

马立克氏病病毒超强毒感染鸡羽髓蛋白质组分析

陈欣虹, 卢占军, 钱琨, 金文杰, 王友, 秦爱建*

扬州大学兽医学院, 江苏省动物预防医学重点实验室, 扬州 225009

摘要: 【目的】羽毛是细胞游离马立克氏病病毒 (Marek's disease virus, MDV) 释放的部位, 为了解感染 MDV 后鸡羽中宿主基因表达的变化及对病毒感染的应答, 进行了 MDV 感染鸡的羽髓蛋白质组学分析。【方法】1 日龄无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 鸡人工感染 MDV 超强毒 RB1B 株 (1000PFU), 感染后 21d 采集鸡羽毛, 提取羽髓蛋白, 以 17cm, pH5-8 的 IPG 胶条进行二维电泳, 以未感染病毒的 SPF 鸡羽髓蛋白为对照, 使用 PDQuest 软件对二维电泳图谱进行差异蛋白分析, 并选取部分差异斑点进行质谱鉴定。【结果】PDQuest 软件分析发现攻毒组和对照组表达差异大于两倍的蛋白点有 41 个, 其中攻毒组表达上调的蛋白点 25 个, 下调的蛋白点 7 个, 新出现的蛋白点有 9 个。质谱分析共成功鉴定了 21 个斑点, 对应于 20 个蛋白。如载脂蛋白 AI (apolipoprotein AI)、14-3-3 sigma (两个斑点均为该蛋白)、癌蛋白 18 (stathmin) 等。【结论】功能预测表明这些蛋白涉及到宿主的抗病毒应答、物质代谢、细胞骨架成分、细胞增殖相关等方面。

关键词: 马立克氏病病毒, 羽髓, 蛋白质组

中图分类号: R37 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2011)10-1398-09

马立克氏病病毒 (Marek's disease virus, MDV) 为一种细胞结合型的 α -疱疹病毒, 其宿主鸡的羽囊上皮细胞 (feather follicle epithelium, FFE) 是形成有囊膜的游离病毒的部位。游离的有囊膜的病毒在 FFE 形成后, 通过皮肤或羽屑释放到环境中, 成为感染其他鸡的传染源。用 SYBR Green 定量聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 在感染 RB1B 7d 后的雏鸡羽中就可检测到病毒基因组, 14-28 d 达到高峰, 此后逐渐下降, 此外羽中病毒载量比其他器官如脾、淋巴瘤等要高^[1-2]。由于羽毛方便获取, 因此是研究病毒的复制、释放、病毒基因的表达及病毒与宿主相互作用的良好材料。

关于宿主对 MDV 感染应答在免疫器官如脾脏、胸腺、法氏囊等的研究较多^[3-5]。由于羽囊是形

成感染性的有囊膜病毒的部位, 近年来学者们开始关注羽囊中宿主的应答。Abdul-Careem 等报道: 感染 MDV 超强毒 RB1B 的鸡羽髓中会有 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞浸润, 同时干扰素 γ (interferon- γ , IFN- γ)、白介素 (interleukin, IL)-18、IL-6 等细胞因子以及主要组织相容性复合体 I (major histocompatibility complex I, MHC I) 的表达也会大大增强^[6-7]。这些研究也说明感染 MDV 鸡羽髓中已产生了较强的免疫应答, 但仍不足以阻止病毒的形成和释放, 其中的原因还需深入的研究。

虽然目前对羽髓中 MDV 的载量、宿主的应答等方面已有一些报道, 但这些研究都只是停留在 DNA 或 mRNA 水平上, 研究的往往只是单个或少数几个的基因。众所周知, 生命活动中执行各项功能

基金项目: 国家自然科学基金 (30871873, 31072135); 江苏省高校自然科学重大基础研究项目 (07KJA23021)

* 通信作者。Tel: +86-514-87979224; E-mail: aijian@yzu.edu.cn

作者简介: 陈欣虹 (1971-), 女, 江西上饶人, 博士研究生, 主要从事马立克氏病病毒的研究。E-mail: yixhchen@163.com

收稿日期: 2011-05-17; 修回日期: 2011-06-22

的是蛋白质, 病毒感染宿主的过程实际上就是病毒编码的蛋白质和宿主蛋白相互作用的过程, 与多种因素有关。目前已知: mRNA 水平并不能真实全面地反映蛋白质水平, 单个基因表达的变化更难以说明宿主对病毒感染的整体应答情况。蛋白质组学是一门可在整体及动态水平上进行蛋白质研究的新兴技术, 它利用高通量的二维电泳分离技术, 可同时分离分析大量的蛋白。利用蛋白质组学寻找和研究病毒毒力因子以及毒力因子与宿主之间的相互作用等, 对于病毒致病机理的研究、疾病的诊断、治疗和防治都十分重要。对含 MDV 的羽囊或羽髓提取蛋白进行二维电泳, 然后与正常无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 鸡比较, 寻找差异表达或新出现的蛋白, 可从整体水平上研究羽中宿主对 MDV 感染的应答以及病毒基因的表达, 从而进一步了解 MDV 传染的机制, 为 MDV 新型疫苗研制和 MD 控制提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器: 等电聚焦仪 PROTEAN IEF Cell、垂直电泳仪和垂直电泳槽 PROTEAN II xi、二维电泳蛋白提取液、蛋白定量试剂盒、IEF 水化液、pH 值范围为 5-8 的固相 pH 梯度 (immoblie pH gradient, IPG) 胶条、碘乙酰胺、矿物油等均为 Bio-Rad 产品; 尿素、硫脲、三羟甲基氨基甲烷、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺等为 AMERSCO 产品; 低熔点琼脂糖、考马斯亮蓝 G-250 为上海生工产品; 其他试剂均为国产分析纯产品。

1.1.2 实验动物和病毒: SPF 种蛋由北京梅里亚公司提供, 本实验室孵化至 9-11d, 按常规方法制备鸡胚成纤维细胞 (chicken embryo fibroblast, CEF), 次日用胰酶消化成均一的次代细胞 CEF 备用。取本室冻存的 MDV 超强毒 RB1B 株, 接种次代 CEF, 37°C CO₂ 培养箱培养, 待蚀斑长满瓶底 80% 时, 收获细胞。SPF 种蛋在严格控制外界污染的环境下孵化至出壳, 转移至 SPF 隔离器中饲养至使用日龄。

1.2 实验设计

48 只 SPF 鸡在孵化器中孵育出壳后, 随机分为攻毒组 (24 只) 和对照组 (24 只) 转移至隔离器中饲养, 24 h 内攻毒组每鸡腹腔注射 RB1B-CEF 0.2 mL

(1000 plaque-forming unit, 1000PFU)。对照组腹腔注射等体积 DMEM。感染后第 21 d (21 days post infected, 21dpi), 分别从对照组和攻毒组取 4 只鸡扑杀, 收集羽髓丰富的羽毛, 冻存于 -80°C 以备蛋白提取。

1.3 羽髓蛋白提取和二维电泳

取攻毒组及对照组鸡新生羽毛若干根, 剪下约 1 cm 羽根, 用干净镊子从羽根中挤出羽髓, 按本室建立的方法提取羽髓蛋白并进行二维电泳^[8]。过程简述如下: 每 50-100 mg 羽髓用 500 μL 裂解液 (Bio-Rad 163-2106 8 mol/L 尿素, 2% chaps, 50 mmol/L 二硫苏糖醇, 0.2% bio-lyte 3/10 两性电解质, 临用前加入蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氟至 1 mmol/L) 裂解, 取 400 μg 羽髓蛋白提取液加水化液 (同裂解液) 稀释至 300 μL, 进行第一向等电聚焦 (isoelectric focusing, IEF) 和第二向十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)。

1.4 凝胶染色、扫描、比对

电泳结束后, 使用胶体考染法对凝胶进行染色^[9]。Umax 扫描仪透射扫描 (分辨率 600dpi)。攻毒组和对照组各取 3 个个体的样品进行二维电泳, 每个样品至少重复 3 次, 每组各取 3 个质量最好的图谱, 即攻毒组和对照组各取 3 个来源于不同个体的图谱 (2 groups × 3 images), 用 PDQuest 8.0 软件同时进行比对, 分析两组间的差异表达蛋白。

1.5 差异点质谱分析及数据库检索

根据分析结果, 再经统计学分析, 切下攻毒组新增点及与两组之间差异显著及极显著的斑点共 25 个用于质谱鉴定, 委托上海复旦大学进行质谱分析 (部分蛋白点委托广州南方医科大学进行质谱分析)。步骤如下: 将胰酶消化后的肽段点于 MALDI192 孔靶上, 用 ABI4700 基质辅助激光电离解析串联飞行时间 (Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight-time of flight, MALDI-TOF-TOF) 质谱仪进行质谱分析。质谱结果以批处理送入 GPS Explore (Applied Biosystems, USA) 通过 MASCOT (MatrixScience, London, UK) 引擎检索。数据库为 Swiss-Prot/TrEMBL, 数据检索的方式为 combined, 最大允许漏切位点为 1; 酶为胰蛋白酶。质量误差范围设置: PMF 0.3 Da, MS/MS 0.4 Da; 在数据库检索时胰酶自降解峰和污染物质的峰都手工

剔除。根据 MASCOT-GPS 软件判定,蛋白质得分 (Protein score) >56 即为可信度较高。利用蛋白数据库网站对鉴定到的差异蛋白进行功能分析,获得这些蛋白更详细的资料,从而对蛋白进行功能分类。

2 结果和讨论

2.1 MDV 感染鸡羽髓蛋白表达差异点的鉴定

按上述方法,对感染 MDV 鸡的羽髓蛋白表达

情况进行了二维电泳分析。经软件统计分析,对照组和攻毒组较为清晰的点总数在 700-800 之间,各胶之间匹配率大于 90%,攻毒组与对照组相比,共检测到差异点 41 个,其中表达上调(达 2 倍或以上)的点有 25 个,表达下调的有 7 个,攻毒组新出现的点有 9 个。使用 PDQuest 软件将所有差异点标注在图谱上,其中“up”表示攻毒组上调点,“down”表示攻毒组下调点,“new”表示攻毒组新出现的点,详见图 1 和图 2。

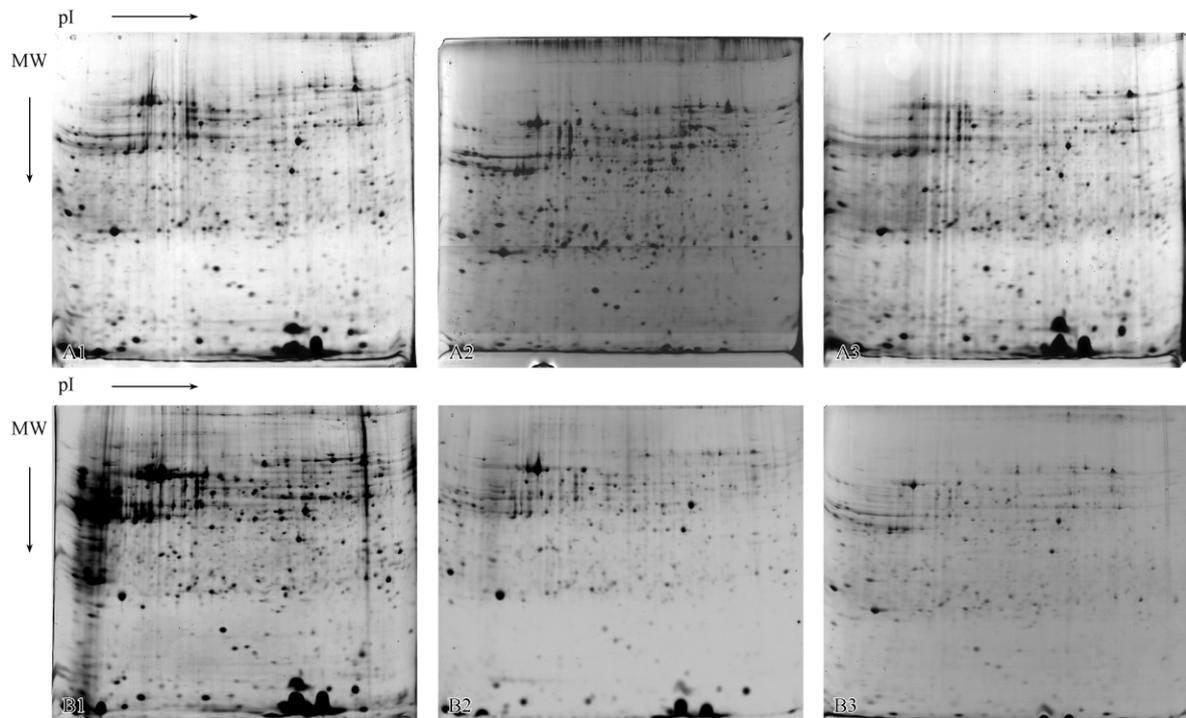


图 1 攻毒组与对照组羽髓蛋白二维电泳图谱

Fig. 1 Two dimensional electrophoresis maps of feather pulp protein from infective group and control group. Maps of A1, A2 and A3 were from three chickens of infected group, maps of B1, B2 and B3 were from three chickens of control group.

2.2 差异蛋白的质谱鉴定与数据库检索

将质谱检测得到的数据在蛋白质数据库进行检索。根据检索结果,鉴定成功 21 个斑点(另有 4 个斑点未得到特异性质谱峰或未检索到相应蛋白),对应于 20 种蛋白(其中有两个斑点均为 14-3-3 sigma 蛋白)。差异蛋白质的相关数据见表 1。经生物学信息分析,鉴定成功的蛋白主要涉及到细胞代谢、细胞增殖与分化、细胞骨架成分及免疫相关等方面。功能分类见表 2。

2.3 羽囊部分蛋白可能参与了抗病毒应答

虽然目前的 MD 疫苗能有效防止病毒感染后临床症状的发展,但却不能显著减少病毒在羽中的复

制及释放,这可能是因为宿主在羽中没有产生足够的免疫应答^[1]。本研究发现了一些与抗病毒感染相关的蛋白在 MDV 感染的鸡羽囊中表达上调。其中之一是载脂蛋白 AI (apolipoprotein AI, apo A I),该蛋白在感染组法氏囊^[10]及皮肤中亦上调^[11]。鸡的 apo A I 氨基酸序列与哺乳动物 apo A I 同源,但其组织分布与功能却与哺乳动物的 apo A E 相似,以前已有报道认为人的 apo A I 及 apo A E 具广谱的抗感染和抗病毒活性^[12],因此 apo A I 很可能参与了 MDV 感染后的抗病毒应答。另一个蛋白——卵转铁蛋白前体,在感染组中也是上调表达。卵转铁蛋白在 CEF 中的抗病毒作用已得到证实,MDV

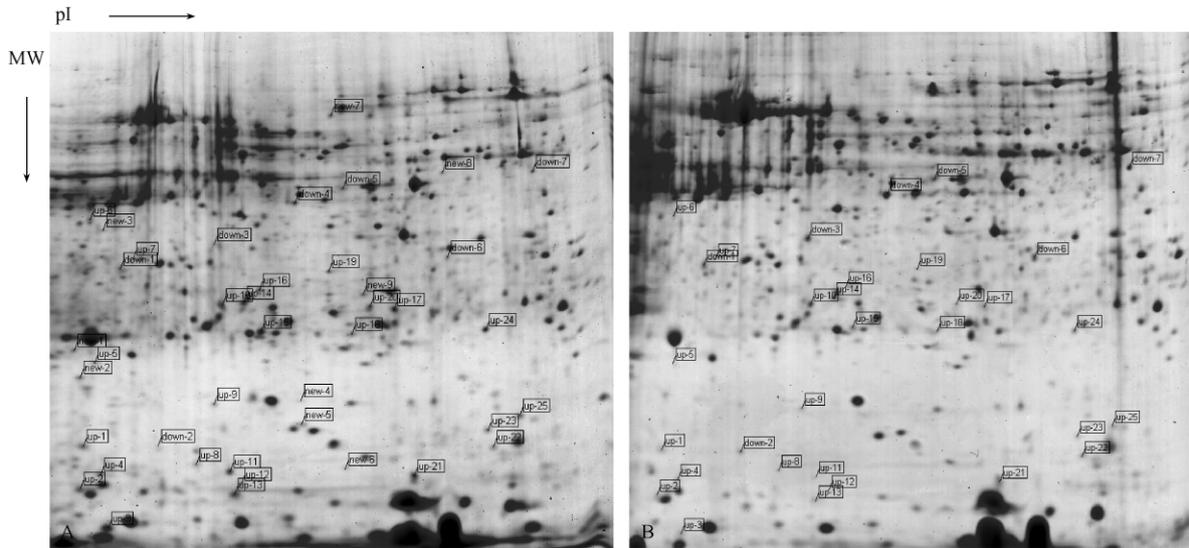


图 2 感染组和对照组羽髓蛋白差异点展示

Fig. 2 Differential expressed protein spots displayed in 2-DE protein images of feather pulp from MDV-infected group and control group.

A: MDV-infected group; B: Control group.

感染后的 CEF 和淋巴细胞中卵转铁蛋白的释放会上升,提示卵转铁蛋白的释放在防止整个组织受到病毒感染方面可能起着重要的作用^[13]。此外,本研究中免疫球蛋白 λ 链表达亦增加。Abdul-Careem 等也报道了感染 MDV 的鸡羽髓中细胞因子及 MHC I 等基因表达显著增强^[6]。所有这些结果都提示感染鸡羽中产生了宿主应答,但是仍不足以阻止病毒的复制和释放。

研究结果发现了一个蛋白酶体的调节因子 PSMC6 46kDa 蛋白,在感染组表现为下调。蛋白酶体系统是真核细胞主要的蛋白降解系统,在 MHC I 肽类生成中起着重要的作用。病毒蛋白被蛋白酶体降解成 8-10 个氨基酸残基的小肽,结合到 MHC I 分子上,然后被转运到细胞表面,将抗原肽呈递给细胞毒 T 细胞 (CD8 + Cytotoxic T lymphocyte, CD8 + CTL)。已发现有些病毒能通过改变泛素-蛋白酶体系统的蛋白降解途径来保护自己的生存^[14]。通过二维电泳分析已发现在 MDV 感染的鸡脾脏中蛋白酶体的一些成分表达下调^[4]。蛋白酶体激活因子的下调可能导致病毒蛋白不能及时降解,从而使病毒成功实施免疫逃逸,使鸡体产生免疫抑制,导致病毒大量增殖,最终形成肿瘤。

2.4 感染 MDV 后羽囊中与细胞增殖相关蛋白过度表达

MDV 感染最显著的特征就是感染细胞的转化

和随后的淋巴瘤形成,MDV 致癌机理也是 MDV 的研究中最令人感兴趣的。本研究鉴定到一些与细胞增殖、分化及肿瘤形成的相关蛋白,这些蛋白在感染组中均上调。主要有 14-3-3 sigma, S100 calcium binding protein A11、癌蛋白 18、真核翻译起始因子 5A-1 等。

本研究中鉴定到两个上调的斑点均为 14-3-3 sigma,两个斑点的分子量和等电点接近,很可能是 14-3-3 sigma 翻译后修饰的结果(如磷酸化)。14-3-3 蛋白家族参与了许多重要的生物学途径,如细胞增殖、凋亡、肿瘤发生等相关途径。14-3-3 sigma 是抑癌基因 p53 的正调控因子,因此是细胞周期的负调控因子,能抑制肿瘤的生长。已发现有些病毒蛋白能与 14-3-3 蛋白相互作用^[15-16],其中, Kaposi's 肉瘤相关疱疹病毒 (Kaposi's sarcoma-associated Herpesvirus, KSHV) 的潜伏蛋白 LANA2 就能与 14-3-3 sigma 相互作用,抑制转录因子 FOXO3a 的转录活性,将细胞阻断在 G2/M 期^[17]。MDV 的蛋白是否也能与 14-3-3 sigma 相互作用从而调控宿主细胞的周期还有待进一步研究。

癌蛋白 18,又名 stathmin (STMN1),是调节细胞周期和微管的重要蛋白。有报道认为 EB 病毒 (Epstein-Barr Virus, EBV) 感染能诱导 STMN1 表达,病毒编码的癌蛋白 LMP1,可通过 cdc2 介导调节 STMN1 信号通路^[18]。Chen 等也发现 EBV 病毒编

续表 1

No.	Spots on the 2-DE maps	Accession No.	Protein name	Protein score	Protein score C. I. %	MW	pI	Peptide information
12	Up-1	IP100577746	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1	105	100	15878.8	5.32	VHLVGDIFTGK EDLRLPEGELGR EDLRLPEGELGREIEQK KYEDICFSTHNDVPMK GDFQLIGIQDGFSLLLQDSGEVR
13	Up-11 and up-12	IP100592567	14-3-3 sigma	86	99.994	15099.6	5.66	MKGDYFR AVVEHGDELSNEER NLLSVAYKNVVGQQR TEEGDDKAQLVNEYR LAEQAERYEDMADFVK VISSIEHKTEEGDDKAQLVNEYR
14	Up-19	IP100682113	PKM2 58kDa protein	155	100	58010.9	7.68	IENHEGVR AADVHAVRK LDIDSEPTIAR NFGIICTIGPASR IYVDDGLISLLVK NDQTAQAHLYR IYVDDGLISLLVKEK GDLGIEPAEKVFLAQK RFDEIMEASDGNMVAR LNFSGTHEYHEGTEK FGVEQNVDMVFASFR CNRAGKPICATQMLESMIK EATESEASDPITYRPAIALDTKGPDIR
15	Up-17	IP100822447	RCJMB04_2917 37kDa protein	170	100	37238.1	8.73	GFGFVLFK DLTEYLSR SRGFGFVLFK FGEVVDCTIK YHQIGSGKCEIK EYVRQQ-QQQK MFIGLSWDTSKK GFGFVLFKDAASVEK GFCFITYTDEEPVKK SRGFGFV-LFKDAASVEK FGEVVDCTIKTPVTGR RGFCFITYTDEEPVKK
17	Down-6	IP100570965	PSMC6 46kDa protein	416	100	45769	7.1	YVVGRR EMFNAR DKALQDYR LSDGFNGADLR LLEHKEIDGR GCLLYGPPGT-GK QLTEEFVVK HGEIDYEAIVK LIREMFNAR AVASQLDCNFKL NVCTEAGMFAIR VALDMTTLTMR NVCTEAGMFAIR
18	Up-13	IP100578195	ACP1 Low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase	126	100	18184	6.81	SPIAEAVFR HGITMNHAR SVLFVCLGNICR AKIELLGAYDPQK LVTDEKVENKWR IDSAATSTYEIGNPPDYRGQTCMK QLIHEDPYGNEKDFETVYE-QCVR
19	Up-24	IP100576271	SOD2 Superoxide dismutase	64	99	24754.6	8.6	NVRPDYK DFGSFANFK GELMEAIKR DFGSFANFKEK GDVTAQVSLQPALK HHATYVNNLNVTTEK
20	Down-2	IP100820372	TTR 15kDa protein	417	100	14968.4	4.98	GSPAANVAVK VEFDTSSYWK AADGTWQDFATCK VLDVAVRGSPAANVAVKVFVK GLGLSPHEYADVVFANDSGHR HYTIAALLSPFSYSTTAVVSDPQE TTEFGEIHELITTEQFVEGVYR
21	Up-4	IP100574195	ALB Serum albumin	59	96.839	69871.9	5.51	LLINLIKR LCSAPAEER RPCFTAMGVDTK RKPQMTEEQIK NLQRFARDAEHK VSFLGHFIYSVAR IKDCCEKPIVER ADPERNECFLEFK

表 1 差异蛋白的数据库检索信息

No.	Spots on the 2-DE maps	Accession No.	Protein name	Protein score	Protein score C. I. %	MW	pI	Peptide information
1	New-1	gi 1227016	Apolipoprotein A I	250	100	28790.1	5.45	LTPVAEEAR VMEQLSNIR NLAPYSDELK WTEELEQYR LREDMAPYYK IRPFLDQFSK IRDMVDVYLETVK
2	Up-5	gi 113990814	Immunoglobulin lambda chain	125	100	11237.5	5.04	FSGSTSGSTLTLTTGVR SLVQAALTQPSSVSASFETVVR
3	Up-7	gi 11703121	Actin, cytoplasmic type 5	112	100	41835.875	3.30	IIAPPER IAPPERKIKIAPPER GYSFTTAAER QEYDESGFSIVHR GYSFTTAAERE- IVR QEYDESGFSIVHRK SYELPDGQVITGNER DLYANTVLSGGTTMYPGIADR
4	Up-9	gi 134978361	Calponin-1 (Calponin, smooth muscle)	52	98.635	32360	9.30	GASQAGMTAPGTKR FASQOGMTAYGTRR SNANFNRCPAYGLSAEVK GASQQG- MTVYGLPRQVYDPK HLYDPKLGTDQLDQATISLQMGTKN
5	New-4	gi 145383566	ATP synthase alpha subunit	94	99.972	60148.9	9.29	TSIAIDTIINQKR ILGADTSAELEETGR TGAIVDVPVGEELLGR GMSLNLEPDNVG- VVVFGNDR
6	New-5	gi 145384028	S100 calcium binding protein A11	154	100	11405.8	6.08	DPAVVDR VSPTETER NQKDPVVDR TFMNTELASFTK
7	New-7	gi 11351295	Ovotransferrin precursor	55	99.331	77726.4	6.85	NKADWAK YFGYTGALR TDERPASYFAVAVAR
8	Up-18	gi 134221747	Triosephosphate isomerase 1	365	100	22521.7	6.19	LRGWLK SHVSDAVAQSTR GAFTGEISFAMIK SLGELIHTLNGAK HVFGEDEL- IGQK TATPQQAQEVHEK KSLGELIHTLNGAK DIGAAWVILGHSR VVLAYEPVW- AIGTK RHVFGESDELIGQK
9	Up-3	IP100601777	TXN Thioredoxin	143	100	11692.8	5.1	KVQFSGANK CMPTFQFYK SVGNLADFEAELK MIKPPFHSLCDK SVGNLADFEAELKAAAGEK VQEFSGANKEKLEETIK
10	Up-21	IP100819509	STMN1 13kDa protein	139	100	12765.7	6.04	AIENNNFSK EAAPEFFLPPK ASGQAFELILGPR SKEAAPEFFLPPK RASQAFELILGPR SHEAEVLKQLAEKR DLSLEIEIKKLEAAEER
11	New-9	IP100684255	ETFA 34kDa protein	224	100	34196	6.54	SDRPELTSAR YTHICAGASAFCK LDVAPVSDIIEIK LSKSDRPELTSAR GTSFEAAPTSGGASVEK LLYDLADQLNAAVGASR RLGGEVSVCLVAGTSCDK

表 2 差异蛋白的功能分类

Table 2 Functional classification of differential expressed proteins from feather pulp of chickens infected with MDV

Functional classification	Proteins name
Immune-related proteins	Immunoglobulin lambda chain
	Ovotransferrin precursor
	RCJMB04_2917 37 kDa protein
cell proliferation-related proteins	14-3-3 sigma
	S100 calcium binding protein A11
	Stathmin
cytoskeleton	PSMC6 46kDa protein
	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1
	Actin , cytoplasmic type 5
metabolism-related enzymes	Calponin-1
	Apolipoprotein A I
	SOD2 Superoxidodismutase
	ATP synthase alpha subunit
	Triosephosphate isomerase 1
	ETFA 34kDa protein
	TXN Thioredoxin
PKM2 58kDa protein	
others	ACPI Low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase
	TTR 15kDa protein
	Albumin

码的激酶 BGLF4 能直接调节 stathmin 的活性,使得细胞微管动力学改变,可能调节相关的细胞进程^[19],这些报道都提示 stathmin 可能参与了 EBV 的致癌过程,那么, stathmin 在同为疱疹病毒的 MDV 感染过程中是否也有相似的作用呢?其结果仍不得而知。然而,这个蛋白在 MDV 感染的不同组织器官是变化的,法氏囊中呈波动性表达,4dpi 和 7dpi 时表达下调,14dpi 上调,21dpi 时又下调^[10];在脾脏,7dpi 时检测不到该蛋白的表达,而在 21dpi 该蛋白被诱导产生^[4]。其在不同组织器官及不同感染阶段的表达变化可能与病毒基因在不同感染阶段的表达变化有关。

S100 calcium binding protein A11 和真核翻译起始因子 5A-1 也被发现在多种人类肿瘤中过度表达,因此,它们也与肿瘤的发生、发展有关。然而,病毒引起的肿瘤形成是由多因素相互作用的复杂的过程,期间包括病毒与宿主多个因子之间的相互作用,这些蛋白在 MDV 致病及致瘤过程中到底有着什么作用,仍需进一步的研究。

2.5 MDV 感染后细胞的能量代谢发生改变

本研究鉴定到了一些参与能量代谢的蛋白和酶类,如 ATP 合酶 α 亚基、电子传递黄素蛋白 α 链、磷

酸丙糖异构酶 1 (TPI1) 等,这些蛋白在感染组均为上调表达。TPI1 是糖酵解途径中的一个关键酶,该蛋白和另两个糖酵解中的酶—— β -烯醇化酶和磷酸甘油酸激酶在感染组皮肤中亦上调。早在 80 年前, Warburg 就观察到:肿瘤组织糖酵解代谢途径非常活跃,即使在氧供应充分的条件下也主要是以无氧糖酵解获取能量。该现象被称为“Warburg”效应。因此,糖酵解途径中有关酶类在肿瘤细胞中往往过度表达^[20]。ATP 合酶位于线粒体内膜,催化 ATP 合成,然而,近年的研究发现 ATP 合酶在某些肿瘤组织内皮细胞的外表面也表达^[21];细胞表面的 ATP 合酶除合成 ATP 外,还可作为多种配体的受体及多种抗肿瘤药物的作用靶点。电子传递黄素蛋白 α 链是电子传递黄素蛋白的成分,电子传递黄素蛋白位于线粒体中,参与电子传递和氧化磷酸化,产生 ATP。我们推测这些能量代谢相关蛋白表达增强是对肿瘤细胞生长时高能量需求的一种代偿作用。

综上所述,本研究通过 2-DE 结合质谱技术,鉴定得到 MDV 感染后鸡羽髓中差异表达的多种蛋白,可能通过影响宿主防御、肿瘤相关基因表达、细胞物质与能量代谢等方式参与抗病毒感染和肿瘤的发生发展过程。这些发现可为进一步研究 MDV 致病机理提供一定的理论基础。

参考文献

- [1] Baigent SJ, Smith LP, Currie RJ, Nair VK. Replication kinetics of Marek's disease vaccine virus in feathers and lymphoid tissues using PCR and virus isolation. *The Journal of General Virology*, 2005, 86 (Pt11): 2989-2998.
- [2] Abdul-Careem MF, Hunter BD, Nagy E, Read LR, Sanei B, Spencer JL, Sharif S. Development of a real-time PCR assay using SYBR Green chemistry for monitoring Marek's disease virus genome load in feather tips. *Journal of Virological Methods*, 2006, 133 (1): 34-40.
- [3] Abdul-Careem MF, Hunter BD, Lee LF, Fairbrother JH, Haghghi HR, Read L, Parvizi P, Heidari M, Sharif S. Host responses in the bursa of Fabricius of chickens infected with virulent Marek's disease virus. *Virology*, 2008, 379 (2): 256-265.
- [4] Thantrige-Don N, Abdul-Careem MF, Shack LA, Burgess SC, Sharif S. Analyses of the spleen proteome of chickens infected with Marek's disease virus. *Virology*,

- 2009, 390(2):356-367.
- [5] Thanthrige-Don N , Parvizi P , Sarson AJ , Shack LA , Burgess SC , Sharif S. Proteomic analysis of host responses to Marek's disease virus infection in spleens of genetically resistant and susceptible chickens. *Developmental and Comparative Immunology* , 2010 ,34 (7) :699-704.
- [6] Abdul-Careem MF , Hunter BD , Sarson AJ , Parvizi P , Haghighi HR , Read L , Heidari M , Sharif S. Host responses are induced in feathers of chickens infected with Marek's disease virus. *Virology* , 2008 ,370(2) :323-332.
- [7] Abdul-Careem MF , Read LR , Parvizi P , Thanthrige-Don N , Sharif S. Marek's disease virus-induced expression of cytokine genes in feathers of genetically defined chickens. *Developmental and Comparative Immunology* , 2009 ,33(4) :618-623.
- [8] 陈欣虹, 钱锟, 卢占军, 张晨飞, 王友, 邵红霞, 金文杰, 秦爱建. 双向电泳分析鸡羽髓蛋白组学方法的建立. *中国动物传染病学报 (Chinese Journal of Animal Infectious Diseases)* , 2009 ,17(4) :25-30.
- [9] Candiano G , Bruschi M , Musante L , Santucci L , Ghiggeri GM , Carnemolla B , Orecchia P , Zardi L , Righetti PG. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* , 2004 ,25(9) :1327-1333.
- [10] Lu Z , Qin A , Qian K , Chen X , Jin W , Zhu Y , Eltahir YM. Proteomic analysis of the host response in the bursa of Fabricius of chickens infected with Marek's disease virus. *Virus Research* 2010 ,153(2) :250-257.
- [11] 陈欣虹. 马立克病毒感染鸡羽髓及皮肤蛋白质组学研究. 扬州大学博士论文, 2010.
- [12] Bhattacharjee PS , Neumann DM , Hill JM. A human apolipoprotein E mimetic peptide effectively inhibits HSV-1 TK-positive and TK-negative acute epithelial keratitis in rabbits. *Current eye research* , 2009 ,34(2) :99-102.
- [13] Federica Giardi M , La Torre C , Giansanti F , Botti D. Effects of transferrins and cytokines on nitric oxide production by an avian lymphoblastoid cell line infected with Marek's disease virus. *Antiviral Research* , 2009 ,81(3) :248-252.
- [14] Blanchette P , Branton PE. Manipulation of the ubiquitin-proteasome pathway by small DNA tumor viruses. *Virology* , 2009 ,384(2) :317-323.
- [15] Aoki H , Hayashi J , Moriyama M , Arakawa Y , Hino O. Hepatitis C virus core protein interacts with 14-3-3 protein and activates the kinase Raf-1. *Journal of Virology* , 2000 ,74(4) :1736-1741.
- [16] Kino T , Gragerov A , Valentin A , Tsopanomalou M , Ilyina-Gragerova G , Erwin-Cohen R , Chrousos GP , Pavlakis GN. Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 binds to 14-3-3 proteins and facilitates complex formation with Cdc25C: implications for cell cycle arrest. *Journal of Virology* , 2005 ,79(5) :2780-2787.
- [17] Munoz-Fontela C , Marcos-Villar L , Gallego P , Arroyo J , Da-Costa M , Pomeranz KM , Lam EW , Rivas C. Latent protein LANA2 from Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus interacts with 14-3-3 proteins and inhibits FOXO3a transcription factor. *Journal of Virology* , 2007 ,81(3) :1511-1516.
- [18] Lin X , Liu S , Luo X , Ma X , Guo L , Li L , Li Z , Tao Y , Cao Y. EBV-encoded LMP1 regulates Op18/stathmin signaling pathway by cdc2 mediation in nasopharyngeal carcinoma cells. *International Journal of Cancer* , 2009 ,124(5) :1020-1027.
- [19] Chen PW , Lin SJ , Tsai SC , Lin JH , Chen MR , Wang JT , Lee CP , Tsai CH. Regulation of microtubule dynamics through phosphorylation on stathmin by Epstein-Barr virus kinase BGLF4. *The Journal of Biological Chemistry* , 2010 ,285(13) :10053-10063.
- [20] Altenberg B , Greulich KO. Genes of glycolysis are ubiquitously overexpressed in 24 cancer classes. *Genomics* , 2004 ,84(6) :1014-1020.
- [21] Yamamoto K , Shimizu N , Obi S , Kumagaya S , Taketani Y , Kamiya A , Ando J. Involvement of cell surface ATP synthase in flow-induced ATP release by vascular endothelial cells. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2007 ,293(3) :H1646-1653.

Proteomics analysis of feather pulp from chickens infected with very virulent strain of Marek's disease virus

Xinhong Chen , Zhanjun Lu , Kun Qian , Wenjie Jin , You Wang , Aijian Qin*

Key Laboratory of Preventive Veterinary Medicine of Jiangsu , School of Veterinary Medicine , Yangzhou University , Yangzhou 225009 , China

Abstract: [Objective] Feather follicle epithelium (FFE) and feather of chicken are sites that produce and release enveloped infectious Marek's disease virus (MDV). In order to investigate host responses , the feather pulp from chickens infected with MDV was analyzed by proteomics. [Methods] Forty-eight one-day old specific pathogen free (SPF) chickens were randomly divided into two groups. One group of birds (n = 24) were inoculated intraperitoneally with 1000 plaque-forming unit (PFU) of the RB1B strain of MDV , the rest (n = 24) kept as uninfected control. Feather pulp were extracted from feather tips collected from chickens of infected and control group at 21 days post infected (dpi) , and dissolved in two dimensional electrophoresis (2-DE) sample buffer. The soluble proteins were separated by 2-DE , 6 images (2 groups × 3 images) of 2-DE were used to analyze the differentially expressed proteins with PDQuest 8.0.1. Some of spots changed significantly were further analyzed by mass spectrometry. [Results] 41 spots , which expression level changed above two fold , were detected. Among of them , 25 of these spots were up-regulated , 7 spots down-regulated , 9 spots newly induced expression in group infected with MDV. 21 spots , corresponding to 20 proteins , were successfully identified by mass spectrometry. These differential expressed proteins are apolipoprotein A I , 14-3-3 sigma (two spots are the same protein) , stathmin , and so on. [Conclusion] Bioinformatics analysis indicates these differential proteins are mainly associated with host response , metabolism , cytoskeleton , and cell proliferation.

Keywords: Marek's disease virus , feather pulp , proteomics

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Nature Science Foundation of China (30871873 ,31072135) and by the Major Basic Research of Natural Science Foundation of the Jiangsu Higher Education Institutions of China (07KJA23021)

* Corresponding author. Tel: +86-514-87979224; Fax: +86-514-87979217; E-mail: aijian@yzu.edu.cn

Received: 17 May 2011 / Revised: 22 June 2011