

CD137L 在 HBsAg DNA 疫苗诱导小鼠细胞 免疫应答中的佐剂效应

江虹¹, 黄茵¹, 史丽云¹, 吴炜², 蔡玲斐¹, 贾红宇², 钟石根¹

(1. 杭州师范大学基础医学部免疫学教研室, 浙江 杭州 310036;

2. 浙江大学医学院附属第一医院传染病研究所, 传染病诊治国家重点实验室, 浙江 杭州 310003)

[摘要] **目的:**研究共刺激分子 CD137L 重组质粒对 HBsAg DNA 疫苗诱导小鼠细胞免疫应答和回忆反应的佐剂作用。**方法:**将小鼠 CD137L 真核表达载体 (pcD137L) 体外转染 NIH3T3 细胞, RT-PCR、流式细胞仪和免疫荧光法分别检测 CD137L mRNA 和蛋白的表达; pcD137L 与 HBsAg DNA 疫苗 (pcDS) 通过肌肉注射联合免疫 BALB/c 小鼠, LDH 释放法测定体外脾细胞特异性 CTL 杀伤活性; 流式细胞仪分析小鼠脾脏 CD8⁺ 记忆 T 细胞数量; 流式细胞仪检测 CD8⁺ T 细胞及淋巴细胞中 IFN- γ 和 IL-4 的表达水平。**结果:**重组质粒 pcD137L 在 NIH3T3 细胞中获得有效表达。与 pcDS 单独免疫组比较: 免疫后 1 周, pcDS + pcD137L 免疫组能诱导更强的 HBsAg 特异性 CTL 杀伤活性 ($P < 0.05$); 免疫后 1 周和 12 周, pcDS + pcD137L 免疫组 CD8⁺ T 细胞 CD44^{high} 和 CD127 表达水平均显著增高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 免疫后 1 周、12 周和 13 周 (即再次给予 pcDS 刺激后 1 周), pcDS + pcD137L 免疫组分别明显上调 CD8⁺ T 细胞和淋巴细胞中 IFN- γ 产生细胞的百分比, 差异有显著意义 (均 $P < 0.05$)。**结论:**共刺激分子 CD137L 能显著增强 HBsAg DNA 疫苗诱导的 Tc1 (I 型) 细胞免疫、特异性 CTL 应答及回忆反应, 是诱导 HBV 特异性 T 细胞应答的有效佐剂。

[关键词] DNA, 病毒/免疫学; 共刺激分子; CD137L; 乙型肝炎病毒; 细胞免疫应答; 回忆反应; DNA 疫苗

[中图分类号] R 392.11 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1008-9292(2010)04-0370-08

Adjuvant effect of co-stimulatory molecule CD137L on cellular responses to HBsAg DNA vaccination in mice

JIANG Hong¹, HUANG Yin¹, SHI Li-yun¹, WU Wei², CAI Ling-fei¹, JIA Hong-yu², ZHONG Shi-gen¹

(1. Department of Immunology, College of Preclinical Medicine, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036, China; 2. Institute of Infectious Diseases, State Key Laboratory for Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases, The First Affiliated Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310003, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the adjuvant effect of co-stimulatory molecule CD137L on

收稿日期: 2010-05-07 修回日期: 2010-06-12

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目 (Y207643); 杭州市科技发展计划项目 (200803331318)。

作者简介: 江虹 (1983-), 女, 硕士研究生, 从事病毒性乙型肝炎的免疫治疗研究。

通讯作者: 黄茵 (1966-), 女, 教授, 硕士生导师, 从事病毒性肝炎的免疫学发病机制与治疗研究; E-mail: 163_huangyin@163.com

cellular responses to HBsAg DNA vaccination in mice. **Methods:** Eukaryotic expression vector containing the full length of mouse CD137L cDNA sequence (pcD137L) was transfected into NIH3T3 cells, and then the expression of CD137L mRNA and protein in the transfected cells were detected by RT-PCR, flow cytometry and immunofluorescence method, respectively. The BALB/c mice were co-immunized with pcD137L and HBsAg DNA vaccine (pcDS) by intramuscular injection. HBsAg-specific activity of splenic cytotoxic T lymphocyte (CTL) in the immunized mice was measured by LDH release assay. The splenic memory CD8⁺ T cells, and intracellular IFN- γ and IL-4 of splenic lymphocytes and CD8⁺ T cells after immunization were detected by flow cytometry. **Results:** The NIH3T3 cells transfected with pcD137L efficiently expressed mouse CD137L mRNA and protein. HBsAg-specific CTL responses induced by the pcDS plus pcD137L group were much stronger than those induced by pcDS alone at a week after immunization ($P < 0.05$). Compared to mice immunized with pcDS alone, CD44^{high} and CD127 (IL-7R) were all significantly up-regulated in memory CD8⁺ T cells from the mice immunized with pcDS combined CD137L both at a week and 12 weeks after immunization ($P < 0.05$ and $P < 0.01$). The pcDS plus CD137L group also elicited higher levels of IFN- γ secreted by CD8⁺ T cells and splenic lymphocytes than pcDS alone at a week, 12 and 13 weeks after immunization, respectively (all $P < 0.01$). **Conclusion:** DNA, viral/immunol; Co-stimulatory molecule CD137L can enhance the Tc1 (type I) cell-mediated immunity, HBsAg-specific CTL and memory responses induced by HBsAg DNA vaccine, and may be an efficient adjuvant in priming HBV-specific T cell response.

[**Key words**] DNA, viral/immunol; Co-stimulatory molecule; CD137L; Hepatitis B virus; Cellular immune responses; Memory responses; DNA vaccine

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2010, 39(4):370-377.]

乙型肝炎病毒 (Hepatitis B virus, HBV) 特异性细胞免疫应答低下或异常, 是导致 HBV 感染慢性化或长期携带的主要原因^[1-3]。因此, 诱导有效细胞免疫, 尤其是特异性 CD8⁺ 细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 反应的治疗性疫苗有望控制病毒复制, 乃至清除感染病毒。尽管在动物实验和前期临床实验中发现, 各类治疗性乙肝疫苗对 HBV 持续感染有一定的疗效, 但大多最终难以诱导长久而持续的抗病毒免疫^[4,6]。因此, 通过不同策略增强 HBV 疫苗免疫作用的有效性和持续性, 已成为慢性乙肝免疫治疗研究的重要方向。

CD137L(4-1BBL) 是独立于 CD28-B7 信号以外的共刺激分子, 主要表达于专职抗原提呈细胞 (巨噬细胞、树突状细胞、B 细胞), 属肿瘤坏死因子超家族成员, 为 II 型跨膜糖蛋白, 其胞外区与分布在活化 T 细胞、NK 细胞等表面的 CD137(4-1BB) 分子结合, 对增强和维持免疫应

答有重要作用^[7-8]。

本研究我们在构建小鼠共刺激分子 CD137L 真核表达质粒的基础上, 将重组质粒与 HBsAg DNA 疫苗共免疫 BALB/c 小鼠, 观察其体内对 DNA 疫苗诱导特异性细胞免疫应答及记忆 T 细胞的作用, 探讨 CD137L 分子作为 HBV DNA 疫苗的佐剂而增强抗病毒免疫治疗作用的可行性。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 荧光 (FITC、PE 或 PCy5) 标记的抗小鼠 γ -干扰素 (IFN- γ)、白细胞介素-4 (IL-4) 和 CD8 α 单抗及相应的同型对照抗体 (BD 公司); FITC、PE 或 PCy7 标记的抗小鼠 CD137L、CD44 和 CD127 (IL-7Ra) 单抗及相应的同型对照抗体, 以及重组小鼠 IL-2、抗小鼠 CD28 单抗、固定剂和穿膜剂 (ebioscience 公司); RPMI 1640 培养基、胎牛血清 (FCS) 和

TRIzol RNA 提取试剂盒 (Gibco 公司); 逆转录试剂盒 (Promega 公司); 刀豆蛋白 A (con A)、G418、细胞因子刺激剂 (PMA、Ionomycin 和 Monensin, Sigma 公司); QIAGEN Plasmid Plus Giga Kit 质粒纯化试剂 (QIAGEN 公司); Lipofectamine™ 2000 转染试剂 (Invitrogen 公司); 乳酸脱氢酶 (LDH) 释放法检测试剂盒 (Roche 公司)。HBsAg 特异性 CTL 多肽 (L^d /S28-39, IPQSLDSWWTSL) 由南京金思特科技有限公司合成。根据 GenBank 中小鼠 CD137L cDNA 全长序列设计并合成引物 P1 (5'-CGGAA TTCATGGACCAGCACACACTTGATGTGG-3') 和 P2 (5'-CCGCTCGAGTCATTCCTCCATGGGTTGTCTG GGTTC-3'), 分别引入 EcoR I 和 Xho I 酶切位点 (下划线部分), 预计扩增片段为 947 bp。引物合成由上海生工生物工程公司完成。

1.2 实验动物、质粒和细胞株 BALB/c ($H-2^d$) 小鼠, 雌性, 6~8 周龄, SPF 级, 购自中科院上海实验动物中心。HBsAg DNA 疫苗 pcDS 为本实验室构建, 由 681 bp 的 ayw 型 HBV S 基因和真核表达载体 pcDNA3.1 (+) 构建而成。pcDNA3.1 (+)、NIH3T3 细胞及其他分子克隆相关菌株和质粒为本实验室保存。

1.3 重组质粒的制备和检测

1.3.1 重组质粒 pcD137L 的构建与制备 分离 BALB/c 小鼠脾细胞, Tris·NH₄Cl 溶解红细胞, PBS 洗涤后, 在含 conA (5 μ g/ml) 的 cRPMI 1640 培养基 (含 10% FCS, 100 U/ml 青霉素, 100 μ g/ml 链霉素) 中, 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 48~72 h 后收集细胞, TRIzol 试剂提取细胞总 RNA, 通过 RT-PCR 克隆小鼠 CD137L cDNA, 测序正确后, 将其克隆到真核表达载体 pcDNA3.1 (+) 中, 形成小鼠 CD137L 重组质粒 (以下简称 pcD137L), 经酶切、PCR 和测序等方法鉴定其正确 (另文待发表)。以 QIAGEN DNA 纯化试剂盒大量抽提和纯化重组质粒, 分光光度计测定质粒浓度, 过滤除菌后于 -20 °C 保存。pcDS 及对照质粒 pcDNA3.1 (+) 以同样方法抽提和纯化。

1.3.2 转染 NIH3T3 细胞及 CD137L 的表达 参照 Lipofectamine™ 2000 试剂说明书, 脂质体介导将 pcD137L 和空载体 pcDNA3.1 (+) 分

别转染 NIH3T3 细胞, 培养 48 h 后换以含 G418 (500 μ g/ml) 的 cRPMI 1640 培养液培养和筛选阳性克隆, 约 2 周后逐个转移出阳性克隆, 并继续筛选扩增培养 2 周以上。TRIzol 试剂提取上述阳性克隆细胞的总 RNA, 以 RT-PCR 方法检测转染细胞 CD137L mRNA 的表达。转染细胞经胰酶消化和 PBS 洗涤 3 次后, 分别加入 PE-抗小鼠 CD137L 或同型对照抗体, 室温避光孵育 30 min, PBS 洗涤 3 次, 用于流式细胞仪检测, 或制片后荧光显微镜下观察 CD137L 蛋白的表达。

1.4 动物分组与免疫 BALB/c 小鼠随机分 6 组, 每组 12 只: (1) pcDNA3.1 (+); (2) pcD137L; (3) pcDS; (4) pcDS + pcDNA3.1 (+); (5) pcDS + pcD137L; (6) NS。每种质粒按 100 μ g/50 μ l (100 μ g DNA 溶于 50 μ l 含 25% 蔗糖的 NS 中) 多点注射于每只小鼠双后肢肌肉, 采用 0、3、6 周程序共免疫 3 次。最后 1 次免疫结束后 12 周, 除 NS 对照组外, (1)~(5) 组再给予一次 pcDS 刺激, 剂量同上。

1.5 CTL 活性检测 免疫后 1 周处死小鼠, 分离脾细胞, 溶解红细胞后制备单细胞悬液, 以含 HBsAg 特异性 CTL 多肽 (L^d /S28-39, 2 μ g/ml)、IL-2 (20 U/ml) 及 5% FCS 的 RPMI 1640 培养基培养, 每隔 2d 半量换液, 共培养 7d 以上作为效应细胞; 正常 BALB/c 小鼠脾细胞与肽 S28-39 (5 μ g/ml) 在无血清 RPMI 1640 中, 5% CO₂、37 °C 孵育 2 h, PBS 洗涤 3 次后作为 HBsAg 特异性靶细胞, 而肽 S28-39 未处理的脾细胞作为对照靶细胞。将效应细胞和靶细胞分别按效: 靶比 (E:T) 为 10、20、40 混合, 以 LDH 释放法测定 HBsAg 特异性 CTL 活性, 方法参见试剂盒说明书。CTL 活性 (%) = (效-靶混合孔 - 效应细胞自发释放孔 - 靶细胞自发释放孔) / (靶细胞最大释放孔 - 靶细胞自发释放孔) × 100%。HBsAg 特异性 CTL 活性 (%) = HBsAg 特异性靶细胞 CTL - 对照靶细胞 CTL。

1.6 CD8⁺ 记忆 T 细胞的比例分析 免疫后 1 周和 12 周分别处死小鼠, 制备脾细胞悬液, 分别与 PCy5-抗 CD8 和 FITC-抗 CD127 (IL-7Ra) 及 PCy7-抗 CD44 单抗, 或同型对照抗体避光孵育 30 min, PBS 洗涤 3 次后, 流式细胞仪分析 CD44^{high}CD8⁺ 及 CD127⁺CD44^{high}CD8⁺ 记忆

T细胞数。

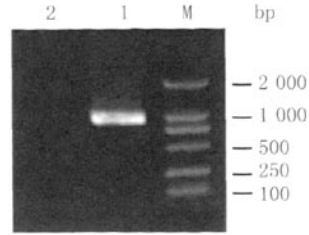
1.7 CD8⁺T 细胞内细胞因子检测 方法参见文献报道^[9]。免疫后1周、12周及13周分别取小鼠脾脏后制备脾细胞悬液,按细胞浓度为 10^6 细胞/ml 与刺激剂 PMA (25 ng/ml)、Ionomycin (1 μ g/ml) 和 Monensin (2 μ g/ml) 混匀(即非特异性刺激值),或细胞与上述刺激剂及 HBsAg 特异性多肽 S28-39 (5 μ g/ml)、抗小鼠 CD28 单抗 (2 μ g/ml) 混匀(即特异性增强刺激值),37℃、5% CO₂ 孵育 4 h。先后加入 PCy5-抗 CD8 单抗、固定剂和破膜剂、FITC-抗 IFN- γ 及 PE-抗 IL-4 单抗或同型对照抗体,室温避光孵育 30 min, PBS 洗涤后,流式细胞仪检测产生 IFN- γ 或 IL-4 的 CD8⁺T 细胞数。HBsAg 肽特异性刺激值 = 特异性增强刺激值 - 非特异性刺激值。

1.8 统计学处理 用统计学软件 SPSS 11.0 处理和分析实验数据(以表示),采用方差分析(ANOVA),两两比较用 q 检验, $P < 0.05$ 为差异具有显著意义。

2 结果

2.1 重组质粒 pcD137L 在 NIH3T3 细胞中的表达 分别从转染重组质粒 pcD137L 及空载体的 NIH3T3 细胞提取总 RNA, RT-PCR 分析小鼠 CD137L mRNA 的表达。PCR 产物电泳结果显示,重组质粒转染的细胞中扩增出与目的基因(947 bp)相符的单一条带,空载体转染细胞中未检出相应大小条带(图1)。转染 pcD137L 的 NIH3T3 细胞经 PE-抗小鼠 CD137L 单抗染色后,流式细胞仪检测到 3 个阳性克隆细胞表面 CD137L 分子阳性率分别为 33.5%、38.3% 和 44.7%,并且在荧光显微镜下还观察到这些细胞的胞膜呈现橙黄色荧光(图2),而空载体转染细胞均未见阳性表达。这些结果表明,构建的重组质粒 pcD137L 在真核细胞内能成功表达目的蛋白。

2.2 脾细胞特异性 CTL 检测结果 免疫后1周,以 LDH 释放法检测小鼠脾细胞体外特异性 CTL 活性。结果显示(图3),在效:靶比为 10、20 和 40 时,pcDS + pcD137L 组的 CTL 反应分别为 21.48%、27.25% 和 38.25%,均显著高于



M: DNA marker; Lane 1: NIH3T3 cells transfected with pcD137L; Lane 2: NIH3T3 cells transfected with pcDNA3.1(+).

图1 RT-PCR 检测 CD137L mRNA 的表达
Fig.1 Detection for expression of CD137L mRNA by RT-PCR

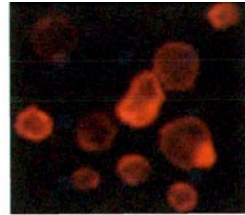
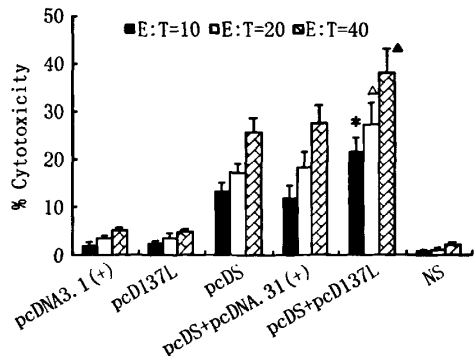


图2 免疫荧光法检测 CD137L 蛋白的表达 ($\times 200$)

Fig.2 Detection for expression of CD137L protein by immunofluorescence assay ($\times 200$)



* $P < 0.05$, $\Delta P < 0.05$, $\Delta P < 0.05$, vs pcDS group at E: T = 10, 20 and 40, respectively.

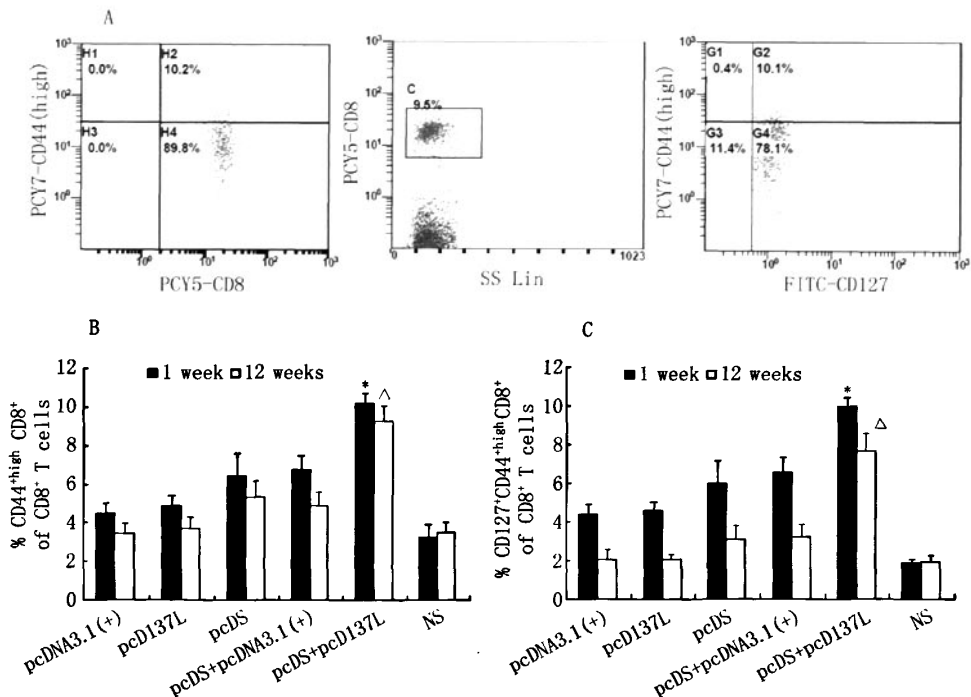
图3 特异性 CTL 活性检测

Fig.3 The CTL response *in vitro* a week after immunization

pcDS 组的 13.13%、17.35% 和 25.90% (均 $P < 0.05$), 而 pcDS + pcDNA3.1(+) 组与 pcDS 组比较差异无显著意义, 表明共刺激分子 CD137L 能明显增强 HBsAg DNA 疫苗诱导的特异性 CTL 应答。

2.3 脾细胞 CD8⁺ 记忆 T 细胞分析结果 流式细胞术分析免疫后小鼠脾细胞记忆 T 细胞 (图 4A), 结果显示, 免疫后 1 周和 12 周, pcDS + pcD137L 免疫组 CD8⁺ T 细胞均表达高水平 CD44^{high} 和 CD127, 与 pcDS 单独免疫组比较有

显著差异 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 但 pcDS + pcDNA3.1(+) 组与 pcDS 组之间差异不明显 (图 4B 和 C), 表明 CD137L 分子能明显促进 pcDS 疫苗诱导 CD8⁺ 记忆 T 细胞产生。除 NS 组外, 各免疫组在 1 周时 CD8⁺ T 细胞中 CD44^{high} 和 CD127⁺ CD44^{high} 的百分率均非常接近, 但 12 周时 CD127⁺ CD44^{high} 细胞百分率明显低于 CD44^{high} 细胞 (图 4B 和 C), 提示随着免疫刺激的减弱 CD127 (IL-7R) 的表达可能逐渐降低。



* $P < 0.05$, $^{\Delta} P < 0.05$, $^{\Delta\Delta} P < 0.01$, vs pcDS group at a week and 12 weeks after immunization, respectively.

图 4 流式细胞术分析 CD8⁺ 记忆 T 细胞的比例

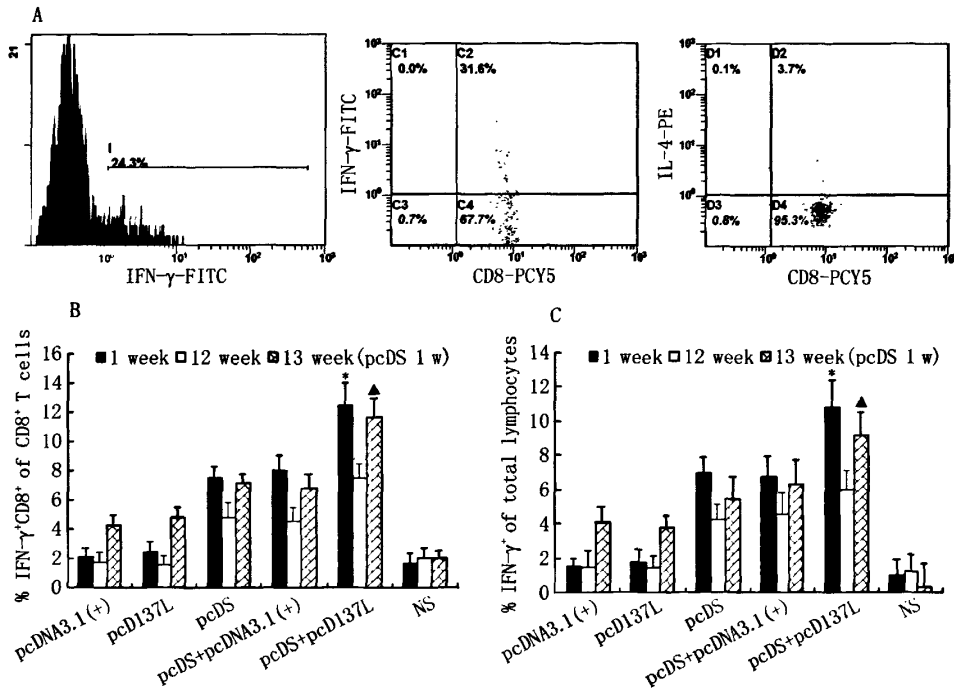
Fig. 4 Analysis of CD8⁺ memory T cells by flow cytometry

2.4 CD8⁺ T 细胞内 IFN- γ /IL-4 分析结果 以流式细胞术分析免疫后小鼠脾细胞内 IFN γ 和 IL-4 产生 (图 5A)。结果显示 (图 5B), 在免疫后 1 周、12 周和 13 周 (即 pcDS 刺激后 1 周), 与单独免疫 pcDS 组相比, pcDS + pcD137L 联合免疫组均显著上调 CD8⁺ T 细胞中 HBsAg 肽特异性

IFN- γ 产生细胞的百分比 (7.48%、4.83% 和 7.13% vs 12.45%、7.43% 和 11.63%, $P < 0.05$); 此外, 在免疫后 1 周和 13 周与 pcDS 组比较, pcDS + pcD137L 组也能显著提高特异性 IFN- γ 应答的淋巴细胞百分比 ($P < 0.05$, 图 5C), pcDS + pcDNA3.1(+) 组与 pcDS 组之间均无显

著差异,表明 pcD137L 明显促进 HBsAg DNA 疫苗诱导更强的 Tc1 反应及 I 型细胞免疫应答。另一方面,除 NS 组外,在免疫后 12 周,产生 IFN- γ 的 CD8⁺ T 细胞或淋巴细胞百分率较 1 周时均明显减少,但再次给予 pcDS 刺激后 1 周, pcDS、pcDS + pcDNA3.1(+) 及 pcDS + pcD137L 免疫组 IFN- γ ⁺ CD8⁺ T 细胞,或 IFN- γ ⁺ 淋巴细胞数均明显提高(图 5B 和 5C)。初次受 pcDS 刺

激的 pcDNA3.1(+) 组和 pcD137 组则引起较 pcDS 组低水平的反应,表明 HBsAg 基因能激发 pcDS 疫苗的回忆反应,而 pcD137L 能增强 pcDS 这种反应的记忆性。由于各组 IL-4⁺ CD8⁺/CD8⁺ T 细胞检测结果较低(2%~7%),减去非特异性本底后,肽特异性刺激组间无统计学差异(数据未显示),提示 CD137L 分子对 CD8⁺ T 细胞 IL-4 产生的调节作用不明显。



Data shown in (B) and (C) are HBsAg-specific IFN- γ response by subtracting the HBsAg-nonspecific IFN- γ response. * $P < 0.05$, $\Delta P < 0.05$, $\Delta P < 0.05$, vs pcDS group at a week, 12 and 13 weeks (namely a week post another pcDS stimulation) after immunization, respectively.

图5 流式细胞术分析抗原特异性胞内细胞因子的分泌水平

Fig.5 Analysis of antigen-specific intracellular cytokine production by flow cytometry

3 讨论

乙肝治疗性疫苗研究的主要目标是增强 HBV 抗原诱导有效而持久的细胞免疫应答^[46]。本研究用共刺激分子 CD137L 重组质粒 pcD137L 作为 HBV DNA 疫苗的佐剂,观察其体内对疫苗诱导的抗 HBV 细胞免疫应答的

影响作用。结果显示,CD137L 分子可显著增强乙肝 HBsAg DNA 疫苗 pcDS 的细胞免疫应答和免疫记忆性。与 pcDS 单独免疫比较, pcDS 与 pcD137L 共免疫能诱导更强的 HBsAg 特异性 CTL 应答(图 3),及增加表达 CD44^{high} 和 CD127 的 CD8⁺ 记忆 T 细胞数量(图 4)。重组质粒 pcD137L 还明显促进 pcDS 诱导淋巴细

胞和 CD8⁺ T 细胞特异性 IFN- γ 反应,而且,在免疫刺激减弱的 12 周再次受到 HBsAg 基因刺激后,pcD137L 能增强 pcDS 疫苗引起的 HBsAg 特异性 IFN- γ 应答的回忆反应(图 5),这与 pcDS 与 pcD137L 联合免疫上调 CD8⁺ 细胞中记忆 T 细胞比率的结果相一致。

研究证实,HBV DNA 疫苗能诱导特异性 Th1/Tc1 (I 型)细胞免疫应答和特异性 CD8⁺ CTL 反应,是具有较好临床应用前景的抗 HBV 治疗性疫苗之一,但 DNA 疫苗也存在免疫原性低、用量大等不足,还需探索新的方法以增强其临床疗效^[6,10]。

CD137/CD137L 是 CD28/B7 之外的另一对重要的协同刺激信号分子,其作用主要表现在免疫应答的后期,为 CD8⁺ T 细胞克隆扩增、存活和记忆性杀伤提供信号,其刺激 T 细胞增殖和分泌细胞因子的作用,在缺乏强大的 CD28/B7 信号时表现更明显^[7]。已发现,CD137L 能诱导 Th1 应答和 Tc1 应答,促进 CD8⁺ T 细胞的细胞毒活性及免疫记忆细胞的形成;CD137L 转染的 APC 细胞体内能上调 T 淋巴细胞增殖及增强 CTL 应答^[7-8]。

Bukczynski 等^[11] 报告,CD137L 重组腺病毒作为佐剂能促进 APC 细胞的抗原提呈作用,增强流感病毒和 EB 病毒特异性 CTL 应答;Harrison 等^[12] 发现,表达 4-1BBL 的重组痘病毒明显增强 HIV 疫苗诱导小鼠产生以 IFN- γ 应答为特征的特异性 CD8⁺ T 细胞应答,这种作用在免疫后 2 个月仍能检测到;Du 等^[13] 用 CD137L 重组质粒与 HBsAg 核酸疫苗共免疫 C57BL/6 小鼠,1 周后检测到 HBV 特异性的 T 细胞内 IFN- γ 表达、CTL 应答和记忆细胞等产生,均比单用核酸疫苗组明显增强。与上述文献报告相似,我们发现 CD137L 真核表达质粒作为佐剂,也能显著增强 HBsAg DNA 疫苗在 BALB/C 小鼠诱导特异性 CTL 应答、CD8⁺ 记忆 T 细胞及 CD8⁺ T 细胞内 IFN- γ 的表达。此外,我们还观察到小鼠接种疫苗后 12 周 Tc1 应答也相应减弱,但 HBsAg 基因的刺激能激发强有力的回忆反应,pcD137L 可增强 pcDS 疫苗形成的免疫记忆性,提示共刺激分子 CD137L 能促进 HBsAg DNA 疫苗诱导更持久的免疫应答,这

对以最终清除 HBV 为目标的治疗性乙肝疫苗诱导长期抗病毒免疫有重要意义。

记忆 T 细胞,尤其是抗原特异性的 CD8⁺ 记忆 T 细胞,在病毒感染的清除和防止再感染中起到非常重要的作用^[14]。已证实,IL-7 涉及效应 T 细胞扩增和记忆 T 细胞的维持^[15]。本研究中,重组质粒 pcD137L 上调 CD44⁺high CD8⁺ 记忆 T 细胞数量及其上的 IL-7R (CD127) 表达,提示共刺激分子 CD137L 可能通过加强 IL-7R 表达来促进记忆 T 细胞的形成和维持,从而可增强 pcDS 疫苗引起的回忆反应。

总之,本研究证实,CD137L 重组质粒作为佐剂能显著增强 HBsAg DNA 疫苗诱导的以分泌 IFN- γ 为特征的 I 型细胞免疫及记忆反应,是旨在产生持续而强有力的细胞免疫应答以清除病毒的 HBV 治疗性疫苗的有效佐剂,可为慢性乙肝的免疫治疗提供新的疫苗优化手段。但 CD137L 分子是否促进其他形式 HBV 疫苗的抗病毒作用,如蛋白疫苗、DC 疫苗等,有待进一步研究。

References:

- [1] LOK A S, MCMAHON B J. Chronic hepatitis B [J]. *Hepatology*, 2007, 45 (2): 507-539.
- [2] MAINI M K, SCHURICH A. The molecular basis of the failed immune response in chronic HBV: Therapeutic implications [J]. *J Hepatol*, 2010, 52 (4): 616-619.
- [3] PENG Guo-ping, SUN Wen, WU Wei, et al (彭国平, 孙雯, 吴伟, 等). PD-L1 expression in circulating dendritic cells of patients with chronic hepatitis B [J]. *Journal of Zhejiang University: Medical Science* (浙江大学学报: 医学版), 2008, 37 (4): 364-372. (in Chinese)
- [4] MICHEL M L, MANCINI-BOURGAIN M. Therapeutic vaccination against chronic hepatitis B virus infection [J]. *J Clin Virol*, 2005, 34 (S1): S108-114.
- [5] INCHAUSPE G, MICHEL ML. Vaccines and immunotherapies against hepatitis B and hepatitis C viruses [J]. *J Viral Hepat*, 2007, 14 (S1): 97-103.
- [6] VANDEPAPELIERE P. Therapeutic vaccination against chronic viral infections [J]. *Lancet Infect*

- Dis, 2002, 2(6): 353-367.
- [7] WILCOX R A, CHAPOVAL A I, GORSKI K S, et al. Cutting edge: Expression of functional CD137 receptor by dendritic cells [J]. *J Immunol*, 2002, 168(9): 4262-4267.
- [8] FUTAGAWA T, AKIBA H, KODAMA T, et al. Expression and function of 4-1BB and 4-1BB ligand on murine dendritic cells [J]. *Int Immunol*, 2002, 14(3): 275-286.
- [9] HUANG Y, CHEN Z, JIA H, et al. Induction of Tc1 response and enhanced cytotoxic T lymphocyte activity in mice by dendritic cells transduced with adenovirus expressing HBsAg [J]. *Clin Immunol*, 2006, 119(3): 280-290.
- [10] MANCINI BOURGINE M, FONTAINE H, SCOTT ALCARA D, et al. Induction or expansion of T-cell responses by a hepatitis B DNA vaccine administered to chronic HBV carriers [J]. *Hepatology*, 2004, 40(4): 874-882.
- [11] BUKCZYNSKI J, WEN T, ELLEFSEN K, et al. Costimulatory ligand 4-1BBL (CD137L) as an efficient adjuvant for human antiviral cytotoxic T cell responses [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2004, 101(5): 1291-1296.
- [12] HARRISON J M, BERTRAM EM, BOYLE DB, et al. 4-1BBL coexpression enhances HIV-specific CD8 T cell memory in a poxvirus prime-boost vaccine [J]. *Vaccine*, 2006, 24 (47-48): 6867-6874.
- [13] DU X, ZHENG G, JIN H, et al. The adjuvant effects of co-stimulatory molecules on cellular and memory responses to HBsAg DNA vaccination [J]. *J Gene Med*, 2007, 9(2): 136-146.
- [14] WELSH R M, SELIN L K, SZOMOLANYI-TSUDA E. Immunological memory to viral infections [J]. *Annu Rev Immunol*, 2004, 22: 711-743.
- [15] KAECH S M, TAN J T, WHERRY E J, et al. Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells [J]. *Nat Immunol*, 2003, 4(12): 1191 - 1198.

[责任编辑 张荣连]

(上接第 369 页)

- [17] LIU B P, STRITTMATTER S M. Semaphorin2-mediated axonal guidance via Rho2related G p roteins [J]. *Curr Op in Neurobiol*, 2001, 13 (5): 619-626.
- [18] AL-ALWAN M M, ROWDEN G, LEE T D, et al. Fascin is involved in the antigen presentation activity of mature dendritic cells [J]. *J Immunol*, 2001, 166(1): 338-345.
- [19] BENYENUTI F, HUGUES S, WALMSLEY M, et al. Requirement of Rac1 and Rac2 Expression by Mature Dendritic Cells for T Cell Priming [J]. *Science*, 2004, 305(5687): 1150-1153.
- [20] INOSHIMA N, NAKANISHI Y, MINAMI T, et al. The influence of dendritic cell infiltration and vascular endothelial growth factor expression on the prognosis of non - small cell lung cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8(11): 3480-3496.

[责任编辑 张荣连]