

病毒感染蛋白质组学研究进展

孙金福^{1,2} 涂长春^{2*}

(1. 东北大学理学院生物技术研究 所 沈阳 110004)

(2. 军事医学科学院军事兽医研究所 长春 130062)

摘要: 病毒的侵入会导致宿主细胞蛋白表达模式的改变, 这种改变将影响宿主细胞的正常生理功能并决定病毒的致病进程和结果。因此, 病毒感染蛋白质组学研究有助于揭示病毒与宿主的相互作用机制和病毒的分子致病机制, 以及寻找病毒早期感染的分子标记、建立早期诊断方法、评价治疗效果和预后。本文介绍了病毒感染蛋白质组学研究技术、病毒诱导宿主细胞蛋白质组改变和病毒感染宿主血清差异蛋白质组等方面的研究进展。

关键词: 病毒, 感染, 蛋白质组学

Advances in Viral Infection Proteomics

SUN Jin-Fu^{1,2} TU Chang-Chun^{2*}

(1. Institute of Biotechnology, College of Science, Northeastern university, Shenyang 110004)

(2. Institute of Military Veterinary Research, Academy of Military Medical Sciences, Changchun 130062)

Abstract: Viral invasion will modify the patterns of host cell protein expression, which may affect the normal physiological function of host cell and determines viral pathogenic progress and consequence. Therefore, studies on viral infections proteomics contributes to uncover the mechanism of interaction between virus and host and viral molecular pathogenesis, found early biomarker of virus infection, develop earlier diagnostic method, evaluate therapeutic effect and prognosis and so on. In this paper, techniques of viral infection proteomics, the progress of changes of host cell proteome induced by virus, and serum differential proteome of host after viral infection were introduced.

Keywords: Virus, Infection, Proteomics

自 1994 年首次提出蛋白质组(proteomic)概念以来, 蛋白质组学技术已成为后基因组时代发现疾病相关蛋白、寻找早期诊断标记和揭示致病机制的有力工具^[1]。随着蛋白质组技术在病毒研究领域的应用, 病毒感染蛋白质组学应运而生, 方兴未艾。本文综述了病毒感染蛋白质组研究常用技术、病毒感染诱导宿主细胞蛋白质组改变以及病毒感染宿主血清

/血浆差异蛋白质组等 3 方面的研究进展。

1 病毒感染蛋白质组研究常用技术

病毒感染蛋白质组研究技术主要包括基于质谱鉴定的二维电泳(two-dimension electrophoresis, 2DE)、二维差异凝胶电泳(2D differential gel electrophoresis, 2D DIGE)分离技术、化学标记定量质谱

技术和基于蛋白芯片的表面增强激光解吸/离子化飞行时间质谱(Surface enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, SELDI-TOF MS)技术(图 1^[2] 显示了不同技术方法的主要流程)。2D DIGE^[3]克服了传统 2DE 存在的胶与胶之间的差异以及传统的银染等染色方法线性范围窄等缺陷, 提高了结果的重复性、准确性, 因此, 目前应用较多。常用的标记定量质谱技术包括体外标记 ICAT^[4] (isotope-coded affinity tag) 和体内标记 SILAC^[5] (stable isotope labeling by amino acids in cell culture)等技术, ICAT 技术是用轻、重两种试剂与蛋白质分子的半胱氨酸残基的-SH 基团反应, 标记不同蛋白样品。SILAC 技术主要是在培养细胞的介质中加入用稳定同位素标记的某一种必需氨基酸, 在细胞生长过程中掺入标记的氨基酸, 实现对不同样品蛋白质的标记。这些技术方法各有其优势和局限性, 联合使用可实现优势互补。与 ICAT 相比,

SILAC 技术省去了标记化学反应和分离纯化等繁琐步骤, 但只能用于体外培养细胞, 不能用于组织来源的蛋白质样品分析, ICAT 则不能检测没有半胱氨酸残基的蛋白质分子。2D DIGE 在检测极端分子量和等电点以及低丰度蛋白方面存在局限性, 但具有能够检测翻译后修饰的不同蛋白亚型的优势。ICAT 和 SILAC 两种技术虽在检测低丰度蛋白方面有强大优势, 但不能检测蛋白质的翻译后修饰亚型, 为了简化上述化学标记定量方法的繁琐性和消除因标记效率等因素造成的定量误差, 建立了无需样品标记(label-free)的液相色谱串联质谱定量蛋白质组新方法, 并在实践中陆续得到应用^[6,7]。

SELDI-TOF MS 技术是病毒感染血清蛋白质组分析最常用的方法之一^[8], 该技术能够快速、可重复地直接从样品(细胞裂解物或体液等)获得疾病特异的生物标记——蛋白/肽。

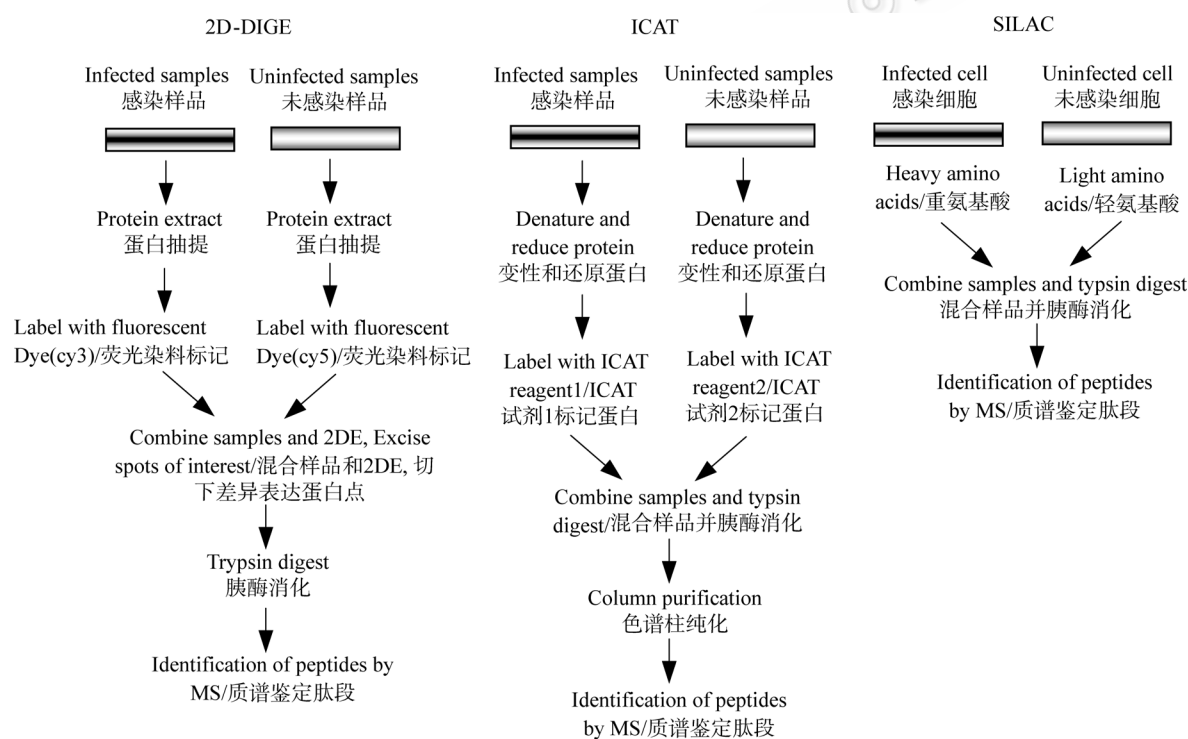


图 1 比较蛋白质组学方法^[2]

Fig. 1 Methods of comparative proteomics^[2]

2 病毒感染诱导宿主细胞蛋白质组变化

病毒成功实现对宿主细胞的感染并在细胞内复制需要克服细胞对病毒感染产生的各种免疫防卫反

应, 阻断或影响宿主细胞的正常循环机制, 利用宿主细胞的物质和能量合成病毒自身物质。这种相互作用最终会导致宿主细胞蛋白表达模式的改变, 这种改变影响着宿主细胞的正常生理功能, 决定和反

映着病毒感染致病的进程和结果。因此,开展病毒感染的宿主细胞蛋白质组变化研究将为揭示病毒与宿主细胞的相互作用机制、病毒的分子致病机制、寻找病毒的作用靶标等研究提供有意义的信息。

2.1 病毒感染对宿主细胞蛋白表达模式的影响

Mannová等^[9]用2DE、SILAC两种方法分析了丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染细胞Huh7的脂筏(lipid rafts)蛋白质组变化。两种方法共鉴定了189个差异表达蛋白,这些蛋白大多数与囊泡和蛋白运输以及细胞信号有关。用siRNA抑制上调表达蛋白RhoA、Rab9A、syntaxin 7、Bax和Cdc42的表达,分析其对HCV复制的影响。结果显示,抑制Cdc42和RhoA表达会提高HCV的复制,而抑制突触融合蛋白7(syntaxin 7)的表达会导致HCV复制的降低。抑制Rab9A和Bax的表达,对HCV复制没有影响。Jiang等^[10]在SARS冠状病毒(severe acute respiratory syndrome-associated Coronavirus, SARS-CoV)感染的vero E6细胞系鉴定了186个显著差异表达蛋白。西尼罗河病毒(West Nile virus, WNV)感染原代神经元细胞,诱导55个蛋白表达水平发生变化,其中的9种鉴定为凋亡相关蛋白^[11]。人获得性免疫缺陷病毒1型(human immunodeficiency virus type 1, HIV-1)LA1株感染CD4⁺CEMx174细胞系,在病毒产量高峰期,有687种蛋白的表达丰度发生变化,这些蛋白多数参与泛素化、核质运输、细胞循环等重要生命循环和代谢通路^[12]。

这些研究无一例外地显示了病毒感染诱导宿主细胞蛋白表达模式的改变,鉴定的诸多差异表达蛋白体现了病毒与宿主细胞相互作用的结果以及宿主细胞正常循环通路的改变,为进一步揭示病毒感染和致病机制提供了研究方向和研究素材。

2.2 揭示病毒的分子致病机制

根据病毒感染后宿主细胞差异表达蛋白谱,可以揭示病毒的可能致病机制。HIV-1的感染可致宿主CD4⁺T细胞减少,从而导致免疫缺陷综合征。但令人费解的是有一小部分CD4⁺T细胞长期存活而不凋亡,并持续生产完整的病毒粒子,这种持续感染机制尚不清楚。Mayte等^[13]发现HIV-1 Tat蛋白诱导T细胞的7种细胞骨架蛋白或与细胞骨架重组相关的蛋白下调表达,这些蛋白的下调表达使宿主细胞避免了细胞骨架的重组,保持了细胞的完整,从而抑

制了细胞凋亡,实现了HIV的持续性感染。

Dhingra V等^[14]发现,野生型狂犬病毒(Rabies virus, RV)感染能诱导与离子平衡有关的蛋白H⁺ATP酶和Na⁺/K⁺ATP酶上调表达,而Ca²⁺ATP酶下调表达,参与突触泡与突出前膜对接或融合的相关蛋白下调表达。这些蛋白的表达变化,导致细胞内Na⁺和Ca²⁺浓度降低和感染鼠的前联会积聚大量突出泡,而弱毒RV感染没有类似现象,这可能是野生型RV致神经机能障碍的机制。另外发现,弱毒RV感染介导凋亡相关蛋白上调表达,而野生型RV没有这种现象,这一发现解释了仅有弱毒RV感染才能诱导细胞凋亡的机制。

有必要指出,蛋白质功能数据库还很不完善,限制了对差异表达蛋白的功能注释。因此,仅仅依靠比较蛋白质组学方法鉴定的差异表达蛋白完全阐明病毒的致病机制是不现实的,在蛋白质组研究获得的大量信息基础上,还需结合其它技术方法进一步研究差异表达蛋白在病毒感染和致病机制中的具体作用。

2.3 寻找病毒的作用靶标

通过病毒感染亚细胞蛋白质组研究,可以筛选病毒作用于细胞的靶标蛋白。卡波西肉瘤相关疱疹病毒(Kaposi sarcoma-associated herpesvirus, KSHV)的K5蛋白,是病毒的免疫识别调节子,能够介导多种跨膜蛋白的下调或降解,并能够通过下调MHC等免疫相关分子抑制细胞毒性T淋巴细胞等免疫细胞的激活。Eric等^[15]为了寻找新的K5蛋白的作用靶标,用SILAC方法定量比较了表达和未表达K5蛋白的HeLa细胞的质膜、高尔基体和内质网膜蛋白质组差异,发现三种以前未知的膜蛋白在表达K5的细胞中一致性地下调,同时用其它方法验证了这些蛋白的下调与K5蛋白的相关性,从而证实这些蛋白也是K5调节细胞免疫功能的靶蛋白。发现病毒的作用靶标对抗病毒新型药物的开发具有重要意义,可以根据靶标的结构有的放矢地设计多肽类等抗病毒分子药物,阻断病毒对靶标的作用。

3 病毒感染宿主血清(血浆)蛋白质组

血清/血浆中含有机体各种组织、细胞产生的数千种蛋白,血清中蛋白的丰度、结构和功能的任何改变都预示着机体正常生理状态的改变或病理生理

状态的出现^[16]。因此,开展病毒感染的宿主血清蛋白质组研究,可以发现病毒感染生物标记、建立早期诊断方法、监控疾病进程、预测治疗效果等。

3.1 筛选生物标记(biomarker),建立早期诊断方法

目前,关于乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)、HCV 感染相关的肝癌血清蛋白质组的研究报道最多。He等^[17]发现HBV感染患者血清至少有 7 个蛋白(haptoglobin β/α chain, apolipoprotein A-1/A-, α 1 antitrypsin, transthyretin, DNA topoisomerase β)显著变化,其中载脂蛋白 A- 不同亚型表达水平的改变和 α 1 抗胰蛋白酶产生不同片断的独特现象是HBV感染特异的。Lee等^[18]发现 8900D 的补体 C3a 在慢性丙型肝炎和 HCV 相关的肝细胞癌患者血清中上调表达,而 HBV 相关的肝癌患者则没有这种现象,显示 C3a 是鉴别诊断 HBV 和 HCV 感染或相关肝癌的潜在生物标记。Steel等^[19]报道,在 HBV 感染和 HBV 相关的肝癌血清中补体 C3 的羧基端片段和载脂蛋白 A1 亚型特异性地下调表达。

除 2DE 技术外,SELDI 技术是病毒感染血清蛋白质组研究的最常用方法之一,多个研究小组利用 SELDI 技术进行了 SARS CoV 感染血清蛋白质组指纹的研究。Pang等^[20]在 SARS CoV 感染血清中发现了 2 个有价值的诊断标记——补体 C3c α 链 N 末端片段(m/z 28119)和纤维蛋白原 α -E 链内片段(m/z 5908),以 m/z 28119 蛋白峰为 SARS CoV 感染诊断标记,特异性和敏感性均为 97%, m/z 5908 的特异性和敏感性分别为 95% 和 100%。Kang等^[21]利用急性 SARS 患者血清中的 4 个差异表达蛋白峰作为变量建立了急性 SARS 血清蛋白质组指纹图谱诊断法——决策树分类算法。双盲试验显示,该诊断法鉴定急性 SARS 样品(发热症状出现后 7 d 内的 SARS 血清)的准确率为 97.3%(36/37),鉴定非 SARS 样品的准确率为 99.4%(987/993),鉴别 SARS 和流感发热病例的敏感性为 97.3%(36/37),特异性 100% (187/187, 60/60)。更有意义的是,这种诊断方法对发病后 1 d 的病例也能准确鉴定,真正实现了对 SARS CoV 感染的早期诊断,而用传统的免疫荧光和 ELISA 检测 SARS 病毒抗体的诊断方法要分别在发病后 10 d 和 21 d 才能准确检测。

由此可见,血清分子诊断标记在疾病亚型的鉴

别诊断和临床症状出现前的早期诊断方面较传统病理生理指标诊断方法具有显著优势。但是,目前在病毒感染血清蛋白质组研究中发现的诸多诊断生物标记以及建立的一些新型诊断方法,尚未见有应用于临床实践的报道,表明分子诊断标记和新型诊断方法从发现到临床应用是一个系统复杂的工作,还有必要进行大量的临床验证和风险评估。

3.2 预测和评价抗病毒治疗的效果

Paradis等^[22]对 96 例 HCV 感染患者进行干扰素和三氮唑核苷治疗,治疗结束后以能否在血清中检测到病毒 RNA 为指标将接受治疗的患者分为对治疗无反应组和持续反应组。血清蛋白质组分析显示,持续反应组患者在治疗前后有 37 个蛋白峰变化显著(16 个上调,21 个下调),而无反应的患者只有 1 个蛋白峰变化。比较分析持续反应组和无反应组患者接受治疗前的血清蛋白质组,发现有 6 个显著差异蛋白峰,其中 4 个蛋白在无反应组上调表达,2 个在持续反应组上调表达,利用这 6 个特征蛋白峰可以将 80% 的患者准确地预测为对治疗有反应和无反应患者,预测的敏感性为 81%,特异性为 80%。如果将感染病毒的基因型(1 vs non-1)、肝脏纤维化分期(F0-2 vs F3-4)和 2 个特征蛋白峰(cM32835.1、qM36764.2)作为变量,预测对治疗有反应患者的准确率为 89%。

这一研究显示,根据不同个体病例的血清/血浆蛋白质组特异性及其变化动力学,可以成功预测和评估不同个体病例对抗病毒治疗的反应,这将使发展有针对性的、可预后的个性化抗病毒治疗成为可能。

4 问题与展望

虽然病毒感染蛋白质组研究鉴定了大量差异表达蛋白,为揭示病毒与宿主相互作用机制和病毒的分子致病机制提供了大量信息,但是,大多数研究尚停留在差异表达蛋白的鉴定水平,对于差异表达蛋白在病毒的感染和致病机制中的具体作用还有待解释。因此,病毒感染蛋白质组研究仅仅是病毒和宿主相互作用研究的开始,而不是终点,在蛋白质组研究获得的信息基础上,结合其他的技术手段确定差异表达蛋白在病毒感染和致病机制中的具体作用将是病毒感染蛋白质组学研究的重点及难点。另

外,关于病毒感染蛋白质组研究的靶细胞大多是体外感染细胞,体外感染细胞存在不能完全反映在宿主体内免疫和各种生理条件下病毒和宿主细胞的相互作用机制的缺陷,所以病毒感染的体内靶细胞蛋白质组研究有待加强。

蛋白质组技术的应用为病毒感染和致病机制的研究提供了强有力的高通量扫描工具,必将加快和促进病毒致病机制的研究。为了提高对低丰度蛋白的检测能力和研究病毒特定蛋白在致病机制中的作用,病毒感染宿主细胞亚单位蛋白质组和病毒特定蛋白诱导宿主细胞或细胞亚单位蛋白质组改变的研究将是未来的发展方向。

参 考 文 献

- [1] Hanash S. Disease proteomics. *Nature*, 2003, **422**: 226–232.
- [2] Maxwell KL, Frappier L. Viral proteomics. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2007, **71**(2): 398–411.
- [3] Unlu M, Morgan ME, Minden JS. Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis*, 1997, **18**: 2071–2077.
- [4] Gygi SP, Rist B, Gerber SA, *et al.* Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol*, 1999, **17**: 994–999.
- [5] Ong SE, Blagoev B, Kratchmarova I, *et al.* Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics*, 2002, **1**: 376–386.
- [6] Ono M, Shitashige M, Honda K, *et al.* Label-free quantitative proteomics using large peptide data sets generated by nanoflow liquid chromatography and mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*, 2006, **5**(7): 1338–1347.
- [7] Cutillas PR, Vanhaesebroeck B. Quantitative profile of five murine core proteomes using label-free functional proteomics. *Mol Cell Proteomics*, 2007, **6**(9): 1560–1573.
- [8] Issaq HJ, Veenstra TD, Conrads TP, *et al.* The SELDI-TOF MS approach to proteomics: protein profiling and biomarker identification. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, **292**(3): 587–592.
- [9] Mannová P, Fang R, Wang H, *et al.* Modification of host lipid raft proteome upon hepatitis C virus replication. *Mol Cell Proteomics*, 2006, **5**(12): 2319–2325.
- [10] Jiang XS, Tang LY, Dai J, *et al.* Quantitative analysis of severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus-infected cells using proteomic approaches. *Mol Cell Proteomics*, 2005, **4**: 902–913.
- [11] Dhingra V, Li Q, Allison AB, *et al.* Proteomic profiling and neurodegeneration in west-nile-virus-infected neurons. *J Biomed Biotechnol*, 2005, **3**: 271–279.
- [12] Chan EY, Qian WJ, Diamond DL, *et al.* Quantitative analysis of human immunodeficiency virus type 1-infected CD4+ cell proteome: Dysregulated cell cycle progression and nuclear transport coincide with robust virus production. *J Virol*, 2007, **81**(14): 7571–7583.
- [13] Mayte C, Emilio C, Tomás U, *et al.* Modifications in the human T cell proteome induced by intracellular HIV-1 Tat protein expression. *Proteomics*, 2006, **6**: 63–73.
- [14] Dhingra V, Li X, Liu Y, *et al.* Proteomic profiling reveals that rabies virus infection results in differential expression of host proteins involved in ion homeostasis and synaptic physiology in the central nervous system. *J Neurovirol*, 2007, **13**(2): 107–117.
- [15] Barteel E, McCormack A, Früh K. Quantitative membrane proteomics reveals new cellular targets of viral immune modulators. *Plos Pathog*, 2006, **2**(10): 0975–0988.
- [16] Issaq HJ, Xiao Z, Veenstra TD. Serum and plasma proteomics. *Chem Rev*, 2007, **107**(8): 3601–3620.
- [17] He QY, George KKL, Zhou Y, *et al.* Serum biomarkers of hepatitis B virus infected liver inflammation: A proteomics study. *Proteomics*, 2003, **3**: 666–674.
- [18] Lee IN, Chen CH, Sheu JC, *et al.* Identification of complement C3a as a candidate biomarker in human chronic hepatitis C and HCV-related hepatocellular carcinoma using a proteomics approach. *Proteomics*, 2006, **6**: 2865–2873.
- [19] Steel LF, Shumpert D, Michael T, *et al.* A strategy for the comparative analysis of serum proteomes for the discovery of biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Proteomics*, 2003, **3**: 601–609.
- [20] Pang RT, Poon TC, Chan KC, *et al.* Serum proteomic fingerprints of adult patients with severe acute respiratory syndrome. *Clin Chem*, 2006, **52**(3): 421–429.
- [21] Kang XX, Xu Y, Wu XY, *et al.* Proteomic fingerprint for potential application to early diagnosis of severe acute respiratory syndrome. *Clin Chem*, 2005, **51**: 56–64.
- [22] Paradis V, Asselah T, Dargere D, *et al.* Serum proteome to predict virologic response in patients with hepatitis C treated by pegylated interferon plus ribavirin. *Gastroenterology*, 2006, **130**(7): 2189–2197.