融合蛋白Seb-Ova-Perforin在食物过敏性肠炎中的治疗作用

曾露, 李珊珊, 杨平常*

深圳大学医学部过敏反应与免疫学研究所, 深圳 518060

* 联系人, E-mail: pcy2356@szu.edu.cn

收稿日期: 2017-10-10; 接受日期: 2017-10-25; 网络版发表日期: 2018-01-16

食物过敏是一个重要的公共卫生问题, 近10年其患病率急剧上升, 在发达国家中发病率接近10%^[1]. 研究显示, 约4%~6% 5岁以下的儿童和3%的成年人有不同程度的食物过敏现象, 对食物抗原具有IgE介导的高反应性^[1,2]. 小麦(*Triticum aestivum*)、大豆(*Glycine max* (Linn.) Merr.)、蛋类、花生(*Arachis hypogaea* Linn.)、坚果类、甲壳类、鱼类和乳类是食品过敏原标记的重点, 这8种过敏原合称“八大类”^[3]. 鸡蛋为八大食物过敏原之一, 而卵清蛋白OVA为鸡蛋的主要过敏原, 在其患者的血清中可以检测到大量的OVA特异性IgE和IgG抗体; 有报道称, 在食物过敏中35%的儿童对卵清蛋白较高的IgE介导高反应性, 成年人占12%^[4-6].

最近几年有关食物过敏领域的研究发展迅速, 但其发病机制并不完全明了. 本实验的研究目的用实验室诱导表达出的Seb-Ova-Perforin融合蛋白作用于OVA引起的过敏性肠炎小鼠(*Mus musculus*), 观察该融合蛋白对食物过敏性肠炎是否有抑制作用. OVA选取其优势表位323~339 aa^[7], 在融合蛋白中主要起导向作用, 识别OVA特异性T细胞. 金黄葡萄球菌肠道毒素B (*Staphylococcus aureus* enterotoxin B, SEB)是一种的超抗原, 可通过连接抗原递呈细胞上的MHC II类分子和T细胞表面受体(T cell receptor, TCR)使T细胞活化增

殖, 实验中选择SEB与TCR结合的部位. 研究发现, SEB与TCR结合的表位主要位于其N端和C端, 选取的SEB片段分别为15~100和170~200 aa^[8,9]. 穿孔素(perforin)储存在细胞毒性T细胞和NK细胞胞质颗粒中, 通过聚合作用在靶细胞表面形成小孔, 从而介导杀伤. 研究表明, 穿孔素的N末端前34个氨基酸具有完整的穿孔活性, 可溶解有核细胞及脂质膜, 而且作用于靶细胞形成的超微结构与天然穿孔素作用的相似^[10,11], 所以融合蛋白穿孔素选取部位为N端34 aa.

根据上述OVA, SEB, Perforin 3个蛋白的特点, 本实验提出以下假说: OVA过敏性肠炎小鼠体内可产生大量的OVA特异性T细胞; 当小鼠通过腹腔注射融合蛋白后, 融合蛋白中OVA片段可特异性识别T细胞, 随后SEB与OVA特异性T细胞紧密结合, 最后Perforin发挥细胞毒性作用, 在OVA特异性T细胞表面打孔, 发挥杀伤作用, 从而阻断后续的过敏反应.

1 材料和方法

1.1 实验动物及主要试剂

(1) 实验动物. 年龄4~6周SPF级BALB/c雌性小鼠购自广东省实验动物中心, 在深圳大学SPF级实验动

引用格式: 曾露, 李珊珊, 杨平常. 融合蛋白Seb-Ova-Perforin在食物过敏性肠炎中的治疗作用. 中国科学: 生命科学, 2018, 48: 77-83
Zeng L, Li S S, Yang P C. The treatment effect of fusion protein Seb-Ova-Perforin in food allergic inflammatory bowel disease (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2018, 48: 77-83, doi: [10.1360/N052017-00231](https://doi.org/10.1360/N052017-00231)

物中心适应1周后进行实验。

(2) 主要试剂. 卵清蛋白(OVA, Sigma, 美国); 抗OVA单克隆抗体(Anti-Ovalbumin Antibody, Abcam, 美国)、抗金黄色葡萄菌肠毒素B单克隆抗体(Anti-SEB Antibody, Abcam)及抗穿孔素(Anti-Perforin Antibody, Abcam) $\text{Al}(\text{OH})_3$ 佐剂(Sigm); BCA蛋白定量试剂盒(索莱宝公司); 辣根过氧化物酶标记羊抗鼠IgG2a抗体(Southern Biotech, 美国); 辣根过氧化物酶标记羊抗鼠IgG1抗体(Southern Biotech); 羊抗鼠IgE抗体(Southern Biotech); 辣根过氧化物酶标记链霉亲和素(Streptavidin-HRP, Southern Biotech); 小鼠总IgE ELISA试剂盒(eBioscience, 美国)。

1.2 实验方法

(1) 融合蛋白的诱导表达. 从NCBI网站获取卵清蛋白OVA短肽(GenBank: AAO43266.1); 金黄色葡萄菌肠毒素B短肽(GenBank: AB630021.1); 穿孔素全肽及其短肽(GenBank: M23182.1), 将上述短肽以Seb-Ova-Perforin顺序连接, 构建融合蛋白. 短肽单体及融合蛋白均委托金斯瑞(南京)生物科技有限公司合成, 并连接至Pet32a表达载体. 将重组的表达载体转化至大肠埃希氏菌Rosetta (DE3)感受态细胞内, 在含有Amp抗生药的LB固体培养基上涂布扩增菌种, 放置37℃培养箱培养过夜。

次日, 用牙签挑取单菌于20 mL LB液体培养基中(含Amp 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 37℃ 150 r/min摇床12~16 h. 取已摇过夜的2 mL菌液于50 mL LB液体培养基中进行扩增, 37℃ 250 r/min培养2~3 h, 待细菌生长处于指数增长后期加入1 mmol/L IPTG诱导4 h, 表达目的蛋白. 取3管1.5 mL的离心管, 其中一管加入1 mL诱导前菌液, 其余两管分别加入1 mL诱导后菌液, 离心弃上清, 其中一管诱导后菌液进行超声破碎, 弃上清, 加入80 μL PBS和20 μL 5× loading buffer上样缓冲液混合, 水浴锅中煮沸10 min, 取10 μL 样品进行电泳检测表达情况。

(2) 融合蛋白的纯化. 将已确定无误的融合蛋白按上述方法进行大量表达, 4℃ 10621×g离心弃上清收集菌体. 用30 mL PBS缓冲液溶解收集的菌体并在冰上进行超声破碎10 min; 4℃ 30 min 10621×g离心弃上清, 用30 mL 6 mol盐酸胍重悬沉淀, 4℃过夜. 次日, 冰上超声破碎10 min, 4℃ 30 min 10621×g离心, 收集

上清, 待用. 通过Ni-NTA纯化柱洗脱杂蛋白即可获得纯度较高目的蛋白. SDS-PAGE鉴定纯化的结果, 鉴定为目的蛋白后将其装入透析袋于3 mol尿素透析液中, 3 h更换一次透析液, 如此重复5次, 以除弃蛋白液中有毒物质咪唑. 收集目的蛋白, BCA蛋白定量试剂盒对目的蛋白进行浓度测定。

(3) 酶链免疫吸附法鉴定融合蛋白活性. 表达纯化后的SEB单体、Perforin蛋白及卵清蛋白作为阳性对照, 牛血清白蛋白BSA作为阴性对照. 分别将抗原SEB单体、Perforin蛋白、卵清蛋白OVA、牛血清白蛋白BSA及融合蛋白用CBS稀释至1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 包被于96孔板4℃过夜. 次日, 弃上清, 加200 μL 5% BSA-PBS封闭37℃ 2 h; PBST洗涤3次, 抗perforin抗体及抗OVA抗体参照说明书以1:1000稀释, 而抗SEB抗体则以1:4000稀释, 100 μL 37℃孵育2 h; PBST洗涤3次, 二抗(IgG1及IgG2a)按1:2000稀释, 100 μL 37℃孵育1 h; PBST洗涤5次, 加入100 μL TMB显色液37℃ 10 min, 待反应明显时加入50 μL 2 mol H_2SO_4 终止反应, 利用酶标仪在450 nm处读取吸光值即可。

(4) 食物过敏性肠炎模型建立及融合蛋白治疗. 40只年龄4~6周SPF级BALB/c雌性小鼠随机分成4组, 每组10只, 分为空白对照组(生理盐水组)、3 mol尿素透析液组对照、食物过敏性肠炎组及融合蛋白治疗组. 图1为食物过敏性肠道模型的建立及融合蛋白的治疗, 其中治疗组在皮下致敏和灌胃前4~6 h腹腔注射1 mg融合蛋白进行治疗, 透析液对照组腹腔注射相应体积的3 mol尿素透析液进行处理, 空白对照和模型组则给予的生理进行处理。

(5) 小鼠血清抗体检测. 小鼠激发24 h后, 进行眼球取血并脱颈处死. 血液4℃静置过夜, 5310×g离心, 吸取血清. 利用间接ELISA法检测血清中OVA特异性IgG2a及和IgE. 用1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ OVA过敏原包被, 4℃过夜. 检测特异性IgG2a的血清用PBS 1:100倍稀释, 而特异性IgE则1:5倍稀释, 血清37℃孵育2 h. 分别加入相应的二抗(羊抗鼠IgG2a抗体、IgE), 按1:2000稀释, 37℃孵育1 h. 洗板后, 加入TMB显色, 2 mol H_2SO_4 终止底物反应后在450 nm处读取吸光值。

(6) 肠道组织HE染色. 将小鼠空肠部分取出后, 用PBS冲洗干净, 剪成约1 cm肠道放于4%多聚甲醛中浸泡过夜进行固定, 随后进行脱水、包埋及切片、烤片. HE染色具体步骤如下:

图1 动物模型及蛋白治疗

红色箭头: 融合蛋白治疗; 黑色箭头: 0, 3, 7为皮下致敏, 其余为灌胃处理

二甲苯 I, II 各10 min→二甲苯-乙醇(1:1) 5 min→无水乙醇 I 3 min→无水乙醇 II 3 min→95%乙醇 3 min→80%乙醇 3 min→70%乙醇 3 min→50%乙醇 3 min→去离子水 5 min→苏木素染色 5 min→自来水冲洗多余的染料→1%盐酸酒精分化1~2 s→自来水冲洗 1 min→0.1%氨水返蓝 5 min→80%乙醇 3 min→伊红 3 min→95%乙醇 10~20 s→无水乙醇 I, II 各3 min→二甲苯 I, II 各5 min→载玻片沥干→中性树胶封固。

2 结果

2.1 融合蛋白重组表达载体的鉴定

融合基因*Seb-Ova-Perforin*插入*Pet32a*质粒中, 通过*Bam*H I /*Xho* I 双酶切鉴定, 核酸胶显示的酶切片段与融合基因(690 bp)基本一致(图2)。

2.2 融合蛋白Seb-Ova-Perforin的诱导表达与纯化

将已含有重组质粒的Rosetta表达菌进行小量表达, 发现融合蛋白无论是低温16℃诱导过夜还是高温37℃诱导4 h, 均为包涵体, 所以本实验选择高温诱导。分别取诱前1 mL菌体, 和37℃诱导4 h后两管1 mL菌液, 其中一管诱后菌液进行超声破碎处理, 离心吸取上清, 加PBS重悬沉淀, 分别加入5× loading buffer缓冲液进行电泳检测。由图3可知, 诱导后融合蛋白的表达量明显增加, 在分子量40 kD处, 与预期一致; 并且该融合为包涵体。利用Ni-NTA纯化柱即可获得较为纯净的融合蛋白。

2.3 Elisa检测融合蛋白Seb-Ova-Perforin的活性

融合蛋白中OVA片段为其优势表位, 图4A可明显看出融合蛋白中OVA的活性高于阴性对照及卵清蛋白($P<0.0001$, $P=0.0006$), 说明OVA片段具有较高活性;

图2 *pet32a*融合基因重组质粒的双酶切鉴定

M: DNA Marker; 1: 融合基因*Pet32a*重组质粒酶切

图4B和C分别为SEB, Perforin的活性检测, 与阴性对照相比融合蛋白活性明显升高($P=0.0014$, $P<0.0001$), 与SEB单体、Perforin蛋白相比差异不明显($P=0.0002$, $P=0.0001$); 由此表明融合蛋白Seb-Ova-Perforin具有较好的活性。

2.4 血清特异性抗体(IgG2a及IgE)检测

小鼠血清内特异性IgE抗体的测定如图5A所示, 与正常组相比, 模型组小鼠血清的特异性IgE显著升高($P=0.0053$); 融合蛋白治疗组与模型组相比, IgE水平下降明显且具有统计学意义($P<0.05$)。图5B为小鼠血清

图 3 融合蛋白Seb-Ova-Perforin的诱导表达及纯化图

M: 蛋白Marker; 1: 诱导前全菌蛋白; 2: 诱导4 h后全菌; 3: 诱导4 h后上清; 4: 诱导4 h后沉淀; 5: 纯化后融合蛋白

特异性IgG2a检测, 与正常组相比, 对照组和模型组血清中的特异性IgG2a差异不大; 但是与模型组相比, 治疗组其IgG2a水平显著升高, 具有较大的差异 ($P=0.0012$). 由此可见, 融合蛋白具有较好的治疗效果.

2.5 肠道组织病理切片观察

肠道组织的病理切片如图6所示, 与空白及对照组相比, 模型组肠道的结构破坏且肠绒毛受损, 炎症细胞浸润严重; 治疗组与模型组相比肠道结构较完整且肠绒毛排列整齐, 炎症细胞少, 说明融合蛋白具有较好的治疗效果.

3 讨论

食物过敏(food allergy, FA)指人体对食物中抗原物质产生的由免疫介导的不良反应, 是一种常见病和多发病. 西方国家的FA发病率为2%~6%, 并在逐年上升^[12,13]. 食物过敏的临床表现在不同的个体差异很大, 从轻微的腹部不适、腹痛、腹泻到危及生命的过敏性休克都有报道^[14]. FA还可引起其他器官的病变, 如食物过敏性哮喘, 食物过敏性皮炎, 食物过敏性肾病^[15]等. 每年用于FA的医疗费用已经是一笔巨大开支; 如

图 4 融合蛋白Seb-Ova-Perforin活性检测

图 5 小鼠血清特异性IgE, IgG2a检测

图6 小鼠肠道HE染色

美国2007年用于FA的治疗就超过5亿美元^[16]。FA已经对人类健康和社会经济造成了重大影响。过去10年来,食物过敏的发生率急剧上升,成为了引起人们广泛关注的一个公共卫生问题。

近10年的研究,对食物过敏的认识逐渐增加,将其归纳为三类: IgE介导的过敏反应、非IgE介导的过敏反应及两者混合介导的过敏反应^[17],其中IgE介导的食物过敏占据主导地位。当抗原进入过敏性机体后首先被体内的APC抗原提呈细胞加工处理,以MHC-抗原肽的形式递呈给T细胞,进而促使B细胞分泌特异性IgE抗体。产生的特异性抗体IgE其fc段与肥大细胞表面的IgE-fc受体结合;当抗原再次进入体内时,与致敏的肥大细胞上的IgE特异性结合使其脱颗粒,释放出组胺、激肽原酶等介导免疫反应。食物过敏轻者会有面部肿胀、呕吐、肚痛或腹泻等,尽管食物过敏的死亡率比较低,初步估算约为1.8/1000000^[18],对患者及其家属的生活质量造成极大的影响。目前,对食物过敏的预防及治疗在临床上并无有效的方案,最常用的是严格规避某种特定过敏性食物。虽然皮下注射免疫治疗和口服耐药治疗在防治食物过敏中取得一定进展,但存在较大的副作用,如胃肠道炎症和过敏^[19]。由此可见,为了确保食物过敏治疗的安全性和有效性,急需发展低风险靶向治疗。

本次实验研究首先用OVA建立食物过敏性肠炎小鼠模型,然后再用Seb-Ova-Perforin融合蛋白进行靶向治疗。结果显示,致敏激发后模型组小鼠血清中OVA特异性IgE明显增加,出现明显过敏反应,可见该致敏方法可以使BALB/c小鼠产生食物过敏性肠炎。研究还发现,融合蛋白靶向治疗后,小鼠血清中OVA特异性IgE显著低于模型组,这就说明融合蛋白治疗后可以抑制IgE分泌,而过敏时IgE通过调节T细胞向Th2细胞方向分化,所以表明融合蛋白可以使Th2反应向Th1转化,降低过敏炎症,达到治疗效果。进一步检测与IgE相竞争的封闭性抗体IgG2a,发现融合蛋白治疗组封闭性抗体IgG2a显著增高,而其他组IgG2a未见升高,这表明融合蛋白在降低Th2型IgE抗体分泌,同时提高Th1型封闭抗体IgG2a分泌, IgG2a与过敏原结合能力增强,降低了sIgE与过敏原结合,从而减轻过敏反应。在肠道的病理切片中,可明显的观察到治疗相对于模型组而言炎症细胞少,肠道结构完整与对照组相似。综上所述, Seb-Ova-Perforin融合蛋白能有效抑制OVA特异性IgE的产生,诱导sIgG2a的分泌,可用来治疗因食物OVA引起的过敏性肠炎,改善Th1/Th2平衡,达到对食物过敏性肠炎的有效预防和治疗,研究结果将为治疗食物过敏性肠炎药物研发提供新靶点,新途径。

参考文献

- 1 Sampson H A. Food allergy: past, present and future. *Allergol Int*, 2016, 65: 363–369
- 2 Rachid R, Chatila T A. The role of the gut microbiota in food allergy. *Curr Opin Pediatrics*, 2016, 28: 748–753
- 3 王智. 美国的食物过敏原标签管理走向. *中国食品添加剂*, 2005, (6): 7–9
- 4 Park H Y, Yoon T J, Kim H H, et al. Changes in the antigenicity and allergenicity of ovalbumin in chicken egg white by *N*-acetylglucosaminidase. *Food Chem*, 2017, 217: 342–345
- 5 Caubet J C, Bencharitwong R, Moshier E, et al. Significance of ovomucoid- and ovalbumin-specific IgE/IgG(4) ratios in egg allergy. *J All Clin Immunol*, 2012, 129: 739–747

- 6 Longo G, Berti I, Burks A W, et al. IgE-mediated food allergy in children. [Lancet](#), 2013, 382: 1656–1664
- 7 Sun L Z, Elsayed S, Aasen T B, et al. Comparison between ovalbumin and ovalbumin peptide 323–339 responses in allergic mice: humoral and cellular aspects. [Scand J Immunol](#), 2010, 71: 329–335
- 8 Zhang L, Rogers T J. Assessment of the functional regions of the superantigen staphylococcal enterotoxin B. [Toxins](#), 2013, 5: 1859–1871
- 9 Rödström K E J, Elbing K, Lindkvist-Petersson K. Structure of the superantigen staphylococcal enterotoxin B in complex with TCR and peptide-MHC demonstrates absence of TCR-peptide contacts. [J Immunol](#), 2014, 193: 1998–2004
- 10 Mossu A, Daoui A, Bonnefoy F, et al. Plasmacytoid dendritic cells die by the CD8 T cell-dependent perforin pathway during acute nonviral inflammation. [J Immunol](#), 2016, 197: 1672–1682
- 11 Takenaka M C, Quintana F J. Achieving tolerance with perforin-secreting dendritic cells. [Trends Mol Med](#), 2016, 22: 3–4
- 12 Harrington D W, Elliott S J, Clarke A E, et al. Exploring the determinants of the perceived risk of food allergies in Canada. [Hum Ecol Risk Assessment-An Int J](#), 2012, 18: 1338–1358
- 13 Pelz B J, Bryce P J. Pathophysiology of food allergy. [Pediatric Clin North Am](#), 2015, 62: 1363–1375
- 14 Sicherer S H, Leung D Y. Advances in allergic skin disease, anaphylaxis, and hypersensitivity reactions to foods, drugs, and insects in 2011. [J Allergy Clin Immunol](#), 2012, 129: 76–85
- 15 马晓蕾, 孙青苗, 贾军, 等. 过敏性皮肤病患者血清食入性和吸入性过敏原特异性IgE结果分析. [北京大学学报\(医学版\)](#), 2012, 44: 765–769
- 16 Smerud H K, Fellström B, Hällgren R, et al. Gastrointestinal sensitivity to soy and milk proteins in patients with IgA nephropathy. [Clin Nephrol](#), 2010, 74: 364–371
- 17 刘晓宇, 李荔, 刘志刚. 食物过敏原介导食物过敏机制研究进展. [食品安全质量检测学报](#), 2012, 3: 9–13
- 18 Umasunthar T, Leonardibee J, Hodes M, et al. Incidence of fatal food anaphylaxis in people with food allergy: a systematic review and meta-analysis. [Clin Exp All](#), 2013, 45: 1333–1341
- 19 曹军皓. 食物过敏的研究进展. [医学综述](#), 2011, 17: 1985–1987