DOI:10.16016/j.1000-5404.201512005

pBR002-HLA-DRB1*0803 转基因载体构建、表达及其抗原递呈功能研究

张旭晖[1],何韦韦[1],谭文婷[1],但芸婕[1],李辉文[1],王 勇[2],邓国宏[1] (400038 重庆,第三军医大学:西南医院全军感染病研究所,感染病研究重庆市重点实验室[1],基础医学部实验动物学教研室[2])

[摘要] **目的** 构建可以表达人类 HLA-DRB1*0803 的转基因载体,并在细胞水平验证其表达及抗原递呈功能。**方法** 提取人 WATANABE 细胞株(基因型为 HLA-DRB1*0803 纯合子)的总 RNA,RT-PCR 扩增 DRB1*0803 基因片段,与小鼠 Eα promoter 和兔 β-globin 基因内含子序列同时导入 pBR002-lacz 载体。pBR002-HLA-DRB1*0803 转基因载体转染小鼠 DCS 细胞和 B 细胞系,用 Western blot 和免疫荧光的方法对 HLA-DRB1 蛋白进行检测。流式细胞术检测转染小鼠 DCS 细胞对 HBcAg 特异性 $CD4^+$ T 细胞的刺激和极化效应。**结果** 经双酶切和测序验证,成功构建了 pBR002-HLA-DRB1*0803 转基因载体;转染载体后的小鼠 DCS 细胞和 B 细胞系均表达出了大小约为 29×10^3 的 HLA-DRB1 蛋白;免疫荧光结果表明 HLA-DRB1 蛋白主要表达于细胞质内。转染后的小鼠 DCS 细胞可将负载的 HBcAg 递呈给 HLA-DRB1*0803 阳性基因型的人 $CD4^+$ T 细胞,产生明显的 $CD4^+$ T 细胞应答。**结论** 成功构建了 HLA-DRB1*0803 转基因载体,该载体可以在细胞水平特异性表达 HLA-DRB1 蛋白,并具有 HLA-DRB1*0803 特异性抗原递呈功能。

[关键词] HLA-DR;转基因载体;乙型肝炎病毒;抗原递呈
[中图法分类号] R392-33; R392.11; R392.2 [文献标志码] A

Construction of transgenic vector pBR002-HLA-DRB1*0803 and its expression and antigen-presenting function

Zhang Xuhui[1], He Weiwei[1], Tan Wenting[1], Dan Yunjie[1], Li Huiwen[1], Wang Yong[2], Deng Guohong[1] ([1]Institute of Infectious Diseases, Chongqing Key Laboratory of Infectious Diseases Research, Southwest Hospital; [2]Department of Experimental Animals, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To construct a transgenic vector of human HLA-DRB1*0803 gene, and validate its expression and antigen-presenting function *in vitro*. **Methods** The cDNA encoding the HLA-DRB1*0803 gene was reverse transcribed and amplified by RT-PCR from the DRB1*0803 BLCL cell lines. The sequences of mouse Eα promoter and rabbit β-globin intron 1 were synthesized. The above 3 fragments were inserted into the plasmid pBR002-lacz in a particular order. Successfully constructed pBR002-HLA-DRB1*0803 transgenic vector was used to transfect DCS cells and B cell line by Lipofectamine 2000, and the target proteins were detected by Western blotting and immunofluorescence assay. T cell proliferation assay were used to validate whether the transgenic DCS cells can present HBcAg antigens to human $CD4^+$ T cells and polarize the $CD4^+$ T cells. **Results** A pBR002-HLA-DRB1*0803 transgenic vector was successfully constructed, and verified by dual restriction enzyme and sanger sequencing. After transfection, the DCS cells and B cells expressed the target protein at a molecular weight of 29×10^3. Immunofluorescence assay results showed that the HLA-DRB1 proteins were expressed mainly in the cytoplasm of DCS cells after transfection. T cell proliferation assay showed that the transfected DCS cells presented the HBcAg to the human T cells, resulting in a specific $CD4^+$ T cell response. **Conclusion** HLA-DRB1*0803 transgenic vector is successfully constructed, which can express the HLA-DRB1*0803 at the cellular level, present viral antigen and stimulate

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(81330038);重庆市前沿与应用基础研究计划项目(CSTC2014jcyjA10114)
[通信作者] 邓国宏,电话:(023)68765218,E-mail:gh_deng@hotmail.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160202.1355.001.html(2016-02-02)

a HBcAg-specific $CD4^+$ T cell response.

[**Key words**] HLA-DR; transgenic vector; hepatitis B virus; antigen presentation

Supported by the Key Project of National Natural Science Foundation of China (81330038), and the Project of Frontier and Application Basic Research Plan of Chongqing (CSTC2014jcyjA10114). Corresponding author: Deng Guohong; Tel:86-23-68765218; E-mail: gh_deng@hotmail.com

慢性 HBV 感染是我国最主要的人类慢性病毒感染,波及 7% ~10% 左右的人口。近年来,多项基于大样本患者人群的全基因组关联研究(genome-wide association study, GWAS)发现 HLA-DP、DQ、DR 基因位点的遗传变异决定 HBV 的感染/清除、肝癌发生、疫苗应答等转归结局,从遗传流行病学角度证实了 HLA-Ⅱ类分子在 HBV 保护性免疫中的重要作用[1-4]。我们前期的 GWAS 研究发现 HLA-DRB1*0803 等位是重型乙型肝炎的保护等位。为了进一步研究 HLA-DRB1*0803 等位的保护效应及免疫遗传学机制,需要构建 HLA-DRB1*0803 等位转基因小鼠模型。本研究从头构建了一个 pBR002-HLA-DRB1*0803 转基因载体,在细胞水平对该载体进行了表达功能和抗原提呈功能的验证,为下一步构建 HLA-DRB1*0803 转基因小鼠提供前期基础。

1 材料与方法

1.1 材料

DMEM 培养基,OPTI-MEM 无血清培养基,胎牛血清,TOYOBO 高效率反转录试剂盒购自日本东洋纺公司;质粒提取试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司;凝胶回收试剂盒、限制性内切酶 *Xba* Ⅰ和 *Hin*dⅢ购自美国 Sigma 公司;Lipofectamine 2000 转染试剂盒、T_4 DNA Ligase 连接酶购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。Anti-HLA-DR 单克隆阻断抗体购自美国 LifeSpan Biosciences 公司(克隆号 L243),抗 HLA-DR 多克隆抗体(N2C3)购自美国 Gene Tex 公司,cy3 标记的山羊抗大鼠 IgG 抗体、Alexa Fluor 488 标记山羊抗兔 IgG(H+L)和辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(H+L)抗体购自碧云天生物技术有限公司。Percp-Cy5.5 anti-human CD3、FITC anti-human CD4、PE anti-human IFN-γ、PE-Cy7 anti-human IL-4、APC anti-human IL-17 抗体、大鼠抗小鼠 MHC Class Ⅱ (I-A/I-E)抗体购自美国 eBioscience 公司。

人 WATANABE 永生化 B 淋巴细胞株(基因型为 HLA-DRB1*0803 纯合子),购自美国华盛顿大学佛雷德·哈钦森癌症研究中心。pBR002-lacz 载体购自上海生工公司。小鼠 Eα promoter 和兔 β-globin 内含子调控元件参照文献[5]序列,由赛业(广州)生物科技有限公司合成。PCR 引物由华大生物股份有限公司合成。HBcAg 肽池由上海耀强公司合成。DCS 细胞(小鼠树突状细胞肉瘤细胞)和 RMS-S-B 3501(小鼠 B 淋巴细胞系)均购自上海拜力生物科技有限公司。细胞培养条件:用 T25 培养瓶在 37 ℃恒温,5% CO_2的无菌条件下培养。培养基为 DMEM+10% FBS。

1.2 pBR002-HLA-DRB1*0803 转基因载体的构建

TRIzol 法提取人 WATANABE 永生化 B 淋巴细胞株的总 RNA,然后反转录为 cDNA。根据 NCBI 序列库 HLA-DRB1*0803 基因序列(NM_001243965.1),用 Primer Premier 5.0 设计 PCR 引物(上游引物为:5′-GTTCCCTCCATCTCCTTTAC-3′;下游引物为:5′-CTCAGGACCTGGTTGCTACT-3′)进行 PCR 扩增。目标产物片段连入 PUC57 载体,转化至感受态大肠杆菌 DH5α,进行扩增得到 PUC57-HLA-DRB1*0803 质粒。小鼠 Ea promoter 用 *Hin*dⅢ/*Bsp*1407Ⅰ做酶切;兔 β-globin 基因内含子用 *Bsp*1407Ⅰ/*Xho*Ⅰ做酶切;克隆载体 pBR002-lacz 用 *Hin*dⅢ/*Xho*Ⅰ酶切。然后将 Ea promoter 序列(−2 172 bp 至 +12 bp)、β-globin 序列(内含子 2 及 3′多聚腺苷位点)和酶切载体 pBR002-lacz 用 T_4 DNA Ligase 连接酶连接,转入 DH5α 得到 pBR002-EaP-BGLOBIN 质粒。将前两步测序验证无误后的 PUC57-HLA-DRB1*0803 质粒和 pBR002-EaP-BGLOBIN 质粒用 *Mfe*Ⅰ和 *Bsu*36Ⅰ(*Eco*81Ⅰ)双酶切,分别电泳回收目的条带,T_4 DNA Ligase 连接酶连接到 pBR002 酶切载体,转入 DH5α 扩增、测序验证,得到 pBR002-HLA-DRB1*0803 转基因载体。

1.3 pBR002-HLA-DRB1*0803 转基因载体在细胞水平的表达

将 DCS 细胞(小鼠树突状细胞肉瘤细胞)和 RMS-S-B 3501 细胞(小鼠 B 淋巴细胞系)以 lipofectamine 2000 Transfection Reagent 转染 pBR002-HLA-DRB1*0803 转基因载体,收集转染细胞 1×10^6 个,裂解细胞提取蛋白。经 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)电泳,转至 PVDF 膜上,经兔抗人 HLA-DR 多克隆抗体(N2C3)(1∶1 000)4 ℃过夜,辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(H+L)抗体(1∶500)37 ℃孵育 1 h,ECL 化学发光显色,记录结果。

在培养板中将已爬好的 DCS 细胞玻片用 4% 的多聚甲醛固定,分别经兔抗人 HLA-DR 多克隆抗体(N2C3)和小鼠 MHC-AE 多克隆抗体 4 ℃孵育过夜,Alexa Fluor 488 标记山羊抗兔 IgG (H+L) 37 ℃孵育 1 h,DAPI 避光孵育 5 min 染核,封片,激光共聚焦显微镜观察。

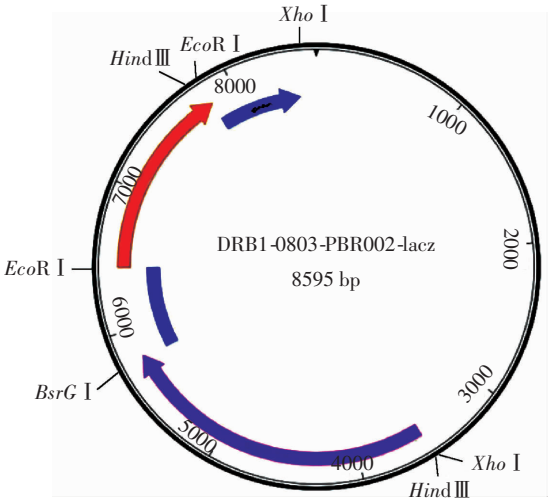
1.4 pBR002-HLA-DRB1*0803 转基因载体转染 DCS 细胞后的抗原肽提呈功能观察

$CD4^+$ T 细胞体外抗原特异性刺激及 HLA-DR 阻断步骤参照文献[6-8]报道的方法。经患者知情同意,从西南医院感染科收集 6 例慢性乙型肝炎患者全血 10 mL。外周血 PBMC 分离培养,用 SBT 法进行 HLA-DRB1 基因分型,筛选出 1 例 HLA- DRB1*0803 的慢性乙型肝炎患者。PBMC 用培养基稀释成 1×10^6/mL,移至 48 孔板培养,每孔 1 mL。每孔细胞中加 10 μg/mL 的 HBV 衣壳蛋白(HbcAg)肽池 1 μL 刺激8 d。第 8 天取步骤 1.3 中转染 pBR002-HLA-DRB1*0803 转基因载体的 DCS 细胞 1×10^5个加入到培养的 PBMC 细胞内,维持 HBcAg 肽池继续刺激 7 d,过程中根据细胞状态隔天换液,视情况补加 IL-2。第 15 天各孔再次加入转染后的 DCS 细胞 1×10^5个,然后分成 2 组,HLA-DR 阻断组和对照组,阻断组加入 10 μL 的 Anti-HLA-DR 单克隆阻断抗体孵育 1 h,对照组加等体积培养基。然后每孔加 HBcAg 肽池、低剂量 PMA(25 ng/mL)、离子霉素(500 ng/mL)刺激 6 h。孵育最后 1 h 后加入莫能霉素(0.7 μL/mL)。细胞吸入流式管中,PBS 洗涤后以 PBS 100 μL 重悬,加入表面标记抗体 Percp-Cy5.5 anti-human CD3、FITC anti-human CD4 各 2 μL,混匀,4 ℃避光 30 min。PBS 洗涤后加入 200 μL 固定剂重悬,4 ℃ 避光 20 min。加入 100 μL 1×通透液、细胞因子抗体 PE anti-human IFN-γ、PE-Cy7 anti-human IL-4、APC anti-human IL-17 各 2 μL,混匀,4 ℃避光 20 min。PBS 洗涤后 150 μL PBS 重悬,流式检测,用 FlowJo 7.6 软件分析结果。流式设门:先利用 SSC-A 与 FSC-A 在细胞群中设立淋巴细胞门,然后用 Percp-Cy5.5 与 FITC 来定义 $CD3^+CD4^+$ 阳性细胞群,再从 $CD3^+CD4^+$ 阳性细胞群中分别用 PE、PE-Cy7、APC 定义产 IFN-γ、IL-4、IL-17 的 $CD3^+CD4^+$ T 细胞的数量。

2 结果

2.1 pBR002-HLA-DRB1*0803 转基因载体的构建和验证

WATANABE 细胞总 RNA 的反转录 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,可见一大小约 1 600 bp 的条带,该条带相对分子质量与 HLA-DRB1*0803 基因 mRNA 编码区扩增长度一致。分别测序比对验证无误后,将小鼠 Eα promoter、兔 β-globin 内含子和 DRB1*0803 cDNA 三段序列按顺序连接至 pBR002-lacz 载体上,构建成功的 pBR002-HLA-DRB1*0803 转基因载体示意图谱见图 1。经 *Eco*R Ⅰ/*Bsr*G Ⅰ 双酶切验证和测序验证,载体序列包含小鼠 HLA-DRB1*0803 cDNA 序列、Eαpromoter 序列、兔 β-globin 基因内含子序列,符合设计构想。

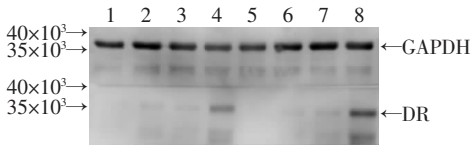


紫色部分为小鼠 Eαpromoter 序列,蓝色部分为断开的兔 β-globin 基因内含子序列,橙色部分为在 β-globin 内含子的 *Eco*R Ⅰ 位点插入的 HLA-DRB1*0803 cDNA 序列

图 1 构建的 pBR002-HLA-DRB1*0803 转基因载体示意图谱

2.2 Western blot 检测 HLA-DRB1 蛋白表达

从图 2 可以看出,转染 pBR002-HLA-DRB1*0803 转基因载体的小鼠 B 细胞株 RMS-S-B 3501 细胞(D 组)和小鼠 DC 细胞株 DCS 细胞(H 组)有大小约为 29×10^3的目的蛋白条带;内参为 GAPDH,检测条带大小约为 36×10^3。相比 RMS-S-B 3501 细胞,DCS 细胞转染后的表达效率较强。

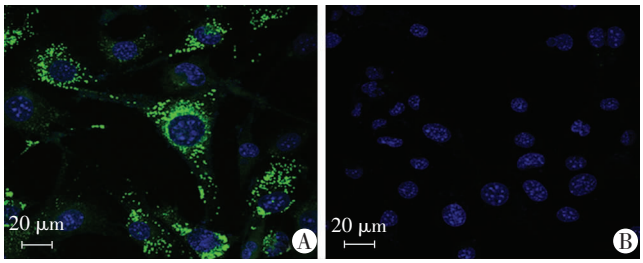


1~4:RMS-S-B 3501 细胞;5~8:DCS 细胞;1、5:培养基空白对照;2、6: lipofectamine 2 000 空白对照;3、7:pBR002-HLA-DRB1*0803 转基因载体对照;4、8:pBR002-HLA-DRB1*0803 转基因载体 + lipofectamine 2000

图 2 Western blot 检测 HLA-DRB1 蛋白表达

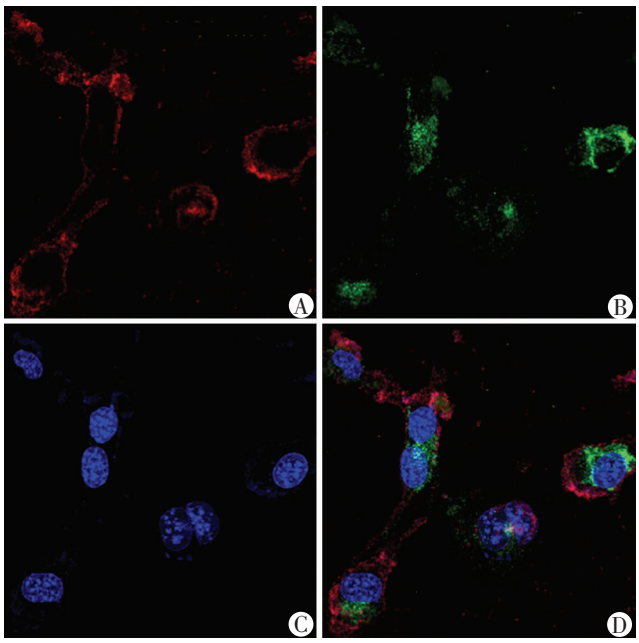
2.3 免疫荧光(immunofluorescence)检测 HLA-DRB1 蛋白表达

从图 3 可以看到,转染 pBR002-HLA-DRB1*0803 转基因载体的小鼠 DCS 细胞,细胞质内可见很强的 HLA-DRB1 特异性荧光,而未转染的 DCS 细胞内无 HLA-DRB1 蛋白荧光信号,表明本研究构建的 pBR002-HLA-DRB1*0803 转基因载体能高效表达 HLA-DRB1 蛋白。从图 4 可以看出,小鼠自身 MHC-Ⅱ 蛋白主要表达于细胞膜(红色荧光),而转入的人 HLA-DRB1 蛋白主要表达于细胞质(绿色荧光)。



A:HLA-DRB1 蛋白;B:未转染的 DCS 细胞(阴性对照)

图 3 激光共聚焦显微镜观察 pBR002-HLA-DRB1*0803 转基因载体转染后的 DCS 细胞 HLA-DRB1 蛋白的表达



A:MHC-Ⅱ蛋白;B:HLA-DRB1 蛋白;C:DAPI 染色;D:A、B、C 融合图像

图 4 激光共聚焦显微镜观察 pBR002-HLA-DRB1*0803 转基因载体转染后的 DCS 细胞 HLA-DRB1 蛋白和小鼠自身 MHC-AE 蛋白的表达 (×500)

2.4 pBR002-HLA-DRB1*0803 转基因载体转染 DCS 细胞后的抗原肽提呈功能

pBR002-HLA-DRB1*0803 转基因载体转染 DCS 细胞后,负载 HbcAg 表位肽,与 HLA-DRB1*0803 阳性的慢性乙型肝炎患者 PBMC 孵育。根据 T 细胞增殖第 15 天是否添加 HLA-DR 单抗阻断分为阻断组和未阻断组,分别上流式检测后结果见图 5。$CD4^+$ T 细胞亚群分析结果表明,和阻断 HLA-DR 相比,未阻断 HLA-DR 条件下产 IFN-γ 的 $CD4^+$ T 细胞亚群比例由 6.68% 提高到了 10.4%,产 IL-4 的 $CD4^+$ T 细胞亚群比例由 2.57% 提高到了 6.05%,产 IL-17 的 $CD4^+$ T 细胞亚群比例由 2.90% 降低到了 1.08%,3 类细胞的比例均发生了明显的变化。

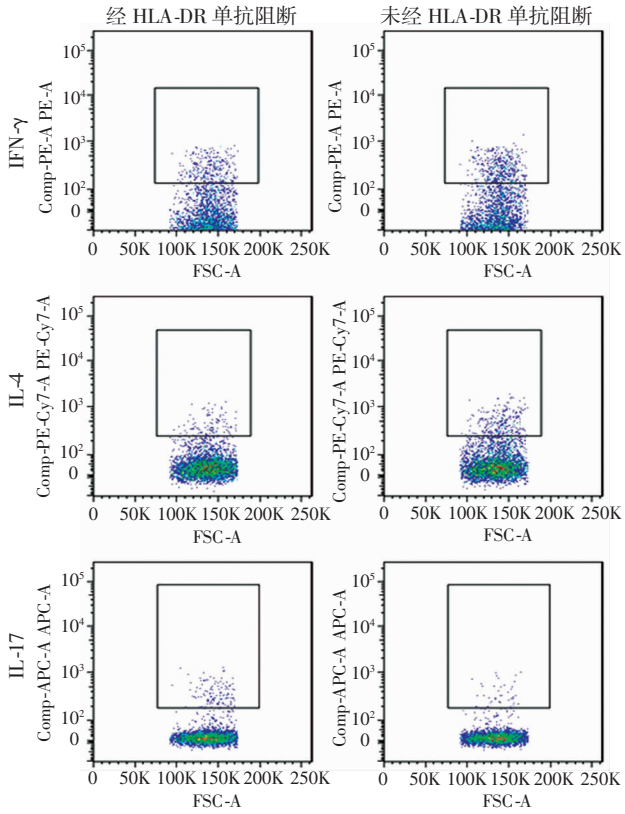


图 5 流式细胞检测转染 pBR002-HLA-DRB1*0803 转基因载体 DCS 细胞对人 $CD4^+$ T 细胞的极化作用

3 讨论

HLA 转基因鼠的研究由来已久,1991 年构建出第 1 个 HLA-Ⅱ类分子(HLA-DQ6)转基因鼠,HLA-DQ 分子能表达于目标器官,并且对小鼠 T 细胞 repertoire 产生显著的影响,能激发出 HLA 限制的特异性 T 细胞反应[9]。多发性硬化、类风湿关节炎易感的 HLA-DR 和 DQ 等位转基因鼠,在给予人特异性自身抗原刺激后,能很好地模拟多发性硬化、类风湿关节炎的疾病特点(严重程度、性别差异),大大提高了人们对多发性硬化、类风湿关节炎等疾病机制的认识[10]。但是,国外实验室基于欧美人群优势等位建立的少数几个等位的 HLA 转基因小鼠品系(HLA-A*0201, B35, B7, Cw3, DRB1*0301, DRB1*0401, DQB1*0801, DQB1*0601 等),涉及知识产权问题,同时,欧美人群和中国人群的 HLA 等位基因频率有非常显著的差异。例如,国外的 HLA-A2 转基因鼠为 A*0201,此等位在欧美白人中占 46%,识别 HBcAg 的经典表位为 18-27,而中国人群中 HLA-A 基因等位主要是 A*0203、A*0206、A*0207,并不识别 HBcAg 的 18-27 表位[11]。因此,非常有必要建立中国人群特异的 HLA 等位转基因小鼠品系。

我们选择了中国人群中频率较高的 HLA-DRB1*

0803 等位进行转基因载体构建。国外学者在 pDOI-5 质粒中按特定顺序插入小鼠 Eα promoter、兔 β-globin 基因内含子序列和人类 HLA-Ⅱ类基因构建转基因载体,用受精卵注射的方法得到的转基因小鼠体内可以检测到 HLA-Ⅱ类基因在组织和细胞水平特异性的表达[12]。小鼠 Eα promoter 可使 RNA 聚合酶特异性识别和结合;兔 β-globin 基因内含子序列的作用是提供一个内含子以及聚腺苷酸化信号,前者被认为有助于转录本从细胞核内的导出[13]。因无法获取 pDOI-5-HLA-Ⅱ转基因载体质粒,本研究改用 pBR002-lacz 载体从头构建。pBR002-lacz 载体是由经典的真核表达载体 pBR322 改造而来,携带有氨苄青霉素和四环素的抗性,且增加了一个 lacZ 基因标签,相对 pDOI-5 质粒来说具有蛋白表达量大,易于与感受态细胞转化,筛选方便,分子量小且拷贝数多等优点。

构建的载体是否可以稳定地表达外源性蛋白,以及外源性蛋白是否具有生物学活性,是判断一个表达载体成功与否的关键。本研究分别选择了 Western blot 和免疫荧光的方法对目的蛋白进行检测。结果证实,经过 pBR002-HLA-DRB1*0803 转基因载体转染的小鼠 DCS 细胞及 RMS-S-B 3501 细胞均有 HLA-DRB1 蛋白产生。为了检测经该载体转染进小鼠 DCS 细胞产生的目的蛋白是否具有人类 HLA-Ⅱ类分子的抗原递呈功能,我们进行了体外 $CD4^+$ T 细胞刺激实验。从实验结果来看,未阻断 DR 组相比阻断 DR 组的 IFN-γ 和 IL-4 的比例明显增高,IL-17 的比例明显降低,表明转染载体表达的 HLA-DRB1 具有抗原提呈活性。

文献[13]报道小鼠的 MHC-Ⅱ分子的 α 链可与人 HLA-Ⅱ的 β 链形成异源二聚体。本研究虽然成功构建了 pBR002-HLA-DRB1*0803 转基因载体,但其转染 DCS 细胞后表达的 HLA-DRB1 蛋白主要停留于细胞质,表明与小鼠的 MHC-Ⅱ分子的 α 链没有充分结合。可能尚需同时引入 HLA-DRA 形成同源二聚体才能完成胞膜定位,从而更好地发挥抗原提呈功能。同时,有待注射小鼠受精卵后构建活体转基因小鼠,才能进一步观察其人源化免疫学效应[14]。

参考文献:

[1] Kamatani Y, Wattanapokayakit S, Ochi H, *et al*. A genome-wide association study identifies variants in the HLA-DP locus associated with chronic hepatitis B in Asians[J]. Nat Genet, 2009, 41(5): 591 – 595. DOI: 10.1038/ng.348

[2] Hu Z, Liu Y, Zhai X, *et al*. New loci associated with chronic hepatitis B virus infection in Han Chinese[J]. Nat Genet, 2013, 45(12): 1499 – 1503. DOI: 10.1038/ng.2809

[3] Jiang D K, Sun J, Cao G, *et al*. Genetic variants in STAT4 and HLA-DQ genes confer risk of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma[J]. Nat Genet, 2013, 45(1): 72 – 75. DOI: 10.1038/ng.2483

[4] Png E, Thalamuthu A, Ong R T, *et al*. A genome-wide association study of hepatitis B vaccine response in an Indonesian population reveals multiple independent risk variants in the HLA region[J]. Hum Mol Genet, 2011, 20(19): 3893 – 3898. DOI: 10.1093/hmg/ddr302

[5] Kouskoff V, Fehling H J, Lemeur M, *et al*. A vector driving the expression of foreign cDNAs in the MHC class Ⅱ-positive cells of transgenic mice[J]. J Immunol Methods, 1993, 166(2): 287 – 291.

[6] Kennedy P T, Sandalova E, Jo J, *et al*. Preserved T-cell function in children and young adults with immune-tolerant chronic hepatitis B[J]. Gastroenterology, 2012, 143(3): 637 – 645. DOI: 10.1053/j.gastro.2012.06.009

[7] Chen L, Li B, Yang W C, *et al*. A dominant CD4(+) T-cell response to Helicobacter pylori reduces risk for gastric disease in humans[J]. Gastroenterology, 2013, 144(3): 591 – 600. DOI: 10.1053/j.gastro.2012.12.002

[8] 李辉文, 何韦韦, 谭文婷, 等. HLA-DRB1*0803 与 HLA-DRB1*0901 等位特异性 HBcAg 表位肽的筛查与鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2015, 37(9): 833 – 838. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201501091.

[9] Zhou P, Anderson G D, Savarirayan S, *et al*. Thymic deletion of V beta 11 +, V beta 5 + T cells in H-2E negative, HLA-DQ beta + single transgenic mice[J]. J Immunol, 1991, 146(3): 854 – 859.

[10] Luckey D, Bastakoty D, Mangalam A K. Role of HLA class Ⅱ genes in susceptibility and resistance to multiple sclerosis: studies using HLA transgenic mice[J]. J Autoimmun, 2011, 37(2): 122 – 128. DOI: 10.1016/j.jaut.2011.05.001

[11] Desmond C P, Bartholomeusz A, Gaudieri S, *et al*. A systematic review of T-cell epitopes in hepatitis B virus: identification, genotypic variation and relevance to antiviral therapeutics[J]. Antivir Ther, 2008, 13(2): 161 – 175.

[12] Ru Z, Xiao W, Pajot A, *et al*. Development of a humanized HLA-A2.1/DP4 transgenic mouse model and the use of this model to map HLA-DP4-restricted epitopes of HBV envelope protein[J]. PLoS One, 2012, 7(3): e32247. DOI: 10.1371/journal.pone.0032247

[13] Zhu G, Flies D B, Tamada K, *et al*. Progressive depletion of peripheral B lymphocytes in 4-1BB (CD137) ligand/I-Ealpha)-transgenic mice[J]. J Immunol, 2001, 167(5): 2671 – 2676.

[14] Taneja V, David C S. Role of HLA class Ⅱ genes in susceptibility/resistance to inflammatory arthritis: studies with humanized mice[J]. Immunol Rev, 2010, 233(1): 62 – 78. DOI: 10.1111/j.0105-2896.2009.00858.x

(**收稿**:2015-12-01;**修回**:2016-01-31)

(编辑 王 红)