

中文图书分类号: Q7
密 级: 公开
UDC: 577
学 校 代 码: 10005



硕士学位论文

MASTERAL DISSERTATION

论 文 题 目: 人乳头瘤病毒 18 型 L1 食管癌疫苗的研究

论 文 作 者: 刘海庭

学 科: 生物物理学

指 导 教 师: 曾毅 教授 周玉柏 副研究员

论文提交日期: 2014 年 6 月

UDC: 577
中文图书分类号: Q7

学校代码: 10005
学 号: S201115036
密 级: 公开

北京工业大学理学硕士学位论文

题 目: 人乳头瘤病毒 18 型 L1 食管癌疫苗的研究

英文题目: RESEARCH ON HPV18 L1 VACCINES
AGAINST ESOPHAGEAL CANCER

论 文 作 者: 刘海庭

学 科 专 业: 生物物理学

研 究 方 向: 病毒学与药理学

申 请 学 位: 理学硕士

指 导 教 师: 曾毅 教授 周玉柏 副研究员

所 在 单 位: 生命科学与生物工程学院

答 辩 日 期: 2014 年 6 月

授 予 学 位 单 位: 北京工业大学

摘要

食管癌是全球六大癌症之一，我国也是食管癌的高发区。一般认为，食管癌的发生是多种因素（包括环境、生活习惯、遗传等）长期综合作用的结果，但其确切病因还不清楚。上世纪 80 年代，Syrjane 从形态学角度提出了 HPV 和食管鳞癌之间存在相关性的观点，后续的大量研究显示，食管癌组织中可检出 HPV 的核酸，然而，HPV 检出率存在巨大差异，从 0~100%均有报道。这可能是研究样本的采集方法，样本量的大小，HPV 检测方法上的差异所致。本课题组在汕头、揭阳等地区开展的分子流行病学调查显示，食管癌组织和细胞株中 50~80%带有 HPV 不同亚型的病毒，其中 16, 18 型可达 60%左右；HPV18E6E7 能诱发人胎食管正常上皮细胞永生化和癌变，且各种促癌物(TPA 和丁酸)、化学致癌物(亚硝基吡啶)、三氧化二砷及放射线等均可加速 HPV E6E7 诱发的永生化细胞的癌变，这进一步提示，食管癌的发生是多因素协同作用的结果。综上，虽然食管癌的发生是一个多因素长期协同作用的结果，但高危型 HPV 是食管癌的重要病毒学病因。因此，研发针对 HPV 的疫苗也能预防和治疗食管癌。

本研究针对 HPV18 设计了一种基于 DNA/rADV 的新型疫苗，提出了多载体的序贯重复免疫方法，并对 DNA、重组腺病毒序贯重复免疫策略进行了研究，以确定获得最佳免疫效果的免疫规程。实验结果显示，重组 DNA 疫苗 VR-HPV18L1 和重组腺病毒疫苗 rAdv-HPV18L1 采用 prime-boost-boost 序贯重复联合接种策略可诱导强而持久的特异性体液及细胞免疫反应，虽然细胞免疫应答在加强免疫后会逐渐下降，但在重复免疫后期，其下降速率较免疫前期明显变缓，且 HPV16 和 18 病毒混合物共同免疫还能进一步增强针对 HPV18 的特异性免疫应答。另外，本文还构建了重组腺相关病毒载体 rAAV2/1-HPV18L1，并对该病毒载体单针接种的免疫效果进行了初步研究。实验结果显示，rAAV2/1-HPV18L1 单针肌注小鼠即可诱导产生高滴度的 HPV18L1 血清中和抗体及特异性细胞免疫应答。

综合上述实验结果，我们后续将采用多载体序贯重复免疫策略对 3 种疫苗联合应用的保护性免疫效果进行系统研究，为该食管癌疫苗的进一步研发奠定实验基础。

关键词：人乳头瘤病毒；腺相关病毒；食管癌；疫苗；L1

独创性声明

本人声明所提交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得北京工业大学或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

签 名： 刘海庭

日 期： 20140607

关于论文使用授权的说明

本人完全了解北京工业大学有关保留、使用学位论文的规定，即：学校有权保留送交论文的复印件，允许论文被查阅和借阅；学校可以公布论文的全部或部分内 容，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文。

（保密的论文在解密后应遵守此规定）

签 名： 刘海庭

导师签名： 曾毅

日 期： 20140607

Abstract

Esophageal cancer is one of the six most common cancers, China is one of regions of high incidence of esophageal cancer. Generally, the esophageal cancer is the result of a long-term synergic effects of various factors (including environmental, lifestyle, genetics, etc.), but the exact etiopathogenesis is unknown. In the 1980s, Syrjane proposed the morphological correlation between HPV infection tissue specimens and esophageal squamous cell carcinoma. A mass of subsequent studies have shown that HPV genomic fragments can be detected in esophageal tissue, however, there is a huge differences in HPV detection rate ranging from 0 to 100%. This may derive from the differences in the sample collection methods, sample size. Molecular epidemiology researches conducted by our group in Shantou, Jieyang and other areas indicate that 50% to 80% of the esophageal cancer tissues specimens and cell lines have been detected with HPV virus, wherein HPV16 and 18 reach to about 60%; HPV18E6/E7 can induce immortalization of normal human fetal esophageal epithelial cell and a variety of tumor promoters(TPA and butyric acid), chemical carcinogens (nitroso pyridine), arsenic trioxide and radiation etc. can accelerate the carcinogenesis induced by HPV E6E7, which further suggests, esophageal cancer is the results of multifactorial synergistic effects . In summary, although the incidence of esophageal cancer is the results of multifactorial long-term synergistic effects, but the high-risk HPV is an important virological cause of esophageal cancer. Therefore, the development of a vaccine against HPV could also prevent and treat esophageal cancer.

This study designed a novel vaccine against HPV18 based on DNA / rADV, proposed a multi-carrier sequential repeated immunization methods, and studied the sequential repeated immunization strategies of DNA and recombinant adenovirus to determine the optimal immunization procedures. The results showed that the recombinant DNA vaccine VR-HPV18L1 and recombinant adenovirus vaccine rAdv-HPV18L1 using prime-boost-boost sequential repetition combined inoculation immunization strategy can induce strong and long-lasting humoral and cellular immune responses, although the cellular immune response in strengthening after immunization will gradually decline, but in the latter part of the immunization course, the rate of decline slowed significantly compared with pre-immunization, and the

co-immunization of the mixture of HPV16 and 18 can further enhance the immune response against HPV18-specific immunity. In addition, the subject also constructed the recombinant adeno-associated virus vector rAAV2/1- HPV18L1, and studied the immune effects of the viral vector with a single vaccination. Experimental results show that a single intramuscular injection of rAAV2/1-HPV18L1 can induce high titers of serum antibodies and HPV18L1-specific cellular immune response.

Considering all these experimental results, we will study the protective effects of the three vaccines using a multi-carrier sequential repeated immunization strategy for the experimental basis of the further development of esophageal cancer vaccine.

Keywords: HPV, esophageal, cancer, vaccine, L1

主要英文缩写词

缩写词	英文名称	中文名称
Adv	Adenovirus	腺病毒
Amp	ampicillin	氨苄青霉素
ALP	Alkaline Phosphatase	碱性磷酸酶
APC	antigen-presenting cell	抗原递呈细胞
bp	Base pair	碱基对
cDNA	Complementary DNA	互补DNA
CIN	Cervical intraepithelial neoplasia	宫颈上皮内瘤
Cm	Chloramphenicol	氯霉素
CTL	Cytotoxic t-lymphocyte	细胞毒性T淋巴细胞
CPE	Cytopathic effect	细胞病变效应
DC	Dendritic cell	树突状细胞
ddH ₂ O	Double-Distilled Water	双蒸水
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium	Dulbecco优化的Eagle培养基
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent assay	酶联免疫吸附法
ELISPOT	Enzyme-linked immunospot assay	酶联免疫斑点法
HPV	Human papillomavirus	人乳头瘤病毒
IFN- γ	Interferon- γ	γ -干扰素
kb	Kilobases	千碱基对
kD	Kilodaltons	千道尔顿
LB	Luria-Bertani	溶菌肉汤
LR	Late region	晚期蛋白编码区
NCR	Non coding region	非编码区
ORF	Open Reading Frame	开放阅读框
OD	Optical density	光密度
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PBS	Phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
PCR	Polymerase chain reaction	多聚酶链式反应
PMA	phorbol myristate acetate	佛波酯
PsV	Pseudovirus	假病毒
PVDF	Polyvinylidene Fluoride	聚偏二氟乙烯膜
rAdv	Recombinant adenovirus	重组腺病毒
rAAV	Recombinant adeno-associated virus	重组腺相关病毒
rpm	Round Per Minute	转每分钟
SEAP	secreted alkaline phosphatase	分泌性碱性磷酸酶
SFC	spot forming cell	斑点形成细胞
SEM	Standard error of the mean	均数的标准误差
vg	viral genome	病毒基因组
VLPs	Virus-like particles	病毒样颗粒

目 录

摘 要.....	I
Abstract.....	III
主要英文缩写词.....	V
第 1 章 绪论.....	1
1.1 食管癌病因研究.....	1
1.2 人乳头瘤病毒疫苗研究.....	1
1.2.1 HPV 及其相关疾病.....	1
1.2.2 HPV 疫苗的研究现状.....	3
1.2.3 重组载体疫苗的研究.....	4
1.3 本课题研究内容.....	5
1.4 本课题技术路线.....	6
第 2 章 重组 DNA 疫苗及腺病毒疫苗免疫效果的研究.....	7
2.1 实验材料.....	7
2.1.1 工具酶、细胞和试剂.....	7
2.1.2 疫苗成分及来源.....	7
2.1.3 仪器和设备.....	7
2.1.4 实验动物.....	8
2.2 实验方法.....	8
2.2.1 DNA 疫苗 VR-HPV18L1 的制备及鉴定.....	8
2.2.2 小鼠品系和刺激性多肽的筛选.....	9
2.2.3 基因导入仪对 DNA 疫苗免疫效果的影响.....	11
2.2.4 多载体疫苗序贯重复免疫方案的设计.....	11
2.2.5 多载体疫苗免疫效果检测.....	12
2.3 实验结果和讨论.....	14
2.3.1 小鼠品系和多肽筛选结果.....	14
2.3.2 基因导入仪对 DNA 疫苗免疫效果的影响.....	19
2.3.3 多载体疫苗免疫效果的检测.....	21
2.4 本章小结.....	25
第 3 章 含 HPV18L1 基因的重组腺相关病毒的构建.....	27
3.1 实验材料.....	27
3.1.1 菌株和细胞.....	27

3.1.2 载体和试剂.....	27
3.1.3 主要仪器设备.....	27
3.1.4 引物.....	27
3.2 实验方法.....	28
3.2.1 构建重组穿梭质粒 pAAV-HPV18L1.....	28
3.2.2 重组腺相关病毒 rAAV2/1-HPV18L1 的包装.....	29
3.2.3 重组腺相关病毒滴度的测定.....	30
3.2.4 重组腺相关病毒颗粒电镜检测.....	30
3.3 实验结果及讨论.....	30
3.3.1 PCR 扩增 HPV18L1 基因片段的的结果.....	30
3.3.2 酶切鉴定重组质粒 pAAV-HPV18L1 结果.....	31
3.3.3 重组腺相关病毒的滴度测定结果.....	31
3.3.4 重组腺相关病毒的电镜检测结果.....	32
3.4 本章小结.....	32
第 4 章 重组腺相关病毒疫苗免疫效果的研究.....	35
4.1 实验材料.....	35
4.1.1 细胞和菌种.....	35
4.1.2 主要试剂.....	35
4.1.3 主要仪器设备.....	35
4.1.4 实验动物.....	35
4.2 实验方法.....	36
4.2.1 疫苗免疫方案设计.....	36
4.2.2 假病毒中和滴定检测体液免疫.....	36
4.2.3 ELISPOT 检测细胞免疫反应.....	36
4.3 实验结果和讨论.....	36
4.3.1 体液免疫结果.....	36
4.3.2 细胞免疫结果.....	37
4.4 本章小结.....	39
结 论.....	41
参 考 文 献.....	43
攻读硕士学位期间所发表的学术论文.....	49
致 谢.....	51

第 1 章 绪 论

1.1 食管癌病因研究

食管癌是常见的消化道肿瘤，是全球六大常见癌症之一，每年约有 406,000 人死于食管癌^[1]。南非、印度、伊朗和我国都是世界上食管癌高发地区，被称为癌症高发带^[2]。

对食管癌病因的研究表明，微量元素缺乏、促癌化学物如亚硝酸等的作用、以及吸烟饮酒或长期吃热烫食物等饮食习惯的影响均对食管癌的发生有一定作用，除此之外，生物学因素，如病毒的感染与食管癌的关系也成为研究热点。

上世纪 80 年代，Syrjane 的研究表明，HPV 和食管鳞癌之间存在相关性，HPV 可能是导致食管癌的危险因子^[3]，后续研究显示，在食管癌组织中可检出 HPV DNA，且食管癌患者的血清中也能检出 HPV 的抗原^[4]。但是，由于样本大小，采样区域及检测方法上的差异，不同国家和地区的食管癌组织中 HPV 检出率差异极大。本课题组在我国食管癌高发区进行的研究显示，食管癌组织中 HPV 检出率为 82.6%。其中，HPV18 检出率为 34.8%^[5]；HPV18E6E7 能诱发人胎食管正常上皮细胞永生化和癌变，且各种促癌物、化学致癌物、辐射等均可促进 HPV 感染食管上皮细胞的永生化和恶性变过程。对癌变不同阶段食管组织标本的分析显示，HPV 在食管癌发生过程中的阳性率呈逐渐升高的趋势^[6]。Fang Yong 和李淑英等通过不同地区食管癌相关性 meta 分析表明，高危型 HPV 感染在不同地区普遍存在，HPV 可能是食管癌发生的重要致病原因^[7,8]。上述研究均提示，虽然食管癌的发生是多因素长期协同作用的结果，但 HPV 的感染是食管癌的重要病毒学病因。

1.2 人乳头瘤病毒疫苗研究

1.2.1 HPV 及其相关疾病

人乳头瘤病毒 (Human papillomavirus, HPV) 是一种小 DNA 肿瘤病毒，属于乳多空病毒科乳头瘤病毒属，含闭合双链 DNA，基因组大小为 7.2 至 8 kb，分子量为 5×10^6 道尔顿。HPV 的基因组分为两个编码区包括早期蛋白编码区 (E 区)、晚期蛋白编码区 (L 区) 以及一个非编码区 (长末端控制区 LCR)，共 8

个开放阅读框架 (ORF), 即 E 区中的 E1、E2、E4、E5、E6 和 E7 以及 L 区中的 L1 和 L2, 其中基因组的 DNA 复制起点位于 LCR 区阅读框, 后者在 HPV 转录调控中起重要调节作用。E 区编码的六个蛋白中, E1 蛋白具有 DNA 解旋酶活性, 可特异性结合于复制起始点, E2 基因编码产物主要调节病毒基因组在转录过程中的反式激活, E4 涉及病毒识别并结合细胞, 参与形成空泡细胞, E5 能与表皮生长因子受体结合, 通过磷酸化作用影响信号通路并调控细胞周期, 是除 E6、E7 之外的另一个癌基因。HPV E6、E7 蛋白是主要的癌蛋白, 促进细胞增殖的同时抑制细胞肿瘤抑制蛋白 p53 和 pRb 的作用促进细胞的恶性转化过程。病毒的癌基因产物使 RB 和 P53 肿瘤中抑制通路失活。在非病毒导致的肿瘤的发展过程中, 这些通路通常并不完整。肿瘤抑制通路的失活促进了细胞增殖, 使得细胞在增殖过程中发生变异并降低增殖抑制的发生, 并抑制 DNA 损伤导致的凋亡^[9]。此外, HPV 诱导的宫颈癌还需要 HPV E6、E7 基因的持续表达^[10]。L 区编码的结构蛋白 L1 和 L2 参与病毒衣壳的组装。研究显示, L1 蛋白可单独或与 L2 共同组装形成病毒样颗粒。

在已经发现的 200 多种 HPV 基因型中, 约 1/4 可引起皮肤和粘膜的增生或病变^[11]。根据 HPV 对宿主细胞的转化能力以及是否致癌将其分为低危型如 HPV6、11、40、42 和高危型如 16、18、31、33、35。其中, 低危型 HPV 常引起生殖道湿疣等良性病变, 而高危型 HPV 则与宫颈癌、食管癌, 头颈癌等恶性病变密切相关。宫颈癌是世界范围内第二大常见的女性癌症。全球每年大约有 47 万新发病例, 约 23.3 万妇女死于宫颈癌, 约有 80% 以上的新增患者位于欠发达国家, 中国每年约有 14 万的新发病例。鳞状细胞宫颈癌约占宫颈癌患者 80%, 宫颈腺癌约占 20%^[12], 宫颈癌通过宫颈上皮内瘤变 (CIN) I 级到 III 级逐渐发展。在发展中国家宫颈癌发病率远高于发达, 在部分国家, 宫颈癌甚至是癌症死亡的首要因素^[13]。现已明确, 高危型 HPV 的持续感染是宫颈癌的主要病因^[14]: (1) 99% 的宫颈癌组织中可检出 HPV 核酸, 其中, HPV16 和 HPV18 最为常见^[15]; (2) HPV E6、E7 的结合使细胞过度增殖并转化为癌细胞, 其持续表达对于宫颈癌的发生必不可少^[16、17]。

近来的研究还发现, 头颈癌的发生与 HPV 的感染密切相关: (1) 在头颈部鳞状细胞癌组织中检测到 HPV 核酸; (2) Syrjanen 等确认 HPV16/18 等的感染与头颈癌的发生相关^[18-20], 后续研究表明 HPV 是口咽部鳞状细胞癌重要致病因子^[21], HPV 导致头颈部鳞状细胞癌 (HNSCCs) 可能的病毒学机制是病毒在肿瘤发展过程中使得肿瘤抑制蛋白 pRb 失活^[22]。除此之外, 全球每年约 3 万的肛门癌患者中约 2 万患者癌样本中检出了 HPV^[23], 因此, HPV 也可能和结直肠癌的发

生相关^[24]。

HPV 除了与宫颈癌、头颈癌、结直肠癌的发生有密切关系外, 自上世纪 80 年代, Syrjane 提出 HPV 和食管鳞癌之间存在相关性之后, 针对二者之间的相关性做了大量研究, 但是不同地区之间食管癌组织中 HPV 的检出率从 0 至 100% 均有报道, 本课题组的流行病学调查显示食管癌组织和细胞株中 50~80% 带有 HPV 不同亚型的病毒, HPV18E6/E7 能诱发人胎食管正常上皮细胞永生化和癌变, 且各种促癌物 (TPA 和丁酸)、化学致癌物 (亚硝基吡啶)、三氧化二砷及放射线等均可加速 HPV E6E7 诱发的永生生化细胞的癌变, 这进一步提示, 食管癌的发生是多因素协同作用的结果, HPV 是食管癌发生的病毒学病因。

1.2.2 HPV 疫苗的研究现状

基于 HPV 的疫苗可分为预防性和治疗性疫苗两大类。预防性疫苗是基于真核表达的 HPV L1 通过自组装形成的病毒样颗粒 (virus-like particles VLP) 亚单位疫苗, 这种 VLPs 疫苗可模拟天然病毒颗粒表面的抗原构象, 具有良好的安全性及免疫原性, 可诱导机体产生高滴度的血清中和抗体, 通过阻断人乳头瘤病毒相关型别的感染起到预防宫颈癌的作用^[25]。目前, 由默克公司开发的 HPV6、11、16、18 四价疫苗 Gardasil (嘉德希尔) 以及葛兰素史克 (GSK) 开发的 HPV16、18 二价疫苗 Cervarix 已在欧美国家上市, 可有效预防人乳头瘤病毒相应型别感染所致的生殖器疣、低度宫颈瘤样病变 (CIN) 及阴道癌等的发生。然而, VLPs 疫苗还存在诸多问题: 比如疫苗的生产工艺复杂, 成本较高, 难以在广大发展中国家中大规模推广; VLPs 疫苗具有型别特异性, 不同型别间鲜有交叉保护效力, 现有疫苗对其他型别的感染无保护效力。因此, 继续开发经济改良型疫苗及其他 HPV 型别的多联疫苗可以预期良好的效果。作为蛋白疫苗其安全性高于其他载体疫苗如腺病毒疫苗和 DNA 疫苗等, 美国食品药品监督管理局通过对近万名妇女的调查研究表明, 接种后可能会在接种处引起红肿疼痛等轻度过敏症状。

预防性疫苗对于未受感染的个体作用明显, 然而对于已经有癌前期病变的患者或癌症病人来说, 预防性疫苗作用不大。为治疗这些患者, 发展出了治疗性的疫苗, 这些疫苗能诱导产生细胞毒性淋巴细胞 (CTL), 这些细胞能识别和杀死表达病毒蛋白的肿瘤细胞, 降低体液和组织液中病毒的滴定量, 杀死感染的细胞, 或减少感染细胞中病毒基因产物的浓度^[26-31]。这些作用能降低肿瘤的恶性转化或病毒感染新的宿主。在治疗性疫苗发展过程中, 大量研究针对人乳头瘤病毒中具有转化效果的 E6/E7 基因, E6/E7 蛋白可以与抑癌蛋白 p53 和 pRb 结合, 而 p53 和 pRb 是细胞周期的重要调控蛋白, E6/E7 的结合使细胞过度增殖并转化为癌细

胞, 现已明确 E6/E7 基因的持续表达对于宫颈癌的发生必不可少^[16, 17], 除此之外, 在正常组织细胞中较少表达 E6/E7 蛋白, 因此是研制 HPV 相关的宫颈癌及其他肿瘤理想的靶抗原^[32-34]。目前 HPV 治疗性疫苗主要包括 DNA 疫苗、RNA 复制子疫苗、合成肽疫苗、治疗性 HPV 蛋白质类疫苗、活载体疫苗以及 DC 疫苗等^[35, 36]。

高危型 HPV 持续感染导致 HPV DNA 整合宿主基因的过程常伴随 L1 不同程度的丢失或 L1 不表达, 然而, 有研究显示 L1 和 E7 诱导产生的 CTLs 在宫颈癌中具有同样的细胞免疫效力。我们前期的工作表明, 在食管癌组织和新建食管癌细胞株中均检测到 HPV18 L1 蛋白的表达, 这为开发以 L1 蛋白为靶点的治疗性疫苗提供了实验依据。

1.2.3 重组载体疫苗的研究

重组载体如 DNA 和重组病毒已广泛应用于生物医药领域。已经证明, 重组 DNA 疫苗可诱导机体产生细胞免疫应答及 CTL 反应, 但是因为 DNA 质粒基因可能存在的对宿主基因组的整合, 而这种整合可能引起潜在的癌变, 因而限制了 DNA 疫苗从基础研究到人体实验的进一步发展。腺病毒、腺相关病毒、痘苗病毒、慢病毒等病毒作为外源基因载体构建的重组病毒已成功应用于疫苗的研发及基因治疗中。HPV16 和 18 型的重组痘病毒疫苗的临床试验表明所述重组痘病毒疫苗可诱导 T 细胞免疫反应。腺病毒载体 (Adv) 经过多次重构改造, 已发展至第 3 代, 其作为外源基因的表达载体, 在装载外源基因容量及安全性上均有较大提高, 相比于逆转录病毒导致的插入突变, 腺病毒载体安全性更高。

重组腺相关病毒 (rAAV) 是一种复制缺陷型病毒, 作为常用的病毒载体, rAAV 具有较高的安全性^[37-41]。rAAV 作为疫苗载体表达外源基因, 如高危型 HPV 基因, 此外 rAAV 具有长期稳定表达外源基因的特性^[42, 43]。Liu,D. 等的实验表明编码 HPV16L1 的 rAAV2 和编码 GM-CSF 的 rAdv 联合免疫可诱发针对 HPV16L1 的较高的中和抗体^[44]。但是相对于 rAAV2 载体, 相关实验结果表明, rAAV2/1 载体对骨骼肌的转导率高于 rAAV2 载体, 外源基因表达水平也大幅提高^[45]。此外杨谨等采用 HPV18L1 的融合基因导入 DNA 载体, 免疫小鼠后产生了较好的体液和细胞免疫^[46], 其他的研究也表明携带 HPV18L1 的疫苗可诱导产生高水平的细胞和体液免疫^[47]。

rAAV 载体长期稳定表达外源基因的特点使其在疫苗研究方面具有很好的前景。研究表明 rAAV2/1 载体表达水平、表达时间明显优于 rAAV2 载体, 并且有报道显示单针的 rAAV 即可引起足够的免疫反应^[48]。本实验室前期研究显示

使用携带密码子优化型基因 HPV16L1 的 rAAV2 可诱导较高强度和较长持续时间的 HPV18 特异性体液免疫^[49], 本课题中 rAAV2/1-HPV18L1 也诱导产生了高滴度的 HPV18 特异性的血清中和抗体。并且相比于 DNA 疫苗和蛋白疫苗的多针接种, 单针肌注具有成本和便捷性上的优势, 可诱导产生较强的 HPV18L1 特异性免疫反应, 但是单针 rAAV2/1-HPV18L1 的长期免疫效果还有待验证。

1.3 本课题研究内容

本课题主要研究内容分为以下两个部分:

第一: 通过分子生物学等技术手段验证构建好的重组 DNA 疫苗 VR-HPV18L1 和重组腺病毒疫苗 rAdv-HPV18L1, 筛选合适的 T 细胞表位肽及小鼠型别后, 免疫小鼠, 采用 ELISPOT 方法和假病毒体外中和滴定的方法分别检测重组 DNA 疫苗和重组腺病毒疫苗单独免疫或序贯重复免疫诱导产生的细胞免疫和体液免疫效果。

第二: 通过基因工程技术构建含密码子优化型的重组腺相关病毒疫苗 rAAV2/1-HPV18L1, 免疫小鼠后采用 ELISPOT 方法和假病毒体外中和滴定的方法分别检测重组腺相关病毒疫苗 rAAV2/1-HPV18L1 免疫后诱导产生的细胞免疫和体液免疫效果。

1.4 本课题技术路线

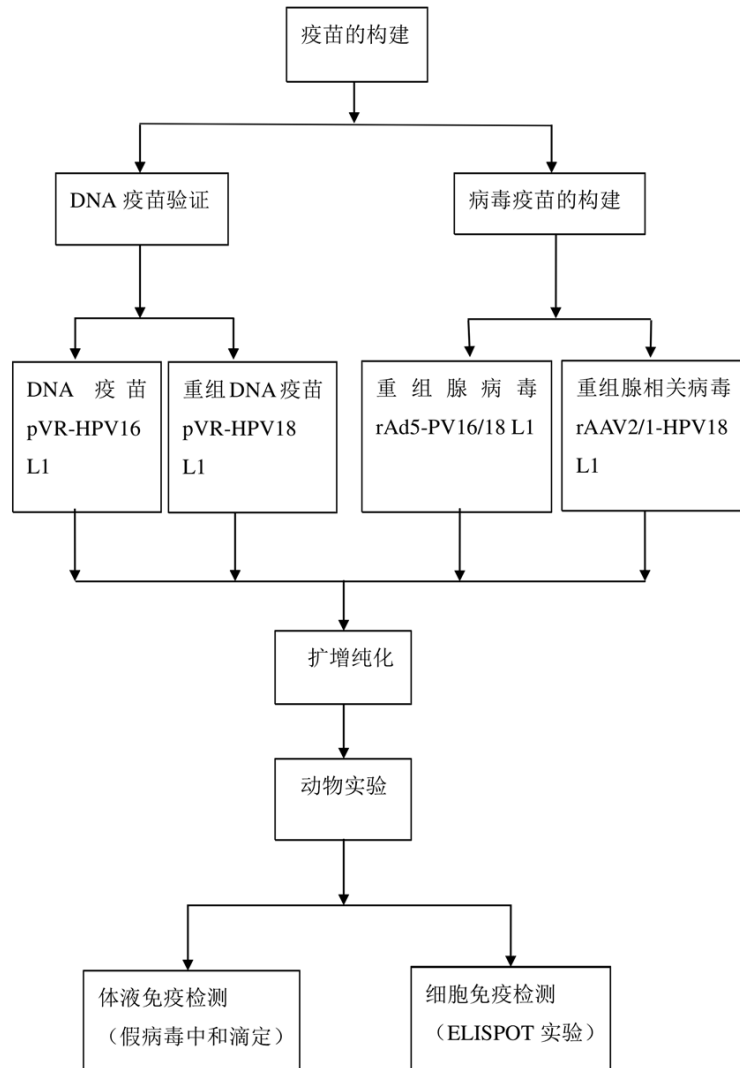


图 1-1 本课题研究的技术路线
Figure 1-1 Road map of this study

第 2 章 重组 DNA 疫苗及腺病毒疫苗免疫效果的研究

2.1 实验材料

2.1.1 工具酶、细胞和试剂

HEK293FT 细胞购自英潍捷基公司。含密码子优化型 HPV18 L1 基因的质粒 pMK-RQ 由周玉柏博士惠赠。限制性内切酶购自 NewEngland Biology 公司, T4 DNA 连接酶、DNA Marker 购自宝生物公司。普通 DNA 纯化试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒、质粒抽提试剂盒、去内毒素大提质粒试剂盒购自 QIAGEN。青链霉素双抗、DMEM 培养基、OptiMEM 培养基、胎牛血清、购自 Gibco 公司。DMEM 培养基、RPMI-1640 培养基、易得小鼠淋巴细胞分离液、 γ -干扰素 ELISPOT 预包被试剂盒购自深圳达科为生物公司。其他化学试剂均由病毒药理科室提供。MHC 结合多肽由北京中科亚光生物科技公司合成。

阳性刺激物: 植物凝血素 (PHA) 课题中使用的 PHA (Cat#DKW-st-p) 是达科为公司标准品, 用 500 ml 灭菌的 PBS 重悬混匀后, 浓度为 25 $\mu\text{g/ml}$, 每孔 100 μL 细胞培养液加入 10 μL PHA, 使其工作浓度达到 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 。

阴性刺激物: 灭菌的 PBS

2.1.2 疫苗成分及来源

VR-HPV18L1: 表达 HPV18L1 基因的 DNA 疫苗, 该重组 DNA 疫苗由密码子优化型 HPV18L1 基因插入 pVR 质粒构建而成, 构建工作由病毒药理实验室完成。

rAdv-HPV18L1: 为表达 HPV18L1 基因的复制缺陷性腺病毒, 该病毒缺失 E1、E3 区, 可插入 6.5 kb 左右的片段; 该病毒由病毒药理室完成质粒构建并采用 admax 系统包装腺病毒, 委托本元正阳基因技术有限公司完成病毒的扩增和纯化, 最终滴度为 5.8×10^{13} vp/ml。

2.1.3 仪器和设备

设备名称	厂商
恒温磁力搅拌器 (X85-2)	上海梅颖浦仪器仪表制造有限公司
台式高速冷冻离心机	Thermo 公司
低温冰箱	Thermo 公司
微量移液器	Eppendorf 公司

电热恒温水箱	北京长风仪器公司
干式恒温器	杭州奥康仪器有限公司
恒温摇床	上海市实验仪器总厂
透明门立式冷藏柜 (SC-329G)	青岛海尔特种电冰柜有限公司
恒温培养箱	上海一恒科技有限公司
超净工作台 (WT-1ND 型)	北京王堂蓝翼科技有限公司
DNA 电泳仪及电泳槽	北京市六一仪器厂
蛋白电泳仪	博迈德公司
生物安全柜	Thermo 公司
转印槽、电泳槽	博迈德公司
微量移液器	Eppendorf 公司
雪花制冰机	北京长流科学仪器
细胞培养箱	Thermo 公司
红外双色检测系统	LI-COR Biosciences 公司

以上仪器除特殊标注外均为病毒药理室实验室设备。

2.1.4 实验动物

雌性 C57BL/6H-2D^b 及 Balb/c H-2K^d 小鼠, 4~6 周龄, 由北京维通利华实验动物技术有限公司购得, 在中国中医科学院医药动物中心饲养小鼠。

2.2 实验方法

2.2.1 DNA 疫苗 VR-HPV18L1 的制备及鉴定

在 Kana 抗性的平板上筛选含 pVR-HPV18 L1 的甘油菌, 将接种后的平板置于培养箱中 37°C 过夜培养, 将含有 pVR-HPV18 L1 的甘油菌的单菌落接种到 5 ml 具有 Kana 抗性的 LB 培养基中培养, 37°C 条件下过夜振荡培养, 然后按照 1:1 000 的比例接种至 700 ml 含 Kana 的 LB 培养基中, 37°C 剧烈振荡过夜培养后, 使用 QIAGEN 公司无内毒素大抽提试剂盒 EndoFree Plasmid GiGa kit 提取质粒, 按照试剂盒说明书操作。质粒抽提后取 1 μL 初步稀释液, 将其稀释 100 倍后, 使用分光光度计测定稀释液的浓度和纯度。抽取的质粒在 -30°C 冰箱保存, 以进行后续的动物免疫。同时按照配比为 15% 的甘油加上 85% 菌液的比例, 冻存含有 pVR-HPV18 L1 的甘油菌, 将甘油菌送北京华大基因测序。

2.2.2 小鼠品系和刺激性多肽的筛选

2.2.2.1 小鼠品系筛选

因为本课题前期的细胞免疫实验并不理想, 因此在进行实验前, 做筛选实验以确定合适的小鼠型别以及在细胞免疫阶段的刺激性多肽, 其中 C57BL/6H-2D^b 分为实验组和对照组, 每组各 10 只, 其中实验组 2 在第一周和第三周分别注射 DNA 疫苗 VR-18L1 以及腺病毒疫苗 rAdv-HPV18L1, 实验组 2 的对照组即实验组 1 则在相应时间点只注射灭菌的等量 PBS, 针对 C57 小鼠型别构建了 8 条多肽以用于筛选合适的表位肽。Balb/c H-2K^d 分为实验组和对照组, 每组各 10 只, 其中实验组 4 在第 1 周和第 3 周分别注射 DNA 疫苗 VR-HPV18L1 以及腺病毒疫苗 rAdv-HPV18L1, 实验组 4 的对照组及实验组 3 则在相应时间点只注射灭菌的等量 PBS, 针对 Balb/c 小鼠构建 12 多条肽以确定适宜的表位肽用于后续细胞免疫检测实验。针对腺病毒疫苗的免疫剂量设计实验组别 4、5、6; 每组 5 只, 分别在免疫 DNA 疫苗的 3 周后, 加强 1×10^9 、 1×10^8 、 1×10^7 vp 剂量的重组腺病毒, 第 4 周采用 ELISPOT 方法检测细胞免疫, 具体免疫方案见表 2-1。

表 2-1 筛选实验免疫方案

Table 2-1 Immunization programs of screening experiment

Number	Group	Prime	Boost
1	C57 对照组	PBS	PBS
2	C57 实验组 1	VR-HPV18L1	rAdv-HPV18L1
3	Balb/c 对照组	PBS	PBS
4	Balb/c 实验组 1	VR-HPV18L1	rAdv-HPV18L1 (10^9)
5	Balb/c 实验组 2	VR-HPV18L1	rAdv-HPV18L1 (10^8)
6	Balb/c 实验组 3	VR-HPV18L1	rAdv-HPV18L1 (10^7)

2.2.2.2 刺激性多肽的筛选

特异性刺激物包括 T 细胞表位肽和重叠的多肽库, T 细胞表位肽即经抗原呈递细胞 (APCs) 处理后, 由主要组织相容性抗原 (MHC) 分子递呈给 T 细胞表面受体的抗原上的线性肽段。T 细胞表位肽是建立在对 T 细胞表位及其相应的 MHCII 基因型的深入的认识和研究基础之上的, 并由此才能合成。因此对于基因优化型 HPV18L1 编码蛋白采用合成多肽库的方法筛选有效的特异性刺激物。

通过下述系统提供的算法 http://www.bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind/ (标记为 Bis) 和 <http://www.syfpeithi.de/home.htm> (标记为 Syp), 筛选 MHC 结合肽以预测 HPV18L1 的 T 细胞表位肽, 如表 2-2 和表 2-3 所示。按照上述网站提供的算法, 针对 C57BL/6H-2D^b 小鼠, 输入 L1 蛋白序列后, 挑选了得分较高的 MHC

结合肽作为候选的表位肽，所述表位肽和及其序列如表 2-2 所示。

表 2-2 C57BL/6H-2D^b 小鼠中 HPV18 L1 的 MHC 结合多肽预测结果
Table 2-2 MHC binding polypeptides of HPV18 L1 in C57BL/6H-2D^b

Number	Sequence	Score	Source
18-1	WRPSDNTVYL	600	Bimas
18-2	ARVVNTDDYV	26	Syf
18-3	AGGGNKQDI	286	Bimas
18-4	QLPDPNKFGL	600	Bimas
18-5	AATSNVSEDEV	23	Syf
18-6	RHFWNRAGTM	21	Syf
18-7	SQLFNKPYWL	25	Syf
18-8	IHSMNSSIL	220	Bimas

对于 Balb/c H-2K^d 小鼠中 HPV18L1 的细胞表位肽，按照同样的方法，在上述网站利用生物信息学的方法挑选分数较高的 12 个可能的 T 细胞表位肽。按照 HPV18L1 特异性 H-2d/Ld/Dd 类型其序号、序列、来源的网站网址及在该网址提供的算法下挑选限制性 CTL 表位多肽，得出的分数如表 2-3 所示。

上述 C57 小鼠的 8 条 MHC 结合肽和 Balb/c 小鼠的 12 条 MHC 结合肽均按照表中序列，95%纯度规格交由中科亚光生物公司制备及检验。

表 2-3 Balb/c H-2K^d 小鼠中 HPV18 L1 的 MHC 结合多肽预测结果
Table 2-3 MHC binding polypeptides of HPV18 L1 in Balb/c H-2K^d

Number	Sequence	Score	Source site
P462	QYPLGRKFL	2300	Bis
P150	DYKQTQLCI	2100	Bis
P90	IYNPETQRL	1800	Bis
P69	QYRVFRVQL	31	Syp
P390	SYIHSMNSSI	29	Syp
P290	VYSPSPGSI	19	Syp
P418	TYRFVQSVAI	3200	Bis
P34	FYHAGSSRLL	28	syp
P204	GYGAMDFSTL	1900	Bis
Ld407	VPPPPTTSL	900	Bis
L240	DPYGDSMFF	38	Syp
Dd	IGPRKRSAPS	41	syp

2.2.3 基因导入仪对 DNA 疫苗免疫效果的影响

在确定小鼠型别、刺激多肽、腺病毒剂量实验设计后，考虑到不同的接种方法也会引起免疫效果的差异，因此设计实验组别 1、2、3 以验证采用基因导入仪和常规的 DNA 肌注法诱导产生的免疫效果的优劣，以用于后续的免疫计划。在实验组 2、3 中，每组 5 只，在 0 周免疫 100 μg VR-HPV18L1 DNA 疫苗，3 周加强免疫一次相同剂量的 DNA 疫苗，在第 4 周采用 ELISPOT 方法检测小鼠的细胞免疫从而确定 DNA 的免疫方式，免疫方案如表 2-4 所示。以上使用的小鼠品系即为 Balb/c 小鼠。

表 2-4 DNA 疫苗免疫方式筛选
Table 2-4 Immunization screening programs of DNA vaccine

Number	Group	Primer	Boost
1	Balb/c 对照组	PBS	PBS
2	DNA 常规组	DNA (100 μg)	DNA (100 μg)
3	DNA 导入仪组	DNA (100 μg)	DNA (100 μg)

2.2.4 多载体疫苗序贯重复免疫方案的设计

将筛选实验确定的小鼠分为 6 组，1 组为对照组，其余 4 组为实验组，即实验组 1 到实验组 4，其中，实验组 1 为 20 只，在 0 周免疫重组腺病毒疫苗 rAdv-HPV18L1，其免疫剂量为 10⁹ vp 每只，在 3 周等剂量加强一针；实验组 2 为 25 只，在 0 周免疫 DNA 疫苗 VR-HPV18L1，其免疫剂量为 100 μg 每只，在 3 周等剂量加强一针；实验组 3 为 45 只，在 0 周、3 周按 100 μg 每只的剂量注射 DNA 疫苗，6 周、9 周、14 周则按 10⁹ vp 每只的剂量注射腺病毒疫苗。实验组 4 位为 HPV16 和 HPV18L1 两种高危型别共同免疫，共 45 只，在 0 周、3 周按 100 μg 每只的剂量注射 DNA 疫苗，其中包括 VR-HPV18L1 和 VR-HPV16L1，6 周、9 周、14 周则按 10⁹ vp 每只的剂量注射腺病毒疫苗，即 rAdv-HPV18L1 和 rAdv-HPV16L1，对照组则分别在 0、3、6、9、14 周注射等体积的灭菌 PBS。

实验组 1 组免疫后，分别于第 4、6、22、27 周处死，每次各 5 只；实验组 2 组免疫后，分别于第 4、6、9、22、27 周处死，每次各 5 只；第 3 组分别于第 4、6、7、9、10、14、15、22、27 周处死，每次 5 只；第 4 组分别于 4、6、7、9、10、14、15、22、27 周处死，每次 5 只。各组小鼠采用眼眶取血后断颈处死，之后分离脾脏中的淋巴细胞，采用体外假病毒颗粒中和实验以及 ELISPOT 实验，监测免疫前后小鼠体液免疫和细胞免疫的反应强度，并对疫苗的免疫效果进行评价。具体的免疫方案见表 2-5。上述的小鼠均为经过筛选实验筛选过的小鼠品系即 Balb/c H-2K^d。

表 2-5 联合免疫实验方案
Table 2-5 Immunization programs of Combined inoculation

时间 (周)	0	3	6	9	14
对照组	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
实验组 1	ADV	ADV			
实验组 2	DNA	DNA			
实验组 3	DNA	DNA	ADV	ADV	ADV
实验组 4	DNA	DNA	ADV	ADV	ADV

2.2.5 多载体疫苗免疫效果检测

2.2.5.1 血清和淋巴细胞的取样

按照上述的免疫时间点和采样点, 每组每次各取 5 只小鼠用于分离血清和淋巴细胞。采血在超净台或安全柜内进行, 保持室温在 15~28°C 间, 采用摘除眼球采血的方法分离提取血清, 左手拇、食指抓取小鼠双耳及颈后皮肤, 小指和无名指捏住尾部; 中指按压在小鼠左侧前肢的胸骨心脏部位加快心脏泵血速度, 无名指指按压腹部, 拇指和食指提拉头颈部皮肤, 使眼球充血突出, 使用弯头镊夹取眼球, 夹住小鼠眼球后的血管和神经束, 轻往外拉, 将出血口对准 EP 管, 持续外拉使血液沿管壁流入过程中, 保持管口清洁, 防止毛发掉落至 EP 管中造成污染及溶血。取血过程中按压小鼠心脏, 使血液加速流动, 采集血液后用颈部脱臼法处死小鼠, 取血量一般在 500~800 μL 之间。分离血清时首先即将上述离心管室温下放置室温 2~5 h, 当血液凝固成血块收缩后, 5 000 rpm 下离心 10 min; 取上清分装于干净的离心管中, -80°C 下保存。

在生物安全柜中分离脾脏中淋巴细胞, 首先将断颈处死的小鼠浸泡在含量为 70% 的酒精中 5 min, 无菌剪刀沿左侧腹部皮肤剪开, 剥离皮下组织, 扩大开口, 使用灭菌的剪刀和镊子, 将腹膜剪开, 分开内脏其他内脏, 露出暗红色长条形脏器的即为脾脏, 用镊子将脾脏提起, 剔去周围结缔组织, 剪开粘连的筋膜, 淋巴细胞的处理参见后续 2.2.5.3 中细胞免疫检测。

2.2.5.2 假病毒中和滴定检测体液免疫

假病毒颗粒的制备: 使用 QIAGEN Plasmid GigaKits 大量制备转染用 pHPV-18L1 及 pYSEAP 质粒。用脂质体转染试剂 quickshuttle 将上述质粒等摩尔比共转染 293FT 细胞, 即将 293FT 细胞接种到 6 孔细胞板中, 每孔 $1\sim 2\times 10^6$ 细胞, 2.5 ml 完全培养基。将 8 μg 质粒 DNA 和 20 μL 转染试剂分别稀释至 100 μL 生理盐水中。混匀上述溶液并。将上述质粒和转染试剂混合物直接加入细胞培养基中, 轻摇细胞板以混匀。将细胞板移至 37°C, 5% CO_2 孵箱中进行培养。转染

后 48~72 h 收集细胞, 加入等体积 DPBS 缓冲液重悬细胞沉淀, 2 000 g 离心 5 min, 使用含 0.5% Brij58、0.2% Benzonase 及 9.5 mmol/L MgCl_2 的 DPBS 裂解液重悬细胞沉淀至细胞密度为 $5\times 10^8/\text{ml}$, 将细胞裂解物置 37°C 孵育 16 h~24 h, 之后加入 0.17 体积的 5 mol/L NaCl, 冰上孵育 20 min 后 4°C 1500 g 离心 10 min, 上清分装小份置 -70°C 保存。

特异性中和抗体的检测: 取铺满 293FT 细胞的 75 cm^2 细胞培养瓶, 弃去培养液, 灭菌的 PBS 冲洗残留培养液。吸取 3~5 ml 0.05% 的胰酶消化液至瓶壁, 左右倾斜培养瓶使胰酶可覆盖细胞表面, 37°C 培养箱消化 1 min 后吸出消化液, 加入 15 ml 的 DMEM 培养液, 终止消化并重悬细胞, 使细胞分散均匀。将培养液转移至 15 ml 离心管, 200 g 离心。弃上清, 加入 5 ml DMEM 重悬。细胞计数后将其稀释至密度为 2×10^5 cells/ml。轻轻混匀细胞, 用排枪将细胞 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入 96 孔培养板中。培养板放入细胞培养箱, 37°C 过夜。DMEM 稀释假病毒至合适浓度后对其滴定。将上述步骤中的假病毒及肝素钠加入含有 293FT 细胞的 96 孔培养板中, 阳性对照按照 2 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入 100 mg/ml 浓度的肝素钠, 将培养板放入细胞培养箱中, 37°C 培养 48~72 h 后每孔加入 20 μL 0.05% chaps 溶液, 再加入培养 72 h 后的上清液 40 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 65°C, 30 min 灭活碱性磷酸酯酶, 每孔加入 200 μL 显色底物, 室温避光放置 2~3 h。酶标仪测定 A405 nm。根据测定结果选择合适的假病毒浓度用于下游的血清抗体中和试验。

中和抗体滴度测定: 首先稀释 293FT 细胞至密度为 $3\times 10^5/\text{ml}$, 按 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 铺于 96 孔细胞培养板中, 37°C 培养 3 h 后, 按一定比例稀释血清, 及 SEAP-PsV18 假病毒, 将稀释血清加入到适量稀释 PSV 中, 冰浴 1 h, 将混合液加入 293FT 细胞中, 继续培养 72 h, 未加入血清的孔作为阴性对照, 每个标本及阴性对照为双复孔, 在酶标板的孔中先加入 0.05% CHAPS 溶液中, 20 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 。加入细胞上清液 40 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 65°C, 30 min 灭活内源性碱性磷酸酶, 加入 200 μL PNP 反应底物, 室温避光 2~5 h, Bio-Rad550 型酶标仪测定 405 nm 波长下的 OD 值。以 A405 nm 值低于阴性对照 50% 判为阳性。

2.2.5.3 ELISPOT 实验检测细胞免疫

脾淋巴细胞的准备: 首先处死小鼠, 浸入 75% 的乙醇中浸泡 1~2 min 后用镊子摘下小鼠脾脏, 在培养皿中放入 4~5 ml 摇匀的淋巴细胞分离液, 点压研磨, 轻轻研磨脾脏约 5 min, 研磨液立即转移到离心管中, 拧上活塞, 以防止液体挥发, 分离层扩散, 沿管壁在液面覆盖上大约 200~500 μL 的易培养培养基, 在所有的小鼠脾脏处理完后, 再加 500 μL 1640 培养基。在 800 g 下离心 30 min, 慢速停止, 可见液面间的白色细胞层, 即为淋巴细胞层, 吸出淋巴细胞层至 15 ml 管, 吸取分离的淋巴细胞层时多吸上层的细胞, 之后缓慢加入 10 ml 1640 培养基, 盖

上盖后, 颠倒 6~10 次, 重悬洗涤, 250 g 离心 10 min, 弃上清, 加入 1 ml Lympho-Spot 无血清培养基重悬, 进行细胞计数。此时进行预包被板的活化, 后续的步骤在生物安全柜中进行。在 96 孔板中每孔加入 200 μ L/well EZ-Culture 无血清培养基, 室温静置 5~10 min 后将其扣出, 稀释细胞悬液, 将调整好浓度的细胞悬液加入各实验孔即 3×10^5 cells/well, 阳性对照孔相同或适当减少以利于后续计数。

细胞及多肽上样: 稀释 PHA 干粉, 使其浓度至 10 倍工作液浓度, 终浓度为 2.5 μ g/ml, 之后加入刺激物 conA 或 PHA, 10 μ L/well, 其他实验孔加入刺激性表位肽或其他刺激物, 使用无血清培养基稀释多肽至终浓度分别为 2、4、6、8 μ g/ml。所有样品和刺激物加完后, 盖好板盖, 放入 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱培养 16~20 h, 稀释好的多肽可在 4 $^{\circ}$ C 保存一星期备用。整个培养过程中应避免移动、碰撞培养板引起的细胞移位, 造成斑点模糊、拖尾。

斑点显色: 倾倒入去除培养基, 96 孔板中每孔内加入 100~200 μ L 双蒸水, 置于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱 5 min 低渗法裂解细胞。排枪清洗 96 孔板, 200 μ L 冲洗缓冲液洗涤 10 次, 每次 1 min。吸水纸上扣干孔内残余液体。之后加入生物素标记抗体, 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱下孵育 1 h。去除残留液体, 200 μ L 磷酸盐缓冲液洗涤 4 次。吸水纸上扣干残留液体。加入辣根过氧化物酶标的亲和素后 37 $^{\circ}$ C 恒温箱下孵育 1 h, 磷酸缓冲液冲洗 4 次, 扣干残留液体, 加入 AEC 显色液, 按操作说明的浓度, 每孔加入 100 μ L 稀释好的酶标亲和素, 37 $^{\circ}$ C 下静置 1 h。随后每孔用 200 μ L PBST 洗涤 3~5 次。在吸水纸上扣干后, 每孔中加入 100 μ L AEC 显色液, 室温避光静置 30 min 后可见阳性斑点, 双蒸水洗涤使显色终止。扣干残留液体, 室温静置 20 min 通风干燥。置于自动读板仪内扫描计数并做统计分析。

2.3 实验结果和讨论

2.3.1. 小鼠品系和多肽筛选结果

采用以下 www.syfpeithi.de (简称为 Syp) 以及 www.bimas.cit.nih.gov (简称为 Bis) 提供的 MHC 结合肽以筛选表位肽。不同组别间用单因素方差分析 (One Way ANOVA), 组间两两比较采用 Newman-Keuls 检验, 若方差不齐, 不同免疫组采用 Kruskal-Wallis 检验, 组间二者比较采用 Dunn's Multiple comparison 检验。小鼠在 0 周免疫 DNA 疫苗及 2 周加强免疫重组腺病毒疫苗后, 第 3 周取脾分离淋巴细胞, 使用 ELISPOT 方法检测细胞免疫效果。通过筛选多肽, 确定 C57 小鼠以及 Balb/c 小鼠最适宜的刺激多肽, 通过比两种小鼠的最高值, 确定合适的小鼠型别。即筛选小鼠型别及适宜的刺激性多肽, 参见表 2-6 和表 2-7。本实验

中 c57 实验组分别加入 8 条肽 HPV18L1 的 MHC 结合肽, Balb/c 小鼠分别加入 12 条 HPV18L1 的 MHC 结合肽, 每条多肽均设置 2 个复孔, 通过阳性斑点数确定适宜的小鼠型别以及相应的刺激性 MHC 结合肽。

实验组 1 为实验组 2 的空白对照, 在实验组 2 中, 在 0 周初免 100 μ g 的 pVR-HPV18L1 DNA 疫苗后, 3 周后加强一针剂量为 10^9 vp 的携带密码子优化型 HPV18L1 的重组腺病毒疫苗 rAd5-HPV18L1, 初免后 4 周做断颈处理, 按照 2.2.5.3 中所述的方法分离脾脏淋巴细胞, 使用表 2-2 中所述的刺激性多肽, 终浓度为 8 μ g/ml 作为表位肽, 经 ELISPOT 反应检测后筛选合适的表位肽即小鼠型别。ELISPOT 的检测结果如图 2-1 所示。

从图 2-1 中可知, C57BL/6H-2D^b 小鼠实验组中使用多肽 18-3, 18-5, 18-6, 18-8 多肽刺激的实验组与对照组有显著差异 ($p < 0.05$) 并且多肽 18-6 刺激产生的阳性斑点数明显高于其他多肽, 因此可以确认 18-6 多肽相对与其他多肽具有更好的刺激效果。实验组 1 中八条多肽刺激产生的阳性斑点数如表 2-6 所示。

在实验组 4 中, 0 周初免 100 μ g 的 pVR-18 L1 DNA 疫苗, 3 周后加强 10^9 vp 的 rAd5-HPV18 L1 腺病毒疫苗, 4 周断颈处理。其对照组, 实验组 3 则注射相应体积的灭菌 PBS。分离脾脏淋巴细胞做 ELISPOT 反应, 使用表 2-3 中所示合成的刺激性多肽, 终浓度为 8 μ g/ml。ELISPOT 的检测结果如图 2-2 所示。

表 2-6 C57BL/6H-2D^b 小鼠中 HPV18L1MHC 结合肽
Table 2-6 MHC binding peptide of HPV18 L1 in C57BL/6H-2D^b

Number	Sequence	Spots per 1×10^6 splenocytes
18-1	WRPSDNTVYL	1.5 \pm 0.3
18-2	ARVVNTDDYV	0.5 \pm 0.5
18-3	AGGGNKQDI	12.5 \pm 4.3
18-4	QLPDPNKFGL	2.8 \pm 0.5
18-5	AATSNVSEDV	26.3 \pm 5.2
18-6	RHFWRNAGTM	177.0 \pm 79.8
18-7	SQLFNKPYWL	4.0 \pm 1.0
18-8	IHSMNSSIL	18.0 \pm 1.7

Figure 2-1 Specific cellular immunization of C57 mouse

表 2-7 Balb/c 小鼠中 HPV18L1 T 细胞表位的确定
Table 2-7 T cell epitope definition of HPV 18L1 in Balb/c

Number	Sequence	Spots per 1×10 ⁶ splenocytes
P462	QYPLGRKFL	473±33
P150	DYKQTQLCI	130±21
P90	IYNPETQRL	92±18
P69	QYRVFRVQL	340±31
P390	SYIHSMNSSI	27±2
P290	VYSPSPSGSI	36±8
P418	TYRFVQSVAI	406±19
P34	FYHAGSSRLL	1450±270
P204	GYGAMDFSTL	68±9
Ld407	VPPPPTTSL	38±2
L240	DPYGDSMFF	92±7
Dd	IGPRKRSAPS	183±5

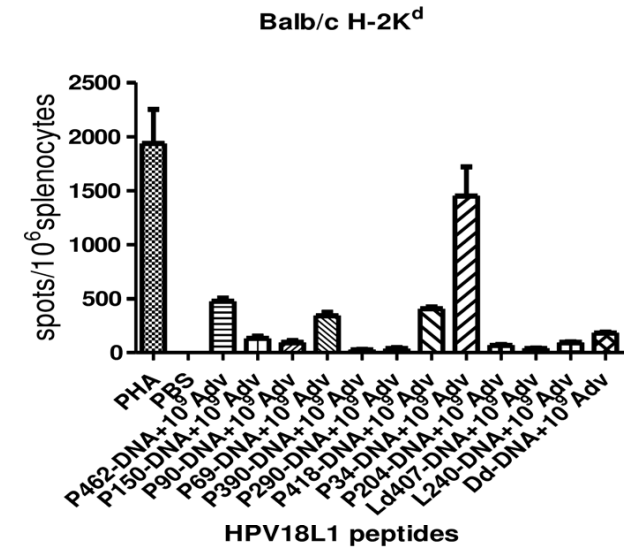


图 2-2 Balb/c 小鼠特异性细胞免疫结果
Figure 2-2 Specific cellular immunization of Balb/c mouse

从表 2-7 和图 2-2 可知, Balb/c H-2K^d 小鼠实验组中多肽 P462、P69、P418、P34 等 4 条多肽刺激产生的阳性斑点数目明显高于其他多肽刺激产生的阳性斑点数目, 与对照组相比具有显著性差异 ($p < 0.05$)。

在上述 MHC 结合肽中, 以 p34 多肽刺激产生的阳性斑点数最多, 因此可以确认 p34 多肽相对于其他多肽具有更好的刺激效果。实验组 2 中 12 条多肽刺激产生的阳性斑点数如表 2-7 所示。

在实验组 4、5、6 中, 0 周初免 100 μ g 的 pVR-18 L1 DNA 疫苗, 3 周后组别 4、5、6 分别加强免疫 10⁹, 10⁸, 10⁷ vp 的 rAd5-HPV18 L1 腺病毒疫苗, 4 周断颈处理, 分离脾脏淋巴细胞做 ELISPOT 反应, 使用表 2-7 中所示的刺激性多肽 p34, 终浓度为 8 μ g/ml。ELISPOT 的检测结果如图 2-3 和表 2-8 所示。

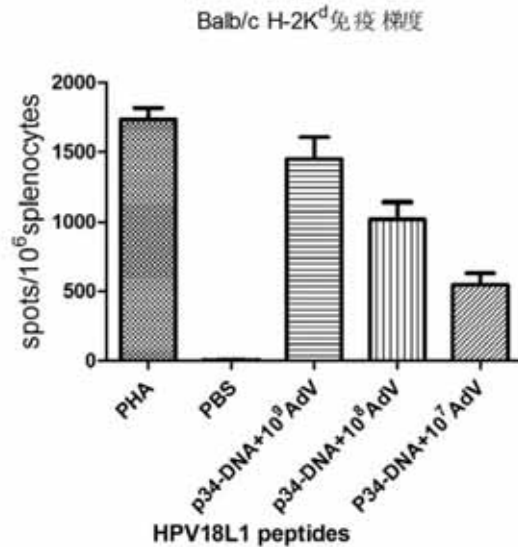


图 2-3 Balb/c 小鼠在不同剂量腺病毒疫苗作用下的细胞免疫效果
Figure 2-3 cellular immunization induced by different dose of rAdV in Balb/c

表 2-8 不同剂量腺病毒疫苗诱导的细胞免疫效果
Table 2-8 cellular immunization induced by different dose of rAdV

Group	Spots per 1 × 10 ⁶ splenocytes
PHA	1582 ± 108.3
PBS	3.5 ± 0.2
4	1450.5 ± 137.3
5	1020.5 ± 97.3
6	547.5 ± 46.3

从表 2-8 可知, Balb/c H-2K^d 小鼠实验组中使用筛选的多肽 p34 做为刺激性多肽, 其中加强免疫 10⁷, 10⁸, 10⁹ vp 的 rAd5-HPV18 L1 腺病毒的小鼠细胞免疫均产生了较明显的阳性斑点数, 对比阴性对照 (PBS 组) 有显著性差异 (P<0.05), 其中加强免疫 10⁷ vp 的 rAd5-HPV18 L1 腺病毒疫苗产生的阳性斑点数为 547.5±46.3, 加强免疫 10⁸ vp 的 rAd5-HPV18 L1 腺病毒疫苗产生的阳性斑点数为 1020.5±97.3, 加强免疫 10⁹ vp 的 rAd5-HPV18 L1 腺病毒疫苗产生的阳性斑点数为 1450.5±137.3, 因此加强免疫 10⁹ vp 的 rAd5-HPV18 L1 腺病毒疫苗可诱导产

生最多的阳性斑点, 因此在后续的实验采用 10⁹ vp 剂量的 rAd5-HPV18L1 腺病毒疫苗。

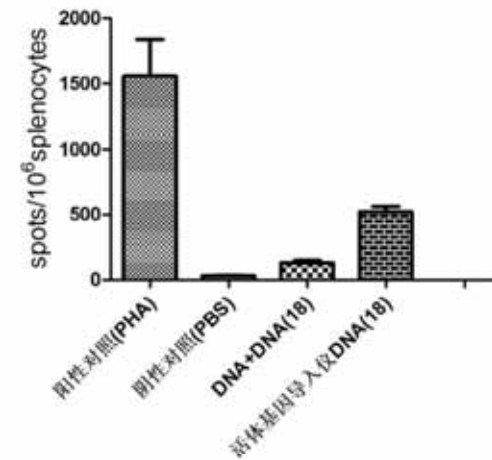


图 2-4 Balb/c 小鼠在不同的注射方式下的细胞免疫效果
Figure 2-4 Cellular immunization by different way of inoculation in Balb/c

2.3.2 基因导入仪对 DNA 疫苗免疫效果的影响

由于 DNA 疫苗不同的接种方法也会引起免疫效果的差异, 因此在实验确定小鼠品系 Balb/c、刺激多肽 p34、腺病毒剂量 10⁹ vp 之后, 设计实验以验证采用 DNA 导入仪和常规的 DNA 肌注法诱导产生的免疫效果的优劣, 在实验组 1、2、3 中, 每组 5 只, 在 0 周免疫 100 μg VR-HPV18L1 DNA 疫苗, 3 周加强免疫一次相同剂量的 DNA 疫苗, 在第 4 周做断颈处理, 分离脾脏淋巴细胞通过 ELISPOT 反应检测小鼠的细胞免疫以优选 DNA 的免疫方式。其中 1、2 组采用普通单侧肌注的方法, 3 组采用 DNA 导入仪进行 DNA 免疫, 初免和加强的接种方式前后一致。在初免 4 周后采用 ELISPOT 方法使用 2.1.3 中所示合成的终浓度为 8 μg/ml 刺激性多肽, 检测细胞免疫。ELISPOT 的检测结果如图 2-4 和表 2-9 所示。

从以上数据可知, Balb/c H-2K^d 小鼠实验组采用肌肉注射和 DNA 导入仪注射的方法接种疫苗, ELISPOT 检测后均产生明显的阳性斑点数, 但是采用基因导入仪接种 DNA 疫苗诱导产生的阳性斑点数明显高于采用肌肉注射方式接种相同疫苗诱导产生的阳性斑点数, 二者间有显著性差异 (p<0.05), 这说明采用基因导入仪的方式进行 DNA 疫苗的接种是较优的选择。

表 2-9 不同注射方式诱导的细胞免疫效果
Table 2-9 Cellular immunization induced by different way of inoculation

Group	Spots per 1×10^6 splenocytes
PHA	1536.7 \pm 184.5
1	30.5 \pm 2.9
2	132.4 \pm 11.9
3	521.2 \pm 34.7

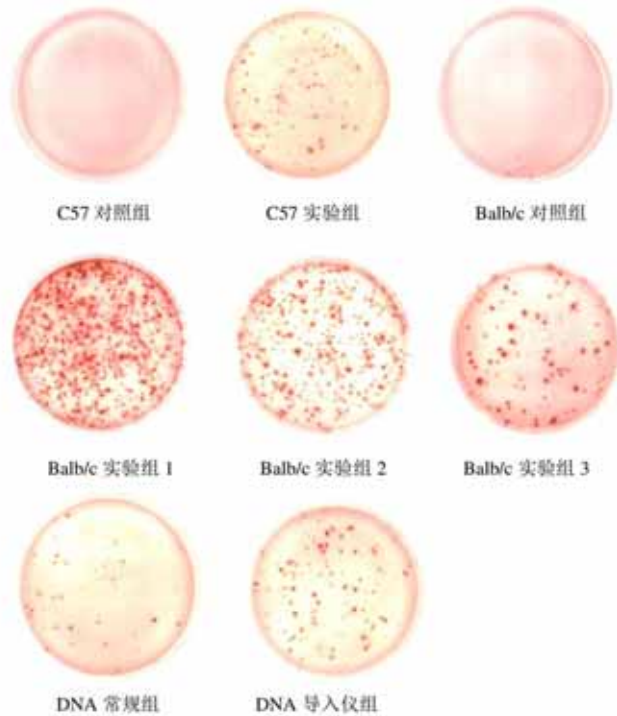


图 2-5 筛选实验中各组 ELISPOT 检测照片
Figure 2-5 Graphs of ELISPOT in pre-experiment

综上所述可知 C57BL/6H-2D^b 小鼠 ELISPOT 检测产生的阳性斑点数远低于 Balb/c H-2K^d 小鼠实验组，并且 Balb/c H-2K^d 小鼠实验组中 p34 多肽产生的阳性

斑点数最多，具有更好的刺激效果。此外对比了重组腺病毒不同免疫剂量（ 10^7 、 10^8 、 10^9 vp）和采用肌注及活体基因导入仪接种方法的细胞免疫效果，综合上述实验结果，及筛选实验中组对应的 ELISPOT 检测图（图 2-5）可知：采用活体基因导入仪肌注 DNA 疫苗之后采用 10^9 vp 剂量的 rAdV5 疫苗加强免疫 H-2K^d Balb/c 小鼠，p34 作为刺激性肽段诱导细胞免疫，可产生最佳的免疫效果。

2.3.3 多载体疫苗免疫效果的检测

2.3.3.1 VR-HPV18L1 和 rAdV-HPV18L1 联合诱导细胞免疫反应

实验组 1 中，在 0 周初免 10^9 vp 的 rAdV-HPV18L1，3 周加强同剂量的 rAdV-HPV18L1，分别在第 4 周、6 周、22 周、27 周采用 ELISPOT 检测重组腺病毒疫苗 rAdV-HPV18L1 诱导的 HPV18L1 特异性细胞免疫反应，结果显示，4 周时可检测到 HPV18L1 特异性细胞免疫反应，初免后 6 周（加强免疫 3 周后）细胞免疫反应水平下降接近 1/3，初次免疫 22 周后（加强免疫 19 周后）仍可检测到 HPV18L1 特异性细胞免疫反应，但是跟初免后 4 周 HPV18L1 特异性细胞免疫反应水平相比，下降明显；初免后 27 周可检测到的 HPV18L1 特异性细胞免疫反应，且和对照组相比有显著性差异（ $p < 0.05$ ）。以上实验数据说明在初免重组腺病毒疫苗 rAdV-HPV18L1 后加强一次即可诱导 HPV18L1 特异性细胞免疫反应，并且在较长时间内仍可保持一定的细胞免疫反应水平，结果如图 2-6 所示。

实验组 2 中，在 0 周初免 100 μ g VR-HPV18L1 DNA 疫苗，3 周加强同剂量的 VR-HPV18L1 DNA 疫苗，均使用 DNA 导入仪进行肌注，分别在第 4 周、6 周、9 周、22 周、27 周采用 ELISPOT 检测重组 DNA 疫苗 VR-HPV18L1 诱导的 HPV18L1 特异性细胞免疫反应，结果如图 2-6 所示。4 周时可检测到 HPV18L1 较强的 HPV18 特异性细胞免疫反应，初免后 6 周（加强免疫 3 周后）细胞免疫反应水平有所下降，但比较缓慢，初免后 9 周，至初后初免疫后 22 周（加强免疫 19 周后）仍检测到的阳性斑点数一致呈下降趋势，但是相比 rAdV-HPV18L1 免疫的组 1，组 2 前期细胞免疫反应强度下降较慢，但后期（初免后 6 周）特异性细胞免疫反应强度下降趋势快于组 2，而且其免疫强度一直低于同期的组 1。组 2 实验数据说明在初免重组 VR-HPV18L1 DNA 疫苗后加强一次即可诱导 HPV18L1 特异性细胞免疫反应，并且在较长时间内仍可保持一定的细胞免疫反应水平，但其免疫反应强度低于重组腺病毒疫苗 rAdV-HPV18L1。

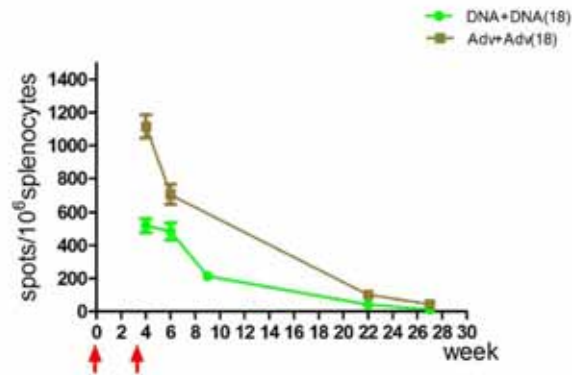


图 2-6 VR-HPV18L 和 rAdv-HPV18L1 免疫的小鼠细胞免疫结果

Figure 2-6 Cellular immunization by VR-HPV18L1 and rAdv-HPV18L1 in Balb/c

实验组 3 采用多载体序贯重复免疫的免疫规程, 其中组 3 在 0 周和 3 周接种 100 μg VR-HPV18L1 DNA 疫苗, 在初免后 6 周、9 周、14 周接种 10^9 vp 重组腺病毒疫苗 rAdv-HPV18L1。采用 ELISPOT 方法监测免疫过程中小鼠产生的细胞免疫反应, 分别在初免后第 4、6、7、9、10、14、15、22、27 周断颈处死, 每次 5 只, 取脾淋巴细胞检测 HPV18L1 特异性阳性细胞斑点, 结果显示, 在接种 VR-HPV18L1 DNA 后, 加强一针 rAdv-HPV18L1 即可诱导产生强烈的细胞免疫反应, 初免后 9 周加强一针 rAdv-HPV18L1 可再次诱导更为强烈的细胞免疫反应, 初免后 14 周加强一针 rAdv-HPV18L1, 细胞免疫应答达到最高, 以上实验表明多载体 (VR-HPV18L1 DNA 和 rAdv-HPV18L1) 序贯重复免疫可在 Balb/c 小鼠体内诱导产生强烈且持久的细胞免疫反应, 结果如图 2-7 所示。

实验组 4 是在组 3 的基础上增加了 HPV16L1 型别, 即在 0 周和 3 周接种 100 μg VR-HPV16/18L1 DNA 疫苗, 之后在初免后 6 周、9 周、14 周接种 10^9 vp 重组腺病毒疫苗 rAdv-HPV16/18L1。采用 ELISPOT 方法监测免疫过程中, 小鼠产生的细胞免疫反应, 分别在初免后第 4、6、7、9、10、14、15、22、27 周断颈处死, 每次 5 只, 取脾淋巴细胞检测 HPV18L1 特异性阳性细胞斑点, 结果显示组 4 和组 3 诱导产生的特异性细胞免疫反应具有相同的趋势, 但是, 组 4 在相应时期诱导产生的阳性斑点数均高于 HPV18 单一型别诱导产生的阳性斑点数, 这表明 HPV16 和 18 型别共同免疫可起到强化免疫效果的作用, 可能是因为抗原或表位的影响或其他原因等, 这还需进一步的研究, 实验结果如图 2-7 所示。

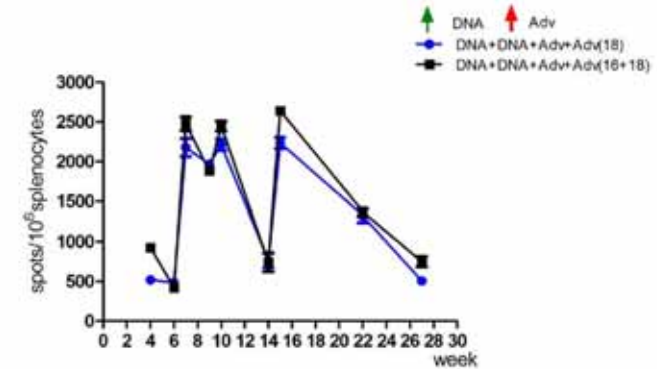


图 2-7 VR-HPV18L 和 rAdv-HPV18L1 多载体重复接种细胞免疫结果

Figure 2-7 Cellular immunization by multiple vectors of repeated inoculation with VR-HPV18L1 and rAdv-HPV18L1 in Balb/c

总之, 上述细胞免疫结果表明, 腺病毒疫苗诱导产生的细胞免疫效果好于 DNA 疫苗免疫效果。通过对比图 2-6 和 2-7, 在 DNA 疫苗免疫后保护效力逐渐减弱, 在加强免疫腺病毒疫苗后, 免疫效果增强, 并且在多次免疫后达到最高值, 此时的细胞免疫强度远高于单一类型疫苗免疫效果, 因此 DNA 和腺病毒疫苗的联合免疫策略较单独免疫效果明显加强, 采用重组 DNA 疫苗和重组腺病毒疫苗的多载体序贯重复免疫策略可诱导产生最佳的细胞免疫应答。此外 HPV16、18 不同型别的疫苗共同免疫有相互增强免疫效果的作用, 这在细胞免疫应答中也得到了验证。两种性别相互加强免疫效果的机制, 可能由于共同免疫的剂量有所变化, 或其他因素的影响。

2.3.3.2 VR-HPV18L1 和 rAdv-HPV18L1 诱导的体液免疫反应

实验过程中采用假病毒体外中和实验的方法对疫苗诱导产生的中和抗体进行监测, 其中分别在第 4 周、6 周、22 周、27 周对组 1 采用体外中和实验检测重组腺病毒疫苗 rAdv-HPV18L1 诱导产生的 HPV18L1 特异性体液免疫反应, 结果如图 2-8 所示, 4 周时可检测到 HPV18L1 特异性中和抗体, 初免后 6 周 (加强免疫 3 周后) 体液免疫反应水平下降有所下降, 初次免疫 22 周后 (加强免疫 19 周后) 及 28 周后, 中和抗体滴度一直呈下降趋势, 但和对照组相比仍有显著差异 ($p < 0.01$)。实验结果表明, 2 针重组腺病毒疫苗 rAdv-HPV18L1 即可产生高滴度 HPV18L1 特异性中和抗体, 并且在较长时间内仍可提供一定的体液免疫保护性。

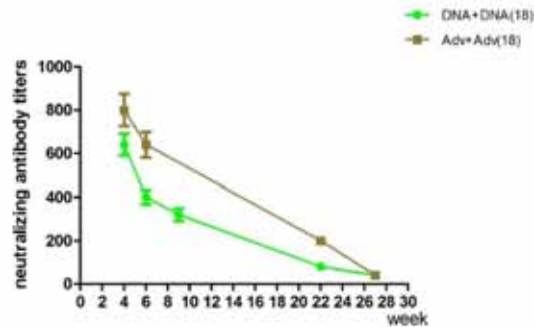


图 2-8 VR-HPV18L1 和 rAdv-HPV18L1 免疫的小鼠体液免疫结果

Figure 2-8 Humoral immunization by VR-HPV18L1 and rAdv-HPV18L1 in Balb/c

实验组 2 分别在 0 周、3 周使用 DNA 导入仪接种 VR-HPV18L1 DNA, 在第 4 周、6 周、9 周、22 周、27 周眼眶取血, 分离血清, 采用假病毒颗粒体外中和实验检测重组 DNA 疫苗诱导的 HPV18L1 特异性体液免疫反应, 结果如图 2-9 所示, 4 周时可检测到 HPV18L1 特异性中和抗体, 此后至初免后 27 周, 体液免疫水平一直呈下降趋势, 但对对照组相比仍有显著差异 ($p < 0.01$)。和实验组 1 对比, 组 2 诱导产生的中和抗体滴度较低, 实验结果表明, 2 针重组 DNA 疫苗种 VR-HPV18L1 DNA 即可诱导产生较高滴度 HPV18L1 特异性中和抗体, 并且在较长时间内仍可提供一定的体液免疫保护性。

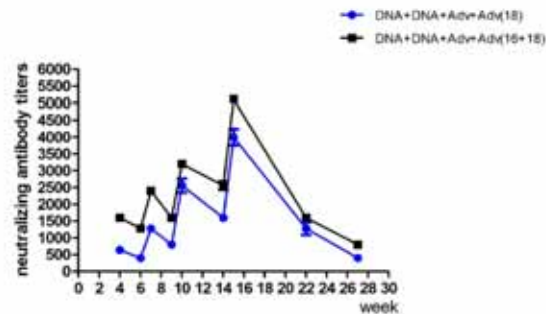


图 2-9 VR-HPV18L1 和 rAdv-HPV18L1 多载体重复接种体液免疫结果

Figure 2-9 Humoral immunization by multiple vectors of repeated inoculation with VR-HPV18L1 and rAdv-HPV18L1 in Balb/c

实验组 3 分别在 4、6、7、9、10、14、15、22、27 周眼眶取血, 分离血清

检测中和抗体滴度。实验结果如图 2-9 所示, 在 2 针重组 DNA 疫苗免疫后, 6 周加强一针重组腺病毒疫苗 rAdv-HPV18L1, 可极大提高体液免疫反应强度, 在初免 9 周后重复加强 rAdv-HPV18L1, 初免 10 周后中和抗体滴度达到了 DNA 疫苗诱导抗体滴度的 4 倍, 此后 14 周接种第 3 针 rAdv-HPV18L1, 一周后检测发现 HPV18 特异性中和抗体滴度达到最大值, 并且直到初 12 周后 (免后 27 周) 仍保持较高的中和抗体滴度, 以上实验现象表明, 相对与单一载体疫苗而言, 重组 DNA 载体和重组腺病毒组成的多载体序贯重复免疫可提供较高强度以及较长持续时间的体液免疫保护性。

实验组 4 分别在 4、6、7、9、10、14、15、22、27 周眼眶取血, 分离血清采用假病毒体外中和实验检测中和抗体滴度。实验结果如图 2-10 所示, 通过长期的监测可知, 实验组 4 和实验组 3 具有一致的体液免疫反应强度变化趋势, 但是相对与单一型别的 (HPV18) 的免疫, 多型别 (HPV16 和 HPV18) 重组 DNA 疫苗和重组腺病毒疫苗可诱导产生更强的体液免疫反应, 这也和之前的细胞免疫反应结果一致, 但是 HPV16 和 HPV18 型别共同免疫后, 相互加强免疫效果的机制, 目前尚不清楚, 这可能是因为抗原或表位的影响或其他因素的影响, 具体原因还需进一步的研究。

综上所述, 重组腺病毒疫苗和重组 DNA 疫苗分别免疫两针后, 在 Balb/c 小鼠中诱导的中和抗体均较低, 但腺病毒疫苗诱导的中和抗体高于 DNA 疫苗诱导产生的中和抗体, DNA 疫苗免疫后中和抗体数量逐渐降低, 但在加强免疫腺病毒疫苗后, 免疫效果增强, 在第 3 次加强腺病毒时诱导产生的中和抗体数增加最多, 多次加强免疫后达到最高值, 从图 2-8 和 2-9 中对比可知, 此时的体液免疫远高于单一类型疫苗诱导产生的免疫效果, 即使在初免后 27 周仍有一定的保护效力, 因此 DNA 和腺病毒疫苗的联合序贯免疫策略较单独免疫效果明显加强, 此外 HPV16、18 不同型别的疫苗共同免疫有相互增强免疫效果的作用, 这与细胞免疫的结果一致。

2.4 本章小结

本章首先进行筛选实验, 即使用制备的 HPV18 L1 的重组 DNA 疫苗 pVR-18 L1 和重组腺病毒疫苗 rAd5-HPV18 L1 分别免疫 C57BL/6H-2D^b 和 Balb/c H-2K^d 小鼠, 并使用 ELISPOT 方法检测细胞免疫效果。结果发现:

- (1) 活体基因导入仪接种 DNA 疫苗诱导的细胞免疫效果优于肌肉注射。
- (2) 10^9 vp 剂量的 rAd5-HPV18 L1 疫苗诱导的免疫效果优于其他剂量。
- (3) Balb/c H-2K^d 小鼠的 p34 多肽可诱导产生最多的阳性斑点

因此由筛选实验可知,采用活体基因导入仪肌注 DNA 疫苗与 10^9 vp 剂量的 rAdv5 疫苗联合免疫 H-2K^d Balb/c 小鼠, p34 作为刺激性肽段诱导细胞免疫,可诱导产生最佳的免疫效果。

其次是采用筛选的小鼠型别、接种方式、表位肽进行重组 DNA 疫苗和重组腺病毒疫苗联合免疫在小鼠体内诱导的免疫反应实验,采用 ELISPOT 和假病毒体外中和实验对其长期的免疫反应进行监测。结果发现:

(1) 重组腺病毒疫苗和重组 DNA 疫苗均能诱导小鼠产生较好的 HPV18 特异性细胞和体液免疫反应,并且前者诱导产生的细胞和体液免疫反应强度均高于后者。

(2) 重组 DNA 疫苗免疫后诱导产生的细胞和体液免疫强度逐渐减弱,但在多次加强免疫重组腺病毒疫苗后,免疫效果增强,在第 3 次加强重组腺病毒疫苗时,细胞和体液免疫强度增加最快,并达到高峰,在初免后 27 周检测,仍有较强的保护效力,说明包含重组 DNA 和重组腺病毒的多载体序贯重复免疫可诱导机体在较长时间内产生针对 HPV18L1 的高滴度的血清中和抗体及特异性细胞免疫应答。

(3) HPV16、18 不同型别的疫苗共同免疫诱导产生的中和抗体数即特异性细胞免疫较单一型别的有明显的增加,共同免疫有相互促进的作用。

第 3 章 含 HPV18L1 基因的重组腺相关病毒的构建

3.1 实验材料

3.1.1 菌株和细胞

大肠杆菌 DH5 α 由天根生物公司购得。HEK293FT 细胞由英潍捷基(上海)贸易有限公司购得。

3.1.2 载体和试剂

含密码子优化型 HPV18L1 基因的质粒 pMK-RQ 由周玉柏博士惠赠。假病毒颗粒的包装质粒 pYSEAP 及 shell18 由美国国家癌症研究所(NCI)的 John.Schiller 教授惠赠。*Hind* III 和 *Eco*R I 限制酶、T4 连接酶、DNA Marker 均由 Takara 公司购得。QuickShuttle 293 转染试剂购自北京康碧泉公司。DNA 聚合酶、质粒回收试剂盒、DNA 纯化试剂盒、dNTP 均购自天根生化科技(北京)有限公司。质粒抽提试剂盒、endodfree 大提试剂盒由 QIAGEN 公司购得。DMEM 培养基、OptiMEM I 培养基、胎牛血清、青链霉素双抗购自 Gibco 公司。

3.1.3 主要仪器设备

仪器名称	厂家
恒温磁力搅拌器	上海梅颖浦仪器仪表有限公司
台式高速冷冻离心机	Thermo 公司
DNA 电泳设备	北京六一仪器仪表
蛋白电泳仪	博迈德公司
生物安全柜	Thermo 公司
转印槽、电泳槽	博迈德公司
雪花制冰机	北京长流科学仪器
细胞培养箱	Thermo 公司

3.1.4 引物

实验中上游引物 MCSF 和下游引物 MCSR 均由上海英潍捷基公司合成,引物序列如下:

MCSF: 5'-ATAAGAATTCATGGCTCTGTGGCGGCCAG -3'

MCSR: 5'-ATATAAGCTTTCACCTTGCGGGCTCTCACGC -3'

本发明所涉及的分子生物学和免疫学等相关技术如核酸操作技术, 细胞生物学技术等均在科学文献中都有充分描述 (详细参见萨姆布鲁克 E·F·弗里奇 T·曼尼蒂斯, 分子克隆指南)。

3.2 实验方法

3.2.1 构建重组穿梭质粒 pAAV-HPV18L1

3.2.1.1 PCR 扩增 HPV18 L1 基因片段

MCSF 为上游引物, MCSR 为下游引物, pMK-RQ 为模板, PCR 扩增 HPV18L1 基因片段。PCR 扩增完成后采用 DNA 凝胶电泳方法进行检测并回收扩增产物 HPV18L1 片段。PCR 反应体系如下所示:

双或三蒸水	37.5 μ L
10 \times Pfu Reaction Buffer	5 μ L
4 种 dNTP 混合物	4 μ L
上游引物 MCSF	1 μ L
DMSO	2.5 μ L
下游引物 MCSV	1 μ L
PfuDNA 聚合酶	1 μ L
模板 PMK-RQ	0.5 μ L

PCR 程序: 以两条引物互为引物和模板进行拼接预变性 94 $^{\circ}$ C, 5 min; 25 个循环 (变性 90 $^{\circ}$ C 1 min, 复性 58 $^{\circ}$ C 30s, 延伸 72 $^{\circ}$ C 2 min); 充分延伸 72 $^{\circ}$ C, 5 min。PCR 完成后放到 -30 $^{\circ}$ C 保存。对 PCR 扩增产物进行 DNA 凝胶电泳检测, 切胶回收 PCR 扩增产物。

3.2.1.2 双酶切重组载体和 HPV18 L1 质粒

挑取冻存的 pAAV-MCS 菌, 接种至 5 ml 氨苄抗性的 LB 培养基后 37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜。按质粒抽提试剂盒说明抽提质粒, 然后对 pAAV-MCS 质粒和 HPV18L1 基因片段使用限制性内切酶 *Eco*RI 以及 *Hind* III 进行双酶切。用琼脂糖凝胶电泳电泳回收目的片段并检测回收的效果。

3.2.1.3 HPV18 L1 片段和 pAAV-MCS 质粒的连接转化

将酶切回收的适量 HPV18 L1 目的片段和 pVR 质粒混合后, 加入 2.5 μ L T4 Ligase 缓冲液及 1 μ L 的 T4 连接酶, 补加双蒸水至 20 μ L, 室温连接过夜后将连接产物加入 50 μ L 大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 冰上放置 30 min。42 $^{\circ}$ C 热激 90 s

后, 冰上放置 3~5 min。随后加入 500 μ L LB 培养基, 37 $^{\circ}$ C 恒温振荡 1 h。用玻棒将转化的大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞涂布至含有氨苄抗性的 LB 琼脂平板培养基上, 37 $^{\circ}$ C 恒温培养 12~16 h。

3.2.1.4 重组质粒的鉴定

挑取单菌落接种至氨苄抗性的 LB 培养基平板中, 置于 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中振荡培养 12~16 h。按照质粒抽提试剂盒抽提质粒后使用限制酶 *Hind* III 和 *Eco*RI 对抽提质粒酶切后凝胶电泳鉴定, 在相应的条带上有 pAAV-MCS 和 HPV18L1 片段。送北京华大基因测序并命名为 pAAV-HPV18 L1。

3.2.2 重组腺相关病毒 rAAV2/1-HPV18L1 的包装

根据 Quickshuttle 试剂盒操作说明将 48 μ g pHelper、16 μ g p5E18RXC1 及重组腺相关病毒穿梭质粒 16 μ g PAAV-HPV18L1 质粒混匀后加入 500 μ l 的 NaCl 生理盐水中。将 160 μ l 的转染试剂加入 500 μ L 的 NaCl 生理盐水中。上述溶液二者混匀之后加入含有 15 ml 细胞培养基的每瓶细胞, 如图 3-1 所示 (转自 cell labs 主页: <http://www.cellbiolabs-cn.com/aav-helper-free-packaging-system.html>), DNA 和转染试剂按照 1:2 的比例混匀后, 培养瓶置于 37 $^{\circ}$ C 5%CO₂ 条件下培养, 转染 72 h 后, 用细胞刮刀将细胞刮下, 800 rpm 离心 5 min, 弃上清, 用 2 ml 无菌 PBS 重悬细胞沉淀; -80 $^{\circ}$ C 和 37 $^{\circ}$ C 反复冻融 3 次, 3 000 rpm, 2 min 离心取上清, 收获重组腺相关病毒粗制品, 命名为 rAAV2/1-HPV18L1, -80 $^{\circ}$ C 保存备用。

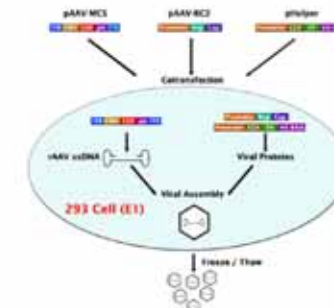


图 3-1 三质粒共转染 293 细胞构建 rAAV2/1-HPV18L1 示意图
Figure 3-1 Illustration of rAAV2/1-HPV18L1 constructed by cotransfection of three plasmids to 293 cells

3.2.3 重组腺相关病毒滴度的测定

使用 CELL BIOLABS, INC QuickTiter™ AAV2 Quantitation Kit 腺相关病毒滴度测定试剂盒对重组腺相关病毒进行滴度测定, 即测定荧光染料发光值确定腺相关病毒含量。按照 1:2 比例建立标准样品曲线, 浓度分别为 10 μg/ml, 5 μg/ml, 2.5 μg/ml, 1.25 μg/ml, 0 μg/ml, 每个稀释度转移 10 μL 至微孔板 (如图 3-4)。加入 90 μL CyQuant@GR 染料至含有 10 μL 标准样品的 96 孔板中, 将 13.5 μL 纯化 AAV2/1 样品和 1.5 μL QuickTiter 试剂盒中的 10× C 液混匀, 75°C 孵育 1 h 后, 短暂离心, 室温静置 20 min。通过混合 13.5 μL 相同的纯化 AAV2/1 和 1.5 μL 10×C 液准备未加热的对照样品。将 10 μL 未加热组和实验组样品的混合物到 96 孔板中, 各孔分别加入 90 μL 的新鲜配制 1×CyQuant@GR 染料, 荧光酶标仪 480/520 nm 波段读板。根据标准曲线及说明书中的公式计算 rAAV rAAV2/1-HPV18L1 滴度。公式如下所示。

$$\text{Titer(GC/ml)} = \text{Dilution Factor} \times \text{AAV2-1/DNA(ng)} \times (3.6 \times 10^8 \text{GC/ng}) \times (15 \mu\text{L}/13.5 \mu\text{L}) / 0.010 \text{ ml}$$

计算得出 rAAV 滴度约为 8.8×10^{11} vg/ml, -80°C 冻存以进行后续动物实验。

3.2.4 重组腺相关病毒颗粒电镜检测

取 10 μL 纯化的 rAAV2/1-HPV18L1 病毒悬液置于支持膜上, 用 2% 磷钨酸负染 3~5 min, 吸去多余染色液, 室温静置过夜。使用透射电镜 (×52 000) 观察病毒形态。

3.3 实验结果及讨论

3.3.1 PCR 扩增 HPV18L1 基因片段的结果

以 pMK-RQ 为模板, MCSF 及 MCSR 为上、下游引物 PCR 扩增 HPV18L1 基因片段。PCR 完成后取 1 μl 反应溶液进行 DNA 凝胶 (1%) 电泳检测。结果如图 3-2 所示, 产物片段和预期结果大小一致。



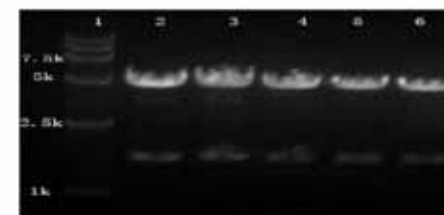
1. DNA Marker 5000 2. HPV18L1 基因片段

图 3-2 PCR 扩增 HPV18L1 目的条带

Figure 3-2 PCR Amplification of HPV18L1

3.3.2 酶切鉴定重组质粒 pAAV-HPV18L1 结果

将 pMK-RQ 中的密码子优化的 HPV18L1 基因克隆至 pAAV-MCS 质粒酶切鉴定基因, 得到 pAAV-HPV18L1。经酶切验证插入片段大小及方向正确。酶切验证结果如图 3-3



1. DNA marker 12000 2. MCS-HPV8L1 质粒

3. MCS-HPV8L1 质粒 4. MCS-HPV8L1 质粒

5. MCS-HPV8L1 质粒 6. MCS-HPV8L1 质粒

图 3-3 pAA-HPV18L1 重组质粒 *Hind* III, *Eor* I 酶切电泳

Figure 3-3 pAA-HPV18L1 digested by *Hind* III, *Eor* I

3.3.3

使用 CELL BIOLABS, INC QuickTiter™ AAV Quantitation Kit 腺相关病毒滴度测定试剂盒对重组腺相关病毒进行滴度测定。通过测定腺相关病毒中 DNA

分子含量即其荧光染料发光值确定腺相关病毒含量。根据标准曲线及说明书中的公式 $\text{Titer (GC/ml)} = \text{Dilution Factor} \times \text{AAV-2 DNA (ng)} \times (3.6 \times 10^8 \text{ GC/ng}) \times (15 \mu\text{l}/13.5 \mu\text{L}) / 0.010 \text{ ml}$ 计算得到 rAAV2/1-HPV18L1 病毒的滴度约为 8.8×10^{11} vg/ml。

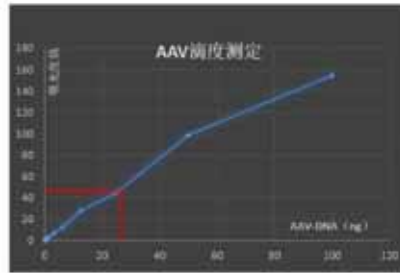


图 3-4 rAAV 滴度测定标准曲线
Figure 3-4 rAAV titrating test standard curve

3.3.4 重组腺相关病毒的电镜检测结果

取 10 μL 纯化的 rAAV2/1-HPV18L1 病毒悬液用 2% 磷钨酸负染 3 min 后，在透射电镜下观察病毒样颗粒，结果如图 3-5 所示，电镜下可见直径约 20 nm 的病毒颗粒的存在。

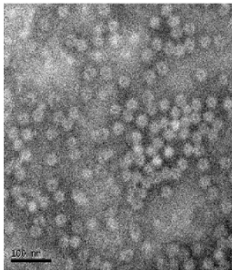


图 3-5 纯化的腺相关病毒颗粒的电镜观察 ($\times 52000$)
Figure 3-5 Electron micrographs of purified rAAV2/1
($\times 52000$. Bar=100nm)

3.4 本章小结

本章中使用 AAV Helper-Free 腺相关病毒包装系统成功包装除了含密码子优化型 HPV18L1 基因的重组腺相关病毒 rAAV2/1-HPV18L1, 使用凝胶柱成功纯

化了该重组腺相关病毒，使用 CELL BIOLABS, INC QuickTiter™ AAV Quantitation Kit 腺相关病毒滴度测定试剂盒测定重组腺相关病毒滴度为 8.8×10^{11} vg/ml，经透射电镜观察，可见直径约 20 nm 的病毒颗粒。本章中制备的重组腺相关病毒 rAAV2/1-HPV18L1 用于后续的动物免疫实验。

第 4 章 重组腺相关病毒疫苗免疫效果的研究

4.1 实验材料

4.1.1 细胞和菌种

HEK293FT 细胞购自英潍捷基贸易有限公司。大肠杆菌 DH5 α 购自天根生化科技公司。

4.1.2 主要试剂

DMEM 培养基、RPMI-1640 培养基、易得小鼠淋巴细胞分离液、 γ -干扰素 ELISPOT 预包被试剂盒均由深圳达科为生物公司购得。分析纯化学试剂均由病毒药理科室提供。MHC 结合多肽均由北京中科亚光生物科技公司制备及鉴定。

4.1.3 主要仪器设备

仪器名称	厂家
酶联斑点图像自动分析仪	美国 CTL 公司
台式高速冷冻离心机	Thermo 公司
金属浴	杭州奥康公司
恒温摇床	Ohaus corporation
透明门立式冷藏柜	青岛海尔特种电冰柜有限公司
恒温培养箱	上海一恒科技公司
超净工作台	北京王堂蓝翼科技公司
透明门立式冷藏柜 (SC-329G)	青岛海尔特种电冰柜有限公司
恒温培养箱	上海一恒科技有限公司 DHP-9052

4.1.4 实验动物

4~6 周龄的雌性 Balb/c H-2K^d 小鼠随机分为实验组 (组 1) 和对照组 (组 2) 两组, 每组 5 只, 单侧胫前肌注射, 免疫后 2 周取各组小鼠血清及脾淋巴细胞进行相应的免疫学检测。

4.2 实验方法

4.2.1 疫苗免疫方案设计

从商业途径获得的 20 只 4~6 周龄的 SPF 级的健康雌 Balb/cH-2K^d 小鼠随机分为 2 组, 每组 10 只, 在第一周大腿肌肉注射免疫, 免疫后一周检测免疫反应。具体免疫内容和剂量见表 4-1。

表 4-1 rAAV2/1-HPV18L1 免疫程序
Table 4-1 Immunization schedule of rAAV2/1-HPV18L1

组别	剂量	接种物
1	100 μ l	PBS
2	1×10^{11} μ g	rAAV-HPV18 L1

4.2.2 假病毒中和滴定检测体液免疫

使用 2.2.5.2 中包被好的 HPV18 假病毒颗粒, 使用假病毒体外中和实验检测体液免疫反应。将 3×10^4 的 293FT 细胞接种于 96 孔细胞培养板中, 37°C 培养 3 h, 按一定比例倍比稀释待测血清, 与适量 HPV18 特异性假病毒混匀后, 冰浴 1 h, 将血清-假病毒颗粒混合物加入 293FT 细胞中, 每个待测血清及阴性对照设置双复孔, 5% CO₂, 37°C 培养箱继续培养 72 h, 将 40 μ L 细胞上清液加入 20 μ L 0.05% CHAPS 溶液, 65°C, 30 min 灭活内源性碱性磷酸酶, 加入 200 μ L 显色底物, 室温避光 2~5 h 显色, 使用 Bio-Rad550 型酶标仪测定 405 nm 波长下每孔的吸光值。以 A405 nm 值低于阴性对照 50% 时的血清最大稀释度判为中和抗体滴度。

4.2.3 ELISPOT 检测细胞免疫反应

使用达科为公司的 IFN- γ ELISPOT 试剂盒, 按使用说明检测。以 8 μ g/ml 的 p34 多肽刺激脾淋巴细胞, PHA 为阳性对照刺激物, 检测分泌 γ 干扰素的细胞数量, 以斑点形成细胞数 (SFC) / 10^6 表示体内细胞免疫应答水平。

4.3 实验结果和讨论

4.3.1 体液免疫结果

采用假病毒颗粒体外中和实验对各组小鼠血清进行检测, 结果显示 rAAV2/1-HPV18L1 产生 1:2560 滴度的 HPV18 血清中和抗体滴度, 而对照组则未检测到中和抗体的存在, 两组差异具有统计学意义 ($p < 0.01$), 这表明 rAAV2/1-HPV18L1 单针肌注即可在 Balb/c 小鼠体内有效表达外源基因并可诱导

高水平的体液免疫保护性 (见图 4-1)。

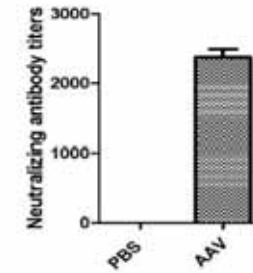


图 4-1 各组小鼠血清中和抗体平均滴度

Figure 4-1 The average neutralizing antibody titers of immunized group

4.3.2 细胞免疫结果

采用 IFN- γ ELISPOT 方法检测各组小鼠体内诱导的针对 HPV18L1 的特异性细胞免疫应答。结果如图 4-2、图 4-3 所示, 免疫组小鼠脾淋巴细胞在相应的 p34 多肽的刺激下产生的阳性斑点数达到 $750/10^6$ ($p < 0.01$), 表明重组腺相关病毒疫苗能在 Balb/c H-2K^d 小鼠体内诱导高水平的 HPV18L1 特异性的细胞免疫应答。

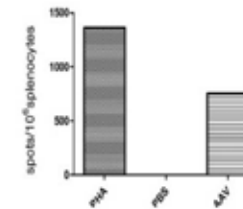


图 4-2.ELISPOT 检测各免疫组中的细胞免疫

Figure 4-2 Cellular immunization by ELISPOT of immunized

全球范围内子宫颈癌是第二大常见的妇科恶性肿瘤, 而高危型 HPV 的持续感染是导致宫颈癌的重要原因, 同时也可能是食管癌的诱因之一, 因此针对高危型 HPV 的疫苗使预防和治疗 HPV 相关的肿瘤成为可能。本实验室前期研究显示使用携带密码子优化型基因 HPV16L1 的 rAAV2 可诱导高水平血清中和抗体^[49]。这使我们相信携带 HPV18L1 的 rAAV2/1 可诱导产生良好的免疫效果。

AAV 的载体稳定性、抗酸碱性及长期稳定表达外源基因的特点使其在疫苗研究方面具有很好的前景^[50-53]。在 AAV1 的蛋白外壳包装 AAV2 的 ITR 及其外源基因表达盒构成 rAAV2/1, 研究表明 rAAV2/1 载体表达水平、表达时间明显优于 rAAV2 载体^[45], 并且有报道显示单针的 rAAV 即可引起足够的免疫反应^[48],

对比蛋白疫苗多针接种，单针肌注具有成本和便捷性上的优势。

本实验免疫评价包括采用基于分泌型碱性磷酸酶报告基因的 HPV 假病毒中和抗体实验以及 ELISPOT 技术检测细胞免疫反应。携带碱性磷酸酶报告基因的中和相比荧光素酶(Luciferase)报告基因的假病毒中和实验具有便捷性和成本上的优势，rAAV2/1 单针肌注可诱导高滴度的血清中和抗体，免疫后 2 周血清中和抗体的平均滴度达到 1:2560，由于实验所用的 rAAV2/1 经过上样洗脱等纯化过程，其活性有所降低，因此实际的效果应该优于此结果。

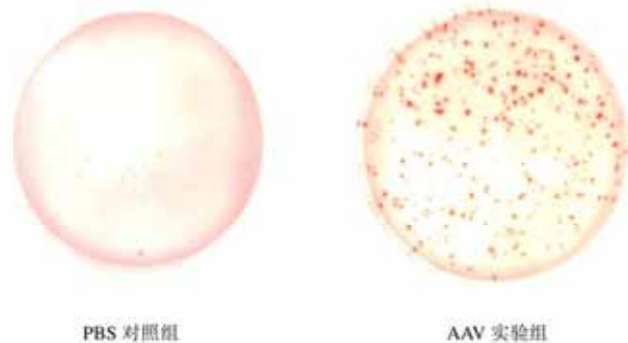


图 4-3 ELISPOT 检测图
Figure 4-3 Pictures of ELISPOT

有学者采用流式细胞仪 ELISA 等方法检测细胞免疫反应，相比而言 Elispot 技术在灵敏度、便捷性和检测成本上都有明显的优势，此外流式的方法并不能除去细胞因子含量丰富但是没有分泌能力的假阳性细胞，而 ELISA 方法则只能检测细胞分泌的抗体或细胞因子，从而间接检测细胞免疫反应的强弱，而且不能反应单细胞水平的免疫反应程度。因此，ELISPOT 方法灵敏度高、可高通量，单细胞水平检测、且检测成本低，在《预防用以病毒为载体的活疫苗制剂的技术指标原则》中指出，ELISPOT 是检测及评价疫苗的细胞免疫的有效方法。本实验中在 Balb/c 小鼠免疫两周后，取脾脏进行 ELISPOT 反应，免疫结果显示使用 p34 多肽刺激后，rAAV2/1 免疫组产生了较好的细胞免疫反应，达到每百万细胞 750 个斑点（图 4-3），这与有关实验报道 AAV 载体单独免疫细胞免疫应答水平很低^[54]并不一致，因此有待继续深入研究。

综合上述数据可知，表达密码子优化的 HPV18L1 重组腺相关病毒（rAAV2/1）的疫苗 rAAV2/1-HPV18L1 可诱导产生较强的血清中和抗体和细胞免疫反应，并且特异性体液免疫反应强于细胞免疫反应。因此 rAAV2/1-HPV18L1

针对 HPV18 病毒，既有一定的预防作用同时还能起到治疗的效果，是针对 HPV18 导致的包括食管癌在内的肿瘤的理想的首选疫苗。

4.4 本章小结

高危型 HPV 尤其是 HPV16 和 HPV18 型的持续感染可能是食管癌的病因之一，尽管不同地区在食管癌组织中 HPV 检出率并不一致，这可能是由于样本差异，非标准化的检测方法以及病人来源不同的影响。并且已有研究显示 HPV18 E6/E7 能诱发人胎食管正常上皮细胞永生^[55]，促癌物、化学致癌物、辐射等均可促进 HPV 诱发食管正常上皮细胞永生及其恶性变^[56]。以上证据表明食管癌的发生是多因素协同作用的结果，其中 HPV 的感染是食管癌的重要病因。因此研发针对 HPV 的疫苗将使预防和治疗食管癌及与 HPV 相关的恶性肿瘤成为可能。

AAV 载体长期稳定表达外源基因的特点使其在疫苗研究方面具有很好的前景。本课题前期研究显示使用携带密码子优化型基因 HPV16L1 的 rAAV2 可诱导较高强度和较长持续时间的 HPV18 特异性体液免疫，本文中 rAAV2/1-HPV18L1 诱导产生了高滴度的 HPV18 特异性的血清中和抗体。并且相比于 DNA 疫苗和蛋白疫苗的多针接种，单针肌注具有成本和便捷性上的优势，可诱导产生较强的 HPV18L1 特异性免疫反应，但是单针 rAAV2/1-HPV18L1 的长期免疫效果还有待进一步的验证。

细胞免疫结果显示使用 p34 多肽刺激后，rAAV2/1-HPV18L1 免疫组产生了较好的细胞免疫反应，达到每百万细胞 750 个斑点，这与有关实验报道 AAV 载体单独免疫细胞免疫应答水平很低^[54]并不一致，这可能和载体的型别或抗原的类型相关，因此有待进一步的深入研究。因此重组腺相关病毒载体 rAAV2/1-HPV18L1 可诱导产生高滴度的抗 HPV18 血清中和抗体以及特异性细胞免疫反应，既有预防作用同时还能起到治疗的效果，综上所述，rAAV2/1-HPV18L1 是防治与 HPV18 感染密切相关的包括食管癌在内的恶性肿瘤的理想的首选疫苗。

结 论

人乳头瘤病毒属乳多空病毒科乳头瘤病毒属的无包膜闭环双链 DNA 病毒。Syrjane 的研究表明 HPV 和食管鳞癌之间存在相关性, HPV 可能是导致食管癌的危险因子。本课题前期研究发现食管癌组织和新建食管癌细胞株中均检测到 HPV18 型 L1 蛋白的表达(数据未发表), 这为开发以 L1 蛋白为靶点的治疗性疫苗提供了实验依据, 此外, 相对于 HPV 的 E6/E7 蛋白, L1 作为结构蛋白, 无转化活性, 更为安全, 因此是理想的治疗性疫苗的靶蛋白。

本文采用分子生物学和细胞生物学等技术比较了携带携带密码子优化型 HPV18L1 的重组 DNA 疫苗 VR-HPV18L1 和重组腺病毒疫苗 rAdv-HPV18L1 在不同的免疫方案下诱导产生的体液免疫和细胞免疫的优点和不足。并为食管癌疫苗的研发在在载体、接种方式、免疫策略等方面提供合理的依据。同时本课题中构建了携带密码子优化型 HPV18L1 的重组腺相关病毒疫苗 rAAV2/1-HPV18L1, 并通过动物实验对重组腺相关病毒疫苗 rAAV2/1-HPV18L1 的免疫效果进行了评价。通过上述实验, 得出以下结论:

(1) 采用活体基因导入仪肌注 DNA 疫苗及 10^9 vp 剂量的 rAdv5 疫苗免疫 H-2K^d Balb/c 小鼠, p34 作为刺激性肽段诱导细胞免疫, 可产生最佳的免疫效果。

(2) 重组腺病毒疫苗和重组 DNA 疫苗均能诱导小鼠产生较好的 HPV18 特异性细胞和体液免疫反应, 并且前者诱导产生的细胞和体液免疫反应强度均高于后者。

(3) 重组 DNA 疫苗免疫后诱导产生的细胞和体液免疫强度逐渐减弱, 但在多次加强免疫重组腺病毒疫苗后, 免疫效果增强, 在第 3 次加强重组腺病毒疫苗时, 细胞和体液免疫强度增加最快, 并达到高峰, 在初免后 27 周检测, 仍有较强的保护效力, 说明包含重组 DNA 和重组腺病毒的多载体序贯重复免疫可诱导机体在较长时间内产生针对 HPV18L1 的高滴度的血清中和抗体及特异性细胞免疫应答。

(4) HPV16、18 不同型别的疫苗共同免疫诱导产生的中和抗体数及特异性细胞免疫较单一型别的有明显的增加, 共同免疫有相互促进的作用。这可能是由于抗原或表位的影响或其他因素的影响, 具体原因还需进一步的研究。

(5) 重组腺相关病毒疫苗 rAAV2/1-HPV18L1, 单针肌注小鼠即可诱导产生针对 HPV18L1 的高滴度的血清中和抗体及特异性细胞免疫反应。

(6) 携带携带密码子优化型 HPV18L1 的重组 DNA 疫苗 VR-HPV18L1、重组腺病毒疫苗 rAdv-HPV18L1 和重组腺相关病毒疫苗 rAAV2/1-HPV18L1 单独或

联合免疫小鼠均可诱导产生较强的体液和细胞免疫反应,并且采用多载体序贯重复免疫策略进行免疫后可诱导产生强烈且持久的细胞和体液免疫反应,因此上述三种重组载体疫苗可作为候选疫苗用于防治食管癌、宫颈癌等与 HPV 感染相关的恶性肿瘤。

参考文献

- [1] JEMAL A, CENTER M M, DESANTIS C, et al. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends [J]. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 2010, 19(8): 1893-907.
- [2] YAHYAPOUR Y, SHAMSI-SHAHRABADI M, MAHMOUDI M, et al. Evaluation of human papilloma virus infection in patients with esophageal squamous cell carcinoma from the Caspian Sea area, north of Iran [J]. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, 2012, 13(4): 1261-1266.
- [3] SYRJANEN K, PYRHONEN S, AUKEE S, et al. Squamous cell papilloma of the esophagus: a tumour probably caused by human papilloma virus (HPV) [J]. *Diagnostic histopathology / published in association with the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 1982, 5(4): 291-296.
- [4] WINKLER B, CAPO V, REUMANN W, et al. Human papillomavirus infection of the esophagus. A clinicopathologic study with demonstration of papillomavirus antigen by the immunoperoxidase technique [J]. *Cancer*, 1985, 55(1): 149-155.
- [5] 曲鹏, 李劲涛, 王立东. 安阳地区不同食管鳞癌标本 HPV 感染率的比较研究 [J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2012, 26(1): 34-36.
- [6] SHEN Z Y, XU L Y, LI E M, et al. The multistage process of carcinogenesis in human esophageal epithelial cells induced by human papillomavirus [J]. *Oncology reports*, 2004, 11(3): 647-654.
- [7] 邵智慧, 张科, 李淑英. 人乳头瘤病毒感染与不同地域食管癌发生相关性 Meta 分析 [J]. *中国老年学杂志*, 2013, 18): 4451-4453.
- [8] YONG F, XUDONG N, LIJIE T. Human papillomavirus types 16 and 18 in esophagus squamous cell carcinoma: a meta-analysis [J]. *Annals of Epidemiology*, 2013, 23(11): 726-34.
- [9] ZUR HAUSEN H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application [J]. *Nature reviews Cancer*, 2002, 2(5): 342-350.
- [10] REUSCHENBACH M, WATERBOER T, WALLIN K L, et al. Characterization of humoral immune responses against p16, p53, HPV16 E6 and HPV16 E7 in patients with HPV-associated cancers [J]. *International journal of cancer Journal international du cancer*, 2008, 123(11): 2626-2631.
- [11] BERNARD H U. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses [J]. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 2005, 32 Suppl 1:1-6.
- [12] JIMENEZ-WENCES H, PERALTA-ZARAGOZA O, FERNANDEZ-TILAPA G. Human

- papilloma virus, DNA methylation and microRNA expression in cervical cancer (Review) [J]. *Oncology reports*, 2014, 31(6):2467-2476.
- [13] PERALTA-ZARAGOZA O, BERMUDEZ-MORALES V H, PEREZ-PLASENCIA C, et al. Targeted treatments for cervical cancer: a review [J]. *OncoTargets and therapy*, 2012, 5(3):15-28.
- [14] HEYMANS J, BENOY I H, POPPE W, et al. Type-specific HPV geno-typing improves detection of recurrent high-grade cervical neoplasia after conisation [J]. *International journal of cancer Journal international du cancer*, 2011, 129(4): 903-909.
- [15] RIECK G C, FIANDER A N. Human papillomavirus, cervical carcinogenesis and chemoprevention with Indole derivatives - a review of pathomechanisms [J]. *Molecular nutrition & food research*, 2008, 52(1): 105-113.
- [16] RIJKAART D C, HEIDEMAN D A, COUPE V M, et al. High-risk human papillomavirus (hrHPV) E6/E7 mRNA testing by PreTect HPV-Proofer for detection of cervical high-grade intraepithelial neoplasia and cancer among hrHPV DNA-positive women with normal cytology [J]. *Journal of clinical microbiology*, 2012, 50(7): 2390-2396.
- [17] MAGALDI T G, ALMSTEAD L L, BELLONE S, et al. Primary human cervical carcinoma cells require human papillomavirus E6 and E7 expression for ongoing proliferation [J]. *Virology*, 2012, 422(1): 114-124.
- [18] CROW J M. HPV: The global burden [J]. *Nature*, 2012, 488(7413): S2-3.
- [19] NASMAN A, ATTNER P, HAMMARSTEDT L, et al. Incidence of human papillomavirus (HPV) positive tonsillar carcinoma in Stockholm, Sweden: an epidemic of viral-induced carcinoma? [J]. *International journal of cancer Journal international du cancer*, 2009, 125(2): 362-366.
- [20] GILLISON M L, KOCH W M, CAPONE R B, et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers [J]. *Journal of the National Cancer Institute*, 2000, 92(9): 709-720.
- [21] DALIANIS T. Human papillomavirus and oropharyngeal cancer, the epidemics, and significance of additional clinical biomarkers for prediction of response to therapy (Review) [J]. *International journal of oncology*, 2014, 44(6):1799-805.
- [22] ZUMBACH K, HOFFMANN M, KAHN T, et al. Antibodies against oncoproteins E6 and E7 of human papillomavirus types 16 and 18 in patients with head-and-neck squamous-cell carcinoma [J]. *International journal of cancer Journal international du cancer*, 2000, 85(6): 815-818.
- [23] FORMAN D, DE MARTEL C, LACEY C J, et al. Global burden of human papillomavirus and related diseases [J]. *Vaccine*, 2012, 30 Suppl 5(F12):23.
- [24] BAANDRUP L, THOMSEN L T, OLESEN T B, et al. The prevalence of human papillomavirus in colorectal adenomas and adenocarcinomas: A systematic review and meta-analysis [J]. *Eur J Cancer*, 2014, 50(8):1446-1461.
- [25] 谢一舟, 吴尚为. 人乳头瘤病毒疫苗研制和临床应用的最新进展 [J]. *现代妇产科进展*, 2013, 06): 501-504.
- [26] PENG S, SONG L, KNOFF J, et al. Control of HPV-associated tumors by innovative therapeutic HPV DNA vaccine in the absence of CD4+ T cells [J]. *Cell & bioscience*, 2014, 4(1): 11.
- [27] MISUMI I, WHITMIRE J K. B cell depletion curtails CD4+ T cell memory and reduces protection against disseminating virus infection [J]. *J Immunol*, 2014, 192(4): 1597-1608.
- [28] KOSKIMAA H M, PAASO A E, WELTERS M J, et al. Human papillomavirus 16 E2-, E6- and E7-specific T-cell responses in children and their mothers who developed incident cervical intraepithelial neoplasia during a 14-year follow-up of the Finnish Family HPV cohort [J]. *Journal of translational medicine*, 2014, 12:44.
- [29] HARTLEY A N, COOLEY G, GWYN S, et al. Frequency of IFN γ -producing T cells correlates with seroreactivity and activated T cells during canine *Trypanosoma cruzi* infection [J]. *Veterinary research*, 2014, 45:6.
- [30] GAUGHAN A, WANG J, PELLETIER R P, et al. Key role for CD4 T cells during mixed antibody-mediated rejection of renal allografts [J]. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 2014, 14(2): 284-294.
- [31] AGUIAR-SOARES R D, ROATT B M, KER H G, et al. LBSapSal-vaccinated dogs exhibit increased circulating T-lymphocyte subsets (CD4(+) and CD8(+)) as well as a reduction of parasitism after challenge with *Leishmania infantum* plus salivary gland of *Lutzomyia longipalpis* [J]. *Parasites & vectors*, 2014, 7(61).
- [32] FILIPPOVA M, EVANS W, ARAGON R, et al. The small splice variant of HPV16 E6, E6, reduces tumor formation in cervical carcinoma xenografts [J]. *Virology*, 2014, (153-64):450-451.
- [33] ZHANG J, LI S, YAN Q, et al. Interferon-beta induced microRNA-129-5p down-regulates HPV-18 E6 and E7 viral gene expression by targeting SP1 in cervical cancer cells [J]. *PloS one*, 2013, 8(12): e81366.
- [34] TJALMA W A, DEPUYDT C E. Cervical cancer screening: which HPV test should be used--L1 or E6/E7? [J]. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*, 2013, 170(1): 45-46.
- [35] 海峰, 白梅, 孟和宝力高. 人乳头瘤病毒(HPV)疫苗的研究进展 [J]. *放射免疫学杂志*, 2013, (04): 438-442.
- [36] 江昱. HPV 病毒及其疫苗的研究进展 [J]. *四川文理学院学报*, 2010, 05): 54-56.
- [37] WAGNER J A, MESSNER A H, MORAN M L, et al. Safety and biological efficacy of an adeno-associated virus vector-cystic fibrosis transmembrane regulator (AAV-CFTR) in the cystic fibrosis maxillary sinus [J]. *The Laryngoscope*, 1999, 109(2 Pt 1): 266-274.
- [38] DURING M J, SAMULSKI R J, ELSWORTH J D, et al. In vivo expression of therapeutic

- human genes for dopamine production in the caudates of MPTP-treated monkeys using an AAV vector [J]. *Gene therapy*, 1998, 5(6): 820-827.
- [39] MAEDA Y, IKEDA U, OGASAWARA Y, et al. Gene transfer into vascular cells using adeno-associated virus (AAV) vectors [J]. *Cardiovascular research*, 1997, 35(3): 514-521.
- [40] JOMARY C, VINCENT K A, GRIST J, et al. Rescue of photoreceptor function by AAV-mediated gene transfer in a mouse model of inherited retinal degeneration [J]. *Gene therapy*, 1997, 4(7): 683-690.
- [41] WEITZMAN M D, KYOSTIO S R, CARTER B J, et al. Interaction of wild-type and mutant adeno-associated virus (AAV) Rep proteins on AAV hairpin DNA [J]. *J Virol*, 1996, 70(4): 2440-8.
- [42] WU J, WANG D, ZHANG C, et al. Extending the activities of human nucleus pulposus cells with recombinant adeno-associated virus vector-mediated human telomerase reverse transcriptase gene transfer [J]. *Tissue engineering Part A*, 2011, 17(19-20): 2407-15.
- [43] JOHNSON P R, SCHNEPP B C, CONNELL M J, et al. Novel adeno-associated virus vector vaccine restricts replication of simian immunodeficiency virus in macaques [J]. *J Virol*, 2005, 79(2): 955-965.
- [44] LIU D W, CHANG J L, TSAO Y P, et al. Co-vaccination with adeno-associated virus vectors encoding human papillomavirus 16 L1 proteins and adenovirus encoding murine GM-CSF can elicit strong and prolonged neutralizing antibody [J]. *International journal of cancer Journal international du cancer*, 2005, 113(1): 93-100.
- [45] CHAO H, MONAHAN P E, LIU Y, et al. Sustained and complete phenotype correction of hemophilia B mice following intramuscular injection of AAV1 serotype vectors [J]. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 2001, 4(3): 217-222.
- [46] 杨谨, 李旭, 李昂. The Humoral and Cellular Immune Responses Induced by HPV18L1-E6/E7 DNA Vaccines in Mice [J]. *Academic Journal of Xi'an Jiaotong University*, 2006, 18(1): 44-48.
- [47] LEE H J, HUR Y K, CHO Y D, et al. Immunogenicity of bivalent human papillomavirus DNA vaccine using human endogenous retrovirus envelope-coated baculoviral vectors in mice and pigs [J]. *PLoS one*, 2012, 7(11): e50296.
- [48] PONNAZHAGAN S. Adenoassociated virus vectors for genetic immunization [J]. *Immunologic research*, 2002, 26(1-3): 247-253.
- [49] 周玉柏, 李泽琳, 周玲. 表达 HPV16 L1 抗原的 1 型重组 AAV 载体免疫效果的研究 [J]. *病毒学报*, 2008, (04): 300-304.
- [50] MOULAY G, SCHERMAN D, KICHLER A. Fasting increases the in vivo gene delivery of AAV vectors [J]. *Clinical and translational science*, 2010, 3(6): 333-336.
- [51] MARKAKIS E A, VIVES K P, BOBER J, et al. Comparative transduction efficiency of AAV vector serotypes 1-6 in the substantia nigra and striatum of the primate brain [J]. *Molecular*

- therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 2010, 18(3): 588-593.
- [52] HAURIGOT V, MINGOZZI F, BUCHLIS G, et al. Safety of AAV factor IX peripheral transvenular gene delivery to muscle in hemophilia B dogs [J]. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 2010, 18(7): 1318-1329.
- [53] COLELLA P, AURICCHIO A. AAV-mediated gene supply for treatment of degenerative and neovascular retinal diseases [J]. *Current gene therapy*, 2010, 10(5): 371-380.
- [54] 杨松梅, 王湛, 周玲. 携带 EBV-LMP2 基因的 DNA 疫苗、腺相关病毒疫苗和腺病毒疫苗免疫小鼠的特异性细胞免疫应答 [J]. *中国科学(C 辑:生命科学)*, 2009, (04): 342-5.
- [55] 沈忠英, 岑山, 蔡维佳. 人乳头状瘤病毒 18 型 E6E7 基因诱导人食管上皮永生化 [J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 1999, (2): 121.
- [56] SHEN Z Y, CEN S, XU L Y, et al. E6/E7 genes of human papilloma virus type 18 induced immortalization of human fetal esophageal epithelium [J]. *Oncology reports*, 2003, 10(5): 1431-1436.

攻读硕士学位期间所发表的学术论文

- 1.刘海庭,方军,李泽琳,李劲涛,曾毅,周玉柏. HPV18L1 重组腺相关病毒疫苗的免疫研究 中华实验和临床病毒学杂志. 2014 年第 28 卷.已接收
- 2.周玉柏,曾毅,刘海庭,方军,李泽琳,李劲涛,沈思嗣. HPV18 的重组腺相关病毒疫苗及其制备方法: 中国,201410035933.4 [P].2014-01-25 (发明专利已受理)
- 3.周玉柏,曾毅,方军,刘海庭,李泽琳,李劲涛,沈思嗣. 用于食管癌防治的 HPV16, 18L1 重组 DNA 疫苗: 中国, 201410035942.3 [P].2014-01-25 (发明专利已过初审)

致 谢

三年的研究生学习即将结束，回首过去，倍感时光荏苒，学无止境。

在完成课题的过程中，导师曾毅院士严谨的治学之道、敏锐活跃的科研思维、孜孜不倦的工作态度和宽厚的长者风范让我终生受益！在此向我的导师曾毅院士表示深切的谢意与祝福！

衷心感谢李泽琳教授在我的学习和生活中给予的悉心指导和无微不至的关怀，正是在李老师的关心下，本课题实验才得以顺利开展并及时完成。

衷心感谢周玉柏副研究员一直以来在实验和学习上给予的细心指导和殷切关怀，为课题研究的顺利完成提供了极大的支持和帮助！

感谢病毒药理室各位老师在工作上给予的大力支持和耐心指导！

感谢程江师兄在论文完成过程中无私的帮助，本文前期实验是在师兄的指导下共同完成的。

感谢郭艳涛、方军、张潇、邓雄威在课题研究过程中提供的全力支持与热情帮助，感谢李莉丽、王鹤蓉、侯雪莹、周芷亦等同学给予的通力合作和热情帮助！感谢王世华、王小虎、吴同超、郭正原、赵晨、胥少华、汪孟冉、仝艳艳、张丽霞在学习和生活上给予的热心帮助！

向所有关心和帮助过我的老师和同学一并致以最诚挚的谢意！

感谢家人和朋友的支持，生活的道路上，是他们给了我最大的动力！