

中文图书分类号：Q7

密 级：公开

UDC：577

学 校 代 码：10005



# 硕士学位论文

MASTERAL DISSERTATION

论 文 题 目：负载 HPV16 L1 抗原的树突状细胞疫苗的构  
建及免疫效果研究

论 文 作 者：罗婧

学 科：生物学

指 导 教 师：周玉柏 副研究员

论文提交日期：2017年6月

UDC: 577  
中文图书分类号: Q7

学校代码: 10005  
学 号: S201415027  
密 级: 公开

# 北京工业大学理学硕士学位论文

题 目 负载 HPV16 L1 抗原的树突状细胞疫苗的构建及  
免疫效果研究

---

英文题目 CONSTRUCTION AND IMMUNE EVALUATION  
OF THE DENDRITIC CELL VACCINE PULSED  
WITH HPV16 L1

---

论文作者: 罗婧

学 科: 生物学

研究方向: 细胞生物学与基因工程

申请学位: 理学硕士

指导教师: 周玉柏副研究员

所在单位: 生命科学与生物工程学院

答辩日期: 2017 年 5 月 23 日

授予学位单位: 北京工业大学

## 独创性声明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得北京工业大学或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

签 名：罗婧

日 期：2017年6月15日

## 关于论文使用授权的说明

本人完全了解北京工业大学有关保留、使用学位论文的规定，即：学校有权保留送交论文的复印件，允许论文被查阅和借阅；学校可以公布论文的全部或部分内容，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文。

(保密的论文在解密后应遵守此规定)

签 名： 罗婧

日 期：2017年6月15日

导师签名： 周玉柏

日 期：2017年6月15日

## 摘要

高危型 HPV 与多种恶性肿瘤密切相关, 研究显示, 预防 HPV 感染或在 HPV 感染的早期清除被感染细胞可有效控制 HPV 相关恶性肿瘤的发生。目前以 L1 VLPs 为代表的蛋白疫苗已在欧美上市, 仅有预防作用, 不能有效清除已感染细胞; 而治疗性疫苗的研究则主要集中在 E6/E7 上, 目前多处于临床前研究阶段。越来越多的证据显示, HPV L1 抗原在已感染上皮细胞及肿瘤细胞中均有不同程度的表达, 这为开发基于 HPV L1 的新型治疗性疫苗提供了实验依据。

DC 细胞是迄今所知功能最强大的专职抗原提呈细胞, 具有抗原处理, 递呈以及免疫功能调节等多种生理功能, 可同时诱导特异性体液及细胞免疫应答。目前, 已有多种肿瘤治疗性 DC 疫苗进入临床 I、II 期阶段, 取得了令人鼓舞的结果, 显示出巨大的应用前景。

肿瘤的免疫治疗是一个多种治疗措施综合应用的过程, 单独的干预措施一般效果有限。本实验室在前期研究中使用多种不同类型的载体疫苗采用序贯免疫的策略进行抗肿瘤效果的评价, 结果显示多载体疫苗序贯免疫可获得更强而持久的细胞免疫和抗肿瘤效果。鉴于 DC 细胞在免疫调节中的重要作用, 为进一步增强多载体疫苗的抑瘤效应, 本研究对负载 HPV16 L1 抗原的 DC (DC-L1) 的免疫学功能进行了研究, 为 DC-L1 疫苗和多载体疫苗的联合使用奠定实验基础。我们首先分离诱导 C57BL/6 小鼠骨髓源 DC 细胞, 负载 HPV16 L1 抗原构建树突状细胞疫苗 DC-L1, 使用 DC-L1 疫苗和腺病毒载体疫苗 Ad5-HPV16 L1 分别进行了单针及三针免疫, 通过 ELISPOT、ELISA、体外杀伤及肿瘤攻击实验分别检测 DC-L1 疫苗诱导的特异性细胞、体液免疫反应及抗肿瘤效应。

我们的结果显示, 使用细胞因子联合诱导培养法, 通过改良细胞培养条件可获得大量成熟的 DC 细胞, 利用重组腺病毒载体疫苗感染成熟 DC 细胞可获得高质量的 DC-L1 疫苗。DC-L1 疫苗可诱导产生 L1 特异性的体液及细胞免疫应答。与单针免疫相比, DC-L1 疫苗三针免疫可显著增强特异性的细胞免疫应答, 且三针免疫诱导的抑瘤效果也明显优于单针免疫; 而特异性体液免疫应答水平则与单针免疫无显著差异。实验结果提示, DC-L1 疫苗具有诱导 L1 特异性免疫应答的功能, 可以用于后续的多载体疫苗的联合应用研究。

关键词: 树突状细胞; 疫苗; 人乳头瘤病毒 16 型; 主要衣壳蛋白

## Abstract

High-risk HPVs are closely associated with many malignant diseases. Accumulating evidence suggests that preventing HPV infection or clearing the HPV infected cells at early stage can effectively reduce the incidence of HPV-related malignancies. Currently, the prophylactic vaccines based on HPV L1 VLPs have been commercially available in United States and Europe, which can induce high titer of neutralizing antibodies in sera, but the therapeutic effects are poor. Due to their sustaining expression, the majority preclinical studies of therapeutic vaccine mainly focus on the HPV oncogenes E6/E7. Mounting evidence shows that the different level of HPV L1 antigens can be detect in HPV infected cells and HPV-positive tumor cells, which provides the rationale for the development of the novel therapeutic vaccines based on HPV L1.

Known as the most powerful antigen-presenting cell, Dendritic cell(DC) has many unique functions such as antigen uptake, process and presentation, maintaining the immune homeostasis and immune response regulation. At present, many phase I/II clinical trials evaluating the antitumor effects of DC vaccines have been conducted, and some of them showed promising results.

Tumor immunotherapy is a comprehensive process which combined a variety of treatment measures, the single intervention only has limited effects. Our lab's previous study evaluated the anti-tumor effects of different types of vector vaccines by sequential repeat immune strategy, the results showed that sequential immunized multi-vector vaccines can induce more potent and sustained cellular immunity and anti-tumor effects. Due to the important roles in immune regulation, in present study, we preliminarily evaluated the immunogenicity of DC pulsed with HPV16 L1(DC-L1) in order to further enhance the antitumor effect of multi-vector vaccines, which will lay the experimental foundation for the further combined application using DC-L1 and multi-vector vaccines. First, we obtained mature DCs derived from precursor cells in C57BL/6 mouse bone marrow(BM) and pulsed with HPV16 L1 antigen to construct DC vaccine DC-L1. The single- and triple-immunization were performed using DC-L1 vaccine and adenovirus vector vaccine Ad5-HPV16 L1, respectively. The HPV16 L1 specific cellular, humoral immune response and antitumor effects were evaluated respectively by ELISPOT, ELISA, *in vitro* killing experiment and tumor challenge assay.

Our results showed that high-quality DC-L1 vaccine can be obtained by classical

cytokine induce protocol with a minor optimisation in culture procedure. DC-L1 can induce L1-specific humoral and cellular immune responses. Compared with single-immunization, the triple-immunization of DC-L1 significantly enhanced the specific cellular immunity, and in line with this, the antitumor effect was also superior to the DC-L1 single-immunization; In other hand, there was no significant difference in specific humoral immune response between single- and triple-immunization. The results suggested that DC-L1 vaccine can effectively induce the L1 specific immune response by prime-boost-boost regimen and can be used combinedly with multi-vector vaccines.

Keywords: Dendritic cell; vaccine; human papillomavirus type 16; major capsid protein

## 主要英文缩写词

缩写词	英文名称	中文名称
HPV	Human papillomavirus	人乳头瘤病毒
CIN	Cervical intraepithelial neoplasia	宫颈上皮内瘤
DC	Dendritic cell	树突状细胞
Ad5	Adenovirus type 5	腺病毒 5 型
APC	Antigen Presenting Cell	抗原提呈细胞
bp	Base pair	碱基对
PBS	Phosphate Buffer Solution	磷酸缓冲液
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium	Dulbecco 优化的 Eagle 培养基
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
OD	Optical density	光密度
CTL	Cytotoxic T lymphocyte	细胞毒性 T 淋巴细胞
ELISPOT	Enzyme-linked Immunospot Assay	酶联免疫斑点测定法
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay	酶联免疫吸附测定法
HRP	Horseradish Peroxidase	辣根过氧化物酶
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter	流式细胞分选术
FITC	Fluorescein Isothiocyanate	异硫氰酸荧光素
IFN- $\gamma$	Interferon-gama	干扰素 $\gamma$
Luc	Luciferase	荧光素酶
MHC	Major histocompatibility complex	主要组织相容性复合体
PBST	Phosphate Buffered Saline Tween-20	含吐温-20 的磷酸盐缓冲液
PMA	Phorbol-12-myristate-13-acetate	佛波酯
PVDF	Polyvinylidene Fluoride	聚偏二氟乙烯膜
SDS	Sodium Dodecyl Sulfonate	十二烷基磺酸钠
TAE	Tris/Acetate/Edta Buffer	Tris/乙酸/EDTA 缓冲液
VLP	Virus-like particle	病毒样颗粒
MOI	Multiplicity of Infection	感染复数
WB	Western Blot	蛋白免疫印迹
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
KD	Kilodalton	千道尔顿

## 目 录

摘 要.....	I
<b>Abstract</b> .....	III
主要英文缩写词.....	V
<b>第 1 章 绪论</b> .....	1
1.1 HPV.....	1
1.1.1 HPV 概述.....	1
1.1.2 HPV 疫苗的研究现状.....	1
1.1.3 HPV 与食管癌.....	2
1.2 DC 细胞.....	3
1.2.1 DC 细胞概述.....	3
1.2.2 基于树突状细胞的肿瘤免疫治疗方法.....	4
1.2.3 DC 疫苗在肿瘤免疫治疗中的应用及存在的问题.....	5
1.3 本课题的研究内容和目的.....	7
1.3.1 本课题的研究内容.....	7
1.3.2 本课题的研究目的.....	7
<b>第 2 章 负载 HPV16 L1 的树突状细胞疫苗的制备</b> .....	9
2.1 引言.....	9
2.2 实验材料.....	9
2.2.1 主要实验试剂.....	9
2.2.2 实验动物.....	9
2.2.3 主要仪器设备.....	9
2.3 实验方法.....	10
2.3.1 小鼠骨髓源未成熟树突状细胞的体外分离培养及诱导成熟.....	10
2.3.2 成熟 DC 细胞的鉴定.....	10
2.3.3 DC-L1 疫苗的制备及鉴定.....	11
2.4 实验结果.....	12
2.4.1 成熟 DC 细胞的鉴定.....	12
2.4.2 DC-L1 疫苗的鉴定.....	13
2.5 讨论.....	13
2.6 小结.....	14
<b>第 3 章 TC-1-L1 肿瘤细胞系的构建</b> .....	15

3.1 引言 .....	15
3.2 实验材料 .....	15
3.2.1 细胞株和质粒.....	15
3.2.2 工具酶和主要试剂.....	15
3.2.3 主要仪器设备.....	15
3.3 实验方法 .....	16
3.3.1 溶液的配制.....	16
3.3.2 Bsd-L1 表达载体的构建.....	16
3.3.3 TC-1 细胞系的复苏、传代和培养 .....	21
3.3.4 Bsd-L1 表达载体转染 TC-1 细胞和稻瘟毒素稳筛细胞系 .....	22
3.3.5 RT-PCR 法检测 TC-1-L1 肿瘤细胞系中 HPV16 L1 的转录.....	22
3.3.6 Western Blot 法检测 TC-1-L1 肿瘤细胞系中 HPV16 L1 的表达.....	24
3.4 实验结果 .....	25
3.4.1 表达 HPV16 L1 基因的表达载体的构建 .....	25
3.4.2 表达 HPV16 L1 基因的 TC-1 肿瘤细胞系的构建.....	26
3.5 讨论 .....	28
3.6 本章小结 .....	28
<b>第 4 章 负载 HPV16 L1 的树突状细胞疫苗免疫效果的研究 .....</b>	<b>29</b>
4.1 引言 .....	29
4.2 实验材料 .....	29
4.2.1 细胞和疫苗.....	29
4.2.2 主要试剂.....	29
4.2.3 主要仪器设备.....	29
4.3 实验方法 .....	30
4.3.1 小鼠免疫方案.....	30
4.3.2 小鼠体内细胞免疫水平检测.....	30
4.3.3 小鼠体内体液免疫水平检测.....	32
4.3.4 肿瘤攻击实验.....	33
4.3.5 体外杀伤实验.....	34
4.3.6 数据分析及处理.....	35
4.4 实验结果 .....	35
4.4.1 DC-L1 疫苗单针免疫效果研究 .....	35
4.4.2 DC-L1 疫苗三针免疫效果研究 .....	37

4.4.3 肿瘤攻击实验.....	38
4.4.4 体外杀伤实验结果.....	39
4.5 讨论.....	40
4.6 本章小结.....	41
结论.....	43
参考文献.....	45
攻读硕士学位期间发表的学术论文.....	53
致 谢.....	55

## 第 1 章 绪论

### 1.1 HPV

#### 1.1.1 HPV 概述

人乳头瘤病毒 (human papillomavirus, HPV) 属于乳头瘤病毒科, 病毒颗粒直径约 55 nm, 是由外壳蛋白包裹基因组构成, 病毒基因组为约 7900 bp 的双链闭合环状 DNA 分子, 分为早期编码区、晚期编码区及非编码调控区, 早期编码区编码病毒早期蛋白, 包括 E1, E2, E4, E5, E6, E7; 晚期编码基因主要编码病毒外壳蛋白 L1 和 L2<sup>[1,2]</sup>。目前已经发现的 HPV 基因型有 200 多种, 依据不同型别 HPV 与肿瘤发生的危险性高低的关系, 将 HPV 分为低危型和高危型, 低危型 HPV 包括 HPV6、11、43、44 等型别; 高危型 HPV 包括 HPV16、18、31、33、35、45、52、58 等型别<sup>[3,4]</sup>。大量流行病学及分子生物学研究表明, 高危型人乳头瘤病毒的持续感染与多种上皮性恶性疾病, 比如宫颈癌、食管癌、乳腺癌、结肠癌、口腔癌、胃癌、头颈癌的发生密切相关<sup>[5-6]</sup>。目前已经确定, 高危型 HPV 是导致宫颈癌的主要病毒学病因。我国也是宫颈癌高发国家之一, 在 2015 年, 我国宫颈癌的新发病例数估计为 9.89 万, 死亡数估计为 3.05 万例, 其中在中国女性宫颈癌患者体内存在高危性别 HPV 以 HPV16、18、31、33、52、58 型别最为常见<sup>[7-10]</sup>。

#### 1.1.2 HPV 疫苗的研究现状

从全球范围来看, HPV 预防性疫苗的研究已获得成功, 目前, 由 Merck 公司开发的针对 HPV 6、11、16、18 型的四价疫苗和针对 HPV 6、11、16、18、31、33、45、52、58 的九价疫苗以及 GSK 公司研发的针对 HPV16、18 型的二价疫苗<sup>[11-13]</sup>分别获得 FDA 批准上市。此外, 日本的武田制药公司研发的针对六种高危型 HPV 的疫苗目前处于临床前研究阶段<sup>[14]</sup>。韩国研发的针对 HPV 16、18 的预防性疫苗 EG-HPV, 目前处于临床一期研究阶段<sup>[15]</sup>。上述疫苗均为基于真核表达 HPV 主要衣壳蛋白 L1 的病毒样颗粒 (Virus-like particle, VLP) 亚单位疫苗, 制备工艺复杂, 价格偏高, 在世界范围, 尤其是在广大发展中国家中的大规模推广面临困难<sup>[16]</sup>。目前, 也有公司正在开发低成本的 HPV 疫苗。比如, 我国厦门的 Innovex YST Biotech 公司通过原核表达系统研发针对 HPV16、18 型的二价病毒样颗粒疫苗, 目前该疫苗已进入临床三期研究<sup>[17]</sup>。此外, 也有学者利用 HPV L2 蛋白的交叉中和表位构建第二代的 HPV 预防性疫苗, 目前已取得较大进展<sup>[18,19]</sup>。然而, 多项临床前及临床试验均提示, L1 VLP 疫苗虽可刺激产生高滴度的血清中和抗体, 但不能诱导高水平的细胞免疫应答, 对于已感染 HPV 的患者没有显著的治疗效果<sup>[20-22]</sup>。

治疗性疫苗主要通过激活机体内的抗原特异性细胞免疫来清除体内被病毒感染的细胞以及转化细胞。鉴于 HPV E6/E7 蛋白在整个病毒的生命周期中持续表达,因此,目前针对 HPV 的治疗性疫苗大都以 E6 和 E7 为靶抗原,已经有多个治疗性疫苗完成或正在进行临床试验(I, II 或 III),其中一些疫苗显示出一定的治疗效应<sup>[23,24]</sup>。此外,也有少量以 HPV E2、E5、L1 为靶抗原的治疗性疫苗的临床研究报告,以上治疗性疫苗均可以诱导特异性细胞免疫应答,以 HPV E5 为靶抗原的病毒载体疫苗还有抑制肿瘤生长的作用<sup>[25-28]</sup>。然而, E6/E7 为癌基因表达产物,具有致癌活性,虽可通过基因突变以及表位洗牌(epitope shuffling)清除转化活性,但同时其免疫原性则严重受损,且仍然存在回复突变为野生型基因的可能性,因此,基于 HPV E6/E7 的治疗性疫苗多面临免疫原性偏低或安全性欠佳的问题。一般认为 HPV L1 在病毒基因组整合过程中发生缺陷或基因丢失从而在肿瘤细胞中没有表达,然而,近来的免疫组化分析显示,在宫颈上皮内瘤变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN) 1 期, 2 期以及 3 期的患者中, L1 蛋白的检出率分别为 83.53%, 41.81% 和 3.13%<sup>[29]</sup>。Bellone<sup>[30]</sup>等分别对 HPV16 L1 和 HPV16 E6、E7 产生的细胞免疫效果进行了比较,结果发现 HPV16 阳性的宫颈癌组织样品中不仅含有 HPV16 E6、E7 的 RNA,也含有 HPV16 L1 的 RNA,其中 E7 RNA 拷贝量平均为 176.2, E6 RNA 拷贝量平均 47.3, L1 RNA 拷贝量平均 58.3,可见 E7 RNA 拷贝量明显大于 E6,然而 E6 和 L1 之间则没有明显区别。本课题组从食管癌组织中分离获得的肿瘤细胞株中也检测到 HPV L1 蛋白的表达(数据未发表)。在大多数与高危型 HPV 相关的癌及癌前病变中, L1 蛋白在感染的肿瘤细胞中持续表达,而这种持续表达是特异性细胞免疫清除感染细胞的前提条件。因此,研制针对 HPV L1 的新型疫苗,在诱导产生高滴度中和抗体的同时又能产生强有力的特异性细胞免疫反应,可提供更好的预防及治疗效果,且 L1 为病毒结构蛋白,无转化活性,安全性好,是新型 HPV 治疗性疫苗的理想候选靶抗原。

### 1.1.3 HPV 与食管癌

据统计,食管癌分别是导致男性和女性死亡的第六和第九大恶性肿瘤<sup>[31]</sup>。1982 年 Syrjanen 提出 HPV 感染是导致食管鳞状细胞癌的高危因素<sup>[32]</sup>。在 HPV 诱发食管正常上皮细胞永生前期加入化学致癌物,促癌物、放射等均可促进诱导永生细胞的癌变,这直接证明食管癌的发生是存在多因素协同作用,其中 HPV 起了重要作用<sup>[33]</sup>。从 1990 年开始,中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所肿瘤室曾毅院士研究组在分子流行病学方面开展 HPV 与食管癌的病原学关系的研究,大规模现场及实验室研究发现食管癌高发区食管鳞癌组织标本中 HPV16 和 HPV18 亚型的 DNA 阳性率高达 60-80%,其中 HPV16 感染癌组织细胞中 80%的染色体整合有 HPV DNA。其中在我国广东省食

管癌高发区的研究结果显示 HPV16 和 18 型在新鲜食管癌切除组织中的分布率分别为 40% 和 20%，后来对建立了 30 多年的食管癌细胞株 (EC109) 进行验证，发现确有 HPV18 型 DNA 的存在<sup>[34,35]</sup>。本实验室的研究还证实食管癌细胞株可查到 L1 和 E6E7 抗原的表达，许多病人血清中可检测到相应的抗体。

## 1.2 DC 细胞

### 1.2.1 DC 细胞概述

1973 年, Steinman 和 Cohn 等从小鼠脾组织中分离发现一种细胞, 因其形态具有树突样或伪足样突起而命名为树突状细胞 (Dendritic cells, DCs)<sup>[36]</sup>。DC 是迄今人类发现的唯一能够刺激初始 T 细胞的活化增殖和功能最强大的抗原提呈细胞 (Antigen presenting cell ,APC), 其可介导抗原转移, 在体内激活初始 T 细胞, 启动适应性免疫应答, 这是 B 细胞, 巨噬细胞等抗原提呈细胞不具有的特性<sup>[37]</sup>。DC 的生命周期可分为两个阶段, 不成熟阶段和成熟阶段, 不成熟 DC 通过各种机制识别抗原并将抗原呈递给 T 细胞同时转变为成熟 DC, 成熟 DC 表面高表达 MHCII 分子、CD40、CD80、CD86、热休克蛋白、细胞间黏附分子-1 等免疫刺激分子, 并能分泌细胞因子, 如 TNF- $\alpha$ 、IL-12 等细胞因子, 介导抗肿瘤免疫反应<sup>[38]</sup>。分布在肿瘤微环境中的不成熟 DC, 不能诱导抗肿瘤免疫反应, 而且还可能诱导 T 细胞耐受和失能<sup>[39]</sup>。

DC 细胞在体内分布广泛, 在脾脏, 淋巴结, 血液, 皮肤以及肺中均可分离获得, 但其含量极微, 仅占外周血单核细胞的 1%<sup>[40]</sup>。依据来源不同, DC 可分为髓系 DC (myeloid, mDC) 和淋巴系 DC (plasmacytoid, pDC), pDC 定居在血液和淋巴器官中, mDC 既停留在血液和淋巴器官也存在于皮肤的真皮和大多数器官的组织间隙中, 朗格汉斯细胞作为一种特殊亚型的 mDC, 存在于表皮和含黏液的组织, 在 DC 疫苗领域的研究大多集中在单核细胞来源的 mDC<sup>[41]</sup>。研究发现, 这种具有独特形态的细胞与机体的免疫应答密切相关。现已明确, 树突状细胞主要通过抗原摄取, 处理, 并以 MHC 限制性的方式递呈给初始 T 细胞, 是迄今人类发现的唯一能够刺激初始 T 细胞活化增殖的细胞, 在机体抵抗外来病原体以及清除肿瘤细胞的过程中发挥重要作用; 另一方面, 静息状态的 DC 细胞可摄入自身抗原诱导免疫耐受, 维持机体的免疫自稳状态。因此, 树突状细胞也被称为专职抗原提呈细胞<sup>[42]</sup>。

DC 的来源较多, 现有研究表明可以从小鼠、大鼠骨髓和人外周血及脐血中提取 DC<sup>[43-46]</sup>。目前, 国内外分离纯化、扩增 DC 的方法主要有以下两种: 一种是“直接分离法”, 此法简单方便, 但是分离 DC 细胞数量少, 纯度低; 另一种方法是细胞因子体外诱导和扩增 DC 前体细胞, 此法分为从外周血中分化扩增 DC 和小鼠骨髓来源的 DC,

前者对实验操作要求较高, 有研究表明此法分离获得 DC 数量是直接分离法获得 DC 数量的 40 余倍<sup>[47]</sup>。在 DC 细胞的体外诱导培养过程中, 大量的研究发现有机物质能够诱导 DC 成熟, 如植物和药用菌类来源的多糖物质, 能够通过改善宿主免疫功能而增强抗肿瘤效应<sup>[48]</sup>。

### 1.2.2 基于树突状细胞的肿瘤免疫治疗方法

由于 DC 细胞具有的强大的抗原提呈及激活初始 T 细胞的功能, 因此, 人们希望通过 DC 细胞诱导机体针对肿瘤细胞的特异性免疫反应, 发挥抗肿瘤的效果。目前, 基于 DC 细胞的肿瘤免疫治疗方法有多种: 包括自体或同种异体 DC 细胞体外负载抗原后回输患者体内的 DC 单体疗法, 肿瘤抗原体内负载天然 DC 细胞的 DC 单体治疗以及 DC 细胞联合放化疗, DC 细胞联合免疫检查点抑制剂等方法<sup>[49,50]</sup>。除肿瘤抗原体内负载天然 DC 细胞方法外, 其他 DC 细胞肿瘤免疫治疗方法均需要大量的成熟 DC 细胞, 而树突状细胞虽然在人体中分布广泛, 但其数量极少, 仅占人血单个核细胞总数的 1%, 为获得足够的 DC 细胞, 人们发展了在体外诱导 DC 前体细胞以获得大量成熟 DC 的方法。其中, 最为成熟的是应用细胞因子组合诱导骨髓源 (小鼠) 及血单个核细胞细胞分化为不成熟 DC 细胞, 再用 TNF- $\alpha$  或其他刺激因子比如 TLR 激动剂或配体诱导 DC 细胞成熟<sup>[51,52]</sup>。

在获得成熟 DC 细胞后, 为发挥 DC 细胞独特的抗原处理及递呈功能, 还需要对成熟 DC 细胞负载相应抗原。目前, 抗原负载的方法有很多, 比较有代表性的方法有: (1) 应用抗原表位肽直接负载, 该方法的优点是抗原不需要进行处理可直接负载至 DC 细胞表面, 缺点是需要提前获知有效的抗原表位信息; (2) 携带抗原肽编码信息的 mRNA 或 DNA 表达质粒通过转染或电击转入成熟 DC 细胞内, 通过 MHC-I 类途径将抗原表位通过 MHC-I 类分子进行递呈; (3) 通过病毒载体将抗原编码序列导入 DC 细胞。

虽然以体外诱导的方式获得的 DC 细胞与天然 DC 细胞之间在表面标志物以及细胞表型方面相似, 但它是否是 DC 疫苗最佳的细胞形式目前还不清楚, 有证据显示, 过长的体外培养以及细胞因子诱导过程可能损害 DC 细胞功能, 导致回输的 DC 细胞功能偏低<sup>[53]</sup>。而天然 DC 细胞不需要在体外长时间的培养, 鉴于此, 目前也有直接从全血中通过血细胞分离法直接获得天然成熟 DC 细胞用于免疫治疗的报道, 目前的技术进步已经能通过一次的血细胞分离获得  $10^6$  个成熟 DC 细胞。除了直接分离成熟 DC 细胞再进行体外负载抗原的方法此外, 人们试图通过体内靶向分子偶联抗原引导至 DC 细胞从而直接利用体内的天然 DC 细胞发挥抗肿瘤活性<sup>[54]</sup>。有研究者将针对 DC 表面标志物 CD40 的单抗偶联 HPV E6/E7 的抗原多肽进行体内注射, 结果显示, 该疫苗

能诱导特异性的免疫<sup>[55]</sup>。为了增强 DC 疫苗的免疫效应，还需要联合应用佐剂或免疫刺激因子比如 TLR 配体或激动剂，促炎症反应的细胞因子等才能逆转免疫耐受，刺激抗原特异性的抗肿瘤免疫应答<sup>[56]</sup>。近来的一项突破性的进展是通过改变脂质体-抗原 mRNA 复合物表面电荷特性可将该复合物特异性靶向体内天然的成熟 DC 细胞，诱导强烈的抗肿瘤免疫应答。

### 1.2.3 DC 疫苗在肿瘤免疫治疗中的应用及存在的问题

DC 细胞介导的特异性免疫治疗方法，就是在体外诱导分化的过程中用自身肿瘤抗原刺激诱导细胞产生特异性肿瘤杀伤作用。如用肿瘤抗原肽、蛋白、肿瘤细胞或等体外冲击致敏并回输体内可诱导机体产生较强的抗肿瘤免疫应答。国外有学者研究发现肿瘤进展与循环中髓源 DC 细胞数量过低相关，而在诊断时数量低则是预后良好的一个指标<sup>[57]</sup>。

虽然外科手术、放化疗、激素治疗等在肿瘤治疗方面有一定程度的发展，但是肿瘤患者存在高度复发和易转移的问题，而 DC 疫苗作为一种免疫学治疗方法，其抗癌机制主要是通过纠正肿瘤患者的免疫缺陷，启动患者自身特异性杀瘤免疫反应，杀伤肿瘤细胞而对正常细胞的伤害降低到了最低限<sup>[58]</sup>。随着体外分离诱导大量 DC 和制备 DC 疫苗技术的日趋成熟，采用 DC 疫苗进行抗肿瘤治疗已成为当今肿瘤生物治疗领域倍受关注的焦点之一，其基本原理是在体外分离获的未成熟 DC，经诱导扩增后，将肿瘤相关抗原负载 DC，形成疫苗回输体内，从而激活针对肿瘤细胞的细胞毒性 T 淋巴细胞（Cytotoxic T lymphocyte，CTL），使患者获得拮抗肿瘤的能力<sup>[59]</sup>。

DC 疫苗在肿瘤治疗等方面的一系列体外实验、动物实验及临床 I、II、III 期研究中均证明 DC 疫苗确实可以诱导出特异性抗肿瘤免疫保护效应<sup>[60]</sup>。DC 疫苗的临床应用最早应用于淋巴瘤的治疗，目前 DC 疫苗已经应用于黑色素瘤，神经胶质瘤，前列腺癌，乳腺癌，卵巢癌，肺癌，肾癌，肝癌等恶性肿瘤的临床治疗中，并取得了令人鼓舞的结果。最近的研究表明食管癌患者接种负载食管癌抗原的 DC 细胞后可诱导抗原特异性的免疫反应，在接受疫苗治疗两年后，与对照组相比，Th1 型反应产生的 IL-2 分泌量增加 92.4%，IL-12 分泌量增加 70.9%，IFN- $\gamma$  的分泌量增加 214.3%，而 CD8<sup>+</sup>T 细胞产生的 IFN- $\gamma$  的分泌量增加 3-16.4 倍<sup>[61]</sup>。Teramoto 等人的研究表明 DC 细胞疫苗能延长非小细胞肺癌患者的生存期<sup>[62]</sup>。FujimasaTada 等将肝癌细胞中提取的肿瘤抗原致敏 DC 制成的 DC 疫苗免疫 5 个晚期肝癌和肝硬化患者，发现 DC 疫苗能够诱导抗肿瘤免疫反应，显示出基于 DC 的肿瘤免疫治疗作为肝癌手术，放化疗的辅助疗法的应用前景<sup>[63]</sup>。并且在黑色素瘤、前列腺癌、肾癌和恶性胶质瘤的临床 III 期实验中发现，对于黑色素瘤，接受 DC 治疗的患者有 8.5% 有客观免疫反应和治疗黑色素的药物

能使 5-15% 的病人产生免疫反应有相似的效果；对于前列腺癌，DC 治疗能使 7.1% 的病人产生免疫反应，和化学药物治疗雄激素抵抗性前列腺癌能使 10% 患者产生免疫反应是相似的效果；对恶性胶质瘤患者，15.6% 的患者接受 DC 治疗后有免疫反应；在肾癌患者，DC 治疗使 11.5% 的患者有免疫反应，和其他的免疫治疗方法如白介素效果是相似的<sup>[64]</sup>。

在治疗性 HPV 疫苗的研究中，已经建立了基于 DC 疫苗的模型。目前该类疫苗的制备方法有病毒样颗粒融合 DC 疫苗，肿瘤相关抗原肽负载 DC 疫苗，肿瘤细胞 DNA/RNA 负载 DC 疫苗。De Witte<sup>[65]</sup> 等将 HPV-L1 病毒样颗粒 (Virus like particles, VLP) 通过硫酸乙酰肝素与 DC 结合，发现能够上调共刺激分子和细胞因子的产生。Zhou 等<sup>[66]</sup> 将宫颈癌细胞中提取的肿瘤抗原负载 DC 制成的 DC 疫苗，将肿瘤细胞和 DC 疫苗共培养诱导 CTL 对肿瘤细胞产生强大的杀伤力，肿瘤相关抗原肽负载 DC 疫苗不能对肿瘤细胞产生持久有效的抗肿瘤效应。Dell<sup>[67]</sup> 等利用 HPV16 E7 的 DNA 和 mRNA 分别转染小鼠骨髓源 DC，发现 mRNA 转染 DC 后提高了 CD40、CD80、CD86 和 MHC I、MHC II 分子的表达，同时 HPV16 E7 转染的 DC 注射小鼠后在体内产生针对 E7 的特异性细胞毒性 T 淋巴细胞反应。

近年来，DC 细胞疫苗与细胞因子诱导杀伤细胞 (Cytokine Induced Killer, CIK) 共培养治疗恶性肿瘤取得了令人鼓舞的结果。CIK 细胞能够直接或间接地通过调节宿主免疫系统杀伤肿瘤细胞，阻止肿瘤细胞的再生。并且已经有研究发现 CIK 细胞和 DC 细胞共培养在不同的肿瘤中都显示出很强的杀瘤效应<sup>[68,69]</sup>。DC 细胞疫苗和 (CIK) 共培养治疗肝胆胰腺癌的临床研究表明，DC-CIK 疫苗免疫的肿瘤患者较未免疫 DC-CIK 疫苗的肿瘤患者的生活质量和平均生存时间有显著的提高和延长<sup>[70]</sup>。国内也有临床研究发现 DC-CIK 联合免疫疗法在 B 细胞淋巴瘤，晚期肺癌，多发性骨髓瘤，晚期宫颈癌的治疗中均证明 DC-CIK 联合免疫疗法是安全有效的，并且明显改善患者化疗后免疫降低的状况，延长晚期肺癌患者生存期，改善患者生活质量<sup>[71-74]</sup>。

虽然对 DC 疫苗的研究取得了很大进展，但 DC 疫苗还远未发挥其最大效力。目前，对 DC 疫苗的优化策略集中在以下几点：(1) 对经典的 DC 体外诱导成熟方法进行改进，使用不同的细胞因子组合诱导 DC 分化，并使用新的免疫刺激手段刺激 DC 细胞成熟，以获得更接近体内天然状态的 DC 细胞，同时，应用 DC 细胞生物学最新研究成果，对 DC 抗原递呈的通路进行干预，以最大程度提高 DC 细胞的抗原递呈效率。(2) 通过新的细胞培养技术，缩短 DC 细胞分化成熟以及抗原负载所需时间，建立标准化的 DC 疫苗制备工艺。(3) 改进从人体中直接分离获得足够数量的天然成熟 DC 细胞的技术，用于制备相关 DC 疫苗。(4) 研究更高效的体内抗原靶向技术，结合单抗以及新型纳米材料获得靶向体内成熟 DC 细胞的新型制剂，以充分利用体内的

天然 DC 细胞，获得最佳的免疫效果。近来的研究表明，使用纳米材料和 toll 样受体抑制剂和一些辅助蛋白等可以提高 DC 疫苗诱导的免疫效应<sup>[75-78]</sup>。随着对 DC 功能的进一步研究，以及 DC 疫苗制备技术的不断发展，DC 的免疫原性将会获得显著的提高，然而，需要指出的是，肿瘤的免疫治疗和手术，放化疗相结合将成为治愈肿瘤的有效方法之一。

本实验室的前期研究显示，单独使用 DNA 载体疫苗和重组腺病毒载体及痘苗病毒载体疫苗免疫小鼠，不能诱导抗原特异性的强烈的细胞免疫和体液免疫反应，而使用多载体序贯免疫能够诱导机体产生高且持久的细胞免疫应答，同时还有诱导机体产生与预防型疫苗(VLP)接近体液免疫应答。并且使用 IFN- $\gamma$  和疫苗一起注射小鼠后，通过检测淋巴细胞内部的细胞因子和分泌到淋巴细胞外的细胞因子的总的变化情况，发现与细胞免疫密切相关的因子都有所增加，肿瘤细胞体外杀伤试验结果和肿瘤攻击实验的结果都证明 IFN- $\gamma$  能够增强疫苗的免疫效果。基于本实验室的前期研究结果，本研究制备了基于 HPV16 L1 的树突状细胞疫苗，通过动物实验评价疫苗的免疫效果。为 DC 疫苗和 DNA 载体疫苗及病毒载体疫苗联合使用抗肿瘤的研究奠定基础。

### 1.3 本课题的研究内容和目的

#### 1.3.1 本课题的研究内容

(1) 树突状细胞的体外分离培养，体外分离获得 C57BL/6 小鼠骨髓单个核细胞，使用细胞因子联合培养诱导树突状细胞成熟。通过显微镜下树突状细胞的典型特征观察和流式细胞术检测成熟树突状细胞表面标志的表达鉴定树突状细胞的成熟。

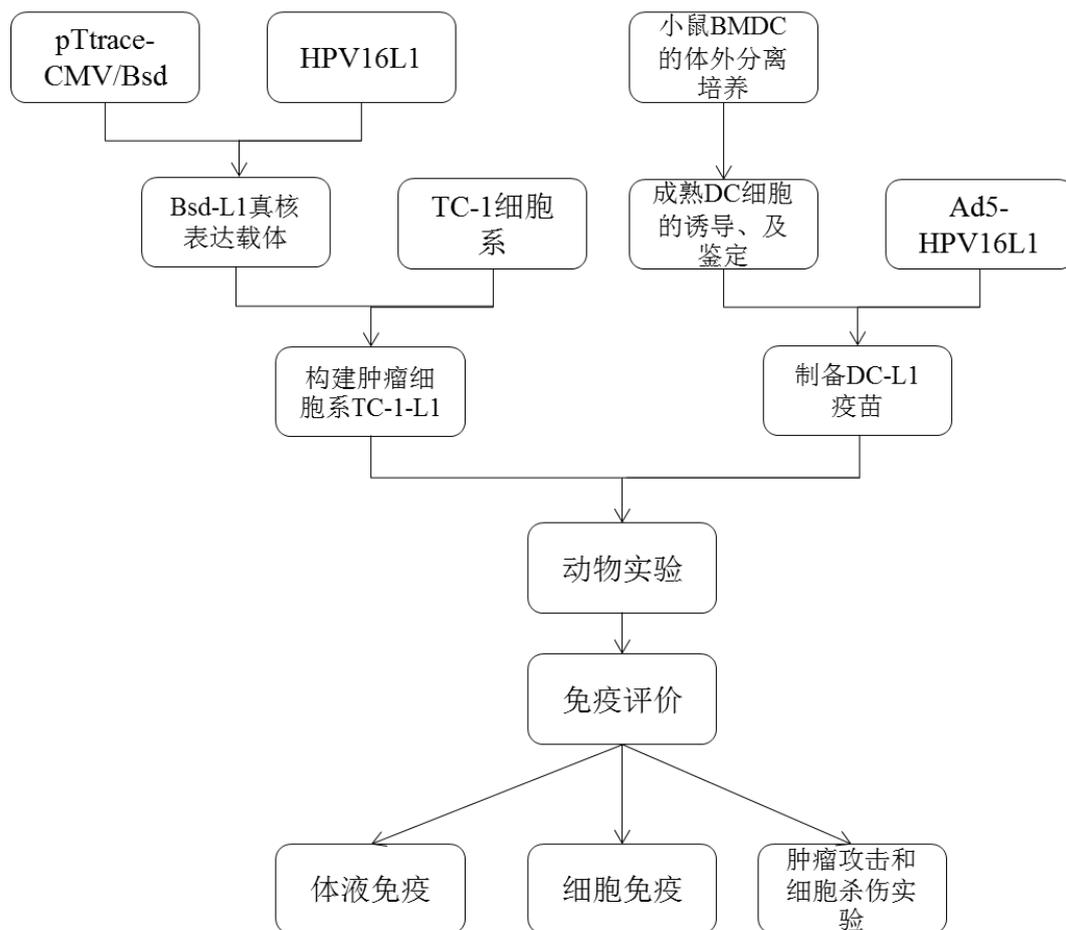
(2) 基于 HPV16 L1 抗原的树突状细胞疫苗的制备，通过携带有 HPV16 L1 基因的重组腺病毒疫苗感染成熟 DC，获得负载 HPV16 L1 抗原的树突状细胞疫苗 DC-L1。使用 Western Blot 检测 DC-L1 细胞中 HPV16 L1 蛋白的表达。

(3) 树突状细胞疫苗的免疫效果研究，使用树突状细胞疫苗和腺病毒载体疫苗免疫 C57BL/6 小鼠，在不同时间点通过 ELISPOT 和 ELISA 检测 DC-L1 疫苗诱导的特异性细胞及体液免疫应答，并通过体外杀伤实验以及肿瘤攻击实验对 DC-L1 疫苗的抗肿瘤效力进行评价。

#### 1.3.2 本课题的研究目的

(1) 获得纯化的成熟 DC 细胞，构建负载有 HPV16 L1 抗原表位的 DC 疫苗。  
(2) 完成树突状细胞疫苗的免疫实验，并和病毒载体疫苗的免疫效果进行比较。为 DC 疫苗和 DNA 载体疫苗及病毒载体疫苗联合使用抗肿瘤的研究奠定基础。

本课题的技术路线：



## 第2章 负载 HPV16 L1 的树突状细胞疫苗的制备

### 2.1 引言

本章从 C57BL/6 小鼠骨髓中分离获得骨髓干细胞，经细胞因子联合诱导培养获得成熟树突状细胞，使用重组腺病毒载体疫苗 Ad5-HPV16 L1 感染成熟树突状细胞得到表达 HPV16 L1 蛋白的树突状细胞疫苗。

### 2.2 实验材料

#### 2.2.1 主要实验试剂

RPMI1640 培养基，FBS，PBS，PS 购自 Gbico 公司；IL-4、GM-CSF、TNF- $\alpha$  购自美国 Peprotech 公司；FITC anti-mouse CD11c，APC anti-mouse I-A/I-E，PE anti-mouse CD80 购自 Biolegend 公司；红细胞裂解液购自碧云天生物科技公司；HPV16 L1 单克隆抗体（Camvir-1）购于英国 Abcam 公司；IRDye800CW Goat(polyclonal) Anti-Mouse IgG(H+L)购自 KPL 公司。

#### 2.2.2 实验动物

4-6 周龄 C57BL/6 雄性小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司，委托中国疾病预防控制中心病毒病研究所饲养。

#### 2.2.3 主要仪器设备

仪器名称	厂家
微量移液器	Eppendorf 公司、 Thermo 公司
精密电子天平	丹佛仪器（北京）有限公司
4℃ 冰箱	海尔公司
-20℃ 低温冰箱	SANYO 公司
-80℃ 低温冰箱	Thermo 公司
高压蒸汽灭菌锅	江阴滨江医疗设备有限公司
超净工作台（ WT-IND 型）	北京王堂蓝翼科技有限公司
细胞培养箱	Thermo 公司
生物安全柜（ 1389 型）	Thermo Fisher Scientific 公司
蛋白质电泳仪	Bio-Rad 公司
半干式碳板转印槽、垂直电泳槽	Bio-Rad 公司
Odyssey 远红外影响分析仪	LI-COR Biosciences 公司
倒置荧光显微镜（CK40）	Olympuss 公司

## 2.3 实验方法

### 2.3.1 小鼠骨髓源未成熟树突状细胞的体外分离培养及诱导成熟<sup>[79-81]</sup>

- (1) 颈椎脱臼法处死 6-8 周龄 C57 BL/6 小鼠，75%酒精浸泡 5-10 min。
- (2) 在超净工作台中，剥离小鼠后肢，保证股骨和胫骨完好。使用灭菌手术剪和镊子剥除皮毛，使用灭菌纱布辅助，换另一套手术剪和镊子，剔除骨上结缔组织，使用 PBS 将剔除肌肉的后肢骨洗两遍或者使用 75%酒精浸泡 2 min。
- (3) 剪掉骨两端骨髓，使用 1 mL 注射器吸取无血清 RPMI 1640 培养基从骨两端冲洗出骨髓，直至骨变白。
- (4) 用一次性吸管反复吹打至骨髓细胞分散，收集骨髓细胞悬液，经 200 目滤网过滤，除去肌肉等杂质。
- (5) 收集细胞悬液至 15 mL 离心管，使用一次性吸管冲洗皿壁，冲洗液收集到离心管中，1000 rpm，离心 5 min，弃上清。
- (6) 取 37℃ 预温的红细胞裂解液，加入 5 mL 红细胞裂解液，室温放置 2-4 min，除去红细胞，1000 rpm，离心 5 min，弃上清。
- (7) 加入 10 mL 无血清 RPMI 1640 培养基重悬细胞，1000 rpm，离心 5 min，弃上清。
- (8) 重复步骤 (7)。
- (9) 使用 1 mL RPMI 1640 培养基重悬细胞，将细胞悬液做 100 倍稀释，使用手持式细胞计数仪计数，记录获得骨髓单个核细胞的数量。
- (10) 配制含 10% FBS，1% PS，10 ng/mL IL-4，20 ng/mL GM-CSF 的 RPMI 1640 诱导培养基，调整骨髓单核细胞浓度为  $1 \times 10^6$  个/mL，接种至 100 mm 细胞培养板，每板 10 mL。于 37℃，5% 的 CO<sub>2</sub> 孵箱培养，此为培养的第 0 天。
- (11) 每隔一天，3/4 量换液，收集上清至 15 mL 离心管，1000 rpm，离心 5 min，弃上清，使用配制的诱导培养基重悬细胞，补充到细胞培养板中。
- (11) 培养至第 5 天，在诱导培养基中补加 TNF- $\alpha$  使其终浓度为 50 ng/mL，继续培养 48h。
- (12) 培养至第 7 天，诱导结束。

### 2.3.2 成熟 DC 细胞的鉴定

#### 2.3.2.1 DC 细胞形态特征的观察

在 DC 细胞培养过程中，分别在培养的第 3、5、7 天，使用照相显微镜观察 DC 细胞的形态特征，并使用照相显微镜拍照。

### 2.3.2.2 流式细胞术检测成熟 DC 细胞的表面标志物

- (1) 使用一次性吸管沿培养板壁反复吹打, 收集诱导结束的成熟 DC 细胞至 15 mL 离心管中, 1000 rpm, 离心 5 min, 弃上清。
- (2) 使用 PBS 洗细胞两次, 每次 5 mL, 1000 rpm, 离心 5 min, 弃上清。
- (3) 使用 1 mL PBS 重悬细胞, 将细胞悬液做 100 倍稀释, 使用手持式细胞计数仪计数, 调整细胞浓度为  $1 \times 10^7$  个/mL。
- (4) 取无菌 1.5 mL EP 管, 分别做上标记, 将调整好浓度的细胞悬液转移至 1.5 mL EP 管中, 每管 100  $\mu$ L 细胞悬液。
- (5) 分别在每管中加入 1  $\mu$ g CD16/32 抗体, 将离心管置于冰上封闭 10 min。
- (6) 按照荧光标抗体说明书加入适量抗体, 室温避光孵育 30 min。
- (7) 孵育完毕后, 在每管中加入 1 mL 1% FBS 的 PBS, 2500 rpm, 离心 5 min, 弃尽上清。
- (8) 在每管中加入 200  $\mu$ L 组织细胞固定液, 室温避光孵育 20 min。
- (9) 使用 1% FBS 的 PBS 洗两次, 2500 rpm, 离心 5 min, 弃上清。使用 500  $\mu$ L 1% FBS 的 PBS 重悬细胞。
- (10) 将细胞转移到流式管中, 上机检测。

### 2.3.3 DC-L1 疫苗的制备及鉴定

- (1) 收集诱导成熟的 DC 细胞至 15 mL 离心管, 280 g, 离心 5 min, 弃上清, 使用 RPMI 1640 培养基重悬细胞, 调整细胞浓度为  $1 \times 10^6$  个/mL, 接种至六孔板, 每孔 3 mL。以感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 100 的重组腺病毒载体疫苗 Ad5-HPV16 L1 感染成熟 DC 细胞。
- (2) 感染 48 h 以后, 收集细胞, 用 PBS 洗两遍, 1000 rpm, 离心 5 min, 弃上清。
- (3) 向离心管中加入适量的 ddH<sub>2</sub>O 和上样缓冲液 (5X), 沸水浴 10 min。
- (4) 配制 SDS 聚丙烯酰胺凝胶 (浓缩胶为 5%, 分离胶为 10%), 样品孔每孔上样 20  $\mu$ L, Marker 上 10  $\mu$ L, 110V 恒压电泳。
- (5) 电泳结束后, 根据胶的大小剪六张滤纸, 一张硝酸纤维素膜, 将膜和滤纸, 胶分别在转膜缓冲液中浸泡 5-10 min。使用半干电转仪将蛋白转至硝酸纤维素膜上, 按照阳极 $\rightarrow$ 滤纸 $\rightarrow$ 硝酸纤维素膜 $\rightarrow$ 凝胶 $\rightarrow$ 滤纸 $\rightarrow$ 阴极的顺序放置在半干转印槽中, 15 V 电转 10-15 min。
- (6) 电转完毕, 使用 PBST 将膜上转膜缓冲液洗掉。将膜浸泡在 10% 脱脂奶粉里, 室温摇床孵育 2 h。
- (7) 封闭完毕, 使用 PBST 洗掉膜上脱脂奶粉, 使用 PBST 以 1:3000 稀释 HPV16 L1

单抗，室温摇床孵育 1h。一抗孵育完毕，使用 PBST 在 10 min 内洗膜 3 次。使用 PBST 以 1:2000 稀释荧光标记二抗，室温摇床孵育 1 h。

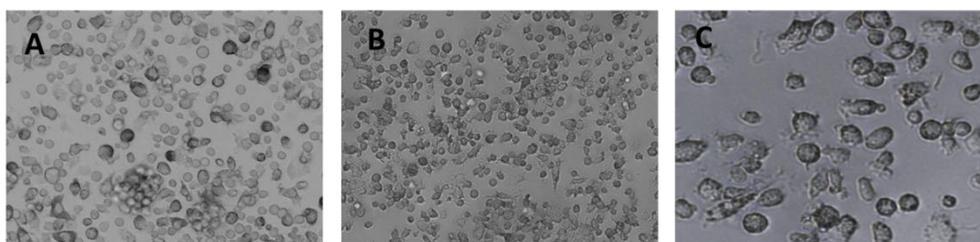
(7) 观察与拍照：使用 PBST 洗涤后，在远红外成像分析仪上对膜进行扫描，并进行观察分析和拍照。

## 2.4 实验结果

### 2.4.1 成熟 DC 细胞的鉴定

#### 2.4.1.1 小鼠骨髓源 DC 细胞的分离培养及诱导成熟

在诱导培养后的第 3, 5, 7 天在显微镜下观察细胞的形态特征，如图 2-1。显微镜下观察可见，诱导培养后第 3 天，细胞多为形态比较规整，圆球状，悬浮生长的不成熟 DC 细胞（图 2-1A）；诱导培养第 5 天，部分细胞表面出现小突起，呈不规则形状（图 2-1B）；而诱导培养第 7 天，大部分细胞表面出现明显的树枝状突起，呈现典型的树突状细胞的形态（图 2-1C）。



A: 诱导后第 3 天细胞形态 ( $\times 200$ )； B: 诱导后第 5 天细胞形态 ( $\times 200$ )；  
C: 诱导后第 7 天细胞形态 ( $\times 400$ )

图 2-1 诱导后不同时间点 DC 细胞形态特征的显微镜图像

Figure 2-1 The microscopic images of morphologic characteristics of DCs at different time points after induction

#### 2.4.1.2 检测成熟 DC 细胞的表面标志物

收集诱导成熟的 DC 细胞，使用 CD80-PE, CD11c-FITC, IA/IE-APC 抗体进行染色，利用流式细胞术进行检测，结果显示带有 CD80, CD11c, IE/IA 表面标记的阳性细胞数占总细胞数的比率分别为 94.71%, 96.57%, 87.09%（图 2-2），这与成熟 DC 细胞表面高表达 CD80, CD11c, IE/IA 表面标记分子的特征相符。上述结果提示，经细胞因子联合诱导培养后获得了纯度较高的成熟 DC 细胞。

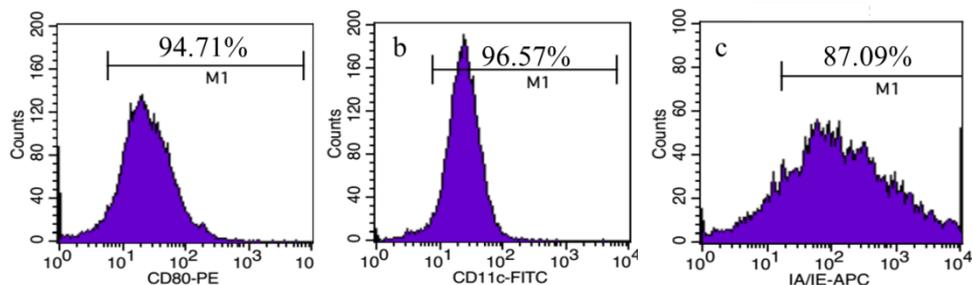
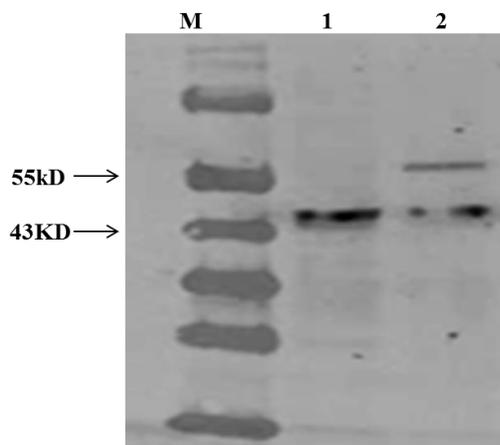


图 2-2 流式细胞术检测成熟 DC 表面标志物

Figure 2-2 Detection of surface markers on mature DCs by flow cytometry

### 2.4.2 DC-L1 疫苗的鉴定

重组腺病毒载体 Ad5-HPV6L1 以 MOI 100 剂量感染成熟 DC 细胞，构建 DC 疫苗 DC-L1。感染 48h 后，裂解 DC-L1 细胞，收集总蛋白进行 Western Blot 分析，同时设置未感染 DC 细胞为阴性对照。结果显示，DC-L1 在 55KD 处出现 HPV16 L1 目的条带，而阴性对照组只在 43KD 处有非特异性条带（图 2-3）。上述结果提示，DC-L1 细胞可有效表达 HPV16 L1 蛋白，表明 DC-L1 疫苗构建成功。



M: 预染蛋白 Marker ; 1: VR-16L1; 2: DC-L1

图 2-3 Western Blot 检测 HPV16 L1 蛋白的表达

Figure 2-3 The expression of HPV16 L1 protein detected by Western Blot

## 2.5 讨论

已知 DC 细胞是专职抗原提呈细胞，能够在体内激活静息 T 细胞，从而激活免疫反应。DC 细胞分为未成熟 DC 和成熟 DC，未成熟 DC 细胞更有效的摄取抗原，成熟 DC 表面高表达 CD40, CD80, CD86, CD11c, MHC-II 等表面黏附分子和共刺激分子，成熟 DC 将抗原提呈给初始 T 细胞，在共刺激分子的协助下激活 T 细胞，诱导产生

CTL, 增强机体的细胞免疫反应。因此基于 DC 细胞的抗肿瘤疫苗的研究大都利用成熟的 DC 细胞为载体<sup>[82-84]</sup>。在本实验中, 我们采用经典的 DC 细胞体外分离培养法, 并通过改进细胞培养条件以获得更多的成熟 DC 细胞<sup>[85]</sup>, 从一只小鼠体内平均可收获约  $1.0 \times 10^7$  个成熟 DC 细胞, 可以满足实验需要, 这与文献报道相符<sup>[86]</sup>。通过细胞形态观察和流式细胞术鉴定, 我们获得了纯度较高的成熟 DC<sup>[87]</sup>。

在 DC 疫苗的构建中, 不同的抗原负载方式对 DC 疫苗的效应产生不同的影响, 目前有两种策略构建 DC 疫苗: 一种是 DC 负载肿瘤抗原, 另外一种为 DC 负载细胞因子<sup>[88]</sup>。前一种策略有利于提高免疫治疗的靶向性, 主要包括肿瘤抗原和肿瘤抗原编码基因负载 DC。后一种策略有利于提高 DC 疫苗的有效性, 主要包括将共刺激分子, 细胞因子和化学因子导入 DC 细胞。在上述 DC 疫苗构建方法中, DC 细胞负载肿瘤抗原基因能有效地将抗原提呈给 T 细胞并激活 T 细胞, 随后继续释放内源性肿瘤抗原, 因此, DC 细胞负载肿瘤抗原基因比 DC 直接负载肿瘤抗原更好的刺激 T 淋巴细胞。目前, 基因治疗载体包括两类, 病毒载体 (腺病毒、逆转录病毒、腺相关病毒、慢病毒、单纯疱疹病毒) 和非病毒载体 (细菌载体、人工载体、脂质体载体)。非病毒载体对于插入片段大小没有限制, 用于低免疫原性, 并容易生产; 然而, 与病毒载体相比, 她们在体内转染效率较低, 因此减少了非病毒载体的广泛应用性。在病毒载体中, 腺病毒系统被证明是有效的载体, 腺病毒有较高的转染效率, 低基因毒性, 很小的致癌突变可能性, 并且容易利用重组 DNA 技术。因此本研究利用重组腺病毒载体疫苗感染成熟 DC 细胞获得 DC 疫苗, 经 Western Blot 鉴定抗原基因可以在 DC 细胞中有效表达, 提示 DC 疫苗构建成功。

虽然本研究获得了足够量的成熟 DC 细胞, 但是在 DC 疫苗的构建过程中, 我们发现仍存在一些问题亟待解决, 如 DC 细胞分离方法的优化, 以及获得纯度更高的 DC 细胞。上述问题的解决将进一步推动 DC 疫苗的临床应用。

## 2.6 小结

成功分离获得了小鼠骨髓单核细胞, 经细胞因子联合诱导法培养获得大量较高纯度的成熟 DC 细胞。使用重组腺病毒载体感染成熟 DC 细胞负载 HPV16 L1 抗原, 成功构建了 DC-L1 疫苗, 并通过 Western Blot 法对 DC-L1 细胞中 HPV16 L1 蛋白的表达水平进行了检测。综上, 我们获得了纯度较高的成熟 DC 细胞并成功制备了 DC-L1 疫苗, 为后续实验奠定了基础。

## 第 3 章 TC-1-L1 肿瘤细胞系的构建

### 3.1 引言

TC-1 细胞来源于 C57BL/6 小鼠肺上皮细胞，通过整合表达 HPV16 E6/E7 及 c-Ha-ras 转化形成肿瘤细胞系<sup>[89]</sup>。为建立体外杀伤实验的肿瘤模型细胞，我们构建了基于 HPV16 L1 的真核表达载体，通过转染和压力筛选获得整合表达 HPV16 L1 的 TC-1-L1 肿瘤细胞系。

### 3.2 实验材料

#### 3.2.1 细胞株和质粒

TC-1 细胞：由北京工业大学药物研究所本研究组保存。

质粒：pTracer™-CMV/Bsd 质粒购自 Invitrogen 公司，plv-16 L1H 由本室构建并保存。

#### 3.2.2 工具酶和主要试剂

DMEM 培养基、FBS、PBS、GlutaMAX、Penicillin-Streptomycin 及 Trypsin-EDTA (0.25%) 购自 Gibco 公司；Quick-Shuttle Enhanced 转染试剂购自北京博奥龙生物技术有限公司；EcoRI 和 NotI 核酸内切酶购自 NEB 公司；细胞/组织基因组 RNA 提取试剂盒购自于上海捷瑞生物工程有限公司。

#### 3.2.3 主要仪器设备

仪器名称	厂家
微量移液器	Eppendorf 公司、 Thermo 公司
精密电子天平	丹佛仪器（北京）有限公司
4℃ 冰箱	海尔公司
-20℃ 低温冰箱	SANYO 公司
-80℃ 低温冰箱	Thermo 公司
高压蒸汽灭菌锅	江阴滨江医疗设备有限公司
超净工作台（ WT-IND 型）	北京王堂蓝翼科技有限公司
细胞培养箱	Thermo 公司
生物安全柜（ 1389 型）	Thermo Fisher Scientific 公司
PCR 仪	Eppendorf 公司
DNA 电泳仪与电泳槽	深圳市海普诺科技发展有限公司
凝胶成像系统（ 4400 型）	Alpha Innotech 公司

医用纯水设备	MILLIPORE, Milli-Q
恒温摇床 ( DDH2-300 型)	江苏太仓市实验设备厂
恒温培养箱 ( DHP-9052 型)	上海一恒科技有限公司
台式微型离心机	Eppendorf 公司
台式普通离心机 ( TD5B)	长沙湘智离心机仪器有限公司
台式低温离心机	Eppendorf 公司
恒温水浴锅 (HX-1050)	北京博医康实验仪器
蛋白质电泳仪	Bio-Rad 公司
半干式碳板转印槽、垂直电泳槽	Bio-Rad 公司
Odyssey 远红外影响分析仪	LI-COR Biosciences 公司
倒置荧光显微镜 (CK40)	Olympuss 公司

### 3.3 实验方法

#### 3.3.1 溶液的配制

(1) LB 液体培养基的配制: 使用电子天平称取 10 g 蛋白胨, 5 g 酵母粉, 10 g 氯化钠于锥形瓶中, 加水定容到 1 L, 高温高压灭菌后, 4 °C 冰箱保存, 使用时加入氨苄抗生素使其终浓度为 100  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ; LB 固体培养基的配制: 向配制好的 LB 液体培养基中加入 1.5% 的琼脂粉, 高温高压灭菌后, 加入氨苄抗生素使其终浓度为 100  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 在超净台中, 倒入无菌培养皿, 待培养基凝固, 恢复室温, 使用封口膜密封, 4 °C 冰箱保存。

(2) DNA 凝胶电泳缓冲液配制: 50 $\times$ TAE 配方: 称取 242 g Tris, 57.1 mL 冰乙酸, 100 mL 0.5 mol/L EDTA, 定容到 1 L, 并调 pH 为 8.0。

(3) Western Blot 溶液配制: Tris-甘氨酸电泳缓冲液配方: 14.4 g 甘氨酸, 3 g Tris HCL, 1 g SDS, 定容到 1 L; 转膜缓冲液配方: 14.4 g 甘氨酸, 3.03 g Trisbase, 150 mL 甲醇, 定容到 1 L; PBST: 向 1 L PBS 中加入 500  $\mu\text{L}$  Tween-20; 封闭液配方: 10% 的脱脂奶粉。

#### 3.3.2 Bsd-L1 表达载体的构建

##### 3.3.2.1 Bsd-L1 表达载体构建流程

PTracer<sup>TM</sup>-CMV/Bsd 表达载体为携带绿色荧光基因和稻瘟毒素基因的真核表达载体。使用限制性核酸内切酶 *EcoRI* 和 *NotI* 对 LV-16 L1 表达载体和 PTracer<sup>TM</sup>-CMV/Bsd 表达载体进行双酶切, 回收 HPV16 L1H 片段后, 利用 T4 DNA

连接酶将 HPV16 L1H 片段插入到 PTracer™-CMV/Bsd 的多克隆位点处。如图 3-1，为 Bsd-L1 表达载体构建流程图。

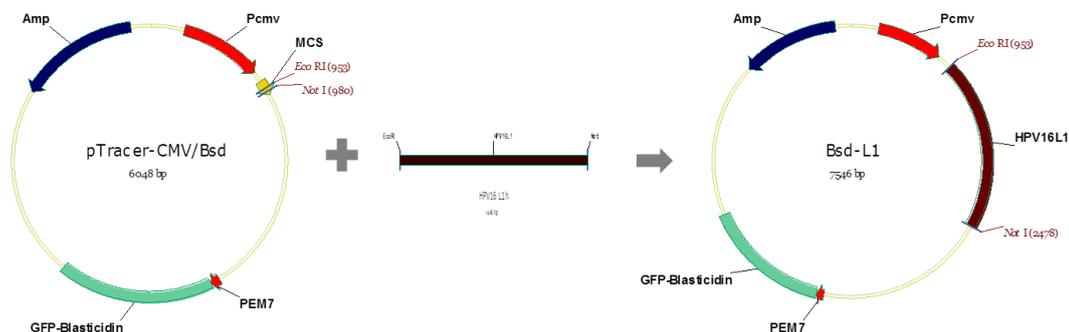


图 3-1 Bsd-L1 表达载体构建流程图

Figure 3-1 Construction scheme of the expression vector Bsd-L1

### 3.3.2.2 Plv-16 L1H 和 pTracer™-CMV/Bsd 质粒的转化和小量提取

取一支感受态细胞 (100 $\mu$ L)，化冻。向感受态细胞悬液中加入 10 $\mu$ L 目的 DNA，轻弹混匀，冰浴 30 min。42 $^{\circ}$ C，热击 60-90 sec，快速转移到冰浴中 2-3 min。向离心管中加入不含抗生素的 LB 培养基 900  $\mu$ L，混匀后置于 37 $^{\circ}$ C 摇床震荡培养 45 min (150 rpm)。3000 rpm 离心 5 min，吸弃 900  $\mu$ L 上清，将离心管内容物混匀，使用移液枪吸取 100  $\mu$ L 已转化的感受态细胞到含氨苄抗生素的 LB 固体培养基上，用无菌的玻璃棒轻轻的将细胞均匀涂开。将平板置于无菌工作台中放置数 min，直至液体被吸收，倒置平板，置于 37 $^{\circ}$ C 孵箱培养 12-16 h。

第二天将培养板上长出的菌落分别挑至 3 mL 含 1% 氨苄抗生素的 LB 液体培养基内，160 rpm，37 $^{\circ}$ C 震荡培养过夜，然后每管取 1 mL 冻存甘油菌，剩下 2 mL 菌液小提质粒后做酶切鉴定。质粒提取步骤如下：

(1) 将试剂盒中的吸附柱放入收集管中，使用移液枪向吸附柱中加入 500  $\mu$ L 的平衡液，然后 12000 rpm 离心 1 min，弃废液，将吸附柱重新放回收集管中。

(2) 取 2 mL 过夜培养的菌液，加入离心管中，使用常规台式离心机，12000 rpm 离心 1 min，弃上清。

(3) 取 250  $\mu$ L 的溶液 P1 加入留有菌体沉淀的离心管中，使用移液器反复吹打彻底悬浮细菌沉淀。

(4) 取 250  $\mu$ L 溶液 P2 加入离心管中，温和地上下翻转离心管 8 次使菌体充分裂解。

(5) 取 350  $\mu$ L 溶液 P3 加入离心管中，立即温和地上下翻转离心管 8 次以充分混匀离心管内容物，然后 12000 rpm 离心 10 min。

(6) 使用移液枪将离心管内上清液转移到吸附柱中，然后 12000 rpm 离心 1 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

(7) 取 500  $\mu\text{L}$  去蛋白液加入吸附柱中, 12000 rpm 离心 1 min, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。

(8) 使用漂洗液洗脱吸附柱中的 DNA, 每次使用 600  $\mu\text{L}$  漂洗液, 洗两次, 将漂洗液加入吸附柱中, 12000 rpm 离心 1 min, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。

(9) 将吸附柱放回收集管中, 12000 rpm 离心 2 min。

(10) 将吸附柱置于一个干净的离心管中, 向吸附膜的中间部位滴加 70  $\mu\text{L}$  洗脱缓冲液, 室温放置 2 min, 然后 12000 rpm 离心 2 min, 将质粒溶液收集到离心管中, 做好标记, 保存  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱。

### 3.3.2.3 Plv-16 L1 和 pTracer<sup>TM</sup>-CMV/Bsd 质粒的酶切和目的片段的纯化

使用 *EcoRI*-HF 和 *NotI*-HF 分别对 Plv-16 L1H 和 pTracer<sup>TM</sup>-CMV/Bsd 质粒进行双酶切, 酶切体系见表 3-1:

表 3-1 酶切体系

Table 3-1 Enzymatic system

组分	用量
DNA	10 $\mu\text{L}$
Buffer 2.1	5 $\mu\text{L}$
<i>EcoRI</i> -HF	1 $\mu\text{L}$
<i>NotI</i> -HF	1 $\mu\text{L}$
H <sub>2</sub> O	33 $\mu\text{L}$
总体积	50 $\mu\text{L}$

$37^{\circ}\text{C}$ , 水浴酶切 3 h。加入 10  $\mu\text{L}$  混有 DNA 染料的 5 $\times$ Loading Buffer, 混匀, 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳。在紫外灯下观察并拍照, 将目的条带切下, 使用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收目的条带, 具体实验步骤如下:

(1) 在紫外灯辅助下, 使用干净的刀片将目的片段从琼脂糖凝胶中切下, 放入离心管中, 使用电子天平精确称量重量。

(2) 按照每 100 mg 琼脂糖凝胶加入 100  $\mu\text{L}$  Binding Solution 的用量加入适量的 Binding Solution, 将离心管置于  $55^{\circ}\text{C}$  金属浴中 4 min, 期间每 2 min 间断轻微颠倒混匀, 直至胶块完全融化。

(3) 将离心管中混合液转移至套有收集管的吸附柱中, 室温放置 2 min, 然后 6000 rpm 离心 1 min, 倒掉收集管中废液。

(4) 将吸附柱重新放回收集管中, 向吸附柱中加入 500  $\mu\text{L}$  WA Solution, 然后 12000 rpm 离心 1 min, 倒掉收集管中废液。

(5) 使用 500  $\mu\text{L}$  Wash Solution 洗脱吸附柱中 DNA 两次, 将吸附柱重新放回收集管中, 向吸附柱中加入 500  $\mu\text{L}$  Wash Solution, 然后 12000 rpm 离心 1 min, 倒掉收集管中废液。

(6) 将吸附柱重新放回收集管中, 12000 rpm 离心 1 min, 打开吸附柱的盖子, 50 $^{\circ}\text{C}$  金属浴中放置 5 min。

(8) 将吸附柱放入干净的试剂盒中自带的 1.5 mL 收集管中, 对膜中央悬空加入 17  $\mu\text{L}$  EB, 盖好盖子, 37 $^{\circ}\text{C}$  金属浴中放置 2 min, 然后 12000 rpm 离心 1 min, 离心管中的液体即为包含目的 DNA 片段的溶液。

取 4  $\mu\text{L}$  回收产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 以确认目的条带正确。

#### 3.3.2.4 HPV16 L1 片段和 pTracer<sup>TM</sup>-CMV/Bsd 表达载体的连接

使用 T4 DNA Ligase 将 HPV16 L1 片段连接到 pTracer<sup>TM</sup>-CMV/Bsd 表达载体上, 连接体系见表 3-2:

表 3-2 连接体系

Table 3-2 ligation system

组分	用量
HPV16 L1 片段	5 $\mu\text{L}$
pTracer <sup>TM</sup> -CMV/Bsd 回收片段	10 $\mu\text{L}$
T4 DNA Ligase Buffer	2 $\mu\text{L}$
T4 DNA Ligase	1 $\mu\text{L}$
H <sub>2</sub> O	2 $\mu\text{L}$
总体积	20 $\mu\text{L}$

16 $^{\circ}\text{C}$  金属浴连接过夜, 取 4  $\mu\text{L}$  连接产物, 加入 1  $\mu\text{L}$  5 $\times$ DNA 上样 Buffer(含染料), 混匀后, 上样 1% 琼脂糖凝胶, 110 V 恒压电泳至条带清晰分开, 在紫外灯下观察并拍照, 以确认连接正确。

#### 3.3.2.5 连接产物的转化、提取及鉴定

取 10  $\mu\text{L}$  连接产物加到 100  $\mu\text{L}$  DH5 $\alpha$  中, 轻弹混匀, 冰浴 30 min。将离心管置于 42 $^{\circ}\text{C}$ , 热击 1 min, 然后快速将离心管转移到冰浴中, 冷却 2-3 min。向离心管中加入 900  $\mu\text{L}$  不含抗生素的液体 LB 培养基, 将离心管内容物混匀后置于 37 $^{\circ}\text{C}$  摇床震荡培养 45 min (150 rpm)。45 min 后, 将离心管置于离心机中, 4000 rpm 离心 2 min, 吸弃 900  $\mu\text{L}$  上清, 将离心管内容物混匀, 吸取 100  $\mu\text{L}$  已转化的感受态细胞加到含氨苄抗生素的 LB 固体琼脂培养基上, 用无菌的弯头玻璃棒轻轻的将细胞均匀涂开。将平板置于室温数 min 直至液体被吸收, 倒置平板, 放置孵箱中, 37 $^{\circ}\text{C}$  培养 12-16 h。

第二天，挑取固体平板上长出的单菌落，于 3 mL 含 1% 氨苄抗生素的 LB 液体培养基中，37℃，200 rpm，摇床震荡培养过夜。取 1 mL 过夜培养的菌液冻存甘油菌，剩下的做质粒小提，质粒小提步骤见 2.3.2.1。取 4 μL 新提的质粒加 1 μL 5×DNA 上样 Buffer（含染料），混匀后，上样 1% 琼脂糖凝胶，110V 恒压电泳至条带清晰分开，在紫外灯下观察并拍照。取 3 μL 新提质粒使用 EcoRI-HF 和 NotI-HF 进行双酶切鉴定。酶切体系见表 3-3：

表 3-3 酶切体系

Table 3-3 Enzymatic system

组分	用量
质粒	3 μL
Buffer2.1	1 μL
EcoRI-HF	0.5 μL
NotI-HF	0.5 μL
H <sub>2</sub> O	5 μL
总体积	10 μL

于 37℃ 金属浴，酶切 3 h。加入 2 μL 5×DNA 上样 Buffer（含染料），混匀后，上样 1% 琼脂糖凝胶，110 V 恒压电泳至条带清晰分开，在紫外灯下观察并拍照。以确认目的条带正确。将酶切鉴定正确的菌株随机挑选两株进行序列测定。将鉴定正确的菌株冻存于 - 80℃ 冰箱，命名为 Bsd-L1。

### 3.3.2.6 Bsd-L1 质粒的大量提取与纯化

将鉴定正确的 Bsd-L1 甘油菌，取 50 μL 加到 100 mL 含氨苄抗生素的液体 LB 培养基中，37℃，180 rpm，摇床震荡培养过夜。

(1) 柱平衡步骤：吸附柱放入 50 mL 收集管中，向吸附柱中加入 2.5 mL 的平衡液，然后 8000 rpm 离心 2 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

(2) 取 100 mL 过夜培养的菌液加入离心管中，室温 8000 rpm 离心 3 min，弃上清，使用干净的吸水纸吸去离心管壁上的水滴。

(3) 使用移液管取 8 mL 溶液 P1 加入留有菌体沉淀的离心管中，使用移液器反复吹打彻底悬浮细菌沉淀。

(4) 使用移液管取 8 mL 溶液 P2 加入离心管中，立即温和地上下翻转 8 次，室温放置 5 min。

(5) 使用移液管取 8 mL 溶液 P4 加入离心管中，立即温和地上下翻转 8 次，充分混匀，至溶液出现白色分散絮状沉淀，然后室温放置 10 min 左右。8000 rpm 离心 10 min，使白色沉淀离至管底，将全部溶液小心转移到过滤器 CS1 中，慢慢推动推柄过滤，将

滤液收集在干净的 50 mL 的离心管中。

(6) 向滤液中加入 0.3 倍滤液体积的异丙醇，上下颠倒混匀后转移到吸附柱中。

(7) 室温 8000 rpm 离心 2 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

(8) 向吸附柱中加入 10 mL 漂洗液 PW，8000 rpm 离心 2 min，弃掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

(9) 重复操作步骤 (8)。

(10) 向吸附柱中加入 3 mL 无水乙醇，室温 8000 rpm 离心 2 min，倒掉废液。将吸附柱重新放回收集管中，8000 rpm 离心 5 min，将吸附柱中残余的漂洗液去除。

(11) 将吸附柱置于一个干净的 50 mL 收集管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加 500  $\mu$ L 洗脱缓冲液 TB，室温放置 5 min，然后室温 8000 rpm 离心 2 min。将 50 mL 离心管中的洗脱液全部移入一个干净的 1.5 mL 离心管， $-20^{\circ}\text{C}$  保存。

取 4  $\mu$ L 新提 Bsd-L1 质粒加入 1  $\mu$ L 5 $\times$ DNA 上样 Buffer (含染料)，混匀后，上样 1% 琼脂糖凝胶，110 V 恒压电泳至条带清晰分开，在紫外灯下观察并拍照，以确认质粒提取正确。取 1  $\mu$ L 进行双酶切鉴定。酶切体系见表 3-3，于  $37^{\circ}\text{C}$  金属浴，酶切 3 h。加入 2  $\mu$ L 5 $\times$ DNA 上样 Buffer (含染料)，混匀后，上样 1% 琼脂糖凝胶，110 V 恒压电泳至条带清晰分开，在紫外灯下观察并拍照。以确认目的条带正确。

### 3.3.3 TC-1 细胞系的复苏、传代和培养

#### 3.3.3.1 细胞复苏

(1) 将 T25 细胞培养瓶、15 mL 离心管、微量移液器等实验用品放入生物安全柜中，紫外灯照射 20-30 min。同时水浴锅预热到  $37^{\circ}\text{C}$ 。

(2) 从液氮罐中取出细胞，移到  $37^{\circ}\text{C}$  水浴锅中，使其快速融化。

(3) 无菌环境下，将细胞转入 15 mL 离心管中，加入 5 mL DMEM 培养基混匀，2000 rpm 离心 5 min。

(4) 弃上清，以 5 mL DMEM 培养基重悬细胞，计数调整浓度后接入 T25 细胞培养瓶中。

(5) 放入  $37^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养。次日更换培养液。

#### 3.3.3.2 细胞传代

(1) 将细胞从  $\text{CO}_2$  培养箱中取出，光学显微镜下观察，汇合度达到 80-90% 时，即可进行传代培养。

(2) 将微量移液器、废液缸等实验用品放入生物安全柜，紫外灯照射 20-30 min。同时，将 DMEM 培养基、PBS 放入  $37^{\circ}\text{C}$  水浴锅预热、胰蛋白酶平衡到室温。

- (3) 弃掉原来的培养基，用 5 mL PBS 洗 1-2 次。
- (4) 加入 500  $\mu$ L 胰蛋白酶，37 $^{\circ}$ C 消化 2 min。显微镜下观察，细胞变圆且相互分离。
- (5) 加入 5 mL DMEM 培养基，用移液管吹打混匀，使分散成单个细胞。将细胞悬液移入 15 mL 离心管中，2000 rpm 离心 5 min。
- (6) 弃去上清，加入 5 mL DMEM 培养基重悬细胞。
- (7) 取 1 mL 细胞悬液转入新的细胞培养瓶中，加 4 mL DMEM 培养基混匀(可根据细胞生长情况，适当调整细胞悬液和培养基的量)。置于 37 $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

### 3.3.3.3 细胞冻存

- (1) 同 3.3.3.2 的步骤 1-5。
- (2) 弃上清，加适当体积的 DMEM 培养基重悬细胞，计数调整浓度，加入等体积的双倍细胞冻存液。吹打均匀。
- (3) 分装于冻存管中，每管 1 mL。放入冻存盒，置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱。24 h 后转入液氮罐中。

### 3.3.4 Bsd-L1 表达载体转染 TC-1 细胞和稻瘟霉素稳筛细胞系

- (1) 稻瘟霉素最佳筛选浓度的确定：提前一天接种 TC-1 细胞到 24 孔板，每孔  $5 \times 10^4$  个细胞，1 mL 完全培养基。按 1  $\mu$ g/mL, 3  $\mu$ g/mL, 5  $\mu$ g/mL, 7  $\mu$ g/mL, 9  $\mu$ g/mL 的浓度梯度加入稻瘟霉素。每 3 天换一次液，保证稻瘟霉素浓度不变，一周内能够杀死所有细胞的最小 blasticidin 浓度为最佳筛选浓度。
- (2) 转染前 18~24 h 接种 TC-1 细胞到 24 孔细胞板中，每孔  $5 \times 10^4$  个细胞，1 mL 完全培养基。
- (3) 将 1  $\mu$ g 质粒 Bsd-L1 和 4  $\mu$ L 转染试剂分别稀释到 50  $\mu$ L 生理盐水中。
- (4) 合并上述两溶液并混匀，从待转染细胞孔中吸取 500  $\mu$ L 培养基与上述转染复合物预混后再加入细胞中。
- (5) 将细胞板移至 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中进行培养 24-72 h。
- (6) 去除培养基，PBS 洗一次，加入最佳筛选浓度的稻瘟霉素筛选培养基，每 3 天换一次液，一周后获得稳定转染细胞系，命名为 TC-1-L1。

### 3.3.5 RT-PCR 法检测 TC-1-L1 肿瘤细胞系中 HPV16 L1 的转录

#### 3.3.5.1 HPV16 L1 mRNA 的提取

- (1) 使用 PBS 洗 T25 培养瓶中的 TC-1-L1 和 TC-1 细胞两遍，除尽培养基和 PBS。
- (2) 加入 350  $\mu$ L 裂解液，将细胞裂解液转移到离心管中，涡旋震荡混匀。
- (3) 将所有溶液转移至过滤柱 CS 上，12000 rpm 离心 2 min，收集滤液。

- (4) 向滤液中加入一倍体积 70% 乙醇，混匀，得到的溶液全部转入吸附柱 CR3 中，12000 rpm 离心 1 min，倒掉收集管中废液，将吸附柱 CR3 放回收集管中。
- (5) 向吸附柱中加入 350  $\mu\text{L}$  去蛋白液 RW1，12000 rpm 离心 1 min，倒掉收集管中废液，将吸附柱放回收集管中。
- (6) 向吸附柱中加入 80  $\mu\text{L}$  的 DNase I 工作液，室温放置 15 min。
- (7) 向吸附柱 CR3 中加入 350  $\mu\text{L}$  去蛋白液 RW1，12000 rpm 离心 1 min，倒掉收集管中的废液。
- (8) 向吸附柱 CR3 中加入 500  $\mu\text{L}$  漂洗液 RW，室温静置 2 min，12000 rpm 离心 1 min，倒掉收集管中废液。
- (9) 重复步骤 (8)。
- (10) 12000 rpm 离心 2 min，倒掉废液，将吸附柱 CR3 置于室温放置数 min，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。
- (11) 将吸附柱 CR3 转入新的 RNase-Free 的离心管中，加入 50  $\mu\text{L}$  RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 室温放置 2 min，12000 rpm 离心 2 min，得到 RNA 溶液。使用检测 RNA 的浓度。-70 $^{\circ}\text{C}$  保存。

### 3.3.5.2 RT-PCR 法检测 HPV16 L1 基因的转录

使用 VECTORTI 软件以 HPV16 L1 为模板设计上、下游特异性引物: HPV16 L1-f: ATGAGCCTGTGGCTGCCAGCG; HPV16 L1-r: TCACAGCTTCCTCTTCTTCCTCTTGGCGG。

按照引物合成说明书上说明配制引物为 100  $\mu\text{M}$ 。完全融化模板 RNA，将特异性引物稀释至 10  $\mu\text{M}$ ，将试剂盒中试剂，短暂离心后置于冰上。按表 3-4 在冰上配制反应液，按表 3-5 设置 RT-PCR 反应条件。

表 3-4 RT-PCR 反应体系

Table 3-4 RT-PCR reaction system

反应成分	体积/反应
2 $\times$ FastKing One Step RT-PCR MasterMix	25 $\mu\text{L}$
25 $\times$ RT-PCR Enzyme Mix	2 $\mu\text{L}$
HPV16 L1-f (10 $\mu\text{M}$ )	1.25 $\mu\text{L}$
HPV16 L1-r (10 $\mu\text{M}$ )	1.25 $\mu\text{L}$
RNA 模板	10ng-1 $\mu\text{g}$ RNA
RNase-Free ddH <sub>2</sub> O	补水至 50 $\mu\text{L}$
总体系	50 $\mu\text{L}$

表 3-5 RT-PCR 反应条件

Table 3-5 RT-PCR reaction conditions

步骤	时间	温度
1	30 min	42°C
2	3 min	95°C
3	0.5 min	94°C
4	0.5 min	67°C
5	0.5 min	72°C
6	从 3-5 步进行 35 个循环	
7	5 min	72°C

启动 PCR 仪器直到温度上升到 42°C 时，将反应管放入 PCR 仪器中。待反应结束后，使用普通 DNA 产物纯化试剂盒回收 RT-PCR 产物。操作步骤如下：

(1) 柱平衡步骤：将吸附柱放入收集管中，向吸附柱中加入 500  $\mu\text{L}$  的平衡液，然后 12000 rpm 离心 1 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中待用。

(2) 向 RT-PCR 产物中加入 250  $\mu\text{L}$  结合液，充分混匀。

(3) 将上述混合液转移到吸附柱中，室温放置 2 min，12000 rpm 离心 1 min，倒掉收集管中废液，将吸附柱放回收集管中。

(4) 使用漂洗液洗脱吸附柱，洗两次，每次 600  $\mu\text{L}$  漂洗液，向吸附柱中加入 600  $\mu\text{L}$  漂洗液，12000 rpm 离心 1 min，倒掉收集管中废液，吸附柱放回收集管中。

(5) 将吸附柱放回收集管中，12000 rpm 离心 2 min。然后将吸附柱置于室温数 min 以彻底晾干吸附柱。

(6) 将吸附柱放入新的离心管中，向吸附柱中央悬空加入 40  $\mu\text{L}$  EB，室温放置 2 min，12000 rpm 离心 2 min 收集 DNA 溶液。

取 10  $\mu\text{L}$  DNA 上样琼脂糖凝胶电泳，检测 HPV16 L1 目的条带的存在。

### 3.3.6 Western Blot 法检测 TC-1-L1 肿瘤细胞系中 HPV16 L1 的表达

(1) 去除长满 TC-1-L1 细胞的六孔板中的培养基，使用 PBS 洗 3 次后，除尽 PBS。每孔加入 200  $\mu\text{L}$  细胞裂解液，用移液器将细胞裂解物收集到离心管中，反复吹打。

(2) 使用常规台式离心机，10000 rpm，离心 10 min，吸取上清至另一离心管中，向离心管中加入 5 $\times$ SDS-PAGE 上样缓冲液，沸水浴 10 min。

(3) 配制 10% 分离胶和 5% 浓缩胶的 SDS 凝胶，待凝胶凝固后，安装至电泳槽中，每孔上样 20  $\mu\text{L}$ ，110 V 恒压垂直电泳，待溴酚蓝跑至凝胶边缘时停止电泳。

(4) 电泳结束后，取出凝胶板，小心将胶板撬开，切掉多余部分胶，剪 NC 膜和滤纸 6 张使其和胶一样大。

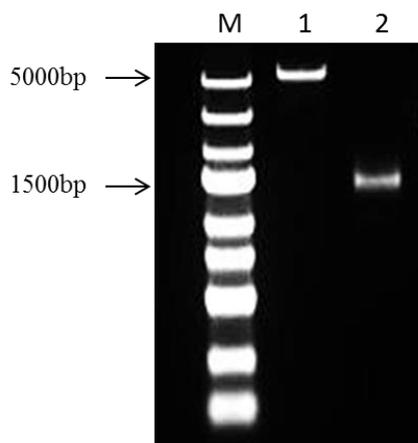
- (5) 将切下的胶，滤纸和膜分别在转膜缓冲液里浸泡 5 min。
- (6) 按照阳极→滤纸→硝酸纤维素膜→凝胶→滤纸→阴极的顺序放置在半干转印槽中，15 V 电转 15 min。
- (7) 电转完毕后，取出硝酸纤维素膜，使用 PBST 将膜上转膜缓冲液洗掉。
- (8) 将膜浸泡在 10% 脱脂奶粉里，室温摇床封闭 2 h。
- (9) 使用 PBST 洗膜三次，室温摇床，3-5 min/次，10 min 内洗 3 次。
- (10) 以 HPV16 L1 单抗 (Camvir-1) 为一抗 (1:3000 稀释)，将膜置于一抗稀释液中，室温摇床孵育 1 h。一抗孵育结束后，使用 PBST 洗膜 3 次。
- (11) 以荧光标记抗体 IRDye800CW Goat (polyclonal) Anti-Mouse IgG (H+L) 为二抗 (1:2000 稀释)，将膜置于一抗稀释液中，室温摇床，避光孵育 1h。二抗孵育结束后，使用 PBST 洗膜 3 次。
- (12) 使用 Odyssey 远红外影像分析仪 (LI-COR Biosciences 公司) 对结果进行观察。

### 3.4 实验结果

#### 3.4.1 表达 HPV16 L1 基因的表达载体的构建

##### 3.4.1.1 Plv-16 L1 和 pTracer<sup>TM</sup>-CMV/Bsd 质粒的小量提取和酶切鉴定

使用 EcoRI-HF 和 NotI-HF 对 Plv-16 L1H 和 pTracer<sup>TM</sup>-CMV/Bsd 质粒分别进行双酶切，酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳，结果显示 pTracer<sup>TM</sup>-CMV/Bsd 载体的双酶切产物条带在 5000 bp 以上，Plv-16 L1H 的双酶切产物条带在 1500 bp 处(图 3-2)。而 HPV16 L1 基因大小为 1518 bp，pTracer<sup>TM</sup>-CMV/Bsd 载体的基因大小为 6048 bp，双酶切产物条带大小与预期相符。



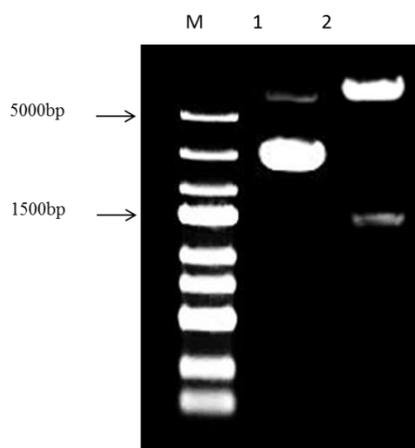
M:DNA Marker DL5000; 1: pTracer<sup>TM</sup>-CMV/Bsd 双酶切产物; 2: Plv-16L1H 双酶切产物;

图 3-2 质粒的双酶切鉴定

Figure 3-2 Identification of Bsd-L1 plasmid by double digests

### 3.4.1.2 HPV16 L1 和 pTracer<sup>TM</sup>-CMV/Bsd 质粒载体的连接

使用 T4 DNA 连接酶将 HPV16 L1 片段插入到 pTracer<sup>TM</sup>-CMV/Bsd 载体的多克隆位点上, 构建 Bsd-L1 表达载体, 经双酶切鉴定, 结果显示 Bsd-L1 双酶切电泳条带大小与预期相符 (图 3-3)。随机挑选两株菌株送擎科生物技术有限公司进行测序, 经序列比对结果显示插入序列与 HPV16 L1 序列完全一致。上述结果证明 Bsd-L1 表达载体构建成功。



M:DNA Marker DL5000; 1: Bsd-L1 质粒; 2: Bsd-L1 双酶切产物

图 3-3 Bsd-L1 质粒双酶切鉴定

Figure 3-3 Identification of Bsd-L1 plasmid by double digests

### 3.4.2 表达 HPV16 L1 基因的 TC-1 肿瘤细胞系的构建

#### 3.4.2.1 Bsd-L1 质粒转染 TC-1 细胞

使用构建的 Bsd-L1 质粒转染 TC-1 肿瘤细胞系, 24 h 后更换含  $3 \mu\text{g/mL}$  稻瘟毒素的筛选培养基, 压力筛选培养一周后, 在荧光显微镜观察细胞, 结果如图 3-4, 细胞状态良好, 并且可见绿色荧光。上述结果证明质粒转染成功并且得到稳定表达绿色荧光蛋白和稻瘟毒素的细胞系。

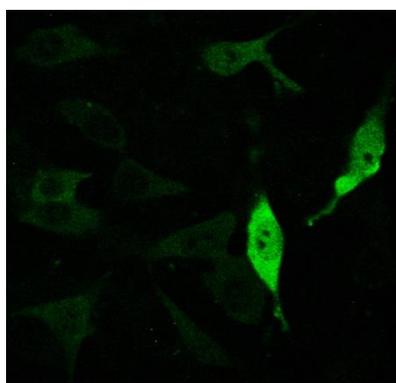
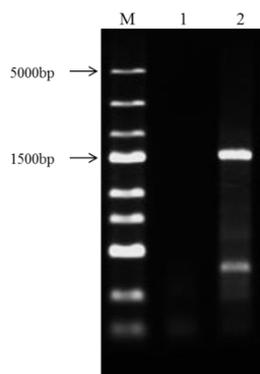


图 3-4 荧光显微镜下观察 TC-1-L1 细胞 (400 $\times$ )

Figure 3-4 The TC-1-L1 cells were observed under fluorescence microscope (400 $\times$ )

## 3.4.2.2 RT-PCR 法检测 TC-1-L1 肿瘤细胞系 HPV16 L1 mRNA 的存在结果

以 TC-1 细胞为阴性对照, TC-1-L1 为实验组, 提取 TC-1 和 TC-1-L1 细胞的总 RNA, RT-PCR 法扩增 HPV16 L1 条带, 将 RT-PCR 产物回收后, 经琼脂糖凝胶电泳鉴定, 结果显示 TC-1-L1 细胞总 RNA 的 RT-PCR 产物电泳, 在 1500 bp 处有明显的条带, TC-1 细胞总 RNA 的 RT-PCR 产物电泳, 在 1500 bp 处无条带 (图 3-5)。上述结果提示, HPV16 L1 基因存在于 TC-1-L1 肿瘤细胞系中并能进行有效的转录。



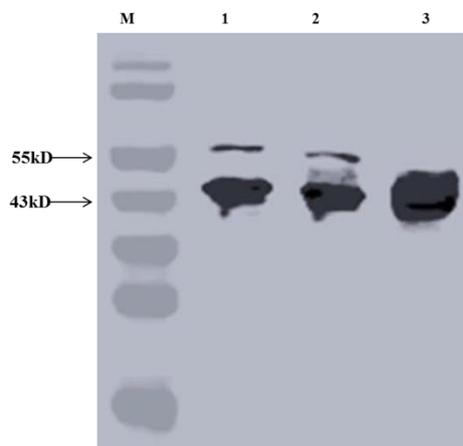
M:DNA Marker DL5000; 1: TC-1; 2: TC-1-L1

图 3-5 RT-PCR 检测 HPV16 L1 基因的转录

Figure 3-5 The transcription of HPV16 L1 gene detected by RT-PCR

## 3.4.2.3 Western Blot 检测 TC-1-L1 细胞中 HPV16 L1 的表达

我们以 VR-16L1 质粒转染 TC-1 细胞做为阳性对照, TC-1 细胞为阴性对照, 使用 Western Blot 检测 HPV16 L1 蛋白的表达水平。结果显示, VR-16 L1 及 TC-1-L1 在 55 KD 处出现明显目的条带, TC-1 只在 43KD 处有非特异性条带 (图 3-6)。上述结果提示, TC-1-L1 细胞可有效表达 HPV16 L1 基因, TC-1-L1 肿瘤细胞系构建成功。



M:预染蛋白 Marker ; 1: VR-16L1; 2: TC-1-L1; 3: TC-1

图 3-6 Western Blot 检测 HPV16 L1 蛋白的表达

Figure 3-6 The expression of HPV16 L1 protein detected by Western Blot

### 3.5 讨论

本实验室的前期研究使用 C3-luc 肿瘤模型细胞作为以 HPV16 L1 为靶抗原的疫苗的研究, C3 细胞系是来源于 C57BL/6 小鼠的第二代胚胎细胞, 整合了 HPV 16 的全基因组, 本实验室的前期研究将 Luciferase 整合到 C3 细胞系中构建了稳定表达 Luciferase 的 C3-luc 肿瘤细胞系。但是在 C3-luc 肿瘤细胞系中只能检测到 HPV16 L1 的转录, 检测不到其表达, 因此 C3 肿瘤细胞系虽然可以作为以 HPV16 L1 抗原为靶点的肿瘤模型细胞, 但是在体外杀伤实验中的灵敏度较低。为了解决以 HPV16 L1 抗原为靶点的肿瘤模型细胞的缺乏, 本实验构建了 TC-1-L1 肿瘤模型细胞。TC-1 细胞是约翰霍普金斯大学的研究组在 1996 年构建的用于 HPV16 型肿瘤治疗型疫苗研究的模型细胞株, 该细胞株含有 HPV16 E6/E7 基因。

为了构建 TC-1-L1 肿瘤细胞系, 我们的策略是将 HPV16 L1 基因通过转染的方式整合到 TC-1 细胞系, 经过抗生素压力筛选获得稳定表达 HPV16 L1 的 TC-1-L1 肿瘤细胞系。我们首先构建了一个含有 HPV16 L1 的质粒载体 Bsd-L1, 然后通过转染和稻瘟霉素压力筛选获得稳定表达 HPV16 L1 抗原的 TC-1-L1 肿瘤细胞系。通过 RT-PCR 和 Western Blot 鉴定, 结果显示 HPV16 L1 能够在 TC-1-L1 细胞中稳定的转录和表达。综上所述, 本实验成功的构建了 TC-1-L1 肿瘤细胞系, 该细胞系不仅含有 HPV16 E6/E7 基因, 还含有 HPV16 L1 基因, 拓展了 TC-1 肿瘤细胞系的用途, 为后续细胞杀伤实验奠定实验基础。

### 3.6 本章小结

将 HPV16 L1 基因插入到 pTracer™-CMV/Bsd 载体上, 成功构建了含 HPV16 L1 基因的 Bsd-L1 真核表达载体。将 Bsd-L1 质粒转染 TC-1 细胞, 通过 RT-PCR 和 Western Blot 检测 HPV16 L1 基因在 RNA 及蛋白水平上的表达, 稻瘟酶素压力筛选一周后获得稳定表达 HPV16 L1 的 TC-1-L1 细胞株。综上, 我们成功的构建了稳定表达 HPV16 L1 的 TC-1-L1 肿瘤细胞系, 为后期的肿瘤体外杀伤实验奠定了基础。

## 第4章 负载 HPV16 L1 的树突状细胞疫苗免疫效果的研究

### 4.1 引言

为研究 DC 疫苗的免疫效果及抗肿瘤活性,使用 DC-L1 疫苗分别对 C57BL/6 进行了单针和三针免疫,通过酶联免疫斑点测定法 (enzyme-linked immunospot assay, ELISPOT)、定量酶联免疫吸附测定法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA),肿瘤杀伤实验及肿瘤攻击实验分别对 DC-L1 疫苗诱导的特异性细胞、体液免疫应答及抗肿瘤效果进行评价。

### 4.2 实验材料

#### 4.2.1 细胞和疫苗

细胞: C3-luc 细胞由本室构建并保存; TC-1-L1 细胞由本人构建。

疫苗: 重组腺病毒载体疫苗 Adv5-HPV16 L1 由本室构建并保存; DC-L1 疫苗由本人构建。

#### 4.2.2 主要试剂

HPV16 L1 单克隆抗体 (Camvir-1) 购于英国 Abcam 公司; IRDye800CW Goat(polyclonal) Anti-Mouse IgG(H+L)购自 KPL 公司; 淋巴细胞分离液 EZ-Sep™ Mouse、EZ-Culture™ ELISPOT 专用无血清培养基、小鼠 IFN- $\gamma$  ELISPOT 试剂盒购于达科为生物技术有限公司; 实验用 SPF 级别 C57BL/6 小鼠购自维通利华实验动物中心; 99% 纯度的多肽 (AGVDNRECI) 由中科亚光生物科技公司制备; E-Plate L8 购自 ACEA 公司。

#### 4.2.3 主要仪器设备

仪器名称	厂家
生物安全柜	Thermo Fisher Scientific1389 型
超速离心机	BECKMAN Coulter Optima™ L-80 XP
恒温培养箱	Forma Scientific
倒置荧光显微镜	Olympuss 公司
全波长酶标仪	Bio-Tek, Epoch
微量移液器	Eppendorf 公司、Thermo 公司
细胞培养箱	Thermo 公司
手持式细胞计数器 Scepter2.0	Millipore 公司

ELISPOT 读板机	德国 AID 公司
流式细胞分析仪 Calibur	美国 BD 公司
ELISA 洗板仪	BIO-TEK 公司
iCELLigence 实时无标记细胞功能 分析仪	艾森生物（杭州）有限公司

## 4.3 实验方法

### 4.3.1 小鼠免疫方案

#### 4.3.1.1 小鼠单针免疫方案

将 60 只雄性 C57BL/6 小鼠随机分为三组，每组 20 只。采用肌肉注射的方法，分别用 DC-L1、Ad5-HPV16 L1 和 PBS 免疫小鼠一次。DC-L1 接种剂量为  $2.0 \times 10^5$  个细胞/只，Ad5-HPV16 L1 剂量为  $4.0 \times 10^8$  vp/只，PBS 剂量为 100  $\mu$ L/只。分别于免疫后 1 周、3 周、4 周、5 周通过 ELISPOT 和定量 ELISA 法检测各组小鼠体内诱导的 L1 特异性细胞与体液免疫应答。

#### 4.3.1.2 小鼠三针免疫方案

将 48 只雄性 C57BL/6 小鼠随机分成四组，每组 12 只。采用肌肉注射的方法，使用 DC-L1、Ad5-HPV16 L1、DC 细胞、PBS 分别于 1 周、3 周、5 周免疫小鼠。DC-L1 接种剂量为  $2.0 \times 10^5$  个细胞/只，Ad5-HPV16 L1 剂量为  $4.0 \times 10^8$  vp/只，DC 细胞接种剂量为  $2.0 \times 10^5$  个细胞/只，PBS 剂量为 100 $\mu$ L/只。分别于免疫后 1 周、3 周、6 周、9 周检测小鼠体内诱导的细胞和体液免疫水平。

### 4.3.2 小鼠体内细胞免疫水平检测

#### 4.3.2.1 小鼠脾淋巴细胞的获得

- (1) 颈椎脱臼法处死小鼠，75%乙醇浸泡 5-10 min。
- (2) 将处死后的小鼠置于超净工作台，使用高温高压灭菌的镊子和剪刀剪开小鼠腹部，在腹部左上侧取出小鼠脾脏，减去多余组织，将脾脏置于 200 目筛网上。
- (3) 将筛网放在 35 mm 培养皿中，每只老鼠的脾脏放 5mL 小鼠淋巴细胞分离液，用 10 mL 注射器内芯橡皮头研磨脾脏。使脾脏细胞透过筛网进入淋巴细胞分离液中。
- (4) 把悬有脾脏细胞的分离液转移到 15 mL 离心管，沿离心管壁轻轻覆盖 500  $\mu$ L 无血清 RPMI 1640 培养基，保持液面分界明显。室温，800 g，离心 30 min。
- (5) 吸出淋巴细胞白膜层于另一 15 mL 离心管，再加入 10 mL 无血清 RPMI 1640 培养基，颠倒混匀，室温，250 g，离心 10 min。

(6) 倾倒上清, 用 500  $\mu\text{L}$  无血清培养基重悬细胞。

(7) 将细胞悬液做 100 倍稀释, 使用手持式细胞计数仪计数, 调整细胞浓度为  $5 \times 10^6$  个/mL 和  $2.5 \times 10^5$  个/mL。

#### 4.3.2.2 ELISPOT 法检测小鼠体内细胞免疫水平

(1) 向预包被 ELISPOT 板的每孔中加入 200  $\mu\text{L}$  达优 ELISPOT 专用无血清培养基, 室温静置 10 min 后将其扣出。

(2) 将调整好浓度的细胞悬液加入各实验孔中, 每孔 100  $\mu\text{L}$ , 具体如下:

正对照孔: 细胞浓度  $0.25 \times 10^5$  个/孔;

负对照孔: 细胞浓度  $0.25 \times 10^5$  个/孔;

背景负对照: 加入无血清培养基;

实验孔: 样品细胞浓度  $5 \times 10^5$  个/孔。

(3) 向各实验孔中加入刺激物: 每孔 10  $\mu\text{L}$ , 具体如下:

正对照孔: 加入 PMA 阳性刺激剂工作液。

负对照孔(含背景负对照孔): 加入达优 ELISPOT 专用无血清培养基;

实验孔: 加入多肽 (AGVDNRECI)。

(4) 所有样品和刺激物加完后, 盖好板盖, 放入  $37^\circ\text{C}$ ,  $5\% \text{CO}_2$  培养箱培养 16-20 h。

(5) 培养结束后, 倾倒孔内细胞及培养基。加入冰冷的去离子水, 每孔 200  $\mu\text{L}$ , 于  $4^\circ\text{C}$  冰箱放置 10 min 低渗裂解细胞。

(6) 裂解结束后, 倾倒孔内液体, 使用预先配制的  $1 \times$ Washing buffer, 200  $\mu\text{L}$ /孔, 洗涤 5-7 次, 每次停留 1 min, 最后一次, 在吸水纸上扣干。

(7) 洗板结束后, 将稀释好的生物素标记的抗体工作液加入各实验孔, 100  $\mu\text{L}$ /孔, 于  $37^\circ\text{C}$  孵育 1 h。

(8) 抗体孵育结束后, 倾倒孔内液体, 使用  $1 \times$ Washing buffer, 200  $\mu\text{L}$ /孔, 洗涤 5 次。每次停留 1 min, 最后一次, 在吸水纸上扣干。

(9) 将稀释好的酶标亲和素工作液加入各实验孔, 100  $\mu\text{L}$ /孔, 于  $37^\circ\text{C}$  孵育 1 h。

(10) 酶标亲和素孵育结束后, 倾倒孔内液体, 使用  $1 \times$ Washing buffer, 200  $\mu\text{L}$ /孔, 洗涤 5 次, 每次停留 1 min, 最后一次, 在吸水纸上扣干。

(11) 将现配的 AEC 显色液工作液加入各实验孔, 100  $\mu\text{L}$ /孔。室温避光静置 15-45 min 每隔 5-10 min, 观察显色情况。

(12) 待显色结束, 倾倒孔内液体, 揭开板底座, 用去离子水洗涤正反面及板底座 5 遍以终止显色。将板放置在室温阴凉处, 待其自然晾干后合上底座。

(13) ELISPOT 板斑点计数, 并记录斑点的各种参数, 使用 Graphpad Prime 软件做

统计分析。

### 4.3.3 小鼠体内体液免疫水平检测

#### 4.3.3.1 小鼠血清的获得

- (1) 摘眼球取血法获得小鼠血液于 1.5 mL EP 管中。
- (2) 将 EP 管放置于室温 2 h, 3000 rpm, 离心 10 min。
- (3) 小心吸取上清, 收集到新的 EP 管中, 做好标记, 保存于-80℃冰箱。

#### 4.3.3.2 用于包板的 HPV16 型的 VLP 蛋白浓度的测定

- (1) 取 5 个 EP 管, 用 PBS 稀释标准品, 分别 2、4、8、16、32 倍稀释标准品。
- (2) 取 3 个 EP 管, 用 PBS 稀释样品, 分别 10、20、100 倍稀释样品。
- (3) 将 BCA 试剂盒中的 A 液和 B 液按 1:1 的比例配制 BCA 工作液。
- (4) 取一 ELISA 板, 做好标记, 每孔加入 200  $\mu\text{L}$  PBS, 加入 10 $\mu\text{L}$  标准品或样品, 每个稀释度 2 个孔, 对照孔加入 10  $\mu\text{L}$  PBS, 并设空白孔。空白孔只加 BCA 工作液。
- (5) 37℃, 孵育 30 min。酶标仪, 570 nm 读数。
- (6) 根据标准品浓度做标准曲线, 测出 VLP 浓度。

#### 4.3.3.3 ELISA 试验中各组分使用浓度的摸索

- (1) 使用包被液稀释 VLP, 分别为 2  $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}/\text{孔}$ 、1  $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}/\text{孔}$ 、0.5  $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}/\text{孔}$ 、0.25  $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}/\text{孔}$ , 每孔 100  $\mu\text{L}$  加到 ELISA 板中, 每个浓度两横排, 共 24 孔。4℃, 包被过夜。
- (2) 第二天取出 ELISA 板, 使用自动洗板仪洗板子。
- (3) 每孔加入 250  $\mu\text{L}$  过期胎牛血清, 37℃, 封闭 2 h。使用自动洗板仪洗板子。
- (4) 使用 PBS 稀释抗 HPV16 L1 单克隆抗体, 分别做 1:2500、1:5000、1:10000、1:20000、1:40000、1:80000 倍稀释, 每个浓度一竖排, 加到 ELISA 板中。
- (5) 取阴性小鼠血清, 1: 1000 倍稀释, 作为阴性对照, 并做 PBS 组, 空白组对照。
- (6) 37℃, 孵育 2 h。使用自动洗板仪洗板子。
- (7) 按照二抗说明书稀释二抗。每孔 100  $\mu\text{L}$ , 并设只加二抗组对照。
- (8) 37℃, 孵育 2 h。自动洗板仪洗板子。
- (9) 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  显色液, 37℃, 显色 10-30 min。
- (10) 每孔加入 50  $\mu\text{L}$  终止液, 终止显色。使用酶标仪, 于 450 nm, 读出 OD 值。

#### 4.3.3.4 定量 ELISA 法检测小鼠血清中抗 HPV16 L1 抗体 IgG 浓度

- (1) 按照上述摸索的 VLP 最佳包被浓度, 使用包被液稀释 VLP 至 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 每孔 100  $\mu\text{L}$  加到 ELISA 板子中, 将 ELISA 板子放置 4℃冰箱, 包被过夜。

- (2) 取出 ELISA 板子，倾倒孔内液体，使用自动洗板洗板子。
- (3) 每孔加入 250  $\mu$ L 过期胎牛血清，37 $^{\circ}$ C 孵箱封闭 2 h。
- (4) 倾倒空内封闭液，使用自动洗板仪洗板子，将孔内液体在吸水纸上扣干。
- (5) 样品血清分别做 1:100、1:1000、1:10000 倍稀释，每孔 100 $\mu$ L 加到 ELISA 板中，每个样品 2 孔，并设 PBS 组、空白组对照。37 $^{\circ}$ C，孵育 2 h。
- (6) 使用自动洗板仪洗板子，将孔内液体在吸水纸上扣干。
- (7) 按照二抗说明书稀释二抗，每孔 100  $\mu$ L 加到 ELISA 板中。37 $^{\circ}$ C，孵育 2 h。
- (8) 使用自动洗板仪洗板子，将孔内液体在吸水纸上扣干。
- (9) 每孔加入 100  $\mu$ L 显色液。37 $^{\circ}$ C，避光显色 10-30 min。
- (10) 每孔加入 50  $\mu$ L 终止液。使用酶标仪，于 450 nm，读出 OD 值。

#### 4.3.4 肿瘤攻击实验

##### 4.3.4.1 C3-luc 细胞的复苏，传代培养

- (1) 将 T25 细胞培养瓶、15 mL 离心管、微量移液器等实验用品放入生物安全柜中，紫外灯照射 30 min。同时水浴锅预热到 37 $^{\circ}$ C。
- (2) 从液氮罐中取出 C3-luc 细胞，移到 37 $^{\circ}$ C 水浴锅中，使其快速融化。
- (3) 在超净工作台，将细胞转入 15 mL 离心管中，加入 5 mL DMEM 培养基混匀，1000 rpm，离心 5 min。
- (4) 弃上清，以 5 mL DMEM 培养基重悬细胞，计数调整浓度后接入 T25 细胞培养瓶中，放入 37 $^{\circ}$ C，5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。
- (5) 待细胞长到铺满细胞培养板底 80% 左右时，使用 10 mL PBS 洗两次，吸除 PBS。
- (6) 加入 1 mL 胰酶，放置培养箱中，消化 3 min。
- (7) 在显微镜下观察细胞消化情况，向培养瓶中加入 5 mL 含 10% FBS 的 DMEM 培养基，终止胰酶的消化作用。
- (9) 使用一次性吸管反复吹打至单细胞悬液，以 1:2 比例传代至另一瓶 T25 培养瓶，补充培养基至 5 mL 每瓶，放置 37 $^{\circ}$ C，5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养。

##### 4.3.4.2 免疫注射

- (1) 将 C3-luc 细胞传代至 T175 细胞培养瓶中，根据所需细胞数量推测培养瓶数。待 C3-luc 细胞长满培养瓶底 80% 左右时，使用 PBS 洗两遍。
- (2) 使用胰酶消化细胞，将收集的细胞悬液转移到 15 mL 离心管中，1000 rpm 离心 5 min。
- (3) 弃上清，使用 10 mL PBS 重悬细胞，1000 rpm 离心 5 min。

(4) 重复步骤 (3)。

(5) 吸除上清, 使用 1 mL PBS 重悬细胞, 将细胞悬液做 100 倍稀释, 使用手持式细胞计数仪计数, 调整细胞浓度为  $5 \times 10^7$  个/mL。

(6) 在免疫后第六周, 采用皮下注射的方法, 于小鼠腹股沟处接种 100  $\mu$ L C3-luc 细胞, 即每只小鼠接种  $5 \times 10^6$  个细胞。

#### 4.3.4.3 小鼠成瘤情况观察

每隔 3-4 天, 肉眼观察并使用手指触摸小鼠的成瘤情况。

#### 4.3.4.4 小鼠肿瘤体积的测量

使用酒精擦拭小鼠成瘤部位, 以使瘤子暴露出来, 测量瘤子的最大直径和横径, 计算肿瘤的体积。

#### 4.3.5 体外杀伤实验

##### 4.3.5.1 免疫后小鼠脾淋巴细胞的制备

(1) 小鼠脾淋巴细胞的分离步骤见 4.3.2.2。

(2) 将分离获得的小鼠脾淋巴细胞进行 100 倍稀释, 使用手持式细胞计数仪计数, 调整过细胞浓度为  $1 \times 10^6$  个/mL。

(3) 将调整好浓度的脾淋巴细胞铺至 96 孔 U 型板中, 每孔  $1 \times 10^5$  个细胞。

(4) 向每孔中加入 10  $\mu$ g 的 HPV16 L1 特异性刺激肽段 (AGVDNRECI)。

(5) 向每孔中加入 10 ng 的 IL-2, 辅助刺激 T 细胞的生长。

(6) 将 96 孔板放置 37 $^{\circ}$ C, 5%CO<sub>2</sub> 孵箱培养 12-20 h。

##### 4.3.5.2 TC-1-L1 细胞的制备

(1) 将 TC-1-L1 细胞传代于 T25 培养瓶中, 放置 37 $^{\circ}$ C, 5%CO<sub>2</sub> 孵箱培养。

(2) 待细胞铺满培养瓶底 80%左右时, 使用 PBS 洗两次, 每次 5 mL。

(3) 将 PBS 除尽, 加入 1 mL 胰酶, 放置孵箱中消化 3 min。

(4) 在显微镜下观察细胞消化情况, 加入 4 mL 含血清的 DNEM 培养基终止消化作用。

(5) 将培养瓶中细胞悬液转移至 15 mL 离心管, 1000 rpm, 离心 5 min。

(6) 弃上清, 使用 1 mL DMEM 培养基重悬细胞。

(7) 将细胞悬液做 100 倍稀释, 使用手持式细胞计数仪计数, 调整细胞浓度为  $5 \times 10^4$  个/mL。

#### 4.3.5.3 使用 iCelligence 系统进行检测

- (1) 安装 RTCA iCelligence 实时无标记细胞功能分析仪并检测。
- (2) 在超净工作台内, 无菌环境下, 取出 E-Plate L8, 在 E-Plate L8 每孔中加入 150  $\mu\text{L}$  培养基。将 E-Plate L8 放在 iCelligence 检测仪上, 进行基线检测。
- (3) 系统检测正确后, 取出 E-Plate L8, 向各个孔中加入细胞悬液, 效靶比为 100, 使每孔最终溶液体积为 450  $\mu\text{L}$ 。并设置对照孔。
- (4) 将加好细胞悬液的 E-Plate L8 在超净工作台中静置 30 min, 使细胞沉到孔底部。
- (5) 30 min 后, 将 E-Plate L8 放回 iCelligence 检测仪上, 进行检测。

#### 4.3.6 数据分析及处理

利用 GraphPad Prime 5 统计学软件分析结果并绘制图表。以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

### 4.4 实验结果

#### 4.4.1 DC-L1 疫苗单针免疫效果研究

##### 4.4.1.1 DC-L1 疫苗单针免疫诱导的细胞免疫应答

将 DC-L1 疫苗及重组腺病毒载体疫苗 Ad5-HPV16 L1 以肌肉注射的方式分别免疫 C57BL/6 小鼠一次, 在免疫后第 1, 3, 4, 5 周, 分离获得各组小鼠脾淋巴细胞, 通过 ELISPOT 方法检测疫苗诱导的 L1 特异性细胞免疫应答水平。如图 4-1, DC-L1 疫苗及重组腺病毒疫苗均可诱导产生 L1 特异性的细胞免疫应答, 二者在免疫动力学特性上的差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。其中腺病毒疫苗单针接种可迅速诱导特异性细胞免疫应答, 在免疫后第 3 周, ELISPOT 斑点数达到峰值, 之后缓慢下降。而 DC-L1 疫苗组单针接种后经历了一个较长的无应答期, 直到免疫后第 4 周 ELISPOT 斑点数才出现显著的增加, 与 PBS 组差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 且 DC-L1 组细胞免疫应答随着时间的推移而缓慢增强, 在免疫后第 5 周, DC-L1 疫苗组 ELISPOT 斑点数逐渐超过 Ad5-HPV6L1 疫苗组。

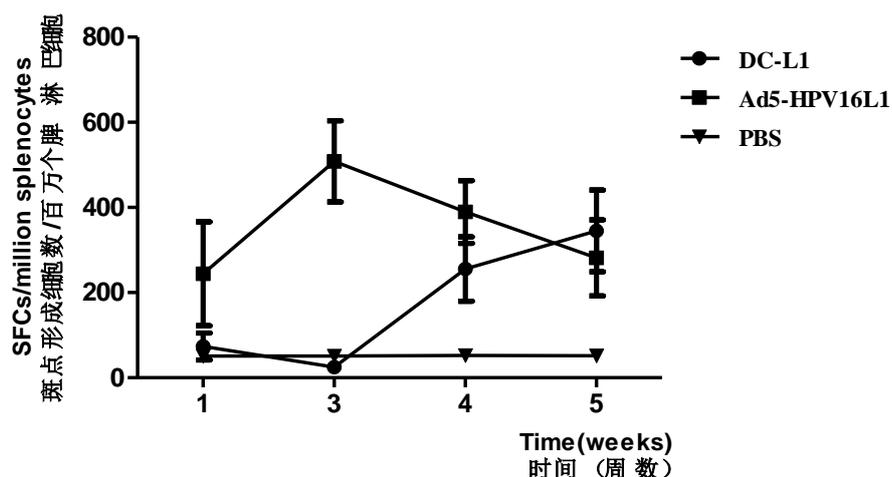


图 4-1 ELISPOT 检测单针免疫小鼠 HPV16 L1 特异性细胞免疫应答

Figure 4-1 Detection of HPV16 L1 specific cellular immune response by ELISPOT

#### 4.4.1.2 DC-L1 疫苗单针免疫诱导的体液免疫应答

使用定量 ELISA 法检测各组小鼠血清中 HPV16 L1 总抗体浓度。如图 4-2，结果显示，DC-L1 疫苗组和 Ad5-HPV16 L1 疫苗组单针免疫小鼠后均可诱导 L1 特异性的血清抗体，两组免疫动力学特性相似，虽然 Ad5-HPV16 L1 组在各检测时间点的抗体浓度均高于 DC-L1 组，但二者差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )，并且在免疫后第 5 周，两组疫苗的体液免疫应答水平仍未见减弱趋势。

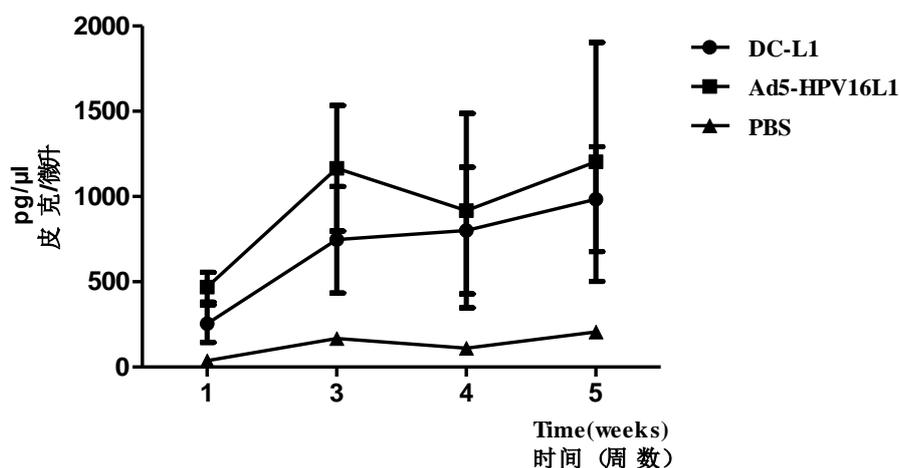


图 4-2 定量 ELISA 法检测单针免疫小鼠血清 HPV16 L1 特异性抗体

Figure 4-2 Detection of HPV16 L1 specific antibodies in mice by quantitative ELISA

#### 4.4.2 DC-L1 疫苗三针免疫效果研究

##### 4.4.2.1 DC-L1 疫苗三针免疫诱导的细胞免疫应答

使用 DC-L1 疫苗, 重组腺病毒载体疫苗 Ad5-HPV16 L1, DC 细胞和 PBS 以肌肉注射的方式分别于 1, 3, 5 周免疫小鼠三次, 分别于免疫后第 1, 3, 6, 9 周使用 ELISPOT 法检测小鼠体内细胞免疫水平。如图 4-3, 结果显示 DC-L1 疫苗和 Ad5-HPV16 L1 均可诱导较高强度的特异性细胞免疫应答, 组间差异无统计学意义( $P>0.05$ )。在免疫后第 6 周, DC-L1 疫苗组诱导的细胞免疫水平达到峰值, 为 5586 斑点/百万个脾淋巴细胞, 随后开始下降, 直到第 9 周仍可检测到 3535 斑点/百万个脾淋巴细胞, 说明在免疫后第 9 周, DC-L1 疫苗仍可诱导较强的细胞免疫反应。并且 DC-L1 疫苗组诱导的细胞免疫水平明显高于 DC 细胞组和 PBS 组, 虽然 DC 细胞组检测到的斑点数始终多于 PBS 组, 但是与 PBS 组并无显著性差异 ( $P>0.05$ )。上述结果证明 DC-L1 疫苗多针免疫可以诱导持久而强烈的细胞免疫应答, 而单纯的 DC 细胞回输不能诱导机体产生明显的细胞免疫反应。

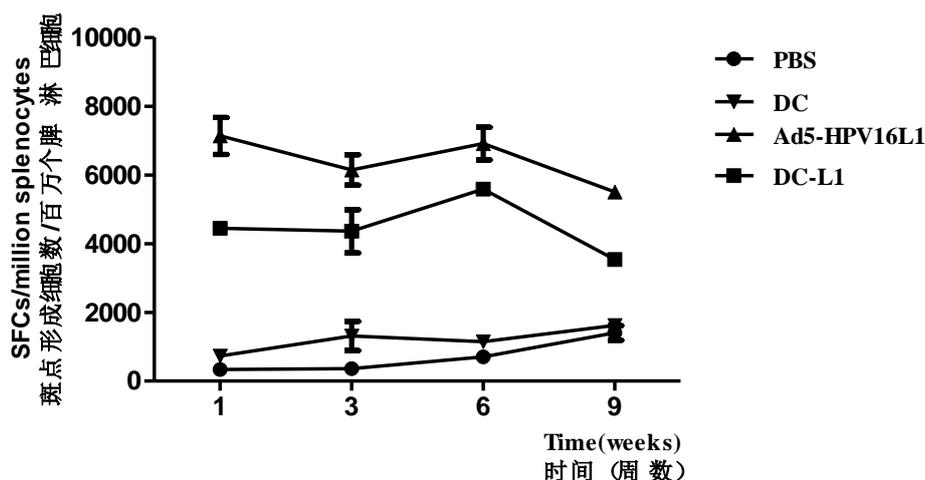


图 4-3 ELISPOT 检测三针免疫小鼠 HPV16 L1 特异性细胞免疫应答

Figure 4-3 Detection of HPV16 L1 specific cellular immune response by ELISPOT

##### 4.4.2.2 DC-L1 疫苗三针免疫诱导的体液免疫应答

使用定量 ELISA 法检测小鼠血清中抗 HPV16 L1 总抗体的浓度来判断疫苗诱导的体液免疫水平。如图 4-4, 重组腺病毒疫苗组和 DC-L1 组均可诱导产生特异性体液免疫应答, 且二者产生的体液免疫反应差异无统计学意义( $P>0.05$ ), 在免疫后第 6 周, 重组腺病毒载体疫苗 Ad5-HPV16 L1 组和 DC-L1 组诱导的体液免疫均达到峰值。随后迅速下降, 在免疫后第 9 周时, 疫苗组体液免疫水平与 DC 组和 PBS 组接近。上述结果说明本实验制备的 DC-L1 疫苗可以诱导产生特异性体液免疫应答。

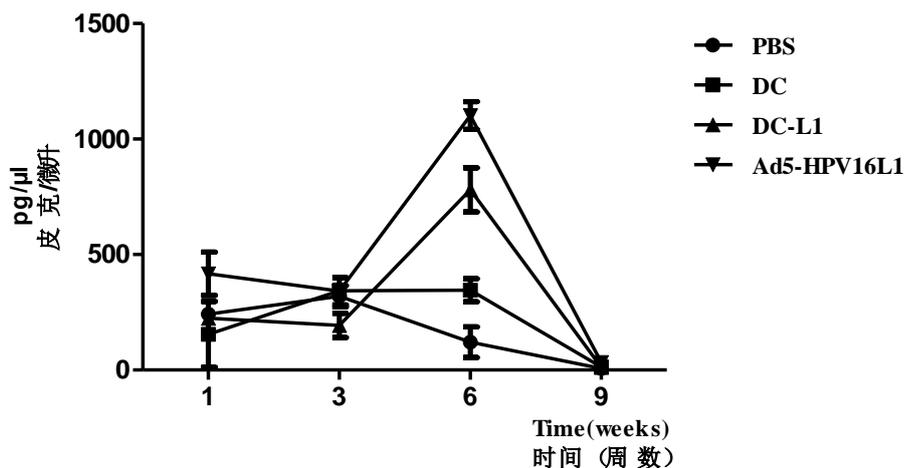


图 4-4 定量 ELISA 法检测小鼠血清 HPV16 L1 特异性抗体

Figure 4-4 Detection of HPV16 L1 specific antibodies in mice by quantitative ELISA

#### 4.4.3 肿瘤攻击实验

采用皮下接种的方法，于腹股沟处接种肿瘤细胞，每只老鼠接种  $5 \times 10^6$  个 C3-luc 细胞。在接种后第 4 周，使用尺子测量肿瘤的体积，按照公式  $V = \pi/6 \times a \times b^2$  计算出各组老鼠肿瘤的体积<sup>[90]</sup>。如图 4-5，结果显示，重组腺病毒载体疫苗组在接种后 4 周无肿瘤长出，DC-L1 疫苗组虽然长出肿瘤，但明显小于 PBS 组肿瘤体积，且 DC-L1 组与 PBS 组间差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )，上述结果说明本实验制备的 DC-L1 疫苗具有抑制肿瘤细胞生长的作用。

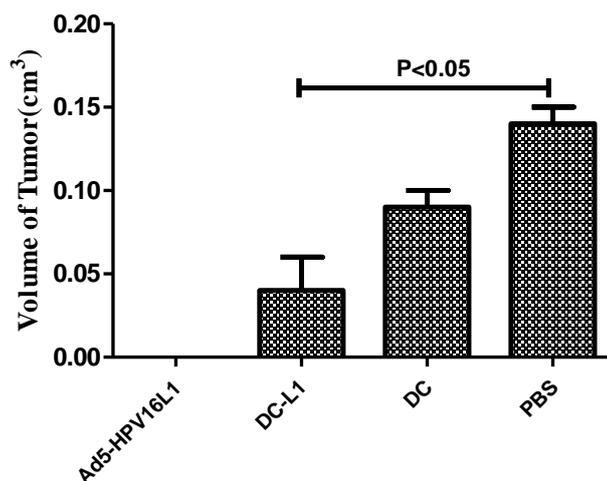


图 4-5 各组小鼠肿瘤体积大小

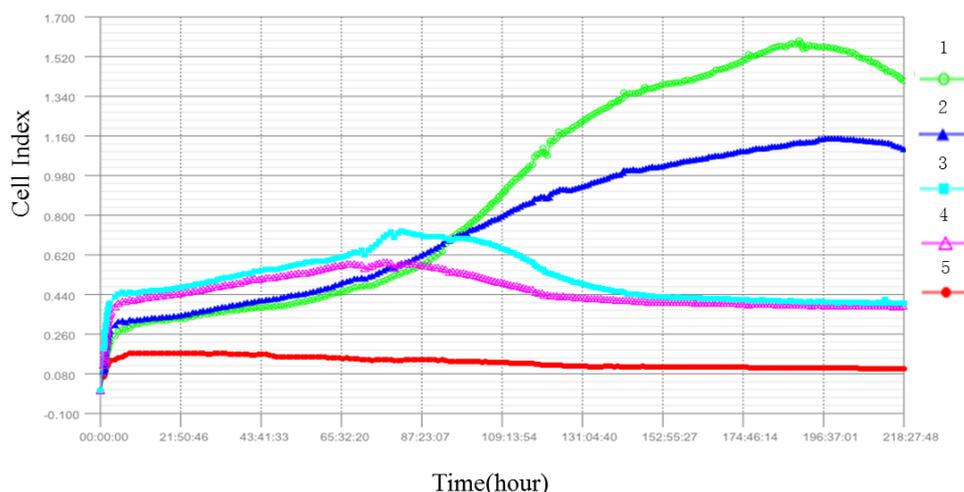
Figure 4-5 Average volume of tumor in each group mouse

#### 4.4.4 体外杀伤实验结果

iCELLigence 实时无标记细胞功能分析仪由细胞分析仪、细胞检测板( E-Plate L8) 和监测设备 ( iPad) 三部分组成。当细胞增殖、生长受到抑制或者由于死亡而变成悬浮状态时, 由于贴壁细胞数量的变化, 而使监测曲线发生高低起伏。本实验分离获得免疫后小鼠的脾淋巴细胞后, 使用肽段进行体外刺激 12-20 h 后作为效应细胞, 将本实验前期构建的 TC-1-L1 肿瘤细胞作为靶细胞, 以效应细胞: 靶细胞=100 的比例接种至 E-Plate L8 中, 利用 iCELLigence 系统监测细胞贴壁情况的变化。

##### 4.4.4.1 单针免疫体外杀伤结果

培养 200 h 后, 获取体外杀伤实验结果图, 如图 4-6。曲线 1 为单独培养的 TC-1-L1 细胞, 贴壁细胞增长迅速, 在培养至 180 h 左右时开始下降; 曲线 5 为单独培养的脾淋巴细胞, 由于脾淋巴细胞不贴壁也不增长, 为一条平稳的直线; 曲线 2 为 PBS 组脾淋巴细胞与 TC-1-L1 细胞共培养, 理论上 PBS 组的生长曲线同单独培养的 TC-1-L1 细胞相同, 但是实际上 PBS 组曲线在 87 h 之后一直低于 TC-1-L1 组, 分析原因为活的脾淋巴细胞与靶细胞竞争培养基, 导致细胞生长缓慢; Ad5-HPV16 L1 组和 DC-L1 组与 TC-1-L1 细胞共培养时, 贴壁细胞生长缓慢, 生长趋势相近, 大约在 80 h 处贴壁细胞数达到高峰, 随后开始下降。上述结果说明, 单针免疫后, Ad5-HPV16 L1 组和 DC-L1 组对 TC-1-L1 细胞具有杀伤作用。



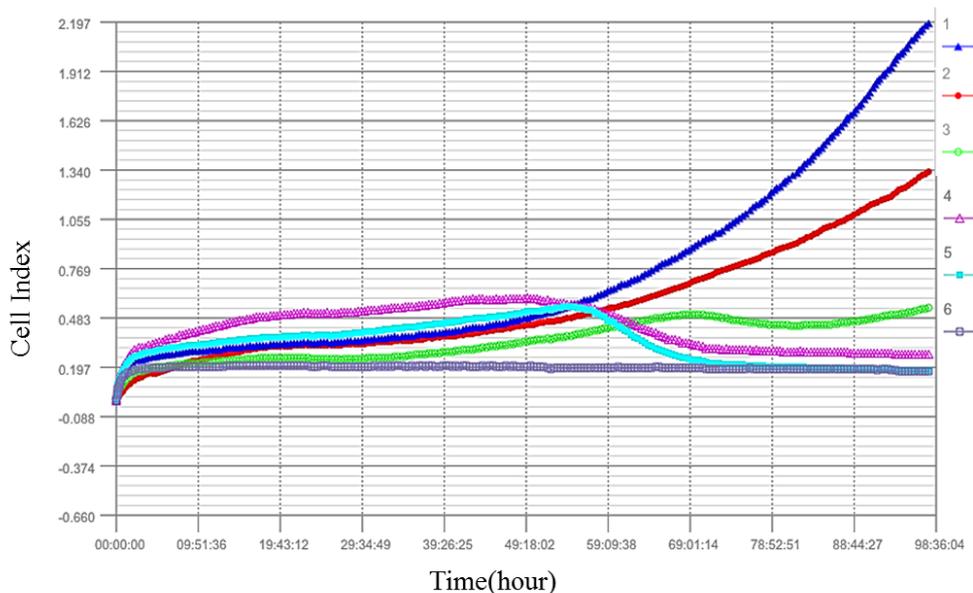
- 1: 单独培养的 TC-1-L1 细胞;
- 2: 刺激后的 PBS 组脾淋巴细胞与 TC-1-L1 共培养;
- 3: 刺激后的 DC-L1 组脾淋巴细胞与 TC-1-L1 共培养;
- 4: 刺激后的 Ad5-HPV16 L1 组皮淋巴细胞与 TC-1-L1 共培养;
- 5: 单独培养的 PBS 组脾淋巴细胞

图 4-6 单针免疫肿瘤体外杀伤实验

Figure 4-6 Results of *in vitro* tumor killing experiment after single - immunization

#### 4.4.4.2 三针免疫体外杀伤结果

培养 96 h 之后，获取体外杀伤结果图。如图 4-7， Ad5-HPV16 L1 组和 DC-L1 组脾淋巴细胞与 TC-1-L1 共培养时，贴壁细胞生长速度明显减缓，并且 DC-L1 疫苗组和 Ad5-HPV16 L1 组贴壁细胞数在约 49-55 h 处达到高峰后迅速减少，在约 70 h 处，Ad5-HPV16 L1 组贴壁细胞数降到最低而 DC-L1 疫苗组仍处于减少趋势（曲线 4、5）；而 PBS 组和 DC 组的脾淋巴细胞与 TC-1-L1 细胞共培养，DC 组对 TC-1-L1 细胞的生长具有抑制作用，在约 69 h 处，DC 组贴壁细胞数量达到高峰，随后一直处于平稳状态，可见 DC 细胞组的脾淋巴细胞只是竞争靶细胞的培养基，但对靶细胞并无杀伤效果（曲线 2、3）；TC-1-L1 细胞单独培养时，增长速度迅速，在培养至 96 h 时，仍未见减弱趋势（曲线 1）；上述结果说明本实验制备的 DC-L1 疫苗三针免疫后对肿瘤细胞具有显著的杀伤作用。



- 1: 单独培养的 TC-1-L1 细胞；
- 2: 刺激后的 PBS 组脾淋巴细胞与 TC-1-L1 共培养；
- 3: 刺激后的 DC 组脾淋巴细胞与 TC-1-L1 共培养；
- 4: 刺激后的 DC-L1 组脾淋巴细胞与 TC-1-L1 共培养；
- 5: 刺激后的 Ad5-HPV16 L1 组皮淋巴细胞与 TC-1-L1 共培养；
- 6: 单独培养的 PBS 组脾淋巴细胞

图 4-7 三针免疫肿瘤体外杀伤实验

Figure 4-7 Results of *in vitro* tumor killing experiment after triple-immunization

## 4.5 讨论

肿瘤的免疫治疗即通过激活或增强机体的免疫系统发挥抗肿瘤免疫反应以达到抑

制或清除肿瘤的目的。大量研究表明 DC 瘤苗在抗肿瘤免疫反应中发挥重要作用, DC 疫苗通过激活肿瘤抗原特异性的 CTL, 识别和杀伤肿瘤细胞, 有研究表明经过 DC 疫苗的免疫治疗后, 在 77% 的前列腺癌患者和 61% 的肾癌患者中可以引发这种抗原特异性的细胞免疫反应<sup>[91]</sup>。在本实验中制备的 DC-L1 疫苗三针免疫小鼠后, 可以诱导持久而强烈的细胞免疫反应, 与文献报道相符。并且在以 TC-1-L1 为靶抗原的体外杀伤实验中我们进一步验证了 DC-L1 疫苗可以诱导产生细胞免疫反应。Ad5-HPV16 L1 除了能够激活特异性免疫应答, 还可通过有效刺激固有免疫来进一步增强特异性免疫反应, Ad5-HPV16 L1 组在接种后可迅速产生免疫反应, 这与本实验室前期研究结果相符。DC-L1 疫苗三针免疫后诱导的细胞免疫产生的斑点数是单针免疫产生的斑点数的数百倍, 而 DC-L1 疫苗单针接种后经历了一个较长的无应答期的原因可能为 DC 疫苗制备过程中较长的体外培养时间以及高浓度细胞因子体外诱导过程对 DC 细胞功能的损害, 导致回输的 DC 细胞在免疫功能方面较体内天然 DC 细胞偏低<sup>[92]</sup>。因此, 改进 DC 疫苗的制备方法, 比如缩短 DC 细胞体外培养时间、或直接使用体内天然 DC 细胞进行抗原负载可能获得更为理想的免疫效果。

单针免疫和三针免疫诱导的体液免疫结果显示, 重组腺病毒 Ad5-HPV16 L1 疫苗和 DC-L1 疫苗均可诱导产生特异性体液免疫应答。与单针免疫小鼠诱导的体液免疫水平相比, 三针免疫的疫苗组血清中抗 HPV16 L1 总抗体浓度并无明显增高, 且重组腺病毒载体疫苗 Ad5-HPV16 L1 和 DC-L1 疫苗诱导的体液免疫反应无显著性差异。分析原因可能是两种载体疫苗通过相似的途径激活体液免疫反应。更有, 通过利用腺病毒载体, 在不抑制 DC 活性和免疫功能的情况下, 转染效率能达到 50-90%。然而, 腺病毒系统不是完美的, 瞬时转染时免疫原性持续时间将会减少, 这也是 DC-L1 疫苗诱导的体液免疫水平持续时间短的原因之一<sup>[93]</sup>。

本实验室的前期研究结果显示重组腺病毒载体疫苗可以有效的抑制肿瘤细胞的生长, 本实验的研究结果与其相符。已有研究显示使用肿瘤细胞裂解物通过细胞融合方法制备 DC 瘤苗可以抑制肿瘤细胞生长, 而本研究利用重组腺病毒载体疫苗感染 DC 细胞制备的 DC-L1 疫苗也可以抑制肿瘤细胞生长, 提示以不同的方法和不同的抗原制备的 DC 疫苗可以有效抑制肿瘤细胞的生长, 为 DC 疫苗的临床应用奠定实验基础。虽然本实验中 DC 组与 DC-L1 组肿瘤体积大小在统计学上无意义, 但是肉眼仍然可以观察到两组小鼠肿瘤体积大小具有明显差异, 分析原因一方面由于 DC 细胞是专职抗原提呈细胞, 回输体内后, 增加了 DC 细胞数量, 从而增强了机体的抗原提呈能力; 另一方面可能由于接种肿瘤细胞的小鼠数量不足导致在统计学上差异无意义。

#### 4.6 本章小结

DC-L1 疫苗三针免疫后的细胞免疫水平明显高于单针免疫, 而在体液免疫方面则

无明显的增强。通过体外杀伤实验，我们进一步比较了单针和三针免疫的细胞免疫效果，结果表明，三针免疫的体外杀伤效果明显高于单针免疫。并且在三针免疫后的第6周，我们给 C57BL/6 小鼠接种了 C3-luc 肿瘤细胞，经过 4 周的观察，发现 DC-L1 疫苗具有抑制肿瘤生长的作用。上述结果说明本实验制备的 DC-L1 疫苗多针免疫后可以增强机体的细胞免疫应答和肿瘤杀伤作用，为 DC-L1 疫苗的序贯免疫研究奠定实验基础。

## 结论

本研究利用分子生物学和细胞生物学等技术，构建了稳定表达 HPV16 L1 的 TC-1-L1 肿瘤细胞系。同时采用细胞因子联合诱导法体外培养扩增树突状细胞，使用重组腺病毒载体疫苗 Ad5-HPV16 L1 感染成熟树突状细胞制备基于 HPV16 L1 的树突状细胞疫苗，并通过动物实验评价该疫苗的免疫效应。通过上述实验得出以下结论：

(1) 使用经典的细胞因子联合诱导培养法，分离获得 C57BL/6 小鼠骨髓单个核细胞，为获得更多的成熟 DC 细胞，我们通过改良细胞培养条件，平均一只小鼠可获得  $1.0 \times 10^7$  个成熟的 DC 细胞。在显微镜下可见典型树突状细胞形态特征，并且使用流式细胞术可检测到 DC 细胞表面标记分子 CD80, CD11c, IA/IE 高表达，上述结果显示本实验成功的获得成熟 DC 细胞。

(2) 使用 MOI 为 100 的重组腺病毒载体疫苗 Ad5-HPV16 L1 感染成熟的 DC 细胞，感染 48h 后，经 Western Blot 法检测，实验结果显示与未感染重组腺病毒载体疫苗 Ad5-HPV16 L1 组 DC 相比，感染组在 55KD 处有明显的目的条带，证明本实验成功的制备了基于 HPV16 L1 的 DC 疫苗。

(3) 成功构建了基于 HPV16 L1 的真核表达载体 Bsd-L1，通过酶切和测序鉴定插入基因序列与 HPV16 L1 序列完全一致。利用转染和稻瘟霉素压力筛选的方法在较短的时间内获得稳转肿瘤细胞系 TC-1-L1，通过 RT-PCR 和 Western Blot 法检测外源基因的转录和表达，结果显示外源基因可以稳定的转录和表达。上述结果说明本实验成功的构建了 TC-1-L1 肿瘤细胞系。

(4) 将本实验制备的 DC-L1 疫苗分别进行单针和三针免疫 C57BL/6 小鼠，以重组腺病毒载体疫苗 Ad5-HPV16 L1 接种小鼠为阳性对照，PBS 组为阴性对照，分别于免疫后不同时间点使用 Elispot 和 Elisa 法检测小鼠体内的细胞和体液免疫水平。结果显示单针免疫后 Ad5-HPV16 L1 和 DC-L1 疫苗诱导的体液免疫反应水平相当，但各组间细胞免疫水平具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。上述结果显示 DC-L1 疫苗单针免疫小鼠可诱导特异性的细胞和体液免疫反应。三针免疫诱导的细胞免疫水平明显强于单针免疫。而在体液免疫方面，三针免疫与单针免疫无明显差别。

(5) 于疫苗诱导的免疫水平最高时间点接种 C3-luc 肿瘤细胞，在接种后 6 周内观察小鼠成瘤情况，在接种后第 6 周可观察到重组腺病毒载体疫苗组无肿瘤生成，DC-L1 组有肿瘤生成，但是肿瘤体积明显小于 DC 组和 PBS 组。上述结果说明 DC-L1 疫苗可以特异性抑制肿瘤细胞的生长。

(6) 通过体外杀伤实验证明本实验制备的 DC-L1 疫苗免疫小鼠后分离获得的脾淋巴细胞，经过特异性肽段刺激后，能够特异性杀伤 TC-1-L1 靶细胞。再次证明 DC-L1

疫苗能够诱导小鼠体内的细胞免疫。

综上所述，DC-L1 疫苗可以诱导机体产生较高强度和较长时间的细胞免疫反应。为 DC-L1 疫苗与 DNA 载体疫苗和病毒载体疫苗的联合使用奠定实验基础。

## 参考文献

- [1] ZUR HAUSEN H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application [J]. *Nat. Rev. Cancer*, 2002, 2: 342–350.
- [2] HANDLER M Z, HANDLER N S, MAJEWSKI S, et al. Human papillomavirus vaccine trials and tribulations Clinical perspectives [J]. *J. Am. Acad. Dermatol.* , 2015, 73 (5): 743-756.
- [3] BERNARD H. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papilloma-viruses [J]. *J. Clin. Virol.* , 2005,32:1-6.
- [4] Fu Z, Tian H, Wang F, et al. Carcinogenic mechanisms of oncoproteins in high-risk human papillomavirus [J]. *Int. J. Clin. Exp. Med.* , 2016, 9 (10): 20439-20447.
- [5] KITCHENER H C, D K, SOLDAN K, et al. Developing role of HPV in cervical cancer prevention [J]. *BMJ*, 2013, 347: f4781.
- [6] LINDEBERG H, FEY S J, OTTOSEN P D, et al. Human papilloma virus (HPV) and carcinomas of the head and neck [J]. *Clin. Otolaryngol.* , 1988, 13(6): 447-454.
- [7] ZHANG L, BI Q, DENG H, et al. Human papillomavirus infections among women with cervical lesions and cervical cancer in Eastern China: genotype-specific prevalence and attribution [J]. *BMC Infect. Dis.* , 2017, 17 (1): 107-126.
- [8] WANG Y, WANG S, SHEN J, et al. Genotype distribution of human Papillomavirus among Women with Cervical Cytological Abnormalities or Invasive Squamous Cell Carcinoma in a High-Incidence Area of Esophageal Carcinoma in China[J]. *BioMed Res. Inter.* , 2016, 2016: 1256384.
- [9] 应倩, 夏庆民, 郑荣寿,等. 中国2009年宫颈癌发病与死亡分析 [J]. *中国肿瘤*, 2013, (08): 612-616.
- [10] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer Statistics in China, 2015 [J]. *CA-Cancer J. Clin.* , 2016, 66: 115–132.
- [11] KWANG S K, SHIN A P, KYUNG-N K, et al. Current status of human pap-illomavirus vaccines [J]. *Clin. Exp. Vaccine Res.* , 2014, 3: 168-175.
- [12] BEATRIZ S, LAIA A, PATRICIA A, et al. Potential impact of a 9-valent HPV vaccine in HPV-related cervical disease in 4 emerging countries (Brazil, Mexico, India and China) [J]. *Cancer Epidemiol.* , 2014, 38: 748–756.
- [13] JOURA E A, GIULIANO A R, IVERSEN O-E, et al. A 9-valent HPV vaccine against infection and intraepithelial neoplasia in women [J]. *NEW ENGL. J. MED.* , 2015, 372(8): 711–723.
- [14] TAKEDA. Annual report 2013 [Internet]. Osaka: Takeda; c2013 [cited 2014 Feb 17].
- [15] HAN JE, WUI SR, KIM KS, et al. Characterization of the structure and immunestimulatory activity of a vaccine adjuvant, de-O-acylated lipooligosaccharide [J]. *PLoS One*, 2014, 9: e85838.
- [16] NICOL AF, DE ANDRADE CV, Russomano FB, et al. HPV vaccines: their pathology-based discovery, benefits, and adverse effects, *Ann Diagn Pathol* [J]. *Ann. Diagn. Pathol.* , 2015, 19(06): 418-422.
- [17] ZHANG SK, PAN XF, WANG SM, et al. Perceptions and acceptability of HPV vaccination among

- parents of young adolescents: a multicenter national survey in China [J]. *Vaccine*, 2013, 31: 3244-9.
- [18] INGA I, HITZEROTH, JO-ANN S, et al. Immunogenicity of an HPV-16 L2 DNA vaccine [J]. *Vaccine*, 2009, 27 (46):6432-6434.
- [19] CHRISTINA S, RICHARD B S, REINHARD K. Developments in L2-based human papillomavirus (HPV) vaccines [J]. *Virus Res.*, 2017, 231: 166-175.
- [20] HILDESHEIM A, HERRERO R, WACHOLDER S, et al. Effect of human papillomavirus 16/18 L1 viruslike particle vaccine among young women with preexisting infection: a randomized trial [J]. *Jama*, 2007, 298(7): 743-53.
- [21] AULT K A. Effect of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like-particle vaccine on risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2, grade 3, and adenocarcinoma in situ: a combined analysis of four randomised clinical trials [J]. *Lancet*, 2007, 369(9576): 1861-8.
- [22] PAAVONEN J, JENKINS D, BOSCH F X, et al. Efficacy of a prophylactic adjuvanted bivalent L1 virus-like-particle vaccine against infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: an interim analysis of a phase III double-blind, randomised controlled trial [J]. *Lancet*, 2007, 369(9580): 2161-70.
- [23] MAYER CT, BEROD L, SPARWASSER T. Layers of dendritic cell-mediated T cell tolerance, their regulation and the prevention of autoimmunity [J]. *Front. Immunol.*, 2012, 3(3): 183-187.
- [24] NUYTS AH, LEE WP, BASHIR-DAR R, et al. Dendritic cells in multiple sclerosis: key players in the immunopathogenesis, key players for new cellular immunotherapies? [J]. *Mult. Scler.*, 2013, 19(8): 995-1002.
- [25] SU JH, WU AJ, SCOTNEY E, et al. Immunotherapy for Cervical Cancer Research Status and Clinical Potential [J]. *Bio. Drugs*, 2010, 24(2): 109-129.
- [26] 周良. HPV16 E2与IL-12联合基因疫苗的免疫效果初步研究 [D]. 南华大学, 2011.
- [27] GANGULY N. Human papillomavirus-16 E5 protein: oncogenic role and therapeutic value [J]. *Cell. Oncol. (Dordr.)* 2012, 35(2): 67-76.
- [28] LI LL, WANG HR, ZHOU ZY, et al. One-prime multi-boost strategy immunization with recombinant DNA, adenovirus, and MVA vector vaccines expressing HPV16 L1 induces potent, sustained, and specific immune response in mice [J]. *Antivir. Res.* 2016; 128: 20-7.
- [29] XIAO W, BIAN M, MA L, et al. Immunochemical analysis of human papillomavirus L1 capsid protein in liquid-based cytology samples from cervical lesions [J]. *Acta. Cytol.*, 2010, 54 (5): 661-667.
- [30] BELLONE S, ELSAHWI K, COCCO E, et al. Human papillomavirus type 16 (HPV-16) virus-like particle L1-specific CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes (CTLs) are equally effective as E7-specific CD8<sup>+</sup>CTLs in killing autologous HPV-16-positive tumor cells in cervical cancer patients: implications for L1 dendritic cell-based therapeutic vaccines [J]. *J. Virol.* 2009, 83(13): 6779-6789.
- [31] TORRE LA, BRAY F, SIEGEL RL, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. *CA Cancer J. Clin.* 2015; 65(2): 87-108.
- [32] SYRJANEN K, PYRHONEN S, AUKEE S, et al. Squamous cell papilloma of the esophagus: a tumour probably caused by human papilloma virus (HPV) [J]. *Diagn. Histopathol.*, 1982, 5(4):291-297.

- [33] RUXING XI, SHUPEI PAN, XIN CHEN , et al. HPV16 E6-E7 induces cancer stem-like cells phenotypes in esophageal squamous cell carcinoma through the activation of PI3K/Akt signaling pathway in vitro and in vivo [J]. *Oncotarget*, 7(35): 57050-57065.
- [34] ZHAO X Y, LI S Y, LI Y, et al. Detection of human papillomavirus in esophageal carcinoma tissues from Baoding City of Hebei Province [J]. *Chinese journal of experimental and clinical virology*, 2009, 23(2): 91-3.
- [35] 齐宗利, 霍霞, 张宝, 等. 食管癌 EC109细胞属人类乳头状瘤病毒 18型阳性细胞株 [J]. *汕头大学医学院学报*, 2006, 19(3): 136-8, 53.
- [36] STEINMAN RM, COHN ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro [J]. *The Journal of experimental medicine*, 1974, 139: 380-397.
- [37] Malerod L, Sporstol M, Juwet LK, et al. Hepatic scavenger receptor class B,type I is stimulated by peroxisome proliferator activated receptor or gamma and hepatocyte nuclear factor 4 alpha [J]. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* , 2003, 305(3): 557-565.
- [38] LICHTENEGGER FS, MUELLER K, OTTE B, et al. CD86 and IL-12p70 are key players for T helper 1 polarization and natural killer cell activation by Toll-like receptor-induced dendritic cells [J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e44266.
- [39] HARDING FA, MCARTHUR JG, GROSS JA, et al. CD28-mediated signaling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones [J]. *Nature*, 1992, 356 (6370): 607-609.
- [40] STEIN MAN RM. The dendritic cell system and its role in im-munogenicity [J]. *Annu. Rev. Immunol.* , 1991, 9: 271- 296 .
- [41] GIANNI AM, SIENA S, BREGNI M, et al. Bonadonna, Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to harvest circulating haemopoietic stem cells for autotransplantation [J]. *Lancet*, 1989, 2: 580-585.
- [42] TADA F, ABE M, HIROOKA M, et al. Phase I/II study of immunotherapy using tumor antigen-pulsed dendritic cells in patients with hepatocellular carcinoma[J]. *Int. J. Oncol.* , 2012, 41: 1601-1609.
- [43] LUTZ MB, KUKUTSCH N, OGILVIE AL, et al. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow [J]. *J. Immunol. Methods.* , 1999, 223: 77-92.
- [44] SON YI, EGAWA S, TATSUMI T, et al. A novel bulk-culture method for gene-rating mature dendritic cells from mouse bone marrow cells [J]. *Immunol. Methods.* , 2002, 262: 145-157.
- [45] INABA K, INABA M, ROMANI N, et al. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte macrophage colony-stimulating factor [J]. *Exp. Med.* , 1992, 176: 1693.
- [46] SALLUSTO F, LANZAVECCHIA A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte macrophage colony-stimulating factor plus inter-leukin-4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha [J]. *Exp. Med.* , 1994, 179: 1109.
- [47] PANG L, YE W, CHE XM, et al. Reduction of inflammatory response in the mouse brain with adenoviral mediated transforming growth factor-beta expression [J]. *Stroke*, 2001, 32(2): 544-552.

- [48] ZHONG M, ZHONG C, WANG TT, et al. Activation of dendritic cells by low molecular weight oyster polysaccharides [J]. *Int. Immunopharmacol.* , 2017, 44: 183-190.
- [49] SIOUD M, NYAKAS M, SÆBØE-LARSEN S, et al. Diversification of Antitumour Immunity in a Patient with Metastatic Melanoma Treated with Ipilimumab and an IDO-Silenced Dendritic Cell Vaccine [J]. *Cas. Rep. Med.* . 2016; 2016: 9639585.
- [50] WANG Q, LUAN W, WARREN L, et al. Autologous Tumor Cell Lysate-Loaded Dendritic Cell Vaccine Inhibited Tumor Progression in an Orthotopic Murine Model for Hepatocellular Carcinoma [J]. *Ann. Surg. Oncol.* , 2016, 23(5): 574-582.
- [51] SON YI, EGAWA S, TATSUMI T, et al. A novel bulk-culture method for generating mature dendritic cells from mouse bone marrow cells [J]. *J. Immunol. Methods*, 2002; 262(1-2): 145-57.
- [52] LUTZ MB, KUKUTSCH N, OGILVIE AL, et al. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow [J]. *J. Immunol. Methods*, 1999; 223(1): 77-92.
- [53] BOL KF, SCHREIBELT G, GERRITSEN WR, et al. Dendritic cell-based immunotherapy: state of the art and beyond [J]. *Clin. Cancer. Res.* , 2016, 22(8): 1897-1906.
- [54] YAMASAKI S, SHIMIZU K, KOMETANI K, et al. In vivodendritic cell targeting cellular vaccine induces CD4+ Tfh cell-dependent antibody against influenza virus [J]. *Sci. Rep.* , 2016; 6: 35173.
- [55] YIN W, DULUC D, JOO H, et al. Dendritic cell targeting vaccine for HPV-associated cancer [J]. *Cancer Cell Microenviron.* , 2016; 3(4): e1482.
- [56] MATSUO K, NISHIUMA S, HASEGAWA Y, et al. Vaccination with Antigen Combined with alphabeta-ATP as a Vaccine Adjuvant Enhances Antigen-Specific Antibody Production via Dendritic Cell Activation [J]. *Biol. Pharm. Bull.* , 2016, 39(6): 1073-1076.
- [57] VAKKILA J, THOMSON AN, VETTERNRANTA K, et al. Dendritic cell subsets in childhood and in children with canaer:relation to age and disease prognosis [J]. *Clin. Exp. Immunol.* , 2004, 135(3): 455-461.
- [58] DHODAPKAR MV, DHODAPKAR KM, PALUCKA AK. Interactions of tumor cells with dendritic cells: Balanceing immunity and tolerance [J]. *Cell Death Differ*, 2008, 15: 39-50.
- [59] KAROLINA P, JACQUES B. Cancer immunotherapy via dendritic cells [J]. *Nat. Rev. Cancer*, 2013, 12(4): 265-277.
- [60] DIAMOND MS, KINDER M, MATSUSHITA H, et al. Type I interferon is selectively required by dendritic cells for immune rejection of tumors [J]. *J. Exp. Med.* , 2011, 208: 1989-2003.
- [61] WANG C, PU J, YU H, et al. A Dendritic Cell Vaccine Combined With Radiotherapy Activates the Specific Immune Response in Patients With Esophageal Cancer [J]. 2017, *J. Immunother*, 40(2): 71-76.
- [62] TERAMOTO K, OZAKI Y, HANAOKA J, et al. Predictive biomarkers and effectiveness of MUC1-targeted dendritic-cell-based vaccine in patients with refractory non-small cell lung cancer [J]. *Ther. Adv. Med. Oncol.* , 2017, 9(3): 147-157.
- [63] FUJIMASA T, MASANORI A, MASASHI H, et al. Phase I/II study of immunotherapy using tumor

- antigen-pulsed dendritic cells in patients with hepatocellular carcinoma [J]. *Int. J. Oncol.* , 2012(41), 1601-1609.
- [64] SÉBASTIEN A, EVELIEN LS, EVA L, et al. Clinical use of dendritic cells for cancer therapy [J]. *Lancet Oncol.* , 2014, 15: e257-67.
- [65] DE WL, ZOUGHAMI Y, AENGENEYNDT B, et al. Binding of human papilloma virus L1 virus like particles to dendritic cells is mediated through heparan sulfates and induces immune activation [J]. *Immunobiology*, 2007, 212(910): 679-691.
- [66] REMONDO C, CEREDA V, MOSTB CK S, et al. Human dendritic cell maturation and activation by a heat killed recombinant yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) vector encoding carcinoembryonic antigen [J]. *Vaccine*, 2009, 27(7): 987-994.
- [67] DELL K, KLEIN C, GISSMANN L. Comparison of DNA and mRNA transfected mouse dendritic cells as potential vaccines against the human papillomavirus type 16 associated oncoprotein E7 [J]. *Antivir. Ther.* , 2008, 13(4): 495-509.
- [68] MARTIN CA, KURKOWSKI DL, VALENTINO AM, et al. Increased intracellular, cell surface and secreted inducible heat shock protein 70 responses are triggered during the monocyte to dendritic cell (DC) transition by cytokines independently of heat stress and infection and may positively regulate DC growth[J]. *J. Immunol.* , 2009, 183: 388-399.
- [69] LIU C, SUKSANPAISAN L, CHEN YW, et al. Enhancing cytokine-induced killer cell therapy of multiple myeloma[J]. *Exp. Hematol.* , 2013, 41: 508-517.
- [70] LIHONG Z, JIALI LI, XUEJING Y, et al. Clinical outcome of immunotherapy with dendritic cell vaccine and cytokine induced killer cell therapy in hepatobiliary and pancreatic cancer [J]. *Mol. Clin. Oncol.* , 2016, 4: 129-133.
- [71] 朱学军, 姜鹏君, 孔祥图, 等. DC疫苗联合CIK细胞免疫治疗B细胞淋巴瘤的初步临床观察 [J]. *Chin. J. Cancer Biother.* , 2015, 22: 790-793.
- [72] 杨佳, 顾国民, 王秀丽, 等. 自体肿瘤抗原致敏DC-CIK联合化疗治疗晚期肺腺癌的疗效 [J]. *Chin. J. Cancer Biother.* , 2016, 23: 83-88.
- [73] 姜鹏君, 朱学军, 范振芳, 等. 肿瘤抗原冲击的DC联合CIK细胞治疗复发性多发性骨髓瘤的疗效 [J]. *Chin. J. Cancer Biother.* , 2016, 22: 785-789.
- [74] 江龙委, 黄伟谦, 姚露, 等. DC疫苗联合CIK细胞治疗39例中晚期宫颈癌的临床疗效观察及预后分析 [J]. *Chin. J. Cancer Biother.* , 2015, 22: 765-772.
- [75] JADIDI NF, ATYABI F, RASTEGARI A, et al. CD73 specific siRNA loaded chitosan lactate nanoparticles potentiate the antitumor effect of a dendritic cell vaccine in 4T1 breast cancer bearing mice [J]. *J. Control. Release*, 2017, 246: 46-59.
- [76] SHI GN, ZHANG CN, XU R, et al. Enhanced antitumor immunity by targeting dendritic cells with tumor cell lysate-loaded chitosan nanoparticles vaccine [J]. *Biomaterials*, 2017, 113: 191-202.
- [77] REN S, WANG Q, ZHANG Y, et al. Imiquimod combined with dendritic cell vaccine decreases Treg proportion and enhances anti-tumor responses in mice bearing melanoma [J]. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2017, 33(2): 145-150.

- [78] ARAB S, KHESHTCHIN N, AJAMI M, et al. Increased efficacy of a dendritic cell-based therapeutic cancer vaccine with adenosine receptor antagonist and CD73 inhibitor [J]. *Tumour Biol.*, 2017, 39(3): 1010428317695021.
- [79] LABEUR MS, ROTERS B, BRIGHT P, et al. Generation of tumor immunity by bone marrow-derived dendritic cells correlates with dendritic cell maturation stage [J]. *J Immunol.*, 1999, 162(1):168-75.
- [80] LUTZ MB, KUKUTSCH N, OGILVIE AL, et al. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow [J]. *J Immunol Methods.* 1999; 223(1): 77-92.
- [81] SON YI, EGAWA S, TOMORHIDE T, et al. A novel bulk-culture method for generating mature dendritic cells from mouse bone marrow cells [J]. *J Immunol Methods.* 2002; 262(1-2):145-57
- [82] BANCHEREAU J, STEINMAN RM. Dendritic cells and the control of immunity [J]. *Nature*, 1998, 392(6673): 245–252.
- [83] RAHMA OE, ASHTAR E, CZYSTOWSKA M, et al. A gynecologic oncology group phase II trial of two p53 peptide vaccine approaches: subcutaneous injection and intravenous pulsed dendritic cells in high recurrence risk ovarian cancer patients [J]. *Cancer Immunol. Immunother.* 2012, 61(3): 373–84.
- [84] SANTIN AD, BELLONE S, PALMIERI M, et al. HPV16/18 E7-pulsed dendritic cell vaccination in cervical cancer patients with recurrent disease refractory to standard treatment modalities [J]. *Gynecol Oncol.* 2006, 100(3): 469–478.
- [85] LUTZ MB, KUKUTSCH N, OGILVIE AL, et al. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow [J]. *J Immunol Methods*, 1999, 223(1): 77-92.
- [86] WENGUANG W, JIA L, KAN W, et al. Culture and Identification of Mouse bone marrow-derived dendritic cells and their capability to induce T lymphocyte proliferation [J]. *Med. Sci. Monit.*, 2016, 22: 244-250.
- [87] 刘超, 何小周, 刘雪, 等. 负载Ad5-HIVgag/env的DC疫苗在小鼠体内的免疫原性研究 [J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2016, 30(4): 369-372.
- [88] MURPHY GP, TJOA BA, SIMMONS SJ, et al. Higher-dose and less frequent dendritic cell infusions with PSMA peptides in hormone-refractory metastatic prostate cancer patients [J]. *Prostate*, 2000, 43: 59-62.
- [89] KEN-TU L, FRANK G, KEVIN S O, 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.
- [90] 周忠信, 吕明德, 殷晓煜, 等. C57BL/6j小鼠接种Hepa1-6细胞诱导皮下肝癌模型的建立 [J]. *广东医学*, 2007, 28(2): 178-180.
- [91] DRAUBE A, KLEIN-GONZÁLEZ N, MATTHEUS S, et al. Dendritic cell based tumor vaccination in prostate and renal cell cancer: a systematic review and meta-analysis [J]. *PLoS One*, 2011, 6: e18801.
- [92] BOL KF, SCHREIBELT G, GERRITSEN WR, et al. Dendritic cell-based immunotherapy: state of the art and beyond[J]. *Clin. Cancer Res.*, 2016, 22 (8): 1897-1906.

- [93] ZHANG Y, SHEN X. The impact of transfection with common viral vector on dendritic cells [J]. Foreign Medical Science, 2003, 25: 188-190.



## 攻读硕士学位期间发表的学术论文

1. 罗婧,杨鸣,刘铁威,等.负载 HPV16 L1 抗原的 DC 疫苗的构建及免疫效果的研究[J].中华实验和临床病毒学杂志,2016,30(6):516-520.
2. Li LL, Wang HR, Zhou ZY, Luo J, Xiao XQ, Wang XL, et al. One-prime multi-boost strategy immunization with recombinant DNA, adenovirus, and MVA vector vaccines expressing HPV16 L1 induces potent, sustained, and specific immune response in mice. Antiviral research.2016;128:20-7.
3. Li LL, Wang HR, Zhou ZY, Luo J, Wang XL, Xiao XQ, et al. C3-Luc Cells Are an Excellent Model for Evaluation of Cellular Immunity following HPV16 L1 Vaccination. PloS one.2016;11(2):e0149748.
4. 李莉莉,王鹤蓉,周芷亦,罗婧,周玉柏,曾毅. TC-1-HPV16 L1 细胞模型与动物模型的建立与评价[J].北京工业大学学报, 2016,42(10): 1581-1587.



## 致 谢

本文的研究工作和论文的撰写都是在我的导师周玉柏副研究员的悉心指导下完成的。周老师渊博的专业知识、严谨的治学态度感染和激励着我，必将使我终生受益。在论文完成之际，谨向周老师表示最崇高的敬意和最由衷的感谢！

本文实验研究过程中还得到了王小利老师、肖向茜老师等老师的大力支持和帮助，在此向各位老师表示衷心的感谢！

在此，感谢本实验室的硕士研究生齐婷娟、贾莉莉、顾敬超、冯涛等同学对我的帮助，我的同学王双，朱莹，汪小菲等对我工作和生活上的支持和帮助！

最后，感谢我的家人对我生活和学业的支持和鼓励！