



表达宫颈癌抗原基因的李斯特菌平衡致死系统的构建及其生物学特性研究*

欧倩^{1,2}, 陈昭斌², 唐静¹, 陈梦蝶², 张云雯¹, 汪川^{1△}

1. 四川大学华西公共卫生学院/四川大学华西第四医院 卫生检验与检疫系(成都 610041);

2. 深圳市生医联盟生物科技集团有限公司(深圳 518057)

【摘要】目的 构建表达宫颈癌抗原的单增和绵羊李斯特菌平衡致死系统,并研究其基本生物学特性,为宫颈癌免疫治疗提供参考数据。**方法** 将实验室已有的HPV16型E6E7融合蛋白抗原基因盒通过无缝克隆的方式连接到含有营养基因 dal 的回补质粒pCWgfp-LM dal -Amp上,并用 asd 营养基因替换回补质粒的氨苄(ampicillin, Amp)抗性基因,转化大肠杆菌受体菌DH5 $\alpha\Delta asd$,利用营养筛选得到表达宫颈癌抗原同时不具有Amp抗性的回补质粒pCWgfp-E6E7-LM dal -Ampfree,将其分别电转两株敲除了毒力基因 $actA$ 、 $plcB$ 和营养基因 dal 、 dat 的减毒李斯特菌营养缺陷株LM Δdd 和LI Δdd 中,得到表达宫颈癌抗原基因的单增和绵羊李斯特菌平衡致死系统。观察其体外生长情况,利用蛋白印迹实验检测蛋白表达情况,PCR检测回补质粒pCWgfp-E6E7-LM dal -Ampfree的体外传代稳定性,通过基本生化反应测定和溶血实验研究其基本生物学特性。**结果** 成功构建表达宫颈癌抗原的两种李斯特菌平衡致死系统;目标蛋白能够在李斯特菌平衡致死系统中成功表达;表达宫颈癌抗原的回补质粒能够在李斯特菌平衡致死系统中稳定存在;表达宫颈癌抗原的李斯特菌平衡致死系统较李斯特菌营养缺陷株相比明显恢复生长;生化反应测定结果显示,表达宫颈癌抗原的李斯特菌平衡致死系统与李斯特菌减毒株绝大多数生化反应保持一致;添加了宫颈癌抗原基因的李斯特菌平衡系统仍能保持溶血能力,但略逊于未表达宫颈癌抗原的李斯特菌平衡致死系统和李斯特菌减毒株。**结论** 成功构建表达宫颈癌抗原基因的两种李斯特菌平衡致死系统,其在体外能正常生长,回补质粒能在体外稳定存在,基本生化特性及溶血能力变化不大,可作为宫颈癌治疗性疫苗候选株进一步研究。

【关键词】 宫颈癌 平衡致死系统 李斯特菌

Listeria Balanced Lethal Systems Expressing Cervical Cancer Antigen Genes: Construction and Basic Biological Characteristics OU Qian^{1,2}, CHEN Zhaobin², TANG Jing¹, CHEN Mengdie², ZHANG Yunwen¹, WANG Chuan^{1△}.

1. Department of Public Health Laboratory Sciences, West China School of Public Health and West China Fourth Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Shenzhen Biomed Alliance Biotech Group Co., Ltd, Shenzhen 518057, China

△ Corresponding author, E-mail: wangchuan@scu.edu.cn

【Abstract】 Objective To construct *Listeria monocytogenes* (LM) and *Listeria ivanovii* (LI) balanced lethal systems expressing cervical cancer antigens, to study their basic biological characteristics, and to provide reference data for the immunotherapy of cervical cancer. **Methods** Through seamless cloning via *in vitro* ligation kit, the HPV16 E6E7 fusion protein antigen gene constructed in our lab was spliced to the complement plasmid pCWgfp-LM dal -Amp that contained the nutritional gene dal . Then, we replaced the ampicillin (Amp) resistance gene of the complement plasmid with the asd nutrition gene. The ligation reaction mixture was transformed into *Escherichia coli* (*E. coli*) recipient bacteria DH5 $\alpha\Delta asd$ and the complement plasmid pCWgfp-E6E7-LM dal -Ampfree, which expressed cervical cancer antigens and had no Amp resistance, was obtained by nutrition screening from the *E. coli* DH5 $\alpha\Delta asd$. The plasmid pCWgfp-E6E7-LM dal -Ampfree was complemented into LM Δdd and LI Δdd , the attenuated nutrition-deficient *Listeria* strains with the virulence genes $actA$ and $plcB$ and nutrition genes dal and dat deleted by electroporation, thereby obtaining LM and LI balanced lethal systems expressing cervical cancer antigen genes. The *in vitro* growth of the strains was observed. Western blot was performed to examine the status of antigen protein expression. PCR was performed to measure the *in vitro* passage stability of complement plasmid pCWgfp-E6E7-LM dal -Ampfree. Their basic biological characteristics were examined by biochemical reaction tests and hemolysis assay. **Results** Two *Listeria* balanced lethal systems expressing cervical cancer antigen were successfully constructed. The HPV16 type E6E7 fusion protein was successfully expressed in the two *Listeria* balanced lethal systems. pCWgfp-E6E7-LM dal -Ampfree, the positive plasmid

* 国家自然科学基金面上项目(No. 31570924)和成都市科技局重点研发支撑计划技术创新研发项目(No. 2018-YF05-00292-SN)资助

△ 通信作者, E-mail: wangchuan@scu.edu.cn

出版日期: 2023-11-20

expressing cervical cancer antigen, maintained stable existence in the two *Listeria* balanced lethal systems. The two *Listeria* balanced lethal systems expressing cervical cancer antigen showed significantly better recovery growth in comparison with *Listeria* nutrition deficiency strains. The results of biochemical reaction tests showed that most of the biochemical reaction of the two *Listeria* balanced lethal systems expressing cervical cancer antigen were consistent with those of *Listeria* attenuated strains. The two *Listeria* balanced lethal systems expressing cervical cancer antigen still maintained the hemolytic ability, although their hemolytic ability was slightly inferior to that of the *Listeria* balanced lethal systems not expressing cervical cancer antigen and the *Listeria* attenuated strains. **Conclusion** The two *Listeria* balanced lethal systems expressing cervical cancer antigen genes are constructed successfully. They display normal *in vitro* growth. The complement plasmid pCWgfp-E6E7-LM *dal*-Ampfree can maintain stable existence *in vitro*, showing little change in its biochemical characteristics and hemolytic ability. Further research should be conducted to investigate the potential of these two recombinant strains to be used as candidate strains for cervical cancer therapeutic vaccine.

【Key words】 Cervical cancer Balanced lethal system *Listeria*

2022年全球癌症数据统计结果显示,宫颈癌的发病人数和死亡人数均处于上升趋势,宫颈癌仍然是危害全球女性健康的“头号杀手”,急需有效的治疗手段^[1]。肿瘤疫苗作为一种新兴的免疫治疗手段,因其具有治疗效果好、副作用小、联合用药效果好的优点,已应用于临床。与噬菌体、病毒等肿瘤疫苗载体相比,细菌载体能携带多个抗原,具有更好的抗原表达量,是肿瘤疫苗载体的较优选择^[2]。

单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, LM)是革兰阳性兼性厌氧的胞内寄生菌,在吞噬细胞内,LM携带的抗原肽可通过MHC-II类分子呈递给CD4⁺ T细胞,同时细菌分泌的溶血素蛋白(Listeriolysin O, LLO)裂解溶酶体膜,使细菌从溶酶体中逃逸,通过MHC-I类分子递呈抗原肽,诱导CD8⁺ T细胞免疫应答^[3-6]。目前已有多种以LM作为载体的肿瘤疫苗进入临床试验^[7]。绵羊李斯特菌(*Listeria ivanovii*, LI)对人体不致病,具有更好的生物安全性,已证明LI也能作为疫苗载体提呈抗原^[8]。

人为敲除或自然丢失调控细菌生长的关键营养基因的细菌即成为营养缺陷型细菌,只有额外添加相应的营养物质,该菌才能生长。若在体外构建一个带有其缺失的营养基因的回补质粒,再将其导入营养缺陷型细菌中,回补后的菌株能够正常生长,不再需要添加多余的营养物质,而一旦丢失该质粒,菌株将因不能合成关键营养物质而死亡,以此方式构建的系统被称为平衡致死系统。以平衡致死系统作为载体能够解决普通细菌载体疫苗因携带抗生素抗性基因,而可能导致的抗生素耐药问题,同时又可以提高抗原基因表达量,达到更好的免疫效果^[9-10]。目前已有多种以单增李斯特菌平衡致死系统为载体的肿瘤疫苗进入临床试验,观察到了较好的治疗结果^[11]。但尚未有以绵羊李斯特菌为载体的相关报道。

本研究以LM和LI这两种李斯特菌为疫苗载体,构建

表达宫颈癌抗原的李斯特菌平衡致死系统,检测其抗原蛋白表达、基因传代稳定性,通过体外生长曲线的测定、生化反应测定、溶血实验探究其基本生物学特性,为研发宫颈癌免疫治疗提供参考数据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

回补质粒pCW-gfp-LM *dal*-Amp携带LM营养基因*dal*和氨苄抗性基因, pCW702-HPV-36携带HPV16型E6E7抗原基因盒片段*phly*-SS-*gp33*-HA-E6E7*gp61*和氨苄抗性基因,由本实验室构建后保存^[10,12];质粒PYA886携带*asd*基因,由四川大学华西公共卫生学院唐田老师惠赠,本实验室保存。敲除了毒力基因*actA*、*plcB*的单增李斯特菌减毒株LMΔ、绵羊李斯特菌减毒株LIΔ,敲除了毒力基因*actA*、*plcB*和营养基因*dal*、*dat*的单增李斯特菌营养缺陷株LMΔ*dd*和绵羊李斯特菌营养缺陷株LIΔ*dd*由本实验室构建后保存^[10];大肠杆菌营养缺失株DH5αΔ*asd*由扬州大学彭大新老师惠赠,本实验室保存。

1.1.2 引物

见表1,均由北京擎科新业生物技术有限公司合成。

1.1.3 试剂

质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒均购于OMEGA公司;限制性核酸内切酶HindⅢ购于NEB公司;李斯特菌生化鉴定试剂盒、BHI培养基、LB培养基均购于北京陆桥技术有限公司;Monoclonal Anti-HA antibody produced in mouse购于Sigma;HRP-labeled Goat Anti-Rat IgG(H+L)购于碧云天;In-Fusion HD Cloning kits购于Takara。

1.2 表达宫颈癌抗原基因的李斯特菌平衡致死系统建立

1.2.1 pCWgfp-E6E7-LM *dal*-Amp回补质粒的构建

通过HindⅢ酶切带有Amp抗性的回补质粒pCWgfp-LM *dal*-Amp,胶回收得到回补质粒线性载体;利用高保

表 1 本实验所用PCR引物
Table 1 PCR primers

Primer	Sequence (5'→3')	Target gene
Infusion- <i>phly-gp61</i>	F: TTAGGTCGACAAGCTCAGTGTGATGGATATCTGCAGA R: TACCGCATTAAAGCTCTCGACATCAAATTCAACACTTT	HPV16 <i>E6E7</i> gene with homologous arm
<i>E6E7</i>	F: AACGTACAGCAATGTTCCA R: GAGAAAGAACGACAACAAG	<i>phly-SS-gp33-HA-E6E7gp61</i> gene
<i>Dal</i>	F: GAACAAAATAAACTCCCGGAA R: TACTTTTGAACCAGTTTG AAAT	<i>dal</i> gene
<i>LM</i>	F: CTTCGATGACAACAGCTGTACC R: AATCCTAAAGCATGCGCCTTCG	<i>LM-orfBALdh</i> gene
<i>LI</i>	F: GATTAAAGATTGGTGATTATAAG R: ACAAAAAACGGAAATCAGTTAG	<i>LI-orfBALdh</i> gene
Vector	F: CTGTCAGACCAAGTTTACTCA R: ACTCTTCCTTTTCAATATTATTGA	Specific primers for linearizing the vector
<i>asd</i>	F: TGA AAAAGGAAGAGTATGAAAAATGTTGGTTTATCGGCT R: AACTTGGTCTGACAGCTAGGCCAACTGGCGCAG	<i>asd</i> gene with homologous arm

真酶和添加同源臂的引物infusion-*phly-gp61*从质粒pCW702-HPV-36中PCR扩增得到HPV16 *E6E7*抗原基因盒*phly-SS-gp33-HA-E6E7-gp61*,与回补质粒线性载体无缝克隆连接,连接产物转化至大肠杆菌感受态DH5α中,涂板于添加了100 μg/mL Amp抗生素的LB平板即LA抗性平板,*E6E7*和*Dal*引物PCR筛选的阳性菌落再进行测序验证,得到表达宫颈癌抗原的回补质粒pCW*gfp-E6E7-LM dal-Amp*。

1.2.2 *asd*营养基因替换氨苄抗性基因

在1.2.1中构建的回补质粒上通过高保真酶和引物vector反向PCR扩增回补质粒上除*Amp*抗性基因以外的全部序列;利用高保真酶和添加同源臂的引物*asd*从质粒PYA3342中PCR扩增得到目的基因片段*asd*,与去除了氨苄抗性的回补质粒线性载体无缝克隆连接,连接产物转化至大肠杆菌营养缺陷型DH5αΔ*asd*感受态中,涂板于LB平板,通过营养筛选和引物*asd* PCR筛选阳性菌落,得到不带*Amp*抗性基因同时携带宫颈癌抗原基因的回补质粒pCW*gfp-E6E7-LM dal-Ampfree*。

1.2.3 表达宫颈癌抗原基因的李斯特菌平衡致死系统的建立

将1.2.2中构建的pCW*gfp-E6E7-LM dal-Ampfree*分别电转化至LMΔ*dd*菌株和LIΔ*dd*菌株中,30 ℃培养48 h。挑取单个菌落,利用引物*E6E7*和*Dal*进行PCR筛选并测序验证,将验证正确的菌分别命名为LMΔ*dd*:*dal-E6E7-ampfree*和LIΔ*dd*:*dal-E6E7-ampfree*。

1.3 Western blot定性检测HPV16-E6E7目的蛋白的表达情况

提取LMΔ*dd*:*dal-E6E7-ampfree*和LIΔ*dd*:*dal-E6E7-ampfree*的上清分泌蛋白及菌体蛋白^[13],将蛋白进行SDS-PAGE电泳后转至0.22 μm的PVDF膜上,封闭液封闭2 h后利用工作浓度为0.1 μg/mL抗HA鼠单克隆抗体作为一抗,

工作浓度为1 μg/mL辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠Ig (G+H)作为二抗孵育,HRP化学发光底物显色反应液显色。

1.4 体外传代基因稳定性实验

分别取LMΔ*dd*:*dal-E6E7-ampfree*和LIΔ*dd*:*dal-E6E7-ampfree* 100 μL接种5 mL BHI肉汤,连续传代25代,取1、5、10、15、20、25代利用*E6E7*、*Dal*和李斯特菌特异性引物*LM*、*LI*进行PCR验证。

1.5 生长曲线的绘制

LMΔ、LIΔ、LMΔ*dd*:*dal-ampfree*、LIΔ*dd*:*dal-ampfree*、LMΔ*dd*:*dal-E6E7-ampfree*和LIΔ*dd*:*dal-E6E7-ampfree*在BHI肉汤中培育16~18 h(37 ℃、180 r/min),取适量各菌液接种于50 mL BHI肉汤中调至600 nm的光密度(OD₆₀₀)值约等于0.05。37 ℃、180 r/min培养,每小时测定OD₆₀₀值,绘制生长曲线。

1.6 生化反应鉴定

利用全自动菌种鉴定及药敏分析仪(法国梅里埃公司,VITEK® 2 Compact),分别测定LMΔ、LIΔ、LMΔ*dd*:*dal-ampfree*和LIΔ*dd*:*dal-ampfree*、LMΔ*dd*:*dal-E6E7-ampfree*和LIΔ*dd*:*dal-E6E7-ampfree*的43种生化反应。

1.7 溶血实验

1.7.1 绵羊血平板上溶血情况

将LMΔ、LIΔ、LMΔ*dd*:*dal-ampfree*、LIΔ*dd*:*dal-ampfree*、LMΔ*dd*:*dal-E6E7-ampfree*和LIΔ*dd*:*dal-E6E7-ampfree*穿刺接种及涂圈接种于含5%绵羊血的BHI平板上,37 ℃培育48 h,观察溶血情况。

1.7.2 溶血效价测定

LMΔ、LIΔ、LMΔ*dd*:*dal-ampfree*、LIΔ*dd*:*dal-ampfree*、LMΔ*dd*:*dal-E6E7-ampfree*和LIΔ*dd*:*dal-E6E7-ampfree*接种于BHI肉汤中培养至对数生长期,13 500 r/min离心5 min得菌液上清,2倍倍比稀释后加入96孔板中作为样品孔,

同时设立PBS对照孔,加入1%绵羊红细胞悬液,37℃培育2 h,观察结果。

1.8 统计学方法

经正态性检验和方差齐性检验后,采用Graphpad Prism软件进行方差分析,每种实验独立重复3次, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 表达宫颈癌抗原基因的李斯特菌平衡致死系统的构建

2.1.1 成功构建含有HPV16型E6E7融合蛋白基因的回补质粒

通过Hind III酶切回补质粒载体,PCR扩增目的基因

phly-SS-gp33-HA-E6E7-gp61,无缝克隆连接,同时经E6E7和Dal引物PCR验证及测序验证,证明成功得到含有HPV16型E6E7融合蛋白基因的回补质粒pCW *gfp-E6E7-LM dal-Amp*,如图1A所示。

2.1.2 *asd*营养基因成功替换pCW *gfp-E6E7-LM dal-Amp*质粒上的Amp抗性基因

利用PCR扩增*asd*目的基因,反向PCR得到去除Amp基因的回补质粒载体,无缝克隆连接,热击转化至DH5 α *asd*大肠杆菌中,同时经E6E7和*asd*引物PCR验证及测序验证,证明成功得到用*asd*基因替换Amp抗性基因同时带有HPV16型E6E7融合蛋白基因的回补质粒pCW *gfp-E6E7-LM dal-Ampfree*,如图1B所示。

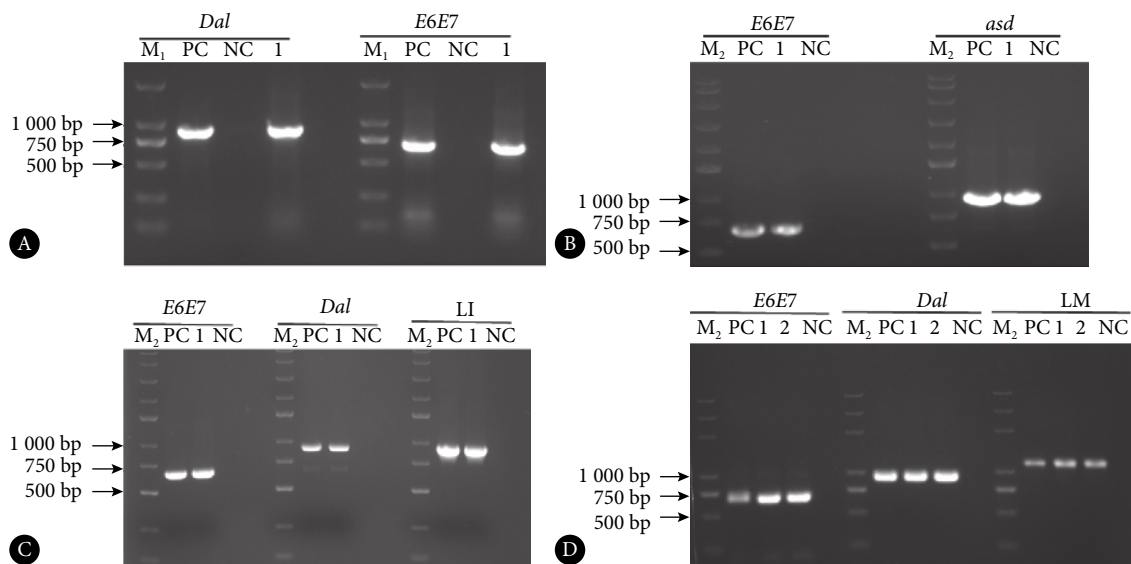


图1 表达宫颈癌抗原的李斯特菌平衡致死系统的构建PCR验证结果图

Fig 1 PCR verification results for the construction of the *Listeria* balanced lethal system expressing cervical cancer antigen genes

M₁: DL2000 DNA marker; M₂: 250 bp DNA marker; PC: positive control; NC: negative control; 1 and 2: colonies to be validated. A, Verifying the construction of the plasmid pCW *gfp-E6E7-LM dal-Amp* with primers E6E7 and Dal; B, verifying the construction of the plasmid pCW *gfp-E6E7-LM dal-Ampfree* with primers E6E7 and *asd*; C, verifying the construction of LIΔdd: dal-E6E7-ampfree with primers E6E7, Dal, and LI; D, verifying the construction of LMΔdd: dal-E6E7-ampfree with primers E6E7, Dal, and LM.

2.1.3 成功构建表达宫颈癌抗原的两种李斯特菌平衡致死系统

提取在DH5 α *asd*大肠杆菌中的回补质粒pCW *gfp-E6E7-LM dal-Ampfree*,电转化单增和绵羊李斯特菌营养缺陷株,利用营养筛选、E6E7、Dal和李斯特菌特异性引物LM、LI进行PCR验证,获得表达宫颈癌抗原的两种李斯特菌平衡致死系统,如图1C、1D所示。

2.2 抗原蛋白表达

提取LMΔdd: dal-E6E7-ampfree和LIΔdd: dal-E6E7-ampfree的上清分泌蛋白及菌体蛋白,Western blot实验结果表明李斯特菌平衡致死系统成功表达目标抗原蛋白HPV16-E6E7(图2)。

2.3 基因传代稳定性

见图3。将LMΔdd: dal-E6E7-ampfree和LIΔdd: dal-E6E7-ampfree在BHI肉汤中连续传25代,取第1、5、10、15、

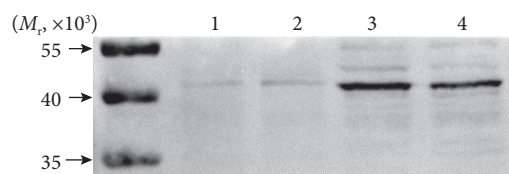


图2 Western blot检测上清分泌蛋白及菌体蛋白

Fig 2 Western blot of culture supernatant and cell lysate

1 and 2, cell lysate of LMΔdd: dal-E6E7-ampfree and LIΔdd: dal-E6E7-ampfree; 3 and 4, culture supernatant of LMΔdd: dal-E6E7-ampfree and LIΔdd: dal-E6E7-ampfree.

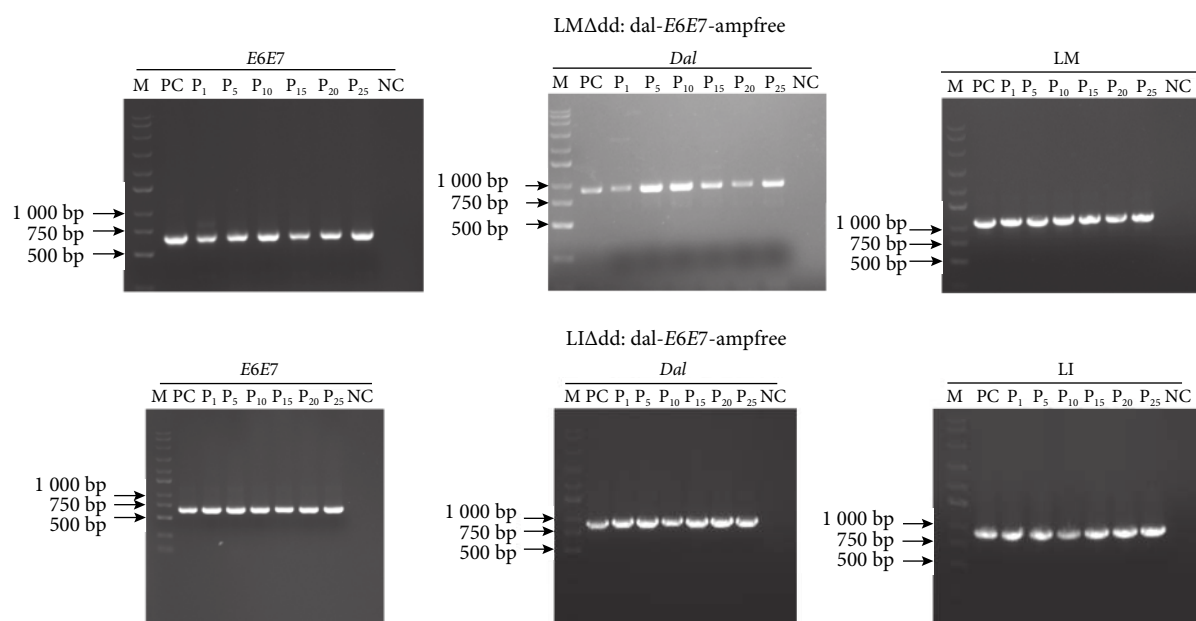


图3 体外基因传代稳定性PCR验证图

Fig 3 PCR verification results of gene passage stability *in vitro*

M: 250 bp marker; PC: positive control; NC: negative control; P₁, P₅, P₁₀, P₁₅, P₂₀, and P₂₅: the 1, 5, 10, 15, 20, and 25th generations of LMΔdd: dal-E6E7-ampfree and LIΔdd: dal-E6E7-ampfree.

20、25代的细菌用E6E7、*Dal*和李斯特菌特异性引物进行PCR验证均在预期位置得到目标条带,证明pCWgfp-E6E7-LM *dal*-Ampfree能够在李斯特菌营养缺陷株中稳定存在。

2.4 体外生长能力

LMΔdd: dal-E6E7-ampfree、LIΔdd: dal-E6E7-ampfree、LMΔ、LIΔ、LMΔdd: dal-ampfree、LIΔdd: dal-ampfree和李斯特菌营养缺陷株LMΔdd、LIΔdd体外生长结果表明, LM组的LMΔdd: dal-E6E7-ampfree和LMΔdd: dal-ampfree均在生长4 h后生长速度稍慢于LMΔ,更晚进入平台期,但最终生长到同一水平,与在BHI肉汤中生长的营养缺陷株LMΔdd相比,明显恢复生长(图4); LI组的LIΔdd: dal-E6E7-ampfree和LIΔdd: dal-ampfree同样在生长4 h后生长速度稍慢于LIΔ,更晚进入平台期,最终平台期OD₆₀₀值稍低于LIΔ,但与在BHI肉汤中生长的营养缺陷株LMΔdd相比,同样明显恢复生长(图4)。结果表明表达宫颈癌抗原的李斯特菌平衡致死系统能够恢复正常生长,但生长速度稍慢于李斯特菌减毒株。

2.5 生化结果

43种生化反应检测结果表明, LMΔdd: dal-E6E7-ampfree和LMΔdd: dal-ampfree大部分生化特性与LMΔ一致; LIΔdd: dal-E6E7-ampfree和LIΔdd: dal-ampfree大部分生化特性与LIΔ保持一致。有差异的结果见表2、表3。

2.6 溶血实验结果

见图5。LMΔ、LMΔdd: dal-ampfree、LMΔdd: dal-

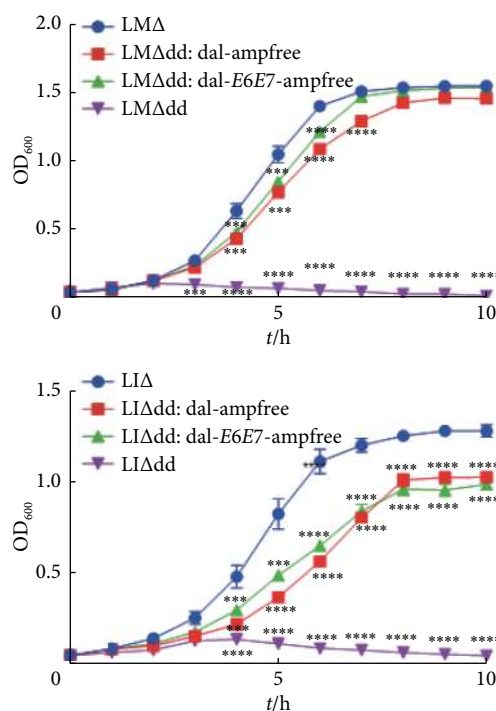


图4 LMΔdd: dal-E6E7-ampfree和LIΔdd: dal-E6E7-ampfree生长曲线

Fig 4 Growth curves of LMΔdd: dal-E6E7-ampfree and LIΔdd: dal-E6E7-ampfree

*** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, vs. LMΔ or LIΔ. $n = 3$.

E6E7-ampfree穿刺接种血平板产生狭小的透明溶血环,涂圈接种血平板未产生明显的溶血现象; LIΔ、LIΔdd: dal-ampfree和LIΔdd: dal-E6E7-ampfree穿刺接种和涂圈接种

表 2 LM组生化鉴定有差异的结果

Table 2 Different biochemical properties of the LM group			
Biochemical reactions	LMA	LMΔdd:dal-E6E7-ampfree	LMΔdd:dal-ampfree
LAC	+	-	+
SAC	+	-	+
POLYB	+	+	-

LAC: lactose; SAC: saccharose; POLYB: polymyxin B.

表 3 LI组生化鉴定有差异的结果

Table 3 Different biochemical properties of the LI group			
Biochemical reactions	LIA	LIΔdd:dal-E6E7-ampfree	LIΔdd:dal-ampfree
LeuA	-	+	-
dRIB	+	-	-
POLYB	+	-	-

LeuA: leucine aminopeptidase; dRIB: deoxyribose; POLYB: polymyxin B.

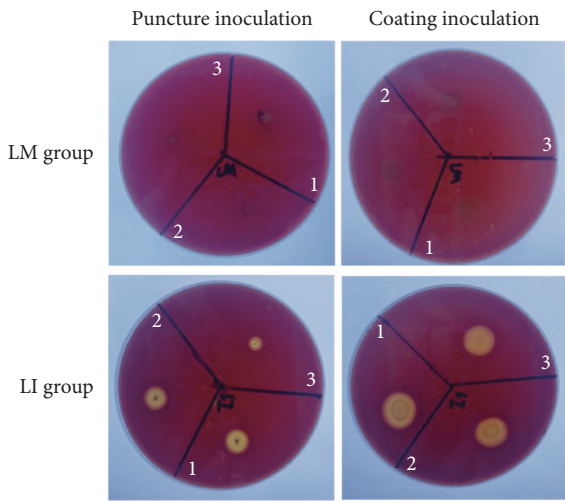


图 5 血平板生长情况

Fig 5 Growth on the blood plate

LM group: 1, LMA; 2, LMΔdd:dal-ampfree; 3, LMΔdd:dal-E6E7-ampfree.
LI group: 1, LIA; 2, LIΔdd:dal-ampfree; 3, LIΔdd:dal-E6E7-ampfree.

血平板均产生大而透明的β溶血环。LIΔdd:dal-E6E7-ampfree溶血效价低于LIΔdd:dal-ampfree和LIA; LMΔdd:dal-E6E7-ampfree的溶血效价同样低于LMΔdd:dal-ampfree和LMA(图6)。

3 讨论

平衡致死系统能够解决抗生素抗性残留、体内基因不稳定及耐药风险等问题因此也被称为“绿色减毒疫苗活载体”^[14]。李斯特菌通常通过敲除营养代谢基因*dal*、*dat*进行平衡致死系统的构建^[15]，以李斯特菌为载体的活菌肿瘤疫苗已在转移性腺瘤、前列腺肿瘤和肝部肿瘤等肿瘤中进行了相关研究^[16-19]。因此本研究构建了表达

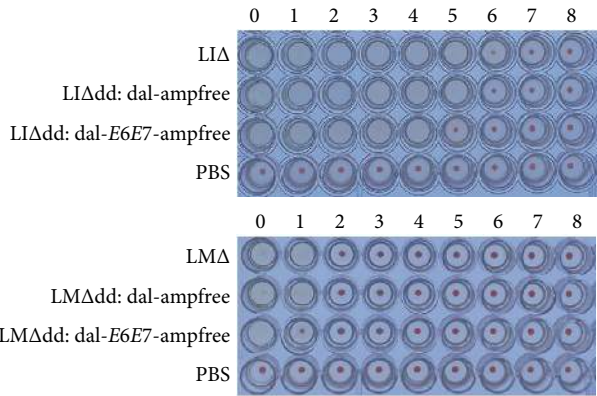


图 6 溶血效价测定结果

Fig 6 Results of hemolytic titers

0: undiluted; 1: diluted 2¹ fold; 2: diluted 2² fold; 3: diluted 2³ fold; 4: diluted 2⁴ fold; 5: diluted 2⁵ fold; 6: diluted 2⁶ fold; 7: diluted 2⁷ fold; 8: diluted 2⁸ fold.

HPV16型E6E7融合蛋白基因的单增和绵羊李斯特菌两种平衡致死系统,探究其基本特性,为宫颈癌治疗手段提供新思路。

研究表明单增李斯特菌对人致病,绵羊李斯特菌则不引起人类疾病,目前已有的报道大多为单增李斯特菌平衡致死系统,绵羊李斯特菌平衡致死系统报告较少。MASON等^[20]曾以单增李斯特菌平衡致死系统为载体的构建骨肉瘤治疗性疫苗,具有较好的临床表现,与其相比,本实验除了两个营养基因*dal*、*dat*外,还删除了李斯特菌中的两个主要毒力基因,即*actA*和*plcB*,使其较其他平衡致死系统相比可能更加安全。同时已有研究表明,按照初次免疫-加强免疫-再次免疫的策略,采用LM-LI-LM的组合免疫方式能有效提高疫苗抗肿瘤免疫效果^[12]。本研究创新性地构建了两种表达宫颈癌抗原基因的李斯特菌平衡致死,其中表达肿瘤癌基因的绵羊李斯特菌平衡致死系统在已有报道中第一次提到,在今后治疗效果研究中可采用组合免疫的方式,可能具有较好的免疫效果。

单增李斯特菌平衡致死系统已被证实能够使单增李斯特菌营养缺陷株基本恢复生长,回补质粒能够在体外稳定性传代^[21]。体外稳定性实验表明带有宫颈癌抗原基因的回补质粒能够在体外稳定存在;体外生长曲线测定结果表明带有回补质粒的单增李斯特菌平衡致死系统和绵羊李斯特菌平衡致死系统均能够恢复正常生长,外来肿瘤抗原基因的引入也不会影响其生长能力,轻微的生长延迟可能是合成质粒的代谢负荷造成的,符合预期。

Western blot实验表明目的蛋白基因*phly-SS-gp33-HA-E6E7-gp61*在菌体内外都能稳定表达,证明了李斯特菌平衡致死系统作为疫苗载体的可行性。溶血效价测定

实验表明, 添加了宫颈癌抗原基因的李斯特菌平衡致死系统的溶血能力低于未引入宫颈癌抗原基因的李斯特菌平衡致死系统, 未添加宫颈癌抗原基因的平衡致死系统的溶血能力与李斯特菌减毒株相似。目前李斯特菌平衡致死系统生化反应测定较少, 仅有文献测定6种基本糖发酵反应, 结果表明单增李斯特菌会丢失发酵木糖的能力^[10]。本实验同时测定了43种反应, 结果表明携带宫颈癌抗原的李斯特菌平衡致死系统绝大多数生化结果均与李斯特菌减毒株类似, 部分生化结果的不一致可能是由于营养基因*dal*、*dat*的敲除所导致的, 但未出现单增李斯特菌平衡致死系统不能发酵木糖的情况, 可能与抗性基因敲除方式不同及测定方式不同有关, 具体原因机制还需要进一步研究。

总而言之, 本实验所构建的表达宫颈癌抗原的双李斯特菌平衡致死系统是一种能够在体外稳定遗传, 基本生物学特性与亲本株基本一致, 且避免了抗生素耐药风险的绿色载体疫苗, 同时创新性地构建出了表达宫颈癌抗原的绵羊李斯特菌平衡致死系统, 为后续宫颈癌肿瘤治疗提供新思路。本实验也具有局限性, 仅在体外对疫苗候选株进行了初步分析, 后续应通过动物实验深入探究疫苗候选株在体内的安全性、免疫原性及治疗效果。但所构建的双李斯特菌平衡致死系统仍可以作为一种新的活菌载体结合各种肿瘤抗原基因用于各种肿瘤治疗研究, 为免疫治疗手段提供新方向。

* * *

作者贡献声明 欧倩负责论文构思、正式分析、调查研究、研究方法和初稿写作, 陈昭斌负责正式分析、调查研究和提供资源, 唐静负责正式分析和调查研究, 陈梦蝶和张云雯负责调查研究, 汪川负责论文构思、研究方法和审读与编辑写作。所有作者已经同意将文章提交给本刊, 且对将要发表版本进行最终定稿, 并同意对工作的所有方面负责。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, *et al.* Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin*, 2022, 72(1): 7–33. doi: 10.3322/caac.21708.
- [2] TOUSSAINT B, CHAUCHET X, WANG Y, *et al.* Live-attenuated bacteria as a cancer vaccine vector. *Expert Rev Vaccines*, 2013, 12(10): 1139–1154. doi: 10.1586/14760584.2013.836914.
- [3] GLUSCHKO A, FARID A, HERB M, *et al.* Macrophages target *Listeria monocytogenes* by two discrete non-canonical autophagy pathways. *Autophagy*, 2022, 18(5): 1090–1107. doi: 10.1080/15548627.2021.1969765.
- [4] LIANG Z Z, SHERRID A M, WALLECHA A, *et al.* *Listeria monocytogenes*: a promising vehicle for neonatal vaccination. *Hum Vaccin Immunother*, 2014, 10(4): 1036–1046. doi: 10.4161/hv.27999.
- [5] BRUHN K W, CRAFT N, MILLER J F. *Listeria* as a vaccine vector. *Microbes Infect*, 2007, 9(10): 1226–1235. doi: 10.1016/j.micinf.2007.05.010.
- [6] MITCHELL G, GE L, HUANG Q Y, *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. doi: 10.1128/IAI.00110-15.
- [7] FLICKINGER J C, Jr, RODECK U, SNOOK A E. *Listeria monocytogenes* as a vector for cancer immunotherapy: current understanding and progress. *Vaccines*, 2018, 6(3): 48. doi: 10.3390/vaccines6030048.
- [8] 刘婷, 刘思静, 周玉真, 等. 绵羊李斯特菌为载体的结核多阶段T细胞表位疫苗的构建及评价. *四川大学学报(医学版)*, 2020, 51(1): 1–6. doi: 10.12182/20200160201.
- [9] WIELSTRA B. Balanced lethal systems. *Curr Biol*, 2020, 30(13): R742–R743. doi: 10.1016/j.cub.2020.05.011.
- [10] LEI Y, ZHOU Y, ZHANG Y, *et al.* A *Listeria ivanovii* balanced-lethal system may be a promising antigen carrier for vaccine construction. *Microb Biotechnol*, 2022, 15(11): 2831–2844. doi: 10.1111/1751-7915.14137.
- [11] CHEN Y, YANG D, LI S, *et al.* Development of a *Listeria monocytogenes*-based vaccine against hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 2012, 31(17): 2140–2152. doi: 10.1038/nc.2011.395.
- [12] SU L, ZHANG Y, ZHANG X, *et al.* Combination immunotherapy with two attenuated *Listeria* strains carrying shuffled HPV-16 E6E7 protein causes tumor regression in a mouse tumor model. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 13404. doi: 10.1038/s41598-021-92875-9.
- [13] 徐宗凯, 林青青, 周梦莹, 等. 三种李斯特菌体蛋白提取方法的比较. *生命科学研究*, 2015, 19(1): 29–33. doi: 10.16605/j.cnki.1007-7847.2015.01.006.
- [14] YAN Y, MU W, ZHANG L, *et al.* Asd-based balanced-lethal system in attenuated *Edwardsiella tarda* to express a heterologous antigen for a multivalent bacterial vaccine. *Fish Shellfish Immunol*, 2013, 34(5): 1188–1194. doi: 10.1016/j.fsi.2013.01.027.
- [15] THOMPSON R J, BOUWER H G, PORTNOY D A, *et al.* Pathogenicity and immunogenicity of a *Listeria monocytogenes* strain that requires D-alanine for growth. *Infect Immun*, 1998, 66(8): 3552–3561. doi: 10.1128/IAI.66.8.3552-3561.
- [16] WALLECHA A, MACIAG P C, RIVERA S, *et al.* Construction and characterization of an attenuated *Listeria monocytogenes* strain for clinical use in cancer immunotherapy. *Clin Vaccine Immunol*, 2009, 16(1): 96–103. doi: 10.1128/CVI.00274-08.
- [17] QUISPE-TINTAYA W, CHANDRA D, JAHANGIR A, *et al.* Nontoxic radioactive *Listeria*^{at} is a highly effective therapy against metastatic pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(21): 8668–8673. doi: 10.1073/pnas.1211287110.
- [18] BOLHASSANI A, NADERI N, SOLEYMANI S. Prospects and progress of *Listeria*-based cancer vaccines. *Expert Opin Biol Ther*, 2017, 17(11): 1389–1400. doi: 10.1080/14712598.2017.1366446.
- [19] WAN X, CHENG C, LIN Z, *et al.* The attenuated hepatocellular carcinoma-specific *Listeria* vaccine Lmdd-MPFG prevents tumor

occurrence through immune regulation of dendritic cells. *Oncotarget*, 2015, 6(11): 8822–8838. doi: 10.18632/oncotarget.3558.

- [20] MASON N J, GNANANDARAJAH J S, ENGILES J B, *et al.* Immunotherapy with a HER2-targeting *Listeria* induces HER2-specific immunity and demonstrates potential therapeutic effects in a phase I trial in canine osteosarcoma. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(17): 4380–4390. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0088.

- [21] VERCH T, PAN Z K, PATERSON Y. *Listeria monocytogenes*-based antibiotic resistance gene-free antigen delivery system applicable to other bacterial vectors and DNA vaccines. *Infect Immun*, 2004, 72(11):

6418–6425. doi: 10.1128/IAI.72.11.6418-6425.2004.

(2023-08-03收稿, 2023-09-23修回)

编辑 吕 熙



开放获取 本文遵循知识共享署名—非商业性使用

4.0国际许可协议(CC BY-NC 4.0), 允许第三方对本刊发

表的论文自由共享(即在任何媒介以任何形式复制、发行原文)、演绎(即修改、转换或以原文为基础进行创作), 必须给出适当的署名, 提供指向本文许可协议的链接, 同时标明是否对原文作了修改; 不得将本文用于商业目的。

CC BY-NC 4.0许可协议访问<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>。

© 2023《四川大学学报(医学版)》编辑部 版权所有

本 刊 征 订 启 事

《四川大学学报(医学版)》为原《华西医科大学学报》, 创办于1959年, 系四川大学主办的综合性医药卫生学术刊物, 多次被评为国家和省部级优秀科技期刊。期刊以“传承创新、与时俱进、坚守初心、砥砺前行”为办刊理念, 主要报道基础医学、临床医学、口腔医学、预防医学、药学、法医学等医学及相关交叉学科的科研成果。本刊是中文核心期刊, 被中国科学引文数据库(CSCD)(核心版)、北京大学图书馆中文核心期刊要目总览(北大核心/中文核心)、中国科技论文与引文数据库(CSTPCD)(科技核心)、美国PubMed《医学索引》(IM/MEDLINE)、美国生物医学全文数据库PubMed Central(PMC)、Scopus等收录。本刊以从事医药卫生事业的高、中级科研、医疗、教学、预防机构人员和高等医药院校师生为主要阅读对象。

本刊为双月刊, 大16开本, 每册国内定价10.00元, 全年定价60.00元。

国内代号: 62-72 国外代号: BM376

地址: 四川省成都市人民南路三段17号《四川大学学报(医学版)》编辑部

邮编: 610041

联系电话: (028)85501320, (028)85500106

E-mail: scuxbyxb@scu.edu.cn

网址: <https://ykxb.scu.edu.cn>