

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.03.004

原核表达系统制备 HPV58L1 VLP 可诱发高滴度且持久的中和抗体 *

胡美丽 刘洪洋 王志荣 陈 雪 张 婷 许雪梅^Δ

(中国医学科学院基础医学研究所 北京协和医学院基础学院 北京 100005)

摘要 目的:采用大肠杆菌表达系统制备人乳头瘤病毒 58 型(human papillomavirus type 58, HPV58)病毒样颗粒(virus-like particle, VLP)疫苗。**方法:**合成法获得 HPV58 L1 大肠杆菌密码子优化基因,构建 HPV58 L1 重组原核表达质粒 mpET22b/HPV58 L1,检测其在 BL21(DE3)中表达水平,饱和硫酸铵沉淀加阳离子交换层析法纯化蛋白后进行动态光散射(dynamic light scatter, DLS)分析。小鼠免疫后,检测免疫血清针对 HPV58 假病毒的中和抗体水平。**结果:**HPV58 L1 蛋白在 BL21(DE3)细胞中大部分以可溶形式表达,纯化获得的 HPV58 L1 蛋白可组装成水动力学直径约为 74 nm 的 VLP。0.5 μg 的 HPV58 L1 VLP 可诱发小鼠产生高滴度的 HPV58 特异性中和抗体,可维持至少 20 周。**结论:**原核表达系统制备的 HPV58 L1 VLP 可诱发高滴度且持久的中和抗体,可用于成本低的 HPV58 疫苗的研究。

关键词:人乳头瘤病毒 58 型;大肠杆菌表达系统;病毒样颗粒;中和抗体

中图分类号:Q-33;Q789;R730.51 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)03-419-04

Human Papillomavirus Type 58 L1 Virus-Like Particles Produced in Prokaryotic System Elicit High Level of Long-lasting Specific Neutralizing Antibodies*

HU Mei-li, LIU Hong-yang, WANG Zhi-rong, CHEN Xue, ZHANG Ting, XU Xue-mei^Δ

(Institute of Basic Medical Sciences Chinese Academy of Medical Sciences, School of Basic Medicine Peking Union Medical College, Beijing, 100005, China)

ABSTRACT Objective: To produce human papillomavirus type 58 (HPV58) virus-like particles (VLP) vaccine with *Escherichia coli* expression system. **Methods:** A synthesized HPV58 L1 gene optimized with bias condons of *Escherichia coli* was inserted into prokaryotic expression vector mpET22b, and expressed in BL21(DE3). Cells were sonicated and the supernatant was purified with ammonium sulfate precipitation plus cation-exchange chromatography. The purified HPV58 L1 protein was analyzed by dynamic light scatter (DLS), and then immunized mice twice with two week interval. Sera were analyzed with pseudovirion-based neutralization assays. **Results:** The HPV58 L1 protein was expressed largely in cell lysate and was easy to purify. Dynamic light scattering analysis showed that the mean hydrodynamic diameter of the purified protein was 74 nm, which was similar to that of HPV58 L1 VLP control, indicating the protein was self-assembled into HPV58 L1 VLP. The mean titer of HPV58 neutralizing antibody was as high as 10,000 in sera collected at week 4, and retained 5,000 at week 22. **Conclusions:** The HPV58 L1 VLP produced in prokaryotic system can induce high titer of long-term specific neutralizing antibody, which is a cost-effective candidate of HPV58 prophylactic vaccine.

Key words: Human papillomavirus type 58; *Escherichia coli* expression system; Virus-like particles; Neutralizing antibody

Chinese Library Classification (CLC): Q-33; Q789; R730.51 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)03-419-04

前言

高危型人乳头瘤病毒的持续性感染是宫颈癌发生的主要诱因,目前已发现约 20 种高危型别,包括 HPV16、18、45、31、58、52 等。在全球 15-44 岁女性群体中,宫颈癌是第二高发癌症,每年有 265,672 人死于宫颈癌^[1]。有研究表明在亚洲,HPV58 在宫颈内低度病变和宫颈内高度病变的检出率分别高达 10.8% 和 15.5%^[2]。在中国,HPV58 在高级鳞状上皮内病变

(high grade squamous intraepithelial lesions, HSIL)和鳞状细胞癌中检出率仅次于 HPV16^[3]。另外,在南美洲和大洋洲,HPV58 在 HSIL 的阳性率分别为 8.4% 和 10.4%,是诱发 HSIL 的第二大流行型别^[4]。

HPV 的主要衣壳蛋白 L1 蛋白可以自组装成 VLP, VLP 表面紧密有序的排列着重复表位,免疫原性强。目前上市的三种 HPV 疫苗均是以 L1 VLP 为基础的混合性疫苗,包括昆虫细胞生产的二价疫苗 Cervarix(HPV16/18)、酵母细胞生产的四价疫

* 基金项目:国家国际科技合作专项(2013DFA32430);中国医学科学院医学与健康科技创新工程基金项目(2016-I2M-3-026)

作者简介:胡美丽(1992-),硕士研究生,主要研究方向:肿瘤疫苗方向, E-mail: h_umeili@126.com

Δ 通讯作者:许雪梅(1965-),博士生导师, E-mail: xuemeixu@vip.sina.com, 电话:010-69156932

(收稿日期:2017-05-23 接受日期:2017-06-18)

苗 Gardasil (HPV16/18/6/11) 和九价疫苗 Gardasil 9 (HPV16/18/31/33/45/52/58/6/11)。临床研究表明 Cervarix 对 HPV31 和 HPV45 引起的 6 个月以上持续感染的预防效率分别是 77 % 和 79 %, 但对 HPV58 的预防效率为 0 %^[9]。Gardasil 对非疫苗型别相关的 1-3 级宫颈上皮内异常增生的预防效率仅为 27 %^[9]。上市的三种疫苗均来源于真核表达系统, 成本较高, 特别是价次高的疫苗, 成本更高, 所以研制出低成本的 HPV58 预防性疫苗意义重大。

原核表达系统具有制备简便、成本低廉等优点, 目前国内厦门大学采用原核表达系统制备 HPV16/18 二价疫苗 Cecolin 已进入临床 III 期试验^[7], 但尚未有利用原核系统制备 HPV58 L1 VLP 的报道。本研究采用原核表达系统制备了免疫原性好的 HPV58 L1 VLP, 为低成本 HPV58 预防性疫苗的研发奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

mpET22b、大肠杆菌细胞 BL21(DE3) 为本实验室保存; 2× EsTaqMasterMix、山羊抗小鼠二抗 HRP 标记 IgG 购自中国北京康为世纪生物技术公司; Tryptone 及 Yeast Extract 均购自美国 OXID 公司; 填料介质购自美国 GE 公司; 质粒小量提取试剂盒及小量琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自中国北京庄盟国际生物基因科技有限公司; CAMVIR-1 单抗购自美国 Chemicon 公司; pfwB 质粒和 293TT 细胞由美国国立卫生研究院肿瘤研究所 (National Cancer Institute) John T. Schiller 教授惠赠; p58SHELL 质粒由日本国立传染病研究所 (National Institute of Infectious Diseases) Tadahito Kanda 教授惠赠; DMEM 培养基购自 Invitrogen 公司; Western blot 化学发光检测试剂盒购自美国 PIERCE 公司; 蛋白预染 marker 购自德国 Fermentas 公司; 其他试剂均为国产分析纯; 4-6 周龄雌性 Balb/c 小鼠购自中国医学科学院实验动物研究所。

1.2 方法

1.2.1 HPV58 L1 基因优化合成及表达载体构建 以 GenBank 序列号为 ADK78687.1 的 HPV58 L1 氨基酸序列为基础, 采用大肠杆菌偏性密码子表对 HPV58 L1 基因进行优化, 基因合成后, 以酶切位点 *Nde* I / *Xho* I 插入 mpET22b 载体(上海生工有限公司), 重组质粒命名为 mpET22b/HPV58 L1。

1.2.2 HPV58 L1 的表达鉴定 取 1 μL (0.12 μg) 质粒 mpET22b/HPV58 L1 热激法转化感受态 BL21(DE3), 在含有氨苄抗性的 LB 固体培养基 37 °C 培养过夜。挑取克隆至含有氨苄抗性的培养基, 37 °C 振荡培养过夜。将培养物按 1:100 的比例转接至 200 mL 含氨苄抗性的培养基中, 37 °C 振荡表达 24 h。离心收集菌体, PBS 洗涤后重悬菌体, 超声破碎 (200 W, 超声 5 s, 间歇 7 s, 共 30 min), 离心收集上清。空载体 mpET22b 转化 BL21(DE3) 作为空白对照。SDS-PAGE 考染及 Western blot 试验分析目的蛋白的表达情况, 一抗为 CAMVIR-1, 二抗为 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体。

1.2.3 HPV58 L1 的纯化 裂解上清中缓慢加入饱和硫酸铵至终浓度 30 %, 4 °C 搅拌 1 h 后, 离心收集沉淀, 用含有 10 mM DTT 的缓冲液重悬沉淀, 冰浴 3 h。0.45 μm 滤膜过滤后进行阳离子交换层析。用含 500 mM NaCl 的缓冲液预洗杂蛋白, 1 M

NaCl 的缓冲液洗脱目的蛋白。纯化过程留取少量样品进行 SDS-PAGE 考染检测, 分析蛋白纯化效果。

1.2.4 HPV58 L1 VLP 的体外组装 纯化蛋白在 4 °C 透析组装 48 h, 稳定 12 h^[8], 充分去除还原剂 DTT, 使目的蛋白自组装为 VLP。

1.2.5 HPV58 L1 VLP 形态学检测 超声处理组装完成的纯化蛋白, Zetasizer Nano ZS 动态光散射仪进行检测, 观察光强指标下的平均水化分子动力学直径 Z-Average 和多分散指数 PDI。

1.2.6 Balb/c 小鼠免疫 选用 4-6 周龄的雌性 Balb/c 小鼠, 分两组, 每组 4 只。取 0.5 μg 的 HPV58 L1 VLP 肌肉免疫两次, 间隔两周。昆虫细胞表达制备的 HPV58 L1MΔ C VLP^[8] 为阳性对照组。最后一次免疫 2 周和 20 周后分别采集血清, 用于中和活性的分析。

1.2.7 假病毒的制备 参考相关文献^[9,10], 将 p58SHELL 与 pfwB 共转染 293TT 细胞, 37 °C 孵育 48 h, 裂解细胞, 37 °C 再孵育 24 h。用含 5 M NaCl 的裂解液抽提假病毒, 之后感染细胞检测 HPV58 假病毒的滴度。

1.2.8 免疫中和活性的检测 假病毒最佳稀释度为测得荧光细胞数量占总细胞百分数在 1~25 % 的病毒稀释倍数, 按此稀释度与倍比稀释的免疫血清等体积混合, 4 °C 孵育 1 h, 然后加至 293TT 细胞 (3×10^4 个 / 100 μL / 孔)。DMEM-10 培养基与等体积假病毒混合作为阴性对照, 同时设培养基为空白对照。37 °C 孵育 72 h, 流式细胞仪检测各孔细胞的感染抑制率。感染抑制率 = (1 - 待测血清样品中的荧光细胞百分数 / 阴性对照样品中的荧光细胞百分数) × 100 %。当血清稀释 50 倍后仍有 50 % 的感染抑制率, 则说明其具备一定的中和能力, 将达到高于 50 % 感染抑制率的最高血清稀释倍数定为其中和滴度。

1.3 统计学分析

应用 SPSS17.0 软件进行统计分析, 计量资料组间比较采用独立样本 t 检验分析, 以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HPV58 L1 蛋白的表达鉴定

HPV58 L1 蛋白在大肠杆菌细胞 BL21(DE3) 中表达情况见图 1, 泳道 2 和 3 分别是 mpET22b/HPV58 L1 转化 BL21(DE3) 后表达的总蛋白和可溶性蛋白, 55 kDa 处均可见明显条带, 与 HPV58 L1 蛋白理论值一致, 且 HPV58 L1 的总蛋白和可溶性蛋白表达量大致相同, 说明 HPV58 L1 蛋白表达水平较高, 大部分以可溶形式表达。

2.2 HPV58 L1 的纯化

采用饱和硫酸铵沉淀和阳离子交换层析纯化 HPV58 L1 蛋白, 结果见图 2。泳道 1 是经饱和硫酸铵处理后的蛋白, HPV58 L1 蛋白被明显富集, 纯度得到提高。阳离子交换层析流穿组分中只有较少目的蛋白, 说明 HPV58 L1 蛋白大部分结合到层析介质。最后目的蛋白被含 1 M NaCl 的缓冲液集中洗脱, 得到了纯度高的 HPV58 L1 蛋白。

2.3 HPV58 L1 VLP 的动态光散射测定

取组装完成的 HPV58 L1 VLP 的蛋白样品进行动态光散射分析, 如图 3 所示, 测定 HPV58 L1 VLP 的 Z-Average 为 74.28 nm, 大小与天然病毒颗粒相近; PDI 为 0.160, 表明颗粒组装均一度良好, 说明 HPV58 L1 VLP 组装效果较好。

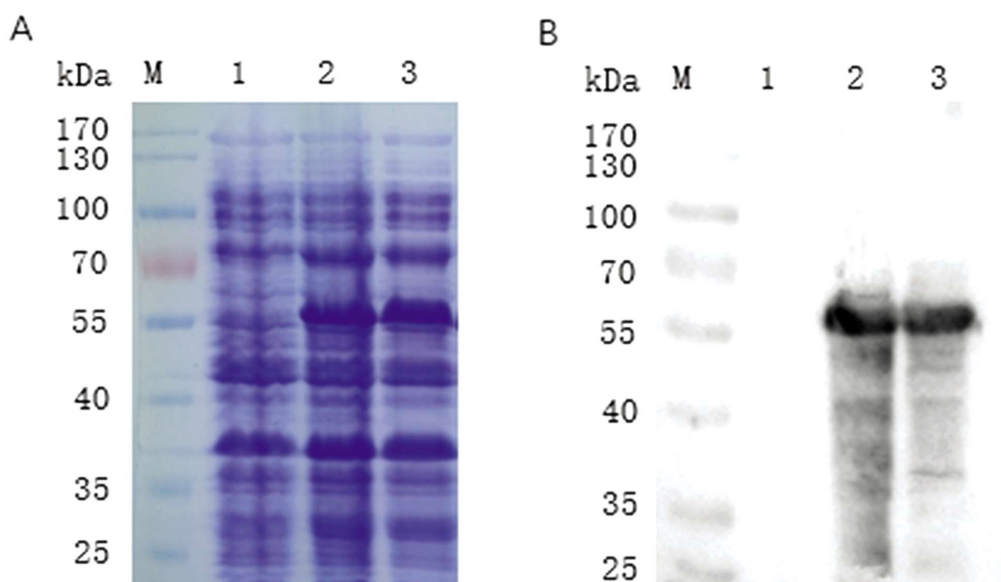


图1 SDS-PAGE 考染(A)和 Western blot (B)分析 HPV58 L1 蛋白在大肠杆菌 BL21(DE3)中的表达情况

Fig.1 SDS-PAGE with Coomassie blue staining (A) and Western blot (B) analyses of HPV58 L1 protein expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3)

M: protein maker; 1: total cell protein of BL21(DE3)transformed with mpET22b, 2-3: total cell protein or cell lysate supernatant of BL21(DE3) transformed with mpET22b/HPV58 L1, respectively.

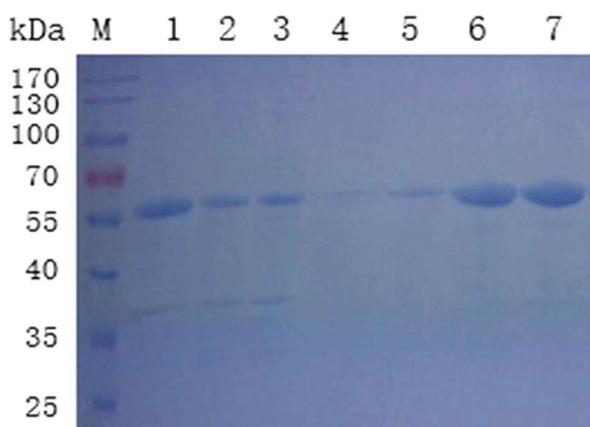


图2 饱和硫酸铵及阳离子交换层析纯化 HPV58 L1 蛋白

Fig.2 Purification of HPV58 L1 protein by saturated ammonium sulfate and cation-exchange chromatography

M: protein maker; 1: saturated ammonium sulfate; 2-3: flow through fractions; 4-5: fractions eluted by 500 mM NaCl; 6-7: fractions eluted by 1 M NaCl.

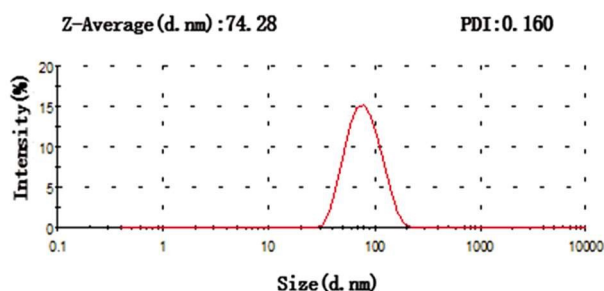


图3 HPV58 L1 VLP 的动态光散射分析

Fig.3 Dynamic light scattering analysis of HPV58 L1 VLP

2.4 免疫活性检测

如图4所示,HPV58 L1 VLP 免疫小鼠4周后,免疫血清中 HPV58 平均中和抗体滴度达 10,000,22 周后的免疫血清仍达

5,000,与昆虫细胞生产的 HPV58 L1M Δ C VLP 相应时间点的平均中和抗体滴度相比差异没有统计学意义($P>0.05$)。

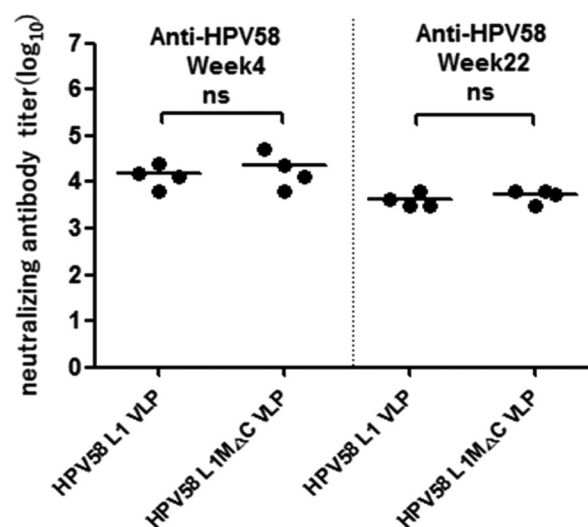


图4 HPV58 L1 VLP 诱发针对 HPV 58 型假病毒的中和抗体滴度

Fig.4 Specific neutralizing antibody titers induced by HPV58 L1 VLP

Note: Statistical significance was determined by Student's t-test. ns, $P>0.05$.

3 讨论

Jiang 等在毕氏酵母中表达 HPV58 L1 全长序列,获得了可诱发高滴度中和抗体的 HPV58 L1 VLP^[11]。本实验室前期研究发现昆虫细胞中表达 C 端氨基酸序列截短的 HPV58 L1,可以提高 HPV58 L1 蛋白表达水平(未发表)。李等采用全长 L1 基因在大肠杆菌中表达 HPV6 L1 VLP 和 HPV16 L1 VLP 的研究发现大肠杆菌表达 L1 蛋白多以包涵体形式表达^[12,13],这种非可溶性的 L1 蛋白难以通过常规变性和复性方法获得正确组装的 L1 VLP^[14,15]。Pan 等将含有 GST 标签的 HPV16 L1 与分子伴侣 GroEL/ES 在大肠杆菌中共表达,可溶性蛋白得率提高 2 倍^[16]。

Chen 等在原核表达载体上分别添加 SUMO 标签和 GST 标签, 可以提高 L1 蛋白的可溶性表达水平^[17]。但上述策略下游纯化工艺采用亲和层析纯化, 而且还需要酶切去除标签蛋白, 因此生产成本高。目前, 李等采用盐析法对裂解上清中 HPV16 L1 可溶性表达组分进行分离纯化, 纯化工艺成本低, 不需亲和层析及酶切去除融合蛋白, 已获得专利保护^[18]。本研究采用大肠杆菌偏性密码子优化的 HPV58 L1 全长基因, 在大肠杆菌 BL21(DE3)中成功表达了 HPV58 L1 蛋白, 发现 HPV58 L1 蛋白在裂解上清中的可溶性组分表达量较高。

Thones 等发现非组装形式的 HPV16 L1 蛋白诱发的 HPV16 中和抗体水平极低, 添加铝佐剂也无法提高抗体水平, 表明组装形式的 HPV16 L1 蛋白对其免疫原性十分重要^[21]。Kim 等采用饱和硫酸铵和阳离子交换层析对酿酒酵母细胞来源的 HPV16 L1 蛋白纯化, 获得了免疫原性好的 HPV16 L1 VLP^[9]。Kwag 等发现单体形式的 L1 蛋白无法结合阳离子层析介质, 表明阳离子交换层析法可以有效去除单体形式的 L1 蛋白^[20]。研究表明, 将酿酒酵母细胞中生产的 HPV16 L1 VLP 经解聚再组装后, 可以提高其结构均一度和稳定性^[22]。本研究采用解聚再组装的方法处理 HPV58 L1 VLP, 首先用饱和硫酸铵对 HPV58 L1 蛋白进行初步纯化, 该方法易操作, 成本低, 再用阳离子交换层析进一步纯化, 获得了纯度高的 HPV58 L1 蛋白, DLS 分析发现组装后的 HPV58 L1 VLP 大小与天然病毒颗粒相似, 免疫活性检测发现 HPV58 L1 VLP 可诱发高滴度的特异性中和抗体。

机体主动或被动获得 L1 VLP 特异的中和抗体后可产生有效的抗感染免疫, 血清中和抗体的水平能够反映疫苗的保护活性^[23], 表明疫苗的保护作用是由中和抗体直接介导的。临床研究显示 Cervarix 的长期保护效果与中和抗体的水平相关, 表明中和抗体的水平和持久性对疫苗的长期保护效果是至关重要的^[24]。本研究制备的 0.5 μg HPV58 L1 VLP 免疫小鼠两次, 4 周后免疫血清的 HPV58 平均中和抗体滴度高达 10,000, 免疫 22 周后仍可达 5,000, 表明本研究生产的 HPV58 L1 VLP 免疫原性好, 可诱发持久高水平的 HPV58 特异性中和抗体, 可以发挥长期保护作用。

综上, 本研究采用原核系统的表达 HPV58 L1 蛋白无标签, 操作简单, 蛋白表达水平高, 且大部分以可溶形式表达, 纯化工艺简单, 易于放大, 免疫原性好, 可用于低成本的 HPV58 预防性疫苗的研究。

参考文献(References)

- [1] Bruni L, Barrionuevo-Rosas L, Albero G, et al. Human Papillomavirus and Related Diseases in the World [R]. ICO Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre), 2016-02-25
- [2] Bruni L, Barrionuevo-Rosas L, Albero G, et al. Human Papillomavirus and Related Diseases in Asia [R]. ICO Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre), 2016-10-07
- [3] Bao YP, Li N, Smith JS, et al. Human papillomavirus type distribution in women from Asia: A meta-analysis[J]. International Journal of Gynecological Cancer, 2008, 18(1): 71-79
- [4] HPV and cervical cancer in the 2007 report [R]. Vaccine, 2007, 25(12 (Suppl.3)): C1-230
- [5] Wheeler CM, Castellsagué X, Garland SM, et al. Cross-protective efficacy of HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by non-vaccine oncogenic HPV types: 4-year end-of-study analysis of the randomised, double-blind PATRICIA trial[J]. Lancet Oncology, 2012, 13(1): 100-110
- [6] Moscicki A-B. HPV Vaccines: today and in the Future [J]. Journal of Adolesc Health, 2008, 43(4): 26-40
- [7] Qiao Y, Li R, Hu Y, et al. Safety and Efficacy of an E.coli-produced Human Papillomavirus 16/18 Bivalent Vaccine in Women: an Interim Analysis of Phase III Clinical Trial [R]. South Africa: Cape Town International Convention Centre Convention Square, 1 Lower Long Street, Cape Town, 8001, 2017
- [8] Xie X, Liu Y, Zhang T, et al. Human papillomavirus type 58 L1 virus-like particles purified by two-step chromatography elicit high levels of long-lasting neutralizing antibodies [J]. Arch Virol, 2013, 158(1): 193-199
- [9] Buck CB, Pastrana D V, Lowy DR, et al. Efficient intracellular assembly of papillomaviral vectors [J]. Journal of Virology, 2004, 78(2): 751-757
- [10] Pastrana D V, Buck CB, Pang YYS, et al. Reactivity of human sera in a sensitive, high-throughput pseudovirus-based papillomavirus neutralization assay for HPV16 and HPV18 [J]. Virology, 2004, 321(2): 205-216
- [11] Jiang Z, Tong G, Cai B, et al. Purification and immunogenicity study of human papillomavirus 58 virus-like particles expressed in Pichia pastoris[J]. Protein Expression and Purification, 2011, 80(2): 203-210
- [12] 潘晖峰, 李少伟, 刘波, 等. 人乳头状瘤病毒 6 型类病毒颗粒的制备及其中和抗体的检测[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2009, 29(1): 71-76
- [13] 魏旻希, 李少伟, 黄博, 等. 人乳头状瘤病毒 16 型病毒样颗粒的制备及其免疫原性研究[J]. 病毒学报, 2009, 25(7): 245-250
- [14] Kelsall SRI, Kulski JK. Expression of the major capsid protein of human papillomavirus type 16 in Escherichia coli [J]. Journal of Virological Methods, 1995, 53: 75-90
- [15] Zhang W, Carmichael J, Ferguson J, et al. Expression of Human Papillomavirus Type 16 L1 Protein in Escherichia coli?: Denaturation, Renaturation, and Self-Assembly of Virus-like Particles in Vitro[J]. Virology, 1998, 431(243): 423-431
- [16] Pan D, Zha X, Yu X, et al. Enhanced expression of soluble human papillomavirus L1 through coexpression of molecular chaperonin in Escherichia coli[J]. Protein Expression and Purification, 2016, 120(12): 92-98
- [17] Chen Y, Liu Y, Zhang G, et al. Human papillomavirus L1 protein expressed in Escherichia coli self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic[J]. Virus Research, 2016, 220(4): 97-103

- nanofibers [J]. Journal of the American Chemical Society, 2008, 130 (15): 5036-5037
- [5] Wang Ling, Wu Yao-bin, Guo Bao-lin et al. Nanofiber Yarn/Hydrogel Core-Shell Scaffolds Mimicking Native Skeletal Muscle Tissue for Guiding 3D Myoblast Alignment, Elongation and Differentiation[J]. Acs Nano, 2015, 9(9): 9167-9179
- [6] Sackmann EK, Fulton AL, Beebe DJ, et al. The present and future role of microfluidics in biomedical research [J]. Nature, 2014, 507(7491): 181-189
- [7] Lichtenberg J, de Rooij NF, Verpoorte, E. A microchip electrophoresis system with integrated in-plane electrodes for contactless conductivity detection[J]. Electrophoresis, 2002, 23(21): 3769-3780
- [8] Jun Yesl, Kang Edward, Chae Sukyoung, et al. Microfluidic spinning of micro- and nano-scale fibers for tissue engineering [J]. Lab on a Chip, 2014, 14(13): 2145-2160
- [9] Utada AS, Lorenceau E, Link DR, et al. Monodisperse double emulsions generated from a microcapillary device [J]. Science, 2005, 308 (5721): 537-541
- [10] Marco Angarano, Schulz Simon, Fabritius Martin, et al. Layered Gradient Nonwovens of In Situ Crosslinked Electrospun Collagenous Nanofibers Used as Modular Scaffold Systems for Soft Tissue Regeneration[J]. Advanced Functional Materials, 2013, 23(26): 3277-3285
- [11] Yang Guang, Wang Jie, Li Long, et al. Electrospun micelles/drug-loaded nanofibers for time-programmed multi-agent release [J]. Macromolecular bioscience, 2014, 14(7): 965-976
- [12] Godbey WT, Wu KK, Mikos AG. Poly (ethylenimine) and its role in gene delivery [J]. Journal of Controlled Release, 1999, 60 (2-3): 149-160
- [13] Yu Yue, Wen Hui, Ma Jing-yun, et al. Flexible Fabrication of Biomimetic Bamboo- Like Hybrid Microfibers[J]. Advanced Materials, 2014, 26(16): 2494-2499
- [14] Sun Yong-ming, Sills Ryan B, Hu, Xian-luo, et al. A Bamboo-Inspired Nanostructure Design for Flexible, Foldable, and Twistable Energy Storage Devices[J]. Nano Letters, 2015, 15(6): 3899-3906
- [15] Yarin AL, Koombhongse S, Reneker DH. Taylor cone and jetting from liquid droplets in electrospinning of nanofibers [J]. Journal of Applied Physics, 2001, 90(9): 836-846
- [16] Cheng Li-ying, Sun Xiao-ming, Zhao Xin, et al. Surface biofunctional drug-loaded electrospun fibrous scaffolds for comprehensive repairing hypertrophic scars[J]. Biomaterials, 2016, 83: 169-181
- [17] Li Xiao-ran, Li Meng-yuan, Sun Jie, et al. Radially Aligned Electrospun Fibers with Continuous Gradient of SDF1 alpha for the Guidance of Neural Stem Cells[J]. Small, 2016, 12(36): 5009-5018
- [18] Ghavami NA, Sasikala ARK, Unnithan AR, et al. Mussel-Inspired Electrospun Smart Magnetic Nanofibers for Hyperthermic Chemotherapy[J]. Advanced Functional Materials, 2015, 25(19): 2867-2875
- [19] Zhao Xin, Yuan Zi-ming, Yildirim Lara et al. Tumor-Triggered Controlled Drug Release from Electrospun Fibers Using Inorganic Caps for Inhibiting Cancer Relapse[J]. Small, 2015, 11(34): 4284-4291
- [20] Zhang Zhi-yun, Liu Shi, Qi Yan-xin, et al. Time-programmed DCA and oxaliplatin release by multilayered nanofiber mats in prevention of local cancer recurrence following surgery[J]. Journal of Controlled Release, 2016, 235: 125-133
- [21] Kaplan JA, Liu Rong, Freedman JD, et al. Prevention of lung cancer recurrence using cisplatin-loaded superhydrophobic nanofiber meshes [J]. Biomaterials, 2016, (76): 273-281
- [22] Srivastava Yasmin, Marquez Manuel, Thorsen Todd. Microfluidic electrospinning of biphasic nanofibers with Janus morphology [J]. Biomicrofluidics, 2009, 3(1): 012801-012806
- [23] Zhang Xu, Gao Xing-hua, Jiang Lei, et al. Flexible Generation of Gradient Electrospinning Nanofibers Using a Microfluidic Assisted Approach[J]. Langmuir, 2012, 28(26): 10026-10032

(上接第 422 页)

- [18] 李少伟, 沈文通, 潘晖榕, 等. 从原核生物中纯化人乳头瘤病毒晚期蛋白 L1 的方法[P]. 中国专利, CN200610140613.0, 2006-09-29
Li Shao-wei, Shen Wen-tong, Pan Hui-rong, et al. Purification of human papillomavirus late protein L1 from prokaryotes [P]. Chinese Patent, CN200610140613.0, 2006-09-29
- [19] Kim H, Kim S, Lim S, et al. One-step chromatographic purification of human papillomavirus type 16 L1 protein from *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Protein Expression and Purification, 2010, 70(8): 68-74
- [20] Kwag HL, Kim HJ, Chang DY, et al. The production and immunogenicity of human papillomavirus type 58 virus-like particles produced in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Journal of Microbiology, 2012, 50(5): 813-820
- [21] Thönes, Nadja Herreiner, Anna Schädlich, et al. A direct comparison of human papillomavirus type 16 L1 particles reveals a lower immunogenicity of capsomeres than viruslike particles with respect to the induced antibody response [J]. Journal of Virology, 2008, 82(11): 5472-5485
- [22] Zhao, Q Modis, Y High, et al. Disassembly and reassembly of human papillomavirus virus-like particles produces more virion-like antibody reactivity[J]. Virology journal, 2012, 9(11): 52
- [23] Suzich JA, Ghim SJ, Palmer-Hill FJ, et al. Systemic immunization with papillomavirus L1 protein completely prevents the development of viral mucosal papillomas [J]. Immunology, 1995, 92 (12): 11553-11557
- [24] Roteli-Martins C, Naud P, De Borja P, et al. Sustained immunogenicity and efficacy of the HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine: up to 8.4 years of follow-up[J]. Human vaccines & immunotherapeutics, 2012, 10(8): 2147-2162