

· 论著 ·

程序性死亡配体-1 抑制剂协同作用下治疗性人乳头状瘤病毒 16 型腺病毒疫苗的抗肿瘤效应

马培凯¹ 张柯欣² 杨银梦³ 张苗³ 朱赞¹ 吴洁⁴ 庄昉成³ 陆绍红³ 高孟¹

¹ 杭州医学院高等生物安全实验室, 杭州 311305; ² 开封市疾病预防控制中心检验科, 开封 475000; ³ 杭州医学院新型疫苗浙江省工程研究中心, 杭州 310007; ⁴ 杭州医学院临床医学院, 杭州 311399

通信作者: 高孟, Email: yourgm@hmc.edu.cn

【摘要】 目的 探索程序性死亡配体-1(PD-L1)抑制剂协同作用下治疗性人乳头状瘤病毒(HPV)16 型重组腺病毒载体疫苗(Ad5)对 HPV16 型宫颈癌的靶向抗肿瘤作用。**方法** 选用 6 周龄雌性 C57BL/6 小鼠, 通过 TC-1 肿瘤细胞构建小鼠肿瘤模型, 造模后的小鼠共分为模型对照组(TC-1 组)、单克隆抗体治疗对照组(antiPD-L1 组)、疫苗治疗对照组(Ad5 组)、疫苗治疗后间隔 3 天单克隆抗体治疗组[Ad5+antiPD-L1(3)组]和疫苗治疗后间隔 6 天单克隆抗体治疗组[Ad5+antiPD-L1(6)组]。通过比较各组小鼠肿瘤体积生长变化、肿瘤组织病理分析、脾淋巴细胞分化流式细胞技术检测、肿瘤组织转录组基因表达差异, 探索 PD-L1 单克隆抗体与疫苗协同作用下的靶向抗肿瘤作用。**结果** 第 22 天, 各组间小鼠肿瘤体积有统计学意义 ($F=9.52, P<0.001$), Ad5 组的肿瘤体积为 $(292.9\pm 107.1) \text{ mm}^3$, 显著大于 Ad5+antiPD-L1(3)组的 $(182.7\pm 113.4) \text{ mm}^3$ 和 Ad5+antiPD-L1(6)组的 $(123.6\pm 85.4) \text{ mm}^3$ ($t=10.77$ 和 $7.77, P=0.002$ 和 0.004)。第 25 天, Ad5+antiPD-L1 (6) 组的肿瘤体积为 $(109.6\pm 85.2) \text{ mm}^3$, 小于 Ad5+antiPD-L1(3)组的 $(168.2\pm 136.1) \text{ mm}^3$ ($t=4.70, P=0.042$)。病理分析显示, 协同治疗可以导致肿瘤出现大量坏死区域, 并伴随明显的炎性细胞浸润。流式细胞术结果表明, 各组间 $\text{E7}^+\text{CD8}^+\text{CD38}^+\text{CD3}^+$ 比例差异存在统计学意义 ($F=6.74, P=0.112$), Ad5 组、antiPD-L1 组、Ad5+antiPD-L1(3)组、Ad5+antiPD-L1(6)组的 $\text{E7}^+\text{CD8}^+\text{CD38}^+\text{CD3}^+$ 的比例均低于 TC-1 组, 差异有统计学意义 ($\text{MD}=12.33\sim 13.67, 95\% \text{ CI}: 1.79\sim 24.21$)。转录组基因测序表明治疗抑制 CD274 表达, 上调 CD3e、CD247、IFNG 表达。**结论** PD-L1 抑制剂的协同作用可以有效提升 Ad5 的靶向抗肿瘤免疫效果。

【关键词】 重组载体疫苗; 腺病毒; 免疫检查点抑制剂; 人乳头状瘤病毒 16 型宫颈癌

基金项目: 中央引导地方科技发展资金 (2023ZY1019); 杭州医学院基本科研业务费基础科研计划 (KYZD202107); 浙江省基础公益研究计划 (LGF20C080001)

DOI:10.3760/cma.j.cn331340-20250226-00023

Targeted anti-tumour effects of a therapeutic human papillomavirus type 16 recombinant adenovirus vaccine based on synergistic action of programmed cell death ligand 1 inhibitors

Ma Peikai¹, Zhang Kexin², Yang Yinmeng³, Zhang Miao³, Zhu Yun¹, Wu Jie⁴, Zhuang Fangcheng³, Lu Shaohong³, Gao Meng¹

¹High-level Biosafety Laboratory, Hangzhou Medical College, Hangzhou 311305, China; ²Medical Laboratory, Kaifeng Center for Disease Control and Prevention, Kaifeng 475000, China; ³Zhejiang Engineering Research Center for Novel Vaccines, Hangzhou Medical College, Hangzhou 310007, China; ⁴School of Clinical Medicine, Hangzhou Medical College, Hangzhou 311399, China

Corresponding author: Gao Meng, Email: yourgm@hmc.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate the targeted anti-tumor effects of therapeutic human papillomavirus (HPV) type 16 recombinant adenovirus vector vaccines (Ad5) against HPV16 cervical carcinoma under the synergistic action of programmed cell death ligand 1 (PD-L1) inhibitors. **Methods** Six-week-old female C57BL/6 mice were used

to establish a mouse tumor model via TC-1 tumor cells. After tumor formation, the mice were divided into the following groups: model control group (TC-1 group), monoclonal antibody treatment control group (antiPD-L1 group), vaccine treatment control group (Ad5 group), vaccine treatment followed by anti-PD-L1 monoclonal antibody treatment after 3 days [Ad5+antiPD-L1(3) group], and vaccine treatment followed by monoclonal antibody treatment after 6 days [Ad5+antiPD-L1 (6) group]. The synergistic anti-tumor effects of PD-L1 monoclonal antibody and the vaccine were explored by comparing growth changes of tumor volume, tumor histopathology analysis, spleen lymphocyte differentiation flow cytometry, and differential gene expression in tumor tissues among groups. **Results** At Day 22, tumor volumes in different groups showed significant differences ($F=9.52, P<0.001$). Tumor volume in the Ad5 group was $(292.9\pm 107.1) \text{ mm}^3$, which was significantly bigger than those in Ad5+AntiPD-L1 (3) group of $(182.7\pm 113.4) \text{ mm}^3$, and Ad5+antiPD-L1(6) group of $(123.6 \pm 85.4) \text{ mm}^3$ ($t=10.77$ and $7.77, P=0.002$ and 0.004). At Day 25, tumor volume in Ad5+antiPD-L1(6) group was $(109.6\pm 85.2) \text{ mm}^3$, which was significantly smaller than that in Ad5+AntiPD-L1(3) group of $(168.2\pm 136.1) \text{ mm}^3$ ($t=4.70, P=0.042$). Pathological analysis revealed that the combination therapy induced extensive tumor necrosis accompanied by marked inflammatory cell infiltration. Flow cytometry results indicated that $\text{E7}^+\text{CD8}^+\text{CD38}^+/\text{CD3}^+$ ratios in different groups were significantly different ($F=6.74, P=0.112$). The $\text{E7}^+\text{CD8}^+\text{CD38}^+/\text{CD3}^+$ ratios in the Ad5 group, antiPD-L1 group, Ad5+antiPD-L1(3) group, and Ad5+antiPD-L1(6) group were all lower than that in the TC-1 group, with statistical significance ($\text{MD}=12.33\text{--}13.67, 95\% \text{ CI}: 1.79\text{--}24.21$). Transcriptomic gene sequencing indicated that the treatment suppressed CD274 expression and upregulated CD3e, CD247, and IFNG expression. **Conclusions** The synergistic effect of PD-L1 inhibitors can effectively enhance the targeted anti-tumor immune effect of Ad5.

【Key words】 Recombinant vector vaccine; Adenovirus; Immune checkpoint inhibitors; Human papillomavirus type 16 cervical cancer

Fund program: Central Guided Local Science and Technology Development Funds Project (2023ZY1019); Basic Public Welfare Research Program of Zhejiang Province (LGF20C080001); Basic Research Program of Fundamental Research Fund of Hangzhou Medical College (KYZD202107)

DOI:10.3760/cma.j.cn331340-20250226-00023

人乳头状瘤病毒 (human papillomavirus, HPV) 感染与宫颈癌的发生紧密相关,超过 99%的宫颈病例与高危型 HPV 有关^[1],其中 HPV16 型^[2]最为常见。目前,已有多个预防性 HPV 疫苗获批上市并广泛应用。不过,这些预防性 HPV 疫苗均以 HPV 的晚期结构蛋白自组装形成的病毒样颗粒作为抗原,通过诱导高效的特异性中和抗体来预防病毒感染。而 HPV 感染相关的癌症患者是通过早期转化基因 E6、E7 等整合细胞染色体来实现转化的,这就导致以晚期结构蛋白为基础的预防性疫苗接种无法用于治疗 HPV 感染及其诱发的癌变^[3]。因此,开展靶向治疗药物或疫苗的研究,对于高危型 HPV 感染及其诱发的癌变具有重大意义^[4-5]。程序性死亡受体 1 及其配体 (programmed death-1/programmed cell death ligand 1, PD-1/PD-L1) 等免疫检查点抑制剂已在肿瘤临床治疗中广泛应用,而 HPV 持续感染引发的宫颈癌细胞和浸润细胞呈现 PD-1 和 PD-L1 高表达,具有“免疫热肿瘤”的特征^[6]。本研究在前期已开展

临床研究的治疗性 HPV16 型重组腺病毒载体疫苗 (Ad5) 基础上 (临床试验号 CTR20202014),拟探索借助免疫检查点抑制剂的 T 细胞调节活性,增强疫苗所诱发的特异性抗肿瘤免疫,从而为宫颈癌的临床免疫治疗新方案提供依据。

材料与方法

一、实验材料

1. 细胞系及疫苗

TC-1 细胞系购自美国细胞培养物收藏中心 (American Type Culture Collection, ATCC), 由 C57BL/c (H-2b) 小鼠肺上皮细胞经共转染 HPV16 E6、E7 基因和激活的 *ras* 癌基因转化而成,能够在 C57BL 小鼠体内形成特异性实体肿瘤,由新型疫苗浙江省工程研究中心建库保存^[7]。

Ad5 由浙江普康生物科技股份有限公司提供,该疫苗将 HPV16 型 E6/E7 基因插入 5 型腺病毒载体中,构建完成的重组腺病毒载体在体内表达 E6

和 E7 融合蛋白^[8-9]。

2. 试剂与仪器

PD-L1 单克隆抗体(大鼠, GolnVivo™ Purified anti-mouse CD274)购自 Biolend 公司; RPMI1640 培养基购自 Cytiva 公司; 胎牛血清购自 Gibco 公司; 胰酶和 4% 通用组织固定液购自 Biosharp 公司; PBS 缓冲液购自山东齐都生物医药有限公司; 无水乙醇购自杭州化学试剂有限公司; FACS、Fc 受体阻断剂、荧光抗体 CD3e (BV510)、荧光抗体 CD4 (PerCP-Cy™5.5)、荧光抗体 CD8a (PE-Cy™7)、荧光抗体 CD38 (FITC) 均购自 BD Biosciences 公司; ACK 红细胞裂解液购自碧云天公司; HPV E7 混合重叠肽库由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

仪器包括 FACS Celesta 型流式细胞仪 (BD 公司)、AP280-2 包埋机 (MICROM 公司)、HM335E 切片机 (MICROM 公司)、滨松数字病理切片扫描系统 NanoZoomer 2.0RS (日本滨松公司)。

3. 实验动物

SPF 级 C57BL/6 小鼠, 雌性, 6 周龄, 体重 17~19 g, 购自上海斯莱克实验动物有限公司 [实验动物质量合格证号: SCXK (沪) 2022-0004], 饲养于浙江中医药大学实验动物中心 [实验动物使用许可证号: SYXK (浙) 2021-0012]。所有动物实验经杭州医学院动物实验伦理委员会审查 (动物伦理批号: 2019-074)。

二、TC-1 小鼠肿瘤模型的建立

用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基复苏培养 TC-1 肿瘤细胞, 胰酶消化后收集细胞, 用无菌 PBS 缓冲液清洗细胞后计数, 制备成浓度为 8.0×10^5 个/mL 细胞悬液, 所得细胞悬液按 100 μ L/只接种于 C57/BL 雌性小鼠右腿内侧腹股沟处皮下, 以此获得 TC-1 小鼠肿瘤模型^[10]。

三、动物分组与干预方案

将肿瘤模型小鼠分为 5 组, 每组 5 只: TC-1 组为肿瘤模型对照组; antiPD-L1 组在 TC-1 小鼠肿瘤模型建立后第 13 天经腹腔注射进行 PD-L1 单克隆抗体治疗; Ad5 组在 TC-1 小鼠肿瘤模型建立后第 10 天经大腿肌肉注射接种 Ad5; Ad5+antiPD-L1 (3)

组在 TC-1 小鼠肿瘤模型建立后第 10 天经大腿肌肉注射接种 Ad5, 间隔 3 天后进行 PD-L1 单克隆抗体治疗; Ad5+anti PD-L1 (6) 组在 TC-1 小鼠肿瘤模型建立后第 10 天经大腿肌肉注射接种 Ad5, 间隔 6 天后进行 PD-L1 单克隆抗体治疗。Ad5 接种剂量为 1×10^7 IU/只; PD-L1 单克隆抗体治疗方案为间隔 3 天 1 次, 连续注射 4 次, 每次注射剂量为 100 μ g/只。

四、检测指标与方法

1. 肿瘤体积观察

用游标卡尺测量一次小鼠实体肿瘤瘤径的长 (L) 和宽 (W), 按 $V(\text{mm}^3) = L \times W^2 / 2$ 计算肿瘤体积。从肿瘤细胞接种后第 10 天起, 每隔 3 天测量各组小鼠肿瘤体积并绘制肿瘤生长曲线。

2. 脾淋巴细胞流式分析

取小鼠脾脏放入经 0.1% FACS 浸润的细胞筛网中用注射器活塞柄进行充分碾磨, 加入 0.1% FACS, 转移细胞悬液至离心管中, 加入 ACK 裂解红细胞 3 min, 加入 PBS 终止裂解后离心弃上清, 用 0.1% FACS 重悬细胞, 取 1×10^7 个细胞用 10% RPMI 1640 培养基稀释至 1 mL 细胞悬液, 接种于 24 孔板, 按 500 ng/孔加入 HPV E7 重叠肽库刺激 12 h; 另取冰上 5×10^6 个细胞并转移至流式专用离心管, 用 PBS 洗涤 2 次后, 用 100 μ L 0.1% FACS 重悬细胞并稀释至细胞个数为 5×10^6 个细胞/mL, 加入 Fc 受体阻断剂, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min, 用 1 mL 0.1% FACS 洗涤后, 450 $\times g$ 离心后, 再用 1 mL 0.1% FACS 重悬细胞, 加入 CD3、CD4、CD8 荧光素标记抗体, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min; 洗涤重悬后, 用 BD 流式细胞分析仪上机分析^[11-12]。

3. 肿瘤组织病理分析

小鼠麻醉处死后剥离肿瘤组织, 放入 4% 通用组织固定液中, 固定 24 h, 依次将组织块放入梯度酒精脱去水分, 浸泡至组织透明。将透明的组织块包埋于石蜡中, 使用预冷后的切片将组织蜡块切成厚度为 5 μ m 的薄片, 将切好的薄片展开至载玻片上, 在室温下烤干; 使用二甲苯脱蜡, 10 min/次, 重复 5 次; 将脱蜡后的切片依次浸入梯度酒精, 每个浓度浸泡 5 min 后用纯水冲洗; 使用苏木素染色

10 min, 再次用纯水冲洗; 将切片用分化液(75%乙醇+1%盐酸)分化 2~3 次, 再次用纯水洗净, 使用伊红染色 1 min 后纯水冲洗, 将洗净的切片依次浸入 75%乙醇, 2 min, 85%乙醇, 2 min, 100%乙醇, 5 min; 最后将切片用二甲苯浸泡 5 min 至透明, 待切片干燥后, 用中性树脂封片, 切片进行扫描分析。

4. 肿瘤组织转录组测序

小鼠麻醉处死后剥离肿瘤组织, 用 PBS 缓冲液漂洗, 去除血渍和毛发, 剔除结缔组织, 并用无屑纸吸干表面液体。剪取肿瘤组织中间部位 50~100 mg 立即放入已预冷的 2.0 mL 细胞冻存管中, 用液氮速冻 1 h 后在 -80 °C 中低温保存。寄送至华大基因股份有限公司进行转录组测序。测序结果进行组间差异基因筛选。其中 $\log_2(FC) > 0$ 为表达上调, $\log_2(FC) < 0$ 为表达下调, 差异基因表达量以 $|\log_2(FC)| > 1$, $P < 0.05$ 为阈值筛选具有显著性统计学意义的差异基因^[13]。

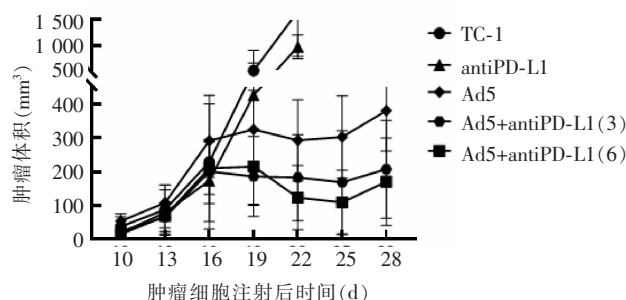
五、统计学分析

采用 GraphPad Prism 软件进行统计学分析。对数据进行正态性检验, 符合正态分布的数据以平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。组间差异比较采用单因素方差分析, 小鼠肿瘤体积组间两两比较采用 Welch 校正 t 检验, 小鼠脾淋巴细胞流式分析的两两组间比较采用 Tukey-HSD 多重比较, 计算均值差(MD)和 95%置信区间(95%CI), 以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、Ad5 与 PD-L1 抑制剂协同治疗对小鼠肿瘤生长曲线的影响

如图 1 所示, 第 22 天, 各组间小鼠肿瘤体积差异存在统计学意义 ($F=9.52$, $P < 0.001$), TC-1 对照组的肿瘤体积为 $(1\ 540.5 \pm 681.6)$ mm³, antiPD-L1 组为 (968.7 ± 206.8) mm³, 两组比较差异有统计学意义 ($t=4.51$, $P=0.020$), Ad5 组的肿瘤体积为 (292.9 ± 107.1) mm³, 显著小于 TC-1 对照组和 antiPD-L1 组 ($t=3.95$ 和 3.53 , $P=0.029$ 和 0.037), Ad5 组的肿瘤体积显著大于 Ad5+antiPD-L1 (3) 组的 (182.7 ± 113.4) mm³ 和 Ad5+antiPD-L1(6)组的 (123.6 ± 85.4) mm³ ($t=10.77$ 和



注: HPV: 人乳头状瘤病毒; PD-L1: 程序性死亡配体-1; Ad5: 治疗性 HPV16 型重组腺病毒载体疫苗; TC-1 组为肿瘤模型对照组, 第 22 天因肿瘤超过动物伦理, 被处死; antiPD-L1 组进行 PD-L1 单克隆抗体治疗, 第 22 天因肿瘤超过动物伦理, 被处死; Ad5 组接种 Ad5; Ad5+antiPD-L1(3)组接种 Ad5, 间隔 3 天后进行 PD-L1 单克隆抗体治疗; Ad5+antiPD-L1(6)组接种 Ad5, 间隔 6 天后进行 PD-L1 单克隆抗体治疗

图 1 不同分组小鼠肿瘤体积变化趋势

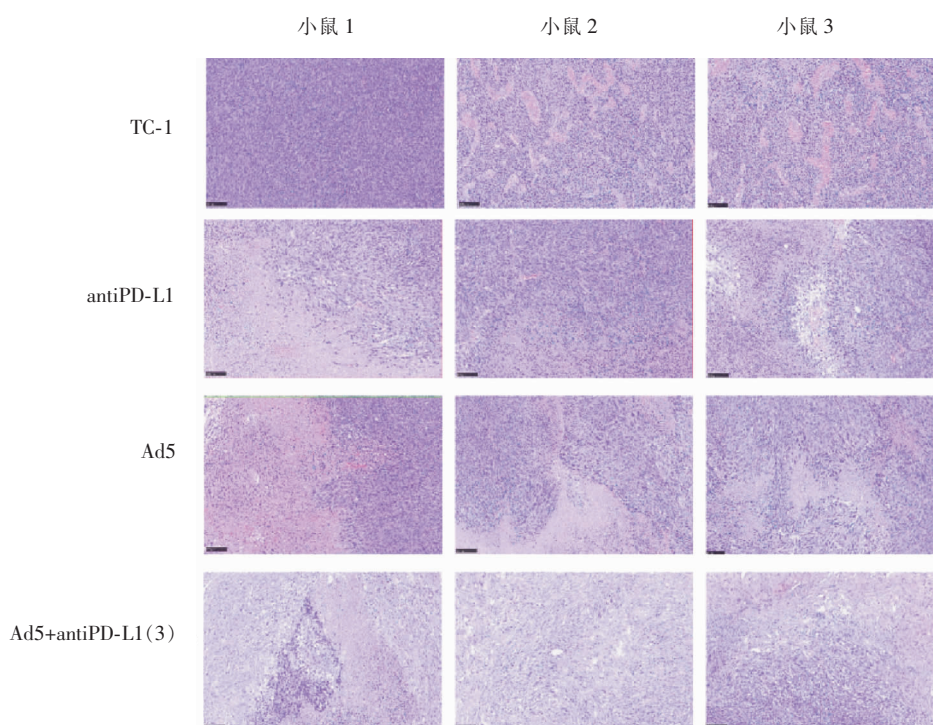
7.77, $P=0.002$ 和 0.004)。在第 25 天, Ad5+antiPD-L1(6)组的肿瘤体积为 (109.6 ± 85.2) mm³, 显著小于 Ad5+antiPD-L1 (3) 组的 (168.2 ± 136.1) mm³ ($t=4.70$, $P=0.042$)。

二、Ad5 与 PD-L1 抑制剂协同治疗下小鼠肿瘤组织病理变化

在肿瘤细胞接种后第 28 天, 取 TC-1 组、antiPD-L1 组、Ad5 组和 Ad5+antiPD-L1(3)组的肿瘤组织进行 HE 染色病理分析, Ad5+antiPD-L1(6)组由于小鼠肿瘤体积过小, 未进行检测。结果如图 2 所示, 在 TC-1 组的小鼠肿瘤组织中, 可见肿瘤实性生长, 排列紧密, 肿瘤细胞核质比高, 可见明显分裂象, 间质成分较少, 血管增生明显, 且血管形态不规则, 分布紊乱, 少见炎症细胞浸润; 在 antiPD-L1 组中, 肿瘤组织灶状炎性细胞浸润, 主要为淋巴细胞, 但坏死区域较少, 肿瘤间质成分也较少; 单独使用 Ad5 治疗的肿瘤组织中局部可见坏死灶, 小灶状炎性浸润, 主要为淋巴细胞; Ad5+antiPD-L1(3)组肿瘤组织的肿瘤细胞胞质透亮, 可见多灶性坏死, 间质反应和纤维化增加, 多灶性炎症细胞浸润(主要为淋巴细胞), 免疫细胞聚集更为明显。

三、Ad5 与 PD-L1 抑制剂协同治疗下小鼠脾淋巴细胞分化情况

在肿瘤细胞接种后第 28 天, 取各组小鼠脾脏淋巴细胞进行流式细胞检测。由图 3 ①和②可见,



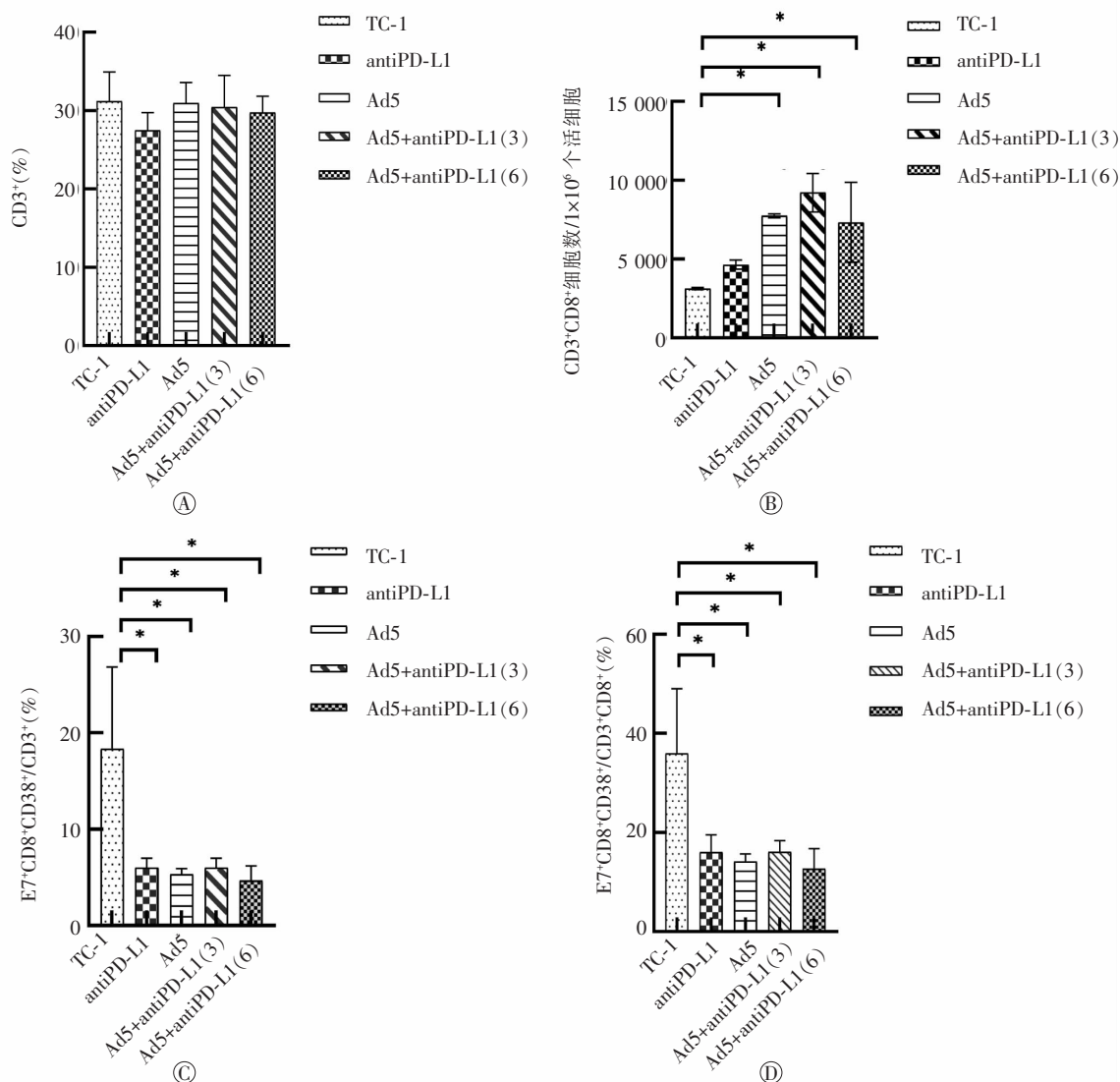
注:HPV:人乳头状瘤病毒;PD-L1:程序性死亡配体-1;Ad5:治疗性 HPV16 型重组腺病毒载体疫苗;TC-1 组为肿瘤模型对照组;antiPD-L1 组进行 PD-L1 单克隆抗体治疗;Ad5 组接种 Ad5;Ad5+anti PD-L1(3)组接种 Ad5,间隔 3 天后进行 PD-L1 单克隆抗体治疗

图 2 不同分组小鼠肿瘤组织 HE 染色(400×)

各实验组之间的 CD3⁺细胞分化数差异无统计学意义 ($F=0.72, P=0.598$), 但各组间 CD3⁺CD8⁺细胞分化数差异存在统计学意义 ($F=11.38, P=0.001$), 其中 Ad5 组、Ad5+antiPD-L1(3)组、Ad5+antiPD-L1(6)组的 CD3⁺CD8⁺细胞分化数分别为 (7 743±121.3) 个/10⁶ 个细胞、(9 212±1 226) 个/10⁶ 个细胞、(7 332±2 530) 个/10⁶ 个细胞, 均显著高于 TC-1 组的 (3 135±71) 个/10⁶ 个细胞, 差异有统计学意义 [Ad5 组: MD = -4 607, 95% CI: -8 008 ~ -1 207, $P=0.008$; Ad5+antiPD-L1(3)组: MD=-6 076, 95% CI: -9 477~-2 675, $P=0.001$; Ad5+antiPD-L1(6)组: MD=-4 197, 95% CI: -7 598 ~ -796.3, $P=0.015$]. Ad5 组、Ad5+antiPD-L1(3)组和 Ad5+antiPD-L1(6)组之间 CD3⁺CD8⁺细胞分化数无明显差异 (均 $P>0.05$).

进一步用 HPV16 E7 重叠多肽刺激淋巴细胞后进行流式检测分析。由图 3 ③可见, 各组间 E7⁺CD8⁺CD38⁺/CD3⁺比例差异存在统计学意义 ($F=6.74, P=0.011$), Ad5 组、antiPD-L1 组、Ad5+antiPD-L1(3)组、Ad5+antiPD-L1(6)组的 E7⁺CD8⁺CD38⁺/CD3⁺比例分别

为 (5.4±0.9)%、(5.9±0.9)%、(6.1±1.3)%和 (4.7±1.4)%, 均低于 TC-1 组的 (18.4±8.7)%, 差异有统计学意义 [Ad5 组: MD=13.00, 95% CI: 2.46~23.55, $P=0.015$; antiPD-L1 组: MD=12.49, 95% CI: 1.63~23.38, $P=0.022$; Ad5+antiPD-L1(3)组: MD=12.33, 95% CI: 1.79~22.88, $P=0.021$; Ad5+antiPD-L1(6)组: MD=13.67, 95% CI: 3.12~24.21, $P=0.011$]. 而 Ad5 组、Ad5+antiPD-L1(3)组和 Ad5+antiPD-L1(6)组之间的 E7⁺CD8⁺CD38⁺/CD3⁺比例差异不显著 (调整后均 $P>0.05$)。经 E7 重叠多肽刺激后, 由图 3 ④可见, 各组 E7⁺CD8⁺CD38⁺/CD3⁺CD8⁺比例差异有统计学意义 ($F=12.94, P=0.001$), Ad5 组、antiPD-L1 组、Ad5+antiPD-L1(3)组、Ad5+antiPD-L1(6)组的 E7⁺CD8⁺CD38⁺/CD3⁺CD8⁺的比例分别为 (14.1±1.6)%、(14.8±1.67)%、(14.8±1.75)%和 (12.7±4.0)%, 均低于 TC-1 组的 (36.0±13.1)%, 差异有统计学意义 [Ad5 组: MD = 21.87, 95% CI: 2.67~37.20, $P=0.013$; antiPD-L1 组: MD=19.96, 95% CI: 4.60~39.13, $P=0.023$; Ad5+antiPD-L1(3)组: MD=19.93, 95% CI: 2.67~37.20, $P=0.023$;



注:HPV:人乳头状瘤病毒;PD-L1:程序性死亡配体-1;Ad5:治疗性 HPV16 型重组腺病毒载体疫苗;TC-1 组为肿瘤模型对照组;antiPD-L1 组进行 PD-L1 单克隆抗体治疗;Ad5 组接种 Ad5;Ad5+anti PD-L1(3)组接种 Ad5,间隔 3 天后进行 PD-L1 单克隆抗体治疗;Ad5+anti PD-L1(6)组接种 Ad5,间隔 6 天后进行 PD-L1 单克隆抗体治疗;①:CD3⁺占活细胞百分比;②:CD3⁺CD8⁺细胞占 1×10⁶ 个活细胞的细胞数;③:E7 多肽刺激后 CD8⁺CD38⁺占 CD3⁺细胞百分比;④:E7 多肽刺激后 CD8⁺CD38⁺占 CD3⁺CD8⁺细胞百分比;* 表示差异具有统计学意义

图 3 不同分组小鼠脾淋巴细胞流式分析结果

Ad5+antiPD-L1(6)组:MD=23.28, 95%CI: 6.02~40.55, $P=0.009$], 而 Ad5 组、Ad5+antiPD-L1(3)组和 Ad5+antiPD-L1(6)组之间 E7⁺CD8⁺CD38⁺/CD3⁺CD8⁺比例差异不显著(调整后均 $P>0.05$)。

四、Ad5 与 PD-L1 抑制剂协同治疗下肿瘤组织基因转录组变化

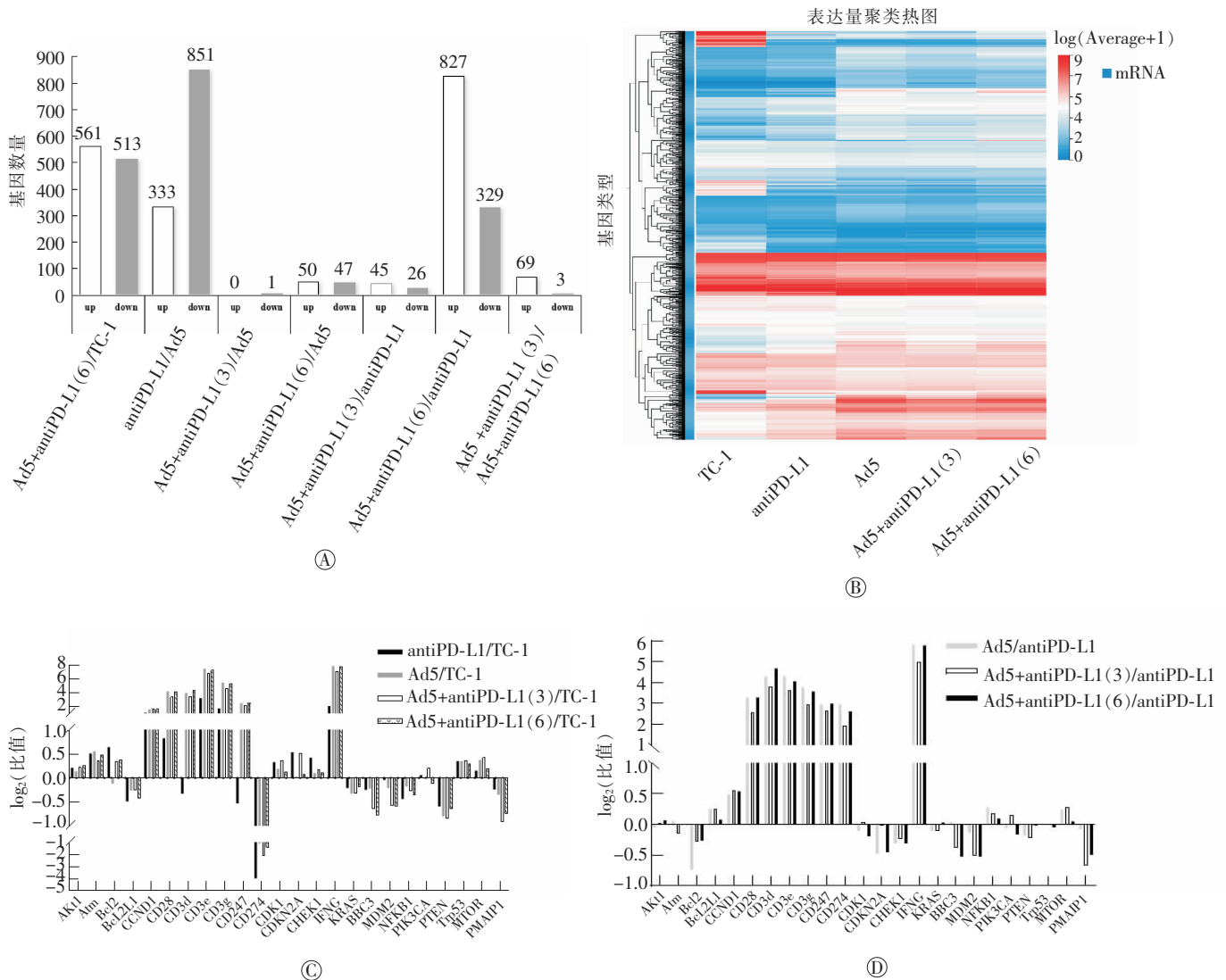
在肿瘤细胞接种后第 28 天后,对小鼠肿瘤样本进行转录组测序分析,TC-1 组、antiPD-L1 组、Ad5 组、Ad5+antiPD-L1(3)组和 Ad5+antiPD-L1(6)组的表达基因数分别为(4 480±640)个、(15 163±202)个、

(15 715±222)个、(15 365±357)个和(15 894±131)个。由各组差异基因表达柱状图(图 4 ①)可见,antiPD-L1 组与 Ad5 组相比,有 333 个基因表达上调,851 个基因表达下调;Ad5+antiPD-L1(6)组与 antiPD-L1 组相比,有 827 个基因表达上调,329 个基因表达下调;Ad5+antiPD-L1(3)组与 Ad5+antiPD-L1(6)组相比,共有 69 个基因表达上调,3 个基因表达下调。为探究不同治疗方式对小鼠肿瘤基因表达模式,筛选出 $|\log_2(FC)|>1$ 的表达进行聚类热图分析(图 4 ②),结果可见,热图清

晰地呈现出 TC-1 组与治疗各组不同的基因聚类, 聚类富集发现在不同治疗条件下差异基因与癌症相关通路、P53 通路等显著相关。

对上述差异基因中与 PD-L1 表达、P53 通路以及 pRB 蛋白相关的基因进行梳理, 并对其在不同组别中的表达量进行统计, 结果如图 4 ③和④所示, 相比 TC-1 组, CD274 在其余各组中均呈下调趋势, 其中单独使用 PD-L1 抑制剂的下调程度高于 Ad5+antiPD-L1(6)组和 Ad5+antiPD-L1(3)组 ($P<0.05$); 在

Ad5 组、Ad5+antiPD-L1(3)组和 Ad5+antiPD-L1(6)组中, 与 T 细胞激活相关基因 CD28、CD3e、CD3d、CD3g、CD247 表达均高于 TC-1 组 ($P<0.05$); 与 antiPD-L1 组相比, 上述 3 组的表达均有所提升 ($P<0.05$)。就编码 IFN- γ 的 IFNG 基因而言, antiPD-L1 组、Ad5 组、Ad5+antiPD-L1(3)组和 Ad5+antiPD-L1(6)组基因表达均高于 TC-1 组, 且 Ad5 组、Ad5+antiPD-L1(3)组和 Ad5+antiPD-L1(6)组的表达也高于 antiPD-L1 组 ($P<0.05$)。此外, CCND1 基因在 antiPD-



注:HPV:人乳头状瘤病毒;PD-L1:程序性死亡配体-1;Ad5:治疗性 HPV16 型重组腺病毒载体疫苗;TC-1 组为肿瘤模型对照组;antiPD-L1 组进行 PD-L1 单克隆抗体治疗;Ad5 组接种 Ad5;Ad5+anti PD-L1(3)组接种 Ad5,间隔 3 天后进行 PD-L1 单克隆抗体治疗;Ad5+anti PD-L1(6)组接种 Ad5,间隔 6 天后进行 PD-L1 单克隆抗体治疗;③:各组间差异基因统计柱状图;④:各组差异基因热图;⑤:antiPD-L1 组、Ad5 组、Ad5+antiPD-L1(3)组和 Ad5+antiPD-L1(6)组相对于 TC-1 组的 PD-L1、P53 和 pRB 相关基因表达差异分析;⑥:Ad5 组、Ad5+antiPD-L1(3)组和 Ad5+antiPD-L1(6)组相对于 antiPD-L1 组的 PD-L1、P53 和 pRB 相关基因表达差异分析

图 4 不同分组小鼠真核转录组测序差异基因表达

L1 组、Ad5 组、Ad5+antiPD-L1(3)组和 Ad5+antiPD-L1(6)组的表达均较 TC-1 上调($P<0.05$)。

讨 论

治疗性疫苗与免疫检查点抑制剂的联合应用,已成为增强抗肿瘤免疫效应的新兴策略。一方面,疫苗可特异性激活并扩增肿瘤抗原特异性 T 细胞;另一方面,PD-1/PD-L1 抑制剂则能解除肿瘤微环境中的免疫抑制,防止 T 细胞耗竭。两者理论上存在协同增效的潜力^[14-15]。本研究在此基础上,旨在探讨 PD-L1 单克隆抗体与一款基于 HPV16 E6/E7 抗原的治疗性 Ad5 的协同抗肿瘤作用,并初步探索其免疫学机制。

本研究以 TC-1 荷瘤小鼠模型为治疗对象,其中 TC-1 细胞是由 C57BL/c(H-2b)小鼠肺上皮细胞经共转染 HPV16 E6、E7 基因和激活的 *ras* 癌基因转化而成,能在 C57BL 小鼠体内形成特异性实体肿瘤,目前被认为是治疗性 HPV 疫苗评价的经典肿瘤模型^[11,16-17]。在此基础上,系统评估了 PD-L1 单克隆抗体与治疗性 HPV 疫苗的协同治疗效果。结果显示,协同治疗在肿瘤生长抑制方面明显优于任一单一治疗方式,尤其是在第 19~28 天,肿瘤体积显著减小。同时,组织病理学结果揭示联合组肿瘤组织中存在大量淋巴细胞浸润,呈现围绕肿瘤细胞的“屏障”状聚集,提示其在限制肿瘤扩展和促进肿瘤细胞清除方面具有重要作用。

值得注意的是,本研究发现 PD-L1 单克隆抗体的给药时机显著影响治疗效果。与疫苗接种后第 3 天给药,延后至第 6 天使用 PD-L1 抗体可获得更佳的抗肿瘤效应,这一现象提示,疫苗诱导的系统性免疫激活与抗体介导的肿瘤局部免疫微环境重塑之间存在一个关键的“时间窗”。我们推测,过早给予 PD-L1 抑制剂时,疫苗尚未充分激发足够数量的抗原特异性 T 细胞并使其归巢至肿瘤部位;而适当的延迟(如第 6 天)则可能使疫苗先完成 T 细胞的初始激活与扩增,此时再解除免疫抑制信号,能更有效地将这些效应细胞的功能发挥出来^[18]。这一假设得到了转录组数据的部分支持:联合治疗组中 T

细胞激活相关基因(如 CD3e、CD247)及效应分子基因(IFNG)的上调更为显著。

本研究借助流式细胞术分析发现,各治疗组小鼠脾淋巴细胞均显著增加了 CD3⁺CD8⁺T 细胞比例,同时降低了 E7⁺CD8⁺CD38⁺/CD3⁺比值和 E7⁺CD8⁺CD38⁺/CD3⁺CD8⁺比值,显示一定程度的肿瘤微环境诱导的 T 细胞耗竭被逆转。然而,上述指标各治疗组间无显著统计学差异,可能由于单一时间点取样难以全面揭示 T 细胞活化、耗竭与记忆分化等免疫动态变化^[19-22]。此外,疫苗诱导的特异性免疫应答常发生于早期,而 PD-L1 抗体作用可能更依赖于持久的免疫微环境重塑,因此两者间的免疫时序需在以后的研究中进一步优化。

为深入解析免疫作用机制,我们进一步开展了转录组分析。结果显示,联合治疗组中 T 细胞激活及 IFNG 相关基因显著上调,且差异表达基因主要富集于“癌症通路”和“癌症中的 microRNA”等 KEGG 通路。这提示联合治疗不仅增强了局部免疫反应,也可能在调控肿瘤相关信号网络方面发挥作用。然而,上述分子变化仍需通过后续实验进一步验证其功能与机制。

综上所述,本研究的结果为 PD-L1 单克隆抗体与治疗性 HPV 疫苗的协同治疗的可行性提供了实验依据,初步验证了其在抗肿瘤治疗中的增效作用,并提示优化给药程序和联合机制的研究具有重要意义。然而,该研究目前尚存在一定局限性,需要进一步开展研究,包括:①多时间点流式细胞术分析 T 细胞活化、记忆化及耗竭状态(如 CD44、CD62L、PD-1 等);②监测外周血细胞因子水平变化以评估系统性免疫响应;③系统评估肿瘤局部与邻近组织的免疫微环境变化;④结合 qPCR 或多重免疫组化验证关键差异表达基因的功能变化。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

志谢 感谢浙江省中医药大学动物实验中心、浙江省中医药大学理中心、杭州医学院新型疫苗浙江省工程研究中心的导师及师兄师姐对本次科研及论文协作过程中的帮助与支持

作者贡献声明 马培凯:肿瘤模型构建、流式细胞检测、肿瘤组织病理、肿瘤组织转录组测序、数据统计分析、文章撰写;张柯欣:肿瘤模型构建、文章撰写;杨银梦、张苗:流式细胞检测、数据统计分析;朱

赉、吴洁;数据统计分析、肿瘤模型构建;庄昉成、陆绍红;研究指导;
高孟;研究设计、研究指导、论文审阅、经费支持

参 考 文 献

- [1] Yuan Y, Cai X, Shen F, et al. HPV post-infection microenvironment and cervical cancer[J]. *Cancer Lett*, 2021, 497: 243-254. DOI: 10.1016/j.canlet.2020.10.034.
- [2] Zhang J, Cheng K, Wang Z. Prevalence and distribution of human papillomavirus genotypes in cervical intraepithelial neoplasia in China: A meta-analysis[J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2020, 302(6): 1329-1337. DOI: 10.1007/s00404-020-05787-w.
- [3] Mikulić S, Strunk J, Florin L. HPV16 entry into epithelial cells: Running a gauntlet[J]. *Viruses*, 2021, 13(12) DOI: 10.3390/v13122460.
- [4] Gennigens C, De Cuyper M, Hermesse J, et al. Optimal treatment in locally advanced cervical cancer[J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2021, 21(6): 657-671. DOI: 10.1080/14737140.2021.1879646.
- [5] van Driel WJ, Rensing ME, Kenter GG, et al. Vaccination with HPV16 peptides of patients with advanced cervical carcinoma: Clinical evaluation of a phase I-II trial[J]. *Eur J Cancer*, 1999, 35(6): 946-952. DOI: 10.1016/s0959-8049(99)00048-9.
- [6] Wang Y, Li G. PD-1/PD-L1 blockade in cervical cancer: Current studies and perspectives[J]. *Front Med*, 2019, 13(4): 438-450. DOI: 10.1007/s11684-018-0674-4.
- [7] Lin KY, Guarnieri FG, Staveley-O'Carroll KF, 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.
- [8] Wu J, Chen G, Jin S, et al. Immune responses of recombinant adenovirus-5 vector vaccine of human papillomavirus type 16 E6E7 and its anti-tumor effects in mice[J]. *Inter J Epidemiol Infect Dis*, 2014, 41: 368-373. DOI:10.3760/CMA.J.ISSN.1673-4149.2014.06.002
- [9] Wu J, Chen G, Zhuang FC, et al. Long-term toxicity, pharmacokinetics and immune effects of a recombinant adenovirus vaccine expressing human papillomavirus 16 E6 and E7 proteins (HPV16 E6E7-Ad5 Vac) in primates[J]. *Am J Transl Res*, 2018, 10(5): 1539-1551.
- [10] 李莉莉, 王鹤蓉, 周芷亦, 等. T C-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): 141-147. DOI: 10.11936/bjtxb2015090056.
- [11] Verma V, Shrimali RK, Ahmad S, et al. PD-1 blockade in subprimed CD8 cells induces dysfunctional PD-1 +CD38hi cells and anti-PD-1 resistance[J]. *Nat Immunol*, 2019, 20(9): 1231-1243. DOI: 10.1038/s41590-019-0441-y.
- [12] Backer RA, Probst HC, Clausen BE. Multiparameter flow cytometric analysis of the conventional and monocyte-derived DC compartment in the murine spleen[J]. *Vaccines (Basel)*, 2024, 12(11): 1294. DOI: 10.3390/vaccines12111294.
- [13] Smith CC, Bixby LM, Miller KL, et al. Using RNA sequencing to characterize the tumor microenvironment[J]. *Methods Mol Biol*, 2020, 2055: 245-272. DOI: 10.1007/978-1-4939-9773-2_12.
- [14] Galluzzi L, Humeau J, Buqué A, et al. Immunostimulation with chemotherapy in the era of immune checkpoint inhibitors[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2020, 17(12): 725-741. DOI: 10.1038/s41571-020-0413-z.
- [15] Galon J, Bruni D. Approaches to treat immune hot, altered and cold tumours with combination immunotherapies[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, 18(3): 197-218. DOI: 10.1038/s41573-018-0007-y.
- [16] Peng S, Tan M, Li YD, et al. PD-1 blockade synergizes with intratumoral vaccination of a therapeutic HPV protein vaccine and elicits regression of tumor in a preclinical model[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2021, 70(4): 1049-1062. DOI: 10.1007/s00262-020-02754-x.
- [17] Wang S, Cheng M, Chen CC, et al. Salmonella immunotherapy engineered with highly efficient tumor antigen coating establishes antigen-specific CD8⁺ T cell immunity and increases in antitumor efficacy with type I interferon combination therapy [J]. *Oncoimmunology*, 2024, 13(1): 2298444. DOI: 10.1080/2162402X.2023.2298444.
- [18] Zhou K, Jiang Y, Feng S, et al. Establishment of image-guided radiotherapy of orthotopic hepatocellular carcinoma mouse model [J]. *Animal Model Exp Med*, 2023, 6(5): 419-426. DOI: 10.1002/ame2.12335.
- [19] Baharom F, Ramirez-Valdez RA, Khalilnezhad A, et al. Systemic vaccination induces CD8⁺ T cells and remodels the tumor microenvironment[J]. *Cell*, 2022, 185(23): 4317-4332.e15. DOI: 10.1016/j.cell.2022.10.006.
- [20] Braun DA, Moranzoni G, Chea V, et al. A neoantigen vaccine generates antitumor immunity in renal cell carcinoma[J]. *Nature*, 2025, 639(8054): 474-482. DOI: 10.1038/s41586-024-08507-5.
- [21] Fan T, Xu C, Wu J, et al. Lipopolyplex-formulated mRNA cancer vaccine elicits strong neoantigen-specific T cell responses and antitumor activity[J]. *Sci Adv*, 2024, 10(41): eadn9961. DOI: 10.1126/sciadv.adn9961.
- [22] Hirayama AV, Kimble EL, Wright JH, et al. Timing of anti-PD-L1 antibody initiation affects efficacy/toxicity of CD19 CAR T-cell therapy for large B-cell lymphoma[J]. *Blood Adv*, 2024, 8(2): 453-467. DOI: 10.1182/bloodadvances.2023011287.

(收稿日期:2025-02-26)