DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.15.001
第26卷第15期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 15
2004年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2004

文章编号:1000-5404(2004)15-1325-05

论著

Alzheimer病 $A\beta_{1-42}$肽和IL-4双基因表达质粒的构建和表达鉴定

倪 兵[1],杨日高[2],黎万玲[1],姜 曼[1],李艳秋[1],范文辉[3],吴玉章[1] (第三军医大学:[1]基础医学部全军免疫学研究所,[3]西南医院神经内科,重庆 400038;[2]解放军第322医院外三科,大同 037006)

提 要:目的 构建Alzheimer病$A\beta_{1-42}$基因和小鼠IL-4共表达质粒,探讨其作为Alzheimer病特异疫苗的可能性。方法 全基因合成$A\beta_{1-42}$基因片段并克隆入pMD18-T载体中,再从$A\beta_{1-42}$/pMD18-T重组质粒中切下$A\beta_{1-42}$基因并克隆入TACE5真核双表达载体中,构建重组质粒$A\beta_{1-42}$/TACE5。从pUMMV-mIL4质粒中切下mIL-4并克隆到重组质粒$A\beta_{1-42}$/TACE5中,构建双表达重组质粒$A\beta_{1-42}$/mIL-4/TACE5测序鉴定克隆基因的正确性。脂质体试剂Lipofectamine 2000体外转染$A\beta_{1-42}$/mIL-4/TACE5重组质粒于BHK-21细胞中,用ECL-Western-blot方法鉴定mIL-4和$A\beta_{1-42}$能在该细胞中共表达。结果 正确构建了$A\beta_{1-42}$/mIL-4/TACE5双表达重组质粒,并且在转化此质粒的BHK-21细胞中检测出了$A\beta_{1-42}$和mIL-4的表达。结论 双表达重组质粒$A\beta_{1-42}$/mIL-4/TACE5基本可以满足其作为Alzheimer病特异的候选DNA疫苗的要求,为下一步的基因疫苗转基因动物体内免疫学实验提供了实验依据。

关键词:Alzheimer病;$A\beta_{1-42}$;mIL-4;基因疫苗
中图法分类号:R392.11;R394.2;R745.7 文献标识码:A

Construction and identification of the recombinant plasmid co-expressing $A\beta_{1-42}$ gene of Alzheimer's disease and mouse IL-4 gene

NI Bing[1], YANG Ri-gao[2], LI Wan-ling[1], JIANG Man[1], LI Yan-qiu[1], FAN Wen-hui[3], WU Yu-zhang[1] ([1]Institute of Immunology, College of Medicine, [3]Department of Neurology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Department of Surgery 3, No. 322 Hospital, Datong 037006, Shanxi Province, China)

Abstract: **Objective** To construct the recombinant plasmid co-expressing $A\beta_{1-42}$ gene of Alzheimer's disease (AD) and mouse IL-4 (mIL-4) gene to explore the possibility of the recombinant plasmid as Alzheimer's disease specific vaccine. **Methods** Full length $A\beta_{1-42}$ gene was synthesized and cloned into pMD18-T vector. The $A\beta_{1-42}$ gene fragment was cut out from $A\beta_{1-42}$/pMD18-T recombinant plasimd with restriction enzymes and inserted into eukaryotic bi-expressing vector TACE5 to construct recombinant plasmid $A\beta_{1-42}$/TACE5. Mouse Il-4 gene was cut off from plasmid pUMMV-mIL4 and cloned into $A\beta_{1-42}$/TACE5 to construct recombinant $A\beta_{1-42}$/mIL-4/TACE5 which was identified by sequencing. Recombinant $A\beta_{1-42}$/mIL-4/TACE5 was transformed into BHK-21 cells with liposome reagent. Lipofectamine 2000 and its co-expression of mouse IL-4 and $A\beta_{1-42}$ gene in the cells was identified with ECL-Western-blot. **Results** Recombinant plasmid $A\beta_{1-42}$/mIL-4/TACE5 was constructed correctly which could express mouse IL-4 and $A\beta_{1-42}$ well in the transformed BHK-21 cells. **Conclusion** Bi-expressing recombinant plasmid $A\beta_{1-42}$/mIL-4/TACE5 can basically meet the requirement of Alzheimer's disease specific DNA vaccine, which can provide experimental data for the investigation of the immunological effect of this candidate genetic vaccine in transgenic mice.

Key words: Alzheimer's disease; $A\beta_{1-42}$; mouse IL-4; genetic vaccine

$A\beta_{1-42}$肽在大脑认知区域的积累、聚合是Alzheimer病(Alzheimer's disease, AD)的一个病理学特征[1,2]。但是,到目前为止仍然不清楚什么是老化过程中引起Aβ积累和毒性的关键因素。因此,通过免疫学方法靶向Aβ,清除已经生成的Aβ肽不失为一种好的方法。$A\beta_{1-42}$肽的II期临床试验因为少数病人出现脑膜脑炎而被迫终止,临床尸检结果提示死亡病人脑组织中存在强有力的细胞免疫应答[3]。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30170338, 30100058),国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(2001CB510001)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30170338, 30100058) and the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects) (2001CB510001)
作者简介:倪 兵(1968-),男,湖北省黄梅县人,博士,副教授,主要从事分子疫苗方面的研究,发表论文15篇。电话:(023)68752236-614; E-mail: nibing@vip.163.com
通信作者:吴玉章,E-mail: wuyuzhang@yahoo.com.cn
收稿日期:2004-03-02;修回日期:2004-06-03

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

因此,AD免疫学治疗进一步的改进应该包括避免使用可能引起细胞免疫应答的佐剂,或使用促进体液免疫应答的佐剂。因此,本研究拟利用生物佐剂IL-4来调节机体的免疫应答向体液免疫方向发展,并结合基因疫苗近10年来已经在实验动物和临床上取得的很大的进展[4~6],拟将$A\beta_{1-42}$基因和IL-4基因同时克隆到真核表达载体上,构建重组DNA疫苗,为下一步的转基因动物体内免疫学治疗实验提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 质粒、菌种和细胞株 TACE5真核双表达质粒为本所刘宏利博士赠送,两个表达盒均由CMV启动子驱动。BHK-21细胞购于ATCC;DH5α菌株为本所自存。

1.1.2 试剂及耗材 High Pure Plasmid Isolation Kit、蛋白酶抑制剂-Complete Mini、ECL Western-blot购于Roche公司;脂质转染试剂Lipofectamine 2000购于Invitrogen公司;DNA分子量标准DL2000购于TAKARA公司;限制型内切酶、连接酶购于Pomega公司;测序引物于上海申友生物技术公司合成,重组质粒测序也由其完成;pMD18-T载体(大连宝生物公司);pUMVC-mIL-4重组质粒购于Adevron公司。$A\beta_{1-42}$多肽单克隆抗体Rabbit anti-Human Beta-Amyloid 1-40 IgG购自ALPHA DIAGNOTIC(深圳达科为公司代理);mIL-4多克隆抗体Anti-Murine IL-4购自PEPROTECH公司(深圳达科为公司代理)。

1.2 方法

1.2.1 克隆$A\beta_{1-42}$基因于pMD18-T载体 由于mIL-4基因中有一个*Eco*RI限制酶位点,所以为了克隆的方便,必需首先克隆$A\beta_{1-42}$基因,然后再克隆mIL-4基因。

1.2.1.1 合成$A\beta_{1-42}$基因片段 于上海申友生物技术公司全基因合成人$A\beta_{1-42}$基因片段,为了克隆方便分别在N-端和C-端加上*Bgl*Ⅱ和*Eco*RI位点。同时,为了鉴定方便,在*Eco*RI位点前加入一个*Avr*Ⅱ酶切位点,这样可以在酶切鉴定$A\beta_{1-42}$基因插入是否成功时避免使用另外一个基因mIL-4本身所带有点*Eco*RI位点。

1.2.1.2 连接 取合成产物4 μl、pMD18-T Vector 1 μl、Ligase Buffer 5 μl于16 ℃反应8 h。

1.2.1.3 转化(化学法) 取出4管冻存的DH5α(200 μl/Tube),冰中溶解。各取5 μl连接液加入菌液中,轻轻混匀。冰浴30 min,42 ℃ 1 min 30 s;冰浴2 min。分别加入500 μl LB,37 ℃ 100 r/min 45 min。取200 μl涂布至Amp琼脂平板(100 μg/ml);37 ℃,倒置培养过夜,至克隆长出。

1.2.1.4 扩增和酶切鉴定 取单克隆至3 ml Amp/LB中,37 ℃ 250 r/min振荡过夜培养。抽提质粒后用*Bgl*Ⅱ/*Eco*RI进行双酶切,产物于2.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.1.5 测序 酶切且鉴定的阳性克隆产物送上海申友生物技术公司测序鉴定其正确性。

1.2.2 构建$A\beta_{1-42}$/TACE5重组质粒 克隆成功的$A\beta_{1-42}$/pMD18-T质粒和TACE5载体用*Bgl*Ⅱ和*Eco*RI分别进行双酶切,$A\beta_{1-42}$/pMD18-T质粒中切下的$A\beta_{1-42}$片段通过常规连接反应克隆到TACE5中,构建$A\beta_{1-42}$/TACE5重组质粒。该重组子粒经*Bgl*Ⅱ/*Eco*RI双酶切后于15% PAGE凝胶电泳鉴定。阳性克隆送上海申友生物技术公司测序鉴定$A\beta_{1-42}$基因是否插入成功,测序引物为5′-GAACCGTCAGATCGCCTGGAGA-3′。

1.2.3 构建真核双表达质粒$A\beta_{1-42}$/mIL-4/TACE5 对pUMVC3-mIL4重组质粒和$A\beta_{1-42}$/TACE5重组质粒进行*Sal*Ⅰ/*Eco*RⅠ双酶切,pUMVC3-mIL4重组质粒中切下的mIL-4基因连接于$A\beta_{1-42}$/TACE5重组质粒的相应缺口中,构建$A\beta_{1-42}$/mIL-4/TACE5双表达重组质粒。*Sal*Ⅰ/*Eco*RI对重组质粒克隆进行双酶切后于2.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定。阳性克隆送上海申友生物技术公司测序鉴定mIL-4基因是否插入。测序引物为mIL-4自身特异序列,分别为:上游5′-ACCCCCAGCTAGTTGTCATCC-3′,下游5′-CGAAAAGCCCGAAAGAG-3′。

1.2.4 重组双表达质粒的体外表达鉴定

1.2.4.1 细胞培养 BHK-21细胞采用RPMI1640加10%热灭活小牛血清完全培养基,于37 ℃、5% CO_2孵育箱内常规培养。

1.2.4.2 转染 按照说明书,用Lipofectamine 2000脂质体转染试剂将TACE-5(对照)和$A\beta_{1-42}$/mIL-4/TACE5双表达重组质粒分别转染入BHK-21细胞中,常规细胞培养24 h。

1.2.4.3 Western-blot法鉴定转染细胞中目的基因的表达 转染后,BHK-21细胞生长良好。

转染后24 h,PBS洗涤细胞。从培养瓶中刮下细胞,蒸馏水调节体积至200 μl,加入20 μl完全蛋白酶抑制剂-Complete Mini,轻轻吹打下细胞,收于0.5 ml EP管中,置沸水浴中加热10 min,再用超声处理2次。4 ℃,12 000 r/min离心10 min。上清用上样缓冲液处理后,于9% Tris-Tricine PAGE凝胶电泳。电印迹于硝纤膜上,4 ℃封闭过夜。次日,分别利用$A\beta_{1-42}$单克隆抗体Rabbit anti-Human Beta-Amyloid 1-40 IgG和mIL-4多克隆抗体Anti-Murine IL-4为一抗,按试剂盒说明书步骤,对双表达质粒表达的$A\beta_{1-42}$和小鼠IL-4进行检测。最后于暗盒中对X线片曝光10 s,并进行后续处理。

2 结果

2.1 $A\beta_{1-42}$基因片段克隆到pMD18-T载体

$A\beta_{1-42}$基因片段经过T/A连接后,挑取的克隆经过质粒抽提和*Bgl*Ⅱ/*Avr*Ⅱ双酶切后,在2.5%琼脂糖凝胶中电泳后显示出特异的150 bp左右的$A\beta_{1-42}$基因片段条带和2 692 bp的pMD18-T线性片段(图1)。其中,双酶切下来的$A\beta_{1-42}$基因片段和全基因合成的$A\beta_{1-42}$基因产物的电泳位置一致。测序后,由测序结果可知编号为T/A克隆含正确的定点突变基因(反向插入T载体),说明T载体的克隆成功。

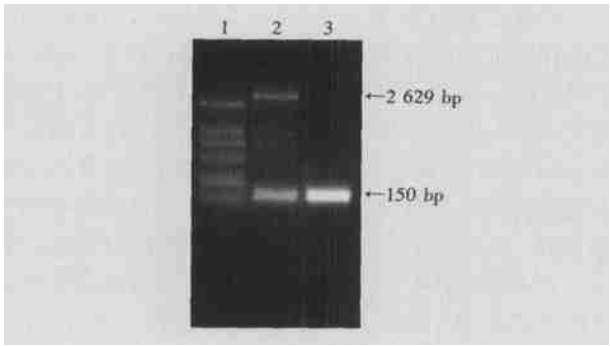
2.2 $A\beta_{1-42}$基因克隆到TACE5载体中

2.2.1 重组质粒筛选鉴定及重组质粒酶切鉴定结果 $A\beta_{1-42}$基因从T载体上用*Bgl*Ⅱ/*Eco*RI双酶切后,连接到用相同内切酶消化的TACE5载体。

连接物转化DH5α菌株,铺板。最后在氨苄平板上可见分布均匀、形态大小均一的10余个阳性单克隆细菌;而对照平板上未见任何菌落生长。挑取阳性单克隆菌落,扩增后用High Pure质粒提取试剂盒提取质粒,用*Bgl*Ⅱ/*Eco*RI双酶切,酶切产物在15% PAGE凝胶上电泳。第3、5、8号菌落显示其质粒已完全切开,为两条带。其中插入片段分子量为150 bp,载体部

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

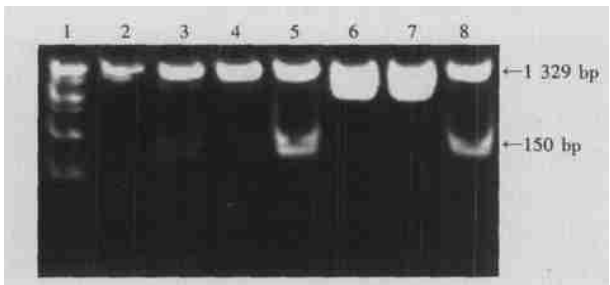
分(1 329 bp)由于在高浓度 PAGE 凝胶上电泳, 基本没有移行出加样孔。但是插入片段条带的大小与理论值一致, 提示克隆已基本成功(图 2)。



1: DNA Ladder (DL2000: 2 000, 1 000, 750, 500, 250, 100 bp, from up to bottom); 2: Product of *Bgl* Ⅱ/*Eco*R Ⅰ double digestion; 3: Synthesized full-gene of $A\beta_{1-42}$ as control

图 1　重组质粒 $A\beta_{1-42}$/pMD18-T 经过 *Bgl* Ⅱ/*Eco*R Ⅰ 双酶切后在 2.5%琼脂糖凝胶上电泳结果

Fig 1　Electrophoresis of *Bgl* Ⅱ/*Eco*R Ⅰ double digested product of $A\beta_{1-42}$/pMD18-T recombinant plasmds on 2.5% agarose gel



1: DNA Ladder (DL2000, indicated as above); 2－8: Screened clones, among which 3, 5, and 8 represent the positive clones which can be digested into two bands. The small fragment was (150 bp), representing $A\beta_{1-42}$ gene fragment

图 2　重组质粒 $A\beta_{1-42}$/TACE5 的 *Bgl* Ⅱ/*Eco*R Ⅰ 双酶切产物在 15% PAGE 凝胶上的电泳结果

Fig 2　Eletrophoresis of *Bgl* Ⅱ/*Eco*R Ⅰ double digested product of recombinant plasmids $A\beta_{1-42}$/TACE5 on 15% PAGE gel

2.2.2　重组质粒测序结果　　重组质粒提取后寄送上海申友公司测序, 测序结果与 Genebank 中相应序列完全一致。

2.3　mIL-4 基因克隆入 $A\beta_{1-42}$/TACE5 重组质粒中

mIL-4 基因从 pUCMV3/mIL-4 重组质粒用 *Sal* Ⅰ/*Bam*H Ⅰ 双酶切后, 连接到用相同内切酶消化的 $A\beta_{1-42}$/TACE5 重组质粒中。连接物转化 DH5α 菌株, 铺板。最后在氨苄平板上可见分布均匀、形态大小均一的多个阳性单克隆细菌。挑取阳性单克隆菌落, 扩增后用 High Pure 质粒提取试剂盒提取质粒, 用 *Sal* Ⅰ/*Bam*H Ⅰ 双酶切, 酶切产物在 2.5%琼脂糖凝胶上电泳。4、5 和 6 号细菌克隆中抽提的质粒酶切、电泳后显示出 2 条带, 其中插入片段大小为 420 bp 左右, 同小鼠 IL-4 基因大小一致。2、3 和 7 号克隆为阴性克隆(图 3)。阳性克隆提取后寄送上海申友公司测序, 证实插入片段序列与 Genebank 中小鼠 IL-4 序列完全一致。



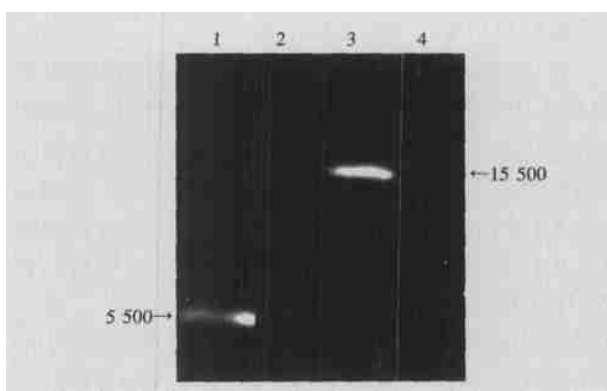
1: DNA Ladder (DL2000, indicated as above); 2－7: Screened clones, among which 4, 5, and 6 represent the positive clones which can be digested into two bands. The small fragment was about 420 bp, representing mouse IL-4 gene

图 3　重组质粒 $A\beta_{1-42}$/mIL-4/TACE5 的 *Sal* Ⅰ/*Bam*H Ⅰ 双酶切产物在 2.5%琼脂糖凝胶上的电泳结果

Fig 3　Eletrophoresis of *Sal* Ⅰ/*Bam*H Ⅰ double digested product of recombinant plasmids $A\beta_{1-42}$/mIL-4/TACE5 on 2.5% agarose gel

2.4　Western-blot 法鉴定转化细胞中目的蛋白的表达

重组质粒 $A\beta_{1-42}$/mIL-4/TACE5、TACE5 质粒和生理盐水用脂质体转染试剂 Lipofectamine 2000 转染 BHK-21 细胞, 24 h 后裂解细胞, ECL 法进行 Western-blot 分析。由于 $A\beta_{1-42}$多肽和 mIL-4 分子量都不足 1 500, 故采用 9% Tris-Tricine PAGE 系统(参见《精编分子生物学实验指南》)进行分析。图 4 显示, 转染 $A\beta_{1-42}$/mIL-4/TACE5 的 BHK-21 细胞所表达的 $A\beta_{1-42}$多肽和小鼠 IL-4 蛋白条带的位置分别在 5 500 和 15 000 左右(分别位于第 1 和第 3 泳道), 同理论值一致。而 TACE5 质粒对照组(第 2 和第 4 泳道)未见 $A\beta_{1-42}$多肽和 mIL-4 蛋白特异条带出现。



1, 3: Lysate of cells transformed with $A\beta_{1-42}$/mIL-4/TACE5, and detected with rabbit anti-human beta-amyloid 1-40 IgG (for $A\beta_{1-42}$ peptide) and anti-murine IL-4 (for mIL-4), respectively; 2, 4: Lysate of cells transformed with TACE5 for control, and detected with rabbit anti-human beta-amyloid 1-40 IgG (for $A\beta_{1-42}$ peptide) and anti-murine IL-4 (for mIL-4), respectively. Amount of all samples was 30 μg/30 μl

图 4　转染重组质粒的 BHK-21 细胞裂解产物的 Western-blot 结果

Fig 4　Western-blot of lysate of transformed 293 cells

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

3 讨论

CNS 的专职 APCs 是实质小胶质细胞和血管周围细胞, 二者都是髓源性并在发育期间移行至 CNS。Aβ 可以认为是一种自身抗原, 其含有 CD4 T 细胞表位($Aβ_{15-42}$)和优势 B 细胞表位($Aβ_{1-15}$)[7,8]。Aβ T 细胞表位及其同 HLA-DR 的限制性分析进一步显示, Aβ 通过含有 MHC 的 APCs 来加工和呈递, Aβ 特异性 T 细胞增殖是通过 MHC-TCR 的相互作用来介导的。因此, Aβ 不但可以在 CNS 中诱导了天然免疫应答, 其在外周也诱导了适应性免疫应答。

用同弗氏完全佐剂混合的合成 Aβ 对 APP Tg 小鼠进行胃肠外免疫可以显著降低脑组织中 Aβ 沉淀的数量和密度, 伴随着神经炎性营养障碍和神经胶质增生的改善[9]。Aβ 抗体的诱导对脑组织中疫苗介导的 Aβ 的清除可能扮演主要作用, 因为 Aβ 抗体的被动转移显示出类似有益的神经病理学效应[10]。现在已经出现两个主要的有关 Aβ 抗体在小鼠中的作用机制的理论。首先, 有证据显示局部活化的小胶质细胞的 Fc-介导的 Aβ-抗体复合物的吞噬和清除[10]。其次, 也有证据显示在血清和脑脊髓液(CSF)中, Aβ 肽从脑组织中移出[11]; 当然也可能存在抗体降低 Aβ-介导的突触和神经元功能障碍的其它途径。对转基因小鼠反复粘膜(鼻腔内)给予 Aβ 肽后也有积极的效应[12], 可能会诱导 Aβ 抗体和 Aβ 斑的部分清除, 伴随着少量有抗炎特性的单核细胞, 即 CNS 中分泌 IL-4、IL-10 和 TGF-β 的单核细胞的浸润。所以, 靶向诱导 Aβ 抗体和 Th2 免疫应答的免疫途径可以导致对 AD 病理学有益效应的小胶质细胞和星形胶质细胞的活化。

在 Aβ 肽的临床人体试验中发现, 在轻度至重度 AD 病人中, 用 $Aβ_{1-42}$ 合成肽同以前试验过的佐剂 QS21 进行胃肠外免疫, 虽然 I 期临床安全性试验没有显示出明显的副作用, 但随后 II 期临床试验开始不久因为大约 5%治疗的病人出现明显的 CNS 炎症反应症状就被终止。最近的 1 例尸检病例报告显示, Aβ 免疫后在 CNS 中出现了一些巨噬细胞和 T 细胞的浸润[3]。最近发现一些中年后个体和 AD 病人有显著增强的针对 Aβ 的 T 细胞反应性[13], 可能是有着高 Aβ T 细胞反应性的 AD 病人当接种同 Th1 型佐剂 QS21 乳化的 Aβ 时, 在 CNS 中出现了严重的 T 细胞反应。因此, 可能是 Aβ-反应性 T 细胞在 Th2 型佐剂存在的情况下, 诱导了第一波 T 细胞对 CNS 的浸润, 紧接着由于脑组织炎症应答引起的针对髓磷脂抗原的 T 细胞应答。也可能是脑组织长时间同佐剂 QS21 的接触诱导了不依赖于 Aβ 反应性 T 细胞的病理性髓磷脂特异的 T 细胞刺激。磁共振图像分析支持病理性髓磷脂反应性 T 细胞介入的可能性, 因为该分析显示在 Aβ 正常情况下不表达的脑白质处出现了损伤。

尽管在人类 Aβ 免疫后出现了副作用, 但是这些结果将有助于确定将来的免疫治疗途径。首先, 采用 Aβ 序列中的一些片段来诱导 Aβ 抗体而不诱导 Aβ T 细胞应答, 因为 $Aβ_{1-15}$ 含有可结合到 Aβ 斑的优势 B 细胞表位, 而不含 T 细胞表位。Aβ 抗体可以通过将此区中的序列偶联到一个载体蛋白上来诱导。也可以被动给予 Aβ 抗体, 从理论上来说, 这将需要周期性地反复应用。另一个途径是以一种诱导 Aβ 抗体和一个非病理性或者甚至是有益的 T 细胞应答的方式来接种。用 $Aβ_{1-42}$ 进行粘膜免疫可诱导 Aβ 抗体和可能有调节特性的 T 细胞。这种途径也可以用人体中鉴定的一个 T 细胞表位来应用, 而且, 这些表位可以经过修饰来产生改变的肽配体(altered peptide ligands, APLs)来诱导 Th2 应答[14] 来提高沉淀斑清除能力和抑制天然神经毒反应。

基因疫苗已经在很多领域取得了进展。基因疫苗相对于传统的免疫策略有着许多优点[4,15]: ①易操作性和稳定性; ②在体内持续表达, 持续刺激免疫系统; ③除了产生 T 细胞免疫之外, 体液免疫功能也较强; ④可方便地制备出多价 DNA 疫苗; ⑤DNA 疫苗在机体内所表达的蛋白将以天然蛋白形式出现; ⑥当在质粒中整合入 CKs (cytokines)或共刺激分子基因, 或与编码这一成分的质粒共注射时, 将能加强随后机体对编码抗原的反应, 或可调节正在起作用的免疫反应。因此, 当 Th2 型细胞因子同某种基因疫苗共同使用时, 随着细胞因子的表达, 会使抗原特异的免疫应答向体液免疫应答的方向发展。如果疫苗和细胞因子构建在不同的载体上共注射时, 可能会出现抗原和细胞因子表达部位的不一致性, 同时还会影响实验的可重复性。但是, 当将这 2 个基因克隆在同一个真核表达载体上使用时, 则可以使它们能在同一部位同时表达, 从而提高免疫效果和实验的可重复性。

参考文献:

[1] Selkoe D J. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy[J]. Physiol Rev, 2001, 81(2): 741-766.

[2] Price D L, Sisodia S S. Mutant genes in familial Alzheimer's disease and transgenic models[J]. Annu Rev Neurosci, 1998, 21(8): 479-505.

[3] Nicoll J A, Wilkinson D, Holmes C, *et al*. Neuropathology of human Alzheimer's disease after immunization with amyloid-beta peptide: a case report[J]. Nat Med, 2003, 9(4): 448-452.

[4] Finn O J. Cancer vaccines: between the idea and the reality[J]. Nat Rev Immunol, 2003, 3(8): 630-641.

[5] 倪 兵, 杨日高, 李艳秋, 等. 基于重组α-病毒的基因疫苗对小鼠肥大细胞瘤 P815 的防治作用[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2004,

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

20(1): 45—48.
[6] 倪 兵, 吴玉章, 王 莉, 等. IL-12 对小鼠肥大细胞瘤基因疫苗的免疫学作用[J]. 免疫学杂志, 2002, 18(4): 258—262.
[7] Monsonego A, Maron R, Zota V, *et al*. Immune hyporesponsiveness to amyloid beta-peptide in amyloid precursor protein transgenic mice: implications for the pathogenesis and treatment of Alzheimer's disease[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(18): 10273—10278.
[8] Frenkel D, Katz O, Solomon B. Immunization against Alzheimer's beta-amyloid plaques via EFRH phage administration[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(21): 11455—11459.
[9] Schenk D, Barbour R, Dunn W, *et al*. Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse[J]. Nature, 1999, 400(6740): 173—177.
[10] Bard F, Cannon C, Barbour R, *et al*. Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. Nat Med, 2000, 6(8): 916—919.
[11] DeMattos R B, Bales K R, Cummins D J, *et al*. Peripheral anti-A beta antibody alters CNS and plasma A beta clearance and decreases brain A beta burden in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(15): 8850—8855.
[12] Weiner H L, Lemere C A, Maron R, *et al*. Nasal administration of amyloid-beta peptide decreases cerebral amyloid burden in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. Ann Neurol, 2000, 48(4): 567—579.
[13] Monsonego A, Zota V, Karni A, *et al*. Increased T cell reactivity to amyloid beta protein in older humans and patients with Alzheimer's disease[J]. J Clin Invest, 2003, 112(3): 415—422.
[14] Kim H J, Antel J P, Duquette P, *et al*. Persistence of immune responses to altered and native myelin antigens in patients with multiple sclerosis treated with altered peptide ligand[J]. Clin Immunol, 2002, 104(2): 105—114.
[15] 倪 兵, 吴玉章. DNA 疫苗与 CTL[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(10): 1012—1015.

(编辑 王 红)

文章编号: 1000-5404(2004)15-1329-01

个案与短篇

65 例肥胖者血脂血糖异常的调查

Survey on blood lipid and glucose abnormality in 65 cases of obesity

杜晓梅, 王 华, 陈文道 (四川省达州市中心医院内分泌科, 达州 635000)

为了解肥胖患者传统心血管危险因素情况, 我们调查了本地区 65 例肥胖患者血糖、血脂水平, 现报告如下。

1 对象与方法

1.1 调查对象

采用随机抽样的方法调查了我院内分泌专科初诊患者(包括门诊及住院), 共 96 人。体质量指数(BMI), 在 25 kg/m^2 及以上者为 65 例, 其中男 40 例, 女 25 例, 年龄 19~74 岁, 平均(48.7±11.3)岁。另以同期健康体检者 BMI≤23 kg/m^2 者为对照组, 共 31 例, 其中男 20 例, 女 11 例, 平均年龄(47.5±9.3)岁。

1.2 调查指标

抽取 12 h 空腹静脉血, 于当日测定以下指标: 胆固醇(TC), 甘油三酯(TG), 高密度脂蛋白(HDL-C), 低密度脂蛋白(LDL-C)。于次日晨 8:00 行口服葡萄糖耐量试验(OGTT)。以上指标系由日立 7060 全自动生化分析完成。人体测量指标包括: 体质量、身高、计算 BMI。受试者脱鞋, 免冠, 仅穿内衣测量, 分别以 kg、cm 为单位记录, 精确度为 0.1 kg 或 0.1 cm。

1.3 诊断标准

①糖尿病及糖耐量异常: 依据 1985 年 WHO 标准入选。②肥胖: 采用 2002 年 WHO 西太平洋地区肥胖诊断标准即: BMI 18.5~22.9 kg/m^2 为正常范围, 23~24.9 kg/m^2 为超重, 25~29.9 kg/m^2 为Ⅰ度肥胖(肥胖 A 组)共 40 例, ≥30 kg/m^2 为Ⅱ度肥胖(肥胖 B 组)共 25 例。

1.4 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 不同组间的比较采用方差分析, 计数资料采用 χ^2 检验(均用 SPSS 软件处理)。

2 结果

2.1 各组 BMI 及血脂的比较(表 1)

表 1 不同 BMI 组血脂比较

组别	BMI (kg/m^2)	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)
对照组	21.65±0.28	4.44±0.55	1.37±0.33	1.46±0.70	2.47±0.54
肥胖 A 组	2.51±.65	27.78±1.25**	5.52±1.02**	3.11±1.47**	1.25±0.61**
肥胖 B 组	32.25±1.35**	5.6±0.96**	3.44±1.33**△	1.21±.57**	2.78±0.59

**: 与对照组比较, $P<0.01$; △: 与肥胖 A 组比较, $P<0.05$

2.2 各组 NGT、IGT、DM 存在情况的比较(表 2)

表 2 不同 BMI 组糖耐量异常比较

组别	n	NGT	IGT	DM
对照组	31	27	3	1
肥胖 A 组	40	10**	9**	21**
肥胖 B 组	25	3**△	2**△	19**△

**: 与对照组比较, $P<0.01$; △: 与肥胖 A 组比较, $P<0.01$

作者简介: 杜晓梅(1966—), 女, 四川省渠县人, 副主任医师, 主要从事糖尿病临床方面的研究, 发表论文 10 余篇。电话: 13508258983

收稿日期: 2004-03-16; 修回日期: 2004-07-05

(下转 1338 页)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net