4^+CD25^+$ T细胞有何不同?是否还有比CD25更为特异的标志物待发现[2]?蛋白质组学研究能够全貌性对比调节性T细胞和非调节性T细胞的蛋白质表达差异,是查找特征性功能蛋白质和标志物的有力手段。本实验通过从人脾脏分选 $CD4^+CD25^+$ T细胞和 $CD4^+CD25^-$ T细胞,双向电泳分离细胞总蛋白,采用图像分析软件对数字化电泳图谱进行分析比对,以期建立蛋白质差异表达谱,为差异蛋白的进一步筛选鉴定奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

脾脏取自青年男性外伤脾切除术。人淋巴细胞分离液(比重1.077)购自天津TBD公司,$CD4^+$ T细胞纯化柱为R&D公司产品,FITC-抗人CD25单抗及PE-抗人CD4单抗为eBioscience公司产品,抗FITC磁珠以及MACS分选装置购自miltenyi公司,二硫苏糖醇、尿素、十二烷基磺酸钠、甘氨酸、溴酚蓝、CHAPS、IPG缓冲液和IPG干胶条(13 cm, pH 3~10, NL)、低分子量蛋白Marker均购自Amersham Pharmacia公司,丙烯酰胺、Tris、碘代乙

基金项目:国家自然科学基金重大资助项目(39993430-2);国家自然科学基金面上资助项目(30200264)
作者简介:彭双发(1969-),男,湖北省天门市人,博士,讲师,主要从事移植免疫方面的研究。电话:(023)68752688
通信作者:吴 军,电话:(023)68754006,E-mail:junwupro@cta.cq.cn
收稿日期:2002-10-12;修回日期:2002-12-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

酰胺为购自 Sigma 公司, 过硫酸铵、TEMED 购自 Bio-Rad 公司, 甲叉双丙烯酰胺购自 Fluka 公司, 其余试剂为国产分析纯, 所有溶液均用 Milli-Q 水配制。

1.2　方法

1.2.1　细胞分选及纯度检测　新鲜切除之脾脏剪碎, 在加有 RPMI1640 培养基的 100 目不锈钢筛上钝性撕拉、挤压、吹打, 再过 400 目钢筛制成单细胞悬液, 加入淋巴细胞分离液, 20 ℃, 800× g 离心 30 min, 收集单个核细胞, ACK 液裂解红细胞, 低速离心(220× g, 10 min)3 次去除血小板, 用 $CD4^+$T 细胞纯化柱分离获得 $CD4^+$T 细胞, FITC-抗 CD25 抗体 4 ℃孵育 15 min, 10% FCS PBS 洗, 抗 FITC 磁珠 4 ℃孵育 15 min, 10%FCS PBS 洗, 2 mmol/L EDTA10%FCS PBS 混匀细胞, 过 400 目筛网后上 MACS 分选柱, 脱离磁场洗出扣留细胞即为 $CD4^+CD25^+$T 细胞, 非扣留细胞换新分选柱再过一次磁场以彻底去除阳性细胞, 得到 $CD4^+CD25^-$T 细胞。分别留取细胞标记 FITC-抗 CD25 单抗及 PE-抗 CD4 单抗, 用 Coulter Epics 流式细胞仪检测细胞纯度。

1.2.2　蛋白样品制备　参考文献[3], 细胞用 0.3 mol/L 等渗蔗糖洗涤 3 次后离心收集于 1.5 ml EP 管, 细胞重悬于 200 μl 裂解液(8 mol/L 尿素、4%CHAPS、40 mmol/L Tris、60 mmol/L DTT 和0.01 mmol/L PMSF), 超声细胞破碎仪冰浴超声 2 min, 4 ℃、50 000× g 离心 30 min(Sorvall RC 5C Plus, 美国 Kendro 公司), 吸取上清, Bradford 法测蛋白浓度。

1.2.3　双向电泳　按文献[3]进行, 75 μg 总蛋白与重泡胀液(8 mol/L 尿素、2% CHAPS、0.5% IPG 缓冲液 pH 3～10, NL、18 mmol/L DTT 和痕量溴酚蓝)混合, 总体积为 250 μl, 加入持胶槽中, IPG 干胶条(13 cm, pH 3～10, NL)胶面朝下放入持胶槽中, 并覆盖一层矿物油以防样品蒸发, 盖好后置 IPGphor 等电聚焦电泳仪(Amersham Pharmacia)电极板上, 重泡胀和和等电聚焦在 20 ℃下自动进行, 其中重泡胀在 30 V 下 12 h, 500 V 1 h, 1 000 V 1 h, 最后稳定在 8 000 V 下进行, 总电压时间积为 21～23 kVh。等电聚焦后 IPG 胶条在平衡液(50 mmol/L Tris-HCl pH6.8, 6 mmol/L 尿素, 30% 甘油, 2%SDS, 1% DTT 和痕量溴酚蓝)平衡 15 min, 再于 2.5% 碘代乙酰胺替换 1% DTT 的同样平衡液中平衡 15 min, 胶条移置 1 mm 厚 9%～16% SDS 线性梯度胶上端, 0.5% 琼脂糖封胶, SDS-PAGE 在 Hoefer SE600 Ruby(Amersham Pharmacia)电泳槽中进行, 10 mA/胶电泳 15 min 后换用 25 mA/胶, 直到溴酚蓝到达胶的底线, 为确定蛋白点的分子量, 在邻近 IPG 胶条碱端放置 Marker。

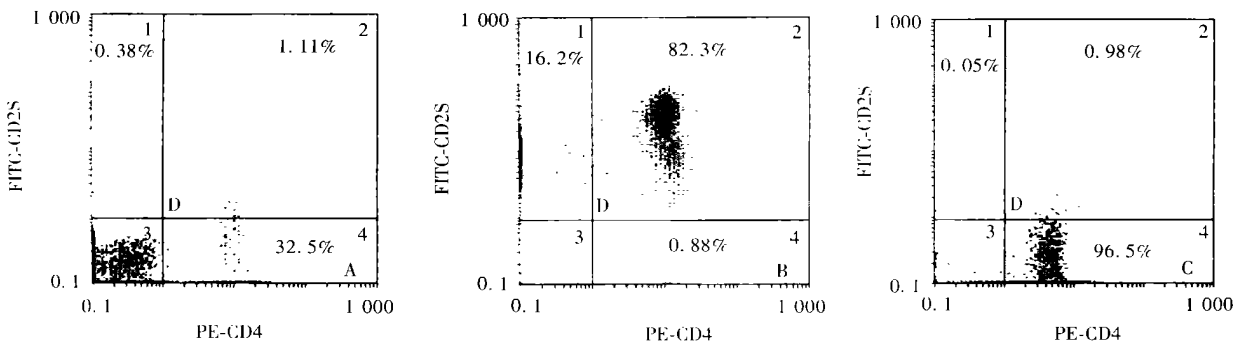
1.2.4　银染　采用 Vorum 法[4], 凝胶置于固定液(50% 甲醇、12% 乙酸、0.05% 福尔马林)过夜; 35% 乙醇漂洗 3× 20 min; 0.02% $Na_2S_2O_3$ 致敏 2 min; 水洗 3× 5 min, 银染液(0.2% $AgNO_3$、0.076% 福尔马林)染色 20 min; 水洗 2× 1 min; 显色液(6% Na_2CO_3、0.05% 福尔马林、0.0004% $Na_2S_2O_3$)显色 3～8 min; 终止液(50% 甲醇、12% 乙酸)终止 5 min, 1% 乙酸保存。

1.2.5　图像采集与分析　染色后用 ImageScanner(Amersham Pharmacia)扫描仪透射扫描, 数字化图像文件运用 ImageMaster 2D Elite 软件分析, 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 $CD4^+CD25^-$T 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　细胞纯度及蛋白提取量

分选前人脾脏单个核细胞中 $CD4^+CD25^+$T 细胞和 $CD4^+CD25^-$T 细胞比例分别为 1.11% 和 32.5%, 分选获得 $CD4^+CD25^+$T 细胞纯度为 82.3%, $CD4^+CD25^-$T 细胞为 96.5%, 见图 1。裂解所得细胞总蛋白平均为 50～70 μg/10^6 细胞。



A: spleenic mononuclear cells; B: isolated $CD4^+CD25^+$T cells; C: isolated $CD4^+CD25^-$T cells

图 1　人脾单个核细胞及分选细胞流式细胞检测结果

Fig 1　Flow cytometry of human spleenic mononuclear cells and isolated T cell subsets

2.2　电泳结果

$CD4^+CD25^-$T 细胞和 $CD4^+CD25^+$T 细胞蛋白质双向电泳银染图谱见图 2A、B, 检出蛋白点数分别为 $CD4^+CD25^-$T 细胞 792 个、$CD4^+CD25^+$T 细胞 758 个。蛋白等电点和分子量分布范围广, 但多数集中在(25～66)× 10^3 区域。对两张图进行匹配比较发现有 9 个蛋白点明显只见于 $CD4^+CD25^-$T 细胞, 而在 $CD4^+CD25^+$T 细胞未见; 有 4 个蛋白点明显见于 $CD4^+CD25^+$T 细胞, 而 $CD4^+CD25^-$T 细胞未见。具体蛋白点编号、等电点和分子量见表 1。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

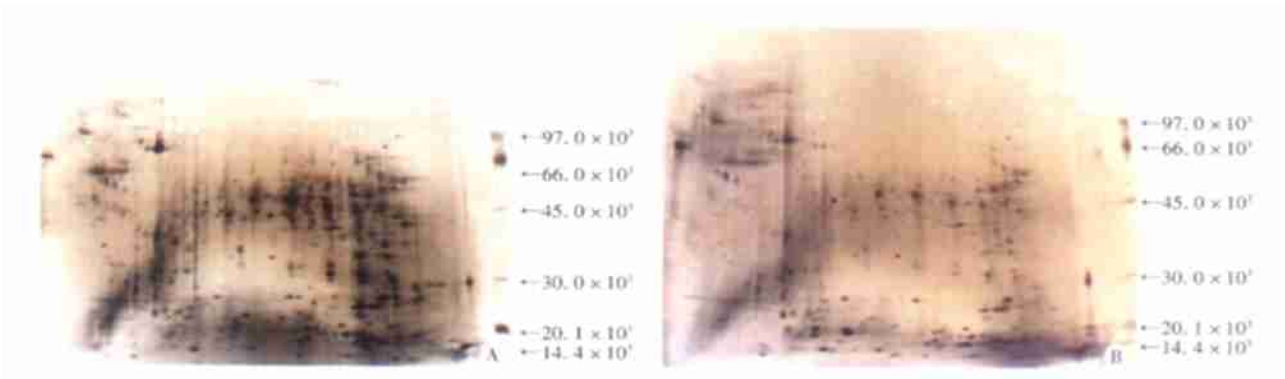


图2 $CD4^+CD25^-$ T细胞(A)和 $CD4^+CD25^+$ T细胞(B)总蛋白双向电泳图谱(银染)

Fig 2 2D-PAGE of total proteins from $CD4^+CD25^-$ T cells(A) and $CD4^+CD25^+$ T cells(B)(silver staining)

表1 仅在 $CD4^+CD25^-$ T细胞或 $CD4CD25^+$ T细胞检测到的蛋白点

Tab 1 protein spots only detected in $CD4^+CD25^-$ T cells or $CD4^+CD25^+$ T cells

$CD4^+CD25^-$ T cells			$CD4^+CD25^+$ T cells		
Spot number	pI	$Mr(\times 10^3)$	Spot number	pI	$Mr(\times 10^3)$
114	7.49	43.8	94	5.54	50.9
178	7.50	34.1	102	5.89	47.3
213	6.41	32.6	283	8.10	29.2
223	7.45	31.9	574	6.08	18.5
232	7.69	31.6			
280	7.28	30.4			
549	6.36	20.6			
573	7.91	19.2			
603	7.61	18.2			

3 讨论

$CD4^+CD25^+$调节性T细胞是免疫耐受和自身免疫研究的一大热点,但国内外文献多集中于对该细胞的功能分析、作用机制研究以及治疗应用。后基因组时代的全貌性基因和蛋白质表达分析将有助于揭示该细胞本质特征,Rudensky 实验室公布的基因芯片研究结果显示其在信号转导及抗凋亡相关基因表达方面的特征性[5]。蛋白质组学研究能直接对比调节性T细胞和非调节性T细胞的蛋白质表达差异,因此更有可能发现调节性T细胞新的标志物和特征性功能蛋白质,这将有助于寻找移植免疫以及自身免疫病治疗的新靶位和新方法。

流式细胞检测结果人 $CD4^+CD25^+$ T细胞在脾细胞中的比例与文献中成年小鼠接近,细胞数量稀少,因此以蛋白质组研究为目的的高通量、高纯度 $CD4^+CD25^+$T细胞分选有相当难度,除了应用高速流式细胞分选仪(如 Moflo、BD FACS Vantage Diva)外,磁珠标记分选也是一种便利选择,本实验应用磁珠分选获得较好效果。

标准化预制 IPG 胶条的应用使 IPG-DALT 电泳比较标准化,但干扰胶间比对的因素很多,对上述差异结果的进一步阐述必须谨慎。Vorum 银染法为无戊二醛银染法,是一种能够衔接质谱的染色方法,在差异蛋白质点得到确证后即可以通过质谱加以鉴定。

本实验获得了较好的双向电泳图谱,并初步分析了部分差异表达蛋白点,为进一步筛选、鉴定人 $CD4^+CD25^+$T细胞和 $CD4^+CD25^-$T细胞差异蛋白质奠定了基础。

参考文献:

[1] McHugh R S, Shevach E M. The role of suppressor T cells in regulation of immune responses[J]. J Allergy Clin Immunol, 2002, 110(5): 693-702.

[2] Shevach E M. $CD4^+CD25^+$ suppressor T cells: more questions than answers[J]. Nat Rev Immunol, 2002, 2(6): 389-400.

[3] Berkelman T, Stenstedt T. 2-D Electrophoresis using immobilized pH gradients: Principles and Methods[M]. USA: Amersham Biosciences, 2001. 17-71.

[4] Vorum H, Hager H, Christensen B H, *et al*. Human calumenin localizes to the secretory pathway and is secreted to the medium[J]. Exp Cell Res, 1999, 248(2): 473-481.

[5] Gavin M A, Clarke S R, Negrou E, *et al*. Homeostasis and anergy of $CD4^+CD25^+$ suppressor T cells *in vivo*[J]. Nat Immunol, 2002, 3(1): 33-41.

(编辑 张 宁)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net