

· 综述 ·

人乳头瘤病毒衣壳蛋白 L1 病毒样颗粒疫苗免疫机制及其应用效果进展

李青 赵卫东

目前国内外已公认高危型人乳头瘤病毒 (human papilloma virus, HPV) 持续感染是宫颈癌发生的必要条件, 约 90% 的宫颈癌由 HPV 感染所致^[1]。据统计, 全世界每年大约有 50 万例新发宫颈癌患者, 约 27.4 万死亡, 其中 80% 的死亡病例发生在发展中国家, 是因为在这些国家筛查和健康体检很难普及, 且年轻妇女宫颈癌的发病率呈上升趋势^[2]。另外 HPV 也可以引起男性阴茎及肛门周围恶性肿瘤。2006 年研制成功的预防性 HPV 疫苗通过重组 DNA 技术表达 L1 蛋白, 诱导机体产生中和性抗体可有效预防 HPV 感染, 临床应用已取得良好效果。

一、HPV VLP 分子结构及 HPV 自然感染的机体免疫反应

1. HPV 病毒样颗粒 (virus-like particles, VLP) 分子结构: HPV 是一种小的二十四面体 DNA 病毒颗粒, 无包膜。病毒衣壳由 360 个 L1 主要结构蛋白及 L2 次要结构蛋白构成。L1 蛋白是主要衣壳蛋白, 其含量是 L2 蛋白的 3~5 倍, 含多个抗原表位。已经有研究证实 HPV L1 可以从酵母、昆虫细胞和大肠杆菌体外表达系统中表达, 并合成 VLP。形态上 VLP 与真正的病毒颗粒及 HPV 病毒颗粒的构像相似, 具有诱导中和抗体的构像表位。

2. HPV 自然感染的机体免疫反应: HPV 感染很常见, 多数是“一过性”的, 可被机体免疫系统识别并加以清除。局部细胞强烈的免疫反应可以有效地阻止大多数 HPV 感染。研究发现在 HPV 感染相关肿瘤的病变组织中, CD4⁺ T 辅助淋巴细胞和细胞毒 T 淋巴细胞数目减少, 并发现 HPV 感染组织中 T 淋巴细胞亚型发生变化, 导致 CD4⁺/CD8⁺ 比

例降低。由此说明, 在自然感染中细胞免疫起重要作用。

在机体自然感染 HPV 后, 机体主要产生针对衣壳蛋白 L1 的血清中和抗体, 但这种反应是缓慢的, 抗体浓度低, 研究发现只有 50%~70% 感染 HPV 的妇女出现低度抗体, 而 HPV 的复制并不会引起细胞溶解、坏死或病毒血症, 且仅在终末分化的上皮细胞中释放大量病毒蛋白或病毒颗粒导致细胞凋亡从而逃避免疫监视反应^[3]; 此外 HPV 病毒可抑制干扰素的合成^[4]。因此需要预防性疫苗刺激机体产生高度抗体, 预防 HPV 感染。

二、L1 VLP 疫苗诱导机体免疫作用机制

1. L1 VLP 疫苗概况: L1 衣壳蛋白可在真核细胞中表达, 可以自我组装成 VLP, 这是 HPV 疫苗发展的关键一步。由于 VLP 不含病毒 DNA 或 RNA 基因组, 因此不会发生返祖或遗传重组, 具有较高的安全性。预防性 HPV 疫苗通过重组 DNA 技术表达 L1 蛋白, 诱导机体发生体液及细胞免疫, 并且 VLP 具有良好的免疫原性、免疫记忆及交叉保护的特点, 从而能更好地预防 HPV 感染。

至今, 国外已有两种注册的疫苗: 针对 HPV16 和 18 型的二价疫苗 (Cervarix) 和针对 HPV 6、11、16 及 18 型的四价疫苗 (Gardasil)。假设第 1 次接种时间定义为“0 月”, 疫苗成分和接种情况见表 1^[5]。

2. VLP 的免疫原性: VLP 诱导特异性抗体反应是免疫原性研究的焦点, HPV L1 VLP 疫苗具有高度的免疫原性, 其产生抗体的浓度在 3 次免疫接种后比自然感染后高 1~4 logs^[6]。有研究表明尽管标准方案是进行 3 次免疫接种, 但疫苗一次接种也可

基金项目: 安徽省科技攻关计划 (08010302101)

作者单位: 230001 合肥, 安徽医科大学附属省立医院妇产科分子实验室

通讯作者: 赵卫东, E-mail: victorzhao@163.com

表1 两种预防性疫苗的成分及接种规则

疫苗	二价疫苗 (Cervarix)	四价疫苗 (Gardasil)
接种时间	0, 1, 6月肌肉注射	0, 2, 6月肌肉注射
VLP 抗原	VLPs: 20 μg HPV-16; 20 μg HPV-18	VLPs: 40 μg HPV-16; 20 μg HPV-18; 20 μg HPV-6; 40 μg HPV-11
辅佐剂	含 ASO450 μg 的氢氧化铝 500 μg	硫酸氢氧化铝 225 μg
表达系统	杆状病毒	酵母菌

注: VLP: 类颗粒状病毒 ASO: 单磷酸类脂和铝盐氢氧化铝

提供短期保护^[7]。L1 VLP 独特的结构特点造成了其较强的免疫原性: 首先, VLPs 的表面具有中性和抗原决定簇, 其高度规则的紧密结构加强了与 B 细胞受体的交叉连接, 与单一抗原相比, 降低了受体激活的临界值。其次, L1 VLP 可能阻止了激活人体未成熟的树突状细胞的过程。最后, 与典型的蛋白抗原相反的是, L1 VLP 可以被免疫细胞快速识别^[8]。VLP 疫苗主要目的是通过诱导产生病毒的中和抗体起到保护作用, 因此 VLP 较强的免疫原性可以为机体提供保护性抗体。

3. 体液免疫: L1 VLP 最好的保护机制是因其能够诱导产生高滴度抗 L1 抗体 IgG、IgA 等, 已有实验证明 IgG 可以在接种过疫苗的阴道分泌物中检测到, 表明 IgG 已对病毒产生反应并阻止病毒感染。关于 L1 VLP 疫苗如何调节保护已经在动物模型上实验过, 用白尾兔的乳头瘤病毒和犬口腔乳头瘤病毒, 从 L1 VLP 免疫过的动物血清被动转移至实验中未接种病毒的动物研究表明, 中和抗体对调节保护是充分的。Day PM 等^[9]利用 HPV 小鼠宫颈模型, 显微镜观察 L1 VLP 抑制机体感染 HPV 的机制, 发现抗 L1 抗体可以抑制其感染。另有研究表明 L1 VLP 热稳定性好、不易失活, 可以诱导高滴度中和抗体的产生。

4. 细胞免疫: 树突状细胞 (dendritic cells, DCs) 是人体内抗原提呈细胞, 是机体免疫的始动者, 能够刺激并致敏 T 淋巴细胞, 产生细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL), 启动早期免疫反应。HPV VLP 免疫可诱导特异性 CTL 应答, 已有实验证实: 包含 HPV16 E7 CTL 表位的杂合乳头瘤病毒 VLP 能作为载体呈递抗原给组织相容性抗原 I 类和 II 类。被

HPV VLP 免疫后可诱导特异性 CTL, 且可保持很长时间。而且 CTL 可识别 HPV16 L1 的特异性表位 L1165 – 173, 可以在体内外活化 CTL 并诱导特异性抗体产生, Thnes 等^[10]研究口服不同组装形式的 HPV16 L1 (由 T7-VLP, T1 颗粒和衣壳蛋白亚单位组成) 的免疫原性时发现, 在体外用 HPV16 L1165 – 173 刺激, 用 IFN-γ ELISPOT 法测定发现, L1 特异性 CTL 反应明显增强。

另外 L1 VLP 单独并不能诱导 DC 分泌 IL-12 p70, 而当 Fausch 等^[11]将 DC、VLP 与同系 T 细胞共同培养时, 发现 IL-12 p70 分泌明显增多, IL-12 p70 可经多种细胞介导 Th1 细胞产生 IFN-γ, IFN-γ 对于 Th1 细胞反应的建立非常重要。由此说明, L1 VLP 可以与其他免疫细胞联合激发细胞免疫应答。

5. 免疫记忆: HPV VLP 免疫产生的抗体记忆反应是疫苗长期保护机体的先决条件。记忆性的抗体应答, 有保护性记忆和反应性记忆, 前者直接由留存的抗体或可迅速分泌抗体的浆细胞介导; 后者则由记忆性 B 细胞介导, 该细胞需二次遭遇抗原, 重新增殖和分化为浆细胞并产生抗体, 记忆 B 细胞可以针对感染发生回忆应答。二价疫苗 (Cervarix) 持续时间为 6.4 年。研究四价疫苗 (Gardasil) 时发现, 给受试者免疫接种 3 倍剂量 (1.5 mL) 的疫苗, 至少会产生 5 年的免疫记忆, 在血清里可检测到 HPV 型特异性抗体。注射疫苗 3 次后, 抗体反应随着预期的形式浓度达到高峰, 抗体浓度在随后的 12 ~ 18 个月后下降, 然后处于有效的稳定水平。四价疫苗接种后 60 个月再给予 1 个剂量, 结果显示回忆应答快速且强大, 在 3 ~ 5 d 之内抗体水平达到高峰, 在初次免疫中显示了反应记忆 B 细胞的存在^[12], 但目前还不清楚最低水平的中和性抗体是否可以充分中和消灭病毒及引发快速记忆 B 细胞的激活, 从而产生中和性抗体^[13]。

6. 交叉保护: 虽然 L1 产生的中和抗体主要是型特异性的, 但是也可以产生交叉反应。疫苗可抵抗相关型 HPV 感染引起的上皮内的病变。例如, 接种 HPV16 L1 VLP 可对 HPV31 提供强的保护, 这大概因为 HPV31 L1 的序列是与 HPV16 接近^[14]。相似的 HPV18 L1 VLP 可引起 HPV45 交叉中和和交叉反应, 但是对其它不同类型保护更弱。Kemp 等^[15]也通过对接种过 Cervarix 疫苗的妇女进行 HPV16 和 18 以及相关 HPV 类型的抗体反应评估,

发现 Cervarix 疫苗可诱导针对 HPV31 和 45 型产生交叉中和性抗体。VLP 预防性疫苗的交叉保护作用进一步降低了 HPV 感染的几率，而预防致癌的非疫苗 HPV 类型，尤其是人乳头瘤状病毒 HPV 45 型，在交叉保护预防宫颈腺癌上可能是重要的，因为目前不能常规筛查出宫颈腺癌^[16]。

三、L1 VLP 疫苗的临床应用进展

1. 适应范围：宫颈癌疫苗 Gardasil 用于 9~26 岁的女性群体，预防由 HPV 6、11、16、18 型引起的宫颈、外阴和阴道的恶性肿瘤，生殖器疣，以及用于 9~26 岁男性群体预防由 HPV 6、11 引起的生殖器疣^[17]。近日又获准用于预防由 HPV 引起的恶性肿瘤以及预防 1、2、3 级肛门上皮内瘤变（anal intraepithelial neoplasia, AIN）。目前，Cervarix 已经被澳大利亚治疗产品管理局批准用于年龄 10~45 岁的女性，主要预防 HPV16 和 18 型感染引起的宫颈癌前病变和宫颈癌。

2. 临床试验及效能评价：自 2006 年来，两种预防性 HPV VLP 疫苗在对女性预防 HPV 感染中取得了很好的疗效，美国疾病预防控制中心在 2010 年 5 月 27 日正式作出临时建议，确认四价疫苗 Gardasil 对男性有效，可用于男性 HPV 感染的预防，这一建议为人类预防 HPV 感染提供了良好的前景。

Romanowski 等^[18]评估了对 HPV16、18 L1 二价疫苗 Cervarix 的有效性，免疫原性，其中疫苗对 HPV16、18 型的有效性是 95.3%，在随访研究中，不良事件的发生与是否接种疫苗无关，接种后无一例死亡病例发生。这些显示了疫苗的良好疗效及有效而持续的免疫原性、安全性。欧洲研究小组评估了四价 HPV6、11、16、18 L1 VLP 对 HPV 相关宫颈和生殖器疾病预防的影响，并进行巴氏涂片和抗 HPV6、11、16、18 血清学检测。对与 HPV6、11、16、18 型相关的宫颈癌、癌前病变，疫苗有效率是 100%；对抗外生殖器病变与人乳头状瘤病毒，疫苗临床疗效为 99.0%。这些数据表明，四价 HPV6、11、16、18 型疫苗接种计划在 16~24 岁的女性接种是切实可行的。

Giuliano 等^[19]对 9~26 岁接种疫苗的男性也进行了评估，结果证明四价疫苗对男性接种是有效的。美国食品药品管理局（FDA）批准 HPV 疫苗 Gardasil 用于 9~26 岁男性人群，预防由 HPV 6、

11、16 和 18 引起的肛门癌和相关癌前病变。一项在同性恋男性中进行的随机对照试验对 Gardasil 预防肛门 HPV16、18 型感染导致的肛门癌及相关癌前病变 [1、2、3 度肛门上皮瘤 (AIN)] 的效果进行了评价。在试验末期，结果显示 AIN 的有效率为 78%。由于肛门癌这一疾病无性别差异，因此该数据同样支持疫苗用于女性患者。对于接种前已出现癌前病变的患者，Gardasil 无法达到预防效果，而对于感染 HPV 前已接种 Gardasil 的人群，可以因接种获益。

四、存在问题和展望

预防性疫苗的使用是减低宫颈癌发病率的有效途径。试验数据和后续疫苗效果监测表明该疫苗是安全有效的，但是预防性疫苗对于宫颈上皮内瘤变 2、3 级及原位癌的进展的阻遏效果较小^[20]，需进一步研究治疗性疫苗或者治疗性与预防性相结合的新型疫苗。另外高昂的成本限制了疫苗的广泛使用，各国政府，国际卫生机构，疫苗行业之间的合作是克服这一障碍的主要途径。实验证明了疫苗能有效预防男性 HPV 的感染，从而间接减少宫颈癌的发生，提高人类生存质量，为了更好地控制和治疗生殖道 HPV 感染，必须对 HPV 疫苗进行进一步研制和优化。

参 考 文 献

- [1] Bermudez-Humaran LG, Langella P. Perspectives for the development of human papillomavirus vaccines and immunotherapy. Expert Rev Vaccines, 2010, 9: 35~44.
- [2] Hakim AA, Dinh TA. Worldwide impact of the human papillomavirus vaccine. Curr Treat Options Oncol, 2009, 10: 44~53.
- [3] Stanley M. Immune responses to human papillomavirus. Vaccine, 2006, 24: 16~22.
- [4] Einstein MH, Schiller JT, Visconti RP, et al. Clinician's guide to human papillomavirus immunology: knowns and unknowns. Lancet Infect Dis, 2009, 9: 347~356.
- [5] Garland SM, Smith JS. Human papillomavirus vaccines: current status and future prospects. Drugs, 2010, 70: 1079~1098.
- [6] Villa LL, Ault KA, Giuliano AR, et al. Immunologic responses following administration of a vaccine targeting human papillomavirus Types 6, 11, 16 and 18. Vaccine, 2006, 24: 5571~5583.

- [7] Kreimer AR, Rodriguez AC, Hildesheim A, et al. Proof-of-principle evaluation of the efficacy of fewer than three doses of a bivalent HPV16/18 vaccine. *Journal of the National Cancer Institute*, 2011, 103: 1444–1451.
- [8] Kwak Kihyuck, Yemelyanova A, Roden RBS, Prevention of cancer by prophylactic human papillomavirus vaccines, *Current Opinion in Immunology*, 2011, 23: 244–251.
- [9] Day PM, Kines RC, Thompson CD, et al. In vivo mechanisms of vaccine-induced protection against HPV infection. *Cell Host & Microbe*, 2010, 8: 260–270.
- [10] Thoennes N, Müller M. Oral immunization with different assembly forms of the HPV 16 major capsid protein L1 induces neutralizing antibodies and cytotoxic T-lymphocytes. *Virology*, 2007, 369: 375–388.
- [11] Fausch SC, Da Silva DM, Kast WM. Heterologous papillomavirus virus-like particles and human papillomavirus virus-like particle immune complexes activate human Langerhans cells. *Vaccine*, 2005, 23: 1720–1729.
- [12] Olsson SE, Villa LL, Costa RL, et al. Induction of immunememory following administration of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus (HPV) types 6/11/16/18 L1 virus-like particle (VLP) vaccine. *Vaccine*, 2007, 25: 4931–4939.
- [13] Dauner JG, Pan Y, Hildesheim A, et al. Characterization of the HPV-specific memory B cell and systemic antibody responses in women receiving an unadjuvanted HPV16 L1 VLP vaccine. *Vaccine*, 2010, 28: 5407–5413.
- [14] Bernard HU, Burk RD, Chen Z, et al. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*, 2010, 401: 70–79.
- [15] Kemp TJ, Hildesheim A, Safaeian M, et al. HPV16/18 L1 VLP vaccine induces cross-neutralizing antibodies that may mediate cross-protection. *Vaccine* 2011, 29: 2011–2014.
- [16] Szarewski A. HPV vaccine: Cervarix. *Expert Opin Biol Ther*, 2010, 10: 477–487.
- [17] Garg A, Guez G. FDA approves quadrivalent HPV vaccine for use in males ages 9–26 years. *Dent Implantol Update*, 2011, 22: 23–24.
- [18] Romanowski B, de Borba P, Naud PS, et al. Sustained efficacy and immunogenicity of the human papillomavirus (HPV) – 16/18 AS04 – adjuvanted vaccine: analysis of a randomised placebo-controlled trial up to 6 · 4 years. *Lancet*, 2009, 374: 1975–1985.
- [19] Giuliano AR, Palefsky JM, Goldstone S, et al. Efficacy of quadrivalent HPV vaccine against HPV Infection and disease in males. *N Engl J Med*, 2011, 364: 401–411.
- [20] Haupt RM, Wheeler CM, Brown DR et al. Impact of an HPV6/11/16/18 L1 virus-like particle vaccine on progression to cervical intraepithelial neoplasia in seropositive women with HPV16/18 infection. *Int J Cancer*, 2011, 129: 2632–2642.

(收稿日期: 2011-05-20)

(本文编辑: 段慧)