

بررسی پاسخ تکثیری لنفوسیت‌های طحالی حاصل از تزریق پلاسمید کد کننده E7-HPV16 در مدل موش توموری پاپیلوماویروس

ساناز باغبان رحیمی^۱، حوریه سلیمان جاهی^۲، علیرضا محبی^۱، میر سعید ابراهیم زاده^۱، لیلا علیزاده^۲، امیر قائمی^{۴*}

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران.
۲. دانشیار، دکترای ویروس شناسی پزشکی، گروه ویروس شناسی پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
۳. کارشناس ارشد بیوشیمی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفا، بیمارستان خاتم انبیا، تهران، ایران.
۴. استادیار، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: انکوپروتئین‌های پاپیلوما ویروس، شامل E7 و E6 به‌طور معمول در سلول‌های سرطان سرویکس بیان می‌شوند. این پروتئین‌ها اهداف مناسبی برای طراحی واکسن‌های درمانی علیه بدخیمی‌های وابسته به پاپیلوما ویروس‌ها می‌باشد. هدف از انجام این مطالعه سنجش میزان پاسخ تکثیری لنفوسیت‌های طحالی حاصل از تزریق پلاسمید کد کننده E7-HPV16 بر روی مدل موش توموری پاپیلوما ویروس بود.

روش بررسی: پس از تکثیر و استخراج DNA واکسن E7-HPV16، موش‌های C57BL/6 با تزریق سلول‌های TC-1 به تعداد ۱۰۵×۲ سلول، توموری شدند و سپس با DNA واکسن E7-HPV16 در ۳ نوبت و با فواصل زمانی دو هفته‌ای به روش زیر پوستی واکسینه شدند و پاسخ تکثیری سلول‌های طحالی به روش MTT ارزیابی شد. همچنین میزان بیان اینترلوکین-۱۲ در بافت تومور به کمک الایزا تعیین و میزان رشد تومور توسط کولیس به مدت ۶ هفته بررسی شد. **یافته‌ها:** به دنبال بکارگیری DNA واکسن واجد ژن درمانی E7، پاسخ‌های تکثیری لنفوسیت‌های طحالی تحریک شده و به طور معنی داری نسبت به تحریک ایجاد شده در گروه کنترل بیشتر بود ($P < 0/05$). همچنین بررسی اینترلوکین-۱۲ نشان داد که مقدار ترشح این سایتوکاین در بافت تومور موش واکسینه شده، به طور معنی داری افزایش یافت ($P < 0/05$). رشد تومور در گروه واکسینه شده با DNA واکسن E7-HPV16 در مقایسه با گروه‌های PBS و pcDNA3، کاهش معنی داری ($P < 0/05$) داشت.

نتیجه گیری: این پژوهش نشان می‌دهد که بکارگیری DNA واکسن حاوی ژن E7 در مدل موش توموری می‌تواند به عنوان راهکاری برای القای پاسخ ایمنی سلولی ضد تومور می‌باشد.

کلمات کلیدی: DNA واکسن، مدل موش توموری پاپیلوماویروس، پاسخ تکثیری لنفوسیت‌های CD4، پاپیلوماویروس

نویسنده مسئول: امیر قائمی

آدرس: ایران، گرگان، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی

ایمیل: Ghaem_amir@yahoo.com



مقدمه

واکسن زنده تقلید می‌کند (۱۲). لذا توسعه واکسن‌های ژنی مطرح می‌باشد که بدین منظور در مطالعه حاضر از پلاسمید بیان کننده آنتی ژن E7 و ویروس پاپیلومای تیپ ۱۶ (HPV16) برای مصون سازی موش‌های C57BL/6 استفاده شد. سپس پاسخ تکثیری لنفوسیت‌های CD4 مثبت حاصل از تزریق در مقایسه با موش‌های واکسینه نشده سنجیده شد.

روش بررسی

این مطالعه تجربی در آزمایشگاه دپارتمان میکروبیولوژی و ایمونولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گلستان انجام شد. ۳۰ موش ماده ۸-۱۰ هفته‌ای نژاد BALB/C از انستیتو پاستور آمل (پس از یک هفته سازگاری با شرایط حیوان خانه دانشگاه علوم پزشکی گلستان) تهیه شد. حیوانات در شرایط دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و رژیم غذایی مناسب، نگه داری شدند. در تمام مراحل کار، اصول اخلاقی پژوهش روی حیوانات رعایت گردید. حیوانات به‌طور تصادفی به سه گروه آزمایش اول (A)، آزمایش دوم (B) و گروه کنترل تقسیم شدند، تعداد موش‌ها در هر گروه ۱۰ عدد بود.

تهیه وکتور بیان کننده آنتی ژن E7

در مطالعه حاضر پلاسمید pcDNA3 حاوی ژن E7، طراحی شده در مطالعه Ghaemi مورد استفاده قرار گرفت (۱۳) که قبلاً E7 در وکتور بیانی از نظر بیان و مقایسه واکنش دهی آن با پروتئین اصلی مورد تأیید قرار گرفته است (۱۳).

تکثیر وکتور بیان کننده آنتی ژن E7

به منظور تکثیر وکتور بیانی pcDNA3-E7 سلول باکتری اشرشیا کلی سویه DH5α استفاده شد و بدین منظور از روش تیمار با کلرید کلسیم و شوک حرارتی بر اساس روش Cohen و همکارانش (۱۴) استفاده شد. مقدار

پاپیلوما ویروس انسانی (Human Papilloma Virus) به عنوان عامل مسبب سرطان گردن رحم (۱) که دومین بدخیمی متداول در میان زنان سراسر دنیا می‌باشد، مطرح می‌باشد (۲). سویه‌های پرخطر HPV16 و HPV18 ارتباط قوی با سرطان گردن رحم دارند (۳) و در بین این دو سویه، HPV16 شایع‌ترین HPV پرخطر در همه جمعیت‌ها می‌باشد که در ۵۰ درصد موارد سرطان گردن رحم یافت شده است (۴). در تمامی مراحل سرطان گردن رحم، انکوپروتئین‌های E6 و E7 پاپیلوما ویروس در سلول‌های سرطانی مرتبط با HPV بیان می‌شوند (۵) و مسئول القای بدخیمی و ترانسفورم کردن سلول‌ها می‌باشند. اعتقاد بر این است که القای بدخیمی و ایجاد سلول‌های سرطانی با برهم زدن چرخه سلولی پروتئین‌های P53 و رتینوبلاستوما اتفاق می‌افتد (۶). اتصال اختصاصی پروتئین E7-HPV-16 به پروتئین رتینوبلاستوما موجب بی‌ثباتی آن شده و از ورود به فاز S سیکل سلولی جلوگیری می‌کند (۷). در واقع پروتئین E7 با از کار انداختن تنظیم کننده‌های سیکل سلولی موجب القاء ناهنجاری‌های کروموزومی و مهار آپوپتوز و همچنین نامیرا شدن و ترنسفورماسیون سلول‌ها می‌شود (۸). چندین مطالعه پیشنهاد می‌کند که ایمنی سلولی در کنترل عفونت‌های HPV و نوپلاسم مرتبط با HPV مهم می‌باشد (۹). بنابراین انکوپروتئین‌های E6 و E7 اهداف آنتی ژنی ایده آلی برای درمان آسیب‌ها و تومورهای القا شده توسط HPV می‌باشد (۱۰). از آن جایی که شیوع گسترده سرطان گردن رحم در سراسر جهان مطرح است، تولید واکسن مناسب از اولویت‌های بهداشتی در جهان محسوب می‌شود (۱۱). در میان انواع روش‌های واکسیناسیون، DNA واکسن‌ها با حداقل ساختار آنتی ژنیک لازم برای القای پاسخ‌های ایمنی حفاظت بخش مورد توجه قرار گرفته‌اند و با تولید متناوب پروتئین در داخل بدن میزبان از عملکرد یک

ایمونیزاسیون موش‌ها

تزریق به روش زیر پوستی، در ۳ نوبت و با فواصل زمانی دو هفته‌ای انجام شد. میزان پلاسمیدها و دوز مؤثر تزریق ۱۰۰ میکرو گرم از پلاسمید استخراج شده در ۱۰۰ میکرو لیتر PBS در هر تزریق در نظر گرفته شده بود. فرمولاسیون گروه‌های تزریقی به این صورت بود که به گروه اول پلاسمید فاقد ژن گروه دوم نیز تزریق پلاسمید کد کننده توالی کامل ژن E7 صورت گرفت و در گروه کنترل ۱۰ موش سالم با PBS واکسینه شدند. اندازه تومور موش‌ها ۲ بار در هر هفته به مدت ۶ هفته سنجیده شد که برای این منظور از خط کش کولیس استفاده شد.

پاسخ تکثیری لنفوسیت‌های طحالی

یک هفته بعد از آخرین ایمونیزاسیون موش‌ها نخاعی گردید و طحال خارج شد و سلول‌های طحالی با بافر لیز کلرید آمونیم - پتاسیم به مدت یک دقیقه برای جدا سازی اریتروسیت‌ها تیمار شد. در فلاسک ۹۶ خانه ته صاف (به مقدار 2×10^5 در هر چاهک) به همراه RPMI ۱۶۴۰، ۱۰ درصد سرم، ۱ درصد گلوتامین، یک درصد هپس و یک درصد پنی‌سیلین و استرپتومایسین در انکوباتور CO₂ دار انکوبه شدند. برای هر موش ۹ چاهک در نظر گرفته شده بود که در ۳ چاهک به عنوان کنترل مثبت، میتوژن سلول T یا همان فیتوهمگلوتینین اضافه شد، در ۳ چاهک دیگر به عنوان کنترل منفی RPMI افزودیم و برای انجام تست در ۳ چاهک یک میکروگرم بر میلی لیتر اپی توپ لنفوسیت T سایتوتوکسیک H-2Db اختصاصی E7 افزوده شد. بعد از ۳ روز (۷۲ ساعت) ۱۰ میکرو لیتر از محلول MTT به هر چاهک اضافه شد و پس از ۴ ساعت انکوبه در انکوباتور CO₂ دار کریستال‌های فورمازان رویت شد و برای حل کردن کریستال‌های فورمازان به هر چاهک ۱۰۰ میکرو لیتر DMSO افزوده شد. جذب این محلول رنگی را در طول موج ۵۴۰ نانومتر قرائت و ضریب Stimulation index (SI) را

۲ میکرو گرم پلاسمید pcDNA3 حاوی ژن E7 با غلظت ۵۰۰ نانوگرم برای ترانسفورماسیون سلولی به کار برده شد و در محیط LB (Luria Bertani) کشت داده شد. در انتها باکتری ترانسفورم شده بر روی پلیت LB agar (۱۰۰mg/ml) آمپی‌سیلین مثبت کشت داده شد. برای استخراج پلاسمید روش لیز قلیایی مورد استفاده قرار گرفت.

اندازه گیری غلظت پلاسمید استخراج شده

برای اندازه گیری غلظت پلاسمید استخراج شده، جذب نوری محصول با استفاده از اسپکتوفتومتر در طول موج‌های ۲۶۰، ۲۸۰، ۲۳۰ نانومتر خوانده شد و با استفاده از رابطه‌ی زیر غلظت نمونه محاسبه شد.

$$\text{ضریب رقت} \times C(\mu\text{g/ml}) = 50 \times (A_{260} - A_{280})$$

در این فرمول C غلظت نمونه بر حسب میکروگرم در میلی لیتر، و ضریب رقت میزان رقیق شدن DNA می‌باشد. اندازه جذب نوری در طول موج ۲۶۰ نانومتر، تعیین کننده میزان اسیدهای نوکلئیک (DNA, RNA) می‌باشد.

ایجاد مدل توموری سرطان گردن رحم در موش

سلول‌های TC-1 (سلول اپتلیال ریه موش) از انستیتو پاستور تهیه شد و برای ایجاد مدل توموری سرطان گردن رحم در موش C57BL/6 مورد استفاده قرار گرفت. سلول‌های TC-1 با RPMI ۱۶۴۰ ترکیب شده با سرم جنین گاو ۱۰ درصد و ۵۰ mg/ml پنی‌سیلین و استرپتومایسین، گلوتامین Mm₂، سدیم پیرووات Mm₁ کشت داده شد و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵ درصد CO₂ قرار گرفت (۱۵). پس از رنگ آمیزی سلول‌ها به روش تریپان بلو و شمارش آن‌ها، تعداد 2×10^5 سلول TC-1 حل شده در ۱۰۰ میکرو لیتر PBS به فلانک چپ هر موش به صورت زیرپوستی تزریق شد (۹).

به‌طور میانگین ۲۰ کلنی روی پلیت های کشت با قطر ۶ سانتی متر قابل مشاهده بودند.

غلظت DNA استخراج شده

نتیجه سنجش غلظت DNA استخراج شده با دستگاه اسپکتوفتومتر نشان داد که میانگین غلظت DNA برابر با ۵۰۰۰ µg/ml بود که غلظت مناسب برای تزریقات آماده گردید.

ایجاد مدل توموری سرطان گردن رحم در موش

بررسی روزانه موش‌ها نشان داد که با تزریق تعداد 2×10^5 سلول TC-1 حل شده در ۱۰۰ میکرو لیتر PBS به فلانک چپ موش C57BL/6 به‌صورت زیرپوستی متوسط زمان ایجاد تومور در این موش‌ها، ۱۶-۱۴ روز بود (شکل ۱).



شکل ۱. مدل موش توموری پاپیلوماویروس ایجاد شده با

سلول‌های TC-1

سپس موش‌ها در ۳ نوبت و با فواصل زمانی دو هفته‌ای با DNA واکسن HPV16-E7 به مقدار ۱۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر در ۰/۱ مولار PBS در هر تزریق واکنش شدند. سنجش میزان رشد تومور به کمک اندازه گیری حجم تومور با کولیس صورت گرفت. نمودار ۱ داده‌های حاصل از اندازه

محاسبه نمودیم (۹). در رابطه زیر Cs میزان OD سلول‌های تحریک شده (گروه تست) و Cu میزان OD سلول‌های تحریک نشده (گروه کنترل منفی) است.

$$SI = (Cs - Cu) / Cu$$

سنجش میزان اینترلوکین-۱۲ (سیتوکین درون توموری)

۲۴ ساعت بعد از تزریق آخرین واکسن، تومور القا شده حاصل از تزریق سلول TC1 جراحی و خارج شدند و بعد از اندازه گیری وزن تومور، قطعه‌قطعه کرده و با بافر لیز کننده (PBS با تریتون-X یک درصد و یک میلی مولار از فنیل متان سولفونیل فلوراید [PMSF]) به مقدار ۱ ml برای هر ۱۰۰ mg از سلول‌های توموری، ۳۰ ثانیه سونیفیکاسیون نموده و سلول‌ها لیز شدند و سپس نمونه‌ها هموژن و سانتریفیوژ شدند. سپس در سوپرناتانت سلول‌های توموری سطح IL-12 با استفاده از کیت ساندویچ الایزا شرکت (eBioscience, Inc. San Diego, CA) اندازه گیری شد. (تعداد سایتوکاین به‌صورت {پیکوگرم بر میلی لیتر} در هر ۲۰ میلیون سلول توموری سنجش شد) (۹)

آنالیز آماری

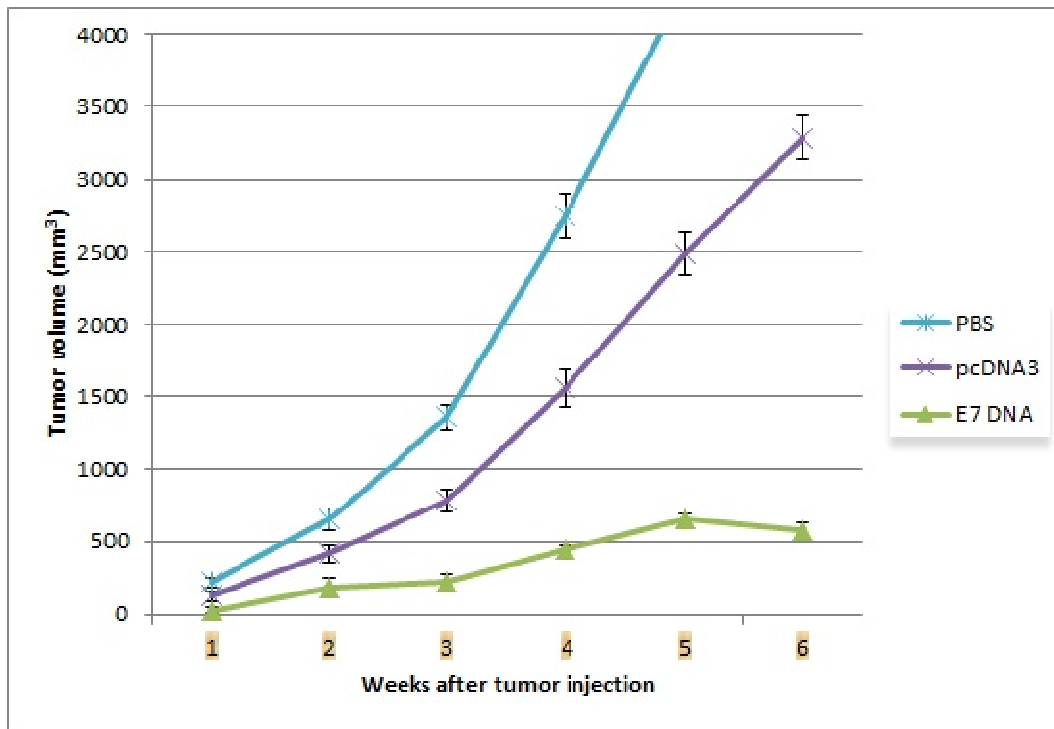
داده‌ها به‌صورت دستی به نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ داده شد. در تمامی مراحل از آزمون ANOVA با سطح معنی داری کمتر از ۰/۰۵ برای بررسی سطوح معنی داری استفاده شد.

یافته‌ها

تکثیر وکتور بیان کننده آنتی ژن E7

در بررسی نتایج حاصل از انتقال پلاسمید پس از تیمار باکتری با کلرید کلسیم و تهیه سلول مستعد، شوک حرارتی به منظور انتقال DNA پلاسمیدی (یک میکرو لیتر با غلظت ۰/۱ نانوگرم) القا شد، در انتها بر روی پلیت LB agar (۱۰۰mg/ml) آمپی‌سیلین مثبت کشت داده شد،

تومور می باشد که اندازه گیری ۲ بار در هفته به مدت ۶ هفته ادامه یافت و حاکی از آن است که موش های تحت درمان با DNA واکسن HPV16-E7 نسبت به دو گروه دریافت کننده PBS و pcDNA3، کاهش معنی داری در رشد تومور داشت ($P < 0.05$).



نمودار ۱. منحنی مقایسه روند رشد تومور در موش های توموری شده بعد از ایمونیزاسیون با DNA واکسن HPV16-E7، pcDNA3 و PBS

فیتوهماگلوآنتینین اضافه شد، در ۳ چاهک به عنوان کنترل منفی RPMI افزودیم و ۳ چاهک دیگر به عنوان تست یک میکروگرم بر میلی لیتر آنتی ژن اختصاصی E7 افزوده شد. میزان تکثیر لنفوسیت ارزیابی شد.

نمودار ۲ نشان می دهد که تکثیر اختصاصی لنفوسیت در موش های مصون شده با DNA واکسن HPV16 E7، در مقایسه با گروه دریافت کننده PBS و pcDNA3، سطوح بالاتری داشت ($P < 0.05$) و پاسخ تکثیری لنفوسیت های

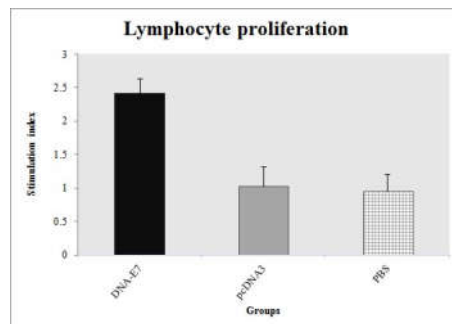
پاسخ تکثیری لنفوسیت های CD4

تزریق DNA واکسن HPV16-E7 باعث افزایش پاسخ تکثیری لنفوسیت ها می شود. برای تعیین اینکه آیا DNA واکسن HPV16-E7 پاسخ ایمنی سلولی را تحت تأثیر قرارداد است، تحریک لنفوسیت های T سلول های طحالی هر موش با آنتی ژن اختصاصی در شرایط آزمایشگاهی داخل فلاسک ۹۶ خانه انجام گرفت و برای هر موش ۹ چاهک در نظر گرفته شده بود که در ۳ چاهک به عنوان کنترل مثبت،

CD4 مثبت در گروه تحت درمان به طور معنی داری افزایش یافته است.

جدول ۱. میزان جذب نوری در طول موج ۵۴۰ نانومتر به منظور محاسبه ضریب تحریک سلول های طحال

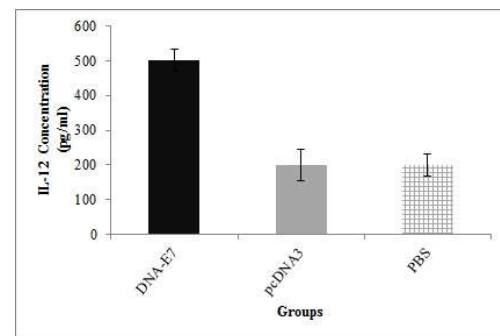
داده‌های مربوط به گروه دریافت کننده پلاسمید کد کننده E7			
گروه تست	گروه کنترل منفی	گروه کنترل مثبت	
۶/۹۴	۲/۰۹	۶/۰۳	۱
۷/۲۹	۲/۲۲	۶/۴۵	۲
۷/۲۱	۲/۱۶	۵/۹۶	۳
۶/۹۷	۲/۱	۵/۸۷	۴
۶/۹۴	۱/۹	۵/۸۹	۵
۶/۷۸	۱/۹۶	۵/۹۳	۶
۶/۷۴	۱/۸۶	۵/۹	۷
۷/۳۲	۲/۴۷	۶/۱۶	۸
۶/۸۵	۱/۸۷	۵/۸۸	۹
۶/۷۵	۱/۸۸	۵/۹۷	۱۰
داده‌های مربوط به گروه دریافت کننده پلاسمید pcDNA3			
گروه تست	گروه کنترل منفی	گروه کنترل مثبت	
۳/۹۹	۲/۰۹	۵/۸	۱
۳/۹	۱/۸۴	۵/۷۴	۲
۳/۷۶	۱/۹۶	۵/۷۸	۳
۳/۹۸	۲/۱۶	۵/۷۳	۴
۳/۸۵	۱/۸۸	۵/۷۵	۵
۳/۹۳	۲/۴۶	۵/۷۹	۶
۳/۸	۱/۷۸	۵/۸۲	۷
۳/۷۸	۱/۹	۵/۷	۸
۳/۹۷	۱/۸۳	۵/۷۵	۹
۳/۸۳	۲/۰۶	۵/۸۳	۱۰
داده‌های مربوط به گروه دریافت کننده PBS			
گروه تست	گروه کنترل منفی	گروه کنترل مثبت	
۳/۸۶	۱/۸۴	۵/۷۲	۱
۳/۸۱	۱/۹	۵/۷۴	۲
۳/۸۳	۲/۰۷	۵/۷۷	۳
۳/۹۸	۱/۷۵	۵/۷۱	۴
۳/۷۸	۲/۱	۵/۸۰	۵
۳/۹	۱/۴۵	۵/۶۸	۶
۳/۸۲	۱/۸۷	۵/۷۲	۷
۳/۸۹	۲/۰۳	۵/۷۶	۸
۳/۸	۲/۱	۵/۸۰	۹
۳/۸۱	۲/۰۸	۵/۷۸	۱۰



نمودار ۲. پاسخ تکثیر لئوسیت‌های CD4 مثبت در گروه‌های واکسینه شده با DNA واکسن HPV16-E7، pcDNA3 و PBS

سنجش میزان اینترلوکین-۱۲ درون توموری

۲۴ ساعت بعد از تزریق آخرین واکسن، سلول‌های توموری خارج شد، ۲۰ میلیون سلول توموری شمارش و لیز سلولی انجام گرفت و سوپرناتانت سلول‌ها را جمع آوری کرده و سطح IL-12 با استفاده از کیت ساندویچ الایزا شرکت (eBioscience, Inc. San Diego, CA) اندازه گیری شد. نمودار شماره ۳ نشانگر افزایش معنی دار سطح اینترلوکین-۱۲ در موش‌های ایمن شده با DNA واکسن pcDNA3 و HPV16-E7 نسبت به موش‌هایی که با PBS و pcDNA3 ایمونیزه شده‌اند می‌باشد ($P < 0.05$).



نمودار ۳. میزان اینترلوکین-۱۲ ریز محیط تومور در گروه‌های واکسینه شده با DNA واکسن HPV16-E7، pcDNA3 و PBS

جدول ۲. داده‌های مربوط به سنجش IL-12

میزان اینترلوکین-۱۲ ریز محیط تومور			
گروه واکسینه شده با پلاسمید E7 کد کننده	گروه واکسینه شده با pcDNA3	گروه واکسینه شده با PBS	
۵۱۱/۴۳	۲۱۴/۸۱	۱۹۷/۵۱	۱
۴۹۸/۳۲	۲۰۱/۷۰	۱۸۵/۴۵	۲
۵۰۳/۹۴	۲۰۳/۰۶	۲۰۸/۳۲	۳
۵۱۴/۲۶	۲۱۹/۹۸	۱۹۳/۳۹	۴
۴۹۹/۹۵	۱۸۱/۹۶	۱۸۲/۰۰	۵
۴۹۴/۹۸	۲۰۹/۴۷	۱۷۸/۸۶	۶
۵۰۷/۳۸	۱۸۰/۳۶	۲۰۳/۹۳	۷
۴۹۲/۶۸	۲۲۵/۲۹	۲۱۸/۱۴	۸
۵۱۵/۴۴	۱۷۶/۴۲	۱۹۹/۷۳	۹
۵۰۹/۸۳	۲۰۰/۴۸	۲۰۷/۸۳	۱۰

بحث و نتیجه گیری

سرطان گردن رحم دومین سرطان شایع و از عوامل مهم مرگ و میر در زنان سراسر جهان می‌باشد. مطالعات مختلف روی بیماران مبتلا به سرطان گردن رحم نشان می‌دهد که ارتباط معنی داری بین سرطان گردن رحم و عفونت HPV وجود دارد و شایع‌ترین تیپ در نمونه‌های سرطان‌های تهاجمی سرویکس تیپ HPV16 می‌باشد (۱۶). این ویروس به خاطر داشتن سیکل غیر لیتیک، به طور سیستمیک پخش نمی‌شود و در همان محل ورود باقی‌مانده و می‌تواند باعث ایجاد عفونت مزمن و پایدار شود. تشکیل ویروئیدهای بالغ در سلول‌های تمایز یافته خارجی (کراتینوسیت‌ها) اتفاق می‌افتد و بنابراین کمترین برخورد بین آنتی‌ژن و سیستم ایمنی روی می‌دهد. سلول‌های آلوده حتی در صورت عرضه آنتی‌ژن به سیستم ایمنی اکتسابی به خاطر نداشتن مولکول‌های co-stimulatory نمی‌توانند مانند APC ها پاسخ‌های ایمنی را القا کنند و حالتی از تحمل محیطی رخ می‌دهد. بنابراین تنها در صورتی که ویروئیدهای ایجاد شده در سلول‌های سطحی اپیتلیوم به طریقی مانند خراش در معرض سیستم ایمنی قرار بگیرند، تولید آنتی بادی علیه ذره ویروسی القا می‌شود. علاوه بر این انکوپروتئین‌های HPV امکان فرار فعال از سیستم ایمنی را با مکانیسم‌های مولکولی از قبیل مداخله با مسیر سیگنالینگ اینترفرون، کاهش بیان HLA I و مداخله با بیان TLR9 فراهم می‌کنند (۱۷). واکسیناسیون علیه عفونت HPV به منظور پیشگیری می‌تواند ابتلا و مرگ ناشی از سرطان را تا حد زیادی کاهش دهد (۱۸). انکوپروتئین‌های E6 و E7 به دلیل این‌که در تمامی مراحل سرطان گردن رحم بیان می‌شوند و نقش مهمی در ایجاد سلول‌های سرطانی دارند، اهداف مناسبی جهت تولید واکسن‌های درمانی محسوب می‌شوند (۱۰). مطالعات متعددی برای تولید واکسن‌هایی علیه عفونت HPV به ویژه

سیتوتوکسیته سلول‌های کشنده طبیعی و لنفوسیت‌های T سیتوتوکسیک CD8 مثبت را واسطه‌گری کرده و افزایش می‌دهد. سلول‌های T کشنده در دفاع علیه ویروس‌ها و تومورهای القا شده توسط ویروس‌ها اهمیت دارند. در واقع این سلول‌ها، پپتیدهای مشتق شده از پردازش آنتی‌ژن‌های آندوژن عرضه شده در شکاف اتصال پپتید مولکول‌های MHC-I را شناسایی می‌کنند (۲۰). از آن جایی که اینترلوکین-۱۲ قادر به افزایش فعالیت سیتوتوکسیته و القای پاسخ ایمنی ضد تومور و مهار رگ زایی می‌باشد (۲۱)، به عنوان فاکتور مورد علاقه‌ای برای انجام آزمایش‌ها و تعیین خاصیت ضد سرطانی در نظر گرفته می‌شود. این یافته‌ها نتایج مطالعات پیشین می‌تواند راهکار مفیدی را در مبارزه با سرطان سرویکس و مکانیسم‌های ایمونولوژیکی مرتبط با آن ارائه دهد.

مطالعه حاضر نشان می‌دهد که DNA واکسن درمانی کد کننده آنتی ژن HPV16 E7 قادر است به میزان چشمگیری پاسخ تکثیری لنفوسیت‌های CD4 مثبت را در مدل موش توموری واکسینه شده، القاء نماید و باعث القای تولید اینترلوکین-۱۲ در محیط توموری شده و موجب تمایز پاسخ لنفوسیت‌های TH1 و القای پاسخ ایمنی ضد توموری و کاهش رشد تومور گردد.

تقدیر و تشکر

این مقاله قسمتی از پایان نامه دانشجویی با کد اخلاق ۳۱۰۷۸۶۹۳۱۲۲۴۲۷ می‌باشد. بدین وسیله از مسئولان دانشگاه علوم پزشکی گلستان تشکر و قدردانی می‌نمایم.

تیپ ۱۶ (به خاطر نقش مؤثر آن در ایجاد سرطان) با هدف پیشگیری و درمان تاکنون انجام شده و همچنان ادامه دارد. در این مطالعه استفاده از پلاسמיד کد کننده توالی E7 به منظور واکسیناسیون مدل موش توموری پاپیلوما ویروس افزایش معنی‌داری در سطح پاسخ تکثیری لنفوسیت‌های CD4+ (نمودار ۲) و میزان IL-12 درون توموری نشان داد (نمودار ۳)، همچنین رشد تومور نیز در گروه دریافت‌کننده واکسن ژنی کاهش نشان داد (نمودار ۱). پیش‌تر در بررسی قابلیت تحریک ایمنی حامل باکتریوفازی کد کننده ژن E7 در مدل موش توموری نیز رشد تومور مهار شده و آزاد شدن لاکتات دهیدروژناز و اینترفرون گاما و گرانزیم بتا از سلول‌های طحال موش و تکثیر لنفوسیت‌ها افزایش یافته و با افزایش ایمنی سلولی، اثر ضد توموری واکسن مورد تأیید قرار گرفت (۱۳). همچنین بررسی میزان ایمونوژنیسیته و فعالیت ضد توموری DNA واکسن HPV16-E7 که در موتیف اتصال به رتینوبلاستوما دچار جهش شده بود نشان داد که پلاسמיד حاوی ژن موتانت E7 به طور قابل توجهی پاسخ‌های ایمنی سلولی قوی‌تر و سطح بالاتری از حفاظت در برابر تومور را در مقایسه با DNA واکسن کد کننده ژن E7 نوع وحشی ایجاد می‌کند و سلول‌های T، اختصاصی E7 مانع رشد سلول‌های توموری و پیشرفت تومور می‌گردد و افزایش تعداد لنفوسیت‌های CD4 T مثبت به عنوان سلول T فاکتور و لیز سلول‌های آلوده قادر به القا ترشح سایتوکاین‌های مهم از جمله اینترلوکین-۱۲ می‌باشد که در ایجاد ایمنی علیه تومور نقش ایفا می‌کند (۹). اینترلوکین-۱۲ با القا تمایز لنفوسیت‌های CD T مثبت Naive به سمت لنفوسیت TH1 منجر به تکثیر و بقا پاسخ لنفوسیت TH1 می‌گردد (۱۹). اینترلوکین-۱۲ به عنوان فاکتور تحریکی T سل‌ها شناخته می‌شود که قادر به تحریک رشد و عملکرد این سلول‌ها می‌باشد (۲۰). اینترلوکین-۱۲ فعالیت



References

1. Broomall EM, Reynolds SM, Jacobson RM. Epidemiology, clinical manifestations, and recent advances in vaccination against human papillomavirus. *Postgraduate medicine*. 2010;122(2):121-9.
2. WHO/ICO. HPV Information Centre Human papillomavirus and related cancers in world. Summary Report WHO. (2010)
3. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *New England Journal of Medicine*. 2003;348(6):518-27.
4. Cho H, Lee H-J, Heo Y-K, Cho Y, Gwon Y-D, Kim M-G, et al. Immunogenicity of a trivalent human papillomavirus L1 DNA-encapsidated, non-replicable baculovirus nanovaccine. *PloS one*. 2014;9(4):e95961.
5. McLaughlin-Drubin ME, Münger K. The human papillomavirus E7 oncoprotein. *Virology*. 2009;384(2):335-44.
6. Zur Hausen H. Papillomavirus infections—a major cause of human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*. 1996;1288(2):F55-F78.
7. Ghittoni R, Accardi R, Hasan U, Gheit T, Sylla B, Tommasino M. The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses. *Virus genes*. 2010;40(1):1-13.
8. Tahamtan A, Tabarraei A, Moradi A, Dinarvand M, Kelishadi M, Ghaemi A, et al. Chitosan nanoparticles as a potential nonviral gene delivery for HPV-16 E7 into mammalian cells. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*. 2014(0):1-7.
9. 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.
10. Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *Journal of the National Cancer Institute*. 1995;87(11):796-802.
11. McIntosh J, Sturpe DA, Khanna N. Human papillomavirus vaccine and cervical cancer prevention: Practice and policy implications for pharmacists. *Journal of the American Pharmacists Association*. 2008;48(1):e1-e17.
12. Syrjänen KJ, Syrjänen SM. *Papillomavirus infections in human pathology*: Wiley; 2000.
13. Ghaemi A, Soleimanjahi H, Gill P, Hassan Z, Jahromi SRM, Roohvand F. Research Recombinant λ -phage nanobioparticles for tumor therapy in mice models. 2010.
14. Cohen SN, Chang AC, Boyer HW, Helling RB. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1973;70(11):3240-4.
15. Ghaemi A, Soleimanjahi H, Gill P, Hassan ZM, Razeghi S, Fazeli M, et al. Protection of mice by a λ -based therapeutic vaccine against cancer associated with human papillomavirus type 16. *Intervirology*. 2010;54(3):105-12.
16. Gableh F, Saeidi M, Hemati S, Hamdi K, Soleimanjahi H, Gorji A, et al. Combination of the toll like receptor agonist and α -Galactosylceramide as an efficient adjuvant for cancer vaccine. *Journal of biomedical science*. 2016;23(1):1.
17. Howley PM. *Fields virology*: Lippincott, Williams & Wilkins; 2013.



18. Palmer KE, Jenson AB, Kouokam JC, Lasnik AB, Ghim S-j. Recombinant vaccines for the prevention of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Experimental and molecular pathology*. 2009;86(3):224-33.
19. Hsieh C-S, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science*. 1993;260(5107):547-9.
20. Kaliński P, Hilkens C, Snijders A, Snijdwint F, Kapsenberg ML. IL-12-deficient dendritic cells, generated in the presence of prostaglandin E2, promote type 2 cytokine production in maturing human naive T helper cells. *The Journal of Immunology*. 1997;159(1):28-35.
21. Wang KS, Frank DA, Ritz J. Interleukin-2 enhances the response of natural killer cells to interleukin-12 through up-regulation of the interleukin-12 receptor and STAT4. *Blood*. 2000;95(10):3183-90.



Evaluation of DNA vaccine encoding HPV-16 E7 on Lymphocyte proliferation induction in Human Papilloma Virus-associated tumor animal models

Sanaz BaghbanRahimi¹, Hoorieh Soleimanjahi², Alireza Mohebbi¹, Mir Saeid Ebrahimzadeh¹, Leyla Alizade³, Amir Ghaemi^{4*}

1. Department of Microbiology, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran.
2. Department of Virology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
3. Shefa Neuroscience Research Center, Khatam Al-Anbiya Hospital, Tehran, Iran.
4. Department of Microbiology, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran.

Abstract

Background & Objective: Human papillomavirus (HPV) oncoproteins, including E6 and E7 are constitutively expressed in cervical cancer cells. These proteins are ideal targets to be used for developing therapeutic vaccines against existing HPV-associated carcinomas. The aim of this study was to measure the proliferation response rate of splenic lymphocytes derived from E7-HPV16 encoding plasmid injection on the tumor mouse model of papillomavirus.

Method: C57BL/6 mice were inoculated subcutaneous with 5×10^6 TC-1 cells in three times with two weeks intervals and then immunized with HPV-16 E7 DNA vaccine. The proliferation response of splenic cells was measured by MTT assay. IL12 cytokine was measured by ELISA assay and the mass of tumor was calculated with caliper for six weeks.

Results: Following the application of DNA vaccines containing E7 therapeutic gene, the proliferative response of splenic cells was provoked significantly higher than the stimulation in control group ($P < 0.05$). Moreover, the secretion of IL12 was significantly increased in vaccinated mice tumor tissue ($P < 0.05$). The growth of tumor in vaccinated group was markedly decreased in comparison to PBS and pcDNA3 groups ($P < 0.05$).

Conclusion: Our findings revealed that the application of DNA vaccine containing E7 gene in a tumor mouse model may induce anti-tumor cellular immune responses.

Key words: DNA vaccine, Papillomavirus tumor model, Lymphocyte proliferation assay, HPV

Corresponding Author: Amir Ghaemi

Address: Department of Microbiology, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran

E-mail: Ghaem_amir@yahoo.com

