

文章编号: 1006-3080(2025)02-0219-09

DOI: 10.14135/j.cnki.1006-3080.20240601001

基于 AFP 靶点的肝细胞癌的免疫治疗研究

张 洁¹, 汤丁越¹, 王成烨², 高雅文², 徐文青², 刘思雅², 肖 啸², 吴 侠²

(华东理工大学 1. 生物工程学院; 2. 药学院, 上海 200237)

摘要: 甲胎蛋白(AFP)在大约 70%~80% 的肝细胞癌患者中表达, 可作为肝细胞癌免疫治疗的靶点。目前大多以 AFP 为靶点的肿瘤疫苗的临床试验效果欠佳, 因此急需开发一种更有效的、基于 AFP 抗原的治疗性肿瘤疫苗。以复制缺陷型腺病毒为载体, 构建了一种肝癌治疗性病毒载体 Ad-hAFPm。该载体通过表达 AFP/HSP70(热休克蛋白 70)融合蛋白和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)来实现 AFP 抗原的特异性靶向治疗。在两种过表达人源 AFP(hAFP)的细胞系皮下移植瘤模型中模拟验证了 Ad-hAFPm 病毒载体的治疗效果。结果表明, Ad-hAFPm 病毒在两种皮下移植瘤模型中均表现出良好的肿瘤抑制效果, 肿瘤内免疫细胞浸润水平显著升高, 并呈现出一定的靶向性优势。

关键词: 肝细胞癌; AFP; 免疫疗法; 腺病毒; 治疗性肿瘤疫苗

中图分类号: R735.9

文献标志码: A

肝癌是一种发生于肝脏的恶性肿瘤, 其发病率在世界范围内正在不断增长^[1], 五年内的生存率仅有 18%^[2]。据估计, 到 2040 年, 将有 130 万人死于肝癌, 较 2020 年相比增加 56.4%^[3]。肝细胞癌(Hepatocellular carcinoma, HCC)是肝癌中最常见的形式, 其在原发性肝癌中的比例高达 70%~85%^[2]。HCC 是全球第五大常见的恶性肿瘤, 也是目前癌症相关死亡的第二大原因^[4]。手术(肝切除和肝移植)目前仍是治疗 HCC 最常用的手段, 除此之外还有放疗、化疗、消融、经动脉化疗栓塞术等, 但它们都只对中早期肝细胞癌的治疗具有一定效果^[5], 复发率较高^[6], 且预后性较差^[7]。同时, 由于恶性肿瘤发病较为隐匿, 大多数患者会在中晚期被诊断出来, 错过了最佳的治疗时间。索拉非尼是唯一一种获批的、用于晚期 HCC 的一线治疗和标准治疗药物^[8], 但只有不到 1/3 的患者能从中获益, 且会在治疗后 6 个月内出现耐药性^[9]。因此需要寻找新的、能更好治疗 HCC 的方法。

甲胎蛋白(AFP)是一种癌胎糖蛋白, 属于血清白

蛋白家族^[10]。AFP 在胎儿组织中高度表达, 在健康的成人组织中几乎检测不到它的表达, 但在大约 70%~80% 的 HCC 患者中观察到 AFP 的再表达^[11-12]。因此此特异性, AFP 被认为是免疫治疗的一个有利的靶点^[13]。研究发现, AFP 的一些表位可被抗原提呈细胞(APC)的主要组织相容性复合体(MHC)I 类或 II 类分子识别^[14], 当呈递给 CD8⁺ T 或 CD4⁺ T 淋巴细胞时, 激活细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)分泌高水平的 TNF- α 和 IFN- γ , 并刺激机体免疫系统产生针对 AFP 的特异性免疫反应^[15-16]。虽然免疫系统处于高血浆水平的 AFP 中, 但免疫耐受使 AFP 蛋白只能引发较弱且重复性较低的抗肿瘤效果^[17-18], 因此需要改善免疫系统对 AFP 的低亲和力, 可使用肿瘤抗原和免疫佐剂的组合重新增强 AFP 的免疫原性^[19], 以确保良好的诱发免疫效果。粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)是一种细胞因子, 已被证明可用于肿瘤疫苗的佐剂, 其可以启动树突状细胞的募集和成熟, 以及巨噬细胞、NK 细胞的激活, 进而加强机体对于肿瘤细胞的免疫应答^[20]。同时, 有研究证明热休克

收稿日期: 2024-06-01

作者简介: 张 洁(1999—), 女, 辽宁庄河人, 硕士生, 主要研究方向为肿瘤的免疫治疗。E-mail: zhangjie9956@163.com

通信联系人: 吴 侠, E-mail: wuxia@ecust.edu.cn

引用本文: 张 洁, 汤丁越, 王成烨, 等. 基于 AFP 靶点的肝细胞癌的免疫治疗研究[J]. 华东理工大学学报(自然科学版), 2025, 51(2): 219-227.

Citation: ZHANG Jie, TANG Dingyue, WANG Chengye, *et al.* Immunotherapy for Hepatocellular Carcinoma Based on AFP Antigen[J]. Journal of East China University of Science and Technology, 2025, 51(2): 219-227.

蛋白 70(HSP70)作为佐剂也可增强抗原的免疫原性, HSP70-抗原肽复合物具有直接刺激 APC 的能力, 增强抗肿瘤免疫反应^[21]。

启动或增强人体对癌症的免疫反应是癌症免疫策略的主要目标^[22], 治疗性肿瘤疫苗在临床前研究中显示出了其在肿瘤免疫治疗领域的巨大前景。其中, 基于病毒载体的肿瘤疫苗在癌症免疫治疗中显示出了相当大的潜力, 病毒载体可以将抗原有效地递送到免疫系统内, 形成强烈的免疫反应^[23]。由于腺病毒具有强大的感染能力和一定的免疫原性等优点, 重组腺病毒载体常被用于癌症的基因治疗和疫苗的制备中。目前已有大量的早期研究和临床试验证明, 使用复制缺陷型腺病毒载体进行肿瘤的体内治疗较为安全^[24-25]。

本研究通过增强 AFP 的免疫原性, 激发机体对于 AFP 阳性的肿瘤细胞的免疫反应, 以达到良好的、靶向治疗肿瘤的效果。将表达 AFP 抗原融合蛋白的质粒载体包装为 Ad-hAFPm 病毒注射液, 并使用相同的载体结构, 选择纽约食管鳞状上皮癌抗原 1(New York-Esophageal-1, NY-ESO-1) 设计非靶向 hAFP 的治疗性病毒载体 Ad-hNYm, 以判断治疗性病毒载体在体内发挥药效是由特异性抗原主导、并非病毒载体本身效果, 由此说明 Ad-hAFPm 病毒能够特异性靶向 AFP 阳性的肿瘤细胞, 发挥肿瘤杀伤效果。NY-ESO-1 为肿瘤/睾丸抗原, 在包括 HCC 在内的多种肿瘤组织中均有所表达^[26-27], 同时它被认为是迄今为止发现的最具免疫原性的抗原之一^[28], 且小鼠不表达 NY-ESO-1 蛋白, 因此选择 NY-ESO-1 作为对照抗原。同时, 本文建立了小鼠肝癌皮下移植瘤模型并进行病毒药物的瘤旁注射, 定期测量肿瘤体积。结果表明, Ad-hAFPm 治疗组在两种皮下移植瘤模型中均表现出良好的肿瘤抑制效果, 具有一定的靶向性优势, 并激发了机体对于肿瘤细胞的强免疫应答。

1 实验部分

1.1 主要原料与试剂

本文所用的腺病毒骨架载体质粒由本实验室保存。质粒 hAFPm 和 hNYm 序列由苏州金唯智生物科技有限公司合成。各种限制性内切酶购于赛默飞世尔科技公司; T4 连接酶购于 Takara 公司; 胎牛血清(FBS)、双抗(Penicillin-Streptomycin)、胰蛋白酶(0.25% Trypsin)均购于美国 Gibco 公司; DMEM 高糖培养基、磷酸盐缓冲液(PBS)购于美国 HyClone 公

司; 人源过表达 AFP 慢病毒购于山东维真生物科技有限公司; 抗 HSP70 (*Mycobacterium tuberculosis*) 抗体购于 GeneTex 公司; C57BL/6J 小鼠购于江苏集萃药康生物科技有限公司; 小鼠黑色素瘤细胞(B16F10)、小鼠肺癌细胞(LLC)购于中科院细胞库; QPCR SYBR Mix 购于南京诺唯赞生物科技有限公司; Human AFP ELISA Kit、Human GM-CSF ELISA Kit 购于武汉三鹰生物技术有限公司。

1.2 主要仪器

多功能酶标仪(美国 BioTek 仪器有限公司, Synergy H1 型); 二氧化碳培养箱(赛默飞世尔科技公司, BB150 型); 超净工作台(上海上净净化设备有限公司, CA-1390-1 型); 定量基因扩增仪(德国耶拿分析仪器有限公司, QTOWER 3.0 型); 荧光显微镜(德国徕卡公司, DM6B 型); 流式细胞仪(美国 BD 公司, FACS Aria™ III Cell Sorter)。

1.3 实验方法

1.3.1 质粒构建及病毒包装 根据人源 AFP(hAFP) 和 NY-ESO-1 序列, 设计得到 hAFPm、hNYm 基因序列, 由于本研究中所设计的质粒载体不需要 hAFP 分泌到胞外, 因此选择去掉其分泌肽序列, 将基因序列提交至苏州金唯智生物科技有限公司进行基因合成。将合成好的 hAFPm、hNYm 序列和实验室已有的腺病毒骨架载体同时使用限制性核酸内切酶进行双酶切, 酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳及胶回收获得目的基因片段及骨架载体, 将回收到的片段使用 T4 连接酶进行连接, 得到本研究所需要的两种质粒载体。质粒转化感受态细胞、涂板、挑选单克隆进行培养, 对菌液进行测序, 选择序列正确的单菌落进行质粒抽提。将得到的质粒送至上海泰尔图生物科技有限公司进行病毒的包装和纯化。

1.3.2 细胞培养及病毒感染 细胞培养所使用的培养基为含体积分数 10% 的 FBS 和体积分数 1% 的双抗组成的 DMEM 高糖培养基, 细胞置于 37 ℃ 的 CO₂ 培养箱中进行培养。将 B16F10、LLC 细胞以 5×10^5 个/孔的密度接种于六孔板, 当细胞汇合度达到 80%~90% 时, 以感染复数(MOI)值为 2×10^4 vp/cell 对细胞进行腺病毒感染。培养 48 h 后收取细胞及上清液进行后续实验检测。

1.3.3 过表达 hAFP 的细胞系构建 以 MOI 值为 20 对 B16F10、LLC 细胞进行慢病毒感染, 24 h 后换上新鲜的完全培养基; 48 h 后在显微镜下观察 GFP 荧光(慢病毒中含 GFP 荧光蛋白的表达基因), 判断感染效率。利用含嘌呤霉素的新鲜完全培养基, 筛选出成功被慢病毒感染的细胞株(慢病毒中携带

Puromycin 抗性基因)。收取筛选后的细胞进行流式细胞术分选,获得稳转细胞株。将稳转细胞株进行传代培养,在流式细胞仪检测细胞中 GFP 荧光比例;并收取细胞上清,利用酶联免疫吸附(ELISA)实验法检测细胞分泌 hAFP 蛋白水平,验证细胞构建情况。将构建成功的稳转细胞株命名为 B16F10-AFP、LLC-AFP。

1.3.4 ELISA实验 ELISA 实验主要用于定性分析细胞上清中 GM-CSF、hAFP 蛋白表达,以及小鼠血清中 hAFP 蛋白表达水平。原理为靶标蛋白与包被抗体和 HRP 标记检测抗体这三者形成双抗夹心结构,在 3, 3', 5, 5'-四甲基苯胺(TMB)和终止液的反应下,液体变为黄色,进行吸光值的测定。使用 Human AFP ELISA Kit、Human GM-CSF ELISA Kit 试剂盒进行检测。

1.3.5 小鼠肿瘤组织RNA提取及实时荧光定量PCR (qRT-PCR) 向小鼠肿瘤组织中加入 Trizol 及研磨珠匀浆提取 RNA,测定提取出的 RNA 浓度。使用 Prime Script Mix 酶进行反转录,获得 cDNA。配制含 cDNA、SYBR Mix、DEPC 水和引物的扩增体系,利用 qRT-PCR 法检测各免疫指标的分子表达水平。

1.3.6 B16F10-AFP、LLC-AFP小鼠皮下移植瘤实验

将构建并验证好的 B16F10-AFP、LLC-AFP 细胞以 2×10^5 个细胞量皮下接种于 6~7 周龄、雌性 C57/WT 小鼠的右侧腋下。将小鼠随机分为 3 组,分别为 PBS 组、Ad-hAFPm 组和 Ad-hNYm 组。在细胞移植

后共进行 3 次皮下给药,每只小鼠每次皮下注射相应病毒时接受的剂量为 5×10^{10} vp(体积为 100 μ L)。根据肿瘤生长速度,每 2~3 d 使用游标卡尺测量一次肿瘤大小,计算肿瘤体积。肿瘤终点时获取小鼠肿瘤组织及小鼠血清。

1.3.7 小鼠肿瘤组织切片及免疫荧光染色 终点时期处死小鼠,将肿瘤组织经过固定、脱水、透明和浸蜡得到组织蜡块。使用石蜡切片机进行切片,切片厚度均为 5 μ m,将切片贴于载玻片上进行烤片,获得石蜡切片。将获得的石蜡切片脱蜡,并使用抗原修复液进行修复。血清封闭后孵育 CD8 抗体,再使用 DAPI(4',6-Diamidino-2-phenylindole)对细胞核进行染色后封片,于荧光显微镜下观察并拍摄荧光图。

1.3.8 统计学处理 本文的实验数据均为 3 次平行实验后的统计数据,结果以平均值 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SD)表示。实验数据分析采用 t-检验法和方差分析。 $P < 0.05$ 在统计学上为有显著性差异(* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$)。免疫荧光图片使用 Image J 进行统计处理,并使用 Graphpad Prism 9 进行数据分析。

2 结果与讨论

2.1 两种载体构建及表达水平检测

设计并构建两种质粒表达载体 hAFPm、hNYm,具体结构如图 1(a)所示,这两个质粒载体均含有两

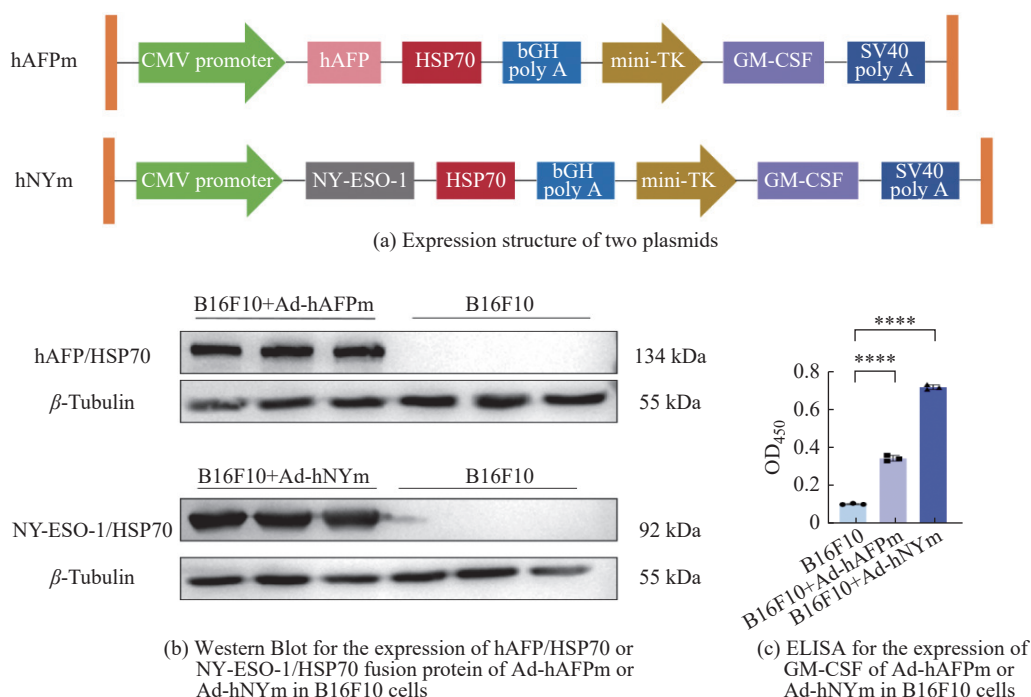


图1 两种载体构建及表达水平检测

Fig. 1 Two vectors construct and expression level detection

个启动子, CMV 启动子驱动 hAFP/HSP70 融合蛋白或 NY-ESO-1/HSP70 融合蛋白的表达, 其中 hAFP 不含其分泌肽; mini-TK 启动子驱动 GM-CSF 的表达。质粒构建成功后, 进行腺病毒包装, 得到 Ad-hAFPm 和 Ad-hNYm 两种病毒。

本研究选取 B16F10 细胞对以上两种病毒进行体外感染实验。利用 Western Blot 检测细胞中 hAFP/HSP70 融合蛋白和 NY-ESO-1/HSP70 融合蛋白的表达, 结果如图 1(b) 所示。在感染 Ad-hAFPm 和 Ad-hNYm 病毒的 B16F10 细胞中可明显检测到 hAFP/HSP70 融合蛋白(理论大小为 134 kDa)和 NY-ESO-1/HSP70 融合蛋白(理论大小为 92 kDa)的表达, 而在未感染的对照组细胞中无表达。同时使用 ELISA 检测细胞上清中 GM-CSF 蛋白的表达, 使用

OD₄₅₀ 表示(OD₄₅₀ 为 ELISA 实验中 TMB 显色终止后在 450 nm 处测得的吸光度)。结果显示, B16F10 空白组的 OD₄₅₀ 值为 0.107±0.003, Ad-hAFPm 病毒感染组的 OD₄₅₀ 值为 0.348±0.015, Ad-hNYm 病毒感染组的 OD₄₅₀ 值为 0.722±0.012, 与对照组相比均有显著性提升(图 1(c), $P < 0.0001$)。

2.2 B16F10-AFP、LLC-AFP 细胞系构建

为了验证 Ad-hAFPm 病毒的治疗效果, 本研究在两种鼠源细胞系(B16F10 细胞和 LLC 细胞)中使用慢病毒构建了能稳定表达 hAFP 蛋白的肿瘤细胞系, 即 B16F10-AFP、LLC-AFP, 结果如图 2、图 3 所示。使用含嘌呤霉素的培养基培养 1~2 代后, 流式细胞仪检测 B16F10-AFP 和 LLC-AFP 细胞系中 GFP 荧光蛋白比例。结果显示, B16F10-AFP 细胞中表达

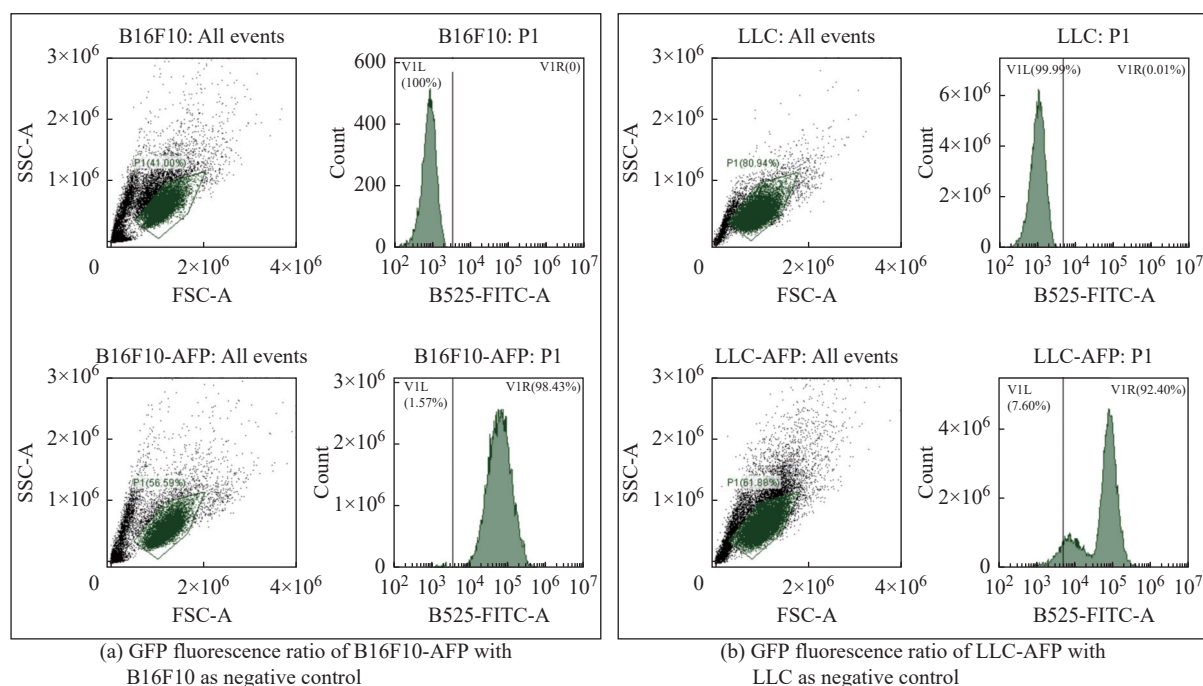


图 2 细胞系中的 GFP 荧光蛋白比例

Fig. 2 GFP fluorescence ratio of cell lines

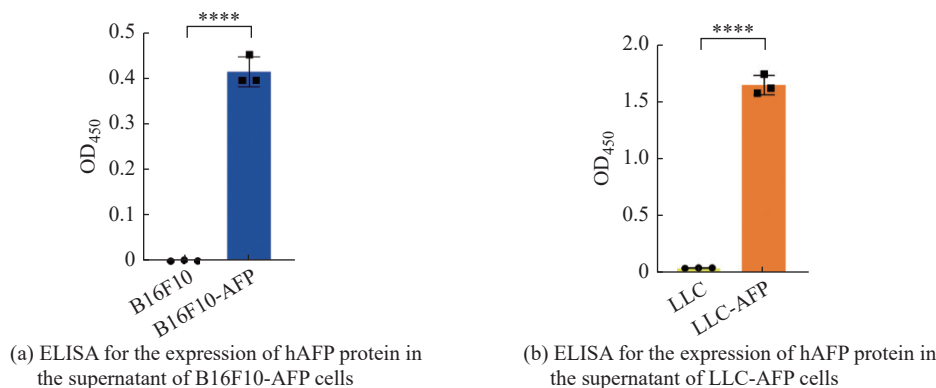


图 3 ELISA 法检测细胞上清液中 hAFP 蛋白的表达

Fig. 3 ELISA for expression of hAFP protein in the supernatant of cells

GFP 荧光的细胞比例为 98.43%(图 2(a)), LLC-AFP 细胞中的比例为 92.40%(图 2(b))。进一步使用 ELISA 法检测上述两种细胞上清液中 hAFP 蛋白的表达含量,使用 OD_{450} 表示。结果显示 B16F10-AFP、LLC-AFP 细胞的 hAFP 蛋白的表达水平与其对应的对照细胞相比有显著提升($P < 0.0001$)。证明能够稳定表达 hAFP 蛋白的稳转细胞系 B16F10-AFP、LLC-AFP 均已构建成功。

2.3 小鼠过表达 hAFP 皮下移植瘤模型的建立及 Ad-hAFPm 病毒药效验证

2.3.1 Ad-hAFPm 病毒在过表达 hAFP 的 B16F10 细胞皮下移植瘤模型中的药效评价 为了验证 Ad-hAFPm 病毒在体内对 hAFP 表达阳性的肿瘤细胞的靶向杀伤效果,将 2×10^5 个 B16F10-AFP 细胞接种于 6~7 周龄、雌性 C57/WT 小鼠的右侧腋下皮下,诱导肝癌皮下移植瘤模型($n=7$)。在细胞移植后的第 2 d 开始进行药物治疗,并获取小鼠血清(图 4(a))。

Ad-hAFPm 组小鼠的皮下肿瘤体积始终处于较低水平,肿瘤生长速度缓慢,而从细胞接种后第 14 d 开始,Ad-hNYm 组和 PBS 组小鼠的肿瘤均开始显著增长。与 PBS 组和 Ad-hNYm 相比,Ad-hAFPm 病毒能够显著抑制肿瘤的生长速度(图 4(b), $P < 0.05$)。

研究终点处死小鼠,取肿瘤组织、小鼠血清并记录终点时肿瘤体积及质量。从肿瘤体积分析,Ad-hAFPm 组显著低于 PBS 组和 Ad-hNYm 组(图 4(c), $P < 0.05$)。从肿瘤质量分析,Ad-hAFPm 组显著低于 PBS 组(图 4(d), $P < 0.001$),但与 Ad-hNYm 组相比,虽然 Ad-hAFPm 组小鼠肿瘤终点质量的均值更小,但不存在统计学差异(图 4(d), $P=0.2922$)。通过监测小鼠的体重,发现给药组小鼠的体重稳定,未有明显变化(图 4(e))。综合肿瘤生长情况分析可得,Ad-hAFPm 病毒对于肿瘤有显著性抑制效果,优于 Ad-hNYm,存在 AFP 的靶向抑制作用。

同时,由于 hAFP 蛋白可分泌,且已有文献证明 AFP 蛋白含量与肿瘤大小呈正相关,即肿瘤越大,AFP 蛋白分泌量越多^[29]。因此使用 ELISA 法监测小鼠在肿瘤生长中分泌到血清中 hAFP 蛋白含量的变化及研究终点时小鼠血清中 hAFP 蛋白含量,使用 OD_{450} 表示。结果表明,Ad-hAFPm 组小鼠血清中 hAFP 蛋白含量始终处于较低水平,且具有一定的下降趋势。Ad-hNYm 组和 PBS 组则在细胞接种后第 10 d 开始,血清中 hAFP 蛋白含量快速上升,且 PBS 组上升速度最快,这说明 Ad-hAFPm 病毒能显著抑制 hAFP 阳性肿瘤细胞的生长(图 4(f), $P < 0.05$)。

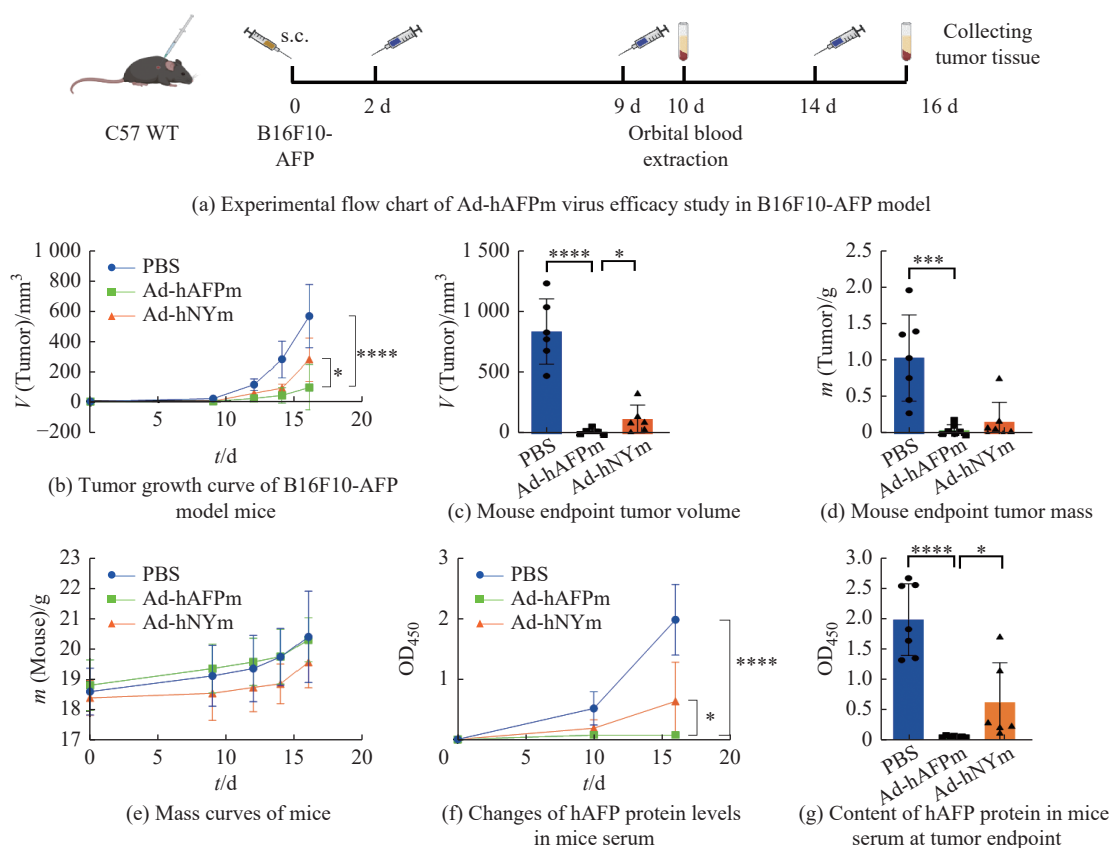


图4 Ad-hAFPm 病毒在 B16F10-AFP 小鼠模型中的药效探究

Fig. 4 Pharmacological exploration of Ad-hAFPm virus in B16F10-AFP model

终点时, Ad-hAFPm 组小鼠血清中 hAFP 蛋白水平最少, 显著低于 PBS 组和 Ad-hNYm 组 (图 4(g), $P < 0.05$)。该结果与上述肿瘤体积结果一致, 在研究终点时 Ad-hAFPm 组小鼠肿瘤体积最小, 证明 Ad-hAFPm 病毒对肿瘤的抑制效果最好, 且对 hAFP 表达阳性的肿瘤细胞具有一定的杀伤作用。

CD3、CD4 和 CD8 分子是淋巴细胞表面抗原, 淋巴细胞主要负责细胞免疫, 具有抵抗病毒和调节机体免疫系统功能的作用。CD3⁺ T 细胞是成熟 T 淋巴细胞, 表示机体细胞免疫功能状态。CD4⁺ T 细胞是辅助性 T 细胞, 可在识别肿瘤抗原后, 激活其他免疫细胞并辅助 CD8⁺ T 细胞发挥抗肿瘤作用。CD8⁺ T 细胞是细胞毒性 T 细胞, 是免疫反应中的直接杀伤性细胞, 能够特异性地杀伤肿瘤细胞。因此, 本研究通过检测小鼠肿瘤组织中 CD3⁺ T、CD4⁺ T、CD8⁺ T 细胞的表达情况分析 Ad-hAFPm 病毒对于激发小鼠体内抗肿瘤的免疫情况。首先使用 RT-qPCR 法检测小鼠肿瘤组织中 CD3⁺ T、CD4⁺ T、CD8⁺ T 细胞的分子表达水平。结果表明, Ad-hAFPm 组小鼠的肿瘤组织中 CD3⁺ T、CD4⁺ T、CD8⁺ T 细胞的表达水平均显

著上升 (图 5(a)、(b)、(c), $P < 0.05$), 且 Ad-hAFPm 组内每只小鼠肿瘤内 CD3⁺ T、CD8⁺ T 细胞均高于 PBS 组。上述结果证明 Ad-hAFPm 病毒能够高水平激活小鼠体内的 T 细胞免疫反应, 产生较强的免疫杀伤作用。

由于杀伤效果最主要的体现是 CD8⁺ T 细胞的浸润水平, 这是细胞免疫最终作用环节产生应答的 T 细胞, 因此, 本研究随机选择 PBS 组和 Ad-hAFPm 组中各 5 只小鼠的肿瘤组织进行切片和免疫荧光染色, 从蛋白表达层面分析肿瘤组织中 CD8⁺ T 细胞的免疫浸润情况。结果表明, Ad-hAFPm 组小鼠肿瘤组织中 CD8⁺ T 细胞的阳性荧光信号明显高于 PBS 组 (图 5(d)、(e), $P < 0.0001$), 该结果与 RT-qPCR 的趋势一致, 证明 Ad-hAFPm 病毒能够诱导强烈的免疫反应进而抑制肿瘤的生长。

2.3.2 Ad-hAFPm 病毒在过表达 hAFP 的 LLC 细胞皮下移植瘤模型中的药效评价 将 3×10^5 个 LLC-AFP 细胞接种于 6~7 周龄、雌性 C57/WT 小鼠的右侧腋下皮下, 诱导肝癌皮下移植瘤模型 ($n=6$)。在细胞移植后的第 2 d 开始进行药物治疗, 并于肿瘤终点时获取小鼠血清 (图 6(a))。

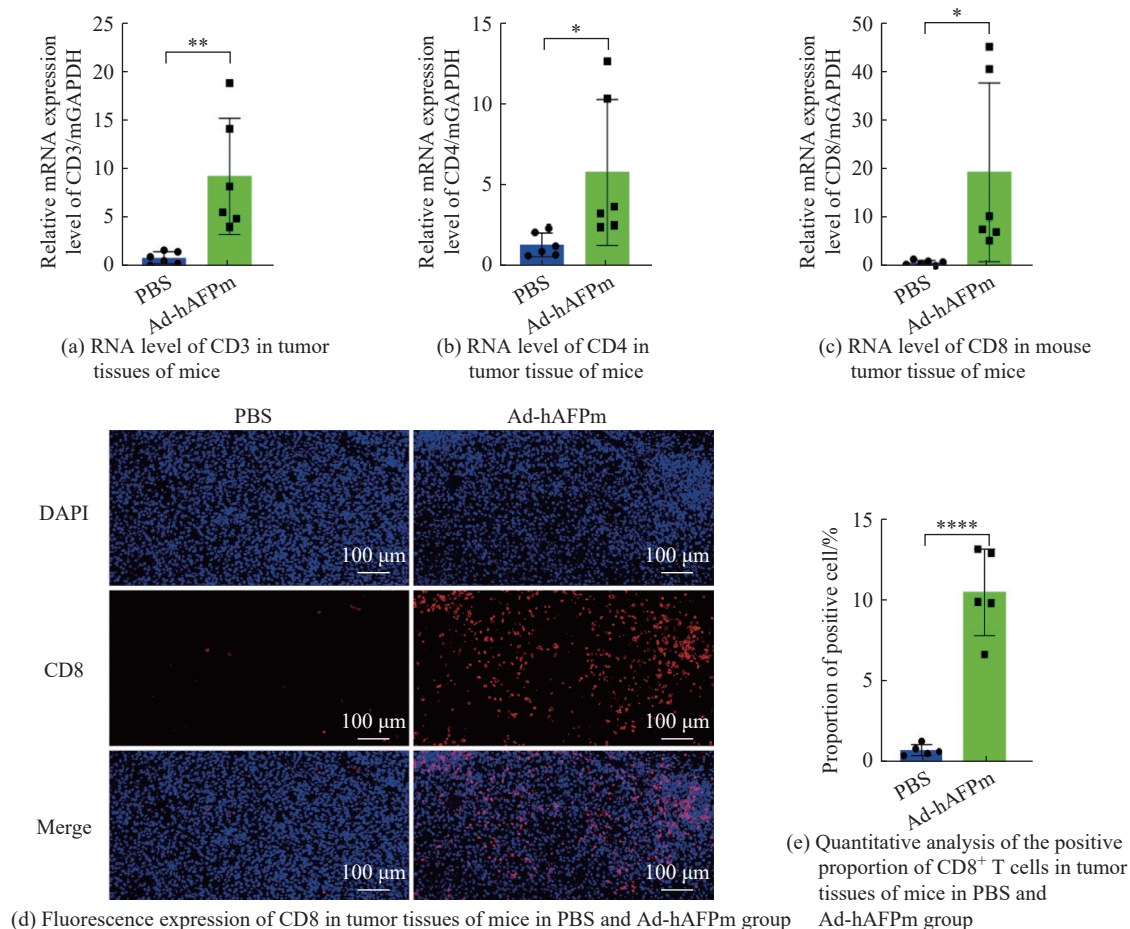


图 5 接种和未接种 Ad-hAFPm 病毒小鼠肿瘤组织中各免疫指标表达水平

Fig. 5 Expression levels of various immune indexes in tumor tissues of mice vaccinated and unvaccinated with Ad-hAFPm virus

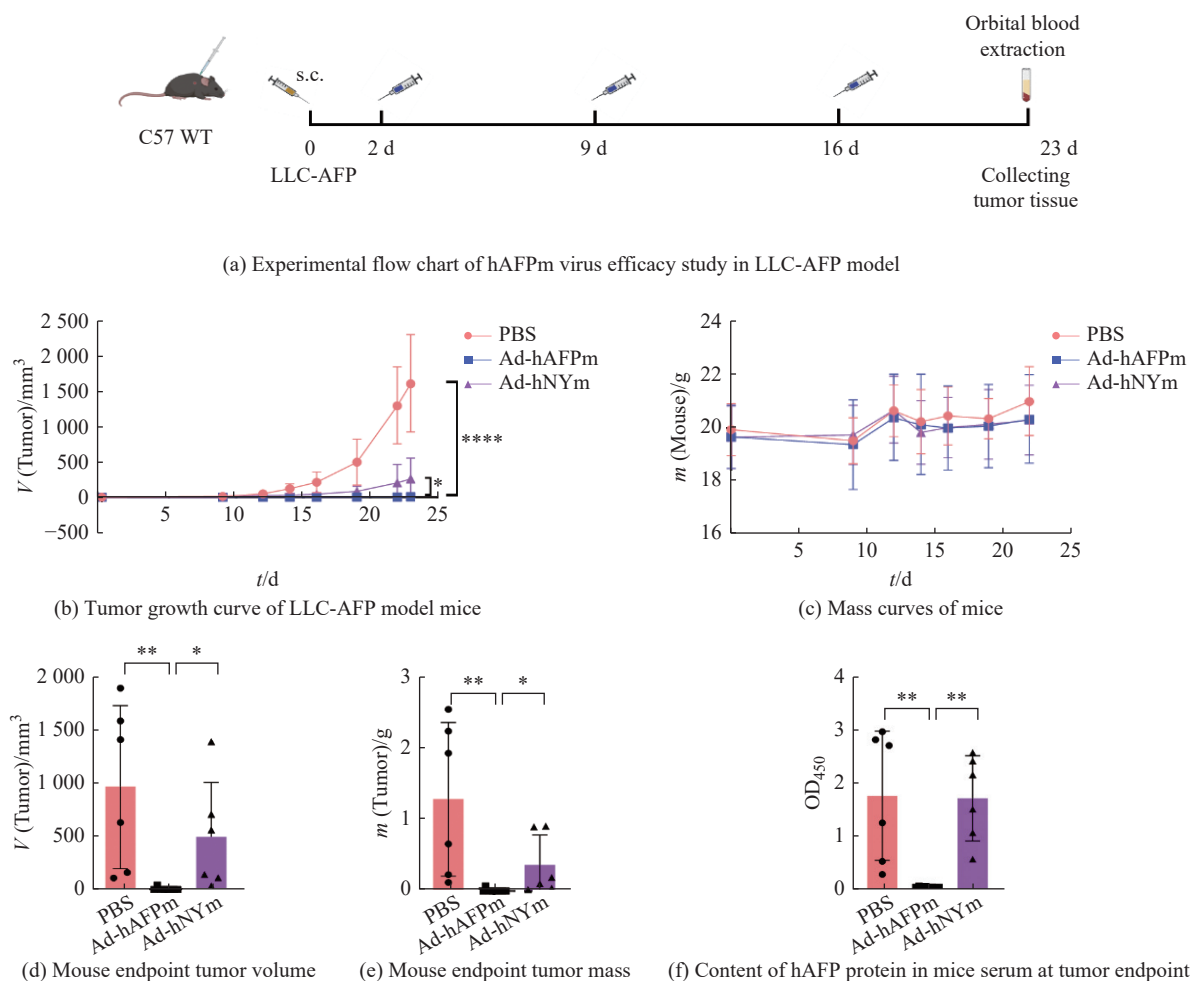


图6 Ad-hAFPm病毒在LLC-AFP小鼠模型中的药效探究

Fig. 6 Pharmacological exploration of Ad-hAFPm virus in LLC-AFP model of mice

Ad-hAFPm组小鼠的肿瘤体积始终处于极低水平,而从细胞接种后第16d开始,PBS组小鼠的肿瘤呈现快速生长趋势,Ad-hNYm组小鼠的肿瘤生长速度缓慢。与PBS组和Ad-hNYm组相比,Ad-hAFPm病毒能够显著抑制LLC-AFP肿瘤的生长速度(图6(b), $P < 0.05$)。终点处死小鼠,记录终点时小鼠的终点肿瘤体积及质量,结果表明,Ad-hAFPm组中只有一只小鼠长出肿瘤,其余小鼠均未长出肿瘤,显著低于PBS组和Ad-hNYm组(图6(d)、(e), $P < 0.05$)。通过监测小鼠的体重,发现Ad-hAFPm组小鼠的体重虽然有所波动,但波动趋势与PBS组一致,说明Ad-hAFPm病毒对小鼠无明显毒性(图6(c))。综合肿瘤生长情况分析可发现Ad-hAFPm能够显著抑制LLC-AFP细胞在小鼠体内的成瘤能力,且优于Ad-hNYm病毒。

在研究终点时获取小鼠血清,使用ELISA法分析各组小鼠血清中hAFP蛋白含量,间接反映小鼠体内hAFP阳性的肿瘤大小。结果显示,Ad-hAFPm组中每只小鼠血清中hAFP蛋白含量均显著低于PBS

组和Ad-hNYm组(图6(f), $P < 0.01$)。该结果与终点时期肿瘤体积结果一致,证明Ad-hAFPm病毒具有一定特异性杀伤表达hAFP蛋白的肿瘤细胞的效果,可实现肝癌的靶向治疗,发挥优异的抗肿瘤作用。

本组实验中Ad-hAFPm组小鼠由于未生长出肿瘤,无法对小鼠肿瘤组织内相关免疫细胞的表达情况进行分析。但该模型通过小鼠终点肿瘤体积、终点肿瘤质量及小鼠血清中hAFP蛋白的含量所得出的结论与B16F10-AFP小鼠模型一致,证明了Ad-hAFPm病毒能够抑制hAFP蛋白阳性的肿瘤细胞的生长及其在体内的成瘤能力,且具有一定靶向杀伤hAFP表达阳性的肿瘤细胞的能力。

3 结束语

本研究设计的Ad-hAFPm病毒可在两种皮下移植瘤模型中表现出良好的肿瘤抑制效果,能够特异性杀伤hAFP阳性的肿瘤细胞,具有一定的靶向性优势,并能激发机体对于肿瘤细胞的强烈的免疫应

答,为肝细胞癌治疗药物的开发提供了新思路 and 可能性。

本文目前关注的主要为 Ad-hAFPm 病毒的药效结果,即 Ad-hAFPm 病毒对肿瘤的抑制作用,有关毒理的实验会在后续的药效药理研究进一步深入之后再行进行,如探究小鼠的最高耐受剂量、对小鼠主要脏器进行病理染色以及对小鼠血生化指标包括 Alt 和 Ast 等的检测,小鼠血常规、尿常规的检测,以及评估小鼠肝肾功能等。

参考文献:

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2019[J]. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2019, 69(1): 7-34.
- [2] VILLANUEVA A. Hepatocellular carcinoma[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2019, 380(15): 1450-1462.
- [3] RUMGAY H, ARNOLD M, FERLAY J, *et al.* Global burden of primary liver cancer in 2020 and predictions to 2040[J]. *Journal of Hepatology*, 2022, 77(6): 1598-1606.
- [4] WEN N, CAI Y, LI F, *et al.* The clinical management of hepatocellular carcinoma worldwide: A concise review and comparison of current guidelines: 2022 update[J]. *Bioscience Trends*, 2022, 16(1): 20-30.
- [5] LLOVET J M, KELLEY R K, VILLANUEVA A, *et al.* Hepatocellular carcinoma[J]. *Nature Reviews Disease Primers*, 2021, 7(1): 6.
- [6] TREVISANI F, GARUTI F, NERI A. Alpha-fetoprotein for diagnosis, prognosis, and transplant selection[J]. *Seminars in Liver Disease*, 2019, 39(2): 163-177.
- [7] LLOVET J M, PINYOL R, YARCHOAN M, *et al.* Adjuvant and neoadjuvant immunotherapies in hepatocellular carcinoma[J]. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2024, 21(4): 294-311.
- [8] GALLE P R, DUFOUR J F, PECK-RADOSAVLJEVIC M, *et al.* Systemic therapy of advanced hepatocellular carcinoma[J]. *Future Oncology*, 2021, 17(10): 1237-1251.
- [9] EL-SERAG H B, MARRERO J A, RUDOLPH L, *et al.* Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma[J]. *Gastroenterology*, 2008, 134(6): 1752-1763.
- [10] HANIF H, ALI M J, SUSHEELA A T, *et al.* Update on the applications and limitations of alpha-fetoprotein for hepatocellular carcinoma[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2022, 28(2): 216-229.
- [11] WANG X, WANG Q. Alpha-fetoprotein and hepatocellular carcinoma immunity[J]. *Canadian Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 2018, 2018: 9049252.
- [12] BRUIX J, GORES G J, MAZZAFERRO V. Hepatocellular carcinoma: Clinical frontiers and perspectives[J]. *Gut*, 2014, 63(5): 844-855.
- [13] HU X, CHEN R, WEI Q, *et al.* The landscape of alpha fetoprotein in hepatocellular carcinoma: Where are we?[J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2022, 18(2): 536-551.
- [14] BUTTERFIELD L H, MENG W S, KOH A, *et al.* T cell responses to HLA-A*0201-restricted peptides derived from human alpha fetoprotein [J]. *Journal of Immunology*, 2001, 166(8): 5300-5308.
- [15] HIROISHI K, EGUCHI J, BABA T, *et al.* Strong CD8(+) T-cell responses against tumor-associated antigens prolong the recurrence-free interval after tumor treatment in patients with hepatocellular carcinoma[J]. *Journal of Gastroenterology*, 2010, 45(4): 451-458.
- [16] LU X, DENG S, XU J, *et al.* Combination of AFP vaccine and immune checkpoint inhibitors slows hepatocellular carcinoma progression in preclinical models [J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2023, 133(11): e163291.
- [17] WANG X P, LIU G Z, SONG A L, *et al.* Antitumor immunity induced by DNA vaccine encoding alpha-fetoprotein/heat shock protein 70[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2004, 10(21): 3197-3200.
- [18] MELLMAN I, COUKOS G, DRANOFF G. Cancer immunotherapy comes of age[J]. *Nature*, 2011, 480(7378): 480-489.
- [19] BOLHASSANI A, SAFAIYAN S, RAFATI S. Improvement of different vaccine delivery systems for cancer therapy[J]. *Molecular Cancer*, 2011, 10: 3.
- [20] KHONG H, OVERWIJK W W. Adjuvants for peptide-based cancer vaccines[J]. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 2016, 4: 56.
- [21] KARYAMPUDI L, GHOSH S K. Mycobacterial HSP70 as an adjuvant in the design of an idiotypic vaccine against a murine lymphoma[J]. *Cellular Immunology*, 2008, 254(1): 74-80.
- [22] PALMER D H, MIDGLEY R S, MIRZA N, *et al.* A phase II study of adoptive immunotherapy using dendritic cells pulsed with tumor lysate in patients with hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology (Baltimore, Md)*, 2009, 49(1): 124-132.
- [23] GHAFARI-NAZARI H, TAVAKKOL-AFSHARI J, JAAFARI M R, *et al.* Improving multi-epitope long peptide vaccine potency by using a strategy that enhances CD4⁺ T help in BALB/c mice[J]. *PloS One*, 2015, 10(11): e0142563.
- [24] WATANABE M, NISHIKAWAJI Y, KAWAKAMI H, *et al.* Adenovirus biology, recombinant adenovirus, and adenovirus usage in gene therapy[J]. *Viruses*, 2021, 13(12): 2502.
- [25] SYIAM A, NAWAZ A, IJAZ A, *et al.* Adenovirus vector

- system: Construction, history and therapeutic applications[J]. *BioTechniques*, 2022, 73(6): 297-305.
- [26] WANG X Y, CHEN H S, LUO S, *et al.* Comparisons for detecting NY-ESO-1 mRNA expression levels in hepatocellular carcinoma tissues[J]. *Oncology Reports*, 2009, 21(3): 713-719.
- [27] THOMAS R, AL-KHADAIRI G, ROELANDS J, *et al.* NY-ESO-1 based immunotherapy of cancer: Current perspectives[J]. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9: 947.
- [28] JÄGER E, CHEN Y T, DRIJFHOUT J W, *et al.* Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1: Definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes[J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 1998, 187(2): 265-270.
- [29] SAFFROY R, PHAM P, REFFAS M, *et al.* New perspectives and strategy research biomarkers for hepatocellular carcinoma[J]. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2007, 45(9): 1169-1179.

Immunotherapy for Hepatocellular Carcinoma Based on AFP Antigen

ZHANG Jie¹, TANG Dingyue¹, WANG Chengye², GAO Yawen², XU Wenqing², LIU Siya², XIAO Xiao², WU Xia²
(1. School of Bioengineering; 2. School of Pharmacy, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: Alpha-fetoprotein (AFP) is expressed in approximately 70% to 80% of hepatocellular carcinoma (HCC) patients, serving as a target for immunotherapy. However, the clinical trial results of most AFP-based tumor vaccines have been unsatisfactory, so there is an urgent need to develop a more effective therapeutic tumor vaccine based on AFP antigen. This paper constructed an immunotherapy vector, namely Ad-hAFPm, using a replication-defective adenovirus as the vector. This vector aimed to achieve specific targeting of the AFP antigen by expressing a fusion protein of AFP and heat shock protein 70 (HSP70), along with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). Both HSP70 and GM-CSF served as adjuvants to enhance the immunogenicity of tumor antigens. The therapeutic efficacy of the Ad-hAFPm vector was evaluated in xenograft models of two human AFP-overexpressing cell lines, with a non-targeted vector, Ad-hNYm, employed as a control. The results demonstrated significant tumor suppression in the Ad-hAFPm treatment group across both xenograft models. Specifically, there was a notable reduction in tumor growth rate, a decrease in tumor volume at the experimental endpoint, and a decline in serum hAFP protein secretion. These observations indicated the specific cytotoxic effects of Ad-hAFPm virus against AFP-positive tumor cells. Furthermore, enhanced infiltration of immune cells, particularly CD8⁺ T cells, was observed in the tumor tissues of the Ad-hAFPm group, suggesting that Ad-hAFPm virus could elicit an immune response against tumor cells.

Key words: hepatocellular carcinoma; AFP; immunotherapy; adenovirus; therapeutic tumor vaccine

(责任编辑: 王晓丽)