

B 细胞受体核心岩藻糖基化调节成熟 B 细胞的信号转导

于蕊¹,刘红霞²,孙世杰²,王惠国¹,李文哲²

摘要 目的 探讨核心岩藻糖基转移酶(Fut8)对成熟 B 细胞信号转导的影响。方法 利用 Fut8-siRNA 逆转录病毒载体建立 Fut8 基因沉默成熟 B 细胞株(3-83-KD 细胞),并将 PLHCX-Fut8 质粒导入 3-83-KD 细胞建立 Fut8 基因恢复成熟 B 细胞株(3-83-KD-Re)。用 Real time-PCR、Western blot 和 HPLC 法检测 Fut8 mRNA、蛋白表达和 Fut8 酶活性,流式细胞仪和凝集素免疫印迹检测 BCR 的表达量和核心岩藻糖基化水平,Western blot 技术检测细胞内酪氨酸磷酸化水平。结果 与 3-83 细胞相比,3-83-KD 细胞的 BCR 核心岩藻糖基化水平明显下降,而 3-83-KD-Re 细胞其表达得到恢复。Fut8 基因沉默使 3-83-KD 细胞 BCR 介导的信号传导明显减弱,而 3-83-KD-Re 细胞的信号传导恢复正常。结论 Fut8 修饰的核心岩藻糖基化在 BCR 介导的细胞信号转导过程中发挥重要的调节作用。

关键词 核心岩藻糖基转移酶;siRNA;B 细胞受体;信号转导

中图分类号 R 392.11

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)03-0320-04

成熟 B 细胞的抗原识别及 B 细胞受体(B cell receptor,BCR)介导的细胞信号转导是体液免疫应答调节的重要组成部分^[1]。质谱分析表明 IgG-BCR 分子是富含核心岩藻糖基的糖蛋白^[2],核心岩藻糖基修饰对 IgG-BCR 的生物活性具有重要的调节作用。但目前核心岩藻糖基化对 IgG-BCR 介导的信号传导尚不清楚。核心岩藻糖基转移酶(α -1,6-fucosyltransferase, Fut8)是催化核心岩藻糖修饰的唯一的糖基转移酶,是以 GDP-岩藻糖为活化的糖基供体,以 α -1,6 糖苷键的形式把岩藻糖移交到 N-糖

链还原末端的乙酰葡萄糖胺,形成核心岩藻糖基^[3]。研究^[4-6]显示 Fut8 在 B 细胞的分化发育中发挥重要的调节作用。该实验以成熟 B 细胞株即 3-83 细胞,该细胞为 BCR 转基因模型,在 p31 刺激下,表达 IgG2a-BCR^[7]为研究对象,通过 RT-PCR、实时定量 PCR、Western blot、流式细胞术等,研究 Fut8 对成熟 B 细胞活化过程的调节作用。

1 材料与与方法

1.1 材料 逆转录病毒载体 PSINsi-hU6、PLHCX-Fut8-mutant cDNA 质粒为本实验室保存;3-83 细胞株购自美国 ATCC 公司;逆转录酶、dNTP mixture、RNase 抑制剂、DNA 连接试剂盒、Ex Taq 酶、质粒提取试剂盒购于大连 TaKaRa 公司实验室常规试剂购于上海生工公司;G418 购自美国 AMRESCO 公司;Anti-mouse IgG2a 等一抗购自美国 Sigma 公司;辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG 购自江苏碧云天公司;生物素标记-AOL 购自日本 TCI;抗 GAPDH (FL-355)抗体购自美国 Santa Cruz(sc-25778);生物素标记 p31 由北京中科亚光公司合成;膜蛋白提取试剂盒(BSP049)购自上海生工生物公司。

1.2 细胞模型的制备 筛选出最佳的 Fut8 siRNA 序列,siRNA-sense:5'-GATCCTCTCAGAATTGCGCGTATGT-TCAAGAGACATAGCGCCAATTCTGAGACTT-TTTTAT-3'; siRNA-antisense:5'-CGATAAAAAAGG-TATCGCGGTTAA-GACTCTTCTCTTGAAAGAGTCTT-AAACCGGATACCG-3',该序列位于小鼠 Fut8 基因(NM_016893)的 1386~1404 位。Fut8 基因沉默细胞(3-83-KD)模建立:准备阶段: 5×10^5 个 3-83 细胞置于 6 孔板内,37 °C 培养。感染阶段:利用聚凝胺处理细胞后,加入含 Fut8-siRNA 的逆转录病毒液,37 °C,CO₂ 培养箱中孵育 6 h,再追加 1ml 培养液到 6 孔板中过夜培养。G418 筛选阶段:加入 G418(400 μ g/ml)的培养液,每 2 d 更换一次 G418 的培养液,两周后挑选单个克隆置于 96 孔板中培养扩大培养,获得稳定遗传的沉默细胞模型命名为 3-83-KD。Fut8 恢复细胞(3-83-KD-Re)模型建立:准备阶段: 5×10^5 3-83-KD 细胞置于 6 孔板内,37 °C 培

2015-12-08 接收

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:31270864、30972675)

作者单位:¹大连大学生命科学与技术学院生物专业,大连 116622

²大连医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室,大连 116044

作者简介:于蕊,女,硕士研究生;

李文哲,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail:liwenzhe46@hotmail.com

王惠国,女,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:wanghuiquo126@126.com

养。转染阶段:将梭华-Sofast 和 Fut8-pLHCX 质粒按一定比例混合,并转染至 3-83-KD 细胞,37 °C 孵育 6 h,然后再加入 1 ml 含 20% 血清的 DEME 培养液,37 °C,CO₂ 培养箱中孵育 24 ~ 48 h。筛选阶段:加入潮霉素(200 μg/ml)于培养液中,每隔 3 d 换一次含潮霉素的培养液,2 周后挑取单个克隆细胞进行扩大培养,获得稳定遗传的具有潮霉素抗性的 Fut8 基因恢复细胞株,命名为 3-83-KD-Re。

1.3 实时定量 PCR 按 TRIzol RNA 提取试剂盒的操作说明提取细胞总 RNA。以 Oligo(dT)为起始引物,按照反转录说明书操作进行反转录合成 cDNA。PCR 程序:变性:94 °C 3 min,退火:93 °C 10 s,60 °C 20 s,72 °C 1 min 35 个循环,延伸:72 °C 10 min。引物序列为:5-AACAGCTTGTAAAGCCAAAG-3 and 5-GCATGTCTTTGGAGTTCATTTTC-3 (Fut8) (NM_016893); 5-GCAAGAGCTACAGCATGAGAG-3 and 5-TGCCGCCAGCGAAGAGACGCT-3 (Fut4) (NM_010242); 5-TCAAGCCATCAACATCAAC-3 and 5-GTGCCGGATGTACTCGAAGG-3 (GnT III) (NM_010795); 5-CAGCGCCAGCAACTCGACTA-3 and 5-TCGATTGAACATGGTGTCTCCAG-3 (β4GalT-I) (NM_022305); 5-AAATGCTGAAGCTCGGTGTG-3 and 5-TGAAGGGCTCGTTGATGG-3 (GAPDH) (NM_001001303)。

1.4 高效液相色谱 (HPLC) 检测酶活性 底物为 PABA[4-(2-pyridylamino) butylamine] 标记的 GnGn-bi-Asn-PABA (S)。通过 HPLC 对其产物(GnGnFuc-bi-Asn-PABA) (P) 进行分析,Fut8 酶活性 [pmol/(h·mg)] 按照公式 [P (pmol)/反应时间(h) 蛋白含量(mg)] 来计算。

1.5 流式细胞术分析细胞表面 BCR 的表达 首先利用 BSA-抗-CD16/CD32 (2.4G2) 抗体混合液对细胞表面的 Fe 受体进行封闭,然后加入荧光标记抗体在冰上反应 15 min。利用流式细胞仪 (FACS-Calibur) 进行分析。

1.6 免疫沉淀 (immunoprecipitation, IP) 纯化膜蛋白 根据膜蛋白提取试剂盒提取膜蛋白,测定蛋白浓度后取蛋白(约 500 μg)与抗-IgG2a 以及 G-Sepharose 充分混匀 4 °C 摇晃过夜,之后用 PBS 洗两次,加无变性剂 loading buffer 100 °C 煮 5 min 待用。

1.7 Western blot 和 lectin blot 法分析细胞内蛋白的表达 按标准方法进行 SDS-PAGE,将蛋白转移至 PVDF 膜上,用含 5% BSA 封闭 2 h 后,加入合适的一抗或生物素标记-AOL(米曲霉素,特异性识别核心岩藻糖基),摇床过夜,洗膜后加入二抗,孵育

1 h,洗膜后 ECL 显色并扫描。

2 结果

2.1 3-83-KD 细胞及 3-83-KD-Re 细胞特性 利用含 Fut8-siRNA 的重组逆转录病毒及 Fut8 -pLHCX 质粒,建立 3-83-KD 细胞及 3-83-KD-Re 细胞。RT-PCR 结果显示,与正常 3-83 细胞相比,3-83-KD 细胞中 Fut8 mRNA 的表达量明显减少(图 1A),而在 3-83-KD-Re 细胞中其表达得到恢复。实时定量 PCR 结果也显示,3-83-KD 细胞的 Fut8 mRNA 表达量小于 3-83 细胞的 5%(图 1B),但 Fut4, GnT III 和 β4GalT-I 等其它糖基转移酶的表达量并没有明显的变化(图 1B)。Western blot 实验结果进一步显示,与正常 3-83 细胞相比,Fut8 蛋白含量明显减少(图 1C),而在 3-83-KD-Re 细胞中得到恢复。此外,通过 HPLC 技术检测了 Fut8 的酶活性,结果显示 3-83 细胞和 3-83-KD-Re 细胞在 20 min 处出现特异性 Fut8 酶产物,而 3-83-KD 细胞在 20 min 处并没有出现特异性 Fut8 酶产物(图 1D)。

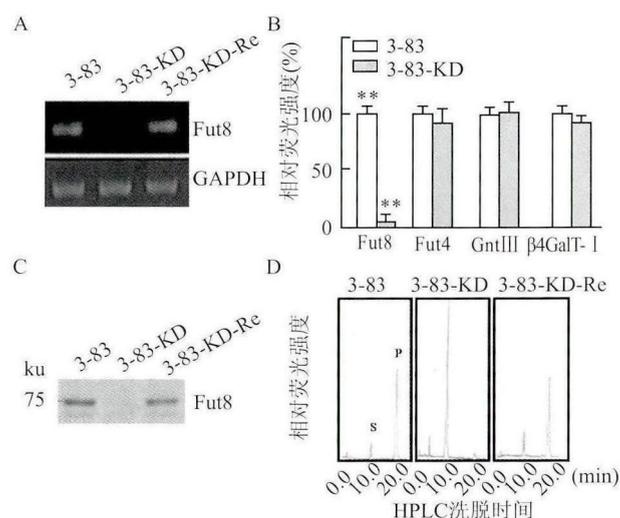


图1 3-83-KD 细胞及 3-83-KD-Re 细胞特性

A: RT-PCR 检测 Fut8 mRNA 表达; B: 实时定量 PCR 检测糖基转移酶的表达量; C: Western blot 检测 Fut8 蛋白表达量; D: HPLC 技术测定 Fut8 酶活性

2.2 细胞表面的 IgG-BCR 是核心岩藻糖基化糖蛋白 BCR 介导的信号是 B 细胞活化、增殖和分化的关键。流式细胞术检测结果显示,3-83、3-83-KD、3-83-KD-Re 细胞之间 IgG2a-BCR 的表达量没有明显的差别(图 2A)。但是 Lectin blot 结果表明 3-83-KD 细胞中 IgG2a-BCR 的核心岩藻糖基化修饰缺失,在

3-83-KD-Re 细胞中又得到恢复(图 2B)。

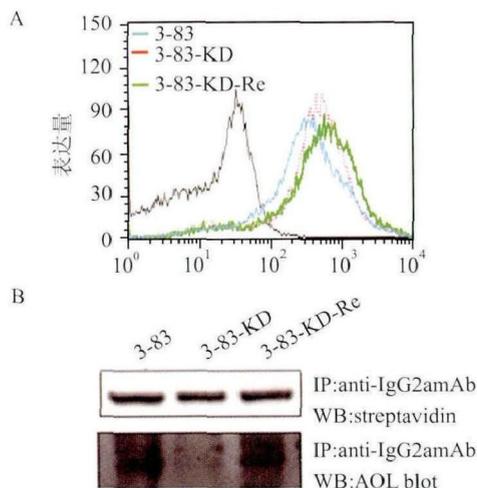


图 2 3-83-KD 细胞表面 BCR 缺损核心岩藻糖基化修饰

A: 流式细胞仪技术分析 3-83、3-83-KD、3-83-KD-Re 细胞中 IgG2a-BCR 的表达量;B:Lectin blot 检测 B 细胞表面 IgG2a-BCR 的核心岩藻糖基化水平

2.3 核心岩藻糖基化修饰影响 BCR 介导的下游信号分子磷酸化

BCR 复合物是由识别抗原的膜表面免疫球蛋白(the membrane surface immunoglobulin, mIg)与传递抗原刺激信号的 CD79a/CD79b (cluster of differentiation, CD) 异源二聚体所组成。BCR 与特异性抗原表位结合后,由 CD79a 和 CD79b 把此激活信号转入细胞内,并通过 Fyn、Lyn、Syk、Vav、PLC γ 2 及钙离子流出,激活 B 细胞^[8]。3-83 细胞表面的 BCR 特异性识别 p31 抗原肽(HDWRSFGGGFQHLCC)。为了更进一步确认核心岩藻糖基修饰对 BCR 介导的细胞信号传导的影响,用 p31 作用不同种类的 3-83 细胞,检测细胞内信号分子的酪氨酸磷酸化情况。用 p31(0.1 μ g/ml)处理后,与正常的 3-83 细胞相比,3-83-KD 细胞在 5 min 和 15 min 时酪氨酸磷酸化水平明显的下降,但在 3-83-KD-Re 细胞中磷酸化水平又得到恢复(图 3a)。进一步的研究结果显示,3-83-KD 细胞中 BCR 下游信号分子,如 CD79a 和 Syk 分子的磷酸化水平明显下降,而在 3-83-KD-Re 细胞中又得到恢复(图 3b)。

3 讨论

BCR 介导的信号是 B 细胞活化的第一信号,是 B 细胞成熟和活化的关键步骤。最新研究^[9]表明,糖基化对 BCR 功能具有重要的影响,如糖基化在维系 BCR 水溶性和立体构象中起重要作用,糖基化程度低下,会使 BCR 肽链缺乏刚性;糖基化过度,会遮

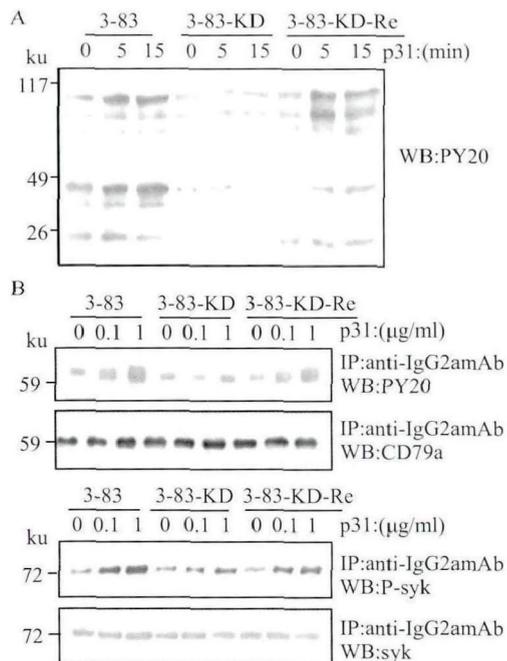


图 3 Fut8 影响 BCR 介导的下游信号分子的磷酸化

A: Western blot 法检测经 p31 刺激后 3-83、3-83-KD、3-83-KD-Re 细胞中酪氨酸磷酸化水平;B: Western blot 法检测经 p31 刺激后 3-83、3-83-KD、3-83-KD-Re 细胞中 CD79a 和 Syk 分子的酪氨酸磷酸化水平

住 BCR 的 Ag 结合位点,影响与 Ag 的结合。

Fut8 是修饰核心岩藻糖基化的唯一的糖基转移酶。基因敲除小鼠实验^[5-6]表明 Fut8 在 B 细胞的分化发育中发挥重要的调节作用。阐明某个基因的功能,目前常用的方法是利用 siRNA,抑制该基因表达,观察其相应功能的丢失;然后细胞内重新导入该基因,建立转基因恢复模型,观察其丢失功能的恢复。与正常 3-83 细胞相比,3-83-KD 细胞中 Fut8 mRNA 明显减少,而 Fut4、GnT-III 及 β 4-GalT-I mRNA 的表达量没有变化,说明复制缺陷型 Fut8-siRNA 重组逆转录病毒(pSINsi-hU6)没有脱靶现象。将 PLHCX-Fut8 质粒导入 3-83-KD 细胞建立 Fut8 基因恢复成熟 B 细胞株(3-83-KD-Re),发现在 3-83-KD-Re 细胞中 Fut8 mRNA、蛋白表达和 Fut8 酶活性表达得到恢复。IgG-BCR 是富含核心岩藻糖基化糖蛋白,也是 Fut8 的重要的靶蛋白。Fut8 基因沉默并没有影响 IgG2a-BCR 的表达量,只是影响了 IgG2a-BCR 核心岩藻糖基化水平。进一步研究表明,核心岩藻糖修饰能够调节 IgG-BCR 与抗原肽(p31)之间的相互作用。Fut8 基因沉默使 IgG-BCR 介导的信号传导(p31 刺激细胞)明显减弱,而 3-83-KD-Re 细胞的信号传导得到恢复。本实验结果提示核心岩藻

糖基化修饰在 BCR 介导的细胞信号转导过程中发挥重要的调节作用,为从糖基化角度揭示 B 细胞活化规律提供新的科学思路。

参考文献

- [1] Holly M, James H. Roles of EBF and PAX5 in B lineage commitment and development[J]. *Immunol*, 2002, 14(6):415-22.
- [2] Wang L D, Clark M R. B-cell antigen-receptor signalling in lymphocyte development[J]. *Immunology*, 2003, 110(4):411-20.
- [3] Wada Y, Azadi P, Costello C E, et al. Comparison of the methods for profiling glycoprotein glycans-HUPO Human Disease Glycomics/Proteome Initiative multi-institutional study[J]. *Glycobiology*, 2007, 17(4):411-22.
- [4] Wang X, Inoue S, Gu J, et al. Dysregulation of TGF- β receptor activation leads to abnormal lung development and emphysema-like phenotype in core fucose-deficient mice[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(44):15791-6.
- [5] Li W, Ishihara K, Yokota T, et al. Reduced α 4 β 1 integrin/VCAM-1 interactions lead to impaired pre-B cell repopulation in α 1,6-fucosyltransferase deficient mice [J]. *Glycobiology*, 2008, 18(1):114-24.
- [6] Li W, Liu Q, Pang Y, et al. Core fucosylation of mu heavy chains regulates assembly and intracellular signaling of precursor B cell receptors[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(4):2500-8.
- [7] 焦鑫艳, 马彪, 王旭, 等. Fut8 基因通过促进 VLA-4/VCAM-1 表达影响 B 细胞发育[J]. *免疫学杂志*, 2012, 28(8):683-6.
- [8] Russell D M, Dembić Z, Morahan G, et al. Peripheral deletion of self-reactive B cells[J]. *Nature*, 1991, 354(6351):308-11.
- [9] Arnold J N, Wormald M R, Sim R B, et al. The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins[J]. *Annu Rev Immunol*, 2007, 25:21-50.

Core fucosylation of B cell receptor regulates the signal transduction of mature B cells

Yu Rui¹, Liu Hongxia², Sun Shijie², et al

(¹College of Life Science and Technology, Dalian University, Dalian 116622;

²College of Basic Medical Sciences, Dalian Medical University, Dalian 116044)

Abstract Objective To investigate the role of core fucosyltransferase (Fut8) on the signal transduction *via* B cell receptor in mature B cells. **Methods** Firstly, Fut8 gene knockdown mature B cells (3-83-KD cells) were established by using retroviruses containing Fut8-siRNA, and Fut8 gene restored mature B cells (3-83-KD-Re) were generated by transfections of PLHCX-Fut8 plasmid into 3-83-KD cells. The expressions of Fut8 mRNA, protein and enzyme activity were detected by real time PCR, Western blot and HPLC, and the expressions of BCR and core fucosylation level were detected by flow cytometry and lectin blot, and intracellular tyrosine phosphorylation level was detected by Western blot. **Results** There were no differences on the expression of IgG2a-BCR in 3-83, 3-83-KD, 3-83-KD-Re cells, while core fucosylation of IgG2a-BCR was abolished in 3-83-KD cells, and rescued by reintroduction of Fut8, as evidenced by AOL blot. Compared to 3-83 cells, the tyrosine phosphorylation was substantially reduced in 3-83-KD cells with p31 stimulation, and then completely restored by re-introduction of the Fut8 gene to 3-83-KD cells. **Conclusion** In summary, core fucosylation modified by Fut8 plays an important role in the cellular signal transduction *via* BCR.

Key words Fut8; siRNA; BCR; signal transduction