

细胞因子诱导外周血单个核细胞的转录和蛋白表达研究

魏传钰[#] 刘运洪[#] 庞伟 孟明耀 解燕华 薛莎 侯宗柳^{*}

(昆明医科大学附属延安医院, 昆明 650051)

摘要 采用干扰素- γ 、抗CD3单克隆抗体和IL-2体外诱导扩增外周血单个核细胞成为CIK细胞, 并于诱导培养前及培养第15 d时分别收集细胞样本。在对培养前后细胞的增殖、形态及表面标志变化检测的同时, 提取总蛋白进行定量、双向电泳和银染。利用ImageMasterTM软件对培养前后表达相同和不同的蛋白质点进行分析, 并选择其中24个蛋白质点进行质谱鉴定。对于部分培养前后具有代表性的蛋白, 进一步采用qPCR技术分析其的转录情况。结果表明, 培养前后细胞的蛋白质组学特征是完全不同的, 相同表达蛋白点主要与基因的转录因子和细胞骨架相关, 诱导后特异表达蛋白主要与细胞生长、增殖相关。虽然在转录与蛋白水平上呈现出部分负相关现象, 由于蛋白质组才是基因表达的最终形式, 结合蛋白差异研究结果提示, 经细胞因子诱导后, CIK细胞的大量扩增与细胞内蛋白表达改变相关。

关键词 CIK细胞; 诱导培养; 蛋白质谱; qPCR

Study on Differences in Proteome and Transcriptome of Peripheral Blood Mononuclear Cells Induced by Cytokines

Wei Chuanyu, Liu Yunhong, Pang Wei, Meng Mingyao, Xie Yanhua, Xue Sha, Hou Zongliu^{*}

(Yan'an Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650051, China)

Abstract We added Interferon- γ , anti-CD3 monoclonal antibody and IL-2 into culture medium in order to induce amplification of peripheral blood mononuclear cells into CIK cells, then collected cell samples before the induction culture and at 15 days of culture. The total proteins were extracted for cell counting, two-dimensional electrophoresis and silver staining as well as shape observation and cell surface markers were detected before and after culture. Then, the expression of different protein spots were analyzed by ImageMasterTM software to analyze different proteins spots which were expressed the same or different before and after culture. There were 24 protein spots selected and mass spectrum identification. The representative proteins collected before and after culture were analyzed of their transcription by qPCR technology. The results showed that the proteomics characteristics of the cells before and after culture were completely different, for same expression of the protein spots, they mainly related to gene transcription factors and cytoskeleton. Meanwhile, specific proteins expressed after induction mainly relate to cell growth and proliferation. Though a negative correlation phenomenon is shown on the level of tran-

收稿日期: 2013-05-22 接受日期: 2013-09-13

云南省科技厅-昆明医学院联合基金项目(批准号: 2010CD211)资助的课题

[#]共同第一作者

^{*}通讯作者。Tel: 0871-63211157, E-mail: hzl579@163.com

Received: May 22, 2013 Accepted: September 13, 2013

This work was supported by the Foundation of Yunnan Science and Technology Department-Kunming Medical College Joint Project (Grant No.2010CD211)

[#]These authors contributed equally to this work

^{*}Corresponding author. Tel: +86-871-63211157, E-mail: hzl579@163.com

网络出版时间: 2013-11-12 12:43

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20131112.1243.005.html>

scription and protein-binding, the proteome is the final form of the gene expression. Therefore, protein differences in results suggested that induced by the cytokines, heavy amplification of CIK cells was associated with its intracellular protein expression changes.

Key words CIK cells; induced culture; protein mass spectrum; qPCR

细胞因子诱导杀伤性细胞(cytokine-induced killer cells, CIK)是一种新型的广谱抗肿瘤免疫活性细胞,最早于1986年被人们从外周血单个核细胞在体外用IFN- γ 、抗人的CD3⁺抗体、IL-2等多种细胞因子诱导出来所获得的一群异质细胞,其主要细胞成分为CD3⁺CD56⁺细胞和CD3⁺CD8⁺细胞,由于其细胞群表面主要表达CD3和CD56两种膜蛋白分子,在细胞表型特征上兼有NK细胞和T细胞的特征,故又称为NK细胞样T淋巴细胞^[1]。功能方面,CIK一方面拥有T淋巴细胞强大的抗肿瘤活性,另一方面还拥有NK细胞非MHC限制性的杀伤肿瘤的特点,与其他过继性免疫治疗细胞相比,具有增殖速度快、杀瘤活性高、杀瘤谱广等优点且对正常造血影响轻微。关于CIK细胞的杀瘤机制,目前主要有以下几点认识:(1) CIK细胞能够释放IL-2、IL-4、TNF- α 、GM-CSF及IFN- γ 等大量炎性细胞因子,这些炎性细胞因子在直接抑制肿瘤细胞的同时,还通过调节机体免疫系统反应,对肿瘤细胞产生间接的杀伤作用^[2]。(2) CIK细胞可以释放胞浆颗粒进入细胞外间隔,颗粒内物质通过两条不同途径对靶细胞产生直接的杀伤作用^[3]。(3) CIK细胞可以高表达*Bcl-2*、*survivin*、*Bcl-xL*、*DAD1*等抗凋亡基因,并通过这些基因的共同作用耐受由肿瘤细胞诱导表达的*FasL*基因的凋亡,从而发挥对肿瘤细胞有效的杀伤^[4]。多项临床研究显示,CIK细胞对急性髓系白血病、肺癌、胃癌、肝癌、乳腺癌、肠癌和食道癌等多种恶性肿瘤均有一定的疗效^[5-6]。然而,目前对CIK细胞内特异蛋白及其信号通路的研究较少。在本研究中,我们运用蛋白组学方法,比较诱导培养前后蛋白表达的差异,并选取部分代表性蛋白在转录水平上的mRNA进行检测,为研究CIK细胞抗癌作用的分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

经知情同意后,抽取本实验室3个健康个体(HIV、HBV、HCV和梅毒检测均为阴性)外周血40 mL/人,进行外周血单个核细胞的分离。

1.2 试剂、仪器及软件

试剂: rhIL2(江苏金丝利有限公司), CD3McAb(北京四正柏生物科技有限公司), rhIFN- γ 、ACRY-MIDE、BIS、APS(Sigma), SDS、GLYCINE、TRIS(Amresco), α -MEM培养液(Hyclone), 小牛血清(GibcoBRL), 胰蛋白酶(Roche), TEMED(BIO-RAD), 考马斯亮蓝(R-350)(AM-ERSHAM), 2D-Quant蛋白定量试剂盒(GE healthcare), 无水乙醇、乙酸、GLYCEROL(西陇化工股份有限公司)。

仪器: HPLC Grad ACN (Baker), 冷冻离心机(BECKMAN), 冷冻真空仪(LABCONCO), 析天平(Mettler Toledo ALI 04), 电聚焦仪IPGphorII(Amersham), 纯水装置(Millipore), 冷却水循环系统(用于电泳冷却, Cole-Parmer), Imagescanner(UMAX), Bruker autoflex tof/tof II质谱仪, 脱色摇床、水平摇床、超声细胞破碎仪(国产)。

软件: ImageMaster™ 2D Platinum 7.0图谱分析软件(GE healthcare)。

1.3 实验方法

1.3.1 诱导前后细胞的样品制备 将抽取的40 mL外周血与生理盐水等体积混匀,然后缓慢地铺在等体积的分离液上,以2 000 r/min离心20 min收集白膜层,用生理盐水洗涤2~3次,然后2 300 r/min离心10 min。3 h后PBMC贴壁,收集其中的未贴壁细胞,分为两部分:一部分用生理盐水洗涤3次,计数后取 1×10^6 细胞于-70 °C冻存备用,为诱导前细胞样本;另一部分用1640培养液10 mL重悬,移至75 cm T型培养瓶中。0时刻加入rh-IFN- γ 1 000 U/mL终浓度,37 °C、5% CO₂、饱和湿度条件下培养过夜。24 h后加50 ng/mL CD3 McAb和终浓度为500 U/mL的IL-2,隔日加入含IL-2的新鲜培养基,于14 d后收获细胞,用生理盐水洗涤3次,计数后取 1×10^6 个细胞于-70 °C冻存备用,为诱导后CIK细胞样本^[7]。

1.3.2 诱导前后细胞数量、形态观察及效应细胞表面标志测定 取0 d、诱导培养7, 9, 11, 13 d的细胞悬液,台盼蓝染色后,用血细胞计数仪进行计数,并动态观察细胞形态对改变。另外,对诱导前后细胞中CD3⁺CD56⁺细胞和CD3⁺CD8⁺细胞的比例进行测试。

定。取诱导前、后细胞悬液50 μL (1×10^5 细胞), 分别加入荧光标记抗体10 μL , 振荡混匀后25 $^{\circ}\text{C}$ 避光20 min, 振荡混匀, 2 000 r/min离心5 min, 去上清, 再加入500 μL 的PBS使细胞重悬, 上机检测。上机前以标准微球和FACSCOMP软件校正流式细胞仪, 再利用CellQuest软件进行双参数数据获取和分析, 激光光源为15 mW的氩离子激光, 波长为488 nm, 计数 5×10^3 细胞, 每个标本用同型抗体作阴性对照, 检测各细胞表型的阳性表达率。

1.3.3 细胞样品的处理和双向电泳 3×10^5 诱导前或诱导后的CIK细胞加入1 mL的冰预冷提取缓冲液中(含50 mmol/L Tris-HCl, pH8.5; 5 mmol/L EDTA; 100 mmol/L KCl; 1% w/v DTT或2% v/v B-巯基乙醇; 30%蔗糖)超声破碎至溶液无明显混浊。加入等体积的Tris饱和酚(pH8.0), 4 $^{\circ}\text{C}$ 混匀15 min, 6 000 r/min离心3 min取上清, 用4倍体积的冰预冷的含0.1 mol/L醋酸胺的甲醇溶液沉淀蛋白, 2 h后用冰预冷的丙酮洗2~3遍; 充分干燥; 加入双向电泳的裂解缓冲液, 超声10 min, 12 000 r/min离心5 min, 保留上清。蛋白定量后, 取120 μg 样品进行双向电泳: 第一向(IPG-IEF)根据蛋白质等电点的不同进行固相pH梯度(pH3~10)等电聚焦电泳, 第二向根据蛋白质相对分子质量大小进行垂直平板SDS-PAGE电泳(T=13%)分离样品。取出胶块后进行银染。

1.3.4 图像分析和差异蛋白选取 将银染后的二维凝胶图用imagescanner扫描入电脑。应用ImageMaster™ 2D platinum 7.0软件分析每一张凝胶图像, 将细胞诱导前组(3例)与诱导后组(3例)的6张二维凝胶图谱进行匹配; 设置蛋白点参数Smooth=10, Saliency=2, Min Area=5; 寻找不同组别间相同和不同的蛋白质点, 并计算相同点蛋白质相对含量。同时进行Student's检测及Mann-Whitney U检测统计学差异($P < 0.05$)。由于每个组别重复3次, 可获得3张平行的二维凝胶图谱, 在本研究中, 我们选取同一样品蛋白斑点较清晰的1张图谱进行后续质谱分析。

1.3.5 酶解和质谱鉴定 选择性切取诱导前后有效的相同或差异蛋白质点并酶解, 置于0.5 mL小管中, 在胶上进行酶解。酶解得到的肽段取0.5~1 μL 板上, 干燥后上样于Bruker autoflex tof/tof II质谱仪进行鉴定。得到碎片(fragment)信息通过在线网站<http://www.matrixscience.com/>进行数据库检索, 得出蛋白质名称、等电点(PI)、相对分子质量(MW)以及

蛋白质序列等详细信息。蛋白质分值 >64 为差异有统计学意义($P < 0.05$), 串联质谱图分数 >36 为差异有统计学意义($P < 0.05$)。

1.3.6 RNA的提取及qPCR分析 按Trizol试剂盒操作手册分别提取诱导培养前、后细胞的总RNA, oligdT逆转录为cDNA。设计引物(由华大基因公司合成)分别对部分诱导前、后蛋白表达无差异、诱导前特异表达及诱导后特异表达的目的蛋白相应基因进行qPCR扩增(表1)。PCR扩增参数: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min, 1个循环; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 59 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 35个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 1个循环。以 β -actin为内参基因, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法进行相对表达量的计算。

1.3.7 统计学分析 采用SPSS 15.0软件进行统计学分析, 所有计量资料采用mean $\pm$ S.D.表示。所有离散资料均用卡方检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 诱导前、后细胞数量、形态观察及免疫表型测定

通过在培养过程中动态观察我们发现, 细胞在培养1~7 d增殖较慢, 第7~13 d增殖较快, 其数量较第0 d时增殖了约80倍(图1A)。形态学方面, 培养10 d时体系中出现较多的集落状细胞, 大部分细胞为形态相似的幼稚淋巴样细胞; 培养至15 d时, 细胞体积明显增大, 包浆丰富, 形态大多变为葵花子型(图2)。对细胞免疫表型测定后发现, $\text{CD}3^+ \text{CD}56^+$ 细胞比例从培养前的(4.67 $\pm$ 2.10)%, 至第15 d时已增至达到(62.60 $\pm$ 2.86)%, 呈现出显著性差异($P < 0.05$); $\text{CD}3^+ \text{CD}8^+$ 细胞比例培养前的(28.51 $\pm$ 7.02)%, 至第15 d时明显上升至(76.10 $\pm$ 8.03)%, 也呈现出显著性差异($P < 0.05$)(图1B和图3)。

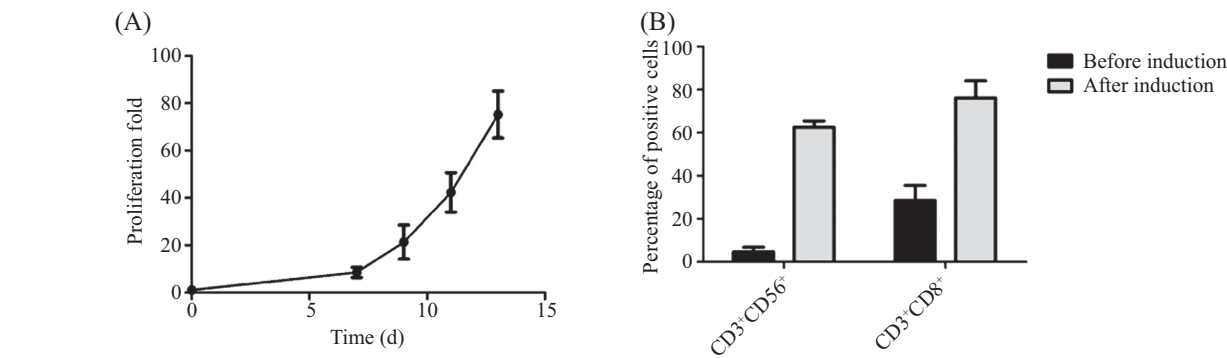
2.2 二维电泳图谱及比较分析

分别建立了良好重复性的细胞诱导前、后样品的二维电泳图谱: 经ImageMaster™ 2D platinum 7.0软件分析, 同一样品的3张二维电泳图谱匹配率均在75%以上, 说明获得的图谱具有良好的重复性。与内标匹配分析后, 细胞诱导前获得257个蛋白点, 诱导后获得279个蛋白点。其中, 两组中表达相同的蛋白质点74个, 各只占诱导前、后蛋白点量的29%和27%。在这74个点中, 表达量有统计学差异的点有32个: 诱导后表达量上调的点有18个; 表达量下调的点有14个。除了这74个点外, 其余的点为两组各自

表1 七个基因mRNA扩增引物序列信息

Table 1 The sequences of seven genes' mRNA amplification primers

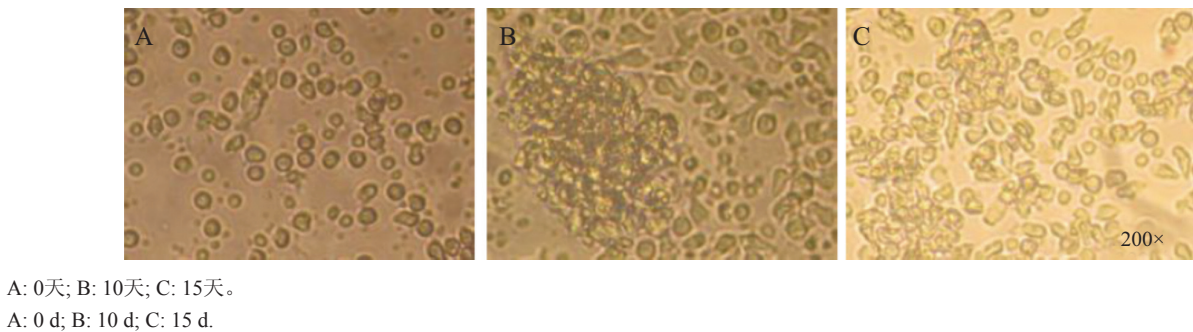
基因名称 Gene name	上游引物(5'→3') Sense primer(5'→3')	下游引物(5'→3') Anti-sense primer(5'→3')	片段大小 Size of fragments
<i>UNG</i>	ACG CTG TCC TCA CGG TTC G	CAT GGT GCC GCT TCC TAT CA	177 bp
<i>ENO1</i>	GTC TAT CGA AGA TCC CTT TGA CC	TTG ACT TTG AGC AGG AGG CAG	165 bp
<i>FGG</i>	GTA GCC CAG CTT GAA GCA CAG T	CCA TCC ATT TCC AGA CCC ATC	192 bp
<i>ANXA1</i>	AAG GGT GAC CGA TCT GAG GAC	AAC ACT CTG CGA AGT TGT GGA TAG	158 bp
<i>ACTG1</i>	GCT AAG GTA AGA ACG TGC TTG TG	AAA CTG GGT CCT ACG GCT TG	196 bp
<i>PSME1</i>	AGC GGA AGA AAC AGC AGG AGA	CCA GGT GGT GAC CAG GTT GA	176 bp
<i>ACTB</i>	CGG GAA ATC GTG CGT GAC	TGG AAG GTG GAC AGC GAG G	434 bp



A: 培养过程中细胞增殖情况; B: 诱导前后效应细胞表型的改变。
A: proliferation during cell culture; B: the change of effector cell phenotypes before and after induction.

图1 诱导前后细胞增殖及免疫表型改变

Fig.1 Cell proliferation and change of immunotypes before and after induction



A: 0天; B: 10天; C: 15天。
A: 0 d; B: 10 d; C: 15 d.

图2 倒置显微镜观察培养过程中细胞形态的变化

Fig.2 Changes of cells morphology observed under inverted microscope during culture process

组别特异的蛋白质。这说明外周血单核细胞经诱导后, 蛋白表达谱发生了重大的改变。

2.3 部分蛋白的质谱鉴定

由于细胞诱导前、后表达的蛋白较多, 我们选择了其中5个在诱导前、后表达量无统计学差异的蛋白点(1~5)、8个CIK细胞诱导前特异表达的蛋白点(6~13)、11个CIK细胞诱导后特异表达的蛋白点

(14~24)进行酶解质谱分析(图4)。其中, 有6个蛋白质点在蛋白库中未找到相匹配的蛋白质, 分别为9、10、15、17、18、21; 18个点找到匹配蛋白质, 共鉴定出15个蛋白(表2)。

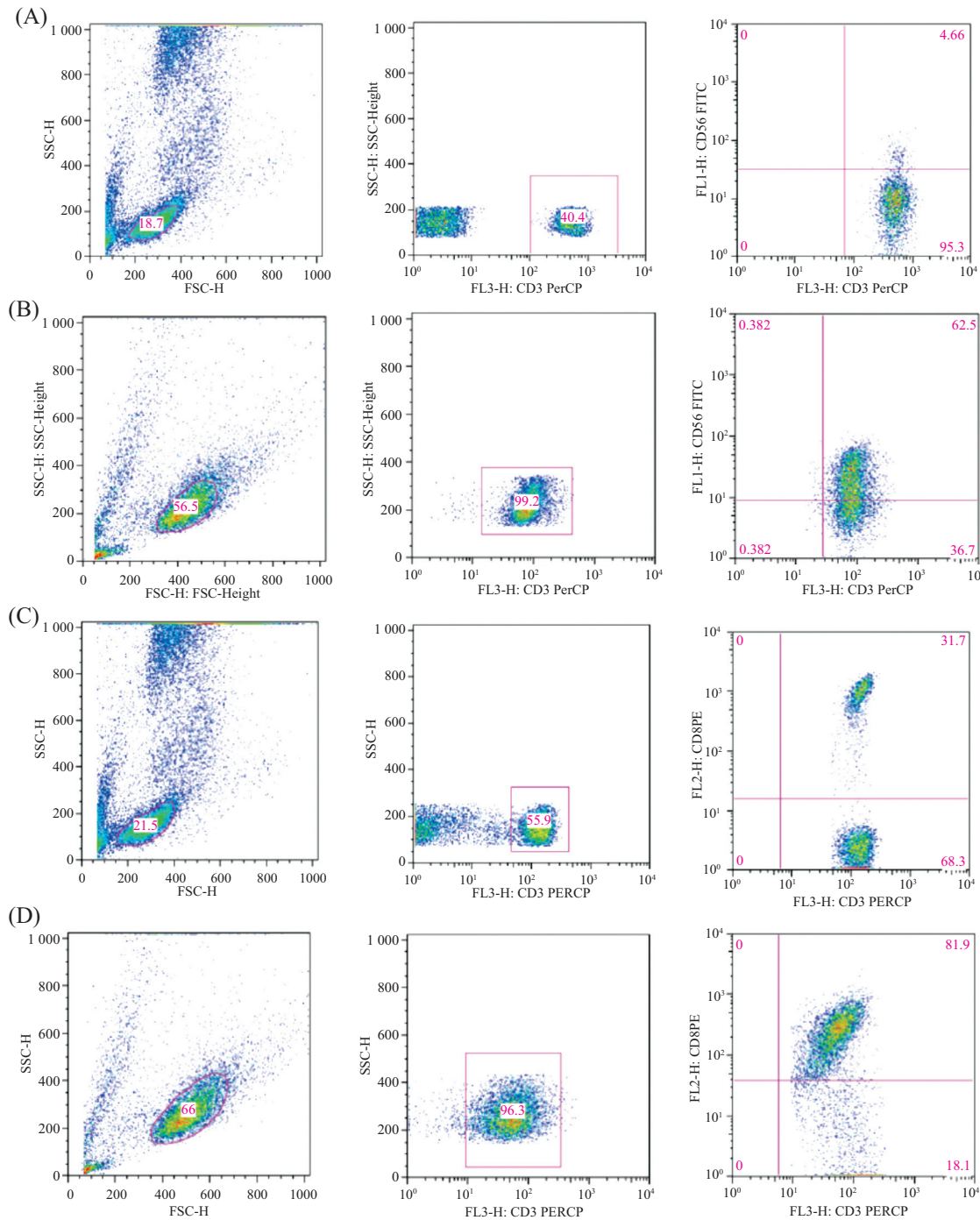
2.4 部分蛋白基因qPCR结果

*FGG*基因mRNA的表达在培养前高于培养后, *ACTG-1*、*PSME-1*的表达在培养前低于培养后, 这

表2 细胞诱导前后部分蛋白质质谱鉴定结果

Table 2 Identification results of part of protein in cells before and after induction

蛋白点 Protein spots	蛋白名称 Name of proteins	基因名称 Name of genes	登记号 Register number	相对分子量 Relative molecular weight	等电点 PI	可信值(%) CI(%)
Proteins of same expression level before and after induction						
1	uracil DNA glycosylase [<i>Homo sapiens</i>]	<i>UNG</i>	gi 35053	35 698	8.22	97.21
2	chain A, Cyclophilin A complexed with dipeptide Gly-Pro	<i>PPIA</i>	gi 1633054	18 098	7.82	89.45
3	protein disulfide-isomerase precursor [<i>Homo sapiens</i>]	<i>P4HB</i>	gi 20070125	57 480	4.76	91.34
4	myosin light polypeptide 6 isoform 1 [<i>Homo sapiens</i>]	<i>MYL6</i>	gi 17986258	17 090	4.56	89.56
5	chain A, crystal structure of human enolase 1	<i>ENO1</i>	gi 203282367	47 350	6.99	92.62
Proteins of specific expression before induction						
6	fibrinogen gamma chain, isoform CRA_j [<i>Homo sapiens</i>]	<i>FGG</i>	gi 119625320	48 277	6.02	81.21
7	chain C, crystal structure of human fibrinogen	<i>FIBCD1</i>	gi 237823916	47 009	5.54	87.34
8	PREDICTED: similar to Cofilin-1 (Cofilin, non-muscle isoform) (18 kDa phosphoprotein) (p18) isoform 2 [<i>Canis familiaris</i>]	<i>CFL1</i>	gi 73983054	17 029	8.54	85.32
11	fibrin beta	<i>FGB</i>	gi 223002	51 358	7.95	89.45
12	chain B, crystal structure of human fibrinogen	<i>FICCD1</i>	gi 237823915	52 908	7.14	84.45
13	annexin A1 [<i>Homo sapiens</i>]	<i>ANXA1</i>	gi 4502101	38 918	6.57	83.21
Proteins of specific expression after induction						
14	chain A, human L-lactate dehydrogenase H Chain, ternary complex with Nadh and Oxamate	<i>LDHA</i>	gi 13786847	36 769	5.72	80.32
16	chain A, phosphorylation independent interactions between 14-3-3 and exoenzyme S: from structure to pathogenesis	<i>EXS</i>	gi 161172138	26 439	5	75.78
19	ACTG1 protein [<i>Homo sapiens</i>]	<i>ACTG1</i>	gi 40226101	29 678	5.5	71.05
20	unnamed protein product [<i>Homo sapiens</i>]	-	gi 193785062	28 478	5.2	89.03
22	proteasome activator complex subunit 1 isoform 1 [<i>Homo sapiens</i>]	<i>PSME1</i>	gi 5453990	28 876	5.78	91.20
23	gamma-actin [<i>Homo sapiens</i>]	<i>ACTG</i>	gi 178045	26 147	5.65	80.45
24	PREDICTED: actin, cytoplasmic 2-like isoform 3 [<i>Pongo abelii</i>]	<i>ACTB</i>	gi 297702014	40 116	5.23	75.23



A: 诱导前CD3⁺CD56⁺检测流式图; B: 诱导后CD3⁺CD56⁺检测流式图; C: 诱导前CD3⁺CD8⁺检测流式图; D: 诱导后CD3⁺CD8⁺检测流式图。

A: flow cytometry scatter plot of CD3⁺CD56⁺ before induction; B: flow cytometry scatter plot of CD3⁺CD56⁺ after induction; C: flow cytometry scatter plot of CD3⁺CD8⁺ before induction; D: flow cytometry scatter plot of CD3⁺CD8⁺ after induction.

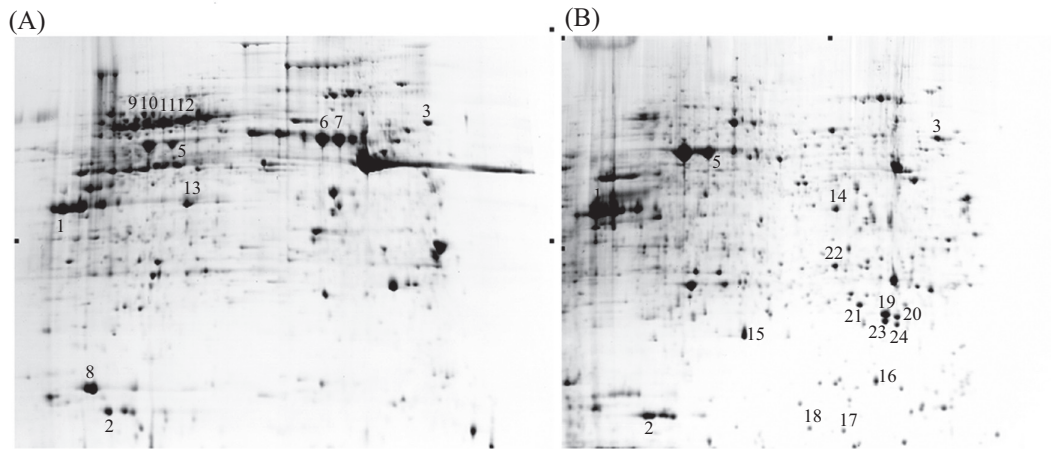
图3 诱导前后效应细胞表型的改变

Fig.3 The change of effector cell phenotypes before and after induction

与蛋白表达水平呈现出一致性。此外, 在蛋白水平培养前后无差异的*UNG*及*ENO1*的mRNA水平在诱导培养后明显高于培养前, 而*ANXA-1*的mRNA则表现出相反的结果, 即培养前表达低于培养后(表3和图5)。

3 讨论

CIK 细胞是一种新型免疫活性细胞, 是将人外周血单个核细胞在体外经多种细胞因子共同培养后获得的具有高效溶解毒性的T细胞, 该细胞在诱导前主要为未贴壁的外周血单个核细胞, 经细胞因子诱

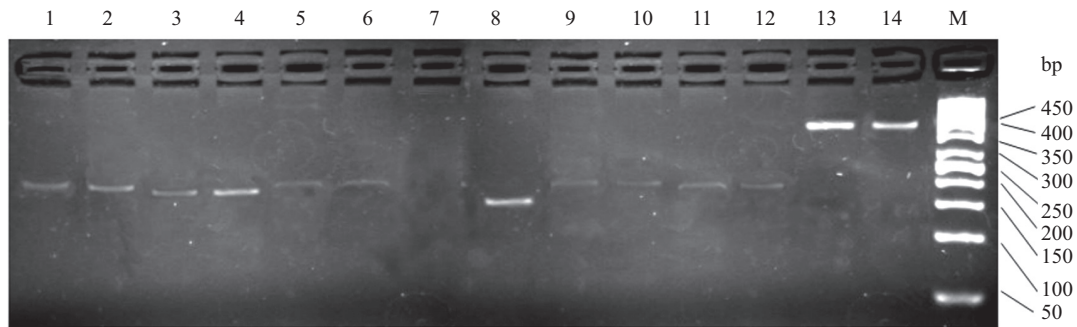


A: 诱导前的外周血单个核细胞; B: 诱导后的CIK细胞, 1~24为选择进行质谱分析的蛋白点。1~5为诱导前后CIK细胞都表达无统计学差异的蛋白; 6~13为诱导前CIK细胞特异表达的蛋白; 14~24为诱导后CIK细胞特异表达的蛋白。

A: peripheral blood mononuclear cells before induction; B: CIK cells after induction. 1~24 protein spots were selected to do mass spectrum identification. 1~5: proteins of same expression level before and after induction; 6~13: proteins of specific expression before induction; 14~24: proteins of specific expression after induction.

图4 细胞诱导前后的二维电泳图

Fig.4 2D electrophoresis of protein in cells before and after induction



1、3、5、7、9、11、13为诱导前的细胞*UNG*、*ENO1*、*FGG*、*ANXA1*、*ACTG1*、*PSME1*及*ACTB*扩增电泳图; 2、4、6、8、10、12、14为诱导后的细胞*UNG*、*ENO1*、*FGG*、*ANXA1*、*ACTG1*、*PSME1*及*ACTB*扩增电泳图; M: DL1500 bp ladder。

1, 3, 5, 7, 9, 11, 13: amplification electrophoretogram of *UNG*, *ENO1*, *FGG*, *ANXA1*, *ACTG1*, *PSME1* and *ACTB* genes in cells before induction; 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14: amplification electrophoretogram of *UNG*, *ENO1*, *FGG*, *ANXA1*, *ACTG1*, *PSME1* and *ACTB* genes in cells after induction; M: DL1500 bp ladder.

图5 细胞诱导前后的7个基因扩增电泳图

Fig.5 Amplification electrophoretogram of 7 genes in cells before and after induction

诱导后细胞在数量及表型方面都将发生很大变化: 一般在培养2周后, 细胞数量可增长30~100多倍^[8], 其主要细胞成分为CD3⁺CD56⁺细胞、CD3⁺CD8⁺细胞、抗原特异性CTL细胞和Th1细胞。其中, 最主要的效应细胞CD3⁺CD56⁺NKT细胞, 可扩增10~1 000倍左右^[9-11]。这种细胞数量的剧增和类群的改变必然是细胞内某些信号通路的激活, 特异性蛋白表达上调所导致的结果。本研究小组前期研究不同效靶比下细胞毒活性实验的结果表明, 效靶比为10:1时对肿瘤细胞SPC-A-1和BGC-823的杀瘤活性分别为68.28±13.82和75.45±18.65, 20:1时的杀瘤活性分别为

表3 细胞诱导培养前、后部分基因mRNA相对表达量
2^{-ΔΔCt}值(mean±S.D.)

Table 3 Partial genes mRNA relative expression level of cells before and after induction

基因	培养前	培养后
Gene	Before induction	After induction
<i>UNG</i>	1	652.57±28.30*
<i>ENO1</i>	1	76.63±10.34*
<i>FGG</i>	1	0.03±0.01*
<i>ANXA1</i>	1	1 305.15±58.67*
<i>ACTG1</i>	1	84.44±14.69*
<i>PSME1</i>	1	78.79±11.65*

*P<0.05.

81.98±11.95和85.10±14.45。明显可以看出, 随着效靶比的增高, 效应细胞的细胞毒作用明显增强^[12]。

而在本研究中我们发现, 在诱导前、后两组细胞的总蛋白点中, 完全不同的蛋白点竟占了诱导前总蛋白点的71%, 诱导后总蛋白的73%。该结果充分说明了经细胞因子诱导培养后, CIK细胞已经彻底脱胎换骨, 变成了另外一个细胞类群的集合了。这和以前大量的细胞学研究认为诱导后的CIK细胞大量扩增和细胞类群迅速变化是吻合的。由于诱导前、后细胞相同表达的蛋白点比例较少, 本研究选择了3类蛋白中的部分蛋白点作进一步的质谱分析, 选取了其中24个蛋白做质谱分析并鉴定出的15个蛋白。(1)诱导前、后细胞共同表达的蛋白主要是细胞组成性酶和蛋白, 在维持细胞的正常生理状态中必不可少。如尿嘧啶DNA转葡萄糖酶(uracil DNA glycosylase)是细胞内的组成性酶, 它能够催化DNA双链脱嘧啶, 在DNA修复、细胞生长、凋亡中起重要的作用^[13]; 亲环素A(cyclophilin A)是一种在细胞内广泛存在、高度保守的蛋白质, 具有肽酰脯氨酰顺反异构酶活性(peptidylprolylcis transisomerase, PPIase), 它参与蛋白质折叠、组装与运输, 在胞内能与环孢素A(cyclosporine A, CsA)结合, 具有免疫抑制的作用, 还可参与胆固醇转运, 具有前炎症因子的功能, 并在信号传导中发挥重要作用^[14-15]。蛋白二硫化物异构酶前体(protein disulfide-isomerase precursor)是一种重要的分子伴侣, 参与蛋白的折叠、转运。另外, 它定位于内质网上, 是一种重要的应激蛋白, 在细胞处于应激状态下能够大量表达, 以维持内质网的稳定性^[16]。烯醇化酶(human enolase 1)是一个细胞浆中高度保守的糖酵解酶, 能够催化2-磷酸甘油酸形成磷酸苯酚丙酮酸酯, 此物质是糖酵解反应中催化产生ATP的两个高能量中介物之一^[17-18]。(2)诱导前细胞特异表达的蛋白主要为外周血单个核细胞的结构蛋白。本研究中发现的血纤蛋白原 γ 链(fibrinogen gamma chain)和纤维蛋白原C链(human fibrinogen)都是由肝细胞合成的血纤蛋白原的亚单位, 而血纤蛋白原是重要凝血和炎症因子, 在血栓形成和止血中起重要的作用, 也是血液黏度和血小板聚集的主要决定因素之一。纤维蛋白 β (fibrin beta)则是血纤蛋白原酶解后的活性亚单位^[19]。膜联蛋白A1(annexin A1)是细胞组成性代谢酶, 为Annexin家族成员之一, 具有钙依赖性的磷脂结合作用, 与糖皮质激素调节

的炎症反应、细胞增殖、分化、凋亡和信号转导密切相关^[20]; (3)诱导后的CIK细胞特异表达的蛋白主要细胞生长、增殖过程中的可诱导性酶类。如L-乳酸脱氢酶(L-lactate dehydrogenase H chain), 是一种主要的糖酵解酶, 它广泛存在人体组织内, 在正常人血清内含量很少, 其活性升高常见于急性心肌梗死、骨骼肌损伤、急性肝炎、白血病及恶性肿瘤等疾病^[21-22]。在本研究中, 其表达量急剧上调, 可能和CIK细胞的大量扩增相关。Exoenzyme S、 γ -肌动蛋白1(ACTG1)、复合酶体活化剂亚单位-1(proteasome activator complex subunit 1)和 γ -肌动蛋白(gamma-actin; ACTG2)这四个蛋白则是细胞分裂和增殖过程中重要的活性酶和组成性蛋白。其中, Exoenzyme S是细胞分泌的胞外水解酶, 它能够分解胞外大分子物质, 为细胞生长提供可吸收的营养^[23]。 γ -肌动蛋白1和 γ -肌动蛋白都是细胞内非常保守的蛋白, 其大量合成可能和细胞骨架的形成相关^[24]。这些酶在诱导后的CIK细胞中大量表达, 与实验中观察到CIK细胞大量扩增的现象是一致的。本研究中外周血单个核细胞诱导培养13 d后增殖了约80倍, 且诱导后特异表达的蛋白多为细胞生长、增殖功能相关蛋白, 使其可以短时间内的大量增殖, 是形成高效靶比从而实现更佳杀瘤效率的关键所在。

而对于mRNA表达水平的检测结果, 我们可以看出, 仅有FGG、ACTG-1、PSME-1基因的表达与蛋白表达水平呈现出一致性。此外, 在蛋白水平培养前后无差异的UNG及ENO1的mRNA水平在诱导培养后明显高于培养前, ANXA-1的mRNA水平也表现出相反的结果。在生物系统中, 基因组是遗传信息的储存体, mRNA(转录水平)是基因表达的中间体, 而功能性蛋白质(蛋白水平)是基因功能的执行体^[25]。通常人们认为生物体为了尽可能地节约资源, 一般会实现这两种表达水平的对应。但实际上多个研究小组都报导了蛋白质组和转录组的部分不相关或负相关的结果, 并且用统计方法证明了这种显著差异是由生物因素所造成的^[26]。造成这种不相关或负相关的原因可能有: (1)基因转录后mRNA的稳定性。有研究表明, mRNA的稳定性与其3'UTR的特定核苷酸序列及相应的结合蛋白有关^[27]。(2)蛋白质的翻译后修饰(如酶切、磷酸化、糖基化等)将影响蛋白质的分泌与降解^[28]。(3)基因的差别。不同基因可能受到不同转录后调控的影响, 因而会导致不同基

因的两个水平表达出现差异。(4)作为翻译的一种抑制机制, microRNA也展示了另一种可能性。

综上所述, 本研究主要运用蛋白组学和转录水平表达的研究方法, 比较细胞因子诱导前后相应细胞蛋白及mRNA表达差异。结果提示, 外周血单个核细胞经诱导培养后, 已经变成了一群异质细胞, 与细胞增殖、生长相关蛋白的特异表达其大量扩增的分子基础, 对CIK细胞的细胞毒活性有重要的影响。而在蛋白及转录两个水平上呈现出部分不一致的可能性及其具体作用机制还需进一步研究。

参考文献 (References)

- Sangiolo D. Cytokine induced killer cells as promising immunotherapy for solid tumors. *J Cancer* 2011; 2: 363-8.
- Linn YC, Lau SK, Liu BH, Ng LH, Yong HX, Hui KM, *et al.* Characterization of the recognition and functional heterogeneity exhibited by cytokine-induced killer cell subsets against acute myeloid leukaemia target cell. *Immunology* 2009; 126(3): 423-35.
- Mehta BA, Schmidt-Wolf IG, Weissman IL, Negrin RS. Two pathways of exocytosis of cytoplasmic granule contents and target cell killing by cytokine-induced CD3⁺CD56⁺ killer cells. *Blood* 1995; 86(9): 3493-9.
- Verneris MR, Kornacker M, Mailänder V, Negrin RS. Resistance of *ex vivo* expanded CD3⁺CD56⁺ T cells to Fas-mediated apoptosis. *Cancer Immunol Immunother* 2000; 49(6): 335-45.
- Zhong R, Teng J, Han B, Zhong H. Dendritic cells combining with cytokine induced killer cells synergize chemotherapy in patients with late-stage non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2011; 60(10): 1497-502.
- Zhang J, Mao G, Han Y, Yang X, Feng H, Jia L, *et al.* The clinical effects of DC-CIK cells combined with chemotherapy in the treatment of advance NSCLC. *Clin Oncol* 2012; 11(2): 67-71.
- 孟明耀, 解燕华, 刘红伟, 刘运洪, 侯宗柳. 改良RPMI1640培养基对CIK细胞增殖的影响. *中国生物制品学杂志*(Meng Mingyao, Xie Yanhua, Liu Hongwei, Liu Yunhong, Hou Zongliu. Effect of modified RPMI1640 medium on proliferation of CIK cell. *Chinese Journal of Biologicals*) 2010; 23(8): 843-44, 851.
- Weng DS, Zhou J, Zhou QM, Zhao M, Wang QJ, Huang LX, *et al.* Minimally invasive treatment combined with cytokine-induced killer cells therapy lower the short-term recurrence rates of hepatocellular carcinomas. *J Immunother* 2008; 31(1): 63-71.
- Wang Y, Dai H, Li H, Lv H, Wang T, Fu X, *et al.* Growth of human colorectal cancer SW1116 cells is inhibited by cytokine-induced killer cells. *Clin Dev Immunol* 2011; 2011: 621414.
- Su X, Zhang L, Jin L, Ye J, Guan Z, Chen R, *et al.* Immunotherapy with cytokine-induced killer cells in metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Biother Radiopharm* 2010; 25(4): 465-70.
- Pievani A, Borleri G, Pende D, Moretta L, Rambaldi A, Golay J, *et al.* Dual-functional capability of CD3⁺CD56⁺ CIK cells, a T-cell subset that acquires NK function and retains TCR-mediated specific cytotoxicity. *Blood* 2011; 118(12): 3301-10.
- 刘运洪, 孟明耀, 解燕华, 刘莹, 魏传钰, 侯宗柳. 人外周血淋巴细胞体外诱导培养前后细胞表型与细胞毒活性相关性研究. *中国细胞生物学学报*(Liu Yunhong, Meng Mingyao, Xie Yanhua, Liu Ying, Wei Chuanyu, Hou Zongliu. The correlation between phenotypes of human peripheral blood. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2011; 33(5): 531-7.
- Zharkov DO, Mechetin GV, Nevinsky GA. Uracil-DNA glycosylase: Structural, thermodynamic and kinetic aspects of lesion search and recognition. *Mutat Res* 2010; 685(1/2): 11-20.
- Galat A, Bua J. Molecular aspects of cyclophilins mediating therapeutic actions of their ligands. *Cell Mol Life Sci* 2010; 67(20): 3467-88.
- 戎梦瑶, 朵瑞雪, 朱平, 王聪华, 汪莉, 樊春梅, 等. 细胞亲环素A对单核来源泡沫细胞功能的影响. *细胞与分子免疫学杂志*(Rong Mengyao, Duo Ruixue, Zhu Ping, Wang Conghua, Wang Li, Fan Chunmei, *et al.* Effect of cyclophilin A on monocyte-derived foam cell. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*) 2011; 27(5): 515-8.
- Kamauchi S, Wadahama H, Iwasaki K, Nakamoto Y, Nishizawa K, Ishimoto M, *et al.* Molecular cloning and characterization of two soybean protein disulfide isomerases as molecular chaperones for seed storage proteins. *FEBS J* 2008; 275(10): 2644-58.
- Gerlt JA, Babbitt PC, Jacobson MP, Almo SC. Divergent evolution in enolase superfamily: Strategies for assigning functions. *J Biol Chem* 2012; 287(1): 29-34.
- 刘靖, 鲍依稀, 刘明学, 祝绚, 李进. RNA干扰enolase-1基因治疗胃癌的实验研究. *中国肿瘤临床*(Liu Jing, Bao Yixi, Liu Mingxue, Zhu Xu, Li Jin. The effect of RNA interference of the Enolase-1 gene on gastric carcinoma. *Chinese Journal of Oncology*) 2008; 35(8): 455-62.
- Lord ST. Molecular mechanisms affecting fibrin structure and stability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; 31(3): 494-9.
- D'Acquisto F. On the adaptive nature of annexin-A1. *Curr Opin Pharmacol* 2009; 9(4): 521-8.
- Singh P, Bhardwaj A. Mechanism of action of key enzymes associated with cancer propagation and their inhibition by various chemotherapeutic agents. *Mini Rev Med Chem* 2008; 8(4): 388-98.
- O'Brien PJ. Cardiac troponin is the most effective translational safety biomarker for myocardial injury in cardiotoxicity. *Toxicology* 2008; 245(3): 206-18.
- Hallberg B. Exoenzyme S binds its cofactor 14-3-3 through a non-phosphorylated motif. *Biochem Soc Trans* 2002; 30(4): 401-5.
- de Lanerolle P, Serebryanny L. Nuclear actin and myosins: Life without filaments. *Nat Cell Biol* 2011; 13(11): 1282-8.
- 钱小红, 贺福初. 蛋白质组学: 理论与方法. 北京: 科学出版社 (Qian Xiaohong, He Fuchu. *Proteomics: Theory and Method*. Beijing: Science Press), 2003, 8-10.
- Tian Q, Stepanians SB, Mao M, Weng L, Feetham MC, Doyle MJ, *et al.* Integrated genomic and proteomic analyses of gene expression in mammalian cells. *Mol Cell Proteomics* 2004; 3(10): 960-9.
- Waggoner SA, Liebhauer SA. Regulation of alpha-globin mRNA stability. *Exp Biol Med*(Maywood) 2003; 228(4): 387-95.
- Beyer A, Hollunder J, Nasheuer HP, Wilhelm T. Post-transcriptional expression regulation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* on a genomic scale. *Mol Cell Proteomics* 2004; 3(11): 1083-92.