

CD40L 对单纯疱疹病毒 2 型 DNA 疫苗的免疫增强作用研究

胡如西 陶 薇 傅 婷 何卓晶 贾 岚 洪 艳 陈 勇

摘 要 **目的** 研究重组质粒 pcDNA3-Kan/CD40L 辅佐 HSV-2 DNA 疫苗增强小鼠体液免疫和细胞免疫的作用效果,探讨其作为 HSV-2 DNA 疫苗佐剂的潜力。**方法** (1)构建鼠 CD40L 基因的重组真核表达质粒 pcDNA3-Kan/CD40L。(2)体外细胞实验:检测重组质粒 pCD40L 刺激小鼠外周血淋巴细胞增殖情况和脾细胞分泌 IFN- γ 的能力。(3)体内动物实验:48 只雌性 BALB/c 小鼠随机分为 4 个免疫组 pK 组、pgD 组、pCD40L+pgD 组和 pK+pgD 组。小鼠后腿肌内注射,共免疫 2 次,间隔 3 周。末次免疫 3 周后,每组随机取 4 只小鼠进行致死剂量攻毒实验验证疫苗的保护作用。ELISA 检测小鼠血清抗 HSV-2 IgG 抗体水平和趋化因子 RANTES;流式细胞术检测全血中 CD4⁺ 和 CD8⁺T 细胞百分率以及分泌 IFN- γ 和 IL-4 的 T 细胞的百分率;MTS 法检测小鼠脾脏 T 细胞的增殖能力。**结果** (1)体外实验结果:重组质粒 pcDNA3-Kan/CD40L 对小鼠外周血淋巴细胞的增殖能力和刺激脾细胞分泌 IFN- γ 的能力均显著大于空质粒 pcDNA3-Kan($P<0.05$)。(2)体内实验结果:小鼠血清抗 HSV-2 IgG 水平、趋化因子 RANTES、脾淋巴细胞刺激指数和外周血 CD4⁺T 细胞数和分泌 IFN- γ 的 Th1 细胞数均高于其他免疫组($P<0.05$)。pcDNA3-Kan/CD40L+pgD 组预防小鼠感染 HSV-2 效果好于其他免疫组。**结论** (1)重组质粒 pcDNA3-Kan/CD40L 能够诱导外周血淋巴细胞增殖并刺激脾细胞分泌 IFN- γ 具有作为疫苗佐剂的潜力。(2)pcDNA3-Kan/CD40L 可以辅助 HSV-2 DNA 疫苗诱导 BALB/c 小鼠产生特异性抗 HSV-2 的体液免疫和细胞免疫,具备作为 HSV-2 DNA 疫苗免疫佐剂的能力。

关键词 CD40 配体(CD40L) 单纯疱疹病毒 2 型(HSV-2) 疫苗佐剂

中图分类号 R3

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.10.009

Plasmid CD40L Enhances Immune Response of HSV-2 DNA Vaccine. Hu Ruxi, Tao Wei, Fu Ting, et al. Wenzhou Medical University School of Laboratory Medicine and Life Science, Zhejiang 325035, China

Abstract Objective To detect HSV-2-specific humoral immunological response and cellular immunological response in BALB/c mice which were induced by plasmid CD40L- adjuvanted HSV-2 DNA vaccine. **Methods** ①The murine CD40L gene transcript was inserted into the pcDNA3 vector to obtain the recombinant plasmid pcDNA3-Kan/CD40L. ②In vitro study: MTS colorimetric method was employed in the detection of the rat peripheral blood lymphocytes proliferation and SYBRgreen qPCR assay was used to test the IFN- γ secretion ability of spleen cells. ③In vivo study: Forty eight female BALB/c mice were randomly divided into four groups: pKan, pgD, pCD40L+pgD and pKan+pgD, and inoculated through intramuscular immunization at the weeks 0 and 3. After 6 weeks the protection given to the mice was assayed by a fatal dose of HSV-2. The humoral immunological response and the cellular immunological response were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), MTS colorimetric assay and flow cytometry (FCM). **Results** ①The ability of stimulation lymphocytes proliferation of rat PBMC and IFN- γ level in spleen cells of cDNA3-Kan/CD40L group were significantly better than that of pK group ($P<0.05$). ②The level of anti-HSV-2 IgG, RANTES, stimulation index (SI), CD4⁺ and IFN- γ in pCD40L+pgD group were significantly higher than anther groups. Furthermore, mice of pCD40L+pgD group were prophylactically protected from challenge with a high dose of HSV-2. **Conclusion** ①The potential of pcDNA3-Kan/CD40L could be used as an adjuvant in vaccines. ②The potential of pCD40L- adjuvantd HSV-2 DNA vaccine could induce systemic humoral immune responses and cellular immune responses intramuscular vaccinated mice.

Key words CD40 ligand (CD40L); Herpes simplex virus type 2 (HSV-2); Vaccine adjuvant

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(LY12H19009)

作者单位:325035 温州医科大学检验医学院生命科学学院(胡如西、陈勇);310013 杭州,浙江省医学科学院(陶薇、傅婷、何卓晶、贾岚、洪艳)

通讯作者:洪艳,陈勇,电子信箱:hongy1008@163.com

单纯疱疹病毒(HSV)的感染是人类比较常见的感染性疾病之一,包括 HSV-1 和 HSV-2 型^[1]。目前,市面上还没有能够有效控制 HSV 的特效药,研制有效的疫苗是控制 HSV 感染的关键。随着分子生物学技术的发展,多肽疫苗和 DNA 疫苗的研制成为近年来研究的热点,其中 DNA 疫苗因具有诱导全面免疫应答的高效性而备受青睐,本研究涉及的 HSV-2 核酸疫苗是由笔者所在课题组研究开发,动物实验结果显示该疫苗对于小鼠具有很好的免疫原性和保护效力^[2]。为了寻求更高的体液免疫和细胞免疫效果,DNA 疫苗可以利用各种免疫佐剂与之相配合^[3]。

CD40L 属于肿瘤坏死因子超家族(TNFSF),是一种 39kDa 的 II 型膜糖蛋白,主要活化 T 细胞表面的协同刺激分子,特别是 CD4⁺ T 细胞,其分布广泛,主要表达于活化 T 细胞表面,特别是活化 CD4⁺ T 细胞^[4-6]。CD40L 在机体免疫应答方面扮演着重要角色,其可直接刺激 B 细胞和树突状细胞(DCs)以增强 T 细胞反应和抗体产生;能够增强活化 B 细胞分化,促进免疫生发中心形成;也能够激活 DCs 启动细胞毒性 CD8⁺ T 细胞反应^[7];还能够与受体 CD40 相互作用。这些免疫刺激功能使得 CD40L 具有作为疫苗佐剂的潜力。

本研究构建了含有鼠 CD40L 基因的重组真核质粒 pCD40L,通过体外细胞实验研究 CD40L 是否具有核酸疫苗免疫佐剂的潜能,再经体内动物实验研究 CD40L 辅佐 HSV-2 DNA 疫苗增强小鼠体液免疫和细胞免疫的能力,考察其作为核酸疫苗免疫佐剂的可能性。

材料与方法

1. 质粒、菌种和病毒:质粒载体 pK(pcdNA3-kan 质粒)由本实验室改建了 pcdNA3 质粒,将 Kan 抗性基因代替了 Amp 基因,得到了真核表达质粒载体 pcdNA3-kan(pK 质粒)、重组质粒 pgD(含单纯疱疹病毒 II 型糖蛋白 gD 基因的卡那霉素抗性真核表达质粒 pgD,为本实验室构建的 HSV-2 DNA 疫苗)、HSV-2 病毒(LD₅₀ = 10^{-1.88}/0.1ml)由本实验室培养保存。DH₅α 感受态细胞购自康为世纪公司。

2. 实验动物:清洁级 BALB/c 小鼠,体重 18~22g,购自浙江省实验动物中心。

3. 实验试剂:限制性内切酶 EcoR I、Xho I 和 T4DNA 连接酶购自 Thermo 公司;Tap PCR Master Mix Kit、UltraSYBR Mixture 和 Rneasy Mini Kit 购自 Qiagen 公司,第 1 链 cDNA 合成试剂盒购自 TaKaRa 公司;单溶液细胞增殖检测试剂盒(MTS)购自 Promega 公司;100bp DNA 标志物、DM10000 DNA 标志物、高纯度质粒小提试剂盒、快速琼脂糖凝胶 DNA 回收

试剂盒购自康为世纪公司。离子霉素(iono mycin),佛波酯(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA),刀豆蛋白 A(concanavalin A, Con A)皆购自 Sigma 公司;红细胞裂解液、流式抗体 FITC-CD4、PE-CD8a、FITC-IFN-γ、PE-IL-4 和流式固定破膜试剂盒购自美国 BD 公司;Mouse RANTES(受激活调节正常 T 细胞表达和分泌因子,Regulated upon activation normal T cell expressed and secreted factor)试剂盒为 eBioscience 公司产品;小鼠淋巴细胞分离液购自天津灏洋生物公司;胎牛血清 FBS、RPMI1640 培养基购自 GIBCO BRL 公司;辣根过氧化物酶(HRP)酶标羊抗鼠抗体购自鼎国生物生物技术公司;其他试剂为国产或进口分析纯试剂。

4. 方法:(1) pCD40L 质粒的构建:利用 RT-PCR 方法从 BALB/c 小鼠脾细胞中获得 CD40L 基因并将其克隆至 pK 质粒中,经酶切、测序验证得到 pCD40L 质粒^[8]。(2) 细胞实验-SYBR green QPCR:无菌条件下制备小鼠脾细胞悬液,按浓度梯度分别加入空质粒 pK 和重组质粒 pCD40L。37℃,5% CO₂ 条件下培养 3 天。用 Rneasy Mini Kit 提取总 RNA,以 Oligod(T)n 为引物,反转录生成 cDNA。本实验选用 β-actin 作为内参。IFN-γ 的上游引物:5'-TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGA-3',下游引物:5'-CTGGCTCTGCAGGATTTTCAT-3'(GeneBank: NC-000076.6);内参 β-actin 的上游引物:5'-AGAGGGAAATCGTGCCTGAC-3',下游引物:5'-CAATAGTGATGACCTGGCCGT-3'(GeneBank: NM-007393.3)。取 1μl 上述反应合成的 cDNA 为模板进行 real-time PCR 的扩增。其扩增条件为 95℃ 10min;预变性 95℃ 15s,退火 60℃ 1min,循环 40 个周期。所得数据采用 Roto-Gene QPCR 自带软件进行分析,mRNA 相对含量分析采用 2^{-ΔΔCt} 法[ΔΔCt = (C_{T,Target} - C_{T,Actin})_{处理} - (C_{T,Target} - C_{T,Actin})_{对照}]。(3) 细胞实验-MTS 比色法:无菌条件下采集小鼠眼球静脉血,用小鼠淋巴细胞分离液试剂盒分离淋巴细胞(按试剂盒说明书操作)。然后加入含 10% FBS 的 RPMI1640 培养基重悬细胞,按每孔 5 × 10⁵ 细胞接种于 96 孔细胞板,按浓度梯度分别加入空质粒 pK 和重组质粒 pCD40L。37℃,5% CO₂ 条件下培养 3 天,加入 40μl MTS 溶液,继续培养 4h,用酶标仪检测 490nm 下的吸光度(A)值。细胞增殖率用刺激指数(stimulation index, SI)表示,SI = (实验组 A 值 - 空白组 A 值)/(阴性对照组 A 值 - 空白组 A 值)。(4) 动物实验-动物免疫和攻毒实验:48 只雌性 BALB/c 小鼠随机分为以下 4 组:①空载体 pK 组(100 微克/只);②空载体 pK + 重组质粒 pgD 组[(50 微克 + 100 微克)/只];③重组质粒 pgD 组 + 重组质粒 pCD40L 组[(100 微克 + 50 微克)/只];④重组质粒 pgD 组(100 微克/只),小鼠后腿肌肉内注射 100 微升/只,隔 21 天加强免疫 1 次,剂量相同。免疫第 42 天,每组随机选取 4 只小鼠进行攻毒实验。腹腔注射 200 微升/只 20 × LD₅₀ HSV-2 病毒悬液,每天观察并记录小鼠死亡数,观察 14 天。(5) 动物实验-免疫小鼠样本的收集:每次免疫后 14 天收集小鼠尾静脉血 200μl 分离血清,所有样本于 -20℃ 保存。末次免疫后 21 天剖杀小鼠,无菌取小鼠脾

脏,经 200 目尼龙纱布网滤过制备单个细胞悬液备用。(6)动物实验 - 间接 ELISA 法检测小鼠血清中 IgG 抗体:采用灭活 HSV-2 病毒包被酶联反应板,二抗采用羊抗鼠 IgG-HRP,按常规 ELISA 法检测血清中 IgG 抗体 A 值。被检血清 A450/阴性对照 A450 $\geq$ 2.1 为阳性,否则为阴性。(7)动物实验 - 流式细胞仪检测外周血中 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞百分率:经 2 次加强免疫的 4 组 BALB/c 小鼠最后 1 次免疫的 14 天后眼眶取血,肝素钠抗凝处理收集的血液,分别与 FITC 标记的单抗 CD4⁺ 和 PE 标记的单抗 CD8⁺ 避光孵育 30min,PBS 洗涤 3 次后,流式细胞仪分析 CD4⁺ 和 CD8⁺ 百分率。实验结果使用 Cellquest 软件进行分析。(8)动物实验 - MTS 比色法检测小鼠脾脏 T 淋巴细胞增殖能力:小鼠加强免疫 21 天后各组小鼠按常规方法制备脾脏细胞,调节细胞浓度至 5×10^6 个/毫升,细胞 100 微升/孔。将细胞培养板分为 3 部分:分别为特异性抗原刺激孔 - 50 μ g/ml 灭活单纯疱疹病毒;非特异性抗原刺激孔 - 10 μ g/ml Con A;对照孔 - RPMI 1640 完全培养液。将细胞培养板置于 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂,细胞培养箱中培养 68h,加细胞活力检测试剂 40 微升/孔继续培养 4h,酶标仪测 A 值。计算刺激指数 SI = (实验组 A 值 - 空白组 A 值)/(阴性对照组 A 值 - 空白组 A 值)。(9)动物实验 - 小鼠血清中趋化因子 RANTES 的检测:经 2 次加强免疫的 4 组 BALB/c 小鼠最后 1 次免疫的 14 天后眼眶取血,分离血清,样本保存于 -20 $^{\circ}$ C。按 ELISA 试剂盒说明检测 RANTES 的含量。(10)动物实验 - 流式细胞仪检测外周血分泌 IFN- γ 和 IL-4 的 T 的表达水平:加强免疫 35 天后的小鼠肝素抗凝全血加入 RPMI1640 完全培养液(含 20ng/ml 佛波酯、1 μ mol/L 离子霉素和 0.7 μ l/ml 莫能霉素)刺激培养 4h;100 μ l 培养液加 2ml 红细胞裂解液室温裂解 10min 后离心;染色缓冲液洗涤后离心;加固定透化液室温避光孵育 20min,BD 缓冲液洗涤后离心;加鼠流式抗体 IFN- γ 和 IL-4 室温避光染色 30min,BD 缓冲液洗涤后离心;加 PBS500 微升/管重悬细胞,流式细胞仪分析 IFN- γ 、IL-4 的表达水平。实验结果使用 Cellquest 软件进行分析。

5. 统计学方法:数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。利用 Origin7.0 统计学软件分析数据的统计学意义。各组之间的统计学差异分析选用方差分析(one-way ANOVA),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. pCD40L 重组质粒的构建:CD40L 片段大小约为 723bp,与预期的 783bp 相符。重组质粒 pCD40L 经 EcoR I 和 Xho I 双酶切后,显示为 5.4 kb 和 783bp 左右的片段(图 1)。该质粒经 DNA 测序后,插入片段与 GeneBank BC119225.1 的鼠 CD40L 序列中 1~783 碱基序列完全相符。结果表明 CD40L 已成功地克隆到真核表达载体 pK 质粒中。

2. 细胞实验:(1)小鼠脾脏 IFN- γ mRNA 水平:不同浓度 pCD40L(1、5、10、25、50、75 和 100 μ g/ml)

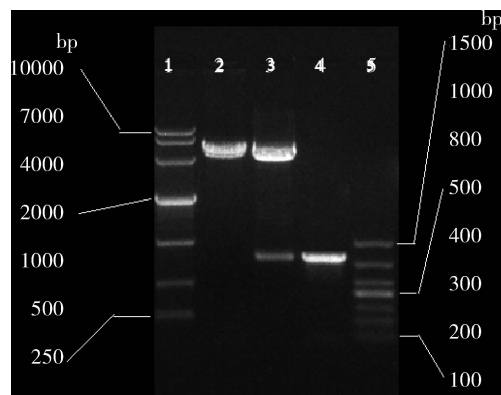


图 1 pCDNA3-Kan/CD40L 质粒酶切鉴定结果
1. DM10 000 DNA 标志物;2. pcDNA-Kan 经 EcoR I 和 Xho I 双酶切;3. pcDNA3-Kan/CD40L 经 EcoR I 和 Xho I 双酶切;4. CD40L(约 783bp);5. 100bp DNA Ladder

在诱导脾细胞表达 IFN- γ 的能力与空质粒相比有统计学意义($P < 0.05$,图 2)。(2)淋巴细胞增殖能力:当重组质粒 pCD40L 浓度在 1、5、10、25 μ g/ml 时,体外诱导大鼠外周,血淋巴细胞增殖能力(SI)与空质粒 pK 无明显差异。当浓度达到 50、75 μ g/ml 时,重组质粒组的 SI 值显著增加($P < 0.05$),表明外周血淋巴细胞明显增殖,而空质粒的 SI 值并无明显变化。当浓度达到 100 μ g/ml 时,重组质粒组的 SI 值显著下降(图 3)。此外不同浓度的空质粒体外诱导大鼠外周血淋巴细胞增殖能力差异无统计学意义。

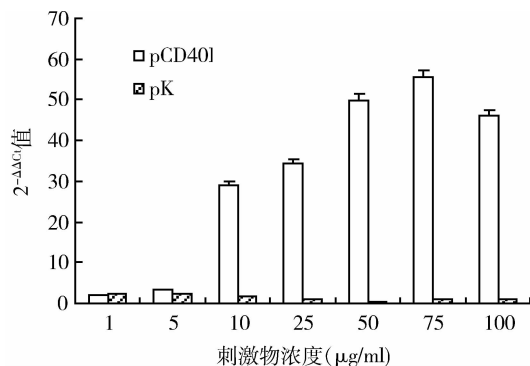


图 2 小鼠脾脏 IFN- γ mRNA 水平

3. 动物实验:(1)小鼠血清中抗 HSV-2 抗体的 ELISA 检测结果:初次免疫 14 天后,pCD40L + pgD 组、pK + pgD 组和 pgD 组产生的 IgG 的水平显著大于 pK 组($P < 0.05$),pCD40L + pgD 组刺激产生的 IgG 的水平明显大于其他各组刺激产生的 IgG 的水平($P < 0.05$)。35 天后除 pK 组外,其他 3 组的 IgG 均有明显的上升,并且各组间差异有统计学意义,特别是

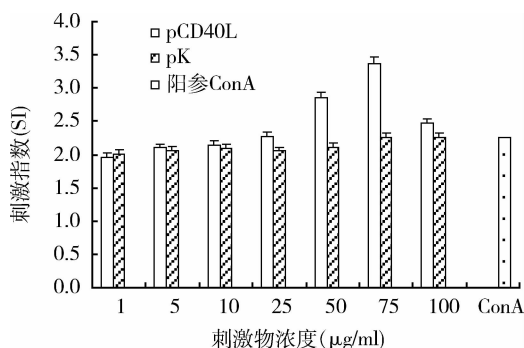


图3 淋巴细胞增殖能力

pCD40L + pgD 组的 IgG 上升的最为明显 ($P < 0.01$), 高于初次免疫 14 天后的特异性 IgG A 值的 2 倍之多。初免 42 天后, 各组的 IgG 与第 35 天无明显变化, 跟第 2 次接种 14 天差别不大 (表 1)。(2) 动物实验 - 小鼠外周血中 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞百分率: 初次免疫 42 天后的全血刺激培养液的流式检测结果显示, pCD40L + pgD 组的 CD4⁺ 细胞的百分率略高于不加佐剂组, 与 pK 组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 但其他两组间两两 t 检验, 差异无统计学意义; 加 pCD40L + pgD 组的 CD8⁺ 细胞百分率略高于 pK 组 ($P < 0.05$); 其他 3 组间两两比较, 差异无统计学意义 (图 4)。(3) 小鼠 T 细胞增殖能力: 加 pCD40L 佐剂组的 ConA 刺激指数和灭活单纯疱疹病毒刺激指数均高于其他各组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 其他 3 组间两两比较, 差异均有统计学意义 (图 5)。(4) 小鼠血清中 RANTES 含量: ELISA 法分析经 2 次免疫后小鼠血清中 RANTES 的产生。pK 组、pK + pgD 组、pCD40L + pgD 组、pgD 组 RANTES 含量分别为 10.034、201.633、676.633 和 170.204 pg/ml。结果显示经 2 次免疫后, pCD40L + pgD 组的 RANTES 含量最高, 含量达到了 676.633 pg/ml, 明显高于其他 3 组, 各组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。(5) 小鼠外周血分泌 IFN- γ 和 IL-4 T 的表达水平: pCD40L + pgD 组的 IFN- γ 的表达水平显著高于其他各组 ($P < 0.05$); 其他 3 组两两比较, 差异均有统计学意义。加 pCD40L + pgD 组的 IL-4 的表达水平均低于其他各组 ($P < 0.05$); 其他 3 组两两比较, 差异无统计学意义 (图 6)。(6) 疫苗对小鼠的保护性: HSV-2 病毒攻毒 14 天后, 空质粒组小鼠全部死亡; pCD40L + pgD 组存活 3 只, 保护率为 75%; pK + pgD 组和 pgD 组的保护率仅为 50% (图 7)。

表 1 小鼠血清抗 HSV-2IgG 吸光度值

组别	14 天	35 天	42 天
pK 组	0.104 ± 0.006	0.151 ± 0.007	0.136 ± 0.017
pK + pgD 组	0.838 ± 0.036	1.433 ± 0.071	1.359 ± 0.030
pCD40L + pgD 组	1.473 ± 0.043	2.383 ± 0.182	2.235 ± 0.036
pgD 组	0.682 ± 0.046	1.368 ± 0.037	1.164 ± 0.035

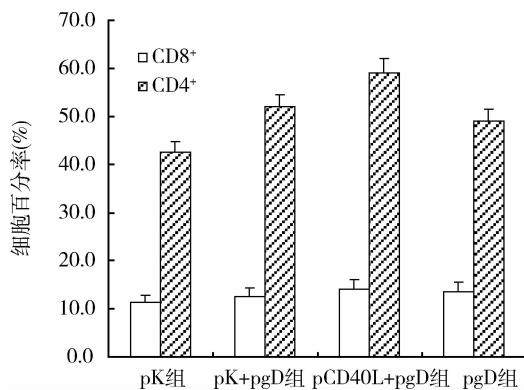
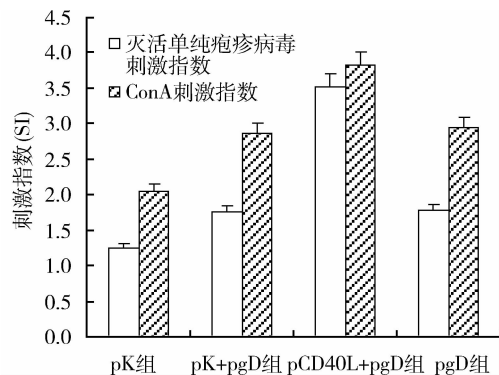
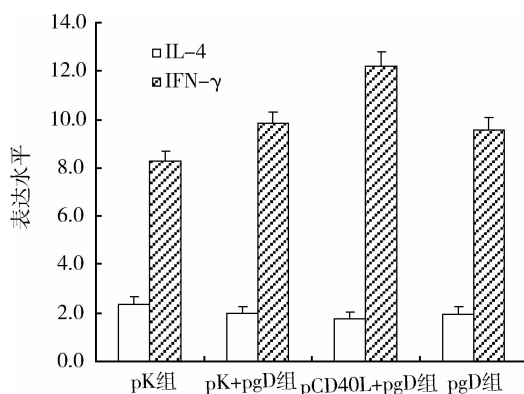
图4 小鼠外周血中 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞百分率

图5 小鼠 T 细胞增殖能力

图6 外周血分泌 IFN- γ 和 IL-4 T 的表达水平

讨 论

CD40L 是一种有着良好应用前景的新型免疫刺激剂。最近研究发现, CD40L 的重组质粒作为病毒

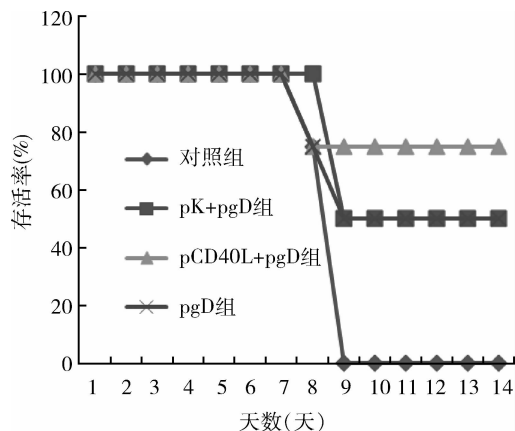


图 7 疫苗对小鼠的保护性

DNA 疫苗的免疫佐剂在人类免疫缺陷病毒 (HIV)、流感病毒、呼吸道合胞病毒 (RSV) 等感染的相关临床疾病中均能够增强 DNA 疫苗细胞免疫或体液免疫应答^[9-11]。Sin 等^[12]做了类似研究,证明 CD40L 有作为疫苗佐剂的能力。但是,真核表达质粒 pcDNA3 为 Amp 抗性质粒,现在有研究发现如果终产品中有残留 Amp,可能会对青霉素过敏的接种者不安全。本研究中,笔者采用了本实验室 pK 质粒。笔者的研究也获得了与其他研究者相似的研究结果。在体外实验中,笔者发现 CD40L 重组质粒具有诱导细胞免疫的能力。本研究利用 CD40L 重组质粒直接作用小鼠外周血淋巴细胞和脾脏淋巴细胞。SYBRgreen QPCR 实验结果显示重组质粒 pCD40L 组小鼠脾脏 IFN- γ mRNA 水平显著增高,这说明 CD40L 能促进小鼠脾脏 T 细胞向 Th1 型细胞分化。在淋巴细胞增殖实验中,重组质粒 pCD40L 能促进小鼠脾脏淋巴细胞的增殖,说明它对于淋巴细胞的免疫功能具有一定的积极影响。当重组质粒 pCD40L 浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时,它对外周血淋巴细胞的促分裂作用比低浓度的作用显著增高;当其浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时,外周血淋巴细胞增殖能力反而下降,这说明重组质粒 pCD40L 促外周血淋巴细胞分裂活性在一定的浓度范围内才发挥作用。在本研究中,重组质粒 pCD40L 刺激外周血淋巴细胞增殖的最佳浓度为 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

在动物实验中,重组质粒 pCD40L 能够辅佐 HSV-2 DNA 疫苗刺激小鼠产生抗 HSV-2 的细胞免疫和体液免疫。在第 2 次免疫后第 14 天,pCD40L 和 HSV-2 DNA 疫苗组可以诱导机体产生较高 A 值的 IgG 抗体,其 A 值是其他各组的 2 倍之多 ($P < 0.05$),诱导机体产生强烈的体液免疫。流式细胞仪

检测结果显示,pCD40L 和 HSV-2 DNA 疫苗组 CD4⁺T 细胞和分泌 IFN- γ 的 Th1 细胞百分率高于其他组 ($P < 0.05$);在小鼠脾脏 T 淋巴细胞增殖结果显示,pCD40L 的特异性抗原和非特异性抗原的刺激指数都显著高于其他 3 组 ($P < 0.05$),以上结果均说明重组质粒 pCD40L 能够辅佐 HSV-2 DNA 疫苗刺激小鼠产生抗 HSV-2 的细胞免疫。此外,pCD40L 和 HSV-2 DNA 疫苗组能刺激产生更高量的趋化因子 RANTES。趋化因子 RANTES 是 CD40L 调节巨噬细胞和 DC 细胞表达产生。趋化因子 RANTES 的高表达,可募集未激活的 CD4⁺记忆 T 细胞、刺激 CD4⁺T 和 CD8⁺T 的活化,参与不成熟 DCs 细胞的募集、促进 Th1 型细胞因子 IFN- γ 的产生,趋化炎症细胞到达炎症部位,发挥多种作用参与机体对病毒的免疫^[13]。在动物保护性实验中,由于与本实验室曾经所用的病毒效价 (LD_{50}) 不一样,实验结果不尽相同,但是都说明了 HSV-2 DNA 疫苗 pgD 质粒及其佐剂 pCD40L 质粒对感染单纯疱疹病毒后的小鼠的存活率有一定的提高。

总之,本研究构建的质粒 pCD40L 能够辅佐 HSV-2 DNA 疫苗刺激小鼠产生特异性的细胞免疫和体液免疫,特别是其在提高细胞免疫方面的能力,具有作为疫苗佐剂的潜力。在后续研究中,我们将围绕 CD40L 做进一步的探索,为研发 HSV-2 的治疗性疫苗提供可靠的依据。

参考文献

- Vlahava VM, Eliopoulos AG, Sourvinos G. CD40 ligand exhibits a direct antiviral effect on herpes simplex virus type - 1 infection via a PI3K - dependent, autophagy - independent mechanism[J]. Cell Signal, 2015, 27(6): 1253 - 1263
- 洪艳,杨连华,陈勇,等. HSV-2DNA 疫苗诱导小鼠免疫应答研究[J]. 浙江省医学科学院学报, 2005, 16(2): 121 - 123
- Volmar CH, Ait - Ghezala G, Frieling J, et al. CD40/CD40L interaction induces Abeta production and increases gamma - secretase activity independently of tumor necrosis factor receptor associated factor (TRAF) signaling[J]. Exp cell Res, 2009, 315(13): 2265 - 2274
- Eliopoulos AG, Young LS. The role of the CD40 pathway in the pathogenesis and treatment of cancer[J]. Curr Opin Pharmacol, 2004, 4(4): 360 - 367
- Léveillé C, Bouillon M, Guo W, et al. CD40 ligand binds to alpha5beta1 integrin and triggers cell signaling[J]. J Biol Chem, 2007, 282(8): 5143 - 5151
- Auten MW, Huang W, Dai G, et al. CD40 ligand enhances immunogenicity of vector - based vaccines in immunocompetent and CD4⁺T cell deficient individuals [J]. Vaccine, 2012, 30(17): 2768 - 2777

(下转第 37 页)

球形结构,将该 CD49f⁺ 的乳腺癌细胞进行移植实验后,形成的乳腺肿瘤更多,并能抵抗阿霉素的化疗作用^[10]。López 等^[11] 从球形成试验中分离宫颈癌细胞系中的球形结构,发现球结构细胞高表达宫颈癌癌干细胞标志 CD49f,很少数量的球细胞可以在动物体内形成肿瘤。因此,球形成试验可以富集包括肺癌、胰腺癌、卵巢癌、结肠癌、胆囊癌和乳腺癌等中的癌干细胞,形成的球形结构高表达癌干细胞的基因,并且这些癌干细胞具有抗化疗的作用^[12]。

笔者的研究结果也发现,顺铂作用 HeLa 细胞后,球形成试验中形成的球形结构的数量明显增加,同时癌干细胞的自我更新因子 Notch1 表达显著增加。但是顺铂作用 HeLa 细胞后通过干扰 Notch1 基因后,被干扰 Notch1 的 HeLa 细胞的中球形结构的数量明显减少,说明 Notch1 能调控宫颈癌癌干细胞的自我更新作用。Peng 在研究中也发现,顺铂可以引起沉默 Notch1 的宫颈癌细胞凋亡增加。因此笔者推测宫颈癌癌干细胞的抗顺铂作用和 Notch1 的表达有关,可通过增加 Notch1 的表达促进宫颈癌癌干细胞的自我更新。而这种增强表达的癌干细胞的自我更新因子与癌症的复发和转移关系密切^[13,14]。笔者认为,通过病理学检测宫颈癌中 Notch1 的表达,对于分析宫颈癌的复发、转移和抗化疗作用可能有指示作用。在临床上深入研究 Notch1 与宫颈癌转移复发的关系,对于分析 Notch1 在宫颈癌诊断、治疗和预后都有重要的意义。

参考文献

- 1 Jemal A, Bray F, Center MM, *et al.* Global cancer statistics[J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69–90
- 2 Clevers H. The cancer stem cell: premises, promises and challenges [J]. *Nature Medicine*, 2011; 313–319
- 3 Pannuti A, Foreman K, Rizzo P, *et al.* Targeting Notch to target cancer stem cells[J]. *Clinical Cancer Research*, 2010, 16(12): 3141–3152

- 4 de Paiva CS, Chen Z, Corrales RM, *et al.* ABCG2 transporter identifies a population of clonogenic human limbal epithelial cells[J]. *Stem Cells*, 2005, 23(1): 63–73
- 5 Yang WJ, Song MJ, Park EY, *et al.* Transcription factors Sp1 and Sp3 regulate expression of human ABCG2 gene and chemoresistance phenotype[J]. *Molecules Cells*, 2013; 1–8
- 6 Asuthkar S, Stepanova V, Lebedeva T, *et al.* Multifunctional roles of urokinase plasminogen activator (uPA) in cancer stemness and chemoresistance of pancreatic cancer[J]. *Molecular Biology of Cell*, 2013, 24(17): 2620–2632
- 7 Yo YT, Lin YW, Wang YC, *et al.* Growth inhibition of ovarian tumor – initiating cells by niclosamide[J]. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2012, 11(8): 1703–1712
- 8 Liu YS, Hsu HC, Tseng KC, *et al.* Lgr5 promotes cancer stemness and confers chemoresistance through ABCB1 in colorectal cancer[J]. *Bio-medicine & Pharmacotherapy*, 2013; 791–799
- 9 Shi C, Tian R, Wang M, *et al.* CD44⁺ CD133⁺ population exhibits cancer stem cell – like characteristics in human gallbladder carcinoma [J]. *Cancer Biology Therapy*, 2010, 10(11): 1182–1190
- 10 Lee KM, Han W, Kim JB, *et al.* The CD49d⁺/high subpopulation from isolated human breast sarcoma spheres possesses tumor – initiating ability [J]. *International Journal of Oncology*, 2012, 40(3): 665–672
- 11 López J, Poitevin A, Mendoza – Martínez V, *et al.* Cancer – initiating cells derived from established cervical cell lines exhibit stem – cell markers and increased radioresistance[J]. *BMC Cancer*, 2012, 12(1): 48
- 12 Feng D, Peng C, Li C, *et al.* Identification and characterization of cancer stem – like cells from primary carcinoma of the cervix uteri [J]. *Oncology Reports*, 2009, 22(5): 1129–1134
- 13 Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions [J]. *Nature Reviews Cancer*, 2008, 8(10): 755–768
- 14 Medema JP. Cancer stem cells: the challenges ahead[J]. *Nature Cell Biology*, 2013, 15(4): 338–344

(收稿日期:2015–01–29)

(修回日期:2015–03–06)

(上接第 33 页)

- 7 Parameswaran S, Khalil M, Ahmed KA, *et al.* Enhanced protective immunity derived from dendritic cells with phagocytosis of CD40 ligand transgene – engineered apoptotic tumor cells via increased dendritic cell maturation[J]. *Tumori*, 2015, Epub ahead of Print
- 8 钱莉,王蓓,龚卫娟,等. 小鼠 CD40L 基因的克隆与真核细胞表达研究[J]. *实用临床医药杂志*, 2007, 11(6): 1–4
- 9 Miller EA, Gopal R, Valdes V, *et al.* Soluble CD40 ligand contributes to dendritic cell – mediated T – cell dysfunction in HIV – 1 infection [J]. *AIDS*, 2015, 29(11): 1287–1296
- 10 Kwa S, Lai L, Gangadhara S, *et al.* CD40L – adjuvanted DNA/MVA SIV239 vaccine enhances SIV – specific humoral and cellular immunity, and improves protection against a heterologous SIVE660 mucosal challenge[J]. *J Virol*, 2014, 88(17): 9579–9589

- 11 Harcourt JL, Brown MP, Anderson LJ, *et al.* CD40 ligand(CD154) improves the durability of respiratory syncytial virus DNA vaccination in BALB/c mice[J]. *Vaccine*, 2003, 20(21–22): 2964–2979
- 12 Sin JJ, Kim JJ, Zhang D, Weiner DB. Modulation of cellular responses by plasmid CD40L: CD40L plasmid vectors enhance antigen – specific helper T cell type 1 CD4⁺ T cell – mediated protective immunity against herpes simplex virus type 2 in vivo[J]. *Hum Gene Ther*, 2001, 12(9): 1091–1102
- 13 Ma K, Xu W, Shao XN, *et al.* Coimmunization with RANTES plasmid polarized Th1 immune response against hepatitis B virus envelope via recruitment of dendritic cells[J]. *Antiviral Research*, 2007, 76(2): 140–149

(收稿日期:2015–07–07)

(修回日期:2015–07–21)