

## 人乳头瘤病毒感染的细胞模型与动物模型

汪欣怡<sup>1</sup> 卜璋于<sup>2</sup>

<sup>1</sup>浙江中医药大学第四临床医学院, 杭州 310006; <sup>2</sup>西湖大学医学院附属杭州市第一人民医院皮肤科, 杭州 310006

通信作者: 卜璋于, Email: buzhyz@163.com

**【摘要】** HPV 感染会引起宫颈癌、生殖器疣等多种疾病, 严重危害人类健康。因此, 需要建立 HPV 体外感染模型来研究 HPV 相关疾病的发生发展和治疗策略。由于 HPV 感染具有高度的组织特异性及分化依赖性, 长期以来, HPV 无法在体外培养体系中复制扩增。近年来, HPV 体外培养模型取得了一些进展, 为 HPV 相关疾病的治疗和预防提供更有效的方法和策略。本文综述了目前常用的 HPV 感染细胞模型及动物模型。

**【关键词】** 乳头状瘤病毒感染; 细胞模型; 动物模型; 转基因动物; 体外

**基金项目:** 浙江省医药卫生科技计划 (2018KY578、2020RC095); 浙江省公益技术应用研究计划 (LGF19H110001); 杭州市社会发展科研自主申报项目 (20191203B94)

DOI: 10.3760/cma.j.cn331340-20230607-00093

### Cellular models and animal models of human papillomavirus infection

Wang Xinyi<sup>1</sup>, Bu Zhangyu<sup>2</sup>

<sup>1</sup>The Fourth School of Medicine Affiliated to Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310000, China;

<sup>2</sup>Department of Dermatology, Affiliated Hangzhou First People's Hospital, School of Medicine, Westlake University, Hangzhou 310006, China

Corresponding author: Bu Zhangyu, Email: buzhyz@163.com

**【Abstract】** HPV infection causes various diseases such as cervical cancer and genital warts, which seriously endanger human health. Therefore, it is necessary to establish an *in vitro* HPV infection model to study the occurrence, development, and treatment strategies of HPV-related diseases. Due to the high tissue specificity and differentiation-dependent nature of HPV infection, HPV has long been unable to replicate and amplify *in vitro* culture systems. In recent years, some progress has been made in the *in vitro* culture models of HPV, providing more effective methods and strategies for the treatment and prevention of HPV-associated diseases. This paper reviews the current commonly used cellular and animal models of HPV infection.

**【Key words】** Papillomavirus infections; Cellular model; Animal model; Transgenic animal; *In vitro*

**Fund program:** Zhejiang Medical Science and Technology Program (2018KY578, 2020RC095); Zhejiang Public Welfare Technology Application Project (LGF19H110001); Hangzhou Social Development Research Independent Application Project (20191203B94)

DOI: 10.3760/cma.j.cn331340-20230607-00093

HPV 是一种小型双链 DNA 病毒, 目前为止已经发现 200 多种亚型, 根据其致病性可分为高危型和低危型。高危型 HPV 病毒持续感染能引起子宫颈上皮内瘤变、导致宫颈癌的发生, 而低危型 HPV 感染主要引起良性生殖器疣。建立 HPV 体外感染模型有助于对 HPV 生物学、疾病进展和治疗的理解, 但由于 HPV 病毒的物种和组织特异性, 难以在体外培养

系统中复制和扩增, 长期阻碍了对 HPV 的深入研究<sup>[1]</sup>。然而, 近年来 HPV 的体外研究技术取得了重大进展, 这为探索 HPV 的治疗策略和疫苗研究提供了新的机遇和可能性。本文概述了目前 HPV 体外感染的细胞模型和动物模型。

#### 一、HPV 感染细胞模型

HPV 天然宿主细胞是人皮肤和粘膜的角质形成细胞, 然

而原代角质形成细胞传代有限,人永生化角质形成细胞是更好的选择。目前广泛应用的细胞系是近二倍体、自发永生化的人包皮角质形成细胞系(NIKS),它可以支持几种高危型 HPV 的生命周期,包括 HPV16、HPV18 和 HPV31 等<sup>[2]</sup>。另一广泛应用的细胞系是 HaCaT 细胞系,HaCaT 细胞很大程度上保留了终末分化的能力,可通过多种方式成功诱导分化,已经成功应用于多种皮肤病的体外研究。由于高危型 HPV 的基因组可以驱动其感染的细胞增殖<sup>[3]</sup>,在转染后保留在永生化角质形成细胞系以及原代角质形成细胞中繁殖,培养后可以重建病毒的完整生产生命周期<sup>[4]</sup>,因此高危型 HPV 更容易在细胞培养系统中建模。国内外研究者成功建立了支持高危型 HPV 完整生产生命周期的上皮细胞分化体外模型,并在癌症进展过程和病毒蛋白的研究中发挥作用<sup>[5-6]</sup>。低危型 HPV 在基底细胞层形成的病变细胞增殖有限,无选择性优势与生长优势,再加上在组织培养中传代细胞时难以确保 HPV 基因组的维持<sup>[7]</sup>。可见,不同型别 HPV 不同的生物学特性在一定程度上与病毒蛋白功能的差异有关,反映出感染后病毒基因表达和基因控制模式的显著差异<sup>[7]</sup>。建立模拟 HPV 感染的细胞模型有多种方法,包括基因转染法、实验性感染法和器官型上皮组织培养。

### 1. 基因转染法

目前,基因转染法是最常用的构建细胞模型的方法之一。在 HaCaT 细胞中,通常采用物理、化学、生物 3 种方式进行导入。物理介导中,电穿孔法被广泛使用,但实验条件控制较严、难度较大且细胞致死率高。生物介导则是利用包装了外源基因的病毒感染细胞,但携带基因不能太大,需考虑生物安全因素。化学转染法是当前应用最广泛的一种方法。其中,脂质体转染技术因其转染效率高、操作简便而易于实现,在体外进行转染试验中得到了广泛的应用。转染后既可检测瞬时表达,也可通过适当的筛选系统获取稳定携带有 HPV DNA 的细胞系。但是传统的转染法对 HaCaT 细胞的转染效果不佳。目前已有研究显示,利用离心技术可以有效地促进 HaCaT 细胞的基因转染<sup>[8]</sup>。

### 2. 实验性感染法

实验性感染是模拟 HPV 感染自然过程的一种方法,使用各种来源的 HPV 病毒颗粒在体外与宿主细胞共育。这种方式制备了许多应用广泛的细胞系,包括含有 HPV16 外显体基因组的 W12 和含有 HPV31 外显体的 CIN-612。这两种细胞系都是从低度宫颈肿瘤活检中分离出来的,与转染的 NIKS 细胞相比更接近人体自然感染状态,W12 细胞系被广泛用于了解导致肿瘤和癌症的细胞变化<sup>[9]</sup>。研究者从临床尖锐湿疣样本中分离出 HPV 病毒颗粒,并通过匀浆、常规离心

和过滤除菌等步骤,提取出病毒颗粒。研究显示,从临床尖锐湿疣组织中分离出 HPV6/11 微粒,能在一定的环境下进行 HaCaT 细胞感染<sup>[10]</sup>。

### 3. 器官型上皮组织培养

器官型上皮组织培养用于模拟分层上皮的结构与体内细胞生长环境,模拟 HPV 生命周期中的上皮细胞增殖和鳞状化生<sup>[10-11]</sup>,这种上皮培养物通常被称为“筏形”培养物<sup>[12]</sup>。通过在筏形培养物上培养携带 HPV 的角质形成细胞,可以模拟病毒完整的生产生命周期<sup>[13]</sup>。首先从供体组织(扁桃体、宫颈、包皮等)中分离出原始人类角质细胞(PHK),并在单层培养中生长和维持。然后将 HPV 基因组被整合进 PHKs 中,并用抗生素进行培养,在由胶原和人成纤维细胞组成的真皮等效物的培养基中继续浸没培养。4 d 后,将培养物提升到气液界面,并抬起。培养 12~21 d 后,组织学观察显示,HPV 阳性 PHKs 有明显的分化,并有空泡细胞和角化不全,上皮 L1 衣壳蛋白表达阳性,可见感染性病毒颗粒<sup>[14]</sup>。尽管器官型上皮组织培养为细胞提供一个接近体内生存条件的微环境,可以模拟细胞分化与 HPV 生命周期,但由于培养过程复杂,技术难度大且成功率低,不适合大规模的应用。

## 二、HPV 感染动物模型

由于具有严格的宿主特异性,HPV 只能感染人类上皮细胞,因此目前不存在自然感染形成的动物模型。然而,一些动物乳头瘤病毒在它们的自然宿主中表现出与恶性病变发展有关的特征。最早被研究的乳头瘤病毒感染动物模型是牛乳头瘤病毒(BPV),它能够引起乳头瘤,并在几个月后自然消退。棉尾兔乳头瘤病毒(CRPV)可导致家兔和棉尾兔感染,由 CRPV 引起的皮肤病变一般可以自然消退,但少数情况下会持续存在并发展成肿瘤<sup>[15]</sup>。因此,许多科研人员将 BPV 和 CRPV 作为研究乳头瘤病毒感染生命周期、潜伏期和致癌性的模型<sup>[16]</sup>。这些模型的构建对 HPV 感染过程、生命周期和致病机理的研究和疫苗的评估都有很大的意义。但是,由于其生物学、遗传学、免疫学和人体有很大的差别,以及试验材料的局限性,使其在临床上的应用受到很大的限制。因此,建立小鼠模型十分必要<sup>[17]</sup>。

### 1. HPV 假病毒建立动物感染模型

早期研究发现,HPV 基因的 L1 和 L2 衣壳蛋白组装成的假病毒,能够有效地将 DNA 递送至细胞中,为研究 HPV 感染与疫苗提供了强大的工具<sup>[18-19]</sup>,在此基础上,生产高滴度 HPV 假病毒感染小鼠的宫颈阴道上皮,构建动物感染模型<sup>[20-21]</sup>。完整的小鼠阴道上皮对 HPV 具有抗性,需通过物理破坏或化学破坏增加其对 HPV 假病毒的易感性。壬苯醇醚 9 (N-9)是一种非离子膜反应性表面活性剂,可以破坏动物和人

类生殖器上皮的正常结构,为假病毒感染小鼠生殖器上皮提供了重要条件<sup>[22]</sup>。HPV 假病毒动物感染模型的成功构建为病毒传染性研究、疫苗评价、感染抑制剂评价提供了有价值的研究工具,但由于假病毒感染模型只能研究感染的早期阶段,因此无法深入研究病毒的感染周期。

### 2. 裸鼠肾囊异种移植、表皮及皮下异种移植模型

裸鼠模型通常能满足肿瘤学和免疫学研究的需要。由于裸鼠自身免疫功能的不足,使得其体外感染 HPV 的活体移植不产生显著的排异性,因而成为 HPV 感染的模型动物,能够模仿人类自身的 HPV 感染<sup>[23]</sup>。1987 年,有研究者将新生儿包皮组织切片与尖锐湿疣提取液共培养,然后将其植入裸鼠的肾囊,移植后 3~5 个月,发现移植物上长出湿疣囊肿,并从中分离出 HPV11,这是首次在实验室中生产并纯化大量 HPV11<sup>[24]</sup>。

由于裸鼠肾囊异种移植模型无法在体外观察,研究者进一步提出了裸鼠表皮异种移植模型。将 HPV6 和 HPV11 感染的新鲜尖锐湿疣皮损组织移植于裸鼠皮下,5 周内移植皮块组织病理学表现显著的乳头瘤样增生及挖空细胞改变,成功构建了尖锐湿疣动物模型<sup>[25]</sup>。裸鼠表皮异种移植模型可以直接在裸鼠体表观察到移植物上的乳头瘤样增殖,这使得治疗和观察更加方便,成为该领域的一大进步。然而,该模型也有局限性,如不具有功能性免疫系统,无法产生有效的免疫应答,再如肿瘤通常植入异位(通常是皮下),而不是原位。此外,异种移植病变不是通过多步骤过程发展的,而是从一开始就表现出恶性表型,这与真正肿瘤的多样性不同。

### 3. 转基因动物模型

转基因技术是一种通过实验手段将外来基因引入动物基因组并确保其在动物体内表达的方法,能在动物层面监测基因表达的功能和表型效应,用来研究人类疾病的分子机制、组织病理学状况和治疗效果。1993 年,第一批 HPV 转基因小鼠被报道,研究者通过使用  $\alpha$ A 结晶蛋白或  $\beta$ -肌动蛋白基因启动子,将癌基因表达靶向晶状体或其他脱靶细胞群体,在细胞角蛋白 14 启动子的控制下,产生单独表达早期蛋白 E5、E6 或 E7 的小鼠,从而将基因表达靶向基底角质形成细胞<sup>[26]</sup>。HPV DNA 靶向基底角质形成细胞会在癌症患者中观察到相同位置产生损伤,从而更好地了解癌蛋白在患者体内的功能<sup>[27]</sup>。可见,转基因技术已成为研究 HPV 感染的一个重要工具,特别是人类角蛋白启动子在 HPV 动物模型中的广泛使用,加速了对 HPV 相关疾病的研究。然而,该方法也有一定的局限性,如病毒基因表达是由 K14 启动子而不是内源性乳头瘤病毒启动子调节,从而影响了雌激素等激素对病毒转录作用<sup>[28-29]</sup>。

### 三、结语

HPV 细胞模型与动物模型是 HPV 理化性质、相关疾病发病机理、抗 HPV 药物与疫苗的基础。HPV 细胞模型目前使用最广泛,利用基因转染技术,可以很容易获得 HPV 的 DNA,并对其阳性细胞进行富集,从而进一步研究其对特定基因及宿主细胞的作用:实验性感染方式更贴近 HPV 感染的本质,能在早期发现病毒与细胞的相互作用,以及抗体的中和和保护作用;器官型上皮组织培养能够很好地模拟人体中的细胞生长情况与 HPV 生命周期中的上皮细胞增殖和鳞状化。然而,由于细胞系及转染方式不同,HPV 的感染效果并不一致,无法模拟完整的 HPV 感染过程,与人的正常细胞感染区别较大。目前,最理想的体外 HPV 模型是动物模型。尽管它不能完整地反映出 HPV 与人类疾病之间的相互影响,但可为 HPV 的致病机理、感染的治疗提供一定的参考资料,更适合的细胞系、感染方式以及建立动物模型的方法有待今后更深入的研究。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

### 参 考 文 献

- [1] Doorbar J. Model systems of human papillomavirus-associated disease[J]. *J Pathol*, 2016, 238(2): 166-179. DOI: 10.1002/path.4656.
- [2] Baba S, Taguchi A, Kawata A, et al. Differential expression of human papillomavirus 16-, 18-, 52-, and 58-derived transcripts in cervical intraepithelial neoplasia[J]. *Virol J*, 2020, 17(1): 32. DOI: 10.1186/s12985-020-01306-0.
- [3] Rehm TM, Straub E, Forchhammer S, et al. Transcription properties of beta-HPV8 and HPV38 genomes in human keratinocytes[J]. *J Virol*, 2022, 96(23): e0149822. DOI: 10.1128/jvi.01498-22.
- [4] Graham SV. The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: A comprehensive review[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2017, 131(17): 2201-2221. DOI: 10.1042/CS20160786.
- [5] Bienkowska-Haba M, Luszczek W, Myers JE, et al. A new cell culture model to genetically dissect the complete human papillomavirus life cycle[J]. *PLoS Pathog*, 2018, 14(3): e1006846. DOI: 10.1371/journal.ppat.1006846.
- [6] Gao C, Wu P, Yu L, et al. The application of CRISPR/Cas9 system in cervical carcinogenesis[J]. *Cancer Gene Ther*, 2022, 29(5): 466-474. DOI: 10.1038/s41417-021-00366-w.
- [7] Graham SV. Keratinocyte differentiation-dependent human papillomavirus gene regulation[J]. *Viruses*, 2017, 9(9): 245. DOI: 10.3390/v9090245.
- [8] 徐云飞, 孟莎莎, 周卫辉, 等. 离心法增加 HaCaT 细胞的基因转染效率[J]. *中国细胞生物学学报*, 2018, 40(6): 999-1007. DOI: 10.11844/cjcb.2018.06.0028.
- [9] De Geest K, Turyk ME, Hosken MI, et al. Growth and differentiation of human papillomavirus type 31b positive human cervical cell

- lines[J]. *Gynecologic Oncol*, 1993, 49(3): 303-310. DOI:10.1006/gyno.1993.1131.
- [10] Wang Y, Li X, Song S, et al. Development of basal-like HaCaT keratinocytes containing the genome of human papillomavirus (HPV) type 11 for screening of anti-HPV effects[J]. *J Biomol Screen*, 2014, 19(8): 1154-1163. DOI: 10.1177/1087057114536987.
- [11] Barrila J, Crabbé A, Yang J, et al. Modeling host-pathogen interactions in the context of the microenvironment: Three-dimensional cell culture comes of age[J]. *Infect Immun*, 2018, 86(11): e00282-00218. DOI: 10.1128/IAI.00282-18.
- [12] Jackson R, Maarsingh JD, Herbst-Kralovetz MM, et al. 3D oral and cervical tissue models for studying papillomavirus host-pathogen interactions[J]. *Curr Protoc Microbiol*, 2020, 59(1): e129. DOI: 10.1002/cpmc.129.
- [13] Lee D, Norby K, Hayes M, et al. Using organotypic epithelial tissue culture to study the human papillomavirus life cycle[J]. *Curr Protoc Microbiol*, 2016, 41: 14B.8.1-14B.8.19. DOI: 10.1002/cpmc.4.
- [14] De Gregorio V, Urciuolo F, Netti PA, et al. *In vitro* organotypic systems to model tumor microenvironment in human papillomavirus (HPV)-related cancers[J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(5): 1150. DOI: 10.3390/cancers12051150.
- [15] Brandsma JL. The cottontail rabbit papillomavirus model of high-risk HPV-induced disease[J]. *Methods Mol Med*, 2005, 119: 217-235. DOI:10.1385/1-59259-982-6:217.
- [16] Cladel NM, Xu J, Peng X, et al. Modeling HPV-associated disease and cancer using the cottontail rabbit papillomavirus[J]. *Viruses*, 2022, 14(9): 1964. DOI: 10.3390/v14091964.
- [17] Xue XY, Majerciak V, Uberoi A, et al. The full transcription map of mouse papillomavirus type 1 (MmuPV1) in mouse wart tissues [J]. *PLoS Pathog*, 2017, 13 (11): e1006715. DOI: 10.1371/journal.ppat.1006715.
- [18] Wu X, Nie J, Wang Y. Pseudotyped virus for papillomavirus[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2023, 1407: 85-103. DOI: 10.1007/978-981-99-0113-5\_5.
- [19] Wang Y, Zhou Z, Wu X, et al. Pseudotyped viruses[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2023,1407:1-27. DOI: 10.1007/978-981-99-0113-5\_1.
- [20] Spurgeon ME, Uberoi A, McGregor SM, et al. A novel *in vivo* infection model to study papillomavirus-mediated disease of the female reproductive tract[J]. *mBio*, 2019, 10(2): e00180-00119. DOI: 10.1128/mBio.00180-19.
- [21] Medeiros-Fonseca B, Mestre VF, Estêvão D, et al. HPV16 induces penile intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma in transgenic mice: First mouse model for HPV-related penile cancer [J]. *J Pathol*, 2020, 251(4): 411-419. DOI: 10.1002/path.5475.
- [22] Baik S, Mehta FF, Unsal E, et al. Estrogen inhibits epithelial progesterone receptor-dependent progestin therapy efficacy in a mouse model of cervical cancer[J]. *Am J Pathol*, 2022, 192(2): 353-360. DOI: 10.1016/j.ajpath.2021.10.008.
- [23] Zottnick S, Voß AL, Riemer AB. Inducing immunity where it matters: Orthotopic HPV tumor models and therapeutic vaccinations[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1750. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01750.
- [24] Kreider JW, Howett MK, Leure-Dupree AE, et al. Laboratory production *in vivo* of infectious human papillomavirus type 11 [J]. *J Virol*, 1987, 61(2): 590-593. DOI:10.1128/jvi.61.2.590-593.1987.
- [25] 张菊, 高艳娥, 阎小君, 等. 建立人乳头瘤病毒 6,11 型感染皮损移植模型的研究[J]. *中国皮肤性病杂志*, 2002, 16(5): 293-295. DOI: 10.3969/j.issn.1001-7089.2002.05.003.
- [26] Cochicho D, Nunes A, Gomes JP, et al. Characterization of the human papillomavirus 16 oncogenes in K14HPV16 mice: Sublineage A1 drives multi-organ carcinogenesis[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(20): 12371. DOI: 10.3390/ijms232012371.
- [27] Mendonça F, Teles AM, Nascimento M, et al. Human papillomavirus modulates matrix metalloproteinases during carcinogenesis: Clinical significance and role of viral oncoproteins[J]. *In Vivo*, 2022, 36(6): 2531-2541. DOI: 10.21873/invivo.12990.
- [28] Santos C, Vilanova M, Medeiros R, et al. HPV-transgenic mouse models: Tools for studying the cancer-associated immune response [J]. *Virus Res*, 2017, 235:49-57. DOI: 10.1016/j.virusres.2017.04.001
- [29] de Oliveira Neto CP, Medeiros-Fonseca B, Estêvão D, et al. Differential incidence of tongue base cancer in male and female HPV16-transgenic mice: Role of female sex hormone receptors[J]. *Pathogens*, 2021, 10(10): 1224. DOI: 10.3390/pathogens10101224.

(收稿日期:2023-06-07)