

人乳头瘤病毒 16 型 E7 变异株免疫原性研究*

张 涵, 赵 旻, 李 辉, 邱小萍, 谭 云, 伍欣星**

(武汉大学医学院病毒研究所分子病毒室, 湖北武汉 430071)

Study on Immunogenicity of HPV 16 E7 Variant

ZHANG Han, ZHAO Min, LI Hui, QIU Xiao-ping, TAN Yun, WU Xin-xing**

(Department of Molecular Virology, Institute of Virology, Medicine School of Wuhan University, Wuhan 430071, China)

Abstract: The HPV E7 variant shares the same coding sequence with the wild type E7 except that the 43rd cordon was mutated from CAA to TAA. The recombinant plasmid pcDNA3.1-(by) E7 DNA and pcDNA3.1-(ys)- E7 DNA, were constructed by molecular clone technology, and then injected into mice intradermally respectively. The serum and the spleen lymphocyte suspension of the mice were isolated respectively at different time. The specific antibody was detected by ELISA and the lymphocyte proliferative response was detected by MTT method. After gene immune, the result of ELISA showed both the HPV₁₆ (ys) E7 and HPV₁₆ (by) E7 could induce specific antibody. The result of MTT method showed in comparison to HPV16 (ys) E7, no specific lymphoproliferation after E7 protein restimulation *in vitro* was detected in HPV16 (by) E7 group. The results suggested that the variant E7 protein could induce host humoral immune response, but could not elicit special cellular-immune to it, which indicated that HPV16 E7 variant was different from wild type HPV16 E7 in both structure and immunogenicity, perhaps resulting in escaping the nature infection and the response induced by vaccines, leading to persistent infection. Furthermore, this experiment offered reference for other studies on virus variant which can't be cultivated *in vitro*.

Key Words: Human papillomavirus type 16; E7; Variant; Immunogenicity

摘要: 采用分子克隆技术, 构建 E7 变异株重组质粒[pcDNA3.1-(by)E7]和 E7 标准株重组质粒[pcDNA3.1-(ys)- E7], 并将两种质粒分别皮下免疫 Balb/c 小鼠, 免疫后于不同时间提取小鼠血清和制备脾淋巴细胞悬液, 分别用 ELISA 法和 MTT 比色法检测特异性抗体和特异性淋巴细胞增殖反应。基因免疫后, ELISA 法显示, HPV16 E7 变异株和标准株均能诱导特异性抗 E7 抗体; MTT 比色法显示, E7 标准株免疫组脾淋巴细胞在体外受到变异株 E7 蛋白的再次刺激后出现特异性淋巴细胞增殖反应, 变异株 E7 免疫组脾淋巴细胞经过同样处理后, 出现非特异性淋巴细胞增殖反应。结果表明 HPV16 E7 变异株能诱导特异性体液免疫应答而不能诱导特异性细胞免疫应答, HPV16 E7 变异株无论在结构还是免疫原性上均与标准株有差异。由此推测, HPV16E7 变异可能导致其逃逸机体自然感染或疫苗诱导的免疫应答。用基因免疫方法研究 E7 变异株免疫原性也为其它不能或难以进行体外培养的病毒变异研究提供借鉴。

关键词: 人乳头瘤病毒 16 型; E7; 变异株; 基因免疫

中图分类号: R373

文献标识码: A

文章编号: 1003-5152(2004)-0220-04

人乳头瘤病毒 16 型(Human papillomavirus type 16, HPV₁₆)是与人类宫颈癌发生发展密切相关的一

种 DNA 病毒, 该病毒的分子结构和核酸序列已清楚。该病毒基因组中 *e7* 基因与细胞的恶性转化、

收稿日期: 2003-11-25, 修回日期: 2004-03-02

* 基金项目: 湖北省自然科学基金项目资助 (97J077)

作者简介: 张 涵 (1978-), 女, 湖北武汉籍, 硕士研究生, 主要从事分子病毒学研究。

** 通讯作者: Corresponding author. Tel: 020-87331138, E-mail: wuxinxing975@sohu.com

恶性表型的维持密切相关,并可诱导机体产生特异性免疫反应。然而,病毒是只能在活细胞内复制的微生物,在长期的进化演变和与宿主相互作用的结果的过程中,常发生变异。病毒变异后可能改变病毒的致病性,改变病毒感染的种属或组织嗜性,逃逸自然感染或疫苗诱生的免疫以及产生耐药性等。我室 1996 年从湖北地区宫颈癌患者癌组织中分离得到 HPV16E7 变异株,测序后证明其在基因一级结构上与 HPV16 E7 标准株有差异^[1],将该基因在原核细胞中表达,证明了高效表达重组质粒中确实有 HPV16E7-by 顺序^[2],而 HPV16E7 变异株也能够真核细胞中表达^[3]。一般而言,病毒结构的变异通常会导致功能的改变,如 HBV S 基因区变异可引起人体异常免疫应答,与 HBV 慢性感染相关;冠状病毒结构的变异则改变了其宿主范围和毒力^[4]。但 HPV16 E7 的结构变异对其功能是否有影响,这种变异株的免疫原性如何,能否诱导诱导机体产生特异性体液和细胞免疫应答,与标准株有无差异是本实验的重点。

1 材料和方法

1.1 实验材料

分别含 HPV₁₆ys- E7 基因和 HPV₁₆by- E7 基因全长的克隆质粒已测序,由本室保存;真核表达载体 pcDNA3.1 由武汉大学李文鑫教授惠赠,原核表达载体 pWR590-1-E7 由本室构建, *E.coli* JM109 菌株由本室保存。限制性内切酶, DNA 连接酶, DNA Marker 均为华美公司产品; MTT 购自 Fluka。Balb/c 纯系小鼠,雄性,6 周龄,25-30g,购自湖北省预防医学科学院动物研究基地。

1.2 DNA 分子克隆

酶切,连接,转化,筛选,质粒的提取纯化均按文献进行^[5]。

1.3 免疫动物

将 46 只 Balb/c 纯系小鼠随机分为 4 组。第一组:8 只,注射生理盐水 100 μ L,作空白对照;第二组:8 只,注射载体 pcDNA3.1 100 μ g/100 μ L,作阴性对照;第三组:15 只,注射 pcDNA3.1-(ys) E7 100 μ g /100 μ L;第四组:15 只,注射 pcDNA3.1-(by) E7 100 μ g /100 μ L。

1.4 免疫

于小鼠双侧胫骨前肌处皮内注射形成皮丘,每侧各注射 50 μ L。第二周加强免疫一次,第六周对剩下的小鼠再加强免疫一次。

1.5 ELISA 法测特异性抗体

第三周后,每周取空白对照组和阴性对照组小鼠各一只,pcDNA3.1-(ys) E7 组、pcDNA3.1-(by) E7 组小鼠各 3 只,取其血,按照 ELISA 试剂盒说明书要求操作,抗原均用变异株 E7 蛋白。标本 1:10 稀释,测定 A_{450nm}OD 值。

1.6 MTT 比色法检测淋巴细胞增殖反应^[6]

基因免疫后第六周末处死各实验组剩下的小鼠,常规制备各组免疫动物的脾淋巴细胞悬液,调整为 6 $\times 10^6$ /mL。以 100 μ L/孔与 5 μ L (10 μ g) 的 E7 蛋白共同培养 5d,并设立不加 E7 蛋白刺激的淋巴细胞作为对照。均设 4 个复孔。然后加入 MTT 10 μ L/孔充分混匀,37 $^{\circ}$ C 温育 4h 后于每孔加酸化异丙醇 100 μ L 终止反应,充分混匀以溶解还原的甲颗粒。室温静置 30min 后于 DG3002 型酶联仪上测 A₅₇₀。淋巴细胞增殖能力=A₅₇₀ 实验组-A₅₇₀ 对照组。

1.7 统计处理

体外增殖实验均做 4 个复孔,独立重复 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和 q 检验。

2 结果

2.1 E7 变异株重组质粒的构建

从原核表达载体 pWR590-1-E7 中用 *Eco*R I 和 *Hind*III 双酶切,回收 E7 片段,插入到真核表达载体 pcDNA3.1 *Eco*R I 和 *Hind* III 位点,将该重组 DNA 用冷 CaCl₂ 法转化 JM109 菌,在含 Amp⁺ 的培养基上筛选,双酶切鉴定,证实基因插入片段和载

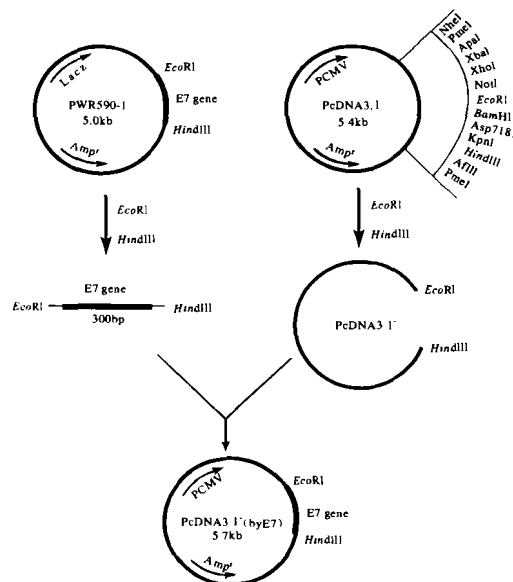


图 1 E7 变异株重组质粒的构建

Fig.1 Construction of E7 variant recombinant plasmid

体的大小、方向和插入位点均正确,命名为 pcDNA3.1-(by) E7 (图 1M)。

2.2 E7 标准株重组质粒的构建

步骤同 E7 变异株重组质粒的构建,命名为 pcDNA3.1-(ys) E7。

2.3 ELISA 法检测特异性抗体

$P/N = (\text{标本 OD 值} - \text{空白对照 OD 值}) / (\text{阴性对照 OD 值} - \text{空白对照 OD 值})$ 当 $P/N \geq 2.1$ 为阳性,若 $1.5 \leq P/N < 2.1$ 为可疑, $P/N < 1.5$ 为阴性。由图 2 看出第三周时产生抗体最多,第四周略有下降,第五周下降最多,第六周加强免疫后产生抗体量最多。

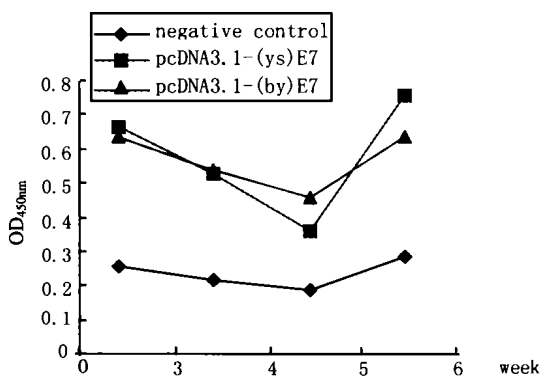


图 2 ELISA 法检测抗体

Fig.2 Antibody detection by ELISA assay

2.4 MTT 法检测特异性淋巴细胞增殖反应^[6]

用 MTT 比色法测 A_{570} 值,淋巴细胞增殖能力 = A_{570} 实验组 - A_{570} 对照组,结果见表 1。

表 1 MTT 法检测淋巴细胞体外增殖情况

Table 1 Lymphoproliferation detected by MTT method

Group	n	$\bar{x} \pm s$
N.S	5	0.889 ± 0.122
pcDNA3.1-	5	1.290 ± 0.455
pcDNA3.1-(ys) E7	6	2.109 ± 0.378
pcDNA3.1-(by) E7	6	1.575 ± 0.499

将所得数据用成组设计的方差分析作统计学处理,载体对照组在体外受到变异株 E7 蛋白的再刺激后,虽出现了淋巴细胞增殖性反应,但与生理盐水组无显著性差异 ($p > 0.01$)。pcDNA3.1-(ys) E7 组脾淋巴细胞在体外受到变异株 E7 蛋白的再刺激后,出现了淋巴细胞增殖性反应,与生理盐水组相比有显著性差异 ($p < 0.01$),并与载体对照组有显著性差异 ($p < 0.01$),而 pcDNA3.1-(by) E7 组脾淋巴细胞经过同样处理后,虽然也出现了淋巴细胞增

殖性反应,与生理盐水组相比有显著性差异 ($p < 0.01$),但其与载体对照组差异没有显著性 ($p > 0.05$),HPV16 E7 变异株不能诱导特异性细胞免疫应答。

3 讨论

病毒是变异率比较高的微生物。一方面病毒的复制频率很高,遗传物质很容易在复制过程中发生突变;另一方面病毒在宿主体细胞内复制繁殖,必然要遭到宿主免疫系统的攻击(称之为免疫压力),因而变异则成为逃避免疫杀伤的最好方式。病毒的变异株可以改变病毒的抗原性、免疫原性等,对病毒感染性疾病的治疗、预后构成不利,同时也对病毒感染的正确诊断,包括免疫学诊断和基因诊断有潜在影响。

由于 HPV 到目前为止很难进行体外细胞培养,故不能用常规方法研究其变异。我室采用分子克隆技术构建 E7 变异株重组质粒。E7 变异株全长与标准株相同 (294bp),但其 43 位密码子由 CAA 变为 TAA,使相应的谷氨酰胺密码子变为终止密码,发生无义突变^[1],从而使 E7 蛋白翻译提前终止,C-末端缺失而形成了截短的 E7 蛋白。本实验用 ELISA 法检测变异株 E7 蛋白能诱发机体产生特异性抗 E7 抗体,表明 HPV16 E7 变异株可以诱导机体产生特异性体液免疫应答,和文献报道的 E7 蛋白的 B 细胞识别区主要集中在 N-末端的结论一致^[7]。一般而言,抗病毒和肿瘤免疫以细胞免疫为主,体液免疫通常仅在某些情况下起协同作用。本实验分别构建了 E7 变异株与标准株重组表达质粒,用 MTT 比色法检测 HPV16 E7 变异株 DNA 能否诱导机体产生特异性淋巴细胞增殖反应,并与 HPV16 E7 标准株进行对比。特异性淋巴细胞增殖能反映机体细胞免疫应答情况,MTT 比色法检测特异性淋巴细胞增殖反应简便、快速、安全。结果表明,HPV16 E7 标准株可诱导特异性细胞免疫应答,而 HPV16E7 变异株不能诱导特异性细胞免疫应答。其原因可能在于:(1)E7 蛋白的 CTL 识别区主要集中在 C-末端,截短的 E7 (by) 蛋白 C-末端缺失,丧失了绝大多数的 T 细胞表位,因此 HPV16E7 变异株在体内诱导特异性的细胞免疫能力差。(2) HPV16 E7 基因的变异可能造成一些蛋白的缺失,影响抗原呈递中的各个环节,造成 HPV16E7 变异株诱导特异性的细胞免疫能力降低。(3) E7 功能结构单位一两个锌指结构分别位于第 58-61 位和 91-94 位的氨基酸位点,完整的锌指结构与 E7 二聚体的形成密切相关,

HPV16 E7 变异株 C-末端缺失使锌指结构不完整,也可能造成病毒免疫逃逸,持续感染。由此推测,HPV16E7 变异株无论在结构还是免疫原性上都与 HPV16 E7 标准株存在差异。通过对 HPV16 E7 变异株免疫原性的研究,可以深化对 HPV16 致病机制、免疫机制的探讨,为该病毒免疫治疗奠定基础。同时,用基因免疫方法研究 E7 变异株免疫原性也为其它不能或难以进行体外培养的病毒变异研究提供借鉴。

参考文献

- [1] 伍欣星, 赵文先, 丁晓华, 等. 中国地方株人乳头瘤病毒 16 型 E7 基因一级结构及其变异[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 1996; 16: 395-398.
- [2] 赵 昱, 伍欣星. 人乳头瘤病毒 16 型湖北株 E7 基因的克隆和高表达[J]. 中国病毒学, 1998; 13(4): 322-326.
- [3] 盛德乔, 伍欣星, 王宇哲, 等. 人乳头瘤病毒 16 型(湖北株) E7 逆转录病毒重组体的构建及在真核细胞中的表达[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 1999; 19(2): 120.
- [4] Ruan Y, Wei C, *et al.* Comparative full-length genome sequence analysis of 14 SARS coronavirus isolates and common mutations associated with putative origins of infection [J]. *Mechanisms of disease*, 2003; 361:1779-1785.
- [5] 金冬雁, 黎孟枫. 分子克隆[M]. 北京: 科学出版社, 1992.
- [6] 沈关心, 周汝麟. 现代免疫学实验技术[M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1998.
- [7] 唐松山, 刘钟滨. 大肠杆菌外源基因表达产物的下游技术[J]. 国外医学遗传学分册, 1995, 18(3): 124.

(上接第 313 页)

Abstract: 研究论文和简报均需撰写英文摘要, 英文摘要要求同中文摘要, 可稍详细。

Key words: 词组之间用分号隔开, 词组首词首字母大写。

2.5 摘要(中文): 应简要介绍本文的目的意义、主要方法、结果及结论, 应有独立性和自含性, 一气呵成, 不分段, 不另列小标题, 不附图表, 不用非公知公用符号、略写语。简报不需要撰写中文摘要, 但需撰写英文摘要。

2.6 关键词(中文): 3-5 个, 词组之间用分号隔开。

2.7 中图分类号: "...”、“文献标识码: ..."“文章编号: ..." (内容由本刊填写);

2.8 文章首页地脚处(格式):

收稿日期: XXXX-XX-XX, 修回日期: XXXX-XX-XX。(由本刊填写)

* 基金项目: 基金名称 1 (编号); 基金名称 2 (编号)

作者简介: 作者(出生年-), 性别(民族), 籍贯, 职称, 学位, 从事专业或研究方向。

** 通讯作者: 相关内容(同作者简介, 个人资料也可省略) Corresponding author. Tel: , E-mail:

2.9 正文: 文章正文内标题层次标号采用阿拉伯数字分级编号法, 一级标题通常为“1 材料和方法”, “2 结果”, “3 讨论”; 二级标题为 1.1、1.2....., 三级标题为 1.1.1、1.1.2.....。

2.10 参考文献: 集中附于文后, 综述附文献不超过 40 篇, 研究报告不超过 30 篇, 简报不超过 20 篇。未公开正式发表的文献请勿引用。

3 文稿撰写要求

3.1 文稿请用计算机打印, 字体请勿小于 5 号宋体字。文中大小写、正斜体、上下角、以及希腊文、罗马数字均应打印清楚。

3.2 使用法定的计量单位。如: 分子量用 **Mr**; 溶液浓度单位不用 M、N 而用 **mol/L**; 体积单位不用 l 而用 **L** (ml、 μ l 分别应为 **mL**、 **μ L**); 时间单位用 **s**、**min**、**h**、**d** 分别表示秒、分、小时、天; 离心机转速用 **r/min** 取代 **rpm**, 或用 **g** (离心力) 表示。

3.3 蛋白质和核酸名称的英文缩写一律用正体, 首字母大写或全部大写; 限制性内切酶的前 3 个字母用斜体, 如 *Bam*H I。基因座名称的英文缩写一律用小写斜体, 基因位点用正体大写, 如 *aroG*; 基因表达产物和蛋白名称用正体, 首字母大写, 如 *AroG*。

3.4 病毒的科属的名称为斜体, 正式定名的毒种名称为斜体, 首字母大写, 其余小写, 如 *Potato leafroll virus*。暂定种名或自定名为正体。请作者查阅国际病毒分类命名委员会第 VII 报告确定病毒种名是否正式定名。

(下转第 236 页)