

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.04.013

· 临床研究 ·

PA-MSHA 疫苗增强急性髓细胞白血病源 DC 对 Treg 的抑制作用

刘媛媛,张连生,柴 晔,曾鹏云,岳玲玲,吴重阳,李莉娟(兰州大学附属第二医院血液肿瘤科,甘肃兰州 730030)

[摘要] 目的:探讨带有甘露糖敏感血凝菌毛的铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa* with mannose sensitive hemagglutination pili, PA-MSHA)疫苗处理后急性髓细胞白血病源性树突状细胞(dendritic cells derived from acute myeloid leukemia, AML-DC)对调节性T细胞(regulatory T cell, Treg)的抑制作用。方法:rhGM-CSF和rhIL-4诱导的AML-DC分为对照组、PA-MSHA组和TNF- α 组,培养24h后观察3组AML-DC的形态、流式细胞术检测各组AML-DC的表型、MTT法和混合淋巴细胞反应检测AML-DC对淋巴细胞增殖的作用。磁珠法分离健康人外周血CD4⁺T细胞,加入各组AML-DC中诱导Treg,ELISA法检测各组Treg上清液中IL-10、TGF- β 的水平,流式细胞术检测Treg表面CD4、CD25的表达,RT-PCR法检测Treg中Foxp3 mRNA的表达水平。结果:PA-MSHA组和TNF- α 组AML-DC呈树突状形态,且CD1a、CD80、CD83、CD86和HLA-DR表达较对照组明显升高($P < 0.05$)。PA-MSHA组和TNF- α 组AML-DC诱导的T细胞增殖能力显著增强($P < 0.05$)。PA-MSHA组和TNF- α 组AML-DC诱导产生的Treg分泌较低水平的IL-10、TGF- β ($P < 0.05$),CD4、CD25的表达及Foxp3 mRNA水平均较对照组明显降低($P < 0.05$)。上述各指标PA-MSHA组和TNF- α 组间均无明显差异。结论:PA-MSHA疫苗可促进AML-DC的成熟,抑制初始T细胞向Treg的分化,增强AML-DC对AML患者Treg的抑制作用。

[关键词] 急性髓细胞白血病;带有甘露糖敏感血凝菌毛的铜绿假单胞菌;树突状细胞;调节性T细胞

[中图分类号] R392.7

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2010)04-0429-05

PA-MSHA vaccine enhances inhibitory effect of acute myeloid leukemia-derived dendritic cells on regulatory T cells

LIU Yuan-yuan, ZHANG Lian-sheng, CHAI Ye, ZENG Peng-yun, YUE Ling-ling, WU Chong-yang, LI Li-juan (Department of Hematology and Oncology, Second Hospital Affiliated to Lanzhou University, Lanzhou 730030, Gansu, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the influence of PA-MSHA (*Pseudomonas aeruginosa* with mannose sensitive hemagglutination pili) vaccine on the inhibitory effect of dendritic cells derived from acute myeloid leukemia (AML-DCs) on regulatory T cells (Treg). **Methods:** AML-DCs were induced with rhGM-CSF and IL-4 and were divided into three groups: control group, PA-MSHA, and TNF- α groups. After 24 h, the morphological features of AML-DCs in different groups were observed; the phenotypes were detected by flow cytometry; and the effect of AML-DCs on T cell proliferation was measured by mixed lymphocyte reaction and MTT assay. CD4⁺T cells were collected by magnetic bead assay from healthy peripheral blood cells and were incubated with different AML-DCs to induce differentiation of Treg. Then IL-10 and TGF- β were detected in different Treg supernatants by ELISA; CD4 and CD25 expressions on different Treg were determined by flow cytometry; and Foxp3 mRNA expression was examined by RT-PCR. **Results:** AML-DCs in PA-MSHA and TNF- α groups showed typical dendritic morphology, increased expressions of CD1a, CD80, CD83, CD86 and HLA-DR ($P < 0.05$), and enhanced abilities to induce proliferation of T cells compared with those in the control group ($P < 0.05$). In addition, the levels of IL-10 and TGF- β , the expressions of CD4 and CD25 on Treg, and the expression of Foxp3 mRNA in PA-MSHA and TNF- α groups were all significantly lower than those in the control group ($P < 0.05$), and these indices had no differences between PA-MSHA and TNF- α groups. **Conclusion:** PA-MSHA vaccine can promote the maturation of AML-DC, inhibit the differentiation of Treg from CD4⁺T cells, and enhance the inhibitory effect of AML-DC on Treg of AML patients.

[基金项目] 甘肃省科技支撑计划项目(No.0804NKCA115)。Project supported by the Program of Science and Technology of Gansu Province (No. 0804NKCA115)

[作者简介] 刘媛媛(1982-),女,甘肃省兰州市人,硕士生,主要从事肿瘤生物免疫治疗方面的研究。E-mail:liuyuanxuanxy@126.com

[通信作者] 张连生(ZHANG Lian-sheng, corresponding author), E-mail:zls2170@yahoo.com

[**Key words**] acute myeloid leukemia; *Pseudomonas aeruginosa* with mannose sensitive hemagglutination pili (PA-MSHA); dendritic cell; regulatory T cell(Treg)

[Chin J Cancer Biother, 2010, 17(4): 429-433]

目前肿瘤免疫治疗策略的研究重点集中在打破免疫耐受和提高宿 T 细胞反应。CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞(regulatory T cells, Treg)占正常人体外周 CD4⁺T 淋巴细胞的 5% ~ 10%, 它具有免疫抑制和免疫无能性, 在多种肿瘤患者外周血及肿瘤组织局部的数量增多, 被认为与肿瘤发病和发展有关, 减少或抑制恶性肿瘤患者体内的 Treg 可以达到抑制肿瘤的作用^[1]。另有研究^[2]证实, 未成熟 DC 促进 Treg 的产生。急性髓细胞白血病(acute myeloid leukemia, AML)是造血干细胞异常克隆增生导致的一种恶性肿瘤性疾病, 与正常人相比, AML 患者外周血和骨髓血中均含有更高比例 Treg^[3]。研究^[4]表明, 带有甘露糖敏感血凝菌毛的铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa* with mannose sensitive hemagglutination pili, PA-MSHA)疫苗可诱导机体体液和细胞免疫反应, 通过增强体内免疫活性细胞杀伤肿瘤细胞的能力来达到治疗肿瘤的目的, 但其具体作用机制尚不十分明确。本研究通过检测经 PA-MSHA 疫苗刺激的 AML 源性 DC(AML-DC)对 Treg 作用的影响, 探讨 PA-MSHA 对 AML 的免疫治疗作用机制。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂

RPMI 1640 购自 Hyclone 公司, 小牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司, TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司, rhGM-CSF 由厦门特宝生物工程公司惠赠, rhIL-4、rhTNF- α 购自美国 BD 公司, 抗人 CD1a-PE、CD80-FITC、CD83-FITC、CD86-PE、HLA-DR-FITC、CD4-PE、CD25-FITC 单克隆抗体购自美国 Burlingame 公司。初始 CD4⁺T 细胞分选试剂盒购自 Miltenyi Biotec 公司, ELISA 试剂盒(TGF- β 1, IL-10)购自晶美生物公司, RT-PCR 试剂盒购自 Toyobo 公司。PMA 及离子霉素购自美国 Sigma 公司。PA-MSHA 疫苗(万特普安, 含菌量为 1.6×10^9 /ml ~ 2.0×10^9 /ml)购自北京万特生物制药有限公司。

1.2 标本选择

选择兰州大学第二医院血液科初诊未治的 AML(M5 型)患者, 诊断符合血液病诊断标准。经血细胞分离单采术获得患者的外周血富集白细胞

层。患者知晓实验的目的和过程, 均签署知情同意书, 并报院伦理委员会审批。

1.3 外周血单个核细胞的分离

将 AML 患者外周血富集白细胞层用 PBS 液按 1:1 比例混合稀释, 用淋巴细胞分离液经密度梯度离心法分离外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC), 调整密度至 5×10^6 /ml, 用含 40% 胎牛血清、50% RPMI 1640 和 10% 二甲基亚砷的冻存液保存于 -196 °C 液氮中备用。

1.4 DC 细胞的诱导培养

常规复苏冻存的 AML-PBMC, 锥虫蓝计数细胞活性大于 95%。用 RPMI 1640 完全培养基调整细胞密度至 2×10^6 /ml, 接种于 12 孔培养板, 37 °C、5% CO₂ 孵箱内培养 3 h。洗去非贴壁细胞, 贴壁细胞中加入含细胞因子 1 000 U/ml rhGM-CSF 及 500 U/ml rhIL-4 的 RPMI 1640 完全培养基 1 ml/孔, 置 37 °C 饱和湿度、5% CO₂ 孵箱内培养, 每 3 d 半量换液 1 次, 并补充等量的生长因子。将培养至第 7 天时的不成熟 DC (imDC)分成对照组(不作任何处理)、PA-MSHA 组(加入 1×10^7 /ml PA-MSHA)和 TNF- α 组(加入 100 ng/ml TNF- α), 继续培养 24 h 后收集细胞。倒置显微镜下每天观察培养中的 DC 的细胞数目、形状、生长状况等。

1.5 流式细胞术检测 AML-DC 的免疫表型

取培养第 8 天的 3 组 AML-DC, 调整细胞密度至 1×10^6 /ml。取细胞悬液 100 μ l, 分别加入相应单克隆抗体 15 μ g/ml, 混匀后室温下暗室反应 30 min, 加 PBS 缓冲液, $1 000 \times g$ 离心 5 min, 洗涤, 以 10 g/L 多聚甲醛固定, 用流式细胞仪检测, Cell Quest 软件分析。

1.6 MTT 法检测 AML-DC 对淋巴细胞增殖的影响

取健康供者的外周血 50 ml, 分离 PBMC, 接种于 25 cm²培养瓶中培养 3 h, 然后收集悬浮细胞, 调整细胞密度至 1×10^6 /ml, 作为 T 反应细胞。取培养第 8 天的各组 DC 加入 25 μ g/ml 丝裂霉素, 37 °C 灭活 1 h, PBS 液洗涤后作为刺激细胞。按刺激细胞: 反应细胞为 1:10、1:20、1:50 的比例加入 96 孔培养板中(200 μ l/孔), 每组设 3 个复孔, 另设空白对照孔。在 37 °C 饱和湿度、5% CO₂ 孵箱中培养 4 d, 吸出上清, 加入 MTT 液(5 mg/ml) 20 μ l/孔, 继续培养 4 h 弃上清, 每孔加入二甲基亚砷 150 μ l, 震

荡 10 min 使 MTT 溶解,以空白孔调零,酶标仪测波长 570 nm 时各孔光密度值 (D),计算增殖指数 (PI), $PI = D_{\text{实验组}}/D_{\text{空白组}}$ 。

1.7 Miltenyi 磁珠阴性选择分离 CD4⁺T 细胞

采集健康对照者静脉血 10 ml,肝素抗凝,淋巴细胞分离液分离外周血单个核细胞,再采用 Miltenyi 磁珠阴性分选出 CD4⁺T 细胞,经流式细胞仪检测细胞纯度大于 92%。

1.8 Treg 细胞的诱导培养

将 3 组培养第 8 天的 DC 1×10^4 /ml,分别和健康供者的自体 T 细胞 1×10^6 /ml 加入含 RPMI 1640 完全培养基的 24 孔培养板,37 °C 饱和湿度、5% CO₂ 孵箱中培养 7 d。在结束前,再用相应的 DC 重新刺激 7 h。最后以 PMA(25 ng/ml)和离子霉素(2 μg/ml)刺激 4 h。

1.9 ELISA 法检测 IL-10 及 TGF-β

取 1.8 中各组培养的的上清液,用 ELISA 法分别测定 IL-10 及 TGF-β 的含量。具体操作按试剂盒说明书进行。

1.10 流式细胞术检测 Treg 细胞的 CD4、CD25 免疫表型

取诱导 7 d 的 Treg 细胞悬液(1×10^6 /ml),按上述流式细胞仪方法检测细胞 CD4、CD25 免疫表型。

1.11 RT-PCR 检测 Treg 细胞 Foxp3 mRNA 的表达

取诱导 7 d 的 Treg 细胞悬液,离心后进行 RT-PCR,检测 Foxp3 mRNA 表达水平。按文献^[5]方法设计引物,目的基因 Foxp3 引物:上游 5'-AGGCTTCATCTGTGGCATCAT-3',下游 5'-CTTGC GGA ACTC CAGCTCAT -3';扩增片段长度为 443 bp。内参基因 β-actin 引物:上游 5'-ATGGATGATGATATCGCGG-3',下游 5'-CATGAAGCATTTGCGGTGGACGATGGAG

GGGCC-3';扩增片段长度为 1 126 bp。以 TRIzol 提取总 RNA,逆转录成 cDNA,后进行 PCR 扩增,反应体系 20 μl,扩增条件:94 °C 变性 40 s,60 °C 退火 40 s,72 °C 延伸 60 s,35 个循环。取扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统扫描并分析,Foxp3 mRNA 表达水平以 Foxp3/β-actin 比值表示。

1.12 统计学处理

采用 SPSS10.0 软件进行统计分析,所测数据用以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数比较采用方差分析,进一步组间比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PA-MSHA 和 TNF-α 作用后 AML-DC 形态学的变化

倒置显微镜下可见,培养初的 PBMC 呈球形散在分布,表面光滑;第 3 天可见细胞体积增大,胞体出现树状突起;培养第 5~7 天,细胞大多可见毛刺状突起,呈集落生长。加入 PA-MSHA 和 TNF-α 24 h 后,细胞树状突起较对照组更加明显,数量也进一步增多,有大量细胞集落生成,出现成熟 DC 的特征。

2.2 PA-MSHA 和 TNF-α 作用后 AML-DC 的免疫表型

流式细胞术检测 3 组 AML-DC 免疫表型,实验结果(表 1)显示,经过 PA-MSHA 和 TNF-α 作用后的 AML-DC,其表型分子 CD1a、CD80、CD83、CD86、HLA-DR 均显著高于对照组($P < 0.05$),TNF-α 作用的 AML-DC 各表型分子均显著高于 PA-MSHA 作用的 AML-DC($P < 0.05$)。

表 1 PA-MSHA 和 TNF-α 作用后 AML-DC 的表型分析(%)
Tab.1 Phenotypes of AML-DC after treatment with PA-MSHA and TNF-α(%)

Group	CD1a	CD80	CD83	CD86	HLA-DR
Control	20.72 ± 4.86	13.37 ± 4.22	2.92 ± 2.16	15.85 ± 3.56	18.49 ± 3.95
PA-MSHA	27.33 ± 4.06*	25.48 ± 3.92*	18.82 ± 2.60*	32.76 ± 3.52*	37.17 ± 2.79*
TNF-α	33.77 ± 7.20* [△]	31.06 ± 6.42** [△]	21.19 ± 1.86*** [△]	36.94 ± 3.44*** [△]	43.12 ± 2.98*** [△]

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control, [△] $P < 0.05$ vs PA-MSHA

2.3 PA-MSHA 疫苗加强 AML-DC 对淋巴细胞增殖的刺激作用

异体淋巴细胞混合培养 4 d,用 MTT 法检测淋

巴细胞增殖指数(表 2),可见除对照组外,其他两组 AML-DC 诱导的 T 细胞增殖指数随刺激细胞数量的增加而增强($P < 0.05$);在同一靶比例下,与对照

组相比,其他两组 AML-DC 均能显著刺激 T 细胞增殖 ($P < 0.05$), 而以 TNF- α 组的刺激作用最强 ($P < 0.05$)。

2.4 PA-MSHA 疫苗抑制 CD4⁺T 上清中 IL-10 及 TGF- β 的表达水平

分别检测 3 组 AML-DC 培养结束时的 CD4⁺T 上清液 IL-10 及 TGF- β 的水平。结果(图 1)显示, 经 PA-MSHA 和 TNF- α 处理 DC 组的 IL-10 及 TGF- β 的水平明显低于对照组 ($P < 0.05$), 且 TNF- α 组水平最低 ($P < 0.05$)。

表 2 不同效靶比时 AML-DC 诱导淋巴细胞增殖
Tab.2 AML-DC induced proliferation of lymphocytes at different effector-to-target ratios

Group	Stimulator: Responder		
	1: 10	1: 20	1: 50
Control	1.33 ± 0.10	1.22 ± 0.29	1.01 ± 0.13
PA-MSHA	2.62 ± 0.20*	1.99 ± 0.19*	1.41 ± 0.14*
TNF- α	3.17 ± 0.21* Δ	2.70 ± 0.23* Δ	1.92 ± 0.10* Δ

* $P < 0.05$ vs control, $\Delta P < 0.05$ vs PA-MSHA

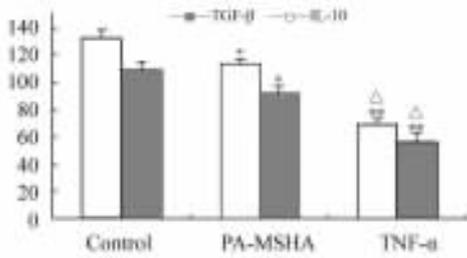


图 1 PA-MSHA 和 TNF- α 处理后 CD4⁺T 上清液中 IL-10 及 TGF- β 的水平

Fig. 1 Concentrations of IL-10 and TGF- β in CD4⁺T supernatant after PA-MSHA and TNF- α treatment

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control, $\Delta P < 0.05$ vs PA-MSHA

2.5 PA-MSHA 疫苗抑制 Treg 的免疫表型表达

CD4⁺CD25⁺Treg 细胞占 CD4⁺T 细胞的比例, 在 PA-MSHA 组为 (12.26 ± 1.10)%, TNF- α 组为 (11.15 ± 0.78)%, 均明显低于对照组的 (14.84 ± 1.39)% ($P < 0.05$, 图 2)。

2.6 PA-MSHA 疫苗抑制 Foxp3 mRNA 的表达

RT-PCR 结果(图 3)表明, PA-MSHA 组 Foxp3

mRNA 的表达为 0.27 ± 0.032, TNF- α 组为 0.20 ± 0.030, 均明显低于对照组的 0.35 ± 0.038 ($P < 0.05$)。

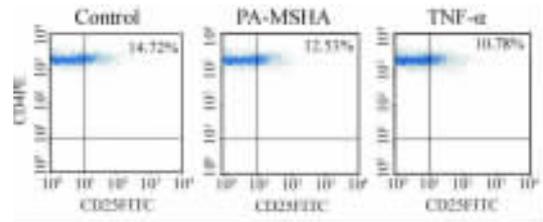


图 2 流式细胞术检测各处理组 Treg 细胞的免疫表型

Fig. 2 Phenotypes of Treg in different treatment groups as detected by flow cytometry



图 3 RT-PCR 检测各处理组 Foxp3 mRNA 的表达
Fig. 3 Expressions of Foxp3 mRNA in different treatment groups as detected by RT-PCR

1, 2, 3: TNF- α ; 4, 5, 6, 7: PA-MSHA; 8, 9, 10: Control

3 讨论

近年来,以肿瘤免疫治疗为基础发展起来的生物治疗日益受到人们重视。肿瘤生物治疗是通过调动和增强机体固有的抗癌能力去抑制和杀伤肿瘤细胞或使其转化为良性的组织细胞的治疗方法,成为继肿瘤手术治疗、放射治疗和化学治疗三大常规治疗之后的第四种肿瘤治疗模式^[6]。白血病细胞来源的 DC 疫苗因携带自身肿瘤抗原在白血病免疫治疗中备受关注^[7]。PA-MSHA 是从带甘露糖敏感血凝菌毛的铜绿假单胞菌中制备而来,因其产生免疫调节作用及低毒无不良反应而倍受青睐,目前已广泛应用于抗感染治疗,甚至作为免疫调节剂用于抗肿瘤治疗。据报道^[8], PA-MSHA 疫苗作为白血病、恶性淋巴瘤、肺癌、乳腺癌、胃癌、肝癌等恶性肿瘤的辅助治疗可提高临床有效率,其抗肿瘤的可能机制在于通过增加树突状细胞的抗原提呈能力,提高 Th1/Th2 的比例,调节细胞免疫和体液免疫的不平衡状态,达到有效的免疫调节作用。

CD4⁺CD25⁺Treg 占正常人体外周 CD4⁺T 淋巴细胞的 5% ~ 10%, 参与体内免疫抑制过程,在多种肿瘤患者外周血及肿瘤组织局部的数量增

多^[9-10],并参与肿瘤免疫的调节,抑制自体 T 细胞的增生,从而削弱免疫监视和清除,参与肿瘤细胞的增殖过程,促进肿瘤的发生与发展。有报道^[11-12]表明,减少 Treg 的数量成为一种新的肿瘤免疫治疗思路。Foxp3 是 Treg 发育和功能维持的主要调节基因,可作为其特征性标志^[13]。IL-10 及 TGF- β 是与 Treg 抑制功能相关的两种主要细胞因子^[14]。急性髓细胞白血病(AML)是造血干细胞异常克隆增生导致的一种恶性肿瘤性疾病,伴有严重的免疫系统损伤。与正常人相比,急性髓细胞白血病患者外周血和骨髓血中均含有更高比例的 Treg。

Treg 可分为天然性 Treg 和获得性 Treg^[15]。获得性 Treg 在一定的环境条件下由于抗原提呈细胞(APC)表面共刺激分子表达的改变或细胞因子种类的变化,使 T 细胞分化为 Treg。未成熟 DC 提呈抗原可促使 CD4⁺ T 细胞向诱导性 Treg 分化^[2]。

孙文平等^[16]报道了 PA-MSHA 疫苗能明显提高急性白血病患者的各项免疫功能,增强其自身的免疫杀伤能力,PA-MSHA 疫苗治疗组患者其 IL-2 水平、NK 细胞活性、CD4⁺/CD8⁺ 比值均明显高于对照组。但 PA-MSHA 疫苗是否可以通过降低 AML 患者体内的 Treg 细胞的数量和功能,从而发挥其抗肿瘤作用方面的研究,还尚未有报道。

本实验结果表明,应用 rhGM-CSF、rhIL-4、TNF- α 或 rhGM-CSF、rhIL-4、PA-MSHA 能够成功地诱导 AML 外周血富集白细胞层分离的 PBMC 成为功能正常的成熟 DC,与相关文献报道相似。本实验将 3 组 AML-DC 分别与同种异体 CD4⁺ T 细胞进行培养。结果表明,单纯应用 PA-MSHA 疫苗刺激的 DC 组,虽不及应用经典的 TNF- α 刺激的 DC 组的效果明显,但对 CD4⁺ T 细胞诱导出的 Treg,在基因水平、免疫表型的表达、分泌的细胞因子水平方面,均明显低于对照组。分析其机制是由于 PA-MSHA 作为促成剂可以促进 DC 的进一步成熟,从而减少 AML 患者体内 CD4⁺ T 向 Treg 的分化,减少 Treg 的数量,降低 Treg 的功能,达到增强机体抗白血病细胞的作用。故可得出结论:PA-MSHA 可作为急性髓细胞白血病 DC 疫苗的免疫佐剂,并抑制初始 T 细胞向 Treg 方向分化,从而增强对急性髓细胞白血病细胞的抑制活性,能够为该疫苗应用于 AML 治疗提供实验依据。但本实验未能研究联合 PA-MSHA 及 TNF- α 对 DC 及 Treg 的影响,也未能进一步研究 PA-MSHA 对 CD4⁺ T 向 TH1、TH2、TH17 分化的影响,这需要在今后进一步探索。

[参考文献]

- [1] Wolf AM, Wolf D, Steurer M, Gastl G, Gunsilius E, Grubeck-Loebenstien B. Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients [J]. *Clinical Cancer Res*, 2003, 9(2): 606-612.
- [2] Jonuleit H, Schmitt E, Steinbrink K, Enk AH. Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells [J]. *Trends Immunol*, 2001, 22(7): 394-400.
- [3] Wang X, Zheng J, Liu J, Yao J, He Y, Li X, et al. Increased population of CD4(+)CD25(High), regulatory T cells with their higher apoptotic and proliferating status in peripheral blood of acute myeloid leukemia patients [J]. *Eur J Haematol*, 2005, 75(6): 468-476.
- [4] 张明策, 牟希亚. PA-MSHA 菌苗的抗肿瘤活性和免疫调节作用 [J]. *上海免疫学杂志*, 1994, 14(5): 268-271.
- [5] 罗征秀, 刘恩梅, 邓兵, 李欣, 陈坤华, 王莉佳, 等. Foxp3 表达与 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞在儿童哮喘发病中的作用 [J]. *中华儿科杂志*, 2006, 44(4): 267-271.
- [6] 林 垚, 李承博, 侯东泽. 肿瘤生物治疗新进展 [J]. *中国实用医药*, 2009, 4(1): 225-226.
- [7] Kater AP, van Oers MH, Kipps TJ. Cellular immune therapy for chronic lymphocytic leukemia [J]. *Blood*, 2007, 110(8): 2811-2818.
- [8] Cao Z, Shi L, Li Y, Wang J, Wang D, Wang G, et al. Pseudomonas aeruginosa: Mannose sensitive hemagglutinin inhibits the growth of human hepatocarcinoma cells via mannose-mediated apoptosis [J]. *Dig Dis Sci*, 2009, 54(10): 2118-2127.
- [9] Kobayashi N, Hiraoka N, Yamagami W, Ojima H, Kanai Y, Kosuge T, et al. FOXP3⁺ regulatory T cells affect the development and progression of hepatocarcinogenesis [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(3): 902-911.
- [10] Mougiakakos D, Choudhury A, Lladser A, Kiessling R, Johansson CC. Regulatory T cells in cancer [J]. *Adv Cancer Res*, 2010, 107: 57-117.
- [11] Rech AJ, Vonderheide RH. Clinical use of anti-CD25 antibody daclizumab to enhance immune responses to tumor antigen vaccination by targeting regulatory T cells [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2009, 1174: 99-106.
- [12] Teng MW, Swann JB, von Scheidt B, Sharkey J, Zerafa N, McLaughlin N, et al. Multiple antitumor mechanisms downstream of prophylactic regulatory T-cell depletion [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(7): 2665-2674.
- [13] Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells [J]. *Nat Immunol*, 2003, 4(4): 330-336.
- [14] Askenasy N, Kaminitz A, Yarkoni S. Mechanisms of T regulatory cell function [J]. *Autoimmun Rev*, 2008, 7(5): 370-375.
- [15] Bluestone JA, Abbas AK. Natural versus adaptive regulatory T cells [J]. *Nat Rev Immunol*, 2003, 3(3): 253-257.
- [16] 孙文平, 付红文, 刘 妮, 吴 毓, 牟希亚, 靳 岩, 等. PA-MSHA 菌毛株疫苗对三种癌症患者免疫疗效的临床观察 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2000, 20(4): 373-376.

[收稿日期] 2010-04-26

[修回日期] 2010-06-05

[本文编辑] 王 莹