

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00768

双向电泳分析 CCR5 对二氢叶酸还原酶表达的抑制作用

邱磊,丁力,张冉,冯皓,郭葆玉*

第二军医大学药学院生化药学教研室,上海 200433

[摘要] 目的:采用双向电泳为基础的蛋白质组学的研究手段,发现趋化因子受体 5 被配体激活后的功能相关蛋白质。方法:构建稳定表达 CCR5 的 HEK-293 细胞株。用 RANTES 刺激 12 h 后,用双向电泳方法进行分析。在以 PDQuest 图像分析软件进行分析后,对表达有差异的蛋白质进行 MOLDI-TOF MS/MS 质谱鉴定,并对鉴定的蛋白作 RT-PCR 初步分析。结果:流式细胞仪检测结果表明 HEK-293 细胞稳定表达 CCR5,在受 RANTES 刺激后作双向电泳分析并经质谱鉴定后,发现二氢叶酸还原酶表达降低,与 RT-PCR 检测结果相一致。结论:经蛋白质组学方法分析,发现 CCR5 被其配体 RANTES 激活后抑制了二氢叶酸还原酶的表达。

[关键词] 双向凝胶电泳;RANTES;CCR5 受体;四氢叶酸脱氢酶

[中图分类号] R 345.4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)07-0768-05

Analysis of inhibitory effect of CCR5 on dihydrofolate reductase expression by two-dimensional electrophoresis

QIU Lei, DING Li, ZHANG Ran, FENG Hao, GUO Bao-yu*

Department of Biochemical Pharmacy, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[ABSTRACT] **Objective:** To identify the differentially expressed proteins after activation of CCR5 by its ligand using two-dimensional electrophoresis. **Methods:** The HEK-293 cells stably expressing CCR5 were constructed. The global protein analysis in 293-CCR5 stables and mock cells was performed after treatment with RANTES. After analysis with the PDQuest image software, the differential spots were identified by MOLDI-TOF MS/MS. RT-PCR was performed to further analyze the changes at mRNA level. **Results:** Flow cytometry revealed that HEK-293 cells stably expressed CCR5. In this study, we analyzed the proteomic results to reveal the proteins which were significantly modulated by the activation of CCR5 with RANTES. Expression of dihydrofolate reductase was found in HEK-293 cells after RANTES treatment, which was confirmed by RT-PCR at the mRNA level. **Conclusion:** This proteomic study suggests that CCR5 activated by its ligand RANTES inhibits the expression of dihydrofolate reductase.

[KEY WORDS] two-dimensional gel electrophoresis; RANTES; CCR5 receptors; tetrahydrofolate dehydrogenase

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(7):768-772]

趋化因子受体 5 (CC-chemokine receptor 5, CCR5) 是 CC 亚族趋化因子 MIP-1 α (macrophage inflammatory protein-1 α)、MIP-1 β 和 RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted) 的特异性受体^[1]。研究发现 CCR5 能辅助 HIV-1 感染机体^[2], 因此, 自 1996 年其基因被克隆后, 一直是人们关注的热点。

CCR5 基因位于 3q21.3 上, 长 1.9 kb, 编码 352 个氨基酸, 相对分子质量为 40 600, 与 CCR2 有 70% 同源性, 不同的序列主要集中在胞外区和胞质部分,

其三维结构目前尚未确定。CCR5 是 G 蛋白偶联受体家族的一员, 主要表达于原始单核巨噬细胞、静止 T 细胞^[3], 在小神经胶质细胞、早幼粒细胞中亦有表达。随着对 CCR5 认识的深入, 人们把视线投向 CCR5 与相关疾病的研究领域。CCR5 与多种疾病有关, 如糖尿病^[4]、肝纤维化^[5]、心肌炎^[6]、类风湿性关节炎^[7-8] 等等, 对这些疾病的发病和进程中有重要影响。但同时, 也有文献指出目前尚不能对 CCR5 的趋化现象进行完整的解释^[9], 对 CCR5 在各种相关疾病的发病机制中的作用尚待进一步研究^[10]。

[收稿日期] 2007-12-04 **[接受日期]** 2008-01-15

[基金项目] 国家自然科学基金(30371349). Supported by National Natural Science Foundation of China(30371349).

[作者简介] 邱磊, 讲师. E-mail: qiulei70399@yahoo.com.cn

* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 021-25074497, E-mail: byguo1632000@yahoo.com.cn

本实验采用蛋白质组学的方法——双向电泳,拟发现CCR5被趋化因子RANTES(正常T细胞表达和分泌,活化时表达下降的因子)激活后,表达出现差异的蛋白。从对这些候选对象的证实过程中,找出参与CCR5功能的相关蛋白,并对这些蛋白的功能作进一步的研究和解释,为设计抗艾滋病药物和CCR5/RANTES相关疾病的治疗打下基础。

1 材料和方法

1.1 试剂 抗huCCR5抗体购自R&D公司, RANTES购自PeproTech公司。尿素、硫脲、过硫酸铵、二硫苏糖醇(DTT)、CHAPS、TEMED、十二烷基硫酸钠、碘乙酰胺、苯甲基磺酰氟、17 cm固相pH梯度(IPG)干胶条均购自美国Bio-Rad公司;丙稀酰胺、甲叉双丙稀酰胺、Tris、琼脂糖、甘氨酸、硝酸银、碳酸钠、甘油均购自中国医药(集团)上海化学试剂公司;DMEM培养基为杭州吉诺生物医药公司产品,新生小牛血清购自杭州四季青生物工程材料公司;其余试剂均为国产分析纯,所有溶液均用Milli-Q水配制。

1.2 设备 细胞培养孵箱(美国Forma scientific公司)。低温高速离心机(上海安亭科学仪器公司)。超声破碎仪(宁波新芝科器研究所)。-80℃冰箱(美国Revco公司)。等电聚焦仪、大型聚丙烯酰胺凝胶系统、GS800扫描仪(美国Bio-Rad公司)。Milli-Q纯水仪(美国Millipore公司)。

1.3 质粒构建 实验中采用真核表达载体pcDNA3.0及构建了huCCR5基因片段的重组质粒pcDNA3.0(由法国Samson博士^[11]馈赠)。实验前进行酶切,并测序鉴定。

1.4 细胞转染并筛选稳定表达CCR5的HEK-293细胞 HEK-293细胞用含10%小牛血清的DMEM培养基于37℃,体积分数为5% CO₂孵箱中培养。将细胞以1×10⁵/孔的密度传代移入24孔板中培养,待细胞长至80%融合时,进行细胞稳定转染实验。采用lipofectamine (Invitrogen)转染试剂,将脂质体与质粒一起放入无血清培养基中,放置15~45 min,缓慢滴加到换用无血清培养基孵育的细胞上,于5 h后按10%比例加入血清。至第2天,将细胞按1:10的比例传代;并于转染实验2 d后加入G418(400 μg/ml, Life Technologies, Inc.)进行筛选。大约2周后,从中挑选单克隆细胞,分别培养,细胞长至一定量后,收集细胞,用anti-CCR5 antibodies (R&D Systems)孵育,

4℃过夜;用PBS洗涤细胞,再用FITC-偶联的羊抗鼠二抗标记,37℃ 0.5 h, PBS洗涤后用流式细胞仪(Beckman, Germany)进行鉴定,确定细胞表面是否有CCR5表达。HEK-293细胞用空载体转染,并用G418筛选,作为对照细胞组。

1.5 蛋白样品制备 对照细胞和CCR5转染子用含体积分数为10%小牛血清的DMEM培养液中培养,生长至对数生长期, RENTES(50 nmol/L)刺激12 h后收集蛋白。用预冷PBS漂洗,干净滤纸吸干,然后用预冷的Milli-Q水冲洗,吸干;将2×10⁶细胞溶解于150 μl预冷的裂解缓冲液(7 mol/L尿素, 2 mol/L硫脲,质量浓度为4% CHAPS, 65 mmol/L DTT,体积浓度为0.2% Bio-Lyte)中;冰浴超声破碎40 s(每次1 s,间隔9 s),超声功率为120 W;于4℃,10 000×g离心1 h,取上清,Bradford法测定细胞总蛋白浓度,用BSA作为标准品^[12-13]。

1.6 双向凝胶电泳

1.6.1 等电聚焦 200 μg总蛋白与裂解缓冲液混合均匀(总体积为350 μl),均匀注入聚焦盘中,胶面朝下铺入17 cm固相pH梯度(IPG)干胶条,泡胀1 h后覆盖矿物油,然后进入等电聚焦程序:被动水化7 h,再经过50 V(快速)主动水化2 h,再经过250 V(慢速)2 h,1 000 V(慢速)2 h的除盐过程,10 000 V(线性)5 h升压过程,最后在10 000 V下等电聚焦达到60 000 Vh。

1.6.2 平衡 等电聚焦结束后,将IPG胶条取出,吸干矿物油,置入干净的溶胀盘中,然后先后加入5 ml平衡液A(6 mol/L尿素,质量浓度为2% SDS, 0.375 mol/L Tris-HCl pH 8.8,体积浓度20%甘油,质量浓度为2%的DTT和5 ml平衡液B(6 mol/L尿素,质量浓度为2% SDS, 0.375 mol/L Tris-HCl pH 8.8,体积浓度20%甘油,质量浓度为2.5%碘乙酰胺)中各12 min。

1.6.3 SDS-PAGE电泳 将平衡好的IPG胶条在第二向电泳缓冲液漂洗数秒后,转移至1 mm厚、12% SDS-PAGE胶上端,按压IPG胶条使两胶接触面紧密贴合。加入0.5%低熔点琼脂糖封胶液包埋胶条。待封胶液凝固后开始电泳,恒定电流15 mA,30 min,待溴酚蓝跑出浓缩胶后恒定电流50 mA,6 h。

1.6.4 银染 按Bio-Rad公司操作手册进行,基本过程依次为:体积浓度为40%乙醇、体积浓度为10%乙酸的固定液中固定过夜;体积浓度为30%乙

醇、质量浓度为 0.2% 硫代硫酸钠、质量浓度为 6.8% 乙酸钠的敏化液中敏化 30 min; 水洗 3 次, 每次 5 min; 质量浓度为 0.25% 硝酸银溶液染色 20 min; 水洗 2 次, 每次 1 min; 质量浓度为 2.5% 碳酸钠和体积浓度为 0.016% 甲醛的显影液中显影至凝胶上蛋白质斑点清晰; 以体积浓度为 40% 乙酸溶液终止反应, 水洗 3 次后直接保存于水中备用。

1.6.5 凝胶图像分析及统计学处理 银染后的 2-D 胶用 GS800 扫描仪(Bio-Rad)进行扫描, 获得蛋白质点图像。所得图谱用 PDQuest 图像分析软件进行分析, 分析过程包括蛋白质点的检测、获取蛋白质斑点位置坐标、背景消减、手工加减点、差异蛋白点的分析等。在本实验中用相同的条件对实验组和对照组分别进行了 4 次双向电泳。在每组的蛋白质电泳图谱中选择点清晰、背景好的图像作为参照胶, 与组内其他 3 次实验的图像进行匹配, 并建立平均胶; 以实验组和对照组的平均胶进行两两匹配, 寻找两组细胞的差异表达蛋白。

1.7 质谱鉴定 样品用 4700 串联飞行时间质谱仪 [4700 Proteomics Analyzer (TOF/TOFTM) (Applied Biosystems, USA)] 进行质谱分析^[14], 激光源为 355 nm 波长的 Nd:YAG 激光器, 加速电压为 20 kV, 采用正离子模式和自动获取数据的模式采集数据。进行完 MS 后, 直接选择与对照基质的 PMF 图有差异的肽段离子进行 MS/MS 分析。

1.8 RT-PCR 分析 对照细胞和 CCR5 转染子用含体积浓度为 10% 小牛血清的 DMEM 培养液培养, 生长至对数生长期, RANTES(50 nmol/L) 刺激 12 h, 分别用不加 RANTES 刺激的 2 种细胞样品作对照。用 DEPC 处理的 PBS 洗 2 遍, 用 TRIzol 试剂(Invitrogen)抽提 RNA。设计 DHFR 基因引物, RT-PCR 法检测其表达。5'-GCG AAT TCA TAA TTA ATT CGC TAA AC-3', 5'-CAT ATA CTC TTC TTA CTA ATT CAG CTG CG-3'。RT-PCR 一步法: 50°C 30 min; 94°C 2 min; 以 94°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 90 s, 扩增 30 个循环。用 GAPDH 作对照, 以琼脂糖凝胶电泳点样观察。

2 结果

2.1 构建编码 CCR5 片段的 pcDNA 3.0 载体 PCR 克隆 CCR5 cDNA 片段: 上游引物为 5'-GCG AAG CTT ATG GAT TAT CAA GTG TCA

AGT-3', 5' 端加入了保护性核苷酸和 BamH I 的酶切位点。下游引物为 5'-TCA CAA GCC CAC AGA TAT TTC CTG CTC CCC-3', 5' 端加入了 Hind III 的酶切位点。扩增出 huCCR5 cDNA 并插入真核表达载体 pcDNA 3.0。重组质粒酶切结果如图 1 所示。

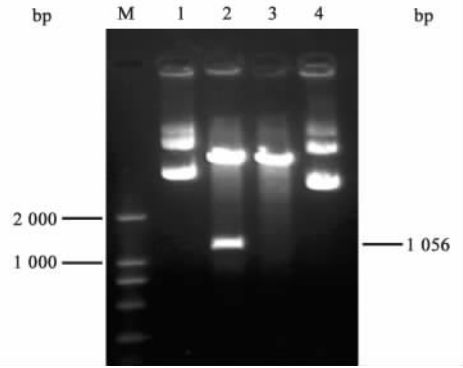


图 1 pcDNA3.0 和重组 pcDNA3.0(CCR5+) 质粒电泳图
Fig 1 Electrophoretogram of pcDNA3.0 and recombinant pcDNA3.0(CCR5+)

1: pcDNA3.0 (CCR5+); 2: pcDNA3.0 (CCR5+) digested with BamH I and Hind III; 3: pcDNA3.0 digested with BamH I and Hind III; 4: pcDNA3.0

2.2 构建表达 CCR5 的 293 细胞阳性克隆 pcDNA 3.0 质粒和构建了 CCR5 的重组质粒 pcDNA 3.0(CCR5+) 用脂质体方法分别转染 HEK 293 细胞, 用 G418 筛选阳性克隆。流式细胞仪鉴定结果如图 2, 转染组细胞有荧光标记, 峰形明显右移, 说明稳定转染的细胞有 CCR5 受体表达。

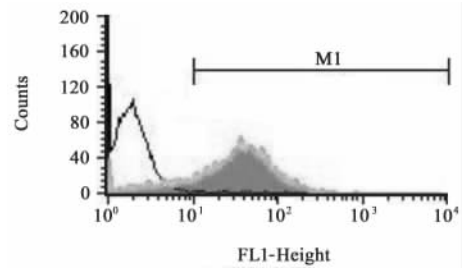


图 2 流式细胞仪检测稳定转染后 HEK-293 细胞表面有 CCR5 受体表达
Fig 2 CCR5 expression on HEK293-CCR5 as detected by flow cytometry

HEK 293-CCR5 stables (Gray area) and mock cells (Blank area) were incubated with 5 μg/ml monoclonal antibody against CCR5 and FITC-conjugated goat-anti-mouse immunoglobulin. CCR5 expression of 5 000 cells was determined by flow cytometry. Three separate experiments were performed and a representative one was shown

2.3 CCR5的激活抑制二氢叶酸还原酶(DHFR)的表达 用RANTES(50 nmol/L)刺激CCR5转染细胞和对照细胞12 h,提取细胞蛋白,进行双向电泳。双向电泳实验结果见图3。2个蛋白质样品分别来自HEK-293空载体转染的对照细胞(图3A、3C)和CCR5的稳定表达细胞(图3B、3D),RANTES(50 nmol/L)刺激12 h后进行双向电泳分析。电泳结束后,凝胶用银染法进行蛋白质染色,寻找表达差异蛋

白质点。从样品处理到双向电泳实验重复3次,双向电泳结果重现性较好。将在3次实验中重复出现的表达有差异的蛋白点凝胶部分取出,用MALDI-TOF-MS-MS法对蛋白点进行鉴定(图4)。在已鉴定的数个表达有差异的蛋白质中,我们发现DHFR的表达变化在以前的研究中未见报道。RANTES对CCR5的激活可下调细胞中DHFR表达。

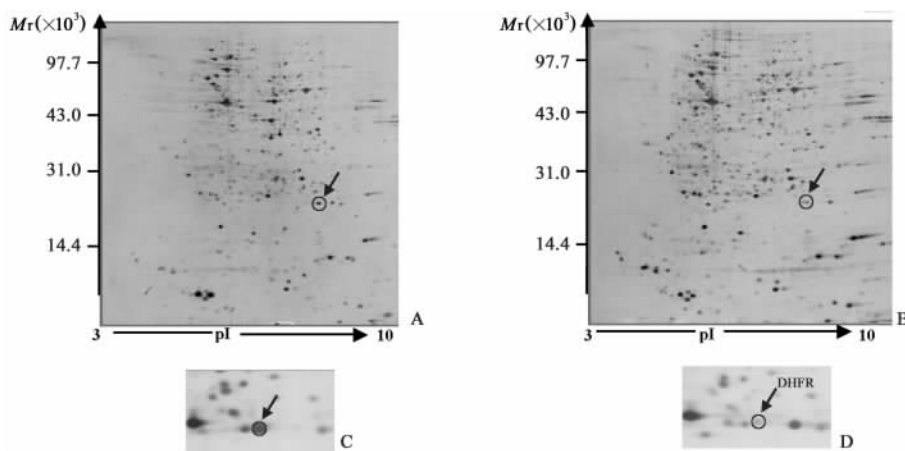


图3 HEK-293稳定转染细胞和对照细胞的双向电泳图谱

Fig 3 2-DE SDS-PAGE analysis of HEK 293-CCR5 stables and mock cells stimulated with RANTES

Total proteins were extracted from HEK 293 mock cells (A,C) and HEK 293-CCR5 stables (B,D). Molecular weight (M_w , $\times 10^3$) and isoelectric point (pI) are indicated along the Y- and X-axis, respectively. Selected regions show the significant differences in protein expression. The spots marked with circle was down-regulated and was identified as DHFR

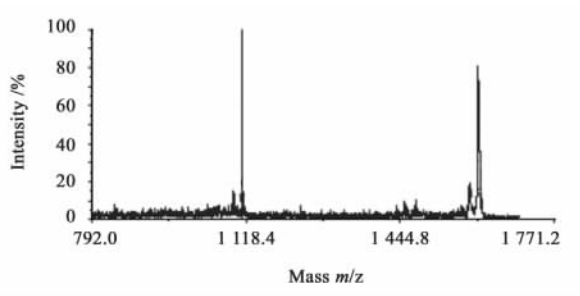


图4 MALDI-TOF-MS/MS质谱法鉴定差异表达肽段图谱

Fig 4 Identification of differentially expressed protein spot by MALDI-TOF-MS/MS

2.4 RT-PCR初步鉴定DHFR的表达差异 通过RT-PCR实验结果,进一步对双向电泳进行验证。实验结果表明,以GAPDH为参照,CCR5被RANTES激活后细胞中DHFR的mRNA水平下调(图5),与双向电泳的结果一致。

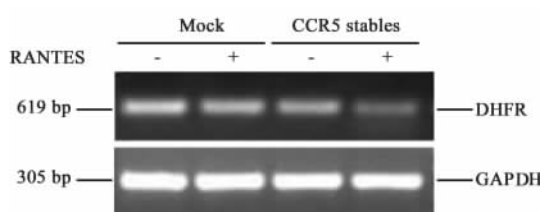


图5 RT-PCR分析CCR5被RANTES激活后细胞中DHFR的mRNA水平下调

Fig 5 Analysis of mRNA levels of DHFR in HEK-293-CCR5 stables and mock cells induced with(+) or without(-) RANTES

DHFR mRNA level in activated CCR5 stables was down-regulated compared with that of GAPDH

3 讨论

CCR5是HIV-1感染机体细胞的重要辅助受体,并与多种疾病的发病机制有关,但目前对CCR5在病毒感染过程和生理过程中的信号转导途径和相

关基因的表达调控尚不清楚。本实验用双向电泳的方法发现,CCR5被RANTES激活后表达有差异的蛋白分子,并从这些候选对象的证实过程中,找出了参与CCR5功能的分子。

双向电泳是蛋白质组学研究的基本方法,在某种意义上可以较全面地发现生物细胞在特定条件下蛋白质表达的变化。对于像CCR5这样功能解释尚不完整,有诸多未知数的受体,采用双向电泳的分析方法可以进一步发现有用的信息。

通过分析,本实验报道了CCR5在RANTES的激活作用下,抑制二氢叶酸还原酶的表达。二氢叶酸还原酶是叶酸代谢中的关键酶,主要存在于人的肝脏中,相对分子质量约为20 000。叶酸可在二氢叶酸还原酶的作用下转变成叶酸的活性型四氢叶酸,而四氢叶酸是体内一碳单位转移酶的辅酶,在体内参加多种物质的合成。二氢叶酸还原酶的减少会造成DNA合成受到抑制,降低细胞分裂速度。

目前尚未见有关CCR5影响二氢叶酸还原酶表达的报道,我们的实验提示CCR5的部分功能可能经过了二氢叶酸还原酶的传递,通过对这一信息的证实和二者在细胞、疾病模型中的进一步研究,发现其中可能的药靶,为治疗和诊断与CCR5相关的疾病打下基础。

[参考文献]

- [1] Wong M M, Fish E N. Chemokines: attractive mediators of the immune response[J]. *Semin Immunol*, 2003, 15: 5-14.
- [2] Atchison R E, Gosling J, Monteclaro F S, Franci C, Digilio L, Charo I F, et al. Multiple extracellular elements of CCR5 and HIV-1 entry: dissociation from response to chemokines[J]. *Science*, 1996, 274: 1924-1926.
- [3] Wong M, Fish E N. RANTES and MIP-1 α activate stats in T cells [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273: 309-314.
- [4] Kalev I, Oselin K, Pärlist P, Zilmer M, Rajasalu T, Podar T, et al. CC-chemokine receptor CCR5-del32 mutation as a modifying pathogenetic factor in type I diabetes[J]. *J Diab Complicat*, 2003, 17: 387-391.
- [5] Ajuebor M N, Carey J A, Swain M G. CCR5 in T cell-mediated liver diseases: what's going on [J]? *J Immunol*, 2006, 177: 2039-2045.
- [6] Machado F S, Koyama N S, Carregaro V, Ferreira B R, Milanezi C M, Teixeira M M, et al. CCR5 plays a critical role in the development of myocarditis and host protection in mice infected with *Trypanosoma cruzi* [J]. *J Infect Dis*, 2005, 191: 627-636.
- [7] Zapico I, Coto E, Rodríguez A, Alvarez C, Torre J C, Alvarez V. CCR5 (chemokine receptor-5) DNA-polymorphism influences the severity of rheumatoid arthritis[J]. *Genes Immun*, 2000, 1: 288-289.
- [8] Barcellos L F, Schito A M, Rimmler J B, Vittinghoff E, Shih A, Licoln R, et al. CC-chemokine receptor 5 polymorphism and age of onset in familial multiple sclerosis. Multiple Sclerosis Genetics Group [J]. *Immunogenetics*, 2000, 51: 281-288.
- [9] Oppermann M. Chemokine receptor CCR5: insights into structure, function, and regulation [J]. *Cell Signal*, 2004, 16: 1201-1210.
- [10] Mueller A, Mahmoud N G, Goedecke M C, Mckeating J A, Strange P G. Pharmacological characterization of the chemokine receptor, CCR5 [J]. *Br J Pharmacol*, 2002, 135: 1033-1043.
- [11] Samson M, LaRosa G, Libert F, Paindavoine P, Detheux M, Vassart G, et al. The second extracellular loop of CCR5 is the major determinant of ligand specificity [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272: 24934-24941.
- [12] Moertz E, Krogh T N, Vorum, H, Görg A. Improved silver staining protocols for high sensitivity protein identification using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis [J]. *Proteomics*, 2001, 1: 1359-1363.
- [13] Son W K, Lee D Y, Lee S H, Joo W A, Kim C W. Analysis of proteins expressed in rat plasma exposed to dioxin using 2-dimensional gel electrophoresis [J]. *Proteomics*, 2003, 3: 2393-2401.
- [14] Zhou H, Liu Y, Chui J, Guo K, Shun Q, Lu W, et al. Investigation on glycosylation patterns of proteins from human liver cancer cell lines based on the multiplexed proteomics technology [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2007, 459: 70-78.

[本文编辑] 尹 茶