

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.03.09

· 基础研究 ·

CEA mRNA 转染的成熟树突状细胞体外诱导特异性抗肿瘤作用

杨蕾¹, 霍锐², 赵建军³, 杜珍武⁴, 张桂珍⁴ (1. 吉林大学中日联谊医院内镜中心, 吉林 长春 130033; 2. 吉林大学药学院基因工程教研室, 吉林 长春 130021; 3. 吉林大学中日联谊医院呼吸内科, 吉林 长春 130033; 4. 吉林大学中日联谊医院中心实验室, 吉林 长春 130033)

[摘要] 目的: 将体外转录的癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA) mRNA 转染入成熟树突状细胞(dendritic cell, DCs), 观察其体外诱导的特异性抗肿瘤作用。方法: GM-CSF、IL-4、TNF- α 体外诱导成熟 DCs 并用流式鉴定。构建 pcDNA3.1-CEA 载体, 体外转录为 CEA mRNA, 电穿孔法将 CEA mRNA 转染入 DCs。流式细胞术检测转染后 DCs 中 CEA 蛋白的表达; MTT 法检测 DCs 刺激 T 细胞增殖能力; LDH 法检测 DCs 体外诱导的 CTL 的特异性抗肿瘤作用; ELISA 法检测诱导的 CTL 上清中 IFN- γ 的水平。结果: CEA mRNA 转染后 DCs 细胞内 CEA 蛋白显著高于对照组(83.32% vs 3.34%, $P < 0.01$)。CEA mRNA 转染组 DCs 在效靶比为 1:10 时, 刺激 T 细胞增殖作用最强, 明显高于未转染组[(19.11 \pm 1.89)% vs (15.59 \pm 0.70)%], $P < 0.05$ 。CEA mRNA 转染组 DCs 能产生 CEA 特异性的 CTL 效应, 在效靶比为 5:1、10:1、20:1 和 40:1 时杀伤率分别为[(5.42 \pm 0.87)%、(14.09 \pm 1.13)%、(27.16 \pm 0.72)%、(32.49 \pm 0.84)%], $P < 0.01$, 而未转染组和对照靶细胞均无杀伤作用。转染组 DCs 诱导的 CTL 上清中 IFN- γ 分泌量显著高于未转染组[(141.73 \pm 28.61) vs (9.45 \pm 4.63) pg/ml], $P < 0.01$ 。结论: CEA mRNA 转染的成熟 DCs 体外能产生特异性抗肿瘤作用, 为研制 CEA RNA-DCs 疫苗提供了实验依据。

[关键词] 树突状细胞; 癌胚抗原; RNA; 疫苗; 免疫治疗

[中图分类号] R734.54; R735.3

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2011)03-0285-05

Transfection of mature dendritic cells with carcinoembryonic antigen mRNA induces specific anti-tumor effects *in vitro*

YANG Lei¹, HUO Rui², ZHAO Jian-jun³, DU Zhen-wu⁴, ZHANG Gui-zhen⁴ (1. Department of Endoscopy, China-Japan Union Hospital of Jilin University, Changchun 130033, Jilin, China; 2. Department of Gene Engineering, School of Pharmacy, Jilin University, Changchun, 130021, Jilin, China; 3. Department of Respiratory, China-Japan Union Hospital of Jilin University, Changchun 130033, Jilin, China; 4. Central Laboratory, China-Japan Union Hospital, Jilin University, Changchun 130033, Jilin, China)

[Abstract] **Objective:** To transfect transcribed-carcinoembryonic antigen (CEA) mRNA into mature dendritic cells (DCs) *in vitro*, so as to observe the specific anti-tumor effect of DCs. **Methods:** Mature DCs was induced by GM-CSF, IL-4 TNF- α and then identified by FACS. pcDNA3.1-CEA plasmid was constructed and transcribed to CEA mRNA *in vitro*, and CEA mRNA was then transfected into mature DCs by electroporation; CEA protein expression in DCs was examined by FACS, the proliferation of T cells induced by DCs was examined by MTT, the ability of DCs to induce specific anti-tumor responses of CTL was examined by LDH, and the level of IFN- γ in CTL supernatant was determined by ELISA. **Results:** CEA protein in CEA mRNA transfected DCs was significantly increased compared with that in the control group (83.32% vs 3.34%, $P < 0.01$). CEA mRNA transfected DCs showed a stronger ability to induce the proliferation of T cells compared with control DCs when the ratio of effect cell to target cell (E:T) being 1:10 ([19.11 \pm 1.89]% vs [15.59 \pm 0.70]%, $P < 0.05$). CEA mRNA transfected DCs induced specific anti-tumor responses of CTL, the cytotoxic

[基金项目] 吉林省科技厅基金资助课题(No. 20050405-7)。Project supported by Foundation from Science and Technology Bureau of Jilin Province (No. 20050405-7)

[作者简介] 杨蕾(1976-)女, 吉林省长春市人, 博士, 副主任医师, 主要从事消化道肿瘤的临床研究。E-mail: doctoryanglei@hotmail.com

[通信作者] 张桂珍(ZHANG Gui-zhen, corresponding author), E-mail: zhangguizhenjlu@yahoo.com

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20110531.1700.008.html>

rates being (5.42 ± 0.87)% , (14.09 ± 1.13)% , (27.16 ± 0.72)% , and (32.49 ± 0.84)% ($P < 0.01$) when the E:T were 5:1, 10:1, 20:1 and 40:1, and untransfected DCs and control target cells showed no cytotoxic effects. The level of IFN- γ in CTL supernatant induced by CEA mRNA transfected DCs was significantly increased compared with that in the untransfected group ([141.73 ± 28.61] pg/ml vs [9.45 ± 4.63] pg/ml, $P < 0.01$). **Conclusion:** Mature DCs transfected with CEA mRNA can induce specific anti-tumor responses, which provides a theoretical basis for CEA RNA-DCs vaccine.

[**Key words**] dendritic cell; carcinoembryonic antigen; RNA; vaccine; immunotherapy

[Chin J Cancer Biother, 2011, 18(3): 285-289]

癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)是一种重要的肿瘤相关抗原和肿瘤标志物,而树突状细胞(dendritic cells, DCs)是体内功能最强大的专职抗原提呈细胞,各种以 DCs 为基础的肿瘤疫苗的理论依据就是通过 DCs 将负载于其上的肿瘤信息传递给免疫系统而激发抗肿瘤反应^[1-2],而选择合适的肿瘤抗原是制备 DCs 肿瘤疫苗的关键。用 RNA 负载 DCs 是一种制备治疗型疫苗的新型方法,编码肿瘤相关性抗原的 RNA 或包含全部肿瘤信息的 mRNA 转染 DCs,能够诱导抗原特异性或针对多个抗原表位的肿瘤特异性 T 细胞反应。本研究采用基因工程技术构建 CEA mRNA 的体外转录载体并转染成熟 DCs,观察其体外诱导的特异性抗肿瘤作用,为研制 CEA RNA-DCs 疫苗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料

细胞因子 IL-4、GM-CSF、TNF- α 、IL-2 购自 Peprotech 公司, FITC 标记的 CD83、CD80、CD1a 单抗、羊抗兔抗体、兔抗人 CEA 抗体购自 Bioscience 公司。Fermentas 体外转录试剂盒购自 MBI 公司, BIORT 逆转录试剂盒购自天津博日公司, IFN- γ 检测试剂盒购自上海森雄公司。PCR 引物合成、DNA 测序由上海生物工程公司进行。结肠癌 SW480 细胞(CEA 阳性)由中日联谊医院中心实验室提供。

1.2 外周血 DCs 的体外诱导与培养

采用前期本实验室已建立的方法培养并鉴定 DCs^[3]。健康人新鲜血外周血浓缩白细胞用 Ficoll 密度梯度分离法获得外周血单个核细胞,贴壁获得单核细胞,未贴壁细胞作为同种异体 T 细胞冻存备用。用 GM-CSF、IL-4 细胞因子组合培养单核细胞 5 d,将其诱导为未成熟 DCs,5 d 后加入含 TNF- α (10 ng/ml)的 IMDM 继续培养 24 h。流式细胞仪检测细胞表型 CD83、CD80、CD1a,以未加抗体的 DCs 细胞作为空白对照,以未加 TNF- α 刺激的未成熟 DCs 作为阴性对照。

1.3 CEA 基因的克隆及体外转录

取对数生长期 SW480 细胞, TRIzol 法提取总 RNA,根据 Genbank 内 CEA 基因(M29540)核苷酸序列,结合 pcDNA3.1(+)载体酶切位点,设计引物如下:上游引物为 5'-TTCGGAATTCACCATG-GAGTCTCCCTCGGC-3'(下划线部分为 *Eco*R I 酶切位点),下游引物为 5'-GCTCTAGAGAAGAACTA-CACCAGGGCTGC-3'(下划线部分为 *Xba* I 酶切位点)。RT-PCR 扩增 CEA cDNA,并构建体外转录载体 pcDNA3.1-CEA, *Xba* I 限制性内切酶将其线性化,以之为模板进行体外转录为 CEA mRNA,并纯化定量。

1.4 电穿孔法转染 CEA mRNA

取成熟 DCs 加入 2 mm 的电转杯,随后按照 10 μ g CEA mRNA: 2 $\times 10^6$ 个 DCs 的比例,调电压 500 V、1 ms 进行电穿孔。穿孔后置入 4 $^{\circ}$ C 冰箱静置 10 min,移入含 GM-CSF 400 U/ml、IL-4 250 U/ml 的 IMDM 培养基中,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 饱和湿度条件下继续培养 12 h,作为转染组 DCs。未进行电穿孔的 DCs 作为未转染组 DCs。

1.5 流式细胞术检测转染后 DCs 内 CEA 蛋白表达

分别收集 CEA mRNA 转染组 DCs 和未转染组 DCs,各加入抗 CEA 兔抗体(1:50 稀释)作为第一抗体和 FITC 标记的羊抗兔二抗体(1:50 稀释),通过流式细胞术检测 DCs 中 CEA 蛋白的表达。

1.6 MTT 法检测 DCs 刺激后 T 细胞的增殖能力

分别收集 CEA mRNA 转染组 DCs 和未转染组 DCs,加入丝裂霉素 25 mg/L 作用后,作为刺激细胞,分别以 4 $\times 10^4$ /ml、2 $\times 10^4$ /ml、1 $\times 10^4$ /ml、4 $\times 10^3$ /ml 种于 96 孔板,每个密度组设 3 个复孔。复苏同种异体淋巴细胞,并调细胞密度 2 $\times 10^5$ /ml,作为效应细胞,加入已含有不同密度的刺激细胞的各孔,每孔 100 μ l(即刺激细胞与效应细胞比例为 1:5、1:10、1:20、1:50),为实验组。另设只单独加入效应细胞孔和刺激细胞孔。在检测前 4 h 加入制备好的 MTT 溶液 20 μ l/孔,孵育 4 h 后测定各孔 *D* 值。T

细胞增殖率(%) = [实验组 D - (效应细胞 D + 刺激细胞 D)] / 效应细胞 D × 100%。

1.7 CEA mRNA 负载 DCs 后体外诱导 CTL 及特异性细胞毒的实验

取 CEA mRNA 转染组 DCs, 调细胞密度为 5×10^5 /ml, 同种异体淋巴细胞调细胞密度为 2×10^6 /ml。各取 400 μ l 于 24 孔板共同培养, 并于第 1、3、5 天各加入 IL-2 1 ng/ml, 第 7 天再次加入 CEA mRNA 转染组 DCs, 刺激 5 d, 以诱导细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 作为实验组效应细胞, 未转染组 DCs 按上述方法与同种异体淋巴细胞共同培养作为对照组效应细胞。转染 CEA mRNA DCs 作为实验靶细胞, 转染编码无关蛋白人抵抗素 (human resistin, hR) mRNA 的 DCs 作为对照靶细胞。

按效靶比 40:1、20:1、10:1、5:1 将效应细胞与靶细胞混合并加入 96 孔板, 每组设 3 个复孔, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵育 5 h, 按 LDH 比色法试剂盒说明书操作, 用分光光度计在 510 nm 处检测各孔 D 值。同时设只加入靶细胞的自然释放孔, 只加入靶细胞后再加入 Triton X-100 裂解细胞的最大释放孔。杀伤率(%) = [(实验孔 D - 自然释放孔 D) / (最大释放孔 D - 自然释放孔 D)] × 100%。

1.8 ELISA 法检测细胞上清中的 IFN- γ

收集方法 1.7 中的实验组效应细胞和对照组效应细胞上清各 100 μ l, 加入 96 孔酶标板, 每组设 3 个复孔, 用 IFN- γ ELISA 试剂盒分别检测上清中 IFN- γ 水平。

1.9 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 13.0 统计软件分析, 组间数据比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 体外诱导 DCs 的形态及其表型

成熟 DCs 脱壁悬浮, 体积增大不规则, 有特征性毛刺状突起, 部分细胞聚集成簇。成熟 DCs 组表面 CD1a、CD80、CD83 均呈阳性, 未成熟对照组 DCs 表面 CD1a 呈阳性、CD80 弱阳性、CD83 阴性(图 1)。

2.2 CEA 基因的体外转录

体外转录产物电泳结果显示, pcDNA3.1-CEA 质粒体外转录后, 在 1 200 至 2 000 bp 之间出现大小不等条带, 为转录的不同片段的 CEA mRNA, 在 7 500 bp 左右的条带为 pcDNA3.1-CEA 线性质粒; 对照组 pcDNA3.1 质粒体外转录后, 在 300 bp 附近出现条带, 为转录的对照 RNA, 在 5 400 bp 左右的

条带为 pcDNA3.1 质粒(图 2)。

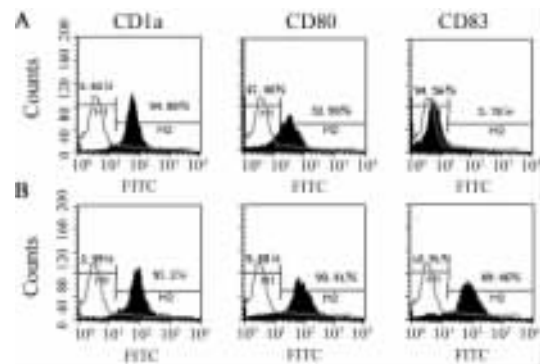


图 1 流式细胞术检测各组 DCs 表面分子表达
Fig. 1 Surface molecule expression on DCs in different groups as assessed by flow cytometry
A: imDCs group; B: mDCs group

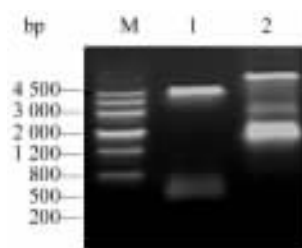


图 2 琼脂糖凝胶电泳检测 pcDNA3.1-CEA 体外转录的 CEA mRNA
Fig. 2 Agarose gel electrophoresis detection of CEA mRNA transcribed from pcDNA3.1-CEA
M: DNA Marker III; 1: Control group; 2: CEA mRNA

2.3 CEA mRNA 转染后 DCs 中 CEA 的表达

流式细胞仪检测结果显示(图 3), 未转染组中只有 3.34% 的 DCs 细胞内 CEA 蛋白表达呈阳性, 而转染组中有 83.32% 的 DCs 细胞 CEA 蛋白表达呈阳性($P < 0.01$)。

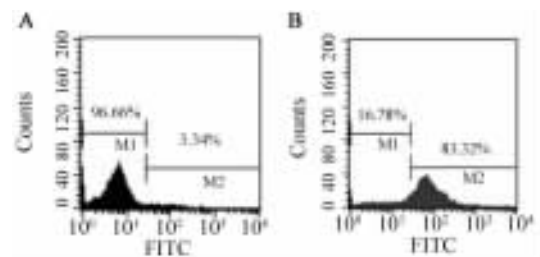


图 3 CEA mRNA 转染后 DCs 高表达 CEA 蛋白
Fig. 3 Overexpression of CEA protein in DCs after CEA mRNA transfection
A: Untransfected DCs; B: CEA mRNA transfected DCs

2.4 CEA mRNA 转染后 DCs 增强 T 细胞增殖能力

MTT 法检测结果(图 4)表明,在刺激细胞与效应细胞比为 1:10 时,转染组 DCs 刺激 T 细胞增殖作用最强,达(19.11 ± 1.89)%,其刺激 T 细胞增殖作用明显高于未转染组 DCs(15.59 ± 0.70)%($P < 0.05$)。在刺激细胞与效应细胞比为 1:20 时,转染组 DCs 刺激 T 细胞增殖率为(16.04 ± 0.97)%,其刺激 T 细胞增殖作用也明显高于未转染组 DCs(12.13 ± 1.03)%($P < 0.05$)。而在刺激细胞与效应细胞比为 1:5 和 1:50 时,CEA mRNA 转染组 DCs 与未转染组 DCs 均能刺激 T 细胞增殖,但两者之间差异无统计学意义($P < 0.05$)。

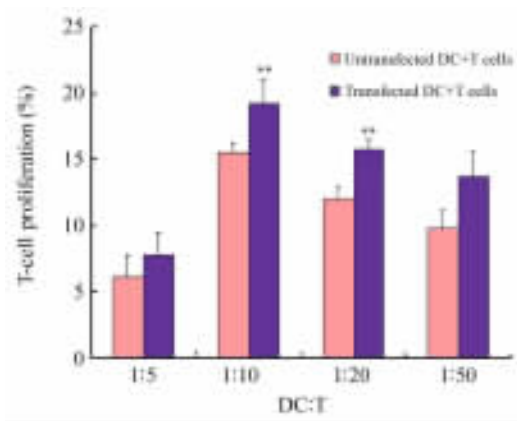


图 4 CEA mRNA 转染组 DCs 刺激 T 细胞增殖能力增强

Fig. 4 CEA mRNA transfection increased the ability of DCs to induce proliferation of T cells

** $P < 0.05$ vs untransfected DCs group

2.5 CEA mRNA 转染 DCs 诱导的特异性细胞毒效应

CEA mRNA 转染组效应 CTL 细胞在任何效靶比时仅对表达 CEA 蛋白的实验靶细胞有杀伤作用,且随着效靶比增高,其对实验靶细胞的杀伤作用也逐步增强,在效靶比为 5:1、10:1、20:1 和 40:1 时,对实验靶细胞的杀伤率分别为(5.42 ± 0.87)%、(14.09 ± 1.13)%、(27.16 ± 0.72)% 和(32.49 ± 0.84)%。而未转染组效应 CTL 细胞对表达 CEA 蛋白的实验靶细胞和表达无关抗原 hR 蛋白的对照靶细胞均无杀伤作用(图 5)。说明 CEA mRNA 转染的 DCs 可诱导特异性细胞毒效应。

2.6 CEA mRNA 转染 DCs 诱导的 CTL 分泌高水平 IFN- γ

ELISA 方法检测结果显示,CEA mRNA 转染组 DCs 与未转染组 DCs 体外诱导的 CTL 上清中均有

IFN- γ 分泌,转染组 IFN- γ 分泌量为(141.73 ± 28.61)pg/ml,显著高于未转染组的 IFN- γ 分泌水平(9.45 ± 4.63)pg/ml($P < 0.01$)。

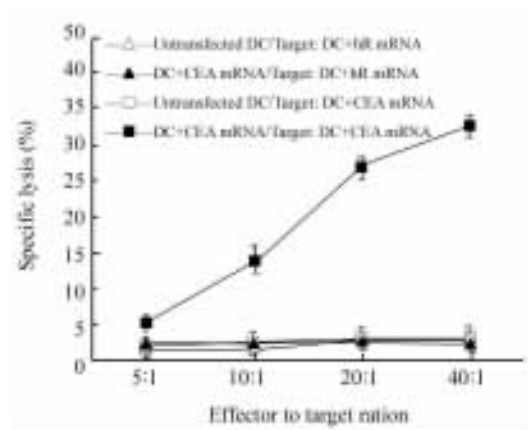


图 5 CEA mRNA 转染 DCs 诱导的特异性细胞毒效应

Fig. 5 CEA-specific cytotoxic effects induced by DCs transfected with CEA mRNA

3 讨论

CEA 是一种肿瘤相关抗原,其基因定位于 19 号染色体长臂(19q13.1 ~ 13.2),编码 180 000 的高度糖基化的蛋白质。正常消化道黏膜仅少量分泌,而 90% 的胃肠道恶性肿瘤和胰腺癌、50% 的乳腺癌及 70% 的非小细胞性肺癌细胞有 CEA 的高表达^[4-5],故 CEA 可作为这些肿瘤检测和治疗的靶目标。但由于 CEA 的免疫原性很弱,一般不能引起机体产生有效的免疫反应,因此机体的免疫系统无法识别肿瘤细胞表面的癌胚抗原,使肿瘤细胞逃避了免疫系统的杀伤^[6-7]。而 DCs 是体内功能最强大的专职抗原提呈细胞,有强大的抗原提呈及 T 细胞激活功能。体外将 CEA 抗原负载于 DCs 后传递给免疫系统,打破宿主对肿瘤的免疫耐受,并激发特异性的抗肿瘤免疫是 CEA-DCs 肿瘤疫苗的理论基础^[8]。既往以 CEA 为靶目标的免疫治疗一般用多肽负载 DCs,这种方法在几种抗肿瘤免疫治疗的体内外实验中也取得了较好的效果^[9-10]。但与 DCs 表面 MHC 结合的多肽链需与患者的 HLA 相匹配,因此需鉴定 HLA 分型,且大部分多肽只能激活 CD8⁺ CTL 反应^[11],而目前 CD4⁺ Th 产生的抗肿瘤反应越来越受到重视^[12-13],因此其应用有一定的局限性。本研究用 CEA mRNA 作为负载对象制备核酸疫苗,以避免以上缺陷,且 RNA 转染只需进入胞质,转染效率较高,同时没有整合入宿主染色体的风险,应用

更安全,并省略了复杂的转录机制^[14]。更重要的是,可以通过基因工程方法而方便并充足地获得,有利于应用于临床。

本研究用基因工程技术构建 CEA mRNA 的体外转录载体 pcDNA3.1-CEA,线性化后以之为模板在体外转录为 CEA mRNA,通过电穿孔法转染入 PBMC 诱导的成熟 DCs 内。结果表明,电穿孔后 12 h,DCs 内即可检测到 CEA 蛋白的表达。可见虽然成熟 DCs 摄取功能较差,但电穿孔法能使足够的 RNA 进入成熟 DCs 内并保证目标蛋白的表达。

DCs 调节免疫反应的机制非常复杂,目前能通过其刺激 T 细胞增殖能力、CTL 的产生及细胞因子分泌情况等几方面来研究其抗肿瘤效应。DCs 刺激 T 细胞的增殖能力是评价其抗原提呈功能的重要指标。T 细胞的增殖活化不仅需要 MHC 分子提呈的抗原信号,还需要由黏附分子、共刺激分子及细胞因子等提供的第二信号,只接受抗原信号的 T 细胞成为无能 T 细胞或发生凋亡,这也是肿瘤免疫逃避的主要原因。本研究结果表明,负载 CEA mRNA 的 DCs 因能同时提供第一信号及第二信号,促进 T 细胞增殖的能力显著增强。

CTL 是细胞介导的免疫反应的效应细胞,对于清除肿瘤细胞必不可少。Matjaz 等^[15]研究认为,对于分析 DCs 的免疫刺激功能,细胞毒实验要优于 T 细胞增殖实验。本研究结果表明,负载 CEA mRNA 的 DCs 诱导的 CTL 效应细胞能特异性杀伤表达 CEA 抗原的实验靶细胞,即能产生 CEA 特异性的 CTL 效应。

IFN- γ 主要由活化的 T 淋巴细胞包括 Th1、CD8⁺ CTL 细胞和 NK 细胞释放,在体内与特异性受体结合参与免疫调节,可介导 T 细胞对 NK 细胞的激活,增强巨噬细胞杀伤病原体的功能,同样也能增加 DCs 表面共刺激分子表达,放大 T 细胞介导的免疫应答,参与抗肿瘤作用。本研究结果表明,转染 CEA mRNA 的 DCs 体外诱导的 CTL 上清中 IFN- γ 分泌量显著增多。

总之,本研究结果表明,体外转录的 CEA mRNA 能够转染入人外周血单核细胞诱导的成熟 DCs 中,并使目标蛋白在 DCs 内表达,且负载 CEA mRNA 的 DCs 能产生特异性的抗肿瘤作用,为构建 CEA RNA-DCs 疫苗并应用于临床提供了实验依据。

[参 考 文 献]

[1] Bodey B, Bodey B Jr, Siegel SE, et al. Failure of cancer vac-

cines: The significant limitations of this approach to immunotherapy [J]. *Anticancer Res*, 2000, 20(4): 2665-2676.

- [2] García-Lora A, Algarra I, Collado A, et al. Tumour immunology, vaccination and escape strategies [J]. *Eur J Immunogenet*, 2003, 30(3): 177-183.
- [3] 杨蕾,霍锐,赵建军,等. 结肠癌细胞总 RNA 电穿孔法体外转染成熟树突状细胞 [J]. *吉林大学学报: 医学版*, 2009, 35(2): 271-275.
- [4] Javorovic M, Pohla H, Frankenberger B, et al. RNA transfer by electroporation into mature dendritic cells leading to reactivation of effector-memory cytotoxic T lymphocytes: A quantitative analysis [J]. *Mol Ther*, 2005, 12(4): 734-743.
- [5] Hörig H, Medina FA, Konkright WA, et al. Strategies for cancer therapy using carcinoembryonic antigen vaccines [J]. *Expert Rev Mol Med*, 2000, 2(1): 1-24.
- [6] Gilboa E. How tumors escape immune destruction and what we can do about it [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 1999, 48(7): 382-385.
- [7] Healy LJ, Collins HL, Thompson SJ. Systemic administration of tolerogenic dendritic cells ameliorates murine inflammatory arthritis [J]. *Open Rheumatol J*, 2008, 2(3): 71-80.
- [8] Joffre O, Nolte MA, Spörri R, et al. Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity [J]. *Immunol Rev*, 2009, 227(1): 234-247.
- [9] Paczesny S, Banchereau J, Wittkowski KM, et al. Expansion of melanoma-specific cytolytic CD8⁺ T cell precursors in patients with metastatic melanoma vaccinated with CD34⁺ progenitor-derived dendritic cells [J]. *J Exp Med*, 2004, 199(1): 1503-1511.
- [10] Brossart P, Wirths S, Stuhler G, et al. Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses *in vivo* after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells [J]. *Blood*, 2000, 96(9): 3102-3108.
- [11] Giermasz AS, Urban JA, Nakamura Y, et al. Type-1 polarized dendritic cells primed for high IL-12 production show enhanced activity as cancer vaccines [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2009, 58(8): 1329-1336.
- [12] Velders MP, Markiewicz MA, Eiben GL, et al. CD4⁺ T cell matters in tumor immunity [J]. *Int Rev Immunol*, 2003, 22(2): 113-140.
- [13] Issa F, Wood KJ. CD4⁺ regulatory T cells in solid organ transplantation [J]. *Curr Opin Organ Transplant*, (2010-09-24) [Epub ahead of print].
- [14] Ponsaerts P, Van Tendeloo VF, Berneman ZN. Cancer immunotherapy using RNA-loaded dendritic cells [J]. *Clin Exp Immunol*, 2003, 134(3): 378-384.
- [15] Jeras M, Bergant M, Repnik U. *in vitro* preparation and functional assessment of human monocyte-derived dendritic cells-potential antigen-specific modulators of *in vivo* immune responses [J]. *Transpl Immunol*, 2005, 14(3): 231-244.

[收稿日期] 2011-03-10

[修回日期] 2011-04-25

[本文编辑] 韩丹