

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.27.001

携带不同 HBV 抗原基因片段的重组腺相关病毒 转染树突状细胞诱导 CTL 的效应研究*

安 选¹, 刘 勇², 向 毅¹, 魏 芳¹, 夏莉娜¹, 钟 庆¹, 杜 彪¹, 巫贵成^{1△}
(1. 重庆三峡中心医院肝病中心, 重庆 404000; 2. 美国阿肯色医科大学, 小石城 72205)

[摘要] **目的** 了解携带不同 HBV 抗原基因片段的重组腺相关病毒(rAAV-HBV-S、C、E、X)转染慢性乙型肝炎患者来源的树突状细胞(DC)诱导细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)的效应。**方法** 采用携带不同 HBV 抗原基因片段的 rAAV-HBV-S、C、E、X 转染慢性乙型肝炎患者外周血中分离出的单核细胞,并在 GM-CSF、IL-4 和 TNF- α 作用下继续培养 7 d 获得成熟的 DC。通过观察 DC 的状态和流式细胞仪(FACS)检测各段 HBV 转染后 DC 分化抗原(CD)的表达,评价其成熟与功能。将同一个体的 DC 与 T 细胞混合培养制备 CTL,通过四甲基偶氮唑盐(MTS)细胞杀伤实验研究被激活的 CTL 对 HBV 感染的靶细胞 HepG2.2.15 特异性的细胞毒作用。**结果** 不同 HBV 抗原基因 rAAV-HBV-S、C、E、X 转染 DC 后 CD14、CD80、CD83、CD86 的表型表达中,CD80、CD83 差异有统计学意义($P < 0.05$);rAAV/HSV-X 转染的 DC 其 CD80 表达最高,rAAV/HSV-S 转染的 DC 其 CD83 表达最高。转染不同 HBV 抗原基因片段 rAAV(S、C、E、X)的 DC 诱导的 CTL 对 MHC-I 类抗原阳性且有 HBV 的靶细胞(HepG2.2.15)的特异性杀伤效率显著高于对无 HBV 的靶细胞(HepG2)的非特异性杀伤效应($P < 0.01$),但不同 rAAV-HBV 组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** rAAV-HBV-S、C、E、X 转染 DC 均可诱导 CTL 引起 MHC-I 依赖的特异性细胞毒效应。

[关键词] 肝炎病毒,乙型;树突细胞;T 淋巴细胞,细胞毒性;人主要组织相容性复合物;腺相关病毒

[中图分类号] R392.12 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2016)27-3745-03

Study on the killing effect of cytotoxic T lymphocytes induced by dendritic cells transduced recombinant adenovirus associated virus with different hepatitis B virus gene fragment*

An Xuan¹, Liu Yong², Xiang Yi¹, Wei Fang¹, Xia Lina¹, Zhong Qing¹, Du Biao¹, Wu Guicheng^{1△}

(1. Chongqing Three Gorges Central Hospital, Chongqing 404000, China; 2. Gene & Biotherapy Center, University of Arkansas for Medical Sciences, Little Rock, Arkansas 72205, USA)

[Abstract] **Objective** To compare the killing effect of cytotoxic T lymphocytes(CTLs) induced by dendritic cells transduced recombinant adenovirus associated virus (rAAV) with different hepatitis B virus gene fragment (rAAV-HBV-S, C, E, X). **Methods** Peripheral blood mononuclear cells(PBMCs) from chronic hepatitis B patients were isolated and transduced recombinant adeno-associated virus with different hepatitis B virus (HBV) antigen gene fragment (rAAV-HBV-S, C, E, X), then GM-CSF, IL-4 and TNF α were added to cultivate for 7 days to generate mature dendritic cells (DCs). The state of DCs were observed and differentiation antigen molecules (CD) were detected by flow cytometry(FACS) to evaluate their maturation and function. Cytotoxic T lymphocytes (CTLs) were induced by the mixed culture of DCs with prepared T lymphocytes. HepaG2.2.15 and HepaG2 were targeted cells and the killing effect of CTLs were compared using MTS assay. **Results** The expression of phenotype CD14, CD80, CD83, CD86 from DCs transduced with rAAV-HBV-S, C, E, X were compared, respectively. Of which, CD80, CD86 were significantly different ($P < 0.05$). CD80 in group rAAV-HBV-X was the highest, and CD83 in group rAAV-HBV-S was the highest. Cytotoxic effect of CTL induced by DC transduced with HBV antigen gene fragment of rAAV (S, C, E, X) to target cells with HBV (HepG2.2.15 cells) were significantly higher than that of without HBV target cells (HepG2 cells) ($P < 0.01$), but the four groups were no significant difference, respectively ($P > 0.05$). **Conclusion** HBV-S, C, E, X genes all induce MHC-I dependently cytotoxic T-lymphocytes specific response based adeno-associated virus (AAV) vector delivery into dendritic cells.

[Key words] hepatitis B virus; dendritic cells; T-lymphocytes, cytotoxic; major histocompatibility complex; adeno-associated virus

慢性乙型病毒性肝炎的治疗目前仍然是临床医师面临的重大挑战,主要的药物有核苷(酸)类药物和干扰素两大类^[1];前者虽然具有较好的抑制病毒复制的作用,却由于血清学应答率容易复发而难以停药,后者虽然血清学应答优于前者,但抗原转阴和转换率仍然不理想^[2-3]。因此,寻求新的方法以期实现满意以至理想的治疗终点一直是近年来临床工作者追求的目标^[4]。本研究旨在比较以腺相关病毒(adenovirus associated virus, AAV)2 型为载体,携带不同乙型肝炎基因片段 S(C 基

因型)、C、E、X 即重组腺相关病毒(rAAV-HBV-S、C、E、X)感染树突状细胞(DCs)诱导细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)的细胞毒效应,为慢性乙型肝炎免疫治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及重组腺相关病毒 GM-CSF、IL-4、TNF- α 等细胞因子购自美国 Peprotech 公司, AIM-V 培养基购自美国 Gibco 公司。人 HBV-S、E、C 和 X 抗体购自美国 Chemicon 公司, 荧光 FITC 标记二抗及同型对照购自美国 BD 公司。

* 基金项目:重庆市自然科学基金资助项目(csts2012jjA10110)。

作者简介:安选(1978—),主治医师,硕士,主要从事各种肝病的研究。

△ 通讯作者, E-mail: 351094703@qq.com。

rAAV-HBV-S、E、C、X 病毒由美国阿肯色州立医科大学基因治疗中心刘勇教授惠赠,其构建、扩增和纯化均在阿肯色州立医科大学基因治疗中心完成,病毒滴度可以达到 10^7 copy/mL 以上。靶细胞人肝癌细胞系, HepG2 及 HepG2. 2. 15 细胞株购自中国典型培养物保藏中心(CCTCC)。HepG2. 2. 15 细胞是在 HepG2 细胞转染了 HBV 基因并稳定表达 HBV 的细胞株。

1.2 主要仪器 流式细胞仪(FACS,美国 Millipore 公司),高速离心机(美国 Thermo 公司),酶标仪(美国 Thermo 公司)。

1.3 研究对象与靶细胞人主要组织相容复合物 I 类分子(MHC-I)HLA 配型 按照 2010 年《慢性乙型肝炎防治指南》的诊断标准,经过伦理委员会同意,在知情同意的基础上选取重庆三峡中心医院 18~60 岁 e 抗原阳性的慢性乙型病毒性肝炎住院患者为研究对象,排除甲、丙、丁、戊型病毒性肝炎,酒精性肝炎,自身免疫性肝炎,药物性肝炎,重型乙型肝炎和肝癌。抽取患者的外周血分离单个核细胞与实验靶细胞(HepG2 及 HepG2. 2. 15 细胞)进行 MHC-I 类抗原位点检测配型。

1.4 DC 的分离培养和转染 rAAV-HBV-S、E、C 和 X 用淋巴细胞分离液分离外周血单个核细胞(PBMCs)后,将细胞重悬于 AIM-V 培养基中,于六孔培养板中 37°C , $6\% \text{CO}_2$ 培养 3 h,将未贴壁细胞用 PBS 轻洗后用含有重组 IL-2(终浓度为 20 U/mL)的 AIM-V 培养基重悬后以 2×10^6 /孔加入到六孔板中用于 T 细胞(CTL 的前期细胞)体外诱导扩增,隔日换半量换液备用。在贴壁细胞中每孔分别加入 $100 \mu\text{L}$ 重组 rAAV-HBV-S、E、C 和 X 病毒(按照每 1×10^8 细胞加入 $200 \mu\text{L}$ 的比例, MOI 相当于 400)感染细胞,同时在 AIM-V 培养基中加入 900 U/mL GM-CSF 于 37°C , $6\% \text{CO}_2$, 过夜培养。病毒感染后第 1 天,将细胞培养上清液去除。隔天半量更换培养液,同时加入 GM-CSF(终浓度为 900 U/mL)和 IL-4(终浓度为 1000 U/mL)。在培养第 5 天加入 10 ng/mL TNF- α , 培养第 7 天收获细胞。

1.5 rAAV-HBV-S、E、C 和 X 重组病毒感染 DC 的检测 流式细胞仪间接荧光法检测 DC 内 HBV 相应抗原的表达:将感染的 DC 经 PBS 洗涤 3 次后,用 4% 多聚甲醛室温固定 15 min, 750 r/min 离心 5 min, 弃上清液;将穿透剂(含 1% BSA, 0.1% 皂素, 0.24% HEPES 的 PBS)按每 1×10^6 个细胞加入 1.5 mL 的比例加入,室温作用 15 min 后离心弃上清液。在细胞沉淀中加入 $10 \mu\text{L}$ 抗 HBV 相应抗体室温闭光标记 60 min, 洗涤后加 FITC 标记的二抗,再用穿透剂洗涤一次, $500 \mu\text{L}$ 的 PBS 重悬细胞,上机检测。

1.6 DC 成熟状态的检测 将收获的两组细胞用 PBS 洗涤两遍后, 1200 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 细胞沉淀用 $50 \mu\text{L}$ 含 1% 胎牛血清的 PBS 重悬。细胞管中加入抗 CD14-FITC、抗 CD80-CY5 各 $20 \mu\text{L}$, 在细胞管中加入抗 CD83-FITC, 抗 CD86-CY5 各 $20 \mu\text{L}$, 同时做一管 FITC/PE/CY5 三标同型对照, 闭光标记 30 min 后, 各管分别加入 3 mL PBS 洗涤两遍, 1200 r/min , 离心 5 min, 弃上清液, 细胞沉淀用 $500 \mu\text{L}$ PBS 重悬, 上机检测。

1.7 DC 诱导 CTL 在 6 孔板内, 以 AIM-V 为培养基, 参照前期实验及文献[5]研究报道按 DC : T = 1 : 20 的比例混合 DC 和 T 细胞。同时加入 IL-2(终浓度为 100 U/mL)以及 IL-7(终浓度为 40 U/mL)共培养, 每隔 1 天半量换液, 以充分诱导激活特异性的 CTL。

1.8 四甲基偶氮唑盐(MTS)法分析 HBV 特异性的 CTL 杀伤作用 使用 CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Prolif-

eration Assay 试剂盒, 收获 HBV 抗原特异性 AAV 激活的成熟 CTL, 并按照 20 : 1(前期研究结果最佳效靶比)将其与靶细胞(转染 HBV 基因的 HepG2. 2. 15 细胞或无 HBV 的 HepG2 细胞)混合并接种于 96 孔板中, 置于 37°C , $6\% \text{CO}_2$ 培养箱中。孵育 6 h 后, 加入 MTS 试剂, 再置于 37°C , $6\% \text{CO}_2$ 培养箱孵育 1 h 后, 使用酶标仪读取波长为 570 nm 的吸光度(A)值, 计算杀伤率。杀伤率($\%$) = $[1 - (\text{实验孔 A 值} - \text{效应孔 A 值}) / \text{靶细胞孔 A 值}] \times 100\%$ 。

1.9 流式细胞仪间接荧光细胞内染色检测 HBV 目的基因的表达 分别使用 4 种携带不同 HBV 抗原的 AAV 感染单核细胞, 使用 AIM-V 培养基、GM-CSF、IL-4、TNF- α 等试剂将其在 7 d 内诱导为成熟的 DC 细胞, 收获 DC 细胞, 进行流式胞内检测处理后, 使用流式细胞仪检测 4 种 HBV 抗原的表达率。

1.10 统计学处理 采用 SPSS21.0 软件统计分析实验数据, 部分图表由 Graphpad prism 6 软件绘制。所有计量资料均表示为 $\bar{x} \pm s$, 多组数据间差异的比较采用方差分析, 配对样本之间的比较采用 *t* 检验; 计数资料采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HLA 配型 靶细胞(HepG2 及 HepG2. 2. 15 细胞)与慢性乙型肝炎患者外周血进行 MHC-I 成功配型, 保证被激活的 CTL 细胞特异性杀伤靶细胞具有严格的 MHC-I 型限制性。

2.2 DC 细胞的体外培养 分离出的 PBMCs 于 AIM-V 培养液中培养 4 h 即有部分细胞贴壁, 经 rAAV-HBV 感染刺激后, 在含有 GM-CSF/IL-4/TNF- α 的 AIM-V 培养液中, 单核细胞向 DC 分化及成熟。各实验组 AAV 感染组在细胞形态及细胞数量上差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 不同 rAAV 感染 DC 效率 FACS 检测感染 DC 中荧光标记的阳性细胞内 HBV-S、C、E、X 相应抗原的表达, 分别为 86.87% 、 85.03% 、 89.51% 和 89.40% , 各组间差异无统计学意义($P > 0.05$), 见表 1。

表 1 携带不同 HBV 基因片段腺相关病毒感染效率($\%$)

| 基因片段 | 第 1 次 | 第 2 次 | 第 3 次 | 平均值 |
|------------|-------|-------|-------|-------|
| rAAV-HBV-S | 87.29 | 86.54 | 86.77 | 86.87 |
| rAAV-HBV-C | 82.52 | 89.48 | 83.09 | 85.03 |
| rAAV-HBV-E | 88.52 | 90.71 | 89.30 | 89.51 |
| rAAV-HBV-X | 98.14 | 98.44 | 71.60 | 89.40 |

2.4 DC 细胞表型的检测 携带不同乙肝病毒抗原的 rAAV 感染外周血单核细胞后, 在含有 GM-CSF/IL-4/TNF- α 的 AIM-V 培养液中, 单核细胞向 DC 分化及成熟。在培养后第 6 天, 流式分析收获 DC 的表型 CD14、CD80、CD83、CD86, 组间 CD80 和 CD83 的表达差异有统计学意义($P < 0.05$), 其中 CD80 以 rAAV-HBV-X 为最高, CD83 以 rAAV-HBV-S 最高, 见表 2 和图 1。

表 2 携带不同 HBV 基因片段腺相关病毒对 DC 的表型和功能的影响($\%$, $\bar{x} \pm s$)

| 项目 | rAAV-HBV-S | rAAV-HBV-E | rAAV-HBV-C | rAAV-HBV-X | <i>P</i> |
|------|-------------------|------------------|-------------------|-------------------|----------|
| CD14 | 9.95 ± 0.07 | 11.65 ± 2.65 | 9.69 ± 4.84 | 8.47 ± 0.27 | 0.590 |
| CD80 | 70.58 ± 5.13 | 50.71 ± 7.31 | 48.45 ± 8.66 | 73.50 ± 1.49 | 0.002 |
| CD86 | 59.33 ± 17.05 | 55.83 ± 0.58 | 58.13 ± 3.52 | 64.86 ± 12.10 | 0.763 |
| CD83 | 79.65 ± 2.71 | 46.99 ± 1.36 | 59.53 ± 14.15 | 68.31 ± 2.45 | 0.004 |

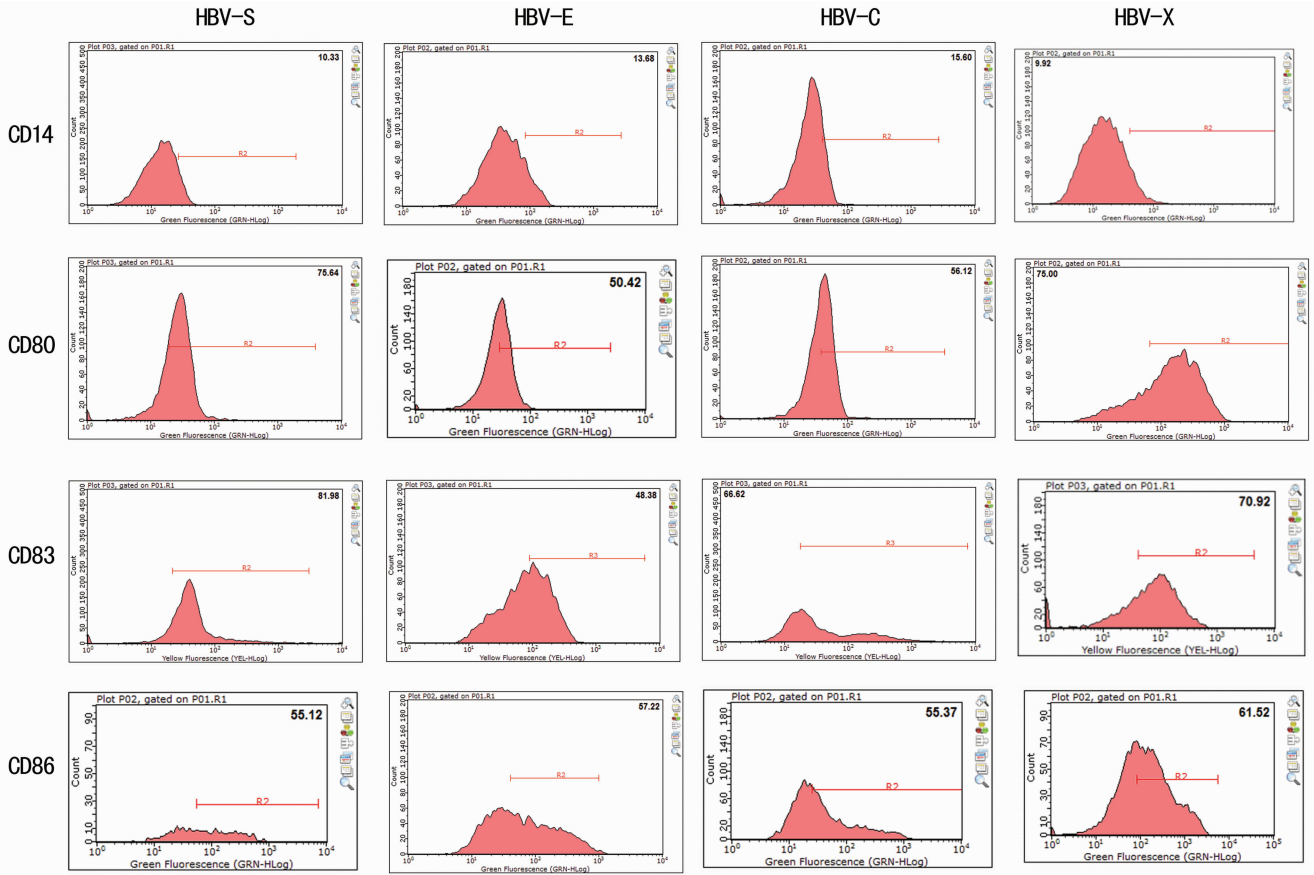


图 1 流式细胞仪检测不同 HBV 基因片段腺相关病毒转染 DC 对其表型的影响

2.5 不同 rAAV-HBV 转染 DC 诱导的 CTL 特异性的细胞毒效应 rAAV-HBV-S、C、E、X 转染 DC 诱导的 CTL 特异性的杀伤靶细胞 HepG2. 2. 15(表达 HBV 抗原的靶细胞)与对照组 HepG2(不表达 HBV 抗原的靶细胞)相比均差异有统计学意义($P < 0.01$),但不同基因片段之间对 HepG2. 2. 15 靶细胞的杀伤作用差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 2 和表 3。

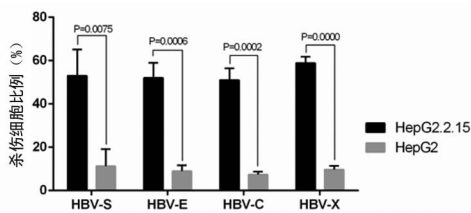


图 2 携带乙型肝炎基因片段的 rAAV 转染 DC 诱导的 CTL 对靶细胞的杀伤效应

表 3 不同 rAAV-HBV 转染 DC 诱导的 CTL 的细胞杀伤效应比较(%, $\bar{x} \pm s$)

| 靶细胞 | HBV-S | HBV-E | HBV-C | HBV-X | P |
|--------------|-------------|------------|------------|------------|---------|
| HepG2. 2. 15 | 53.01±12.16 | 52.02±6.99 | 51.06±5.39 | 58.90±2.92 | 0.414 1 |
| HepG2 | 11.30±7.81 | 8.95±2.73 | 7.39±1.39 | 9.67±1.68 | 0.559 2 |

3 讨论

乙型肝炎是一个免疫相关性疾病,其中树突状细胞在 HBV 清除与慢性化中扮演了重要角色。以乙型肝炎疫苗负载的 DC 治疗乙型肝炎有一定的效果^[6-7];但由于疫苗作为蛋白质抗原半衰期短、降解快,刺激 DC 不充分而效果不理想,如果用 HBV 基因片段转染树突状细胞诱导 CTL 治疗慢性乙型病

毒性肝炎,有可能克服乙型肝炎疫苗负载 DC 刺激不充分的缺点^[8-10]。

AAV 是一种安全和稳定的载体,已被美国 FDA 宣布为最安全、最理想的病毒载体^[11];以负载肿瘤基因的 AAV 在肿瘤治疗上已有较多的研究^[12-14]。文献^[15-16]已证明经扩增纯化的携带 HBV 的 C 基因片段的重组 AAV 能高效转染 DC,并促进其成熟和功能表达,也能刺激 CTL 引起细胞的毒效应。本研究进一步比较了携带 HBV S、C、E、X 4 种基因片段的重组 AAV 转染 DC 后诱导 CTL 的细胞毒效应。不同 rAAV 刺激 DC 表型表达有一定差异,其中 CD80 和 CD83 差异有统计学意义,其中 CD80 以 rAAV-HBV-X 为最高,CD83 以 rAAV-HBV-S 最高。

尽管在刺激 DC 表型的表达上携带不同 HBV 基因片段的 rAAV-HBV-S、C、E、X 之间差异有统计学意义,但 4 种抗原基因均能诱导 CTL 的特异性杀伤效应,4 组间差异无统计学意义。提示 4 种基于重组腺相关病毒转染树突状细胞的治疗慢性乙型肝炎技术均可能成为治疗慢性乙型病毒性肝炎的新方向,有必要进行临床研究进一步评价。

参考文献

- [1] 中华医学会肝病学会、中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2010 年版)[J]. 中华肝病杂志, 2011,19(1):13-24.
- [2] 顾生旺,高凯旋,刘欢. 树突状细胞治疗 42 例核苷(酸)类似物和(或)干扰素经治慢性乙型肝炎患者的临床研究[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版),2015,7(3):85-88.
- [3] Hagiwara S, Nishida N, Kudo M. Antiviral therapy for chronic hepatitis B; Combination of nucleoside(下转第 3752 页)

- [13] Ropke M, Boltze C, Meyer B, et al. Rb-loss is associated with high malignancy in chondrosarcoma[J]. *Oncol Rep*, 2006, 15(1):89-95.
- [14] 胡松. 抑癌基因 TCF21 对肺癌细胞 A549 增殖, 迁移和凋亡的影响[J]. *中国肺癌杂志*, 2014, 17(4):302-307.
- [15] Quaggin SE, Vanden Heuvel GB, Igarashi P. Pod-1, a mesoderm-specific basic-helix-loop-helix protein expressed in mesenchymal and glomerular epithelial cells in the developing kidney[J]. *Mech Dev*, 1998, 71(1/2):37-48.
- [16] Wu YY, Sato F, Yamada T, et al. The BHLH transcription factor DEC1 plays an important role in the epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer[J]. *Int J Oncol*, 2012, 41(4):1337-1346.
- [17] Xu Q, Ma P, Hu C, et al. Overexpression of the DEC1 protein induces senescence in vitro and is related to better survival in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *PLoS One*, 2012, 7(7):e41862.
- [18] Liu Y, Miao Y, Wang J, et al. DEC1 is positively associated with the malignant phenotype of invasive breast cancers and negatively correlated with the expression of claudin-1[J]. *Int J Mol Med*, 2013, 31(4):855-860.
- [19] Liu Y, Wang L, Lin XY, et al. The transcription factor DEC1 (BHLHE40/STRA13/SHARP-2) is negatively associated with TNM stage in non-small-cell lung cancer and inhibits the proliferation through cyclin D1 in A549 and BE1 cells[J]. *Tumour Biol*, 2013, 34(3):1641-1650.
- [20] Zhu Y, Xu L, Zhang J, et al. Sunitinib induces cellular senescence via p53/Dec1 activation in renal cell carcinoma cells[J]. *Cancer Sci*, 2013, 104(8):1052-1061.
- [21] Wu Y, Sato H, Suzuki T, et al. Involvement of c-Myc in the proliferation of MCF-7 human breast cancer cells induced by bHLH transcription factor DEC2[J]. *Int J Mol Med*, 2015, 35(3):815-820.
- [22] You JM, Lin L, Liu Q, et al. The correlation between the expression of differentiated embryo-chondrocyte expressed gene 1 and oral squamous cell carcinoma[J]. *Eur J Med Res*, 2014, 19:21.
- [23] Suzuki M, Sato F, Bhawal UK. The basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor DEC2 negatively regulates Twist1 through an E-box element[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 455(3/4):390-395.
- [24] Li Y, Bi Z. Ultraviolet-B induced expression of hypoxia-inducible factor 1 α , transferrin receptor through EGFR/PI3K/AKT/DEC1 pathway[J]. *Front Med China*, 2007, 1(1):79-86.
- [25] Bandiera R, Vidal VP, Motamedi FJ, et al. WT1 maintains adrenal-gonadal primordium identity and marks a population of AGP-like progenitors within the adrenal gland[J]. *Dev Cell*, 2013, 27(1):5-18.
- [26] Fumarola C, Bonelli MA, Petronini PG, et al. Targeting PI3K/AKT/mTOR pathway in non small cell lung cancer[J]. *Biochem Pharmacol*, 2014, 90(3):1.

(收稿日期:2016-02-18 修回日期:2016-04-06)

(上接第 3747 页)

- analogs and interferon[J]. *World J Hepatol*, 2015, 7(23):2427-2431.
- [4] Minami M. Future therapy for hepatitis B virus infection[J]. *Clin J Gastroenterol*, 2015, 8(4):167-171.
- [5] Liu Y, Chiriva-Internati M, You C, et al. Use and specificity of breast cancer antigen/milk protein BA46 for generating anti-self-cytotoxic T lymphocytes by recombinant adeno-associated virus-based gene loading of dendritic cells[J]. *Cancer Gene Ther*, 2005, 12(3):304-312.
- [6] Manzoor S, Saalim M, Imran M, et al. Hepatitis B virus therapy: What's the future holding for us? [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(44):12558-12575.
- [7] Liu T, Song HL, Zheng WP, et al. Inhibition of HBV replication in HepG2. 2. 15 cells by human peripheral blood mononuclear cell-derived dendritic cells[J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2015, 45(5):495-501.
- [8] 邱燕, 杨彬, 柳纪省. 重组腺相关病毒载体的研究进展[J]. *生物技术通报*, 2012, 11:49-53.
- [9] You CX, Shi M, Liu Y, et al. AAV2/IL-12 gene delivery into dendritic cells (DC) enhances CTL stimulation above other IL-12 applications Evidence for IL-12 intracrine activity in DC[J]. *Oncoimmunology*, 2012, 1(6):847-855.
- [10] 刘勇, 吴邦富, 胡媛媛. 抗 HBV-DC 联合药物治疗乙型肝炎病毒携带者的临床疗效[J]. *中国药物经济学*, 2014, 9(21):37-38.
- [11] Gaudet D, Méthot J, Déry S, et al. Efficacy and long-term safety of alipogene tiparvovec (AAV1-LPL S447X) gene therapy for lipoprotein lipase deficiency: an open-label trial[J]. *Gene Ther*, 2013, 20(4):361-369.
- [12] Büning H, Perabo L, Coutelle O, et al. Recent developments in adeno-associated virus vector technology[J]. *J Gene Med*, 2008, 10(7):717-733.
- [13] Rey-Rico A, Cucchiari M. Controlled release strategies for rAAV-mediated gene delivery[J]. *Acta Biomater*, 2016, 29(29):1-10.
- [14] Dai SL, Zhuo M, Song LL, et al. Dendritic cell-based vaccination with lentiviral vectors encoding ubiquitinated hepatitis B core antigen enhances hepatitis B virus-specific immune responses in vivo[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2015, 47(11):870-879.
- [15] 丛敏, 王萍, 阎钟钰, 等. 含乙型肝炎病毒 C 基因的重组腺相关病毒对树突状细胞的作用[J]. *中华肝脏病杂志*, 2005, 13(1):17-19.
- [16] You H, Liu Y, Cong M, et al. HBV genes induce cytotoxic T-lymphocyte response upon adeno-associated virus (AAV) vector delivery into dendritic cells[J]. *J Viral Hepat*, 2006, 13(9):605-612.

(收稿日期:2016-04-18 修回日期:2016-07-06)