

CD40L 融合改造后的人乳头瘤病毒 16 型 E7 基因 DNA 疫苗的构建及其免疫原性测定

王庆勇, 许于飞, 范东升, 彭清林, 张 婷, 许雪梅

中国医学科学院 北京协和医学院 基础医学研究所生物物理学系, 北京 100005

通信作者: 许雪梅 电话: 010-65296932, 电子邮件: xuemeixu@vip.sina.com

摘要: **目的** 研究针对人乳头瘤病毒 (HPV) 16 型的 DNA 疫苗, 测定其免疫原性, 用于治疗 HPV16 感染及感染相关恶性肿瘤。 **方法** 联合采用基因切割重排、定点突变及密码子优化等策略改造 HPV16 的转化基因 E7, 基因合成法获得改造后的 E7 基因 (*mE7*); PCR 法将 *mE7* 基因与 CD40L 胞外区编码序列融合, 然后以 pVR1012 为载体构建 pVR1012-*mE7* (*mE7*) 及 pVR1012-*mE7/CD40L* (*mE7/CD40L*) 表达质粒; 经肌肉免疫 C57BL/6 小鼠; ELISA 法检测 E7 特异性血清抗体水平, ELISPOT 法分析 E7_{49,57} (H-2b) 特异性分泌 IFN- γ 的 CD8⁺ T 细胞活化水平, 胞内染色 - 流式细胞检测分析 E7 特异性 CD4⁺ Th 细胞活化水平; 并在 C57BL/6 小鼠体内进行疫苗抗瘤活性检测。 **结果** 与野生型 E7 基因 (*wE7*) 相比, *mE7* 基因诱发产生的 E7 特异抗体水平 ($P < 0.01$)、分泌 IFN- γ 的 CD8⁺ T 细胞数目 ($P < 0.01$) 及 CD4⁺ Th 细胞活化水平 ($P < 0.05$) 均显著提高; 与 *mE7* 基因相比, *mE7/CD40L* 融合基因可进一步显著提高 E7 特异性分泌 IFN- γ 的 CD8⁺ T 细胞数目 ($P < 0.01$), 但对 E7 特异性抗体产生及 CD4⁺ Th 细胞活化水平没有明显影响。疫苗小鼠体内预防性免疫实验中, 经 *wE7* 免疫的小鼠接种瘤细胞后 2 周内全部形成移植瘤, 而所有经 *mE7* 及 *mE7/CD40L* 免疫的小鼠在瘤细胞攻击后第 7 周仍未见移植瘤形成; 疫苗体内治疗性免疫实验中, 小鼠在接种 *wE7* 后第 8 天左右全部形成移植瘤, 并呈渐进性生长, 而接种 *mE7* 的小鼠移植瘤清除率为 30%, 接种 *mE7/CD40L* 的小鼠移植瘤清除率增高至 45%。对移植瘤的组织学检查结果显示, *mE7/CD40L* 及 *mE7* 免疫组小鼠瘤细胞间及瘤组织周围可见大量淋巴细胞浸润, 而 *wE7* 组小鼠的瘤细胞呈编织状紧密排列, 未见有淋巴细胞浸润。 **结论** HPV16 型 *mE7/CD40L* 融合基因疫苗免疫小鼠后可诱发较强的 E7 特异性细胞免疫及体内抗瘤活性, 具有较强的免疫原性。

关键词: 人乳头瘤病毒; 子宫颈癌; DNA 疫苗; CD40 配体

中图分类号: R772.2; Q786 文献标识码: A 文章编号: 1000-503X(2007)05-0584-08

Linkage of Modified Human Papillomavirus Type 16 E7 to CD40 Ligand Enhances Specific CD8⁺ T-lymphocyte Induction and Anti-tumour Activity of DNA Vaccine

WANG Qing-yong, XU Yu-fei, FAN Dong-sheng, PENG Qing-lin, ZHANG Ting, XU Xue-mei

Department of Biophysics and Structural Biology, Institute of Basic Medical Sciences,
CAMS and PUMC, Beijing 100005, China

Corresponding author: XU Xue-mei Tel: 010-65296932, E-mail: xuemeixu@vip.sina.com

ABSTRACT: Objective To develop human papillomavirus (HPV) 16 DNA vaccine for the treatment of HPV16 infection and its related tumors. **Methods** HPV16 oncogene E7 was modified by combined approaches including insertion and replication of specific region of E7 gene, murine codon optimization, and point-mutation at transforming regions of the E7 protein. The resulting artificial gene, named as *mE7*, was obtained

by gene synthesis. The *mE7* gene was then genetically fused to murine *CD40 ligand* (*CD40L*) by overlapping PCR to form the *mE7/CD40L* fusion gene. The *mE7/CD40L* gene was inserted into pVR1012 plasmid and then immunized C57/BL6 mice intramuscularly. The E7-specific IFN- γ -secreting CD8⁺ T cells were analyzed with ELISPOT, and E7-specific antibody was measured by indirect ELISA. FACS assays were performed to analyze the activation of E7-specific Th cells. Mice were vaccinated, followed by tumor challenged or challenged before immunization. Tumor growth was observed. **Results** The *mE7* DNA vaccine elicited an increased E7-specific antibody level ($P < 0.01$), E7-specific IFN- γ -secreting CD8⁺ T ($P < 0.01$), and CD4⁺ T cells number ($P < 0.05$), compared with those of mice immunized with *wE7* gene. Furthermore, the *mE7/CD40L* DNA vaccine elicited an increased number of E7-specific IFN- γ secreting CD8⁺ T cell compared with that of mice immunized with *mE7* gene ($P < 0.01$); however, no significant differences were found between mice immunized with the *mE7* gene and *mE7/CD40L* fusion gene in the E7-specific antibody production and Th cell activation. In the preventive experiment, all mice received the *mE7* or *mE7/CD40L* remained tumor-free 7 weeks after challenges with TC-1 tumor cells, while the *wE7* group exhibited tumor growth within 2 weeks. In the therapeutic experiment, all the mice in the *wE7* group exhibited tumor growth within 8 days, while among mice receiving the *mE7* and *mE7/CD40L*, 30% and 45% of mice remained tumor-free after TC-1 challenge, respectively. HE staining of tumor tissues showed copious lymphocytes infiltration around tumor cells in *mE7* and *mE7/CD40L* mice with regression of tumor growth. **Conclusions** The *mE7* DNA vaccine increases the E7-specific humoral and cellular immune responses, and the fusion of *CD40L* to *mE7* gene enhances the specific immune responses and anti-tumor effects against HPV16 E7-expressing murine tumors. *mE7/CD40L* may therefore be a suitable and promising target for HPV16 therapeutic vaccine.

Key words: human papillomavirus; cervical cancer; DNA vaccine; CD40 ligand

Acta Acad Med Sin, 2007, 29(5): 584–591

宫颈癌是全球第 2 位高发妇科恶性肿瘤, 每年约有 47 万新发病例, 23 万死亡病例, 其中 80% 在发展中国家。我国是宫颈癌的高发区, 中西部落后地区的发病率与死亡率几十年来居高不下, 死亡率高达 30/10 万。近来研究显示, 我国宫颈癌发病率有进一步增高趋势, 且发病年龄趋于年轻化^[1]。已知慢性持续性高危型人乳头瘤病毒 (human papillomavirus, HPV) 感染是宫颈癌等多种恶性肿瘤发生的主要诱因^[2,3], 在我国, 有 79.6% 的宫颈癌患者 HPV16 感染为阳性^[4]。目前, HPV 预防性疫苗已经上市, 但从中受益还需时日, 而且对于已经感染 HPV 且出现病变的患者, 预防性疫苗作用不大。因此, 研制出具有较强免疫原性和抗肿瘤活性的治疗性 HPV 疫苗意义重大。

肿瘤及慢性持续感染疾病的免疫治疗需要反复多次免疫干预, 由于 DNA 疫苗不会产生针对载体的自身抗体, 故反复多次应用不会降低疫苗的免疫效果。此外, DNA 疫苗可诱发包括细胞免疫在内的全面的免疫反应, 因此在抗感染和抗肿瘤等领域发展迅速。研究显示, HPV16 E7 蛋白持续表达是上皮细胞恶性转化和维持恶性特征所必需的, 可诱导机体

产生病毒特异性排斥反应^[5~8], 但 HPV16 E7 基因是病毒的主要转化基因, 对人体具有潜在致癌性, 所以消除 E7 癌蛋白的转化活性十分必要。本研究采用定点突变方法消除了 HPV 16 E7 癌蛋白转化活性相关位点 (Rb 结合区及 2 个锌指结合区)^[9~11], 基因切割重排、密码子优化等策略改造 E7 基因, 并用基因合成法获得改造后的基因 *mE7*。为进一步提高 *mE7* 基因疫苗的免疫原性, 本研究还将 *CD40* 配体 (*CD40 ligand*, *CD40L*) 与 *mE7* 基因融合构建成 *mE7/CD40L* 融合基因疫苗, 并经小鼠实验证实该疫苗具有较强的免疫原性, 有望应用于临床。

材料和方法

质粒 定点突变消除 E7 蛋白转化活性相关位点, 具体为: 在锌指结合区引入 2 个点突变, 分别是 C61G 和 C93G; Rb 结合区 DLYCYEQ 引入 3 个点突变点, 即 DLYCYEQ→DGYGYGQ。为进一步破坏 E7 蛋白转化活性, 将切割位点选在第 1 个锌指结合区 [第 60 位及 61 位氨基酸之间 (60K/C61)] 及 CK-II 激酶作用

位点(两个丝氨酸之间31S/S32)^[12],将E7基因“切割”成3段,依次命名为a、b、c,然后按abbc规律重新排列;最后采用哺乳动物偏爱的密码子对其进行密码子优化。由上海生工生物工程技术有限公司合成经定点突变、基因切割重排、密码子优化等策略改造后的HPV16 E7基因,命名为mE7,将mE7基因克隆到pVR1012载体上,构建pVR1012-mE7真核表达质粒。

以鼠源CD40L基因(美国华盛顿大学Michael教授惠赠)为模板,采用PCR方法扩增CD40L胞外区编码序列(47-260 aa)。先用Overlap PCR法将Igκ链信号肽序列按正确的读码框架融合在mE7的N末端,然后采用Overlap PCR法将含Igκ链信号肽序列mE7和CD40L胞外区融合获得mE7/CD40L融合基因,构建pVR1012-mE7/CD40L真核表达质粒,经酶切及DNA测序验证无误。pVR1012-CD40L和pVR1012-wE7由本室构建保存^[13]。pVR1012-mE7及pVR1012-mE7/CD40L真核表达质粒用Lipofectamine 2000(Invitrogen)脂质体瞬时转染NIH3T3细胞,用1:3 000稀释的抗HPV16 E7多抗(新疆大学张富春教授惠赠)或抗CD40L单克隆抗体(eBioscience公司)进行Western blot印迹杂交,均获正确表达。

动物免疫 6~8周龄雌性C57BL/6小鼠40只,购自中国医学科学院实验动物研究所,随机分为5组,每组8只,于小鼠双侧股四头肌内分别注射pVR1012(Control)、pVR1012-CD40L(CD40L)、pVR1012-wE7(wE7)、pVR1012-mE7(mE7)及pVR1012-mE7/CD40L(mE7/CD40L)质粒各50 μg。即在免疫前24 h经小鼠双侧股四头肌分别注射5 mg/ml的盐酸布比卡因50 μl,免疫时先用戊巴比妥钠(75 mg/kg)腹腔注射麻醉小鼠,然后在预处理的双侧股四头肌内分别注入50 μg质粒DNA,共免疫2次,间隔1周。最后一次免疫2周后取免疫血清用于E7特异性抗体检测,同时取小鼠脾细胞用于特异性T细胞的活化情况的检测。

ELISA检测血清特异性抗体水平 向ELISA板中加入1 μg/ml原核表达的E7蛋白(100 μl/孔),4℃过夜。封闭后,加入1:20稀释后的免疫血清(100 μl/孔),阳性对照组加入1:2 000稀释的E7抗血清,室温孵育2 h。用含0.05% Tween-20的PBS洗涤多次后,加入1:3 000稀释的HRP标记山羊抗鼠IgG(100 μl/孔),37℃孵育1~2 h。加入邻苯二胺(OPD)底物溶液,室温闭光显色反应10~15

min。每孔加入50 μl 2 mol/L H₂SO₄终止液后,用酶标仪于490 nm波长检测其光密度。

ELISPOT检测分泌IFN-γ的CD8⁺T细胞活化情况 第2次免疫后2周,取小鼠脾脏,在无菌环境下将脾脏碾碎后,用红细胞裂解液裂解红细胞,再用含5%胎牛血清、100 U/ml青霉素、100 μg/ml链霉素的DMEM培养基洗涤3次,最后用含10%胎牛血清、100 U/ml青霉素、100 μg/ml链霉素、2 mmol/L非必需氨基酸、50 μmol/L 2-ME、50 U/ml IL-2的IMDM培养基将脾细胞浓度调节为3×10⁶/ml。采用BD PharMingen公司ELISPOT试剂盒,向ELISPOT板中每孔加入100 μl浓度为5 μg/ml的抗小鼠IFN-γ单抗,4℃孵育过夜。封闭后,每孔加入100 μl的3×10⁶/ml脾细胞,设3个复孔,加入5 μg/ml H-2D^b限制性HPV16 E7₄₉₋₅₇肽(RA-HYNIVTF)^[14],于37℃、5% CO₂的条件下孵育40 h。洗涤后,每孔加入100 μl浓度为2.5 μg/ml生物素标记的IFN-γ单抗,4℃过夜。洗涤后,每孔加入1:100稀释的辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素100 μl,室温孵育1 h。0.05% PBS-T洗4遍,PBS洗3遍后,每孔加入100 μl AEC底物溶液,当斑点形成后,用双蒸水冲洗,终止底物反应,空气中干燥后,用CTL公司ImmunoSpot[®] ELISPOT分析仪进行结果分析。

胞内染色-流式细胞仪分析特异性CD4⁺T细胞活化情况 采用BD PharMingen公司Cytotfix/Cytoperm Plus with GolgiStop[™]试剂盒。向24孔板中每孔加入2 ml浓度为3×10⁶/ml的小鼠脾细胞悬液,再加入3 μg/ml E7₃₀₋₆₇肽于37℃、5% CO₂的条件下孵育20 h,每孔加入2 μl的1:30稀释后的BD GolgiStop,继续培养6 h。将细胞收集后,用含有1%胎牛血清的PBS洗涤1次,加入20 μg/ml的FITC标记的抗小鼠CD4单抗(BD PharMingen),冰浴30 min。洗涤1次后,用BD Cytotfix/Cytoperm溶液处理30 min。用1×Perm/Wash溶液洗涤后,加入20 μg/ml的PE标记抗小鼠IFN-γ(BD PharMingen)抗体,冰浴30 min。1×Perm/Wash溶液洗3次后,用500 μl含1%胎牛血清的PBS重悬细胞,用Beckman细胞流式分析仪进行分析。

TC-1细胞培养 TC-1细胞系来源于鼠C57BL/6的肺上皮细胞,是共转染HPV16 E6/E7和活化的c-H-ras基因后得到的稳定表达HPV16 E6/E7的癌细胞株,本室保存。用含10 mmol/L HEPES、2 mmol/L L-谷氨酰胺、1.0 mmol/L 丙酮酸钠、2.0 mmol/L非必需氨基酸、0.8 mg/ml G418和10%胎牛血清的RPMI

1640 完全培养液在 37℃、5% CO₂ 条件下培养。

体内肿瘤预防性实验 取 6~8 周龄雌性 C57BL/6 小鼠 50 只, 随机分为 5 组, 每组 10 只, 于双侧股四头肌内分别注射 pVR1012 (Control)、pVR1012-CD40L (CD40L)、pVR1012-wE7 (wE7)、pVR1012-mE7 (mE7) 及 pVR1012-mE7/CD40L (mE7/CD40L) 质粒各 50 μg, 免疫 2 次, 间隔 1 周。最后一次免疫后 7 d 时, 用 7.5×10^4 个 TC-1 细胞皮下接种攻击, 随后每周 2 次观察肿瘤生长情况。

体内肿瘤治疗性实验 取 6~8 周龄雌性 C57BL/6 小鼠 50 只, 随机分为 5 组, 每组 10 只, 先在小鼠皮下接种 7.5×10^4 个 TC-1 细胞, 3 d 后在小鼠双侧股四头肌内分别注射 pVR1012 (Control)、pVR1012-CD40L (CD40L)、pVR1012-wE7 (wE7)、pVR1012-mE7 (mE7) 及 pVR1012-mE7/CD40L (mE7/CD40L) 质粒各 50 μg, 共免疫 2 次, 间隔 1 周, 随后每周 2 次观察肿瘤生长情况。

瘤组织切片 HE 染色 将体内肿瘤治疗性实验中对对照组小鼠及移植瘤显著消退的 mE7 及 mE7/CD40L 免疫组小鼠处死后, 快速分离肿瘤, 用福尔马林固定后送病理科制成石蜡切片, HE 染色后置于显微镜下观察。

统计学处理 采用 SPSS 统计软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

结 果

E7 特异性 CD8⁺ T 细胞活化情况分析 mE7 免疫组鼠脾细胞中 E7 特异分泌 IFN-γ 的 CD8⁺ T 细胞数目高出 wE7 免疫组 2 倍多, 差异有显著性 ($P = 0.003$)。与 mE7 免疫相比, mE7/CD40L 基因免疫可进一步显著提高 E7 特异性分泌 IFN-γ 的 CD8⁺ T 细胞的数目 ($P = 0.00008$), 高出 wE7 免疫组 7 倍多, 差异有显著性 ($P = 0.00002$) (图 1)。

E7 特异性 CD4⁺ T 细胞活化情况分析 mE7 免疫组小鼠脾细胞分泌 IFN-γ 的 CD4⁺ T 数目显著高于 wE7 免疫组及 CD40L 对照组 ($P < 0.05$), 但 mE7 免疫组与 mE7/CD40L 免疫组小鼠脾细胞分泌 IFN-γ 的 CD4⁺ T 数目间差异没有显著性 ($P > 0.05$) (图 2)。

免疫血清抗体滴度测定 与 wE7 基因免疫相比, mE7 基因免疫和 mE7/CD40L 融合基因免疫小鼠血清中诱产生的 E7 特异性抗体水平显著高于 wE7 基因免疫组 ($P < 0.01$), 但是 mE7 与 mE7/CD40L 免疫

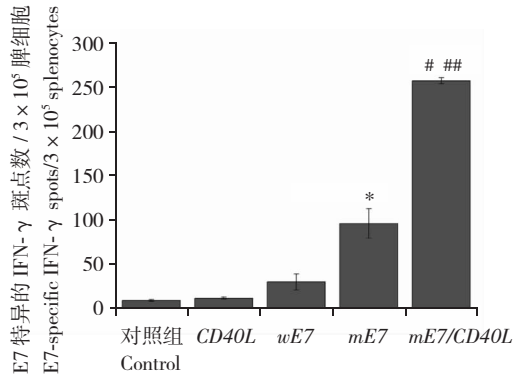


图 1 ELISPOT 分析各免疫组中 E7 特异性的 CD8⁺ T 细胞的活化情况

Fig 1 ELISPOT analysis of E7-specific IFN-γ-producing CD8⁺ T cell precursors in mice vaccinated with various recombinant DNA vaccines

与 wE7 组相比, $*P = 0.003$; 与 wE7 组相比, $\#P = 0.00002$; 与 mE7 组相比, $\#\#P = 0.00008$
 $*P = 0.003$ compared with wE7; $\#P = 0.00002$ compared with wE7; $\#\#P = 0.00008$ compared with mE7

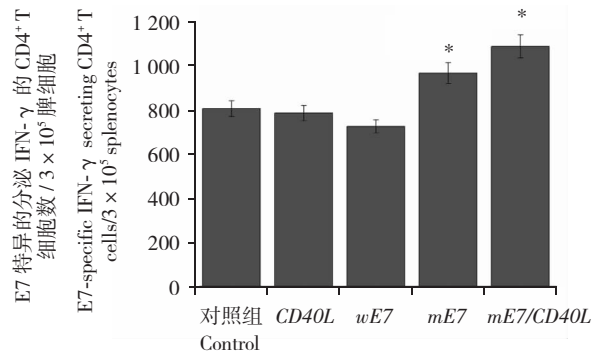


图 2 FACS 法分析各免疫组中 E7 特异性的 CD4⁺ T 细胞的活化情况

Fig 2 Flow cytometry analysis of E7-specific IFN-γ-secreting CD4⁺ T cells in mice vaccinated with various recombinant DNA vaccines

与 wE7 免疫组及 CD40L 对照组相比, $*P < 0.05$
 $*P < 0.05$ compared with wE7 and CD40L

组间的抗体水平差异无显著性 ($P > 0.05$) (图 3)。

疫苗体内抗瘤活性的检测 体内肿瘤预防性实验结果显示, 实验结束时 (即瘤细胞接种后第 7 周时), 所有 mE7 及 mE7/mCD40L 免疫组小鼠均未见移植瘤形成, 而对照组及 wE7 免疫组小鼠在瘤细胞接种后 2 周内全部形成移植瘤 (图 4)。肿瘤治疗性实验结果显示, 在瘤细胞接种后第 8 天左右, 所有对照组及 wE7 免疫组小鼠均有移植瘤形成, 并呈渐进性生长; mE7 免疫组小鼠部分成瘤, 移植瘤清除

率为 30%，*mE7/CD40L* 免疫组小鼠移植瘤清除率进一步增高至 45%（图 5）。对 *mE7/CD40L* 及 *mE7* 免疫组小鼠渐进性缩小移植瘤的组织学观察结果显示，瘤细胞间及肿瘤组织周围可见大量淋巴细胞浸润，而对照组小鼠移植瘤中瘤细胞呈编织状紧密排列，未见有淋巴细胞浸润（图 6）。

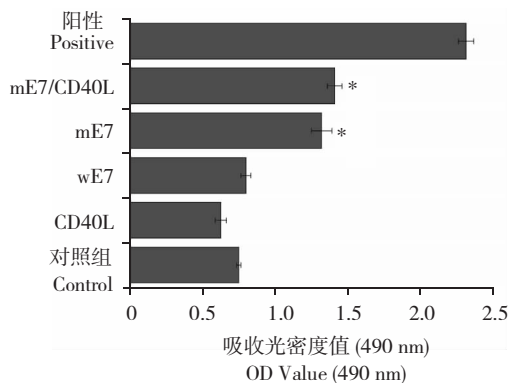


图 3 小鼠免疫血清 E7 特异性抗体水平的检测
 Fig 3 ELISA analysis of the productions of E7-specific antibodies in the sera of mice vaccinated with various recombinant DNA vaccines

与 *wE7* 组相比，* $P < 0.01$

* $P < 0.01$ compared with *wE7*

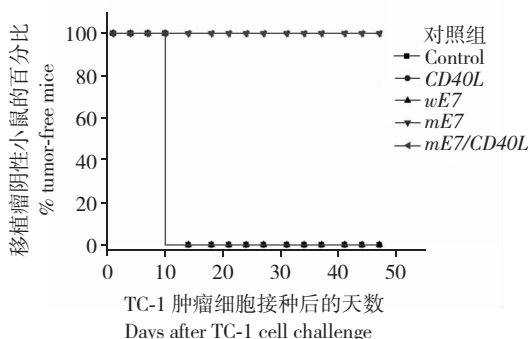


图 4 疫苗体内肿瘤的免疫预防实验
 Fig 4 *In vivo* immunologic prevention of tumors

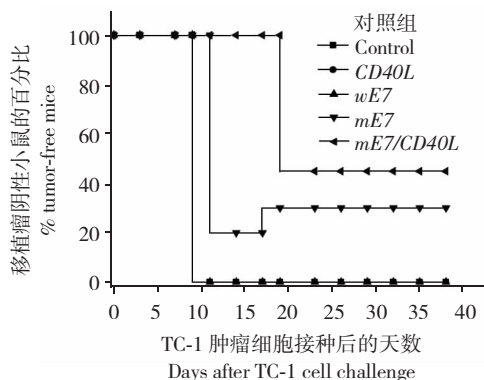


图 5 疫苗体内肿瘤的免疫治疗实验
 Fig 5 *In vivo* immunologic treatment of tumor

讨 论

研究显示，采用定点突变法敲除与 E7 蛋白转化活性密切相关的活性位点，如 pRB 结合区或锌指结合区，均可消除 E7 蛋白转化活性，表明 E7 蛋白的转化活性取决于 pRB 结合区是否存在及 E7 蛋白是否可通过其自身的锌指结合区形成同源二聚体^[10,11]。如将 E7 基因人为切割后，再在保留 E7 蛋白所有可能的 T 细胞表位前提下，将 E7 的亚基因片段进行重排或重复插入某些亚基因片段形成人工假基 *mE7*，其转化活性也随之丧失^[14~16]。本研究在定点突变与 E7 癌蛋白转化活性相关的活性位点，如 Rb 结合区及 2 个锌指结合区的基础上，采用了基因切割后重排及亚基因片断插入策略。此外，为进一步破坏 E7 蛋白转化活性，将切割位点选在第 1 个锌指结合区及 CK-II 激酶作用位点，因为该位点中的 31、32 位丝氨酸突变和缺失可导致 E7 转化活性的部分缺失^[12]。由此顺序形成 3 个人为分割的 E7 亚基因片断 a、b 和 c，然后按 abbc 方式重排形成 *mE7*，因此该人工 E7 假基因完全丧失了 E7 蛋白所需的各种物质基础。由于特异性细胞免疫的诱发取决于主要组织相容性复合物（major histocompatibility complex, MHC）I 及 MHC II 分子对其限制性线性抗原表位的有效呈递，而与抗原是否以完整的天然蛋白形式存在无关，因此基因切割重排对于改造癌蛋白基因，并将其应用到疫苗研究具有特别的意义。

已知 E7 基因的免疫原性很弱，为此人们通过各种方法对 E7 基因疫苗的免疫原性进行强化，主要有 4 种方法：（1）对 E7 基因本身进行改造。E7 的 Rb 结合区定点突变后可形成 E7GGG DNA 疫苗，在消除 E7 基因转化活性的同时还可显著提高疫苗的免疫原性^[11]。由于 E7 的 Rb 结合区除了结合降解 Rb 外，还可下调树突状细胞（dendritic cell, DC）细胞抗原呈递功能，因此 E7GGG DNA 疫苗免疫原性的增强可能与 E7GGG 蛋白丧失了对 DC 细胞抗原呈递功能的抑制有关^[17]。此外 Shi 等^[10]研究发现，单独突变 E7 的锌指结合区可通过降低 E7 蛋白稳定性利于抗原的加工和呈递机制来增强疫苗免疫原性。（2）将所有可能的 E7 特异性 CTL 表位或是 Th 表位人为连接起来形成 Mini-epitopes 基因疫苗。该类疫苗在动物体内可显示出较好的免疫原性^[18]，但该类疫苗呈递的抗原肽受 MHC 分子限制，人体应用受限。（3）采

用多种方法提高 E7 基因疫苗的抗原表达水平。如通过在 E7 基因表达框前增加 Kozark 序列、采用哺乳类偏性密码子优化改造 E7 基因的读码框架等方法构建的 E7 DNA 疫苗^[19~21]。(4) 采用基因切割重排技术, 在保留其所有可能的 T 细胞抗原表位的基础上重排产生的 mE7 DNA 疫苗, 不仅可以消除 E7 转化活性, 还可诱发机体产生特异性的细胞毒 T 细胞 (cytotoxic T cell, CTL) 反应^[14]。此后, 又引入重复插入基因分割后产生的亚片段即中间片段 "b" 的理念, 结果表明该策略在消除 E7 基因转化活性的同时可显著增强疫苗诱发产生的特异性细胞免疫和体内抗瘤活性^[15]。本研究根据以上研究成果, 联合采用包括基因切割后重排及插入、转化活性相关位点的定点突变、哺乳类密码子优化等策略改造 E7 基因, 构建了 mE7 基因疫苗。结果发现, 经肌肉免疫后, 与 wE7 基因免疫相比, mE7 基因疫苗免疫诱产生的 E7 特异性抗体水平、分泌 IFN- γ 的 CD8⁺ T 细胞数目及 CD4⁺ Th 细胞活化水平均显著提高; 体内肿瘤预防性实验结果显示, 预防性免疫后, 所有 mE7 DNA 疫苗组小鼠均完全清除了 7.5×10^4 个 TC-1 瘤细胞的攻击, 在实验结束时 (瘤细胞攻击后 7 周) 仍未见移植瘤形成, 而 wE7 基因免疫组小鼠于瘤细胞攻击后 2 周内全部形成移植瘤; 体内肿瘤治疗性实验结果则发现, wE7 免疫组小鼠于瘤细胞接种后第 8 天左右全部形成移植瘤, 而部分 mE7 免疫组小鼠可对移植瘤攻击, 清除率为 30%。表明联合基因切割重排等多种策略改造的 E7 基因肌肉免疫后可诱发较强的 E7 特异性细胞免疫及体内抗瘤活性, 具有较强的免疫原性, 具有进一步研究价值。

CD40L 是肿瘤坏死因子家族成员, 主要表达在活化 CD4⁺ T 淋巴细胞表面, 其配体 CD40 可在多种细胞表面表达, 如: DC 细胞、巨噬细胞、B 细胞、成纤维细胞、上皮细胞、内皮细胞及某些癌细胞表面^[22]。研究显示, CD40L 和 CD40 的相互作用具有多种生物活性, 主要表现为: (1) 上调抗原递呈细胞 (antigen presenting cell, APC), 特别是 DC 细胞表面共刺激分子 (如 B7-1、B7-2、ICAM-1、LFA3) 的表达, 促进抗原的加工和呈递, 启动 T 细胞免疫^[23]; 诱导 DC 细胞分泌 IL-12、TNF- α 、IL-8 等细胞因子, 其中 IL-12 对于促进 Th1 类细胞的成熟和细胞免疫发展具有重要意义^[24]; (2) 抑制荷瘤机体 DC 细胞凋亡, 延长 DC 细胞寿命^[25]; (3) CD40 L 和 CD40 相互作用还可直接诱发表达 CD40 的瘤细胞

凋亡^[26], 因此 CD40L 在肿瘤免疫治疗领域得到广泛研究, 对于 B 细胞淋巴瘤及某些实体瘤具有明显的抗肿瘤作用^[27, 28]。近年来, CD40L 的免疫刺激活性还被用于抗病毒、抗原虫及抗肿瘤疫苗研究, 如 CD40L 与利什曼原虫融合抗原修饰的巨噬细胞疫苗、表达 CD40L 与乙型肝炎病毒核心抗原或牛疱疹病毒 1 糖蛋白融合抗原蛋白的 DNA 疫苗、表达 CD40L 与呼吸合胞病毒融合蛋白疫苗或融合有 CD40L 的肿瘤相关抗原基因 (CD40L-TAA) 的重组腺病毒疫苗或 DC 疫苗等, 上述研究发现融合 CD40L 后均可获得不同程度免疫活性的增强^[29~32]。本研究结果表明, 与 mE7 基因免疫相比, mE7/CD40L 融合基因免疫可进一步显著提高 E7 特异性分泌 IFN- γ 的 CD8⁺ T 细胞数目, 而对 E7 特异性抗体产生及 CD4⁺ Th 细胞活化水平没有显著影响, 预防性免疫可完全保护小鼠免受 TC-1 瘤细胞的攻击。治疗性免疫后疫苗抗瘤活性的分析发现, 融合 CD40L 后的 mE7/CD40L DNA 疫苗对业已存在的移植瘤清除率由 30% 提高至 45%, 表明融合 CD40L 的基因疫苗可进一步提高疫苗诱产生的特异性细胞免疫和小鼠体内抗瘤活性。此外对 mE7/CD40L 及 mE7 DNA 疫苗免疫组小鼠渐进性缩小的移植瘤的组织学观察发现, 瘤细胞间及瘤组织周围可见大量淋巴细胞浸润。鉴于 HPV 感染相关肿瘤的免疫治疗作用主要取决于细胞免疫活化水平, 尽管 mE7 及 mE7/CD40L DNA 疫苗免疫可显著提高特异性抗体产生水平, 但由于抗体介导的细胞毒 (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC) 对肿瘤细胞的杀伤作用在体内尚未得到证实, 所以推测 mE7 及 mE7/CD40L DNA 疫苗免疫活性主要是由 E7 特异的 CD8⁺ T 细胞所诱发。

本研究构建的 mE7/CD40L DNA 疫苗虽然具有较好的免疫预防效果, 但对业已存在的移植瘤清除效果尚不理想, 移植瘤的清除率仅为 45%。可能的原因是小鼠在接种致死量的瘤细胞后, 瘤细胞会分泌一些免疫抑制因子如 TGF- β 、IL-10 等, 进而下调 MHC I 类分子的表达和抑制 Th1 细胞和 CTL 的活化水平; 另外研究发现瘤细胞可活化特异性的具有抑制其他免疫细胞功能的调节性 T 细胞, 而且荷瘤小鼠体内 DC 细胞的寿命由于凋亡加速而短命^[33, 34, 35], 上述因素与瘤细胞免疫耐受和免疫逃避有关。因此为了获得较为理想的肿瘤免疫治疗效果, 除了需要考虑采取措施如疫苗免疫等诱发机体产生较强的针对瘤细胞的特异性免疫反应外, 同时也要兼顾克服

肿瘤的免疫耐受和免疫逃避。因此肿瘤的免疫治疗除需进一步加强疫苗诱发的特异性免疫反应之外,尚需同时联合应用消除机体对瘤细胞的免疫耐受。

综上所述,本研究表明,联合基因切割重排等多种策略改造的 E7 基因疫苗可诱发较强的 E7 特异性细胞免疫及体内抗瘤活性,具有较强的免疫原性,融合 CD40L 的基因疫苗可进一步提高疫苗诱发产生的特异性细胞免疫和小鼠体内抗瘤活性。mE7/CD40L 基因可作为 HPV16 治疗性 DNA 疫苗的靶基因,有望应用于临床。

(本文图 6 见插图第 II 页)

参 考 文 献

- [1] Wu RF , Dai M , Qiao YL , *et al.* Human papillomavirus infection in women in Shenzhen city , people's Republic of China , a population typical of recent Chinese urbanization [J]. *Int J Cancer* , 2007 , 121 (6) :1306-1311.
- [2] Munoz N , Bosch FX , de Sanjose S , *et al.* Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer [J]. *N Engl J Med* , 2003 , 348(6) :518-527.
- [3] Kamangar F , Qiao YL , Schiller JT , *et al.* Human papillomavirus serology and the risk of esophageal and gastric cancers : results from a cohort in a high-risk region in China [J]. *Int J Cancer* , 2006 , 119(3) :579-584.
- [4] Wu Y , Chen Y , Li L , *et al.* Associations of high-risk HPV types and viral load with cervical cancer in China [J]. *J Clin Virol* , 2006 , 35(3) :264-269.
- [5] Gomez-Gutierrez JG , Elpek KG , Montes de Oca-Luna R , *et al.* Vaccination with an adenoviral vector expressing calreticulin-human papillomavirus 16 E7 fusion protein eradicates E7 expressing established tumor in mice [J]. *Cancer Immunol Immunother* , 2007 , 56(7) :997-1007.
- [6] 田厚文, 韩立群, 任 皎, 等. HPV16 型 E7 复制型 DNA 疫苗诱发的抗肿瘤免疫反应 [J]. *病毒学报* , 2003 , 19(1) :6-11.
- [7] Kang TH , Lee JH , Bae HC , *et al.* Enhancement of dendritic cell-based vaccine potency by targeting antigen to endosomal/lysosomal compartments [J]. *Immunol Lett* , 2006 , 106(2) :126-134.
- [8] Motoyama S , Ladines-Llave CA , Luis Villanueva S , *et al.* The role of human papillomavirus in the molecular biology of cervical carcinogenesis [J]. *Kobe J Med Sci* , 2004 , 50(1-2) :9-19.
- [9] 许雪梅, 朱明昭, 张明策, 等. 人乳头瘤病毒 16 型 E6E7 基因协同共激活分子 B7-1 基因免疫诱导的特异性免疫反应 [J]. *中国医学科学院学报* , 2003 , 25(3) :301-306.
- [10] Shi W , Bu P , Liu J , *et al.* Human papillomavirus type 16 E7 DNA vaccine : mutation in the open reading frame of E7 enhances specific cytotoxic T-lymphocyte induction and anti-tumor activity [J]. *J Virol* , 1999 , 73(9) :7877-7881.
- [11] Smahel M , Sima P , Ludvikova V , *et al.* Modified HPV16 E7 genes as DNA vaccine against E7-containing oncogenic cells [J]. *Virology* , 2001 , 281(2) :231-238.
- [12] Firzlafl JM , Galloway DA , Eisenman RN , *et al.* The E7 protein of human papillomavirus type 16 is phosphorylated by casein kinase II [J]. *New Biol* , 1989 , 1(1) :44-53.
- [13] 许雪梅, 张明策, 罗利群, 等. 修饰后中国山东地方株 HPV16E6E7 基因的转化活性检测及免疫原性分析 [J]. *中华微生物学及免疫学杂志* , 2002 , 22(4) :431-436.
- [14] Ohlschlager P , Pes M , Osen W , *et al.* An improved rearranged human papillomavirus type 16 E7 DNA vaccine candidate (HPV-16 E7SH) induces an E7 wildtype-specific T cell response [J]. *Vaccine* , 2006 , 24(15) :2880-2893.
- [15] Brinkman JA , Xu X , Kast WM. The efficacy of a DNA vaccine containing inserted and replicated regions of the E7 gene for treatment of HPV-16 induced tumors [J]. *Vaccine* , 2007 , 25(17) :3437-3444.
- [16] Osen W , Peiler T , Ohlschlager P , *et al.* A DNA vaccine based on a shuffled E7 oncogene of the human papillomavirus type 16 (HPV 16) induces E7-specific cytotoxic T cells but lacks transforming activity [J]. *Vaccine* , 2001 , 19(30) :4276-4286.
- [17] Frazer IH , Thomas R , Zhou J , *et al.* Potential strategies utilised by papillomavirus to evade host immunity [J]. *Immunol Rev* , 1999 , 168(1) :131-142.
- [18] Velders MP , Weijzen S , Eiben GL , *et al.* Defined flanking spacers and enhanced proteolysis is essential for eradication of established tumors by an epitope string DNA vaccine [J]. *J Immunol* , 2001 , 166(9) :5366-5373.
- [19] Steinberg T , Ohlschlager P , Sehr P , *et al.* Modification of HPV16 E7 genes : correlation between the level of protein expression and CTL response after immunization of C57BL/6 mice [J]. *Vaccine* , 2005 , 23 :1149-1157.
- [20] Liu WJ , Gao F , Zhao KN , *et al.* Codon modified human papillomavirus type 16 E7 DNA vaccine enhances cytotoxic T-lymphocyte induction and anti-tumour activity [J]. *Virology* , 2002 , 301(1) :43-52.
- [21] Cid-Arregui A , Juarez V , zur Hausen H. A synthetic E7 gene of human papillomavirus type 16 that yields enhanced expression of the protein in mammalian cells and is useful for

- DNA immunization studies [J]. *J Virol* , 2003 , 77(8) : 4928-4937.
- [22] Tong AW , Stone MJ. Prospects for CD40-directed experimental therapy of human cancer [J]. *Cancer Gene Ther* , 2003 , 10(1) : 1-13.
- [23] Van Kooten C , Banchereau J. CD40-CD40 ligand [J]. *J Leukoc Biol* , 2000 , 67(1) : 2-17.
- [24] Peng X , Remacle JE , Kasran A , *et al.* IL-12 up-regulates CD40 ligand (CD154) expression on human T cells [J]. *J Immunol* , 1998 , 160(3) : 1166-1172.
- [25] Wurtzen PA , Nissen MH , Claesson MH. Maturation of dendritic cells by recombinant human CD40L-trimer leads to a homogeneous cell population with enhanced surface marker expression and increased cytokine production [J]. *Scand J Immunol* , 2001 , 53(6) : 579-587.
- [26] Grewal IS , Flavell RA. CD40 and CD154 in cell mediated immunity [J]. *Annu Rev Immunol* , 1998 , 16(1) : 111-135.
- [27] Messmer D , Kipps TJ. CD154 gene therapy for human B-cell malignancies [J]. *Ann NY Acad Sci* , 2005 , 1062(1) : 51-60.
- [28] Liu A , Guardino A , Chinsangaram L , *et al.* Therapeutic vaccination against murine lymphoma by intratumoral injection of recombinant fowlpox virus encoding CD40 ligand [J]. *Cancer Res* , 2007 , 67(14) : 7037-7044.
- [29] Tripp RA , Jones L , Anderson LJ , *et al.* CD40 ligand (CD154) enhances the Th1 and antibody responses to respiratory syncytial virus in the BALB/c mouse [J]. *J Immunol* , 2000 , 164(11) : 5913-5921.
- [30] Manoj S , Griebel PJ , Babiuk LA , *et al.* Modulation of immune responses to bovine herpesvirus-1 in cattle by immunization with a DNA vaccine encoding glycoprotein D as a fusion protein with bovine CD154 [J]. *Immunology* , 2004 , 112(2) : 328-338.
- [31] Chen HW , Huang HI , Lee YP , *et al.* Linkage of CD40L to a self-tumor antigen enhances the antitumor immune responses of dendritic cell-based treatment [J]. *Cancer Immunol Immunother* , 2002 , 51(6) : 341-348.
- [32] Chen G , Darrah PA , Mosser DM. Vaccination against the intracellular pathogens *Leishmania major* and *L. amazonensis* by directing CD40 ligand to macrophages [J]. *Infect Immunol* , 2001 , 69(5) : 3255-3263.
- [33] Molling JW , de Gruijl TD , Glim J , *et al.* CD4 (+) CD25 (hi) regulatory T-cell frequency correlates with persistence of human papillomavirus type 16 and T helper cell responses in patients with cervical intraepithelial neoplasia [J]. *Int J Cancer* , 2007 , 121(8) : 1749-1755.
- [34] Yu P , Lee Y , Liu W , *et al.* Intratumor depletion of CD4 + cells unmasks tumor immunogenicity leading to the rejection of late-stage tumors [J]. *J Exp Med* , 2005 , 201(5) : 779-791.

(2007-08-07 收稿)