

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2009)17-11-0882-03

热休克蛋白 60口服耐受诱导特异性调节 T 细胞对动脉粥样硬化斑块的影响

王治校, 陈彬, 李大主, 盛富强, 詹中群, 党书毅, 王崇全

(鄖阳医学院附属太和医院心内科, 湖北省十堰市 442000)

[关键词] 热休克蛋白 60 动脉粥样硬化; CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞; 口服耐受

[摘要] 目的 探讨热休克蛋白 60口服耐受诱导特异性调节 T 细胞对载脂蛋白 E^{-/-}小鼠动脉粥样硬化斑块形成的影响。方法 8周龄载脂蛋白 E^{-/-}小鼠分别口服重组鼠热休克蛋白 60-PBS溶液和单纯 PBS溶液(对照组),连续 5天后高脂饲养 12周。比较两组斑块面积;分析脾细胞中 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞百分比和功能;酶联免疫吸附法检测上清液细胞因子浓度。结果 与对照组比较,口服热休克蛋白 60组斑块面积显著减小,脾细胞中 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞百分比显著升高,CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞增殖反应下降,上清液中转化生长因子 β 和白细胞介素 10浓度显著升高,而 γ 干扰素浓度显著下降。结论 热休克蛋白 60口服耐受能诱导 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞介导抗原特异性免疫耐受;口服热休克蛋白 60可能会抑制小鼠动脉粥样硬化斑块的形成。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Effect of Oral Tolerance to HSP60 Inducing Antigen-Specific T Cells on the Formation of Atherosclerotic Plaque in Mouse

WANG Zhixiao CHEN Bin LIDa-Zhu SHENG Fu-Qiang ZHANG Zhong-Qun DANG Shu-Yi and WANG Cong-Quan

(Department of Cardiology, Taihe Hospital, Yunyang Medical College, Shiyan 442000, China)

[KEY WORDS] Heat Shock Protein 60 CD4⁺CD25⁺Regulatory T Cells Atherosclerosis Oral Tolerance

[ABSTRACT] **Aim** To evaluate whether heat shock protein 60 (HSP60) oral administration could induce antigen-specific CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells and its effect on the formation of atherosclerotic plaque in hypercholesterolemia apolipoprotein (Apo) E^{-/-} mice. **Methods** At 8 weeks of age, 12 male Apo E^{-/-} mice were divided into two groups that were orally administered PBS plus HSP60 and only PBS separately for 5 days, and a high-cholesterol diet was started 5 days after the last treatment for 12 weeks, at which time pathological analysis of plaque was performed, percentage of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in splenocytes were analyzed by FACS, proliferation response of splenocytes to HSP60 was detected and cytokines in the supernatant were determined by ELISA. **Results** Compared with control animals, oral tolerance to HSP60 resulted in a significant decrease in the size of atherosclerotic plaques and had a significant increase in CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in spleen. Specific proliferation response of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in splenocytes to HSP60 was significantly suppressed and the level of TGF-β and IL-10 in the supernatant increased while IFN-γ decreased significantly. **Conclusion** HSP60 oral tolerance can induce antigen-specific CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells which in turn attenuates the progression of atherosclerotic plaque. This provides a new immunologic approach for the prevention of atherosclerosis.

动脉粥样硬化 (As) 是一种慢性炎症性疾病,其发生发展与免疫炎症反应关系密切^[1], 干预 As 的炎症反应已成为其防治的一条新途径。许多研究表明调节性 T 细胞 (主要是 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞) 参与 As 的免疫炎症反应^[2]。CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞是机体抑制功能强大的免疫细胞,在免

疫耐受和抑制免疫反应中起重要作用。有研究表明热休克蛋白 60(HSP60)特异性免疫反应在 As 发展中起重要作用。近来口服耐受已成功用于许多自身免疫性疾病的实验研究和临床治疗^[3]。本研究通过 HSP60口服耐受诱导特异性 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞,观察其对 As 斑块的影响,以探讨一条新的干预 As 炎症的方法。

[收稿日期] 2009-07-28 [修回日期] 2009-10-05

[基金项目] 国家自然科学基金(30670855)资助

[作者简介] 王治校,主要从事冠心病基础及介入治疗研究。Email 为 dywz@sina.com。陈彬,主要从事冠心病介入研究。通讯作者王崇全,教授,硕士研究生导师,主要从事冠心病发病机制及介入治疗研究,Email 为 sythwq@medmail.com。

1 材料和方法

1.1 材料

8周龄雄性 C57BL/6 载脂蛋白 E^{-/-}小鼠购自

北京维通利华实验动物有限公司; mHSP60 购自 Stress Gen 公司; ConA 和 OVA 购自 Sign a 公司, 白细胞介素 10(IL-10)、转化生长因子 β (TGF- β) 和 γ 干扰素 (IFN- γ) ELISA 试剂盒购自 R&D 公司; PE-antimouse CD25 和 FITC-anti mouse CD4 购自 Bio-legend 公司; CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞免疫磁珠 (MACS) 分选试剂盒购自德国美天旄生物技术公司。

1.2 小鼠 HSP60 的口服及高脂饲养

实验小鼠分为两组, 每组 8 只: HSP60 口服耐受组: 5 μ g HSP60 溶于 500 μ L PBS 溶液中灌胃; ④ PBS 口服对照组: 只用 500 μ L PBS 溶液灌胃。连续处理 5 天, 间隔 2 天后用含有 1% 胆固醇、10% 脂肪的饲料喂养, 12 周后进行实验。

1.3 脾细胞中 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞百分比检测

取各组小鼠脾细胞, 分离淋巴细胞, 调细胞浓度到 1×10^9 /L, FITC-anti CD4 和 PE-anti CD25 标记 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞室温避光孵育 30 min, 0.1% 胎牛血清 (FCS) 加 0.1% 叠氮钠的磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗 3 遍, 加入 0.5 mL PBS 重悬, CD4⁺ 设门, 美国 Becton Dickinson 公司流式细胞仪检测 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞占总 CD4⁺ T 细胞的百分比。

1.4 脾细胞中 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞对 HSP60 的反应

取各组小鼠脾细胞, MACS 法分离 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞^[4], 96 孔培养板上每孔加 200 μ L 细胞悬液 (5×10^5 cell/孔), 37 $^{\circ}$ C、50% CO₂ 培养箱中培养 6 h。每孔加入终浓度 10 mg/L HSP60(特异性抗原), OVA(无关抗原阴性对照) 以及 ConA(非特异性阳性对照) 共育 60 h, 每孔加入 ³H 胸腺嘧啶 (1 μ Ci/孔) 继续培养 12 h 将细胞收集到玻璃纤维上, 经液体闪烁计数器计数。

1.5 上清液细胞因子检测

取上述反应体系上清, ELISA 法测定 IFN- γ 、IL-10 和 TGF- β 浓度。

1.6 主动脉斑块面积分析

于 20 周龄时, 10% 乌拉坦麻醉后断颈处死小鼠, 立即取出心脏及主动脉段, 经 4% 多聚甲醛固定 6~8 h, 常规石蜡包埋切片。HE 染色, 光镜观察, JVC 公司 Tonx-427 图像分析系统计算斑块与管腔面积、比例及管壁厚度。

1.7 统计学方法

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组比较用 *t*-test 多组间比

较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脾细胞中 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞百分比

HSP60 口服组脾细胞中 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞占 CD4⁺ 细胞的百分比为 10.96% \pm 1.71%, 显著高于对照组 (4.83% \pm 1.68%, $P < 0.01$; 图 1)。

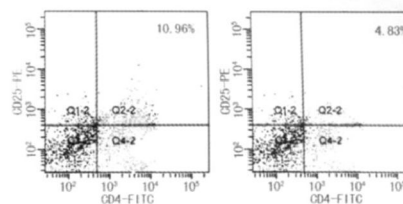


图 1 流式细胞仪检测 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞百分比
左为 HSP60 口服耐受组, 右为对照组。

2.2 脾细胞对 HSP60 的反应及特异性

口服 HSP60 组脾 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞对 HSP60 刺激的增殖反应显著低于对照组 ($P < 0.01$), 而无关抗原 OVA 对两组脾细胞均无增殖刺激作用, 说明口服 HSP60 可诱导载脂蛋白 E^{-/-} 小鼠对 HSP60 产生特异性免疫耐受 (表 1)。

表 1 脾 CD4⁺ CD25⁺ CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞对不同抗原刺激的增殖反应 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$ cpm)

| 分 组 | HSP60 | OVA | ConA |
|-------------|---------------------------------|------------------|----------------------|
| HSP60 口服耐受组 | 2434.6 \pm 526.4 ^a | 156.4 \pm 43.5 | 26110.7 \pm 5816.6 |
| 对照组 | 8415.6 \pm 726.5 | 187.5 \pm 48.8 | 27734.5 \pm 5882.4 |

a 为 $P < 0.01$ 与对照组比较。

2.3 细胞因子浓度

与对照组比较, 口服 HSP60 后脾细胞分泌 IL-10 和 TGF- β 增加, 而分泌 IFN- γ 降低 (表 2)。两组脾细胞经无关抗原 OVA 和非特异刺激物 ConA 刺激后的分泌功能无显著性差异。

表 2 脾细胞上清中细胞因子浓度 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$ ng/L)

| 分 组 | IL-10 | TGF- β | IFN- γ |
|-------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| HSP60 口服耐受组 | 148.0 \pm 29.8 ^a | 285.6 \pm 34.8 ^a | 56.9 \pm 23.1 ^a |
| 对照组 | 65.5 \pm 13.8 | 78.8 \pm 28.9 | 178.9 \pm 42.5 |

a 为 $P < 0.01$ 与对照组比较。

2.4 粥样斑块形态学变化

HSP60 口服耐受组主动脉粥样斑块面积

($1805.98 \pm 196.48 \mu\text{m}^2$)明显小于对照组 ($4169.13 \pm 631.32 \mu\text{m}^2$, $P < 0.01$; 图 2)。

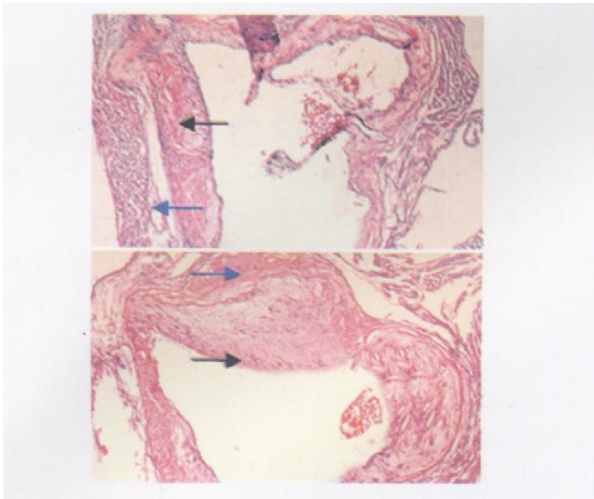


图 2 光镜下观察斑块形态学变化 上为 HSP60 口服耐受组, 下为对照组。蓝色箭头指动脉内膜, 黑色箭头指粥样斑块。

3 讨论

HSP 是炎症疾病中一种常见的自身抗原, 现有许多研究表明 HSP 家族中的 HSP60 参与 A_s 的炎症反应^[5,6]。动物和人的 A_s 斑块中均检测到 HSP60 的高度表达^[7]; 在高胆固醇血症兔和小鼠中发现经 HSP60 免疫后可加速脂肪条纹的进展^[8]; 自体同源的 HSP60 可作为危险信号刺激免疫系统, 产生 TNF- α 、IL-12、IL-15 等炎症细胞因子^[9], 这些因子又加剧了免疫应答; 有研究通过体外实验证实 HSP60 可激活 DC 和 T 细胞, 过继传输 HSP60 特异性调节性 T 细胞可抑制 A_s 斑块的形成。这些都说明 HSP60 作为自身抗原之一参与 A_s 斑块的形成^[10,11], 本研究结果也证实, 对高脂饲养的小鼠用 HSP60 口服后脾细胞中 HSP60 特异性 T 细胞显著增多。因此抑制 HSP60 特异性反应性 T 细胞可望成为干预 A_s 炎症反应的途径之一。

有研究通过体外诱导 HSP60 特异性耐受性 DC 和 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞, 过继传输小鼠体内后, 发现能抑制动物体内针对 HSP60 的特异性免疫炎症反应, 也能抑制 A_s 斑块的发展。但体外诱导特异性免疫抑制细胞过程复杂, 干扰因素较多, 不便于临床推广。口服耐受是机体通过消化系统摄入外源性抗原诱导外周免疫系统产生抗原特异性无反应状态, 同时机体对其它抗原仍可产生正常的免疫应答。也就是通过肠粘膜淋巴组织激活 T 细胞, 释放出抑制性细胞因子, 降低自身免疫性疾病患者病灶处的炎症细胞数, 从而抑制炎症反应, 其副作用小、

疗效显著。目前已用于多种自身免疫性疾病的研究和治疗^[3]。而在 A_s 中的作用研究才起步。给小鼠口服氧化型低密度脂蛋白 (ox-LDL), 再高脂饲养, 小鼠能产生针对 ox-LDL 的特异性免疫抑制反应, 显著抑制了 A_s 的形成^[12]。而对 HSP60 口服耐受与 A_s 的研究国内外不多。本研究通过给小鼠口服 HSP60 成功诱导小鼠产生 HSP60 特异性调节性 T 细胞, 结果抑制了 A_s 斑块的进展。同时口服 HSP60 后小鼠脾细胞中 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞数目增加, 脾细胞分泌抑炎因子 IL-10 和 TGF- β 升高, 而促炎因子 IFN- γ 分泌减少。但口服耐受的确切机制尚不清楚。有研究表明树突状细胞, 调节性 T 细胞以及一些细胞因子 (如 IL-10 和 TGF- β) 参与了口服耐受的形。本研究结果也支持这点。

本研究表明, HSP60 口服耐受可诱导机体产生特异性调节性 T 细胞, 从而抑制 A_s 斑块的形成。口服 A_s 相关抗原诱导机体产生特异性调节 T 细胞可望成为干预 A_s 炎症反应的一条新途径。

[参考文献]

- [1] 范乐明. 动脉粥样硬化炎症机制的再认识 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2005, 13 (3): 249-253
- [2] Ait-Oufella H, Salmón BL, Potteaux S et al. Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice [J]. *Nat Med* 2006, 12: 178-180
- [3] Hafler DA, Kent SC, Pietusewicz MJ et al. Oral administration of myelin induces antigen-specific TGF- β T cells in patients with multiple sclerosis [J]. *Ann NY Acad Sci* 1997, 835 (19): 120-131
- [4] 郑峻松, 吴军, 罗高兴, 等. 调节性 T 细胞的 MACS 分选和纯度鉴定 [J]. 重庆医学, 2002, 8: 659-660
- [5] Erkkila L, Laitinen K, Haasio K, et al. Heat shock protein 60 autoimmunity and early lipid lesions in cholesterol-fed C57BL/6J mice during Chlamydia pneumoniae infection [J]. *Atherosclerosis* 2004, 177 (2): 321-328
- [6] Hoshida S, Nishino M, Tanouchi J et al. A acute Chlamydia pneumoniae infection with heat shock protein-60 related response in patients with acute coronary syndrome [J]. *Atherosclerosis* 2005, 183 (1): 109-112
- [7] Mandal K, Jahangiri M, Xu Q, et al. Autoimmunity to heat shock protein in atherosclerosis [J]. *Autoimmun Rev* 2004, 3 (2): 31-37
- [8] George J, Shoenfeld Y, Afeek A, et al. Enhanced fatty streak formation in C57BL/6J mice by immunization with heat shock protein-65 [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999, 19: 505-510
- [9] Chen W, Sykklath U, Bellmann K, et al. Human 60-kDa heat shock protein: a danger signal to the innate immune system [J]. *J Immunol* 1999, 162 (6): 3212-219
- [10] 吴伟, 李大主, 周游, 等. 负载 HSP60 树突状细胞对小鼠动脉粥样斑块影响研究 [J]. 中国病理生理杂志, 2007, 23 (3): 598-600
- [11] Yang K, Li D, Luo M, et al. Generation of HSP60-specific regulatory T cells and effect on atherosclerosis [J]. *Cell Immunol* 2006, 2 (43): 90-95
- [12] van Puijvelde GH, Hauer AD, de Vos P, et al. Induction of oral tolerance to oxidized low-density lipoprotein ameliorates atherosclerosis [J]. *Circulation* 2006, 114 (18): 1968-976

(此文编辑 文玉珊)