

· 论 著 ·

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2006 )06-0442-05

## 紫杉醇与肿瘤疫苗联合应用对小鼠 Lewis 肺癌皮下移植瘤的治疗效果

郑秀娟, 张 镭, 林 怡, 张 毅, 胡红明, 储以微 ( 复旦大学上海医学院免疫学系、教育部分子医学重点实验室, 上海 200032 )

[ 摘 要 ] **目的:** 评价化疗药物紫杉醇联合应用肿瘤疫苗对小鼠 Lewis 肺癌皮下移植瘤的治疗效果。**方法:** 以编码有 GM-CSF 的腺病毒感染 Lewis 肺癌细胞 3LL, 制备肿瘤疫苗 3LL/GM-CSF。以  $2 \times 10^4$  个 3LL 瘤细胞皮下注射 C57BL/6( H-2<sup>b</sup> ) 小鼠腹股沟部, 制备小鼠皮下移植瘤。检测体内、外应用紫杉醇对 Lewis 肺癌细胞 3LL 的杀伤敏感性。在小鼠 Lewis 肺癌皮下移植瘤体内首先以紫杉醇化疗, 随后以肿瘤疫苗 3LL/GM-CSF 免疫; 或反之, 首先以肿瘤疫苗免疫, 随后以紫杉醇化疗, 观察肿瘤生长和小鼠生存状况, 以及检测小鼠体内对肿瘤的特异性杀伤效率和免疫应答记忆反应。**结果:** 紫杉醇体外作用于 3LL 肿瘤细胞, 24 h 后在浓度为 100 nmol/L 时可使 32.10% 的 3LL 肿瘤细胞发生死亡; 但体内注射紫杉醇( 5、10 和 25 mg/kg ) 不能使所有 3LL 荷瘤小鼠肿瘤消退。体内使用紫杉醇后应用 3LL/GM-CSF 肿瘤疫苗, 70% 的荷瘤小鼠发生显著的肿瘤消退, 与单纯化疗的小鼠相比生存时间明显延长( 70.0 vs 27.5 d ); 化疗后应用肿瘤疫苗诱导了体内对 3LL 的特异性杀伤, 第 3 天体内杀伤率达 41.35%; 同时, 存活小鼠能抵抗  $2 \times 10^4$  3LL 肿瘤细胞的再次攻击。接种 3LL/GM-CSF 肿瘤疫苗后应用紫杉醇化疗却不能使肿瘤消退。**结论:** 化疗后应用肿瘤疫苗免疫可诱导出抗原特异性免疫效应, 使荷瘤小鼠肿瘤消退并延长生存时间, 为临床开展化疗后的肿瘤疫苗主动免疫提供了实验依据。

[ 关键词 ] 紫杉醇; 肿瘤疫苗; 3LL/GM-CSF; 肿瘤免疫治疗

[ 中图分类号 ] R392.11 [ 文献标识码 ] A

## Efficacy of 3LL/GM-CSF tumor vaccine combined with paclitaxel chemotherapy in treatment of mice bearing transplanted Lewis lung carcinoma

ZHENG Xiu-juan, ZHANG Lei, LIN Yi, ZHANG Yi, HU Hong-ming, CHU Yi-wei ( Department of Immunology, Shanghai Medical College, Fudan University; Key Laboratory of Molecular Medicine, Ministry of Education, Shanghai 200032, China )

[ Abstract ] **Objective:** To evaluate the efficacy of 3LL/GM-CSF tumor vaccine combined with paclitaxel chemotherapy in treatment of mice bearing transplanted Lewis lung carcinoma. **Methods:** The tumor vaccine 3LL/GM-CSF was prepared by infecting Lewis lung carcinoma cell line 3LL with adenovirus encoding GM-CSF. Mice model of Lewis lung carcinoma was established by subcutaneous injection of  $2 \times 10^4$  3LL cells into C57BL/6( H-2<sup>b</sup> ) mice. The sensitivity of Lewis lung carcinoma cell line-3LL to the treatment of paclitaxel was detected *in vivo* and *in vitro*. The mice tumor model was first treated with paclitaxel chemotherapy and then with 3LL/GM-CSF, or first with 3LL/GM-CSF and then with paclitaxel. Tumor growth and the long-term survival of mice were observed after treatment. The immune memory and cytotoxicity against target cells were studied in the mice. **Results:** Paclitaxel at 100 nmol/L killed 32.10% 3LL cells after 24 hour *in vitro*; but paclitaxel at 5-25 mg/kg only had a poor effect on growth of 3LL cells *in vivo*. The tumors regressed in 70% of mice treated with paclitaxel chemotherapy and 3LL/GM-CSF vaccination successively, and the survival of these mice was obviously longer than that of pure paclitaxel chemotherapy group ( 70.0 days vs 27.5 days ). The killing rate of 3LL/GM-CSF after paclitaxel chemotherapy was 41.35% on day 3. Meanwhile, the survival mice could resist the re-attack of 3LL cells (  $2 \times 10^4$  ). We also noticed that first treatment with 3LL/GM-CSF and then paclitaxel chemotherapy had no effect on tumors. **Conclusion:** Application of tumor vaccine shortly after paclitaxel chemotherapy can induce specific immune responses and prolong the survival of experimental mice, which provide a basis for future clinical practice.

[ 基金项目 ] 国家自然科学基金资助项目( No. 30571713 ); 复旦大学上海医学院临床基础交叉基金资助项目( No. 2005JL19 )

[ 作者简介 ] 郑秀娟( 1956- ), 女, 上海人, 技师, 主要从事肿瘤免疫学方面的研究

[ 通讯作者 ] 储以微, E-mail: Yiwei\_chu@126.com

[ **Key words** ] paclitaxel; tumor vaccine; 3LL/GM-CSF; tumor immunotherapy

[ Chin J Cancer Biother, 2006, 13(6): 442-446 ]

紫杉醇(paclitaxel, 商品名为 Taxol)是从红豆杉树皮或针叶中提取或半合成的细胞周期特异性药物,抑制细胞的有丝分裂和增殖,被广泛应用于多种不同种类恶性肿瘤的治疗中<sup>[1,2]</sup>。尤其对非小细胞性肺癌,紫杉醇是最有效的化疗药物之一<sup>[3]</sup>。然而,仅用紫杉醇化疗对提高肿瘤患者长期存活率的作用比较有限,较少出现肿瘤完全消退,且多数患者最终由于抗药性的出现而导致化疗失败。

肿瘤的免疫生物治疗是重要的辅助治疗手段<sup>[4,5]</sup>。但是,以往的研究很少在化疗后开展肿瘤疫苗的主动免疫,认为化疗使机体的免疫细胞数减少,免疫功能受损,不利于机体对肿瘤疫苗产生免疫应答。然而,近年来的研究却发现化疗药物与肿瘤免疫生物治疗结合可以提高乳腺癌的存活率,其作用机制与产生较强的抗肿瘤应答有关<sup>[6,9]</sup>。基于此,本研究以紫杉醇联合肿瘤疫苗组成不同的用药方案作用于 Lewis 肺癌皮下移植瘤小鼠,观察肿瘤在体内的生长及荷瘤小鼠生存期,并检测免疫功能的改变,了解化疗联合肿瘤疫苗能否产生有效的抗肿瘤免疫,为临床开展化疗联合肿瘤疫苗的免疫治疗提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 小鼠与肿瘤细胞系

8~12 周龄雌性 C57BL/6(H-2<sup>b</sup>)小鼠,清洁级,购自并饲养于复旦大学实验动物科学部(实验动物合格证号:SCXK(沪)2002-0002)。Lewis 肺癌细胞株 3LL 源于 C57BL/6 小鼠的肺肿瘤,由交通大学肿瘤研究所赠送。3LLTR40 是耐受紫杉醇的细胞株,在体外经 40 nmol/L 紫杉醇筛选获得。培养肿瘤细胞所用完全培养液(CM)由 RPMI 1640(BioWhittaker, Walkersville, MD)和 10% FSC(Life Technologies, Grand Island, NY)组成。MUT1 八肽(FEQNTAQP)源自 3LL 细胞中 H-2K<sup>b</sup>CTL 限制性表位,由 Invitrogen 公司(Carlsbad, CA)按照要求合成,纯度大于 99%。

### 1.2 3LL/GM-CSF 肿瘤疫苗和小鼠皮下移植瘤的制备

将编码有 GM-CSF 的腺病毒在完全培养液(CM)中以 100 MOI 的剂量感染  $2 \times 10^6$  3LL 肿瘤细胞 1 h。感染后,细胞用 100 Gy 进行照射灭活,在含 10% DMSO 的 CM 中以  $20 \times 10^6$ /ml 的整数倍密度在液氮中保存。 $1 \times 10^6$  3LL/GM-CSF 细胞培养 24 h 后分泌 GM-CSF 的分泌量用 ELISA(试剂盒购自 B-D Pharmingen, CA)方法检测,GM-CSF 分泌量范围在 600~800 ng/ml。

小鼠皮下移植瘤的制备:以  $2 \times 10^4$  3LL 肿瘤细胞在右侧腹股沟处皮下注射小鼠,约 4 d 肿瘤生成并逐渐生长,每 2 或 3 d 以数码卡尺测量肿瘤生长,肿瘤面积以肿瘤最大径和最小径的乘积表示。当肿瘤最大径超过 12 mm 后,处死小鼠。

### 1.3 紫杉醇对 3LL 肿瘤细胞杀伤性观察

紫杉醇(Aventis, 80 mg 小瓶装)用 PBS 溶液稀释成质量浓度为 0.5 mg/ml 备用, -20 °C 保存。将 0、2、10、50、100 和 200 nmol/L 的紫杉醇加入在六孔板内培养的 3LL 细胞( $0.2 \times 10^6$ /ml)中,24 和 48 h 后收获所有细胞。用碘化丙啶(PI)染色后 FACS 检测细胞死亡百分率;浓度-反应曲线按照 GraphPad Prism(version 4)软件统计分析数据获得。

体内敏感性的检测方法:第 0 天以  $2 \times 10^4$  3LL 细胞皮下注射小鼠,随机分为 4 组:第 1 组( $n=8$ )未做任何处理;第 2 组( $n=8$ )在第 3 天和第 13 天用 5 mg/kg 紫杉醇腹腔内注射治疗;第 3 组( $n=7$ )以 10 mg/kg 紫杉醇腹腔内注射治疗,方案同第 2 组;第 4 组( $n=8$ )在以 25 mg/kg 紫杉醇腹腔内注射治疗,方案同第 2 组。肿瘤生长测量方法同 1.2。

### 1.4 紫杉醇与 3LL/GM-CSF 肿瘤疫苗的联合应用

皮下移植瘤模型小鼠随机分为 4 组,每组 10 只。对照组(control):荷瘤小鼠不作任何治疗;单纯治疗组(Taxol only):仅以 5 mg/kg 紫杉醇治疗,重复 2 次,间隔时间为 10 d;化疗+疫苗组(Taxol pre and 3LL-GM):腹腔内注射紫杉醇(5 mg/kg),4 d 后皮下注射肿瘤疫苗( $2 \times 10^6$  3LL/GM-CSF),用法同上;疫苗+化疗组(3LL-GM and Taxol post):第 6 天皮下注射肿瘤疫苗,第 8 天给予紫杉醇治疗,剂量和用法同上。按 1.3 方法检测肿瘤生长大小,记录荷瘤小鼠生存期。

### 1.5 体内杀伤实验

按文献<sup>[10]</sup>方法,将初始 C57BL/6 小鼠的脾淋巴细胞随机分为两组作为靶细胞。一组在 37 °C 以 10 μg/ml MUT-1 荷肽 1 h,然后在室温下用高浓度 CFSE(羧基端标记荧光素的琥珀二乙脂;Molecular Probes, OR) 20 μmol/L 标记 5 min(CFSE<sup>Hi</sup>)。另一组不荷有 MUT-1 肽的初始淋巴细胞用 0.5 μmol/L CFSE(CFSE<sup>Lo</sup>)标记作为体内对照。洗涤后,来自两组的同等数量但不同 CFSE 标记浓度的细胞相混合,共计  $1 \times 10^7$  细胞悬于 200 μl PBS 中,经尾静脉分别注射入(A)未经处理的小鼠、(B)单纯用紫杉醇化疗的小鼠、(C)先肿瘤疫苗治疗后化疗处理的小鼠和(D)先化疗处理再进行肿瘤疫苗治疗的

小鼠体内。第 3 天自眼眶后采血, FACS 分析。如体内淋巴细胞能够识别 MUT-1 肽, 则它对荷该肽的靶细胞(高浓度 CFSE, CFSE<sup>hi</sup>) 特异性杀伤, 而对未荷肽的靶细胞(低浓度 CFSE, CFSE<sup>lo</sup>) 不杀伤。计算方法如下: 首先计数每一组的 CFSE<sup>lo</sup> 与 CFSE<sup>hi</sup> 标记细胞被体内淋巴细胞杀伤的数量, 以百分比表示。杀伤率(%) = CFSE<sup>lo</sup> / CFSE<sup>hi</sup>。进一步计算特异性杀伤率: 特异性杀伤率(%) = (1 - 未活化杀伤率 / 活化杀伤率) × 100% (未活化杀伤率指对照组 A, 活化杀伤率分别指 B、C 和 D 组)。

1.6 体内保护实验

实验 1.4 中联合应用紫杉醇和肿瘤疫苗治疗荷瘤小鼠后, 肿瘤生长消退并长期生存的小鼠 (n = 7) 再次以 2 × 10<sup>4</sup> 3LL 细胞皮下注射, 观察小鼠是否成瘤。正常小鼠 (n = 6) 经同等数量肿瘤细胞皮下注射作为对照。

1.7 统计学处理

采用 SPSS10.0 和 GraphPad Prism (version 4) 软件, 应用 ANOVA one-way 对数据进行检验, 以 P < 0.05 为差异显著。

2 结果

2.1 紫杉醇对 3LL 肿瘤细胞的体内、外杀伤作用

体外以不同浓度的紫杉醇处理 3LL 肿瘤细胞和耐药的 3LLTR40 肿瘤细胞, 分别作用 24 h 和 48 h。结果发现: 3LL 肿瘤细胞在 nmol/L 浓度下即被杀死(图 1),

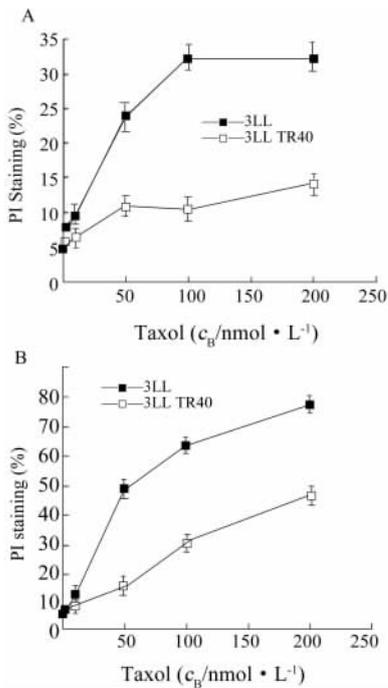


图 1 紫杉醇对 3LL 肿瘤细胞的体外杀伤作用  
Fig.1 Sensitivity of 3LL tumor cells to Taxol in vitro  
A: Treating for 24 h; B: Treating for 48 h

100 nmol/L 紫杉醇处理 3LL 细胞 24 h 后的细胞死亡率为 32.10%, 处理 48 h 后的浓度-反应曲线计算得 EC<sub>50</sub> 为 40 nmol/L。

体内实验结果显示, 皮下接种 2 × 10<sup>4</sup> 3LL 肿瘤细胞后, 对照组和接受 5 mg/kg 紫杉醇治疗的小鼠 100% 肿瘤生长, 10 mg/kg 紫杉醇治疗后 7 只小鼠中 6 只肿瘤生长; 25 mg/kg 治疗后 8 只小鼠中 6 只肿瘤生长。在所有肿瘤生长的小鼠中, 10 mg/kg 紫杉醇治疗小鼠肿瘤生长达到同样面积的速度(以时间天数表示)最为缓慢, 5 mg/kg 紫杉醇治疗小鼠肿瘤生长速度居中, 而 25 mg/kg 紫杉醇治疗小鼠肿瘤生长速度最快, 和对照组类似。经统计学分析, 各组小鼠肿瘤生长大小没有显著性差异 (P > 0.05, 图 2), 提示紫杉醇虽对肿瘤生长有延缓作用, 但不能使荷瘤小鼠体内的肿瘤消退。

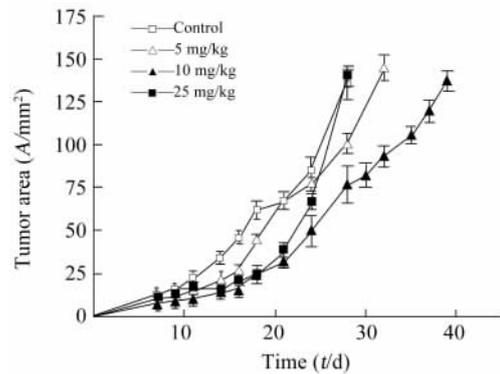


图 2 紫杉醇对小鼠 3LL 皮下移植瘤的体内杀伤作用  
Fig.2 Sensitivity of 3LL tumor cells to Taxol in vivo

2.2 紫杉醇化疗与肿瘤疫苗 3LL/GM-CSF 联合应用的抗肿瘤效应

结果显示: 化疗 + 疫苗组荷瘤小鼠的肿瘤明显消退, 10 只小鼠中的 7 只最初长出了可触及的肿瘤, 至 21 d 开始逐渐消退, 到 28 d 完全消退, 观察至 70 d 仍然存活; 另外 3 只小鼠则分别在 26、27 和 31 d 死亡。然而, 疫苗 + 化疗组或单纯化疗组的小鼠都未能发生肿瘤消退, 10 只小鼠全部有肿瘤生长。其中对照组的小鼠中位生存期为 25.5 d; 单纯化疗组的小鼠中位生存期为 27.5 d; 疫苗 + 化疗组的小鼠中位生存期为 34.5 d, 疫苗 + 化疗组与其它 3 组比较具有显著性差异(图 3, P < 0.05)。

2.3 紫杉醇化疗后应用肿瘤疫苗对体内特异性免疫杀伤效应的诱导

为证明荷瘤小鼠肿瘤消退是由免疫应答诱导的, 本研究使用体内 CTL 测定法直接检测体内的 CTL 活性。结果显示: 注射后第 3 天, 与未荷肽的低水平标记

CFSE( CFSE<sup>Lo</sup>)的脾淋巴细胞比较, 荷肽的高水平标记 CFSE( CFSE<sup>Hi</sup>)脾淋巴细胞的数量在化疗 + 疫苗组显著下降, 提示了小鼠体内肽特异性的 CTL 对荷有肿瘤 CTL 抗原肽的杀伤作用。化疗 + 疫苗组联合治疗的小鼠中观察到了 41.35% 的杀伤率( D); 而单纯化疗( B) 或疫苗 + 化疗组( C) 小鼠却仅有 2.78% 或 14.69% 的杀伤率, 化疗 + 疫苗联合治疗小鼠 CTL 杀伤活性明显强于单纯化疗或疫苗 + 化疗处理小鼠(  $P < 0.05$  )。表明先化疗后疫苗的联合治疗产生了特异性 CTL 应答, 与肿瘤消退和延长生存期的结果是相一致的( 图 4)。

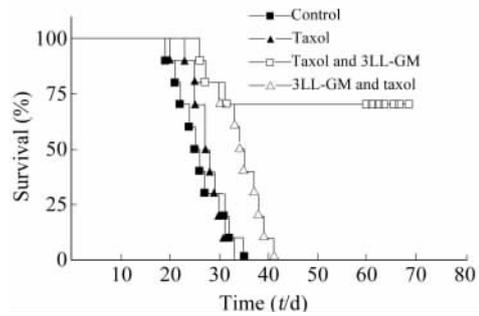


图 3 紫杉醇和肿瘤疫苗治疗对荷瘤小鼠存活期的影响  
Fig.3 Influence of Taxol chemotherapy combined with 3LL/GM-CSF tumor vaccine on mice survival

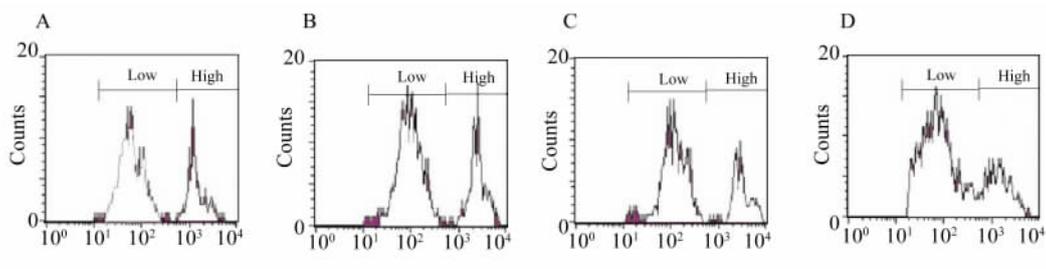


图 4 紫杉醇和肿瘤疫苗联合治疗诱生体内特异性 CTL 应答

Fig.4 *In vivo* specific CTL response induced by Taxol chemotherapy combined with 3LL/GM-CSF tumor vaccine

A: Control; B: Taxol only; C: 3LL/GM-CSF and Taxol post; D: Taxol pre and 3LL/GM-CSF

#### 2.4 紫杉醇化疗后应用肿瘤疫苗诱生特异性免疫应答的记忆反应

上述 2.2 和 2.3 研究结果提示, 化疗 + 疫苗组治疗荷瘤小鼠诱生了特异性的杀伤效应, 并使 70% 小鼠肿瘤消退和获得长期存活。为了解长期存活的小鼠是否具有免疫记忆功能, 以  $2 \times 10^4$  3LL 肿瘤细胞皮下注射这些小鼠。结果显示: 所有小鼠没有肿瘤发生, 并长期存活至 60 d 以上; 而对照组小鼠则 100% 肿瘤生长, 中位生存期仅 26 d。这表明: 化疗 + 疫苗组联合治疗在荷瘤小鼠体内产生了免疫记忆, 能够抵抗肿瘤的再次攻击, 产生长期的保护效应。

### 3 讨论

紫杉醇是从红豆杉树皮或针叶中提取或半合成的细胞周期特异性药物, 通过作用细胞的微管/微管蛋白系统, 使细胞生长停滞于 G<sub>2</sub> 和 M 期, 从而抑制细胞的有丝分裂和增殖<sup>[11]</sup>。紫杉醇被广泛应用于多种不同种类恶性肿瘤的治疗中。在非小细胞肺癌中, 紫杉醇被作为最有效的药物和顺铂等化疗药物联合应用, 可以延长患者生存期, 但是不能治愈肿瘤患者。本研究结果证实: 体外使用不同剂量的紫杉醇, 能杀死小鼠 3LL 肿瘤细胞, 但是体内应用却仅能延缓荷瘤小鼠的

肿瘤生长时间, 而不能使荷瘤小鼠的肿瘤消退, 与临床上应用化疗仅能延长生存期却不能根治肿瘤的结果一致, 表明紫杉醇需要联合其他疗法治疗肿瘤。

曾有报道<sup>[12-13]</sup>, 用化疗药物环磷酰胺和自体黑色素瘤疫苗治疗肿瘤患者产生良好的效果, 且临床反应与增强的 DTH( 迟发性变态反应) 相关。然而, 由于大多数化疗药物不仅能杀死肿瘤细胞, 还会导致不同程度的免疫抑制和淋巴细胞减少, 因此, 几乎没有结合化疗和肿瘤疫苗的临床研究。本实验中比较了肿瘤疫苗应用前或应用后联合紫杉醇化疗, 发现首先使用化疗药物, 然后用肿瘤疫苗免疫, 不仅没有产生免疫耐受, 反而诱导出了特异性的 CTL 杀伤效应, 并且使得大部分荷瘤小鼠肿瘤消退, 获得长期生存。再一次以 3LL 肿瘤细胞攻击肿瘤消退并长期存活的小鼠, 仍未发生肿瘤生长, 表明产生了免疫记忆效应, 分析原因, 可能与化疗药物作用后肿瘤机体的免疫微环境发生改变相关。化疗药物紫杉醇可选择性地作用于某些细胞亚群, 如调节性 T 细胞亚群, 使得该亚群细胞比例明显下降, 相应地, 增加了效应 T 细胞亚群的比例; 同时, 去除了调节性 T 细胞的免疫抑制功能有利于抗肿瘤免疫应答的诱生和抗肿瘤效应的发挥。本实验室及其他实验室相关研究亦证实了这个假设<sup>[14-19]</sup>。研究还发现, 在

肿瘤疫苗免疫后应用紫杉醇化疗并没有获得免疫保护效应。分析原因可能是化疗药物对肿瘤免疫应答诱导免疫细胞的直接细胞毒作用,从而抑制了免疫应答效应,该结果与 Nigam A 等<sup>[20]</sup>的发现相一致。

本研究表明:紫杉醇化疗后应用 3LL/GM-CSF 肿瘤疫苗,可使荷有 3LL 的小鼠肿瘤完全消退并获得长期的存活,用该联合疗法处理的小鼠表现出特异性的 CTL 免疫应答和记忆效应。本研究结果部分修正了以往认为化疗削弱了免疫功能,不能进行肿瘤疫苗主动免疫的观点,提出在化疗后进行肿瘤疫苗的主动免疫可以诱生出较强的抗肿瘤免疫并使荷瘤小鼠肿瘤消退。由于紫杉醇以 1 次注射给药后休息 3 周为 1 个周期,因此,在每次紫杉醇治疗后给予肿瘤疫苗具有可行性。本研究为临床联合应用化疗和肿瘤免疫生物治疗提供了实验依据。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Schiller JH, Harrington D, Belani CP, *et al.* Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer [ J ]. *N Engl J Med*, 2002, 346 ( 2 ): 92-98.
- [ 2 ] Azrak RG, Frank CL, Ling X, *et al.* The mechanism of methylselenocysteine and docetaxel synergistic activity in prostate cancer cells [ J ]. *Mol Cancer Ther*, 2006, 5 ( 10 ): 2540-2548.
- [ 3 ] Scagliotti GV, Turrisi AT. Docetaxel-based combined-modality chemoradiotherapy for locally advanced non-small cell lung cancer [ J ]. *Oncologist*, 2003, 8 ( 4 ): 361-374.
- [ 4 ] Chu Y, Xia M, Lin Y, *et al.* Th2-dominated antitumor immunity induced by DNA immunization with the genes coding for a basal core peptide PDTRP and GM-CSF [ J ]. *Cancer Gene Ther*, 2006, 13 ( 5 ): 510-519.
- [ 5 ] Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. Cancer immunotherapy: Moving beyond current vaccines [ J ]. *Nat Med*, 2004, 10 ( 9 ): 909-915.
- [ 6 ] Machiels JP, Reilly RT, Emens LA, *et al.* Cyclophosphamide, doxorubicin, and Paclitaxel enhance the antitumor immune response of granulocyte/macrophage-colony stimulating factor-secreting whole-cell vaccines in HER-2/neu tolerized mice [ J ]. *Cancer Res*, 2001, 61 ( 9 ): 3689-3697.
- [ 7 ] Yu B, Kusmartsev S, Cheng F, *et al.* Effective combination of chemotherapy and dendritic cell administration for the treatment of advanced-stage experimental breast cancer [ J ]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9 ( 1 ): 285-294.
- [ 8 ] Eralp Y, Wang X, Wang JP, *et al.* Doxorubicin and Paclitaxel enhance the antitumor efficacy of vaccines directed against HER 2/neu in a murine mammary carcinoma model [ J ]. *Breast Cancer Res*, 2004, 6 ( 4 ): R275-283.
- [ 9 ] Sportes C, McCarthy NF, Hakim F, *et al.* Establishing a platform for immunotherapy: Clinical outcome and study of immune reconstitution after high-dose chemotherapy with progenitor cell support in breast cancer patients [ J ]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2005, 11 ( 6 ): 472-483.
- [ 10 ] Byers AM, Kemball CC, Moser JM, *et al.* Rapid *in vivo* CTL activity by polyoma virus-specific effector and memory CD8<sup>+</sup> T cells [ J ]. *J Immunol*, 2003, 171 ( 1 ): 17-21.
- [ 11 ] Larroque AL, Dubois J, Thoret S, *et al.* Novel C2-C3 N-peptide linked macrocyclic taxolids. Part 2: Synthesis and biological activities of docetaxel analogues with a peptide side chain at C2 and their macrocyclic derivatives [ J ]. *Bioorg Med Chem*, 2007, 15 ( 1 ): 563-574.
- [ 12 ] Berd D, Maguire HCJ, Mastrangelo MJ, *et al.* Induction of cell-mediated immunity to autologous melanoma cells and regression of metastases after treatment with a melanoma cell vaccine preceded by cyclophosphamide [ J ]. *Cancer Res*, 1986, 46 ( 5 ): 2572-2577.
- [ 13 ] Wang LX, Kjaergaard J, Cohen PA, *et al.* Memory T cells originate from adoptively transferred effectors and reconstituting host cells after sequential lymphodepletion and adoptive immunotherapy [ J ]. *J Immunol*, 2004, 172 ( 6 ): 3462-3468.
- [ 14 ] Terando A, Mule JJ. On combining antineoplastic drugs with tumor vaccines [ J ]. *Cancer Immunol Immunother*, 2003, 52 ( 11 ): 680-685.
- [ 15 ] 刘荣军,葛 棣,丁建勇,等. 肺癌患者 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> Foxp3<sup>+</sup> 调节性 T 细胞的格局变化及意义 [ J ]. *中国免疫学杂志*, 2006, 22 ( 6 ): 101-104.
- [ 16 ] 储以微,刘荣军,张 镭,等. 肺癌患者化疗前后免疫细胞格局的改变及其临床意义 [ J ]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2006, 13 ( 4 ): 253-256.
- [ 17 ] Tracy LV, Sarada LN, Mare KJ, *et al.* CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells facilitate CD4<sup>+</sup> T cell clonal anergy induction during the recovery from lymphopenia [ J ]. *J Immunol*, 2006, 176 ( 10 ): 5880-5889.
- [ 18 ] Lutsiak ME, Semnani RT, DePascalis R, *et al.* Inhibition of CD4<sup>+</sup> 25<sup>+</sup> T regulatory cell function implicated in enhanced immune response by low-dose cyclophosphamide [ J ]. *Blood*, 2005, 105 ( 7 ): 2862-2868.
- [ 19 ] Dudley ME, Wunderlich JR, Yang JC, *et al.* Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma [ J ]. *J Clin Oncol*, 2005, 23 ( 10 ): 2346-2357.
- [ 20 ] Nigam A, Yacavone RF, Zahurak ML, *et al.* Immunomodulatory properties of antineoplastic drugs administered in conjunction with GM-CSF secreting cancer cell vaccines [ J ]. *Int J Oncol*, 1998, 12 ( 1 ): 161-170.

[ 收稿日期 ] 2006 - 11 - 10

[ 修回日期 ] 2006 - 12 - 08

[ 本文编辑 ] 韩 丹