



## 论文

# HIV-1 病毒样颗粒疫苗的构建及免疫原性研究

张喜珍<sup>①②</sup>, 王晓丹<sup>①</sup>, 赵东海<sup>③</sup>, 孟祥玉<sup>①②</sup>, 赵兴红<sup>①②</sup>, 于湘晖<sup>①②\*</sup>, 孔维<sup>①②\*</sup>

① 吉林大学生命科学院, 艾滋病疫苗国家工程实验室, 长春 130012;

② 吉林大学生命科学院, 分子酶学教育部重点实验室, 长春 130012;

③ 吉林医药大学病理学教研室, 长春 132013

\* 联系人, E-mail: xianghui@jlu.edu.cn; weikong@jlu.edu.cn

收稿日期: 2011-05-25; 接受日期: 2011-10-25

国家自然科学基金(批准号: 30371317)资助项目

**摘要** 人免疫缺陷病毒 HIV 在全球的迅猛传播使得有效疫苗的研制工作变成重中之重。出于安全考虑, 减毒或灭活的 HIV 病毒不能作为疫苗应用, VLPs 则因为不具有病毒基因组而带来的安全性成为一个极具吸引力的选择。本研究通过共转染筛选得到了一个有效而持久表达 HIV-1 结构蛋白 *gag* 和 *env* 的真核细胞系, 证实了细胞培养上清中的 *gag* 和 *env* 能够自组装成为病毒颗粒。这些 VLPs 能够在不经佐剂加强的条件下诱导产生具有特异性的体液和细胞免疫应答。

**关键词**HIV-1  
共转染  
稳定表达细胞系  
病毒样颗粒(VLPs)  
疫苗

随着人类免疫缺陷病毒的不断传播, 研发一种安全、有效、经济的疫苗成为当务之急。要设计出一种有效的疫苗面临 3 个问题: 病毒的变异性、免疫逃逸和适当的评估免疫的动物模型<sup>[1]</sup>。为了克服免疫逃逸, 一个主要的办法就是要找到 HIV-1 蛋白的保守区, 例如结合到 CD4 细胞和 CCR5, CXCR4 上的外壳蛋白 *gp120* 的保守位点, 或者是另一个外壳蛋白 *gp41* 的复合受体结合位点<sup>[2-5]</sup>。HIV-1 病毒的变异性可以通过宿主免疫系统诱导中和抗体而得到解决。设计出一个预防性病毒样颗粒疫苗恰好能使上述 2 个问题得到解决<sup>[6]</sup>。HIV-1 VLPs 是以 *gag* 蛋白为基础构建出一个复合物结构, 这种结构能够自我组装成特定的-形态和大小都相似的不成熟 HIV-1 颗粒。由于没有感染性, 导致复制缺陷, VLPs 疫苗比传统的灭活疫苗和减毒疫苗更具安全性。VLPs 不同的形式使它有着独特的性质<sup>[7-10]</sup>。只有包装过的 VLPs 才能在表面表

达全长的结构蛋白, 尽量模仿原有的外壳三聚体结构<sup>[7,11,12]</sup>。对于不成熟的 HIV-1 病毒相似的抗原免疫系统有良好的应答<sup>[13]</sup>。VLP 抗原可以通过 MHC-I 和 MHC-2 途径被加工成递呈抗原, 诱导 CD4 和 CD8 介导的免疫应答<sup>[14-16]</sup>。上述情况表明, VLPs 即能够高效地诱导体液免疫, 也能高效地诱导细胞免疫。当务之急就是要设计出一种预防性的 HIV 疫苗, 在 HIV 病毒感染的初级阶段进行阻断, 从这方面来说, VLPs 疫苗是一个非常具有前景的重组疫苗。

目前, HIV-1 VLPs 疫苗正处于研制阶段<sup>[12,17-22]</sup>。VLPs 是现在最具潜力的候选疫苗, 但是它的免疫原型仍有待提高。本研究利用 2 种质粒共转染 293 细胞, 获得高效持续表达结构蛋白 *gag* 和 *env* 的真核细胞系。其分泌的病毒样颗粒疫苗在不添加任何佐剂的情况下就可以诱导特异性的体液免疫和细胞免疫应答。

## 1 材料与方方法

### 1.1 材料

pcDNA3.1(-)质粒、lipofectmin-2000 购于 Invitrogen 公司. D-GPEi, pcDNA 3.1 EnvB/C, pNL4-3.Luc.R-E 质粒和 HOS-CD4-CCR5、293 细胞等为本实验室保存. 用购于 Qiagen 的小提试剂盒提取质粒, 终产物不含内毒素(<2.5 U/mg). HIV-1 阳性血清来自广西 AIDS 病人. 抗人 HRP-IgG 购于 Jackson-Immuno 研究室, INC 和 G418 购于 Invitrogen 公司.

### 1.2 重组 293 细胞和 HIV-VLP 的构建与表达

D-GPEi 和 pcDNA3.1(-)共转染 293 细胞获得同时表达 HIV-1 结构蛋白 Gag 和 Env 的重组 293 细胞系. D-GPEi 含有 CMV 启动子, kanamycin 抗性基因, 原核细胞高拷贝因子和内含子 A. HIV-1 中国流行株的主要结构蛋白 *gagpol* 和 *env* 分别克隆进 Gag 融合和 Pol 的 N 末端表达载体的 2 个表达框<sup>[23]</sup>. 质粒的所有组装均符合美国 FDA 的临床实验安全管理标准, 并能够稳定高效的表达外源基因. 293 细胞培养用含 10% 小牛血清的 DMEM 基本培养基培养 (HyClone Laboratories). D-GPEi 和 pcDNA3.1(-)通过 lipofectmin-2000 共转染 293 细胞. 转染后 48 h 用胰酶消化重悬并系列稀释细胞, 培养基中加入 G418 抗生素使细胞回贴. 重组表达的 293 细胞在含有浓度为 1 mg/mL G418 的培养基中生长. 2~3 周后收获单克隆细胞并用 Western blot 检测表达情况. 收集阳性克隆细胞的培养上清, 4000 r/min 离心 30 min 去除细胞碎片, 离心后的上清液用 0.22  $\mu$ m 膜过滤. 滤过后的上清液在 4 $^{\circ}$ C 条件下用 Beckman 超速离心机 SW28 转头 26000 r/min 30%蔗糖垫, 1.5 h 离心 2 次, 沉淀收获后用免疫电子显微镜及 Western blot 检测分析.

### 1.3 免疫水平检测

选 6~8 周龄的雌性 BALB/c 小鼠, 每组 6 只, 通过小鼠尾静脉注射分别给予提纯后的 VLPs 0.5, 2.5, 12.5 和 25  $\mu$ g 4 个不同剂量和 100  $\mu$ g DNA 进行免疫. 对照组鼠注射去除内毒素的 PBS. 免疫方案以 3 针为基础, 初免后第 3 周和第 5 周给予加强免疫. 所有免

疫方案均不加佐剂.

### 1.4 样品收集处理

最后 1 针免疫后 1 周尾静脉取血收集单只动物血样, 用标准方法收获血清后 -80 $^{\circ}$ C 保存备用.

### 1.5 透射电子显微镜检测

病毒样颗粒通过铜网液滴化处理, 5 min 后用滤纸出去多余的液滴, 用 JEOL-8100 型电子显微镜在 200 kV 条件下进行透射电子显微镜分析.

### 1.6 CTL 检测

第 4 次免疫后 2 周取脾, 用在 1 mmol/L 的合成小肽 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h 条件下激活的  $1 \times 10^6$  个 P815 细胞作为靶细胞. 细胞毒性实验通过 CTL 试剂盒 (Promega) 用标准的检测乳酸脱氢酶释放测定法完成.

### 1.7 ELISPOT 实验

小鼠脾内的 HIV-1 特异性 T 细胞作用也可以用 ELISPOT 实验通过检测 HIV-1 抗原诱导 IFN- $\gamma$  的产生而间接检测出来, 结果根据鼠 IFN- $\gamma$  ELISPOT 试剂盒(BD)说明书来操作完成. 用 100  $\mu$ L 5  $\mu$ g/mL 抗 -IFN- $\gamma$  多克隆抗体预先包被底部为硝酸纤维素膜的 96 孔板并置于 4 $^{\circ}$ C 过夜, 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h. 分离后提纯后的脾细胞以一定浓度加到 96 孔板内, 每浓度 3 复孔, 并加入小肽(P7)刺激细胞, 96 孔板置于 37 $^{\circ}$ C 孵育 24 h. 弃去孔内液体, 洗板, 加入生物素化的抗 -IFN- $\gamma$  抗体 37 $^{\circ}$ C 孵育 1.5 h. 1/1000 稀释的辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗体孵育 1 h, 加入 HRP 底物 30 min 后显色, 流水洗去染色液, 晾干, 计数阳性斑点.

### 1.8 中和抗体检测

pcDNA 3.1 EnvB/C 和 pNL4-3.Luc.R-E 质粒共转染 293T 细胞. 转染后 48 h 收集细胞上清液, 上清液终浓度分别为 1:1, 1:2, 1:4 和 1:8 与血清样本于 37 $^{\circ}$ C 共孵育 1 h, 混合孵育后的液体通过 DEAE 感染表达 CD4-CXCR4 的 HOS 细胞. 72 h 收获 HOS 细胞, 裂解, 通过化学发光检测系统检测 (Promega Inc. USA), 化学发光的表达通过定量以相对光单位通过 Dynex MLX 化学发光检测仪完成, 中和抗体的抑制浓度通过线性回归曲线分析计算, 中和抗体的浓度

指的是混合孵育前的浓度。

### 1.9 统计学分析

方差分析值用 SPSS 13.0 软件得出.  $P < 0.05$  表明结果存在显著差异. 所有数据在标准误差范围内。

## 2 结果

### 2.1 HIV-1 *gagPol*, *env* 基因在 293 细胞的有效表达和 HIV-1 VLPs 的获得

D-GPEi 和 pCDNA 3.1 质粒共转染重组的 293 细胞, pCDNA 3.1 具有带筛选标记的 G418 抗性基因, 能够增加目的基因的整合效率。

为用 pcDNA3.1(-) 载体成功的构建表达目的基因的的稳定表达细胞系, 本研究选择 D-GPEi 和 pcDNA3.1 的比例为 3:1 共转染 293 细胞, 48 h 更换加入 G418 的选择培养基, 并筛选表达 HIV-1 结构蛋白 *gagpol* 和 *env* 的阳性克隆细胞, 3 周后 Western blot 检测(结果未显示). 为了检测阳性克隆细胞蛋白的分泌, 细胞上清中通过 30% 蔗糖垫密度离心, 沉淀用 PBS 重悬, 并通过 SDS-PAGE 和 Western Blot 检测(图 1)。

### 2.2 细胞表达的稳定性

为检测细胞表达的稳定性, 将筛选的阳性克隆细胞持续培养 12 个月, 培养 1 个月和 12 个月的细胞裂解产物均检测到 HIV-1 *gagpol* 和 *env* 蛋白的表达, 结果表明, 目标蛋白能够在细胞内持久稳定的表达. 在稳定表达的细胞上清中也可以检测到 HIV-1VLP 的分泌(图 2)。

### 2.3 HIV-1 VLPs 的组装

为研究 HIV-1 *gagpol* 和 *env* 蛋白的合成与组装, 收集阳性细胞上清, 通过 10%~40% 蔗糖密度梯度, 4℃ 条件下, 26000 r/min 离心 4 h, 通过低密度分泌至 40% 和 30% 密度层, 免疫印迹结果表明, 蛋白能够组装成病毒样颗粒(VLP), 颗粒中包含 HIV-1 结构蛋白 *gagpol* 和 *env*(图 3)。

### 2.4 VLPs 的形态学分析

HIV-1 VLPs 的分子量太大不能用非变型聚丙烯

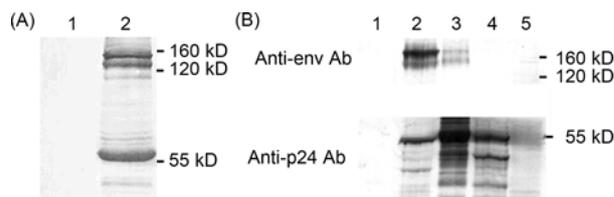


图 1 病毒样颗粒的产生和分析通过材料方法中描述的免疫蛋白印迹分析

(A) 提纯后的 VLP 的与 HIV-阳性血清作用的免疫印记结果. 1: 空白细胞上清; 2: 提纯后的 VLP. (B) 阳性细胞与提纯后的分别与 P24 单抗和多克隆 gp120 抗体作用后的免疫印记结果. 1: 空白; 2-4: 不同阳性克隆

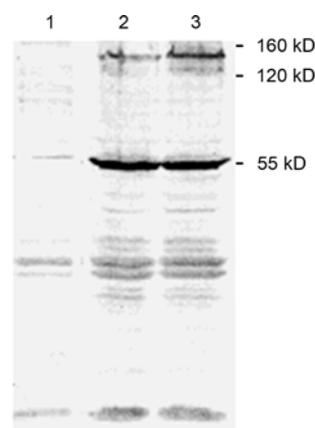


图 2 持续培养 12 个月的阳性细胞裂解物的免疫印迹分析  
1: 空白细胞裂解; 2: 培养 1 个月细胞裂解产物; 3: 培养 12 个月细胞裂解产物

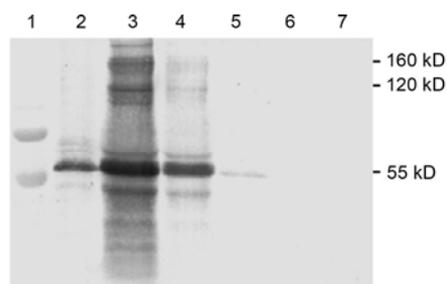


图 3 VLPs 的梯度分析阳性克隆细胞上清通过 30%~40% 密度梯度蔗糖垫

sw28 转头在 4℃ 条件下 26000 r/min 离心 4 h 从底部到顶部收集离心产物(从左到右)蛋白电泳后用抗 HIV-1 阳性血清作用后免疫印迹分析. 1: Marker; 2: 底部沉淀; 3-6: 40%~10% 梯度层; 7: 上清层

酰胺凝胶电泳或者 MALDI-TOF 飞行质谱分析. 为证实 HIV-1 结构蛋白 *gag* 和 *env* 确实组装成了病毒样颗粒, 通过透射电子显微镜观测阳性细胞培养上清液

通过 30%蔗糖垫超速离心后的样品. 数据结果表明, 结构蛋白组装成了直径大约 100 nm 的与天然病毒大小相近的病毒样颗粒(图 4).

### 2.5 HIV-1 特异的抗体反应

免疫后血清抗体的特异性通过免疫印迹检测. 如图 5 所示, 疫苗免疫后引起了特异的抗体反应, 没有其他的免疫原性产生也没有免疫原性的改变. 2.5~25  $\mu\text{g}$  VLPs 产生的 HIV-1-Gag 特异的抗体反应比 100  $\mu\text{g}$  DNA 抗体强.

### 2.6 HIV-1 特异的 CTL 反应

病毒样颗粒将通过 MHC I 类途径被抗原提呈细胞(APCs)提呈给  $\text{CD8}^+\text{T}$  细胞产生细胞毒性反应<sup>[14]</sup>. 为检测 T 细胞反应强弱, 以 3 针的免疫程序分别给予小鼠免疫 VLPs 不同剂量(0.5, 2.5, 12.5 和 25  $\mu\text{g}$ ) 和 DNA 100  $\mu\text{g}$ . 最后一针免疫 1 周后, 通过 P815/BALB/c 靶细胞杀伤实验作为 HIV-1 特异性的  $\text{CD8}^+\text{T}$  细胞体外评价. 0.5  $\mu\text{g}$  VLPs 组和 DNA 组 CTL 反应低, 随着注射剂量的增加反应增强. CTL 反应以 12.5  $\mu\text{g}$  剂量组为最强, 25  $\mu\text{g}$  VLPs 组与之比较反应没有明显

改变, 因此认为 12.5  $\mu\text{g}$  VLPs 即可引起足够的 CTL 反应(图 6), 并且 CTL 的抗原表位主要存在于 GAG 的 NC 区(p7). 在 BALB/c 免疫保护的有效性的不能给予评价.

### 2.7 IFN- $\gamma$ ELISPOT 实验表明 VLPs 免疫能够引起 HIV-1 特异的 CTL 反应

在自然感染阶段, HIV-1 特异的 Th1 细胞、CTL 作用以及抗病毒的细胞因子(IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2)在对抗病毒方面起主要作用<sup>[24]</sup>. ELISPOT 实验检测 HIV-1 特异的  $\text{CD8}^+\text{T}$  细胞分泌 IFN- $\gamma$  的分泌量. 25  $\mu\text{g}$  剂量和 12.5  $\mu\text{g}$  剂量的 VLPs 产生的免疫效果相同, 0.5 和 2.5  $\mu\text{g}$  剂量的免疫都不如 12.5  $\mu\text{g}$ . 这表明 12.5  $\mu\text{g}$  已经能够足够来诱导细胞免疫了(图 7).

### 2.8 VLPs 诱导产生中和抗体与抗体水平

pNL4-3.Luc.R-E 质粒包含荧光素酶和 HIV-1 全套基因组, 除了 *env* 的移码突变. 293T 细胞能够通过共转染包含 *env* 基因的 pNL4-3.Luc.R-E 质粒和 pcDNA 3.1 EnvB/C 质粒, 表达 HIV-1 结构蛋白 *gag* 和 *env*, 这 2 种蛋白能被整合到病毒颗粒中, 使颗粒也包含荧光素. 颗粒被称作假病毒, 没有复制性, 但仍然能够感染 HOS-CD4-CCR5 细胞, 感染水平能够通过荧光素酶含量被检测到. 中和作用可以通过血样与转染后的细胞上清共孵育后的荧光素酶含量值变化而测出. 结果表明, 0.5  $\mu\text{g}$  的 VLPs 就可以诱导出中和抗体. 抗体水平随免疫剂量的增加而增加. 结果还表明, 抗体也能够中和假病毒的感染性. 中和抗体的结合表位主要在 *Pr55* 和 *gp120* 上. 诱导抗

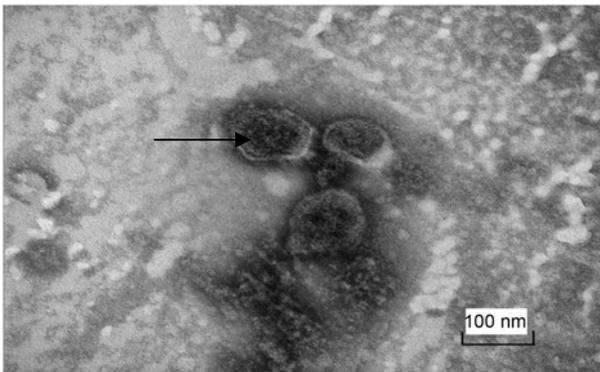


图 4 VLP 的透射电子显微镜结构

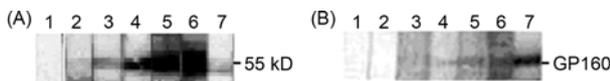


图 5 免疫鼠血清的抗体的 HIV-1 Gag 和 Env 蛋白的免疫印迹检测

收集 3 针免疫后的鼠血清 1:20 稀释(6 只鼠为一组). (A) 1: PBS 对照组; lane 2~5: VLP 0.5, 2.5, 12.5 和 25  $\mu\text{g}$ ; 6: 阳性对照组; 7: DNA 100  $\mu\text{g}$ . (B) 1: PBS 对照组; 2: DNA 100  $\mu\text{g}$ ; 3~6: VLP 0.5, 2.5, 12.5 和 25  $\mu\text{g}$ ; 7: 阳性对照组

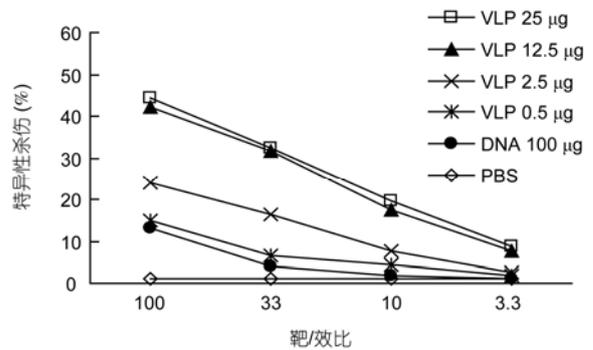


图 6 收集免疫鼠的脾细胞进行细胞毒性分析

用小肽刺激的 P815 细胞作为靶细胞, 通过乳酸脱氢酶的释放情况检测特异的细胞裂解

体最多的 VLPs 剂量为 12.5 和 2  $\mu\text{g}$ , 并且 DNA 引起的中和抗体水平较所有剂量的 VLPs 都低, 此结果表明, VLP 免疫诱导中和抗体的能力强与 DNA, 并且它的最佳剂量为 12.5  $\mu\text{g}$ . 血清 1:2 和 1:4 倍稀释后抗体的中和活力下降, 说明中和抗体是 HIV-1 特异的 (图 8).

### 3 讨论

与减毒活疫苗相比, VLPs 疫苗的主要优势是 VLP 能够表达多种抗原表位, 能够刺激机体产生多样化的免疫应答, 并且没有减毒活疫苗那样的负面影响. VLP 有潜力激发出体内和体外两种抗原递呈方式, 能够通过 MHC-1 途径和 MHC-2 途径进行抗原递呈. 这种多抗原表位疫苗比单一组分疫苗更能产生广泛的免疫应答, 并且能够清除 HIV-1 的逃逸突变

体. VLPs 疫苗在将来的一期临床试验中比多种单一疫苗共同注射更经济便宜. 比起单独的重组蛋白疫苗的另一个优点就是结合进入细胞后的表达适当受体的能力好. HIV-1 VLPs 疫苗能够通过 *gp120* 结合到 CD4 和趋化因子受体上进而进入到专门的抗原递呈细胞当中, 比如巨噬细胞和树突状细胞当中(两种细胞型都表达 CD4 和 CCR5).

病毒蛋白在感染之后能够被加工和递呈到 MHC 分子, 因此, 促进 T 细胞的 APCs 递呈. 另外, 结合到抗体上的 VLPs 能够通过 Fc 受体被巨噬细胞吞噬掉, 因此, 又增加了 MHC 途径的抗原递呈.

VLPs 已经在杆状病毒和酵母的系统中表达过<sup>[25-27]</sup>. 这些系统能够从真核细胞中产生出大量的颗粒. 但它们都受一定的限制只能表达单一的基因, 不易用来生产多基因的 VLPs. 另外, 要使颗粒从酵母中出芽, 外膜也需要被移除掉.

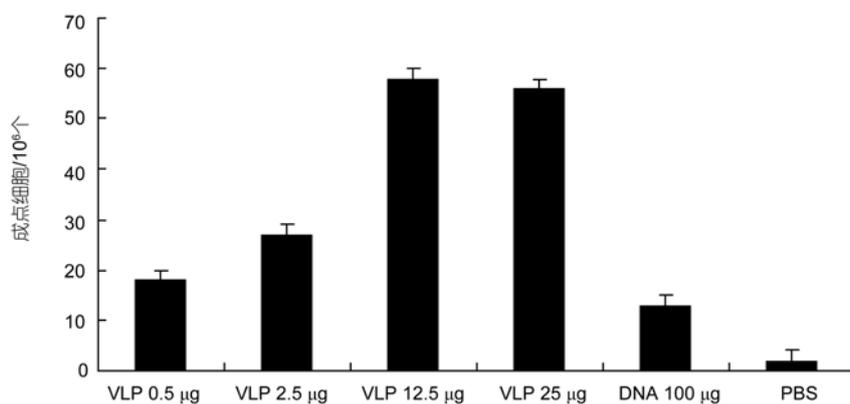


图 7 VLP 疫苗和 DNA 疫苗肌肉注射后, 脾细胞分泌出 IFN- $\gamma$   
每个柱形条代表每 10<sup>6</sup> 个细胞内分泌的 IFN- $\gamma$  量

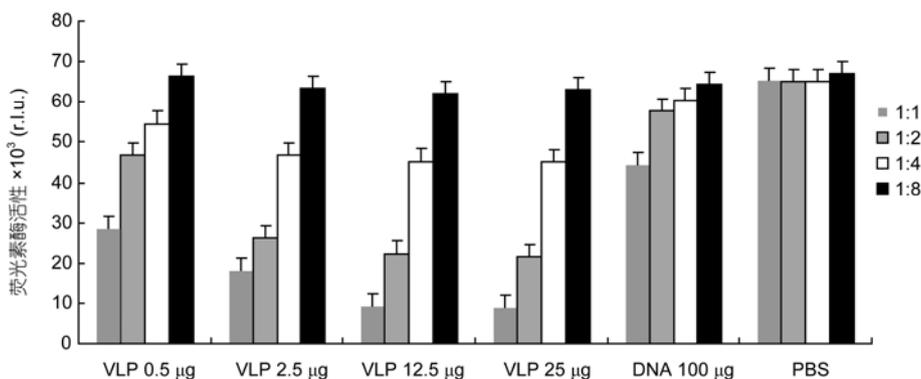


图 8 假病毒感染 HOS-CD4-CCR5 细胞后荧光素酶终点检测

共转染细胞上清和血清样本共同孵育感染细胞. 结果表明检测到了细胞内荧光素酶的表达. 该数据是通过 3 次平行实验得出的结果

为克服上述不足, 本研究首先利用2种质粒进行共转染, 用新霉素作为稳定筛选标记, 最终筛选出了能够高效稳定表达主要结构蛋白 *gagpol* 和 *env* 的真核细胞系. *gag* 蛋白可以自动组装到 VLPs 中, 而 *env* 蛋白的存在可以提供更多的抗原决定簇<sup>[22]</sup>, 于是可以利用 *gag* 蛋白的自组装结构和共表达的 *gag* 和 *env* 来生产 VLPs 颗粒. 实验证明, 这个细胞系不仅生产

出的 VLPs 性质稳定, 数量也多.

通过本研究的方法生产的 VLPs 不带病毒的核酸是安全的, 还能诱导出强的体液免疫和细胞免疫, 为 HIV-1 疫苗提供了广阔的应用前景. 由于表达的 *gagpol* 和 *env* 具有与野生 HIV-1 病毒相似的结构, 要确定这个细胞系是否是最佳的候选疫苗, 接下来仍需做许多工作, 以便为将来的优化提供更可靠的证据.

**致谢** 感谢于晓方教授对本研究的建议和技术上的指导.

## 参考文献

- Gamble L J, Matthews Q L. Current progress in the development of a prophylactic vaccine for HIV-1. *Drug Des Devel Ther*, 2010, 5: 9–26
- Fenouillet E, Barbouche R, Jones I M. Cell entry by enveloped viruses: redox considerations for HIV and SARS-coronavirus. *Antioxid Redox Signal*, 2007, 9: 1009–1034
- Devico A, Fouts T, Lewis G K, et al. Antibodies to CD4-induced sites in HIV gp120 correlate with the control of SHIV challenge in macaques vaccinated with subunit immunogens. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 17477–17482
- Doms R W, Moore J P. HIV-1 membrane fusion: Targets of opportunity. *J Cell Biol*, 2000, 151: F9–F14
- Wyatt R, Sodroski J. The HIV-1 envelope glycoproteins: Fusogens, antigens, and immunogens. *Science*, 1998, 280: 1884–1888
- Tagliamonte M, Tornesello M L, Buonaguro F M, et al. Conformational HIV-1 envelope on particulate structures: a tool for chemokine coreceptor binding studies. *J Transl Med*, 2011, 9(Suppl 1): S1
- Buonaguro L, Buonaguro F M, Tornesello M L, et al. High efficient production of Pr55(gag) virus-like particles expressing multiple HIV-1 epitopes, including a gp120 protein derived from an Ugandan HIV-1 isolate of subtype A. *Antiviral Res*, 2001, 49: 35–47
- Gheysen D, Jacobs E, D E Foresta F, et al. Assembly and release of HIV-1 precursor Pr55gag virus-like particles from recombinant baculovirus-infected insect cells. *Cell*, 1989, 59: 103–112
- Yamshchikov G V, Ritter G D, Vey M, et al. Assembly of SIV virus-like particles containing envelope proteins using a baculovirus expression system. *Virology*, 1995, 214: 50–58
- Wagner R, Deml L, Fliessbach H, et al. Assembly and extracellular release of chimeric HIV-1 Pr55gag retrovirus-like particles. *Virology*, 1994, 200: 162–175
- Wang B Z, Liu W, Kang S M, et al. Incorporation of high levels of chimeric human immunodeficiency virus envelope glycoproteins into virus-like particles. *J Virol*, 2007, 81: 10869–10878
- Crooks E T, Moore P L, Franti M, et al. A comparative immunogenicity study of HIV-1 virus-like particles bearing various forms of envelope proteins, particles bearing no envelope and soluble monomeric gp120. *Virology*, 2007, 366: 245–262
- Yao Q, Bu Z, Vzorov A, et al. Virus-like particle and DNA-based candidate AIDS vaccines. *Vaccine*, 2003, 21: 638–643
- Bachmann M F, Lutz M B, Layton G T, et al. Dendritic cells process exogenous viral proteins and virus-like particles for class I presentation to CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes. *Eur J Immunol*, 1996, 26: 2595–2600
- Deml L, Kratochwil G, Osterrieder N, et al. Increased incorporation of chimeric human immunodeficiency virus type 1 gp120 proteins into Pr55gag virus-like particles by an Epstein-Barr virus gp220/350-derived transmembrane domain. *Virology*, 1997, 235: 10–25
- Reimann J, Schirmbeck R. Alternative pathways for processing exogenous and endogenous antigens that can generate peptides for MHC class I-restricted presentation. *Immunol Rev*, 1999, 172: 131–152
- Visciano M L, Diomedea L, Tagliamonte M, et al. Generation of HIV-1 Virus-Like Particles expressing different HIV-1 glycoproteins. *Vaccine*, 2011
- Speth C, Bredl S, Hagleitner M, et al. Human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) Pr55gag virus-like particles are potent activators of human monocytes. *Virology*, 2008, 382: 46–58
- Deml L, Speth C, Dierich M P, et al. Recombinant HIV-1 Pr55gag virus-like particles: potent stimulators of innate and acquired immune responses. *Mol Immunol*, 2005, 42: 259–277

- 20 Doan L X, Li M, Chen C, et al. Virus-like particles as HIV-1 vaccines. *Rev Med Virol*, 2005, 15: 75–88
- 21 Lebedev L R, Karpenko L I, Poryvaeva V A, et al. Design of virus-like particles, exposing HIV-1 epitopes. *Mol Biol(Mosk)*, 2000, 34: 480–485
- 22 Young K R, Mcburney S P, Karkhanis L U, et al. Virus-like particles: designing an effective AIDS vaccine. *Methods*, 2006, 40: 98–117
- 23 姜春来. 细胞因子对 HIV-1 疫苗 DNA prime/MVA boost 的加强作用. 长春: 吉林大学, 2005
- 24 Seder R A, Hill A V. Vaccines against intracellular infections requiring cellular immunity. *Nature*, 2000, 406: 793–798
- 25 Wagner R, Fliessbach H, Wanner G, et al. Studies on processing, particle formation, and immunogenicity of the HIV-1 gag gene product: a possible component of a HIV vaccine. *Arch Virol*, 1992, 127: 117–137
- 26 Sakuragi S, Goto T, Sano K, et al. HIV type 1 Gag virus-like particle budding from spheroplasts of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 7956–7961
- 27 Tsunetsugu-yokota Y, Morikawa Y, Isogai M, et al. Yeast-derived human immunodeficiency virus type 1 p55(gag) virus-like particles activate dendritic cells (DCs) and induce perforin expression in Gag-specific CD8(+) T cells by cross-presentation of DCs. *J Virol*, 2003, 77: 10250–10259