维普资讯 http://www.cqvip.com

第17卷 4期
2002年11月

中 国 病 毒 学
VIROLOGICA SINICA

17(4):304-307
November 2002

重组人乳头瘤病毒核酸疫苗诱导特异性淋巴细胞增殖

丁 勇[1], 伍欣星[2**], 张 炜[2], 赵 旻[2], 谭 云[2]
(1.湖北省卫生职工医学院生化教研室,湖北荆州 434000;2.武汉大学医学院分子生物学研究室,湖北武汉 430071)

Study on Recombinant HPV DNA Vaccine Inducing Specific Lymphoproliferation

DING Yong[1], WU Xin-xing[2**], ZHANG Wei[2], ZHAO Min[2], TAN Yun[2]
(1. *Hubei Medical staff College, Jingzhou* 434000, *China*; 2. *Medical College, Wuhan University, Wuhan* 430071, *China*)

Abstract: Using molecular cloning technique, HPV16 E7 gene was cloned into eukarytic expression vector. HPV16 E7 DNA vaccine was constructed and Balb/c mice were immunized by intradermal administration with HPV16 E7 vaccine. After immunization, mice spleen lymphocytes were prepared and restimulated by E7 protein *in vitro*. Specific lympproliferation were detected by MTT colorimetric assay. Because detection of specific lymphoproliferation is a simple and efficient way, which can reflect cell-mediated immunity. The study showed that the construction of HPV16 E7 vaccine was correct. It can induce a specific cell-mediated immunization.

Key words: *Human papillomavirus*(HPV); DNA vaccine; Gene immunization; Lymphoproliferation

摘要: 采用分子克隆技术,将人乳头瘤病毒16型E7(HPV 16 *E7*)基因重组于真核表达载体上,构建了HPV 16 E7核酸疫苗。将该疫苗通过皮内注射方式免疫Balb/c纯系小鼠。基因免疫后制备小鼠脾淋巴细胞悬液,经体外E7蛋白再次刺激后用MTT比色法检测出了特异性淋巴细胞增殖反应。由于特异性淋巴细胞增殖是反映细胞免疫功能的简便有效方法,所以本实验表明HPV 16 E7核酸疫苗构建正确,并能够诱导机体产生特异性细胞免疫应答。

关键词: 人乳头瘤病毒;核酸疫苗;基因免疫;淋巴细胞增殖
中图分类号:R373 **文章标识码**:A **文章编号**: 1003-5125(2002)04-0304-04

人乳头瘤病毒(*Human papillomavirus*)16型(HPV 16)是重要的感染因子,尤其是与妇女宫颈癌发生发展的密切关系,已为大量资料所证实[1~3]。HPV 16在引起宫颈上皮转化过程中,持续表达E7蛋白,可引起机体特异性细胞免疫应答[4],并且HPV转化细胞能将出现在肿瘤细胞核内或胞浆中的转化蛋白提呈到细胞表面供免疫系统识别[5],因此,HPV 16 E7基因成为HPV治疗性疫苗的候选基因之一。根据上述思路,我们采用分子克隆技术构建了HPV16 E7核酸疫苗,并通过基因免疫观察了小鼠特异性淋巴细胞增殖情况,以了解该疫苗是否能诱导机体产生细胞免疫应答。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 PUC18-E7重组质粒、原核表达质粒pWE7-HB由本室克隆并保存,真核表达载体pcD3.1⁻,由武汉大学细胞生物室李文鑫教授惠赠,HPV16 E7单克隆抗体由美国国立卫生院郑志明博士惠赠。

1.1.2 限制性内切酶、连接酶、RNA酶、DNA聚合酶、DNA标准分子量以及MTT购于华美生物工程公司;RPMI1640干粉培养基为GIBCO公司产品;小牛血清为杭州四季青生物工程公司产品。

1.1.3 HPV16 E7PCR引物:P1:5'-GGGAATTCATGCATGGAGATACACCTAC-3'

收稿日期:2002-02-10,修回日期:2002-03-21
作者简介:丁 勇(1949-),女,湖北省籍,副教授,从事生物化学教学与科研。
** 通讯作者:伍欣星(1957-),女,教授,从事医学分子生物学教学与科研。Correspondence author.

维普资讯 http://www.cqvip.com

P2:5'-GGCAAGCTTATGGTTTCTGAGAAC AGATGG-3'

1.2 方法

1.2.1 重组子的构建　按文献[6]方法构建重组子:用 *Eco*R1 与 *Hin*d III 酶切 pUC18-E7,琼脂糖凝胶电泳后,回收 E7 片段(约 300bp),按目的基因片段与载体 3:1(摩尔比)的量,将 E7 与同酶消化的 pcD3.1⁻连接在一起,用冷 $CaCl_2$ 法制备 JM109 感受态细胞,取上述连接反应物加入感受态细胞中,热休克处理后涂布于筛选平板中,挑取筛选平板中生长的菌落,液体培养后,提取质粒 DNA。用 *E.coli* 与 *Hin*d III 双酶切以及 PCR 进行鉴定。

1.2.2 实验动物分组与基因免疫　取 Balb/c 小鼠 30 只,随机分为三组;第一组:4 只,注射生理盐水 100μL(空白对照)。第二组:5 只,注射载体 pcD 3.1⁻100μL。第三组:7 只,注射 E7 重组质粒 100μg/100μL 于小鼠双侧胫前肌处皮内注射皮丘,每侧各 50μL。第二周加强接种一次。共加强两次。最后一次加强免疫 2 周后颈椎脱臼法处死小鼠。

1.2.3 脾淋巴细胞悬液的制备[7,8]　将小鼠处死后,置 70% 乙醇浸泡 3-5min,无菌取脾脏置于适量不含小牛血清的 RPMI1640 培养基中剪去脂肪及筋膜组织,于 200 目不锈钢网筛上研碎鼠脾,悬于含 5% 小牛血清的 Hanks 液中,2 000r/min 离心 5min 沉降细胞,0.83% NH_4Cl 37℃ 15min 低渗裂解红细胞,清洗后加 15% 小牛血清的培养基,37℃ 孵育 90min 去除贴壁细胞,收集脾细胞悬液用于检测淋巴细胞增殖。

1.2.4 HPV16E7-HB 融合蛋白的制备[9]　将含原核表达质粒 pWE7-HB 的转化菌,IPTG 诱导培养过夜,收集细菌,加入裂解液,超声碎菌。用 8mol/L 脲溶解,离心后收集上清,加上样缓冲液沸水浴 5min,进行 8% SDS-PAGE。从凝胶中切下含 E7-HB 融合蛋白的凝胶块,电透析 5h,纯水透析过夜,聚乙二醇浓缩蛋白,测定蛋白含量,针头滤器过滤除菌后 4℃ 保存。

1.2.5 MTT 比色法检测淋巴细胞增殖反应[10]　取各组免疫动物的脾淋巴细胞悬液,调整浓度为 6×10^6/mL。以 10μL/孔与 5μL(19μg)的 E7-HB 融合蛋白共同培养 5 d,以不加 E7 蛋白刺激的淋巴细胞作为对照(均设三个复孔),然后加入 MTT10μl/孔,37℃ 温育 4h,加酸化异丙醇终止反应。波长 570nm 测 A 值。实验组 A 值减去对照组 A 值等于淋巴细胞增殖能力。增殖实验独立重复 2~3 次,取均值作为实验结果。数据分析采用成组设计的方差分析。

2 结果

2.1 HPV 16 E7 核酸疫苗的构建

将含 HPV 16 E7 的重组质粒 pUCl8 E7 用 *Eco*R I 与用 *Hin*d III 双酶切,得到两端为粘性末端 E7 基因,将该基因插入真核表达载体 pcDNA3.1⁻中 *Eco*R I/*Hin*dIII 位点,构建了 HPV 16 E7 重组质粒,即 HPV 16 E7 核酸疫苗,命名 pcDE7-ys。

2.2 HPV 16 E7 核酸疫苗的鉴定

将 pcDE7-ys 用 *Eco*R I 与用 *Hin*d III 双酶切,电泳后可见两条带:一条为载体 pcDNA3.1⁻,分子量为 5.4kb,另一条为 E7DNA,分子量为0.3kb,与预期结果一致(图 1)。以 pcDE7-ys 为模板,用 HPV 16 E7 引物进行 PCR 扩增反应,结果 pcDE7-ys 出现特异性扩增产物:以 pcDNA3.1⁻为模板,结果为阴性(图 2)。

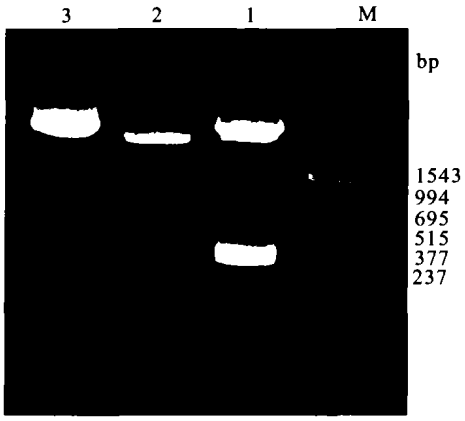

图 1　重组质粒酶切鉴定

M,PCR 分子量标准;1,重组质粒 *Eco*R I/*Hin*d Ⅲ 双酶切;2,pcD3.1⁻ *Eco*R I/*Hin*d Ⅲ双酶切;3,pcD3.1⁻质粒。

Fig.1　Identification of recombinant by restriction analysis

M, PCR Marker; 1, the recombinant with *Eco*R I/*Hin*d Ⅲ; 2, pcDNA3.1⁻with *Eco*R I/*Hin*d Ⅲ; 3, pcD3.1⁻plasmid

2.3 E7-HB 融合蛋白的表达与纯化

含原核表达质粒 pWE7-HB 的转化菌经 IPTG 诱导后高效表达。表达产物是 E7-HB 与 LacZα 肽的融合蛋白,分子量理论值应为 68.6kD SDS-PAGE 结果,在 69kD 处可见清晰的新增蛋白带;用 HPV 16 E7 单克隆抗体进行 Western blot 鉴定,显示明显的阳性信号。对融合蛋白包含体进行提取、纯化,得

维普资讯 http://www.cqvip.com

到了可溶性（活性）E7融合蛋白(图3)。

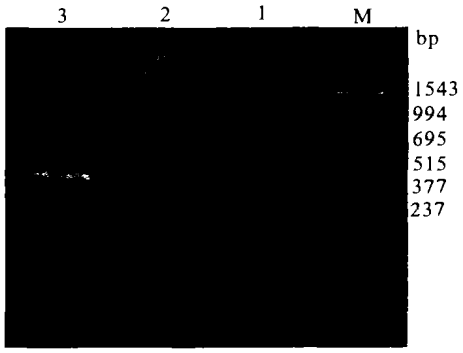

图2 重组质粒PCR鉴定

M,PCR分子量标准;1,重组质粒作为模板的PCR产物;2,pcD3.1⁻作为模板的PCR产物(阴性对照);3,pUC18 E7作为模板的PCR产物(阳性对照)。

Fig.2 Identification of recobinant by PCR

M,PCR Marker; 1, PCR product using recombinant as template; 2, PCRproduct using pcDNA3.1⁻as template(negativwe control; 3, PCR-product using pUC18 E7 as template(positive control.

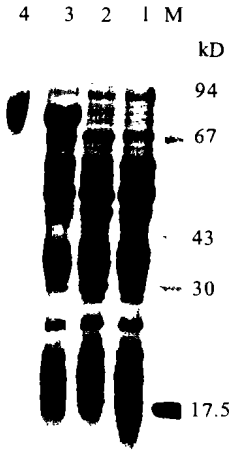

图3 HPV16 E7融合蛋白SDS-PAGE

M,蛋白质分子量标准;1,大肠杆菌JM109;2,载体DNA转化JM109;3,E7重组质粒转化JM109;4,E7融合蛋白包含体。

Fig.3 SDS-PAGE of HPV16 E7 fusion protein

M, protein marker; 1, E.coli JM109; 2, E.coli JM109 with vector; 3, *E.coli* JM109 with E7 recombinant; 4, lac-E7 inclusion body.

表1 pcDE7-ys核酸疫苗接种后小鼠脾淋巴细胞体外增殖情况

Table 1 Proliferation of mice spleen lymphocytes in vitro after E7 DNA vaccine Administration

Groug	A_{570}						X±S
N.S	0.513	0.746	0.847	0.723	0.734		0.713±0.122
pcDNA3.1⁻	0.010	0.770	1.738	0.010	1.760		0.858±0.871
pcDE7-ys	1.947	1.267	1.967	2.050	1.620	2.360	1.869±0.378

2.4 MTT法检测特异性淋巴细胞增殖

用pcDE7-ys核酸疫苗免疫小鼠,制备免疫小鼠脾淋巴细胞悬液。用上述E7融合蛋白与脾淋巴细胞共同培养,以不加E7融合蛋白刺激的淋巴细胞为对照,MTT比色法测A_{570}值,结果见表。

方差分析:pcDNA3.1⁻组与N.S组比较$P>0.05$;pcDNA3.1⁻组与pcDE7-ys组比较$p<0.01$;pcDE7-ys组与N.S组比较$P<0.01$。

上述结果显示,pcDE7-ys核酸疫苗免疫组脾淋巴细胞在体外受E7蛋白再次刺激后出现了特异性淋巴细胞增殖。

3 讨论

HPV至今没有合适的体外培养系统,因此,HPV基因、蛋白来源以及疫苗制备受到很大的限制。核酸疫苗是将能编码抗原基因的真核表达质粒直接导入机体,以表达目的抗原,进而诱导机体产生特异性免疫应答,达到防病治病的新型疫苗。由于不需要化学载体,故又称裸DNA疫苗。裸DNA疫苗诱导的特异性CTL应答对抗病毒感染、抗肿瘤的治疗至关重要。当前,肿瘤特异性主动免疫治疗策略之一就是从病毒抗原中去发现和分析肿瘤抗原,制备相应的肿瘤疫苗,通过适当途径在体内表达,打破机体对肿瘤抗原的免疫耐受状态,刺激机体产生抗肿瘤免疫。本实验采用分子克隆的方法,构建了HPV 16 E7病毒核酸疫苗,并观察该疫苗是否能诱导小鼠特异性细胞免疫应答。已有资料表明,测定淋巴细胞增殖反应是检测细胞免疫功能的有效方法,即通过测定淋巴细胞增殖情况可间接反映特异性细胞免疫应答情况。本实验结果显示,经E7核酸疫苗免疫后,小鼠体内淋巴细胞活化增殖;由于细胞免疫也存在免疫记忆现象[11],当这些细胞在体外受到E7蛋白的再次刺激后,出现比初次免疫应答更强烈的细胞增殖,并且具有特异性。E7疫苗免疫

维普资讯 http://www.cqvip.com

组淋巴细胞增殖反应与载体 (pcDNA3.1)对照组比较有显著性差异。

MTT 为四甲基偶氮唑盐,它在活细胞线粒体琥珀酸脱氢酶的作用下,被还原成蓝黑色 MTT-甲臜颗粒。形成 MTT-甲臜的量与细胞增殖程度呈正相关,故通过测定细胞形成 MTT-甲臜的量,间接分析细胞增殖情况[8]。MTT 法比传统的^{3}H-TdR 法简便、快速、安全,避免了同位素造成的污染和危害。但由于 MTT-甲臜为颗粒状物质,溶解时要反复吹打混匀,溶解不完全会影响实验结果。另外,同一个样品均设 3 个复孔,每孔重复测定 2～3 次,取平均值作为实验数据,以最大限度地减少实验误差。

核酸疫苗免疫途径有多种,我们采用了皮内注射方式,该方式与 HPV 自然感染的过程相似,因此可模拟 HPV 自然感染诱导的免疫应答过程。注射进入表皮组织中的质粒 DNA 除可被上皮细胞摄取外,皮肤组织中大量存在的朗罕氏细胞、树突细胞等也可摄取表达质粒 DNA,使有足够的 E7 蛋白抗原经 MHC-I 和 MHC-II 途径进行递呈,产生免疫应答。而皮肤角质形成细胞产生的 IL-1、TNF-2 等细胞因子更可激活各种免疫细胞,辅助免疫应答。本实验中用核酸疫苗诱导了特异性淋巴细胞增殖也证明皮内接种是有效的接种方法。

参考文献

[1] Zur Hausen H. Viruses in human cancers[J]. Science, 1991, 254: 1167.

[2] Phekps W C, Yee C L, Munger K, *et al*. The HPV 16 *E*7 gene encodes transactivation and transformation function similar to those of adenovirus EI A[J]. Cell, 1988, 53:539.

[3] Bosh F X, Manos M M, Munoz N. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer a world wide prospective[J]. JNCI, 1995, 87:796－802.

[4] Schwat Z E, Freese U K, Gissman L, *et al*. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical cells[J]. Nature, 1985;145:313－318.

[5] Meneguzzi G, Ceni C, Kieny M P, *et al*. Immunization against human papillomavirus type l6 tumor cells with recombinant vaccinia viruses expressing E6 and E7[J]. Virology, 1991, 181:62－69.

[6] 金冬雁,黎孟枫.分子克隆实验指南[M].北京:科学出版社,1992.

[7] 王新江,李　燕,谷淑燕.特异性细胞毒性 T 细胞检测方法的建立及其在重组痘苗病毒活疫苗细胞免疫中的应用[J].中华实验和临床病毒学杂志,1994,8:308－311.

[8] 沈关心,周汝磷.现代免疫学实验技术[M],武汉:湖北科学技术出版社,1998.

[9] 赵　旻,伍欣星,赵文先,等.人乳头瘤病毒 16 型湖北株基因的克隆和高效表达[J].中国病毒学,1998,13(4):322－326.

[10] 叶　萍,李　燕,谷淑燕.Epstein－Barr 病毒膜抗原基因免疫的研究[J].病毒学报,1998,14:215－220.

[11] 龙振洲.医学免疫学[M],第二版,北京:人民卫生出版社,1996.