

生物可降解微球作为 HPV-E7 蛋白免疫佐剂的研究 *

高飞艳¹ 刘会玲² 杨燕³ 祝秉东^{3△} 杨毓琴^{2△}

(1 兰州大学第一临床医学院 甘肃 兰州 730000 ; 2 甘肃省人民医院妇产科 甘肃 兰州 730000 ;

3 兰州大学病原生物学研究所 甘肃 兰州 730000)

摘要 目的:对聚乳酸聚羟基乙酸(PGLA)作为疫苗运输载体进行免疫学评价。方法:用复乳法制备 PLGA 微球,通过表面吸附人乳头状瘤病毒(HPV) E7 蛋白制备成聚乳酸聚羟基乙酸(PGLA)微球,考察粒径分布情况及体外释放水平,通过皮下免疫注射途径免疫 C57BL/6 小鼠,用间接 ELISA 法检测免疫鼠血清中的抗体水平,由此评价 PLGA 微球疫苗运输载体的佐剂效应。结果:复乳法制备的 PLGA 微球表面光滑,大小均匀,包封率 20.1%,注射小鼠 6 周后(第 2 周加强免疫 1 次),微球疫苗诱导产生的 IgG1 抗体水平较同剂量的铝佐剂组和溴化二甲氨基十八胺(DDA)组明显升高(平均滴度分别为 3805、1270、2262),微球疫苗诱导产生 IgG2b 的抗体水平明显高于铝佐剂组,略低于 DDA 组(平均滴度分别为 1131、475、2653)而 IgG2c 的抗体量高于铝佐剂组和 DDA 组(平均滴度分别为 150、36、106)。结论:人乳头状瘤病毒 E7 蛋白聚乳酸聚羟基乙酸微球作为疫苗输送体系可以明显的提高抗原的免疫原性。

关键词 HPV-E7 蛋白;微球;PLGA;铝佐剂;DDA

中图分类号:Q95-3 R737.33 R392.7 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)12-2211-04

Research on Biodegradable Microspheres as HPV-E7 Protein Adjuvant*

GAO Fei-yan¹, LIU Hui-ling², YANG Yan³, ZHU Bing-dong^{3△}, YANG Yu-qin^{2△}

(1 First Clinical Medical College of Lanzhou University, Gansu, Lanzhou, 730000; 2 People's Hospital of Gansu Province, Gansu,

Lanzhou 730000; 3 Institute of Pathogenic Biology of Lanzhou University, Gansu, Lanzhou, 730000, China)

ABSTRACT Objective: To evaluate the immune response of PLGA-MS used as carrier to carry the vaccinum. **Methods:** Microspheres were prepared by double-emulsion solvent evaporation method. HPV E7 protein was used an antigen absorb different adjuvant conclude aluminum hydroxide hydrate [Al (OH)₃], Dimethyl dioctadecylammonium (DDA) and poly (lactic-co-glycolic) acid (PLGA) microspheres to immunize C57BL/6 mouse with the subcutaneous administration. The IgG1、IgG2b and IgG2c were detected by indirect ELISA. **Result:** The microspheres had good shape with smooth and uniform surface, and the mean particle size were about 1 um and surface associated protein were 20.1%. 6 weeks later, IgG1 antibody levels in C57BL/6 mouse injected by E7 protein of HPV-loaded PLGA microsphere was higher than those injected with E7 protein of HPV puls Al (OH)₃ and DDA (the midpointtiters were 3805,1270,2262, respectively); IgG2b antibody levels was significantly higher than that of Al (OH)₃ and slightly less than that of DDA (the midpointtiters were 1131,475,2653 respectively); In terms of the IgG2b antibody levels, It is higher than that of Al(OH)₃ and DDA (the midpointtiters were 150, 36, 106 respectively). **Conclusion:** Biodegradable PLGA microsphere was an effective system for conteolled delivery of vaccines.

Key words: HPV E7 protein; Microsphere; PLGA; Al(OH)₃; DDA

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3 R737.33 R392.7 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)12-2211-04

前言

宫颈癌是女性第二大常见的肿瘤,每年大约有 49300 个新发病例,约有 27400 人死于宫颈癌,80%以上的死亡发生在发展中国家,到 2020 年将达到 90%,并呈有稳步上升和年轻化的趋势,严重危害着妇女的健康^[1]。宫颈癌和上皮内瘤变中持续感染人乳头状瘤病毒(HPV)是最重要的致病因素^[2]。在 HPV 的 15 个致癌基因型中,高危型 HPV16 和 18 最常见,其中高危型 HPV 的 E6 和 E7 蛋白在肿瘤的发生和发展中起重要作用,癌

蛋白 E7 几乎在所有的宫颈癌细胞和癌前病变中表达,能够被免疫系统所攻击^[2]。尽管预防性疫苗(美国默克公司生产的 Gardasil(HPV6/11/16/18 的 L1VLPs 的重组体)和英国公司葛兰素史克生产的 Cervarex (HPV16 和 HPV18 的 VLPs 双价疫苗))已经上市,但预防性疫苗对已经感染 HPV 的患者或确诊为癌前病变及宫颈癌的患者则无治疗作用,因此治疗性疫苗的研制对宫颈癌而言就更为重要,它主要诱导细胞免疫以消除 HPV 感染和 HPV 相关的肿瘤。HPV E6 和 E7 是理想的靶蛋白,因为它在受感染的细胞中持续表达,在非感染细胞中不表达,

* 基金项目:兰州大学功能有机分子化学国家重点实验室资助

作者简介:高飞艳(1983-),女,硕士研究生,主要研究方向:妇科肿瘤,电话:15002553478,E-mail:gaofeiyan1983@163.com

△通讯作者:祝秉东(1971-),E-mail:bdzhu@lzu.edu.com 杨毓琴(1955-),E-mail:yangyuqin3212@sina.com

(收稿日期:2011-12-20 接受日期:2011-01-16)

而且在免疫逃逸中也不消失。

疫苗缓释技术可以减少剂量和接种次数,提高细胞免疫等优点,进而得到了广泛的应用。目前,生物可降解微球因具有良好的生物相容性及生物降解性而备受关注。聚乳酸-羟基乙酸(PLGA)是一类由乙交酯和丙交酯聚合而成的高分子化合物,已被美国FDA批准的能用于人体的可生物降解材料,通过调整PLGA的分子量和共聚物中乙交酯和丙交酯的分子组成可以控制其降解速度,是优先选择的疫苗输送载体^[3]。因此本实验制备了HPV16 E7-PLGA微球,并对它的免疫特性进行研究,为治疗性宫颈癌疫苗及宫颈癌术后联合免疫治疗提供理论依据,开发更好的疫苗进行探索。

1 材料和方法

1.1 材料和仪器

乳酸聚-羟基乙酸(PLGA 50:50 MW) 聚乙烯醇(PVA 30000-70000 MW),二甲基三十六烷基铵(DDA),Al(OH)₃均购自美国Sigma公司;HPV16 E7蛋白由兰州结核病研究中心研制,IgG1、IgG2b、IgG2c抗体购自美国Rockland公司;C57BL/6小鼠(SPF级)购自兰州大学动物实验中心(雌性,4~6周龄);磁力搅拌器、超声波细胞粉碎机(宁波新芝科器研究所);扫描电子显微镜(JSM-6380Lv 日本电子公司);真空干燥箱(重庆恒达仪器厂);恒温培养振荡器(上海申安医疗器械厂);Bio-Rad550型酶联免疫检测仪(USA)。

1.2 实验方法

1.2.1 PLGA微球的制备 详见^[4]:采用乳化-溶剂挥发法制备PLGA微球,0.25g PLGA溶于由丙酮和乙醇组成的20ml的溶剂(按4:1的容积比混合),搅拌至溶解,并滴入100ml 1.5% PVA水溶液中,搅拌速度为300 r/min、10 min,减压蒸去丙酮和乙醇,1000 r/min,低速离心除去聚集体,再16000 r/min离心25 min,沉淀用25ml蒸馏水洗涤。离心和洗涤重复3次以去除PVA和残存的丙酮和乙醇。最后将沉淀物超声分散50ml于蒸馏水中,冰浴下以60W的功率超声乳化2 min,真空下冷冻干燥即得粉末状PLGA微球粒。

1.2.2 微球的表面形态 干燥好的微球铺在铝箔的粘性表面,表面喷金后在扫描电镜下观察微球的大小形态。

1.2.3 微球包封率和体外释放动力学的测定 100μl的E7(2.15mg/ml)逐滴加入600ul的1%PLGA微球体溶液中,室温震荡1小时,4℃放置过夜。离心1400rpm/min 30min,取上清用CBB法测蛋白浓度。蛋白结合率=(总E7蛋白-上清未结合E7蛋白)/总E7蛋白。结合的E7蛋白重悬于PBS中取,置于37℃的恒温摇床中(150r/min),分别在不同时间取样并补充等量的PBS,用CBB法测蛋白浓度,计算释放液中的蛋白总量,按蛋白累积释放量所占总量的百分比与测定时间做体外释放动力学曲线。

1.2.4 小鼠免疫程序 C57BL/6小鼠随机分为5组,每组6只,PBS组,E7蛋白组,E7-DDA组,E7-PLGA组,E7+Al(OH)₃,每只免疫抗原注射量均为20μg/200μL。在第2周以相同的免疫剂量加强免疫1次,第6周后收集血清用间接ELISA法检测抗体水平,免疫方式均为腹股沟皮下注射。

1.2.5 免疫反应检测(间接ELISA)眼球取血法收集小鼠外周

血,分离血清,用E7蛋白包被96孔板100μl/well,4度过夜。用PBST洗板300μl/well 5次,吸水纸拍干。1%的牛血清蛋白(BSA)200μl/well,封闭1h,37℃,倾倒入,排干,从1:200开始到1:12800,加入对倍稀释的血清样品,37℃孵育1h后,洗板5次后,分别加入200μl/well的1:20000稀释的兔抗鼠IgG1,IgG2b,IgG2c 37度放置1h,洗板后,加入100μl/well TMB显色液,室温避光反应15分钟显色后,加入50μl/well终止液终止反应,在450nm检测OD值。

1.2.6 统计分析 小鼠免疫后产生的抗体应答水平,以抗体几何平均滴度表示。应用SPSS16.0系统软件分析结果,各组间与对照组免疫效果采用ANOVA检验,显著性水平P=0.05时,判断各组间有无统计学意义。

2 结果

2.1 微球的特性

复乳法制备PLGA微球,扫描电子显微镜下见PLGA微球成球形颗粒,外观圆整,表面光滑,大小均匀,直径小于1μm。当吸附E7蛋白时,形状各异,有的黏附成团,或成条索状,没有吸附蛋白的仍成球形。微球的包封率均值(n=4)是21.4%(图1,图2)。

2.2 微球体外释放动力学测定

在体外释放的研究中,初期表现为释放较快的突释现象,随后进入缓慢释放。第一天释放百分率是36.2%,15天后的累积释放百分率是64.8%(图3)。

2.3 免疫小鼠的抗体分析

不同的佐剂免疫C57BL/6小鼠后产生的特异性抗体不同,结果见图4-6,吸附有E7蛋白的微球组免疫小鼠后可诱导高的IgG1抗体水平,均高于DDA组和铝佐剂,IgG2b抗体水平明显高于铝佐剂,略低于DDA组,且微球组和DDA组跟对照组(E7蛋白)相比有统计学意义,而诱导产生的IgG2c抗体水平均高于DDA组和铝佐剂组(图4,图5,图6)。

3 讨论

HPV疫苗分为预防性疫苗和治疗性疫苗两大类,预防性疫苗主要是由HPV病毒衣壳蛋白L1或L1和L2组成,在细胞内自我组装成病毒样颗粒,诱导体液免疫,但是其对已经感染的相关病变没有作用,因此治疗性疫苗就显得更为重要,它主要诱导机体的细胞免疫,清除HPV感染细胞和肿瘤细胞^[5]。1925年Ramon首次定义了佐剂是“一类与抗原合用时能增强抗原免疫效应的物质”,1926年Glenny首次发现铝佐剂可以提高白喉类毒素疫苗的免疫原性,近半个世纪以来铝佐剂得到了广泛的应用如百日破疫苗,脊髓灰质炎疫苗,炭疽疫苗等^[6]。随生物科学的发展,越来越多的佐剂如脂质体,腺病毒载体,病毒样颗粒,重组痘病毒,及免疫刺激佐剂如TLR受体,CpG, PolyI:C等被应用^[7],但选择合适的佐剂尤为重要,尤其是合适的佐剂不仅可以提高免疫应答的水平而且可以诱导不同的免疫反应^[8]。生物可降解微球PLGA由于它安全,无毒副作用,在体内可脉冲式释放抗原从而可以降低疫苗的免疫次数,提高尤其是需要多次加强免疫接种的人群的依从性^[9],因此微球作为疫苗佐

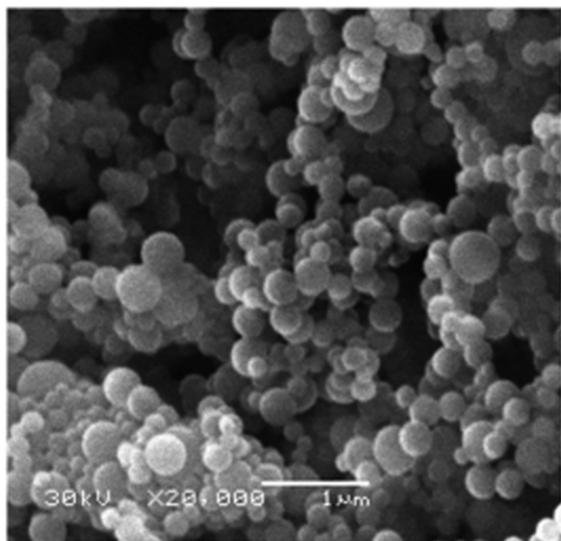


图1 PLGA 微球的外形

Fig.1 SEM image of the PLGA microspheres

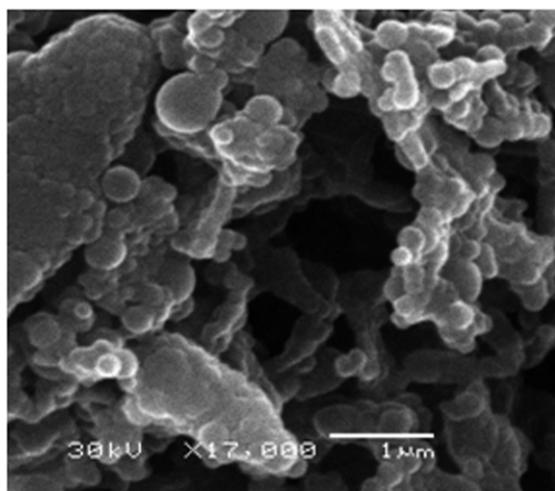


图2 吸附有 E7 蛋白的 PLGA 微球

Fig.2 SEM image of E7 protein of HPV-loaded PLGA microspheres

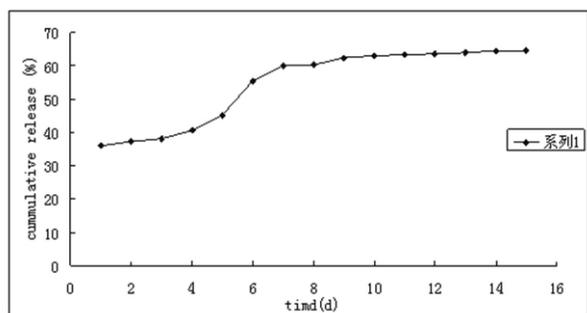


图3 微球的体外释放曲线

Fig.3 In vitro release of E7 protein loaded PLGA microspheres

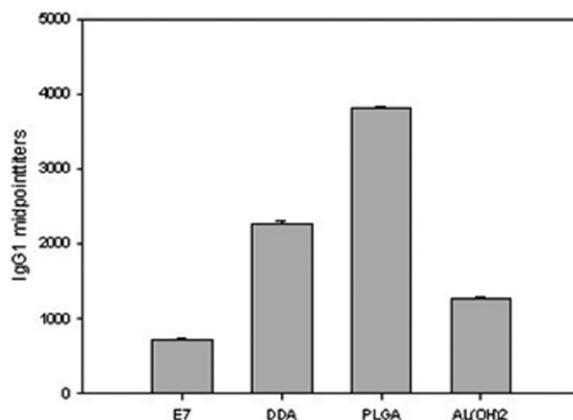


图4 不同疫苗诱导 C57BL/6 小鼠的产生的抗体亚类 IgG1 的抗体水平

Fig.4 IgG1 antibody levels in C57BL/6 mouse injected with different vaccine

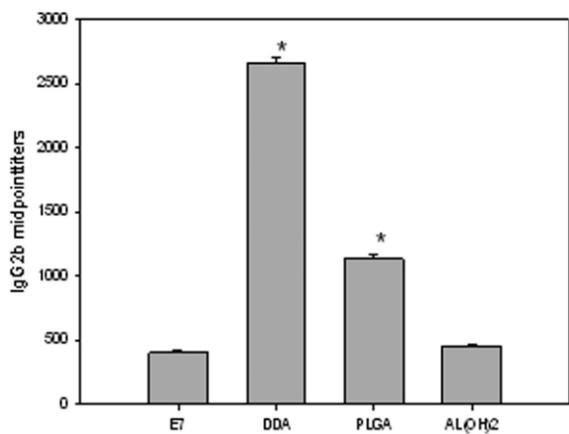


图5 不同疫苗诱导 C57BL/6 小鼠的产生的抗体亚类 IgG2b 的抗体水平

Fig.5 IgG2b antibody levels in C57BL/6 mouse injected with different vaccine

Asterisks indicate * P<0.05 compared to naive controls and as assessed by ANOVA and Dunnett's multiple comparison test.

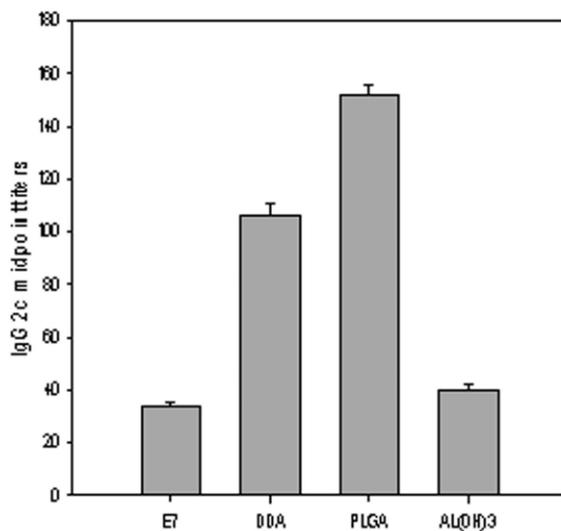


图6 不同疫苗诱导 C57BL/6 小鼠的产生的抗体亚类 IgG2c 的抗体水平

Fig.6 IgG2c antibody levels in C57BL/6 mouse injected with different vaccine

剂就成为了研究的热点,并且吸附抗原的微球可以持续释放抗原而引起持续的免疫应答。小于 $10\mu\text{m}$ 的微球更容易被巨噬细胞和树突状细胞等抗原提呈细胞摄取,提呈给 TH-1 细胞,诱导 CTL 反应,主要针对胞内寄生的病原体包括细菌、病毒、寄生虫及抗肿瘤的作用^[9]。因此设计 HPV 微球疫苗对治疗性宫颈癌疫苗有深远的意义。

抗原引起的免疫应答与多种因素包括佐剂,抗原剂量,免疫的途径及宿主的反应有关。不同的抗体亚类的产生主要与 TH 细胞有关,^[10] 在鼠中,TH-2 细胞主要辅助体液免疫应答,诱导 IgG1 产生,TH-1 细胞主要辅助的细胞免疫应答,诱导 IgG2b 和 IgG2c 产生^[10]。抗体是评价免疫原性的重要指标,通过比较不同疫苗诱导产生的抗体水平可以了解它们免疫原性。本研究结果显示,免疫小鼠 6 周后,微球疫苗组诱导产生的抗体亚类主要为 IgG1,比同等抗原吸附的铝佐剂组和 DDA 组明显升高,推测主要诱导强的体液免疫。在诱导细胞免疫中,微球组没有达到预期的效果,微球组诱导产生的 IgG2b 抗体水平明显高于铝佐剂组,低于 DDA 组,并和对照组相比有统计学意义;就 IgG2c 抗体水平而言,微球组诱导产生的抗体滴度高于铝佐剂组和 DDA 组。溴化二甲基双十八胺(DDA)是一种阳离子脂质体,它可以吸附抗原到它的表面,并能诱导体液免疫和细胞免疫,这与文献报道的一致^[11]。铝佐剂是至今唯一被 FDA 批准人用疫苗的免疫佐剂,但存在不能诱导细胞免疫(TH1)免疫反应,可介导 IgE- 过敏反应(如注射部位肉芽肿等),并且须冷藏不易储存等缺点。本实验的不足在于免疫小鼠后,没有做时间梯度来进一步观察抗体的水平有无随时间的变化而变化。因此如何进一步提高微球的细胞免疫,需要进一步的探索。

参考文献(References)

- [1] Agosti JM, Goldie SJ. Introducing HPV vaccine in developing countries--key challenges and issues [J]. *The New England Journal of Medicine*, 2007, 356:1908-1910
- [2] Lin K, Doolan K, Hung CF, et al. Perspectives for Preventive and

Therapeutic HPV Vaccines [J]. *Journal of the Formosan Medical Association*, 2006, 109:4-24

- [3] Mundargi RC, Babu VR, Rangaswamy V, et al. Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D, L-lactide-co-glycolide) and its derivatives [J]. *Journal of Controlled Release*, 2008, 125:193-209
- [4] Kazzaz J, Singh M, Ugozzoli M, et al. Encapsulation of the immune potentiators MPL and RC529 in PLG microparticles enhances their potency[J]. *Journal of Controlled Release*, 2006, 110:566-573
- [5] Das BC, Hussain S, Nasare V, et al. Prospects and prejudices of human papillomavirus vaccines in India[J]. *Vaccine*, 2008, 26:2669-2679
- [6] Baylor NW, Egan W, Richman P. Aluminum salts in vaccines--US perspective[J]. *Vaccine*, 2002, 20:18-23
- [7] Singh M, O'Hagan D. Advances in vaccine adjuvants [J]. *Nat Biotech*, 1999, 17:1075-1081
- [8] Clawson C, Huang CT, Futalan D, et al. Delivery of a peptide via poly (D,L-lactic-co-glycolic) acid nanoparticles enhances its dendritic cell-stimulatory capacity[J]. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2007, 6:651-661
- [9] Audran R, Peter K, Dannull J, et al. Encapsulation of peptides in biodegradable microspheres prolongs their MHC class-I presentation by dendritic cells and macrophages in vitro [J]. *Vaccine*, 2003, 21: 1250-1255
- [10] Ferro VA, Costa R, Carter KC, et al. Immune responses to a GnRH-based anti-fertility immunogen, induced by different adjuvants and subsequent effect on vaccine efficacy [J]. *Vaccine*, 2004, 22: 1024-1031
- [11] Davidsen J, Rosenkrands I, Christensen D, et al. Characterization of cationic liposomes based on dimethyldioctadecylammonium and synthetic cord factor from *M. tuberculosis* (trehalose 6,6'-dibehenate) --A novel adjuvant inducing both strong CMI and antibody responses *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* [J]. *Biomembranes*, 2005, 1718:22-31