

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2014.03.004

· 基础研究 ·

融合穿膜肽的 *HSP70* 基因联合 CIK 细胞对裸鼠胃癌移植瘤的治疗效果

梅伟群¹, 李晓雅², 王伟国¹, 马炬明¹, 季卫丹², 胡慧珍¹, 宋启哲¹, 苏长青², 吴孟超²(1. 解放军第 117 医院消化科, 杭州 310004; 2. 第二军医大学 东方肝胆外科医院 国家肝癌研究中心 分子肿瘤研究室, 上海 200438)

[摘要] **目的:** 观察融合穿膜肽的 *HSP70* 基因联合 CIK 细胞对裸鼠胃癌移植瘤的治疗效应。**方法:** 采用编码 11 个精氨酸 (11R) 的穿膜肽序列融合 *HSP70* 基因序列, 构建重组腺病毒载体 AdCMV-HSP70s、AdCMV-HSP70 (无穿膜肽对照) 和 AdCMV-EGFV (空载体对照)。Western blotting、ELISA 法检测重组腺病毒介导的 *HSP70* 基因在胃癌 SGC-7901 细胞中的表达, MTT 检测重组腺病毒感染后 *HSP70* 分泌性表达对胃癌细胞的抑制作用。裸鼠移植瘤模型的抗瘤实验检测 *HSP70* 基因联合 CIK 细胞对胃癌移植瘤的抗瘤效应。**结果:** 与 AdCMV-HSP70 感染细胞比, AdCMV-HSP70s 感染细胞的 *HSP70* 表达量明显增加 [胃癌 SGC-7901 细胞: (360.72 ± 20.89) vs (121.01 ± 15.94) ng/ml, $P < 0.05$; 胃黏膜上皮 GES-1 细胞: (188.62 ± 10.82) vs (135.00 ± 13.96) ng/ml, $P < 0.05$]。融合 11R 的 *HSP70* 蛋白能够穿膜并分泌到细胞外后对胃癌细胞产生一定的增殖抑制作用 [MOI = 100 pfu/cell 时, 细胞存活率 (66.33 ± 4.33)% vs (101.33 ± 7.64)% , $P < 0.01$]。AdCMV-HSP70s + CIK 联合治疗对胃癌移植瘤的抑制率显著高于 AdCMV-HSP70 + CIK 组 [(66.5 ± 7.3)% vs (43.6 ± 5.6)% , $P < 0.05$] , 该组移植瘤组织间质中 CD3⁺T 细胞浸润数量也明显多于后者。**结论:** 融合穿膜肽可明显促进 *HSP70* 蛋白的表达和分泌, 和 CIK 细胞联合治疗能增强抗瘤免疫效应, 从而显著抑制裸鼠胃癌移植瘤。

[关键词] 胃癌; 热激蛋白; *HSP70*; 穿膜肽; 腺病毒; 基因治疗

[中图分类号] R735.2; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2014)03-0257-06

Cell-penetrating peptide-fused *HSP70* gene therapy for gastric cancer in combination cytokine-induced killer cells in a xenograft nude mouse model

Mei Weiqun¹, Li Xiaoya², Wang Weiguo¹, Ma Juming¹, Ji Weidan², Hu Huizhen¹, Song Qizhe¹, Su Changqing², Wu Mengchao²(1. Department of Gastroenterology, No. 117 Hospital of Chinese PLA, Hangzhou 310004, Zhejiang, China; 2. Department of Molecular Oncology, Eastern Hepatobiliary Surgical Hospital & National Center of Liver Cancer, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the efficacy of cell-penetrating peptide-fused *HSP70* gene therapy in combination with the use of cytokine-induced killer (CIK) cells for gastric cancer in a xenograft nude mouse model. **Methods:** CMV promoter-driven adenoviral vectors expressing wild-type *HSP70* (AdCMV-HSP70) and *HSP70* fused with a cell-penetrating peptide of 11 arginines (AdCMV-HSP70s) were constructed. In *in vitro* experiments, human gastric cancer SGC-7901 and GES-1 cells were infected with these two viral vectors respectively. At 48 h after infection, cell viability was assessed by MTT assays and *HSP70* protein content by Western blotting. In *in vivo* experiments, Sgc-7901 cells were injected subcutaneously into BALB/c nude mice. Cancer cell-challenged mice were treated every 48 h for a total of five times with AdCMV-HSP70 or AdCMV-HSP70s, either each alone or in combination with a single dose of 1×10^7 CIK cells (tail vein injection) prepared from normal BALB/c mice. Thirty-five days after treatment, animals were sacrificed. The number and size of tumors formed were assessed. **Results:** *HSP70* protein content after AdCMV-HSP70s infection was significantly

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 81370552, No. 81172303); 南京军区医学科技创新项目 (No. 10MA127)。Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81370552, No. 81172303), and the Innovation Project of Medical Science and Technology from Nanjing Military Command (No. 10MA127)

[作者简介] 梅伟群 (1971 -), 女, 浙江省永康市人, 主治医师, 主要从事消化内科疾病基础和临床的研究。E-mail: mwqun117@sina.com

[通信作者] 王伟国 (Wang Weiguo, corresponding author), E-mail: wangwg117@163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/doi/10.3872/j.issn.1007-385X.2014.03.004.html

higher than that after AdCMV-HSP70 infection in both SGC cells (360.72 ± 20.89 ng/ml vs 121.01 ± 15.94 ng/ml, $P < 0.05$) and GES-1 cells (188.62 ± 10.82 ng/ml vs 135.00 ± 13.96 ng/ml, $P < 0.05$). Fusion of 11 arginine peptide into HSP70 led to significant inhibition of gastric cancer cell proliferation; at low multiplicity of infection (MOI) of 100 pfu/ml, the cell viability was (66.33 ± 4.33)% in AdCMV-HSP70s-infected SGC-7901 cells, significantly lower than that (101.33 ± 7.64)% in AdCMV-HSP70-infected SGC-7901 cells ($P < 0.05$). CIK cell administration resulted in immune reconstruction in nude mice carrying xenograft gastric cancer cells. Adenoviral delivery of HSP70 enhanced infiltration of CD3⁺ T cells into tumor tissues and induce antitumor immune response. CIK cells in combination with AdCMV-HSP70s showed a significantly higher tumor inhibition rate (66.5%) than CIK cells in combination with AdCMV-HSP70 (43.6%) in nude mice challenged with gastric cancer cells ($P < 0.05$). **Conclusion:** In nude mice carrying human gastric cancer cells, HSP70 may not only inhibit gastric cancer cell proliferation but also induce antitumor immune response. These effects can be enhanced by fusion of a cell-penetrating peptide with the HSP70 molecule and implantation of cytokine-induced killer cells.

[**Key words**] gastric cancer; heat shock protein; HSP70; cell-penetrating peptide; adenovirus; gene therapy

[Chin J Cancer Biother, 2014, 21(3): 257-262]

在肿瘤的基因治疗方案中,抗肿瘤基因的筛选是提高肿瘤治疗疗效的一个关键因素。癌细胞在受热或其他不良因素刺激下发生应激反应,可诱导产生热激蛋白(heat shock protein, HSP),其中HSP70与免疫调节密切相关^[1-2]。肿瘤细胞来源的HSP70可引发针对癌细胞本身的特异性免疫,诱发NK细胞对癌细胞的杀伤活性^[3-4]。研究^[5]还发现,肿瘤细胞坏死后裂解物释放的HSP70能诱导树突状细胞(dendritic cells, DCs)的成熟。因此,HSP70是一种有效的抑瘤因子,可成为肿瘤免疫治疗的有效候选基因。但也有研究^[6-8]认为,癌组织HSP70的表达能够抑制癌细胞凋亡,促进癌细胞增殖,导致患者预后很差。HSP70不同的生物学效应可能与其在细胞内外的定位有关,表达于细胞内的HSP70能够保护细胞抑制凋亡^[9],而分泌到细胞外的HSP70则能够诱导免疫反应杀伤细胞^[10]。为提高针对肿瘤细胞的杀伤效应,本研究采用腺病毒载体介导HSP70基因的表达,通过结合编码11个精氨酸穿膜肽的引导效应,并联合CIK细胞治疗,在裸鼠移植瘤模型上达到抑制癌细胞的免疫增强作用,提高抗癌基因治疗策略的安全性和有效性。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人胃癌细胞系SGC-7901来源于中科院上海细胞所细胞库,人胃黏膜上皮细胞系GES-1由南京第一医院消化科赠送,人胚肾细胞系HEK293购自加拿大Microbix公司(Microbix Biosystems, Ontario, Canada)。细胞系在含10%胎牛血清的DMEM培养液中置37℃5%CO₂条件下培养,培养液中含青霉

素100U/ml、链霉素100μg/ml。鼠抗HSP70单克隆抗体购自福州迈新生物工程有限公司,鼠抗CD3抗体购自Santa Cruz Biotechnology Inc.公司,ELISA试剂盒购自Stressgen Biotechnologies公司。

1.2 腺病毒载体的构建及扩增

以前期构建的载体质粒pDC316-HSP70^[11]为基础,PCR扩增pDC316-HSP70中的HSP70全长cDNA,扩增引物为:上游为5'-CCC AAG CTT ATG (CGC CGC AGG AGA CGA CGG CGA CGG CGA AGA AGG) GCC AAA GCC GCG GCG-3',含Hind III位点;下游为5'-GCGTCGAC CTA ATC TAC CTC CTC AAT GGT GGG-3',含Sal I。在起始密码子之后插入11个精氨酸编码序列(11R),形成pDC316-HSP70s。测序正确后,pDC316-HSP70s腺病毒包装质粒一同转染HEK293细胞,重组新型腺病毒AdCMV-HSP70s。将AdCMV-HSP70s病毒与前期构建的对照病毒AdCMV-HSP70、AdCMV-EGFP一起在HEK293细胞中扩增,采用常规氯化铯梯度离心方法纯化病毒。

1.3 Western blotting和ELISA法检测腺病毒介导HSP70基因在胃癌细胞中的表达

胃癌及胃黏膜细胞铺6孔板,1×10⁶/孔,24h后感染AdCMV-HSP70s和AdCMV-HSP70,MOI=100pfu/cell。继续培养48h后,收集培养液上清和细胞。收集的细胞-80℃反复冻融3次,离心取上清,Western blotting检测HSP70基因的表达,鼠抗人HSP70单克隆抗体工作浓度1:1000,HRP-羊抗小鼠IgG抗体工作浓度1:2000。收集细胞培养上清,通过ELISA方法检测HSP70基因表达情况,按照HSP70 ELISA试剂盒说明进行操作。

1.4 MTT 法检测 HSP70 分泌性表达对胃癌细胞的抑制作用

通过 MTT 法检测病毒介导的 HSP70 对胃癌细胞的杀伤作用。胃癌及胃黏膜细胞接种于 96 孔板, 1×10^4 /孔; 培养 24 h 后, 换无血清培养液, 按 MOI = 1、5、10、50、100、200 pfu/cell 的感染强度分别加入病毒 AdCMV-HSP70s、AdCMV-HSP70 和 AdCMV-EGFP, 2 h 后换 5% 血清培养液; 培养 48 h 后, 参照 MTT 试剂盒说明检测细胞生存率。

1.5 裸鼠移植瘤模型的抗瘤实验检测 HSP70 联合 CIK 细胞的抗瘤效应

健康纯种 BALB/c 裸鼠 20 只, 4 周龄, 购自中科院上海斯莱克实验动物中心。右侧腹部近腋下皮下种植胃癌 SGC-7901 细胞, 1×10^6 个细胞/只; 接种后 2 周接种部位出现直径 0.5 ~ 0.8 cm 的瘤体。将荷瘤鼠随机分 3 组, 每组 5 只小鼠, 分别给予 AdCMV-HSP70s、AdCMV-HSP70、AdCMV-EGFP 瘤内多点注射治疗, 每次每只 2×10^8 pfu/100 μ l 的重组病毒, 隔日 1 次, 共治疗 5 次。另设空白对照组 5 只, 以 100 μ l 病毒保存液 (10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 2 mmol/L MgCl₂; 4% Sucrose) 同步注射。另取 5 只健康普通 BALB/c 小鼠, 取血制备 CIK 细胞^[12]。在上述胃癌移植瘤模型裸鼠最后 1 次治疗结束后, 经尾静脉输入预培养的 CIK 细胞 1×10^7 个/只。然后以游标卡尺定时测量瘤体大小并以“ $a \times b^2 \times 0.5$ ”公式计算瘤体体积 (a: 最大径; b: 最小径), 绘制瘤体生长体积曲线。观察期结束, 乙醚麻

醉处死小鼠, 取瘤体标本以 10% 中性甲醛固定, 石蜡包埋切片; 免疫组化染色定位 HSP70 表达 (工作浓度 1:100) 和组织内 CD3⁺ 浸润 T 细胞的数量和分布 (工作浓度 1:500)。每张切片在 20 倍物镜下计数 5 个视野的阳性细胞并计算阳性百分比。

1.6 统计分析

所有实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据两两比较采用配对资料 *t* 检验, 多组之间比较用 ANOVA *F* 检验, 采用 SPSS 13.0 统计软件, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重组腺病毒介导胃癌细胞分泌性 HSP70 表达

以 MOI = 100 pfu/cell 的强度感染病毒 AdCMV-HSP70s 和 AdCMV-HSP70 48 h 后, AdCMV-HSP70s 和 AdCMV-HSP70 介导 HSP70 在胃癌细胞中表达量明显高于正常细胞。Western blotting 检测结果 (图 1) 显示, 细胞内 HSP70 的表达量在 AdCMV-HSP70s 和 AdCMV-HSP70 之间没有明显差别。但 ELISA 检测结果 (图 1) 显示, 与 AdCMV-HSP70 感染细胞相比, AdCMV-HSP70s 感染的细胞 HSP70 表达量明显增加 [SGC-7901 细胞: (360.72 ± 20.89) vs (121.01 ± 15.94) ng/ml, $P < 0.01$; GES-1 细胞: (188.62 ± 10.82) vs (135.00 ± 13.96) ng/ml, $P < 0.05$]。结果提示, AdCMV-HSP70s 介导的 HSP70 具有较强的外分泌性。

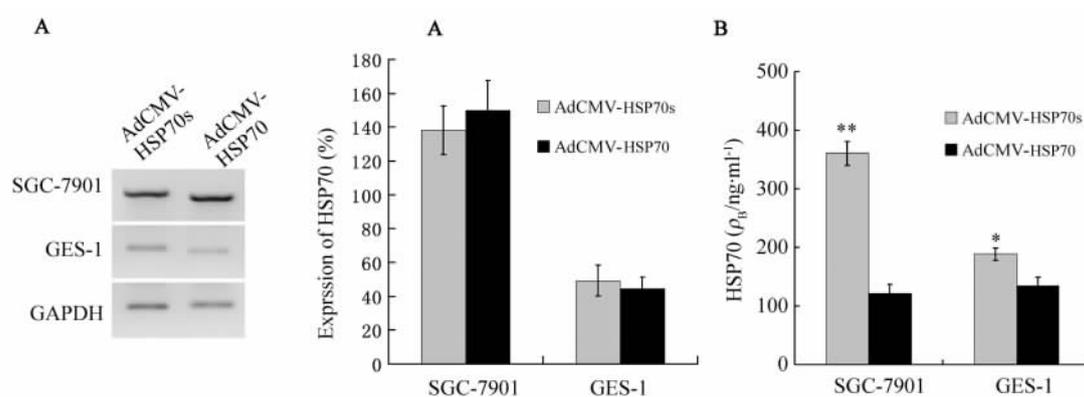


图 1 Western blotting (A) 和 ELISA 法 (B) 检测腺病毒介导 HSP70 蛋白在胃癌细胞中的表达

Fig. 1 Adenovirus-mediated HSP70 expression on gastric cancer cells detected by Western blotting (A) and ELISA (B)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs AdCMV-HSP70

2.2 HSP70 表达对胃癌细胞的体外抑制作用

胃癌细胞和胃黏膜上皮细胞以 MOI = 1 ~ 200

pfu/cell 不同强度感染 AdCMV-HSP70s、AdCMV-HSP70 和 AdCMV-EGFP, 感染后 48 h 检测细胞存活

率,以未感染病毒的亲代细胞为对照。结果发现,在 MOI 达到 200 pfu/cell 时,对照病毒 AdCMV-EGFP 出现明显的细胞毒作用。以 $MOI \leq 100$ pfu/cell 感染的细胞存活率进行实验发现,在 $MOI = 100$ pfu/cell 时,AdCMV-HSP70s 感染的 SGC-7901 细胞存活率较对照组有明显降低 [$(66.33 \pm 4.33)\%$ vs $(101.33 \pm 7.64)\%$, $P < 0.05$]; AdCMV-HSP70s 对 GES-1 细胞也有一定抑制作用(图 2)。

2.3 HSP70 联合 CIK 细胞对裸鼠胃癌移植瘤的抗

瘤效应

以 BALB/c 裸鼠建立胃癌细胞 SGC-7901 移植瘤模型,在给予表达 HSP70 的腺病毒治疗同时,给裸鼠输入体外激活的 CIK 细胞,部分恢复小鼠免疫功能,观察 HSP70 的表达对免疫细胞的趋化和调控后的抗肿瘤效应。结果发现,AdCMV-HSP70s + CIK 治疗组疗效明显,治疗 35 d 后抑瘤率显著高于 AdCMV-HSP70 + CIK 组 [$(66.5 \pm 7.3)\%$ vs $(43.6 \pm 5.6)\%$, $P < 0.01$ 。图 3]。

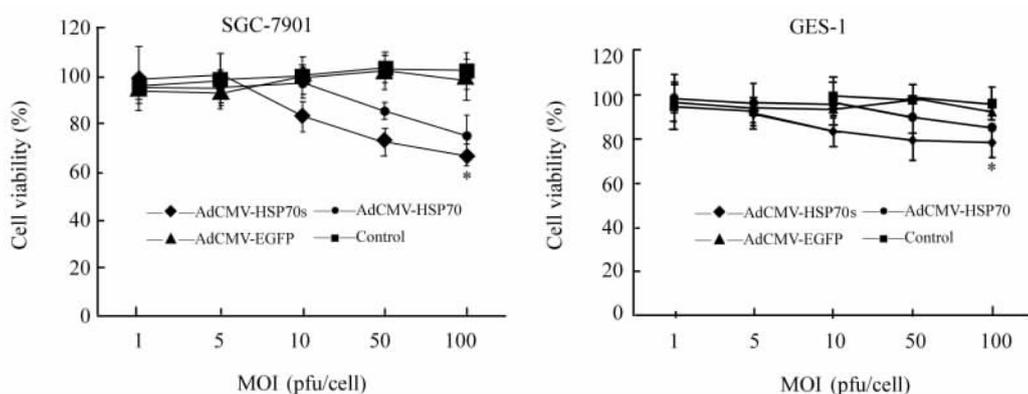


图 2 腺病毒介导 HSP70 表达对胃癌细胞的抑制作用

Fig. 2 Inhibitory effect of adenovirus-mediated HSP70 expression on gastric cancer cells

* $P < 0.05$ vs control group

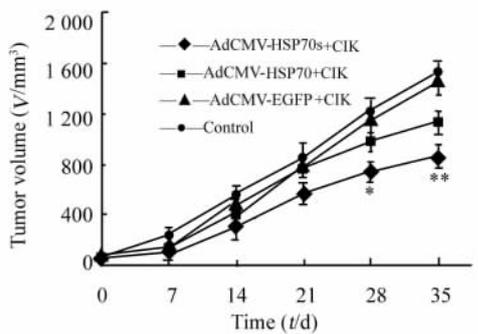


图 3 腺病毒介导 HSP70 表达联合 CIK 细胞对胃癌裸鼠移植瘤的抑制作用

Fig. 3 Inhibitory effect of adenovirus-mediated HSP70 expression combined with CIK cells on gastric cancer xenograft model in nude mice

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

2.4 HSP70 联合 CIK 细胞治疗后移植瘤组织中 HSP70 的表达及瘤组织间质中 CD3⁺T 细胞的浸润变化

裸鼠移植瘤模型治疗后观察 HSP70 的表达及

肿瘤间质中 CD3⁺T 细胞浸润的数量,结果发现, AdCMV-HSP70s + CIK 和 AdCMV-HSP70 + CIK 治疗组 HSP70 的阳性表达程度无明显差别,但 AdCMV-HSP70s + CIK 组阳性物质更弥散。AdCMV-HSP70s 组瘤组织间质中 CD3⁺T 细胞浸润的数量明显多于 AdCMV-HSP70 + CIK 组,而 AdCMV-EGFP + CIK 组 T 细胞浸润数量与空白对照组无差异(图 4)。

3 讨论

根据肿瘤细胞的遗传特性不同,可以设计不同的基因治疗策略。常用的抗肿瘤目的基因包括抑癌基因、免疫调节基因、抗血管生成基因、肿瘤细胞自杀基因、抗肿瘤抗体基因以及肿瘤自分泌生长因子及其受体基因的反义核酸等。然而,目前疗效优异基因还是太少,筛选安全有效的基因仍然是肿瘤基因治疗努力的方向。研究^[1]发现,癌细胞在受热或其他应激反应条件下可诱导产生 HSP 蛋白,其中 HSP70 与免疫调节密切相关。HSP70 在免疫应答、机体抗感染、自身免疫反应中发挥重要作用^[9],它能促进 T 细胞增殖^[13],还能诱导 DC 成熟^[5]。HSP70 不仅可作为抗原提呈的辅助分子参与肿瘤抗

原肽的加工和处理,增强肿瘤抗原的稳定性和免疫原性,而且可通过活化自然杀伤细胞(Nature killer, NK)及 γ/δ T细胞,诱导产生非主要组织相容性抗原复合物(MHC)限制的免疫应答,活化补体系统,促进多种细胞因子释放发挥抗肿瘤的作用^[14-15]。因此,HSP70可看做是一种抗肿瘤候选基因。

但是,对于HSP70抗肿瘤的效应还有不少争论。虽然有研究认为HSP70具有抗凋亡而促进肿瘤生长的功能,但也有文献认为癌细胞能够依赖HSP70合成分泌的机制发挥抑制细胞凋亡促进肿瘤生长的目的^[9],而抑制HSP70的表达即可抑制癌细胞的增殖^[16],表明HSP70在调解肿瘤细胞凋亡时具有双向性。对于HSP70如何促进肿瘤凋亡的研究文献报道极少。因此,对于HSP70在肿瘤治疗中

的应用,有必要进行更深入的机制的研究。HSP70的生物学作用主要是介导蛋白质的折叠和装配、定位和转运,参与蛋白质的活化或水解,其中包括癌基因或抑癌基因蛋白。正常情况下HSP70主要存在于胞质中,应激时迅速进入胞核发挥作用,可见HSP70表达后在细胞的定位非常关键,可能是HSP70发挥不同生物效应的重要关键环节,在细胞内表达并能够定位到细胞膜甚至分泌到细胞外的HSP70具有更强的抗肿瘤效应^[17]。虽然目前还没有足够证据来说明其相关分子机制,但可以猜测,改变HSP70的定位可能对细胞跨膜蛋白尤其是具有生长因子受体功能的蛋白质的定位和转运有影响,从而改变了细胞的命运。

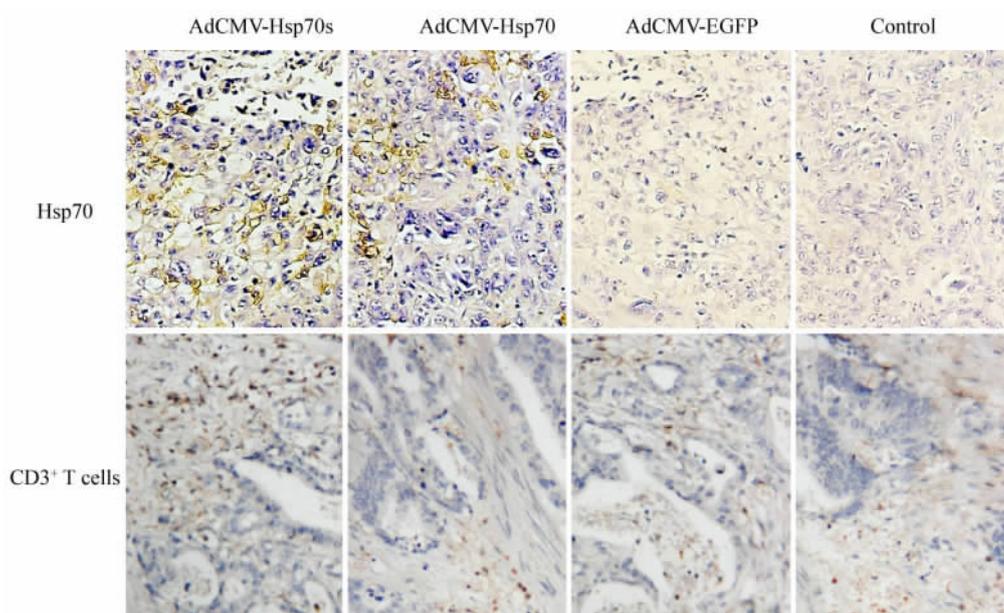


图4 腺病毒介导HSP70表达趋化外源CIK细胞对胃癌裸鼠移植瘤组织中CD3⁺T细胞浸润的影响(×200)

Fig. 4 Effect of CIK cells chemotaxis of adenovirus-mediated HSP70 expression on CD3⁺T cells infiltration in gastric cancer xenograft tissues in nude mice(×200)

本项研究中,以11个精氨酸的穿膜肽序列(11R)介导HSP70穿膜分泌到细胞外,发挥免疫调控和抗癌效应^[18-19]。通过细胞学实验,我们证实融合11R的HSP70能够提高细胞内HSP70的穿膜和分泌,在细胞培养体系中检测到高水平的HSP70蛋白表达。HSP70的穿膜和分泌在细胞学水平上确实证实能够抑制胃癌细胞的增殖活性。以胃癌细胞SGC-7901建立裸鼠移植瘤模型,通过输入外源性CIK细胞,验证腺病毒介导的HSP70表达分泌联合CIK细胞治疗对胃癌的抗癌活性。HSP70在胃癌移

植瘤组织中表达,能够趋化更多地CD3⁺的T细胞集中于癌组织中,发挥抗肿瘤免疫作用,抑制移植瘤的生长。本研究证实,通过促进HSP70的表达和分泌,一方面能够直接抑制癌细胞增殖,调控抗癌免疫反应;另一方面,CIK细胞的输注,不但恢复了裸鼠的部分免疫功能,产生抗肿瘤效应,而且能够在HSP70的趋化下集中于癌组织内,与HSP70产生协同作用,共同增强胃癌的基因治疗疗效。研究结果提示,腺病毒介导的HSP70表达分泌联合CIK细胞治疗,具有明确的抗胃癌疗效,在临床胃癌及其他肿

瘤的综合治疗中具有一定的应用前景。

[参考文献]

[1] Calderwood SK, Stevenson MA, Murshid A. Heat shock proteins, autoimmunity, and cancer treatment [J]. *Autoimmune Dis*, 2012, 2012(1): 486069.

[2] Chen T, Cao X. Stress for maintaining memory: HSP70 as a mobile messenger for innate and adaptive immunity [J]. *Eur J Immunol*, 2010, 40(6): 1541-1544.

[3] Böttger E, Multhoff G, Kun JFJ, et al. Plasmodium falciparum-infected erythrocytes induce granzyme B by NK cells through expression of host-HSP70 [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(3): e33774.

[4] Chen X, Tao Q, Yu H, et al. Tumor cell membrane-bound heat shock protein 70 elicits antitumor immunity [J]. *Immunol Lett*, 2002, 84(2): 81-87.

[5] Morse MA, Clay TM, Hobeika AC, et al. Phase I study of immunization with dendritic cells modified with fowlpox encoding carcinoembryonic antigen and costimulatory molecules [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(8): 3017-3024.

[6] Budina-Kolomets A, Balaburski GM, Bondar A, et al. Comparison of the activity of three different HSP70 inhibitors on apoptosis, cell cycle arrest, autophagy inhibition, and HSP90 inhibition [J]. *Cancer Biol Ther*, 2014, 15(2): 194-199.

[7] Juhasz K, Lipp AM, Nimmervoll B, et al. The complex function of HSP70 in metastatic cancer [J]. *Cancers (Basel)*, 2013, 6(1): 42-66.

[8] Lee HW, Lee EH, Kim SH, et al. Heat shock protein 70 (HSP70) expression is associated with poor prognosis in intestinal type gastric cancer [J]. *Virchows Arch*, 2013, 463(4): 489-495.

[9] Murphy ME. The HSP70 family and cancer [J]. *Carcinogenesis*, 2013, 34(6): 1181-1188.

[10] Guzhova IV, Shevtsov MA, Abkin SV, et al. Intracellular and extracellular HSP70 chaperone as a target for cancer therapy [J]. *Int J Hyperthermia*, 2013, 29(5): 399-408.

[11] Xu C, Sun Y, Wang Y, et al. CEA promoter-regulated oncolytic

adenovirus-mediated HSP70 expression in immune gene therapy for pancreatic cancer [J]. *Cancer Lett*, 2012, 319(2): 154-163.

[12] Todorovic M, Mesiano G, Gammaitoni L, et al. Ex vivo allogeneic stimulation significantly improves expansion of cytokine-induced killer cells without increasing their alloreactivity across HLA barriers [J]. *J Immunother*, 2012, 35(7): 579-586.

[13] Haug M, Dannecker L, Schepp CP, et al. The heat shock protein HSP70 enhances antigen-specific proliferation of human CD4⁺ memory T cells [J]. *Eur J Immunol*, 2005, 35(11): 3163-3172.

[14] Yamaoka A, Guan X, Takemoto S, et al. Development of a novel HSP70-based DNA vaccine as a multifunctional antigen delivery system [J]. *J Control Release*, 2010, 142(3): 411-415.

[15] Kim TW, Lee JH, He L, et al. DNA vaccines employing intracellular targeting strategies and a strategy to prolong dendritic cell life generate a higher number of CD8⁺ memory T cells and better long-term antitumor effects compared with a DNA prime-vaccinia boost regimen [J]. *Hum Gene Ther*, 2005, 16(1): 26-34.

[16] Behnsawy HM, Miyake H, Kusuda Y, et al. Small interfering RNA targeting heat shock protein 70 enhances chemosensitivity in human bladder cancer cells [J]. *Urol Oncol*, 2013, 31(6): 843-848.

[17] Schmitt E, Gehrman M, Brunet M, et al. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: Repercussions in cancer therapy [J]. *J Leukoc Biol*, 2007, 81(1): 15-27.

[18] Ogawa T, Ono S, Ichikawa T, et al. Protein transduction method for cerebrovascular disorders [J]. *Acta Med Okayama*, 2009, 63(1): 1-7.

[19] Wang W, Ji W, Hu H, et al. Survivin promoter-regulated oncolytic adenovirus with HSP70 gene exerts effective antitumor efficacy in gastric cancer immunotherapy [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(1): 150-160.

[收稿日期] 2014 -04 -05 [修回日期] 2014 -05 -10
 [本文编辑] 韩丹

• 读者 • 作者 • 编者 •

本刊对论文中实验动物描述的要求

根据国家科学技术部 1988 年颁布的《实验动物管理条例》和卫生部 1998 年颁布的《医学实验动物管理实施细则》，本刊对论文中有关实验动物的描述，要求写清楚以下事项：(1)品种、品系及亚系的确切名称；(2)遗传背景或其来源；(3)微生物检测状况；(4)性别、年龄、体重；(5)质量等级及合格证书编号；(6)饲养环境和实验环境；(7)健康状况；(8)对动物实验的处理方式。

医学实验动物分为四级：一级为普通级；二级为清洁级；三级为无特定病原体(SPF)级；四级为无菌级(包括悉生动物)。省部级课题及研究生毕业论文等科研实验必须应用二级以上的实验动物。

(本刊编辑部)