

HIV-2 gag-gp105 嵌合基因 DNA 疫苗对小鼠的免疫原性研究*

李子健², 金宁一^{1**}, 张立树¹, 江文正¹, 张洪勇¹

(1. 军事医学科学院军事兽医研究所 全军基因工程重点实验室, 吉林长春 130062, 2. 北京大学第三医院血管医学研究所, 北京 100083)

Humoral and Cellular Immunogenicity of DNA Vaccine of HIV-2 Chimeric Gene gag-gp105 in BALB/c

LI Zi-jian², JIN Ning-yi^{1**}, ZHANG Li-su¹, JIANG Wen-zheng¹, ZHANG Hong-yong¹

(1. Key Laboratory of Genetic Engineering of PLA, Military Veterinary Institute, Academy of Military Medical Sciences, Changchun 130062, China; 2. Institute of Vascular Medicine, Peking University Third Hospital, Beijing 100083, China)

Abstract: The recombinant expression plasmid of pVAX1gag-gp105 was constructed and transfected into BHK21 cells by lipofectamine, the expressed product was detected by indirect immunofluorescence. After the mice were immunized with pVAX1gag-gp105 and control plasmid, the number of CD4⁺ and CD8⁺ subgroups of spleen T lymphocyte, the specific killing activities of spleen CTL and the titers of serum antibodies of the immunized mice were detected. Compared with vaccinated control groups, pVAX1gag-gp105 vaccinated group had significant differences in the titers of the serum antibodies ($P < 0.01$), the numbers of spleen CD4⁺ and CD8⁺ T cells ($P < 0.05$) and the specific killing activities of spleen CTL ($P < 0.01$). These results manifested that the DNA vaccine based on HIV-2 chimeric gene gag-gp105 possessed good humoral and cellular immunogenicity in BALB/c mice.

Key words: HIV-2; gag-gp105; DNA vaccine

摘要: 利用真核表达载体 pVAX1 构建 HIV-2 gag-gp105 嵌合基因的重组质粒 pVAX1gag-gp105, 将其转入 BHK21 细胞中, 利用间接免疫荧光方法检测其表达情况。进一步分别将核酸疫苗质粒 pVAX1gag-gp105、对照质粒 pVAX1 和 PBS 溶液经肌肉注射免疫 BALB/c 小鼠, 检测免疫小鼠脾 CD4⁺、CD8⁺T 细胞亚群的数量, 脾特异性 CTL 杀伤活性和血清抗体滴度。结果显示, 重组核酸疫苗质粒 pVAX1gag-gp105 疫苗组小鼠脾 CD4⁺、CD8⁺T 细胞亚群的数值均比对照组高 ($P < 0.01$), 脾特异性 CTL 杀伤活性与对照组相比差异极显著 ($P < 0.01$), 血清抗体滴度显著高于对照组 ($P < 0.01$)。以上结果表明, HIV-2 gag-gp105 嵌合基因 DNA 疫苗对 BALB/c 小鼠具有良好的体液和细胞免疫原性。

关键词: HIV-2; gag-gp105; DNA 疫苗

中图分类号: R373.9

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125 (2004) 06-0559-04

HIV-2 是引起艾滋病的主要致病原之一, 最初 HIV-2 呈区域性流行, 在西非感染率较高。而目前, HIV-2 除了主要在非洲流行以外, 在欧洲、美洲和亚洲也出现了蔓延的趋势。1994 年印度已发现有较大规模的 HIV-2 流行, 1996 年以后印度 HIV-2 感染者迅速增加, 而我国 1998 年也于福建省发现了首

例 HIV-2 感染者^[1]。因此 HIV-2 疫苗的研制已成为亟待解决的重要问题。HIV-2 外膜蛋白 Gp105 和核心蛋白 Gag 是病毒的主要抗原蛋白, 存在有大量的引起体液免疫和细胞免疫的抗原决定簇^[2,3], 且外膜蛋白具有抗原性强, 但变异程度相对较高的特点, 而核心蛋白具有相对保守, 又具有自我装配的特

收稿日期: 2004-06-02, 修回日期: 2004-07-20

* 基金项目: 国家“863”基金资助 (2001AA215031); 吉林省科技发展计划项目 (20030550-1)

作者简介: 李子健(1970-), 男, 吉林省长春市, 博士后, 主要从事分子病毒学及心血管方向的研究。

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

性,因此外膜蛋白与核心蛋白基因的嵌合表达已成为 HIV 疫苗研究的一个重要方向^[4,5]。DNA 疫苗是将抗原编码质粒 DNA 直接导入机体组织,由机体的体细胞完成抗原编码基因的转录、翻译、折叠装配和翻译后加工,从而“天然”地表达该抗原蛋白^[6]。因此,可模拟天然病原体的感染过程,有效地诱导特异性体液免疫应答和细胞免疫应答。核酸疫苗的发展为 HIV 疫苗的研究提供了一条新途径。本实验应用 HIV-2 gag-gp105 嵌合基因 DNA 疫苗免疫 BALB/c 小鼠,进行了小鼠体内的体液和细胞免疫原性研究。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

含有CMV启动子的核酸疫苗载体质粒pVAX1,质粒pKSGp105(含HIV2 A亚型ROD株gp105基因)、质粒pKSGag(含HIV-2 A亚型ROD株gag基因)、宿主菌DH5 α 和BHK21细胞均为解放军军需大学研究所病毒室保存,pDisplay gag-gp105由作者构建和鉴定。P815细胞(小鼠肥大细胞瘤细胞)购自中国科学院上海细胞所。HIV-2 阳性血清、HIV-2型鼠源抗体酶联检测试剂盒(ELISA)购自万泰生物药业公司,荧光标记的大鼠抗小鼠CD₃、CD₄和CD₈单克隆抗体(mAb),购自北京大学医学部免疫系。FITC 标记的兔抗人IgG、Lipofectin Reagent、小牛血清、购自Gibco2BRL公司,各种内切酶、修饰酶、T4 DNA 连接酶等均为Promega 公司和华美生物工程公司产品,CytoTox 96[®] Non-Radioactive Cytotoxicity Assay Kit为Promega公司产品,其余试剂均为分析纯或生化试剂。6-8周龄雌性BALB/c鼠,体重18-20g,SPF(III)级动物,购自北京军事医学科学院实验动物中心。

1.2 重组表达质粒的构建

质粒的酶切、连接及转化按常规方法进行^[7]。

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汇合单层 BHK21 细胞。用丙酮固定后,间接免疫荧光法检测 gp105、gag 基因的表达产物,一抗为 HIV-2 阳性血清,二抗为 FITC 标记的兔抗人 IgG,最后置荧光显微镜下观察。

1.4 核酸疫苗免疫小鼠

BALB/c 雌性小鼠随机分三组,每组 8 只,分别为 PBS 对照组、pVAXI 空白质粒对照组、重组质粒 pVAXI gag-gp105 免疫组。每只小鼠于双侧胫前肌直接注射总容量为 100 μ L (1 μ g/ μ L) 的质粒 DNA

溶液。共免疫三次,每次间隔为 20d。

1.5 免疫小鼠血清中抗 HIV-2gag 特异性抗体的检测

免疫小鼠后每隔 2 周断尾采血 1 次,每次 0.1-0.3mL,离心后分离血清,采用抗 HIV-2 ELISA 检测试剂盒检测血清抗体的水平及动态变化。

1.6 脾 T 淋巴细胞亚群的测定

采用荧光抗体染色法,用大鼠抗小鼠荧光标记的 CD₃、CD₄ 和 CD₈ 单克隆抗体与制备的小鼠脾脏单细胞悬液反应后,上流式细胞仪检测 10000 个细胞,所得数据进行统计学处理。

1.7 细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 杀伤活性检测

采用脂质体法将纯化的真核表达质粒 pDisplay gag-gp105 用 Lipofectin Reagent 包裹后转染体外培养呈 60%~80% 汇合单层 P815 细胞,经 G418 加压筛选,制备成细胞表面能呈递表达 HIV gag-gp105 蛋白的靶细胞。

在稳定表达 HIVgag 的 P815 细胞中加入丝裂霉素 C 至终浓度为 40mg/L,培养 2h, RPMI1640 洗三次,调整细胞浓度至 10⁷ 个/mL,作为刺激细胞。制备免疫小鼠的脾细胞悬液,调整细胞浓度至 5 \times 10⁷ 个/mL。靶细胞和刺激细胞各 1mL 加入 60mm 细胞培养皿,补加 2mL RPMI1640,培养 24h 后加入 IL2 至终浓度 10 μ /mL,继续培养 5d。2000rpm/min 离心 5min。沉淀以 RPMI1640 悬浮,调整细胞浓度至 10⁷ 个/mL,作为效应细胞。以乳酸脱氢酶释放法检测 CTL 反应。96 微孔板上划分好样品、自然释放孔及最大释放孔,效靶细胞比例(E/T)为 20:1、50:1、100:1,每孔补加 RPMI1640 至 200 μ L,效靶细胞于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱中共同孵育 4h,取上清 50 μ L,加入 LDH 作用底物 50 μ L,室温、闭光反应 30 min 后加 50 μ L 终止液终止反应,490 nm 下测吸光度,计算杀伤效率。

2 结果

2.1 重组质粒 pVAXI gag-gp105 的构建及鉴定

重组质粒 pVAXI gag-gp105 的构建如图 1 所示。纯化质粒后经酶切鉴定,得到预期大小的片段(见图 2),表明重组质粒构建正确。

2.2 重组质粒表达抗原蛋白的检测

间接免疫荧光检测(indirect immunofluorescence assay, IFA)显示,转染重组核酸疫苗质粒 pVAXI gag-gp105 的 BHK21 细胞,在核周围及细胞浆中出现与特异性荧光抗体发生反应的黄绿色荧光,而对照质粒 pVAXI 转染的细胞看不到黄绿色荧光(图 3)。结果说明,构建的核酸疫苗质粒表达了 gag-gp105 蛋白。

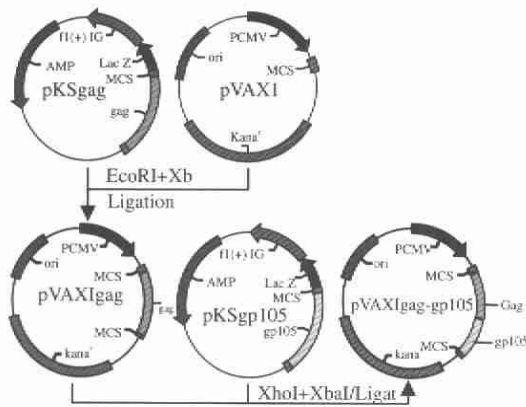


图1 pVAXI gag-gp105 核酸疫苗质粒的构建
Fig.1 Construction of pVAXI gag-gp105 plasmids

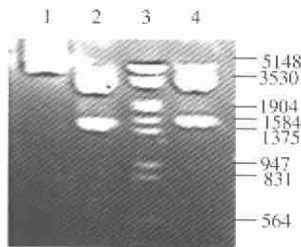


图2 pVAXI gag-gp105 酶切鉴定

Fig.2 Restriction analysis of pVAXI gag-gp105

1, pVAXI gag-gp105; 2, pVAXI gag-gp105/ EcoR I; 3, DNA marker (λ DNA/EcoR I+Hind III); 4, pVAXI gag-gp105/ Xba I+Xho I.

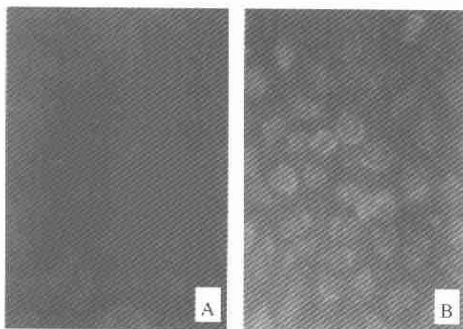


图3 重组核酸疫苗质粒免疫荧光

Fig.3 IFA of recombinant plasmids

A: control plasmid; B: HIV recombinant plasmid

2.3 血清抗 HIV-2 抗体检测结果

分离免疫鼠血清,用双抗原夹心 ELISA 法检测血清中的抗 HIV-2 抗体水平,结果见图 4, pVAXI gag-gp105 免疫组第一次免疫后二周有微弱的体液免疫反应。第二次加强免疫后,抗体水平明显升高,第三次加强免疫后(第十周)抗体水平达到最高值,此后比较稳定地保持到最后测定的第二十二周。从结果可知 pVAXI gag-gp105 免疫组与对照组 pVAXI 免疫组及 PBS 免疫组相比,差异显著

($P < 0.01$)。

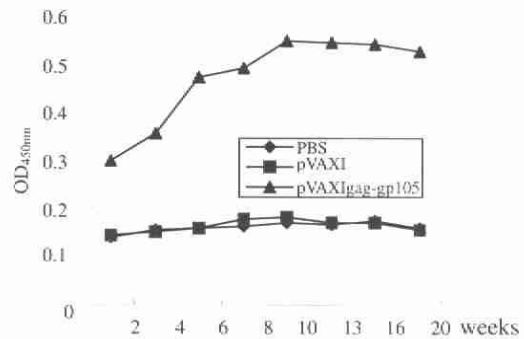


图4 免疫鼠血清中 HIV 特异性抗体测定。

Fig.4 Dynamics of HIV specific serum IgG antibodies in immunized mice

2.4 小鼠 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞亚群数量的检测

结果见表 1,核酸疫苗质粒 pVAXI gag-gp105 免疫小鼠后可诱导小鼠脾 CD4⁺和 CD8⁺ T 淋巴细胞数量明显增加,显著高于空载体 pVAXI 对照组和 PBS 对照组 ($P < 0.01$),说明该核酸疫苗质粒免疫小鼠后,可有效地刺激淋巴细胞增殖。

表1 免疫鼠脾 T 淋巴细胞亚群的数量

Table 1 The numbers of spleen T lymphocyte subgroups in immunized mice($\bar{X} \pm SD$)

Group	n	Splenic T cell subsets(%)		CD3 ⁺ CD8 ⁻
		CD3 ⁺ CD4 ⁺	CD3 ⁺ CD8 ⁺	
PBS	8	13.52 ± 1.75	8.98 ± 1.33	1.62 ± 0.38
pVAXI	8	15.64 ± 1.88	10.39 ± 1.59	1.55 ± 0.39
pVAXI gag-gp105	8	34.96 ± 1.97*	18.31 ± 1.33*	1.92 ± 0.14

* $P < 0.01$ compared with PBS and pVAXI group

2.5 脾特异性 CTL 杀伤活性检测结果

结果(见图 5)表明,在效靶比分别为 20/1、50/1 及 100/1 时, pVAXI gag-gp105 免疫组的 CTL 杀伤率均明显高于空载体质粒 pVAXI 对照组和 PBS 对照组 ($P < 0.01$)。说明核酸疫苗质粒 pVAXI gag-gp105 能够诱导小鼠产生较强的针对 HIV 靶细胞的特异性 CTL 杀伤活性。

3 讨论

现代免疫学和病毒学研究证实,对于病毒感染性疾病,机体起防御作用的主要是细胞免疫。而 DNA 疫苗与蛋白疫苗相比,在诱导 CTL 应答方面具有显著优势,其理论依据是以任何途径接种 DNA 疫苗,都可能直接转染巨噬细胞、树突状细胞等 APC 细胞,并在其内表达特定的蛋白抗原作为“内

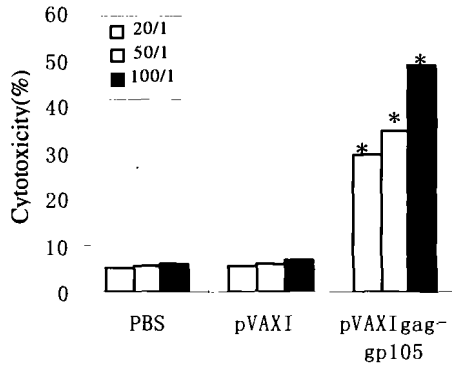


图5 免疫鼠脾特异性 CTL 杀伤活性

Fig.5 The specific CTL lysis activity of spleen lymphocyte in immunized mice

*P<0.01 compared with PBS and pVAXI group

源性抗原”，被加工处理转运后与 MHC I 类分子形成复合物表达于 APC 膜表面，被 CD8⁺的 T 细胞表面 T 细胞受体识别。DNA 疫苗的这一特性在抗病毒感染中显得尤为重要^[8]。因此，本研究利用 DNA 疫苗的上述特点，采用 HIV-2 外膜蛋白与核心蛋白基因的嵌合表达方式构建 DNA 疫苗，转染真核细胞后，利用间接免疫荧光法检测到了 HIV-2 相应抗原蛋白的表达，进一步免疫 BALB/C 小鼠。结果表明与空白载体 pVAXI 及 PBS 对照免疫组比较，所构建的核酸疫苗质粒 pVAXI gag-gp105 具有较强的诱导健康小鼠体液免疫应答效果，并呈一定的剂量依赖性。本研究免疫接种后动态观察发现，血清抗体水平随时间延长而不断升高，这可能是局部淋巴滤泡中的树突状细胞(DCs)摄取疫苗 DNA 并长期保存和表达抗原，从而诱导血清抗 HIV 抗体水平的持续稳定。此外，研究表明 gag-gp105 嵌合基因 DNA 疫苗具有较强的细胞免疫原性，免疫鼠脾特异性 CTL 杀伤活性和 T 淋巴细胞亚群的数量都与对照组

有显著差异 (P<0.01)，这对清除细胞内 HIV 感染极为重要。

本研究结果充分证明了 HIV-2 gag-gp105 嵌合基因 DNA 疫苗对 BALB/c 小鼠具有良好的体液和细胞免疫原性，同时也为与本实验室研究的蛋白亚单位疫苗^[9]进行“prime-boost”联合免疫打下基础。

参考文献

- [1] 严延生. 我国首例 HIV-2 感染者的确认[J]. 中国性病艾滋病防治杂志, 2000, 6(1):5-7.
- [2] McKnight A, Shotton C, Cordell J, *et al.* Location, exposure, and conservation of neutralizing and nonneutralizing epitopes on human immunodeficiency virus type 2 SU glycoprotein[J]. J Virol, 1996, 70: 4 598-4 606.
- [3] Reeves J D, Robert W. Doms human immunodeficiency virus type 2[J]. J Gen Virol, 2002, 83:1253-1265.
- [4] Kang C Y, Luo L, Wainberg M A, *et al.* Development of HIV/AIDS vaccine using chimeric gag-env virus-like particles[J]. Biol-Chem, 1999, 380:353-364.
- [5] Nabel G J. Challenges and opportunities for development of an AIDS vaccine[J]. Nature, 2001, 410(6831): 1002-1007.
- [6] Tang C, DeVit M, Johnson S A, *et al.* Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response[J]. Nature, 1992, 356(6365): 152-154.
- [7] 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.
- [8] Donnelly J J, Ulmer J B, Liu M A. DNA vaccine[J]. Life Sci, 1997, 60: 163-172.
- [9] 李子健, 金宁一, 江文正, 等. HIV-2 gp105-gag 截短体在 Pichia pastoris 酵母中重组表达研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2003, 23(5): 326-329.