

# 我国不同流行区婴儿利什曼原虫前鞭毛体比较蛋白质组学分析

危芙蓉, 高春花, 汪俊云\*, 杨玥涛, 石锋

**[摘要]** **目的** 应用比较蛋白质组学方法分析两株来自我国内脏利什曼病不同流行区的婴儿利什曼原虫前鞭毛体蛋白表达差异, 为筛选和鉴定我国不同流行区利什曼原虫致病差异相关分子奠定基础。**方法** 分别培养两株分离于我国四川九寨沟县(SC6株)和新疆伽师县内脏利什曼病流行区(JIASHI-5株)的婴儿利什曼原虫前鞭毛体, 经酶解后进行液相色谱串联质谱(Liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)非标记(Label-free)定量分析, 利用MaxQuant软件(版本号1.3.0.5)查库, 进行非标记定量(Label-free quantitation, LFQ)分析。**结果** 成功鉴定蛋白4 274个, 筛选出差异蛋白1 219个(差异倍数 $> 2.0$ 或 $< 0.5$ ,  $P < 0.05$ ), 其中JIASHI-5株前鞭毛体特有蛋白550个, SC6株前鞭毛体特有蛋白174个。SC6株和JIASHI-5株间差异表达蛋白495个, 其中SC6株上调蛋白(高表达)167个, JIASHI-5株上调蛋白328个。这些差异表达蛋白主要涉及能量代谢、应激反应、延长感染宿主细胞的寿命以及利什曼原虫存活与增殖。**结论** 来自我国内脏利什曼病不同流行区的婴儿利什曼原虫前鞭毛体蛋白质表达存在差异。

**[关键词]** 利什曼原虫; 内脏利什曼病; 比较蛋白质组学; 差异蛋白; 非标记定量分析

**[中图分类号]** R382.22 **[文献标识码]** A

## Comparative proteomics analysis of *Leishmania infantum* strains isolated from two epidemiological regions of visceral leishmaniasis in China

WEI Fu-Rong, GAO Chun-Hua, WANG Jun-Yun\*, YANG Yue-Tao, SHI Feng

National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention; Laboratory of Parasite and Vector Biology, National Health Commission; National Center for International Research on Tropical Diseases, Ministry of Science and Technology; WHO Collaborating Centre for Tropical Diseases, Shanghai 200025, China

\* Corresponding author

**[Abstract]** **Objective** To analyze the protein abundance differences between two *Leishmania infantum* strains isolated from different epidemiological types of visceral leishmaniasis in China by comparative proteomics method. **Methods** Tryptic digests of total proteins were analyzed by using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), followed by label-free quantitative differential expression analysis. The MS data were analyzed with MaxQuant software (ver 1.3.0.5) against data base. **Results** This study resulted in the identification of 4 274 proteins across two strains (JIASHI-5 and SC6). Of these, 1 219 differentially expressed proteins (ratio  $> 2.0$  or  $< 0.5$ ,  $P < 0.05$ ) were identified. Considering the proteins differentially or uniquely expressed in the strains, 550 proteins were only found in the JIASHI-5 strain, and 174 proteins were only found in the SC6 strain. Totally 495 differentially proteins were expressed in the two groups, among which 328 proteins were down-regulated and 167 proteins were up-regulated in SC6 strain. Some of the identified differentially expressed proteins were demonstrated and they involved in energy metabolism, stress response, prolonging the lifetime of the infected host cell and survival and proliferation in virulent strains. **Conclusion** This study reveals a group of differentially expressed proteins and the related biologic function that may lay the foundation for screening and identification of the key *Leishmania* molecules relative to pathogenicity.

**[Key words]** *Leishmania*; Visceral leishmaniasis; Comparative proteomics; Differential protein; Label-free quantitative analysis

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81472923)

**[作者单位]** 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所、国家卫生健康委员会病原与媒介生物学重点实验室、科技部国家级热带病国际联合研究中心、世界卫生组织热带病合作中心(上海 200025)

**[作者简介]** 危芙蓉,女,硕士,助理研究员。研究方向:寄生虫病预防控制

\* 通信作者 E-mail: wangjy@nipd.chinacdc.cn

**[数字出版日期]** 2019-01-16 14:18:30

**[数字出版网址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/32.1374.R.20190115.1548.002.html>

内脏利什曼病是一种由利什曼原虫感染所致的严重危害人类健康的重要人畜共患寄生虫病。目前我国存在3种类型内脏利什曼病流行区,分别是平原型、山丘型和荒漠型<sup>[1]</sup>。尽管山丘型和荒漠型内脏利什曼病病原体均为婴儿利什曼原虫<sup>[2-4]</sup>,且其所致的内脏利什曼病有相似临床表现,但在发病人群、潜伏期、宿主、传播媒介及对培养基适应性等方面均存在差异<sup>[1]</sup>。对不同流行区病原体分子表达谱进行比较,有助于了解产生上述差异的原因。

利什曼原虫基因表达主要表现为转录后和翻译后调节,这导致基因、mRNA和蛋白质表达间相关程度极低,不同种利什曼原虫的蛋白谱表现出很大差异<sup>[5]</sup>。对不同流行区利什曼原虫进行比较蛋白质组学分析有助于发现和鉴定相关毒力因子。非标记(Label-free)定量蛋白质组学技术是一种近年发展起来的较敏感的蛋白质组分析技术,其在寻找利什曼原虫不同样本的差异蛋白方面得到了广泛应用<sup>[6]</sup>。

本研究采用非标记定量蛋白质组学技术,比较来自我国四川九寨沟县和新疆伽师县两种类型内脏利什曼病流行区具有感染力的婴儿利什曼原虫前鞭毛体间蛋白质表达差异,旨在为筛选和鉴定我国不同内脏利什曼病流行区利什曼原虫致病差异相关分子奠定基础。

## 材料与方法

### 1 材料

1.1 虫株 婴儿利什曼原虫九寨沟株(MCAN/CN/1986/SC6株,以下简称SC6株),于1986年分离于四川省九寨沟县(山丘型或人-犬共患型流行区)内脏利什曼病病犬;婴儿利什曼原虫伽师株(MHOM/CN/2008/JIASHI-5株,以下简称JIASHI-5株),于2008年分离于新疆伽师县(荒漠型或自然疫源型流行区)内脏利什曼病病人。上述两株婴儿利什曼原虫虫株均在金色仓鼠体内保种。金色仓鼠购自上海松江淞联实验动物厂,由中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所动物中心饲养,经该所实验动物福利伦理委员会审批同意使用。

1.2 试剂与仪器 199培养基干粉购自德国Gibco公司,胎牛血清购自美国ScienCell公司,二硫苏糖醇(DTT)、十二烷基硫酸钠(SDS)、尿素、碘乙酰胺(IAA)、乙腈和BCA蛋白测定试剂盒购自美国Bio-Rad公司,胰蛋白酶购自美国Promega公司,Q-exactive质谱仪、HPLC液相系统EASY-nLC1000和色谱柱RP-C18购自美国Thermo公司。

### 2 方法

2.1 利什曼原虫前鞭毛体培养和收集 分别取两株利什曼原虫感染的金色仓鼠脾脏置NNN培养基培养,10 d后将全部培养液转移至199培养基(含20%胎牛血清)中进行扩大培养。在原虫处于对数生长期,原虫密度约为 $10^6$ /mL时,4℃下以 $3\ 000 \times g$ 离心15 min,收集前鞭毛体,用PBS洗3次后备用。

2.2 蛋白质制备 两株鞭毛体各取100  $\mu$ L压积量,分别加入500  $\mu$ L STD缓冲液(4% SDS,1 mmol/L DTT,pH 8.0的150 mmol/L Tris-HCl),匀浆混匀,沸水浴5 min。超声破碎(80 w,超声10 s,间歇15 s,共10次),沸水浴5 min,离心取上清,BCA法蛋白质定量。取20  $\mu$ g蛋白进行SDS-PAGE分析。

2.3 蛋白质FASP酶解 蛋白质酶解参照文献[7]。取200  $\mu$ g样品,加入DTT至终浓度为100 mmol/L,沸水浴5 min,冷却至室温。加入200  $\mu$ L UA缓冲液(8 mol/L尿素,pH 8.0的150 mmol/L Tris-HCl)混匀,转入10 kDa超滤离心管,以 $14\ 000 \times g$ 离心15 min。加入200  $\mu$ L UA缓冲液,以 $14\ 000 \times g$ 离心15 min,弃滤液。加入100  $\mu$ L IAA溶液(含50 mmol/L IAA),600 r/min振荡1 min,避光室温30 min,以 $14\ 000 \times g$ 离心10 min。加入100  $\mu$ L UA缓冲液,以 $14\ 000 \times g$ 离心10 min,重复2次。加入100  $\mu$ L 25 mmol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ,以 $14\ 000 \times g$ 离心10 min,重复2次。加入40  $\mu$ L胰蛋白酶缓冲液(含有25 mmol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 和75  $\mu$ g/L胰蛋白酶),600 r/min振荡1 min后,37℃孵育16~18 h。换新收集管,以 $14\ 000 \times g$ 离心10 min,取滤液,测量280 nm处吸光度并进行肽段定量。

2.4 酶解产物液相色谱串联质谱(Liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)分析 按照定量结果取2  $\mu$ g酶解后的产物进行LC-MS/MS分析。采用纳升流速高效液相系统EASY-nLC1000进行分离。液相A液为0.1%甲酸乙腈水溶液(乙腈为2%),B液为0.1%甲酸乙腈水溶液(乙腈为84%)。色谱柱Thermo EASY column SC200 150  $\mu$ m  $\times$  100 mm (RP-C18)以100% A液平衡。样品由自动进样器上样到Thermo EASY column SC001 traps 150  $\mu$ m  $\times$  20 mm (RP-C18),再经色谱柱分离,流速为300 nL/min。相关液相梯度如下:0~110 min,B液线性梯度从0%到45%;110~117 min,B液线性梯度从45%到100%;117~120 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质谱仪进行质谱分析。分析时长:120 min;检测方式:正离子;母离子扫描范围:300~1 800  $m/z$ 。多肽和多肽碎片的质量

电荷比按下列方法采集: MS1 在 200  $m/z$  时分辨率为 70 000, AGC target 为 3e6, 一级最大 IT 为 10 ms, 扫描范围数为 1, 动态排除 40.0 s; 每次全扫描后采集 20 个碎片图谱, 二级质谱在 200  $m/z$  时分辨率为 17 500, MS/MS 激活类型为 HCD, 隔离窗为 2  $m/z$ , 微碎片图谱数为 1, 二级最大 IT 为 60 ms, 规一化碰撞能量为 30 eV, 填充率为 0.1%。

**2.5 MaxQuant 查库** 原始文件导入 MaxQuant 软件 (版本号 1.3.0.5) 查库<sup>[8]</sup>, 进行非标定量 (Label-free quantitation, LFQ) 分析。查库所用的数据库为 uni-prot\_Leishmania\_genus\_50931\_20160303.fasta (蛋白质序列 50 931 条, 下载日期 2016-03-03)。每个样品重复 3 次质谱分析, 只有 1 次 LFQ 值的蛋白舍弃。

**2.6 生物信息学分析** 查库文件用 Perseus 软件 (版本号为 1.3.0.5) 进行分析; 用 Omicsbean (<http://www.omicsbean.cn/>) 进行差异表达蛋白质的生物信息学分析, 包括 GO 富集和 KEGG 富集分析<sup>[9]</sup>。

**2.7 统计分析** 对鉴定样品蛋白质的 LFQ 强度值进行  $t$  检验 (双侧), 差异倍数 > 2.0 或 < 0.5 且  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

### 1 蛋白质鉴定

利用 LFQ 蛋白质组学技术共成功鉴定蛋白 4 274 个, SC6 株与 JIASHI-5 株之间差异表达蛋白 1 219 个 (差异倍数 > 2.0 或 < 0.5,  $P < 0.05$ ); 其中 SC6 株前鞭毛体特有表达蛋白 174 个, JIASHI-5 株前鞭毛体特有表达蛋白 550 个。SC6 株和 JIASHI-5 株间差异表达蛋白 495 个, 其中 SC6 株表达上调蛋白 (高表达) 167 个, 表达下调蛋白 (低表达) 328 个。

### 2 差异表达蛋白功能注释

对婴儿利什曼原虫 SC6 株与 JIASHI-5 株差异蛋白进行生物信息学分析, 结果显示仅在 SC6 株前鞭毛体内表达而在 JIASHI-5 株不表达的蛋白有 174 个, 其中 103 个为未命名蛋白; 仅在婴儿利什曼原虫 JIASHI-5 株前鞭毛体内表达而在 SC6 株不表达的蛋白有 550 个, 其中 386 个为未命名蛋白。上述差异表达蛋白主要参与细胞过程、代谢过程、单一的生物过程等 19 个生物学过程 (图 1), 其存在于细胞内、细胞器、膜等 15 个细胞组分中 (图 2), 具有结合、催化活性、运输活性等 12 项分子功能 (图 3)。

这些差异表达蛋白中确定功能者主要涉及能量代谢、应激反应、细胞膜/细胞骨架形成以及利什曼原虫存活与增殖。

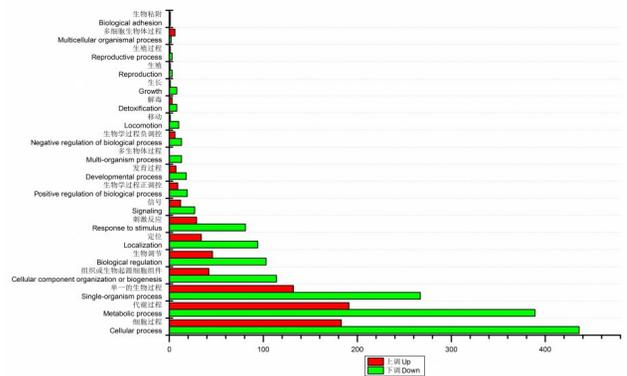


图 1 SC6 株与 JIASHI-5 株利什曼原虫前鞭毛体差异蛋白生物学过程富集图

Fig. 1 Biological process enrichment diagram of differentially expressed proteins between SC6 and JIASHI-5 strains

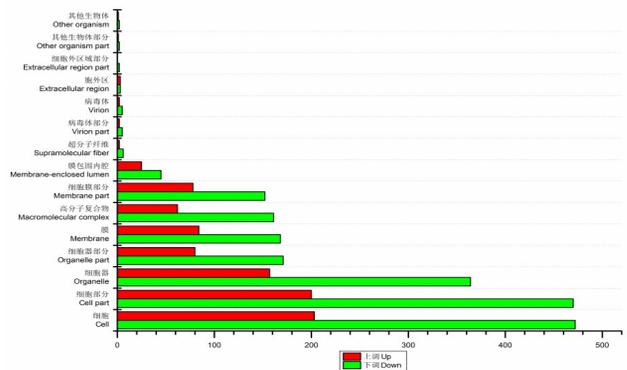


图 2 SC6 株与 JIASHI-5 株利什曼原虫前鞭毛体差异蛋白细胞成分富集图

Fig. 2 Cell composition enrichment diagram of differentially expressed proteins between SC6 and JIASHI-5 strains

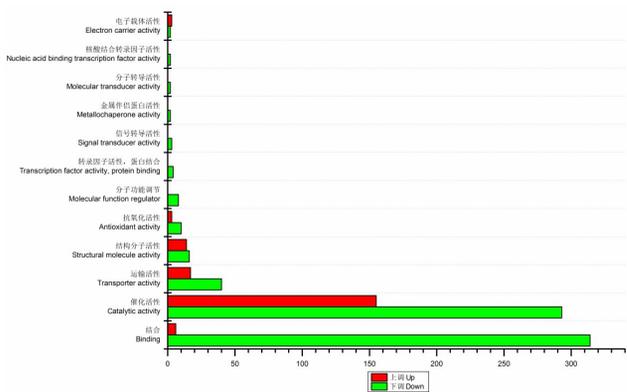


图 3 SC6 株与 JIASHI-5 株利什曼原虫前鞭毛体差异蛋白分子功能富集图

Fig. 3 Molecular function enrichment diagram of differentially expressed proteins between SC6 and JIASHI-5 strains

### 3 差异表达蛋白通路富集分析

对 SC6 株与 JIASHI-5 株利什曼原虫前鞭毛体差

异蛋白进行信号转导通路富集分析,结果显示这些差异蛋白参与了代谢、次生代谢物的生物合成、抗生素的生物合成等信号转导通路(图4)。

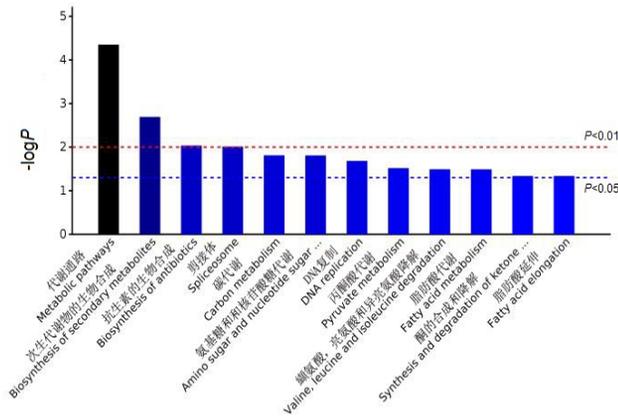


图4 SC6株与JIASHI-5株利什曼原虫前鞭毛体差异蛋白的通路富集图

Fig. 4 Pathways enrichment diagram of differentially expressed proteins between SC6 and JIASHI-5 strains

### 讨论

我国山丘型和荒漠型内脏利什曼病的病原体均为婴儿利什曼原虫。山丘型内脏利什曼病流行于甘肃、四川等山丘地带,犬是主要传染源,传播媒介为中华白蛉,发病人群主要为幼儿,潜伏期为3~6个月,类似地中海型内脏利什曼病。荒漠型内脏利什曼病流行于甘肃、内蒙古和新疆(如喀什地区)的沙漠地带,传染源未知(推测为未确定动物),传播媒介为吴氏白蛉,95%以上的病例为1岁以内的婴幼儿,潜伏期为1~3个月;这种类型内脏利什曼病常发生暴发疫情,病程特别凶险,但在其他国家未见报道<sup>[1]</sup>。为探究导致不同类型内脏利什曼病之间存在差异的相关致病分子,本研究应用非标记高通量蛋白质组学技术,对分离于我国山丘型内脏利什曼病流行区的婴儿利什曼原虫SC6株和分离于荒漠型内脏利什曼病流行区的婴儿利什曼原虫JIASHI-5株前鞭毛体进行了蛋白质组学分析,共鉴定蛋白4 274个,1 219个蛋白在SC6株和JIASHI-5株前鞭毛体间的表达存在差异(特异表达或表达丰度差异)。这些差异表达蛋白中确定功能者主要涉及能量代谢、应激反应、细胞膜/细胞骨架形成以及利什曼原虫存活与增殖。

利什曼原虫专性寄生于哺乳动物巨噬细胞内,病原体入侵宿主依赖于两个生物体细胞中分子间的相互作用。因此,感染成功取决于寄生虫攻击宿主期间逃避宿主保护机制的能力,病原体入侵靶细胞成功并增殖。本研究鉴定到的SC6株和JIASHI-5株间的差异表达蛋白在利什曼原虫成功感染宿主细胞并实现

存活和增殖过程中发挥重要作用。感染期间,宿主细胞产生大量活性氧(ROS)和一氧化氮(NO),创造不利于细胞内病原体生存的环境。利什曼原虫则分泌某些蛋白质以抵抗应激反应,如锥虫还原蛋白过氧化物酶和过氧化物酶。这两种蛋白在JIASHI-5株中高表达,有研究表明其与利什曼原虫的毒力相关<sup>[10]</sup>。该两种蛋白间的相互作用涉及信号转导、增殖和分化,为利什曼原虫在氧化环境中生存发挥了重要作用<sup>[11]</sup>。此外,锑剂抗性株巴西利什曼原虫和恰加氏利什曼原虫之间的蛋白质组学分析显示,锥虫还原蛋白过氧化物酶和过氧化物酶的上调表达对锑剂抗性起关键作用<sup>[12]</sup>。JIASHI-5株中高表达蛋白超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)通过保护寄生虫免受线粒体产生的氧化应激和启动ROS介导的信号机制以提升利什曼原虫的毒力<sup>[13]</sup>。JIASHI-5株中高表达蛋白3'-核酸酶/核酸酶(3'-nucleotidase/nuclease, 3'NT/NU)在嘌呤核苷酸补救合成途径中发挥作用。利什曼原虫和巨噬细胞相互作用试验表明,3'NT/NU活性增加了两者间的关联指数;另外,该蛋白在寄生虫逃避中性粒细胞胞外诱捕中也发挥一定作用<sup>[14]</sup>。JIASHI-5株中高表达的HSP70、延伸因子1α(Elongation factor 1α, EF-1α)和SC6中高表达的Gp63是外泌体中的重要毒力因子<sup>[15-16]</sup>。SC6株中高表达的烯醇酶在墨西哥利什曼原虫、杜氏利什曼原虫和硕大利什曼原虫中被证明是毒力因子,其作为分子伴侣行使多种功能<sup>[17]</sup>。葡萄糖转运蛋白(Glucose transporter, GLUT)家族有3个亚基,分别是LmGT1、LmGT2和LmGT3。本研究鉴定到LmGT2在SC6株中高表达。GT蛋白具有葡萄糖转运能力,对利什曼原虫生存起重要作用,LmGT2是戊糖D-核糖更有效的转运体。基因敲除GT蛋白的墨西哥利什曼原虫增长率下降,对巨噬细胞的感染性也显著降低<sup>[18-19]</sup>。

综上所述,通过比较来源于我国不同类型内脏利什曼病流行区的婴儿利什曼原虫SC6株与JIASHI-5株前鞭毛体蛋白质组,发现两者在蛋白质表达方面存在差异,一些高表达的蛋白在分子组装体或通路中发挥协同作用,以实现利什曼原虫对宿主细胞的感染及在感染细胞中生存。对这些高表达蛋白进行深入研究,不仅可以为筛选和鉴定导致同种利什曼原虫致病性差异的分子奠定基础,还有助于更好地理解这些蛋白质在细胞中或与宿主的相互作用。

### [参考文献]

[ 1 ] Wang JY, Cui G, Chen HT, et al. Current epidemiological profile and features of visceral leishmaniasis in People's Republic of Chi-

- na[J]. Parasit Vectors, 2012, 5: 31.
- [ 2 ] Wang Y, Yang YE, Wang JY, et al. Molecular characterization of *Leishmania* isolates from China by inter-simple sequence repeat polymerase chain reaction[J]. Parasitol Res, 2010, 106(6): 1385-1394.
- [ 3 ] Wang JY, Ha Y, Gao CH, et al. The prevalence of canine *Leishmania infantum* infection in western China detected by PCR and serological tests[J]. Parasit Vectors, 2011, 4: 69.
- [ 4 ] Wang JY, Gao CH, Yang YT, et al. An outbreak of the desert subtype of zoonotic visceral leishmaniasis in Jiashi, Xinjiang Uygur Autonomous Region, People's Republic of China [J]. Parasitol Int, 2010, 59(3): 331-337.
- [ 5 ] Gomez C, Esther Ramirez M, Calixto-Galvez MA, et al. Regulation of gene expression in protozoa parasites [J]. J Biomed Biotechnol, 2010, 2010: 726045.
- [ 6 ] Singh S, Dubey VK. Quantitative proteome analysis of *Leishmania donovani* under spermidine starvation [J]. PLoS One, 2016, 11(4): e0154262.
- [ 7 ] Wiśniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, et al. Universal sample preparation method for proteome analysis [J]. Nat Methods, 2009, 6(5): 359-362.
- [ 8 ] Lubber CA, Cox J, Lauterbach H, et al. Quantitative proteomics reveals subset-specific viral recognition in dendritic cells [J]. Immunity, 2010, 32(2): 279-289.
- [ 9 ] Bindea G, Mlecnik B, Hackl H, et al. ClueGO: a Cytoscape plugin to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks [J]. Bioinformatics, 2009, 25(8): 1091-1093.
- [ 10 ] Romao S, Castro H, Sousa C, et al. The cytosolic trypanothione of *Leishmania infantum* is essential for parasite survival [J]. Int J Parasitol, 2009, 39(6): 703-711.
- [ 11 ] Castro H, Sousa C, Santos M, et al. Complementary antioxidant defense by cytoplasmic and mitochondrial peroxiredoxins in *Leishmania infantum* [J]. Free Radic Biol Med, 2002, 33(11): 1552-1562.
- [ 12 ] Matrangola FS, Liarte DB, Andrade LC, et al. Comparative proteomic analysis of antimony-resistant and -susceptible *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum chagasi* lines [J]. Mol Biochem Parasitol, 2013, 190(2): 63-75.
- [ 13 ] Mitra B, Laranjeira-Silva MF, Miguel DC, et al. The iron-dependent mitochondrial superoxide dismutase SODA promotes *Leishmania* virulence [J]. J Biol Chem, 2017, 292(29): 12324-12338.
- [ 14 ] Freitas-Mesquita AL, Meyer-Fernandes JR. 3'nucleotidase/nuclease in protozoan parasites: Molecular and biochemical properties and physiological roles [J]. Exp Parasitol, 2017, 179: 1-6.
- [ 15 ] Silverman JM, Clos J, de'Oliveira CC, et al. An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from *Leishmania* and communication with macrophages [J]. J Cell Sci, 2010, 123(Pt 6): 842-852.
- [ 16 ] Nandan D, Yi T, Lopez M, et al. *Leishmania* EF-1alpha activates the Src homology 2 domain containing tyrosine phosphatase SHP-1 leading to macrophage deactivation [J]. J Biol Chem, 2002, 277(51): 50190-50197.
- [ 17 ] Vanegas G, Quiñones W, Carrasco-López C, et al. Enolase as a plasminogen binding protein in *Leishmania mexicana* [J]. Parasitol Res, 2007, 101(6): 1511-1516.
- [ 18 ] Naula CM, Logan FM, Wong PE, et al. A glucose transporter can mediate ribose uptake: definition of residues that confer substrate specificity in a sugar transporter [J]. J Biol Chem, 2010, 285(39): 29721-29728.
- [ 19 ] Burchmore RJ, Rodriguez-Contreras D, McBride K, et al. Genetic characterization of glucose transporter function in *Leishmania mexicana* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(7): 3901-3906.

[收稿日期] 2018-07-26 [编辑] 邓瑶

欢迎投稿！ 欢迎订阅！