

## IL-18 DNA 免疫对 HIV-1 核酸疫苗诱导的免疫应答的影响

王福祥, 孙永涛\*\*, 孙永年, 徐哲, 王临旭, 刘娟, 康文臻

(第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心, 陕西西安 710038)

### Modulation of Immune Responses to a HIV-1 Nucleic Acid Vaccine by Interleukin-18 DNA Immunization

WANG Fu-xiang, SUN Yong-tao\*\*, SUN Yong-nian, XU Zhe, WANG Lin-xu, LIU Juan, KANG Wen-zhen  
(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 interleukin-18 (IL-18) DNA immunization on immune response induced by Human immunodeficiency virus 1(HIV-1) nucleic acid vaccine (DNA vaccine), the recombinant expression vector pVAX1-IL-18 was constructed by inserting the IL-18 gene into the eukaryotic expression vector pVAX1. Balb/c mice were immunized with pCI-neoGAG alone or co-administered with the DNA encoding for IL-18. Their sera were collected for analyzing anti-HIV antibody and IFN- $\gamma$  by ELISA, and spleen cells were isolated for detecting antigen-specific lymphoproliferative responses and specific CTL response by MTT assay and LDH assay, respectively. Restriction enzymes digestion analysis and DNA sequencing results revealed that the recombinant expression vector pVAX1-IL-18 has been constructed successfully. The anti-HIV antibody titers of mice co-immunized with pCI-neoGAG and the DNA encoding for IL-18 were lower than that of mice immunized with pCI-neoGAG alone ( $P < 0.01$ ). In contrast, the IFN- $\gamma$  level of mice co-immunized with pCI-neoGAG and the DNA encoding for IL-18 was higher than that of mice immunized with pCI-neoGAG alone ( $P < 0.01$ ). Furthermore, compared with mice injected with pCI-neoGAG alone, the specific CTL cytotoxicity and antigen-specific lymphoproliferative responses of mice immunized with pCI-neoGAG and the DNA encoding for IL-18 were significantly enhanced ( $P < 0.01$ ). The DNA encoding for IL-18 together with HIV DNA vaccine may enhance specific Th-1 responses and cellular immune responses elicited in mice. However, the DNA encoding for IL-18 may down-regulate the humoral responses.

**Key words:** Human immunodeficiency virus 1(HIV-1); DNA vaccination; Interleukin-18(IL-18); Immunization

**摘要:** 为了研究白细胞介素-18(IL-18)基因对人免疫缺陷病毒(HIV-1)核酸疫苗诱导免疫应答的影响, 将人 IL-18 基因插入到真核表达载体 pVAX1 中, 构建了真核表达载体 pVAX1-IL-18; 将 pCI-neoGAG 联合 pVAX1-IL-18 或者 pCI-neoGAG 单独免疫 Balb/c 小鼠, 检测免疫小鼠的特异性抗体和 IFN- $\gamma$ , 同时观察免疫小鼠脾淋巴细胞增殖和小鼠特异性细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)反应。酶切及测序结果表明成功地构建了人 IL-18 基因真核表达载体; 与 pCI-neoGAG 免疫组比较, pCI-neoGAG 联合 pVAX1-IL-18 免疫组小鼠血清的抗 HIV-1p24 抗体滴度降低 ( $P < 0.01$ ); 而与 pCI-neoGAG 免疫组比较, pCI-neoGAG 联合 pVAX1-IL-18 免疫组小鼠血清的 IFN- $\gamma$  升高 ( $P < 0.01$ ); pCI-neoGAG 联合 pVAX1-IL-18 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

收稿日期: 2003-08-25, 修回日期: 2003-10-21

作者简介: 王福祥 (1971-), 男, 黑龙江齐齐哈尔人, 主治医师, 博士生, 主要从事 AIDS 基因疫苗研究。

Tel: (029) 83377595, E-mail:wangfuxiang999@sohu.com.

\*\* 通讯作者. Corresponding author. Tel: (029)83377652, E-mail:yongtaos@hotmail.com.

活性均高于 pCI-neoGAG 免疫组 ( $P < 0.01$ )。IL-18 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-18 基因对体液免疫有抑制作用。

**关键词:** HIV-1; 核酸疫苗; 白细胞介素-18(IL-18); 免疫

**中图分类号:** R373.9

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1003-5152(2004)02-0097-04

一个有效的人免疫缺陷病毒 (Human immunodeficiency virus, HIV) 疫苗必须能够诱导和维持病毒特异性 CTL 反应。DNA 疫苗可以调动机体的细胞和体液免疫, 可以很好地防治病毒性疾病。然而, 单独使用 HIV DNA 疫苗免疫, 所产生的免疫力较弱。IL-18 是新近发现的一种细胞因子, 结构类似于 IL-1 家族而功能类似于 IL-12, 具有多种生物学功能。它由单核-巨噬细胞、上皮细胞产生, 可以激活 NK 细胞, 刺激激活的 T 细胞产生 IFN- $\gamma$ 、GM-CSF、IL-2, 抑制激活的 T 细胞产生 IL-10。IL-18 在促进 Th1 型细胞免疫反应及增强 NK 细胞活性方面发挥着重要作用, 它被认为是一种特异的 Th1 型免疫反应诱导因子<sup>[1]</sup>。因此, 为了探求 HIV 核酸疫苗免疫预防和治疗的新策略, 本实验将人 IL-18 真核表达载体和表达 HIV 核心蛋白的核酸疫苗共免疫小鼠, 评价人 IL-18 真核表达载体对 HIV 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 核酸疫苗提供实验和理论基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

菌株 JM109、p815 细胞、真核表达载体 pVAX1 为本室保存。含有人 IL-18 基因的质粒 PgEM-T-IL-18 为西安交通大学免疫病理研究室王一理教授惠赠。含有中国人 HIV-1 流行株 Gag 基因的真核表达载体 pCI-neoGAG 为作者构建。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; 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- $\gamma$  ELISA 试剂盒购自晶美生物工程有限公司; CytoTox96R Non-Radioactive Cytotoxicity Assay 试剂盒为美国 Promega 公司产品。

### 1.2 pVAX1-IL-18 真核表达载体的构建及鉴定

限制性内切酶 BamH I、EcoR I 双酶切质粒 pGEM-T-IL-18, 将其中的 IL-18 基因重组到同样酶切处理的真核表达载体 pVAX1 中, 得到含有 IL-18 基因的真核表达载体 (pVAX1-IL-18)。(具体操作步骤见分子克隆实验指南)<sup>[2]</sup>。使用 BamH I、EcoR I 双酶切重组质粒 pVAX1-IL-18 进行鉴定。并将酶切

鉴定正确的重组质粒送至上海生工生物工程公司测序。

### 1.3 质粒的细胞转染

采用脂质体转染技术, 具体操作步骤参阅 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 $\mu$ L 加入 250 $\mu$ L 无血清和抗生素的 DMEM 中; B: lipofectamine 10 $\mu$ L 加入 250 $\mu$ 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 $\mu$ 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%CO<sub>2</sub> 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 $\mu$ g/mL 筛选 4 周。同时设空质粒对照组。

### 1.4 质粒 DNA 的大量制备和纯化

操作按试剂盒说明书进行, DNA 用生理盐水调节浓度至 1 $\mu$ g/ $\mu$ 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 pCI-neoGAG 100 $\mu$ L/只和 pVAX1-IL-18 100 $\mu$ L/只; B 组: pCI-neoGAG 免疫组, 肌肉注射质粒 pCI-neoGAG 100 $\mu$ L/只; C 组: 对照组, 注射空质粒 pCI-neo 100 $\mu$ L/只。每只小鼠在每次接种前 24h 均需用 0.25% 的布比卡因 100 $\mu$ 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 HIVp24 抗体

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 OD 值, 具体操作步骤见文献<sup>[3]</sup>。免疫小鼠血清中 IFN- $\gamma$  测定采用 ELISA 方法。根据试剂盒提供的说明书操作。

### 1.7 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 ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  155 mmol/L、 $\text{KHCO}_3$  10 mmol/L、EDTA 0.1 mmol/L) 去除红细胞。以含 10% FCS 的 RPMI-1640 将脾细胞调节浓度至  $2 \times 10^5/\text{mL}$ , 取此脾细胞悬液 100  $\mu\text{L}$ , 加入 96 孔板。实验组加入 HIV-1p24 蛋白, 终浓度为 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 对照组不加入 HIV-1p24 蛋白。将加入上述脾细胞的 96 孔板于  $37^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  培养 3d 后, 进行增殖实验检测, 具体操作步骤见<sup>[3]</sup>。刺激指数 (SI) 按下列公式计算:  $\text{SI} = \text{实验组 A 值} / \text{对照组 A 值}$ 。

### 1.8 小鼠 CTL 反应检测

收获脾细胞具体方法同增殖实验。加入 HIV-1p24 蛋白, 终浓度为 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 免疫小鼠脾淋巴细胞于  $37^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  培养 5d 后作为效应细胞。以 pCI-neoGAG 重组质粒转染 P815 细胞并经 G418 筛选 4 周后作为靶细胞。效应细胞与靶细胞以 50:1、25:1 和 12.5:1 3 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)  $\times 100\%$ 。

### 1.9 统计学方法

采用 SPSS 软件, 计量资料采用 t 检验。

## 2 结果

### 2.1 pVAX1-IL-18 真核表达载体构建及鉴定

pVAX1-IL-18 酶切鉴定图谱见图 1。pVAX1-IL-18 用 *Bam*H I、*Eco*R I 双酶切后, 可切出 500bp 左右的的目的基因带, 表明载体构建正确。同时测序鉴定结果表明该段基因的序列与 GenBank 中 6 个 IL-18 编码核苷酸序列完全一致。

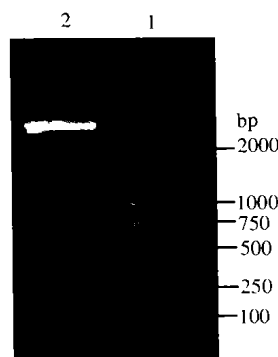


图 1 pVAX1-IL-18 的鉴定

Fig.1 Analysis of pVAX1-IL-18 by enzymes digestion

1. DL 2000; 2. pVAX1-IL-18 digested with *Bam*H I/*Eco*R I.

### 2.2 免疫小鼠血清中抗-HIV p24 抗体测定

用 ELISA 法分别检测每组 5 只小鼠的抗-HIV p24 抗体滴度, 然后计算平均值, 结果如图 2。两组抗 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。免疫后 2 周时, pCI-neoGAG+ pVAX1-IL-18 联合免疫组诱导小鼠的抗 p24 抗体平均滴度为 1/368, pCI-neoGAG 免疫组为 1/368, 两组相比没有差异。免疫后 4 周时, pCI-neoGAG+ pVAX1-IL-18 联合免疫组诱导小鼠的抗 p24 抗体平均滴度为 1/1114, 而 pCI-neoGAG 免疫组为 1/2229 ( $P < 0.01$ )。免疫后 6 周时, pCI-neoGAG+ pVAX1-IL-18 联合免疫组诱导小鼠的抗 p24 抗体平均滴度为 1/1280, 而 pCI-neoGAG 免疫组为 1/2560 ( $P < 0.01$ )。

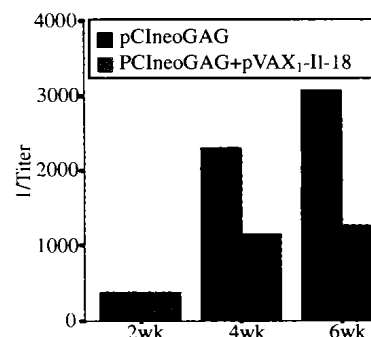


图 2 HIV-1 DNA 疫苗免疫后不同时间血清特异性抗 p24 抗体检测

Fig.2 Anti-p24 antibody titers induced by the HIV-1 DNA vaccine during different time

### 2.3 免疫小鼠血清中 IFN- $\gamma$ 检测结果

检测结果显示 pCI-neoGAG+ pVAX1-IL-18 联合免疫组小鼠血清中的 IFN- $\gamma$  ( $424.4 \pm 6.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) 高于 pCI-neoGAG 免疫组小鼠血清中的 IFN- $\gamma$  ( $168.8 \pm 6.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ), 两组比较有显著性差异 ( $P < 0.01$ )。

### 2.4 免疫小鼠脾淋巴细胞增殖实验检测结果

HIV p24 刺激后, pCI-neoGAG+ pVAX1-IL-18 联合免疫组能够产生特异性淋巴细胞增殖, SI 为  $11.42 \pm 0.69$ , 而 pCI-neoGAG 免疫组为  $4.94 \pm 0.31$ , 两组比较有显著性差异 ( $P < 0.01$ )。

### 2.5 CTL 反应

免疫小鼠的特异性 CTL 反应如图 3。效: 靶比为 50: 1 时, pCI-neoGAG+ pVAX1-IL-18 联合免疫组和 pCI-neoGAG 免疫组的 CTL 杀伤率分别为  $69.09\% \pm 1.77\%$ 、 $41.18\% \pm 0.30\%$  ( $P < 0.01$ ); 效: 靶比为 25: 1 时, pCI-neoGAG+ pVAX1-IL-18 联合

免疫组和 pCI-neoGAG 免疫组的 CTL 杀伤率分别为  $58.19\% \pm 2.31\%$ 、 $31.62\% \pm 0.30\%$  ( $p < 0.01$ )；效靶比为 12.5:1 时，pCI-neoGAG+ pVAX1-IL-18 联合免疫组和 pCI-neoGAG 免疫组的 CTL 杀伤率分别为  $48.38\% \pm 1.44\%$ 、 $21.64\% \pm 0.18\%$  ( $p < 0.01$ )。

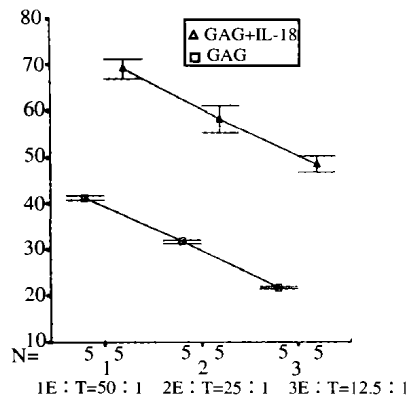


图 3 IL-18 基因与 HIV-1 DNA 疫苗共免疫小鼠后诱导 CTLs 杀伤活性的影响

Fig.3 The CTL responses of mice co-immunized with HIV-1Gag DNA with the gene for IL-18

### 3 讨论

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缺点。

IL-18 的主要功能为诱导活化 T 细胞和 NK 细胞产生 IFN- $\gamma$ ，并与 IL-12 有协同刺激作用；IL-18 可以上调 T 细胞和 NK 细胞 FasL 的表达，IL-18 所诱导的 IFN- $\gamma$  又可以刺激多种细胞 Fas 的表达，通过 Fas/FasL 的相互作用发挥 Th1 细胞的细胞毒作用；此外，IL-18 还可以促进 Th1 亚群的分化，并可促进 Th1 细胞的增殖和 IL-2 的分泌，抑制活化 T 细胞产生 IL-10<sup>[4]</sup>。IL-18 具有较大的临床应用前景，其应用领域包括抗肿瘤、抗感染及治疗移植植物抗宿主反应等，其中抗感染主要包括抗病毒、抗结核分支杆菌、抗真菌及抗寄生虫等胞内感染。Kremer 等发现 IL-18 基因可以促进 Th1 型细胞免疫反应，降低体液免疫应答，可以用于开发新型的免疫治疗策略，以控制分支杆菌感染<sup>[5]</sup>。Billaut-Mulot 在一项研究中提示：肌肉注射编码 HIV-1 Gag、Tat 和 Nef 蛋白和 IL-18 的混合 DNA，发现共注射编码 IL-18

基因的质粒能够缩短诱导 CTL 反应的时间，增加抗原分泌 IL-2 和 IFN- $\gamma$ ，增强抗原特异性淋巴增殖性应答，而 IL-18 基因使病毒蛋白抗体滴度下降<sup>[6]</sup>。

本研究结果表明与 pCI-neoGAG 单独免疫小鼠组比较，IL-18 基因联合 pCI-neoGAG 免疫组小鼠所诱导的特异性抗 HIV p24 抗体滴度降低。这与 IL-18 活化 Th1 细胞功能，选择性抑制 Th2 细胞功能有关，因此，降低了体液免疫应答。此外，研究结果还提示 IL-18 基因联合 pCI-neoGAG 免疫组小鼠血清中的 IFN- $\gamma$  ( $424.4 \pm 6.0\text{pg/mL}$ ) 高于 pCI-neoGAG 单独免疫小鼠组血清中的 IFN- $\gamma$  ( $168.8 \pm 6.5\text{pg/mL}$ )，两组比较有显著性差异 ( $P < 0.01$ )。这证实了 IL-18 在促进 Th1 亚群分化中的重要性，导致活化 T 细胞产生 IFN- $\gamma$ 。本研究结果还表明 IL-18 基因可以增强特异性淋巴细胞增殖，IL-18 基因联合 pCI-neoGAG 免疫组小鼠淋巴细胞增殖实验刺激指数 (SI) 为  $11.42 \pm 0.69$ ，而 pCI-neoGAG 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-18 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-18 基因联合 pCI-neoGAG 免疫组 CTL 杀伤率均高于 pCI-neoGAG 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，IL-18 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-18 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] Dinarello C A. IL-18: A TH1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 1999, 103(1 Pt 1): 11-24.
- [2] 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.
- [3] 朱立平, 陈学清. 免疫学常用实验方法[M]. 北京: 人民军医出版社, 2000. 193-355.
- [4] Gracie J A, Robertson S E, McInnes I B. Interleukin-18[J]. *J Leukoc Biol*, 2003, 73(2): 213-224.
- [5] Kremer L, Dupre L, Wolowczuk I, et al. In vivo immunomodulation following intradermal injection with DNA encoding IL-18[J]. *J Immunol*, 1999, 163(6): 3226-3231.
- [6] Billaut-Mulot O, Idziorek T, Loyens M, et al. Modulation of cellular and humoral immune responses to a multiepitopic HIV-1 DNA vaccine by interleukin-18 DNA immunization/viral protein boost[J]. *Vaccine*, 2001, 19(20-22): 2803-2811.