

外周血单个核细胞 TLR3 信号通路活化在重组乙型肝炎表面抗原免疫应答中的作用

晋聪 郝海昀 陈文鑫 王婷 李雁笛 袁琳珠 冯永亮 王素萍

山西医科大学公共卫生学院流行病学教研室,太原 030001

通信作者:王素萍,Email:supingwang@sxmu.edu.cn

【摘要】 目的 探讨外周血单个核细胞(PBMC)Toll样受体3(TLR3)信号通路的活化在重组HBsAg(rHBsAg)免疫应答中的作用及机制。方法 收集13名健康献血者外周血制备血液制品时滤除的白细胞,分离培养PBMC后分别给予TLR3激动剂聚肌苷酸-聚胞苷酸(Poly I:C组)及PBS(对照组)处理,48 h后收集部分细胞,采用流式细胞术检测TLR3信号通路蛋白水平;在活化(Poly I:C组)/未活化(对照组)TLR3信号通路后,采用rHBsAg处理两组PBMC 72 h,采用流式细胞术检测PBMC中树突状细胞(DC)、T、B淋巴细胞及其亚群比例。采用配对 t 检验、配对资料的符号秩和检验和典型相关分析进行统计学分析。结果 Poly I:C组PBMC TLR3信号通路中TLR3蛋白阳性细胞百分比(19.21%)、TLR3蛋白表达量(8 983.95)、NF- κ B蛋白的表达量(26 193.13)、磷酸化NF- κ B(pNF- κ B)蛋白阳性细胞百分比(13.73%)及其占NF- κ B的比例(16.03%)、磷酸化IRF3(pIRF3)蛋白阳性细胞百分比(12.64%)及其占IRF3的比例(21.80%)均明显高于对照组(分别为11.54%、8 086.00、22 340.66、8.72%、9.71%、9.57%、19.12%)($P < 0.05$), TRIF蛋白阳性细胞百分比(89.75%)和蛋白表达量(304 219.54)均高于对照组(89.64%、288 149.72)($P > 0.05$);经rHBsAg处理后,Poly I:C组髓样DC(mDC)(2.90%)、浆细胞样DC(1.80%)、B细胞(5.31%)比例及浆细胞占B细胞比例(67.71%)均明显高于对照组(1.83%、0.81%、4.23%、58.82%)($P < 0.05$);TLR3信号通路相关蛋白阳性细胞百分比和蛋白表达量与免疫细胞之间均存在典型相关,TLR3蛋白表达量与浆细胞比例、pIRF3蛋白表达量与浆细胞和mDC比例、pNF- κ B和pIRF3蛋白阳性细胞百分比与CD4⁺T细胞的比例均正相关。结论 Poly I:C可以活化PBMC TLR3/TRIF/NF- κ B和TLR3/TRIF/IRF3信号通路,促进下游信号分子发挥功能,进而促进DC的成熟,诱导CD4⁺T细胞免疫反应,促进B细胞的成熟分化,促进rHBsAg的免疫应答。

【关键词】 Toll样受体3; 聚肌苷酸-聚胞苷酸; 免疫反应

基金项目:国家自然科学基金(81872677,81573212)

Effect of activation of Toll-like receptor signaling pathway of peripheral blood mononuclear cell in recombinant hepatitis B surface antigen immune response

Jin Cong, Hao Haiyun, Chen Wenxin, Wang Ting, Li Yandi, Yi Linzhu, Feng Yongliang, Wang Suping
Department of Epidemiology, School of Public Health, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China
Corresponding author: Wang Suping, Email: supingwang@sxmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To explore the effect and mechanism of activation of peripheral blood mononuclear cell (PBMC) Toll-like receptor (TLR3) signaling pathway in recombinant HBsAg (rHBsAg) immune response. **Methods** White blood cells were collected from peripheral blood of 13 healthy donors in the preparation of blood products. PBMC was isolated and treated with Poly I:C

DOI:10.3760/cma.j.cn112338-20210714-00547

收稿日期 2021-07-14 本文编辑 万玉立

引用格式:晋聪,郝海昀,陈文鑫,等.外周血单个核细胞TLR3信号通路活化在重组乙型肝炎表面抗原免疫应答中的作用[J].中华流行病学杂志,2022,43(4):560-565. DOI:10.3760/cma.j.cn112338-20210714-00547.

Jin C, Hao HY, Chen WX, et al. Effect of activation of Toll-like receptor signaling pathway of peripheral blood mononuclear cell in recombinant hepatitis B surface antigen immune response[J]. Chin J Epidemiol, 2022, 43(4):560-565. DOI: 10.3760/cma.j.cn112338-20210714-00547.



(Poly I:C group) and PBS (control group) respectively. 48 h later, some cells were collected and the expressions of TLR3 signaling pathway proteins were detected by flow cytometry. After activating (Poly I:C group)/inactivating (control group) TLR3 signaling pathway, rHBsAg was given to both groups for 72 h, and the proportions of DC, T, B cells and their subsets in PBMC were detected by flow cytometry. Paired *t*-test, paired samples wilcoxon signed-rank test and canonical correlation analyses were used for statistical analysis. **Results** The percentage of TLR3 protein-positive cells (19.21%) and protein expression (8 983.95), NF- κ B protein expression (26 193.13), the percentage of pNF- κ B protein-positive cells (13.73%) and its proportion in NF- κ B (16.03%), and the percentage of pIRF3 protein-positive cells (12.64%) and its proportion in IRF3 (21.80%) in Poly I:C group were higher than those in control group (11.54%, 8 086.00, 22 340.66, 8.72%, 9.71%, 9.57%, 19.12%) ($P < 0.05$), and the percentage of TRIF protein-positive cells (89.75%) and protein expression (304 219.54) were higher in Poly I:C group than in the control group (89.64%, 288 149.72) ($P > 0.05$). After PBMC stimulation by rHBsAg, the proportions of mDC (2.90%), pDC (1.80%), B cell (5.31%) and plasma cell (67.71%) in Poly I:C group were significantly higher than those in the control group (1.83%, 0.81%, 4.23%, 58.82%) ($P < 0.05$). Results of canonical correlation analysis showed that the expression of TLR3 protein was positively correlated with the proportions of plasma cells, the expression of pIRF3 protein was positively correlated with the proportions of plasma cells and mDC, and the percentage of pNF- κ B protein-positive cells and the percentage of pIRF3 protein-positive cells were positively correlated with the proportion of CD4⁺T cells. **Conclusions** Poly I:C can activate TLR3/TRIF/NF- κ B and TLR3/TRIF/IRF3 signaling pathway, promote the function of downstream signaling molecules, and then promote the maturation of DC, induce the immune responses of CD4⁺T cell, and promote the maturation and activation of B cells and the immune response of rHBsAg.

【Key words】 Toll-like receptor 3; Polyinosinic acid-polycytidylic acid; Immune response
Fund programs: National Natural Science Foundation of China (81872677, 81573212)

全球约有 2.57 亿慢性 HBV 感染者^[1]。预防 HBV 感染的重要措施是接种乙型肝炎(乙肝)疫苗,但仍有 5%~10% 的个体免疫后体内 HBsAb 达不到保护性水平^[2-3]。Toll 样受体 3(TLR3)是一种常见的与天然免疫密切相关的病原模式识别受体,其与配体双链 RNA(dsRNA)结合后,可激活天然免疫并诱导特异性免疫,增强机体的免疫水平^[4-8]。聚肌苷酸-聚胞苷酸(Poly I:C)是一种人工合成的 dsRNA,作为 TLR3 激动剂已广泛应用于体内外研究。既往研究发现,Poly I:C 联合治疗性乙肝疫苗可通过活化 TLR3 进而有效地清除小鼠体内的 HBV DNA^[9],其与铝佐剂联合后可提高小鼠腺病毒载体乙肝疫苗特异性抗体的产生^[10]。本课题组前期研究显示,乙肝疫苗免疫强应答婴儿 TLR3 蛋白表达量高于无/弱应答婴儿,体外实验显示活化脐血单个核细胞中 TLR3 可改善其乙肝疫苗免疫应答效果^[11]。以上研究均提示 TLR3 在乙肝疫苗免疫应答过程中发挥重要作用。外周血单个核细胞(PBMC)是免疫细胞的集合体,可以反映机体的免疫功能,且 PBMC 中树突状细胞(DC)、T 淋巴细胞广泛表达 TLR3 信号通路相关蛋白。因此本研究以健康献血者的 PBMC 为研究对象,用 Poly I:C 活化 PBMC 中 TLR3 信号通路后,用高纯度重组 HBsAg

(rHBsAg)处理 PBMC 模拟重组乙肝疫苗接种,通过分析 DC 及 T、B 淋巴细胞亚群比例变化反映机体对 rHBsAg 的免疫应答,结合典型相关分析研究 TLR3 信号通路在 rHBsAg 免疫应答中作用的分子机制,为乙肝疫苗无/弱应答机制研究提供新思路。

材料与方法

1. 细胞来源:收集 13 名健康献血者的新鲜外周血,将制备血液制品中滤除的白细胞回收,经密度梯度离心法获得 PBMC。研究对象均签署知情同意书,本研究经山西医科大学伦理委员会批准(批准文号:2015LL073)。

2. PBMC 培养、分组及 Poly I:C、rHBsAg 处理:调整 PBMC 浓度为 1.2×10^6 个/ml,用含 10% 胎牛血清、1% 青霉素和链霉素、1% 谷氨酰胺和 88% 的 RPMI 1640 培养基于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中常规培养 18 h 后,将健康献血者的 PBMC 分为两组,每组设 3 个平行样,分别给予 56 μ l 终浓度为 40 μ g/ml 的 Poly I:C(Sigma-Alorich 公司)(Poly I:C 组)及等量 PBS(对照组)处理,48 h 后收集部分细胞检测 PBMC TLR3 信号通路活化状态,在活化(Poly I:C 组)/未活化(对照组)TLR3 信号通路后,

采用 26 μl 终浓度为 2 $\mu\text{g/ml}$ 的 rHBsAg (Abcam 公司) 处理两组 PBMC 72 h, 检测 PBMC 中各免疫细胞比例, 评估 PBMC rHBsAg 免疫应答情况。

3. TLR3 信号通路的活化状态: 采用流式细胞术检测 TLR3 信号通路中 TLR3、TRIF、NF- κB 和磷酸化 NF- κB (pNF- κB)、IRF3 和磷酸化 IRF3 (pIRF3) 6 个蛋白的表达, 包括蛋白阳性细胞百分比和蛋白表达量, 后者用平均荧光强度 (mean fluorescence intensity, MFI) 表示, 反映 TLR3 信号通路的活化情况。

(1) TLR3、TRIF 蛋白检测: 各管细胞加 100 μl IC Fixation Buffer, 室温避光孵育 30 min, 1 ml 1 \times Permeabilization Buffer 洗 2 次, 重悬细胞后各管分别加入 TLR3-PE (eBioscience 公司)、TRIF-PE (BD 公司) 及同型抗体, 室温避光孵育 30 min, 1 ml 1 \times Permeabilization Buffer 洗 2 次后重悬上机。

(2) NF- κB 和 pNF- κB 、IRF3 和 pIRF3 蛋白检测: 每管细胞加 0.5 ml 4% 的多聚甲醛, 室温孵育 10 min, PBS 洗 2 次, 630 μl -20 $^{\circ}\text{C}$ 甲醇重悬细胞后 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, PBS 洗 2 次, 重悬细胞后各管分别加 NF- κB -APC、IRF3-APC (R&D 公司)、pNF- κB -PE、pIRF3-PE (CST 公司) 及同型抗体, 室温避光孵育 30 min, PBS 洗 2 次后重悬上机。

4. PBMC rHBsAg 免疫应答情况: 采用流式细胞术检测 PBMC 中髓样树突状细胞 (mDC) 和浆细胞样树突状细胞 (pDC)、CD4 $^{+}$ T 细胞和 CD8 $^{+}$ T 细胞、B 细胞和浆细胞、CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Treg 细胞和 CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ foxp3 $^{+}$ Treg 细胞所占比例, 反映 PBMC 对 rHBsAg 的免疫应答相关免疫细胞活化情况。

(1) DC 细胞、T 细胞、B 细胞检测: 各管细胞加入相应抗体 (DC 抗体: Lin-FITC、HLA-DR-PerCP-Cyanine5.5、CD123-APC、CD11c-PE; T 细胞抗体: CD3-FITC、CD4-PE、CD8-APC; B 细胞抗体: CD3-FITC、CD19-PerCP-Cyanine5.5、CD27-PE、CD38-APC 及同型抗体, eBioscience 公司), 室温避光孵育 30 min, PBS 洗 2 次后重悬上机。DC 细胞及其亚型的鉴别: 首先根据 Lin 鉴别出 Lin $^{-}$ 细胞, 再根据 HLADR/CD11c 鉴别 mDC 细胞、根据 HLA-DR/CD123 鉴别 pDC 细胞; T 细胞及其亚型的鉴别: 根据 CD3/CD4 鉴别 CD3 $^{+}$ CD4 $^{+}$ T 细胞、根据 CD3/CD8 鉴别 CD3 $^{+}$ CD8 $^{+}$ T 细胞; B 细胞及其亚型鉴别: 根据 CD3/CD19 鉴别 B 细胞, 再根据 CD27/CD38 鉴别 B 细胞中的浆细胞。

(2) Treg 细胞检测: 各管细胞分别加入

CD4-FITC、CD25-PE 及同型抗体 (eBioscience 公司), 室温避光孵育 30 min, PBS 洗 2 次, 重悬细胞后加 1 ml Foxp3 Fixation/Permeabilization working solution, 室温避光孵育 30 min, 1 ml 1 \times Permeabilization Buffer 洗 2 次, 重悬细胞后各管分别加入 Foxp3-APC 及同型抗体 (eBioscience 公司), 室温避光孵育 30 min, 1 ml 1 \times Permeabilization Buffer 洗 2 次后重悬上机。Treg 细胞的鉴别: 首先根据 CD4 鉴别出 CD4 $^{+}$ 细胞, 再根据 CD4/CD25 鉴别出 CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Treg、根据 CD4/CD25/Foxp3 鉴别出 CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Foxp3 $^{+}$ Treg。

5. 统计学分析: 流式细胞术数据采用 CytExpert 软件分析, 采用 Excel 2016 软件建立数据库, 采用 SPSS 23.0 软件分析数据, 服从正态分布的定量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 描述, 不服从正态分布的定量资料采用 $M(Q_1, Q_3)$ 描述。采用配对 t 检验对服从正态分布的定量资料进行组间比较, 不服从正态分布时采用配对资料的符号秩和检验。采用典型相关分析, 以 PBMC rHBsAg 免疫应答相关细胞作为典型相关分析的一组原始变量, TLR3 信号通路蛋白阳性细胞百分比、蛋白表达量分别作为典型相关分析的另一组原始变量, 分别分析两组原始变量间的相关性。两组原始变量通过线性组合, 得到单个综合变量 U 和 V , U_1 和 V_1 为第一对典型变量, 相关程度最大, R_1 为第一典型相关系数, 用来表示两组变量的相关性, 以此类推。典型载荷是原始变量与典型变量对之间的相关系数, 是反映原始变量提供信息量多少的指标, 其绝对值越大说明该原始变量与典型变量之间的相关关系越强, 在典型变量中的代表程度越大。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. Poly I:C 活化 PBMC TLR3 信号通路蛋白情况: Poly I:C 组 TLR3 蛋白阳性细胞百分比 (19.21%)、pNF- κB 阳性细胞百分比 (13.73%) 及其占 NF- κB 的比例 (16.03%)、pIRF3 阳性细胞百分比 (12.64%) 及其占 IRF3 的比例 (21.80%) 均显著高于对照组 (分别为 11.54%、8.72%、9.71%、9.57%、19.12%) ($P < 0.05$); TLR3 蛋白表达量及 NF- κB 的表达量 (MFI 分别为 8 983.95 和 26 193.13) 均显著高于对照组 (MFI 分别为 8 086.00 和 22 340.66) ($P < 0.05$), TRIF、pNF- κB 、IRF3、pIRF3 的表达量高于对照组 ($P > 0.05$)。见表 1。以上结果提示 Poly I:C 可

以活化 PBMC 中 TLR3/TRIF/NF-κB 和 TLR3/TRIF/IRF3 信号通路。

2. TLR3 信号通路活化促进 PBMC rHBsAg 免疫应答: 经 rHBsAg 处理后, Poly I: C 组 PBMC 中 mDC (2.90%)、pDC (1.80%)、B 淋巴细胞 (5.31%) 和 B 细胞中浆细胞 (67.71%) 比例均高于对照组 (分别为 1.83%、0.81%、4.23%、58.82%), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞、CD4⁺CD25⁺Treg 细胞和 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 细胞比例在两组间的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。提示活化 TLR3 信号通路可以促进 PBMC 中 DC 和 B 淋巴细胞的成熟活化, 促进 PBMC rHBsAg 的免疫应答。

3. TLR3 信号通路蛋白与 PBMC rHBsAg 免疫应答相关免疫细胞间存在典型相关: TLR3 信号通路蛋白与 PBMC rHBsAg 免疫应答相关免疫细胞之间的关系错综复杂, 为了更加全面地反映两组指标之间的相关性, 使两组变量的信息更加充分地表达, 本研究对两组指标进行了典型相关分析。结果显示, TLR3 信号通路蛋白阳性细胞百分比和蛋白表达量与免疫细胞之间均存在典型相关。在蛋白阳性细胞百分比上, TLR3 信号通路蛋白与免疫细胞的第一典型相关系数为 0.948, $P = 0.003$, 特征值的贡献比为 0.693。见表 3。进一步典型载荷分析结果

显示, TLR3 信号通路蛋白阳性细胞百分比与免疫细胞相关主要表现在 pNF-κB、pIRF3 和 CD4⁺T 细胞的相关, 即 pNF-κB 和 pIRF3 升高可能会引起 CD4⁺T 细胞比例升高。见表 4。在蛋白表达水平上, TLR3 信号通路蛋白与免疫细胞的第一、二、三典型相关系数分别为 0.977、0.907、0.840 ($P < 0.05$); 且前 3 对典型变量的特征值累计贡献比达到 0.917。见表 3。对前 3 对典型变量的典型载荷进行分析, 第 1 对典型变量的典型载荷分析结果显示, IRF3 蛋白表达量与 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞正相关, 第 2 对典型变量的典型载荷分析结果显示, pIRF3 蛋白表达量与浆细胞和 mDC 正相关; 第 3 对典型变量的典型载荷分析结果显示, TLR3 蛋白表达量与浆细胞比例正相关。见表 5。以上结果提示, TLR3 信号通路相关蛋白与 mDC、浆细胞、CD4⁺T 细胞、CD4⁺CD25⁺Treg 细胞比例相关。

讨 论

乙肝疫苗接种是预防 HBV 感染的重要措施, TLR3 是连接天然免疫和特异性免疫的桥梁, 既往研究显示, TLR3 在乙肝疫苗免疫应答中发挥重要作用, 但 TLR3 及其下游信号通路在乙肝疫苗免疫

表 1 聚肌苷酸-聚胞苷酸 (Poly I:C) 对 13 名健康献血者外周血单个核细胞 TLR3 信号通路活化情况

类 别	TLR3 信号通路蛋白表达阳性的细胞比例 (%)		t 值	P 值	TLR3 信号通路蛋白表达量 (MFI)		t 值	P 值
	对照组	Poly I: C 组			对照组	Poly I: C 组		
TLR3	11.54±7.79	19.21±13.64	-3.30	0.006	8 086.00±1 920.17	8 983.95±2 525.19	-3.15	0.008
TRIF	89.64±4.54	89.75±5.00	-0.22	0.828	288 149.72±118 346.49	304 219.54±136 332.23	-1.43	0.179
NF-κB	90.97±6.83	87.77±10.09	1.64	0.126	22 340.66±8 884.83	26 193.13±10 808.66	-3.59	0.004
pNF-κB	8.72±4.43	13.73±5.60	-3.94	0.002	6 105.09±1 416.21	6 323.03±1 443.40	-0.89	0.391
IRF3	92.99±3.31	90.35±6.34	1.73	0.110	522 748.95±126 865.54	584 733.48±207 557.83	-2.05	0.063
pIRF3	9.57±2.97	12.64±4.75	-2.83	0.018	5 282.98±854.74	5 589.48±1 375.22	-1.38	0.192
pNF-κB/NF-κB ^a	9.71±5.05	16.03±7.30	-3.47	0.005				
pIRF3/IRF3 ^b	19.12±4.51	21.80±6.65	-2.52	0.030				

注: Poly I: C: 聚肌苷酸-聚胞苷酸; ^apNF-κB 占 NF-κB 的比例; ^bpIRF3 占 IRF3 的比例; MFI: 平均荧光强度

表 2 TLR3 信号通路活化对 13 名健康献血者外周血单个核细胞 rHBsAg 免疫应答的影响

类 别	对照组 (%)	Poly I: C 组 (%)	t/Z 值	P 值
mDC ^a	1.83 (1.66, 3.65)	2.90 (1.24, 6.44)	-2.27	0.023
pDC ^a	0.81 (0.38, 2.83)	1.80 (0.58, 4.54)	-2.43	0.015
CD4 ⁺ T 细胞	45.63±17.61	45.20±17.82	0.45	0.663
CD8 ⁺ T 细胞	20.05±9.99	19.39±9.08	0.88	0.394
B 淋巴细胞	4.23±2.16	5.31±2.67	-3.25	0.007
浆细胞	58.82±19.36	67.71±20.27	-5.26	<0.001
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg 细胞 ^a	4.03 (1.58, 10.48)	2.86 (0.71, 11.23)	-0.45	0.650
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ Treg 细胞 ^a	1.48 (0.58, 3.16)	0.90 (0.40, 1.65)	-1.08	0.279

注: Poly I: C: 聚肌苷酸-聚胞苷酸; mDC: 髓样树突状细胞; pDC 为浆细胞样树突状细胞; ^a为 $M(Q_1, Q_3)$

表 3 TLR3 信号通路蛋白与免疫细胞的典型相关系数及其检验

典型变量对	TLR3 通路蛋白阳性细胞百分比与免疫细胞						TLR3 通路蛋白表达量(MFI)与免疫细胞					
	典型相关系数	特征值	贡献比	累计贡献比	F 值	P 值	典型相关系数	特征值	贡献比	累计贡献比	F 值	P 值
U1 和 V1	0.948	8.792	0.693	0.693	2.120	0.003	0.977	21.121	0.688	0.688	4.877	<0.001
U2 和 V2	0.824	2.108	0.166	0.859	1.286	0.196	0.907	4.619	0.150	0.839	3.157	<0.001
U3 和 V3	0.735	1.172	0.092	0.951	0.951	0.540	0.840	2.404	0.078	0.917	2.571	0.002
U4 和 V4	0.555	0.445	0.035	0.986	0.595	0.862	0.809	1.898	0.062	0.979	2.148	0.026
U5 和 V5	0.339	0.130	0.010	0.996	0.346	0.941	0.620	0.624	0.020	0.999	1.171	0.347
U6 和 V6	0.207	0.045	0.004	1.000	0.253	0.858	0.167	0.029	0.001	1.000	0.162	0.920

注: MFI: 平均荧光强度

表 4 TLR3 信号通路蛋白阳性细胞百分比与免疫细胞的典型载荷

变 量	第一对典型变量
TLR3 信号通路	U1
TLR3	-0.533
TRIF	-0.363
NF-κB	-0.260
pNF-κB	0.742
IRF3	-0.538
pIRF3	0.704
免疫细胞	V1
CD4 ⁺ T 细胞	0.633
CD8 ⁺ T 细胞	0.300
B 细胞	0.178
浆细胞	-0.270
mDC	-0.592
pDC	-0.192
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg	0.477
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ Treg	-0.084

注: U、V 分别为两组变量通过线性组合得到的综合变量, U1、V1 为第一对典型变量; 典型载荷是典型变量对与原始变量之间的相关系数; mDC: 髓样树突状细胞; pDC 为浆细胞样树突状细胞

表 5 TLR3 信号通路蛋白表达量(MFI)与免疫细胞的典型载荷

变 量	第一对典型变量			第二对典型变量			第三对典型变量		
	U1	U2	U3	V1	V2	V3	V1	V2	V3
TLR3 信号通路	U1	U2	U3	V1	V2	V3	V1	V2	V3
TLR3	0.544	0.127	-0.678						
TRIF	0.269	-0.371	-0.558						
NF-κB	-0.469	0.205	-0.351						
pNF-κB	-0.135	0.037	-0.429						
IRF3	-0.888	0.283	-0.096						
pIRF3	-0.551	0.623	0.021						
免疫细胞	V1	V2	V3	V1	V2	V3	V1	V2	V3
CD4 ⁺ T 细胞	-0.342	0.582	0.257						
CD8 ⁺ T 细胞	-0.612	0.566	0.147						
B 细胞	0.387	0.589	0.122						
浆细胞	0.253	0.657	-0.605						
mDC	0.027	0.630	0.169						
pDC	0.556	0.340	0.484						
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg	-0.767	0.384	0.410						
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ Treg	0.176	0.126	0.111						

注: U、V 分别为两组变量通过线性组合得到的综合变量, U1、V1 为第一对典型变量; U2、V2 为第二对典型变量; U3、V3 为第三对典型变量; 典型载荷是典型变量对与原始变量之间的相关系数; mDC: 髓样树突状细胞; pDC 为浆细胞样树突状细胞

应答中的作用机制尚不清楚。本研究发现, Poly I:C 处理 PBMC 后活化 TLR3/TRIF/NF-κB 和 TLR3/TRIF/IRF3 信号通路, 进而促进 DC 的成熟, 诱导 CD4⁺T 细胞免疫反应, 促进 B 细胞的成熟分化, 增强 PBMC 对 rHBsAg 的免疫应答, 提示 TLR3 信号通路在乙肝疫苗免疫应答过程中发挥重要作用, Poly I:C 可能作为乙肝疫苗的佐剂, 促进抗原提呈细胞发挥功能, 诱导细胞免疫和体液免疫, 提高乙肝疫苗免疫应答水平。

TLR3 由细胞外 dsRNA 激活, 既往研究表明, TLR3 与配体 dsRNA 结合后可募集下游含 TIR 结构域诱导的 TRIF, 促进 TLR3 与 TRIF 的结合, 诱导 IFN-β 的分泌^[12-13], TRIF 激活后可促进下游的 NF-κB 和 IRF3 磷酸化进而发挥作用, NF-κB 磷酸化后可上调细胞因子和趋化因子等基因的转录和表达, 诱发炎症反应和抗病毒反应等^[14]; IRF3 磷酸化

后诱导 IFN-β 及 IFN 调控基因的表达, 从而增强免疫细胞的募集和激活^[15]。Poly I:C 是一种体外合成的 dsRNA, 可作为 TLR3 激动剂应用于体内外研究。在本研究中, 使用 Poly I:C 处理 PBMC 后, TLR3、TRIF 和 pNF-κB、pIRF3 蛋白阳性细胞百分比及其表达量均有不同程度升高, 表明 Poly I:C 作为 TLR3 激动剂, 可活化 TLR3/TRIF/NF-κB 和 TLR3/TRIF/IRF3 信号通路。因此, 本研究采用 Poly I:C 活化 PBMC 中 TLR3 信号通路, 进一步分析 TLR3 信号通路活化后在 rHBsAg 免疫应答中的作用。

目前, 关于 TLR3 活化在乙肝疫苗免疫应答中的研究多集中于治疗性乙肝疫苗, Poly I:C 联合治疗性乙肝疫苗可通过活化 TLR3 进而有效地清除 HBV DNA^[9,16]。而关于 TLR3 在健康者乙肝疫苗免

疫应答中的研究较少,一项针对广西壮族自治区汉族儿童的研究发现,TLR3 基因 rs13126816 位点等位基因 A 可能是汉族儿童初次乙肝疫苗免疫低应答的影响因素^[17]; Chuai 等^[10]在动物实验中发现, Poly I: C 与铝佐剂联合后可增强 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞应答,提高小鼠腺病毒载体乙肝疫苗特异性抗体的产生。另外,有研究者发现,活化 TLR3 可以增强 HIV 疫苗和流感疫苗等疫苗的免疫应答, Longhi 等^[18]在体外及动物实验中发现,活化 TLR3 可刺激 I 型干扰素的分泌,促进 DC 成熟和 CD4⁺T 细胞反应,从而增强机体对 HIV Gag 蛋白疫苗的免疫应答;一项体外实验结果显示,活化 TLR3 可以增强 T 细胞依赖性 B 细胞激活,从而增强 B 细胞功能并促进其向浆细胞分化,增强对流感疫苗的免疫应答^[19]。rHBsAg 是重组乙肝疫苗的主要成分,是一种胸腺依赖性抗原,被 DC 摄取并处理后以 p-MHC 复合物的形式表达于表面,再与特异性 CD4⁺T 细胞结合,从而激活 MHC II 类限制性 T 细胞,然后分化为 Th1 和 Th2 类辅助性 T 细胞,激活特异性 B 细胞并诱导其分化为浆细胞分泌 HBsAb^[20]。本研究中在 Poly I: C 活化 TLR3 信号通路后使用 rHBsAg 处理 PBMC,结果显示, mDC、pDC、B 细胞及 B 细胞中浆细胞比例升高,且典型相关分析结果显示, TLR3 信号通路相关蛋白不仅与 mDC、浆细胞比例相关,还与 CD4⁺T 细胞比例相关,说明 TLR3 信号通路活化能够提高 DC 比例,促进 CD4⁺T 细胞的激活,提高 B 细胞及浆细胞比例,使 PBMC 对 rHBsAg 免疫应答水平有所升高。

综上所述, Poly I: C 能够活化 TLR3/TRIF/NF- κ B 和 TLR3/TRIF/IRF3 信号通路,促进 NF- κ B 和 IRF3 磷酸化,进而促进 DC 的成熟,诱导 CD4⁺T 细胞免疫反应,促进 B 细胞成熟并分化为浆细胞,增强 PBMC 对 rHBsAg 的免疫应答。初步阐释了 TLR3 信号通路活化后增强 PBMC rHBsAg 免疫应答的分子机制,为改善乙肝疫苗的免疫效果提供了新视角,也为 Poly I: C 用作乙肝疫苗佐剂提供了新思路。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 晋聪:分析/解释数据、统计学分析、论文撰写;郝海响:酝酿和设计实验、实施研究;陈文鑫、王婷:采集数据;李雁笛、袁琳琳:实施研究;冯永亮:酝酿和设计实验、研究指导、论文修改;王素萍:酝酿和设计实验、研究指导、论文修改、经费支持

参 考 文 献

- [1] Naggie S, Lok AS. New therapeutics for Hepatitis B: the road to cure[J]. *Annu Rev Med*, 2021, 72: 93-105. DOI: 10.1146/annurev-med-080119-103356.
- [2] Cardell K, Akerlind B, Sällberg M, et al. Excellent response rate to a double dose of the combined hepatitis A and B

- [3] Wang B, Xu XX, Wen HX, et al. Influencing factors for non/low-response to hepatitis-B vaccine in infants of HBsAg positive mothers[J]. *Chin J Epidemiol*, 2017, 38(7): 911-915. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2017.07.013.
- [4] Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity[J]. *Nat Immunol*, 2001, 2(8): 675-680. DOI: 10.1038/90609.
- [5] Pifferi C, Fuentes R, Fernández-Tejada A. Natural and synthetic carbohydrate-based vaccine adjuvants and their mechanisms of action[J]. *Nat Rev Chem*, 2021, 5(3): 197-216. DOI: 10.1038/s41570-020-00244-3.
- [6] Sharma S, Tenover BR, Grandvaux N, et al. Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway[J]. *Science*, 2003, 300(5622): 1148-1151. DOI: 10.1126/science.1081315.
- [7] Zang R, Lian H, Zhong X, et al. ZCCHC3 modulates TLR3-mediated signaling by promoting recruitment of TRIF to TLR3[J]. *J Mol Cell Biol*, 2020, 12(4): 251-262. DOI: 10.1093/jmcb/mjaa004.
- [8] Tjwa ETTL, van Oord GW, Biesta PJ, et al. Restoration of TLR3-activated myeloid dendritic cell activity leads to improved natural killer cell function in chronic hepatitis B virus infection[J]. *J Virol*, 2012, 86(8): 4102-4109. DOI: 10.1128/JVI.07000-11.
- [9] Zhao HJ, Han QJ, Wang G, et al. Poly I: C-based rHBV vaccine eliminates HBV via generation of HBV-specific CD8⁺ effector memory T cells[J]. *Gut*, 2019, 68(11): 2032-2043. DOI: 10.1136/gutjnl-2017-315588.
- [10] Chuai X, Chen H, Wang W, et al. Poly(I: C)/alum mixed adjuvant priming enhances HBV subunit vaccine-induced immunity in mice when combined with recombinant adenoviral-based HBV vaccine boosting[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e54126. DOI: 10.1371/journal.pone.0054126.
- [11] 张睿君, 袁琳琳, 武佳欣, 等. TLR3 对乙型肝炎疫苗无弱应答婴儿脐血单个核细胞 Th1/Th2 型细胞因子的影响[J]. *中华疾病控制杂志*, 2020, 24(6): 711-715, 722. DOI: 10.16462/j.cnki.zbjbkz.2020.06.018.
- [12] Zhang RJ, Yi LZ, Wu JX, et al. The effects of TLR3 up-regulation on Th1/Th2 cytokines in CBMCs of infants with non/hypo response to hepatitis B vaccine[J]. *Chin J Dis Control Prev*, 2020, 24(6): 711-715, 722. DOI: 10.16462/j.cnki.zbjbkz.2020.06.018.
- [13] Glavan TM, Pavelic J. The exploitation of Toll-like receptor 3 signaling in cancer therapy[J]. *Curr Pharm Des*, 2014, 20(42): 6555-6564. DOI: 10.2174/1381612820666140826153347.
- [14] Matsumoto M, Seya T. TLR3: interferon induction by double-stranded RNA including poly(I: C) [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, 60(7): 805-812. DOI: 10.1016/j.addr.2007.11.005.
- [15] D'Atri LP, Etulain J, Rivadeneyra L, et al. Expression and functionality of Toll-like receptor 3 in the megakaryocytic lineage[J]. *J Thromb Haemost*, 2015, 13(5): 839-850. DOI: 10.1111/jth.12842.
- [16] Hu JX, Song DL, Luo GH, et al. Activation of Toll like receptor 3 induces spermatogonial stem cell apoptosis[J]. *Cell Biochem Funct*, 2015, 33(6): 415-422. DOI: 10.1002/cbf.3133.
- [17] Wu J, Huang SM, Zhao XL, et al. Poly(I: C) treatment leads to interferon-dependent clearance of hepatitis B virus in a hydrodynamic injection mouse model[J]. *J Virol*, 2014, 88(18): 10421-10431. DOI: 10.1128/JVI.00996-14.
- [18] 李海, 吕应楠, 杨庆利, 等. TLR 基因多态性对广西汉族儿童乙型肝炎疫苗初次免疫应答水平的影响[J]. *中华疾病控制杂志*, 2019, 23(4): 397-401, 411. DOI: 10.16462/j.cnki.zbjbkz.2019.04.006.
- [19] Li H, Lv YN, Yang QL, et al. Effect of TLR gene polymorphisms on primary immune response to hepatitis B vaccine in Han children of Guangxi[J]. *Chin J Dis Control Prev*, 2019, 23(4): 397-401, 411. DOI: 10.16462/j.cnki.zbjbkz.2019.04.006.
- [20] Longhi MP, Trunpfheller C, Idoyaga J, et al. Dendritic cells require a systemic type I interferon response to mature and induce CD4⁺ Th1 immunity with poly I: C as adjuvant [J]. *J Exp Med*, 2009, 206(7): 1589-1602. DOI: 10.1084/jem.20090247.
- [19] Weir GM, Karkada M, Hoskin D, et al. Combination of Poly I: C and Pam3CSK4 enhances activation of B cells *in vitro* and boosts antibody responses to protein vaccines *in vivo* [J]. *PLoS One*, 2017, 12(6): e0180073. DOI: 10.1371/journal.pone.0180073.
- [20] Moser M, Leo O. Key concepts in immunology[J]. *Vaccine*, 2010, 28 Suppl 3: C2-13. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.07.022.