维普资讯 http://www.cqvip.com

局解手术学杂志 2007年第16卷第6期
J Regional Anat & Operative Surg, 2007, Vol. 16, No. 6

HPV18E2蛋白CTL表位多肽的构建与表达

汪 云[1]，肖 岚[1]，吕凤林[2] （1.第三军医大学基础医学部组织学与胚胎学教研室，重庆 400038；2.第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所第一研究室，重庆 400042）

［摘 要］ **目的** 分析HPV18E2蛋白的CTL表位，合成并纯化这些表位多肽，构建表达HPV18E2蛋白的靶细胞，检验特异性CTL对靶细胞的杀伤效果，为进一步研制人乳头瘤病毒18型（HPV18）基因工程疫苗打下基础。**方法** 以重组质粒（pBR322-HPV18）为模板，利用PCR方法扩增HPV18E2 DNA片段，将HPV18E2 DNA与加强绿色荧光质粒（pIRES$_2$-EGFP）重组构建重组质粒（pIRES$_2$-HPV18E2-EGFP）。用酶切电泳及测序检查质粒重组后序列正确性。重组质粒转染Hela细胞。^{51}Cr释放实验评估CTL杀伤能力。**结果** 克隆重组质粒pIRES$_2$-HPV18E2-EGFP酶切后显示的酶切图谱与预期相同，而且测序验证插入片段全序列无改变。转染并用G418筛选后，在荧光显微镜下可见绿色荧光细胞的表达。三条候选多肽特异性杀伤能力分别为60.00%、71.29%和80.00%。**结论** 三条备选肽段都具有明显的杀伤效应，均为HPV18E2蛋白的有效CTL表位。

［关键词］人乳头瘤病毒18型；E2基因；多肽
［中图分类号］Q784；R737.33 ［文献标识码］A ［文章编号］1672-5042(2007)06-0376-03

Construction and expression of recombinant plasmid pIRES$_2$-HPV18-EGFP

WANG Yun, XIAO Lan, LÜ Feng-lin (Department of Histology and Embryology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To analyse the function of epitope-specifical HPV18E2 CTL. **Methods** The E2 gene of HPV18 was amplified by PCR from pBR322-HPV18 and cloned into pIRES$_2$-EGFP. The sequence of cloned HPV18E2 was confirmed by restriction analysis and DNA sequencing. Then transfected into HeLa cells. The functional analysis is valued by ^{51}Cr-release assay. **Results** HPV18 E2 gene fragment was amplified by PCR and ligated to pIRES$_2$-EGFP, then transfected into HeLa cells successfully. The expression of green fluorescence cells was observed by fluorescence microscopy. The specific lysis of the cells from the three peptides was 60.00%, 71.29% and 80.00%. **Conclusion** The three peptides have the ability to active epitope-specifical CTL. Based on them, a new peptides vaccine maybe constructed.

Keywords: human papillomavirus type18; E2 gene; polypeptide

宫颈癌是最常见的妇科恶性肿瘤。宫颈癌的发生可能与性生活紊乱，过早性生活，早年分娩，多产，地理环境等因素有关。分子生物学研究结果显示90%以上的宫颈癌伴有人乳头瘤病毒（HPV）感染。宫颈癌以鳞状细胞癌最为多见，其次为腺癌和腺鳞癌等。高危型HPV的感染是诱发宫颈癌的必要条件，尤其是HPV16型和18型。E2是一种反式激活蛋白，涉及病毒DNA转录的反式激活，能延缓染色体有丝分裂的进程，具有抑制癌细胞生长的功能。本实验是以加强绿色荧光质粒pIRES$_2$-EGFP为载体，构建了HPV18E2蛋白的真核表达质粒pIRES$_2$-HPV18E2-EGFP，为制作宫颈上皮内瘤变的治疗性多肽疫苗打下基础。

［基金项目］国家自然科学基金资助项目（30170884）
［作者简介］汪 云（1980－），女，四川省成都市人，助教，硕士，主要从事宫颈癌方面的研究。电话：(023)68752229
［收稿日期］2007-08-30 ［修回日期］2007-10-15

1 材料与方法

1.1 材料

菌株：E. coli DH5（由本实验室保存）。质粒：①pBR322/HPV18，含目的基因的重组质粒，由德国癌症研究中心E-M de Villiers教授惠赠；②pIRES$_2$-EGFP：含绿色荧光蛋白报告基因的真核表达载体，Clontech公司，由Professor Roger Y. Tsien（University of California, San Diego, U.S.A）惠赠，含有Kan$^+$抗性基因。HeLa细胞株，购自协和医科大学基础医学研究所。主要试剂：pfu高保真DNA聚合酶（上海生物工程公司）；质粒抽提试剂盒（Omega公司，美国）；DNA凝胶回收试剂盒（上海华舜生物有限公司）；BamH I、EcoR I内切酶（大连TaKaRa公司）；T_4DNA连接酶试剂盒（大连TaKaRa公司）；DL2000 Marker（大连TaKaRa公司）；DL15000 Marker（大连TaKaRa公司）；PCR克隆引物（上海生物工程公司），上游引物：5'-CGGAATTCATGGAGACTCTTTGCC-3'；（下划线部分为BamH I酶切位点，5'端为保护性碱基），下游引物5'-CGGAATTCATGCAGACACCGAAGC-3'（下划线部分为EcoR I酶切位点，5'端为保护性碱基）；Gene Jammer Transfection Reage（Stratagene公司，美国）；质粒中量抽

维普资讯 http://www.cqvip.com

提试剂盒(Omega公司,美国);DMEM培养基(Hyclone,美国);胎牛血清(四季青公司,中国);HEPES(GIBCO公司,美国);胰蛋白酶(Sigma公司,美国)。

1.2 实验方法

pIRES$_2$-HPV18E2-EGFP重组质粒的构建及质粒DNA转染HeLa细胞。外周血单个核细胞的分离及经典^{51}Cr释放实验。

2 结果

2.1 重组质粒酶切鉴定结果

质粒pIRES$_2$-HPV18E2-EGFP经BamH I和EcoR I双酶切后,1%琼脂糖凝胶电泳。重组质粒双酶切在DL2000 Marker 1 000 bp条带稍靠后处出现两条特异性条带,应分别为载体片段和目的片段,初步证明构建正确(图1)。

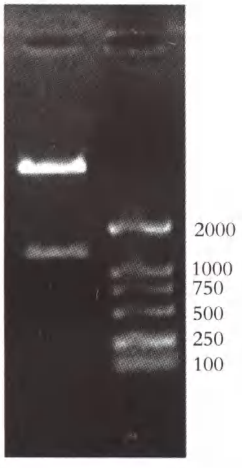


图1 重组质粒pIRES$_2$-HPV18E2-EGFP酶切产物电泳

2.2 重组质粒DNA序列测定

质粒pIRES$_2$-HPV18E2-EGFP由重庆医科大学分子生物学实验室测序。测序结果与NCBI公布的HPV18E2基因对比表明,插入的基因序列与HPV18E2基因序列正确吻合,表明重组质粒成功,命名为pIRES$_2$-HPV18E2- EGFP。

2.3 HeLa细胞pIRES$_2$-HPV18E2-EGFP绿色荧光蛋白的表达

转染后第4天加入G418进行筛选,在G418终浓度为600 mg/L时,细胞大量死亡,仅余少量贴壁细胞成活。维持此筛选浓度,培养基血清浓度改为20%,再筛选7 d后,荧光显微镜下见成活的贴壁细胞中,带有荧光的明显增多,约占细胞总数的50%(图2)。由于表达报告基因的细胞必然同时表达目的基因,转染成功的同时已成功构建表达HPV18E2蛋白的靶细胞模型。

2.4 特异性CTL杀伤效能的检测

经三条备选肽段刺激后得到的CTL具有明显的表位特异性杀伤能力。随着CTL与靶细胞比例(效靶比)的增加,靶细胞溶破率亦不断升高。而无关肽刺激得到的CTL在与靶细胞的反应中,未体现出明显的杀伤效果,当效靶比为12.5:1、25:1和50:1时特异性杀伤率均小于5%,而在效靶比为100:1时,也仅为2.7%,远远小于备选肽段的特异性杀伤率(图3)。

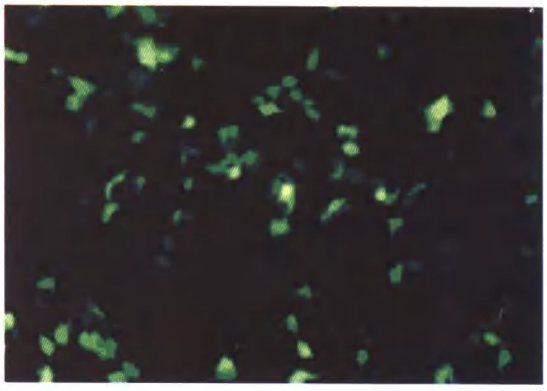


图2 pIRES$_2$-HPV18E2-EGFP绿色荧光蛋白在HeLa细胞中的表达

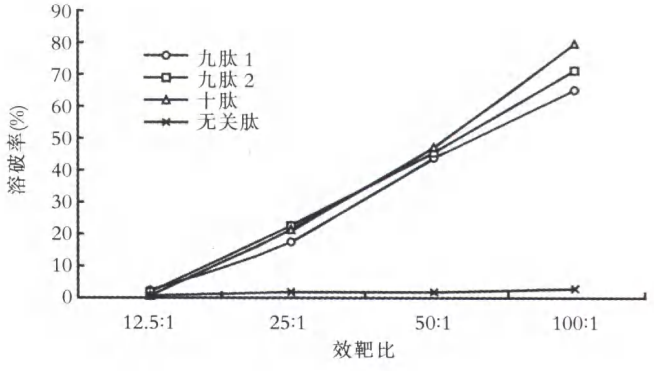


图3 特异性CTL对靶细胞的溶破率

在效靶比为12.5:1、25:1和50:1时,三条肽段刺激得到的CTL杀伤效应没有明显的区别,而在效靶比为100:1时,肽段3诱导得到的特异性CTL杀伤效应明显高于肽段2,而肽段2又明显高于肽段1,三者的特异性杀伤率从高到低依次为60.00%、71.29%和80.00%,都具有明显的杀伤效应,说明三条备选肽段均为HPV18E2蛋白的有效CTL表位。

3 讨论

HPV18E2蛋白编码基因序列位于HPV18基因组第2 817至3 914位,其蛋白由365个氨基酸构成[1]。E2是一种反式激活蛋白,涉及病毒DNA转录的反式激活。而且E2能延缓染色体有丝分裂的进程[2]。在HPV相关的恶性肿瘤中,病毒DNA常整合到宿主染色体中。相比之下,在癌前病变及宫颈上皮内瘤样变中却很少有整合。整合形式的HPV才具有恶性转化能力,因为HPV-DNA控制了宿主基因物质而产生

维普资讯 http://www.cqvip.com

HPV编码的蛋白。因此,整合常被认为是癌前病变转变为癌的激活机制之一[3]。HPV中的16型和18型是引发宫颈癌的主要型别。有研究发现HPV18感染在腺癌及腺鳞癌中更常见[4]。而且更易发生骨盆淋巴结转移和间质浸润,复发率也相对较高[5]。整合HPV18基因到宿主细胞后对癌的发生发展起决定性作用。其基因编码两种蛋白E1及E2。E2能结合HPV的早期启动子,从而抑制E6、E7转录。高危型HPV感染宫颈上皮后,病毒组DNA整合到染色体中,其E6和E7基因产物的持续表达,是诱发宫颈癌的主要原因[6]。因此,E2失去表达后将导致病毒癌基因的激活。在HPV18感染的细胞株中E2处于灭活状态,E2的功能即是抑制癌的发展[7]。将E2导入HPV感染的癌细胞中将抑制细胞生长,使其细胞周期停在G1期,衰老及凋亡。E2蛋白作为病毒DNA复制和基因表达的主要调控蛋白,在感染早期的病毒复制阶段和宫颈上皮内瘤变Ⅰ期(CINⅠ)高表达。这是因为在宫颈上皮瘤后期病变和高恶性度的宫颈癌中,病毒基因组线性化整合入人基因组中时,E2基因已经发生了断裂[8]。最近也有研究发现,机体针对HPV16之E6、E7蛋白的细胞免疫在有些时候并不能彻底清除HPV感染的细胞,说明机体对高危型HPV病毒(HPV16、HPV18)E6、E7蛋白的反应与病变的自行消退没有必然联系。Brandsma发现在兔乳头瘤(cottontail rabbit papillomavirus,CRPV)模型中,表达HPV E2的腺病毒疫苗能清除HPV的感染[9]。由此本文认为,E2蛋白将是一个新的治疗性靶蛋白。现阶段有关E2基因的疫苗已在宫颈上皮内瘤变中取得了初步的研究进展[10]。HeLa细胞是宫颈癌细胞株系,因整合HPV18 E2基因而永生化。在本文的研究中,体外刺激外周血单个核细胞(PBMC),诱导表位特异性CTL时,加入表位肽的同时也加入了rhIL-2,培养2周后见到明显的淋巴细胞增殖。在实验的最后结果中,肽段1、2、3的溶破率分别为60.00%、71.29%和80.00%,都具有明显的杀伤效应,说明三条备选肽段均为HPV18E2蛋白的有效CTL表位。也为以后宫颈上皮内瘤变的治疗性多肽疫苗研制打下基础。

[参考文献]

[1] Arias Pulido H, Peyton CL, Torrez Martinez N, et al. Human papillomavirus type 18 variant lineages in United States populations characterized by sequence analysis of LCR-E6, E2, and L1 regions[J]. Virology, 2005,338(1):22-34.

[2] Thierry F, Benotmane MA, Demeret C, et al. A genomic approach reveals a novel mitotic pathway in papillomavirus carcinogenesis[J]. Cancer Res, 2004,64(3): 895-903.

[3] Green KL, Gaston K. Development of a topical protein therapeutic for human papillomavirus and associated cancers[J]. BioDrugs, 2006,20(4): 209-218.

[4] Huang LW, Chao SL, Chen PH, et al. Multiple HPV genotypes in cervical carcinomas: improved DNA detection and typing in archival tissues[J]. J Clin Virol, 2004,29(4):271-276.

[5] Im SS, Wilczynski SP, Burger RA, et al. Early stage cervical cancers containing human papillomavirus type 18 DNA have more nodal metastasis and deeper stromal invasion[J]. Clin Cancer Res, 2003,9(11): 4145-4150.

[6] DeFilippis RA, Goodwin EC, Wu L, et al. Endogenous human papillomavirus E6 and E7 proteins differentially regulate proliferation, senescence, and apoptosis in HeLa cervical carcinoma cells[J]. J Virol, 2003,77(2):1551-1563.

[7] Demeret C, Garcia Carranca A, Thierry F, et al. Transcription-independent triggering of the extrinsic pathway of apoptosis by human papillomavirus 18 E2 protein[J]. Oncogene, 2003,22(2):168-175.

[8] Albarran Y Carvajal A, de la Garza A, Cruz Quiroz BJ, 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]. Bio Drugs, 2007, 21(1): 47-59.

[9] Brandsma JL, Shlyankevich M, Zhang L, et al. Vaccination of rabbits with an adenovirus vector expressing the papillomavirus E2 protein leads to clearance of papillomas and infection[J]. J Virol, 2004,78(1):116-123.

[10] Garcia Hernandez E, Gonzalez Sanchez JL, 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 Ther, 2006,13(6): 592-597.

(编辑:余汇洋)

关于日期的用法

公历世纪、年代、年、月、日和时刻 例如:公元前5世纪、20世纪90年代、1995年6月8日14时30分。

表示年份要写全称,1995年不能写成95年或95年;1953—1958年不能写成1953—58年。年月日可以写成1995-06-08。时刻用":"分隔的形式。如:13时45分8秒可以写成13:45:08。

(本刊编辑部)