

[文章编号] 1007-385X(2007)04-0312-05

腺病毒载体介导人 KDR 胞外段诱导抗小鼠肝癌的免疫效应

谭晓华^{1*}, 吴彬², 王芳¹, 刘兵¹, 王友臣¹ (1. 北京军区总医院血液科, 北京 100700; 2. 解放军军事医学科学院放射与辐射研究所, 北京 100850)

[摘要] 目的: 探讨复制缺陷型腺病毒载体(Ad)介导人血管内皮细胞生长因子受体-2(hVEGFR-2 或 hKDR)胞外段诱导抗小鼠肝癌血管免疫及打破免疫耐受的效果。方法: 构建 Ad hKDR_E, 用 Ad hKDR_E 皮内免疫 C57BL/6 小鼠, 7 d 后取脾细胞作为效应细胞(E), Hepa 1-6/mKDR 作为靶细胞(T), 行乳酸脱氢酶(LDH)释放实验检测特异性 CTL 杀伤活性; 给免疫小鼠接种肝癌细胞 Hepa 1-6, 观察荷瘤小鼠成活情况。结果: Ad hKDR_E 免疫小鼠 1 周后, 在 E: T 为 100: 1、50: 1 和 25: 1 时, Ad hKDR_E 诱导的 6 h CTL 杀伤率分别为(81.5 ± 5.6)%、(68.4 ± 5.5)% 和(39.6 ± 3.9)%。Ad hKDR_E 免疫小鼠 1 周后接种 2 × 10⁶ Hepa1-6 肝癌细胞, 观察 2 个月无小鼠成瘤; 接种 5 × 10⁶ Hepa1-6 细胞, 小鼠无瘤成活率为 60%。上述 CTL 效应和抗成瘤作用在清除 CD8⁺ 和 CD4⁺ T 淋巴细胞后消失。结论: Ad 介导异种(人)KDR 胞外段能有效地打破小鼠肝癌的免疫耐受, 诱发强烈的抗原特异性细胞免疫反应, 这种特异性细胞免疫反应是 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞依赖性的。

[关键词] 复制缺陷型腺病毒载体; 原发性肝癌; 血管内皮细胞生长因子受体-2; 异种抗原

[中图分类号] R735.7 **[文献标志码]** A

Adenovirus vector-mediated human extracellular domain of vascular endothelial growth factor receptor-2 elicits immunity against murine hepatocellular carcinoma

TAN Xiao-hua^{1*}, WU Bin², WANG Fang¹, LIU Bing¹, WANG You-chen¹ (1. Department of Hematology, General Hospital of PLA Beijing Military Area Command, Beijing 100700, China; 2. Institute of Radiation Medicine, the Academy of Military Medical Science, Beijing 100850, China)

[Abstract] Objective: To investigate the role of replication-defective adenovirus vector encoding human extracellular domain of vascular endothelial growth factor receptor-2 (hVEGFR-2 or hKDR) in induction of immunity against murine hepatocellular carcinomas and in breaking the immune tolerance. **Methods:** Ad hKDR_E were constructed and were used to immunize C57BL/6 mice. Seven days after immunization mice splenocytes were collected as effectors and Hepa 1-6/mKDR cells were used as target cells for lactate dehydrogenase (LDH) release assay to analyze the cytotoxic activity of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes (CTL). In addition, immunized mice were transplanted with Hepa 1-6 cells and the survival of tumor-bearing mice was observed. **Results:** Seven days after the immunization, 6 h cytotoxic activity of CTL elicited by the Ad hKDR_E were (81.5 ± 5.6)% , (68.4 ± 5.5)% , and (39.6 ± 3.9)% at the ratio of effector: target (E: T) of 100: 1 , 50: 1 , and 25: 1 , respectively. In addition, no tumor formed 2 months after implantation of 2 × 10⁶ hepatoma cells in Ad hKDR_E-immunized mice; after implantation of 5 × 10⁶ hepatoma cells, 60% of the mice survived without bearing tumor. The above CTL activity and protection against tumor disappeared when CD8⁺ and CD4⁺ T lymphocytes were depleted from mice. **Conclusion:** Adenovirus vector-mediated xenogeneic extracellular domain of KDR can effectively break the immune tolerance to murine hepatocellular carcinomas in mice and induce a strong antigen-specific T cell response, which is dependent on CD8⁺ and CD4⁺ T cells.

[Key words] replication-defective adenovirus vector; primary hepatocellular carcinomas; extracellular domain of vascular endothelial growth factor receptor-2; xenogeneic antigen

[Chin J Cancer Biother, 2007, 14(4): 312-316]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30371627). Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30371627)

[作者简介] 谭晓华(1962-), 男, 湖南永州市人, 博士, 副主任医师, 研究生导师, 主要从事肿瘤免疫基因治疗方面的研究

* Corresponding author. E-mail: xiaohua_t@hotmail.com; Tel: 010-66721169

原发性肝癌在我国有很高的发病率和病死率。目前尚无根治的方法,特别是肝癌到了中晚期,现有的治疗手段都不尽人意。因此,寻找新的治疗手段势在必行。肿瘤免疫基因治疗以其先进的理论性和科学性成为肿瘤治疗研究的热点。由于肿瘤的发生和发展过程极其复杂,肿瘤患者的免疫机能常有异常,往往不能对肿瘤细胞本身存在的肿瘤抗原产生有效的免疫反应,即肿瘤患者对自身的肿瘤产生免疫耐受^[1]。如何打破这种免疫耐受,成为是肿瘤免疫治疗取得突破的关键。

本研究采用腺病毒载体(Ad)编码人血管内皮细胞生长因子受体2(hVEGFR-2或hKDR)胞外段截短基因修饰小鼠树突状细胞(dendritic cells, DC)作为瘤苗免疫小鼠,通过体外乳酸脱氢酶(LDH)释放实验和体内荷瘤实验检测特异性T淋巴细胞细胞毒性(CTL)反应和肿瘤保护效应,以期诱发针对小鼠肝癌血管的特异性细胞免疫反应,为异种同源KDR打破自体KDR所产生的免疫耐受、诱发有效的抗原特异性细胞免疫反应提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

RPMI 1640 培养液购自美国 Gibco BRL 公司。RNA 提取试剂盒(RNeasy Mini Kit)购自美国 Qiagen 公司。各种质粒提取和胶回收试剂盒购自美国 O-MEGA Bio-Tek 公司。脂质体 LipofectamineTM 2000 脂质体购自美国 Invitrogen 公司。RT-PCR 试剂盒(One Step RNA Kit)购自日本 TaKaRa 公司。Ad-MaxTM FLP 重组腺病毒系统购自加拿大 Microbix Inc.。抗 hKDR 和 mKDR 单克隆抗体购自美国 R&D 公司。Western blotting 试剂盒(VisualizerTM EC Western blotting Detection Kits)购自美国 Millipore 公司。PCR 引物由北京赛百盛基因技术有限公司合成。dl 70-3(为 E1 区缺损的对照腺病毒)由加拿大麦克马斯特大学分子病理医学系基因治疗中心 Wan Yanghong 博士惠赠,真核表达载体 pcDNA3.1 hKDR 和 pcDNA3.1 mKDR 由本实验室构建。

1.2 动物与细胞株

雌性 C57BL/6 小鼠(4~6 周龄,15~20 g)购自中国医学科学院动物所[动物合格证号:SCXK(京)2004-0001]。小鼠肝癌 Hepa 1-6 细胞为本室常规传代培养^[2]。

1.3 Ad hKDR_E 的构建

hKDR_E 序列通过 PCR 方法从 pcDNA3.1 hKDR 扩增。上游引物:5'-cgg gat cca tgg aga gca agg tgc

tgc tg-3'(在 5'端引入 BamH I 位点),下游引物:5'-ccg ctc gag tta aac act gca tgc ctg gca att-3'(下游引物设计时加入终止密码子 taa,并在 5'端引入 Xho I 位点)。扩增的 hKDR_E PCR 片段经相应酶切后插入腺病毒穿梭质粒 pDC516 构建成 pDC516 hKDR_E,测序证明 hKDR_E 序列的正确性。Ad hKDR_E 的构建按 AdMaxTM FLP 重组腺病毒系统说明书和参考文献[2]进行。

1.4 RT-PCR 和 Western blotting 检测 hKDR_E mRNA 和蛋白表达

dl 70-3 和 Ad hKDR_E 分别按 100 pfu/细胞感染 293 细胞 24 h,部分细胞用于提取总 RNA,检测 hKDR_E mRNA 的转录;另一部分细胞裂解物用于 Western blotting 检测蛋白的表达,检测方法按试剂盒提供的说明书进行。

1.5 Hepa 1-6/mKDR 细胞的建立

Hepa 1-6 细胞按每孔 $5 \times 10^5/0.5$ ml 接种至 24 孔板中,细胞融合达到 80% 进行转染。质粒 pcDNA3.1 mKDR 与 LipofectamineTM 2000 比例为 1:3 (m:V),即将 1 μ g 的质粒溶于 50 μ l OPTI-MEM 及 3 μ l 脂质体溶于 50 μ l OPTI-MEM 后充分混匀,室温下孵育 20 min,然后将混合物加入待转染的 Hepa 1-6 细胞孔中,24 h 后加入含 G418(0.5 mg/ml)的培养液筛选,筛选得到的阳性克隆用流式细胞术检测 mKDR 在 Hepa 1-6 细胞中的表达。

1.6 CD8⁺ 和 CD4⁺ T 淋巴细胞清除

参考文献[3]方法,用含 CD8 单抗的 2.43 和 CD4 单抗的 GK1.5 杂交瘤的腹水在免疫前第 5、3 和 1 天以及免疫后每 5 d 小鼠腹腔内注射,肿瘤接种前 1 d 流式细胞仪分析小鼠脾细胞中 CD8⁺ 和 CD4⁺ T 淋巴细胞被清除的程度。

1.7 LDH 释放实验检测特异性杀伤活性

对照腺病毒 dl 70-3、Ad hKDR_E 皮内免疫小鼠,剂量为每只小鼠 1×10^8 感染复数(MOI)。实验随机分 4 组,每组 3 只小鼠:(1)对照组(dl 70-3);(2)Ad hKDR_E 组;(3)Ad hKDR_E + CD8⁺ T 细胞清除组;(4)Ad hKDR_E + CD4⁺ T 细胞清除组。CTL 细胞毒杀伤实验用 LDH 释放实验测定,方法按试剂盒说明书进行。免疫 1 周的小鼠脾细胞作为效应细胞(E)、Hepa 1-6/mKDR 细胞作为靶细胞(T),用 3 个 E:T 比例 100:1、50:1 和 25:1。靶细胞的特异性杀伤率用试剂盒提供的公式计算。每组实验重复 1 次。

1.8 体内荷瘤实验观察成瘤情况

50 只 6 周龄的雌性 C57BL/6 小鼠随机分成 5

组,每组 10 只小鼠,免疫方案同体外 CTL 细胞毒性鉴定。7 d 后小鼠左后腿上背部皮内接种 Hepa 1-6 小鼠肝癌细胞,实验分组为:(1)对照病毒(d1 70-3)免疫后接种 Hepa 1-6 细胞 1×10^6 /小鼠;(2)Ad hKDR_E 免疫后接种 Hepa 1-6 细胞 2×10^6 /小鼠;(3)Ad hKDR_E 免疫后接种 Hepa 1-6 细胞 5×10^6 /小鼠;(4)Ad hKDR_E 免疫后接种 Hepa 1-6 细胞 5×10^6 /小鼠 + CD8⁺ T 细胞清除;(5)Ad hKDR_E 免疫后接种 Hepa 1-6 细胞 5×10^6 /小鼠 + CD4⁺ T 细胞清除。接种后每周观察 1 次,包括成瘤时间和肿瘤大小,如果肿瘤体积大于 10 cm³ 即处死小鼠,观察期为 2 个月。每组实验重复 1 次。

2 结果

2.1 Ad hKDR_E 的构建和功能检测

用 PCR 的方法,从 pcDNA3.1 hKDR 中将 hKDR 胞外段(hKDR_E)扩增下来,长度为 2 229 bp。在引物设计时,其下游引物的 3' 末端加入终止密码子 taa。将 PCR 扩增的 hKDR_E 片段经相应酶切后插入腺病毒穿梭质粒 pDC516,构建成为 pDC516 hKDR_E,与腺病毒骨架质粒经共转染至 293 细胞、扩增、纯化和滴度测定构建成 Ad hKDR_E。用 Ad hKDR_E 感染 293 细胞 24 h 后,提取总 RNA 行 RT-PCR,电泳示一条 2 229 bp 的条带(图 1A),用细胞裂解物行 Western blotting 检测,显示有一特异性条带(相对分子质量为 85 800)(图 1B),表明 Ad hKDR_E 感染 293 细胞后有相应的 mRNA 转录和蛋白的表达。

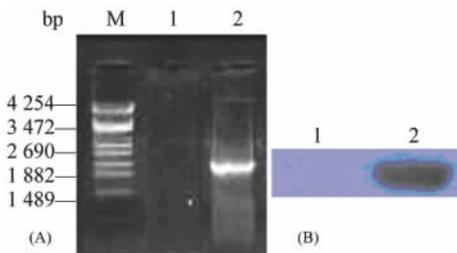


图 1 Ad hKDR_E 构建后 mRNA 和蛋白质表达的鉴定

Fig. 1 Expression levels of mRNA and protein after construction of Ad hKDR_E

A: Results of RT-PCR; M: λ -EcoT 14 I markers; 1: Control; 2: KDRE (2 229 bp). B: Results of Western blotting; 1: Negative control; 2: Detection of a positive band(85 800) after infection of 293' cells with Ad hKDR_E

2.2 Hepa 1-6/mKDR 细胞的建立

为便于体外检测抗原特异性 CTL,特建立表达

mKDR 的 Hepa 1-6 细胞作为体外细胞毒实验的靶细胞(Hepa 1-6/mKDR)。用 Lipofectamine™ 2 000 将编码小鼠 KDR 的质粒 pcDNA3.1 mKDR 转染至小鼠 Hepa 1-6 细胞中,G418 筛选获得阳性克隆并稳定表达 1 个月后,用流式细胞术检测 mKDR 在 Hepa 1-6 细胞中的 mKDR 表达水平。如图 2 所示,筛选获得的阳性克隆 99% 以上均表达 mKDR。

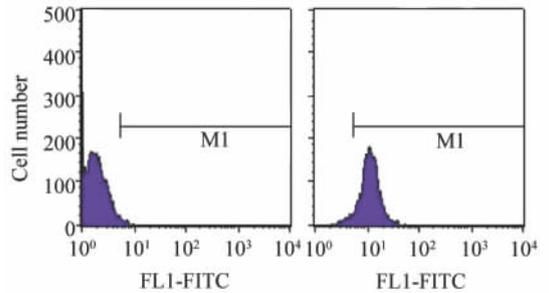


图 2 流式细胞仪检测 Hepa 1-6/mKDR mKDR 的表达

Fig. 2 Expression of mKDR in Hepa 1-6/mKDR cells by flow cytometry

2.3 Ad hKDR_E 免疫小鼠抗原特异性 CTL 的产生

Ad hKDR_E 皮内免疫小鼠 1 周后,取脾细胞作为效应细胞、Hepa 1-6/mKDR 作为靶细胞,按 100:1、50:1 和 25:1 的 E:T 测定 LDH 释放率。结果如图 3 所示,Ad hKDR_E 能诱导特异性 CTL 的产生,其 CTL 对靶细胞的杀伤效率与 E:T 比例成正比。在 E:T 为 25:1 时,Ad hKDR_E CTL 杀伤率为 $(39.6 \pm 3.9)\%$;50:1 时,其 CTL 杀伤率为 $(68.4 \pm 5.5)\%$;100:1 时,其 CTL 杀伤率为 $(81.5 \pm 5.6)\%$ 。表明 Ad hKDR_E 皮内免疫能诱发小鼠针对 mKDR 的特异性细胞免疫反应。

2.4 CD8⁺ 和 CD4⁺ T 细胞清除对 Ad hKDR 诱发 CTL 的影响

用 CD8 或 CD4 单抗清除 CD8⁺ 或 CD4⁺ T 细胞达 98% 以上^[2],再用 Ad hKDR_E 免疫小鼠,1 周后测定脾细胞中的 CTL 杀伤效率。结果(图 3)显示,清除 CD8⁺ T 细胞后,脾细胞失去对靶细胞的杀伤效应;而 CD4⁺ T 细胞清除可严重地损伤 Ad hKDR_E 诱发的特异性 CTL 产生,表明 Ad hKDR_E 诱发的特异性 CTL 是 CD8⁺ 和 CD4⁺ T 细胞依赖性的。

2.5 Ad hKDR_E 诱发肿瘤保护效应

对照组每只小鼠接种 1×10^6 Hepa 1-6 细胞后,2 周内全部有肿瘤生长;Ad hKDR_E 免疫小鼠接种 2×10^6 的 Hepa 1-6 细胞,连续观察至 2 个月,仍然无肿瘤生长;但增加肿瘤接种剂量,即接种 5×10^6 的

Hepa 1-6 细胞, 接种 1 个月左右可见部分小鼠成瘤, 观察至 2 个月, 有 40% 小鼠陆续成瘤, 另 60% 的小鼠仍然无瘤生存(图 4)。表明 Ad hKDR_E 皮内免疫小鼠 1 次, 在一定的瘤负荷范围能有效地诱发免疫小鼠的肿瘤保护效应。清除 CD8⁺ T 细胞后, Ad hKDR_E 免疫后接种 5 × 10⁶ Hepa 1-6 细胞, 小鼠的肿瘤生长情况与对照组相似(图 4), 而 CD4⁺ T 细胞清除后, 接种 5 × 10⁶ Hepa 1-6 细胞时, 尽管小鼠成瘤显著延迟, 但接种后的所有小鼠均成瘤。表明 Ad hKDR_E 的肿瘤保护效应是 CD8⁺ 和 CD4⁺ T 细胞依赖性的。

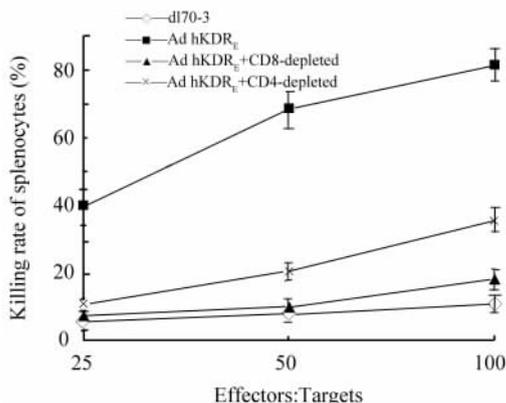


图 3 LDH 释放实验测定 CTL 对靶细胞杀伤活性
Fig. 3 Cytotoxic activity of CTL on target cells by LDH release assay

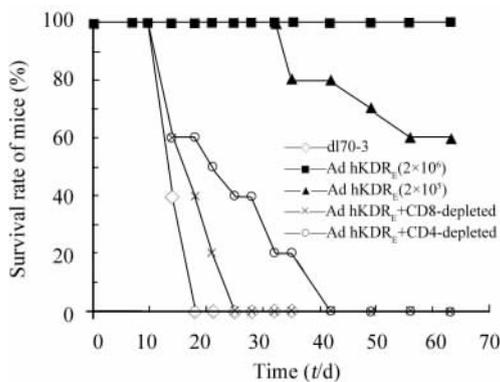


图 4 Ad hKDR_E 免疫后各组荷瘤小鼠的存活曲线
Fig. 4 Survival curves of tumor-bearing mice after immunization with Ad hKDR_E in each group

Protection of mice from tumors was achieved by the immunization with AdhKDR_E; however, the protection disappeared after depletion of CD8⁺ or CD4⁺ T cells by anti-CD8 or CD4 antibodies

3 讨论

肿瘤免疫基因治疗代表未来肿瘤治疗的一大方

向。尽管这一领域的研究取得了令人瞩目的成果, 但至今尚未取得突破性进展。主要原因之一是目前大多数肿瘤相关抗原都是正常、非突变的“自身”蛋白, 既在肿瘤中表达, 也在正常组织中表达, 免疫原性很弱, 机体对这些肿瘤抗原往往处于一种免疫耐受状态, 如何打破这种耐受状态, 诱发有效的抗肿瘤免疫反应, 应是抗肿瘤免疫治疗取得突破的关键。此外, 某些肿瘤相关抗原在机体长期的免疫压力下, 其免疫原性常发生漂移, 导致原本有效的治疗失效。因此, 在肿瘤免疫基因治疗时, 肿瘤相关抗原的选择亦至关重要。

用异种同源肿瘤相关抗原作为靶抗原刺激诱导机体产生特异性细胞和体液免疫反应以打破自身免疫耐受, 已成为诱导有效抗肿瘤免疫反应的一大策略, 这一策略在多种肿瘤相关抗原中得以证实^[2,4,6]。另一方面, 由于靶向血管治疗具有诸多优点^[7], 靶向针对肿瘤血管的免疫基因治疗也是一种很有前景的肿瘤免疫治疗策略。这种策略特别适合于肝癌, 因为肝癌是一种血供丰富的肿瘤。肿瘤新生血管的形成与肿瘤细胞过度表达和分泌血管内皮细胞生长因子(VEGF)有密切关系^[8], 血管内皮细胞生长因子受体 1(VEGFR-1)和血管内皮细胞生长因子受体 2(VEGFR-2, 或称 KDR)为 VEGF 两个主要的受体。肝癌细胞常过度分泌 VEGF 以及过度表达 VEGFR-1 和 KDR^[9-11], 其中 KDR 的过度表达在肝癌组织中更具有特异性^[11]。因此, KDR 可作为抗肝癌血管生成治疗中理想的靶位点。

用 KDR 作为靶抗原诱导针对多种肿瘤的免疫基因治疗已有报道^[12-15]。在这些系列研究中, 所使用的免疫方式各异, 包括 KDR 的 DNA 疫苗^[12], mRNA 疫苗^[13], DC 瘤苗^[14]以及重组蛋白^[15], 均证实了 KDR 能诱导针对肿瘤血管内皮的特异性细胞免疫和体液免疫反应。上述研究的特点是使用 KDR 的全长序列, 需要多次给动物进行免疫, 诱导的抗肿瘤免疫反应为 CD8⁺ 和(或)CD4⁺ T 细胞依赖性, 用异种的 KDR 较自身的 KDR 作为抗原诱导的抗肿瘤免疫反应更为有效^[15]。本课题另一项研究亦证实用腺病毒载体介导 KDR 能诱导针对肝癌血管的特异性细胞免疫反应, 而且用人 KDR 较小鼠自身 KDR 诱导更为有效的抗肿瘤免疫反应。

KDR 为一酪氨酸激酶受体, 可分胞外区、跨膜区和胞内段三个部分, 其中胞外区含 7 个 Ig 样环状结构, 是 VEGF 结合的部位, 在介导新生血管的形成中起至关重要的作用^[16]。因此, 在以 KDR 作为分子靶点时, 针对 KDR 胞外段特异性

免疫反应即可能产生有效的反应。Pan 等^[17]证实,用编码小鼠自身的可溶性 KDR 胞外段的 DNA 质粒,通过电转染方法转染至小鼠的 DC 细胞中,多次免疫小鼠后能诱导产生有效的抗小鼠 Lewis 肺癌和小鼠 B16 黑色素瘤的肺转移作用。甚至用编码小鼠自身 KDR 胞外段的 N 端 1-3 Ig 样的 DNA 质粒多次肌肉注射免疫小鼠,均能产生特异性的细胞免疫反应,对小鼠肝癌发挥保护作用 and 部分的治疗作用^[18]。本研究中用编码人 KDR 胞外段的腺病毒载体皮内免疫小鼠,产生了有效的抗小鼠肝癌的细胞免疫反应。该研究与其他同类研究相比,具有以下特点:(1)首次证实用人 KDR 胞外段能诱导产生有效的抗小鼠肝癌免疫,再一次验证异种同源肿瘤抗原易于打破自身肿瘤抗原所诱导免疫耐受的理论;(2)腺病毒载体介导 KDR 胞外段诱发抗小鼠肝癌免疫有较大的优势,如免疫途径简单、便捷,仅需皮内注射;另外,免疫次数明显地少于其他研究。通常用腺病毒载体介导的免疫只需 1 次、最多 2 次即可产生较为有效的免疫反应,而用其他方式进行免疫,常需反复免疫 3~4 次。

总之,本研究第一次证实用编码人 KDR 胞外段的 Ad 能有效地诱发抗小鼠肝癌的特异性细胞免疫反应,有利于打破对肝癌的免疫耐受,可为肝癌的免疫基因治疗提供一条新的思路。

[参 考 文 献]

[1] Adler AJ. Mechanisms of T cell tolerance and suppression in cancer mediated by tumor-associated antigens and hormones [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2007, 7(1): 3-14.

[2] 谭晓华, Zhu Qing, 刘 畅, 等. 人 AFP 腺病毒载体感染的树突状细胞诱导小鼠抗肝癌免疫 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2006, 28(1): 13-16.

[3] Tatsumi T, Takehara T, Yamaguchi S, *et al.* Injection of IL-12 gene-transduced dendritic cells into mouse liver tumor lesions activates both innate and acquired immunity [J]. *Gene Ther*, 2007, 14(11): 863-871.

[4] Lou Y, Wen YJ, Ding ZY, *et al.* Immunotherapy of tumors with protein vaccine based on chicken homologous Tie-2 [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(6): 1813-1819.

[5] Yi T, Wei YQ, Tian L, *et al.* Humoral and cellular immunity induced by tumor cell vaccine based on the chicken xenogeneic homologous matrix metalloproteinase-2 [J]. *Cancer Gene Ther*,

2007, 14(2): 158-164.

[6] 谭晓华, 王永红. 异种黑色素瘤相关抗原诱发抗肿瘤免疫伴发自身免疫性损伤 [J]. *中华医学杂志*, 2005, 85(23): 1596-1600.

[7] Isayeva T, Kumar S, Ponnazhagan S. Anti-angiogenic gene therapy for cancer [J]. *Int J Oncol*, 2004, 25(2): 335-343.

[8] Benjamin LE, Golijanin D, Itin A, *et al.* Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal [J]. *J Clin Invest*, 1999, 103(2): 159-165.

[9] An FQ, Matsuda M, Fujii H, *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor in surgical specimens of hepatocellular carcinoma [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2000, 126(3): 153-160.

[10] Ribatti D, Vacca A, Nico B, *et al.* Angiogenesis and anti-angiogenesis in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Treat Rev*, 2006, 32(6): 437-444.

[11] Shimamura T, Saito S, Morita K, *et al.* Detection of vascular endothelial growth factor and its receptor expression in human hepatocellular carcinoma biopsy specimens [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2000, 15(6): 640-646.

[12] Niethammer AG, Xiang R, Becker JG, *et al.* A DNA vaccine against VEGF receptor 2 prevents effective angiogenesis and inhibits tumor growth [J]. *Nat Med*, 2002, 8(12): 1369-1375.

[13] Nair S, Boczkowski D, Moeller B, *et al.* Synergy between tumor immunotherapy and antiangiogenic therapy [J]. *Blood*, 2003, 102(3): 964-971.

[14] Li Y, Wang MN, Li H, *et al.* Active immunization against the vascular endothelial growth factor receptor flk1 inhibits tumor angiogenesis and metastasis [J]. *J Exp Med*, 2002, 195(12): 1575-1584.

[15] Liu JY, Wei YQ, Yang L, *et al.* Immunotherapy of tumors with vaccine based on quail homologous vascular endothelial growth factor receptor-2 [J]. *Blood*, 2003, 102(5): 1815-1823.

[16] Hiratsuka S, Maru Y, Okada A, *et al.* Involvement of Flt-1 tyrosine kinase (vascular endothelial growth factor receptor-1) in pathological angiogenesis [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(3): 1207-1213.

[17] Pan J, Heiser A, Marget M, *et al.* Enhanced antimetastatic effect of fetal liver kinase 1 extracellular domain and interferon-gamma fusion gene-modified dendritic cell vaccination [J]. *Gene Ther*, 2005, 12(9): 742-750.

[18] Lu F, Qin ZY, Yang WB, *et al.* A DNA vaccine against extracellular domains 1-3 of flk-1 and its immune preventive and therapeutic effects against H22 tumor cell *in vivo* [J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(14): 2039-2044.

[收稿日期] 2007-04-20 [修回日期] 2007-06-04
 [本文编辑] 韩 丹