

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2012.00145

## 重组 tHsp70 对罗非鱼腹腔巨噬细胞免疫功能的影响

陈明<sup>1,2</sup>, 王秋华<sup>2</sup>, 王瑞<sup>1</sup>, 甘西<sup>1</sup>, 李莉萍<sup>1</sup>, 雷爱莹<sup>1</sup>, 梁万文<sup>1</sup>, 黄维义<sup>2</sup>

1. 广西水产研究所, 广西水产遗传育种与健康养殖重点实验室, 广西 南宁 30021;

2. 广西大学 动物科学技术学院, 广西 南宁 30005

**摘要:** 利用酵母分泌表达的重组罗非鱼热休克蛋白 70(heat shock protein 70 of tilapia, tHsp70), 与海豚链球菌 (*Streptococcus iniae*) 抗原在体外非共价结合形成 tHsp70-抗原复合物, 通过对体外培养的腹腔巨噬细胞 NO 释放水平、吞噬活性及免疫相关基因表达进行检测, 研究 tHsp70 对罗非鱼细胞免疫功能的影响。结果显示, tHsp70 在体外能够与海豚链球菌菌体、胞外分泌物(extracellular bacteria products, ECP)结合形成 tHsp70-抗原复合物; tHsp70-抗原复合物和 tHsp70 均可显著增强罗非鱼腹腔巨噬细胞的贴壁和生长、NO 释放及吞噬活性( $P < 0.01$ ), 而 ECP 单独作用可引起腹腔巨噬细胞死亡, 显著降低腹腔巨噬细胞 NO 释放( $P < 0.05$ ), 但 tHsp70 与 ECP 体外非共价结合后可减轻 ECP 对巨噬细胞的损伤; tHsp70-抗原复合物和 tHsp70 作用于腹腔巨噬细胞, 白细胞介素 8(IL-8), 热休克蛋白 70(HSP70), CXC 趋化因子受体 4(CXCR4)和颗粒蛋白前体(PGRN)4 个基因的表达量均显著高于海豚链球菌抗原单独刺激和无刺激对照组( $P < 0.01$ )。研究表明 tHsp70 具有免疫增强和免疫佐剂的功能, 为开发罗非鱼链球菌病 Hsp70-肽疫苗提供了实验依据。

**关键词:** 热休克蛋白 70; 巨噬细胞; 免疫功能; 海豚链球菌; 疫苗

中图分类号: S94

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2012)01-0145-09

Hsp70s 是一组存在于真核及原核生物中高度保守的蛋白, 其家族成员在细胞质、线粒体、内质网中扮演分子伴侣的角色<sup>[1]</sup>。Hsp70s 通过循环式地与 ATP 结合及水解, 对帮助新生蛋白折叠或错误折叠蛋白重折叠以及蛋白进入内质网和线粒体起重要作用<sup>[2]</sup>。Hsp70 是 Hsp70s 家族的重要成员, 自 1986 年 Srivastava 发现 HSP70 具有肿瘤免疫原性以来, Hsp70 参与肿瘤免疫研究就成为 HSPs 家族研究的热点<sup>[3]</sup>。针对 HSP70 参与肿瘤免疫应答的分子机制, 研究者提出了许多观点, 最广为接受的观点为通过 MHC I 途径实现。胞质溶液中抗原经蛋白酶体降解后, 抗原多肽通过 ATP 依赖方式与 Hsp70 结合, 并转运至内质网膜上的抗原处理转运蛋白(transporter associated with anti-

gen processing, TAP), 再经 TAP 转运至内质网腔内。在转运过程中, 为了易于与 MHC I 类分子形成稳定的三聚体, 抗原多肽分子被进一步加工修剪, 然后被呈递至细胞表面<sup>[4]</sup>。当肿瘤细胞的 HSPs 制备物被注射入宿主体内时, HSP70-肽复合物通过抗原呈递细胞(antigen-presenting cells, APC)表面的 Hsp70 特异受体进入 APC, 一方面诱导 APC 分泌 IL-1、IL-2、TNF- $\alpha$  和 IFN 等细胞因子激活各种效应细胞杀伤肿瘤; 另一方面 APC 在细胞因子刺激作用下抗原呈递增强, 可被 CD<sup>8+</sup>T 细胞识别引起免疫应答<sup>[4]</sup>。抗原多肽通过 Hsp70 特异高效激活抗原递呈细胞(特别是树突状细胞)很可能是打破肿瘤发生中免疫耐受最有效的机制之一<sup>[5-6]</sup>。利用 Hsp70 这种有效递呈抗原及特异

收稿日期: 2011-06-08; 修订日期: 2011-09-08.

基金项目: 广西科学研究与技术开发课题(桂科攻 1123006-4); 罗非鱼产业技术体系岗位科学家经费项目.

作者简介: 陈明(1979-), 男, 博士研究生, 从事水产疫苗与免疫技术研究. E-mail: cm990919@163.com. 王秋华为并列第一作者.

通信作者: 梁万文, 研究员, 从事水生生物病害研究. E-mail: nlnww@126.com. 黄维义, 教授, 从事动物寄生虫免疫学研究. E-mail: wyhuang@gxu.edu.cn

激发细胞免疫反应等功能,近 20 年已大量开展了抗肿瘤<sup>[5-7]</sup>、病毒<sup>[8-9]</sup>、细菌<sup>[10]</sup>及寄生虫等病原<sup>[11-12]</sup>的 Hsp70 分子疫苗研究,并取得了较大突破。抗肿瘤 HSP70 分子疫苗已完成了 I、II 和 III 期临床试验<sup>[13-15]</sup>。然而,在抗病毒、细菌及寄生虫感染的 Hsp70 分子疫苗研究中,目前均是将 Hsp70(大多是利用原核生物如结核杆菌 Hsp70)与病原的某个抗原融合制备成疫苗,很少将 Hsp70 与病原体全部抗原肽结合设计疫苗。同时,目前所有 Hsp70 分子疫苗都是通过注射进行免疫接种,这种接种途径对某些动物(如野生动物、水生动物)的免疫不适用。

Hsp70 在肿瘤免疫中可以高效特异激活树突状细胞(dendritic cells, DC)和巨噬细胞等进行抗原的交叉呈递,进而促进细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocytes, CTL)等的细胞免疫反应,打破肿瘤发生中的免疫耐受屏障。受此启发,可通过打破罗非鱼消化道免疫耐受屏障,研发一种可以通过口服途径激发罗非鱼高水平系统免疫的链球菌疫苗。本研究利用毕赤酵母表达的 tHsp70 与海豚链球菌(*Streptococcus iniae*)胞外产物(ECP)和菌体(thallus)进行体外非共价结合,通过检测罗非鱼腹腔巨噬细胞对 Hsp70-抗原复合物产生的免疫反应评价 tHsp70 的免疫学功能,探索 tHsp70 在罗非鱼细胞免疫中是否具备免疫佐剂和免疫增强剂的功能,为后期研发基于 Hsp70 抗罗非鱼海豚链球菌病口服疫苗提供理论支撑。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

菌株 CMS005 和重组罗非鱼 Hsp70 由广西水产遗传育种与健康养殖重点实验室保存提供; HBSS、L-15 培养基为 GIBCO 产品; MS-222、squalene、ADP、ATP、肝素钠和台盼蓝染色液为 Sigma 产品; Trizol 为 Invitrogen 产品; SYBR® PrimeScript™ RT-PCR Kit II 为 TaKaRa 产品; percoll 和 BrdU Cell Proliferation Assay 为 GE 产品; NO 检测试剂盒为 Promega 产品。

### 1.2 腹腔巨噬细胞分离与培养

取雄性奥尼罗非鱼(*Oreochromis niloticus*♀×*O.aureus*♂)腹腔注射 250 μL 角鲨烯(squalene),正常饲养 48 h 后,100 mg/L 的 MS-222 麻醉,75% 酒精消毒体表。用连接有三通阀的注射器吸取预冷的 PBS 对腹腔进行冲洗,冲洗液收集于 45 mL 离心管中,300 g、4℃ 离心 10 min。吸去上清,细胞沉淀用预冷的 HBSS 重悬,300 g、4℃ 离心 10 min 洗涤 1 次。细胞重悬于 2 mL HBSS,加入 9 mL 灭菌三蒸水作用 20 s 破裂红细胞,立即加入 1 mL 10×HBSS。300 g、4℃ 离心 10 min,HBSS 洗涤 2 次,最后用 L-15 完全培养基(含 10% 罗非鱼血清、 $5\times 10^{-5}$  μmol/L β-巯基乙醇、100 IU/mL 氨苄青霉素、100 μg/mL 硫酸链霉素)重悬细胞。取适量细胞悬液,台盼蓝染色计数,瑞氏染色观察细胞状态。调整细胞密度为  $1.0\times 10^6$ /mL,加入 96 孔培养板,每孔 100 μL,28℃ 培养。

### 1.3 抗原及 tHsp70-抗原复合物制备

**1.3.1 抗原制备** -80℃ 保存的 CMS005 菌株接种于兔血平板,28℃ 培养 24 h。挑取单菌落接种于含 TSB 培养基 50 mL 的 250 mL 三角瓶,150 r/min,28℃ 振荡培养 24 h。加入甲醛使其最终浓度为 0.25%,150 r/min,28℃ 静止灭活 24 h。2 kD 超滤浓缩到原体积的 1/10,超滤产物 10 000 g 离心 10 min,分别获得菌体(thallus)和分子量大于 2 kD 的胞外产物(ECP)抗原。将菌体用 PBS 重悬,浓度调整为  $1.0\times 10^9$ /mL。

**1.3.2 tHsp70-抗原复合物制备** 取上述制备的 ECP 抗原(体积分别为 1 μL、10 μL、25 μL、50 μL)、菌体抗原 10 μL(浓度分别为  $1\times 10^9$ /mL、 $1\times 10^8$ /mL、 $1\times 10^7$ /mL、 $1\times 10^6$ /mL),分别加入 35 μL tHsp70(10 μg)混合,加 PBS 至 90 μL,再加入 10×结合反应液(10 mmol/L KCl,20 mmol/L MgCl<sub>2</sub>,1 mmol/L ADP)10 μL,37℃ 孵育 45 min。分别取 ECP-tHsp70 复合物 10 μL,thallus-tHsp70 复合物 10 μL 离心,取上清进行 SDS-PAGE 电泳。

### 1.4 巨噬细胞 NO 及吞噬活性检测

按 1.3 方法进行 tHsp70-thallus 复合物和

tHsp70-ECP 复合物的制备, 实验共设 12 个试验组: tHsp70-thallus 复合物组(菌体量均为  $1.0 \times 10^6$  cell), tHsp70 设 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  3 个浓度; tHsp70-ECP 复合物组(ECP 量均为 1  $\mu\text{g}$ ), tHsp70 设 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  3 个浓度; tHsp70 刺激组, tHsp 设 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  3 个浓度; 另设 thallus( $1.0 \times 10^6$  cell)、ECP(1  $\mu\text{g}$ )及无刺激物 3 个对照组, 每组设 3 个试验平行孔。将分离到的腹腔巨噬细胞培养于 96 孔板, 每孔 100  $\mu\text{L}$ (细胞个数约  $1 \times 10^5$ ), 培养 24 h, 吸走未贴壁细胞并加入新的培养基继续培养 48 h。吸去培养基上清, 加入 190  $\mu\text{L}$  新培养基及 10  $\mu\text{L}$  上述各种刺激物, 继续培养。于刺激后 24 h 和 48 h, 分别吸取 50  $\mu\text{L}$  培养上清液转入酶标板, 按 NO 检测试剂盒(Promega, USA)操作说明进行 NO 浓度标准曲线制作, 检测样品 NO 浓度。同时, 按巨噬细胞吞噬活性检测试剂盒(Jiancheng, Nanjin, China)说明, 对抗原刺激 48 h 后巨噬细胞吞噬活性进行检测。

## 1.5 免疫相关基因表达检测

**1.5.1 实验分组及设计** 实验分组与 1.4 相同, 于 tHsp70-ECP 复合物刺激巨噬细胞 24 h 后, 对细胞中 *CXCR4*、*PGRN*、*HSP70*、*IL-8* 这 4 个基因的表达进行定量检测。此外, 在 12、24、48 和 72 h 4 个时间点, 对 tHsp70-thallus 复合物(菌体量为  $1 \times 10^6$ , tHsp70 浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、菌体( $1.0 \times 10^6$  cell)刺激组和无刺激对照组巨噬细胞的上述 4 基因表达进行定量分析。

**1.5.2 RNA 提取及反转录** 将各试验组 3 个平行孔细胞收集于离心管, 2 000 g 离心 10 min, 去除上清, 加入 1 mL Trizol 混合作用 5 min。加入 200  $\mu\text{L}$  氯仿涡旋振荡 15 s, 12 000 g, 4 $^{\circ}\text{C}$  离心 15 min。吸取上清转入新的离心管, 加入 500  $\mu\text{L}$  异丙醇混匀-20 $^{\circ}\text{C}$  静置 30 min。12 000 g, 4 $^{\circ}\text{C}$  离心 15 min。弃上清, 沉淀用 75%乙醇洗涤 2 次, 7 000 g, 4 $^{\circ}\text{C}$  离心 5 min。弃上清, 室温干燥沉淀, 加入 10  $\mu\text{L}$  TE, 55 $^{\circ}\text{C}$  水浴助溶 5 min。获得的 RNA 按荧光定量 PCR 试剂盒 SYBR $^{\circledR}$  PrimeScript $^{\text{TM}}$  RT-PCR Kit II 中说明进行反转录, 反转录所得 cDNA 于-80 $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

**1.5.3 实时荧光定量 PCR 检测** *CXCR4*、*PGRN*、*HSP70*、*IL-8* 和及内参基因  $\beta$ -actin 的引物序列分别为: *CXCR4F* 5'-AAGGGCCAGACACTGAAGA AAA-3'、*CXCR4* 5'-AGTAGGGGAGCCAGCAAC AA-3'、*PGRN* F5'-GCGGTCACAGTCAAATCCAA-3'、*PGRN* R5'- TGTCCTGATGGCACTACTTGCT-3'、*HSP70F*5'-GGCGATTTTGTCCCTCTGAA-3'、*HSP70R*5'-GGCCGACTGAGCAAAGAAGA-3'、*IL-8F*5'-GCACTGCCGCTGCATTAAG-3'、*IL-8* R5'-GCAGTGGGAGTTGGGAAGAA-3'、 $\beta$ -actinF5'-AA CAACCACACACCACACATTTC-3'、 $\beta$ -actinR5'-TG TCTCCTTCATCG TTCCAGTTT-3'。用 ddH $_2$ O 对 cDNA 进行 5 倍稀释, 使用 ABI 7500 Fast 荧光定量 PCR 仪进行 PCR 扩增反应。反应体系(50  $\mu\text{L}$ ): SYBR Premix Ex Taq $^{\text{TM}}$ (2 $\times$ )25  $\mu\text{L}$ , ROX Reference Dye II (50 $\times$ ) 1  $\mu\text{L}$ , 正反向引物各 2  $\mu\text{L}$ (10  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ), 稀释后的 cDNA 模板 4  $\mu\text{L}$ , ddH $_2$ O 16  $\mu\text{L}$ ; 反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$  预变性 2min; 95 $^{\circ}\text{C}$  30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  30 s, 40 个循环。

## 2 结果与分析

### 2.1 海豚链球菌抗原与 tHsp70 结合

等量 tHsp70(10  $\mu\text{g}$ )与不同量海豚链球菌 ECP(体积分别为 1、10、25、50  $\mu\text{L}$ )非共价结合后, SDS-PAGE 电泳结果显示(图 1-A), 结合前海豚链球菌 ECP 量越多, 对应泳道 tHsp70 条带越亮, 表明 tHsp70-ECP 复合物越多。同时, 等量 tHsp70(10  $\mu\text{g}$ )与不同量菌体非共价结合后, 上清 SDS-PAGE 电泳结果显示(图 1-B), 菌体量越多, 结合的 tHsp70 越多, 离心后上清中 tHsp70 蛋白量越少, 对应泳道 tHsp70 蛋白条带也相应越暗。

### 2.2 巨噬细胞培养状态观察

显微镜下观察(图 2)发现, 培养基中加入 3 种质量浓度(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )tHsp70 均可显著刺激罗非鱼腹腔巨噬细胞的贴壁和生长, 细胞间突触样的细胞连接明显增多, 其中以质量浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 tHsp70 试验组细胞生长状态最好。加入 ECP 试验组贴壁细胞数量明显少于其他试验组, 出现大量的死亡细胞(疑似调亡的细胞)。tHsp70-ECP 复合物(tHsp70 浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

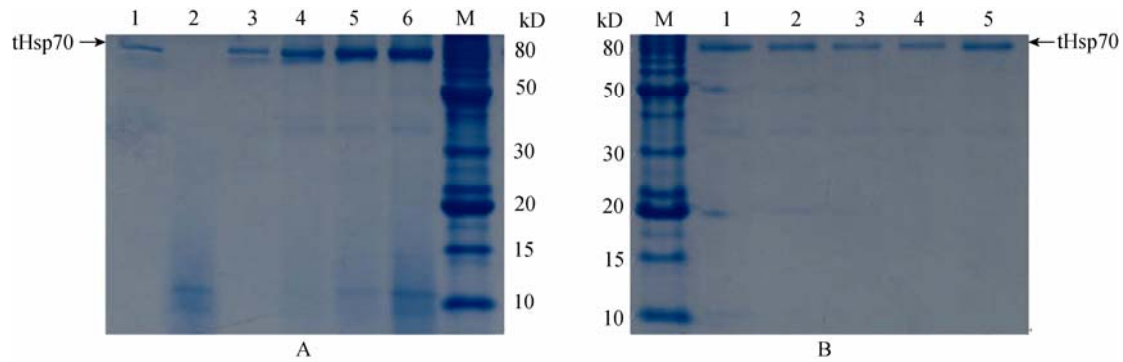


图 1 tHsp70 与海豚链球菌胞外产物(A)和菌体(B)的非共价结合

(A)1:未结合 tHsp70(1  $\mu\text{g}$ ); 2: 胞外产物 ECP(50  $\mu\text{L}$ ); 3-6: 10  $\mu\text{g}$  的 tHsp70 分别与 1  $\mu\text{L}$ 、10  $\mu\text{L}$ 、25  $\mu\text{L}$ 、50  $\mu\text{L}$  胞外产物 ECP 非共价结合后取 1/10 体积反应液进行 SDS-PAGE; M: 蛋白分子量标准。

(B)1-4: 10  $\mu\text{g}$  的 tHsp70 分别与  $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$  菌体非共价结合, 离心(10 000 g, 10 min)后取 1/10 体积上清进行 SDS-PAGE 电泳; 5: 未结合 tHsp70(1  $\mu\text{g}$ ); M: 蛋白分子量标准。

Fig.1 SDS-PAGE analysis of tHsp70 non-covalently bound to different amount of ECP(A) and thallus(B) of *Streptococcus iniae* (A) Lane 1: 1  $\mu\text{g}$  purified tHsp70; Lane 2: 50  $\mu\text{L}$  ECP; Lanes 3-6: 1/10 volume of solutions containing 10  $\mu\text{g}$  tHsp70 bounding to 1  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{L}$ , 25  $\mu\text{L}$ , and 50  $\mu\text{L}$  ECP, respectively; M: protein marker.

(B) Lanes 1-4: 1/10 volume of supernatants obtained by centrifuging at 10 000 g for 10 min after 10  $\mu\text{g}$  tHsp70 bounded to  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ , and  $1 \times 10^7$  thallus of *S.iniae*, respectively; 5: 1  $\mu\text{g}$  purified tHsp70; M: protein marker

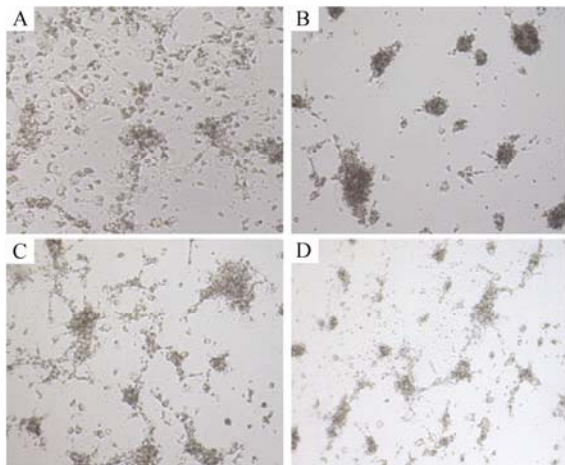


图 2 tHsp70 对罗非鱼腹腔巨噬细胞体外培养生长的影响(200 $\times$ )

A.培养基中含有 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  tHsp70; B.培养基 ECP 含量为 1  $\mu\text{g}/\text{孔}$ ; C.未含刺激物对照组; D.培养基中含有 tHsp70-ECP 复合物(tHsp70 浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , ECP 含量为 1  $\mu\text{g}/\text{孔}$ ).

Fig.2 Effects of tHsp70 on growth of tilapia peritoneal macrophages(200 $\times$ )

A. 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  tHsp70; B. 1  $\mu\text{g}$  ECP; C. medium without stimulator; D. ECP-tHsp70 complex (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 1  $\mu\text{g}/\text{hole}$  ECP).

试验组尽管细胞生长状态不如无刺激对照组, 但细胞死亡程度明显减弱。菌体和 tHsp70-thallus 复合物对罗非鱼腹腔巨噬细胞生长也有一定的刺激作用, 其中以 tHsp70-thallus 试验组(tHsp70 浓度

为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的细胞生长状态最佳。

### 2.3 腹腔巨噬细胞 NO 检测

NO 检测结果显示(图 3), 除 tHsp70-thallus 复合物(tHsp70 浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )和 tHsp70 (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )2 个试验组 NO 释放显著( $P < 0.05$ )外, 其余组 NO 释放水平在 24 h 差异不明显。与对照组相比较刺激 48 h 后, ECP 可显著降低罗非鱼腹腔巨噬细胞 NO 释放( $P < 0.05$ ); 而 tHsp70-ECP 复合物(tHsp70 浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )却可显著增强巨噬细胞 NO 释放( $P < 0.01$ )。tHsp70(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )单独作用也可刺激巨噬细胞 NO 释放( $P < 0.05$ )。

### 2.4 腹腔巨噬细胞吞噬活性检测

检测结果显示(图 4), 海豚链球菌菌体或 ECP 与 tHsp70 体外非共价结合后, tHsp70 浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的试验组巨噬细胞的吞噬活性显著提高( $P < 0.05$ )。tHsp70(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )单独作用同样可以显著提高巨噬细胞吞噬活性 ( $P < 0.05$ ), 其中 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  tHsp70 组提高幅度最大。

### 2.5 免疫相关基因表达分析

实时荧光定量 PCR 检测结果显示(图 5), 相对于菌体或 ECP 单独作用, tHsp70-抗原复合物(tHsp70 浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )及单独 tHsp70(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )刺激罗非鱼腹腔巨噬细胞 24 h, 均可极显

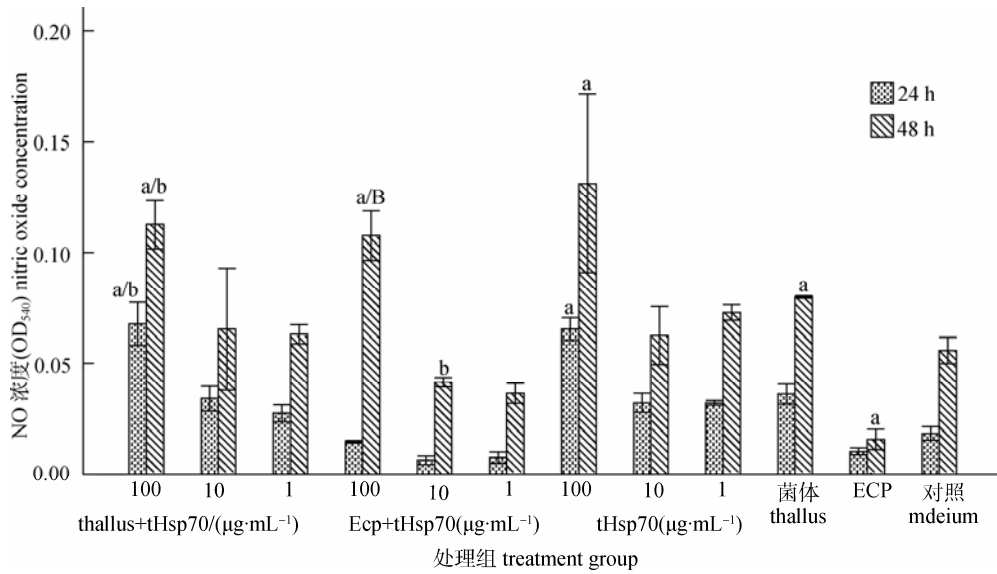


图 3 tHsp70 对体外培养罗非鱼腹腔巨噬细胞 NO 释放的影响

a/A 代表与未加刺激物的对照组相比差异显著 ( $P < 0.05$ )/极显著 ( $P < 0.01$ ); b/B 代表 tHsp70-thallus 复合物和 tHsp70-ECP 复合物与对应的 thallus 和 ECP 刺激组相比差异显著 ( $P < 0.05$ )/极显著 ( $P < 0.01$ ).

Fig. 3 Effect of tHsp70 on nitric oxide release *in vitro* of tilapia peritoneal macrophages

a/A indicate significant difference ( $P < 0.05$ )/extremely significant difference ( $P < 0.01$ ) compared with medium control; b/B indicate significant difference ( $P < 0.05$ )/extremely significant difference ( $P < 0.01$ ) in comparison of thallus-tHsp70 versus thallus and ECP-tHsp70 versus ECP.

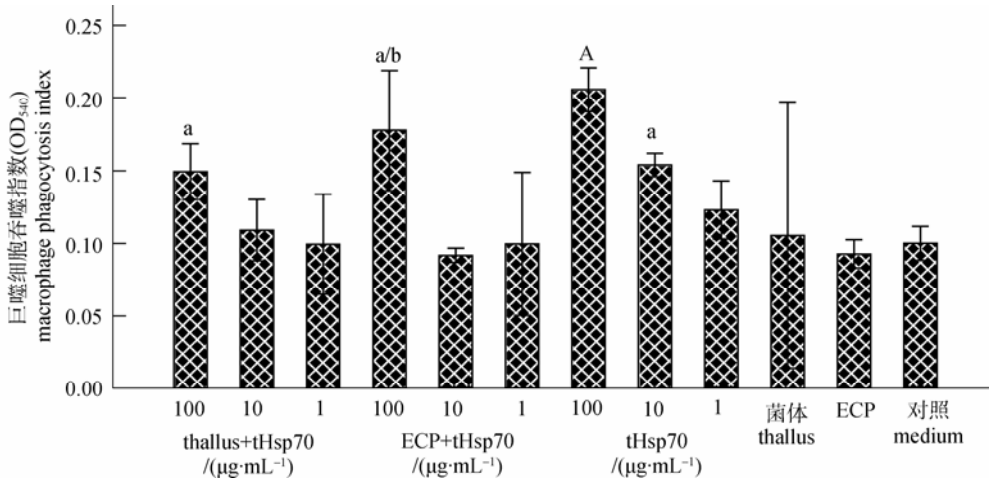


图 4 tHsp70 对体外培养罗非鱼腹腔巨噬细胞吞噬活性的影响

a/A 代表与未加刺激物的对照组相比差异显著 ( $P < 0.05$ )/极显著 ( $P < 0.01$ ); b/B 代表 tHsp70-thallus 复合物和 tHsp70-ECP 复合物与对应的 thallus 和 ECP 刺激组相比差异显著 ( $P < 0.05$ )/极显著 ( $P < 0.01$ ).

Fig. 4 Effect of tHsp70 on macrophage activity *in vitro* of tilapia peritoneal macrophages

a/A indicates significant difference ( $P < 0.05$ )/extremely significant difference ( $P < 0.01$ ) compared with medium control; b/B indicates significant difference ( $P < 0.05$ )/extremely significant difference ( $P < 0.01$ ) in comparison of thallus-tHsp70 versus thallus and ECP-tHsp70 versus ECP.

著提高其 *IL-8*、*HSP70*、*CXCR4* 和 *PGRN* 这 4 个基因的表达水平 ( $P < 0.01$ ), 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  tHsp70 单独作用不明显 ( $P > 0.05$ )。相对于无刺激物对照组, 菌体和 ECP 也可以极显著提高腹腔巨

噬细胞 *IL-8*、*HSP70*、*CXCR4* 和 *PGRN* 4 个基因的表达 ( $P < 0.01$ )。在 12 h、24 h、48 h 和 72 h 这 4 个时间点, tHsp70-菌体复合物组 *IL-8*、*HSP70*、*CXCR4* 和 *PGRN* 4 个基因的表达量均极显著高

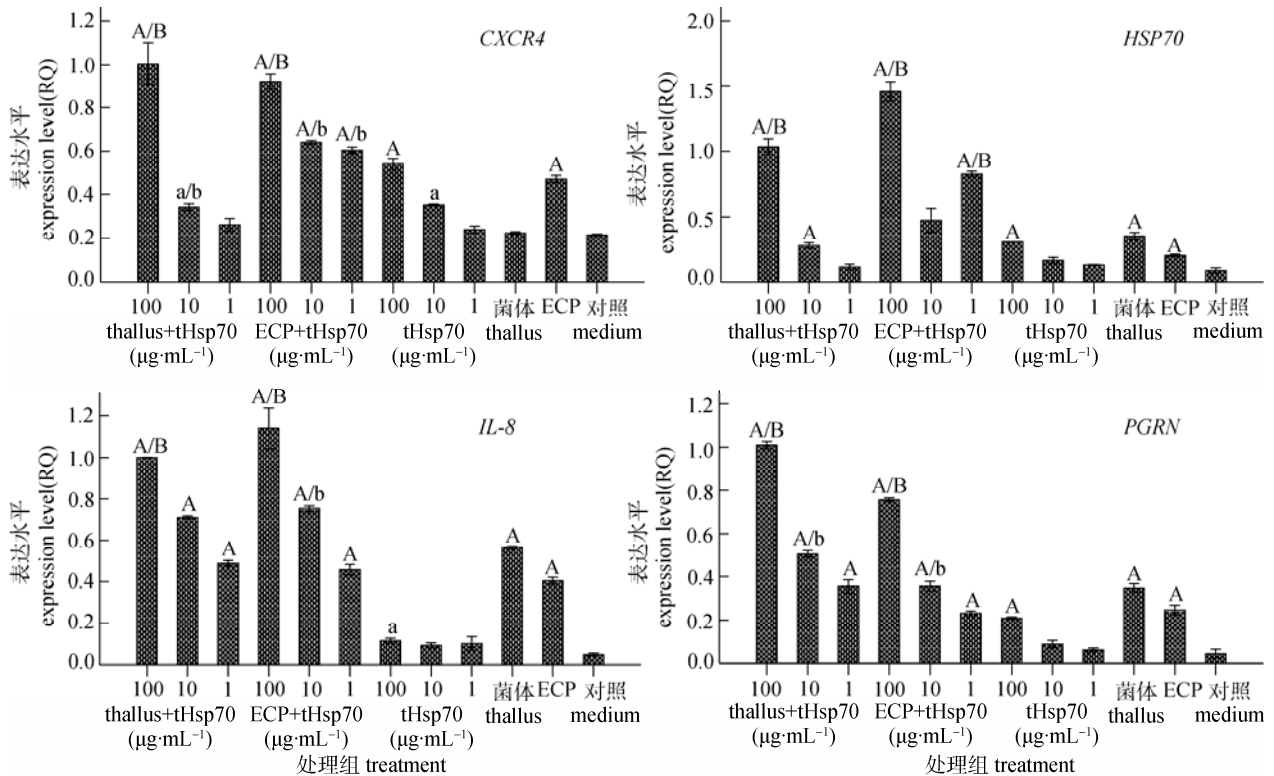


图 5 tHSP70 对罗非鱼腹腔巨噬细胞免疫相关基因表达影响的浓度效应

a/A 代表与未加刺激物的对照组相比差异显著( $P<0.05$ )/极显著( $P<0.01$ ); b/B 代表 tHsp70-thallus 复合物和 tHsp70-ECP 复合物与对应的 thallus 和 ECP 刺激组相比差异显著( $P<0.05$ )/极显著( $P<0.01$ )。

Fig.5 Dosage effects of tHsp70 on the expression of immune related genes in tilapia peritoneal macrophages  
a/A indicate significant difference( $P<0.05$ )/extremely significant difference( $P<0.01$ ) compared with medium control; b/B indicate significant difference( $P<0.05$ )/extremely significant difference( $P<0.01$ ) in comparison of thallus-tHsp70 versus thallus and ECP-tHsp70 versus ECP.

于菌体单独刺激组和无刺激对照组( $P<0.01$ , 图 6)。从 12 h 开始, 菌体单独刺激组 *IL-8* 和 *HSP70* 基因的表达量超过无刺激对照组( $P<0.05$ ); *CXCR4* 和 *PGRN* 基因表达量从 48 h 才超过无刺激对照组( $P<0.05$ )。另外, *IL-8* 表达峰值出现在 48 h, 而 *HSP70*、*CXCR4* 和 *PGRN* 这 3 个基因表达量一直呈上升趋势。

### 3 讨论

HSPs 分子中含有结合多肽位点。研究表明细胞内 HSPs 分子可与绝大部分肽结合, 但 HSPs 更易结合小分子多肽、疏水性多肽及突变型蛋白<sup>[10]</sup>。由于 HSP70-肽免疫原性主要来源于其结合的肽, 因此不少学者期望通过将 HSP70 与蛋白进行体外结合, 获取有价值的 HSP70-抗原复合物, 从而实

现对某些疾病的有效预防和治疗。实验证明 HSPs 在体外可与蛋白进行有效结合, Blachere 等<sup>[16]</sup>用 HSPs 家族的 GP96 与 G 蛋白 A 进行体外交联, 结果表明 GP96 与外源蛋白结合效率与蛋白浓度、反应温度以及缓冲液离子浓度有关。本研究将重组 tHsp70 与海豚链球菌菌体及胞外产物(ECP)进行体外非共价结合, SDS-PAGE 电泳结果显示, 参与反应的 ECP 越多, 反应液中 tHsp70-抗原复合物产生越多; 菌体量越多, tHsp70-菌体复合物形成得越多。该结果表明海豚链球菌菌体表面具有 tHsp70 结合表位, tHsp70 能有效地与海豚链球菌菌体及 ECP 中的小肽结合。实验还发现 tHsp70-抗原复合物与 tHsp70 迁移率相近, 蛋白条带所处位置基本一致, 该现象可能与 tHsp70-抗原复合物中所结合的蛋白多为小分子量多肽有关, 也有

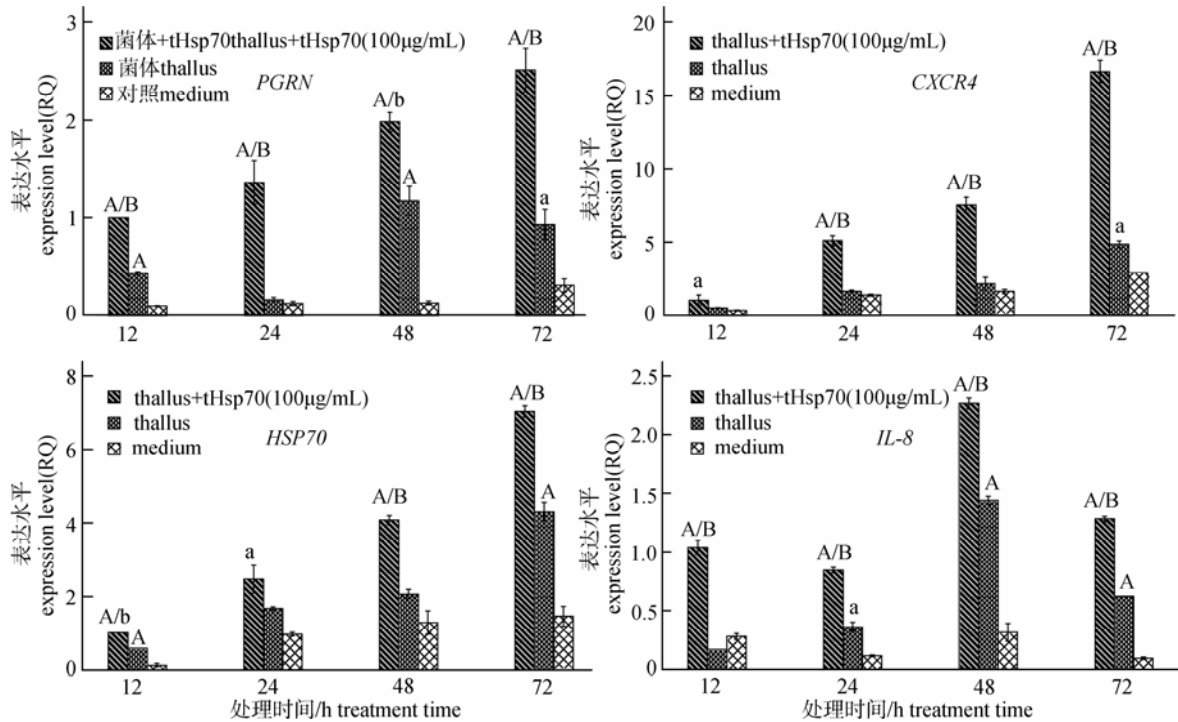


图 6 tHSP70 对腹腔巨噬细胞免疫相关基因表达影响的时间效应

a/A 代表与未加刺激物的对照组相比差异显著( $P<0.05$ )/极显著( $P<0.01$ ); b/B 代表 tHsp70-thallus 复合体和 tHsp70-ECP 复合体与对应的 thallus 和 ECP 刺激组相比差异显著( $P<0.05$ )/极显著( $P<0.01$ ).

Fig.6 Time effects of tHsp70 on the expression of immune related genes in tilapia peritoneal macrophages  
a/A indicates significant difference( $P<0.05$ )/extremely significant difference( $P<0.01$ ) compared with medium control; b/B indicates significant difference( $P<0.05$ )/extremely significant difference( $P<0.01$ ) in comparison of thallus-tHsp70 versus thallus and ECP-tHsp70 versus ECP.

可能与电泳样品未经煮沸处理有关, tHsp70 与肽结合紧密, 从而导致电泳中复合物迁移率变化不大。

巨噬细胞在识别、吞噬外来病原微生物, 处理和呈递抗原, 激活淋巴细胞启动特异性免疫应答以及分泌免疫因子等方面发挥重要作用<sup>[17]</sup>。巨噬细胞产生的 NO 是一个细胞毒性免疫调节因子, 有研究证明巨噬细胞产生的 NO 可杀灭癌症细胞, NO 还是影响辅助细胞(Th1 cell)功能的调节剂, 通过对细胞的直接抑制和预凋亡作用进行调控, 从而影响细胞免疫反应<sup>[18-20]</sup>。细胞外 HSP 特别是 HSP70 可通过受体介导作用活化巨噬细胞、树突细胞及 NK 细胞。单核细胞在 HSP70 作用下可释放 NO<sup>[21-23]</sup>。鱼类巨噬细胞与哺乳动物巨噬细胞相似, 生物活性物质如 IFN- $\gamma$ 、MGF(巨噬细胞活性因子)、灭活的病原体等的刺激可促进其释放 NO 及提高吞噬活性<sup>[24]</sup>。本研究中, tHsp70(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )和 tHsp70-抗原复合物(tHsp70 浓度为 100

$\mu\text{g}/\text{mL}$ )相对于抗原单独作用和无刺激对照组, 可显著促进巨噬细胞 NO 的释放及增强吞噬活性; tHsp70 与 ECP 交联结合后可以减轻 ECP 对巨噬细胞的致死作用; 同时发现高浓度 tHsp70(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )与低浓度 tHsp70(10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的作用有显著差异。这些结果在一定程度上证明 tHsp70 可提高抗原诱导罗非鱼腹腔巨噬细胞 NO 释放和增强其吞噬活性, 具有免疫佐剂和免疫增强剂功能。

HSP70 通过信号转导网络改变机体基因的表达, 在搞肿瘤和感染中发挥其免疫学功能。本研究利用前期筛选到的罗非鱼免疫和感染后差异表达基因(IL-8、HSP70、CXCR4 和 PGRN)作为研究对象<sup>[25-26]</sup>, 尝试从基因水平评价 tHsp70 对罗非鱼腹腔巨噬细胞免疫机能的影响。IL-8 可通过与 CXCR1 或 CXCR2 结合而兴奋靶细胞, 吸引中性粒细胞向炎症部位聚集, 清除炎症物质<sup>[27]</sup>; IL-8 和

CXCR4 是虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)感染前期非特异性免疫反应重要的细胞因子和受体<sup>[28]</sup>。PGRN 在罗非鱼感染或免疫海豚链球菌后,其脾、前肾及肝免疫组织中的表达发生了显著变化<sup>[29]</sup>。本研究中 tHsp70-抗原复合物(tHsp70 浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )及单独 tHsp70(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )刺激罗非鱼腹腔巨噬细胞 24 h, *IL-8*、*HSP70*、*CXCR4* 和 *PGRN* 基因表达水平极显著高于菌体或 ECP 单独作用 ( $P < 0.01$ ); tHsp70-菌体复合物试验组 4 个基因在 12、24、48 和 72 h 4 个时间点的表达量均极显著高于菌体和无刺激对照组 ( $P < 0.01$ )。这充分证明 tHsp70 单独或与链球菌抗原共同作用于罗非鱼腹腔巨噬细胞,可极显著改变免疫相关基因的表达,最终实现其分子伴侣、免疫佐剂和抗原载体等免疫学功能。

#### 参考文献:

- [1] Hendrick J P, Hartl F U. Molecular chaperone functions of the heat-shock proteins[J]. *Annu Rev Biochem*, 1993, 62: 349–384.
- [2] Hartl F U, Hayer H M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein[J]. *Science*, 2002, 295: 1852–1858.
- [3] Srivastava P K, Deleo A B, Old L J. Tumor rejection antigens of chemically induced sarcomas of in bred mice[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1986, 83: 3407–3411.
- [4] Murshid A, Gong J L, Calderwood S K. Heat-shock protein in cancer vaccines: agents of antigen cross-presentation [J]. *Expert Rev Vaccine*, 2008, 7(7): 1019–1030.
- [5] Deirdre T, Helen C, Andrew G J, et al. Therapeutic vaccination with dendritic cells pulsed with tumor-derived Hsp70 and a COX-2 inhibitor induces protective immunity against B16 melanoma[J]. *Vaccine* 2008, 26:3540–3549.
- [6] Barbosa M D F S, Celis E. Immunogenicity of protein therapeutics and the interplay between tolerance and antibody responses[J]. *Drug Discovery Today*, 2007; 12: 674–681.
- [7] Liu B, Ye D X, Song X X, et al. A novel therapeutic fusion protein vaccine by two different families of heat shock proteins linked with HPV16 E7 generates potent antitumor immunity and antiangiogenesis[J]. *Vaccine*, 2008, 26: 1387–1396.
- [8] Li J X, Jiang P, Li Y F, et al. Hsp70 fused with GP3 and GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus enhanced the immune responses and protective efficacy against virulent PRRSV challenge in pigs[J]. *Vaccine*, 2009, 27:825–832.
- [9] Bogers W M J M, Bergmeier L A, Oostermeijer H, et al. CCR5 targeted SIV vaccination strategy preventing or inhibiting SIV infection[J]. *Vaccine*, 2004, 22:2974–2984.
- [10] Hoek A, Rutten V P, Zee R V D, et al. Epitopes of *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis 70 kD heat-shock protein activate bovine helper T cells in outbred cattle[J]. *Vaccine*, 2010, 28:5910–5919.
- [11] He L, Liu Q, Quan M, et al. Molecular cloning and phylogenetic analysis of *Babesia orientalis* heat shock protein 70[J]. *Vet Parasitol*, 2009, 162:183–191.
- [12] Wang S H, Zhu X P, Yang Y P, et al. Molecular cloning and characterization of heat shock protein 70 from *Trichinella spiralis*[J]. *Acta Tropica*, 2009, 110:46–51.
- [13] Hoos A, Levey D L. Vaccination with heat shock protein-peptide complexes: from basic science to clinical applications[J]. *Expert Rev Vaccines*, 2003, 2(3): 369–379.
- [14] Fan W, Robert G, Reinhard A. Treatment of colon and lung cancer patients with ex vivo heat shock protein 70-peptide-activated, autologous natural killer cells: a clinical phase I trial[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 6(10): 3699–3707.
- [15] Robert J B. Heat-shock protein-based vaccines for cancer and infectious disease[J]. *Expert Rev Vaccine*, 2008, 7(3): 383–393.
- [16] Blachere N E, Li Z H, 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): 1315–1322.
- [17] Mosser D M. The many faces of macrophage activation[J]. *J Leukoc Biol*, 2003; 73(2):209–212.
- [18] Hibbs J J, Vavrin Z, Taintor R. L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells[J]. *J Immunol*, 1987, 138(2): 550–565.
- [19] Cui S, Reichner J, Mateo R, et al. Activated murine macrophages induce apoptosis in tumor cells through nitric oxide-dependent or -independent mechanisms[J]. *Cancer Res*, 1994, 54(9): 2462–2467.
- [20] Yim C, Bastian N, Smith J C, et al. Macrophage nitric oxide synthesis delays progression of ultraviolet light induced



- murine skin cancers[J]. *Cancer Res*, 1993, 53(22): 5507–5511.
- [21] Asea A, Kraeft S K, Kurt-Jones E A, et al. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine[J]. *Nat Med*, 2000, 6(4): 435–442.
- [22] Theriault J R, Adachi H, Calderwood S K. Role of scavenger receptors in the binding and internalization of heat shock protein 70 [J]. *J Immunol*, 2006, 177(12): 8604–8611.
- [23] Gastpar R, Gross C, Rossbacher L, et al. The cell surface-localized heat shock protein 70 epitope TKD induces migration and cytolytic activity selectively in human NK cells[J]. *J Immunol*, 2004, 172(2):972–980.
- [24] Grayfer L, Walsh J G, Belosevic M. Characterization and functional analysis of goldfish (*Carassius auratus* L.) tumor necrosis factor- $\alpha$ [J]. *Dev Comp Immunol*, 2008, 32(5): 532–543.
- [25] 李超, 陈明, 李莉萍, 等. 罗非鱼免疫前后白细胞 cDNA 差减文库的构建及鉴定[J]. *西南农业学报*, 2010, 23(4): 1286–1292.
- [26] 李超, 陈明, 李莉萍, 等. 用链球菌疫苗免疫罗非鱼前后其差异表达基因的鉴定与分析[J]. *大连水产学院学报*, 2009, 24(5): 379–386.
- [27] Holmes W E, Lee J, Kuang W J, et al. Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor[J]. *Science*, 1991, 253:1278–1280.
- [28] Zhang H, Thorgaard G H, Ristow S S. Molecular cloning and genomic structure of an interleukin-8 receptor-like gene from homozygous clones of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2002, 13(3): 251–258.
- [29] 王瑞, 陈明, 黄钧, 等. 罗非鱼颗粒蛋白前体 cDNA 序列与表达分析[J]. *水生生物学报*, 2010, 34(5): 1–7.

## Effects of recombinant tHsp70 on immune function of tilapia peritoneal macrophages

CHEN Ming<sup>1,2</sup>, WANG Qihua<sup>2</sup>, WANG Rui<sup>1</sup>, GAN Xi<sup>1</sup>, LI Liping<sup>1</sup>, LEI Aiyang<sup>1</sup>, LIANG Wanwen<sup>1</sup>, HUANG Weiyi<sup>2</sup>

1. Key Laboratory for Aquatic Genetic Breeding and Healthy Aquaculture of Guangxi, Guangxi Institute of Fisheries, Nanning, Guangxi 530021, China;
2. Institute of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning, Guangxi 530005, China

**Abstract:** We used recombinant tilapia Hsp70 (tHsp70) from *Pichia* yeast to prepare non-covalent HSP70-antigen complexes with thallus and extracellular bacterial products (ECP) of *Streptococcus iniae*. We investigated the effects of the antigen complexes on the cellular immune response of tilapia by detection of NO release, phagocytic activity, and related immune gene expression of peritoneal macrophages *in vitro*. tHsp70 can form complexes with the thallus and ECP of tilapia *in vitro*. In addition, tHsp70 alone and its complexes significantly stimulated growth and attachment of peritoneal macrophages and enhanced NO release and phagocytic activity of peritoneal macrophages. In contrast, treatment with ECP significantly inhibited NO release and led to cell death, while treatment with tHsp70-ECP complex reduced the cell death. Moreover, tHsp70 alone or tHsp70-antigen complexes significantly increased the expression of immune related genes (*IL-8*, *Hsp70*, *CXCR4*, and *PGRN*) in tilapia peritoneal macrophages compared to antigen only and medium control groups. Our results suggest that tHsp70 has an immunoadjuvant and immunopotentiator function, and provides experimental data for development of a tHsp70 based vaccine against tilapia streptococcal diseases.

**Key words:** heat shock protein 70; macrophage; immune function; *Streptococcus iniae*; vaccine

**Corresponding author:** LIANG Wanwen. E-mail: nnlww@126.com; HUANG Weiyi. E-mail: wyhuang@gxu.edu.cn