

茶树菇凝集素检测醋酸格拉替雷诱导小鼠的 CD8⁺T 淋巴细胞表面糖基化研究

巫伟鹏, 黄碧霞, 关鑫, 文钰棣, 梁一

(广东医学院医学检验学院临床免疫教研室, 广东东莞 523808)

摘要: 醋酸格拉替雷是治疗多发性硬化症的一线药物, 可通过诱导调节性 CD8⁺T 细胞发挥免疫调节作用。为研究 GA 诱导的 CD8⁺T 淋巴细胞, 我们将茶树菇分离的两种凝集素 AAL (*Agrocybe aegerita* lectin) 和 AAL2 (*Agrocybe aegerita* lectin 2), 通过生物素标记结合流式细胞仪, 分别分析 GA 诱导的免疫耐受小鼠模型中脾脏、腹股沟淋巴结 CD8⁺T 淋巴细胞的糖基化水平, 及细胞因子的表达。发现脾脏 AAL⁺CD8⁺, AAL2⁺CD8⁺T 淋巴细胞的比例 (%) 分别为 8.46±3.1 和 9.08±2.8, 淋巴结 AAL⁺CD8⁺, AAL2⁺CD8⁺T 淋巴细胞的比例 (%) 分别为 10.65±4.6 和 8.25±5.9, 且脾脏、淋巴结 CD8⁺T 淋巴细胞中 AAL⁺细胞的百分比均显著高于 CD8⁺T 淋巴细胞 ($p<0.05$)。淋巴结中 AAL⁺CD8⁺T 细胞表达 IFN- γ 的细胞比例显著高于 AAL⁻CD8⁺T 细胞, AAL2⁺CD8⁺T 细胞表达 IFN- γ 和 perforin 细胞比例均显著高于 AAL2⁻CD8⁺T 细胞。该结果为 CD8⁺T 淋巴细胞表面糖基化研究提供了初步数据, 并暗示糖基化水平与细胞因子分泌有关。

关键词: 糖基化; 茶树菇半乳糖凝集素; CD8⁺T 淋巴细胞; 醋酸格拉替雷

文章编号: 1673-9078(2016)5-9-13

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.5.02

Detection of Surface Glycosylation of CD8⁺T Lymphocytes in Glatiramer Acetate-treated Mice, Using *Agrocybe aegerita* Lectins

WU Wei-peng, HUANG Bi-xia, GUAN Xin, WEN Yu-di, LIANG Yi

(Department of Clinical Immunology, Institute of Laboratory Medicine, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China)

Abstract: Glatiramer acetate (GA) is a first-line agent for the treatment of multiple sclerosis, and it exerts an immunomodulatory function by inducing regulatory CD8⁺T cells. In order to investigate GA-induced CD8⁺T cells, the lectins AAL (*Agrocybe aegerita* lectin) and AAL2 were used to analyze the glycosylation level and cytokine expression in CD8⁺T lymphocytes in the spleen and inguinal lymph nodes in GA-induced, immune-tolerant mice, by biotin-labeling and flow cytometry. The results showed that the percentages of AAL⁺CD8⁺ and AAL2⁺CD8⁺T lymphocytes in the spleen were 8.46 ± 3.1% and 9.08 ± 2.8%, respectively; and the percentages of AAL⁺CD8⁺ and AAL2⁺CD8⁺T lymphocytes in the inguinal lymph nodes were 10.65 ± 4.6% and 8.25 ± 5.9%, respectively. Moreover, the percentages of AAL⁺ cells in CD8⁺T lymphocytes in both the spleen and inguinal lymph nodes were significantly higher than those in the CD8⁻T lymphocytes ($p < 0.05$). In the inguinal lymph nodes, the proportion of AAL⁺CD8⁺T cells expressing IFN- γ was significantly higher than that of AAL⁻CD8⁺T cells, and the proportion of cells expressing IFN- γ ⁺ and perforin in AAL2⁺CD8⁺T cells was also significantly higher than that in AAL2⁻CD8⁺T cells. These studies provide preliminary data for studies on the surface glycosylation of CD8⁺T lymphocytes, and indicate that glycosylation level is associated with cytokine secretion.

Key words: glycosylation; *Agrocybe aegerita* galectin; CD8⁺T lymphocyte; glatiramer acetate

收稿日期: 2015-06-03

基金项目: 国家自然科学基金 (81102850); 省卫生厅基金 (A2011434); 省教育厅育苗工程 (LYM11070); 东莞市科技局项目 (2011108102049); 湛江市科技攻关项目 (201103109015); 广东医学院大学生创新实验项目 (2013ZYDC004)

通讯作者: 梁一 (1981-), 女, 博士, 硕士生导师, 研究方向: 药用真菌抗肿瘤、抗病毒活性成分

糖基化是最普遍参与信号转导的蛋白质翻译后修饰方式^[1], 在蛋白质多种糖基化中, 以 N-糖基化和 O-糖基化最为广泛。细胞内大约 50% 以上的蛋白质发生糖基化修饰, 其修饰对蛋白质的结构和功能有着重要影响^[2], 例如蛋白质的折叠、运输和定位^[3]; 免疫系统中的分子应答^[4]等。蛋白质糖基化程度和结构的改变常常是疾病发生的重要标志^[5], 尤其是与感染、恶

性肿瘤、自身免疫疾病等重大疾病密切相关。随着蛋白质组学技术的不断发展,蛋白质糖基化的研究也越来越受到广泛的重视。

醋酸格拉替雷(GA, Copaxone 1)是由四种氨基酸(丙氨酸、赖氨酸、谷氨酸和酪氨酸)构成的多肽类药物,分子量介于6.7~11 ku。因其有效性和副作用小,被美国食品药品监督管理局批准用于治疗多发性硬化症(Multiple Sclerosis, MS),且被用于多种自身免疫疾病及器官移植的临床试验^[6]。GA对多发性硬化症病人的免疫作用包括CD4⁺T细胞由Th1向Th2免疫迁移,诱导CD4⁺CD25⁺FoxP3调节T细胞,通过诱导II型单核细胞调节抗原提呈细胞功能,诱导产生IL-10的B细胞等,但GA治疗MS的具体机制仍不明确。最新研究表明,GA治疗可诱导出一群调节性CD8⁺T细胞,活化细胞表达细胞因子IFN- γ 和perforin,通过细胞毒性作用抑制或直接杀死活化的CD4⁺T细胞^[7,8]。然而,关于调节性CD8⁺T细胞的研究非常少,尤其是其膜上标志物至今未知,因此,机理的不明确阻碍了全面评价GA的应用潜力。

糖分子作为重要的生物大分子之一,其研究远远滞后,究其原因,糖基的加工过程,结构连接以及生物功能都比基因和蛋白质复杂得多,且难以找到其中的规律。而凝集素是一类可识别特异性糖基的(糖)蛋白,是天然的糖基解码器,为糖基生物学研究的重要手段之一,不同的凝集素对特定的糖链具有相对专一的结合识别能力,尤其是一些没有单克隆抗体识别的复杂糖基,因此,在糖基的鉴定和结构区分方面具有其他方法或仪器无法比拟的优势。因此,标记的凝集素结合流式细胞仪经常被用作细胞尤其是免疫细胞,在分化过程糖基改变的分析。AAL和AAL2是从茶树菇中分离的两种凝集素,通过美国功能糖组学协会的糖芯片技术鉴定其分别对磺酸化/唾液酸化-Gal β 1-3GalNAc^[9]和末端N-acetylglucosamine^[10]有非常高的糖结合特异性。本文将利用这两种凝集素对GA诱导的CD8⁺T细胞表面糖基化进行研究,希望能为对异质性的CD8⁺T细胞分群提供数据。

1 材料与方法

1.1 动物与试剂

C57L/6 小鼠购自广东佛山广东省医学实验动物中心,醋酸格拉替雷(Glatimmer acetate, GA)购自杭州湃肽生化科技有限公司, Anti-Mouse CD3e APC-eFluor、Anti-Mouse CD8a PE-Cyanine7、Anti-Mouse Perforin PE、Anti-Mouse IFN- γ FITC、

Streptavidin-percP 为美国 eBioscience 公司产品, PMA/Ionomycin mixture(250 \times)、BFA/Monensin Mixture (250 \times)购自杭州联科生物技术有限公司, EZ-SepTM Mouse 1 \times 淋巴细胞分离液购自深圳市达科为生物技术有限公司,改良 RPMI 1640 培养基、血清胎牛血清购自浙江天杭科技股份有限公司。

1.2 凝集素纯化及生物素标记

茶树菇 *Agrocybe aegerita* 子实体购自福建省三明食用菌研究所,按照文献报道提取总蛋白 Yt^[11],将茶树菇子实体在 60 $^{\circ}$ C 烘干,粉碎,取 15 g 干粉用 300 mL PBS 浸泡抽提 2~3 次,用四层纱布过滤,6000 r/min 离心 30 min,合并提取液,加硫酸铵至 40%饱和度,继续搅拌 20 min,10000 r/min 离心 20 min,弃沉淀,取上清;再加入硫酸铵至 80%饱和度,充分沉淀 60 min,10000 r/min 离心 20 min,取沉淀。将沉淀用 PBS 重悬,用蒸馏水充分透析后,冻干,得到的组分称为 Yt。

按照说明书制备 Lactose 和 GlcNAc 偶联亲和柱,将总蛋白 Yt 通过亲和层析柱,流速 1 mL/min,可循环上样,使目的蛋白与柱子配体充分结合。用 TBS 缓冲液洗涤,流速 1 mL/min,约 1 h。在 Lactose-Sepharose 6B 层析柱上,用含 200 mM 的 Lactose 的 1 \times TBS 溶液竞争洗脱 AAL,约 14 min 收集洗脱峰,在 GlcNAc-Sepharose 6B 层析柱上用含 200 mM GlcNAc 的 1 \times TBS 竞争洗脱 AAL2,约 12 min 收集洗脱峰。将收集的蛋白 AAL 和 AAL2 装入 3 ku 孔径大小的透析袋中,4 $^{\circ}$ C 透析过夜,之后至少换水 3 次,每次约 4 h。将蛋白至于低温真空冻干机中冻干 24 h,收集粉末,并用 SDS-PAGE 检测分离纯化的目的蛋白的纯度。

用 0.01 M PBS(pH 7.4)重悬 AAL 和 AAL2,用 0.1 M NaHCO₃ 调 pH 至 8.0,加活化生物素,12000 r/m 高速离心,用 Sephadex G-25 分离,去游离生物素并脱盐,检测回收第一峰,冻干保存。

1.3 GA 诱导免疫耐受小鼠模型

C57L/6 小鼠(雌,6周龄,16~18 g)购自广东省医学实验动物中心,并按照实验动物管理条例饲养在广东省东莞市广东医学院动物中心屏障系统中。醋酸格拉替雷(GA)溶于 PBS,浓度为 2.5 mg/mL,以 200 μ L/(天·只)的剂量腹部皮下注射,连续两周^[8]。

1.4 小鼠脾脏、腹股沟淋巴结淋巴细胞分离

将 C57BL/6 小鼠用颈椎脱臼法处死,75%乙醇浸泡 5 min。无菌条件下,在 35 mm 培养皿中加入 2~3 mL

EZ-Sep™ Mouse 1 淋巴细胞分离液，剪开小鼠腹腔，用镊子分别取出脾脏和双侧腹股沟淋巴结，固定 200 目尼龙网，用玻璃注射器活塞分别轻轻研磨小鼠脾脏和淋巴结，将重悬有细胞的分离液转移到 15 mL 离心管中，轻轻加入 200 μL RPMI-1640 培养基于分离液上面，800 g 离心 30 min。吸出 RPMI-1640 培养基与分离液交界处的淋巴细胞层，加入适量 RPMI-1640 培养基（3 倍体积以上）重悬，250 g 离心 10 min。去上清，加入适量培养基（含血清和双抗）重悬并计数。

1.5 细胞膜及胞内分子染色

在细胞悬液中加入 PMA/Lonomycin (250×) 刺激 3 h，再加入 BFA/Monensin (250×)，继续培养 3 h，1000 r/min 离心 5 min 收集细胞，PBS 洗涤 1 遍，重悬。先进行细胞膜染色，按照抗体使用浓度，加入荧光标记的 CD3 和 CD8 抗体、AAL-biotin (终浓度 0.5 μM) 和 AAL2-biotin (终浓度 1.4 μM) 及对应的同型对照，4 °C 避光 30 min。PBS 洗涤，加入 Streptavidin-perCP，4 °C 避光 30 min。洗涤后，进行细胞因子胞内染色，加入 300 μL 固定液 4 °C 避光 20 min，再加 100 μL 破膜缓冲液，离心弃上清。用 100 μL 破膜缓冲液重悬后，加入胞内细胞因子抗体 Anti-Mouse Perforin PE 和 Anti-Mouse IFN-γ FITC 及对应的同型对照，4 °C 避光 30 min，加入 200 μL PBS 洗涤重悬，使用流式细胞仪 (BD FACS Calibur II) 进行检测，结果使用流式软件 CellQuest v3.3 分析。

1.6 统计学分析

用统计学软件 Sigmaplot 进行实验数据分析，组间显著性差异分析采用 Student's t 检验来分析是否具有统计学差异。

2 结果

2.1 茶树菇凝集素检测醋酸格拉替雷诱导的免疫耐受小鼠脾脏 CD3⁺CD8⁻、CD3⁺CD8⁺T 淋巴细胞表面糖基化水平。

分离 GA 诱导的免疫耐受小鼠脾脏细胞，使用抗体和凝集素-biotin 标记淋巴细胞，通过流式细胞仪检测，使用同型对照设门，分析 CD3⁺CD8⁺和 CD3⁺CD8⁻T 淋巴细胞表面凝集素特异性识别糖基 (图 1A)。统计结果显示，AAL⁺CD3⁺CD8⁻、AAL⁻CD3⁺CD8⁻、AAL⁺CD3⁺CD8⁺和 AAL⁻CD3⁺CD8⁺细胞的比率 (%)

分别为：13.19±7.4、57.21±8.4、8.46±3.1、21.12±5.8 (图 1B)。其中，CD3⁺CD8⁻和 CD3⁺CD8⁺T 淋巴细胞中 AAL⁺细胞的百分比分别为：18.72±10.6 和 29.62±10.9 (*p*<0.05, 图 1C)。AAL2⁺CD3⁺CD8⁻、AAL2⁺CD3⁺CD8⁺和 AAL2⁻CD3⁺CD8⁺细胞的比率 (%) 分别为：20.53±8.6、47.41±7.2、9.08±2.9、31.06±7.5 (图 1D)。其中，CD3⁺CD8⁻和 CD3⁺CD8⁺T 淋巴细胞中 AAL2⁺细胞的百分比分别为：29.80±10.3 和 27.2±13.4 (图 1E)。

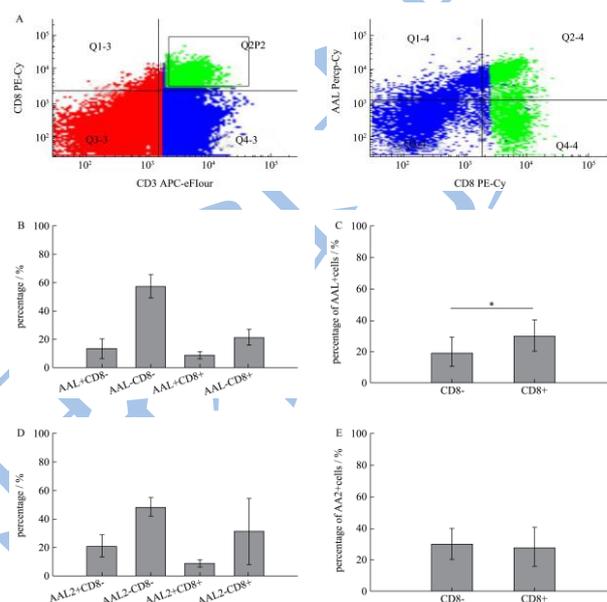


图 1 AAL 和 AAL2 检测醋酸格拉替雷诱导的免疫耐受小鼠脾脏 CD3⁺CD8⁻和 CD3⁺CD8⁺T 淋巴细胞

Fig.1 Detection of CD3⁺CD8⁻ and CD3⁺CD8⁺T lymphocytes in the spleen from GA-induced, immune-tolerant mice, using AAL and AAL2

分离醋酸格拉替雷药物诱导的免疫耐受 C57L/6 小鼠脾脏淋巴细胞，使用 CD3 和 CD8 抗体，及 lectin-biotin 和链霉亲和素-perCP 标记淋巴细胞，并通过流式细胞仪检测。A.流式细胞术检测结果。B.小鼠脾脏 CD3⁺CD8⁻和 CD3⁺CD8⁺T 淋巴细胞使用 AAL 鉴定其细胞表面糖基化水平。C. CD3⁺CD8⁻和 CD3⁺CD8⁺T 淋巴细胞中 AAL⁺细胞百分比。D.小鼠脾脏 CD3⁺CD8⁻和 CD3⁺CD8⁺T 淋巴细胞使用 AAL2 鉴定其细胞表面糖基化水平。E. CD3⁺CD8⁻和 CD3⁺CD8⁺T 淋巴细胞中 AAL2⁺细胞百分比。

2.2 检测醋酸格拉替雷诱导的免疫耐受小鼠淋巴结 CD3⁺CD8⁻、CD3⁺CD8⁺T 淋巴细胞表面糖基化水平

分离 GA 诱导的免疫耐受小鼠腹股沟淋巴结细胞, 使用抗体和凝集素-biotin 标记淋巴细胞, 通过流式细胞仪检测, 使用同型对照设门, 分析 CD3⁺CD8⁻和 CD3⁺CD8⁺ T 淋巴细胞表面凝集素特异性识别糖基。统计结果显示, AAL⁻CD3⁺CD8⁻、AAL⁻CD3⁺CD8⁺、AAL⁺CD3⁺CD8⁻和 AAL⁺CD3⁺CD8⁺细胞的比率(%) 分别为: 13.26±6.2、51.39±9.1、10.65±4.6、24.73±7.2 (图 2A)。其中, CD3⁺CD8⁻和 CD3⁺CD8⁺T 淋巴细胞中 AAL⁺细胞的百分比分别为: 20.59±9.2 和 30.43±11.4 ($p<0.05$, 图 2B)。AAL2⁺CD3⁺CD8⁻、AAL2⁺CD3⁺CD8⁺和 AAL2⁻CD3⁺CD8⁺细胞的比率(%) 分别为: 13.78±8.2、45.25±9.6、8.25±5.9、51.67±28.0 (图 2C)。其中, CD3⁺CD8⁻和 CD3⁺CD8⁺T 淋巴细胞中 AAL2⁺细胞的百分比分别为: 23.52±13.8 和 15.01±13.2 (图 2D)。

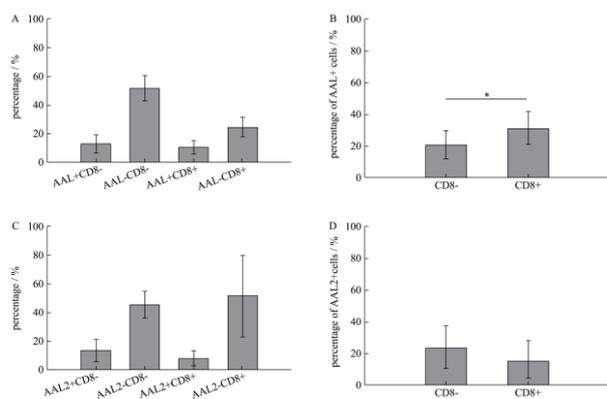


图 2 AAL 和 AAL2 检测醋酸格拉替雷诱导的免疫耐受小鼠腹股沟淋巴结 CD3⁺CD8⁻和 CD3⁺CD8⁺T 淋巴细胞

Fig.2 Detection of CD3⁺CD8⁻ and CD3⁺CD8⁺ T lymphocytes in the inguinal lymph nodes from GA-induced, immune-tolerant mice, using AAL and AAL2

分离醋酸格拉替雷诱导的免疫耐受 C57L/6 小鼠腹股沟淋巴结淋巴细胞, 使用 CD3 和 CD8 抗体, 及 lectin-biotin 和链霉亲和素-perCP 标记淋巴细胞, 并通过流式细胞仪检测。A. 小鼠淋巴结 CD3⁺CD8⁻和 CD3⁺CD8⁺T 淋巴细胞使用 AAL 鉴定其细胞表面糖基化水平。B. CD3⁺CD8⁻和 CD3⁺CD8⁺T 淋巴细胞中 AAL⁺细胞百分比。C. 小鼠淋巴结 CD3⁺CD8⁻和 CD3⁺CD8⁺T 淋巴细胞使用 AAL2 鉴定其细胞表面糖基化水平。D. CD3⁺CD8⁻和 CD3⁺CD8⁺T 淋巴细胞中 AAL2⁺细胞百分比。

2.3 检测醋酸格拉替雷诱导的免疫耐受小鼠 CD3⁺CD8⁺T 淋巴细胞胞内细胞因子 IFN- γ 和 perforin 的表达

GA 特异性 CD8⁺T 细胞的抑制功能是依赖于细胞因子 IFN- γ 和 perforin^[12] 的表达, 因此我们用凝集素结合活性设门, 分别检测脾脏和淋巴结 CD3⁺CD8⁺T 淋巴细胞胞内细胞因子 IFN- γ 和 perforin 的表达。表 1 所示, AAL⁻CD3⁺CD8⁺细胞与 AAL⁺CD3⁺CD8⁺细胞表达的细胞因子 IFN- γ 和 perforin 无显著性差异, AAL2⁻CD3⁺CD8⁺细胞与 AAL2⁺CD3⁺CD8⁺细胞表达的细胞因子 IFN- γ 和 perforin 无显著性差异。表 2 为腹股沟淋巴结 CD3⁺CD8⁺T 细胞胞内细胞因子的表达, 发现 AAL⁺CD3⁺CD8⁺细胞中 IFN- γ ⁺ 的细胞比例显著高于 AAL⁻CD3⁺CD8⁺细胞, AAL2⁺CD3⁺CD8⁺细胞中 IFN- γ ⁺ 和 perforin⁺ 的细胞比例均显著高于 AAL2⁻CD3⁺CD8⁺细胞 ($p<0.05$)。

表 1 AAL 和 AAL2 检测醋酸格拉替雷诱导的免疫耐受小鼠脾脏 CD3⁺CD8⁺T 淋巴细胞胞内细胞因子 IFN- γ 和 perforin 的表达

Table 1 Detection of intracellular cytokine IFN- γ ⁺ and perforin⁺ expression in CD3⁺CD8⁺ T lymphocytes of the spleen in GA-induced, immune-tolerant mice, using AAL and AAL2

Frequency/%	AAL ⁻ CD3 ⁺ CD8 ⁺ 细胞	AAL ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ 细胞	AAL2 ⁻ CD3 ⁺ CD8 ⁺ 细胞	AAL2 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ 细胞
IFN- γ ⁺ 细胞	11.3±2.5	26.8±6.8	10.2±5.4	22.1±10.4
perforin ⁺ 细胞	2.4±4.1	5.1±7.5	3.7±2.2	10.0±3.8

表 2 AAL 和 AAL2 检测醋酸格拉替雷诱导的免疫耐受小鼠腹股沟淋巴结 CD3⁺CD8⁺T 淋巴细胞胞内细胞因子 IFN- γ 和 perforin 的表达

Table 2 Detection of intracellular cytokine IFN- γ ⁺ and perforin⁺ expression in CD3⁺CD8⁺ T lymphocytes of the inguinal lymph nodes in GA-induced, immune-tolerant mice, using AAL and AAL2

Frequency/%	AAL ⁻ CD3 ⁺ CD8 ⁺ 细胞	AAL ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ 细胞	AAL2 ⁻ CD3 ⁺ CD8 ⁺ 细胞	AAL2 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ 细胞
IFN- γ ⁺ 细胞	4.3±1.7	9.0±3.3*	3.0±0.7	9.7±4.2*
perforin ⁺ 细胞	0.4±0.2	1.1±0.7	2.1±0.7	15.6±7.9*

注: *代表 $p<0.05$ 。

3 讨论

GA 诱导的 CD8⁺T 细胞表面糖基化研究几乎为空白, 本文通过两种分别对磺酸化/唾液酸化

-Gal β 1-3GalNAc α 和末端 N-乙酰葡萄糖胺有高结合特异性的凝集素, 研究 GA 诱导免疫耐受小鼠脾脏、淋巴结 CD8⁺T 淋巴细胞糖基修饰, 为该方面研究提供了部分数据。由结果分析, 无论脾脏、腹股沟淋巴结中, 表面表达磺酸化/唾液酸化-Gal β 1-3GalNAc α 糖基的 CD8⁺T 淋巴细胞比例显著高于 CD8⁺T 淋巴细胞(主要是 CD4⁺T 淋巴细胞)(图 1C, 图 2B), 而表达末端 N-乙酰葡萄糖胺的 CD8⁺T 淋巴细胞比例与 CD8⁺T 淋巴细胞(主要是 CD4⁺T 淋巴细胞)无显著性差异。

由于技术的限制和抗体的缺乏, CD8⁺T 细胞表面糖基化水平的研究主要通过花生凝集素 PNA(结合去唾液酸化糖基)完成。目前研究表明, 未成熟 CD8⁺T 淋巴细胞表面主要为去唾液酸化糖基, 成熟的则多表达唾液酸化, 活化后则又表达为去唾液酸化。该糖基的动态表达也暗示糖基化表达可作为不同活化阶段细胞的标志物。CD8⁺T 淋巴细胞在 GA 治疗中意义重大, 研究表明, 多发性硬化症病人体内 GA 特异性 CD8⁺T 细胞相比较健康人是缺陷的, 而 GA 治疗将极大增强 CD8⁺T 细胞的应答, 且该群细胞可存活很久。GA 诱导的 CD8⁺T 细胞可通过抑制 CD4⁺T 细胞来发挥治疗疾病的作用, 因此, 该群细胞成为调节性 CD8⁺T 细胞的重要成员之一。调节型 CD8⁺T 细胞的研究局限在细胞表面标志物的不确定, 因此, 研究该群细胞表面糖基化将有助于发现新的细胞标志物, 促进该领域的研究进展。

通过凝集素设门发现, 淋巴结中表面表达磺酸化/唾液酸化-Gal β 1-3GalNAc α 糖基 CD8⁺T 淋巴细胞表达 IFN- γ 的细胞比例显著高于不表达该糖基的细胞, 而表达末端 N-乙酰葡萄糖胺的 CD8⁺T 淋巴细胞中表达 IFN- γ 和 perforin 的细胞比例均显著高于不表达该糖基的细胞(表 2)。这一结果暗示, 活化的 CD8⁺T 淋巴细胞中依然存在糖基化程度和种类不同的细胞亚群, 且糖基化程度与细胞因子表达水平有关。

在对人外周血单个核细胞的抑制试验中发现, 阻断 IFN- γ 和 perforin 将彻底抑制抗原特异性 CD8⁺T 淋巴细胞的抑制活性^[13]。在 EAE 动物试验中, 过继 IFN- γ 和 perforin 缺陷的 MOG35-55 特异性的 CD8⁺T 淋巴细胞到野生型小鼠中, 对 MOG 诱导的 EAE 无抑制活性^[14]。GA 诱导的 CD8⁺T 淋巴细胞的调节活性也依赖于细胞因子 IFN- γ 和 perforin 的表达^[7]。IFN- γ 可抑制或调解 CD4⁺T 淋巴细胞的分化模式, perforin 可发挥细胞毒性作用, 二者对调节性 CD8⁺T 淋巴细胞作用重大。我们的试验中发现, 与凝集素结合的 AAL⁺CD8⁺和 AAL2⁺CD8⁺T 细胞中表达 IFN- γ 和 perforin 的细胞比例显著高过不结合凝集素的细胞, 暗示磺酸化/唾液

酸化-Gal β 1-3GalNAc α 和末端 N-乙酰葡萄糖胺有助于分离活性 CD8⁺T 淋巴细胞。因此, 下一步研究可通过凝集素结合细胞因子表达, 分选出细胞亚群, 通过表达差异寻找调节性 CD8⁺T 淋巴细胞的标志物, 并为 GA 诱导调节性 CD8⁺T 淋巴细胞抑制 CD4⁺T 淋巴细胞机制研究提供理论支持。

4 结论

关于 GA 诱导免疫耐受小鼠 CD8⁺T 淋巴细胞的研究报道非常少, 本文通过茶树菇分离的两种凝集素 AAL 和 AAL2(分别对磺酸化/唾液酸化-Gal β 1-3GalNAc α 和末端 N-乙酰葡萄糖胺有高结合特异性)研究 GA 诱导的 CD8⁺T 淋巴细胞表面糖基水平, 发现 GA 诱导的 CD8⁺T 淋巴细胞表面表达磺酸化/唾液酸化-Gal β 1-3GalNAc α 糖基的比例显著高于 CD8⁺T 淋巴细胞, 而表达末端 N-乙酰葡萄糖胺的比例无显著性差异。且 GA 诱导出活性的 CD8⁺T 淋巴细胞高表达磺酸化/唾液酸化-Gal β 1-3GalNAc α 糖基和末端 N-乙酰葡萄糖胺。下一步研究我们将利用凝集素进一步分离 CD8⁺T 细胞亚群, 研究其表面标志物, 将有助于研究调节性 CD8⁺T 细胞的异质性和作用机制。

参考文献

- [1] ALTELAAR A F, MUNOZ J, HECK A J. Next-generation proteomics: towards an integrative view of proteome dynamics [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2013, 14(1): 35-48
- [2] MOREMEN K W, TIEMEYER M, NAIRN A V. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2012, 13(7): 448-462
- [3] BRAAKMAN I, BULLEID N J. Protein folding and modification in the mammalian endoplasmic reticulum [J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2011: 8071-99
- [4] RABINOVICH G A, CROCI D O. Regulatory circuits mediated by lectin-glycan interactions in autoimmunity and cancer [J]. *Immunity*, 2012, 36(3): 322-335
- [5] YI W, CLARK P M, MASON D E, et al. Phosphofructokinase 1 Glycosylation Regulates Cell Growth and Metabolism [J]. *Science*, 2012, 337(6097): 975-980
- [6] SINHA S, ITANI F R, KARANDIKAR N J. Immune regulation of multiple sclerosis by Cd8⁺ T cells [J]. *Immunologic Research*, 2014, 59(1-3): 254-265
- [7] TYLER A F, MENDOZA J P, FIRAN M, et al. Cd8 T cells are required for glatiramer acetate therapy in autoimmune demyelinating disease [J]. *PloS One*, 2013, 8(6): e66772

- [8] YAO Y, HAN W, LIANG J, et al. Glatiramer acetate ameliorates inflammatory bowel disease in mice through the induction of Qa-1-restricted Cd8(+) regulatory cells [J]. *Eur. J. Immunol.*, 2013, 43(1): 125-136
- [9] LIANG Y, CHEN H, ZHANG H B, et al. Lectin from agrocybe aegerita as a glyco-phenotype probe for evaluation of progression and survival in colorectal cancer [J]. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2014, 15(14): 5601-5605
- [10] JIANG Shuai, CHEN Yi-jie, WANG Man et al. A novel lectin from agrocybe aegerita shows high binding selectivity for terminal N-acetylglucosamine [J]. *Biochem J.*, 2012, 443(2): 369-378
- [11] 梁一, 郭莲仙, 孙慧. 茶树菇活性蛋白组分对荷瘤小鼠免疫调节功能研究[J]. 现代食品科技, 2014, 30(7): 1-5
LIANG Yi, GUO Lian-xian, SUN Hui. *In vivo* antitumor activity of the active protein components from agrocybe aegerita on tumor-bearing mouse model [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2014, 30(7): 1-5
- [12] TENNAKOON D K, MEHTA R S, ORTEGA S B, et al. Therapeutic induction of regulatory, cytotoxic Cd8+ T cells in multiple sclerosis [J]. *J. Immunol.*, 2006, 176(11): 7119-7129
- [13] CUNNUSAMY K, BAUGHMAN E J, FRANCO J, et al. Disease exacerbation of multiple sclerosis is characterized by loss of terminally differentiated autoregulatory Cd8+ T cells [J]. *Clinical Immunology*, 2014, 152(1-2): 115-126
- [14] ORTEGA S B, KASHI V P, TYLER A F, et al. The disease-ameliorating function of autoregulatory Cd8 T cells is mediated by targeting of encephalitogenic Cd4 T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *J. Immunol.*, 2013, 191(1): 117-126