

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2026.02.004

含PD-1 B细胞表位的乙型肝炎病毒核心蛋白病毒样颗粒的制备及其抗结肠癌活性

谢诺彤^{1,2}, 曹鐸雨^{1,3}, 周丽⁴, 李玉林¹, 张楠⁵, 张新伟³, 王云龙^{1,3} (1. 河南省生物工程技术研究中心 靶向药物开发实验室, 河南 郑州 450121; 2. 郑州大学 生命科学学院, 河南 郑州 450001; 3. 郑州职业技术学院 生命科学学院, 河南 郑州 450121; 4. 河南省职工医院 内科, 河南 郑州 450002; 5. 河南省科学院 生物医学研究所, 河南 郑州 450046)

摘要 **目的:** 建立一种以乙型肝炎病毒核心蛋白(HBc)病毒样颗粒(VLP)为骨架, 嵌合PD-1 B细胞表位的重组颗粒蛋白, 研究其对小鼠结肠癌(CRC)的抑制效果。**方法:** 设计PD-1 HBc VLP质粒并导入BL21(DE3)获得重组PD-1 HBc VLP表达菌株后, 通过优化培养温度, 实现蛋白可溶性表达, 经硫酸铵沉淀、Sephrose 4 Fast Flow尺寸排阻层析和DEAE阴离子树脂层析纯化获得高纯度的PD-1 HBc VLP。采用电泳、WB、HPLC及电镜手段对其表达水平、蛋白纯度、颗粒形成率、形态特征及抗原结合活性等特征进行系统表征, ELISA测定免疫小鼠后的血清效价, 评价其免疫原性, 构建CT26细胞CRC小鼠移植瘤模型, 通过监测PD-1 HBc VLP治疗后小鼠体质量和肿瘤体积变化, 评估PD-1 HBc VLP抗肿瘤活性。**结果:** 在28 °C条件下, 可溶性目的蛋白表达量占总蛋白的10.27%, 多步纯化后目的蛋白纯度为(91.77 ± 0.62)%, 分子量为23 000, 电镜测定粒径为(31.90 ± 1.88) nm, 粒径仪测定粒径为(30.66 ± 0.62) nm, 多分散指数(PDI)为(0.18 ± 0.05)。WB结果显示, PD-1 HBc VLP重组蛋白可分别与HBc VLP抗血清和PD-1抗体结合。ELISA结果显示, 经PD-1 HBc VLP 3次免疫后, 第14天小鼠血清中总抗体效价为1:640 000, 其中抗PD-1的效价为1:40 000。抗肿瘤实验表明, PD-1 HBc VLP组小鼠的肿瘤抑制率为(27.99 ± 2.98)%, 对照组在45 d全部死亡, PD-1 HBc VLP组中位生存期延长20 d。**结论:** 成功制备了以HBc VLP为骨架, 嵌合PD-1 B细胞表位的PD-1 HBc VLP, 且对小鼠结肠癌有治疗效果。

关键词 PD-1; 病毒样颗粒; 结肠癌; B细胞表位; 乙型肝炎病毒核心蛋白

中图分类号 R730.3; R735.3 **文献标识码** A **文章编号** 1007-385x(2026) 02-0140-07

Preparation and activity identification of hepatitis B core protein virus-like particles containing PD-1 B cell epitopes

XIE Nuotong^{1,2}, CAO Xinyu^{1,3}, ZHOU Li⁴, LI Yulin¹, ZHANG Nan⁵, ZHANG Xinwei³, WANG Yunlong^{1,3} (1. Targeted Drug Development Laboratory, Henan Bioengineering Technology Research Center, Zhengzhou 450121, Henan, China; 2. School of Life Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan, China; 3. School of Life and Health, Zhengzhou Vocational and Technical College, Zhengzhou 450121, Henan, China; 4. Department of Internal Medicine, Henan Provincial Workers Hospital, Zhengzhou 450002, Henan, China; 5. Institute of Biomedicine, Henan Academy of Sciences, Zhengzhou 450046, Henan, China)

[Abstract] Objective: To establish a recombinant particle protein using hepatitis B core protein (HBc) virus-like particles (VLPs) as the scaffold, with chimeric incorporation of PD-1 B cell epitopes, and to investigate its inhibitory effect on colorectal cancer in mice. **Methods:** A PD-1 HBc VLPs plasmid was designed and introduced into *Escherichia coli* BL21 (DE3) to obtain recombinant PD-1 HBc VLPs-expressing strains. Soluble protein expression was achieved by optimizing the culture temperature. Subsequently, high-purity PD-1 HBc VLPs were obtained via a series of purification steps, including ammonium sulfate precipitation, size-exclusion chromatography, and anion-exchange chromatography. The expression level, protein purity, particle formation efficiency, morphological characteristics, and antigen-binding activity of the obtained PD-1 HBc VLPs were systematically characterized by electrophoresis, WB, high-performance liquid chromatography (HPLC), and transmission electron microscopy. Immunogenicity was evaluated by ELISA to determine serum antibody titers in immunized mice. CT26 colorectal carcinoma cell transplant tumor model was constructed in mice, and the anti-tumor activity of PD-1 HBc VLPs was further assessed *in vivo* by comparing tumor growth, body weight and tumor volume changes. **Results:** At 28 °C, the soluble target protein accounted for 10.27% of total protein. The target protein was purified using

基金项目 2023年度第二批省级科技研发计划(235200810052); 2024年河南省科技攻关项目(242102311221); 河南省高等学校重点科研项目(24B320020)

作者简介 谢诺彤, 硕士生

通信作者 王云龙(扫码获取作者通信方式)



Sepharose 4 Fast Flow molecular sieve and DEAE anion resin chromatography, with a purity of $(91.77 \pm 0.62)\%$ and a molecular weight of 23 000. The particle size measured by electron microscopy was (31.90 ± 1.88) nm, while particle size analyzer showed a particle size of (30.66 ± 0.62) nm, and the polydispersity index (PDI) was (0.18 ± 0.05) . WB analysis demonstrated that the recombinant PD-1 HBc VLPs could bind to anti-HBc VLPs serum and anti-PD-1 antibodies, respectively. ELISA results showed that on day 14 after the third immunization with PD-1 HBc VLPs, the total antibody titer in mouse serum reached 1:640 000, with an anti-PD-1 antibody titer of 1:40 000. Anti-tumor experiments showed that PD-1 HBc VLPs achieved a tumor inhibition rate of $(27.99 \pm 2.98)\%$ in mice with colorectal carcinoma. All mice in the control group died by day 45, whereas the median survival time (MST) in the PD-1 HBc VLPs group was prolonged by 20 days. **Conclusion:** PD-1 HBc VLPs containing PD-1 B cell epitopes were successfully prepared and demonstrated therapeutic efficacy against colorectal cancer in mice.

[Key words] PD-1; virus-like particle (VLP); colorectal carcinoma (CRC); B cell epitope; hepatitis B core protein (HBc)

[Chin J Cancer Biother, 2026, 33(2): 140-146. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2026.02.004]

结直肠癌(colorectal carcinoma, CRC)是起源于结肠或直肠黏膜上皮的恶性肿瘤,绝大多数由腺瘤性息肉逐步癌变形成。PD-L1在CRC表面异常高表达,其与PD-1的相互作用促进了CRC的免疫逃逸^[1],并与肿瘤的转移和患者的预后相关。PD-1单克隆抗体^[2]作为肿瘤免疫治疗的重要药物,已被批准应用于晚期黑色素瘤^[3]、非小细胞肺癌^[4]及肾细胞癌^[5]的治疗。PD-1单克隆抗体在CRC治疗中也展现出显著疗效,特别是针对传统一线治疗无应答的患者群体^[6]。但PD-1单克隆抗体的半衰期仅2~3周,需每3周大剂量静脉输注(≥ 200 mg)以维持血药浓度^[7]。长期反复给药不仅增加治疗成本,还可能诱发抗药物抗体,导致免疫耐受和疗效衰减^[8-9]。目前,新的癌症治疗方法已经取得显著成效:基于B细胞肽表位的免疫疗法抑制致癌信号通路,从而阻断肿瘤生长和转移^[10]。但多肽疫苗免疫原性弱^[11]的缺点限制了其进一步应用。为了解决这个问题,研究者们采用纳米颗粒制备多肽疫苗的载体以提高其免疫原性。乙型肝炎病毒核心蛋白(hepatitis B virus core protein, HBc)是由病毒衣壳蛋白组成的纳米笼结构的纳米粒子^[12-13]。HBc不含有病毒的遗传物质^[14],不具有致病性和感染性^[15-17]。其次HBc可以通过基因工程策略进行修饰,将肽段或蛋白序列直接插入或延伸到衣壳蛋白的一级氨基酸序列上,使其呈现在病毒样颗粒(virus-like particle, VLP)的表面^[18],从而有效激活免疫应答。该载体系统凭借其均一纳米结构、可控装配特性及灵活的可修饰性^[12, 19],展现出显著的临床转化潜力;此外,HBc蛋白固有的生物可降解性、优异生物相容性、适度免疫原性以及体外自组装/自调控特性^[13, 17, 20],使其在疫苗开发、靶向治疗等生物医学领域备受关注。本研究将PD-1抗原表位肽展示在HBc VLP载体表面,构建了PD-1 HBc VLP,探讨其表达纯化条件,并检测PD-1 HBc VLP在小鼠体内的免疫效果以及对CT26细胞小鼠CRC移植瘤模型的治疗效果。本研究阐明了PD-1 B细胞表位对抗肿

瘤的有效性,为CRC的治疗提供了一种新的思路。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

RPMI 1640培养基购自北京索莱宝科技有限公司, FBS购自浙江四季青生物科技有限公司,青霉素、链霉素购自美国赛默飞世尔科技公司,大肠埃希菌(*E. coli*)BL21(DE3)由河南省生物工程技术研究中心保存,酵母粉、蛋白胨购自英国OXOID公司,氯化钠、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、硫酸铵、考马斯亮蓝R250、Tris均购自国药集团化学试剂有限公司, HBc VLP抗血清由河南省生物工程技术研究中心提供,鼠源PD-1抗体购自百济神州有限公司。

Sepharose 4 Fast Flow柱、DEAE柱购自美国GE公司,超声波细胞破碎仪购自宁波新芝生物科技股份有限公司,高效液相色谱仪购自美国Waters公司,纳米粒度分析仪(马尔文)购自英国马尔文仪器有限公司,透射电子显微镜购自日本电子株式会社(由河南中医药大学提供),电泳仪购自美国伯乐公司,微量紫外分光光度计购自美国赛默飞世尔科技公司,恒温摇床购自上海世平实验设备有限公司。

小鼠CRC细胞CT26来源于河南省生物工程技术研究中心,细胞在RPMI 1640中培养,培养基中添加10%热灭活胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素,于37 $^{\circ}$ C,含5% CO₂的湿润环境中培养。

雌性6~8周龄BALB/c小鼠来源于海南斯克贝斯生物科技股份有限公司[动物质量合格证号:410983251100140421,实验动物生产许可证号:SCXK(豫)2020-0005]。所有实验动物在河南省中医药大学SPF级环境中饲养[实验动物使用许可证号:SYXK(豫)2021-0015]。所有动物实验均在河南省生物工程技术研究中心动物管理和使用委员会监督下进行(伦理审查编号:HNBCLL2023009)。

1.2 PD-1 HBc VLP大肠杆菌表达系统构建

将PD-1表位^[21](92-110)两端连接柔性连接子

(TSGSSGSGSGSGSGGGG), 插入HBc VLP的免疫显性区(78~79位氨基酸), 并删除了HBc VLP第144位氨基酸之后的序列, 以此获得目标氨基酸序列。将该序列经密码子优化后, 委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成相应基因片段, 并克隆至pET-28a(+)*Nde* I和*Xho* I酶切位点之间。将获得的质粒通过氯化钙转化法转化至*E.coli* BL21(DE3)中, 构建大肠杆菌表达系统, 并通过含卡那霉素的固体培养基筛选获得重组表达菌株。

1.3 PD-1 HBc VLP的表达与纯化

PD-1 HBc VLP菌种的可溶性表达条件探究。将重组质粒转化至*E.coli* BL21(DE3), 涂布平板, 挑取单克隆菌落于含卡那霉素(50 μg/mL)的LB培养基中于37℃活化, 分别于37℃、28℃诱导表达。表达完成后, 收集菌体, 加入10 mmol/L Tris-HCl缓冲液重悬, 冰水浴条件下300 W超声3 s, 暂停3 s, 超声破碎30 min, 4℃离心, 分别收集上清液和沉淀进行SDS-PAGE分离蛋白, 使用考马斯亮蓝R250染色液染色后使用脱色液脱色至底色透明后, 采用ImageJ对蛋白条带进行定量分析。

PD-1 HBc VLP菌种的培养与表达。随机挑取单克隆菌落, 接种于50 mL含卡那霉素(50 μg/mL)的LB培养基, 37℃、210 rpm培养至光密度(D_{600})值至1.00。按4%接种量转接至300 mL含卡那霉素(50 μg/mL) LB培养基, 同条件下培养至 D_{600} 值为1.00。再将此培养物按100%接种量全部转接至300 mL含卡那霉素(50 μg/mL) LB培养基, 均分后同条件下培养至 D_{600} 值为1.00。加入终浓度为0.2 mmol/L IPTG, 28℃、210 rpm诱导6 h。离心收集菌体, -20℃冻存。

PD-1 HBc VLP蛋白的纯化。取适量菌体沉淀, 于10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)按1:20的比例重悬菌体, 在冰水浴条件下, 超声破碎细菌(功率为300 W, 频率为3 s开、3 s关)30 min。离心弃沉淀。

向上清中分步加入饱和硫酸铵至终饱和度为10%、20%、30%、40%(硫酸铵)。不同硫酸铵浓度的上清液在冰水浴条件下搅拌10 min后, 离心后收集上清液及沉淀。各步沉淀分别用10 mL 10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)重悬, SDS-PAGE分析PD-1 HBc VLP蛋白在不同硫酸铵饱和度下的分布情况。

将目标沉淀重悬液上Sepharose 4 Fast Flow凝胶过滤层析柱。用10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)洗脱, 收集280 nm波长处检测到的(主要)洗脱峰所对应的组分, SDS-PAGE确认PD-1 HBc VLP峰。

合并目标组分上DEAE阴离子交换层析柱。先用10 mmol/L Tris-HCl平衡缓冲液洗脱, 再用含500 mmol/L NaCl的10 mmol/L Tris-HCl洗脱结合部分。

各组分进行SDS-PAGE分析。

1.4 PD-1 HBc VLP蛋白的鉴定

PD-1 HBc VLP蛋白的颗粒形成率检测。采用高效液相色谱(HPLC)对PD-1 HBc VLP进行纯度检测, 色谱柱为Ultrasphere 2000凝胶过滤色谱柱, 检测器为2998型紫外-可见光检测器(UV/Vis detector), 检测波长为280 nm。流动相为10 mmol/L Tris-HCl。在使用0.05%叠氮化钠溶液冲洗进样针及色谱柱后, 使用10 mmol/L Tris-HCl平衡后, 设置条件: 上样量20 μL, 流速0.6 mL/min, 检测时间30 min, 柱温25℃, 分析PD-1 HBc VLP蛋白颗粒形成效率。

PD-1 HBc VLP蛋白的粒径检测。将纯化后的蛋白样品稀释至0.3 mg/mL, 吸取1 mL的蛋白样品至干净的样品槽中, 通过纳米粒度分析仪(马尔文)对重组PD-1 HBc VLP进行粒径检测, 检测类别为数量分布(number particle size distribution, Number PSD)。

PD-1 HBc VLP蛋白的形态检测。采用负染色法对PD-1 HBc VLP进行染色, JEM-1400型透射电镜观察形态学特征。观察参数设定为加速电压100 kV、放大倍率200 000×。

PD-1 HBc VLP蛋白的免疫印迹检测。SDS-PAGE分离纯化后的蛋白, 在200 mA条件下, 转膜1 h将蛋白转印至PVDF膜上。5%脱脂奶粉封闭后, HBc VLP免疫小鼠的血清(1:5 000)和鼠源PD-1一抗(1:5 000)室温条件下作用2 h, HRP-羊抗鼠二抗(1:2 000)室温条件下作用2 h后使用DAB显色液显色。

1.5 PD-1 HBc VLP免疫BALB/c小鼠的体液免疫应答评价

6~8周龄雌性BALB/c小鼠($n=5$)经皮下注射接种PD-1 HBc VLP, 共免疫3次, 每次间隔2周, 每次50 μg。对照组注射等量PBS。每次免疫前及末次免疫7 d后通过尾静脉取血。间接ELISA法检测小鼠血清中抗体水平。ELISA板上分别包被PD-1 HBc VLP抗原及PD-1全长(100 ng/孔), 以经PD-1 HBc VLP免疫的小鼠血清作为一抗, 由1:100开始倍比稀释; 免疫前第0天小鼠的血清为阴性对照, 每孔加样100 μL, 37℃反应0.5 h, PBST洗板5次; 加入羊抗鼠HRP-IgG二抗(1:8 000)放至37℃反应0.5 h后取出, 倒掉样品及酶标结合物, PBST洗板5次; 随后每孔依次加入50 μL的显色底物A液和底物B液, 贴上封板膜放至37℃反应20 min; 最后每孔依次加入50 μL的终止液并立即用酶标仪检测450 nm处的D值。

1.6 PD-1 HBc VLP对CT26细胞小鼠移植瘤模型的作用评价

在小鼠腹部皮下注射 1×10^6 个/100 μL CT26肿瘤细胞, 构建小鼠CT26细胞异位移植瘤模型, 当小

鼠肿瘤的平均体积达到约 60 mm^3 时, 将小鼠随机分为 2 组 ($n = 5$): PBS 组、PD-1 HBc VLP 组, PBS 组每只小鼠注射 $100 \mu\text{L}$ PBS, PD-1 HBc VLP 组每只小鼠注射 $50 \mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ PD-1 HBc VLP, 每 7 天给小鼠皮下注射 1 次, 共注射 3 次。每次注射前测量各组荷瘤小鼠的体质量以及小鼠肿瘤的长径 (a) 和短径 (b), 计算每只小鼠的肿瘤体积 (V) = $a \times b^2/2$ 。

根据下列公式计算每组小鼠的抑瘤率: 抑瘤率 = (PBS 组肿瘤平均体积 - PD-1 HBc VLP 治疗组肿瘤平均体积) / PBS 组肿瘤平均体积 $\times 100\%$ 。

1.7 统计学处理

本研究采用 GraphPad Prism 10.0 统计软件进行数据处理与分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用重复测量双因素方差分析, 事后采用 Bonferroni 法进行组间多重比较, 生存分析采用对数秩检验, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

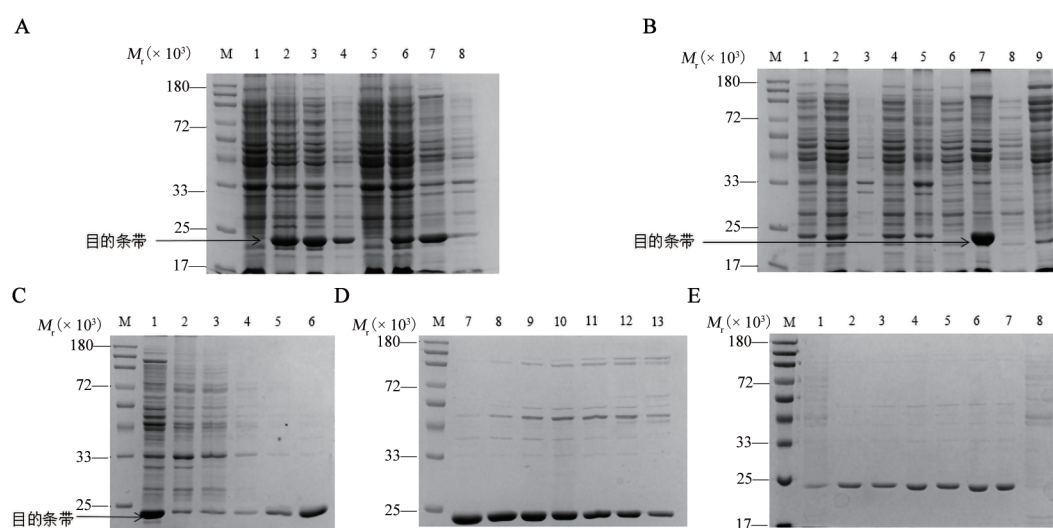
2 结果

2.1 低温诱导优化 PD-1 HBc VLP 可溶性表达

重组蛋白分别在 37°C 、 28°C 诱导表达 6 h, 超声破碎后通过 SDS-PAGE 分析上清液和沉淀中蛋白组成 (图 1A), 结果表明, 蛋白分子量约为 23 000; 在 37°C 诱导条件下 PD-1 HBc VLP 占菌体总蛋白的 14.46%, 其中可溶形式占目的蛋白的 67.07% (即可溶性目的蛋白占总蛋白的 9.70%); 在 28°C 诱导条件下 PD-1 HBc VLP 占菌体总蛋白的 11.18%, 其中可溶形式占目的蛋白的 91.86% (即可溶性目的蛋白占总蛋白的 10.27%)。

2.2 PD-1 HBc VLP 蛋白的表达和纯化

不同浓度硫酸铵盐析沉淀蛋白, 结果 (图 1B) 显示, 在 30% 的硫酸铵中 PD-1 HBc VLP 蛋白沉淀最多, 经 Sepharose 4 Fast Flow 尺寸排阻层析和 DEAE 阴离子交换层析柱进一步纯化后, PD-1 HBc VLP 纯度为 $(91.77 \pm 0.62)\%$ (图 1C-E)。



A: PD-1 HBc VLP 蛋白在不同温度下的诱导表达结果, 1 为 PD-1 HBc VLP 未诱导菌体总蛋白, 2~4 为 37°C 诱导后的 PD-1 HBc VLP 菌体总蛋白 (2)、破碎上清 (3) 和沉淀 (4), 5 为 PD-1 HBc VLP 菌种, 6~8 为 28°C 诱导后的 PD-1 HBc VLP 菌种 (6) 及破碎后收集的上清 (7) 和沉淀 (8); B: PD-1 HBc VLP 蛋白经硫酸铵沉淀粗提结果, 1 为 PD-1 HBc VLP 菌种经 37°C 诱导破碎后收集的上清, 2, 3 为 PD-1 HBc VLP 经 10% 硫酸铵沉淀后收集的上清 (2) 和沉淀 (3), 4, 5 为 PD-1 HBc VLP 经 20% 硫酸铵沉淀后收集的上清 (4) 和沉淀 (5), 6, 7 为 PD-1 HBc VLP 经 30% 硫酸铵沉淀后收集的上清 (6) 和沉淀 (7), 8, 9 为 PD-1 HBc VLP 经 40% 硫酸铵沉淀后收集的上清 (8) 和沉淀 (9); C: 尺寸排阻层析纯化 PD-1 HBc VLP, 1~6 为尺寸排阻层析纯化流出液 1~6 管; D: 尺寸排阻层析纯化 PD-1 HBc VLP, 7~13 为尺寸排阻层析纯化流出液 7~13 管; E: DEAE 纯化 PD-1 HBc VLP, 1~7 为 DEAE 纯化流出液 1~7 管, 8 为 500 mmol/L NaCl 洗脱部分。M: Marker (蛋白质分子量标准)。

图 1 PD-1 HBc VLP 蛋白电泳图

2.3 PD-1 HBc VLP 蛋白的表征

纳米粒度分析仪 (马尔文) 分析结果 (图 2A) 显示, PD-1 HBc VLP 粒径为 $(30.66 \pm 0.62) \text{ nm}$, 多分散指数 (polydispersity index, PDI) 为 0.18 ± 0.05 , 均一性良好。电镜结果 (图 2B) 显示, PD-1 HBc VLP 为规则的纳米颗粒, 粒径大小为 $(31.90 \pm 1.88) \text{ nm}$ 。HPLC

检测结果 (图 2C) 显示, PD-1 HBc VLP 的保留时间为 $(13.83 \pm 0.17) \text{ min}$, 符合 HBV 颗粒的保留时间, 且颗粒形成率为 $(92.97 \pm 1.62)\%$ 。

2.4 PD-1 HBc VLP 可以与 HBc VLP 抗血清及 PD-1 抗体结合

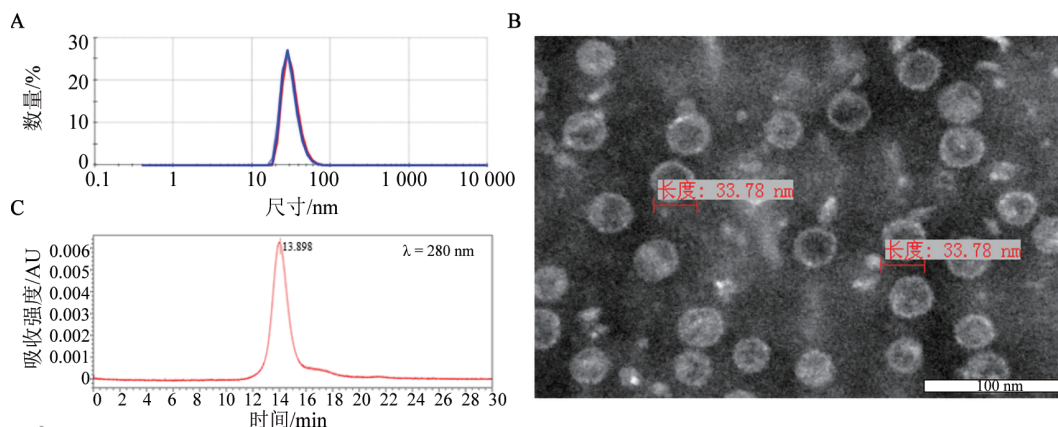
WB 实验结果 (图 3) 显示, PD-1 HBc VLP 纳米颗

粒可与HBc VLP抗血清及PD-1抗体结合,在23 000左右出现较清晰的特异性目的条带,与预期蛋白分子量大小相符,证明PD-1 HBc VLP成功展示HBc VLP和PD-1表位,且重组蛋白可与PD-1抗体结合。

2.5 PD-1 HBc VLP诱导小鼠产生高效价HBc VLP

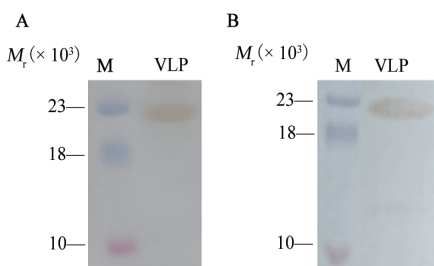
特异性抗体及PD-1抗体

ELISA检测经PD-1 HBc VLP免疫的小鼠血清中针对HBc VLP和PD-1的抗体水平,结果(图4A、B)显示,第3次免疫14 d后小鼠血清中HBc VLP抗体效价可达1:640 000,PD-1抗体效价可达1:40 000。



A:PD-1 HBc VLP蛋白粒径分析图;B:PD-1 HBc VLP蛋白电镜检测结果;C:PD-1 HBc VLP蛋白HPLC检测结果。

图2 PD-1 HBc VLP蛋白的表征

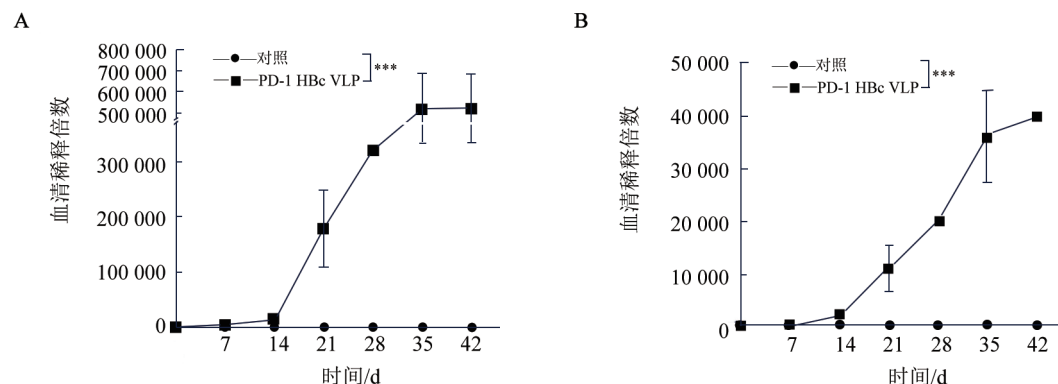


A:PD-1 HBc VLP与HBc VLP阳性血清免疫印迹分析; B:PD-1 HBc VLP与PD-1抗体免疫印迹分析。泳道VLP: PD-1 HBc VLP样品。M:Marker(蛋白质分子量标准)。

图3 PD-1 HBc VLP蛋白免疫印迹分析结果

2.6 PD-1 HBc VLP对小鼠体内CRC具有抑制作用

成功建立CT26皮下异位移植瘤模型,按治疗流程(图5 A)对荷瘤小鼠进行PD-1 HBc VLP接种治疗。与PBS组相比,在接受PD-1 HBc VLP后,肿瘤生长被抑制,治疗38 d时抑制率为 $(27.99 \pm 2.98)\%$ (图5 B);PD-1 HBc VLP组小鼠体质量较对照组上升缓慢,小鼠体质量在治疗过程中17 d时下降,可能与肿瘤压迫有关(图5 C);PBS组小鼠在45 d全部死亡,接受PD-1 HBc VLP治疗后延长了小鼠生存期20 d(图5D),说明PD-1 HBc VLP对小鼠体内CRC具有抑制作用。



ELISA检测PD-1 HBc VLP免疫后小鼠血清中抗HBc VLP抗体效价(A)及抗PD-1抗体效价(B)。

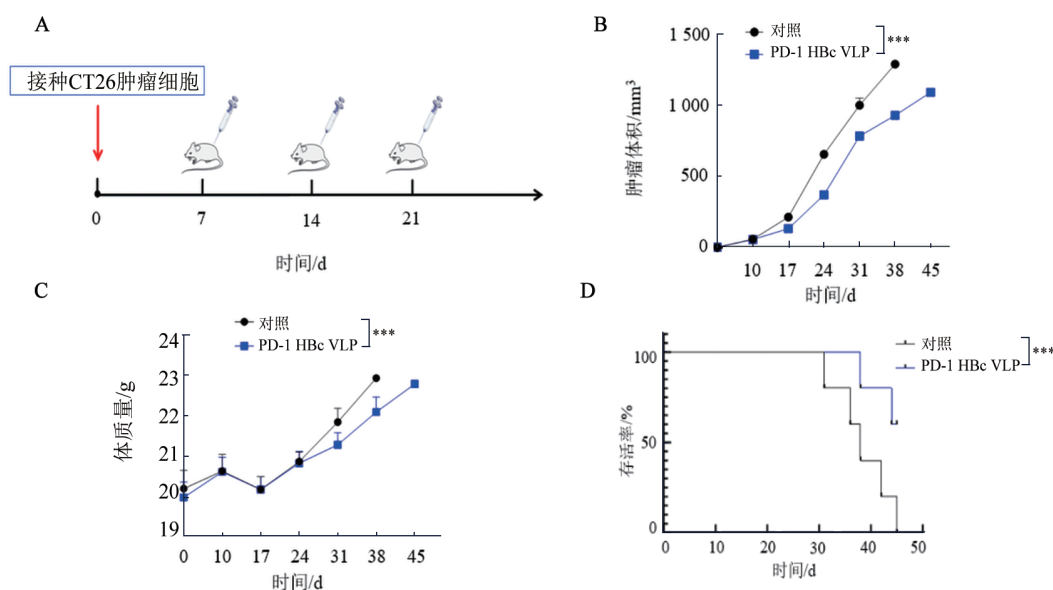
图4 抗体效价测定

3 讨论

2020年CRC全球新发病例约193万例, 占有类型癌症的10%, 其发病率位于恶性肿瘤发病率第3位^[22], 仅次于乳腺癌和肺癌。CRC的治疗仍以手术切除、放疗及化疗为主, 目前, 已上市的PD-1单克隆抗体药物在一定程度上提高CRC患者的生存率, 但由于其半衰期短、需频繁大剂量给药的问题限制了临

床应用^[7]。基于B细胞肽表位的免疫疗法为本研究提供了理论基础^[10]。

PD-1表位(92-110)在诱导抗体产生和抑制肿瘤生长中具有突出表现^[21], 本研究将该表位插入了HBc VLP的免疫显性区, 构建PD-1 HBc VLP重组蛋白。这种设计充分发挥HBc VLP的固有免疫原性优势, 通过模拟天然病毒颗粒增强抗原呈递效率, 显著提升机体对PD-1表位的免疫应答。



A: PD-1 HBc VLP 治疗方案; B: PD-1 HBc VLP 治疗小鼠移植瘤生长情况; C: 经 PD-1 HBc VLP 治疗后, 小鼠体质量变化趋势; D: 经 PD-1 HBc VLP 治疗, 小鼠生存情况。

图5 PD-1 HBc VLP 免疫治疗效果研究

本研究利用原核表达系统, 通过优化表达条件, 大量快速制备具备颗粒均一性、稳定的纳米结构, 以及与PD-1抗体的特异性结合能力的PD-1 HBc VLP重组蛋白。为了证明PD-1 HBc VLP的有效性, 我们在CRC小鼠移植瘤模型上进行了抑瘤实验, 结果显示PD-1 HBc VLP抑制了小鼠的肿瘤生长, 并延长了荷瘤小鼠的生存期, 为同类研究提供了技术借鉴。

本研究取得了初步成果, 但PD-1 HBc VLP作用机制仍需进行充分探索。因此, 未来研究将探索该重组蛋白通过何种机制抑制肿瘤生长, 包括抗原提呈细胞的激活、免疫细胞的浸润及细胞因子的分泌等。

综上所述, 本研究初步证实了PD-1 HBc VLP能够有效抑制小鼠CRC的发生和发展, 这些发现为HBc VLP作为疫苗抗原载体及PD-1 HBc VLP作为新型疫苗在治疗CRC的研究提供了借鉴, 使个性化肿瘤疫苗的设计有望突破现有疗法, 为癌症免疫治疗开辟新路径。

利益冲突声明: 所有作者均声明不存在利益冲突。

[参考文献]

- MESTRALLET G, BROWN M, VANINOV N, et al. Coordinated macrophage and T cell interactions mediate response to checkpoint blockade in colorectal cancer[PP/OL]. bioRxiv.(2025-02-17) [2026-05-07]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40027748/>.
- ZHANG S G, CHEN W Y, ZHOU J H, et al. The benefits and safety of monoclonal antibodies: implications for cancer immunotherapy [J]. J Inflamm Res, 2025, 18: 4335-4357. DOI:10.2147/jir.s499403.
- AMIR M, ALI KHAN Z, ASAD A, et al. Role of neoadjuvant pembrolizumab in advanced melanoma[J]. Semin Oncol, 2024, 51 (5/6): 161-162. DOI:10.1053/j.seminoncol.2024.09.001.
- FU J, YAN Y D, WAN X, et al. A network comparison on efficacy and safety profiling of PD-1/PD-L1 inhibitors in first-line treatment of advanced non-small cell lung cancer[J]. Front Pharmacol, 2025, 15: 1516735. DOI:10.3389/fphar.2024.1516735.
- BERLAND L, GABR Z, CHANG M, et al. Further knowledge and developments in resistance mechanisms to immune checkpoint inhibitors[J]. Front Immunol, 2024, 15: 1384121. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1384121.
- ZHANG H B, XIA Y, YU C Q, et al. Discovery of novel small-molecule inhibitors of PD-1/PD-L1 interaction via structural simplification strategy[J]. Molecules, 2021, 26(11): 3347. DOI:

- 10.3390/molecules26113347.
- [7] TANG C, HARTLEY G P, COUILLAULT C, et al. Preclinical study and parallel phase II trial evaluating antisense STAT3 oligonucleotide and checkpoint blockade for advanced pancreatic, non-small cell lung cancer and mismatch repair-deficient colorectal cancer[J]. *BMJ Oncol*, 2024, 3(1): e000133. DOI:10.1136/bmjonc-2023-000133.
- [8] MIDDHA P, THUMMALAPALLI R, QUANDT Z, et al. Germline prediction of immune checkpoint inhibitor discontinuation for immune-related adverse events[J]. *J Immunother Cancer*, 2025, 13(3): e011273. DOI:10.1136/jitc-2024-011273.
- [9] EZDOGLIAN A, TSANG-A-SJOE M, KHODADUST F, et al. Monocyte-related markers as predictors of immune checkpoint inhibitor efficacy and immune-related adverse events: a systematic review and meta-analysis[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2025, 44(1): 35. DOI:10.1007/s10555-025-10246-6.
- [10] GUO L L, OVERHOLSER J, DARBY H, et al. A newly discovered PD-L1 B-cell epitope peptide vaccine (PDL1-Vaxx) exhibits potent immune responses and effective anti-tumor immunity in multiple syngeneic mice models and (synergizes) in combination with a dual HER-2 B-cell vaccine (B-Vaxx) [J]. *OncoImmunology*, 2022, 11: 2127691. DOI:10.1080/2162402x.2022.2127691.
- [11] ZHANG Y, RU Y, ZHAO L H, et al. Ferritin and encapsulin nanoparticles as effective vaccine delivery systems: boosting the immunogenicity of the African swine fever virus C129R protein[J]. *Viruses*, 2025, 17(4): 556. DOI:10.3390/v17040556.
- [12] FENG W X, CHEN Z, WU L P, et al. A novel HBc-S230 protein chimeric VLPs induced robust immune responses against SARS-CoV-2[J]. *Int Immunopharmacol*, 2024, 143: 113362. DOI:10.1016/j.intimp.2024.113362.
- [13] LATIFI T, JALILVAND S, GOLSAZ-SHIRAZI F, et al. Characterization and immunogenicity of a novel chimeric hepatitis B core-virus like particles (cVLPs) carrying rotavirus VP8*protein in mice model[J]. *Virology*, 2023, 588: 109903. DOI: 10.1016/j.virol.2023.109903.
- [14] BERREIROS-HORTALA H, VILCHEZ-PINTO G, DIAZ-PERALES A, et al. Virus-like particles as vaccines for allergen-specific therapy: an overview of current developments[J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(13): 7429. DOI:10.3390/ijms25137429.
- [15] 赵梦杉, 吕熙, 王运航, 等. 猫疱疹病毒 1 型病毒样颗粒在酵母中的制备及体外组装[J]. *中国兽医科学*, 2024, 54(7): 866-872. DOI: 10.16656/j.issn.1673-4696.2024.0122.
- [16] WANG Z W, TANG S B, YUE N, et al. Development of HBc virus-like particles as modular nanocarrier by intein-mediated trans-splicing[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 534: 891-895. DOI:10.1016/j.bbrc.2020.10.081.
- [17] ZHAO Y W, LI Z F, ZHU X Y, et al. Improving immunogenicity and safety of flagellin as vaccine carrier by high-density display on virus-like particle surface[J]. *Biomaterials*, 2020, 249: 120030. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2020.120030.
- [18] NING W S, YAN S, SONG Y Y, et al. Virus-like particle: a nano-platform that delivers cancer antigens to elicit an anti-tumor immune response[J]. *Front Immunol*, 2025, 15: 1504124. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1504124.
- [19] PETROVSKIS I, SKRASTINA D, JANSONS J, et al. Toward a SARS-CoV-2 VLP vaccine: HBc/G as a carrier for SARS-CoV-2 spike RBM and nucleocapsid protein-derived peptides[J]. *Vaccines*, 2024, 12(3): 267. DOI:10.3390/vaccines12030267.
- [20] SUFFIAN I F B M, AL-JAMAL K T. Bioengineering of virus-like particles as dynamic nanocarriers for in vivo delivery and targeting to solid tumours[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2022, 180: 114030. DOI: 10.1016/j.addr.2021.114030.
- [21] BOJKO M, WĘGRZYN K, SIKORSKA E, et al. Design, synthesis and biological evaluation of PD-1 derived peptides as inhibitors of PD-1/PD-L1 complex formation for cancer therapy[J]. *Bioorg Chem*, 2022, 128: 106047. DOI:10.1016/j.bioorg.2022.106047.
- [22] 上海市抗癌协会大肠癌专业委员会. 结直肠癌早筛、早诊、早治上海方案(2023年版)[J]. *中国癌症杂志*, 2024, 34(1): 13-66. DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2024.01.002.

[收稿日期] 2025-08-07

[修回日期] 2025-11-07

[本文编辑] 邢一凡