

## 重组 IL-18BP 拮抗重组鸡 IL-18 刺激外周血单核细胞产生 IFN- $\gamma$ 的作用

刘文强, 刘桂芹, 秦绪岭, 王桂英

(聊城大学农学院, 聊城大学畜禽疫病防治技术研究所, 聊城 252059)

**摘要:**【目的】白细胞介素-18 通过激活 Th1 细胞和 NK 细胞产生 IFN- $\gamma$  而发挥关键的免疫调节作用。人和小鼠分泌的白细胞介素-18 结合蛋白(IL-18BP)可以拮抗其活性。推测在鸡痘病毒基因组中也含有 IL-18BP 基因的同源物,对其表达的蛋白质进行了活性鉴定,为拮抗 IL-18 主导的疾病提供理论依据。【方法】根据鸡痘病毒基因组的序列设计特异性引物,使用 PCR 方法从中分离 cIL-18BP 基因,将该基因克隆到酵母表达载体 pPICZ $\alpha$ A 中,甲醇诱导后在酵母 GS115 中进行表达。对表达的重组蛋白进行了活性鉴定。【结果】从鸡痘病毒中克隆到 cIL-18BP 基因,SDS-PAGE 鉴定了该基因在酵母系统中的高效表达。ELISA 检测表明纯化后的 cIL-18BP 与重组鸡(c)IL-18 发生特异性结合;通过测定 IFN- $\gamma$  的浓度,表明该蛋白具有拮抗 IL-18 刺激外周血单核细胞(PBMCs)和 MSB1 细胞分泌 IFN- $\gamma$  的活性。【结论】实验表明,cIL-18BP 通过抑制 cIL-18 刺激相关免疫细胞分泌 IFN- $\gamma$  而发挥对 IL-18 的拮抗作用,敲除该基因可能有助于研制更安全和高效的鸡痘疫苗。

**关键词:** 鸡痘病毒;IL-18 结合蛋白;活性

**中图分类号:** S852.65      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2010) 04-0506-06

白细胞介素-18(Interleukin-18, IL-18),属于 IL-1 家族成员,是机体先天性和获得性免疫的重要调节因子<sup>[1-2]</sup>。IL-18 促进小鼠脾细胞生成 IFN- $\gamma$ ,并可以强化 T 细胞及 NK 细胞的成熟、细胞因子的分泌及细胞毒作用的产生<sup>[3-4]</sup>,IL-18 还在某些抗变态反应的病理过程中出现<sup>[5-6]</sup>。对 IL-18 生物学特性的研究发现,它在某些疾病病理状态、自身免疫性疾病及感染中作为重要的效应因子而发挥上层调节作用<sup>[6]</sup>和免疫介导功能。近来,IL-18 受体及其转导机制的研究也取得了较大进展。已经发现的与 IL-18 受体有关的蛋白质有 3 种,第 3 种是 IL-18 结合蛋白(IL-18BP),可以在体外消除 IL-18 诱导的 IFN- $\gamma$  和 IL-8 的生成及对 NF $\kappa$ B 的激活,可视为 IL-18 的拮抗剂<sup>[7]</sup>。IL-18BP 在脾脏中呈组成性表达,属于免疫球蛋白超家族中的成员,其基因定位于人染色体的

11q13,其氨基酸序列与已知的细胞因子受体氨基酸序列及空间结构均不相同,到目前为止一直无法找到编码其跨膜区的外显子序列。尽管 IL-18BP 与 L-18R $\alpha$  没有同源性,结构也不相同,但是小鼠和人的 IL-18BP 均能抑制 IL-18 与其受体的结合。

虽然一直没有发现 IL-18BP 基因的外显子序列,但人和小鼠痘病毒编码的一些蛋白质,如 MC53L 和 MC54L 与人和小鼠的 IL-18 具有很好的亲和性,能抑制 IL-18 诱导产生 IFN- $\gamma$  的活性,可能是痘病毒逃避机体免疫作用的机制之一,而且这两个基因编码的序列与以前捕获的 IL-18BP 蛋白有着高度的同源性<sup>[7-8]</sup>。此后,对于 IL-18BP 的研究都是围绕着正痘病毒属的几种病毒进行的,已经发现小鼠痘病毒(EV)、人痘病毒(VV)和接触性软疣病毒(MCV)和羊痘病毒的基因组都含有编码 IL-

**基金项目:** 国家自然科学基金(30800130);山东省中青年科学家奖励基金(2006BS02012);聊城大学博士基金(31805)

**作者简介:** 刘文强(1977-),男,山东临清人,博士,副教授,研究方向为动物传染病学。Tel: +86-635-8239959; E-mail: liuwqsky@sina.com

**收稿日期:** 2009-08-16; **修回日期:** 2010-01-20

18BP 的基因序列<sup>[5,8]</sup>。其它的痘病毒,如猴痘病毒、猪痘病毒、禽痘病毒(FPV)也可能含有该基因的同源物。在 Afonso CL 等完成的鸡痘病毒(FPV)基因组序列中推测有一段基因可能编码 IL-18BP 的同源物<sup>[9]</sup>。本文对该来源于鸡痘病毒中的 cIL-18BP 基因进行了克隆和真核表达,并研究了该重组蛋白抑制 IL-18 诱生 IFN- $\gamma$  的生物学活性。这为研究 IL-18 主导疾病发生机制及治疗提供了理论和实践依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 病毒:** 鸡痘鹌鹑化疫苗弱毒,批号 2008120514,齐鲁动物保健品有限公司。

**1.1.2 质粒:** 穿梭酵母表达质粒 pPICZ $\alpha$ A,毕式酵母菌 GS115 来源于中国动物卫生与流行病学中心, TG1 宿主菌保存于本实验室。

**1.1.3 主要试剂和仪器:** 病毒基因组 DNA 小量纯化试剂盒、PCR 反应试剂盒以及内切酶等分子生物学试剂购自宝生物(大连)公司。刀豆蛋白(Con)A 和 RPM11640 购自 Sigma 公司。cIL-18 标准品及其 HRP 酶标鼠抗鸡 IL-18 mAb 和 cIFN- $\gamma$  ELISA 试剂盒均购自 Biosource 公司。重组 cIL-18 系从 MSB1 细胞中以一对特异性引物<sup>[10]</sup>(上游引物: 5'-CGCGAATTCGCCCTTTTGTAAAGGATAAAACT-3', 下游引物: 5'-CCCGTCTGACTCATAGGTTGTGCCTTTCATT-3')克隆,经原核表达并层析纯化。酶标仪(M680 型)购自 BIO-RAD 公司。

### 1.2 病毒和模板 DNA 的处理

鸡痘鹌鹑化疫苗弱毒使用生理盐水稀释后,使用病毒基因组 DNA 小量纯化试剂盒提取胚体中的 DNA 作为模板,以适量的双纯水溶解 DNA,进行紫外分析定量<sup>[7,10]</sup>。

### 1.3 PCR 扩增 cIL-18BP 基因

比较 GenBank 收录的 VV Lister 株, MCV Madrid99 株, EV Moscow 株和鸡痘病毒基因组序列 FPV073 (GenBank 序号: AF110798), 设计一对特异性引物, 扩增 cIL-18BP 的完整阅读框。上游引物(5'-CGCTCTAGAATGATCTCTTTCAAAAA-3', 含有 Xba I 酶切位点)和下游引物(5'-ATACCTCGAGATCGCTATTTCGATGACAT-3', 含 Xho I 酶切位点), 测序引物由上海生工公司合成。

以上述总 DNA 5  $\mu$ g 为模板, 加入设计的一对引物, 在 25  $\mu$ L 体系中进行 PCR 反应: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C

45 s, 65 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

### 1.4 酵母表达的 cIL-18BP 穿梭表达质粒的构建

胶回收试剂盒回收的 PCR 产物, 经 Xba I 和 Xho I 分别酶切纯化后与同样经过酶切纯化的载体 pPICZ $\alpha$ A 在 T4 DNA 连接酶的作用下进行连接反应, 挑取白色菌斑, 接种于含 Zeocin (25  $\mu$ g/mL) 的 LB 培养液中, 转化入 *E. coli* TG1。PCR 筛选阳性克隆, 对阳性克隆的插入片段进行 DNA 测序。重组质粒命名为 pPICZ $\alpha$ A-c18BP。

用 Sal I 酶线性化载体, 电泳确定是否全部线性化, 通过电穿孔转化毕赤酵母 GS115, 涂布 MD 平板, 30 $^{\circ}$ C 培养 2-4 d, 挑取生长较快的大菌落用含 G418 浓度梯度为 1.0、2.0 mg/mL 的 YPD 培养基中, 筛选多拷贝重组菌株。同时取少量菌落消化后为模板, 应用质粒携带的测序引物 5'-AOX 和 3'-AOX 进行 PCR 扩增整合到酵母染色体内目的基因, 同时酶切鉴定<sup>[10]</sup>。

### 1.5 cIL-18BP 基因的表达和鉴定

挑取 Zeocin 抗性高的 cIL-18BP 酵母转化子, 接种到 BMGY 培养液中 30 $^{\circ}$ C 振荡培养, 转到 MMY 培养液悬浮培养, 按 1% 转接于 1 L 瓶中, 继续振荡培养至  $OD_{600}$  约为 0.6 后, 换 BMMY 液体培养基 50 mL 培养。每隔 12 h 取样, 补加甲醇保持 24 h 内甲醇含量为 10 g/L。4 d 后取上清液进行 SDS-PAGE。用 10 倍体积的 Column Buffer 平衡几丁质柱子, 酵母培养上清加入几丁质柱子, 使其流量小于 0.5 mL/min。加入 Cleavage Buffer, 关闭柱子出口, 4 $^{\circ}$ C 过夜。第 2 日用 Column Buffer 冲洗柱子, 收集液体, 得到纯化后的 cIL-18BP。

测定纯化的重组蛋白质溶液在 280 nm 和 260 nm 处的吸光度值, 计算蛋白质浓度。

### 1.6 cIL-18BP 重组蛋白与 cIL-18 的结合

为了检测载体所表达的 cIL-18BP, 将纯化的重组蛋白稀释到不同浓度, 0.1 mL 加入聚乙烯孔内, 4 $^{\circ}$ C 培养 24 h, 经  $OD_{450}$  测定 1.0  $\mu$ g/mL 为最适包被浓度, 设 4 个重复孔。将等量的 cIL-18 重组蛋白作为抗体加入反应孔中, 置于 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 然后洗涤。同时设空白孔、阴性对照孔及包被 cIL-18 标准品的阳性对照孔。加入新鲜稀释 1000 倍的 HRP 酶标抗体(鼠抗鸡 IL-18 mAb) 0.1 mL, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 洗涤后加底物显色。以空白对照孔在  $OD_{450}$  处调零后测定各孔值, 若大于规定的阴性对照值的 2.1 倍, 即为阳性, 可以确定二者的结合。每个孔做两个重复, 取平均值。以测定值和阳性对照值的比率确定

二者的结合率。

### 1.7 cIL-18BP 抗 cIL-18 的活性,通过测定重组蛋白对分泌 IFN- $\gamma$ 的影响来确定

**1.7.1** cIL-18BP 在 PBMCs 细胞上的拮抗 cIL-18 活性<sup>[10]</sup>: 制备 SPF 鸡 (山东省农科院 SPF 鸡场) PBMCs, 使用 RPMI1640 (含有 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ConA) 将其稀释为  $2 \times 10^6/\text{mL}$ , 在 96 孔板上  $37^\circ\text{C}$  培养 2 h。将 10 ng/mL 的重组 cIL-18<sup>[6]</sup> 与不同浓度的纯化 cIL-18BP (3.7、7.5、15、30、60 和 120 ng/mL) 置于室温共同孵育 2 h 后<sup>[5]</sup>, 按照每孔 20  $\mu\text{L}$  加到细胞上, 同时设 cIL-18 对照、cIL-18BP 组和空白对照。置  $37^\circ\text{C}$  培养 24 h 后, 将细胞培养物以 2000 r/min 离心 10 min 后, 取上清液用特异的 cIFN- $\gamma$  ELISA 试剂盒检测 IFN- $\gamma$  的浓度。主要操作是: 将上清液 4 倍稀释, 固定, 依次加入 IFN- $\gamma$  单抗及 HRP 标记的羊抗鼠二抗, 同时加标准品及空白对照, 孵育, 洗涤, 然后, 加入底物各 50  $\mu\text{L}$ , 避光室温显色 10 min, 加终止液, 在酶标仪内于 450nm 处读数。每个孔做两个重复, 取平均值。SPSS 软件处理数据, 数据用  $\chi \pm s$  表示, 进行方差分析 (P 值)。

**1.7.2** cIL-18BP 在 MSB1 细胞上的拮抗 cIL-18 活性: 培养 MSB1 细胞, 按照 1.7.1 方法所述检测 cIL-18BP 与 cIL-18 结合后, 抑制对 MSB1 细胞分泌 cIFN- $\gamma$  的活性。

## 2 结果

### 2.1 cIL-18BP 基因的分离

以 FPV DNA 作为模板, 经 PCR 扩增得到 521 bp 的目的片段, 对其进行了克隆和序列测定。序列分析表明该基因位于 PFV 基因组的 76782 - 76261 位, 编码 174 个氨基酸的多肽序列, 与登记的序列完全一致。该基因克隆到 pPICZ $\alpha$ A 载体中, 重组质粒命名为 pPICZ $\alpha$ A-c18BP (图 1)。

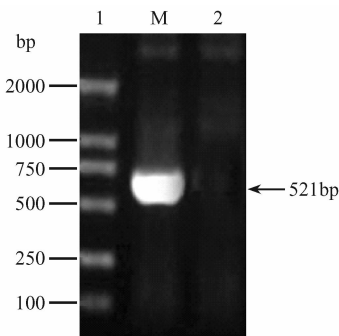


图 1 重组 cIL-1BP 基因片段的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification result of cIL-18BP gene. M. DL 2000 Marker; 1. cIL-18BP gene; 2. Negative control.

### 2.2 毕赤酵母转化子鉴定和高拷贝表达盒的筛选

重组质粒经酶切线性化回收, 转化酵母, MD 抗性筛选, 获得了抗 2 mg/mL G418 的酵母转化子 2 个。经特异性质粒携带的引物进行 PCR 鉴定, 2 个转化子都整合有目的基因, 如图 2 所示。转化子和重组质粒都可以扩增出 1109 bp 的片段, 而原始空白质粒及其转化的酵母转化子只扩增出约 588 bp 的片段。经 MM 和 MD 平板测定 2 个重组子均为生长快速型 (Mut +)。

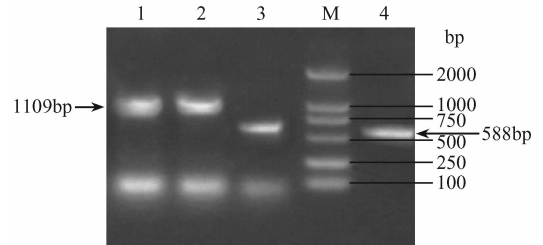


图 2 cIL-18BP 基因重组毕赤酵母转化子的鉴定

Fig. 2 PCR product of recombinant of cIL-18BP in Pichia yeast transducer. 1 and 2. PCR results of recombinant yeast transducer; 3. blank plasmid; M. DL 2000 Marker; 4. yeast transducer.

### 2.3 重组 pPICZ $\alpha$ A-c18BP 质粒的甲醇诱导酵母表达

经 10 mL/L 甲醇诱导, pPICZ $\alpha$ A-c18BP 在 72 h 开始表达, 96 h 达到高峰。SDS-PAGE 检测后, 将凝胶进行染色和脱色后观察, 得到分子量约为 27 kDa 的融合蛋白条带 (图 3), 表明酵母表达的融合蛋白与预期一致, 在真核毕赤酵母 GS115 表达了 cIL-18BP 融合蛋白, 并分泌到酵母胞外上清液中。结果在重组表达的蛋白样品中, 确定了 27 kDa 的条带。

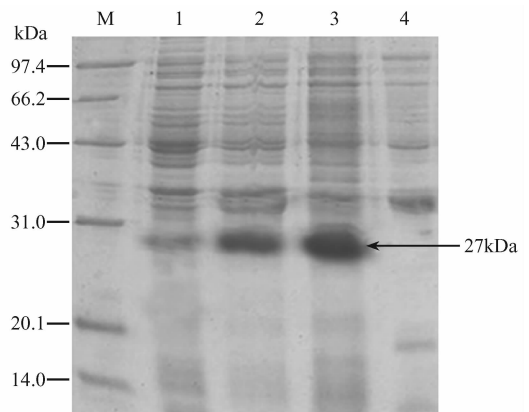


图 3 表达重组 cIL-18BP SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE result of the recombinant cIL-18BP. M. Low MW standard protein Marker; 1. products of cIL-18BP (introducing for 12h); 2. Products of cIL-18BP (introducing for 48h); 3. products of cIL-18BP (introducing for 106h); 4. blank control of thalli.

进行纯化后得到了约 27 kDa 的条带,显示了良好的纯化效果(图 4)。经测定其含量约为 156 ng/mL。

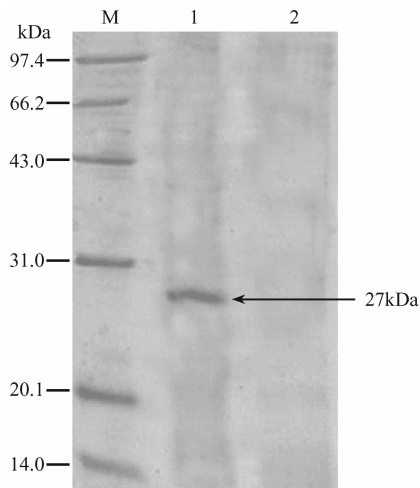


图 4 重组 cIL-18BP 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE result of the recombinant IL-18BP. M. Protein marker; 1. recombinant cIL-18BP protein; 2. blank plasmid control. .

## 2.4 cIL-18BP 重组蛋白与 cIL-18 的结合

经测定,1.0  $\mu\text{g/mL}$  的重组蛋白包被后,与重组 cIL-18 反应,经酶标二抗显色,其平均  $OD_{450}$  值达到  $1.346 \pm 0.447$ ,与不加重重组 cIL-18 的对照组( $0.193 \pm 0.417$ )和阴性对照组( $0.125 \pm 0.117$ )相比,差异极显著。与阳性对照组( $1.923 \pm 0.247$ )相比较后初步估算,这两种重组蛋白实现了体外结合,二者的结合率约为 70% ( $1.346/1.923$ )。

## 2.5 重组蛋白的生物学活性测定

体外刺激 PBMCs 分泌 IFN- $\gamma$  是 cIL-18 的重要功能。检测 cIL-18BP 重组蛋白拮抗 cIL-18 刺激 PBMCs 分泌 IFN- $\gamma$  的含量,以评估其生物活性。结果表明单纯的 cIL-18BP 对照、不加 cIL-18 的含有 ConA 的 PBMCs 不分泌 cIFN- $\gamma$ 。将 cIL-18BP 以不

同的浓度与 cIL-18 室温孵育 2 h,加到 PBMCs 细胞上,绘制 cIFN- $\gamma$  的分泌曲线(图 5)。当 cIL-18BP 浓度达到 15 ng/mL 后可以抑制大约 50% 的 cIL-18 的活性。MSB1 细胞在 cIL-18 刺激下分泌 cIFN- $\gamma$  的活性强于 PBMCs,当 cIL-18BP 浓度达到 30 ng/mL 后可以抑制大约 50% 的 cIL-18 的活性。

## 3 讨论

目前认为,机体内 IFN- $\gamma$  的过量表达可以诱导 IL-18BP 的产生。IL-18BP 通过与 IL-18 竞争性结合以阻断 IL-18 通过细胞表面受体向细胞内传递信号,从而抑制 IL-18 依赖性 IFN- $\gamma$  的产生。因此,IL-18BP 在 IL-18 活化中具有负调节因子的功能,是 IL-18 介导免疫网络调节的重要组成部分<sup>[11-12]</sup>。很明确的是,IL-18BP 不只一种。除了已经鉴定的 cDNA 文库中人 IL-18BP 的 4 个异构体和小鼠的 2 个异构体,还有在 EV、VV、GPV 和 MCV 的几个基因中发现了 IL-18BP 的同源物<sup>[5,13]</sup>。

Novick 等发现,由痘病毒编码的一些蛋白质与 IL-18BP 具有高度的同源性,提示这些病毒产物可降低 IL-18 的反应,干扰细胞毒性 T 细胞反应。Xiang 等发现,体外重组的由人痘病毒 MC53L 和 MC54L 基因编码的蛋白质与人和小鼠的 IL-18 均具有很高的亲和性,能抑制 IL-18 诱导产生 IFN- $\gamma$ ,且具有剂量依赖性<sup>[12-14]</sup>。痘病毒蛋白的这种模仿 IL-18BP 作用的特点,使其可扮演 IL-18“诱捕”受体的角色,并可能是痘病毒逃避免疫反应作用的机制之一。

本试验从鸡痘病毒中克隆和表达了 cIL-18BP 基因,并将其在酵母系统中进行了表达,因为没有现成的 cIL-18BP 单抗可用,因此,设计了以 cIL-18BP 包被酶标板,作为抗原,cIL-18 作为其抗体与其结合后,在酶标记 cIL-18 抗体的作用下显色,通过测定其 OD 值指示这两种蛋白质的特异性结合。检测表明该重组蛋白具有明显抑制鸡成熟 IL-18 诱导 PBMCs 分泌 IFN- $\gamma$  的生物学活性,是 IL-18 的一种良好的体外拮抗剂。在 MSB1 细胞上的动力学曲线试验也证实了 cIL-18BP 的活性。毕赤酵母表达体系表达 IL-18 和 IL-18BP 基因有其独特的优势,为以上两种蛋白质作为佐剂或者治疗剂在临床的应用,以及研究 IL-18 在各种疾病中的免疫调节作用奠定了基础。至此,痘病毒科的四个病毒属包括正痘病毒属、羊痘病毒属和禽痘病毒属均已发现该基因的同源物。IL-18 的过度表达与机体的自杀免疫性疾病

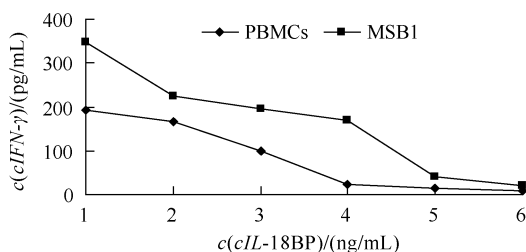


图 5 cIL-18BP 抑制 cIL-18 刺激相关细胞分泌 cIFN- $\gamma$  的活性

Fig. 5 cIL-18BP inhibit cIL-18 inducing relative cells secreting cIFN- $\gamma$ . 1~6 in x horizontal axis represent concentration of cIL-18BP from 3.7 to 120 ng/mL.

病以及其它炎性疾病的发生发展有极其密切的关系,如促进某些类型的关节炎的发生和肺炎肉芽肿的增生等<sup>[15-17]</sup>。因此,研究 IL-18 生物拮抗剂,对于控制 IL-18 主导的疾病,对于研究 IL-18 信号转导和生物学功能都具有重要的应用价值和理论意义<sup>[18]</sup>。而且这也表明 cIL-18BP 是痘病毒对机体先天免疫和特异性宿主反应进行调节的一个重要因子,提示我们如果敲除这种基因,可能会使痘病毒疫苗更加安全<sup>[19-21]</sup>。

主流的细胞因子功能的研究多数集中在细胞因子保护机体,防御病毒的作用上,本研究有望明确痘病毒 IL-18BP 基因及其编码蛋白的功能,从而在病毒方面入手,揭示痘病毒与宿主之间相互作用的分子机制<sup>[22-23]</sup>。IL-18 参与了多种有关炎症和自身免疫疾病,机体虽然有天然的拮抗物,但在疾病状态下,其含量往往不足,需要外源性 IL-18BP。由于 IL-18BP 可以特异性的结合并阻断 IL-18 的作用,因此这是一种比较有开发前景的细胞因子。IL-18 大多已成功表达,生物学活性也已基本阐明<sup>[24-25]</sup>,但是,对于 IL-18BP 的全部生物活性有待于进一步深入研究。

## 参考文献

- [ 1 ] Sugawra I. Interleukin-18 ( IL-18 ) and infectious diseases, with special emphasis on diseases induced by intracellular pathogens. *Microbes Infect*, 2000, 2 ( 10 ): 1257-1263.
- [ 2 ] Nananishi KA, Yoshinoto T, Tsutsui H, et al. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annual Review of Immunology*, 2001, 19(1):423-474.
- [ 3 ] Puren AJ, Fantuzzi G, Dinarello CA. Gene expression synthesis and secretion of interleukin-18 and interleukin 1beta are differentially regulated in human blood mononuclear cells and mouse spleen cells. *Journal of Virology*, 1999, 96(5), 2256-2261.
- [ 4 ] Kohno KJ, Kataoka T, Ohtsuki Y, et al. IFN-gamma-inducing factor (IGIF) is a co-stimulatory factor on the activation of Th1 but not Th2 cells and exerts its effect independently of IL-12. *Journal of Immunology*, 1997, 158(4):1541-1550.
- [ 5 ] Netea MG, Joosten LA, Lewis E, et al. Deficiency of interleukin-18 in mice leads to hyperphagia, obesity and insulin resistance. *Nature Medicine*, 2006, 28(3):252-268.
- [ 6 ] Tso TK, Huang WN, Huang HY, et al. Elevation of plasma interleukin-18 concentration is associated with insulin levels in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 2006, 15(4):207-212.
- [ 7 ] Novich D, Kim SH, Fantuzzi G, et al. Interleukin-18 binding protein: a novel modulator of the Th1 cytokine response. *Immunity*, 1999, 10(1):177-179.
- [ 8 ] Vincent PS, Neil A, Bryant, et al. Ectromelia, vaccinia and cowpox viruses encoded secreted interleukin-18-binding proteins. *Journal General Virology*, 2000, 81: 1223-1230.
- [ 9 ] Afonso CL, Tulman ER, Li UZ, et al. the genome of fowlpox virus. *Journal of virology*, 2000, 74(8):3815-3831.
- [ 10 ] 李宏梅,胡敬东,郭慧君. 重组鸡白细胞介素 18 (rChIL-18)对 MDV 感染 SPF 鸡细胞免疫的影响,中国兽医学报( *Chinese Journal of Veterinary Science* ), 2007, 27(5):624-628.
- [ 11 ] Torigoe K, Ushio S, Okura T, et al. Purification and characterization of the human interleukin-18 receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(41):25737-25742.
- [ 12 ] Lochner M, Kastenmuller K, Neuenhahn M, et al. Decreased susceptibility of mice to infection with *Listeria monocytogenes* in the absence of interleukin-18. *Infection and Immunity*, 2008, 76(9):2318-2326.
- [ 13 ] 刘文强,杨少华,栾婧婧,等. 来源于羊痘病毒的白介素-18 结合蛋白基因的表达和活性研究. 病毒学报( *Chinese Journal of Virology* ), 2005, 21(4):305-307.
- [ 14 ] Xiang Y, Moss B. IL-18 binding and inhibitor of interferon gamma induction by human poxvirus-encoded proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999, 96(20):11537-11542.
- [ 15 ] Sekiyama A, Uedah, Kashiwamura S, et al. IL-18, a cytokine translates a stress into medical science. *Journal of Investigative Medicine*, 2005, 52(Suppl):236-239.
- [ 16 ] Liang D, Mm W, Yao C, et al. Imbalance of interleukin 18 and interleukin-18 binding protein in patients with lupus nephritis. *Cell Molecular Immunology*, 2006, 3(4):303-306.
- [ 17 ] Sugiura MT, Maeno N, Kawaguchi Y, et al. A promoter type of the interleukin-18 gene is associated with juvenile idiopathic arthritis in the Japanese population. *Arthritis Research & Therapy*, 2006, 17(3):60.
- [ 18 ] Timothy AS. Clinical significance of interleukin-18. *Leukemia Research*, 2002, 26(11):975-976.
- [ 19 ] 陈韩英,陈文云,刘丽梅,等. 中药复方对热刺激小鼠脾脏 IFN- $\gamma$ 、IL-4 含量的影响. 畜牧兽医学报( *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences* ), 2008, 39(6):810-813.
- [ 20 ] Riley EM, Grenais RK. Notice of redundant publication: Plasma levels of interleukin-18 and interleukin-12 in *Plasmodium falciparum* malaria. *Parasite Immunology*, 2006, 28(5):231.

- [21] Schwarz A, Maeda A, Stander S, et al. IL-18 reduces ultraviolet radiation-induced DNA damage and thereby affects photo immune suppression. *Journal of Immunology*, 2006, 176(5): 2896-2901.
- [22] 刘文强, 赵宏坤. 山羊白细胞介素-18 成熟蛋白的表达, *中国农业科学 (Agricultural Sciences in China)*, 2007, 47(7): 1523-1527.
- [23] Liu WQ, Zhao HK, Gao Y D, et al. Cloning and Expression of goat Interleukin-18 Gene. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2005, 67(2): 219-221.
- [24] Bryson KJ, Wei XQ, Alexander J. Interleukin-18 enhances a Th2 biased response and susceptibility to *Leishmania mexicana* in BALB/c mice. *Microbes and infection*, 2008, 10(7): 834-839.
- [25] Tulman ER, Afonso CL, Lu Z, et al. The genomes of sheep pox and goat pox viruses. *Virology*, 2002, 76(12): 6054-6061.

## Recombinant cIL-18-binding protein as an antagonist to cIL-18 enhanced PBMCs secreting IFN- $\gamma$

Wenqiang Liu<sup>\*</sup>, Guiqin Liu, Xuling Qin, Guiying Wang

(Agricultural College of Liaocheng University, Prevention and Control Technology Institute of Animal Disease in Liaocheng University, Liaocheng 252059, China)

**Abstract:** [ **Objective** ] Interleukin-18(IL-18) is a proinflammatory cytokines that plays a key role of immune regulation through activating the Th 1 cell and NK cell secreting interferon- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ ). IL-18-binding proteins(IL-18BP) secreted in human and mouse can antagonise the activity of IL-18. The homologue gene of IL-18BP from fowlpox virus genome was predicted and identified of its expressed protein, to use as an antagonist to IL-18 guiding disease. [ **Methods** ] The cIL-18BP gene was isolated from the genome of fowlpox vaccine virus by PCR through a pair of special primers and cloned into vectors pPICZ $\alpha$ A, then expressed in yeast GS115. The biologic activity of recombinant proteins binding with cIL-18 was measured, inhibiting the activity of cIL-18 enhancing relative cells secreting IFN- $\gamma$  was confirmed through ELISA. [ **Results** ] The cIL-18BP gene was cloned from fowlpox virus and acquired high performance expression in yeast systems induced with methanol identified by SDS-PAGE. Recombinant cIL-18BP purified can bind specifically with recombinant cIL-18 determined by ELISA test. cIL-18BP can antagonise the activity of cIL-18 with determining the IFN- $\gamma$  concentration secreting in PBMCs and MSB1 cells stimulated by cIL-18 respectively. [ **Conclusion** ] The experiment indicates that recombinant cIL-18BP can inhibit the activity of cIL-18 stimulating related immune cells secreting IFN- $\gamma$ . Deletion of the cIL-18BP from virus may improve the safety and immunogenicity of fowlpox virus vaccine.

**Keywords:** fowlpox virus; IL-18BP; activity

(本文责编:王晋芳)