

HBV 刺激下滋养层细胞 MAVS 信号通路对 PBMC 乙肝疫苗免疫反应影响的研究

任朝敏¹, 赵甜静¹, 陈转转¹, 姚添², 王科科³, 张德梅⁴, 冯永亮¹, 王素萍¹

1. 山西医科大学公共卫生学院流行病学教研室, 山西 太原 030001; 2. 山西医科大学第一临床医学院;

3. 山西医科大学第一医院; 4. 太原市血液中心

摘要:目的 探讨 HBV 刺激下人绒毛膜滋养层细胞(HTR8-S/Vneo)线粒体抗病毒信号蛋白(Mitochondrial Antiviral Signaling Protein, MAVS)信号通路对外周血单个核细胞(Peripheral Blood Mononuclear Cell, PBMC)乙肝疫苗免疫反应的影响及作用机制。方法 HBV DNA 阳性患者血清刺激 HTR8-S/Vneo 后,采用 MAVS 过表达质粒/siRNA 分别转染至 HTR8-S/Vneo 以过表达/沉默 MAVS,并将其与人类免疫细胞集合体 PBMC 共培养后给予乙肝疫苗刺激。采用逆转录-实时荧光定量 PCR (Reverse Transcription-Quantitative Real-Time PCR, RT-qPCR) 及流式细胞术(Flow Cytometry, FCM)检测 MAVS 信号通路相关分子(MAVS、NF- κ B、pNF- κ B、IRF3 和 pIRF3 等)mRNA 及蛋白水平;酶联免疫吸附试验(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)检测 IL-2、IL-6、IFN- β 和 IL-17 等细胞因子表达;FCM 检测 PBMC 中 CD4⁺T 细胞比例。采用独立样本 *t* 检验进行数据分析。结果 HBV 下调 MAVS、NF- κ B、IRF3 mRNA 表达($t=6.66, P=0.003; t=14.18, P<0.001; t=3.70, P=0.021$)及 MAVS、NF- κ B、pNF- κ B 蛋白表达($t=3.42, P=0.042; t=4.23, P=0.013; t=4.86, P=0.008$),抑制抗病毒因子 IFN- β 的产生($t=9.83, P=0.010$);沉默 HTR8-S/Vneo 中 MAVS 下调 MAVS mRNA 及蛋白表达($t=31.20, P<0.001; t=6.53, P=0.023$),抑制 PBMC 乙肝疫苗免疫反应中 IFN- β 的产生($t=5.46, P=0.032$),降低 CD4⁺T 细胞比例($t=9.07, P=0.001$);过表达 MAVS 则上调 MAVS mRNA 及蛋白表达($t=-34.26, P<0.001; t=-5.11, P=0.036$),诱导 PBMC 乙肝疫苗免疫反应中 IFN- β 的产生($t=-7.04, P=0.020$),CD4⁺T 细胞比例数值上升高($t=-0.73, P=0.506$)。结论 HBV 可抑制 HTR8-S/Vneo 中 MAVS 信号通路;过表达 MAVS 则促进 PBMC 乙肝疫苗的免疫反应。

关键词:MAVS;信号通路;乙型肝炎疫苗;免疫反应

中图分类号:R512.62;R113 文献标志码:A 文章编号:1003-8507(2024)06-1077-06

DOI:10.20043/j.cnki.MPM.202311043

Effects of MAVS signaling pathway in HTR8-S/Vneo stimulated by HBV on PBMC immune response to hepatitis B vaccine

REN Chao-min*, ZHAO Tian-jing, CHEN Zhuan-zhuan, YAO Tian, WANG Ke-ke, ZHANG De-mei, FENG Yong-liang, WANG Su-ping

* Department of Epidemiology, School of Public Health, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanism of HBV-stimulated HTR8-S/Vneo mitochondrial antiviral signaling protein (MAVS) signaling pathway on the immune response of peripheral blood mononuclear cell (PBMC) to hepatitis B vaccine. **Methods** The HTR8-S/Vneo were co-incubated with serum of HBV-DNA positive patients. MAVS siRNA transfection was hereby applied for silencing of MAVS and MAVS plasmid transfection was applied for overexpression of MAVS in HTR8-S/Vneo. We then cocultured them with human immune cells assembly PBMC and subsequently stimulated with hepatitis B vaccine. The mRNA and protein expression levels of MAVS, NF- κ B, pNF- κ B, IRF3 and pIRF3 in HTR8-S/Vneo were detected by reverse transcription-quantitative real-time PCR (RT-qPCR) and flow cytometry (FCM). The levels of IL-2, IL-6, IFN- β and IL-17 were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the proportion of CD4⁺T cell were detected by flow cytometry. The data were analyzed for *t* test. **Results** HBV down-regulated the mRNA expression levels of MAVS, NF- κ B, IRF3 ($t=6.66, P=0.003; t=14.18, P<0.001; t=3.70, P=0.021$)

基金项目:国家自然科学基金(81872677, 82073622);山西省基础研究计划项目(202303021211122);山西医科大学第一医院博士启动基金(YB2201)

作者简介:任朝敏(1997—),女,硕士在读,研究方向:乙肝分子流行病学研究

通信作者:王素萍, E-mail:supingwang@sxmu.edu.cn

and the protein expression levels of MAVS, NF- κ B, pNF- κ B ($t=3.42, P=0.042; t=4.23, P=0.013; t=4.86, P=0.008$), and inhibited the production of IFN- β ($t=9.83, P=0.010$). Silencing MAVS down-regulated the mRNA and protein expression of MAVS ($t=31.20, P<0.001; t=6.53, P=0.023$), inhibited the expression of IFN- β ($t=5.46, P=0.032$), and reduced the proportion of CD4⁺T cells in PBMC ($t=9.07, P=0.001$). Overexpression of MAVS induced IFN- β production ($t=-34.26, P<0.001; t=-5.11, P=0.036$), but the proportion of CD4⁺T cells did not show significant effect ($t=-0.73, P=0.506$). **Conclusion** HBV can inhibit the MAVS signaling pathway in HTR8-S/Vneo. Overexpression of MAVS could promote the immune response to hepatitis B vaccine in PBMC.

Keywords: MAVS; Signal pathway; Hepatitis B vaccine; Immune response

乙型肝炎病毒表面抗原 (Hepatitis B Surface Antigen, HBsAg) 阳性母亲婴儿乙肝疫苗无/弱应答率 (12.31% ~ 51.72%)^[1-2] 远高于一般人群 (5% ~ 10%)^[3-5], 但具体机制未明。天然免疫的激活是乙肝疫苗免疫应答的“首要环节”, 在乙肝疫苗免疫应答的过程中发挥重要作用^[6-7]。线粒体抗病毒信号蛋白 (Mitochondrial Antiviral Signaling Protein, MAVS) 是线粒体中发现的第一个与天然免疫相关的蛋白质, 活化后可激活 NF- κ B, 驱动 IFN- β 介导的抗病毒免疫的产生^[8-9], 而 MAVS 活化后又可控制滤泡辅助性 T 细胞 (Tfh) 和 B 细胞的分化^[10], 调节特异性免疫应答, 是连接天然免疫和适应性免疫的桥梁。且已有研究表明, MAVS 信号通路对增强西尼罗河病毒疫苗及结核分枝杆菌 Ag85A DAN 疫苗的保护性免疫反应至关重要^[11-12], 上述研究提示 MAVS 信号通路可能在乙肝疫苗免疫应答中具有重要作用。

HBsAg 阳性母亲婴儿长期处于 HBV 高危环境中, 孕妇体内 HBV 可进入胎盘, 导致 MAVS 信号通路活化异常^[13], 进一步在体外实验中发现 1.3 倍 HBV 全基因组重组质粒 (pcDNA3.1-HBV3.1) 或乙型肝炎病毒 e 抗原 (Hepatitis B e Antigen, HBeAg) 刺激胎盘滋养层细胞可抑制细胞内 MAVS 及其下游信号传递^[14-15], 上述研究提示 HBV 进入胎盘可抑制滋养层细胞 MAVS 信号通路, 但滋养层细胞 MAVS 信号通路的异常活化是否影响婴儿乙肝疫苗免疫应答效果, 国内外未见报道。基于上述研究, 我们推测 HBV 可能通过抑制滋养层细胞 MAVS 信号通路影响婴儿乙肝疫苗免疫应答, 而活化滋养层细胞 MAVS 信号通路能否减弱 HBV 刺激对婴儿的免疫损伤, 提高 HBsAg 阳性母亲婴儿乙肝疫苗免疫应答, 成为揭示 HBsAg 阳性母亲婴儿乙肝疫苗无/弱应答机制的关键。

因此, 本研究采用 HBV 刺激 HTR8-S/Vneo, 模拟 HBsAg 阳性母亲婴儿宫内 HBV 高危环境, 采用 MAVS 过表达质粒/siRNA 转染 HTR8-S/Vneo, 将其外周血单个核细胞 (Peripheral Blood Mononuclear Cell, PBMC) 共培养后给予乙肝疫苗刺激, 模拟调整滋养层细胞 MAVS 信号通路后, 婴儿接种乙肝疫苗, 血液中免疫细胞比例及细胞因子表达水平发生变化

的过程, 探讨调节胎盘滋养层细胞 MAVS 对 PBMC 乙肝疫苗免疫反应的影响及其作用机制, 为阐明 HBsAg 阳性母亲婴儿乙肝疫苗无/弱应答机制提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞与血清 HTR8-S/Vneo 为人绒毛膜滋养层细胞, 购自北纳创联生物科技有限公司 (BNCC); 采集健康献血者肘静脉血, 经密度梯度离心法获得 PBMC; 分离慢性乙肝病人血清 (HBV DNA = 5.49×10^8 IU/ml); 本研究方案经山西医科大学医学伦理委员会审批 (批号: 2018LL323)。

1.1.2 主要试剂与耗材 胎牛血清购自美国 Gibco 公司; RPMI 1640 培养基购自美国 HyClone 公司; MAVS(64568-1) 过表达质粒购自上海吉凯基因医学科技股份有限公司; MAVS siRNA 序列购自上海吉玛制药技术有限公司; TRIgent 总 RNA 提取试剂购自北京聚合美生物科技有限公司; RNA 反转录试剂盒 GoScriptTM Reverse Transcription Mix, Oligo (dT) 和 qPCR 试剂盒 GoTaq qPCR Master Mix (Promega) 均购自美国 Promega 公司; 白细胞介素-2 (IL-2)、白细胞介素-6 (IL-6)、干扰素- β (IFN- β) ELISA 试剂盒购自武汉云克隆科技股份有限公司, 白细胞介素-17 (IL-17) ELISA 试剂盒购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; IC Fixation Buffer 及 Permeabilization Buffer 购自美国 eBioscience 公司; 藻红蛋白 (Phycoerythrin, PE) 标记的抗 MAVS、磷酸化 NF- κ B p65 (pNF- κ B p65) 和磷酸化 IRF3 (pIRF3) 及同型抗体购自 CST 公司; 别藻蓝蛋白 (Allophycocyanin, APC) 标记的抗 NF- κ B p65、IRF3 抗体均购自美国 R&D 公司; 藻红蛋白标记的抗 CD4 抗体, 异硫氰酸荧光素 (Fluorescein isothiocyanate, FITC) 标记的 CD3 抗体均购自美国 Bdbiosciences 公司。

1.1.3 主要仪器 CKX41 显微镜 (OLYMPUS, 日本), SIM-F140 制冰器 (SANYO, 日本), Milli-Q Century 超纯水仪 (Millipore, 美国), CytoFLEX 流式细胞仪 (Beckman, 美国), 5417R 高速冷冻离心机 (Eppendorf, 德国), Mastercycler gradient 梯度 PCR 仪

(Eppendorf, 德国), Bio-Rad CFX connect TM 实时荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad, 德国)。

1.2 方法

1.2.1 HTR8-S/Vneo 培养与干预 HTR8-S/Vneo 铺板前加入 HBV DNA (1.00×10^6 IU/ml) 血清刺激细胞, 采用含 10% 胎牛血清、1% 青、链霉素、1% 谷氨酰胺的 RPMI 1640 培养基, 于 37°C、5% CO₂ 细胞培养箱中进行常规培养 24h, 检测 MAVS 信号通路相关分子了解 HBV 对 HTR8-S/Vneo 中 MAVS 信号通路的影响; 将 HBV 刺激后的 HTR8-S/Vneo 分为 4 组, 每组设 3 个平行样, 分别接受如下处理: MAVS 过表达组给予过表达质粒转染、空载体对照组给予空载体质粒转染; MAVS 沉默组给予干扰序列 MAVS-Homo-724; sense: 5'-CAC AGG GUC AGU UGU AUC UTT -3', antisense: 5'-AGA UAC AAC UGA CCC UGU GTT -3' 转染、阴性对照组给予阴性序列 si-NC 转染; 上述 4 组 HTR8-S/Vneo 分别与 1.00×10^6 个 PBMC 共培养, 留取共培养前后的细胞悬液, 共培养前的细胞悬液用于检测 MAVS 表达, 共培养后的细胞悬液用于检测细胞因子水平及 CD4⁺T 细胞比例, 探讨 HBV 刺激 HTR8-S/Vneo 后过表达/沉默 MAVS 对 PBMC 的影响; HBV 刺激 HTR8-S/Vneo 后, 过表达/沉默 MAVS 并与 PBMC 共培养, 同时加入 0.05 μg/ml 的乙肝疫苗刺激 12h, 留取乙肝疫苗干预前后细胞悬液, 干预前细胞悬液用于检测 MAVS 表达; 干预后细胞悬液用于检测细胞因子水平及 CD4⁺T 细胞比例, 探讨 HBV 刺激 HTR8-S/Vneo 后过表达/沉默 MAVS 对 PBMC 乙肝疫苗免疫反应的影响。

1.2.2 逆转录-实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 检测 MAVS 信号通路相关分子 MAVS、NF-κB 和 IRF3 mRNA 表达 收集各组细胞, 按照 TRIgent 说明书提取细胞总 RNA, 以 NanoDrop One 微量紫外可见分光光度计检测 RNA 纯度与浓度, 取 1 μg 总 RNA 反转录合成 cDNA, 按试剂盒说明操作。取 0.1 μg cDNA 作为模板与相应的引物进行荧光定量 PCR, 反应条件为 95°C 10 min; 95°C 15 s, 60°C 1 min, 39 个循环。β-actin 用作内参对照。MAVS 正向引物为 5'-ATCCAAAGTGCCTACTAGCATG-3', 反向引物为 5'-TATFTCAGAGCTGCTGTCTAG-3'; 核因子 kappa B (NF-κB) 正向引物为 5'-AGGCTCCTGTGGTGTCTCC-3', 反向引物为 5'-TCGTCTGTATCTGGCAGGTACTGG'; 干扰素调节因子 3 (IRF3) 正向引物为 5'-GCAGGAGGATTCGGAATCTTC-3', 反向引物为 5'-GGAAATTCCTCTCCAGGTTGG-3'; β-actin 正向引物为 5'-TGGCACCCAGCACAAATGAA-3', 反向

引物为 CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA-3'; 以 2^{-ΔΔct} 值反映实验组目的基因 mRNA 的表达相对于对照组的变化倍数。

1.2.3 流式细胞术检测 MAVS 信号通路相关分子 MAVS、NF-κB p65 和 pNF-κB p65、IRF3 和 pIRF3 蛋白表达 各管细胞加 100 μl IC Fixation Buffer, 室温避光孵育 20 min, 1 ml 1 × Permeabilization Buffer 室温孵育 5 min, 洗 1 次。MAVS 蛋白检测: 重悬细胞后各管分别加入 MAVS-PE 及同型抗体, 室温避光孵育 30 min, PBS 洗 1 次后重悬上机; NF-κB p65、pNF-κB p65、IRF3、pIRF3 蛋白检测: 1 ml Foxp3 室温避光孵育 30 min, 洗 1 次, 重悬细胞后各管分别加 NF-κB-APC、IRF3-APC、pNF-κB-PE、pIRF3-PE 及同型抗体, 室温避光孵育 30 min, PBS 洗 2 次后重悬上机。

1.2.4 ELISA 检测细胞因子 IL-2、IL-6、IFN-β 和 IL-17 含量 按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作。

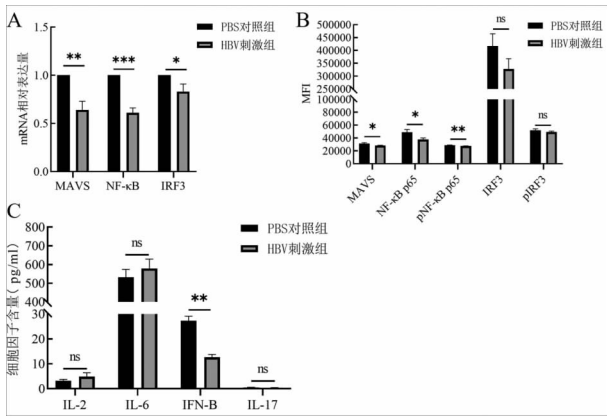
1.2.5 流式细胞术检测 PBMC 中免疫细胞 CD4⁺T 细胞比例 各管细胞加入 CD3-FITC、CD4-PE 抗体, 室温避光孵育 30 min, PBS 洗 1 次后重悬上机。

1.3 统计学处理 采用 CytoExpert 2.3.1.22 软件分析流式细胞术检测数据, 以平均荧光强度 (MFI) 表示蛋白表达量; 采用 SPSS 23.0 软件进行数据整理和统计分析, 定量数据以 " $\bar{x} \pm s$ " 表示; 采用独立样本 *t* 检验进行组间比较; 显著性检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 HBV 抑制 MAVS 介导的 NF-κB 信号通路及 IFN-β 的表达 HBV 刺激 HTR8-S/Vneo 后, HBV 刺激组 MAVS、NF-κB、IRF3 mRNA 相对表达量均低于对照组 ($t = 6.66, P = 0.003; t = 14.18, P < 0.001; t = 3.70, P = 0.021$); MAVS、NF-κB 和 pNF-κB 的蛋白平均荧光强度 (MFI) 均低于对照组 ($t = 3.42, P = 0.042; t = 4.23, P = 0.013; t = 4.86, P = 0.008$); 而 IRF3 和 pIRF3 的 MFI 两组间无统计学差异 ($t = 2.51, P = 0.066; t = 1.52, P = 0.202$); 另外, HBV 刺激 HTR8-S/Vneo 后, IFN-β 的表达量低于对照组 ($t = 9.83, P = 0.010$), IL-2、IL-6、IL-17 两组间没有统计学意义 ($t = -1.87, P = 0.135; t = -1.26, P = 0.276; t = 1.21, P = 0.350$) (图 1)。上述结果表明 HBV 可以抑制 MAVS 介导的 NF-κB 信号通路, 进而抑制 IFN-β 的表达。

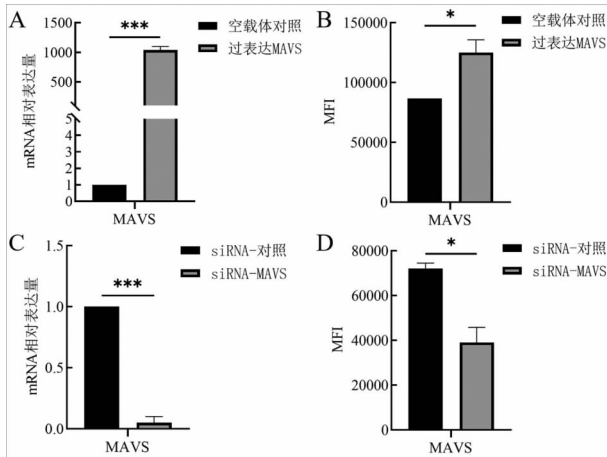
2.2 在 HBV 刺激的 HTR8-S/Vneo 中转染 MAVS 的效果鉴定 HBV 刺激 HTR8-S/Vneo 后, 过表达 MAVS, MAVS mRNA 相对表达量和 MFI 均高于空载



注: ns 表示 $P \geq 0.05$; * 表示 $P < 0.05$; ** 表示 $P < 0.01$; *** 表示 $P < 0.001$ 。

图 1 HBV 刺激对 HTR8-S/Vneo 中 MAVS 信号通路的影响
Fig. 1 Effect of HBV on MAVS signaling pathway in HTR8-S/Vneo

体对照组 ($t = -34.26, P < 0.001$; $t = -5.11, P = 0.036$); 而沉默 MAVS, MAVS mRNA 相对表达量和 MFI 均低于阴性对照组 ($t = 31.20, P < 0.001$; $t = 6.53, P = 0.023$) (图 2)。结果表明, 在 HBV 刺激的 HTR8-S/Vneo 中成功转染了 MAVS 过表达质粒和 siRNA, 并分别过表达和沉默了 MAVS 的表达。



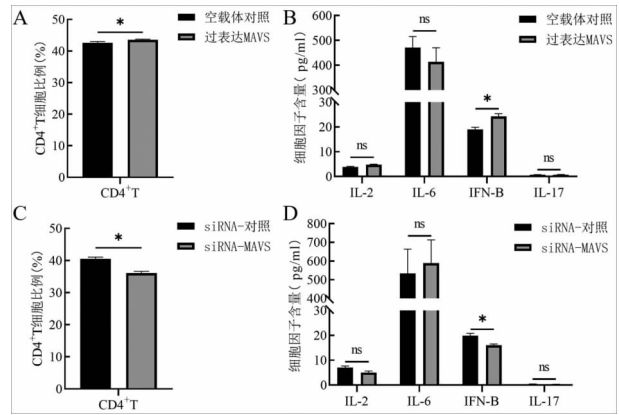
注: * 表示 $P < 0.05$; *** 表示 $P < 0.001$ 。

图 2 HBV 刺激 HTR8-S/Vneo 后过表达/沉默 MAVS mRNA 和蛋白表达水平

Fig. 2 The mRNA and protein expression of MAVS after overexpressing/silencing MAVS in HBV-stimulated HTR8-S/Vneo

2.3 HBV 刺激 HTR8-S/Vneo 后过表达/沉默 MAVS 对 PBMC 的影响 HBV 刺激 HTR8-S/Vneo 细胞后, 过表达 MAVS 并与 PBMC 共培养, $CD4^+$ T 细胞比例和 IFN-β 的表达均高于空载体对照组 ($t = -3.04, P = 0.038$; $t = -5.20, P = 0.035$), IL-2、IL-

-6、IL-17 两组间没有统计学意义 ($t = -3.06, P = 0.092$; $t = 1.37, P = 0.244$; $t = 0.48, P = 0.676$); 而沉默 MAVS 后, $CD4^+$ T 细胞比例和 IFN-β 的表达均低于阴性对照组 ($t = 9.47, P = 0.001$; $t = -5.70, P = 0.029$), IL-2、IL-6、IL-17 两组间没有统计学意义 ($t = 3.30, P = 0.081$; $t = -0.53, P = 0.622$; $t = 2.50, P = 0.129$) (图 3)。结果表明, HBV 刺激的 HTR8-S/Vneo 细胞可通过提高 MAVS 进而提升 PBMC 中 $CD4^+$ T 细胞比例和 IFN-β 的表达, 对 IL-2、IL-6、IL-17 没有明显作用; 相反, 沉默 MAVS 可降低 PBMC 中 $CD4^+$ T 细胞比例和 IFN-β 的表达, 对 IL-2、IL-6、IL-17 没有明显作用。



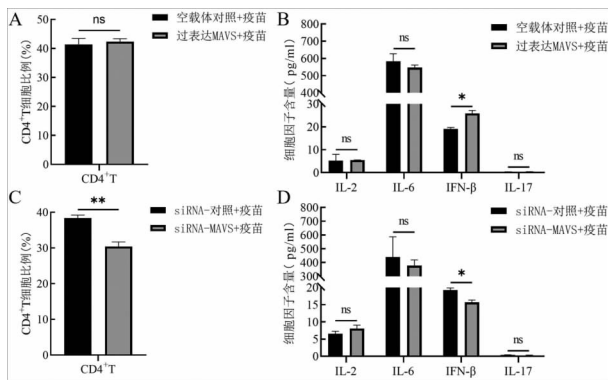
注: ns 表示 $P \geq 0.05$; * 表示 $P < 0.05$ 。

图 3 HBV 刺激 HTR8-S/Vneo 后过表达/沉默 MAVS 对 PBMC 的影响

Fig. 3 Effect of overexpression/silencing of MAVS on PBMC after HBV stimulation of HTR8-S/Vneo

2.4 HBV 刺激 HTR8-S/Vneo 后过表达/沉默 MAVS 对 PBMC 乙肝疫苗免疫反应的影响 HBV 刺激 HTR8-S/Vneo 后过表达 MAVS, 将其与 PBMC 共培养并给予乙肝疫苗刺激, 过表达 MAVS 组 $CD4^+$ T 细胞比例数值上高于空载体对照组 ($t = -0.73, P = 0.506$), IFN-β 的表达高于空载体对照组 ($t = -7.04, P = 0.020$), IL-2、IL-6、IL-17 均未发现差异有统计学意义 ($t = -0.12, P = 0.915$; $t = 1.35, P = 0.249$; $t = -0.77, P = 0.524$); 沉默 MAVS 组 $CD4^+$ T 细胞比例和 IFN-β 的表达均低于 siRNA 对照组 ($t = 9.07, P = 0.001$; $t = 5.46, P = 0.032$), IL-2、IL-6、IL-17 均未发现差异有统计学意义 ($t = -2.21, P = 0.092$; $t = 0.71, P = 0.517$; $t = 1.87, P = 0.202$) (图 4)。结果表明, HBV 刺激的 HTR8-S/Vneo 细胞可通过提高 MAVS 进而提升 PBMC 乙肝疫苗免疫应答 IFN-β 的表达, $CD4^+$ T 细胞比例、IL-2、IL-6 和 IL-17 尚未显示出明显作用; 相反, HBV

刺激的 HTR8 - S/Vneo 细胞可通过抑制 MAVS 进而降低 PBMC 乙肝疫苗免疫应答中 IFN - β 的表达和 CD4⁺T 细胞比例, IL - 2、IL - 6 和 IL - 17 尚未显示出明显作用。



注: ns 表示 $P \geq 0.05$; * 表示 $P < 0.05$; ** 表示 $P < 0.01$ 。

图 4 HBV 刺激 HTR8 - S/Vneo 后过表达/沉默 MAVS 对 PBMC 对乙肝疫苗免疫反应的影响

Fig. 4 Effect of overexpression/silencing of MAVS on PBMC immune response to hepatitis B vaccine after HBV stimulation of HTR8 - S/Vneo

3 讨论

HBsAg 阳性母亲婴儿长期处于 HBV 高危环境中,乙肝疫苗无/弱应答率远高于一般人群,HBV 感染风险高,揭示该人群乙肝疫苗无/弱应答机制是控制婴儿及成人期乙肝及 HBV 感染相关疾病发生率的关键,对实现 WHO 提出的 2030 年消除病毒性肝炎目标具有重要意义。

天然免疫信号通路在乙肝疫苗免疫应答的过程中发挥重要作用,其中 MAVS 蛋白是线粒体中首个发现与天然免疫相关的蛋白,活化的 MAVS 既可通过刺激下游的 IKK α / β 激活 NF - κ B,也可通过刺激下游的 TANK 结合激酶 1 (TBK1) 和核因子 κ B 激酶抑制剂 - ϵ (IKK - ϵ) 激活 NF - κ B,诱导 I 型干扰素 (IFN) 产生,在调节宿主天然免疫信号通路中发挥重要作用^[16-18]。Li 等^[19]研究表明向人肝癌 HepG2 细胞中瞬时转染 HBV DNA,可明显降低细胞中 MAVS mRNA 的表达水平。其他研究进一步发现,HBV 可通过促进 MAVS 蛋白中的 Lys¹³⁶ 泛素化,促使 MAVS 降解,也可通过与 MAVS 蛋白结合,降低其稳定性,抑制 IFN - β 的产生^[20-21]。相类似地,本研究用 HBV 刺激 HTR8 - S/Vneo 后,发现 HBV 下调 MAVS、NF - κ B 及 pNF - κ B 表达,抑制 IFN - β 的产生,结果表明 HBV 可抑制 MAVS 介导的 NF - κ B 信号通路。

目前未见 MAVS 信号通路活化在乙肝疫苗免疫

应答中的相关报道,但有学者探索了 MAVS 信号通路与其他疫苗的关系,Luo 等^[11] 研究显示,在西尼罗河病毒疫苗——NS4B - P38G 疫苗接种期间,MAVS 对提高最佳的初始 CD4⁺T 细胞应答至关重要。另有研究发现,在树突状细胞系 (DC2.4) 中,Ag85A DNA 疫苗通过上调 MAVS 信号转导通路产生更有效的保护性免疫反应^[12]。PBMC 细胞比例和细胞因子表达水平等相关检测指标可在体外研究中反映免疫应答,在体外免疫反应的相关研究中具有重要作用^[22-24]。本研究用 HBV 刺激 HTR8 - S/Vneo 细胞后过表达 MAVS,将其与 PBMC 共培养并给予乙肝疫苗刺激,发现 IFN - β 的表达明显升高;沉默 MAVS 发现 IFN - β 的表达及 CD4⁺T 细胞比例明显降低。既往研究表明,IFN - β 可直接作用于抗原提呈细胞 (Antigen Presenting Cell, APC),进而增强 APC 及 T 细胞、B 细胞等细胞免疫应答水平,且能刺激初始 T 细胞分化为 CD4⁺T 细胞,连接天然免疫和适应性免疫应答^[25-26],CD4⁺T 细胞是乙肝疫苗接种后刺激 B 细胞分化为浆细胞产生保护性抗体的关键细胞^[27-28],提示 IFN - β 和 CD4⁺T 细胞在抗原提呈、T 细胞分化及保护性抗体产生等在乙肝疫苗免疫反应的多个阶段发挥着重要作用。因此,本文创新性地发现了过表达 MAVS 可提高乙肝疫苗免疫反应。本研究结果表明新生儿长期处于 HBV 感染的高危环境中,沉默 MAVS 可进一步抑制乙肝疫苗免疫应答,过表达 MAVS 可提高 IFN - β 的表达水平及 CD4⁺T 细胞比例,减弱 HBV 刺激对 PBMC 乙肝疫苗免疫应答的不利影响,进而可能提高乙肝疫苗免疫效果,提示 MAVS 激动剂或 IFN - β 可用作乙肝疫苗佐剂,逆转 HBsAg 阳性母亲婴儿乙肝疫苗无/弱应答。

综上所述,本文发现 HBV 可抑制 HTR8 - S/Vneo 中 MAVS 信号通路,而过表达 MAVS 可促进 PBMC 乙肝疫苗的免疫反应。本研究初步阐释了过表达 MAVS 增强乙肝疫苗免疫应答的分子机制,为逆转乙肝疫苗无/弱应答及乙肝疫苗佐剂的研发提供了科学依据,对实现 WHO 提出的 2030 年消除病毒性肝炎目标具有一定的意义。

利益冲突声明 本研究不存在任何利益冲突

参考文献

- [1] 姚添,袁琳琳,王科科,等. HBsAg 阳性母亲新生儿干扰素基因刺激因子天然免疫信号通路对婴儿乙型肝炎疫苗无/弱应答的影响[J]. 中华流行病学杂志,2023,44(9):1447-1453.
Yao T, Yi LZ, Wang KK, et al. Effects of neonatal stimulator of interferon genes innate immune signaling pathway of HBsAg - positive mothers on non/hypo - response to hepatitis B vaccine in infants[J]. Chinese Journal of Epidemiology, 2023, 44(9): 1447 - 1453.

- [2] Wirahmadi A, Gunardi H, Medise BE, et al. Seroconversion among children with HBsAg - positive mothers in Indonesia and factors affecting the anti - HBs titers [J]. *Global Epidemiology*, 2024, 7: 100135.
- [3] 赵梅娥, 张慧, 甄宏斌, 等. 乙肝疫苗接种无应答者免疫因素的研究进展 [J]. *中国免疫学杂志*, 2022, 38(18): 2292 - 2296. Zhao ME, Zhang H, Zhen HB, et al. Research progress of immune factors in unresponsive hepatitis B vaccine recipients [J]. *Chinese Journal of Immunology*, 2022, 38(18): 2292 - 2296.
- [4] Di Iello FA, Martínez AP, Flichman DM. Insights into induction of the immune response by the hepatitis B vaccine [J]. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 2022, 28(31): 4249 - 4262.
- [5] 郑徽, 王富珍, 张国民, 等. 中国 1992 - 2019 年乙型肝炎疫苗免疫及母婴阻断策略的成本效益分析 [J]. *中华流行病学杂志*, 2021, 42(9): 1537 - 1545. Zheng H, Wang FZ, Zhang GM, et al. Cost - benefit analysis of the hepatitis B vaccination to prevent mother - to - child transmission strategies in China, 1992 - 2019 [J]. *Chinese Journal of Epidemiology*, 2021, 42(9): 1537 - 1545.
- [6] Aebermann BD, Shannon CP, Novotny M, et al. Machine Learning - Based single cell and integrative analysis reveals that baseline mDC predisposition correlates with hepatitis B vaccine antibody response [J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 690470.
- [7] Budroni S, Buricchi F, Cavallone A, et al. Antibody avidity, persistence, and response to antigen recall: comparison of vaccine adjuvants [J]. *NPJ Vaccines*, 2021, 6(1): 78.
- [8] Chen YQ, Shi YH, Wu J, et al. MAVS: A Two - Sided CARD mediating antiviral innate immune signaling and regulating immune homeostasis [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 744348.
- [9] Chen SS, Liao ZY, Xu PL. Mitochondrial control of innate immune responses [J]. *Frontiers in Immunology*, 2023, 14: 1166214.
- [10] Xu Y, Shen J, Ran ZH. Emerging views of mitophagy in immunity and autoimmune diseases [J]. *Autophagy*, 2020, 16(1): 3 - 17.
- [11] Luo HL, Winkelmann E, Xie GR, et al. MAVS is essential for primary CD4 + T cell immunity but not for recall T cell responses following an attenuated West Nile virus infection [J]. *Journal of Virology*, 2017, 91(6): e02097 - 16.
- [12] Zhai JB, Wang QB, Gao YF, et al. The mechanisms of Ag85A DNA vaccine activates RNA sensors through new signal transduction [J]. *International Immunopharmacology*, 2018, 59: 1 - 11.
- [13] 王芳, 资捷, 刘泽滨, 等. 慢性乙型肝炎孕妇胎盘组织视黄酸诱导基因 - I 和线粒体抗病毒信号蛋白的表达及意义 [J]. *中国妇幼保健*, 2017, 32(21): 5411 - 5414. Wang F, Zi J, Liu ZB, et al. Expressions of retinoic acid - inducible gene - I and mitochondrial antiviral signaling protein in placenta of pregnant women with chronic hepatitis B and the significance [J]. *Maternal & Child Health Care of China*, 2017, 32(21): 5411 - 5414.
- [14] 王芳, 资捷, 刘泽滨, 等. RIG - I 配体 poly (dAT; dAT) 诱导 Bewo 细胞抑制乙型肝炎病毒复制的研究 [J]. *中国计划生育和妇产科*, 2017, 9(11): 58 - 62. Wang F, Zi J, Liu ZB, et al. Study of RIG - I ligand poly (dAT; dAT) - induced inhibition hepatitis B virus replication in Bewo cells [J]. *Chinese Journal of Family Planning & Gynecotokology*, 2017, 9(11): 58 - 62.
- [15] 王芳, 资捷, 刘泽滨, 等. 乙型肝炎病毒 e 抗原对 Bewo 细胞 RIG - I 和 MAVS 表达的作用 [J]. *中国热带医学*, 2018, 18(4): 361 - 364. Wang F, Zi J, Liu ZB, et al. The effect of HBeAg on expression of retinoic acid - inducible - I and mitochondrial antiviral signaling protein in Bewo cells [J]. *China Tropical Medicine*, 2018, 18(4): 361 - 364.
- [16] Sharma A, Kontodimas K, Bosmann M. The MAVS immune recognition pathway in viral infection and sepsis [J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2021, 35(16): 1376 - 1392.
- [17] Liu WJ, Ma JL, Chen JW, et al. A novel TBK1/IKKε is involved in immune response and interacts with MyD88 and MAVS in the scallop *Chlamys farreri* [J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 1091419.
- [18] Thoresen D, Wang W, Galls D, et al. The molecular mechanism of RIG - I activation and signaling [J]. *Immunological Reviews*, 2021, 304(1): 154 - 168.
- [19] Li T, Yang XS, Li W, et al. ADAR1 stimulation by IFN - α downregulates the expression of MAVS via RNA editing to regulate the Anti - HBV response [J]. *Molecular Therapy*, 2021, 29(3): 1335 - 1348.
- [20] Chang KC, Chua HH, Chen YH, et al. Hepatitis B virus X gene impacts on the innate immunity and immune - tolerant phase in chronic hepatitis B virus infection [J]. *Liver International*, 2022, 42(10): 2154 - 2166.
- [21] Zhang B, Han HJ, Zhao XY, et al. An HBV susceptibility variant of KNG1 modulates the therapeutic effects of interferons α and λ1 in HBV infection by promoting MAVS lysosomal degradation [J]. *EBioMedicine*, 2023, 94: 104694.
- [22] 晋聪, 郝海鸣, 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. 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]. *Chinese Journal of Epidemiology*, 2022, 43(4): 560 - 565.
- [23] Chen YH, Lin SJ, Lai JL, et al. Expression of RNA - m6A - related genes correlates with the HIV latent reservoir level and the CD4 + and CD8 + T cell profiles of patients with AIDS [J]. *Cellular and Molecular Biology (Noisy - le - Grand, France)*, 2023, 69(4): 125 - 132.
- [24] Leonard WJ, Lin JX. Strategies to therapeutically modulate cytokine action [J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2023, 22(10): 827 - 854.
- [25] Duong E, Fessenden TB, Lutz E, et al. Type I interferon activates MHC class I - dressed CD11b + conventional dendritic cells to promote protective anti - tumor CD8 + T cell immunity [J]. *Immunity*, 2022, 55(2): 308 - 323. e9.
- [26] Yu RR, Zhu B, Chen DG. Type I interferon - mediated tumor immunity and its role in immunotherapy [J]. *CMLS - Cellular and Molecular Life Sciences*, 2022, 79(3): 191.
- [27] Zheng JR, Wang ZL, Feng B. Hepatitis B functional cure and immune response [J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 1075916.
- [28] Zhao MX, Li XY, Xie S, et al. The dynamics and association of B and T cell receptor repertoires upon antibody response to hepatitis B vaccination in healthy adults [J]. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 2021, 17(9): 3203 - 3213.