

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2017.07.010

· 基础研究 ·

黏蛋白1基因转染DC对乳腺癌细胞MCF-7裸鼠移植瘤的免疫抑制作用

尹良伟^{1a}, 马海英², 张利^{1b}, 王贺双^{1b}, 刘宇^{1a}, 于环^{1a}, 祝艳华^{1a}, 伍建林³ (1. 大连医科大学附属大连市中心医院 a. 肿瘤内三科; b. 中心实验室, 辽宁 大连 116033; 2. 大连医科大学组织胚胎学教研室, 辽宁 大连 116044; 3. 大连大学附属中山医院医学影像教研室, 辽宁 大连 116033)

[摘要] **目的:** 探讨黏蛋白1(mucin 1, *MUC1*)基因转染DC对人乳腺癌MCF-7细胞裸鼠移植瘤的抑制作用。**方法:** 体外诱导培养健康成人DC, 应用脂质体转染法将pcDNA3.1-MUC1转染DC, ELISA法检测转染后DC分泌细胞因子IL-12和TNF- α 的能力, LDH释放法检测基因转染后DC诱导特异性CTL对乳腺癌MCF-7细胞的杀伤活性。应用*MUC1*基因转染DC、空质粒转染DC、及生理盐水皮下注射治疗人乳腺癌MCF-7细胞裸鼠移植瘤, 观测其对肿瘤生长的抑制作用。**结果:** 转染pcDNA3.1-MUC1的DC分泌IL-12、TNF- α 的能力较转染空质粒DC明显增强[IL-12: (202.52 \pm 29.61) vs (10.83 \pm 1.02)pg/ml; TNF- α : (349.07 \pm 79.42) vs (9.26 \pm 1.52)pg/ml, 均 $P < 0.01$]; 转染pcDNA3.1-MUC1的DC诱导产生特异性CTL, 对人乳腺癌MCF-7细胞具有更明显的杀伤活性, 效靶比为10:1、5:1和2.5:1时的杀伤率分别达到56.2%、38.9%和25.8%, 显著高于对照组CTL(均 $P < 0.01$)。 *MUC1*基因转染DC对乳腺癌MCF-7裸鼠移植瘤生长抑制作用明显强于空质粒转染DC组($P < 0.05$)。**结论:** *MUC1*基因转染DC可以诱导特异性CTL, 对乳腺癌MCF-7细胞具有更强的抗肿瘤免疫效应。

[关键词] *MUC1*基因; 树突状细胞; 基因转染; 乳腺癌; 免疫效应

[中图分类号] R737.9; R730.51 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2017)07-0756-06

Immuno-inhibitory effect of DC transfected with *MUC1* gene on xenograft tumor of the breast carcinoma MCF7 cell in nude mouse

YIN Liangwei^{1a}, MA Haiying², ZHANG Li^{1b}, WANG Heshuang^{1b}, LIU Yu^{1a}, YU Huan^{1a}, ZHU Yanhua^{1a}, WU Jianlin³ (1 a. Department of the 3rd Oncology, b. Central Laboratory, Dalian Central Hospital affiliated to Dalian Medical University, Dalian 116033 Liaoning, China; 2. Department of histoembryology, Dalian Medical University, Dalian 116044, Liaoning, China; 3. Department of Medical Imageology, Zhongshan Hospital affiliated to Dalian University, Dalian 116033, Liaoning, China)

[Abstract] **Objective:** To explore inhibitory effect of dendritic cell (DC) transfected with mucin 1 (*MUC1*) gene on xenograft tumor of human breast carcinoma MCF7 cell in nude mouse. **Methods:** DC of healthy adults were induced-cultured in vitro. Plasmid with human pcDNA3.1-MUC1 gene were transfected into the DC by a lipofection assay. ELISA assay was used to detect secretion ability of cytokines IL-12 and TNF- α by the transfected DC. LDH release assay was used to exam killing activity of specific cytotoxic T lymphocytes (CTL) induced by the transfected DC to the breast carcinoma MCF7 cell. The xenograft tumors of human breast carcinoma MCF7 cell in nude mice were treated by the DC transfected with *MUC1* gene, the DC transfected with empty plasmid and normal saline in subcutaneous injection, and growth inhibition of the xenograft tumors in nude mice were observed. **Results:** Secretion abilities of IL-12 and TNF- α by the DC transfected with pcDNA3.1-MUC1 gene were obviously more en-

[基金项目] 大连市卫计委科研课题资助项目(No.2012-0407L)。Project supported by the Scientific Research Foundation for Projects of Dalian City's Health and Family Planning Commission (No.2012-0407L)

[作者简介] 尹良伟(1975-),男,博士,主任医师,主要从事肿瘤化疗及生物治疗方面的临床及基础研究, E-mail: Lwyin2008@163.com

[通信作者] 伍建林(WU Jianlin, corresponding author),主任医师,教授,博士生导师,主要从事影像医学的临床及基础研究, E-mail: cjr.wujianlin@vip.163.com

hanced than those by the DC transfected with empty plasmid (IL-12:[202.52±29.61] vs [10.83±1.02] pg/ml; TNF- α : [349.07±79.42] vs [9.26±1.52] pg/ml, all $P<0.01$). Killing activity of the specific CTL induced by the DC transfected with pcDNA3.1-MUC1 genes was more obvious than that by the CTL of the control group, and the killing rates at effector/targetor ratio of 10:1, 5:1 and 2.5:1 were 56.2%, 38.9% and 25.8% respectively (all $P<0.01$). Inhibitory effect of the DC transfected with MUC1 gene on the xenograft tumors of breast carcinoma MCF7 cell in nude mice was significantly stronger than that of the DC transfected with empty plasmid ($P<0.05$). **Conclusion:** The DC transfected with MUC1 gene might induce specific CTL, which might have stronger anti-tumor immune effect on the breast carcinoma MCF7 cell.

[Key words] MUC1 gene; dendritic cell(DC); gene transfection; breast cancer; immune efficacy

[Chin J Cancer Biother, 2017, 24(7): 756-761. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2017.07.010]

黏蛋白1(mucin 1, MUC1)是黏蛋白家族中最重要的成员之一,为一种穿膜糖蛋白。依据检测及分离方法的不同可命名为多形上皮黏蛋白(polymorphic epithelial mucin, PEM)、上皮膜抗原(epithelial membrane antigen, EMA)、CD227及CA153等。MUC1存在于正常组织腺上皮细胞表面的分泌极,其作用为润滑、保护、调节细胞间黏附等^[1]。MUC1还广泛存在于腺癌上皮细胞的表面,表达异常丰富,而且其表达程度与肿瘤恶性程度呈正相关;MUC1在乳腺癌、肺腺癌、胰腺癌、卵巢癌、胃癌、结肠癌等多种癌组织中均有表达,其异常表达程度越高提示肿瘤侵袭性越强,预后越差,且其表达与淋巴结转移、肿瘤进展明显相关^[2-3]。本研究依据MUC1在多种恶性肿瘤中表达的普遍性,以及近年来MUC1在肿瘤生物治疗中的新发现,结合DC疫苗在抗肿瘤免疫治疗方面的强大作用,应用脂质体将质粒pcDNA3.1-MUC1转染健康成人DC,检测MUC1基因修饰DC的抗肿瘤免疫活性,探讨其抗肿瘤的相关机制。

1 材料与方法

1.1 质粒和主要试剂

质粒pcDNA3.1-MUC1由宝生物公司(大连)合成。脂质体Lipofectamine™ 2000购自Initrogen公司,重组人GM-CSF、重组人IL-4、重组人TNF- α 购自Cytolab公司,FITC-CD83、FIT-CD86、PE-CD80单克隆抗体购自Ebioscience公司,RPMI 1640培养基、10%胎牛血清(FBS)购自晶美公司,Ficoll淋巴细胞分离液购自达科为公司;质粒提取试剂盒、RNA提取试剂盒、Taq酶、AMV购自Promega公司,用于扩增MUC1基因及内参 β -actin基因的引物由宝生物公司(大连)合成。

MUC1基因引物序列:上游引物5'-CGGAATTC-TATGACACCGGGCACCCAGTC-3';下游引物5'-

CGGGATCCCTACAAGTTGGCAGAAGTGGCTGC-3'。 β -actin引物序列:上游引物5'-AGCGGAAATC-GTGCCTG-3';下游引物5'-CAGGGTACATGGTG-GTGCC-3'。

1.2 质粒提取及纯化

应用质粒提取试剂盒制备和纯化pcDNA3.1-MUC1质粒,采用紫外分光光度计测定pcDNA3.1(+)-MUC1质粒在260 nm、280 nm波长时的光密度(D)值, D_{260}/D_{280} 值为1.9328,计算并稀释至质量浓度为1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$,置-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3 体外培养人外周血DC

抽取健康志愿者新鲜血50 ml,密度梯度离心分离外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC),37 $^{\circ}\text{C}$ 贴壁3 h,弃上清,培养瓶中加入含有重组GM-CSF(1 000 U/ml)和IL-4(500 U/ml)的RPMI 1640完全培养基,第3天换液,取出培养液,400 \times g离心10 min,弃上清,加入新鲜诱导体系培养至第7天,流式细胞仪检测DC表面的分子标志物CD80、CD83和CD86。

1.4 MUC1基因转染DC

将100 μl pcDNA3.1-MUC1质粒与脂质体混合液加入培养DC的24孔板中(pcDNA3.1-MUC1-DC组),对照组将100 μl pcDNA3.1与脂质体混合液加入培养DC的24孔板中(pcDNA3.1-DC组),轻轻摇动,置含5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育6 h,弃上清,换含有重组GM-CSF(1 000 U/ml)、IL-4(500 U/ml)的RPMI 1640完全培养基,继续培养24 h。

1.5 RT-PCR检测转染后DC MUC1 mRNA的表达

采用RNA提取试剂盒提取DC总RNA,贮存于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。取2 μg 总RNA逆转录,按M-MLV逆转录酶说明书操作。反应体系(25 μl):RNA 10 μl 、随机引物1 μl 、RNA酶抑制剂1 μl 、5 \times 缓冲液5 μl 、dNTP混合物1 μl 、DEPC(0.1%的焦碳酸二乙酯)处理水6 μl 和

AMV 1 μ l, 反应条件: 80 $^{\circ}$ C 5min, 38 $^{\circ}$ C 1 h, 85 $^{\circ}$ C 10 min, 逆转录获得 cDNA。

PCR 反应体系: 上、下游引物各 2 μ l, 5 \times 缓冲液 5 μ l、dNTP 混合液 1 μ l、cDNA 2 μ l、Taq 酶 1 μ l 和 DEPC 处理水 37 μ l。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 2 min, 93 $^{\circ}$ C 45 s, 56 $^{\circ}$ C 70 s, 72 $^{\circ}$ C 5 min, 30 个循环。 β -actin 引物作为内参照。PCR 扩增产物用琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.6 Western blotting 检测转染后 DC 的 MUC1 蛋白表达水平

分别收集转染 MUC1 基因及对照组 DC, 乙基苯基聚乙二醇-40(NP-40)裂解细胞, 提取细胞总蛋白, 18 407 \times g 离心 10 min 后加入等体积的 2 \times SDS 上样缓冲液, 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min 后行 SDS, 电转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h, 加入 MUC1 单抗后 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜, 用 TBST 缓冲液洗涤 3 次, 每次 10 min, 加入二抗室温孵育 2 h, 再用 TBST 缓冲液洗涤 3 次, 然后加入化学发光剂进行检测, X 线片暗室曝光, 常规显影定影。

1.7 ELISA 法检测转染后 DC 分泌 IL-12 和 TNF- α 的水平

将上述基因转染 DC 用完全培养基调整细胞密度为 1×10^6 个/ml 置于 96 孔板中培养, 48 h 后收集每孔上清液, 用 ELISA 法检测 IL-12、TNF- α 含量, 并以空质粒转染 DC 作对照。

1.8 诱导培养 CTL 细胞

将体外培养 PBMC 中非贴壁淋巴细胞用含 IL-2 (500 U/ml) 的 RPMI 1640 完全培养基培养, 隔天半量换液并补充细胞因子, 第 7 天将上述细胞分别与培养至第 7 天的 pcDNA3.1-MUC1 质粒转染组 (pcDNA3.1-MUC1-DC 组)、pcDNA3.1 空质粒转染组 (pcDNA3.1-DC 组) 以及无转染 DC 组 (DC 组) DC, 以 10:1 的比例混合培养, 隔天半量换液并补充细胞因子, 培养至第 12 天, 所收集细胞即为 CTL 细胞。

1.9 LDH 释放法检测 CTL 的杀伤活性

以人乳腺癌细胞系 MCF-7 为靶细胞, 以转染 pcDNA3.1 的 DC 细胞刺激淋巴细胞后的 CTL (CTL-DC 组) 及 pcDNA3.1-MUC1 质粒转染的 DC 刺激淋巴细胞后的 CTL (CTL-DC-MUC1 组) 为效应细胞。按 10:1、5:1、2.5:1 混合培养 6 h 后, 采用 LDH 释放试验检测 CTL 特异性杀伤率。CTL 特异性杀伤率 (%) = (试验孔值 - 效应细胞对照值) / (最大杀伤对照值 - 最小杀伤对照值) \times 100%。

1.10 裸鼠体内抑瘤实验

于裸鼠胸背部皮下注射 0.1 ml 对数生长期人乳腺癌 MCF-7 细胞 (1×10^7 个/只)。第 7 天选择荷瘤大小相似的裸鼠共 18 只, 数字表法随机分为生理盐水对照组、转染空质粒 DC 细胞治疗组及转染 MUC1 质粒 DC 细胞治疗组, 每组 6 只。治疗组皮下注射 0.2 ml 相应处理的 DC (1×10^7 个/只), 对照组皮下注射 0.2 ml 生理盐水, 每天注射 1 次。治疗第 3 天起每 5 d 用卡尺测量肿瘤的最大长径 (a) 及最大横径 (b), 肿瘤体积 = $0.5 \times a \times b^2$, 观察肿瘤的生长情况。

1.11 统计学处理

数据采用 SPSS 11.0 统计学软件分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DC 具有典型形态学特征和表型分子

相差显微镜动态观察体外培养的外周血来源 DC 形态变化过程, 由初始的细胞聚集成团, 到分散状态; 由 DC 的表面毛茸状到不规则的细胞表面毛刺状突起。

人 DC 的特异性标志 CD80、CD83、CD86 等已经得到公认, CD83 是 DC 成熟的标志, 同样共刺激因子 CD80 (B7-1) 也是在 DC 成熟时有较高表达。培养 7 d 的 DC 流式检测结果 (图 1) 显示, CD80、CD83 及 CD86 分子表达率分别为 (22.7 \pm 1.6)%、(24.9 \pm 2.1)% 及 (95.4 \pm 4.3)%, 提示本实验已获得成熟 DC。

2.2 转染后 DC 显著提高 MUC1 mRNA 和蛋白的表达

将 pcDNA3.1(+)-MUC1 转染人 DC, RT-PCR 检测到在 296 bp 处有一特异性的扩增带 (图 2A)。同时 Western blotting 检测转染后 DC 有明显 MUC1 蛋白条带 (图 2B)。

2.3 转染后 DC 明显提高分泌 IL-12、TNF- α 能力

转染空质粒 (pcDNA3.1-DC 组) 的 DC 分泌细胞因子 IL-12、TNF- α 能力较低, 分别为 (10.83 \pm 1.02) pg/ml、(9.26 \pm 1.52) pg/ml; 而转染 MUC1 (pcDNA3.1-MUC1-DC 组) 的 DC 分泌这两种因子的能力明显增强, 分别为 (202.52 \pm 29.61)、(349.07 \pm 79.42) pg/ml, 与前者有明显统计学差异 ($P < 0.01$, 表 1)。

2.4 转染 MUC1 基因 DC 明显加强了 CTL 对乳腺癌细胞的杀伤活性

LDH 释放法检测结果 (表 2) 显示, CTL-DC-MUC1 组 CTL 对靶细胞人乳腺癌 MCF-7 细胞具有明显的杀伤活性, 与 CTL-DC 组比较差异非常显著 ($P < 0.01$), 而且随着效靶比的升高, CTL 的杀伤活性

逐渐增强,说明 *MUC1* 基因转染 DC 刺激的 CTL 具有明显的杀伤活性。

2.5 转染 *MUC1* 基因 DC 对乳腺癌细胞裸鼠移植瘤具有明显免疫抑制效应

裸鼠移植瘤抑制实验结果(图3)所示,生理盐水

对照组裸鼠移植瘤块生长较快,空质粒转染 DC 组和转染 *MUC1* 基因 DC 组裸鼠肿瘤生长明显受抑制,从 25 d 开始,转染 *MUC1* 基因 DC 组裸鼠肿瘤生长抑制作用显著大于空质粒转染 DC 组($P<0.05$)裸鼠和生理盐水对照组($P<0.01$)。

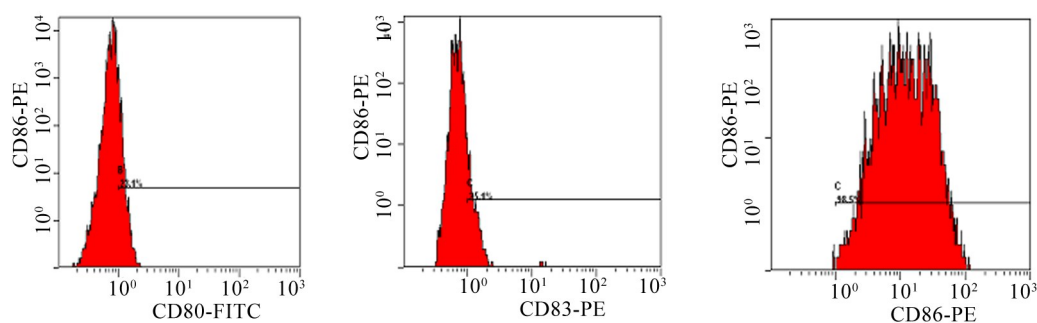
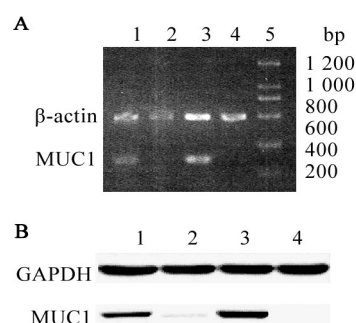


图1 流式细胞仪检测 DC 表型分子典型图

Fig. 1 Typical images of DC phenotypic molecules detected by flow cytometry assay



1, 3: pcD-NA3.1-MUC1-DC; 2, 4: pcD-NA3.1-DC; 5:Marker

- A. Expression result of MUC1 mRNA detected by RT-PCR assay;
- B. Expression result of MUC1 protein detected by Western blotting assay

图2 RT-PCR 和 Western blotting 实验检测 MUC1 的 mRNA 和蛋白质表达结果

Fig. 2 Expression results of mRNA and proteins of MUC1 detected by RT-PCR and Western blotting assays

表1 不同组 DC 分泌 IL-12、TNF- α 的能力 [ρ_B /(pg·ml⁻¹)]

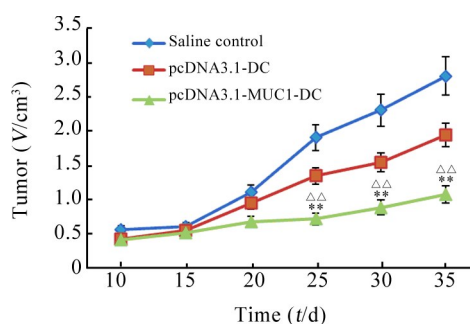
Tab.1 Secretion abilities of IL-12 and TNF- α of DCs in the various groups [ρ_B /(pg·ml⁻¹)]

Group	IL-12	TNF- α
PcDNA3.1-MUC1-DC	202.52±29.6	349.07±79.42
PcDNA3.1-DC	10.83±1.02	9.26±1.52
<i>t</i>	58.47	36.41
<i>P</i>	<0.01	<0.01

表2 不同组 DC 诱导 CTL 的乳腺癌细胞杀伤率(%)

Tab. 2 Killing rates of CTL against the breast cancer cells induced by DC in the various groups (%)

Group	E:T		
	10:1	5:1	2.5:1
CTL-DC-MUC1	56.2	38.9	25.8
CTL-DC	28.7	20.1	12.7
<i>t</i>	13.985	4.661	4.213
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01



$\Delta\Delta P<0.05$ vs pcDNA3.1-DC

** $P<0.01$ vs Saline control

图3 不同实验组裸鼠移植瘤生长情况

Fig. 3 Growth situations of the xenograft tumor in nude mice of the various groups

3 讨论

研究^[4]表明 MUC1 在肿瘤的发生、发展中起重要

作用,其广泛表达于肿瘤组织表面,所以MUC1可能成为肿瘤生物靶向治疗的新靶点。在肿瘤免疫治疗中,一个重要的途径就是利用理想的靶向抗原基因修饰DC,进而诱导机体产生特异性的抗肿瘤免疫应答。

成熟DC可以通过诱导细胞免疫途径发挥其抗肿瘤作用:成熟DC摄取肿瘤抗原后,将其加工、处理成MHC-抗原肽复合物形式表达于细胞表面,进而与T细胞表面T细胞受体结合,在DC表面高表达的B7-1、B7-2等共刺激分子协同作用下,激活T细胞,启动CTL介导的抗肿瘤免疫应答^[10]。这种受MHC-I类分子限制的高度特异性的杀伤机制有两种:通过分泌释放穿孔素、颗粒酶、淋巴毒素、肿瘤杀伤因子等引起靶细胞的裂解或凋亡(分泌型杀伤);激活CTL细胞表面FASL与肿瘤细胞表面的FAS分子结合,进而诱导肿瘤细胞凋亡(非分泌型杀伤)^[11]。有研究^[12-13]表明,经特定基因修饰的DC诱导出的特异性CTL具有更强的杀瘤活性。本研究结果表明,MUC1基因转染DC与空质粒转染DC诱导的CTL,对人乳腺癌MCF-7细胞具有更明显的杀伤活性,在效靶比为10:1时对效应细胞的杀伤率达到56.2%。MUC1基因可以在转染的DC内转录并翻译为MUC1糖蛋白,不仅可以提呈到DC表面形成有效的抗原表位,而且可以成功诱导抗原特异性CTL,可有效识别人乳腺癌MCF-7细胞表面的MUC1抗原表位,通过分泌释放穿孔素、颗粒酶或通过FAS/FASL途径诱导肿瘤细胞凋亡。

成熟DC还可以通过参与体液免疫及分泌细胞因子等途径发挥抗肿瘤作用。DC可调控特异性辅助T淋巴细胞的分化,促进抗体生成,介导体液免疫;另外,DC还可以直接作用于B细胞,参与B细胞的发育、分化、激活,并可以通过分泌IFN- γ ,诱导初始和记忆型B细胞分化为浆细胞,促进体液免疫。成熟DC可以分泌多种细胞因子,如IL-12、IL-4、IL-1、IL-8、IFN- γ 、TNF- α 、GM-CSF等。这些细胞因子能促进免疫效应细胞的增殖,增强它们特异性或非特异性杀瘤活性。其中IL-12还可以抑制肿瘤新生血管的形成,增强肿瘤细胞MHC-I类、MHC-II类分子和共刺激分子的表达,增强特异性CTL杀瘤活性^[14]。本实验表明转染MUC1基因的DC分泌IL-12和TNF- α 细胞因子的能力显著提高。

近些年,诸多临床试验已经验证了DC疫苗在一些恶性肿瘤方面的疗效,部分DC疫苗已经正式批准应用于临床^[15-17]。Kai等^[18]研究表明,转染MUC1基因

的DC活化的淋巴细胞对膀胱癌BIU-87细胞的杀伤作用明显大于未转染DC活化的淋巴细胞;Chen等^[19]应用MUC1基因转染DC体外作用于胰腺癌细胞也得到了相似的结果。王小利等^[20]的研究显示转染CEA(MUC1)基因的DC诱导产生抗原特异性CTL不但对表达CEA的乳腺癌细胞有明显的杀伤作用,对CD44⁺CD24^{-low}乳腺癌干细胞也有一定的杀伤。本研究应用MUC1基因转染人DC免疫人乳腺癌荷瘤裸鼠后,基因转染组裸鼠肿瘤生长明显抑制,体现了较好的抗肿瘤活性。在临床应用方面,Pecher等^[21]应用脂质体将连续重复序列的MUC1-cDNA转染DC,并应用于10例晚期乳腺癌或胰腺癌患者,结果显示4例患者特异性CTL明显增强,且未发生明显不良反应。

近年来,转染目的基因的DC疫苗成为了肿瘤靶向免疫治疗的热点。本研究成功的应用质脂体转染方式将MUC1基因转染到DC表面,显著激活了DC抗原提呈功能,并且成功诱导出抗原特异性CTL并发挥出高效而特异的抗肿瘤免疫应答。这将为进一步开展基因治疗恶性肿瘤奠定理论和实验基础。

[参考文献]

- [1] LACUNZA E, ABBA M C, SEGAL E A, et al. Identification and expression of the epithelial Muc1 mucin in normal feline tissues[J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2009, 130(1-2):17-24. DOI:10.1016/j.vetimm.2009.01.001.
- [2] ZHOU R, CURRY J M, ROY L D, et al. A novel association of neuropilin-1 and MUC1 in pancreatic ductal adenocarcinoma: role in induction of VEGF signaling and angiogenesis[J]. *Oncogene*, 2016, 35(43): 5608-5618. DOI:10.1038/ncr.2015. 516.
- [3] DAVID J M, HAMILTON D H, PALENA C. MUC1 upregulation promotes immune resistance in tumor cells undergoing brachyury-mediated epithelial mesenchymal transition[J/OL]. *Oncoimmunology*, 2016, 5(4): e1117738[2017-04-24].<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/2162402X.2015.1117738>. DOI:10.1080/2162402X.2015.1117738.
- [4] SMITH S G, PATEL P M, PORTE J, et al. Human dendritic cells genetically engineered to express a melanoma polyepitope DNA vaccine induce multiple cytotoxic T-cell responses[J]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7(12):4253-4261. PMID: 11751527.
- [5] 曹雪涛. 树突状细胞的分化发育、抗原提呈及其功能调控的研究[J]. *第二军医大学学报*, 2004, 25(5): 547-549. DOI:10.3321/j.issn:0258-879X.2004. 05.023.
- [6] ADAMS S, O'NEILL D W, BHARDWAJ N. Recent advances in dendritic cell biology[J]. *J Clin Immunol*, 2005, 25(2): 87-98. PMID: 16118915
- [7] JANIKASHVILI N, LARMONIER N, KATSANIS E. Personalized dendritic cell- based tumor immunotherapy[J]. *Immunotherapy*,

- 2010, 2(1): 57-68. DOI:10.2217/ imt.09.78
- [8] 尹良伟,王苏平,张利,等.DC-CIK过继性免疫疗法联合化疗治疗转移性结肠癌患者的疗效[J].中国肿瘤生物治疗杂志,2013,20(2):217-224. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2013.02.016.
- [9] MAEDA Y, YOSHIMURA K, MATSUI H, et al. Dendritic cells transfected with heat-shock protein 70 messenger RNA for patients with hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma: a phase I dose escalation clinical trial[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2015, 64(8):1047-1056. DOI: 10.1007/s00262-015-1709-1.
- [10] O'NEILL D W, ADAMS S, BHARDWAJ N. Manipulating dendritic cell biology for the active immunotherapy of cancer[J]. *Blood*, 2004, 104(8):2235-2246. DOI:10.1182/blood-2003-12-4392.
- [11] 尹良伟,马海英,王苏平.基因修饰DC在抗肿瘤免疫治疗中的应用[J].中国肿瘤生物治疗杂志,2013,20(5):618-622. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2013.05.019.
- [12] LIU S, YI L, LING M, et al. HSP70L1-mediated intracellular priming of dendritic cell vaccination induces more potent CTL response against cancer[J/OL]. *Cell Mol Immunol*, 2016, 2016[2017-04-24]. <https://www.nature.com/cmi/journal/vaop/ncurrent/full/cmi201633a.html>. DOI:10.1038/cmi.2016.33.
- [13] IWABUCHI M, NARITA M, UCHIYAMA T, et al. Enhancement of the antigen-specific cytotoxic T lymphocyte-inducing ability in the PMDC11 leukemic plasmacytoid dendritic cell line via lentiviral vector-mediated transduction of the caTLR4 gene[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(2): 2443-2450. DOI:10.3892/mmr.2015.3685.
- [14] DRANOFF G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4(1): 11-22. DOI:10.1038/nrc1252.
- [15] HEGMANS J P, VELTMAN J D, LAMBERS M E, et al. Consolidative dendritic cell-based immunotherapy elicits cytotoxicity against malignant mesothelioma[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010, 181(12): 1383-1390. DOI:10.1164/rccm.200909-1465OC.
- [16] 高艳荣,贾绍昌,江龙委.树突状细胞疫苗肿瘤抗原负载方式的临床转化研究进展[J].中国肿瘤生物治疗杂志,2015,22(5):646-650. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2015.05.016.
- [17] NI M, HOFFMANN J M, SCHMITT M, et al. Progress of dendritic cell-based cancer vaccines for patients with hematological malignancies[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2016, 16(9):1113-1123. DOI: 10.1080/14712598.2016.1196181.
- [18] KAI S, SIWEI Z, GANG L, et al. Lethal effect of T cells activated by dendritic cells with MUC1 gene transfection on BIU-87 cells in vitro[J]. *Chinese-German J Clin Oncol*, 2005, 12(4):347-350. DOI: 10.1007/s10330.004.0340.y.
- [19] CHEN J, LI H Y, WANG D, et al. Human dendritic cells transfected with amplified MUC1 mRNA stimulate cytotoxic T lymphocyte responses against pancreatic cancer in vitro [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2011, 26(10): 1509-1518. DOI:10.1111/j.1440-1746.2011.6778.x.
- [20] 王小利,马博,贾军,等.rAAV/CEA转染树突状细胞诱导特异性CTL杀伤MCF-7细胞系CD4⁺CD24^{low}乳腺癌干细胞[J].北京大学学报(医学版),2011,43(2):173-178. DOI:10.3969/j.issn.1671-167X.2001.02.003.
- [21] PECHER G, HÄRING A, KAISER L, et al. Mucin gene (MUC1) transfected dendritic cells as vaccine: results of a phase I/II clinical trial[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2002, 51(11/12): 669-673. DOI:10.1007/s00262-002-0317-z.
- [收稿日期] 2017-02-22 [修回日期] 2017-06-08
[本文编辑] 宋美鸿

· 读者·作者·编者·

文稿中须写成斜体的外文字符

在科技文稿中出现许多外文字符,它们有的是正体、有的是斜体。正体和斜体外文字符各有其特定含义和用法,切不可混淆使用。现根据有关标准和规则,把生物医学文稿中须要写成斜体的外文字符归纳为以下几类:

(1) 生物学中拉丁学名的属名和种名(包括亚属、亚种、变种)应斜体,例如大肠杆菌 *Escherichia coli*、幽门螺杆菌 *Helicobacter pylori* 等。(2) 各种基因的缩写符号应斜体(基因表达产物缩写符号应写成正体),例如人脆性X智力低下基因1的符号为 *FMR1*、原癌基因 *RAF1*(人)、病毒癌基因 *v-raf-1*(鼠)、抑癌基因 *p53*(鼠)等。(3) 限制性内切核酸酶缩写符号中前3个字母应斜体,例如 *Hind* III、*Bam*HI、*Sal*I 等。(4) 各种统计学符号应斜体,例如样本数 *n*、均数 \bar{x} 、样本差 *s*、*t* 检验、*F* 检验、概率 *P*、相关系数 *r* 等。(5) 各种物理量的量符号应斜体(pH用正体除外),例如长度 *L*(*l*)、面积 *A*(或 *S*)、体积 *V*、质量 *m*、时间 *t*、压力 *p*、相对分子质量 *M_r*、物质的量浓度 *c_B* 等。(6) 化学中表示旋光性、分子构型、构象、取代基等符号应斜体,例如左旋 *L*-、右旋 *D*-、邻位 *o*-、对位 *p*-、反式 *trans*-、顺式 *cis*- 等。(7) 数学中用字母表示的变数和一般函数应斜体。(8) 英文中使用的某些拉丁词应斜体,例如 *vs*、*in situ*、*in vivo*、*in vitro* 等。

(本刊编辑部)