

[文章编号] 1007-385X(2002)03-0163-05

HSP70-肿瘤肽对小鼠肝癌的抗肿瘤免疫效应

陈代雄¹, 苏艳蓉², 钱振超³(1. 遵义医学院附属医院贵州省细胞工程重点实验室, 遵义 563003; 2. 北京大学医学部免疫学系; 3. 大连医科大学肿瘤研究所生物治疗中心)

[摘要] 目的: 观察 HSP70-肿瘤肽介导的非 MHC- I 限制性抗肿瘤免疫效应。方法: 通过主动免疫和继承性免疫保护试验, 观察从热休克小鼠肝癌 HCaF 细胞纯化的 HSP70-肿瘤肽对 HCaF(MHC- I 类分子表达阴性) 的抗肿瘤免疫效果。结果: 用源自 HCaF 细胞的 HSP70-肿瘤肽主动免疫小鼠, 可获得对 HCaF 细胞攻击的主动免疫保护效果, 雌性组明显优于雄性组。转输 HSP70-肿瘤肽免疫后抗 HCaF 细胞攻击的小鼠脾细胞, 能产生良好的过继性免疫保护效果, 可耐受 HCaF 细胞反复攻击, 以 1×10^7 个活瘤细胞攻击亦未致瘤。转输 HSP70-肿瘤肽体外致敏的脾细胞, 也能使宿主产生一定的抗 HCaF 免疫效果。结论: 从 HCaF 细胞纯化的 HSP70-肿瘤肽可激发宿主产生非 MHC- I 限制性抗肿瘤免疫保护效应, 其强度可藉反复攻击而增强, 并可通过免疫脾细胞继承性传递。

[关键词] 热休克蛋白 70-肿瘤肽; 肝癌; 免疫治疗

[中图分类号] R730.51 [文献标识码] A

The Effect of Antitumor Immunity Elicited by Heat Shock Protein70-Associated Peptide Complexes on Hepatoma in Mice

CHEN Dai-xiong¹, SU Yan-rong², QIAN Zhen-chao³(1. Key Laboratory of Cell Engineering of Guizhou Province, The Affiliated Hospital of Zunyi Medical College; Zunyi, 563003, China; 2. Department of Immunology, Health Science Center, Peking University, Beijing 100083, China; 3. Research Center of Cancer Biotherapy, Institute of Cancer Research, Dalian Medical University, Dalian 116027, China)

[Abstract] **Objective:** To observe effective of antitumor immunity elicited by heat shock protein70(HSP70)-associated peptide complexes isolated from hepatoma (HCaF), a tumor model of no MHC- I molecule expression in mice. **Methods:** Specific active immunization and adoptive cellular immunization assay was adopted to observe the immunoprotective effect elicited by HSP70-associated peptide complexes purified from the HCaF. **Results:** Mice immunized with HSP70-associated peptide complexes were protected from HCaF challenge. The immunoprotective effect in female mice was better than the male groups. Adoptively transferred immune spleen cells of mice which had been immunized with HSP70-associated peptide complexes could be elicited immunity against HCaF challenge, and the mice free of tumor can resist repeated challenge, the maximal challenge-quantities exceeded 1×10^7 HCaF cells. Mice immunized once with spleen cells pulsed by HSP70-associated peptide complexes could also be elicited certain immunity against HCaF challenge. **Conclusions:** HSP70-associated peptide complexes derived from the HCaF can elicit no-MHC- I molecule restrictive immunoprotective effect against HCaF and could be continuously enhanced by repeated challenge with alive HCaF cells. Adoptively transferred immune spleen cells of mice which had been immunized with HSP70-associated peptide complexes could provide protection against HCaF cells challenge.

[Key words] heat shock protein70-peptide complexes; hepatoma; immunotherapy

* 热休克蛋白(heat shock protein, HSP)作为一种分子伴侣, 在维持细胞的正常结构和功能方面起着重要作用。近年来发现, 源自肿瘤组织的 HSP-肽复合物无

* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目(39730440- II)

[作者简介] 陈代雄(1949-), 男, 重庆市人, 硕士, 教授, 主要从事肿瘤免疫学和肿瘤分子病理学研究。

同种异型性,能激活多个 CTL 克隆,产生特异的杀伤肿瘤细胞效应,而且所激发的持久的 T 细胞免疫显示记忆细胞特性,因而 HSP-肿瘤肽复合物可能是一种较理想的抗肿瘤疫苗^[1-3]。有实验证明,外源性 HSP-肿瘤肽复合物进入体内后,由特殊的巨噬细胞亚群摄取、内化,并通过某种途径递呈给 MHC-I 类分子,继而激活特异的 CD8⁺ CTL,以 MHC-I 限制的方式杀伤肿瘤细胞^[4]。本研究以 MHC-I 类分子表达阴性的瘤株小鼠肝癌 HCaF(H-2K⁻)为模型,探讨 HSP70-肿瘤肽的非 MHC-I 限制性抗肿瘤免疫效应及其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物和瘤株

BALB/c 系小鼠(H-2^d),清洁级,6~8 周龄,体重 18~20 g,购自上海西普尔必凯实验动物有限公司。小鼠腹水型肝癌 H22(H-2K⁻)高淋巴转移亚系 HCaF 由大连医科大学肿瘤研究所提供,本室用昆明种小鼠常规腹腔传代保种。

1.1.2 主要试剂

重组人白细胞介素 2(rhIL-2)购自南京军区军事医学研究所;新生小牛血清(NCS)、RPMI-1640、HEPES 等均购自 GIBCO 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 HSP70-肿瘤肽及肝癌细胞或肝细胞匀浆透析物的制备

收集腹腔传代第 6~7 天的 HCaF 细胞,42℃ 水浴热休克 12 h,37℃ 恢复 2 h,PBS 洗涤 3 次,细胞沉淀经低速匀浆后超速离心→ConA-Sephrose→ADP-Agarose→DEAE 离子交换纯化 HSP70-肿瘤肽。经 SDS-PAGE、银染检测和 Western blot 鉴定,纯化产物为高纯度的 HSP70-肿瘤肽蛋白(另文发表)。临用前,用 PBS(pH7.26)溶解 HSP70-肿瘤肽,SDS-PAGE 检测其完整性,Bradford 法测定蛋白浓度。热休克的 HCaF 细胞匀浆或 BALB/c 小鼠肝细胞匀浆 100 000 g 4℃ 超速离心 90 min,上清液于 4℃ PBS 中透析 48 h,每 8 小时更换透析液 1 次,透析结束后测定蛋白浓度,-30℃ 暂存备用。

1.2.2 HCaF 瘤细胞悬液的制备

无菌抽取腹腔传代第 6~7 天的 HCaF 瘤性腹水,用 PBS 调节至所需细胞密度备用。攻击前用台盼蓝染色检查细胞活力应 ≥98%。

1.2.3 HSP70-肿瘤肽主动免疫保护试验

BALB/C 小鼠随机分为 5 组,每组 10~12 只,雌雄各半,雌雄分笼饲养。A 组和 B 组分别为 HSP70-肿瘤

肽 6 μg/(100 μl·次·只)和 12 μg/(100 μl·次·只)免疫组,C 组为 12 μg/(100 μl·次·只)热休克的 HCaF 瘤细胞匀浆上清液透析物(S-HCaF)免疫组,D 组为 12 μg/(100 μl·次·只)热休克肝细胞匀浆上清液透析物(S-HC)免疫组,E 组为 100 μl/(次·只)PBS 组。各组均经皮下注射免疫小鼠,间隔 1 周,共免疫 2 次。于末次免疫后 1 周,每只小鼠右腋皮下接种 5 × 10⁴个/100 μl 活 HCaF 瘤细胞,动态观察肿瘤生长情况。每 2 天用游标卡尺测量肿瘤的最大和最小直径,以平均直径求出瘤体积,记录荷瘤小鼠的存活时间、死亡时的体重、瘤重及脾重,计算存活时间延长率和抑瘤率。

1.2.4 继承性免疫保护试验

取经 HSP70-肿瘤肽主动免疫,HCaF 细胞攻击后 1 个月仍未生长肿瘤的小鼠脾脏,制成细胞悬液(免疫脾细胞)。每只正常 BALB/c 小鼠经尾静脉转输 1 × 10⁷/0.2 ml 免疫脾细胞,间隔 5 d 再等量转输 1 次。于末次转输后第 3 天,每只小鼠右腋皮下接种 5 × 10⁴/100 μl 活 HCaF 细胞。对照组(转输同龄健康 BALB/c 小鼠脾细胞悬液)小鼠同部位等量接种肿瘤细胞。观察指标同主动免疫保护试验。对于接种 HCaF 细胞不长肿瘤的小鼠,于第 50 天进行第 2 次 HCaF 细胞攻击(1 × 10⁵活瘤细胞/只)。耐受第 2 次攻击的小鼠,于第 2 次攻击后第 25 天进行第 3 次攻击(1 × 10⁷活瘤细胞/只)。每次攻击均设攻击对照。

1.2.5 脾细胞体外致敏与继承性免疫保护试验

制备正常 BALB/c 小鼠脾细胞悬液,按 1 × 10⁶脾细胞/ml 加入 rhIL-2 100 U 分 4 组培养。其中 1 组不加任何制剂致敏,其余 3 组分别加入 HSP70-肿瘤肽 15 μg/ml、热休克的 HCaF 细胞匀浆上清液透析物 15 μg/ml 和肝细胞匀浆上清液透析物 15 μg/ml。置于 37℃,5% CO₂ 培养箱培养 48 h,半量换液,补充 rhIL-2(终浓度 100 U/ml),换瓶以除去黏附细胞,继续培养 3 d。分别收集各组脾细胞,调细胞数至 5 × 10⁷/ml,经尾静脉转输 BALB/c 小鼠(1 × 10⁷/只)。各组小鼠于转输脾细胞后第 3 天,以 5 × 10⁴个活 HCaF 细胞右腋皮下攻击。观察指标同主动免疫保护试验。

1.3 统计学处理

应用 SPSS8.0 统计学软件处理实验数据。致瘤率、60 d 存活率用卡方精确检验法,荷瘤动物平均存活时间、平均瘤重、脾重、存活时间延长率、抑瘤率检验采用方差分析,瘤体积经平方根转换后用方差分析检验。

2 结果

2.1 HSP70-肿瘤肽的主动免疫保护效果

从图 1 和表 1 可见,不同剂量 HSP70-肿瘤肽免疫小鼠,对 HCaF 细胞攻击均获得了不同程度的免疫保护效果,雌性组优于雄性组。在 HSP70-肿瘤肽免疫的雌性鼠中,12 μg 组优于 6 μg 组,前者的存活率达 83.3%,后者为 60%。S-HCaF 免疫的雌性鼠也获得了一定的免疫保护效果,无论其存活率还是荷瘤小鼠的平均存活时间(MST),均与 S-HC 和 PBS 组有明显差别($P < 0.01$)。尽管雄性鼠各组间的致瘤率无差别,但两个不同剂量的 HSP70-肿瘤肽免疫组荷瘤鼠的 MST 均较 S-HCaF, S-HC 和 PBS 组明显延长($P < 0.05$)。

从 HCaF 细胞攻击后第 10 天和第 15 天各组荷瘤小鼠肿瘤生长情况看,HSP70-肿瘤肽和 S-HCaF 免疫组的瘤体明显小于 S-HC 和 PBS 组,说明肿瘤生长受

到抑制(见表 2)。

图 1 HSP70-肿瘤肽抗肿瘤免疫保护效果

Fig. 1 Immunoprotective effect of HSP70-peptide complexes against tumor

表 1 HSP70-肿瘤肽免疫后荷瘤小鼠存活时间的比较

Tab. 1 Comparison of survival time of tumor-bearing mice after immunized by HSP70-peptide complexes

Groups	Sex	No. of tumor-bearing/ No. of mice challenged	Survival time of tumor-bearing ($\bar{x} \pm s$, days)	Prolonged rate of survival time (%) [△]
HSP70 6μg	female	2/6	48.0 ± 8.5*▲	67.4**▲
	male	6/6	31.0 ± 13.2	49.7□
12μg	female	1/6	33	
	male	6/6	30.7 ± 12.7	48.4□
S-HCaF	female	5/6	59.2 ± 10.0**▲	106.5**▲
	male	6/6	20.3 ± 0.9	-2.0
S-HC	female	6/6	24.0 ± 5.8	-16.3
	male	6/6	18.5 ± 0.6	-10.5
PBS	female	6/6	28.7 ± 11.6	
	male	6/6	20.7 ± 6.1	

* $P < 0.05$ compared with PBS; ** $P < 0.01$ compared with PBS; ▲ $P < 0.01$ compared with S-HC;

□ $P < 0.05$ compared with S-HC; △ prolonged rate of survival time = $\frac{\text{MST of experimental group} - \text{MST of control group}}{\text{MST of control group}} \times 100\%$

雌性鼠 HSP70-肿瘤肽免疫组(6 μg)瘤重和脾重大于 S-HCaF, S-HC 和 PBS 组($P < 0.01$), S-HCaF 组瘤重和脾重也大于 S-HC 和 PBS 组($P < 0.05$)。雄性鼠各组间瘤重和脾重均无明显差异($P > 0.05$) (表 3)。

2.2 转输免疫脾细胞后继发性免疫保护效果

给小鼠转输免疫脾细胞(ISC)后,用 5×10^4 个 HCaF 细胞攻击,长期存活率达 75%,荷瘤小鼠(2/8)平均存活时间较转输未免疫脾细胞(SC)和攻击对照组明显延长(见表 4)。对 HCaF 攻击获得免疫保护的小鼠用 HCaF 细胞进行第 2 次攻击(5×10^5 /只),致瘤率仅 16.7%(1/6),而对照组则为 100%(6/6),并于 27.5 d 全部死亡。对第 2 次攻击仍存活的小鼠以 $1 \times$

10^7 个瘤细胞/只进行第 3 次攻击,均未长瘤,且长期存活(>90 d),而对照组小鼠均致瘤(6/6),于攻击后 22 d 内全部死亡。

转输经 HSP70-肿瘤肽体外致敏的脾细胞(1×10^7 /只)后,小鼠对 HCaF 细胞攻击的致瘤率为 80%,荷瘤小鼠的平均存活时间为(42.0 ± 13.6) d。但 S-HCaF, S-HC 和 PBS 对照组的致瘤率均为 100%,所有荷瘤小鼠于 26~33 d 全部死亡。

3 讨论

HCaF 是一由小鼠腹水型肝癌 H22 转型的高淋巴转移亚株(H-2K⁻),MHC-I 类分子表达阴性,对多种

不同品系小鼠(昆明种、BALB/c、C3H/hej、615 系等)的致瘤率为 100%。我们的实验也证明, BALB/c 小鼠皮下接种 HCaF 3×10^4 个活瘤细胞就可使小鼠 100%

致瘤。可以认为, 以该瘤株为模型所获得的主动免疫抗肿瘤效应是非 MHC- I 类分子限制性的。

表 2 HSP70-肿瘤肽免疫后 HCaF 荷瘤鼠肿瘤生长情况的比较

Tab. 2 Comparison of tumor growth in mice immunized with HSP70-peptide complexes

Groups	sex	No. of tumor-bearing mice	10 days after HCaF challenge		15 days after HCaF challenge	
			Size of tumor (mm ³)	Inhibition rate(%) [△]	Size of tumor (mm ³)	Inhibition rate(%)
HSP70 6μg	female	2	0.88**▲	97.0*▲	6.66**▲	98.5*□
	male	6	61.98**▲	80.2**▲	384.77**□	83.2**□
12μg	female	1	0.45	98.4	5.74	
	male	6	64.49**	79.4**▲	515.10**□	77.6**□
S-HCaF	female	5	3.09**▲	89.2**▲	10.21**▲	97.7**▲
	male	6	24.27**▲	92.2**▲	501.55**	78.2**▲
S-HC	female	6	30.00	-4.5	402.17	8.2
	male	6	204.89	34.5	1554.30	32.3
PBS	female	6	28.70		438.17	
	male	6	312.83		2295.52	

* $P < 0.05$ compared with PBS; ** $P < 0.01$ compared with PBS; ▲ $P < 0.05$ compared with S-HC;

□ $P < 0.01$ compared with S-HC; △ Inhibition rate (%) = $1 - \frac{\text{tumor size of experimental group}}{\text{tumor size of control group(PBS)}} \times 100\%$

表 3 荷瘤小鼠死亡时瘤重及脾重比较($\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Comparison of tumor weight and spleen weight after tumor-bearing mice death

Groups	Female			Male		
	No. of tumor-bearing mice	Tumor wt. (g)	Spleen wt. (g)	No. of tumor-bearing mice	Tumor wt. (g)	Spleen wt. (g)
HSP70 6 μg	2	14.40 ± 6.22**▲□	0.93 ± 0.18**▲■	6	7.06 ± 2.59	0.19 ± 0.04
12 μg	1	6.5	0.4	6	7.51 ± 2.33	0.20 ± 0.11
S-HCaF	6	8.68 ± 1.65 [△]	0.53 ± 0.22**▲	6	5.06 ± 0.71	0.24 ± 0.10
S-HC	5	4.72 ± 1.65	0.17 ± 0.08	6	4.98 ± 1.04	0.14 ± 0.02
PBS	6	6.78 ± 1.34	0.25 ± 0.06	6	6.30 ± 2.18	0.12 ± 0.07

** $P < 0.01$ compared with PBS; △ $P < 0.05$ compared with S-HC; ▲ $P < 0.01$ compared with S-HC;

□ $P < 0.05$ compared with S-HCaF; ■ $P < 0.01$ compared with S-HCaF

表 4 转输免疫脾细胞对 HCaF 攻击的继承性免疫保护效果

Tab. 4 Adoptive immunoprotective effect against HCaF challenge elicited by transfer of ISC

Groups	Survival rate(%)	Survival time of tumor-bearing mice ($\bar{x} \pm s$, days)	Prolonged rate of survival time (%)	Tumor wt. (g) ($\bar{x} \pm s$)	Spleen wt. (g) ($\bar{x} \pm s$)
	(No. of deaths/No. of mice challenged)				
ISC	75(2/8)*	50.5 ± 9.2**	71.0**	14.92 ± 0.42**▲	0.39 ± 0.01**▲
SC	0(8/8)	36.8 ± 12.9	24.6	7.73 ± 2.14	0.18 ± 0.05
Chal. control	0(8/8)	29.5 ± 3.9	0	7.35 ± 1.16	0.21 ± 0.05

* : $P < 0.05$ compared with chal. control; ** $P < 0.01$ compared with chal. control; ▲ $P < 0.01$ compared with SC

HSP 本身并不具备免疫原性,其免疫原性来自所携带的肿瘤肽^[2,5]。本实验表明,我们纯化的 HSP70 具有免疫原性。据此,实验中用 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定的 HSP70 应视为 HSP70-肿瘤肽。

本实验结果表明,用源自热休克 HCaF 细胞的 HSP70-肿瘤肽进行主动免疫后,小鼠对 HCaF 产生了明显的抗瘤保护作用,12 μg 组优于 6 μg 组。实验结果进一步发现,给正常小鼠转输 HSP70-肿瘤肽免疫后获得抗 HCaF 攻击的小鼠的免疫脾细胞,可获得对 HCaF 攻击的过继性免疫保护效应,且可藉反复攻击而不断增强,用 HCaF 1×10^7 个活细胞/只攻击也不致瘤。说明 HSP70-肿瘤肽免疫所诱导的抗肿瘤免疫效应具有相当的稳定性和保护强度,并可通过免疫脾细胞继发性传递,显示了免疫记忆特性。

有文献报道,在 MHC-I 类分子阳性肿瘤中,外源性 HSP 所激发的效应细胞主要是 CD8^+ CTL^[6]。值得提出,本实验所用瘤株 HCaF 不表达 MHC-I 类分子,在体内很难诱导肿瘤浸润淋巴细胞毒活性,也不可过 CD8^+ CTL 途径杀伤肿瘤细胞。有很多研究证明^[7-9],肿瘤细胞表面的 HSP70 可作为 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞识别的配体,越过 MHC 限制,介导 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞的增殖和杀伤效应,而且这种增殖和杀伤作用可被 HSP70 抗体阻抑。我们推测,本实验用纯化的 HSP70-肿瘤肽主动免疫所诱导的抗肿瘤免疫保护效应,主要是通过激活 $\text{CD4}^-\text{CD8}^-\gamma\delta\text{T}$ 细胞,以非 MHC 限制的方式识别 HCaF 细胞膜上的 HSP70 而实现的。

HCaF 细胞膜 HSP70 的自然表达率较高,43 $^{\circ}\text{C}$ 热休克 4 h 后,膜 HSP70 阳性表达率为 75.51%^[10]。直接用热休克 H22 细胞或热休克灭能 H22 瘤苗免疫小鼠就能产生一定的免疫保护效应^[11-12]。本实验用热休克的 HCaF 匀浆上清液透析物免疫小鼠也能产生一定的抗肿瘤免疫效果。我们还不能解释,为什么用热休克正常肝细胞匀浆上清液透析物免疫后,肿瘤生长较 PBS 组快,荷瘤小鼠平均存活时间缩短。这是否与正常肝细胞匀浆上清液透析物诱导宿主免疫耐受,抑或与存在某种促瘤因素有关,值得探讨。

比较各组荷瘤小鼠死亡时的脾重发现,HSP70-肿瘤肽主动免疫组的平均脾重,明显高于肝细胞匀浆上清液透析物和 PBS 组。说明脾细胞的增殖在主动免疫应答中起重要作用。过继免疫试验也证明,转输 HSP70-肿瘤肽主动免疫小鼠的脾细胞可以获得较好的免疫保护效果。转输 HSP70-肿瘤肽体外致敏的脾细胞也有一定的免疫保护作用。进一步对 HSP70-肿瘤肽体外致敏剂量、致敏脾细胞的扩增及转输致敏脾细胞密度等进行优化,对评价 HSP70-肿瘤肽作为疫苗的

应用前景是很重要的。

实验中发现,HSP70-肿瘤肽免疫的雌性鼠组对 HCaF 攻击的保护效果明显优于雄性鼠,对照组荷瘤鼠的平均存活时间也是雌性鼠比雄性鼠长。国外有关 HSP70-肿瘤肽体内免疫抗瘤的动物实验,几乎只用雌性小鼠而不用雄性鼠^[13-14]。似乎用雌性鼠作为肿瘤免疫治疗实验优于雄性鼠。我们的实验结果符合这一规律。看来 HSP70-肿瘤肽所激发的抗肿瘤免疫强度与性激素有关,这为 HSP70-肿瘤肽免疫联合雌激素的治疗方案提供了新的思路,颇值得深入研究。

[参考文献]

- [1] Breloer M, Marti T, Fkeischer B, *et al.* Isolation of processed, H-2k^b-binding ovalbumin-derived peptides associated with the stress proteins HSP70 and GP96[J]. *Eur J Immunol*, 1998, 28: 1016-1021.
- [2] Udono H, Srivastava PK. Heat shock protein70-associated peptides elicit specific cancer immunity[J]. *J Exp Med*, 1993, 178: 1391-1396.
- [3] Udono H, Srivastava PK. Comparison of tumor-specific immunogenicities of stress-induced protein gp96, hsp90, and hsp70[J]. *J Immunol*, 1994, 152: 5398-5403.
- [4] Suto K, Srivastava PK. A mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein-chaperoned peptides[J]. *Science*, 1995, 269: 1585-1588.
- [5] 岳培彬, 杨树. 热休克蛋白 g96 抗肿瘤免疫的研究进展[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2001, 8(3): 225-227.
- [6] Harada M, Kimura G, Nomoto K. Heat shock protein and the anti-tumor T cell response[J]. *Biotherapy*, 1998, 10(3): 229-235.
- [7] Tamura Y, Tsuboi N, Sato N. 70 Kda heat shock protein is a transformation-associated antigen and a possible target for the host's anti-tumor immunity[J]. *J Immunol*, 1993, 151: 5516-5524.
- [8] 李新燕, 张学光, 张毅, 等. 特异性扩增人 $\gamma\delta\text{T}$ 及其生物学特性研究[J]. *中华医学杂志*, 1997, 7(2): 111-115.
- [9] 江晓丰, 张学光, 李新燕, 等. $\gamma\delta\text{T}$ 细胞识别人多发现骨髓瘤细胞 XG-7 膜热休克蛋白 70[J]. *中国免疫学杂志*, 1999, 15: 160-162.
- [10] 傅庆国, 刘军, 郭仁宣, 等. 小鼠肝癌细胞膜上 HSP70 的表达及检测分析[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 1999, 15(2): 131-132.
- [11] 吴伟忠, 汤晓雷, 刘康达, 等. 鼠肝癌细胞的热休克蛋白诱导及其抗瘤机理研究[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 1999, 19(5): 272-277.
- [12] 顾君一, 张天一, 王华, 等. 热休克预处理对瘤苗效果的影响[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2000, 7(2): 146-147.
- [13] Peng P, Menoret Antoine, Srivastava PK, *et al.* Purification of immunogenic heat shock protein 70-peptide complexes by ADP-affinity chromatography[J]. *J of Immunol Meth*, 1997, 204: 13-21.
- [14] Udono H, Levey DL, Srivastava PK, *et al.* Cellular requirement for tumor-specific immunity elicited by heat shock proteins: Tumor rejection antigen gp96 primes CD8^+ T cells *in vivo*[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 3077-3081.

[收稿日期] 2002-03-19

[修回日期] 2002-05-03