

· 论 著 ·

结核杆菌热休克蛋白 70 作为表位肽载体体外 诱导 HBV 特异性免疫应答*

罗 莉¹, 何 松^{2#}, 罗 娜³, 彭明利^{4△}

(1. 重庆市渝北区人民医院消化内科 401120; 2. 重庆医科大学附属第二医院消化内科 400010;
3. 重庆医科大学附属第一医院急诊科 400016; 4. 重庆医科大学病毒性肝炎研究所 400016)

摘要:目的 在体外研究结核杆菌热休克蛋白 70(TB. HSP70)作为乙型肝炎病毒(HBV)核心抗原(HBcAg)细胞毒性 T 淋巴细胞表位肽载体,诱导 HBV 特异性免疫应答。方法 应用毕赤酵母分泌表达 HSP70(P1)、HSP70-HBcAg(18-27)(P2)、HSP70-PreS2B(18-24)-PreS2Th(37-53)-HBcAg(18-27)(P3),用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳和蛋白免疫印迹法鉴定各重组蛋白的表达。体外考察重组蛋白(P1、P2、P3)对慢性乙型肝炎外周血来源的树突状细胞和淋巴细胞的作用,流式细胞术评估树突状细胞的成熟,酶联免疫吸附测定法检测细胞因子白细胞介素(IL)-12p70、IL-1 β 、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、干扰素- γ (IFN- γ)分泌情况,TdR-3H 掺入法检测淋巴细胞的增殖情况,应用经典⁵¹Cr 法检测重组蛋白诱导 HBV 特异性细胞毒活性。结果 重组蛋白 P1、P2、P3 构建成功,P1、P2、P3 能诱导树突状细胞成熟,上调 CD1a、CD40、CD86 表达,释放 Th1 型细胞因子 IL-12p70、IL-1 β 和 TNF- α ,P3 最能有效激活自体淋巴细胞成为细胞毒活性细胞,促进淋巴细胞增殖和 IFN- γ 的释放,而单独的 HSP70 无杀伤活性。结论 TB. HSP70 可作为 HBV HBcAg 细胞毒性 T 淋巴细胞表位肽载体,提高 T 淋巴细胞表位肽的免疫原性,且含有 B、Th 表位的 P3 能更好地激活 HBV 特异性免疫应答。

关键词: HSP70 热休克蛋白; T 淋巴细胞; 乙型肝炎病毒; 树突细胞

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.09.001

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)09-1025-04

The study of heat shock protein 70 as an adjuvant carrier on HBV-specific immune response in vitro*

Luo Li¹, He Song^{2#}, Luo Na³, Peng Mingli^{4△}

(1. Department of Gastroenterology, the People's Hospital of Yubei District of Chongqing, Chongqing 401120, China;
2. Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University,
Chongqing 400010, China; 3. Department of Emergency, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University,
Chongqing 400016, China; 4. Institute for Viral Hepatitis, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of mycobacterium tuberculosis heat shock protein 70(TB. HSP70) as an adjuvant carrier on stimulating hepatitis B virus(HBV) core antigen(HBcAg) specific immune response to an accompanying cytotoxic T lymphocytes epitope peptide from HBV core antigen in vitro. **Methods** Recombinant proteins HSP70(P1)、HSP70-HBcAg(18-27)(P2)、HSP70-PreS2B(18-24)-PreS2Th(37-53)-HBcAg(18-27)(P3) were expressed in methylotropic yeast *Pichia pastoris* GS115. The expression of recombinant proteins was identified by SDS-PAGE and Western blot. The effect of recombinant proteins on dendritic cell and lymphocytes of chronic HBV infection volunteers was investigated in vitro. The maturation of dendritic cell was measured by flow cytometry; the secretion of Th1 cytokines such as IL-12p70, IL-1 β , TNF- α and IFN- γ was measured by ELISA; the proliferation of lymphocytes was measured by TdR-3H; the HBV-specific cytotoxic activity was measured by the classic ⁵¹Cr. **Results** The recombinant proteins (P1, P2, P3) were constructed successfully. P1, P2, P3 could activate dendritic cell from chronic HBV infection volunteers by upregulation CD1a, CD40, CD86 and production Th1 cytokines such as IL-12p70, IL-1 β and TNF- α . Especially P3 could better induce autologous T cells to generate HBV specific cytotoxic T lymphocytes response, activate the proliferation of lymphocytes and release IFN- γ effectively. However, the recombinant HSP70 showed no target cell killing and could not induce immune response effectively. **Conclusion** TB. HSP70 can be used as an adjuvant carrier to stimulate HBV specific immune response to an accompanying cytotoxic T lymphocytes epitope peptide from HBV core antigen, and enhance immunogenicity of the cytotoxic T lymphocytes epitope peptide. The P3 with B- and T-epitope can activate the HBV specific immune response effectively.

Key words: HSP70 heat-shock protein; cytotoxic T lymphocytes; hepatitis B virus; dendritic cell

乙型肝炎病毒(HBV)感染是一种世界性的传染病,全球约有 3.5 亿 HBV 慢性携带者,严重危害人类健康^[1]。而主要组织相容性复合物 MHC-I 限制的细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)在预防、控制、清除 HBV 感染中起着核心作用^[2-3]。已

有研究运用结核杆菌热休克蛋白 70(TB. HSP70)作为表位肽载体制备疫苗免疫治疗 HBV 感染^[2]。HBV18-27 核心肽的 CTL 表位在大多数 HBV 病毒株中高度保守,与 HLA-A2.1e 有高度亲和力,能与几种 HLA-A2 的亚型产生交叉反应^[4]。

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30300297);重庆市自然科学基金资助项目(2008BB5402)。 作者简介:罗莉(1985—),住院医师,硕士,主要从事消化内科方面的研究。何松(1965—),主任医师,博士,主要从事消化内科方面的研究。 # 共同第一作者。 △ 通讯作者, Tel:(023)63893707; E-mail: sallypeng2002@gmail.com。

已有研究表明, HSP70-HBcAg(18-27)-CTL 融合蛋白和 HSP70-HBcAg(18-27)-CTL 复合物可有效诱导 HBV 特异性细胞免疫反应, HBcAg(18-27)的增殖活性较弱,它对淋巴细胞的特异性杀伤作用影响不大^[2]。因此,本研究借助结核杆菌 HSP70 作为表位肽载体,设想将 HBcAg HLA-A2 限制性 CTL 表位 HBcAg(18-27)融合到 TB. HSP70 的 C 端,并引入 Th 和 B 表位,应用 *Pichia pastoris* 酵母分泌表达目的蛋白,体外考察疫苗对慢性 HBV 感染者外周血淋巴细胞和外周血来源的树突状细胞的作用,进行免疫学功能研究,为慢性乙型肝炎(CAH)的治疗开辟新的途径。

1 材料与方法

1.1 材料 *Pichia pastoris* GS115 表达宿主菌、表达质粒 pPIC9 和 pPIC9K、重组人白细胞介素(IL)-2 为 Invitrogen 公司产品;含 TB. HSP70 基因的表达载体 H37Rv、HepG2. 2. 15 细胞为本实验室构建、保存;限制性内切酶(大连宝生物公司);ATP-agarose(美国 Sigma 公司);辣根酶标记的羊抗鼠 IgG 抗体(北京康为公司);鼠抗-TB. HSP70 单克隆抗体、FITC 标记的鼠抗 CD1a、CD86、HLA-DR 单克隆抗体及同型对照抗体(Sigma 公司);FITC 标记的鼠抗 CD40 单克隆抗体(Abcam 公司);检测 IL-12p70、IL-1 β 、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和干扰素- γ (IFN- γ)的酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(深圳晶美公司);淋巴细胞分离液(天津 TBD 公司);PCR 引物由大连宝生物公司合成。

1.2 方法

1.2.1 酵母表达质粒的构建与鉴定 以结核分枝杆菌 H37Rv 作为模板,PCR 法扩增含 TB. HSP70 编码序列的 DNA 片段(1 900 bp),在 *XhoI* 和 *EcoRI* 位点将扩增的 TB. HSP70 基因亚克隆到 pPIC9 表达载体上获得毕赤酵母质粒 pPIC9-HSP70。然后将来自 pPIC9-HSP70 质粒的 HSP70 基因亚克隆到 pPIC9K 载体的 *SacI* 和 *HpaI* 位点上获得 pPIC9K-HSP70 质粒(PIC9/P1)^[2,5]。以 pPIC9-HSP70 为模板,将 HBcAg(18-27)融合到 TB. HSP70 的 C 端,并引入 Th 和 B 表位,按照上述方法经双酶切后亚克隆到 pPIC9K 载体上,构建质粒 pPIC9K-HSP70-HBcAg(18-27)(PIC9/P2)、pPIC9K-HSP70-PreS2B(18-24)-PreS2Th(37-53)-HBcAg(18-27)(PIC9/P3)、pPIC9K-HSP70-PreS2B(18-24)-Th(830-843)-HBcAg(18-27)(PIC9/P4)^[2]。将上述构建的质粒进行 *XhoI* 和 *EcoRI* 双酶切和测序鉴定。

1.2.2 重组蛋白的表达、纯化与鉴定 按照 Invitrogen 公司的 *Pichia pastoris* expression system 表达系统手册,用 *SacI* 酶线性化各质粒,电转化宿主菌 GS115^[2],重组转化子分别标识为 GS115/P1、GS115/P2、GS115/P3、GS115/P4,MD 平板选择性培养,PCR 方法快速筛选每种阳性转化子 6~10 株。将宿主菌培养在 OD₆₀₀ 为 1.0 的 BMMY 培养基中,用 0.5% 的甲醇诱导表达 3 d。将表达上清液用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进行电泳后,考马斯亮蓝染色观察有无目的条带。然后将蛋白转移到聚偏氟乙烯(PVDF)印迹膜上,用鼠抗-TB. HSP70 单克隆抗体和辣根酶标记的羊抗鼠 IgG 抗体孵育,蛋白免疫印迹法(Western blot)鉴定表达的目的蛋白^[2,5]。将表达量高的菌株接种至 1 L 培养基中诱导表达 3 d,10 000 r/min 离心 30 min,收集的上清液经 50 \times 10³ 的滤膜超滤浓缩后,去除小分子和盐,其滤液放置 ADP-agarose 柱中分离纯化,用 1 mmol/L 的 MgATP 预先调节至 pH 7.0 洗脱,然后在洗脱液中加入乙二胺四乙酸(EDTA)至终浓度 2 mmol/L,进行磷酸盐透析得到的洗脱液包含纯度超过 95% 的

目的蛋白 HSP70(P1)、HSP70-HBcAg(18-27)(P2)、HSP70-PreS2B(18-24)-PreS2Th(37-53)-HBcAg(18-27)(P3)、HSP70-PreS2B(18-24)-Th(830-843)-HBcAg(18-27)(P4)^[2]。

1.2.3 体外考察重组蛋白对慢性乙型肝炎患者外周血来源的树突状细胞生物学活性的影响 按乙型肝炎治疗指南的标准选取慢性乙型肝炎志愿者(HLA-A2)24 例,每组 6 例,与健康志愿者(CTR)作对照,取 20 mL 外周血,肝素抗凝,常规分离外周血单个核细胞,放置 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 培养箱中用 RMIP1640 完全培养基(含 10% 胎牛血清)贴壁培养 2~4 h。用 RMIP1640 培养基清洗细胞 3 次,洗脱未贴壁的细胞(混合淋巴细胞),得到的贴壁细胞在 GM-CSF(1 000 U/mL)和 IL-4(500 U/mL)的作用下诱导成树突状细胞^[2]。用 RMIP1640 培养基重悬树突状细胞,调节细胞浓度为 1 \times 10⁶ 个/mL 置于 96 孔培养板中培养至 5 d 时,分别加入 100 μ g/mL 重组蛋白 P1、P2、P3 各 0.1 mL(终浓度为 10 μ g/mL),共同孵育 2 d,以培养基为空白对照,行流式细胞术评估树突状细胞成熟度,包括检测 CD1a、CD40、CD86、HLA-DR 表达^[6]。重组蛋白负载树突状细胞 2 d 后,ELISA 法检测细胞因子分泌情况 IL-12p70、IL-1 β 、TNF- α (pg/mL)。

1.2.4 体外考察重组蛋白诱导淋巴细胞增殖 树突状细胞按照上述方法分离培养 5 d 后,用 RMIP1640 培养基重悬树突状细胞,调节细胞浓度为 1 \times 10⁶ 个/mL 置于 96 孔培养板中,每孔 100.0 μ L,分别加入 100.0 μ g/mL 重组蛋白 P1、P2、P3 各 0.1 mL(终浓度为 10.0 μ g/mL),共同孵育 5 d。在树突状细胞培养过程中,贴壁孵育后,取未贴壁的细胞(自体淋巴细胞),用 RMIP1640 完全培养基,含 10% 的胎牛血清和 100 U 重组人 IL-2 培养,以 2 \times 10⁶ 个/mL 的细胞浓度置于 24 孔培养板中,分别加入 10 μ g P1、P2、P3 刺激,共同培养 5 d,收集细胞并用无血清 1640 培养基洗涤 2 次。负载重组蛋白的树突状细胞以 1:10 的比例与洗涤后的自体淋巴细胞混合置于 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 培养箱中共同孵育 3 d,以培养基为空白对照,每孔加入 TdR-3H 1 μ Ci,18 h 后收集细胞,检测 cpm 值^[6]。在细胞共同孵育 3 d 后收集细胞培养上清液,用 ELISA 检测 IFN- γ 分泌。

1.2.5 体外考察重组蛋白诱导 HBV 特异性细胞毒活性 将树突状细胞与 10 μ g 重组蛋白 P1、P2、P3 共同培养 5 d 后,再以 1:10 比例与自体淋巴细胞共同孵育 7 d 作为效应细胞,换液,用前 24 h 重组蛋白 P1、P2、P3 再刺激 1 次。以 HepG2. 2. 15 细胞(表达 HBsAg 和 HBeAg)为靶细胞,将 2 \times 10⁶ 个靶细胞在含 20% 胎牛血清的 1640 培养基中用 100 μ Ci Na⁵¹Cr O₄ 于 37 $^{\circ}$ C 标记 1 h,再用无血清的 1640 培养基洗涤细胞。在 1 \times 10⁴ 个/孔的靶细胞中按不同的效靶比(10:1、20:1、40:1、80:1)加入效应细胞于 37 $^{\circ}$ C 10% 胎牛血清中孵育 4 h,取 100 μ L 上清液应用经典⁵¹Cr 法检测细胞毒活性。杀伤率=100 \times (实验组释放-自然释放)/[最大释放(0.1 mmol HCl)-自然释放]。在所有实验中自然释放小于 15% 最大释放^[6]。

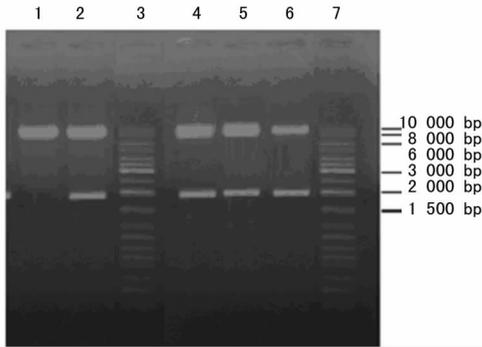
1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行分析,每次独立的实验重复操作 3 次,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 Student's *t* 检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 酵母表达质粒的构建与鉴定 构建的质粒经 *XhoI* 和 *EcoRI* 双酶切后,得到相应的目的片段(图 1),同时测序结果也显示表达载体构建成功,表位序列准确地融合在 HSP70 的 C 端,质粒分别标识为 PIC9/P1、PIC9/P2、PIC9/P3、PIC9/P4。

2.2 重组蛋白的表达、纯化与鉴定 实验表明重组蛋白 P1、

P2、P3 能够顺利地分泌表达(在 70×10^3 处均有一条带),而带有破伤风毒素通用辅助性 T 细胞识别表位 Th830-843 融合蛋白 P4 不能分泌表达(图 2A),经实验反复证实,但胞内检测有表达,可能 Th830-843 表位的引入干扰了该载体分泌信号的正确切割。将表达量高的菌株接种至 1 L 培养基中诱导表达 3 d,离心,上清液经 50×10^3 的超滤浓缩后,用 ADP-agarose 介质亲和层析得纯度超过 95% 的目的蛋白,摇瓶实验显示目的蛋白表达量大于 120 mg/L(图 2B)。



1: PIC9; 2: PIC9/P1 双酶切; 3: DNA 相对分子质量标准; 4: PIC9/P2 双酶切; 5: PIC9/P3 双酶切; 6: PIC9/P4 双酶切; 7: DNA 相对分子质量标准标记物。

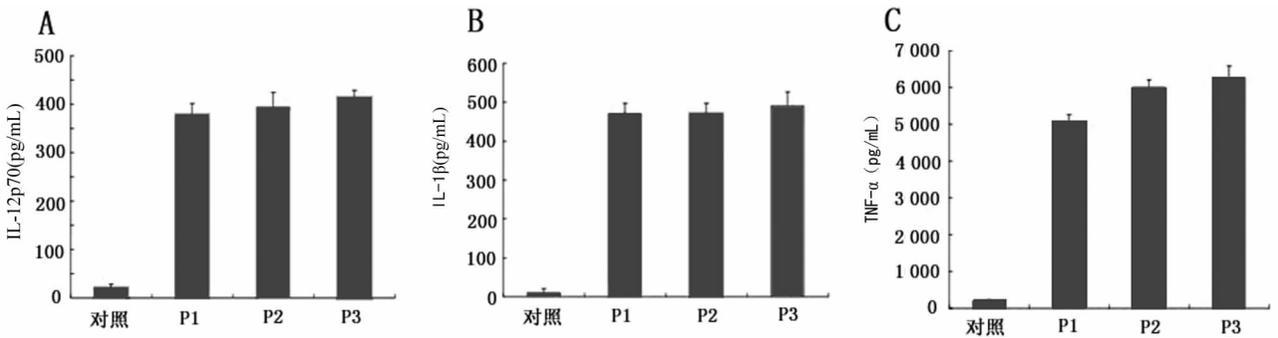
图 1 表达质粒的酶切鉴定

2.3 重组蛋白刺激慢性乙型肝炎与健康者外周血来源树突状

表 1 重组蛋白刺激慢性乙肝与健康者外周血来源树突状细胞表面分子表达(%pos)

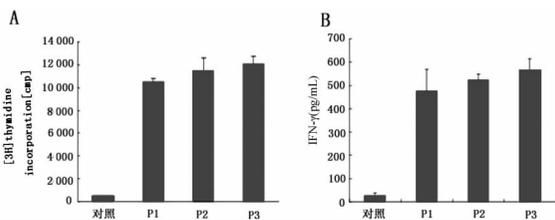
分组	CD1a		CD40		CD86		HLA-DR	
	CAH(n=6)	CTR(n=6)	CAH(n=6)	CTR(n=6)	CAH(n=6)	CTR(n=6)	CAH(n=6)	CTR(n=6)
对照组	1.04±0.50	52.25±8.05 ^a	40.01±7.12	60.00±4.25 ^a	61.54±5.04	80.50±6.80 ^a	97.80±1.00	98.54±1.20
P1	18.89±3.55	52.25±8.06	68.71±5.12	72.80±2.10	98.68±1.25 ^b	99.25±0.25 ^b	99.36±0.55	99.55±0.10
P2	25.93±5.82	52.25±8.07	76.61±7.70 ^b	78.55±3.81 ^b	98.97±1.00 ^b	99.12±0.38 ^b	99.31±0.45	99.38±0.32
P3	30.10±2.50 ^b	52.25±8.08	82.27±4.10 ^b	84.51±3.50 ^b	99.21±0.50 ^b	99.11±0.51 ^b	99.27±0.20	99.12±0.50

^a: $P < 0.05$ 与 CAH 比较; ^b: $P < 0.05$, 与对照组比较。



A: IL-12p70; B: IL-1β; C: TNF-α。

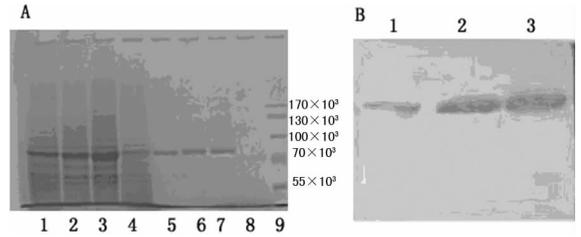
图 3 重组蛋白刺激慢性乙型肝炎外周血来源树突状细胞因子分泌情况



A: 淋巴细胞增殖; B: IFN-γ。

图 4 重组蛋白负载树突状细胞刺激淋巴细胞增殖和 IFN-γ 的分泌

细胞表面分子表达 体外重组蛋白诱导树突状细胞成熟,促进细胞因子分泌,树突状细胞在培养 5 d 时,分别加入 P1、P2、P3,浓度为 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$,共同孵育 2 d,以培养基为对照,行流式细胞术检测树突状细胞 CD1a、CD40、CD86、HLA-DR 表达,结果见表 1。树突状细胞经 P1、P2、P3 刺激后,CD1a、CD40、CD86 均明显提高,CD1a 乙型肝炎患者较健康者低,CD40、CD86 二者差异无统计学意义($P > 0.05$),HLA-DR 差异无统计学意义($P > 0.05$),且 HLA-DR 的表达在抗原刺激前后差异无统计学意义($P > 0.05$),重组蛋白负载树突状细胞 2 d 后,ELISA 法检测细胞因子分泌情况(图 3),P1、P2、P3 均能诱导树突状细胞分泌 Th1 型细胞因子(IL-12p70、IL-1β、TNF-α),有利于 Th0 向 Th1 的极化。



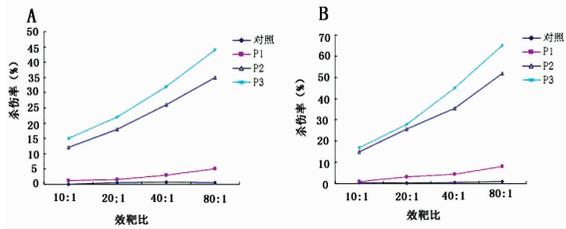
A: 10% SDS-PAGE; 1~4: 分别为 GS115/P1、GS115/P2、GS115/P3、GS115/P4 酵母胞内裂解物; 5~8: 分别为 GS115/P1、GS115/P2、GS115/P3、GS115/P4 表达上清液; 9: 蛋白相对分子质量。B: Western blot; 1: 重组蛋白 P1; 2: 重组蛋白 P2; 3: 重组蛋白 P3。

图 2 重组蛋白的表达和鉴定图

2.4 体外重组蛋白诱导淋巴细胞增殖和 IFN-γ 释放 将负载重组蛋白的树突状细胞按 1 : 10 与自体淋巴细胞孵育 3 d, TdR-3H 掺入法检测淋巴细胞的增殖情况(图 4A)和 ELISA 检测 IFN-γ 分泌(图 4B),结果显示 P1、P2、P3 明显刺激淋巴细胞增殖和释放 IFN-γ。

2.5 体外重组蛋白诱导 HBV 特异性细胞毒活性 以 HepG2. 2. 15 细胞(表达 HBsAg 和 HBeAg)为靶细胞,在体外应用经典 ⁵¹Cr 法检测重组蛋白(P1、P2、P3)诱导 HBV 特异性细胞毒活性(图 5),其结果显示 P3 能引起较强的细胞毒活性,

健康者较乙型肝炎患者强,在效靶比为 80 : 1 时,前者为 65%,后者为 44%,这可能与乙型肝炎患者 T 细胞功能缺陷有关,而单纯的 TB. HSP70(P1)基本没有细胞毒性。以 HepG2 和 HEN 细胞为靶细胞,P3 几乎无细胞毒性。



A:乙型肝炎患者; B 健康者。

图 5 重组蛋白诱导自身淋巴细胞 HBV 特异性细胞毒活性

3 讨 论

本研究借助 TB. HSP70 作为表位肽载体,选用了应用最多的 HBcAg HLA-A2 限制性 CTL 表位 HBcAg(18-27),将 HBcAg(18-27)融合到 TB. HSP70 的 C 端,并引入 Th 和 B 表位,应用 *Pichia pastoris* 酵母分泌表达目的蛋白 HSP70(P1)、HSP70-HBcAg(18-27)(P2)、HSP70-PreS2B(18-24)-PreS2Th(37-53)-HBcAg(18-27)(P3),体外考察这些疫苗对慢性 HBV 感染者外周血淋巴细胞和外周血来源的树突状细胞的作用,表明 HSP70 可作为 HBV HBcAg 细胞毒性 CTL 表位肽载体,提高 CTL 表位肽的免疫原性,特别是含有 B、Th 表位的 P3 能更好地激活 HBV 特异性免疫应答。

作者之前的研究证实 HBcAg(18-27)有较弱的增殖活性,它对淋巴细胞的特异性杀伤作用影响不大^[2,7]。而本研究观察了重组蛋白(P1、P2、P3)在体外诱导树突状细胞成熟、淋巴细胞增殖以及 HBV 特异性细胞毒活性情况。其结果显示 P1、P2、P3 能上调 CD1a、CD40、CD86 表达,诱导未成熟的树突状细胞分泌大量的 IL-12p70、IL-1 β 、TNF- α ,有利于 Th0 向 Th1 的极化,促进树突状细胞成熟,增强树突状细胞抗原递呈能力,同时促进淋巴细胞增殖和释放 IFN- γ ,而且 P3 最能有效激活自体淋巴细胞成为细胞毒活性细胞,而单独的 HSP70 没有杀伤活性,不能有效引起机体特异性免疫应答。这些实验结果表明 HSP70 作为表位肽载体大大增强了 CTL 表位肽的免疫原性,特别是引入 B、Th 表位,可更有效地诱导 HBV 特异性免疫应答。其可能的原因为:(1)HSP70(P1)和融合蛋白(P2、P3)结合树突状细胞能上调 CD1a、CD40、CD86 表达,诱导树突状细胞分泌产生高水平的 Th1 型细胞因子(IL-12p70、IL-1 β 、TNF- α),其中 IL-12 在诱导 Th1 极化中起关键作用,另外诱导释放的 IFN- γ 也有利于 Th0 向 Th1 的极化,从而促进树突状细胞成熟,增强其免疫活性^[2,8-9]。(2)HSP70 特异性结合 CD40,作用于单核细胞、树突状细胞等激活免疫系统,促进树突状细胞释放趋化因子如 CCL3(MIP-1a)、CCL4(RANTES)。通过 CD40 信号可以上调抗原递呈能力,增加共刺激分子 CD80、CD86 和 CD58 的表达,使树突状细胞能向 CTL 启动^[10]。因此树突状细胞通过刺激 T 细胞、促进 CD40 表达,以及与 CD40L 的交联作用诱导 MHC-I 限制性抗原特异性 CD8⁺ T 细胞反应^[3,11]。

本研究通过体外考察表明 TB. HSP70 可作为 HBV HBcAg 细胞毒性 CTL 表位肽载体,提高 CTL 表位肽的免疫原性,而且含有 B 和 Th 表位的 P3 能更好地激活 HBV 特异性免

疫应答,这为 CAH 的免疫治疗开辟新的途径。Floto 等^[12]研究表明 TB. HSP70 通过 CCR5 受体作用于树突状细胞,诱导树突状细胞聚集,促进树突状细胞与 T 细胞形成免疫应答,而 P3 是否也通过 CCR5 受体作用于树突状细胞,这将在后续研究中进一步探讨。

参考文献:

- [1] Brooks J, Gelson W, Rushbrook SM. Therapeutic advances in the management of chronic hepatitis B infection[J]. *Ther Adv Chronic Dis*, 2013, 4 (4): 157-166.
- [2] Peng M, Chen M, Ling N, et al. Novel vaccines for the treatment of chronic HBV infection based on mycobacterial heat shock protein 70[J]. *Vaccine*, 2006, 24 (7): 887-896.
- [3] Moffat JM, Cheong WS, Villadangos JA, et al. Hepatitis B virus-like particles access major histocompatibility class I and II antigen presentation pathways in primary dendritic cells[J]. *Vaccine*, 2013, 31 (18): 2310-2316.
- [4] del Guercio MF, Sidney J, Hermanson G, et al. Binding of a peptide antigen to multiple HLA alleles allows definition of an A2-like supertype[J]. *J Immunol*, 1995, 154 (2): 685-693.
- [5] 彭明利, 凌宁, 许红梅, 等. 结核杆菌热休克蛋白 70 在毕赤酵母中的分泌表达与鉴定 [J]. *生物工程学报*, 2003, 19 (3): 286-290.
- [6] 彭明利, 陈敏, 任红. 结核杆菌热休克蛋白 70 作为乙型肝炎核心抗原细胞毒性 T 淋巴细胞表位肽载体的研究 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2006, 14 (4): 406-407.
- [7] 彭明利, 任红, 许红梅, 等. 结核杆菌热休克蛋白 70-乙型肝炎表面抗原诱导特异性免疫反应 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2003, 11 (5): 271-274.
- [8] Tavakoli S, Schwerin W, Rohwer A, et al. Phenotype and function of monocyte derived dendritic cells in chronic hepatitis B virus infection[J]. *J Gen Virol*, 2004, 85 (Pt 10): 2829-2836.
- [9] Ge C, Xing Y, Wang Q, et al. Improved efficacy of therapeutic vaccination with dendritic cells pulsed with tumor cell lysate against hepatocellular carcinoma by introduction of 2 tandem repeats of microbial HSP70 peptide epitope 407-426 and OK-432[J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11 (12): 2200-2207.
- [10] Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, et al. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking[J]. *J Exp Med*, 1994, 180 (4): 1263-1272.
- [11] Borges TJ, Wieten L, van HMJ, et al. The anti-inflammatory mechanisms of Hsp70[J]. *Front Immunol*, 2012, 3: 95.
- [12] Floto RA, MacAry PA, Boname JM, et al. Dendritic cell stimulation by mycobacterial Hsp70 is mediated through CCR5[J]. *Science*, 2006, 314 (5798): 454-458.