

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.05.004

· 基础研究 ·

异种 EGFR 口服 DNA 疫苗抑制小鼠 Lewis 肺癌的生长

武建毅¹, 刘 崇², 唐 亮², 谈立松², 黄晓东¹(1. 上海市普陀区人民医院 肿瘤科, 上海 200060; 2. 同济大学附属肺科医院 肺癌免疫研究室, 上海 200433)

[摘要] 目的: 观察表达异种鸡 EGFR(chicken EGFR, cEGFR)与 IgG- γ Fc 融合基因的口服减毒鼠伤寒沙门菌疫苗对高表达 EGFR 的肺癌 Lewis 细胞小鼠移植瘤生长的抑制作用。方法: 将 pVAX1-cEGFR- γ Fc 质粒转化减毒沙门菌 SL7207, 重组菌 SL7207/pVAX1-cEGFR- γ Fc 体外感染小鼠腹腔巨噬细胞, 免疫荧光法检测 cEGFR- γ Fc 融合蛋白的表达。SL7207/pVAX1-cEGFR- γ Fc 重组菌口服免疫小鼠 3 次后接种 Lewis 细胞, Western blotting 检测小鼠体内融合蛋白的表达, ELISA 法检测免疫小鼠血清抗 EGFR 抗体的水平。接种 Lewis 细胞 14 d 后处死小鼠, 瘤体称质量, 检测 SL7207/pVAX1-cEGFR- γ Fc 疫苗对 Lewis 肺癌生长的抑制作用, 测定荷瘤小鼠的生存时间。结果: 成功构建减毒沙门菌疫苗 SL7207/pVAX1-cEGFR- γ Fc, SL7207/pVAX1-cEGFR- γ Fc 感染后, 在小鼠后体内外都能检测到 cEGFR- γ Fc 融合蛋白的表达; SL7207/pVAX1-cEGFR- γ Fc 疫苗口服免疫后小鼠能够产生高水平的抗 EGFR 抗体, 口服 SL7207/pVAX1-cEGFR- γ Fc 疫苗能够有效抑制小鼠 Lewis 移植瘤的生长, 延长荷瘤小鼠的生存时间。结论: 异种 EGFR 口服 DNA 疫苗能够有效地抑制高表达 EGFR 肺癌的生长, 是 EGFR 分子靶向治疗的一条新途径。

[关键词] 减毒沙门氏菌; 表皮生长因子受体; 肺肿瘤; DNA 疫苗; 异种同源抗原

[中图分类号] R734.2; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2010)05-0505-05

Oral DNA vaccine expressing xenogeneic EGFR inhibits growth of Lewis lung cancer in mice

WU Jian-yi¹, LIU Dong², TANG Liang², TAN Li-song², HUANG Xiao-dong¹(1. Department of Oncology, Putuo District People's Hospital of Shanghai, Shanghai 200060, China; 2. Immunology Institute of Lung Cancer, Shanghai Pulmonary Hospital, Tongji University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the inhibitory effect of attenuated salmonella typhimurium vaccine, which expressing xenogeneic chicken EGFR and IgG- γ Fc, on the growth of Lewis lung cancer (expressed high level of EGFR)-implanted tumors in mice. **Methods:** pVAX1/cEGFR- γ Fc plasmid was transformed into attenuated salmonella typhimurium strain SL7207, and the resultant SL7207/pVAX1-cEGFR- γ Fc bacteria were used to infect murine peripheral macrophage *in vitro*. Then expression of cEGFR- γ Fc fusion protein was detected by immunofluorescent assay. Mice were immunized with SL7207/pVAX1-cEGFR- γ Fc for 3 times, and then inoculated with Lewis cells. Expression of cEGFR- γ Fc fusion protein in mice tissue was detected by Western blotting analysis, and serum anti-EGFR level was determined by ELISA method. The weight of implanted Lewis tumor was measured after 14 d to investigate the anti-tumor effect of SL7207/pVAX1-cEGFR- γ Fc vaccine, and the survival time of tumor-bearing mice was also examined. **Results:** The attenuated salmonella typhimurium DNA vaccine SL7207/pVAX1-cEGFR- γ Fc was successfully constructed. The cEGFR- γ Fc fusion protein could be expressed in mouse cells after SL7207/pVAX1-cEGFR- γ Fc infection *in vitro* and *in vivo*. The mice immunized with SL7207/pVAX1-cEGFR- γ Fc could produce high level of anti-EGFR antibody. The tumor growth was obviously inhibited and the survival time of tumor-bearing mice was also increased in the SL7207/pVAX1-cEGFR- γ Fc vaccine group. **Conclusion:** The DNA vaccine expressing xenogeneic EGFR can effectively inhibit the growth of EGFR-positive tumors,

[基金项目] 上海市科委基金资助项目(No. 03DZ19263); 上海市普陀区卫生局资助项目(No. PTW08-Z01)。Project supported by the Foundation of Shanghai Science Committee (No. 03DZ19263), and the Foundation of Health Bureau of Putuo District in Shanghai (No. PTW08-Z01)

[作者简介] 武建毅(1978-),男,山西省介休市人,主治医师,硕士,主要从事肿瘤生物治疗方面的研究

[通信作者] 黄晓东(HUANG Xiao-dong, corresponding author), E-mail: wangshengx@tom.com

which is a new EGFR-targeting therapy strategy.

[**Key words**] attenuated salmonella typhimurium; epidermal growth factor receptor; lung neoplasmas; DNA vaccine; xenogeneic homologous antigen

[Chin J Cancer Biother, 2010, 17(5): 505-509]

表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)在调节肿瘤细胞的生长、损伤和修复、血管新生、细胞浸润和转移中发挥非常关键的作用。封闭 EGFR 的活性可以抑制受体磷酸化和信号转导,从而抑制肿瘤生长^[1]。EGFR 已经成为肿瘤分子靶向治疗最热门的靶点之一。在小分子酪氨酸激酶抑制剂取得突破性进展的同时,通过外源或内源性抗体封闭 EGFR 信号转导通路也给肿瘤分子靶向治疗带来新的希望。EGFR 蛋白和 DNA 疫苗已经在小鼠模型上取得了一定的疗效^[2-3]。本课题组曾以异种同源鸡 EGFR(chicken EGFR, cEGFR)膜外部分基因与免疫球蛋白 IgG- γ Fc 段基因为基础构建融合基因裸 DNA 疫苗 pVAX1/cEGFR- γ Fc, 动物实验证明,其对小鼠高表达 EGFR 移植肿瘤具有保护作用^[4]。本研究中将前期构建^[4]的 DNA 真核表达载体克隆入减毒沙门菌中,构建口服 DNA 疫苗,观察其对小鼠移植肺癌的保护作用,为 EGFR 分子靶向治疗寻求新途径。

1 材料与方法

1.1 实验材料

小鼠 Lewis 肺癌 LL2 细胞株(EGFR 高表达^[3])、人肺癌细胞株 A431 由上海肺科医院肿瘤研究所提供,真核表达质粒 pVAX1、减毒鼠伤寒沙门菌株 SL7207 及 LB5000 由复旦大学遗传所提供。15 ~ 20 g 的 4 周龄 C57BL/6J 小鼠,雌性,由上海市斯莱克实验动物公司提供[动物许可证号为 SCXK (沪)2003-0003]。工具酶、质粒抽提试剂盒均购自上海华舜生物工程公司,RPMI 1640 培养液、新生胎牛血清购自 Gibco 公司,鼠抗兔 IgGFc-FITC 荧光抗体、鼠抗兔 IgGFc 抗体、HRP 标记的羊抗小鼠 IgG 均购自上海普飞生物公司,流式细胞仪检测试剂及 ELISA 试剂盒购自上海晶美生物公司。引物合成及基因测序由上海赛百盛基因公司完成。

1.2 pVAX1-cEGFR- γ Fc 真核表达载体的构建

pVAX1-cEGFR- γ Fc 真核表达载体构建过程见文献^[4]。以 cEGFR 膜外部分 L2 区基因(640 bp)与免疫球蛋白 IgG 的 γ Fc 段基因(680 bp)通过 *EcoR* I / *Xho* I 双酶切位点克隆进 pVAX1 真核表达载体中,构建成重组真核表达质粒 pVAX 1/cEGFR-

γ Fc。其中融合基因 cEGFR- γ Fc 全长 1 300 bp,表达目的蛋白 47 000。构建的载体经过酶切和测序鉴定。

1.3 口服 DNA 疫苗的制备

采用氯化钙法将质粒 pVAX1-cEGFR- γ Fc 及 pVAX1 空载体分别转化鼠沙门菌 LB5000,提取质粒,应用电转化法分别导入到减毒沙门菌 SL7207 中。电转化条件:2 000 V 电压、24 μ F 电容、200 Ω 电阻、放电时间约为 1.5 ms,获重组菌 SL7207/pVAX1-cEGFR- γ Fc。提取沙门菌的质粒,经 *EcoR* I / *Xho* I 双酶切后,1% 琼脂糖凝胶电泳分析,并送测序鉴定。鉴定正确的重组菌 SL7207/pVAX1-cEGFR- γ Fc 即为口服 DNA 疫苗。

1.4 口服 DNA 疫苗感染小鼠腹腔灌洗巨噬细胞

取 2 只 C57BL/6J 小鼠,脱颈椎处死。无菌条件下,用无血清 PRMI 1640 培养基灌洗小鼠腹腔,灌洗液分别收集于 50 ml 细胞培养瓶。37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h,使之贴壁。然后用无抗生素 PRMI 1640 培养基洗涤细胞 2 次,洗去非贴壁细胞,加入含胎牛血清(100 ml/L)的 PRMI 1640 培养基,所得贴壁细胞即为小鼠腹腔灌洗巨噬细胞。分别将 1×10^8 /ml 携带有 pVAX1-cEGFR- γ Fc 及 pVAX1 质粒的减毒沙门菌加入小鼠腹腔灌洗巨噬细胞中,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,用含庆大霉素(50 mg/L)的无血清培养基洗涤细胞 2 次,杀伤胞外菌。加入含胎牛血清(100 ml/L)的 PRMI 1640 培养基,37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h。加入四环素至终质量浓度 10 mg/L,继续培养 48 h 后检测融合蛋白的表达。

1.5 免疫荧光法检测小鼠巨噬细胞融合蛋白表达

取经减毒沙门菌感染 48 h 后小鼠腹腔灌洗巨噬细胞,用 4% 多聚甲醛室温固定 30 min, PBS 洗 3 次,加入 1:20 稀释的灭活正常山羊血清封闭,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,加入 1:60 稀释的鼠抗兔 IgGFc-FITC 荧光抗体,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, PBS 洗 3 次,制片后于荧光显微镜下观察并拍照。

1.6 口服 DNA 疫苗对小鼠 Lewis 肺癌移植瘤的保护实验

将重组菌 SL7207/pVAX1-cEGFR- γ Fc 和 SL7207/pVAX1 分别接种于含 2 ml 卡那霉素的 LB 培养基中过夜,次日取 50 μ l,加入 50 ml 含卡那霉

素的 LB 培养基中,4 h 后收集菌体,PBS 清洗后用 100 g/L 的 NaHCO_3 溶液悬浮,调整细菌数为 $1 \times 10^9/\text{ml}$ 。C57BL/6J 小鼠共分 3 组,每组 20 只:(1)疫苗组:胃管饲服 SL7207/ pVAX1-cEGFR- γ Fc 0.1 ml,每 2 周 1 次,共 3 次;(2)载体对照组:胃管饲服 SL7207/pVAX1 0.1 ml,每 2 周 1 次,共 3 次;(3)碳酸氢钠对照组:胃管饲服 100 g/L 的 NaHCO_3 溶液 0.1 ml。小鼠经 3 次疫苗免疫后 1 周,以每只 1×10^6 个细胞量腋窝皮下接种 Lewis 肺癌细胞。

1.7 Western blotting 检测免疫小鼠体内融合蛋白的表达

小鼠接种 Lewis 细胞后 2 周,每组小鼠各取 1 只,眼球放血处死,剖开腹腔取出肝脏、脾脏、小肠,成瘤后取肿瘤组织,加入裂解液裂解组织制样,各组蛋白样本 -20°C 保存。采用 Western blotting 法检测融合蛋白的表达,蛋白样品按 1:1 加入缓冲液,煮沸 5 min,进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至硝酸纤维素膜上。蛋白印迹基本步骤:硝纤膜经 10% 牛奶室温封闭 5 h;加鼠抗兔 IgGFc 单抗(1:200)孵育,4 $^\circ\text{C}$ 过夜;二抗为羊抗鼠 IgG-HRP(1:500),室温孵育 1 h;加 DAB,避光显色 20 min,终止反应,观察结果并拍照。各步骤间均用含 0.05% 吐温-20 的 PBS 液洗涤。

1.8 ELISA 法检测免疫小鼠血清抗 EGFR 抗体的水平

各组小鼠在首次免疫后 2、4、6 周眼眶取血,分离血清,抗体效价的测定采用 ELISA 法。以高表达 EGFR 的人 A431 细胞为抗原,取对数生长期人 A431 细胞 $8 \times 10^4/\text{ml}$ 铺板,加入 0.25% 戊二醛,固定 30 min,洗涤 5 次,5% 的脱脂奶粉封闭 1 h,分别加入待测血清样品(1:40),每孔 100 μl ,37 $^\circ\text{C}$ 孵育 2 h。洗涤后加入 1:500 稀释的二抗 100 μl ,孵育 2 h,洗涤后加入底物显色 15 min,加入终止液 50 μl ,测定 D_{490} 值。

1.9 检测口服 DNA 疫苗对 Lewis 移植瘤生长的抑制作用

Lewis 肿瘤细胞接种后 2 周各组处死 10 只小鼠,完整剥离肿瘤称重。连续观察各组余下小鼠的生存状况,直到小鼠死亡,记录各组小鼠的生存率并绘制生存率曲线。

1.10 统计方法

采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较样本采用 t 检验, $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 重组质粒 pVAX1-cEGFR- γ Fc 的酶切鉴定

先期构建的 pVAX1-cEGFR- γ Fc 质粒转化沙门菌后再次抽取质粒,pVAX1-cEGFR- γ Fc 质粒和转化后的质粒都经 *EcoR* I/*Xho* I 双酶切后电泳,均可见大小为 1 300 bp(cEGFR- γ Fc)的基因片段(图 1)。所有载体的测序结果正确无误,说明载体转化后基因序列正确无误。

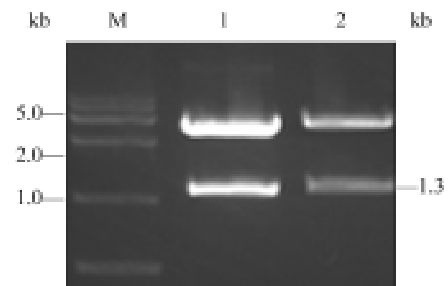


图 1 重组质粒 pVAX1-cEGFR- γ Fc 的酶切鉴定

Fig. 1 Identification of recombinant pVAX1-cEGFR- γ Fc plasmid

1: pVAX1-cEGFR- γ Fc digested with *EcoR* I and *Xho* I ;
2: pVAX1-cEGFR- γ Fc transformed into SL7207 then digested with *EcoR* I and *Xho* I ; M: DNA marker

2.2 小鼠巨噬细胞表达 cEGFR- γ Fc 融合蛋白

减毒沙门菌感染小鼠腹腔灌洗巨噬细胞 48 h,荧光显微镜下可见感染 SL7207/pVAX1-cEGFR- γ Fc 沙门菌的巨噬细胞内有很强的荧光信号,表明融合蛋白表达成功,而感染 SL7207/pVAX1 的巨噬细胞内则未见到荧光信号。

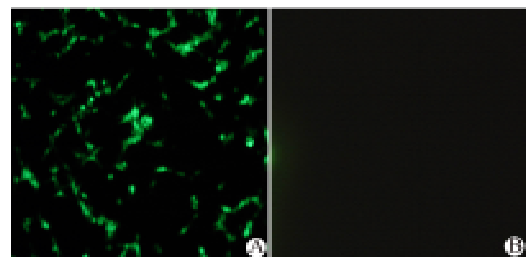


图 2 免疫荧光法检测巨噬细胞感染 SL7207/pVAX1-cEGFR- γ Fc 后融合蛋白的表达($\times 200$)

Fig. 2 Expression of fusion protein in macrophage after infection with SL7207/pVAX1-cEGFR- γ Fc as detected by immunofluorescent assay($\times 200$)

A: SL7207/pVAX1-cEGFR- γ Fc; B: SL7207/pVAX1

2.3 SL7207/pVAX1-cEGFR-γFc 免疫后小鼠体内融合蛋白的表达

3 次免疫并接种 Lewis 细胞后 2 周,SL7207/pVAX1-cEGFR-γFc 免疫组小鼠肝脏、脾脏、小肠及瘤组织蛋白样品行 SDS-PAGE(图 3),在近 50 000 处出现明显的蛋白条带,大小与 cEGFR-γFc 融合蛋白的理论值相符。而 SL7207/pVAX1 免疫组小鼠肝组织中无相应条带,脾、小肠、肿瘤组织内也无蛋白条带(结果未显示)。

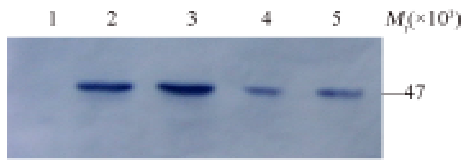


图 3 SL7207/pVAX1-cEGFR-γFc 免疫后小鼠体内融合蛋白的表达

Fig. 3 Expression of fusion protein in mice after SL7207/pVAX1-cEGFR-γFc immunization

1: Liver, SL7207/pVAX1; 2: Liver, SL7207/pVAX1-cEGFR-γFc; 3: Spleen, SL7207/pVAX1-cEGFR-γFc; 4: Intestine, SL7207/pVAX1-cEGFR-γFc; 5: Lewis tumor, SL7207/pVAX1-cEGFR-γFc

2.4 SL7207/pVAX1-cEGFR-γFc 免疫小鼠诱导高水平的抗 EGFR 抗体

SL7207/pVAX1-cEGFR-γFc 免疫小鼠血清抗 EGFR 抗体 ELISA 结果显示,SL7207/pVAX1-cEGFR-γFc 组小鼠在服用携带 pVAX1-cEGFR-γFc 的减毒沙门菌后,血清中能够诱导出高水平的抗 EGFR 抗体($P < 0.05$),且抗体的水平维持稳定,而 SL7207/pVAX1 对照组及碳酸氢钠对照组未产生高效价抗 EGFR 抗体(图 4)。

2.5 口服 SL7207/pVAX1-cEGFR-γFc 对 Lewis 肺癌生长的抑制

接种 Lewis 瘤细胞后 14 d 处死小鼠,解剖肿瘤称质量后发现,口服 SL7207/pVAX1-cEGFR-γFc 疫苗组小鼠 Lewis 肺癌的生长受到抑制,其平均质量为(1.47 ± 0.17)g,较 SL7207/pVAX1 载体对照组的(3.38 ± 0.09)g 和 NaHCO_3 对照组的(4.27 ± 0.14)g 明显减少($P < 0.01$)。

2.6 口服 SL7207/pVAX1-cEGFR-γFc 对荷瘤小鼠生存率的影响

小鼠生存率分析显示,小鼠接种 Lewis 细胞后第 23 天,SL7207/pVAX1-cEGFR-γFc 疫苗组小鼠生存率达(70 ± 3)%,高于 SL7207/pVAX1 载体对照

组的(40 ± 5)% 和 NaHCO_3 对照组的(27 ± 4)%;接种 Lewis 细胞后第 31 天,SL7207/pVAX1-cEGFR-γFc 疫苗组小鼠生存率为(53 ± 2)%,此时其他各组小鼠已全部死亡(图 5)。

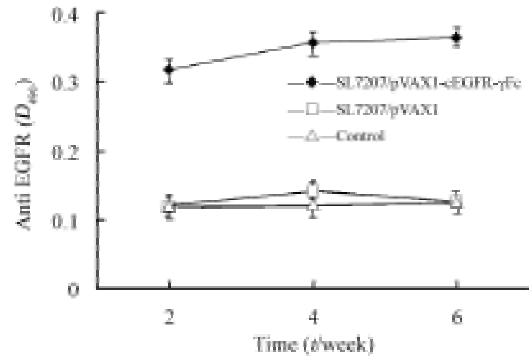


图 4 SL7207/pVAX1-cEGFR-γFc 免疫后小鼠血清 EGFR 抗体的水平

Fig. 4 Serum anti-EGFR level in SL7207/pVAX1-cEGFR-γFc immunized mice

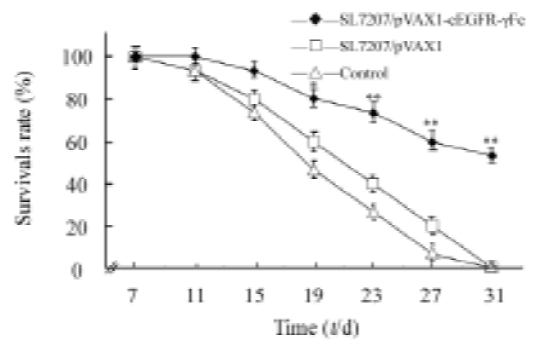


图 5 口服 SL7207/pVAX1-cEGFR-γFc 疫苗对荷瘤小鼠生存率的影响

Fig. 5 Effect of SL7207/pVAX1-cEGFR-γFc vaccine on survival rate of tumor-bearing mice

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs SL7207/pVAX1 or Control

3 讨论

近年来减毒沙门菌作为基因治疗的载体越来越受到人们的重视,伤寒沙门菌通过肠道黏膜侵入体内,并选择性感染、定植于肿瘤组织,是肿瘤靶向基因治疗新的理想载体^[5]。本研究使用的减毒鼠伤寒沙门菌 SL7207 为编码分枝酸合成酶 *AroA* 基因的缺陷株,不能在哺乳动物细胞内增殖,在侵入肿瘤细胞以后,沙门菌本身因营养缺陷而死亡,而其携带的质粒被释放到肿瘤细胞的胞质并被转移至细胞核,表达抗原蛋白。以减毒沙门菌为载体的分子靶向

DNA 疫苗能够有效抑制小鼠移植瘤的生长^[6]。

EGFR 属于内源性抗原,怎样打破机体对内源性抗原的免疫耐受是 EGFR 靶向免疫治疗的难点。利用不同物种间同源基因的差异诱导交叉免疫反应是克服内源性抗原免疫耐受的有效方法。研究^[7]表明,人 EGFR 作为异源蛋白分子可在小鼠体内激发特异的免疫反应,并因其同源性而交叉反应于鼠 EGFR,从而抑制了高表达鼠源 EGFR 肿瘤的生长。本实验室曾以鸡源 EGFR 构建噬菌体疫苗、DNA 疫苗和蛋白疫苗,成功地诱导了小鼠的交叉免疫反应^[4,8-10]。鸡源 EGFR 与人 EGFR 有 73% 同源性的,如果选人源 EGFR 作为免疫原,对小鼠是异源性抗原,但对人是同源性抗原,应用于临床很可能会引起人的免疫耐受;而鸡源 EGFR 作抗原,对小鼠和人都是外源性抗原,小鼠动物实验结果对临床具有较高参考价值。单一用 EGFR 作为抗原的免疫效果十分有限,如果将目的抗原和其他大分子构建成融合蛋白则更容易诱发免疫应答,EGFR 与 HBcAg 融合蛋白疫苗已有报道^[11]。免疫球蛋白 IgG 可通过树突状细胞表面的 Fc 受体有效地促进 APC 细胞吞噬靶抗原,激活细胞和体液免疫,将目的基因与免疫球蛋白 IgG 的 Fc 段基因构建成融合基因能够提高免疫细胞对靶分子的识别能力^[12-13]。在以上研究的基础上,本研究将先期构建的鸡 EGFR 与 IgG- γ Fc 融合表达载体 pVAX1/cEGFR- γ Fc 转化减毒沙门菌 SL7207,构建成口服 DNA 疫苗,免疫小鼠并观察其对小鼠移植 Lewis 肺癌的保护作用。结果表明,口服 SL7207/pVAX1-cEGFR- γ Fc 疫苗能诱发小鼠产生较高滴度的抗 EGFR 抗体,从而抑制 EGFR 高表达 Lewis 肺癌细胞的生长,延长荷瘤小鼠的生存期,说明融合疫苗克服了内源性抗原的免疫耐受,成功地诱发机体产生抗肿瘤免疫反应。

综上,本实验成功构建了载鸡源 EGFR 与免疫球蛋白 IgG 的 Fc 段融合基因的减毒沙门菌 DNA 疫苗 SL7207/PVAX1-cEGFR-rFc,体内及体外均检测到融合蛋白的稳定表达。通过口服疫苗免疫小鼠,融合基因疫苗能诱发高滴度的抗 EGFR 抗体,抑制 Lewis 肺癌细胞的生长,延长荷瘤小鼠的存活时间。本实验结果为打破机体对内源性抗原的免疫耐受,增强 EGFR 等靶向分子的免疫原性提供了新的实验依据。

[参 考 文 献]

[1] Klein DE, Stayrook SE, Shi F, Narayan K, Lemmon MA. Structural basis for EGFR ligand sequestration by Argos [J]. *Nature*, 2008, 453(7199): 1271-1275.

- [2] Ramírez BS, Pestana ES, Hidalgo GG, García TH, Rodríguez RP, Ullrich A, et al. Active antimetastatic immunotherapy in Lewis lung carcinoma with EGFR extracellular domain protein in VSSP adjuvant [J]. *Int J Cancer*, 2006, 119(9): 2190-2199.
- [3] Lai MD, Yen MC, Lin CM, Tu CF, Wang CC, Lin PS, et al. The effects of DNA formulation and administration route on cancer therapeutic efficacy with xenogenic EGFR DNA vaccine in a lung cancer animal model [J]. *Genetic Vaccines Ther*, 2009, 7(2): 211-215.
- [4] 武建毅, 刘 崇, 唐 亮, 谈立松, 张尚权, 周彩存, 等. 重组 EGFR-rFc 融合 DNA 疫苗的抗肿瘤效果 [J]. *中国肿瘤生物治疗*, 2008(4): 342-346.
- [5] Moreno M, Kramer MG, Yim L, Chabalgoity JA. Salmonella as live trojan horse for vaccine development and cancer gene therapy [J]. *Curr Gene Ther*, 2010, 10(1): 56-76.
- [6] Zuo SG, Chen Y, Wu ZP, Liu X, Liu C, Zhou YC, et al. Orally administered DNA vaccine delivery by attenuated Salmonella typhimurium targeting fetal liver kinase 1 inhibits murine Lewis lung carcinoma growth and metastasis [J]. *Biol Pharm Bull*, 2010, 33(2): 174-182.
- [7] Lu Y, Wei YQ, Tian L, Zhao X, Yang L, Hu B, et al. Immunogene therapy of tumors with vaccine based on xenogeneic epidermal growth factor receptor [J]. *Immunology*, 2003, 170(6): 3162-3170.
- [8] 刘 崇, 唐 亮, 周彩存, 谈立松. 重组表皮生长因子受体噬菌体疫苗的抗肿瘤效果 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2006, 28(10): 728-732.
- [9] 吴 永, 张培德, 唐 亮, 谈立松, 张尚权, 等. 异种 EGFR 胞外区重组 DNA 疫苗与蛋白质疫苗抗小鼠 Lewis 肺癌的作用研究 [J]. *肿瘤*, 2009, 29(3): 195-200.
- [10] 李英辉, 唐 亮, 刘 倩, 陈德坤, 谈立松. 异种表皮生长因子受体胞外段的表达及其抗肿瘤效果研究 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2008, 24(11): 1051-1054.
- [11] Duan XY, Han DG, Zhang MX, Wang JS. Generation of fusion protein EGFRvIII-HBcAg and its anti-tumor effect *in vivo* [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2009, 29(28): 133-135.
- [12] Qin H, Zhou C, Wang D, Ma W, Liang X, Lin C, et al. Enhancement of antitumor immunity by a novel chemotactic antigen DNA vaccine encoding chemokines and multiepitopes of prostate-tumor-associated antigens [J]. *Immunology*, 2006, 117(3): 419-430.
- [13] Sun W, Qian H, Zhang X, Zhou C, Liang X, Wang D, et al. Induction of protective and therapeutic antitumor immunity using a novel tumour-associated antigen-specific DNA vaccine [J]. *Immunol Cell Biol*, 2006, 84(5): 440-447.

[收稿日期] 2010-06-30

[修回日期] 2010-08-21

[本文编辑] 韩 丹