

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.05.004

· 基础研究 ·

SA-IL-7 融合蛋白的制备及其膀胱内灌注对小鼠表浅性膀胱癌的治疗效应

张振¹, 贺利民¹, 马磊¹, 李金龙², 许晓玲³, 高基民³(1. 南阳市第一人民医院 肿瘤科, 河南 南阳 473000; 2. 南方医科大学 生物治疗研究所, 广东 广州 510515; 3. 温州医科大学 浙江省模式生物技术与应用重点实验室, 浙江 温州 325035)

[摘要] **目的:**制备链亲和素标记的白介素 7 (streptavidin-tagged interleukin-7, SA-IL-7) 融合蛋白, 评价其对小鼠表浅性膀胱癌治疗的效果。 **方法:**构建 pET24a-SA-IL-7 重组质粒, 制备 SA-IL-7 融合蛋白。流式细胞术检测 SA-IL-7 融合蛋白与生物素化膀胱癌细胞 MB49 的结合, 胸腺细胞增殖法检测 SA-IL-7 融合蛋白促进胸腺细胞增殖的生物学活性。应用小鼠表浅性膀胱癌模型评价膀胱内灌注 SA-IL-7 的治疗效果, 观察小鼠生存期, 免疫组化法检测各组小鼠肿瘤浸润 CD8⁺T 细胞。 **结果:**成功制备的 SA-IL-7 融合蛋白可锚定于生物素化的 MB49 细胞表面, 结合率达(96.6 ± 1.3)%; 同时能够促进胸腺细胞的增殖。SA-IL-7 融合蛋白能够锚定于小鼠生物素化的膀胱黏膜表面 7 d 以上, 而未生物素化的膀胱黏膜在始终未检测到 IL-7 的存在。在小鼠表浅性膀胱癌模型中, MB49 细胞接种后的第 80 天, IL-7 灌注治疗组 90% 小鼠死亡, 而 SA-IL-7 组 60% 小鼠存活且未出现肿瘤 ($P < 0.05$); 且 SA-IL-7 灌注治疗组小鼠肿瘤组织中浸润 CD8⁺T 细胞明显增多 ($P < 0.01$)。SA-IL-7 治愈的 15 只表浅性膀胱癌模型小鼠中, 11 只能够抵抗膀胱内 MB49 细胞的第二次接种, 而对照组 15 只小鼠仅 1 只幸存 ($P < 0.01$)。 **结论:**SA-IL-7 融合蛋白膀胱内灌注能够产生抗肿瘤免疫应答和明显的治疗效果, 有可能成为免疫治疗浅表性膀胱癌的新方法。

[关键词] 白细胞介素 7; 链亲和素; 生物素; 融合蛋白; 表浅性膀胱癌

[中图分类号] R737.14; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2013)05-0529-06

Preparation of streptavidin-tagged interleukin-7 fusion protein and its therapeutic effect with intravascular instillation on mouse superficial bladder cancer

Zhang Zhen¹, He Limin¹, Ma Lei¹, Li Jinlong², Xu Xiaoling³, Gao Jimin³(1. Department of Oncology, First People's Hospital of Nanyang City, Nanyang 473000, Henan, China; 2. Institute of Biotherapy, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong, China; 3. Zhejiang Provincial Key Laboratory for Technology & Application of Model Organisms, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, Zhejiang, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare streptavidin-tagged interleukin-7 (SA-IL-7) fusion protein and to value its therapeutic effect on mouse superficial bladder cancer. **Methods:** Recombinant pET24a-SA-IL-7 plasmid was constructed and then SA-IL-7 fusion protein was prepared. The binding of SA-IL-7 to biotinylated bladder cancer MB49 cells was examined by flow cytometry and the bioactivity of SA-IL-7 fusion protein was examined by thymocyte proliferation assay. The mouse superficial bladder cancer model was used to evaluate the therapeutic effect of intravesical instillation of SA-IL-7. Mice were monitored for survival and the tumor-infiltrated CD8⁺T cells were examined by immunohistochemistry assay. **Results:** SA-IL-7 fusion protein efficiently anchored on the biotinylated MB49 cell surface, with a binding ratio of (96.6 ± 1.3)%; SA-IL-7 promoted the proliferation of thymocytes. The SA-IL-7 fusion protein anchored on biotinylated bladder mucosal surface for more than 7 d. Whereas, IL-7 was no longer detected in the first day in the unbiotinylation group. After being attacked by bladder cancer MB49 cells for 80 d, 90% mice in the IL-7 group, while 60% mice survived without tumors in the SA-IL-7 group ($P < 0.05$). Moreover, tumor-infiltrated CD8⁺T cells in the SA-IL-7 group was significantly

[基金项目] 国家 863 计划基金资助项目(No. 2006AA02Z4C4), 浙江省自然科学基金资助项目(No. R2080407)。Project supported by the National 863 Plan Foundation of China (No. 2006AA02Z4C4), and the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No. R2080407)

[作者简介] 张振(1980 -), 男, 河南省南阳市人, 硕士, 主治医师, 主要从事肿瘤临床及生物治疗方面的研究。E-mail: zhzh77@163.com

[通信作者] 高基民(Gao Jimin, corresponding author), E-mail: jimingao@yahoo.com

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20130930.1555.005.html>

higher than those in the control group ($P < 0.01$). Importantly, 11 out of 15 SA-IL-7-cured mice resisted to a second intravesical MB49 cell challenge, whereas only 1 of 15 control mice survived the challenge ($P < 0.01$). **Conclusion:** Intravesical instillation of SA-IL-7 fusion protein can induce anticancer immunity, which may represent a promising immunotherapy for superficial bladder cancer.

[**Key words**] interleukin-7; streptavidin; biotin; fusion protein; superficial bladder cancer

[Chin J Cancer Biother, 2013, 20(5): 529-534]

链亲和素(streptavidin, SA)是由亲和素链霉菌产生的非糖基化同源四聚体蛋白,它能与生物素紧密非共价结合。由于SA可与生物素快速且几乎不可逆的结合,且生物素较容易与蛋白质、核酸中相应基因偶联形成生物素化标记物,故SA-生物素作用广泛应用于生物医学领域^[1-3]。白细胞介素7(interleukin-7, IL-7)是由骨髓基质细胞产生,调节淋巴细胞和巨噬细胞的分化、增殖及活化细胞因子,IL-7还能促进CTL和LAK增殖、分化并增强其杀伤活性^[4]。IL-7通过调节T细胞和DC细胞的相互作用,维持T细胞的动态平衡^[5]。同时,IL-7可以对抗多种免疫抑制细胞和分子的网络,增强机体的免疫能力^[6],提高机体对弱抗原的免疫应答^[7-8]。此外,IL-7还具有抗肿瘤作用。本研究制备了链亲和素标记的IL-7(streptavidin-tagged IL-7, SA-IL-7)双功能融合蛋白,通过链亲和素和生物素特异结合,把融合蛋白直接锚定于生物素化的膀胱黏膜表面,并在小鼠正位膀胱癌模型中观察蛋白的抗肿瘤效果。

1 材料与方 法

1.1 细胞株及主要试剂

C57BL/6 雌性小鼠购自南方医科大学实验动物中心[实验动物合格证号:SCXK(粤)2006-0015]。各种限制性内切酶购自 Promega 公司,DNeasy 组织试剂盒、Ni-NTA 螯合层析填料购自 Qiagen 公司,NHS-PEO4-Biotin 购自 Pierce 公司,IL-7 单克隆抗体、IL-7 标准品购自 R&D 公司,抗 CD8 抗体购自 BioLegend 公司,亲和素链霉菌购自 ATCC。膀胱癌 MB49 细胞是美国 Lahey 诊所 Summerhayes 医师馈赠。

1.2 pET24a-SA-IL-7 质粒的构建和 SA-IL-7 融合蛋白的制备

用 DNeasy 组织试剂盒从链霉菌抽提出细菌基因组 DNA,然后用其作为模板,加入上游引物 5'-GGAATTCATATGCATCATCACCATCACCATGAGCCGGCATCACCGGCACCTGG-3'(55 nt *Nde* I)和下游引物 5'-GGAATTCGCCGGATCCGCCCCCGCCGCTGCCTCCGCCCGCTGCCCGCTCGTCTGCTGAACGGCGTCGAGCGGGTTGCC-3'(82 nt *Bam* H I),然后

加入相应试剂进行 PCR。

用 TRIzol 抽提出 Con-A 活化的正常人外周血单个核细胞总 RNA,以其作为模板,加入上游引物 5'-CGGGATCCGATTGTGATATTGAAGGT-3'(26 nt *Bam* H I)和下游引物 5'-CCCTCGAGTCAGTGTCTTTAGTGCC-3'(26 nt *Xho* I),进行 RT-PCR 制备成熟 IL-7 的 DNA 片段。利用 *Nde* I、*Xho* I 酶切位点将其插入 pET24a 质粒^[9]。应用 PCR 及酶切鉴定,正确的质粒 pET24a-SA-IL-7 应用 T7 上下游引物进行 DNA 测序。将测序正确的质粒转化感受态大肠杆菌 BL21(DE3),收集菌体,超声裂解收集包涵体,洗涤后应用镍金属螯合层析纯化 SA-IL-7 融合蛋白,透析复性^[10]。

1.3 流式细胞检测 SA-IL-7 融合蛋白与生物素化 MB49 细胞的锚定结合

应用流式细胞仪检测 SA-IL-7 融合蛋白与生物素化 MB49 细胞的锚定结合。取生长状态良好的 MB49 细胞,胰酶消化后制备细胞悬液,PBS 洗涤 2 次,加入 NHS-PEO4-Biotin 使其终质量浓度为 1 mg/ml,室温下作用 30 min;PBS 洗涤后,加入 SA-IL-7 融合蛋白,室温作用 60 min;应用含有 100 mmol/L 甘氨酸的 PBS 洗 3 次,调整细胞密度为 5×10^6 /ml,加入鼠抗人 IL-7 单克隆抗体,37 °C 作用 60 min;洗涤细胞 3 次,加入 10 μ l 荧光标记的二抗,37 °C 避光作用 30 min;洗涤 2 次后,取 500 μ l 洗液重悬细胞,进行流式细胞仪分析,测定 SA-IL-7 融合蛋白与 MB49 细胞的锚定修饰率。应用未进行生物素化的 MB49 细胞作为阴性对照,给予 PBS 处理,余操作与上述相同。

1.4 活化胸腺细胞增殖法检测 SA-IL-7 融合蛋白对胸腺细胞增殖的影响

IL-7 能够促进刀豆素 A(ConA)活化的胸腺细胞的增殖,并且对人和鼠 IL-7 没有种属特异性,因此,可以应用小鼠活化胸腺细胞增殖法来测定融合蛋白中 IL-7 的生物学活性。制备小鼠胸腺细胞悬液,调整细胞密度为 1×10^7 /ml,加入终质量浓度为 1 μ g/ml 的 ConA。于 96 孔培养板中每孔加入 100 μ l 胸腺细胞悬液,分别加入一系列倍比稀释浓度的

SA-IL-7 融合蛋白和 IL-7 标准品。考虑 SA-IL-7 融合蛋白的分子量为 IL-7 标准品的 2 倍,为保证同样的分子数,融合蛋白的初始孔质量浓度为 200 ng/ml,IL-7 标准品的初始孔质量浓度为 100 ng/ml,按顺序进行倍比稀释。每个样品设 3 个复孔,37 °C、5% CO₂ 培养 48 h。MTT 法测定各孔 570 nm 处光密度 (*D*) 值。

1.5 免疫组化法检测 SA-IL-7 融合蛋白与生物素化膀胱黏膜的锚定结合

为明确 SA-IL-7 在膀胱表面的锚定情况,取 C57BL/6 雌性小鼠,实验组麻醉后膀胱插管,生物素化后,给予 SA-IL-7 膀胱灌注;对照组膀胱未生物素化,只给予 SA-IL-7 膀胱灌注。灌注后第 1、4、7 天颈椎脱臼处死小鼠,摘取膀胱,4% 甲醛溶液固定后进行冰冻切片。应用鼠抗人 IL-7 抗体、辣根过氧化物酶标记的抗鼠聚合物二抗进行免疫组化法检测。

1.6 小鼠表浅性膀胱癌模型的构建及 SA-IL-7 膀胱灌注治疗疗效

应用络合碘棉球消毒小鼠尿道口及腹部皮肤,60 mg/kg 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉小鼠。将 24 号静脉留置针侧管夹闭,针芯往外退出 3 mm 左右,应用液体石蜡润滑静脉留置针,从小鼠尿道口插入膀胱,拔出针芯,PBS 冲洗 2 次后,膀胱灌注 0.1 mol/L 盐酸溶液 100 μl,作用 15 s,然后应用 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液作用 5 s 以中和盐酸作用,PBS 冲洗 3 次后,灌注 MB49 细胞悬液 100 μl 制备膀胱癌模型^[11]。

小鼠膀胱灌注 MB49 细胞后的第 3 天开始治疗,按照上述方法膀胱插管,PBS 冲洗膀胱 2 次后,灌注 100 μl 的活化生物素 (1 mg/ml),作用 30 min,PBS 冲洗两次,灌注 SA-IL-7 融合蛋白 100 μl,同时灌注 SA-GFP 或 IL-7 作为阴性对照,灌注 PBS 作为

空白对照。治疗每周 2 次,共 3 周。观察各组小鼠的生存状况。在第 80 天,给予治愈小鼠膀胱再次 MB49 细胞攻击,观察其肿瘤生长情况,应用同样周龄小鼠作为对照。

1.7 免疫组化法检测各组肿瘤组织中 CD8⁺ 细胞的浸润

在最后一次膀胱灌注后 7 d 摘取各组小鼠膀胱,甲醛固定,冰冻切片。37 °C 烤片 30 min,PBS 浸泡 5 min,每张切片加 1 滴 3% 过氧化氢,室温孵育 10 min 以阻断内源性过氧化物酶活性。PBS 冲洗 3 次,每次 3 min。应用大鼠抗小鼠 CD8 抗体、辣根过氧化物酶标记的抗大鼠二抗进行免疫组化检测,DAB 试剂盒显色,自来水冲洗,苏木精复染 1 min,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。

1.8 统计学处理

使用 SPSS13.0 软件,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组数据间比较采用 *t* 检验,采用 Kaplan-Meier 法计算生存率,Log rank 检验比较组间生存率。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 pET24a-SA-IL-7 重组质粒的构建和 SA-IL-7 融合蛋白的制备

单克隆菌落 PCR 鉴定结果(图 1)显示,应用 *Bam*H I、*Xho* I 双酶切,获得与 IL-7 大小一致(约 1 100 bp)的片段。应用 T7 引物进行 DNA 序列测定,结果与 GenBank 中 SA 和 IL-7 序列一致,连接肽和 His 标签与设计相符,无读码错误。经过镍亲和层析纯化及透析复性,SA-IL-7 融合蛋白纯度达到 90% 以上。结果提示,应用原核系统表达融合蛋白方法可靠,且纯化方法简单,有利于大规模的制备。

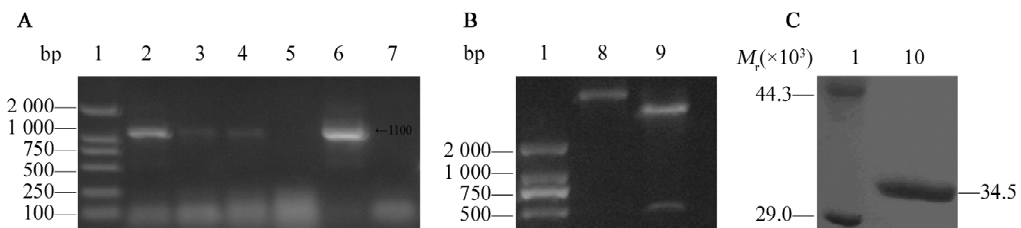


图 1 pET24a-SA-IL-7 质粒和 SA-IL-7 融合蛋白的鉴定

Fig. 1 Identification of pET24a-SA-IL-7 plasmid and SA-IL-7 fusion protein

A: PCR of different monoclonal bacteria; B: Digesting fragment of recombinant plasmid by *Bam*H I and *Xho* I ;

C: SA-IL-7 fusion protein after purifying and refolding

1: Marker; 2 - 5: PCR of different monoclonal bacteria; 6: Positive control; 7: Negative control;

8: Recombinant expression plasmid; 9: Digesting frogment of recombinant plasmid; 10: SA-IL-7

2.2 SA-IL-7 融合蛋白高效结合生物素化 MB49 细胞并促进胸腺细胞增殖

流式细胞仪分析结果(图 2)显示,左峰为未生物素化的 MB49 细胞(阴性对照),而右峰为 SA-IL-7 融合蛋白锚定生物素化的 MB49 细胞,锚定率为 $(96.6 \pm 1.3)\%$ 。

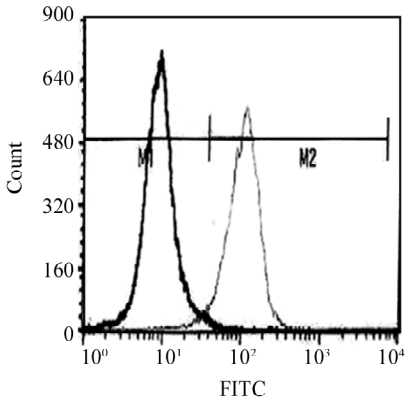


图 2 SA-IL-7 融合蛋白高效结合生物素化 MB49 细胞修饰锚定的流式细胞术检测

Fig. 2 Anchoring of SA-IL-7 on biotinylated MB49 cells by FACS

小鼠活化胸腺细胞增殖法测定结果(图 3)显示,SA-IL-7 能够促进 ConA 活化的小鼠胸腺细胞的增殖,呈剂量依赖关系。在排除分子量差别的影响后,SA-IL-7 与 IL-7 标准品生物学活性并无显著差别 ($P > 0.05$)。IL-7 标准品的生物学活性为 2×10^6

U/mg,SA-IL-7 的生物学活性为 1×10^6 U/mg。结果提示,SA-IL-7 融合蛋白有双功能,即同时具有 SA 和 IL-7 的生物学活性。

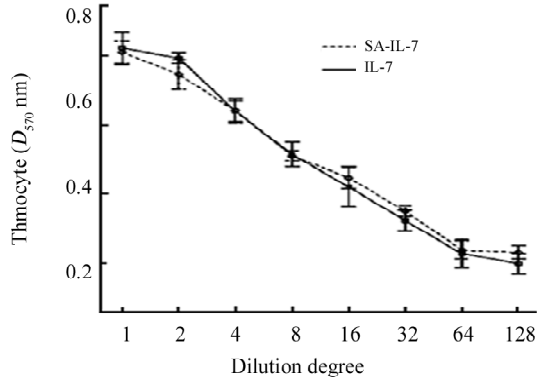


图 3 MTT 法检测 SA-IL-7 融合蛋白对胸腺细胞增殖的促进作用

Fig. 3 Promoting effect of SA-IL-7 fusion protein on thymocytes by MTT

2.3 SA-IL-7 融合蛋白与生物素化膀胱表面的结合以 SA-IL-7 膀胱灌注第 1、4、7 d,生物素化的膀胱黏膜表面出现锚定结合的黄褐色条带,但随着时间的延长颜色逐渐减弱;而在未生物素化的阴性对照膀胱黏膜表面始终无黄褐色结合条带。结果(图 4)提示,通过 SA 锚定治疗,可以延缓细胞因子 IL-7 的代谢,更有利于其在局部发挥抗肿瘤作用。

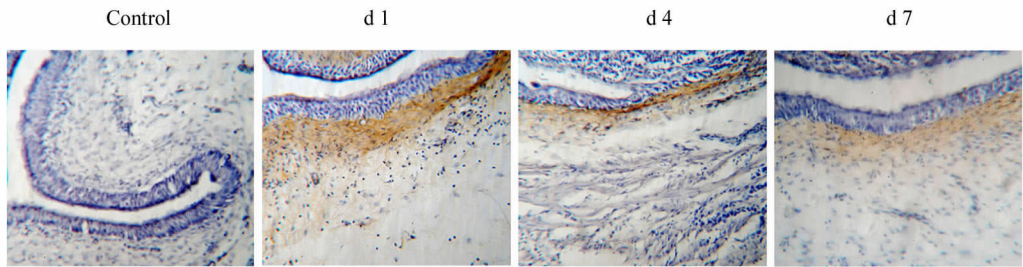


图 4 免疫组化法检测 SA-IL-7 融合蛋白与膀胱黏膜的结合(×200)

Fig. 4 Combination of SA-IL-7 fusion protein and bladder mucosal surface detected by immunohistochemical assay(×200)

2.4 SA-IL-7 融合蛋白灌注治疗延长荷瘤小鼠生存期并诱导免疫记忆

以 SA-IL-7 融合蛋白灌注治疗表浅型膀胱癌模型小鼠,以小鼠的生存时间绘制生存曲线,结果(图 5)显示,在膀胱癌 MB49 细胞接种后的第 80 天,PBS 治疗组小鼠全部死亡,IL-7 治疗组 90% 小鼠死亡,SA-GFP 治疗组 80% 小鼠死亡,而 SA-IL-7 治疗组

60% 小鼠存活且未出现肿瘤生长 ($P < 0.05$)。SA-IL-7 治疗组小鼠没有出现发热、体质量减轻等治疗相关不良反应。SA-IL-7 组与 IL-7、SA-GFP、PBS 组生存时间比较,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),而 SA-GFP 组与 IL-7 组比较,差异则无统计学意义 ($P > 0.05$)。

另外,给予治愈小鼠二次膀胱内 MB49 细胞接

种,在 SA-IL-7 治愈组 15 只小鼠 11 只未出现肿瘤生长,而对照组小鼠仅 1 只未出现肿瘤生长($P < 0.01$,图 6)。结果提示,经 SA-IL-7 融合蛋白灌注治疗后能够产生一定的免疫记忆,可以有效预防肿瘤复发。

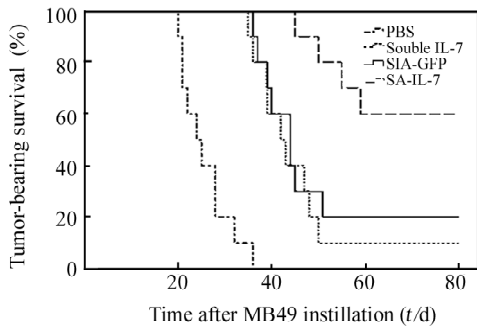


图 5 SA-IL-7 融合蛋白灌注治疗荷瘤小鼠的生存曲线
Fig. 5 Survival curve of tumor-bearing mice after treatment of SA-IL-7 fusion protein perfusion

2.5 SA-IL-7 融合蛋白灌注治疗对肿瘤组织浸润 CD8⁺T 细胞的影响

在最后一次膀胱灌注后 7 d,摘取各组小鼠膀胱,甲醛固定,冰冻切片。应用大鼠抗小鼠 CD8 抗体进行免疫组织化学检测,发现 SA-IL-7 治疗组小鼠肿瘤浸润 CD8⁺T 细胞明显增多(图 7)。结果提示,SA-IL-7 融合蛋白灌注治疗可通过特异性免疫应答发挥抗肿瘤作用。

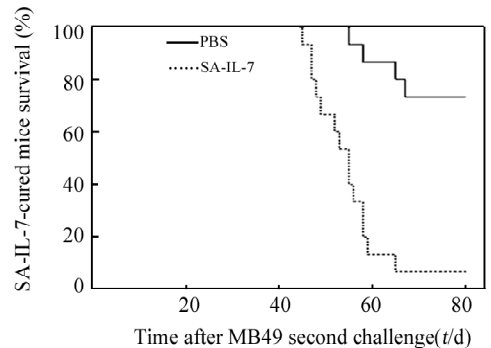


图 6 SA-IL-7 治愈小鼠膀胱内二次接种 MB49 细胞后的生存曲线

Fig. 6 Survival curve of SA-IL-7-cured mice second intravesical MB49 cells inoculation

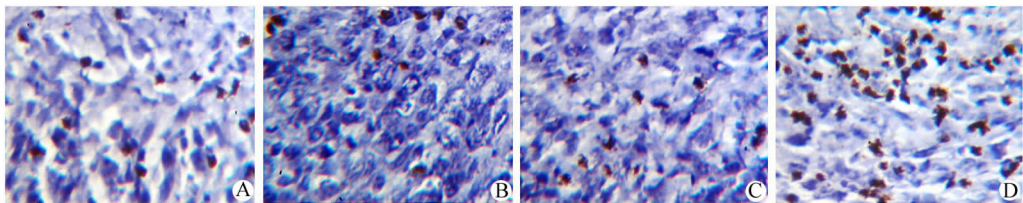


图 7 免疫组化法检测 SA-IL-7 融合蛋白灌注治疗后肿瘤组织浸润 CD8⁺T 细胞(×400)

Fig. 7 Tumor-infiltrating CD8⁺T cells after treatment of intravesical instillation(×400) of SA-IL-7 detected by immunohistochemical assay

A: PBS treatment; B: IL-7 treatment; C: SA-GFP treatment; D: SA-IL-7 treatment

3 讨论

本研究应用基因工程方法构建了 pET24a-SA-IL-7 质粒,采用原核表达系统制备了 SA-IL-7 融合蛋白,经层析纯化、透析复性得到双功能融合蛋白。在构建 pET24a-SA-IL-7 质粒的过程中,在 SA 和 IL-7 间引入甘氨酸-丝氨酸的连接肽,有助于融合蛋白中各单元蛋白质分子的独立折叠。设计中引入组氨酸标签,利用镍螯合亲和层析即可将表达的蛋白纯度提高至 90%,制备方法简单、快捷。

膀胱癌为泌尿系统最常见的恶性肿瘤,大约 70% 的患者在确诊时为表浅性膀胱癌^[12]。目前膀

胱灌注治疗中,常用的药物包括化疗药物以及 BCG 等免疫制剂,但这种治疗作用是通过非特异性免疫应答实现的,不能使机体产生长期有效的肿瘤特异性免疫应答^[13]。研究^[14-16]显示,IL-2、IFN 等细胞因子膀胱灌注对表浅性膀胱癌有一定的治疗作用,且毒副作用较小。但由于尿液的冲刷,药物灌注很难在膀胱局部长时间保持高浓度,影响了治疗效果。膀胱原位基因治疗已经被证实是一种效果明显的治疗方法,通过基因转染,可以实现细胞因子在膀胱局部的持续表达,使肿瘤发生率降低、生长减缓,能够产生一定的免疫记忆^[17-19]。但由于基因治疗操作费时、技术要求较高、修饰效率低以及安全性问题,

限制了其临床应用^[20-21]。本研究利用生物素和链亲和素的作用,把 SA-IL-7 融合蛋白持续锚定在生物素化的膀胱表面,实现细胞因子的持续作用。通过对治疗小鼠的观察,没有发现体重减轻、活动减少等治疗相关的毒副作用。经治疗后,小鼠肿瘤组织局部 CD8⁺T 细胞明显增多。而且,灌注 SA-IL-7 治愈的小鼠能够产生免疫记忆,抵抗肿瘤细胞的第二次攻击,说明 SA-IL-7 锚定治疗能够通过特异性免疫应答发挥抗肿瘤作用。在此前的工作中,本课题组已经制备了 SA-IL-4 和 SA-CD40L 融合蛋白,并且在动物实验中取得了一定的治疗效果^[9-11]。但本研究中发现,SA-IL-7 融合蛋白在膀胱局部的锚定时间及治疗效果优于前两者。而且 IL-7 和 IL-4、CD40L 的抗肿瘤作用机制并不相同,SA-IL-7 和 SA-IL-4 或 SA-CD40L 融合蛋白的联合灌注是否能够获得协同抗肿瘤作用,从而进一步提高治疗效果,有待进一步研究。

融合蛋白灌注治疗表浅性膀胱癌操作简单,且能够在膀胱局部的较持久作用,但其一次锚定,随时间的推移,锚定量会有下降,与基因治疗后实现细胞因子局部稳定表达存在一定的差别,能否完全取代基因治疗,仍需要进一步研究加以确认。

[参 考 文 献]

- [1] Sano T, Cantor CR. Streptavidin-containing chimeric proteins: Design and production [J]. *Methods Enzymol*, 2000, 326: 305-311.
- [2] Gao J, Huang S, Li M, et al. GM-CSF-surface-modified B16. F10 melanoma cell vaccine [J]. *Vaccine*, 2006, 24(25): 5265-5268.
- [3] 李金龙, 常红, 胡志明, 等. CD80-链亲和素融合蛋白锚定的鼻咽癌 CNE2 细胞增强 T 细胞的杀伤活性 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2010, 17(4): 398-402.
- [4] Alderson MR, Sassenfeld HM, Widmer MB. Interleukin 7 enhances cytolytic T lymphocyte generation and induces lymphokine-activated killer cells from human peripheral blood [J]. *Int J Clin Exp Med*, 1990, 172(2): 577-587.
- [5] Saini M, Pearson C, Seddon B. Regulation of T cell-dendritic cell interactions by IL-7 governs T-cell activation and homeostasis [J]. *Blood*, 2009, 113(23): 5793-5800.
- [6] Pellegrini M, Calzascia T, Elford AR, et al. Adjuvant IL-7 antagonizes multiple cellular and molecular inhibitory networks to enhance immunotherapies [J]. *Altern Med Rev*, 2009, 15(5): 528-536.

- [7] Fry TJ, Mackall CL. Interleukin-7: From bench to clinic [J]. *Blood*, 2002, 99(11): 3892-3904.
- [8] Li B, Vanroey MJ, Jooss K. Recombinant IL-7 enhances the potency of GM-CSF-secreting tumor cell immunotherapy [J]. *Allergy Asthma Clin Immunol*, 2007, 123(2): 155-165.
- [9] Zhang Z, Xu X, Zhang X, et al. The therapeutic potential of SA-sCD40L in the orthotopic model of superficial bladder cancer [J]. *Acta Oncol*, 2011, 50(7): 1111-1118.
- [10] 张振, 法萍萍, 李金龙, 等. mIL-4-SA 双功能融合蛋白的制备和活性测定 [J]. *中国生化药物杂志*, 2010, 31(2): 90-93.
- [11] 张振, 许晓玲, 马磊, 等. 链亲和素标记的白细胞介素 4 双功能融合蛋白锚定治疗小鼠浅表性膀胱癌 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2012, 34(5): 331-335.
- [12] Kaufman DS, Shipley W, Feldman AS. Bladder cancer [J]. *Lancet*, 2009, 374(9685): 239-249.
- [13] Kausch I, Doehn C, Jocham D. Recent improvements in the detection and treatment of nonmuscle-invasive bladder cancer [J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2006, 6(9): 1301-1311.
- [14] Belldegrun AS, Franklin JR, O'donnell MA, et al. Superficial bladder cancer: The role of interferon-alpha [J]. *Brain*, 1998, 159(6): 1793-1801.
- [15] Ferlazzo G, Magno C, Iemmo R, et al. Treatment of superficial bladder cancer with intravesical perfusion of rIL-2: A follow-up study [J]. *Anticancer Res*, 1996, 16(2): 979-980.
- [16] Tubaro A, Stoppacciaro A, Velotti F, et al. Local immunotherapy of superficial bladder cancer by intravesical instillation of recombinant interleukin-2 [J]. *Eur Urol*, 1995, 28(4): 297-303.
- [17] Wu Q, Mahendran R, Esuvaranathan K. Nonviral cytokine gene therapy on an orthotopic bladder cancer model [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(12): 4458-4522.
- [18] Wu Q, Esuvaranathan K, Mahendran R. Monitoring the response of orthotopic bladder tumors to granulocyte macrophage colony-stimulating factor therapy using the prostate-specific antigen gene as a reporter [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(20): 6977-6984.
- [19] Loskog AS, Fransson ME, Totterman TT. AdCD40L gene therapy counteracts T regulatory cells and cures aggressive tumors in an orthotopic bladder cancer model [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(24): 8816-8821.
- [20] Pfeifer A, Verma IM. Gene therapy: Promises and problems [J]. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2001, 2: 177-211.
- [21] Gottesman MM. Cancer gene therapy: An awkward adolescence [J]. *Cancer Gene Ther*, 2003, 10(7): 501-508.

[收稿日期] 2013-06-11

[修回日期] 2013-08-14

[本文编辑] 韩丹, 周玲琳