

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X·2008·04·007

重组腺病毒介导 survivin 基因转染树突状细胞对肾细胞癌的免疫效应

赖海标^{1*}, 吴松¹, 钟希文², 钟亮¹, 黄智峰¹, 曾晔¹ (广州中医药大学附属中山医院 1. 泌尿外科; 2. 药理实验室, 广东 中山 528400)

[摘要] 目的: 研究重组腺病毒介导 survivin 基因转染的树突状细胞(DCs)体外诱导特异性抗肾细胞癌的免疫效应。方法: 以携带 survivin 基因的重组腺病毒(Ad-svv)感染 DCs, Western blotting 检测转染 DCs 的 survivin 的表达, 流式细胞术检测 DCs 表面分子 CD83、MHC II、CD80、CD86 的表达, ELISA 法检测 DCs 培养上清中 IL-12 的含量; 混合淋巴细胞反应(MLR)测定 DCs 刺激同种异体淋巴细胞增殖的能力, ELISA 法检测 DCs 刺激淋巴细胞后上清中 IFN- γ 含量, MTT 法检测其诱导的特异的细胞毒性 T 淋巴细胞(CTLs)免疫效应。结果: 各组 Ad-svv 转染 DCs 后均表现出成熟的 DCs 表型特征, 均可见 survivin 蛋白表达; 转染 Ad-svv 或转染空白腺病毒载体(Ad-CMV)的 DCs 上清中 IL-12 均高于对照组($P < 0.01$), 转染 Ad-svv 的 DCs 上清中 IL-12 高于转染 Ad-CMV-DCs 组($P < 0.01$)。MLR 中, 转染或未转染腺病毒的 DCs 均能刺激同种异体 T 淋巴细胞的增殖, Ad-svv-DC 刺激 T 淋巴细胞增殖的能力最强($P < 0.01$); MLR 后, 转染或未转染重组腺病毒的 DCs 均能刺激 T 淋巴细胞 IFN- γ 的分泌, Ad-svv-DC 组 IFN- γ 的分泌能力最强($P < 0.01$)。Ad-svv-DCs 组诱导的 CTL 对 survivin 表达阳性的 786-0 肾癌细胞的杀伤率明显高于无 survivin 表达的 L-02 肝细胞($P < 0.01$), Ad-CMV-DCs、空白 DC 对 786-0 肾癌细胞无杀伤作用。结论: 重组腺病毒介导 survivin 基因转染能显著提高 DCs 对肾癌细胞抗原的提呈能力、激活特异性细胞毒性 T 淋巴细胞、诱导针对 survivin 的特异性抗癌免疫效应。

[关键词] survivin 基因; 树突状细胞; 肾癌; 腺病毒; 免疫治疗; 基因治疗

[中图分类号] R737.11; R730.51

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2008)04-0331-05

Recombinant adenovirus-mediated survivin gene transfection of dendritic cells induces immune responses against renal cell carcinoma

LAI Hai-biao^{1*}, WU Song¹, ZHONG Xi-wen², ZHONG Liang¹, HUANG Zhi-feng¹, ZENG Ye¹ (1. Department of Urology; 2. Department of Pharmacology, Zhong-shan Hospital, Guangzhou Traditional Chinese Medicine University, Zhong-shan 528400, Guangdong Province, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the anti-tumor immune responses against renal cell carcinoma induced by dendritic cells (DCs) transfected with survivin gene mediated by recombinant adenovirus. **Methods:** The DCs derived from human peripheral blood were infected with recombined adenovirus vector carrying the survivin gene. The expression of survivin protein in the infected DCs was examined by Western blotting assay; the surface expression of CD83, MHC II, CD80 and CD86 by flow cytometry (FCM), Interleukin-12 (IL-12) in the supernatants of DCs and IFN- γ released by the cytotoxic T lymphocytes (CTLs) by ELISA, the ability of DCs in proliferating allo-lymphocytes by mixed lymphocyte reaction (MLR), and specific killing activity of CTLs by MTT assay. **Results:** The DCs presented mature DCs phenotype after transfection with Ad-svv. The expression of survivin protein in transfected DCs was confirmed by Western blotting analysis. The IL-12 level in the supernatant of DCs transfected with Ad-svv was significantly higher than that transfected with empty vector (Ad-CMV, $P < 0.01$); and both of them were significantly higher than that in the control group ($P < 0.01$). During MLR assay the DCs infected and not infected with adenovirus both stimulated allogeneic lymphocyte proliferation, with DCs infected with Ad-svv having the strongest stimulating activity ($P < 0.01$). After MLR the DCs infected and not infected with adenovirus both stimulated IFN- γ secretion by T lymphocytes, with DCs infected with Ad-svv having the strongest secreting activity ($P < 0.01$). The CTL activity of DCs was significantly higher against renal cancer cell line 786-0 positive for survivin than against hepatic cancer cell line L-02 negative for survivin ($P < 0.01$). DCs in the Ad-

[基金项目] 广东省医学科研基金资助课题(No. A2006778). Supported by the Medicine Science Research Foundation of Guangdong Province (No. A2006778)

[作者简介] 赖海标(1968-),男,广东省紫金县人,硕士,教授,主任医师,硕士生导师,主要从事泌尿生殖系肿瘤免疫治疗方面的研究

* Corresponding author. E-mail: lhb8829@163.com

CMV group and empty control group had not cytotoxic effect on 786-0 cells. **Conclusion:** Infection with the recombinant adenovirus encoding survivin can greatly enhance the antigen presenting ability of DCs and subsequently induce survivin-specific CTL activity and anti-tumor effect.

[**Key words**] survivin gene; dendritic cell; renal cell carcinoma; adenovirus; immuno therapy; gene therapy

[Chin J Cancer Biother, 2008, 15(4): 331-335]

肾癌恶性度极高且不易早期发现,确诊时 35% 的患者已有转移^[1]。在抗肿瘤免疫中,树突状细胞(dendritic cell, DC)是目前已知体内最强的抗原提呈细胞,可以通过介导抗原特异性细胞毒 T 淋巴细胞(CTL)和激活 CD4⁺T 细胞分泌大量的细胞因子,如 TNF- α 、IL-12 等介导肿瘤杀伤^[2]。由于抗原结合受 MHC 限制、抗原与受体亲和力低、抗原表达持续性差等原因,外源性抗原脉冲 DC 介导肿瘤的特异性 CTL 杀伤受到了限制,而应用抗原转基因技术可以克服以上缺点^[3,4]。目前,肿瘤相关抗原(tumor associated antigene, TAA)基因转染树突状细胞制备 DC 疫苗进行肿瘤基因免疫治疗正成为肿瘤治疗研究的热点。Survivin 蛋白是一种独特的凋亡抑制蛋白,它表达于人类绝大多数肿瘤组织,而在正常组织细胞中未见表达。本研究利用重组腺病毒载体介导 survivin 基因转染树突状细胞制备 DC 疫苗,观察其诱导产生抗人肾癌 786-0 细胞的体外免疫效应。

1 材料与方法

1.1 细胞株及主要试剂

786-0 人肾癌细胞株、L-02 人肝细胞株购自中国科学院细胞库。携带 survivin 基因的重组腺病毒(Ad-svv)滴度为 1.97×10^9 PFU/ml 及空白腺病毒载体(Ad-CMV)购自本元正阳公司。细胞因子 GM-CSF、IL-4、TNF- α 购自 R&D 公司;胎牛血清、RPMI 1640 购自 Gibco 公司。Ficoll-Hypaque 细胞分离液购自 Sigma 公司。荧光标记鼠抗人 CD80、CD86、MHC II、CD83 单克隆抗体及相应的同型对照购自 BD 公司。兔抗人 survivin 多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG、Western blotting 试剂盒为 Santa Cruz 公司产品。ELISA 法测定 IL-12 试剂盒购自 Sigma 公司,IFN- γ 检测试剂盒购自晶美公司。

1.2 人外周血来源 DCs 的诱导及培养

分别取 3 名健康志愿者抗凝外周血,用 RPMI 1640 不完全培养液按 1:1 稀释,加至细胞分离液的液面上,1 000 $\times g$ 离心 20 min,吸取界面单个核细胞层(PBMC),用 RPMI 1640 不完全培养液洗涤 2 次后,调细胞密度为 2×10^6 /ml,加入 6 孔板,每孔 2 ml。培养 2 h 后,弃去未贴壁细胞,每孔加入完全培养液(GM-CSF 1 000 U/ml + IL-4 800 U/ml + 10% 胎牛血清)RPMI 1640,在 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 条件下培养,2 d 后半量换液,培养 5 d。

1.3 Ad-svv 对 DCs 的转染

分别加入 Ad-svv(MOI 为 10, 20, 100, 200)、Ad-CMV(MOI 为 100)感染 DCs,加入等体积 AB 型血清作对照。同时加入 TNF- α ,使其终质量浓度达 50 ng/ml,48 h 后调密度为 1×10^5 /ml,收获细胞备用。

1.4 Western blotting 检测 DCs 的 survivin 蛋白表达

采用快速制备法提取核蛋白,蛋白样品经 10% SDS-PAGE 分离,湿转法电转移至 NC 膜上。转移后的 NC 膜经 3% BSA 封闭 3 h,加入兔抗人 survivin 多克隆抗体 4 $^{\circ}$ C 过夜。洗涤缓冲液洗膜 3 遍,加入相应辣根标记山羊抗兔 IgG,37 $^{\circ}$ C 反应 2 h,洗膜,显色,水洗终止反应。以图像处理仪分析,计算图像灰度(D)比值。

1.5 流式细胞术检测感染后 DCs 的表型分子

用流式细胞标记液 PBA(PBS + 0.5% BSA + 0.02% 叠氮钠)悬浮细胞,加入 PSA 稀释抗体,4 $^{\circ}$ C 暗处标记 30 min, PBS 洗 2 次,细胞重悬于含有 1% 多聚甲醛的 PBS 荧光细胞保存液中,流式细胞仪进行表型分析。

1.6 ELISA 法检测感染后 DCs 上清中 IL-12 的含量

采用双抗体夹心 ELISA 法检测培养 7 d 的 Ad-svv(MOI 为 10, 20, 100, 200)、Ad-CMV(MOI 为 100)及等体积 AB 型血清感染 DCs 的上清液中 IL-12 含量,按试剂盒说明书操作,实验设 3 个复孔。

1.7 混合淋巴细胞反应(MLR)检测 DCs 对 CTL 的增殖及活化效果

采集健康人自体外周血,分离单个核细胞,洗涤 3 次。调细胞密度为 2×10^6 个/ml,接种 24 孔板,每孔 2×10^6 个细胞。孵育 2 h 后取非黏附细胞(即淋巴细胞),用尼龙毛法去除 B 淋巴细胞,获得同种异体 T 细胞。用含 10% 胎牛血清、100 μ g/ml rhIL-2、2 mmol/L 谷氨酰胺的 RPMI 1640 培养 5 d,收集细胞,调密度至 2×10^6 /ml。将 T 细胞与 Ad-svv-DCs(MOI 为 100)、Ad-CMV-DCs(MOI 为 100)、DCs 按一定细胞比(100:1, 50:1, 20:1, 10:1)在 96 孔板中混合培养,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养 72 h,同时设单一 T 细胞孔作对照。加 MTT 10 μ g,培养 4 h,弃去上清,每孔加 150 μ l DMSO 震荡 10 min,结晶物充分溶解后,用酶标仪在 570 nm 处测 D 值,计算刺激指数(SI)。SI(%) = 实验孔 D/对照孔 D \times 100%。

1.8 ELISA 法检测 MLR 后淋巴细胞上清中 IFN- γ 含量

分别收集混合淋巴细胞反应 3 d 后各组上清,按 ELISA 法说明书检测 IFN- γ 含量,设 3 个复孔。

1.9 CTL 杀伤实验检测 DCs 的细胞毒杀伤活性

收集各组 DCs 作刺激细胞。自体 T 淋巴细胞来源于非贴壁单个核细胞,将淋巴细胞与刺激细胞按 20:1 接种 24 孔板作效应细胞。靶细胞分别为 survivin 阳性的 786-0 人肾癌细胞和无 survivin 表达的 L-02 人肝细胞。以效应细胞:靶细胞(E/T)为 100:1 和 50:1 加入 96 孔板,设相应梯度未经 DC 刺激的 T 细胞和靶细胞混合为对照孔,设 3 个复孔。培养 12 h 后 MTT 法测 570 nm 波长的 *D* 值。杀伤率(%)=(1-实验孔 *D*/对照孔 *D*) \times 100%。

1.10 统计学处理

采用 SPSS13.0 软件处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析。

2 结果

2.1 人外周血 DC 培养过程中的形态学改变

分离后单核细胞经 GM-CSF 和 IL-4 刺激,细胞体积增大,伸出伪足,形态不规则,胞体透亮,并呈细胞积聚现象。随着培养时间延长,悬浮细胞逐渐增多,细胞体积逐渐增大,突起变长,形态更加不规则。培养至 6 d 后可见大量具有毛刺状或根须状突起的悬浮细胞,为典型的 DCs 形态(图 1)。

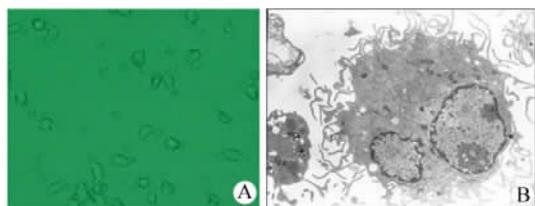


图 1 外周血来源 DC 的形态学观察

Fig. 1 Morphology of DCs derived from peripheral blood

A:DCs under inverted microscope(\times 400);

B: DCs under TEM(\times 5 000)

2.2 Ad-svv 感染 DCs 后 survivin 蛋白的表达

Western blotting 检测结果显示:Ad-svv MOI 为 10、20、100、200 感染的 DCs 均可见 survivin 表达,提示 Ad-svv 感染的 DCs 可有效表达外源基因;而且 survivin 蛋白的表达水平与 Ad-svv 感染 DCs 的 MOI 呈正相关,具有剂量依赖性。而未感染的 DCs 未检出 survivin 蛋白表达(图 2)。

2.3 重组腺病毒感染后 DCs 的表型

流式细胞术分析显示:空白 DCs、Ad-CMV-DCs、Ad-svv-DCs 组无显著性差异。3 组表达率,CD80 分

别为(97. 11 \pm 12. 55)%、(88. 04 \pm 17. 36)% 和 (96. 68 \pm 14. 91)% ; CD86 为(92. 88 \pm 15. 71)%、(94. 74 \pm 16. 16)% 和 (82. 69 \pm 16. 68)% ;MHC II 为 (91. 66 \pm 14. 40)%、(84. 89 \pm 18. 07)% 和 (90. 67 \pm 15. 79)% , CD83 为(98. 15 \pm 12. 77)%、(91. 04 \pm 15. 16)% 和 (85. 74 \pm 18. 57)% 。表明本实验条件下腺病毒转染 DCs 不会影响 DCs 表型的成熟。

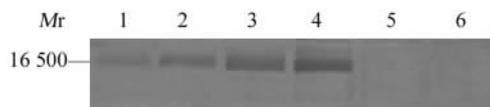


图 2 Western blotting 检测 survivin 蛋白在感染后 DCs 中的表达

Fig. 2 Expression of survivin protein in DCs after infection as detected by Western blotting

1: As-svv-DCs(MOI 10);2: As-svv-DCs(MOI 20);

3: As-svv-DCs(MOI 100);4: As-svv-DCs(MOI 200);

5: Ad-CMV-DCs(MOI 100); 6: Human AB serum(control)

2.4 重组腺病毒感染对 DCs 培养上清中 IL-12 含量的影响

各组 DCs 的 IL-12 分泌量见图 3。Ad-CMV-DCs、各 Ad-svv-DCs 组 IL-12 分泌量[(56. 04 \pm 7. 36)、(100. 68 \pm 10. 91)、(231. 93 \pm 20. 59)、(458. 63 \pm 30. 49)、(680. 44 \pm 42. 49) ng/L]均高于空白 DCs 组[(12. 11 \pm 1. 55) ng/L];Ad-svv 感染 DCs 组 IL-12 分泌量均高于 Ad-CMV-DCs 组($P < 0. 01$);不同 MOI Ad-svv 感染 DCs 组间表现为剂量依赖性($P < 0. 01$)。

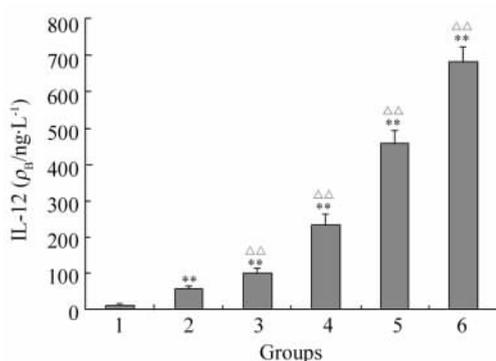


图 3 ELISA 检测 IL-12 在各组 DCs 上清中的分泌水平

Fig. 3 IL-12 levels in the supernatants of DCs in different groups as detected by ELISA

1: Human AB serum (control) group;2: Ad-CMV-DCs (MOI 100) group; 3: Ad-svv-DCs(MOI 10) group; 4: Ad-svv-DCs (MOI 20) group; 5: Ad-svv-DCs (MOI 100) group; 6: As-svv-DCs (MOI 200) group; * $P < 0. 01$ vs human AB serum (control) group; $\Delta\Delta P < 0. 01$ vs Ad-CMV-DCs

2.5 感染后 DCs 对 CTL 的增殖及活化效果的影响

T 细胞与 Ad-svv-DCs、Ad-CMV-DCs、空白 DCs 按一定细胞比例(100: 1、50: 1、20: 1、10: 1)混合培养后均能刺激同种 T 淋巴细胞的增殖, 且随着 DC 细胞比例的提高, Ad-svv-DCs、Ad-CMV-DCs、空白 DCs 刺激 T 细胞增殖的能力随之提高($P < 0.01$); 其中 Ad-svv-DCs 刺激 T 细胞增殖的能力明显高于 Ad-CMV-DCs、空白 DCs 组($P < 0.01$, 图 4)。

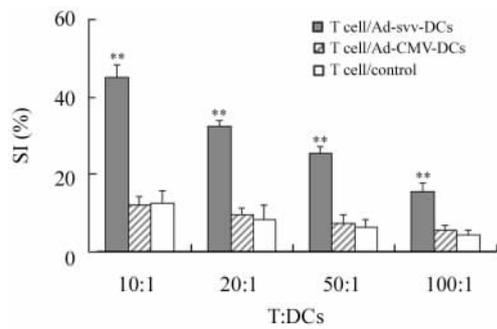


图 4 MLR 各组 DCs 刺激同种异体 T 细胞增殖的能力

Fig. 4 Proliferation of allogeneic T cells stimulated by DCs in different MLR groups

** $P < 0.01$ vs T cell/Ad-CMV-DCs or T cells/control

2.6 感染后的 DCs 刺激 T 淋巴细胞上清中 IFN- γ 的含量

ELISA 方法检测的结果显示, T 淋巴细胞与 Ad-svv-DCs、Ad-CMV-DCs、空白 DCs 按一定细胞比例(100: 1、50: 1、20: 1、10: 1)混合培养后均能刺激 T 淋巴细胞 IFN- γ 的分泌; 随着细胞比例的提高, Ad-svv-DCs、Ad-CMV-DCs、空白 DCs 刺激 T 细胞 IFN- γ 的分泌能力随之提高($P < 0.01$); 在各组细胞比例中, Ad-svv-DCs 刺激 T 细胞 IFN- γ 分泌的能力明显高于 Ad-CMV-DCs、空白 DCs 组($P < 0.01$, 图 5)。

2.7 重组腺病毒感染提高肿瘤抗原特异性 CTL 的杀伤活性

CTL 杀伤实验显示, Ad-svv-DCs 组在效靶比为 100: 1 时对 survivin 阳性表达的 786-0 人肾癌细胞的杀伤率为 78.3%, 在效靶比为 50: 1 时的杀伤率达到 45.6%; 对无 survivin 表达的 L-02 人肝细胞的杀伤率则分别为 10.3%、8.7%; 两组间比较有统计学意义($P < 0.01$)。Ad-CMV-DCs 组、空白 DCs 组对 786-0 细胞基本上无杀伤作用(图 6)。结果说明, Ad-svv 可向 DCs 高效转导 survivin 基因, 使 DCs 高水平呈呈抗原, 有效地诱导 survivin 抗原特异性 CTL 效应。

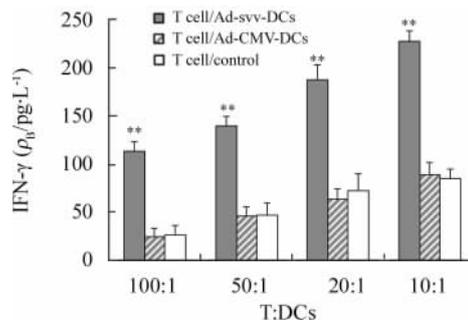


图 5 ELISA 法检测混合淋巴细胞反应后 T 细胞上清液中 IFN- γ 的分泌水平

Fig. 5 IFN- γ levels in the supernatants of T cells in different groups after MLR by ELISA

** $P < 0.01$ vs T cell/Ad-CMV-DCs or T cell/control

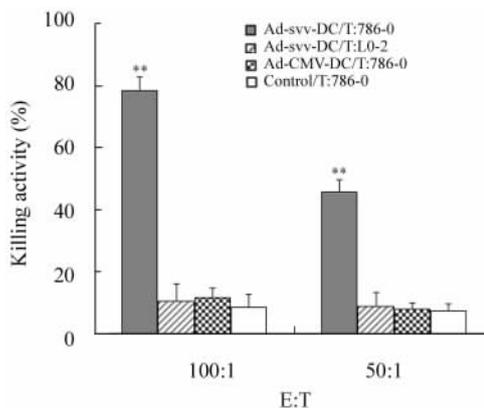


图 6 不同效靶比 T 细胞对靶细胞的特异性 CTL 杀伤活性

Fig. 6 Cytotoxicity of CTLs against target cells in different groups with various effector-to-target cell ratios

* $P < 0.01$ vs Ad-CMV-DCs/T: 786-D or control/T: 786-0

3 讨论

本研究显示, DCs 通过细胞因子体外诱导培养, 无论是否加入腺病毒或携带肿瘤抗原基因的腺病毒感染 DCs 细胞, 均可诱导为成熟的 DCs, 且分泌 IL-12。腺病毒感染 DCs 不会影响 DCs 的表型成熟。将诱导成熟的 DCs 与相同来源的 T 细胞混合, 可成功促进 T 细胞的增殖活化, 并释放 IFN- γ , 且随着细胞比例的提高, Ad-svv-DCs、Ad-CMV-DCs、空白 DCs 刺激 T 细胞 IFN- γ 分泌的能力随之提高, 表明致敏后的 DCs 可较好地激活 T 细胞增殖成熟。研究同时发现, 各组 Ad-svv 感染 DCs 组 IL-12 分泌量均高于 Ad-CMV 组, Ad-svv-DCs 激活 T 细胞后释放的 IFN- γ 明显高于以相同比例混合的 Ad-CMV-DCs、DCs 组。表明转染的 survivin 基因在 DCs 表达

后能进一步促进 DCs 细胞的成熟和激活 T 细胞增殖成熟。

肿瘤免疫逃逸与自身不表达肿瘤抗原、免疫原性弱、抗原缺失或抗原调变有关,因此,DCs 介导肿瘤免疫治疗成功的另一关键在于选择合适的肿瘤相关抗原(TAA)。一个理想的 TAA 应该满足以下条件:(1)表达于肿瘤组织,在正常组织中不表达或仅在极少数组织中表达;(2)大多数患者肿瘤中表达 TAA 且肿瘤组织中的细胞阳性表达率高;(3)为肿瘤细胞生长过程中所必须的,避免肿瘤细胞通过不表达该抗原而逃避免疫监视。Survivin 是一种相对分子质量为 16 500、编码 142 个氨基酸的凋亡抑制蛋白。研究^[5-6]表明,survivin 基因可抑制多种细胞凋亡刺激因子,从而抑制细胞凋亡;其组织分布有明显特征性,胚胎组织中表达丰富,出生后除胸腺和生殖腺表达外,其他正常组织及癌旁组织均无表达,当细胞发生转化或恶性变时重新表达。在肾癌组织中 survivin 过度表达,并且与肾癌的浸润性及预后呈正相关^[7-8]。已有研究^[9-10]证实,当 survivin 的表达降低时,肿瘤组织的生长亦受到抑制,表明 survivin 在肿瘤生长中扮演着不可缺少的角色。2003 年 Casati 等^[11]以 Survivin 蛋白来源的多肽刺激肾癌患者外周血中分离的 DC,将之与同基因淋巴细胞共孵育并收集 CD8⁺ CTL,作用于 CG706、HCT116 肾癌细胞系,发现 Survivin 蛋白来源的多肽刺激产生的 CTL 对 survivin 高表达的肾癌细胞系有特异杀伤性;但由于肿瘤细胞大多数 TAA 受 MHC I 类分子限制,并且通过抗原调变逃避免疫,抗原肽直接刺激诱导 DCs 的方法受到了限制。本实验利用携带 survivin 基因的腺病毒感染 DCs,结果显示,Ad-svv-DCs 诱导的肿瘤抗原特异性 CTL 能显著杀伤 786-0 细胞,而对 L-02 细胞未见明显的杀伤作用;Ad-CMV-DCs 组和空白 DCs 组对 786-0 细胞无明显杀伤作用。表明 Ad-svv 可向 DCs 高效转导 survivin 基因,使 DCs 成熟并向 T 细胞提呈抗原,有效地诱导 survivin 抗原特异性 CTL 效应;对无 survivin 蛋白表达的正常肝细胞 L-02 无明显毒性。

已证实无复制能力的腺病毒是目前最有效的载体^[12-13]。本研究利用腺病毒高效转染外源基因安全性好,转染后对 DCs 表型和多种功能没有任何影响。结果显示,经 Ad-svv 感染的 DCs 可有效表达 survivin 蛋白,survivin 蛋白在 DCs 中的表达水平与 Ad-svv 感染 DCs 的浓度呈剂量依赖性。此方法可以让 survivin 蛋白多种表位在 DCs 中都表达,并克服 MHC I 类分子限制,长时间地有效提呈抗原表

位,且相同 HLA 等位基因可提呈多个抗原表位;使 DCs 选择合适的表位,通过 MHC I 及 MHC II 类分子限制性抗原提呈途径,诱导 CTL。

Survivin 基因修饰致敏的 DC 将是极有前景的 DCs 疫苗,有望成为一种高效低不良反应的肿瘤治疗制剂。

[参考文献]

- [1] Papadopoulos I, Weichert-Jacobsen K, Wacker HH, *et al*. Correlation between DNA ploidy, proliferation marker Ki-67 and early tumor progression in renal cell carcinoma. A prospective study [J]. *Eur Urol*, 1997, 31(1): 49-53.
- [2] Marzo AL, Kinneer BF, Lake RA, *et al*. Tumor-specific CD4⁺ T cells have a major "post-licensing" role in CTL mediated anti-tumor immunity [J]. *J Immunol*, 2000, 165(11): 6047-6055.
- [3] Reinhard G, Marten A, Kiske SM, *et al*. Generation of dendritic cell-based vaccines for cancer therapy [J]. *Br J Cancer*, 2002, 86(10): 1529-1533.
- [4] Xiang R, Mizutani N, Luo Y, *et al*. A DNA vaccine targeting survivin combines apoptosis with suppression of angiogenesis in lung tumor eradication [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(2): 553-561.
- [5] Charalambous A, Oks M, Nchinda G, *et al*. Dendritic cell targeting of survivin protein in a xenogeneic form elicits strong CD4⁺ T cell immunity to mouse surviving [J]. *J Immunol*, 2006, 177(12): 8410-8421.
- [6] Ciesielski MJ, Apfel L, Barone TA, *et al*. Antitumor effects of a xenogeneic survivin bone marrow derived dendritic cell vaccine against murine GL261 gliomas [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2006, 55(12): 1491-1503.
- [7] Kosari F, Parker AS, Kube DM, *et al*. Clear cell renal cell carcinoma: gene expression analyses identify a potential signature for tumor aggressiveness [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(14): 5128-5139.
- [8] Ljungberg B. Prognostic markers in renal cell carcinoma [J]. *Curr Opin Urol*, 2007, 17(5): 303-308.
- [9] Chen T, Deng C. Inhibitory effect of siRNA targeting survivin in gastric cancer MGC-803 cells [J]. *Int Immunopharmacol*, 2008, 8(7): 1006-1011.
- [10] Pennati M, Folini M, Zaffaroni N. Targeting survivin in cancer therapy [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2008, 12(4): 463-476.
- [11] Casati C, Dalerba P, Rivoltini L, *et al*. The apoptosis inhibitor protein survivin induces tumor-specific CD8⁺ and CD4⁺ T cells in colorectal cancer patients [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(15): 4507-4515.
- [12] Arthur JF, Butterfield LH, Roth MD, *et al*. A comparison of gene transfer methods in human dendritic cells [J]. *Cancer Gene Ther*, 1997, 4(1): 17-25.
- [13] He TC, Zhou S, da Costa LT, *et al*. A simplified system for generating recombinant adenoviruses [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(5): 2509-2514.

[收稿日期] 2008-05-26

[修回日期] 2008-07-20

[本文编辑] 韩丹