

## 表达 HPV16 E7 的重组减毒李斯特菌诱导的小鼠抗肿瘤作用

贾艳艳, 殷月兰, 谈卫军, 付红, 陈祥, 潘志明, 焦新安\*

扬州大学, 江苏省人兽共患病学重点实验室, 禽类预防医学教育部重点实验室, 扬州 225009

**摘要:** 【目的】研究运送 HPV16 E7 抗原的重组李斯特菌 (LM4  $\Delta hly$ :E7) 诱导的特异性免疫应答, 并进行免疫保护性效力评价。【方法】将重组减毒李斯特菌 LM4  $\Delta hly$ :E7 腹腔注射免疫 C57BL/6 小鼠, 2 次免疫后, 通过 ELISPOT 方法、细胞毒性杀伤实验及脾脏中效应性 T 细胞比例分析来研究重组菌激发的细胞免疫应答, 同时, 用 ELISA 方法检测小鼠血清中的 E7 抗体效价。最后, 将 TC-1 肿瘤细胞皮下注射免疫小鼠进行保护性效力评价。【结果】ELISPOT 结果表明, 重组菌 LM4  $\Delta hly$ :E7 以诱发 Th1 型免疫为主; 同时 LM4  $\Delta hly$ :E7 能够诱导强烈的特异性 CTL 杀伤活性, 杀伤率可达到 72%, 与对照组相比, 差异极显著 ( $P < 0.01$ ); 并且研究结果显示重组李斯特菌诱导小鼠脾脏内产生较多数量的 CD4<sup>+</sup> T 细胞和 CD8<sup>+</sup> T 细胞 ( $P < 0.05$ ); ELISA 检测 LM4  $\Delta hly$ :E7 免疫小鼠血清中的 E7 抗体效价为 1:400; 保护性效力评价结果证实, LM4  $\Delta hly$ :E7 能够 100% 保护小鼠抵御肿瘤细胞的攻击。【结论】重组减毒菌 LM4  $\Delta hly$ :E7 能够诱导机体产生 E7 特异性的细胞免疫应答和体液免疫应答, 具有较好的免疫保护效力, 显示出减毒李斯特菌在肿瘤疫苗研发中的良好应用前景。

**关键词:** 减毒李斯特菌, 肿瘤疫苗载体, 免疫应答, 保护性效力, 宫颈癌

**中图分类号:** R37      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2012) 12-1508-07

单核细胞增生性李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, LM) 作为一种革兰氏阳性的兼性胞内寄生菌, 不仅具有刺激抗原提呈细胞成熟、诱导机体产生强烈的天然免疫应答的能力; 同时能够运送抗原进入 MHC-I 类和 MHC-II 类抗原提呈途径, 诱导强烈的 T 细胞免疫应答, 以及刺激记忆性 T 细胞的应答和促进被感染巨噬细胞凋亡的能力<sup>[1-2]</sup>。目前, LM 业已被认为是理想的新型基因工程疫苗载体之一, 已被广泛用于各种肿瘤疾病的疫苗研发<sup>[3-4]</sup>, 因此, 研究重组李斯特菌诱导的异源抗原特异

性免疫应答, 在 LM 载体疫苗研发中具有重要意义。

E7 是人乳头瘤病毒 (Human papillomavirus, HPV) 编码的致癌蛋白之一, 是当前研发宫颈癌疫苗的理想靶点之一<sup>[5]</sup>。为此, 前期我们构建了表达 HPV16 E7 抗原的减毒重组李斯特菌 LM4  $\Delta hly$ :E7。该重组菌是利用同源重组技术将 HPV16 E7 基因定点整合至 *hly* 信号肽下游, 获得分泌表达 LLO-E7 融合蛋白, 同时缺失 *hly* 的部分序列, 重组菌的毒力显著下降。本研究以重组减毒菌 LM4  $\Delta hly$ :E7 为生物材料, 从细胞免疫应答和体液免疫应答两

**基金项目:** 国家“973 项目” (2012CB518805); 教育部“长江学者和创新团队发展计划”资助项目; 国家自然科学基金 (31101841); 江苏省科技支撑项目 (BE2012367); 江苏省自然科学基金 (BK2011446)

\* 通信作者。Tel: +86-514-87971136; E-mail: jiao@yzu.edu.cn

**作者简介:** 贾艳艳 (1983-), 女, 河南洛阳人, 博士, 研究方向为人兽共患病学与免疫学。E-mail: jiaayanyan0120@163.com

**收稿日期:** 2012-07-13; **修回日期:** 2012-09-23

方面,分析重组菌 LM4 $\Delta$ hly::E7 诱导针对 E7 的特异性免疫应答,并且进行了保护性效力评价,以期为宫颈癌疫苗研发提供新的思路,同时为李斯特菌载体系统应用于癌症疫苗研发奠定重要基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 主要细胞系与菌株:**TC-1 细胞系(共转染 HPV16 E6/E7 和 c-H-ras 基因的小鼠肺上皮肿瘤细胞株)购自中国医学科学院肿瘤细胞库;LM4 $\Delta$ hly::E7 是表达 LLO-E7 融合蛋白的重组李斯特菌,LM4 $\Delta$ hly::esat-6 是表达 LLO-ESAT-6 融合蛋白的重组李斯特菌,与 LM4 $\Delta$ hly::E7 构建方法一致,在本研究中作为表达不相关抗原的对照菌,以上两株重组菌均由本实验室构建保存。

**1.1.2 主要试剂:**HPV16 E7<sub>49-57</sub> (H-2D<sup>b</sup>) 多肽由北京中科亚光生物科技有限公司合成;GST-E7 融合蛋白由本实验室表达保存,FITC Rat anti-mouse CD3 mAb、PE Rat anti-mouse CD4 mAb、APC Rat anti-mouse CD8 mAb,小鼠 IFN- $\gamma$ 、IL-4 检测试剂盒均为 BD 公司产品,ELISPOT 板购自 Millipore 公司,羊抗鼠 IgG-HRP 购自 Sigma 公司,HPV16E7 鼠单克隆抗体(clone 8C9)及 CFSE 染料购自 invitrogen 公司。

**1.1.3 主要仪器:**普通摇床 SCS 24 购自上海市离心机械研究所,台式冷冻离心机 FRESCO 21、恒温 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱购自 Thermo 公司,台式冷冻离心机 Centrifuge 5810R、Biophotometer 分光光度计购自 Eppendorf 公司,FACS Aria 购自 BD 公司,酶标仪 TECAN5082 购自 TECAN 公司。

**1.1.4 实验动物:**6-8 周龄 SPF 级 C57BL/6 (H-2D<sup>b</sup>) 雌性小鼠购自扬州大学比较医学中心。

### 1.2 动物免疫

取适量重组菌 LM4 $\Delta$ hly::E7、LM4 $\Delta$ hly::esat-6 的新鲜培养物,140 × g 离心 5 min,PBS 洗涤菌体沉淀,测定其 OD<sub>600</sub> 值,将菌液调整至 5 × 10<sup>9</sup> CFU/mL,4℃ 保存备用。将 6-8 周龄 C57BL/6 (H-2D<sup>b</sup>) 雌性小鼠随机分成 3 组,每个实验每组 5 只小鼠,分别为 LM4 $\Delta$ hly::E7 免疫组、LM4 $\Delta$ hly::esat-6 免疫组及 PBS 对照组,腹腔注射 100  $\mu$ L (0.1 LD<sub>50</sub>, 5 × 10<sup>8</sup> CFU/只),共免疫 2 次,每次间隔 7 d。各实验组小鼠于第二次免疫后第 7 天进行如下试验。

### 1.3 ELISPOT 检测特异性 IFN- $\gamma$ 和 IL-4 分泌细胞

无菌分离小鼠脾脏细胞,并调整至适宜浓度,以下具体步骤参见文献 [6]。

### 1.4 E7 特异性细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 杀伤试验

按照 Coles 等 [7] 报道的 CFSE 标记法分析重组菌诱导小鼠产生的特异性 CTL 杀伤活性,并计算 CTL 的特异性杀伤率。

### 1.5 脾细胞中的 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞和 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞比例分析

收获 2 免后小鼠的脾脏制备单细胞悬液。取 1 × 10<sup>6</sup> 个细胞分别用 FITC Rat anti-mouse CD3 mAb、PE Rat anti-mouse CD4 mAb 及 APC Rat anti-mouse CD8 $\alpha$  mAb 染色,4℃ 避光作用 15 min;收获细胞;用适量 1% BSA 的 PBS 重悬细胞,FACS 分析各组小鼠中脾脏内 CD4<sup>+</sup>T 细胞、CD8<sup>+</sup>T 细胞的比例。

### 1.6 ELISA 检测免疫鼠血清中的 E7 特异性抗体

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 方法测定各免疫组的 E7 抗体效价 [8]。

### 1.7 重组菌 LM4 $\Delta$ hly::E7 的免疫保护性效力评价

将 6-8 周龄 C57BL/6 雌性小鼠随机分成 3 组,每组 8 只,在 0 d、7 d 分别腹腔注射 LM4 $\Delta$ hly::E7、LM4 $\Delta$ hly::esat-6 及 PBS 缓冲液,在 2 免后第 4 天皮下注射 2 × 10<sup>5</sup> TC-1 肿瘤细胞,观测小鼠移植瘤的发展进程,在第一次肿瘤细胞注射后 40 d,以 TC-1 细胞再次注射未出现肿瘤的免疫小鼠,分析重组菌 LM4 $\Delta$ hly::E7 诱导小鼠产生的保护性效果及记忆性应答。

### 1.8 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 (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ );应用 GradPrism5.0 软件作图。

## 2 结果

### 2.1 E7 特异性 IFN- $\gamma$ 和 IL-4 分泌细胞的测定

ELISPOT 试验结果显示,LM4 $\Delta$ hly::E7 免疫组分泌 IFN- $\gamma$  的细胞数量明显高于分泌 IL-4 的细胞

数量,二者具有极显著性差异 (\*\* $P < 0.01$ ) (图 1),说明重组菌 LM4  $\Delta hly::E7$  诱导的免疫应答趋向于 Th1 型应答。同时 LM4  $\Delta hly::E7$  免疫组分泌 IFN- $\gamma$  细胞数量与其他对照组相比较有极显著性差异 (\*\* $P < 0.01$ ) (图 1)。

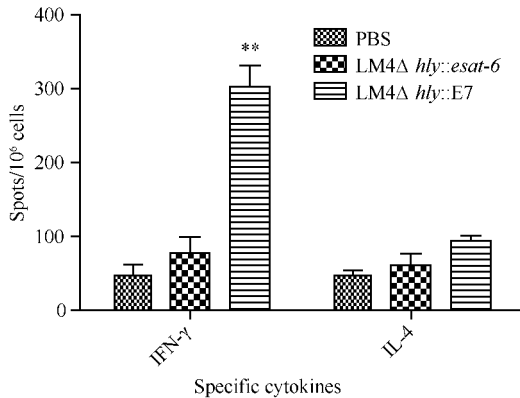


图 1 不同免疫组脾脏细胞中分泌特异性细胞因子的细胞数

Fig. 1 The number of secreting-IFN- $\gamma$  and IL-4 cells in the splenocytes from different groups. Data were expressed as the mean and s. d. values from three independent experiments. \*\*  $P < 0.01$  versus the controls.

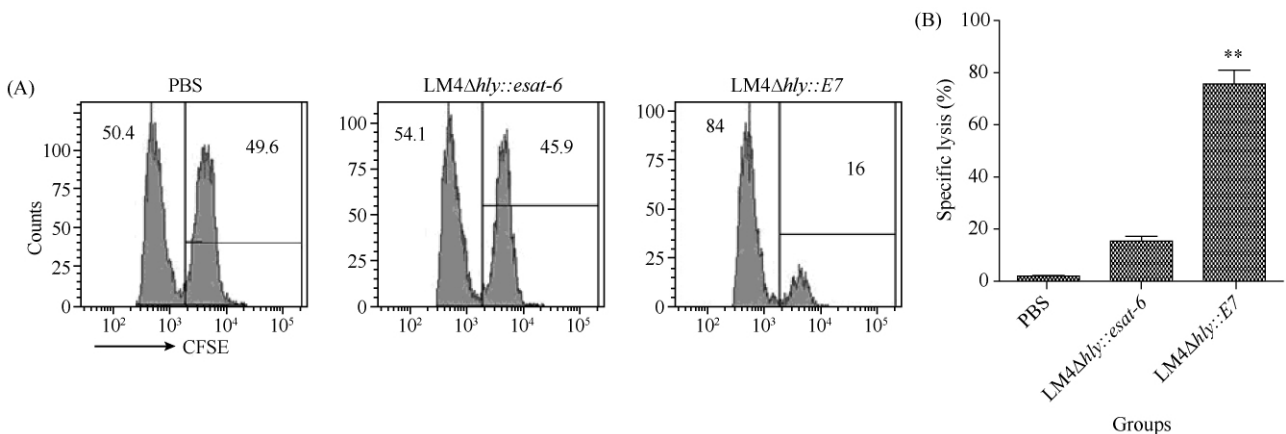


图 2 不同免疫组诱导的 E7 特异性 CTL 应答

Fig. 2 E7-specific CTL activity in different groups. A: the cytotoxic activity *in vivo*, the representative samples of *in vivo* killing of E7<sub>49-57</sub>-positive targets are shown; B: the proportion of specific lysis in different groups. Data were expressed as the mean and s. d. values from three independent experiments. \*\*  $P < 0.01$  versus the controls.

## 2.4 血清中 E7 特异性抗体效价检测

采用 ELISA 方法检测了不同免疫组血清中 E7 抗体水平,结果如图 4 所示。LM4  $\Delta hly::E7$  经过 2 次免疫后小鼠血清中 E7 抗体效价为 1:400。试验结果表明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。

## 2.2 LM4 $\Delta hly::E7$ 诱导的 E7 特异性 CTL 效应

本研究应用 CFSE 标记法测定了重组菌诱导的特异性 CTL 杀伤活性,从图 2-A 中可见,LM4  $\Delta hly::E7$  免疫组小鼠脾脏中的 CFSE<sup>high</sup> 细胞峰明显降低,说明注入免疫小鼠体内的 CFSE<sup>high</sup> 细胞被特异性 CTL 细胞所杀伤,表明重组菌 LM4  $\Delta hly::E7$  能够诱导机体产生较强的特异性 CTL 杀伤活性。而 PBS 对照组和 LM4  $\Delta hly::esat-6$  免疫组中的 CFSE<sup>high</sup> 细胞峰和 CFSE<sup>low</sup> 细胞峰无明显差异,表明此两组小鼠均未产生特异性 CTL 效应。LM4  $\Delta hly::E7$  诱导 E7 特异性杀伤率为 72.06%  $\pm$  7.83%,与其它对照组相比有极显著性差异 (\*\* $P < 0.01$ ) (图 2-B)。

## 2.3 重组菌诱导小鼠脾脏内 CD4<sup>+</sup>T 细胞与 CD8<sup>+</sup>T 细胞比例变化

从图 3 可见,PBS 免疫组中 CD4<sup>+</sup>T 细胞占 T 细胞比例为 36.2%  $\pm$  1.557%、CD8<sup>+</sup>T 细胞为 29.71%  $\pm$  0.99%,而 LM4  $\Delta hly::E7$ 、LM4  $\Delta hly::esat-6$  均能诱导小鼠脾脏内的 CD4<sup>+</sup>T 细胞及 CD8<sup>+</sup>T 细胞数量增加,且与对照组有显著性差异 (\*  $P < 0.05$ )。而 LM4  $\Delta hly::E7$  免疫组与 LM4  $\Delta hly::esat-6$  免疫组之间无显著性差异。

## 2.5 重组菌 LM4 $\Delta hly::E7$ 的免疫保护性效果

将 C57BL/6 小鼠随机分成 3 组,分别腹腔免疫 LM4  $\Delta hly::E7$ 、LM4  $\Delta hly::esat-6$  及 PBS,于 2 免之后第 4 天皮下注射 TC-1 肿瘤细胞注射免疫小鼠,动态观测各组小鼠肿瘤的发展进程。从图 5-A 可以看出,重组菌 LM4  $\Delta hly::E7$  免疫小鼠注射肿瘤细胞

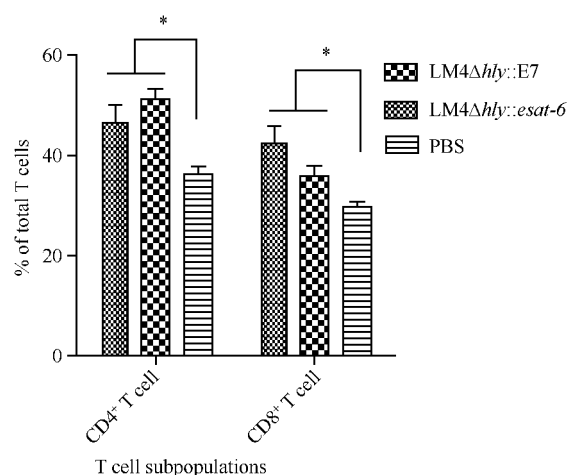


图3 不同免疫组脾脏中 T 细胞亚群比例变化

Fig. 3 The proportion of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in the splenocytes from vaccinated mice. Data were expressed as the mean and s. d. values from three independent experiments. \*  $P < 0.05$  versus the controls.

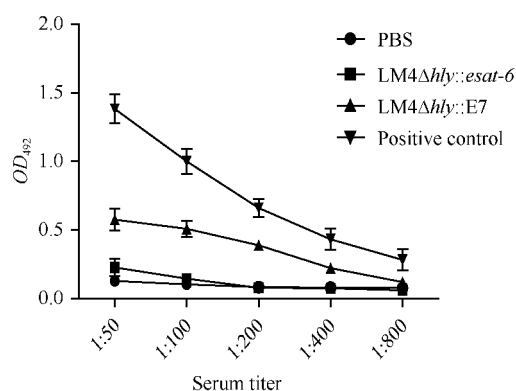


图4 不同免疫组血清中的 E7 抗体水平

Fig. 4 Serum antibody against E7 protein in different groups. Data were expressed as the mean and s. d. values from three independent experiments.

后,在观测的 33 d 内均无肿瘤的生长,而对照组在肿瘤细胞注射后第 10 天,所有小鼠均有肿瘤的生长,并且随着时间的推移,肿瘤体积日渐增大。同时在 TC-1 细胞注射后第 40 天,对无肿瘤的免疫鼠进行 TC-1 细胞的再次注射,在随后的 50 d 内所有小鼠仍然没有出现肿瘤的生长(图 5-B)。

### 3 讨论

宫颈癌居于全球女性癌症死亡率的第三位,是重要的公共健康问题,HPV 已被证实是引起宫颈癌的主要病原<sup>[9]</sup>。目前,虽有宫颈癌预防性疫苗的问题

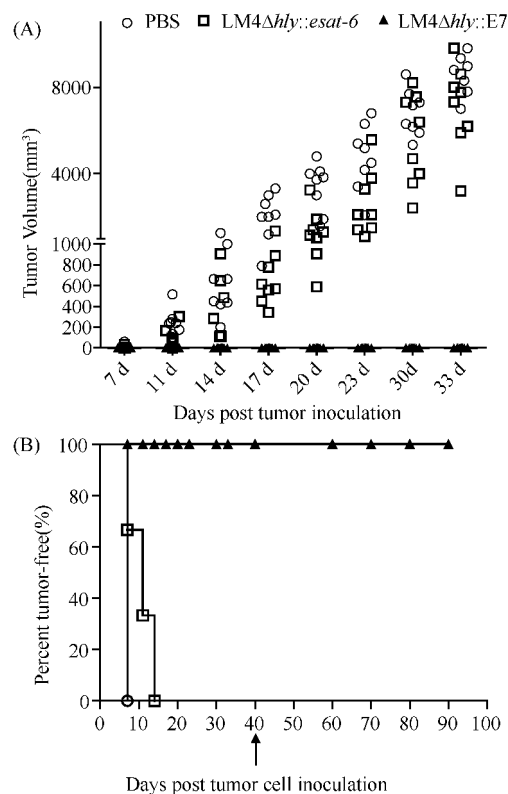


图5 不同免疫组的免疫保护性效力

Fig. 5 *In vivo* tumor protection experiments with recombinant *L. monocytogenes*. A: tumor sizes in different groups within 33 days post tumor cell inoculation; B: the percent of tumor-free animals in different groups. These results are representative of three independent experiments. (arrow, tumor-free mice from LM4  $\Delta$ hly::E7 treatment were received the second challenge)

世,因其成本高,疫苗持续保护期不明确等问题而未能普遍应用于宫颈癌高发地区<sup>[10]</sup>,因此,研发实用有效的宫颈癌疫苗显得很有必要。多项研究证实,LM 是很有潜力的肿瘤疫苗载体,其能够通过分泌毒力因子 LLO 和磷脂酶 C 降解吞噬体膜,进而使 LM 从吞噬体逃离至胞浆内,在胞浆内增殖,从而诱导强烈的 CD8<sup>+</sup> T 细胞免疫应答,而 CD8<sup>+</sup> T 细胞介导的 CTL 应答在杀伤肿瘤细胞机制中发挥着相当重要的作用<sup>[2-3,11]</sup>。因此,我们前期构建了表达 HPV16E7 的重组李斯特菌 LM4  $\Delta$ hly::E7,在本研究中,对重组菌 LM4  $\Delta$ hly::E7 进行免疫保护性效力评价及抗肿瘤免疫的初步探索,以期新型宫颈癌预防性疫苗的研发提供借鉴意义。

LM 作为载体运送肿瘤相关抗原,进而诱导机

体产生特异性免疫应答用于肿瘤疾病的预防和治疗,其中特异性细胞免疫应答在抗肿瘤免疫中显得尤为重要。在本研究中,通过 ELISPOT 方法分析特异性 IFN- $\gamma$  分泌细胞和 IL-4 分泌细胞,用于评价重组菌诱导的 Th1 和 Th2 应答水平。结果显示,重组菌诱导的特异性免疫应答倾向于 Th1 型应答。Th1 型应答在细胞免疫应答中起关键作用,效应 Th1 细胞通过表面 TCR-CD3 复合物受体分子和 CD40L 共刺激分子与 APC 表面相应抗原肽-MHC II 类分子复合物和 CD40 分子结合,通过释放 IL-2、IFN- $\gamma$  等细胞因子发挥免疫调节作用,介导产生细胞免疫效应,同时一部分 Th1 细胞能够辅助细胞毒性 T 淋巴细胞活化增殖为效应性 CTL,介导清除肿瘤和病毒感染的靶细胞<sup>[12]</sup>。

CTL 是一种特异性 T 细胞,专门分泌各种细胞因子参与免疫调节作用。效应性 CTL 通过表面 TCR-CD3 复合受体分子和黏附分子,与肿瘤或病毒的靶细胞表面相应抗原肽-MHC I 类分子复合物结合,通过释放颗粒酶、穿孔素及表达 FasL 等细胞毒性介质,产生细胞毒效应,介导靶细胞的杀伤作用<sup>[13]</sup>。因此,效应性 CTL 是抗肿瘤免疫的主要效应细胞。本研究应用 CFSE 标记法检测重组菌诱导小鼠产生的 CTL 应答,将等量的负载 E7<sub>49-57</sub> 肽 CFSE<sup>high</sup> 细胞和不含肽 CFSE<sup>low</sup> 细胞输入免疫小鼠体内,根据荧光强度不同,应用 FACS 分析 CFSE<sup>high</sup> 细胞和 CFSE<sup>low</sup> 细胞数量的变化,揭示不同免疫组诱导的 CTL 杀伤活性。结果发现,LM4  $\Delta hly$ : :E7 免疫组小鼠脾脏中的 CFSE<sup>high</sup> 细胞数量显著下降,而对照组细胞数量无明显变化,说明 LM4  $\Delta hly$ : :E7 能够诱导机体产生具有强烈杀伤活性的特异性 CTL,杀死输入体内负载 E7<sub>49-57</sub> 多肽的 CFSE<sup>high</sup> 细胞。而强烈的 E7 特异性 CTL 应答与重组菌诱导小鼠产生 CD4<sup>+</sup> T 细胞、CD8<sup>+</sup> T 细胞数量显著增加密切相关。

除了分析重组菌诱导的细胞免疫应答外,本研究还进行了体液免疫应答检测。结果显示,重组李斯特菌能够诱导机体产生 E7 特异性抗体,抗体效价为 1:400,这与相关文献报道的结论相符合<sup>[14]</sup>。分析其原因主要是,李斯特菌是胞内菌,并且在进行胞间感染时,主要通过双层膜方式进入相邻细胞,不经过胞外环境<sup>[1]</sup>,因此,重组李斯特菌诱导的免疫

应答是以细胞免疫应答为主<sup>[15]</sup>,这是其作为病毒病和肿瘤疾病疫苗载体的优势之一。

TC-1 肿瘤细胞系是经共转染 HPV16 E6、E7 和活化的 c-H-ras 基因的 C57BL/6 小鼠肺上皮肿瘤细胞,将其皮下注射 C57BL/6 小鼠可建立移植瘤模型,广泛用于宫颈癌的疫苗研究<sup>[16-17]</sup>。本研究通过观测小鼠能否抵抗肿瘤细胞 TC-1 攻击,对重组李斯特菌的免疫保护性效力进行了评价。研究发现,LM4  $\Delta hly$ : :E7 免疫组中所有小鼠在肿瘤细胞注射后 33d 内均未出现肿瘤生长,而 PBS 组和 LM4  $\Delta hly$ : :esat-6 免疫组小鼠在肿瘤细胞注射后的第 7-10 天内,所有小鼠均出现肿瘤的生长,显示重组菌 LM4  $\Delta hly$ : :E7 具有显著的免疫保护效果,这与 LM4  $\Delta hly$ : :E7 诱导强烈的细胞免疫应答密切相关。结果还显示,LM4  $\Delta hly$ : :E7 免疫组中无肿瘤小鼠仍能够抵御第 2 次肿瘤细胞攻击,从而推测重组菌 LM4  $\Delta hly$ : :E7 诱导强烈的细胞免疫应答的同时,也能够诱导机体产生特异性的记忆性应答。

总之,重组减毒李斯特菌 LM4  $\Delta hly$ : :E7 能够诱导小鼠产生强烈的 T 细胞免疫应答及特异性体液免疫应答,具有较好的免疫保护作用,预示减毒李斯特菌在肿瘤疫苗研发中具有重要的应用前景,同时为研发实用有效的宫颈癌预防性疫苗提供新的策略。

## 参考文献

- [1] Hamon M, Bierne H, Cossart P. *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. *Nature Reviews Microbiology*, 2006, 4 (6) :423-434.
- [2] Pamer EG. Immune responses to *Listeria monocytogenes*. *Nature Reviews Immunology*, 2004, 4 (10) :812-823.
- [3] Brockstedt DG, Dubensky TW. Promises and challenges for the development of *Listeria monocytogenes*-based immunotherapies. *Expert Review of Vaccines*, 2008, 7 (7) :1069-1084.
- [4] Le DT, Brockstedt DG, Nir-Paz R, Hampl J, Mathur S, Nemunaitis J, Sterman DH, Hassan R, Lutz E, Moyer B, Giedlin M, Louis JL, Sugar EA, Pons A, Cox AL, Levine J, Murphy AL, Illei P, Dubensky TW Jr, Eiden JE, Jaffee EM, Laheru DA. A live-attenuated *Listeria* vaccine (ANZ-400) and a live-attenuated *Listeria* vaccine expressing mesothelin (CRS-207) for advanced cancers:

- Phase 1 studies of safety and immune induction. *Clinical Cancer Research*, 2012, 18 (3) :858-868.
- [5] zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature Reviews Cancer*, 2002, 2 (5) :342-350.
- [6] Jiao X, Lo-Man R, Winter N, Dériaud E, Gicquel B and Leclerc C: The shift of Th1 to Th2 immunodominance associated with the chronicity of *Mycobacterium bovis* bacille Calmette- Guérin infection does not affect the memory response. *The Journal of Immunology*, 2003, 170 (3) : 1392-1398.
- [7] Coles RM, Mueller SN, Heath WR, Carbone FR, Brooks AG. Progression of armed CTL from draining lymph node to spleen shortly after localized infection with herpes simplex virus 1. *The Journal of Immunology*, 2002, 168 (2) :834-838.
- [8] Zhang H, Jiao X, Pan Z, Hu M, Tang L. Kinetic of immune response induced by recombinant *Salmonella* through oral immunization. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2007, 29 (5) :392-393. (in Chinese)  
张辉, 焦新安, 潘志明, 胡茂志, 唐丽华. 口服重组沙门菌诱导的免疫应答动态分析. 中国预防兽医学报, 2007, 29 (5) :392-393.
- [9] Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer*, 2010, 127 (12) :2893-2917.
- [10] Lin K, Doolan K, Hung CF, Wu TC. Perspectives for preventive and therapeutic HPV vaccines. *Journal of the Formosan Medical Association*, 2010, 109 (1) :4-24.
- [11] Yin Y, Zhu G, Geng Sh, Hu M, Jiao X. Construction and characterization of a mutant strain of *Listeria monocytogenes* with a deletion of *actA* and *plcB*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2008, 48 (3) :1-5. (in Chinese)  
殷月兰, 朱国强, 耿士忠, 胡茂志, 焦新安. 产单核细胞李斯特菌 *actA/plcB* 缺失株的构建及其生物学特性. 微生物学报, 2008, 48 (3) :1-5.
- [12] Katzman SD, Gallo E, Hoyer KK, Abbas AK. Differential requirements for Th1 and Th17 responses to a systemic self-Antigen. *The Journal of Immunology*, 2011, 186 (8) :4668-4673.
- [13] Cervantes-Barragan L, Lewis KL, Firner S, Thiel V, Huques S, Reith W, Ludwig B, Reizis B. Plasmacytoid dendritic cells control T-cell response to chronic viral infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109 (8) :3012-3017.
- [14] Sewell DA, Pan ZK, Paterson Y. *Listeria*-based HPV-16 E7 vaccines limit autochthonous tumor growth in a transgenic mouse model for HPV-16 transformed tumors. *Vaccine*, 2008, 26 (41) :5315-5320.
- [15] Starks H, Bruhn KW, Shen H, Barry RA, Dubensky TW, Brockstedt D, Hinrichs DJ, Hiquins DE, Miller JF, Giedlin M, Bouwer HG. *Listeria monocytogenes* as a vaccine vector: virulence attenuation or existing antivector immunity does not diminish therapeutic efficacy. *The Journal of Immunology*, 2004, 173 (1) :420-427.
- [16] Lin K-Y, Guarnieri FG, Staveley-O'Carroll KF, Levitsky HI, August JT, Pardoll DM, Wu TC. Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. *Cancer Research*, 1996, 56 (1) :21-26.
- [17] Li YL, Liu J, Liu JN, Zhang J. Immunization of protein HPV16 E7 in fusion with mouse HSP70 inhibits the growth of TC-1 cells in tumor bearing mice. *Vaccine*, 2011, 29 (35) :5959-5962.

## Protective immune responses induced by a recombinant *Listeria monocytogenes* delivering HPV16 E7

Yanyan Jia, Yuelan Yin, Weijun Tan, Hong Fu, Xiang Chen, Zhiming Pan,  
Xin'an Jiao\*

Jiangsu Key Laboratory of Zoonosis; Ministry of Education Key Lab for Avian Preventive Medicine, Yangzhou University,  
Yangzhou, Jiangsu 225009, China

**Abstract:** [Objective] To investigate specific immune responses elicited by a recombinant *Listeria monocytogenes* strain LM4  $\Delta hly::E7$  and assess protective effect in C57BL/6 mice. [Methods] C57BL/6 mice were intraperitoneally immunized with LM4  $\Delta hly::E7$  at 1-week intervals. After the second immunization, cellular immunity elicited by this recombinant *L. monocytogenes* strain was analyzed via an ELISPOT assay, Cytotoxic T lymphocytes (CTL) measurement assay and analysis of effector T cells proportion in the splenocytes. Also, the serum antibodies against HPV16 E7 protein were determined in an ELISA assay. Finally, protective effect was assessed against the challenge with TC-1 tumor cells. [Results] The immune responses elicited by LM4  $\Delta hly::E7$  were biased towards Th1 type in the ELISPOT assay. Also, LM4  $\Delta hly::E7$  was able to induce E7-specific CTL activity, with average specific lysis of 72%, which was highly significant difference compared with the controls ( $P < 0.01$ ). Moreover, the proportion of effector T cells in the spleens were increased in mice immunized with recombinant *L. monocytogenes* strain ( $P < 0.05$ ). The titer of E7-specific antibodies in mice immunized with LM4  $\Delta hly::E7$  was 1:400 in the ELISA assay. Furthermore, immunization with LM  $\Delta hly::E7$  protected all mice against the lethal tumor cell challenge. [Conclusion] The data suggest that attenuated *Listeria monocytogenes* delivering HPV16 E7 antigen could induce both E7-specific cell mediated immunity and humoral immunity, and had a protective effect against challenge with TC-1 tumor cells.

**Keywords:** attenuated *Listeria monocytogenes*, cancer vaccine vector, immune responses, protective effect, cervical cancer

(本文责编:王晋芳)

---

Supported by the National Basic Research Program of China (2012CB518805), by the Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University; the National Natural Science Foundation of China (31101841), by the Science and Technology Support Program of Jiangsu Province (BE2012367) and by the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK2011446).

\* Corresponding author. Tel: +86-514-87971136; E-mail: jiao@yzu.edu.cn

Received: 13 July 2012/ Revised: 23 September 2012