

减毒李斯特菌载体运送 HPV16 E7 基因重组疫苗的构建及其生物学特性

贾艳艳, 殷月兰, 谈卫军, 段斐斐, 潘志明, 陈祥, 焦新安

扬州大学 江苏省人兽共患病重点实验室 江苏省动物重要疫病和人兽共患病防控协同创新中心, 江苏 扬州 225009

贾艳艳, 殷月兰, 谈卫军, 等. 减毒李斯特菌载体运送 HPV16 E7 基因重组疫苗的构建及其生物学特性. 生物工程学报, 2016, 32(5): 683–692.

Jia YY, Yin YL, Tan WJ, et al. Construction and characterization of an attenuated recombinant *Listeria monocytogenes* vector vaccine delivering HPV16 E7. Chin J Biotech, 2016, 32(5): 683–692.

摘要: 单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, LM) 是一种理想的肿瘤疫苗载体, 本文旨在构建表达人乳头瘤状病毒 (HPV) 16 型 E7 蛋白的减毒重组李斯特菌疫苗候选株并分析其生物学特性。利用同源重组技术将 HPV16 E7 基因定点整合至 LM *hly* 基因信号肽序列下游, 获得减毒重组李斯特菌 LM4 Δ *hly*::E7, 并对该重组菌进行生物学特性研究。实验结果表明, 重组菌能够分泌表达具有免疫学活性的 E7-LLO 融合蛋白, 大小约 66 kDa; 通过激光共聚焦扫描显微镜观察到重组菌能够在 RAW264.7 细胞胞内增殖。ELISA 测定结果显示减毒重组菌能够诱导小鼠产生 E7 特异性抗体。重组菌在 C57BL/6 小鼠中 LD₅₀ 为 3.863×10^9 CFU, 低于亲本株 4 个数量级, 通过组织切片观察到重组菌对小鼠肝脏及脾脏无明显病理变化。以上表明, 本研究构建的分泌表达 E7-LLO 融合蛋白的减毒重组李斯特菌具有较好的安全性, 为下一步研究其抗肿瘤作用提供了材料, 并为研发宫颈癌的免疫治疗型候选疫苗奠定重要基础。

关键词: 减毒单核细胞增生李斯特菌, 人乳头瘤状病毒 16 型 E7 蛋白, 巨噬细胞系, 安全性

Received: September 29, 2015; **Accepted:** December 21, 2015

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 31472193, 31101841), Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions.

Corresponding author: Xin'an Jiao. Tel: +86-514-87971136; Fax: +86-514-87311374; E-mail: jiao@yzu.edu.cn

国家自然科学基金 (Nos. 31472193, 31101841), 江苏高校优势学科建设工程项目资助。

Construction and characterization of an attenuated recombinant *Listeria monocytogenes* vector vaccine delivering HPV16 E7

Yanyan Jia, Yuelan Yin, Weijun Tan, Feifei Duan, Zhiming Pan, Xiang Chen,
and Xin'an Jiao

Jiangsu Co-Innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Disease and Zoonoses, Jiangsu Key Laboratory of Zoonosis, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu, China

Abstract: *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*, LM) is an excellent tumor vaccine vector. In this study, recombinant LM vaccine candidate expressing human papillomavirus type 16 (HPV16) E7 protein was constructed and its characteristics were determined. Through homologous recombination, E7 gene was cloned in frame with the LM4 *Phly* promoter-signal sequence, and introduced into the chromosome of LM4. The recombinant strain named LM4 Δ *hly*::E7 with the plasmid-free and antibiotic-resistant gene-free was constructed. LM4 Δ *hly*::E7 could express and secrete E7-LLO fusion protein; its size is 66 kDa and has immunological activity. Furthermore, LM4 Δ *hly*::E7 could multiply in RAW264.7 macrophages by confocal laser scanning microscope. Additionally, LM4 Δ *hly*::E7 could induce specific antibodies against E7 in immunized mice in ELISA. Also, the 50% lethal dose (LD₅₀) of LM4 Δ *hly*::E7 strain was 3.863×10^9 CFU (Colony-Forming Units) in C57BL/6 mice with intraperitoneal immunization, which was more attenuated than wild type LM4. Mice immunized with LM4 Δ *hly*::E7 did not show obvious pathological change. These data show that LM4 Δ *hly*::E7 expressing E7-LLO fusion protein has good safety, which may provide the materials for research of antitumor effect and would be a promising vaccine candidate for cervical cancer.

Keywords: attenuated *Listeria monocytogenes*, HPV16 E7, macrophage cell line, safety

宫颈癌位居女性癌症死亡率中的第 2 位，是重要的公共健康问题^[1]。中国是宫颈癌的高发国之一，每年有 13.5 万人被诊断为宫颈癌，占全世界每年宫颈癌病例的 1/3^[2-3]。目前已经证实人乳头瘤状病毒 (HPV) 是引起宫颈癌的主要病原，而 HPV 的 E6、E7 蛋白特异性存在于癌细胞中，是维持细胞转化和恶性特征所必需的，常被作为宫颈癌免疫治疗的靶基因^[4-5]。

单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, LM) 是一种革兰氏阳性、兼性胞内寄生菌^[6]，一般经过消化道感染，然后通过肠上皮细胞散播至全身^[7]。LM 被吞噬细胞吞噬后，在吞噬体

内 LM 分泌毒力因子溶血素 (Listeriolysin O, LLO) 及磷脂酶 C 裂解吞噬体膜，进而逃脱至细胞胞浆。这种独特胞内生活史使 LM 能够诱导强烈的 CD8⁺T 细胞免疫和 CD4⁺T 细胞免疫应答^[8]。目前，利用 LM 诱导强烈的 T 细胞免疫应答特性，李斯特菌已试用于传染性疾病和肿瘤疾病疫苗载体的研发^[9-11]。

基于此，本研究拟以 LM4 为材料，利用穿梭载体 pKSV7 将 HPV16 E7 抗原定点整合至 LM4 的基因组 *hly* 基因信号肽序列下游，获得分泌表达 LLO-E7 融合蛋白的重组减毒李斯特菌，并对其生物学特性进行研究。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 主要菌株及载体

野生型菌株 LM4 (血清型 1/2a) 及 LM4 Δ *hly::esat-6*, RAW264.7 细胞、宿主菌 *E. coli* DH5 α 、穿梭载体 pKSV7 (Amp^r) 及 pNF8 (erm^r, gfp-mut1)、GST-E7 融合蛋白均由江苏省人兽共患病学重点实验室保存; pcDNA3.1-E7 由扬州大学医学院高慧老师惠赠; pMD 18-T 载体购自 TaKaRa 公司。

1.1.2 主要仪器

普通摇床 SCS 24 购自上海市离心机械研究所; 隔水式电热恒温培养箱购自上海跃进医疗器械厂; PCR 仪购自东胜创新生物科技有限公司; 台式冷冻小离心机 FRESCO 21 购自 Thermo 公司; 超声波裂解仪购自 SONICS & MATERIALS 公司; 蛋白质电泳仪、凝胶成像系统购自 Bio-Rad 公司; 转印仪购自 Amer Sham 公司; Biophotometer 分光光度计、台式冷冻离心机 Centrifuge 5810R 购自 eppendorf 公司。

1.1.3 主要试剂

细菌基因组 DNA 抽提纯化试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司; DNA 聚合酶、高保真 DNA 聚合酶、DNA 回收试剂盒及限制性核酸内切酶、DNA Marker、X-Gal 及 IPTG 购自大连宝生物 (TaKaRa) 公司; T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司; 氨苄青霉素 (Amp)、氯霉素购自华美公司; BHI 培养基 (BactoTM brain heart infusion) 购自 BD 公司; 过硫酸铵 (AP)、Tris、十二烷基磺酸钠 (SDS)、三氯乙酸 (TCA) 购自上海国药集团; 羊抗鼠 IgG-HRP 购自 Sigma 公司及 HPV16 E7 鼠单克隆抗体 (clone 8C9) 购自

Invitrogen 公司。

1.1.4 实验动物

6 周龄 SPF 级 C57BL/6 雌性小鼠购自扬州大学比较医学中心。

1.2 引物设计

参照 GenBank 上公布的基因序列设计引物, 由北京六合华大基因科技股份有限公司合成。

1.3 重组菌 LM4 Δ *hly::E7* 的构建

1.3.1 *hly a*、*hly b* 及 HPV16 E7 基因的 PCR 扩增及拼接

参照细菌基因组抽提试剂盒说明抽提 LM4 基因组 DNA, 以 LM4 基因组 DNA 为模板, 分别扩增上下游同源臂 *hly a* 及 *hly b*; 以 pcDNA3.1-E7 为模板, 扩增 E7 片段。

利用重叠延伸 PCR (SOEing PCR) 将 *hly a*、E7 及 *hly b* 拼接成 a-E7-b, 按照 DNA 凝胶回收试剂盒程序回收 a-E7-b 片段, 连接至 pMD18-T

表 1 实验所用引物

Table 1 Primer pairs used to amplify related genes

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
<i>hly a</i> 1	CCGGTACCAGGTTTGTGTGTC AGGTAGAGC	525
<i>hly a</i> 2	GTAGGTGTATCTCCATG TGAAATTGAATTTCTTTAT	
E7-F	ATAAAGAAAATTCAATTTTCA TGGAGATACACCTAC	330
E7-R	CGTGTTCCTTTTCGATTGGTGG TTTCTGAGAACA	
<i>hly b</i> 1	TGTTCTCAGAAACCACCAATCG AAAAGAAACACG	730
<i>hly b</i> 2	GGGTCTAGAACTTGAGATATAT GCAGGAGG	
<i>hly b</i> +	GTTCTACATCACCTGAGACAGA TTTTCCGC	

Restriction enzyme sites incorporated into primers are underlined.

载体, 鉴定正确的 pMD18-T-aEb 克隆送北京六合华大基因科技股份有限公司测序。

1.3.2 pKSV7-aEb 的构建

pMD18-T-aEb 及 pKSV7 经过 *Kpn* I、*Xba* I 双酶切消化后, 分别回收酶切产物, 置 16 °C 连接过夜, 将连接产物转化至大肠杆菌 DH5 α , 抽提重组质粒 pKSV7-aEb, 酶切鉴定正确的重组质粒用于重组李斯特菌的构建。

1.3.3 电转化

用电转化方法将重组质粒 pKSV7-aEb 导入感受态 LM4 中, 通过温度和氯霉素抗性压力下实现同源重组, 最终将目的抗原 E7 定点整合至 LM4 的 *hly* 启动子下游, 同时实现 *hly* 毒力区 42 bp 片段的缺失^[12], 获得在氯霉素抗性下不能生长且经 PCR 及 RT-PCR 鉴定正确的重组菌 LM4 Δ *hly*::E7。

1.4 Western blotting 分析

采用 TCA 方法提取重组菌分泌蛋白, 将分泌蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 然后电转印至 NC 膜, 1% BSA 的 PBST 溶液封闭过夜, 次日, 与 HPV16 E7 鼠单克隆抗体在 37 °C 孵育 2–3 h, 然后用 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 二抗孵育 1 h, ECL 显色。

1.5 重组菌 LM4 Δ *hly*::E7 在巨噬细胞中的增殖

将 pNF8 (*erm*^r, *gfp*-*mut*1) 电转化至感受态 LM4 Δ *hly*::E7, 构建表达 GFP 的重组菌 LM4 Δ *hly*::E7 (pNF8)。参照殷月兰等的方法^[13], 将 LM4 Δ *hly*::E7 (pNF8) 以 MOI 为 20–1 (细菌数/细胞数) 感染 RAW264.7 巨噬细胞; 取培养 3 h 和 5 h 后的细胞爬片进行固定、鬼笔环肽染色, 最终利用激光共聚焦扫描显微镜观察 LM4 Δ *hly*::E7 (pNF8) 在巨噬细胞中的侵袭与

增殖情况。

1.6 生长曲线的测定

将 LM4、LM4 Δ *hly*::E7 接种于 BHI 培养基中振荡培养 12–14 h, 然后取 1 mL 菌液用 PBS 洗涤 2 次, 取适当体积菌液接种至 5 mL BHI 培养基中调整 OD_{600} 值至 0.05, 放置在 37 °C 振荡培养, 分别在 0 h、1.5 h、2 h、3 h、4 h、5 h、6.5 h、8 h、9.5 h、10.5 h 及 22.5 h 等时间点后取出 2 支菌液, 测定其 OD_{600} 值, 绘制其生长曲线。

1.7 溶血活性的测定

LM4、LM4 Δ *hly*::E7 在 BHI 培养基中 37 °C 培养 15 h 后, 菌液离心后取上清, 用 PBS 调整 OD_{600} 至相同大小, 取 70 μ L 上清液加至 96 孔 V 型板中, 用 PBS 从原液到 2⁷ 系列倍比稀释, 然后每孔加入 30 μ L 1% 绵羊红细胞, 微振荡混匀, 96 孔 V 型板放置 37 °C 培养箱, 1 h 后观察溶血情况。

1.8 重组菌对 C57BL/6 小鼠的 LD₅₀ 测定

将过夜培养物按 1:20 转接 BHI 培养基, 37 °C 培养 4 h 后, 用 PBS 洗涤, 测定其 OD_{600} 并调整至所需大小。将 6 周龄 C57BL/6 小鼠随机分成 5 组, 每组 5 只, 腹腔注射, 每只小鼠注射剂量为 100 μ L, 呈倍数递减。观察 2 周, 记录小鼠死亡情况, 并采用 Reed-Muench 方法计算重组菌对 C57BL/6 小鼠的半数致死量^[14]。

1.9 免疫鼠脏器的组织切片观察

6–8 周龄 C57BL/6 雌性小鼠, 随机分为 2 组, 每组 3 只, 在 0 d、7 d, 分别腹腔注射 LM4 Δ *hly*::E7、LM4 (注射剂量为 0.1 LD₅₀) 和 PBS, 于 2 次免疫后 7 d 取小鼠的脾脏、肝脏用 13% 甲醛固定, 用于组织切片的制作, 分析组织的显微变化。

1.10 ELISA 检测免疫鼠血清中的 E7 特异性抗体

免疫后 7 d, 无菌采集分离小鼠血清以 GST-E7 融合蛋白为检测抗原, 应用间接 ELISA 方法测定免疫组的 E7 抗体效价。

1.11 数据分析

应用 SPSS16.0 软件对试验数据进行方差分析及卡方检验; 应用 GraphPad Prism 5.0 软件作图。

2 结果与分析

2.1 重组菌 LM4 Δ *hly*::E7 的构建

2.1.1 *hly*-E7-b 片段的 PCR 扩增

采用 PCR 扩增出 *hly* a、*hly* b、HPV16 E7 等 3 个基因片段, 电泳结果显示产物大小分别为 525 bp、291 bp 及 730 bp, 与预期结果相符合。通过 2 次 SOEing PCR 扩增, 将 *hly* a、E7、*hly* b 拼接成 *hly*-E-b, 电泳结果显示 PCR 产物大小为 1 586 bp, 与预期相符。

2.1.2 pKSV7-*hly*-E-b 的构建及鉴定

将 *hly*-E-b 拼接片段连接至 pMD-18T 载体, 将鉴定正确的重组质粒 pMD-18T-aEb 与 pKSV7 经过 *Kpn* I、*Xba* I 双酶切消化后, 连接转化。抽提重组质粒, 进行 PCR 鉴定, 电泳结果显示出 PCR 产物为 1 586 bp, 然后经过双酶切鉴定, 产物呈现出 6 900 bp 和 1 586 bp 两条带, 与预期相符 (图 1), 说明重组质粒构建成功, 命名为 pKSV7-*hly*-E-b。

2.1.3 重组菌 LM4 Δ *hly*::E7 的鉴定及 Western blotting 分析

将重组质粒 pKSV7-*hly*-E-b 电转化至 LM4 感受态中, 经过同源重组将 E7 片段定点整合至 *hly* 的启动子下游得到重组菌, 然后利用 *hly* a 上游引物与 *hly* b 下游区外侧设计的一条引物

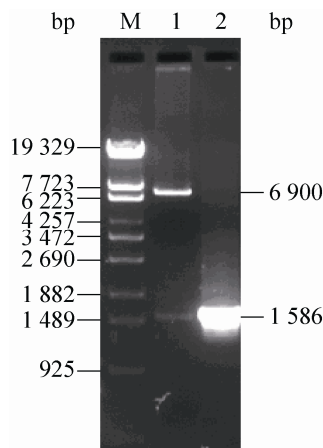


图 1 重组质粒 pKSV7-*hly*-E-b 的 PCR 鉴定及酶切鉴定

Fig. 1 Identification results of pKSV7-*hly*-E-b using PCR and enzyme digestion assay. M: λ -T14; Lane 1: pKSV7-*hly* a-E-b digested with *Kpn* I and *Xba* I; Lane 2: PCR product of pKSV7-*hly* a-E-b.

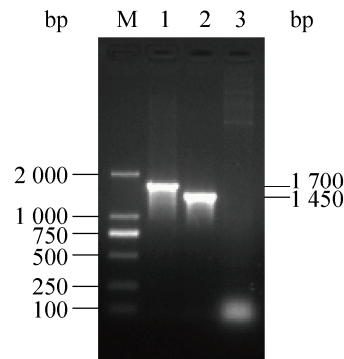


图 2 LM4 Δ *hly*::E7 的 PCR 鉴定

Fig. 2 PCR identification results of LM4 Δ *hly*::E7 (primer *hly* a1/*hly* b+). M: DL2 000. 1: amplified product of LM4 *hly*::E7; 2: amplified product of wild type LM4; 3: amplified product of pKSV7-*hly* aEb.

*hly*b+进行 PCR 扩增, 鉴定结果显示重组菌的扩增片段为 1 700 bp, 亲本株 LM4 的扩增片段为 1 450 bp, pKSV7-*hly*-E-b 无任何扩增片段, 且经测序证明, 与 LM4 的扩增片段相比, 重组菌

的 1 700 bp 扩增片段中增加了 E7 基因序列,少了 42 bp 的 *hly* 毒力区,由此说明减毒重组菌构建成功并命名为 LM4 Δ *hly*::E7。

提取重组菌 LM4 Δ *hly*::E7 的分泌蛋白进行 Western blotting 分析,结果显示利用 HPV16 E7 单抗检测到在 66 kDa 左右处有一条清晰的浓染带,与预期相符(图 3),表明 LM4 Δ *hly*::E7 能够分泌表达具有良好免疫反应性的 HPV16 E7 蛋白。

2.2 重组菌 LM4 Δ *hly*::E7 (pNF8) 在巨噬细胞中的增殖试验

为了检测重组菌 LM4 Δ *hly*::E7 在巨噬细胞中的增殖情况,构建了表达 GFP 的重组菌 LM4 Δ *hly*::E7 (pNF8),LM4 Δ *hly*::E7 (pNF8) 感染 RAW264.7 细胞后,激光共聚焦扫描显微镜观察到感染 3 h 时,RAW264.7 细胞胞内有少量的发绿色荧光重组菌,而感染 5 h 时胞内出现了大量绿色荧光的重组菌(图 4)。

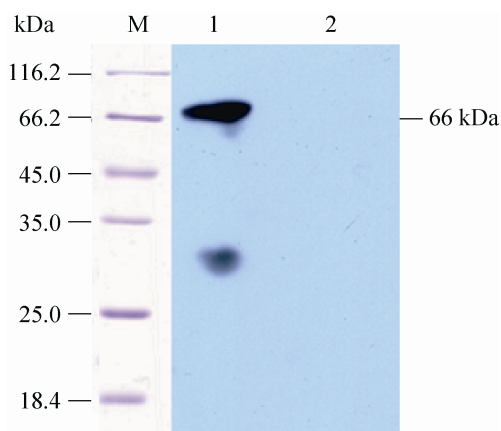


图 3 LM4 Δ *hly*::E7 的 Western blotting 分析

Fig. 3 Western blotting analysis of proteins secreted by LM4 Δ *hly*::E7. M: protein marker; 1: LM4 Δ *hly*::E7; 2: wt LM4.

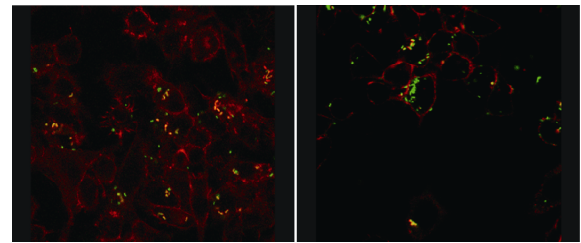


图 4 LM4 Δ *hly*::E7(pNF8)在巨噬细胞 RAW264.7 中的增殖

Fig. 4 Intracellular localization of LM4 Δ *hly*::E7(pNF8) strain in RAW264.7 cells (1 000 \times).

2.3 重组菌 LM4 Δ *hly*::E7 的生长曲线测定

LM4 Δ *hly*::E7、LM4 的生长曲线见图 5,从图中可以看出 LM4 Δ *hly*::E7 与 LM4 的生长曲线基本一致,均表现为培养 1 h 至 7 h 期间,细菌进入快速增长期,7-9 h 时,细菌增殖进入稳定期。

2.4 重组菌 LM4 Δ *hly*::E7 的溶血性试验

通过溶血性实验,显示出重组菌 LM4 Δ *hly*::E7 的溶血效价为 2^3 ,野生型细菌 LM4 的溶血效价为 2^4 (图 6),表明 E7 插入 LM4 的 *hly* 下游并未导致 LLO 的完全失活。

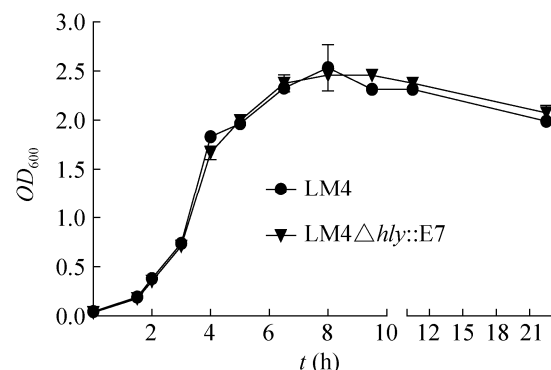


图 5 重组菌 LM4 Δ *hly*::E7 的生长曲线

Fig. 5 Growth curve of LM4 Δ *hly*::E7 strain.

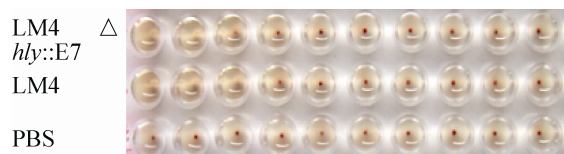


图6 溶血性试验

Fig. 6 Haemolytic activities of LM4 and LM4 Δ hly::E7 strains.

2.5 重组菌 LM4 Δ hly::E7 的 LD₅₀ 测定

小鼠死亡情况见表 2, 通过 Reed-Muench 法计算重组菌 LM4 Δ hly::E7 的 LD₅₀ 为 3.863×10^9 CFU, 而 LM4 的 LD₅₀ 为 1.06×10^5 CFU, 结果显示重组菌 LM4 Δ hly::E7 的 LD₅₀ 高于野生菌 LM4 的 4 个数量级。

2.6 组织切片观察结果

通过组织切片观察到 LM4 腹腔感染小鼠的肝脏呈现肝细胞肿胀, 水泡变性, 肝窦狭窄甚

至闭塞, 细胞浆有大小不等的水泡; 脾脏结构模糊, 巨噬细胞浸润。重组菌 LM4 Δ hly::E7 以高于 LM4 10^5 倍的细菌量感染小鼠后, 小鼠肝脏仅表现出轻微的炎症反应, 少量炎性细胞浸润, 脾脏无明显病理变化 (图 7)。

2.7 血清中 E7 抗体检测结果

利用 ELISA 方法检测各免疫组小鼠血清中 E7 抗体水平, 图 8 显示 LM4 Δ hly::E7 免疫组小鼠血清中 E7 抗体效价为 1:400, 试验结果表明构建的重组李斯特菌能够诱导机体产生 E7 特异性的体液免疫应答。

3 讨论

目前, 重组李斯特菌疫苗用于癌症免疫治疗成为众学者的研究方向之一^[15-17], 其采用的构建方式多数是应用质粒互补系统^[18-20], 构建

表 2 LM 菌株对 C57BL/6 小鼠的 LD₅₀ 测定Table 2 LD₅₀ of LM strains for C57BL/6 mice

Dose	LM4(1×10^5 CFU)					LM4 Δ hly::E7(1×10^8 CFU)				
	39.6	13.2	4.4	1.47	0.49	100	50	25	12.5	6.25
Mortality	5/5	5/5	5/5	4/5	0/5	5/5	4/5	0/5	0/5	0/5
LD ₅₀	1.06×10^5					3.863×10^9				

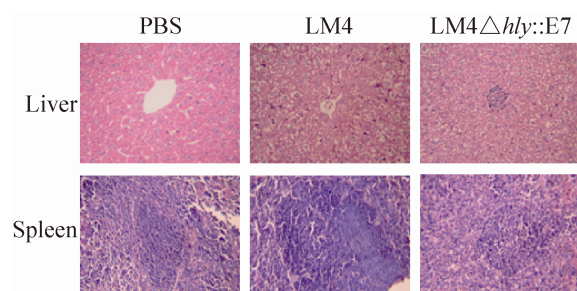


图7 不同免疫组的脾脏及肝脏组织切片

Fig. 7 Spleen and liver tissue sections from mice in different groups (400 \times).

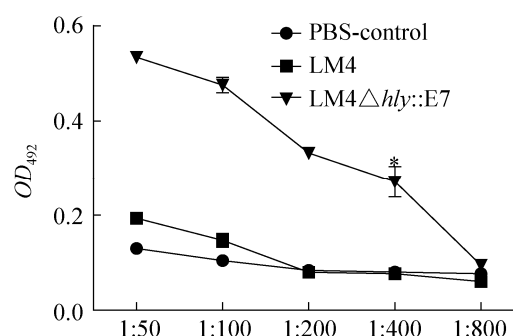


图8 不同免疫组血清中的 E7 抗体水平

Fig. 8 Serum antibodies against E7 antigen in different regimens.

的重组菌需要抗生素的维持,并存在质粒被脱掉的隐患。因此,本研究利用穿梭载体 pKSV7 通过同源重组技术将 HPV16 E7 抗原整合至 LM4 基因组内,在无压力条件下传代脱掉质粒,进行筛选重组菌时,首先选择在 BHI 平板生长,而在 BHI^{cm+} 不生长的细菌,然后在 *hly b* 下游区的外侧设计一条引物,通过 PCR 扩增鉴定外源抗原是否整合至基因组及质粒是否完全脱掉,最终获得稳定分泌表达 HPV16 E7 抗原的重组菌株,该减毒重组菌不需要抗生素的维持,安全性好,在临床应用上更有优势。

LLO 是一类胆固醇依赖的孔形成素,单增李斯特菌的重要毒力蛋白^[21],是维持 LM 逃脱吞噬体进入胞浆及诱导 MHC I 类抗原提呈途径所必需的^[22-23]。同时研究表明,LLO 蛋白能够增强肿瘤抗原的免疫原性,增加肿瘤特异性 CD8⁺T 细胞产生的数量,有助于疫苗以 CD8⁺T 细胞免疫应答方式消除肿瘤,在肿瘤疫苗研发中具有很好的佐剂效应^[24-25]。因此,在构建重组李斯特菌时,将 E7 基因定点插入至 *hly* 基因的信号肽下游,以期获得分泌表达 E7-LLO 融合蛋白的重组菌,提取减毒重组菌的分泌型蛋白进行 Western blotting 分析,结果显示减毒重组菌能够分泌表达具有免疫学活性的 E7-LLO 蛋白,为减毒重组菌发挥抗肿瘤作用奠定重要基础。

考虑到疫苗的安全性,我们在构建重组菌的同时,缺失了 LLO 部分毒力区,LD₅₀ 测定结果显示重组菌的毒力比亲本株 LM4 显著下降,且通过组织切片观察到重组菌对小鼠肝脏及脾脏无明显病理变化,安全性较高。而溶血性试验表明 E7 的插入及 LLO 部分毒力区的缺失并未导致 LM4 Δ *hly::E7* 中 LLO 活性的完全丧失,

激光共聚焦扫描显微镜观察到重组菌能够在 RAW264.7 细胞内增殖,这为重组菌诱导 CD8⁺T 细胞免疫应答奠定基础。

生长曲线测定结果显示重组菌和野生型细菌无显著差别,表明外源抗原 E7 插入 LM4 基因组内,没有造成细菌的代谢负担,也没有改变细菌的正常生长规律。此外,对重组菌进行连续传代,利用 RT-PCR 技术能够检测到第 30 代重组菌中 E7 的表达(另文发表),表明该重组菌具有较好的遗传稳定性。同时血清抗体检测结果显示构建的减毒重组李斯特菌能够诱导小鼠产生 E7 特异性的体液免疫应答。

本研究成功地构建了表达 E7 蛋白的减毒重组李斯特菌,并对其溶血活性、毒力及体液免疫应答等特性进行了分析,结果显示该减毒重组菌分泌表达具有良好免疫学活性的 E7-LLO 融合蛋白,毒力比亲本株显著降低,安全性好,且能够诱导特异性抗体的产生,这为后续抗肿瘤研究提供了重要的生物材料,为宫颈癌候选疫苗的研发提供了新思路。

REFERENCES

- [1] Bruni L, Diaz M, Castellsagué X, et al. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *J Infect Dis*, 2010, 202(12): 1789-1799.
- [2] Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*, 2010, 127(12): 2893-2917.
- [3] Zhang HY, Fei MD, Jiang Y, et al. The diversity of human papillomavirus infection among human immunodeficiency virus-infected women in Yunnan, China. *Virol J*, 2014, 11(1): 202, doi:

- 10.1186/s12985-014-0202-3.
- [4] Honegger A, Schilling D, Bastian S, et al. Dependence of intracellular and exosomal microRNAs on viral E6/E7 oncogene expression in HPV-positive tumor cells. *PLoS Pathog*, 2015, 11(3): e1004712, doi: 10.1371/journal.ppat.1004712.
- [5] Zacapala-Gómez AE, Del Moral-Hernández O, Villegas-Sepúlveda N, et al. Changes in global gene expression profiles induced by HPV16 E6 oncoprotein variants in cervical carcinoma C33-A cells. *Virology*, 2016, 488:187–195.
- [6] Mitchell G, Ge L, Huang QY, et al. Avoidance of autophagy mediated by PlcA or ActA is required for *Listeria monocytogenes* growth in macrophages. *Infect Immun*, 2015, 83(5): 2175–2184.
- [7] Pillich H, Chakraborty T, Mraheil MA. Cell-autonomous responses in *Listeria monocytogenes* infection. *Future Microbiol*, 2015, 10(4): 583–597.
- [8] Rothman J, Paterson Y. Live-attenuated *Listeria*-based immunotherapy. *Expert Rev Vaccines*, 2013, 12(5): 493–504.
- [9] Wood LM, Paterson Y. Attenuated *Listeria monocytogenes*: a powerful and versatile vector for the future of tumor immunotherapy. *Front Cell Infect Microbiol*, 2014, 4: 51, doi: 10.3389/fcimb.2014.00051.
- [10] Lin QQ, Zhou MY, Xu ZK, et al. Construction of two *Listeria ivanovii* attenuated strains expressing *Mycobacterium tuberculosis* antigens for TB vaccine purposes. *J Biotechnol*, 2015, 196–197: 20–26.
- [11] Abdallah DS, Bitar PA, Oliveira F, et al. A *Listeria monocytogenes*-based vaccine that secretes sand fly salivary protein LJM11 confers long-term protection against vector-transmitted *Leishmania major*. *Infect Immun*, 2014, 82(7): 2736–2745.
- [12] Kang MQ, Cai XX, Tan WJ, et al. Construction and characterization of *Listeria monocytogenes* Δhfq mutant strain. *Acta Microbiol Sin*, 2015, 55(4): 433–439 (in Chinese).
- 康美琴, 蔡雪薛, 谈卫军, 等. 单核细胞增生李斯特菌 *hfq* 基因缺失株的构建及其生物学特性. *微生物学报*, 2015, 55(4): 433–439.
- [13] Yin YL, Tian DB, Jia YY, et al. Attenuated *Listeria monocytogenes*, a *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 antigen expression and delivery vector for inducing an immune response. *Res Microbiol*, 2012, 163(8): 540–549.
- [14] Zamoiskii EA. Evaluation of Reed-Muench method in determination of activity of biological preparations. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*, 1956, 27(1): 77–83.
- [15] Kennedy GT, Judy BF, Bhojnagarwala P, et al. Surgical cytoreduction restores the antitumor efficacy of a *Listeria monocytogenes* vaccine in malignant pleural mesothelioma. *Immunol Lett*, 2015, 166(1): 28–35.
- [16] Jia YY, Yin YL, Duan FF, et al. Prophylactic and therapeutic efficacy of attenuated *Listeria monocytogenes*-based vector vaccine delivering HPV16 E7 antigen in a murine model. *Int J of Mol Med*, 2012, 30(6): 1335–1342.
- [17] van Pijkeren JP, Morrissey D, Monk IR, et al. A novel *Listeria monocytogenes*-based DNA delivery system for cancer gene therapy. *Hum Gene Ther*, 2010, 21(4): 405–416.
- [18] Keenan BP, Saenger Y, Kafrouni MI, et al. A *Listeria* vaccine and depletion of T-regulatory cells activate immunity against early stage pancreatic intraepithelial neoplasms and prolong survival of mice. *Gastroenterology*, 2014, 146(7): 1784–1794.e6
- [19] Hannan R, Zhang HG, Wallecha A, et al. Combined immunotherapy with *Listeria monocytogenes*-based PSA vaccine and radiation therapy leads to a therapeutic response in a murine

- model of prostate cancer. *Cancer Immunol Immunother*, 2012, 61(12): 2227–2238.
- [20] Le DT, Brockstedt DG, Nir-Paz R, et al. A live-attenuated *Listeria* vaccine (ANZ-100) and a live-attenuated *Listeria* vaccine expressing mesothelin (CRS-207) for advanced cancers: phase 1 studies of safety and immune induction. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(3): 858–868.
- [21] Walls ZF, Goodell S, Andrews CD, et al. Mutants of listeriolysin O for enhanced liposomal delivery of macromolecules. *J Biotechnol*, 2013, 164(4): 500–502.
- [22] Hernández-Flores KG, Vivanco-Cid H. Biological effects of listeriolysin O: implications for vaccination. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 360741–360749.
- [23] Seveau S. Multifaceted activity of listeriolysin O, the cholesterol-dependent cytolysin of *Listeria monocytogenes*. *Subcell Biochem*, 2014, 80: 161–195.
- [24] Neeson P, Pan ZK, Paterson Y. Listeriolysin O is an improved protein carrier for lymphoma immunoglobulin idiotype and provides systemic protection against 38C13 lymphoma. *Cancer Immunol Immunother*, 2008, 57(4): 493–505.
- [25] Hamon MA, Ribet D, Stavru F, et al. Listeriolysin O: the Swiss army knife of *Listeria*. *Trends Microbiol*, 2012, 20(8): 360–368.

(本文责编 陈宏宇)