

# 基于戊肝病毒的嵌合病毒样颗粒对人乳头瘤病毒 16 型肿瘤免疫治疗作用的研究

张柯欣<sup>a</sup>, 朱贇<sup>a</sup>, 马培凯<sup>a</sup>, 安彤<sup>a</sup>, 李思奇<sup>a</sup>, 沈钱通<sup>a</sup>, 陈刚<sup>a,b,c</sup>, 罗永能<sup>d</sup>, 庄昉成<sup>a,b,c</sup>, 陆绍红<sup>a,b,c</sup>, 高孟<sup>a,b,c\*</sup> (杭州医学院, a.基础医学与法医学院, b.浙江省医学生物工程疫苗研究开发重点实验室, c.新型疫苗浙江省工程研究中心, d.检验医学院, 杭州 310007)

**摘要:** 目的 研究基于戊肝病毒(hepatitis E virus, HEV)的嵌合病毒样颗粒(virus-like particles, VLPs)对人乳头瘤病毒 16 型(human papillomavirus type 16, HPV 16)肿瘤免疫治疗作用。方法 将 HPV 16 E7 插入 HEV 的 p239 蛋白形成重组嵌合蛋白 p239-HPV16 E7。所构建的重组蛋白经大肠杆菌表达、纯化、复性后, 通过电镜和动态光散射对所得蛋白颗粒大小形态进行表征。将蛋白颗粒免疫 C57B/L 小鼠, 通过流式细胞技术与酶联免疫斑点免疫试验检测脾淋巴细胞特异性免疫细胞分化情况; 并且利用 TC-1 肿瘤细胞在 C57B/L 小鼠中构建肿瘤模型, 以此评价蛋白颗粒在小鼠体内的抗肿瘤免疫效果。结果 体外复性后的嵌合蛋白在电镜下观察到颗粒结构, 粒径大小为 22.80 nm。所得蛋白颗粒在 C57B/L 小鼠体内诱导产生良好的特异性细胞免疫反应。与对照组相比, 试验组脾淋巴细胞的 CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>比例均有明显差异( $P<0.05$ ), 且分泌 IFN- $\gamma$  干扰素的效应 T 细胞显著增加。同时, 所得蛋白颗粒能有效抑制 TC-1 荷瘤小鼠体内肿瘤细胞的生长, 在实验周期内小鼠未出现死亡, 而对照组小鼠体内肿瘤快速生长, 且 6 周后全部死亡。结论 原核表达的嵌合蛋白 p239-HPV16 E7 形成病毒样颗粒并有效诱导针对 HPV 16 的抗肿瘤免疫。

**关键词:** 人乳头瘤病毒 16 型; 原核表达; 免疫原性

中图分类号: R965.3 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2023)23-3251-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20230543

引用本文:张柯欣, 朱贇, 马培凯, 等. 基于戊肝病毒的嵌合病毒样颗粒对人乳头瘤病毒 16 型肿瘤免疫治疗作用的研究[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(23): 3251-3256.

## Study on the Effect of Chimeric Virus-like Particles Based on Hepatitis E Virus on Human Papillomavirus Type 16 Tumor Immunotherapy

ZHANG Kexin<sup>a</sup>, ZHU Yun<sup>a</sup>, MA Peikai<sup>a</sup>, AN Tong<sup>a</sup>, LI Siqu<sup>a</sup>, SHEN Qiantong<sup>a</sup>, CHEN Gang<sup>a,b,c</sup>, LUO Yongneng<sup>d</sup>, ZHUANG Fangcheng<sup>a,b,c</sup>, LU Shaohong<sup>a,b,c</sup>, GAO Meng<sup>a,b,c\*</sup> (Hangzhou Medical College, a.School of Basic Medicine Sciences and Forensic Medicine, b.Medical & Biological Vaccine R&D Key Lab of Zhejiang Province, c.Zhejiang Engineering Research Center of New Vaccine, d.School of Laboratory Medicine, Hangzhou 310007, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To study the immunotherapeutic effect of chimeric virus-like particles(VLPs) based on hepatitis E virus(HEV) against human papillomavirus type 16(HPV 16) tumor. **METHODS** HPV16 E7 was inserted into the p239 protein of HEV to form the recombinant chimeric protein p239-HPV16 E7. The constructed recombinant protein was expressed by *Escherichia coli*, purified, and then refolded, and the protein was detected by electron microscopy and dynamic light scattering to confirm size and shape. Then, the C57B/L mice were immunized with the protein grain, and the lymphocyte differentiation of mouse spleen was detected by flow cytometry and enzyme-linked immune spot immunoassay; in addition, TC-1 tumor cells were used to construct tumor models in C57B/L mice to evaluate the anti-tumor immune effect of protein particles in mice. **RESULTS** After refold *in vitro*, the structure of chimeric protein was observed under electron microscopy, and the size of particle was 22.80 nm. The obtained protein particles induced favorable specific cellular immune response in C57B/L mice. Compared with the control group, the proportions of CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> in spleen lymphocytes of experimental groups were significantly different( $P<0.05$ ), and effector T cells secreting IFN- $\gamma$  interferon were also increased remarkably. At the same time, the obtained protein particles could effectively inhibit the growth of tumor cells in TC-1 tumor-bearing mice, and the mice did not die during the experimental period, while the tumors in the control mice grew rapidly and all died after 6 weeks. **CONCLUSION** Chimeric protein p239-HPV16E7 which was expressed in prokaryotes can form virus-like particles and effectively induce anti-tumor immunity against HPV16.

**KEYWORDS:** human papillomavirus type 16; prokaryotic expression; immunogenicity

基金项目: 浙江省基础公益研究计划项目(LGF20C080001); 中央引导地方科技发展资金项目(2023ZY1019); 杭州医学院基本科研业务费基础科研计划项目(KYZD202107)

作者简介: 张柯欣, 女, 硕士生 E-mail: 18438611337@163.com \*通信作者: 高孟, 男, 硕士 副研究员 E-mail: gaom8888@126.com

目前, 宫颈癌已成为女性第二大高发的恶性肿瘤, 全球每年约有 50 万例宫颈癌病例被确诊, 其中约 30 万人死于该疾病<sup>[1]</sup>。人乳头瘤状病毒(human papilloma virus, HPV)的持续感染是导致宫颈癌发生的主要原因<sup>[2]</sup>, 其中 HPV16 作为高危型在宫颈癌患者中的检出率可达 40%左右<sup>[3]</sup>。目前, 已上市各类 HPV 预防性疫苗可以有效预防宫颈癌的发生, 但是这些疫苗对于已经感染的患者效果甚微<sup>[4]</sup>。尤其在发展中国家, 受限于筛查与预防手段的普及与宣传, 仍有许多女性面临着患上宫颈癌的风险<sup>[5]</sup>。临床上, 宫颈癌及晚期癌前病变的主流治疗方案是手术切除、放射治疗和化疗等, 这些治疗手段经济负担较重, 且存在一定的手术风险和复发率<sup>[6-7]</sup>。但对于早期癌前病变患者, 目前仍缺少可靠有效的治疗方法。因此, 研究治疗性 HPV 疫苗对于解决上述问题有重要的意义。E6 和 E7 蛋白是 HPV 的早期转化蛋白, 是维持肿瘤持续增生的必需蛋白, 可以作为治疗性 HPV 疫苗的理想靶抗原<sup>[8]</sup>。但在之前的临床研究发现单独的 E6、E7 蛋白疫苗的治疗效果并不理想<sup>[9-10]</sup>。因此, 有必要开展更加高效的治疗性 HPV 疫苗的研究。戊肝病毒(hepatitis E virus, HEV)衣壳蛋白的 p239(368-606aa)片段可通过大肠杆菌表达并组装成病毒样颗粒(virus-like particles, VLPs), 同时具有很高的免疫原性<sup>[11]</sup>。因此, 本研究拟将 HPV16 E7 蛋白嵌入 HEV p239 蛋白中形成一个含有 HPV16 E7 的嵌合蛋白, 并研究该嵌合蛋白对 HPV16 肿瘤的免疫治疗作用, 从而为治疗性 HPV 疫苗的设计提供一个新思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞、载体及菌株

TC-1 肿瘤细胞、pET-28a 载体、HEV p239 蛋白及感受态细胞 *Escherichia coli* BL21(DE3)由杭州医学院病毒病研究所实验室保存。

### 1.2 试剂与仪器

双色预染蛋白 marker(上海雅酶生物科技有限公司, 批号: 02634840); 蛋白上样缓冲液(北京康为世纪生物有限公司, 批号: 01410/34522); 羊抗鼠 IgG 抗体(北京康为世纪生物有限公司, 批号: 01325/33621); 硝酸纤维素膜(PVDF, 杭州诺扬生物技术有限公司, 批号: A29463123); 鼠源 HPV16-E7 IgG 单抗(南京金斯瑞生物科技有限公司, 批号: C2713); DEAE 阴离子交换层析柱填料

[思拓凡生物科技(杭州)有限公司, 批号: 10053763]; 小鼠酶联免疫斑点检测(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISPOT)IFN- $\gamma$  试剂盒(深圳市达科为生物技术股份有限公司, 批号: 2111-2); HPV E7 混合重叠肽库由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

SpectraMaxiD3 型多功能酶标仪(美国 Molecular Devices 公司); Zetasizer pro 激光粒度仪(上海思百吉仪器系统有限公司); HIBIopure150 型蛋白纯化仪(苏州市海葳生物科技有限公司); BD FACS Celesta 型流式细胞仪[碧迪医疗器械(上海)有限公司]。

### 1.3 动物

SPF 级 C57B/L 小鼠, ♀, 6 周龄, 体质量 17~19 g, 购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司, 在浙江中医药大学实验动物中心饲养和实验, 实验动物生产许可证号: SCXK(苏)2018-0008; 实验动物质量合格证号: NO.202227718; 实验动物使用许可证号: SYXK(浙)2019-0024。

### 1.4 质粒的构建

将 HPV16 E7 蛋白(genebank: AAD33253.1)的氨基酸序列插入 HEV p239 蛋白(genebank: AFJ064 17.1)的 486aa 位点与 487aa 位点之间, 形成嵌合重组蛋白 p239-HPV16 E7; 表达蛋白的核苷酸序列由南京金斯瑞公司经密码子优化后进行人工合成。经 NdeI 与 XhoI 限制性内切酶位点插入 pET-28a 载体中, 所得重组质粒命名为 pET28a p239-HPV16 E7。

### 1.5 蛋白的诱导表达与鉴定

将 pET28a p239-HPV16 E7 重组质粒热激活转化至 *Escherichia coli* BL21(DE3)中, 所得重组表达菌 37 °C 过夜活化后, 按照 1 : 50 接种至 2×YT 培养基中, 37 °C 条件下培养 A600 值达到 0.6 左右, 向菌液中加入 IPTG 至终浓度达到 1 mmol·L<sup>-1</sup>, 25 °C 条件下诱导过夜, 6 372×g 离心菌液 20 min 后收集菌沉淀。取诱导前后菌液, 分别进行 12% SDS-PAGE 预制胶电泳及 Western blotting 检测。Western blotting 条件如下: 电泳胶通过电转移转到 PVDF 膜上, 用现配的新鲜 5%脱脂奶粉在室温下封闭 1 h, 加入按 1 : 1 000 稀释的鼠源 HPV16-E7 IgG 单抗于 4 °C 孵育过夜, 用 PBST 洗涤 3 次; 后加入按照 1 : 1 000 比例稀释的 HRP 酶标羊抗鼠 IgG, 常温孵育 1 h, 用 PBST 洗涤 3 次, 最后经化学发光法显色曝光。

## 1.6 蛋白的纯化与复性

收获菌沉淀经超声破菌洗涤后,收集沉淀得到包涵体蛋白。所得包涵体用溶解液(5 mmol·L<sup>-1</sup> PB, 9 mol·L<sup>-1</sup> 尿素, 1 mmol·L<sup>-1</sup> DTT, pH 7.0)于 4 °C 环境中溶解后离心,所得上清用 0.45 μm 滤膜过滤后经 DEAE 阴离子交换层析柱进行纯化,洗脱后得到所需目的蛋白。将目的蛋白用透析液(10 mmol·L<sup>-1</sup> PB, 1 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA, 0.1% tween 20, pH 7.0)进行透析,所得复性蛋白经过滤除菌后即重组嵌合蛋白 p239-HPV16 E7。

## 1.7 重组蛋白颗粒表征检测

**1.7.1 粒径检测** 将复性后的蛋白样本经 10 878×g 离心 5 min 后,吸取 1 mL 上清于室温下静置 5 min,使用 Zetasizer pro 激光粒度仪在动态光散射(dynamic light scattering, DLS)下测量蛋白粒径大小,重复测量 3 次。

**1.7.2 电镜检测** 在铜网载膜上滴加 100 μL 蛋白样品,用 1%磷酸钨负染液染色 2 min,去离子水清洗 2 次并吸干多余水分,充分干燥后在透射电子显微镜下观察蛋白颗粒状态。

## 1.8 重组蛋白免疫原性检测

**1.8.1 动物分组与免疫** 将 C57B/L 雌鼠分为 3 组,每组 5 只,设置重组蛋白 50 μg 组、100 μg 组和对照组;分组小鼠分别于第 1, 3, 7 天通过大腿肌肉注射免疫 1 次;免疫结束后第 3 周处死小鼠,取脾脏。

**1.8.2 流式细胞术检测** 将脾脏放于经 1640 培养基浸润的细胞筛网中进行充分碾磨,加入 10 mL 1640 培养基,转移细胞悬液至 50 mL 离心管中,混匀后,取 1 mL 细胞悬液于 24 孔板,加入浓度为 50 ng·μL<sup>-1</sup> 的 HPV E7 重叠肽库,每孔 10 μL,37 °C 刺激 5 h;冰上重悬细胞并转移至流式专用离心管,493×g 离心 5 min,弃上清,加入 0.4 mL ACK 裂红 3 min,加入 0.8 mL PBS 终止裂红,493×g 离心 5 min;1 mL PBS 洗涤 2 次,所得细胞沉淀用 1 mL Staining Buffer 重悬,计数并稀释至活细胞个数为 2×10<sup>6</sup> mL<sup>-1</sup>,取 1 mL 加入 1 μL FVS780 储存液,避光 15 min,493×g 离心 5 min,去上清,用 100 μL Staining Buffer 重悬细胞团块,加入 2 μL Fc 阻断剂,4 °C 条件下作用 15 min,用 1 mL Staining Buffer 洗涤后重悬细胞团块,加入 CD3、CD4、CD8 荧光素标记抗体各 5 μL,4 °C 避光 30 min;洗涤重悬后,用 BD 流式细胞分析仪上机分析各类淋巴细胞数。

**1.8.3 ELISPOT 试验** 将小鼠脾脏充分碾磨后所得细胞悬液 493×g 离心 5 min 后裂红并洗涤,制成淋巴细胞个数为 5×10<sup>6</sup> mL<sup>-1</sup> 的悬液,加至细胞培养板中(每孔 100 μL),复孔,按每孔 5 μg 添加 E7 肽库刺激物,并设置阴阳对照孔,轻柔混匀,密封后放至 37 °C 培养;按照 ELISPOT 试剂盒操作说明检测每个样本特异性分泌 IFN-γ 的效应 T 细胞斑点数。

## 1.9 重组蛋白的肿瘤抑制试验

将 C57B/L 雌鼠分 3 组,每组 10 只,经大腿腹股沟皮下注射 TC-1 细胞(每只 4×10<sup>4</sup> 个)。接种细胞后,于第 3, 6, 10 天经大腿肌肉注射免疫蛋白(设 100 μg 组、200 μg 组以及对照组)1 次;同时,每隔 1 周用游标卡尺测量 1 次肿瘤瘤径,以  $V=L \times W^2/2$  计算肿瘤体积(L:长;W:宽),并监测小鼠的存活情况。

## 1.10 统计学分析

应用 GraphPad Prism 软件进行统计学分析。数据采用  $\bar{x} \pm s$  描述,组间比较采用独立样本 *t* 检验,以  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 质粒的构建

采用南京金斯瑞公司的 Codon Optimization 对表达嵌合蛋白 p239-HPV16 E7 的核苷酸序列进行密码子优化,所得优化后的序列经人工合成,并通过 Nde I 和 Xho I 2 个酶切位点插入 pET28a 质粒中,得到重组表达质粒 pET28a p239-HPV16 E7,结果见图 1。

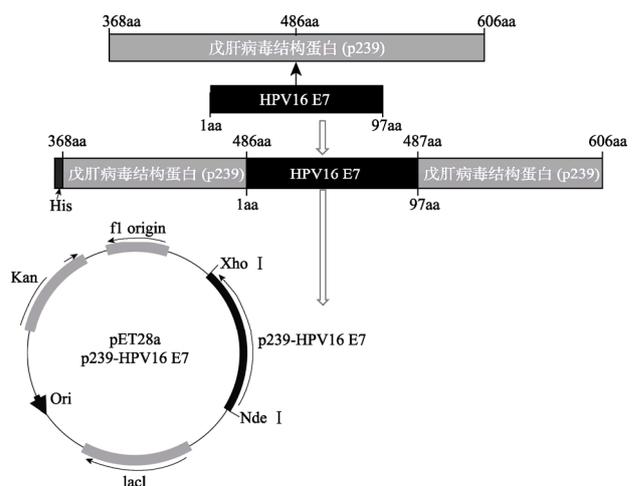


图 1 pET28a p239-HPV16 E7 重组质粒的构建

Fig. 1 Construction of pET28a p239-HPV16 E7 recombinant plasmid

## 2.2 重组蛋白的表达与鉴定

转化 pET28a p239-HPV16 E7 重组质粒的 BL21(DE3)大肠杆菌,在 IPTG 诱导下能高效表达 p239-HPV16 E7 重组蛋白,且所表达的蛋白相对分子质量约为 40 kDa,与理论值基本相符,见图 2A。同时,免疫印迹鉴定表明,诱导后菌液蛋白与 HPV16 E7 单克隆抗体反应,能在相对分子质量约为 40 kDa 处产生一条阳性条带,而诱导前菌液蛋白中则无阳性条带,见图 2B。

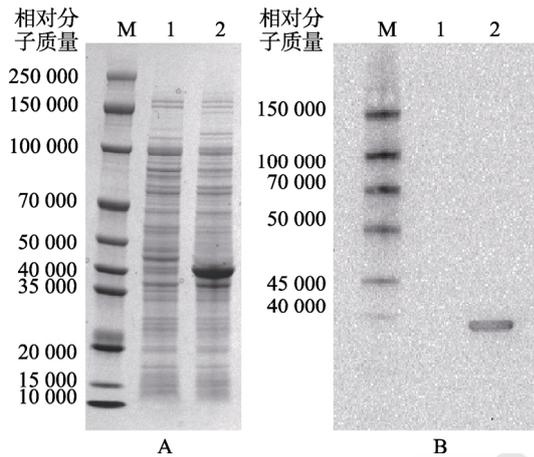


图 2 重组蛋白的表达与鉴定

A-SDS-PAGE; B-Western blotting; M-蛋白 marker; 1-诱导前菌液; 2-诱导后菌液。

Fig. 2 Expression and identification of recombinant proteins

A-SDS-PAGE; B-Western blotting; M-protein marker; 1-bacterial fluid before induction; 2-bacterial fluid after induction.

## 2.3 重组蛋白的纯化与复性

收获诱导表达后的菌沉淀,经重悬超、声破菌后,破菌上清中未见明显目的条带,而主要以不溶解的包涵体形式存在于破菌沉淀中。变性溶解后的包涵体蛋白,经 DEAE 阴离子交换层析可以得到高纯度的目的蛋白,且经过透析复性后,

能够得到可溶的目的蛋白,见图 3。

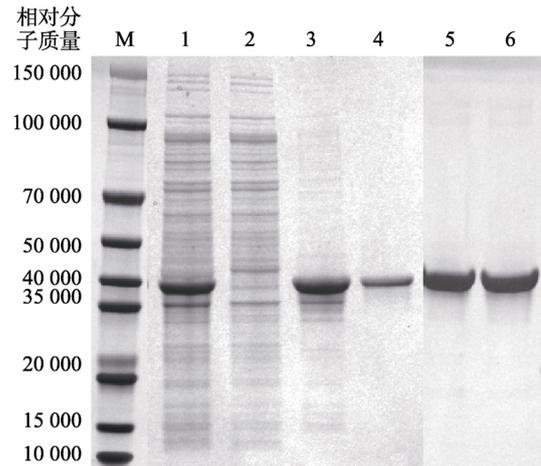


图 3 蛋白纯化过程的 SDS-PAGE 分析

M-蛋白质 marker; 1-破菌液总蛋白; 2-破菌液离心上清; 3-破菌沉淀溶解蛋白; 4-DEAE 柱纯化后蛋白; 5-复性前蛋白; 6-复性后蛋白。

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of protein purification process

M-protein marker; 1-breaking bacterial fluid total protein; 2-breaking bacterial fluid centrifuge supernatant; 3-bacterial precipitation dissolved protein; 4-DEAE column purified protein; 5-protein before renaturation; 6-protein after renaturation.

## 2.4 重组蛋白表征的检测

复性后所得目的蛋白通过 DLS 检测,重组蛋白形成了平均直径为 22.80 nm 的颗粒,且蛋白颗粒的均一性较好(分布系数 PDI: 0.25)。同时,电镜下亦观察到所得重组蛋白呈现出散在颗粒样状态,颗粒大小与粒径检测结果相近,见图 4。

## 2.5 重组蛋白免疫原性分析

2.5.1 特异性脾淋巴细胞的分化情况 取重组蛋白免疫后的小鼠脾淋巴细胞,经 HPV E7 重叠肽库刺激后,用流式细胞术分析检测淋巴细胞的分化情况,与对照组相比,100  $\mu$ g、50  $\mu$ g 2 个免疫剂量组中 CD4<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>淋巴细胞比例均显著增加(CD4<sup>+</sup>: 100  $\mu$ g 组 vs 对照组  $t=29.63$ ,

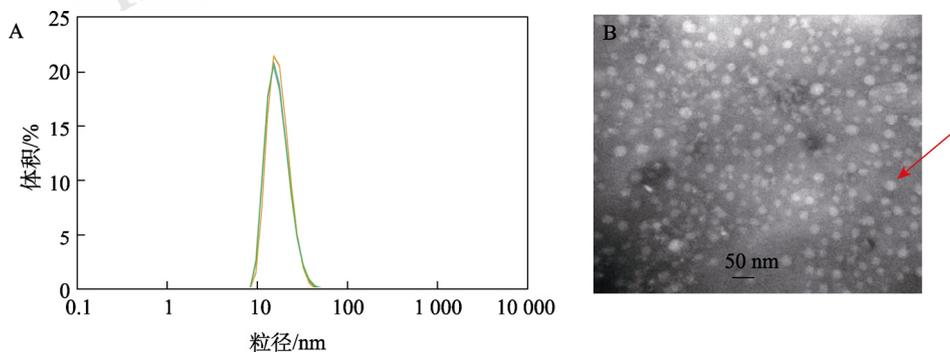


图 4 蛋白的表征检测

A-粒径检测图; B-电镜检测图。

Fig. 4 Apparent detection of proteins

A-particle size detection diagram; B-electron microscopy detection diagram.

$P < 0.001$ ; 50  $\mu\text{g}$  组 vs 对照组  $t = 8.29$ ,  $P < 0.01$ ;  
 $\text{CD8}^+$ : 100  $\mu\text{g}$  组 vs 对照组  $t = 26.81$ ,  $P < 0.001$ ;  
 50  $\mu\text{g}$  组 vs 对照组  $t = 8.31$ ,  $P < 0.001$ ), 结果见图 5。

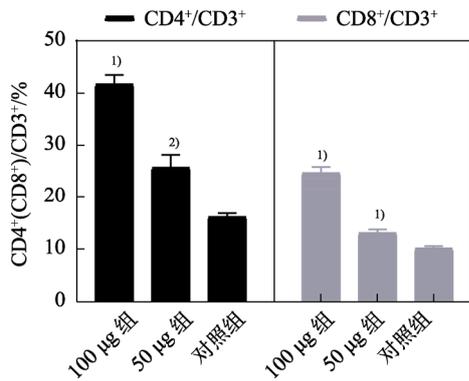


图 5 流式细胞术检测结果  
 与对照组相比, <sup>1)</sup> $P < 0.001$ , <sup>2)</sup> $P < 0.01$ 。

Fig. 5 Flow cytometry test results  
 Compared to the control group, <sup>1)</sup> $P < 0.001$ , <sup>2)</sup> $P < 0.01$ .

**2.5.2 特异性细胞毒性 T 淋巴细胞分化情况** 取重组蛋白免疫后的小鼠脾淋巴细胞, 经 HPV E7 重叠肽库刺激后, 用 ELISPOT 法检测分泌特异性 IFN- $\gamma$  的效应 T 细胞数, 结果见图 6。100  $\mu\text{g}$  组小鼠脾脏淋巴细胞分泌 IFN- $\gamma$  的效应 T 细胞数为  $(187.60 \pm 67.66)$  斑点数  $\cdot (5 \times 10^5 \text{ cells})^{-1}$ ; 50  $\mu\text{g}$  组小鼠脾脏淋巴细胞分泌 IFN- $\gamma$  的效应 T 细胞数为  $(111 \pm 42.78)$  斑点数  $\cdot (5 \times 10^5 \text{ cells})^{-1}$ ; 对照组小鼠脾脏淋巴细胞分泌 IFN- $\gamma$  的效应 T 细胞数为  $(5.37 \pm 4.27)$  斑点数  $\cdot (5 \times 10^5 \text{ cells})^{-1}$ 。与对照组相比, 重组蛋白免疫诱导的分泌特异性 IFN- $\gamma$  的效应 T 细胞数显著增加, 组间差异具有统计学意义(100  $\mu\text{g}$  组 vs 对照组  $t = -6.01$ ,  $P < 0.01$ ; 50  $\mu\text{g}$  组 vs 对照组  $t = -5.49$ ,  $P < 0.01$ )。

### 2.6 肿瘤抑制试验与抗肿瘤免疫保护

在 TC-1 小鼠肿瘤模型中, 对照组小鼠在细胞接种后第 3 周全部成瘤, 第 6 周 100% 死亡; 而 200  $\mu\text{g}$  和 100  $\mu\text{g}$  2 个剂量组可以有效抑制小鼠体内实体肿瘤的生长且在实验 6 周的周期内未见小鼠死亡。此外, 200  $\mu\text{g}$  剂量组中小鼠在实验周期内未见实体肿瘤出现, 结果见图 7~8。

### 3 讨论

HPV E7 蛋白是由近 100 个氨基酸残基组成的小且酸性的多肽, 寿命短, 极易降解, 且具有锌指结构, 从而不易获得高活性蛋白<sup>[12-13]</sup>。这对于以 E7 蛋白为靶抗原的治疗性人乳头瘤病毒 16 型肿瘤疫苗的开发带来了较大的难度, 维持 E7 蛋白在体外的结构稳定性对于其免疫提呈和免疫效力

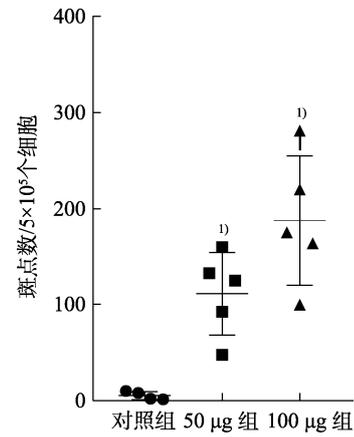


图 6 ELISPOT 检测结果

与对照组相比, <sup>1)</sup> $P < 0.01$ 。

Fig. 6 ELISPOT of the test results  
 Compared to the control group, <sup>1)</sup> $P < 0.01$ .

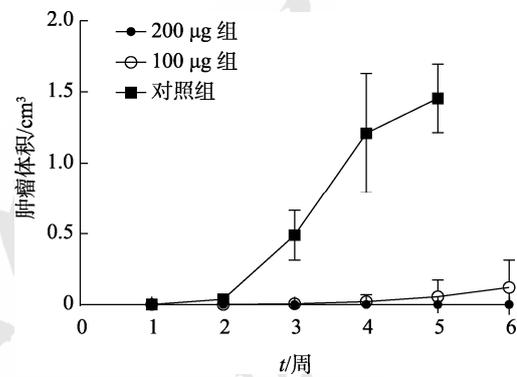


图 7 肿瘤体积变化趋势

Fig. 7 Tumor volume's change trend

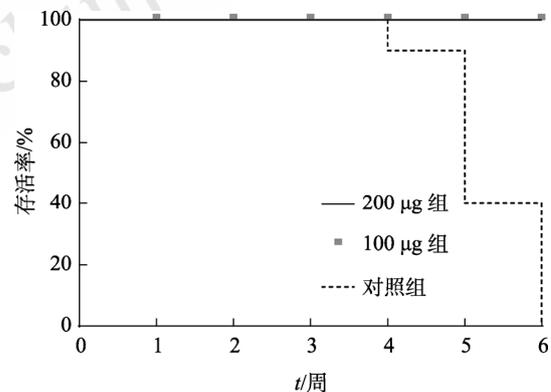


图 8 各组小鼠的存活情况

Fig. 8 Survival of mice in each group

有着至关重要的作用。研究表明, 在 p239 蛋白的结构域(452aa-606aa)空间构象中, 残基 Y485 所处的位置附近存在一个“凹槽”区域, 该区域使得其在容纳其他氨基酸的同时不会干扰自身三级结构的折叠和蛋白组装<sup>[14]</sup>。因此, 笔者选择在 485aa 附近的氨基酸位点(486aa)插入 E7 蛋白序列, 使其形成理想的嵌合蛋白。此前 Baha 等<sup>[15]</sup>利用 HEV

病毒样颗粒的特点,将猪圆环病毒 2(PCV2)通过免疫信息学等方法设计成同时控制戊型肝炎与预防 PCV2 相关疾病的抗原,并获得理想的效果。

基于上述研究,笔者探索以 HEV p239 蛋白作为 HPV16 E7 蛋白的有效“支架”,构建了一个嵌合蛋白 p239-HPV16 E7,该蛋白通过大肠杆菌表达、纯化复性后在体外形成了稳定的病毒样颗粒结构,并且在小鼠体内诱导产生了高效的特异性细胞免疫反应和抗肿瘤免疫反应。这一结果为后续开展治疗性人乳头瘤病毒 16 型肿瘤疫苗的研究奠定了基础。后续笔者所在课题组计划对该重组蛋白的抗肿瘤免疫作用开展进一步研究,包括特异性抗体的功能研究、免疫持久性研究乃至在灵长类动物身上的免疫原性评价等。同时,也考虑加入疫苗佐剂来进一步提高免疫效果,以期开发出具有良好临床表现的抗肿瘤治疗性疫苗。

## REFERENCES

- [1] SHRESTHA A D, VEDSTED P, KALLESTRUP P, et al. Prevalence and incidence of oral cancer in low-and middle-income countries: A scoping review[J]. *Eur J Cancer Care*, 2020, 29(2): 319-324.
- [2] ZHANG L N, SHI X Y, ZHANG Q, et al. HPV-16 E7-specific cellular immune response in women with cervical intraepithelial lesion contributes to viral clearance: A cross-sectional and longitudinal clinical study[J]. *Front Immunol*, 2021(12): 768144.
- [3] SCOTT-WITTENBORN N, FAKHRY C. Epidemiology of HPV related malignancies[J]. *Semin Radiat Oncol*, 2021, 31(4): 286-296.
- [4] PARK S, AUYEUNG A, LEE D L, et al. HIV-1 protease inhibitors slow HPV16-driven cell proliferation through targeted depletion of viral E6 and E7 oncoproteins[J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(5): 949.
- [5] YAO R, ZHENG H Z, WU L Q, et al. Study on effect of glycyrrhizin on apoptosis of HPV<sup>18+</sup> human cervical carcinoma HeLa cells induced by mitochondrial membrane depolarization[J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学)*, 2020, 37(22): 2727-2733.
- [6] NTANASIS-STATHOPOULOS I, KYRIAZOGLU A, LIONTOS M, et al. Current trends in the management and prevention of human papillomavirus (HPV) infection[J]. *J BUON*, 2020, 25(3): 1281-1285.
- [7] HU Z, MA D. The precision prevention and therapy of HPV-related cervical cancer: New concepts and clinical implications[J]. *Cancer Med*, 2018, 7(10): 5217-5236.
- [8] TIAN Y Y, ZHANG Q Y. Predictive value study of HR HPV DNA load, HPV16-E7 protein and VEGF\_C expression after recombinant human interferon  $\alpha_2\beta$  on squamous cell carcinoma of the cervix cancer[J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学)*, 2018, 35(6): 891-894.
- [9] FARMER E, CHENG M A, HUNG C F, et al. Vaccination strategies for the control and treatment of HPV infection and HPV-associated cancer[J]. *Recent Results Cancer Res*, 2021(217): 157-195.
- [10] CHABEDA A, YANEZ R J R, LAMPRECHT R, et al. Therapeutic vaccines for high-risk HPV-associated diseases[J]. *Papillomavirus Res*, 2018(5): 46-58.
- [11] MAZALOVSKA M, KOUOKAM J C. Progress in the production of virus-like particles for vaccination against hepatitis E virus[J]. *Viruses*, 2020, 12(8): E826.
- [12] VATS A, TREJO-CERRO O, MASSIMI P, et al. Regulation of HPV E7 stability by E6-associated protein (E6AP)[J]. *J Virol*, 2022, 96(16): e0066322.
- [13] LOU H, BOLAND J F, LI H C, et al. HPV16 E7 nucleotide variants found in cancer-free subjects affect E7 protein expression and transformation[J]. *Cancers*, 2022, 14(19): 4895.
- [14] JARIYAPONG P, XING L, VAN HOUTEN N E, et al. Chimeric hepatitis E virus-like particle as a carrier for oral-delivery[J]. *Vaccine*, 2013, 31(2): 417-424.
- [15] BAHA S, ZHANG M, BEHLOUL N, et al. Efficient production and characterization of immunogenic HEV-PCV<sub>2</sub> chimeric virus-like particles[J]. *Vet Microbiol*, 2022(268): 109410.

收稿日期: 2023-03-03

(本文责编: 陈怡心)