

趋化因子基因对 HIV-1 外膜蛋白基因疫苗诱导的免疫应答的影响*

王福祥^{1**}, 潘艳¹, 孙永涛²

(1. 哈尔滨医科大学附属第一医院感染科, 黑龙江 哈尔滨 150001; 2. 第四军医大学唐都医院传染科, 陕西 西安)

Chemokine Genes Modulate Immune Responses Induced by HIV-1 Envelope Protein Gene Vaccine

WANG Fu-xiang^{1**}, PAN Yan¹, SUN Yong-tao²

(1. Department of Infectious Diseases, The First Hospital of the Harbin Medical University, Harbin 150001, China 2. Center of Diagnosis and Treatment for Infectious Diseases of PLA, Tangdu Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China)

Abstract: To investigate the effect of chemokine gene immunization on immune responses induced by HIV-1 envelope protein gene vaccine and to explore new strategies against HIV, Balb/c mice were immunized with pVAX1GP120 alone or co-administered with the DNA encoding for RANTES, and MIP-1 α . Their sera were collected for analyzing anti-HIV antibody and IFN- γ by ELISA, and splenocytes of Balb/c mice were isolated for detecting antigen-specific lymphoproliferative responses and specific CTL response by MTT and LDH assays, respectively. Our results showed that the anti-HIV antibody titers of mice co-immunized with pVAX1GP120 and the DNA encoding for RANTES and MIP-1 α were higher than that of mice immunized with pVAX1GP120 alone ($P < 0.01$). The IFN- γ level of mice co-immunized with pVAX1GP120 and the DNA encoding for RANTES and MIP-1 α was higher than that of mice immunized with pVAX1GP120 alone ($P < 0.01$). In comparison with mice injected with pVAX1GP120 alone, the specific CTL cytotoxicity activity and antigen-specific lymphoproliferative responses of mice immunized with pVAX1GP120 and the DNA encoding for RANTES and MIP-1 α were significantly enhanced ($P < 0.01$). The DNA encoding for RANTES and MIP-1 α together with HIV-1 envelope nucleic acid vaccine may enhance HIV-1 specific Th-1 responses and cellular immune responses elicited in mice and may up-regulate the humoral responses. The DNA encoding for RANTES and MIP-1 α are promising immune adjuvant for HIV-1 envelope nucleic acid vaccine.

Key words: HIV-1; Envelope protein gene vaccine; Immunization; RANTES; MIP-1 α

摘要: 研究趋化因子基因对 HIV-1 外膜蛋白基因疫苗诱导免疫应答的影响, 以探求防治 HIV 的新策略。将 pVAX1GP120 联合 RANTES、MIP-1 α 基因或者 pVAX1GP120 单独免疫 Balb/c 小鼠, 采用 ELISA 检测免疫小鼠的特异性抗体和 IFN- γ 水平, 用 MTT 比色法检测免疫小鼠脾淋巴细胞的增殖, 用乳酸脱氢酶(LDH)试验检测小鼠特异性细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)的应答。与 pVAX1GP120 免疫组比较, pVAX1GP120 联合 RANTES、MIP-1 α 基因免疫组小鼠血清的抗 HIV-1gp120 抗体滴度升高, 有显著性差异($p < 0.01$); 与 pVAX1GP120 免疫组比较, pVAX1GP120 联合 RANTES、MIP-1 α 基因免疫组小鼠血清的 IFN- γ 升高, 有显著性差异($p < 0.01$); pVAX1GP120 联合 RANTES、MIP-1 α 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 pVAX1GP120 免疫组, 有显著性差异($p < 0.01$)。RANTES、MIP-1 α 基因联合 HIV-1 外膜蛋白基因疫苗免疫小鼠, 可能增强 HIV 特异性 Th1 细胞和 CTL 反应, RANTES、MIP-1 α 基因对体液免疫有加强作用。因此, RANTES、MIP-1 α 基因对于 HIV-1 外膜蛋白基因疫苗具有较好应用前景的免疫佐剂。

收稿日期: 2005-05-16, 修回日期: 2005-07-18

* 基金项目: 黑龙江省教育厅资助项目(10551180)

** 通讯作者: 王福祥(1971-), 男, 黑龙江齐齐哈尔人, 副主任医师, 博士, 主要从事 AIDS 防治研究。
Corresponding author. Tel: 0451-53621909, E-mail: wangfuxiang999@sohu.com

关键词:HIV-1;外膜蛋白基因疫苗;免疫; RANTES; MIP-1 α

中图分类号:R373.9

文献标识码:A

文章编号:1003-5125(2005)06-0578-04

诱导较强的细胞免疫应答已经成为 HIV-1 疫苗首要考虑的因素^[1]。目前,人们在世界范围内开发针对 HIV 诱导高水平 CTL 应答的治疗性疫苗。然而,尽管 HIV 核酸疫苗可以调动机体的细胞和体液免疫应答,很好地防治 HIV 感染,但是,单独使用 HIV 核酸疫苗免疫所诱导的免疫应答具有一定的局限性,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 核酸疫苗诱导的细胞免疫应答,刺激 CTL 应答产生。

MIP-1 α (巨噬细胞炎症蛋白 1 α)是 β -趋化因子家族成员之一,具有吸附炎症细胞和调节单核细胞、B 细胞和 T 细胞功能,还可影响造血干/祖细胞的生长。Lu 等^[2]在一项研究中,共免疫表达 MIP-1 α 的质粒和 HIV-1 pCMV160IIIIB、pcREV DNA 质粒,并且评价了肌肉注射和鼻内免疫 MIP-1 α 质粒对 HIV 特异性免疫应答的效果。共免疫 MIP-1 α 质粒和 DNA 疫苗组与单独接种 DNA 疫苗组相比较,前者 CTL 应答活性和 DTH 水平提高,提示 MIP-1 α 可明显增强 HIV 特异性细胞免疫应答,而 HIV 特异性血清 IgG1/IgG2a 的比率则明显降低。RANTES(活化 T 细胞调节的、正常 T 细胞表达和分泌的分子)亦是 β 类趋化因子家族的一员, RANTES 蛋白能够诱导迟发型超敏反应(DTH),可以促进 CD4+T 细胞和巨噬细胞的聚集^[3]。Xin 等^[4] 研究报道,用编码 RANTES 趋化因子的质粒和编码 HIV-1env/rev 基因的质粒共免疫小鼠,与单独 DNA 免疫相比较,编码 RANTES 的质粒和 DNA 疫苗共免疫小鼠可明显诱导血清高滴度的 HIV-1 特异性 IgG 和 IgG2a,增强 HIV-1 特异性 CTL 应答和 DTH,提示共注射 RANTES 质粒主要诱导 HIV-1 特异性细胞免疫应答。为了探求 HIV 核酸疫苗免疫预防和治疗的新策略,本实验将 RANTES、MIP-1 α 基因和表达 HIV 外膜蛋白的核酸疫苗共免疫小鼠,评价 RANTES、MIP-1 α 基因对 HIV 外膜蛋白核酸疫苗诱导免疫反应的影响,为今后研制高效的 HIV 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、真核表达载体 pVAX1 为本室保存。含有 MIP-1 α 、RANTES 的真核表达载体,为第四军医大学白雪帆教授惠赠。含有中国

人 HIV-1 流行株 env 基因的真核表达载体 pVAX1GP120 为作者构建^[5]。

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;lipo-fectamine 2000 购自 Invitrogen 公司;HIV GP120 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

按照 lipofectamine 2000 产品的说明书进行操作。

1.4 质粒 DNA 的大量制备和纯化

操作按大量质粒快速抽提纯化提取试剂盒说明书进行,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 4 组,每组 5 只。A 组:联合免疫 1 组,肌肉注射质粒 pVAX1GP120 100 μ L/只和 RANTES 100 μ L/只;B 组:联合免疫 2 组,肌肉注射质粒 pVAX1GP120 100 μ L/只和 MIP-1 α 100 μ L/只;C 组:pVAX1GP120 免疫组,肌肉注射质粒 pVAX1GP120 100 μ L/只;D 组:对照组,注射空质粒 pVAX1 100 μ L/只。每只小鼠在每次接种前 24 小时均需用 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 ELISA 法检测免疫小鼠特异性抗 HIV GP120 抗体

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-1 GP120 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,用酶标仪于波长 450nm 测定各孔 A 值,具体操作步骤见于^[6]。

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

免疫小鼠脾淋巴细胞增殖的检测 无菌操作解

剖免疫小鼠取脾,去除结缔组织后过 100 目铜网碾磨。收获脾细胞并以等渗氯化铵溶液(NH_4Cl 155 mmol/L、 KHCO_3 10 mmol/L 及 EDTA 0.1 mmol/L)去除红细胞。以含 100ml/L FCS 的 RPMI1640 将脾细胞的密度调节密度至 2×10^8 /L,取此脾细胞悬液 $100 \mu\text{L}$ 加入到 96 孔板中。实验组加入 HIV-1 GP120 蛋白,终浓度为 10 mg/L,对照组不加入 HIV-1 GP120 蛋白。将加脾细胞的 96 孔板于 37°C 50ml/L CO_2 中培养 3d 后,用 MTT 比色法检测脾细胞的增殖,具体操作步骤见文献^[6]。

1.9 小鼠 CTL 反应检测

免疫小鼠脾细胞杀伤活性的检测以含 100ml/L FCS 的 RPMI1640 将脾细胞的密度调整至 2×10^8 /L,加入 96 孔板中,每孔 $100 \mu\text{L}$,并加入 HIV-1 GP120 蛋白,终浓度为 10 mg/L,将免疫小鼠脾淋巴细胞于 37°C 50ml/L CO_2 中培养 5d 作为效应细胞。以重组质粒转染的 p815 细胞并经 G418 筛选 6wk 作为靶细胞。效应细胞与靶细胞按 50:1、25:1 和 12.5:1 的比例混合培养 5h 后,以 LDH 释放法检测脾细胞的杀伤活性,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 A 值-效应细胞自发释放 A 值-靶细胞自发释放 A 值)/(靶细胞最大释放 A 值-靶细胞自发释放 A 值) $\times 100\%$ 。

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 GP120 抗体测定

DNA 免疫小鼠后,分别于免疫后 2、4、6 周采血,分离血清,用 ELISA 法分别检测每组 5 只小鼠的抗 GP120 抗体滴度,然后计算平均值,结果如图 1,免疫后 2~6 周时, pVAX1GP120 + RANTES 和 pVAX1GP120 + MIP-1 α 联合免疫组诱导出小鼠的抗 GP120 抗体平均滴度分别与 pVAX1GP120 免疫组相比差异明显($p < 0.01$)。对照组均无特异性抗体检出。

2.2 免疫小鼠血清中 IFN- γ 检测结果

使用小鼠 IFN- γ ELISA 试剂盒检测免疫小鼠血清中的 IFN- γ 。结果显示: pVAX1GP120 + RANTES 联合免疫组小鼠血清中的 IFN- γ ($196.4 \pm 6.9 \text{ pg/mL}$)高于 pVAX1GP120 免疫组小鼠血清中的 IFN- γ ($147.4 \pm 3.8 \text{ pg/mL}$),两组比较有显著性差异($p < 0.01$)。pVAX1GP120 + MIP-1 α 联合

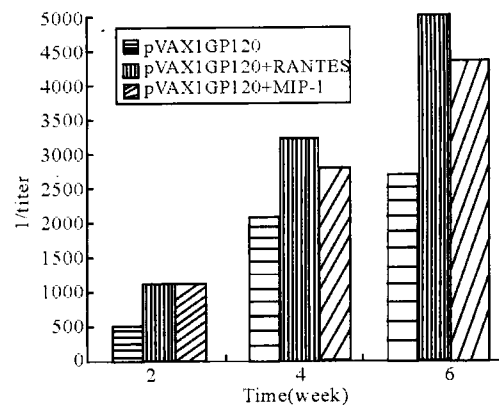


图 1 趋化因子基因与 HIV-1 基因疫苗共免疫小鼠后抗 GP120 抗体的滴度

Fig. 1 Antibody titers to HIV-1 GP120 of mice co-immunized with HIV-1 envelope nucleic acid vaccine with the chemokine gene

免疫组小鼠血清中的 IFN- γ ($245.3 \pm 5.6 \text{ pg/mL}$)高于 pVAX1GP120 免疫组小鼠血清中的 IFN- γ ($147.4 \pm 3.8 \text{ pg/mL}$),两组比较亦有显著性差异($p < 0.01$)。

2.3 免疫小鼠脾淋巴细胞增殖实验检测结果

HIV GP120 刺激后, pVAX1GP120 + RANTES 联合免疫组和 pVAX1GP120 + MIP-1 α 联合免疫组的 SI 为 7.34 ± 0.58 、 6.76 ± 0.36 , 而 pVAX1GP120 免疫组为 3.98 ± 0.24 , 两组比较有显著性差异($p < 0.01$)。

2.4 免疫小鼠脾细胞杀伤活性的检测

效:靶比为 50:1 时, pVAX1GP120 + RANTES 联合免疫组和 pVAX1GP120 的 CTL 杀伤率, 高于 pVAX1GP120 免疫组, 两组比较有显著性差异($p < 0.01$)。pVAX1GP120 + MIP-1 α 联合免疫组和 pVAX1GP120 免疫组的 CTL 杀伤率比较有极显著性差异($p < 0.01$); 效:靶比为 25:1 时, pVAX1GP120 + RANTES 联合免疫组和 pVAX1GP120 免疫组的 CTL 杀伤率有显著性差异($p < 0.01$)。pVAX1GP120 + MIP-1 α 联合免疫组和 pVAX1GP120 免疫组的 CTL 杀伤率比较有显著性差异($p < 0.01$); 效:靶比为 12.5:1 时, pVAX1GP120 + RANTES 联合免疫组和 pVAX1GP120 免疫组的 CTL 杀伤率有显著性差异($p < 0.01$)。pVAX1GP120 + MIP-1 α 联合免疫组和 pVAX1GP120 免疫组的 CTL 杀伤率比较有显著性差异($p < 0.01$)见图 2。

3 讨论

本研究结果表明与 pVAX1GP120 单独免疫小

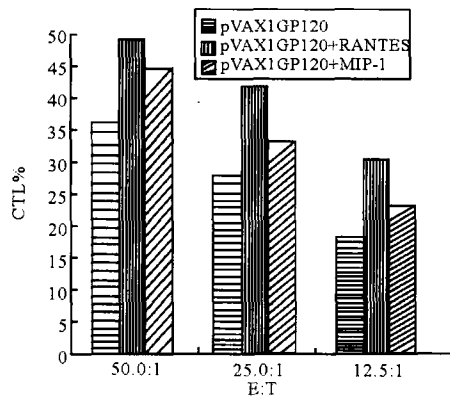


图2 趋化因子基因与 HIV-1 基因疫苗共免疫小鼠后诱导的 CTL 应答

Fig. 2 The CTL responses of mice co-immunized with HIV-1 nucleic acid vaccine with the chemokine gene

鼠组比较, MIP-1 α 或 RANTES 基因联合 pVAX1GP120 免疫组小鼠所诱导的特异性抗 HIV GP120 抗体滴度升高。可能与 MIP-1 α 或 RANTES 基因诱导 Th1 类细胞增加, 使 IgG2a 型抗体增加, 导致总抗体水平的提高。此外, 研究结果还提示 MIP-1 α 或 RANTES 基因联合 pVAX1GP120 免疫组小鼠血清中的 IFN- γ 均高于 pVAX1GP120 单独免疫小鼠组血清中的 IFN- γ , 相比较均有显著性差异 ($p < 0.01$)。这证实了 MIP-1 α 或 RANTES 基因在促进 Th1 亚群分化中的重要性, 导致活化 T 细胞产生 IFN- γ 。本研究结果还表明 MIP-1 α 或 RANTES 基因可以增强特异性淋巴细胞增殖, MIP-1 α 或 RANTES 基因联合 pVAX1GP120 免疫组小鼠淋巴细胞增殖实验刺激指数 (SI) 分别为 7.34 ± 0.58 、 6.76 ± 0.36 , 而 pVAX1GP120 免疫组为 3.98 ± 0.24 , 相比较均有显著性差异 ($p < 0.01$)。此外,

MIP-1 α 或 RANTES 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, MIP-1 α 或 RANTES 基因联合 pVAX1GP120 免疫组 CTL 杀伤率均高于 pVAX1GP120 单独免疫小鼠组的 CTL 杀伤率, 有显著性差异 ($p < 0.01$)。因此, 我们的研究提示, MIP-1 α 或 RANTES 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, 同时也增强了体液免疫应答。提示 MIP 或 RANTES 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 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] Lu Y, Xin K Q, Hamajima K, *et al.* Macrophage inflammatory protein-1alpha (MIP-1alpha) expression plasmid enhances DNA vaccine-induced immune response against HIV-1 [J]. *Clin Exp Immunol*, 1999, 115(2):335-341.
- [3] Devergne O, Marfaing-Koka A, Schall T J, *et al.* Production of the RANTES chemokine in delayed-type hypersensitivity reactions: involvement of macrophages and endothelial cells[J]. *J Exp Med*, 1994, 179(5):1689-1694.
- [4] Xin K Q, Lu Y, Hamajima K, *et al.* Immunization of RANTES expression plasmid with a DNA vaccine enhances HIV-1-specific immunity[J]. *Clin Immunol*, 1999, 92(1):90-96.
- [5] 王福祥, 孙永涛, 王临旭, 等. 中国株 HIV-1 外膜蛋白真核表达载体的构建与表达[J]. *中国病毒学*, 2004, 19:70-72.
- [6] 朱立平, 陈学清. 免疫学常用实验方法, 第 1 版, 北京: 人民军医出版社, 2000:193-355.