

共表达 HIV-1 中国流行株 gp120 与 IL-18 重组 鸡痘病毒的构建及其免疫原性观察

江文正 金宁一* 李子健 张立树 韩文瑜

(解放军军需大学 全军基因工程重点实验室, 长春 130062)

摘 要 为筛选我国的 HIV-1 疫苗候选株,以鸡痘病毒 282E4 中国疫苗株为载体,构建了共表达中国流行株 HIV-1 外膜蛋白 gp120 和 IL-18 的重组鸡痘病毒,并将该重组鸡痘病毒免疫 BALB/c 小鼠,检测免疫小鼠脾特异性 CTL 杀伤活性和血清抗体水平。结果显示, HIV-1 外膜蛋白 gp120 和 IL-18 不但可在重组鸡痘病毒感染的鸡胚成纤维细胞中表达,而且可在重组鸡痘病毒感染的哺乳动物细胞中表达。重组病毒具有良好的免疫原性,可诱导小鼠产生特异性抗体和脾特异性 CTL 反应,且 IL-18 发挥了免疫佐剂的作用。本研究结果为制备安全、有效的 HIV-1 基因工程活载体疫苗奠定了基础。

关键词 HIV-1 gp120 白细胞介素 18 鸡痘病毒 抗体 细胞毒 T 淋巴细胞

中图分类号 R373.9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)03-0337-05

HIV-1 Env 蛋白是由一次剪接病毒 mRNA 翻译的 160kD 前体蛋白形式存在的糖蛋白,在高尔基体中被剪切成成熟的氨基端的外膜蛋白 gp120 和羧基端的跨膜蛋白 gp41。gp120 的 V3 区存在着中和抗体决定簇、CTL 决定簇以及对巨噬细胞和脑组织纤维的特异性识别区,它与 HIV-1 中和抗体应答、特异性细胞毒反应及分子致病机制密切相关^[1,2]。因此, HIV-1 外膜蛋白 gp120 已成为人研制 HIV-1 疫苗的重要靶蛋白。白细胞介素 18(IL-18)在免疫网络调节中具有重要作用,可诱导活化的 T 细胞和 NK 细胞产生 IFN- γ ,通过 IFN- γ 刺激单核/巨噬细胞发挥天然免疫作用,同时可增强细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)的杀伤功能^[3]。本研究利用我国鸡痘病毒疫苗株为载体,构建了共表达 HIV-1 中国流行株外膜蛋白 gp120 和 IL-18 的重组鸡痘病毒,通过免疫接种小鼠,评价其诱导小鼠产生的体液和细胞免疫反应的效果,为进一步制备适合我国的 HIV-1 基因工程活载体疫苗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株、病毒和细胞株

含有 HIV-1 中国流行株 B 亚型 gp120 基因的质

粒 pKS-gp120 由中国预防医学科学院艾滋病参比实验室邵一鸣教授提供。含 IL-18 基因的质粒 pVAX-IL18 由本室提供。含牛痘病毒 A 型包涵体(ATI)晚期启动子下游串联了 20 个突变型早期痘苗病毒 P7.5 启动子组成的复合启动子(ATI-P7.5)和 16 个串联的突变型早期痘苗病毒 P7.5 启动子的鸡痘病毒载体质粒 pUTAL 由本室自行构建。大肠杆菌 DH5 α 由本室保存。282E₄ 株鸡痘病毒为南京兽药厂生产的弱毒疫苗。表达 HIV-1 gp120 蛋白的重组鸡痘病毒 rFPV-GP 由本室构建^[4]。9~11 日龄 SPF 鸡胚购自中国农科院哈尔滨兽医研究所实验动物中心,用于制备鸡胚成纤维细胞(CEF)。HeLa 细胞(人宫颈癌细胞)为本室保存。P815 细胞(小鼠肥大细胞瘤细胞)购自中科院上海细胞所。

1.2 酶与试剂

各种工具酶均购自 TaKaRa 公司和 GIBCO BRL 公司。脂质体 DOTAP 为 GIBCO BRL 公司产品。抗 HIV-1 gp120 单克隆抗体由本室制备,人 IL-18 单克隆抗体购自华美生物公司。NBT/BCIP、碱性磷酸酶标记兔抗鼠 IgG 抗体、细胞毒分析试剂盒(CytoTox 96[®] Non-Radioactive Cytotoxicity Assay Kit)均为 Promega 公司产品。HIV-1 抗体 ELISA 检测试剂盒购自

收稿日期 2003-09-15,修回日期 2003-12-29。

基金项目 国家 863 高技术发展计划基金资助(No. 2001AA215031)。

* 通讯作者。 Tel 86-431-6986747; Fax 86-431-7983165; E-mail ningyij@yahoo.com

©中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

北京金豪药业公司。用于鉴定重组鸡痘病毒的 HIV-1 gp120 特异性引物(P1:5'-ccttgggatgtgatgat-3'; P2:5'-actcttctcttggccttgggtg-3')由上海生工公司合成。HIV-1 gp120 特异性多肽(RGPCRAFTV, 311-320)由美联(西安)生物科技有限公司合成。

1.3 重组质粒的构建

将 pVAX-IL18 中的 IL-18 基因(*Hind* III 和 *Xho* I 双酶切片段)定向插入到鸡痘病毒载体质粒 pUTAL 串联启动子下游的 *Hind* III 和 *Sal* I 位点中,构建了中间质粒 pUTA-IL18。再将中国株 HIV-1 gp120 基因插入到鸡痘病毒载体质粒 pUTAL 复合启动子下游的 *Sma* I 酶切位点中,构建了重组鸡痘病毒表达质粒 pUTA-GP-IL18。酶切、连接、转化等步骤均按常规方法进行^[5]。

1.4 病毒的重组、筛选和纯化

利用脂质体法将重组质粒与 282E₄ 株鸡痘病毒共转染长至 80% 融合的 CEF 细胞,进行同源重组。待出现细胞病变后收获病毒,在 5-溴脱氧尿苷(BrdU)的选择压力下筛选 3 次后,用无 BrdU 的 MEM 营养液培养,待出现细胞病变后挑出单个病毒蚀斑,经纯化后分别扩毒。

1.5 重组病毒的 PCR 鉴定

采用 SDS-蛋白酶 K-苯酚法提取重组病毒的基因组 DNA,以其为模板,用特异性引物进行 PCR 扩增,以检测重组病毒基因组中是否有外源基因的插入。PCR 反应条件为 97℃ 预变性 5min 后,按 94℃ 变性 30s,55℃ 退火 30s,72℃ 延伸 1min,共 30 个循环,最后 72℃ 延伸 10min。

1.6 重组病毒表达产物的检测

将 PCR 阳性的重组病毒以 10MOI(感染复数)接种 CEF 单层,待出现细胞病变后收获细胞,用裂解缓冲液裂解细胞,取其上清进行 SDS-PAGE 和 Western blot 检测。以抗 HIV-1 gp120 单克隆抗体为一抗,碱性磷酸酶标记兔抗鼠 IgG 抗体为二抗,用 NBT/BCIP 显色后观察。经 Western blot 检测可见特异性蛋白表达带的为阳性重组病毒,命名为 rFPV-GP-IL18。

1.7 重组病毒在哺乳动物细胞中的表达

将获得的重组病毒 rFPV-GP-IL18 以 10MOI 接种于 HeLa 细胞和 P815 细胞,于感染后 48h 收获细胞,对细胞总蛋白进行 SDS-PAGE 和 Western blot 分析,以检测目的蛋白的表达情况。

1.8 动物免疫及免疫小鼠血清抗体的检测

将 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)随机分成 4 组,每组 8 只,分别按 1×10^7 PFU/只腿部肌肉注射重组病毒 rFPV-GP-IL18、重组病毒 rFPV-GP、FPV 282E₄ 疫苗株和 PBS 溶液。每间隔 20d 加强免疫一次,第三次免疫 10d 后,免疫小鼠进行眼眶采血并分离血清,按试剂盒说明书介绍的双抗原夹心 ELISA 法检测血清抗体的水平。

1.9 免疫小鼠特异性 CTL 杀伤活性检测

采用乳酸脱氢酶释放法进行。在无菌条件下取小鼠脾脏,去除结缔组织后研磨过滤,制备淋巴细胞单细胞悬液。在正常同源小鼠的脾淋巴细胞中加入终浓度为 25μg/mL HIV-1 gp120 特异性多肽及 10 ng/mL IL-2,37℃ 5% CO₂ 培养箱中孵育 4h,经 80μg/mL 丝裂霉素 C 处理 2h,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 IL-2 的 1640 培养液,37℃ 5% CO₂ 共培养 5 d,调整细胞数为 1×10^7 细胞/mL,即得到效应细胞。将作者构建的表达 HIV-1 结构蛋白的 P815 细胞为靶细胞^[6],调整细胞浓度为 1×10^5 细胞/mL。效应细胞和靶细胞以 50:1 和 25:1 两个效靶比混合培养 4h 后,用酶标仪在波长 490 nm 处测定吸光度(A)值。特异性 CTL 杀伤率的计算,按细胞毒分析试剂盒说明书介绍的步骤进行,计算公式为:

杀伤效率(%)=

$$\frac{(\text{实验孔 A 值} - \text{靶细胞对照孔 A 值} - \text{效应细胞对照孔 A 值})}{(\text{靶细胞最大释放孔 A 值} - \text{靶细胞对照孔 A 值})} \times 100$$

2 结果

2.1 重组质粒的酶切鉴定及重组病毒的 PCR 鉴定

重组质粒的酶切鉴定图谱见图 1 和图 2。由图 1 可见,中间质粒 pUTA-IL18 经 *Hind* III 和 *Pst* I 及 *Cla* I 和 *Pst* I 双酶切后分别得到 0.5kb,7.3kb 大小的片段和 1.1kb,6.7kb 大小的片段,表明质粒构建正确。从图 2 可以看出,重组质粒 pUTA-GP-IL18 经 *Eco*RI 和 *Hind* III 双酶切及 *Bam*HI 单酶切后分别得到 2.8kb,6.6kb 大小的片段和 0.6kb,0.8kb,1.4kb,1.6kb,5.0kb 大小的片段,表明质粒构建正确。

单个病毒噬斑经纯化和扩毒后进行 PCR 扩增,PCR 扩增结果见图 3。由图 3 可见,阳性重组病毒基因组内含有 gp120 基因,有一条 1.4kb 的 DNA 条带,而 FPV 疫苗株未能扩增到 DNA 条带。

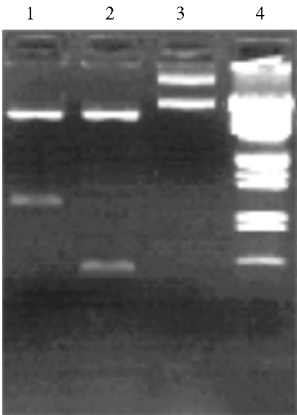


图 1 重组质粒 pUTA-IL18 酶切鉴定图谱

Fig.1 Enzyme-digestion profile of pUTA-IL18

1 pUTA-IL18/*Cla* I + *Pst* I ; 2 pUTA-IL18/*Hind* III + *Pst* I ;
3 pUTA-IL18 ; 4 λDNA/*Eco*R I + *Hind* III

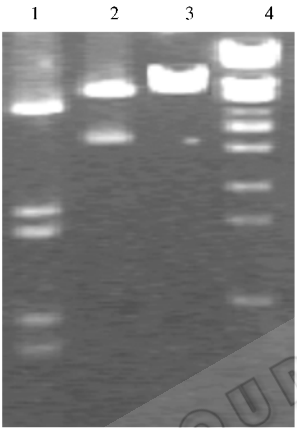


图 2 重组质粒 pUTA-GP-IL18 酶切鉴定图谱

Fig.2 Enzyme-digestion profile of pUTA-GP-IL18

1 pUTA-GP-IL18/*Bam*H I ; 2 pUTA-GP-IL18/*Eco*R I + *Hind* III ;
3 pUTA-GP-IL18 ; 4 λEcoT14 I

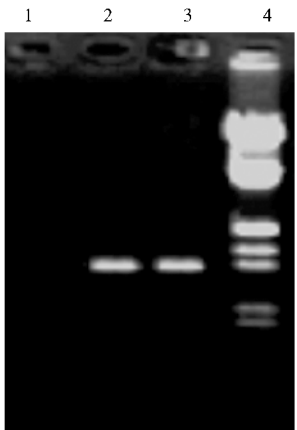


图 3 重组病毒的 PCR 鉴定

Fig.3 PCR identification of recombinant virus

1 rFPV ; 2 rFPV ; 3 Positive control ;
4 λDNA/*Eco*R I + *Hind* III

2.2 SDS-PAGE 和 Western blot 检测

将 PCR 阳性重组病毒感染的鸡胚成纤维细胞的裂解液上样进行 SDS-PAGE 和转膜后 ,分别与抗 HIV-1 gp120 单克隆抗体和碱性磷酸酶标记兔抗鼠 IgG 抗体反应 ,显色结果见图 4。由图 4 可见 ,重组病毒感染细胞裂解物在 120kD 处有一条特异性显色带 ,而 FPV 疫苗株感染细胞裂解物未见显色带 ,表明该重组病毒表达了 HIV-1 gp120 蛋白。用 IL-18 的单克隆抗体也同样检测到了 18kD 的目的蛋白带 ,表明重组病毒也表达了 IL-18 蛋白(图 5)。将该重组病毒分别感染 HeLa 细胞和 P815 细胞 ,细胞裂解液进行 SDS-PAGE 和 Western blot 分析 ,结果同样显示 ,阳性重组病毒也可在哺乳动物细胞中表达外源蛋白。

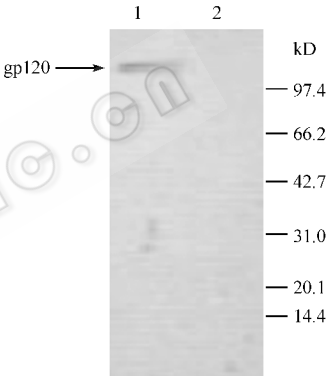


图 4 重组病毒表达的 gp120 蛋白的 Western blot 分析

Fig.4 Western blot analysis of gp120 protein expressed by rFPV

1 rFPV ; 2 FPV

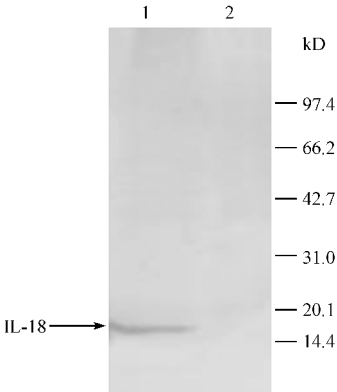


图 5 重组病毒表达的 IL-18 蛋白的 Western blot 分析

Fig.5 Western blot analysis of IL-18 protein expressed by rFPV

1 rFPV ; 2 FPV

2.3 重组病毒诱导小鼠血清抗体水平

利用双抗原夹心 ELISA 法检测结果显示(见表 1) 重组病毒 rFPV-GP-IL18 和 rFPV-GP 免疫组 8 只小鼠血清抗 HIV-1 IgG 的水平(以 A_{450nm} 表示)均显著

高于 FPV 疫苗株对照组($P < 0.01$)和 PBS 对照组($P < 0.01$),且两个重组病毒组之间也差异显著($P < 0.05$),表明 IL-18 可一定程度地增强重组病毒的抗体的反应。

2.4 重组病毒诱导特异性 CTL 杀伤活性

效应细胞和靶细胞以 50:1 和 25:1 两个效靶比

的 CTL 杀伤结果见表 1。从表 1 可以看出 ,重组病毒 rFPV-GP-IL18 免疫组小鼠脾特异性 CTL 杀伤活性明显高于 FPV 疫苗株对照组($P < 0.01$)和 PBS 对照组($P < 0.01$),且显著高于重组病毒 rFPV-GP 免疫组($P < 0.05$),表明 IL-18 发挥了免疫佐剂的作用 ,能使重组病毒诱导小鼠产生更强的 CTL 活性。

表 1 免疫小鼠脾淋巴细胞 CTL 细胞毒活性

Table 1 CTL cytotoxicity activity of spleen lymphocyte from the immunized mice

Group	n	Cytotoxicity/%		A_{450nm}
		50:1	25:1	
rFPV-GP-IL18	8	40.67 ± 8.96	31.99 ± 2.91	0.243 ± 0.020 *
rFPV-GP	8	35.08 ± 3.42	28.27 ± 3.16	0.209 ± 0.030
FPV	8	8.32 ± 3.71	8.76 ± 2.30	0.075 ± 0.013
PBS	8	7.52 ± 2.53	7.83 ± 1.37	0.065 ± 0.014

3 讨论

艾滋病已在全球范围内迅速蔓延 ,因此 ,研制安全、有效的疫苗是控制艾滋病发生的一个重要途径。由于 HIV 是一种高度变异的病毒 ,而且病毒核酸可以直接整合到人类基因组 DNA 中 ,所以无论是减毒活疫苗还是灭活疫苗 ,都不适用于艾滋病的预防。合成肽疫苗虽可以诱导有效的中和抗体产生 ,但不能保护机体免受病毒攻击 ,且成本高。因此研究重组病毒活载体疫苗已成为人们研究的热点。鸡痘病毒表达系统是继痘苗病毒以后又一种动物病毒载体 ,它作为载体除具有与痘苗病毒相同的优点 ,如基因组结构庞大 ,含有多个复制非必需区 ,可在其感染的细胞中忠实地进行修饰 ;外源基因的表达产物可以诱导机体产生持续时间较长的体液与细胞免疫反应 ;严格的胞浆内复制 ,避免了病毒基因重组入宿主细胞染色体的可能性 ,从而消除了重组病毒的应用对人类造成的潜在威胁。除此之外 ,鸡痘病毒的宿主范围较窄 ,它仅感染禽类 ,在哺乳动物体内产生一过性感染 ,或称为流产性感染 ,即它能有效感染一些哺乳动物的细胞和表达早期基因 ,也能产生一些晚期基因的表达和 DNA 复制 ,但不能发育成成熟的病毒粒子 ,然而这并不影响它对外源基因的正确表达 ,诱发机体产生免疫保护性^[7,8]。最为重要的是在重组鸡痘病毒中所表达的蛋白质可以进行翻译后加工、修饰 ,其中的许多过程与体内相类似 ,因此表达产物具有天然蛋白质的活性 ,并且保留了其相应的抗原性、免疫原性及功能。所以它不仅可以用来研

制禽类的基因工程活载体疫苗 ,而且可以作为非复制型病毒载体研制哺乳动物基因工程活载体疫苗 ,用于禽类以外的动物乃至人类疾病的防制。

鸡痘病毒同其它 DNA 病毒一样 ,其基因的表达调控主要是在转录水平上 ,表达水平主要决定于上游启动子的强弱 ,一般选用自身的强启动子。但由于鸡痘病毒自身启动子还很少 ,而鸡痘病毒和痘苗病毒二者之间 RNA 聚合酶可相互识别 ,所以目前多用痘苗病毒启动子用于构建鸡痘病毒载体 ,且将多个启动子串联可增强其效果。本研究将 HIV-1 中国流行株外膜蛋白 gp120 基因插入到本室自行构建的鸡痘病毒载体的复合启动子(AT1-P7.5)下游 ,同时将细胞因子 IL-18 插入到同一载体的串联启动子(16× P7.5)下游 ,构建了鸡痘病毒表达质粒 pUTA-GP-IL18 ,经同源重组、加压筛选和 PCR 检测后获得共表达 HIV-1 中国流行株外膜蛋白 gp120 与细胞因子 IL-18 的重组鸡痘病毒。Western blot 检测结果显示 ,获得的重组鸡痘病毒不仅能在感染的 CEF 细胞中表达外源蛋白 ,而且可在感染的 HeLa 细胞和 P815 细胞中表达外源蛋白 ,这表明重组鸡痘病毒可用于哺乳动物的基因工程疫苗载体。为了探索重组鸡痘病毒的免疫原性 ,作者将它免疫小鼠 ,并检测了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。血清抗体检测结果显示 ,重组病毒可诱导小鼠产生特异性体液免疫。CTL 杀伤活性检测结果显示 ,免疫小鼠的脾淋巴细胞可特异性杀伤表达 HIV-1 结构蛋白的 P815 细胞(靶细胞) ,表明重组病毒诱导了特异性细胞免疫。另外 ,本实验构建重组

鸡痘病毒 rFPV-GP-IL18 可比重组病毒 rFPV-GP 诱导小鼠产生更强的抗体反应和 CTL 杀伤活性 ,提示细胞因子 IL-18 能显著增强特异性体液免疫和细胞免疫 ,它发挥了免疫佐剂的作用。因此 ,该研究为我国 HIV-1 基因工程活载体疫苗候选株的筛选提供了实验数据。

REFERENCES(参考文献)

[1] Wyatt R , Sodroski J. The HIV-1 envelope glycoproteins :fusogens , antigens ,and immunogens. *Science* , 1998 , **280**(5371): 1884 – 1889

[2] Wyatt R , Kwong PD , Hendrickson WA *et al.* The antigen structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature* , 1998 , **393** (6686): 705 – 711

[3] Dinarello CA. IL-18 : A Th1-inducing proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family. *J Allergy Clin Immuno* , 1999 , **103**

(1 Pt 1): 11 – 24

[4] Jin NY(金宁一) , Fang HH(方厚华) , Guo ZR(郭志儒) *et al.* The expression of HIV-1 env gene in recombinant fowlpox virus. *Chinese Journal of Biologicals*(中国生物制品学杂志) , 1999 , **12** (4): 193 – 196

[5] Sambrook J , Fritsch EF , Maniatis T. *Molecular Cloning :A Laboratory Manual* . 2nd ed , New York :Cold Spring Harbor Laboratory Press ,1989

[6] Jiang WZ(江文正) , Jin NY(金宁一) . Identification and construction of target cell expressing the structural protein of HIV-1. *Chinese Journal of Biologicals*(中国生物制品学杂志) , 2003 , **16**(2): 66

[7] Somogyi P , Frazier J , Skinner MA. Fowlpox virus host range restriction : gene expression , DNA replication , and morphogenesis in non-permissive mammalian cells. *Virology* , 1993 , **197**(1): 439 – 444

[8] Taylor J , Weinberg R , Languet B *et al.* Recombinant fowlpox virus inducing protective immunity in non-avian species. *Vaccine* . 1988 , **6** (6): 497 – 503

Construction of Recombinant Fowlpox Virus Coexpressing gp120 of Chinese HIV-1 Strain and IL-18 and Its Immunogenicity in Mice

JIANG Wen-Zheng JIN Ning-Yi* LI Zi-Jian ZHANG Li-Shu HAN Wen-Yu
(Key Laboratory of Genetic Engineering of PLA , Quartermaster University of PLA , Changchun 130062 ,China)

Abstract To screening out Chinese vaccine candidate against HIV-1 , Chinese vaccine strain 282E4 of fowlpox virus was used as the vector to construct the recombinant fowlpox virus(rFPV) coexpressing gp120 of Chinese HIV-1 strain and IL-18 , and the recombinant virus was indentified by PCR and Western blot. The specific DNA fragment could be amplified by PCR from the genome of rFPV. Western blot analysis showed that gp120 and IL-18 could be expressed not only in chicken embryo fibroblast (CEF) cells infected by rFPV , but also in mammalian cells infected by rFPV. After the recombinant fowlpox virus was inoculated into BALB/c mice , the spleen specific CTL activities and serum antibodies in the immunized mice were detected , which demonstrated that the rFPV had good immunogenicity and could induce BALB/c mice to produce specific humoral and cellular immunity. IL-18 palyed the role of immunoadjuvant. The study lays the basis on the preparation of genetic engineering live vector vaccine against HIV-1.

Key words HIV-1 , gp120 , IL-18 , fowlpox virus , antibody , cytotoxicity T lymphocyte

Received : 09-15-2003

This work was supported by Grant from National 863 project (No. 2001AA215031)

* Corresponding author. Tel 86-431-6986747 ; Fax 86-431-7983165 ; E-mail :ningyij@yahoo.com