

中文图书分类号：Q78

密 级：公开

UDC：577

学 校 代 码：10005



硕 士 学 位 论 文

MASTERAL DISSERTATION

论 文 题 目：基于 HPV L1 的食管癌疫苗的构建及
免疫效果的初步研究

论 文 作 者：程江

学 科：生物化学与分子生物学

指 导 教 师：曾毅 教授 周玉柏 副研究员

论文提交日期：2012 年 6 月

UDC: 577

学校代码: 10005

中文图书分类号: Q78

学 号: S200915002

密 级: 公开

北京工业大学理学硕士学位论文

题 目: 基于 HPV L1 的食管癌疫苗的构建及
免疫效果的初步研究

英文题目: THE CONSTRUCTION AND PRELIMINARY
IMMUNOLOGICAL STUDY OF
ESOPHAGEAL CANCER VACCINES BASED
ON HPV L1

论 文 作 者: 程江

学 科 专 业: 生物化学与分子生物学

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: 2012 年 6 月

授 予 学 位 单 位: 北京工业大学

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： 程江

日 期：2012 年 6 月 11 日

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： 程江

日 期： 2012 年 6 月 11 日

导师签名： 曾毅

日 期： 2012 年 6 月 11 日

摘 要

人乳头瘤病毒 (Human papillomavirus, HPV) 是一种广泛存在的嗜上皮性病毒, 能引起多种疾病。高危型 HPV 与多种鳞状及腺上皮恶性肿瘤 (包括宫颈癌、食管癌、喉癌等) 有关, 我国为食管癌高发国家, 全世界每年新确诊的 40 多万食管癌患者中, 一半以上发生在中国。研究表明, 食管癌的发生是多因素协同作用的结果, 其中 HPV16 和 18 型是中国人食管癌发生的重要致病因素。

已上市的宫颈癌 HPV 疫苗为蛋白质疫苗, 仅能诱发机体产生特异性中和抗体, 只能起到预防病毒感染的作用, 不能作为治疗性疫苗清除已经感染病毒的细胞和癌细胞。目前, 国际上还没有针对食管癌的预防性及治疗性疫苗研究, 由于在食管癌组织和食管癌细胞株中检测到了衣壳蛋白 L1 的表达, 因而可以以此开发基于 HPV L1 的食管癌疫苗。

本课题构建了含有 HPV16 L1 和 HPV18 L1 基因的重组 DNA 疫苗和重组腺病毒疫苗, 然后使用制备的疫苗分别免疫小鼠, 在最后一次免疫一周后, 通过假病毒中和滴定实验检测了疫苗的体液免疫效果, 并使用酶联免疫斑点法 (ELISPOT) 检测了疫苗的细胞免疫效果。结果发现: (1) HPV16 L1 和 HPV18 L1 疫苗都可以诱导产生较高的体液免疫反应。加强免疫时注射 10^8 vp 腺病毒疫苗的免疫组血清中和滴度达到 320 以上, 注射 10^9 vp 或 10^{10} vp 腺病毒疫苗的免疫组血清中和滴度达到 640 以上。(2) HPV16 L1 的重组 DNA 疫苗和腺病毒疫苗确定可以诱导产生强烈的 HPV16 L1 特异性的细胞免疫反应; HPV18 L1 的重组 DNA 疫苗和腺病毒疫苗可能由于 T 细胞表位肽预测不正确因而检测到的细胞免疫反应较弱。(3) HPV16 L1₁₃₉₋₁₄₇ (AGVDNRECI) 为 HPV16 L1 的 H-2D^b 限制性 T 细胞表位, HPV16 L1₃₅₅₋₃₆₄ (YKNTNFKEYL) 可能是 HPV16 L1 的一个较弱的 H-2D^b 限制性 T 细胞表位。HPV18 L1 的 T 细胞表位还有待进一步的筛选。

关键词: 人乳头瘤病毒; 食管癌; 疫苗; L1

Abstract

The human papillomavirus (HPV) is a wide spread virus that can cause many diseases in keratinocytes of the skin or mucous membranes. High risk types of HPV are related to many cancers such as cervical cancer, esophageal cancer, laryngeal cancer and so on. Incidence of esophageal cancer in China is very high. There are more than 400 thousand new patients with esophageal cancer in the whole world every year, among them more than one half are in China. According to some studies, Esophageal cancer is the result of the cooperation of multiple factors, and HPV 16 and 18 are important pathogenic factor of esophageal cancer in China.

The cervical cancer HPV vaccines are proteins, which can only induce specific antibody to prevent virus infection. They cannot do as therapeutic vaccines which can clear the infected cells and cancer cells. Till now, no prophylactic or therapeutic vaccines have been reported. In some study, HPV L1 has been detected in esophageal carcinoma and esophageal carcinoma cell line. So here HPV L1 is used to develop esophageal cancer.

In this paper, the recombinant DNA vaccines and adenovirus vaccines which contain HPV L1 gene are constructed. Then C57BL/6 mice are immunized with the vaccines. One week after the last immunization, humoral immunity is detected by pseudovirus neutralization assay and cellular immunity is detected by enzyme-linked immunospot assay. The results show that both HPV16 L1 and HPV18 L1 vaccines can induce very strong humoral immunity, the neutralization titer of immune group which is injected with 10^9 vp or 10^{10} vp recombinant adenovirus vaccines is above 640, the neutralization titer of immune group which is injected with 10^8 vp recombinant adenovirus vaccines is above 320. The HPV16 L1 vaccines can surely induce strong L1 specific cellular immunity. Only weak cellular immunity reaction is detected in the groups which are immunized with HPV18 L1 vaccines, and this is probably caused by the incorrect T cell epitopes which are needed in enzyme-linked immunospot assay. HPV16 L1₁₃₉₋₁₄₇(AGVDNRECI) and L1₃₅₅₋₃₆₄(YKNTNFKEYL) are H-2D^b restricted T cell epitopes of HPV16 L1.

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
Ad5	Adenovirus type 5	腺病毒5型
bp	Base pair	碱基对
CIN	Cervical intraepithelial neoplasia	宫颈上皮内瘤
CTL	Cytotoxic t-lymphocyte	细胞毒性T淋巴细胞
CPE	Cytopathic effect	细胞病变效应
DAB	Diamino benzidine	二氨基联苯胺
DC	Dendritic cell	树突状细胞
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium	Dulbecco优化的Eagle培养基
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
dNTP	Deoxynucleoside triphosphate	三磷酸脱氧核苷
EDTA	Ethylene diamino tetrecetic acid	乙二胺四乙酸
ELISPOT	Enzyme-linked immunospot assaay	酶联免疫斑点法
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
HPV	Human papillomavirus	人乳头瘤病毒
HRP	Horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
IFN- γ	Interferon- γ	γ -干扰素
kb	Kilobases	千碱基对
kD	Kilodaltons	千道尔顿
LR	Late region	晚期蛋白编码区
LTR	Long terminal repeats	长末端重复序列
MHC	Major histocompatibility complex	主要组织兼容性复合体
MOI	Multiplicity of infection	感染复数
NCR	Non coding region	非编码区
OD	Optical density	光密度
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell	外周血淋巴细胞
PBS	Phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
PCR	Polymerase chain reaction	多聚酶链式反应
polyA	Polyadenylic acid	多聚腺苷酸
rAdv	Recombinant adenovirus	重组腺病毒
RCA	Replication competent adenoviruses	复制型腺病毒
RNase	Ribonuclease	核糖核酸酶
rpm	Revolutions per minute	每分钟转速
SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基磺酸钠
SDS-PAGE	Sodium dedecyl sulfate Polyacrylamide gel electrophoresis	十二烷基磺酸钠一 聚丙烯酰胺凝胶电泳
SEM	Standard error of the mean	均数的标准误
URR	Upstream regulatory region	上游调节区

VLP	Virus-like particles	病毒样颗粒
WB	Western blot	蛋白印迹
wt	Wild-type	野生型

目 录

摘 要.....	I
Abstract.....	III
主要英文缩写词.....	V
第 1 章 绪论.....	1
1.1 HPV 及其疫苗研究.....	1
1.1.1 HPV 结构及相关疾病.....	1
1.1.2 目前治疗性 HPV 疫苗的进展.....	2
1.1.3 方向和展望.....	6
1.2 酶联免疫斑点法 (ELISPOT)	7
1.3 本课题研究内容.....	9
1.4 本课题技术路线.....	10
第 2 章 含 HPV L1 基因的重组 DNA 疫苗的构建.....	11
2.1 实验材料.....	11
2.1.1 质粒、细胞和菌株.....	11
2.1.2 工具酶及主要试剂.....	11
2.1.3 主要仪器设备.....	12
2.1.4 引物.....	12
2.2 实验方法.....	12
2.2.1 重组 DNA 疫苗 pVR-HPV18 L1 的构建.....	12
2.2.2 中提 pVR-HPV18 L1 质粒	14
2.2.3 转染细胞并检测重组质粒的蛋白表达.....	14
2.2.4 大提 pVR-HPV16 L1 和 pVR-HPV18 L1 质粒.....	15
2.3 实验结果和讨论.....	16
2.3.1 PCR 扩增 HPV18 L1 基因片段的的结果.....	16
2.3.2 重组质粒 pVR-HPV18 L1 的酶切鉴定和测序结果	16
2.3.3 Western Blot 检测重组质粒的蛋白表达.....	16
2.4 本章小结.....	18
第 3 章 含 HPV L1 基因的重组腺病毒疫苗的构建	19
3.1 实验材料.....	19
3.1.1 质粒、细胞和菌株.....	19
3.1.2 工具酶及主要试剂.....	19

3.1.3 主要仪器设备.....	20
3.1.4 引物.....	20
3.2 实验方法.....	20
3.2.1 重组穿梭质粒 pDC316-HPV18 L1 的构建.....	20
3.2.2 重组腺病毒 rAd5-HPV18 L1 的包装.....	22
3.2.3 重组腺病毒的滴度测定.....	23
3.2.4 重组腺病毒的空斑筛选和鉴定.....	23
3.2.5 重组腺病毒疫苗的大量扩增和纯化.....	25
3.3 实验结果和讨论.....	25
3.3.1 PCR 扩增 HPV18L1 基因片段的的结果.....	25
3.3.2 重组质粒 pDC316-HPV18 L1 的酶切鉴定结果.....	26
3.3.3 重组腺病毒的滴度测定结果.....	27
3.3.4 Western Blot 检测重组腺病毒的蛋白表达.....	28
3.3.5 重组腺病毒中 HPV18 L1 基因和复制缺陷型的鉴定.....	28
3.4 本章小结.....	30
第 4 章 重组 DNA 疫苗和重组腺病毒疫苗免疫效果的检测.....	31
4.1 实验材料.....	31
4.1.1 质粒、细胞和菌株.....	31
4.1.2 主要试剂.....	31
4.1.3 主要仪器设备.....	31
4.1.4 实验动物.....	32
4.2 实验方法.....	32
4.2.1 使用重组疫苗免疫小鼠.....	32
4.2.2 ELISPOT 实验刺激物的准备.....	33
4.2.3 ELISPOT 检测细胞免疫反应.....	33
4.2.4 ELISPOT 实验数据处理及作图.....	35
4.2.5 假病毒中和滴定检测体液免疫.....	35
4.3 实验结果和讨论.....	36
4.3.1 体液免疫结果.....	36
4.3.2 T 细胞表位肽预测结果.....	40
4.3.3 细胞免疫结果.....	41
4.4 本章小结.....	46
结 论.....	49
参 考 文 献.....	51

攻读硕士学位期间所发表的学术论文.....	55
致 谢.....	57

第 1 章 绪论

1.1 HPV 及其疫苗研究

1.1.1 HPV 结构及相关疾病

人乳头瘤病毒 (Human papillomavirus, HPV) 是一种在自然界广泛存在的嗜上皮性病毒, 属于乳多空病毒科的乳头瘤病毒属的无包膜闭环双链 DNA 病毒。HPV 基因组按功能不同可分为三个区, 即早期蛋白编码区 (Early region, ER), 晚期蛋白编码区 (Late region, LR) 和上游调控区 (Upstream regulatory region, URR, 又称长末端控制区, LCR)。ER 区主要编码 6 种早期蛋白 E1、E2、E4、E5、E6 和 E7, URR 区主要调控 HPV 基因的转录、复制和表达, LR 区主要编码两种晚期蛋白, 包括主要衣壳蛋白 L1 和次要衣壳蛋白 L2^[1]。L1 能够单独或与 L2 共同在体外自行组装成病毒样颗粒 (Virus like particles, VLP)。

已发现的 HPV 基因型有 200 多种^[2], 根据致癌性高低, 可将 HPV 分为低危型和高危型两种。低危型 (包括 HPV6、11 等) 主要引起生殖器疣等, 通常不进展为恶性病变; 高危型与多种鳞状及腺上皮恶性肿瘤 (包括宫颈癌、食管癌、喉癌等) 有关, 尤其是 HPV16、18、31 和 45 型, 高达 80% 的宫颈癌由其引起^[3]。

全球每年有新发宫颈癌病例 51 万, 有 28 万人死于该病, 我国每年新发病例高达 13.15 万, 并且发病率还在上升。国际上已有两种宫颈癌疫苗获批上市, 分别为 Merck 公司研制的 HPV6、11、16、18 四价 VLP Gardasil 疫苗^[4]和 GSK 公司研制的 HPV16、18 双价 VLP Cervarix 疫苗^[5]。Gardasil 和 Cervarix 疫苗都是由 HPV L1 蛋白组装成的 VLP, 属于预防性疫苗, 主要是以衣壳蛋白 L1 作为靶抗原诱导机体产生特异性中和抗体达到预防相应型别 HPV 感染的效果。VLP 疫苗安全性好, 并且因为与 HPV 病毒颗粒有几乎相同的空间构象和中和表位, 免疫原性较强, 小剂量即可产生持久的免疫力。

食管癌是世界上最常见的六大恶性肿瘤之一, 显著的地域性分布差异 (高、低发区发病率相差 500 倍) 是其突出的流行病学特征。全世界每年新确诊的 40 多万食管癌患者中, 一半以上发生在中国。河南, 河北和山西三省交界的太行山地区是世界上食管癌发病率和死亡率非常高的地区。虽然食管癌的发病率存在明显的地区差异, HPV 检测方法也不尽相同, 使得不同研究中食管癌患者的 HPV 阳性率有较大差异, 但越来越多的研究表明 HPV 感染和食管癌之间存在很大的相关性。大规模现场及实验室研究发现, 食管癌高发区河南林州市, 广东汕头市

和揭阳市以及淮河流域地区的食管鳞癌组织标本中 HPV16+18 亚型高达 60~80%，其中 HPV16 阳性癌组织细胞中 80% 以上的染色体整合有 HPV DNA，远远高于正常的未感染 HPV 的组织，并且在食管癌组织和食管癌细胞株中检测到了 E6, E7 病毒癌蛋白和衣壳蛋白 L1 的表达。研究进一步发现，食管癌的发生是多因素协同作用的结果，其中 HPV16 和 18 型是中国人食管癌发生的重要致病因素^[6]。研究发展食管癌预防及治疗性疫苗，是降低食管癌发病率和死亡率，防治食管癌的重要关键措施。

1.1.2 目前治疗性 HPV 疫苗的进展

已上市的病毒样颗粒预防性疫苗存在一些不足，比如费用昂贵，推广困难，而且只能保护未受相应型别 HPV 感染的人。治疗性疫苗则可以通过诱导特异性的细胞免疫应答，阻止甚至清除 HPV 感染引起的病变及肿瘤，相对于费用昂贵，毒副作用大的传统手术、放疗、化疗等临床治疗方法有巨大优势，因此治疗性 HPV 疫苗将成为今后治疗 HPV 相关疾病的重点。

治疗性疫苗主要通过激活细胞免疫来特异性地清除被病毒感染的细胞。已经有多个治疗性疫苗完成或正在进行临床试验 (I, II 或 III)，并且一些治疗疫苗显示出不错的效果。以下将从不同 HPV 靶抗原的角度概述目前治疗性 HPV 疫苗的研究进展。

1.1.2.1 以 HPV E6 和 E7 为靶抗原的治疗性疫苗研究 E6 和 E7 是 HPV 的主要致癌蛋白，E6 蛋白主要通过抑制抑癌蛋白 p53 结合使其降解而引起细胞无限增殖并向恶性转化；E7 蛋白则通过与抑癌蛋白 pRb 结合引起转录因子 E2F 的释放，在转录因子 E2F 的作用下，细胞开始转录由 G1 期进入 S 期所需的基因，导致细胞周期失控，产生永生化细胞^[7]。由于 HPV 早期蛋白 E6、E7 在病毒的生命周期中持续表达并且在细胞癌变中起重要作用，且正常组织中很少表达^[8, 9]，因此目前治疗性疫苗的研究主要集中在 E6 和 E7 蛋白。目前治疗性 HPV 疫苗主要有重组载体疫苗、多肽和蛋白疫苗、树突细胞等类型。

(1) 重组活载体疫苗 常被用来作疫苗的载体主要有病毒（牛痘病毒、腺病毒、腺相关病毒和 α 病毒等），细菌等。牛痘病毒具有感染力强和重组基因表达水平高等优点，因而使用重组牛痘疫苗的临床实验进展较快。一次用含有 HPV16、18 型 E6 和 E7 基因的重组牛痘病毒疫苗 TA-HPV^[10] 进行的临床 II 期实验结果表明，疫苗具有很好的安全性，并诱导产生了 HPV 特异性的毒性 T 细胞反应，但是效果持续时间有限，需要进一步的实验研究。

腺相关病毒 (Adeno-associated virus, AAV) 是非致病性的单链 DNA 细小病

毒,具有复制缺陷性,且没有腺相关病毒基因的表达,所以常被用来作为目的基因的载体。Liu^[11]等把融合有热休克蛋白 70 (Hsp70) 基因的 HPV16 E7 T 细胞表位肽基因构建到腺相关病毒载体上,该疫苗免疫小鼠后产生了 CD4⁺和 CD8⁺ T 细胞反应,并可以抑制肿瘤生长。由于 AAV 载体不会诱导产生强的针对 AAV 感染细胞的 CTL 反应,所以基因的表达可以持续很长时间,AAV 感染的骨骼肌细胞中基因的持续表达甚至超过 1.5 年^[12]。虽然第二次免疫后疫苗产生了针对 AAV 的体液免疫反应,但考虑到第一次免疫后 AAV 感染细胞的长期存在,重复免疫是不必要的。

腺病毒是一种无包膜的双链 DNA 病毒,腺病毒能够感染分裂期和静止期细胞,可在一些高度分化的组织细胞中增殖,并能高效地复制和表达其基因,因此成为基因治疗和活病毒载体疫苗研究的有利工具。腺病毒载体容量大,并可高效感染哺乳动物细胞,能够获得高滴度的病毒;腺病毒 DNA 不会整合入宿主基因组,安全性高;可增强 MHC 分子和共刺激分子的表达,从而促进抗原递呈。

研究表明,复制缺陷型重组腺病毒嗜性广泛,能感染包括粘膜上皮细胞在内的多种细胞,介导外源基因在细胞内的稳定表达并刺激机体产生特异性体液及细胞免疫反应,重组腺病毒不仅能介导外源基因的有效表达,还可通过自然感染途径将抗原呈递给免疫系统,有效激发局部和远端粘膜表面的特异性免疫反应^[13]。而且,重组腺病毒基因不与受体细胞基因组发生整合,具有良好的生物安全性^[14],便于大规模培养制备,成本低廉等优点,因此是理想的疫苗载体之一。

(2) DNA 疫苗 DNA 疫苗是指将编码某种蛋白质抗原的重组真核表达载体直接注射到动物体内,使外源基因在活体内表达,产生的抗原激活机体的免疫系统,从而诱导特异性的体液免疫和细胞免疫应答。DNA 疫苗容易制备,稳定性好,并且不会产生针对 DNA 载体的中和抗体,可以重复免疫^[15]。ZYC101a 是将编码 HPV16、18 型 E6 和 E7 的质粒 DNA 包裹到一种可生物降解的微粒中,用该疫苗治疗宫颈上皮内瘤变 (CIN2 和 CIN3) 的临床试验显示^[16],70% 患者的病变减退,具有明显的治疗效果。

(3) 多肽和蛋白疫苗 多肽疫苗通常使用 HLA 限制性的 CTL 表位肽,因而特异性好,但相应地限制了其应用范围。Welters^[17]等使用包含 HPV16 E6 和 E7 序列的长肽,混合 Montanide ISA-51 佐剂免疫 HPV16 阳性的宫颈癌患者,结果 HPV16 特异性 CD4⁺和 CD8⁺ T 细胞明显增加,随后用该疫苗治疗 20 例 VIN (外阴上皮内瘤) 患者也取得了很好的疗效^[18],全部患者产生了特异的 T 细胞反应,有 5 例患者病变完全消退,4 例患者检测不到 HPV16 病毒。由于多肽良好的安全性和治疗效果以及易于制备、成本低等优点,多肽作为治疗性疫苗前景巨大。

直接使用蛋白作为疫苗可以不考虑患者的 HLA 型别限制, 但蛋白往往主要产生体液免疫, T 细胞反应较弱, 需要寻找适合的佐剂等来增强其细胞免疫。使用 HPV E6、E7 作为蛋白疫苗需要注意其潜在的致癌能力, Qian^[19]等改造的 HPV16 E6/E7/Hsp70Delta 融合蛋白, 去除了 E6 和 E7 中分别与 p53 和 pRb 结合的位点, 在动物实验中对表达 HPV16 E6、E7 的 TC-1 肿瘤病变有显著的预防、治疗和抗转移作用。

(4) 树突状细胞 树突状细胞 (Dendritic cells, DC) 是最重要的抗原提呈细胞, 使用肿瘤相关抗原体外冲击致敏 DC, 回输体内可诱导产生特异性的 CTL 反应。Santin^[20]等使用经 HPV16、18 型 E7 抗原冲击致敏的自体 DC 来免疫 10 例宫颈癌患者, 结果全部患者都产生了 CD4⁺ T 细胞反应, 8 名患者产生了不同数量的针对 E7 的特异性 CD8⁺ T 细胞。

1.1.2.2 E6、E7 之外其它 HPV 蛋白的治疗性疫苗研究 由于 HPV E6 和 E7 是主要的致癌蛋白, 用其作为疫苗有潜在的致癌风险, 因此一方面应对其改造去除致癌性, 或加大对其 CTL 表位肽的研究; 另一方面, 我们应从 HPV 的其它蛋白着手, 研究它们的功能和免疫效果, 以期发现安全有效的治疗疫苗。

(1) E1 和 E2 蛋白 E1 是病毒 DNA 复制的启动蛋白, 具有 DNA 解旋酶和 ATP 酶活性。E2 蛋白具有调节病毒转录和复制的功能, E2 蛋白通过和 E1 蛋白形成复合物来刺激 E1 蛋白结合到复制起始位点上, 在复制中扮演辅助角色。E1 蛋白抗原性较弱, 暂时没有用作疫苗的研究。E2 蛋白具有 B 细胞和 T 细胞表位, 已有使用 E2 的疫苗进入临床实验, 并获得了良好的疗效。

Corona Gutierrez^[21]等在 78 名女性宫颈上皮内瘤变 (CIN1、CIN2 和 CIN3) 患者中进行了 MVA-E2 (含有与 HPV E2 相似的 BPV E2 基因序列的重组 Ankara 牛痘病毒) 治疗性疫苗的临床 II 期试验, 对 36 名患者在 6 周内每周一次将 10⁷ MVA-E2 病毒颗粒直接注入宫颈内, 42 名患者使用宫颈锥形切除术。结果表明, 36 名接受疫苗治疗的患者中 34 名表现出完全的癌前病变消退, 全部患者产生了针对疫苗的抗体, 并且疫苗引发了针对 HPV 转化细胞的特异性毒性 T 细胞反应, 50% 患者治疗后没有检测到 HPV, 另 50% 患者 HPV 载量为治疗前的 10%。Garcia-Hernandez^[22]等在 54 例女性患者 (CIN2 和 CIN3) 中进行的 MVA-E2 疫苗的 II 期临床试验结果显示, 58.85% 的患者完全复原, 41.18% 的患者病变减少 60%。所有接种 MVA-E2 疫苗的 34 名患者产生了抗体和特异的毒性 T 细胞反应, 并且 HPV 载量明显下降, 而接受锥形切除术的 20 名患者虽然组织病变减少 80%, 但未表现出特异的毒性 T 细胞反应, 且三名患者一年后有复发。Garza^[23]等使用 MVA-E2 治疗男性扁平湿疣的临床 III 期试验也取得了令人满意的效果。

(2) E4 和 E5 蛋白 E4 是 HPV 基因组中表达水平最高的一个基因, 它能

破坏感染细胞的角质蛋白结构,从而形成空泡细胞,对于病毒的成熟和复制十分重要,在感染晚期随着病毒毒粒组装的完成开始表达,破坏细胞角蛋白网络,协助病毒释放,目前还没有 E4 作为疫苗的研究,不过已有研究确定了 E4 蛋白的部分表位肽^[24]。

E5 是一个较弱的癌蛋白,可能在癌症的早期阶段起作用^[25],但其功能仍然不够明确。E5 可在表皮生长因子(EGF)存在下,增加细胞对生长因子的反应。E5 还可以引起抑癌蛋白 p21 表达下降,使细胞容易癌变。Liu^[26]等使用携带有 HPV16 E5 基因的重组腺病毒疫苗进行的动物实验显示该疫苗诱导产生了 CD8⁺ T 细胞,可以控制肿瘤的生长,表明 E5 可以作为抑制肿瘤的抗原。Chen^[27]等研究发现,使用 E5 限制性(Db) CTL 表位肽(VCLLIRPLL)分别混合 CpG 寡核苷酸和弗氏佐剂免疫小鼠后,两者都产生了 E5 特异性 CTL 反应,抑制了肿瘤生长,并且使用 CpG 寡核苷酸效果要好于弗氏佐剂和携带完整 E5 基因的腺病毒疫苗。

(3)L1 蛋白 L1 作为 HPV 的主要衣壳蛋白能够单独或与次要衣壳蛋白 L2 共同在体外自行组装成 VLPs。目前上市的两款预防性疫苗,Merck 公司的 HPV6、11、16、18 四价 VLP Gardasil 疫苗^[4]和 GSK 公司研制的 HPV16、18 双价 VLP Cervarix 疫苗^[5],都是由 HPV L1 蛋白组装成的 VLPs,主要是以衣壳蛋白 L1 作为靶抗原诱导机体产生特异性中和抗体达到预防相应型别 HPV 感染的效果。

有研究发现,L1 也可以诱导产生细胞免疫。Dupuy^[28]等分别使用 HPV16 L1 VLP 和含 HPV16 L1 基因的真核表达载体 DNA 做疫苗对小鼠进行滴鼻免疫,结果显示,VLPs 疫苗产生了较强的 IgG 和 IgA 抗体,而 DNA 疫苗的 IgG 和 IgA 抗体反应很微弱,不过两种疫苗都激活了 CD4⁺ 辅助 T 细胞和 CD8⁺ 杀伤性 T 细胞。Pinto^[29]等在健康女性志愿者中进行了一项临床 II 期试验,在第 0, 1 和 6 个月使用不加佐剂的 HPV16 L1 VLPs 通过肌肉注射入体内,结果显示,疫苗不只产生了强烈的 B 细胞反应,还引起了 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞增殖,并观察到了细胞因子(γ -干扰素, IL-5 和 IL-10)明显增加。

但由于 L1 在受 HPV 感染的基底层细胞、癌前病变细胞和癌组织中表达水平很低,所以通常认为由 L1 诱导产生的细胞免疫对上述情况没有治疗作用。不过 Bellone^[30]等的研究使人们对 L1 蛋白的细胞免疫效果有了新的认识,他们对 HPV16 L1 产生的细胞免疫效果与 HPV16 E6、E7 进行了比较,HPV16 阳性的宫颈癌组织样品中不只含有 E6 和 E7 RNA,也含有 L1 RNA, E7 RNA 拷贝量(平均 176.2)明显高于 E6(平均 47.3)和 L1(平均 58.3),而 E6 和 L1 之间则没有明显区别。使用 HPV-16 VLPs 或全长 E7 蛋白体外冲击致敏的自体树突细胞(DCs)都能产生很强的 L1 特异性或 E7 特异性的 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞反应。体

外实验表明, 由 DC 激活的 L1 特异性 CD8⁺ 毒性 T 细胞可以杀死自体的宫颈癌细胞 (即使这些癌细胞中 L1 只是低水平的表达), 并且杀伤活性同 E7 特异性的毒性 T 细胞没有明显区别。因此, L1 有可能成为治疗性疫苗的新的靶抗原。

(4) L2 蛋白 L2 定位于细胞核 ND10 区, 协助病毒基因组进入细胞核内, 协助 L1 组装成病毒颗粒, 对于病毒的装配具有重要作用^[31]。早有研究发现 L2 蛋白含有交叉中和表位, 可用来研制广谱的 HPV 疫苗。一种包含 HPV16 L2、E6 和 E7 的融合蛋白 TA-CIN^[32]在临床前实验中产生了 HPV16 特异性的毒性 T 细胞和辅助 T 细胞反应以及中和抗体。Karanam^[33]等将 TA-CIN 添加 GPI-0100 佐剂免疫小鼠后, 与使用不加佐剂的 TA-CIN 的小鼠相比, HPV16 中和抗体显著增加, 而且对于 HPV31 和 HPV58 有交叉保护作用, 同时特异性 CD8⁺ T 细胞数量明显增加, 完全抑制了肿瘤生长。TA-CIN 疫苗的临床 II 期实验^[34]也产生了良好的治疗效果。

也有人单独对 L2 疫苗进行了研究, Hitzerth^[35]等使用 HPV16 L2 DNA 疫苗和 HPV16 L2 蛋白分别免疫小鼠的实验表明, L2 蛋白疫苗诱导产生了中和抗体, 而 L2 DNA 疫苗只产生了微弱的中和抗体反应, 不过 L2 DNA 疫苗免疫的小鼠肿瘤体积减小了 50%, 这说明 L2 DNA 的体内表达可以产生细胞免疫, 控制肿瘤生长。这可能表明 L2 重组载体疫苗更趋向于诱导产生细胞免疫反应, 确切的效果还需要进一步的实验来确定。

1.1.3 方向和展望

人们已经进行了大量的 HPV 治疗性疫苗的研究, 很多取得了可喜的成果, 但从这些研究中也发现了一些不足。如 (1) 病毒和细菌等活载体容易诱导机体产生中和抗体, 可能造成重复免疫效果差的问题, 这可以考虑使用本身免疫原性较低的载体比如 AAV^[11]和 α 病毒^[36], 或改造载体, 去除不必要的抗原表位; (2) DNA 疫苗的免疫原性较低, 并有与宿主基因组整合的潜在危险^[37]; (3) 多肽疫苗治疗效果理想, 但有 HLA 型别限制, 应该针对不同人群来筛选安全有效的 CTL 表位肽, 蛋白疫苗中, E5、E6 和 E7 应通过改造去除致癌性, 而且多肽和蛋白免疫原性都不强, 需要使用佐剂来增强其免疫效果。值得注意的是, 有研究^[38]称, 使用不完全弗氏佐剂的多肽疫苗有可能因为导致 T 细胞免疫耐受而使肿瘤加速生长。Hsp70 (热激蛋白 70) 作为融合蛋白能增强疫苗的细胞免疫反应^[39], 可以替代佐剂来生产无佐剂疫苗。

另外治疗性疫苗的研究重点不应该只放在 E6 和 E7, HPV 其它的蛋白的疫苗研究也取得了很好的效果, 尤其是作为预防性疫苗的 L1 和 L2, 两者都产生了

很好的细胞免疫效果。这提示我们需要对 HPV 感染的免疫学机制作进一步的深入研究，同时也需要更多的临床试验来验证各类疫苗的效果。考虑到 HPV 各个蛋白的不同作用及各类疫苗的局限性，研究中或可采用不同疫苗联合使用来达到取长补短的效果。

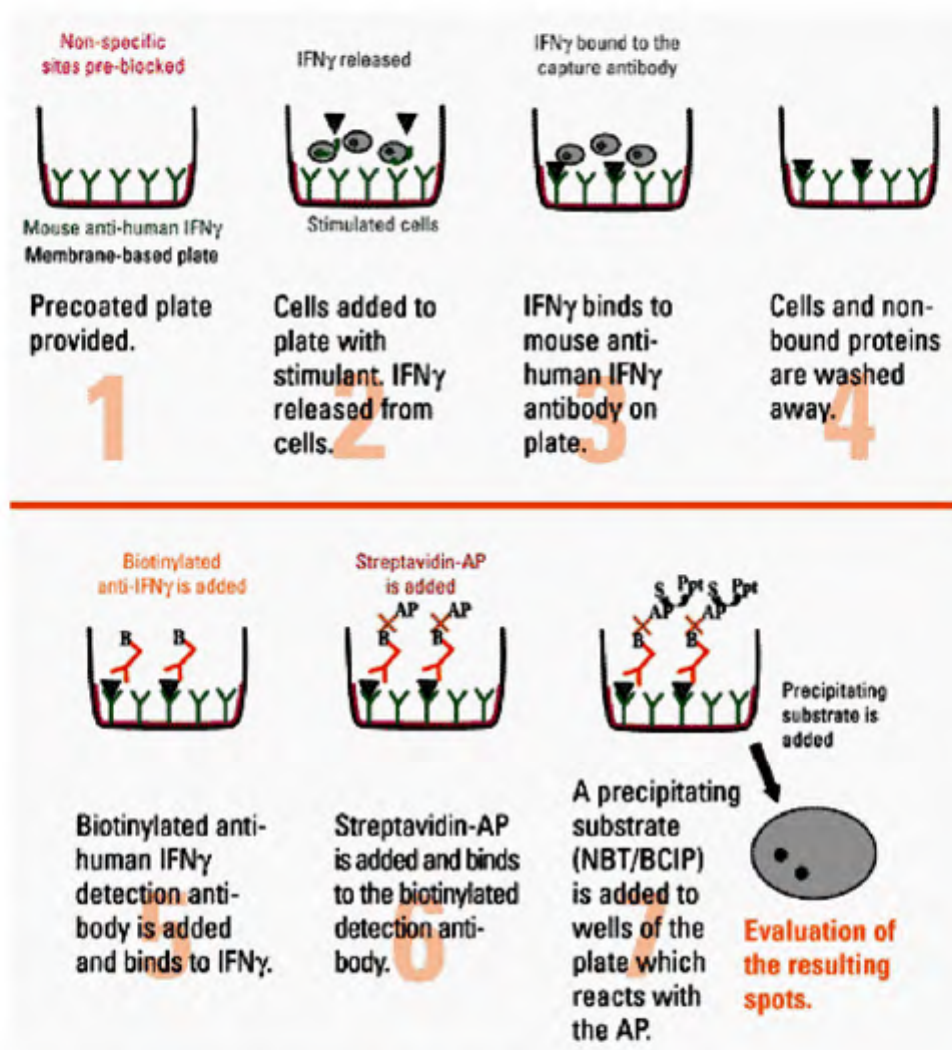
治疗性 HPV 疫苗相对于传统治疗的巨大优势和已经表现出的良好的临床疗效会吸引越来越多的研究者参与进来，目前存在的问题也会逐步得到解决，因此治疗性 HPV 疫苗将会有很好的发展前景。

1.2 酶联免疫斑点法 (ELISPOT)

酶联免疫斑点检测 (Enzyme-linked Immunospot Assay, ELISPOT) 是在单细胞水平检测细胞分泌细胞因子的情况的一项细胞免疫学检测技术。在免疫学领域中，对于疫苗的研究不仅仅是局限于体液免疫 (B 细胞免疫)，很多时候细胞免疫应答 (Cell mediated immune response, CMI) 是更需要关注的方面，而 T 细胞在细胞免疫中起关键作用。在抗原入侵后，T 细胞能识别抗原，分泌多种淋巴因子，ELISPOT 就是用抗体捕获培养中的细胞分泌的细胞因子，并以酶联斑点显色的方式将其表现出来^[40]。

ELISPOT 技术是当今检测生物体细胞免疫水平的最佳技术，具有高灵敏度、高可信度、高通量、单细胞水平、功能性检测与低成本等诸多优点，在免疫学获得了广泛的应用，成为主流免疫学检测技术之一。首先，ELISPOT 法的灵敏度比传统的 ELISA 方法高 2-3 个数量级，在一百万个细胞中只要有一个分泌细胞因子的阳性细胞即可被检测出来，这是目前为止，最为灵敏的检测技术；其次，ELISPOT 法检测的是单个活细胞分泌细胞因子的能力，可以区分出细胞因子的增加是由于分泌细胞数量增加还是单个细胞分泌水平增加。

ELISPOT 在 96 孔培养板上进行，直接以培养板的塑料板底或者 PVDF 膜以及硝酸纤维素膜为基质，包被上特异性的单克隆抗体，用以捕获细胞分泌的细胞因子，在培养板的孔内加入细胞培养基、待检测的细胞以及抗原刺激物进行培养。在特异性的抗原或者非特异性的有丝分裂原的刺激下，数小时之内，T 细胞就会开始分泌各种细胞因子。细胞因子会被位于细胞下方的膜上的单克隆抗体所捕获。在洗去细胞之后，加入生物素标记的检测抗体，与被捕获的细胞因子结合，然后用酶标亲和素再与生物素结合，进行化学酶联显色，就可以在膜的局部形成一个圆形的斑点。每一个斑点就对应了当初一个分泌细胞因子的细胞，统计膜上的斑点的数目，再除以当初加入孔内的细胞总数，就可以计算出阳性细胞的频率。具体的原理和步骤如下图 1-1 所示。



1. 细胞因子特异性单抗包被在培养孔底部的膜上；
2. 加入细胞及刺激物培养，阳性细胞开始分泌 γ -干扰素；
3. γ -干扰素被膜上的包被抗体捕获；
4. 通过裂解和洗涤移除细胞和杂蛋白；
5. 加入生物素标记的检测抗体，检测抗体和 γ -干扰素结合，形成“抗体-抗原-抗体”夹心结构；
6. 加入链霉亲和素标记的碱性磷酸酶（AP），链霉亲和素和生物素结合；
7. 加入显色底物，在碱性磷酸酶的作用下，生成不可溶的色素，就近沉淀在局部的膜上形成斑点

图 1-1 ELISPOT 技术原理和步骤

Figure 1-1 ELISPOT assay procedure

1.3 本课题研究内容

人乳头瘤病毒是一种在自然界广泛存在的嗜上皮性病毒，高危型（HPV16、18、31 和 45 型等）与多种鳞状及腺上皮恶性肿瘤（包括宫颈癌、食管癌、喉癌等）有关。食管癌是最常见的六大恶性肿瘤之一，全世界每年新确诊的 40 多万食管癌患者中，一半以上发生在中国。食管癌的发生是多因素协同作用的结果，其中 HPV16 和 18 型是中国人食管癌发生的重要致病因素。研究发展食管癌预防及治疗性疫苗，是降低食管癌发病率和死亡率，防治食管癌的重要关键措施。

本课题研究内容主要分为以下两个部分：

第一，通过分子生物学、细胞生物学等方法分别构建含有 HPV16 L1 和 HPV18 L1 基因的重组 DNA 疫苗和重组腺病毒疫苗，并进行大量扩增和纯化。

第二，用制得的重组 DNA 疫苗和重组腺病毒疫苗免疫小鼠，通过酶联免疫斑点法（ELISPOT）和假病毒中和滴定实验检测疫苗的免疫效果，并对合成的 HPV16 L1 和 HPV18 L1 的 T 细胞表位肽进行筛选。

1.4 本课题技术路线

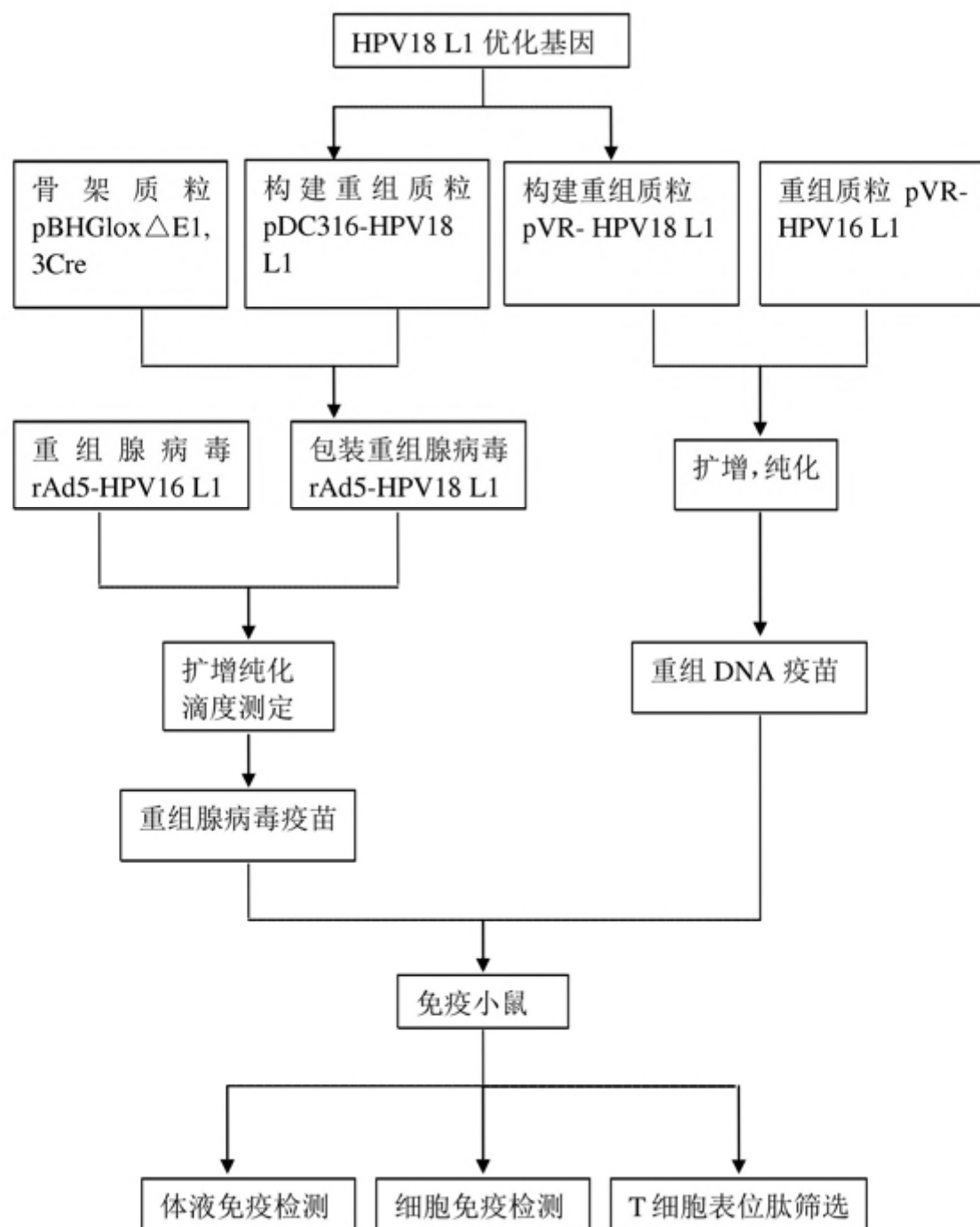


图 1-2 本课题研究的技术路线
Figure1-2 Road map of this study

第2章 含 HPV L1 基因的重组 DNA 疫苗的构建

食管癌的发生是多因素协同作用的结果,其中 HPV16 和 18 型是中国人食管癌发生的重要致病因素。因此可以开发以 HPV16 L1 和 HPV18 L1 为基础的预防及治疗性疫苗。

基因治疗的载体有病毒载体和非病毒载体,非病毒载体中直接肌肉注射重组质粒是简便有效的方法。重组 DNA 疫苗构建简单,易于改造,成本低,容易大量生产等优点,本研究中使用的 pVR 质粒是一种高效的真核表达载体,重组 pVR 质粒肌肉注射入体内后,可在肌肉细胞内高效的表达外源蛋白,从而刺激机体产生良好的免疫效果。

2.1 实验材料

2.1.1 质粒、细胞和菌株

大肠杆菌 DH5 α 购自天根生化科技(北京)有限公司, DNA A-Tailing Kit、pMD18-T 载体购自宝生物工程(大连)有限公司。HEK293 细胞由中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所贾润清老师提供。含 pVR-HPV16 L1 质粒的甘油菌以及含密码子优化型 HPV18 L1 基因的质粒 pMK-RQ 由周玉柏老师提供。

2.1.2 工具酶及主要试剂

限制性内切酶 *Bgl* II 和 *Sal* I 购自 NewEngland Biology 公司, T4 DNA 连接酶、DNA Marker 购自宝生物工程(大连)有限公司。普通 DNA 纯化试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒、*pfu* DNA 聚合酶、dNTP 均购自天根生化科技(北京)有限公司。质粒提取试剂盒(Midi)、去内毒素质粒提取试剂盒(Maxi、Mega)购自 QIAGEN 公司。预染蛋白 Marker 购自 Fermentas 公司。

脂质体转染试剂 Lipofectamine2000 购自 Invitrogen 公司。DMEM 培养基、OptiMEM I 培养基、胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS)、青链霉素双抗购自 Gibco 公司。小鼠抗 HPV18 L1 单抗购自 Abcam 公司,小鼠抗 β -actin 单抗购自北京中杉金桥生物技术公司。羊抗小鼠 IgG 抗体(Anti-MOUSE IgG (H&L) (GOAT) Antibody IRDye700DX) 购自 Rockland 公司。其它分析纯试剂由本实验室提供。

2.1.3 主要仪器设备

仪器名称	厂家
台式高速冷冻离心机	Thermo 公司
台式微型离心机	Eppendorf 公司
恒温水浴锅	北京博医康实验仪器 HX-1050 型
金属浴	Thermo 公司
恒温摇床	江苏太仓市实验设备厂 DDH2-300 型
恒温培养箱	上海一恒科技有限公司 DHP-9052 型
凝胶成像系统	Alpha Innotech 公司 4400 型
DNA 电泳仪及电泳槽	北京市六一仪器厂 DYCP-31C 型
蛋白电泳仪	Bio-Rad 公司 PowerPac 3000
半干式碳板转印槽、垂直电泳槽	Bio-Rad 公司
微量移液器	Eppendorf 公司
PCR 仪	Applied biosystems, 2720 thermal cycler
Odssey 远红外影像分析仪	LI-COR Biosciences 公司
二氧化碳细胞培养箱	Thermo 公司
生物安全柜	Thermo Fisher Scientific 1389 型

2.1.4 引物

实验所需引物由上海英骏生物技术有限公司合成，序列如下：

VRF: 5' -ATTTGTCGACATGGCTCTGTGGCGGCCAGCGAC-3'

VRR: 5' -ATTTAGATCTTCACTTGCGGGCTCTCACGCGCACG-3'

2.2 实验方法

2.2.1 重组 DNA 疫苗 pVR-HPV18 L1 的构建

2.2.1.1 PCR 扩增 HPV18 L1 基因片段 以含密码子优化的 HPV18 L1 基因的 pMK-RQ 为模板，VRF 为上游引物，VRR 为下游引物 PCR 扩增 HPV18L1 基因片段。PCR 反应体系如下：

模板 pMK-RQ	0.5 μ L
上游引物 VRF	1 μ L
下游引物 VRR	1 μ L

10×Pfu Reaction Buffer	5 μL
dNTP	4 μL
ddH ₂ O	35 μL
Pfu DNA 聚合酶	1 μL
DMSO	2.5 μL

PCR 参数设置为:

94℃ 预变性 5 min,
94℃ 30 s, 58℃ 1 min, 72℃ 2 min, (30 cycles)
72℃ 7 min.

PCR 完成后取 1 μL 反应溶液进行 DNA 凝胶 (1%) 电泳检测。检测得到较好结果后回收 PCR 产物。

2.2.1.2 HPV18 L1 基因片段与 T 载体的连接 将 PCR 扩增得到的 HPV18 L1 基因片段连接到 pMD18-T 载体上以保存并确保较高的酶切效率。由于 pfu 酶不能在扩增产物的 3' 末端加上 A, 需要首先使用 DNA A-Tailing Kit 把 PCR 产物 3' 末端加 A。按说明书取适量的 PCR 产物, 加入 10×A-Tailing Buffer 5 μL, dNTP 4 μL, A-Tailing Enzyme 0.5 μL, 补水至 50 μL, 置于 PCR 仪 72℃ 反应 20 分钟, 然后冰上静置 1~2 分钟。然后取适量的上述 3' 末端加 A 的 PCR 产物, 加入 pMD18-T Vector 1 μL, 补水至 5 μL, 然后加入 5 μL Solution I, 16 °C 反应 2 小时。

2.2.1.3 T 载体连接产物的转化 将 2.2.1.2 全部的连接产物 (10 μL) 加入至 50 μL DH5α 感受态细胞中, 冰中放置 30 分钟。42℃ 加热 90 秒后, 再在冰中放置 2~3 分钟。然后加入 400 μL LB 培养基, 37℃ 振荡培养 45 分钟。取 100 μL 已转化的感受态细胞, 用弯头玻棒轻轻涂到含有 X-Gal、IPTG、Amp 的 LB 琼脂平板培养基上。平板上液体被吸收后置于 37℃ 恒温箱培养 12~16 h。

2.2.1.4 小提并双酶切重组 T 载体和 pVR 质粒 挑取平板上的白色菌落, 接种到 4 mL Amp 抗性的 LB 培养基中, 37℃ 剧烈振荡培养过夜。按小提试剂盒说明书步骤小提质粒, 然后使用限制性内切酶 *Bgl* II 和 *Sal* I 对重组 T 载体和 pVR 质粒进行双酶切。

酶切体系为: 适量的相应质粒, NEBuffer 3.5 μL, *Bgl* II 和 *Sal* I 各 1.5 μL, BSA 0.5 μL, 补水至 50 μL。37℃ 水浴过夜酶切后, 加 5.5 μL 10× DNA loading buffer 混匀后上样到 1% 琼脂糖凝胶中, 110 V 恒压水平电泳至指示剂距凝胶边缘 2 cm。紫外灯下切取含有目的条带的琼脂糖凝胶, 使用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收目的条带。取 1 μL 回收的 DNA 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测回收效果。

2.2.1.5 HPV18 L1 片段和 pVR 质粒的连接 连接体系为: 适量的 2.2.1.4 中酶切回收的 HPV18 L1 片段和 pVR 质粒, 10×T4 Ligase buffer 2 μL, T4 连接酶 1.5 μL,

补水至 20 μL 。16 $^{\circ}\text{C}$ 连接过夜。

2.2.1.6 连接产物的转化 将 2.2.1.5 全部的连接产物 (20 μL) 加入至 50 μL DH5 α 感受态细胞中, 冰中放置 30 分钟。42 $^{\circ}\text{C}$ 加热 90 秒后, 再在冰中放置 2~3 分钟。然后加入 400 μL LB 培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 45 分钟。取 100 μL 已转化的感受态细胞, 用弯头玻棒轻轻涂到含有 Kana 的 LB 琼脂平板培养基上。平板上液体被吸收后置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱培养 12~16 h。

2.2.1.7 小提并鉴定重组质粒 挑取平板上的单菌落接种到 4 mL Kana 抗性的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 剧烈振荡培养过夜。按小提试剂盒说明书步骤小提质粒, 然后使用限制性内切酶 *Bgl* II 和 *Sal* I 对提取的质粒进行酶切鉴定。初步鉴定正确后送北京华大基因测序。测序结果正确的重组 pVR 质粒命名为 pVR-HPV18 L1。

2.2.2 中提 pVR-HPV18 L1 质粒

用 pVR-HPV18 L1 质粒所对应的甘油菌在 Kana 抗性平板上划线, 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养后, 挑单菌落接种到 5 mL Kana 抗性的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 剧烈振荡培养 8~12 h, 然后按照 1:1 000 的比例接种到 60 mL 含 Kana 的 LB 培养基中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 剧烈振荡培养 12~16 h 后, 用 QIAGEN 公司中提试剂盒 QIAGEN Plasmid Midi Kit 提质粒, 具体操作步骤见试剂盒说明书。提取的质粒冻存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

2.2.3 转染细胞并检测重组质粒的蛋白表达

2.2.3.1 HEK293 细胞的培养 培养 HEK293 细胞所用的培养基为含 10% FBS 和 1% 双抗的 DMEM 培养基, 培养条件为 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 恒温培养箱。

2.2.3.2. 用中提的质粒转染细胞 按以下步骤将质粒 pVR-HPV18 L1 转染到 293 细胞中以检测质粒是否可以正确表达蛋白:

(1) 转染前一天, 胰酶消化 293 细胞并计数, 将细胞转至六孔板, 使其在转染日密度接近 90%。细胞铺板在 2 mL 含血清, 不含抗生素的正常生长的培养基中。

(2) 对于每孔细胞, 使用 250 μL OPTI-MEM I 培养基稀释 4 μg 质粒 (pVR-HPV18 L1)。Lipofectamine 2000 试剂用前混匀, 用 250 μL OPTI-MEM I 培养基稀释 10 μL Lipofectamine 2000。轻柔混匀, 室温静置 5 分钟, 然后同稀释的质粒混合, 再室温静置 20 min。

(3) 直接将复合物 (500 μL) 逐滴加入到每孔中, 前后 (或左右) 摇动培养板, 轻轻混匀。放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 恒温培养箱。4~6 小时后换液为正常生长的培养基。

2.2.3.3 Western Blot 检测 HPV18 L1 蛋白 对转染后的细胞按以下步骤进行 Western Blot 检测:

(1) 转染 48 h 后, 弃去培养基, 用 PBS 洗一遍细胞, 每孔细胞加入 80 μ L 的细胞裂解液 (50 mM Tris-HCl (pH8.0), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 100 μ g/mL PMSF (临用前加入)), 用移液器吹打或用细胞刮刮下细胞, 裂解后的细胞收集到 1.5 mL Eppendorf 管中, 12 000 r/min 离心 10 min。

(2) 取上清加 1/4 体积的 5 \times 电泳上样缓冲液, 沸水中煮 5~10 min, 取 20 μ L 进行 SDS-PAGE 电泳 (积层胶为 5%, 分离胶为 10%), 110 V 恒压电泳; 电泳结束后, 采用半干转法将蛋白转至硝酸纤维素 (NC) 膜上; 将 NC 膜置于含有 5% 脱脂奶粉的 PBS 中 37 $^{\circ}$ C 慢慢摇动封闭 1 h; 弃封闭液, 加入 1:1 000 的小鼠抗 HPV18 L1 单克隆抗体 (8.F.324) 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜; 以含有 0.05% Tween-20 的 PBS 洗膜 3 次, 每次 10 min; 加入 1:5 000 稀释的羊抗小鼠 IgG 抗体 (Anti-MOUSE IgG (H&L) (GOAT) Antibody IRDye700DX) 室温摇动孵育 45 min; 用含有 0.05% Tween-20 的 PBS 洗膜 3 次, 每次 10 min; 将膜置于 PBST 中, 然后用 Odyssey 远红外影像分析仪检测 HPV18 L1 蛋白。

(3) 保存图像后, 将用过的膜浸入 stripping buffer (β -mercaptoethanol 342 μ L, 20% SDS 5 mL, 1 M Tris-HCl pH 6.7 3.125 mL, 加 ddH₂O 至 50 mL) 中, 置 50 $^{\circ}$ C 水浴箱中 30 min, 间断振摇。然后用含 0.05% Tween-20 的 PBS 洗 3 次, 每次 5 min。后加入 1:1 000 稀释的小鼠抗 β -actin 单抗室温摇动 1 h, 以含有 0.05% Tween-20 的 PBS 洗膜 3 次, 每次 10 min; 加入 1:5 000 稀释的羊抗小鼠 IgG 抗体 (Anti-MOUSE IgG (H&L) (GOAT) Antibody IRDye 700 DX) 室温摇动孵育 45 min; 用含有 0.05% Tween-20 的 PBS 洗膜 3 次, 每次 10 min; 将膜置于 PBST 中, 然后用 Odyssey 远红外影像分析仪检测 β -actin 蛋白。

2.2.4 大提 pVR-HPV16 L1 和 pVR-HPV18 L1 质粒

用 pVR-HPV16 L1 和 pVR-HPV18 L1 质粒所对应的甘油菌在 Kana 抗性平板上划线, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养后, 挑单菌落接种到 5 mL Kana 抗性的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 剧烈振荡培养 8~12 h, 然后按照 1:1 000 的比例接种到 500 mL 含 Kana 的 LB 培养基中, 于 37 $^{\circ}$ C 剧烈振荡培养 12~16 h 后, 用 QIAGEN 公司去内毒素大提试剂盒 EndoFree Plasmid Mega Kit 大提质粒, 具体操作步骤见试剂盒说明书。质粒提取后分别取部分稀释 100 倍用分光光度计测定浓度和纯度。提取的质粒冻存于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱。

2.3 实验结果和讨论

2.3.1 PCR 扩增 HPV18 L1 基因片段的結果

以含密码子优化的 HPV18 L1 基因的 pMK-RQ 为模板, VRF 为上游引物, VRR 为下游引物进行 PCR 反应, 应该得到大小约为 1 524 bp 的 HPV18 L1 片段, 实验结果如图 2-1 所示, 与预期一致。

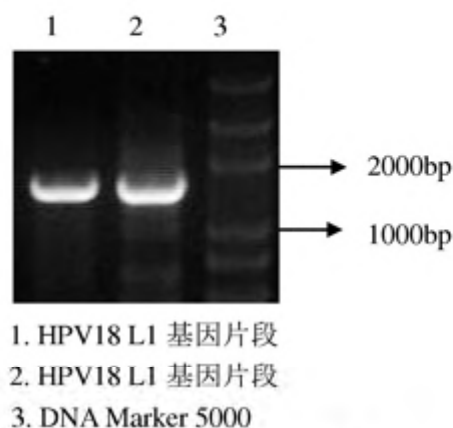


图 2-1 PCR 扩增 HPV18 L1 基因片段

Figure 2-1 Amplification of HPV18 L1 by PCR

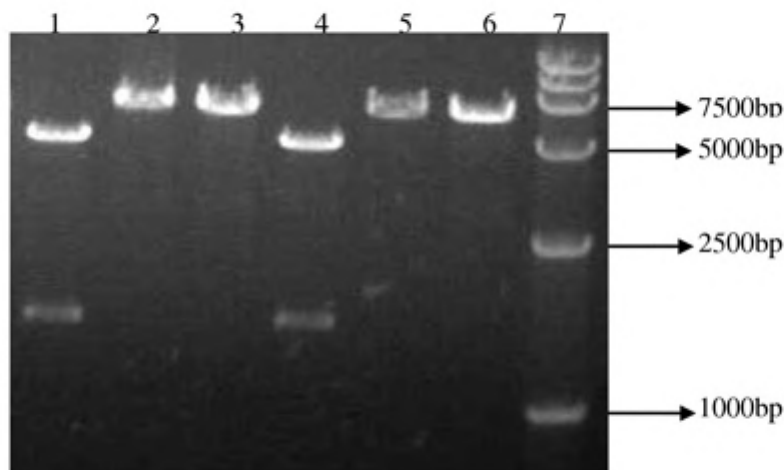
2.3.2 重组质粒 pVR-HPV18 L1 的酶切鉴定和测序结果

使用限制性内切酶 *Bgl* II 和 *Sal* I 对重组质粒 pVR-HPV18 L1 进行双酶切和单酶切鉴定, 双酶切应该得到 1 524 bp 的小片段和约 4 900 bp 的大片段, 单酶切应能看到 6 400 bp 左右的片段。实验结果如图 2-2 所示, 与预期一致。

对初步鉴定正确后的质粒的测序结果也表明, HPV18 L1 正确地插入到了质粒 pVR 中。

2.3.3 Western Blot 检测重组质粒的蛋白表达

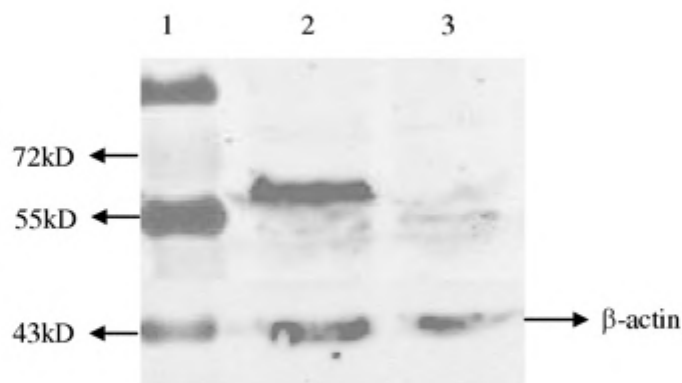
将质粒 pVR-HPV18 L1 转染进 293 细胞, 验证质粒构建是否正确。Western Blot 结果如下图 2-3 所示, 转染组的细胞在大约 58 kD 处有特异性的条带, 而未转染的对照细胞在 58 kD 处没有条带。说明 pVR-HPV18 L1 构建正确, 并且可以在真核细胞内表达有抗原性的 HPV18 L1 蛋白。



1. 质粒 pVR-HPV18 L1-1 的 *Bgl* II 和 *Sal* I 双酶切产物
2. 质粒 pVR-HPV18 L1-1 的 *Bgl* II 酶切产物
3. 质粒 pVR-HPV18 L1-1 的 *Sal* I 酶切产物
4. 质粒 pVR-HPV18 L1-2 的 *Bgl* II 和 *Sal* I 双酶切产物
5. 质粒 pVR-HPV18 L1-2 的 *Bgl* II 酶切产物
6. 质粒 pVR-HPV18 L1-2 的 *Sal* I 酶切产物
7. DNA Marker 15000

图 2-2 重组质粒 pVR-HPV18 L1 的双酶切和单酶切鉴定

Figure 2-2 Identification of recombinant plasmids pVR-HPV18 L1 by restriction enzymes digestion.



1. 预染蛋白彩色 Marker
2. 质粒 pVR-HPV18 L1 转染后的 293 细胞裂解上清
3. 没有转染的正常 293 细胞裂解上清

图 2-3 重组质粒 pVR-HPV18 L1 转染 293 细胞后的 HPV18 L1 表达检测

Figure 2-3 Detection of HPV18 L1 protein by Western Blot in 293 cells transfected with pVR-HPV18 L1.

2.4 本章小结

本章中利用分子生物学、细胞生物学等的技术成功构建了含密码子优化型 HPV18 L1 基因的重组 pVR-HPV18 L1 DNA 疫苗, 经过验证, 重组 pVR-HPV18 L1 质粒可以在 293 细胞内高效的表达 HPV18 L1 蛋白。使用 QIAGEN 公司去内毒素大提试剂盒 EndoFree Plasmid Mega Kit 大提 pVR-HPV16 L1 和 pVR-HPV18 L1 质粒, 得到了足量的纯度 (OD 260/280 值在 1.79 左右) 和浓度较高的无内毒素重组质粒, 可以免疫动物。

第3章 含 HPV L1 基因的重组腺病毒疫苗的构建

复制缺陷型腺病毒缺失 E1/E3 (4.7 kb) 区基因, 可以容许 6.5 kb 的片段插入, 其具有嗜性广泛、外源基因容量大、包装病毒滴度高、感染力强、安全性高等一系列优点, 成为目前基因治疗中最为常用的病毒载体之一。

本研究使用的 AdMax 腺病毒包装系统具有操作简便、重组效率高、目的基因的表达水平高等优点。AdMax 系统是通过 Cre/loxP 重组酶系统获得重组病毒, 这个过程发生在 293 细胞中。将插入外源基因的腺病毒穿梭质粒与携带腺病毒大部分基因组的骨架质粒共转染 293 细胞, 利用 Cre/loxP 系统的作用实现重组, 产生重组腺病毒。

3.1 实验材料

3.1.1 质粒、细胞和菌株

Admax 系统穿梭质粒 pDC316、骨架质粒 pBHGlox Δ E1, 3Cre、含有野生型 Ad5 E1 基因的质粒 pXC-1 以及 HEK293 细胞由中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所惠赠。大肠杆菌 DH5 α 购自天根生化科技(北京)有限公司。重组腺病毒疫苗 rAd5-HPV16 L1 由周玉柏老师构建。

3.1.2 工具酶及主要试剂

限制性内切酶 *Bgl* II 和 *Sal* I 购自 NewEngland Biology 公司, T4 DNA 连接酶、DNA Marker 购自宝生物工程(大连)有限公司。普通 DNA 纯化试剂盒、质粒小提试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒、*pfu* DNA 聚合酶、dNTP 均购自天根生化科技(北京)有限公司。预染蛋白 Marker 购自 Fermentas 公司。

脂质体转染试剂 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司。QuickShuttle 转染试剂购自北京康碧泉生物科技有限公司。DMEM 培养基、OptiMEM 1 培养基、胎牛血清 FBS、青链霉素、4%软琼脂糖凝胶均购自 Gibco 公司。小鼠抗 HPV18 L1 单抗购自 Abcam 公司, 小鼠抗 β -actin 单抗购自北京中杉金桥生物技术公司。羊抗小鼠 IgG 抗体 (Anti-MOUSE IgG (H&L) (GOAT) Antibody IRDye 700 DX) 购自 Rockland 公司。质粒提取试剂盒 (Midi) 购自 QIAGEN 公司。其它分析纯试剂由本实验室提供。

3.1.3 主要仪器设备

仪器名称	厂家
台式高速冷冻离心机	Thermo 公司
台式微型离心机	Eppendorf 公司
恒温水浴锅	北京博医康实验仪器 HX-1050 型
金属浴	Thermo 公司
恒温摇床	江苏太仓市实验设备厂 DDH2-300 型
恒温培养箱	上海一恒科技有限公司 DHP-9052 型
凝胶成像系统	Alpha Innotech 公司 4400 型
DNA 电泳仪及电泳槽	北京市六一仪器厂 DYCP-31C 型
蛋白电泳仪	Bio-Rad 公司 PowerPac 3000
半干式碳板转印槽、垂直电泳槽	Bio-Rad 公司
微量移液器	Eppendorf 公司
PCR 仪	Applied biosystems, 2720 thermal cycler
Odssey 远红外影像分析仪	LI-COR Biosciences 公司
二氧化碳细胞培养箱	Thermo 公司
生物安全柜	Thermo Fisher Scientific 1389 型

3.1.4 引物

实验所需引物由上海英骏生物技术有限公司合成，序列如下：

316F: 5' -AGCTAGATCTATGGCTCTGTGGCGGCCAGCGAC -3'

316R: 5' -ATTTGTCGACTCACTTGCGGGCTCTCACGCGCACG -3'

RCF: 5' -CCTGCGAGTGTGGCGGTA AAA -3'

RCR: 5' -CACAAGGGCGTCTCCAAGTT -3'

其中引物 316F 和 316R 用于构建重组穿梭质粒 pDC316-HPV18 L1；引物 RCF 和 RCR 用于检测重组腺病毒的复制缺陷性。

3.2 实验方法

3.2.1 重组穿梭质粒 pDC316-HPV18 L1 的构建

3.2.1.1 PCR 扩增 HPV18 L1 基因片段 以含密码子优化的 HPV18 L1 基因的 pMK-RQ 为模板，316F 为上游引物，316R 为下游引物 PCR 扩增 HPV18L1 基因

片段。PCR 反应体系如下：

模板 pMK-RQ	0.5 μ L
上游引物 316F	1 μ L
下游引物 316R	1 μ L
10 \times Pfu Reaction Buffer	5 μ L
dNTP	4 μ L
ddH ₂ O	35 μ L
Pfu DNA 聚合酶	1 μ L
DMSO	2.5 μ L

PCR 参数设置为：

94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,
94 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, (30 cycles)
72 $^{\circ}$ C 7 min.

PCR 完成后取 1 μ L 反应溶液进行 DNA 凝胶 (1%) 电泳检测。检测得到较好结果后回收 PCR 产物。

3.2.1.2 双酶切 pDC316 质粒和 HPV18 L1 片段 吸取 0.5 μ L pDC316 质粒加入 50 μ L DH5 α 感受态细胞中，轻轻旋转混匀，冰中放置 30 分钟。42 $^{\circ}$ C 加热 90 秒后，再在冰中放置 2~3 分钟。然后加入 400 μ L LB 培养基，37 $^{\circ}$ C 振荡培养 45 分钟。取 100 μ L 已转化的感受态细胞，用弯头玻棒轻轻涂到含有 Amp 的 LB 琼脂平板培养基上。平板上液体被吸收后置于 37 $^{\circ}$ C 恒温箱培养 12~16 h。

挑取单个 pDC316 转化菌落接种于 5 mL 含 Amp 的 LB 培养基中，37 $^{\circ}$ C 剧烈振荡培养过夜。使用质粒小提试剂盒提取 pDC316 质粒。

然后使用限制性内切酶 *Bgl* II 和 *Sal* I 对 pDC316 质粒和 HPV18 L1-pDC316 片段进行双酶切。酶切体系为：适量的相应质粒，NEBuffer 3.5 μ L，*Bgl* II 和 *Sal* I 各 1.5 μ L，BSA 0.5 μ L，补水至 50 μ L。37 $^{\circ}$ C 水浴过夜酶切后，加 5.5 μ L 10 \times DNA loading buffer 混匀后上样到 1% 琼脂糖凝胶中，110 V 恒压水平电泳至指示剂距凝胶边缘 2cm。紫外灯下切取含有目的条带的琼脂糖凝胶，使用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收目的条带。取 1 μ L 回收的 DNA 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测回收效果。

3.2.1.3 HPV18 L1 片段和 pDC316 质粒的连接 连接体系为：适量的 3.2.1.2 中酶切回收的 HPV18 L1 片段和 pDC316 质粒，10 \times T4 Ligase buffer 2 μ L，T4 连接酶 1.5 μ L，补水至 20 μ L。16 $^{\circ}$ C 连接过夜。

3.2.1.4 连接产物的转化及酶切鉴定 将 3.2.1.3 全部的连接产物 (20 μ L) 加入至 50 μ L DH5 α 感受态细胞中，冰中放置 30 分钟。42 $^{\circ}$ C 加热 90 秒后，再在冰中放

置 2~3 分钟。然后加入 400 μL LB 培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 45 分钟。取 100 μL 已转化的感受态细胞, 用弯头玻棒轻轻涂到含有 Amp 的 LB 琼脂平板培养基上。平板上液体被吸收后置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱培养 12~16 h。

挑取琼脂平板上的单个菌落接种于 5 mL 含 Amp 的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 剧烈振荡培养过夜。使用质粒小提试剂盒提取质粒。

然后使用限制性内切酶 *Bgl* II 和 *Sal* I 对 pDC316 质粒和 HPV18 L1-pDC316 片段进行酶切鉴定。初步鉴定正确后送北京华大基因测序。测序结果正确的重组 pDC316 质粒命名为 pDC316-HPV18 L1。

3.2.2 重组腺病毒 rAd5-HPV18 L1 的包装

3.2.2.1 中提重组穿梭质粒和骨架质粒 使用 QIAGEN 公司中提试剂盒 QIAGEN Plasmid Midi Kit 提取重组穿梭质粒 pDC316-HPV18 L1 和骨架质粒 pBHGlox Δ E1, 3Cre, 具体操作步骤见试剂盒说明书。质粒提取后分别取部分稀释 100 倍用分光光度计测定浓度和纯度。提取的质粒冻存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

3.2.2.2 293 细胞的共转染 培养 HEK293 细胞所用的培养基为含 10% FBS 和 1% 双抗的 DMEM 培养基, 培养条件为 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 恒温培养箱。按以下步骤使用穿梭质粒和骨架质粒共转染 293 细胞:

(1) 转染前, 传代 293 细胞于 25 cm^2 细胞培养瓶, 培养基用不含抗生素、含 10% FBS 的 DMEM。控制密度使其在转染日密度接近 90%。

(2) 配制转染液: A 液: 溶于纯水的重组腺病毒穿梭质粒 pDC316-HPV18 L1 (1.33 μg , 0.46 μl)、骨架质粒 pBHGlox Δ E1, 3Cre (6.67 μg , 2.59 μl) 和 Opti-MEM I 培养基共 500 μl ; B 液: 20 μl Lipofectamine 2000 和 Opti-MEM 培养液共 500 μL 。B 液室温放置 5 min, 然后将 A 液和 B 液轻轻混匀, 室温放置 20 min。

(3) 移去旧细胞培养液, 换 2 mL 新鲜的不含抗生素、含 10% FBS 的 DMEM, 然后将 A、B 混合液逐滴加入培养细胞上, 左右摇动, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵育 4~6 h, 然后移去旧细胞培养液, 换液为 5~10 mL 含 10% FBS 的 DMEM (可含抗生素)。

3.2.2.3 重组腺病毒的收获及传代扩增 每天观察共转染的细胞的形态变化, 第九天时细胞略有萎缩, 移除旧的培养基, 以 PBS 洗一遍, 然后加入 0.8 mL 胰酶, 使之流遍所有细胞表面, 即将其吸除, 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 1 min 后, 加入 1 mL DMEM 培养基终止消化, 轻轻吹打细胞, 然后将细胞转移到 1.5 mL Eppendorf 管中, 置于 -70 $^{\circ}\text{C}$ 和 37 $^{\circ}\text{C}$ 各 10 min 反复冻融三次, 12 000 rpm 离心 10 min, 吸取上清, 即为原代病毒, 命名为 rAd5-HPV18 L1, -70 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

取原代病毒 0.5 mL 接种于密度为 90% 的 HEK293 细胞, 37°C、5% CO₂ 培养, 每日观察细胞病变 (Cytopathic effect, CPE), 直至大部分 HEK293 细胞病变后, 按上述方法收集病毒, 病毒液保存于 -70°C 备用。传代病毒到第三代时, 第三天即观察到明显的细胞病变, 绝大部分细胞变圆, 出现串珠样甚至葡萄簇样改变, 说明此代的病毒滴度已经较高, 收集病毒保存于 -70°C 备用。

3.2.3 重组腺病毒的滴度测定

使用 TCID₅₀ (50% 组织细胞感染量) 方法测定收获的第三代重组腺病毒的滴度。

细胞的准备: 准备 10 mL 含 2% FBS 的 DMEM 重悬细胞, 将细胞浓度调至 1×10^5 /mL, 接种于 96 孔细胞培养板, 每孔加入 100 μ L。

病毒的稀释: 第一管中加入 0.9 mL 含 2% FBS 的 DMEM, 其余则加入 1.8 mL。第一管中加入 0.1 mL 第三代病毒原液。上下吸打 5 次混匀。每一次稀释后都更换吸头。从第一管中吸取 0.2 mL 加入第二管。重复这个稀释步骤直到最高稀释度。

病毒的加入: 96 孔板的每一排 10 孔作为一个稀释度, 从 A 到 H 分别为 10^{-3} 到 10^{-10} 稀释度。11, 12 列不加病毒作为阴性对照。实验孔每孔加入 0.1 mL 不同稀释度病毒, 阴性对照孔加入 0.1 mL 含 2% FBS 的 DMEM。把 96 孔板放在 37°C 孵箱培养 10 天, 观察病变。只要有一个小病变此孔即作为阳性对待, 如果不易判断可跟阴性对照比较。如果阴性对照中无任何 CPE 且细胞生长良好, 最低稀释度 100% 阳性而最高稀释度 100% 阴性, 则本测试有效。最后按公式 $T=10^{1+d(s-0.5)}$ 计算病毒的滴度 (d 为稀释度的对数值, s 为病变比例的和)。

3.2.4 重组腺病毒的空斑筛选和鉴定

3.2.4.1 空斑法挑选重组腺病毒和小量扩增 腺病毒穿梭载体和骨架质粒通过在 293 细胞内同源重组产生重组腺病毒, 这涉及到复杂的反应和基因重排或突变, 可能导致病毒呈现不同的表型, 单独的病毒颗粒在病毒增殖力及蛋白表达量上可能有差异, 因此有必要对获得的重组腺病毒进行筛选。

(1) 在六孔板每孔加入一定数量的 293 细胞, 控制细胞密度达到 90%, 确认细胞贴壁完好。

(2) 对重组腺病毒原液进行一系列梯度稀释, 稀释度从 10^{-1} 到 10^{-9} 。第一管中加入 0.9 mL 含 5% FBS 的 DMEM, 其余则加入 1.8 mL。第一管中加入 0.1 mL 第三代病毒原液。上下吸打 5 次混匀。每一次稀释后都更换吸头。从第一管中吸

取 0.2 mL 加入第二管。重复这个稀释步骤直到最高稀释度。

(3) 六孔板的每孔换液为 1 mL 5% DMEM, 然后在 1 到 5 孔中分别加入 1 mL 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 稀释度的病毒, 留一孔作为阴性对照, 置于 37°C 孵育 2 h, 期间每 15 min 慢摇一次, 使病毒充分吸附。

(4) 配制 1.25% 含 5% FBS 的低熔点琼脂糖凝胶, 置于 37°C 保温。

(5) 移去培养液, 沿着孔的边缘每孔加入 3 mL 配制好的 1.25% 含 5% FBS 的低熔点琼脂糖凝胶, 室温放置等待琼脂糖凝固, 之后放回 37°C、5% CO₂ 恒温培养箱培养。

每 4~5 天或培养基变黄时应追加 1.25% 含 5% FBS 的低熔点琼脂糖凝胶。在第 10 天左右开始有空斑形成, 等空斑长到较大 (约 15~20 天), 肉眼明显可见时按下列步骤挑选空斑并小量扩增:

(1) 从培养板上挑选 5 个空斑, 标上圆圈。

(2) 用 200 μ L 枪头挑出克隆并转入每孔含 2 mL 10% FBS DMEM 的六孔板。

(3) 37°C 清洗病毒 24 小时。

(4) 细胞铺板: 在六孔板每孔加入一定数量的 293 细胞, 控制细胞密度达到 90%。

(5) 移去培养液, 轻轻加入步骤 (3) 中清洗的病毒, 切勿将细胞吹起, 放入 37°C、5% CO₂ 恒温培养箱培养。

(6) 培养细胞直至完全出现 CPE, 按照 3.2.2.3 所述方法收获病毒, 病毒原液储存于 -70°C 备用。

3.2.4.2 Western Blot 检测重组腺病毒的蛋白表达 (1) 取部分挑取的 5 个空斑所扩增的病毒感染 293 细胞, 至细胞完全病变时, 移除培养基, 用 PBS 洗一遍细胞, 每孔细胞加入 80 μ L 的细胞裂解液 (50 mM Tris-HCl (pH8.0), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 100 μ g/mL PMSF (临用前加入)), 用细胞刮刮下细胞, 裂解后的细胞收集到 1.5 mL Eppendorf 管中, 12 000 r/min 离心 10 min。

(2) 取离心后的上清进行 SDS-PAGE 电泳, 然后采用半干转法将蛋白转至硝酸纤维素 (NC) 膜上; 以小鼠抗 HPV18 L1 单克隆抗体 (8.F.324) 为一抗, 羊抗小鼠 IgG 抗体 (Anti-MOUSE IgG (H&L) (GOAT) Antibody IRDye 700 DX) 为二抗, 按 2.2.3.3 所述方法进行 Western Blot 实验, 最后用 Odyssey 远红外影像分析仪检测 HPV18 L1 蛋白。

(3) 保存图像后, 将用过的膜浸入 stripping buffer (β -mercaptoethanol 342 μ L, 20% SDS 5 mL, 1M Tris-HCl pH 6.7 3.125 mL, 加 ddH₂O 至 50 mL) 中, 置 50°C 水箱中 30 min, 间断振摇。然后用含 0.05% Tween-20 的 PBS 洗 3 次, 每次 5 min。后以小鼠抗 β -actin 单抗为一抗, 羊抗小鼠 IgG 抗体 (Anti-MOUSE IgG (H&L)

(GOAT) Antibody IRDye 700 DX) 为二抗, 检测 β -actin 蛋白。

3.2.4.3 重组腺病毒中 HPV18 L1 基因和复制缺陷型的鉴定 (1) 使用 PCR 方法检测重组腺病毒中 HPV18 L1 基因的插入: 取病毒上清 50 μ L 加入 2 μ L 蛋白酶 K (20 mg/mL), 55 $^{\circ}$ C 水浴 1 h, 煮沸 10 min, 取 2 μ L 并稀释 10 倍和 100 倍, 然后以原液、稀释 10 倍、稀释 100 倍三个浓度梯度作为 PCR 反应的模板。

以 316F 和 316R 分别为上下游引物, 按 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 然后 94 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min 进行 25 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 完成后取 1 μ L 反应溶液进行琼脂糖凝胶 (1%) 电泳检测。

(2) 重组腺病毒中 RCA 的检测

实验中使用的腺病毒载体是复制缺陷型的, 其基因组中的腺病毒复制必需基因 E1 缺失。但由于在制备或扩增重组腺病毒时, 重组腺病毒的基因组与 293 细胞的基因组中的 E1 基因的同源序列间可能发生重组, 从而导致重组腺病毒中目的基因被 E1 区代替, 产生复制型腺病毒 (Replication Competent Adenoviruses, RCA)。RCA 可以在不支持腺病毒复制的细胞株中进行病毒的复制和扩增。重组腺病毒疫苗中 RCA 的含量过高是不安全的和不被允许的。为检验所挑取的空斑扩增的病毒中是否含有 RCA, 特设计针对 E1 区的特异性引物, 使用 PCR 方法检测腺病毒载体中 RCA 的存在。

以上述的经蛋白酶 K 消化过的三个浓度梯度的病毒上清为模板, 以含有野生型 Ad5 E1 基因的质粒 pXC-1 为阳性对照的模板, 以 RCF 和 RCR 为上下游引物, 按 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 然后 94 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min 进行 25 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 完成后取 1 μ L 反应溶液进行琼脂糖凝胶 (1%) 电泳检测。

3.2.5 重组腺病毒疫苗的大量扩增和纯化

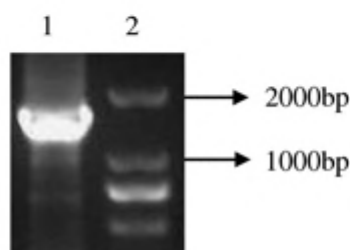
选取蛋白表达量较高且无 RCA 的重组腺病毒 rAd5-HPV18 L1 毒种和周玉柏老师提供的重组 rAd5-HPV16 L1 毒种一起送深圳市源兴生物医药科技有限公司进行大量扩增和纯化。

3.3 实验结果和讨论

3.3.1 PCR 扩增 HPV18L1 基因片段的结果

以含密码子优化的 HPV18 L1 基因的 pMK-RQ 为模板, 316F 为上游引物, 316R 为下游引物进行 PCR 反应, 应该得到大小为 1 524 bp 的 HPV18 L1 片段,

实验结果如图 3-1 所示，与预期一致。



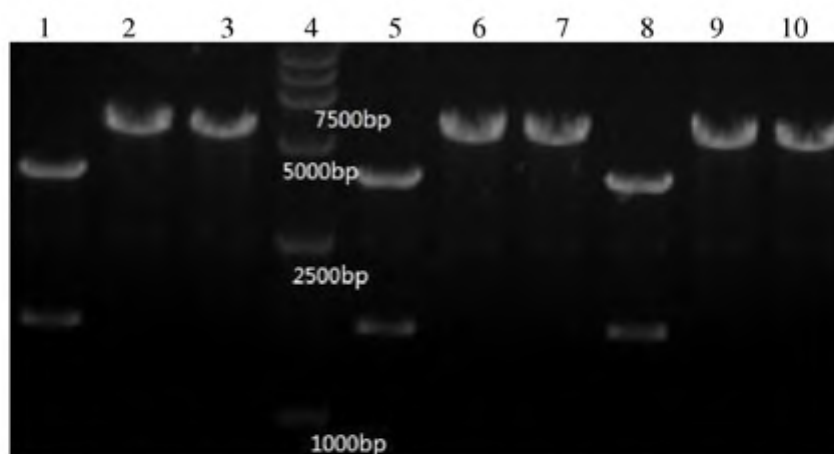
1. HPV18 L1 基因片段
2. DNA Marker 2000

图 3-1 PCR 扩增 HPV18 L1 基因片段

Figure 3-1 Amplification of HPV18 L1 by PCR

3.3.2 重组质粒 pDC316-HPV18 L1 的酶切鉴定结果

使用限制性内切酶 *Bgl* II 和 *Sal* I 对重组质粒 pDC316-HPV18 L1 进行双酶切和单酶切鉴定，双酶切应该得到 1 524 bp 的小片段和约 3 900 bp 的大片段，单酶切应能看到 5 400 bp 左右的片段。实验结果如图 3-2 所示，与预期一致。



- 1-3. 质粒 pDC316-HPV18 L1-1 分别被 *Bgl* II 和 *Sal* I 双酶切、*Bgl* II 单酶切、*Sal* I 单酶切的片段
4. DNA Marker 15000
- 5-7. 质粒 pDC316-HPV18 L1-2 分别被 *Bgl* II 和 *Sal* I 双酶切、*Bgl* II 单酶切、*Sal* I 单酶切的片段
- 8-10. 质粒 pDC316-HPV18 L1-3 分别被 *Bgl* II 和 *Sal* I 双酶切、*Bgl* II 单酶切、*Sal* I 单酶切的片段

图 3-2 重组质粒 pDC316-HPV18 L1 的双酶切和单酶切鉴定

Figure 3-2 Identification of recombinant plasmids pDC316-HPV18 L1 by restriction enzymes digestion

对初步鉴定正确后的质粒的测序结果也表明, HPV18 L1 正确地插入到了质粒 pDC316 中。

3.3.3 重组腺病毒的滴度测定结果

使用 TCID₅₀ (50%组织细胞感染量) 方法测定收获的第三代重组腺病毒的滴度。实验结果以“1”表示阳性, 以“0”表示阴性, 如下表 3-1:

表 3-1 TCID₅₀ 方法测定重组腺病毒的滴度结果

Table 3-1 Titers determination of recombinant adenovirus using TCID₅₀

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
B	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
C	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
D	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
E	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
F	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
G	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

统计每个稀释度的阳性比率, 结果如下表 3-2:

表 3-2 TCID₅₀ 方法测定病毒滴度中每个稀释度的阳性比率

Table 3-2 Positive well ratios of every dilution in TCID₅₀ test

稀释度	阳性比率
10 ⁻¹⁰	0/10=0
10 ⁻⁹	1/10=0.1
10 ⁻⁸	4/10=0.4
10 ⁻⁷	1
10 ⁻⁶	1
10 ⁻⁵	1
10 ⁻⁴	1
10 ⁻³	1

由上表可以看出, 当稀释度为 10⁻⁷ 时出现 100% 阳性, 稀释度为 10⁻¹⁰ 时全部为阴性。滴度可以用 KARBET 统计法精确算出: 对于 100 μL 的稀释液, 滴度为 $T = 10^{1+d \times (s-0.5)}$ 。

此次测定中, $d = \log_{10}$ 稀释度 = 1 (对于 10 倍的稀释度而言), $s =$ 阳性比率之和 (从第一个 10 倍稀释度开始) = 7.5, 因此滴度 $T = 10^8$ (100 μL 病毒保存液中) = 10⁹ TCID₅₀/mL。

已经证实, TCID₅₀ 法测得的滴度 $d = \log_{10}$ 值比标准空斑法高 0.7。将

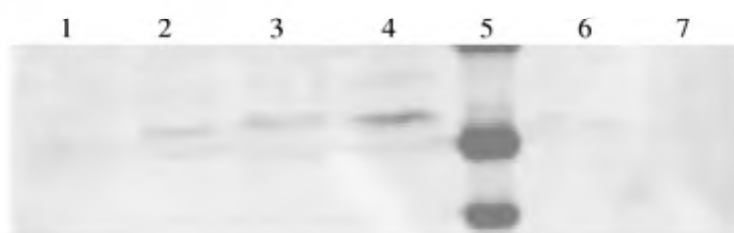
TCID₅₀/mL 转换为 PFU/mL:

$$T = 1 \times 10^9 \text{TCID}_{50}/\text{mL} = 2 \times 10^8 \text{PFU}/\text{mL}$$

因此，第三代重组腺病毒 rAd5-HPV18 L1 的滴度为 2×10^8 PFU/mL。

3.3.4 Western Blot 检测重组腺病毒的蛋白表达

挑取 5 个空斑分别感染 293 细胞，对空斑病毒进行小量扩增后，分别取部分病毒感染 293 细胞，48 h 后，病毒 1 和 2 产生的细胞病变十分明显，细胞大部分脱落，3 和 4 病变明显，细胞脱落不多，病毒 5 产生病变不明显。Western Blot 检测各病毒感染细胞的蛋白表达后，发现病毒 3 蛋白表达量最高（图 3-3），因此后续实验以病毒 3 进行。病毒 3 的进一步的蛋白表达量检测如图 3-4。可以看到，相对于正常的 293 细胞，重组腺病毒 rAd5-HPV18 L1 感染的 293 细胞有明显的 HPV18 L1 表达。



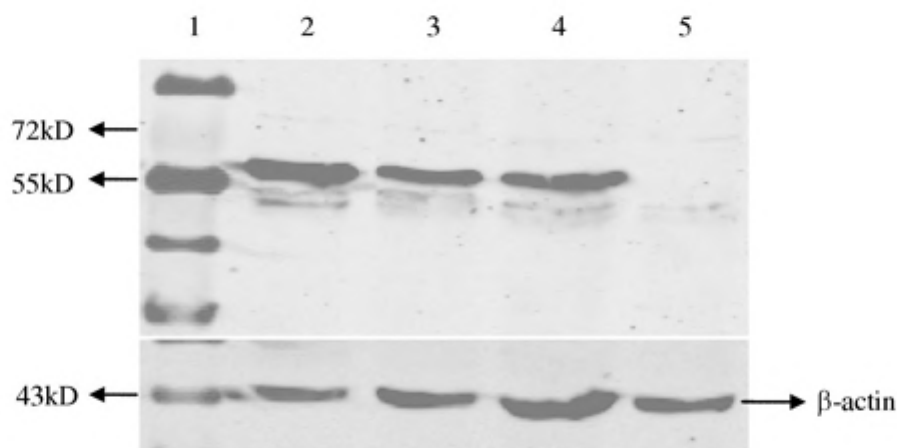
1. 未感染病毒的 293 细胞
2. 病毒 1 感染 293 细胞后的蛋白表达
3. 病毒 2 感染 293 细胞后的蛋白表达
4. 病毒 3 感染 293 细胞后的蛋白表达
5. 预染蛋白彩色 Marker
6. 病毒 4 感染 293 细胞后的蛋白表达
7. 病毒 5 感染 293 细胞后的蛋白表达

图 3-3 空斑筛选的病毒感染细胞蛋白表达比较

Figure 3-3 Protein expression comparison of 5 different virus plaques

3.3.5 重组腺病毒中 HPV18 L1 基因和复制缺陷型的鉴定

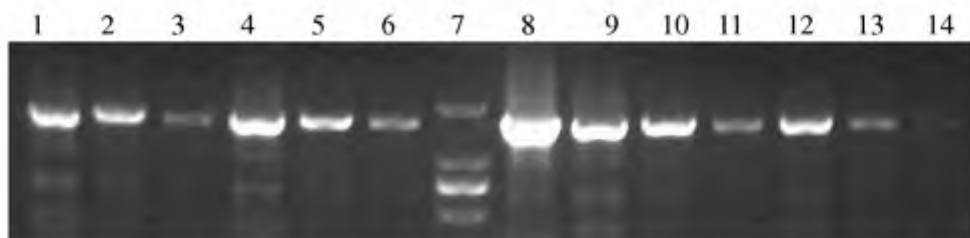
(1) 以经蛋白酶 K 消化过的三个浓度梯度的病毒上清为模板，316F 和 316R 为引物进行 PCR 反应后的电泳结果如图 3-5 所示，可以看到，所有的病毒上清都可以经 PCR 扩增得到大小约为 1 524 bp 的 HPV18 L1 片段，说明 HPV18 L1 基因已经插入到了腺病毒的基因组中。



1. 预染蛋白彩色 Marker
2. 重组腺病毒 rAd5-HPV18 L1 感染 293 细胞裂解上清
3. 质粒 pDC316- HPV18 L1 转染 293 细胞裂解上清
4. 质粒 pDC316- HPV18 L1 转染 293 细胞裂解上清
5. 正常的 293 细胞裂解上清

图 3-4 重组腺病毒 rAd5-HPV18 L1 感染 293 细胞后的 HPV18 L1 表达检测

Figure 3-4 Detection of HPV18 L1 protein by Western Blot in 293 cells infected with rAd5-HPV18 L1.

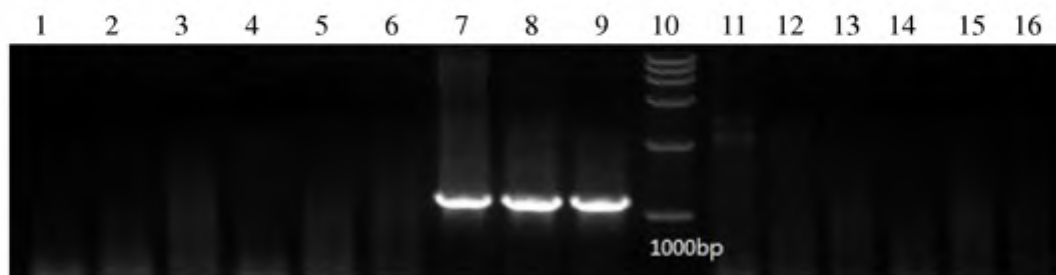


- 1-3. 病毒 rAd5-HPV18 L1-1 上清的原液、10 倍稀释、100 倍稀释的 PCR 产物
- 4-6. 病毒 rAd5-HPV18 L1-2 上清的原液、10 倍稀释、100 倍稀释的 PCR 产物
7. DNA Marker 2000, 从上到下依次为 2000bp、1000bp、750bp、500bp
8. 以 pMK-RQ 为模板的 PCR 产物, 作为阳性对照
- 9-11. 病毒 rAd5-HPV18 L1-3 上清的原液、10 倍稀释、100 倍稀释的 PCR 产物
- 12-14. 病毒 rAd5-HPV18 L1-4 上清的原液、10 倍稀释、100 倍稀释的 PCR 产物

图 3-5 重组腺病毒中 HPV18 L1 基因的检测

Figure 3-5 Detection of HPV18 L1 gene in rAd5-HPV18 L1

(2) 以经蛋白酶 K 消化过的三个浓度梯度的病毒上清为模板, 以 RCF 和 RCR 为引物进行 PCR 反应检测 RCA, 琼脂糖凝胶电泳结果如下图 3-6 所示, 可以看到, 以含有野生型 Ad5 E1 基因的质粒 pXC-1 为模板的阳性对照有大约 1 200 bp 左右的条带出现, 而病毒上清都没有此条带, 说明构建的重组腺病毒为复制缺陷型的, 不含有 RCA。



- 1-3. 病毒 rAd5-HPV18 L1-1 上清的原液、10 倍稀释、100 倍稀释的 PCR 产物
 4-6. 病毒 rAd5-HPV18 L1-2 上清的原液、10 倍稀释、100 倍稀释的 PCR 产物
 7-9. 以 pXC-1 为模板的 PCR 产物，作为阳性对照
 10. DNA Marker 15000，从上到下依次为 15 kb 10 kb 7.5 kb 5 kb 2.5 kb 1 kb
 11-13. 病毒 rAd5-HPV18 L1-3 上清的原液、10 倍稀释、100 倍稀释的 PCR 产物
 14-16. 病毒 rAd5-HPV18 L1-4 上清的原液、10 倍稀释、100 倍稀释的 PCR 产物

图 3-6 重组腺病毒中 RCA 复制型病毒的检测

Figure 3-6 Replication Competent Adenoviruses detection in recombinant adenovirus.

3.4 本章小结

本章中使用 AdMax 腺病毒包装系统成功包装出了含密码子优化型 HPV18 L1 基因的重组腺病毒 rAd5-HPV18 L1，并通过空斑筛选的方法得到了不含 RCA 且能高效地表达 HPV18 L1 的复制缺陷型腺病毒。将重组腺病毒 rAd5-HPV18 L1 毒种和重组 rAd5-HPV16 L1 毒种一起送深圳市源兴生物医药科技有限公司进行大量扩增和纯化，得到了足量的纯度和滴度较高的重组腺病毒疫苗。

第4章 重组DNA疫苗和重组腺病毒疫苗免疫效果的检测

使用疫苗免疫动物后,动物的免疫系统会产生免疫记忆,当使用相同的抗原再次刺激淋巴细胞后,记忆T细胞会迅速分化,产生抗原特异性的辅助性T细胞和毒性T细胞,Th1细胞和毒性T细胞都会分泌 γ -干扰素来增强免疫反应。ELISPOT即是通过检测T细胞分泌的 γ -干扰素来检测疫苗的细胞免疫效果,具有高灵敏度、高通量、单细胞水平等诸多优点,已成为评价疫苗细胞免疫效果的有力工具。

4.1 实验材料

4.1.1 质粒、细胞和菌株

含有HPV L1基因的重组DNA疫苗和重组腺病毒疫苗由本研究构建。含有HPV16 L1基因的p16L1、含有HPV16 L2基因的p16L2和含有HPV18 L1、L2基因的p18sheLL质粒由美国National Cancer Institute-NIH的John T. Schiller博士惠赠,pEGFP由本室保存。293FT细胞购自Invitrogen公司。

4.1.2 主要试剂

脂质体转染试剂Lipofectamine 2000购自Invitrogen公司。QuickShuttle转染试剂购自北京康碧泉生物科技有限公司。DMEM培养基、RPMI-1640培养基、OptiMEM I培养基、胎牛血清FBS、青链霉素均购自Gibco公司。Quick Spot小鼠IFN- γ ELISPOT预包被试剂盒、EZ-Sep™ Mouse 1X易得小鼠淋巴细胞分离液购自深圳达科为生物技术有限公司。其它分析纯试剂由本实验室提供。

实验中设计的多肽由北京中科亚光生物科技有限公司合成。

4.1.3 主要仪器设备

仪器名称	厂家
台式微型离心机	Eppendorf公司
恒温水浴锅	北京博医康实验仪器HX-1050型
恒温摇床	江苏太仓市实验设备厂DDH2-300型
恒温培养箱	上海一恒科技有限公司DHP-9052型

微量移液器	Eppendorf 公司
二氧化碳细胞培养箱	Thermo 公司
生物安全柜	Thermo Fisher Scientific 1389 型
550 型酶标仪	美国 Bio-Rad 公司
ELISPOT 读板机	美国 CTL 公司

4.1.4 实验动物

雌性 4~6 周龄的 C57BL/6 小鼠 (H-2D^b) 购自中国医学科学院医学实验动物研究所, 委托中国中医科学院中药研究所实验动物中心饲养。

4.2 实验方法

4.2.1 使用重组疫苗免疫小鼠

4~6 周龄的雌性 C57BL/6 小鼠 (H-2D^b), 随机分为 7 组, 每组 4 只。将重组 DNA 疫苗 pVR-HPV16 L1 和 pVR-HPV18 L1 以及 pVR 空载体稀释为 1 mg/mL, 重组腺病毒疫苗 rAd5-HPV16 L1 和 rAd5-HPV18 L1 以及 Ad5-EGFP 稀释为 1×10^9 vp/mL, 1×10^{10} vp/mL, 1×10^{11} vp/mL 三个浓度。具体的免疫程序见表 4-1。

表 4-1 重组 DNA 疫苗和重组腺病毒疫苗免疫方案

Table 4-1 Immunization programs of recombinant vaccines

类别	分组	Primer (DNA, Day 0)	Boost (rAd5, Week 9)
对照组	1	pVR 空载体 - 100 μ g	Ad5-EGFP - 10^9 vp
	2	pVR-16 L1 - 100 μ g	rAd5-16 L1 - 10^8 vp
HPV 16 L1	3	pVR-16 L1 - 100 μ g	rAd5-16 L1 - 10^9 vp
	4	pVR-16 L1 - 100 μ g	rAd5-16 L1 - 10^{10} vp
	5	pVR-18 L1 - 100 μ g	rAd5-18 L1 - 10^8 vp
HPV 18 L1	6	pVR-18 L1 - 100 μ g	rAd5-18 L1 - 10^9 vp
	7	pVR-18 L1 - 100 μ g	rAd5-18 L1 - 10^{10} vp

在第 0 天和第 9 周后腿肌肉注射免疫两次, 每只每次 100 μ L, 第二次加强免疫后一周对小鼠眼球采血, 然后用颈椎脱臼法将其处死, 分离血清和脾淋巴细胞, 检测免疫反应。

4.2.2 ELISPOT 实验刺激物的准备

ELISPOT 检测到的 IFN- γ 等细胞因子不是事先就存在的,而是在检测的过程中,淋巴细胞被加入的刺激物刺激而分泌出来的。斑点的强弱和数量反映了细胞对刺激物的反应能力和分泌细胞因子的能力,这是体现细胞免疫反应的最重要的功能指标。如果刺激物不能形成有效的刺激,即使细胞状态再好,那也不会出现斑点,因此刺激物的种类与质量直接关系到 ELISPOT 结果的好坏。

实验中阳性对照使用的是非特异性刺激物,本研究中使用的是通常用来刺激小鼠和大鼠淋巴细胞的伴刀豆蛋白 A (ConA)。

特异性刺激物中最好的是 T 细胞表位肽,因为这些表位肽不需要抗原提呈细胞 (APC) 的内化和加工,可以直接和 MHC 分子结合后被 T 细胞表面的 T 细胞抗原受体 (T cell receptor, TCR) 识别,而且由于每一条 T 细胞表位肽都有相对应的 MHC 分子,因此不确定因素少,实验结果非常明确。

由于目前并没有 HPV16 L1 和 HPV18 L1 的 T 细胞表位肽的相关文献报道,选择合成一系列的重叠多肽库则经济成本太高,因此本研究选择通过生物信息学的方法来预测 HPV16 L1 和 HPV18 L1 的 T 细胞表位肽。

使用网站 http://www.bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind/ 和 <http://www.syfpeithi.de/home.htm> 提供的算法^[41],选择 MHC 限制为 H-2D^b,分别预测 HPV16 L1 和 HPV18 L1 的 T 细胞表位肽,选择两个网站预测结果排名靠前的 T 细胞表位肽,综合分析比较后对 HPV16 L1 和 HPV18 L1 各选择 8 条多肽委托北京中科亚光生物科技有限公司合成,纯度为 95% 以上。

4.2.3 ELISPOT 检测细胞免疫反应

第二次加强免疫后一周对小鼠眼球采血,4℃ 静置 3~5 h,自然凝血,3 000 rpm 离心 5 min,将血清取出分装后于 -70℃ 冻存储用。然后用颈椎脱臼法将其处死,分离脾淋巴细胞,检测细胞免疫反应。

4.2.3.1 小鼠脾淋巴细胞的分离 (1) 断颈处死小鼠,浸入 75% 的乙醇中浸泡 1-2 分钟。

(2) 在生物安全柜中使小鼠左侧暴露,用镊子夹起小鼠的腹部外皮,小心剪开,可见靠近脊柱处腹壁下有暗红色长条状脏器,即为脾脏,再剪开小鼠的腹腔,用镊子取出小鼠脾脏。

(3) 在 35 mm 培养皿中加入 3-4 mL EZ-Sep™ Mouse 1X 淋巴细胞分离液,在 200 目细胞筛网上用注射器活塞轻轻研磨小鼠脾脏,使得分散的单细胞透过细

胞筛网进入淋巴细胞分离液中。

(4) 把悬有脾脏细胞的分离液转移到 15 mL 离心管中，盖紧管盖。等所有小鼠都完成取脾后，轻轻覆盖上大约 0.5 mL 的 1640 培养基。

(5) 800 g 离心 30 分钟。离心结束后淋巴细胞会漂浮上来，在 1640 覆盖层下面聚集。管中液体基本分为三层，上层为 1640 培养基，中间为白色的淋巴细胞层，下层为淋巴细胞分离液。

(6) 小心吸出淋巴细胞层，加入 10 mL 1640 培养基洗涤一次，250 g 离心 10 分钟。倾倒上清液，然后加入 5 mL 含双抗的 10% FBS 1640 培养基重悬细胞，并进行细胞计数。

4.2.3.2 细胞铺板及刺激 (1) 板的活化：将试剂盒中用铝膜密封包装的预包被板放入生物安全柜，然后撕开包装。每孔加入 200 μ L 的 RPMI-1640 培养基，室温静置 10 分钟左右，倾倒。

(2) 细胞铺板：用含双抗的 10% FBS 1640 培养基把细胞稀释到 3×10^6 个/mL 按照事先写好的实验卡片的安排，将稀释好的细胞加入到各孔中，每孔 100 μ L。细胞在孔中的分布要尽量均匀，加入细胞之后，不要再震动或者拍击 ELISPOT 板。

(3) 加刺激物：把 ConA 和多肽配成 10 \times 工作液，每孔加入 10 μ L 相应刺激物。ConA 的终浓度为 25 μ g/mL，只加单独一条肽的孔中多肽终浓度为 8 μ g/mL，加入 8 条肽组成的肽池的孔中每条多肽的终浓度为 1.5 μ g/mL。负对照孔不加任何刺激物。加完刺激物后不要再拍击 ELISPOT 板。

(4) 静置培养：加完所有的样品之后，盖板上盖，放入 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 恒温培养箱，培养 18 h。注意：碰撞会引起细胞移位，造成斑点模糊、拖尾。在整个培养过程中应避免移动、碰撞培养板，并尽量减少开关培养箱的次数。

4.2.3.3 培养后的操作 (1) 裂解细胞：倾倒孔内的细胞及培养基。每孔加入 200 μ L 冰冷的去离子水，4 $^{\circ}$ C 冰箱冰浴 10 分钟（低渗法裂解细胞）。

(2) 洗板：每孔用 200 μ L 1 \times Washing buffer 洗涤 5-7 次，每次 30~60 秒。最后一次，在吸水纸上扣干。

(3) 检测抗体孵育：每孔加入 100 μ L 稀释好的生物素标记的抗体，37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。

(4) 洗板：每孔用 200 μ L 1 \times Washing buffer 洗涤 5 次，每次 30~60 秒。最后一次，在吸水纸上扣干。

(5) 亲和素孵育：每孔加入 100 μ L 稀释好的酶标亲和素，37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。

(6) 洗板：每孔用 200 μ L 1 \times Washing buffer 洗涤 5 次，每次 30~60 秒。最

后一次，在吸水纸上扣干。

(7) 显色：照试剂配制说明，配好 AEC 显色液。每孔加入 100 μL 的显色液，室温避光静置 15-45 分钟（在 20-25 $^{\circ}\text{C}$ ，显色 25 分钟较合适）。

(8) 待斑点生长到适合的大小之后，以去离子水洗涤 2 遍，终止显色过程。将板倒扣在吸水纸上，拍干细小的水珠，之后取下保护层，放在通风的地方，室温静置 10-30 分钟，让膜自然晾干。

(9) 斑点计数，做统计分析。

4.2.4 ELISPOT 实验数据处理及作图

对 ELISPOT 读板机输出的数据进行检验，对错误数据修正后，使用 Origin8.5 软件对所得各组的斑点数据进行 t 检验和单因素方差分析（one-way ANOVA），在显著性水平 $\alpha=0.05$ 上检验各免疫组与对照组、HPV16 L1 疫苗免疫组之间及 HPV18 L1 疫苗免疫组之间的数据有无明显差异，以各组数据的均值 Mean \pm SEM 为 Y 轴，SEM 为均值的标准误，以各组编号为 X 轴作图。

4.2.5 假病毒中和滴定检测体液免疫

4.2.5.1 HPV16 型和 HPV18 型假病毒的包装 培养 293FT 细胞所用的培养基为含 10% FBS 和 1% 双抗的 DMEM 培养基，培养条件为 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 恒温培养箱。按以下步骤转染 293FT 细胞：

(1) 转染前，传代 293 细胞于 25 cm^2 细胞培养瓶，每瓶细胞约 2×10^6 。

(2) 配制转染液：A 液：将质粒稀释到 200 μL 无菌生理盐水中，每种质粒 5 μg （HPV16 假病毒需要 p16L1、p16L2、pEGFP 三种质粒；HPV18 假病毒需要 p18sheLL、pEGFP 二种质粒）；B 液：将 20 μl Quickshuttle 转染试剂稀释到 200 μL 无菌生理盐水中。

(3) 合并上述 A、B 两溶液并混匀，然后直接加入到细胞培养基中，轻摇细胞瓶以混匀。于 37 $^{\circ}\text{C}$ ，5% CO_2 孵育 48 h。

4.2.5.2 HPV16 型和 HPV18 型假病毒的收获 (1) 转染 48 h 后，胰酶消化并收集细胞，如果有悬浮状态的细胞则通过 210 g，5 min，离心收集。使用 10 mL DMEM 完全重悬细胞，尽量收集瓶中细胞。

(2) 离心收集细胞，弃上清，用 0.5 ml DPBS-Mg 重悬细胞，转至带螺口盖的 1.5 mL EP 管中，用 0.5 mL DPBS-Mg 冲洗原管，将冲洗液加入硅化离心管中。210 g，5 min，离心收集细胞。

(3) 用与沉淀等体积的裂解缓冲液（DPBS-Mg 补加 0.4% Brij58，0.2%

Benzonase, 临用前配制) 重悬细胞。将细胞裂解物 37°C 孵育至少 16 h, 在孵育的头 2 h 应上下倒置混合数次。上述操作及所用试剂应保证无菌。

(4) 将成熟的细胞裂解物置冰上 5 min 预冷。

(5) 加入一定体积的 5 M NaCl 使盐浓度达到 850 mM。冰上孵育 10-20 min。

(6) 5 000 g 离心 10 min。

(7) 将上清转移至新 EP 管中, -70°C 保存。

4.2.5.3 假病毒中和滴定 (1) 预先铺 293FT 细胞于 96 孔板中, 每孔细胞数为 2×10^4 个/100 μL , 置于 37°C、5% CO_2 恒温培养箱培养 8 h 以上。

(2) 将 HPV16 和 HPV18 假病毒使用无血清 DMEM 分别按照 500, 2 500, 5 000 的稀释倍数进行稀释。

(3) 将 4.2.3 得到的 7 组血清使用无血清 DMEM 分别按 20, 40, 80, 160, 320 的稀释倍数进行稀释。

(4) 分别取 60 μL 血清和相应的 60 μL 假病毒混合均匀后 4°C 放置 1 h。

(5) 然后吸取 100 μL 的假病毒血清混合物(或培养基)贴壁缓缓加入预先已铺好细胞的培养板对应孔中, 设置只加假病毒的阳性对照及只加培养基的阴性对照, 轻拍培养板四周混匀, 置于 37°C、5% CO_2 恒温培养箱培养。

(6) 72 h 后置于荧光显微镜下观察结果, 感染抑制率达到 50% 的血清为阳性血清。

4.3 实验结果和讨论

4.3.1 体液免疫结果

4.3.1.1 HPV16 型假病毒的中和滴定结果

各 HPV16 L1 疫苗免疫组血清中和滴度如表 4-2。

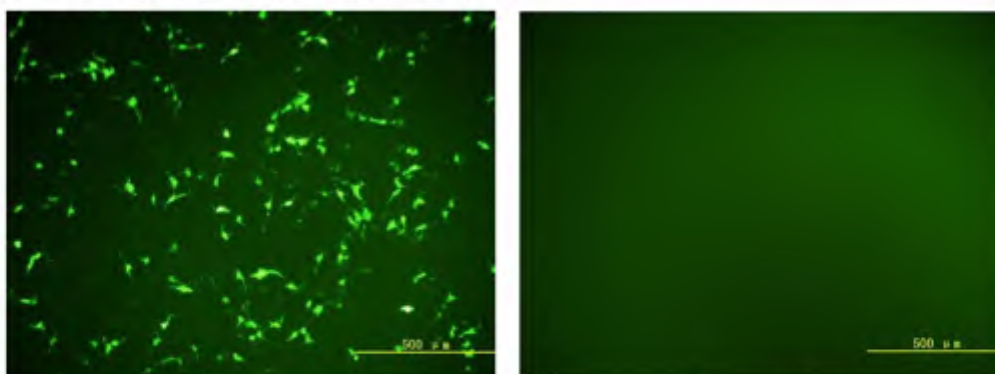
表 4-2 HPV16 L1 疫苗免疫组血清中和滴度

Table 4-2 HPV16 pseudovirus neutralization assay results

组别	16 型假病毒的血清中和滴度	免疫剂量
1	阴性	Ad5-EGFP - 10^9 vp
2	≥ 320	10^8 vp
3	≥ 640	10^9 vp
4	≥ 640	10^{10} vp

结果表明, 对于 10^4 稀释的 HPV16 型假病毒, 第 1 组对照组的 40 倍稀释血清对于 HPV16 型假病毒完全没有中和活性 (图 4-2 a), 加强免疫时注射 10^8 vp

rAd5-HPV16 L1 的第 2 组 320 倍稀释的血清对假病毒的感染抑制率达到 50%以上 (图 4-2 b), 注射 10^9 vp rAd5-HPV16 L1 的第 3 组 640 倍稀释的血清对假病毒的感染抑制率达到 50%以上 (图 4-2 c), 注射 10^{10} vp rAd5-HPV16 L1 的第 4 组 640 倍稀释的血清对假病毒的感染抑制率达到 50%以上 (图 4-2 d)。HPV16 型假病毒(10^4 稀释)的阳性和阴性对照见图 4-1。

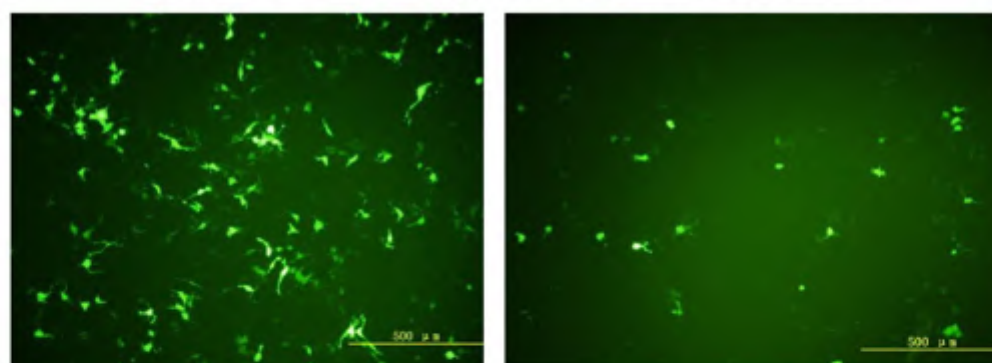


(a) 阳性对照

(b) 阴性对照

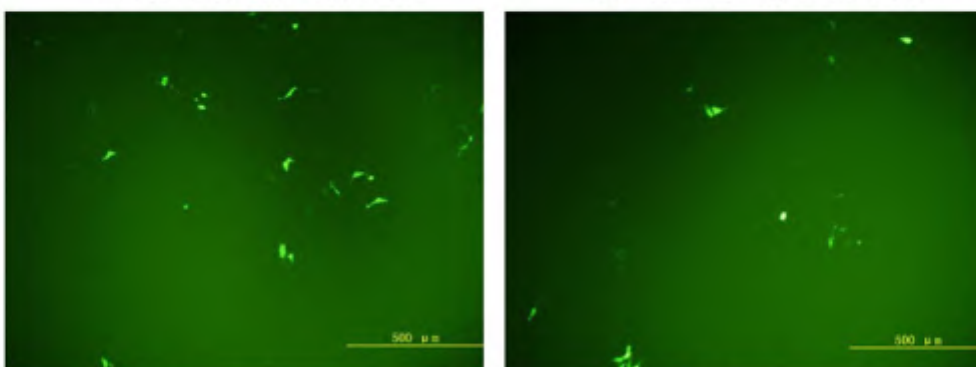
图 4-1 HPV16 型假病毒(10^4 稀释)的阳性和阴性对照

Figure 4-1 Positive and negative control of HPV16 pseudovirus



(a) 第 1 组血清 40 倍稀释

(b) 第 2 组血清 320 倍稀释



(c) 第 3 组血清 640 倍稀释

(d) 第 4 组血清 640 倍稀释

图 4-2 第 1、2、3、4 组血清的 HPV16 型假病毒(10^4 稀释)中和滴定

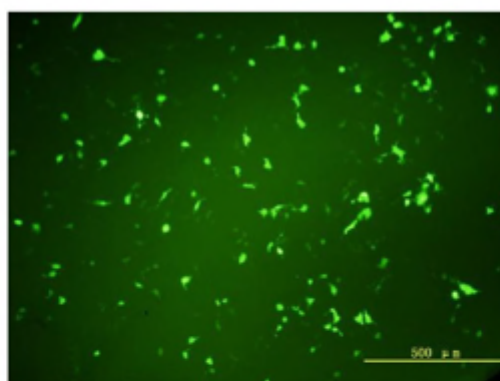
Figure 4-2 HPV16 pseudovirus neutralization assay results of group 1.2.3.4

4.3.1.2 HPV18 型假病毒的中和滴定结果 对于 10^4 稀释的 HPV18 型假病毒, 阳性和阴性对照见图 4-3。第 1 组对照组的 40 倍稀释血清对于 HPV18 型假病毒完全没有中和活性 (图 4-4 a), 加强免疫时注射 10^8 vp rAd5-HPV18 L1 的第 5 组 320 倍稀释的血清对假病毒的感染抑制率达到 50%以上 (图 4-4 b), 注射 10^9 vp rAd5-HPV18 L1 的第 6 组 640 倍稀释的血清对假病毒的感染抑制率达到 50%以上 (图 4-4 c), 注射 10^{10} vp rAd5-HPV18 L1 的第 7 组 640 倍稀释的血清对假病毒的感染抑制率达到 50%以上 (图 4-4 d), 因此各 HPV18 L1 疫苗免疫组血清中和滴度如表 4-3。

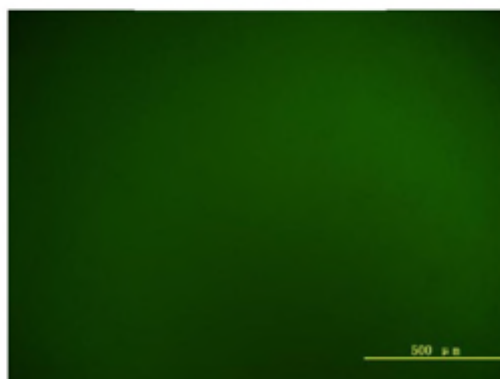
表 4-3 HPV18 L1 疫苗免疫组血清中和滴度

Table 4-3 HPV18 pseudovirus neutralization assay results

组别	18 型假病毒的血清中和滴度	免疫剂量
1	阴性	Ad5-EGFP - 10^9 vp
5	≥ 320	10^8 vp
6	≥ 640	10^9 vp
7	≥ 640	10^{10} vp



(a) 阳性对照



(b) 阴性对照

图 4-3 HPV18 型假病毒(10^4 稀释)的阳性和阴性对照

Figure 4-3 Positive and negative control of HPV18 pseudovirus

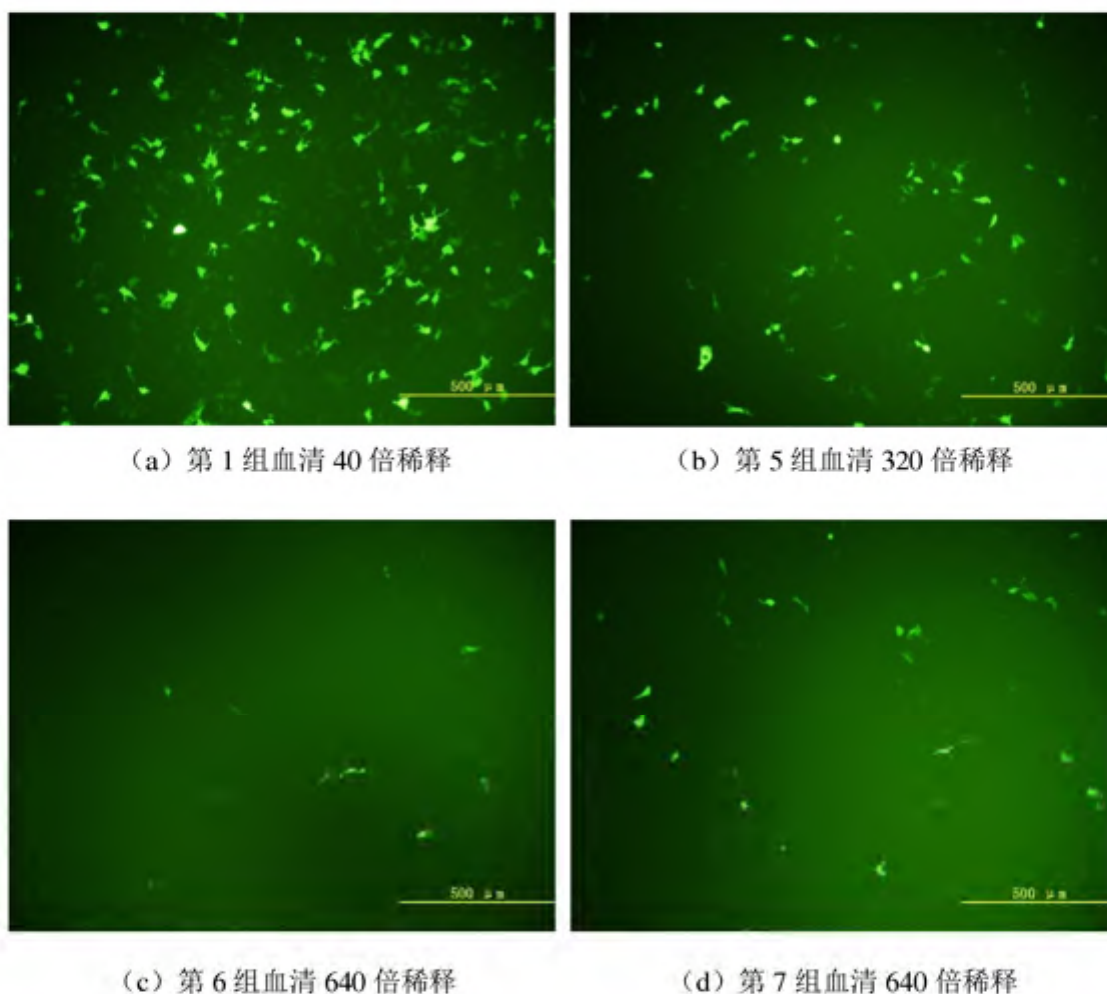


图4-4 第1、5、6、7组血清的HPV16型假病毒(10^4 稀释)中和滴定
Figure 4-4 HPV16 pseudovirus neutralization assay results of group 1,5,6,7

4.3.1.3 不同剂量腺病毒疫苗体液免疫效果的比较 由图 4-5 可以看出, 使用相同稀释倍数 320 倍稀释血清时, 注射 10^8 vp 重组腺病毒疫苗 rAd5-HPV16 L1 的第 2 组血清对 HPV16 型假病毒的感染抑制率要明显低于注射 10^9 vp 和 10^{10} vp 重组腺病毒的第 3 组和第 4 组血清; 注射 10^8 vp 重组腺病毒疫苗 rAd5-HPV18 L1 的第 5 组血清对 HPV18 型假病毒的感染抑制率要明显低于注射 10^9 vp 和 10^{10} vp 重组腺病毒的第 6 组和第 7 组血清。不同剂量的腺病毒疫苗注射入小鼠肌肉内后, 高剂量腺病毒表达的 HPV L1 比较多, 因此会刺激 B 细胞产生更多的抗体。这个实验结果意味着要获得理想的体液免疫效果, 至少要注射 10^9 vp 的重组腺病毒疫苗。

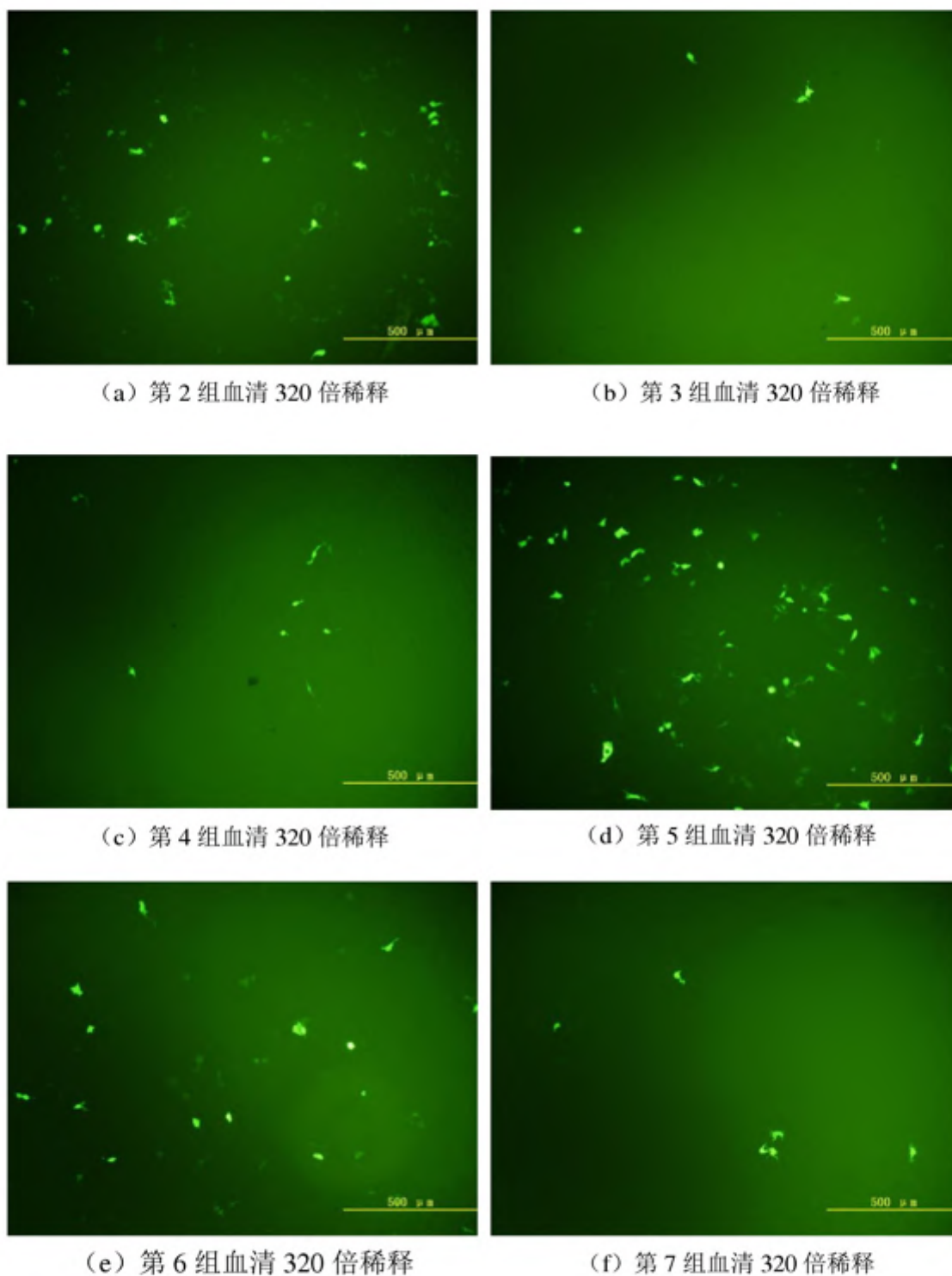


图 4-5 不同剂量腺病毒疫苗免疫组的血清中和滴度比较

Figure 4-5 HPV pseudovirus neutralization assay results of different dosage

4.3.2 T 细胞表位肽预测结果

ELISPOT 实验所需要的 HPV16 L1 和 HPV18 L1 的 T 细胞表位肽为本研究通

过生物信息学的方法预测得到的。

T细胞表位肽的使用有严格的MHC限制性，C57BL/6小鼠的MHC I类抗原为H-2D^b，因此预测时选择为H-2D^b。

使用网站 http://www.bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind/ (简记为 Bimas) 和 <http://www.syfpeithi.de/home.htm> (简记为 Syf) 提供的算法，分别预测长度为9肽和10肽的HPV16 L1和HPV18 L1的T细胞表位肽，综合两个网站的数据进行分析比较后，对于HPV16 L1和HPV18 L1各确定了8条T细胞表位肽，结果如表4-4和4-5。

表4-4 HPV16 L1的T细胞表位肽预测结果

Table 4-4 T cell epitope prediction of HPV16 L1

Number	Position	Sequence	Length	Score	Source site
16-1	53	KKPNNKIL	9	600	Bimas
16-2	139	AGVDNRECI	9	858	Bimas
16-3	212	TLQANKSEV	9	20	Syf
16-4	266	AVGENVPDDL	10	26	Syf
16-5	304	AQIFNKPYWL	10	25	Syf
16-6	355	YKNTNFKEYL	10	26	Syf
16-7	391	IHSMNSTIL	9	220	Bimas
16-8	446	FWEVNLKEKF	10	25	Syf

表4-5 HPV18 L1的T细胞表位肽预测结果

Table 4-5 T cell epitope prediction of HPV18 L1

Number	Position	Sequence	Length	Score	Source site
18-1	4	WRPSDNTVYL	10	600	Bimas
18-2	19	ARVVNTDDYV	10	26	Syf
18-3	54	AGGGNKQDI	9	286	Bimas
18-4	76	QLPDPNKFGL	10	600	Bimas
18-5	134	AATSNVSEDV	10	23	Syf
18-6	258	RHFWRNRAGTM	10	21	Syf
18-7	304	SQLFNKPYWL	10	25	Syf
18-8	392	IHSMNSSIL	9	220	Bimas

4.3.3 细胞免疫结果

4.3.3.1 DNA疫苗和不同剂量重组腺病毒疫苗的免疫结果 小鼠免疫实验中，在分

别对第 2、3、4 组和对第 5、6、7 组免疫了 100 μg 的 pVR-16 L1 和 pVR-18 L1 后, 加强免疫时对第 2、3、4 组分别注射了 10^8vp 、 10^9vp 、 10^{10}vp 的重组腺病毒疫苗 rAd5-HPV16 L1, 对第 5、6、7 组分别注射了 10^8vp 、 10^9vp 、 10^{10}vp 的重组腺病毒疫苗 rAd5-HPV18 L1。

ELISPOT 实验时对第 2、3、4 组使用的是表 4-4 列出的 8 条 T 细胞表位肽组成的肽池 (每条肽终浓度 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$); 对第 5、6、7 组使用的是表 4-5 列出的 8 条 T 细胞表位肽组成的肽池 (每条肽终浓度 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。ELISPOT 检测结果如下:

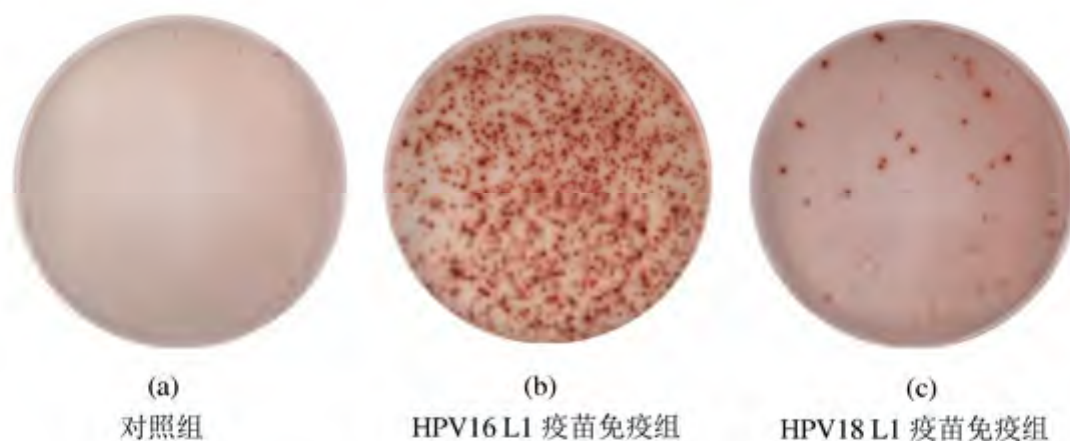


图 4-6 ELISPOT 检测结果的斑点照片

Figure 4-6 Photos of ELISPOT results

由表 4-6 和图 4-7 可以看出, 使用 DNA 疫苗 pVR-HPV16 L1 和重组腺病毒疫苗 rAd5-HPV16 L1 免疫的第 2、3、4 组都表现出了显著的细胞免疫反应, 与对照组相比具有明显的差异 (LSD-t 检验, $P < 0.05$), 这表明 pVR-HPV16 L1 和 rAd5-HPV16 L1 联合免疫可以诱导小鼠产生 HPV16 L1 特异性的细胞免疫反应。

HPV16 L1 装配形成的 VLPs 已经作为宫颈癌的预防性疫苗上市, 主要是以 L1 作为靶抗原诱导机体产生特异性中和抗体达到预防相应型别 HPV 感染的效果, 以 L1 作为治疗性疫苗的研究很少, Bellone^[30]等的研究证明了 HPV16 L1 可以产生和 HPV16 E7 几乎相同的细胞免疫效果。我们的实验结果也表明 HPV16 L1 可以产生强烈的细胞免疫反应, 这为研制以 L1 为靶抗原的治疗性疫苗奠定了基础。

表 4-6 HPV L1 疫苗免疫的 ELISPOT 结果

Table 4-4 ELISPOT results of different HPV L1 vaccines

Group	Spots per 3×10^5 splenocytes
1	0.8 ± 0.3
2	482.3 ± 52.8
3	473.3 ± 49.3
4	418.4 ± 38.6
5	13.3 ± 6.8
6	12.3 ± 2.6
7	14.6 ± 3.9

注：表中数据为每个孔的阳性斑点数，以 Mean \pm SEM 显示。

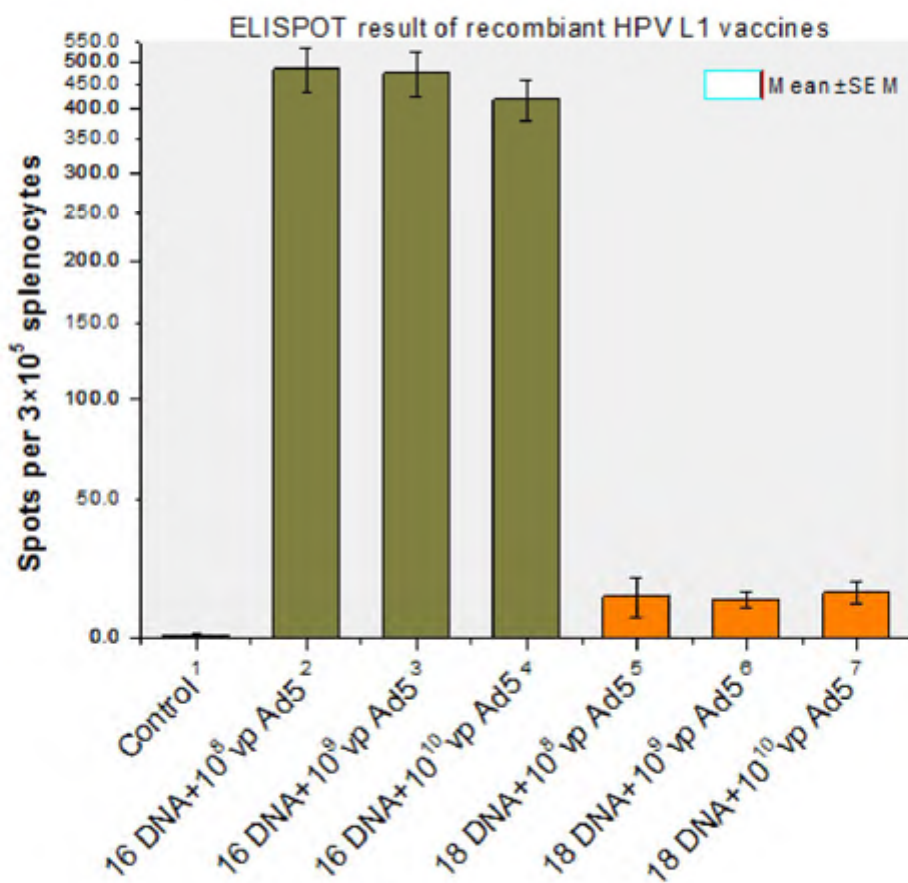


图 4-7 HPV L1 疫苗免疫的 ELISPOT 结果

Figure 4-7 ELISPOT results of different HPV L1 vaccines

不过，使用 DNA 疫苗 pVR-HPV18 L1 和重组腺病毒疫苗 rAd5-HPV18 L1 免疫的第 5、6、7 组只是略高于对照组，虽然跟对照组相比具有差异性（LSD-t 检验， $P < 0.05$ ），但是 ELISPOT 检测到的细胞免疫反应较弱。这可能有几方面的原因，首先，HPV18 L1 的免疫原性要弱于 HPV16 L1；其次，针对 HPV18 L1 的 T 细胞表位肽预测不准确，现阶段预测最多只能达到大约 70% 的准确率，通常只有

30%~50%，如果预测不准确，刺激物不能形成有效的刺激，即使细胞状态再好，那也不会出现斑点。同时我们也发现第 2、3、4 组之间以及第 5、6、7 组之间都没有显著的差异（t 检验， $P < 0.05$ ），这表明分别注射 10^8 vp、 10^9 vp、 10^{10} vp 的重组腺病毒疫苗的免疫效果没有差别，这可能意味着 10^8 vp 量的重组腺病毒疫苗对于小鼠已经足够产生较强的细胞免疫反应。

4.3.3.2 T 细胞表位肽的筛选 (1) 为确定根据网站算法预测的 HPV16 L1 8 条 T 细胞表位肽中可以刺激 T 细胞分泌 IFN- γ 的多肽（表位），选择第 4 组中 2 只小鼠的脾淋巴细胞分别加入表 4-4 中 HPV16 L1 的每条多肽，对每条肽设置一个复孔；进行 ELISPOT 检测，结果见表 4-7 和图 4-8。

表 4-7 HPV16 L1 T 细胞表位的确定

Table 4-7 T cell epitope definition of HPV16 L1

Number	Sequence	Score	Source site	Spots per 3×10^5 splenocytes
16-1	KKPNNKIL	600	Bimas	2.5 ± 0.9
16-2	AGVDNRECI	858	Bimas	467.8 ± 67.5
16-3	TLQANKSEV	20	Syf	1.0 ± 0.7
16-4	AVGENVPDDL	26	Syf	2.3 ± 0.9
16-5	AQIFNKPYWL	25	Syf	4.5 ± 0.9
16-6	YKNTNFKEYL	26	Syf	169.5 ± 45.9
16-7	IHSMNSTIL	220	Bimas	1.3 ± 0.6
16-8	FWEVNLKEKF	25	Syf	1.5 ± 0.9

注：表中数据为每个孔的阳性斑点数，以 Mean \pm SEM 显示。

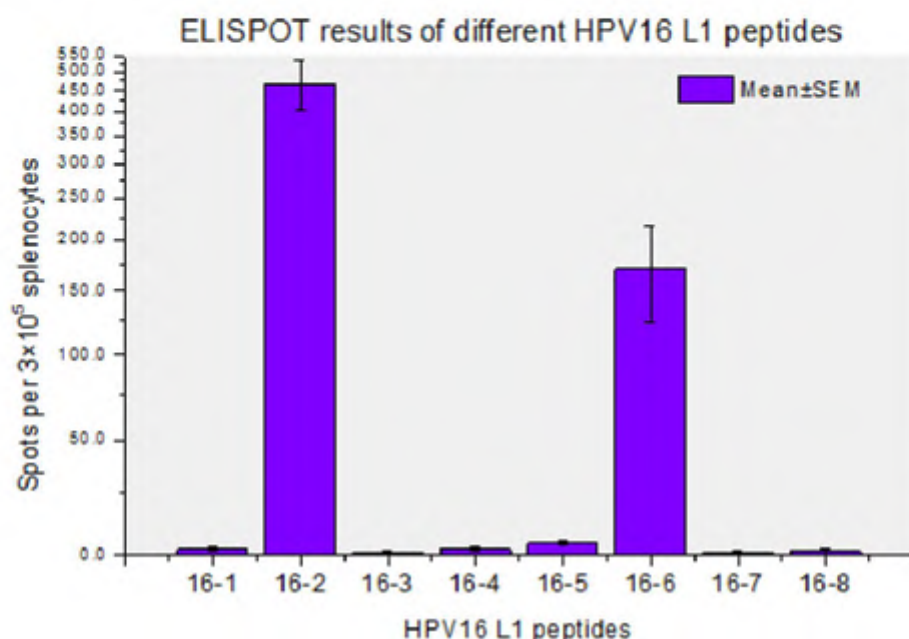


图 4-8 HPV16 L1 T 细胞表位的确定

Figure 4-8 T cell epitope definition of HPV16 L1

由上表 4-7 和图 4-8 可以看出, 编号为 16-2 的多肽刺激产生了最多的斑点, 并且与 8 条肽组成的肽池的刺激效果没有明显差异, 因此可以确定 16-2 即 HPV16 L1₁₃₉₋₁₄₇ (AGVDNRECI) 为 HPV16 L1 的 T 细胞表位; 编号为 16-6 的肽也产生可较多的斑点, 但明显少于 16-2, 因此 16-6 即 HPV16 L1₃₅₅₋₃₆₄ (YKNTNFKEYL) 可能是 HPV16 L1 的一个较弱的 T 细胞表位; 其它的多肽与阴性对照组相比没有明显差异, 认为没有刺激效果。

(2) 为确定根据网站算法预测的 HPV18 L1 8 条 T 细胞表位肽中可以刺激 T 细胞分泌 IFN- γ 的多肽 (表位), 选择第 7 组中 2 只小鼠的脾淋巴细胞分别加入表 4-5 中 HPV18 L1 的每条多肽, 对每条肽设置一个复孔; 进行 ELISPOT 检测, 结果见表 4-8 和图 4-9。

由表 4-8 和图 4-9 可以看出, 预测得到的 HPV18 L1 的 8 条多肽刺激产生的斑点都不多, 其中 18-3 和 18-7 两条多肽相对于其它多肽来说有一定的刺激效果, 并且与 HPV18 L1 的 8 条多肽组成的肽池的刺激效果没有明显差异, 可以推测出 HPV18 L1 的 8 条多肽组成的肽池中起作用的就是 18-3 (AGGGNKQDI) 和 18-7 (SQLFNKPYWL) 两条多肽, 但由于检测到的细胞免疫反应太过于微弱, 我们认为这两条多肽并不是 HPV18 L1 的 H-2D^b 限制性 T 细胞表位; 其余的多肽与阴性对照组相比没有明显差异, 认为没有刺激效果。

表 4-8 HPV18 L1 T 细胞表位的确定

Table 4-8 T cell epitope definition of HPV18 L1

Number	Sequence	Score	Source site	Spots per 3×10 ⁵ splenocytes
18-1	WRPSDNTVYL	600	Bimas	1.5±0.3
18-2	ARVVNTDDYV	26	Syf	0.5±0.5
18-3	AGGGNKQDI	286	Bimas	12.5±4.3
18-4	QLPDPNKFGL	600	Bimas	2.8±0.5
18-5	AATSNVSEDV	23	Syf	1.3±0.6
18-6	RHFWRNRAGTM	21	Syf	1.8±0.6
18-7	SQLFNKPYWL	25	Syf	12.0±3.2
18-8	IHSMNSSIL	220	Bimas	3.8±0.9

注: 表中数据为每个孔的阳性斑点数, 以 Mean±SEM 显示。

HPV18 L1 的 18-3 和 18-7 两条多肽的效果不好, 不能认为是 HPV18 L1 的 H-2D^b 限制性 T 细胞表位, 原因可能有两点, 第一可能是因为重组 pVR-HPV18 L1 和 rAd5-HPV18 L1 疫苗细胞免疫效果不好, 这样即使使用正确的 T 细胞表位肽

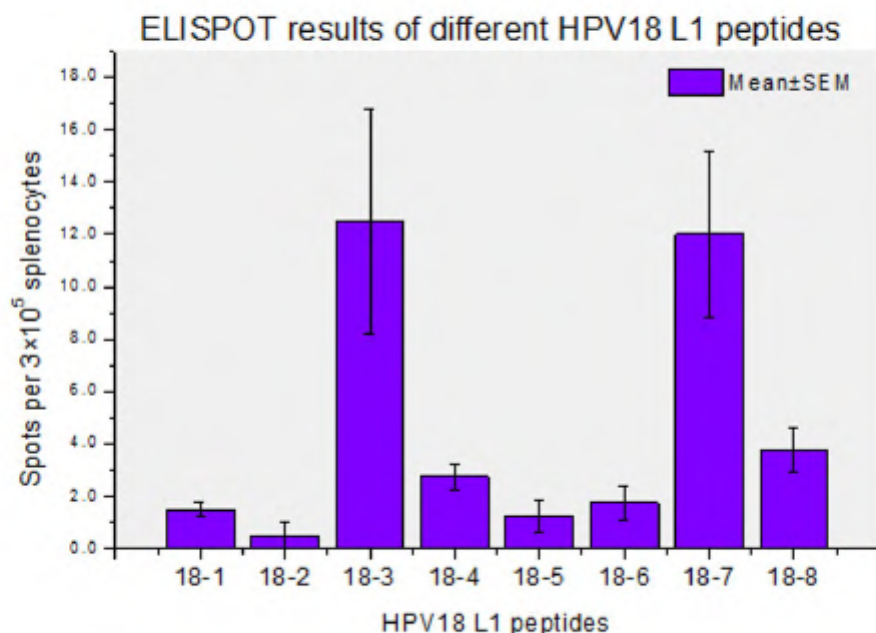


图 4-9 HPV18 L1 T 细胞表位的确定

Figure 4-9 T cell epitope definition of HPV18 L1

也不能产生好的细胞免疫反应；第二可能是预测的结果不够准确，因为就 HPV16 L1 的编号为 16-1 的肽来看，Bimas 预测分值为 600，但实际也基本没有刺激效果，而 HPV18 L1 的编号为 18-1 和 18-4 的肽分值都为 600，其实际效果却不如 18-3 和 18-7，因此预测结果不可全信。

对此我们认为应该使用涵盖 HPV18 L1 全序列的肽库来作为刺激物，或者再次合成部分多肽，以 HPV18 L1 刺激效果较好的几条多肽向两边分别延伸几个氨基酸，形成 15~20 个氨基酸的多肽，再验证刺激效果。

4.4 本章小结

本章使用制备的基于 HPV16 和 18 L1 的重组 DNA 疫苗和重组腺病毒疫苗分别免疫小鼠，并使用假病毒中和滴定检测体液免疫效果，使用 ELISPOT 方法检测细胞免疫效果。结果发现：

(1) 加强免疫时注射 10^8 vp 腺病毒疫苗的第 2、5 组血清中和滴度达到 320 以上，注射 10^8 vp 或 10^9 vp 腺病毒疫苗的第 3、4、6、7 组血清中和滴度达到 640 以上。要获得理想的体液免疫效果，至少要注射 10^9 vp 的重组腺病毒疫苗。

(2) 使用 pVR-HPV16 L1 和 rAd5-HPV16 L1 免疫的第 2、3、4 组表现出了强烈的细胞免疫反应，使用 pVR-HPV18 L1 和 rAd5-HPV18 L1 免疫的第 5、6、7 组可能由于 T 细胞表位肽预测不正确而只检测到了较弱的细胞免疫反应。实验还发现，HPV16 L1₁₃₉₋₁₄₇ (AGVDNRECI) 为 HPV16 L1 的 H-2D^b 限制性 T 细胞表

位；HPV16 L1₃₅₅₋₃₆₄ (YKNTNFKEYL) 可能是 HPV16 L1 的一个较弱的 H-2D^b 限制性 T 细胞表位。HPV18 L1 的 T 细胞表位还有待进一步的筛选。

结 论

本文中通过分子生物学、细胞生物学等方法分别构建含有 HPV16 L1 和 HPV18 L1 基因的重组 DNA 疫苗和重组腺病毒疫苗, 并进行大量扩增和纯化。然后用制得的重组 DNA 疫苗和重组腺病毒疫苗免疫小鼠, 通过酶联免疫斑点法 (ELISPOT) 和假病毒中和滴定实验检测疫苗的免疫效果, 并对合成的 HPV16 L1 和 HPV18 L1 的 T 细胞表位肽进行筛选, 得出以下结论:

(1) 重组质粒 pVR-HPV18 L1 和重组腺病毒 rAd5-HPV18 L1 可以在真核细胞内高效的表达 HPV18 L1 蛋白。

(2) 含有 HPV16 L1 和 HPV18 L1 基因的重组 DNA 疫苗和重组腺病毒疫苗都可以诱导产生较高的体液免疫反应。加强免疫时注射 10^8 vp 腺病毒疫苗的第 2、5 组血清中和滴度达到 320 以上, 注射 10^9 vp 或 10^{10} vp 腺病毒疫苗的第 3、4、6、7 组血清中和滴度达到 640 以上。要获得理想的体液免疫效果, 至少要注射 10^9 vp 的重组腺病毒疫苗。

(3) 重组疫苗 pVR-HPV16 L1 和 rAd5-HPV16 L1 确定可以诱导产生强烈的 HPV16 L1 特异性的细胞免疫反应; 使用重组疫苗 pVR-HPV18 L1 和 rAd5-HPV18 L1 进行的 ELISPOT 实验可能由于 T 细胞表位肽预测不正确检测到的细胞免疫反应较弱。

(4) HPV16 L1₁₃₉₋₁₄₇ (AGVDNRECI) 为 HPV16 L1 的 H-2D^b 限制性 T 细胞表位; HPV16 L1₃₅₅₋₃₆₄ (YKNTNFKEYL) 可能是 HPV16 L1 的一个较弱的 H-2D^b 限制性 T 细胞表位。HPV18 L1 的 T 细胞表位还有待进一步的筛选。

参考文献

- [1] ZUR HAUSEN H. Papillomaviruses in human cancers [J]. *Proceedings of the Association of American Physicians*. 1999, 111(6): 581-587.
- [2] BERNARD H U. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses [J]. *Journal of clinical virology*. 2005, 32: 1-6.
- [3] MU OZ N, BOSCH F X, DE SANJOS S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer [J]. *New England Journal of Medicine*. 2003, 348(6): 518-527.
- [4] VILLA L L, COSTA R L R, PETTA C A, et al. Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial [J]. *The Lancet Oncology*. 2005, 6(5): 271-278.
- [5] HARPER D M, FRANCO E L, WHEELER C, et al. Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial [J]. *Lancet*. 2004, 364(9447): 1757-1765.
- [6] 李淑英. 人乳头瘤病毒与食管癌病原学关系的 Meta 分析 [J]. *中华实验和临床病毒学杂志*. 2009, 23(2): 85-87.
- [7] WANG J, SAMPATH A, RAYCHAUDHURI P, et al. Both Rb and E7 are regulated by the ubiquitin proteasome pathway in HPV-containing cervical tumor cells [J]. *Oncogene*. 2001, 20(34): 4740.
- [8] FIEDLER M, MILLER-HOLZNER E, VIERTLER H P, et al. High level HPV-16 E7 oncoprotein expression correlates with reduced pRb-levels in cervical biopsies [J]. *The FASEB journal*. 2004, 18(10): 1120-1122.
- [9] MNGER K and HOWLEY P M. Human papillomavirus immortalization and transformation functions [J]. *Virus research*. 2002, 89(2): 213-228.
- [10] KAUFMANN A M, STERN P L, RANKIN E M, et al. Safety and immunogenicity of TA-HPV, a recombinant vaccinia virus expressing modified human papillomavirus (HPV)-16 and HPV-18 E6 and E7 genes, in women with progressive cervical cancer [J]. *Clinical cancer research*. 2002, 8(12): 3676-3685.
- [11] LIU D W, TSAO Y P, KUNG J T, et al. Recombinant adeno-associated virus expressing human papillomavirus type 16 E7 peptide DNA fused with heat shock protein DNA as a potential vaccine for cervical cancer [J]. *Journal of virology*. 2000, 74(6): 2888-2894.
- [12] XIAO X, LI J and SAMULSKI R J. Efficient long-term gene transfer into muscle tissue of immunocompetent mice by adeno-associated virus vector [J]. *Journal of virology*. 1996, 70(11): 8098-8108.
- [13] XIANG Z Q P S, ERTL H C J.. Induction of genital immunity by DNA priming and

- intranasal booster immunization with a replication-defective adenoviral recombinant [J]. *J Immunol.* 1999, 162: 6716-6723.
- [14] MCCONNELL M J and IMPERIALE M J. Biology of adenovirus and its use as a vector for gene therapy [J]. *Human gene therapy.* 2004, 15(11): 1022-1033.
- [15] HUANG C F, MONIE A, WENG W H, et al. DNA vaccines for cervical cancer [J]. *American journal of translational research.* 2010, 2(1): 75.
- [16] GARCIA F, PETRY K U, MUDERSPACH L, et al. ZYC101a for treatment of high-grade cervical intraepithelial neoplasia: a randomized controlled trial [J]. *Obstetrics & Gynecology.* 2004, 103(2): 317.
- [17] WELTERS M J P, KENTER G G, PIERSMA S J, et al. Induction of tumor-specific CD4⁺ and CD8⁺ T-cell immunity in cervical cancer patients by a human papillomavirus type 16 E6 and E7 long peptides vaccine [J]. *Clinical cancer research.* 2008, 14(1): 178-187.
- [18] KENTER G G, WELTERS M J P, VALENTIJN A R P M, et al. Vaccination against HPV-16 oncoproteins for vulvar intraepithelial neoplasia [J]. *New England Journal of Medicine.* 2009, 361(19): 1838-1847.
- [19] QIAN X, LU Y, LIU Q, et al. Prophylactic, therapeutic and anti-metastatic effects of an HPV-16mE6Delta/mE7/TBhsp70Delta fusion protein vaccine in an animal model [J]. *Immunol Lett.* 2006, 102(2): 191-201.
- [20] SANTIN A D, BELLONE S, PALMIERI M, et al. Human papillomavirus type 16 and 18 E7-pulsed dendritic cell vaccination of stage IB or IIA cervical cancer patients: a phase I escalating-dose trial [J]. *Journal of virology.* 2008, 82(4): 1968-1979.
- [21] CORONA GUTIERREZ C M, TINOCO A, NAVARRO T, et al. Therapeutic vaccination with MVA E2 can eliminate precancerous lesions (CIN 1, CIN 2, and CIN 3) associated with infection by oncogenic human papillomavirus [J]. *Human gene therapy.* 2004, 15(5): 421-431.
- [22] GARCIA-HERNANDEZ E, GONZALEZ-SANCHEZ J, ANDRADE-MANZANO A, et al. Regression of papilloma high-grade lesions (CIN 2 and CIN 3) is stimulated by therapeutic vaccination with MVA E2 recombinant vaccine [J]. *Cancer gene therapy.* 2006, 13(6): 592-597.
- [23] DE LA GARZA A, QUIROZ B J C C, ZEA E V, et al. MVA E2 recombinant vaccine in the treatment of human papillomavirus infection in men presenting intraurethral flat condyloma: a phase I/II study [J]. *BioDrugs.* 2007, 21(1): 47-59.
- [24] SUCH NKOV A, KRCHNAK V, VAGNER J, et al. Epitope mapping of the human papillomavirus type 16 E4 protein by means of synthetic peptides [J]. *J Gen Virol.* 1992, 73: 429.
- [25] TALBERT-SLAGLE K and DIMAIO D. The bovine papillomavirus E5 protein and the PDGF [beta] receptor: It takes two to tango [J]. *Virology.* 2009, 384(2): 345-351.
- [26] LIU D W, TSAO Y P, HSIEH C H, et al. Induction of CD8 T cells by vaccination with

- recombinant adenovirus expressing human papillomavirus type 16 E5 gene reduces tumor growth [J]. *Journal of virology*. 2000, 74(19): 9083-9089.
- [27] CHEN Y F, LIN C W, TSAO Y P, et al. Cytotoxic-T-lymphocyte human papillomavirus type 16 E5 peptide with CpG-oligodeoxynucleotide can eliminate tumor growth in C57BL/6 mice [J]. *Journal of virology*. 2004, 78(3): 1333-1343.
- [28] DUPUY C, BUZONI-GATEL D, TOUZ A, et al. Nasal immunization of mice with human papillomavirus type 16 (HPV-16) virus-like particles or with the HPV-16 L1 gene elicits specific cytotoxic T lymphocytes in vaginal draining lymph nodes [J]. *Journal of virology*. 1999, 73(11): 9063-9071.
- [29] PINTO L A, EDWARDS J, CASTLE P E, et al. Cellular immune responses to human papillomavirus (HPV)-16 L1 in healthy volunteers immunized with recombinant HPV-16 L1 virus-like particles [J]. *Journal of Infectious Diseases*. 2003, 188(2): 327-338.
- [30] BELLONE S, EL-SAHWIK, COCCO E, et al. Human papillomavirus type 16 (HPV-16) virus-like particle L1-specific CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes (CTLs) are equally effective as E7-specific CD8⁺ CTLs in killing autologous HPV-16-positive tumor cells in cervical cancer patients: implications for L1 dendritic cell-based therapeutic vaccines [J]. *Journal of virology*. 2009, 83(13): 6779-6789.
- [31] BECKER K A, FLORIN L, SAPP C, et al. Dissection of human papillomavirus type 33 L2 domains involved in nuclear domains (ND) 10 homing and reorganization [J]. *Virology*. 2003, 314(1): 161-167.
- [32] VAN DER BURG S, KWAPPENBERG K, O'NEILL T, et al. Pre-clinical safety and efficacy of TA-CIN, a recombinant HPV16 L2E6E7 fusion protein vaccine, in homologous and heterologous prime-boost regimens [J]. *Vaccine*. 2001, 19(27): 3652-3660.
- [33] KARANAM B, GAMBHIRA R, PENG S, et al. Vaccination with HPV16 L2E6E7 fusion protein in GPI-0100 adjuvant elicits protective humoral and cell-mediated immunity [J]. *Vaccine*. 2009, 27(7): 1040-1049.
- [34] HIBBITTS S. TA-CIN, a vaccine incorporating a recombinant HPV fusion protein (HPV16 L2E6E7) for the potential treatment of HPV16-associated genital diseases [J]. *Curr Opin Mol Ther*. 2010, 12(5): 598-606.
- [35] HITZEROTH II, PASSMORE J A S, SHEPHARD E, et al. Immunogenicity of an HPV-16 L2 DNA vaccine [J]. *Vaccine*. 2009, 27(46): 6432-6434.
- [36] CHENG W F, HUNG C F, HSU K F, et al. Cancer immunotherapy using Sindbis virus replicon particles encoding a VP22-antigen fusion [J]. *Human gene therapy*. 2002, 13(4): 553-568.
- [37] SU J H, WU A, SCOTNEY E, et al. Immunotherapy for cervical cancer: Research status and clinical potential [J]. *BioDrugs: clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy*. 2010, 24(2): 109.
- [38] TOES R, OFFRINGA R, BLOM R, et al. Peptide vaccination can lead to enhanced tumor

- growth through specific T-cell tolerance induction [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1996, 93(15): 7855.
- [39] SUZUE K, ZHOU X, EISEN H N, et al. Heat shock fusion proteins as vehicles for antigen delivery into the major histocompatibility complex class I presentation pathway [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1997, 94(24): 13146.
- [40] SEDGWICK J D. ELISPOT assay: a personal retrospective [J]. Methods Mol Biol. 2005, 302: 3-14.
- [41] PARKER K C, BEDNAREK M A and COLIGAN J E. Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains [J]. J Immunol. 1994, 152(1): 163-175.

攻读硕士学位期间所发表的学术论文

程江, 李劲涛, 周玉柏, 曾毅. 治疗性 HPV 疫苗的研究进展. 中华实验和临床病毒学杂志. 2012 年第 26 卷. 已接收

致 谢

值此论文完成之际，衷心感谢导师曾毅教授以及周玉柏副研究员的悉心指导和殷切关怀！

衷心感谢曾毅院士，先生严谨的治学态度和宽厚的长者风范使我终生难忘！

感谢李泽琳教授在我的学习和生活中给予的指导和无微不至的关怀！

感谢周玉柏老师在我的学习和生活中给予的指导和无微不至的关怀！

感谢盛望、杨怡姝、王湛、周志祥、刘伟等老师在工作上给予的指导和帮助。感谢郭艳涛、徐银胜、陈学斌、王晓雯、陈琳、黄剑、徐婷婷、闫晓、杨柳、陈丹瑛、刘海庭、方军、王颖等同学在工作、学习中对我的帮助和关心。正是大家无私的帮助才使本文的研究工作得以及时完成。

在此对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。

最后我要感谢我的家人，他们的支持和理解给了我最大的动力。