

· 论著 ·

文章编号: 1007-8738(2013)02-0113-05

重组腺病毒 Ad5F35-IL-12 感染不同单核-巨噬细胞的研究

王 秦, 成 凤, 张维理, 匡文斌, 李 朴, 董晋豫, 梁勤东, 涂植光*

(重庆医科大学检验医学院, 临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016)

[摘要] 目的 确定人 IL-12 基因重组腺病毒 Ad5F35-IL-12 在不同人单核-巨噬细胞中的表达。方法 将人 IL-12 基因重组腺病毒 Ad5F35-IL-12 分别感染人外周血单个核细胞、胸水巨噬细胞, 以及 THP-1 和 U937 单核细胞株及其经佛波酯(PMA)诱导后生成的巨噬细胞; 感染 48 h 后荧光显微镜观察对相应细胞的感染效率, RT-PCR 检测 IL-12 双亚基 p35 和 p40 的 mRNA 表达情况, ELISA 检测细胞培养上清中 IL-12p70 的分泌水平。结果 人 IL-12 基因重组腺病毒 Ad5F35-IL-12 可成功感染人外周血单个核细胞、胸水巨噬细胞以及 THP-1 和 U937 单核细胞株及其 PMA 诱导后生成的巨噬细胞, 并分泌 IL-12 p70 蛋白, 蛋白表达量从高至低依次是胸水巨噬细胞、PMA 诱导后 U937 细胞、PMA 诱导后 THP-1 细胞、U937 细胞、外周血单个核细胞、THP-1 细胞。结论 人 IL-12 基因重组腺病毒 Ad5F35-IL-12 可以感染不同的单核-巨噬细胞, 并成功表达分泌 IL-12 p70 蛋白。

[关键词] IL-12; 腺病毒 Ad5F35; 单核巨噬细胞; 基因治疗

[中图分类号] R392.33, R392.12 **[文献标志码]** A

Infection of recombinant adenovirus Ad5F35-IL-12 in different kinds of human mononuclear macrophages

WANG Qin, CHENG Feng, ZHANG Weili, KUANG Wenbin, LI Pu, DONG Jinyu, LIANG Qindong, TU Zhiguang*

College of Laboratory Medicine, Ministry of Education Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

[Abstract] **Objective** To investigate the efficiencies of transfection and expression of human recombinant adenovirus Ad5F35-IL-12 in the different kinds of human mononuclear macrophages. **Methods** The human recombinant adenovirus Ad5F35-IL-12 was used to infect human peripheral blood monocytes, pleural fluid macrophages as well as THP-1, U937 monocyte cell lines and their phorbol myristate acetate (PMA)-induced macrophages. 48 h later, green fluorescence was observed under the fluorescence microscope to detect the transfection efficiency. The expressions of IL-12 double-subunits (p35, p40) mRNA were tested by RT-PCR and the level of IL-12p70 protein in the cell culture supernatant was detected with ELISA. **Results** The human recombinant adenovirus Ad5F35-IL-12 successfully infected the human peripheral blood monocytes, pleural fluid macrophages, THP-1 monocytes, U937 monocytes, and THP-1 and U937 macrophages induced with PMA. All above infected mononuclear macrophages effectively secreted IL-12p70 protein, and they were listed from high to low of IL-12p70 protein level as pleural fluid macrophages, U937 and THP-1 macrophages induced with PMA, U937 monocytes, human peripheral blood monocytes and THP-1 monocytes. **Conclusion** The human recombinant adenovirus Ad5F35-IL-12 could infect different kinds of mononuclear macrophages, and IL-12 p70 protein could be successfully expressed in cell supernatants.

[Key words] IL-12; adenovirus Ad5F35; mononuclear macrophage; gene therapy

白介素 12(IL-12)是目前发现的对免疫活性细胞诱导和调节作用最强、范围最广的细胞因子, 在诱导 Th0 细胞向 Th1 细胞分化过程中发挥重要作用, 单核

巨噬细胞是 IL-12 的主要产生细胞^[1]。由于人体单核-巨噬细胞比较难以获取, 单核巨噬细胞的异质性, 不表达柯萨奇病毒腺病毒受体(coxsackie and adeno-

收稿日期: 2012-09-24; 接受日期: 2012-10-23

基金项目: 国家自然科学基金(81172016)

作者简介: 王 秦(1986-), 女, 四川德阳人, 硕士研究生

Tel: 023-68485759; E-mail: cqwq1986925@sina.com

*Corresponding author, 涂植光, E-mail: tuzhiguang@yahoo.com.cn

· 论著 ·

文章编号: 1007-8738(2013)02-0113-05

重组腺病毒 Ad5F35-IL-12 感染不同单核-巨噬细胞的研究

王 秦, 成 凤, 张维理, 匡文斌, 李 补, 董晋豫, 梁勤东, 涂植光*

(重庆医科大学检验医学院, 临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016)

[摘要] 目的 确定人 IL-12 基因重组腺病毒 Ad5F35-IL-12 在不同人单核-巨噬细胞中的表达。方法 将人 IL-12 基因重组腺病毒 Ad5F35-IL-12 分别感染人外周血单个核细胞、胸水巨噬细胞, 以及 THP-1 和 U937 单核细胞株及其经佛波酯(PMA)诱导后生成的巨噬细胞; 感染 48 h 后荧光显微镜观察对相应细胞的感染效率, RT-PCR 检测 IL-12 双亚基 p35 和 p40 的 mRNA 表达情况, ELISA 检测细胞培养上清中 IL-12p70 的分泌水平。结果 人 IL-12 基因重组腺病毒 Ad5F35-IL-12 可成功感染人外周血单个核细胞、胸水巨噬细胞以及 THP-1 和 U937 单核细胞株及其 PMA 诱导后生成的巨噬细胞, 并分泌 IL-12 p70 蛋白, 蛋白表达量从高至低依次是胸水巨噬细胞、PMA 诱导后 U937 细胞、PMA 诱导后 THP-1 细胞、U937 细胞、外周血单个核细胞、THP-1 细胞。结论 人 IL-12 基因重组腺病毒 Ad5F35-IL-12 可以感染不同的单核-巨噬细胞, 并成功表达分泌 IL-12 p70 蛋白。

[关键词] IL-12; 腺病毒 Ad5F35; 单核巨噬细胞; 基因治疗

[中图分类号] R392.33, R392.12 **[文献标志码]** A

Infection of recombinant adenovirus Ad5F35-IL-12 in different kinds of human mononuclear macrophages

WANG Qin, CHENG Feng, ZHANG Weili, KUANG Wenbin, LI Pu, DONG Jinyu, LIANG Qindong, TU Zhiguang*

College of Laboratory Medicine, Ministry of Education Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

[Abstract]. Objective To investigate the efficiencies of transfection and expression of human recombinant adenovirus Ad5F35-IL-12 in the different kinds of human mononuclear macrophages. **Methods** The human recombinant adenovirus Ad5F35-IL-12 was used to infect human peripheral blood monocytes, pleural fluid macrophages as well as THP-1, U937 monocyte cell lines and their phorbol myristate acetate (PMA)-induced macrophages. 48 h later, green fluorescence was observed under the fluorescence microscope to detect the transfection efficiency. The expressions of IL-12 double-subunits (p35, p40) mRNA were tested by RT-PCR and the level of IL-12p70 protein in the cell culture supernatant was detected with ELISA. **Results** The human recombinant adenovirus Ad5F35-IL-12 successfully infected the human peripheral blood monocytes, pleural fluid macrophages, THP-1 monocytes, U937 monocytes, and THP-1 and U937 macrophages induced with PMA. All above infected mononuclear macrophages effectively secreted IL-12p70 protein, and they were listed from high to low of IL-12p70 protein level as pleural fluid macrophages, U937 and THP-1 macrophages induced with PMA, U937 monocytes, human peripheral blood monocytes and THP-1 monocytes. **Conclusion** The human recombinant adenovirus Ad5F35-IL-12 could infect different kinds of mononuclear macrophages, and IL-12 p70 protein could be successfully expressed in cell supernatants.

[Key words] IL-12; adenovirus Ad5F35; mononuclear macrophage; gene therapy

白介素 12(IL-12)是目前发现的对免疫活性细胞诱导和调节作用最强、范围最广的细胞因子, 在诱导 Th0 细胞向 Th1 细胞分化过程中发挥重要作用, 单核

巨噬细胞是 IL-12 的主要产生细胞^[1]。由于人体单核-巨噬细胞比较难以获取, 单核巨噬细胞的异质性, 不表达柯萨奇病毒腺病毒受体 (coxsackie and adeno-

收稿日期: 2012-09-24; 接受日期: 2012-10-23

基金项目: 国家自然科学基金(81172016)

作者简介: 王 秦(1986-), 女, 四川德阳人, 硕士研究生

Tel: 023-68485759; E-mail: cqwq1986925@sina.com

* Corresponding author, 涂植光, E-mail: tuzhiguang@yahoo.com.cn

virus receptor, CAR)等原因,携人 IL-12 基因载体转染单核巨噬细胞的研究还未见报道。腺病毒具有制备方便,扩增效率高,滴度高,不整合宿主染色体,宿主范围广等优点而被广泛地应用于基因治疗,尤其近年来新型嵌合型腺病毒 Ad5F35 被广泛地用于感染造血干细胞、树突状细胞、T 细胞、NK 细胞、K562、U937 等难转染血液细胞^[2-6]。为采用腺病毒感染人单核巨噬细胞提供了重要的理论依据。本研究拟采用人 IL-12 基因重组腺病毒 Ad5F35-IL-12 感染不同的单核巨噬细胞,探讨其感染效率和 IL-12 p70 蛋白的表达情况,为下一步研究单核巨噬细胞的免疫功能和 IL-12 的基因治疗奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 人单核细胞株 THP-1 细胞和 U937 单核细胞为本实验室保存,肝素钠抗凝全血标本 5 mL 经健康供血者知情同意后获取,肝素钠抗凝胸水 500 mL 经患者知情同意后获取,Ad5F35-GFP 为本实验室保存,人 IL-12 基因重组腺病毒 Ad5F35-IL-12 为本课题组前期构建^[7]。总 RNA 抽提试剂盒、逆转录试剂盒、Taq DNA 聚合酶、DNA marker 均购自 TaKaRa 公司,人 IL-12 p70 ELISA 试剂盒购自 R&D 公司,人淋巴细胞分离液 Ficoll-Paque PLUS 购自 GE 公司,磷酸盐平衡盐溶液购自武汉博士德公司,D-Hank's 缓冲液购自 HyClone 公司,RPMI1640 培养液和胎牛血清购自美国 Gibco 公司,佛波酯(phorbol ester, PMA)购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 分离外周血单个核细胞和胸水巨噬细胞 分离外周血单个核细胞:无菌抽取新鲜肝素钠抗凝全血标本 5 mL,加入 5 mL D-Hank's 缓冲液制成细胞悬液,用巴氏吸管吸取 5 mL 细胞悬液缓慢加在 5 mL 的淋巴细胞分离液上,室温水平离心 2 000 r/min, 20 min。离心后可见 5 层,从上到下依次是:血浆层、环状乳白色单个核细胞(淋巴细胞或单核细胞)层、分离液层、红细胞层。小心收集环状乳白色单个核细胞,加入 2 × D-Hank's 缓冲液重悬细胞,并采用梯度离心以更有效地洗去残留的血小板和分离液,依次是 1 500 r/min × 10 min、1 000 r/min × 10 min、800 r/min × 10 min,最后用含 100 mL/L 胎牛血清的 RPMI1640 培养液重悬细胞,置于 37℃、50 mL/L CO₂ 孵育箱中培养,2 h 后吸去未贴壁的淋巴细胞,贴壁的单核细胞置于孵育箱中继续培养。

分离胸水巨噬细胞:无菌抽取新鲜肝素抗凝胸水 500 mL,室温 2 000 r/min,离心 10 min 收集细胞,加入 5 mL D-Hank's 缓冲液重悬细胞,用巴氏吸管吸取 5 mL 细胞悬液缓慢加在 5 mL 的淋巴细胞分离液上,室温水平离心 2 000 r/min 离心 20 min,收集环状乳白色细胞层,其中富含巨噬细胞,D-Hank's 缓冲液洗涤细胞 3 次,用含 100 mL/L 胎牛血清的 RPMI1640 培养液重悬细胞,置于 37℃、50 mL/L CO₂ 孵育箱中培养,12 h 后洗去未贴壁细胞,贴壁的巨噬细胞置于孵育箱中继续培养。

1.2.2 细胞株的培养及诱导生成巨噬细胞 人单个核细胞 THP-1 和 U937 用含 100 mL/L 胎牛血清,100 U/mL 青霉素、100 mg/mL 链霉素的 RPMI1640 培养基,置于 37℃、50 mL/L CO₂ 孵育箱中培养。每日于显微镜下观察细胞生长情况,THP-1 细胞每日换液,隔日传代 1 次,U937 细胞 2~3 d 传代 1 次,均选用对数生长期细胞进行实验研究。参考文献^[8]的方法,向 THP-1 和 U937 细胞中加入 320 nmol/L PMA 诱导分化,6 h 后采用光学显微镜可观察到细胞贴壁增多,体积明显增大,从圆形逐渐变成不规则形的巨噬细胞。

1.2.3 重组腺病毒 Ad5F35-IL-12 感染不同的单核巨噬细胞 外周血单个核细胞,THP-1 细胞,U937 细胞均以 1 × 10⁶ 个细胞接种 6 孔板,胸水巨噬细胞以 2 × 10⁵ 个细胞接种 6 孔板。PMA 诱导 THP-1 和 U937 细胞分化成巨噬细胞后,以 1 × 10⁶ 个细胞接种 6 孔板,每个孔中加入 2 mL 培养基,THP-1 细胞的最佳感染复数是 800,外周血单个核细胞,U937 细胞,胸水巨噬细胞的最佳感染复数是 600,PMA 诱导 THP-1 和 U937 细胞生成的巨噬细胞最佳感染复数分别是 400、300。孵育 48 h 后以倒置荧光相差显微镜观察计数荧光染色细胞的比值并采集图片。

1.2.4 RT-PCR 检测 IL-12 双亚基 p35 和 p40 的 mRNA 表达情况 收集感染 48 h 后的单核巨噬细胞,按照 TaKaRa 公司提供的试剂盒说明书采用 TRIzol 法提取总 RNA 并逆转录成 cDNA,进行 PCR 反应。引物序列如下:β-actin 基因(NM-001101.3)上游引物为:5'-CTGGGACGACATCGAGAAAA-3',下游引物为:5'-AAGGAAGGCTGGAAGACTGC-3',扩增产物片段大小为 564 bp;p40 基因 NM_002187.2)上游引物为:5'-GTGGAGTCCCAGGAGGACA-3',下游引物为:5'-TCTTGGGTGGGTCAGGTTT-3',扩增产物片段大小为 148 bp;p35 基因(NM_000882.3)上游引物为:5'-CTGGACCACCTCAGTTTGG-3',下游引物为:5'-TCAGAAGTCCAAGGCTAAAA-3',扩增产物片段大小为 155 bp。PCR 反应条件均为:94℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 30 s,56℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,共 35 个循环,最后充分延伸 5 min。PCR 产物进行琼脂糖凝胶(25 g/L)电泳鉴定,采用 Quantity One 软件对图像进行分析,实验重复 3 次。

1.2.5 ELISA 检测细胞培养上清中的 IL-12 p70 收集 Ad5F35-IL-12 感染 72 h 后的各组单核巨噬细胞的培养上清,10 000 r/min 离心 5 min,吸取上清,按照人 IL-12 p70 ELISA 试剂盒说明书进行操作,每个样本做两个复孔并建立标准曲线,450 nm 比色测定吸光度(A)值,根据标准曲线计算出相应上清中人 IL-12 的浓度。实验重复 3 次。

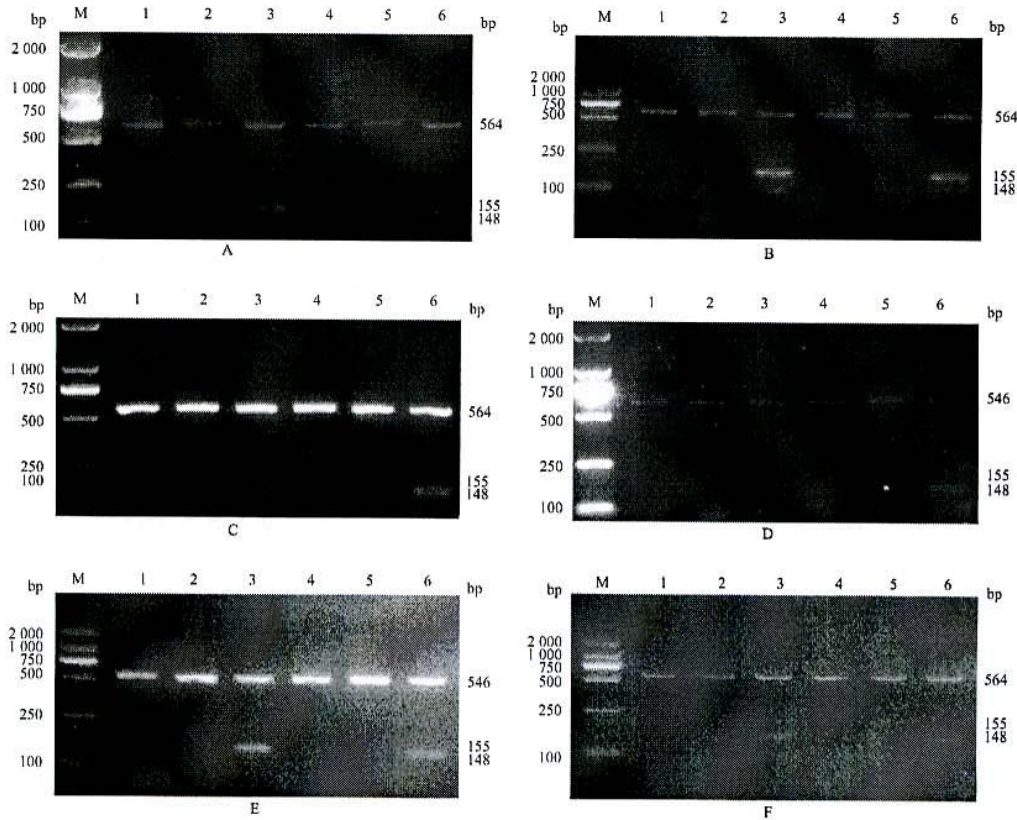
1.2.6 统计学分析 采用 SPSS16.0 软件对数据进行统计学分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较采用单因素方差检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Ad5F35-IL-12 对不同单核巨噬细胞的感染效率 重组腺病毒 Ad5F35-IL-12 感染人单核巨噬细胞

亚基目的条带,说明重组腺病毒 Ad5F35-IL-12 能够感染人单核巨噬细胞,并能够在单核巨噬细胞中高

效表达人 IL-12(图 2)。



M: DNA marker DL2000; 1, 4: 未感染组; 2, 5: 感染 Ad5F35-GFP; 3, 6: 感染 Ad5F35-IL-12; 1~3: IL-12 p35 亚基的 mRNA 表达情况; 4~6: IL-12 p40 亚基的 mRNA 表达情况。A: 外周血单个核细胞; B: 胸水巨噬细胞; C: U937 细胞; D: PMA 诱导后的 U937 细胞; E: THP-1 细胞; F: PMA 诱导后的 THP-1 细胞。

图 2 RT-PCR 检测 Ad5F35-IL-12 感染不同单核巨噬细胞后 IL-12 p35p40 的 mRNA 表达情况

2.3 ELISA 检测培养上清中 IL-12 p70 的表达水平

按照人 IL-12 p70 ELISA 试剂盒说明书进行操作,根据标准品检测结果绘制标准曲线(图 3),得到 IL-12 p70 浓度在 450 nm 处吸光度值的线性关系为 $y = 489.2x - 57.29 (R^2 = 0.994)$ 。根据标准曲线计算出各组单核巨噬细胞培养上清中的人 IL-12 p70 浓度,Ad5F35-IL-12 感染 72 h 后各组细胞培养上清中人 IL-12 p70 浓度如下(表 1): 外周血单个核细胞(312.55 ± 1.28) pg/mL, 胸水巨噬细胞(917.52 ± 1.41) pg/mL, THP-1 细胞(288.09 ± 1.57) pg/mL, U937 细胞(314.94 ± 1.41) pg/mL, PMA 诱导后的 THP1 细胞(537.09 ± 2.21) pg/mL, PMA 诱导后的 U937 细胞(801.32 ± 3.09) pg/mL, 蛋白表达量从高至低依次是胸水巨噬细胞、PMA 诱导后 U937 细胞、PMA 诱导后 THP-1 细胞、U937 细胞、外周血单个核细胞、THP-1 细胞。未感染组和 Ad5F35-GFP 感染组的细胞培养上清中未检测到人 IL-12。

表 1 单核-巨噬细胞分泌人 IL-12 p70 的水平

细胞	(pg/mL, $\bar{x} \pm s$)		
	未感染组	Ad5F35-GFP 感染组	Ad5F35-IL-12 感染组
外周血单个核细胞	未检测到	未检测到	312.55 ± 1.28
胸水巨噬细胞	未检测到	未检测到	917.52 ± 1.41
THP-1 细胞	未检测到	未检测到	288.09 ± 1.57
U937 细胞	未检测到	未检测到	314.94 ± 1.41
PMA 诱导后的 THP1 细胞	未检测到	未检测到	537.09 ± 2.21
PMA 诱导后的 U937 细胞	未检测到	未检测到	801.32 ± 3.09

3 讨论

近年来,以细胞因子介导的基因和免疫治疗成为肿瘤治疗的一种重要措施,尤其是人白细胞介素 12(human interleukin-12, hIL-12),它作为细胞免疫应答过程中的关键调节因子被广泛地应用于肿瘤治疗中^[1]。一般研究多是以瘤内或瘤旁注射 IL-12 的方式治疗肿瘤,也在肝癌、卵巢癌、肾细胞癌、消化道恶性肿瘤、乳腺癌、恶性黑色素瘤等恶性肿瘤模型中取得了显著疗效^[9-14],但是当 IL-12 基因治疗

进入临床研究就发现许多毒副作用,比如半衰期短、作用不持久、容易引起出血、肝肾功能衰竭等。究其原因,主要是因为全身应用外源性 IL-12 缺乏靶向性,发挥抗肿瘤作用的同时也影响了正常细胞。所以,如果一种大量存在于肿瘤局部的细胞可持续高效分泌 IL-12,则可有效的抗肿瘤并避免上述毒副作用。

单核-巨噬细胞作为重要的固有免疫细胞和抗原提呈细胞^[15],在第一时接触、识别从任何部位进入人体的抗原,立即发挥先天免疫作用,随后又可通过其高效的抗原呈递能力启动获得性免疫;此外,巨噬细胞是肿瘤局部微环境中数量最多的炎症细胞,约占30%~50%。所以我们采用单核-巨噬细胞作为持续大量表达 IL-12 抗肿瘤的媒介细胞。由于单核-巨噬细胞是悬浮细胞并且细胞表面不表达 CAR 受体,传统的非病毒载体(脂质体、电穿孔、磷酸钙沉淀法)和常用的5型腺病毒载体均不能有效地转染外源基因进入单核-巨噬细胞。但是经改良后的腺病毒 Ad5F35 可以成功感染难转染血液悬浮细胞,如造血干细胞、树突状细胞、K562、U937 细胞等^[2-6]。所以本研究采用人重组腺病毒 Ad5F35-IL-12 感染单核-巨噬细胞,观察到其可以有效感染不同来源的单核-巨噬细胞,并可以持续分泌表达 IL-12 蛋白,感染效率明显优于常用的脂质体 2000、腺病毒、慢病毒^[16]等载体转染单核细胞,探索出了一种有效的转染单核-巨噬细胞的方法。

此外,本研究发现不同来源的单核-巨噬细胞感染效率有很大差异,胸水巨噬细胞和 U937 细胞经 PMA 诱导而成的巨噬细胞感染效率分别可高达(94±1)%, (70.67±0.58)%, 外周血单个核细胞和 THP-1 细胞经 PMA 诱导而成的巨噬细胞感染效率分别为(34±1)%和(31±1)%, 而 U937 细胞和 THP-1 细胞感染效率很低,均低于9%。IL-12 蛋白表达量也具有显著差异,其浓度从高至低依次是胸水巨噬细胞、PMA 诱导后 U937 细胞、PMA 诱导后 THP-1 细胞、U937 细胞、外周血单个核细胞、THP-1 细胞。上述结果表明,尽管单核-巨噬细胞的基因转染问题一直是基因治疗的难题,但本实验通过采用人重组腺病毒 Ad5F35-IL-12 可程度不等地感染不同的单核-巨噬细胞,并表达 IL-12 蛋白,为进一步研究单核巨噬细胞的功能和 IL-12 的基因治疗提供了重要的实验基础。另一方面,本研究也提示在进行后续研究时,应注意选用相对感染效率高的单核-巨噬细胞。

参考文献:

- [1] 王雪梅,袁远英,方强,等. 真核表达的重组猪单链 IL-12 生物学活性的研究[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2012, 28(7): 691-695.
- [2] Nilsson M, Karlsson S, Fan X. Functionally distinct subpopulations of cord blood CD34⁺ cells are transduced by adenoviral vectors with serotype 5 or 35 tropism[J]. Mol Ther, 2004, 9(3): 377-388.
- [3] Schroers R, Hildebrandt Y, Hasenkamp J, et al. Gene transfer into human T lymphocytes and natural killer cells by Ad5/F35 chimeric adenoviral vectors [J]. Exp Hematol, 2004, 32(6): 536-546.
- [4] Shayakhmetov DM, Papayannopoulou T, Stamatoyannopoulos G, et al. Efficient gene transfer into human CD34⁺ cells by a retargeted adenovirus vector[J]. J Virol, 2000, 74(6): 2567-2583.
- [5] Nilsson M, Ljungberg J, Richter J, et al. Development of an adenoviral vector system with adenovirus serotype 35 tropism; efficient transient gene transfer into primary malignant hematopoietic cells [J]. J Gene Med, 2004, 6(6): 631-664.
- [6] Toyoda E, Doi R, Kami K, et al. Adenovirus vectors with chimeric type 5 and 35 fiber proteins exhibit enhanced transfection of human pancreatic cancer cells [J]. Int J Oncol, 2008, 33(6): 1141-1147.
- [7] 成 凤, 匡文斌, 王 秦, 等. 携人 IL-12 基因腺病毒的构建及其对 Hep3B 细胞增殖及 TGF-β 表达的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2012, 8(5): 402-406.
- [8] Chen J, Li G, Meng H, et al. Upregulation of B7-H1 expression is associated with macrophage infiltration in hepatocellular carcinomas[J]. Cancer Immunol Immunother, 2011, 61(1): 101-108.
- [9] Del Vecchio M, Bajetta E, Canova S, et al. Interleukin-12; biological properties and clinical application [J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(16): 4677-4985.
- [10] Marchi LH, Paschoalin T, Travassos LR, et al. Gene therapy with interleukin-10 receptor and interleukin-12 induces a protective interferon-γ-dependent response against B16F10-Nex2 melanoma [J]. Cancer Gene Ther, 2011, 18(2): 110-122.
- [11] Engel MA, Neurath MF. Anticancer properties of the IL-12 family-focus on colorectal cancer [J]. Curr Med Chem, 2010, 17(29): 3303-3308.
- [12] He XZ, Wang L, Zhang YY. An effective vaccine against colon cancer in mice: Use of recombinant adenovirus interleukin-12 transduced dendritic cells [J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(4): 532-540.
- [13] Kayashima H, Toshima T, Okano S, et al. Intratumoral neoadjuvant immunotherapy using IL-12 and dendritic cells is an effective strategy to control recurrence of murine hepatocellular carcinoma in immunosuppressed mice [J]. J Immunol, 2010, 185(1): 698-708.
- [14] Berraondo P, Prieto J, Gonzalez G, et al. Advances in interleukin-12 gene therapy for acquired liver diseases [J]. Curr Gene Ther, 2009, 9(2): 62-71.
- [15] 谢长好, 王元元, 李志军, 等. 系统性红斑狼疮患者外周血 CD14⁺ 单核细胞表达 PD-L1 的分析和意义 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2012, 28(4): 429-432.
- [16] 叶双梅, 阚淳一, 杨丽兰, 等. 人外周血单核细胞 3 种不同转染方法的比较 [J]. 华中科技大学学报(医学版), 2011, 40(2): 196-199.