

以 RBP-4 为靶点的疫苗对 2 型糖尿病 小鼠血糖降低的研究

李彦涵¹, 余柄廷², 孙 静¹, 李建芳¹, 乌美妮¹, 王海璇¹, 胡云章¹, 胡凝珠¹

(1. 中国医学科学院北京协和医学院医学生物学研究所疫苗研究室 云南省重大传染病疫苗研发重点实验室
云南省重大传染病疫苗工程技术研究中心, 昆明 650118; 2. 河北大学生命科学学院, 河北 保定 071000)

【摘要】 目的 探讨以人源 RBP-4 为靶标的疫苗免疫干预胰岛素抵抗的有效性和可行性, 为 2 型糖尿病治疗新方法的推进提供基础研究数据。**方法** 以 T7 噬菌体为载体表达人源 RBP-4 的疫苗经皮下免疫 2 型糖尿病小鼠, 同时设空载体组和空白对照组, 经 2 次免疫后在不同时间点检测体液免疫水平、空腹血糖值及体重, 并于 20 周处死动物进行病理学切片检测。**结果** RBP-4 疫苗有效诱导了抗 RBP-4 IgG 抗体的产生, 并于 12 周达到峰值, 同时, 免疫组的空腹血糖值从第 8 周开始逐步下降, 到第 12 周时较空载体组和空白组有显著差异, 并始终维持在 2 型糖尿病发病值 (7 mmol/L) 以下。实验期间, 2 型糖尿病小鼠未出现蜷缩、竖毛、搔鼻、抽搐等明显异常, 免疫组、空载体组小鼠心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏组织均未观察到明显病变, 表明 RBP-4 疫苗安全性良好。**结论** RBP-4 疫苗能显著降低 2 型糖尿病小鼠的血糖, 有可能成为治疗胰岛素抵抗的一个新突破点。

【关键词】 2 型糖尿病; RBP-4 疫苗; db/db 小鼠

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 10-0046-05

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2015. 010. 011

The research of RBP-4 vaccine reducing blood glucose of type 2 diabete mice

LI Yan-han¹, YU Bing-ting², SUN Jing¹, LI Jian-fang¹, WU Mei-ni¹, WANG Hai-xuan¹,
HU Yun-zhang¹, HU Ning-zhu¹

(1. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical College and Peking Union Medical College,
Yunnan Key Laboratory of Vaccine Research & Development on Severe Infectious Diseases, Yunnan
Research Center of Engineering Technique for Vaccines against Severe Infectious Diseases, Kunming 650118, China;
2. Life Science College of Hebei University, Hebei Baoding 071000, China)

【Abstract】 Objective To explore efficacy of the human RBP-4 vaccine interventions targeting insulin resistance, and provide new ways to treatment of type 2 diabetes. **Methods** T7 bacteriophage vector expressing human-derived vaccine RBP-4 subcutaneously immunized mice with type 2 diabetes, at the same time set up empty vector group and control group. After the second immunization, detecting humoral immunity levels, fasting plasma glucose value and weight at different time points, and the animals were sacrificed for pathological slice assay at 20 weeks. **Results** The anti-RBP-4

【基金项目】 2013 年云南省高技术产业发展项目计划; 基因工程药物关键技术研究及新产品开发应用; 云南省社会发展新药专项 (2013BC011); 北京协和医学院协和青年基金 (33320140080)。

【作者简介】 李彦涵 (1982 -), 女, 助理研究员, 研究方向: 疫苗研发。E-mail: 110393273@qq.com。

【通讯作者】 胡凝珠 (1961 -), 女, 主任技师, 研究方向: 疫苗研发。E-mail: 845653517@qq.com。

IgG antibodies induced by RBP-4 vaccine was peaked at 12 weeks, the fasting blood glucose level of immunity group gradual decline from the 8th week to 12 weeks and compared with empty vector group and the control group were significantly different, and always maintain the value (7 mmol/L) or less. During the experiment, mice with type 2 diabetes did not appear straight, vertical hair, scratching nose, convulsions and other obvious abnormalities. The mouse heart, liver, spleen, lung and kidney lesions of Immunization group and vector group have no obviously pathological changes, indicating RBP-4 vaccine safety is good. **Conclusion** RBP-4 vaccine can significantly reduce fasting blood glucose level in type 2 diabetic mice, it may become a new method in the treatment of insulin resistance.

【Key words】 Type 2 diabetes; RBP-4 vaccine; db/db mouse

目前,我国糖尿病发病人数达 9840 万,预计到 2035 年糖尿病的发病比例将达到 13%^[1],随着病程进展 2 型糖尿病患者将出现许多严重并发症,严重影响生活质量甚至死亡。在目前药物治疗尚不能治愈 2 型糖尿病^[2],并且长期服药将带来巨大经济负担的情况下,另辟途径寻找新的预防和治疗方法具有重要意义。

由脂肪组织分泌的脂肪细胞因子视黄醇结合蛋白-4 (retinol binding protein, RBP-4) 是肥胖症和胰岛素抵抗之间的关联因子^[3]。在对胰岛素不敏感性增加的小鼠及患有肥胖症、2 型糖尿病的患者体内,其血清中 RBP4 的含量明显增加^[4]。血清中 RBP-4 含量的增加,会刺激肝脏表达葡糖异生酶—烯醇丙酮酸磷酸羧激酶,并削弱肌肉组织中的胰岛素信号传导途径^[5]。通过转基因技术过表达人源 RBP-4 或将重组 RBP-4 注射到正常小鼠体内,可以引起机体对胰岛素的抵抗;相反,将 RBP-4 基因敲除后机体对胰岛素的敏感性增加。因此, RBP-4 是一种源于脂肪细胞的“信号”,降低 RBP-4 的水平可能成为治疗 2 型糖尿病的一个新的途径^[6-8]。

本实验将展示有人源全长 RBP-4 序列的以 T7 噬菌体为载体的疫苗与铝佐剂混合后免疫 2 型糖尿病 db/db 小鼠模型,观察糖尿病小鼠免疫后体液免疫效果以及体重、血糖等指标以及病理切片的变化,为以 RBP-4 为靶标的疫苗治疗 2 型糖尿病的研究提供基础数据。

1 材料和方法

1.1 抗原

将人源全长 RBP-4 序列与经酶切处理的 T7 噬菌体基因组连接并展示于 T7 噬菌体表面作为免疫用的疫苗。该疫苗由中国医学科学院医学生物学研究所疫苗研究室提供,噬菌体效价(1.5×10^{10} pfu/mL)。

1.2 实验试剂

稳豪血糖仪和血糖试纸购自强生(中国)医疗器材有限公司;Al(OH)₃ 佐剂(29.9 mg/mL)由中国医学科学院医学生物学研究所提供;ELISA 试剂盒(Anti Mouse ABT System)购自美国 KPL 公司。

1.3 实验动物

B6. BKS(D)-Lepr^{db}/JNju II 型糖尿病小鼠(db/db 小鼠)模型购自南京大学模式动物研究所【SCXK(苏)2015-0001】,6~8 周龄,体重 30~35 g。实验动物使用许可证号【SYXK(滇)2013-0001】。

1.4 动物分组及免疫

将 30 只 II 型糖尿病小鼠(禁食后空腹血糖均 ≥ 10 mmol/L)随机分为 3 组:免疫组(RBP-4 疫苗 1.5×10^8 pfu + Al(OH)₃ 0.6 mg/只)、空载体组(T7 空载体 1.5×10^8 pfu + Al(OH)₃ 0.6 mg/只)、空白对照组(生理盐水),每组各 10 只,免疫剂量为 100 μ L,检测体液免疫效果及体重、血糖指标变化。

1.5 血清中抗-RBP-4 抗原特异性 IgG 抗体水平的检测

于免疫后的 4、8、12、16、20 周采集尾静脉血,分离血清,用 RBP-4 作为抗原包被板子,用间接 ELISA 法检测抗 RBP-4 抗体。取 RBP-4 抗原,加入 96 孔板中,100 μ L/孔,4 $^{\circ}$ C 包被过夜;以 BSA 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h;洗板 4 次,加入倍比稀释的小鼠血清(起始稀释倍数为 1:40),100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h;洗板 4 次,加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG(1:400 稀释),100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h;洗板 3 次,加入 TMB 显色液,100 μ L/孔,显色 5 min;加入 2 mol/L H₂SO₄, 100 μ L/孔,终止反应。于酶标仪 405 和 655 nm 波长处,检测各孔 A 值,以阳性反应的最大稀释度作为样品的抗体效价,根据 ELISA 结果计算各组的平均滴度。

1.6 体重及空腹血糖检测

实验期间,于免疫前及免疫后的 4、8、12、16、20 周检测实验动物血糖及体重指标的变化。过夜禁食、禁水、撤垫料,禁食 12 h 后,测体重及空腹血糖。

1.7 安全性实验

实验期间,观察并记录小鼠的饮食、体重、毛色、注射部位有无异常。免疫 20 周后,取 RBP-4 免疫组、空载体组及空白对照组小鼠心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏组织,制备病理切片,HE 染色,显微镜下观察。

1.8 统计学分析

应用 SPSS 软件进行统计学分析,组间比较采用

t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠血清中抗 RBP-4 疫苗 IgG 抗体水平

间接 ELISA 检测结果显示,RBP-4 疫苗免疫 db/db 小鼠后,诱导了抗 RBP-4 抗体的产生,并且抗体水平在第二次免疫后的第 12 周时升至最高,并于之后开始逐渐下降。

表 1 2 型糖尿病小鼠抗 RBP-4 疫苗 IgG 水平
Tab.1 The anti-RBP-4 IgG levels of type 2 diabete mice

	免疫前 (Before immunization)	4 周(4w)	8 周(8w)	12 周(12w)	16 周(16w)	20 周(20w)
免疫组 (Immunity group)	1:1.5 ± 1	1:425 ± 45	1:1279 ± 355	1:4966 ± 867	1:3867 ± 688	1:3053 ± 759
空载体组 (Empty vector group)	1:2.3 ± 1	1:3.1 ± 2	1:2.8 ± 1	1:1.9 ± 1.5	1:2.6 ± 1	1:1.9 ± 1.5
空白对照组 (Control)	1:1.8 ± 1	1:2.2 ± 1	1:1.8 ± 1	1:1.6 ± 1	1:2.7 ± 1.3	1:2.3 ± 1

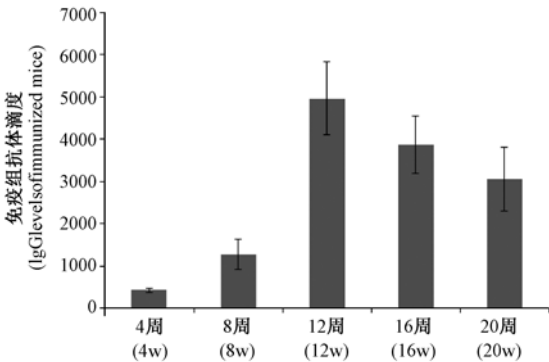


图 1 免疫后不同时间点免疫组小鼠抗 RBP-4 疫苗 IgG 水平

Fig.1 The anti-RBP-4 IgG levels of immunized mice at different time points

2.2 各组小鼠空腹血糖水平

各组小鼠于免疫前及二次免疫后的 4、8、12、16、20 周测空腹血糖。检测结果显示,空载体组和空白对照组在整个实验期间血糖值均大于 7.0 mmol/L,免疫组在免疫后的第 8 周血糖值下降,从第 12 周开始血糖值较空载体组和空白对照组差异显著($P < 0.01$),具有统计学意义。实验结果表明 RBP-4 疫苗免疫 2 型糖尿病小鼠后,对小鼠产生了保护作用,避免血糖水平升高,并且从 12 周以后小鼠血糖值均处于发病值(7.0 mmol/L) 以下,说明 RBP-4 疫苗具有良好的降血糖的作用。

2.3 各组小鼠体重水平

各组小鼠于免疫前及二次免疫后的 4、8、12、16、20 周测体重。检测结果显示,在整个实验期间,

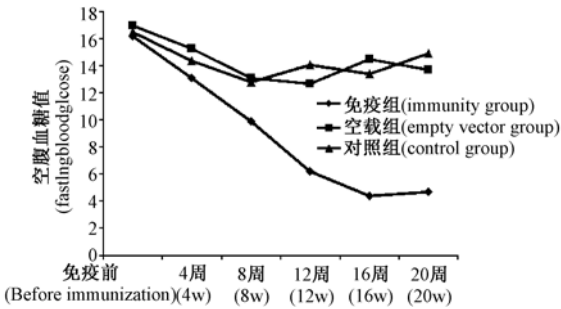


图 2 免疫前及免疫后不同时间点各组小鼠空腹血糖值(单位:mmol/L)

Fig.2 The fasting blood glucose of type 2 diabete mice at different time points (unit: mmol / L)

免疫组较空载体组及空白组体重不具有显著差异($P > 0.5$),说明 RBP-4 疫苗对体重无影响。

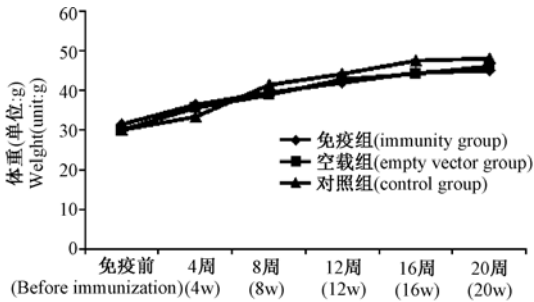


图 3 免疫前及免疫后不同时间点各组小鼠体重水平(单位:g)

Fig.3 The weight of type 2 diabete mice at different time points (unit: g)

2.4 安全性检测

实验期间各组小鼠体重、毛色均正常,未出现

蜷缩、竖毛、搔鼻、抽搐、痉挛、水肿及休克等异常反应,各组小鼠注射部位均未出现红肿、结节。显微镜下观察显示,免疫组、空载体组及空白对照组小鼠心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏组织均未观察到病变,表明 RBP-4 安全性良好,病理切片图片见彩插 6 图 4。

3 讨论

慢性非传染性疾病是全球一个严重的公共卫生问题,已成为影响人民健康的主要危害。

糖尿病已成为继肿瘤和心脑血管病之后的第三大非传染病,是导致病残和死亡的第三大原因。根据最新文献报道,2013 年全球已确诊的糖尿病患者约 3.82 亿,预计到 2035 年将增长至 5.92 亿,其中在发展中国家糖尿病患者的数目将显著增加^[1]。

2 型糖尿病是指由于胰岛素抵抗伴胰岛素分泌不足所致的持续性慢性高血糖,占糖尿病总数的 90% 以上。2 型糖尿病为终身疾病,可出现多种并发症,给患者、家庭以及社会带来沉重的负担。治疗 2 型糖尿病的主要药物有磺酰脲类、双胍类降血糖药、 α 葡萄糖苷酶抑制剂和胰岛素增敏剂^[9-10]。但是采用 2 型糖尿病药物治疗具有以下不可避免的缺点:1. 只能从一定程度上控制血糖;2. 药物价格昂贵,导致治疗成本高;3. 长期服用药物有一定的副作用;4. 需要长期服药,给患者带来极大的不便。

RBP-4 是一种转运蛋白,其主要功能是在血液循环中转运视黄醇。正常情况下,血清 RBP4 主要来源于肝细胞,其次为脂肪组织。新近发现,由脂肪组织分泌的 RBP4 是肥胖症和胰岛素抵抗之间的关联因子。在正常个体中,胰岛素与分布于细胞膜上的相应胰岛素受体结合后,刺激 GLUT4 通路将葡萄糖转运到肌肉组织和脂肪细胞中,并抑制肝脏生成葡萄糖,由此维持血糖处于正常水平。Yang 等^[11]发现,在肥胖动物的脂肪组织中,GLUT4 的表达量降低,伴随的是脂肪细胞分泌的 RBP4 表达量和分泌量的增加。这种分泌因子可能与视黄醇一起作用削弱肌肉组织中胰岛素信号通路,阻碍葡萄糖的转运,并干扰胰岛素对肝脏中葡萄糖生成的抑制作用,最终导致血糖升高。因此 RBP-4 作为一种新的脂肪源性信号,为胰岛素抵抗和 2 型糖尿病的干预治疗提供了新靶标。

本实验用展示于 T7 噬菌体表面的人源 RBP-4 疫苗免疫 2 型糖尿病模型小鼠 db/db,于 2 次免疫

后的各个时间点检测 db/db 小鼠的体液免疫效果、体重、血糖指标,免疫后第 20 周处死动物,检测病理切片。实验结果表明,RBP-4 疫苗免疫小鼠后,诱导了抗 RBP-4 抗体的产生,并于 12 周达到峰值。同时,免疫组小鼠的空腹血糖值从 2 次免疫后的 8 周开始逐渐下降,在 12 周时与空载体组及空白组空腹血糖相比较具有显著差异,并在 12 周之后免疫组小鼠的空腹血糖值均低于 2 型糖尿病发病值(7 mmol/L),而空载体组和空白组小鼠在整个实验间期空腹血糖值均高于 2 型糖尿病发病值(7 mmol/L)。因此实验结果表明,RBP-4 复疫苗免疫 2 型糖尿病小鼠后有效的诱导了抗 RBP-4 抗体的产生,中和了小鼠血液中的 RBP-4 表达量,使胰岛素对肝脏中葡萄糖生成的抑制作用恢复正常,最终血糖达到正常值,对 2 型糖尿病小鼠起到了有效的保护作用。病理切片结果显示,免疫组小鼠各主要组织无明显异常,安全性良好。但 RBP-4 疫苗对 2 型糖尿病小鼠的体重无干预作用,推测 RBP-4 虽然与糖代谢、脂代谢紧密相关,但在 2 型糖尿病干预过程中不涉及体重的降低。本实验结果表明,将 RBP-4 作为 2 型糖尿病免疫干预的新靶标,有可能成为治疗胰岛素抵抗的一个新突破点。

参考文献:

- [1] Guariguata L, Whiting DR, Hambleton I, *et al.* Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035 [J]. *Diabetes Res Clin Prac*, 2014, 103: 137-149.
- [2] 常向云, 糖尿病流行现状及防治对策[J], 全科医学临床与教育, 2004, 2(1): 49-50.
- [3] Shaker O, El-Shehaby A, Zakaria A, *et al.* Plasma visfatin and retinol binding protein-4 levels in patients with type 2 diabetes mellitus and their relationship to adiposity and fatty liver[J]. *Clin Biochem*, 2011, 44(17/18): 1457-1463.
- [4] Tan Y, Sun LQ, Kamal MA, *et al.* Suppression of retinol-binding protein 4 with RNA oligonucleotide prevents high-fat diet-induced metabolic syndrome and non-alcoholic fatty liver disease in mice [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1811(12): 1045-1053.
- [5] Wang MN, Han YB, Li Q, *et al.* Higher serum retinol binding protein 4 may be a predictor of weak metabolic control in chinese patients with type 2 diabetes mellitus[J]. *J Int Med Res*, 2012, 40(4): 1317-1324.
- [6] Berry DC, Noy N. Signaling by vitamin A and retinol-binding protein in regulation of insulin responses and lipid homeostasis [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1821(1): 168-176.
- [7] Rocha M, Banuls C, Bellod L, *et al.* Association of serum retinol binding protein 4 with atherogenic dyslipidemia in morbid obese patients[J]. *Plos One*, 2013, 8(11): e78670.

- [8] Norseen J, Hosooka T, Hammarstedt A, *et al.* Retinol-binding protein 4 inhibits insulin signaling in adipocytes by inducing proinflammatory cytokines in macrophages through a c-Jun N-terminal kinase-and toll-like receptor 4-dependent and retinol-independent mechanism[J]. Mol Cell Biol, 2012, 32 (10) : 2010 – 2019.
- [9] 张安玉, 糖尿病流行趋势及其防治的有关问题, 中国慢性病预防与控制, 2005, 13(6) : 257 – 259.
- [10] 任丽, 2 型糖尿病口服药物进展[J]. 辽宁医学杂志, 2006, 20 (4) : 247 – 248.
- [11] Qin Yang. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes, Nature, 2005, 436: 356 – 3.
- [修回日期] 2015-08-31

《中国实验动物学报》《中国比较医学杂志》 入编“中文核心期刊要目总览”

《中文核心期刊要目总览》是学术界对某类期刊的定义, 一种期刊等级的划分。它的对象是中文学术期刊。是根据期刊影响因子等诸多因素所划分的期刊。中文核心期刊是北京大学图书馆联合众多学术界权威专家鉴定, 目前受到了学术界的广泛认同。从影响力来讲, 其等级属同类划分中较权威的一种。按照惯例, 北大核心期刊每四年由北大图书馆评定一次, 并出版《北大核心期刊目录要览》一书。

2014 年版核心期刊定量评价体系采用了被索量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、他引影响因子、被国内外重要检索工具收录、基金论文比、Web 下载量、论文被引指数、互引指数等 12 个评价指标, 涉及期刊 14, 728 余种。经过定量评价和定性评审, 从我国正在出版的中文期刊中评选出 1983 种核心期刊。

经研究人员对相关文献的检索、统计和分析, 以及学科专家评审:

《中国实验动物学报》入编《中文核心期刊要目总览》2014 年版(即第七版)之生物学类的核心期刊;

《中国比较医学杂志》入编《中文核心期刊要目总览》2014 年版(即第七版)之综合性医药卫生的核心期刊。

《中国实验动物学报》《中国比较医学杂志》编辑部

2015 年 8 月