

[文章编号] 1007-385X(2002)02-0077-05

趋化因子 MCP-3 基因和 B7 基因共转染诱导抗大肠癌主动免疫

胡锦跃¹, 朱建高¹, 李官成¹, 王文蒙², 李跃辉¹, 孙去病¹ (1. 中南大学湘雅医学院肿瘤研究所, 长沙 410078; 2. 湖南省武警总队医院内科)

[摘要] 目的: 探讨趋化因子 MCP-3 (monocyte chemotactic protein-3) 和 B7 基因共转染诱导抗大肠癌主动免疫的可能性。方法: 用脂质体将小鼠 MCP-3 和 B7 (B7.1) 基因导入小鼠大肠癌 CMT93 细胞, G418 筛选抗性克隆, RT-PCR 检测 B7 和 MCP-3 的表达, 趋化实验检测 MCP-3 的功能。体内实验观察基因修饰瘤细胞 (CMT93/B7 + MCP-3) 的成瘤性、免疫小鼠后所诱导的针对 CMT93 的免疫保护及其作为疫苗治疗已形成肿瘤的疗效。结果: RT-PCR 检测发现 CMT93/B7 + MCP-3 瘤细胞有 B7 和 MCP-3 的表达, 而且所表达的 MCP-3 有良好的趋化活性。CMT93/B7 + MCP-3 的成瘤性显著下降 ($P < 0.01$)。经 CMT93/B7 + MCP-3 免疫的小鼠获得对 CMT93 的免疫保护 ($P < 0.05$)。作为疫苗 CMT93/B7 + MCP-3 能抑制接种早期肿瘤的生长。结论: 共转染 MCP-3 和 B7 基因能有效诱导抗大肠癌主动免疫, 共转染的瘤细胞作为疫苗治疗已形成的肿瘤有一定的疗效。

[关键词] 大肠癌; 基因转移; 趋化因子; MCP-3; B7

[中国分类号] R735.34 **[文献标识码]** A

Co-Transfection of Colorectal Cancer Cells with Chemokine MCP-3 Gene and B7 Gene to Induce Anti-Tumor Immunity

HU Jin-yue, ZHU Jian-gao, LI Guan-cheng, WANG Wen-meng, LI Yue-hui, SUN Qu-bing (Cancer Research Institute, Xiangya Medical School, Central South University, Changsha 410078, China)

[Abstract] Objective: To evaluate the possibility of the anti-tumor immunity induction by co-transfecting the colorectal cancer cells with chemokine MCP-3 and B7 gene. **Methods:** Mouse MCP-3 and B7 (B7.1) genes were transduced into mouse colorectal cancer CMT93 cells using Liposome. G418-resistant clones were selected. MCP-3 and B7 mRNA expression was detected by RT-PCR. Chemotactic activity of MCP-3 was measured by chemotaxis assay. The tumorigenicity of gene transfectants (CMT93/B7 + MCP-3) was detected by *in vivo* experiments. The immune protection against rechallenged CMT93 in the mice primed by CMT93/B7 + MCP-3 was observed, and the effect of CMT93/B7 + MCP-3 as vaccine to treat established tumors in the early stage was detected by *in vivo* experiments as well. **Results:** CMT93/B7 + MCP-3 expressed MCP-3 and B7 mRNA, but control groups not expressed. The secreted MCP-3 in the cell culture supernatant possesses the chemotactic activity. *in vivo* experiments showed that the tumorigenicity of CMT93/B7 + MCP-3 was reduced significantly ($P < 0.01$), All mice primed by CMT93/B7 + MCP-3 got system immunity against the rechallenged CMT93 ($P < 0.05$). And CMT93/B7 + MCP-3 as vaccine retarded the growth of the tumors from the early stage of CMT93. **Conclusion:** The co-transfection of MCP-3 gene and B7 gene promotes the induction of anti-colorectal cancer immunity, and co-transfectant as vaccine is effective to treat the established tumors.

[Key words] colorectal cancer; gene transfer; chemokine; MCP-3; B7

* 肿瘤免疫基因治疗为肿瘤治疗提供了新的途径, 然而大量的研究发现转染单一免疫分子基因只在部分肿瘤中有效。近年来, 越来越多的研究转向转染两个或两个以上的基因以诱导更强的抗肿瘤免疫反应^[1-4]。共转染趋化因子 lymphotactin (Lptn) 基因和 IL-2 基因, 通过“吸引—扩增”的机制诱导了 CD4 和 CD8 依赖的免疫反应, 使已形成的肿瘤得以消退^[5]。

同样基于“吸引—扩增”的机制将鼠 IP-10 和 IL-12 基因共同注射于大肠癌 CT26 模型, 发现不仅肿瘤 100% 消退, 而且对远处接种的肿瘤也有抑制作用^[6]。与“吸引—扩增”机制不同, 通过共转染 B7 基因和趋化

* [作者简介] 胡锦跃 (1966-), 男, 湖南衡山人, 副教授, 博士, 主要从事肿瘤免疫治疗基础研究。

[通讯作者] 孙去病, E-mail: Libsun@public.cs.hn.cn

因子 MCP-3 基因,我们建立了一种“吸引—活化”的机制。其原理基于 MCP-3 对免疫细胞的趋化作用以及 B7 分子对淋巴细胞活化的共刺激作用。研究表明共转染的肿瘤细胞其致瘤性显著下降,而且作为疫苗对接种早期的肿瘤有一定的治疗作用,提示此方法可能有一定的临床参考价值。

1 材料与方法

1.1 材料来源

C57BL/6 小鼠(H-2^b近交系):雌雄不限,6~8 周龄,购自中国科学院上海实验动物中心。CMT93 细胞株为化学致癌物诱导的 C57BL/6 小鼠来源的结肠癌细胞株^[7],购自美国 ATCC 公司。含小鼠 MCP-3 (MARC)基因的质粒 pCMV/MCP-3、含 MCP-3 受体 CCR1 基因质粒 pCND4/YT4 及 B7 和 MCP-3 引物均由美国国立癌症研究所王吉民博士惠赠。B7 引物序列为: Sense 5'-CCA-TGT-CCA-AGG-CTC-ATT-CT-3', Antisense 5'-TCT-GAC-ACG-TGA-GCA-TCT-CC-3', 产物大小为 641 bp。MCP-3 引物序列为: Sense 5'-TCT-CTG-CCT-GCT-GCT-CAT-AG-3', Antisense 5'-CTT-TGG-AGT-TGG-GGT-TTT-CA-3', 产物大小为 268 bp。小鼠 β-actin 内对照引物购自美国 STARTAGENE 公司,序列为: Sense 5'-TGT-GAT-GGT-GGG-AAT-GGG-TCG-G-3', Antisense 5'-TTT-GAT-GTC-ACG-CAC-GAT-TTC-C-3', 产物大小为 514 bp。

1.2 脂质体法转导 B7 和 MCP-3 基因

1.2.1 B7 基因转染

按试剂盒说明书(GIBCO,18324-012)进行。

1.2.2 MCP-3 基因导入 CMT93/B7 瘤细胞

将已鉴定表达 B7 基因的 CMT93 瘤细胞 CMT93/B7 培养至 6 孔板中,等细胞长满至 60%~80%,加入 MCP-3 质粒 pCMV/MCP-3 和空白质粒 pCDNA3-Hygro, pCMV/MCP-3 与 pCDNA3-Hygro 的比例为 40:1,转染过程完成后,用含 50 μg/ml Hygromycin 的培养基进行筛选,所得到的阳性克隆用 RT-PCR 鉴定 MCP-3 的表达,阳性克隆命名为 CMT93/B7 + MCP-3。

1.3 RT-PCR

采用 QIAGEN 公司的总 RNA 抽提试剂盒抽提总 RNA 后。利用 STRATAGENE 公司的 RT-PCR 一步法试剂盒扩增目的片段。反应步骤为:37℃ 15 min,95℃ 1 min 完成逆转录;95℃ 变性 30 s,60℃ 30 s 退火,68℃ 延伸 2 min,循环 40 次完成 PCR 后再 68℃ 充分延伸 10 min。

1.4 趋化实验^[8]

各种细胞的无血清培养上清(27 μl~29 μl)加至

趋化板的下孔中,以趋化缓冲液为空白对照,加盖预先用大鼠 I 型胶原处理的趋化膜(孔径为 10 μm),加盖防漏膜固定,于趋化板的上孔中加入转染小鼠 CCR1 基因的大鼠白血病细胞 RBL/2H3(CCR1/RBL)。置于湿盒中,37℃ 孵育 5 h。取出趋化膜,刮去未穿过趋化膜的细胞,固定细胞并染色(Wright 法)。镜下计数趋化细胞数并计算趋化指数。

$$\text{趋化指数} = \frac{\text{实验组的趋化细胞数}}{\text{缓冲液的趋化细胞数}}$$

趋化缓冲液的组成为:RPMI-1640 500 ml, 1% BSA, 30 mmol/L HEPES, 20 mmol/L L-Glutamine, 100 U Penicillin, 100 μg Streptomycin。

1.5 成瘤实验^[9-10]

收集处于对数生长期的 CMT93、CMT93/mock(转染空白载体的瘤细胞)、CMT93/B7 + MCP-3 细胞,以每只小鼠 5 × 10⁶ 细胞数接种于 C57BL/6 小鼠背部皮下,其中 CMT93 组 5 只小鼠,CMT93/mock 组 6 只小鼠,CMT93/B7 + MCP-3 组 7 只小鼠,观察肿瘤的生长,并用游标卡尺(精确度 0.002cm)测量肿瘤的长径和短径,比较肿瘤的大小。

$$\text{肿瘤体积} = \frac{\pi}{6} \left(\frac{\text{长径} + \text{短径}}{2} \right)^3$$

对照组肿瘤生长至直径大于 1.5 cm 时,断颈处死小鼠。

1.6 免疫保护实验^[10]

接种 CMT93/B7 + MCP-3 的小鼠(n=6),肿瘤完全消退,再接种 5 × 10⁶ 野生型 CMT93 瘤细胞,以正常未经免疫的小鼠接种 5 × 10⁶ 的 CMT93 瘤细胞作对照,观察转基因瘤细胞所诱导的免疫反应是否对野生型的瘤细胞具有免疫保护作用。

1.7 免疫治疗实验^[10]

9 只 C57BL/6 小鼠随机分为 2 组,其中实验组 5 只小鼠,对照组 4 只小鼠。每只小鼠背部皮下接种 5 × 10⁶ 细胞数的 CMT93 后,分别于接种的当天、第 7 天和第 14 天于小鼠的腹腔接种 mitomycin C 灭活的 1 × 10⁷ CMT93/B7 + MCP-3(实验组)、mitomycin C 灭活 1 × 10⁷ CMT93(对照组)作为肿瘤疫苗治疗接种的肿瘤。比较肿瘤大小以确定 B7 和 MCP-3 基因共转染瘤细胞作为疫苗治疗肿瘤的疗效。当肿瘤出现比较严重的溃疡时处死小鼠。

2 结果

2.1 RT-PCR

利用一步法 RT-PCR 从 CMT93 野生型瘤细胞和转基因瘤细胞中扩增 B7 mRNA,结果显示,CMT93 和

CMT93/mock 不表达 B7; CMT93/B7 + MCP-3 表达 B7 (图 1A)。从瘤细胞中扩增 MCP-3 基因, 结果显示: CMT93 和 CMT93/mock 不表达 MCP-3; CMT93/B7 + MCP-3 表达 MCP-3 (图 1B)。证明转染成功并有基因的表达。

图 1 RT-PCR 检测基因的表达

Fig. 1 Gene expression detected by RT-PCR

A: B7 expression; Lane 1: 100 bp ladder marker; Lane 2: CMT93 + primer B7; Lane 3: CMT93 + Primer β -actin; Lane 4: CMT93/mock + primer B7; Lane 5: CMT93/mock + primer β -actin; Lane 6: CMT93/B7 + MCP-3 + primer B7; Lane 7: CMT93/B7 + MCP-3 + primer β -actin; B: MCP-3 expression; Lane 1: 100 bp ladder marker; Lane 2: CMT93/B7 + MCP-3 + primer MCP-3; Lane 3: CMT93/mock + primer MCP-3; Lane 4: CMT93 + primer MCP-3

2.2 趋化实验

在所有细胞的培养上清中, CMT93 及 CMT93/mock 的培养上清所吸引的靶细胞数与对照组培养基所吸引的靶细胞数无明显差别(图 2A, B, C), 趋化指数分别为 1.1 ($P > 0.05$) 和 1.2 ($P > 0.05$), 说明这 2 种瘤细胞不分泌趋化因子 MCP-3; 转 MCP-3 基因的瘤细胞 CMT93/B7 + MCP-3, 其培养上清所吸引的靶细胞数明显增加(图 2D), 趋化指数达到 6.3 ($P < 0.05$), 说明 MCP-3 基因导入 CMT93 瘤细胞后, 得到了很好的表达, 而且表达的 MCP-3 具有很好的生物学活性。

2.3 CMT93 及其转基因瘤细胞的成瘤性

如表 1、图 3 所示: CMT93, CMT93/mock 及 CMT93/B7 + MCP-3 瘤细胞接种小鼠后, 于第 5 天所有

小鼠均出现肿瘤。随后 CMT93 组、CMT93/mock 组小鼠肿瘤呈进行性生长, CMT93/B7 + MCP-3 组中所有 7 只小鼠的肿瘤于第 10 天起则进行性消退, 至第 20 天所有肿瘤全部被排斥, 此组小鼠在各个时间点肿瘤的大小显著性小于对照 CMT93 组及 CMT93/mock 组 ($P < 0.05$, 表 1、图 3)。

图 2 CMT93 及其转基因瘤细胞培养上清中 MCP-3 趋化活性(瑞氏染色示被趋化的靶细胞 $\times 25$)

Fig. 2 Chemotactic activity of MCP-3 in supernatant from CMT93 or its gene transfectants (Wright staining showed the chemoattracted target cells $\times 25$)

A: Medium; B: CMT93 supernatant, the chemoattracted cells were not increased significantly; C: CMT93/Mock supernatant, the chemoattracted cells were not increased significantly; D: CMT93/B7 + MCP-3 supernatant, the chemoattracted cells were increased significantly ($P < 0.01$)

表 1 接种 CMT93 及其基因修饰瘤细胞后不同时期的肿瘤大小 ($\text{cm}^3, \bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Tumor sizes in the mice inoculated with CMT93 or its gene transfectants

Days	Tumor sizes in the mice inoculated with		
	CMT93	CMT93/mock	CMT93/B7 + MCP-3
5	0.041 \pm 0.007	0.037 \pm 0.003	0.004 \pm 0.003 ^{Δ}
10	0.132 \pm 0.016	0.128 \pm 0.013	0.016 \pm 0.008 ^{Δ}
15	0.333 \pm 0.115	0.355 \pm 0.113	0.009 \pm 0.010 ^{Δ}
20	0.537 \pm 0.264	0.507 \pm 0.248	0.001 \pm 0.002 ^{Δ}
25	0.869 \pm 0.210	0.822 \pm 0.271	0 ^{Δ}
30	1.272 \pm 0.429	1.228 \pm 0.438	0 ^{Δ}

$\Delta P < 0.01$ compared to CMT93 group or CMT93/mock group

野生型 CMT93 相比, CMT93/B7 + MCP-3 能显著性减慢肿瘤的生长, 并且至接种后第 20 天, 使一只小鼠的肿瘤消退。实验组与对照组相比, 第 10 天开始各个时间点的肿瘤均显著性小于对照组的肿瘤 ($P < 0.01$, 表 3, 图 5)。

图 3 CMT93 及其转基因瘤细胞接种小鼠后的肿瘤生长曲线
Fig. 3 Tumor growth curves in the mice inoculated with CMT93 or its gene transfectants

2.4 免疫保护实验

经 CMT93/B7 + MCP-3 致敏后的小鼠, 再接种 5×10^6 野生型 CMT93, 从接种第 1 天直至第 15 天, 小鼠均未生长肿瘤, 至第 20 天 CMT93/B7 + MCP-3 组中有一只小鼠出现肿瘤。对照组小鼠于第 5 天全部长出肿瘤, 且呈进行性生长。两实验组各时间点肿瘤均显著性小于对照组肿瘤 ($P < 0.01$, 表 2, 图 4)。

表 2 经基因修饰瘤细胞致敏后再接种 CMT93 不同时期的肿瘤大小 ($\text{cm}^3, \bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Tumor sizes in the mice inoculated with CMT93 after elicited by CMT93 gene transfectant

Days	Tumor sizes	
	Non-primed mice	CMT93/B7 + MCP-3 primed mice
5	0.090 ± 0.034	0 [△]
10	0.193 ± 0.023	0.001 ± 0.001 [△]
15	0.346 ± 0.077	0.002 ± 0.004 [△]
20	0.469 ± 0.108	0.022 ± 0.050 [△]
25	0.714 ± 0.215	0.074 ± 0.085 [△]
30	1.223 ± 0.317	0.157 ± 0.133 [△]

△ $P < 0.01$ compared to non-primed group

2.5 肿瘤治疗实验

以上实验结果显示, 共转染 B7 基因和 MCP-3 基因能诱导较好的抗肿瘤免疫反应, 因此我们选择 CMT93/B7 + MCP-3 瘤细胞作为肿瘤疫苗, 探讨其对接种的野生型 CMT93 瘤细胞的治疗效果, 结果在接种的当天、第 7 天和第 14 天接种灭活的瘤细胞疫苗后, 与

图 4 基因修饰瘤细胞致敏小鼠后对野生型瘤细胞的免疫排斥
Fig. 4 Immune rejection against rechallenged wild type tumor cells in the mice primed by gene modified tumor cells

表 3 CMT93 形成的肿瘤经治疗后不同时期的肿瘤大 ($\text{cm}^3, \bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Tumor sizes in the mice treated by CMT93 or its gene transfectant

Days	Tumor sizes (cm^3) in the mice treated by	
	CMT93	CMT93/B7 + MCP-3
5	0.008 ± 0.006	0.001 ± 0.002 [△]
10	0.056 ± 0.011	0.009 ± 0.007 [▲]
15	0.152 ± 0.023	0.057 ± 0.038 [▲]
20	0.293 ± 0.042	0.078 ± 0.047 [▲]

△ $P > 0.05$ compared to CMT93 group;

▲ $P < 0.01$ compared to CMT93 group

3 讨论

肿瘤免疫基因治疗的发展表明: 大部分转染单一基因的瘤细胞虽然使肿瘤细胞的致癌性显著下降, 而且也能诱导针对野生型瘤细胞的免疫保护, 但是将其作为疫苗治疗已形成的肿瘤疗效有限, 因此许多研究者转向将两个或两个以上的基因共同转染肿瘤细胞^[14,11], 希望通过这种方法诱导更强的免疫反应, 以便对已形成的肿瘤有更高的疗效。

Dilloo 等^[5]将趋化因子 lymphotactin (Lptn) 基因和 IL-2 基因转染纤维母细胞建立了一种“吸引—扩增”的抗肿瘤免疫新机制。通过这种机制增加了 T 淋巴细胞的浸润和扩增, 诱导了 CD4 和 CD8 依赖的免疫

反应,使已形成的肿瘤得以消退。Narvaiza 等^[6]将鼠 IP-10 基因和 IL-12 基因共同注射于大肠癌 CT26 模型,发现不仅肿瘤 100% 消退,而且对远处接种的肿瘤也有作用,其原理也是基于“吸引—扩增”的机制。

间具有协同效应。提示共转染 B7 基因和 MCP-3 基因的瘤细胞作为肿瘤疫苗有临床参考价值。

[参 考 文 献]

- [1] Gaken JA, Hollingsworth SJ, Hirst WJ, *et al.* Irradiated NC adenocarcinoma cells transduced with both B7.1 and interleukin-2 induce CD4⁺-mediated rejection of established tumors[J]. *Hum Gene Ther*, 1997, 8(4): 477-488.
- [2] Emtage PC, Wan Y, Muller W, *et al.* Enhanced interleukin-2 gene transfer immunotherapy of breast cancer by coexpression of B7-1 and B7-2[J]. *J Interferon Cytokine Res*, 1998, 18(11): 927-937.
- [3] Kato K, Okumura K, Yagita H. Immunoregulation by B7 and IL-12 gene transfer[J]. *Leukemia*, 1997, 11, 3: 572-576.
- [4] Putzer BM, Hitt M, Muller WJ, *et al.* Interleukin 12 and B7-1 costimulatory molecule expressed by an adenovirus vector act synergistically to facilitate tumor regression[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(20): 10889-10894.
- [5] Dilloo D, Bacon K, Holden W, *et al.* Combined chemokine and cytokine gene transfer enhances antitumor immunity[J]. *Nature Med*, 1996, 2: 1090-1095.
- [6] Narvaiza I, Mazzolini G, Barajas M, *et al.* Intratumoral coinjection of two adenoviruses, one encoding the chemokine IFN-gamma-inducible protein-10 and another encoding IL-12, results in marked antitumoral synergy[J]. *J Immunol*, 2000, 164(6): 3112-3122.
- [7] McCune CS, O'Donnell RW, Marquis DM, *et al.* Renal cell carcinoma treated by vaccines for active specific immunotherapy: Correlation of survival with skin testing by autologous tumor cell-bacillus Calmette-Guerin vaccine[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 1990, 32: 62-66.
- [8] Deng X, Ueda H, Su SB, *et al.* A synthetic peptide derived from human immunodeficiency virus type 1 gp120 downregulates the expression and function of chemokine receptors CCR5 and CXCR4 in monocytes by activating the 7-transmembrane G-protein-coupled receptor FPRL1/LXA4R[J]. *Blood*, 1999, 94(4): 1165-1173.
- [9] Chong H, Hutchinson G, Hart IR, *et al.* Expression of Co-stimulatory molecules by tumor cells decreases tumorigenicity but may also reduce systemic antitumor immunity[J]. *Hum Gene Ther*, 1996, 7(14): 1771-1779.
- [10] Chen L, Ashe S, Brady WA, *et al.* Costimulation of antitumor immunity by the B7 counter-receptor for the T lymphocyte molecules CD28 and CTLA-4[J]. *Cell*, 1992, 71: 1093-1109.
- [11] Hurwiz AA, Townsend SE, Yu TE, *et al.* Enhancement of the anti-tumor immune response using a combination of interferon-gamma and B7 expression in an experimental mammary carcinoma[J]. *Int J Cancer*, 1998, 77(1): 107-113.
- [12] 胡锦跃, 李官成, 朱建高, 等. 转染趋化因子 MCP-3 基因诱导抗大肠癌主动免疫[J]. *癌症*, 2002, 21(5): 504-508.
- [13] Hu JY, Wang S, Zhu JG, *et al.* Expression of B7 costimulation molecules by colorectal cancer cells reduces tumorigenicity and induces anti-tumor immunity[J]. *World J Gastroenterol*, 1999, 5(2): 147-151.
- [14] 胡锦跃, 王 飒, 朱建高, 等. B7 基因修饰的肿瘤细胞诱导抗大肠癌主动免疫[J]. *中国肿瘤临床*, 2000, 27(2): 45-49.
- [15] 吴宜林, 陶光实, 胡锦跃, 等. 趋化因子 MCP-3 协同 B7 诱导小鼠抗宫颈癌的主动免疫效果[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2001, 8(2): 98-101

图 5 基因修饰瘤细胞作用疫苗对已形成肿瘤生长的抑制作用

Fig. 5 Inhibition of the tumor growth in the mice treated by gene modified tumor cells

本研究中将 B7 基因和趋化因子 MCP-3 基因共转染小鼠大肠癌 CMT93 细胞。与“吸引—扩增”机制不同,我们所选择的是一种“吸引—活化”的机制,这种机制基于趋化因子 MCP-3 在肿瘤局部能引起免疫细胞浸润,而肿瘤细胞表达共刺激 B7 分子能促进已浸润的免疫细胞活化。

单独转染 MCP-3 基因后,瘤细胞的致瘤性虽然不能完全消失,但肿瘤的生长速度与对照组相比明显下降;组织学检查中发现在肿瘤局部中有明显的免疫细胞浸润^[12]。转染 B7 基因后,肿瘤的致瘤性显著下降,而且肿瘤消退的小鼠诱导了针对野生型瘤细胞的免疫保护反应^[13-14],但转染 B7 基因的瘤细胞作为疫苗治疗已形成的肿瘤,疗效不显著(数据未显示)。在已往的研究中,共转染 B7 基因和 MCP-3 基因诱导了抗小鼠宫颈癌的主动免疫^[15]。本研究中,共转染 B7 基因及 MCP-3 基因的大肠癌细胞其致瘤性下降更为显著,所有接种早期形成的肿瘤都逐渐被排斥(图 3),经 CMT93/B7 + MCP-3 免疫后的小鼠诱导了野生型瘤细胞的免疫保护作用,再接种野生型瘤细胞的 5 只小鼠中只有 1 只小鼠形成肿瘤,且该肿瘤比对照组肿瘤生长缓慢(图 4)。选择 CMT93/B7 + MCP-3 作为疫苗治疗早期形成的肿瘤。结果发现 CMT93/B7 + MCP-3 治疗组肿瘤较对照组肿瘤生长缓慢(图 5),至 20 d 时,实验组中 1 只小鼠的肿瘤完全消退。结果显示共转染 B7 基因和 MCP-3 基因诱导的免疫反应优于单独转染 MCP-3 基因或单独转染 B7 基因,说明 MCP-3 与 B7 之