

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.13.051

## 蛋白质组学在病毒致病机理研究中的应用\*

王 华<sup>#</sup> 孙成友<sup>#</sup> 王淑娟 王志亮<sup>△</sup>

(中国动物卫生与流行病学中心外来动物疫病研究中心 山东 青岛 266032)

**摘要:**近年来,蛋白质组学技术成为医学研究的热点。蛋白质组学是高通量的分析正常及病理条件下机体、组织、细胞或亚细胞成分中的全部蛋白质。对不同空间、不同时间上动态变化的蛋白质组整体进行比较,分析不同蛋白质组之间在表达数量、表达水平和修饰状态上的差异。蛋白质组学分析作为对生物代谢调控分析的技术手段,以病毒为研究的对象和工具,该技术的研究主要集中在新蛋白的发现、致病机理、疫苗的研制及耐药机制等方面。本文主要概述了蛋白质组学在一些动物传染病病毒致病方面研究和应用,分析了蛋白质组学技术对蛋白功能研究存在的问题和未来发展趋势,以便使研究者了解该技术使用的现状,提供理论参考。

**关键词:**蛋白质组学;病毒;致病机理

**中图分类号:**Q816,Q75,Q78 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)13-2583-03

## The Application of Proteomics in Viral Pathogenesis Research\*

WANG Hua<sup>#</sup>, SUN Cheng-you<sup>#</sup>, WANG Shu-juan, WANG Zhi-liang<sup>△</sup>

(Exotic animal diseases research center of China animal health and epidemiology center, Shan dong Qingdao, 266032, China)

**ABSTRACT:** In recent years, the proteomics technology is applied to study on medical research. Proteomics is analysis of normal and pathological conditions organism, tissue, cell or subcellular component of all proteins in a high throughput, through comprehensive comparison of dynamic change on different spatial and time proteomic, analysis the different between proteome expression quantity, differences of expression level and modification status. Proteomic analysis technology of biological metabolic control is used virus as research tool. And the technology research mainly focused on the new protein findings, pathogenesis, vaccine development and resistance mechanism, etc. Research advances in proteomics were summarized focused on some animal infectious viral pathogenesis research and application. The problems relating to research and tendency in future of proteomics technologies were also analyzed in order to better understand the technologies, furthermore guide their theoretical reference.

**Key words:** Proteomics; Virus; Pathogenesis

**Chinese Library Classification (CLC):** Q816, Q75, Q78 **Document code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2014)13-2583-03

蛋白质组学是生命科学研究领域中一门新兴学科,可以高通量的分析正常及病理条件下机体、组织、细胞或亚细胞成分中的全部蛋白质。对不同空间、不同时间上动态变化的蛋白质组整体进行比较,分析不同蛋白质组之间在表达数量、表达水平和修饰状态上的差异。通过对蛋白质组学技术研究病毒,结合传统病毒学的方法,可以深入分析病毒与宿主相互作用引起的疾病机制;可以发现与疾病相关的特异蛋白质功能;对发生病变的相关蛋白质的研究可以为探索疾病的致病机制提供信息;而且这些蛋白质还用来作为疾病诊断潜在的生物标志和治疗的药物靶点。

### 1 蛋白质组常用技术

蛋白质组(proteome)由 Wilkins 和 Williams 等在 1994 年首次提出。蛋白质组学是后基因组时代产生和发展的一门新兴

学科,它以蛋白质组为研究对象,从整体层面上分析组织、细胞内动态变化的蛋白质组成、表达水平与翻译后修饰,最终阐述蛋白质的功能以及蛋白之间相互作用与联系。蛋白质组学中进行蛋白表达分析应用最广泛的技术为双向凝胶电泳(two-dimensional electrophoresis, 2-DE<sup>[1]</sup>)以及基于 2-DE 的重复性和精确性大大提高的双向差异凝胶电泳(two-dimensional difference electrophoresis, 2D-DIGE<sup>[2]</sup>), 偶联应用质谱(mass spectrometry, MS)技术对筛选到的差异表达蛋白进行快速精确的鉴定<sup>[3]</sup>。使用标记的氨基酸在细胞中进行稳定同位素标记 Stable-isotope labeling by amino acids in cell culture(SILAC)<sup>[4]</sup>是一种鉴定和定量病毒感染后细胞蛋白中表达差异的有效方法, SILAC 标记的氨基酸整合到细胞蛋白中然后进行质谱(MS)分析,从而在细胞水平上对病毒感染后差异蛋白进行鉴定和分析。蛋白质组学技术在病毒学中的应用有助于病毒感染以及病毒宿主间的

\* 基金项目:农业部公益性行业(农业)科研专项(200903037);农业部农业产业技术体系(NYCYTX-0305);MATS(2060302)

作者简介:王华(1977-),男,兽医师,主要从事预防兽医学研究。E-mail:huawang007@126.com

<sup>#</sup> 贡献相同:孙成友

<sup>△</sup> 通讯作者:王志亮, E-mail:zlwang111@yahoo.com.cn

(收稿日期:2013-04-24 接受日期:2013-05-25)

相互作用机制的研究。

## 2 蛋白质组学在病毒致病机理研究中的应用

病毒寄生在宿主细胞中,需要不断地适应和改变宿主的环境。病毒利用宿主细胞能够编码多种功能的蛋白质,这些蛋白能与宿主蛋白发生一系列的相互作用以完成病毒的功能特点。迄今,虽然许多病毒的基因组测序已经完成,但是由于受到病毒的影响而发生相应改变的宿主蛋白质组、宿主蛋白质翻译后的修饰以及蛋白酶剪接过程还未被完全阐明。

近年来新兴的高通量技术,如基于质谱技术的定量或半定量蛋白组方法,已被广泛应用于病毒宿主相互作用的研究中,并且有望在上述领域中取得一些突破性进展。依托于质谱技术的蛋白质组学的飞速发展,不仅促进了病毒蛋白质组学研究的不断进步,同时也加快了对于病毒颗粒相关的宿主蛋白的鉴定。酵母双杂交技术、串联亲和纯化技术、体外 pull-down 技术以及免疫沉淀技术已用于解析病毒和宿主间的蛋白相互作用。而 RNAi 筛选技术则用于初步研究蛋白质相互作用的生物学信息。新兴的蛋白标记技术与传统的 2-DE 与质谱联合具有互补性,用于在病毒感染条件下宿主全蛋白水平的改变的研究。目前,大多数用蛋白质组学方法鉴定得到的蛋白质的相互作用和蛋白差异表达仍需进一步验证。此外,有上述蛋白质组学方法所获得的数据在今后的用途将不断增加,这需要更加先进的生物信息学技术对这些数据进行数据模拟,可视化分析,进而更加全面地了解病毒感染过程。蛋白质组学技术通过认识病毒蛋白质结构及其与宿主之间相互的作用,将为病毒相关疾病诊断和治疗的发展产生深远影响<sup>[9]</sup>。

## 3 蛋白质组技术在病毒及感染中的研究

### 3.1 SARS-CoV 冠状病毒蛋白质组研究

Jiang 等<sup>[6]</sup>首次应用 DIGE 技术分析了 SARS-CoV 感染 Vero E6 细胞,鉴定出 355 个在 SARS-CoV 感染后表达并发生变化的蛋白,为分析 SARS-CoV 的感染和致病机制提供了方法。应用 SILAC 定量分析 SARS-CoV 感染的 BHK21 细胞,对蛋白质的功能分析表明 BAG3 可以抑制 SARS-CoV 的复制。通过对感染 SARS-CoV 病人的血清蛋白质分析,有助于发现可用于病毒感染的诊断、预后以及治疗的生物标记,从而更好地分析病毒的致病性并控制疾病<sup>[7]</sup>。

### 3.2 传染性支气管炎病毒 (IBV) 病毒粒子蛋白质组

经典的 2-DE 偶联质谱鉴定的方法对纯化后的 IBV 粒子进行蛋白质组分析,鉴定到 2 个病毒编码的蛋白(N,S)和 60 个宿主蛋白<sup>[8]</sup>。

**3.2.1 IBV 感染细胞蛋白质组** 应用 SILAC 技术对 IBV 感染后的 Vero 细胞的细胞浆、细胞核以及核仁组成成分进行了定量蛋白质组分析。鉴定到的差异表达的蛋白质,包括 NF- $\kappa$ B 和 AP-1 信号通路调控的蛋白质以及参与细胞骨架和分子马达的蛋白质。同时证实病毒粒子的 N 蛋白存在于细胞浆、细胞核以及核仁中,而 M 蛋白仅存在于胞浆中<sup>[9]</sup>。由于 IBV 在非禽源的宿主细胞系的相互作用不同于禽源的细胞系中的细胞,进一步应用 SILAC 技术分析 IBV 感染的鸡成纤维细胞(DF-1)核仁蛋

白质组,对鉴定到的核仁蛋白进行了功能归类总结,并首次在 DF-1 细胞核中鉴定到 IBV 的 N 蛋白,进一步证实 N 蛋白在细胞核中的定位,为分析 IBV 及 RNA 病毒的复制机理提供了数据和信息资料<sup>[9]</sup>。

**3.2.2 IBV 与宿主相互作用** 通过酵母双杂交技术研究表明 M 蛋白可以与宿主细胞的肌动蛋白 actin 相互作用,将 M 蛋白与 actin 相互作用位点位于羧基端的 A159 和 K160 氨基酸进行突变验证,结果表明二者的相互作用在感染早期 IBV 病毒粒子的组装和出芽中具有重要功能<sup>[10]</sup>。酵母双杂交结合免疫共沉淀和免疫荧光染色也证实 SARS-CoV 和 IBV 的 S 蛋白与真核起始因子 3(eIF3)之间存在相互作用,且二者的相互作用能够调控 CoVs 感染后宿主基因的表达<sup>[11]</sup>。

**3.2.3 IBV 感染鸡胚蛋白质组** 应用 2-DE 筛选 IBV,感染鸡胚后气管和肾脏的差异表达蛋白,质谱鉴定和生物学分析显示 IBV 感染后差异表达蛋白主要涉及细胞骨架、钙离子结合、应激反应、抗氧化以及大分子代谢等生物学过程。获得的数据为分析 IBV 致病机理的研究提供了参考<sup>[12]</sup>。

### 3.3 禽流感病毒(AIV)感染蛋白质组

Liu 等<sup>[13]</sup>利用 2-DE 技术筛选 H9N2 感染人源细胞系后不同时间点的差异表达蛋白,运用质谱技术鉴定到 22 种蛋白,主要包括细胞骨架蛋白、RNA 加工相关蛋白和代谢相关蛋白等,其中表达差异显著的蛋白主要参与细胞骨架网络的构成。这些蛋白的鉴定有助于分析 AIV 在哺乳动物细胞中的复制以及其宿主之间的相互作用关系。

应用 SILAC 技术分析 H1N1 和 H3N2 亚型的 AIV 感染 293T 细胞的核仁蛋白组,发现少数核仁蛋白在 AIV 感染后表达丰度发生了显著变化,而且不同毒株之间引起的蛋白表达多少情况存在较大差异。通过与腺病毒和 IBV 感染细胞后核仁蛋白组的比较,分析不同病毒感染后的复制功能及其对宿主的致病性的差异<sup>[13]</sup>。

Zou 等运用 2-DE 和质谱技术对 H5N1 感染鸡脑组织后的差异表达蛋白进行分析,鉴定到的差异蛋白主要包括细胞骨架蛋白、泛素-蛋白酶体相关蛋白和神经信号传导蛋白等。其中 CRMP 和 SEP5 参与帕金森病的疾病进程,伴随神经系统功能障碍引发脑炎。这些蛋白的鉴定和功能分析为 AIV 感染后导致神经功能障碍作用机理提供重要的参考信息<sup>[14]</sup>。

### 3.4 新城疫病毒(NDV)感染细胞蛋白质组

吴双等应用 2-DE 对中等毒力 NDV 感染后的鸡胚成纤维细胞进行分析,鉴定差异表达的蛋白,目的是为 NDV 与宿主细胞的相互作用及其致病机制提供参考信息<sup>[15]</sup>。NDV 病毒粒子蛋白质组研究<sup>[16]</sup>发现,除了病毒自身的蛋白,宿主的 30 种蛋白也在病毒粒子中被鉴定到,包括细胞骨架,膜联蛋白,分子伴侣,酶结合蛋白,钙离子结合蛋白,信号转导蛋白等。

### 3.5 其他病毒的蛋白质组研究

传染性法氏囊病毒 IBDV 感染鸡胚成纤维细胞<sup>[17]</sup>,以及其靶器官法氏囊<sup>[18]</sup>,马立克病毒感染 SPF 鸡脾脏<sup>[19]</sup>,猪流感病毒 H1N1 感染猪肺泡巨噬细胞<sup>[20]</sup>差异蛋白质组分析,对鉴定到的蛋白进行功能归类和分析为病毒感染的分子致病机制及与宿主相互作用机制的研究提供信息。

## 4 展望

病毒的致病机理和与宿主相互作用机制的可用信息相对较少,当前的研究主要集中于病毒基因组结构和功能的研究。病毒感染宿主的蛋白质组研究处于差异蛋白质的筛选和鉴定的初步阶段。通过这种比较蛋白质组学对病毒感染前后的蛋白表达图谱进行鉴定,进一步对病毒感染引起的差异表达蛋白进行功能分析和验证,探索其在病毒感染中的潜在作用有助于揭示病毒的分子致病机制、与宿主细胞的相互作用机制、寻找病毒的作用靶标,为病毒病的预防诊治提供理论依据和解决途径。

目前,病毒感染的蛋白质组学研究主要采用的是体外培养的细胞,而部分病毒没有能够支持其复制的合适的宿主细胞系而只能采用非宿主源的细胞,但体外培养的细胞以及非宿主源的细胞并不能完全反映在天然宿主体内的免疫和各种生理条件下病毒和宿主细胞的相互作用机制。因此,在继病毒感染细胞的差异蛋白质组分析后,进行病毒感染宿主机体的差异及功能蛋白质组分析将是今后研究主要方向。

### 参考文献(References)

- [1] Rabilloud T M, Chevallet, et al. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future [J]. Journal of Proteomics, 2010, 73(11): 2064-2077
- [2] Timms J F, Cramer R. Difference gel electrophoresis [J]. Proteomics, 2008,8(23-24): 4886-4897
- [3] Zimny-Arndt U M, Schmid, et al. Classical Proteomics: Two-Dimensional Electrophoresis/MALDI Mass Spectrometry [J]. 2009, 492: 65-91
- [4] Emmott E H, Wise, et al. Quantitative Proteomics Using SILAC Coupled to LC/MS/MS Reveals Changes in the Nucleolar Proteome in Influenza A Virus-Infected Cells [J]. Journal of Proteome Research, 2010, 9(10): 5335-5345
- [5] Santos H M, Lodeiro C, et al. Analytical Proteomics: An emerging field[J]? Journal of Proteomics, 2010, 73(8): 1411-1414
- [6] Jiang X S, Tang L Y, et al. Quantitative analysis of severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus-infected cells using proteomic approaches[J]. Molecular & Cellular Proteomics, 2005, 4 (7): 902
- [7] Chen JH. Plasma proteome of severe acute respiratory syndrome analyzed by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2004, 101 (49): 17039-17044
- [8] Kong Q C, Xue, et al. Proteomic analysis of purified coronavirus infectious bronchitis virus particles [J]. Proteome Science, 2010, 8(1): 29
- [9] Emmott E C, Smith, et al. Elucidation of the avian nucleolar proteome by quantitative proteomics using SILAC and changes in cells infected with the coronavirus infectious bronchitis virus[J]. Proteomics, 2010, 10(19): 3558-3562
- [10] Jin D Y, Wang J, et al. Interaction of the Coronavirus Infectious Bronchitis Virus Membrane Protein with  $\beta$ -Actin and Its Implication in Virion Assembly and Budding[J]. PLoS ONE, 2009, 4(3): 4908
- [11] Xiao H L, Xu, et al. Coronavirus spike protein inhibits host cell translation by interaction with eIF3f[J]. PLoS ONE, 2008, 3(1): 1494
- [12] Cao Z, Han Z, et al. Proteomic analysis of chicken embryonic trachea and kidney tissues after infection in ovo by avian infectious bronchitis coronavirus[J]. Proteome Science, 2011,9(1): 11
- [13] Liu N, Song W, et al. Proteomics analysis of differential expression of cellular proteins in response to avian H9N2 virus infection in human cells[J]. Proteomics, 2008, 8(9): 1851-1858
- [14] Zou W, Ke J, et al. Proteomics Analysis of Differential Expression of Chicken Brain Tissue Proteins in Response to the Neurovirulent H5N1 Avian Influenza Virus Infection [J]. Journal of Proteome Research, 2010,9(8):3789-3798
- [15] 吴双, 开妍, 王晓泉, et al. 新城疫病毒感染细胞的双向凝胶电泳方法建立及其初步分析[J]. 中国家禽, 2010,32(10): 25-29  
Wu Shuang, Kai Yan, Wang Xiao-quan, et al. Establishment of Two-dimensional Gel Electrophoresis for Newcastle Disease Virus Infected-cells and Its Preliminary Application [J]. China Poultry, 2010,32(10):25-29
- [16] Ren X, Xue C, et al. Proteomic analysis of purified Newcastle disease virus particles[J]. Proteome Science,2012, 10(1): 32
- [17] Zheng X, Hong L, et al. Proteomics analysis of host cells infected with infectious bursal disease virus [J]. Molecular & Cellular Proteomics, 2008,7(3): 612-625
- [18] Wu Y, Peng C, et al. Proteome dynamics in primary target organ of infectious bursal disease virus [J]. Proteomics, 2012, 12 (11): 1844-1859
- [19] Thanthrige-Don N, Abdul-Careem M, et al. Analyses of the spleen proteome of chickens infected with Marek's disease virus[J]. Virology, 2009, 390(2): 356-367
- [20] Zhu JP, Zou W, et al. Analysis of cellular proteome alterations in porcine alveolar macrophage cells infected with 2009 (H1N1) and classical swine H1N1 influenza viruses [J]. Journal of Proteomics Research, 2012,75(6):1732-1741