

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2005 )01-0019-04

## HPV16E6/E7 融合蛋白疫苗与放疗联合应用治疗宫颈癌的实验研究

周小山, 千新来, 陆元志, 刘巧, 赵清正( 中国协和医科大学中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所, 生物化学与分子生物学实验室, 北京 100021 )

[ 摘要 ] 目的: 观察人乳头瘤病毒 16 型( HPV )E6/E7 融合蛋白疫苗与放疗( 12 Gy )联合应用对宫颈癌的治疗效果。方法: 24 只雌性 C57BL/6 小鼠右侧后肢接种肿瘤细胞后 7 d, 随机分为 4 组: 对照组( C,  $n=6$  ); 免疫组( IM,  $n=6$  ); 放疗组( RA,  $n=6$  ); 联合治疗组( IM + RA,  $n=6$  )。比较各组小鼠的肿瘤生长速度及存活时间。采用 TUNEL 法对小鼠肿瘤组织中细胞的凋亡情况进行检测。结果: IM + RA 组小鼠肿瘤生长速度较慢, 平均存活时间明显长于 RA、IM 及 C 组, IM 组与 C 组动物的平均存活时间没有差异。TUNEL 实验结果表明, IM + RA 组小鼠肿瘤组织中凋亡细胞明显高于其他各组。结论: HPV16E6/E7 融合蛋白疫苗与放疗联合应用, 具有协同抗肿瘤作用。

[ 关键词 ] 人乳头瘤病毒 16 型; 免疫治疗; 放疗; 宫颈癌

[ 中图分类号 ] R737.33 [ 文献标识码 ] A

## The Therapeutic Effect of Combination of the Human Papillomavirus 16 ( HPV16 ) E6/E7 Fusion Protein Vaccine Combined with Radiotherapy on Cervical Cancer

ZHOU Xiao-shan, QIAN Xin-lai, LU Yuan-zhi, LIU Qiao, ZHAO Qing-zheng ( Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, Cancer Institute and Cancer Hospital, Peking Union Medical College and Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China )

[ Abstract ] **Objective:** To evaluate the therapeutic effect of combination of the human papillomavirus 16 ( HPV16 ) E6/E7 fusion protein vaccine with radiotherapy on the HPV16-positive cervical cancer. **Methods:** Twenty-four female C57BL/6 mice 7 days after inoculation of tumor cells on the right hind legs were randomly divided into four groups: The control group ( C,  $n=6$  ); Immunotherapy group ( IM,  $n=6$  ); Radiotherapy group ( RA,  $n=6$  ); Immunotherapy + Radiotherapy ( IM + RA,  $n=6$  ). The growth rates of tumors and survival time were recorded and compared with each other. The apoptotic tumor cells *in situ* were detected by TUNEL assay. **Results:** The growth rates of tumors in IM + RA- group were lower than other groups. The mean survival time in IM + RA-group was longer than those in IM-, RA- and C-groups, but the difference between IM- and C- group was not significant. The result of TUNEL assay indicated that there were more apoptotic tumor cells in IM + RA- group than that in other groups. **Conclusion:** The combination of HPV16E6/E7 fusion protein vaccine with low dose radiotherapy exerted synergic antitumor efficacy, which might provide a new approach for the treatment of cervical cancer.

[ Key words ] human papillomavirus 16; immunotherapy; radiotherapy; cervical cancer

宫颈癌是常见的妇科恶性肿瘤之一, 严重威胁着女性的身体健康。目前放疗仍然是治疗宫颈癌的基本手段之一。如何减少放疗引起的并发症, 进一步提高患者的生存率, 是宫颈癌治疗中急需解决的问题。流行病学研究表明宫颈癌的发生与人乳头瘤病毒( human papillomavirus, HPV ) 的感染密切相关, HPV 病毒

基因 E6, E7 在宫颈癌及其癌前病变组织中持续表达, 这为宫颈癌的免疫治疗提供了理想的靶抗原<sup>[1]</sup>。目前

[ 基金项目 ] 国家“863”计划项目( NO:2002AA216041 )

[ 作者简介 ] 周小山( 1974- ), 男, 河南焦作市人, 博士生, 主要从事抗肿瘤基因工程制剂方面的研究

[ 通讯作者 ] 赵清正, E-mail: Qzhzhao@263.net

针对 HPV 的宫颈癌免疫治疗已有报导<sup>[2]</sup>。本实验室在前期工作中构建了 HPV16E6/E7 融合基因,并且在原核系统中获得了高效表达,将该蛋白免疫动物后能够诱导针对 HPV16 的保护性免疫反应,有效保护动物抵抗 HPV16E6/E7 恶性转化的肿瘤细胞的攻击,并对未形成实体瘤的微小肿瘤病灶具有理想的治疗效果<sup>[3]</sup>。但是现有的资料表明对于已经形成的实体瘤,单纯免疫治疗的效果往往不理想。在此基础上,为进一步观察免疫治疗与放疗联合应用对宫颈癌的治疗效果,本研究中我们将 HPV16E6/E7 融合蛋白疫苗与放疗联合应用,以期对宫颈癌的治疗提供新的实验数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

不完全弗氏佐剂(Incomplete Freud's Adjuvant, IFA)(GIBCO BRL 公司产品), RPMI-1640 培养基(GIBCO BRL 公司产品,按说明配制), TUNEL 原位凋亡试剂盒(Boehringer Mannheim 公司产品), HPV16mE6 $\Delta$ /mE7 $\Delta$  融合蛋白由本室保存<sup>[3]</sup>。

### 1.2 细胞株

TC-1 细胞系为来源于 C57BL/6 小鼠上皮细胞,经共转染 HPV16E6/E7 基因及激活的 c-H-ras 转化而形成的肿瘤细胞系<sup>[4]</sup>,由 Johns Hopkins 大学 T-C. Wu 教授惠赠,已被广泛用作宫颈癌的治疗模型<sup>[3]</sup>。

### 1.3 实验动物

C57BL/6 雌性小鼠,6~8 周龄,体重 18~20 g,购自中国医学科学院实验动物研究所实验动物繁育场。

### 1.4 蛋白疫苗的制备

HPV16mE6 $\Delta$ /mE7 $\Delta$  融合蛋白由本室制备,将重组 HPV16mE6 $\Delta$ /mE7 $\Delta$  融合蛋白溶液与等体积的 IFA 佐剂充分混匀,制备成稳定的乳白色膏状物免疫动物。

### 1.5 主要仪器设备

Varian600C 直线加速器(美国 Varian 公司),恒温培养箱(IP-51, Yamata),培养箱(SKP-01,湖北黄石医疗器械厂),CO<sub>2</sub> 细胞培养箱(REVCO),超净工作台(北京昌平长城空气净化工程公司)。

### 1.6 动物肿瘤模型的建立

取 24 只雌性 C57BL/6 小鼠,测量、记录动物右后肢直径,然后在右后肢后侧皮下注射  $2 \times 10^5$  TC-1 细胞,每 3 天测量 1 次,7 d 后直径增加 1.5~2 mm 时,随机分为 4 组( $n = 6$ ): C 组、IM 组、IM + RA 组、RA 组。

### 1.7 动物放疗与免疫联合治疗

C57BL/6 小鼠右后肢后侧皮下注射 TC-1 细胞后 7 d,该右后肢直径比左侧增加 1.5~2 mm 时(已形成小的实体瘤),开始进行治疗。C 组小鼠左侧腹股沟皮下注

射 100  $\mu$ l IFA + PBS 的混合物;IM 组小鼠左侧腹股沟皮下注射 2 mmol/L HPV16mE6 $\Delta$ /mE7 $\Delta$  融合蛋白与 IFA 充分混合后制成的疫苗,7 d 后再使用相同的剂量加强免疫 1 次;将 RA 组小鼠装入一特制的有机玻璃盒内,并将其接种肿瘤的后腿拉出固定,接种部位位于野中央,距野边缘均超过 5 cm,小鼠全身其余部位均在照射野之外。照射是在 Varian 600C 直线加速器上进行,射线为 6MV-X,进行一次照射,总照射剂量为 12 Gy,剂量率为 3 Gy/min,照射时间 4 min<sup>[5]</sup>。IM + RA 组小鼠的疫苗用量及免疫方法同单纯免疫组,同时接受放射治疗,方法与剂量同单纯放疗组。测量接种肿瘤的后肢直径,每周 2 次,当后肢直径超过 20 mm 时停止测量。

### 1.8 原位凋亡分析

放射线能够对肿瘤细胞造成损伤,并可以引起细胞的凋亡。为进一步观察联合治疗引起的肿瘤细胞的凋亡情况,重复动物联合治疗实验,在联合治疗后 4 d,处死小鼠,取出肿瘤组织,固定、石蜡包埋、切片,采用原位末端标记(TUNEL)法对肿瘤组织进行原位凋亡分析。

### 1.9 统计学分析

采用 SPSS10.0 统计软件,对动物存活情况采用 log-rank 时序检验( $P < 0.05$ )。

## 2 结果

### 2.1 蛋白免疫治疗与放疗联合应用对肿瘤生长的抑制作用

HPV 蛋白疫苗与局部放疗联合应用可以有效的抑制小鼠移植肿瘤的生长,如图 1 所示,在开始治疗后的 3~4 d 内,虽然各组小鼠的肿瘤均有生长,但是 RA 组和 IM + RA 组肿瘤生长受到抑制,生长速度小于 IM 和 C 组小鼠。尽管开始 RA 和 IM + RA 组在肿瘤生长的抑制上没有明显的差异,但是在 5~6 d 后,IM + RA 组联合治疗的优势开始显现出来,肿瘤消退速度开始快于 RA 组,在接下来的 15 d 内肿瘤的生长基本被控制,接种肿瘤的后肢直径基本上恢复到接种前大小。RA 组在肿瘤生长受到短暂抑制后,迅速重新生长,到 36 d 荷瘤后肢直径超过 20 mm。而 IM + RA 组小鼠 20 d 后肿瘤才开始缓慢的生长,生长速度明显低于 RA 及 IM 组,45 d 后小鼠后肢直径才开始超过 20 mm,说明蛋白疫苗免疫治疗和放疗有一定的协同作用。另外,联合治疗明显提高了荷瘤小鼠的存活时间,除了 16.7% 小鼠的移植性肿瘤被治愈以外,其余小鼠的平均存活时间较其他 3 组小鼠明显延长( $P < 0.05$ ),而单纯(图 2)。各组小鼠平均存活时间见表(1)。

### 2.2 原位凋亡结果分析

采用原位末端标记(TUNEL)检测肿瘤细胞凋亡情况,结果发现凋亡细胞核着色,有棕黄色颗粒,呈散在分布。C组凋亡细胞最少,IM组及RA组较C组为多,而IM+RA组肿瘤细胞凋亡的最多(图3)。

除此之外,放疗和化疗联合应用也增加了正常组织损伤的危险性,有些患者可能难以忍受放化联合治疗所引起的副作用。因而有必要寻找新的安全、有效的辅助性治疗方法。目前随着分子生物学和肿瘤免疫学的发展以及肿瘤抗原的发现,辅助性的免疫治疗已经成为研究的热点。

图1 免疫治疗与放疗联合应用对 TC-1 肿瘤生长的抑制作用

Fig. 1 Inhibitory effect of immunotherapy combined with radiotherapy on TC-1 tumor growth

图2 免疫治疗与放疗联合应用对 C57BL/6 小鼠存活时间的影响

Fig. 2 Effect of the immunotherapy combined with radiotherapy on the survival of C57BL/6 mice

### 3 讨论

宫颈癌是严重危害女性健康的妇科肿瘤之一,其发病率在妇科肿瘤中居第一,每年有大约50万左右的新发病例<sup>[6]</sup>。目前临床常用的治疗手段是手术和局部放疗,但是近40年来其生存率并没有显著提高,仍然停留在40%左右。为了提高宫颈癌的治疗效果,许多研究将放化疗进行联合应用。但是大剂量放疗,尤其是化疗可对机体的免疫系统产生严重的抑制作用,同时有可能加速耐放疗或化疗的细胞克隆的形成。另外很多化疗方案本身是毒性很大,并且具有致癌潜能<sup>[7]</sup>。

表1 各组小鼠平均存活时间

Tab.1 Mean survival times of mice in each group ( $\bar{x} \pm s$ )

Groups	Number of animals	Mean survival time ( d )
C	6	21 ± 2.45
IM	6	24 ± 8.89
RA	6	47.25 ± 8.54
IM + RA	6	78 ± 16.9

图3 肿瘤组织中细胞凋亡的分析

Fig. 3 Analysis of tumor cells apoptosis

A: C; B: IM; C: RA; D: IM + RA

许多研究表明宫颈癌的发生与HPV的感染持续密切相关。在约90%以上的宫颈癌标本中可检测到HPV DNA,其中HPV16占多数,约为60%左右<sup>[8]</sup>。HPV16 E6/E7基因属于癌基因,能够诱导细胞发生恶性转化,并且在宫颈癌及其癌前病变组织细胞中持续

表达,因此,可作为HPV相关宫颈癌免疫治疗的理想靶抗原。我们在前期工作中构建了HPV16E6/E7融合基因,并且在原核系统中获得了高效表达,动物实验表明该融合蛋白作为疫苗是安全、有效的,在动物体内可诱导有效的抗肿瘤免疫反应,另外并没有观察的明显

的毒性反应<sup>[3]</sup>。本研究中,我们以 HPV16E6/E7 融合蛋白作为疫苗,以表达 HPV16E6/E7 蛋白的 TC-1 肿瘤细胞建立动物模型,我们对免疫治疗与放疗联合应用的效果进行了研究,结果表明联合治疗的效果明显优于单纯的放疗和免疫治疗效果。在较低照射剂量的条件下,加上免疫治疗可以有效抑制肿瘤的生长,有 16.7%(1/6)小鼠的肿瘤被治愈,其他动物的平均存活时间为  $78 \pm 16.9$  d,明显高于 RA 组的  $47.25 \pm 8.54$  d 和 IM 组的  $24 \pm 8.89$  d。虽然放射治疗后 IM + RA 组和 RA 组肿瘤都有一个先缓慢生长,然后肿瘤体积消退的过程,但是 RA 组肿瘤消退的程度小,并且迅速重新快速生长,而 IM + RA 组肿瘤下降的幅度大,并且肿瘤的生长速度缓慢,明显延长了实验动物的存活时间。而在 IM 组,免疫治疗对肿瘤生长的抑制作用十分微弱,与 C 组相比,在肿瘤体积及生存时间上均没有显著性差异( $P > 0.05$ )。另外原位凋亡结果表明来源于 IM + RA 组的肿瘤标本中有大量的凋亡细胞存在,这些结果表明局部的放疗与免疫治疗具有协同作用。与此结果相一致,最近报导表明,对接种胶质瘤细胞后 5 d 的大鼠先进行放射治疗,然后对使用灭活的瘤细胞疫苗进行免疫,结果可以治愈 45% 的动物,并且生存时间显著延长。进一步的组织病理学观察也发现在肿瘤注射部位有大量的浸润淋巴细胞和巨噬细胞,但是没有发现肿瘤细胞<sup>[5]</sup>。另外在其它类型肿瘤的动物模型治疗实验中也观察到类似的结果<sup>[9-10]</sup>。

放疗与特异性免疫治疗联合应用提高肿瘤治疗效果的机理可能如下:1)通过局部放疗可有效清除肿瘤负荷,同时减少了肿瘤微环境中肿瘤细胞分泌的免疫抑制性细胞因子,如 IL-10、TGF- $\beta$  等,有助于机体免疫系统发挥作用;2)激活的特异性免疫细胞可清除残存的肿瘤细胞或放疗耐受细胞克隆;3)另外可能还与射线诱导肿瘤细胞凋亡,进而导致肿瘤微环境的破坏以及增强肿瘤细胞免疫原性等有关。许多证据表明细胞经射线照射后,不仅引起肿瘤细胞的凋亡,还会促进肿瘤细胞膜表面与免疫有关的重要分子上调,如 LFA-3、ICAM-1 等。这些分子在机体的免疫识别过程中具有重要作用,因而局部照射后这些分子的上调有利于机体免疫系统对肿瘤细胞的识别,进而增强 CTL 细胞的杀伤活性<sup>[11]</sup>。Santin 等<sup>[12]</sup>对 CaSki 和 SiHa 两个宫颈癌细胞系进行照射,发现肿瘤细胞表面的 MHC-1 和 ICIM-1 分子表达显著提高,并且这种提高是剂量依赖性的,在不同的时间点均可以检测到其表达,直到细胞死亡为止。另外,Dranoff 等<sup>[13]</sup>也发现经照射的肿瘤细胞免疫原性显著提高。这些结果均表明局部照射后细胞膜表面重要的蛋白表达水平可能发生改变,导致肿

瘤细胞免疫原性的改变。进而有利于机体免疫系统对肿瘤细胞的识别和清除作用。

本研究为 HPV 阳性宫颈癌的辅助性免疫治疗与放疗联合应用提供了初步的实验依据。

## [参考文献]

- [1] Crook T, Morgenstern JP, Crawford LL, *et al.* Continued expression of HPV-16 E7 protein is required for maintenance of the transformed phenotype of cells co-transformed by HPV-16 plus EJ-ras [J]. *EMBO J*, 1989, 8(2): 513-519.
- [2] Muderspach L, Wilczynski S, Riman L, *et al.* A phase I trial of a human papillomavirus (HPV) peptide vaccine for women with high-grade cervical cancer and vulvar intraepithelial neoplasia who are HPV 16 positive [J]. *Clin Cancer Res*, 2000, 6(9): 3406-3416.
- [3] Zhou XS, Qian XL, Zhao QZ, *et al.* Efficient expression of modified human papillomavirus 16 E6/E7 fusion protein and the anti-tumor efficacy in a mouse model [J]. *Biol Pharm Bull*, 2004, 27(3): 303-307.
- [4] Lin KY, Guarnieri FG, Stavelev-O'Canroll KF, *et al.* Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen [J]. *Cancer Res*, 1996, 56(1): 21-26.
- [5] Graf MR, Prins RM, Hawkins WT, *et al.* Irradiated tumor cell vaccine for treatment of an established glioma. I. Successful treatment with combined radiotherapy and cellular vaccination [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2002, 51(4): 179-189.
- [6] Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990 [J]. *Int J Cancer*, 1999, 80(6): 827-834.
- [7] Kollmannsberger C, Hartmann JT, Kanz L, *et al.* Therapy-related malignancies following treatment of germ cell cancer [J]. *Int J Cancer*, 1999, 83(6): 860-863.
- [8] Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, *et al.* Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide [J]. *J Pathol*, 1999, 189(1): 12-19.
- [9] Maini A, Nishisaka N, Kinoshita Y, *et al.* Combination of radiation and vaccination with autologous tumor cells expressing IL-2, IFN-gamma and GM-CSF for treatment of murine renal carcinoma [J]. *In Vivo*, 2003, 17(2): 119-123.
- [10] Demaris S, Kawashima N, Deviee M, *et al.* Combination of local radiation with CTLA4 blockade: A new approach to the immunotherapy of breast cancer [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2003, 57: s259.
- [11] Zamai L, Rana R, Mazzotti G, *et al.* Lymphocyte binding to K652 cells: Effects of target cell irradiation and correlation with ICAM-1 and LFA-3 expression [J]. *Eur J Histochem*, 1994, 38(1): 53-60.
- [12] Santin AD, Hermonat PL, Hiserodt JC. Effects of irradiation on the expression of major histocompatibility complex class I antigen and adhesion costimulation molecules ICAM-1 in human cervical cancer [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1997, 39(3): 737-742.
- [13] Dranoff G, Jaffee E, Lazenby A, *et al.* Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, 90(8): 3539-3543.

[收稿日期] 2004-07-19

[修回日期] 2004-12-06

[本文编辑] 王莹, 韩丹