

肿瘤诊断技术与基因治疗

DOI: 10.11699/cyxb20130514

带有 HPV-16 E6/E7 基因的树突状细胞疫苗对裸鼠人宫颈癌 CaSki 细胞移植瘤的抗肿瘤作用

符少月, 焦庆昉, 黄启彬, 刘潇淇, 易发平, 宋方洲

(重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心、重庆医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室, 重庆 400016)

【摘要】目的:探索带有 HPV-16 E6/E7 基因的树突状细胞(dendritic cell, DC)疫苗对裸鼠人宫颈癌 CaSki 细胞移植瘤的抗肿瘤作用。**方法:**体外诱导培养 C57BL/6 小鼠骨髓的未成熟 DC(imature DC, imDC), 将已经成功构建的携带人乳头状瘤病毒(human papillomavirus, HPV)-16 E6/E7 基因的重组腺病毒感染 imDC, Western blot 检测 E7 蛋白的表达; 构建裸鼠的人宫颈癌 CaSki 细胞移植瘤模型, 应用 DC 疫苗诱导的 BALB/c 小鼠脾脏的细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocytes, CTL)处理后, 观察裸鼠肿瘤体积变化, 肿瘤长出第 28 天后处死裸鼠, 小心剥下肿瘤组织, 石蜡包埋, HE 染色观察各组肿瘤的细胞形态, 免疫组织化学技术法检测肿瘤组织中 Bcl-2、Bax 蛋白的表达情况。**结果:**成功培养出 DC 并制备出 DC 疫苗; 第 28 天各组裸鼠肿瘤体积 pAd-E6/E7-DC-CTL-CaSki 组与 pAd-mock-DC-CTL-CaSki 组、DC-CTL-CaSki 组、CaSki 组相比较, pAd-E6/E7-DC-CTL-CaSki 组裸鼠肿瘤体积最小($P<0.05$); 免疫组化检测肿瘤组织中 Bax 蛋白的表达结果显示 pAd-E6/E7-DC-CTL-CaSki 组最高, 而 CaSki 组表达最低; 免疫组化检测肿瘤组织中 Bcl-2 蛋白的表达结果显示 pAd-E6/E7-DC-CTL-CaSki 组最低, 而 CaSki 组表达最高。**结论:**带有 HPV-16 E6/E7DC 疫苗能够诱导 CTL 抑制裸鼠人宫颈癌 CaSki 细胞移植瘤的生长。

【关键词】树突状细胞; 人乳头瘤病毒 16; T 淋巴细胞; CaSki 细胞

【中国图书分类法分类号】R737.33

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-09-19

Anti-tumor effects of dendritic cell vaccine carrying HPV-16 E6/E7 gene on the transplantable tumor of human cervical cancer in nude mice

FU Shaoyue, JIAO Qingfang, HUANG Qibin, LIU Xiaoqi, YI Faping, SONG Fangzhou

(Molecular Medicine and Cancer Research Center, Teaching and Research Section of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To explore the anti-tumor effects of dendritic cell(DC) vaccine carrying HPV-16 E6/E7 gene on the CaSki cell transplantable tumor of human cervical cancer in nude mice. **Methods:** Immature C57BL/6 DC(imDC) was cultured and was infected with recombinant adenovirus vector carrying human papillomavirus-16 E6/E7 gene. Expressions of E7 protein were detected by Western blot. CaSki cell transplantable tumor model of human cervical cancer was constructed in nude mice and was treated by cytotoxic T lymphocytes(CTL), acquired from BALB/c mice. Changes in tumor volume were observed. Nude mice were sacrificed and Paraffin-embedded on the 28th d since tumors appeared. Tumor cell morphology was observed in each group by HE staining. Expressions of Bcl-2 and Bax protein of tumor tissues were detected by immunohistochemical techniques. **Results:** DC was successfully cultured and DC vaccine was prepared. On the 28th d, tumor volume of nude mice was smaller in pAd-E6/E7-DC-CTL-CaSki group than in pAd-mock-DC-CTL-CaSki group, DC-CTL-CaSki group and CaSki group($P<0.05$). Bax protein expressions of tumor tissues detected by immunohistochemical techniques demonstrated that; expressions in pAd-E6/E7-DC-CTL-CaSki group were the highest while in CaSki group were the lowest. Bcl-2 protein expressions of tumor tissue detected by immunohistochemical techniques demonstrated that; expressions in pAd-E6/E7-DC-CTL-CaSki group were the lowest while those in CaSki group were the highest. **Conclusions:** DC vaccine modified by HPV-16 E6/E7 gene can inhibit the grow of cervical cancer transplantable tumor in nude mice by inducing CTL.

【Key words】dendritic cell; human papillomavirus-16; T lymphocytes; CaSki cell

作者介绍: 符少月, Email: fushaoyue2010@163.com,

研究方向: 宫颈癌的 DC 疫苗研究。

通信作者: 易发平, Email: fazicq@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 30800945); 重庆市科

委自然科学基金资助项目(编号: CSTC2008BB5225)。

宫颈癌是引起妇女死亡的第 2 大肿瘤,其发病率仅次于乳腺癌,并且呈年轻化趋势^[1]。宫颈癌的致病机制被认为与 E6、E7 蛋白的早期表达密切相关^[2]。E6 蛋白可诱导端粒酶活性,进而维持端粒长度使上皮细胞出现永生化。而 E7 蛋白通过 CR1 与 Rb 蛋白的相关因子-p600 作用,促进细胞的独立生长及转化,进而引起上皮细胞出现转化、永生化^[3]。因此,基于 E6、E7 基因的肿瘤生物治疗已经成为研究热点。

1 材料与方法

1.1 材料

宫颈癌 CaSki 细胞购自中国上海生命科学研究院;胎牛血清及 RPMI1640 培养液购自美国 Gibco 公司;重组小鼠白细胞介素-4(recombinant mouse interleukin,rmIL-4)、重组小鼠粒-巨噬细胞集落刺激因子(recombinant mouse granulocyte-macrophage,rmGM-CSF)购自美国 Peprotech 公司;辣根过氧化物酶(horse radish peroxidase,HRP)标记的山羊抗小鼠 IgG、ECL 发光试剂均购自碧云天生物技术研究;兔抗 Bax 多克隆抗体、兔抗 Bcl-2 多克隆抗体、鼠抗 E7 多克隆抗体均购自 Santa Cruz 公司;带有 HPV-16 E6/E7 基因的重组腺病毒载体、空载体由本课题组成功构建;小鼠淋巴细胞分离液购自天津市灏洋生物制品公司。免疫组化试剂盒购自北京中杉公司。

C57BL/6 小鼠,4~5 周龄,雄性,由重庆医科大学实验动物中心提供;BALB/c 小鼠,6~8 周龄,雌性,由重庆医科大学实验动物中心提供,饲养于无特定病原体房间;裸小鼠,4~5 周龄,雌性,由重庆医科大学实验动物中心提供,饲养于独立通气笼盒房间。证书编号:CQLA-2011-0047。

1.2 树突状细胞(dendritic cell,DC)的培养

处死 C57BL/6 小鼠,于超净工作台取出股骨和胫骨,用 1 ml 注射器吸取 PBS 冲洗骨髓腔,获得骨髓。1 000 r/min 离心 10 min,收集细胞,红细胞裂解液作用后 1 000 r/min 离心 10 min。用 RPMI1640 培养基洗涤 2 遍,收集细胞,调整细胞密度为 3×10^9 个/ml 接种于 6 孔板,加入细胞因子 rmGM-CSF 和 rmIL-4 并调整其浓度为 10 ng/ml。培养 48 h 后半量换液,并补足相同浓度的细胞因子。每天在显微镜下观察细胞形态。

1.3 构建 DC 疫苗

收集培养至第 6 天的未成熟 DC(imature DC,imDC),分别加入感染复数为 200 的腺病毒 pAd-E6/E7 和空载体 pAd-mock。于 6 孔板中培养 2 h 后,再加入含细胞因子 rmGM-CSF 和 rmIL-4 的细胞培养液,调整细胞因子浓度为 5 ng/ml。继续培养 36 h,分别提取 pAd-E6/E7 感染的 DC、pAd-mock 感染的 DC 及未成熟 DC 的总蛋白。按每孔蛋白上样量为 30 μ g 进行 12%的 SDS-PAGE,转膜,采用含 5%脱脂奶粉室温封闭

1 h,1:200 稀释的鼠抗 E7 多克隆抗体于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,TBST 洗膜 5 次,每次 5 min,1:1 000 辣根过氧化物酶标记的 IgG 室温孵育 1 h,ECL 显色,检测目的蛋白 E7 的表达。

1.4 DC 疫苗对裸鼠体内宫颈癌的抑制作用

将 BALB/c 小鼠随机分为 3 组,每组 4 只,分别为 pAd-E6/E7-DC 组、pAd-mock-DC 组、DC 组。背部左侧皮下注射,每只 200 μ l、细胞密度为 1×10^7 个/ml 的 pAd-E6/E7-DC、pAd-mock-DC 和 DC。每 7 d 免疫 1 次,共 3 次。第 21 天处死各组小鼠,无菌条件下取出脾脏,制成单细胞悬液。1 500 r/min 离心 10 min 收集细胞,加入 4 ml 小鼠淋巴细胞分离液吹散,再于液面上轻轻加入 500 μ l RPMI1640 培养液,2 000 r/min 垂直离心 30 min,轻轻吸出第 2 层乳白色细胞层。用含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养液洗涤两次,收集细胞即为细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocytes,CTL),与分组相对应简称为 pAd-E6/E7-DC-CTL、pAd-mock-DC-CTL、DC-CTL。

将 16 只裸鼠随机分成 4 组,分别为 pAd-E6/E7-DC-CTL-CaSki 组、pAd-mock-DC-CTL-CaSki 组、DC-CTL-CaSki 组和 CaSki 组。先于每组小鼠背部左侧皮下注射 200 μ l 细胞密度为 1×10^7 个/ml 的 CaSki 细胞,3 d 后各组分别腹腔注射 500 μ l 细胞密度为 1×10^7 个/ml 的 pAd-E6/E7-DC-CTL、pAd-mock-DC-CTL 和 DC-CTL,CaSki 组注射 500 μ l PBS。每天观察裸鼠的生长状况,肿瘤长出后每 7 d 测量肿瘤的最长径(a)和最短径(b),绘制肿瘤生长曲线。处死第 28 天成瘤裸鼠,小心剥下肿瘤组织,石蜡切片,HE 染色观察各组肿瘤的细胞形态。

1.5 免疫组织化学技术 SP 法检测肿瘤组织中 Bcl-2、Bax 蛋白的表达情况

肿瘤组织用 4%多聚甲醛固定。石蜡包埋、切片,二甲苯脱蜡,抗原修复,血清封闭 30 min,滴加一抗(Bcl-2 或 Bax,1:50)4 $^{\circ}$ C 过夜。加生物素化二抗,滴加 HRP 标记的亲和素 37 $^{\circ}$ C 30 min,DAB 显色,苏木精染色,碳酸锂返蓝约 10 s,烘干,树脂封片。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 18 软件进行统计分析,实验数据以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

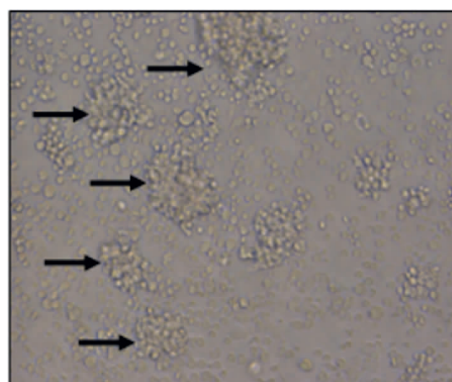
2.1 成功培养出 DC

每天倒置显微镜下观察细胞的生长状态,发现细胞多为悬浮状、密且多,第 5 天可见大量悬浮细胞成簇、呈集落状生长,即为未成熟的 DC。见图 1。

2.2 构建了 DC 疫苗

于第 6 天收集未成熟的 DC,加入重组腺病毒载体(pAd-E6/E7)和空载体(pAd-mock)进行转染,培养 36 h,Western

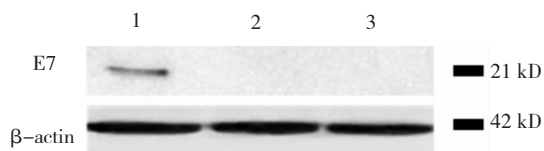
blot检测,发现:pAd-E6/E7-DC组有1条目的蛋白E7的表达,2个对照组pAd-mock-DC组和DC组中无表达,说明疫苗构建成功。见图2。



黑色箭头所指为 DC

图1 培养第5天小鼠未成熟DC形态(倒置显微镜,100×)

Fig.1 Immature DC morphology of mice on the 5th d of culture (inverted microscope, 100×)



1. pAd-E6/E7-DC组;2. pAd-mock-DC组;3. DC组

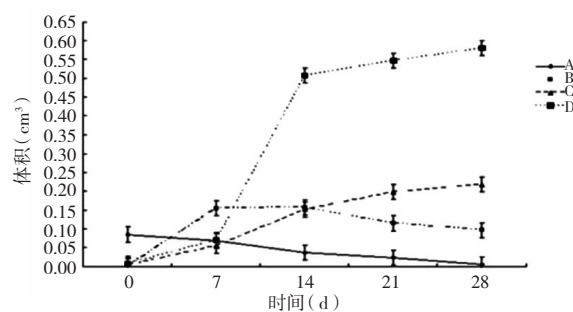
图2 Western blot 检测各组 E7 蛋白的表达

Fig.2 E7 protein expressions detected by Western blot

2.3 裸鼠的肿瘤体积分析

每隔7d观察小鼠肿瘤的生长,测量肿瘤最长径为a,最短径为b,计算体积公式为: $V=0.4 \times a \times b^2$ 。随着时间的延长CaSki组肿瘤体积不断变大,pAd-E6/E7-DC-CTL-CaSki组、pAd-mock-DC-CTL-CaSki组和DC-CTL-CaSki组的肿瘤体积不断减小,pAd-E6/E7-DC-CTL-CaSki组的肿瘤体积减小幅度最大。第28天各组裸鼠肿瘤体积分别为pAd-E6/E7-DC-CTL-CaSki组(5.40 ± 10.80) mm³、pAd-mock-DC-CTL-CaSki组(96.90 ± 45.05) mm³、DC-CTL-CaSki组(217.20 ± 51.00) mm³、CaSki组(580.40 ± 197.25) mm³。多组均数比较 $F=23.335, P<0.05$,与CaSki组相比pAd-E6/E7-DC-CTL-CaSki-

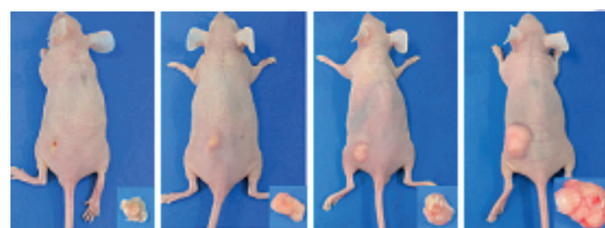
ki组裸鼠肿瘤明显减小,结果见图3、表1和图4。



A. pAd-E6/E7-DC-CTL-CaSki组;B. pAd-mock-DC-CTL-CaSki组;C. DC-CTL-CaSki组;D. CaSki组

图3 各组裸鼠肿瘤体积变化曲线

Fig.3 Curves of changes in tumor volume in each group



A. pAd-E6/E7-DC-CTL-CaSki组;B. pAd-mock-DC-CTL-CaSki组;C. DC-CTL-CaSki组;D. CaSki组

图4 免疫治疗28d后各组老鼠的移植瘤大小

Fig.4 Size of transplanted tumor in each group on 28 d after immunotherapy

2.4 各组肿瘤组织的HE染色

各组肿瘤组织HE染色结果显示,实验组即pAd-E6/E7-DC-CTL-CaSki组的肿瘤细胞有大部分坏死,其他对照肿瘤组组织染色可见肿瘤细胞呈巢样分布,细胞大小不一,形状各异,胞质丰富、核大、深染,CaSki组肿瘤细胞形态最为典型。见图5。

2.5 肿瘤组织Bax的表达

免疫组化检测肿瘤组织中Bax蛋白的表达结果显示:Bax主要表达于细胞质,pAd-E6/E7-DC-CTL-CaSki组最高,而CaSki组表达最低。见图6。

2.6 肿瘤组织Bcl-2的表达

免疫组化检测肿瘤组织中Bcl-2蛋白的表达结果显示:Bcl-2主要表达于内质网膜、线粒体膜和核膜,pAd-E6/E7-DC-CTL-CaSki组最低,而CaSki组表达最高。见图7。

表1 各组肿瘤体积($n=4, \bar{x} \pm s$)

Tab.1 Tumor volume of mice in four groups ($n=4, \bar{x} \pm s$)

组别	肿瘤体积 (mm ³)				
	0 d	7 d	14 d	21 d	28 d
pAd-E6/E7-DC-CTL-CaSki组	84.20 ± 66.40	68.40 ± 79.20	36.00 ± 72.00	22.50 ± 45.00	5.40 ± 10.80 ^a
pAd-mock-DC-CTL-CaSki组	1.20 ± 2.40	154.80 ± 55.62	156.20 ± 127.77	115.10 ± 77.87	96.90 ± 45.05
DC-CTL-CaSki组	4.00 ± 2.77	55.20 ± 18.36	150.80 ± 58.14	198.10 ± 56.45	217.20 ± 51.00
CaSki组	6.00 ± 6.04	69.60 ± 20.80	506.40 ± 202.47	546.60 ± 275.23	580.40 ± 197.25

注:a, $P<0.05$ 与CaSki组比较

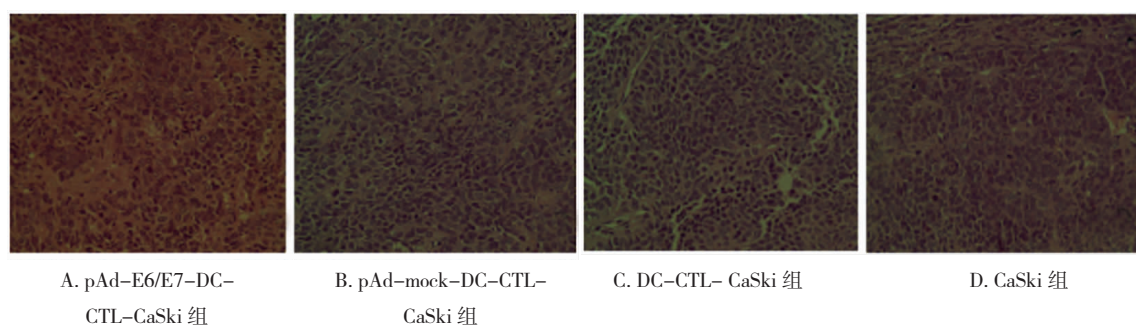


图 5 各组小鼠肿瘤组织 HE 染色(400 ×)

Fig.5 HE staining of tumor tissues in each group (400 ×)

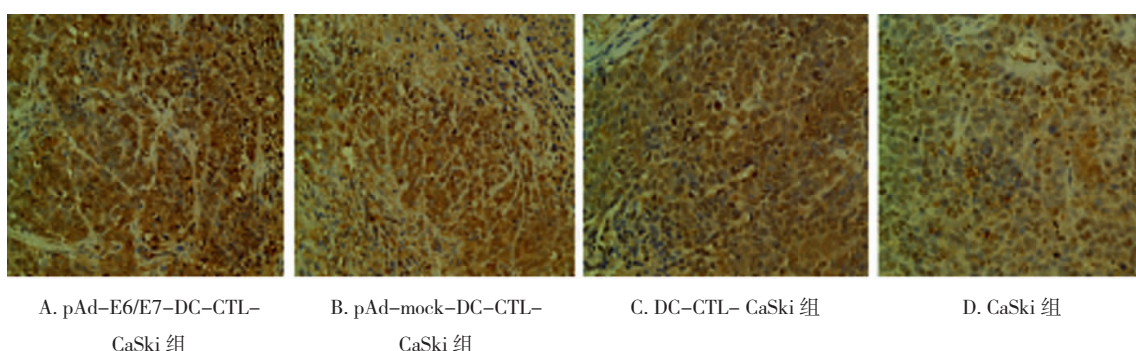


图 6 肿瘤组织 Bax 的表达 (400 ×)

Fig.6 Bax expressions of tumor tissues (400 ×)

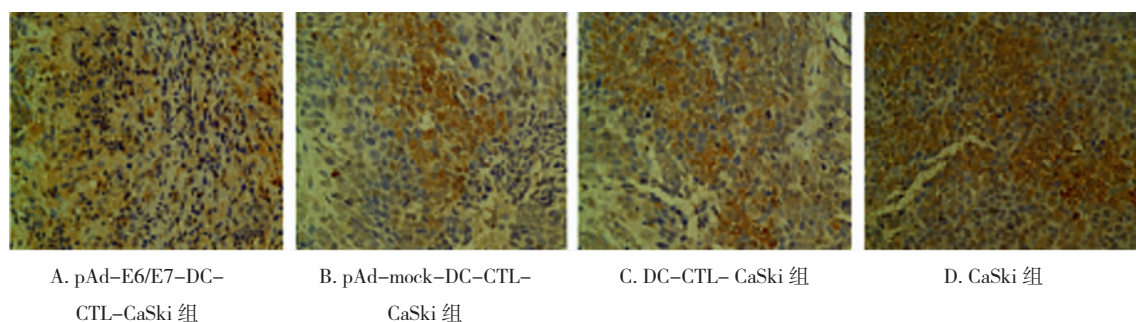


图 7 肿瘤组织 Bcl-2 的表达 (400 ×)

Fig.7 Bcl-2 expressions of tumor tissues (400 ×)

3 讨 论

DC被认为是体内功能最强大的抗原提呈细胞,能够激活 T 淋巴细胞,产生 CTL,启动人体的特异性免疫,溶解杀伤肿瘤细胞。在抗肿瘤免疫应答中显示出巨大的潜能^[4-6]。因此 DC 成为研究肿瘤免疫治疗的热点。本实验构建带有 HPV-16E6/E7 基因的 DC 疫苗,将 DC 疫苗皮下注射到 BALB/c 小鼠体内,提取 BALB/c 小鼠脾脏的 CTL,腹腔注入裸鼠体内,观察 CTL 在裸鼠体内对人宫颈癌 CaSki 细

胞移植瘤的抗肿瘤作用,为基于 DC 疫苗的肿瘤生物治疗提供坚实的实验依据。

本实验在前期实验基础上着重研究 HPV-16E6/E7DC 疫苗在小鼠体内对宫颈癌移植瘤的抑制作用。首先构建 HPV-16E6/E7DC 疫苗,3 次连续免疫 BALB/c 小鼠。21 d 后,提取免疫的 BALB/c 小鼠脾脏的 T 淋巴细胞,把提取的 DC 疫苗免疫 BALB/c 小鼠 CTL 注入已注射过宫颈癌 CaSki 细胞的裸鼠体内,观察肿瘤的生长状况。

裸鼠的肿瘤体积曲线显示:CaSki 组的肿瘤体积比 pAd-E6/E7-DC-CTL-CaSki 组要大得多且随

时间的增加呈增长趋势,而 pAd-E6/E7-DC-CTL-CaSki 组的肿瘤体积较小,随时间增加呈递减趋势。比较第 28 天肿瘤体积发现 pAd-E6/E7-DC-CTL-CaSki 组肿瘤体积最小,CaSki 组肿瘤体积最大,表明 HPV-16E6/E7 基因修饰的 DC 疫苗能够抑制肿瘤生长。裸鼠肿瘤组织的 HE 染色结果显示,实验组即 pAd-E6/E7-DC-CTL-CaSki 组的肿瘤细胞有大部分坏死,其他对照肿瘤组组织染色可见肿瘤细胞呈巢样分布,细胞大小不一,形状各异,胞质丰富、核大、深染,CaSki 组肿瘤细胞形态最为典型。该结果表明 pAd-E6/E7-DC-CTL-CaSki 组对肿瘤有较明显的抑制作用,导致肿瘤组织多处坏死,而 CaSki 组肿瘤细胞增殖明显。DC 疫苗能够捕捉肿瘤抗原,处理后与组织相容性复合物(major histocompatibility complex,MHC)-I、MHC-II 类分子结合形成 MHC 类分子-抗原肽复合物,表达于细胞表面,提呈给 T 细胞,在此过程中 DC 细胞逐渐成熟,许多黏附分子、共刺激分子表达上调,为 T 细胞提供第 2 活化信号,促进 T 细胞增殖、分化、产生 CTL,杀伤肿瘤细胞;肿瘤抗原肽也可通过 DC 经 MHC-I 途径提呈给 CD8⁺T 细胞,直接诱导 CTL 反应,杀伤肿瘤细胞^[7-8]。

肿瘤的发生发展是多因素作用的最终结果,可能是细胞的异常增殖也可能是细胞的异常凋亡。细胞凋亡是指细胞在一定条件下,启动自身机制而发生的一系列程序性自主死亡,是调节机体细胞群体相对平衡的重要方式。Bcl-2 和 Bax 基因均属 Bcl-2 家族,在细胞的凋亡调控过程中发挥着及其重要的作用。Bcl-2 作为最重要的凋亡抑制基因,它的过表达会导致肿瘤细胞生存期的延长,组织细胞凋亡。Bax 是促凋亡基因,它的过表达可拮抗 Bcl-2 促进细胞增殖和抑制凋亡的作用。研究表明,CTL 在杀伤肿瘤细胞时释放的穿孔素和丝氨酸颗粒蛋白酶,能够诱导线粒体释放各种促凋亡因子,如 Bcl-2 家族的 Bax 等^[9]促使凋亡的发生。

本实验中,免疫组化检测肿瘤组织中 Bax 蛋白的表达结果显示:pAd-E6/E7-DC-CTL-CaSki 组表达最高,CaSki 组表达最低;免疫组化检测 Bcl-2 蛋白的表达结果显示:实验组 pAd-E6/E7-DC-CTL-

CaSki 组表达最低,而 CaSki 组表达最高;该结果与前期实验疫苗诱导的 CTL 能够诱导 CaSki 细胞的体外凋亡的结论相一致^[10]。表明 HPV-16E6/E7DC 疫苗能够诱导 CTL 抑制裸鼠人宫颈癌 CaSki 细胞移植瘤的生长。

参 考 文 献

- [1] Zeng Q, Peng S, Monie A, et al. Control of cervicovaginal HPV-16 E7-expressing tumors by the combination of therapeutic HPV vaccination and vascular disrupting agents[J]. Hum Gene Ther, 2011, 22(7): 809-819.
- [2] Moscicki AB. HPV vaccines: today and in the future[J]. Adolesc Health, 2008, 43(4s): s26-s40.
- [3] Yugawa T, Kiyono T. Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins[J]. Rev Med Virol, 2009, 19(2): 97-113.
- [4] Cubillos-Zapata C, Guzman E, Turner A, et al. Differential effects of viral vectors on migratory afferent lymph dendritic cells in vitro predict enhanced immunogenicity in vivo[J]. J Virol, 2011, 85(18): 9385-9394.
- [5] Ballestrero A, Boy D, Moran E, et al. Immunotherapy with dendritic cells for cancer[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2008, 60(2): 173-183.
- [6] Lebson L, Wang T, Jiang Q, et al. Induction of the glucocorticoid-induced leucine zipper gene limits the efficacy of dendritic cell vaccines[J]. Cancer Gene Ther, 2011, 18(8): 563-570.
- [7] Palucka K, Banchereau J. Cancer immunotherapy via dendritic cells[J]. Nat Rev Cancer, 2012, 12(4): 265-277.
- [8] Yang X, Zhu H, Hu Z. Dendritic cells transduced with TEM8 recombinant adenovirus prevents hepatocellular carcinoma angiogenesis and inhibits cells growth[J]. Vaccine, 2010, 28(43): 7130-7135.
- [9] Kim J H, Kang T H, Noh K H, et al. Enhancement of dendritic cell-based vaccine potency by anti-apoptotic siRNAs targeting key pro-apoptotic proteins in cytotoxic CD8⁺ T cell-mediated cell death[J]. Immunol Lett, 2009, 122(1): 58-67.
- [10] 焦庆昉, 艾青, 符少月, 等. HPV16 E6E7 基因修饰树突状细胞疫苗诱导 CTL 致 CaSki 细胞凋亡体外实验研究[J]. 中国免疫学杂志, 2011, 27(2): 115-119.
- Jiao Q F, Ai Q, Fu S Y, et al. Construction of genetically modified dendritic cell vaccine expressing HPV-16 E6E7 fusion gene and activating specific cytotoxic T lymphocytes to induce apoptosis CaSki cells in vitro[J]. Chinese Journal of Immunology, 2011, 27(2): 115-119.

(责任编辑:关蕴良)