

杜露平,鲁海燕,侯立婷,等.免疫增强剂CVC1302调控体细胞高频突变的机制研究[J].华中农业大学学报,2025,44(1):211-216.
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2025.01.023

免疫增强剂CVC1302调控体细胞高频突变的机制研究

杜露平^{1,2},鲁海燕^{1,2},侯立婷^{1,2},于晓明^{1,2},程海卫^{1,2},
张元鹏^{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,泰州 225300

摘要 为探究CVC1302调控生发中心B细胞发生体细胞高频突变的免疫机制,本研究将4-羟基-3-硝基苯乙酰基耦联鸡卵白蛋白(NP-OVA)混合免疫增强剂CVC1302后,利用ISA206乳化获得疫苗。BALB/c小鼠分为2组,分别后腿肌肉注射NP-ISA206和NP-CVC1302-ISA206,每只50 μg NP-OVA,免疫后14 d,利用流式分选获得生发中心B细胞,利用巢氏PCR扩增B细胞免疫球蛋白序列可变区VH_{186.2},Western blot检测诱导活化的胞苷脱氨酶(AID)、Pax5表达水平,β-actin作为内参,比较组间AID、Pax5表达差异;利用荧光定量PCR检测AID、Pax5基因转录水平。试验结果显示:CVC1302显著诱导生发中心B细胞免疫球蛋白序列VH_{186.2}突变频率,试验组W33L突变频率为62.2%,而对照组仅为20.25%;CVC1302可提升AID蛋白、Pax5蛋白表达水平,其中试验组AID蛋白相对表达水平为0.72,对照组仅为0.16,试验组Pax5蛋白相对表达水平为0.62,对照组仅为0.26;CVC1302增强AID基因、Pax5基因转录水平,相较于对照组分别提高2.36、4.13倍。推断CVC1302依赖Pax5介导AID表达,调控生发中心B细胞发生体细胞高频突变。

关键词 免疫增强剂CVC1302;体细胞高频突变;免疫机制;生发中心B细胞;胞苷脱氨酶;Pax5

中图分类号 S852.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2025)01-0211-06

机体感染病原体或者接受免疫后,引流淋巴结内抗原特异性B细胞被激活迁移至初级淋巴小结,并在该处快速克隆增殖,进而形成生发中心(germinal center, GC)^[1]。组织学上,生发中心分为暗区和明区^[2]。暗区是GC B细胞迅速增殖分裂并进行体细胞高频突变(SHM)的场所,明区则是GC B细胞接受滤泡树突状细胞(FDC)和滤泡辅助性T细胞(Tfh)帮助,进行命运选择的场所。GC B细胞经过SHM,产生各种B细胞克隆,且B细胞受体(BCR)的亲合力各不相同。其中表达高亲和力受体的B细胞竞争性结合FDC递呈的抗原抗体复合物,并递呈至Tfh,依赖CD40-CD40L配接,促进抗凋亡转录因子B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)和B细胞超大淋巴瘤(Bcl-X_L)的表达,使其免于凋亡^[3]。GC B细胞发生SHM依赖于诱导活化的胞苷脱氨酶(activation-induced cytidine deaminase, AID),AID与单链DNA上的胞

嘧啶结合,使其脱氨后转变为尿嘧啶,随后经过错配修复和碱基切除修复,导致原位C:G发生处发生点突变、插入或删除,影响抗体亲和力成熟^[4-5]。AID的表达主要由活化B细胞的CD40信号调控,其次也可进一步由CD4⁺T细胞分泌的IL-4及Toll样受体(TLR)信号正向调控^[6]。一系列胞内信号转导通路整合引起AID动态调控,其中包括正向调控因子,如配对盒蛋白(Pax5)、同源框C4(HoxC4)、核转录因子E47和干扰素调节因子8(IRF8);负向调控因子,如B淋巴细胞诱导成熟蛋白1(Blimp1)和DNA结合抑制蛋白2(Id2)^[7]。AID基因含有4个主要的顺式调控原件,其中区域2位于AID的第1个内含子区,包含Pax5、E2A、Myb和E2F等转录因子结合位点。研究^[8-9]发现,利用TLR4激动剂LPS作用于小鼠脾脏B细胞,Pax5 mRNA水平于第2天快速提升,并且AID开始表达,第4天Pax5 mRNA水平呈下降趋

收稿日期:2023-12-15

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)

杜露平,E-mail:duluping@126.com

通信作者:陈瑾,E-mail:chenjin@jaas.ac.cn

势,同时伴随着AID表达降低。

免疫增强剂CVC1302组分包含TLR和NOR激动剂。前期研究^[10-12]发现,CVC1302配伍NP-OVA模式抗原免疫小鼠,相较于NP免疫组小鼠,其高亲和力NP特异性抗体水平显著提升。在兽医领域中,免疫增强剂多停留于研制层面,对其作用机制的研究甚少。体细胞高频突变加之T_H细胞阳性选择是抗体亲和力成熟的关键,因此,本试验探究CVC1302介导高亲和力抗体的免疫机制是否依赖于Pax5表达介导AID表达进而诱导体细胞高频突变,旨在研制新型免疫增强剂以促进GC B细胞产生体细胞高频突变,分泌高亲和力抗体提升疫苗效力,为机体提供免疫保护力。

1 材料与方法

1.1 试验材料

5周龄BALB/c雌性小鼠购自扬州大学;NP-OVA购自美国Bioscience Technologies公司;免疫增强剂CVC1302为笔者所在团队制备所得;MontanideTM-ISA206购自上海Seppic特殊化学品有限公司;RNA提取试剂盒和Real-time PCR mix购自武汉ABclonal有限公司;anti-GL-7-PE荧光抗体购于上海优宁维有限公司;单克隆抗体AID和Pax5购于华安生物有限公司;HRP-羊抗兔IgG购自武汉博士得有限公司;高敏性ECL发光试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

1.2 免疫抗原制备

本研究参照文献^[10]制备疫苗,NP-OVA(4-羟基-3-硝基苯乙酰基耦联鸡卵白蛋白)利用磷酸缓冲液(PBS)溶解后,与CVC1302混合制备水相(50:1),涡旋混匀后利用ISA206进行乳化(1:1),即获得疫苗并命名为NP-CVC1302-ISA206。

1.3 小鼠免疫试验

将10只小鼠随机均分为2组,分别免疫NP-ISA206和NP-CVC1302-ISA206,肌肉注射,50 μg NP-OVA/只,1 μL CVC1302/只。

1.4 GC B细胞分选

免疫后14 d,采集小鼠腹股沟淋巴结,用PBS冲洗3次,将淋巴结置于70 μm滤网上进行研磨,获得单个淋巴细胞。细胞先利用B细胞负选磁珠进行初次分选,随后用anti-GL-7-PE进行染色,用流式分选仪分选获得GC B细胞,一部分细胞提取RNA,利用Real-time PCR检测AID转录水平;一部分细胞利用

试剂盒提取蛋白,利用Western blot检测AID表达水平。

1.5 巢氏PCR及VH_{186.2}突变频率分析

分选获得的GC B细胞利用试剂盒提取基因组DNA,通过巢氏PCR扩增VH_{186.2}片段,引物见表1。

外部引物PCR程序为:95℃ 5 min,95℃ 1 min,55℃ 30 s,72℃ 1 min,共进行25个循环;72℃延伸10 min。内部引物PCR程序为:95℃ 5 min,95℃ 1 min,55℃ 30 s,72℃ 30 s,共进行25个循环;72℃延伸10 min。跑胶回收扩增的VH_{186.2}片段并连接到pMD18-T载体(Takara)上利用T7引物进行测序;测序结果利用IgBlast(NCBI)进行分析统计。

表1 巢氏PCR用引物对序列

Table 1 Sequences of primers for nested-PCR

目的基因 Target gene	引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequences (5'-3')
VH _{186.2}	外部引物-F Outer primer-F	GTGACAACAAT- GATTAGACCCCTG
	外部引物-R Outer primer-R	AGCTCTATCAT- GCTCTTCTTGGCA
	内部引物-F Inner primer-F	GTGACAACAAT- GATTAGACCCCTG
	内部引物-R Inner primer-R	AGATGGAGGCCAGT- CAGGGAC

1.6 GC B细胞AID和Pax5转录水平检测

将分选获得的2组GC B细胞分别用Trizol提取RNA,反转录为cDNA后,利用Real-time PCR分别检测基因AID和Pax5转录水平,以β-actin作为内参基因,试验所涉及的基因引物见表2。程序为:95℃ 10 min,95℃ 15 s,60℃ 1 min,72℃ 1 min,共进行40个循环。

1.7 GC B细胞AID、Pax5表达水平检测

取相同数目分选的GC B细胞置于冰上,加入蛋白裂解液,冰上裂解约30 min,每10 min在震荡仪上混匀涡旋1次。将样品置于离心机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AID、Pax5一抗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AID条带灰度值/β-actin条带灰度值和Pax5条带灰度值/β-actin条带灰度值。

表 2 实时荧光定量 PCR 用引物对序列
Table 2 Sequences of primers for real-time PCR

目的基因 Target gene	引物序列(5'-3') Primer sequences (5'-3')	退火温度/℃ Annealing temperature
<i>β-actin</i>	CACTGCCGCATCCTCTTCC/CAATAGTGATGACCTGGCCGT	
<i>AID</i>	GGAGAGATAGTGCCACCTCC/TCTCAGAAACTCAGCCACGT	53
<i>Pax5</i>	CACAGTCCTACCCTATTGTCAC/TCCAGAAAATTCACTCCCAGG	

1.8 统计与分析

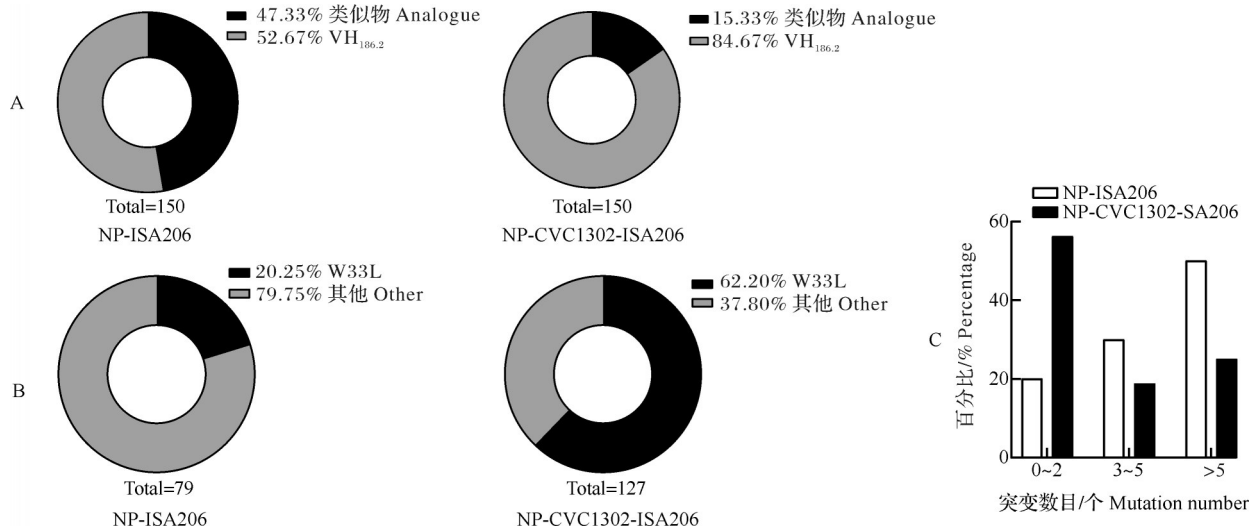
试验数据表示为“平均值±标准差”,利用 Graph Prism 软件进行数据分析、作图,以 $P<0.01$ 和 $P<0.001$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 $VH_{186.2}$ 片段突变频率分析

考虑到抗体亲和力成熟与体细胞高频突变相关联,因此,小鼠免疫后 14 d,制备淋巴结细胞,流式分选 GC B 细胞,并利用巢氏 PCR 对 $VH_{186.2}$ 片段进行测序分析。由图 1 可知,CVC1302 可显著影响 $VH_{186.2}$ 及对应类似物 Analogue 家族在整体克隆内所

占的比例(图 1A),经统计分析发现,NP-CVC1302-ISA206 组小鼠 $VH_{186.2}$ 片段 W33L 突变频率高达 62.20%,而 NP-ISA206 组小鼠 $VH_{186.2}$ 片段 W33L 突变频率仅为 20.25%(图 1B)。图 1C 为 $VH_{186.2}$ 片段不同氨基酸突变数目的比较,NP-CVC1302-ISA206 组小鼠氨基酸突变个数多为 0~2,占 56.25%;而 NP-ISA206 组突变个数多大于 5,占 50%,然而其突变氨基酸多位于 FR 区。结果表明,CVC1302 可以诱导 GC B 细胞发生显著的体细胞高频突变,进而使高亲和力 GC B 细胞在 FDC 和 Tfh 细胞辅助下分化为浆母细胞,随血液循环并定居于骨髓,转变为长寿浆细胞,持续分泌高亲和力抗体。



A: $VH_{186.2}$ 片段占比; B: W33L 突变频率; C: $VH_{186.2}$ 片段氨基酸突变频率。A: The percentage of $VH_{186.2}$; B: The mutation ratio of W33L; C: The mutation ratio of amino acid of $VH_{186.2}$.

图 1 CVC1302 诱导 $VH_{186.2}$ 片段突变

Fig.1 CVC1302 induced mutation of $VH_{186.2}$

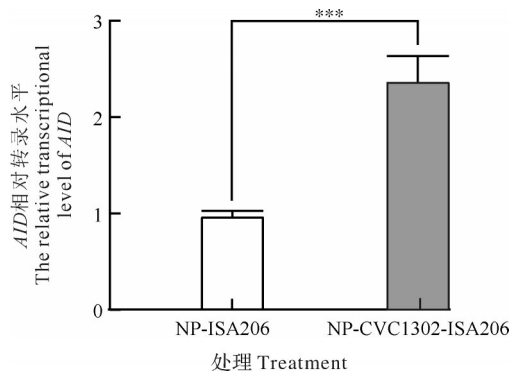
2.2 CVC1302 促进 GC B 细胞 AID 转录和表达

考虑到体细胞高频突变主要由 AID 介导,本研究比较分析 NP-CVC1302-ISA206 与 NP-ISA206 对照组诱导 AID 转录与表达水平。由图 2 可知,NP-CVC1302-ISA206 组小鼠 GC B 细胞中 AID 转录水平为 NP-ISA206 组小鼠的 2.36 倍,二者差异极显著 ($P<0.001$);NP-CVC1302-ISA206 组及 NP-ISA206 组 AID 的相对表达水平分别为 0.721、0.161,二者差

异极显著 ($P<0.001$,图 3)。结果表明,免疫增强剂 CVC1302 配伍 NP-OVA 免疫小鼠,GC B 细胞 AID 转录和表达水平得到显著提升。

2.3 CVC1302 促进 GC B 细胞中 Pax5 转录和表达

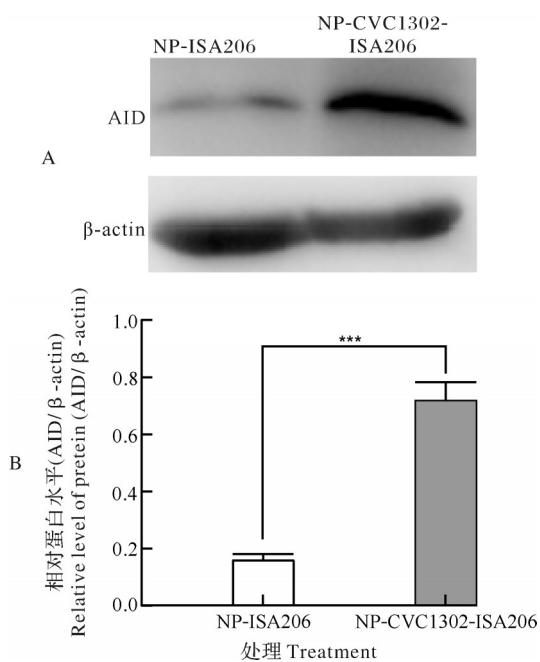
小鼠免疫后 14 d,取腹股沟淋巴结,流式分选获得 GC B 细胞,分别利用 Real-time PCR 和 Western blot 分别检测 Pax5 转录和表达水平。由图 4 可知,



表示 $P < 0.01$, 差异极显著; *表示 $P < 0.001$, 差异极显著。下同。 ** represent extremely significant differences between groups ($P < 0.01$); *** represent extremely significant differences between groups ($P < 0.001$). The same as below.

图2 CVC1302处理下GC B细胞AID基因转录水平

Fig.2 CVC1302 regulates the transcription level of AID in GC B cells



A: AID蛋白表达; B: AID蛋白相对表达水平。A: AID protein expression; B: Relative expression level of AID protein.

图3 CVC1302处理下GC B细胞AID表达水平

Fig.3 CVC1302 regulates the expression level of AID in GC B cells

NP-CVC1302-ISA206组小鼠GC B细胞中Pax5转录水平为NP-ISA206小鼠的4.13倍,二者差异极显著($P < 0.001$);同时二者Pax5蛋白表达水平差异极显著($P < 0.01$,图5)。结果表明,CVC1302可显著提升GC B细胞Pax5转录和表达水平。

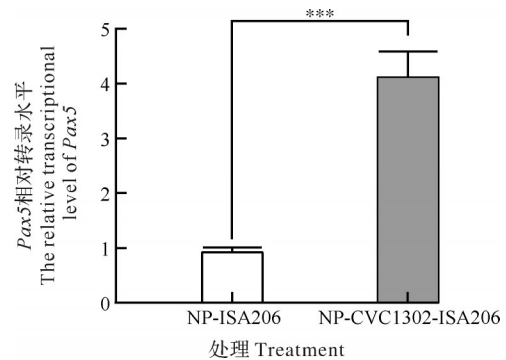
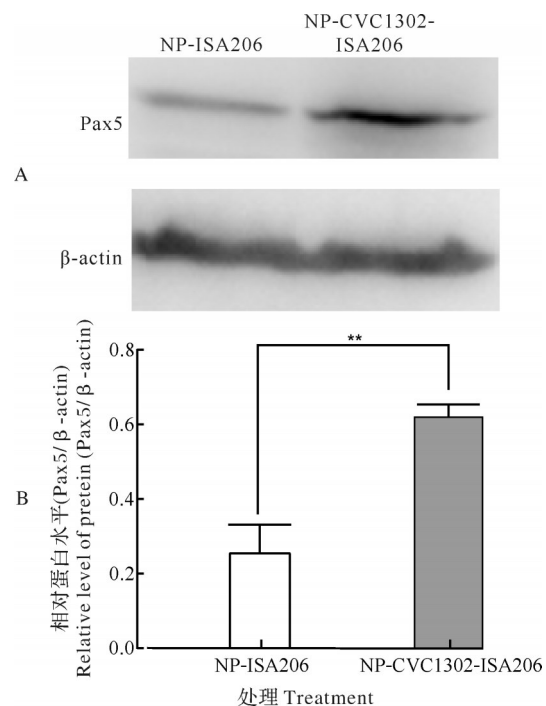


图4 CVC1302处理下GC B细胞Pax5基因转录水平

Fig.4 CVC1302 regulates the transcription level of Pax5 in GC B cells



A: Pax5蛋白表达; B: Pax5蛋白相对表达水平。A: Pax5 protein expression; B: Relative expression level of Pax5 protein.

图5 CVC1302处理下GC B细胞Pax5表达水平

Fig.5 CVC1302 regulates the expression level of Pax5 in GC B cells

3 讨论

免疫增强剂的研制注重于抗体水平及其持续期的检测,然而高亲和力的抗体可以更高效地识别并中和病原体,以抵抗高毒力病原体感染。文献中关于免疫增强剂调控AID也仅限于其表达量的变化^[13],本研究利用模式抗原NP-OVA免疫小鼠,注重分析免疫增强剂CVC1302如何调控AID表达进而诱导高亲和力抗体。

位于生发中心暗区的GC B细胞增殖分裂,与此同时,AID作用于单链DNA,使GC B细胞重链和轻链的V区基因发生SHM。突变后的GC B细胞间BCR亲和力存在差异,进入明区后,经过FDC和Tfh细胞的双重辅助后,具有高亲和力BCR的B细胞分化为浆细胞,其分泌的抗体对抗原具有高亲和力,此现象为亲和力成熟^[14]。抗体亲和力提升可以更高效地识别并中和病原体,为机体提供高效体液免疫保护力。AID的表达水平多依赖于转录过程中多种转录因子的调控,研究发现,Pax5可促进AID的表达,进而介导SHM^[15]。本研究发现,NP-CVC1302-ISA206组小鼠中GC B细胞VH_{186.2}片段中W33L突变的频率显著提升,研究报道称第33位氨基酸W突变为L,其抗体亲和力可提升10倍,表明CVC1302可显著提升抗体亲和力^[16],这一发现与笔者前期的研究结果(高亲和力NP特异性抗体水平显著提升)一致;此外本研究发现,CVC1302可显著提升Pax5的转录及表达水平,进而促进AID的转录及表达,后续将集中探究CVC1302提升Pax5表达所涉及的相关信号通路。本研究利用NP-OVA混合CVC1302免疫小鼠,阐明CVC1302依赖于Pax5正向调控AID使GC B细胞发生SHM,提升抗体亲和力抵抗强毒力病毒的感染,为机体提供高效的免疫保护力。

参考文献 References

- [1] VICTORA G D, NUSSENZWEIG M C. Germinal centers [J]. Annual review of immunology, 2012,30:429-457.
- [2] YOUNG C, BRINK R. The unique biology of germinal center B cells[J]. Immunity, 2021,54(8):1652-1664.
- [3] MAYER C T, GAZUMYAN A, KARA E E, et al. The microanatomic segregation of selection by apoptosis in the germinal center[J/OL]. Science,2017,358(6360):eaao2602[2023-12-15]. <https://doi.org/10.1126/science.aao2602>.
- [4] WANG J H. The role of activation-induced deaminase in antibody diversification and genomic instability [J]. Immunologic research, 2013,55(1/2/3):287-297.
- [5] YU K F. AID function in somatic hypermutation and class switch recombination [J]. Acta biochimica et biophysica sinica, 2022,54(6):759-766.
- [6] CHEN Z G, WANG J H. Signaling control of antibody isotype switching [J]. Advances in immunology, 2019, 141: 105-164.
- [7] YEAP L S, MENG F L. Cis- and trans-factors affecting AID targeting and mutagenic outcomes in antibody diversification [J]. Advances in immunology, 2019,141:51-103.
- [8] LIN K I, ANGELIN-DUCLOS C, KUO T C, et al. Blimp-1-dependent repression of Pax-5 is required for differentiation of B cells to immunoglobulin M-secreting plasma cells [J]. Molecular and cellular biology, 2002,22(13):4771-4780.
- [9] SCHRADER C E, LINEHAN E K, MOCHEGOVA S N, et al. Inducible DNA breaks in Ig S regions are dependent on AID and UNG [J]. The journal of experimental medicine, 2005,202(4):561-568.
- [10] CHEN J, YU X M, ZHENG Q S, et al. 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] DU L P, CHEN J, HOU L T, et al. 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.
- [12] DU L P, HOU L T, YU X M, et al. Pattern-recognition receptor agonist-containing immunopotentiator CVC1302 boosts high-affinity long-lasting humoral immunity [J/OL]. Frontiers in immunology, 2021, 12: 697292 [2023-12-15]. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.697292>.
- [13] RIVERA C E, ZHOU Y L, CHUPP D P, et al. Intrinsic B cell TLR-BCR linked coengagement induces class-switched, hypermutated, neutralizing antibody responses in absence of T cells [J/OL]. Science advances,2023,9(17):eade8928[2023-12-15]. <http://doi.org/10.1126/sciadv.aade8928>.
- [14] GITLIN A D, MAYER C T, OLIVEIRA T Y, et al. T cell help controls the speed of the cell cycle in germinal center B cells [J]. Science,2015,349(6248):643-646.
- [15] NAGAOKA H, TRAN T H, KOBAYASHI M, et al. Preventing AID, a physiological mutator, from deleterious activation: regulation of the genomic instability that is associated with antibody diversity [J]. International immunology, 2010, 22(4):227-235.
- [16] CHEN D Y, WANG Y, VIJAY G K M, et al. Coupled analysis of transcriptome and BCR mutations reveals role of OXPHOS in affinity maturation [J]. Nature immunology, 2021,22(7):904-913.

Mechanism of immunopotentiator CVC1302 regulating somatic hypermutation

DU Luping^{1,2}, LU Haiyan^{1,2}, HOU Liting^{1,2}, YU Xiaoming^{1,2}, CHENG Haiwei^{1,2},
ZHANG Yuanpeng^{1,2}, CHEN Jin^{1,2}, ZHENG Qisheng^{1,2}, HOU Jibo^{1,2}

1. *Institute of Veterinary Immunology & Engineering, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/
National Research Center of Engineering and Technology for Veterinary Biologicals/
Jiangsu Key Laboratory for Food Quality and Safety, Nanjing 210014, China;*
2. *GuoTai (Taizhou) Center of Technology Innovation for Veterinary Biologicals,
Taizhou 225300, China*

Abstract ISA206 was used to obtain the vaccine by emulsifying 4-hydroxy-3-nitrophenylacetyl conjugated chicken egg white protein (NP-OVA) with immunopotentiator CVC1302 to study the immune mechanism of CVC1302 regulating the occurrence of somatic hypermutation in germinal center B (GC B) cells. Six-week-old BALB/c female mice were divided into 2 groups and immunized with NP-CVC1302-ISA206, NP-ISA206 in the hind leg muscles, with each mouse receiving 100 μ L vaccine and 50 μ g NP-OVA. Germinal center B cells were obtained with flow cytometry after 14 days of immunization, and the variable region VH_{186.2} gene sequence of immunoglobulin in GC B cells was amplified with nested-PCR. Western blot was used to detect the expression level of cytidine deaminase (AID) and Pax5 induced activation, and the differences in the expression level of AID and Pax5 between groups were compared with β -actin as an internal reference. The transcription level of *AID* and *Pax5* in GC B cells was analyzed with fluorescence quantitative PCR. The results showed that immunopotentiator CVC1302 significantly induced the mutation frequency of VH_{186.2} in the immunoglobulin sequence of germinal center B cells, with a W33L mutation frequency of 62.2% in the NP-CVC1302 immunized group and only 20.25% in the NP immunized group. CVC1302 increased the expression level of AID protein and Pax5 protein in GC B cells. The relative expression level of AID protein in the NP-CVC1302 immunized group was 0.72, while that in the NP immunized group was only 0.16. The relative expression level of Pax5 protein in the NP-CVC1302 immunized group was 0.62, while that in the NP immunized group was only 0.26. CVC1302 enhanced the transcription level of *AID* gene and *Pax5* gene in the NP-CVC1302 immunized group, which was increased by 2.36 and 4.13 times compared to that in the NP immunized group. It is indicated that CVC1302 relies on Pax5 mediated AID expression to regulate the occurrence of somatic hypermutation in germinal center B cells.

Keywords immunopotentiator CVC1302; somatic hypermutation (SHM); immune-mechanism; germinal center B (GC B) cells; AID; Pax5

(责任编辑:胡敏)