پژوهش درپزشکی (مجله پژوهشی دانشکده پزشکی)
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
دوره ۳۷، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۲، صفحات ۸۰ تا ۸۴

مقاله اصلی
(Original Article)

مطالعه اثر ادجوانت *HSP90* بر ایمنی زایی *HbsAg* در موش بالب‌سی

مژگان بنده پور[1*]، زرین شریف نیا[1]، نریمان مصفا[2]، بهرام کاظمی[1]، نگار سید[3]، معصومه سلیمانی دارانی[1]

[1] مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
[2] بخش ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران
[3] انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: *با توجه به اینکه یک بخش مهم در پروژه واکسن، یافتن ادجوانتی موثر و مناسب در واکسن‌های انسانی است، امروزه پروتئین‌های شوک حرارتی در این پروژه‌ها به عنوان ادجوانت‌های قوی مطرح می‌باشند. این پروتئین‌ها با تحریک تولید سایتوکاین‌های التهابی باعث فعالیت سیستم مونوسیت ماکروفاژ شده و بلوغ سلول‌های دندریتیک را سبب می‌شوند. سوال این است که آیا این پروتئین در ایمنی‌زایی فرم نوترکیب HBV HbsAg تاثیر دارد؟*

روش بررسی: *در این مطالعه تجربی، زیر واحد بتای Hsp90 نوترکیب انسانی به همراه پروتئین نوترکیب HBV HbsAg به ۳۰ موش BalbC تزریق گردید و سیستم ایمنی هومورال و سلولی موش‌ها با روش ELISA بررسی شد.*

یافته‌ها: *در مقایسه با گروه‌های کنترل بیان هم‌زمان پروتئین و ادجوانت اختلاف معنی‌داری در IgG توتال و IgG2a سرم ملاحظه شد، ادجوانت hsp باعث افزایش IL-4 و بعد کاهش معنی‌دار ($p<0/05$) آن شد که نشان دهنده تحریک سیستم ایمنی هومورال و سپس سوئیچ آن به سمت IL-5 و ساخت آنتی بادی‌های دیگر به جز IgE است. در مورد استفاده از فروند IL-4 بالا رفته که مطلوب نیست و نشان دهنده ازدیاد حساسیت و ایجاد آلرژی می‌باشد.*

نتیجه‌گیری: *پروتئین‌های شوک حرارتی ادجوانت مناسبی در فرمولاسیون واکسن هپاتیت بی می‌باشند. در ادامه این تحقیق می‌توان اثر آن را در پیشگیری از ابتلای موش‌های بالب سی به هپاتیت بی مورد مطالعه قرار داد.*

واژگان کلیدی: *ادجوانت، پروتئین شوک حرارتی، هپاتیت بی، ایمیونیتی.*

مقدمه

از پروتئین‌های موثر در پاسخ ایمنی بر علیه عفونت‌ها می‌توان پروتئین‌های شوک حرارتی (HSP) را نام برد. در سال‌های اخیر عملکرد خارج سلولی این پروتئین‌ها توجه محققین را به خود جلب کرده است. این پروتئین‌ها فعال کننده‌های سیستم ایمنی ذاتی هستند و قادر به تحریک تولید سایتوکاین‌های التهابی توسط سیستم مونوسیت ماکروفاژ وهمچنین فعالیت و بلوغ سلول‌های دندریتیک می‌باشند (۱). اتصال HSP به کمپلکس‌های ویروسی، فعالیت NK cells و CTL را افزایش می‌دهد. این پروتئین‌ها باعث فعال شدن دفاع میزبان شده، به گونه‌ای که حتی اتصال غیر کوولان HSP به اپی‌توپهای MHC کلاس یک و دو قادر به فعال کردن پاسخ‌های CTL می‌باشند. از طرفی، HSPها از طریق سیستم مونوسیت – ماکروفاژ و همینطور فعالیت بلوغ سلول‌های دندریتیک (Antigen Presenting Cells :APC)، قادر به تحریک تولید سایتوکاین‌های التهابی هستند که با سیگنال هایی به واسطه کمپلکس‌های CD14/TLR2 و CD14/TLR4

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، بخش بیوتکنولوژی، دکتر مژگان بنده پور (**e-mail:** m.bandehpour@sbmu.ac.ir)
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۱/۱۵
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۲/۴/۳۰

انجام می‌گیرند (۲،۱). ادجوانت‌های پلاریزه کننده Th1 امروزه از موضوعات مهم در استراتژی واکسن می‌باشند. ادجوانت‌های قبلی مثل نمک‌های آلومینیوم و روغن باعث تحریک پاسخ‌های Th2 و تولید آنتی‌بادی‌های اختصاصی بر علیه شاخص‌های آنتی‌ژنیک می‌شوند.در سال‌های اخیر موضوع واکنش مولکول‌های چپرون با سلول‌های APC و ظرفیت القاء اختصاصی آنتی‌ژن درلنفوسیت های $T\ CD8^+$ و پاسخ‌های Th1 مورد بررسی قرار گرفته است. بر همین اساس HSP خارج سلولی با سلولهایAPC واکنش داده و با عملکرد ادجوانتی باعث تحریک سیستم ایمنی فرد می‌شود. فرآیند ایجاد شده به دنبال عرضه پپتیدهای متصل به چپرون توسط کمپلکس MHC و ترشح سایتوکاین‌های پیش التهابی و بلوغ DCها کامل می‌شود (۴،۳). لذا در این مطالعه جهت بررسی پروتئین HSP 90 به عنوان ادجوانت در تحریک سیستم ایمنی موش بالب سی از آنتی‌ژن HbsAg به عنوان واکسن استفاده شده است. اثر محرک این آنتی ژن روی موش و انسان امروزه تایید شده است.

مواد و روشها

این تحقیق با روش تجربی و در آزمایشگاه انجام گرفت. پروتئین Hsp90β انسانی طی تحقیق قبلی از سلول‌های MDA-MB468 بعد از تحریک با PMA جدا شده و در وکتور pGP1-2 کلون گردید، بیان آن از طریق تحریک حرارتی انجام گرفت و با طراحی ستون کروماتوگرافی تمایلی تخلیص شد (۵). پروتئین HbsAg طی تحقیق دیگری در وکتور pGEMEX-1 کلون شد. تخلیص پروتئین آن با کروماتوگرافی تمایلی T7-Tag انجام گرفت (۶).

بررسی پروتئینهای خالص شده با تست LAL

قبل از تزریق، هر یک از پروتئین‌ها از نظروجود اندوتوکسین با تست LAL (Limulus Amebocyte Lysate) (Cambrex,USA) ارزیابی شدند. این تست با افزودن پروآنزیم حاصل از آمبوسیت خرچنگ لیمولوس پلی فموس انجام می‌شود که در صورت وجود آلودگی با باکتری گرم منفی یا اندوتوکسین در محلول پروتئین، پروآنزیم به کواگولاز تبدیل شده و کواگولوژن را به کواگولین تبدیل کرده و پروتئین منعقد می‌شود. در این تست از رقت‌های مختلف کنترل مثبت استفاده شد. در مقایسه با پنج غلظت کنترل مثبت و منفی، پروتئین‌های حاوی اندوتوکسین از ادامه تحقیق حذف شدند.

تزریق پروتئین‌های بیان شده به موش‌های Balb C

در این تحقیق، هفت گروه چهارتایی یعنی ۳۰ موش تهیه شد. جهت تحریک سیستمیک ایمنی موش‌ها مقدار ۱۰μg پروتئین HbsAg به صورت داخل صفاقی (۷) به موش‌ها تزریق گردید. حجم پروتئین تزریق شده به همراه ادجوانت (hsp90 یا فروندز) ۱۰۰μl در نظر گرفته شد. برای تنظیم غلظت ۱۰ μg پروتئین در حجم ۵۰μl، از PEG6000 برای آب‌گیری از پروتئین‌ها استفاده گردید (۸). موش‌ها به صورت زیر گروه‌بندی شدند: گروه اول: HBsAg+ FA (آنتی ژن به همراه ادجوانت فروند)، گروه دوم: HBsAg/h+FA (بیان هم زمان hsp و HbsAg)، گروه سوم: HBsAg + h (مخلوط دو پروتئین)، گروه چهارم: HBV vaccine، گروه پنجم: HSP90، گروه ششم: LPS و گروه هفتم: PBS.

طبق patent شماره WO/2005/025614 میزان hsp ۱/۱۵ مقدار آنتی ژن نوترکیب در نظر گرفته شد.

بررسی سرم موش‌ها از نظر تولید آنتی بادی Total IgG و IgG2a در پاسخ اولیه، ثانویه و خاطره با تست ELISA

آنتی‌بادی‌های Total IgG و IgG2a در نمونه‌های سرم خون موش‌ها در هفته اول و دوم با استفاده از کیت‌های Mouse IgG2a ELISA quantitation Kit و Mouse IgG ELISA quantitation Kit (BETHYL ,TX) بررسی گردید.

تعیین میزان سایتوکاین‌های IL-4،IL-5 و IFN- γ در محیط کشت با تست ELISA

سایتوکاین‌های تولید شده در محیط کشت لنفوسیت‌های طحال موش‌های ایمن بعد از تحریک مجدد در آزمایشگاه، با استفاده از کیت‌های Mouse IL-5 CytoSet (invitrogen,Germany)، Duoset ELISA mouse IFN-γ (R&D Systems,USA) و کیت (R&D Systems,USA) Duoset ELISA mouse IL-4 اندازه گیری شد.

تست MTT جهت بررسی میزان تکثیر سلول‌ها و ارزیابی اثر آنتی‌ژن در جمعیت سلولی

بعد از جداسازی و کشت لنفوسیت‌های طحال موش‌ها در میکروپلیت ۹۶ خانه، جهت انجام تست به هر چاهک ۱۰۰μl MTT (Sigma,USA) (۱۰μl MTT ۵mg/ml در ۹۰μl RPMI) افزوده خوب پلیت را تکان داده و به مدت ۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس پلیت را با دور ۱۰۰۰rpm به مدت پنج دقیقه سانتریفوژ و بعد از حذف مایع

رویی به هر چاهک DMSO ۲۰۰µl افزوده شد. سپس جذب رنگ ارغوانی ایجاد شده با طول موج ۵۶۰nm تعیین گردید. با این تست در مقایسه با موارد کنترل در هر گروه از موش‌ها و همچنین گروه‌های کنترل PBS ، Hsp90 و موارد منفی، میزان تکثیر و Proliferation لنفوسیت‌ها در مجاورت مجدد سلول‌ها با پروتئین (in vivo)، تحریک مجدد با PHA یک محرک قوی لنفوسیت‌ها (in vitro) و شرایط بدون محرک (Ex vivo) بررسی گردید.

یافته‌ها

اثر ادجوانتی hsp90 روی ۳۰ موش بالب سی به همراه پروتئین HbsAg به عنوان آنتی‌ژن در هفت گروه، مطالعه گردید. نتایج به دست آمده از بررسی ایمنی هومورال و سلولار موش‌ها بعد از تزریق به ترتیب زیر بود.

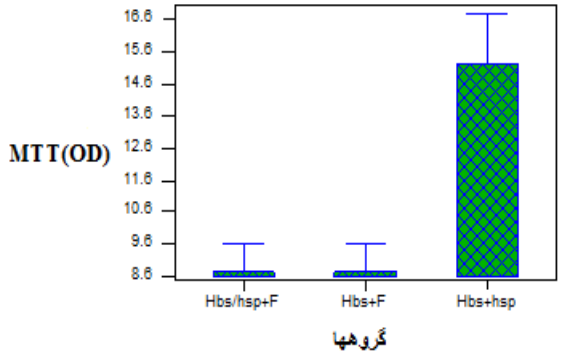
میزان total IgG و IgG2a سرمی در پاسخ اولیه، ثانویه و خاطره

در بیان همزمان چپرون و HbsAg، IgG سرم به طور معنی داری از گروه‌های دیگر بالاتر بود، ولی در پاسخ ثانویه کاهش نشان داد (جدول ۱). از نظر IgG2a سرم در گروهی که ادجوانت فروند تزریق شده بود، در پاسخ ثانویه افزایش معنی داری نشان داد (p<۰/۰۵).

جدول ۱. میزان IgG و IgG2a سرم (ng/ml) در پاسخ اولیه و ثانویه بر حسب گروه‌ها

	IgG total (1)	IgG total (2)	IgG2a (1)	IgG2a (2)
HbsAg+FA	۸۳۰±۹۱/۸	۳۴۹۷±۱۰۵	۲۱۴±۲	۲۵۰±۸/۹
HbsAg+hsp	۱۲۴۱±۶۷/۲	۳۳۰۰±۶۴/۸	۲۱۹±۱/۵	۲۰۹±۷/۱
HbsAg/hsp+FA	۱۴۷۰±۶۵/۲	۳۷۹۸±۳۱	۲۲۴±۱/۶	۲۱۴±۴/۴

در بررسی ایمنی خاطره با تست MTT میزان تکثیر لنفوسیت‌های طحال در گروه Hbs+hsp بالاتر از گروه‌های دیگر بود، چرا که تزریق داخل صفاقی و تحریک سیستمیک بود و با مقادیر IgG2a نیز هماهنگی داشت (نمودار ۱).

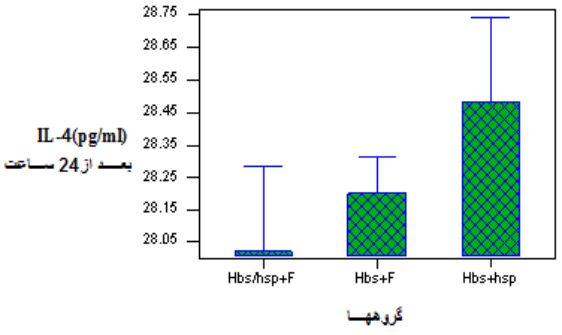


نمودار ۱- میزان تکثیر لنفوسیت‌ها (MTT) بر گروه‌ها

میزان سایتوکاین‌های IL-4، IL-5 و IFN-γ در مایع کشت لنفوسیت‌ها

در دو نوبت ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از افزودن پروتئین HbsAg به سلول‌ها، از مایع رویی کشت لنفوسیت‌های طحال نمونه برداری انجام شد. در ضمن، در کنار اینها نمونه‌های کنترل منفی، PBS و PHA نیز در نظر گرفته شد. به منظور بررسی سیستم‌های ایمنی هومورال و سلولی، سایتوکاین‌های IL-4، IL-5 و IFN-γ با استفاده از کیت ELISA اندازه گیری شدند. همان طور که در نمودار ۲ دیده می‌شود بعد از ۲۴ ساعت ادجوانت hsp باعث افزایش IL-4 وبعد از ۴۸ ساعت کاهش چند درصدی آن مشاهده می‌شود.

این حالت نشان دهنده تحریک سیستم ایمنی هومورال و سپس سوئیچ آن به سمت IL-5 و ساخت آنتی بادی‌های دیگر به جز IgE است. برعکس، در مورد استفاده از فروند بعد از ۴۸ ساعت این سایتوکاین بالا رفته که مطلوب نیست و نشان دهنده ازدیاد حساسیت و ایجاد آلرژی می‌باشد (نمودار ۲).



نمودار ۲- میزان IL-4 (pg/ml) در محیط کشت لنفوسیت‌های طحال بر حسب گروه‌ها

در مقایسه با IL-4، بیان IL-5 بسیار بالاتر بود و چون طحال پایگاه آنتی بادی سازی است در لنفوسیت‌های این ارگان بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت میزان IL-5 که ارتباط مستقیم با آنتی‌بادی

سازی دارد. در گروه سوم یعنی بیان هم‌زمان پروتئین با چپرون و تزریق به همراه فروند این مقدار با اختلاف معنی‌دار بالاتر بود (p<۰/۰۰۱).

همان طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود در تزریق داخل صفاقی HbsAg تولید IFN-γ بعد از ۲۴ ساعت تقریبا یکسان بود و در گروه حاوی چپرون این سایتوکاین پایدار بود (ایمنی لوکال). در گروه مورد تزریق بیان همزمان HbsAg با چپرون و ترکیب آن با فروند این حالت برعکس بود و تولید IFN-γ در سلول‌های طحال در نوبت دوم پایدارتر بود (نمودار ۳).

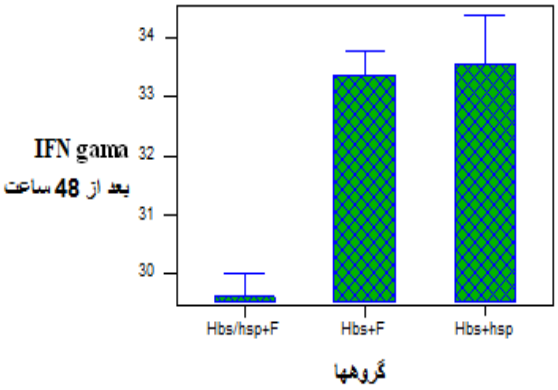
جدول ۲- میزان IL-4، IL-5 و IFN-γ در دو نوبت نمونه‌برداری بر حسب گروه‌ها (میانگین±انحراف معیار)

گروه‌ها		بعد از ۲۴ ساعت	بعد از ۴۸ ساعت
IL- ۴(pg/ml)	H+F	۲۸/۲±۰/۲۳	۳۱/۰۶±۰/۳۹
	H+h	۲۸/۴۸±۰/۵۸	۳۱/۳±۰/۵۶
	H/h+F	۲۸/۰۲±۰/۵	۳۷/۷±۲/۰۶
	PBS	۱۸/۲±۰/۲۳	۲۰±۰/۲۲
IL5(pg/ml)	H+F	۲۵/۳۶±۰/۵۵	۳۱/۶±۱/۴۵
	H+h	۲۶/۴±۰/۵۴	۲۸±۰/۷
	H/h+F	۲۷/۶۵±۱/۴۲	۲۲/۱۸±۱۶
	PBS	۱۷/۸۵±۰/۶۸	۱۹/۳۶±۱/۵۴
IFN-γ (pg/ml)	H+F	۲۷/۱±۰/۴۶	۳۲/۴۷±۰/۸۳
	H+h	۲۷/۳۸±۲/۴	۳۱/۵۷±۰/۷۱
	H/h+F	۲۵/۳۲±۰/۰۵	۳۷/۴۶±۸/۷۶
	PBS	۱۵/۴۷±۰/۳۵	۱۷/۲۸±۰/۶

h=hsp90 , H=HbsAg , F=freund's adjuvant

بحث

در این تحقیق در مقایسه گروه‌های Hbs+F (HbsAg protein with freund's adjuvant)، Hbs+h (Core protein with chaperon) و Hbs/h+F (Coexpression of HbsAg and chaperon with freund's adjuvant) بیان همزمان پروتئین و ادجوانت اختلاف معنی‌داری در توتال IgG و IgG2a سرم با گروه‌های دیگر ملاحظه شد، Hsp90 به عنوان ادجوانت حتی از فروند نیز موفق‌تر بود (p<۰/۰۰۵). از نظر قدرت تکثیر و proliferation لنفوسیت‌ها، ترکیب پروتئین با ادجوانت Hsp90 در invitro نشان دهنده ادامه پاسخ‌گویی لنفوسیت‌ها در مواجهه مجدد با آنتی ژن و پاسخ خاطره می‌باشد که در تست MTT جذب بالاتری را نشان داد. میزان IgG2a در نوبت دوم با اختلاف معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل PBS بود و از نظر این آنتی‌بادی اختلاف معنی‌داری بین گروه‌ها مشاهده نشد. اثر فروند بر آنتی ژنیسیتی Hbs آنقدر زیاد بود که حتی بدون PHA هم قابل ملاحظه بود و نشان دهنده قدرت تکثیر ادامه یافته لنفوسیت‌ها است.



نمودار ۳- میزان IFN-γ (pg/ml) درمحیط کشت لنفوسیت‌های طحال بر حسب گروه‌ها

در کل با این آزمایش تاثیر بارز hspبر ادامه عملکرد ایمنی به اثبات رسید. در مقایسه با IL-4 بیان IL-5 بسیار بالاتر بود و چون طحال پایگاه آنتی بادی سازی است در لنفوسیتهای این ارگان، هم بعد از ۲۴ ساعت و هم بعد از ۴۸ ساعت میزان IL-5 که ارتباط مستقیم با آنتی‌بادی سازی دارد بالا می‌باشد. در بین این گروه‌ها، hsp مانند فروند عمل کرد. در این گروه، تولید IFN-γ در سلول‌های طحال در نوبت دوم پایدارتر بود.

Doody و همکاران در سال ۲۰۰۴ دریافتند که گلیکوپروتئین ۹۶ قادر به ایجاد پیچش در پروتئین‌های MHC I و MHC II است و در ارائه آنتی ژن نقش دارد (۱۰). در ضمن باعث تمایز در سلول‌های CD8 T و تبدیل آنها به effector cell می‌شود. به منظور مقایسه اثر ادجوانتی HSP90 از ادجوانت قوی فروند استفاده گردید که طبق تحقیق Sanchez و همکاران قدرت فروند، آلوم و لیپوزوم در تحریک سیستم ایمنی به همراه HbsAg در خوکچه هندی در مقایسه با PBS باعث افزایش تولید آنتی بادی ضد Hbs شدند. ولی تیتر ایجاد شده در مورد فروند از همه بالاتر (۸۲۰) و آلوم از آندو پایین‌تر (۳۸/۴) به دست آمد (۱۱).

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه که تامین کننده بودجه این تحقیق بودند و همچنین مسئولین و همکاران محترم مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی صمیمانه تشکر می‌کنیم. از سرکار خانم پوران قائدی و جناب آقای مهندس ناصر ولایی نیز تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Wallin RP, Lundqvist A, Moré SH, von Bonin A, Kiessling R, Ljunggren HG. Heat-shock proteins as activators of the innate immune system. Trends Immunol 2002; 23:130-35.
2. Heike M, Weinmann A, Bethke K, Galle PR. Stress protein/peptide complexes derived from autologous tumor tissue as tumor vaccines. Biochem Pharmacol 1999; 58:1381-87.
3. Csermely P, Schnaider T, Soti C, Prohászka Z, Nardai G. The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. Pharmacol Ther 1998; 79:129-68.
4. Wan T, Zhou X, Chen G, An H, Chen T, Zhang W, et al. Novel heat shock protein Hsp70L1 activates dendritic cells and acts as a Th1 polarizing adjuvant. Blood 2004; 103:1747-54.
5. Bandehpour M, Khodabandeh M, Mosaffa N, Sharifnia Z, Ghazanfari T, Kazemi B. An efficient procedure for purification of recombinant human β heat shock protein. Daru 2010; 18:64-68.
6. Bandehpour M. Cloning and expression of Hepatitis B surface antigen. Hepat Mon 2008; 8: 17-21.
7. Schirmbeck R, Melber K, Mertens T, Reimann J. Antibody and cytotoxic T-cell responses to soluble hepatitis B virus (HBV) S antigen in mice: implication for the pathogenesis of HBV-induced hepatitis. J Virol 1994; 68:1418-25.
8. Rosengerg IM. Protein analysis and purification.1th ed. Germany: Birkhauser Publisher; 2004. P. 146-148.
9. Xu X, Chen WN, Zheng DL, Huang QL, Lin X. X protein variations of genotype B and C hepatitis B virus isolated from the patients with hepatocellular carcinoma. Ai Zheng 2004; 23:756-61.
10. Doody AD, Kovalchin JT, Mihalyo MA, Hagymasi AT, Drake CG, Adler AJ. Glycoprotein 96 can chaperone both MHC class I- and class II-restricted epitopes for in vivo presentation, but selectively primes CD8+ T cell effector function. J Immunol 2004; 172:6087-92.
11. Sanchez Y, Ionescu-Matiu I, Dreesman GR, Kramp W, Six HR, Hollinger FB, et al. Humoral and cellular immunity to hepatitis B virus-derived antigens: comparative activity of Freund complete adjuvant alum, and liposomes. Infect Immun 1980; 30:728-33.