

霍乱毒素 B 亚单位与热休克蛋白 65 功能表位融合蛋白皮下免疫加剧动脉粥样硬化

孙云霄^{1,2}, 张礼标¹, 王华倩^{2,3}, 张宇², 熊祺琰², 李泰明², 曹荣月²

(1. 广东省昆虫研究所暨华南濒危动物研究所, 广东省广州市 510260; 2. 中国药科大学生命科学与技术学院微基因药物实验室, 江苏省南京市 210009; 3. 广东工业大学药学院, 广东省广州市 510260)

[关键词] 动脉粥样硬化; 热休克蛋白; 免疫

[摘要] **目的** 研究热休克蛋白 65 B 细胞表位经皮下免疫高脂膳食动物对动脉粥样硬化(As)斑块生成的影响。**方法** 利用 HSP65 上与炎症性自身免疫性疾病相关的两段功能表位 P1(179-190)、P2(31-46), 以 CTB 为载体蛋白构建高效表达载体 pET28a-CTB-p117, 提取纯化获得可用于动物实验的蛋白, 皮下免疫新西兰大白兔, 比较抗 HSP65 抗体、血液总胆固醇含量变化与主动脉粥样硬化斑块的生成情况。**结果** 能够诱导产生抗 HSP65 的抗体, 血液中总胆固醇含量与对照组比较显著提高, 并且能显著增加主动脉 As 斑块生成($P < 0.05$)。**结论** HSP65 相关表位蛋白以 CTB 为载体蛋白, 在弗氏不完全佐剂条件下, 经皮下免疫能显著加重 As 斑块生成, 分析是因为抗 HSP65 抗体生成, 促进炎症反应, 脂类代谢变化进而促进 As 斑块的形成。可基于此, 利用以上表位, 改变免疫方式, 设计出可用于降低斑块生成的抑制 As 斑块生成的免疫调节剂。对于 CTB 单独皮下免疫也致 As 斑块加重的结果需进一步实验考察验证。

[中图分类号] R9

[文献标识码] A

Aggravating Atherosclerosis of the Fusion-Protein of CTB and Heat Shock 65 Epitopes by Subcutaneous Injection

SUN Yun-Xiao^{1,2}, ZHANG Li-Biao¹, WANG Hua-Qian^{2,3}, ZHANG Yu², XIONG Qi-Yan², LI Tai-Ming², and CAO Rong-Yue²

(1. *Guangdong Entomological Institute & South China Institute of Endangered Animals, Guangzhou, Guangdong 510260, China*; 2. *Minigene Pharmacy Lab, School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing, Jiangsu 210009, China*; 3. *School of Pharmacy, Guangdong University of Technology, Guangzhou, Guangdong 510260, China*)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; Heat Shock Protein; Immunization

[ABSTRACT] **Aim** To study the immunization effects of B epitopes of heat shock protein 65 on the atherosclerosis plaque formation of high fat diets animals. **Methods** By using two functional epitopes P1(179-190), P2(31-46) of HSP65 related to inflammatory autoimmune disease, high-level expression vector of pET28a-CTB-p117 was built with CTB as a carrier protein. The fusion protein of CTB-p117 was acquired by expression and purification process and used to immunize the animals by subcutaneous and intracutaneous injections. **Results** Anti-HSP65 antibodies were induced and both blood total cholesterol levels and aortic As plaques significantly increased compared with control group ($P < 0.05$). **Conclusions** The HSP65 epitopes (CTB as the carrier protein) were able to aggravate As plaque formation after subcutaneous injections which could be the reasons that the induced anti-HSP65 antibodies promoted inflammatory reaction, lipid metabolic changes, and then accelerate the As plaque formation. The above HSP65 epitopes can be used to construct the anti-As vaccine to inhibit the As plaque formation by different immunization way.

[收稿日期] 2013-12-05

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81102358);广东省科学院优秀青年人才基金(rejj201104);广东省自然科学基金(S2012040007488)

[作者简介] 孙云霄, 博士, 副研究员, 主要从事动脉粥样硬化生物药物研究及动脉粥样硬化早期诊断与动物模型研究等, E-mail 为 yunxiaosun@126.com。曹荣月, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事糖尿病与心血管病基因及多肽药物研究, E-mail 为 minigene1@yahoo.com.cn。

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是一种心脑血管疾病,是造成心肌梗死、脑中风和局部缺血的主要病理基础,严重危害人类健康。热休克蛋白 (heat shock proteins, HSP) 是一类高度保守的蛋白,在 As 发病过程中作为自身抗原起着重要的作用。与 As 相关的主要为 HSP65、HSP60 和 HSP70,很多研究表明 HSP60/65 是致 As 重要因子^[1-3]。结核分支杆菌来源的 mHSP65 与人自身来源的 hHSP60 高度同源,具有相似的抗原表位, mHSP65 能通过分子模拟产生抗人自身 HSP60 的免疫反应,诱导自身反应性 T 细胞攻击自身抗原,引起人自身免疫性反应而促进 As 的发生^[2]。

抗原分子中起主要作用的是抗原表位,包括 T 细胞表位和 B 细胞表位。研究发现 mHSP65 中与 As 相关的表位它们大多数都是 B 细胞表位^[4-7]。从健康人群体内获得的抗体和从 As 患者体内获得的抗体对人 HSP60 和结核分支杆菌 HSP65 进行抗原扫描,发现许多表位是 hHSP60 与 mHSP65 共有表位。其中 HSP65179-190 (P1)、HSP6531-46 (P2) 及为佐剂性关节炎疾病相关重要表位,也为 HSP65/60 两者共有表位^[8-9],因为 As 与佐剂型关节炎都为炎症性自身免疫疾病,我们选择 mHSP65 中佐剂型关节炎的表位 P1 与 P2,通过考察其对 As 的皮下免疫效果,来研究 HSP 功能表位与 As 之间的关系。

为了提高小分子多肽的免疫原性,采用基因工程的方法,将 P1、P2 其按一定的方式串联组合成 p117(P1P2P1) 片段,以霍乱毒素 B 亚基 (cholera toxin B, CTB) 为载体蛋白,构建融合蛋白 CTB-p117 (CTB-P1P2P1),分离纯化得到用于动物实验的纯化蛋白^[10],在弗氏不完全佐剂存在情况下,对高脂高胆固醇膳食诱导的患 As 新西兰大白兔进行皮内皮下联合免疫,测定动脉粥样硬化斑块的大小,血脂中总胆固醇的变化情况及兔血清中抗 HSP65 抗体产生情况及变化趋势,从而考察基于 HSP65 相关功能表位所构建蛋白在弗氏不完全佐剂存在条件下经皮内皮下免疫是否加重 As 病情,通过研究 HSP 重要功能表位与 As 之间的关系,为 As 多肽抑制剂的设计提供理论及实验基础。

1 材料和方法

1.1 试剂、融合蛋白与动物

融合蛋白 pET28a-CTB-p117 菌种来源于中国药科大学微基因药物实验室,利用李祝方等^[10]的方法,成功得到了所需的可用于动物实验的纯化蛋

白。pET28a-CTB 由中国药科大学微生物教研室徐旭东博士构建,实验室成功提取并纯化。

胆固醇固体颗粒纯度 >99.9% (上海生工);弗氏不完全佐剂 (freund's adjuvant incomplete, IFA) (Sigma 公司);辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG (武汉博士德生物工程有限公司);总胆固醇 (total cholesterol, TC) 测定试剂盒 (上海荣盛生物技术有限公司);其余皆为常规试剂,国产 AR 级。

新西兰大白兔购自江苏省农业科学研究所,雄性,体重 1.5~2.0 kg,于一般室内环境饲养。

1.2 新西兰大白兔动脉粥样硬化模型的建立和免疫

新西兰大白兔按照体重平均分为 3 组,分别为 PBS、CTB 及 CTB-p117 免疫组。其中 PBS 组 9 只,其余两组各 8 只。各组新西兰大白兔饲喂高胆固醇的食物,使每只兔每天的胆固醇摄入量为 0.5 g (饲料配方:0.5% 的胆固醇,5% 的油脂,94.5% 的基础饲料)。蛋白都溶于灭菌 PBS (1 g/L),200 μ L PBS 蛋白溶液与 200 μ L IFA 混合,皮内皮下多点注射方法免疫新西兰大白兔,背部 4 点皮内注射,颈部 1 点皮下注射,前后共饲喂 5 个月,直至 PBS 组兔主动脉中有稍明显的粥样硬化斑生成,自造模开始,免疫 4 次,前 4 个月每月免疫 1 次,第一次免疫在高脂喂养 2 周后。各组分别于免疫第 0、3、5、8、11、14、18 和 22 周耳缘静脉取血。4 $^{\circ}$ C 条件下 4 kr/min 离心 10 min,血液上清储存于 -20 $^{\circ}$ C 备用。

1.3 兔体征变化情况

实验过程中肉眼观察新西兰大白兔的外观、行为、活动、摄食量、体重、粪便及眼、耳、皮肤等器官的情况,最后在解剖新西兰大白兔取出主动脉过程中观察心、肝、脾、肺、肾等内脏器官的变化。

1.4 抗 HSP65 抗体 (IgG) 的 ELISA 检测

用已纯化的 HSP65,包被 96 孔酶标板,以 10 mg/L 的浓度溶于包被稀释液 (0.05 mmol/L 碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液, pH 9.6),每孔中加入 100 μ L,4 $^{\circ}$ C 包被过夜。弃去包被液,加入 2% BSA (pH 7.4 PBS 配制) 封闭液,4 $^{\circ}$ C 满孔封闭过夜。弃去封闭液,每孔加入 1:200 稀释 (2% BSA 封闭液) 的兔血清 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。弃去血清,每孔用 PBST 和自来水间隔洗涤,每次 3 min,共洗涤 6 次。洗涤后,每孔加入 1:20000 (2% BSA 封闭液) 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。弃去酶标二抗液,每孔用 PBST 和自来水间隔洗涤,每次 3 min,共洗涤 6 次。洗涤后,每孔加入 100 μ L 底物液 (过氧化氢尿素和 3,3',5,5'-四甲基

联苯胺(TMB)溶液)。37℃反应40 min后,加入2 mol/L H₂SO₄终止反应,用酶标仪在450 nm波长测定每孔的光密度值OD₄₅₀。

1.5 兔血清中总胆固醇含量检测

按照上海荣盛生物技术有限公司TC测定试剂盒中的说明书,用胆固醇氧化酶-过氧化物酶法测定各批次血清中TC含量,用可见分光光度法在500 nm处测定其吸光度,根据吸光度的变化,最后推算出胆固醇含量(mmol/L)。

1.6 兔主动脉粥样硬化斑块检测

将各组新西兰兔颈动脉放血处死后,从主动脉出心脏处至髂动脉分岔处取主动脉,剔除血管背面的脂肪组织,沿背侧剪开,10%甲醛溶液固定4天后,以0.2% Sudan III乙醇溶液染色30 min,再用70%乙醇充分洗涤后,以扫描仪将染色后的血管内表面扫下,然后使用软件MapInfor7.0计算斑块面积和血管内皮总面积。

1.7 统计学分析

实验中测得数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。所有统计分析采用Student's t test, $P < 0.05$ 被认为差异有显著性。

2 结果

2.1 兔体征变化情况

实验过程中肉眼观察新西兰大白兔的外观、行为、活动、摄食量、体重、粪便及眼、耳、皮肤等器官的情况均未见异常变化。体重变化正常,逐日增加。

此外,对处死后兔的肝、脾、肺、肾等脏器,进上肉眼和显微观察,在外观上这些脏器无明显病变,无异常粘连物质。2组注射免疫后与PBS对照组相比较对新西兰大白兔的生长并无明显影响,除主动脉外其它脏器没有明显异于正常之处。

2.2 抗HSP65抗体(IgG)的ELISA检测

在弗氏不完全佐剂存在的情况下,CTB与CTB-p117皮下免疫新西兰大白兔,CTB-p117蛋白从第一次给药后的第3周就可检测到血清中抗HSP65抗体的存在,与对照PBS组比较,差异具有显著性($P < 0.01$),最后一次免疫(第12周第4次免疫)后仍存在的高抗HSP65抗体水平一直持续到第22周实验结束;与CTB对照组比较差异同样具有显著性($P < 0.01$),从第一次给药后的第3周开始一直持续到实验结束,差异都具有显著性;而整个实验过程中,CTB免疫组与PBS对照组比较差异无显著性(图1)。

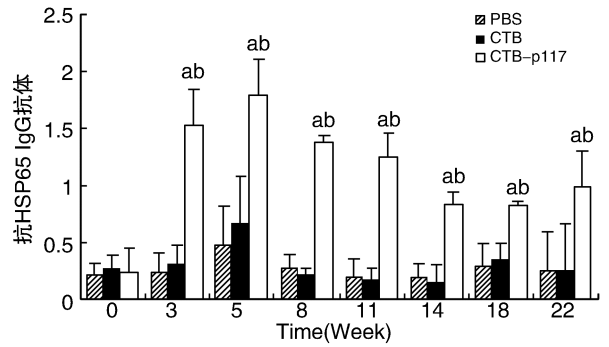


图1. 新西兰大白兔经皮下注射免疫后血清中抗HSP65 IgG抗体的变化趋势 a为 $P < 0.01$,与PBS组比较;b为 $P < 0.01$,与CTB组比较。

Figure 1. Anti-HSP65 IgG in the serum of New Zealand white rabbits immunized subcutaneously

2.3 免疫后兔血清TC的含量测定

CTB免疫组与PBS组相比较,CTB免疫组中没有诱导产生抗HSP65抗体,与PBS组比较差异无显著性,同样3次血清总胆固醇含量测定,差异同样也无显著性;而CTB-p117免疫组与PBS组比较,在实验后期TC含量上也出现了显著性的差异($P < 0.05$;图2),在免疫的第22周检测CTB-p117免疫组TC含量为27.34 mmol/L,与PBS组(18.57 mmol/L)相比上升47.23%。

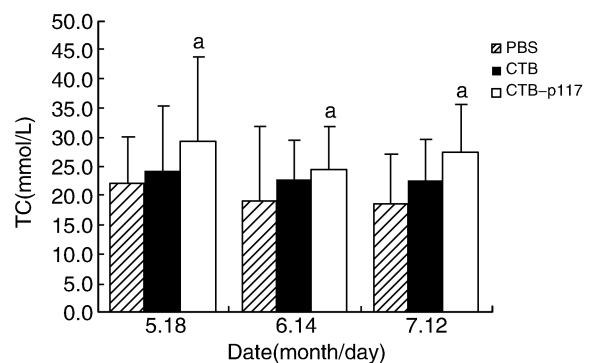


图2. 新西兰大白兔血清中TC的含量变化 a为 $P < 0.05$,与PBS组比较。

Figure 2. Changes of concentration of TC in the serum of New Zealand white rabbits

2.4 免疫后兔主动脉粥样硬化斑块的检测

PBS组的主动脉粥样硬化斑块面积占血管总面积的百分比为10.35%;CTB与CTB-p117主动脉粥样硬化斑块面积分别占血管总面积的百分比为36.78%和31.04%,与PBS对照组相比较,主动脉斑块面积百分比分别为PBS组的3.6倍和3.0倍,差异有显著性($P < 0.05$;图3)。CTB、CTB-p117在

弗氏佐剂存在情况下经皮下皮内免疫新西兰大白兔均能激发加强动脉粥样硬化斑块生成(图4)。

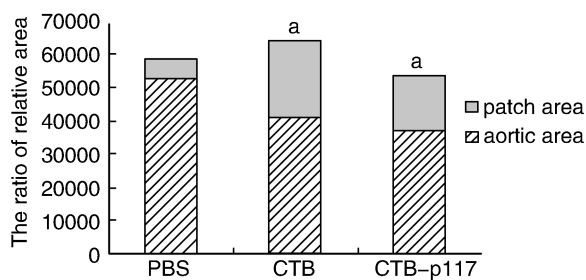


图3. 皮下皮内注射免疫新西兰大白兔主动脉的粥样斑块

a 为 $P < 0.05$, 与 PBS 组比较。

Figure 3. Patch area in area of aorta obtained from New Zealand white rabbits



图4. PBS组、CTB组与CTB-p117免疫组主动脉斑块染色结果

A为PBS组,B为CTB组,C为CTB-p117组。

Figure 4. Atherosclerosis lesion of rabbit immunized with PBS, CTB and CTB-p117 stained with Sudan III

炎的研究表明,P1作为引起体液免疫的B细胞表位能够抵抗炎症的产生;P2为T细胞表位,能够使得IFN- γ 下调,提高IL-10和TGF β 1的分泌。IL-10和TGF β 1是免疫调节细胞因子,可以诱使TH1细胞向TH2细胞转变,进而对炎症起抑制调节作用。作为理想的免疫原,抗原分子中可同时包含目的抗原B细胞表位和自身或外源T细胞表位,可诱导出高度特异的体液或细胞免疫反应,从体液和细胞免疫水平起到预防或治疗作用。但由于小分子量表位组合免疫原性不足以激发显著的免疫反应,因此本研究选取CTB作为融合蛋白,构建融合蛋白CTB-p117。研究表明,CTB是一种较强的免疫佐剂,作为载体蛋白与相关抗原免疫动物时,可大大增强机体对特异性抗原的特异性IgA免疫应答和系统IgG免疫应答^[15-16]。本研究中通过皮下注射免疫结果显示,以CTB为载体的P1、P2两表位确实能加剧As斑块的产生。

基于P1、P2两表位所构建CTB-p117融合蛋白以

3 讨论

用重组的结核分支杆菌HSP65肌注免疫能诱发As,用从卡介苗中获得的结核分支杆菌HSP65经皮下注射免疫高胆固醇膳食的新西兰大白兔,也能观察到HSP65能明显加剧As;但用HSP65经鼻黏膜途径免疫高脂高胆固醇膳食新西兰大白兔,与卵清蛋白黏膜免疫组及PBS组进行比较,发现结核分支杆菌HSP65经黏膜免疫不仅不会加剧As,反而能有效防止As的发生和发展^[11-14]。提示在HSP65分子中存在As相关的功能性表位肽段,这种表位在皮下注射免疫时会诱发As,但通过黏膜免疫却能激发旁路抑制,起到预防As的作用。

Quintana等^[8-9]对自身免疫性疾病佐剂型关节

皮内皮下免疫能诱导出针对整个大分子HSP65的抗体,这点与前人研究一致,如Ulmansky等研究单独用含P1表位的合成肽免疫小鼠,小鼠体内不但产生了针对P1表位的抗体,而且诱导产生了针对整个HSP65大分子的抗HSP65抗体^[9]。提示高的抗HSP65抗体水平的存在可能与导致的As加重有关。

TC含量的升高也可能与血清中抗HSP65抗体滴度的升高存在某种联系。具体影响过程需进行进一步细致的机理研究讨论。

从粥样硬化斑所占整个主动脉血管的面积比上看,CTB-p117免疫组能够显著加强主动脉粥样硬化斑的生成。如果是因其抗HSP65抗体滴度显著升高而增加硬化斑的生成,这与文献体内高的抗HSP65抗体滴度可以加重As病情相一致,符合HSP65及其相关表位皮下注射免疫可加重As的进展^[17]。前面提到在HSP60/65分子中存在As相关的功能性表位肽段皮下注射免疫时会诱发As,但通过鼻腔或胃肠道黏膜免疫却能激发旁路抑制,起到

预防 As 的作用^[18-19]。因此在我们的后续实验可利用这些表位,设计出免疫多肽,进行黏膜免疫考察表位对 As 的预防及免疫治疗效果。

综上,在以 CTB 做为载体蛋白的情况下,CTB-p117 组能显著加强 As 斑块的生成,原因可能与基于 P1、P2 两表位所构建 CTB-p117 融合蛋白以皮下免疫能诱导出针对整个抗 HSP65 大分子的抗体有关。以 HSP65 个别表位免疫后能诱导出针对 HSP65 大分子的抗体可能是因为免疫过程中出现所谓的“表位扩展”。在持续的免疫应答过程中,免疫系统可对隐蔽抗原表位相继发生免疫应答,这一现象称为“表位扩展”。表位扩展是直接致病情抗体缺乏情况下,抗原特异性 B 淋巴细胞促进疾病发生的重要机制,B 淋巴细胞能通过提高递呈的效能和多样性促进疾病发展^[20]。HSP65 反应性的 T 细胞及特异性抗体可能介导诱发炎症反应进而加剧 As 的发生。至于研究中 CTB 免疫组也能显著增加主动动脉硬化斑的生成,且与 CTB-p117 相比无统计学差异,这未曾见有研究报道。这就给 d 研究者提出一个问题,CTB-p117 加重斑块生成,是因为融合了 CTB 的原因还是因为 p117 表位的存在激发高抗 HSP65 的产生而导致的,这就需要研究者进一步研究探明。因此给研究者提出了以后的研究方向,后期实验可以单独合成 HSP65 上与 As 相关的表位,与牛血清白蛋白(BSA)偶联皮下免疫新西兰大白兔,来考察排除 CTB 做载体蛋白的情况下 HSP65 的表位皮下免疫的抗体生成情况及加强 As 斑块形成的效果等。再综合实验结果,考虑改变免疫方式,设计出可用于降低斑块生成的抑制 As 斑块生成的免疫调节剂。

[参考文献]

[1] Pockley AG. Heat shock proteins, inflammation, and cardiovascular disease [J]. *Circulation*, 2002, 105(8): 1 012-017.

[2] Xu Q. Role of heat shock proteins in atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, 22(10): 1 547-559.

[3] 孙海阁, 田迪, 谭迎, 等. 皮下免疫热休克蛋白 65 对高密度脂蛋白抗炎抗氧化功能的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2013, 21(11): 977-981.

[4] Perschinka H, Mayr M, Millonig G, et al. Cross-reactive B-cell epitopes of microbial and human heat shock protein 60/65 in atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23(6): 1 060-065.

[5] Uray K, Hudecz F, Fust G, et al. comparative analysis of linear antibody epitopes on human and mycobacterial 60-kDa heat shock proteins using samples of healthy blood donors [J]. *Int Immunol*, 2003, 15(10): 1 229-236.

[6] Metzler B, Schett G, Kleindienst R, et al. Epitope specificity of an-

ti-heat shock protein 65/60 serum antibodies in atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, 17(3): 536-541.

[7] Zhang Y, Xiong QY, Hu XB, et al. A novel atherogenic epitope from *Mycobacterium tuberculosis* heat shock protein 65 enhances atherosclerosis in rabbit and LDL receptor-deficient mice [J]. *Heart Vessels*, 2012, 27(4): 411-418.

[8] Quintana FJ, Carmi P, Mor F, et al. DNA fragments of the human 60-kDa heat shock protein (HSP60) vaccinate against adjuvant arthritis: identification of a regulatory HSP60 peptide [J]. *J Immunol*, 2003, 171(7): 3 533-541.

[9] Ulmansky R, Cohen CJ, Szafer F, et al. Resistance to Adjuvant arthritis is due to protective antibodies against heat shock protein surface epitopes and the induction of IL-10 secretion [J]. *J Immunol*, 2002, 168(12): 6 463-469.

[10] 李祝方, 龙军, 孙云霄, 等. 热休克蛋白 65 及其两个功能表位在调节动脉粥样硬化中的作用 [J]. *药物生物技术*, 2009, 16(1): 1-7.

[11] Jing H, Yong L, Hai YL, et al. Oral administration of lactococcus lactis delivered heat shock protein 65 attenuates atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice [J]. *Vaccine*, 2011, 29(24): 4 102-109.

[12] Maron R, Sukhova G, Faria AM, et al. Mucosal administration of HSP65 decreases atherosclerosis and inflammation in aortic arch of low-density lipoprotein receptor-deficient mice [J]. *Circulation*, 2002, 106(13): 1 708-715.

[13] Long J, Lin J, Yang X, et al. Nasal immunization with different forms of heat shock protein-65 reduced high-cholesterol-diet-driven rabbit atherosclerosis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2012, 13(1): 82-87.

[14] Long J, Lin J, Liu JJ, et al. Effects of nasal immunization of multi-target preventive vaccines on atherosclerosis [J]. *Vaccine*, 2012, 30(6): 1 029-037.

[15] Wu HY, Russell MW. Induction of mucosal and systemic immune responses by intranasal immunization using recombinant cholera toxin B subunit as an adjuvant [J]. *Vaccine*, 1998, 16(23): 286-292.

[16] Sun JB, Czerkinsky C, Holmgren J. B lymphocytes treated in vitro with antigen coupled to cholera toxin B subunit induce antigen-specific Foxp3+ Regulatory T cells and protect against experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *J Immunol*, 2012, 188(4): 1 868-897.

[17] Xu Q, Dietrich H, Steiner HJ, et al. Induction of arteriosclerosis in normocholesterolemic rabbits by immunization with heat shock protein 65 [J]. *Arterioscler Thromb*, 1992, 12(7): 789-99.

[18] 李海禹, 丁艳萍, 曾秋棠. 鼻饲热休克蛋白 65 诱导免疫耐受降低动脉粥样硬化的形成及其机制 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(53): 10007-10010.

[19] 王治校, 陈彬, 李大主, 等. 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 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009, 17(11): 882-884.

[20] 缪怡, 胡朝英, 钱柳, 等. 类风湿性关节炎免疫学研究进展 [J]. *上海交通大学学报*, 2011, 31(7): 1035-1040.