

Hsp70-NP 融合蛋白增强诱导 HTNV NP 特异性 CTL 的实验研究*

李 静¹, 叶正旭², 杨守京^{1**}, 李铠男¹, 高 娟³, 刘彦仿¹

(1.第四军医大学病理学教研室; 2.第四军医大学西京医院骨科; 3.第四军医大学西京医院消化内科 陕西西安 710032)

Hsp70-NP Recombinant Protein Enhances HTNV NP Specific Cellular Immune Response *in vivo*

LI Jing¹, YE Zheng-xu², YANG Shou-jing^{1**}, LI Kai-nan¹, GAO Juan³, LIU Yan-fang¹

(1. Department of Pathology; 2. Department of Orthopaedics; 3. Department of Gastroenterology, Xi Jing hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract: To examine whether the recombinant protein Hsp70-NP could induce the N-specific CTLs, we immunized C57/BL6 mice with purified protein Hsp70-NP, NP or Hsp70. The lymphoproliferative responses and CTL activities of spleen cells from vaccinated mice were determined. Accordingly, in order to get the target cells for cytotoxic assay, we transfected pcDNA3.1/S into mice melanoma cells B16 with Lipofectamine2000, and selected stable transfectants with G418. RT-PCR, Western blots and immunofluorescence were used to identify the B16-N. The lymphoproliferative responses of spleen cells of mice vaccinated with Hsp70-NP, NP clearly showed proliferation in the presence of the N protein. But the stimulation indexes of splenocytes to NP of Hsp70-NP group were significantly higher than that of NP group. The CTL results showed that the cytotoxic effect of lymphocyte of the Hsp70-NP group was higher than that of the NP group. The results showed that Hsp70 could enhance the potency of NP to elicit HTNV NP specific cellular immune responses *in vivo*.

Key words: Heat shock protein (HSP); *Hantaan virus* Nucleocapsid protein; Transfection; Cytotoxic T lymphocyte

摘要: 本文采用纯化蛋白 Hsp70-NP, NP, Hsp70 分别免疫 C57/BL6 小鼠, 取各组小鼠脾淋巴细胞进行淋巴细胞增殖试验和细胞毒试验。此外, 为了获得细胞毒实验的靶细胞, 本文还采用脂质体介导质粒 pcDNA3.1/S 转染黑色素瘤细胞 B16, 通过 G418 筛选稳定克隆, 并用 RT-PCR, Western blots 以及免疫荧光染色证实 N 蛋白在胞浆中表达。淋巴细胞增殖实验表明, Hsp70-NP, NP 组小鼠脾淋巴细胞均能够对体外抗原刺激产生增殖反应, 而 Hsp70-NP 组的增殖指数明显高于 NP 免疫组。细胞毒实验结果表明, LDH 的释放具有效应细胞依赖性, Hsp70-NP, NP 免疫组脾淋巴细胞均可以特异性杀伤靶细胞 B16-N, 而 Hsp70-NP 免疫组的杀伤率显著高于 NP 免疫组。实验结果显示, Hsp70 可以增强 NP 诱导产生特异性 CTL 的能力。本研究结果为进一步设计基于 NP 的合成肽疫苗或基因疫苗提供了重要实验依据。

关键词: 热休克蛋白(HSP); 汉滩病毒核蛋白; 转染; 细胞毒性 T 淋巴细胞

中图分类号: R373

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2006)04-0339-04

由汉坦病毒(*Hantaviruses*, HV)引起的肾综合征出血热严重危害着我国人民的身体健康。现有的用于出血热防治的灭活疫苗主要诱导机体产生体液免疫, 难以获得持久的免疫力。而一般说来, 抗病毒免疫需要有效的由 CTL 和 Th1 介导的细胞

免疫。寻求更加安全、有效的疫苗一直是国内外学者多年研究的目标。目前, 热休克蛋白(HSPs)因其独特的分子伴侣和抗原提呈功能在肿瘤和传染病的免疫治疗研究中备受关注。研究者已证实从感染或转染细胞中提取的热休克蛋白抗原肽复

收稿日期: 2006-01-11, 修回日期: 2006-04-20

* 基金项目: 国家自然科学基金(30271186)

作者简介: 李 静(1975-), 女, 四川省籍, 博士研究生, 主要从事传染病的免疫治疗研究。

** 通讯作者: 杨守京(1965-), 男, 山东省籍, 教授, 第四军医大学病理学教研室。Corresponding author. Tel: 029-84773527
Email: yangsj@fmmu.edu.cn

合物 (Heat Shock Protein Peptide Complex, HSPPC) 能诱导特异性抗病毒 CTL 反应^[1-4]; 体外将 HSPs 与 HIV-1 p24, HBV, HPV16-E7, HSV, LCMV 或卵蛋白混合能有效刺激抗病毒体液保护和细胞免疫反应^[5-8]。而将 Hsp70 用于汉坦病毒的免疫研究尚未见报道。本研究利用原核表达的融合蛋白 Hsp70-NP 以及 NP 免疫小鼠, 观察比较淋巴细胞增殖指数及对靶细胞的杀伤效率, 以明确 Hsp70 是否具有增强 NP 诱导细胞免疫反应的能力。

1 材料与方法

1.1 实验材料

质粒 pcDNA3.1/S 由本室高娟硕士构建, 含有完整的汉坦病毒 76-118 株的核蛋白编码区基因。脂质体 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司; G418, CytoTox 96 检测试剂盒购自 Promega 公司; 新生小牛血清购自杭州四季青公司; 1640 购自 Gibco 公司; 细胞 RNA 提取试剂盒购自 U-gene 公司; 逆转录酶 AMV 购自 Promega 公司; 羊抗鼠 IgG-HRP, 羊抗鼠 IgG-FITC 购自中杉公司; 鼠 NP mAb (1A8) 由本校微生物教研室惠赠; 化学发光液为 Pierce 公司产品。其它所用配制各种液体的化学试剂均为分析纯或分子生物学纯级。

1.2 B16-N 稳定转染克隆的筛选

B16 细胞培养于含 10% 新生小牛血清的 1640 培养液, 37℃, 5%CO₂ 条件下。转染采用脂质体 Lipofectamine2000 介导的方法, 具体操作方法按照说明书进行。转染后 24 h 按 1:10 稀释传代, 次日加入 G418 终浓度为 800ng/mL 筛选。采用有限稀释法在 96 孔板内进行克隆化。

1.3 RT-PCR 检测

对 10 个克隆的细胞进行总 RNA 提取, 具体操作方法按照说明书进行。采用逆转录酶 AMV (Promega) 从总 RNA 中转录出 cDNA 并进行 PCR 扩增。引物包括 S 基因全长, 设计如下: P1: 5' GC GAA TTC ATG GCA ACT ATG GAG GAA TTA C 3' P2: 5' GC CTC GAG TTA GAG TTT CAAAG G CTC TTG G 3'。

1.4 Western blot 检测

分别收集同样 10 个克隆的细胞 1×10^7 , 加入蛋白上样缓冲液, 100℃ 煮沸 5min, 离心后进行 SDS-PAGE。Western blot: 一抗为鼠 NP mAb (1A8, 1:4000); 二抗为羊抗鼠 IgG-HRP (1:5000)。

1.5 免疫荧光检测

制备细胞爬片, 4% 多聚甲醛固定。一抗为鼠 NP mAb (1A8, 1:2000); 二抗为羊抗鼠 IgG-FITC (1:64)。

1.6 蛋白制备

融合蛋白 Hsp70-NP, 蛋白 NP 以及蛋白 Hsp70 的原核表达及分离纯化详见另文。分离的蛋白 4℃ PBS 透析 48h, Bradford 法测定蛋白含量, 分别采用 PBS 调整蛋白浓度: Hsp70-NP 蛋白浓度为 89μg/mL; NP 蛋白浓度为 73μg/mL; Hsp70 蛋白浓度为 96μg/mL。

1.7 动物免疫

选用 6-8 周的 C57/BL6 雌性小鼠, 由本校实验动物中心提供。采用微量免疫法将三种纯化蛋白 Hsp70-NP, NP, Hsp70 按 200pmol/只分别滴在 NC 膜上, 晾干并剪成小条。实验分成 3 组, 每组 5 只。将上述 NC 膜条卷起, 包埋于小鼠一侧后肢腹股沟皮下。设对照组: PBS 组, NC 膜免疫组。每隔 2 周免疫 1 次, 共免疫 3 次。第二次 NC 膜埋于另一侧后肢腹股沟皮下, 第三次免疫直接将蛋白腹腔注射。第三次免疫后采用淋巴细胞分离液分离脾淋巴细胞。

1.8 特异性淋巴细胞增殖功能的检测

制备小鼠脾细胞悬液 1×10^6 /mL 加入 96 孔板, 200 μL/孔, 用纯化的 NP 进行刺激 (终浓度为 10 μg/mL), 每样本做 3 个复孔。37℃, 5%CO₂ 孵育 68h, 加入四甲基偶氮唑盐 (MTT) 溶液 (5 mg/mL) 20 μL/孔, 37℃, 5%CO₂ 孵育 4h, 弃孔内培养上清, 加入 DMSO 150 μL/孔, 振荡 10min, 测定各孔 OD_{490nm} 值。设空白对照刺激。增殖指数: 实验组抗原刺激 OD_{490nm} 值/实验组空白对照 OD_{490nm} 值。

1.9 细胞毒 T 淋巴细胞杀伤功能检测 (CTL 试验)

采用乳酸脱氢酶 (LDH) 法, 选用 CytoTox 96, PROMGA 试剂盒。具体操作步骤按说明书进行。实验组、靶细胞自发释放组、效应细胞自发释放组的 OD 值均需减去培养液背景 OD 值。靶细胞最大释放孔需减去体积校正孔的 OD 值。

$$\text{杀伤率 (\%)} = \frac{\text{实验组 OD} - \text{效应细胞自发 OD} - \text{靶细胞自发 OD}}{\text{靶细胞最大 OD} - \text{靶细胞自发 OD}} \times 100\%$$

2 结果

2.1 B16-N 稳定转染克隆的鉴定

用 RT-PCR 鉴定 G418 筛选出的 10 个细胞克隆中 NP mRNA 水平表达情况。结果有 6 个细胞克隆可以扩增出 1.3kb 片段。用 Western blot 检测进一步这 6 个细胞克隆 NP 蛋白水平表达情况。结果有 4 个细胞克隆表达能与 mAb 1A8 特异性结合的蛋白, 证实为 NP。最后通过免疫荧光观察到 NP 在细胞浆表达 (图 1, 图 2, 图 3)。

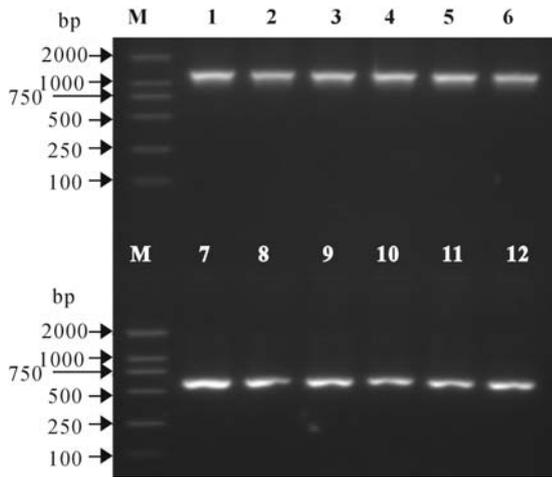


图1 B16-N RT-PCR 鉴定结果

Fig.1 The RT-PCR analysis of B16-N

M, DL2000 DNA Marker; 1-6, PCR product of NP from 6 clones; 7-12, PCR product of β -actin.

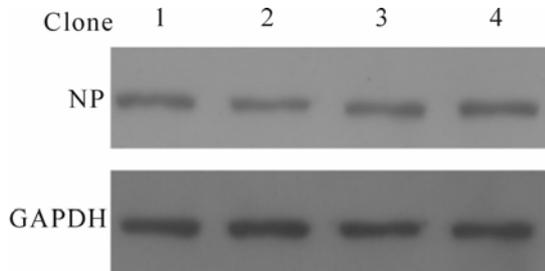


图2 B16-N Western blot 鉴定结果

Fig.2 The Western blot analysis of B16-N

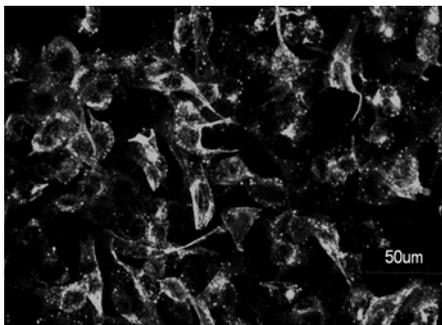


图3 B16-N 免疫荧光染色结果

Fig.3 The immunofluorescence of B16-N

2.2 淋巴细胞增殖功能检测结果

Hsp70-NP 组和 NP 组小鼠脾淋巴细胞对 NP 的刺激均有明显增殖, 而且 Hsp70-NP 组的增殖指数 $SI=7.71\pm 0.882$ 明显高于 NP 组 $SI=4.70\pm 0.65$ 。Hsp70 组, PBS 组, NC 膜免疫组对 NP 的刺激都没有明显增殖 (图 4)。

2.3 特异性细胞毒 T 淋巴细胞功能检测结果

实验结果表明, 随着 E:T 比值的增大, 效应细胞对靶细胞的杀伤力也增大。Hsp70-NP 组小鼠在 E:T 为 5:1, 10:1, 20:1 时其杀伤效率分别为

$36.94\%\pm 4.57\%$, $42.14\%\pm 1.02\%$, $58.22\%\pm 2.79\%$, 均高于 NP 组 $17.56\%\pm 3.2\%$, $20.90\%\pm 2.47\%$, $25.03\%\pm 1.80\%$ 。而 Hsp70, PBS 和 NC 膜免疫组小鼠脾淋巴细胞对 B16-N 细胞无杀伤功能 (图 5)。

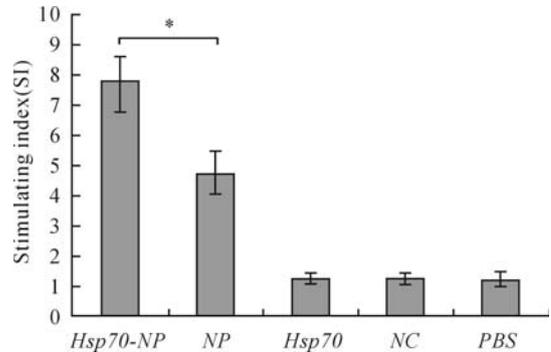


图4 小鼠脾细胞对汉滩病毒 NP 的增殖反应指数

Fig.4 The average stimulation indexes of splenocytes to HTNV NP

* $p<0.05$

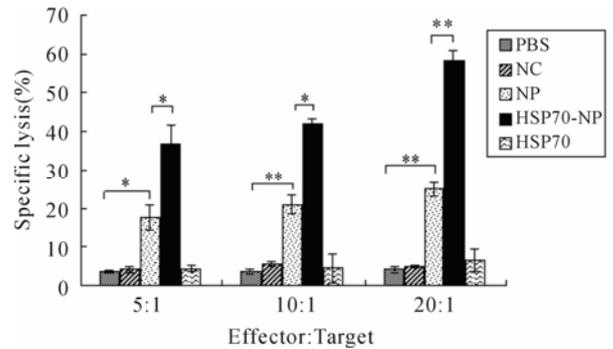


图5 不同 E:T 比值测定的实验鼠 CTL 特异性杀伤结果

Fig.5 The specific CTL activity of vaccinated mice detected by different E:T ratios.

** $p<0.01$, * $p<0.05$).

3 讨论

本研究首次用 Hsp70-NP 融合蛋白进行了动物免疫研究, 结果发现与单独病毒蛋白 HTNV NP 免疫相比, Hsp70-NP 融合蛋白可显著增强 HTNV NP 特异性的细胞免疫反应。淋巴细胞增殖实验表明, Hsp70-NP, NP 组小鼠脾淋巴细胞均能够对体外抗原刺激产生增殖反应, 而 Hsp70-NP 组的增殖指数明显高于 NP 免疫组。采用非放射性的 LDH 释放实验检测小鼠脾淋巴细胞对靶细胞 B16-N 的杀伤作用, 结果显示 Hsp70-NP 融合蛋白免疫小鼠的脾淋巴细胞对 B16-NP 的杀伤作用明显增强。以上结果表明, Hsp70-NP 融合蛋白能够增强 HTNV NP 特异性的细胞免疫反应。

大多数外源性抗原进入 MHC II 类分子途径, 激活 $CD4^+$ T 细胞反应, 但是 HSP70 能够进入 MHC I 类分子递呈途径, 诱导机体产生特异性的 $CD8^+$ T

细胞反应。将外源性抗原传递进入内源性抗原加工途径可能是 HSPs 的一种特殊功能, 主要是通过吞噬细胞、树突状细胞等具有类似功能的抗原提呈细胞 (APC) 上 HSPs 的受体来进行的^[9-11]。对于 Hsp70-NP 融合蛋白增强 HTNV NP 特异性细胞免疫反应的分子机制尚不清楚, 我们推测如下: 在抗原提呈过程中, Hsp70 作为抗原载体, 向表达 CD91 的 APC 细胞提呈与之结合的 HTNV NP 抗原。HTNV NP 在细胞内由 gp96 进行降解或通过 ATP 依赖的机制释出肽分子, 后者进入内质网腔, 与巨噬细胞的 gp96 结合, 经内源性 MHC I 类途径, 激活针对 HTNV NP 的 CD8⁺ T 细胞亚群, 从而诱发特异性的细胞免疫反应。近来研究表明, Hsp70 也能够通过 MHC II 类分子递呈途径, 增强机体的特异性 CD4⁺ T 细胞反应^[12-15]。Hsp70 增强的特异性细胞免疫反应究竟是通过 CD4⁺ 还是 CD8⁺ T 细胞来实现, 与 Hsp70 携带的抗原有关。而本实验中, Hsp70-NP 融合蛋白是通过 MHC I 类还是 MHC II 类分子递呈途径, 或者同时通过者两条途径, 增强了 HTNV NP 特异性细胞免疫, 尚有待进一步实验研究。

此外, 本实验还成功建立了稳定表达 HTNV-N 蛋白的小鼠黑色素瘤细胞系 B16-N 细胞系, 分别从 mRNA 水平, 蛋白质水平和细胞水平证实了 HTNV S 基因的稳定表达。对于一直受缺乏实验动物模型和细胞免疫反应靶细胞困扰的出血热疫苗研究来说, B16-N 细胞的建立无疑为今后的研究奠定了物质基础。而 Hsp70-NP 融合蛋白能够增强诱导 HTNV NP 特异性的细胞免疫反应的证实, 为今后研究以 Hsp70 为载体和 NP 为靶抗原的 HTNV 免疫治疗提供了实验依据。

References

- [1] Blachere N E, Li Z, Chandawarkar R Y, *et al.* Heat shock protein-peptide complexes, reconstituted in vitro, elicit peptide-specific cytotoxic T lymphocyte response and tumor immunity [J]. *J Exp Med*, 1997, 186 (8): 1315-22.
- [2] Srivastava P K, Udono H, Blachere N E, Li Z. Heat shock proteins transfer peptides during antigen processing and CTL priming [J]. *Immunogenetics*, 1994, 39 (2): 93-8.
- [3] Tamura Y, Peng P, Liu K. Immunotherapy of tumors with autologous tumor-derived heat shock protein preparations [J]. *Science*, 1997, 278 (5335): 117-20.
- [4] Udono H, Srivastava P K. Heat shock protein 70-associated peptides elicit specific cancer immunity [J]. *J Exp Med* 1993; 178 (4): 1391-6.
- [5] SenGupta D, Norris P J, Suscovich T J, *et al.* Heat shock protein-mediated cross-presentation of exogenous HIV antigen on HLA class I and class II [J]. *J Immunol*, 2004, 173 (3): 1987-93.
- [6] Li X, Yang X, Li L, Liu H, Liu J. A truncated C-terminal fragment of Mycobacterium tuberculosis HSP70 gene enhanced potency of HBV DNA vaccine [J]. *Vaccine*, 2006, 24 (16): 3321-31.
- [7] Peng M, Chen M, Ling N. Novel vaccines for the treatment of chronic HBV infection based on mycobacterial heat shock protein 70 [J]. *Vaccine* 2006, 24 (7): 887-96.
- [8] Pack C D, Kumaraguru U, Suvas S. Heat-shock protein 70 acts as an effective adjuvant in neonatal mice and confers protection against challenge with herpes simplex virus [J]. *Vaccine*, 2005, 23 (27): 3526-34.
- [9] Srivastava P. Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity [J]. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2 (3):185-94.
- [10] Srivastava P. Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: chaperoning of the innate and adaptive immune responses [J]. *Annu Rev Immunol*, 2002, 20: 395-425.
- [11] Suto R, Srivastava P K. A mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein-chaperoned peptides [J]. *Science*, 1995, 269 (5230): 1585-1588.
- [12] Haug M, Dannecker L, Schepp C P, *et al.* The heat shock protein Hsp70 enhances antigen-specific proliferation of human CD4+ memory T cells [J]. *Eur J Immunol*, 2005, 35 (11): 3163-3172.
- [13] Roth S, Willcox N, Rzepka, Melchers I. Major differences in antigen-processing correlate with a single Arg71<-->Lys substitution in HLA-DR molecules predisposing to rheumatoid arthritis and with their selective interactions with 70-kDa heat shock protein chaperones [J]. *J Immunol*, 2002, 169 (6): 3015-3020.
- [14] Mycko M P, Cwiklinska H, Szymanski J, *et al.* Inducible heat shock protein 70 promotes myelin autoantigen presentation by the HLA class II [J]. *J Immunol*, 2004, 172 (1): 202-213.
- [15] Tobian A A, Canaday D H, Harding C V. Bacterial heat shock proteins enhance class II MHC antigen processing and presentation of chaperoned peptides to CD4+ T cells [J]. *J Immunol*, 2004, 173 (8): 5130-5137.