

茶树菇凝集素 AAL、AAL-2 检测小鼠 CD8⁺T 淋巴细胞表面糖基化研究

雷桂炎, 张晓敏, 文钰棣, 巫伟鹏, 黄碧霞, 关鑫, 梁一

(广东医科大学医学检验学院临床免疫教研室, 广东东莞 523808)

摘要: 本研究使用两种大型真菌茶树菇新型凝集素 AAL (*Agrocybe aegerita* lectin) 和 AAL2 (*Agrocybe aegerita* lectin 2), 以检测小鼠 CD8⁺T 淋巴细胞表面糖基化。用生物素标记的 AAL 和 AAL2 结合流式细胞仪, 分别分析从 C57BL/6 小鼠脾脏和腹股沟淋巴结分离出来的 CD8⁺T 淋巴细胞表面的糖基化水平, 及其细胞因子表达水平。结果发现脾脏中 AAL⁺CD8⁺, AAL2⁺CD8⁺T 淋巴细胞所占的比例 (%) 分别为 6.72±3.00 和 12.18±5.28, 而腹股沟淋巴结的 AAL⁺CD8⁺, AAL2⁺CD8⁺T 淋巴细胞所占的比例 (%) 分别为 12.18±5.28 和 10.15±3.46。细胞因子表达水平结果发现小鼠脾脏 AAL2⁺CD8⁺T 细胞表达 perforin 的细胞比例低于 AAL⁺CD8⁺T 细胞 ($p<0.05$, 有统计学意义), 腹股沟淋巴结中 AAL⁺CD8⁺T 细胞表达 perforin 的细胞比例则高于 AAL⁺CD8⁺T 细胞 ($p<0.05$, 有统计学意义)。该数据为研究小鼠脾脏和腹股沟淋巴结 CD8⁺T 细胞表面糖基化提供了新的数据, 也为两种新型凝集素 AAL 和 AAL2 的应用提供理论依据。

关键词: 茶树菇凝集素; 小鼠 CD8⁺T 淋巴细胞; 糖基化

文章编号: 1673-9078(2017)1-8-13

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.1.002

Glycosylation of CD8⁺ T Lymphocytes from C57BL/6 Mice Recognized by *Agrocybe aegerita* Lectins

LEI Gui-yan, ZHANG Xiao-min, WEN Yu-di, WU Wei-peng, HUANG Bi-xia, GUAN Xin, LIANG Yi

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

Abstract: Two novel lectins, AAL (*Agrocybe aegerita* lectin) and AAL2 (*Agrocybe aegerita* lectin 2), were employed to detect the glycosylation of CD8⁺ T lymphocytes from C57BL/6 mouse spleen and inguinal lymph nodes. Biotinylated AAL and AAL2, combined with flow cytometry, were used to analyze the glycosylation of CD8⁺ T lymphocytes and cytokine expression. The proportion (%) of AAL⁺CD8⁺ and AAL2⁺CD8⁺ T lymphocytes in spleen was found to be 6.72±3.00 and 12.18±5.28, respectively. The proportion (%) of AAL⁺CD8⁺ and AAL2⁺CD8⁺ T lymphocytes in lymph nodes was 12.18±5.28 and 10.15±3.46, respectively. Moreover, the frequency of perforin⁺ cells in spleen AAL2⁺CD8⁺ T cells was lower than that in AAL⁺CD8⁺ T cells ($p<0.05$), and the frequency of perforin⁺ cells in lymph node AAL⁺CD8⁺ T cells was higher than that in AAL⁺CD8⁺ T cells ($p<0.05$). This study provides new data on the glycosylation of spleen and inguinal lymph node CD8⁺ T cells and the application of two new lectins, AAL and AAL2.

Key words: *Agrocybe aegerita* lectins; CD8⁺ T lymphocytes; glycosylation

糖基化是一种重要的蛋白质翻译后修饰方式, 它参与和调控关键信号转导通路^[1]及疾病的发生^[2], 例如, 糖基化修饰在染色质结构稳定、基因的复制和转

收稿日期: 2015-06-27

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81102850); 广东省卫生厅基金项目 (A2011434); 广东省教育厅育苗工程项目 (LYM11070); 东莞市科技局项目 (2011108102049); 湛江市科技攻关项目 (2011C3109015); 广东医学院大学生创新实验项目 (2013ZYDC004)

作者简介: 雷桂炎 (1994-), 女, 药用真菌抗肿瘤、抗病毒活性成分研究; 张晓敏; 文钰棣 (共同第一作者)

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

录、蛋白质的翻译和加工、信号转导及细胞免疫等生物过程中扮演了重要的角色。因此, 研究糖基化对揭示生命现象的本质和活动规律意义重大。目前研究的糖基化修饰类型主要分为: N-连接糖基化修饰、O-连接糖基化修饰和 O-GlcNAc 修饰^[3]。

T 淋巴细胞在分化发育过程中伴随着细胞表面的 N-连接糖基化修饰和 O-连接糖基化修饰的改变, 这些改变与发挥生物学功能密切相关, 可直接影响或改变细胞膜蛋白的亲亲和特性来调节 T 细胞应答^[4]。目前对于 T 细胞表面糖基化的研究主要通过凝集素和单克隆抗体, 报道主要集中在, 初始 T 细胞在成熟过程中表面唾液酸化程度增强^[5], 活化后唾液酸化降低 (花生

凝集素 PNA 检测)^[6]。效应性 T 细胞表面高表达 O-连接糖基化修饰蛋白,而记忆 T 细胞表面低表达该糖基修饰蛋白(单克隆抗体检测)^[7]。除了使用 PNA 研究的唾液酸化和单克隆抗体研究的 O-连接糖基,关于 T 淋巴细胞表面其他糖基修饰报道很少。

正如花生凝集素 PNA 可用于检测唾液酸化的 Gal β 1,3GalNAc, 本文使用两种新的茶树菇凝集素 AAL 和 AAL2 检测 T 淋巴细胞表面糖基化水平。AAL 属半乳糖凝集素,该凝集素对半乳糖苷具有高度结合特异性,且 AAL 氨基酸序列与哺乳动物的半乳糖凝集素具有较高相似性。糖芯片实验表明其糖结合特异性最高的糖基是磺酸化/唾液酸化-Gal β 1-3GalNAc, AAL 特异识别糖基的低表达是结肠癌的总生存率和无进展生存显著良好的预后因素^[8]。AAL2 的糖芯片实验表明,其糖结合特异性最高的是末端 N-acetylglucosamine^[9],且 AAL-2 对 GlcNAc 的特异性高于其他结合 GlcNAc 的凝集素,是已知凝集素中与 GlcNAc 结合特异性最高,但它在组织或细胞中糖基结合能力未知。因此,本文将检测 AAL 与 AAL2 在小鼠 CD8⁺T 淋巴细胞表面结合能力,即可为研究 T 细胞表面糖基构成提供新的数据,又可为两种新型凝集素 AAL 和 AAL-2 的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物及试剂

C57BL/6 小鼠(雌性,6 周龄,16~18 g)购自广东省医学实验动物中心,小鼠许可证号为 SCXK(粤)20110015, EZ-SepTMMouse 淋巴细胞分离液购自深圳达科为公司, PMA/Ionomycin mixture(250 \times)、BFA/Monensin Mixture(250 \times)购自杭州联科生物技术有限公司, Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set 为 Multiscience 公司产品, Streptavidin PerCP-Cyanine5.5、Anti-Mouse CD3e APC-eFluor[®] 780、Anti-Mouse CD8a PE-Cyanine7、Anti-Mouse Perforin PE 和 Anti-Mouse IFN- γ FITC 为美国 eBioscience 公司产品。

1.2 AAL 和 AAL-2 制备及生物素标记

茶树菇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,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,得到总蛋白^[10]。按照说明书分别制备分离 AAL-2 的 GlcNAc 偶联亲和柱以及 AAL 的 Lac 偶联亲和柱:将 200 mM GlcNAc 偶联溶液(pH 13.0)与 Epoxy activated Sepharose 6B 填料混合,30 $^{\circ}$ C 旋转过夜。加 1 M 乙醇胺 pH 8.0 混匀,45 $^{\circ}$ C 温育。去离子水洗涤 3~4 次,装柱。AAL 的 Lac-Sepharose 6B 柱填料的制备方法同 GlcNAc-Sepharose 6B 柱的制备过程。将总蛋白 Yt 通过亲和层析柱,控制流速 1 mL/min。用 TBS 缓冲液洗涤,分别用含 200 mM 的 Lactose 和 GlcNAc 的 TBS 溶液竞争洗脱 AAL 和 AAL2,收集洗脱峰,蛋白透析冻干。

分别重悬 AAL 和 AAL2,将样品用 0.01 M PBS(pH 7.4)透析,然后用 0.1 M NaHCO₃ 调 pH 至 8.0,加活化生物素进行连接,12000 r/min 高速离心去除变性蛋白,用 Sephadex G-25 分离,去除游离生物素 biotin 并脱盐,监测回收第一峰即为标记好的复合物,低温真空冷冻干燥,-80 $^{\circ}$ C 保存。

1.3 小鼠脾脏和腹股沟淋巴结分离

断颈处死 C57BL/6 小鼠,75%乙醇浸泡 5 min。在超净台中操作,加入 2~3 mL 常温下的 EZ-SepTM Mouse 1 \times 淋巴细胞分离液到 35 mm 培养皿中。用灭菌的剪刀剪开小鼠腹腔,用灭菌的镊子取出脾脏,固定灭菌的 200 目尼龙网,用灭菌的玻璃活塞轻轻研磨小鼠脾脏,将细胞分离液转移到 15 mL 离心管中,加入适量 RPMI-1640 培养基。800 g 离心 30 min,小心吸出淋巴细胞层,加入培养基充分洗涤。250 g 离心 10 min,去上清,加入 1 mL 培养基重悬并计数。腹股沟淋巴结细胞分离用同样的操作。

1.4 细胞膜及胞内分子染色

在细胞悬液中先后加入 PMA/Ionomycin(250 \times)和 BFA(250 \times),在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的培养箱中分别处理 3 h,1000 r/min 离心收集细胞,PBS 重悬。加入荧光标记的抗体(Anti-Mouse CD3e APC-eFluor[®] 780、Anti-Mouse CD8a PE-Cyanine7)、AAL-biotin(终浓度 0.5 μ M)和 AAL2-biotin(终浓度 1.4 μ M)及同型对照,4 $^{\circ}$ C 避光 30 min。PBS 洗涤,加入 Streptavidin-percP,4 $^{\circ}$ C 避光 30 min。PBS 洗涤,固定液 4 $^{\circ}$ C 避光处理 20 min,再加破膜缓冲液,离心弃上清。用破膜缓冲液重悬,加入胞内细胞因子抗体 Anti-Mouse Perforin PE 和 Anti-Mouse IFN- γ FITC 及同型对照,4 $^{\circ}$ C 避光 30 min, PBS 洗涤重悬。使用流式细胞仪(BD FACS Calibur II)检测,结果用流式软件 CellQuest v3.3 分析。

1.5 统计学分析

数据采用 Sigmaplot 10.0 进行分析, 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。当 $p < 0.05$ 时, 为显著性差异, 用符号*表示, 当 $p < 0.01$ 时, 用符号**表示。

2 结果与讨论

2.1 茶树菇凝集素检测小鼠脾脏 CD3⁺CD8⁺和

CD3⁺CD8⁻细胞表面糖基化水平

分离 C57BL/6 小鼠脾脏细胞, 使用抗体和凝集素-biotin 及 Streptavidin-perCP 标记细胞, 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: 7.77±3.53、59.70±4.29、6.72±3.05 和 25.82±6.17 (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: 11.41±4.58 和 21.31±11.53(图 1c)。AAL2⁺CD3⁺CD8⁻、AAL2⁻CD3⁺CD8⁻、AAL2⁺CD3⁺CD8⁺和 AAL2⁻CD3⁺CD8⁺细胞的比率(%) 分别为: 12.90±3.78、54.37±4.78、7.47±1.03 和 25.28±4.53(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: 19.17±5.29 和 23.22±4.90 (图 1e)。

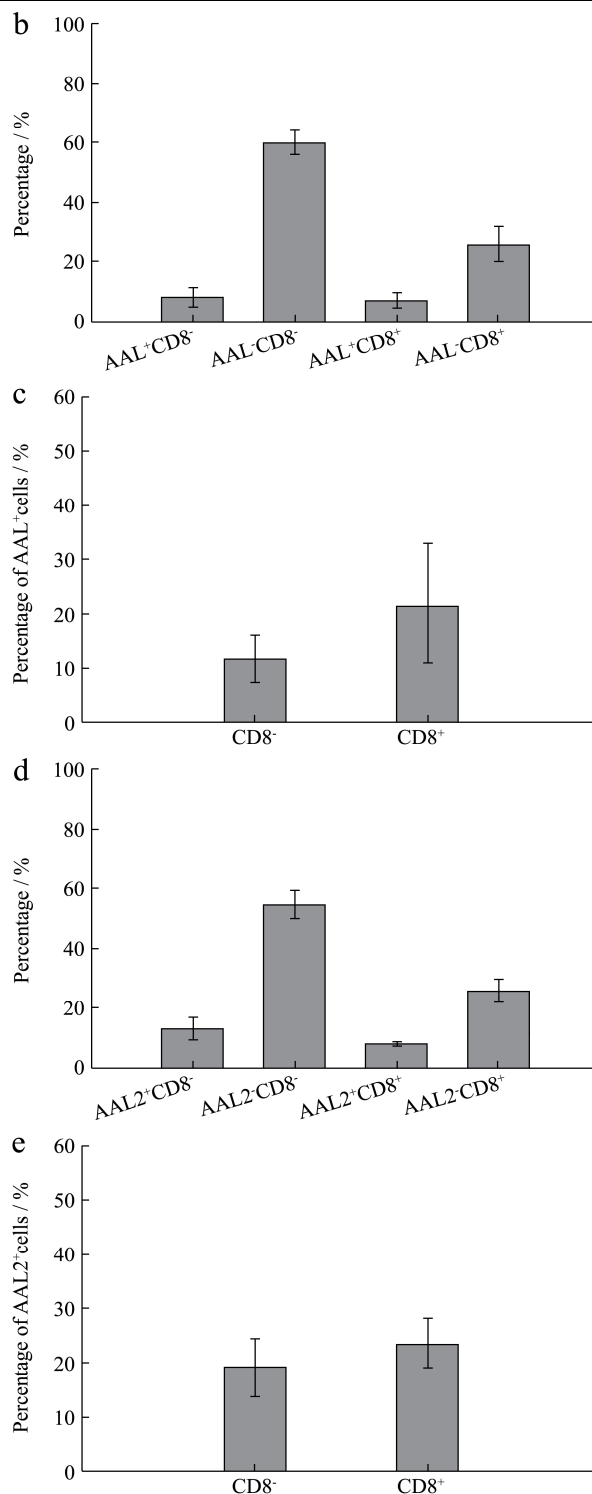
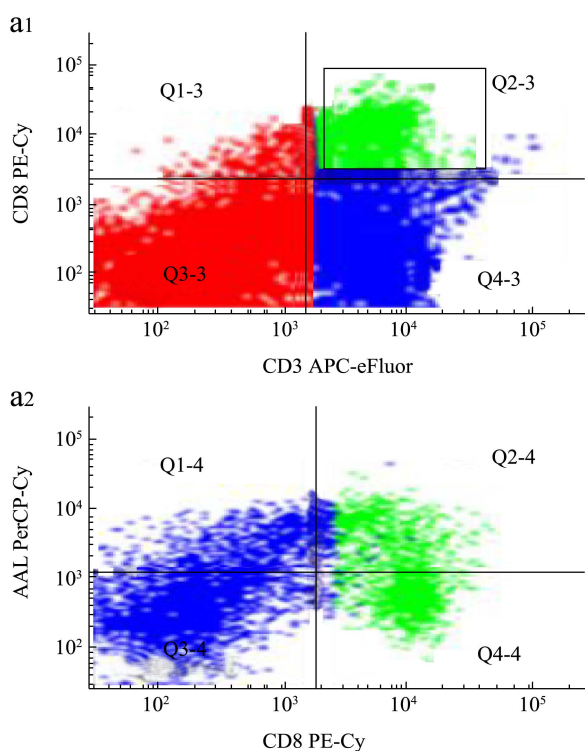


图 1 AAL 和 AAL2 检测小鼠脾脏 CD3⁺CD8⁻和 CD3⁺CD8⁺T 淋巴细胞表面糖基化

Fig.1 AAL and AAL2 recognition of CD3⁺CD8⁻ and CD3⁺CD8⁺ T cells from spleen

注: 分离 C57BL/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。图 a 为流式细胞术检测结果; 图 b 为小鼠脾脏 CD3⁺CD8⁻和 CD3⁺CD8⁺T 淋巴细胞使用 AAL 鉴定其糖基化水平; 图 c 为 CD3⁺CD8⁻和 CD3⁺CD8⁺T 淋巴细胞中 AAL⁺细

胞百分比;图 d 为小鼠脾脏 CD3⁺CD8⁻和 CD3⁺CD8⁺淋巴细胞使用 AAL2 鉴定其糖基化水平;图 e 为 CD3⁺CD8⁻和 CD3⁺CD8⁺T 淋巴细胞中 AAL2⁺细胞百分比。

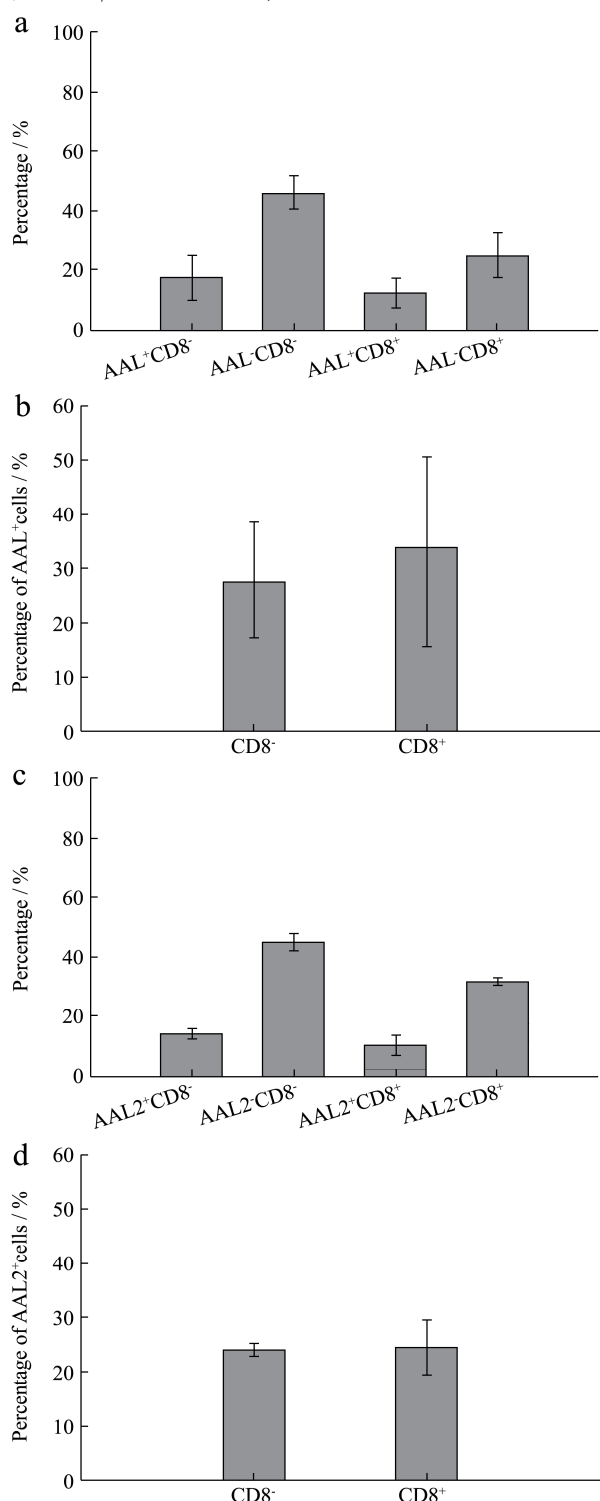


图 2 AAL 和 AAL2 检测小鼠腹股沟淋巴结 CD3⁺CD8⁻和 CD3⁺CD8⁺ 细胞表面糖基化

Fig.2 AAL and AAL2 recognition of CD3⁺CD8⁻ and CD3⁺CD8⁺ T cells from inguinal lymph nodes

注:分离 C57BL/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。图 a 为小鼠淋巴结 CD3⁺CD8⁻和 CD3⁺CD8⁺淋巴细胞使用 AAL 鉴定其糖基化水平;图 b 为 CD3⁺CD8⁻和 CD3⁺CD8⁺淋巴细胞中 AAL⁺细胞百分比;图 c 为小鼠淋巴结 CD3⁺CD8⁻和 CD3⁺CD8⁺淋巴细胞使用 AAL2 鉴定其糖基化水平;图 d 为 CD3⁺CD8⁻和 CD3⁺CD8⁺淋巴细胞中 AAL2⁺细胞百分比。

2.2 凝集素检测小鼠腹股沟淋巴结 CD3⁺CD8⁺和 CD3⁺CD8⁻细胞表面糖基化水平

分离小鼠腹股沟淋巴结细胞,使用 CD3 和 CD8 抗体,凝集素-biotin 和 Streptavidin-perCP 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: 17.48±7.65、45.62±6.10、12.18±5.28 和 24.76±7.66 (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: 27.44±11.05 和 33.79±16.65 (图 2b)。AAL2⁺CD3⁺CD8⁻、AAL2⁻CD3⁺CD8⁻、AAL2⁺CD3⁺CD8⁺和 AAL2⁻CD3⁺CD8⁺细胞的比率(%)分别为: 14.00±1.84、44.45±3.32、10.15±3.46 和 31.40±1.70 (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: 23.91±1.03 和 24.10±5.35 (图 2d)。

2.3 检测小鼠不同糖基化水平的 CD3⁺CD8⁺细胞中细胞因子 IFN-γ 和 perforin 的表达

CD8⁺T 细胞的功能活性与细胞因子 IFN-γ 和 Perforin 的表达密切相关,用凝集素结合活性设门,分别检测脾脏和淋巴结不同糖基水平 CD3⁺CD8⁺T 淋巴细胞胞内细胞因子 IFN-γ 和 perforin 的表达。表 1 所示,小鼠脾脏 AAL⁻CD3⁺CD8⁺细胞与 AAL⁺CD3⁺CD8⁺细胞中 IFN-γ⁺和 perforin⁺细胞比例无显著性差异, AAL2⁻CD3⁺CD8⁺细胞与 AAL2⁺CD3⁺CD8⁺细胞中 IFN-γ⁺细胞比例无显著性差异,但 AAL2⁺CD3⁺CD8⁺细胞中 perforin⁺的细胞比例显著低于 AAL2⁻CD3⁺CD8⁺细胞 ($p<0.05$)。表 2 表明,小鼠淋巴结 AAL2⁻CD3⁺CD8⁺细胞与 AAL2⁺CD3⁺CD8⁺细胞中 IFN-γ⁺和 perforin⁺细胞比例无显著性差异, AAL⁻CD3⁺CD8⁺细胞与 AAL⁺CD3⁺CD8⁺细胞中 IFN-γ⁺细胞比例无显著性差异,但 AAL⁺CD3⁺CD8⁺细胞中 perforin⁺的细胞比例显著高于 AAL⁻CD3⁺CD8⁺细胞 ($p<0.05$)。

之前的研究表明,小鼠 CD8⁺T 淋巴细胞表面糖基化研究主要集中在唾液酸化糖基,其他糖基化修饰报道较少。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。糖基的动态表达暗示了糖基化可作为免疫细胞不同活化阶段的标志物。因此,本文希望通过两种分别对磺酸化/唾液酸化-Galβ1-3GalNAc 和末端 N-乙酰葡萄糖胺(N-acetylglucosamine)有高结合特异性的新型凝集素 AAL 和 AAL-2 进一步研究小鼠 CD8⁺T 淋巴细胞表面糖基化水平。AAL (特异结合磺酸化/唾液酸化-Galβ1-3GalNAc) 与 PNA (主要结合去唾液酸化

Galβ1-3GalNAc) 的糖结合活性不同,成熟 CD8⁺T 淋巴细胞由于表面的唾液酸化糖基,因此 PNA 结合比例非常低^[11]。本文发现,AAL 可分别结合脾脏和腹股沟淋巴结 CD8⁺T 淋巴细胞中 21.31%和 33.79%的细胞,这与其可结合唾液酸化-Galβ1-3GalNAc 是一致的。AAL-2 与末端 N-乙酰氨基葡萄糖具有极高的亲和力,是已知凝集素中结合 N-acetylglucosamine 特异性最高的凝集素。关于 CD8⁺T 淋巴细胞表面 N-acetylglucosamine 至今鲜有报道,因此,本文 AAL2 的结果为该部分的研究提供了新的数据。

表 1 AAL 和 AAL2 检测小鼠脾脏 CD3⁺CD8⁺T 淋巴细胞胞内细胞因子 IFN-γ 和 perforin 的表达

Table 1 Frequency of intracellular cytokine IFN-γ⁺ and perforin⁺ cells in AAL/AAL2 gated cells from spleen

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	5.30±3.80	14.30±11.20	11.85±3.55	11.80±4.40
perforin ⁺ 细胞	2.48±3.09	9.55±12.63	15.49±11.14	1.98±4.00*

注: *代表 p<0.05。

表 2 AAL 和 AAL2 检测小鼠腹股沟淋巴结 CD3⁺CD8⁺T 淋巴细胞胞内细胞因子 IFN-γ 和 perforin 的表达

Table 2 Frequency of intracellular cytokine IFN-γ⁺ and perforin⁺ cells in AAL/AAL2 gated cells from inguinal lymph nodes

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	3.10±2.50	8.10±5.70	0.30±0.30	11.75±3.85
perforin ⁺ 细胞	0.90±0.30	10.15±2.90*	0.15±0.05	0.45±0.35

注: *代表 p<0.05。

小鼠 CD8⁺T 细胞的功能可通过其产生的细胞因子 IFN-γ、perforin 等来评价。本文的研究发现,脾脏中 AAL2⁺CD3⁺CD8⁺T 细胞中的 perforin⁺细胞所占比例显著高于 AAL2⁻CD3⁺CD8⁺T 细胞(表 1),这暗示去 N-acetylglucosamine 糖基修饰的小鼠 CD8⁺T 细胞中活性细胞比例高于 N-acetylglucosamine 糖基修饰的小鼠 CD8⁺T 细胞。而淋巴结中 AAL⁻CD3⁺CD8⁺T 细胞中表达的 perforin⁺ 的细胞所占比例显著低于 AAL⁺CD3⁺CD8⁺T 细胞(表 2),这说明凝集素 AAL 结合的小鼠 CD8⁺T 细胞的活性细胞比例要高过不结合的。已有研究报道,小鼠活化的 T 淋巴细胞表面 O-糖基化上的唾液酸位点减少,说明其表面是低唾液酸化^[6],结合本研究数据,暗示 AAL 可以结合通过结合磺酸化糖基来结合活化的小鼠 CD8⁺T 淋巴细胞。目前由于缺乏研究磺酸化糖基的凝集素或抗体,因此小鼠 CD8⁺T 淋巴细胞表面磺酸化糖基修饰报道几乎空白。糖结合芯片结果表明,凝集素 AAL 结合糖基的能力: 3OSO3Galβ1-3GalNAcα-Sp8>Neu5Aca2-3Galβ1-3GalNAcα-Sp8,即结合能力最强的是磺酸化的 Galβ1-3GalNAc 二糖^[8],所以本文的发现将促使我们进一步利用新凝集素 AAL 这个工具来研究免疫细

胞表面磺酸化糖基修饰。

小鼠 CD8⁺T 细胞膜上花生凝集素 PNA 的受体被鉴定出包括 CD8、CD43 和 CD45 等^[11],花生凝集素与这些受体结合主要受唾液酸修饰的调控,PNA 之所以在成熟 T 淋巴细胞上结合率低于未成熟 T 细胞,部分源于在发育过程中 ST3Gal-I sialyltransferase 表达的改变^[12]。另外,去唾液酸化(活化)的小鼠 CD8⁺T 细胞会出现末端唾液酸糖基丢失,半乳糖苷增多,Ca⁺反应增强,细胞上的 CD69 和 CD25 分子上调,细胞因子 IL-2、IFN-γ 以及颗粒酶 B 的上调^[13]。AAL 和 AAL-2 可研究 T 淋巴细胞表面磺酸化糖基和 N-acetylglucosamine 糖基,其糖基表达动态机制可通过磺酸转移酶及 N-乙酰氨基葡萄糖转移酶的表达来深入研究。

除了对活化/未活化的 CD8⁺T 淋巴细胞的糖基化研究,另一部分研究主要集中在通过糖基修饰效应区反应性/记忆性 CD8⁺T 淋巴细胞^[14,7]。最新的研究表明,感染后的抗原特异性效应 CD8⁺T 淋巴细胞会高表达核心 2 O-glycan,而记忆性 CD8⁺T 淋巴细胞则低表达,且该糖基化修饰是 IL-15 依赖性的。本研究也发现,使用 AAL 和 AAL2 可分别将 CD8⁺和 CD4⁺T 淋巴细

胞分成两群,说明其中至少存在两个细胞亚群。在下一步研究中,可将细胞亚群分选对其糖基化水平和细胞分群之间的关系进行研究。

3 结论

本文通过大型真菌茶树菇中可分别特异性结合磺酸化/唾液酸化-Gal β 1-3GalNAc 和 N-acetylglucosamine 的两种凝集素 AAL 和 AAL2 来研究小鼠 CD8⁺T 淋巴细胞表面糖基修饰水平,发现 AAL 可更多地结合在小鼠活性 CD8⁺T 淋巴细胞表面的糖基,AAL-2 则更多地结合在非活性 CD8⁺T 细胞表面的糖基,暗示 AAL 主要通过结合细胞表面磺酸化糖基来结合活化的小鼠 CD8⁺T 淋巴细胞,而活化的小鼠 CD8⁺T 细胞表面末端 N-acetylglucosamine 糖基修饰水平较低;AAL-2 则主要通过末端 N-acetylglucosamine 来结合非活性小鼠 CD8⁺T 细胞,而非活化的小鼠 CD8⁺T 细胞表面磺酸化糖基修饰水平较低。本研究为 CD8⁺T 淋巴细胞表面糖基化提供新的数据,并为两种新型凝集素的使用提供理论依据。

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] 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
- [3] Hart G W, Slawson C, Ramirez-Correa G, Lagerlof O. Cross talk between O-GlcNAcylation and phosphorylation: roles in signaling, transcription, and chronic disease [J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2011, 80(1):825-858
- [4] Rossi N E, Reine J, Pineda-Lezmit M, et al. Differential antibody binding to the surface alpha beta TCR.CD3 complex of CD4⁺ and CD8⁺T lymphocytes is conserved in mammals and associated with differential glycosylation [J]. *International Immunology*, 2008, 20(10): 1247-1258
- [5] Daniels M A, Devine L, Miller J D, et al. CD8 binding to MHC class I molecules is influenced by T cell maturation and glycosylation [J]. *Immunity*, 2001, 15(6): 1051-1061
- [6] Galvan M, Murali-Krishna K, Ming L L, et al. Alterations in cell surface carbohydrates on T cells from virally infected mice can distinguish effector/memory CD8⁺T cells from naive cells [J]. *Journal of Immunology*, 1998, 161(2): 641-648
- [7] Harrington L E, Galvan M, Baum L G, et al. Differentiating between memory and effector CD8 T cells by altered expression of cell surface O-glycans [J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 2000, 191(7): 1241-1246
- [8] 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 : APJCP*, 2014, 15(14): 5601-5605
- [9] Jiang S, Chen Y, Wang M, et al. A novel lectin from *Agrocybe aegerita* shows high binding selectivity for terminal N-acetylglucosamine [J]. *The Biochemical Journal*, 2012, 443(2): 369-378
- [10] 梁一,郭莲仙,孙慧.茶树菇活性蛋白组分的体内抗肿瘤活性研究[J].现代食品科技,2014,30(7):1-5
LIANG Yi, GUO Lian-xian, SUN Hui, et al. 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
- [11] Wu W, Harley P H, Punt J A, et al. Identification of CD8 as a peanut agglutinin (PNA) receptor molecule on immature thymocytes [J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 1996, 184(2): 759-764
- [12] Sadighi Akha A A, Berger S B, Miller R A. Enhancement of CD8⁺T-cell function through modifying surface glycoproteins in young and old mice [J]. *Immunology*, 2006, 119(2): 187-194
- [13] Comelli E M, Sutton-Smith M, Yan Q, et al. Activation of murine CD4⁺ and CD8⁺T lymphocytes leads to dramatic remodeling of N-linked glycans [J]. *Journal of Immunology*, 2006, 177(4): 2431-2440
- [14] Nolz J C, Harty J T. IL-15 regulates memory CD8⁺T cell O-glycan synthesis and affects trafficking [J]. *J. Clin. Invest.*, 2014, 124(3): 1013-1026