

## افزایش القای پاسخ Th1 و Th2 در اثر تلقیح DNA کد کننده آنتی ژن E7 و ویروس پاپیلومای انسانی تیپ ۱۶ در مدل موش توموری

علیرضا محبی<sup>۱</sup>، ساناز باغبان رحیمی<sup>۱</sup>، علیجان تبرایی<sup>۱</sup>، محسن سعیدی<sup>۲</sup>، میرسعید ابراهیم زاده<sup>۱</sup>، لیلا علیزاده<sup>۲</sup>، امیر قائمی<sup>۳\*</sup>

۱. مرکز تحقیقات بیماری های عفونی، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان.

۲. گروه ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان.

۳. مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفا، بیمارستان خاتم انبیا، تهران اعصاب.

### چکیده

زمینه و هدف: ویروس پاپیلومای انسانی (HPV) به عنوان عامل اصلی سرطان دهانه رحم، دومین سرطان شایع در میان زنان سراسر دنیا شناخته شده است. از این میان HPV های پر خطر بیشترین دخالت را در ایجاد این سرطان دارند. سرطان زایی این ویروس ها به وسیله آنکوپروتئین هایی نظیر E7 می باشد. یکی از روش های نوین به منظور مقابله با این سرطان بکارگیری DNA واکسن های بیان کننده این آنتی ژن جهت تهیه واکسن های درمانی علیه این سرطان می باشد. روش بررسی: در این مطالعه به منظور بررسی اثر تحریک کنندگی پاسخ ایمنی، پلاسمید بیان کننده آنتی ژن E7 HPV16 به صورت زیرپوستی به موش های C57BL/6 توموری تزریق شد. گروهی نیز به عنوان کنترل تنها وکتور pcDNA3.1+ را دریافت کردند. پس از مصون سازی، طحال موش ها جدا شد. سپس آزادسازی لاکتات دهیدروژناز (LDH) به عنوان شاخص سمیت سلولی (CTL) القاء شده توسط ایمنی سلولی و سایتوکاین های اینترفرون گاما (شاخص Th1)، اینترلوکین ۴ (شاخص Th2) درون طحال و سایتوکاین ضد التهابی اینترلوکین ۱۰ در ریز محیط توموری سنجیده شدند.

یافته ها: نتایج نشان داد که فعالیت CTL در گروه دریافت کننده DNA واکسن بیان کننده HPV16 به طور معنی داری از فعالیت CTL در گروه کنترل pcDNA3.1+ بیشتر بود ( $P < 0.05$ ). همچنین بررسی سطوح اینترفرون گاما و اینترلوکین ۴ در گروه دریافت کننده DNA واکسن HPV16، نسبت به سطوح این سایتوکاین ها در گروه کنترل بیشتر بود ( $P < 0.05$ ). همچنین بطور معنی داری ( $P < 0.05$ ) سطح اینترلوکین ۱۰ در ریز محیط تومور گروه دریافت کننده واکسن نسبت به گروه های کنترل کاهش یافته بود.

نتیجه گیری: نتایج مطالعه حاضر نشان داد که DNA واکسن بیان کننده HPV16 قادر است باعث افزایش آزاد سازی LDH که منجر به فعالیت CTL سیستم ایمنی سلولی می باشد، گردد. همچنین افزایش سطوح سایتوکاین های اینترفرون گاما و اینترلوکین ۴ و کاهش سطح اینترلوکین ۱۰ بیانگر افزایش هر دو سطح Th1 و Th2 در اثر استفاده از DNA واکسن HPV16 در مدل موش توموری می باشد.

کلمات کلیدی: DNA واکسن E7، پاپیلوماویروس انسانی، سایتوکاین، ایمنی سلولی، سرطان دهانه رحم

نویسنده مسئول: امیر قائمی

آدرس: ایران، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، مرکز تحقیقات بیماری های عفونی

ایمیل: Ghaem\_amir@yahoo.com



## مقدمه

از همان زمان فازهای بالینی واکسن های DNA، ابتدا برای HIV-1، آغاز شد. نسل اول این واکسن ها به دلیل عدم القاء مناسب پاسخ ایمنی مورد پسند نبودند. نسل دوم این واکسن ها با فرمولاسیون مناسب برای بیان آنتی ژن در سطح بالا، بکار گرفتن مولکول های ادجوانت برای افزایش پاسخ ایمنی اختصاصی تومور مورد استفاده قرار می گیرند (۱۲). DNA واکسن ها استراتژی نوید بخشی در تولید ایمنی اختصاصی آنتی ژن می باشند که به دلیل ایمنی، ظرفیت بالا، پایداری و عدم نیاز به تزریق های یادآور، بسیار مورد توجه قرار گرفته شده است (۱۳). DNA واکسن هایی که آنتی ژن E7 را مورد هدف قرار می دهند، روشی بالقوه در توسعه واکسن درمانی علیه تومورهای بیان کننده E7 می باشد (۱۴).

در این مطالعه از پلاسمید بیان کننده آنتی ژن E7 ویروس پاپیلومای تیپ ۱۶ (HPV16) برای ایمن سازی موش های C57BL/6 استفاده شد. سپس در مقایسه با موش های واکسینه شده با پلاسمید فاقد ژن ایمنوزن، بالانس سایتوکاین های ایمنی شامل اینترلوکین ۴ و اینترفرون گاما سنجیده شد. از سوی دیگر سطح لنفوسیت های CD8 سیتوتوکسیک با روش سنجش آزاد سازی لاکتات دهیدروژناژ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه بیانگر پتانسیل DNA واکسن E7 برای ایجاد پاسخ ایمنی سلولی اختصاصی آنتی ژن می باشد.

سرطان دهانه رحم دومین عامل شایع مرگ زنان در سراسر دنیاست. این بیماری باعث مرگ نزدیک ۳۰۰۰۰۰ نفر سالانه، بویژه در کشورهای در حال توسعه می شود (۱). مطالعات بالینی و اپیدمیولوژیک، ویروس پاپیلومای انسانی (HPV) را به عنوان عامل اصلی سرطان دهانه رحم معرفی کرده اند (۲). تقریباً تمام سرطان های دهانه رحم حاوی ژن های HPV های پر خطر (HrHPV) بویژه تیپ های ۱۶، ۱۸، ۳۱، ۳۳، و ۴۵ می باشند (۳). علاوه بر این، HPV در سرطان های دیگر نظیر سرطان سر و گردن نیز نقش دارد (۴). لازمه ایجاد سرطان دهانه رحم و حفظ آن، عفونت پایدار با HrHPVs می باشد. واکسن های تأیید شده وزارت غذا و داروی آمریکا (FDA)، علاوه بر بی خطری و ایمنوزن بودن، سبب تولید آنتی بادی های خنثی کننده علیه آنتی ژن سطحی L1، پتانسیل درمانی برابر عفونت های از قبل موجود را ندارند (۵). از این رو، سال هاست که تلاش برای ایجاد واکسن های درمانی برای کنترل و توقف این مشکل جهانی ادامه دارد. واکسن های درمانی HPV می توانند بطور بالقوه، زخم های پیش سرطان و تومورهای بدخیم مرتبط با HPV را با تولید پاسخ ایمنی سلولی علیه سلول های آلوده به ویروس که پروتئین های اولیه E6 و E7 را تولید می کنند، نابود نماید (۶). بنابراین، لازم است واکسن های درمانی ای برای کاهش عفونت های مرتبط با HPV بویژه سرطان دهانه رحم ایجاد شوند (۷و۸). هنگامی که یک سلول با HPV آلوده می شود، پروتئین E7 عملکرد پروتئین رتینوبلاستوما (pRb) را مهار می کند و از واکنش آن با E2F جلوگیری می کند (۹). همچنین E7 الگوی بیان سایتوکاین را تغییر و باعث گریز ویروس از سیستم ایمنی می شود (۱۰و۱۱). دو دهه از زمانی که برای اولین بار پاسخ ایمنی القاء شده از تزریق پلاسمید بیان کننده آنتی ژن در موش مشاهده شد می گذرد.

## ایجاد مدل حیوان توموری

سلول های TC-1 از انستیتو پاستور تهیه شد و برای ایجاد مدل توموری سرطان گردن رحم در موش C57BL/6 مورد استفاده قرار گرفتند. پس از کشت و رنگ آمیزی سلول ها به روش تریپان بلو، تعداد  $3 \times 10^5$  سلول TC-1 به فلانک چپ هر موش به صورت زیرپوستی تزریق شد. سپس موش ها از نظر رشد تومور اندازه گیری شدند.

### مصون سازی حیوانات آزمایشگاهی

در آزمایش مصون سازی موش های 6-8 C57BL/6 هفته ای ماده، به صورت زیر پوستی (S.C) به وسیله ۱۰۰ میکروگرم پاسمید بیان کننده آنتی ژن HPV16 E7 تزریق شدند. از وکتور خالی pcDNA3.1+ نیز به عنوان کنترل پلاسمید حاوی ژن و از PBS نیز به عنوان کنترل حلال پلاسمید استفاده شد. تزریق ها سه بار به صورت ۱ هفته درمیان انجام شد. و در نهایت موش ها برای ارزیابی سایتوکاین و سمیت سلولی کشته شدند.

### لنفوسیت های CD8 سیتوتوکسیک

یک هفته پس از سومین واکسیناسیون، طحال موش ها جدا شد. پس از جدا سازی لنفوسیت ها و تهیه سوسپانسیون تک سلولی (گروه تست) در محیط کشت RPMI 1640 با سلول های تست EL-4 (رده سلول لنفومای موش C57BL/6) در پلیت ته صاف ۹۶ خانه به مدت ۴ ساعت در محیط RPMI 1640 بدون فنول رد حاوی ۳ درصد FBS کشت داده شدند. برای آماده سازی سلول های تست، سلول های EL-4 با  $3 \times 10^5$  سلول TC-1 که بیشتر در معرض mitomycin C (۳۰ میکروگرم بر میلی لیتر) قرار گرفته بودند، تحریک شدند. پس از سانتریفیوژ، سوپرناتانت (۱۰۰ میکرولیتر در هر چاهک) بدون پلیت های ته صاف ۹۶ خانه منتقل شدند و مطابق پروتکل کیت Cytotoxicity Detection Kit

## روش بررسی

### مدل حیوان آزمایشگاهی

موش های C57BL/6 ماده ۸-۶ هفته ای از انستیتو پاستور (آمل، ایران) خریداری شدند و به مدت ۱ هفته در حیوانخانه دانشگاه علوم پزشکی گلستان نگهداری شدند. در این مدت موش ها با آب و غذای مناسب تغذیه شدند. تمام حیوانات مطابق با پروتکل کار با حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی گلستان انجام شد. موش ها به دو گروه ۶ تایی تقسیم شدند.

### تهیه DNA واکسن

DNA واکسن کد کننده آنتی ژن E7 از مطالعه قبل (۱۵) تهیه و قبلاً از نظر بیان و تعیین توالی DNA ژن E7 بررسی شده بود. انبوه و خالص سازی DNA پیشتر توضیح داده شده بود (۱۶). استوک های پلاسمیدهای DNA واکسن و پلاسمید وکتور (+pcDNA3.1) برای مطالعات مصون سازی In Vivo با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر در ۰/۱ مولار PBS آماده شدند.

### تهیه و کشت سلول

رده های سلول لنفوسیتی EL-4 (رده سلول لنفومای موش C57BL/6) و TC-1 (سلول های اپیتلیال اولیه ریوی موش C57BL/6)، از کار قبلی (۱۵) تهیه شدند. سلول ها پس از دفریز شدن در فلاسک ۲۵ میلی متری دارای محیط RPMI 1640 (Invitrogen, USA) حاوی ۱۰۰ u/ml آمپیسیلین، ۱۰۰ mg/ml آمپیسیلین، ۰,۱ L-glutamine، ۱۰ درصد FBS و در انکوباتور ۳۷ درجه با ۵ درصد CO2 کشت داده شد. فلاسک ها به طور روزانه برای بررسی کانفلوئسنسی، به وسیله میکروسکوپ معکوس بررسی شدند.

ارزیابی سطح اینترلوکین ۱۰ در ریز محیط تومور ۲۴ ساعت پس از آخرین مصون سازی، تومورهای TC-1 جمع آوری شدند و به تکه های کوچک بریده شدند. تکه ها برای ۳۰ ثانیه در بافر لیز (PBS همراه با ۱ درصد Triton-X، ۱ میلی مولار فنیل متان سولفونیل فلوراید [PMSF]: ۱ میلی لیتر بافر لیز برای هر ۱۰۰ میلی گرم تومور) سونیکیت داده شدند. سپس نمونه ها هموژن و سانتریفیوژ شدند. سطح اینترلوکین ۱۰ در سوپرناتانت، با استفاده از کیت ساندویچ الیزا (San Diego, CA eBioscience, Inc) اندازه گیری شد. نتایج به صورت مقادیر سایتوکاین (پیکوگرم بر میلی لیتر) در هر ۲۰ میلیون سلول تومور گزارش شد (۱۷).

### تجزیه و تحلیل آماری

داده ها به صورت دستی در نرم افزار آماری SPSS نسخه ۱۶ وارد شد. از آنالیزهای ANOVA و Post Hoc. تست Scheffe با سطح معنی داری  $P < 0.05$  برای بررسی سطوح معنی داری استفاده شد. از این نرم افزار جهت ترسیم نمودار نیز استفاده شد.

### یافته ها

#### فعالیت لنفوسیت های CD8 سیتوتوکسیک

به منظور بررسی نقش DNA واکسن بیان کننده ژن E7 در القای ایمنی محافظت کننده، مصون سازی با وکتور بیان کننده E7 صورت گرفت و با بکار گیری روش آزاد سازی لاکتات دهیدروژناژ میزان فعالیت لنفوسیت های CD8 سیتوتوکسیک مورد بررسی قرار گرفت که نتایج نشان دهنده القاء پاسخ CTL بود. پاسخ CTL در موش های مصون شده، به وسیله آزمون آزاد شدن LDH در پلیت های ۹۶ خانه مطالعه شد. موش ها ۳ بار واکسینه شدند و فعالیت CTL، همان طور که در بالا توضیح داده شد، اندازه گیری شد. فعالیت لیزکنندگی به نسبت ۱:۱۰۰

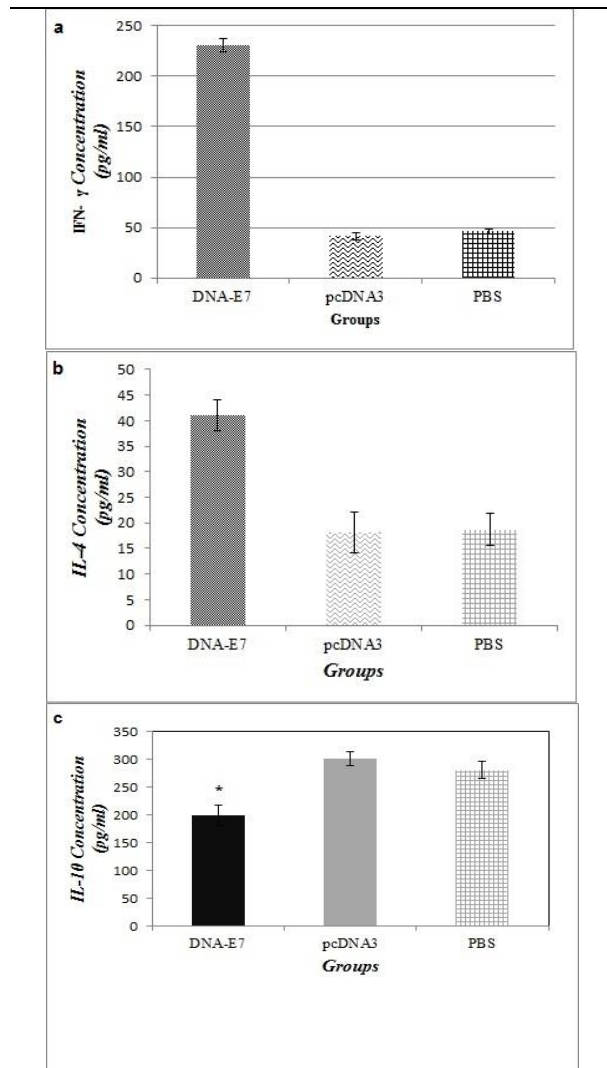
(Takara Company)، محلول LDH به چاهک ها اضافه شد. چند کنترل در این آزمایش استفاده شد. کنترل High، برای اندازه گیری آزاد شدن کل LDH از سلول های هدف (سلول های EL-4 به وسیله SDS ۱۰ درصد لیز شدند). کنترل Low، برای اندازه گیری آزاد شدن طبیعی LDH از سلول های هدف و کنترل Background برای بررسی فعالیت LDH محیط RPMI استفاده شدند. هر تست به صورت سه تکرار انجام شد و نتایج ۲۵ دقیقه بعد از افزودن محلول LDH، به وسیله دستگاه Microplate reader در طول موج ۴۹۰ نانومتر، و طول موج رفرانس ۶۳۰ نانومتر خوانده شد. از فرمول زیر برای اندازه گیری درصد سمیت سلولی القاء شده توسط ایمنی سلولی استفاده شد:

$$Cytotoxicity = \frac{(Test - control) - Low\ control}{High\ control - Low\ control} \times 100$$

#### ارزیابی آزادسازی سایتوکاین های طحالی

یک هفته پس از آخرین ایمن سازی، سلول های تک هسته ای طحال موش مصون شده در رقت  $10^6 \times 2$  سلول در هر چاهک پلیت ۲۴ خانه به مدت ۳ روز در RMPI 1640 حاوی ۱۰ درصد FBS، ۱ درصد L-glutamine، ۱ درصد HEPES، ۰/۱ 2-mercaptoethanol و ۰/۱ پنی سیلین/استرپتومایسین انکوبه شدند، و  $10^5 \times 4$  سلول TC-1 که قبلاً در معرض میتومایسین C (۳۰ میکروگرم در میلی لیتر برای ۳ ساعت) در ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵ درصد  $CO_2$  قرار گرفته شده بود، به چاهک ها اضافه شد. سپس سوپرناتانت ها جمع آوری شد و به وسیله کیت ساندویچ الیزا (Biocompare, USA) و طبق دستورالعمل کیت برای حضور  $IL-4$ ،  $IFN-\gamma$  ارزیابی شد. تمام تست ها برای هر موش ۳ بار تکرار شدند.

نمودار ۱. سطح سایتوکاین های اینترفرون ۴ و اینترفرون گاما در سوپرناتانت طحال موش های مصون شده با DNA واکسن HPV16 E7



تصویر a: سطح اینترفرون گاما در سوپرناتانت طحال گروه واکسن (235.18 ± 15.5) در مقایسه با دو گروه کنترل وکتور pcDNA3 خالی (41.5±4.7) و PBS (48.8±1.2) به طور معنی داری بیشتر بود (P<0.05). b: راست سطح سایتوکاین اینترفرون ۴ را در گروه های واکسن (40.3±4.1)، گروه pcDNA3 (18.3±4.5) و PBS (18.8±3.6) را نشان می دهد (P<0.05). c: سطح سایتوکاین اینترفرون ۱۰ در ریز محیط تومور گروه واکسن (197.78±14.3) نسبت به گروه pcDNA3 (299.67±11.2) و گروه PBS (256.46±15.12) کاهش معنی داری را نشان داد (P<0.05).

(کنترل:تست)، با بیشترین پاسخ سمیت سلولی به سلول های EL-4، بود.

همان طور که در نمودار ۱ نشان داده شده است، لنفوسیت ها در موش های واکسینه شده با HPV16 E7 (۲۸/۳۳ ± ۳/۴۲) فعالیت سلول کشی بیشتری نسبت به کنترل های pcDNA3.1+ (۱۳/۸۹ ± ۲/۵۲) و PBS (۳/۲۳ ± ۱/۴۴) داشت. طبق این نتایج DNA واکسن کد کننده HPV16 E، فعالیت CTL بیشتری نسبت به دو گروه کنترل القاء کرد (P<0.05). به منظور بررسی مکانیزم های دخیل در پتانسیل درمانی DNA واکسن HPV16 E7، تفاوت میان Th1 (اینترفرون گاما) در دو گروه شاهد و کنترل مقایسه شد. برای این کار، سطح سایتوکاین های Th1 (اینترفرون گاما) در سوپرناتانت کشت طحال موش های واکسینه شده و کنترل سنجیده شد. مطابق شکل ۲، طحال موش های مصون شده با DNA واکسن HPV16 E7، در مقایسه با گروه کنترل، سطوح بالاتری از اینترفرون گاما داشت (P<0.05).

## ارزیابی آزادسازی سایتوکاین های طحالی

به منظور بررسی مکانیزم های دخیل در پتانسیل درمانی DNA واکسن HPV16 E7، تفاوت میان Th2 (اینترلوکین ۴) در دو گروه شاهد و کنترل مقایسه شد. همچنان که در شکل ۲ نشان داده شده است، غلظت اینترلوکین ۴ در گروه واکسینه شده در مقایسه با گروه کنترل افزایش داشت ( $P < 0.05$ ). این نتایج نشان می دهد که DNA واکسن HPV16 E7 می تواند باعث القاء سایتوکاین های Th1 و Th2 شود.

## ارزیابی سطح اینترلوکین ۱۰ در ریز محیط تومور

همچنین در راستای بررسی بیشتر در مورد مکانیزم درمانی DNA واکسن HPV16 E7، سطح سایتوکاین اینترلوکین ۱۰ در گروه موش های توموری دریافت کننده واکسن و گروه های کنترل اندازه گیری شد. نتایج (نمودار ۱c) نشان داد که سطح اینترلوکین ۱۰ در گروه دریافت کننده DNA واکسن، نسبت به دو گروه کنترل PBS و pcDNA3.1 بطور چشمگیری کمتر بود ( $P < 0.05$ ).

## بحث و نتیجه گیری

پروتئین E7 بطور انتخابی در سلول های سرطان دهانه رحم بیان می شود و از این رو هدف اولیه برای درمان به واسطه ایمنی سلولی می باشد. بنابراین، هدف مصون سازی علیه بدخیمی های القاء شده به وسیله HPV تقویت سیستم ایمنی سلولی می باشد تا سلول های سرطانی مورد هدف پاسخ ایمنی قرار گیرند. امروزه چندین واکسن درمانی اختصاصی E7 در حال توسعه هستند. در این میان یک DNA واکسن کد کننده آنتی ژن های E6 و E7 HPV16 (VGX-310) که اکنون در فاز 2b آزمایش بالینی است (ClinicalTrials.gov number NCT01304524) نشان داده شده که علاوه بر کارایی بالا کاملاً ایمن است و در سه دوز تزریق تنها در دریافت

گنندگان واکسن، ایجاد قرمزی می کند (۱۸). همچنین، این DNA واکسن بهینه شده در نزدیک به ۸۰ درصد از بیماران باعث القاء اینترفرون گاما و در ۱۰۰ درصد از بیماران باعث القاء سلول های CD8+ T سلول کش اختصاصی HPV شده است (۱۹). مطالعه حاضر نشان می دهد که یک DNA واکسن درمانی کد کننده آنتی ژن E7 HPV16 قادر است تا به میزان چشمگیری پاسخ ایمنی سلولی را در مدل موش توموری واکسینه شده، القاء نماید. عملکرد اینترفرون گاما در سلول می تواند به طور مستقل از دیگر سایتوکاین ها نظیر اینترلوکین ۱۲ (IL-12) باشد و باعث تولید و افزایش سطح Th1 شود (۲۰). Th1 نیز با جلوگیری از افزایش پاسخ های التهابی ایجاد شده توسط سایتوکاین هایی نظیر اینترلوکین ۱۰ (IL-10)، پاسخ اختصاصی آنتی ژن را سبب می شود (۲۱). اینترلوکین ۱۰ یک سایتوکاین ضد التهابی است که توسط ژنی به همین نام کد می شود (۲۲). اینترلوکین ۱۰ باعث کاهش بیان سایتوکاین های Th1 و سرکوب بیان آنتی ژن های MHC II و مهار اینترلوکین ۱۲ و اینترفرون گاما می شود (۲۳). سایتوکاین IL-4 باعث تمایز سلول های Th0 به Th2 می شود که این سلول ها، IL-4 را تولید می کنند. این اثر فیدبک در سلول باعث می شود تا IL-4 با القاء تمایز سلول های B به سلول های پلاسما نقش کلیدی در پاسخ ایمنی همورال و افزایش بیان مولکول های سازگاری نسجی کلاس ۲ (MHC II) داشته باشد (۲۴).

پاسخ ایمنی سلولی نقش مهمی در ایمنی ضد توموری بازی می کند. همان طور که نشان داده شد (نمودار ۱) پاسخ CTL ایجاد شده توسط DNA واکسن HPV E7 نسبت به گروه های کنترل سیتوتوکسیسته لنفوسیتی بیشتری را القاء کرد. پیشتر نشان داده شده است که مصون سازی با پلاسمید کد کننده موتانت E7 و تیپ وحشی نیز، همراستا با این مطالعه پاسخ CTL قوی در مدل موش

تومور TC-1 ایجاد و باعث القاء ایمنی محافظتی می شوند (۲۶, ۲۵).

همچنان که در نمودار ۱ نشان داده شده است، واکسیناسیون موش ها با DNA واکسن کد کننده HPV16 E7، منجر به القاء پاسخ بیشتر اینترفرون گاما و اینترلوکین ۴ می شود که به این ترتیب نشان دهنده این مسئله است که واکسن به طور توأمان پاسخ های ایمنی سلولی و هموال را می تواند القا نماید. همچنان که در مطالعه قبلی نشان داده شده بود (۲۷)، در اثر تلقیح DNA واکسن HPV16 E7 سطح سایتوکاین ضد التهابی اینترلوکین ۱۰ به مقدار چشمگیری در مقایسه با گروه های کنترل کاهش نشان داد ( $P < 0.05$ ) که این امر هم راستا با افزایش سطح اینترفرون گاما می باشد. از این رو، کاهش این فاکتور تنظیم کننده لنفوسیتی مرتبط با اثر ضد توموری و درمانی DNA واکسن کد کننده آنتی ژن E7 می باشد.

القاء سلول های  $CD8^+$  T سلول کش، سایتوکاین های Th1 و Th2 می توانند نقش عملکردی اصلی را در اثر تلقیح DNA آنتی ژن HPV16 E7 بازی کنند و مشابه نمونه های قبلی (۲۸) به عنوان هدف درمانی مناسبی در القاء پاسخ ایمنی ضد HPV مورد مطالعه قرار گیرند.





## References

1. de Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, Clifford G, Bruni L, Muñoz N, et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*. 2007;7(7):453-9.
2. Bosch F, Lorincz A, Munoz N, Meijer C, Shah K. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *Journal of clinical pathology*. 2002;55(4):244-65.
3. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *The Journal of pathology*. 1999;189(1):12-9.
4. Gillison ML. Human papillomavirus-associated head and neck cancer is a distinct epidemiologic, clinical, and molecular entity. *Seminars in oncology*. 2004;31(6):744-54.
5. Lowy DR, Schiller JT. Prophylactic human papillomavirus vaccines. *Journal of Clinical Investigation*. 2006;116(5):1167-73.
6. Hung C-F, Ma B, Monie A, Tsen S-W, Wu TC. Therapeutic human papillomavirus vaccines: current clinical trials and future directions. *Expert opinion on biological therapy*. 2008;8(4):421-39.
7. Stanley MA. Genital human papillomavirus infections: current and prospective therapies. *The Journal of general virology*. 2012;93(Pt 4):681-91.
8. Monie A, Tsen S-W, Hung C-F, Wu TC. Therapeutic HPV DNA vaccines. *Expert review of vaccines*. 2009;8(9):1221-35.
9. McLaughlin-Drubin ME, Münger K. The Human Papillomavirus E7 Oncoprotein. *Virology*. 2009;384(2):335-44.
10. Liu X, Clements A, Zhao K, Marmorstein R. Structure of the human Papillomavirus E7 oncoprotein and its mechanism for inactivation of the retinoblastoma tumor suppressor. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(1):578-86.
11. Tindle RW. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(1):59-64.
12. Ferraro B, Morrow MP, Hutnick NA, Shin TH, Lucke CE, Weiner DB. Clinical applications of DNA vaccines: current progress. *Clinical infectious diseases*. 2011;53(3):296-302.
13. Lara AR, Ramirez OT, Wunderlich M. Plasmid DNA production for therapeutic applications. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2012;824:271-303.
14. Lin K, Roosinovich E, Ma B, Hung CF, Wu TC. Therapeutic HPV DNA vaccines. *Immunologic research*. 2010;47(1-3):86-112.
15. Tahamtan A, Ghaemi A, Gorji A, Kalhor HR, Sajadian A, Tabarraei A, et al. Antitumor effect of therapeutic HPV DNA vaccines with chitosan-based nanodelivery systems. *Journal of biomedical science*. 2014;21:69.
16. Ghaemi A, Soleimanjahi H, Gill P, Hassan Z, Jahromi SR, Roohvand F. Recombinant lambda-phage nanobioparticles for tumor therapy in mice models. *Genetic vaccines and therapy*. 2010;8:3.
17. Lissat A, Joerschke M, Shinde DA, Braunschweig T, Meier A, Makowska A, et al. IL6 secreted by Ewing sarcoma tumor microenvironment confers anti-apoptotic and cell-disseminating paracrine responses in Ewing sarcoma cells. *BMC cancer*. 2015;15:552.
18. Trimble CL, Morrow MP, Kraynyak KA, Shen X, Dallas M, Yan J, et al. Safety, efficacy, and immunogenicity of VGX-3100, a therapeutic synthetic DNA vaccine targeting human papillomavirus 16 and 18 E6 and E7 proteins for cervical intraepithelial neoplasia 2/3: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2b trial. *The Lancet*. 386(10008):2078-88.
19. Morrow M, Trimble C, Shen X, Dallas M, Weiner D, Boyer J, et al. Abstract CT131: HPV specific immunotherapy for cervical intraepithelial neoplasia using VGX-3100 induces regression of cervical lesions and potent T-cell responses: Results from a randomized, double-blind, placebo-controlled phase



- II study. Cancer research. 2015;75(15 Supplement):CT131-CT.
20. Bradley LM, Dalton DK, Croft M. A direct role for IFN-gamma in regulation of Th1 cell development. Journal of immunology. 1996;157(4):1350-8.
21. Cope A, Le Fric G, Cardone J, Kemper C. The Th1 life cycle: molecular control of IFN-gamma to IL-10 switching. Trends in immunology. 2011;32(6):278-86.
22. Eskdale J, Kube D, Tesch H, Gallagher G. Mapping of the human IL10 gene and further characterization of the 5' flanking sequence. Immunogenetics. 1997;46(2):120-8.
23. Aste-Amezaga M, Ma X, Sartori A, Trinchieri G. Molecular mechanisms of the induction of IL-12 and its inhibition by IL-10. Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950). 1998;160(12):5936-44.
24. Sokol CL, Barton GM, Farr AG, Medzhitov R. A Mechanism for the Initiation of the Th2 Response by an Allergen. Nature immunology. 2008;9(3):310-8.
25. Ghaemi A, Soleimanjahi H, Gill P, Hassan ZM, Razeghi S, Fazeli M, et al. Protection of mice by a lambda-based therapeutic vaccine against cancer associated with human papillomavirus type 16. Intervirology. 2011;54(3):105-12.
26. Bahrami AA, Ghaemi A, Tabarraei A, Sajadian A, Gorji A, Soleimanjahi H. DNA vaccine encoding HPV-16 E7 with mutation in L-Y-C-Y-E pRb-binding motif induces potent anti-tumor responses in mice. J Virol Methods. 2014;206:12-8.
27. Sajadian A, Tabarraei A, Soleimanjahi H, Fotouhi F, Gorji A, Ghaemi A. Comparing the effect of Toll-like receptor agonist adjuvants on the efficiency of a DNA vaccine. Archives of virology. 2014;159(8):1951-60.
28. Tahamtan A, Ghaemi A, Gorji A, Kalhor HR, Sajadian A, Tabarraei A, et al. Antitumor effect of therapeutic HPV DNA vaccines with chitosan-based nanodelivery systems. Journal of Biomedical Science. 2014;21(1):69



## Enhanced Th1 and Th2 immune response induction by Human Papilloma virus Type 16 E7 DNA vaccine in a tumoric murine model

Alireza Mohebbi<sup>1</sup>, Sanaz Baghban Rahimi<sup>1</sup>, Alijan Tabarraei<sup>1</sup>, Mohsen Saeedi<sup>2</sup>, Mirsaeed Ebrahimzadeh<sup>1</sup>, Leila Alizadeh<sup>3</sup>, Amir Ghaemi<sup>1\*</sup>

1. Infectious Disease Research Center, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran
2. Department of Immunology, Faculty of Medicine, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran
3. Shafa Neuroscience Research Center, Khatam-al-anbia Hospital, Tehran, Iran

### Abstract

**Background & Objective:** Human papilloma virus (HPV) is known as the etiologic agent of cervical cancer and second common cancer among women. HPV viruses with the elevated risk of infection have more potentiality to cause cancer. The carcinogenesis in these viruses is accomplished by oncoproteins such as E7. Employing DNA vaccines which code specific antigens such as E7 is a novel therapeutic approach against such cancers.

**Methods:** In the present study, plasmid coding HPV16 E7 was administered intracutaneously to C57BL/6 tumoric mice models for investigation of its immunostimulating potential. pcDNA3.1+ vector was used as control vector. After immunization, spleen of animals were removed. Then, release of lactate dehydrogenase (LDH) was evaluated to address the cytotoxic activity (CTL) induced by cellular immunity in spleenocytes. Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) and interleukin-4 (IL-4) cytokines were also analyzed as profiles of Th1 and Th2, respectively. Anti-inflammatory cytokine interleukin-10 (IL-10) levels were also investigated in tumor microenvironments.

**Results:** Our results showed that CTL activity was higher among samples receiving HPV16 E7 coding vector in comparison to the group receiving pcDNA3.1+ control vector ( $P < 0.05$ ). Levels of IFN- $\gamma$  and IL-4 were also higher in the group receiving HPV16 E7 plasmid in comparison to the control group ( $P < 0.05$ ). Similarly, IL-10 levels were significantly lower in tumor carrying mice groups receiving HPV16 DNA vaccine compare to PBS and pcDNA3.1 receiving control groups.

**Conclusion:** HPV16 E7 expressing DNA vaccine could increase the release of LDH due to immune system CTL activity. Elevation in IFN- $\gamma$  and IL-4 levels as well as IL-10 reduction indicates an increase in both Th1 and Th2 profiles resulted by using potent DNA vaccine coding HPV16 E7 in tumor animal model.

**Keywords:** E7 DNA vaccine, Human papillomavirus, cytokine, cellular immunity, cervical cancer

**Corresponding Author:** Amir Ghaemi

**Address:** Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran.

**E-mail:** Ghaem\_amir@yahoo.com

