

· 论 著 ·

[文章编号] 1007-385X(2007)02-0132-005

逆转录病毒载体介导大鼠乳腺癌细胞共表达 *MIP-1 α* 和 *B7-1*

王振发¹, 王 烈¹, 王 瑜¹, 陈少全¹, 林 晨¹, 卫立辛², 覃林花², 张长松³(1. 南京军区福州总医院 普通外科研究所, 福州 350025; 2. 第二军医大学 东方肝胆外科医院 肿瘤免疫与基因治疗中心, 上海 200438; 3. 汕头大学医学院 肿瘤分子流行病学系, 广东 汕头 515041)

[摘 要] **目的:** 建立共表达小鼠 *MIP-1 α* 和 *B7-1* 基因的大鼠乳腺癌细胞株, 并进行体外活性检测。 **方法:** 应用含不同选择标记的重组逆转录病毒载体, 经 1 mg/ml G418 和 2 μ g/ml puromycin 双药物筛选后获得 *MIP-1 α* + *B7-1* 基因共表达的大鼠乳腺癌细胞株。 RT-PCR、免疫组化检测 *mMIP-1 α* 的表达, RT-PCR、流式细胞术检测 *mB7-1* 的表达; 将共表达 *MIP-1 α* 和 *B7-1* 的肿瘤细胞与小鼠脾淋巴细胞混合培养后, MTT 法检测淋巴细胞的增殖指数、琼脂糖打孔法检测共表达 *MIP-1 α* 和 *B7-1* 肿瘤细胞对单个核细胞的趋化活性。 **结果:** 经脂质体转染包装细胞产生的重组逆转录病毒上清病毒滴度达 4.6×10^7 CFU/L。 细胞生长曲线显示, 重组逆转录病毒感染对乳腺癌细胞增殖无明显影响。 重组逆转录病毒感染的大鼠乳腺癌细胞株 SHZ-88/*mMIP-1 α* + *mB7-1* 有 *B7-1* 和 *MIP-1 α* mRNA 及蛋白的表达。 淋巴细胞增殖指数 PI 值 SHZ-88/PLXSN 组为 (0.76 ± 0.25) , SHZ-88/*mMIP-1 α* + *mB7-1* 组为 (1.95 ± 0.31) , 后者体外刺激淋巴细胞增殖能力增强 ($P < 0.01$), SHZ-88/pBabe puro 组的趋化指数为 (0.99 ± 0.19) , *mMIP-1 α* + *mB7-1* 组的为 (3.88 ± 0.33) , 后者显著增强了趋化活性。 **结论:** 通过逆转录病毒载体介导建立 *MIP-1 α* 和 *B7-1* 基因共表达的大鼠乳腺癌细胞株具有招引单个核细胞, 并将其激活的体外生物学活性。

[关键词] *MIP-1 α* ; *B7-1*; 逆转录病毒载体; 大鼠乳腺癌; SHZ-88 细胞

[中图分类号] R392.7 **[文献标志码]** A

Retroviral vector mediated co-expression of *MIP-1 α* and *B7-1* in rat breast cancer cells

WANG Zhen-fa¹, WANG Lie², WANG Yu², CHEN Shao-quan², LIN Chen², WEI Li-xin², QIN Lin-hua², ZHANG Chang-song³(1. Research Institute of General Surgery, General Hospital, PLA Fuzhou Military Area Command, Fuzhou 350025, China; 2. Tumor Immunology and Gene Therapy Center, Shanghai 200438; 3. Department of Tumor Molecular Epidemiology, Medical College, Shantou University, Shantou 515041)

[Abstract] **Objective:** To establish a rat breast cancer cell line stably co-expressing mouse *MIP-1 α* and *B7-1*, and to assay its *in vitro* biological activity. **Methods:** *mMIP-1 α* cDNA was cloned into retrovirus vector pBabe puro to construct pBabe puro/*mMIP-1 α* , then pBabe puro/*mMIP-1 α* was used to transfect packaging cells and the anti-puromycin PA-317 packaging cells were proliferated. Meanwhile, pLXSN/*mB7-1* was constructed and the anti-G418 cells were proliferated. Finally, the two supernatants were used to infect SHZ-88 together and the co-transfected cells were selected with 1 mg/ml G418 and 2 μ g/ml puromycin together. Expression of *mMIP-1 α* mRNA and protein in SHZ-88 and SHZ-88/*mB7-1* + *mMIP-1 α* cells were analyzed by RT-PCR and immunocytochemistry, respectively. Expression of *mB7-1* mRNA and protein was analyzed by RT-PCR and flow cytometry, respectively. Lymphocyte proliferation activity of SHZ-88/*B7-1* + *mMIP-1 α* was detected by MTT assay; chemotactic activity of *MIP-1 α* was measured by chemotaxis assay. **Results:** A titer of 4.6×10^7 CFU/L was obtained after transfection with recombinant retroviral vector. The growth curve of cells showed that the recombinant retroviral had no effect on the growth of rat breast cancer cells. There was expression of *B7-1* and *MIP-1 α* mRNA/protein in SHZ-88/*mMIP-1 α* + *mB7-1* cells. The proliferation indices (PI) in *mMIP-1 α* + *mB7-1* group (1.95 ± 0.31) was significantly higher than that in SHZ-88/PLXSN group (0.76 ± 0.25) ($P < 0.01$). Chemotaxis assay showed that chemotactic activity of lymphocytes in *mMIP-1 α* + *mB7-1* group (3.88 ± 0.33) was significantly higher than that in SHZ-88/pBabe puro group (0.99 ± 0.19) ($P < 0.001$). **Conclusion:** A new rat breast cancer cell line SHZ-88/*mMIP-1 α* + *mB7-1* has been established, which can stably co-express *MIP-1 α* and *B7-1* gene and possesses biologic

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 30471994); 南京军区医学科研“十五”计划项目 (No. 02MA008)

[作者简介] 王振发 (1977-), 男, 福建泉州人, 在读硕士, 主要从事乳腺癌基因治疗的研究

[通讯作者] 王 烈, E-mail: wzf-2004@hotmail.com

activity *in vitro*.

[Key words] MIP-1 α ; B7-1; retroviral vector; rat breast cancer; SHZ-88 cell

[Chin J Cancer Biother, 2007, 14(2): 132-136]

免疫基因治疗为肿瘤治疗提供了新的途径,趋化因子和共刺激分子 B7 在肿瘤免疫基因治疗研究中发挥着重要的作用。B7 通过为 T 细胞激活提供第二信号,趋化因子 MIP-1 α 能趋化 T 细胞、单核细胞、树突状细胞、NK 细胞等在抗肿瘤免疫中有相应作用的细胞,从而产生抗肿瘤效应。研究^[1]表明共转染 B7 因子和趋化因子,可能通过“招引-活化”的机制而产生更强的抗肿瘤效应。本研究利用两种含不同选择标记的重组逆转录病毒载体,采用重复感染法,将小鼠 MIP-1 α 和 B7-1 基因共转染到大鼠乳腺癌细胞(SHZ-88)中,实现共表达,并检测到招引单个核细胞,并将其激活的体外生物学活性

1 材料与方法

1.1 细胞和主要试剂

大鼠乳腺癌 SHZ-88 细胞购自中科院上海细胞所,高产病毒包装细胞 PA317/mB7-1、 Ψ crip/mMIP-1 α 均为上海东方肝胆外科医院肿瘤免疫实验室保存。

G418、MTT、polybrene 购自 Sigma 公司,puromycin、仓鼠抗小鼠 B7-1 单克隆抗体、荧光素标记抗体为肿瘤免疫和基因治疗中心保存,兔抗鼠 MIP-1 α 单抗、SABC 试剂盒购于武汉博士德公司,Trizol 为 Tiangen 公司产品,DMEM、RMPI 1640 培养液购自 Gibco 公司。引物设计与合成:MIP-1 α 引物,上游 5'-CAGGTACCATGAAGGTCTCCACCACTGCC-3',下游 5'-CATCTAGATCAGGCATTCAGTTCCAGGTC-3'; B7-1 引物,上游 5'-GCGGTACCATGGGACTGAGTACATT-3',下游 5'-GCCTCGAGTAAAAATCTGTAGTACT-3',均由上海申能博彩公司合成。

1.2 重组逆转录病毒上清的制备

分别将 PA317/mB7-1 细胞和 Ψ crip/mMIP-1 α 细胞传代,待生长至 80% 丰度时,更换新培养液培养 24 h 后,收集培养上清,0.22 μ m 滤膜过滤,即分别为带有 B7-1 和 MIP-1 α 基因的重组逆转录病毒上清。

1.3 重组逆转录病毒滴度的测定^[2]

过滤后的病毒上清 10 倍系列稀释于 6 孔培养板内,感染对数生长期的 NIH3T3 细胞,并加入 8 μ g/ml 的 polybrene 辅助病毒感染,48 h 后加入 G418(800 μ g/ml)或 puromycin(3 μ g/ml),14 d 后

根据稀释倍数(n)和出现的抗性细胞克隆数(m)计算病毒滴度,病毒滴度即为 $m \times 10^n$ CFU/ml。

1.4 重组逆转录病毒感染乳腺癌细胞

采用重复感染法^[3]操作。经 G418(1 000 μ g/ml)和(或)puromycin(2 μ g/ml)筛选,得到 5 种阳性细胞克隆,即 SHZ-88/mB7-1、SHZ-88/mMIP-1 α 、SHZ-88/mMIP-1 α + mB7-1、SHZ-88/pLXSN、SHZ-88/pBabe puro。

1.5 RT-PCR 检测 MIP-1 α 和 B7-1 mRNA 的表达

按 Trizol 产品说明书提取细胞总 RNA。MIP-1 α 基因片段 20 μ l 扩增体系:10 \times buffer 2 μ l, dNTP 1.6 μ l, primer1 0.5 μ l, primer2 0.5 μ l, cDNA 1 μ l, Taq 0.3 μ l, MgCl₂ 0.4 μ l, ddH₂O 13.7 μ l; B7-1 基因片段 50 μ l 扩增反应体系:10 \times buffer 5 μ l, dNTP 4 μ l, cDNA 5 μ l, primer1 1 μ l, primer2 1 μ l, Taq 酶 0.4 μ l, ddH₂O 33.6 μ l。反应条件均为:94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 10 min。

1.6 免疫组织化学检测趋化因子 mMIP-1 α 蛋白的表达

按常规方法进行^[4],细胞爬片固定后,一抗(兔抗鼠 MIP-1 α 单抗)过夜,二抗 30 min, DAB 显色(按博士德 SABC 试剂盒方法进行),脱水、中性树脂封片,镜检。

1.7 流式细胞仪检测 B7-1 蛋白的表达^[5]

制备细胞悬液(2×10^6 /ml),取 100 μ l,加一抗(仓鼠抗小鼠 B7-1 单抗),4 $^{\circ}$ C,45 min;加二抗(羊抗仓鼠二抗-FITC),4 $^{\circ}$ C,45 min;PBS 洗涤 3 次,加入 200 μ l PBS,上机检测。

1.8 MTT 比色法检测乳腺癌细胞刺激后大鼠脾淋巴细胞的增殖指数(PI)^[6]

将 3 种肿瘤细胞(SHZ-88/mMIP-1 α + mB7-1、SHZ-88/mMIP-1 α 、SHZ-88/pLXSN)灭活(50 mg 丝裂霉素 C,37 $^{\circ}$ C 处理 1 h)后,与大鼠脾淋巴细胞混合培养于 96 孔板,每孔 0.2 ml 培养液,含 1×10^5 淋巴细胞和 1×10^4 肿瘤细胞;对照组只含淋巴细胞或者肿瘤细胞(每组各设 6 个复孔)。6 d 后用 MTT 法测定淋巴细胞增殖指数(PI)。PI 值 = (实验孔 D_{570} - 肿瘤细胞孔 D_{570}) / 淋巴细胞孔 D_{570} 。

1.9 琼脂糖打孔法检测趋化活性

按参考文献[7]进行。将待测细胞以不含选择物的培养液培养 3 d,以培养上清制备相应细胞悬液

(1×10^6 个/ml)。含 20% 小牛血清的 2 倍浓度的 RPMI 1640 与 2% 琼脂糖等体积混匀, 浇注于载玻片 (3 ml/片), 凝固后打孔, 左、中和右 3 孔设为一组, 孔径 3 mm, 孔距 2 mm。右孔、中孔和左孔分别加入 SHZ-88/mMIP-1 α + mB7-1 细胞悬液、小鼠脾细胞悬液 (5×10^6) 和 SHZ-88/pBabe puro 细胞悬液, 将载玻片置湿盒, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵箱温育 4 h 后取出, 待孔中液体干后, 用固定液(甲醇: 冰乙酸 = 3: 1) 固定 30 min, 之后剥除琼脂糖凝胶, 以 Giemsa 染色 10 min, 以自来水冲去多余的染料, 镜检。趋化指数 = 中孔边缘向左孔方向的趋化移动距离/中孔边缘向右孔方向的随机移动距离, 结果以 3 组复孔的平均值表示。

1.10 统计学处理

所有数据以($\bar{x} \pm s$)表示, 应用 SPSS12.0 统计软件进行成组设计两样本均数比较的 *t* 检验。

2 结果

2.1 重组逆转录病毒 rRV-mB7-1 和 rRV-mMIP-1 α 的产生及滴度

脂质体法转染包装细胞系后, 收集细胞培养液即病毒上清, 测定重组逆转录病毒的滴度, 所获病毒上清的滴度均为 4.6×10^7 CFU/L。

2.2 重组逆转录病毒对乳腺癌细胞增殖的影响

用计数板法绘制 SHZ-88/MIP-1 α + B7-1、SHZ-88/MIP-1 α 、SHZ-88/B7-1、SHZ-88 等 4 种乳腺癌细胞的生长曲线, 得出重组逆转录病毒感染对乳腺癌细胞增殖的影响无统计学意义(图 1)。

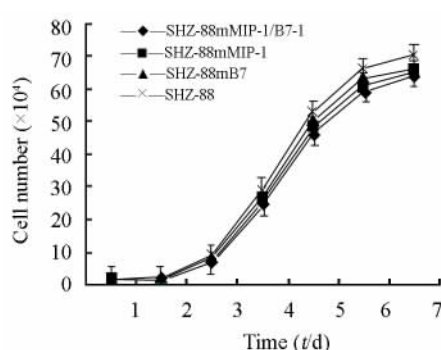


图 1 重组逆转录病毒感染对乳腺癌细胞增殖的影响
Fig.1 Effect of recombinant retroviral infection on growth of rat breast cancer cells

2.3 重组逆转录病毒感染的大鼠乳腺癌细胞 MIP-1 α 和 B7-1 mRNA 的表达

利用两步法 RT-PCR 从乳腺癌细胞中扩增 B7-1 mRNA, 结果显示, SHZ-88/mMIP-1 α + mB7-1 细胞

表达 B7-1, 片段大小约 296 bp; 空载体转染的 SHZ-88 无表达 B7-1(图 2A)。从乳腺癌细胞中扩增 MIP-1 α mRNA, 结果显示, SHZ-88/MIP-1 α + B7-1 细胞表达 mMIP-1 α , 片段大小约 300 bp; 空载体转染的 SHZ-88 无表达 MIP-1 α (图 2B)。

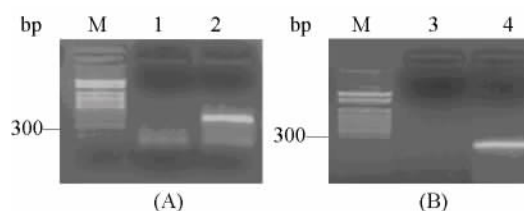


图 2 RT-PCR 检测重组逆转录病毒感染的乳腺癌细胞中 B7-1(A) 和 MIP-1 α (B) mRNA 的表达
Fig.2 Detection of B7-1(A) and MIP-1 α (B) mRNA expression in retrovirus transfected SHZ-88 cells by RT-PCR
M: DNAMarker 100 ladder; 1,3: SHZ - 88;
2: SHZ - 88/B7 - 1; 4: SHZ - 88/MIP - 1 α

2.4 重组逆转录病毒感染的大鼠乳腺癌细胞膜 B7-1 蛋白的表达

通过流式细胞仪, 用 B7-1 单抗检测 SHZ-88/MIP-1 α + B7-1、SHZ-88/pLXSN 和 SHZ-88 3 种乳腺癌细胞, 结果显示, SHZ-88/MIP-1 α + B7-1 细胞膜表达 B7-1 蛋白, 空载体转染的 SHZ-88/pLXSN 和 SHZ-88 细胞膜均无 B7-1 蛋白表达(图 3)。

2.5 重组逆转录病毒感染的大鼠乳腺癌细胞膜 MIP-1 α 蛋白的表达

以兔抗鼠 MIP-1 α 单抗分别对 SHZ-88/MIP-1 α + B7-1、SHZ-88pBabe puro 和 SHZ-88 细胞进行免疫细胞化学染色, 结果显示, SHZ-88/MIP-1 α + B7-1 细胞膜表达 MIP-1 α 蛋白, SHZ-88pBabe puro、SHZ-88 均未表达 MIP-1 α (图 4)。

2.6 乳腺癌细胞刺激后大鼠脾淋巴细胞的增殖

用 MTT 比色法检测乳腺癌细胞刺激后大鼠脾淋巴细胞的增殖指数, 结果显示, 以 SHZ-88/MIP-1 α + B7-1 或 SHZ-88/B7-1 细胞作刺激原时, 大鼠脾淋巴细胞出现明显的增殖反应, PI 值分别为 (1.95 ± 0.31) 和 (1.89 ± 0.27); 而以 SHZ-88/PLXSN 或 SHZ-88/MIP-1 α 细胞作刺激原时, PI 分别为 0.76 ± 0.25 和 0.71 ± 0.21 , 两者差异有显著性意义 ($t = 6.682, P < 0.01$)。

2.7 乳腺癌细胞对大鼠脾单个核细胞的趋化活性

用琼脂糖打孔法检测乳腺癌细胞对大鼠脾单个核细胞的趋化活性, 结果显示, SHZ-88/MIP-1 α + B7-1 或 SHZ-88/MIP-1 α 、SHZ-88pBabe puro 或 SHZ-

88/B7-1 对活化大鼠脾单个核细胞的趋化指数分别为 (0.97 ± 0.18) , 两者差异有显著性意义 ($t = 10.743$, $P < 0.01$)。或 (3.88 ± 0.33) 或 (3.85 ± 0.29) 、 (0.99 ± 0.19) 或

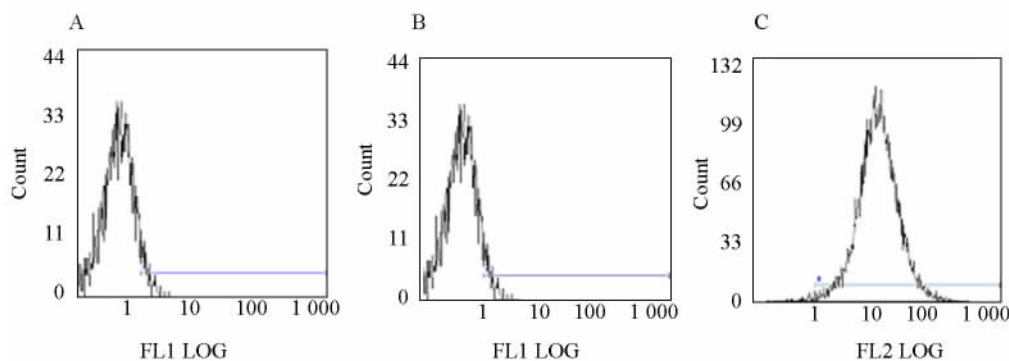


图3 流式细胞仪检测重组逆转录病毒感染的乳腺癌细胞中 B7-1 蛋白的表达

Fig. 3 Detection of B7-1 expression in gene-transfected SHZ-88 cells by flow cytometry

A: SHZ-88; B: SHZ-88/PLXSN; C: SHZ-88/mB7-1

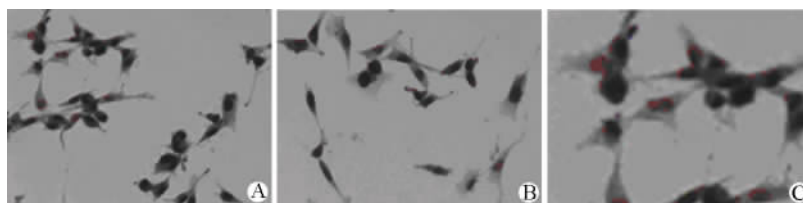


图4 免疫组织化学检测重组逆转录病毒感染的乳腺癌细胞中 MIP-1 α 蛋白的表达 ($\times 400$)

Fig. 4 Detection of mMIP-1 α expression in gene-transfected SHZ-88 cells by immunohistochemistry method

A: SHZ-88; B: SHZ-88/pBabe puro; C: SHZ-88/mMIP-1 α

3 讨论

乳腺癌的基因治疗是继手术、放疗、化疗和内分泌治疗后出现的一种很有前途的治疗手段,是近年来研究的热点,而免疫基因治疗是其重要组成部分之一。共刺激因子 B7 和趋化因子是重要的免疫因子,已广泛应用于肿瘤免疫基因治疗研究。与大多数恶性肿瘤一样,乳腺癌的发生常常是多个基因改变的结果,纠正单个基因的治疗方法难以取得很好的疗效,因此联合应用不同的基因进行治疗,从而产生相加或协同效应,这是目前基因治疗的发展方向^[8]。B7-1,又称 CD80,是重要的共刺激分子,与 CD28 结合,为 T 细胞的激活提供第二信号。肿瘤细胞常存在共刺激分子的缺失或减少,从而不能有效激活 T 细胞,是肿瘤细胞逃逸机体抗肿瘤免疫的机制之一^[9]。由于趋化因子对肿瘤的发生、发展具有双向性,即抗肿瘤效应和促肿瘤效应^[10],因此,选择合适的趋化因子进行治疗,才能达到增强抗肿瘤效应的目的。MIP-1 α 属于 CC(β)类趋化因子,具有抗肿瘤效应。共转染 B7 分子和趋化因子能产生更

强抗肿瘤作用的主要机制为:(1)“招引-活化”的机制^[11];(2)抑制肿瘤血管生成;(3)通过抑制 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞亚型向肿瘤局部的浸润,改善肿瘤局部免疫抑制状态^[11]。吴宜林等^[12]研究表明趋化因子 MCP-3 能增强 B7 基因修饰的 U14 细胞瘤疫苗的抗肿瘤效果。Delman 等^[13]研究表明 RANTES/B7.1/GM-CSF 瘤苗对结直肠癌肝转移的治疗效果优于单一因子瘤苗。He 等^[14]研究表明通过破坏 PD-1 和配体 PD-L1 或 PD-L2 的相互作用,可增强趋化因子 SLC 的抗肿瘤效应。本研究利用逆转录病毒载体成功建立共表达 mMIP-1 α 和 mB7-1 的大鼠乳腺癌细胞株,并检测到其体外生物学活性,MTT 比色法结果显示 B7-1 基因修饰的乳腺癌细胞比亲代乳腺癌细胞更能刺激脾单个核细胞增殖,琼脂糖打孔法结果显示 MIP-1 α 基因修饰的乳腺癌细胞对脾单个核细胞的趋化活性,比亲代乳腺癌细胞更强。因此我们推测联合应用 MIP-1 α 和 B7-1,可通过“招引-活化”的机制产生更强的抗肿瘤效应,为联合免疫基因治疗乳腺癌提供新的实验依据。

基因转移载体是基因治疗成功与否的关键因素

之一,包括病毒载体和非病毒载体两大类。逆转录病毒载体是目前基因治疗研究中最常用的载体之一,它具有将目的基因高效转染细胞,并稳定表达的优点,但只能感染分裂细胞^[15]。本研究利用含不同选择标记基因的重组逆转录病毒载体,应用重复感染法提高转染率,经 G418 和 puromycin 双药物筛选得到阳性克隆,RT-PCR、免疫组化及流式细胞仪检测结果显示重组逆转录病毒感染的大鼠乳腺癌细胞共表达 mMIP-1 α 和 mB7-1,为实现多基因在靶细胞的共表达提供新的思路。但逆转录病毒载体体内应用时有一定局限性,可能出现插入突变、可复制病毒的感染、靶向性不高等安全性问题,有待进一步的研究改善。本研究采用第三代包装细胞 Ψ CRE、 Ψ CRIP 进行包装,至少需要通过 4 次基因整合才可能产生可复制的病毒,从而提高安全性^[16]。近年来,人们一直致力于构建理想的载体,理想的载体应具有高效、低毒、特异性及稳定性等特性,但目前无论是病毒载体还是非病毒载体,都达不到这个标准。只有成功构建了理想的载体,基因治疗才有可能成为一种常规的治疗方法。

恶性肿瘤常常是多基因发生异常的结果,联合基因治疗是一种发展趋势,多基因在靶细胞实现共表达,将为之奠定基础。本研究利用逆转录病毒载体成功实现双基因在乳腺癌细胞共表达,为乳腺癌的联合基因治疗奠定基础。

[参 考 文 献]

- [1] 胡锦跃,朱建高,李官成,等. 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[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2002, 9(2): 77-81.
- [2] 张银刚,郭雄,周京军,等. 携 EGFP 基因的逆转录病毒包装细胞的分选和滴度测定[J]. 第一军医大学学报, 2005, 25(1): 30-32.
- [3] 王 烈,卫立辛,王 飞,等. B7 联合 HSV-TK 基因对大鼠乳腺癌的治疗作用[J]. 第二军医大学学报, 2000, 21(3): 229-32.
- [4] 张盈帆,江华,林子豪,等. 聚集蛋白基因在原代培养成肌细胞中的表达[J]. 中华实验外科杂志, 2005, 22(12): 1562-1564.
- [5] 马国秀,梁再赋,张士发,等. 多发性肌炎和皮肌炎患者 PB-MC 表面 CD43 分子的表达[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2006, 22(4): 274-276.
- [6] 姜 洁,杨兴升,梁华茂,等. mB7-1 转染大鼠卵巢癌细胞诱导细胞免疫应答及体内致瘤性研究[J]. 现代免疫学, 2004, 24(1): 48-51.
- [7] 覃林花,卫立辛,杨 庆,等. 分泌 mRANTES 趋化因子的小鼠肝癌细胞的建立及其体内致瘤性的初步研究[J]. 中国肿瘤临床, 2002, 29(1): 53-57.
- [8] 王振发,王 烈,卫立辛. 趋化因子和 B7 分子联合应用抗肿瘤的研究进展[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2007, 14(1): 94-96.
- [9] Kaufman HL, Deraffle G, Mitcham J, *et al.* Targeting the local tumor microenvironment with vaccinia virus expressing B7. 1 for the treatment of melanoma[J]. J Clin Invest, 2005, 115(7): 1903-1912.
- [10] Ben-Baruch A. The multifaceted roles of chemokines in malignancy [J]. Cancer Metastasis Rev, 2006, 25(3): 357-371.
- [11] Curiel TJ, Coukos G, Zou L, *et al.* Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival[J]. Nat Med, 2004, 10(9): 942-949.
- [12] 吴宜林,陶光实,陆 琳,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.
- [13] Delman KA, Zager JS, Bennett JJ, *et al.* Efficacy of multiagent herpes simplex virus amplicon-mediated immunotherapy as adjuvant treatment for experimental hepatic cancer[J]. Ann Surg, 2002, 236(3): 337-343.
- [14] He YF, Zhang GM, Wang XH, *et al.* Blocking Programmed Death-1 Ligand-PD-1 Interactions by local gene therapy results in enhancement of antitumor effect of secondary lymphoid tissue chemokine[J]. J Immunol, 2004, 173(8): 4919-4928.
- [15] Somia N. Gene transfer by retroviral vectors: An overview[J]. Methods Mol Biol, 2004, 246: 463-490.
- [16] Cometta K, Morgan RA, Anderson WF. Safety issues related to retroviral-mediated gene transfer in humans[J]. Hum Gene Ther, 1991, 2(1): 5-14.

[收稿日期] 2006 - 09 - 22

[修回日期] 2007 - 01 - 16

[本文编辑] 王 莹

《 中国肿瘤生物治疗杂志 》 欢迎投稿、欢迎订阅