

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00874

· 论 著 ·

人巨细胞病毒 UL144 基因克隆表达及其对树突状细胞功能的影响

汪怀周,蔡刚,沈茜*

第二军医大学长海医院实验诊断科,上海 200433

[摘要] **目的:**构建携带人巨细胞病毒(hCMV) UL144 基因的重组腺病毒,研究 UL144 基因修饰的树突状细胞(dendritic cell, DC)的功能变化。**方法:**从 hCMV-DNA 阳性患者外周血提取 cDNA,采用 PCR 技术扩增出 UL144 基因。采用 AdEasy 系统构建携带 hCMV UL144 基因的重组腺病毒载体 pAd-UL144,转染 HEK293 细胞后包装产生重组腺病毒 Ad-UL144。通过 RT-PCR 检测目的基因的表达。将此重组腺病毒转染小鼠骨髓来源的 DC,采用流式细胞术检测 DC 表面分子,采用 ELISA 技术分析 DC 培养上清中的细胞因子,采用³H-TdR 掺入法检测 UL144 基因修饰的 DC 激活 T 细胞增殖的能力。**结果:**成功将 UL144 基因片段克隆至载体上,并经 HEK293 细胞包装出病毒颗粒,经测定病毒滴度为 3×10¹⁰ pfu/ml。流式细胞术检测显示,UL144 基因修饰的 DC 表面分子 CD80、CD86 和 I-A^d 表达水平低于对照组(P<0.01)。ELISA 分析表明,UL144 基因修饰的 DC 分泌 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 的能力减弱(P<0.05)。UL144 基因修饰的 DC 介导的 T 细胞增殖功能明显低于 DC 对照组(P<0.01)。**结论:**UL144 基因修饰的 DC 具有维持相对未成熟状态的能力,并减弱了对抗原特异性 T 效应细胞的刺激功能。

[关键词] 人巨细胞病毒;UL144 基因;疱疹病毒侵入介体;树突状细胞;免疫耐受

[中图分类号] R 373.11 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)08-0874-05

Clone and expression of human cytomegalovirus UL144 gene and its effects on dendritic cells

WANG Huai-zhou, CAI Gang, SHEN Qian*

Department of Clinical Diagnosis, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[ABSTRACT] **Objective:** To construct a recombinant adenovirus vector carrying human cytomegalovirus (hCMV) UL144 gene and to explore the biological characteristics of UL144 gene-modified DCs. **Methods:** The UL144 gene was amplified from hCMV DNA, which was extracted from hCMV-DNA positive serum. The recombinant adenovirus vector carrying hCMV UL144 gene was constructed with AdEasy system and then transfected into HEK293 cells to create recombinant adenovirus Ad-UL144. The expression of inserted gene was identified by RT-PCR. The recombinant adenovirus was then transfected into mice myeloid dendritic cells. The surface proteins of dendritic cells were analyzed by FACS, and cytokines in supernatant were detected by ELISA. T cell proliferation stimulated by gene-modified DC was examined by ³H-TdR uptake assay. **Results:** The UL144 gene was successfully cloned into the pAdEasy-1 plasmid. The recombinant adenovirus Ad-UL144 was packed in HEK293 cells, with a viral titer of 3×10¹⁰ pfu/ml. DCs infected with AdCMV-UL144 had markedly decreased surface expression of CD80, CD86 and I-A^d (P<0.01). The contents of TNF-α, IL-6 and IL-1β were significantly decreased in the supernatant of AdCMV-UL144 modified DCs (P<0.05). T cell proliferation ability induced by gene-modified DC was obviously lower than in the DC control group (P<0.01). **Conclusion:** UL144-modified DCs can maintain a relative immature status, and have reduced stimulating activity upon the proliferation and activation of T cells *in vitro*.

[KEY WORDS] human cytomegalovirus; UL144 gene; herpes virus entry mediator; dendritic cell; immune tolerance

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(8):874-878]

1996年 Cha 等^[1]在人巨细胞病毒(hCMV) Toledo 和几个低传代临床分离株中发现了在 AD169、Towne 等实验室株不存在的 19 个开放阅读框架(open reading frame, ORF), 定位于 hCMV 基因 UL/b' 区, 分别命名为 UL133~UL155 基因。hCMV UL144 ORF 编

码产物是一种 I 型跨膜糖蛋白, 与疱疹病毒侵入介体 (herpesvirus entry mediator, HVEM) 具有高度同源性^[2]。HVEM 属于 TNF 受体超家族的成员, 它具有双向调节 T 细胞激活的作用, 通过结合 TNF 家族的 LIGHT (lymphotoxin-like, exhibits inducible expres-

[收稿日期] 2009-01-21 **[接受日期]** 2009-05-13

[基金项目] 国家自然科学基金(30600244), Supported by National Natural Science Foundation of China(30600244).

[作者简介] 汪怀周, 硕士生, E-mail: whz_smmu@yahoo.com.cn

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81873612, E-mail: msminli@hotmail.com

sion, and competes with HSV glycoprotein D for HVEM, a receptor expressed by T lymphocytes; TNFSF14) 提供给 T 细胞一个刺激信号, 通过结合 Ig 超家族的 B/T 淋巴细胞弱化因子 (B and T lymphocyte attenuator, BTLA) 提供给 T 细胞一个抑制性信号^[3]。研究^[4]表明, UL144 蛋白能够和 BTLA 结合, 并且抑制 T 细胞的增殖, 模拟了 HVEM 的共抑制功能。树突状细胞 (dendritic cell, DC) 是重要的专职抗原递呈细胞, 在免疫应答中起关键作用; hCMV 能够通过感染 DC 影响其抗原递呈功能, 抑制 T 细胞活化^[5-6]。本实验构建了携带 hCMV UL144 基因的重组腺病毒, 并将其转染 DC, 研究 UL144 基因修饰的 DC 的功能变化。

1 材料和方法

1.1 动物和试剂 雄性、6~8 周龄的 C57BL/6 小鼠 (H-2^b) 和 BALB/c 小鼠 (H-2^d), 购于上海西普尔-必凯实验动物有限公司。OVA₃₂₃₋₃₃₉ 肽特异性 T 细胞受体 (T cell receptor, TCR) 转基因小鼠, 由第二军医大学免疫学研究所曹雪涛教授馈赠。HEK293 和 HeLa 细胞株由本科保存。空载病毒 Ad-GFP 和携带 HVEM 基因的腺病毒 (Ad-HVEM) 由本实验室蔡刚博士构建。各种限制性内切酶 (*Bgl* II、*Sal* I、*Pme* I、*Pac* I)、T₄ DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶均为 TaKaRa 公司或 BioLab 公司产品。转染试剂 LipofectamineTM 2000 购自 Gibco 公司; TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司; 反转录试剂盒购自 Fermentes 公司; LPS 购自 Sigma 公司; rmGM-CSF 和 rmIL-4 购自 R&D 公司。胎牛血清 (FCS) 及 RPMI 1640 培养液购自 Hyclone 公司。PE 标记抗小鼠 I-A^d、CD40、CD80、CD86 抗体均购自 eBioscience 公司。CD11c (N418) Microbeads 购自 Miltenyi Biotec 公司。³H-TdR 购自中国科学院原子能研究所。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2 Ad-UL144 的构建、包装及滴度检测 采集 hCMV-DNA 阳性患者外周血 2~4 ml, 5% EDTA 抗凝, 按说明书用 AxyVac Vacuum Manifold 试剂盒提取 DNA, 制备扩增模板。根据 UL144 基因序列设计引物, 上游: 5'-GAC AGA TCT CGG CCC CAT GAG TTA TT-3', 加入 *Bgl* II 酶切位点; 下游: 5'-TACT GTC GAC CAG GGT GCG GTA GAA AA-3', 加入 *Sal* I 酶切位点。以 hCMV-DNA 阳性标本的 cDNA 为模板, 扩增 UL144 基因。将 UL144 基因的 PCR 产物克隆至 pMD18-T 载体中, 并进行 PCR 鉴定和序列测定。载体经 *Bgl* II 和 *Sal* I 双酶切后, 回收片段连接到穿梭质粒载体 pAdTrack-CMV 的多克隆位点上, 构建

含 UL144 基因的穿梭质粒载体 pAdTrack-CMV-UL144。将线性化和去磷酸化处理的 pAdTrack-CMV-UL144 质粒与腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 在大肠杆菌 BJ5183 中进行同源重组, 得到重组腺病毒表达载体 pAd-UL144。用脂质体法转染 HEK293 细胞, 转染过程按 LipofectamineTM 2000 的要求进行, 根据致细胞病变现象和绿色荧光蛋白 (green fluorescence protein, GFP) 的合成判断腺病毒包装完成。大量扩增病毒, 并用 CsCl 双密度梯度离心法纯化病毒, 纯化的病毒经空斑形成实验 (PFU) 定量后分装保存于 -80℃ 冰箱中。

1.3 RT-PCR 检测受感染细胞内 UL144 mRNA 的表达 传代 HeLa 细胞培养于 24 孔板内, 观察细胞生长呈单层约铺满板底部 80% 时, 加入重组腺病毒 (Ad-UL144 为实验组, Ad-GFP 为对照组), 以 MOI 为 5 转染 HeLa 细胞; 次日在荧光倒置显微镜下观察呈绿色荧光的细胞应为受染细胞。48 h 后收集细胞, 用 TRIzol 提取总 RNA, 以总 RNA 为模板进行 RT-PCR 反应, 反应产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.4 小鼠骨髓来源 DC 培养 DC 的培养参考 Inaba 等^[7]的方法并稍作改进: BALB/c 小鼠颈椎脱臼处死, 75% 乙醇浸泡 5 min, 在无菌条件下剪下股骨、胫骨, 除去表面肌肉组织; 剪去两侧骨干端以便暴露骨髓腔, 用 RPMI 1640 培养液冲洗出骨髓细胞, Tris-NH₄Cl 裂解红细胞, RPMI 1640 培养液洗 2 次后, 溶于含 10 ng/ml rmGM-CSF、2 ng/ml rmIL-4 和 10% FCS 的 RPMI 1640 完全培养液, 置 37℃、5% CO₂ 孵箱内培养。第 3 天吸去培养液及悬浮细胞, 重新加入含 rmGM-CSF 和 rmIL-4 的新鲜培养液。第 6 天吸取疏松贴壁的增殖性细胞聚集体, 用 CD11c 磁珠进行阳性分选。

1.5 DC 表面分子检测 将新鲜纯化的 DC 按 1×10⁶/孔加入 24 孔板中, 每孔总量为 200 μl, 按 MOI 为 50 的量分别加入 Ad-UL144 和 Ad-GFP, 并设立不加任何病毒处理的对照组。病毒感染 4 h 后, 更换培养液, 分别加入含或不含 100 ng/ml LPS 的 DC 完全培养液在 37℃、5% CO₂ 条件下继续培养 24 h, 收集上清用于细胞因子测定。收集细胞进行流式细胞仪 (FACSCalibur, BD 公司) 检测, 表面分子的表达以平均荧光强度 (MFI) 表示。

1.6 DC 培养上清细胞因子检测 采用 ELISA 试剂盒 (eBioscience 公司) 检测收集的细胞培养上清中的细胞因子 IFN-γ、IL-1β、IL-6、TNF-α 和 IL-2, 按说明书操作。

1.7 抗原特异性 T 细胞增殖反应 将按前述方法

用2种重组腺病毒感染BALB/c小鼠来源的DC与未感染病毒、同培养时间的DC(空白对照),在含有或不含有LPS(100 ng/ml)的培养液中培养18 h后,洗涤细胞并调整细胞密度,按 2.0×10^4 /孔加入圆底96孔板中,每组细胞每种处理方式做3复孔。将用Miltenyi Biotec CD4⁺磁珠阳性分离纯化的静息期的DO 11.10小鼠来源的OVA₃₂₃₋₃₃₉特异性CD4⁺T细胞调整密度至 5×10^6 /ml,100 μl/孔加入上述DC的圆底96孔板中,同时加入OVA₃₂₃₋₃₃₉肽(400 μg/ml)冲击。37℃、5% CO₂条件下培养96 h,最后18 h按1 μCi/孔掺入³H-TdR(1 Ci=3.7×10¹⁰ Bq),多头细胞收集器收集细胞,Wallac公司的Micro-beta液闪仪测定每分钟放射活性(counts per minute, cpm)。

1.8 统计学处理 所有结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间差异显著性统计采用单因素方差分析(one-way ANOVA),所有统计学处理均采用SPSS 10.0统计软件。

2 结果

2.1 UL144 目的基因的扩增 UL144经PCR扩增后,进行琼脂糖凝胶电泳分析显示,扩增片段的大小为531 bp,同预期的结果一致(图1)。序列测定结果表明:UL144基因与GenBank中登录的hCMV UL144(Gi:1167917)的序列完全一致。

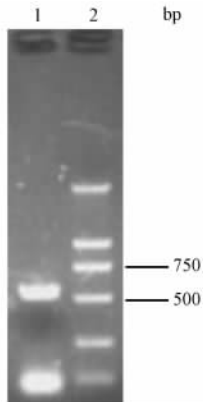


图1 PCR克隆UL144片段

Fig 1 UL144 fragment cloned by PCR

1: Fragment of UL144; 2: 1 kb DNA ladder

2.2 重组腺病毒质粒的构建 将正确构建的腺病毒骨架载体在细菌内进行同源重组,得到不同的克隆,提取质粒。先用PCR技术验证含有目的基因的重组腺病毒质粒,得到约531 bp的片段。再用Pac I酶切重组腺病毒骨架可见有大小2个片段,小的约4.5 kb,大的约30 kb,而pAdEasy-1只有大片段,没有小片段(图2)。

2.3 RT-PCR检测受感染细胞内UL144 mRNA的

表达 空载病毒Ad-GFP和重组腺病毒Ad-UL144感染的HeLa细胞,RT-PCR检测结果显示重组病毒中有UL144基因的表达,空载病毒中无目的基因的表达(图3)。

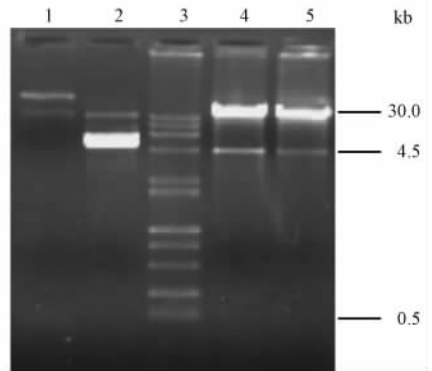


图2 pAd-UL144骨架Pac I酶切鉴定

Fig 2 Pac I restriction map for pAd-UL144

1: pAdEasy-1; 2: Track-Luc; 3: TaKaRa Wide Range DNA ladder; 4: pAdEasy-Luc; 5: pAd-CMV-UL144

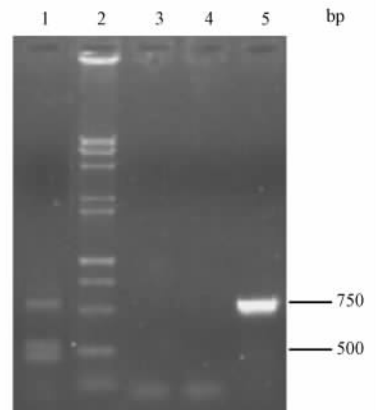


图3 RT-PCR鉴定重组缺陷型病毒包装

Fig 3 RT-PCR identifying UL144 fragment for recombination adenovirus

1: RT-PCR for UL144 from Ad-UL144 infected cells; 2: TaKaRa Wide Range DNA ladder; 3: RT-PCR for UL144 from non-infected cells; 4: RT-PCR for UL144 from Ad-GFP infected cells; 5: UL144 gene

2.4 病毒滴度测定 腺病毒扩增完毕后,检测重组腺病毒Ad-UL144和空载病毒Ad-GFP的病毒滴度分别为: 3×10^{10} pfu/ml和 1×10^{10} pfu/ml。

2.5 DC表面分子检测 结果显示,Ad-UL144处理组I-A^d、CD80、CD86和CD40的表达水平在多次实验中均为相近结果,其中CD80、CD86和I-A^d的表达水平均明显低于Ad-GFP组($P < 0.01$),CD40水平略低于Ad-GFP组,但无明显差异。这些数据表明目的基因UL144在DCs的表达可下调DCs表面CD86、CD80和I-A^d的表达,但与空白对照相比,不能逆转LPS诱导的DC成熟(表1)。

表 1 表达 UL144 对小鼠骨髓来源 DC 的表型的影响 (MFI)

Tab 1 Effect of UL144 on phenotypes of myeloid DCs (MFI)

(n=3, $\bar{x} \pm s$)

Group	CD80	CD86	CD40	I-A ^d
Ad-UL144	186.4 ± 7.0**	316.9 ± 8.3**	98.1 ± 4.9	318.1 ± 12.2**
Ad-GFP	245.5 ± 5.9	414.8 ± 7.6	105.4 ± 5.1	465.3 ± 13.2
Control	153.5 ± 5.9	243.4 ± 5.6	92.1 ± 3.4	246.6 ± 13.2
Ad-UL144+LPS	290.9 ± 3.4 ^{△△}	466.0 ± 11.8 [△]	170.2 ± 5.4	638.9 ± 9.2
Ad-GFP+LPS	310.9 ± 4.3	492.6 ± 6.6	166.4 ± 3.3	652.7 ± 7.4
Control+LPS	238.5 ± 6.8	477.5 ± 7.5	173.1 ± 4.7	637.2 ± 8.6

** P<0.01 vs Ad-GFP group; [△]P<0.05, ^{△△}P<0.01 vs Ad-GFP+LPS group

2.6 DC 培养上清细胞因子检测 结果显示,病毒介导 DC 表达 UL144 后,与 Ad-GFP 对照组相比,能明显下调 TNF- α 、IL-6 以及 IL-1 β 的分泌水平 (P<0.05),其中,IL-6 水平在 LPS 刺激成熟状态下

比空白对照组也有明显降低;对于 IFN- γ , Ad-UL144 处理组虽较 Ad-GFP 处理组有下调趋势,但无统计学意义;IL-2 的分泌水平在各组之间无明显差异。具体结果见表 2。

表 2 表达 UL144 对小鼠骨髓来源 DC 分泌细胞因子的影响

Tab 2 Effect of UL144 on cytokines secretion in myeloid DCs

(n=3, $\bar{x} \pm s$)

Group	TNF- α $\rho_B / (\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1})$	IL-6 $\rho_B / (\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1})$	INF- γ $\rho_B / (\text{pg} \cdot \text{ml}^{-1})$	IL-2 $\rho_B / (\text{pg} \cdot \text{ml}^{-1})$	IL-1 β $\rho_B / (\text{pg} \cdot \text{ml}^{-1})$
Ad-UL144	4.8 ± 0.5**	3.7 ± 1.1**	65.9 ± 19.3	16.0 ± 2.2	167.9 ± 30.4**
Ad-GFP	9.5 ± 0.9	5.2 ± 1.1	76.1 ± 26.4	14.9 ± 2.1	315.6 ± 53.3
Control	1.8 ± 0.2	0.7 ± 0.1	73.8 ± 5.0	17.2 ± 3.9	39.1 ± 16.7
Ad-UL144+LPS	23.0 ± 2.3 [△]	14.1 ± 1.0 ^{△▲}	110.5 ± 6.3	19.7 ± 6.8	330.6 ± 22.6 [△]
Ad-GFP+LPS	26.6 ± 2.7	20.9 ± 4.2	122.2 ± 13.2	16.6 ± 2.6	397.2 ± 34.1
Control+LPS	16.7 ± 1.7	23.0 ± 2.6	117.8 ± 21.7	16.7 ± 2.9	247.9 ± 34.8

** P<0.01 vs Ad-GFP group; [△]P<0.05 vs Ad-GFP+LPS group; [▲]P<0.05 vs control+LPS group

2.7 抗原特异性 T 细胞增殖反应 用 OVA 冲击的各病毒感染的 DC 促 OVA₃₂₃₋₃₃₉ 特异性 CD4⁺ T 细胞的增殖,反映 UL144 基因修饰的 DC 对初始 CD4⁺ T 细胞增殖的抑制功能。同时设立 Ad-HVEM 对照。结果显示,过度表达 UL144 的 DC 对初始型 CD4⁺ T 细胞的增殖有明显的抑制作用 (P<0.01),抑制作用与 HVEM 接近(图 4)。

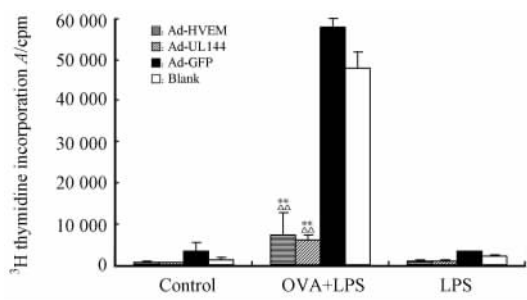


图 4 UL144 基因修饰的 DC 抑制特异性 CD4⁺ T 细胞的增殖

Fig 4 UL144 gene-modified DCs inhibit proliferation of antigen specific CD4⁺ T cells

** P<0.01 vs Ad-GFP group; ^{△△}P<0.01 vs blank group. n=3, $\bar{x} \pm s$. 1 cpm=6.17 × 10⁸ Bq

3 讨论

BTLA 是最近发现的 CD28 家族中的成员,主要表达于 T、B 细胞表面,在巨噬细胞、DC 和 NK 细胞表面也有较低的表达^[8]。HVEM 为 BTLA 的配体,主要表达于 APC、T 和 B 细胞表面。一方面, HVEM-BTLA 可负相调节 DC 内环境的稳定^[9];另一方面, BTLA 结合其配体后可介导抑制性信号,抑制 T 细胞的活化。HVEM 和 BTLA 是迄今发现的第一对联系 TNFR 家族和 Ig 超家族的分子,同时 HVEM 也作为 LIGHT 的配体发挥共刺激活性。鉴于 HVEM 这两方面的特性,它可以作为免疫系统的活性开关蛋白,在体内免疫反应平衡的维持中起

重要作用^[10]。DC 作为功能至为强大的抗原递呈细胞,通过对天然免疫与获得性免疫的联系,在免疫耐受与免疫激活中均具有不可或缺的作用。研究^[5-6]表明, hCMV 可有效感染 DC,能下调 DC 表面的主要组织相容性复合物 I、II 分子, CD80、CD86 和 CD40 的表达,降低 DC 的抗原递呈能力,抑制 DC

激活初始型 T 细胞的功能,延迟或抑制 Tc 细胞的增殖,使 hCMV 逃避细胞免疫反应并持续感染。本研究构建携带人巨细胞病毒 UL144 基因的腺病毒,并将此重组腺病毒转染小鼠骨髓来源的 DC。我们观察到 UL144 基因修饰的 DC 具有维持相对未成熟状态的能力,DC 激活初始 T 细胞的“免疫原性”减弱。

重复多次实验结果显示,在适宜的效-靶比范围内,UL144 基因修饰的 DC 较对照 DC 促特异性 CD4⁺ T 细胞的增殖能力可降低 40%~80%。这种促增殖能力减弱的机制可能是多方面的;其一,直接经 DC 上的 UL144 与 T 细胞上其相关结合分子介导 T 细胞激活抑制作用。UL144 是疱疹病毒中唯一编码 TNFR 超家族成员的基因,它有 2 个和 HVEM 具同源性的半胱氨酸富集区(cysteine rich domain,CRD),但缺少与 TNF 家族成员结合的第 3 个 CRD,不能和任何已知的 TNF 配体结合^[2]。而 Cheung 等^[4]的研究表明,UL144 能和 BTLA 以较低的亲和力结合,并向 T 细胞传递抑制信号,其抑制作用强于 BTLA 的天然配体——HVEM。其二,UL144 基因修饰的 DC 刺激 T 细胞增殖低反应性的机制可能来源于这种 DC 本身性质及功能方面的改变。我们观察到 UL144 基因修饰 DC 其表面分子发生了向幼稚型转换的某些改变。结果表明,无论有无 LPS 刺激,UL144 基因修饰的 DC 的表面分子 MHC-II 类抗原、CD80 和 CD86 的表达水平均不同程度低于它们在对照病毒处理 DC 上的表达($P < 0.01$)。这些表面分子表达的减少可导致其对 T 细胞,尤其是童贞 T 细胞活化能力的减低。其三,DC 功能改变致 T 细胞活化障碍的另一个可能性是其细胞因子表达谱的某些改变。研究^[11]已经证实,TNF- α 、IL-6 等均有强烈的促 T 细胞增殖的作用。在本研究中,我们虽发现 IL-2 的表达水平在各处理组之间无明显差异,但 TNF- α 和 IL-6 的表达水平以及 IL-1 β 的表达水平均有不同程度的下调,说明 T 细胞的活化抑制可能部分依赖于上述细胞因子的相关变化。

本研究发现人巨细胞病毒 UL144 基因修饰的 DC 具有维持相对未成熟状态的能力,并抑制抗原特异性 T 细胞的激活。这些特性有利于病毒逃避细胞免疫应答,造成持续感染或潜伏感染,提示 UL144 基因在针对病毒的免疫应答中发挥重要作

用。这为以后以此病毒基因或基因产物为靶点进一步探讨人巨细胞病毒的免疫应答提供了实验基础。同时,ULL144 基因修饰 DC 诱导的免疫耐受作为一种免疫调节性策略,在今后自身免疫性疾病基础及临床研究中具有更广阔的前景。

[参考文献]

- [1] Cha T A, Tom E, Kemble G W, Duke G M, Mocarski E S, Spaete R R. Human cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains[J]. J Virol, 1996, 70: 78-83.
- [2] Benedict C A, Butrovich K D, Lurain N S, Corbeil J, Rooney I, Schneider P, et al. Cutting edge: a novel viral TNF receptor superfamily member in virulent strains of human cytomegalovirus [J]. J Immunol, 1999, 162: 6967-6970.
- [3] Sedy J R, Gavieli M, Potter K G, Hurchla M A, Lindsley R C, Hildner K, et al. B and T lymphocyte attenuator regulates T cell activation through interaction with herpesvirus entry mediator[J]. Nat Immunol, 2005, 6: 90-98.
- [4] Cheung T C, Humphreys I R, Potter K G, Norris P S, Shumway H M, Tran B R, et al. Evolutionarily divergent herpesviruses modulate T cell activation by targeting the herpesvirus entry mediator cosignaling pathway[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102: 13218-13223.
- [5] Moutaftis M, Mehl A M, Borysiewicz L K, Tabi Z. Human cytomegalovirus inhibits maturation and impairs function of monocyte-derived dendritic cells[J]. Blood, 2002, 99: 2913-2921.
- [6] Senechal B, Boruchov A M, Reagan J L, Hart D N, Young J W. Infection of mature monocyte-derived dendritic cells with human cytomegalovirus inhibits stimulation of T cell proliferation *via* the release of soluble CD83[J]. Blood, 2004, 103: 4207-4215.
- [7] Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, et al. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor[J]. J Exp Med, 1992, 176: 1693-1702.
- [8] Han P, Goularte O D, Rufner K, Wilkinson B, Kaye J. An inhibitory Ig superfamily protein expressed by lymphocytes and APCs is also an early marker of thymocyte positive selection [J]. J Immunol, 2004, 172: 5931-5939.
- [9] De Trez C, Schneider K, Potter K, Droin N, Fulton J, Norris P S, et al. The inhibitory HVEM-BTLA pathway counter regulates lymphotoxin receptor signaling to achieve homeostasis of dendritic cells[J]. J Immunol, 2008, 180: 238-248.
- [10] 林建波, 李俊, 卫立辛, 沈锋. 疱疹病毒侵入介体在免疫应答及抗肿瘤免疫中的研究进展[J]. 第二军医大学学报, 2007, 28: 1003-1007.
- [11] Lin J B, Li J, Wei L X, Shen F. Herpesvirus entry mediator: a switch in immune response and its role in anti-tumor immunity [J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28: 1003-1007.
- [11] Lutz M B, Schuler G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity[J]? Trends Immunol, 2002, 23: 445-449.

[本文编辑] 尹茶