

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.02.011

· 基础研究 ·

IL-21 在肝癌细胞株 H22 细胞中的表达及其活性

王丽娜, 鞠吉雨, 梁淑娟, 牟东珍, 邱大琳, 孙 萍, 苗乃法(潍坊医学院 分子免疫学实验室, 山东 潍坊 261053)

[摘 要] 目的: 构建小鼠 *IL-21* (mIL-21) 真核表达载体 mIL-21-pcDNA3.1, 转染肝癌 H22 细胞, 探讨其生物学活性。方法: RT-PCR 法扩增 *mIL-21* 基因, 构建 *mIL-21* 真核表达载体 mIL-21-pcDNA3.1, 并经 DNA 测序证实。脂质体法介导 mIL-21-pcDNA3.1 转染 H22 细胞, RT-PCR 和 Western blotting 鉴定其表达, MTT 法检测 mIL-21-pcDNA3.1 对 T 细胞增殖和 NK 细胞杀伤活性的影响。结果: DNA 序列分析证实构建的 mIL-21-pcDNA3.1 正确无误, RT-PCR 和 Western blotting 证实转染的 H22 细胞中有 *mIL-21* 的表达。MTT 法显示, 转染 *mIL-21* 的 H22 细胞培养上清刺激 T 细胞增殖的刺激指数 (stimulation index, SI) 为 3.412 ± 0.312 , 联合 ConA 的刺激指数为 4.673 ± 0.450 , 均显著高于转染空质粒组的 1.465 ± 0.103 和未转染组的 1.447 ± 0.245 ($P < 0.01$)。转染 *mIL-21* 的 H22 细胞培养上清 NK 细胞杀伤率为 $(81.66 \pm 4.26)\%$, 显著高于转染空质粒组的 $(34.74 \pm 5.52)\%$ 和未转染对照组的 $(33.61 \pm 1.42)\%$ 。结论: mIL-21-pcDNA3.1 载体在 H22 细胞中的表达可显著增强 T 细胞增殖及 NK 细胞的杀伤功能, 为其在抗肝癌治疗中的应用奠定了基础。

[关键词] 肝肿瘤; *mIL-21* 基因; H22 细胞株; 真核表达

[文献标志码] A [文章编号] 1007-385X(2010)02-0174-05

IL-21 expression in hepatoma cell line H22 and its biological activity

WANG Li-na, JU Ji-yu, LIANG Shu-juan, MU Dong-zhen, DI Da-lin, SUN Ping, MIAO Nai-fa (Laboratory of Molecular Immunology, Weifang Medical College, Weifang 261053, Shandong, China)

[Abstract] **Objective:** To construct a recombinant eukaryotic expression vector mIL-21-pcDNA3.1 and transfect it into hepatoma cell line H22, so as to assess the biological activity of mIL-21. **Methods:** The gene fragment encoding mouse IL-21 was amplified by RT-PCR, and was then cloned into eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1 to form recombinant plasmid mIL-21-pcDNA3.1. The recombinant plasmid is verified by DNA sequencing. mIL-21-pcDNA3.1 was transfected into H22 cells with lipofect reagent, and its expression was detected by RT-PCR and Western blotting analysis. The effects of mIL-21-pcDNA3.1 on proliferation of T cells and cytotoxicity of NK cells were studied. **Results:** The recombinant plasmid mIL-21-pcDNA3.1 was confirmed by DNA sequencing. The expression of mIL-21 in H22 cells was confirmed by RT-PCR and Western blotting analysis. MTT results showed that stimulation index (SI) of T cells stimulated with mIL-2-H22 cell supernatant was 3.412 ± 0.312 , and the SI of ConA combination stimulating group was 4.673 ± 0.450 ; both were significantly higher than those in the mock vector transfected (1.465 ± 0.103) and untransfected groups (1.447 ± 0.245 , $P < 0.01$). The cytotoxicity of NK cells in mIL-21-H22 cell supernatant group was $(81.66 \pm 4.26)\%$, significantly higher than those in the mock vector transfected ($[34.74 \pm 5.52]\%$) and untransfected groups ($[33.61 \pm 1.42]\%$). **Conclusion:** The expression of mIL-21-pcDNA3.1 plasmid in H22 cells can enhance the proliferation of T cells and the cytotoxicity of NK cells, which lays a foundation for its role in the research of anti-hepatoma.

[Key words] live neoplastms; *mIL-21*; H22 cell line; eukaryotic expression

[Chin J Cancer Biother, 2010, 17(2): 174-178]

IL-21 是 2000 年发现的 IL-2 家族中的新成员, 主要由活化的 $CD4^+$ T 细胞分泌^[1], 能有效增强 T 细胞及 NK 细胞的功能^[2-5], 从而使荷瘤动物产生较强的抗肿瘤免疫效应。Moroz 等^[6]研究发现, IL-21 比 IL-2、IL-15 更显著地延长荷瘤小鼠的生存时间, 并且没有 IL-2 的剂量依赖性的毒性作用, 因此 IL-21 的抗

[基金项目] 潍坊市科技局立项计划 (No. 200702038)。Project supported by the Research Foundation of Weifang Science and Technology bureau (No. 200702038)

[作者简介] 王丽娜 (1974 -) 女, 山东省潍坊市人, 讲师, 硕士, 主要从事分子免疫学、肿瘤免疫学方面的研究

[通信作者] 王丽娜 (WANG Li-na, corresponding author), E-mail: xinling200@yahoo.com.cn

肿瘤活性受到越来越多的关注。肝癌是严重威胁人类健康的恶性肿瘤之一,其发病率和病死率都很高。本研究构建小鼠 *IL-21* 的真核表达载体,将其转染小鼠肝癌 H22 细胞,获得 *IL-21* 的稳定表达,并对其生物学活性进行初步鉴定,为进一步开展 *IL-21* 在抗肝癌领域的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

TRIzol 购自大连宝生物有限公司,禽类成髓细胞瘤病毒(avian myeloblastosis virus, AMV)第一链 cDNA 合成试剂盒、Taq DNA 聚合酶、pfu 酶、dNTP、DNA Marker、各种限制性内切酶及 T4 DNA 连接酶、质粒小量抽提试剂盒、MTT、Agarose (西班牙分装)、G418 均购自上海生工公司,质粒中量抽提试剂盒和 lipotap 转染试剂购自碧云天有限公司。DMEM 培养基为 Gibco 公司产品,胎牛血清为杭州四季青产品,均购自北京奇华盛有限公司。真核表达载体 pcDNA3.1(-)及其宿主菌 *E. coil* DH5 α 、小鼠肝癌细胞株 H22 及鼠 T 淋巴瘤细胞株 YAC-1 均由本室常规保存。BALB/c 小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司[实验动物合格证号:SCXK(京)2007-0001]。

1.2 引物设计合成

引物设计用 primer premier 5.0 程序,根据载体 pcDNA3.1 和 *IL-21* 基因序列(GenBank 登录号 NM_021782.2)设计,由上海生工合成。上游引物 P1 为 5'-CCCTCGAGCTGGAGACTCAGTTCTG-3',含 *Xho* I 酶切位点;下游引物 P2 为 5'-CCCAAGCTTCTAG-GAGAG ATGCTGATG-3',含 *Hind* III 酶切位点。下游特异性引物 P3(逆转录用)为 5'-TCAGGAATCT-TCGGTCCCTA-3',无酶切位点。

1.3 RT-PCR 法扩增小鼠 *IL-21* 基因

无菌制备 BALB/c 小鼠脾细胞悬液,常规培养 3 h,将培养上清转移到另一培养瓶,以去除巨噬细胞和中性粒细胞等贴壁细胞,每 1×10^6 个细胞加入 ConA 5 μ g,于 37 $^{\circ}$ C、CO $_2$ 孵箱中培养 48 h。收集活化的淋巴细胞,按 TRIzol 试剂盒说明书抽提总 RNA,RT-PCR 扩增目的基因。逆转录按 AMV 第一链 cDNA 合成试剂盒进行,反应体系为 20 μ l:在冰浴的 EP 管中依次加入总 RNA 6 μ l,下游特异性引物 P3 2 μ l,水 3 μ l。轻轻混匀后离心 3~5 s,反应混合物在 70 $^{\circ}$ C 水浴 5 min 后冰浴 30 s,然后离心 3~5 s。再将 EP 管冰浴,加入 $5 \times$ 反应缓冲液 4 μ l, RNA 酶抑制剂(20 μ g/ μ l)1 μ l、三磷酸脱氧核苷酸

混合溶液(10 mmol/L)2 μ l,轻轻混匀后离心 3~5 s,37 $^{\circ}$ C 水浴 5 min,加入 2 μ l 重组 AMV 逆转录酶(10 μ g/ μ l),反应混合物 37 $^{\circ}$ C 水浴 60 min,再 70 $^{\circ}$ C 加热 10 min 结束反应,置冰上进行后续的实验或冷冻保存。以上述 cDNA 为模板,P1、P2 为上下游引物 PCR 扩增 *IL-21* 基因。反应体系为 50 μ l,cDNA 模板 6 μ l,pfu 酶(5 μ g/ μ l)0.4 μ l,10 \times pfu 反应缓冲液 5 μ l,三磷酸脱氧核苷酸混合溶液(10 mmol/L)2 μ l,P1 4 μ l,P2 4 μ l,双蒸水 28.6 μ l。反应条件:95 预变性 5 min;以 94 $^{\circ}$ C 变性 50 s,53 $^{\circ}$ C 退火 40 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 50 s 为一个循环,共 30 个循环;最后再 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.4 重组质粒 mIL-21-pcDNA3.1 的构建

mIL-21 PCR 产物割胶回收,与载体 pcDNA3.1 分别经 *Xho* I 和 *Hind* III 双酶切,琼脂糖电泳,割胶回收酶切后的 *mIL-21* 目的片段和 pcDNA3.1 大片段,T4 DNA 连接酶 16 $^{\circ}$ C 连接过夜后,转化 DH5a 感受态细菌。菌落 PCR 筛选得到的阳性克隆分别经质粒 PCR、限制性酶谱及测序分析确证。

1.5 mIL-21-pcDNA3.1 转染 H22 细胞

将鉴定确证的 *mIL-21-pcDNA3.1* 重组质粒和 pcDNA3.1 空质粒中量抽提,以脂质体法转染 6 孔板中新鲜小鼠腹腔传代的 H22 细胞,5 h 后去掉转染试剂,更换新鲜培养基培养 48 h 后,加 G418 筛选 2 周,G418 抗性细胞分别命名为 H22-*mIL-21* 和 H22-pcDNA3.1,小鼠腹腔传代。

1.6 RT-PCR 法检测转染细胞中 *mIL-21* 的转录水平

收集 G418 抗性细胞,TRIzol 法提取总 RNA,以 P3 为下游引物逆转录,以 P1、P2 为特异性引物进行 PCR,琼脂糖电泳鉴定 RT-PCR 产物(方法同 1.3)。

1.7 Western blotting 检测转染细胞中 *mIL-21* 蛋白的表达

分别取 H22-*mIL-21*、H22-pcDNA3.1 和 H22 细胞裂解上清 10 μ l,与 10 μ l 的 2 \times SDS 上样缓冲液混合,沸水浴煮沸 5 min,加入 5% 浓缩胶、12% 分离胶的 SDS-PAGE 加样孔中电泳。泳毕,考马斯亮蓝染色 1 h,脱色后观察。同时将相同的另一块 PAGE 胶取下,平衡液中平衡 15 min,电转移至硝酸纤维素膜上,去离子水漂洗膜 5 min 后,置于含 5% 脱脂奶粉的 PBS-T 缓冲液中封闭 3 h。加 1:500 一抗(鸡抗 *mIL-21* Ab)37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,PBS-T 洗膜 5 min \times 3 次;加 1:1 000 二抗(羊抗鸡 HRP 标记)37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,PBS-T 洗膜 5 min \times 3 次。置于含 DAB 和 H $_2$ O $_2$ 的显色液中显色 10 min,拍照分析。

1.8 MTT 比色法检测 *mIL-21* 对淋巴细胞增殖的促

进作用

无菌制备小鼠脾细胞悬液,DMEM 调细胞密度至 1×10^7 /ml 作为淋巴细胞来源。淋巴细胞悬液加入 96 孔培养板,每孔 50 μ l,以 10 mg/L 的 ConA 作为阳性对照和协同因子。实验共分 8 组,每组设 3 个复孔。组 1 为 ConA(50 μ l) + H22-mIL-21 上清(100 μ l)组,组 2 为 ConA(50 μ l) + H22-pcDNA3.1 上清(100 μ l)组,组 3 为 ConA(50 μ l) + H22 上清(100 μ l)组,组 4 为 H22-mIL-21 上清(100 μ l)组,组 5 为 H22-pcDNA3.1 上清(100 μ l)组(另加 DMEM 50 μ l),组 6 为 H22 上清(100 μ l)组(另加 DMEM 50 μ l),组 7 为 ConA 组(加 ConA 50 μ l 和 DMEM 100 μ l),组 8 为 DMEM(150 μ l)组。

上述各组细胞置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵箱中培养 56 h,结束培养前加入 MTT 20 μ l/孔,继续培养 6 h 左右,2 000 \times g 离心 10 min,弃上清。每孔加 100 μ l DMSO,轻微震荡使甲臜颗粒溶解。在酶标仪上波长 560 nm 处测定 D 值。以刺激指数(stimulation index, SI)判断淋巴细胞增殖程度,SI = 实验组 D 值/对照组 D 值。

1.9 MTT 比色法检测 mIL-21 转染对 NK 细胞杀伤活性的增强作用

无菌制备小鼠脾细胞悬液,常规洗涤细胞 2 次,1640 培养液调细胞密度至 2×10^6 /ml 作为效应细胞。取对数生长期的 YAC-1 细胞,1640 调细胞密度至 1×10^5 /ml 作为靶细胞。实验分为 4 组,每组分为效应细胞孔(E)、靶效细胞孔(E + T)、靶细胞孔(T)3 部分,每部分设 3 个复孔。(E)加入效应细胞 50 μ l,(E-T)分别加入效应细胞和靶细胞各 50 μ l,(T)加入靶细胞 50 μ l,效靶比为 20:1。组 1 为 H22-mIL-21 组:每孔再加 100 μ l H22-mIL-21 细胞培养上清;组 2 为 H22-pcDNA3.1 组:每孔再加 100 μ l H22-pcDNA3.1 细胞培养上清;组 3 为 H22 组:每孔再加 100 μ l H22 细胞培养上清;组 4 为 DMEM 组:不加入任何培养上清。每孔总体积为 200 μ l,不足的体积用 DMEM 补足。

上述各组细胞以 1.8 中同样方法处理。以酶标仪测定 490 nm 波长处的光密度值(D),按照公式计算各组 NK 细胞的杀伤活性。NK 细胞杀伤率(%) = $[1 - (D_{E+T} - D_E) / D_T] \times 100\%$; D_E 为效应细胞孔的光密度值, D_{E+T} 为效应细胞加靶细胞孔的光密度值, D_T 为靶细胞孔的光密度值。

1.10 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS11.5 软件对数据进行单因素方差分析比较组间差异。

2 结果

2.1 IL-21 基因的扩增及重组载体 mIL-21-pcDNA3.1 的构建

RT-PCR 法从小鼠脾细胞中扩增出的 mIL-21 基因约 480 bp(图 1),重组载体经限制性酶切分析(图 2)和 DNA 测序证实所获得的 IL-21 基因序列与 Genebank 中报道的序列完全一致。



图 1 mIL-21 基因 RT-PCR 产物琼脂糖电泳
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of RT-PCR product of mIL-21 gene
M: Marker; 2: mIL-21 gene RT-PCR product

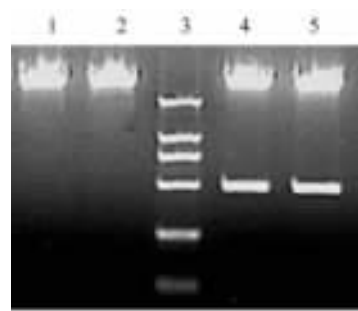


图 2 mIL-21-pcDNA3.1 重组载体的 XhoI 和 HindIII 双酶切鉴定
Fig. 2 Identification of recombinant plasmid mIL-21-pcDNA3.1 by Xho I and Hind III digestion
1: mIL-21-pcDNA3.1; 2: pcDNA3.1; 3: Marker;
4-5: mIL-21-pcDNA3.1 digested by XhoI and Hind III

2.2 H22-mIL-21 细胞中 mIL-21 基因的转录水平

分别从 H22-mIL-21 细胞、H22-pcDNA3.1 细胞和 H22 细胞中扩增 mIL-21 基因,结果显示,只有 H22-mIL-21 细胞扩增出了目的片段,表明 H22-mIL-21 细胞中有 mIL-21 基因的转录(图 3)。

2.3 H22-mIL-21 细胞中 mIL-21 基因的蛋白水平表达

SDS-PAGE 显示,H22-mIL-21 细胞比 H22-pcDNA3.1 和 H22 细胞裂解产物多出一条约 17 000 大小的蛋白质条带,和 mIL-21 蛋白的理论大小一致。

Western blotting 进一步证实该 17 000 大小的蛋白为目的蛋白(图 4)。

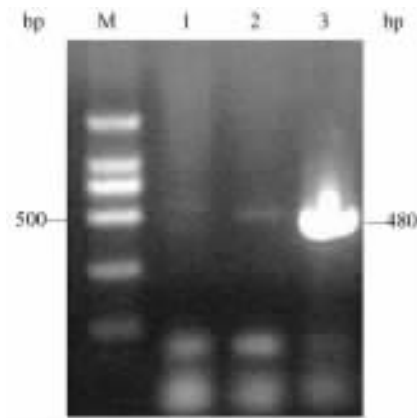


图 3 RT-PCR 鉴定 H22-mIL-21 细胞中 *mIL-21* 的表达
Fig.3 *mIL-21* expression in H22 cells as detected by RT-PCR
M:Marker; 1: H22 cells; 2: H22 cells transfected with pcDNA3.1;
3: H22 cells transfected with *mIL-21*-pcDNA3.1

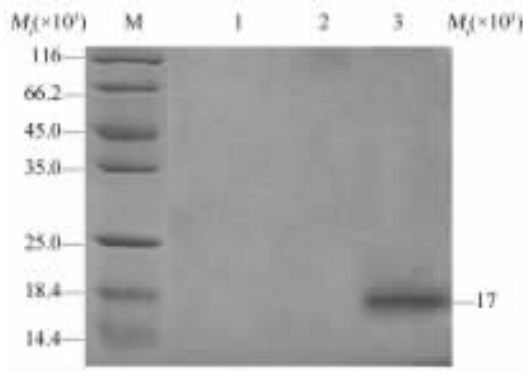


图 4 Western blotting 鉴定 H22-mIL-21 细胞中 *mIL-21* 蛋白的表达
Fig.4 *mIL-21* protein expression in H22-mIL-21 cells as detected by Western blotting
M: Marker; 1: H22 cells; 2: H22-pcDNA3.1 cells;
3: H22-mIL-21 cells

2.4 *mIL-21* 促进淋巴细胞增殖

实验结果(图 5)显示,H22-mIL-21 细胞培养上清刺激 T 细胞增殖的刺激指数为 3.412 ± 0.312 ,联合 ConA 的刺激指数为 4.673 ± 0.450 ,均显著高于转染空质粒组(1.465 ± 0.103)和未转染组($1.447 \pm 0.245, P < 0.01$);H22-pcDNA3.1 及 H22 细胞培养上清和 ConA 的协同作用(SI 分别为 3.178 ± 0.241 和 3.278 ± 0.236)与单独使用 ConA(SI 为 3.146 ± 0.168)无明显区别($P > 0.05$)。因此,H22-mIL-21 细胞分泌上清可明显增强 T 细胞增殖能力,与 ConA 协同作用后效果更显著。

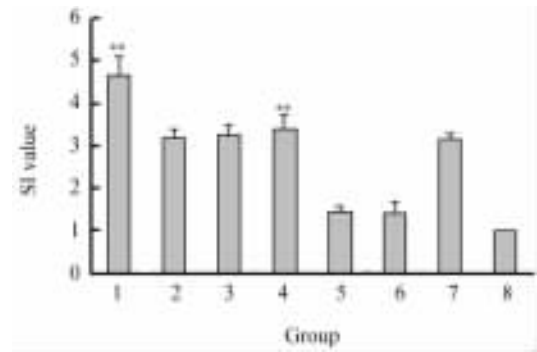


图 5 H22-mIL-21 细胞培养上清促进 T 细胞增殖
Fig.5 H22-mIL-21 cells supernatant enhanced T cells proliferation

1: ConA + H22-mIL-21 cells supernatant; 2: ConA + H22-pcDNA3.1 cells supernatant; 3: ConA + H22 cells supernatant; 4: H22-mIL-21 cells supernatant; 5: H22-pcDNA3.1 cells supernatant; 6: H22 cells supernatant; 7: ConA; 8: DMEM
** $P < 0.01$ vs 5,6,8 group respectively

2.5 *mIL-21* 对 NK 细胞杀伤活性的增强作用

MTT 比色法结果显示,H22-mIL-21 组的 NK 细胞杀伤率为 $(81.66 \pm 4.26)\%$,显著高于 H22-pcDNA3.1 组的 $(34.74 \pm 5.52)\%$ 、H22 组的 $(33.61 \pm 1.42)\%$ 和 DMEM 对照组的 $(32.9 \pm 4.52)\%$ ($P < 0.01$),可见 H22-mIL-21 培养上清可显著增强体外 NK 细胞的杀伤活性($P < 0.01$,图 6)。

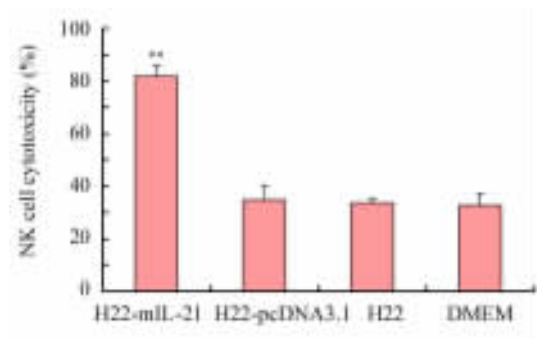


图 6 H22-mIL-21 细胞培养上清增强 NK 细胞杀伤活性
Fig.6 H22-mIL-21 cells supernatant increased cytotoxicity of NK cells

** $P < 0.01$ vs H22-pcDNA3.1 or H22 or DMEM

3 讨论

癌症仍然是目前严重威胁人类健康的疾病之一,传统的手术、放疗和化疗都存在一定的弊端。近年来,肿瘤生物治疗已逐渐被人们所认可,其中细胞

因子治疗备受关注。如应用高剂量的 IL-2 免疫治疗肾细胞癌能显著抑制肿瘤生长^[7]。但是由于 IL-2 具有较强的毒性作用,限制了其在临床的广泛应用。IL-21 与 IL-2 具有相似的生物学功能,但是 IL-21 的毒性低,使其在肿瘤治疗中的研究越来越受到人们的重视。

IL-21 已在黑素瘤、纤维肉瘤和结肠癌等领域取得了良好效果^[8-10],但在肝癌领域的研究甚少,究其原因可能与肝脏特殊免疫状态有关。肝脏是人体免疫细胞数量较多的器官,但发病率却很高,许多物种的同种异型肝移植可存活而不受排斥或排斥很弱,这些现象都提示许多因素参与了肝脏免疫耐受^[11]。有研究^[12]发现,上述情况与 Th1 型效应的 T 细胞失活、而含 Th2 型的 CD4⁺ T 细胞可存活并保留其功能有关。还有研究^[13]表明, NK 细胞能招募 T 细胞并促进 T 细胞免疫应答。IL-21 能有效促进 NK 细胞介导的天然免疫和 Th1 细胞介导的特异性免疫应答,在荷瘤小鼠的实质性肿瘤中显示消退作用^[14-15]。由此推测, IL-21 有望可打破肝脏免疫耐受,使抗肝癌免疫取得更好的效果。

本研究构建了 mIL-21-pcDNA3.1 真核表达载体,并选择具有高致瘤性的肝癌细胞株 H22 细胞作为转染的靶细胞,是考虑到我们后续要用 H22 细胞建立的肿瘤模型来探讨 IL-21 用于肝癌免疫治疗的作用及机制,确保体外实验和体内实验的延续性和一致性;并为以后 mIL-21 基因修饰的肿瘤疫苗研制相关实验打下基础。

实验通过 RT-PCR 和 Western blotting 的方法证实转染 mIL-21-pcDNA3.1 的 H22 细胞中有 IL-21 的表达,淋巴细胞转化实验(MTT 比色法)中加入 H22-mIL-21 细胞培养上清能显著促进淋巴细胞增殖,并且与 T 细胞有丝分裂原 ConA 有协同作用,说明 IL-21 可有效促进 T 淋巴细胞增殖;结果还显示,该细胞培养上清还能在体外有效地增强 NK 细胞的杀伤活性,说明转染 H22 细胞获得的 IL-21 蛋白具有良好的生物学活性,能显著增强 T 淋巴细胞增殖和 NK 细胞杀伤活性,为进一步开展 IL-21 在肝癌治疗中的应用研究奠定了基础。

[参考文献]

[1] Parrish-Novak J, Dillon SR, Nelson A, Hammond A, Sprecher C, Gross JA, *et al.* Interleukin-21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function [J]. *Nature*, 2000, 408(6808): 57-63.

[2] Sivori S, Cantoni C, Parolini S, Marcenaro E, Conte R, Moretta

L, *et al.* IL-21 induces both rapid maturation of human CD34⁺ cell precursors towards NK cells and acquisition of surface killer Ig-like receptors [J]. *Eur J Immunol*, 2003, 33(12): 3439-3447.

- [3] Petersen CC, Diernaes JE, Skovbo A, Hvid M, Deleuran B, Hokland M, *et al.* Interleukin-21 restrains tumor growth and induces a substantial increase in the number of circulating tumor-specific T cells in a murine model of malignant melanoma [J]. *Cytokine*, 2010, 49(1): 80-88.
- [4] Liu Z, Yang L, Cui Y, Wang X, Guo C, Huang Z, *et al.* IL-21 enhances NK cell activation and cytolytic activity and induces Th17 cell differentiation in inflammatory bowel disease [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2009, 15(8): 1133-1144.
- [5] Tagaya Y. Editorial: memory CD8 T cells now join "Club 21" [J]. *J Leukoc Biol*, 2010, 87(1): 13-15.
- [6] Moroz A, Eppolito C, Li Q, Tao J, Clegg CH, Shrikant PA. IL-21 enhances and sustains CD8⁺ T cell responses to achieve durable tumor immunity: comparative evaluation of IL-2, IL-15 and IL-21 [J]. *J Immunol*, 2004, 173(2): 900-909.
- [7] Tamaskar I, Pili R. Update on novel agents in renal cell carcinoma [J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2009, 9(12): 1817-1827.
- [8] Wang G, Tschoi M, Spolski R, Lou Y, Ozaki K, Feng C, *et al.* *In vivo* antitumor activity of interleukin-21 mediated by natural killer cells [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(24): 9016-9022.
- [9] Ugai S, Shimozato O, Kawamura K, Wang YQ, Yamaguchi T, Saisho H, *et al.* Expression of the interleukin-21 gene in murine colon carcinoma cells generates systemic immunity in the inoculated hosts [J]. *Cancer Gene Ther*, 2003, 10(3): 187-192.
- [10] Thompson JA, Curti BD, Redman BG, Bhatia S, Weber JS, Agarwala SS, *et al.* Phase I study of recombinant interleukin-21 in patients with metastatic melanoma and renal cell carcinoma [J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26(12): 2034-2039.
- [11] 袁晓园, 陈隆典. 肝免疫耐受发生的相关因素和机制研究 [J]. *国际免疫学杂志*, 2006, 29(1): 26-30.
- [12] Klugevitz K, Blumenthal-Barby F, Schrage A, Knolle PA, Hamann A, Crispe IN. Immunomodulatory effects of the liver: deletion of activated CD4⁺ effector cells and suppression of IFN-gamma-producing cells after intravenous protein immunization [J]. *J Immunol*, 2002, 169(5): 2407-2413.
- [13] Liu ZX, Govindarajan S, Okamoto S, Dennert G. NK cells cause liver injury and facilitate the induction of T cell-mediated immunity to a viral liver infection [J]. *J Immunol*, 2000, 164(12): 6480-6486.
- [14] Strengell M, Sareneva T, Foster D, Julkunen I, Matikainen S. IL-21 up-regulates the expression of genes associated with innate immunity and Th1 response [J]. *J Immunol*, 2002, 169(7): 3600-3605.
- [15] Bhawe NS, Carson WE 3rd. Immune modulation with interleukin-21 [J]. *Ann N Y Acad Sci U S A*, 2009, 1182: 39-46.

[收稿日期] 2009-11-11

[修回日期] 2010-02-28

[本文编辑] 王莹