



杜露平, 鲁海燕, 李明举, 侯立婷, 于晓明, 程海卫, 张元鹏, 秦竹, 李兰, 张浩明, 杨利, 王义伟, 陈瑾, 郑其升, 侯继波. 免疫增强剂 CVC1302 介导 Tfh 细胞分化机制分析[J]. 中国农业大学学报, 2025, 30(01): 179-187.

DU Luping, LU Haiyan, LI Mingju, HOU Liting, YU Xiaoming, CHENG Haiwei, ZHANG Yuanpeng, QIN Zhu, LI Lan, ZHANG Haoming, YANG Li, WANG Yiwei, CHEN Jin, ZHENG Qisheng, HOU Jibo. Analysis of the mechanism of immunopotentiator CVC1302 promoting the differentiation of follicular helper T cells[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2025, 30(01): 179-187.

DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2025.01.16

免疫增强剂 CVC1302 介导 Tfh 细胞分化机制分析

杜露平^{1,2} 鲁海燕^{1,2} 李明举³ 侯立婷^{1,2} 于晓明^{1,2} 程海卫^{1,2} 张元鹏^{1,2}
秦竹^{1,2} 李兰^{1,2} 张浩明^{1,2} 杨利^{1,2} 王义伟^{1,2} 陈瑾^{1,2*} 郑其升^{1,2} 侯继波^{1,2}
(1. 江苏省农业科学院 动物免疫工程研究所/国家兽用生物制品技术创新中心/江苏省食品质量安全重点实验室, 南京 210014;
2. 兽用生物制品(泰州)国泰技术创新中心, 江苏 泰州 225300;
3. 烟台市动物疾病预防控制中心, 山东 烟台 264033)

摘要 为探究 CVC1302 调控滤泡辅助性 T 细胞(Tfh)分化的机制,本研究体外利用 GM-CSF 刺激培育小鼠骨髓树突状细胞(DC),CVC1302 刺激后,分别检测 IL-6、IL-21 转录及表达水平;利用体外细胞共培养试验,检测 Tfh、Th1、Th2 和 Th17 分化关键转录因子 *Bcl-6*、*T-bet*、*GATA3* 和 *RORγt* 的转录水平,STAT3 信号通路活化水平,Tfh 细胞占 CD4⁺ T 细胞比例及 STAT3 信号通路抑制后反向验证 Tfh 细胞占 CD4⁺ T 细胞比例。结果表明:1)免疫增强剂 CVC1302 极显著促进小鼠骨髓 DC 分泌 IL-6 和 IL-21。2)细胞共培养试验显示,CVC1302 可显著促进 STAT3 磷酸化水平,表明 STAT3 信号通路被激活。3)利用 STAT3 信号通路抑制剂后,CD4⁺ T 细胞分化为 Tfh 细胞的水平显著降低,表明 CVC1302 依赖 STAT3 信号通路激活介导初始 CD4⁺ T 细胞分化为 Tfh 细胞。综上,本研究推断 CVC1302 通过促进 DC 分泌 IL-6 和 IL-12,并激活 STAT3 信号通路介导 Tfh 细胞的分化,旨在为后续免疫增强剂的开发提供思路。

关键词 CVC1302; DC; STAT3; Tfh 细胞

中图分类号 S852.4

文章编号 1007-4333(2025)01-0179-09

文献标志码 A

Analysis of the mechanism of immunopotentiator CVC1302 promoting the differentiation of follicular helper T cells

DU Luping^{1,2}, LU Haiyan^{1,2}, LI Mingju³, HOU Liting^{1,2}, YU Xiaoming^{1,2}, CHENG Haiwei^{1,2},
ZHANG Yuanpeng^{1,2}, QIN Zhu^{1,2}, LI Lan^{1,2}, ZHANG Haoming^{1,2}, YANG Li^{1,2},
WANG Yiwei^{1,2}, CHEN Jin^{1,2*}, ZHENG Qisheng^{1,2}, HOU Jibo^{1,2}

(1. Institute of Veterinary Immunology & Engineering/National Research Center of Engineering and Technology for Veterinary Biologicals/ Jiangsu Key Laboratory for Food Quality and Safety-State Key Laboratory Cultivation Base, Ministry of Science and Technology, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China;

2. GuoTai (Taizhou) Center of Technology Innovation for Veterinary Biologicals, Taizhou 210014, China;

3. Yantai Center for Animal Disease Control and Prevention, Yantai 264600, China)

Abstract In order to explore the immune-mechanism of immunopotentiator CVC1302 mediate the

收稿日期: 2024-02-23

基金项目: "十四五"重点研发专项(2022YFD1800800);国家自然科学基金项目(32102690);江苏省农业自主创新专项(CX(21)3135)

第一作者: 杜露平(ORCID:0000-0002-1377-5396),副研究员,主要从事免疫增强剂作用机制研究,E-mail:duluping@126.com

通讯作者: 陈瑾(ORCID:0009-0001-5145-0277),副研究员,主要从事免疫增强剂的研发与作用机制研究,E-mail:chenjin@jaas.ac.cn

differentiation of follicular helper T cells (Tfh), GM-CSF-cultured DC were stimulated with OVA plus CVC1302, then the transcription and expression levels of IL-6 and IL-21 were detected. In the cell co-culture test in vitro, the transcription levels of *Bcl-6*, *Maf*, *T-bet*, *GATA3* and *ROR γ* were detected, which were key transcriptional factors for Tfh, Th1, Th2 and Th17, the activated levels of STAT3 signaling pathway, as well as the ratio of Tfh cells in CD4⁺ T cell. Furthermore, we detected the ratio of Tfh cells in CD4⁺ T cell when inhibited the STAT3 signaling pathway. The results showed that: 1) The immunopotentiator CVC1302 significantly promoted the expression of IL-6 and IL-12 in DC. 2) CVC1302 significantly enhanced the phosphorylation levels of STAT3, which showed that CVC1302 activated the STAT3 signaling pathway. 3) The ratios of Tfh cells in CD4⁺ T cell was decreased after the STAT3 signaling pathway inhibited, which showed that CVC1302 induced the differentiation of Tfh cells dependent on the activation of STAT3 signaling pathway. In this study, we concluded that CVC1302 induced the expression of IL-6 and IL-12 in DC, then activated STAT3 in order to mediate the differentiation of Tfh cells, which shed light on the development of new immunopotentiators.

Keywords Immunopotentiator CVC1302; Tfh cells; STAT3; IL-6; IL-12

滤泡辅助性T细胞(Follicular helper T cell, Tfh)主要位于生发中心(Germinal center, GC)亮区,依赖于T-B细胞间的相互作用及分泌的细胞因子,刺激GC B细胞增殖和抗体类型转换,通过阳性选择使得高亲和力的GC B细胞分化为浆细胞和记忆性B细胞,参与体液免疫^[1]。研究发现,初始CD4⁺ T细胞分化为不同亚型的效应T细胞(Th1、Th2、Th17和Tfh等)依赖于不同类型的细胞因子,进而激活后续特定的转录调控因子。其中,初始CD4⁺ T细胞在IL-12和IFN- γ 的刺激下,激活STAT1/STAT4调控T-bet转录,使其分化为Th1;初始CD4⁺ T细胞则在IL-4的刺激下,活化STAT6调控GATA3转录,使其分化为Th2;初始CD4⁺ T细胞在IL-6和IL-21的刺激下,通过STAT3促进ROR γ t的转录,使其分化为Th17;初始CD4⁺ T细胞在IL-6和IL-21的协同作用下,活化STAT3提升Bcl-6的转录,使其分化为Tfh细胞^[2-4]。Tfh细胞的命运依赖于DC和B细胞的协同作用^[5]。Tfh细胞分化的初始场所为淋巴结的滤泡间质区(Interfollicular region, IFR)。初始CD4⁺ T细胞识别同源抗原被激活后,依赖于CXCR5或EBI2迁移至IFR^[6]。在位于IFR处的cDC2分泌的IL-6和IL-21的协同作用下,分化为Tfh前体,进而在B细胞提供的ICOSL/ICOS、CD40/CD40L和CD84/CD84-SAP的协同刺激信号下最终分化为Tfh细胞^[7-8]。

研究发现,初始CD4⁺ T细胞分化为Tfh细胞包括2个阶段,第一阶段为DC依赖抗原递呈活化初始CD4⁺ T细胞,且依赖于分泌的细胞因子IL-6和

IL-21活化STAT3信号通路促进活化的CD4⁺ T细胞表达Bcl-6,转化为Tfh前体;第二阶段为Tfh前体与GC B细胞相互作用,进而转化为Tfh细胞,分布于GC亮区,发挥其生物学功能。

免疫增强剂CVC1302由Toll样受体激动剂和NOD样受体激动剂复配组成,其主要成分包括单磷酸脂质A(MPLA)、胞壁酰二肽(MDP)和 β -葡聚糖。前期研究发现,CVC1302配伍口蹄疫病毒(Foot-and-mouth disease virus, FMDV)灭活疫苗可诱导猪只产生长达6个月之久的体液免疫应答,液相阻断抗体滴度高达8log₂,显著高于单独免疫FMDV灭活疫苗;后续机制初探表明免疫增强剂CVC1302依赖于促进初始CD4⁺ T细胞分化为Tfh细胞,进而辅助高亲和力GC B细胞分化为长寿浆细胞,迁移至骨髓后持续性分泌FMDV特异性抗体,为机体提供免疫保护^[9-10]。然而CVC1302调控Tfh细胞形成的免疫机制尚不明确,考虑到Tfh细胞在GC应答中发挥关键作用,可增强高亲和力B细胞和长寿浆细胞的形成,对长效体液免疫应答的形成不可或缺,本研究从体外试验探究CVC1302介导初始CD4⁺ T细胞分化为Tfh细胞的免疫机制,以期可为后续免疫增强剂的研制提供研究思路和指导方向。

1 材料与方法

1.1 试验材料

5周龄C57BL/6雌性小鼠购自扬州大学;OVA、红细胞裂解液购自索莱宝科技有限公司;免疫增强剂CVC1302为本团队制备所得;

Montanide™-ISA206 购自上海 Seppic 特殊化学品有限公司；RPMI-1640 培养基、胎牛血清(FBS)购自 Gibco 公司；重组鼠源 GM-CSF、重组鼠源 IL-4、RNA 提取试剂盒和 Real-time PCR mix 购自武汉 ABclonal 有限公司；anti-Bcl-6-APC、anti-CD4-FITC 荧光抗体购自优宁维有限公司；抗体 STAT3 和 p-STAT3 均购自 HuaBio 有限公司；HRP-羊抗兔 IgG 购自武汉博士德有限公司；ECL 发光试剂盒购自诺唯赞有限公司；小鼠初始 CD4⁺ T 细胞富集分选试剂盒购自金准生物医药科技(天津)有限公司。

1.2 小鼠骨髓源 DC 的分离诱导

参照体外小鼠骨髓源 DC 分离诱导的方法^[11]，取 2 只 C57BL/6 小鼠，颈椎脱位法处死后置于 75% 乙醇浸泡 5 min，取其股骨和胫骨，剥离掉肌肉后，用含 2% 双抗的 RPMI-1640 冲洗 2 遍，利用注射器针头在骨头两端进行打孔，随后用 RPMI-1640(含 10%FBS 和 2% 双抗)进行冲洗，收集冲洗液，70 μm

滤网过滤后，1 700 r/min 离心 15 min，去上清后，利用红细胞裂解液重悬细胞，室温下作用 1 min，1 200 r/min 离心 5 min，用 1 mL RPMI-1640(含 10%FBS 和 2% 双抗)重悬细胞后进行细胞计数。将细胞浓度调整至 5×10⁵ 个/mL，转移至 6 孔板中，4 mL/孔，最后添加重组鼠源 GM-CSF、重组鼠源 IL-4 至终浓度为 10 ng/mL。37℃，含 2% CO₂ 温箱中孵育 3 d 后，弃掉 2 mL 培养基后，额外添加 2 mL RPMI-1640(含 10%FBS、2% 双抗、20 ng/mL 重组鼠源 GM-CSF 和 20 ng/mL 重组鼠源 IL-4)继续培养。第 7 天，收集诱导的 DC 重新铺板备用。

1.3 CVC1302 介导 DC 分泌 IL-6 和 IL-21 mRNA 水平和蛋白水平检测

取 1.2 孵育的骨髓源 DC，分别利用 OVA(1 μg/mL)或 OVA+CVC1302(10 μg/mL)刺激 2 h，收集，细胞用 Trizol 提取 RNA，Real-time PCR 检测 IL-6 和 IL-21 转录水平，以 β-actin 作为内参基因，其中 β-actin、IL-6 和 IL-21 相对应引物见表 1。

表 1 实时荧光定量 PCR 用引物对序列
Table 1 Sequences of primers for Real-time PCR

基因 Gene	引物序列(5'-3') Primer sequences (5'-3')	片段长度/bp Length
<i>β-actin</i>	F:CACTGCCGCATCCTCTTCC R:CAATAGTGATGACCTGGCCGT	68
<i>IL-6</i>	F:AGACAAAGCCAGAGTCCTTCAGAGA R:GCCACTCCTTCTGTGACTCCAGC	88
<i>IL-21</i>	F:GCTCCACAAGATGTAAAGGGGC R:CCACGAGGTCAATGATGAATGTC	115
<i>Bcl-6</i>	F:GGAAACCCAGTCAGAGTATTCG R:GGCAGCGATCACATTTGTATG	149
<i>T-bet</i>	F:TCCCCAAGCAGTTGACAGT R:CACCTCGGGAACACAGTTA	148
<i>GATA3</i>	F:CTCGGCCATTCTGATCATGGAA R:GGATACCTCTGCACCGTAGC	134
<i>RORγt</i>	F:CTCTACACGGCCCTGGTTCT R:GATGGAAAGCCAGTTCCAAA	100

程序为: 95℃ 10 min; 95℃ 15 s; 60℃ 1 min; 72℃ 1 min共进行40个循环。

取1.2孵育的骨髓源DC, 分别利用OVA (1 μg/mL)或OVA+CVC1302(10 μg/mL)刺激6 h, 收集上清, 利用ELISA试剂盒检测IL-6和IL-21蛋白水平。

1.4 初始CD4⁺T细胞分选

小鼠脾脏初始CD4⁺T细胞利用小鼠初始CD4⁺T细胞富集分选试剂盒进行制备, 具体步骤如下, 取2只C57BL/6小鼠, 颈椎脱位法处死后置于75%乙醇浸泡5 min, 取脾脏, 用含2%双抗的RPMI-1640冲洗2遍, 置于70 μm滤网上研磨, 收集滤过液, 1 700 r/min离心15 min, 去上清后, 利用红细胞裂解液重悬细胞, 室温下作用1 min, 1 200 r/min离心5 min, 用1 mL ImunoSep™ Buffer重悬细胞后进行细胞计数。随后利用适当体积的ImunoSep™ Buffer调整细胞浓度至1×10⁸个/mL, 制备单细胞悬液; 每100 μL细胞悬液添加5 μL分选试剂A。涡旋仪混匀后室温下孵育10 min; 添加ImunoSep™ Buffer至2.5 mL且混匀; 将盛有细胞悬液的5 mL流式管插入磁极中, 使流式管底部通过磁极底部孔道, 直至接触到工作台面。在室温条件下静置5 min; 保持流式管在磁极中, 将磁极和流式管一同拿起, 迅速将含有未结合CD4⁺T细胞上清液倒入15 mL无菌离心管; 随即将其恢复至直立位置; 从磁极中取出含有结合CD4⁺T细胞的流式管, 再向其中加入1 mL ImunoSep™ Buffer。通过吸取ImunoSep™ Buffer来清洗管壁上的CD4⁺T细胞。分选所得的CD4⁺T细胞可供下游试验使用。

1.5 CVC1302介导Tfh细胞体外分化检测

取1.2孵育的骨髓源DC与分选的初始CD4⁺T细胞按照1:2的比例进行混合孵育, 同时添加OVA (1 μg/mL)或OVA+CVC1302(10 μg/mL), 每个设置3个重复孔, 共孵育7 d后, 收集全部细胞, 利用anti-Bcl-6-APC和anti-CD4-FITC进行染色, 流式细胞分选仪筛选Tfh细胞, 分析Tfh细胞占CD4⁺T细胞比例。

1.6 CVC1302调控各亚型T细胞转录因子检测

取1.5收集的T细胞, 用Trizol提取RNA, Real-time PCR检测Tfh、Th1、Th2和Th17关键转录因子*Bcl-6*、*c-Maf*、*T-bet*、*GATA3*和*RORγt*转录水平, 以β-actin作为内参基因, 其中β-actin、*Bcl-6*、

T-bet、*GATA3*和*RORγt*相对应引物见表1。

1.7 CVC1302促进STAT3信号通路活化水平检测

取1.5收集流式分选仪筛选的Tfh细胞, 取相同数目分选的Tfh细胞置于冰上, 加入RIPA裂解液, 冰上裂解约30 min。期间每10 min在震荡仪上混匀涡旋一次。将样品置于4℃ 12 000 r/min离心10 min, 取上清, 加入5×SDS上样缓冲液, 100℃作用10 min, 进行SDS-PAGE和Western blot。分别利用兔源STAT3、p-STAT3一抗37℃作用1 h; PBST洗涤后, HRP-羊抗兔IgG 37℃作用1 h, 洗涤3次后, 将高敏型ECL化学发光试剂滴加至目的条带大小处, 利用化学发光成像仪观察拍照。图片利用Image J进行灰度分析, 比较组间STAT3条带灰度值/β-actin条带灰度值和p-STAT3条带灰度值/β-actin条带灰度值。

1.8 CVC1302介导Tfh细胞分化反向验证试验

取1.2孵育的骨髓源DC与分选的初始CD4⁺T细胞按照1:2的比例进行混合孵育, 同时添加OVA (1 μg/mL)或OVA+CVC1302(10 μg/mL)和STAT3抑制剂Stat3ic(10 μmol/L), 每孔设置3个重复, 共孵育7 d后, 收集全部细胞, 利用anti-Bcl-6-APC、anti-CD4-FITC进行染色, 流式细胞仪检测Tfh细胞占CD4⁺T细胞比例。

1.9 统计分析

本研究中所用数据均用平均值±标准差表示。利用Graph Prism软件对数据统计分析, 利用*t*检验评估两组之间的差异。其中*P*>0.05表示差异不显著, *P*<0.05表示差异显著, *P*<0.01、*P*<0.001和*P*<0.000 1表示差异极显著。

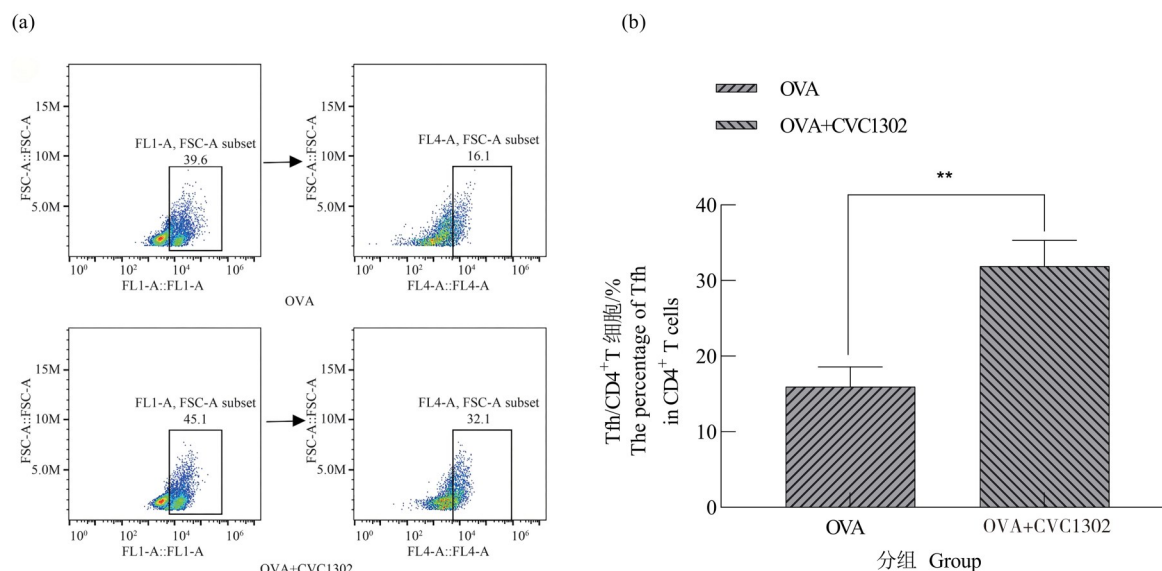
2 结果与分析

2.1 CVC1302对Tfh细胞体外分化水平的影响

本研究利用体外试验对Tfh细胞分化进行了检测。流式分析发现OVA+CVC1302组Tfh细胞占CD4⁺T细胞比例为32.07%, 而OVA组Tfh细胞占CD4⁺T细胞比例为16.77%, 两者差异极显著(*P*<0.01)(图1)。结果表明, CVC1302可以极显著促进初始CD4⁺T细胞分化为Tfh细胞。

2.2 CVC1302对DC分泌IL-6和IL-21 mRNA水平和蛋白水平的影响

研究发现IL-6和IL-21可通过促进STAT3磷酸



**代表组间差异极显著 ($P < 0.01$).

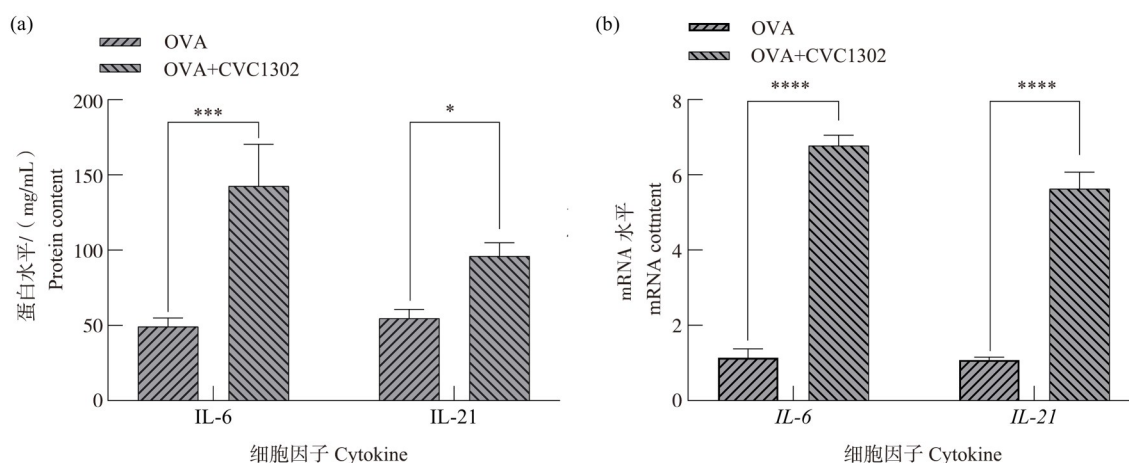
** represent significant differences between groups ($P < 0.01$).

图 1 CVC1302 对 T_H 细胞体外分化水平的影响

Fig. 1 Effect of CVC1302 in inducing the difference of T_H cells *in vitro*

化激活 STAT3 信号通路, 通过促进 Bcl-6 表达诱导初始 CD4⁺ T 细胞分化为 T_H 细胞, 因此通过体外 CVC1302 刺激 DC 分析 IL-6 和 IL-21 mRNA 水平和蛋白水平, 进而验证 CVC1302 促进 T_H 细胞形成的猜想。OVA 或 OVA+CVC1302 刺激体外分离诱导的 DC, 分别于 2 和 6 h 收集细胞和上清, 利用 Real-time PCR 和 ELISA 分别检测 IL-6 和 IL-21 转录和表达水

平。结果显示, OVA+CVC1302 刺激 DC 可极显著或显著促进 IL-6 和 IL-21 的蛋白水平和转录水平(图 2); 其中 OVA 或 OVA+CVC1302 刺激 DC, IL-6 浓度分别为 49.2 和 142.67 ng/mL, 差异极显著 ($P < 0.001$); 而 IL-21 浓度分别为 54.67 和 96.13 ng/mL, 差异显著 ($P < 0.05$)。结果表明, CVC1302 可显著提升 DC 分泌 IL-6 和 IL-21 的蛋白水平和 mRNA 水平。



****代表组间差异极显著 ($P < 0.0001$); ***代表组间差异极显著 ($P < 0.001$); *代表组间差异显著 ($P < 0.05$)。下同。

**** represent extremely significant differences between groups ($P < 0.0001$); *** represent extremely significant differences between groups ($P < 0.001$); * represent significant differences between groups ($P < 0.05$). The same below.

图 2 CVC1302 对 DC 分泌 IL-6 和 IL-21 蛋白 (a) 和 mRNA 水平 (b) 的影响

Fig. 2 The influence of CVC1302 in inducing the levels of protein (a) and mRNA (b) of IL-6 and IL-21 in DC

2.3 CVC1302 对各亚型 T 细胞关键转录因子 mRNA 水平的影响

初始 CD4⁺ T 细胞分化为不同亚型的效应 T 细胞依赖于不同的细胞因子促进关键转录因子的转录。因此本研究比较分析了 OVA+CVC1302 和 OVA 刺激的 DC 与初始 CD4⁺ T 细胞共孵育后, Tfh、Th1、Th2 和 Th17 关键转录因子 *Bcl-6*、*T-bet*、*GATA3* 和 *ROR γ t* 转录因子的 mRNA 水平。OVA+CVC1302 和 OVA 分别刺激的 DC 与初始 CD4⁺ T 细胞共孵育 7 d, 收集细胞, 利用 Real-time PCR 检测 *Bcl-6*、*T-bet*、*GATA3* 和 *ROR γ t* 的 mRNA 水平。由图 3 可见, OVA+CVC1302 刺激组 *Bcl-6* 的 mRNA 水平显著高于 OVA 单独刺激组 ($P < 0.001$); 结果表明, CVC1302 可显著促进 *Bcl-6* 的 mRNA 水平, 进而利于初始 CD4⁺ T 细胞分化为 Tfh 细胞。

2.4 CVC1302 对 STAT3 信号通路活化水平的影响

IL-6 和 IL-21 通过磷酸化 STAT3 活化 STAT3 信号通路, 进而促进 *Bcl-6* 转化, 使得初始 CD4⁺ T 细胞分化为 Tfh 细胞, 本研究通过

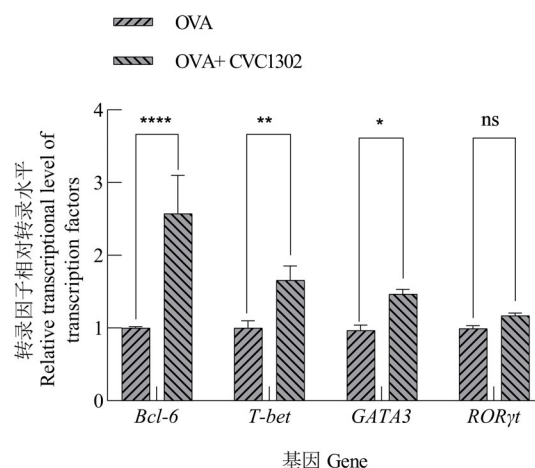
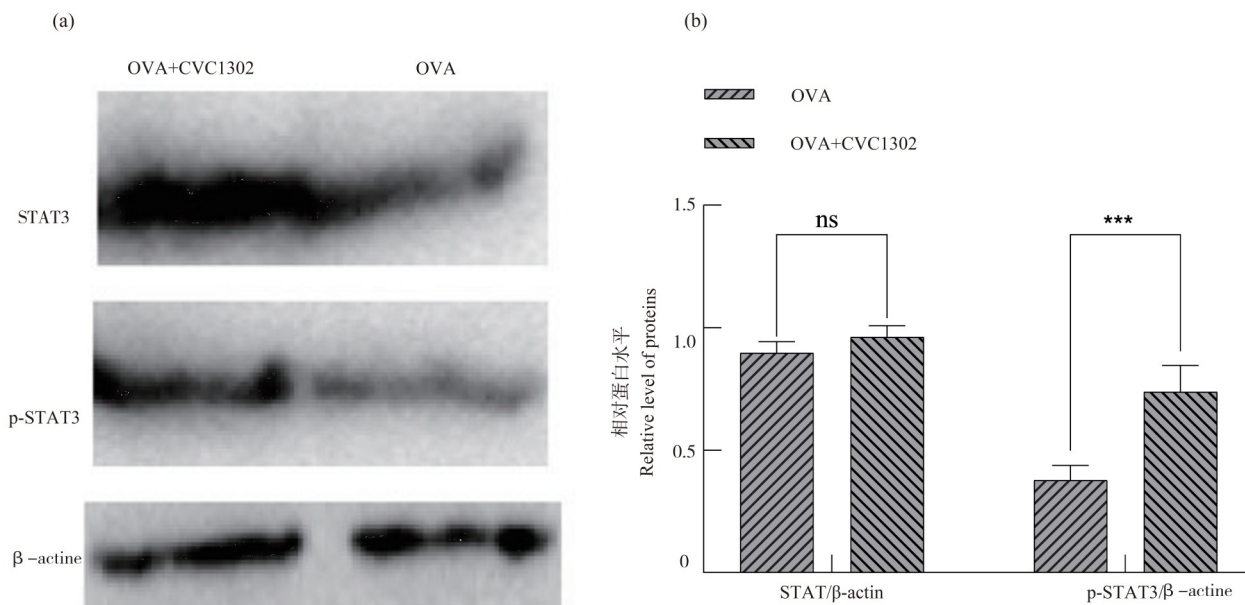


图 3 CVC1302 对各亚型 T 细胞关键转录因子 mRNA 水平的影响

Fig. 3 The influence of CVC1302 in inducing the levels of mRNA of the different subtype of T cells

Western blot 检测分析 CVC1302 对 STAT3 的磷酸化水平(图 4)。结果表明, CVC1302 促进 STAT3 磷酸化水平, 表明 CVC1302 依赖 IL-6-STAT3 信号通路的激活促进初始 CD4⁺ T 细胞分化为 Tfh 细胞。



(a) STAT3 蛋白表达灰度图; (b) STAT3 蛋白相对表达水平柱状图。

(a) The grayscale diagram of the expression of STAT3 protein; (b) The bar chart of grayscale of the relative of STAT3 protein

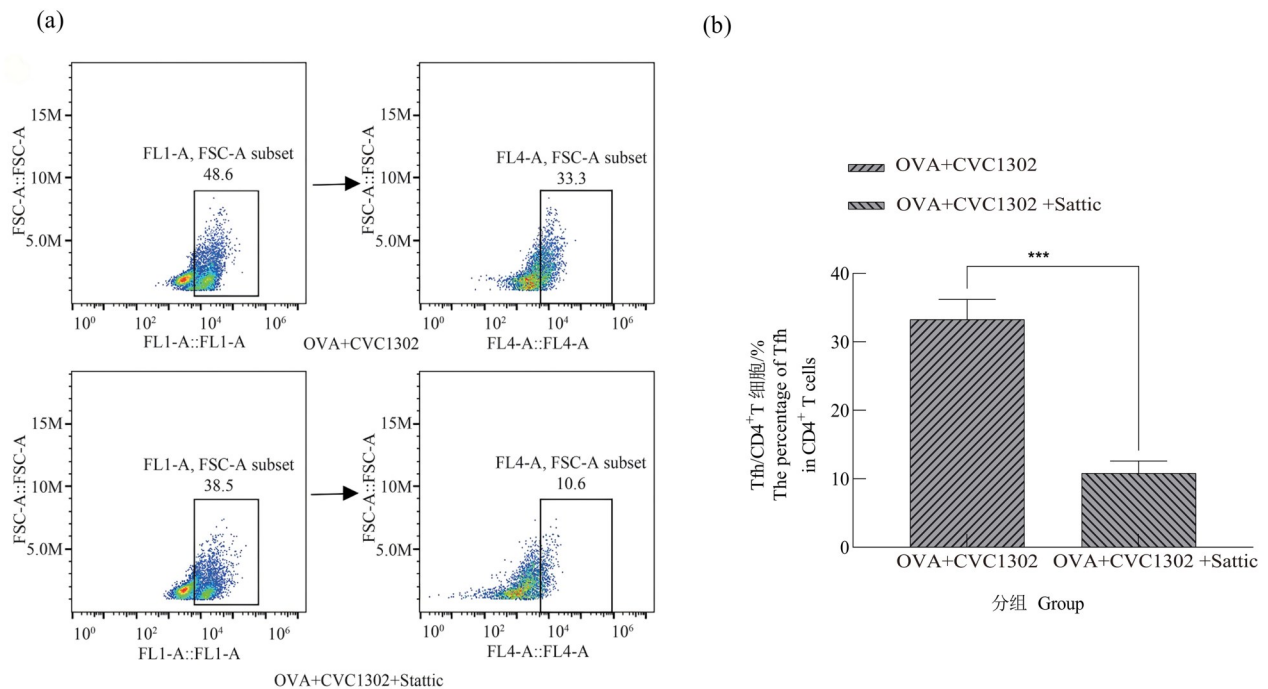
图 4 CVC1302 对 STAT3 信号通路活化水平的影响

Fig. 4 The influence of CVC1302 in inducing the activated levels of STAT3 signal pathway

2.5 Tfh 细胞分化反向验证检测

为验证 CVC1302 是否依赖于 IL-6/STAT3 信号通路促进初始 CD4⁺ T 细胞分化为 Tfh 细胞, 本研究利用 Stattic 抑制 STAT3 磷酸化, 进而利用流式分析 Tfh 细胞占 CD4⁺ T 细胞百分比。由图 5 可

见, 添加 Stattic 后, 可显著降低 Tfh 细胞占 CD4⁺ T 细胞百分比, 比例由 32.63% 降至 10.49%, 两组间差异显著 ($P < 0.001$)。结果表明, CVC1302 依赖于 IL-6/STAT3 信号通路促进初始 CD4⁺ T 细胞分化为 Tfh 细胞。



(a) Tfh 细胞流式图; (b) Tfh 细胞占 CD4⁺ T 细胞比例。

(a) The gating of Tfh cells; (b) The percentage of Tfh cells in CD4⁺ T cells.

图 5 CVC1302 依赖于 STAT3 磷酸化促进初始 CD4⁺ T 细胞分化为 Tfh 细胞

Fig.5 CVC1302 induced the differentiation of naive CD4⁺ T cells into Tfh cells depended on the phosphorylation of STAT3

3 讨论

前期研究发现, CVC1302 依赖于促进初始 CD4⁺ T 细胞分化为 Tfh 细胞辅助口蹄疫灭活疫苗诱导长效体液免疫应答^[9]。在免疫应答过程中, Tfh 细胞通过分泌 IL-21 和提供 CD40/CD40L、PD-1/PDL-1 等接触性信号参与 GC 形成, 并刺激 B 细胞的增殖分化与抗体亲和力筛选循环, 辅助高亲和力 GC B 细胞分化, 诱导高亲和力体液免疫应答^[12]。研究发现, SARS-CoV2 感染或免疫机体后, 诱导产生的刺突蛋白特异性 Tfh 细胞在抗体维持及记忆应答, 乃至长效保护中发挥重要作用^[13-14]。本研究旨在通过探究 CVC1302 介导初始 CD4⁺ T 细胞分化为 Tfh 细胞的免疫机制, 对后续免疫增强剂的开发提供理论基础。

机体感染或免疫后, 初始 B 细胞被抗原激活后, 进行快速增殖, 进而形成 GC。GC 应答是机体产生抗体的关键, 其中 Tfh 细胞是一类特异分布于 GC 的 T 细胞亚型, Tfh 细胞发育受 Bcl-6 调控, 对于 Tfh 细胞迁移至淋巴滤泡必不可少^[15-16]。研究发现, IL-6 激活转录因子 STAT3 来诱导 Bcl-6 的表达, 且 IL-21 也可通过促进 IL-6 介导的 Bcl-6 的表达。Tfh 细胞表达 Bcl-6, 诱导 CXCR5、ICOS 和 PD-1 的上调, 其中 CXCR5 的表达促进 Tfh 细胞归巢至淋巴结的 IFR, Tfh 细胞与 B 细胞相互作用, B 细胞通过 ICOS 和 IL-6 向 Tfh 细胞提供信号, Tfh 细胞向 B 细胞提供 CD40L 和 IL-21, 为 B 细胞分化提供信息, 协助激活 B 细胞, 促进生发中心的形成和免疫球蛋白的类别转换, 维持长时间体液免疫应答^[17-19]。

本研究通过体外试验解析了免疫增强剂CVC1302介导初始CD4⁺T细胞分化为T_{fh}细胞的机制,后续可将其与猪伪狂犬、猪流行性腹泻、蓝耳等疫苗进行配伍,以期诱导机体产生显著增强的GC应答,分泌高亲和力抗体,抵抗强毒的感染。

4 结 论

本研究阐明CVC1302通过刺激DC分泌细胞因子IL-6和IL-21,进而依赖于STAT3信号通路促进初始CD4⁺T细胞分化为T_{fh}细胞,通过正向选择使得GC B细胞分化为长寿浆细胞,进而提升疫苗保护效力,为后续免疫增强剂的研制提供理论基础和研究方向。

参考文献 References

- [1] Olatunde A C, Hale J S, Lamb T J. Cytokine-skewed T_{fh} cells: functional consequences for B cell help [J]. *Trends in Immunology*, 2021, 42(6): 536-550
- [2] Liu X D, Nurieva R I, Dong C. Transcriptional regulation of follicular T-helper (T_{fh}) cells[J]. *Immunological Reviews*, 2013, 252(1): 139-145
- [3] Nurieva R I, Chung Y, Hwang D, Yang X O, Kang H S, Ma L, Wang Y H, Watowich S S, Jetten A M, Tian Q, Dong C. Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages[J]. *Immunity*, 2008, 29(1): 138-149
- [4] Ma C S, Avery D T, Chan A N, Batten M, Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Arkwright P D, Kreins A Y, Averbuch D, Engelhard D, Magdorf K, Kilic S S, Minegishi Y, Nonoyama S, French M A, Choo S, Smart J M, Peake J, Wong M, Gray P, Cook M C, Fulcher D A, Casanova J L, Deenick E K, Tangye S G. Functional STAT3 deficiency compromises the generation of human T follicular helper cells[J]. *Blood*, 2012, 119(17): 3997-4008
- [5] Krishnaswamy J K, Alsén S, Yrlid U, Eisenbarth S C, Williams A. Determination of T follicular helper cell fate by dendritic cells [J]. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9: 2169
- [6] Schroeder A R, Zhu F M, Hu H. Stepwise T_{fh} cell differentiation revisited: New advances and long-standing questions [J]. *Faculty Reviews*, 2021, 10: 3
- [7] Crotty S. Follicular helper CD4 T cells (T_{fh}) [J]. *Annual Review of Immunology*, 2011, 29: 621-663
- [8] Crotty S. T follicular helper cell biology: A decade of discovery and diseases[J]. *Immunity*, 2019, 50(5): 1132-1148
- [9] Du L P, Chen J, Hou L T, Yu X M, Zheng Q S, Hou J B. Long-term humoral immunity induced by CVC1302-adjuvanted serotype O foot-and-mouth disease inactivated vaccine correlates with promoted T follicular helper cells and thus germinal center responses in mice [J]. *Vaccine*, 2017, 35(51): 7088-7094
- [10] Chen J, Yu X M, Zheng Q S, Hou L T, Du L P, Zhang Y P, Qiao X W, Hou J B, Huang K H. The immunopotentiator CVC1302 enhances immune efficacy and protective ability of foot-and-mouth disease virus vaccine in pigs[J]. *Vaccine*, 2018, 36(52): 7929-7935
- [11] 侯立婷,于晓明,杜露平,张元鹏,程海卫,陈瑾,郑其升,侯继波. CVC1302通过小鼠骨髓树突状细胞对免疫反应的调控[J]. *江苏农业学报*, 2023, 39(6): 1380-1385
- [12] Ribeiro F, Perucha E, Graca L. T follicular cells: The regulators of germinal center homeostasis[J]. *Immunology Letters*, 2022, 244: 1-11
- [13] Yang S H, Duan L W, Wang C, Zhang C Y, Hou S Y, Wang H, Song J H, Zhang T T, Li Z H, Wang M X, Tang J, Zheng Q Q, Wang H, Wang Q, Zhao W. Activation and induction of antigen-specific T follicular helper cells play a critical role in recombinant SARS-CoV-2 RBD vaccine-induced humoral responses [J]. *Molecular Biomedicine*, 2023, 4(1): 34
- [14] He R Z, Zheng X Y, Zhang J, Liu B, Wang Q J, Wu Q, Liu Z Y, Chang F F, Hu Y B, Xie T, Liu Y C, Chen J, Yang J, Teng S S, Lu R, Pan D, Wang Y, Peng L T, Huang W J, Terzieva V, Liu W P, Wang Y C, Li Y P, Qu X W. SARS-CoV-2 spike-specific T_{fh} cells exhibit unique responses in infected and vaccinated individuals[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2023, 8: 393
- [15] Nurieva R I, Chung Y, Martinez G J, Yang X O, Tanaka S, Matskevitch T D, Wang Y H, Dong C. Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells[J]. *Science*, 2009, 325(5943): 1001-1005
- [16] Jogdand G M, Mohanty S, Devadas S. Regulators of T_{fh} cell differentiation[J]. *Frontiers in Immunology*, 2016, 7: 520
- [17] Kim Y J, Oh J, Jung S, Kim C J, Choi J, Jeon Y K, Kim H J, Kim J W, Suh C H, Lee Y, Im S H, Crotty S, Choi Y S. The transcription factor Mef2d regulates B: T synapse-dependent GC-T_{fh} differentiation and IL-21-mediated humoral immunity[J]. *Science Immunology*, 2023, 8(81): eadf2248
- [18] Choi J, Crotty S. Bcl6-Mediated Transcriptional Regulation of Follicular Helper T cells (T_{fh}) [J]. *Trends in Immunology*, 2021, 42(4): 336-349
- [19] Hatzi K, Nance J P, Kroenke M A, Bothwell M, Haddad E K, Melnick A, Crotty S. BCL6 orchestrates T_{fh} cell differentiation via multiple distinct mechanisms[J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 2015, 212(4): 539-553

责任编辑: 秦梅



第一作者简介：杜露平,江苏省农业科学院动物免疫工程研究所副研究员。主要从事动物免疫增强剂作用机制研究。先后承担并参与国家自然科学基金项目,江苏省农业自主创新专项、十四五重点研发专项等,已在 *Vaccine*、*Frontiers in Immunology* 等国际与国内学术期刊发表关于免疫增强剂 CVC1302 诱导机体产生长效体液免疫应答的机制相关研究 5 篇。



通讯作者简介：陈瑾,江苏省农业科学院动物免疫工程研究所副研究员。主要从事动物免疫增强剂研制及作用机制研究。先后承担并参与江苏省农业自主创新专项、十四五重点研发专项等,已在 *Vaccine*、*Frontiers in Immunology* 等国际与国内学术期刊发表关于免疫增强剂 CVC1302 免疫增强效力及作用机制相关研究 9 篇。