

• 基础研究 •

SARS- CoV X4 基因转染对 T 细胞
TNF- α 及 IL- 6 分泌的影响^{*}王 青^{1,2} 曾耀英^{1*} 何贤辉¹ 肇静娴¹ 王 通¹

(1 暨南大学组织移植与免疫学教育部重点实验室 广州 510632 2 广州中医药大学免疫研究室 广州 510405)

摘要 目的: 通过检测 SARS- CoV X4 基因转染后 T 细胞细胞因子分泌的变化, 研究 SARS- CoV X4 蛋白潜在的功能及其作用机制, 并探讨其与 SARS- CoV 致病机制的关系。方法: 利用 RosetteSep 分离法分离外周血 T 细胞, 以 Amasa 核转染仪将 pEGFP- SARS- CoV X4 真核表达载体转入 T 细胞, 应用激光共聚焦显微镜观察其瞬时表达情况, 流式细胞仪检测转染效率, CBA 技术检测 T 细胞细胞因子。结果: SARS- CoV X4 基因转染后 12h 得到了明显表达, 共聚焦显微镜观察到 EGFP 绿色荧光表达, 流式细胞仪检测其表达率为 245; 与空载体转染组相比, SARS- CoV X4 基因转染能显著促进 T 细胞 IL- 6 及 TNF- α 的分泌。结论: SARS- CoV X4 蛋白可诱导 T 细胞分泌前炎症因子 IL- 6 及 TNF- α , SARS- CoV X4 蛋白可能在 SARS 发病机制中起重要的作用。

关键词: 严重急性呼吸综合征; 冠状病毒; 基因转染; 细胞因子; T 淋巴细胞

中图分类号: R563 文献标识码: A

Study on cytokine secretion of T cell after SARS- CoV X4 gene transfection

WANG Qing^{1,2}, ZENG Yao- ying^{1*}, HE Xian- hui¹, ZHAO Jing- xian¹, WANG Tong¹

1. Key Laboratory of Tissue Transplantation and Immunology, Ministry of Education, Jinan University, Guangzhou, 510632, China;

2. Department of Immunology, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

ABSTRACT Objective: To explore the function of the SARS- CoV X4 protein and its role in SARS pathogenesis, by detecting the change of cytokine secretion of T cells after transfection of SARS- CoV X4 gene. **Methods:** T cells were transfected with pEGFP- SARS- CoV X4 expression vector by Amasa Nucleofector, and the green fluorescence of EGFP were detected with flow cytometry and confocal microscopy; The production of cytokine were investigated by Cytometry Beads Assay. **Results:** The green fluorescence of EGFP could be detected by with flow cytometry, confocal microscopy; the secretion of IL- 6 and TNF- α increased remarkably in SARS- CoV X4 transfection group. **Conclusion:** SARS- CoV X4 can promote T cells to secrete preinflammatory cytokine IL- 6 and TNF- α ; it may play an important role in the pathogenesis of SARS.

Key Words: Severe acute respiratory syndrome(SARS); Coronavirus; Gene transfection; Cytokine; T- lymphocytes

前言

严重急性呼吸综合征(severe acute respiratory syndrome), 又称非典型肺炎, 研究发现其是由一种全新的冠状病毒(SARS coronavirus)引起的^[1-2]。通过对 SARS CoV 进行测序和分析, 证实 SARS CoV 为单链正义 RNA, 有 11 个开放阅读框(ORF), 其中 ORF8 编码的序列为未知基因 X4, 其产物 X4 蛋白为包含 122 个氨基酸残基的未知功能蛋白, 经 BLAST 和 FASTA 分析无法找到同源序列或蛋白^[3-4]。虽然该蛋白是一个从 DNA 序列推定的功能未知的蛋白, 但可能在病毒复制、发病机制及免疫应答等方面具有潜在的作用, 值得深入研究^[5-9]。本实验利用细胞核转染技术将 SARS- CoV X4- EGFP 融合蛋白基因表达载体转染 T 细胞, 通过检测 T 细胞分泌细胞因子的变化, 旨

在研究 SARS- CoV X4 蛋白潜在的功能, 并探讨其在 SARS 发病机制的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂:

德国 Amasa 公司: 优化 T 细胞转染 Kit(Optimized protocol human T Cell nucleofectorTM kit); 美国 PharMingen 公司: Cytometric Bead Array (CBA) kit, 鼠抗人单克隆抗体 anti- hCD3- PE(phycoerythrin, 藻红蛋白); 真核表达载体 pEGFP- N1 购自 Clontech; Sigma 公司: 碘化丙啶(Propidium, PI); 上海试剂二厂: 淋巴细胞分离液; RPMI- 1640 完全培养液: 10% 胎牛血清(GIBCO), 2mmol/L L- glutamine(Sigma), 100U/ml 青霉素, 100 μ g/mL 链霉素, 50 μ mol/l β - 巯基乙醇(Sigma), RPMI- 1640 培养液

* 基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目(973) 基金(NO. G1999054303) 和国家自然科学基金重点项目(NO. 30230350) 资助。

作者简介: 王青(1977-), 男, 硕士, 助教, 主要从事细胞免疫及免疫药理研究

* 通讯作者: 曾耀英, 510632, E- mail: ozms@jnu.edu.cn

(收稿日期 2006- 04- 20 接受日期: 2006- 05- 13)

(GIBCO)。
1.2 人外周血 T 细胞分离:

取正常健康志愿者外周血于肝素抗凝管,加入 RosetteSep 分离液(50 μ L/mL 全血),充分混匀,室温静置 30 分钟,以等体积 PBS 稀释,充分混匀后小心加到淋巴分离液上,以 20℃、2000rpm 离心 20 分钟,取中间单核细胞层,用 PBS 洗两次(4℃,1500rpm,15min),然后用 RPMI-1640 完全培养液调整细胞数为 2-4 $\times 10^6$ cell/L。

1.3 SARS- CoV X4 基因合成:

由本实验室合成和鉴定。质粒以 Qiagen 高纯度试剂盒纯化,无内毒素,A260/A280>1.8。

1.4 T 淋巴细胞转染及培养:

收集细胞,调整细胞数为 2 $\times 10^6$ /100 μ L 转染溶液,采用 Optimized protocol human T Cell nucleofector™ kit,用 Amaxa 细胞核转染仪将载体转入 T 细胞,具体操作按 Amaxa 建议的操作程序及其试剂盒说明书进行。整个过程在 20 分钟内完成,以减少细胞死亡率,提高转染效率。将转染后的 T 细胞接种到 12 孔培养板内,每孔加入含体积分数为 10% 胎牛血清(FBS)的 RPMI1640 完全培养基 2mL,在 37℃、体积分数为 5% 的 CO₂ 培养箱中培养。

1.5 激光共聚焦显微镜观测 EGFP 表达:

收集转染后的 T 细胞,封于载玻片上,以激光共聚焦显微镜(High Speed Confocal Microscope, Perkin Elmer)进行活细胞观察,激发光为 488 nm,细胞产生的荧光以冷 CCD 扫描成像,并以伪彩色(绿色)显示荧光。

1.6 Cytometric Bead Array (CBA) 检测细胞因子:

细胞培养 12h 后,收集细胞,以 20℃、1500rpm 离心 5 分钟,收集上清,待测。检测时按 CBA 试剂盒说明进行,首先将捕获微球和 PE 检测试剂加入管中,然后把各细胞因子标准品等

倍稀释与待测样品分别加入各管,室温避光孵育 3h,用洗液洗一遍,重悬于 300 μ L 洗液,上流式细胞仪分析。

1.7 免疫荧光染色:

采用直接免疫荧光抗体标记法染色。取各孔培养的细胞,用 PBS 洗涤 2 次,离心浓缩成 50 μ L,分别加入 anti-hCD3 mAb- PE10 μ L,室温下避光放置 30min,再用 PBS 洗涤 2 次,最后用 400 μ L PBS 重悬细胞并加入 PI 溶液 5 μ L,染色 5 分钟,进行流式细胞仪检测。

1.8 流式细胞仪分析:

全部数据经 FACSCalibur 流式细胞仪及 CELLQuest 软件获取和分析。先在前散射(Forward scatter, FSC)和侧散射(Side scatter, SSC)的二维散点图中划出淋巴细胞区,再经 FL2 和 FL3 的二维散点图排除死细胞,然后对活的 T 细胞作 EGFP 荧光强度检测,每管样品检测 10 000 个细胞。数据显示于直方图中,获得数据用 CELLQuest 软件分析。细胞因子数据的获取及分析采用 BD 公司 CBA 分析软件。

1.9 统计学分析:

全部数据使用统计软件包 SPSS 11.0 for Windows 进行处理,数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较用非配对 Student's t- test。

2 结果

2.1 T 细胞的纯度鉴定:

取得高纯度 T 细胞是研究 T 细胞行为的前提,本实验中我们采用 RosetteSep 分离液分离外周血 T 细胞。RosetteSep 分离液是由多种抗体组成的混合液,能有效去除非 T 细胞。经 RosetteSep 分离后 T 细胞纯度为 92.80 $\pm$ 1.92%,而未经纯化的外周血单个核细胞中 T 细胞约为 63.29 $\pm$ 5.40%。图 1 为一次实验结果的典型图。

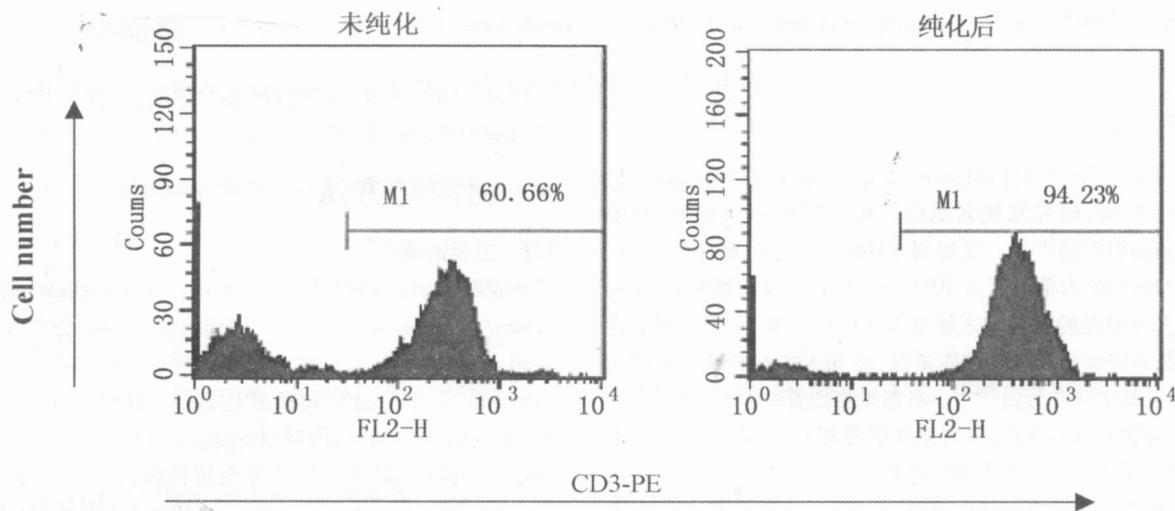


图 1 RosetteSep 分离纯化 T 细胞的 FACS 分析。

Fig 1 Flow cytometric analysis of purity of T lymphocyte population isolated with RosetteSep

2.2 SRAS- CoV X4- EGFP 融合蛋白在 T 细胞中的表达及亚细胞定位:

共聚焦显微镜观察发现,SARS- CoV X4 融合蛋白分布于

整个细胞,在表达水平较高的细胞可见细胞核中的荧光较亮(图 2 C);而空载体的 EGFP 则均匀地分布于整个细胞(图 2 B),未转染组则无任何荧光(图 2 A)。

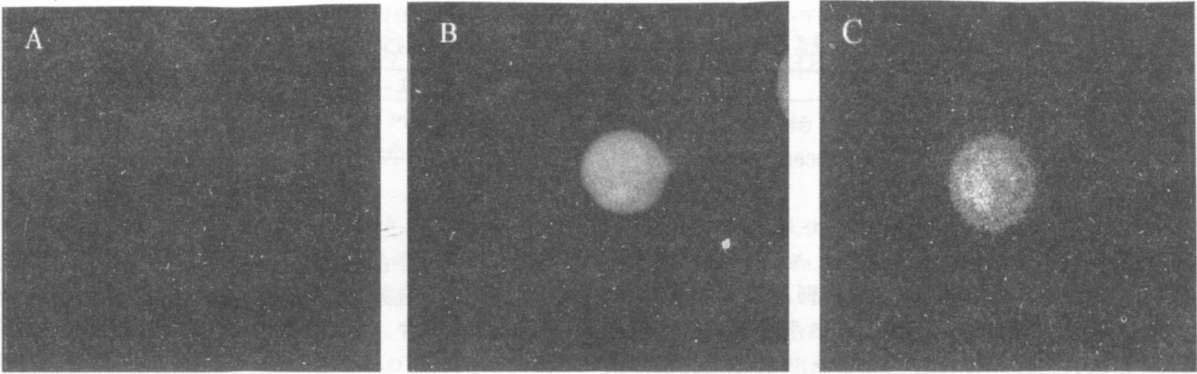


图2 激光共聚焦显微镜观察转染pEGFP- SARS X4的T 细胞中绿色荧光的分布(× 1000)

Fig 2 Laser scanning confocal microscopy analysis of green fluorecence distribution in pEGFP- SARS X4 transfeted T cells(× 1000)

A control; B pEGFP- N1; C pEGFP- SARS- CoV X4

2.3 流式细胞仪检测 SARS X4- EGFP 融合蛋白在 T 细胞中的表达率。:

将转染后的 T 细胞继续培养, 12h 后用流式细胞仪检测

SARS- CoV X4- EGFP 的转染率可达 24% (图 3 C); pEGFP 组转染率为 41% (图 3 B), 而对照组没有绿色荧光蛋白表达(图 3 A)。

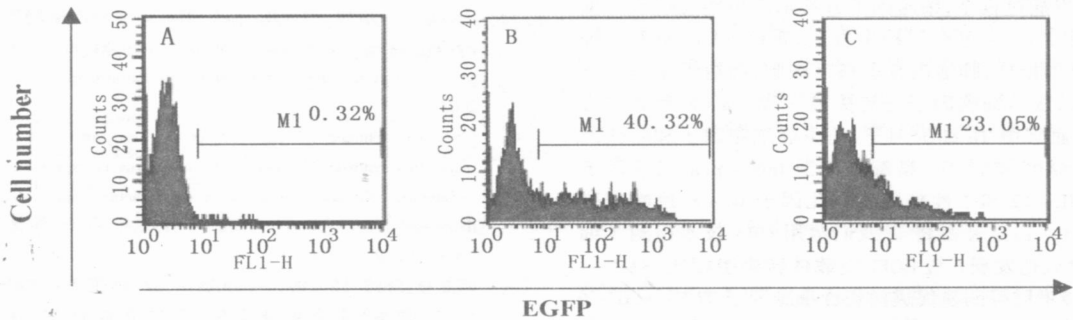


图3 流式细胞仪分析经 pSARS X4- EGFP 转染的 T 细胞 EGFP 绿色荧光表达水平

Fig 3 Flow cytometry analysis of the expression of EGFP fluorecence in T cells transfeted with pEGFP- SARS- CoV X4 vector

A control B pEGFP- SARS- CoV X4 C pEGFP- N1

2.4 SRAS X4 基因转染后 T 细胞分泌细胞因子的变化:

图 4 所示为 CBA 检测细胞因子表达谱的荧光强度散点图, 纵轴从上至下分别代表细胞因子 IL- 2、IL- 4、IL- 6、IL- 10、TNF- α 和 IFN- γ, 横轴表示各细胞因子的荧光强度。由图

4、表 1 可见, pEGFP- SARS- CoV X4 转染组 T 细胞分泌 IL- 6 及 TNF- α 的浓度显著高于 pEGFP 组 (P< 0. 01), 而其它细胞因子浓度则没有明显差异。

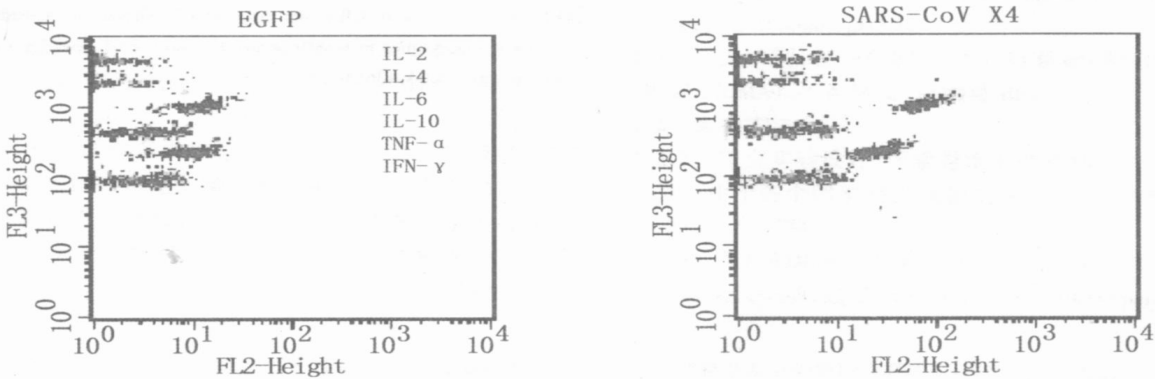


图4 CBA 分析结果代表图

Fig 4 Representative result of cytometric bead array analysis in culture supernatants of T cells transfeted with pEGFP- N1 or pEGFP- SARS X4 vector for 12h

表1 pEGFP- N1 及 pEGFP- SARS X4 转染T 细胞后细胞因子分泌的变化
Table 1 Changes of cytokine profile on T cells transfected with pEGFP- N1 and pEGFP- SARS X4 ($\bar{x} \pm s$, n= 3, pg/ mL)

Group	IL- 2	IL- 4	IL- 6	IL- 10	TNF- α	IFN- γ
EGFP	≤ 20	≤ 20	≤ 20	≤ 20	≤ 20	≤ 20
SARS X4	≤ 20	≤ 20	125. 7+ 4. 2*	≤ 20	47. 4+ 3. 3*	≤ 20

* P< 0.01vs EGFP 组

3 讨论

SARS- CoV X4 基因是一未知功能序列, 经其编码产物 X4 蛋白功能不祥, 已证实在 X4 蛋白在 SARS 患者肺病变组织中有表达, 并推测其在肺部的表达可能与 SARS 肺组织弥漫性损伤的发生发展有关^[6- 7]。除肺组织外, SARS 患者多种免疫细胞中有 SARS- CoV 表达, 这间接提示 X4 蛋白可能在这些细胞中表达, 并参与 SARS 发病的免疫学机制^[8- 9]。我们的实验结果显示, 转染后 SARS- CoV X4- EGFP 融合蛋白可在原代T 细胞中表达, 12h 表达率为 24% ; 经共聚焦显微镜观察, SARS- CoV X4- EGFP 融合蛋白分布于整个细胞中, 主要定位于细胞浆和细胞核, 并没有膜分布的趋向。

在 SARS 发病过程中, 细胞因子分泌紊乱可能是造成肺损伤的重要原因。Peiris 等在尸检中发现, 重症 SARS 患者的肺组织都有明显的损伤, 肺泡内有多核巨细胞, 肺组织中有吞噬红细胞的现象, 提示细胞因子分泌失控。^[10]Wong CK 等通过检测 SARS 患者血浆中 Th 细胞因子、前炎症细胞因子和趋化因子水平, 发现 SARS 患者 Th1 型细胞因子 IFN- γ 、前炎症因子 IL- 1、IL- 6、IL- 12 和中性粒细胞趋化因子 IL- 8、巨噬细胞趋化蛋白(MCP- 1) 显著增高。^[11]我们运用 CBA 技术检测 T 细胞细胞因子谱表达发现, 与 EGFP 空载体转染组相比, SARS- CoV X4 基因转染后可明显促进前炎症细胞因子 TNF- α 、IL- 6 分泌。这些结果提示 SRAS- CoV X4 蛋白很可能调节某些前炎症细胞因子基因的表达, 而这些前炎症细胞因子基因的过度表达则可能是造成 SARS 患者肺损伤的重要病理基础。因此我们推测 SARS- CoV X4 基因表达可能在 SARS- CoV 感染患者肺损伤发病机制中起重要作用。

总之, 我们的研究表明, SARS- CoV X4- EGFP 融合蛋白基因能在 T 细胞中表达, 主要分布在胞浆及细胞核, 并能促进细胞因子 IL- 6 和 TNF- α 分泌。对 SARS- CoV X4 蛋白功能的进一步深入研究, 有助于解释 SARS 致病机理。

参考文献

[1] Peiris J SM, Lai ST, Poon LLM, et al. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome [J]. Lancet, 2003, 361 (9366): 1319- 1325

[2] Drosten C, Gunther S, Preiser W, et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome[J]. N Engl J Med , 2003, 348(20): 1967- 1976

[3] Marra MA, Jones SJM, Astell CR, et al. The Genome Sequence of the SARS2Aassociated Coronavirus[J]. Science, 2003, 300(5624): 1399- 1404

[4] Rota PA, Oberste MS, Monroe SS, et al. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome[J]. Science, 2003, 300(5624): 1394~ 1399

[5] Shuang B, Liu SI, Han P, et al. The X4 protein of SARS- associated coronavirus can induce earlier antibody response in the serum of SARS patients. International Symposium on the Pathogenesis of SARS. Beijing. 2003

[6] Chen YY, Shuang B, Tan YX, et al. The protein X4 of severe acute respiratory syndrome- associated coronavirus is expressed on both virus - infected cells and lung tissue of severe acute respiratory syndrome patients and inhibits growth of Balb / c 3T3 cell line. Chin Med J (Engl), 2005, 118:267- 274

[7] 谭亚夏, 陈涛, 钟淑卿, 等. SARS- CoV X4 蛋白在 SARS 患者肺组织中的表达及其意义. 中华内科杂志, 2006, 45(3): 196- 198

[8] Li L, Wo J, Shao J, et al. SARS- coronavirus replicates in mononuclear cells of peripheral blood (PBMCs) from SARS patients[J]. J Clin Virol. 2003, 28(3): 239- 244

[9] Wang H, Mao Y, Ju L, et al. Detection and monitoring of SARS coronavirus in the plasma and peripheral blood lymphocytes of patients with severe acute respiratory syndrome[J]. Int J Mol Med. 2004, 14(2): 311- 315

[10] Nicholls JM, Poon LIM, Lee KC, et al. Lung pathology of fatal severe acute respiratory syndrome [J]. Lancet, 2003, 361(9371): 1773- 8

[11] Wong CK, Lam CW, Wu AK, et al. Plasma inflammatory cytokines and chemokines in severe acute respiratory syndrome[J]. Clin Exp Immunol. 2004, 136(1): 95- 103