

结核分枝杆菌热休克蛋白 65 对 ApoE 基因敲除小鼠 Treg/Th17 免疫平衡的影响

曹荣月^{1*}, 张昕黎¹, 袁冬平², 李曼曼¹, 俞敏霞¹, 马云菲¹, 苗梓韬¹, 龙军^{2**}

(¹中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 210009;

²南京中医药大学药学院, 江苏省中药药效与安全性评价重点实验室, 南京 210023)

摘要 研究结核分枝杆菌热休克蛋白 65 (HSP65) 对 ApoE^{-/-} 小鼠 Treg/Th17 免疫平衡的影响。首先, 将结核分枝杆菌 HSP65 蛋白免疫高脂饲喂 ApoE^{-/-} 小鼠, 再采用 ELISA 检测小鼠血清中抗 HSP65 抗体的产生情况, 流式细胞术检测血中 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ 调节性 T 细胞 (Treg) 和 CD4⁺ IL-17⁺ 辅助性 T 细胞 17 (Th17) 的数量, ELISA 检测血清中 IL-10、TGF-β1、IL-17 和 IL-21 含量, 生化分析仪检测血中总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 和低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 的含量, 染色法计算动脉粥样硬化斑块面积。结果发现结核分枝杆菌 HSP65 蛋白诱导 ApoE^{-/-} 小鼠产生了高水平的抗 HSP65 抗体, Treg 细胞及其分泌的 IL-10 和 TGF-β1 细胞因子数量明显减少, Th17 细胞及其分泌的 IL-17 和 IL-21 细胞因子数量明显增加, TC、TG、HDL-C 及 LDL-C 的含量未见改变, 但动脉粥样硬化斑块的面积明显增加。由此可见结核分枝杆菌 HSP65 蛋白能够破坏 ApoE^{-/-} 小鼠 Treg/Th17 免疫平衡, 促进动脉粥样硬化的发展。

关键词 HSP65; 动脉粥样硬化; Treg; Th17; ApoE 基因敲除

中图分类号 Q78; R392-33 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2016)03-0353-06

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20160318

引用本文 曹荣月, 张昕黎, 袁冬平, 等. 结核分枝杆菌热休克蛋白 65 对 ApoE 基因敲除小鼠 Treg/Th17 免疫平衡的影响 [J]. 中国药科大学学报, 2016, 47(3):353-358.

Cite this article as: CAO Rongyue, ZHANG Xinli, YUAN Dongping, et al. Effects of *Mycobacterium tuberculosis* HSP65 on Treg/Th17 immune balance in ApoE-knockout mice [J]. *J China Pharm Univ*, 2016, 47(3):353-358.

Effects of *Mycobacterium tuberculosis* HSP65 on Treg/Th17 immune balance in ApoE-knockout mice

CAO Rongyue^{1*}, ZHANG Xinli¹, YUAN Dongping², LI Manman¹, YU Minxia¹, MA Yunfei¹, MIAO Zitao¹, LONG Jun^{2**}

¹School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009; ²Jiangsu Key Laboratory for Pharmacology and Safety Evaluation of Chinese Materia Medica, School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract To investigate the effects of *Mycobacterium tuberculosis* heat shock protein 65 (HSP65) on Treg/Th17 immune balance in ApoE-knockout (ApoE^{-/-}) mice, ApoE^{-/-} mice with a high-cholesterol diet were immunized with *M. tuberculosis* HSP65. Sera were obtained for measurement of anti-HSP65 antibodies by ELISA; the effect of administration of different antigens was investigated, respectively, using flow cytometry analysis on the number of CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Tregs and CD4⁺ IL-17⁺ Th17; the production of cytokines (IL-10, TGF-β1, IL-17 and IL-21) by these cells were determined by ELISA; total plasma cholesterol (TC), triglyceride (TG), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) levels were detected by biochemical

autoanalyzer. Atherosclerotic lesions were measured by lipid deposition stained with oil red O. The results demonstrated that the levels of anti-HSP65 IgG antibodies were increased significantly in *Mycobacterium tuberculosis* HSP65-treated ApoE^{-/-} mice, revealed obvious decrease in Treg number, Treg related cytokines (IL-10, TGF- β 1) levels and significant increase in Th17 number, Th17 related cytokines (IL-17 and IL-21) levels, the levels of TC, TG, HDL-C and LDL-C did not change between groups, while the atherosclerotic lesions significantly increased. Results indicate that *M. tuberculosis* HSP65 could interrupt the Th17/Treg immune balance in ApoE^{-/-} mice, suggesting a potential role in the formation and progression of atherosclerosis.

Key words HSP65; atherosclerosis; Treg; Th17; ApoE-knockout

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81373232, No. 81573929); the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK2012458); the National Training Programs of Innovation and Entrepreneurship for Undergraduates (No. J1030830); and the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions (PAPD)

动脉粥样硬化(AS)是心血管疾病的主要诱因,也是诱发死亡的主要因素^[1]。近年来研究显示,多种病原微生物感染能够促使动脉粥样硬化斑块形成,从而揭示了微生物感染与动脉粥样硬化之间的潜在联系^[2]。HSP65是结核分枝杆菌主要抗原之一,具有很强的免疫原性,它可以与自身HSP65发生交叉免疫反应,引发强烈的细胞免疫和体液免疫反应^[3-4]。Mayr等^[5]发现在动脉粥样硬化斑块中同时存在微生物和人自身HSPs,且抗微生物HSP65免疫反应会促进血管内皮损伤,由此推断持续的微生物感染具有潜在的促动脉粥样硬化作用。

动脉粥样硬化作为慢性炎症性疾病,涉及包括T淋巴细胞在内的多种免疫细胞。传统研究认为Th1/Th2比例失衡有促动脉粥样硬化作用。新近研究发现CD4⁺CD25⁺Tregs细胞和Th17细胞间的平衡对于炎症性和自身免疫性疾病具有重要的调节作用。Tregs细胞能够分泌具有调节炎症特性的IL-10和TGF- β 细胞因子,而Th17细胞则主要分泌IL-17、IL-21等促炎细胞因子。Xie等^[6]研究发现ApoE基因敲除(ApoE^{-/-})小鼠体内存在Th17/Treg失衡。由于ApoE^{-/-}小鼠具有胆固醇脂蛋白清除障碍,蓄积在体内的脂蛋白能够直接导致动脉粥样硬化斑块的形成;此外,在ApoE^{-/-}小鼠中可以观察到动脉粥样硬化各阶段的病理表现,且其所形成的粥样硬化病变都与人类动脉粥样硬化的发展极其相似^[7]。因此,ApoE^{-/-}小鼠已经成为动脉粥样硬化发病机制研究的重要模型之一。

本课题旨在研究结核分枝杆菌HSP65对ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化发展的影响与Treg/

Th17免疫平衡之间的关联性。

1 材料

1.1 菌种和质粒

质粒pET-28a-HSP65由中国药科大学微基因药物实验室构建并保存,菌种 *Escherichia coli* BL21 (DE3)由中国药科大学微基因药物实验室保存。

1.2 试剂和药品

辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗小鼠IgG(武汉博士德公司);Foxp3固定/破膜试剂盒、CD4-FITC、CD25-PE、Foxp3-Alexa Fluor[®] 647、IL-17-PE流式抗体(美国BD公司);小鼠TGF- β 1 ELISA试剂盒(美国eBioScience公司);小鼠IL-10、IL-17和IL-21 ELISA试剂盒(南京阿普斯黛尔生物技术有限公司);总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)及低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)测定试剂盒(日本Wako公司);结核分枝杆菌HSP65蛋白(根据本课题组前期报道的方法制备^[8],经硫酸氨沉淀和阴离子交换色谱纯化);其他试剂均为进口分装或市售分析纯。

1.3 仪器

550型酶标仪(美国Bio-Rad公司);FACS Calibur流式细胞仪(美国BD公司);全自动生化分析仪(美国Beckman Coulter公司);MapInfor7.0软件(美国MapInfo公司)。

1.4 动物

ApoE^{-/-}小鼠(SPF级),雄性,体重18~22 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号SCXK(京)2012-0001。

2 方 法

2.1 分组与给药方案

将 ApoE^{-/-} 小鼠随机分成 3 组,每组 10 只,分别为:磷酸盐缓冲液 (PBS) 对照组、卵清蛋白 (OVA) 对照组、HSP65 组。卵清蛋白和 HSP65 分别以灭菌的 PBS (pH 7.4) 溶解配制成 0.1 mg/mL, 分别在第 1,4 和 7 周皮下接种 0.1 mL。实验进行 16 周,期间除 PBS 对照组给予正常饮食外,其余各组小鼠饲喂高胆固醇食物 (胆固醇 1.25%, 猪油 20%)。实验结束后各组小鼠眼眶取血,4 ℃ 条件下 4 000 r/min 离心 10 min 后上清液储存于 -20 ℃。

2.2 抗 HSP65 抗体的 ELISA 检测

将重组 HSP65 (1 mg/mL) 包被于 96 孔酶标板,4 ℃ 过夜。弃去包被液,加入 2% 牛血清白蛋白 BSA 封闭液,4 ℃ 满孔封闭过夜。弃去封闭液,每孔加入 1:200 稀释的小鼠血清 100 μL,37 ℃ 孵育 1 h。弃去血清,用含有吐温-20 的磷酸盐缓冲液 (PBST) 洗涤后,每孔加入 1:20 000 (2% BSA 封闭液) 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgG 100 μL,37 ℃ 孵育 1 h。弃去酶标二抗液,经 PBST 洗涤后,每孔加入 TMB 底物液 100 μL。37 ℃ 反应 40 min 后,加入 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应,用酶标仪在 450 nm 波长测定吸收度。

2.3 流式检测细胞变化

新鲜肝素抗凝血置于 Eppendorf 管中,加入荧光标记单克隆抗体 CD4/CD25/Foxp3/IL-17,并作同型对照,室温避光孵育 20 min。加入红细胞裂解液 500 μL,混匀,室温避光 10 min。其中 Foxp3 添加前需要加入细胞固定剂/破膜剂 100 μL,室温避光放置 20 min。离心 (1 200 r/min,5 min),弃去上清液,加入 PBS 液 1 mL,混匀。重复洗涤,制成单细胞悬液。流式细胞仪上检测细胞抗原。

2.4 细胞因子的 ELISA 检测

按照 ELISA 试剂盒的说明书操作步骤,检测小鼠血清中 IL-10、TGF-β1、IL-17 和 IL-21 水平。

2.5 血清中血脂含量的检测

采用全自动生化分析仪测定小鼠血清中 TC、TG、HDL-C 及 LDL-C 的含量。

2.6 主动脉粥样硬化病斑检测

依据本课题组前期报道的方法^[9],取各组小

鼠主动脉,剔除血管背面的脂肪组织,沿背侧剪开,10% 福尔马林固定 4 d,以油红 O 溶液染色 30 min 并经洗涤后,以扫描仪将染色后的血管内表面扫下,然后使用软件 MapInfor7.0 计算病斑面积和血管内皮总面积。

2.7 统计学分析

实验中测得的数据采用 *t*-test 检验统计学差异。

3 结 果

3.1 ELISA 法检测血清中抗 HSP65 抗体的变化

采用 ELISA 法检测了小鼠血清中抗 HSP65 抗体在免疫前后的含量变化情况,结果显示:HSP65 组小鼠的抗 HSP65 抗体水平在第 8 周和第 16 周明显增加 (与 OVA 比较, *P* < 0.01)。PBS 组和 OVA 组均未见明显的抗 HSP65 抗体生成 (图 1)。实验结果表明,HSP65 皮下接种能够诱导强烈的免疫反应。

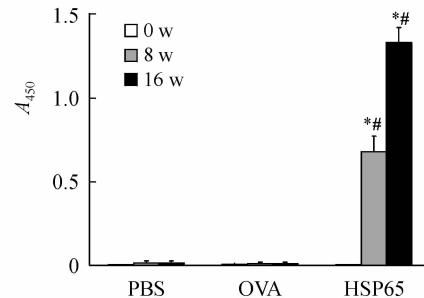


Figure 1 Production of anti-HSP65 IgG antibodies in mice immunized with PBS, ovalbumin (OVA) or HSP65 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

* *P* < 0.01 vs PBS group; # *P* < 0.01 vs OVA group

3.2 Treg 和 Th17 细胞的变化

经流式细胞仪检测,蛋白经皮下注射和高脂饮食处理的 OVA 和 HSP65 组 ApoE^{-/-} 小鼠的外周血中 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 细胞的数量均明显减少 (图 2, *P* < 0.01 vs PBS 组), CD4⁺ IL-17⁺ 细胞的数量均明显增加 (图 3, *P* < 0.01 vs PBS 组)。并且,相对于 OVA 组而言, HSP65 组小鼠的外周血中 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 细胞数量的减少 (图 2, *P* < 0.05) 和 CD4⁺ IL-17⁺ 细胞数量的增加 (图 3, *P* < 0.01) 则更加显著。结果表明,皮下注射 HSP65 可以显著干扰 ApoE^{-/-} 小鼠外周血中的 Treg/Th17 细胞平衡。

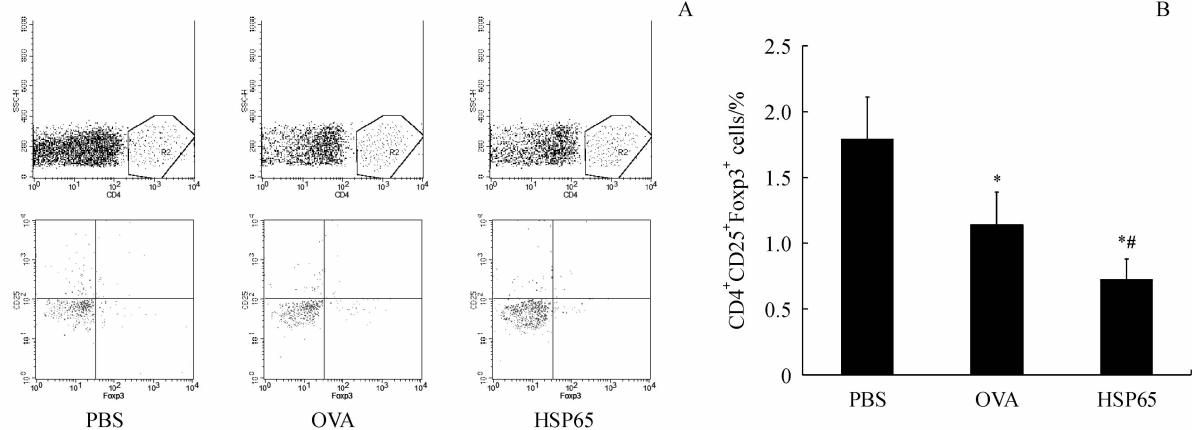


Figure 2 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg cells in mice blood assessed by flow cytometer

A: Cell counting by flow cytometer; B: Percentage of CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg cells in peripheral blood ($\bar{x} \pm s, n=10$)

* $P < 0.01$ vs PBS group; ** $P < 0.05$ vs OVA group

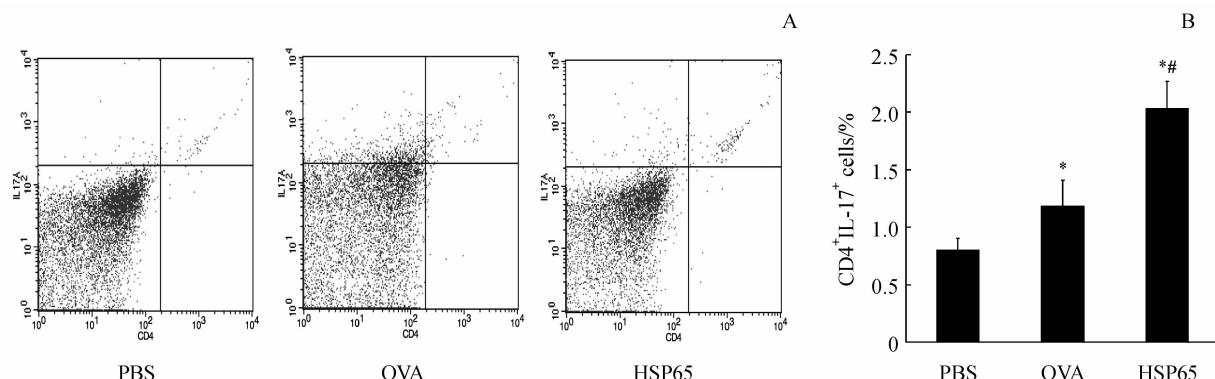


Figure 3 CD4⁺ IL-17⁺ cells in mice blood assessed by flow cytometer

A: Cell counting by flow cytometer; B: Percentage of CD4⁺ IL-17⁺ cells in peripheral blood ($\bar{x} \pm s, n=10$)

* $P < 0.01$ vs PBS group; ** $P < 0.01$ vs OVA group

3.3 ELISA 法检测 Treg 和 Th17 细胞分泌的细胞因子变化

通过 ELISA 法检测细胞因子变化,结果显示,与 PBS 组相比, OVA 组和 HSP65 组的 IL-10 和

TGF- β 1 的含量都有所下降,而 IL-21 和 IL-17 的含量则有显著性增加。并且, HSP65 组的细胞因子变化情况比 OVA 组更加明显($P < 0.01$),见图 4。

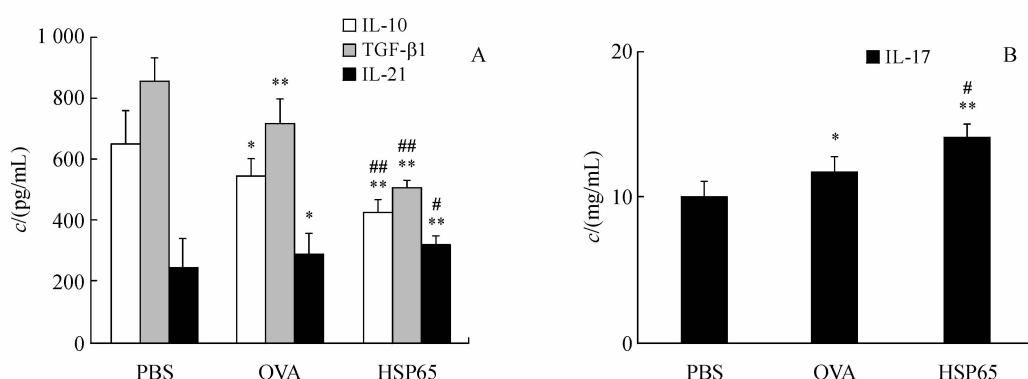


Figure 4 Concentration of cytokines in serum of ApoE^{-/-} mice subcutaneously treated with PBS, OVA and HSP65 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

A: Levels of IL-10, TGF- β 1, IL-21 in each group; B: Levels of IL-17 in each group

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs PBS group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs OVA group

3.4 血脂变化的测定

通过对ApoE^{-/-}小鼠血脂检测结果发现,与PBS组相比,接受高脂饲喂的OVA组和HSP组小鼠的TC、TG和LDL-C水平均明显增加,而HDL-C水平未见明显变化。并且,OVA组和HSP组小鼠的各项血脂均未见显著性差异(图5)。结果表明,皮下注射HSP65对血脂未产生明显影响。

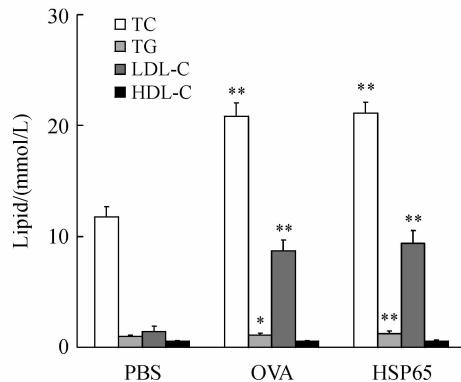


Figure 5 Concentration of lipids in serum of ApoE^{-/-} mice subcutaneously treated with PBS, OVA and HSP65 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

TC: total cholesterol; TG: triglyceride; LDL-C: low density lipoprotein cholesterol; HDL-L: high density lipoprotein cholesterol

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs PBS group

3.5 染色法检测免疫后主动脉粥样硬化病斑变化

小鼠主动脉油红O染色结果如图6所示,与PBS组($29.5\% \pm 2.4\%$)比较,OVA组($41.8\% \pm 2.5\%$)和HSP65组($67.9\% \pm 2.8\%$)的动脉粥样硬化斑块面积明显增加($P < 0.01$)。并且,与OVA组比较,HSP65组的动脉粥样硬化斑块面积增加更加明显($P < 0.01$)。结果表明,皮下注射HSP65明显增加动脉粥样硬化损伤。

4 讨 论

动脉粥样硬化是一种复杂的慢性炎症性疾病,免疫失衡是其非常重要的诱因。Treg/Th17平衡是近年来免疫学研究的热点,对于理解疾病的成因以及防治具有重要的意义。现在认为, Th1 和 Th17 能够诱导局部动脉粥样硬化斑块的形成及发展^[10],而Tregs则抑制动脉粥样硬化斑块的形成,在减轻动脉粥样硬化炎症方面具有积极的保护作用^[11]。研究人员发现,急性冠脉综合征病人体内Th17细胞及其相关因子(IL-17、IL-6、IL-23、IL-21)水平显著升高,而Treg细胞及其相关因子(IL-10、TGF-β)水平明显下降,表明Treg/Th17细胞失衡

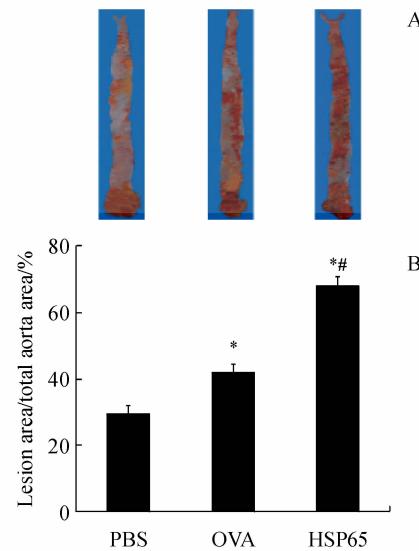


Figure 6 Subcutaneous administration of HSP65 increases plaque formation ($\bar{x} \pm s, n=10$)

A: Total aorta areas; B: Proportion of lesion areas

* $P < 0.01$ vs PBS group; ** $P < 0.01$ vs OVA group

影响了斑块稳定性,从而诱发了急性冠脉综合征^[12-13]。Xie等^[7]在动脉粥样硬化动物模型中也得到了类似的结果,他们将ApoE^{-/-}小鼠与同龄C57BL/6J小鼠作比较,发现ApoE^{-/-}小鼠Th17及其细胞因子IL-17和IL-6显著增加而Treg细胞及其细胞因子TGF-β明显降低,进而证明在ApoE^{-/-}动脉粥样硬化小鼠中存在Treg/Th17失衡现象,表明Treg/Th17失衡对动脉粥样硬化形成及发展具有积极的促进作用。

本实验结果显示,ApoE^{-/-}小鼠经HSP65免疫后,HSP65组小鼠外周血中CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg细胞数量明显减少,而CD4⁺IL-17⁺细胞数量显著增加。此外,HSP65组小鼠血清中IL-10和TGF-β1的含量都有所下降,而IL-21和IL-17含量则显著增加,动脉粥样硬化斑块面积明显增加。该结果表明皮下注射HSP65可以明显破坏ApoE^{-/-}小鼠外周血中的Treg/Th17细胞平衡,进而加重动脉粥样硬化。鉴于上述Treg/Th17平衡在动脉粥样硬化发生发展中的作用以及微生物感染与AS的关系,由本实验结果可以进一步推测微生物感染可以通过其自身抗原(如HSP65)引起Treg/Th17细胞失衡,进而促进动脉粥样硬化的形成和发展。本实验结果丰富了关于微生物源的HSP65影响动脉粥样硬化进程的认识,为动脉粥样硬化的防治提

供新的思路和方法。但HSP65引起Treg/Th17平衡发生变化的根源尚不完全清楚,有待进一步研究。

参考文献

- [1] Jeon US, Choi JP, Kim YS, et al. The enhanced expression of IL-17-secreting T cells during the early progression of atherosclerosis in ApoE-deficient mice fed on a western-type diet [J]. *Exp Mol Med*, 2015, 47(5):163-172.
- [2] Jan M, Meng S, Chen NC, et al. Inflammatory and autoimmune reactions in atherosclerosis and vaccine design informatics [J]. *Biomed Res Int*, 2010, 2010(10):1155-1171.
- [3] Sun HG, Liu TR, Tan Y, et al. Mechanism of heat shock protein 65 promote atherosclerosis occurrence and progression [J]. *Chin J Geriatr Cardiovasc Cerebrovasc Dis* (中华老年心脑血管病杂志), 2012, 14(11):1221-1223.
- [4] Afeck A, George J, Gilburd B, et al. Immunization of low-density lipoprotein receptor deficient (LDL-RD) mice with heat shock protein 65 (HSP-65) promotes early atherosclerosis [J]. *J Autoimmun*, 2000, 14(2):115-121.
- [5] Mayr M, Kiechl S, Willeit J, et al. Infections, immunity, and atherosclerosis associations of antibodies to *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, and cytomegalovirus with immune reactions to heat-shock protein 60 and carotid or femoral atherosclerosis [J]. *Circulation*, 2000, 102(8):833-839.
- [6] Xie J, Wang J, Tang T, et al. The Th17/Treg functional imbalance during atherogenesis in ApoE^{-/-} mice [J]. *Cytokine*, 2010, 49(2):185-193.
- [7] Zhang XM, Yang JH. ApoE and the relationship between atherosclerosis and ApoE knockout mice in the atherosclerosis research [J]. *J Kunming Med Univ* (昆明医科大学学报), 2012, 33(1B):169-172.
- [8] Zhou HX, Liao ZP, Liu JJ. Cloning, purification of heat shock protein 65 (HSP65) and its activity determination [J]. *Pharm Biotechnol* (药物生物技术), 2009, 16(1):19-23.
- [9] 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.
- [10] Yu XH, Jiang N, Zheng XL, et al. Interleukin-17A in lipid metabolism and atherosclerosis [J]. *Clin Chim Acta*, 2014, 431(C):33-39.
- [11] Chistiakov DA, Sobenin IA, Orekhov AN. Regulatory T cells in atherosclerosis and strategies to induce the endogenous atheroprotective immune response [J]. *Immunol Lett*, 2013, 151(1):10-22.
- [12] Cheng X, Yu X, Ding Y, et al. The Th17/Treg imbalance in patients with acute coronary syndrome [J]. *Clin Immunol*, 2008, 127(1):89-97.
- [13] Shimada K. Immune system and atherosclerotic disease heterogeneity of leukocyte subsets participating in the pathogenesis of atherosclerosis [J]. *Circ J*, 2009, 73(6):994-1001.

· 会讯 ·

2016年中国药物制剂大会会议通知

为及时把握药物制剂领域发展动态,获取国内外研究成果信息,提供成果展示平台,促进国内外交流与合作,推动我国药物新型制剂发展,中国药学会与中国化学制药工业协会定于2016年11月18日至20日在江苏省南京市共同举办2016年中国药物制剂大会暨国际控释协会中国分会、中国药学会药剂专业委员会学术年会以及中国化学制药工业协会固体制剂专业委员会工作年会。大会主题为:药剂学发展与制剂创新。届时将邀请国内外药剂学领域专家与同行,就药物制剂新技术发展现状、新研究成果以及未来发展趋势和挑战等进行深入交流与探讨。

本次会议采用大会和分会报告、壁报、专题讨论会等形式进行交流。会议将邀请国内外高等院校、科研院所、制药企业、研发企业、医疗机构、管理机构等知名专家作主题报告和专题演讲。大会将设药物制剂创新技术及高端制剂研发、仿制药一致性评价中的制剂技术、药用辅料与包材、儿童给药、青年和研究生学术报告会等相关主题分会场。大会同期召开中国药学会药剂专业委员会和国际控释协会中国分会工作会议以及中国化学制药工业协会固体制剂专业委员会工作年会。欢迎广大药学工作者积极参与或投稿,也欢迎产业界、投资界及相关机构人员参会。

(本刊讯)