

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2016.10.021

· 综述 ·

人乳头瘤病毒 16 型重组乳球菌疫苗的研制现状

Research of recombinant vaccine of human papillomavirus type 16 mediated by *Lactococcus*

李文桂(LI Wen-gui), 陈雅棠(CHEN Ya-tang)

(重庆医科大学附属第一医院传染病寄生虫病研究所, 重庆 400016)

(Institute of Infectious and Parasitic Diseases, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

[关键词] 人乳头瘤病毒 16 型; HPV16; 乳球菌; 疫苗; 综述

[中图分类号] R183 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9638(2016)10-0802-05

人乳头瘤病毒 16 型(human papillomavirus type 16, HPV16)是一类广泛感染人类上皮组织的小 DNA 病毒,能引起人体各种黏膜和皮肤的增生性疾病与肿瘤,与人宫颈癌的发生密切相关。疫苗接种是防治 HPV16 感染的有效途径之一,现有疫苗的种类包括死疫苗、减毒活疫苗、分子疫苗和 DNA 疫苗等,但存在一定的毒副作用,因此尚需研究新型 HPV16 疫苗。

乳球菌(*Lactococcus*)是一种能大量发酵碳水化合物并产生乳酸的兼性厌氧革兰阳性菌。一般呈球形或卵圆形,大小为 $2 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$,单生,成对或成链状。模式菌株为乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)。乳球菌通常具有加速食品酸化,增加食物营养及改善食物品质的作用,是乳制品工业发酵的重要菌类,是一种有希望的疫苗载体^[1-2]。本文拟就乳球菌介导的 HPV16 的 E7 蛋白、E7-IL-12 融合蛋白、E7mm 蛋白和 L1 蛋白等疫苗的构建及其作用机制等方面的研制现状进行综述。

1 大肠埃希菌-乳球菌穿梭载体的构建

乳球菌的细胞壁厚且复杂,摄取外源 DNA 较为困难。Kim 等^[3]采用电穿孔方法进行外源 DNA

转化乳酸杆菌试验,摸索出了较好的转化条件,为构建重组乳球菌疫苗提供了有利条件。

为将外源 DNA 有效引入乳球菌,需构建大肠埃希菌-乳球菌穿梭表达载体,乳球菌的穿梭表达载体通常有组成型和诱导型 2 种类型。van 等^[4]构建的 pMG36e 是一种常见的组成型表达载体,它含有 p32 启动子及其下游部分的开放阅读框,来自 pUC18 的多克隆位点和来自 PrtP 基因的转录终止子, pWV01 的复制子和氯霉素抗性基因等。尽管该载体可表达高水平的外源蛋白,但外源蛋白在细胞内的富集和聚合却可导致蛋白在胞质中被降解,通常对细胞具有毒害作用。

诱导型表达载体可利用诱导剂对外源蛋白进行可控性表达,应用较为广泛。de Rugter 等^[5]开发了乳菌肽控制的表达系统(Nisin-controlled expression system, NICE),此系统包括 3 个组分:携带 *nisR* 和 *nisK* 基因的宿主菌、充当诱导分子的乳菌肽(Nisin),以及含有 *nisA* 启动子的质粒。诱导剂 Nisin 诱导 *nisA* 启动子,*nisA* 启动子由 *nisR* 和 *nisK* 组成的双组分调节系统进行调节。*nisK* 是 Nisin 的膜结合感应蛋白,*nisR* 是膜内反应调节子。*nisK* 接受外源 *nisin* 肽信号后,自身磷酸化激活胞浆内 *nisR*,随后 *nisR* 激活 *nisA* 启动子,启动下游基

[收稿日期] 2016-01-09

[基金项目] 国家自然科学基金项目(No. 30801052、No. 30671835、No. 30500423 和 No. 30200239)

[作者简介] 李文桂(1967-),男(汉族),湖北省郧县人,研究员,主要从事病原微生物的分子生物学和分子免疫学研究。

[通信作者] 李文桂 E-mail: cqliwengui@163.com

因的转录和表达。宿主菌 NZ3900 含有 *nisK* 和 *nisR* 基因,质粒 pNZ8149 含有 *nisA* 启动子,其起始密码子 ATG 处有 N_{Coi} 酶切位点,这样使插入的目的基因与 *nisA* 启动子的核糖体结合位点区域构成翻译融合,较转录融合具有更高的表达活性。通常将含有 *nisA* 启动子的质粒导入携带 *nisR* 和 *nisK* 蛋白的宿主菌时,外源基因的表达较弱;而在对数生长期加入 nisin 进行诱导后,外源基因的表达水平在一定范围内与 nisin 的剂量成正比,诱导效率可以达到 1 000 倍以上^[6]。

乳球菌的表达载体既可以利用胸苷酸合成酶(thymidylate synthase, Thy)或丙氨酸消旋酶(alanine racemase, Alr)的营养缺陷型作为选择标记,也可以利用乳糖或木糖作为选择标记。这些标记均可食用,对于口服疫苗的开发极具价值。人们发现 *thyA* 基因编码的 Thy 在 DNA 合成中起关键作用,缺失 *thyA* 基因的菌株在普通培养基上不能生长,*alr* 基因编码的 Alr 是许多细菌生长的必需成分。Fu 等^[7]以干酪乳杆菌来源的 *thyA* 基因作为选择标记,构建了食品级载体 pFXL103。Bron 等^[8]将含异源 *alr* 基因的质粒 pGIPO11 转化到乳酸乳球菌 *alr*-菌株后,*alr*-菌株恢复了野生型表型。Platteeuw 等^[9]构建了食品级穿梭表达载体 pLP3537,其含有 *lacF* 选择标记、高拷贝内源性的乳酸乳球菌 pSH71 复制子、*LacA* 启动子和 *PepN* 终止子,配套菌株为删除 *lacF* 基因的乳酸乳球菌 NZ3900 株,可以利用乳糖作为选择标记。将 pLP3537 质粒转入 *lacF* 基因缺失的宿主菌 NZ3900 株后,可使原来不能利用乳糖的宿主菌 NZ3900 发酵乳糖并产酸,使 pH 值降低,使筛选培养基中的溴甲酚紫由紫色变为黄色,此种利用乳糖作为选择标记表达系统的元件均是食品级的,口服安全。Gosalbes 等^[10]构建了乳糖调节的乳酸杆菌食品级表达载体 pILac。戊糖乳球菌的 MD353 染色体上含有木糖(*xylose*, *xy1*)编码基因,可以发酵木糖。Posno 等^[11]把 *xy1* 基因插入 pLP3537,得到食品级表达载体 pLP3537-*xy1*,可以利用木糖作为选择标记。上述选择标记的成功开发为发展乳球菌成为疫苗载体提供了有力保障。

2 E7 蛋白重组乳球菌疫苗

HPV16 基因组分为早期区(E 区)和晚期区(L 区),E 区又分为 E1~E7 区,其中 E7 基因编码 E7 蛋白。E7 蛋白是一种 DNA 结合蛋白,可干扰抑癌

蛋白 RB 与转录因子 E2F 和 P107 的结合,使细胞周期发生紊乱,E7 蛋白还可与 P103、Cyclin A 和 CDK2 等细胞周期相关因子结合,使细胞发生癌变。核酸内切酶 A(nuclease A, NucA)是一种外源信号肽,LEISSTCDA 肽段是一种连接短肽,它们均可促进外源蛋白的分泌。Cortes-Perez 等^[12]将 pBS-E7 与 pVE5547 重组得 pIL-E7-CWA,将其电穿孔转化乳酸乳球菌 NZ9000 株,10 ng/mL 乳菌肽诱导 1 h,免疫印迹发现 HPV16 患者的血清识别分子量为 32 KDa 的 E7-CWA_{M6} 融合蛋白;将 1×10^9 CFU 疫苗滴鼻免疫 C57BL/6 鼠,在初次免疫后 14 和 28 d 加强 2 次,在初次免疫后 35 d 采集免疫鼠的血清,免疫印迹证实该血清可识别重组 E7-GST 融合蛋白,说明该疫苗可诱导小鼠产生有效的体液免疫应答。

Ribelles 等^[13]以 pSEC-E7 为模板扩增 383 bp 的 E7 编码基因,插入 pGEP-CBD 得 pE7-CBD;将其电穿孔转化乳酸乳球菌 NZ9000 株,10 ng/mL 乳菌肽诱导 1 h,SDS-PAGE 证实重组菌表达分子量为 37 KDa 的 E7-CBD 融合蛋白,免疫电镜提示重组菌的表面存在 E7-CBD 融合蛋白分子;将 1×10^8 CFU 疫苗滴鼻免疫 C57BL/6 鼠,初次免疫后 14、28 d 各加强 1 次,初次免疫 35 d 后发现免疫鼠的脾内 E7 特异的细胞毒 T 淋巴细胞的数目显著增多;末次免疫后 1 周用 1×10^5 CFU 的肺癌细胞株 TC-1 皮下注射进行攻击,在攻击后 3 周发现 60% (3/5) 的免疫鼠未发生肿瘤,40% (2/5) 的免疫鼠出现体积为 0.285 cm³ 的肿瘤,而对照组的肿瘤体积为 2.939 cm³,表明该疫苗可有效对抗肺癌细胞株 TC-1 的攻击。

研究^[14-17]表明,以 pCD-E7 为模板扩增大小为 313 bp 的 E7 编码基因,插入 pGEM-Teasy 获得 pGEM-E7,与 pVE8001 重组获得 pBS-E7;将 pGEM-E7 与 pSEC-Nuc 重组获得 pSEC-E7,将 *NucA* 基因插入 pSEC-E7 获得 pSEC-Nuc-E7;将 pBS-E7 与 pSEC-LEISSTCDA 重组获得 pSEC-LEISSTCDA-E7,与 pBS-Nuc 重组获得 pSEC-LEISSTCDA-Nuc-E7;将 pCYT-E7 与 pVE5546 重组获得 pILCYT-E7,与 pGK 重组得 pCWA-E7;分别将 pSEC-E7、pSEC-Nuc-E7、pSEC-LEISSTCDA-Nuc-E7 和 pCWA-E7 这 4 种质粒电穿孔转化乳酸乳球菌 NZ9000 株,1 ng/mL 乳菌肽诱导 1 h,SDS-PAGE 证实 4 种重组菌分别表达 19 KDa 的 E7 蛋白、35KDa 的 Nuc-E7 融合蛋白、41KDa 的 LEISS-Nuc-E7 融合蛋白,以及 38KDa 的 E7-CWA_{M6} 融合

蛋白。免疫印迹发现, HPPV16 患者血清识别重组菌表达的 LEISS-Nuc-E7 融合蛋白, 免疫荧光表明 4 种重组菌表面存在相应的融合蛋白分子。将 1×10^9 CFU 的疫苗滴鼻免疫 C57BL/6 鼠, 初次免疫后 14 和 28 d 各加强 1 次, 末次免疫后 1 周发现免疫鼠的脾细胞分泌高水平的 IL-2 和 IFN- γ 等细胞因子, 提示这 4 种疫苗可诱导小鼠产生 T_H1 型的免疫应答。

随后将 1×10^9 CFU 的 LL-E7 疫苗加 1×10^9 CFU 的 LL-IL-12 佐剂疫苗滴鼻免疫 C57BL/6 鼠, 初次免疫后 14、28 d 各加强 1 次, 在末次免疫后 1 周发现免疫鼠的脾内细胞毒 T 淋巴细胞、CD4+ 和 CD8+ T 细胞的数目显著增加; 末次免疫后 1 周皮下注射 5×10^4 CFU 的肺癌细胞株 TC-1 进行攻击, 攻击后 5 周发现 50% (12/24) 的免疫鼠未发生肿瘤, 可持续 100 d, 50% (12/24) 的免疫鼠出现体积为 1 cm^3 的肿瘤, 而对照组的肿瘤体积可达 6 cm^3 。将 10 只无瘤的免疫鼠喂养 3 个月后再用 TC-1 细胞株进行攻击, 攻击后 6 月仍未发生肿瘤, 提示该类疫苗加用 IL-12 佐剂可明显对抗肺癌细胞株 TC-1 的攻击感染。将 5×10^4 CFU 的肺癌细胞株 TC-1 皮下注射 C57BL/6 鼠, 注射后 7 d 小鼠出现可触诊的肿瘤, 此时用 1×10^9 CFU 的 LL-E7 疫苗和 1×10^9 CFU 的 LL-IL-12 佐剂疫苗对模型鼠混合滴鼻进行免疫治疗, 免疫治疗后 14、18 d 各加强 1 次, 发现 35% (8/24) 免疫治疗鼠的肿瘤消退, 可持续 100 d, 65% (16/24) 免疫治疗鼠的肿瘤体积缩小为 1.8 cm^3 , 而对照组的肿瘤体积可达 7.5 cm^3 , 表明该类疫苗加用 IL-12 佐剂对肺癌细胞株 TC-1 模型鼠具有较好的免疫治疗作用。

3 E7-IL-12 融合蛋白重组乳球菌疫苗

白细胞介素 12 (interleukin 12, IL-12) 可促进 NK 细胞和 T 细胞增殖, 提高它们的杀伤活性, 诱导 IFN- γ 产生, 促进 TH0 细胞分化为 TH1 细胞, 促进 IgG2a、IgG2b 和 IgG3 合成, 抑制 IgG1 合成。Li 等^[18] 分别以 pCD-E7 和 pORT-IL-12 为模板扩增 E7 蛋白和 IL-12 的编码基因, 将 E7 基因插入 pMG36e 获得 pMG36e-E7, 将 IL-12 基因插入 pMG36e-E7 获得 pMG36e-E7-IL-12; 将其电穿孔转化乳酸乳球菌 NZ3900 株, 1 ng/mL 乳菌肽诱导 3 h, SDS-PAGE 证实重组菌表达分子量为 89 KDa 的 E7-IL-12 融合蛋白。将 1×10^9 CFU 疫苗滴鼻免

疫 C57BL/6 鼠, 初次免疫后 14、28 d 各加强 1 次, 初次免疫 35 d 后发现免疫鼠的血清 IL-12 和 IFN- γ 等细胞因子的水平升高, 脾内 E7 特异的细胞毒 T 细胞的数目显著增多; 末次免疫后 1 周皮下注射 5×10^4 的肺癌细胞株 TC-1 进行攻击, 攻击后 5 周发现 37.5% (3/8) 的免疫鼠未发生肿瘤, 62.5% (5/8) 的免疫鼠出现体积为 0.89 cm^3 的肿瘤, 而对照组的肿瘤体积可达 7.84 cm^3 , 说明该疫苗可有效对抗肺癌细胞株 TC-1 的攻击。将 5×10^4 CFU 的肺癌细胞株 TC-1 皮下注射小鼠, 注射后 7 d 小鼠出现可触诊的肿瘤, 此时用 1×10^9 CFU 疫苗对模型鼠滴鼻进行免疫治疗, 治疗后 14、21 d 各重复 1 次, 初次免疫治疗后 90 d 发现 25% (2/8) 治疗鼠的肿瘤消退, 75% (6/8) 治疗鼠的肿瘤体积明显缩小, 而对照组小鼠的肿瘤体积增大, 在 50 d 内全部死亡, 提示该疫苗对肺癌细胞株 TC-1 模型鼠具有较好的免疫治疗作用。

4 E7mm 蛋白重组乳球菌疫苗

E7 蛋白是一种致癌蛋白, 改变 E7 蛋白内的 2 个 C-X-X-C 基序, 可产生一种不稳定的蛋白, 命名为 E7 mm 蛋白。研究发现, E7mm 蛋白的转染活性明显下降, 比天然 E7 蛋白具有更好的免疫原性。Cortes-Perez 等^[19] 以 pBC209-E7mm 为模板扩增 E7mm 蛋白的编码基因, 插入 pVE5547 获得 pILC-WA_{M6}-SP_{USP45}-E7mm, 与 pGK 重组获得 pCWA_{M6}-SP_{USP45}-E7mm; 将其电穿孔转化乳酸乳球菌 NZ9000 株, 25 ng/mL 乳菌肽诱导 5 h, SDS-PAGE 证实重组菌表达分子量为 38 KDa 的 SP_{USP45}-E7-CWA_{M6} 融合蛋白; 免疫荧光发现重组菌的表面含有融合蛋白分子, 但未进行保护力的试验。

5 L1 蛋白重组乳球菌疫苗

HPV16 基因组的 L1 基因可编码 L1 蛋白, 它是主要衣壳蛋白, 可自身聚合成病毒样颗粒 (virus-like particles, VLPs)。Cortes-Perez 等^[20] 以 pCD-L1 为模板扩增 1 606 bp 的 L1 蛋白编码基因, 插入 pCR-TOPO 获得 pCR-L1, 与 pSEC-E7 重组获得 pSEC-L1; 将其电穿孔转化乳酸乳球菌 NZ9000 株, 1 ng/mL 乳菌肽诱导 1 h, SDS-PAGE 证实重组菌表达分子量为 60 KDa 的 PreL1 蛋白; 免疫电镜显示重组菌的表面存在直径 30~50 nm 的 VLPs。

Cho 等^[21]以 pGEM-L1 为模板扩增 L1 蛋白的编码基因,插入 pAM399 获得 pAMJ399-L1;将其电穿孔转化乳酸乳球菌 MG1363 株,培养 1 h, SDS-PAGE 证实重组菌表达分子量为 57 KDa 的 L1 蛋白;将 10^{10} CFU 疫苗口服免疫 BALB/c 鼠,初次免疫后 2、4 周各加强 1 次,初次免疫后 9~12 周发现免疫鼠的血清 IgG 升高,初次免疫后 9 周达较高水平(滴度 1 : 5 000),阴道 SIgA 抗体无明显变化;同时将 10^{10} CFU 疫苗口服免疫 BALB/c 鼠,初次免疫后 1、14、15、28 和 29 d 各加强 1 次,初次免疫后 9~12 周发现免疫鼠的血清 IgG 升高,初次免疫后 9 W 达较高水平(滴度 1 : 900),阴道 SIgA 抗体无明显变化,说明该疫苗可诱导小鼠产生有效的体液免疫应答。

6 结语

重组乳球菌疫苗具有下述优点:它是一种发酵工业长期使用的食品级益生菌,是一种公认为安全(generally regarded as safe, GRAS)的微生物,易培养,基因操作简便、可靠,转化效率高、重复性好。乳球菌是一种革兰阳性菌,不分泌内毒素,表达的外源蛋白不需纯化,可连同菌体直接服用。乳球菌通常不产生细胞外蛋白酶,不会在细胞外对分泌的外源蛋白进行降解;通常较少分泌自身蛋白,减少了载体自身蛋白对分泌的外源蛋白的干扰,外源蛋白既可在细胞内表达,也可在细胞壁进行表达,还可以分泌到细胞外进行表达;乳球菌不在胃肠道定植,很少产生免疫耐受。乳酸菌的伴随抗原是一种免疫佐剂,可提高重组乳球菌疫苗诱导的免疫应答;乳酸菌与微颗粒疫苗的大小相似,可将抗原递呈给肠黏膜组织的 M 细胞,诱导免疫应答。口服或滴鼻接种重组乳球菌疫苗可诱导宿主产生较强的黏膜免疫应答和系统性免疫应答。

重组乳球菌疫苗具有下述缺点:目前大部分乳球菌的表达载体常含有非食品级的基因片段,这将给乳球菌作为活菌微生态制剂带来安全隐患;尚未阐明重组乳球菌疫苗诱导小肠黏膜产生免疫应答的机制,尚未阐明重组乳球菌疫苗的表达调控机制,长期口服重组乳球菌疫苗并不能在宿主体内表达足量的抗原,长期低剂量口服重组乳球菌疫苗有可能诱导免疫耐受,重组乳球菌疫苗的效果评价仅限于体外试验和动物试验阶段。

随着分子生物学和分子免疫学技术的发展,进

一步筛选高表达能力的菌株可提高外源蛋白的表达水平。针对不同的蛋白表达方式采用不同的免疫途径,可提高重组乳球菌疫苗诱导的免疫应答。深入研究重组乳球菌疫苗分泌外源蛋白的调控机制;构建安全、高效的食品级表达载体;准确定位外源蛋白在重组乳球菌疫苗中的表达位置,使重组抗原与黏膜的免疫系统充分接触;实时定量检测重组乳球菌疫苗在宿主胃肠道表达的目的蛋白;合理控制重组乳球菌疫苗在胃肠道的存活时间,避免免疫耐受;开发合适的免疫佐剂,加强重组乳球菌疫苗诱导的免疫应答,阐明上述问题,重组乳球菌疫苗用于 HPV16 感染的免疫预防指日可待。

[参考文献]

- [1] Mercenier A, Müller-Alouf H, Grangette C. Lactic acid bacteria as live vaccines[J]. *Curr Issues Mol Biol*, 2000, 2(1):17-25.
- [2] Langella P, le Loir Y. Heterologous protein secretion in *Lactococcus lactis*: a novel antigen delivery system[J]. *Braz J Med Biol Res*, 1999, 32(2):191-198.
- [3] Kim YH, Han KS, Oh S, et al. Optimization of technical conditions for the transformation of *Lactobacillus acidophilus* strains by electroporation[J]. *J Appl Microbiol*, 2005, 99(1):167-174.
- [4] van der Guchte M, van der Vossen JM, Kok J, et al. Construction of a lactococcal expression vector: expression of hen egg white lysozyme in *Lactococcus lactis subsp. lactis* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1989, 55(1):224-228.
- [5] de Ruyter PG, Kuipers OP, de Vos WM. Controlled gene expression systems for *Lactobacillus lactis* with the food grade inducer nisin[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62(10):3662-3667.
- [6] Kleerebezem M, Beerthuyzen MM, Vaughan EE, et al. Controlled gene expression system for lactic acid bacteria: transferable nisin-inducible expression cassettes for *Lactococcus leuconostoc*, and *Lactobacillus spp.* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63(11):4581-4584.
- [7] Fu X, Xu JG. Development of a chromosome-plasmid balanced lethal system for *Lactobacillus acidophilus* with *thyA* gene as selective marker[J]. *Microbiol Immunol*, 2000, 44(3):551-556.
- [8] Boron PA, Benchmolm G, Lambert J, et al. Use of *alr* gene as a food-grade selection marker in lactic acid bacteria[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(11):5663-5670.
- [9] Platteeuw C, van Alen-Boerrigter I, van Schalkwijk S, et al. Food-grade cloning and expression system for *Lactococcus lactis*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62(3):1008-1013.
- [10] Gosalbes MJ, Esteban CD, Galán JL, et al. Intragrative food-

- grade expression system based on the lactose regulon of *Lactobacillus casei* [J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(11): 4822 - 4828.
- [11] Posno M, Heuvelmans PT, van Giezen MJ, et al. Complementation of the inability of *Lactobacillus* strains to utilize D-xylose with D-xylose catabolism-encoding genes of *Lactobacillus pentosus*[J]. Appl Environ Microbiol, 1991, 57(9):2764 - 2766.
- [12] Cortes-Perez NG, Bermúdez-Humarán LG, Le Loir Y, et al. Mice immunization with live *Lactococci* displaying a surface anchored HPV-16 E7 oncoprotein [J]. FEMS Microbiol Lett, 2003, 229(1):37 - 42.
- [13] Ribilles P, Benbouziane B, Langella P, et al. Protection against human papillomavirus type 16-induced tumors in mice using non-genetically modified lactic acid bacteria displaying E7 antigen at its surface[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2013, 97(3):1231 - 1239.
- [14] Bermúdez-Humarán LG, Langella P, Miyoshi A, et al. Production of human papillomavirus type 16 E7 protein in *Lactococcus lactis*[J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68(2):917 - 922.
- [15] Bermúdez-Humarán LG, Cortes-Perez NG, Le Loir Y, et al. Fusion to a carrier protein and a synthetic propeptide enhances E7 HPV-16 production and secretion in *Lactococcus lactis*[J]. Biotechnol Prog, 2003, 19(3): 1101 - 1104.
- [16] Bermúdez-Humarán LG, Cortes-Perez NG, Le Loir Y, et al. An inducible surface presentation system improves cellular immunity against human papillomavirus type 16 E7 antigen in mice after nasal administration with recombinant *Lactococci* [J]. J Med Microbiol, 2004, 53(Pt 3):427 - 433.
- [17] Bermúdez-Humarán LG, Cortes-Perez NG, Lefèvre F, et al. A novel mucosal vaccine based on live *Lactococci* expressing E7 antigen and IL-12 induces systemic and mucosal immune responses and protects mice against human papillomavirus type 16 induced tumors[J]. J Immunol, 2005, 175(11):7297 - 7302.
- [18] Li YJ, Li XP, Liu HH, et al. Intranasal immunization with recombinant *Lactococci* carrying human papillomavirus E7 protein and mouse interleukin-12 DNA induces E7-specific antitumor effects in C57BL/6 mice[J]. Oncol Lett, 2014, 7(2):576 - 582.
- [19] Cortes-Perez NG, Azevedo V, Alcocer-González JM, et al. Cell-surface display of E7 antigen from human papillomavirus type 16 in *Lactococcus lactis* and in *Lactobacillus plantarum* using a new cell-wall anchor from *Lactobacilli*[J]. J Drug Target, 2005, 13(2):89 - 98.
- [20] Cortes-perez NG, Kharrat P, Langella P, et al. Heterologous production of human papillomavirus type 16 L1 protein by a lactic acid bacterium[J]. BMC Res Notes, 2009, 2:167.
- [21] Cho HJ, Shin HJ, Han IK, et al. Induction of mucosal and systemic immune responses following oral immunization of mice with *Lactococcus lactis* expressing human papillomavirus type 16 L1[J]. Vaccine, 2007, 25(47):8049 - 8057.

(本文编辑:左双燕)