

## 治疗性 HPV DNA 疫苗的研究进展

徐思慧<sup>1</sup>, 曹保利<sup>2\*</sup>

(1. 天津中医药大学 研究生院, 天津 300193; 2. 天津南开医院 妇产科, 天津 300100)

**摘要:** HPV 感染与宫颈癌的发生密切相关。治疗性 HPV DNA 疫苗可以治疗 HPV 感染, 进而阻断由 HPV 引起的宫颈癌前病变。基于 HPV 及 DNA 疫苗的深入研究, 研究者通过不同方法来改进治疗性 HPV DNA 疫苗, 以期在不久的将来能应用于临床。

**关键词:** HPV; DNA 疫苗; 宫颈癌

**中图分类号:** R 173 **文献标志码:** A

## Advances in the researches of the therapeutic HPV DNA vaccines

XU Si-hui<sup>1</sup>, CAO Bao-li<sup>2\*</sup>

(1. Graduate School, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193;

2. Dept. of Obstetrics and Gynecology, Nankai Hospital, Tianjin 300100, China)

**Abstract:** HPV infection is closely related to cervical cancer. Therapeutic HPV DNA vaccines can treat HPV infection so prevent cervical intraepithelial neoplasia. So we mainly reviewed HPV, therapeutic HPV DNA vaccines and clinical improvements. In order to applied the vaccine in clinical treatment in the future, researchers use different methods to improve the therapeutic HPV DNA vaccines which is based on intensive study of HPV and DNA vaccines.

**Key words:** HPV; DNA vaccines; cervical cancer

2008 年在全世界范围内估计有 53 万宫颈癌新发病例, 约有 27 万人死于宫颈癌。宫颈癌是仅次于乳腺癌和结直肠癌的第三大女性常见的癌症<sup>[1]</sup>。高危型人乳头瘤病毒 (human papilloma virus, HPV) 持续感染是子宫颈癌发生发展最重要的致病因素<sup>[2]</sup>。目前, 预防性 HPV 疫苗已应用于临床, 但是对于已经感染 HPV 的妇女并没有作用, 因此治疗性 HPV DNA 疫苗的研究逐渐成为近年来研究的焦点。

### 1 HPV 及致癌机制

#### 1.1 HPV

HPV 是一种双链 DNA 病毒。HPV 的基因组功

能区主要由早期区, 晚期区和长控区组成。早期区包括 E1, E2, E4, E5, E6 和 E7。E1 参与病毒 DNA 复制, E2 参与病毒基因的转录、复制及维护, E4 可能与病毒从宿主细胞释放有关, E6 编码抑制细胞周期的蛋白, 可抑制促进细胞凋亡的 P53 基因, E7 编码与肿瘤抑制因子 Rb 结合的蛋白, 从而使细胞周期紊乱。晚期区包括主要衣壳蛋白和次要衣壳蛋白, 编码病毒晚期的结构蛋白, 形成完整的病毒颗粒。长控区位于 E 区和 L 区之间, 调节病毒 DNA 复制和基因表达<sup>[3-4]</sup>。

目前已识别的 HPV 达 200 种, 大约有 40 种左右通过性接触感染生殖道。这些感染生殖道的 HPV

根据其致癌潜能,可以分为高危型和低危型,高危型 HPV 导致的宫颈癌占有所有宫颈癌的 95%,其中 HPV16 和 18 是宫颈癌最常见的 HPV 类型,低危型 HPV 可引起良性尖锐湿疣<sup>[2,5]</sup>。

## 1.2 HPV 致癌机制

高危型 HPV 表达癌基因 E6 和 E7 是导致宫颈上皮癌变发生的重要因素。HPV 基因序列与宿主细胞基因组整合,使 E2 失活,进而使癌基因 E6 和 E7 过表达,从而破坏细胞周期<sup>[6]</sup>。E6 蛋白可以与 E6 相关蛋白(E6-associated protein, E6-AP)结合形成 E3 泛素化酶,再与 P53 蛋白结合,使 P53 蛋白降解,从而使细胞周期失控而使细胞永生化<sup>[7-8]</sup>。在正常情况下,肿瘤抑制因子 Rb 与 p107、p130 和 E2F 形成复合物,来阻止静止期细胞进入细胞周期,同时调节细胞凋亡和分化过程。而 E7 蛋白可以与 Rb 结合,使 Rb/E2F 复合物解离,解除 Rb 蛋白的抑制作用,使静止期细胞进入细胞周期,进而使细胞永生化<sup>[5]</sup>。

## 2 治疗性 HPV DNA 疫苗

### 2.1 治疗性 HPV DNA 疫苗的作用机理

治疗性 HPV DNA 疫苗是将编码 HPV 抗原蛋白的 DNA 直接导入机体内,外源基因编码目的蛋白,诱导机体产生细胞免疫和体液免疫应答。DNA 疫苗被导入宿主细胞后,可在细胞内表达抗原蛋白,一部分抗原蛋白在蛋白酶体降解成多肽,通过抗原肽转运蛋白进入内质网腔中,与主要组织相容性复合体 I 类分子和  $\beta 2$  微球蛋白结合,再运输到细胞膜表面,供  $CD8^+ T$  淋巴细胞识别,诱导细胞免疫反应<sup>[9]</sup>。另一部分抗原蛋白在溶酶体降解成多肽,与主要组织相容性复合体 II 类分子结合,呈递到细胞表面,激活  $CD4^+ T$  淋巴细胞,诱导免疫反应。与此同时,在  $CD4^+ T$  淋巴细胞辅助下,抗原蛋白刺激 B 细胞产生中和抗体,诱导体液免疫<sup>[10]</sup>。

### 2.2 治疗性 HPV DNA 疫苗的优缺点

治疗性 HPV DNA 疫苗优点<sup>[11-13]</sup>:1)制作简单,成本低;2)在室温下性质稳定,热稳定性好,便于储存和运输;3)不需要佐剂;4)抗原持续表达,增强免疫记忆;5)不需要载体就能诱导免疫反应;6)可以重复给药;7)相比于 HPV 活病毒和细菌载体疫苗,

DNA 疫苗相对安全;8)可同时诱导体液免疫和细胞免疫。

治疗性 HPV DNA 疫苗缺点<sup>[12,14]</sup>:1)转染宿主细胞效率低,缺乏细胞类型特异性,并且不具备在体内扩增和扩散到周围细胞的能力,所以免疫原性低;2)外源的 DNA 插入到宿主细胞基因组中有可能引起肿瘤抑制基因失活或原癌基因激活。

### 2.3 治疗性 HPV DNA 疫苗改进方法

2.3.1 疫苗递送途径的选择:简单的 DNA 疫苗注射转染效率低,而使用基因枪和电穿孔等方法可提高 DNA 疫苗导入细胞的转染效率。基因枪转染是在较高速度下用包裹 DNA 的金颗粒轰击组织转染细胞。而电穿孔是将细胞暴露在足够高的电场中,使细胞膜通透性瞬时增加,促进宿主细胞对 DNA 疫苗的摄取,提高细胞免疫反应。用电穿孔、基因枪和肌肉注射 3 种方法传递 HPV DNA 疫苗,结果显示相比于肌肉注射,电穿孔和基因枪表现出更好的抗肿瘤性,电穿孔法产生数量最多的 E7 特异性细胞毒性  $CD8^+ T$  细胞<sup>[15]</sup>。

2.3.2 增加免疫佐剂:接种治疗性 HPV DNA 疫苗其功效是有限的。因此,可以通过使用免疫佐剂来增强疫苗的免疫应答。HPV E7 DNA 疫苗联合白细胞介素-2(interleukin, IL-2)或 IL-5 比单独使用疫苗的抗肿瘤作用好,伴随着干扰素- $\gamma$ (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )和细胞毒性 T 淋巴细胞裂解活性的增加,IL-2 作为佐剂效果优于 IL-5,而在 HPV E7 DNA 疫苗联合 IL-2 的基础上增加 4-1BB 受体可将肿瘤治愈率由 7%~27% 提高至 27%~67%,不仅提高了肿瘤治愈率,而且延长了肿瘤免疫记忆时间<sup>[16]</sup>。

此外,将高度优化的 CpG 基序插入到质粒骨架中,用电穿孔技术传递 HPV DNA 疫苗给小鼠,通过 Elispot 分析显示 IFN- $\gamma$  和颗粒酶 B 表达增强,使细胞免疫应答增强,具有良好的抗肿瘤效果<sup>[17]</sup>。结核分枝杆菌热休克蛋白 70(heat shock protein 70, HSP70)和  $\alpha$ -神经酰胺可以作为佐剂,使 HPV16 E7 DNA 疫苗能诱导强烈的 E7 特异性  $CD8^+ T$  细胞应答,显著提高抗肿瘤效应<sup>[18-19]</sup>。

2.3.3 微粒包裹疫苗:用可生物降解的聚合物微粒 ZYC101a 包裹 HPV 16 和 18 的编码 E6、E7 蛋白的质粒 DNA 片段,采用多中心、随机双盲对照方法,将组织活检证实为 CIN 2/3 的女性随机分成安慰剂组

和 ZYC101a 组,第一次注射后 6 个月,受试者行宫颈锥切术,在年龄小于 25 岁的女性中,ZYC101a 可促进 CIN2/3 的消退,并且 ZYC101a 具有良好的耐受性和安全性<sup>[20]</sup>。

2.3.4 联合放/化疗:相比于单独使用 HPV DNA 疫苗或单独放射治疗,低剂量放射与钙网蛋白融合 HPV 16 E7 的突变型联合治疗表达 E7 的 TC-1 肿瘤,在治疗小鼠的肿瘤和脾中产生数量最多的 E7 特异性 CD8<sup>+</sup> T 细胞,并显著增强了治疗肿瘤作用<sup>[21]</sup>。化疗药物环磷酰胺可抑制调节性 T 细胞,从而使调节性 T 细胞无法抑制细胞毒性 CD8<sup>+</sup> T 细胞的功能,因此低剂量的环磷酰胺可增强 HPV DNA 疫苗的抗肿瘤作用<sup>[22]</sup>。此外,芹菜素与 HPV16 E7-HSP70 DNA 疫苗联合治疗 TC-1 肿瘤使肿瘤细胞更容易溶解,通过产生最多数量 E7 特异性 CD8<sup>+</sup> T 细胞从而达到有效的抗肿瘤目的。并且,在体外通过

增加芹菜素的剂量可增强使肿瘤细胞凋亡的作用<sup>[23]</sup>。Toll 样受体 7 激动剂咪喹莫特和血管破坏剂 5,6-二甲基占吨酮-4-乙酸(5,6-dimethylxanthone-4-acetic acid, DMXAA)分别与治疗性 HPV DNA 疫苗联合使用可增强 DNA 疫苗诱发的抗肿瘤效果<sup>[24-25]</sup>。

2.3.5 其他:此外,优化编码子可有效改善 HPV DNA 疫苗效能。优化编码子的 HPV DNA 疫苗具有较高的免疫原性,并且已证明在动物模型中可诱导强烈的细胞免疫和体液免疫<sup>[13]</sup>。

### 3 展望

治疗性 HPV DNA 疫苗具有广阔的临床应用前景,但将治疗性 HPV DNA 疫苗应用于临床,仍然需要提高其安全性和免疫原性。随着研究的不断深入和技术不断完善与成熟,相信不久的将来可降低由 HPV 感染所引起的宫颈癌发生率。

### 参考文献:

- [1] Arbyn M, Castellsagué X, De SS, *et al.* Worldwide burden of cervical cancer in 2008 [J]. *Ann Oncol*, 2011, 22: 2675-2686.
- [2] Hoste G, Vossaert K, Poppe WA J. The Clinical role of HPV testing in primary and secondary cervical cancer screening [J]. *Obstet Gynecol Int*, 2013, 2013: 610373. (doi: 10.1155/2013/610373)
- [3] Kajitani N, Satsuka A, Kawate A, *et al.* Productive lifecycle of human papillomaviruses that depends upon squamous epithelial differentiation [J]. *Front Microbiol*, 2012, 3: 152. (doi:10.3389/fmicb.2012.00152)
- [4] Faridi R, Zahra A, Khan K, *et al.* Oncogenic potential of human papillomavirus (HPV) and its relation with cervical cancer [J]. *Virology*, 2011, 8: 269. (doi: 10.1186/1743-422X-8-269)
- [5] Huh K, Zhou X, Hayakawa H, *et al.* Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with the cullin 2 ubiquitin ligase complex, which contributes to degradation of the retinoblastoma tumor suppressor [J]. *J Virol*, 2007, 81: 9737-9747.
- [6] Zappacosta R, Colasante A, Viola P, *et al.* Chromogenic in situ hybridization and p16/Ki67 dual staining on formalin-fixed paraffin-embedded cervical specimens: correlation with HPV-DNA test, E6/E7 mRNA test, and potential clinical applications [J]. *Biomed Res Int*, 2013, 2013: 453606. (doi:10.1155/2013/453606)
- [7] Bernard X, Robinson P, Nominé Y, *et al.* Proteasomal degradation of p53 by human papillomavirus E6 oncoprotein relies on the structural integrity of p53 core domain [J]. *PLoS One*, 2011, 6: e25981. (doi: 10.1371/journal.pone.0025981)
- [8] Li W, Anderson RA. Star-PAP controls HPV E6 regulation of p53 and sensitizes cells to VP-16 [J]. *Oncogene*, 2014, 33: 928-932.
- [9] Pamer E, Cresswell P. Mechanisms of MHC class I—restricted antigen processing [J]. *Annu Rev Immunol*, 1998, 16: 323-358.
- [10] 许雪梅. DNA 疫苗机制研究进展 [J]. *微生物学免疫学进展*, 2002, 30: 65-70.
- [11] Monie A, Tsen SW, Hung CF, *et al.* Therapeutic HPV DNA vaccines [J]. *Expert Rev Vaccines*, 2009, 8: 1221-1235.
- [12] Han KT, Sin JI. DNA vaccines targeting human papillomavirus-associated diseases: progresses in animal and clinical studies [J]. *Clin Exp Vaccine Res*, 2013, 2: 106-114.

- [13] Zhao KN, Chen J. Codon usage roles in human papillomavirus[J]. *Rev Med Virol*, 2011, 21:397-411.
- [14] Nayereh KG, Khadem G. Preventive and Therapeutic Vaccines against Human Papillomaviruses Associated Cervical Cancers[J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2012, 15:585-601.
- [15] Best SR, Peng S, Juang CM, *et al.* Administration of HPV DNA vaccine via electroporation elicits the strongest CD8<sup>+</sup> T cell immune responses compared to intramuscular injection and intradermal gene gun delivery[J]. *Vaccine*, 2009, 27:5450-5459.
- [16] Kim H, Kwon B, Sin JI. Combined stimulation of IL-2 and 4-1BB receptors augments the antitumor activity of E7 DNA vaccines by increasing Ag-specific CTL responses [J]. *PLoS One*, 2013, 8: e83765. doi:10.1371/journal.pone.0083765.
- [17] Ohlschläger P, Spies E, Alvarez G, *et al.* The combination of TLR-9 adjuvantation and electroporation-mediated delivery enhances in vivo antitumor responses after vaccination with HPV-16 E7 encoding DNA[J]. *Int J Cancer*, 2011, 128:473-481.
- [18] Zong J, Wang C, Wang Q, *et al.* HSP70 and modified HPV 16 E7 fusion gene without the addition of a signal peptide gene sequence as a candidate therapeutic tumor vaccine[J]. *Oncol Rep*, 2013, 30:3020-3026.
- [19] Kim D, Hung CF, Wu TC, *et al.* DNA vaccine with  $\alpha$ -galactosylceramide at prime phase enhances anti-tumor immunity after boosting with antigen-expressing dendritic cells[J]. *Vaccine*, 2010, 28:7297-7305.
- [20] Garcia F, Petry KU, Muderspach L, *et al.* ZYC101a for treatment of high-grade cervical intraepithelial neoplasia: a randomized controlled trial [J]. *Obstet Gynecol*, 2004, 103:317-326.
- [21] Tseng CW, Trimble C, Zeng Q, *et al.* Low-dose radiation enhances therapeutic HPV DNA vaccination in tumor-bearing hosts [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2009, 58:737-748.
- [22] Peng S, Lyford-Pike S, Akpeng B, *et al.* Low-dose cyclophosphamide administered as daily or single dose enhances the antitumor effects of a therapeutic HPV vaccine [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2013, 62:171-182.
- [23] Chuang CM, Monie A, Wu A, *et al.* Combination of apigenin treatment with therapeutic HPV DNA vaccination generates enhanced therapeutic antitumor effects [J]. *J Biomed Sci*, 2009, 16:49. doi:10.1186/1423-0127-16-49.
- [24] Chuang CM, Monie A, Hung CF, *et al.* Treatment with imiquimod enhances antitumor immunity induced by therapeutic HPV DNA vaccination [J]. *J Biomed Sci*, 2010, 17:32. doi:10.1186/1423-0127-17-32.
- [25] Peng S, Monie A, Pang X, *et al.* Vascular disrupting agent DMXAA enhances the antitumor effects generated by therapeutic HPV DNA vaccines [J]. *J Biomed Sci*, 2011, 18:21. doi:10.1186/1423-0127-18-21.

## 新闻点击

### 抗氧化剂无助改善生育能力

据美国国家科学院院报(PNAS)网站 2013-08-08 报道,据研究约有 25% 的人曾经历怀孕困难的问题,为了提高成功怀孕的几率,许多人会尝试服用健康食品,如抗氧化剂,过去也曾有研究指出,服用抗氧化剂对男女的生育能力都将有帮助,但最近一项来自新西兰的研究推翻这个论点。

这项研究对 28 个怀孕治疗试验的资料进行分析,共包含 3 548 位 18~42 岁女性参与者,接受治疗的时间为 2~12 年。研究发现,这些女性在接受治疗期间服用多种抗氧化剂,有的只服用一种、有的则服用多种,种类如维生素 E、维生素 C、维生素 D、钙片、及 Omega-3 多元不饱和脂肪酸等等。

分析结果显示,与服用安慰剂或叶酸的女性相比,女性服用抗氧化剂并未被发现会提高怀孕的几率。至于是否会有不良反应,过去曾有研究指出抗氧化剂会有害女性生育能力,但在这项研究并未发现服用抗氧化剂会使女性特别容易出现不良反应的伤害,不过研究中这部分的相关资料非常有限。