

• 论 著 •

HPV-16 E7 负载的 DC-CIK 对宫颈癌细胞的杀伤效应研究*

张春利, 蔡徐山[△], 齐结华, 宦宇, 吴守乐, 乐江漫
(上海市嘉定区妇幼保健院检验科, 上海 201821)

摘要:目的 研究 HPV-16 E7 抗原肽负载的树突状细胞(DC)与细胞因子诱导杀伤(CIK)细胞共培养 Ag-DC-CIK 对人宫颈癌细胞 siha 的杀伤效应。方法 采集健康人外周血, 分离提取单个核细胞(PBMC), 分别诱导生成 DC 和 CIK 细胞, 观察细胞形态, 流式细胞仪检测 DC 摄取能力及其表面分子 CD83、CD86 和 CIK 细胞 CD3、CD8、CD56 的表达。酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测白细胞介素-12(IL-12)、干扰素- γ (IFN- γ)的水平。实验分为 5 组: 效应细胞 CIK、DC-CIK、Ag1-DC-CIK、Ag2-DC-CIK、AgM-DC-CIK, 分别与靶细胞 siha 共培养, 细胞计数试剂盒(CCK8)法检测效应细胞对 siha 活性的影响, 乳酸脱氢酶(LDH)释放法检测效应细胞对 siha 的杀伤效应。结果 DC 成熟后, 摄取能力减弱, CD86、CD83 表达上调, 上清液中 IL-12 水平增高; 与 DC 共培养的 CIK 细胞, CD3⁺CD8⁺、CD3⁺CD56⁺ 细胞比例提高, 分泌 IFN- γ 能力增强; 与 CIK 细胞、DC-CIK 组相比, Ag1-DC-CIK、Ag2-DC-CIK、AgM-DC-CIK 组均表现出对 siha 细胞更强的杀伤效应。结论 成功构建 Ag-DC-CIK 共培养体系, 获得两组有效的 HPV-16 E7 蛋白抗原肽, 为治疗宫颈癌提供了新思路。

关键词: HPV-16 E7; 树突状细胞; 细胞因子诱导的杀伤细胞; 宫颈癌

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2020.08.015

中图法分类号: R737.33

文章编号: 1673-4130(2020)08-0956-04

文献标识码: A

Study the killing effect of HPV-16 E7-loaded DC-CIK on cervical carcinoma cells*

ZHANG Chunli, CAI Xushan[△], QI Jiehua, HUAN Yu, WU Shoule, LE Jiangman

(Department of Clinical Laboratory, Maternal and Child Health Hospital of Jiading District, Shanghai 201821, China)

Abstract: **Objective** To study the killing effect of HPV-16 E7-loaded dendritic(DC) cells co-cultured with cytokine-induced killing(CIK) cells on cervical carcinoma cells. **Methods** The peripheral blood of healthy adults was collected, and the peripheral blood mononuclear cells(PBMC) were separated, then DC and CIK were induced and cultured. The cell morphology was observed under microscope. Flow cytometry was used to analyze the uptake capacity and surface markers CD86 and CD83 of the DC, and CD3, CD8 and CD56 of the CIK. Levels of IL-12 and IFN- γ were determined by enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). The effector cells were divided into five groups: CIK, DC-CIK, Ag1-DC-CIK, Ag2-DC-CIK and AgM-DC-CIK, which were co-cultured with target cells siha respectively. The viability of siha was detected by CCK-8 and the killing effects of effector cells were detected by LDH release method. **Results** The uptake capacity of mature DC was weakened, but the surface markers CD86, CD83 were up regulated, and the levels of secreted IL-12 in the supernatants were higher than that of immature DC. The proportions of CD3⁺CD8⁺, CD3⁺CD56⁺ were significantly elevated in DC-CIK, and the levels of IFN- γ in the supernatants were higher than that of CIK group. The killing effects of Ag1-DC-CIK, Ag2-DC-CIK and AgM-DC-CIK were obviously higher than CIK and DC-CIK. **Conclusion** The co-culture system of DCs-CIKs was successfully constructed, and two effective HPV-16 E7 antigen peptides were obtained, which provides an experimental basis for therapy of cervical carcinoma.

Key words: HPV-16 E7; dendritic cells; cytokine-induced cells; cervical carcinoma

宫颈癌是严重威胁女性健康的恶性疾病之一, 在生殖系统中发病率仅次于乳腺癌, 且近年来发病率和致死率均逐年上升^[1]。流行病学调查分析发现, 高危型人乳头瘤病毒(HR-HPV)持续感染是导致宫颈癌

* 基金项目: 上海市嘉定区卫生和计划生育委员会基金项目(2016-16)。

作者简介: 张春利, 女, 技师, 主要从事医学检验及肿瘤方面的研究。 [△] 通信作者, E-mail: cai139149@126.com。

本文引用格式: 张春利, 蔡徐山, 齐结华, 等. HPV-16 E7 负载的 DC-CIK 对宫颈癌细胞的杀伤效应研究[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(8): 956-959.

发生、发展的主要原因,不同型别的 HPV 致癌作用差别很大,其中 HPV-16 是目前所发现的最重要的致癌性 HPV,感染人数占宫颈癌病例总数的 1/2。HPV-16 E6、E7 是诱导细胞恶变的主要蛋白,也是治疗宫颈癌的理想靶蛋白,如果能破坏体内表达 HPV E6、E7 蛋白的细胞,就能阻止肿瘤的发生、发展,其中 E7 蛋白抗原性更强^[2-5]。近年来细胞免疫治疗已成为继手术、放疗、化疗之后治疗肿瘤的又一重要方法,尤其是特异性细胞免疫治疗已成为国际研究热点,目前树突状细胞(DC)联合细胞因子诱导的杀伤(CIK)细胞在多种肿瘤的治疗中取得了较好的疗效^[6-9]。因此,本研究拟通过用 HPV-16 E7 蛋白抗原肽负载 DC,再与 CIK 细胞共培养,观察其对 siha 细胞的杀伤作用,为治疗宫颈癌提供新的治疗方案。

1 材料与方法

1.1 材料 人外周血淋巴细胞分离液购自北京索莱宝, RPMI1640 培养基购自 sigma,胎牛血清购自 Gibco 公司,重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(rhGM-CSF)、重组人白细胞介素-4(rhIL-4)、重组人肿瘤坏死因子- α (rhTNF- α)、干扰素- γ (IFN- γ)、重组人白细胞介素-1 α (rhIL-1 α)、重组人白细胞介素-2(rhIL-2)、白细胞介素-12(IL-12) ELISA 试剂盒、IFN- γ ELISA 试剂盒购自美国 Pepro Tech 公司,流式抗体 CD83、CD86、CD3、CD8、CD56 购自美国 BD 公司, FITC-dextran 购自 santacruz, CCK8 试剂购自 Thermo, LDH 释放检测试剂盒购自 Promega, 宫颈癌 siha 细胞购自中科院上海细胞库。

1.2 方法

1.2.1 HPV-16 E7 抗原肽的设计与合成 以 HPV-16 E7 为标准,在 UniProtKB 蛋白库中,利用 ExPASy-ProtScale、Antibody epitope prediction 抗原表位预测网站及 Cn3D 软件,分析推测出可能成为抗原表位的氨基酸序列,最终根据亲水性、抗原性及表面可能性选取两条抗原肽,分别为 Ag1(HPV-16 E738-54): CDGPAGQAEPDRAHYNN; Ag2(HPV-16 E714-27): SLQPETTDLNCYEYQ,由吉尔生化(上海)合成。

1.2.2 DC 培养 分离健康人单个核细胞(PBMC),磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 3 次,用含 10% 胎牛血清(FBS)的 RPMI1640 完全培养基混匀,接种至 12 孔板,37 °C 5% CO₂ 培养 3 h。将悬浮细胞转至 T25 培养瓶,进行 CIK 细胞诱导培养,剩余的贴壁细胞加入细胞因子进行 DC 诱导培养,其中 rhGM-CSF 100 ng/mL、rhIL-4 30 ng/mL,隔天半量换液,第 5 天在相应孔中分别加入 HPV-16 E7 抗原肽,终浓度为 50 μ g/mL,分别标记为 Ag1-DC、Ag2-DC、AgM-DC(两条抗原肽 1 : 1 混合)进行抗原负载,第 6 天加入 1 000 U/mL rhTNF- α 促进 DC 分化成熟,第 8 天得到成熟 DC。

1.2.3 CIK 细胞培养 将悬浮细胞转移至 T25 培养

瓶后,加入 1 000 U/mL IFN- γ , 37 °C 5% CO₂ 培养箱中培养,24 h 后加入 50 ng/mL CD3 单抗、1 000 U/mL IL-2、1 000 U/mL IL-1 α ,每 3 天换液 1 次,并添加相应浓度的 IL-2,第 8 天收获 CIK 细胞。

1.2.4 DC-CIK 共培养 分别将未加抗原负载的成熟 DC、Ag1-DC、Ag2-DC、AgM-DC 与 CIK 细胞以 1 : 10 比例共培养,每两天补充含 10% 血浆、100 ng/mL rhGM-CSF、1 000 U/mL IL-2 的 RPMI1640 培养基,7 d 后收获 DC-CIK、Ag1-DC-CIK、Ag2-DC-CIK、AgM-DC-CIK。

1.2.5 流式细胞术检测细胞表型 将需检测的细胞用 PBS 洗涤重悬,分别加入相应抗体,混匀后室温避光孵育 20 min,流式细胞仪检测 DC 摄取能力及表型(CD83、CD86)、CIK 细胞表型(CD3、CD8、CD56)。

1.2.6 ELISA 法检测细胞因子 取未成熟 DC(iDC)、成熟 DC(mDC)细胞上清液,ELISA 法检测 IL-12 水平;取 CIK 细胞、DC-CIK、Ag1-DC-CIK、Ag2-DC-CIK、AgM-DC-CIK 细胞上清液,检测 IFN- γ 水平。

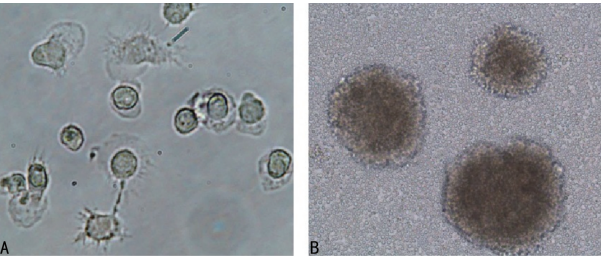
1.2.7 CCK8 法检测效应细胞对 siha 细胞活性的影响 实验分为 5 组,取对数生长期的 siha 细胞,接种于 96 孔板,1 $\times$ 10⁴ 个/孔,贴壁后,将效应细胞 CIK、DC-CIK、Ag1-DC-CIK、Ag2-DC-CIK、AgM-DC-CIK 分别加入靶细胞 siha 培养体系中(效靶比 5 : 1、10 : 1、20 : 1),培养 72 h,加入 CCK8 10 μ L/孔,于培养箱中孵育 2 h,在 450 nm 处检测吸光度值(A 值),取 3 个平行复孔的平均值。

1.2.8 LDH 释放法检测效应细胞对 siha 细胞的杀伤率 将对数生长期的 siha 细胞接种于 96 孔板,1 $\times$ 10⁴ 个/孔,同时将效应细胞 CIK、DC-CIK、Ag1-DC-CIK、Ag2-DC-CIK、AgM-DC-CIK 分别加入 siha 细胞培养体系中(效靶比 5 : 1、10 : 1、20 : 1),并设置自然释放孔、最大释放孔,在 490 nm 处检测 A 值,计算各组细胞杀伤率,杀伤率(%) = (实验组 A 值 - 自然释放组 A 值) / (最大释放组 A 值 - 自然释放组 A 值) $\times$ 100%。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间均数比较采用 *t* 检验,多组间均数比较采用单因素方差分析,*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DC、CIK 细胞形态学观察 外周血 PBMC 贴壁细胞经细胞因子诱导后,体积增大,呈悬浮或半悬浮状态,形态不规则,成熟后细胞表面有毛刺样突起,为典型的 DC(图 1A);CIK 细胞与 DC 共培养后,增殖较快,呈集落生长(图 1B)。



注:A表示 mDC(×400);B表示 DC-CIK(×100)。

图1 成熟DC、DC-CIK共培养形态

2.2 DC、CIK细胞表型鉴定 流式细胞仪检测未成熟DC(iDC)、成熟DC(mDC)细胞摄取能力及CD83⁺、CD86⁺的表达水平,结果表明,DC成熟后,摄取能力降低,CD83⁺、CD86⁺表达率升高,差异有统计学意义($P<0.05$),见表1;DC-CIK细胞表面CD3⁺CD8⁺、CD3⁺CD56⁺表达水平高于CIK细胞,差异有统计学意义($P<0.05$),见表2。

表1 DC成熟前后摄取率及表型的变化(%, $\bar{x}\pm s$)

项目	CD83 ⁺	CD86 ⁺	摄取率
iDC	66.60±1.03	27.60±0.92	51.00±1.15
mDC	82.20±0.91 [*]	60.30±1.01 [*]	18.20±1.05 [*]

注:与iDC比较,^{*} $P<0.05$ 。

表2 与DC共培养后CIK细胞表型的变化(%, $\bar{x}\pm s$)

项目	CD3 ⁺ CD8 ⁺	CD3 ⁺ CD56 ⁺
CIK	54.60±0.97	4.90±0.17
DC-CIK	77.40±1.08 [#]	12.20±0.21 [#]

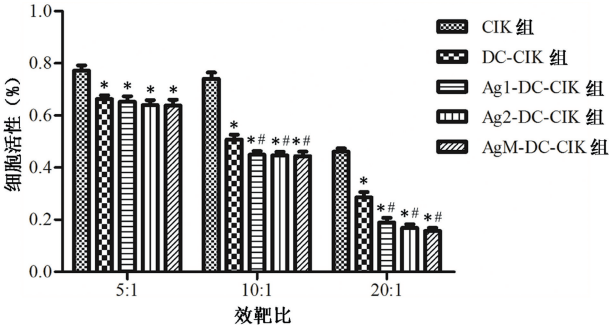
注:与CIK比较,[#] $P<0.05$ 。

2.3 DC、CIK细胞分泌细胞因子能力比较 ELISA结果显示,与iDC[(141.30±2.12)pg/mL]相比,mDC上清液中IL-12[(235.20±3.58)pg/mL]增多,差异有统计学意义($P<0.05$)。与CIK细胞[(328.60±5.41)pg/mL]相比,DC-CIK[(472.90±4.17)pg/mL]、Ag1-DC-CIK[(502.30±5.64)pg/mL]、Ag2-DC-CIK[(527.60±5.44)pg/mL]、AgM-DC-CIK[(538.20±4.93)pg/mL]细胞上清液中IFN- γ 增多,差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.4 效应细胞对siha细胞活性的影响 5组效应细胞对siha细胞均有抑制作用,但与CIK组相比,其余4组抑制作用更强,且经HR-HPV-16 E7蛋白抗原肽负载的3组效应细胞,在效靶比为10:1、20:1时,抑制作用均高于DC-CIK组,差异有统计学意义($P<0.05$),见图2。

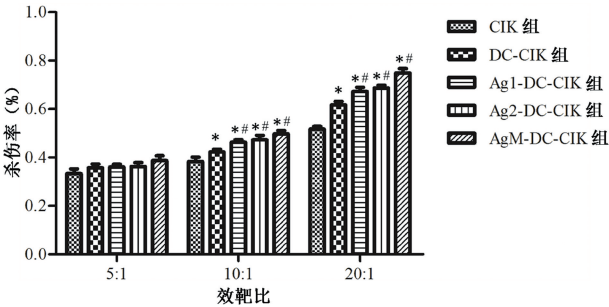
2.5 效应细胞对siha细胞的杀伤效应 与CCK8结果相似,5组效应细胞对siha细胞均有杀伤作用,但效靶比为10:1和20:1时,共培养的4组效果明显强于CIK组,且经抗原肽负载的3组效应细胞Ag1-DC-CIK、Ag2-DC-CIK、AgM-DC-CIK杀伤能力强于DC-CIK组,在5:1、10:1、20:1范围内,随效靶比

升高,杀伤作用也越强,差异有统计学意义($P<0.05$),见图3。



注:与CIK组比较,^{*} $P<0.05$;与DC-CIK组比较,[#] $P<0.05$ 。

图2 各组效应细胞对siha细胞活性的影响



注:与CIK组比较,^{*} $P<0.05$;与DC-CIK组比较,[#] $P<0.05$ 。

图3 各组效应细胞对siha细胞的杀伤率

3 讨论

宫颈癌在全球女性恶性肿瘤发病率中居第2位,严重威胁着女性的健康和生命^[2-4]。据世界卫生组织统计,每年新发病例中,发展中国家所占比例高达80%,而我国宫颈癌发病率和病死率约占全世界的1/3,并且有年轻化趋势^[5]。因此防治宫颈癌及改善患者预后的工作极为重要。目前对于宫颈癌的治疗主要以手术与放疗为主,化疗为辅,但由于常见的胃肠道反应、肾毒性、骨髓抑制等缺点,限制了化疗在临床的长期应用^[10-11]。病因学和流行病学研究表明,HR-HPV持续感染是宫颈癌及其癌前病变的主要病因^[12],其中,HPV-16是目前发现的最重要的致癌性HPV,感染人数占宫颈癌病例总数的1/2。HPV基因组中一般含8个可读框(ORF),其中E6、E7是主要致癌蛋白。E7主要与pRb特异性结合,改变细胞周期,从而引起细胞的恶性转化和无限增殖,导致细胞永生^[13-15]。

DC是目前发现的体内最经典的抗原提呈细胞,能够将抗原加工处理后呈递给CD8⁺T细胞,促使T细胞增殖分化为细胞毒性T淋巴细胞,从而对抗恶性肿瘤。CIK细胞主要来源于T细胞,是一组细胞群,不仅具有T细胞强大的抗肿瘤活性,还具有NK细胞非MHC限制性杀死肿瘤细胞的优势。而DC和CIK细胞共培养,CIK细胞促使DC进一步成熟,成熟DC又会加快CIK细胞释放IFN- γ 等有效因子,DC、CIK细胞的这种相互作用使培养

胞更强的杀伤能力^[6-8]。已有研究表明,DC 处理肿瘤抗原,然后与 CIK 细胞共培养,可以提高对特定靶细胞的杀伤能力。DC-CIK 对乳腺癌^[6]、肺癌^[9,16]、卵巢癌^[17]等均能有效控制,不良反应作用小,不损伤正常组织,能有效改善患者的免疫功能。

大部分肿瘤没有特异性抗原,只能反复冻融肿瘤细胞来负载 DC,但其特异性和有效性受到了限制,且可能对正常细胞也会进行攻击。宫颈癌发病机制明确,因此,根据 HPV-16 特性,设计并合成了 E7 蛋白抗原肽作为特异性抗原负载 DC。实验结果表明,DC-CIK 共培养可以提高抗肿瘤 T 淋巴细胞百分比,分泌更多的 IFN- γ ,在效靶比为 10 : 1、20 : 1 时,对靶细胞 siha 的杀伤效应高于 CIK 细胞,而经 HPV-16 E7 抗原肽负载的 DC 与 CIK 细胞共培养,表现出对靶细胞更加强大的杀伤作用,并随效靶比升高而增强。将两条抗原肽等比例混合负载 DC 与 CIK 细胞共培养,与单条抗原负载的 DC-CIK 相比,杀伤效果比较差异无统计学意义($P > 0.05$),但明显强于单纯 CIK 细胞和 DC-CIK,这对于指导治疗宫颈癌有重要意义。

4 结 论

本研究设计的两条 HPV-16 E7 抗原肽,负载 DC 后,能进一步激活 CIK 细胞,增强对宫颈癌 siha 细胞的杀伤效应,为临床宫颈癌的治疗提供了理论依据,但尚需进一步的体内实验加以证实,其具体机制也有待进一步研究。

参考文献

- [1] NOGUEIRA-RODRIGUES A, DE MELO A C, GARCES A H, et al. Patterns of care and outcome of elderly women diagnosed with cervical cancer in the developing world [J]. *Inter J Gynecol Cancer*, 2016, 26(7):1246-1251.
- [2] LI X Y, WANG X. The role of human cervical cancer oncogene in cancer progression [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(6):8363-8368.
- [3] TEWARI K S, MONK B J. New strategies in advanced cervical cancer: from angiogenesis blockade to immunotherapy [J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(21):5349-5358.
- [4] AL-MANDEEL H M, SAGR E, SAIT K, et al. Clinical practice guidelines on the screening and treatment of pre-cancerous lesions for cervical cancer prevention in Saudi Arabia [J]. *Ann Saudi Med*, 2016, 36(5):313-320.
- [5] WANG S M, QIAO Y L. Implementation of cervical cancer screening and prevention in China-challenges and reality [J]. *JPN J Clin Oncol*, 2015, 45(1):7-11.
- [6] CHEN Q, CUI X X, LIANG P F, et al. Immunotherapy with dendritic cells and cytokine-induced killer cells for MDA-MB-231 breast cancer stem cells in nude mice [J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(7):2947-2955.
- [7] ZHEN Z J, YANG K B, YE L T, et al. HLA-E inhibitor

enhances the killing of neuroblastoma stem cells by co-cultured dendritic cells and cytokine-induced killer cells loaded with membrane-based microparticles [J]. *Am J Cancer Res*, 2017, 7(2):334-345.

- [8] ZHAO Y J, JIANG N, SONG Q K, et al. Continuous DC-CIK infusions restore CD8⁺ cellular immunity, physical activity and improve clinical efficacy in advanced cancer patients unresponsive to conventional treatments [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2015, 16(6):2419-2423.
- [9] ZHANG L, YANG X, SUN Z, et al. Dendritic cell vaccine and cytokine-induced killer cell therapy for the treatment of advanced non-small cell lung cancer [J]. *Oncol Lett*, 2016, 11(4):2605-2610.
- [10] ESKANDER R N, TEWARI K S. Chemotherapy in the treatment of metastatic, persistent, and recurrent cervical cancer [J]. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2014, 26(4):314-321.
- [11] CHANTALAT E, VIDAL F, LEGUEVAQUE P, et al. Cervical cancer with paraaortic involvement: do patients truly benefit from tailored chemoradiation therapy: A retrospective study on 8 French centers [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2015, 193(1):118-122.
- [12] JIA L, HU Y, YANG G, et al. Puerarin suppresses cell growth and migration in HPV-positive cervical cancer cells by inhibiting the PI3K/mTOR signaling pathway [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 18(1):543-549.
- [13] AJORLOO M, ALAMDARY A, SOLEIMANJAH I, et al. Immunization of mice by the co-administration of codon-optimized HPV16 E7 and IL12 genes against HPV16-associated cervical cancer [J]. *Microb Pathog*, 2019, 132(1):20-25.
- [14] JIANG P F, WANG L D, HOU B L, et al. A novel HPV16 E7-affitoxin for targeted therapy of HPV16-induced human cervical cancer [J]. *Theranostics*, 2018, 8(13):3544-3558.
- [15] CESUR Ö, NICOL C, GROVES H, et al. The subcellular localisation of the human papillomavirus (HPV) 16 E7 protein in cervical cancer cells and its perturbation by RNA aptamers [J]. *Viruses*, 2015, 7(7):3443-3461.
- [16] HOU Y, ZANG D, LI X, et al. Effect of cytokine-induced killer cells combined with dendritic cells on the survival rate and expression of 1433 ζ and pBad proteins in Lewis lung cancer cell lines [J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(2):1815-1820.
- [17] QIN W X, XIONG Y, CHEN J, et al. DC-CIK cells derived from ovarian cancer patient menstrual blood activate the TNFR1-ASK1-AIP1 pathway to kill autologous ovarian cancer stem cells [J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(7):3364-3376.