

重组人乳头瘤病毒双价(16/18型)疫苗免疫原性评价方法的研究*

周朝明, 马新兴, 周婧怡, 刘佳骅, 王洪芳, 雷建强

(上海泽润生物科技有限公司, 上海 201203)

摘要 目的: 探讨重组人乳头瘤病毒双价(16/18型)候选疫苗免疫原性评价方法。方法: 对以假病毒为基础的中和实验(ZsGreen法)测定血清中和滴度, 以微球为基础建立的Luminex法测定中和滴度和ELISA法测定抗体滴度的3种方法进行相关性研究以及体内效价测定(ED_{50} 法)和体外相对效力测定(IVRP法)的相关性分析, 同时对5种免疫原性的评价方法进行重复性验证。结果: ZsGreen法、Luminex法测定的中和滴度和ELISA法测定的抗体滴度检测结果表明: 滴度值呈明显的剂量效应以及候选疫苗具有良好的免疫原性。采用SPSS统计软件分析, 对于HPV 16L1 ZsGreen法、Luminex法和ELISA法的相关系数分别为0.791、0.800、0.747(Spearman相关系数)和HPV 18L1的相关系数分别为0.734、0.625、0.634(Spearman相关系数)。并且 ED_{50} 法和IVRP法具有一定的相关性。5种方法重复性验证的RSD分别为: 5.3%(ZsGreen)、5.2%(Luminex)、8.0%(ELISA)、32.3%(ED_{50})、6.3%(IVRP)。结论: 建立的HPV 16和HPV 18型疫苗评价方法为快速准确地评价免疫原性提供了多种解决方法。

关键词: 生物制品; 重组疫苗; 人乳头瘤病毒; 免疫原性; 纽扣珊瑚绿色荧光蛋白法(ZsGreen); 液相芯片法(Luminex); 酶联免疫吸附测定(ELISA); 体内效价测定; 体外相对效力测定

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2011)09-1743-07

Study on recombinant human papillomavirus (16/18) vaccine immunogenicity evaluation assay*

ZHOU Chao-ming, MA Xin-xing, ZHOU Jing-yi, LIU Jia-hua, WANG Hong-fang, LEI Jian-qiang

(Shanghai Zerun Biotechnology Co., Ltd., Shanghai 201203, China)

Abstract Objective: To explore on recombinant human papillomavirus (16/18) candidate vaccine immunogenicity evaluation. **Methods:** To study the correlation of the ZsGreen neutralizing antibody titer (based on pseudovirus), the average of the HPV-Luminex neutralizing antibody titer (based on beads) and the average of the ELISA antibody titer. And to explore the correlation between potency (ED_{50}) and *in vitro* relative potency (IVRP). Then we compare the repeatability validation of all five methods. **Results:** The results of antibody titer by ZsGreen, Luminex and ELISA show the antibody titers have obvious dose-effect relationship and candidate vaccine has good immunogenicity. By SPSS statistical analysis, ZsGreen, Luminex and ELISA correlation coefficient are 0.791, 0.800, 0.747 (Spearman coefficient) for HPV 16L1, correlation coefficient are 0.734, 0.625, 0.634 (Spearman coefficient) for HPV 18L1. ED_{50} and IVRP have certain relationship. The RSD results of five methods are 5.3% (ZsGreen), 5.2% (Luminex), 8.0% (ELISA), 32.3% (ED_{50}), 6.3% (IVRP). **Conclusion:** Established HPV (16/18) vaccine evaluation assay provides multiple solutions to evaluate vaccine immunogenicity rapidly.

Key words: biologicals; recombinant vaccine; human papillomavirus (HPV); immunogenicity; ZsGreen; Luminex; enzyme linked immunosorbent assay (ELISA); body titer determination; *in vitro* relative potency (IVRP)

宫颈癌和宫颈癌前病变是全世界妇女健康的一个主要问题。临床学、分子生物学、和流行病学调查

已经证明人乳头瘤病毒 (human papillomavirus, HPV) 是宫颈癌和宫颈非典型增生的主要病因^[1]。

* 上海市科学技术委员会资助项目 (08431901400)

第一作者 Tel: (021) 58556789-6300; E-mail: zhouchaoming@wison.com

99%的宫颈癌患者被检测出含有高危型 HPV,最常见的类型有 16、18、31、45^[2]。宫颈癌主要发生于发展中国家,我国每年新发病例约 10 万,约占世界宫颈癌新发病例总数的 1/5,死亡人数约为 3.5 万人,并且近几年发病有增加趋势,发病年龄趋于年轻化。Munoz 等的研究表明有 15 种以上的 HPV 型的感染与宫颈癌的发生有关,其中 70.7% 的宫颈癌发病由 HPV 16 和 18 的感染引起,其他多个 HPV 型的感染也在宫颈癌的发病中有重要作用。疫苗成功的关键是诱导有效的体液免疫,产生具有保护作用的中和抗体。因此对抗体的中和活性测定是疫苗评估和质控的重要依据。本文建立的方法为评价候选疫苗的产品质量奠定了基础。

1 仪器、试剂及实验材料

1.1 仪器 液相芯片仪: Luminex²⁰⁰ (Luminex 公司)。多功能酶标仪: SpectraMax M5 (Molecular Devices 公司)。流式细胞分析仪: Cytomics FC500MCL (Beckman 公司)。二氧化碳恒温培养箱: MCO-20AIC (SANYO 公司)。荧光显微镜: CKX41F32FL (OLYMPUS 公司)。洗板机: Bio-Plex Pro II Wash Station (Bio-Rad 公司)。

1.2 主要试剂 HPV 16·V5 鼠单抗、HPV 18·J4 鼠单抗由宾夕法尼亚州立大学的 N. Christensen 提供; HPV 16 鼠单抗、HPV 18 鼠单抗由上海泽润生物科技有限公司免疫研究室提供。Goat anti-Mouse IgG2b-HRP, Santa Cruz, 货号: SC2971; Goat anti-Mouse IgG2a-HRP, Santa Cruz, 货号: SC2061; Goat anti-Mouse IgG-HRP, Calbiochem, 货号: 401215; 人胚肾来源的 293FT 细胞株购自 Invitrogen 公司。Milli-Q 水 (Millipore 公司)。细胞培养用碳酸氢钠购自 Sigma 公司。DMEM 培养基、胰酶、牛血清、P/S 双抗、非必需氨基酸购自 GIBCO 公司。Bio-PlexTM COOH Bead 038/018 微球购自 Bio-Rad 公司。1-(3-(二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 [1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide, EDC] 购于 GE 公司。荧光素 PE 标记链霉亲和素 (Streptavidin-PE): 购自 Invitrogen 公司。EZ-Link Micro Sulfo-NHS-LC-Biotinylation Kit 试剂盒和 N-羟基硫代琥珀酰亚胺 (Sulfo-NHS) 均购自 Thermo Scientific 公司。显色液: 临用前取底物缓冲液 [0.1 mol·L⁻¹ 柠檬酸 (C₆H₈O₇) - 0.2 mol·L⁻¹ 磷酸氢二钠 (Na₂HPO₄·12H₂O) pH 5.0] 9 mL, 加入底物显色液 (2.0 mg·mL⁻¹ TMB) 1 mL, 加入 3.0% H₂O₂ 溶液 10 μL, 混匀; 解吸附缓冲液: 0.06

mol·L⁻¹ 磷酸三钠 (Na₃PO₄) 0.1 mol·L⁻¹ 柠檬酸三钠 (C₆H₅Na₃O₇·2H₂O), 1 mol·L⁻¹ 氯化钠 (NaCl), 0.8% 吐温-80 (Tween-80), pH 6.8。实验用动物: BALB/c 小鼠, 6~8 周龄, 体重 16~20 g, 购自上海斯莱克实验动物中心。

1.3 小鼠免疫 取 3 批重组人乳头瘤病毒双价 (16/18 型) 疫苗的成品 (批号分别为 A200803002, A200803003, A200803004; 上海泽润生物科技有限公司), 样品用铝佐剂稀释, 每个样品设高、中、低 (分别为 D1、D2、D3) 3 个剂量组, 剂量分别为 10 μg、1 μg、0.1 μg, 同时做铝佐剂组, 每组 10 只, 免疫 BALB/c 小鼠, 14 d 后第 2 针免疫, 28 d 后采集血清样品分别检测假病毒中和滴度、抗体滴度和中和抗体滴度。小鼠分组编号见表 1。

2 方法

2.1 假病毒中和实验 (ZsGreen 法)^[3]

2.1.1 检测方法 将 293FT 细胞按 1.0×10^5 mL⁻¹ 的密度铺于 24 孔细胞培养板中, 每孔 1 mL。37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养过夜。将血清分别用 DMEM 完全培养基从 50 倍开始进行连续倍比稀释 (4~6 个稀释倍数)。取 20 μL 稀释血清样品与 20 μL 稀释于 10% DMEM 的假病毒液混合^[4]。并设阳性对照 (为 20 μL 完全培养基与 20 μL 稀释于 DMEM 完全培养基的假病毒液的混合液) 和阴性对照 (为 40 μL DMEM 完全培养基)。细胞板于 4℃ 孵育 1 h 后, 加入到细胞板中于 37℃ 5% CO₂ 培养 48 h 后, 用流式细胞仪分别检测各孔细胞的感染率。中和滴度定义为: 达到高于 50% 感染抑制率的最大稀释倍数。

2.1.2 方法的重复性验证 取 HPV 16L1 假病毒中和滴度的阳性对照分别检测 12 次。比较 12 次检测的阳性感染率。

2.2 液相芯片实验 (Luminex 法)^[5]

2.2.1 检测方法 微球的活化: 将 38 号、18 号 2 种微球各 200 μL 在 1×10^4 g 离心力条件下离心 4 min 去上清液。加入 0.1 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钠溶液 (pH 6.2) 洗涤, 离心弃上清。分别加入浓度为 50 mg·mL⁻¹ 的 Sulfo-NHS 和浓度为 50 mg·mL⁻¹ 的 EDC 各 20 μL, 避光室温 20 min, 1.4×10^4 g 离心 5 min 去上清; 加入 50 mmol·L⁻¹ MES (pH 5.0) 缓冲液 [2-(N-morpholino) ethane sulfonic acid buffer] 250 μL, 涡旋和超声各 20 s, 悬浮洗涤 3 次。偶联: 分别将 HPV 16L1 和 HPV 18L1 原液用 50 mmol·L⁻¹ MES (pH 5.0) 缓冲液稀释至约 50 μg·mL⁻¹, 加入到活化后的微球中, 室温过夜。病毒状颗粒-微球

(VLP-Beads) 用洗涤液含 0.05% 吐温-20 的 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液 (PBS-T) 洗涤 2 次。然后 VLP-Beads 悬液用 PBS-10% BSA (pH 7.4) 溶液稀释至 1.0×10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 4 °C 避光保存。单抗的生物素化: 将 HPV 16·V5 鼠单抗和 HPV 18·J4 鼠单抗按试剂盒操作说明进行生物素化标记。血清的检测: 血清样品用前先在 (56 ± 1) °C 保温 (30 ± 2) min。将血清从 50 倍开始进行连续倍比稀释 (4~6 个稀释倍数), 在 96 孔滤板中先加入血清样品和 PBS-1% BSA (pH 7.4) (阳性对照) 各 50 μL , 再加入 25 μL 稀释过的 HPV16 V5-Biotin 和 HPV18 J4-Biotin, 最后加入 HPV 16 VLP-38# Beads、HPV 18 VLP-18# Beads, 每孔 5000 个, 室温振荡 3 h。洗板 3 次, 加入 $2.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Streptavidin-PE, 每孔 50 μL , 室温振荡 20 min。洗板 3 次, 用 125 μL PBS-1% BSA (pH 7.4) 重悬, 在 Luminex X²⁰⁰ 上分析。中和滴度定义为: 达到高于 50% 抑制率的最大稀释倍数。

2.2.2 方法的重复性验证 取 HPV 16L1 检测的阳性对照分别检测 5 次, 并且每次 8 复孔, 比较阳性对照平均荧光强度 (MFI) 值。

2.3 酶联免疫吸附实验 (ELISA 法)

2.3.1 检测方法 抗体滴度的检测采用 ELISA 法。血清从 8000 倍开始按 2 倍稀释, 加入到分别用 HPV 16L1/HPV 18L1 原液包被的酶标板中。每孔 100 μL , 37 °C 孵育 1 h, 洗板 6 次, 加入羊抗鼠-HRP 抗体, 每孔 100 μL , 37 °C 孵育 1 h, 洗板 6 次, 每孔 100 μL 加入显色液, 37 °C 显色 10 min。将终止液 ($1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸) 以每孔 50 μL 加至板内, 用多功能酶标仪读数, 测定波长为 450 nm, 参比波长为 620 nm。抗体滴度值定义: OD 值大于阴性血清 OD 值平均值 $\times 2.1$ 倍的最大稀释倍数。

2.3.2 方法的重复性验证 取铝佐剂组的 1 个阴性血清, 分别检测 HPV 16L1 抗体滴度时 12 块不同酶标板上平均 OD 值。

2.4 体内效价测定 (ED_{50} 法) [6]

2.4.1 检测方法 动物免疫: 样品免疫剂量 HPV16L1/HPV 18L1 分别从 0.400 μg /0.200 μg 开始 2 倍梯度共 8 组。BALB/c 小鼠随机分组, 每组 10 只, 皮下注射 0.5 mL, 同时做铝佐剂对照。免疫 28 d 后取小鼠外周血, $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min 分离血清后测定阳转率。血清按 1:1 000 用样品稀释液 (2% 脱脂奶粉-PBS pH 7.4) 稀释, 加到分别包被 HPV 16L1 和 HPV 18L1 原液的酶标板 1 μg , 每孔

100 μL , 37 °C 孵育 1 h。洗板 6 次, 加入羊抗鼠-HRP, 每孔 100 μL , 37 °C 孵育 1 h。洗板 6 次, 每孔 100 μL 加入显色液, 37 °C 显色 10 min。将终止液 ($1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸) 以每孔 50 μL 加至板内, 用多功能酶标仪读数, 测定波长为 450 nm, 参比波长为 620 nm。结果计算 Cut-off 值 = 铝佐剂组 OD 平均值 $\times 2.1$, 计算阳转率。使用 SPSS 数据处理软件采用正态概率 (Probit) 模型计算 ED_{50} 值, ED_{50} 值越低说明样品活性越高。

2.4.2 方法的重复性验证 取 1 批成品 (批号: A20090101) 免疫 4 次小鼠, 计算阳转率并比较 ED_{50} 值。

2.5 体外相对效力测定 (IVRP 法)

2.5.1 检测方法 疫苗成品按 1:1 与解吸附缓冲液振荡混匀后 2 倍稀释 11 个稀释度, 加入分别包被 16L1/18L1 纯化鼠单抗的酶标板中, 每孔 100 μL , 37 °C 孵育 1 h。洗板 6 次, 分别加入 HPV 16·V5 鼠单抗和 HPV 18·J4 鼠单抗, 每孔 100 μL , 37 °C 孵育 1 h。洗板 6 次。分别加入羊抗鼠 IgG2b-HRP/羊抗鼠 IgG2a-HRP, 每孔 100 μL , 37 °C 孵育 1 h。洗板 6 次, 每孔 100 μL 加入显色液, 37 °C 显色 10 min。终止液 ($1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸) 50 μL 每孔, 用多功能酶标仪读数, 测定波长为 450 nm, 参比波长 620 nm。数据分析: 使用软件 SoftMax Pro 5.2 分析系统中四参数拟合, 以稀释倍数的对数为 X 轴, 吸光度值做 Y 轴拟合曲线, 拟合方程为:

$$Y = (A - D) / (1 + (X/C)^B) + D$$

计算成品半效量稀释倍数 ED_{50} 值, ED_{50} 值越高说明样品活性越高。

2.5.2 方法的重复性验证 取 1 批疫苗成品 (批号: A20090101) 检测 8 次, 比较 HPV 16L1 的 ED_{50} 值。

3 结果

3.1 小鼠血清 3 种滴度检测方法结果 ZsGreen 法 HPV 16L1 和 HPV 18L1 阳性对照、阴性对照和血清检测的流式分析结果见图 1。3 批疫苗成品小鼠血清分别用假病毒中和实验 (ZsGreen 法)、中和滴度 (Luminex 法) 和抗体滴度 (ELISA 法) 3 种检测方法检测 90 只小鼠血清滴度, 结果见表 1。结果表明: (1) 3 批疫苗成品的滴度值有一定的剂量效应。即滴度平均值: 高剂量组 > 中剂量组 > 低剂量组, 但也有个别组例外。(2) 本试验所用重组人乳头瘤病毒双价 (16/18 型) 候选疫苗具有良好的免疫原性。

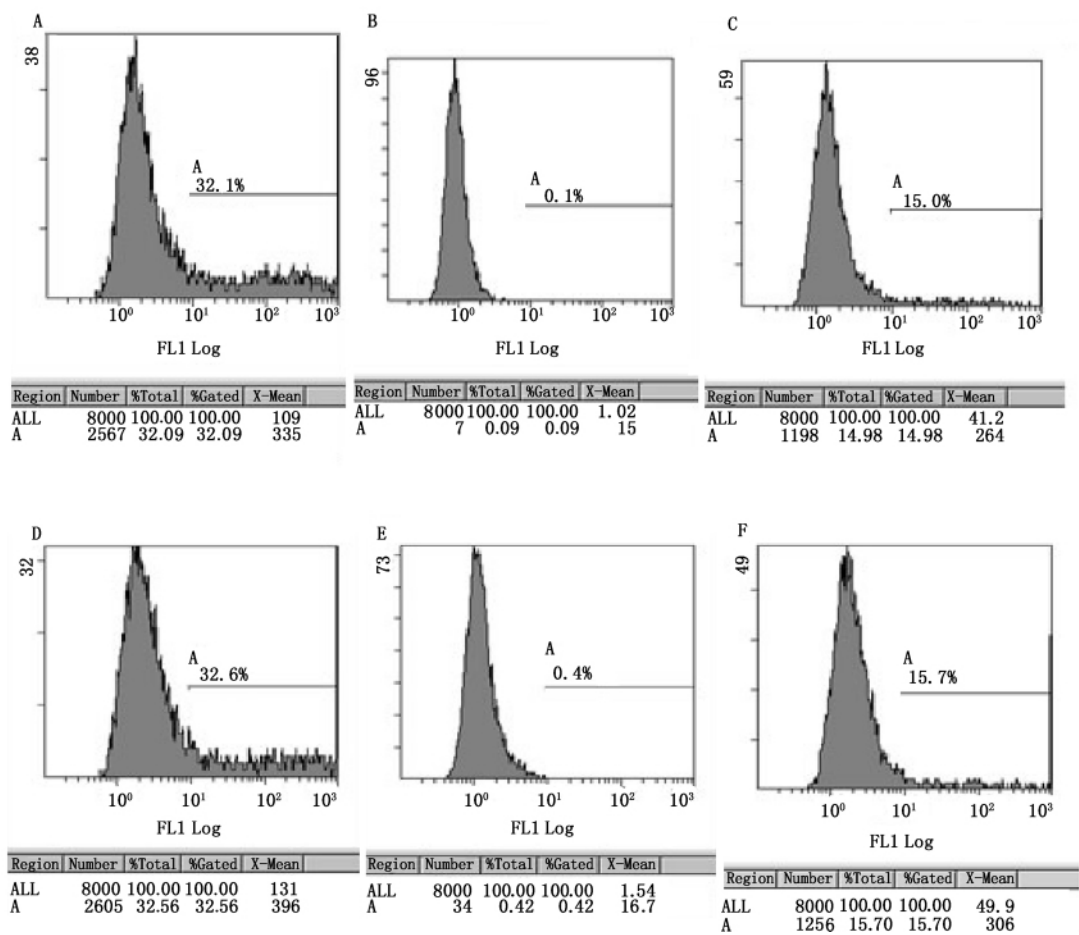


图1 ZsGreen 法中和滴度流式图
Fig 1 The flow cytometry of the ZsGreen neutralizing antibody titer
A: HPV 16L1 Positive B: HPV 16L1 Negative C: HPV 16L1 serum D: HPV 18L1 Positive E: HPV 18L1 Negative F: HPV 18L1 serum

表1 3种检测方法(ZsGreen、Luminex、ELISA)滴度平均值结果
Tab 1 The results of the average antibody titer by three methods(ZsGreen Luminex ELISA)

编号 (No.)	批号 (Lot No.)	剂量 (dose)	HPV16L1 滴度平均值 (average antibody titer of HPV16L1)			HPV18L1 滴度平均值 (average antibody titer of HPV18L1)		
			ZsGreen	Luminex	ELISA	ZsGreen	Luminex	ELISA
A1	A200803002	D1	500	280	2048000	780	170	1136000
A2		D2	260	115	960000	370	80	384000
A3		D3	100	65	592000	140	75	232000
B1	A200803003	D1	480	270	3072000	900	325	1536000
B2		D2	195	145	1376000	510	160	496000
B3		D3	200	165	1228800	275	90	404000
C1	A200803004	D1	330	290	2496000	940	225	1376000
C2		D2	280	255	1728000	260	85	364000
C3		D3	160	80	832000	200	85	316000

3.2 3 种方法测定的血清滴度值的相关性分析
在 SPSS 17.0 软件中采用 Spearman 相关性分析对 ZsGreen 法测定的中和滴度值、Luminex 法测定的中和滴度和 ELISA 法测定的抗体滴度值的相关性进行分析 结果如表 2 和图 2 所示。通过对免疫原性评价滴度的 3 种方法(ZsGreen、Luminex 和 ELISA) 的相关性分析可以看出: ZsGreen 法、Luminex 法和 ELISA 法测定的滴度值是高度相关的 ,显著水平都

在 0.01 以下 ,即这 3 种滴度值是 99% 的正相关。对于 HPV 16L1: ZsGreen 法与 Luminex 法的相关系数($r=0.791$) 和 Luminex 法和 ELISA 法的相关系数($r=0.800$) 略高于 ZsGreen 法与 ELISA 法的相关系数($r=0.747$) 。而对于 HPV 18L1: ZsGreen 法与 Luminex 法的相关系数($r=0.734$) 高于 ZsGreen 法与 ELISA 法的相关系数($r=0.634$) 和 Luminex 法和 ELISA 法的相关系数($r=0.625$) 。

表 2 3 种检测方法(ZsGreen、Luminex、ELISA) Spearman 相关性分析

Tab 2 Spearman correlation analysis of three methods(ZsGreen ,Luminex , ELISA)

Spearman 相关系数 (correlation coefficient of Spearman)		HPV16L1 相关系数 (correlation coefficient of HPV 16L1)			HPV18L1 相关系数 (correlation coefficient of HPV 18L1)		
		ZsGreen	Luminex	ELISA	ZsGreen	Luminex	ELISA
ZsGreen	相关系数(correlation coefficient)	1.000	0.791 **	0.747 **	1.000	0.734 **	0.636 **
	双尾显著性概率值 [Sig. (2 - tailed)]	—	0.000	0.000	—	0.000	0.000
	样本数(N)	90	90	90	90	90	90
Luminex	相关系数(correlation coefficient)	0.791 **	1.000	0.800 **	0.734 **	1.000	0.625 **
	双尾显著性概率值 [Sig. (2 - tailed)]	0.000	—	0.000	0.000	—	0.000
	样本数(N)	90	90	90	90	90	90
ELISA	相关系数(correlation Coefficient)	0.747 **	0.800 **	1.000	0.636 **	0.625 **	1.000
	双尾显著性概率值 [Sig. (2 - tailed)]	0.000	0.000	—	0.000	0.000	—
	样本数(N)	90	90	90	90	90	90

** 双尾检验相关显著性水平 0.01 [Correlation is significant at the 0.01 level(2 - tailed)]

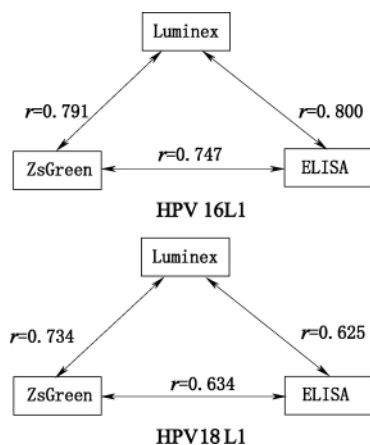


图 2 3 种检测方法(ZsGreen、Luminex、ELISA) 相关系数图

Fig 2 The correlation coefficient of three methods(ZsGreen ,Luminex , ELISA)

3.3 体内效价测定(ED_{50} 法) 检测结果 3 批疫苗成品共免疫 250 只 BALB/c 小鼠 ,取血清进行 HPV 16L1 和 HPV 18L1 的阳转率 ,并计算 ED_{50} 值。结果见表 3

3.4 IVRP 法检测结果 3 批疫苗成品 IVRP 法的

检验结果及与 ED_{50} 法检测结果的比较见表 3。结果表明: 3 批疫苗成品 ED_{50} 法和 IVRP 法具有一定的相关性。下一步将继续进行 ED_{50} 法和 IVRP 法相关性分析 积累大量实验数据后 ,采用检验周期较短、重复性较好的方法作为将来生产的放行标准。

表 3 IVRP 法和 ED_{50} 法比较

Tab 3 Comparison of IVRP and ED_{50}

批号 (Lot No.)	HPV 16 ED_{50} / μ g	HPV 16 ED_{50} [稀释倍数 (dilution)]	HPV 18 ED_{50} / μ g	HPV 18 ED_{50} [稀释倍数 (dilution)]
A200803002	0.001 41	53.5	0.001 15	33.5
A200803003	0.002 04	41.0	0.001 22	34.5
A200803004	0.002 23	38.5	0.001 62	29.0

3.5 5 种检测方法重复性验证结果 ZsGreen 法、Luminex 法、ELISA 法、 ED_{50} 法、IVRP 法共 5 种方法重复性验证汇总结果见表 4。结果显示: ED_{50} 法的 RSD 最大为 32.3% ,大大高于其他 4 种方法的 RSD: 5.3% 5.2% 8.0% 6.3%。这主要是由于动

物个体差异较大等原因。对于体内法由于动物实验周期较长,操作复杂,方法的重复性较差,而 IVRP 法的 RSD 为 6.3%,IVRP 重复性结果见图 3,当通

过大量 ED₅₀ 法和 IVRP 法的相关性研究后,建议采用 IVRP 法作为产品质量的标准。

表 4 5 种检测方法的重复验证结果汇总
Tab 4 Repeatability of all five methods

No.	检测方法 (method)	检验内容 (content)	检验结果 (result)	RSD /%
1	Zsgreen	阳性感染率 (infection rate of positive) /%	36.9 38.1 33.0 32.6 33.8 34.3 32.4 33.1 33.2 32.1 33.5 33.8	5.3
2	Luminex	阳性 MFI 值 (MFI result of positive)	18667.5 ,19323.5 ,19307 ,18641 20392 ,19696 ,19629 ,19417 ,19902 , 20742 ,18058 ,19366 ,17578 ,17306.5 ,18935 ,19377.5 ,19158 ,18688.5 , 18720 21021 ,18450 ,18481 ,19070 ,19598 ,19574 ,19259 ,19627 ,18873 , 20270.5 ,17310.5 ,18121 ,17763 ,18507 ,19376 ,17206.5 ,19325 21935.5 , 19806 ,19875 ,19674	5.2
3	ELISA	阴性血清 OD 值 (OD result of negative serum)	0.00786 0.00743 0.00795 0.00776 0.00843 0.00733 0.00881 , 0.00781 0.00867 0.00681 0.009 0.008	8.0
4	ED ₅₀	ED ₅₀ /μg	0.00677 0.0083 0.0095 0.00414	32.3
5	IVRP	ED ₅₀ [稀释倍数(dilution)]	89 93.3 97.6 83.9 86.5 82.5 85.3 82.2	6.3

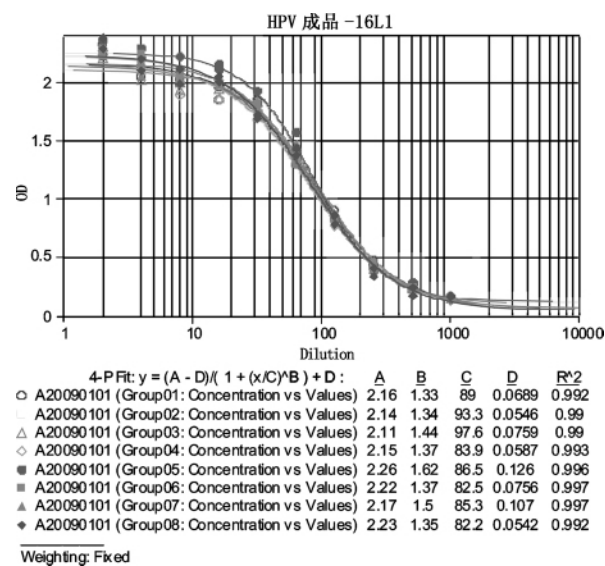


图 3 IVRP 法重复性结果图
Fig 3 Repeatability of IVRP

4 讨论

HPV 的持续性感染是引发宫颈癌的最主要因素。因此,预防 HPV 的感染是减少或控制宫颈癌的最主要手段之一。研制有效的预防疫苗对于预防 HPV 的传播和相关疾病的发生有重要意义。HPV 疫苗研发的一个最终目标是使开发的疫苗诱导人体产生高滴度的中和抗体,所以中和抗体检测是 HPV 疫苗研发过程中一个必不可少、非常关键的环节。

是否能建立一个有效的,精确的,灵敏的,简便的中和抗体评价体系对 HPV 疫苗整个研发项目就显得十分重要。以构建假病毒为基础的中和试验是检测抗体活性最直接的方法^[6-10]。ZsGreen 法可以反映疫苗效力,是较好的方法,同时它还可以对天然 HPV 感染者及宫颈癌患者血清中的特异性中和抗体进行检测,以确定其所感染的 HPV 型别及产生的中和抗体水平,为 HPV 预防性疫苗评价和宫颈癌流行病学研究提供可靠的依据。该方法的不足之处在于其灵敏度较低,操作较复杂和检测周期较长并且重复性较差。液相芯片技术是一种以微球为基础的多指标数据采集和分析平台,起源于流式细胞仪。Luminex 法是成功地利用液相芯片系统来检测血清中不同型别的 HPV 中和抗体的滴度。液相芯片具有以下优点:①高通量:可以同时检测多达百种型别的 HPV 中和抗体;②操作简单,耗时短。③效率高,更有利于保持蛋白质的天然构象;④重复性好,灵敏度高,信噪比高,灵活性好。该方法的不足之处在于:检测成本较高。ELISA 法测抗体滴度所需实验材料简单,操作简便,实验周期短,适用于大范围的样本检测,不足之处在于只能初步测定总抗体滴度,而非中和抗体滴度。本文采用以上 3 种免疫原性评价滴度的方法候选疫苗进行检测的结果表明:此候选疫苗具有较强的中和抗体诱导能力和较好的疫苗应用前景。ED₅₀法是一个经典的体内试验,虽然能

够比较准确地检测疫苗的免疫原性,但由于动物实验周期较长,操作复杂,由于动物的个体差异,方法的重复性较差。不太适合同时检测多批疫苗产品。IVRP 法是一种夹心酶联免疫检测方法,即用中和单抗来衡量疫苗样品中有功能表位的多少。待测样品的活性通过与参考样品的比值来确定。该方法的优点在于:检测重复性好,操作简便,实验周期短。目前本研究同时采用 ED₅₀法和 IVRP 法对候选疫苗进行质量评价,以积累大量实验数据和相关性研究后,找到一种简单易行、成本较低、能准确直接地反映中和抗体水平的方法。

参考文献

- 1 Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM *et al.* Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer world wide. *J Pathol* 1999, 189(1): 12
- 2 Bosch FX, Lorincz A, Munoz N *et al.* The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002, 55(4): 244
- 3 LEI Jian-qiang(雷建强), SHEN Qiong(沈琼), ZHANG Gao-xia(张高峡). The relationship between HPV pseudovirus-neutralizing antibody titers and antibody nter determined by ELISA method(人乳头状瘤假病毒中和抗体滴度和 ELISA 法测定的小鼠血清抗体滴度的相关性研究). *Chin J Microbiol Immunol*(中华微生物学和免疫学杂志) 2009, 29(11): 1049
- 4 LU Wu-xun(卢五迅), CHENG Tong(程通), LI Shao-wei(李少伟) *et al.* Establishment and application of human papillomavirus type 16 pseudovirions neutralization assay(人乳头瘤病毒 16 型假病毒中和实验的建立和初步应用). *Chin J Biotechnol*(生物工程学报) 2006, 22(6): 990
- 5 Opalka D, Lachman CE, MacMullen SA *et al.* Simultaneous quantitation of types antibodies to neutralizing epitopes on virus-like particles for human papillomavirus types 6, 11, 16, and 18 by a multiplexed luminex assay. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003, 10(1): 108
- 6 Retzlaff MS, Wang F, Morley T *et al.* Correlation between mouse potency and in vitro relative potency for human papillomavirus type 16 virus-like particles and Gardasil[®] vaccine samples. *Hum Vaccin*, 2005, 1(5): 191
- 7 Pastrana DV, Buck CB, Pang YY *et al.* Reactivity of human sera in a sensitive, high-throughput pseudovirus-based papillomavirus neutralization assay for HPV 16 and HPV 18. *Virology* 2004, 321(2): 205
- 8 Dias D, Doren JV, Schlottmann S *et al.* Optimization and validation of a multiplexed luminex assay to quantify antibodies to neutralizing epitopes on human papillomaviruses 6, 11, 16, and 18. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005, 12(8): 959
- 9 Ferguson M, Heath A, Johnes S *et al.* Results of the first WHO international collaborative study on the standardization of the detection of antibodies to human papillomaviruses. *Int J Cancer* 2006, 118(6): 1508
- 10 WU Xue-ling(吴雪玲), WANG You-chun(王佑春). Research on human papillomaviruses(HPV) neutralizing antibodies assay(人乳头瘤病毒(HPV)中和抗体检测方法的研究进展). *Chin J Biolog*(中国生物制品学杂志) 2008, 21(7): 632

(本文于 2010 年 8 月 30 日收到)

《中国药学杂志》2012 年征订启事

《中国药学杂志》是我国药学界创刊早、发行量较大、反映我国药学各学科进展和动态的具权威性和影响的综合性学术核心期刊之一。读者群为高、中级药学工作者以及其他医药卫生人员。内容包括药学各学科、辟有院士笔谈、专家笔谈、综述、论著(内容包括:重大新药创制、生物技术、中药及天然药物、药理、药剂、临床药学、药品质量及检验、药物化学)、药物与临床、新药述评、药学史、药学人物、药事管理、学术讨论、科研简报等栏目。创刊 58 年来在医药卫生界享有很高声誉。连续三次荣获国家期刊奖,三次荣获中国科协优秀科技期刊一等奖。2007 年获“百种杰出学术期刊”称号。2006—2011 年连续六年被评为“中国科协精品期刊工程项目资助期刊”。被美国《化学文摘》(CA)、荷兰《医学文摘》(EM)、《国际药学文摘》(IPA)收录,加入中国学术期刊光盘版,进入北大中文科技期刊目录(核心版,排名第 2)。欢迎广大医药工作者积极订阅。

地址:北京市朝阳区建外大街四号建外 SOHO 九号楼 1803 室,100022。半月刊。电话 010-58699280/75/76/78/79。传真:010-58699295。网址 www.zgyxzz.com.cn。电子信箱 zgyxzz@cpa.org.cn。邮发代号:2-232,定价:每期 30 元,全年 720 元。