



空军军医大学

Air Force Medical University

分类号 R392

U D C 61

密 级 公开

硕士学位论文

**汉滩病毒糖蛋白HLA-A*02限制性CTL表位的
鉴定及其免疫保护性作用的研究**

 唐康

培 养 类 别 全日制

学 位 类 型 学术学位

一级学科(专业类) 基础医学

二级学科(专业) 免疫学

研 究 方 向 抗病毒免疫

指 导 教 师 金伯泉 教授

培 养 单 位 基础医学院免疫学教研室

二〇一八年五月

独创性声明

秉承学校严谨的学风与优良的科学道德，本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，不包含本人或他人已申请学位或其他用途使用过的成果。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了致谢。

申请学位论文与资料若有不实之处，本人承担一切相关责任。

论文作者签名：_____日期：_____

保护知识产权声明

本人完全了解空军军医大学有关保护知识产权的规定，即：研究生在校攻读学位期间论文工作的知识产权单位为空军军医大学。本人保证毕业离校后，发表论文等使用本论文工作成果时第一署名单位仍然为空军军医大学。学校可以公布论文的全部或部分内容（含电子版，保密内容除外），可以采用影印，缩印或其他复制手段保存论文；学校有权允许论文被查阅和借阅，并在校园网上提供论文内容的浏览和下载服务。同意学校将论文加入《中国优秀博硕士学位论文全文数据库》和编入《中国知识资源总库》等，并可浏览和下载，同时享受《中国优秀博硕士学位论文全文数据库出版章程》规定的相关权益。

论文作者签名：_____导师签名：_____日期：_____

目 录

缩略语表.....	1
中文摘要.....	4
ABSTRACT.....	6
前 言.....	8
文献回顾.....	10
第一部分 HFRS 及 HTV 概述.....	10
1 HFRS 的流行病学特征.....	10
2 HFRS 的临床表现及诊断.....	11
3 HTV 的基因组及结构蛋白特点.....	12
4 HTV 疫苗的研究进展.....	14
第二部分 HTV CTL 表位鉴定及 CTL 功能研究进展.....	16
1 HTV 结构蛋白 CTL 表位研究进展.....	16
2 HTV 及其他急性病毒感染中特异性 CTL 功能研究进展.....	17
第三部分 CTL 表位鉴定及特异性 CTL 功能研究方法.....	19
1 Tetramer 染色.....	19
2 ELISPOT 技术.....	20
3 ICS.....	20
4 CaFlux 检测技术.....	20
5 HLA 转基因小鼠.....	20
正 文.....	22
第一部分 HLA-A*02 限制性 HTNV-GP CTL 表位可诱导 HFRS 患者保护性免疫 应答.....	22

实验一 HFRS 患者急性期 PBMC 中 HLA-A*02 限制的 HTNV-GP 表位特异性 CTL 频率与 HFRS 病情相关.....	22
1 材料.....	22
2 方法.....	24
3 结果.....	26
4 讨论.....	29
实验二 HTNV-GP 9 肽表位可体外刺激 HLA-A*02 ⁺ HFRS 患者效应 CTL 分泌 IFN- γ	31
1 材料.....	31
2 方法.....	32
3 结果.....	33
4 讨论.....	35
第二部分 HLA-A*02 限制性 HTNV-GP CTL 表位可在 HLA-A2.1/K ^b 转基因小鼠体内诱导保护性免疫应答	37
1 材料.....	37
2 方法.....	39
3 结果.....	43
4 讨论.....	45
小 结.....	50
参考文献.....	51
个人简历及研究成果.....	67
致 谢.....	70

缩略语表

缩略词	英文全称	中文全称
AKI	acute kidney injury	急性肾损伤
ANDV	Andes virus	安第斯山病毒
APC	antigen-presenting cell	抗原提呈细胞
BSA	bovine serum albumin	牛血清白蛋白
CTL	cytotoxic T lymphocyte	细胞毒性 T 淋巴细胞
CXCL10	C-X-C motif chemokine 10	C-X-C 亚家族 趋化因子 10
DAF	decay accelerating factor	促衰变因子
DENV	dengue virus	登革热病毒
DMSO	dimethylsulfoxide	二甲基亚砷
DOBV	Dobrava virus	多不拉伐病毒
dsRNA	double-stranded RNA	双链 RNA
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附实验
ELISPOT	enzyme-linked immunospot assay	酶联免疫斑点实验
FI	fluorescence index	荧光指数
gC1qR	globular heads of complement C1q receptor	补体 C1q 球头部受体
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor	粒细胞 - 巨噬细胞 集落刺激因子
GP, Gn/Gc	glycoprotein	糖蛋白

HCPS	Hantavirus cardiopulmonary syndrome	汉坦病毒心肺综合征
HFRS	hemorrhagic fever with renal syndrome	肾综合征出血热
HLA	human leukocyte antigen	人类白细胞抗原
HPS	Hantavirus pulmonary syndrome	汉坦病毒肺综合征
HRP	horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
HSP70	heat shock protein 70	热休克蛋白 70
HTLV-1	human T cell leukemia virus type 1	人类I型 T 细胞 白血病病毒
HTNV	Hantaan virus	汉滩病毒
IAV	influenza A virus	甲型流感病毒
ICS	intracellular cytokine staining	胞内细胞因子染色
ICTV	International Committee for Taxonomy of virus	国际病毒分类委员会
IL	interleukin	白细胞介素
IQR	interquartile range	四分位数间距
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif	免疫受体酪氨酸 活化基序
LAMP1	lysosomal-associated membrane protein 1	溶酶体相关膜蛋白 1
mAb	monoclonal antibody	单克隆抗体
NC	normal control	正常对照
NP	nucleocapsid protein	核衣壳蛋白
NYV	New York virus	纽约病毒
ORF	open reading frame	开放阅读框
PBMC	peripheral blood mononuclear cell	外周血单个核细胞

PBS	phosphate buffer solution	磷酸盐缓冲液
PE	fluorescein phycoerythrin	荧光素藻红蛋白
PUUV	Puumala virus	普马拉病毒
qRT-PCR	quantitative real time polymerase chain reaction	实时定量聚合酶链式反应
RdRp	RNA-dependent RNA polymerase	RNA 依赖的 RNA 聚合酶
ROC	receiver operating characteristic curve	受试者工作特征曲线
SAAV	Saaremaa virus	萨拉马病毒
SEOV	Seoul virus	汉城病毒
SFC	spot-forming cell	斑点形成细胞
SNV	Sin Nombre virus	辛诺柏病毒
Th	helper T lymphocyte	辅助性 T 淋巴细胞
TMB	tetramethyl benzidine	四甲基联苯胺
TNF- α	tumor necrosis factor- α	肿瘤坏死因子- α
YFV	yellow fever virus	黄热病毒
ZIKV	Zika virus	寨卡病毒

汉滩病毒糖蛋白 HLA-A*02 限制性 CTL 表位的鉴定及其免疫保护性作用的研究

硕士研究生：唐 康

导 师：金伯泉 教授

辅导老师：马 樱 讲师

空军军医大学免疫学教研室，西安 710032

资助基金项目：国家自然科学基金青年项目（NO. 81401297，NO. 81501362）；

国家重点基础研究发展计划（2012CB518905）

中文摘要

汉滩病毒（Hantaan virus, HTNV）感染人体可引起严重的肾综合征出血热（hemorrhagic fever with renal syndrome, HFRS），死亡率可高达 15%。细胞毒性 T 淋巴细胞（cytotoxic T lymphocyte, CTL）应答对于胞内病毒的清除至关重要，且与疾病的发生、发展及预后关系密切。目前，关于 HTNV 特异性 CTL 应答的研究大多集中在 HTNV 核衣壳蛋白（nucleocapsid protein, NP）CTL 表位的鉴定，而 HTNV 糖蛋白（glycoprotein, GP）CTL 表位研究报道极少，这限制了人们对机体 CTL 应答抗 HTNV 感染机制的全面理解。前期研究中，我们筛选得到了 7 条 HLA-A*0201 高亲和力结合 HTNV-GP 9 肽，并成功合成 HLA-A*0201/9 肽-四聚体（tetramer），利用 tetramer 染色技术流式细胞分析检测到 HLA-A*02⁺ HFRS 患者外周血单个核细胞（peripheral blood mononuclear cell, PBMC）中 HTNV-GP 表位特异性 CTL。本研究在此基础上，进一步扩大样本量，发现轻型/中型 HFRS 患者急性期 PBMC 中，HTNV-GP 表位特异性 CTL 频率显著高于重型/危重型 HFRS 患者，提示 HTNV-GP

表位可能在机体内诱导保护性 CTL 应答。进一步利用酶联免疫斑点实验 (enzyme-linked immunospot assay, ELISPOT) 证实 7 条 HTNV-GP 9 肽可分别在体外诱导 HFRS 患者 PBMC 中表位特异性 CTL 分泌 IFN- γ 。在 HTNV 攻毒实验中, 选择 HLA-A*0201 亲和力较高、且轻型/中型 HFRS 中特异性 CTL 频率较高的 3 条 HTNV-GP 9 肽, VV9 (aa8-aa16, VMASLVWPV)、SL9 (aa996-aa1004, SLTECPTFL) 和 LL9 (aa358-aa366, LIWTGMIDL) 免疫 HLA-A2.1/K^b 转基因小鼠, 发现 9 肽表位免疫后可诱导有效的 CTL 应答, 显著降低小鼠肝脏、脾脏和肾脏中的 HTNV 抗原水平和病毒载量。其中, LL9 免疫保护作用最佳, 且对在小鼠肾脏中抑制 HTNV 复制的作用最为突出, 提示 LL9 表位特异性 CTL 应答在肾脏保护过程中发挥重要作用。本研究在鉴定 HLA-A*02 限制的 HTNV-GP CTL 表位基础上, 首次明确 HTNV-GP 表位特异性 CTL 应答与 HFRS 疾病免疫保护有关, 证实 HTNV-GP CTL 表位可在 HLA-A2.1/K^b 转基因小鼠体内诱导保护性免疫应答, 降低感染小鼠主要脏器的 HTNV 抗原水平和病毒载量, 为设计 HTNV 多肽疫苗提供重要的实验依据。

关键词: 汉滩病毒, 肾综合征出血热, HLA-A*0201, 糖蛋白, 细胞毒性 T 淋巴细胞, 多肽疫苗, HLA-A2.1/K^b 转基因小鼠

Identification and Evaluation of Immune Protective Effect of HLA-A*02-Restricted Hantaan Virus Glycoprotein CTL Epitopes

Candidate for master: Kang Tang

Supervisor: Boquan Jin

Tutor: Ying Ma

Department of Immunology, Air Force Medical University,

Xi'an China 710032

Sponsored Programs: The National Natural Science Foundation of China (No.81401297, No.81501362), the National Basic Research Program of China (No. 2012CB518905)

Abstract

Hantaan virus (HTNV) infections can cause severe hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) in humans, with a case-fatality rate as high as 15%. Cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses contribute to the elimination of intracellular virus and closely related to the occurrence, development and prognosis of the disease. To date, most HTNV-specific CTL epitopes identified are distributed on nucleocapsid protein (NP), and only few study focus on HTNV glycoprotein (GP)-specific CTL epitopes, which limits our understanding of CTL responses against HTNV infection in humans. In our previous study, seven HTNV-GP epitopes were demonstrated to bind to HLA-A*0201 molecules with high affinity and were successfully used to synthesize HLA-A*0201/nonapeptide tetramers. Using these tetramers, we detected HTNV-GP epitope-specific CTLs in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of HLA-A*02⁺ HFRS patients. In this study, we enlarged the sample size and found that the frequencies of each epitope-specific CTL were higher in patients with milder HFRS during acute phase, which indicated that the epitopes may induce protective CTL responses after HTNV infection. The results of IFN- γ

enzyme-linked immunospot assay further confirmed that each HTNV-GP epitope could elicit epitope-specific IFN- γ -producing CTL responses in PBMCs of HFRS patients. In an HTNV challenge trial, we selected nonapeptides VV9 (aa8-aa16, VMASLVWPV), SL9 (aa996-aa1004, SLTECPTFL) and LL9 (aa358-aa366, LIWTGMIDL), which showed higher HLA-A*0201 binding affinity and higher frequencies of epitope-specific CTLs in patients with mild/moderate severity, to immunize HLA-A2.1/K^b transgenic mice. Significant inhibition of HTNV replication characterized by lower levels of antigens and HTNV RNA loads was observed in major target organs (liver, spleen and kidneys) of HLA-A2.1/K^b transgenic mice pre-vaccinated with each nonapeptide. Importantly, LL9 exhibited the best ability to induce protective CTL responses and showed a prominent effect on the kidneys of the mice, potentially preventing kidney injury after HTNV infection. Taken together, based on the identification of HLA-A*02-restricted HTNV-GP epitopes, we demonstrated the immune protective effect of HTNV-GP epitope-specific CTLs in HFRS for the first time and confirmed that HTNV GP-derived HLA-A*02-restricted epitopes could induce protective effect by reducing HTNV antigen level and RNA load in major organs of HLA-A2.1/K^b transgenic mice challenged with HTNV, which may advance the design of safe and effective CTL-based HTNV peptide vaccines for humans.

Key words: Hantaan virus, hemorrhagic fever with renal syndrome, HLA-A*0201, glycoprotein, cytotoxic T lymphocyte, peptide vaccines, HLA-A2.1/K^b transgenic mice

前 言

汉坦病毒 (Hantavirus, HTV) 属布尼亚病毒目汉坦病毒科正汉坦病毒属, 为有包膜的单股负链 RNA 病毒^[1]。HTV 感染人体后可导致肾综合征出血热 (hemorrhagic fever with renal syndrome, HFRS) 或汉坦病毒心肺综合征 (Hantavirus cardiopulmonary syndrome, HCPS)^[2]。在我国流行的 HTV 病毒株主要是其原型汉滩病毒 (Hantaan virus, HTNV), HTNV 感染人体可导致严重的 HFRS^[3]。1950 年至 2014 年, 我国总计 1,625,002 例 HFRS 病例报道, 约占全球病例总数的 90%。受气候、个体免疫力等因素影响, HFRS 患者死亡率可高达 15%^[4, 5]。近年来, HTV 自身的进化以及不同 HTV 种间基因重排 (genetic reassortment), 导致新 HTV 成员的不断产生及流行, 为控制和预防 HTV 感染带来了更多的挑战^[6-10]。HFRS 是我国危害最严重的急性传染病之一, 临床上以发热、出血和急性肾功能损伤为特征。根据 HFRS 患者症状、体征及实验室检查结果, 将 HFRS 病程划分为发热期、低血压休克期、少尿期、多尿期和恢复期, 并根据病情严重程度划分为轻型、中型、重型和危重型^[11, 12]。至今, HFRS 发病机制尚不完全清楚, 严重制约了对该病的有效预防和治疗。

HTNV 基因组包含 S、M 和 L 三个基因片段, 分别编码核衣壳蛋白 (nucleocapsid protein, NP)、糖蛋白 (glycoprotein, GP) 前体 (成熟后为 Gn 和 Gc) 和 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)^[13]。其中, HTNV 结构蛋白 NP 和 GP 免疫原性强, 可诱导机体产生细胞免疫应答和体液免疫应答。我们前期研究发现, 轻型/中型 HFRS 患者急性期辅助性 T 淋巴细胞 (helper T lymphocyte, Th) 应答和细胞毒性 T 淋巴细胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) 应答频率、强度和宽度均显著高于重型/危重型 HFRS 患者, 提示 T 细胞免疫应答在 HFRS 早期发挥抗病毒保护作用^[12, 14-16]。HTNV 中和抗体对 HFRS 患者及感染动物都具有明显的保护作用, 但特异性抗体出现较晚, 并且发现尽管小鼠体内存在高滴度特异性中和抗体, 仍可表现为病毒的持续性感染, 提示仅有中和抗体不能完全终止病毒的感染, 中和抗体对细胞内已感染的病毒不能进行有效的清除。而感染小鼠过继转移 HTNV 特异性 CTL 后, 血清 HTNV-NP 消失, 表明 HTNV 特异性 CTL 是清除胞内 HTNV 感染的主

要效应细胞^[17, 18]。此外, 在普马拉病毒 (Puumala virus, PUUV) 和 HTNV 感染个体体内发现病毒特异性记忆 CTL, 且多年后仍持续存在, 提示 CTL 应答对于预防 HTV 再次感染具有重要意义^[19-21]。因此, 搞清 CTL 应答所针对的 HTNV 抗原表位, 探究 HTNV 特异性 CTL 应答规律, 对 HFRS 疾病预防以及新型多肽疫苗的设计意义重大。

目前, 对于 HTNV 特异性 CTL 应答的研究大多集中在 HTNV-NP 表位的鉴定及其诱导的特异性免疫应答功能研究, 而 HTNV-GP CTL 表位的鉴定及研究报道极少。我室在前期工作中鉴定得到了 8 个具有明确 HLA 限制性的 HTNV-NP CTL 表位^[16, 22, 23]。HTV-GP 被证明是诱导体液免疫应答的主要结构蛋白, 可诱导中和抗体保护病毒感染的个体, 降低 HTV 引起的病理损伤^[24, 25]。而 Kilpatrick 等^[26]研究发现, 在辛诺柏病毒 (Sin Nombre virus, SNV) 感染早期, HCPS 患者血液中 SNV-Gc 表位特异性 CTL 频率显著高于 SNV-NP 表位特异性 CTL 频率。Manigold 等^[27]研究发现, 与安第斯山病毒 (Andes virus, ANDV) NP 和 Gc 表位相比, ANDV-Gn 表位可作为优势表位诱导特异性 CTL 应答。在 ANDV 感染后 13 年间, ANDV-NP 表位特异性 CTL 应答逐渐减弱至消失, 而 ANDV-Gn 表位特异性 CTL 应答仍持续存在。以上研究结果表明 HTV-GP 可作为优势蛋白在 HTV 感染早期诱导特异性 CTL 应答, 且部分 GP 表位诱导的特异性 CTL 具有记忆性和长寿特征, 可能参与机体抗 HTV 再次感染。由于 HLA-I 类分子中等位基因 HLA-A*02 在中国人群中分布最广、频率最高 (约 30.0%)^[28, 29], 因此筛选可诱导保护性 CTL 应答的 HTNV-GP 表位, 研究 HLA-A*02 限制的 HTNV-GP CTL 表位及其功能, 对全面认识 HTNV 感染后 CTL 免疫应答规律及免疫保护作用具有重要意义, 且具有潜在的应用价值。

前期研究中, 课题组利用 T2 细胞结合试验筛选得到了 HTNV 76-118 株 GP 来源 7 条 HLA-A*0201 高亲和力 9 肽, 并成功合成 HLA-A*0201/9 肽-四聚体, 用于检测 HLA-A*02⁺ HFRS 患者 PBMC 中 HTNV-GP 表位特异性 CTL^[30]。本研究在鉴定 HLA-A*02 限制的 HTNV-GP CTL 表位基础上, 首次明确 HTNV-GP 表位特异性 CTL 与免疫保护有关。随后利用 HLA-A*02 亲和力最高的 3 条 HTNV-GP 9 肽表位免疫 HLA-A2.1/K^b 转基因小鼠, 进行 HTNV 攻毒实验, 证实 HTNV-GP CTL 表位免疫可降低小鼠主要脏器的 HTNV 抗原水平和病毒载量, 发挥免疫保护作用, 为设计 HTNV 多肽疫苗提供了重要的实验依据。

文献回顾

第一部分 HFRS 及 HTV 概述

1 HFRS 的流行病学特征

汉坦病毒 (Hantavirus, HTV) 属布尼亚病毒目汉坦病毒科正汉坦病毒属, 截至 2017 年底, 国际病毒分类委员会 (International Committee for Taxonomy of virus, ICTV) 正式确定了 41 种汉坦病毒^[1]。HTV 感染人体后可导致肾综合征出血热 (hemorrhagic fever with renal syndrome, HFRS) 或汉坦病毒心肺综合征 (Hantavirus cardiopulmonary syndrome, HCPS), 两种疾病均以毛细血管通透性增高和血小板减少为特征^[2]。分析 HTV 地理分布特点可发现, 啮齿动物是它们的主要储存宿主。近年来发现蝙蝠、食虫动物和螨虫也在 HTV 传染中扮演重要角色^[31, 32]。病毒在储存宿主体内持续复制, 经过尿液、粪便和唾液排泄出病毒, 形成气溶胶, 经呼吸道感染人体, 导致 HFRS 或 HCPS 的发生^[5, 33]。新近研究证明, HTV 也可经胃肠道感染人体引发疾病^[34]。近几十年来, 人群 HTV 感染在欧亚和美洲周期性暴发。早期研究表明 HTV 的流行暴发与携带病毒的啮齿动物种群动态变化密切相关^[13]。最新发现, 啮齿类动物成长及活动主要受气温和降雨量影响, 进而影响 HTV 传播和 HFRS 的流行^[35, 36]。而人类的伐木、耕作、露营和吸烟等活动是 HTV 感染的危险因素^[37]。

在欧洲和亚洲, 以汉滩病毒 (Hantaan virus, HTNV)、汉城病毒 (Seoul virus, SEOV)、多不拉伐病毒 (Dobrava virus, DOBV)、普马拉病毒 (Puumala virus, PUUV) 和萨拉马病毒 (Saaremaa virus, SAAV) 等旧世界汉坦病毒流行为主, 感染人体后主要引起 HFRS。其中 PUUV 和 SAAV 感染导致的 HFRS 病情通常较轻, 而 HTNV 和 DOBV 感染导致的 HFRS 病情较重。在南美洲和北美洲, 以安第斯山病毒 (Andes virus, ANDV)、辛诺柏病毒 (Sin Nombre virus, SNV) 和纽约病毒 (New York virus, NYV) 等新世界汉坦病毒流行为主, 感染人体后主要引起 HCPS, 也有称作汉坦病毒肺综合征 (Hantavirus pulmonary syndrome, HPS), 其中 ANDV 是唯一发现的可在人与人之间传播的 HTV^[2, 3, 11, 38]。全世界每年约有 60,000-100,000 例 HFRS 病例报道, 疫情影

响七十多个国家，特别是欧亚发展中国家。我国流行的主要是 HTNV 和 SEOV^[3]。1950 年至 2014 年，国内总计 1,625,002 例 HFRS 病例报道，约占全球病例总数的 90%。受气候、个体免疫力等因素影响，HFRS 患者死亡率可高达 15%^[4, 5]。从 2000 年开始，国内 HFRS 病例报道总体呈下降趋势，但局部地区仍有 HFRS 的流行和 HFRS 病例的增加。2014 年至 2015 年间，全国 HFRS 病例报道超过 10,000，出现反弹之势^[38]。陕西省是我国 HFRS 高发省份之一，2009 年至 2013 年，陕西省共发现 11,400 例 HFRS 病例，居全国之最。2005 年至 2016 年，陕西省 HFRS 发病人群主要集中在关中平原一带，并逐渐向北偏移。其中，60 岁以上患病人群从 2005 年的 12% 上升至 2016 年的 25%。因此，有学者建议开发针对高龄人群的新型 HTNV 疫苗^[39]。欧洲至今尚未实行 HTV 疫苗接种，部分国家和地区 HFRS 流行，严危害当地居民健康^[40, 41]。1993 年美国首次报道 HCPS，2012 年美国加州公园游客因 HTV 感染出现 HCPS，死亡率高达 37%，HCPS 的出现标志着 HTV 感染性疾病临床表现愈加复杂和多样化^[2, 38, 42]。近年来，HTV 自身的进化以及不同 HTV 种间基因重排（genetic reassortment），导致新 HTV 病毒株的产生及流行，为控制和预防 HTV 感染带来了更多的挑战^[6-10]。

2 HFRS 的临床表现及诊断

HFRS 患者临床表现以发热、出血、急性肾损伤（acute kidney injury, AKI）为特点，在 HFRS 发病早期可出现贫血、白细胞增多、血小板减少、血清肌酐升高、蛋白尿和血尿等现象。典型病例病程包括：发热期、低血压休克期、少尿期、多尿期和恢复期，其中发热、低血压休克和少尿期可发生重叠（详见表 1）^[5, 11]。

根据 HFRS 患者临床表现，将发病 8 天内的发热期、休克期以及少尿早期定义为 HFRS 发病急性期。根据 HFRS 患者病情严重程度（发热高低、中毒症状轻重、出血、休克和肾功能损伤严重程度）进行临床分型，包括：轻型、中型、重型和危重型^[43]。

HFRS 临床诊断依据流行病学史、临床表现和实验室检查结果。其中，实验室检查可明确诊断，常用的实验室检查方法包括：血清学检查、分子生物学方法和免疫组化^[4]。其中最常用的是血清学检查，应用 ELISA 检测患者血清中 HTV 特异性 IgM 或 IgG 可明确诊断。

表 1 HFRS 患者典型病程、临床表现和实验室检查结果

病程	潜伏期	发热期	低血压休克期	少尿期	多尿期	恢复期
持续时间	2-4 周	3-5 天	1-2 天	3-5 天	几周-数月	几周-数月
症状和体征	无明显	发热	低血压	少尿	症状减轻	肌肉无力
	症状和	头痛	口渴	无尿	尿量增加	缺少活力
	体征	呕吐	坐立不安	肾功能不全	低血压	
		腹痛	心动过速	高血压或	肺部症状等	
		背痛	脉压窄小	血压正常		
实验室检查		视觉障碍	皮肤冰冷	严重出血		
		血小板减少	aPTT 延长	CK 升高	电解质异常	指标恢复
		白细胞增多	PT 延长	尿酸升高		
		CRP 升高	AST 增加	镁离子减少		
		血尿	低蛋白血症	血清钙减少		
		蛋白尿				

CRP, C-reactive protein, C 反应蛋白; aPPT, activated partial thromboplastin time, 活化部分凝血活酶时间; PT, prothrombin time, 凝血酶原时间; AST, aspartate transaminase, 天冬氨酸转氨酶; CK, creatine kinase, 肌酸激酶.

3 HTV 的基因组及结构蛋白特点

HTV 是单股负链 RNA 病毒, 基因组包含 3 个片段: S (small, 1.8-2.1 kb)、M (medium, 3.7-3.8 kb) 和 L (large, 6.5-6.6 kb) 基因片段。每一个基因片段中间都具有开放阅读框 (open reading frame, ORF), 其两侧是非编码区。3 个 ORF 分别编码 HTV 核衣壳蛋白 (nucleocapsid protein, NP)、糖蛋白 (glycoprotein, GP) 前体 (成熟后为 Gn 和 Gc) 和 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp) [44]。而非编码区末端具有互补核苷酸序列, 可形成柄状结构, 在 HTV 转录和复制中发挥重要作用 [45]。仓鼠科动物携带的 HTV-S 基因片段具有重叠的 ORF, 除了编码 NP, 也可编码非结构蛋白 NSs (non-structural proteins, NSs), 具有微弱的拮抗干扰素作用。S 片段编码 NSs 在布尼亚病毒目中较为常见, 且多具有一定的抗干扰素作用 [46, 47]。

HTV 病毒颗粒多呈球形，直径范围 120-160nm，平均直径 135nm。病毒颗粒内是由 NP 包裹基因组形成的核糖核蛋白，其外由 5nm 厚的脂质包膜围绕，脂质包膜表面嵌有 10nm 刺突，每个刺突由 4 个 Gn 和 4 个 Gc 组成^[44, 48]。病毒颗粒由超过 50% 蛋白质、20-30% 脂质、7% 的碳水化合物和 2% 的 RNA 组成，十分稳定，室温下可存活长达 10 天，4℃和-20℃下可存活超过 18 天^[4]。

S 片段编码的 NP 全长包含 429-433 个氨基酸，分子量约 50 kD^[9, 49]。NP 在正汉滩病毒属中高度保守，其 N 端约 100 个氨基酸，是 B 细胞抗原表位存在的主要区域，大部分 HTV 单克隆抗体均识别、结合该区域^[50]。针对 N 端的单抗或多抗血清均可用于 Western blot，且敏感度高，表明 N 端主要含线性优势表位。已证明，aa175-aa218 和 C 端 100 个氨基酸是 RNA 结合区域。aa100-aa125 在 HTV 中高度保守，而 aa230-aa302 是高变区，此区域可能是血清型特异性抗体表位所在^[51]。其中，PUUV-NP 的 aa166-aa175 是交叉反应抗原表位，而 aa251-aa260 是血清型特异性单抗识别表位^[52]。NP 来源的 T 细胞表位鉴定已有多篇报道，这也是我室重点研究方向之一。我室现已鉴定得到 HTNV-NP 细胞毒性 T 淋巴细胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) 9 肽表位 24 个，其中 8 个表位的 HLA 限制性已明确鉴定^[16, 22, 23]。

M 片段转录的 GP 前体 mRNA (5'-Gn-Gc-3') 有两个信号序列，一个在 5' 末端，引导转录产物至内质网进行翻译，另一个介于 Gn 和 Gc 之间，翻译成为保守性氨基酸残基序列 (WAASA)，作为切割位点，可被细胞信号肽酶识别，介导 GP 前体裂解，成熟为 Gn 和 Gc^[44]。HTV-GP 全长包含 1133~1148 个氨基酸，其中 HTNV 76-118 株全长包含 1135 个氨基酸。未糖基化的 HTNV-Gn 和 Gc 分子量约为 64kD 和 54kD，两者均在高尔基体内进行天门冬酰胺连接的糖基化 (N-糖基化) 修饰，糖基化修饰后分子量约为 72kD 和 57kD，可在脂质包膜上形成刺突^[30]。据报道，HTNV-Gn 上有 5 个 N-糖基化位点，HTNV-Gc 上有 2 个。此外，HTV-GP 上还有血凝位点，其中 Gn 上 1 个，Gc 上 6 个。Gn 和 Gc 结构相似，均由 N 端胞外域、疏水性的跨膜序列和 C 端胞浆序列组成^[53]。HTV-Gn 的 C 末端有保守的酪氨酸残基，形成免疫受体酪氨酸活化基序 (immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM；HTNV-Gn 为 aa611-aa634)，可促进 Gn 的泛素化，进而加快蛋白酶体对其降解。截断 Gn 的 C 末端 ITAM 序列后，能够增加 Gn 稳定性，阻止其泛素化，使其半衰期延长 3 倍^[54, 55]。对 Gn 晶体结构进行解析，发现 Gn 空间构象在不同正汉坦病毒属高度保守，且 Gn

对 pH 的变化非常敏感, pH 改变引起 Gn 空间结构变化, 促进 Gc 上疏水残基和细胞膜的融合, 参与病毒穿入及病毒核酸释放^[56]。HTNV-GP 可以独立介导病毒与细胞融合, 不需要 NP 和 RdRp 的参与^[57, 58]。对 HTV-GP 蛋白结构及抗原性进行分析, 发现 GP 上至少存在 9 个中和抗原位点, 这些中和位点在病毒与的细胞融合过程中发挥着关键作用^[17, 18]。此外, HTV-GP 存在 T 细胞识别的抗原表位, 可在动物体内诱导保护性免疫应答。我们在前期研究中证实, HTNV-GP 来源的 15 肽可诱导保护性 Th 细胞应答, 其优势应答区域为 aa661-aa927, 并筛选、鉴定得到 7 条 HLA-A*02 限制的 HTNV-GP 9 肽 CTL 表位, 作为本研究基础^[12, 30]。

4 HTV 疫苗的研究进展

目前 HTNV 疫苗主要包括 3 大类: HTV 灭活疫苗、HTV 基因工程疫苗和 HTV 多肽疫苗。后两者尚处于临床 I 期、II 期或临床前研究阶段^[59, 60]。我国 HFRS 疫苗均为 HTV 灭活疫苗, 包括单价疫苗沙鼠肾细胞灭活疫苗 (I 型, 甲醛灭活)、乳鼠脑纯化灭活疫苗 (I 型, 甲醛灭活)、金地鼠肾细胞灭活疫苗 (II 型, β -丙内酯灭活) 和双价疫苗 (由沙鼠肾原代细胞、Vero-E6 细胞和金地鼠肾细胞共同制备双价疫苗, 含 I 型和 II 型, 甲醛灭活), 其中 I 型为 HTNV 灭活疫苗, II 型为 SEOV 灭活疫苗^[61, 62]。HTV 灭活疫苗已在流行区使用, 其中单价疫苗可在 80% 受试者中诱导中和抗体产生, 而双价疫苗可在约 92% 受试者中诱导特异性中和抗体产生, 但中和抗体持续 3-6 月后明显下降, 需 1 年后加强注射^[61-64]。最新报道, Jung 等^[65]对韩国流行区接种灭活 HTV 疫苗的军人群体进行病例对照研究, 发现灭活疫苗的预防效果一般, 其有效性 (vaccine effectiveness) 校正后约为 78.7%。HTV 灭活疫苗可诱导机体产生 HTNV 和/或 SEOV 中和抗体, 预防 HFRS 的发生和流行, 但 HTV 灭活疫苗刺激机体产生的中和抗体滴度往往不高, 而且诱导产生的细胞免疫应答作用相对较弱^[30], 部分人群接种疫苗后仍感染病毒诱发 HFRS。因此, 仍需进一步研制更为有效的新型 HTV 疫苗。

基因工程疫苗包括基因工程亚单位疫苗、基因工程载体疫苗、核酸疫苗和基因缺失活疫苗等。目前 HTV 基因工程疫苗的研究主要集中于基因工程亚单位疫苗、基因工程载体疫苗和核酸疫苗^[60, 66-71]。基因工程亚单位疫苗主要是指将体外表达纯化的蛋白抗原作为疫苗。HTV 结构蛋白 GP 和 NP 具有免疫原性, 体外表达 HTV 单个

结构蛋白抗原分子或表达融合蛋白,纯化后作疫苗可诱导机体产生免疫应答。Li 等^[71]利用原核表达载体表达热休克蛋白 70 (heat shock protein 70, HSP70)-NP 融合蛋白,免疫小鼠后可显著增强适应性免疫应答。Cheng 等^[72]表达嵌合 HTNV 样病毒颗粒(包含 HTNV-NP、GP、GM-CSF 和 CD40L)免疫小鼠,显著增强小鼠机体抗 HTNV 感染作用。基因工程载体疫苗是利用微生物(如慢病毒、腺病毒和牛痘病毒等)作为载体,将保护性抗原基因重组到微生物基因组中,使其能够在机体内表达保护性抗原,诱导保护性免疫应答,其优点在于用量少、载体本身可作为佐剂增强免疫应答,而缺点在于已对载体已免疫的个体免疫效果差。Yu 等^[67]利用慢病毒构建 HTNV-GP 表达载体 rLV-M,在小鼠体内诱导保护性免疫应答,且中和抗体滴度高于 HFRS 灭活疫苗组。Cheng 等^[25]利用腺病毒融合 HSP70 C 末端基因、HTNV-Gn 基因和 0.7 kb HTNV-NP 基因片段,构建 rAd-GnS0.7-pCAG-HSP70C 表达载体,可加强 HTNV-Gn 免疫原性,增强小鼠抗 HTNV 感染免疫应答。

核酸疫苗即 DNA 疫苗,是将一种或多种目的抗原基因克隆到真核质粒表达载体,接种机体后在细胞中表达目的抗原。其优点在于易制备和保存,并可构建含多个优势抗原的多价疫苗或联合抗原提呈相关蛋白基因增强免疫应答,缺点在于可能诱导抗核酸抗体和发生外源性核酸整合。Schmaljohn 等^[60]利用 pWRG7077 质粒作为载体,构建表达 HTNV-GP 的 DNA 疫苗,成功在小鼠体内诱导 HTNV 中和抗体的产生。Jiang 等^[63]利用 pVAX 质粒,融合 HTNV-GP 基因和溶酶体相关膜蛋白 1 (lysosomal-associated membrane protein 1, LAMP1)基因构建 DNA 疫苗,在小鼠体内诱导产生更为长效的免疫保护。而 Hooper 等^[70]研究发现,HTNV-GP DNA 疫苗不仅可以在小鼠体内诱导高滴度中和抗体,也可在非灵长类动物恒河猴中诱导高滴度中和抗体抵抗 HTNV 感染。临床研究中,部分 HTV 基因工程载体疫苗和核酸疫苗虽能诱导个体产生高滴度中和抗体,但整体血清阳转率较低,约 50%^[59]。Hooper 等^[73]通过肌肉电穿孔方式,混合 PUUV 和 HTNV-GP DNA 疫苗进行免疫,在 80% (7/9) 患者体内成功诱导中和抗体产生,且受试者无毒副作用,提示可尝试不同免疫途径改善疫苗免疫效果。

多肽疫苗具有特异性强、安全性高和容易保存等优点,并可利用多抗原表位的线性串联、MAP 空间模式、脂肽模式和表位基因重组方式进行优化,增强疫苗的免疫效果^[74]。猫来源的过敏原多肽免疫机体,成功诱导调节性 T 细胞的产生,形成免

疫耐受, 并已进入临床II期试验^[75]。利用髓磷脂来源的表位诱导调节性 CD8⁺T 细胞, 可抑制小鼠自身免疫性脑脊髓炎^[76]。动物实验中, 靶向血管紧张素II的多肽疫苗应用于高血压和心力衰竭的预防和治疗已取得一定疗效, 利用载脂蛋白 B100 来源的多肽诱导特异性 CTL 应答可减轻动脉粥样硬化的形成^[77, 78]。肿瘤优势表位疫苗联合其它免疫策略, 如纳米圆盘 (Nanodiscs), 显著增强了抗肿瘤 T 细胞应答的特异性和安全性^[79-85]。近年来, 利用多肽疫苗诱导特异性 CTL 应答, 抗登革热病毒 (dengue virus, DENV)、流感病毒及人类I型 T 细胞白血病病毒 (human T cell leukemia virus type 1, HTLV-1) 等病毒感染取得一定进展^[86-90]。我们在前期研究中, 筛选得到了 HLA-A*02 限制的 HTNV-NP CTL 表位 FA9 (FVVPILLKA, FA9), 并已证实 FA9 表位免疫可在 HLA-A2.1/K^b 转基因小鼠体内诱导特异性 CTL 应答, 发挥抗 HTNV 感染作用^[16, 23], 为设计安全、有效的 HTNV 多肽疫苗打下基础。

第二部分 HTV CTL 表位鉴定及 CTL 功能研究进展

1 HTV 结构蛋白 CTL 表位研究进展

病毒特异性 CTL 应答在抗病毒免疫中发挥着重要作用, 且与病情的发生、发展及预后关系密切。目前关于 HTNV 特异性 CTL 应答的研究大多集中在 HTNV 核蛋白 CTL 表位的鉴定及其特异性免疫应答功能研究。我室在前期工作中鉴定得 24 个 HTNV-NP CTL 表位, 其中 8 个 HTNV-NP CTL 表位的 HLA 限制性明确鉴定, 分别是 HLA-A*02 限制性 9 肽 aa129-aa137 (FVVPILLKA), HLA-A*11 限制性 9 肽 aa197-aa205 (RYRTAVCGL), HLA-A*24 限制性 9 肽 aa245-aa253 (KLLPDAAV), HLA-B*07 限制性 9 肽 aa258-aa266 (GPATNRDYL), HLA-A*33 限制性 9 肽 aa167-aa175 (DVNGIRKPK) 和 aa277-aa285 (ETKESKAIR), 以及 HLA-B*35 限制性 9 肽 aa131-aa139 (VPILLKALY) 和 aa247-aa255 (LPDAAVSL)^[16, 22, 23]。此外, SNV 和 PUUV-NP 特异性 CTL 表位也有报道。包括 HLA-B*35 限制性 SNV-NP 9 肽 aa131-aa139 (LPILLKALY), HLA-Cw*07 限制性 SNV-NP 9 肽 aa234-aa242 (ERIDDFLAA), HLA-B*07/B*08 限制性 PUUV-NP 9 肽 aa173-aa181 (RPKHLYVSM), HLA-B*08 限制性 PUUV-NP 9 肽 aa243-aa251 (ECOFIKPEV) 和 HLA-A*02 限制性 PUUV-NP 9 肽 aa204-aa212 (GLFPTQIQV)^[91, 92]。Sankar 等^[93]利用生物信息技术,

分析得到 1 条 CTL 9 肽表位 MRNTIMASK, 此表位在正汉坦病毒属 HTNV、DOBV、SEOV、AMRV (Amur virus) 和 GOUV (Gou virus) 中高度保守, 预测其具有 HLA-B*27 限制性、强抗原性、侧翼蛋白酶体切割位点和抗原加工相关转运物结合活性, 但尚未实验证实。

在以往对 HTV-GP 特异性 CTL 细胞表位的研究中, 研究者已经鉴定得到 PUUV-Gc 来源的 HLA-A*24 限制性 CTL 表位 aa731-aa939 (HWMDATFNL)^[19], ANDV-Gn 来源的 HLA-B*35 限制性 CTL 表位 aa465-aa473 (LMPDVAHSL)^[27], 以及 SNV-Gc 来源的 HLA-B*35 限制性 CTL 表位 aa664-aa673 (TAHGVGIIPM) 和 aa746-aa755 (YPWQTAKCFF)^[26]。但关于 HTNV-GP 来源的 CTL 表位鉴定研究报道极少。Ma 等^[94]鉴定得到了 H-2K^b 限制的 HTNV-GP CTL 表位 aa456-aa463 (ITSLSLL), 并证实其可在小鼠体内诱导特异性 CTL 应答, 参与机体抗 HTNV 感染。本课题组前期研究中, 利用 T2 细胞结合试验和四聚体 (tetramer) 染色筛选、鉴定得到了 7 条 HLA-A*02 限制的 HTNV-GP CTL 表位。有趣的是, Liepe 等^[95]报道称, 蛋白酶体降解、拼接形成的多肽约占整个 HLA-I 类分子免疫多肽组 (immunopeptidome) 的 1/3, 对拼接多肽进行分析, 有助于感染疾病的预防和肿瘤的治疗。

2 HTV 及其他急性病毒感染中特异性 CTL 功能研究进展

普遍认为, T 细胞免疫应答在 HTV 感染中发挥双刃剑作用: 一方面发挥免疫保护作用, 清除胞内病毒; 另一方面过度激活, 杀伤靶细胞, 释放大量炎症因子引起免疫病理损伤^[5, 96]。在 HFRS 患者的肾小管细胞中, CTL 被募集攻击肾小管组织, 可能与上皮细胞渗漏、损伤相关, 并参与急性肾损伤。然而, HFRS 患者组织切片中并未发现明显的细胞病变。研究发现, ANDV 和 HTNV 可通过 NP 抑制凋亡相关蛋白酶, 保护感染的内皮细胞和上皮细胞, 这或许可解释这一矛盾现象^[9]。Kilpatrick 等^[26]发现, 重型 HCPS 患者急性期 SNV 表位特异性 CTL 频率显著高于中型 HCPS 患者, 提示 CTL 在 HCPS 中发挥病理损伤作用。而我们前期研究发现, 轻型/中型急性期 HFRS 患者辅助性 T 淋巴细胞(helper T lymphocyte, Th)应答和 CTL 应答频率、强度和宽度均显著高于重型/危重型 HFRS 患者, 提示 T 细胞免疫应答在 HTNV 感染型 HFRS 患者发病早期发挥抗病毒保护作用^[12, 14-16]。Wang^[97]等发现, 重型/危重型

HFRS 患者发病早期, PBMC 中 HTNV 特异性 CTL 功能受损, 表明疾病早期 CTL 应答失能可能是引起 HFRS 病情加重的主要原因, 功能正常的 CTL 在早期发挥抗病毒用, 控制病毒感染数量, 可减轻病情。Koivula 等^[98]发现, HFRS 患者急性期调节性 T 细胞 (regulatory T cell, Treg) 功能活跃程度与病情正相关, 提示 Treg 早期抑制适应性免疫应答对病毒的清除, 可能加重病情, 也说明了早期 CTL 应答对减轻患者病情的重要性。小鼠 HTNV 感染模型中, 高滴度 HTNV 中和抗体不能完全终止病毒感染, 而过继转移 HTNV 特异性 CTL 后, 血清 HTNV-NP 消失, 表明 HTNV 特异性 CTL 是清除胞内 HTNV 感染的主要效应细胞^[17, 18]。近期, 我们利用 HLA-A2.1/K^b 转基因小鼠进行 HTNV 攻毒实验, 证明 HLA-A*02 限制的 HTNV-NP FA9 表位可诱导特异性 CTL 分泌 IFN- γ 、TNF- α 和颗粒酶 B, 抗 HTNV 感染^[23]。

研究报道, 不同株、不同种属病毒间存在交叉反应的表位特异性 CTL, 可抗多种病毒感染。Valkenburg 等^[99]发现, 利用较为保守的甲型流感病毒 (influenza A virus, IAV) 蛋白来源的 HLA-A*02 限制性多肽免疫 HLA-A2.1/K^b 转基因小鼠, 可对不同 IAV 株产生保护性免疫应答, 这可能是 TCR 识别个别位点突变的多肽片段后, 诱导自身 α 、 β 亚基做出一定程度的适应性改变引起。Sridhar 等^[100]发现, 交叉反应性 CTL 可降低流感流行的风险。此外, 寨卡病毒 (Zika virus, ZIKV) 和 DENV 感染模型中, 也发现了交叉反应的表位特异性 CTL, 并证实其具有免疫保护作用^[90, 101]。早期研究中, Hooper 等^[70]利用 HTNV-GP 基因构建 DNA 疫苗免疫小鼠, 发现 HTNV-GP DNA 疫苗在诱导抗 HTNV 感染的同时, 还可诱导小鼠产生抗 SEOV 和 DOBV 感染免疫应答, 提示 HTV 可能诱导交叉反应性 CTL 应答。

记忆性 CTL 具有效应 CTL 特点, 再次识别抗原表位后可快速活化, 发挥杀伤功能, 同时又兼具初始 T 细胞的特点, 即具有多潜能性, 并可在淋巴结、脾脏等外周淋巴组织和血液间循环^[102]。最新研究发现, 效应 CTL 分化过程中转录活跃, 其中对核糖体蛋白转录本转录的调控可能是记忆 CTL 的形成的关键^[103]。Akondy 等^[104]利用氘标记 CD8⁺T 细胞后进行长期示踪研究, 发现黄热病毒 (yellow fever virus, YFV) 减毒活疫苗免疫个体中存在 HLA-A*02 限制的 NS4B 表位特异性记忆 CTL (CD45RA⁺CCR7⁺CD28⁺⁺CD127⁺⁺), 这些记忆 CTL 在首次免疫的两周内活跃分裂, 并可存活至少 1-2 年。进一步分析发现, 记忆 CTL 虽然不表达颗粒酶 B 等杀伤介质, 但表观遗传分析结果显示其杀伤功能相关基因处于开放状态, 这或许能够解释记忆

CTL 在病原体侵入机体时为何能快速反应、杀伤靶细胞。在 PUUV 和 HTNV 感染个体中发现病毒特异性记忆 CTL，且多年后仍持续存在，提示 CTL 应答对于预防 HTV 再次感染具有重要意义^[19-21]。Kilpatrick 等^[26]研究发现，在 SNV 感染早期，HCPS 患者血液中 SNV-Gc 表位特异性 CTL 频率显著高于 SNV-NP 表位特异性 CTL 频率。Tobias 等^[27]研究发现，与 ANDV-NP 和 Gc 表位比较，ANDV-Gn 表位作为优势表位诱导特异性 CTL 应答。在 ANDV 感染后 13 年间，ANDV-NP 表位特异性 CTL 应答逐渐减弱至消失，而 ANDV-Gn 表位特异性 CTL 应答持续存在。以上研究结果表明 HTV-GP 可作为优势蛋白在 HTV 感染早期诱导特异性 CTL 应答，且部分 GP 表位诱导的特异性 CTL 具有记忆性和长寿特征，可能参与机体抗 HTV 再次感染。因此，搞清 CTL 应答所针对的 HTNV-GP 抗原表位，探究 HTNV-GP 表位特异性 CTL 应答规律，对预防 HFRS 以及新型 HTNV 多肽疫苗的设计意义重大。

第三部分 CTL 表位鉴定及特异性 CTL 功能研究方法

CTL 表位鉴定及特异性 CTL 功能体外研究方法包括：tetramer 染色、酶联免疫斑点实验（enzyme-linked immunospot assay, ELISPOT）和胞内细胞因子染色（intracellular cytokine staining, ICS）等。新近出现一种检测技术 CaFlux，可在单细胞水平检测激活但尚未分泌杀伤介质的 CTL，灵敏度高^[105]。而 HLA 转基因小鼠则是评价 HLA 限制性多肽体内免疫保护效果最常用的动物模型。

1 Tetramer 染色

单体 MHC/抗原肽复合物和 TCR 亲和力低，不能直接用于表位特异性 CTL 的检测。利用半胱氨酸的巯基与生物素的结合，将 1 个荧光标记的链亲和素与 4 个生物素标记的 MHC/抗原肽复合物偶联，形成 MHC/抗原肽-tetramer。Tetramer 极大提高 MHC/抗原肽稳定性及其与 TCR 的亲合力，在与 TCR 结合后，可通过流式细胞仪进行检测。现已广泛应用于 T 细胞表位 MHC 限制性的分析，表位特异性 CTL 的检测及其表型分析、分离和克隆等^[106, 107]。近期，Nauerth 等^[108]建立一种基于流式细胞术的 TCR-ligand- k_{off} -rate 技术，它结合传统 tetramer 染色技术，可对不同亲合力的 CTL 进行分析。Bentzen 等^[109]利用个体 DNA 条形码（DNA barcode）标记 MHC/抗原肽-tetramer 库，在个体单样本中进行高通量筛选，可分析个体在疾病及正常状态下，

1000 多种表位特异性 CTL 的变化情况。

2 ELISPOT 技术

ELISPOT 是基于酶促反应放大效应的免疫学检测技术。该技术原型可追溯到 1978 年牛津大学 Don Mason 教授开发的“胶片上的斑点技术”。5 年后，由 Sedgwich 和 Czerkinsky 真正创立。其原理是将目的抗原的抗体包被在固体基板上，结合样品细胞分泌的抗原，再用酶标抗体检测固体基本上的抗原，通过底物显色检测斑点形成细胞（spot-forming cell, SFC）。也可采用生物素标记的抗体和酶联链亲和素放大显色反应。其优点是能在单细胞水平检测细胞分泌功能^[107]。

3 ICS

ICS 是基于流式细胞术的检测单细胞细胞因子表达水平的实验方法。其原理是利用蛋白转运抑制剂阻断表达蛋白的分泌，并用目的蛋白抗体标记后进行检测。其最大优点在于可对细胞表面标志进行染色，分析不同细胞或细胞亚群中表达目的蛋白细胞的百分比，以及通过平均荧光强度分析目的蛋白表达水平^[110]。

4 CaFlux 检测技术

T 细胞激活过程中，胞内 Ca^{2+} 浓度增加，可作为 T 细胞激活的标志。且 Ca^{2+} 浓度的变化发生较早，在 T 细胞尚未分化、发挥效应之前即出现。近期，Nadia 研究团队开发了一种新的检测技术 CaFlux。研究者利用钙依赖的荧光蛋白标记 CTL，在荧光显微镜实时、动态地观察多肽刺激下单个 CTL 胞内 Ca^{2+} 的变化，通过分析胞内 Ca^{2+} 信号的变化，评估单个 CTL 应答状态^[105]。相同条件下，利用 CaFlux 和 ELISPOT 技术检测特异性 CTL，前者检测的特异性 CTL 频率约后者 2 倍。

5 HLA 转基因小鼠

HLA 转基因小鼠，是将小鼠 H-2 基因抗原肽结合结构域的编码区替换为 HLA 基因抗原肽结合结构域的编码区，其余基因序列不变，使得转基因小鼠可以提呈 HLA 限制的多肽，模拟人体适应性免疫应答的过程。其中，HLA-A2.1/ K^b 转基因小鼠是将 C57BL/6 小鼠 H-2 K^b 基因的 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 结构域编码区替换为 HLA-A*0201 基因的 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 结构域编码区，H-2 K^b 的 $\alpha 3$ 结构域不变，使得人源化的小鼠 H-2 K^b 分子在结合

HLA-A*0201 限制性多肽的同时, 又可与小鼠 TCR 共受体 CD8 分子结合, 模拟人体 CTL 应答。现已广泛用于病毒疫苗和肿瘤疫苗体内免疫效果的评价^[23, 85, 99, 101, 111-115]。此外, HLA-B*0702、HLA-A*0101 和 HLA-DR4 等转基因小鼠也有应用, 并可在 HLA 转基因小鼠基础上联合固有免疫应答相关基因缺陷, 如联合 IFN- α/β 受体基因缺陷, 降低固有免疫应答的影响, 评价疫苗诱导的适应性免疫应答保护作用^[90, 101, 112]。

正 文

第一部分 HLA-A*02 限制性 HTNV-GP CTL 表位可诱导 HFRS 患者保护性免疫应答

实验一 HFRS 患者急性期 PBMC 中 HLA-A*02 限制的 HTNV-GP 表位特异性 CTL 频率与 HFRS 病情相关

前期研究中,我们利用 [SYFPEITHI](#) 和 BIMAS ([The Bioinformatics and Molecular Analysis Section](#)) 数据库对 HTNV 76-118 株 GP 序列中可能由 HLA-A*0201 限制的 CTL 9 肽表位进行预测,得到了 34 条候选 9 肽。随后利用 T2 细胞结合试验,从 34 条候选 9 肽筛选得到了 7 条 HLA-A*0201 高亲和力 9 肽,并成功合成 HLA-A*0201/9 肽-tetramer。利用 PE 标记的 HLA-A*0201/9 肽-tetramer 进行染色,在 HLA-A*02⁺ HFRS 患者 PBMC 中检测到 7 条 HLA-A*02 限制的 HTNV-GP 表位特异性 CTL^[30]。本研究在此基础上,进一步扩大 HLA-A*02⁺ HFRS 患者急性期 PBMC 样本量,并增加 HLA-A*02⁺健康个体作为正常对照。检测 PBMC 中 HLA-A*02 限制的 HTNV-GP 表位特异性 CTL 频率,分析其与 HFRS 病情的关系,从而判断 HTNV-GP 表位特异性 CTL 应答在 HFRS 患者中是否具免疫保护作用。

1 材料

1.1 HFRS 患者知情同意、样本采集及患者资料

45 例 HLA-A*02⁺ HFRS 患者均为本校唐都医院传染科住院病人(2013 年-2016 年)。住院期间,经血清学检测 HTNV 特异性 IgM 或 IgG 抗体阳性确诊。无 HFRS 病史,且血清学检测 HTNV 特异性 IgM 或 IgG 阴性的 10 名 HLA-A*02⁺健康个体作为正常对照(normal control, NC),NC 样本采集自我校西京输血科。该研究经第四

军医大学伦理审查委员会批准，每一个研究对象均在样本采集前签署了知情同意书。根据 HFRS 患者临床表现，将发病 8 天内的发热期、休克期以及少尿早期定义为 HFRS 发病急性期。采集急性期患者全血样本一份用于实验。根据病情严重程度，将 HFRS 患者划分为轻型、中型、重型和危重型。HFRS 患者临床基本信息详见表 1-1。

表 1-1 HFRS 患者临床基本信息

	轻型/中型	重型/危重型
病人数	22	23
年龄（岁）	40(23-58)	46(37-62)
男性/女性	17/5	20/3
急性期临床指标		
白细胞计数最大值 ($\times 10^9/L$)	8.35 (6.22-16.04)	13.79 (9.30-24.16)
血小板计数最小值 ($\times 10^9/L$)	60 (47-93)	33 (13-46)
尿素氮最大值 (mmol/L)	6.58 (5.32-16.51)	22.40 (14.38-31.45)
肌酐最大值 ($\mu\text{mol/L}$)	115.00 (79.00-312.70)	343.20 (183.00-412.00)

注：各参数值均用中位数及相应四分位数间距表示

1.2 定制 HLA-A*0201/9 肽-tetramer

定制 PE (fluorescein phycoerythrin) 标记的 HLA-A*0201/9 肽-tetramer (中国北京旷博生物技术股份公司)，其中 9 肽详细信息见表 1-2^[30]。

表 1-2 数据库预测及 T2 细胞结合试验筛选的 HLA*0201 高亲和力 HTNV-GP 9 肽

GP 氨基酸序列	缩写	氨基酸位置	SYFPEITHI		BIMAS		T2 细胞结合 试验
			排序	分值	排序	分值	FI
VLIEGKCFV	VFV9	179-187	5	27	1	2666.3	1.31
VMASLVWPV	VV9	8-16	8	26	2	1473.1	3.67
SLFSLPGV	SV9	458-466	7	27	3	1006.2	1.23
SLTECPTFL	SL9	996-1004	2	30	5	591.9	2.35
FLLVLESIL	FL9	635-643	32	23	6	481.7	1.13
LIWTGMIDL	LL9	358-366	22	24	13	149.1	2.55
VIGQCIYTI	VI9	448-456	27	23	18	95.3	1.50

FI (fluorescence index) 指荧光指数

$FI = (T2 \text{ 细胞加载肽平均荧光强度} - \text{未加载肽平均荧光强度}) / (T2 \text{ 细胞未加载肽平均荧光强度})$

FI ≥ 1 代表高亲和力 9 肽

1.3 试剂

名称	公司
人淋巴细胞分离液	达科为
小鼠抗人 HLA-A*02-PE 抗体及同型对照	BioLegend
小鼠抗人 CD3-FITC 抗体及同型对照	BioLegend
小鼠抗人 CD8-PerCP-Cy5.5 抗体及同型对照	BioLegend
RPMI 1640 无血清培养基	Gibco
PBS 片	MP Biomedicals

1.4 仪器

名称	公司
电子天平	Sartorius
超纯水制备仪	Millipore
台式离心机	Eppendorf
流式细胞仪	BD

2 方法

2.1 分离 HFRS 患者和正常人 PBMC

- 1) 10ml EDTA 抗凝采血管采集住院患者和正常人外周静脉血。
- 2) 将全血用等体积 RPMI 1640 无血清培养基稀释、混匀。
- 3) 在 15 ml 离心管中加入约 6 ml 人淋巴细胞分离液。
- 4) 用弯头滴管吸取稀释的样本，缓慢加入人淋巴细胞分离液表面，操作轻柔防止破坏分离界面（加入样本与淋巴细胞分离液体积比约 1:1）。
- 5) 750 g 室温离心 30 min。
- 6) 吸取中间白膜层（PBMC）至装有约 45 ml RPMI 1640 无血清培养基的 50 ml 离心管中，吹打混匀，细胞计数。
- 7) 250g 室温离心 5min，倒掉上清（洗去血小板）。

2.2 流式细胞术筛选 HLA-A*02 阳性样本

- 1) 取约 1×10^5 PBMC 于流式管中。
- 2) 加入 2 ml 流式洗涤液（含 5% FBS 和 0.2%NaN₃ 的 PBS 缓冲液）重悬，250 g 室温离心 5 min。
- 3) 倒掉上清，加入 5 μ l HLA-A*02-PE 抗体，同时于另一管中加入相应同型对照抗体作为阴性对照，4°C 孵育 30 min。
- 4) 同步骤 2)，洗涤 2 次。加入约 300 μ l 流式洗涤液，流式细胞仪检测。
- 5) HLA-A*02 阳性 PBMC 用于后续实验。

2.3 Tetramer 染色检测 HFRS 患者 PBMC 中 HTNV-GP 表位特异性 CTL 频率

- 1) 取 HLA-A*02 阳性的 PBMC，每支实验管中加入 $3 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 个 PBMC。
- 2) 加入约 2 ml 流式洗涤液重悬，250 g 室温离心 5 min，弃去上清，涡旋混匀。
- 3) 取出 HLA-A*0201/9 肽-tetramer，低温 14,000 g 离心 5 min，取上清。
- 4) 每支实验管加入 10 μ l HLA-A*0201/9 肽-tetramer，室温避光孵育 10 min。
- 5) 同时设置同型对照管，取约 5×10^5 个 PBMC，流式洗涤液洗涤后加入同型对照抗体。
- 6) 流式洗涤液洗涤 2 次（方法同步骤 2），加入小鼠抗人 CD3-FITC 抗体和小鼠抗人 CD8-PerCP-Cy5.5 抗体，4°C 避光孵育 30 min。
- 7) 流式洗涤液洗涤 2 次（方法同步骤 2），弃上清，加入约 300 μ l 流式洗涤液，涡旋混匀细胞。
- 8) 流式细胞仪检测，收集至少 1×10^6 个细胞，CD3⁺CD8⁺tetramer⁺ T 细胞即为 HLA-A*02 限制的 HTNV-GP 表位特异性 CTL。

2.4 统计方法

- 1) 应用 FlowJo X 软件对 tetramer 染色结果进行分析，首先以 CD3-FITC 及 SSC 设门，圈出 CD3⁺T 细胞。再以同型对照设门，分析 tetramer-PE 和 CD8-PerCP-Cy5.5 双阳性细胞的频率。
- 2) 应用 GraphPad Prism 6 软件对数据进行统计学分析。两组间频率的比较采用非参数 Mann-Whitney U 检验。7 条 HTNV-GP 表位特异性 CTL 频率用中位数及相应四分位数间距（interquartile range, IQR）表示。双侧 p 值 < 0.05 具有统计学意义。

- 3) 以 HFRS 血清学诊断为金标准, 利用 GraphPad Prism 6 软件绘制受试者工作特征曲线 (receiver operating characteristic curve, ROC), 选取阳性似然比最大值处的 CTL 频率作为截断值, 分析 7 种 tetramer 染色的灵敏度和特异度。

3 结果

3.1 轻型/中型 HFRS 患者急性期 PBMC 中 HLA-A*02 限制的 HTNV-GP 表位特异性 CTL 频率高于重型/危重型患者

前期研究中, 我们利用 HLA-A*0201/9 肽-tetramer 检测到 HFRS 患者 PBMC 中 7 条 HLA-A*02 限制的 HTNV-GP 表位特异性 CTL (图 1-1A)^[30]。本研究在此基础上, 扩大了 HLA-A*02⁺ HFRS 患者急性期外周血样本量, 并增加了 10 个 HLA-A*02⁺ 健康个体 PBMC 作为正常对照。轻型/中型 HFRS 患者 PBMC 中, VFV9 (VLIEGKCFV)、VV9 (VMASLVWPV)、SV9 (SLFSLLPGV)、SL9 (SLTECPTFL)、FL9 (FLLVLESIL)、LL9 (LIWTGMIDL) 和 VI9 (VIGQCIYTI) 表位特异性 CTL 频率分别为 0.17% (0.10%-0.47%)、0.21% (0.13%-0.68%)、0.15% (0.13%-0.30%)、0.37% (0.25%-0.43%)、0.20% (0.11%-0.52%)、0.38% (0.20%-0.45%) 和 0.42% (0.27%-0.48%); 重型/危重型 HFRS 患者 PBMC 中, VFV9、VV9、SV9、SL9、FL9、LL9 和 VI9 表位特异性 CTL 频率分别为 0.07% (0.05%-0.24%)、0.08% (0.05%-0.21%)、0.13% (0.05%-0.16%)、0.22% (0.13%-0.30%)、0.11% (0.07%-0.14%)、0.24% (0.18%-0.30%) 和 0.27% (0.14%-0.38%); 正常对照 PBMC 中, VFV9、VV9、SV9、SL9、FL9、LL9 和 VI9 表位特异性 CTL 频率分别为 0.05% (0.03%-0.09%)、0.03% (0.02%-0.08%)、0.06% (0.03%-0.09%)、0.11% (0.09%-0.19%)、0.09% (0.05%-0.10%)、0.07% (0.04%-0.08%) 和 0.07% (0.06%-0.09%)。结果显示, 急性期轻型/中型 HFRS 患者 PBMC 中, 7 条 HTNV-GP 表位特异性 CTL 频率显著高于急性期重型/危重型患者和正常对照 ($p < 0.05$, 图 1-1B), 提示 7 条 HTNV-GP 表位可能在 HFRS 患者疾病早期诱导保护性 CTL 应答。轻型/中型 HFRS 患者 PBMC 中 VV9、SL9、LL9 和 VI9 表位特异性 CTL 频率高于 VFV9、SV9、FL9 表位特异性 CTL 频率, 且重型/危重型 HFRS 患者 PBMC 中, VV9、SL9、LL9 和 VI9 表位特异性 CTL 频率显著高于正常对照 ($p < 0.05$, 图 1-1B), 而 VFV9、SV9、FL9 表位特异性 CTL 频率与正常对照无显著差异, 提示 VV9、SL9、LL9 和 VI9 表位可能具有较强的刺激特异性 CTL 增殖的能力。

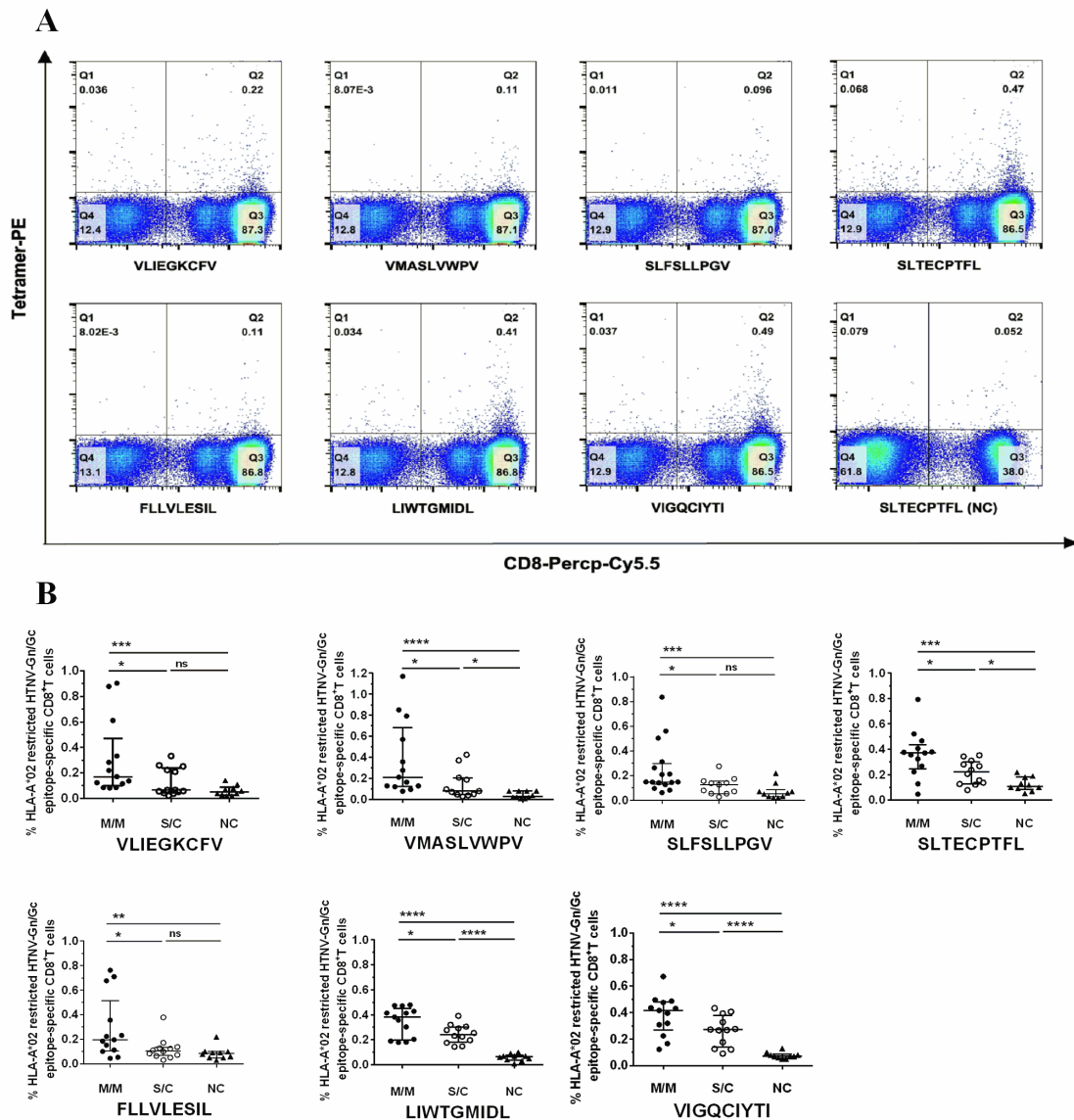


图 1-1 Tetramer 检测 HFRS 患者 PBMC 中 HTNV-GP 表位特异性效应 CTL 频率

(A) 同一 HFRS 病人及 NC PBMC 中 HTNV-GP 表位特异性 CTL 频率。(B) 不同病情 HFRS 患者急性期及 NC PBMC 中 HTNV-GP 表位特异性 CTL 频率的比较。M/M (mild/moderate) 表示轻型/中型患者, S/C (severe/critical) 表示重型/危重型患者, NC (normal control) 表示正常对照。*表示 $p < 0.05$, **表示 $p < 0.01$, ***表示 $p < 0.001$, ****表示 $p < 0.0001$, ns 表示无统计学意义。

3.2 HLA-A*0201/LL9-和 HLA-A*0201/VI9-tetramer 染色具有高灵敏度和特异性

以 HFRS 血清学诊断作为金标准, 根据 ROC 曲线结果选取各 tetramer 染色的截断值, 并计算分析 7 种 tetramer 染色的灵敏度和特异性 (详见表 1-3)。结果显示, 以 0.09% 作为截断值时, HLA-A*0201/LL9-tetramer 染色具有 100% 敏感度和 90.0% 特

异度；以 0.11%作为截断值时，HLA-A*0201/VI9-tetramer 染色具有 96.0%敏感度和 90.0%特异度。

表 1-3 Tetramer 染色灵敏度和特异度分析

血清学	阳性	阴性
A. HLA-A*0201/VFV9-tetramer		
阳性	15	1
阴性	11	9
截断值 = 0.11% 灵敏度 = 57.7% 特异度 = 90.0%		
灵敏度和特异度的 95% 置信区间分别为(36.9%, 76.7%)和(55.5%, 99.8%)		
B. HLA-A*0201/VV9-tetramer		
阳性	22	4
阴性	2	6
截断值= 0.04% 灵敏度 = 91.7% 特异度= 60.0%		
灵敏度和特异度的 95% 置信区间分别为(73.0%, 99.0%) 和 (26.2%, 87.8%)		
C. HLA-A*0201/SV9-tetramer		
阳性	16	1
阴性	11	9
截断值 = 0.14% 灵敏度 = 59.3% 特异度 = 90.0%		
灵敏度和特异度的 95% 置信区间分别为 (38.8%, 77.6%) 和 (55.5%, 99.8%)		
D. HLA-A*0201/SL9-tetramer		
阳性	18	1
阴性	7	9
截断值 = 0.19% 敏感度 = 72.0% 特异度 = 90.0%		
灵敏度和特异度的 95% 置信区间分别为(50.6%, 87.9%)和(55.5%, 99.8%)		
E. HLA-A*0201/FL9-tetramer		
阳性	18	1
阴性	7	9
截断值 = 0.10% 敏感度 = 72.0% 特异度 = 90.0%		
灵敏度和特异度的 95% 置信区间分别为(50.6%, 87.9%) 和 (55.5%, 99.8%)		
F. HLA-A*0201/LL9-tetramer		
阳性	25	1
阴性	0	9
截断值 = 0.09% 敏感度 = 100% 特异度 = 90.0%		
灵敏度和特异度的 95% 置信区间分别为(86.3%, 100%) 和 (55.5%, 99.6%)		
G. HLA-A*0201/VI9-tetramer		
阳性	24	1
阴性	1	9
截断值 = 0.11% 灵敏度 = 96.0% 特异度 = 90.0%		
灵敏度和特异度的 95% 置信区间分别为(79.7%, 99.9%) 和 (55.5%, 99.8%)		

4 讨论

我们在前期研究工作中，系统鉴定了 HTNV-GP Th 表位，并证实 HTNV-GP 表位特异性 Th 细胞可能通过多种途径在 HFRS 病程中发挥抗病毒的作用^[12]。病毒特异性 CTL 应答在抗病毒免疫中也发挥着重要作用，且与病情的发生、发展及预后关系密切。目前关于 HTNV 特异性 CTL 应答的研究大多集中在 HTNV-NP CTL 表位的鉴定及其特异性免疫应答功能研究，而 HTNV-GP CTL 表位的研究寥寥无几，且 HTNV-GP 表位特异性 CTL 应答与 HFRS 患者病情的关系尚无报道。因此，研究 HTNV-GP CTL 表位及其功能对全面认识 HTNV 感染后 CTL 应答规律及免疫保护作用具有重要意义。中国人群 HLA-A*02 等位基因分布最广、频率最高（约 30.0%），研究 HLA-A*02 限制性 CTL 表位，对于设计我国人群更为特异、有效的疫苗具有更高参考价值。

本研究利用 tetramer 染色，在急性期 HLA-A*02⁺ HFRS 患者 PBMC 中检测到 7 条 HLA-A*02 限制的 HTNV-GP 表位特异性 CTL，证实 HLA-A*02/9 肽复合物可被 HFRS 患者 PBMC 中 CTL 识别结合，提示 HLA-A*02⁺ HFRS 患者病毒感染细胞提呈上述 HTNV-GP 9 肽可作为 CTL 应答的靶细胞。值得注意的是，急性期轻型/中型 HFRS 患者 PBMC 中 HTNV-GP 表位特异性 CTL 频率高于重型/危重型患者，提示 HTNV-GP 表位特异性 CTL 可能在 HTNV 感染早期发挥免疫保护作用。HFRS 患者中 HTNV-GP 表位特异性 CTL 频率低于 0.1%（接近正常对照水平）多为重型/危重型患者，提示在 HTNV 感染早期，HTNV-GP 表位特异性 CTL 频率较低者更易发展为严重的 HFRS。这与我们前期关于 HTNV-NP CTL 表位的研究结果吻合，轻型/中型 HFRS 患者 PBMC 中 HTNV-NP 表位特异性 CTL 频率显著高于重型/危重型患者^[15, 16]。Wang 等^[97]同样发现，HTNV 特异性 CTL 应答与免疫保护相关。其它一些研究结果亦表明，HTV 特异性细胞免疫应答在 HTV 感染过程中发挥免疫保护作用。在仓鼠 ANDV 和 SNV 感染模型中，研究者证实仓鼠 HCPS 样免疫病理损伤主要由激活的固有免疫应答细胞（单核/巨噬细胞、中性粒细胞或内皮细胞等）导致，而 T 细胞免疫应答主要发挥免疫保护作用，可降低仓鼠病理损伤^[55]。

而 Kilpatrick 等^[26]鉴定出 3 个 HLA-B*35 限制的 SNV CTL 表位，并发现重型 HCPS 患者 SNV 表位特异性 CTL 频率显著高于中型 HCPS 患者。CTL 应答可发挥

免疫保护作用清除胞内病毒，同时 CTL 过度激活杀伤靶细胞、释放炎症因子也可引起免疫病理损伤。CTL 应答免疫保护和免疫损伤平衡点受多方面影响，其中 HLA 等位基因限制性和 HTV 病毒种类可能是影响 CTL 应答强度和疾病转归的重要因素。在 Kilpatrick 的研究中，重型 HCPS 患者 PBMC 中 3 个 SNV 表位特异性 CTL 频率总和高达 44.2%，而中型 HCPS 患者均未超过 10%^[26]。本研究中，HTNV-GP 表位特异性 CTL 频率范围均较低（0.02%-1.17%），且前期研究中发现，发挥免疫保护作用的 HTNV-NP 表位特异性 CTL 频率同样维持在较低水平（0.01%-0.70%）^[16]，提示将病毒特异性 CTL 频率维持在合适的水平，既能有效发挥抗病毒应答，又可避免对机体过度损伤。

对于 HTV 病毒感染性疾病的诊断基于患者流行病学史、临床表现和阳性血清学检测结果，如特异性 IgM 或 IgG 抗体检测^[5]。本研究中，HLA-A*0201/LL9-tetramer 染色具有 100%敏感度和 90.0%特异度；HLA-A*0201/VI9-tetramer 染色具有 96.0%敏感度和 90.0%特异度，提示应用 HLA-A*0201/LL9-和 HLA-A*0201/VI9-tetramer 染色检测 HFRS 患者血液中特异性 CTL 频率，可辅助 HFRS 早期临床诊断，并对患者病情判断具有一定帮助。

实验二 HTNV-GP 9 肽表位可体外刺激 HLA-A*02⁺ HFRS 患者效应 CTL 分泌 IFN- γ

第一部分实验中,我们已经证实 HLA-A*02⁺ HFRS 患者 PBMC 中存在 HLA-A*02 限制的 HTNV-GP 表位特异性 CTL, 且轻型/中型 HFRS 患者急性期 HTNV-GP 表位特异性 CTL 频率高于重型/危重型患者, 提示 HTNV-GP 表位可在 HFRS 患者体内诱导保护性 CTL 应答。进一步我们利用 ELISPOT 检测分泌 IFN- γ 的表位特异性 CTL 频率, 进而判断 HTNV-GP 9 肽是否可在体外诱导效应 CTL 应答。

1 材料

1.1 HFRS 患者知情同意、样本采集及患者资料

详见第一部分(材料 1.1)。因分离的 HFRS 患者 PBMC 有限, 我们在实验中首先满足第一部分实验 tetramer 染色的需求。10 名 HFRS 患者(6 名轻型/中型患者和 4 名重型/危重型患者)余部分 PBMC, 用于此部分实验。

1.2 HTNV-GP 9 肽合成

根据 HTNV-GP CTL 表位鉴定结果, 委托中国北京旷博生物技术股份公司利用蛋白质自动合成仪合成 7 条 HTNV-GP 9 肽, 分别为 VFV9、VV9、SV9、SL9、FL9、LL9 和 VI9(详见表 1-2)。每条 9 肽合成 10mg(2mg/支), 利用高效液相色谱法和质谱分析测定纯度均大于 90%。9 肽干粉于 -20°C 保存。

1.3 试剂

名称	公司
人 IFN- γ ELISPOT 预包被试剂盒	达科为
人淋巴细胞分离液	达科为
RPMI-1640 无血清培养基	Gibco
胎牛血清	四季青生物工程材料公司
PBS 片	MP Biomedicals

1.4 仪器

名称	公司
ELISPOT 读数仪	CTL 公司
超纯水制备仪	MilLipore
台式离心机	Eppendorf

2 方法

2.1 分离 HFRS 患者和正常人 PBMC

详见第一部分方法 2.1。

2.2 流式细胞术筛选 HLA-A*02 阳性样本

详见第一部分方法 2.2。

2.3 多肽溶解

所有的 HTNV-GP 9 肽均先用 20 μ l 无菌 DMSO 溶解,完全溶解后,加入无菌 PBS 配置终浓度 1 mM 的 9 肽溶液,分装后于-70 $^{\circ}$ C 冻存。

2.4 ELISPOT 检测 HLA-A*02⁺ HFRS 患者 PBMC 中分泌 IFN- γ 的 HTNV-GP 表位特异性效应 CTL 频率

- 1) 加入 200 μ l/孔 RPMI-1640 无血清培养基,室温静置 10 min 后扣出液体。
- 2) 加入 200 μ l/孔含 2×10^5 个 PBMC 的完全培养基(含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基)。
- 3) 实验孔分别加入 40 μ M 的 9 肽或 7 条 9 肽混合物,阳性对照孔加入 10 μ g/ml 植物血凝素,阴性对照孔不加入任何刺激物。
- 4) 盖好盖子,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱培养 32 h,期间不移动板子。
- 5) 倾倒入孔内 PBMC 及培养基。加入 4 $^{\circ}$ C 去离子水,200 μ l/孔,4 $^{\circ}$ C 冰箱放置 10 min,低渗裂解细胞。
- 6) 倾倒入孔内液体,加入 1 \times washing buffer,200 μ l/孔,洗涤 6 次。每次停留 60 s,最后一次扣干。
- 7) 在各孔中加入 100 μ l 生物素标记的抗体工作液,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。
- 8) 洗板子:同步骤 6。

- 9) 在各孔中加入 100 μl 酶联亲和素工作液, 37°C 孵育 1 h。
- 10) 同步骤 6。
- 11) 现配置 AEC 显色液, 100 μl /孔。室温避光孵育约 30 min (具体时间根据显色情况判断)。
- 12) 倾倒入孔内液体, 揭开板子底座, 用水冲洗板子正反面及底座, 终止显色。放置阴凉处自然晾干后, 合上板子底座。
- 13) 用 ELISPOT 读数仪对 SFC 进行计数。

2.5 统计方法

- 1) 利用 CTL 公司 ELISPOT 读数仪计数并计算 SFC, 并标准化为 SFC/ 10^6 细胞。计算公示: SFC/ 10^6 细胞=[(阳性实验孔斑点数-阴性对照孔斑点数)/每孔加入的效应细胞总数] $\times 10^6$
- 2) 应用 GraphPad Prism 6 软件对数据进行统计学分析。两组间频率的比较采用非参数 Mann - Whitney U 检验。7 条 HTNV-GP 表位特异性效应 CTL 频率 (SFC/ 10^6 细胞) 用中位数及相应 IQR 表示。双侧 p 值 < 0.05 具有统计学意义。

3 结果

HTNV-GP 9 肽表位可在体外刺激 HLA-A*02⁺ HFRS 患者效应 CTL 分泌 IFN- γ

体外用单独的 HTNV-GP 9 肽或 7 条 9 肽混合刺激 HLA-A*02⁺ HFRS 患者 PBMC, 均可检测到分泌 IFN- γ 的斑点形成 (图 2-1A), 表明 7 条 HTNV-GP 9 肽均能刺激特异性效应 CTL 分泌 IFN- γ 。接着我们对 7 条 HTNV-GP 表位特异性效应 CTL 频率 (SFC/ 10^6 细胞) 进行分析。由于病人 PBMC 数量有限, 没有获得足够的样本量对不同病情 HFRS 患者之间效应 CTL 频率进行比较。因此, 合并轻型/中型患者与重型/危重型患者的数据, 对 HFRS 患者与正常对照之间进行统计学比较。结果显示, HFRS 患者中, VFV9、VV9、SV9、SL9、FL9、LL9 和 VI9 表位特异性效应 CTL 频率分别为 73 (35-114) SFC/ 10^6 细胞、41 (8-112) SFC/ 10^6 细胞、57 (32-164) SFC/ 10^6 细胞、61 (35-90) SFC/ 10^6 细胞、33 (6-101) SFC/ 10^6 细胞、62 (51-87) SFC/ 10^6 细胞和 33 (2-72) SFC/ 10^6 细胞; 正常对照中, VFV9、VV9、SV9、SL9、FL9、LL9 和 VI9 表位特异性效应 CTL 频率分别为 9 (1-15) SFC/ 10^6 细胞、15 (11-20) SFC/ 10^6 细胞、10 (4-10)

SFC/10⁶ 细胞、12 (8-13) SFC/10⁶ 细胞、10 (7-13) SFC/10⁶ 细胞、9 (7-15) SFC/10⁶ 细胞和 10 (7-17) SFC/10⁶ 细胞。结果显示, VFV9、SV9、SL9 和 LL9 表位特异性效应 CTL 频率显著高于正常对照 ($p < 0.05$, 图 2-1B)。VV9 组 HFRS 患者与正常对照组之间效应 CTL 频率无显著差异, 但剔除其中的重型/危重型患者数据后, HFRS 患者 VV9 表位特异性 CTL 频率显著高于正常对照 ($p < 0.05$), 提示轻型/中型患者 VV9 表位特异性效应 CTL 频率高于重型/危重型患者。表 2-1 中列出了不同病情 HFRS 患者 PBMC 中 HTNV-GP 表位特异性效应 CTL 频率中位数及 IQR, 观察其变化趋势提示轻型/中型患者 HTNV-GP 表位特异性效应 CTL 频率高于重型/危重型患者。

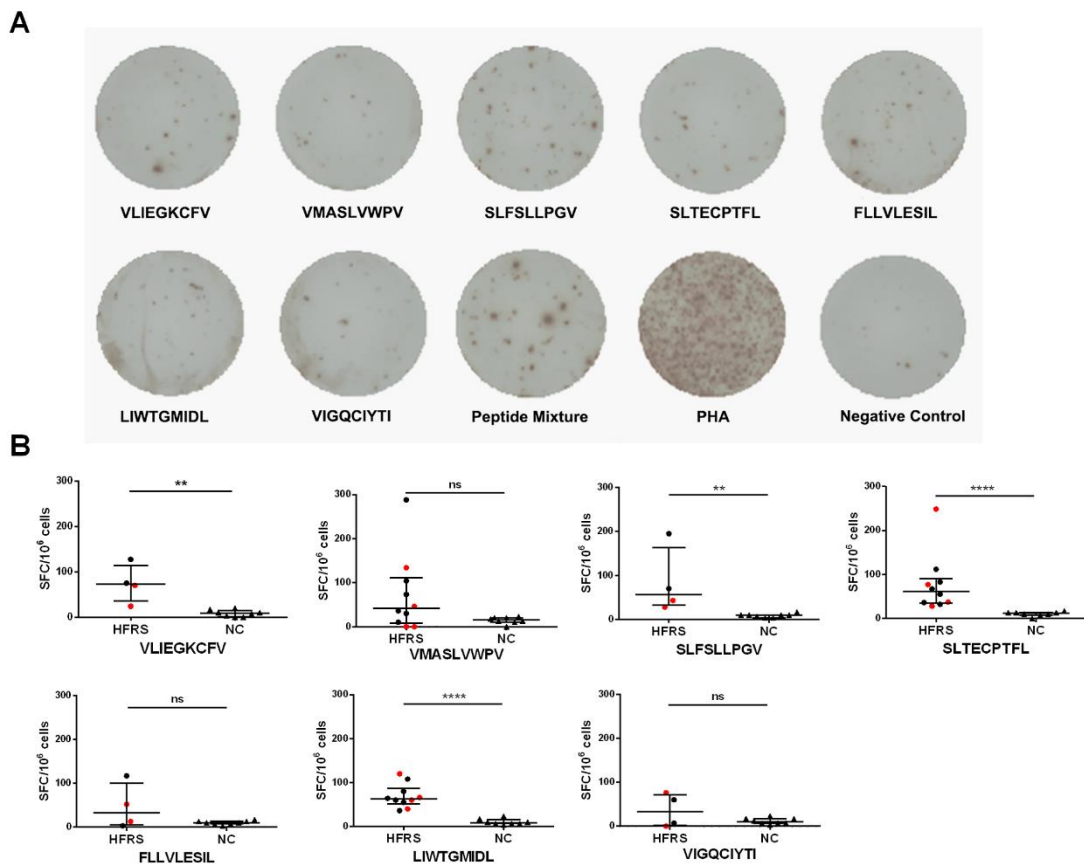


图 2-1 ELISPOT 检测 HFRS 患者 PBMC 中 HTNV-GP 表位特异性效应 CTL 频率

(A) 同一 HFRS 病人 PBMC 中检测到分泌 IFN- γ 的 HTNV-GP 表位特异性 CTL 频率。(B) HFRS 患者急性期及正常对照 (normal control, NC) PBMC 中 HTNV-GP 表位特异性 CTL 频率的比较。阴性对照孔不加入任何刺激物。黑点代表轻型/中型患者, 红点代表重型/危重型患者。**表示 $p < 0.01$, ****表示 $p < 0.0001$, ns 表示无统计学意义。

表 2-1 不同病情 HFRS 患者 PBMC 中 HTNV-GP 表位特异性效应 CTL 频率

	VFV9		VV9		SV9		SL9	
	M/M	S/C	M/M	S/C	M/M	S/C	M/M	S/C
Median	101	47	55	23	133	36	61	57
IQR	75-127	24-70	25-150	23-134	70-195	28-43	35-90	30-206
	FL9		LL9		VI9		-	
	M/M	S/C	M/M	S/C	M/M	S/C	-	
Median	60	33	62	62	34	38	-	
IQR	3-117	13-52	50-87	45-106	7-60	0-76	-	

IQR, interquartile range, 四分位数间距

M/M, mild/moderate, 轻型/中型; S/C, severe/critical, 重型/危重型

4 讨论

本部分研究利用 ELISPOT 证实筛选的 HLA-A*02 限制性 HTNV-GP 9 肽表位具有免疫反应性, 可在体外诱导 HFRS 患者 PBMC 中 CTL 分泌 IFN- γ 。在重型/危重型 HFRS 患者发病早期, PBMC 中 HTNV 特异性 CTL 功能可能受损, 提示早期 CTL 应答失能可能是引起 HFRS 病情加重的主要原因^[97]。在 HTNV 持续感染的小鼠模型中, 几乎检测不到分泌 IFN- γ 的 CTL, 而表现为一过性 HTNV 感染的小鼠模型中存在大量效应 CTL, 表明效应 CTL 是清除 HTNV 的主要细胞^[17, 116]。VV9 组 ELISPOT 结果中, HFRS 患者与正常对照组之间分泌 IFN- γ 的效应 CTL 频率无显著差异, 但剔除重型/危重型 HFRS 患者数据后, HFRS 患者 VV9 表位特异性分泌 IFN- γ 的 CTL 频率显著高于正常对照, 提示轻型/中型患者 VV9 表位特异性效应 CTL 频率高于重型/危重型患者。观察 HTNV-GP 表位特异性分泌 IFN- γ 的 CTL 频率中位数趋势, 结果同样提示, 轻型/中型患者效应 CTL 频率高于重型/危重型患者。结合第一部分 tetramer 染色实验结果, 轻型/中型 HFRS 患者外周血中 HTNV-GP 表位特异性 CTL 频率高于重型/危重型患者, 我们推测在 HTNV 感染早期, 轻型/中型 HFRS 患者血液中 HTNV-GP 表位特异性 CTL 快速激活, 并发挥杀伤作用, 及时清除细胞内感染的 HTNV 病毒, 防止 HTNV 进一步扩散和病情的恶化。而重型/危重型患者中, 由于疾病早期血液中 HTNV-GP 特异性 CTL 频率较低、功能可能异常, 无法及时清除胞内感染病毒, 导致病毒复制、扩散, 最终病情加重, 甚至危及生命。

阐明 CTL 应答所针对的 HTNV 抗原表位及 CTL 应答特点, 可为设计 HTNV 多肽疫苗提供重要实验依据。特定的病毒多肽刺激下, CTL 分泌的细胞因子谱和增殖能力等功能特征表现出一定异质性^[115, 117, 118]。由于细胞数目有限, 本实验仅研究了多肽刺激下 CTL 分泌 IFN- γ 的水平。IFN- γ 主要由活化的 T 细胞和 NK 细胞产生, 参与固有免疫应答与适应性免疫应答。小鼠 IFN- γ 或 IFN- γ 受体缺失后, 固有免疫应答和适应性免疫应答功能严重受损, 出现致死性的细菌和病毒感染^[119], 表明 IFN- γ 在机体抗感染免疫应答中占有重要地位。IFN- γ 通过上调病原体感染细胞/肿瘤细胞 HLA-I 类分子的表达, 增强感染细胞/肿瘤细胞抗原提呈能力, 使其更易被 CTL 识别杀伤。另一方面, IFN- γ 可促进初始 T 细胞向 Th1 细胞分化, 增强 Th1 应答, 辅助 CTL 杀伤靶细胞, 进而增强机体抗感染、抗肿瘤等作用^[120, 121]。本实验证明 HTNV-GP 9 肽表位可诱导 HFRS 患者外周血 CTL 分泌 IFN- γ , HFRS 患者体内 HTNV-GP 表位特异性 CTL 可能通过分泌 IFN- γ 发挥抗 HTNV 感染的作用。

Tetramer 和 ELISPOT 都是检测表位特异性 CTL 的常用实验技术。本实验中, ELISPOT 检测到的 7 条 HTNV-GP 表位特异性 CTL 频率均低于 tetramer 检测结果。Tuuminen 等^[122]同样发现, PUUV 感染患者急性期, ELISPOT 检测到的 PUUV-NP 表位特异性 CTL 频率低于 tetramer 检测结果。应用两种方法对特异性 T 细胞频率进行多次检测, 统计学分析两者的多次检测结果, 发现 tetramer 染色较 ELISPOT 展现出了更高的精确性^[107, 123]。从原理上分析, tetramer 染色是在体外模拟 HLA/肽复合物与 TCR 的相互作用, 也就是 T 细胞接受第一刺激信号的过程, 而 ELISPOT 检测有赖于 T 细胞的激活及效应应答, 如分泌 IFN- γ , 使得两种方法检测结果存在差异^[106]。体外实验中, 高浓度抗原或多肽表位刺激强度/阈值的不同, 可诱导 T 细胞凋亡或失能, 导致克隆清除^[110, 124]。功能耗竭或终末分化的 T 细胞在体外长时间培养(24-48 h)过程中, 可能尚未分泌足够 IFN- γ 供 ELISPOT 检测便已凋亡, 而 tetramer 染色可检测到终末 T 细胞^[103, 105]。功能异常的 CTL 在 IL-2 刺激下可恢复正常功能, 而体外实验无法模拟体内复杂环境, 体外 CTL 可能因缺乏其他刺激, 如 Th 细胞功能辅助, 而处于功能低下状态, 使其不能被 ELISPOT 检测^[125]。以上原因, 共同引起 ELISPOT 和 tetramer 染色检测特异性 CTL 频率的不同。

第二部分 HLA-A*02 限制性 HTNV-GP CTL 表位可在 HLA-A2.1/K^b 转基因小鼠体内诱导保护性免疫应答

前一部分实验中, 我们利用 tetramer 染色发现轻型/中型 HLA-A*02⁺ HFRS 患者 PBMC 中 HTNV-GP 表位特异性 CTL 频率高于重型/危重型患者, 提示 HLA-A*02 限制性 HTNV-GP CTL 表位可能在机体内诱导保护性 CTL 应答, 并利用 ELISPOT 实验证实 HTNV-GP CTL 表位具有免疫反应性, 可在体外诱导特异性 CTL 分泌 IFN- γ 。其中 VV9、SL9 和 LL9 表位与 HLA-A*0201 亲和力最高(表 1-2), 且其特异性 CTL 在轻型/中型 HFRS 患者 PBMC 中频率较高(图 1-1), 提示 VV9、SL9 和 LL9 表位可能具有更强的诱导保护性 CTL 应答的能力。为探究 HTNV-GP CTL 表位是否可在体内诱导保护性免疫应答, 我们选择 VV9、SL9 和 LL9 表位分别免疫 HLA-A2.1/K^b 转基因小鼠, 并进行 HTNV 攻毒实验, 检测小鼠主要脏器中 HTNV 抗原水平和病毒载量。通过比较实验组与对照组的 HTNV 含量, 评价 HLA-A*02 限制性 HTNV-GP CTL 表位在转基因小鼠体内的免疫保护作用, 为设计新型 HTNV 多肽疫苗提供客观的实验依据。

1 材料

1.1 HTNV 病毒

HTNV 76-118 株, 为国际标准株, 由我校微生物学教研室保存。

1.2 HTNV-GP 9 肽合成

选择 3 个 HLA-A*0201 亲和力最高的 HTNV-GP 9 肽表位, VV9、SL9 和 LL9, 委托中国北京旷博生物技术股份公司利用蛋白质自动合成仪合成。同时合成 HLA-B*3501 限制的 HTNV-NP 9 肽 VY9 (aa131-aa139, VPILLKALY), 作为无关肽对照组。每种 9 肽合成 10mg (2mg/支), 利用高效液相色谱法和质谱分析测定纯度均大于 90%。9 肽干粉于 -20°C 保存。

1.3 HLA-A2.1/K^b转基因小鼠

HLA-A2.1/K^b转基因小鼠均为雄性纯合子, 6~8 周龄, 从第三军医大学免疫学教研室购买获得。饲养在我校 SPF 级动物房, 可维持适宜的温度、湿度、气流、光照和空气清洁度, 保证小鼠健康生活。将 C57BL/6 小鼠 H-2K^b 基因的 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 编码区替换为 HLA-A*0201 基因的 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 编码区, 即成为 HLA-A2.1/K^b 转基因小鼠。

1.4 试剂

名称	公司
HFRS 双价灭活疫苗	浙江天元公司
小鼠 glycoprotein 96 (gp96)	达科为
抗 HTNV NP mAb 1A8	微生物学教研室提供
TMB 显色液	eBioscience
ELISA 酶标板	Nunc
非冻型组织 RNA 保存液	北京索莱宝科技有限公司
动物组织总 RNA 提取试剂盒	天根生化科技(北京)有限公司
RNA 反转录试剂盒	Takara
荧光定量 PCR 染料 SYBR	Takara
qPCR 引物	北京六合华大基因科技有限公司
RNase free tips	Corning
RNase free water	Hyclone
PBS 片	MP Biomedicals

1.5 仪器

名称	公司
电子天平	Sartorius
超纯水制备仪	Miuiopore
实时定量 PCR 仪	Bio-Rad
高速低温离心机	Eppendorf
酶标读数仪	Bio-Rad
Nano Drop 2000	ThermoFisher

2 方法

2.1 HTNV 攻毒预实验

- 1) 取 4 只未免疫的 HLA-A2.1/K^b 转基因小鼠，随机分为 2 组（HTNV 攻毒组和阴性对照组）。
- 2) HTNV 攻毒组小鼠后肢肌肉注射 HTNV， 1×10^5 pfu/只。
- 3) 攻毒后第 4 天，脱颈处死小鼠，无菌条件下取出肝脏、脾脏、肾脏、心脏、肺和脑组织。
- 4) 称重后加入 PBS 研磨，制成 10% (W/V) 悬液， $-70^{\circ}\text{C}/37^{\circ}\text{C}$ 冻融 3 次后，3000 rpm，离心 30min，取上清，用于 ELISA 检测组织中 HTNV 抗原水平。

2.2 HTNV-GP9 肽免疫 HLA-A2.1/K^b 转基因小鼠

- 5) 将 HLA-A2.1/K^b 转基因小鼠随机分为 6 组（VV9 免疫组、SL9 免疫组、LL9 免疫组、VY9 免疫组、HFRS 灭活疫苗免疫组和 PBS 阴性对照组），每组 6 只。
- 6) 溶肽：20 μl 无菌 DMSO 溶解多肽粉末，充分溶解后加入 2ml PBS 配置成 1mg/ml 的多肽溶液。
- 7) 每只小鼠按照 50 μg 多肽和 30 μg gp96 免疫用量计算，将多肽与 gp96 混合，生理盐水定容至 3 ml。
- 8) 加入等体积完全弗氏佐剂（3 ml），用三通管“研磨”10 min。
- 9) 换超声研磨抗原，最大功率研磨 15 min。
- 10) 小鼠背部皮下 4 点注射抗原溶液（200 μl /点）。
- 11) 阳性对照组皮下注射 HFRS 双价灭活疫苗（50 μg /只），阴性对照组皮下注射等体积 PBS。
- 12) 第 10 天和第 20 天分别进行第二次和第三次免疫，其中完全弗氏佐剂更换为不完全弗氏佐剂，其余操作同前。

2.3 HTNV 攻毒试验

- 1) 第三次免疫后，于第 10 天对小鼠进行 HTNV 攻毒。后肢肌肉注射 HTNV， 1×10^5 pfu/只。
- 2) 每日观察小鼠各项体征，注意观察是否有异常情况发生。

- 3) 攻毒后第 4 天，脱颈处死小鼠，无菌条件下取出肝脏、脾脏、肾脏、心脏、肺和脑组织。
- 4) 将各脏器一分为二：
 - a) 一份称重后加入 PBS 研磨，制成 10% (W/V) 悬液，-70°C/37°C 冻融 3 次后，3000 rpm，离心 30min，取上清，用于 ELISA 检测组织中 HTNV 抗原水平。
 - b) 一份放入非冻型组织 RNA 保存液中保存，用于 qRT-PCR，检测组织中 HTNV 病毒载量。

2.4 ELISA 法检测组织 HTNV 抗原水平

1) 配置 ELISA 相关溶液：

包被缓冲液 (0.1 M 碳酸盐缓冲液, pH 9.5)	Na ₂ CO ₃ 1.59 g
	NaHCO ₃ 7.13 g
	双蒸水补至 1 L
洗涤液 (0.15 M PBS, pH 7.4)	KCl 0.2 g
	NaCl 8.0 g
	KH ₂ PO ₄ 0.2 g
	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O 2.9 g
	Tween-20 (0.05%) 0.5 ml
	双蒸水补至 1000 ml
抗体稀释液	含有 0.1% BSA 的 PBS
终止液	2M H ₂ SO ₄

- 2) 包被缓冲液 1:100 稀释 mAb 1A8，100 μl/孔，4°C 过夜。
- 3) 洗涤 3 次，拍干后加入各脏器组织悬液，100 μl/孔，37°C 孵育 1 h。
- 4) 洗涤 3 次，拍干后加入 HRP 标记的 mAb 1A8，100 μl/孔，37°C 孵育 1 h。
- 5) 洗涤 4 次，拍干后加入 TMB 显色液，100 μl/孔，37°C 孵育 15 min (根据显色情况调整终止时间)。
- 6) 加入 2M H₂SO₄ 终止显色，100 μL/孔，酶标仪 450 nm 波长读取吸光度值 (A₄₅₀)。
- 7) 结果判定：以 A₄₅₀ > 0.1 且 P/N 值大于 2.1 为阳性，即组织中存在 HTNV 抗原，其中 P (positive) 代表各实验组 A₄₅₀，N (negative) 代表阴性对照组 A₄₅₀。

2.5 qRT-PCR 法检测攻毒小鼠各脏器组织中 HTNV 病毒载量

2.4.1 提取各脏器组织总 RNA

- 1) 取 20 mg 脏器组织, 加入 300 μ l 裂解液 RL (已加入 1% β -巯基乙醇), 彻底研磨。
- 2) 研磨完成后, 加入 10 μ l Proteinase K 和 590 μ l RNase-Free ddH₂O。混匀, 放置 56°C 处理 20 min。
- 3) 随后 12,000 rpm, 4°C 离心 5min, 取上清用于后续实验。
- 4) 缓慢地加入无水乙醇 (0.5 倍上清体积), 混匀, 并将得到的溶液和沉淀一起放回吸附柱 CR3 中。
- 5) 12,000 rpm, 4 °C 离心 60 s。弃掉收集管中废液, 将 CR3 放回至收集管。
- 6) CR3 中加入 350 μ l 去蛋白液 RW1。12,000 rpm, 4°C 离心 60 s。弃掉收集管中废液, 将 CR3 放回至收集管。
- 7) 新 RNase-Free 离心管中加入 10 μ l DNase I 储存液和 70 μ l RDD 溶液, 轻柔地混匀, 配置完成 DNase I 工作液。
- 8) CR3 中央加入 80 μ l 配置好的 DNase I 工作液, 室温放置 15 min。
- 9) CR3 中央加入 350 μ l 去蛋白液 RW1。12,000 rpm, 4°C 离心 60 s。弃掉收集管中废液, 将 CR3 放回至收集管。
- 10) CR3 中加入 500 μ l 漂洗液 RW, 室温静置 2 min。
- 11) 12,000 rpm, 4°C 离心 60 s, 弃掉收集管中废液, 将 CR3 放回至收集管。
- 12) 重复上述步骤 10)。
- 13) 12,000 rpm, 4 °C 离心 2 min, 倒掉废液。
- 14) CR3 于室温放置数分钟, 彻底晾干 CR3 中残余的漂洗液, 避免影响 RT 实验。
- 15) 将 CR3 转入新 RNase-Free 离心管中, 向吸附膜中间部位滴加 100 μ l RNase-Free ddH₂O, 室温放置 2 min。
- 16) 12,000 rpm, 4°C 离心 2 min, 得到所需的 RNA 溶液。
- 17) 使用 Nanodrop 仪器进行 RNA 定量。

2.4.2 RNA 反转录为 cDNA

使用 Takara 的 RNA 反转录试剂盒, 将各组织中提取的 RNA 反转录为 cDNA, 反转录体系如下:

RNA	1 μg
5x Mix buffer	4 μl
Reverse transcriptase	2 μl
RNase free water	To a total 20 μl

反应条件：37°C 15 min→85°C 5s。

反应完成后，cDNA 用 RNase free water 1:5 稀释，-20°C 保存。

2.4.3 荧光定量 qPCR 检测攻毒小鼠各组织 HTNV 病毒载量

以 2.4.2 中制备的 cDNA 为反应模版，进行荧光定量 qPCR 反应。本实验检测 HTNV S 片段 RNA 含量，因此设计 S 片段 cDNA 的 PCR 引物。

1) 引物序列如下：

Gene	Forward primers (5'-3')	Backward primers (5'-3')
HTNV S	GATCAGTCACAGTCTAGTCA	TGATTCTTCCACCATTTTGT
mouse β -actin	CGTTGACATCCGTAAAGACC	AACAGTCCGCCTAGAAAGCAC

2) qPCR 反应体系如下：

2x SYBR	5 μl
Forward primer (10 μM)	0.4 μl
Backward primer (10 μM)	0.4 μl
cDNA	1 μl
H ₂ O	3.2 μl

3) qPCR 反应步骤：

- 预变性 95°C 10 min。
- 95°C 5 s, 60°C 30 s。
- 重复步骤 b), 40 个循环。
- 确认溶解曲线。

4) 计算 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 进行相对定量。

2.6 统计方法

应用 GraphPad Prism 6 软件对数据进行统计学分析及绘图。两组间 HTNV 抗原水平或 HTNV 病毒载量的比较采用 Student's t 检验。双侧 p 值 < 0.05 具有统计学意义。

3 结果

3.1 HLA-A2.1/K^b 转基因小鼠肝脏、肾脏和脾脏是 HTNV 感染的主要靶器官

预实验中, 利用 ELISA 检测攻毒小鼠与未攻毒小鼠的脑、心脏、肝脏、脾脏、肺和肾脏中 HTNV 抗原水平。攻毒小鼠和未攻毒小鼠心、脑和肺中均未检测到 HTNV 抗原 ($P/N < 2.1$, 图 3-1), 表明 HLA-A2.1/K^b 转基因小鼠的心、脑和肺不是 HTNV 感染的靶器官。攻毒小鼠的肝脏、脾脏和肾脏中, 均检测到不同水平的 HTNV 抗原 ($P/N > 2.1$, 图 3-1), 而未攻毒小鼠肝脏、脾脏和肾脏中均未检测到 HTNV 抗原 ($P/N < 2.1$, 图 3-1), 表明 HLA-A2.1/K^b 转基因小鼠的肝脏、脾脏和肾脏是 HTNV 感染的主要靶器官。

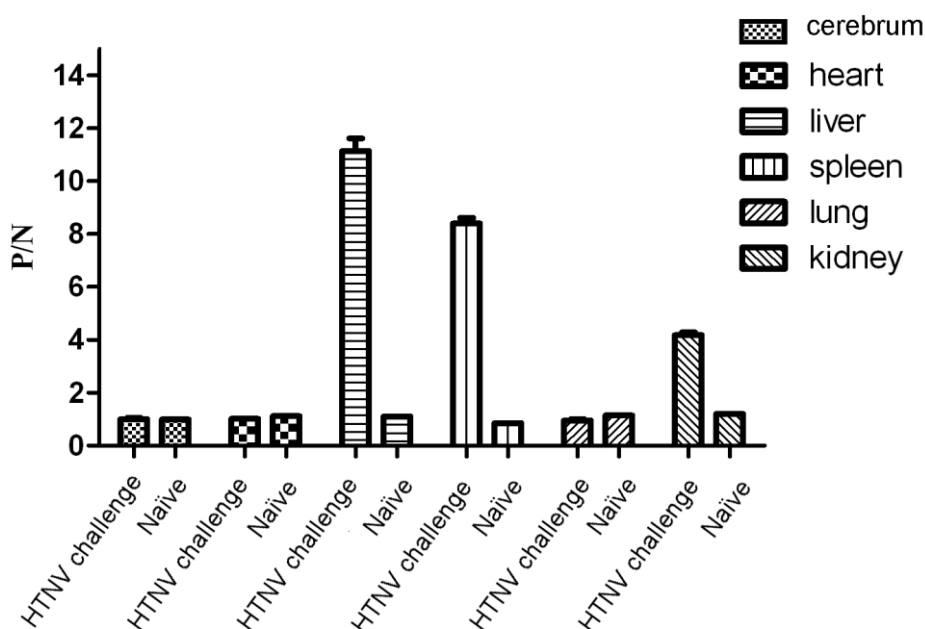


图 3-1 ELISA 检测未免疫 HLA-A2.1/K^b 转基因小鼠各器官 HTNV 抗原水平

3.2 VV9、SL9 和 LL9 9 肽分别免疫 HLA-A2.1/K^b 转基因小鼠可降低攻毒后小鼠肝、脾和肾中 HTNV 抗原水平

同预实验结果一致, 小鼠的肺、脑和心脏中均未检测到 HTNV 抗原 (图 3-1 和图 3-2A), 表明小鼠肺、脑和心不是 HTNV 感染的靶器官。PBS 组 (阴性对照组) 小鼠肝脏、脾脏和肾脏中均检测到了高水平的 HTNV 抗原, 而其余各组小鼠肝脏、脾脏和肾脏中 HTNV 水平较阴性对照组均有不同程度降低 (图 3-2B), 表明小鼠肝脏、脾脏和肾脏是 HTNV 感染的主要靶器官。与 PBS 组比较, VV9 免疫组小鼠肝脏

中 HTNV 抗原水平显著降低 ($p < 0.05$), SL9 免疫组小鼠肝脏和脾脏中 HTNV 抗原水平显著降低 (肝脏 $p < 0.01$, 脾脏 $p < 0.05$), LL9 免疫组小鼠肝脏和肾脏中 HTNV 抗原水平显著降低 (肝脏 $p < 0.05$, 肾脏 $p < 0.01$) (图 3-2B)。值得注意的是, LL9 免疫组小鼠肝脏和肾脏中 HTNV 抗原水平较无关肽 VV9 免疫组小鼠显著降低, 且与 HFRS 疫苗免疫组小鼠 HTNV 抗原水平接近, 提示 LL9 诱导的 CTL 应答可能在肝脏和肾脏中抗病毒作用较突出。以上结果表明, LL9、VV9 和 SL9 免疫 HLA-A2.1/K^b 小鼠均可诱导保护性 CTL 应答, 其中 LL9 免疫保护作用最为显著。

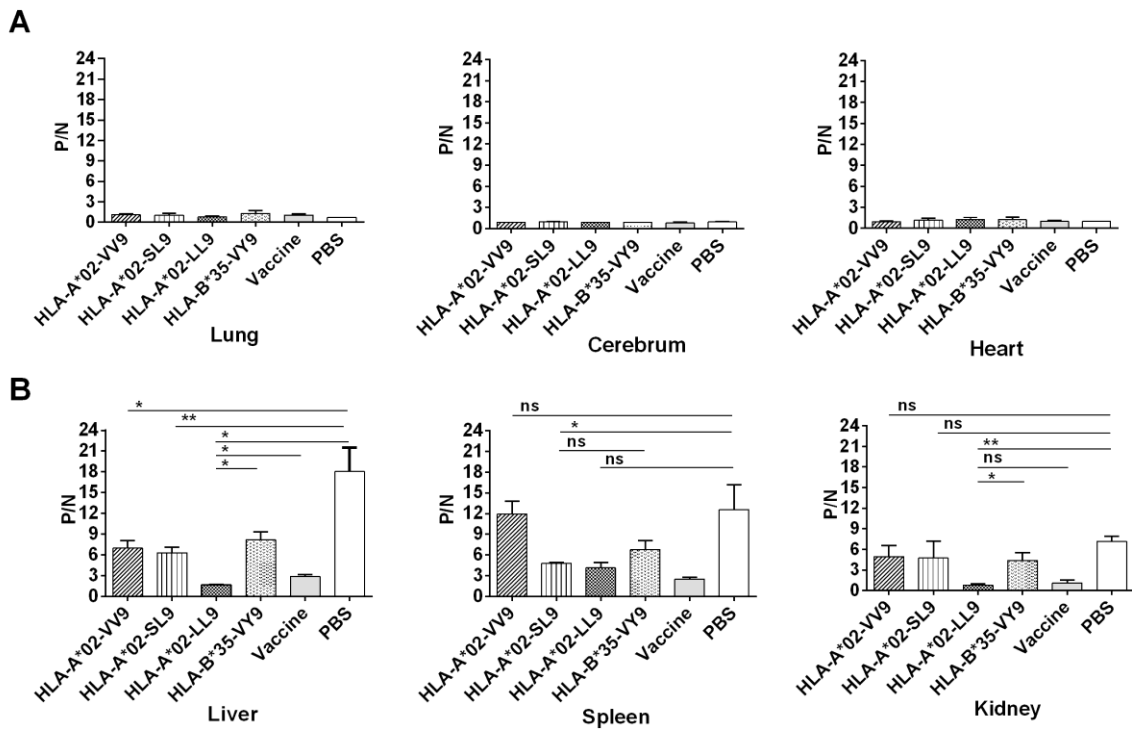


图 3-2 ELISA 检测攻毒后 HLA-A2.1/K^b 转基因小鼠各器官 HTNV 抗原水平

*表示 $p < 0.05$, **表示 $p < 0.01$, ns 表示无统计学意义。

3.3 VV9、SL9 和 LL9 9 肽分别免疫 HLA-A2.1/K^b 转基因小鼠可降低攻毒后小鼠肝、脾和肾中 HTNV 病毒载量

以上研究结果表明, 肝脏、脾脏和肾脏是 HTNV 感染的主要靶器官, VV9、SL9 和 LL9 9 肽免疫 HLA-A2.1/K^b 转基因小鼠可降低攻毒后小鼠各靶器官中 HTNV 抗原水平。进一步, 我们利用更为敏感和精确的 qRT-PCR 法检测小鼠肝脏、脾脏和肾脏中 HTNV S 片段 RNA 水平, 进一步评估 3 条 9 肽的免疫保护作用。在 PBS 组和 VV9 无关肽对照组小鼠肝脏、脾脏和肾脏中检测到高水平 HTNV RNA 含量 (图 3-3), 进

一步证实肝脏、脾脏和肾脏是 HTNV 感染的靶器官。与 PBS 组及无关肽对照组比较，VV9、SL9 和 LL9 肽免疫小鼠均可显著降低小鼠肝脏、脾脏和肾脏中 HTNV RNA 载量 ($p < 0.05$ ，图 3-3)，表明 VV9、SL9 和 LL9 表位可在小鼠体内诱导特异性 CTL 应答，抑制肝脏、脾脏和肾脏中 HTNV 的复制，发挥抗病毒作用。值得注意的是，SL9 和 LL9 免疫组小鼠肾脏 HTNV 病毒载量与 HFRS 疫苗免疫组小鼠无显著差异，提示 SL9 和 LL9 表位诱导的 CTL 应答可能在肾脏部位发挥更为突出的抗病毒作用。

进一步，我们进一步比较 VV9、SL9 和 LL9 免疫各组之间小鼠各脏器 HTNV 病毒载量。结果显示，在肝脏、脾脏和肾脏中，SL9 和 LL9 免疫组小鼠 HTNV 病毒载量均显著低于 VV9 免疫组小鼠 ($p < 0.05$ ，图 3-3)，表明 SL9 和 LL9 表位较 VV9 表位，具有更强的诱导抗病毒 CTL 应答的能力。与 SL9 免疫组比较，LL9 免疫组小鼠各脏器中 HTNV 病毒载量更低，表明 LL9 表位诱导的 CTL 应答抗病毒作用更为显著 (图 3-3)。

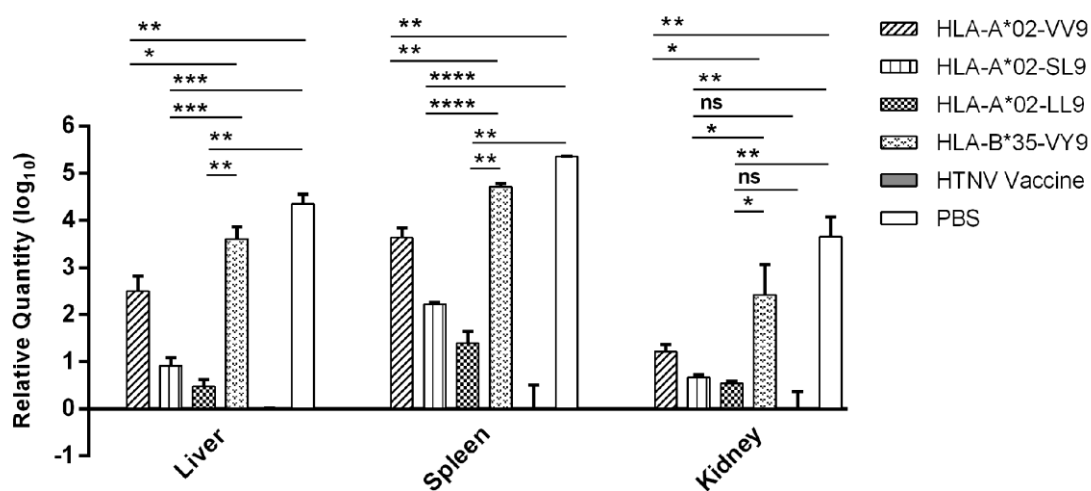


图 3-3 qRT-PCR 检测攻毒后 HLA-A2.1/K^b 转基因小鼠各器官 HTNV RNA 载量

*表示 $p < 0.05$ ，**表示 $p < 0.01$ ，***表示 $p < 0.001$ ，****表示 $p < 0.0001$ ，ns 表示无统计学意义。

4 讨论

接种疫苗是预防病毒感染最有效和最经济的手段。部分人群接种 HTNV 灭活疫苗后，产生的中和抗体滴度较低、细胞免疫应答强度较弱，感染 HTNV 后仍会发生 HFRS^[25, 67, 126]。因此，需进一步探索和设计更为有效的 HTNV 疫苗。Steffensen 等^[127]

研究发现,能诱导亚优势表位(subdominant epitope) CTL 应答的疫苗可增加 T 细胞应答宽度,但有可能减弱 CTL 早期抗病毒感染作用。Eickhoff 等^[128]在研究克氏锥虫(*Trypanosoma cruzi*, TS)疫苗中发现,与可同时诱导优势表位(immunodominant epitope)和亚优势表位 CTL 免疫应答的疫苗比较,仅诱导优势表位 CTL 免疫应答的 TS 疫苗免疫保护作用更加显著和有效,提示 CTL 应答宽度的增加可能减弱优势表位 CTL 应答,降低疫苗免疫保护作用。而含亚优势表位的疫苗降低免疫保护作用的原因,可能是亚优势表位特异性 CTL 竞争性结合抗原提呈细胞(antigen-presenting cell, APC),空间上阻碍优势表位特异性 CTL 与 APC 的识别、结合,减少了优势表位效应 CTL 的产生,进而减弱了优势表位应答,使得早期病原体感染不能得到快速、有效地控制^[129]。HTNV 灭活疫苗免疫机体,可能同时诱导优势表位和亚优势表位特异性 CTL 应答,限制机体最佳 CTL 应答的产生。而 HTNV 多肽疫苗可诱导表位特异性 CTL 应答,应用 HTNV 优势表位作为疫苗,可诱导优势表位 CTL 应答,更加有效地预防 HTNV 感染。因此,鉴定 HTNV 保护性 T 细胞表位,挑选优势表位,可为设计更为安全和有效的 HTNV 多肽疫苗提供实验基础。

第一部分实验二中,我们已经证明 HLA-A*02 限制的 HTNV-GP CTL 表位具有免疫反应性,可在体外诱导特异性 CTL 分泌 IFN- γ 。接着我们选择 HLA-A*0201 亲和力和最高的 3 条 9 肽 VV9、SL9 和 LL9 分别免疫 HLA-A2.1/K^b Tg 小鼠,进行 HTNV 攻毒试验,通过比较不同组转基因小鼠主要脏器的 HTNV 抗原水平和病毒载量,判断 HTNV-GP 表位是否可在小鼠体内诱导保护性 CTL 应答,发挥抗病毒作用。HLA-A2.1/K^b 转基因小鼠 H-2K^b 基因的 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 结构域被 HLA-A*0201 基因的 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 替换,使得转基因小鼠细胞可提呈 HLA-A*0201 限制的多肽,模拟人体 CTL 应答过程^[23, 115],可用于建立 HTNV 体内感染复制模型,研究 HLA-A*0201 限制 HTNV-GP 表位特异性 CTL 应答,评价多肽疫苗保护效果。与 PBS 组和无关肽免疫对照组比较, VV9、SL9 和 LL9 表位分别免疫小鼠可显著降低攻毒后小鼠肝脏、脾脏或肾脏中 HTNV 抗原水平和病毒载量,表明 VV9、SL9 和 LL9 表位可在 HLA-A2.1/K^b 转基因小鼠体内诱导保护性 CTL 应答,并可能在 HLA-A*02⁺ HFRS 患者体内发挥相似的免疫保护作用。病原体的结构蛋白质具有丰富的多肽序列,但 CTL 应答倾向于有限的部分表位,这部分表位可优化作为候选多肽疫苗^[130]。LL9 表位免疫组小鼠肝脏、脾脏和肾脏中 HTNV 抗原水平和病毒载量均较 VV9 和 SL9 表位免疫组更低,其肾脏

中 HTNV 抗原水平和病毒载量甚至与 HFRS 疫苗免疫组相当,提示 LL9 表位可作为优势表位诱导更为强烈的保护性 CTL 应答,并在肾脏部位发挥更为显著的抗病毒作用。

早期研究发现,HTV-Gn 来源的表位较 NP 和 Gc 来源的表位具有更强的免疫原性,可诱导优势表位免疫应答,发挥免疫保护作用,可作为新型基因工程疫苗的主要候选者^[25, 27, 94]。本研究中,优势表位 LL9 (aa358-aa366) 同样位于 HTNV-Gn (aa19-aa648) 序列,而亚优势表位 VV9 (aa8-aa16) 和 SL9 (aa996-aa1004) 分别定位于信号肽序列 (aa1-aa18) 和 HTNV-Gc (aa649-aa1135) 序列。这是一个非常有趣的现象。HTV-Gn 的 C 末端有保守的酪氨酸残基,形成 ITAM (HTNV-Gn 位于 aa611-aa634),可促进 Gn 的泛素化,进而加快蛋白酶体对其降解^[54, 55]。蛋白酶体降解形成的内源性多肽与内质网内 HLA-I 类分子结合,经高尔基体提呈至细胞表面,供 CTL 识别,启动 CTL 应答^[95]。HTV 感染后,Gn 的 ITAM 序列增强蛋白酶体对 Gn 降解,使得 Gn 多肽快而多的形成,并被提呈至细胞表面供 CTL 识别和结合,产生高频率的 CTL 应答,这或许能够部分解释为何体内 Gn 相关疫苗诱导的 T 细胞应答抗病毒作用更加显著。推而广之,病原体蛋白质多肽片段的“随机”产生,因肽段自身或上下游氨基酸序列或蛋白质空间结构等因素影响,而具有一定的倾向性,使得某些肽段高概率或高频率地产生,相应的被 HLA-I 类分子提呈的概率或频率也较高,进而能够较快地被 CTL 识别。具备这种特征的肽段可作为优势表位,优势表位免疫机体,可使机体提前拥有优势表位效应 CTL 和(或)记忆 CTL。当病原体侵入机体细胞时,效应 CTL 和(或)记忆 CTL 能够高效率或高频率识别、杀伤感染细胞,在早期即能有效地控制胞内病原体的扩散。

HLA-I 类分子提呈的多肽长度通常为 8~10 个氨基酸,并对肽段上特定的 2~3 个位点具有一定的选择性,这些位点称锚定位点,对应氨基酸为锚定氨基酸。HLA-A*0201 限制的 9 肽表位,其锚定位点为 N 端第 2 位氨基酸(多为亮氨酸 L)和 C 末端氨基酸(多为缬氨酸 V 和亮氨酸 L)^[131, 132]。有趣的是,HTNV-GP LL9 多肽 LIWTGMIDL 在 SEOV (LIWRGLIDL) 和 DOBV (LIWEGYIDL) 中相对保守,锚定氨基酸并未发生改变,仅其余个别位点氨基酸产生变化。非锚定氨基酸的改变可影响肽段与 HLA-I 类分子的亲和力(或增强或减弱),但新近研究发现第 3, 6 和 7 位氨基酸突变对肽段免疫原性几乎没有影响^[131]。更令人兴奋的是, Valkenburg 等^[99]利

用较为保守的 IAV 蛋白来源的 HLA-A*0201 限制性多肽免疫 HLA-A2.1/K^b 转基因小鼠, 发现对不同 IAV 株可产生保护性免疫应答, 这可能是由于 TCR 识别个别位点突变的多肽片段后, 诱导自身 α 、 β 亚基发生一定程度的适应性改变而产生。ZIKV 和 DENV 感染模型中, 也发现了交叉反应的表位特异性 CTL, 并证实交叉反应性 CTL 对两种病毒感染均有保护作用^[101]。此外, 早期研究中, Hooper 等^[70]利用 HTNV-GP 基因构建 DNA 疫苗免疫小鼠, 发现 HTNV-GP DNA 疫苗在诱导抗 HTNV 感染的同时, 还可诱导小鼠产生抗 SEOV 和 DOBV 感染免疫应答。综上, 我们猜测相对保守的 LL9 表位在诱导机体抗 HTNV 感染的同时, 也可能发挥一定的抗 SEOV 和 DOBV 感染作用, 预防 HFRS 的发生。今后的研究中, 我们将用实验去验证 HTNV-GP LL9 表位是否可诱导交叉反应性 CTL 应答, 抗 SEOV 和 DOBV 感染。

利用多肽表位自身特点可发展新型的更为有效和安全的疫苗, 用于超敏反应^[75]、自身免疫病^[76]、心血管疾病^[77, 78]和肿瘤^[79-85]等的预防和治疗。近年来, 利用 HLA 分子限制的多肽表位诱导特异性 CTL 应答, 预防机体病毒感染也取得一定进展。Ando 等^[86]过继转移 HTLV-1 Tax180-188 表位脉冲致敏的大鼠树突状细胞, 可诱导 Tax180-188 表位特异性 CTL 应答, 促进感染大鼠受损 CTL 功能的恢复, 显著降低大鼠 HTLV-1 病毒载量。Elong^[90]等利用 HLA B*0702 转基因小鼠证实, DENV 多肽诱导的特异性 CTL 应答可降低小鼠病毒含量, 发挥免疫保护作用。我们鉴定得到 HLA-A*02 限制性 HTNV-GP CTL 表位 LL9, 可在 HLA-A2.1/K^b 转基因小鼠体内诱导显著的保护性 CTL 应答, 为推动 HTNV 新型多肽疫苗的设计及 HFRS 特异性治疗打下一定基础。人体肾脏是 HTNV 感染的主要靶器官之一, HTNV 感染后, 多出现肾损伤, 严重者甚至出现致死性 AKI。以往研究表明, HTNV 特异性 CTL 频率与尿素氮和肌酐水平呈负相关, 提示 HTNV 特异性 CTL 有助于降低 HFRS 患者肾损伤, 预防 AKI 的发生^[133, 134]。本研究发现, HTNV-GP LL9 表位免疫转基因小鼠后, 在小鼠肾脏部位可发挥更为显著的抗病毒作用, 提示基于 LL9 优势表位的 HTNV 疫苗可能有助于降低 HTNV 感染者肾脏损伤。而前期研究中, 我们鉴定得到 HLA-A*02 限制的 HTNV-NP CTL 表位 FA9 在肝脏和脾脏抗病毒作用更为显著^[23], 这可能是组织地址素 (addressin) 分布差异、特异性 CTL 归巢受体 (homing receptor) 表达差异和组织特异性 APC 功能差异等多因素共同决定, 最终引起不同表位特异性 CTL 组织分布的倾向性^[135-137]。

该研究已证明，LL9 表位可作为优势表位诱导较佳的保护性 CTL 应答，并在肾脏部位发挥显著的抗病毒作用。基于此，在后续研究中，我们将对 LL9 表位进行优化，在保留多肽疫苗特异性强、安全性高及容易保存的优点基础上，进一步增强其免疫原性、延长其半衰期，如联合 T、B 细胞表位和设计脂肽疫苗等，为设计新型 HTNV 多肽疫苗打下基础。

小 结

1. 首次证实 HLA-A*02 限制的 HTNV-GP 表位特异性 CTL 应答以免疫保护为主，与 HFRS 患者病情相关，轻型/中型患者特异性 CTL 频率高于重型/危重型患者。
2. HTNV-GP 9 肽可在体外刺激 HLA-A*02 HFRS 患者效应 CTL 分泌 IFN- γ ，可能与免疫保护有关。
3. HLA-A*02 限制性 HTNV-GP CTL 表位免疫 HLA-A2.1/K^b 转基因小鼠，可降低攻毒后小鼠主要脏器 HTNV 抗原水平和病毒载量；LIWTGMIDL 表位特异性 CTL 应答可在肾脏部位发挥更为显著的免疫保护作用。
4. 以上发现和实验结果，不仅对深入了解 HTNV 感染后细胞免疫分子机制有理论意义，而且为设计新型 HTNV 多肽疫苗提供了重要的实验依据。

参考文献

- [1] International Committee on Taxonomy of Viruses (2018) Taxonomy. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>. Accessed 15 Mar 2018.
- [2] Kruger D H, Figueiredo L T, Song J W, et al. Hantaviruses--globally emerging pathogens [J]. *Journal of Clinical Virology*. 2015, 64: 128-136.
- [3] Watson D C, Sargianou M, Papa A, et al. Epidemiology of Hantavirus infections in humans: A comprehensive, global overview [J]. *Critical Reviews in Microbiology*. 2014, 40 (3): 261-272.
- [4] Zou L X, Chen M J, Sun L. Haemorrhagic fever with renal syndrome: literature review and distribution analysis in China [J]. *International Journal of Infectious Diseases*. 2016, 43: 95-100.
- [5] Jiang H, Du H, Wang L M, et al. Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome: Pathogenesis and Clinical Picture [J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2016, 6: 1.
- [6] Lee H W, Vaheri A, Schmaljohn C S. Discovery of hantaviruses and of the Hantavirus genus: personal and historical perspectives of the Presidents of the International Society of Hantaviruses [J]. *Virus Research*. 2014, 187: 2-5.
- [7] Reynes J M, Razafindralambo N K, Lacoste V, et al. Anjozorobe hantavirus, a new genetic variant of Thailand virus detected in rodents from Madagascar [J]. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*. 2014, 14 (3): 212-219.
- [8] Zhang Y H, Ge L, Liu L, et al. The epidemic characteristics and changing trend of hemorrhagic fever with renal syndrome in Hubei Province, China [J]. *PloS One*. 2014, 9 (3): e92700.
- [9] Muyangwa M, Martynova E V, Khaiboullina S F, et al. Hantaviral Proteins: Structure,

- Functions, and Role in Hantavirus Infection [J]. *Frontiers in Microbiology*. 2015, 6: 1326.
- [10] Kim J A, Kim W K, No J S, et al. Genetic Diversity and Reassortment of Hantaan Virus Tripartite RNA Genomes in Nature, the Republic of Korea [J]. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2016, 10 (6): e0004650.
- [11] Sargianou M, Watson D C, Chra P, et al. Hantavirus infections for the clinician: from case presentation to diagnosis and treatment [J]. *Critical Reviews in Microbiology*. 2012, 38 (4): 317-329.
- [12] Ma Y, Yuan B, Zhuang R, et al. Hantaan virus infection induces both Th1 and ThGranzyme B+ cell immune responses that associated with viral control and clinical outcome in humans [J]. *PLoS Pathogens*. 2015, 11 (4): e1004788.
- [13] Vaheri A, Strandin T, Hepojoki J, et al. Uncovering the mysteries of hantavirus infections [J]. *Nature Reviews: Microbiology*. 2013, 11 (8): 539-550.
- [14] Liu J M, Zhu Y, Xu Z W, et al. Dynamic changes of apoptosis-inducing ligands and Th1/Th2 like subpopulations in Hantaan virus-induced hemorrhagic fever with renal syndrome [J]. *Clinical Immunology*. 2006, 119 (3): 245-251.
- [15] Wang M, Wang J, Zhu Y, et al. Cellular immune response to Hantaan virus nucleocapsid protein in the acute phase of hemorrhagic fever with renal syndrome: correlation with disease severity [J]. *Journal of Infectious Diseases*. 2009, 199 (2): 188-195.
- [16] Ma Y, Wang J, Yuan B, et al. HLA-A2 and B35 restricted hantaan virus nucleoprotein CD8+ T-cell epitope-specific immune response correlates with milder disease in hemorrhagic fever with renal syndrome [J]. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2013, 7 (2): e2076.
- [17] Araki K, Yoshimatsu K, Lee B H, et al. Hantavirus-Specific CD8+-T-Cell Responses in Newborn Mice Persistently Infected with Hantaan Virus [J]. *Journal of Virology*. 2003, 77 (15): 8408-8417.

- [18] Araki K, Yoshimatsu K, Lee B H, et al. A new model of Hantaan virus persistence in mice: the balance between HTNV infection and CD8(+) T-cell responses [J]. *Virology*. 2004, 322 (2): 318-327.
- [19] Terajima M, Van Epps H L, Fau - Li D, Li D Fau - Leporati A M, et al. Generation of recombinant vaccinia viruses expressing Puumala virus proteins and use in isolating cytotoxic T cells specific for Puumala virus [J]. *Virus Research*. 2002, 84 (1-2): 66-67.
- [20] Van Epps H L, Schmaljohn C S, Ennis F A. Human memory cytotoxic T-lymphocyte (CTL) responses to Hantaan virus infection: identification of virus-specific and cross-reactive CD8(+) CTL epitopes on nucleocapsid protein [J]. *Journal of Virology*. 1999, 73 (7): 5301-5308.
- [21] Van Epps H L, Terajima M, Mustonen J, et al. Long-lived Memory T Lymphocyte Responses After Hantavirus Infection [J]. *Journal of Experimental Medicine*. 2002, 196 (5): 579-588.
- [22] Wang M, Zhu Y, Wang J, et al. Identification of three novel CTL epitopes within nucleocapsid protein of Hantaan virus [J]. *Viral Immunology*. 2011, 24 (6): 449-454.
- [23] Ma Y, Cheng L, Yuan B, et al. Structure and Function of HLA-A*02-Restricted Hantaan Virus Cytotoxic T-Cell Epitope That Mediates Effective Protective Responses in HLA-A2.1/K(b) Transgenic Mice [J]. *Frontiers in Immunology*. 2016, 7: 298.
- [24] Hooper J W, Josleyn M, Ballantyne J, et al. A novel Sin Nombre virus DNA vaccine and its inclusion in a candidate pan-hantavirus vaccine against hantavirus pulmonary syndrome (HPS) and hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) [J]. *Vaccine*. 2013, 31 (40): 4314-4321.
- [25] Cheng L, Yu L, Wu X, et al. Induction of specific humoral and cellular immune responses in a mouse model following gene fusion of HSP70C and Hantaan virus Gn and S0.7 in an adenoviral vector [J]. *PloS One*. 2014, 9 (2): e88183.
- [26] Kilpatrick E D, Terajima M, Koster F T, et al. Role of Specific CD8+ T Cells in the

Severity of a Fulminant Zoonotic Viral Hemorrhagic Fever, Hantavirus Pulmonary Syndrome [J]. *Journal of Immunology*. 2004, 172 (5): 3297-3304.

[27] Manigold T, Mori A, Graumann R, et al. Highly differentiated, resting gn-specific memory CD8+ T cells persist years after infection by andes hantavirus [J]. *PLoS Pathogens*. 2010, 6 (2): e1000779.

[28] Shen C, Zhu B, Liu M, et al. Genetic Polymorphisms at HLA-A, -B, and -DRB1 Loci in Han Population of Xi'an City in China [J]. *Croatian Medical Journal*. 2008, 49 (4): 476-482.

[29] Shen C M, Zhu B F, Ye S H, et al. Allelic diversity and haplotype structure of HLA loci in the Chinese Han population living in the Guanzhong region of the Shaanxi province [J]. *Human Immunology*. 2010, 71 (6): 627-633.

[30] 马樱. 汉滩病毒结构蛋白 T 细胞抗原表位的鉴定及特异性细胞免疫应答研究 [D]. 西安: 第四军医大学, 2013: 1-86.

[31] Xiao D, Wu K, Tan X, et al. The impact of the vaccination program for hemorrhagic fever with renal syndrome in Hu County, China [J]. *Vaccine*. 2014, 32 (6): 740-745.

[32] Zhang Y Z. Discovery of hantaviruses in bats and insectivores and the evolution of the genus Hantavirus [J]. *Virus Research*. 2014, 187: 15-21.

[33] Khaiboullina S F, Levis S, Morzunov S P, et al. Serum Cytokine Profiles Differentiating Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome and Hantavirus Pulmonary Syndrome [J]. *Frontiers in Immunology*. 2017, 8: 567.

[34] Witkowski P T, Perley C C, Brocato R L, et al. Gastrointestinal Tract As Entry Route for Hantavirus Infection [J]. *Frontiers in Microbiology*. 2017, 8: 1721.

[35] Tian H, Yu P, Cazelles B, et al. Interannual cycles of Hantaan virus outbreaks at the human-animal interface in Central China are controlled by temperature and rainfall [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2017, 114 (30): 8041-8046.

- [36] Tian H, Yu P, Bjornstad O N, et al. Anthropogenically driven environmental changes shift the ecological dynamics of hemorrhagic fever with renal syndrome [J]. *PLoS Pathogens*. 2017, 13 (1): e1006198.
- [37] de St Maurice A, Ervin E, Schumacher M, et al. Exposure Characteristics of Hantavirus Pulmonary Syndrome Patients, United States, 1993-2015 [J]. *Emerging Infectious Diseases*. 2017, 23 (5): 733-739.
- [38] Jiang H, Zheng X, Wang L, et al. Hantavirus infection: a global zoonotic challenge [J]. *Virologica Sinica*. 2017, 32 (1): 32-43.
- [39] Liang W, Gu X, Li X, et al. Mapping the epidemic changes and risks of hemorrhagic fever with renal syndrome in Shaanxi Province, China, 2005-2016 [J]. *Scientific Reports*. 2018, 8 (1): 749.
- [40] Vilibic-Cavlek T, Furic A, Barbic L, et al. Clinical and virological characteristics of hantavirus infections in a 2014 Croatian outbreak [J]. *Journal of Infection in Developing Countries*. 2017, 11 (1): 73-80.
- [41] Rista E, Pilaca A, Akshija I, et al. Hemorrhagic fever with renal syndrome in Albania. Focus on predictors of acute kidney injury in HFRS [J]. *Journal of Clinical Virology*. 2017, 91: 25-30.
- [42] Nunez J J, Fritz C L, Knust B, et al. Hantavirus infections among overnight visitors to Yosemite National Park, California, USA, 2012 [J]. *Emerging Infectious Diseases*. 2014, 20 (3): 386-393.
- [43] Liu Z, Zhao Q, Han Q, et al. Serum thrombospondin-1 is altered in patients with hemorrhagic fever with renal syndrome [J]. *Journal of Medical Virology*. 2008, 80 (10): 1799-1803.
- [44] Hepojoki J, Strandin T, Lankinen H, et al. Hantavirus structure--molecular interactions behind the scene [J]. *Journal of General Virology*. 2012, 93 (8): 1631-1644.

- [45] Hussein I T, Haseeb A, Haque A, et al. Recent advances in hantavirus molecular biology and disease [J]. *Advances in Applied Microbiology*. 2011, 74: 35-75.
- [46] Jaaskelainen K M, Kaukinen P, Minskaya E S, et al. Tula and Puumala hantavirus NSs ORFs are functional and the products inhibit activation of the interferon-beta promoter [J]. *Journal of Medical Virology*. 2007, 79 (10): 1527-1536.
- [47] van Knippenberg I, Fragkoudis R, Elliott R M. The transient nature of Bunyamwera orthobunyavirus NSs protein expression: effects of increased stability of NSs protein on virus replication [J]. *PloS One*. 2013, 8 (5): e64137.
- [48] Huiskonen J T, Hepojoki J, Laurinmaki P, et al. Electron cryotomography of Tula hantavirus suggests a unique assembly paradigm for enveloped viruses [J]. *Journal of Virology*. 2010, 84 (10): 4889-4897.
- [49] Guo Y, Wang W, Sun Y, et al. Crystal Structure of the Core Region of Hantavirus Nucleocapsid Protein Reveals the Mechanism for Ribonucleoprotein Complex Formation [J]. *Journal of Virology*. 2016, 90 (2): 1048-1061.
- [50] Olal D, Daumke O. Structure of the Hantavirus Nucleoprotein Provides Insights into the Mechanism of RNA Encapsidation [J]. *Cell Reports*. 2016, 14 (9): 2092-2099.
- [51] Yoshimatsu K, Arikawa J. Antigenic properties of N protein of hantavirus [J]. *Viruses*. 2014, 6 (8): 3097-3109.
- [52] Lundkvist A, Kallio-Kokko H, Sjolander K B, et al. Characterization of Puumala virus nucleocapsid protein: identification of B-cell epitopes and domains involved in protective immunity [J]. *Virology*. 1996, 216 (2): 397-406.
- [53] Li S, Rissanen I, Zeltina A, et al. A Molecular-Level Account of the Antigenic Hantaviral Surface [J]. *Cell Reports*. 2016, 15 (5): 959-967.
- [54] Geimonen E, Fernandez I, Gavrilovskaya I N, et al. Tyrosine Residues Direct the Ubiquitination and Degradation of the NY-1 Hantavirus G1 Cytoplasmic Tail [J]. *Journal*

of Virology. 2003, 77 (20): 10760-10868.

[55] Schountz T, Prescott J. Hantavirus immunology of rodent reservoirs: current status and future directions [J]. Viruses. 2014, 6 (3): 1317-1335.

[56] Rissanen I, Stass R, Zeltina A, et al. Structural Transitions of the Conserved and Metastable Hantaviral Glycoprotein Envelope [J]. Journal of Virology. 2017, 91 (21).

[57] Zheng F, Ma L X, Shao L H, et al. Envelope glycoproteins of hantavirus can mediate cell-cell fusion independently [J]. New Microbiologica. 2007, 30 (2): 101-107.

[58] Ogino M, Yoshimatsu K, Ebihara H, et al. Cell fusion activities of Hantaan virus envelope glycoproteins [J]. Journal of Virology. 2004, 78 (19): 10776-10782.

[59] Schmaljohn C S. Vaccines for hantaviruses: progress and issues [J]. Expert Review of Vaccines. 2012, 11 (5): 511-513.

[60] Schmaljohn C S, Spik K W, Hooper J W. DNA vaccines for HFRS: laboratory and clinical studies [J]. Virus Research. 2014, 187: 91-96.

[61] B H. Vaccines against hantaviruses [J]. Expert Review of Vaccines. 2002 1(3): 373-384.

[62] Dong G M, Han L, An Q, et al. Immunization effect of purified bivalent vaccine to haemorrhagic fever with renal syndrome manufactured from primary cultured hamster kidney cells [J]. Chinese Medical Journal (Engl). 2005, 118 (9): 766-768.

[63] Song J Y, Woo H J, Cheong H J, et al. Long-term immunogenicity and safety of inactivated Hantaan virus vaccine (Hantavax) in healthy adults [J]. Vaccine. 2016, 34 (10): 1289-1295.

[64] Zheng Y, Zhou B Y, Wei J, et al. Persistence of immune responses to vaccine against haemorrhagic fever with renal syndrome in healthy adults aged 16-60 years: results from an open-label 2-year follow-up study [J]. Infectious Diseases (Lond). 2017: 1-6.

[65] Jung J, Ko S J, Oh H S, et al. Protective effectiveness of inactivated hantavirus

vaccine against hemorrhagic fever with renal syndrome [J]. *Journal of Infectious Diseases*. 2018.

[66] Li K, Li P Y, Wu X A, et al. Induction of Hantaan virus-specific immune responses in C57BL/6 mice by immunization with a modified recombinant adenovirus containing the chimeric gene, GcS0.7 [J]. *International Journal of Molecular Medicine*. 2013, 32 (3): 709-716.

[67] Yu L, Bai W, Wu X, et al. A recombinant pseudotyped lentivirus expressing the envelope glycoprotein of hantaan virus induced protective immunity in mice [J]. *Virology Journal*. 2013, 10: 301.

[68] Jiang D B, Sun L J, Cheng L F, et al. Recombinant DNA vaccine of Hantavirus Gn and LAMP1 induced long-term immune protection in mice [J]. *Antiviral Research*. 2017, 138: 32-39.

[69] Custer D M, Thompson E, Schmaljohn C S, et al. Active and passive vaccination against hantavirus pulmonary syndrome with Andes virus M genome segment-based DNA vaccine [J]. *Journal of Virology*. 2003, 77 (18): 9894-9905.

[70] Hooper J W, Custer D M, Thompson E, et al. DNA vaccination with the Hantaan virus M gene protects Hamsters against three of four HFRS hantaviruses and elicits a high-titer neutralizing antibody response in Rhesus monkeys [J]. *Journal of Virology*. 2001, 75 (18): 8469-8477.

[71] Li J, Li K N, Gao J, et al. Heat shock protein 70 fused to or complexed with hantavirus nucleocapsid protein significantly enhances specific humoral and cellular immune responses in C57BL/6 mice [J]. *Vaccine*. 2008, 26 (25): 3175-3187.

[72] Cheng L F, Wang F, Zhang L, et al. Incorporation of GM-CSF or CD40L Enhances the Immunogenicity of Hantaan Virus-Like Particles [J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2016, 6: 185.

[73] Hooper J W, Moon J E, Paolino K M, et al. A Phase 1 clinical trial of Hantaan virus

and Puumala virus M-segment DNA vaccines for haemorrhagic fever with renal syndrome delivered by intramuscular electroporation [J]. *Clinical Microbiology and Infection*. 2014, 20 (Suppl 5): 110-117.

[74] 李少华, 唐康, 张春梅, 等. 联合 T、B 细胞表位设计多肽疫苗的研究进展 [J]. *中国免疫学杂志*. 2017, 33: 136-139.

[75] Osborne R. Synthetic peptide allergy vaccine shows efficacy [J]. *Nature Biotechnology*. 2013, 31 (5): 371-372.

[76] Wang X, Zhang J, Baylink D J, et al. Targeting Non-classical Myelin Epitopes to Treat Experimental Autoimmune Encephalomyelitis [J]. *Scientific Reports*. 2016, 6: 36064.

[77] Watanabe R, Suzuki J I, Wakayama K, et al. A peptide vaccine targeting angiotensin II attenuates the cardiac dysfunction induced by myocardial infarction [J]. *Scientific Reports*. 2017, 7: 43920.

[78] Gistera A, Hermansson A, Strodthoff D, et al. Vaccination against T-cell epitopes of native ApoB100 reduces vascular inflammation and disease in a humanized mouse model of atherosclerosis [J]. *Journal of Internal Medicine*. 2017, 281 (4): 383-397.

[79] Kuai R, Ochyl L J, Bahjat K S, et al. Designer vaccine nanodiscs for personalized cancer immunotherapy [J]. *Nature Materials*. 2017, 16 (4): 489-496.

[80] Baumgaertner P, Costa Nunes C, Cachot A, et al. Vaccination of stage III/IV melanoma patients with long NY-ESO-1 peptide and CpG-B elicits robust CD8+ and CD4+ T-cell responses with multiple specificities including a novel DR7-restricted epitope [J]. *Oncoimmunology*. 2016, 5 (10): e1216290.

[81] Wang X P, Wang Q X, Lin H P, et al. Recombinant heat shock protein 70 functional peptide and alpha-fetoprotein epitope peptide vaccine elicits specific anti-tumor immunity [J]. *Oncotarget*. 2016, 7 (44): 71274-71284.

[82] Nakagawa H, Mizukoshi E, Kobayashi E, et al. Association Between High-Avidity

T-Cell Receptors, Induced by alpha-Fetoprotein-Derived Peptides, and Anti-Tumor Effects in Patients With Hepatocellular Carcinoma [J]. *Gastroenterology*. 2017.

[83] Kunert A, van Brakel M, van Steenbergen-Langeveld S, et al. MAGE-C2-Specific TCRs Combined with Epigenetic Drug-Enhanced Antigenicity Yield Robust and Tumor-Selective T Cell Responses [J]. *Journal of Immunology*. 2016, 197 (6): 2541-2552.

[84] Belnoue E, Di Bernardino-Besson W, Gaertner H, et al. Enhancing Antitumor Immune Responses by Optimized Combinations of Cell-penetrating Peptide-based Vaccines and Adjuvants [J]. *Molecular Therapy*. 2016, 24 (9): 1675-1685.

[85] Capasso C, Hirvonen M, Garofalo M, et al. Oncolytic adenoviruses coated with MHC-I tumor epitopes increase the antitumor immunity and efficacy against melanoma [J]. *Oncoimmunology*. 2016, 5 (4): e1105429.

[86] Ando S, Hasegawa A, Murakami Y, et al. HTLV-1 Tax-Specific CTL Epitope-Pulsed Dendritic Cell Therapy Reduces Proviral Load in Infected Rats with Immune Tolerance against Tax [J]. *Journal of Immunology*. 2017, 198 (3): 1210-1219.

[87] Shi J, Sun J, Wu M, et al. Inferring Protective CD8+ T-Cell Epitopes for NS5 Protein of Four Serotypes of Dengue Virus Chinese Isolates Based on HLA-A, -B and -C Allelic Distribution: Implications for Epitope-Based Universal Vaccine Design [J]. *PloS One*. 2015, 10 (9): e0138729.

[88] Sheikh Q M, Gatherer D, Reche P A, et al. Towards the knowledge-based design of universal influenza epitope ensemble vaccines [J]. *Bioinformatics*. 2016, 32 (21): 3233-3239.

[89] Holtappels R, Lemmermann N A, Podlech J, et al. Reconstitution of CD8 T Cells Protective against Cytomegalovirus in a Mouse Model of Hematopoietic Cell Transplantation: Dynamics and Inessentiality of Epitope Immunodominance [J]. *Frontiers in Immunology*. 2016, 7: 232.

[90] Elong Ngono A, Chen H W, Tang W W, et al. Protective Role of Cross-Reactive CD8

- T Cells Against Dengue Virus Infection [J]. *EBioMedicine*. 2016, 13: 284-293.
- [91] Van Epps H L, Terajima M, Mustonen J, et al. Long-lived memory T lymphocyte responses after hantavirus infection [J]. *Journal of Experimental Medicine*. 2002, 196 (5): 579-588.
- [92] Ennis F A, Cruz J, Spiropoulou C F, et al. Hantavirus pulmonary syndrome: CD8+ and CD4+ cytotoxic T lymphocytes to epitopes on Sin Nombre virus nucleocapsid protein isolated during acute illness [J]. *Virology*. 1997, 238 (2): 380-390.
- [93] Sankar S, Ramamurthy M, Nandagopal B, et al. Short peptide epitope design from hantaviruses causing HFRS [J]. *Bioinformatics*. 2017, 13 (7): 231-236.
- [94] Ma R X, Cheng L F, Ying Q K, et al. Screening and Identification of an H-2Kb-Restricted CTL Epitope within the Glycoprotein of Hantaan Virus [J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2016, 6: 151.
- [95] Liepe J, Marino F, Sidney J, et al. A large fraction of HLA class I ligands are proteasome-generated spliced peptides [J]. *Science*. 2016, 354 (6310): 354-358.
- [96] Guivier E, Galan M, Henttonen H, et al. Landscape features and helminth co-infection shape bank vole immunoheterogeneity, with consequences for Puumala virus epidemiology [J]. *Heredity*. 2014, 112 (3): 274-281.
- [97] Wang M, Wang J, Kang Z, et al. Kinetics and Immunodominance of Virus-Specific T Cell Responses During Hantaan Virus Infection [J]. *Viral Immunology*. 2015, 28 (5): 265-271.
- [98] Koivula T T, Tuulasvaara A, Hetemaki I, et al. Regulatory T cell response correlates with the severity of human hantavirus infection [J]. *Journal of Infection*. 2014, 68 (4): 387-394.
- [99] Valkenburg S A, Josephs T M, Clemens E B, et al. Molecular basis for universal HLA-A*0201-restricted CD8+ T-cell immunity against influenza viruses [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016, 113 (16):

4440-4445.

[100] Sridhar S, Begom S, Bermingham A, et al. Cellular immune correlates of protection against symptomatic pandemic influenza [J]. *Nature Medicine*. 2013, 19 (10): 1305-1312.

[101] Wen J, Tang W W, Sheets N, et al. Identification of Zika virus epitopes reveals immunodominant and protective roles for dengue virus cross-reactive CD8⁺ T cells [J]. *Nature Microbiology*. 2017, 2: 17036.

[102] Youngblood B, Hale J S, Kissick H T, et al. Effector CD8 T cells dedifferentiate into long-lived memory cells [J]. *Nature*. 2017, 552 (7685): 404-409.

[103] Araki K, Morita M, Bederman A G, et al. Translation is actively regulated during the differentiation of CD8(+) effector T cells [J]. *Nature Immunology*. 2017, 18 (9): 1046-1057.

[104] Akondy R S, Fitch M, Edupuganti S, et al. Origin and differentiation of human memory CD8 T cells after vaccination [J]. *Nature*. 2017, 552 (7685): 362-367.

[105] Anikeeva N, Grosso D, Flomenberg N, et al. Evaluating frequency and quality of pathogen-specific T cells [J]. *Nature Communications*. 2016, 7: 13264.

[106] Afonso G, Scotto M, Renand A, et al. Critical parameters in blood processing for T-cell assays: validation on ELISpot and tetramer platforms [J]. *Journal of Immunological Methods*. 2010, 359 (1-2): 28-36.

[107] Maecker H T, Hassler J, Payne J K, et al. Precision and linearity targets for validation of an IFN γ ELISPOT, cytokine flow cytometry, and tetramer assay using CMV peptides [J]. *BMC Immunology*. 2008, 9: 9.

[108] Nauerth M, Stemberger C, Mohr F, et al. Flow cytometry-based TCR-ligand Koff-rate assay for fast avidity screening of even very small antigen-specific T cell populations ex vivo [J]. *Cytometry A*. 2016, 89 (9): 816-825.

[109] Bentzen A K, Marquard A M, Lyngaa R, et al. Large-scale detection of

antigen-specific T cells using peptide-MHC-I multimers labeled with DNA barcodes [J]. *Nature Biotechnology*. 2016, 34 (10): 1037-1045.

[110] Welsh R M. Assessing CD8 T cell number and dysfunction in the presence of antigen [J]. *Journal of Experimental Medicine*. 2001, 193 (5): F19-22.

[111] Tang K, Cheng L, Zhang C, et al. Novel Identified HLA-A*0201-Restricted Hantaan Virus Glycoprotein Cytotoxic T-Cell Epitopes Could Effectively Induce Protective Responses in HLA-A2.1/K(b) Transgenic Mice May Associate with the Severity of Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome [J]. *Frontiers in Immunology*. 2017, 8: 1797.

[112] Alexander J, Bilsel P, del Guercio M F, et al. Universal influenza DNA vaccine encoding conserved CD4+ T cell epitopes protects against lethal viral challenge in HLA-DR transgenic mice [J]. *Vaccine*. 2010, 28 (3): 664-672.

[113] Snyder J T, Belyakov I M, Dzutsev A, et al. Protection against lethal vaccinia virus challenge in HLA-A2 transgenic mice by immunization with a single CD8+ T-cell peptide epitope of vaccinia and variola viruses [J]. *Journal of Virology*. 2004, 78 (13): 7052-7060.

[114] Lacey S F, La Rosa C, Kaltcheva T, et al. Characterization of immunologic properties of a second HLA-A2 epitope from a granule protease in CML patients and HLA-A2 transgenic mice [J]. *Blood*. 2011, 118 (8): 2159-2169.

[115] Zhao K, Yang B, Xu Y, et al. CD8+ T cell response in HLA-A*0201 transgenic mice is elicited by epitopes from SARS-CoV S protein [J]. *Vaccine*. 2010, 28 (41): 6666-6674.

[116] Taruishi M, Yoshimatsu K, Araki K, et al. Analysis of the immune response of Hantaan virus nucleocapsid protein-specific CD8+ T cells in mice [J]. *Virology*. 2007, 365 (2): 292-301.

[117] Heath S L, Sabbaj S, Bansal A, et al. CD8 T-cell proliferative capacity is compromised in primary HIV-1 infection [J]. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 2011, 56 (3): 213-221.

[118] Albiero E, Amati E, Baumeister E, et al. Heterogeneity of Specific CD4+ and CD8+

T Cells Stimulated by CMV pp65 and IE1 Antigens [J]. *Journal of Immunotherapy*. 2016, 39 (9): 329-342.

[119] Szabo S J, Sullivan B M, Stemmann C, et al. Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells [J]. *Science*. 2002, 295 (5553): 338-342.

[120] Parker B S, Rautela J, Hertzog P J. Antitumour actions of interferons: implications for cancer therapy [J]. *Nature Reviews: Cancer*. 2016, 16 (3): 131-144.

[121] Hotter D, Kirchhoff F. Interferons and beyond: Induction of antiretroviral restriction factors [J]. *Journal of Leukocyte Biology*. 2018, 103 (3): 465-477.

[122] Tuuminen T, Kekalainen E, Makela S, et al. Human CD8+ T Cell Memory Generation in Puumala Hantavirus Infection Occurs after the Acute Phase and Is Associated with Boosting of EBV-Specific CD8+ Memory T Cells [J]. *Journal of Immunology*. 2007, 179 (3): 1988-1995.

[123] Xu Y, Theobald V, Sung C, et al. Validation of a HLA-A2 tetramer flow cytometric method, IFN-gamma real time RT-PCR, and IFN-gamma ELISPOT for detection of immunologic response to gp100 and MelanA/MART-1 in melanoma patients [J]. *Journal of Translational Medicine*. 2008, 6: 61.

[124] Cornberg M, Kenney L L, Chen A T, et al. Clonal exhaustion as a mechanism to protect against severe immunopathology and death from an overwhelming CD8 T cell response [J]. *Frontiers in Immunology*. 2013, 4: 475.

[125] Xiong Y, Luscher M A, Altman J D, et al. Simian immunodeficiency virus (SIV) infection of a rhesus macaque induces SIV-specific CD8(+) T cells with a defect in effector function that is reversible on extended interleukin-2 incubation [J]. *Journal of Virology*. 2001, 75 (6): 3028-3033.

[126] Chen Y, Yang X, Ye F, et al. History of incomplete vaccination may associate with occurrence of hemorrhagic fever with renal syndrome with relieved clinical symptoms [J].

Journal of Medical Virology. 2016, 88 (7): 1168-1172.

[127] Steffensen M A, Pedersen L H, Jahn M L, et al. Vaccine Targeting of Subdominant CD8+ T Cell Epitopes Increases the Breadth of the T Cell Response upon Viral Challenge, but May Impair Immediate Virus Control [J]. Journal of Immunology. 2016, 196 (6): 2666-2676.

[128] Eickhoff C S, Zhang X, Vasconcelos J R, et al. Costimulatory Effects of an Immunodominant Parasite Antigen Paradoxically Prevent Induction of Optimal CD8 T Cell Protective Immunity [J]. PLoS Pathogens. 2016, 12 (9): e1005896.

[129] Johnson L R, Weizman O E, Rapp M, et al. Epitope-Specific Vaccination Limits Clonal Expansion of Heterologous Naive T Cells during Viral Challenge [J]. Cell Reports. 2016, 17 (3): 636-644.

[130] Connelley T K, Li X, MacHugh N, et al. CD8 T-cell responses against the immunodominant Theileria parva peptide Tp249-59 are composed of two distinct populations specific for overlapping 11-mer and 10-mer epitopes [J]. Immunology. 2016, 149 (2): 172-185.

[131] Lasso P, Cardenas C, Guzman F, et al. Effect of secondary anchor amino acid substitutions on the immunogenic properties of an HLA-A*0201-restricted T cell epitope derived from the Trypanosoma cruzi KMP-11 protein [J]. Peptides. 2016, 78: 68-76.

[132] Rossjohn J, Gras S, Miles J J, et al. T cell antigen receptor recognition of antigen-presenting molecules [J]. Annual Review of Immunology. 2015, 33: 169-200.

[133] Xie M, Dong Y, Zhou Y, et al. Levels of HTNV-specific CD8+ T lymphocytes in PBMC from the patients with hemorrhagic fever with renal syndrome [J]. Internal and Emergency Medicine. 2013, 8 (6): 503-508.

[134] Khaiboullina S F, Martynova E V, Khamidullina Z L, et al. Upregulation of IFN-gamma and IL-12 is associated with a milder form of hantavirus hemorrhagic fever with renal syndrome [J]. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious

Diseases. 2014, 33 (12): 2149-2156.

[135] Qu D, Lanier G, Yuan Z H, et al. Localization of CD8+ cells specific for hepatitis B virus surface protein in the liver of immunized mice [J]. Journal of Medical Virology. 2008, 80 (2): 225-232.

[136] Belkaid Y, Oldenhove G. Tuning microenvironments: induction of regulatory T cells by dendritic cells [J]. Immunity. 2008, 29 (3): 362-371.

[137] Takamura S, Roberts A D, Jelley-Gibbs D M, et al. The route of priming influences the ability of respiratory virus-specific memory CD8+ T cells to be activated by residual antigen [J]. Journal of Experimental Medicine. 2010, 207 (6): 1153-1160.

个人简历及研究成果

个人简历

- 2010.9-2015.6 四川大学华西基础医学与法医学院 五年制基础医学专业
获学士学位
- 2015.9-2018.9 空军军医大学（第四军医大学） 免疫学专业
攻读硕士学位

学术论文

- [1] **Tang K**, Cheng LF, Zhang CM, Zhang YS, Zheng XY, Zhang Y, Zhuang R, Jin BQ, Zhang FL* and Ma Y*. Novel Identified HLA-A*0201-Restricted Hantaan Virus Glycoprotein Cytotoxic T-cell Epitopes Could Effectively Induce Protective Responses in HLA-A2.1/K(b) Transgenic Mice May Associate with the Severity of Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome. *Front Immunol*, 2017, 8:1797. (IF: 6.429)
- [2] **Tang K**, Zhang CM, Zhang YS, Zhang Y, Zhuang R, Jin BQ* and Ma Y*. Sustained High Levels of Both Total and High Molecular Weight Adiponectin in Plasma during the Convalescent Phase of Haemorrhagic Fever with Renal Syndrome Are Associated with Disease Severity. *J Immunol Res*, 2017, 2017:6468097. (IF=3.276)
- [3] **Tang K**, Zhang CM, Zhang YS, Zhang Y, Zhuang R, Jin BQ* and Ma Y*. Elevated Plasma Soluble CD14 Levels Correlate with the Monocyte Response Status During Hantaan Virus Infection in Humans. *Viral Immunol*, 2015, 28(8):442-447. (IF=1.432)
- [4] Zhang CM, **Tang K (co-first author)**, Zhang YS, Ma Y, Zhuang R, Zheng XY, Jin BQ* and Zhang Y*. Elevated Plasma Growth Arrest-Specific 6 Protein Levels Are Associated with the Severity of Disease During Hantaan Virus Infection in Humans. *Viral Immunol*, 2017, 30(5):330-335. (IF=1.432)
- [5] 唐康, 金伯泉. 单核细胞亚群的研究进展 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2016, 32 (6): 840-844.

- [6] Ma Y, Cheng LF, Yuan B, Zhang YS, Zhang CM, Zhang Y, **Kang T**, Zhuang R, Chen LH, Yang K, Zhang FL* and Jin BQ*. Structure and Function of HLA-A*02-Restricted Hantaan Virus Cytotoxic T-Cell Epitope That Mediates Effective Protective Responses in HLA-A2.1/K(b) Transgenic Mice. *Front Immunol*, 2016, 7:298. (IF=6.429)
- [7] Zheng XY, Bian PY, Ye CT, Ye W, Ma HW, **Tang K**, Zhang CM, Lei YF, Wei X, Wang PZ, Huang CX, Bai XF, Zhang Y* and Jia ZS*. Interferon-Induced Transmembrane Protein 3 Inhibits Hantaan Virus Infection, and Its Single Nucleotide Polymorphism rs12252 Influences the Severity of Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome. *Front Immunol*, 2016, 7:535. (IF=6.429)
- [8] 李少华, **唐康**, 张春梅, 金伯泉, 马樱*. 联合 T、B 细胞表位设计多肽疫苗的研究进展 [J]. *中国免疫学杂志*, 2017, 33:136-139.

会议论文

- [1] **唐康**, 程林峰, 张春梅, 张宇丝, 张赟, 庄然, 金伯泉, 张芳琳*, 马樱*. 汉滩病毒糖蛋白 HLA-A*02 限制性 CTL 表位的鉴定及其在 HLA-A2.1/Kb 转基因小鼠体内的免疫保护作用研究 [A]. 见: 第十一届全国免疫学学术大会分会场交流报告集 [C]. 合肥: 中国免疫学会, 2016: 298.
- [2] **Tang K**, Zhang CM, Zhang YS, Zhang Y, Zhuang R, Jin BQ* and Ma Y*. Sustained High Levels of Both Total and High Molecular Weight Adiponectin in Plasma during the Convalescent Phase of Haemorrhagic Fever with Renal Syndrome Are Associated with Disease Severity [A]. 见: 第十一届全国免疫学学术大会摘要汇编 [C]. 合肥: 中国免疫学会, 2016: 226.
- [3] 张春梅, 张宇丝, 马樱, **唐康**, 张赟, 于海涛, 金伯泉*. 肾综合征出血热患者血浆中 MFG-E8 和 Gas6 升高与血小板减少相关 [A]. 见: 第十届全国免疫学学术大会汇编 [C]. 北京: 中国免疫学会, 2015: 138.
- [4] 马樱, 程林峰, 张春梅, 张宇丝, **唐康**, 张赟, 张芳琳*, 金伯泉*. HLA-A2 限制的汉滩病毒核蛋白 CD8⁺ T 细胞表位在转基因小鼠体内的免疫保护作用研究 [A]. 见: 第十届全国免疫学学术大会分会场交流报告 [C]. 北京: 中国免疫学会, 2015: 193.
- [5] 张春梅, **唐康**, 张宇丝, 马樱, 金伯泉*, 张赟*. 肾综合征出血热患者血浆中可溶

型 AXL 升高与病情严重程度相关 [A]. 见: 第十一届全国免疫学学术大会摘要汇编 [C]. 合肥: 中国免疫学会, 2016: 239-240.

[6] 马樱, 唐康, 张宇丝, 张春梅, 张赟, 金伯泉*. 汉滩病毒结构蛋白串联抗原表位的分子设计及免疫原性评价 [A]. 见: 第十二届全国免疫学学术大会摘要汇编 [C]. 天津: 中国免疫学会, 2017: 252-253.

致 谢

本课题是在导师金伯泉教授的亲切关怀和悉心指导下完成的。导师学术造诣精湛，治学风格严谨，待人宽厚，是我终身学习的榜样。在我困惑之际，导师为我排忧解难，鼓励我勇往直前。当我取得一定学术成果之时，导师为我欣喜，并共同探讨今后努力的方向。衷心感谢导师三年来在学业上的悉心的培养和指导，衷心感谢导师三年来在生活上无微不至的关怀。我今天取得的每一分成绩都凝聚着导师的心血与汗水，衷心感谢导师给予我的一切。

衷心感谢我的辅导老师马樱讲师，感谢她耐心的指导及训练，不仅开拓了我的学术视野，也很好地锻炼了我的科研动手能力，为我今后从事科学研究工作打下良好基础。在论文撰写过程中，辅导老师对我遇到的困难和疑惑及时给予悉心指点，提出许多有益的改善意见，投入了巨大的心血和精力。她精益求精的工作作风和独特的科研视角必将深深地影响我今后的科研工作。

感谢微生物学教研室张芳琳教授、程林峰讲师对本课题做出的巨大贡献。

感谢免疫教研室杨琨教授、杨安钢教授及陈丽华教授在工作和学习中给予的指导和帮助。感谢张赞副教授、宋朝君副教授、庄然副教授、方亮副教授、温伟红副教授、李琦高级实验师和苗咏梅老师给予的关心指导和无私帮助。

感谢金伯泉教授课题组的张宇丝讲师和张春梅博士，她们从学习和生活的点点滴滴中给予我帮助。感谢王静硕士、姜东伯硕士、赵聪博士、金敬一硕士、杨舒雅博士、孙元杰硕士、王宁硕士、熊洁硕士、席文锦博士、李卓博士、曾汉玉硕士、张戎博士、王颖博士、陶亮博士、左百乐博士、王薇博士、吴介恒博士、李智硕士、李子超硕士和石静琦硕士，是大家的鼓励和陪伴，伴我走过了这一段美好的时光。

感谢单抗组技术人员董芸、田莹和李娜老师在实验中的热情帮助，感谢免疫学教研室其他工作人员给予的实验中的无私帮助。

感谢唐都医院传染科杜虹医生和郑煦暘博士在采集样本过程中给予的无私帮助。

感谢室友陈荣庆硕士和翟东昇硕士给予的生活中的热情帮助。

最后，衷心感谢家人的支持和理解，家人是我漫漫科研路上最强大的后盾。