

## HIV 感染导致 MT4 细胞蛋白表达差异的初步研究

李 林<sup>1</sup>, 应天翼<sup>2</sup>, 庄道民<sup>1</sup>, 鲍作义<sup>1</sup>, 刘思扬<sup>1</sup>, 李韩平<sup>1</sup>, 刘永健<sup>1</sup>,  
杨 坤<sup>1</sup>, 李 钰<sup>1</sup>, 王恒良<sup>2</sup>, 黄留玉<sup>2</sup>, 李敬云<sup>1\*\*</sup>

(1. 军事医学科学院微生物流行病学研究所全军艾滋病检测中心, 北京 100071; 2. 军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071)

## Study on the Different Expression Proteins of MT4 Cells Infected by HIV-1 III<sub>B</sub> Strain

LI Lin<sup>1</sup>, YING Tian-yi<sup>2</sup>, ZHUANG Dao-min<sup>1</sup>, BAO Zuo-yi<sup>1</sup>, LIU Si-yang<sup>1</sup>, LI Han-ping<sup>1</sup>, LIU Yong-jian<sup>1</sup>,  
YANG Kun<sup>1</sup>, LI Jue<sup>1</sup>, WANG Heng-liang<sup>2</sup>, HUANG Liu-yu<sup>2</sup>, LI Jing-yun<sup>1\*\*</sup>

(1. Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Science, Beijing 100071, China; 2. Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Science, Beijing 100071, China)

**Abstract:** To analyze the different expression proteins of MT4 cells infected with HIV-1 III<sub>B</sub> strain, the proteins of MT4 cells from infected and uninfected HIV-1 III<sub>B</sub> were separated by 2DE and the gels were analyzed with software Image Master 2D Elite 3.01 to find out the different spots. The proteins in the spots were identified by matrix associated laser desorption/ionization time-of-flight(MALDI-TOF) mass spectrometry. A total of 40 different protein spots were found, 12 proteins were down-regulated in the MT4 cells after infection; the other 28 proteins were up-regulated. 29 proteins were detected by MALDI-TOF. The proteins that down-regulated in MT4 cells after infection include proteins related to energy metabolism, actin proteins and hypothetical proteins. The up-regulated proteins in MT4 cells after infection include proteins related to actin proteins, enzymes, immune proteins and hypothetical proteins. In the MT4 cells infected by HIV, many proteins were changed. In order to understand the mechanism of infection of HIV, we must wipe off the abundant proteins and study the proteins with special functions.

**Key Words:** MT4; HIV; Two-dimensional electrophoresis; Peptide mass fingerprinting

**摘要:** 为了比较 MT4 细胞株感染 HIV-1 的 III<sub>B</sub> 株前后的蛋白质表达差异, 我们分别提取 MT4 细胞及感染了人类免疫缺陷病毒(HIV)的 MT4 细胞的总蛋白质, 通过双向电泳分离, 使用 Image Master 2D Elite 3.10 图像分析软件分析获得的凝胶图谱, 寻找差异点, 使用质谱仪鉴定获得的差异点蛋白质。结果表明感染 HIV 和未感染 HIV 的 MT4 细胞有 40 个蛋白质点差异, HIV 感染后减少的蛋白质点有 12 个, 增多的有 28 个, 通过质谱分析, 29 个蛋白质得到鉴定。其中 HIV 感染后下调的蛋白质有能量代谢相关蛋白、肌动蛋白相关蛋白及假想蛋白等; 上调的蛋白有肌动蛋白、酶类蛋白、免疫蛋白及假想蛋白等。通过研究我们可以看出宿主细胞感染 HIV 病毒后有多数蛋白发生变化, 可能和 HIV 与宿主细胞的相互作用有关。为了研究 HIV 感染的机制必须去除高丰度蛋白, 针对特定功能的蛋白质进行具体研究。

**关键词:** MT4; 人免疫缺陷病毒 (Human immunodeficiency virus, HIV); 双向电泳; 肽质量指纹分析

**中图分类号:** R511

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1003-5125(2004)05-0435-04

研究艾滋病特异性的免疫预防方法和药物有赖于对其致病性机理的深入了解。但关于人免疫缺

陷病毒 (Human immunodeficiency virus, HIV) 感染及致病的确切机理和机体的免疫机制目前尚未完

收稿日期: 2004-02-19, 修回日期: 2004-05-20

作者简介: 李林 (1977-), 男, 山东省招远市籍, 博士生, 主要从事艾滋病的防治研究。

\*\* 通讯作者。Corresponding author. Tel: 010-66948566, Fax: 010-63842689, E-mail: lijy@bmi.ac.cn.

全明了。蛋白质组学是从整体水平、高通量研究蛋白质功能的新兴学科。我们采用双向电泳技术直接分析 MT4 细胞感染 HIV 后蛋白质表达变化, 筛选并鉴定一些相关蛋白, 期望为进一步研究这些蛋白质在 HIV 感染中的作用奠定基础, 也为阐明 HIV 感染细胞的分子机制及治疗的新靶标提供线索。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞和病毒

实验中所用 MT4 细胞和 HIV III<sub>B</sub> 株病毒为本室收藏, MT4 细胞系 HTLV-1 基因转化的人 T 淋巴细胞, 传代培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液中。病毒接种后 2d 显微镜下观察发现有 50% 细胞团出现病变, 收集细胞, 用不含胎牛血清的 RPMI1640 和低盐生理盐水冲洗细胞后, 将细胞悬浮于含蛋白酶抑制剂的水溶液中, 70℃ 2h 灭活病毒后, 保存于 -70℃ 冰箱中。

### 1.2 细胞蛋白的提取

30% 的功率冰浴超声 5min, 加入 RNA 酶和 DNA 酶, 冰浴消化 1h, 加入适量的尿素、硫脲、CHAPS、及 DTT, 定容使尿素、硫脲、CHAPS、及 DTT 的浓度分别达到 7 mol/L、2mol/L、4%、及 40mmol/L。待蛋白充分溶解后, 40000g 离心 1h, 取上清冻存于 -70℃ 冰箱中。

### 1.3 细胞蛋白纯化、定量

使用 Amersham Biosciences 双向电泳蛋白质纯化试剂盒按照说明书进行纯化。使用 Amersham 的 2-D Quant Kit 按照说明书进行定量。

### 1.4 第一相固相 pH 梯度等电聚焦

分别取适量的感染和未感染 HIV 的蛋白溶液, 适量稀释使每种溶液中蛋白质含量均为 100μg(银染)或 1mg(考马斯亮蓝染色), 使用 Amersham Pharmacia Biotech 公司的等电聚焦设备 IPGphor, 胶条 pH 值范围为 4-7, 18cm, 采用胶内泡涨方法, 样品和泡涨液共 350μL。其中各加还原剂 DTT 至 20mmol/L, IPG buffer 至 0.5%。等电聚焦条件如表 1。

表 1 IPGphor IEF 系统中固态胶条的等电聚焦参数

Table 1 IEF parameters of immobilized drystrip in IPGphor IEF system

Step	Voltage(V)	Step duration(h)	Volt-hours(Vh)	Gradient type
Rehydration	0	6	0	Step-n-hold
Rehydration	30	6	180	Step-n-hold
1	500	1	500	Step-n-hold
2	1000	1	1000	Step-n-hold
4	8000	8	64000	Step-n-hold

### 1.5 第二相垂直 SDS-PAGE 电泳

将等电聚焦后的 IPG 胶条按 Amersham Pharmacia Biotech 公司提供的方法平衡后, 使用 Bio-Rad Protean II Xi 垂直电泳仪进行电泳。PAGE 胶大小为 18cm×18cm, 电泳缓冲液为 Tris-Glycine-SDS 系统。在 14℃~15℃ 时, 以每一胶条 10mA 恒流 15min, 再加大至每块胶 35mA 恒流至溴酚蓝前沿至玻璃板下缘为止。按常规银染色和考马斯亮蓝染色方法染色。

### 1.6 图像采集和分析

使用 ImageScanner 扫描仪和 ImageMaster 2D Elite3.1 双向电泳凝胶图像分析软件对双向电泳图进行分析。

### 1.7 差异蛋白质点的提取和酶切

比较银染和考马斯亮蓝染色结果, 发现图谱基本相同。找到考马斯亮蓝染色的 2D 胶上的明显差异的蛋白质斑点, 用刀片沿斑点染色边缘切下蛋白质点置于样品管中, 按照已有方法脱色、干燥、胰酶消化提取、再冰冻干燥, 冻存<sup>[1]</sup>。

### 1.8 肽质量指纹谱分析及数据库检索鉴定

冻干后样品按照文献报道<sup>[2]</sup>进行 PMF 鉴定后, 将蛋白质等电点、分子量范围及肽指纹谱数据和和其它一些参数输入软件, 在数据库中寻找与这些参数相匹配的蛋白质, 互联网上的蛋白质数据库检索程序有: ExPASy Molecular Biology Server 网站提供的 Peptident(<http://www.expasy.ch/tools/peptident.html>), UCSF Mass Spectrometry Facility 网站提供的 MS-Fit (<http://prospector.ucsf.edu/htmlucsf3.0/msfit.htm>)。

## 2 结果

### 2.1 双向电泳及图像分析结果

正常的及 HIV-1 感染的 MT4 细胞蛋白的考马斯亮蓝染色的双向电泳图谱见图 1。通过 Image Master 2D Elite 3.10 双向电泳图像分析软件分析, 共发现 40 个差异蛋白点。图像分析结果显示, 感染 HIV 后下调表达的有 12 个, 上调表达的有 28 个。银染分析结果(未给出)与考马斯亮蓝染色结果一致。

### 2.2 质谱鉴定结果

差异蛋白质经过质谱鉴定, 40 个蛋白质点共检测出 29 个, 检出率为 72.5%。差异蛋白质点的检索结果见表 2。表中列出了蛋白质的等电点、分子量和鉴定结果等数据。其中 MT4-1 至 MT4-12 为感染 HIV 后表达下调的蛋白, 主要包括能量代谢相关蛋白(如细胞色素 C、硫氧还蛋白等)、肌动蛋白相关蛋白(如微管蛋白、肌动蛋白等)、及假想蛋白。

MT4-13 至 MT4-40 为感染 HIV 后表达上调的蛋白, 主要包括肌动蛋白相关蛋白 (如核丝、肌动蛋白

等)、酶类蛋白 (酪蛋白激酶、蛋白磷酸酶 I 等)、免疫蛋白 (免疫球蛋白重链) 及假想蛋白。

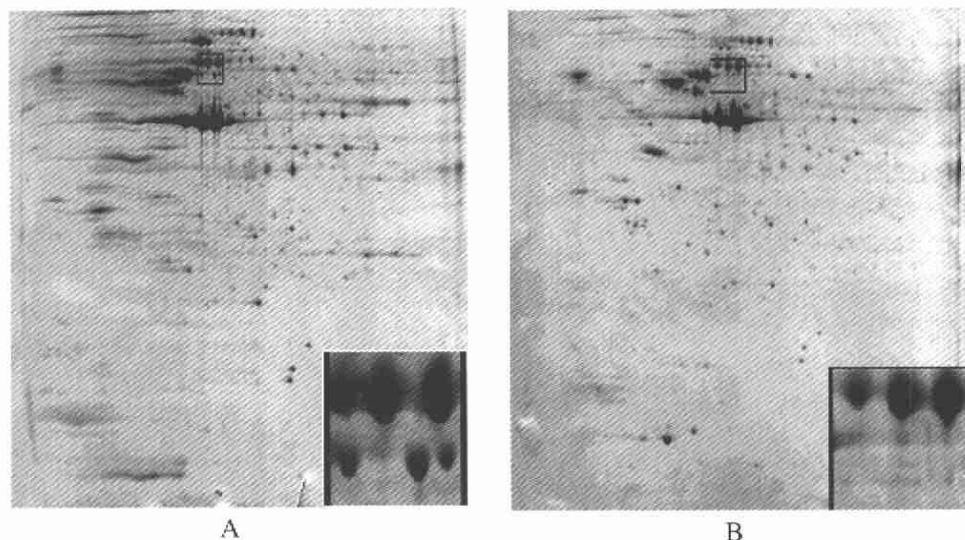


图 1 正常的和 HIV 感染的 MT4 细胞蛋白电泳图(右下方为局部放大图)

Fig. 1 2-D gel map of proteins from normal and HIV infected MT4 cells

A, The map of normal MT4 cells; B, The map of HIV infected MT4 cells. The amplified result was showed in the corner.

表 2 通过肽质量指纹谱初步鉴定的差异蛋白点

Table 2 Differential protein spots identified preliminarily by peptide mass fingerprinting

ID	PM	PI	MW	SC(%)	S	Protein Name
MT4-1	14/33	4.75	49640	41	126	Beta 5-tubulin[Homo sapiens]
MT4-2	20/34	6.01	57452	52	207	ubunit 2 (beta); chaperonin containing t-complex polypeptide 1, beta subunit [Homo sapiens]
MT4-3	10/22	5.24	32080	38	102	beta-actin
MT4-4	9/28	5.31	22204	34	114	hypothetical protein [Homo sapiens]
MT4-5	6/30	5.57	29786	31	56	prohibitin [Homo sapiens]
MT4-6	8/40	5.65	25862	40	61	gamma-actin
MT4-8	6/20	4.82	11700	72	63	Thioredoxin (Reduced Form)
MT4-9	9/37	6.30	16752	52	79	Cytochrome c oxidase subunit Va precursor [Homo sapiens]
MT4-10	9/30	4.82	11700	82	103	Thioredoxin (Reduced Form)
MT4-11	4/9	8.69	30106	29	53	FLJ00374 protein [Homo sapiens]
MT4-12	12/43	5.34	14575	81	118	beta galactoside soluble lectin
MT4-13	17/28	5.37	75694	33	154	Chain A, Crystal Structure Of Phosphorylation-Mimicking Mutant T356d Of Annexin Vi
MT4-14	35/54	5.20	70245	60	269	bA139H14.1 (lymphocyte cytosolic protein 1 (L-plastin)) [Homo sapiens]
MT4-15	31/58	5.20	70245	57	200	L-plastin; Lymphocyte cytosolic protein-1 (plastrin); plastin 2 [Homo sapiens]
MT4-16	28/57	5.13	66367	56	205	Similar to lamin B1 [Homo sapiens]
MT4-24	9/23	5.39	47430	25	64	BAF53a isoform 1; BAF complex 53 kDa subunit; BRG1-associated factor; actin-related protein; hArpN beta [Homo sapiens]
MT4-25	4/28	5.19	9830	42	53	PMS2L16 [Homo sapiens]
MT4-26	7/21	5.11	36362	26	62	actin beta
MT4-27	15/48	5.61	47327	44	117	ARP3 actin-related protein 3 homolog
MT4-28	12/17	5.97	57411	35	123	chaperonin subunit 2 (beta) [Mus musculus]
MT4-29	4/8	5.44	257230	4	37	hypothetical protein [Homo sapiens]
MT4-30	1/32	12.62	19660	12	92	unnamed protein product [Homo sapiens]
MT4-32	7/17	6.36	35103	28	74	protein phosphatase I alpha subunit (PP1A) (EC 3.1.3.16)
MT4-33	8/34	9.50	37543	40	52	casein kinase 1, alpha 1; casein kinase I-alpha [Mus musculus]
MT4-34	4/34	9.36	9327	50	48	immunoglobulin heavy chain variable region [Homo sapiens]
MT4-35	4/20	10.28	9404	72	57	PRO2049 [Homo sapiens]
MT4-37	7/30	4.90	109816	8	43	hypothetical protein FLJ14464 [Homo sapiens]
MT4-38	6/13	5.94	22332	34	61	hypothetical protein MGC15429 [Homo sapiens]
MT4-40	5/16	4.82	11714	72	77	Human Thioredoxin Mutant With Cys 73 Replaced By Ser (Reduced Form)

ID: Spot Identification; PM: Peptide Matched; PI: theoretical isoelectric point; MW: theoretical Molecular Weight; SC: Sequence covered; S: Score; PN: Protein Name.

### 3 讨论

双向电泳作为蛋白质组研究的一项重要技术,是当前用于分析复杂组份蛋白质样品时分辨率和灵敏度最高的手段之一。但在本实验中,在 HIV 感染后的电泳图中未发现病毒蛋白。因此,可以推测 HIV 感染后的细胞中病毒蛋白较少,同时也说明双向电泳对于检测低丰度蛋白尚不完美。虽然银染的敏感性较高,可以检测出纳克水平的蛋白,但是存在背景过深等问题,在漂洗后很难使微量蛋白斑点不受影响<sup>[3]</sup>。通过重复实验,我们发现电泳图谱的重复性较好,因此如果能够有效地去除高丰度蛋白,从而增加上样中的低丰度蛋白的量对于提高双向电泳的检测灵敏度具有重要意义。

本研究通过实验室毒株及细胞株模拟了 HIV 体内感染的状态,以 50% 细胞出现病变作为检测点,主要是考虑此时有大量细胞感染了病毒,但死亡细胞较少,可以很好地反映细胞感染病毒后的蛋白变化。实验结果可以看出细胞在感染 HIV 后,有大量蛋白发生变化。通过分析,可以发现病毒侵入细胞后发生变化的蛋白包括以下几类:(一)能量代谢相关蛋白;(二)肌动蛋白相关蛋白;(三)酶类;(四)免疫相关蛋白;(五)假想蛋白。表明 HIV 感染以后细胞结构、代谢、能量等多方面都发生了变化,提示应从多方面研究 HIV 与宿主细胞的相互作用,从而揭示 HIV 的致病机理。值得注意的是病毒侵入细胞后,免疫细胞会产生免疫反应(免疫相关蛋白增加),但有研究认为这种免疫反应不能起到有效的保护作用<sup>[4]</sup>。通过与 Akihito Ryo 等人<sup>[5]</sup>

的关于基因表达谱的研究比较,可以发现在 HIV 感染的过程中,基因转录的变化要明显高于蛋白质组的变化。其原因可能是因为基因筛选的灵敏度要高于蛋白质组的研究,但也可能是因为细胞感染 HIV 后基因转录水平的变化与蛋白质水平的变化并非同步所致。蛋白质作为基因功能的执行者,应该能够更好地反映病毒的致病机制。但是,病毒感染细胞时伴随着能量、细胞结构及生化代谢等多方面的变化,要了解每个蛋白在 HIV 感染及致病中的作用,必须进行具体的研究。

总之,双向电泳技术可以被应用到 HIV 的研究中来,其研究结果为进一步进行差异蛋白的功能研究具有重要的提示作用。

### 参考文献

- [1] Wang J L, Wan J H, Luo L, *et al.* Development and preliminary application of a peptide mass fingerprinting technique in proteome research[J]. *ACTA Biochimica et Biophysica Sinica*, 2000, 32: 373-378.
- [2] 郝振明, 杨 晓, 应万涛, 等. Smad3 基因剔除致关节炎小鼠血清蛋白质组双向凝胶电泳分析[J]. *生物工程学报*, 2002, 18: 452-456.
- [3] 王振英, 彭永康. 双向电泳分析植物蛋白质的重演性、敏感性和清晰度[J]. *天津师范大学学报*, 2001, 21: 35-64.
- [4] David C M, Giuseppe P, Lisa M F, *et al.* Neutralizing and infection-enhancing antibody responses to human immunodeficiency virus type 1 in long-term nonprogressors[J]. *The Journal of Infectious Disease*. 1996, 173: 60-67.
- [5] Ryo A, Suzuki Y, Ichiyama K, *et al.* Serial analysis of gene expression in HIV-1-infected T cell lines[J]. *FEBS Letters*, 1999, 462: 182-186.

## 欢迎订阅 2005 年《畜牧兽医学报》

《畜牧兽医学报》是由中国科协主管,中国畜牧兽医学学会主办,《畜牧兽医学报》编委会、中国农业科学院畜牧研究所编辑出版的全国性畜牧兽医学学术性期刊。创刊于 1956 年 7 月,读者对象为大、专院校的师生和各级畜牧兽医生产、科研工作者等。刊登较高水平的学术论文和专业研究报告以及对生产实践具有指导性和启发性的文章。

《畜牧兽医学报》是行业内创刊较早、学术水平较高、影响较大的全国中文核心期刊,现被国内外多家数据库及文摘期刊收录。本刊连续三届荣获全国畜牧兽医优秀期刊奖。

《畜牧兽医学报》2005 年为月刊,大 16 开,104 页。邮发代号:82-453。国外代号:BM446。定价 20 元,全年 240 元。全国各地邮局均可订阅。

地址:北京市海淀区中国农业科学院畜牧研究所《畜牧兽医学报》编辑部

邮政编码:100094 电话:(010) 62815987 E-mail: xmsyxb@263.net <http://xmsy.chinajournal.net.cn>