DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.07.010
第23卷第7期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 7
774 2001年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)07-0774-03

HIV-1_{CN}gp120与IL-6基因共表达质粒的构建及其免疫调节作用

郭 焱,金宁一,张应玖,夏志平,王宏伟,郭志儒,殷 震 (解放军军需大学研究所病毒室,长春 130062)

提 要:目的 研究白细胞介素-6对人类免疫缺陷病毒(HIV)gp120基因免疫小鼠后效果的调节作用。方法 构建表达中国流行株HIV-1gp120基因的核酸疫苗质粒pGP及共表达中国流行株HIV-1gp120基因与IL-6基因的核酸疫苗质粒pGPIL-6,并检测其在哺乳动物细胞中的表达。将上述两种质粒经胫前肌注射BALB/c鼠,检测gp120抗体的产生情况及ConA和LPS诱导的T细胞增殖能力。结果 以间接免疫荧光法(IFA)检测到gp120在哺乳动物细胞中得到表达。pGPIL-6与pGP均可刺激小鼠产生抗gp120抗体,协同注射gp120和IL-6基因的小鼠产生的抗体滴度明显高于单独注射gp120的小鼠。pGPIL-6免疫鼠对ConA和LPS诱导的T细胞增殖能力明显高于单独注射gp120的小鼠。结论 协同应用IL-6基因可明显加强HIV-1gp120基因的免疫反应,为中国流行株HIV-1核酸疫苗的可行性提供了重要实验依据。

关键词:人类免疫缺陷病毒;白细胞介素-6;核酸疫苗质粒
中图法分类号:R393.9;R394-33;R394.3 文献标识码:A

Construction of the plasmid for coexpression of HIV-1_{CN}gp120 gene and IL-6 gene in mammalian cells and mice and its immunoregulatory effect

GUO Yan, JIN Ning-yi, ZHANG Ying-jiu, XIA Zhi-ping, WANG Hong-wei, GUO Zhi-ru, YIN Zhen (Quartermaster University of PLA, Changchun 130062, China)

Abstract **Objective** To investigate the regulating effect of interleukin-6 (IL-6) gene on the immune response induced by human immunodeficiency virus(HIV) gp120 gene in mice. **Methods** The nucleic vaccine plasmid of HIV-1_{CN}gp120 gene and co-expressive nucleic vaccine plasimd of pGPIL-6 were constructed, which containiag both HIV-1 gp120 and IL-6 gene. The two plasmids were then injected together into tibilias anterior muscles of BALB/c mice and the induced humoral immune responses were evaluated. **Results** IFA showed that the constructed plasmids were successfully expressed in mammalian cells. Mice immunized with both gp120 gene and IL-6 gene exhibited a significant increase in the production of anti-HIV-1_{CN}gp120 antibody compared to the mice immunized only with pGP and the proliferating response of splenocytes to ConA and LPS elevated markedly. **Conclusion** Humoral immune responses of BALB/c mice to HIV-1_{CN}gp120 antigen can be enhanced when HIV-1_{CN}gp120 gene and IL-6 gene are used in coordination.

Key words: human immunodeficiency virus; interleukin-6; nucleic vaccine plasmid

人类免疫缺陷病毒(HIV)是引起艾滋病的病原体。1981年美国首先发现了获得性免疫缺陷综合症(俗称艾滋病),并证明是一种新的传染病。1983—1984年从艾滋病病人血清中分离出新病毒,称为人类免疫缺陷病毒(HIV)。该病毒分为两大类型,即HIV-1和HIV-2。HIV-1是引起全球艾滋病流行的病原,在全球感染者已达几千万;HIV-2主要局限于西部非洲。根据HIV-1基因组中变异性最大,同时也被研究得最多的膜蛋白基因(env)的核酸和氨基酸序列的同源性,目前可将HIV-1分为M组的A、B、C、D、E、F、G、H、I、J等10个亚型和O组1个亚型,共11个亚型。在HIV-1M组内,各亚型毒株env基因之间的差异一般在22%~35%[1]。我国流行亚型主要以B亚型和C亚型为主,约占流行亚型的45%和36%[2]。艾滋病传播速度快、病死率高,但目前尚无有效的治疗措施,这使我们把希望寄于预防该病的发生上,核酸疫苗的发现为艾滋病的预防提供了一个崭新的思路。但核酸疫苗免疫原性较弱,为了加强HIV基因免疫效果,我们协同应用了IL-6基因,以观察其对HIV-1gp120基因免疫的调节作用。

1 材料与方法

1.1 质粒、细胞和菌株

含有中国流行株HIV-1gp120(HIV-1_{CN}gp120)基因的质粒pKS-gp120、pBIL-6由本室保存。质粒pcDNA3.1(+)为Invitrogen公司产品,质粒pIRES1neo购自Clontech公司。DH5α宿主菌和BHK-21细胞均为本室保存。

1.2 主要试剂和动物

HIV-1阳性血清由邵一鸣教授提供。辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠IgG、FITC标记的羊抗人IgG购自华美生物工程公司。HIV(1/2)IgG抗体诊断盒购自北京现代生物有限责任公司。^{3}H-TdR购自上海原子核研究所。6~8周龄雄性BALB/c鼠,体重(20±2)g,购自长春生物制品所。

1.3 核酸疫苗质粒的构建

1.3.1 表达HIV-1_{CN}gp120基因的核酸疫苗质粒的构建 用*Xho*Ⅰ和*BamH*Ⅰ消化pcDNA3.1,以得到有*Xho*Ⅰ和*BamH*Ⅰ粘性末端的线性载体。用相应的酶消化质粒pKS-gp120,回收片段gp120,并将其定向插入载体中,筛选重组质粒并酶切鉴定。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(3977066);国家杰出青年基金资助项目(39825119)
作者简介:郭 焱(1963—),女,吉林省吉林市人,硕士,讲师,主要从事医学分子病毒学方面的研究,现在长春中医学院基础部微生物学、免疫学教研室,长春 130021
收稿日期:2000-10-12;修回日期:2001-02-08

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

1.3.2　共表达 HIV-1_{CN}gp120 基因与 IL-6 基因的核酸疫苗质粒的构建　　用 *Sma* Ⅰ 和 *Xba* Ⅰ 消化质粒 pIRES1neo, 去除质粒中的 neo, 回收载体并补平去磷。用 *EcoR* Ⅰ 和 *BamH* Ⅰ 消化 pBIL-6 回收片段 IL-6 并补平。将载体与片段连接, 筛选正向插入的重组质粒并酶切鉴定。

1.4　细胞转染

用脂质体转染法转染 6 nm× 30 nm 培养板的 BHK-21 细胞, 同时转染空白质粒 pcDNA3.1(+)作为阴性, 72 h 收获细胞并裂解。

1.5　表达产物的间接免疫荧光鉴定

取共转染 DOTAP 和重组质粒的混合物, 接种于玻片上 BHK-21 细胞单层细胞, 同时设空质粒和细胞对照。37 ℃, 5% CO_2 作用 18 h, 加入含 1% FCS 及 0.5g 甲基纤维素的 MEM 培养液, 继续培养 72 h, 取出玻片, PBS(pH 7.2)洗 1 次, 100%丙酮固定 10~15 min, PBS 冲洗后, 与中国人 HIV-1 阳性血清(1∶300)反应 2 h, PBS 洗涤 3 次, 然后与异硫氰酸荧光素(FITC)标记的羊抗人 IgG 反应 2 h, PBS 洗涤 3~5 次, 加 0.01%~0.02% Evans Blue 少许, 载玻片上加 1 滴甘油缓冲液(50%甘油 PBS), 将载有细胞的玻片倒置于载玻片上, 于荧光显微镜下观察和拍照。

1.6　核酸疫苗质粒免疫小鼠

BALB/c 雄性小鼠 24 只, 体重 18~22 g, 随机分 3 组, 每组 8 只小鼠, 第 1 组注射空白质粒 pcDNA3.1(+), 第 2 组注射含 gp120 基因的重组质粒 pGP, 第 3 组注射含 gp120/ IL-6 的重组质粒 pGPIL-6。上述各组共免疫 3 次, 每次注射 100 μg/ 只, 最后一次免疫后第 7 天, 取眼球血供 ELISA 检测 HIV 抗体, 无菌取其脾脏检测脾细胞对 ConA 及 LPS 诱导的增殖反应。

1.7　ELISA 法检测小鼠血清中抗 HIV 抗体

ELISA 试剂盒中的包被抗原为灭活的全病毒, 二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 抗体。在酶联免疫仪 450 nm 测量各孔 D_{450}值。

1.8　脾细胞对 ConA 及 LPS 诱导的增殖反应测定

采用 ^{3}H-TdR 掺入法。小鼠脾细胞悬液调成 5× 10^6 个/ ml, 各取 100 μl, 加样于 96 孔平底培养板内, 再加 ConA 或 LPS, 其中 ConA 终浓度为 2.5 μg/ ml, LPS 终浓度为 10 μg/ ml, 并设阴性对照。每个样本设 3 个复孔, 5% CO_2, 37 ℃培养 72 h。终止培养前 6 h 每孔加入 18.5 kBq/ 20 μl。用多头细胞收集器收集细胞于 49 型玻璃纤维滤膜上, β-液闪仪测定 ^{3}H-TdR 掺入量, 结果以 SI(刺激指数)表示转化能力。

$$SI=\frac{\text{实验组 cpm}}{\text{对照组 cpm}}\times 100\%$$

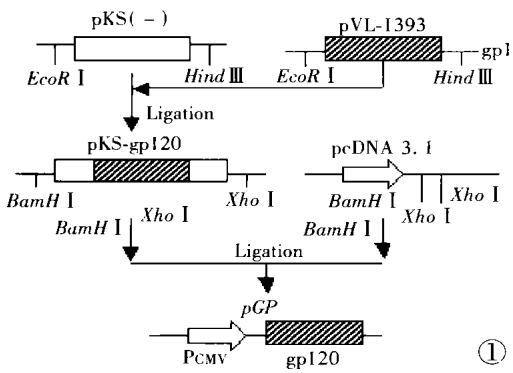
1.9　统计学处理

采用 q 检验。

2　结果

2.1　核酸疫苗质粒的构建

表达 HIV-1_{CN}gp120 基因的核酸疫苗质粒命名为 pGP, 见图 1, 共表达 HIV-1_{CN}gp120 基因与 IL-6 基因的核酸疫苗质粒命名为 pGPIL-6, 见图 2。



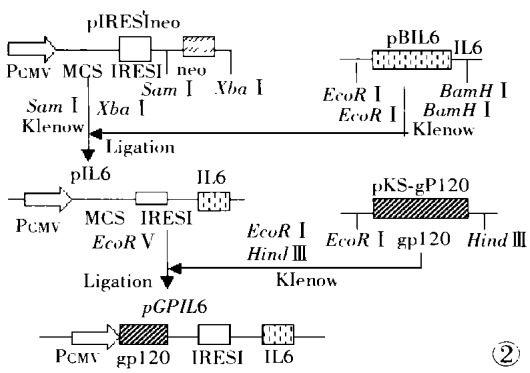


图 1　中国流行株 **HIV-1gp120** 核酸疫苗质粒的构建

Fig 1　Construction of nucleic vaccine plasmid of HIV-1_{CN}gp120

图 2　中国流行株 **HIV-1 gp120/ IL6** 共表达核酸疫苗质粒的构建

Fig 2　Construction of nucleic vaccine plasmid of HIV-1_{CN}gp120/ IL-6

2.2　核酸疫苗质粒表达产物的鉴定

将重组质粒 pGP, pGPIL-6 转染 BHK-21 细胞玻片, 将玻片取出, 经丙酮固定染色, 置荧光显微镜下, 波长 495 nm 处。pGPIL-6转染的细胞, 可检测到荧光; 而 pGP 转染的细胞, 则不能检测到荧光, 表明共表达核酸疫苗质粒表达产物可被 HIV-1 抗体所识别且具有很好的免疫反应性, 表达效率高于对照。

2.3　小鼠血清中抗 HIV 抗体测定

pGPIL-6 与 pGP 比较, pGPIL-6 免疫小鼠后, 血清中 HIV-1 特异的抗体滴度明显高于对照组, $P<0.01$, 见图 3。结果表明, pGPIL-6 能明显提高免疫鼠的体液免疫功能, 细胞因子很好地发挥了免疫佐剂作用。

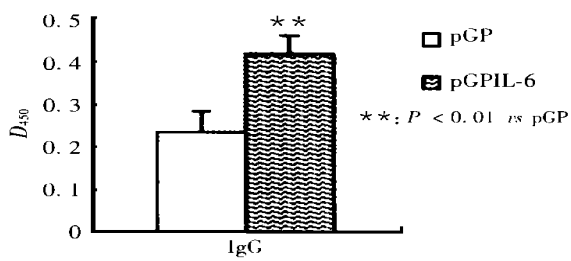


图 3　小鼠血清 **IgG** 抗体的变化

Fig 3　Dynamics of specific serum IgG antibody of immunized mice

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

2.4 小鼠脾细胞对 ConA 及 LPS 诱导的增殖反应测定

pGPIL-6 免疫鼠脾细胞对 ConA、LPS 诱导的增殖能力明显高于对照组 pGP，表明细胞因子 IL-6 很好地发挥了免疫佐剂作用，见图 4。

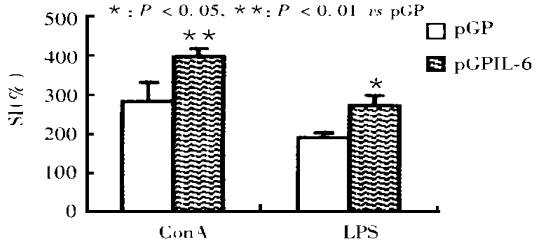


图 4 小鼠脾 T 淋巴细胞 ConA 和 LPS 诱导的反应性

Fig 4 Spleenocytes response of immunized mice to ConA and LPS

3 讨论

核酸疫苗又称基因疫苗或 DNA 疫苗。核酸疫苗一经问世，就因其易于构建和改造、成本低廉、稳定性好，尤其是以自然抗原形式激活免疫系统，产生有效的中和抗体和 CTL 反应，免疫应答持久，使用安全等优点而迅速发展起来。核酸疫苗的发展为 HIV 疫苗的研究提供了一条新途径[3,4]。为了提高核酸疫苗的免疫应答水平，许多研究者将表达免疫调节因子的 DNA 质粒与含有病原的保护性抗原质粒共同免疫，或将二者克隆到同一载体之中，取得了较好的实验结果。细胞因子的免疫佐剂作用已在乙肝疫苗、肿瘤疫苗和其它疫苗的研制中得到了广泛的应用。许多研究者将细胞因子克隆到核酸疫苗质粒中，使之与病原的保护性抗原基因共同表达。常用的细胞因子包括 IL-2、IL-6、IL-12、GM-CSF 和 INF-γ 等。这些细胞因子一方面调节机体的特异性免疫反应，另一方面增强机体的非特异性细胞免疫[5]。构建细胞因子与抗原共同表达的核酸疫苗，通过细胞因子的网络作用，能优化宿主的特异性免疫反应，并诱导机体产生有效的免疫保护，尤其是对免疫力低下和免疫缺陷的个体具有十分重要的意义。IL-6 是一种多功能的细胞因子，具有诱导 T 和 B 淋巴细胞分化和增殖的能力并能增强 CTL 和 NK 细胞的杀伤活力。

本实验利用真核表达质粒构建含 HIV-1_{CN}gp120 基因与 IL-6 基因共表达基因疫苗质粒 pGPIL-6，将其免疫鼠后诱导产生了有效的抗体，免疫鼠脾细胞对 ConA、LPS 诱导的增殖能力明显高于对照组，表明 HIV-1_{CN}gp120 与 IL-6 二者抗原性得到很好地发挥。另外，本实验构建的表达质粒，HIV-1_{CN}gp120 与 IL-6 基因间含有一段 50 几个碱基组成的多克隆位点，这段碱基多克隆位点表达的蛋白，能为两个开放读框蛋白的形成提供足够的空间及柔软性，并使两种外源蛋白各自折叠成有活性的蛋白分子，为保证二者抗原性正常发挥起到一定的作用。

HIV 感染目前尚无理想的治疗措施，本实验证实了核酸疫苗的细胞及体液免疫原性以及细胞因子对免疫应答的促进作用，为临床预防及治疗 HIV 感染提供了崭新的思路。

参考文献：

[1] 潘品良，曾常红，范秀娟，等. 人类免疫缺陷病毒膜蛋白基因(env)F 亚型毒株在中国的首例发现[J]. 病毒学报，1999，15(2)：97－101.

[2] 肖 瑶，戴传斌，潘品良，等. 中国 HIV-1 C 亚型代表株候选疫苗免疫原性的研究[J]. 中华实验和临床病毒学杂志，2000，14(2)：188－189.

[3] Hanke T，Neumann V C，Blanchard T J，*et al*. Effective induction of HIV-specific CTL by multi-epitope using gene gun in a combined vaccination regime[J]. Vaccine，1999，17(6)：589－596.

[4] Kim J J，Ayyavoo V，Bagarazzi M L，*et al*. Development of a multicomponent candidate vaccine for HIV-1[J]. Vaccine，1997，15(8)：879－883.

[5] Sin K Q，Hamajima K，Sasaki S，*et al*. IL-15 expression plasmid enhances cell-mediated immunity induced by an HIV-1 DNA vaccine[J]. Vaccine，1999，17(1 999)：858－866.

[6] 金冬雁，黎孟枫 译. 分子克隆实验指南[M]. 北京：科学出版社，1993. 16－56.

（编辑 谢义霞）

（上接 773 页）

异，$P>0.05$，第 2、3、4 天有显著性差异（$P<0.05$），第 4 天母乳喂养组新生儿体重回升，第 5 天差异不显著（$P>0.05$）。母乳喂养与人工喂养新生儿体重丢失情况见表 1。

表 1 母乳喂养与人工喂养新生儿体重丢失率(%)

组别	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
母乳喂养	3.44	5.19	4.80	3.94	2.76
人工喂养	1.70	2.24	1.81	1.27	1.19
P	>0.05	<0.05	<0.05	<0.05	>0.05

3 讨论

孕期宣教提高了孕产妇及家属对母乳喂养的认知水平，并愿意积极配合及参与母乳喂养；建立和执行促进母乳喂养的工作制度，保证工作的连续性，落实促进母乳喂养的措施，可以有效提高纯母乳喂养率，且在母乳喂养期间新生儿体重丢失率在小于 6%允许范围内，无低血糖发生，是安全有效的。

不同喂养方式体重变化可能有差异，但第 4 天母乳喂养组体重开始回升，第 5 天差异不显著，可能与分娩后前 2 d 奶量不足，新生儿吸吮消耗能量有关，需增加喂哺次数，促进乳汁分泌，提高摄入总量。

关键词：母乳喂养；喂养技术；新生儿体重
中图法分类号：R174.4 文献标识码：B

参考文献：

[1] 能永芳. 围产期一体化整体护理模式的研究与应用[J]. 中华护理杂志，1999，6(6)：402.

[2] 任玉香，王凤英. 母乳喂养中的乳房问题[J]. 中华护理杂志，1997，5(5)：316.

（编辑 冯崇英）

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