

IL-12 基因对 HIV-1 核酸疫苗诱导的免疫应答的影响

王福祥¹, 孙永涛^{1**}, 刘娟¹, 马英骥², 杨宝山², 颜丙柱²

(1. 第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心, 陕西西安 710038 2. 哈尔滨医科大学附属第一医院感染科, 黑龙江哈尔滨 150001)

Interleukin-12 Gene Modulates Immune Responses Induced by

HIV-1 Nucleic Acid Vaccine

WANG Fu-xiang¹, SUN Yong-tao^{1**}, LIU Juan¹, MA Ying-ji², YANG Bao-shan², YAN Bing-zhu²

(1. Center for diagnosis and treatment of infectious diseases of PLA. Tangdu Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China; 2. Department of infectious diseases. The first hospital of the Harbin Medical University, Harbin 150001, China)

Abstract : To investigate the effect of interleukin-12 DNA immunization on immune responses induced by HIV-1 nucleic acid vaccine (DNA vaccine) and to explore new strategies for therapeutic HIV-1 DNA vaccine, Balb/c mice were immunized with pCF-neo GA G alone or co-administered with the DNA encoding for interleukin-12 (IL-12). Their sera were collected for analyzing anti-HIV antibody and IFN- γ by ELISA, and splenocytes were isolated for detecting antigen-specific lymphoproliferative responses and specific CTL response by MTT assay and LDH assay respectively. Our research showed that the anti-HIV antibody titers of mice co-immunized with pCF-neo GA G and the DNA encoding for interleukin-12 (IL-12) were lower than that of mice immunized with pCF-neo GA G alone ($P < 0.01$); In contrast, the IFN- γ level of mice co-immunized with pCF-neo GA G and the DNA encoding for interleukin-12 was higher than that of mice immunized with pCF-neo GA G alone ($P < 0.01$). Furthermore, compared with mice injected with pCF-neo GA G alone, the specific CTL cytotoxicity activity and antigen-specific lymphoproliferative responses of mice immunized with pCF-neo GA G and the DNA encoding for interleukin-12 were significantly enhanced respectively ($P < 0.01$). Thus, the DNA encoding for interleukin-12 together with HIV nucleic acid vaccine may enhance specific Th-1 responses and cellular immune responses elicited in mice. However, the DNA encoding for interleukin-12 may down-regulate the humoral responses.

Key words : Human immunodeficiency virus (HIV); DNA vaccine; Interleukin-12; Immunization

摘要 : 研究白细胞介素-12 (IL-12) 基因对 HIV-1 核酸疫苗诱导免疫应答的影响, 以探求治疗性 HIV-1 核酸疫苗的新策略。将 pCF-neo GA G 联合白细胞介素-12 基因或者 pCF-neo GA G 单独免疫 Balb/c 小鼠, 通过 ELISA 检测免疫小鼠的特异性抗体和 IFN- γ , 通过 MTT 实验检测免疫小鼠脾淋巴细胞增殖实验, 通过乳酸脱氢酶 (LDH) 实验检测小鼠特异性细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 反应。与 pCF-neo GA G 免疫组比较, pCF-neo GA G 联合白细胞介素-12 基因免疫组小鼠血清的抗 HIV-1p24 抗体滴度降低, 有显著性差异 ($P < 0.01$); 而与 pCF-neo GA G 免疫组比较, pCF-neo GA G 联合白细胞介素-12 基因免疫组小鼠血清的 IFN- γ 升高, 有显著性差异 ($P < 0.01$); pCF-neo GA G 联合白细胞介素-12 基因免疫组小鼠的脾淋巴细胞增殖实验刺激指数 (SI) 以及特异性 CTL 活性均高于 pCF-neo GA G 免疫组, 有显著性差异 ($P < 0.01$)。因此, 白细胞介素-12 基因联合 HIV-1 核酸疫苗免疫小鼠, 可能增强特异性 Th1 细胞和 CTL 反应, 白细胞介素-12 基因对体液免疫有抑制作用。

关键词 : 人免疫缺陷病毒 (HIV); 核酸疫苗; 白细胞介素-12; 免疫

中图分类号: R 373.9

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2005)01-0016-04

收稿日期: 2004-08-10, 修回日期: 2004-09-28

作者简介: 王福祥 (1971-), 男, 黑龙江省籍, 主治医师, 博士, 主要从事 AIDS 防治研究, 目前在哈尔滨医科大学附属一院感染科工作。

Tel (029) 3377595, E-mail: wangfuxiang999@sohu.com

** 通讯作者: 孙永涛 (1963-), 男, 博士, 教授, 主要研究方向为艾滋病的防治。

Corresponding author. Tel (029) 83377652, E-mail: yongtaos@hotmail.com

DNA 疫苗是一种新型的免疫策略。DNA 疫苗具有制备、操作简单、诱导免疫应答全面、持久等优点,目前已广泛用于多种疾病的治疗和预防。近年来许多研究证实了细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)在抗 HIV-1 感染和控制 AIDS 形成中发挥着重要作用^[1,2]。一个有效的 HIV 疫苗必须能够诱导和维持病毒特异性 CTL 反应。而单独使用 HIV-1 DNA 疫苗免疫,所产生的免疫力较弱。因此,有必要寻求一种新的策略以增强 HIV-1 DNA 疫苗的细胞免疫,刺激 CTL 反应产生。

为了探求 HIV 核酸疫苗免疫预防和治疗的新策略,本实验将 IL-12 真核表达载体和表达 HIV 核心蛋白的核酸疫苗共免疫小鼠,评价 IL-12 真核表达载体对 HIV-1 核酸疫苗诱导免疫反应的影响,为今后研制高效的治疗性 HIV-1 核酸疫苗提供实验和理论基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、细胞、载体及质粒

菌株 JM109、p815 细胞为本室保存。含有人 IL-12 基因的质粒编码 IL-12 p35 和 p40 蛋白的真核表达载体 pWRG3169 为本室冯志华副教授惠赠。含有中国人 HIV-1 流行株 gag 基因的真核表达载体 pCFneoGAG 为作者构建^[3]。

1.2 工具酶和试剂

实验用酶类购自于 TaKaRa 公司;大量质粒快速抽提纯化提取试剂盒为上海华舜生物工程有限公司产品;胎牛血清及 G418 购自 Gibco 公司;lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司;HIV P24 抗原为中国疾病预防控制中心曾毅院士惠赠;MTT 购自 Sigma 公司;小鼠 IFN- γ ELISA 试剂盒购自晶美生物工程公司;CytoTox96R Non-Radioactive Cytotoxicity Assay 试剂盒为美国 Promega 公司产品。

1.3 质粒的细胞转染

采用脂质体转染技术(参阅 lipofectamine 2000 产品说明书)。操作步骤是:(1)在含有玻片的 6 孔培养板中,接种传代的 p815 细胞,当细胞生长至 90%~95%融合时,于转染前用无血清和抗生素的 DMEM 洗 2 遍,每孔加入 2mL DMEM。(2)配制细胞转染液 A:纯化的重组质粒 12 μ L 加入 250 μ L 无血清和抗生素的 DMEM 中;B: lipofectamine 10 μ L 加入 250 μ L 无血清和抗生素的 DMEM 中。5min 内将 A 和 B 混匀,室温作用 20min。(3)将 522 μ L 的质粒-lipofectamine 混合物加入每孔含细胞的 DMEM 中混匀。(4)细胞于 37 $^{\circ}$ C,5%CO₂ 孵

育培养 6h,吸弃转染液,加入含有 10% FCS 的 1640 液 2mL,继续孵育 48h 后,并以 G418 300 μ g/mL 筛选 6 周,作为靶细胞。同时设空质粒对照组。

1.4 质粒 DNA 的大量制备和纯化

操作按说明书进行,DNA 用生理盐水调节浓度至 1 μ g/ μ L,-20 $^{\circ}$ C 保存待用。

1.5 小鼠的 DNA 免疫

6 周龄的 Balb/c 小鼠购自第四军医大学实验动物中心,重约 18g~20g,随机分成 3 组,每组 5 只。A 组:联合免疫组,肌肉注射质粒 pCFneoGAG 100 μ L/只和 pWRG3169 100 μ L/只;B 组:pCFneoGAG 免疫组,肌肉注射质粒 pCFneoGAG 100 μ L/只;C 组:对照组,注射空质粒 pCFneo 100 μ L/只。每只小鼠在每次接种前 24h 均需用 0.25% 的布比卡因 100 μ L 预处理,在 2、4 周时同样剂量加强免疫,2 组均在各次免疫前剪尾取血,6 周时眼球取血及分离脾细胞检测免疫功能。

1.6 免疫小鼠特异性抗 HIV p24 抗体的检测

检测免疫小鼠血清中特异性抗体采用间接 ELISA 法,包被抗原为大肠杆菌表达的重组 HIV-1p24 蛋白。3% BSA 封闭后加入适当稀释的小鼠血清孵育,洗板后加入辣根过氧化物标记的羊抗鼠抗体孵育,洗板后加底物显色,在酶标仪 450nm 测量各孔 A 值,具体操作步骤见于^[4]。

1.7 免疫小鼠血清中 IFN- γ 测定

ELISA 法。根据试剂盒提供的说明书操作。

1.8 免疫小鼠脾淋巴细胞增殖实验

无菌操作解剖免疫小鼠取脾,去除结缔组织后 100 目铜网碾磨,收获脾细胞并以等渗氯化胺溶液(NH₄Cl 155 mmol/L、KHCO₃ 10 mmol/L、EDTA 0.1 mmol/L)去除红细胞。以含 10% FCS 的 RPMI1640 将脾细胞调节浓度至 2 \times 10⁵/mL,取此脾细胞悬液 100 μ L,加入 96 孔板。实验组加入 HIV-1 p24 蛋白,终浓度为 10 μ g/mL,对照组不加入 HIV-1 p24 蛋白。将加入上述脾细胞的 96 孔板于 37 $^{\circ}$ C,5%CO₂ 培养 3 d 后,进行增殖实验检测,具体操作步骤见^[4]。刺激指数(SI)按下列公式计算:SI = 实验组 A 值/对照组 A 值。

1.9 小鼠 CTL 反应检测

收获脾细胞具体方法同增殖实验。以含 10% FCS 的 RPMI1640 将脾细胞调节浓度至 2 \times 10⁵/mL,取此脾细胞悬液 100 μ L,加入 96 孔板,并加入 HIV-1p24 蛋白,终浓度为 10 μ g/mL,免疫小鼠脾淋巴细胞于 37 $^{\circ}$ C,5%CO₂ 培养 5d 后作为效应细胞。以 pCIneo-gag 重组质粒转染的 BALB/c 小鼠肥大

细胞瘤细胞 P815 (H-2^d) 并经 G418 筛选 6 周后作为靶细胞。效应细胞与靶细胞以 50 ◇1、25 ◇1 和 12.5 ◇13 个效靶比混合培养 5h 后,以 LDH 释放法检测 CTL 活性,具体操作按说明书进行。同时设效应细胞自发释放孔,靶细胞自发释放孔和靶细胞最大释放孔。CTL 活性 (%) = (实验组释放-效应细胞自发释放-靶细胞自发释放)/(靶细胞最大释放-靶细胞自发释放) ×100 %。

1.10 统计学方法

采用 SPSS 软件,计量资料采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 免疫小鼠血清中抗-HIV p24 抗体测定

免疫后 2 周时,pCIneoGAG + pWRG3169 联合免疫组诱导出小鼠的抗-HIV p24 抗体平均滴度为 1/320,pCIneoGAG 免疫组为 1/368,两组相比没有差异。免疫后 4 周时,pCIneoGAG + pWRG3169 联合免疫组诱导出小鼠的抗-HIV p24 抗体平均滴度为 1/1114,而 pCIneoGAG 免疫组为 1/2229,两组相比有显著性差异 ($p < 0.01$)。免疫后 6 周时,pCIneoGAG + pWRG3169 联合免疫组诱导出小鼠的抗 p24 抗体平均滴度为 1/1280,而 pCIneoGAG 免疫组为 1/2560,两组相比亦有显著性差异 ($p < 0.01$)。两组抗-HIV p24 抗体滴度随时间增加和加强免疫而增高。对照组均无特异性抗体检出,结果如图 1。

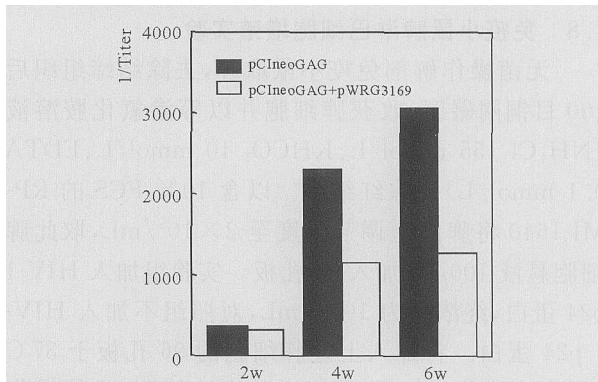


图 1 HIV-1 DNA 疫苗免疫小鼠后不同时间血清特异性抗 p24 抗体滴度

Fig.1 Anti-HIV p24 antibody titers induced by i. m administration of the HIV-1 DNA vaccine during different time

2.2 免疫小鼠血清中 IFN- 检测结果

使用小鼠 IFN- ELISA 试剂盒检测免疫小鼠血清中的 IFN-。检测结果显示 pCIneoGAG + pWRG3169 联合免疫组小鼠血清中的 IFN- (245.6 ±5.2pg/mL) 高于 pCIneoGAG 免疫组小鼠血清

中的 IFN- (168.8 ±6.5pg/mL),两组比较有极显著性差异 ($p < 0.01$)。

2.3 免疫小鼠脾淋巴细胞增殖实验检测结果

HIV p24 刺激后,pCIneoGAG + pWRG3169 联合免疫组能够产生特异性淋巴细胞增殖,SI 为 9.02 ±0.29,而 pCIneoGAG 免疫组为 4.94 ±0.31,两组比较有极显著性差异 ($p < 0.01$)。

2.4 CTL 反应

效:靶比为 50 ◇1 时,pCIneoGAG + pWRG3169 联合免疫组和 pCIneoGAG 免疫组的 CTL 杀伤率分别为 55.99 % ±0.26 %、41.18 % ±0.30 %,两组比较有极显著性差异 ($p < 0.01$);效 ◇靶比为 25 ◇1 时,pCIneoGAG + pWRG3169 联合免疫组和 pCIneoGAG 免疫组的 CTL 杀伤率分别为 44.64 % ±0.23 %、31.62 % ±0.30 %,两组比较有极显著性差异 ($p < 0.01$);效 ◇靶比为 12.5 ◇1 时,pCIneoGAG + pWRG3169 联合免疫组和 pCIneoGAG 免疫组的 CTL 杀伤率分别为 33.14 % ±0.31 %、21.64 % ±0.18 %,两组比较有极显著性差异 ($p < 0.01$)。见图 2:

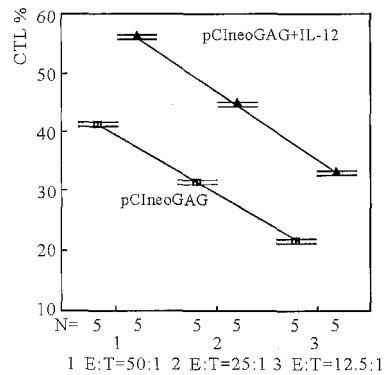


图 2 IL-18 基因与 HIV-1 DNA 疫苗共免疫小鼠后诱导 CTLs 杀伤活性的影响

Fig.2 The CTL responses induced by pCIneoGAG and pCIneoGAG + pWRG3169

3 讨论

IL-12 具有调节 Th1 与 Th2 细胞之间的平衡,诱导 IN- 等细胞因子的作用,IL-12 还能激活为 NK/LAK 前体细胞,使之成具有细胞溶解功能的杀伤细胞。因此 IL-12 诱导 INF-、TNF、GM-CSF 和 IL-8 等多种细胞因子的产生,激活 NK 细胞和 T 细胞,调节 Th 细胞分化等^[5]。Kim 等使用 HIV DNA 疫苗和编码 IL-12 的质粒共免疫小鼠,发现表达 IL-12 的质粒调节抗原特异性细胞和体液免疫应答,降低体液免疫应答,增强抗原特异性细胞免疫应

答^[6]。Boyer 等使用编码人 IL-12 的质粒和 HIV-1 DNA 疫苗免疫感染 HIV-1 IIB 的黑猩猩,发现 IL-12 质粒和 HIV-1 DNA 疫苗共免疫黑猩猩可以增强 HIV-1 抗原增殖性应答,且黑猩猩病毒载量下降^[7]。

编码细胞因子质粒与核酸疫苗共免疫是提高核酸免疫的一个重要策略。将细胞因子质粒与核酸疫苗共免疫,可以使机体产生的细胞因子保持稳定的水平,以更有效地促进免疫细胞之间的相互作用。并且,避免了由于全身注射细胞因子蛋白带来的不良反应,并可克服细胞因子半衰期短的优点。

本研究结果表明与 pCFneo GA G 单独免疫小鼠组比较,IL-12 基因联合 pCFneo GA G 免疫组小鼠所诱导的特异性抗 HIV p24 抗体滴度降低。这与 IL-12 可以促进 Th1 细胞的合成,抑制 IgE 和 IgG1 的产生有关。此外,研究结果还提示 IL-12 基因联合 pCFneo GA G 免疫组小鼠血清中的 IFN- γ (245.6 \pm 5.2 pg/mL) 高于 pCFneo GA G 单独免疫小鼠组血清中的 IFN- γ (168.8 \pm 5.7 pg/mL),两组比较有极显著性差异 ($P < 0.01$)。这证实了 IL-12 在促进 Th1 亚群分化中的重要性,可以刺激 T 细胞产生 IFN- γ 。本研究结果还表明 IL-12 基因可以刺激激活的 T 细胞增殖,IL-12 基因联合 pCFneo GA G 免疫组小鼠淋巴细胞增殖实验刺激指数 (SI) 为 9.02 \pm 0.29,而 pCFneo GA G 免疫组为 4.94 \pm 0.31,两组比较有显著性差异 ($P < 0.01$)。此外,IL-12 基因还可以增强 HIV DNA 疫苗诱导产生的特异性 CTL 反应,在三种效靶比情况下,IL-12 基因联合 pCFneo GA G 免疫组 CTL 杀伤率均高于

pCFneo GA G 单独免疫小鼠组的 CTL 杀伤率,有极显著性差异 ($p < 0.01$)。因此,我们的研究提示,IL-12 基因能使 HIV DNA 疫苗诱导的免疫反应向 Th1 型为主的细胞免疫反应转变,并增强特异性的 CTL 反应,提示 IL-12 基因联合 HIV 核酸疫苗免疫可在抗 HIV 感染中发挥一定的作用。这为进一步研制高效的 HIV 治疗性疫苗提供了重要的实验与理论依据。

参考文献

- [1] Goulder P J, Brander C, Tang Y, *et al.* Evolution and transmission of stable CTL escape mutations in HIV infection[J]. *Nature*, 2001, 412(6844):334-338.
- [2] Chouquet C, Autran B, Gornard E, *et al.* Correlation between breadth of memory HIV-specific cytotoxic T cells, viral load and disease progression in HIV infection[J]. *AIDS*, 2002, 16(18):2399-2407.
- [3] 王福祥,孙永涛,王临旭,等. 中国株 HIV-1 核心蛋白真核表达载体的构建与表达[J]. *中国病毒学*, 2003, 18(5):420-422.
- [4] 朱立平,陈学清. 免疫学常用实验方法[M], 第 1 版,北京:人民军医出版社,2000:193-355.
- [5] Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity[J]. *Nat Rev Immunol*, 2003, 3:133-146.
- [6] Kim J J, Ayyavoo V, Bagarazzi M L, *et al.* In vivo engineering of a cellular immune response by coadministration of IL-12 expression vector with a DNA immunogen [J]. *J Immunol*, 1997, 158(2):816-826.
- [7] Boyer J D, Cohen A D, Ugen K E, *et al.* Therapeutic immunization of HIV-infected chimpanzees using HIV-1 plasmid antigens and interleukin-12 expressing plasmids[J]. *AIDS*, 2000, 14:1515-1522.