

# HIV-1 p24 DNA 和 P24 蛋白联合免疫小鼠的效果

王清涛<sup>1</sup>, 陈玉海<sup>1</sup>, 高诗娟<sup>1</sup>, 姜威<sup>1</sup>, 宋丽萍<sup>1</sup>, 黄文林<sup>1,2</sup>

1 中国科学院微生物研究所 中国科学院病原微生物与免疫学重点实验室, 北京 100101

2 中山大学附属肿瘤医院, 广州 510060

**摘要:** DNA 疫苗能够诱导机体产生特异的细胞免疫和体液免疫反应, 在肿瘤和感染性疾病的疫苗开发中显示出巨大的潜能。以 HIV-1 核心蛋白 P24 为抗原基因, 构建 pVAX1-p24 DNA, 经 Western blotting 和动物活体成像检测证明, pVAX1 DNA 携带的外源基因可以在 293T 细胞和小鼠肌肉组织有效表达。采用不同的免疫策略免疫 BALB/c 小鼠 (DNA/DNA, DNA/Protein), 实验结果表明: pVAX1-p24 单独免疫 BALB/c 小鼠, 可诱导明显的体液免疫及细胞免疫反应; pVAX1-p24 与 P24 蛋白联合免疫诱导的体液免疫反应高于 pVAX1-p24 单独免疫, 所获得的抗体滴度是单独免疫的 7.3~8.0 倍, 但细胞免疫反应则不及单独免疫组。研究结果表明采取不同的免疫策略可以诱导产生不同的免疫反应, 根据具体情况调整免疫策略将获得更好的免疫效果。这些研究为艾滋病疫苗的研发提供了实验依据。

**关键词:** HIV-1, DNA 疫苗, P24 蛋白, 免疫反应

## Immunological efficiency induced by HIV-1 p24 DNA combined with P24 protein

Qingtao Wang<sup>1</sup>, Yuhai Chen<sup>1</sup>, Shijuan Gao<sup>1</sup>, Wei Jiang<sup>1</sup>, Liping Song<sup>1</sup>, and Wenlin Huang<sup>1,2</sup>

1 CAS Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2 State Key Laboratory of Oncology in South China, Cancer Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China

**Abstract:** New strategies to improve vaccine efficacy against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) are still required. DNA vaccines, exhibiting potential advantages over conventional vaccines for their simplicity and versatility, can induce specific humoral and cellular immune responses. We developed a recombinant pVAX1 DNA vector carrying p24 gene of HIV-1. The results showed that pVAX1 mediated gene possessed the ability of effective expression in both transfected 293T cells and BALB/c mice. And pVAX1-p24 DNA prime and boost immunization can induce significant P24-specific humoral immune responses and cellular immune responses in BALB/c mice. Furthermore, immunization with pVAX1-p24 DNA prime and protein boost induced 7.3 to 8.0-fold greater p24-specific humoral responses than pVAX1-p24 DNA prime and boost, while the cellular immune responses induced by combined immunization was lower. The results suggested that pVAX1-p24 DNA and P24 protein vaccine is a promising

**Received:** December 22, 2010; **Accepted:** March 29, 2010

**Supported by:** Guangdong Recruitment Program of Creative Research Groups.

**Corresponding author:** Wenlin Huang. Tel: +86-10-64807808; E-mail: hwenlin@mail.sysu.edu.cn

广东省引进创新科研团队基金资助。

HIV-1 vaccine, and the selections of the immunization strategies are important for the immunization results.

**Keywords:** HIV-1, DNA vaccine, P24 protein, immune response

自 1981 年发现首例艾滋病病例以来,全球已有超过 6 000 万人感染艾滋病毒 (HIV-1),超过一半的感染者因艾滋病以及相关疾病死亡,这种情况在发展中国家尤为严重<sup>[1-3]</sup>。由此可见艾滋病的传播和流行已经对人类健康构成了巨大的威胁,对经济和社会的发展造成了严重的危害。研发安全、有效的 HIV-1 疫苗是控制艾滋病在全世界范围内传播的最为有效的方法,但迄今为止 HIV-1 疫苗的研制依然没有成功<sup>[4]</sup>。

传统的疫苗包括减毒疫苗、灭活疫苗、蛋白亚单位疫苗等,这些方法在众多抗病毒疫苗中取得了巨大的成功,但是在 HIV-1 疫苗的研究中,却各自存在缺陷。减毒 HIV-1 疫苗能够在灵长类动物中诱导抗病毒免疫反应,但是其安全性问题限制了它在人类中的应用<sup>[5]</sup>;灭活疫苗和蛋白亚单位疫苗却无法诱导出有效的中和抗体和细胞免疫反应。病毒载体疫苗和 DNA 载体疫苗作为新型的疫苗策略,在 HIV-1 疫苗的研发中具有巨大的潜力。HIV-1 病毒载体疫苗虽然能够有效诱导机体产生体液免疫和细胞免疫反应,但是同样存在安全性的问题<sup>[6]</sup>,而 DNA 载体具有安全性好、生产工艺简单等特点。1992 年在冷泉港举行的疫苗大会上 DNA 载体首次被报道可诱导机体产生针对病原体和肿瘤抗原的免疫反应<sup>[7]</sup>。随后的 30 年, DNA 载体被越来越多地用于各种肿瘤和病原体的疫苗研究<sup>[8-9]</sup>,其中包括 HIV-1 DNA 疫苗研究,这些研究证明 DNA 疫苗能够诱导机体产生抗原特异的细胞免疫、体液免疫反应和免疫记忆<sup>[6,10-12]</sup>,是一种潜力巨大的艾滋病疫苗。特别是近年来的研究: HIV-1 DNA 疫苗被证明单独使用或者与其他疫苗联合使用能够在灵长类动物模型中诱导特异的免疫反应, HIV-1 DNA 疫苗的临床 I 期试验证明了其安全性<sup>[7]</sup>,近期 4 个兽用 DNA 疫苗(马、狗、猪和鱼)被批准上市<sup>[13]</sup>,这些研究进一步

表明了 HIV-1 DNA 疫苗的巨大潜力。但是与其他类型的 HIV-1 疫苗相比, DNA 疫苗诱导的免疫反应相对较弱,人们采用了不同的策略增强其免疫反应,包括抗原基因密码子优化, DNA 载体结构的改造与优化,新型免疫佐剂的开发, prime-boost 免疫策略,以及更为有效的疫苗递送系统,这些方法都在一定程度上增强了 DNA 疫苗的免疫效果。本实验利用的 pVAX1 DNA 是载体结构已经进行了相应的优化,并被美国食品和药品管理委员会 (FDA) 批准的唯一可以应用于人体实验的载体 DNA;本实验选用序列保守的核心蛋白 P24 作为抗原基因,构建有望诱导具有交叉免疫反应的 HIV-1 疫苗<sup>[6]</sup>,并对 p24 基因做了密码子优化,以提高抗原基因在真核细胞中的表达水平。本实验构建的 pVAX1-p24 重组 DNA 能够在 BALB/c 小鼠体内诱导抗原特异的体液免疫和细胞免疫反应,其单独免疫和与 P24 蛋白的联合免疫所诱导的机体免疫反应展现出不同的特点。该结果提供了一种具有潜力的候选疫苗并为艾滋病疫苗的研发奠定了理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 质粒、菌种和细胞

pVAX1 质粒购自 Invitrogen 公司; pVAX1-luc, pShuttle-gag, pGEX-p24 质粒为本实验室构建并保藏;大肠杆菌 TOP10 和 Rosetta 购自中国 TIANGEN 生物科技有限公司;人转化肾上皮细胞系 293T 购自美国 ATCC。

### 1.2 主要试剂和材料

限制性内切酶和连接酶购自 TaKaRa 公司;胎牛血清购自 Hyclone 公司; DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司;质粒提取试剂盒和 TRNzol Total RNA Reagent 购自中国 TIANGEN 生物科技有限公司;抗 HIV-1 p24 单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司; HRP

标记羊抗鼠 IgG 抗体购自中杉金桥公司。

### 1.3 疫苗的制备和验证

#### 1.3.1 pVAX1-p24 DNA 疫苗的构建

以含有本实验室密码子优化的 gag 基因的 pshuttle-gag 为模板, 上游引物为 5'-ATGCGGCCG CCCCATCGTGCAGAACATCCA-3' (Not I), 下游引物为 5'-GCTCTAGATTACAGCACTCTGGCCTTGT GG-3' (Xba I), PCR 扩增 p24 基因序列, 产物经 Not I 和 Xba I 酶切并回收后, 与经过相同酶酶切回收的 pVAX1 连接, 得到的重组质粒经过测序验证, 获得重组质粒 pVAX1-p24。

#### 1.3.2 细胞培养与转染

细胞在含 10% 胎牛血清、2 mmol/L L-谷氨酰胺、100 U/mL 氨苄和 100 mg/L 氯霉素的 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 培养基 (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) 中贴壁生长。转染前将细胞按 5×10<sup>5</sup>/孔接种于 6 孔板的孔中, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养, 当细胞浓度达到 80%~90% 时, 将培养基换为 DMEM 无血清培养基, 随后转染 pVAX1 质粒和 pVAX1-p24 质粒, 每孔转入质粒的量均为 0.4 μg, 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 4~6 h, 之后用含 10% 血清的 DMEM 培养基换液, 继续培养 36 h, 进行后续的检测。

#### 1.3.3 Western blotting 检测蛋白表达

收集转染 pVAX1 质粒和 pVAX1-p24 质粒的 293T 细胞, 用细胞裂解液提取总蛋白, 用 Bradford 法测量蛋白浓度, 各取 40 μg 蛋白进行 12% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳, 然后在冰上 300 mA 条件下转膜 1 h。5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 加入一定稀释比例的一抗 4 °C 反应过夜, 用 TBST 洗涤 3 次, 再加连接有辣根过氧化物酶的二抗室温孵育 1 h, 然后用凝胶成像仪检测。

#### 1.3.4 P24 蛋白的诱导表达和纯化

将重组质粒 pGEX-p24 转化 Rosetta 菌株, 用 IPTG 诱导 28 °C 表达, 超声破碎提取融合 P24 蛋白, 并经过亲和层析和蛋白酶酶切纯化, SDS-PAGE 电

泳检测, 最终获得纯化的 P24 蛋白。

### 1.4 质粒 pVAX1-luc 注射小鼠

6~8 周龄 BALB/c 雌性小鼠购自中国医学科学院动物繁殖中心, 清洁级饲养。将 20 μg 的 pVAX1-luc 或者 pVAX1 分别注射 BALB/c 小鼠腿部肌肉。实验组和对照组各设 4 只小鼠, 左右腿各注射 1 次。

### 1.5 活体动物成像

pVAX1-luc 或 pVAX1 分别注射的 BALB/c 小鼠 7 d 之后, 腹腔注射 100 μL 终浓度 30 mg/mL 的 D-荧光素钾盐。10 min 后, 腹腔注射戊巴比妥钠, 将小鼠麻醉, 通过活体动物成像仪检测荧光素酶在小鼠体内的表达情况。

### 1.6 肌肉组织中荧光素酶报告基因检测

pVAX1-luc 或 pVAX1 注射的 BALB/c 小鼠 7 d 之后, 颈椎脱臼处死小鼠, 取出腿部肌肉组织, 用预冷的磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤。在液氮中将组织研碎, 用荧光素酶裂解缓冲液 (Promega, E1500 型号) 在冰浴中研磨裂解细胞, 裂解液在 4 °C、12 000×g 条件下离心 10 min, 取上清进行荧光素酶检测。每组 3 只小鼠。

### 1.7 动物免疫

BALB/c 小鼠随机分成 A、B 和 C 三个小组, 每组 10 只小鼠。A 组注射 pVAX1 作为对照, B 组注射 pVAX1-p24 质粒, C 组是 pVAX1-p24 质粒和 P24 蛋白 (添加不完全 Freund 佐剂) 联合免疫。各组注射体积均为 100 μL, 均采用腿部肌肉注射, 左右腿各 50 μL。其中 pVAX1 和 pVAX1-p24 免疫剂量是 40 μg/只, P24 蛋白免疫剂量是 10 μg/只。第 2 次和第 3 次免疫后 2 周每组小鼠随机取出 5 只眼眶取血, 并处死取脾细胞检测 P24 特异的体液免疫和细胞免疫反应。动物分组情况及免疫程序见表 1。

### 1.8 ELISA 检测 P24 特异的体液免疫反应

用表达纯化的 P24 抗原蛋白以 0.1 μg/mL 的浓度包被酶标板, 4 °C 包被过夜, PBST 洗 3 次。小鼠血清以 1:100 稀释, 之后倍比稀释, 每孔加样

表 1 动物分组和免疫程序

Table 1 Animal groups and immunization schedules

Groups	Mice	Method		
		0 week	3 weeks	6 weeks
A	BALB/c	pVAX1 40µg	pVAX1 40µg	pVAX1 40µg
B	BALB/c	pVAX1-p24 40 µg	pVAX1-p24 40 µg	pVAX1-p24 40 µg
C	BALB/c	pVAX1-p24 40 µg	P24 protein 10 µg	P24 protein 10 µg

100 µL, 37 °C 孵育 1 h。PBST 洗 3 次, 加入 1 : 10 000 稀释的相应二抗, 37 °C 孵育 1 h, PBST 洗 3 次, 加入 TMB 显色并读数。

### 1.9 IFN- $\gamma$ ELISPOT 检测 P24 特异的细胞免疫反应

ELISPOT 平板每孔加入 100 µL IFN- $\gamma$  包被抗体, 4 °C 包被过夜, PBS 200 µL/孔洗涤 5 次, 加入封闭液 200 µL/孔, 室温封闭 2 h, 弃去封闭液, 将分离的小鼠脾细胞按  $1 \times 10^5$ /孔加入 ELISPOT 96 孔板, 实验孔加入刺激物 (P24 的肽库终浓度均为 10 µg/mL), 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 孵育 24 h, 甩掉细胞, 去离子水洗 2 次, 磷酸盐吐温缓冲液 (PBST) 洗 3 次。用含 10% 胎牛血清的 PBS 按 1 : 100 稀释 HRP, 100 µL/孔溶液加入 ELISPOT 板中, 室温下孵育 1 h。弃掉液体, 拍干 PBST 洗涤 4 次后用 PBS 洗涤 2 次。加入显色底物 100 µL/孔, 室温下避光放置 5~20 min (并肉眼观察颜色变化), 100 µL/孔去离子水终止显色, 用去离子水 200 µL/孔洗涤后晾干, 用 CTL 公司 Immunospot 读数仪读数, 分析结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 重组质粒 pVAX1-p24 DNA 疫苗的构建与表达

重组质粒 pVAX1-p24 的启动子为 Pcmv, 抗性为 Kanamycin, 复制子为 pUC ori, 所携带的抗原基因是 HIV-1 的衣壳蛋白 p24 基因。将 pVAX1-p24 质粒和 pVAX1 质粒分别转染 293T 细胞, 48 h 之后, 裂解细胞收集上清液并用 Western blotting 技术检测

P24 蛋白表达情况。结果如图 1 所示, pVAX1-p24 DNA 能够在 293T 细胞中高效表达 P24 蛋白。

### 2.2 HIV-1 P24 重组蛋白的表达纯化和鉴定

将融合表达质粒 pGEX-p24 转入表达宿主菌, 用 IPTG 诱导表达。亲和层析酶切纯化后的表达产物用 SDS-PAGE 电泳鉴定, 结果如图 2 所示, 在相对分子量约 24 kDa 的位置有一条明显的条带, 大小与 p24 蛋白一致。

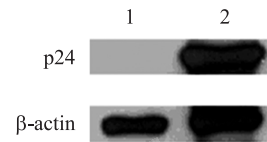


图 1 pVAX1-p24 DNA 在 293T 细胞中的表达

Fig. 1 Expression of pVAX1-p24 in 293T cells by Western blotting. 1: 293T cells transfected with pVAX1; 2: 293T cells transfected with pVAX1-p24.

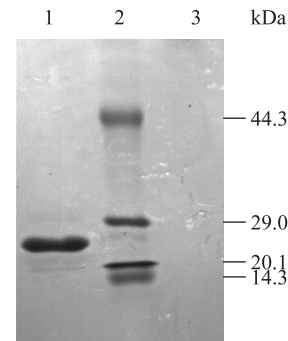


图 2 SDS-PAGE 检测纯化的 P24 蛋白

Fig. 2 Purified P24 protein by SDS-PAGE. 1: P24 protein; 2: protein marker; 3: negative control.

### 2.3 pVAX1-luc DNA 在小鼠腿部肌肉中的表达

DNA 疫苗免疫效果的一个限制因素是抗原能否在机体内有效地表达<sup>[14-15]</sup>, 为了验证 pVAX1 DNA 携带的抗原基因在机体内的表达情况, 我们构建了携带 luciferase 基因的 pVAX1, 命名为 pVAX1-luc DNA。在小鼠腿部肌肉分别注射 pVAX1-luc DNA 和 pVAX1 DNA, 7 d 后使用活体动物成像技术和肌肉组织中荧光素酶报告基因检测技术检测报告基因在肌肉组织中的表达情况。如图 3 所示, 肌肉注射之后外源基因能够在小鼠腿部肌肉位置有效表达。

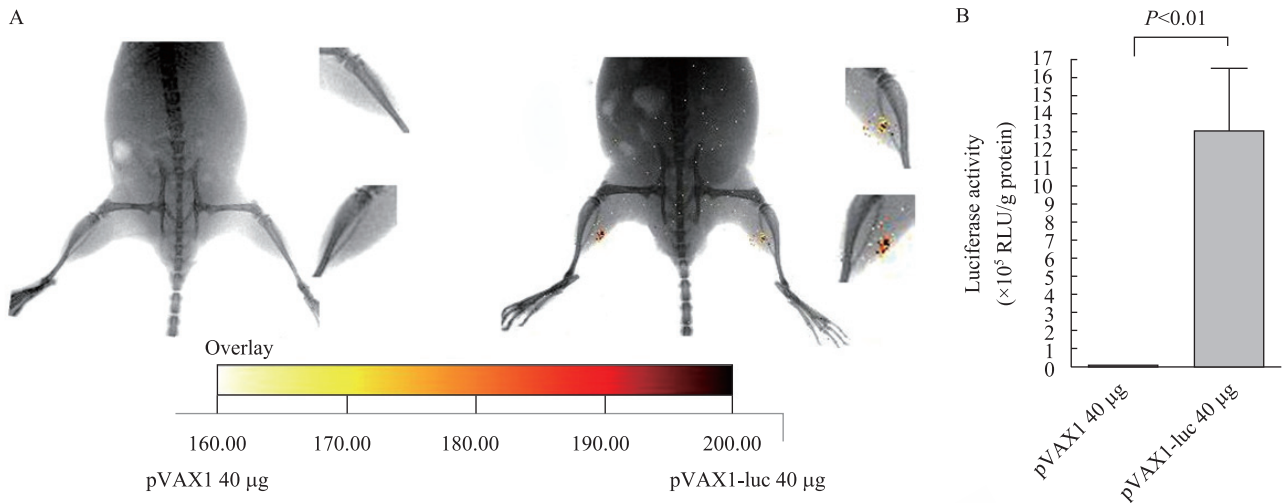


图 3 pVAX1-luc DNA 肌肉注射后在小鼠体内的表达

Fig. 3 Luciferase expression in mice muscle after seven days detected by *in vivo* imaging system (A) and by luciferase assay system (B).

#### 2.4 ELISA 检测 pVAX1-p24 DNA 单独免疫和联合 P24 蛋白免疫诱导的体液免疫反应

pVAX1-p24 DNA 疫苗以 40 µg/只的剂量免疫 BALB/c 小鼠,并在第 2 次免疫后 2 周和第 3 次免疫后 2 周检测 P24 特异的体液免疫反应水平。如图 4 所示, pVAX1-p24 DNA 疫苗能够在 BALB/c 小鼠模型中诱导出明显的体液免疫反应, 3 次免疫后的体液免疫反应比 2 次免疫后体液免疫水平提高 2.9 倍。同时实验还采取了 pVAX1-p24 DNA 联合 P24 蛋白的免疫策略。结果显示第 2 次免疫后 2 周联合免疫显示了强的免疫效果, 其诱导的特异抗体滴度是 pVAX1-p24 DNA 单独免疫诱导的抗体滴度的 7.3 倍,说明 DNA 疫苗和蛋白联合免疫能够诱导出更强的抗原特异的体液免疫反应。第 3 次免疫后 2 周, 各组之间的抗体反应水平趋势和第 2 次免疫之后相同, 但是联合免疫与 DNA 单独免疫组间的差异更加明显, 联合免疫诱导的特异抗体滴度是 DNA 单独免疫诱导的抗体滴度的 8 倍。说明与 DNA 疫苗单独免疫相比, DNA 疫苗和蛋白联合免疫能够诱导出更强的抗原特异的体液免疫反应。

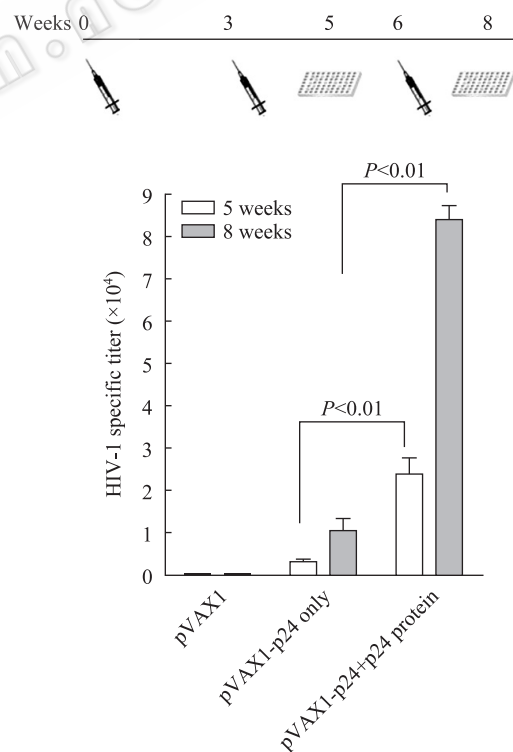


图 4 pVAX1-p24 单独免疫和联合 P24 蛋白免疫 BALB/c 诱导的 P24 特异的体液免疫反应

Fig. 4 p24-specific humoral immune responses in BALB/c mice immunized with pVAX1-p24 DNA prime and boost or pVAX1-p24 DNA prime protein boost.

## 2.5 IFN- $\gamma$ ELISPOT 检测 pVAX1-p24 DNA 单独免疫和联合 P24 蛋白免疫诱导的 P24 特异的细胞免疫反应

IFN- $\gamma$  ELISPOT 检测结果表明 pVAX1-p24 DNA 单独免疫与联合免疫均可诱导出有效的特异性细胞免疫反应。但与体液免疫反应不同, 单独免疫则表现出更强的细胞免疫诱导特性, 第 2 次免疫后 2 周, pVAX1-p24 DNA 单独免疫所诱导的 P24 特异的细胞免疫应答水平是联合免疫组的 2.3 倍。第 3 次免疫后 2 周, 特异性细胞免疫水平和第 2 次免疫后趋势相同, 但是差异更加明显, pVAX1-p24 DNA 单独免疫组是联合免疫组的 5.5 倍。进一步说明了不同的免疫方式将产生不同的免疫效果。

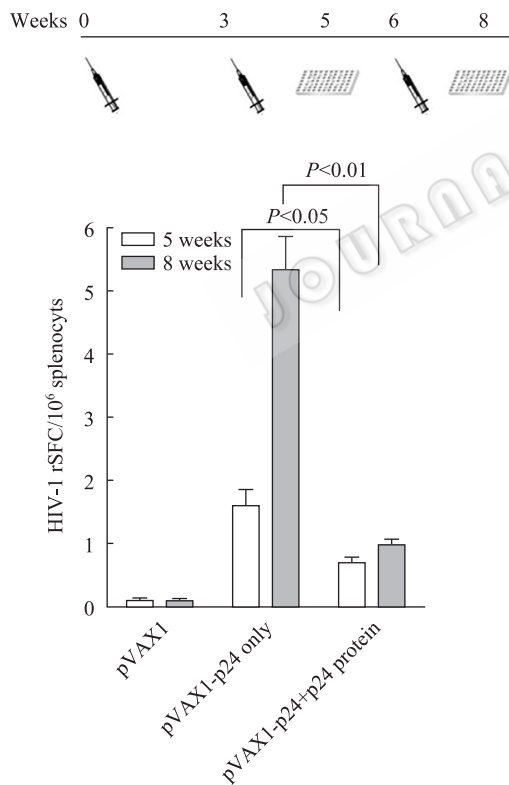


图 5 pVAX1-p24 DNA 单独免疫和与 P24 蛋白联合免疫诱导的 P24 特异细胞免疫反应

Fig. 5 The p24-specific cellular immune responses in BALB/c mice immunized with pVAX1-p24 DNA prime and boost or pVAX1-p24 DNA prime protein boost.

## 3 讨论

尽管作为疫苗载体, DNA 疫苗有巨大的潜在优势, 但也同时存在一些限制因素, 限制 DNA 疫苗的免疫效果, 其中一个重要的限制因素就是 DNA 载体在转染细胞内的表达效率不高, 被抗原呈递细胞吸收并进入细胞核有效表达的效率更低<sup>[16-17]</sup>。本实验结果表明 pVAX1-luc 能够在小鼠腿部肌肉的注射位置周围有效表达, 这也是 pVAX1-p24 DNA 疫苗能够在小鼠体内诱导抗原特异的体液免疫反应和细胞免疫反应的保证。但是动物活体成像的结果表明其表达效率也不是很高, 所以在今后的实验中可以通过改进 pVAX1-p24 DNA 疫苗的免疫方法, 提高抗原基因在机体细胞中的表达效率来进一步提高 pVAX1-p24 DNA 疫苗的免疫效果<sup>[17]</sup>。

DNA 疫苗和蛋白疫苗在诱导机体免疫方面各有特点, 其中 DNA 疫苗能够诱导以抗原特异的细胞免疫为主的免疫反应<sup>[18]</sup>, 而蛋白疫苗则诱导机体产生以抗原特异的体液免疫反应为主的免疫反应<sup>[19]</sup>, 许多研究利用 DNA 疫苗和蛋白疫苗联合免疫来诱导更强的体液免疫和细胞免疫反应<sup>[18,20-21]</sup>。但并不是所有的利用 DNA 疫苗和蛋白疫苗联合免疫的研究都能够诱导出更高水平的体液免疫和细胞免疫反应, 例如 Osorio 等报道无论是 DNA 疫苗初免蛋白疫苗加强还是蛋白疫苗初免 DNA 疫苗加强与 DNA 单独免疫相比, 都没有明显的优势, 反而是 DNA 单独免疫组 INF- $\gamma$  的水平更高<sup>[22]</sup>。Rafati 等也报道了 DNA 免疫组与 DNA 和蛋白联合免疫组相比, 细胞免疫反应水平更高<sup>[23]</sup>。本实验的结果也表明 pVAX1-p24 DNA 疫苗单独免疫能够诱导出更高的 P24 特异的细胞免疫反应, 而 pVAX1-p24 和 P24 蛋白疫苗联合免疫则诱导出更高水平的 P24 特异的体液免疫反应。这可能和 DNA 疫苗以及蛋白疫苗各自的免疫机制有关。现在关于 DNA 疫苗的免疫机制并不是特别清楚, 但一般认为 DNA 疫苗在体内的抗原表达和抗原呈递过程类似与病原体天然的感染过

程。DNA 进入细胞之后,在细胞内表达抗原蛋白,随后被胞内的蛋白水解酶降解成短肽并进入内质网与 MHC-I 分子形成复合物,经 MHC-I 分子途径呈递,激活 CD8<sup>+</sup> T 细胞,部分蛋白也可能分泌或释放,经 MHC-II 分子途径激活体液免疫反应,所以 DNA 疫苗能够诱导细胞免疫和体液免疫,但以细胞免疫反应为主<sup>[24-25]</sup>。而蛋白疫苗进入机体后,很难直接进入细胞质,而是被巨噬细胞或者树突状细胞等专职抗原呈递细胞吞噬,在内吞体或者溶酶体内被加工成为短肽并与 MHC-II 分子形成复合物,经 MHC-II 分子途径呈递从而诱导 B 淋巴细胞的活化和抗体的产生,产生以体液免疫反应为主的免疫反应<sup>[24]</sup>。另外,联合免疫组细胞免疫反应水平比 DNA 单独免疫组低也可能是由于我们所使用的 DNA 载体在细胞内的表达效率低和持续时间短,只免疫一次 DNA 无法提供强烈而持久的刺激,从而导致细胞免疫反应水平低。可以通过调整免疫策略提高联合免疫的免疫效果,例如采用 DNA-蛋白-DNA 的免疫策略,提高细胞免疫反应水平。除此之外,这可能还与免疫剂量、疫苗佐剂等因素有关。尽管本实验中联合免疫组的细胞免疫反应与 DNA 单独免疫组相比较弱,但它同时诱导出较强的体液免疫反应,这种更为全面的免疫反应对于机体针对一些病毒的免疫保护作用可能更为重要。而对于 HIV-1,最为理想的疫苗应该是能够同时诱导体液免疫和细胞免疫的疫苗<sup>[4]</sup>。当然,针对不同的病毒,需要不同特点的免疫反应,要求采取不同的免疫策略。本实验的研究结果就为诱导不同特点的免疫反应提供了理论依据。

综上所述,本实验构建的 pVAX1-p24 DNA 疫苗能够在 BALB/c 小鼠中诱导明显的 P24 特异的免疫反应。并且 pVAX1-p24 DNA 单独免疫以及联合 P24 蛋白疫苗免疫诱导免疫反应呈现出不同的特点,这一研究结果为艾滋病疫苗的研究提供了理论基础和一种潜力的候选疫苗。

## REFERENCES

- [1] Lu L, Jia M, Ma Y, et al. The changing face of HIV in China. *Nature*, 2008, 455(7213): 609-611.
- [2] Weiss RA. HIV and AIDS: looking ahead. *Nat Med*, 2003, 9(7): 887-891.
- [3] Greene WC. A history of AIDS: looking back to see ahead. *Eur J Immunol*, 2007, 37(Suppl 1): S94-S102.
- [4] Barouch DH. Challenges in the development of an HIV-1 vaccine. *Nature*, 2008, 455(7213): 613-619.
- [5] Wyand MS, Manson KH, Garcia-Moll M, et al. Vaccine protection by a triple deletion mutant of simian immunodeficiency virus. *J Virol*, 1996, 70(6): 3724-3733.
- [6] Priddy FH, Brown D, Kublin J, et al. Safety and immunogenicity of a replication-incompetent adenovirus type 5 HIV-1 clade B gag/pol/nef vaccine in healthy adults. *Clin Infect Dis*, 2008, 46(11): 1769-1781.
- [7] Kutzler MA, Weiner DB. DNA vaccines: ready for prime time? *Nat Rev*, 2008, 9(10): 776-788.
- [8] Barouch DH, Yang ZY, Kong WP, et al. A human T-cell leukemia virus type 1 regulatory element enhances the immunogenicity of human immunodeficiency virus type 1 DNA vaccines in mice and nonhuman primates. *J Virol*, 2005, 79(14): 8828-8834.
- [9] Marsac D, Puaux AL, Riviere Y, et al. *In vivo* induction of cellular and humoral immune responses by hybrid DNA vectors encoding simian/human immunodeficiency virus/hepatitis B surface antigen virus particles in BALB/c and HLA-A2-transgenic mice. *Immunobiology*, 2005, 210(5): 305-319.
- [10] Catanzaro AT, Koup RA, Roederer M, et al. Phase I safety and immunogenicity evaluation of a multiclade HIV-1 candidate vaccine delivered by a replication-defective recombinant adenovirus vector. *J Infect Dis*, 2006, 194(12): 1638-1649.
- [11] Catanzaro AT, Roederer M, Koup RA, et al. Phase I clinical evaluation of a six-plasmid multiclade HIV-1 DNA candidate vaccine. *Vaccine*, 2007, 25(20): 4085-4092.
- [12] Liu J, O'Brien KL, Lynch DM, et al. Immune control of an SIV challenge by a T-cell-based vaccine in rhesus monkeys. *Nature*, 2009, 457(7225): 87-91.
- [13] Liu MA, Wahren B, Karlsson Hedestam GB. DNA vaccines: recent developments and future possibilities.

- Human Gene Ther, 2006, 17(11): 1051–61.
- [14] van Drunen Littel-van den Hurk S, Hannaman D. Electroporation for DNA immunization: clinical application. *Expert Rev Vaccines*, 9(5): 503–517.
- [15] Cemazar M, Sersa G. Electrotransfer of therapeutic molecules into tissues. *Curr Opin Molec Ther*, 2007, 9(6): 554–562.
- [16] Roos AK, Eriksson F, Timmons JA, et al. Skin electroporation: effects on transgene expression, DNA persistence and local tissue environment. *PLoS ONE*, 2009, 4(9): e7226.
- [17] Paster W, Zehetner M, Kalat M, et al. *In vivo* plasmid DNA electroporation generates exceptionally high levels of epitope-specific CD8<sup>+</sup> T-cell responses. *Gene Therapy*, 2003, 10(9): 717–724.
- [18] Shu Y, Winfrey S, Yang ZY, et al. Efficient protein boosting after plasmid DNA or recombinant adenovirus immunization with HIV-1 vaccine constructs. *Vaccine*, 2007, 25(8): 1398–1408.
- [19] Walker LE, Vang L, Shen X, et al. Design and preclinical development of a recombinant protein and DNA plasmid mixed format vaccine to deliver HIV-derived T-lymphocyte epitopes. *Vaccine*, 2009, 27(50): 7087–7095.
- [20] Wang S, Kennedy JS, West K, et al. Cross-subtype antibody and cellular immune responses induced by a polyvalent DNA prime-protein boost HIV-1 vaccine in healthy human volunteers. *Vaccine*, 2008, 26(8): 1098–1110.
- [21] Nchinda G, Amadu D, Trumfheller C, et al. Dendritic cell targeted HIV gag protein vaccine provides help to a DNA vaccine including mobilization of protective CD8<sup>+</sup> T cells. *Proc Nat Acad Sci USA*, 107(9): 4281–4286.
- [22] Osorio Y, Cohen J, Ghiasi H. Improved protection from primary ocular HSV-1 infection and establishment of latency using multigenic DNA vaccines. *Invest Ophthalmol Visual Sci*, 2004, 45(2): 506–514.
- [23] Rafati S, Ghaemimanesh F, Zahedifard F. Comparison of potential protection induced by three vaccination strategies (DNA/DNA, Protein/Protein and DNA/Protein) against leishmania major infection using signal peptidase type I in BALB/c mice. *Vaccine*, 2006, 24(16): 3290–3297.
- [24] Srivastava IK, Liu MA. Gene vaccines. *Ann Int Med*, 2003, 138(7): 550–559.
- [25] Alpar HO, Papanicolaou I, Bramwell VW. Strategies for DNA vaccine delivery. *Expert Opin Drug Deliv*, 2005, 2(5): 829–842.