

• 动物及兽医生物技术 •

鸡源 CD40L 基因克隆、蛋白表达及生物活性检测

马萌, 郑孟加, 李晓齐, 高丽, 曹红, 王永强, 郑世军

中国农业大学动物医学院 农业动物流行病学重点实验室, 北京 100193

马萌, 郑孟加, 李晓齐, 等. 鸡源 CD40L 基因克隆、蛋白表达及生物活性检测. 生物工程学报, 2021, 37(8): 2786-2793.

Ma M, Zheng MJ, Li XQ, et al. Gene cloning, protein expression and examination of biological activity of chicken CD40L. Chin J Biotech, 2021, 37(8): 2786-2793.

摘要: 为获得鸡源 CD40L (chCD40L) 蛋白, 以鸡脾细胞制备 cDNA 并以之为模板扩增 *chCD40L* 基因, 构建 pFastBac-*chCD40L* 供体重组质粒, 转化感受态细胞 DH10Bac, 通过筛选及鉴定获得 Bacmid-*chCD40L* 重组质粒, 转入真核表达系统 sf9 昆虫细胞进行蛋白表达与纯化, 获得 His-chCD40L 蛋白。此外, 构建 pQM01-*chCD40L* 质粒, 转染 HEK 293T 细胞进行蛋白表达与纯化, 获得 Strep-chCD40L 蛋白。亲和层析纯化的 chCD40L 蛋白浓度为 0.01 mg/mL。为检测 chCD40L 蛋白的生物活性, 分离和培养 3 周龄 SPF 雏鸡的法氏囊组织原代细胞, 将 chCD40L 加入细胞培养液刺激细胞增殖, 通过 Western blotting 试验、间接免疫荧光试验、流式细胞术检测, 发现该蛋白能够与法氏囊 B 淋巴细胞表面的 CD40 结合, 说明 chCD40L 具有生物活性。成功获得 chCD40L 蛋白, 为原代 B 淋巴细胞体外培养及 IBDV 野毒分离与诊断奠定了基础。

关键词: 鸡, CD40L, 法氏囊原代细胞培养, 真核表达, 生物活性检测, 杆状病毒表达系统

Gene cloning, protein expression and examination of biological activity of chicken CD40L

Meng Ma, Mengjia Zheng, Xiaoqi Li, Li Gao, Hong Cao, Yongqiang Wang, and Shijun Zheng

Key Laboratory of Animal Epidemiology of the Ministry of Agriculture, College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China

Abstract: To obtain chicken CD40L protein, the cDNA was prepared from chicken splenic cells and used as a template to clone and amplify *CD40L* by PCR. The target gene was cloned into pFastBac vector to construct a pFastBac-*chCD40L* donor plasmid. Recombinant plasmid was transformed into DH10Bac and recombinant Bacmid-*chCD40L* was obtained. The Bacmid-*chCD40L* plasmid was transfected into sf9 insect cells to obtain His-chCD40L protein. In addition, the target gene was cloned into pQM01 vector to construct a pQM01-*chCD40L* plasmid, recombinant plasmid was transfected into HEK 293T

Received: September 25, 2020; **Accepted:** December 7, 2020

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31430085), The Modern Agricultural Industry Technology System, China (No. NYCYTX-40).

Corresponding authors: Shijun Zheng. Tel: +86-10-62734681; E-mail: sjzheng@cau.edu.cn

Yongqiang Wang. Tel: +86-10-62734483; E-mail: vetwyq@cau.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 31430085), 现代农业产业技术体系建设专项 (No. NYCYTX-40) 资助。

网络出版时间: 2021-01-06

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20210104.1328.006.html>

cells to obtain Strep-chCD40L protein. The chCD40L protein was purified by affinity chromatography, and the concentration of purified chCD40L protein was determined to be 0.01 mg/mL. Primary cells were isolated from the bursal tissue of 3-week old SPF chickens, and the chCD40L protein was added to the culture medium to stimulate cells. The chCD40L could bind to CD40 on B cells as examined by Western blotting, indirect immunofluorescence assay and flow cytometry, suggesting that chCD40L protein is biologically active. We successfully obtained chicken CD40L protein of biological activity, which laid the foundation in the *in vitro* culture of primary B lymphocytes for the isolation and diagnosis of virulent IBDV.

Keywords: chicken, CD40L, chicken primary bursal cell culture, eukaryotic expression, biological activity assay, baculovirus expression system

CD40L 位于 CD4⁺ T 细胞膜上, 是重要的免疫共刺激分子, 与 B 细胞膜上的 CD40 结合促进 B 细胞活化。鸡 *CD40L* 基因位于 4 号染色体, 有 6 个外显子, 其 mRNA 的长度为 892 nt, 其中 CDS 区域有 819 nt, 编码 272 个氨基酸。2005 年, Tregaskes 等表达了鸡 CD40L 可溶性融合蛋白并研究了其生物学特性, 发现鸡 CD40L 具有与哺乳动物相似的生物学活性^[1]。鸡传染性法氏囊病毒 (Infectious bursal disease virus, IBDV) 主要感染雏鸡的法氏囊 B 淋巴细胞, 而 B 淋巴细胞一旦从法氏囊组织分离将很快进入细胞凋亡状态, 难以进行传代培养^[2]。据研究发现, 鸡 CD40L 能诱导 B 淋巴细胞分裂增殖并维持 B 细胞的体外培养^[2-3]。进一步研究发现, 以鸡 CD40L 刺激培养的法氏囊原代 B 淋巴细胞可以培养 IBDV^[4-5], 为 IBDV 野毒的分离提供了新方法。然而, 目前尚没有商品化的鸡 CD40L, 限制了对 IBDV 野毒的细胞培养、分离和鉴定。因此, 本研究通过鸡 *CD40L* 基因克隆、蛋白表达及生物活性检测获得了具有生物活性的鸡 CD40L 蛋白, 为原代 B 淋巴细胞的体外培养及 IBDV 野毒的分离与诊断奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

HEK 293T 细胞、sf9 细胞为本实验室保存; 大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 购自擎科生物科技有限公司; 大肠杆菌感受态细胞 DH10Bac、pFastbac 质粒由中国农业大学封文海教授实验室惠赠。3 周

龄 SPF 鸡购自北京勃林格殷格翰维通生物技术有限公司, 原代法氏囊细胞分离自 3 周龄 SPF 鸡。pQM01 线性化载体购自粒曼生物科技有限公司; 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司; DNA 凝胶回收试剂盒购自 Zymo 公司; 去内毒素质粒小提试剂盒购自美基生物科技有限公司; 鼠源 His-tag 单克隆抗体购自 Abmart 公司; 鼠源 Strep-tag 单克隆抗体购自 MBL 公司; 转染试剂 jetPRIME 购自 Ployplus 公司; 转染试剂 FuGENE6 购自普洛麦格公司; IMDM 细胞培养基购自迈晨科技有限公司; Strep-Tactin 蛋白纯化填料购自 IBA 生命科学公司; His-tag 蛋白纯化填料购自康为世纪生物科技有限公司; 亲和层析柱购自碧云天生物技术有限公司。

1.2 鸡 *CD40L* 基因克隆与蛋白表达

1.2.1 鸡 *CD40L* 基因的获取

根据鸡 *CD40L* 基因序列 (GenBank 登录号: NM_204733.1) 设计特异性引物 (F-5'-ATGAATGAAGCCTACAGCCCT-3'; R-5'-CAGCTTGAACATGCCAAAGTAGGTGTT-3'), 以鸡脾 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 将扩增得到的特异性条带回收后连接至 pMD19-T 载体, 转化至大肠杆菌 DH5 α , 挑取单克隆菌落进行 PCR 鉴定, 将鉴定为阳性的菌落测序并将测序结果与已发表的鸡 *CD40L* 基因序列进行比对。

1.2.2 鸡 *CD40L* 蛋白在昆虫杆状病毒系统中的表达及鉴定

以测序正确的 pMD19-T-*chCD40L* 载体为模板, 用含有 *EcoR* I 和 *Kpn* I 酶切位点的特异性引

物 (F-5'-CCGGAATTCAACATCATCATCATCATCATCATGAATGAAGCCTACAGCCC-3'; R-5'-CGGGGTACCCTAATGATGATGATGATGATGATGATGCAGCTTGAACATGCCAAAGT-3') 将鸡 *CD40L* 扩增出来, 双酶切后连接到酶切过的 pFastBac 载体上, 转化至 DH5 α , 将菌落 PCR 及双酶切鉴定为阳性的样本测序, 测序正确者即载体构建成功。将 pFastBac-*chCD40L* 重组质粒转化至 DH10Bac, 通过筛选及鉴定获得 Bacmid-*chCD40L* 重组质粒, 将质粒转入 sf9 昆虫细胞, 产生可表达目的蛋白的重组杆状病毒, 将重组杆状病毒感染 sf9 细胞表达目的蛋白, 并通过 Western blotting 分析蛋白表达情况。

1.2.3 鸡 CD40L 蛋白在 HEK 293T 细胞中的表达及鉴定

用含有 pQM01 同源臂的特异性引物 (F-5'-GCAACGGCAGCAGCGGATCCATGAATGAAGCCTACAGCCCT-3'; R-5'-GGGTGGCTCCAGGCGCTGCTCAGCTTGAACATGCCAAAGTAGGTGTT-3') 扩增鸡 *CD40L* 基因, 通过同源重组将目的基因连接到 pQM01 载体上构建 pQM01-*chCD40L* 质粒, 转染 HEK 293T 细胞表达目的蛋白, 并通过 Western blotting 分析蛋白表达情况。

1.3 鸡 CD40L 蛋白纯化与生物活性检测

1.3.1 鸡 CD40L 蛋白的纯化

根据纯化试剂盒说明书, 分别使用 Ni-Agarose Resin 及 Strep-Tactin 填料通过亲和层析的方法对昆虫杆状病毒表达系统表达的 His-*chCD40L* 蛋白及 HEK 293T 细胞中表达的 Strep-*chCD40L* 蛋白进行纯化, 并使用标准浓度的 BSA 样品测定目的蛋白的浓度。

1.3.2 鸡 CD40L 蛋白生物活性的 Western blotting 检测

于无菌条件下从 3 周龄 SPF 雏鸡的法氏囊组织分离原代细胞, 用于鸡 CD40L 蛋白活性检测: 分别使用添加 0.5 $\mu\text{g/mL}$ Strep-*chCD40L* 及没有添

加蛋白的 IMDM 细胞培养液培养原代法氏囊细胞, 24 h 后收集细胞蛋白, 进行 Western blotting 检测。

1.3.3 鸡 CD40L 蛋白生物活性的间接免疫荧光试验检测

分别使用添加 0.5 $\mu\text{g/mL}$ Strep-*chCD40L*、0.5 $\mu\text{g/mL}$ Strep-VDAC2、0.5 $\mu\text{g/mL}$ BSA 及没有添加蛋白的 IMDM 培养液培养原代法氏囊细胞, 相同处理两组细胞分别为实验组与同型对照组。24 h 后收集细胞, 用 PBS 洗细胞后将其涂于载玻片上, 经干燥、固定、封闭、孵育 anti-Strep-tag (IgG2a 亚型) 及 anti-myc-tag (IgG2a 亚型) 一抗、孵育 FITC 标记的荧光二抗、洗涤、干燥后在荧光显微镜下观察。

1.3.4 鸡 CD40L 蛋白生物活性的流式细胞术检测

分别使用添加 0.5 $\mu\text{g/mL}$ Strep-*chCD40L*、0.5 $\mu\text{g/mL}$ Strep-VDAC2、0.5 $\mu\text{g/mL}$ BSA 及没有添加蛋白的 IMDM 培养液培养原代法氏囊细胞, 相同处理两组细胞分别为实验组与同型对照组, 24 h 后收取细胞到流式管中, 用 anti-Strep-tag (IgG2a 亚型) 及 anti-myc-tag (IgG2a 亚型) 一抗、FITC 标记的荧光二抗于室温条件下孵育, 洗涤后用 PBS 重悬细胞, 用流式细胞仪对处理好的样品进行分析, 通过以上 3 种方式检测体外表达纯化的 *chCD40L* 蛋白是否具有生物活性。

2 结果与分析

2.1 鸡 CD40L 基因的获取

以鸡脾脏 cDNA 为模板进行 PCR 扩增获取 *chCD40L* 基因, 结果显示产物大小为 819 bp, 与预期一致 (图 1), 将回收的 PCR 扩增产物连接 pMD19-T 载体, 转化大肠杆菌 DH5 α , 挑取单克隆菌落进行 PCR 鉴定, 将 PCR 鉴定为阳性的菌液测序比对, 结果显示 NCBI 上发表的鸡 *CD40L* 基因序列 (GenBank 登录号: NM_204733.1) 相同。

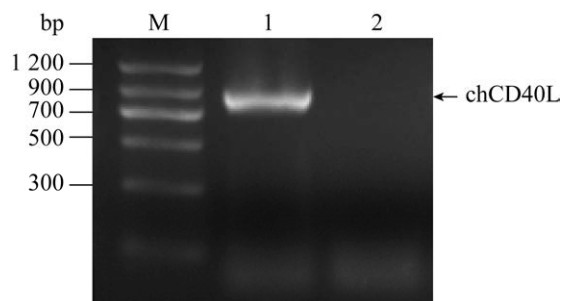


图 1 鸡 *CD40L* 基因的 PCR 扩增

Fig. 1 Amplification of chicken *CD40L* gene by PCR. M: DNA marker II; 1: gene of chicken *CD40L*; 2: negative control.

2.2 鸡 *CD40L* 蛋白在昆虫杆状病毒系统中的表达及鉴定

通过 *Kpn* I、*Eco*R I 两个酶切位点双酶切 pFastbac 质粒及含有酶切位点的鸡 *CD40L* 基因，并将酶切后的目的基因与 pFastbac 载体连接，经 PCR 及双酶切验证成功构建出 pFastbac-*chCD40L* 重组质粒 (图 2A-B)。将 pFastbac-*chCD40L* 质粒转化 DH10Bac，选择菌落较大且颜色均匀的白色单克隆进行 PCR 鉴定，结果显示获得了重组杆状

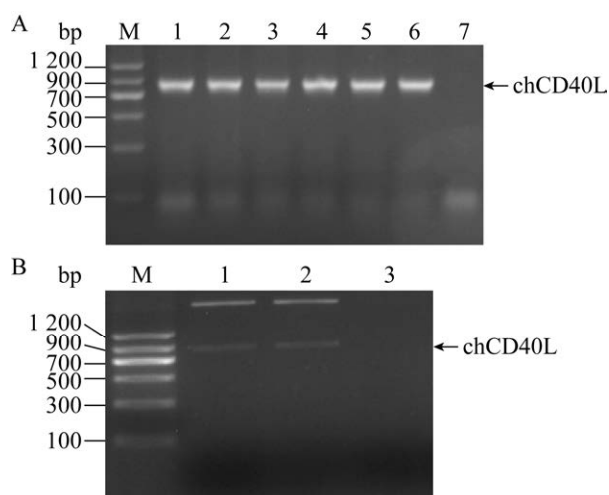


图 2 重组供体质粒 pFastbac-*chCD40L* 的鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant donor plasmids by PCR (A) (M: DNA marker II; 1-6: samples of pFastBac-*chCD40L*; 7: negative control) and double enzyme digestion (B) (M: DNA marker II; 1-2: samples of pFastBac-*chCD40L*; 3: negative control).

病毒 Bacmid-*chCD40L* (图 3)。将重组杆状病毒 Bacmid-*chCD40L* 及野生型杆状病毒 Bacmid-WT 分别感染 sf9 昆虫细胞，于显微镜下观察到，与对照组相比，感染了杆状病毒的实验组出现了明显病变 (图 4A)，收取 P I 病毒，在 sf9 细胞上进

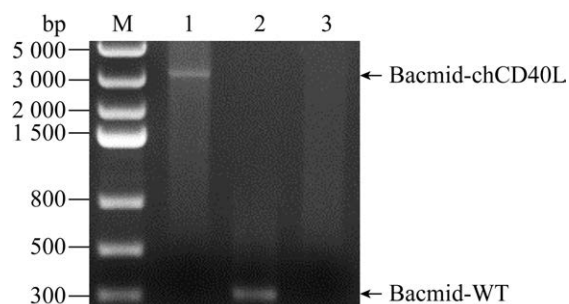


图 3 重组 Bacmid-*chCD40L* 的 PCR 鉴定

Fig. 3 Identification of recombinant Bacmid-*chCD40L* by PCR. M: DNA marker III; 1: sample of Bacmid-*chCD40L*; 2: sample of Bacmid-WT; 3: negative control.

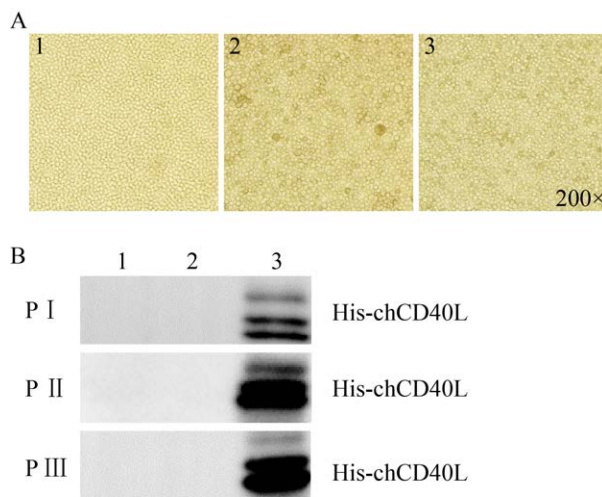


图 4 His-*chCD40L* 重组蛋白表达的鉴定

Fig. 4 Identification of His-*chCD40L* recombinant protein expression by Sf9 cells infected with baculovirus (A) (1: normal sf9 cells; 2: sf9 cells infected with Bacmid-WT; 3: sf9 cells infected with Bacmid-*chCD40L*) and Western blotting (B) (1: samples of normal sf9 cells culture supernatant; 2: samples of sf9 cells culture supernatant containing PI, PII, PIII wild-type baculovirus; 3: samples of sf9 cells culture supernatant containing PI, PII, PIII recombinant baculovirus).

行病毒扩繁, 获得 PII、PIII 病毒, 分别取含有 PI、PII、PIII 病毒的 sf9 细胞培养上清及正常 sf9 细胞培养上清, 加入 5×SDS 上样缓冲液煮沸并冷却, 用 anti-His-tag 特异性抗体做 Western blotting 鉴定, 结果表明含有 PI、PII、PIII 重组杆状病毒的 sf9 细胞培养上清中均有 His-chCD40L 蛋白的表达 (图 4B)。

2.3 Strep-chCD40L 重组蛋白的表达鉴定

使用特异性引物通过 PCR 扩增获得带有 pQM01 载体同源臂的 *chCD40L* 基因, 通过同源重组将其连接到 pQM01 线性化载体上, 转化 DH5 α , 选择阳性克隆提取质粒进行 PCR 鉴定, 结果显示获得与目的基因大小相同的条带 (图 5A), 将重组 pQM01-*chCD40L* 质粒与空载体 pQM01-mcherry

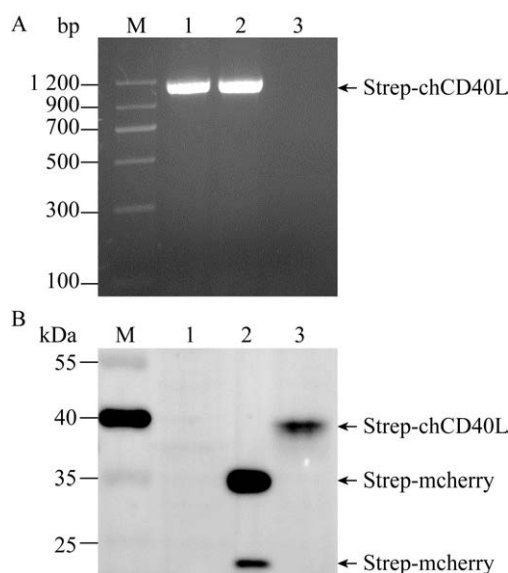


图 5 Strep-chCD40L 重组蛋白表达鉴定

Fig. 5 Identification of Strep-chCD40L recombinant protein expression. (A) Identification of recombinant pQM01-*chCD40L* by PCR. M: DNA marker II; 1: sample of normal HEK 293T cells; 2: sample of HEK 293T cells transfected with pQM01-mcherry plasmid; 3: sample of HEK 293T cells transfected with pQM01-*chCD40L* plasmid. (B) Identification of recombinant Strep-chCD40L Protein by Western blotting. M: marker; 1: sample of normal HEK 293T cells; 2: sample of HEK 293T cells transfected with pQM01-mcherry plasmid; 3: sample of HEK 293T cells transfected with pQM01-*chCD40L* plasmid.

质粒分别转染 HEK 293T 细胞, 24 h 后收取细胞蛋白, 加入 5×SDS 上样缓冲液煮沸并冷却, 用 anti-Strep-tag 特异性抗体进行 Western blotting 鉴定, 结果表明, 重组 pQM01-*chCD40L* 质粒转染的 HEK 293T 细胞样品中检测出的目的蛋白条带与预期大小一致 (图 5B)。

2.4 鸡 CD40L 蛋白的纯化

经 SDS-PAGE 检测 Strep-chCD40L 获得较好的纯化效果, 蛋白浓度约为 0.01 mg/mL (图 6)。

2.5 鸡 CD40L 蛋白的生物活性检测

从 3 周龄 SPF 鸡的法氏囊组织分离原代细胞, 于显微镜下观察到分离的细胞状态良好 (图 7), 可用于鸡 CD40L 蛋白的活性检测。

经 Western blotting 检测, 结果表明, 特异性的 anti-Strep-tag 抗体能够检测到细胞蛋白中的 Strep-chCD40L, 说明在细胞培养液中添加的 Strep-chCD40L 蛋白能与原代法氏囊 B 淋巴细胞的 CD40 结合 (图 8A)。间接免疫荧光试验的结果

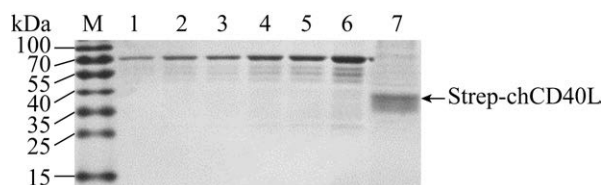


图 6 Strep-chCD40L 蛋白浓度的测定

Fig. 6 Determination of Strep-chCD40L protein concentration. M: marker; 1: sample of 0.01 mg/mL BSA; 2: sample of 0.02 mg/mL BSA; 3: sample of 0.025 mg/mL BSA; 4: sample of 0.04 mg/mL BSA; 5: sample of 0.05 mg/mL BSA; 6: sample of 0.1 mg/mL BSA; 7: sample of Strep-chCD40L protein.



图 7 鸡法氏囊组织分离的原代细胞

Fig. 7 Primary cells isolated from chicken bursal tissue.

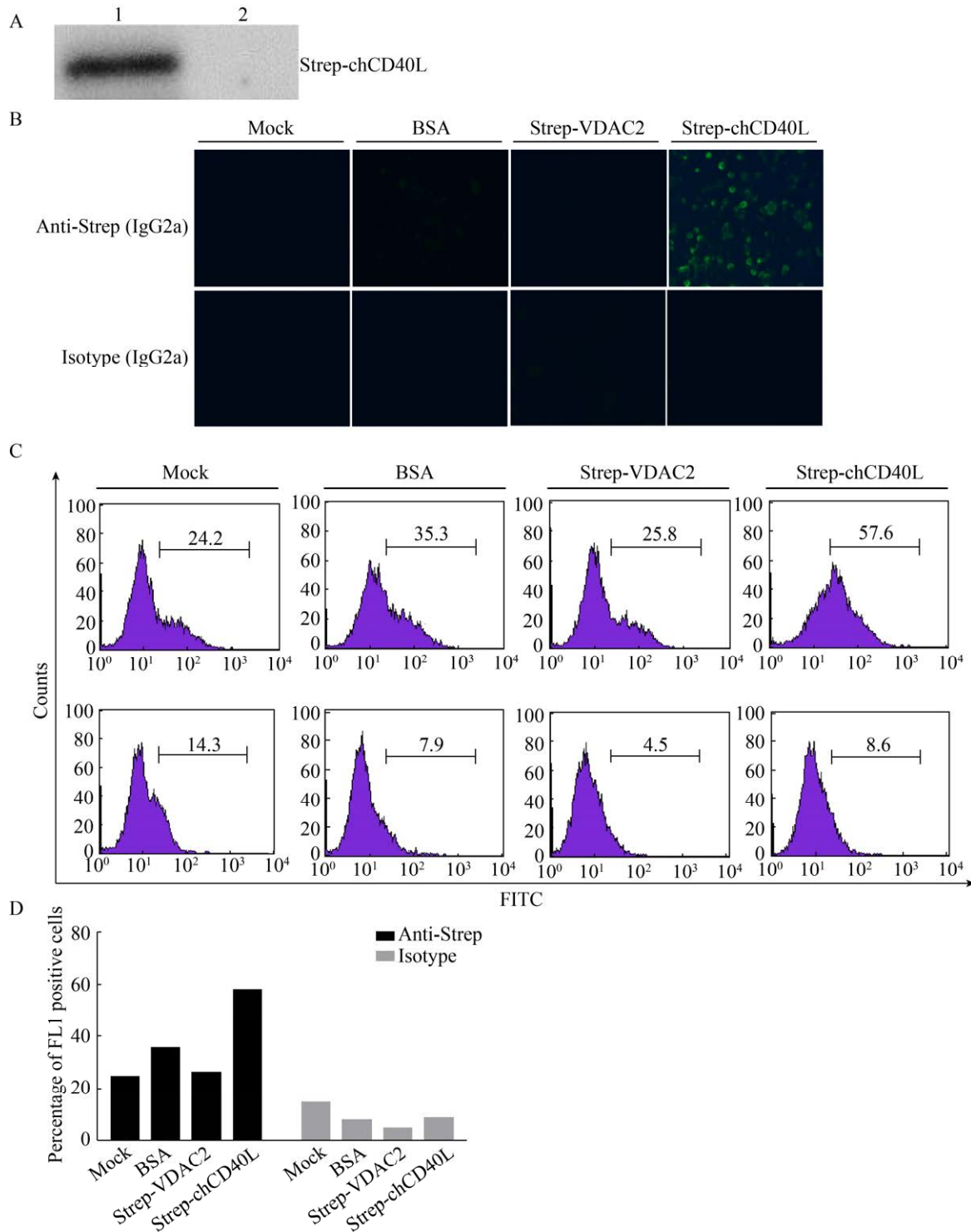


图 8 鸡 CD40L 蛋白生物活性的检测

Fig. 8 Determination of biological activity of chicken CD40L. (A) Western blotting. Sample of primary bursal cells cultured in cell culture medium supplemented with 0.5 $\mu\text{g/mL}$ Strep-chCD40L protein (1) or normal cell culture medium (2). (B) Indirect immunofluorescence assay. (C) Flow cytometry. (D) Quantitative analysis of data shown in panel C.

显示,与 Mock 组、添加 BSA 蛋白组及添加 Strep-VDAC2 蛋白组相比,添加 Strep-chCD40L 蛋白组可在荧光显微镜下观察到较多的绿色荧光(图 8B),流式细胞术检测的结果显示,与 Mock 组、添加 BSA 蛋白组及添加 Strep-VDAC2 蛋白组相比,添加 Strep-chCD40L 蛋白组有更多的细胞表面检测到绿色荧光,说明该蛋白都能与原代法氏囊 B 淋巴细胞表面的 CD40 结合,具有生物活性(图 8C-D)。

3 讨论

1995 年, Graf 等发现活化的 CD4⁺ T 细胞可表达跨膜型及可溶性形式的 CD40L^[6]。鸡传染性法氏囊病病毒 (IBDV) 主要感染雏鸡的法氏囊 B 淋巴细胞,但该细胞在体外培养不能连续传递,限制了对 IBDV 野毒的细胞分离和鉴定。随着对 CD40L 的深入研究,发现其不仅在调节适应性免疫应答^[7]、抗肿瘤^[8]、作为免疫佐剂^[9]、抗病毒^[10-11]等方面具有重要作用,而且能诱导 B 淋巴细胞分裂增殖^[2-3],基于这一特性,可将其应用于 B 细胞的体外培养,为 IBDV 野毒的分离和鉴定提供方向。在本研究中我们从鸡的脾脏组织克隆了鸡 CD40L 基因,通过昆虫杆状病毒表达系统及哺乳动物细胞表达系统表达了 His-chCD40L 及 Strep-chCD40L 重组蛋白。

在蛋白的纯化过程中,经检测发现杆状病毒表达系统表达出的 His-chCD40L 蛋白所带的 His 标签被折叠进了蛋白内部,因此在非变性情况下无法针对 His 标签进行纯化,而在 HEK 293T 细胞中表达的 Strep-chCD40L 蛋白获得较好的纯化效果,经测定蛋白浓度为 0.01 mg/mL。据报道,将 CD40L 蛋白用于 B 淋巴细胞体外培养时,浓度为 0.5 μ g/mL 即可发挥促进 B 淋巴细胞分裂增殖的作用^[3],因此本研究纯化的蛋白浓度是具有后期应用可行性的。

禽类的法氏囊是禽类特有的中枢免疫器官,法氏囊组织中含有大量 B 淋巴细胞,本研究从 3 周龄 SPF 鸡的法氏囊组织分离了原代细胞,由于 CD40L 是 B 淋巴细胞上 CD40 的配体,因此本研究主要通过检测体外表达的 CD40L 能否与 B 淋巴细胞上的 CD40 结合以确定蛋白是否有活性。由于无法使用针对 His 标签的特异性抗体进行非变性条件下的 His-chCD40L 蛋白活性检测,因此本研究主要检测了 Strep-chCD40L 蛋白的活性,即将 Strep-chCD40L 添加到原代法氏囊细胞培养液中,通过 Western blotting 试验、间接免疫荧光试验及流式细胞术检测,证明了体外表达的 Strep-chCD40L 蛋白能够与原代法氏囊细胞中的 B 淋巴细胞上的 CD40 结合。具有生物活性的鸡 CD40L 蛋白的获得为原代 B 淋巴细胞的体外培养及 IBDV 野毒的分离与诊断奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Tregaskes CA, Glansbeek HL, Gill AC, et al. Conservation of biological properties of the CD40 ligand, CD154 in a non-mammalian vertebrate. *Dev Comp Immunol*, 2005, 29(4): 361-374.
- [2] Schermuly J, Greco A, Härtle S, et al. *In vitro* model for lytic replication, latency, and transformation of an oncogenic alphaherpesvirus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(23): 7279-7284.
- [3] Kothlow S, Morgenroth I, Tregaskes CA, et al. CD40 ligand supports the long-term maintenance and differentiation of chicken B cells in culture. *Dev Comp Immunol*, 2008, 32(9): 1015-1026.
- [4] Dulwich KL, Giotis ES, Gray A, et al. Differential gene expression in chicken primary B cells infected *ex vivo* with attenuated and very virulent strains of infectious bursal disease virus (IBDV). *J Gen Virol*, 2017, 98(12): 2918-2930.
- [5] Dulwich KL, Asfor AS, Gray AG, et al. An *ex vivo* chicken primary bursal-cell culture model to study infectious bursal disease virus pathogenesis. *J Vis Exp*, 2018(140): 58489.

- [6] Graf D, Müller S, Korthäuer U, et al. A soluble form of TRAP (CD40 ligand) is rapidly released after T cell activation. *Eur J Immunol*, 1995, 25(6): 1749-1754.
- [7] Grammer AC, Lipsky PE. CD40-mediated regulation of immune responses by TRAF-dependent and TRAF-independent signaling mechanisms. *Adv Immunol*, 2000, 76: 61-178.
- [8] 王天立, 黄建安, 於葛华, 等. 可溶性 CD40 配体对肺癌细胞 A549 的生物学作用及其机制研究. *癌症*, 2004, 23(11): 1278-1282.
Wang TL, Huang JA, Yu GH, et al. Biological effects of soluble CD40 ligand on lung cancer cell line A549 and its mechanism. *Chin J Cancer*, 2004, 23(11): 1278-1282 (in Chinese).
- [9] Kwa S, Lai LL, Gangadhara S, et al. CD40L-adjuvanted DNA/modified vaccinia virus Ankara simian immunodeficiency virus SIV239 vaccine enhances SIV-specific humoral and cellular immunity and improves protection against a heterologous SIVE660 mucosal challenge. *J Virol*, 2014, 88(17): 9579-9589.
- [10] Altenburg A, Abdel-Naser MB, Nikolakis G, et al. CD40/CD40 ligand interactions and TNF α treatment reduce activity of P105 promoter of the human papilloma virus-18 *in vitro*. *Exp Oncol*, 2016, 38(1): 22-25.
- [11] Vlahava VM, Eliopoulos AG, Sourvinos G. CD40 ligand exhibits a direct antiviral effect on herpes simplex virus type-1 infection via a PI3K-dependent, autophagy-independent mechanism. *Cell Signal*, 2015, 27(6): 1253-1263.

(本文责编 郝丽芳)