

文章编号:1000-5404(2012)06-0473-04

论著

人乳头瘤病毒假病毒体外感染模型的建立及人 α 防御素5抗病毒作用

耿放,王艾平,陈芳,申明强,陈默,粟永萍,程天民,王军平 (400038 重庆,第三军医大学军事预防医学院防原医学教研室,全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室)

[摘要] 目的 建立用人乳头瘤病毒16亚型假病毒(HPV-16 Psv)感染宫颈癌细胞模型,并研究3种不同构型人 α 防御素5(HD-5)抗HPV的作用。方法 将表达HPV-16假病毒衣壳蛋白的重组质粒P^{16L112}和含绿色荧光蛋白(GFP)报告基因的质粒P^{fwb}共转染293FT细胞,分离、纯化病毒颗粒后感染宫颈癌细胞株C-33a,同时分别给予20 μ g/ml的HD-5/N(天然构型)、HD-5/Acm(半胱氨酸被Acm修饰)或HD-5/Abu(半胱氨酸被Abu替换)处理,培养48 h后荧光显微镜观察和流式细胞分析病毒感染率。结果 P^{fwb}与P^{16L112}成功转染293FT细胞并获得滴度达 2.5×10^8 TU/ml的HPV-16假病毒液,镜检和流式细胞术检测显示宫颈癌细胞C-33a能够被假病毒感染并表达GFP。HD-5/N、HD-5/Acm和HD-5/Abu对HPV-16感染C-33a细胞的抑制率分别为 $(96.48 \pm 5.67)\%$ 、 $(69.02 \pm 7.88)\%$ 和 $(2.71 \pm 1.53)\%$ 。与HD-5/N相比,HD-5/Acm和HD-5/Abu的抗病毒作用显著降低($P < 0.01$)。结论 建立了基于流式细胞分析的HPV-16假病毒感染模型并将其用于抗病毒药物活性检测。发现HD-5的空间结构和分子中半胱氨酸对其抗HPV感染的活性有重要作用。

[关键词] 人乳头瘤病毒;假病毒;防御素;绿色荧光蛋白;抗病毒作用

[中图分类号] R373;R394-33;R978.7

[文献标志码] A

Establishment of a human papillomavirus pseudovirus *in vitro* infection model and its application to evaluate antiviral activity of human defensin-5

Geng Fang, Wang Aiping, Chen Fang, Shen Mingqiang, Chen Mo, Su Yongping, Cheng Tianmin, Wang Junping (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] **Objective** To establish a human papillomavirus16 pseudovirus (HPV16 Psv) infection model *in vitro* and to determine the anti-HPV effects of human α -defensin 5 (HD-5) with different conformations. **Methods** The 293FT cells were co-transfected with HPV pseudovirus recombinant plasmid P^{16L112} and a GFP reporter plasmid P^{fwb}. After isolation and purification, the pseudovirus particles were used to infect cervical cancer cell line C-33a. During infection, the C-33a cells were treated respectively with 3 different configurations of HD-5, including HD-5/N with natural configuration, HD-5/Acm with Cys residues blocked by acetamidomethyl (Acm) and HD-5/Abu with Cys residues substituted by α -aminobutyric acid (Abu), at a dose of 20 μ g/ml. In 48 h later, the cells were observed by fluorescent microscopy and the viral infection rate was determined by flow cytometry assay. **Results** The 293FT cells were successfully transfected with P^{fwb} and P^{16L112}, and 2.5×10^8 TU/ml of HPV-16 pseudovirus particles were finally obtained. After culturing, most of C-33a cells were infected by HPV16 pseudovirus, which displayed green fluorescence under fluorescent microscope and could be detected by flow cytometry. The inhibitory rate of HD-5/N, HD-5/Acm and HD-5/Abu on HPV infection was $(96.48 \pm 5.67)\%$, $(69.02 \pm 7.88)\%$ and $(2.71 \pm 1.53)\%$ respectively. Compared to HD-5/N, antiviral activity of HD-5/Acm and HD-5/Abu was significantly reduced ($P < 0.01$). **Conclusion** A method for HPV16 pseudovirus infection and anti-HPV analysis based on flow cytometry assay is successfully established. The natural configuration of HD-5 contributes to enhance anti-HPV ability significantly, and Cys residues play important role in the antiviral activity of HD-5.

[Key words] human papillomavirus; defensin; pseudovirus; green fluorescence protein; antiviral activity

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30771892) and the Academician Foundation of Chongqing (CSTC2007AB5022). Corresponding author: Wang Junping, Tel: 86-23-68752283, E-mail: wangjunping@tmmu.edu.cn

[基金项目] 国家自然科学基金(30771892);重庆市院士基金(CSTC2007AB5022)

[通信作者] 王军平,电话:(023)68752283, E-mail:wangjunping@tmmu.edu.cn

人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)为无包膜的环状双链DNA病毒,其基因组由L1和L2两种衣壳蛋白组成的病毒衣壳包裹。研究表明HPV持续性感染能引发宫颈癌、尖锐湿疣等疾病,严重危害人类健康。HPV具有较严格的宿主特异性和分化依赖性,主要感染皮肤和黏膜的鳞片上皮细胞,其中HPV-16亚型致病性最高,分布最广^[1]。人防御素(human defensin)是由免疫细胞、肠道和黏膜上皮分泌的一类内源性阳离子多肽,由于具有突出的抗病原微生物作用而受到人们的广泛关注。人防御素分子由29~34个氨基酸残基组成,其中的6个保守半胱氨酸残基形成3个分子内二硫键以维持其正常的空间结构。根据二硫键形成方式不同,人防御素主要分为 α 和 β 两种类型。现已发现6种人 α -防御素,其中人 α -防御素-5(HD-5)主要由小肠Paneth细胞、女性生殖道和男性尿道黏膜上皮分泌。因此,人们推测HD-5可能对肠道致病菌和生殖道传播病毒具有显著抑制作用,从而参与肠道菌群稳态和生殖道免疫功能的调节^[2-3]。本实验通过制备包裹GFP报告基因的HPV-16假病毒(HPV-16 Psv),结合流式细胞分析,建立了HPV体外感染模型与检测方法,并利用其对不同构型HD-5的抗HPV作用进行了检测,对其抗HPV机制进行了初步探索。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

质粒抽提试剂盒购自Omega公司,Lipofectamine 2000转染试剂为Invitrogen产品,DMEM培养基、胎牛血清和胰酶购自HyClone公司,小鼠抗HPV-16-L1单抗(CBL402)购自Millipore公司,Optiprep梯度液为Sigma公司产品。

1.2 实验材料

P^{fb}质粒,长约5.9 kb,含GFP报告基因;P^{16L112}质粒,长约5.5 kb,表达密码子优化的重组HPV-16衣壳蛋白L1和L2,均由美国马里兰州国家癌症中心John T. Schiller教授惠赠。

宫颈癌细胞株C-33a购自美国ATCC中心,293FT细胞购自Invitrogen公司,大肠杆菌DH5 α 菌株由本教研室保存。

HD-5多肽:①HD-5/N;具有天然结构的HD-5;②HD-5/Acm;HD-5分子中的6个半胱氨酸Cys均进行乙酰甲基修饰,使其不能形成分子内二硫键;③HD-5/Abu;将HD-5分子中的6个Cys均替换为 α -氨基丁酸(Abu),无二级结构。3种多肽均由杭州中肽生化有限公司合成,配置成1 mg/ml多肽储存液,-70℃保存,使用时用DMEM培养基稀释至所需浓度。

1.3 HPV假病毒的制备与鉴定

1.3.1 质粒扩增与转染细胞 采用电转化法将P^{fb}与P^{16L112}质粒分别转入DH5 α 大肠杆菌感受态细胞中,转化后的细菌在含博来霉素的抗性LB板上筛选,37℃培养过夜。挑取单克隆,培养、扩增,小量质粒抽提试剂盒提取质粒,并进行琼脂糖电泳鉴定。接种293FT细胞于含DMEM培养基的培养瓶,37℃、5%CO₂培养至80%布满。然后,取等量P^{fb}和P^{16L112}质

粒,与Lipofectamine2000按质粒/脂质体=1:2.5比例混匀,共转染入293FT细胞,6h后换新培养液,继续培养。

1.3.2 病毒颗粒的提取与纯化 质粒转染48h后,通过细胞产生绿色荧光判断转染情况。加入裂解液在37℃裂解细胞24h,收集细胞,10 000×g离心10 min,然后再加入17%体积的5 mol/L NaCl,冰浴20 min,4℃、10 000×g离心10 min。将不同浓度的Optiprep梯度离心液(27%、33%、39%)按浓度从低到高的顺序缓慢注入离心管。将上述细胞提取液加到Optiprep梯度离心液的上表面,234 000×g离心3.5 h。之后,从上往下取离心产物17份左右,每份200 μ l,编号后-70℃保存备用。

1.3.3 纯化病毒鉴定与滴度测定 将上述不同编号的分离产物进行SDS-PAGE电泳分析,同时应用HPV-16-L1单抗进行Western blot分析,对HPV-16假病毒衣壳蛋白的表达进行鉴定,并将含有HPV-16假病毒的组分合并。按 5×10^5 /孔接种293FT细胞于24孔板,贴壁后加入HPV-16假病毒使终浓度分别为10、2、0.5 μ l/ml。继续培养48h后流式细胞仪检测GFP阳性细胞率,再通过公式计算出病毒的滴度。滴度计算公式:FL1阳性细胞比例×每培养孔细胞数×病毒稀释倍数/病毒液体积,单位:TU/ml(transducing unit, TU)。

1.4 HPV假病毒感染宫颈癌细胞

将C-33a细胞接种于24孔板, 3×10^5 /孔,37℃培养12h后加入HPV-16假病毒使终浓度为 2.5×10^6 TU/ml,继续培养48h后荧光显微镜观察,消化细胞,流式细胞仪检测GFP表达率。

1.5 流式细胞术检测HD-5对HPV假病毒感染的抑制作用

接种C-33a细胞于24孔板, 3×10^5 /孔,37℃培养12h后进行以下分组处理:①HPV-16假病毒+HD-5/N;②HPV-16假病毒+HD-5/Acm;③HPV-16假病毒+HD-5/Abu;④Psv对照组:单纯加入HPV-16假病毒。HPV-16假病毒终浓度为 1.5×10^6 TU/ml,HD-5多肽终浓度为20 μ g/ml。继续培养48h后消化细胞,用流式细胞仪检测GFP表达率,实验重复3次。感染抑制率公式:感染抑制率=(1-药物处理组感染率/阴性对照组感染率)×100%。

1.6 统计学处理

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 13.0统计软件进行单因素方差分析,组间比较采用t检验。

2 结果

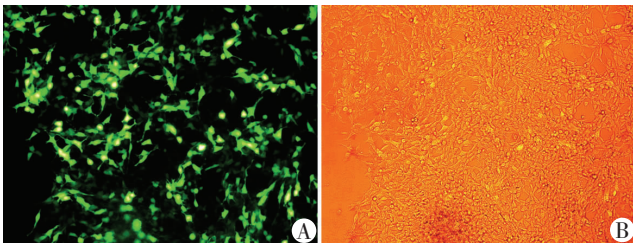
2.1 质粒转染与表达

P^{fb}与P^{16L112}两种质粒经扩增、抽提后经琼脂糖电泳鉴定均有目的条带出现。P^{fb}和P^{16L112}质粒DNA与脂质体共转染293FT细胞48h后倒置荧光显微镜下观察,可见绝大多数细胞均有GFP表达(图1),说明质粒转染成功。

2.2 HPV-16假病毒的鉴定与滴度测定

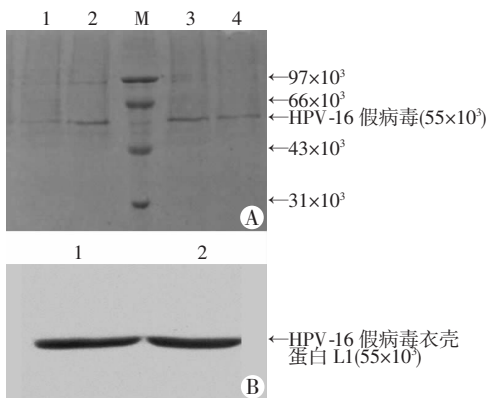
将转染了P^{fb}与P^{16L112}的293FT细胞裂解上清进行Optiprep密度梯度超速离心,不同离心组分SDS-PAGE电泳结果显示,部分组分中出现 55×10^3 的特异条带,其大小与HPV-16病毒衣壳蛋白L1一致(图2A)。将这些组分合并后,用抗HPV-16-L1单抗进行Western blot检测,结果进一步证实该蛋白条带为HPV-16病毒衣壳蛋白L1(图2B),即合并的纯化组分为HPV

假病毒。用纯化后的 HPV-16 假病毒感染 293FT 细胞,48 h 后通过流式细胞分析测定 GFP 阳性表达率,经公式计算 HPV-16 假病毒液的滴度约为: 2.5×10^8 TU/ml。



A: 荧光视野; B: 明场视野

图1 荧光显微镜观察转染了 P^{16L1L2} 和 P^{1wb} 的 293FT 细胞 (×200)



A: SDS-PAGE 电泳结果 M: 标准; 1~4: 含有病毒颗粒的组分;
B: Western blot 检测结果 1,2: HPV-16 假病毒衣壳蛋白 L1

图2 HPV-16 假病毒的纯化组分鉴定

2.3 HPV-16 假病毒感染宫颈癌细胞 C-33a

荧光显微镜观察可见,与 293FT 细胞感染对照组一样,

C-33a 细胞被 2.5×10^6 TU/ml 的 HPV-16 假病毒感染 48 h 后,大多数细胞中均有明显的绿色荧光出现(图3),进一步经流式细胞仪检测发现 GFP 阳性表达率达 $(70.29 \pm 9.32)\%$ 。说明制备的 HPV-16 假病毒液具有感染宫颈癌细胞 C-33a 的能力。

2.4 流式细胞术检测不同构型 HD-5 的抗 HPV 效果

在 HPV-16 假病毒感染 C-33a 细胞的过程中给予不同构型 HD-5 多肽处理,48 h 后经流式细胞仪检测 GFP 阳性表达率,结果可见,与假病毒感染对照组相比,HD-5/N 和 HD-5/Acm 处理组 GFP 的阳性表达率明显降低 ($P < 0.01$),以 HD-5/N 处理组尤为显著,而 HD-5/Abu 处理组与病毒感染对照组无显著差异(图4)。

进一步根据 GFP 阳性表达率推算出不同构型 HD-5 对 HPV-16 假病毒感染的抑制率。在病毒浓度为 1.5×10^6 TU/ml 及多肽浓度为 $20 \mu\text{g/ml}$ 、作用 48 h 的情况下,HD-5/N、HD-5/Acm 和 HD-5/Abu 对 HPV-16 假病毒感染的抑制率分别为 $(96.48 \pm 5.67)\%$ 、 $(69.02 \pm 7.88)\%$ 和 $(2.71 \pm 1.53)\%$ 。对比 HD-5/N、HD-5/Acm 的抗 HPV 作用显著降低 ($P < 0.01$),HD-5/Abu 的抗病毒作用降低更为明显 ($P < 0.01$)。提示具有天然结构的 HD-5 抗 HPV 作用最强,Cys 被封固显著降低其抗病毒活性;而将 Cys 替换为惰性残基会使 HD-5 抗 HPV 作用基本丧失。

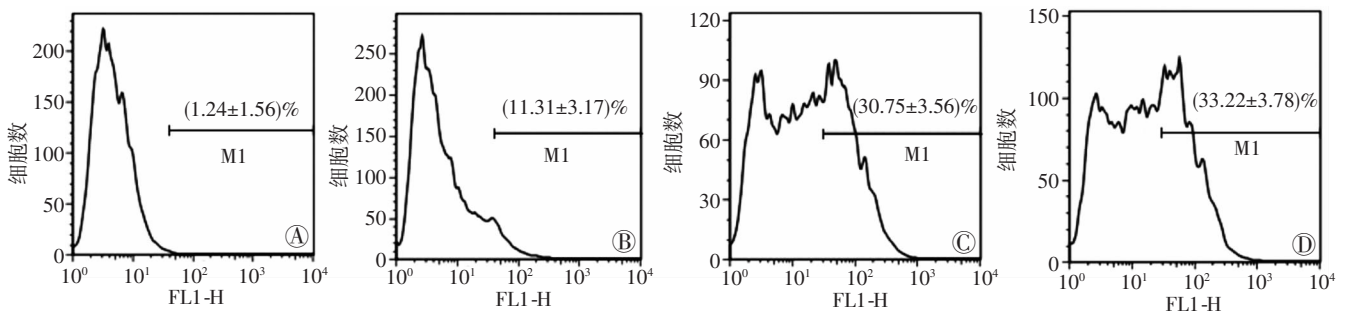
3 讨论

防御素具有广泛的抗病原微生物活性而备受关注,并被认为是继病原体相关分子模式发现后机体的另一主要抵抗病原微生物感染的途径。尽管在防御素被发现的早期人们即对其抗病毒作用有所认识,但这类分子的抗病毒作用机制研究开展较晚,尤其是它们抗无包膜病毒的分子机制尚未完全清楚^[4-5]。通过对防御素抗 HIV、HSV 腺病毒等常见病毒的研究,人们推



A: C-33a 细胞感染组; B: 阴性对照组; C: 293FT 细胞感染对照组

图3 HPV-16 假病毒感染 C-33a 细胞 48 h 后荧光显微镜观察 (×400)



A: Psv + HD-5/N; B: Psv + HD-5/Acm; C: Psv + HD-5/Abu; D: Psv 对照组

图4 流式细胞术检测不同 HD-5 多肽处理组 C-33a 细胞 48 h 后的 GFP 阳性表达率

测防御素可能是主要通过胞内阻断和直接作用两种方式发挥抗病毒作用^[6-8]。

HPV为一类小分子 dsDNA 病毒,无包膜,目前已发现有一百多种亚型,其中至少四十多种亚型与宫颈癌病变有关。在 HPV 所有亚型中,分布最广且致病性最高的是 HPV16 与 HPV18^[9]。由于 HPV 的主要感染途径是生殖道,而人体生殖道黏膜不仅表达和分泌 HD-5,同时 HD-5 还是抗菌和抗病毒作用最为突出的一种人防御素。因此,我们推测 HD-5 在机体抵抗 HPV 感染过程中可能发挥着重要作用。探明 HD-5 的抗 HPV 作用及机制对开发和研制抗无包膜病毒相关药物具有重要的指导意义。

HPV 主要感染人体皮肤或黏膜上皮细胞,其生活周期依赖于细胞的分化。以往的抗 HPV 评价模型,如在体移植模型和体外扩增模型都难度较大且不稳定^[10-11]。随着重组 HPV 技术的成熟,使得获得高滴度和带人工标记的 HPV 假病毒成为可能^[12]。Buck 等^[13-14]开展的 HPV 假病毒质粒共转染法类似于慢病毒转染,其基本原理是通过同时转染 L1、L2 重组质粒和含报告基因的质粒,使宿主细胞(如 293 细胞)在生成病毒颗粒过程中非特异性包裹报告基因质粒 DNA,当病毒颗粒成功感染靶细胞后包裹于其中的报告基因便转移进入细胞并进行表达,此时通过荧光显微镜直接观察或使用流式细胞术等方法即可对报告基因的表达强度和表达率进行检测,从而定量判断病毒对细胞的感染程度,并用于评价药物的抗病毒作用。由于 HPV-16 假病毒中不含 E6、E7 等致病基因,因此尽管其具有与天然病毒相似的感染性,但因无致癌变能力而应用相对安全。

本研究根据 Buck 等建立的方法成功制备了包含 GFP 报告基因的 HPV-16 假病毒,实验结果也证明该假病毒可以成功感染宫颈癌细胞株 C-33a,并能采用流式细胞术对病毒感染进行定量分析。选择 C-33a 细胞作为靶细胞是考虑该细胞报告基因表达较强且自身不携带 HPV 基因,从而避免对实验结果产生影响^[15]。

构效关系研究是探索防御素抗微生物作用机制的一个关键点。本实验使用了 3 种不同构型的 HD-5 多肽,结果发现天然构型的 HD-5 抗 HPV 作用最强,HD-5/Acm 次之,HD-5/Abu 基本失去抗病毒能力。之前有研究报道人 β 防御素 3(hBD-3)的分子内二硫键错配重构对其抗菌活性影响不大,但对该分子的趋化作用影响很大,而且发现 Cys 用 Abu 替换后其趋化能力基本丧失^[16]。本研究发现 Abu 替换 Cys 后 HD-5 的抗病毒作用几乎完全丧失,而 Cys 被 Acm 封闭后的 HD-5 还具有一定的抗病毒作用,一方面说明 HD-5 分子中的 Cys 残基和由它们所形成的二硫键在其抗病毒

过程中发挥着重要作用,另一方面也提示 HD-5 可能会通过趋化作用发挥一定的抗 HPV 作用。此外,不排除多肽分子在缺失二硫键后,酶解位点暴露,加快了其在培养基或血清中的降解导致其功能下降。因此对不同分子构型对 HD-5 抗病毒作用影响的具体机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Hellner K, Munger K. Human papillomaviruses as therapeutic targets in human cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(13): 1785-1794.
- [2] Simms L A, Doecke J D, Walsh M D, et al. Reduced alpha-defensin expression is associated with inflammation and not NOD2 mutation status in ileal Crohn's disease[J]. *Gut*, 2008, 57(7): 903-910.
- [3] Klotman M E, Chang T L. Defensins in innate antiviral immunity[J]. *Nat Rev Immunol*, 2006, 6(6): 447-456.
- [4] Smith J G, Nemerow G R. Mechanism of adenovirus neutralization by Human alpha-defensins[J]. *Cell Host Microbe*, 2008, 3(1): 11-19.
- [5] Nguyen E K, Nemerow G R, Smith J G. Direct evidence from single-cell analysis that human alpha-defensins block adenovirus uncoating to neutralize infection[J]. *J Virol*, 2010, 84(8): 4041-4049.
- [6] Ding J, Chou Y Y, Chang T L. Defensins in viral infections[J]. *J Innate Immunity*, 2009, 1(5): 413-420.
- [7] Seidel A, Ye Y, de-Armas L R, et al. Cyclic and acyclic defensins inhibit human immunodeficiency virus type-1 replication by different mechanisms[J]. *PLoS One*, 2010, 5(3): e9737.
- [8] 陈芳,王艾平,申明强,等. 人 α 防御素-5 多肽体外抗单纯疱疹 II 型病毒作用的研究[J]. *第三军医大学学报*, 2010, 32(18): 1925-1928.
- [9] de-Villiers E M, Fauquet C, Broker T R, et al. Classification of papillomaviruses[J]. *Virology*, 2004, 324(1): 17-27.
- [10] Pyeon D, Pearce S M, Lank S M, et al. Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression[J]. *PLoS Pathog*, 2009, 5(2): e1000318.
- [11] Bedell M A, Hudson J B, Golub T R, et al. Amplification of human papillomavirus genomes *in vitro* is dependent on epithelial differentiation[J]. *J Virol*, 1991, 65(5): 2254-2260.
- [12] Windram O P, Weber B, Jaffer M A, et al. An investigation into the use of human papillomavirus type 16 virus-like particles as a delivery vector system for foreign proteins: N- and C-terminal fusion of GFP to the L1 and L2 capsid proteins[J]. *Arch Virol*, 2008, 153(3): 585-589.
- [13] Buck C B, Thompson C D. Production of papillomavirus-based gene transfer vectors[J]. *Curr Protoc Cell Biol*, 2007, Chapter 26: Unit 26.1.
- [14] Buck C B, Cheng N, Thompson C D, et al. Arrangement of L2 within the papillomavirus capsid[J]. *J Virol*, 2008, 82(11): 5190-5197.
- [15] Yee C, Krishnan-Hewlett I, Baker C C, et al. Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines[J]. *Am J Pathol*, 1985, 119(3): 361-366.
- [16] Wu Z, Hoover D M, Yang D, et al. Engineering disulfide bridges to dissect antimicrobial and chemotactic activities of human beta-defensin 3[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(15): 8880-8885.

(收稿:2011-11-27;修回:2011-12-28)

(编辑 汪勤俭)