

# 网状内皮增生病毒感染改变外泌体 蛋白质组成和免疫调节功能

庄萍萍 王小满 孟 薇 李 根 成子强 王桂花\*

(山东农业大学动物科技学院, 泰安 271018)

**摘要** 采用间接免疫荧光、透射电镜观察、Western blot、质谱分析、酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)和流式细胞术分析技术检测了网状内皮增生病毒感染DF-1细胞的情况、感染细胞分泌外泌体(exosome)的形态大小、标志蛋白质水平以及REV对外泌体蛋白质组成和免疫功能的影响。结果显示, 接毒成功的DF-1细胞胞质中有明显的绿色荧光出现。提取的外泌体呈杯状, 平均直径大小在50~100 nm, 表达标志蛋白质Hsp70和Tsg101。与正常未感染细胞相比, REV感染细胞分泌的外泌体共存在58种表达水平差异的蛋白质。其中上调的46种, 包括REV的env蛋白gp90和gag-pol在内的4种蛋白质, 下降的12种。这些外泌体同时具有明显的促进脾细胞分泌IL-10的作用; 对CD4<sup>+</sup>T和CD8<sup>+</sup>T细胞均具有明显的抑制性。REV感染改变了外泌体的蛋白质组成, 尤其是携带了REV的重要成分, 该成分与引起的外泌体抑制性免疫调节作用密切相关。

**关键词** 网状内皮增生病毒感染; DF-1细胞; 外泌体; 蛋白质组; 免疫调节

## The Infection of Reticuloendotheliosis Virus Changed the Protein Composition and Immunomodulation of Exosome

Zhuang Pingping, Wang Xiaoman, Meng Wei, Li Gen, Cheng Ziqiang, Wang Guihua\*

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)

**Abstract** The indirect immunofluorescence, transmission electron microscopy, Western blot, mass spectrometry analysis, ELISA and flow cytometric were used to investigate the reticuloendotheliosis virus (REV) infected DF-1, the morphology and biomarkers of exosome and the effects of REV on protein composition and immunomodulation of exosome from infected DF-1 cells (Exo-R). The results demonstrated that green fluorescence was observed in the cytoplasm of infected DF-1 cells. Isolated exosome was up to 50-100 nm in diameter, with a cup-shape structure, and expressed marker proteins Hsp70 and Tsg101. Compared with exosome from uninfected cells, 58 kinds of different proteins were detected in Exo-R with up-regulated 46 kinds containing env protein gp90 and gag-pol of REV, and down-regulated 12 kinds. Furthermore, the secretion of IL-10 was increased from splenocytes treated by Exo-R. The number of CD4<sup>+</sup>T and CD8<sup>+</sup>T was also significantly decreased. The infection of REV induced the protein composition change of exosome,

收稿日期: 2016-01-13 接受日期: 2016-05-03

山东省中青年科学家奖励基金(批准号: BS2013SW016)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0538-8233881, E-mail: wguihua1126@163.com

Received: January 13, 2016 Accepted: May 3, 2016

This work was supported by the Promotive Research Fund for Young and Middle-aged Scientists of Shandong Province (Grant No.BS2013SW016)

\*Corresponding author. Tel: +86-538-8233881, E-mail: wguihua1126@163.com

网络出版时间: 2016-07-04 11:03:00

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160704.1103.002.html>

especially those important proteins carried by REV, which was associated with the immunosuppressive effects induced by exosome.

**Keywords** reticuloendotheliosis virus (REV); DF-1 cells; exosome; proteome; immunomodulation

网状内皮增生症病毒(reticuloendotheliosis virus, REV)是一种禽反转录病毒,引起禽网状内皮增生症,能诱发禽群产生严重的免疫抑制<sup>[1]</sup>,加剧其他疾病的易感性和死亡率,给养禽业造成巨大的经济损失。但由于REV感染本身引起的临床症状和致死作用不明显,且造成免疫抑制的机制不清楚,因此在临床上容易被忽视,目前尚无有效的疫苗或药物进行防控。

研究显示,外泌体(exosome)的生物学起源和反转录病毒人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)的出芽非常相似,包括它们的分子组成、在不同细胞上出芽的亚细胞定位以及将蛋白质传递给外泌体和病毒颗粒的靶作用信号等<sup>[2-3]</sup>。于是有人提出了“特洛伊”假说<sup>[4]</sup>,认为反转录病毒借助于外泌体途径以逃避免疫系统的监控。外泌体是活细胞的晚期内体(endosome)与细胞质膜融合以后释放到细胞外环境中的一种功能性小囊泡。这些小囊泡通过调节特异性蛋白质、脂质、mRNA和miRNA的分泌,在细胞间进行信号转导和蛋白质、脂质和核酸等的交换<sup>[5-9]</sup>,参与体内多种的生理和病理过程,比如发育<sup>[10]</sup>、免疫信息传递<sup>[11]</sup>、癌症<sup>[12-14]</sup>、病毒感染<sup>[15-16]</sup>、淀粉样变性疾病<sup>[17-18]</sup>等。随着外泌体功能不断地被发现,引起生命科学各领域越来越多的研究者们广泛的关注和重视。尤其是外泌体通过蛋白质和遗传物质交换在细胞间转移,与反转录病毒的复制增殖途径非常相似<sup>[19]</sup>,这为在反转录病毒感染机制的研究过程中寻找突破口的研究者们提供了新的思路。有研究显示,反转录病毒HIV感染细胞分泌的外泌体携带病毒的免疫抑制成分Nef(negative factor)<sup>[20]</sup>,并且会引起CD4<sup>+</sup>T细胞凋亡<sup>[21]</sup>。

那么外泌体又在反转录病毒REV的感染过程中有怎样的作用呢?外泌体的功能与其来源细胞密切相关,REV感染又会对细胞分泌的外泌体功能产生怎样的影响?本研究中,我们分别对REV感染与未感染的DF-1细胞分泌的外泌体进行了蛋白质组成和免疫功能的检测,发现REV感染细胞来源外泌体的蛋白质组成发生改变。其中,携带病毒的env蛋白和gag-pol聚合蛋白等,并对脾细胞表现出

一定的免疫抑制特性。这为解释外泌体在REV诱导免疫抑制过程中的作用以及阐明REV诱导免疫抑制的机制,提供了有力的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞和试剂

DF-1细胞由上海兽医研究所惠赠;DMEM、RPMI-1640培养基、胎牛血清购自Gibco公司;胰蛋白酶(Trypsin)购自Amresco公司;REV单抗(针对gp90)由本实验室制备;FITC标记羊抗鼠/抗兔IgG-FITC购自北京中杉金桥生物技术有限公司;其他试剂均为国产分析纯;抗Hsp70、CD81和Tsg101单克隆抗体购自Santa Cruz公司。

外泌体提取试剂盒购自Invitrogen公司;白细胞介素-2(interleukin-2, IL-2)、IL-10和IL-12的ELISA检测试剂盒购自Sigma公司。

### 1.2 细胞培养和病毒接种

取对数生长期的DF-1细胞,以 $5 \times 10^5/\text{mL}$ 的密度接种于6孔板,37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养,细胞完全贴壁后接种MOI值为0.01~0.10的REV,用1%血清的DMEM完全培养基培养2 h,弃上清,更换为5%血清的完全培养基,4 d后,收集细胞上清用于提取外泌体,细胞用于间接免疫荧光检测。未接REV细胞作为对照。

### 1.3 间接免疫荧光检测病毒接种情况

收集上清后的DF-1细胞,用冷的丙酮:乙醇(3:2)固定液固定8 min, PBS洗涤3次,干燥,加入REV特异性单抗(抗env蛋白单克隆抗体, 1:200), 37 °C孵育1 h, PBS洗涤3次,加入FITC标记的羊抗鼠IgG荧光抗体(1:100), 37 °C孵育50 min, PBS洗涤3次。置于荧光显微镜下观察、拍照。

### 1.4 外泌体的提取和鉴定

1.4.1 外泌体的提取 细胞上清以12 000 r/min离心30 min去除细胞碎片,转移上清,按照Total Exosome Isolation试剂盒的步骤从上清中提取外泌体, PBS重悬外泌体沉淀, -80 °C保存备用。

1.4.2 电镜观察外泌体的形态和大小 取10 μL

的外泌体重悬液滴加到200目的铜网上, 室温放置5 min使之完全吸附, 滤纸吸去多余液体, 滴加1%的醋酸双氧铀, 室温染色3~5 min, 滤纸吸去多余液体, 完全干燥后, 透射电镜下观察其形态和大小并拍照。

**1.4.3 Western blot检测外泌体标志蛋白质** BCA法测定纯化外泌体蛋白质含量, 分别取等量病毒感染与未感染细胞来源外泌体以及细胞裂解液, 加入4×SDS上样缓冲液, 95 °C水浴变性5 min。12%的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进行蛋白质分离, 然后电转到PVDF膜上, 5%脱脂奶粉封闭1 h。一抗(Hsp70为1:200, Tsg101为1:200, Grp78为1:200) 37 °C孵育2 h, PBS洗涤3次, 二抗(1:5 000) 37 °C孵育50 min, PBS洗涤3次。底片曝光显色。

### 1.5 质谱分析REV感染对DF-1细胞分泌外泌体蛋白组成的影响

取等量(25 µg)的感染与未感染细胞来源外泌体, 12% SDS-PAGE分离, 观察到差异条带后, FASP酶解。每份样品取100 µL, 加入DTT至终浓度为10 mmol/L, 37 °C, 30 min。加入IAA至终浓度为50 mmol/L, 37 °C避光反应30 min。加1 µg Lys-C, 25 °C反应3 h。加500 µL 25 mmol/L NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>(含2 µg Trypsin), 37 °C过夜。C18-SD Extraction Disk Cartridge脱盐处理, 真空冷冻干燥。20 µL 0.1% FA复溶肽段, 测量其 $D_{280}$ 值。

按照定量结果, 每组样品分别取2 µg酶解后产物进行LCMSMS分析。采用纳升流速HPLC液相系统EASY-nLC1000进行分离。色谱柱Thermo EASY column SC200 150 µm×100 mm (RP-C<sub>18</sub>)100%的A液(0.1%甲酸溶液)平衡, 样品由自动进样器上到Thermo EASY column SC001 traps 150 µm×20 mm (RP-C<sub>18</sub>) (Thermo), 再经色谱柱分离, 流速为300 nL/min。线性梯度B液(0.1%甲酸的乙腈溶液, 乙腈含量84%)洗脱。色谱柱的色谱梯度为: 0~100 min, B液线性梯度0%~55%, 100~108 min, B液55%~100%, 108~120 min, B液维持在100%。

酶解产物经毛细管高效液相色谱分离后, 用Q-Exactive质谱仪(Thermo Finnigan)进行质谱分析。分析120 min, 检测方式如下。正离子和母离子扫描范围: 350~1800 m/z, 多肽和多肽的碎片的质量电荷比按照每次全扫描(full scan)后采集20个碎片图谱(MS<sup>2</sup> scan, HCD)方式采集。MS<sup>1</sup>在M/Z 200时分辨

率为70 000, MS<sup>2</sup>在M/Z 200时分辨率为17 500。

### 1.6 REV感染对DF-1细胞分泌外泌体免疫功能的影响

**1.6.1 脾脏白细胞的分离培养** 无菌分离21日龄SPF鸡脾脏, 去除表面结缔组织, 剪碎, 200目细胞筛上研磨, 预冷PBS冲洗过滤。将研磨液以2 000 r/min离心5 min, 弃上清, PBS重悬。加入3倍体积PBS的红细胞裂解液, 置冰上裂解15 min, 2000 r/min离心10 min, 弃上清, 大量PBS清洗细胞。含10%胎牛血清的RPMI-1640完全培养基重悬细胞沉淀, 计数, 接种于24孔板。

**1.6.2 ELISA方法分析IL-2、IL-10和IL-12含量** 不同量的外泌体(2.5、5、10、25 µg)加入脾细胞, 分别于不同时间点(4、8、12 h)收集上清, ELISA检测试剂盒检测细胞上清中IL-2、IL-10和IL-12的量, 通过预实验确定外泌体的用量为10 µg, 检测时间点为0.5、1、2、4、8、12 h。

**1.6.3 流式细胞术分析** 收集外泌体作用后不同时间点(4、8、12、16 h)的脾细胞, 采用直接免疫荧光标记法, 直接加入标记有荧光素的抗CD4/CD8抗体进行双染标记。实验采用美国BD Accuri C6流式细胞仪分析。检测中细胞浓度为100~1 000/µL, 每次分析所需细胞总数为10 000个。脾细胞以2 500 r/min离心5 min。加1 mL Facs缓冲液(2% FBS)重悬, 2 500 r/min离心5 min, 弃上清, 加入100 µL的Facs Buffer。从各样品管中取出适量加入3个新EP管, 2 500 r/min离心5 min; 弃上清, 各样品管中加入20 µL荧光抗体, 避光染色30 min。1 mL的Facs Buffer洗涤, 2 500 r/min离心5 min, 200 µL多聚甲醛固定, 流式细胞术进行观察。

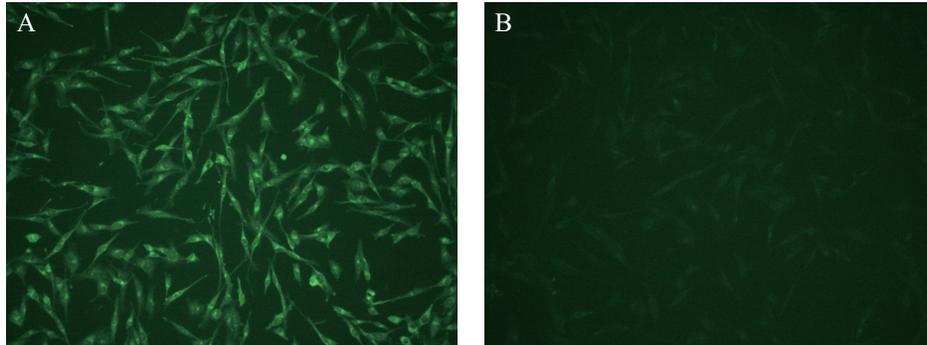
### 1.7 统计学分析

数据为3次以上独立实验结果, 以均值±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示。采用SPSS 17.0统计软件进行统计学分析。两组间比较采用F检验,  $P<0.05$ 为有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 REV接种细胞情况

为了确保REV成功感染DF-1细胞, 采用间接免疫荧光法进行检测。结果显示, 与对照组细胞相比较, 接种病毒组细胞的胞质中可以观察到明显的绿色荧光(图1), 说明病毒接种成功, 可以顺利进行后续实验。

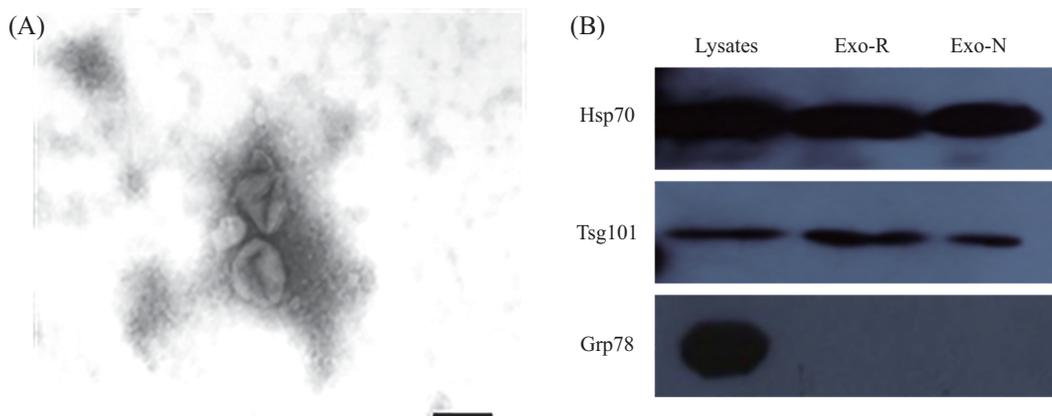


A: 正常细胞(200×); B: 接种REV细胞(200×)。

A: uninfected cells (200×); B: DF-1 cells incubated with REV (200×).

图1 间接免疫荧光法检测REV感染DF-1情况

Fig.1 Detection of REV in DF-1 cells by indirect immunofluorescence assay



A: 透射电镜观察外泌体的形态和大小(标尺=100 nm); B: Western blot分析细胞裂解液和外泌体。

A: observation of exosome morphology and size under microscopy (scale bar=100 nm); B: the cell lysates and exosome were analyzed by Western blot.

图2 外泌体的鉴定

Fig.2 Identification of exosome

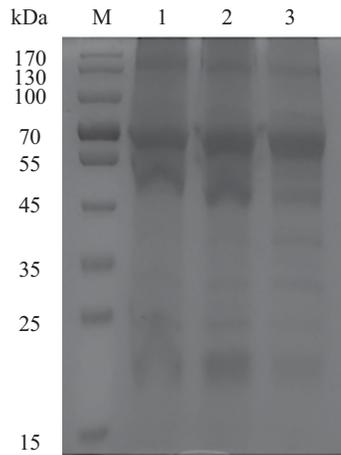
## 2.2 外泌体的鉴定

根据囊泡的形态和大小可以对外泌体进行初步鉴定, 重悬液的负染透射电镜观察结果显示(图2A), 提取的外泌体为杯状小囊泡, 直径大小在50~100 nm。

为了进一步鉴定提取的外泌体, 并排除细胞碎片污染, 采用Western blot法检测外泌体中的标志性蛋白Hsp70和Tsg101以及外泌体中不应该存在的内质网应激蛋白葡萄糖调节蛋白78(glucose regulated proteins 78, Grp78)。结果如图2B所示, 在不同来源外泌体和细胞裂解液的70 kDa和45 kDa处均可以检测到目的条带, 说明提取的外泌体携带了Hsp70和Tsg101蛋白质。但是只在细胞裂解液中检测到了Grp78, 外泌体中均未检测到, 说明纯化提取的外泌体不存在细胞碎片污染。

## 2.3 REV感染对DF-1细胞分泌的外泌体蛋白质组成的影响

通过SDS-PAGE凝胶电泳, 我们发现, DF-1细胞感染REV后分泌的外泌体(Exo-R)蛋白分离条带与正常未感染细胞分泌的外泌体(Exo-N)在蛋白条带的分布和表达量上存在一定的差异性(图3)。为了进一步确定不同来源外泌体携带的蛋白质成分的差异以及不同的蛋白质成分是否与病毒自身成分之间有关联性, 本研究采用质谱分析法对不同来源外泌体的蛋白质组成进行了分析和鉴定。结果显示, 肽段信号强弱和分子量大小分布的情况与SDS-PAGE的结果相符合, 通过与鸡和REV的蛋白质库进行多肽序列比对, 发现Exo-R与Exo-N相比, 共有58种差异明显的蛋白质, 其中表达上调的有46种, 下降的有12种(图4)。REV自身的成分有4种, 分别是gag-pol聚



M: 预染蛋白质marker; 1~2: 正常DF-1细胞分泌的外泌体; 3: REV感染的DF-1细胞分泌的外泌体。

M: preprinted protein marker; 1-2: exosome secreted from the normal DF-1 cells; 3: exosome secreted from REV infected DF-1 cells.

图3 SDS-PAGE 分析外泌体蛋白质组成

Fig.3 The protein composition of exosome analysed by SDS-PAGE

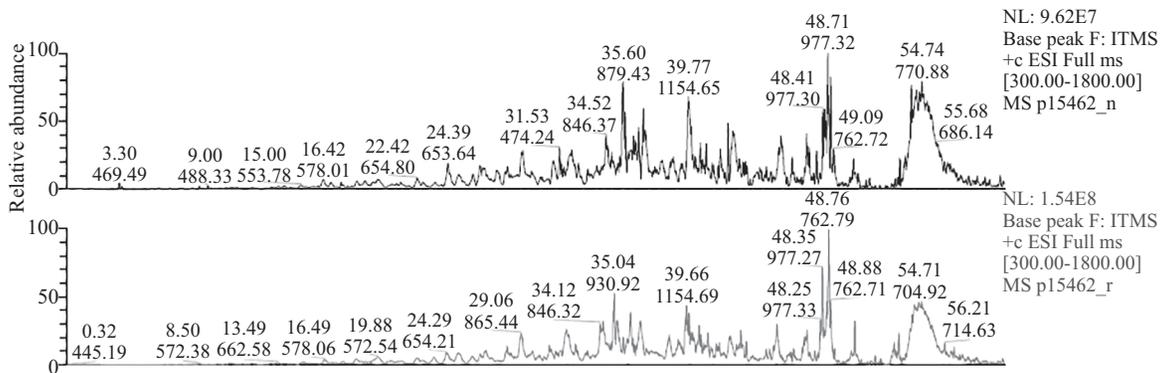


图4 质谱分析Basepeak图谱

Fig.4 Mass spectrometry Basepeak map

合蛋白、env蛋白gp90、聚合酶、酪氨酸蛋白激酶转移蛋白(表1)。

## 2.4 REV感染对DF-1细胞分泌外泌体免疫功能的影响

2.4.1 不同来源外泌体对脾细胞分泌IL-2、IL-10和IL-12的影响 不同来源外泌体在蛋白质组成上存在很大差异,尤其是Exo-R携带病毒重要成分,那么它对免疫细胞的功能又有何影响呢?我们分别检测了Exo-R作用于脾细胞后,细胞上清中IL-2、IL-10和IL-12在不同时间的分泌情况。结果显示,Exo-R与Exo-N相比,在4 h时明显抑制IL-2的分泌,但与空白对照组比,没有明显差异;而在8 h时又明显促进,在12 h时再次明显抑制,但与空白对照组比无差异(图5A),说明Exo-R对脾细胞分泌IL-2的影响作用不明

显。Exo-R对IL-10的分泌的影响开始更早,在0.5 h时已经具有明显的促进作用,在2~12 h作用更明显(图5B),说明Exo-R对脾细胞分泌IL-10具有促进作用。Exo-R对IL-12的分泌影响不明显(图5C)。

2.4.2 不同来源外泌体对CD4<sup>+</sup>T和CD8<sup>+</sup>T细胞的影响 为进一步明确Exo-R对脾细胞的免疫功能的影响,我们又在不同时间点检测了Exo-R对脾细胞中CD4<sup>+</sup>T和CD8<sup>+</sup>T细胞表达分化情况的影响。结果显示,从12 h开始,Exo-R对CD4<sup>+</sup>T细胞具有明显的抑制性作用(图6A)。Exo-R对CD8<sup>+</sup>T细胞的抑制性作用要早于对CD4<sup>+</sup>T细胞的影响,从4 h开始,就出现明显的抑制性作用(图6B)。Exo-R对CD4<sup>+</sup>T和CD8<sup>+</sup>T细胞的抑制性时间与CD4<sup>+</sup>T一致,也是从12 h开始的(图6C)。

表1 不同来源外泌体的差异表达蛋白

Table 1 Differentially expressed proteins in exosomes from different cells

序号 No.	蛋白质登录号 Protein IDs	蛋白质名称 Protein names	iBAQ R	iBAQ N	变化倍数 Change times
1	>tr F1P5T8	Cadherin-13	4 522 400	37 709	↑ 120
2	>sp O73775	Fibulin-1	5 652 400	104 750	↑ 54
3	>tr D0EKR3	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	64 696 000	3 923 000	↑ 16.5
4	>sp Q90WD0	Actin-related protein 3	12 500 000	926 100	↑ 13.5
5	>sp Q5ZHZ0	Spliceosome RNA helicase DDX39B	3 612 100	307 690	↑ 11.7
6	>tr F1NW06	Tetraspanin	81 167 000	11 147 000	↑ 8
7	>sp O13268	Proteasome subunit alpha type-7	31 825 000	4 012 000	↑ 7.9
8	>tr F1NWP3	Heat shock cognate 71 kDa protein	82 868 000	11 096 000	↑ 7.8
9	>tr F1NVA4	Nucleophosmin (Fragment)	31 995 000	4 160 800	↑ 7.7
10	>tr Q155F6	Tumor necrosis factor-inducible protein 6	33 149 000	5 559 600	↑ 6
11	>sp P53488	Actin-related protein 2	12 454 000	2 073 800	↑ 6
12	>sp P62801	Histone H4	85 413 000	15 290 000	↑ 5.6
13	>sp P20785	Collagen alpha-1(VI) chain	12 899 000	2 361 600	↑ 5.5
14	>sp P13731	Serpin H1	5 625 500	1 036 900	↑ 5.4
15	>sp P00337	L-lactate dehydrogenase B chain	1 458 500	7 024 500	↓ 4.8
16	>sp P63247	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1	7 303 900	1 538 400	↑ 4.7
17	>tr R4GM10	Fructose-bisphosphate aldolase	7 531 100	1 739 400	↑ 4.3
18	>sp O93510	Gelsolin	3 344 100	823 480	↑ 4
19	>tr Q9IAU4	Alpha 1 (V) collagen	1 347 900	337 550	↑ 4
20	>tr O57658	Metalloendopeptidase (Fragment)	274 680	72 642	↑ 3.7
21	>sp P08110	Endoplasmic	1 416 100	402 570	↑ 3.5
22	>tr E1C6J9	Thy-1 membrane glycoprotein	33 712 000	9 709 100	↑ 3.4
23	>tr Q6KDZ1	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein	15 667 000	4 834 000	↑ 3.2
24	>sp Q5ZLN1	Phosphoglycerate mutase	29 747 000	9 485 100	↑ 3.1
25	>sp Q8JFP1	Eukaryotic initiation factor 4A-II	6 450 200	2 228 200	↑ 2.9
26	>sp P17785	Pyruvate kinase	168 310 000	60 593 000	↑ 2.7
27	>tr F1NW43	Thioredoxin	50 344 000	19 551 000	↑ 2.6
28	>sp P08629	Thioredoxin	44 090 000	17 312 000	↑ 2.5
29	>sp Q25C36	Thioredoxin	15 819 000	6 237 400	↑ 2.5
30	>sp P43233	Cathepsin B	1 108 200	443 150	↑ 2.5
31	>tr F1N9S7	Annexin	19 454 000	7 584 700	↑ 2.5
32	>sp P08250	Apolipoprotein A-I	5 087 000	2 028 100	↑ 2.5
33	>sp Q90953	Versican core protein	2 687 000	1 121 000	↑ 2.4
34	>sp Q90835	Elongation factor 1-alpha 1	52 595 000	22 164 000	↑ 2.4
35	>tr Q5ZJX9	Proteasome subunit alpha type	13 161 000	5 516 900	↑ 2.4
36	>sp P07583	Beta-galactoside-binding lectin	18 196 000	7 593 100	↑ 2.3
37	>sp P24802	Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1	47 443 000	20 673 000	↑ 2.3
38	>tr F1NX22	Collagen alpha-1(XII) chain	297 680 000	130 250 000	↑ 2.3
39	>sp P50890	40S ribosomal protein SA	5 011 600	2 186 000	↑ 2.2
40	>tr F1NU17	Phosphoglycerate kinase	25 440 000	11 842 000	↑ 2.1
41	>sp P17153	Annexin A5	36 968 000	17 309 000	↑ 2
42	>sp P01994	Hemoglobin subunit alpha-A	5 513 100	2 840 200	↑ 2
43	tr Q462Q9	Polymerase (Fragment) OS		No	
44	sp P00544	Tyrosine-protein kinase transforming protein Fgr		No	
45	tr C8CKX0	Gp90 protein (Fragment)		No	
46	tr A7LKA6	Gag-pol polyprotein		No	
47	>sp P20111	Alpha-actinin-2	3 038 300	47 861 000	↓ 16
48	>tr E1C353	Collagen alpha-1(VIII) chain	623 340	8 093 500	↓ 13
49	>sp P24797	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-2	316 410	2 355 300	↓ 7.4
50	>sp P68034	Actin, alpha cardiac muscle 1	95 125 000	545 450 000	↓ 5.7
51	>sp Q5ZL72	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	627 620	2 931 300	↓ 4.6
52	>sp P02612	Myosin regulatory light chain 2, smooth muscle major isoform	1 055 300	3 294 800	↓ 3
53	>sp O57535	Nucleoside diphosphate kinase	522 770	1 404 100	↓ 2.5
54	>sp Q04619	Hsp90	701 870	1 741 500	↓ 2.5
55	>tr Q5ZL39	Serine/threonine-protein phosphatase	1 061 700	2 754 800	↓ 2
56	>sp P62149	Calmodulin	7 666 100	15 357 000	↓ 2
57	>tr F1P2G4	Adenylyl cyclase-associated protein	682 970	1 318 400	↓ 2
58	>sp P98157	Low-density lipoprotein receptor-related protein 1	534 460	1 024 400	↓ 2

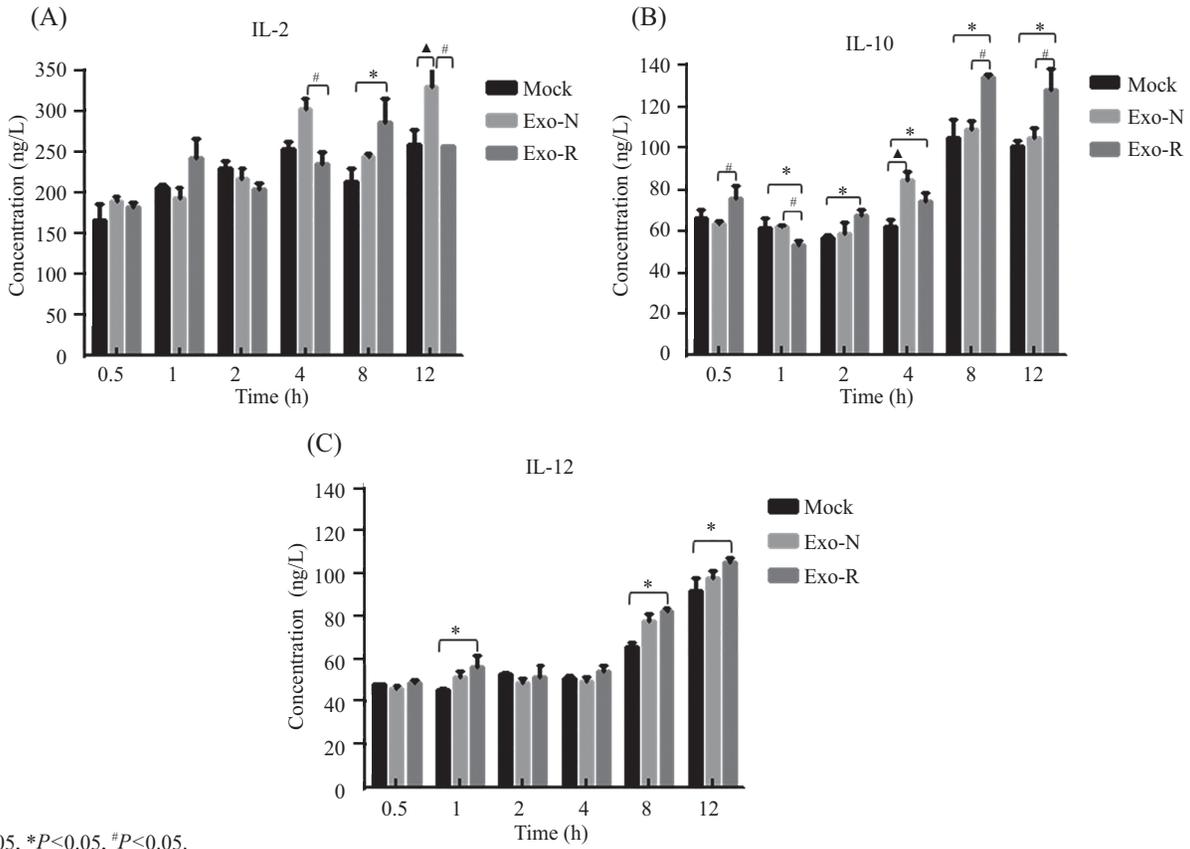


图5 Exo-R在不同时间对脾细胞分泌IL-2、IL-10和IL-12的影响

Fig.5 The effects of Exo-R on IL-2, IL-10 and IL-12 secreted from splenocytes at different times

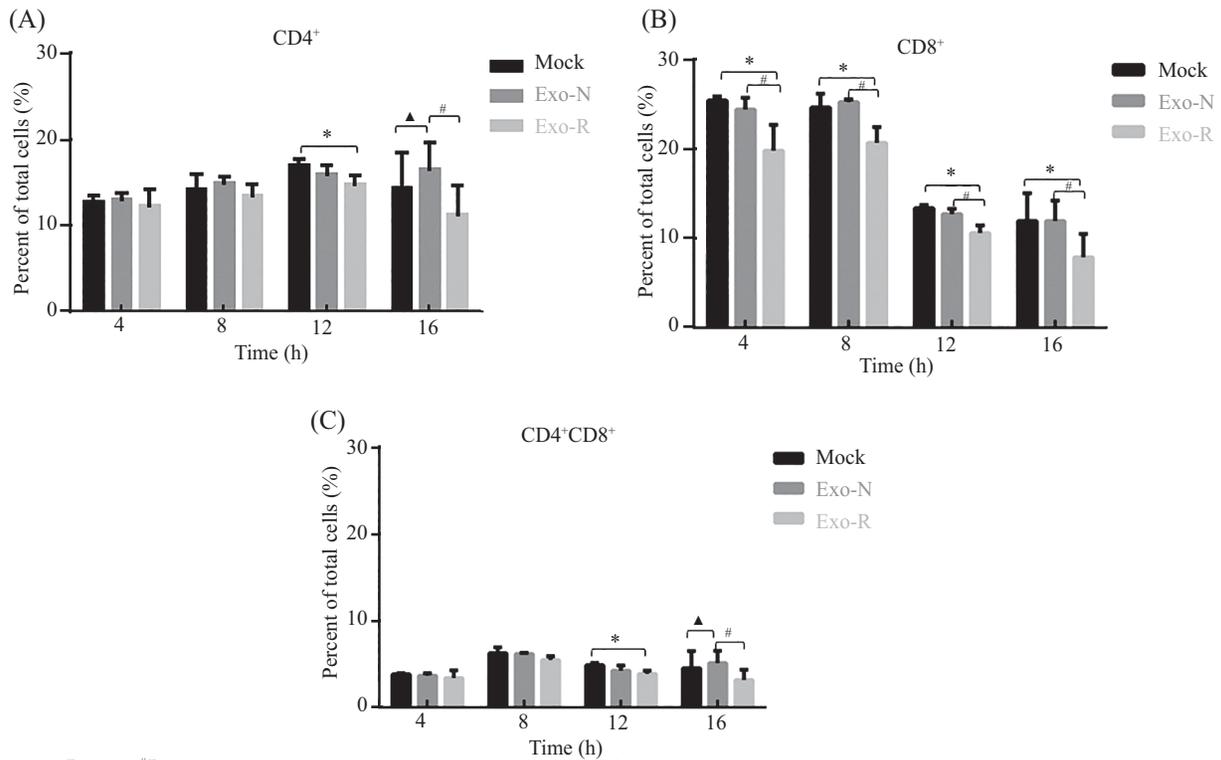


图6 Exo-R对脾细胞中CD4<sup>+</sup>T和CD8<sup>+</sup>T细胞的影响

Fig.6 The effects of Exo-R on CD4<sup>+</sup>T and CD8<sup>+</sup>T cells

### 3 讨论

外泌体的蛋白质组成和功能与其来源细胞密切相关<sup>[23]</sup>, 蛋白组成主要分两大部分: 所有外泌体中都有的普通蛋白质和特异性蛋白质, 前者主要包括与外泌体的生物学起源和功能相关的蛋白质, 后者包括存在于来源细胞的特异性蛋白质<sup>[5]</sup>。本研究中, 我们从Exo-R和Exo-N中均检测到了外泌体的标志蛋白质Hsp70、Tsg101和CD81, 说明病毒感染并未影响外泌体的生物学起源。但值得注意的是, 质谱分析显示, 二者无论在蛋白质组成还是在同种蛋白质的含量方面都存在明显差异(表1), REV感染主要引起外泌体携带的大部分蛋白质水平上调, 共有46种, 其中最显著的钙黏蛋白13上调可达120倍, 其次是衰老关键蛋白1表达上调54倍。更重要的是, 我们在Exo-R中检测到了4种REV自身的成分, 尤其是病毒的免疫原性蛋白质gp90。而引起表达下调的蛋白质无论是数量还是倍数都远远低于上调蛋白质, 仅为12种, 其中最显著的 $\alpha$ -辅肌动蛋白-2下调16倍, 其次是VIII型胶原蛋白 $\alpha$ -1链下调13倍。

钙黏蛋白13又称T-钙黏蛋白, 是近来发现的一种新型、非常独特的钙黏蛋白分子, 在维持正常细胞的表型中起重要作用。大量的研究表明, 高表达的T-钙黏蛋白可以抑制表皮生长因子引起的细胞生长和入侵, 因此与肿瘤的形成和发展密切相关<sup>[24]</sup>。衰老关键蛋白1是一种钙结合糖蛋白, 通过与纤连蛋白、层黏连蛋白、巢蛋白等结合, 而与细胞外基质结构比如微纤维、基底膜弹性纤维和纤维蛋白密切相关。有研究显示, 衰老关键蛋白1可以抑制纤连蛋白调节的细胞的黏附和运动<sup>[25]</sup>。而细胞的黏附性和运动性降低时不利于肿瘤形成。 $\alpha$ -辅肌动蛋白-2是 $\alpha$ -辅肌动蛋白的一种, 在稳定细胞黏附、调节细胞形状和细胞运动中发挥重要作用, 其表达下调与细胞运动增强有关, 促使细胞肿瘤化。VIII型胶原蛋白 $\alpha$ -1是短链胶原蛋白家族的成员之一, 具体功能不确定, 据推测其可以为多种细胞提供基质以及促进在血管形成时内皮细胞的运动、内膜受损伤时平滑肌细胞运动和纤维化时成纤维细胞的运动<sup>[26]</sup>。因此, Exo-R携带表达上调最显著的两种蛋白质与抑制肿瘤形成有关。而Exo-R携带表达下调最显著的两种蛋白质与促进肿瘤形成密切相关。那么在REV感染诱导肿瘤发生过程中, Exo-R究竟发挥着怎样的作用, 有待进一步的研究。

REV感染后除了引起DF-1细胞分泌的Exo-R携带蛋白质成分的表达显著差异, 还携带了病毒的关键性成分, 尤其是抗原性蛋白质gp90。外泌体可以与其他细胞表面的差异受体形成复合物, 然后与细胞膜融合, 将携带的成分释放到靶细胞内调节其生物学功能<sup>[27]</sup>。免疫系统的关键作用就是免疫对抗细胞内病原, 那么Exo-R携带了病毒的成分后会对免疫细胞产生怎样的影响呢? 通过Exo-R对脾细胞作用的体外试验, 我们发现, 携带REV成分的Exo-R明显地促进了脾细胞分泌IL-10的作用; 对CD4<sup>+</sup>T和CD8<sup>+</sup>T细胞均也具有明显的抑制性。而IL-10主要来源于Th2和部分调节性T细胞, 能抑制Th1细胞应答及合成细胞因子, 抑制巨噬细胞的抗原提呈及合成细胞因子, 具有抗炎和免疫抑制作用。CD4<sup>+</sup>T辅助细胞, CD8<sup>+</sup>T杀伤性细胞, 通过介导体液而发挥免疫作用。我们的实验结果说明, Exo-R对脾细胞具有明显的抑制性作用。但这种抑制性作用具有一定的浓度依赖性和时效性, 提示REV可能利用外泌体作为一种短程机制与受体细胞相互作用, 通过创造一种免疫抑制的微环境, 进一步促进病毒的复制增殖。但如果REV病毒利用外泌体途径将自身的重要成分转移在细胞间进行转移, 造成免疫抑制微环境, 那么又如何将这些重要成分重新组装形成新的病毒粒子的呢? 究竟REV和外泌体共享了同一个起源途径, 还是只利用了相同的细胞内运输通道而在同一位置汇聚? 这些都有待进一步研究。

### 参考文献 (References)

- 1 Witter R, Fadly A. Reticuloendotheliosis virus. Diseases of Poultry Ames: Iowa State University Press 2003; 517-36.
- 2 Booth AM, Fang Y, Fallon JK, Yang Jr M, Hildreth JEK, Gould SJ. Exosome and HIV Gag bud from endosome-like domains of the T cell plasma membrane. J Cell Biol 2006; 172(6): 923-36.
- 3 Krishnamoorthy L, Bess JW, Preston AB, Nagashima K, Mahal LK. HIV-1 and microvesicles from T cells share a common glycome, arguing for a common origin. Nat Chem Biol 2009; 5(4): 244-50.
- 4 Nguyen DG, Booth A, Gould SJ, Hildreth JEK. Evidence that HIV budding in primary macrophages occurs through the exosome release pathway. J Biol Chem 2003; 278(52): 52347-54.
- 5 Thery C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosome: Composition, biogenesis and function. Nat Rev Immunol 2002; 2(8): 569-79.
- 6 Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. Nat Chem Biol 2007; 9(6): 654-9.
- 7 Skog J, Wurdinger T, Van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Cater

- BS, *et al.* Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Chem Biol* 2008; 10(12): 1470-6.
- 8 Schneider A, Simons M. Exosome: Vesicular carriers for intercellular communication in neurodegenerative disorders. *Cell Tissue Res* 2009; 352(1): 33-47.
- 9 Yeh YY, Ozer HG, Lehman AM, Maddocks K, Yu L, Johnson AJ, *et al.* Characterization of CLL exosome reveals a distinct microRNA signature and enhanced secretion by activation of BCR signaling. *Blood* 2015; 125(21): 3297-305.
- 10 Kolotuev I, Apaydin A, Labouesse M. Secretion of Hedgehog-related peptides and WNT during *Caenorhabditis elegans* development. *Traffic* 2009; 10(7): 803-10.
- 11 Thery C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol* 2009; 9(8): 581-93.
- 12 Keller S, König A-K, Marmé F, Runz S, Wolterink S, Koensgen D, *et al.* Systemic presence and tumor-growth promoting effect of ovarian carcinoma released exosome. *Cancer Lett* 2009; 278(1): 73-81.
- 13 Yu X, Riley T, Levine AJ. The regulation of the endosomal compartment by p53 the tumor suppressor gene. *FEBS J* 2009; 276(8): 2201-12.
- 14 Valenzuela MM, Bennit HR, Gonda A, Osterman CJ, Hibma A, Khan S, *et al.* Exosome secreted from human cancer cell lines contain inhibitors of apoptosis (IAP). *Cancer Micro* 2015; 8(5): 63-75.
- 15 Aqil M, Naqvi AR, Bano AS, Jameel S. The HIV-1 Nef protein binds argonaute-2 and functions as a viral suppressor of RNA interference. *PLoS One* 2013; 8(9): e74472.
- 16 Fang Y, Wu N, Gan X, Yan W, Morrell JC, Gould SJ. Higher-order oligomerization targets plasma membrane proteins and HIV gag to exosome. *PLoS Biol* 2007; 5(6): e158.
- 17 Alais S, Simoes S, Baas D, Lehmann S, Raposo G, Darlix JL, *et al.* Mouse neuroblastoma cells release prion infectivity associated with exosomal vesicles. *Biol Cell* 2008; 100(10): 603-18.
- 18 Wang GH, Zhou XM, Bai Y, Yin XM, Yang LF, Zhao DM. Hsp70 binds to PrPC in the process of PrPC release via exosome from THP-1 monocytes. *Cell Biol Int* 2011; 35(6): 553-8.
- 19 Izquierdo-Useros N, Puertas M, Borràs F, Blanco J, Martínez-Picado J. Exosomes and retroviruses: the chicken or the egg? *Cell Microbiol* 2010; 13(1): 10-7.
- 20 Ali SA, Huang MB, Campbell PE, Roth WW, Campbell T, Khan M, *et al.* Genetic characterization of HIV type 1 Nef-induced vesicle secretion. *AIDS Res Hum Retrov* 2010; 26(2): 173-92.
- 21 Lenassi M, Cagney G, Liao M, Vaupoti T, Bartholomeeusen K, Cheng Y, *et al.* HIV Nef is secreted in exosomes and triggers apoptosis in bystander CD4<sup>+</sup> T cells. *Traffic* 2010; 11(1): 110-22.
- 22 Marimpietri D, Petretto A, Raffaghello L, Pezzolo A, Gagliani C, Tacchetti C, *et al.* Proteome profiling of neuroblastoma-derived exosome reveal the expression of proteins potentially involved in tumor progression. *PLoS one* 2013; 8(9): e75054.
- 23 Théry C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosome: Composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol* 2002; 2(8): 569-79.
- 24 Yang J, Li L, Wang W, Chen YN, Wang SB, Zhou YZ. T-cadherin association with clinicopathological features and prognosis in axillary lymph node-positive breast cancer. *Breast Cancer Res Tr* 2015; 150(1): 119-26.
- 25 Twal WO, Czirok A, Hegedus B, Knaak C, Chintalapudi MR, Okagawa H, *et al.* Fibulin-1 suppression of fibronectin-regulated cell adhesion and motility. *J Cell Sci* 2001; 114(24): 4587-98.
- 26 Shuttleworth CA. Type VIII collagen. *Int J Biochem Cell B* 1997; 29(10): 1145-8.
- 27 Li X, Zhang Z, Beiter T, Schluesener HJ. Nanovesicular vaccines: Exosome. *Archi Immunol Therap Experim Edit* 2005; 53(4): 329-35.