

· 双清论坛:重大疾病疫苗研究的关键科学问题 ·

“自我”与“非我”免疫识别新机理与创新疫苗发展

华兆琳^{1,2} 侯百东^{1,2,3*}

1. 中国科学院生物物理研究所,北京 100101
2. 中国科学院大学,北京 100049
3. 中国科学院生物大分子科教融合卓越中心,北京 100101

[摘要] 疫苗接种或者感染诱导保护性免疫的核心是刺激 B、T 淋巴细胞的特异性免疫应答。后者启动的关键在于免疫系统对“自我”与“非我”抗原正确的识别。1989 年 Janeway 提出存在天然免疫受体识别病原分子模式的猜想。这个划时代的理念极大丰富了免疫识别的内涵并直接推动了对 Toll 样受体(Toll-like Receptor, TLR)的发现,也帮助确立了淋巴细胞活化的基本范式,即天然免疫信号决定适应性免疫应答的发生及类型。利用佐剂刺激天然免疫信号来增强免疫应答就是这个理论在疫苗设计中的成功应用。尽管如此,复杂多样的体内免疫应答现象显示我们对天然免疫信号的调控机制仍然还有许多未知。本文回顾了研究 TLR 信号增强蛋白抗原免疫应答机理的历史;介绍了 B 细胞 TLR 信号选择性增强病毒抗原抗体反应现象的发现,以及 B 细胞在启动抗病毒免疫应答中的关键作用;并在此基础上提出靶向 B 细胞免疫识别机理的一种全新疫苗设计思路。

[关键词] 免疫识别;Toll 样受体;专职性抗原提呈细胞;抗体反应;疫苗

疫苗的发明和使用是人类医学史上最突出的成就之一。在传染病的防控中,疫苗能以较低的成本为易感个体建立较持久的免疫保护,被推广使用后有效控制了众多曾经广泛流行的传染病,并彻底根除了天花和脊髓灰质炎。但是,在解决了这些传统公共卫生问题后,疫苗当前的发展也面临着明显的挑战。首先,人类免疫缺陷病毒(Human Immunodeficiency Virus, HIV)、结核、疟疾等传染性疾病的疫苗研制一直以来都是被公认的棘手问题,甚至令众多专家感到悲观。其次,当前更为突出的问题是新型冠状病毒肺炎(Corona Virus Disease 2019, COVID-19)疫情爆发性全球大流行给防控带来了巨大压力。传统疫苗策略能否应对这些新的挑战?能否找到新的免疫原理和策略来解决这些新问题?这些都是当前迫切需要回答的问题。



侯百东 中国科学院生物物理所研究员,中国科学院大学岗位教授。中国协和医科大学外科学博士,美国加州大学旧金山分校微生物与免疫学博士后。2011 年入选首批国家“青年千人”计划。主要研究方向是抗体反应调控、B 细胞生物学、与新概念疫苗。



华兆琳 中国科学院生物物理所副研究员,中国科学院大学岗位教授。美国范德比尔特大学分子生物学博士,美国加州大学旧金山分校神经生物学博士后。

1 创新疫苗发展中的“瓶颈”问题

传统疫苗技术始于对病原进行减毒或者灭活。虽然大多数现在使用的这类疫苗保护效果良好,但

收稿日期:2020-05-08;修回日期:2020-07-27

* 通信作者,Email:baidong_hou@ibp.ac.cn

本文受到科技部重大专项(2013ZX10004606)、中国科学院科技服务网络(STS)计划项目(KFJ-EW-STS-027)、中国科学院战略性科技先导专项(B类)项目(XDB29050600)和国家自然科学基金项目(31170848、31370888、31870882 和 81991495)的资助。

并非对所有病原都适用,还存在返毒或灭活不完全的安全性顾虑。随着对病原体分子组成和感染机制的深入了解,靶向病原重要抗原的新型疫苗(包括亚单位疫苗、核酸疫苗和病毒载体疫苗)正成为越来越常见的选择。这些疫苗安全性较好,但是往往存在免疫原性偏弱、免疫后产生的效应机制如抗体水平偏低、持久性不足等。因此,在实际应用中,往往需要添加佐剂来提高疫苗的免疫原性。佐剂应用的经验来自免疫学家的实践,但长期以来对其作用机理却缺乏了解,这严重限制了创新疫苗的发展。

佐剂的种类繁多、作用方式也有差异,对其免疫增强机理最深刻的洞察来自于 Janeway。早在 20 世纪 80 年代,他就认识到基于克隆选择的免疫识别机制难以解释众多复杂的免疫现象。根据佐剂中的病原微生物成分能够增强免疫应答这一现象及其他线索,Janeway 猜想免疫系统应该有特定的模式识别受体(Pattern-Recognition Receptor, PRR)来识别病原微生物的病原相关分子模式(Pathogen-Associated Molecular Pattern, PAMP)^[1]。这个假说直接推动了后来 Toll 样受体(Toll-like Receptor, TLR)的发现,并奠定了天然免疫信号在免疫应答中的重要作用。现在,一个被广泛接受的淋巴细胞活化模式——病原抗原首先被天然免疫系统的抗原呈递细胞(Antigen Presenting Cell, APC)捕获,后者的 PRR 能识别病原 PAMP 并产生信号活化 T 细胞及其他适应性免疫细胞^[2]。在过去的 20 年中,各种 TLR 和其他天然免疫识别受体被陆续发现,为佐剂的科学发展带来了机遇;新的佐剂被不断发明并应用到临床中^[3]。但是,一个不能回避的事实是天然免疫受体信号不仅仅被用来活化淋巴细胞,它们对天然免疫细胞的活化还能引起炎症细胞因子的产生,后者可能导致严重的不良反应。临床观察似乎也提示佐剂的免疫增强作用与其致炎作用有相关性。这种“两难效应”限制了用佐剂来增强疫苗免疫原性的效果。能否克服这个佐剂使用的瓶颈呢?在对这个问题进行回答前,我们认为关键是要先了解天然免疫受体信号增强免疫应答的机理。

2 TLR 信号免疫增强机理研究的启示

TLR 是最早被发现的 PRR。人和小鼠都表达 10 种以上的 TLR^[4]。其中,TLR1、TLR2 和 TLR4

等表达在细胞外膜上的受体能够识别细菌细胞壁和脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)等成分,而 TLR3、TLR7、和 TLR9 等表达于细胞内体膜上的受体能够识别被细胞内吞的细菌或者病毒的核酸成分。TLR 与配体结合后能够招募 MyD88(除 TLR3 外的所有 TLR)或者 Trif(TLR3 与 TLR4)等信号中介分子启动信号传导,并激活 NF- κ B、AP-1 等转录因子,促进炎症细胞因子表达。由于 TLR 信号有重要的免疫增强作用,很多 TLR 配体已成为国内外发展新型佐剂的候选分子。目前,TLR4 的一种配体单磷酸脂质 A(Monophosphoryl Lipid, MPL)和 TLR9 的一种配体含去甲基 CpG 寡链脱氧核苷酸(CpG Oligodeoxynucleotide, CpG ODN)已经被成功应用到人用疫苗中。

TLR 信号如何增强抗体反应?这个看似简单的问题其实并不好回答。一个原因是体内表达 TLR 的免疫细胞和非免疫细胞众多,被活化后都能产生特定的效应,因此增强抗体反应的机制可能多种多样。典型的例子就是关于 B 细胞 TLR 的作用。B 细胞的免疫识别不同于 T 细胞,除了具有抗原受体外还可以表达 TLR。早在 TLR 被发现前,就已经观察到用 LPS 能刺激小鼠 B 细胞增殖和产生抗体的现象。另外,自身免疫病中产生的抗核抗体也被发现与 B 细胞 TLR 有关。这些结果提示 B 细胞 TLR 可能在疫苗诱导的抗体反应中发挥重要作用。为了检测 B 细胞 TLR 信号的作用,Pasare 等人将野生或者 MyD88 缺陷(Myd88^{-/-})小鼠 B 细胞转移到缺陷 B 细胞的 μ MT 小鼠,构建出只有 B 细胞缺陷 TLR 信号的模型;然后用 LPS 与不完全弗氏佐剂(Incomplete Freund's Adjuvant, IFA)混合鸡卵清蛋白(Ovalbumin, OVA)免疫。他们发现转移 Myd88^{-/-} B 细胞的小鼠在两周后的抗体水平较对照小鼠明显降低,因此得出结论蛋白抗原免疫产生的抗体反应依赖 B 细胞的 TLR 信号^[5]。但是不久, Nemazee 等人就报道同时缺陷 MyD88 和 Trif 的小鼠对蛋白抗原免疫的抗体反应没有明显缺陷^[6]。他们使用的佐剂包括 IFA、完全弗氏佐剂(Complete Freund's Adjuvant, CFA)、Ribi 佐剂(包含 MPL)等。另外一家实验室采用与 Pasare 研究相似的模型,也未发现 B 细胞 TLR 信号对 LPS 混合铝佐剂(Alum)增强抗体反应的作用有影响^[7]。这些结果都对 B 细胞 TLR 信号在疫苗免疫中的作用提出了质疑。

为了明确 TLR 信号增强抗体反应的机制,我们构建了 Myd88 条件等位基因(Myd88^{fl}),并在此基础上获得了包括 B 细胞在内的各种 MyD88 细胞特异性敲除小鼠。与常用的 B 细胞过继转移实验相比,该模型受外界因素干扰小,且容易得到充足的实验材料,适合对不同免疫条件进行系统的比较。为了避免佐剂刺激其他天然免疫信号通路的影响,实验中采用的 TLR 配体是 CpG ODN。后者增强抗体反应的作用几乎完全依赖 MyD88 信号。在这样的条件下,我们发现对于蛋白抗原免疫,B 细胞的 TLR 信号对抗体反应几乎没有影响。这个结果不受抗原免疫原性强弱的影响,也不受 CpG ODN 与抗原结合形式的影响。相反,树突状细胞(Dendritic Cells,DC)的 TLR 信号对于增强抗体反应却至关重要^[8]。这与天然免疫受体信号能促进 DC 呈递抗原,活化 CD4⁺ T 细胞来帮助 B 细胞的经典免疫活化模式相一致。但是,B 细胞 TLR 信号的作用仍然令人困惑,因为难以想象 B 细胞表达 TLR 的目的就是为了刺激自身抗体产生。

这个“奇怪”的现象让我们思考人和小鼠 B 细胞都进化出 TLR 的原因。考虑到抗体反应在抗感染免疫中的关键作用,我们猜想关键在于 B 细胞 TLR 信号是否会增强抗病毒免疫应答。基于该思路,我们采用了一种病毒样颗粒(Virus-Like Particle,VLP)来免疫小鼠。这种 VLP 来源于 Q β 噬菌体,通过人工改造可以使其内部包含有 CpG ODN 佐剂,能模拟病毒的基因组成分刺激 TLR 信号。并且由于其没有感染性,还可以避免病毒复制和免疫逃逸对实验造成的干扰。在免疫这种 VLP 后,实验发现缺陷 B 细胞 MyD88 的小鼠产生的特异性 IgG 水平比野生对照小鼠明显降低,特别是 IgG2 等抗体亚型^[8]。相反,DC 的 TLR 信号对于这种抗体反应基本没有影响。这些结果与 OVA 等可溶性蛋白抗原的抗体反应形成了明显对比,初步证实了我们的猜想。随后,对一种小鼠逆转录病毒(Friend Virus)和淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒(Lymphocytic Choriomeningitis Virus,LCMV)的感染进行进一步研究,证实了 B 细胞 TLR 的确在抗病毒抗体反应发挥关键作用^[9-11]。

这项研究还有一个意外的发现。在对比含有 CpG ODN 的 VLP 与“空”VLP 混合 CpG ODN 免疫应答时,我们发现前者产生的抗体反应明显比后者强,但是刺激脾脏细胞产生 TNF- α 、IL-6 等炎症

细胞因子的效应却明显减弱。该结果说明佐剂增强抗体反应的作用并非总与刺激炎症反应的效应正相关。那么,是什么机理让 VLP 具有这种近乎理想的疫苗特点呢?

3 “自我”与“非我”免疫识别的新途径

除了 TLR 可以分辨抗原“自我”与“非我”性质,淋巴细胞表达另一种免疫识别受体是 B、T 细胞分别表达的 B 细胞抗原受体(B Cell Receptor,BCR)和 T 细胞受体(T Cell Receptor,TCR)。这两种抗原受体都产生于细胞发育过程中的抗原受体基因的 V(D)J 基因重组,因此数量庞大并在细胞上呈克隆性分布。但是,单独的抗原受体信号并不足以诱导细胞克隆增殖和免疫效应功能分化,这被归究于为了避免自身反应性克隆被自身抗原异常活化的进化选择。目前被广泛接受的淋巴细胞活化模式是:除了抗原受体信号,淋巴细胞还需要天然免疫信号提供的辅助信号作用才能发生克隆增殖和效应细胞分化。

CD4⁺ T 细胞在大多数疫苗免疫应答中发挥关键作用。CD4⁺ T 细胞抗原受体识别由 APC 的主要组织相容性复合物 II 类分子(Major Histocompatibility Complex Class II,MHC-II)呈递的抗原多肽。组成性表达 MHC-II 分子的人和小鼠细胞有巨噬细胞、DC、和 B 细胞等。巨噬细胞是最早被发现具有抗原呈递功能的天然免疫细胞。但是,Steinman 等人比较了巨噬细胞和 DC 抗原呈递功能后,发现巨噬细胞无法活化初始(Naive)T 细胞,只有 DC 能做到。因此提出对 T 细胞的抗原呈递分为“致敏期”和“效应期”两个不同阶段^[12]。前者是指 APC 对初始 T 细胞的活化阶段;后者则是指各种效应细胞通过抗原呈递获得 T 细胞帮助的过程。由于初始 T 细胞首先需要被某种 APC 活化才能获得帮助其他效应细胞的能力,因此,这种 APC 就必须具备分辨抗原是“自我”还是“非我”的能力。为了强调具有这种特殊能力的 APC 对后续免疫应答的决定性作用,Matzinger 将其称为“专职性抗原提呈细胞”(Professional Antigen Presenting Cell)以示区别^[13]。在不少文献和教科书中,专职性 APC 被泛指为包括巨噬细胞在内的表达 MHC-II 分子的细胞。这样的概念并不准确,容易产生误解,因此需要被纠正。

DC 是第一种被明确有专职性 APC 功能的细

胞。早期研究发现体外培养时 DC 就可以活化初始 T 细胞,因此曾被认为是一种“天然佐剂”细胞。但后来发现培养的 DC 在组织分离过程中已经被活化,特别是当溶液中有细菌 LPS 污染时。现在知道 DC 表达多种天然免疫受体,包括 TLR。在被 LPS 等刺激后,这些 TLR 不但能够活化 DC 抗原呈递,还能促进 DC 表达 CD80、CD86 等共刺激分子和产生 IL-12 等细胞因子。这些因子共同作用引起初始 T 细胞的活化和分化。这个机制也是教科书描述初始 T 细胞活化的经典模型。因此,靶向 DC 抗原呈递也成为绝大多数新疫苗设计的基础。需要强调的是,这仍然是非常简化的模型,对于解释 DC 如何在体内发挥作用存在局限。例如,DC 也分为有不同发育和功能的亚群,虽然早期体外实验未发现它们抗原呈递功能有明显差别,但近些年的体内研究却发现不同 DC 亚群在不同免疫应答中有明显的分工^[14]。此外,在 DC 识别病原信号方面的研究也发现,DC 除了能被自身的 TLR 活化外,还能被周边其他被 TLR 信号刺激后产生的细胞因子所活化^[15]。因此,尽管 Janeway 和 Steinman 等人开创性的研究给我们提供了一个解释免疫识别的基本模型,但是对于感染、自身免疫等真实情况下的免疫应答,仍有许多重要问题需要解决。

B 细胞也是一种 APC。早期的抗体清除实验曾经支持 B 细胞具有专职性 APC 功能,但后来使用 B 细胞遗传缺陷小鼠却未发现对 T 细胞的活化有作用,说明 B 细胞的 APC 功能至少并不是对于所有 T 细胞免疫应答都是必需的。后来,对生发中心(Germinal Center, GC)滤泡辅助 T 细胞(T-Follicular Helper, Tfh)的研究再度唤起了对 B 细胞 APC 功能的兴趣。Tfh 是由 CD4⁺ T 细胞分化产生的一个独立亚群,能够帮助 GC B 细胞增殖和亲和力成熟,对于蛋白疫苗诱导的免疫应答至关重要。在 B 细胞缺陷的小鼠中,免疫一周后 Tfh 的发育出现了明显的障碍^[16],这说明 B 细胞在 Tfh 分化中的重要作用。但是,进一步的研究却发现活化的 CD4⁺ T 细胞在免疫 2~3 天后就能开始表达 Bcl-6、CXCR5 等 Tfh 特征性转录因子和趋化因子受体^[17-19],说明 B 细胞不是决定 Tfh 分化的专职性 APC,但可能对 Tfh 的维持起作用。

那么 B 细胞的 APC 功能是否仅仅是为了获得 T 细胞的帮助呢?为了研究 VLP 活化 T 细胞的机制,我们在 Q β -VLP 中插入了一段来源于 OVA 的

多肽,后者可以被 MHC-II 呈递来活化 TCR 转基因 CD4⁺ OT-II T 细胞。出乎意料的是,研究发现免疫 MD4 小鼠后 CD4⁺ T 细胞的增殖和向 Tfh 分化都表现出明显障碍^[20]。MD4 小鼠没有能结合 VLP 的 B 细胞,说明抗原特异性 B 细胞在启动 VLP 诱导的 CD4⁺ T 细胞反应中发挥着关键作用。通过进一步清除小鼠体内 DC,证实了 CD4⁺ T 细胞的活化也不受影响,这些小鼠甚至还能产生正常的 GC。相反,当缺乏 B 细胞 MHC-II 或 TLR 时,Tfh 的分化都出现明显的障碍,说明 B 细胞的确需要自身的 APC 功能和 TLR 来帮助 T 细胞分辨“非我”抗原。这些结果证实 B 细胞才是 Q β -VLP 的关键专职性 APC(图 1)。接下来,利用灭活的流感病毒免疫也发现了类似的现象^[20],说明 B 细胞的专职性 APC 作用也适用于真正的病原。近来,又有研究发现小鼠疟疾感染模型中 Tfh 的产生不依赖 DC,但却需要 B 细胞^[21]。这些新的研究表明 B 细胞的专职性 APC 功能可能是在病原感染或者类病毒抗原免疫时才发挥关键作用。虽然 B 细胞和 DC 都有专职性 APC 功能令阐明各自机能变得困难,但却避免了免疫系统被病原所轻易“欺骗”,因此在进化上对个体生存更具优势。

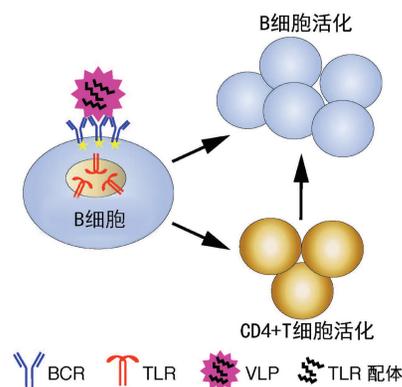


图 1 B 细胞的专职性抗原呈递细胞功能(在感染病毒或者免疫具有病毒特征的纳米颗粒抗原的情况下,B 细胞 BCR 和 TLR 信号的协同作用除了能刺激本身活化外,还能将抗原特异性 B 细胞转变成专职性 APC 来启动初始 CD4⁺ T 细胞活化与分化,进而促进 B 细胞介导的体液免疫应答。)

4 两种专职性 APC 启动免疫应答的特点

了解淋巴细胞免疫应答启动的机理对于设计疫苗至关重要。自从作用被发现以来,DC 一直是疫苗设计时考虑的重要靶细胞。随着 B 细胞专职性

APC 功能被发现,预计对于研究靶向 B 细胞 APC 功能的兴趣会不断增加。因此,有必要对这两种专职性 APC 的特点进行梳理。

这两种 APC 在静息状态下都表达 MHC-II,被活化后都能上调共刺激分子,因此都具备活化 CD4⁺ T 细胞的基本能力。作为专职性 APC、DC 和 B 细胞都表达天然免疫受体 TLR 来增强它们辨别“自我”与“非我”的能力,确保在启动免疫应答时做出正确的判断。在某些条件下,DC 自身的 TLR 信号能够被它周围细胞分泌的细胞因子所替代。目前还不清楚 B 细胞 TLR 信号是否也会被周围因子替代或增强。B 细胞对 I 型和 II 型干扰素都很敏感,这两类细胞因子都在抗病毒免疫应答中起到重要作用。有研究发现 B 细胞的 IFN- γ 信号能够增强自身免疫模型的 GC 反应^[22, 23],这说明 B 细胞的 APC 功能也可能被某些细胞因子调控。

B 细胞和 DC 的 APC 功能也有各自明显的特点。首先在组织分布上,DC 广泛地分布于皮肤、粘膜和淋巴器官等组织;而 B 细胞主要存在于脾脏、淋巴结等二级淋巴器官。因此,DC 可能更适合监控外周组织中的外来抗原,而 B 细胞能更好地发现引流到淋巴和血液循环中的病原。其次是获取抗原的方式,DC 在大多数情况下都是通过非特异性的受体结合或者胞吞作用获取抗原,而 B 细胞主要是通过 BCR 结合抗原。由于 BCR 结合抗原的亲合力高,B 细胞对于微量的抗原非常敏感,尤其是当抗原具有重复性表位的时候,因为多价结合可以大幅增加与抗原的亲合力(Avidity)。我们发现当将 VLP 剂量由 20 μg 降低 2 000 倍后,免疫产生的 GC 反应强度没有明显下降。但是,伴随 B 细胞抗原敏感性高而来的问题是特异性 B 细胞数量稀少,实验检测显示小鼠特异性 B 细胞只占全身淋巴细胞的万分之一到十万分之一。当缺少能与抗原高亲合力结合的 B 细胞时,但如果抗原是被注射到组织中,由于局部浓度高,仍然能被数量众多的 DC 所捕获和提呈给 T 细胞。

为什么 B 细胞不是可溶性蛋白抗原的专职性 APC 呢?这可能与 B 细胞需要 TLR 信号刺激有关。病毒核酸或者类病毒颗粒中的 TLR 配体都被抗原包裹,只有在抗原被 BCR 结合内吞后才能刺激 TLR。BCR 与 TLR 信号这种序贯或者协同作用有利于更好地刺激 B 细胞增殖和分化。因此,B 细胞有可能同时需要 BCR 和 TLR 的刺激才能变成专职

性 APC,当仅将可溶性蛋白与 TLR 佐剂混合免疫时,由于 B 细胞胞内的 TLR 不能敏感地感受环境中的 TLR 佐剂,这种作用就难以发生。甚至当提前刺激 TLR 信号后,B 细胞的 APC 功能反而会被抑制^[24]。

B 细胞通过 BCR 捕获 VLP 抗原也有利于减少 TLR 配体非特异的免疫刺激作用。过去认为 DC 善于捕获颗粒抗原,但研究发现 DC 对于数十纳米尺度的病毒颗粒捕获效果明显不如抗原特异性 B 细胞^[20]。当 VLP 抗原浓度低时(如当抗原扩散到血液循环),其携带的 TLR 配体大多数都被抗原传递给 B 细胞,对 DC 细胞的刺激作用反而减弱。相反,当 CpG 等 TLR 配体被直接以混合方式注射给小鼠时,游离的 TLR 配体能够更容易被 DC 等吞噬细胞捕获,刺激产生更多的炎症因子,这可以解释为什么注射 VLP 抗原比注射 CpG 引起的炎症因子明显减弱。

5 靶向 B 细胞专职性 APC 功能的创新疫苗发展策略

我们研究的 VLP 来自于 RNA 噬菌体 Q β ,最早是由 Pumpens 实验室构建和研究^[25]。当 Q β 噬菌体的衣壳蛋白在大肠杆菌中表达时,会自动组装成包含 180 单体的正二十面体结构,直径约 30 nm 左右。由于 Q β -VLP 内部富含带正电的氨基酸侧链,在组装时还会装载上细菌的单链 RNA (Single-Stranded RNA, ssRNA)。这些 ssRNA 也可以人工置换成 CpG ODN,能分别刺激 TLR7 或者 TLR9^[26]。因此,用 Q β -VLP 免疫时不需要额外添加其他佐剂。需要指出的是,并非所有 VLP 都具有这种结构,目前广泛使用的乙肝病毒(Hepatitis B Virus, HBV)和人乳头瘤病毒(Human Papilloma Virus, HPV)的疫苗抗原成分都是 VLP,但它们内部不含核酸成分。根据以上发现,我们推测这些“空”VLP 不能利用 B 细胞,而需要 DC 来活化初始 CD4⁺ T 细胞,实际上这两种疫苗都需要添加佐剂来提高免疫原性。为了区分这些免疫原理不同的 VLP,我们将 Q β -VLP 这类 VLP 称为病原样抗原(Pathogen-Like Antigen, PLA),因为它们无论从结构还是免疫启动机理都更类似病毒等病原抗原的特点。

除了本身就有强免疫原性外,PLA 颗粒较大的表面积也使它们成为极具潜力的疫苗平台,可以用来展示免疫原性较弱的抗原分子(图 2)。在这个领

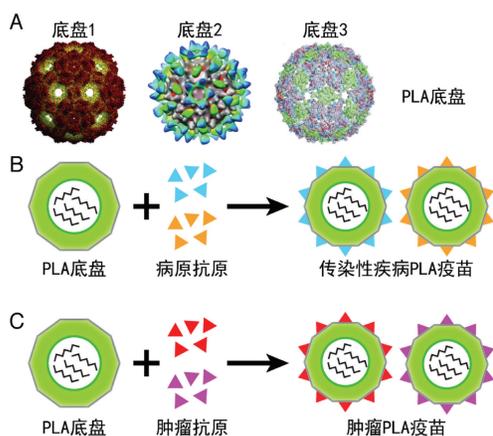


图2 PLA疫苗的合成生物学构建原理(A. PLA可以采用多种与Q β -VLP免疫活性相似的VLP或者人工合成纳米颗粒作为抗原展示底盘;B. 利用PLA底盘和病原抗原构建传染性疾病PLA疫苗,用于应对新发、突发传染病;C. 构建肿瘤抗原的PLA疫苗,增强肿瘤抗原免疫原性。)

域, Bachmann 等人进行了广泛的研究^[27]。他们通过化学方法将尼古丁、流感病毒 M2e 多肽等半抗原或者抗原连接在 Q β -VLP 表面上, 这样疫苗可以显著提高对抗原分子的抗体反应。该作用依然依赖 VLP 载体能刺激 B 细胞 TLR 信号, 其效果也与所连接抗原的表面密度有关, 说明合成 VLP 也能与底盘 VLP 相同的机理活化免疫应答。在人体内, 以 Q β -VLP 为底盘的疫苗也展现出良好的耐受性和免疫增强效果。例如, Kundig 等以尘螨致敏原 Der p1 为抗原构建了 Q β -Der p1 疫苗, 并对 24 名过敏病人进行免疫。结果显示这种疫苗可以显著增强对 Der p1 的 I 型免疫应答, 减少过敏症状; 同时没有出现明显副作用^[28]。有趣的是, 在另一项临床 II 期试验中, 299 名过敏患者连续 6 周接受了 Q β -VLP 或安慰剂注射治疗后过敏症状也得到明显改善^[29]。虽然 Q β -VLP 发挥抗过敏作用的具体机制尚不清楚, 但可以充分表明 PLA 疫苗具有良好的安全性, 为未来的临床应用奠定了基础。

现在, 对 PLA 免疫核心原理的阐明为解决佐剂的“两难问题”提供了一个全新的思路。近年来, VLP 等纳米颗粒平台的发展和对抗原组装方式的改进也为构建 PLA 疫苗提供了更多的选择。例如, AP205-VLP 也是一种来源于噬菌体的 VLP, 内部也装载核酸, 并能更好地通过融合表达方式装载外源蛋白。利用一种细菌的 Split-Intein (SpyTag/SpyCatcher) 连接系统, 可以先将 AP205-VLP 和抗原蛋白分别连接上 SpyTag 短肽和 SpyCatcher 蛋

白, 然后通过 SpyCatcher 和 SpyTag 之间共价连接反应将抗原连接在 AP205-VLP 的表面^[30]。这种组装方式除了连接反应条件更温和, 抗原的排列也比常规化学偶联更均一, 有利于正确展示抗原表位和被 B 细胞识别。这些技术的发展和应用的极大拓展了 PLA 疫苗应用的范围。更重要的是, 采用“二元合成”的疫苗构建方式为疫苗构建带来许多便利, 包括: (1) PLA 的所有元件均采用独立制备, 便于保证最佳生产条件; (2) 改变抗原的灵活性高, 有利于应对病原变异造成的疫苗失效; (3) PLA 底盘有一定通用性, 便于提前生产备用。另一方面, 由于 PLA 疫苗增强免疫原性的效果更显著, 还可以节省疫苗中的抗原使用剂量, 有利于迅速扩大接种范围。这些特点都使 PLA 疫苗策略能更有效地应对新发、突发传染病威胁。

6 总结和展望

面对各种重大传染性疾病的挑战, 创新疫苗的发展不能仅仅依赖对材料、表达与递送方式等方面的渐进式改进, 同时还需要对免疫基础理论不断发现和突破。通过对 TLR 信号增强免疫应答机制的探索, 我们发现了 B 细胞识别病毒抗原“非我”机制对启动适应性免疫应答的重要作用, 突破了以 DC 为中心的传统免疫理论。在这个理论指导下, 通过 PLA 设计策略靶向 B 细胞专职性 APC 功能, 构建的候选疫苗能够克服天然免疫佐剂的“两难”问题, 为创新疫苗设计带来了全新的思路。未来, 结合深度测序技术对病原遗传信息的快速发现, 以及冷冻电镜等技术对病毒抗原结构的快速解析, 有望在利用合成生物学方法发展 PLA 疫苗上取得重大的突破和成就。

致谢 本文中的“病原样抗原(PLA)”术语源自原同事唐宏研究员(现中国科学院上海巴斯德研究所)的构想和建议, 对此深表感谢。

参 考 文 献

- [1] Janeway CA. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 1989, 54 Pt 1: 1—13.
- [2] Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology*, 2002, 20: 197—216.
- [3] Coffman R, Sher A, Seder RA. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity*, 2010, 33 (4): 492—503.

- [4] Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 2006, 124(4): 83—801.
- [5] Pasare C, Medzhitov R. Control of B-cell responses by Toll-like receptors. *Nature*, 2005, 438(7066): 364—368.
- [6] Gavin AL, Hoebe K, Duong B, et al. Adjuvant-enhanced antibody responses in the absence of toll-like receptor signaling. *Science*, 2006, 314(5807): 1936—1938.
- [7] Meyer-Bahlburg A, Khim S, Rawlings DJ. B cell intrinsic TLR signals amplify but are not required for humoral immunity. *Journal of Experimental Medicine*, 2007, 204(13): 3095—3101.
- [8] Hou B, Saudan P, Ott G, et al. Selective utilization of Toll-like receptor and MyD88 signaling in B cells for enhancement of the antiviral germinal center response. *Immunity*, 2011, 34(3): 375—384.
- [9] Browne EP. Toll-like receptor 7 controls the anti-retroviral germinal center response. *PLoS Pathogens*, 2011, 7(10): e1002293.
- [10] Clingan JM, Matloubian M. B Cell-intrinsic TLR7 signaling is required for optimal B cell responses during chronic viral infection. *Journal of Immunology*, 2013, 191(2): 810—818.
- [11] Walsh KB, Teijaro JR, Zuniga EI, et al. Toll-like receptor 7 is required for effective adaptive immune responses that prevent persistent virus infection. *Cell Host Microbe*, 2012, 11(6): 643—653.
- [12] Steinman R, Inaba K. Immunogenicity: Role of dendritic cells. *Bioessays*, 1989, 10(5): 145—152.
- [13] Lassila O, Vainio O, Matzinger P. Can B cells turn on virgin T cells?. *Nature*, 1988, 334(6179): 253—255.
- [14] Durai V, Murphy KM. Functions of Murine Dendritic Cells. *Immunity*, 2016, 45(4): 719—736.
- [15] Hou BB, Reizis B, DeFranco AL. Toll-like receptors activate innate and adaptive immunity by using dendritic cell-intrinsic and -extrinsic mechanisms. *Immunity*, 2008, 29(2): 272—282.
- [16] Haynes NM, Allen C, Lesley R, et al. Role of CXCR5 and CCR7 in follicular Th cell positioning and appearance of a programmed cell death gene-1high germinal center-associated subpopulation. *Journal of Immunology*, 2007, 179(8): 5099—5108.
- [17] Baumjohann D, Preite S, Reboldi A, et al. Persistent antigen and germinal center B cells sustain T follicular helper cell responses and phenotype. *Immunity*, 2013, 38(3): 596—605.
- [18] Kerfoot SM, Yaari G, Patel JR, et al. Germinal center B cell and T follicular helper cell development initiates in the interfollicular zone. *Immunity*, 2011, 34(6): 947—960.
- [19] Kitano M, Moriyama S, Ando Y, et al. Bcl6 protein expression shapes pre-germinal center B cell dynamics and follicular helper T cell heterogeneity. *Immunity*, 2011, 34(6): 961—972.
- [20] Hong S, Zhang Z, Liu H, et al. B cells are the dominant antigen-presenting cells that activate naive CD4⁺ T cells upon immunization with a virus-derived nanoparticle antigen. *Immunity*, 2018, 49(4): 695—708.
- [21] Arroyo EN, Pepper M. B cells are sufficient to prime the dominant CD4⁺ Tfh response to plasmodium infection. *The Journal of Experimental Medicine*, 2020, 217(2): e20190849.
- [22] Domeier PP, Chodiseti SB, Soni C, et al. IFN-gamma receptor and STAT1 signaling in B cells are central to spontaneous germinal center formation and autoimmunity. *The Journal of Experimental Medicine*, 2016, 213(5): 715—732.
- [23] Jackson SW, Jacobs HM, Arkatkar T, et al. B cell IFN-gamma receptor signaling promotes autoimmune germinal centers via cell-intrinsic induction of BCL-6. *The Journal of Experimental Medicine*, 2016, 213(5): 733—750.
- [24] Akkaya M, Akkaya B, Kin AS, et al. Toll-like receptor 9 antagonizes antibody affinity maturation. *Nature Immunology*, 2018, 19(3): 255—266.
- [25] Tissot AC, Renhofa R, Schmitz, et al. Versatile virus-like particle carrier for epitope based vaccines. *PLoS One*, 2010, 5(3): e9809.
- [26] Jegerlehner A, Maurer P, Bessa J, et al. TLR9 signaling in B cells determines class switch recombination to IgG2a. *Journal of Immunology*, 2007, 178(4): 2415—2420.
- [27] Gomes AC, Mohsen M, Bachmann MF. Harnessing Nanoparticles for Immunomodulation and Vaccines. *Vaccines (Basel)*, 2017, 5(1): 6.
- [28] Kundig TM, Senti G, Schnetzler G, et al. Der p 1 peptide on virus-like particles is safe and highly immunogenic in healthy adults. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2006, 117(6): 1470—1476.

- [29] Klimek L, Willers J, Hammann-Haenni A, et al. Assessment of clinical efficacy of CYT003-QbG10 in patients with allergic rhinoconjunctivitis: a phase IIb study. *Clinical and Experimental Allergy*, 2011, 41(9): 1305—1312.
- [30] Thrane S, Janitzek CM, Matondo S, et al. Bacterial superglue enables easy development of efficient virus-like particle based vaccines. *Journal of Nanobiotechnology*, 2016, 14: 30.

New Immune Mechanism of “Self vs Non-Self” Discrimination and Its Implication in Designing Novel Vaccines

Hua Zhaolin^{1,2} Hou Baidong^{1,2,3*}

1. *Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101*

2. *University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049*

3. *Center of Excellence for Science and Technology Integration of Biomacromolecules, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101*

Abstract Inducing the adaptive responses of B and T lymphocytes is the centerpiece of the immune protection caused by infection or vaccination. During the process, a determining step is to make correct recognition “self vs non-self” of the antigen by the immune system. In 1989, Janeway CA proposed the hypothesis of the existence of the innate immune receptors that are able to recognize the molecular patterns of pathogens, which led to subsequent discovery of innate immune receptors such as Toll-like receptors (TLR). This epoch-making discovery greatly enriched our understanding of molecular mechanism of immune recognition, and helped to establish the current immune activation paradigm in which the innate immune signaling critically regulates the adaptive immune responses. An exemplary application of this theory in vaccine design is using adjuvant to stimulate innate immune signals for the enhancement of immune response to vaccination. Nevertheless, the complex and diverse in vivo immune response demonstrated that the mechanism of natural immune signals is still unknown. In the review, we summarized the previous research on the topic of TLR signaling in promoting antibody response to protein antigen. In addition, we introduced the discovery of the selective use of B cell TLR signaling, and the critical function of B cell antigen presentation in the initiation of anti-viral adaptive immune responses. Finally, we proposed the concept that targeting B cell immune recognition can be used as a new strategy to design novel vaccines.

Keywords immune recognition; Toll-like receptor; professional antigen-presenting cells; antibody response; vaccine

(责任编辑 张强)

* Corresponding Author, Email: baidong_hou@ibp.ac.cn