

人乳头瘤病毒 58 型 L1/E7“假病毒”疫苗的制备及免疫效果评价*

王亚婷¹, 李文生¹, 闫小飞², 齐宗利¹, 郭 华¹

(1. 陕西省人民医院病理科, 西安 710068; 2. 西安交通大学基础医学院, 西安 710061)

摘要:目的 构建人乳头瘤病毒 58 型 L1/E7“假病毒”疫苗,并研究其免疫学特性。方法 采用 sf9 昆虫-杆状病毒表达系统表达 HPV58 L1 蛋白,体外解离重组病毒颗粒,向已经解离的衣壳中加入 mE7-pcDNA3.1⁺ 质粒, CaCl₂ 室温透析促使病毒样颗粒(VLP)重新聚合,用“假病毒”颗粒滴鼻免疫小鼠,检测小鼠血清 IgG, IgA 中和抗体以及脾淋巴细胞 IFN- γ 的分泌水平和细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)反应。结果 SDS-PAGE, Western blot 和红细胞凝集实验证实 sf9 昆虫-杆状病毒表达系统有效表达有功能活性的 HPV58 L1 蛋白, HPV58 L1 蛋白能够有效的折叠、解聚以及再折叠为 VLP。小鼠免疫保护实验发现,用包含有 mE7-pcDNA3.1⁺ 质粒的 HPV58 L1“假病毒”免疫小鼠,抗 HPV58 L1 特异性 IgG, IgA 明显升高($P < 0.001$),“假病毒”免疫组产生的 IFN- γ 明显高于 VLP 免疫组($P < 0.001$);“假病毒”免疫过的小鼠脾淋巴细胞可以特异性杀伤 Tc-1 细胞,引起 CTL 反应。结论 成功制备了人乳头瘤病毒 58 型 L1/E7“假病毒”疫苗,能诱发免疫动物较强的体液免疫反应,激发保护性抗体的产生。

关键词:人乳头瘤病毒 58 型;病毒样颗粒;假病毒;细胞毒性 T 淋巴细胞

中图分类号:R373;R392-33 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2018)03-035-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2018.03.011

Construction of Pseudovirions of Human Papillomavirus Type58 L1/E7 and Evaluation of Its Immunity Protective Efficacy

WANG Ya-ting¹, LI Wen-sheng¹, YAN Xiao-fei², QI Zong-li¹, GUO Hua¹

(1. Department of Pathology, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, China;

2. Basic Medical College of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

Abstract: **Objective** To develop a Human papilloma virus (HPV) type 58 L1/E7 pseudovirions vaccine and evaluate its immunity efficacy. **Methods** HPV58 L1 protein was expressed in sf9 insect cell by using baculovirus expression system, after HPV58 VLPs was dialyzed with dissociation buffer, those were mixed with mE7-pcDNA3.1⁺ plasmid, reassembled into a novel pseudovirions of HPV58. The ability of the reassembled into virus-like particles was identified by transmission electron microscope, and murine erythrocyte hemagglutination assay. In addition, HPV58 L1/E7 pseudovirions were immunized Balb/c mice by dripping nasal method, HPV58 L1 specific IgGs and IgAs antibody were examined by ELISA assay, and the concentration of IFN- γ were detected by ELISA method, cytotoxic T lymphocyte reaction of mouse spleen lymphocytes to TC-1 cells were detected by LDH method. **Results** HPV58 L1 protein was highly expressed in sf9 insect system, the results showed that the expression of HPV58 L1 protein could induce the aggregation of red blood cells in mice, demonstrating the expression of HPV58 L1 showed good biological activity. After the CaCl₂ dialysis, the dissociated virus like particles could be resynthesized into pseudovirions. HPV58 L1 specific IgGs and IgAs were significantly increased in the serum of Balb/c mice immunized with HPV58 VLP group and pseudovirions group ($P < 0.001$). The serum levels of IFN- γ were significantly increased in the pseudovirions and VLP group ($P < 0.001$), the spleen lymphocyte of pseudovirions immunized mice could specifically kill TC-1 cells, causing cytotoxic T lymphocyte reaction. **Conclusion** The HPV58 L1/E7 pseudovirions vaccine was been successfully constructed, and “pseudovirus” vaccine can induce a strong humoral immune response in immune animals and stimulate the production of protective antibodies.

Keywords: HPV58; virus-like particles; pseudovirions; cytotoxic T lymphocyte

子宫颈癌是女性最常见的生殖道恶性肿瘤,严重威胁着女性的生命健康。流行病学调查结果表明,高危型人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)感染,是宫颈癌的重要启动因子^[1]。在世界

范围内,高危型 HPV 感染常见型别是 HPV16 和 HPV18 型,但在我国宫颈癌变中, HPV58 型是继 HPV16 之后的重要型别^[2]。研制 HPV58 型预防及治疗性疫苗,对降低我国宫颈癌发生率尤为重

* 基金项目:陕西省科技攻关课题(2010K12-02),陕西省卫生计生科研项目(2016D035)。

作者简介:王亚婷(1979—),女,医学硕士,主要从事病理学及肿瘤生物学研究。

通讯作者:李文生,男,医学博士,主任医师,研究方向:肿瘤病理与肿瘤生物学, E-mail:liwensheng263@hotmail.com。

要。

HPV 基因组结构按功能可分为上游调节区(LCR)、早期基因区(E1, E2, E4, E5, E6, E7)和晚期基因区(L1, L2)。其中, E6, E7 基因编码的蛋白与宿主细胞转化功能直接相关, L1 基因编码的衣壳蛋白可自我组装成病毒样颗粒(virus-like particles, VLPs), 可刺激机体产生长效的中和抗体^[3]。目前已经上市的两种 HPV 疫苗均是以 L1 蛋白为目标抗原的重组疫苗^[4], 均为预防性疫苗, 对于已经感染 HPV 及发生宫颈癌的病人没有治疗作用, 同时已上市的两种 L1 VLP 混合型 HPV 预防性疫苗都是针对欧美地区 HPV 在宫颈癌中的流行分布特点研发, 均不含 HPV58 L1 VLP。

结合我国宫颈癌发生的实际情况, 研制高效廉价的预防性和治疗性 HPV58 型疫苗是我国宫颈癌防治的最佳策略之一。本研究利用昆虫-杆状病毒系统构建了由 HPV58 L1 蛋白组成的病毒样颗粒(virus-like particles, VLPs), 在 VLP 内部包裹突变型 HPV58 E7 基因(通过突变去除了 E7 蛋白的转化活性, 但保持了它的抗原性), 制备了 HPV58VLP/E7DNA“假病毒”疫苗, 同时具有预防和治疗作用, 用“假病毒”疫苗免疫小鼠, 评估疫苗的体液和细胞免疫效果。

1 材料与方法

1.1 实验材料 含 HPV58 L1 的重组昆虫-杆状病毒以及 Tc-1 细胞由本实验室保存; mE7-pcDNA3.1⁺ 质粒由本实验室构建; HPV58 E7 蛋白由本实验室纯化保存; sf9 昆虫细胞购自中国科学院上海生命科学研究院。小鼠抗 HPV58L1 单克隆抗体 MAB885 购自美国 Millipore 公司; HRP 标记山羊抗鼠 IgG 抗体购自 Santa Cruz 公司; Grace's 昆虫细胞培养液购自 invitrogen 公司。小鼠 IFN- γ ELISA 试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司。C57BL/c 小鼠, Balb/c 雌性, 8~10 周龄, 购于西安交通大学医学院实验动物中心。

1.2 方法

1.2.1 HPV 58 L1 重组蛋白的表达鉴定及假病毒的组装: 利用重组的杆状病毒感染 sf9 昆虫细胞, 4 天后收集细胞, 0.5 mg/dl NP-40 裂解细胞, 1 000 r/min 离心 10 min 收集细胞核, 超声裂解细胞核, 12 000 r/min 离心收集上清, 加入 His-Ni 亲和层析纯化 HPV58 L1 VLP, 100 μ g 的 HPV58 VLPs 用解离缓冲液(pH 7.15 Tris-HCl, 0.115 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 20 mmol/L DTT)室温透析 2 h, 然后向已经解离的衣壳粒中加入 100 μ g 的 mE7-pcDNA3.1⁺ 质粒, 采用 5 mmol/L 的 CaCl₂ 室温透析过夜, 超速离心后, 收

集组分行 HPV58 E7 基因 PCR 扩增。

1.2.2 电镜观察: 将需要观察的样品进行透析除去其中的高浓度盐分, 吸取 10 μ l 样品滴于铜网支持的碳膜上, 经磷钨酸复染, H-600 透射电镜观察。

1.2.3 小鼠红细胞凝集试验: 取正常 C57BL/c 小鼠红细胞, 制成 10 ml/L 悬液; 取不同稀释度的裂解细菌上清, 50 μ l 分别加至 96 孔圆底板, 再加 50 μ l 红细胞悬液, 4℃ 孵育 3 h 观察。

1.2.4 动物免疫: 将“假病毒”以及 VLPs 免疫 Balb/c 小鼠。每只小鼠滴鼻免疫 50 μ g “假病毒”或 VLPs, 14 天后进行加强免疫, 接种与第 1 次相同剂量的抗原。免疫后 7 天进行免疫效果评价。作为阴性对照的小鼠以 PBS 滴鼻处理。

1.2.5 ELISA 法检测血清中 IgG 和 IgA 含量: 用 HPV16 VLPs 包被酶标板, 4℃ 包被过夜。用洗涤液洗 3 次, 加入封闭液室温封闭 4 h; 用洗涤液洗 3 次, 分别加入不同稀释度的小鼠血清, 室温反应 2 h; 用洗涤液洗 3 次, 加入 HRP-标记的二抗, 室温反应 2 h。用洗涤液洗 3 次, 加入底物后显色, 利用酶标仪测定 450 nm 光吸收。

1.2.6 脾淋巴细胞 IFN- γ 的分泌水平测定: 将 5×10^6 /ml 的效应细胞接种于细胞板中, E7 蛋白 5 μ g/ml 进行体外刺激, 于 37℃ 5% (v/v) CO₂ 培养箱孵育 72 h 后, 取其上清液 ELISA 检测 IFN- γ 浓度。在酶标板中设好倍比稀释的标准品作为对照, 每孔分别加入样品 100 μ l, 各设 3 个复孔。按试剂盒说明步骤依次加入检测工作液、洗涤液、显色剂各 100 μ l, 其间洗板 5 次, 最后加入终止液, 测吸光度 A_{450nm}, 绘制标准曲线并推算各样本的浓度。

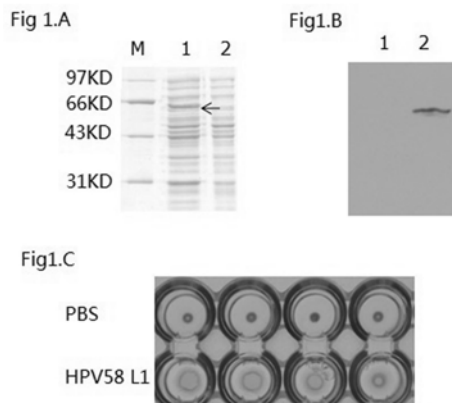
1.2.7 CTL 反应的测定: 利用 LDH 方法测定小鼠脾淋巴细胞的 CTL 反应。将小鼠脾淋巴细胞作为效应细胞, Tc-1 细胞(利用 HPV16 的 E6 和 E7 基因转化的 C57BL 6 小鼠的细胞系)作为靶细胞进行检测。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析, 使用单因素方差(Turkey)分析, 以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 HPV58 L1 蛋白在 sf9 昆虫体系中大量表达 收集接种了重组昆虫-杆状病毒的 sf9 细胞, SDS-PAGE 和 Western-blotting 分析结果显示, 感染 HPV58 L1 重组病毒的 sf9 细胞表达了约 56 kD 的目的蛋白, 其分子量大小与 HPV58 L1 理论预期值一致, 而 sf9 细胞组未见特异性条带, 见图 1A, 1B, 表明 HPV58 L1 蛋白确实在 sf9 细胞中得到高效表达。小鼠红细胞凝集实验结果显示,

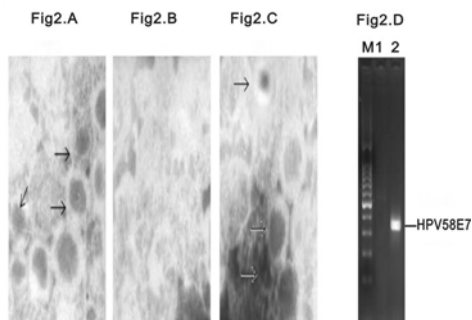
sf9 细胞表达的 HPV58 L1 蛋白可引起小鼠红细胞凝集,说明表达的 HPV58 L1 蛋白具有较好的生物活性,见图 1C。



(A) SDS-PAGE 鉴定 sf9 细胞表达 HPV58 L1 蛋白。lane 1. 低分子量蛋白标准品; lane 2. 感染了 HPV58 L1 重组杆状病毒的 sf9 细胞核裂解上清; lane 3. 使用空白杆状病毒感染 sf9 细胞核裂解上清。(B) Western blotting 鉴定 sf9 细胞表达的 HPV58 L1 蛋白。lane 1. 空白杆状病毒感染 sf9 昆虫细胞裂解物; lane 2. 重组杆状病毒感染 sf9 昆虫细胞裂解物。(C) 小鼠红细胞凝集试验分析纯化后 HPV58 L1 蛋白的生物活性。

图 1 HPV58 L1 蛋白的表达与鉴定

2.2 HPV58 L1 蛋白的电镜形态学观察 经电镜观察证实,纯化的 HPV58 L1 蛋白可形成直径约 55 nm 的球形空心颗粒(图 2A),与 HPV VLP 相符,说明表达的 L1 蛋白有形成 VLP 的能力,使用解离缓冲液处理病毒样颗粒,室温透析 2 h,电镜观察可以看到呈解离状态的病毒样颗粒亚基(图 2B)。解离的病毒样颗粒亚基在 CaCl_2 透析后,能重新聚合成“假病毒”(图 2C)。取少量重新聚合的“假病毒”进行 PCR 扩增,扩增出特异性条带,大小约 340 bp,与 HPV58 E7 基因大小相符,证实重新聚合的病毒样颗粒中包裹有 mE7-pcDNA3.1⁺ 质粒。



(A) 电镜观察 HPV58 L1 蛋白形成的 VLP; (B) VLP 经解离缓冲液处理后的电镜形态; (C) CaCl_2 和 mE7-pcDNA3.1⁺ 质粒存在下重新聚合的“假病毒”; (D) PCR 扩增“假病毒”中的 HPV58 E7 基因。

图 2 HPV58 L1/E7“假病毒”的电镜形态学观察和 PCR 检测

2.3 VLP 和“假病毒”刺激机体产生体液和黏膜免疫反应 用 VLP 和“假病毒”滴鼻免疫 Balb/c 小鼠,再次加强免疫 7 天后,血清学 ELISA 结果

显示:VLP 和“假病毒”均能引起显著的体液和黏膜免疫反应,但是两者之间无显著性差异,而 PBS 组未检出抗 HPV58 IgG, IgA, 见图 3A 和 3B。

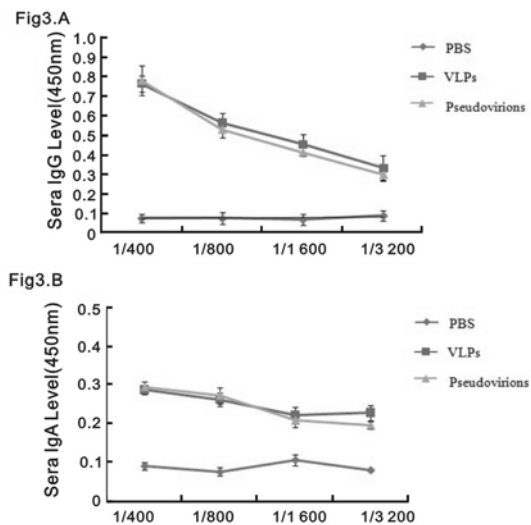
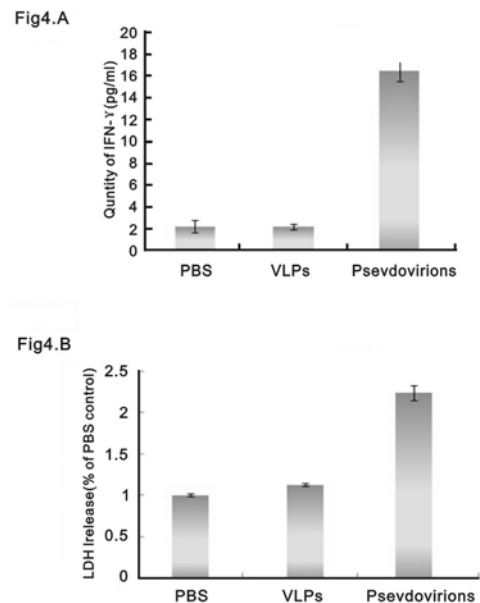


图 3 小鼠血清中 HPV58 L1 特异性 IgG (A) 和 IgA (B) ELISA 检测

2.4 “假病毒”引起细胞免疫反应 IFN- γ 是 Th1 细胞分泌的重要细胞因子,用 HPV58 E7 蛋白体外刺激免疫小鼠脾细胞,通过 ELISA 定量检测 IFN- γ 分泌情况,“假病毒”免疫组产生的 IFN- γ 明显高于 VLP 免疫组与空白组 ($P < 0.001$) (图 4A)。CTL 反应结果发现,“假病毒”免疫过的小鼠脾淋巴细胞可以特异性杀伤 Tc-1 细胞,引起 CTL 反应,而 VLPs 免疫的小鼠则无此反应(图 4B)。



(A) 用 E7 蛋白体外刺激免疫后小鼠脾细胞,通过 ELISA 定量检测 IFN- γ 分泌情况。“假病毒”免疫组产生的 IFN- γ 明显高于 VLP 免疫组与空白组 ($P < 0.001$)。(B) “假病毒”免疫引起 E7 特异性的 CTL 反应 ($P < 0.001$)。

图 4 “假病毒”引起细胞免疫反应

(下转 43 页)

3 讨论 人乳头瘤病毒 L1 衣壳蛋白在病毒感染过程中有着非常重要的作用,通过免疫反应产生针对病毒外壳的中和抗体,可以减少病毒的入侵,达到保护效果^[5]。目前上市的 HPV 疫苗,就是针对 L1 蛋白的预防性疫苗,流行病学研究证实,此类疫苗可有效预防 HPV 感染,但对于已有 HPV 感染或癌前病变者并无明显治疗作用。

HPV 持续感染时,病毒早期基因整合到细胞基因组中,E6,E7 蛋白结合并促进肿瘤抑制蛋白 p53 及 pRb 的降解,干扰细胞周期,促进细胞恶变^[6,7]。但机体缺乏 HPV 特异的 T 细胞免疫反应性,不能及时有效地清除表达 E6,E7 蛋白的 HPV 感染细胞,刺激机体产生 HPV 特异性 T 细胞免疫反应,开发针对 HPV 感染相关癌前病变的治疗性疫苗,是 HPV 疫苗研发的另一热点。

本研究中利用 sf9 昆虫-杆状病毒表达系统表达 HPV58 L1 蛋白。SDS-PAGE 及 Western blot 分析证实,在大约 56kD 处出现了可与 HPV58 L1 mAb 特异性结合的条带,表明 sf9 昆虫-杆状病毒表达系统可成功表达 L1 目的蛋白。小鼠红细胞凝集试验证实表达的 HPV58L1 有诱导小鼠红细胞凝集的能力,表明蛋白具有较好的活性。电镜观察可见表达蛋白有自组装成 VLP 的能力。用解离缓冲液室温透析纯化的 VLP 颗粒,聚集的 VLP 衣壳蛋白发生解离,向已经解离的衣壳粒中加入 mE7-pcDNA3.1⁺ 质粒,再用 CaCl₂ 室温透析过夜,电镜观察发现,VLP 可以解聚和再聚集,再聚合的“假病毒”颗粒中包裹有 E7DNA,这个“假病毒”具有病毒的外壳蛋白,而里面包裹的是经过改造没有转化危险的 E7 基因,因此,从理论上讲,这个假病毒具有嵌合疫苗的作用,即可以预防 HPV58 病毒的感染,同时还可以治疗 HPV58 导致的宫颈癌前病变或宫颈癌。

分别用 HPV58 VLP 和“假病毒”免疫小鼠,动物实验结果证实,HPV58VLP 和假病毒都能够引起宿主体液免疫反应,血清中产生足够数量的 IgG 中和抗体。由于 HPV 主要感染上皮细胞,因此分泌型抗体 IgA 是抵抗 HPV 病毒感染的首要防线。经黏膜免疫,VLP 和假病毒均能产生分泌型 IgA 抗体,这些结果表明:“假病毒”具有预防 HPV 感染的效果。IFN- γ 是细胞免疫反应的重要

特点,“假病毒”刺激机体产生的 IFN- γ 明显高于 VLP 免疫组,而且“假病毒”免疫过的小鼠脾淋巴细胞可以特异性的杀伤 Tc-1 细胞,引起 CTL 反应,说明“假病毒”除了可以预防 HPV 感染之外,还能够刺激机体产生 HPV 特异性 T 细胞免疫反应,特异性杀伤 HPV 感染的阳性细胞,具有 HPV 治疗性疫苗的作用。

本实验研制的新型 HPV58VLPL1/E7DNA “假病毒”疫苗,可引起宿主的抗体反应和细胞免疫反应,为防治 HPV58 感染及其所致的宫颈癌及宫颈上皮内病变提供新的思路。

参考文献:

- [1] Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer[J]. *J Clin Pathol*, 2002, 55(4): 244-265.
- [2] 刘宝印, 李洁, De Villiers EM, 等. 我国人乳头瘤病毒 58 型感染与宫颈癌的关系[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 1996, 10(2): 118-121.
Liu BY, Li J. De villiers EM, et al. Investigation on relationship between the papillomavirus type 58 (HPV58) infection and cervix cancer in China[J]. *Chinese J Exp Clin Virol*, 1996, 10(2): 118-121.
- [3] 刘景会, 刘玉林, 褚迪, 等. 截短型人乳头瘤病毒 58 型 L1 蛋白在昆虫细胞中的表达[J]. *中国生物制品学杂志*, 2015, 3(28): 233-238, 244.
Liu JH, Liu YL, Chu D, et al. Expression of truncated human papillomavirus 58 L1 protein in insect cells[J]. *Chinese Journal of Biologicals*, 2015, 28(3): 233-238, 244.
- [4] Mohsen MO, Zha L, Cabral-Miranda G, et al. Major findings and recent advances in virus-like particle (VLP)-based vaccines[J]. *Semin Immunol*, 2017, 34: 123-132.
- [5] Roden RB, Weissinger EM, Henderson DW, et al. Neutralization of bovine papillomavirus by antibodies to L1 and L2 capsid proteins[J]. *J Virol*, 1994, 68(11): 7570-7574.
- [6] McIntyre MC, Frattini MG, Grossman SR, et al. Human papillomavirus type 18 E7 protein requires intact Cys-X-X-Cys motifs for zinc binding, dimerization, and transformation but not for Rb binding[J]. *J Virol*, 1993, 67(6): 3142-3150.
- [7] Duensing S, Munger K. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins independently induce numerical and structural chromosome instability[J]. *Cancer Res*, 2002, 62(23): 7075-7082.

收稿日期: 2018-04-22

修回日期: 2018-04-27