

RNA 修饰树突状细胞肿瘤疫苗的研究进展

An advance in RNA-modified dendritic cell-based tumor vaccines

马明瑛^{1,2}综述;谭晓华¹审阅(1. 北京军区总医院 生物治疗中心,北京 100700; 2. 山西医科大学,第二临床医学院,山西 太原 030001)

[摘要] 树突状细胞(dendritic cell, DC)是目前已知功能最强的抗原提呈细胞。一种安全可行的肿瘤免疫基因治疗方法是将肿瘤相关抗原的 mRNA 或肿瘤细胞总 RNA 转染 DC,使之将肿瘤抗原信息提呈给 T 细胞,产生特异性免疫应答。目前,临床研究较多的是髓系 DC,体外培养 DC 的技术也一直在不断地改进。RNA 转染 DC 的方法主要有脂质体介导的转染、裸 RNA 转染(被动转染)、电穿孔转染和核转染法。动物实验已经证实, RNA 负载的 DC 能有效地诱导抗原特异性免疫应答。近年来研究者们对 RNA 修饰的 DC 瘤苗治疗临床常见各种肿瘤的免疫学效应进行了广泛的临床前和临床试验研究,已显示出该类疫苗具有广阔的应用前景。

[关键词] 核糖核酸;树突状细胞;肿瘤疫苗

[中图分类号] R730.51; R392.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2012)03-0330-06

树突状细胞(dendritic cell, DC)被认为是免疫系统的“哨兵”,发挥免疫监视作用。当机体遭受病原体入侵和体内细胞发生突变或恶性转化时,DC 能捕获病原微生物或突变细胞释放的产物,诱导产生特异性的抗微生物或者抗肿瘤免疫应答^[1]。一种安全可行的肿瘤免疫基因治疗方法是将肿瘤相关抗原的 mRNA 或肿瘤细胞总 RNA 转染 DC,使之将肿瘤抗原的信息提呈给 T 细胞,产生特异性的免疫应答^[2]。广泛的临床前研究^[3]证实, mRNA 负载的 DC 瘤苗具有较明显的抗肿瘤效应,而临床试验研究也显示出一定的效果。本文就目前肿瘤 RNA 修饰的 DC 瘤苗研究进展进行简要的综述。

1 DC 的特性

DC 是由美国学者 Steinman 于 1973 年发现的,因其表面有许多树突样突起而得名^[4]。DC 是目前已知功能最强的抗原提呈细胞,也是唯一能够显著刺激初始 T 细胞增殖的抗原提呈细胞,是机体获得性 T 细胞免疫应答的始动者。虽然它在体内数量少,仅占人外周血单个核细胞的 1% 以下,占小鼠脾的 0.2% ~ 0.5%,但在机体免疫调节中发挥重要作用。

1.1 DC 生物学特性

DC 是骨髓产生的一群异质性细胞,含有不同的表型、功能和分布。主要分为两大类,髓系 DC 和淋巴系 DC。目前临床研究较多的是髓系 DC,这类 DC 形态似单核细胞,在摄取和处理抗原以及控制免疫反应的启动中发挥了重要作用。

髓系 DC 存在前体阶段、未成熟 DC、迁移期和成熟 DC 四个分化发育阶段。外周血单核细胞被认为是 DC 的前体细胞,在体外,能在某些细胞因子存在下诱导分化为 DC。正常情况下体内存在的 DC 大多数处于非成熟阶段。未成熟 DC 表达少量的共刺激分子,有较强的运动迁移能力,摄取、加工处理抗原的能力也较强,但是抗原提呈能力较弱,主要诱导免疫耐受^[1]。未成熟 DC 摄取抗原加工处理后,迁移至次级淋巴结后转变为成熟 DC。而成熟 DC 表达高水平的共刺激分子,如 CD40、CD50、CD80、CD86 和 CD83 等,以及黏附分子 CD54(ICAM-1)、CD102(ICAM-2)、CD11(LFA-1)^[5]、CD2(LFA-2)、CD58(LFA-3),同时分泌 IL-12 等细胞因子,具有较强的抗原提呈功能,但运动迁移能力较非成熟 DC 弱,且摄取、加工处理抗原的能力减弱,主要诱导 T 细胞产生抗肿瘤免疫。

1.2 DC 抗原提呈机制

未成熟 DC 摄取内源性抗原后,内源性抗原在胞浆被蛋白酶体降解为长度约为 8 ~ 13 个氨基酸的多肽,在内质网上组装成 MHC I 肽复合物,提呈到 DC 表面,同时 DC 迁移进入淋巴结内初始 T 细胞循

[基金项目] 首都医学科研发展基金重点项目资助(No. 2005-2015)。Project supported by Medicine Research Development Foundation of Capital (No. 2005-2015)。

[作者简介] 马明瑛(1987 -),女,河南省洛宁县人,硕士生,主要从事肿瘤免疫基因治疗的研究。E-mail: mamingying2009@163.com

[通信作者] 谭晓华(TAN Xiao-hua, corresponding author), E-mail: xiaohua_t@hotmail.com

环池,通过 MHC I 类分子途径把内源性抗原提呈给初始 CD8⁺T 细胞并激活之,介导抗原特异性毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)应答。当外源性抗原进入机体后,被未成熟 DC 通过胞饮作用、受体介导的内吞作用或者吞噬作用捕获,在细胞内被溶酶体降解为 10~30 个氨基酸残基的抗原肽,然后与 MHC II 类分子形成复合物,转运至 DC 细胞膜表面。同时 DC 迁移分化,细胞表面的共刺激分子,黏附分子及配体表达增加,演变为表型和功能成熟的 DC,通过 MHC II 类分子途径将这些抗原提呈给 CD4⁺T 细胞,介导 Th1 型免疫反应。

除了以上两个经典途径,DC 还可以通过交叉提呈,即通过 MHC I 分子提呈外源性抗原,产生有效的 CTL 应答。

2 DC 的获取与体外成熟

DC 可以从骨髓或者血液 CD34⁺前体细胞^[6]和 CD14⁺单核细胞产生。目前临床中使用的大多数 DC 主要是单核细胞来源的 DC。从患者血液中分离出单核细胞,并在 GM-CSF 和 IL-4 存在下培养,4 到 5 d 后分化为未成熟 DC,在成熟诱导因子如 TNF- α 、IFN- γ 、脂多糖、CpG、IL-1 或 CD40L 存在下进一步激活为成熟 DC^[7]。这种产生 DC 的方法在临床上广泛应用。

DC 的体外培养技术也一直在不断地改进。Ponsaerts 等^[8]在体外用人类单核细胞 48 h 产生成熟 DC,其表现出典型的成熟 DC 标记和强的刺激 T 细胞活化的能力,与经典 DC 培养计划相比显著减少了时间和耗材。Dauer 等^[9]也报道了 2 d 得到快 DC 细胞,与标准 7 d 单核细胞来源的 DC 相比,快 DC 刺激初始抗原免疫应答同样有效,且此培养过程更接近于体内 DC 的分化模型。已有研究^[10]证实,成熟快 DC 是有功能的抗原提呈细胞。在设定好电参数后,低量体外转录的 RNA 通过电穿孔法进入 3 d 成熟的 DC 后可以提高 DC 的蛋白质表达和刺激 T 细胞的能力^[11]。而 Anguille 等^[12]在 IL-15 和 GM-CSF 存在下诱导单核细胞分化 2 d,接着使用 TLR7/TLR8 鸡尾酒组合(R-848、IFN- γ 和前列腺素 E2)刺激 24 h,得到具有较强迁移能力和 T 细胞刺激能力的成熟 DC。也有学者使用 IL-4 和 IFN- γ 诱导人类单核细胞分化为有功能的成熟 DC^[13]。

3 RNA 修饰的 DC 瘤苗的特点

3.1 RNA 的特点

肿瘤抗原有效的负载至 DC 且成功表达在 DC

瘤苗的制备过程中至关重要。目前肿瘤抗原的获取途径有很多种,主要有凋亡肿瘤细胞^[14]、肿瘤细胞裂解物^[15]、肿瘤抗原肽^[16]、肿瘤相关抗原 DNA 或者 mRNA^[17]、肿瘤细胞总 RNA^[18]等。肿瘤抗原相关 mRNA 或者总 RNA 作为肿瘤抗原与其他抗原获取途径相比具有以下诸多优势:(1)RNA 容易降解,可以从组织中很快清除,而 DNA 需要整合进基因组会影响细胞基因的表达。(2)使用 RNA 疫苗时不需要鉴别患者的 HLA 单倍体基因型,不像肽疫苗一样受 MHC 限制性。(3)RNA 不需要使用细菌或者病毒载体可以直接转染至 DC^[19]。(4)足量的肿瘤抗原也是瘤苗制备中需要考虑的重要问题,而并非所有的肿瘤患者均可获得足量的肿瘤细胞或肿瘤细胞裂解物来作为肿瘤抗原制备疫苗,但可以从少量肿瘤组织中提取 RNA,产生肿瘤基因文库从而得到编码患者特异性肿瘤相关抗原的足够量的 RNA^[20]。研究^[21]表明,体外扩增的 mRNA 转染至 DC 是安全可行的,与负载凋亡的肿瘤细胞系相比,负载肿瘤抗原 mRNA 的 DC 能更有力的诱导 CTL 应答^[22]。(5)肿瘤总 RNA 包含了肿瘤患者瘤细胞抗原的全部基因信息,包括已知的肿瘤抗原和未知的抗原信息,能诱导更广泛的免疫,减少肿瘤免疫变种的发生。已有研究^[23]证实。编码肿瘤细胞来源的总 RNA 冲击 DC 可以有效诱导细胞毒性 T 淋巴细胞反应,并介导肿瘤免疫。且 Pan 等^[24]对肝癌细胞总 RNA 和肝癌细胞系裂解物冲击 DC 进行比较,结果肝癌细胞总 RNA 负载的 DC 诱导 CTL 应答能力更强。

3.2 RNA 转染 DC 的方法

目前 RNA 转染 DC 的方法主要有脂质介导的转染、裸 RNA 转染(被动转染)、电穿孔转染和核转染法。

阳离子脂质介导的转染受一些因素的影响,如需要选择合适的脂质,RNA 与脂质的比例、浓度等。且脂质有细胞毒性,可用于临床的脂质是有限的,因此脂质介导的转染需要进一步优化。Nair 等^[25]使用脂质转染法将自身肿瘤总 RNA 转染至自身 DC,成功诱导了抗原特异性 CTL 应答。单独 mRNA 的被动转染是指将裸 RNA 与 DC 一起孵化后 RNA 转染入 DC 的方法,应用这种方法的 DC 瘤苗亦成功诱导 T 细胞免疫^[26]。

电穿孔法是指在电场作用于细胞一段时间后,细胞膜上暂时形成小孔或开口,mRNA 或者 DNA 扩散进入细胞的方法。此方法具有可重复、快速、毒性较少等优点。研究^[27-28]表明,通过电穿孔转染 mR-

NA 至 DC 诱导了特异性免疫应答, 且电穿孔的转染效率比被动转染的转染效率高^[29]。Benencia 等^[30]对分别使用肿瘤细胞 RNA 和中波紫外线杀伤的肿瘤细胞作为抗原负载 DC 后的效果进行对比, 结果电穿孔法转染肿瘤细胞 RNA 负载的 DC 诱导了大量的 T 细胞浸润肿瘤, 并且产生有效的免疫应答。然而也有研究^[31]表明, 与脂质转染法和电穿孔相比, 核转染法是将 RNA 转染至人类单核细胞来源的 DC 更好的办法。

3.3 RNA 修饰的 DC 疫苗的接种途径

制成的细胞疫苗可以通过静脉注射、皮下注射、皮内注射、淋巴结内注射或者直接注射入肿瘤等方法输入体内。但目前尚没有统一的接种途径。可以单独使用也可以两者联合^[32]。其中皮内注射与淋巴结内注射相比还不能确定哪种方法更好^[23,33]。

4 RNA 修饰的 DC 疫苗的免疫学效应

动物实验^[18,23,27]证实, RNA 负载的 DC 能有效地诱导抗原特异性免疫应答。近年来研究者们对 RNA 修饰的 DC 疫苗治疗临床常见的各种肿瘤的免疫学效应进行了广泛的临床前和临床试验研究。

4.1 前列腺癌

研究^[32]表明, 前列腺癌患者外周血单个核细胞培养得到的 DC 与前列腺特异性抗原 (prostate specific antigen, PSA) mRNA 转染后可以在体外产生特异性 CTL 应答。Heiser 等^[34]使用 PSA mRNA 转染 DC 制备的疫苗对前列腺癌患者进行免疫治疗, 在完成治疗的 7 个患者当中, 6 个出现 PSA 水平对数减少, 2 个出现外周血肿瘤细胞短暂的清除。Mu 等^[35]使用异基因前列腺癌细胞系 (DU145, LNCaP 和 PC-3) 的 mRNA 转染 DC 制成疫苗治疗前列腺癌, 19 名患者完成整个接种过程, 每个患者至少接受 4 周 DC 疫苗的注射, 每周 1 次, 每次 2×10^7 个转染的 DC。结果共有 12 名患者产生了特异性免疫应答, 13 名患者 PSA 水平呈对数下降, 疫苗剂量增加这种效应随之加强, 没有观察到疫苗相关的毒性和严重不良反应。表明这种方法可能成为前列腺癌患者一种有效的治疗方式。

人端粒酶逆转录酶 (human telomerase reverse transcriptase, hTERT) 在大于 85% 的人类实体瘤 (包括前列腺癌) 中过度表达, 但是在正常组织中沉默, 这使其成为肿瘤免疫治疗的一个靶目标^[36]。Su 等^[37]给予 20 名转移性前列腺癌患者 hTERT mRNA 转染的 DC 疫苗治疗, 其中 9 名接受溶酶体相关膜蛋白-1 (lysosome-associated membrane protein-1,

LAMP) 修饰的 hTERT mRNA 转染的 DC 治疗, 11 名接受未修饰的 hTERT mRNA 转染的 DC 治疗。结果 19 名患者外周血测量到广泛的 hTERT 特异性 T 细胞应答, 且与未修饰的 hTERT mRNA 相比, LAMP hTERT mRNA 转染的 DC 产生了更强的抗原特异性 CTL 反应, 为 hTERT mRNA 转染的 DC 疫苗治疗前列腺癌和其他癌症提供了依据。

4.2 黑色素瘤

研究^[38]表明, 恶性黑色素瘤自体肿瘤 mRNA 转染的自体 DC 可以诱导产生特异性 CTL 应答。Kyte 等^[33]首先使用自体肿瘤 mRNA 作为抗原来源负载至 DC 产生疫苗, 对进展期黑色素瘤患者进行 I/II 期临床试验。22 名患者均接受 20×10^6 个 DC (根据所产生的细胞数进行适当调整) 治疗, 每周一次, 注射 4 次。结果完成治疗的 19 名患者中 9 个产生 T 细胞特异性应答, 没有观察到严重的不良反应。继续治疗后 1 个患者产生了一定的临床疗效^[39]。Schoorhuis 等^[40]进行临床实验研究, 通过电穿孔法将 mRNA 转染至 DC, 制备出 DC 疫苗, 探讨黑色素瘤患者接种该疫苗后 DC 在淋巴结内的转移能力和抗原表达能力。免疫组化结果表明, mRNA-DC 从注射部位迁移至淋巴结内的 T 细胞区域, 表达编码该 mRNA 的抗原, 并且在 7/11 个患者中监测到接种相关的 CD8⁺ T 淋巴细胞的应答。Bonehill 等^[41]研究显示, 编码 TriMix (由 CD40L, CD70 和构建的活化 Toll 样受体 4 组成) 的 mRNA 电穿孔肿瘤抗原肽冲击的 DC 可以增强其刺激 T 细胞的能力。而后 Bonehill 等^[42]又利用编码 TriMix 的 mRNA 作为增强因素来电穿孔已经负载了肿瘤抗原肽的 DC, 制备成疫苗, 使用此疫苗治疗 2 个黑色素瘤患者, 在 4 个不同的部位注射 1.25×10^7 个 TriMix DC, 每 2 周一次, 共 4 次, 治疗结束后 2 个患者均检测到抗原特异性 CD8⁺ T 细胞应答, 但未显示临床应答结果。

4.3 白血病

WT1 是白血病中异常表达的癌基因。在成功制备 WT1 mRNA 负载的 DC 疫苗并证实急性髓性白血病 (acute myeloid leukemia, AML) 患者皮内注射这种 DC 疫苗是安全的^[43]之后, Van Tendeloo 等^[44]进行了 I/II 期临床试验, 使用 WT1 mRNA 电转染的 DC 作为疫苗, 治疗 10 例 AML 患者。结果 5 个获得临床缓解, 其中 3 个获得长期免疫应答。因此, WT1 mRNA 负载的 DC 可以作为 AML 缓解后预防复发的治疗, 并且临床应答相关的活化 NK 细胞的

高水平表达,表明 DC 瘤苗不仅激活 T 细胞应答,也刺激固有免疫应答。

4.4 女性生殖系统肿瘤

Hernando 等^[45]报道了使用编码叶酸受体- α 的 mRNA 通过电穿孔负载至 DC 产生瘤苗,治疗 1 名复发转移性卵巢癌患者。在超声波引导下将 DC 瘤苗注射入腹股沟淋巴结内,每 4 周一次,共注射 10 次。为了测试治疗的安全性,前 2 次治疗使用低剂量(2×10^6 个细胞),之后每次注射用 2.13×10^7 个细胞(从 1.7×10^7 个到 2.52×10^7 个不等)。与治疗前相比,治疗 3 个月后的 CT 显示了疾病部分缓解,治疗 16 个月后的 CT 显示了大于 50% 的腹部转移淋巴结的消退。CA-125 水平在第一次接种后第 4 周显著减少(从 640 U/L 降到 60 U/L),在治疗结束后的第 11 个月仍处于基线水平。Coosemans 等^[46]对 1 个晚期浆液性子宫内膜癌患者进行 4 周 WT1 RNA 转染的 DC 瘤苗治疗,结果 2 次免疫接种后,CA125 水平开始下降,WT1 特异性 T 细胞增加 2.5 倍,没有出现治疗相关的毒性作用。

4.5 肾癌

Su 等^[26]使用肾肿瘤 RNA 转染的 DC 瘤苗对肾癌患者进行免疫治疗,免疫治疗后 6/7 个患者出现可测量的增殖的肿瘤特异性 T 细胞,但是由于其中部分患者在免疫治疗结束后接受了其他治疗,所以尚不能评价疫苗疗效。Dannul 等^[47]对 10 个转移性肾细胞癌和 1 个弥散性卵巢癌患者进行试验,使用总肿瘤 RNA 转染的 DC 进行免疫治疗。患者分为先使用重组 IL-2 白喉毒素结合体治疗 4 d,再进行免疫治疗和单纯免疫治疗,其中 10 名患者产生了肿瘤特异性 CTL 应答。表明注射重组 IL-2 白喉毒素结合体消耗外周血 CD4⁺CD25⁺T 细胞,能够增强瘤苗诱导的 T 细胞应答能力。

4.6 脑肿瘤

Caruso 等^[48]进行 I 期临床试验,研究使用肿瘤 RNA 冲击外周血单核细胞来源的 DC 治疗脑癌,9 名患者中 8 个得到了足够量的肿瘤 RNA,没有出现过敏性脑炎或者其他自身免疫应答的症状。完成治疗的 7 个患者中的 3 个出现临床应答:1 个部分缓解,2 个疾病稳定。Carus 等^[49]实施 I 期实验使用 RNA 冲击 DC 治疗儿童 4 期成神经细胞瘤,结果所有患者没有产生任何临床或者放射学治疗效应,但有研究^[50]证明,使用成神经细胞瘤 mRNA 转染的 DC 诱导产生了成神经细胞瘤相关抗原特异性 CTL,支持成神经细胞瘤使用细胞免疫治疗的可行性。

4.7 其他类肿瘤

Morse 等^[51]对进展期表达癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)的恶性肿瘤(其中包括肺癌、乳腺癌、结肠癌患者)实施 I 期试验研究,接着对切除肝转移癌的患者进行 II 期研究来评估负载 CEA mRNA 的自体 DC 瘤苗的安全性和可行性。24 名患者接受治疗,治疗结束后 1 名患者肿瘤标记物结果提示完全缓解,2 名患者表现为微小应答,3 名患者疾病稳定,18 名患者疾病进展。在 II 期研究中,13 名患者中的 9 名获得中位期为 122 d 的缓解,没有疫苗相关的严重不良反应。通过 DC 注射部位的病理和外周血细胞毒性测试,结果表明进展期恶性肿瘤患者使用 mRNA 负载的 DC 瘤苗是安全可行的。也有研究^[52]表明,基因修饰的 CEA RNA 负载至 DC 产生的瘤苗诱导了增强的抗原特异性抗肿瘤免疫应答。Wang 等^[53]研究证实,转染总肺癌 RNA 的非成熟 DC 可在体外有效刺激抗原特异性 CTL 应答来对抗肿瘤细胞,也有研究^[54-56]探讨使用 RNA 修饰的 DC 治疗食管癌和霍奇金淋巴瘤。

5 结 语

RNA 修饰的 DC 瘤苗是肿瘤免疫治疗领域研究的热点,其抗肿瘤效应在临床前研究中已被肯定,在治疗各种肿瘤的临床研究中的效果不一。但瘤苗相关的毒性作用小、安全性高,具有广阔的应用前景。此外,许多参数包括临床级 DC 的规模化生产流程、瘤苗接种的剂量、接种途径、接种次数和间隔等需要进一步优化。随着生物学和免疫学研究的进一步深入,通过优化各种参数,联合各种可能的免疫治疗策略,相信肿瘤 RNA 修饰的 DC 瘤苗将在不久的将来从实验室走向临床,为肿瘤的治疗提供一个全新的策略。

[参 考 文 献]

- [1] Cools N, Ponsaerts P, Van Tendeloo VF, et al. Balancing between immunity and tolerance: An interplay between dendritic cells, regulatory T cells, and effector T cells [J]. *J Leukoc Biol*, 2007, 82(6): 1365-1374.
- [2] Bringmann A, Held SA, Heine A, et al. RNA vaccines in cancer treatment [J]. *J Biomed Biotechnol*, 2010, 2010: 623687-623698.
- [3] Ponsaerts P, Van Tendeloo VF, Berneman ZN. Cancer immunotherapy using RNA-loaded dendritic cells [J]. *Clin Exp Immunol*, 2003, 134(3): 378-384.
- [4] Steinman RM, Cohn ZA. Pillars Article: Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 1973, 137(5): 1142-1162 [J]. *J Immunol*, 2007, 178(1): 5-25.

- [5] Inaba K, Steinman RM. Monoclonal antibodies to LFA-1 and to CD4 inhibit the mixed leukocyte reaction after the antigen-dependent clustering of dendritic cells and T lymphocytes [J]. *J Exp Med*, 1987, 165(5): 1403-1417.
- [6] Fay JW, Palucka AK, Paczesny S, et al. Long-term outcomes in patients with metastatic melanoma vaccinated with melanoma peptide-pulsed CD34⁺ progenitor-derived dendritic cells [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2006, 55(10): 1209-1218.
- [7] Janikashvili N, Larmonier N, Katsanis E. Personalized dendritic cell-based tumor immunotherapy [J]. *Immunotherapy*, 2010, 2(1): 57-68.
- [8] Ponsaerts P, Van den Bosch G, Cools N, et al. Messenger RNA electroporation of human monocytes, followed by rapid *in vitro* differentiation, leads to highly stimulatory antigen-loaded mature dendritic cells [J]. *J Immunol*, 2002, 169(4): 1669-1675.
- [9] Dauer M, Obermaier B, Hertel J, et al. Mature dendritic cells derived from human monocytes within 48 hours: A novel strategy for dendritic cell differentiation from blood precursors [J]. *J Immunol*, 2003, 170(8): 4069-4076.
- [10] Jarnjak-Jankovic S, Hammerstad H, Saebøe-Larsen S, et al. A full scale comparative study of methods for generation of functional dendritic cells for use as cancer vaccines [J]. *BMC Cancer*, 2007, 7: 119.
- [11] Bürdek M, Spranger S, Wilde S, et al. Three-day dendritic cells for vaccine development: Antigen uptake, processing and presentation [J]. *J Transl Med*, 2010, 8: 90.
- [12] Anguille S, Smits EL, Cools N, et al. Short-term cultured, interleukin-15 differentiated dendritic cells have potent immunostimulatory properties [J]. *J Transl Med*, 2009, 7: 109.
- [13] Zhang LF, Okuma K, Tanaka R, et al. Generation of mature dendritic cells with unique phenotype and function by *in vitro* short-term culture of human monocytes in the presence of interleukin-4 and interferon-beta [J]. *Exp Bio Med (Maywood)*, 2008, 233(6): 721-731.
- [14] Fry TJ, Shand JL, Milliron M, et al. Antigen loading of DCs with irradiated apoptotic tumor cells induces improved anti-tumor immunity compared to other approaches [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2009, 58(8): 1257-1264.
- [15] Palmer DH, Midgley RS, Mirza N, et al. A phase II study of adoptive immunotherapy using dendritic cells pulsed with tumor lysate in patients with hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2009, 49(1): 124-132.
- [16] Bonehill A, Tuyaerts S, Van Nuffel AM, et al. Enhancing the T-cell stimulatory capacity of human dendritic cells by co-electroporation with CD40L, CD70 and constitutively active TLR4 encoding mRNA [J]. *Mol Ther*, 2008, 16(6): 1170-1180.
- [17] Koido S, Kashiwaba M, Chen D, et al. Induction of antitumor immunity by vaccination of dendritic cells transfected with MUC1 RNA [J]. *J Immunol*, 2000, 165(10): 5713-5719.
- [18] Yu Z, Sun HH, Zhang T, et al. Specific antitumor effects of tumor vaccine produced by autologous dendritic cells transfected with allogeneic osteosarcoma total RNA through electroporation in rats [J]. *Cancer Biology Therapy*, 2009, 8(10): 973-980.
- [19] Sabado RL, Bhardwaj N. Directing dendritic cell immunotherapy towards successful cancer treatment [J]. *Immunotherapy*, 2010, 2(1): 37-56.
- [20] Carralot JP, Weide B, Schoor O, et al. Production and characterization of amplified tumor-derived cRNA libraries to be used as vaccines against metastatic melanomas [J]. *Genet Vaccines Ther*, 2005, 3: 6.
- [21] Markovic SN, Dietz AB, Greiner CW, et al. Preparing clinical-grade myeloid dendritic cells by electroporation-mediated transfection of *in vitro* amplified tumor-derived mRNA and safety testing in stage IV malignant melanoma [J]. *J Transl Med*, 2006, 4: 35.
- [22] Jarnjak-Jankovic S, Pettersen RD, Saebøe-Larsen S, et al. Evaluation of dendritic cells loaded with apoptotic cancer cells or expressing tumor mRNA as potential cancer vaccines against leukemia [J]. *BMC Cancer*, 2005, 5: 20.
- [23] Boczkowski D, Nair SK, Snyder D, et al. Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Exp Med*, 1996, 184(2): 465-472.
- [24] Pan K, Zhao JJ, Wang H, et al. Comparative analysis of cytotoxic T lymphocyte response induced by dendritic cells loaded with hepatocellular carcinoma-derived RNA or cell lysate [J]. *Int J Biol Sci*, 2010, 6(7): 639-648.
- [25] Nair SK, Morse M, Boczkowski D, et al. Induction of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes in cancer patients by autologous tumor RNA-transfected dendritic cells [J]. *Annals Surg*, 2002, 235(4): 540-549.
- [26] Su Z, Dannull J, Heiser A, et al. Immunological and clinical responses in metastatic renal cancer patients vaccinated with tumor RNA-transfected dendritic cells [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(9): 2127-2133.
- [27] Zarei S, Arrighi JF, Ongaro G, et al. Efficient induction of CD8 T-associated immune protection by vaccination with mRNA transfected dendritic cells [J]. *J Invest Dermatol*, 2003, 121(4): 745-750.
- [28] Gholamin M, Moaven O, Farshchian M, et al. Induction of cytotoxic T lymphocytes primed with tumor RNA-loaded dendritic cells in esophageal squamous cell carcinoma: Preliminary step for DC vaccine design [J]. *BMC Cancer*, 2010, 10(1): 261.
- [29] Sousa-Canavez JM, Canavez FC, Leite KR, et al. Therapeutic dendritic cell vaccine preparation using tumor RNA transfection: A promising approach for the treatment of prostate cancer [J]. *Genet Vaccines Ther*, 2008, 6(1): 2.
- [30] Benencia F, Courrèges MC, Coukos G. Whole tumor antigen vaccination using dendritic cells: Comparison of RNA electroporation and pulsing with UV-irradiated tumor cells [J]. *J Transl Med*, 2008, 6(1): 21.
- [31] Melhem NM, Gleason SM, Liu XD, et al. High-level antigen expression and sustained antigen presentation in dendritic cells nucleofected with wild-type viral mRNA but not DNA [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2008, 15(9): 1337-1344.
- [32] Heiser A, Coleman D, Dannull J, et al. Autologous dendritic cells transfected with prostate-specific antigen RNA stimulate CTL responses against metastatic prostate tumors [J]. *J Clin Invest*,

- 2002, 109(3): 409-417.
- [33] Kyte JA, Mu L, Aamdal S, et al. Phase I/II trial of melanoma therapy with dendritic cells transfected with autologous tumor-mRNA [J]. *Cancer Gene Ther*, 2006, 13(10): 905-918.
- [34] Heiser A, Dahm P, Yancey D R, et al. Human dendritic cells transfected with RNA encoding prostate-specific antigen stimulate prostate-specific CTL responses *in vitro* [J]. *J Immunol*, 2000, 164(10): 5508-5514.
- [35] Mu LJ, Kyte JA, Kvalheim G, et al. Immunotherapy with allotumor mRNA-transfected dendritic cells in androgen-resistant prostate cancer patients [J]. *Br J Cancer*, 2005, 93(7): 749-756.
- [36] Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer [J]. *Eur J Cancer*, 1997, 33(5): 787-791.
- [37] Su Z, Dannull J, Yang BK, et al. Telomerase mRNA-transfected dendritic cells stimulate antigen-specific CD8⁺ and CD4⁺ T cell responses in patients with metastatic prostate cancer [J]. *J Immunol*, 2005, 174(6): 3798-3807.
- [38] Kyte JA, Kvalheim G, Aamdal S, et al. Preclinical full-scale evaluation of dendritic cells transfected with autologous tumor-mRNA for melanoma vaccination [J]. *Cancer Gene Ther*, 2005, 12(6): 579-591.
- [39] Kyte JA, Kvalheim G, Lislud K, et al. T cell responses in melanoma patients after vaccination with tumor-mRNA transfected dendritic cells [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2007, 56(5): 659-675.
- [40] Schuurhuis DH, Verdijk P, Schreiber G, et al. *In situ* expression of tumor antigens by mRNA electroporated dendritic cells in lymph nodes of melanoma patients [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(7): 2927-2934.
- [41] Bonehill A, Tuyaerts S, Van Nuffel AM, et al. Enhancing the T-cell stimulatory capacity of human dendritic cells by co-electroporation with CD40L, CD70 and constitutively active TLR4 encoding mRNA [J]. *Mol Ther*, 2008, 16(6): 1170-1180.
- [42] Bonehill A, Van Nuffel AM, Corthals J, et al. Single-step antigen loading and activation of dendritic cells by mRNA electroporation for the purpose of therapeutic vaccination in melanoma patients [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(10): 3366-3375.
- [43] Van Driessche A, Van de Velde AL, Nijs G, et al. Clinical-grade manufacturing of autologous mature mRNA-electroporated dendritic cells and safety testing in acute myeloid leukemia patients in a phase I dose-escalation clinical trial [J]. *Cytotherapy*, 2009, 11(5): 653-668.
- [44] Van Tendeloo VF, Van de Velde A, Van Driessche A, et al. Induction of complete and molecular remissions in acute myeloid leukemia by Wilms' tumor 1 antigen-targeted dendritic cell vaccination [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(31): 13824-13829.
- [45] Hernando JJ, Park TW, Fischer HP, et al. Vaccination with dendritic cells transfected with mRNA-encoded folate-receptor-alpha for relapsed metastatic ovarian cancer [J]. *Lancet Oncol*, 2007, 8(5): 451-454.
- [46] Coosemans A, Wolf M, Berneman ZN, et al. Immunological response after therapeutic vaccination with WT1 mRNA-loaded dendritic cells in end-stage endometrial carcinoma [J]. *Anticancer Res*, 2010, 30(9): 3709-3714.
- [47] Dannull J, Su Z, Rizzieri D, et al. Enhancement of vaccine-mediated antitumor immunity in cancer patients after depletion of regulatory T cells [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(12): 3623-3633.
- [48] Caruso DA, Orme LM, Neale AM, et al. Results of a phase I study utilizing monocyte-derived dendritic cells pulsed with tumor RNA in children and young adults with brain cancer [J]. *Neuro Oncol*, 2004, 6(3): 236-246.
- [49] Caruso DA, Orme LM, Amor GM, et al. Results of a Phase I study utilizing monocyte-derived dendritic cells pulsed with tumor RNA in children with Stage IV neuroblastoma [J]. *Cancer*, 2005, 103(6): 1280-1291.
- [50] Morandi F, Chiesa S, Bocca P, et al. Tumor mRNA-transfected dendritic cells stimulate the generation of CTL that recognize neuroblastoma-associated antigens and kill tumor cells: Immunotherapeutic implications [J]. *Neoplasia*, 2006, 8(10): 833-842.
- [51] Morse MA, Nair SK, Mosca PJ, et al. Immunotherapy with autologous, human dendritic cells transfected with carcinoembryonic antigen mRNA [J]. *Cancer Invest*, 2003, 21(3): 341-349.
- [52] Kim SG, Park MY, Kim CH, et al. Modification of CEA with both CRT and TAT PTD induces potent anti-tumor immune responses in RNA-pulsed DC vaccination [J]. *Vaccine*, 2008, 26(50): 6433-6440.
- [53] Wang K, Zhou Q, Guo AL, et al. An autologous therapeutic dendritic cell vaccine transfected with total lung carcinoma RNA stimulates cytotoxic T lymphocyte responses against non-small cell lung cancer [J]. *Immunol Invest*, 2009, 38(7): 665-680.
- [54] Milano F, Rygiel AM, Buttar N, et al. An *ex vivo* readout for evaluation of dendritic cell-induced autologous cytotoxic T lymphocyte responses against esophageal cancer [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2007, 56(12): 1967-1977.
- [55] Gholamin M, Moaven O, Farshchian M, et al. Induction of cytotoxic T lymphocytes primed with tumor RNA-loaded dendritic cells in esophageal squamous cell carcinoma: Preliminary step for DC vaccine design [J]. *BMC Cancer*, 2010, 10(2): 261.
- [56] Winkler C, Steingrube DS, Altermann W, et al. Hodgkin's lymphoma RNA-transfected dendritic cells induce cancer/testis antigen-specific immune responses [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2012, Mar 15, [Epub ahead of print]

[收稿日期] 2012 - 01 - 12 [修回日期] 2012 - 05 - 09

[本文编辑] 韩丹