

免疫共刺激分子 OX40L 对乙型肝炎核酸疫苗的免疫佐剂作用

杜小刚¹, 康有敏², 王肖², 王军朋², 赵干², 王宾^{2*}

(¹ 四川农业大学生命科学与理学院应用生物物理与免疫工程实验室, 雅安 625014)

(² 中国农业大学生命科学院农业生物国家重点实验室, 北京 100094)

摘要 【目的】为了进一步增强 HBV DNA 疫苗的免疫反应, 本研究将共刺激分子 OX40L 作为 HBV DNA 疫苗的分佐剂免疫小鼠, 旨在探讨共刺激分子 OX40L 对 HBV DNA 疫苗诱导体液和细胞免疫应答的影响。【方法】我们将 HBV DNA 疫苗(p_cDS2)单独或联合共刺激分子质粒 pOX40L 免疫 C57BL/6 小鼠, 分别在第 0、2、4 周进行免疫, 在第 6 周检测抗-HBs IgG、IgG1 和 IgG2a, T 淋巴细胞增殖指数, 细胞因子表达水平和体内细胞毒性 T 淋巴细胞杀伤作用(CTL)等免疫学指标。【结果】p_cDS2 联合 pOX40L 免疫组小鼠的抗-HBs 水平显著提高, 抗-HBs IgG 亚类以 IgG2a 占优, 免疫小鼠的 T 淋巴细胞体外经乙型肝炎表面抗原(HBsAg)刺激后, 联合免疫组刺激指数(SI)明显高于 p_cDS2 组, 联合免疫组 CD4⁺ T 淋巴细胞的 IL-4 和 IFN- γ 表达水平及 CD8⁺ T 淋巴细胞的 IFN- γ 表达水平显著升高, DNA 疫苗免疫的各组小鼠, HBsAg 特异性体内 CTL 高于对照组, 其中联合免疫组小鼠的体内 CTL 杀伤作用最强。【结论】共刺激分子 OX40L 不仅能增强 HBV DNA 疫苗诱导特异性体液免疫应答, 还能增强特异性细胞免疫反应, 尤其增强体内 CTL 的杀伤活性, 为 HBV DNA 疫苗的研究奠定了基础。

关键词: 共刺激分子; OX40L; 表面抗原; DNA 疫苗; 体内 CTL

中图分类号: R392 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2009)03-0357-06

乙型肝炎是由乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)引起的一种影响全球公共卫生的重要传染病。据统计全球大约有 20 亿乙型肝炎病毒感染者, 其中 3.5 亿为 HBV 慢性感染者, 每年死于慢性 HBV 感染人数达到 100~200 万, HBV 持续感染最终将导致肝坏死、脂肪肝和肝癌的发生^[1]。HBV 持续感染不能被清除的重要原因之一是细胞免疫反应低下尤其不能产生强烈的 CTL 杀伤反应。HBV DNA 疫苗能够诱导细胞免疫应答, 尤其是较强的特异性 CTL 应答能有效的清除 HBV 感染, 因此 DNA 疫苗免疫有望成为一种治疗 HBV 慢性感染的新策略^[2]。目前, 增强 HBV DNA 疫苗的免疫反应已是 HBV 治疗及疫苗研究的一个热点。共刺激分子 OX40L 能促进 T 淋

巴细胞增殖, 诱导免疫细胞产生 IFN- γ 、IL-4 和 IL-2 等细胞因子, 增强 CTL 细胞的细胞毒作用等^[3]。本研究将小鼠共刺激分子 OX40L 真核表达质粒和表达 HBsAg DNA 疫苗联合免疫小鼠, 观察 OX40L 对 HBV DNA 疫苗诱导特异性体液免疫和细胞免疫应答的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂: 羊抗鼠 IgG1 和 IgG2a 为 Southern Biotechnology Associates 公司产品; 兔 IgG, 小鼠抗兔 IgG, 四甲基偶氮唑(MTT), 刀豆蛋白(Con A), 牛血清白蛋白(BSA), 佛波二脂(PMA), 莫能菌素, 多聚

基金项目 国家自然科学基金(30771602)

* 通信作者。E-mail: Bwang03@cau.edu.cn

作者简介 杜小刚(1977-)男, 四川阆中人, 博士, 讲师, 主要从事分子免疫学研究。Tel: +86-835-2885081, E-mail: dxg111@gmail.com

收稿日期 2008-10-28; 修回日期 2008-11-29

甲醛和皂素均为 Sigma 公司产品 ;CD3、IL-4、IFN- γ 、CD4、CD8、IgG1 荧光单克隆抗体和 Fc γ 抗体购自 BD 公司 ;羟基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺脂 (CFSE) 为 Molecular Probes 产品 ;胎牛血清和 RPMI1640 为 GIBCO 公司产品 ;HBsAg 华北制药集团提供 ;HBsAg 特异性 CTL 多肽 S208-215 ILSPFLPL 由上海吉尔生化有限公司合成 ;抗-HBs ELISA 检测试剂盒购自北京金豪生物技术有限公司。

1.1.2 实验动物 :C57BL/6 雌性小鼠 ,6~8 周龄 ,15~18 g ,SPF 级 ,购自军事医学科学院实验动物研究中心。

1.2 质粒 DNA 的制备

将 HBV 前 S2 区和 S 区基因构建到真核表达载体 pcDNA3.0 中 ,命名为 pcDS2 ;将共刺激分子 OX40L 基因插入真核表达载体 proVAX(本实验自行改造的表达载体) 中 ,命名为 pOX40L ;pcDS2 和 OX40L 均由本实验室自行构建 ,已证实可高效表达^[4]。将质粒 pcDS2、pOX40L 和 pcDNA3.0 分别转化 *E. coli* DH5a ,提取质粒 ,经酶切测序鉴定为阳性克隆 ,阳性克隆分别接种于 5 mL 含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中 ,于 37℃ 振荡培养 16 h ,次日按 1:100 扩大培养 6 h 制备发酵培养的“种子” ,最后转入发酵罐中发酵培养 ,采用大规模碱裂解法提取质粒^[5] ,并用生理盐水调节浓度至 1 g/L 于 -20℃ 保存。

1.3 动物分组、免疫方法

C57BL/6 小鼠随机分为 6 组 ,每组 6 只 ;免疫分组为第 1 组仅免疫 pcDS2 组 ,第 2 组 pcDS2 + pOX40L 联合免疫组 ,第 3 组免疫 pcDS2 + proVAX 组 ,第 4 组免疫 pOX40L 组 ,第 5 组免疫 pcDNA3 组 ,第 6 组空白组 ;肌肉多点注射于小鼠两后股四头肌进行免疫 ,100 μ L/只 ,100 μ g/只。分别在第 0、2、4 周免疫小鼠 ,第 6 周处死小鼠检测各项免疫学指标。

1.4 ELISA 法检测抗 HBs IgG 及 IgG 亚型 IgG1、IgG2a

1.4.1 抗-HBs IgG 浓度检测 抗-HBs 特异性 IgG 含量按北京金豪生物技术有限公司抗-HBs ELISA 试剂盒说明书完成。

1.4.2 抗-HBs IgG 亚型 IgG1、IgG2a 浓度检测^[6] :在最后一次免疫后第 2 周 ,分离小鼠血清进行检测 IgG 亚型 IgG1、IgG2a 浓度 ;2 μ g/mL 重组 HBsAg 抗原 100 μ L/孔包被 96 孔酶标板中的 48 孔 ,2 μ g/mL 兔 IgG 100 μ L/孔包被另外 48 孔 ,4℃ 过夜 ,PBS 洗板 ,待检测小鼠血清按 1:100 倍稀释 100 μ L/孔加入包被

HBsAg 孔中 ,小鼠抗兔 IgG 从 100 ng/mL 按系列 2 倍稀释 10 个梯度 100 μ L/孔加入包被兔 IgG 孔中 ,37℃ ,1 h ,PBS 洗板 ,加入 100 μ L/孔 1:2000 稀释的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG1 或 IgG2a 第二抗体 ,37℃ ,1 h ,PBS 洗板 ,TMB 显色于 A₄₅₀ 测定每孔光密度值 ,做出标准曲线 ,根据标准曲线计算出小鼠血清抗-HBs IgG1、IgG2a 抗体浓度 ,并计算出 IgG2a/IgG1 比值。

1.5 MTT 法检测 T 淋巴细胞增殖

在最后一次免疫后第 2 周 ,无菌条件下分离脾细胞 ,通过尼龙柱除去 B 细胞制成单细胞悬液 ,调整细胞浓度到 1×10^6 个/mL ,活细胞数在 90% ,每孔加入 100 μ L 细胞悬液到 96 孔细胞培养板上 ,加 100 μ L HBsAg 抗原至终浓度为 5 μ g/mL 为实验组 ,加 100 μ L ConA 至终浓度为 5 μ g/mL 为阳性对照 ,加 100 μ L BSA 至终浓度为 2 μ g/mL 为无关对照 ,100 μ L RPMI-1640 为空白对照物 ,实验组和对照孔各设 3 个重复孔 ,37℃ ,5% CO₂ 培养 48~72 h ,每孔加入 20 μ L 5 μ g/mL MTT ,37℃ ,5% CO₂ 培养 4 h ,离心弃上清 ,每孔加入 100 μ L DMSO ,37℃ 培养 15 min ,用酶标仪测定 A₅₇₀ 吸光值。刺激指数 (SI) ,SI = (A 实验组 - A 培养基) / (A 细胞 - A 培养基)。

1.6 流式细胞仪检测细胞因子表达水平

在最后一次免疫后第 2 周 ,无菌条件下分离脾细胞 ,通过尼龙柱除去 B 细胞制成单细胞悬液 ,调整细胞浓度到 5×10^6 个/mL ,每孔加入 100 μ L 细胞悬液到 96 孔细胞培养板上 ,加 HBsAg 抗原和抗 CD28 抗体每孔各 50 μ L 至终浓度为 5 μ g/mL 为实验组 ,加 100 μ L PMA 至终浓度为 5 μ g/mL 为阳性对照组 ,加 100 μ L RPMI-1640 为空白对照组 ,实验组和对照孔各设 3 个重复孔。37℃ ,5% CO₂ 培养 48 h 后 ,离心收集细胞 ,抗 Fc γ 抗体封闭 ,4% 多聚甲醛固定 8 min ,0.1% 皂素破膜 5 min ,PBS 洗 2 次 ,用 10 μ L 荧光单克隆抗体 CD4-FITC、CD4-PE、CD8-PE、IL-4-PE 和 IFN- γ -FITC 4℃ 暗处染色 30 min ,并设抗相应的同型对照 ,取 300 μ L 流式细胞仪检测。

1.7 流式细胞仪检测体内 CTL 活性^[7]

在最后一次免疫后第 2 周 ,处死未经免疫的空白小鼠 ,分离得到脾细胞 ,制成单个脾细胞悬液 ,分成二份作为靶细胞 ,一份加 10^{-6} mol/L HBsAg 特异性 CTL 表位多肽 S208-215 刺激 ,一份不刺激 ,37℃ ,5% CO₂ 培养 4h ,离心弃上清 ,PBS 洗 1 次 ,未刺激的靶细胞用 0.5 μ mol/L CFSE 暗处染色 10 min ,

刺激的靶细胞用 $5 \mu\text{mol/L}$ CFSE 暗处染色 10 min, 加入等体积小牛血清终止染色 2 min, 离心弃上清, PBS 洗 1 次, 最后将两种靶细胞等体积的混合, 将 2×10^7 个靶细胞尾静脉注射到免疫小鼠体内, 进行体内细胞毒杀伤反应, 杀伤 4 h 后处死小鼠, 暗处分离得到脾细胞, 取 $300 \mu\text{L}$ 流式细胞仪检测分析。

体内 CTL 杀伤率(%) = $[1 - (\text{空白组的比率}/\text{免疫组的比率}) \times 100]$, 比率 = 低浓度 CFSE 百分数/高浓度 CFSE 百分。

1.8 统计学分析

采用 *t* 检验法比较两组之间的差异。

2 结果

2.1 抗-HBs IgG 及亚型 IgG1、IgG2a 检测结果

在最后一次免疫后 2 周, ELISA 法检测小鼠血

清抗-HBs IgG 及亚型 IgG1、IgG2a。抗-HBs IgG 检测结果显示, pcDS2 + pOX4L 联合免疫组抗-HBs 为 425.4 mIU/mL , 高核酸疫苗 pcDS2 组 241.2 mIU/mL (高 $P < 0.01$), 同时也显著高于对照组 pcDS2 + proVAX 组 254.1 mIU/mL , pcDNA3 54.1 mIU/mL 和 pOX4L 60 mIU/mL ($P < 0.01$), 对照组 pcDS2 + proVAX 比 pcDS2 略高, 但差异不显著 ($P > 0.05$) (图 1-A)。抗-HBs IgG1、IgG2a 亚型检测结果显示 (图 1-B 和 C), pcDS2 + pOX4L 联合免疫组 IgG2a 为 28.4 ng/mL 显著高于仅免疫 pcDS2 组 7.5 ng/mL ($P < 0.01$), 同时也显著高于对照组 pcDS2 + proVAX, pcDNA3 和 pOX4L, 后者分别为 $9.2.8$ 和 3.2 ng/mL ; pcDS2 + pOX4L 联合免疫组 IgG2a/IgG1 比值为 3.6 , 均明显高于其它各组值 ($P < 0.05$); IgG1 各组差异不显著 ($P > 0.05$)。

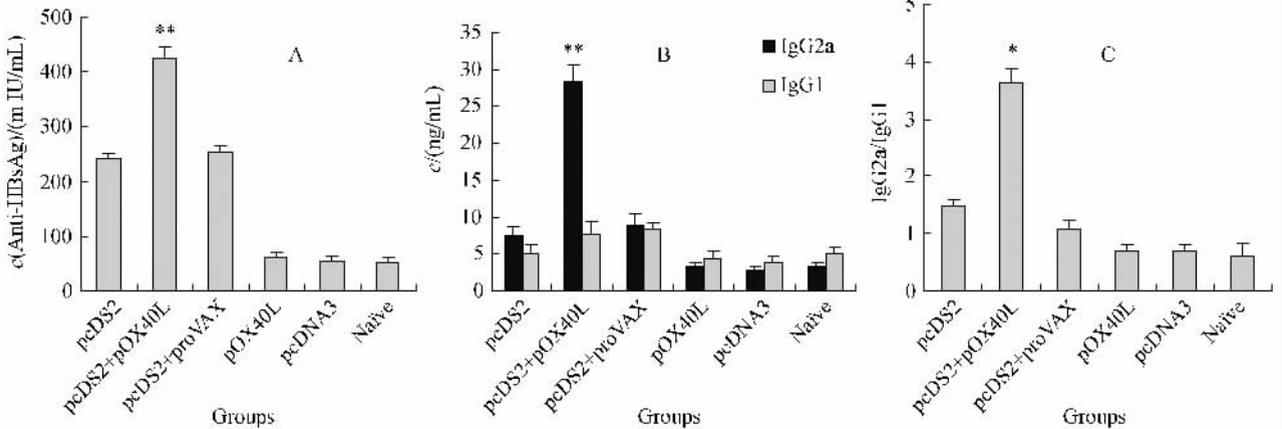


图 1 ELISA 检测抗-HBs IgG 及亚型 IgG1 和 IgG2a 水平

Fig. 1 The level of anti-HBs IgG and isotype IgG1, IgG2a detected by ELISA. A: Concentration of IgG; B: Concentration of IgG1 and IgG2a; C: Ratio of IgG2a/IgG1.

2.2 T 淋巴细胞增殖实验结果

在最后一次免疫后 2 周, 小鼠 T 淋巴细胞经 HBsAg 刺激后, pcDS2 + pOX4L 联合免疫组和 pcDS2 免疫组 T 淋巴细胞均产生特异性增殖, SI 分别为 4.2 和 2.1, 与核酸疫苗 pcDS2 组比较联合免疫组 pcDS2 + pOX4L 的增殖明显较高 ($P < 0.05$), 且联合免疫组明显高于对照组 pcDS2 + proVAX, pOX4L 和 pcDNA3 ($P < 0.05$), 后者的 SI 分别为 2.5, 1.5 和 1.3 (图 2)。

2.3 细胞因子表达检测结果

在最后一次免疫后 2 周, 小鼠 T 淋巴细胞经 HBsAg 刺激后, 与单独免疫 pcDS2 组相比, 联合免疫组 pcDS2 + pOX4L 能够显著上调 CD4^+ T 淋巴细胞

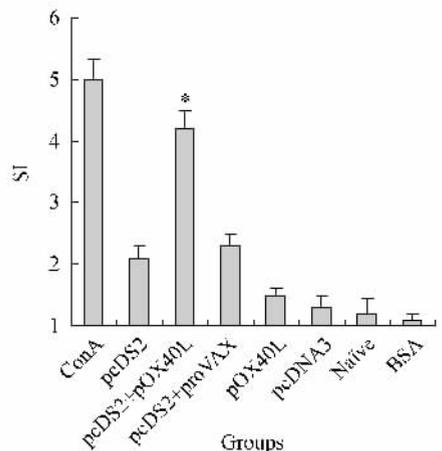


图 2 MTT 法检测 T 淋巴细胞增殖反应

Fig. 2 The T cell proliferation reaction tested by MTT methods.

IL-4 和 IFN- γ 的表达,其 IL-4 和 IFN- γ 的表达水平也显著高于各对照组(图 3-A 和 B)($P < 0.01$),同时联合免疫组也显著增强 CD8 $^{+}$ T 淋巴细胞 IFN- γ 的表达(图 3-C)($P < 0.01$)。

2.4 体内 CTL 活性检测结果

在最后一次免疫后 2 周,体内 CTL 杀伤反应经过流式细胞仪进行检测,pcDS2 组,pcDS2 + pOX40L 组,pcDS2 + proVAX 组,pOX40L 组,pcDNA3 和空白组体内杀伤率分别为 28.4%,68.0%,31.2%,6.8%,6.0%和 4.7%(图 4-A、B)。

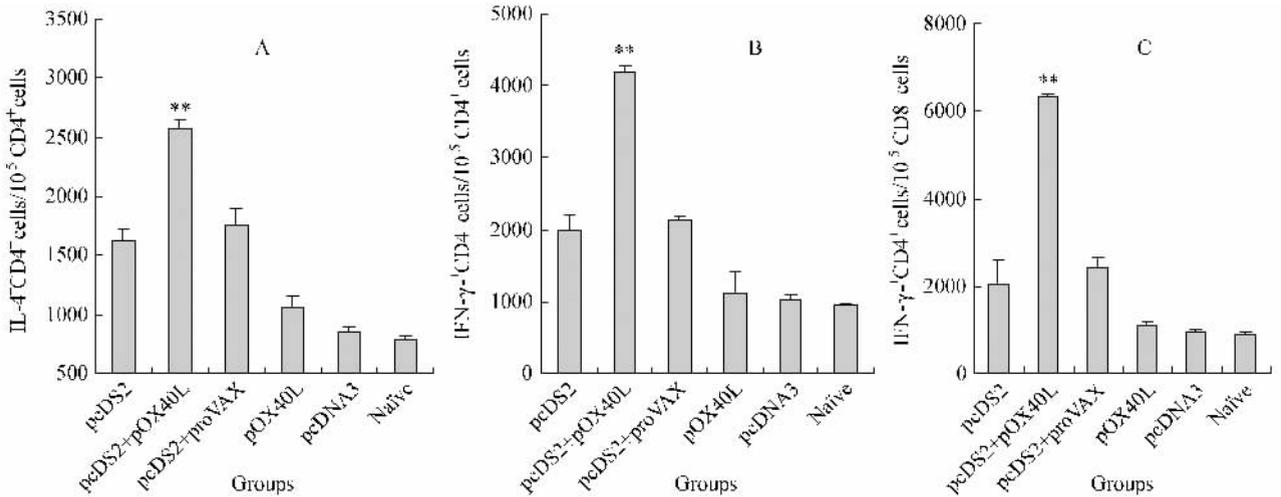


图 3 流式细胞仪检测 CD4 $^{+}$ 和 CD8 $^{+}$ T 淋巴细胞细胞因子表达水平

Fig. 3 The level of cytokines in CD4 $^{+}$ and CD8 $^{+}$ T cell examined by flow cytometry. A: Amount of IL-4 $^{+}$ CD4 $^{+}$ cells in 10^5 CD4 $^{+}$ T cells; B: Amount of IFN- γ + CD4 $^{+}$ cells in 10^5 CD4 $^{+}$ T cells; C: Amount of IFN- γ + CD8 $^{+}$ cells in 10^5 CD8 $^{+}$ T cells.

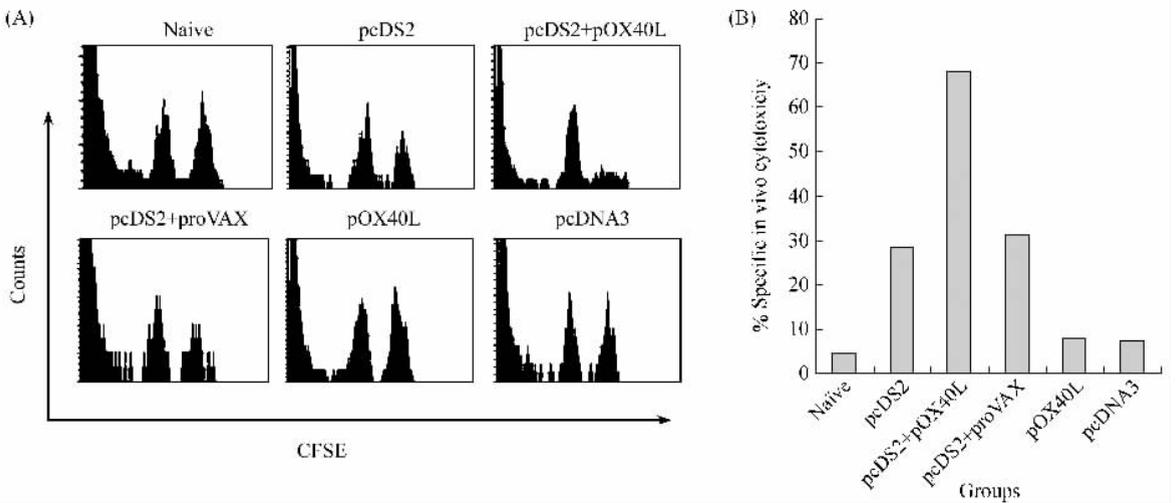


图 4 特异性体内 CTL 活性检测

Fig. 4 Detection of specific in vivo specific cytotoxic T lymphocyte reaction by flow cytometry. A: Analysis of in vivo CTL by flow cytometry; B: Percentage of in vivo CTL.

3 讨论

为了增强 HBV DNA 疫苗免疫反应,克服其免疫原性低下、免疫剂量大等缺点和不足,国内外有不少研究者通过多种方法增强其免疫反应如:HBV 抗原靶向到内质网上增强抗原递呈,活化 APC 细胞表面的受体,Prime-boost 方法扩大免疫反应,或细胞因子

作为佐剂等^[8-10]。本研究将共刺激分子 OX40L 的基因构建到真核表达载体上,与 HBV DNA 疫苗一起免疫 C57BL/6 小鼠,OX40L 分子在细胞内表达,并起到佐剂作用增强 HBV DNA 疫苗免疫反应,与直接用 OX40L 蛋白分子相比方法简单,成本低,避免的 OX40L 蛋白分子的降解,为 HBV DNA 疫苗佐剂的研究提供可借鉴的依据。诱导机体产生强烈的 Th1 免

疫反应对于控制 HBV 的感染,降低血液中病毒含量,HBV 慢性携带者的转阴等有十分重要的作用^[11-13]。然而,对于 OX40L 影响 Th1 还是影响 Th2 反应存在很大的争议;一些体外实验证明 OX40L 引起 Th1,而一些体内实验则证明产生 Th1, Th2, 或者 Th1 和 Th2 反应^[14-15]。而本研究发现 pcDS2 + pOX40L 联合免疫组比单独免疫核酸疫苗产生高水平的抗-HBs(IgG),抗-HBs(IgG)亚型 IgG2a、IgG1 分析表明联合免疫组 IgG2a 的含量显著增加,而 IgG1 的含量差异不显著,且 IgG2a/IgG1 的比值也明示大于核酸疫苗组,提示共刺激分子 OX40L 能够诱导 HBV DNA 疫苗产生强烈 Th1 免疫反应,进一步检测 Th 细胞因子表达水平,发现联合免疫组 CD4⁺ T 细胞表达 IFN- γ 水平明显较核酸疫苗组高,表明 OX40L 主要诱导机体产生 Th1 免疫反应,与抗体检测结果一致。OX40L 能够诱导机体产生 Th1 免疫反应,我们推测可能与 HBV DNA 疫苗免疫小鼠的实验模型有关。

在 HBV 感染过程中,强烈的抗原特异性 CTL 反应和 CD8⁺ T 细胞分泌 IFN- γ 对其清除起着相当重要的作用,前者通过分泌穿孔素和启动 FasL 凋亡信号裂解 HBV 感染的宿主细胞杀死病毒,而后者则通过 IFN- γ 干扰病毒复制达到清除病毒感染的目的。Serghides^[16]等报道将 OX40L 构建到腺病毒载体中,并将其转入人的单核细胞内表达,使自身来源的单核细胞转变为 APC 细胞,增强抗原递呈能力,增加穿孔素的分泌,最终诱导产生强烈的 CTL 反应,清除流感病毒的感染。本研究在用抗原特异性 CTL 多肽体外刺激靶细胞后,通过尾静脉过继转移到免疫 C57BL/6 小鼠体内进行 CTL 杀伤反应,能够更真实的模拟机体内环境,反应机体的免疫状态,结果证实与核酸疫苗相比联合免疫组诱导产生强烈的 CTL 杀伤反应,同时联合免疫组能够上调 CD8⁺ T 淋巴细胞 IFN- γ 的表达;说明 OX40L 能够增强核酸疫苗 CTL 反应和诱导增加 CD8⁺ T 淋巴细胞 IFN- γ 的分泌,但 OX40L 联合免疫是否能清 HBV 病毒的感染还有待进一步证明。

参考文献

- [1] Kane M. Global programme for control of hepatitis B infection. *Vaccine*, 1995, 13(Suppl 1):S47-39.
- [2] Zu Putlitz J, Encke J, Wands JR. Cytotoxic T cell responses against hepatitis B virus polymerase induced by genetic immunization. *Journal of Hepatology*, 2000, 33(6):986-991.
- [3] Croft M. Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity? *Nature Review Immunology*, 2003, 3(8):609-620.
- [4] Wang J, Su B, Ding Z, et al. Cimetidine enhances immune response of HBV DNA vaccination via impairment of the regulatory function of regulatory T cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2008, 373(3):491-496.
- [5] Li X, Jin H, Wu Z, et al. A continuous process to extract plasmid DNA based on alkaline lysis. *Nature Protocol*, 2008, 3(2):176-180.
- [6] Jin H, Li Y, Ma Z, et al. Effect of chemical adjuvants on DNA vaccination. *Vaccine*, 2004, 22(21-22):2925-2935.
- [7] Piriou L CS, Genetet N, et al. Design of a flow cytometric assay for the determination of natural killer and cytotoxic T-lymphocyte activity in human and in different animal species. *Cytometry*, 2000, 41:289-297.
- [8] Hung C-F, Cheng W-F, Chai C-Y, et al. Improving Vaccine Potency Through Intercellular Spreading and Enhanced MHC Class I Presentation of Antigen. *Journal of Immunology*, 2001, 166(9):5733-5740.
- [9] Cusi MG, Terrosi C, Savellini GG, et al. Efficient delivery of DNA to dendritic cells mediated by influenza virosomes. *Vaccine*, 2004, 22(5-6):735-739.
- [10] Calarota SA, Weiner DB. Enhancement of human immunodeficiency virus type 1-DNA vaccine potency through incorporation of T-helper 1 molecular adjuvants. *Immunology Review*, 2004, 199:84-99.
- [11] Chow Y-H, Chiang B-L, Lee Y-L, et al. Development of Th1 and Th2 Populations and the Nature of Immune Responses to Hepatitis B Virus DNA Vaccines Can Be Modulated by Codelivery of Various Cytokine Genes. *Journal of Immunology*, 1998, 160(3):1320-1329.
- [12] Millan CLB, Weeratna R, Krieg AM, et al. CpG DNA can induce strong Th1 humoral and cell-mediated immune responses against hepatitis B surface antigen in young mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998, 95(26):15553-15558.
- [13] Rodriguez F, Harkins S, Redwine JM, et al. CD4⁺ T Cells Induced by a DNA Vaccine: Immunological Consequences of Epitope-Specific Lysosomal Targeting. *Journal of Virology*, 2001, 75(21):10421-10430.
- [14] Gramaglia I, Jember A, Pippig SD, et al. The OX40 Costimulatory Receptor Determines the Development of CD4 Memory by Regulating Primary Clonal Expansion. *Journal of Immunology*, 2000, 165(6):3043-3050.

- [15] Murata K , Nose M , Ndhlovu LC , et al. Constitutive OX40/OX40 Ligand Interaction Induces Autoimmune-Like Diseases. *Journal of Immunology* , 2002 , 169(8) :4628 – 4636.
- [16] Serghides L , Bukczynski J , Wen T , et al. Evaluation of OX40 Ligand as a Costimulator of Human Antiviral Memory CD8 T Cell Responses : Comparison with B7.1 and 4-1BBL. *Journal of Immunology* , 2005 , 175(10) :6368 – 6377.

Adjuvant effect of plasmid vector-expressed OX40L on candidate DNA vaccine against type B hepatitis

Xiaogang Du¹ , Youming Kang² , Xiao Wang² , Junpeng Wang² , Gan Zhao² , Bin Wang^{2*}

(¹Applied Biophysics and Immune Engineering Laboratory , College of Life and Physical Science , Sichuan Agricultural University , Ya'an 625014 , China)

(²State Key Laboratory for Agro-Biotechnology , Department of Microbiology and Immunology , College of Biological Science , China Agricultural University , Beijing 100094 , China)

Abstract [Objective] To improve the immune response to HBsAg DNA vaccine and clear HBV , we investigated co-stimulatory molecule OX40L as adjuvant effect on the humoral and cellular immune responses to HBV DNA vaccine by immunizing mice with HBV DNA vaccine plus OX40L. **[Methods]** We immunized the C57BL/6 mice with pcDS2 alone , or with OX40L and candidate DNA vaccine against HBV (pcDS2) together by intramuscular injection . The immunization was performed on week 0 , 2 , 4 . The concentration of the anti-HBs (IgG) and isotypes (IgG1 , IgG2a) , the stimulated index of T lymphocyte proliferation , and the expression of IL-4 and IFN- γ in CD4⁺ T cell and IFN- γ in CD8⁺ T cell , specific in vivo cytotoxic T lymphocyte (CTL) activity were detected at week 6. **[Results]** The concentration of the anti-HBs IgG induced by pcDS2 plus OX40L groups was much higher than that induce by pcDS2 alone , and the levels of IgG isotype of IgG2a were generally higher than IgG1 in all groups of mice immunized with different plasmids. Compared to mice immunized with pcDS2 alone , the pcDS2 plus OX40L group increased the stimulated index (SI) of T cell proliferation and elicited a higher level of IFN- γ and IL-4 in CD4⁺ T cells and a higher level of IFN- γ in CD8⁺ T cells. In all groups , OX40L plus pcDS2 induced significantly robust in vivo CTL response. **[Conclusion]** The co-immunization of OX40L and HBV DNA vaccine can enhance the humoral and cellular immune responses , especially CTL activity.

Keywords : Co-stimulatory molecule ; OX40L ; HBsAg ; DNA vaccine ; in vivo CTL

(本文责编 张晓丽)