

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.17.002

文章编号: 1005-8982(2019)17-0006-05

热休克蛋白 65 对小鼠溃疡性 结肠炎的作用机制研究 *

李小余, 王莎, 董颖, 马旭东, 王伟伟, 韩江余, 邵圣文

(湖州师范学院医学院 微生物与免疫学研究所, 浙江 湖州 313000)

摘要: **目的** 探讨热休克蛋白 65 (HSP65) 对小鼠溃疡性结肠炎 (UC) 的作用及机制。**方法** 选择 C57BL/6 小鼠, 应用葡聚糖硫酸钠法复制 UC 模型。6 只正常小鼠为正常对照组 (A 组), 48 只 UC 小鼠随机分成模型对照组 (B 组)、低剂量组 (C 组)、中剂量组 (D 组) 及高剂量组 (E 组), 每组 12 只。A 组和 B 组小鼠灌胃给予磷酸盐缓冲液 (PBS), C 组、D 组、E 组小鼠分别灌胃给予 HSP65, 剂量分别是 0.5、2.5 及 5.0 mg/kg 体重。隔天灌胃 1 次, 共 7 次, 末次灌胃 2 d 后, 麻醉处死小鼠。计算小鼠疾病活动指数 (DAI)。取小鼠结肠中段组织, HE 染色镜检并计算组织病理评分。取小鼠血液、脾脏和肠系膜淋巴结, 分离有核细胞后采用流式细胞术检测调节性 T 细胞 (Treg) 活化情况。**结果** HSP65 蛋白治疗 UC 小鼠 14 d, B、C、D 及 E 组小鼠的 DAI 分别为 (3.66±0.39)、(3.07±0.15)、(1.50±0.43) 和 (0.83±0.31), C 组、D 组、E 组小鼠 DAI 变化趋势有差异 ($P < 0.05$); C 组、D 组和 E 组小鼠结肠组织病理评分均低于 B 组小鼠 ($P < 0.05$); E 组小鼠结肠组织病理评分低于 C 组和 D 组 ($P < 0.05$), D 组小鼠结肠组织病理评分低于 C 组 ($P < 0.05$); 与未治疗的 B 组比较, C 组、D 组、E 组小鼠肠系膜淋巴结中的 Treg 细胞比例均高于 B 组 ($P < 0.05$)。**结论** HSP65 蛋白可以缓解小鼠溃疡性结肠炎, 其机制可能是通过激活小鼠肠系膜淋巴结中的静止 Treg 细胞, 使得活化 Treg 细胞比例增加, 再通过活化 Treg 细胞发挥抑制肠道炎症反应作用。

关键词: 结肠炎, 溃疡性; 热休克蛋白 65; 调节性 T 细胞

中图分类号: R574

文献标识码: A

Therapeutic effect of heat shock protein 65 on ulcerative colitis in mice*

Xiao-yu Li, Sha Wang, Ying Dong, Xu-dong Ma, Wei-wei Wang, Jiang-yu Han, Sheng-wen Shao
(Institute of Microbiology and Immunology, School of Medicine, Huzhou University,
Huzhou, Zhejiang 313000, China)

Abstract: Objective To investigate the therapeutic effect and mechanism of heat shock protein 65 (HSP 65) on ulcerative colitis (UC) in mice. **Methods** UC disease model was established in C57BL/6 mice by dextran sulphate sodium salt (DSS). UC mice were randomly divided into model control group (group B), low-dose group (group C), medium dose group (group D) and high-dose group (group E). Mice in group C, group D and group E were respectively given 0.5 mg, 2.5 mg and 5.0 mg HSP 65 protein/kg body weight, respectively (once every other day for 7 times by gavage). Mice in normal control group (group A) and model control group (group B) received PBS solution by gavage. The mice were anesthetized and executed 2 days after the last gavage. The disease activity index (DAI) of mice in each group were analyzed. The histopathological score of colons (HSC) were examined by HE staining.

收稿日期: 2019-03-15

* 基金项目: 浙江省公益性技术应用研究实验动物计划项目 (No: 2016C37126)

[通信作者] 邵圣文, E-mail: Shashe98@163.com

After the nuclear cells were isolated from blood, spleen and mesenteric lymph nodes, the ratio of activated regulatory T cells (Treg) was detected by flow cytometry. **Results** DAI of mice in group B, group C, group D and group E were (3.66 ± 0.39) , (3.07 ± 0.15) , (1.50 ± 0.43) and (0.83 ± 0.31) , respectively. DAI was decreased with treatment of HSP 65 in dose dependent manner ($P < 0.05$). HSC of mice was improved with treatment of HSP 65 when compared with that in group B ($P < 0.05$). Furthermore, HSC of mice was improved obviously in group E when compared with that in group C and group D in dose dependent manner ($P < 0.05$). Proportion of Treg cells in the mesenteric lymph nodes of mice in group C, group D and group E were all higher than that in group B ($P < 0.05$). **Conclusions** The HSP 65 protein can promote the remission of ulcerative colitis in mice potentially through activating the dormant Treg cells of mesenteric lymph nodes and decreasing inflammatory response.

Keywords: ulcerative colitis; heat shock protein 65; regulatory T cells

炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 在临床上包括 2 个独立的疾病, 即溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 和克罗恩病 (Crohn's disease)^[1]。目前关于 IBD 的病因尚不很清楚, 较为普遍的看法是遗传易感性、免疫异常、肠道菌群共同参与 IBD 发病。UC 发病在我国逐年呈上升趋势^[2-3]。有学者认为, UC 属于自身免疫病范畴, 患者自身免疫反应异常是 UC 发病的重要因素^[4]。UC 疾病具有易复发、易慢性化的特点, 在临床上易演变成慢性迁延性疾病, 给临床治疗带来困难。目前还没有完全治愈 UC 的药物。关于 UC 治疗药物和方法的研究一直为临床所重视。有研究指出, 热休克蛋白 (heat shock protein, HSP) 家族成员之一的 HSP65 蛋白具有免疫调节功能^[5]。本研究探讨 HSP65 蛋白是否通过调节性 T 细胞 (regulatory T cells, Treg) 对 UC 小鼠产生免疫调节作用, 从而抑制小鼠肠道炎症反应, 使得小鼠 UC 疾病得以缓解, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 动物与试剂

68 只 C57BL/6 小鼠, 雄性, 8 周龄, 体重 18 ~ 20 g, 合格证编号 201703199, 购自常州卡文斯实验动物有限公司 [许可证 SCXK (苏) 2016-0010]。PE 标记的抗小鼠 CD4 单抗 (cat100407)、APC 标记的抗小鼠 FoxP3 单抗 (cat137221)、PE/Cy7 标记的抗小鼠 CD25 单抗 (cat101915)、FITC 标记的抗小鼠 CD3 单抗 (cat100305) 为美国 Biologend 公司产品。HSP65 蛋白为本实验室自行制备。细胞流式分析采用美国 BD 公司的 FACS Canto 流式细胞仪, 数据分析应用 FlowJo 软件。

1.2 UC 小鼠模型复制

随机选取 62 只 C57BL/6 小鼠, 适应性饲养 3 d 后开始模型复制, 每天给予 3.5% 葡聚糖硫酸钠 (DSS,

相对分子量 36 ~ 50 kD) 的灭菌水自由饮用, 连续饮用 7 d, 第 8 天起按无特定病原体 (SPF) 级要求继续饲养 14 d, 从存活小鼠中随机取 2 只处死, 取结肠组织行病理检查, 结合小鼠 UC 疾病活动指数 (disease activity index, DAI) 评分, 验证 UC 小鼠模型复制成功。

1.3 HSP65 治疗 UC 小鼠

6 只健康小鼠设为正常对照组 (A 组)。48 只 UC 小鼠随机分成 4 组 (各 12 只): UC 模型对照组 (B 组)、低剂量组 (C 组)、中剂量组 (D 组) 及高剂量组 (E 组)。A 组和 B 组灌胃给予磷酸盐缓冲液 (PBS), C 组、D 组、E 组小鼠分别灌胃给予 HSP65 0.5、2.5 及 5.0 mg/kg。每隔 1 天灌胃 1 次, 共 7 次。灌胃期间, 按 SPF 要求常规饲养, 末次灌胃后继续饲养 2 d。每天观察记录各组小鼠体重和大便性状、便血情况, 参照文献计算 DAI^[6]。

1.4 小鼠检测样品取材

末次灌胃后饲养 2 d, 腹腔注射氯胺酮后, 心脏取血处死小鼠。心脏穿刺取血后分离血清和血液有核细胞, 分离小鼠脾脏和肠系膜淋巴结, 分别置于无菌平皿中, 研碎后提取有核细胞; 距回盲部约 2 cm 处, 取结肠中段组织 2 块, 分别采用 4% 甲醛固定及 -80℃ 冰箱冷冻保存备用。

1.5 HE 染色检查及病理评分

结肠中段组织超薄切片后行 HE 染色, 光学显微镜检查病理学变化情况, 参照文献 [7] 进行结肠组织病理评分。

1.6 流式细胞术检测 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 细胞

小鼠脾细胞、淋巴结细胞分离: 组织用无菌毛玻璃片研磨 1 ~ 2 次, 200 目滤网过滤, 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清液; 加入 1 ml 预冷的红细胞裂解液, 冰上裂解 5 min, 70 μm 孔径细胞筛再次过滤, 1 500 r/min

离心 5 min, 弃上清液, PBS 洗涤细胞 2 次, 重悬细胞, 调整细胞浓度为 5×10^5 个/ml 待用。全血细胞处理: 向抗凝血加入 1 ml 预冷的红细胞裂解液, 冰上裂解 5 min, 其余处理步骤同脾细胞处理方法, 得到血液中的有核细胞。调节以上细胞浓度为 5×10^5 个/ml, 在冰上加入 PE 标记的 CD4 单抗, FITC 标记的 CD3 单抗, PE/Cy7 标记的 CD25 单抗, 4°C 避光孵育 30 min; 染色结束后, PBS 洗涤, 4% 多聚甲醛重悬细胞, 4°C 孵育 20 min; 0.1% 皂素 4°C 孵育 20 min, 细胞破膜; PBS 洗涤 2 次, 加入 APC 标记的 Foxp3 单抗, 4°C 孵育 20 min, 洗涤 2 次, 流式细胞仪收集数据进行分析: CD4⁺T 细胞数, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 细胞数, 计算 Treg 细胞数占 CD4⁺T 细胞数的比例。

1.7 统计学方法

数据分析采用 SPSS 16.0 软件。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较采用重复测量设计的方差分析, 组间比较采用 Dunnett T3 法, 独立测量数据两两比较采用独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠疾病活动指数

不同剂量 HSP65 治疗 UC 小鼠的 DAI 评分见表 1,

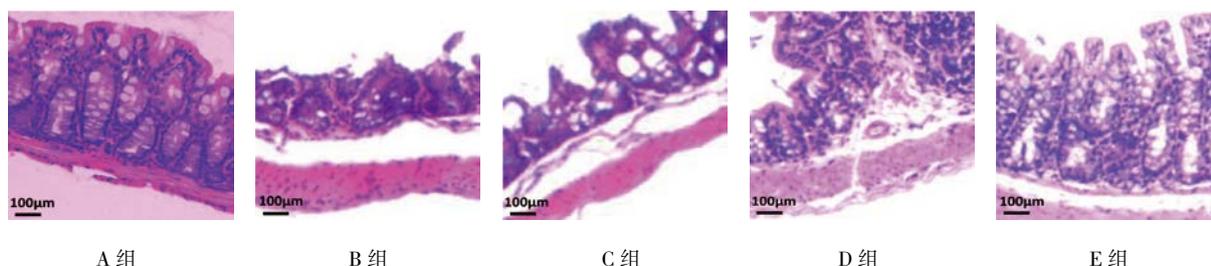


图 1 小鼠结肠组织病理检查结果 (HE $\times 100$)

的结肠组织病理评分分别为 (3.20 ± 0.42)、(1.80 ± 0.79) 及 (1.10 ± 0.57) 分, 均低于 B 组 (3.70 ± 0.48) 分 ($P < 0.05$); E 组小鼠的结肠组织病理评分低于 C、D 组 ($P < 0.05$), D 组小鼠结肠组织病理评分低于 C 组 ($P < 0.05$)。

2.3 小鼠血液、脾脏、淋巴结 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 表型的 Treg 细胞比例

HSP65 治疗 14 d 后, 各组小鼠的血液、脾脏以及肠系膜淋巴结中 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 表型的 Treg 细胞检测结果见表 2。①各组小鼠血液 Treg 细胞比例有差异

结果显示: ①不同时间点的小鼠 DAI 评分有差异 ($F = 374.465$, $P = 0.000$); ②各组小鼠 DAI 评分有差异 ($F = 57.057$, $P = 0.000$), HSP65 治疗 UC 小鼠 14 d 后, D 组和 E 组小鼠 DAI 评分均低于 B 组小鼠 ($P < 0.05$), E 组小鼠 DAI 评分低于 D 组 ($P < 0.05$); ③ HSP65 治疗 UC 小鼠 14 d 后, 各组小鼠 DAI 评分变化趋势有差异 ($F = 64.895$, $P = 0.000$)。

表 1 各组小鼠 DAI 评分的比较 ($n = 12$, $\bar{x} \pm s$)

组别	第 1 天	第 14 天
B 组	3.84 ± 0.19	3.66 ± 0.39
C 组	3.87 ± 0.18	3.07 ± 0.15
D 组	3.78 ± 0.21	1.50 ± 0.43
E 组	3.82 ± 0.31	0.83 ± 0.31

2.2 小鼠结肠组织病理改变情况

A 组小鼠结肠组织结构正常; B 组小鼠结肠组织黏膜结构破坏严重, 隐窝结构破坏, 黏膜下和肌肉层大量细胞浸润; C 组小鼠结肠组织黏膜结构有中度损伤, 黏膜下和肌肉层有中等程度细胞浸润; D 和 E 组, 小鼠结肠组织结构基本正常, 黏膜下和肌肉层有少量细胞浸润。见图 1。

HSP65 治疗 UC 小鼠 14 d 后, 各组小鼠结肠病理评分有差异 ($F = 68.641$, $P = 0.000$); C、D 及 E 组小鼠

($F = 4.678$, $P = 0.006$), 与 A 组比较, B、C、D、E 组小鼠血液 Treg 细胞比例均降低 ($P < 0.05$); ②各组小鼠脾脏 Treg 细胞比例有差异 ($F = 5.786$, $P = 0.002$), 与 A 组比较, B、C、D、E 组小鼠脾脏 Treg 细胞比例均降低 ($P < 0.05$); ③各组小鼠肠系膜淋巴结 Treg 细胞比例有差异 ($F = 8.579$, $P = 0.000$), 与 A 组比较, B、C 组小鼠肠系膜淋巴结 Treg 细胞比例降低 ($P < 0.05$), 与 B 组比较, C、D、E 组小鼠肠系膜淋巴结 Treg 细胞比例升高 ($P < 0.05$)。

表 2 各组小鼠血液、脾脏、淋巴结中的 Treg 细胞比例比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	n	血液 Treg 比例	脾脏 Treg 比例	淋巴结 Treg 比例
A 组	6	5.29 ± 1.78	10.46 ± 1.21	10.96 ± 1.19
B 组	12	3.06 ± 0.81 ^①	7.52 ± 1.10 ^①	6.29 ± 1.41 ^①
C 组	12	3.15 ± 0.97 ^①	8.13 ± 1.05 ^①	9.12 ± 0.97 ^{①②}
D 组	12	3.32 ± 0.74 ^①	8.65 ± 0.91 ^①	9.79 ± 1.52 ^②
E 组	12	3.20 ± 0.65 ^①	8.83 ± 1.30 ^①	10.07 ± 2.10 ^②

注: ①与 A 组比较, $P < 0.05$; ②与 B 组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

HSP 家族蛋白广泛存在于真核及原核生物细胞中。一般而言, 当细胞处于应激状态时, HSP 家族蛋白启动表达, 发挥保护细胞之功能。HSP 家族蛋白成员众多, 包括 HSP60、HSP70、HSP90 等家族蛋白。HSP60 家族蛋白成员包括哺乳动物来源的 HSP60 蛋白和结核杆菌 HSP65 蛋白, 两者高度同源, 能够发生交叉免疫反应^[8]。国外学者发现, 在 UC 患者结肠黏膜组织内, 包括 HSP60、HSP10、HSP70、HSP90 蛋白在内的多种 HSP 家族蛋白异常增多, 这些异常增多的 HSP 家族蛋白通过分子模拟机制激活机体免疫系统, 诱导机体产生针对结肠黏膜组织的异常自身免疫应答, 造成结肠黏膜组织发生炎症反应, 患者则出现相应的 UC 临床症状^[9-10]。

已有研究表明, 口服 HSP60 蛋白或 HSP65 蛋白, 可以缓解自身免疫性疾病^[5]。有学者报道, 对 ApoE 基因敲除小鼠, 通过高脂饮食饲养复制动脉粥样硬化模型, 实验组小鼠在高脂饮食同时口服给与 HSP60 蛋白, 实验组小鼠大动脉根部的粥样斑块大小比模型组减小, 实验组小鼠血浆 IL-10 比模型组增加, 实验组小鼠血浆 II 型干扰素 (IFN- γ) 比模型组减少, 表明口服 HSP60 蛋白可以使小鼠动脉内的粥样斑块减小, 同时可以抑制小鼠体内的炎症反应^[11]。本研究结果证实, HSP65 蛋白可以改善 UC 小鼠的疾病活动指数, 使 UC 小鼠病变的结肠组织结构基本恢复正常。本研究还观察到, HSP65 蛋白对 UC 小鼠的治疗效应跟 HSP65 蛋白之间存在剂量依赖性。考虑到治疗成本和依从性, 笔者建议治疗方案为: HSP65 蛋白以 2.5 mg/kg 体重的剂量灌胃 UC 小鼠, 1 次/d, 间隔 1 d, 连续 7 次。

Treg 细胞属于 CD4⁺T 细胞亚群, 主要通过抑制效应 T 细胞的免疫活性而发挥负向免疫调节作用, 在维

持免疫耐受、抑制过度炎症反应和免疫病理方面有重要作用^[12-13]。Treg 细胞包括 2 种表型, 即静止 Treg 细胞和活化 Treg 细胞。核转录因子叉头蛋白 (forkhead box p3, Foxp3) 是活化 Tregs 细胞的特异性标志^[13]。当静止 Treg 细胞开始表达 Foxp3, 细胞转变成活化 Treg 细胞, 细胞表型也由静止 Treg 细胞 (CD4⁺CD25⁻ 表型) 转变为活化 Treg 细胞 (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 表型)。活化 Treg 细胞能够分泌抑制性细胞因子白细胞介素 -10 (IL-10) 和转化生长因子 - β (TGF- β), 抑制效应性 T 细胞的功能, 进而阻止或减轻炎症反应^[13]。

本研究显示, UC 小鼠给予 HSP65 蛋白后, 小鼠血液和脾脏组织中的活化 Treg 细胞比例未发生改变, 但是小鼠肠系膜淋巴结中的活化 Treg 细胞比例增加。由此, 笔者认为, HSP65 蛋白是通过诱导 UC 小鼠肠系膜淋巴结中的活化 Treg 细胞比例增加来实现。接下来的问题是: UC 小鼠给予 HSP65 后, 肠系膜淋巴结中增多的活化 Treg 细胞来源是哪里? 由于小鼠血液和脾脏组织中的活化 Treg 细胞比例未发生明显改变, 这就排除肠系膜淋巴结中增多的活化 Treg 细胞是从血液和脾脏组织迁移而来的可能。那么, 肠系膜淋巴结中增多的活化 Treg 细胞很可能是由肠系膜淋巴结中的静止 Treg 细胞转化而来。

总之, 采用灌胃方式给予 HSP65 蛋白可以缓解小鼠溃疡性结肠炎, 其中可能的机制是: HSP65 蛋白通过激活小鼠肠系膜淋巴结中的静止 Treg 细胞, 使之转变成活化 Treg 细胞, 进而增加小鼠肠系膜淋巴结中的活化 Treg 细胞比例, 随后通过活化 Treg 细胞分泌抑制性细胞因子, 从而发挥抑制肠道炎症反应作用。

参 考 文 献:

- [1] BRESSLER B, MARSHALL J K, BERNSTEIN C N, et al. Clinical practice guidelines for the medical management of nonhospitalized ulcerative colitis: the Toronto consensus[J]. Gastroenterology, 2015, 148(5): 1035-1058.
- [2] YANG H, LI Y M, WU W, et al. The incidence of inflammatory bowel disease in Northern China: a prospective population-based study[J]. PLoS One, 2014, 9(7): e101296.
- [3] NG W K, WONG S H, NG S C. Changing epidemiological trends of inflammatory bowel disease in Asia[J]. Intestinal Research, 2016, 14(2): 111-119.
- [4] DANESE S, FIOCCHI C. Ulcerative colitis[J]. N Engl J Med, 2011, 365(18): 1713-1725.
- [5] GOMES-SANTOS A C, de OLIVEIRA R P, MOREIRA T G, et al. Hsp65-producing lactococcus lactis prevents inflammatory intestinal disease in mice by IL-10-and TLR2-dependent pathways[J]. Front Immunol, 2017, 8(30): 1-12.

- [6] MURTHY S N, COOPER H S, SHIM H, et al. Treatment of dextran sulfate sodium-induced murine colitis by intracolonic cyclosporin[J]. *Dig Dis Sci*, 1993, 38(9): 1722-1734.
- [7] NEURATH M F, FUSS I, KELSALL B L, et al. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice[J]. *J Exp Med*, 1995, 182(5): 1281-1290.
- [8] DOIMO N T, ZÁRATE-BLADÉS C R, RODRIGUES R F, et al. Immunotherapy of tuberculosis with *Mycobacterium leprae* Hsp65 as a DNA vaccine triggers cross-reactive antibodies against mammalian Hsp60 but not pathological autoimmunity[J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2014, 10(5): 1238-1243.
- [9] TOMASELLO G, RODOLICO V, ZERILLI M, et al. Changes in immunohistochemical levels and subcellular localization after therapy and correlation and colocalization with CD68 suggest a pathogenetic role of Hsp60 in ulcerative colitis[J]. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2011, 19(6): 552-561.
- [10] ABOU E, AZM A R, YOUSEF M, et al. Colonic mucosal expression of heat-shock proteins may have a potential prognostic value in ulcerative colitis[J]. *Arab J Gastroenterol*, 2015, 16(1): 20-24.
- [11] HU Y, CHEN Z, JIANG L, et al. Effects of oral and subcutaneous administration of HSP60 on myeloid-derived suppressor cells and atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 498(4): 701-706.
- [12] CAMPBELL D J. Control of regulatory T cell migration, function, and homeostasis[J]. *J Immunol*, 2015, 195(6): 2507-2513.
- [13] TAO J H, CHENG M, TANG J P, et al. Foxp3, regulatory T cell, and autoimmune diseases[J]. *Inflammation*, 2017, 40(1): 328-339.

(王荣兵 编辑)