

## 血吸虫蛋白组学研究进展

Advances of study on *Schistosoma* proteomics

张满和(ZHANG Man-he) 综述 林雪迟(LIN Xue-chi) 审核

(湘潭职业技术学院, 湖南 湘潭 411102)

(Xiangtan Vocational Technical College, Xiangtan 411102, China)

[关键词] 血吸虫; 血吸虫病; 蛋白质; 寄生虫病

[中图分类号] R532.21 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9638(2009)04-0290-04

血吸虫(*Schistosoma*)是一种流行广泛并严重危害人类健康的病原体,寄生于人体的主要有日本血吸虫(*Schistosoma japonicum*, *S. j*)、曼氏血吸虫(*Smansoni*, *S. m*)和埃及血吸虫(*S. haematobium*, *S. h*)3种。据估计,全球约有6亿人受到威胁,2亿人受感染,成为世界性的公共卫生问题。目前,对血吸虫病的防治方法主要靠吡喹酮(PZQ)化疗和易感地带灭螺。PZQ尽管对人低毒而杀虫高效,但它既不是万能药也不能阻断血吸虫病流行传播。因此,探索药物靶位和发展有效疫苗已成为控制血吸虫病研究的首要问题。

血吸虫生活史复杂,各发育阶段表达的蛋白质差异显著,并在与宿主长期共进化过程中相互作用,形

成了平衡稳定的复杂系统,使其产生很强的逃避宿主免疫的能力。因此,深入开展血吸虫基因组、蛋白质组、糖组、脂组、免疫组等研究有助于阐明血吸虫与宿主的相互关系,筛选新药靶位和探索有效疫苗。

目前,*S. j*基因组测序工作已经完成(<http://lifecenter.sgst.cn/sj.do>),*S. m*基因组也日趋完善(<http://www.genedb.org/genedb/smansoni/index.jsp>)。发现血吸虫基因组由270~300 Mb的DNA组成,编码14 000~20 000个基因,为深入血吸虫蛋白组学、糖组学、脂组学和蛋白免疫组学研究提供了丰富宝贵的资源。最新公布的*S. m*和*S. j*的转录组和公共数据库(表1),为全面启动这2种血吸虫后基因组的研究提供了十分有价值的信息资源。

表1 与血吸虫相关的 ESTs 在线资源

Table 1 Online resources related to *Schistosoma* ESTs available

Resource	Website	Reference
ORESTES and annotation	<a href="http://verjo18.iq.usp.br/schisto/">http://verjo18.iq.usp.br/schisto/</a>	Verjovski-Almeida <i>et al</i> (2003)
TIGR gene index	<a href="http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=S_maasoni">http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=S_maasoni</a>	Merrick <i>et al</i> (2003)
ESTs and KEGG pathways	<a href="http://rgmg.cpqrr.flocruzbr/">http://rgmg.cpqrr.flocruzbr/</a>	Oliveira <i>et al</i> unpublished
EST of <i>S. mansoni</i> , <i>S. japonicum</i> and <i>S. haematobium</i>	<a href="http://www.sanger.ac.uk/Projecis/S_mansoni">www.sanger.ac.uk/Projecis/S_mansoni</a>	Wellcome Trust Sanger Institute Unpublished
<i>S. mansoni</i> SNPs	<a href="http://bioinfo.cpqrr.fiocruz.br/snp/">http://bioinfo.cpqrr.fiocruz.br/snp/</a>	Simoes <i>et al</i> (2007)
<i>Schistosoma</i> Related Reagent Repository—SR3	<a href="http://www.atbr-bri.com/SR3/">www.atbr-bri.com/SR3/</a>	Unpublished
Genome sequence of <i>S. mansoni</i>	<a href="http://www.genedb.org/genedb/smansoni/">www.genedb.org/genedb/smansoni/</a>	Unpublished
Genome database for <i>S. mansoni</i>	<a href="http://www.shistodb.net">www.shistodb.net</a>	Unpublished, under construction
Genome sequence of <i>S. japonicum</i>	<a href="http://lifecenter.sgst.cn/sj.do#">http://lifecenter.sgst.cn/sj.do#</a>	Unpublished
CDD database	<a href="http://130.14.29.110/Structure/cdd/cdd.shtml">http://130.14.29.110/Structure/cdd/cdd.shtml</a>	Marchler-Bauer <i>et al</i> (2007)
Pfam database	<a href="http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/">www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/</a>	Finn <i>et al</i> (2006)
PIR and UNIPROT	<a href="http://pir.georgetown.edu/">http://pir.georgetown.edu/</a>	Wu <i>et al</i> (2003, 2006a)
Swiss-Prot	<a href="http://www.expasy.org/sprot/">www.expasy.org/sprot/</a>	Wu <i>et al</i> (2006a)
InterPro	<a href="http://www.ebi.ac.uk/interpro/">www.ebi.ac.uk/interpro/</a>	Mulder <i>et al</i> (2002)
KEGG	<a href="http://www.genome.jp/kegg/">www.genome.jp/kegg/</a>	Kanehisa <i>et al</i> (2004)

[收稿日期] 2009-02-15

[作者简介] 张满和(1976-),女(汉族),湖南省双峰县人,讲师,主要从事血吸虫病学研究。

[通讯作者] 林雪迟 E-mail: xuechilin71@126.com

蛋白质组学系指大规模研究蛋白质在表达水平、翻译后修饰以及蛋白质与蛋白质间的相互作用,以获取细胞进程、蛋白质网络及疾病病变的整体综合信息的科学。2-DE 分离技术可在同一块胶上同时分离成千上万个蛋白质点,分辨率高、重复性较好,但对极酸或极碱性、难溶性及低丰度蛋白质难以检测,而高效液相色谱(HPLC)、差异凝胶电泳(DIGE)、毛细管电泳(CE)等则可作为 2-DE 的补充。蛋白质组学研究中最重要鉴定蛋白质的技术是质谱技术(MS),具有灵敏度高(fmol)、准确率高、自动化等特点,可分为基质辅助激光解析/电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)和电喷雾电离串联质谱(ESI-MS/MS) 2 种。前者依靠肽质量指纹(PMF)图来实现,要求样本蛋白纯度高;后者则可根据肽序列标签(PST)及肽阶梯序列(PLS)来直接测定,适于鉴定肽混合物中蛋白,而且对蛋白质翻译后的修饰研究(如磷酸化、糖基化等修饰作用)有优势,该质谱法常与 HPLC、CE 等分离技术结合,目前均已实现自动化。此外,分析软件的发展和公共序列数据库的不断完善,推动了蛋白组学研究快速发展。见表 2。

表 2 蛋白质组学搜索工具

Table 2 Proteomics search tools

**For peptide mass fingerprints**

PeptIdent: <http://www.expasy.ch/tools/peptident.html>  
 ProFound: <http://prowl.rockefeller.edu/cgi-bin/ProFound>  
 MASCOT: <http://www.matrixscience.com/>  
 MS-Fit: <http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml3.4/msfit.htm>

**For peptide sequence tags**

BLAST: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>  
 ProteinInfo: <http://prowl1.rockefeller.edu/prowl/proteininfo.html>  
 Parasite Protein Motif Search:  
[http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/parasites/motif\\_search.p](http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/parasites/motif_search.p)

**Parasite EST databases**

<http://www.cbil.upenn.edu/paradb/>  
<http://www.ebi.ac.uk/parasites/paratable.html>  
[http://genome.wustl.edu/est/toxo\\_esthmpg.html](http://genome.wustl.edu/est/toxo_esthmpg.html)  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/dbEST\\_summary.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/dbEST_summary.html)

质谱技术已广泛应用于血吸虫蛋白组学研究,也可用于血吸虫的糖组学研究。先用酶或化学方法从糖蛋白中释放出糖残基,产生一个分子指纹图谱,质谱分析鉴定出精确的单糖和糖苷键,推导出整个糖结构。发育调节是血吸虫糖基化的一个特征,其免疫生物学作用不可忽略,这种作用归功于在血吸虫—宿主间相互作用的血吸虫糖类<sup>[1]</sup>。目前,糖组

学在血吸虫领域的研究主要见于分析雄虫和雌性性别差异、表膜、虫卵和尾蚴及其分泌—排泄成分<sup>[2]</sup>。免疫组学将蛋白质组学和血清学方法结合,是一种鉴定与抗体结合的血吸虫蛋白质和糖类的强有力工具,对血吸虫疫苗的研究起着极其重要的作用,但目前血吸虫研究领域报道少见。

**1 蛋白质组学研究**

1.1 血吸虫雌雄异体成虫的蛋白质组学研究 血吸虫的雌雄异体蛋白质组学研究主要见于 *S. j* 的研究。Cheng 等<sup>[3]</sup>分析了配对后 *S. j* 雄虫和雌虫(42 d)之间蛋白差异表达蛋白,对 12 个雄虫特异蛋白和 16 个雌虫特异蛋白的质谱分析表明,这些差异蛋白的主要功能是参与信号转导、代谢及转录调节等。而 Liu 等<sup>[4]</sup>则采用 2D-nano-LC-MS 技术全面分析了感染后 42~45 天 *S. j* 雄虫和雌虫的差异表达蛋白,在 *S. j* 成虫 1 375 个蛋白中,发现 491、574、723 个分别来自雌虫、雄虫及混合成虫,444 个蛋白为成虫所特有;除了细胞骨架蛋白和转运蛋白、陪伴分子、细胞外基质分子及与血红蛋白消化有关的酶类外,还有与发育及性成熟起关键作用的蛋白,包括 Fez1、H2A 组蛋白和卵壳蛋白。假定核糖体结合糖蛋白 II、细胞外超氧化物歧化酶和雌虫特异的 800 个蛋白在雌虫蛋白中优先表达,而抱雌沟管蛋白、胆红素氧化酶蛋白 9 和脱酰胺酶在雄虫中优势表达。在这些研究中,一个重要的观点是性别偏向的蛋白表达比阶段丰富蛋白的表达更重要。

1.2 血吸虫表膜蛋白组学研究 表膜在血吸虫的营养摄取、虫体生长发育及其抗感染免疫中发挥重要作用,可能在疫苗靶位和化疗及免疫治疗中具有重要意义。Liu 等<sup>[4]</sup>在 *S. j* 成虫表膜蛋白组学研究中发现,373 个表膜蛋白中,有 134 个来自雌虫,58 个来自雄虫,156 个来自性别混合虫体,159 个来自肝期童虫;值得注意的是,85 个表膜蛋白仅特异性存在于性别混合虫体,可能为质谱分析不同批次的标本的不均一,而不是生物学的重要变异。最近发现 *S. m* 混合成虫表膜蛋白组在疫苗研究中的重要性<sup>[5]</sup>:发现了几个与宿主免疫应答有关的蛋白,这些蛋白至少拥有一个跨膜区域,很有希望成为抗血吸虫的疫苗;重要的是,在表膜中,氢乙罂粟碱家族膜内在蛋白表达丰富,可能成为抗血吸虫病的疫苗分子<sup>[6]</sup>;还发现一些与已知表膜特异功能(如代谢产物运输、信号和膜结构)有关的蛋白,一些蛋白是先前

未发现的,可能具有独特的表膜生物学作用,如雄雌相互作用、宿主-虫体相互作用。一项更新的牛血吸虫表膜蛋白组研究表明,其表膜存在大量与胞质能量代谢和骨架结构相关的蛋白<sup>[7]</sup>,与 *S. m* 表膜提取物的蛋白相似<sup>[5]</sup>。

**1.3 尾蚴、童虫、虫卵和毛蚴的蛋白组学研究** 对 *S. j* 的尾蚴、肝期童虫、虫卵、毛蚴的蛋白质组的比较分析<sup>[4]</sup>,共鉴定出 3 260 个蛋白,其中 1 181、1 154、1 441、918 个分别来自尾蚴、肝期童虫、虫卵(完整虫卵及空卵壳)及毛蚴,仅有 337、258、473、237 个分别为每个阶段所特有,提示某些蛋白有期特异表达或受环境刺激表达。在尾蚴,发现有特有的 DNA 光裂合酶及 SPO-1,前者在紫外线作用下能催化生成光激活酶,后者则与性别分化有关。此外,尾蚴还表达许多已知非特殊阶段的受体,提示其为识别宿主进化表达特殊的分子。肝期童虫高表达与神经发育有关的蛋白,这些蛋白与其他物种为同系物,反映出肝期童虫复杂的生理学特性:当其从肝脏迁徙至肠系膜静脉时已适应了环境的剧烈变化。肝期童虫也表达与消化宿主红细胞有关的许多酶。虫卵是血吸虫致病的主要因素,几个与钙离子相关的多肽分子仅发现于虫卵,与发育有关的蛋白及与有丝分裂有关的蛋白也在虫卵表达,提示一小部分毛蚴正在雌虫产的卵内成熟,虽然大部分虫卵已完全发育和休眠。在鉴别出的 918 个毛蚴蛋白中,仅 412 个与虫卵共有,表明在孵化过程中或孵化后,毛蚴经历了很大变化,部分体现在毛蚴的蛋白质组中含有丰富的特异受体蛋白。卵壳制备物的 520 个蛋白,仅 258 个出现于完整虫卵中,需要进一步证明哪些蛋白与虫卵成熟及结构形成有关。此外,动力蛋白、受体样蛋白及与神经发育有关的蛋白表达于毛蚴阶段,这提示自由生活的毛蚴能接受来自钉螺中间宿主的外部信号分子及自身表达的信号刺激。

Perez 等<sup>[8]</sup>鉴定了 *S. m* 尾蚴、肺期童虫及虫卵、全虫提取物中 40 个最为丰富的蛋白质,显示出它们拥有许多相同的蛋白;除一个蛋白位于内质网外,其余都为起源于胞浆,包括具有催化活性的蛋白(以糖酵解酶为主)、钙结合蛋白、肌动蛋白和其他肌肉成分蛋白。40 个蛋白中包括了几种第一代的候选疫苗分子,如磷酸丙糖异构酶(TPI)、谷胱苷肽转移酶(GST)及脂肪酸结合蛋白(FABP)。

**1.4 虫体排泄—分泌物(ES)的蛋白组学研究** 应用蛋白质组学研究 *S. m* 从尾蚴培养到童虫转换过程中释放的排泄—分泌物(ES)成分<sup>[9]</sup>,可为研究其

侵入特定宿主有关的一些假定蛋白提供丰富的信息,这与仅研究整个尾蚴的可溶性蛋白组不同<sup>[4,8]</sup>。这些研究采用脂类诱导和机械转换的方式诱导尾蚴转换,鉴定出不同的 ES 成分,还显示出转换处理诱导腹吸盘和头腺释放许多内容物<sup>[9]</sup>。随后的质谱分析鉴定出一些尾蚴与穿透皮肤有关的蛋白激酶和与免疫调节有关的蛋白<sup>[9-10]</sup>。为研究 *S. m* 逃避免疫机制,Guillou 等<sup>[11]</sup>用蛋白质组学研究了 *S. m* 和中棘口吸虫(*E. caproni*)的子胞蚴 ES 成分,发现一些与抗氧化活性、抗血红蛋白包裹及侵入宿主和迁徙有关的蛋白,提示两者在感染后的 1 h 内有足够时间通过分子模拟或免疫抑制建立保护自身的逃避策略。

## 2 血吸虫糖组学研究

质谱方法也可用于鉴定类似多肽一样具有免疫原性的糖蛋白或脂蛋白的糖基部分,这些糖基能诱导抗体产生。早期鉴定的糖类来自虫卵<sup>[12]</sup>及成虫释放的循环抗原<sup>[13]</sup>,随后的研究来源于虫卵分泌物<sup>[14]</sup>和雄虫及雌虫<sup>[15]</sup>。虽然对已知的糖类在血吸虫生物学中的确切作用还未阐明,故认为糖类的强烈免疫原性使其可能成为候选疫苗分子<sup>[16]</sup>,但也可能是引起逃避免疫应答的重要靶位<sup>[17]</sup>。一项最新研究 *S. m* 虫卵和尾蚴分泌蛋白组的结果显示<sup>[18]</sup>,*S. m* 以糖基化的模式分泌复杂的阶段特异性糖蛋白,尾蚴的糖蛋白以 N-聚糖为主,而虫卵以 O-聚糖为主。随着合成结构上的限制正在解决,第一个糖点阵已经构建成功<sup>[19]</sup>,不久的将来就可能“印刷”来自血吸虫的全长糖结构。例如,由于成虫糖表位在血吸虫感染中是抗体的主要刺激物,所以可用于检测人类和实验动物对血吸虫感染或免疫应答<sup>[17]</sup>。

## 3 血吸虫免疫组学研究

免疫组可理解为能够与免疫系统反应的蛋白质组,最容易作为抗体识别的靶位。在疫苗研究中,人们渴望精确找到抗体介导的保护性蛋白或多肽,进行质谱分析、鉴定蛋白质。通过这种方法,质谱鉴别出大多数可溶性抗原。这些抗原与从抗血清表达文库克隆的一样都是胞浆蛋白。目前,对血吸虫的免疫组学研究有少量报道<sup>[18,20-21]</sup>:一个是用患者血清检测 *S. h* 成虫可溶性抗原,结果发现以糖酵解酶、伴侣蛋白及肌肉蛋白为主;另一个是用感染羊血清检测牛血吸虫的分泌—排泄蛋白和表膜蛋白,主要为 GST、烯

醇酶、甘油醛磷酸脱氢酶、丝氨酸蛋白酶抑制剂、肌动蛋白和 2 个表膜特异抗原;第 3 个是 Curwen 等用血吸虫致弱尾蚴多次免疫血清和自愈恒河猴血清识别抗原的研究,来自 4 个不同发育阶段(尾蚴、肺童虫、成虫和虫卵)的可溶性抗原证明其组成相似,作为候选疫苗的胞浆蛋白(GST, *S. m14*)和细胞骨架蛋白(paramyosin)也是最有免疫原性的蛋白。

开展免疫组学研究面临的技术问题是:2-DE 难以分离难溶性蛋白,如膜蛋白;采用 1-DE 分离蛋白再印迹,获得蛋白可有 1 至数种,难以确定哪种是抗体靶位;采用免疫沉淀方法先将免疫原性蛋白沉淀下来,再进行 1-DE 分离鉴定蛋白,这样非免疫原性蛋白会被去除,得到的是被富集的具有免疫原性的蛋白,这种方法较 2-DE 简单、快捷,适用于极性蛋白、极端分子量及低丰度的蛋白,但灵敏度取决于抗原-抗体的亲和力;难以用质谱方法筛选与 T 细胞反应的抗原。值得指出的是,具有免疫原性的蛋白或多肽并不一定具有保护性。事实上,多数的免疫反应性是一种假象,因此,需设立无保护性对照血清来消除这种假象。

#### [参 考 文 献]

[1] van Die I, van Liempt E, Bank C M, *et al.* Interaction of *Schistosoma* glycans with the host immune system [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2005, 564: 9-19.

[2] Ramajo-Hernández A, Oleaga A, Ramajo-Martín V, *et al.* Carbohydrate profiling and protein identification of tegumental and excreted/secreted glycoproteins of adult *Schistosoma bovis* worms [J]. *Vet Parasitol*, 2006, 144(1-2): 45-60.

[3] Cheng G F, Lin J J, Feng X G, *et al.* Proteomic analysis of differentially expressed proteins between the male and female worm of *Schistosoma japonicum* after pairing [J]. *Proteomics*, 2005, 5(2): 511-521.

[4] Liu F, Lu J, Hu W, *et al.* New perspectives on host-parasite interplay by comparative transcriptomic and proteomic analyses of *Schistosoma japonicum* [J]. *PLoS Pathog*, 2006, 2(4): 268-281.

[5] Braschi S, Curwen R S, Ashton P D, *et al.* The tegument surface membranes of the human blood parasite *Schistosoma mansoni*: a proteomic analysis after differential extraction [J]. *Proteomics*, 2006, 6(5): 1471-1482.

[6] Knudsen G M, Medzihradsky K F, Lim K C, *et al.* Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* cercarial secretions [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2005, 4(12): 1862-1875.

[7] Alex Loukas, Tran M, Pearson M S, *et al.* *Schistosoma* membrane proteins as vaccines [J]. *Int J Parasitol*, 2007, 37(3-4): 257-263.

[8] Perez-Sanchez R, Ramajo-Hernández A, Ramajo-Martín V, *et al.* Proteomic analysis of the tegument and excretory-secretory products of adult *Schistosoma bovis* worms [J]. *Proteomics*, 2006, 6 (Suppl1): S226-S236.

[9] Curwen R S, Ashton P D, Sundaralingam S, *et al.* Identification of novel proteases and immunomodulators in the secretions of *Schistosoma* cercariae that facilitate host entry [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2006, 5(5): 835-844.

[10] Jenkins S J, Hewitson J P, Jenkins G R, *et al.* Modulation of the host's immune response by *Schistosoma* larvae. *Parasite Immunol* [J]. 2005, 27(10-11): 385-393.

[11] Guillou F, Roger E, Moné Y, *et al.* Excretory-secretory proteome of larval *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma caproni*, two parasites of *Biomphalaria glabrata* [J]. *Mol Biochem Parasitol*, 2007, 155(1): 45-56.

[12] Khoo K H, Chatterjee D, Caulfield J P, *et al.* Structural mapping of the glycans from the egg glycoproteins of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*: identification of novel core structures and terminal sequences [J]. *Glycobiology*, 1997, 7(5): 663-677.

[13] Van Dam G J, Bergwerff A A, Thomas-Oates J E, *et al.* The immunologically reactive O-linked polysaccharide chains derived from circulating cathodic antigen isolated from the human blood fluke *Schistosoma mansoni* have Lewis x as repeating unit [J]. *Eur J Biochem*, 1994, 225(1): 467-482.

[14] Wuhler M, Balog C I, Catalina M I, *et al.* IPSE/a-1, a major secretory glycoprotein antigen from *Schistosoma* eggs, expresses the Lewis x motif on core-difucosylated N-glycans [J]. *FEBS J*, 2006, 273(10): 2276-2292.

[15] Wuhler M, Koeleman C A, Fitzpatrick J M, *et al.* Gender-specific expression of complex-type N-glycans in *Schistosomes* [J]. *Glycobiology*, 2006, 16(10): 991-1006.

[16] Nyame A K, Lewis F A, Doughty B L, *et al.* Immunity to schistosomiasis: glycans are potential antigenic targets for immune intervention [J]. *Exp Parasitol*, 2003, 104(1-2): 1-13.

[17] Eberl M, Langermans J A, Vervenne R A, *et al.* Antibodies to glycans dominate the host response to *Schistosoma* larvae and eggs: is their role protective or subversive? [J]. *J Infect Dis*, 2001, 183(8): 1238-1247.

[18] Jang-Lee J, Curwen R S, Ashton P D, *et al.* Glycomics analysis of *Schistosoma mansoni* egg and cercarial secretions [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2007, 6(9): 1485-1499.

[19] Drickamer K, Taylor M E. Glycan arrays for functional glycomics [J]. *Genome Biol*, 2002, 3(12): 1034.

[20] Mutapi F, Burchmore R, Mduluzi T, *et al.* Praziquantel treatment of individuals exposed to *Schistosoma haematobium* enhances serological recognition of defined parasite antigens [J]. *J Infect Dis*, 2005, 192(6): 1108-1118.

[21] Perez-Sanchez R, Ramajo-Hernández A, Ramajo-Martín V, *et al.* Proteomic analysis of the tegument and excretory-secretory products of adult *Schistosoma bovis* worms [J]. *Proteomics*, 2006, 6 (Suppl1): S226-S236.