

卡介苗 *HSP70* 基因转染 HL-60 细胞瘤苗制备及抗瘤机制的研究

李晓玲¹ 刘春雷² 孙立荣³

1. 临沂市人民医院儿内三科(山东临沂 276000); 2. 临沂市人民医院网络与数据中心
(山东临沂 276000); 3. 青岛大学医学院附属医院小儿血液科(山东青岛 266003)

摘要: **目的** 构建卡介苗(BCG)热休克蛋白70(HSP70)的真核表达载体,通过基因转染表达HL-60细胞表面,研究其抗瘤作用和机制。**方法** 利用多聚酶链反应(PCR)方法扩增HSP70基因,与真核表达载体pDisplay连接,构建重组载体pDisplay-HSP70,并利用脂质体2000将其转染HL-60细胞。HL-60细胞分为未转染的HL60-wt组、转染空载体pDisplay的HL60-pDisplay组、转染重组载体pDisplay-HSP70的HL60-HSP70组,分别与外周血T淋巴细胞培养72h,羧基荧光素二醋酸琥珀酰亚胺酯(CFSE)标记和流式细胞术测定淋巴细胞增殖指数,ELISA法检测IFN- γ 水平;各组HL-60细胞与T淋巴细胞混合培养6d后获细胞毒性T淋巴细胞(CTL)效应细胞,加入HL-60靶细胞以不同效靶比共培养12h,LDH释放改良法检测CTL细胞杀伤活性。**结果** 扩增获得的HSP70基因大小与理论值一致,重组载体pDisplay-HSP70构建正确。HSP70表达在转染后的HL-60细胞表面。转染后的HL-60细胞,即HL60-HSP70组能明显促进异体T细胞扩增,该组CFSE阳性率、IFN- γ 含量、CTL杀伤率均高于HL60-wt和HL60-pDisplay组,差异均有统计学意义($P<0.05$);后两组间差异则无统计学意义($P>0.05$);随效靶比增大,HL60-HSP70组CTL细胞杀伤活性逐渐增强,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 成功构建真核表达载体pDisplay-HSP70,并制备膜表面表达BCG HSP70的HL-60细胞瘤苗,HSP70基因转染后能明显增强HL-60细胞的免疫原性。

关键词: 卡介苗; 热休克蛋白70; 基因转染; HL-60; 肿瘤疫苗

Preparation of HL-60 cell vaccine expressing BCG-HSP70 and its anti-leukemia effect LI Xiaoling¹, LIU Chunlei², SUN Lirong³ (1. Department of the Third Pediatrics, The Linyi People's Hospital, Linyi 276000, Shandong, China; 2. Department of The Network and Data Center, The Linyi People's Hospital, Linyi 276000, Shandong, China; 3. Department of Pediatric Hematology, The Affiliated Hospital of Medical College, Qingdao University; Qingdao 266003, Shandong, China)

Abstract: **Objectives** To prepare the HL-60 cell vaccine expressing heat shock protein 70 (HSP70) of Bacille calmette-Guérin (BCG), so as to study its anti-tumor effect and mechanism. **Methods** The whole BCG HSP70 gene was amplified from BCG genome by polymerase chain reaction (PCR) and sub-cloned into the polyclone endonuclease sites in pDisplay. The recombinant vector of pDisplay-HSP70 was verified by sequencing. Then the HL-60 cell vaccine expressing the protein onto the cell surface was prepared by lipofectamine transfection. To detect the immunogenicity of HL-60 cells expressing HSP70, the test groups were divided into three subgroups, HL60-wt, HL60-pDisplay, and HL60-HSP70 respectively. Each group was cultured with peripheral blood T cells for 72 h, then the proliferation indices of T cells were assayed by CFSE-staining method, and IFN- γ were tested by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The HL-60 cells of different groups were cultured with peripheral blood T cells for 6d. The wild-type HL-60 cells were added and co-cultured for another 12h. Cytotoxicity assay was measured by LDH release. **Results** (1) The fragment of BCG HSP70 was consistent with the theoretical value. DNA sequencing showed that the recombinant vector of pDisplay-HSP70 was correctly constructed. (2) BCG HSP70 expressed onto the HL-60 cells surface. (3) Detection of the immunogenicity: ① The most significant T cell proliferation was observed in the group of HSP70-transfected HL-60 cells ($P<0.05$). There was no difference between the HL60-wt group and HL60-pDisplay group ($P>0.05$). ② The contents of IFN- γ of the HSP70-HL60 group was the highest. ③ The inhibiting activity of CTLs on HL-60 cells in the group of HSP70-transfected HL-60 cells was more significant than that of wide-type and pDisplay--transfected HL-60 cells. And with the increase of the E:T ratio, the inhibiting activity of CTLs in the HSP70-HL60 group was rising. **Conclusions** The recombinant eukaryotic expression vector (pDisplay-HSP70) of BCG HSP70 was successfully constructed. And the HL-60 cell vaccine expressing BCG HSP70 onto its surface was successfully prepared. The results showed that gene transfection of BCG HSP70 could significantly enhance the immunogenicity of HL-60 cells.

Key words: BCG; heat shock protein 70; gene transfection; HL-60; cancer vaccine

儿童白血病是可治愈性疾病,联合化疗可使急性白血病患者长期缓解率达70%~80%^[1],但仍有大约30%以上的患儿死于白血病复发^[2]。微小残留病(minimal residual disease, MRD)是复发的主要根源。单纯化疗不能清除MRD,需靠机体免疫功能^[3]。因白血病细胞特异性抗原的免疫原性差,机体对其肿瘤细胞缺乏特异性免疫应答。同时由于个体差异的存在,要实现针对所有类型急性白血病的特异性免疫治疗,其最佳途径是采用基因修饰的细胞疫苗。本课题组以往研究发现,卡介苗(Bacille Calmette-Guérin, BCG)及灭活BCG均能明显改善急性白血病患儿的免疫功能^[4]。然而,严重的不良反应阻碍了BCG的临床应用;而且BCG在传代和减毒过程中因发生菌株变异而导致免疫效果不稳定。BCG热休克蛋白70(BCG heat shock protein 70, BCG HSP70)是BCG的主要抗原成分,免疫原性强,具有免疫优势抗原特性,可以作为一种佐剂,强烈刺激免疫系统针对肿瘤抗原的免疫反应,而不需要其他的免疫佐剂^[5,6]。目前国内外对于BCG HSP70抗肿瘤方面的研究主要包括BCG HSP70蛋白诱导的树突状细胞体内抗癌作用的研究,且主要作用于实体瘤(黑色素瘤、肝癌、肝母细胞瘤、肠癌及胶质细胞瘤等)的研究^[7-11]。对于白血病方面的作用尚无相关研究。为此,本研究拟通过构建膜表达BCG HSP70的真核表达载体,并修饰建立BCG HSP70表达于细胞膜表面的急性早幼粒细胞株(HL-60)的细胞瘤苗,研究其抗癌作用及机制,进一步探讨BCG HSP70能否增强转染后白血病细胞的免疫原性。

1 材料和方法

1.1 细胞来源

1.1.1 HL-60细胞株 HL-60细胞株购自中国科学院上海生命科学研究院。以含10%胎牛血清(FCS)、100 U/ml青霉素和100 μg/ml链霉素的IMDM培养液于37℃、5%CO₂、饱和湿度培养箱中孵育,每2~3 d半量换液。

1.1.2 T淋巴细胞 无菌采集急性早幼粒细胞白血病患者外周血5 ml,肝素抗凝后用淋巴细胞分离液(Ficoll-paque)分离获得单个核细胞,37℃、5% CO₂、饱和湿度培养箱中贴壁3~4 h,收集悬浮细胞,以含10% FCS、重组人白介素-2(rhIL-2, 20 ng/ml, Invitrogen公司)的RPMI-1640培养液于37℃、5% CO₂、饱和湿度培养箱中培养,第7天收获全部悬浮细胞,尼龙膜分离得到T淋巴细胞。

1.2 方法

1.2.1 BCG HSP70基因重组载体构建 根据 Gene-

Bank中结核杆菌HSP70基因序列(NC_000962)设计合成引物,其中分别在P1及P2的5'末端分别引入Bgl II和Sma I酶切位点(用下划线表示),上游引物P1:5'-GAAGATCTATGGCTCGTGCGGTCGGGAT-3',下游引物P2:5'-TCCCCCGGGTGATTTCCGTCCGTCACCTTG-3',进行PCR扩增。纯化后的聚合酶链反应(PCR)产物经纯化和限制性内切酶Bgl II、Sma I酶切后与经同样处理的真核表达载体pDisplay(Invitrogen公司)建立进行连接,转化大肠杆菌感受态细胞(*E. coli* Competent Cells)DH5a(TaKaRa公司)中,抗生素筛选阳性重组克隆行酶切及PCR鉴定。核苷酸序列测定证实其准确性,并命名为pDisplay-HSP70。最终进行扩大培养及无内毒素重组质粒DNA的大量提取。

1.2.2 脂质体转染和瘤苗表面修饰鉴定 按照说明书,利用脂质体(lipofectamine)2000(Invitrogen公司)将重组载体pDisplay-HSP70转染到HL-60细胞表面。收集转染后的HL-60细胞,加入一抗鼠抗人热休克蛋白70抗体(HSP-70)(Cambridge Bioscience公司),4℃孵育过夜,PBS洗涤后,冷丙酮固定5~10 min;PBS洗涤后加入二抗羊抗鼠IgG/异硫氰酸荧光素(FITC)(Cambridge Bioscience公司),4℃孵育1 h;PBS缓冲液离心洗涤后,加入DAPI染色液室温作用20 min,PBS离心洗涤,取1滴滴于载玻片,盖玻片轻盖后于共聚焦显微镜下观察。

1.2.3 转染后HL-60细胞免疫原性检测 将HL-60细胞分为未转染的HL-60细胞(HL60-wt)组、转染空载体pDisplay的HL-60细胞(HL60-pDisplay)组、转染重组载体pDisplay-HSP70的HL-60细胞(HL60-HSP70)组。并进行下述检测:①淋巴细胞增殖能力测定。将10⁶/ml淋巴细胞与10⁵/ml各组HL-60细胞混合培养于96孔板,37℃、5%CO₂、饱和湿度培养箱中培养72 h后,收集细胞加入羧基荧光素二醋酸琥珀酰亚胺酯(CFSE)进行染色,37℃避光孵育30 min,5倍体积的冷培养基终止反应,冰上孵育5 min后,离心沉淀细胞,流式488 nm激发光检测。②细胞因子干扰素-γ(IFN-γ)水平检测。混合淋巴细胞培养72 h后,ELISA法测定培养上清中IFN-γ的含量(试剂盒购自Jingmei Biotech公司),测定完成后绘制相应的标准曲线。③细胞毒性T淋巴细胞(CTL)杀伤活性检测。将10⁶/ml淋巴细胞与10⁵/ml各组HL-60细胞混合培养于96孔板中,加入rhIL-2(20 ng/ml)于37℃、5% CO₂、饱和湿度培养箱中培养6d,获得细胞毒T淋巴细胞,作为效应细胞。调整对数生长期野生型HL-60细胞浓度为10⁵/ml作为靶细胞;按照效应细胞与靶细胞数目比分别为10:1、20:1、40:1、80:1的比例加入效应细胞,混合培

养12h后,离心收集细胞上清液,按照乳酸脱氢酶(LDH)细胞毒性检测试剂盒(Genmed Scientifics公司)说明进行LDH含量的检测,酶标仪上于波长490 nm处测定吸光度(A)。杀伤活性=(实验组A-靶细胞自然释放组A-效应细胞自然释放组A)/(靶细胞最大释放组A-靶细胞自然释放组A)×100%。

1.3 统计学分析

应用SPSS17.0统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,正态分布资料多组间均数比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD-*t*检验;非正态分布资料采用秩和检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BCG HSP70基因重组载体构建

如图1所示,将PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳,可见约1 880 bp的片段,大小与GeneBank公布的结核杆菌HSP70基因一致。如图2所示,重组质粒经限制性内切酶Bgl II和Sma I分别进行双酶切,1%琼脂糖凝胶电泳结果显示:靠近1 880 bp和5 000 bp稍上端处出现片段(泳道5),与目的片段HSP70(1 880 bp)和载体pDisplay(5 300 bp)的理论值大致相等(泳道4和泳道3);以重组质粒为模板进行PCR扩增鉴定,可获得大小约1 880 bp的片段(泳道6),证明HSP70基因已经连接到表达载体pDisplay上。重组质粒提取后进行测序,结果证实插入片段HSP70序列与理论值完全一致,并命名为pDisplay-HSP70。

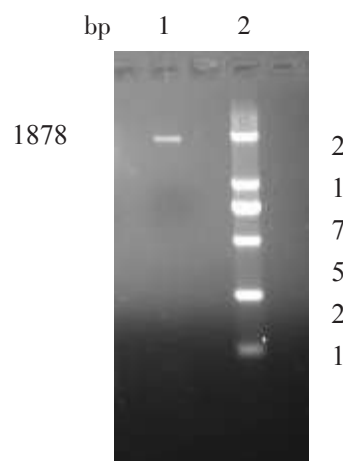
2.2 膜表面表达BCG HSP70的HL-60细胞瘤苗制备

共聚焦显微镜下观察,转染后的HL-60细胞核呈蓝色,细胞表面呈黄绿色荧光,提示BCG HSP70成功表达在HL-60细胞膜表面。见图3。

2.3 转染后的HL-60细胞免疫原性检测

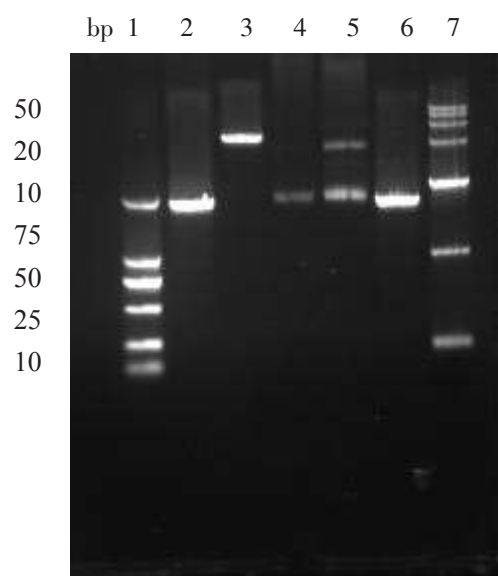
异体淋巴细胞增殖测定显示:CFSE阳性率分别为(17.42±0.41)、(17.49±0.67)和(30.58±1.68),三组间差异有统计学意义($F=15.84, P=0.001$)。经两两比较发现,HL60-HSP70组CFSE阳性率分别高于HL60-wt组和HL60-pDisplay组,差异均有统计学意义(P 均 < 0.05),提示HL60-HSP70组明显促进T细胞扩增;而HL60-pDisplay组与HL60-wt组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见表1。

CTL细胞杀伤活性检测如表1所示,在不同效靶比(分别为10:1、20:1、40:1、80:1)情况下,HL60-wt组、HL60-pDisplay组和HL60-HSP70组三组的CTL细胞杀伤活性的差异均有统计学意义($H=5.82, 5.97, 5.89, 6.10, P$ 均 < 0.05),且均以HL60-HSP70组的CTL细胞杀伤活性为最高。



泳道1. HSP70片段;泳道2. DNA标记(DL2000)

图1 HSP70扩增片段的琼脂糖凝胶电泳



泳道1. DNA标记(DL2000);泳道2. HSP70片段;泳道3. Bgl II和Sma I双酶切后的pDisplay载体;泳道4. Bgl II和Sma I双酶切后的HSP70片段;泳道5. Bgl II和Sma I双酶切后的重组载体pDisplay-HSP70;泳道6. PCR扩增产物(pDisplay-HSP70为模板);泳道7. DNA标记(DL15000)

图2 重组载体pDisplay-HSP70鉴定

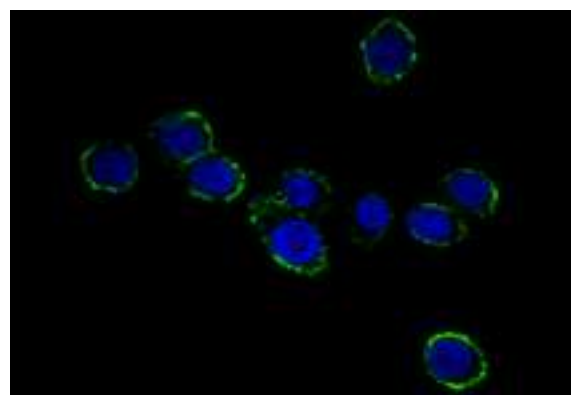


图3 瘤苗表面修饰鉴定

表1 异体淋巴细胞增殖及CFSE IFN-γ分泌水平 (x̄±s)

组别	CFSE(+) (%)	IFN-γ (pg/ml)
HL60-wt组	17.42±0.41	100.23±3.55
HL60-pDisplay组	17.49±0.67	102.68±3.23
HL60-HSP70组	30.58±1.68	146.01±2.98
F值	15.48	56.10
P	0.001	0.000

当效靶比从10:1递增至80:1,HL60-wt组、HL60-pDisplay组和HL60-HSP70组的CTL细胞杀伤活性在各效靶比之间的差异均有统计学意义($H=7.50\sim 7.98$, P 均 <0.05),且CTL细胞杀伤活性均呈逐渐增强趋势。见表2。

HL60-wt组、HL60-pDisplay组和HL60-HSP70组的细胞因子IFN-γ水平分别为(100.23±3.55)pg/ml、(102.68±3.23)pg/ml和(146.01±2.98)pg/ml,三组差异有统计学意义($F=56.10$, $P=0.000$)。经两两比较发现,HL60-HSP70组的IFN-γ水平明显高于HL60-wt组和HL60-pDisplay组,差异均有统计学意义(P 均 <0.05);HL60-pDisplay组与HL60-wt组间的差异无统计学意义($P>0.05$)。见表1。

3 讨论

免疫疗法是治疗儿童急性白血病最有希望的一条治愈途径,是放化疗的有力补充,尤其在清除MRD、预防白血病复发方面具有重要意义。另外,免疫疗法还有非特异性刺激骨髓的作用,通过促进正常干细胞的增生,从而使机体能耐较大剂量的化疗且不易发生骨髓衰竭^[12]。

由于白血病细胞缺乏激发机体免疫应答所必需的成分,宿主T细胞不能有效识别和杀伤白血病细胞,从而发生白血病细胞的免疫逃逸。同时,由于机体免疫功能异常,削弱了对白血病细胞的免疫监视功能,进而免疫清除能力下降,最终发生白血病细胞恶性克隆性地无节制增殖^[13,14]。因此,如何更好激发机体抗肿瘤免疫,提高机体免疫功能成为研究的热点。

BCG HSP70是BCG的主要抗原成分,免疫原性强,具有免疫优势抗原特性,可诱导和增强机体细胞免疫和体液免疫的发生^[15]。研究表明,HSP70家族蛋白

能增强肿瘤细胞对肿瘤抗原的加工与呈递,上调主要组织相容性复合体(MHC)-I分子水平,直接激活肿瘤特异性的T细胞反应;而且HSP70本身具有很强的免疫原性,可作为一种佐剂,而不需要其他免疫佐剂;再者,HSP在全细胞瘤苗中使用具有独特优越性,即无需鉴定和分离肿瘤抗原,且不受肿瘤抗原调变的影响,以及打破了肿瘤的免疫耐受和避免免疫逃逸问题^[16-18]。

从经典的免疫学角度分析,免疫杀伤的靶细胞是肿瘤细胞。由于其具有各种可能的肿瘤抗原,因此采用肿瘤细胞作为疫苗是最佳选择^[19]。同时,要从根本上解决白血病细胞本身免疫原性差,不能诱发生抗自身肿瘤特异性细胞免疫反应的问题;以及儿童白血病患者之间存在个体差异性问题,要实现针对所有类型急性白血病的个体化、特异性免疫治疗的最佳途径,是采用基因修饰的细胞疫苗。因此,本研究将BCG HSP70基因与具有多克隆酶切位点的上游有小鼠κ链信号肽序列,下游有血小板来源的生长因子受体(PDGFR)跨膜序列特点的哺乳动物表面展示系统pDisplay载体连接,成功构建了重组载体pDisplay-HSP70,并制备了膜表面表达BCG HSP70的HL-60细胞瘤苗。

白血病细胞免疫原性的强弱主要通过测定淋巴细胞增殖能力、分泌细胞因子的功能以及CTL的杀伤活性来衡量。目前国内多采用MTT法及放射性同位素方法检测混合淋巴细胞培养(MLTC)后淋巴细胞的增殖情况,但MTT方法粗糙易影响统计学结果,放射性同位素方法存在不安全隐患^[20,21]。本研究采用较为先进的CFSE荧光染料结合流式细胞术方法,避免了上述两种方法的负性后果。结果显示BCG HSP70基因转染后的HL-60细胞能明显增强淋巴细胞增殖反应。

IFN-γ促进Th0细胞分化成Th1,并能促进CTL细胞的成熟及活性^[22]。本研究结果显示BCG HSP70基因转染后的HL-60细胞能明显提高IFN-γ的分泌水平。

另外,目前国内外研究多采用LDH释放试验检测NK细胞和(或)淋巴细胞的杀伤活性^[23,24]。本研究采用此方法测定CTL细胞的杀伤活性,结果显示BCG HSP70基因转染后HL-60细胞的CTL杀伤率明显高于

表2 细胞杀伤活性检测

(x̄±s, %)

组别	效靶比				H值	P
	A (10:1)	B (20:1)	C (40:1)	D (80:1)		
HL60-wt组	4.75±3.98	7.49±5.11	14.52±11.38	37.36±15.76	7.50	0.043
HL60-pDisplay组	4.59±4.37	7.43±6.46	15.22±14.68	38.25±19.24	7.66	0.037
HL60-HSP70组	14.11±7.48	37.99±13.11	58.73±21.11	76.34±22.94	7.98	0.011
H值	5.82	5.97	5.89	6.10		
P	0.041	0.037	0.039	0.036		

野生型 HL-60 组和空载体 pDisplay 转染的 HL-60, 提示 BCG *HSP70* 的基因转染能明显增强同种异体 CTL 细胞对白血病细胞的杀伤活性。

基于以上体外实验, 本研究成功构建 BCG *HSP70* 的真核表达载体 pDisplay-*HSP70*, 并将 BCG *HSP70* 成功转染到 HL-60 细胞膜表面, 完成膜表面表达 BCG *HSP70* 的 HL-60 细胞瘤苗的制备; 同时, BCG *HSP70* 基因转染后能明显增强 HL-60 细胞的免疫原性。采用 BCG *HSP70* 基因修饰的细胞疫苗在实现针对所有类型急性白血病的个体化、特异性免疫治疗方面具有广泛的应用前景。

参考文献:

- [1] Pui CH, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukemia [J]. *Lancet*, 2008, 371(9617): 1030-1043.
- [2] Pui CH, Carroll WL, Meshinchi S, *et al.* Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemia; an update [J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(5): 551-565.
- [3] Stow P, Key L, Chen X, *et al.* Clinical significance of low levels of minimal residual disease at the end of remission induction therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia [J]. *Blood*, 2010, 115(23): 4657-4663.
- [4] Yang J, Sun LR, Pang XY, *et al.* Effect of *Bacillus Calmette-Guerin* on the expansion of dendritic cells from peripheral blood of pediatric patients with leukemia in vitro [J]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 2010, 18(5): 1240-1243.
- [5] Peng ML, Chen M, Ling NX, *et al.* Novel vaccines for the treatment of chronic HBV infection based on mycobacterial heat shock protein 70 [J]. *Vaccine*, 2006, 24(7): 887-896.
- [6] Wei MQ, Menoesha A, Good D, *et al.* Bacterial targeted tumor therapy-drawn of new era [J]. *Cancer Lett*, 2008, 259(1): 16-27.
- [7] Ye J, Chen GS, Song HP, *et al.* Heat shock protein 70/MAGE-1 tumor vaccine can enhance the potency of MAGE-1-specific cellular immune responses in vivo [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2004, 53(9): 825-834.
- [8] Zhang Y, Li ZJ, Ma ZH, *et al.* Enhancement of DNA vaccine potency by linkage of antigen gene to an *HSP70* gene [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(4): 1035-1042.
- [9] Onishi H, Kuroki H, Matsumoto K, *et al.* Monocyte-derived dendritic cells that capture dead tumor cells secrete IL-12 and TNF- α through IL-12/TNF- α /NF- κ B autocrine loop [J]. *J Cancer Immunol Immunother*, 2004, 53(12): 1093-1100.
- [10] Cheng WF, Hung CF, Chai CY, *et al.* Enhancement of Sindbis virus self-replicating RNA vaccine potency by linkage of *Mycobacterium tuberculosis* heat shock protein 70 gene to an antigen gene [J]. *J Immunol*, 2001, 166(10): 6218-6226.
- [11] Hsu KF, Hung CF, Cheng WF, *et al.* Enhancement of suicidal DNA vaccine potency by linking *Mycobacterium tuberculosis* heat shock protein 70 to an antigen [J]. *Gene Ther*, 2001, 8(5): 376-383.
- [12] June CH. Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic [J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(6): 1466-1476.
- [13] Ahmad M, Rees RC, Ali SA. Escape from immunotherapy possible mechanisms that influence tumor regression/progression [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2004, 53(10): 844-854.
- [14] Rouas-Freis N, Moreau P, Menier C, *et al.* Expression of tolerogenic HLA-G molecules in cancer prevents antitumor response [J]. *Semin Cancer Biol*, 2007, 17(6): 413-421.
- [15] Peng ML, Chen M, Ling N, *et al.* Novel vaccines for the treatment of chronic HBV infection based on mycobacterial heat shock protein [J]. *Vaccine*, 2006, 24(7): 887-896.
- [16] Mizukami S, Kajiwarra C, Ishikawa H, *et al.* Both CD4⁺ and CD8⁺ T cell epitopes fused to heat shock cognate protein 70 (hsc70) can function to eradicate tumors [J]. *Cancer Sci*, 2008, 99(5): 1008-1015.
- [17] Murshid A, Gong J, Calderwood SK. Heat-shock proteins in cancer vaccines; agents of antigen cross-presentation [J]. *Expert Rev Vaccines*, 2008, 7(7): 1019-1030.
- [18] Yamaoka A, Guan X, Takemoto S. Development of a novel Hsp70-based DNA vaccine as a multifunction antigen delivery system [J]. *J Control Release*, 2010, 142(3): 411-415.
- [19] Hockertz S. Present and future of cancer vaccines [J]. *Toxicology*, 2005, 214(1-2): 151-161.
- [20] Venken K, Thewissen M, Hellings N, *et al.* A CFSE based assay for measuring CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cell mediated suppression of auto-antigen specific and polyclonal T cell responses [J]. *J Immunol Methods*, 2007, 322(1-2): 1-11.
- [21] Tsuge I, Okumura A, Kondo Y, *et al.* Allergen-specific T-cell response in patients with phenytoin hypersensitivity simultaneous analysis of proliferation and cytokine production by carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) dilution assay [J]. *Allergol Int*, 2007, 56(2): 149-155.
- [22] Placek K, Coffre M, Maiella S, *et al.* Genetic and epigenetic networks controlling T helper 1 cell differentiation [J]. *Immunology*, 2009, 127(2): 155-162.
- [23] Weidmann E, Brieger J, Jahn B, *et al.* Lactate dehydrogenase release assay; a reliable nonradioactive technique for analysis of cytotoxic lymphocyte-mediated lytic activity against blasts from acute myelocytic leukemia [J]. *Ann Hematol*, 1995, 70(3): 153-158.
- [24] Pirious L, Chilmonczyk S, Genetet N, *et al.* Design of a flow cytometric assay for the determination of natural killer and cytotoxic T-lymphocyte activity in human and in different animal species [J]. *Cytometry*, 2000, 41(4): 289-297.

(收稿日期: 2013-11-01)

(本文编辑: 邹强)