文章编号:1000-5404(2010)21-2281-05

论著

HIV 跨膜蛋白 gp41 和 gp36 原核表达及抗原性研究

袁作为[1],帅光泽[2],张 君[1],胡接力[1],郑 建[1] (400016 重庆,重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室[1];610106 成都,成都大学校医院内科[2])

【摘要】 目的 构建 HIV 跨膜蛋白 gp41 和 gp36 原核表达载体,诱导表达 HIV 抗原,为 HIV 快速诊断和蛋白疫苗研究提供材料基础。方法 用 PCR 方法对 HIV-1 包膜蛋白 gp41 和 HIV-2 包膜蛋白 gp36 基因序列进行全长、截短扩增,分别或以融合表达方式克隆入原核表达载体 pQE30、pET32a(+)及 pGST-MOLUC,重组质粒经异丙基硫代半乳糖苷(isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, IPTG)诱导表达,并经 Ni-NAT 或谷胱甘肽-Sepharose-4B 层析柱亲和纯化 HIV 跨膜糖蛋白抗原,对获得的纯化抗原进行 Western blot 检测,利用 HIV 抗原制备 ELISA 检测试剂盒,并分析 HIV 临床样本。结果 成功构建了 HIV 包膜蛋白的原核表达载体,利用亲和层析纯化得到了纯度较高的 HIV 包膜蛋白;Western blot 分析结果证实表达纯化的 HIV 跨膜蛋白 gp41(aa. 538 ~ 718)、gp36(aa. 533 ~ 764)以及 gp41-gp36 均能和 HIV 阳性血清反应;ELISA 试剂盒检测临床样本显示,特异性达 95% 以上,灵敏度达 100%。结论 获得了有生物学活性的 HIV 截短包膜蛋白,并可用于 HIV 快速检测试剂盒的研发。

【关键词】 HIV-1 包膜蛋白 gp41;HIV-2 包膜蛋白 gp36;重组;抗原性
【中图法分类号】 R373.9;R392-33;R392.11 【文献标志码】 A

Expression of HIV trans-membrane protein gp41 and pronucleus gp36 and their antigenicity

Yuan Zuowei[1], Shuai Guangze[2], Zhang Jun[1], Hu Jieli[1], Zheng Jian[1] ([1]Key Laboratory of Molecular Biology Laboratory of Infectious Diseases of Ministry of Education, Chongqing Medical University, Chongqing, 40016; [2]Department of Internal Medicine, Health Center of Chengdu University, Chengdu, Sichuan Province, 610106, China)

【Abstract】 Objective To construct the recombinant plasmids with HIV-1 gp41 and HIV-2 gp36 genes and induce the expression of HIV antigens for the rapid diagnosis of HIV and development of protein vaccine. Methods Full-length genes and/or fragment genes encoding HIV-1 trans-membrane protein gp41 and HIV-2 trans-membrane protein gp36 were amplified by PCR. Target genes were inserted into the expression vectors pQE30, pET32a(+) and pGST-MOLUC, respectively. Recombinant vectors were transformed into *E. coli* BL21 and induced by IPTG. Expressed fusion proteins were purified by Ni^{2+}-affinity chromatography or GST-affinity chromatography. Antigenicity of purified proteins was identified by Western blotting and ELISA were prepared using the purified proteins. HIV samples were analyzed. Results The pronucleus vector of HIV trans-membrane protein was successfully constructed. HIV trans-membrane protein with a rather high purity was obtained by Ni^{2+}-affinity chromatography or GST-affinity chromatography. Western blotting showed that the expressed products including gp41 (aa. 538 – 718), gp36 (aa. 533 – 764) and gp41-gp36 reacted to positive HIV in serum. HIV-1^+ or HIV^- were detected with ELISA in HIV samples with a sensitivity of 100% and a specificity of over 95%. Conclusion The biological activity of HIV truncation cross membrane proteins can be used in research and development of HIV rapid diagnosis kits.

【Key words】 HIV-1 envelope protein gp41; HIV-2 envelope protein gp36; recombinant; antigenicity

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30872419). Corresponding author: Zheng Jian, Tel: 86-23-68486780, E-mail: jian0102@hotmail.com

艾滋病是由人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)感染所致的获得性免疫缺陷综合征(acquired immunodeficiency syndrome, AIDS)。目前全球约 3 500 万感染者,其中我国约有 80 万,疫情开始由高危人群向普通人群大面积扩散,进入快速增长期,防治工作非常艰巨[1]。HIV 疫苗是控制艾滋病传播的有效手段,但是迄今为止没有一种有效的疫苗应

【基金项目】 国家自然科学基金(30872419)
【通信作者】 郑 建,电话:(023)68486780,E-mail:jian0102@hotmail.com

用于临床。因此对于艾滋病的早期诊断就显得尤为重要,特异灵敏的诊断能够让患者尽早治疗,同时也避免HIV的进一步传播[2]。而HIV诊断试剂盒的开发,首先是要获得纯度较高的特异性HIV抗原。HIV包膜蛋白gp41和gp36暴露于HIV表面,是诱导机体产生抗体的优势表位,因此是HIV抗体检测的首选靶标,同时也是蛋白疫苗研制的抗原表位[3,4]。本研究尝试对HIV-1 gp41和HIV-2 gp36蛋白的全长和截短进行原核表达,为HIV快速诊断试剂盒研制以及蛋白多肽疫苗开发提供材料基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株 HIV全基因组质粒pHIV1、pHIV2,宿主大肠杆菌JM109、BL21、SG13009,表达载体pQE30、pET32a(+)及pGST-MOLUC为本室保存。

1.1.2 主要试剂 DNA聚合酶prime star(TAKARA),质粒提取试剂盒(Promega),限制性内切酶(Promega),T_4 DNA连接酶(Promega),胶回收试剂盒(Qiagen),IPTG(Sigma),HRP标记羊抗人IgG购自Bios生物技术公司,HIV ELISA检测试剂盒购自上海科华生物技术有限公司。

1.1.3 临床样本 HIV-1、HIV-2阳性血清样本及阴性血清样本由四川省疾病预防控制中心提供。

1.2 方法

1.2.1 目的基因扩增 根据NCBI提供的HIV-1(B亚型)和HIV-2的基因序列,分别设计针对不同原核表达载体pQE30、pET32a(+)及pGST-MOLUC的gp41和gp36的全长和截短表达PCR引物。以pHIV-1为模板,引物P1、P2扩增全长gp41(1 023 bp),引物P5、P6扩增gp41(aa.538~718、555 bp);以pHIV-2为模板,引物P3、P4扩增全长gp36(1 032 bp),引物P7、P8扩增gp36(aa.533~764、705 bp);用引物P5、P10从gp41(aa.538~718、555 bp)上扩增得到3′端带甘氨酸Linker的PCR产物,用引物P9、P8从gp36(aa.533~764、705 bp)上扩增得到5′端带甘氨酸Linker的PCR产物,二者以1∶1摩尔比加入经重叠延伸PCR后得到融合截短序列gp41-gp36(1 248 bp)。上述PCR产物低熔点胶回收。PCR引物及退火条件见表1。

1.2.2 目的基因克隆 载体pQE30、pET32a(+)、pGST-MOLUC及PCR产物经相应的限制性内切酶双酶切;纯化后的酶切载体与相应的酶切PCR产物经T_4连接酶连接并转化大肠杆菌JM109。重组质粒经酶切、测序鉴定。鉴定正确的重组质粒转化相应的表达菌BL21(DE3)(以pET32a(+)或pGST-MOLUC为载体的重组质粒)或SG13009(以pQE30为载体的重组质粒)。

1.2.3 重组蛋白的诱导表达 单个菌落接种于含相应抗生素的LB培养液[以pET32a(+)或pGST-MOLUC为载体的重组质粒接种于含100 mg/ml氨苄青霉素的培养基;以pQE30为载体的重组质粒接种于含100 mg/ml氨苄青霉素和50 mg/ml卡拉霉素的培养基]。30 ℃摇床振摇过夜培养,待$A_{600}\approx0.6$时加入终浓度为1 mmol/L的IPTG和0.1 mmol/L $MgCl_2$,15 ℃诱导约18 h,离心收集菌体,加入蛋白上样缓冲液,煮沸5 min后离心取上清SDS-PAGE检测重组蛋白的表达。

1.2.4 重组蛋白的Western-blot检测 表达产物经120 g/L SDS-PAGE电泳并转移至硝酸纤维素膜上,以1∶100比例分别稀释HIV-1阳性血清和HIV-2阳性血清并室温下孵育2 h,1∶5 000稀释HRP标记的抗人IgG为二抗并室温孵育1 h。用二氨基联苯胺(DAB)显色分析表达产物的抗原性。

1.2.5 重组蛋白的大量表达和纯化 大量诱导表达重组蛋白,离心收集细菌。对用pQE30和pET32a(+)载体表达含6×His标签的融合蛋白用Ni-NAT层析柱亲和纯化:裂解缓冲液重悬菌体沉淀,超声破菌,14 000×g(4 ℃)离心20 min,上清加入Ni-NAT层析柱,用洗涤液(20 mmol/L imidazole)洗去杂蛋白至$D(280)<0.1$,洗脱液(250 mmol/L imidazole)洗脱结合蛋白至$D(280)<0.1$。对用pGST-MOLUC载体表达含GST标签的融合蛋白用谷胱甘肽-Sepharose-4B层析柱亲和纯化:超声破菌后的蛋白上清加入谷胱甘肽-Sepharose-4B层析柱,PBS洗去杂蛋白后,洗脱液(10 mmol/L还原型谷胱甘肽)洗脱吸附在柱上的融合蛋白。SDS-PAGE测定各洗脱管的纯度和浓度。收集2种融合蛋白的洗脱液,用DEAE离子交换柱第2次纯化融合蛋白。2次洗脱蛋白通过SDS-PAGE测定目的蛋白浓度和纯度后决定洗脱蛋白的收集,并风干浓缩。Bradford法测定纯化蛋白量。

表1 PCR引物设计及退火条件

扩增基因	选用载体	酶切位点			引物序列	退火温度(℃)
			载体	引物		
gp41	V1、V2、V3	P1	*BamH* Ⅰ	*Bgl* Ⅱ	5′-ATG*AGATCT*GCAGTGGGAATAGGAGC-3	58
		P2	*Sal* Ⅰ	*Sal* Ⅰ	5′-ATG*GTCGAC*TTCCAAGCCCTGTCTTA-3′	
gp36	V1、V2、V3	P3	*BamH* Ⅰ	*Bgl* Ⅱ	5′-ATG*AGATCT*GTGAGGAACAAAAGAGGTG-3′	58
		P4	*Sal* Ⅰ	*Sal* Ⅰ	5′-ATG*GTCGAC*TCTTGGAACTGCGAGTAT-3′	
gp41-T	V2、V3	P5	*BamH* Ⅰ	*Bgl* Ⅱ	5′-ATG*AGATCT*ACGGTACAGGCCAGACAAT-3′	55
		P6	*Sal* Ⅰ	*Sal* Ⅰ	5′-GGC*GTCGAC***TGTTCGAATGAT**CTGAAACGATAATGGTGAA-3′	
gp36-T	V2、V3	P7	*Sac* Ⅰ	*Sac* Ⅰ	5′-GCC*GAGCTC***ATCATTCGAACAA**CGCTGTCAGCCCAGT-3′	55
		P8	*Sal* Ⅰ	*Sal* Ⅰ	5′-ATG*GTCGAC*GAGGCGAGTCAGTAGG-3′	
gp41-gp36	V2、V3	P5	*BamH* Ⅰ	*Bgl* Ⅱ	5′-ATGAGATCTACGGTACAGGCCAGACAAT-3	52
		P10			5′-**ATCATTCGAACA**-3	
		P9			5′-**TGTTCGAATGAT**-3′	52
		P8	*Sal* Ⅰ	*Sal* Ⅰ	5′-ATG*GTCGAC*GAGGCGAGTCAGTAGG-3	

gp41-T、gp36-T分别为gp41(aa.538~718)、gp36(aa.533~764);V1、V2、V3分别为载体pET32a(+)、pQE30、pGST-MOLUC。斜体字划线碱基为限制性内切酶酶切位点;加粗碱基为甘氨酸linker

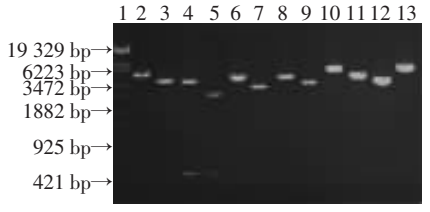
1.2.6　HIV1/HIV2 ELISA 检测试剂盒的制备　　定量后的纯化蛋白用碳酸盐缓冲液(4.3 g/L $NaHCO_3$,5.3 g/L Na_2CO_3,pH 9.4)稀释成 5 μg/ml 包被酶标板,4 ℃孵育过夜。用含 0.5% Tween-20 的 PBS 洗涤酶标板 4 次,加入 200 μl 封闭缓冲液(1% BSA 的 PBS)室温封闭 2 h。洗涤 4 次后吹干并置于 4 ℃保存。

1.2.7　临床样本的 ELISA 检测　　在包被的酶标板中加入患者血清,37 ℃孵 2 h,洗涤缓冲液洗板 4 次,加入 1∶5 000 稀释的抗人二抗 37 ℃孵 0.5 h,充分洗板 4 次,四甲基联苯胺(TMB)显色,于波长 450 nm 测定吸光度值[*D*(450)]。

2　结果

2.1　重组表达质粒的构建

分别以 HIV-1 和 HIV-2 全基因组质粒为模板,扩增 gp41 和 gp36 全长、截短及融合基因片段。PCR 以及重叠延伸 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳可见清晰条带,与预期片段大小相符。PCR 产物与相应的酶切载体连接转化,构建的重组质粒经双酶切鉴定(图 1),其中 pGST-gp36(aa. 533 ~ 764)、pQE-gp36(aa. 533 ~ 764)经 *Sac* Ⅰ、*Sal* Ⅰ双酶切,在约 700 bp 左右位置可见酶切小片段。其他重组质粒用 *Bam*H Ⅰ、*Sal* Ⅰ双酶切,由于载体的酶切位点 *Bam*H Ⅰ与 PCR 产物的酶切位点 *Bgl* Ⅱ为同粘酶,载体与 PCR 产物连接后两种酶切位点消失,所以当用 *Bam*H Ⅰ、*Sal* Ⅰ双酶切重组质粒时,不能酶切出小片段,而大片段的大小为载体大小加上插入片段大小。酶切与测序结果表明,重组质粒大小和读码框正确无误。

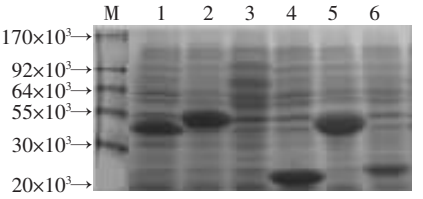


1:λ-EcoT14 I digest DNA 标准;2:pGST-(gp41-gp36);3:pQE-(gp41-gp36);4:pGST-gp36(aa. 533 ~ 764);5:pQE-gp36(aa. 533 ~ 764);6:pGST-gp41(aa. 538 ~ 718);7:pQE-gp41(aa. 538 ~ 718);8:pGST-gp36;9:pQE-gp36;10:pET-gp36;11:pGST-gp41;12:pQE-gp41;13:pET-gp41

图 1　酶切产物琼脂糖凝胶电泳分析

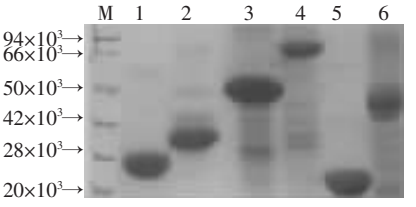
2.2　重组蛋白的诱导表达和纯化

经过降低诱导温度,改变诱导剂浓度等优化诱导表达条件,SDS-PAGE 显示,gp41(aa. 538 ~ 718)、gp36(aa. 533 ~ 764)以及 gp41-gp36 在 pQE30 和 pGST-MOLUC 载体中均有表达,分子量与期望值相符(图 2)。融合蛋白经亲和柱纯化后,纯度均在 80% 以上(图 3)。全长 gp41、全长 gp36 在 pQE30 中没有表达,而在 pET32a(+)和 pGST-MOLUC 中有微量表达,优化诱导条件很难提高其表达水平,亲和层析纯化重组蛋白其纯度不足 10%,浓度不足 0.1 mg/ml,不适合做 ELISA 检测的包被抗原(数据未给出)。免疫印迹结果表明,除 GST-gp41-gp36 外,表达的重组蛋白 gp41(aa. 538 ~ 718)、gp36(aa. 533 ~ 764)、gp41-gp36 及 GST- gp41(aa538 ~ 718)、GST- gp36(aa533 ~ 764)能分别与 HIV-1 和 HIV-2 阳性血清发生特异性反应,融合蛋白具有很好的抗原性(图 4)。



M:蛋白标准;1:gp41-gp36;2:GST-gp36(533 ~ 764);3:GST-gp41-gp36;4:gp41(aa. 538 ~ 718);5:GST- gp41(aa. 538 ~ 718);6:gp36(aa. 533 ~ 764)

图 2　重组蛋白诱导表达产物 SDS-PAGE 分析



M:蛋白标准;1:gp36(aa. 533 ~ 764);2:gp41-gp36;3:GST-gp36(aa. 533 ~ 764);4:GST-gp41-gp36;5:gp41(aa. 538 ~ 718);6:GST-gp41(aa. 538 ~ 718)

图 3　重组纯化蛋白 SDS-PAGE 分析



A:以 HIV-1 阳性血清作为一抗;B:以 HIV-2 阳性血清作为一抗
1:GST-gp41-gp36;2:gp41-gp36;3:GST-gp41(aa. 538 ~ 718);4:gp41(aa. 538 ~ 718);5:gp36(aa. 533 ~ 764);6:GST-gp36(aa. 533 ~ 764)

图 4　纯化蛋白 Western blot 分析

2.3　HIV-1/HIV-2 ELISA 检测试剂盒的应用

以 Western blot 检测具有免疫学活性的重组蛋白包被 ELISA 酶标板,制备 HIV-1 和 HIV-2 ELISA 检测试剂盒。用制备的检测试剂盒分别检测 36 份 HIV-1 阳性血清、12 份 HIV-2 阳性血清以及 109 份阴性血清,分析检测试剂盒的特异性和灵敏性。融合蛋白 gp41(aa. 538 ~ 718)、gp41-gp36 及 GST- gp41(aa. 538 ~ 718)对 HIV-1 的检测灵敏性为 100%,特异性分别为 98.17%,97.25% 和 95.41%。融合蛋白 gp36(aa. 533 ~ 764)、gp41-gp36 及 GST-gp36(aa. 533 ~ 764)对 HIV-2 的检测灵敏性为 100%,特异性分别为 97.25%,97.25% 和 96.33%(表 2、3)。

表 2　HIV-1 阳性和阴性血清样本 ELISA 检测结果

	HIV-1⁺血清	HIV⁻血清	灵敏度	特异度
gp41(aa. 538 ~ 718)	36/36	107/109	100%	98.17%
GST-gp41(aa. 538 ~ 718)	36/36	104/109	100%	95.41%
gp41-gp36	36/36	106/109	100%	97.25%

表 3　HIV-2 阳性和阴性血清样本 ELISA 检测结果

	HIV-2⁺血清	HIV⁻血清	灵敏度	特异度
Gp36(aa. 533 ~ 764)	12/12	106/109	100%	97.25%
GST-gp36(aa. 533 ~ 764)	12/12	105/109	100%	96.33%
gp41-gp36	12/12	106/109	100%	97.25%

3 讨论

HIV 检测方法有多种，如核酸检测、P24 抗原检测、抗体检测等。抗体检测是利用 HIV 特异性抗原来检测血清中针对 HIV 的特异性抗体，该方法广泛应用于 HIV 初筛诊断。与抗体检测相比核酸检测操作复杂，易出现假阳性或假阴性结果，而主要应用于临床 HIV 治疗疗效评价。P24 抗原检测虽然能够早期诊断 HIV，但是 P24 量较少，使其阳性率通常较低，采用解离免疫复合物法或浓缩 P24 抗原可提高敏感性，但这也增加了检测成本[5,6]。因此 HIV 抗体检测是 HIV 筛查的主要手段，在 HIV 的防控中发挥着重要作用。

基于 HIV 抗体检测方法的建立，首要的是获得具有免疫学活性的蛋白抗原。HIV-1 包膜蛋白 gp41 由外膜蛋白前体（gp160）裂解产生，免疫原性强，HIV 感染者能针对其产生特异抗体，且在体内长期存在，检出率高，gp41 N-末端部分（aa. 584 ~ 616）抗原决定簇与 HIV-1 患者血清中抗体有较宽的反应性[7]；HIV-2 包膜蛋白 gp36 由 HIV-2 外膜蛋白（gp140）裂解产生，其 N 端（aa. 581 ~ 605）序列高度保守，HIV 感染者血清中有针对这个区域的特异抗体[8]。因此包含有这些保守区的全长或截短抗原肽可作为开发 HIV 诊断试剂盒的靶蛋白。

我们可以通过化学合成或利用基因工程克隆表达来获得抗原肽，考虑到化学合成价格昂贵且不可再生，所以选择利用构建原核表达载体诱导表达的方法来获得大量的抗原。不同的表达载体由于其启动子、融合标签等成分不同，其表达能力及表达水平差异很大；同时融合蛋白的大小和结构的差异也会对表达的重组融合蛋白的构象产生很大的影响，进而影响融合蛋白的抗原性及生物学功能[9]。在本实验中，为获得高表达水平和高抗原性的重组蛋白，我们同时选用 3 种不同的表达载体分别表达全长和截短的目的蛋白。载体 pQE30 以 T5 为启动子，其启动能力明显低于 T7 启动子，因此在表达大小适中的截短 gp41 和 gp36 片段时，相对于载体 pGST-MOLUC 而言，其表达水平明显降低；对片段较长的全长 gp41 和 gp36 则完全没有表达。融合标签 GST 虽然能增加重组蛋白的溶解性，但随着融合片段的增大，其表达水平也下降，故同为 gp41-gp36 的串联片段，在载体 pQE30 的表达量明显高于 pGST-MOLUC；同时由于融合标签 GST 相对较大，融合后的重组蛋白可能会由于 GST 的空间位阻作用遮蔽 gp41 和 gp36 的抗原决定簇位点，导致抗原性的缺失，从而使免疫印迹无反应。在 gp41 和 gp36 的截短表达中，不同融合标签对抗原的抗原性也起着重要的影响，his 标签由于其分子量太小，几乎不影响重组蛋白的高级结构，对重组蛋白的生物学活性影响甚微，在 ELISA 检测时其特异性最高（gp41 为 98. 17%，gp36 为 97. 25%）。由此可知，选择不同的表达载体对获得高表达和高生物学活性的重组蛋白具有至关重要的影响，甚至直接导致实验的成功或者失败；而不同载体对不同蛋白的表达情况往往是未知的。同时选择多种表达载体表达目的蛋白是获得高效表达重组蛋白的重要策略。

本研究尝试对 HIV-1 gp41 和 HIV-2 gp36 蛋白的全长和截短进行原核表达，其中 gp41 和 gp36 全长的原核表达没有成功，还可能和全长包膜蛋白含有较多疏水氨基酸以及表达产物对宿主菌的毒性有关。包涵体形式表达的重组蛋白往往会由于蛋白的错误折叠导致立体构象的改变，进而造成生物学活性的丢失。而包涵体复性一直是分子生物学界的难题，包涵体复性率通常很低，一般不超过 20%；同时不同的蛋白具有不同的结构和功能，其复性过程也各不相同，存在明显的差异和不同难易程度。为避免重组蛋白包涵体表达，本实验不仅通过选择能增加可溶性表达的融合表达载体 pET32a（+）和 pGST-MOLUC，并通过大幅降低诱导表达温度，严格控制诱导表达细菌密度，加入一些辅助因子等手段，使得原本以包涵体形式表达的重组蛋白重新以溶解形式表达在菌体裂解上清中（数据未给出），最终成功表达纯化了 gp41（aa. 538 ~ 718）、gp36（aa. 533 ~ 764）以及 gp41-gp36 截短蛋白，Western blot 检测显示所表达的抗原均具有很好的抗原性，能够和 HIV 阳性血清发生反应。ELISA 检测试剂盒对 36 份 HIV-1 阳性血清、12 份 HIV-2 阳性血清以及 109 份阴性血清分析结果显示灵敏性为 100%，特异性大于 95%，这说明所表达的抗原肽可以应用于胶体金试纸条以及酶联免疫检测试剂盒的开发，但其特异性还有待提高。纯化过后的蛋白仍然含有一定量的杂蛋白，这可能降低检测的特异性，我们可以进一步优化纯化条件获得更纯的抗原肽，同时可以利用其他特异抗原与现有抗原肽联用，以此来提高检测的特异性。

HIV-1 与 HIV-2 包膜蛋白间只有 40% 的同源序列，因此单一的包膜蛋白不能同时检测出 HIV-1 和 HIV-2 感染。本研究中利用重叠延伸 PCR 通过甘氨酸 Linker 将 HIV-1 包膜蛋白 gp41 和 HIV-2 包膜蛋白 gp36 连接而得融合蛋白 gp41-gp36，这一融合蛋白能够同时检测 HIV-1 和 HIV-2 感染，这增加了 HIV 检测的适用范围，同时可以提高检出率，降低漏诊率。gp41-gp36 同时包括了 HIV-1 和 HIV-2 包膜蛋白，且这

一包膜蛋白区序列高度保守,能诱导机体产生广谱中和抗体[10,11],对HIV联合蛋白多肽疫苗的开发有一定的意义。

参考文献:

[1] 联合国艾滋病规划署. 2009年全球艾滋病流行报告[R]. 上海:联合国艾滋病规划署,2009.
[2] Bojak A, Deml L, Wagner R. The past, present and future of HIV-vaccine development: a critical view[J]. Drug Discov Today, 2002, 7(1):36-46.
[3] Huang X, Xu J, Qiu C, *et al*. Mucosal priming with PEI/DNA complex and systemic boosting with recombinant TianTan vaccinia stimulate vigorous mucosal and systemic immune responses[J]. Vaccine, 2007, 25(14):2620-2629.
[4] Keenan P A, Keenan J M, Branson B M. Rapid HIV testing. Wait time reduced from days to minutes[J]. Postgrad Med, 2005, 117(3):47-52.
[5] Louie B, Lei J, Liska S, *et al*. Assessment of sensitivity and specificity of first, second, and third generation EIA for the detection of antibodies to HIV-1 in oral fluid[J]. J Virol Methods, 2009, 159(1):119-121.
[6] Weiss H A, Wasserheit J N, Barnabas R V, *et al*. Persisting with prevention: the importance of adherence for HIV prevention[J]. Emerg Themes Epidemol, 2008, 5:8.
[7] Hotbauer J M, Schulz T F, Hengster P, *et al*. Comparison of Western blot (immunoblot) based on recombinant-derived p41 with conventional tests for serodiagnosis of human immunodeficiency virus infections[J]. J Clin Microbiol, 1988, 26(1):116-120.
[8] Del-Giudice G, Tougne C, Louis J A, *et al*. A multiple antigen peptide from the repetitive sequence of the Plasmodium malariae circumsporozoite protein induces a specific antibody response in mice of various H-2 haplotypes[J]. Eur J Immunol, 1990, 20(7):1619-1622.
[9] Haas J, Park E C, Seed B. Codon usage limitation in the expression of HIV-1 envelope Glycoprotein[J]. Curr Biol, 1996, 6(3):315-324.
[10] Marcelino J M, Barroso H, Goncalves F, *et al*. Use of a new dual-antigen enzyme-linked immunosorbent assay to detect and characterize the human antibody response to the human immunodeficiency virus type 2 envelope gp125 and gp36 glycoproteins[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(2):607-611.
[11] Forsell M N, Schief W R, Wyatt R T. Immunogenicity of HIV-1 envelope glycoprotein oligomers[J]. Curr Opin HIV AIDS, 2009, 4(5):380-387.

(收稿:2010-06-12 修回:2010-07-06)
(编辑 王 红)

文章编号:1000-5404(2010)21-2285-01

个案与短篇

中耳灌注地塞米松治疗120例主观性耳鸣

闫海燕,李丽萍,兰立国 (064400 河北 迁安,河北省迁安市人民医院五官科)

【关键词】 中耳灌注;地塞米松;主观性耳鸣
【中图法分类号】 R764.45 【文献标志码】 B

主观性耳鸣是指在周围环境中无相应声源和电(磁)刺激源情况下,患者自觉耳内或颅内有声音的一种主观感觉。耳鸣给患者带来很大痛苦和烦恼。耳鸣的治疗方法很多,但疗效都不确定。近年来我们采用中耳灌注地塞米松加常规口服药物治疗主观性耳鸣患者,并与常规口服药物治疗患者进行对照观察,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2007年1月至2009年12月门诊主观性耳鸣患者共计120例152耳,经过全身检查,耳部检查、纯音测听、声导抗、ABR、CT检查,排除耳部器质性病变(耵聍栓塞、中耳炎、咽鼓管堵塞、耳硬化症、听神经瘤)及严重全身疾病(高血压、糖尿病、贫血、肾病、精神病)。分为治疗组和对照组。治疗组:41例56耳,男性24例32耳,女性17例24耳。年龄18~65岁,平均38.5岁,伴听力下降30耳,不伴听力下降26耳。首诊20耳,复诊36耳。病史7 d至5年,平均55 d。对照组:79例96耳,男性36例42耳,女性43例54耳。年龄19~64岁,平均36.7岁,伴听力下降49耳,不伴听力下降47耳。首诊61耳,复诊35耳。病史5 d至5年,平均47 d。2组临床资料差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 方法

对照组:采用常规口服药物治疗。长春胺缓释胶囊30 mg,2次/d;培他啶片4 mg,3次/d;维生素B_1 10 mg,3次/d;维生素B_{12} 0.5 mg,3次/d治疗。

治疗组:采用中耳灌注地塞米松加常规口服药物治疗。患者取坐位,75%乙醇消毒耳廓及外耳道,7号长针经鼓膜紧张部前下象限注入地塞米松5 mg(郑州市卓峰制药有限公司,5 mg/ml),迅速仰卧30 min,期间避免打喷嚏及吞咽动作。每周1次,共3次,共用地塞米松15 mg。同时口服常规药物治疗(同对照组)。

2组患者均治疗20 d后,据临床症状判断疗效。疗效分级标准:王洪田等[1]制定的《耳鸣的诊断和治疗指南建议案》。

(下转2299页)

【通信作者】 闫海燕,E-mail:yanhaiyan111@yahoo.cn