

## HIV-1 结构蛋白 gag-gp120 与白细胞介素 2 联合基因免疫\*

江文正, 金宁一\*\*, 李子健, 张立树, 张洪勇

(解放军军需大学 全军基因工程重点实验室, 吉林长春 130062)

## Co-inoculating DNA Vaccine of HIV-1 gag-gp120 and IL-2

JIANG Wen-zheng, JIN Ning-yi\*\*, LI Zi-jian, ZHANG Li-shu, ZHANG Hong-yong

(Key Laboratory of Genetic Engineering, Quartermaster University of PLA, Changchun 130062, China)

**Abstract:** Eukaryotic expression plasmid pVAXIL2 was constructed by inserting IL-2 gene into the downstream of CMV (cytomegalovirus) promoter in the vector pVAX1. BALB/c mice were co-inoculated muscularly by this plasmid and the nucleic acid vaccine plasmid pVAXGE expressing the HIV-1 (*Human immunodeficiency virus type I*) gag-gp120 protein. The level of serum antibodies after immunization showed that the specific antibodies against HIV-1 appeared at the second week and raised to the peak level at the sixth week for the co-immunization group. The specific CTL cytotoxicity activities examined by non-radioactive lactate dehydrogenase release cytotoxicity assays demonstrated that the specific CTL cytotoxicity activities in co-immunization group were significantly higher than those in pVAXGE immunization group ( $P < 0.05$ ) and pVAX1 control group ( $P < 0.01$ ). These results manifested that specific humoral and cellular immune response can be induced by co-inoculating DNA vaccine of HIV-1 gag-gp120 and IL-2, and the level of immune response in co-immunization group was higher than pVAXGE immunization group, which shows that IL-2 augments the immunogenicity of the nucleic acid vaccine as the immunoadjuvant.

**Key words:** *Human immunodeficiency virus 1* (HIV-1); gag-gp120; IL-2; Immunization

**摘要:** 在真核表达载体 pVAX1 中的 CMV 启动子下游插入 IL-2 基因, 构建真核表达质粒 pVAXIL2。将它与表达 1 型人免疫缺陷病毒 (*Human immunodeficiency virus 1*, HIV-1) gag-gp120 的核酸疫苗质粒 pVAXGE 共同肌肉注射 BALB/c 小鼠, 免疫 3 次后, 以 ELISA 法检测免疫小鼠血清中抗 HIV-1 抗体水平, 结果显示联合免疫组小鼠在免疫 2 周后已有抗体产生, 6 周后进入高峰。乳酸脱氢酶释放法检测免疫小鼠脾特异性 CTL 杀伤活性, 结果显示联合免疫组小鼠脾特异性 CTL 杀伤活性显著高于 pVAXGE 单独免疫组 ( $P < 0.05$ ) 和载体质粒 pVAX1 对照组 ( $P < 0.01$ )。以上结果表明: HIV-1 核酸疫苗质粒 pVAXGE 与真核表达质粒 pVAXIL2 联合免疫可诱导特异性体液免疫和细胞免疫应答, 且免疫应答水平高于 pVAXGE 单独免疫组, IL-2 发挥了免疫佐剂的作用, 增强了核酸疫苗的免疫原性。

**关键词:** HIV-1; gag-gp120; 白细胞介素 2; 免疫

**中图分类号:** R373.9

**文章标识码:** A

**文章编号:** 1003-5152(2004)01-0010-04

基因免疫的基本原理是将编码病原体抗原的基因片段直接通过肌肉注射或基因枪等方法导入宿主体内, 在宿主细胞中表达的抗原经抗原提呈细胞加工处理后提呈给免疫系统, 从而激发机体产生

特异性免疫应答<sup>[1]</sup>。因其具有构建和改造简单、成本低廉、稳定性好, 尤其以自然抗原形式激活免疫系统产生有效的中和抗体和 CTL 反应, 且免疫应答持久和使用安全等优点而迅速发展起来。然而, 有

收稿日期: 2003-08-06, 修回日期: 2003-10-08

\* 基金项目: 国家“863”基金资助课题 (2001AA215031)

作者简介: 江文正 (1973-), 男, 安徽省籍, 讲师, 现为第二军医大学博士后。

\*\* 通讯作者: Corresponding author. Tel: 0431-6986747. Email: ningyij@yahoo.com.cn

研究表明, HIV 的核酸疫苗仅能诱导低水平的免疫应答。为了增强核酸疫苗的免疫应答水平, 许多研究者将表达免疫调节因子的 DNA 质粒与含有保护性抗原的 DNA 质粒共同免疫, 或将二者克隆到同一载体之中, 取得了较好的实验结果<sup>[2,3]</sup>。IL-2 属于 Th1 型细胞因子, 通过分布于 T、B 细胞、NK 细胞及(淋巴因子激活的)杀伤细胞表面的受体系统发挥作用, 它是所有细胞因子佐剂中被最广泛研究的细胞因子。本研究以真核表达载体 pVAX1 为载体, 构建了表达 IL-2 真核表达质粒 pVAXIL2, 并与表达 HIV-1 gag-gp120 嵌合基因的真核表达质粒 pVAXGE 共同免疫 BALB/c 小鼠, 探索了 IL-2 对 HIV-1 核酸疫苗的免疫增强作用。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 质粒、菌种与细胞株: 真核表达载体质粒 pVAX1 和含有 IL-2 基因的质粒 pBV220-IL2 由本室保存, 表达 HIV-1 gag-gp120 嵌合蛋白的核酸疫苗表达质粒 pVAXGE 由作者构建和鉴定<sup>[4]</sup>。E.coli DH5 $\alpha$  由本室保存。P815 细胞(小鼠肥大细胞瘤细胞)购自中国科学院上海细胞所。

1.1.2 工具酶与试剂: DNA 限制性内切酶及 T4 DNA 连接酶均购自 TaKaRa 公司。抗 IL-2 单克隆抗体、FITC 标记的兔抗鼠 IgG、ConA 和 hIL2 均购自华美生物工程公司。脂质体 DOTAP 购自 Gibco BRL 公司。HIV-1 抗体 ELISA 检测试剂盒购自北京金豪药业公司。HIV-1 P24gag 抗原表位多肽 (AMQMLKETI) 由美联(西安)生物科技有限公司合成。细胞毒分析试剂盒 (CytoTox 96<sup>®</sup> Non-Radioactive Cytotoxicity Assay Kit) 为 Promega 公司产品。

1.1.3 实验动物: 6~8 周龄雌性 BALB/c 小鼠, 购自军事医学科学院实验动物中心。

### 1.2 重组表达质粒的构建

将质粒 pBV220-IL2 用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Acc* II 双酶切后, 回收 IL-2 基因, 与用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *EcoR* V 双酶切的 pVAX1 载体质粒相连接, 构建重组表达质粒 pVAXIL2。质粒的酶切、连接及转化按分子克隆介绍的常规方法进行<sup>[5]</sup>。

### 1.3 重组质粒的转染及表达产物的检测

采用脂质体法将构建的重组质粒体外转染生长于盖玻片上的 P815 细胞, 48 h 后取出盖玻片, 用丙酮固定后, 依次与抗 IL-2 单克隆抗体和 FITC 标记的兔抗鼠 IgG 反应, 最后置荧光显微镜下观察

细胞表面是否有荧光物质。同时设载体质粒对照。

### 1.4 小鼠的 DNA 免疫

1.4.1 注射用质粒的大量制备与纯化: 按分子克隆介绍的碱解法大量制备核酸疫苗质粒 pVAXGE、pVAXIL2 和载体质粒 pVAX1, 用 PEG 纯化后溶于无菌的磷酸盐缓冲液 (PBS) 中, 紫外分光光度法测定核酸样品的纯度和浓度, 用无菌的 PBS 液调整浓度至 1.0 $\mu$ g/ $\mu$ L, 作为 DNA 免疫的注射样品。

1.4.2 小鼠的分组及免疫: 选取 24 只 Balb/c 小鼠随机分成 3 组, 每组 8 只。每只小鼠进行股四头肌质粒注射, 其中载体质粒对照组注射 100 $\mu$ g 载体质粒 pVAX1, 核酸疫苗组注射 100 $\mu$ g 核酸疫苗质粒 pVAXGE, 核酸疫苗+pVAXIL2 组注射 50 $\mu$ g 核酸疫苗质粒 pVAXGE 和 50 $\mu$ g 真核表达质粒 pVAXIL2。免疫方案是: 每 20 d 免疫 1 次, 共免疫 3 次, 末次免疫 10 d 后处死小鼠并检测免疫指标。

### 1.5 体液免疫检测

免疫小鼠后每隔 2 周割尾采血 1 次, 每次 0.1~0.3mL, 用 HIV-1 抗体 ELISA 检测试剂盒(北京金豪制药公司产品)一次性检测。离心后分离血清, 按 ELISA 检测试剂盒说明书介绍的步骤检测血清抗体的水平及动态变化。

### 1.6 细胞免疫检测

采用乳酸脱氢酶释放法检测脾特异性 CTL 杀伤活性。操作步骤如下: 免疫小鼠拉颈处死后, 在无菌条件下摘取小鼠脾脏, 研磨过滤, 制成单细胞悬液。在正常同源小鼠的脾淋巴细胞加入终浓度为 25 $\mu$ g/mL 的合成多肽及 10ng/mL hIL-2, 37 $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 培养 4 h, 经 80 $\mu$ g/mL 丝裂霉素 C 处理 2 h, 用培养液洗 3 次后得到刺激细胞。将免疫小鼠脾淋巴细胞与刺激细胞 10:1 混合, 用含终浓度为 10ng/mL hIL-2 的 1640 培养液, 37 $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 共培养 5 d, 调整细胞数为 1 $\times$ 10<sup>7</sup> 细胞/mL, 即得到效应细胞。以作者构建的表达 HIV-1 结构蛋白的 P815 细胞为靶细胞<sup>[6]</sup>, 调整细胞浓度为 1 $\times$ 10<sup>5</sup> 细胞/mL。将效应细胞和靶细胞 100:1 和 25:1 两个效靶比混合培养 4h 后, 按细胞毒分析试剂盒说明书介绍的方法测定脾特异性 CTL 杀伤率。计算公式为:

$$\text{杀伤效率}(\%) = \frac{\text{实验孔-靶细胞对照孔-效应细胞对照孔}}{\text{靶细胞最大释放孔-靶细胞对照孔}} \times 100$$

## 2 结 果

### 2.1 重组质粒 pVAXIL2 的酶切鉴定

图 1 所示, 重组质粒用 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切

后可见 0.6kb 和 3.0kb 的片段, 表明外源基因已正确插入到载体质粒中。

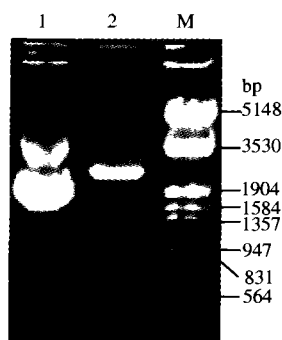


图 1 重组质粒 pVAXIL2 酶切鉴定图谱

Fig.1 Enzyme-digestion profile of recombinant plasmid pVAXIL2

1. pVAXIL2; 2. pVAXIL2/EcoRI + XhoI; M.  $\lambda$  DNA/Hind III + EcoRI marker

## 2.2 重组质粒体外表达检测

间接免疫荧光检测结果显示(图 2), 转染重组质粒 pVAXIL2 的细胞表面有明显的荧光物质, 而转染载体质粒 pVAX1 细胞表面没有荧光物质, 表明重组质粒 pVAXIL2 可在体外表达外源蛋白。

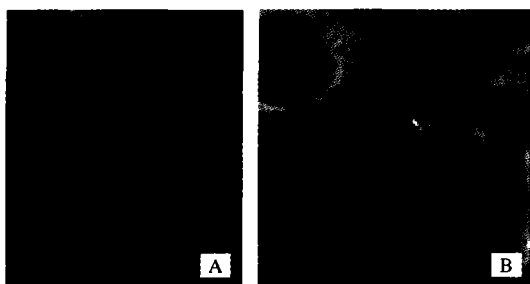


图 2 间接免疫荧光法检测重组质粒 pVAXIL2 表达产物

Fig. 2 IFA of recombinant plasmid pVAXIL2

A, Recombinant plasmid pVAXIL2; B, pVAX1 plasmid

## 2.3 HIV-1 特异性抗体水平及变化规律

小鼠免疫后不同时间采血, 制备血清后, 用双抗原夹心 ELISA 法检测免疫小鼠血清抗体水平及动态变化(图 3)。结果显示, 核酸疫苗 pVAXGE+pVAXIL2 混合免疫组小鼠在第 2 周即可检测出抗 HIV-1 血清抗体, 第 6 周达最高峰。且不同时期混合免疫组小鼠的血清抗体水平均高于核酸疫苗 pVAXGE 单独免疫组, 说明 IL-2 能增强血清抗体的产生。

## 2.4 免疫小鼠脾特异性 CTL 杀伤活性

以免疫小鼠的脾细胞为效应细胞, 以表达 HIV-1 结构蛋白的 P815 细胞为靶细胞, 在体外进行

杀伤试验, 用乳酸脱氢酶释放法测定 CTL 杀伤率(表 1)。结果显示, pVAXGE+pVAXIL2 混合免疫组两个靶靶比的特异性 CTL 杀伤率显著高于载体质粒 pVAX1 对照组 ( $P < 0.01$ ), 且显著高于核酸疫苗 pVAXGE 免疫组 ( $P < 0.05$ )。表明核酸疫苗质粒 pVAXGE+pVAXIL2 混合免疫可诱导小鼠产生特异性 CTL 反应, 且 IL-2 发挥了细胞因子免疫佐剂的作用, 可使 HIV-1 核酸疫苗诱导免疫小鼠产生更强的特异性细胞免疫应答。

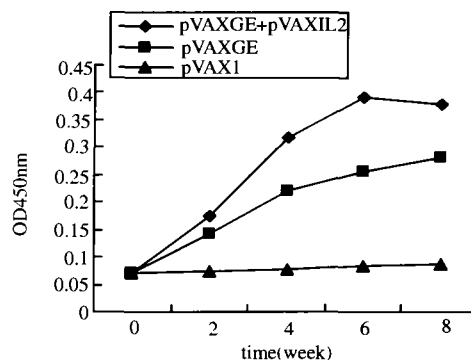


图 2 免疫小鼠血清抗体的动态变化

Fig.2 Dynamic change of serum antibodies from immunized mice

表 1 免疫小鼠脾淋巴细胞特异性 CTL 杀伤率

Table 1 The specific CTL killing rate of spleen lymphocyte from immunized mice

Group	n	Cytotoxicity(%)	
		25:1	100:1
pVAXGE+pVAXIL2	8	38.66±6.22	51.52±8.08
pVAXGE	8	32.59±5.80	44.29±4.68
pVAX1	8	8.01±0.25	8.61±0.89

## 3 讨论

减毒活疫苗虽然能引发一定的体液免疫和细胞免疫, 但安全性始终是个大问题。灭活疫苗和亚单位疫苗效果不理想, 因此, 人们对艾滋病核酸疫苗的研究寄予厚望。但大量的研究表明, 与其它核酸疫苗不同, HIV 的核酸疫苗仅能诱导低水平的免疫应答。近年来, 随着细胞因子研究的进展, 发现许多细胞因子具有明显的免疫佐剂效应, 能增强特异性抗原的免疫原性或增强机体对抗原的反应性。常用的细胞因子包括 IL-1、IL-2、IL-6、IL-12、GM-CSF 和 INF- $\gamma$  等。这些细胞因子一方面调节机体的特异性免疫反应, 如刺激 T、B 淋巴细胞增殖、分化, 一方面增强机体的非特异性免疫反应, 如激活 NK 细胞等。通过细胞因子的网络作用, 能优化

宿主的特异性免疫反应, 并诱导机体产生有效的免疫保护力, 尤其是对免疫力低下和免疫缺陷的个体具有十分重要的意义。IL-2 是所有细胞因子佐剂中被最广泛研究的细胞因子, 它通过主要分布于 T、B 细胞、NK 细胞及杀伤细胞表面的受体系统发挥作用。这一分子直接激活单核细胞并对诱导其他巨噬细胞有作用。而且, 一些次级分子如 GM-CSF 的释放也由 IL-2 引发, 进而激发巨噬细胞的活性。当以 DNA 表达质粒形式与抗原在抗原提呈部位共同接种后, IL-2 有效地扩增针对抗原的 B 细胞及 T 细胞应答。

本研究在构建表达 IL-2 真核表达质粒的基础上, 将该重组质粒与表达 HIV-1 gag-gp120 融合蛋白的核酸疫苗质粒进行混合免疫 Balb/c 小鼠, 通过检测免疫小鼠的血清抗体水平和脾淋巴细胞特异性 CTL 杀伤活性, 探讨了 HIV-1 核酸疫苗的免疫原性和细胞因子 IL-2 作为免疫佐剂的效果。在不同时期采血并检测免疫小鼠的血清抗体水平和动态变规律, 结果表明, HIV-1 核酸疫苗与细胞因子 IL-2 的混合免疫小鼠可在第 2 周检测到抗 HIV-1 特异性抗体, 至第 6 周达最高峰。而 HIV-1 核酸疫苗单独免疫组血清抗体在第 2 周仍为阴性, 表明 IL-2 能增强血清抗体的产生。在 HIV-1 感染者体内病毒复制的遏制与病毒特异性 CTL 反应的出现有关<sup>[7]</sup>, 因此, 抗 HIV-1 特异性 CTL 反应是衡量 HIV-1 疫苗免疫效果的一项重要指标。为了测定免疫小鼠脾特异性 CTL 对靶细胞的杀伤活性, 本研究中采用了非放射性的乳酸脱氢酶 (LDH) 释放法。这种测定方法获得的结果与用标准的铬释放法相类似, 但不需要使

用同位素, 因此具有安全和操作简便的特点。它是利用效应细胞裂解靶细胞, 释放出的乳酸脱氢酶与底物四唑盐发生反应后生成红色的三苯基甲脂, 根据测定的 OD 值来计算效应细胞对靶细胞的杀伤率。本研究中混合免疫组小鼠脾特异性 CTL 杀伤活性明显高于核酸疫苗单独免疫组和载体质粒对照组, 表明 HIV-1 核酸疫苗与细胞因子 IL-2 的混合免疫可诱导比核酸疫苗单独免疫更强的细胞免疫应答, IL-2 发挥了免疫佐剂的作用。该研究为我国 HIV-1 核酸疫苗的研制提供了有益的参考。

## 参考文献

- [1] Tang C, DeVit M, Johnson S A, *et al.* Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response[J]. *Nature*, 1992, 356: 152-154.
- [2] Xiang Z, Ertl H C. Manipulation of the immune response to a plasmid-encoded viral antigen by coinoculation with plasmids expressing cytokines[J]. *Immunity*, 1995, 2: 129-135.
- [3] Lee A H, Suh Y S, Sung Y C. DNA inoculations with HIV-1 recombinant genomes that express cytokine genes enhance HIV-1 specific immune responses[J]. *Vaccine*, 1999, 17: 473-479.
- [4] 江文正, 金宁一, 韩文瑜. I 型人免疫缺陷病毒 gag-gp120 嵌合基因核酸疫苗的构建与鉴定[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2003, 19(4): 339-341.
- [5] 金冬雁, 黎孟枫. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1992: 16-68.
- [6] 江文正, 金宁一. 表达 HIV-1 结构蛋白靶细胞的制备及鉴定[J]. *中国生物制品学杂志*, 2003, 16(2): 66.
- [7] Johnson R P, Silicano R F, McElrath M J. Cellular immune response to HIV-1[J]. *AIDS*, 1998, 12: 113-120.