

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2017.09.002

· 研究快报 ·

EBV-LMP2A肽诱导的特异性CTL对EBV阳性胃癌细胞的体外杀伤作用

杜娟, 苏舒, 孟凡岩, 邵洁, 徐秋萍, 邹征云, 刘宝瑞(南京大学医学院附属鼓楼医院 肿瘤中心暨南京大学临床肿瘤研究所, 江苏 南京 210008)

[摘要] **目的:** 探讨HLA限制性EB病毒(Epstein-Barr virus, EBV)表位肽EBV-潜伏膜蛋白2A (EBV-latent membrane protein 2A, EBV-LMP2A) 诱导的细胞毒性T淋巴细胞(CTL)对EBV阳性胃癌细胞的体外杀伤作用。**方法:** 选用南京大学医学院附属肿瘤医院肿瘤中心HLA-A2阳性胃癌患者外周血单个核细胞(PBMC)、人胃腺癌细胞株(AGS)和人EBV阳性胃腺癌细胞株(AGS-EBV), 通过改良的体外细胞培养技术用HLA-A2限制性的EBV-LMP2A抗原肽从人PBMC中诱导扩增出特异性CTL, 采用四聚体技术和流式细胞术检测抗原肽诱导产生的特异性CTL的含量, 通过FITC-PI标记流式术检测EBV-CTL对EBV阳性和EBV阴性的胃癌细胞的体外杀伤作用。**结果:** 经改良的细胞培养技术和抗原肽双重刺激后EBV-LMP2A抗原肽可以诱导产生出高比例的抗原特异性CTL[EBV-LMP2A-356特异性T细胞占CD8⁺T细胞的(47.1±5.2)%]; EBV-CTL对EBV阳性胃癌细胞的体外杀伤作用较EBV阴性的胃癌细胞明显增强[(45.1±9.3)% vs (19.4±2.5)%, $P<0.05$]. **结论:** 通过改良的细胞培养技术使用EBV-LMP2A抗原肽能诱导产生高比例的EBV特异性CTL, 其对EBV阳性胃癌细胞有较强的特异性杀伤作用。

[关键词] EB病毒-潜伏膜蛋白2A; 细胞毒性T淋巴细胞; EB病毒阳性胃癌; 体外杀伤作用

[中图分类号] R730.51; R735.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2017)09-0938-06

Cytotoxicity of specific CTL induced by EBV-LMP2A peptide on human EBV associated gastric carcinoma cell *in vitro*

DU Juan, SU Shu, MENG Fanyan, SHAO Jie, XU Qiuping, ZOU Zhengyun, LIU Baorui (Comprehensive Cancer Centre of Drum Tower Hospital, Medical School of Nanjing University & Clinical Cancer Institute of Nanjing University, Nanjing 210008, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To study the cytotoxicity of specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) induced by EBV-LMP2A peptide on human EBV associated gastric cancer cells *in vitro*. **Methods:** The peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of HLA-A2 positive gastric cancer patients from Cancer Center of Drum Tower Hospital Affiliated to Medical School of Nanjing University, human gastric adenocarcinoma cell line (AGS) and human EBV positive adenocarcinoma cell line (AGS-EBV) were selected. By modified *in vitro* cell culture technique, specific CTL was amplified from human PBMCs with the induction of HLA-A2 restricted EBV-LMP2A peptide; the content of specific CTL induced by peptide was detected by the method of tetramer and Flow cytometry; the *in vitro* cytotoxicity of EBV-CTL on both EBV⁺ and EBV⁻ human gastric cancer cells was detected by FITC-PI. **Results:** Modified cell culture technique and EBV-LMP2A peptide can induce a high proportion of antigen specific CTL (EBV-LMP2A-356 specific T cells accounted for [47.1±5.2]% of CD8⁺T cells); the cytotoxicity of EBV-CTL on EBV⁺ gastric cancer cells was significantly stronger than that of EBV⁻ gastric cancer cells ([45.1±9.3]% vs [19.4±2.5]%, $P<0.05$). **Conclusion:** Using the modified cell culture technique, EBV-LMP2A antigen peptide can induce a high proportion of EBV specific CTL, which has high specific cytotoxicity on EBV⁺ gastric cancer cells.

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81602077, No. 81572601)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81602077, No. 81572601)

[作者简介] 杜娟(1977-), 女, 博士, 副主任医师, 主要从事消化道恶性肿瘤的免疫治疗研究, E-mail: dujuanglyy@163.com

[通信作者] 刘宝瑞(LIU Baorui, corresponding author), 博士, 教授, 主任医师, 博士生导师, 主要从事消化道恶性肿瘤的免疫治疗研究, E-mail: baoruiliu@nju.edu.cn

[优先发表]

[Key words] EBV-latent membrane protein 2A(EBV-LMP2A); cytolytic T lymphocyte (CTL); EBV-associated gastric carcinoma(EBVaGC); cytotoxicity

[Chin J Cancer Biother, 2017, 24(9): 938-943. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.09.002]

胃癌(gastric carcinoma, GC)的发病率和病死率均居中国恶性肿瘤中的第二位,2015年中国胃癌的新发病例数约为679 100例,病死498 000例^[1];5年生存率约20%,其中IV期胃癌预后更差,5年生存率仅为7%。免疫治疗是继手术、化疗、放疗之后恶性肿瘤治疗胃癌的第4种治疗手段,以其高效、低毒的优势,正在受到前所未有的关注^[2]。2014年在Nature杂志上发表的对胃癌综合性分子分析论文提出了一种新的胃癌分子分型方案,将胃癌分为4个亚型:EB病毒(Epstein-Barr virus, EBV)感染型、微卫星不稳定(MSI)型、基因组稳定(GS)型、染色体不稳定(CIN)型,该胃癌分子分型有助于胃癌个体化治疗药物的筛选^[3]。有研究^[4]不断证实EBV在胃癌发生发展中的作用,全球EBV相关胃癌(EBV-associated gastric carcinoma, EBVaGC)约占总胃癌的10%;EBV潜伏膜蛋白2A(latent membrane protein 2A, LMP2A)是EBV阳性肿瘤细胞免疫治疗较理想的靶抗原^[5]。EBV-LMP2A表位356、426抗原肽是HLA-A2相关的诱导特异性抗肿瘤免疫反应理想的肿瘤抗原表位肽,其在EBV阳性鼻咽癌及恶性淋巴瘤的抗肿瘤治疗中已获得证实^[6-7]。本研究拟通过EBV-LMP2A相关抗原肽负载DC并诱导产生针对EBV-LMP2A特异性CTL,观察所诱导免疫细胞的表型、检测抗原特异性T细胞的含量,并评估其体外对EBV阳性胃癌细胞的杀伤能力,为其进一步临床个体化治疗EBV阳性胃癌提供客观实验依据。

1 材料与方法

1.1 标本来源

采集2014年5月至2016年5月在南京大学医学院附属鼓楼医院肿瘤中心住院治疗的20例HLA-A2阳性胃癌患者外周血;人胃腺癌细胞株(AGS)和EBV阳性胃腺癌细胞株(AGS-EBV)由南京大学医学院附属肿瘤研究所提供。

1.2 主要试剂

AIM-V无血清培养基(美国Life公司),Human IL-4、Human GM-CSF、Human TNF- α 、IFN- γ (美国PeproTech公司),Human IL-2、Human IL-7、Human IL-15(美国PeproTech公司),Human OKT-3单抗(美国eBioscience公司),大鼠抗人LMP2A抗体(美国Abcam公司),HRP标记羊抗鼠/兔IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司)。HLA-A2限制性的EBV-LMP2A特异性表位356、426抗原肽由上海强耀生物科技有

限公司合成,采用反相高压液相色谱仪(RP-HPLC)鉴定其纯度达95%以上;采用液相色谱/质谱技术(LC/MS)鉴定其分子量为所需要目的多肽。抗原肽序列为:LMP2A356-364 (FLYALALLL),LMP2A426-434 (CLGGLLTMV)。

1.3 人胃癌细胞株AGS及AGS-EBV的培养

人胃癌细胞株AGS及AGS-EBV置于含10%胎牛血清的RPMI 1640培养液中、于37℃含5%CO₂的湿润空气的恒温密闭式培养箱中培养。取对数生长期的细胞接种于6孔板中,细胞接种密度为1×10⁵个/孔,继续培养48 h后进入对数生长期,用于实验。

1.4 流式细胞术检测胃癌细胞株的HLA分型

将对数生长期的AGS及AGS-EBV细胞各取1×10⁶左右,用PBS缓冲液洗涤2次后加0.5 ml PBS重悬,再分别加入抗HLA-A2-PE和抗HLA-A24-FITC,混匀后室温避光孵育15 min,再小心用PBS洗涤3次,加0.5 ml PBS缓冲液,上机检测。以Cell Quest-Plot软件分析。

1.5 免疫组化法检测胃癌细胞株的EBV-LMP2A蛋白表达

制作细胞爬片,按说明书的操作规范,用多聚甲醛、PBS等处理后依次加入一抗(LMP2A)和二抗(poly peimidase-anti-rat IgG)等,最后用封片剂封片,光学显微镜下观察、拍摄,检测有无EBV-LMP2A蛋白表达。

1.6 EBV-LMP2A多肽体外负载DC疫苗及诱导CTL

将EBV-LMP2A-356及EBV-LMP2A-426的抗原肽用PBS缓冲液按照1 mg/ml的质量浓度溶解。按常规方法培养DC和T细胞,5~7 d后,按终质量浓度10 μ g/ml将溶解的抗原肽分别加到DC培养瓶内,对DC进行抗原肽负载4~6 h;然后收获DC,一部分按照1:10的比例与培养中的T细胞进行混合培养,刺激悬浮T细胞以获得CTL;另一部分DC冻存备用。实验分4组:第1组是负载EBV-LMP2A-356的DC与T细胞混合;第2组是负载EBV-LMP2A-426的DC与T细胞混合;第3组是未负载抗原肽的DC与T细胞混合;第4组是常规培养的CIK细胞。后续视细胞扩增情况,补加完全培养液和IL-2(100 U/ml)、IL-7(5 ng/ml)、IL-15(5 ng/ml)继续培养。在首次负载抗原肽的7 d后,将冻存的DC复苏再重复刺激T细胞一次,继续培养5~7 d获得CTL,作为实验组效应细胞。未负载抗原肽的DC按上述方法与T淋巴细胞共同培养以及常规培养的CIK细胞作为对照组效应细胞。

1.7 流式细胞术检测CTL表面分子

检测前用PBS调整CTL密度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$, 加入EP管, $100 \mu\text{l}/\text{管}$, 再加入T细胞表面标记的抗体 $5 \mu\text{l}$, 置室温暗处标记15 min后, 用PBS洗细胞2次, 细胞悬于 $100 \mu\text{l}$ PBS中, 流式细胞仪检测细胞表面抗原(CD3、CD4、CD8、CD16、CD56)的表达情况。以Cell QuestPlot软件分析。实验重复3次。

1.8 四聚体技术检测EBV-LMP2A特异性CTL的含量

将诱导至第7天以及第14天的CTL吸出至离心管, 每管 5×10^6 个细胞, 用PBS洗2次, 加入PE标记的LMP2A-356四聚体 $5 \mu\text{l}$, 4°C 避光孵育20 min, 加入PBS洗2次, 加入PerCP-Cy5.5标记的抗人CD3流式抗体 $2.5 \mu\text{l}$ 以及APC标记的抗人CD8流式抗体 $2.5 \mu\text{l}$, 4°C 避光孵育20 min, 加入PBS洗2次, 用 $300 \mu\text{l}$ PBS重悬后流式细胞仪检测EBV-LMP2A特异性CTL的含量。实验重复3次。

1.9 CFSE/PI标记流式术检测EBV-LMP2A特异性CTL的体外杀伤效应

取对数生长期的AGS、AGS-EBV两种细胞作为

靶细胞, 按说明书用CFSE(终浓度为 4 nmmol/L)标记备用。分别收集上述培养的CTL, 按 $10:1$ 、 $20:1$ 效靶比加入CTL和CFSE标记的靶细胞。在 CO_2 培养箱中 37°C 孵育细胞6 h后, 离心细胞混合物以沉淀细胞, 再加入PI(终质量浓度 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$), 4°C 避光孵育15 min。用流式细胞仪检测和分析结果。

1.10 统计学处理

采用Graphpad Prism 5.0统计软件, 计量数据均用 $\bar{x} \pm s$ 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 胃癌细胞株的HLA分型及EBV-LMP2A的蛋白表达

流式细胞术检测结果(图1)显示, AGS胃癌细胞为HLA-A2阳性(图1A)、HLA-A24阴性(图1B), AGS-EBV胃癌细胞为HLA-A2(图1C)、HLA-A24(图1D)双阳性。细胞免疫荧光术检测结果(图2)显示, AGS胃癌细胞中无EBV-LMP2A表达(图2A), AGS-EBV胃癌细胞中有EBV-LMP2A表达(图2B)。

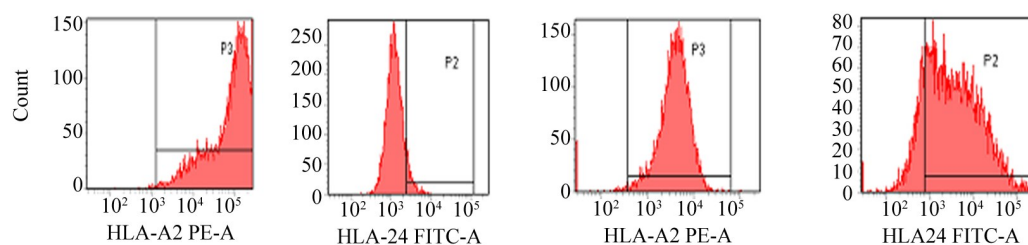


图1 胃癌AGS和AGS-EBV细胞的HLA表型
Fig. 1 HLA phenotypes of AGS and AGS-EBV cells

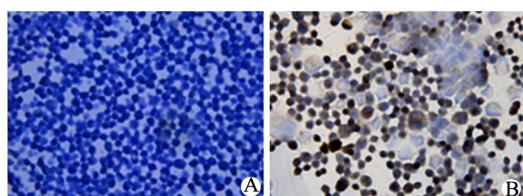


图2 胃癌AGS(A)和AGS-EBV细胞(B)的EBV-LMP2A蛋白表达($\times 200$)
Fig. 2 Expressions of EBV-LMP2A protein in AGS (A) and AGS-EBV cells (B)($\times 200$)

2.2 活化的CTL的表型分型

自体PBMC经EBV-LMP2A特异性表位抗原肽负载DC的刺激后, 所诱导的CTL于第14天经流式细胞检测显示, 表达 $\text{CD}3^+$ 、 $\text{CD}3^+\text{CD}4^+$ 、 $\text{CD}3^+\text{CD}8^+$ 、 $\text{CD}16^+\text{CD}56^+$ 分子阳性细胞的比例分别为 $(97.5 \pm$

$10.2) \%$ 、 $(10.8 \pm 2.1) \%$ 、 $(88.9 \pm 11.1) \%$ 和 $(2.3 \pm 0.4) \%$ 。另外, CTL中含 $(0.1 \pm 0.03) \%$ 的 $\text{CD}19^+$ 细胞。

2.3 EBV-LMP2A抗原肽诱导出高比例的特异性CTL

通过EBV-LMP2A-356四聚体流式术检测结果(图3)发现, 诱导后的第14天, EBV-LMP2A-356特异性T细胞占 $\text{CD}8^+$ T细胞的比例较诱导后的第7天的细胞高 $[(47.1 \pm 5.2) \%$ vs $(4.6 \pm 0.6) \%$, $t = 59.7830$, $P < 0.01]$ 。可见, 通过用自体DC负载EBV-LMP2A-356抗原表位肽联合细胞因子IL-7、IL-15刺激T细胞的方法能够诱导出一比例的特异性T细胞, 且随着培养时间的递增及两次DC刺激, 抗原特异性T细胞的数量明显增加。

2.4 EBV-CTL对EBV阳性胃癌细胞具有较强的杀伤活性

将靶细胞(AGS及AGS-EBV胃癌细胞)与效应细胞(LMP2A-356和LMP2A-426分别致敏的DC-

CTL 及 DC 诱导的 CTL、CIK 细胞)共培养,光镜下可见肿瘤细胞周边逐渐被淋巴细胞包围,4 h 后观察到部分肿瘤细胞崩解。6 h 后 CFSE/PI 法检测各组淋巴细胞对肿瘤细胞的杀伤能力,结果见图 4, DC+LMP2A-356 致敏组、DC+LMP2A-426 致敏组及 DC 组的杀伤能力均明显高于单纯 CIK 组(DC+LMP2A-426 vs CIK, $t=6.9201, P<0.01$; DC+LMP2A-356 vs CIK, $t=7.3365, P<0.01$; DC-CTL vs CIK, $t=2.1120, P<$

0.05); DC+LMP2A-426 致敏组的杀伤能力亦明显高于 DC+LMP2A-356 致敏组及 DC 组(DC+LMP2A-426 vs DC+LMP2A-356, $t=5.4195, P<0.01$; DC+LMP2A-426 vs DC-CTL, $t=4.6946, P<0.01$)。经 EBV-LMP2A 特异性抗原肽刺激的 DC-CTL 对表达 EBV-LMP2A 的 AGS-EBV 细胞的杀伤率明显强于不表达 EBV-LMP2A 的 AGS 细胞,且各组细胞的杀伤率随着效靶比的增高而增强。

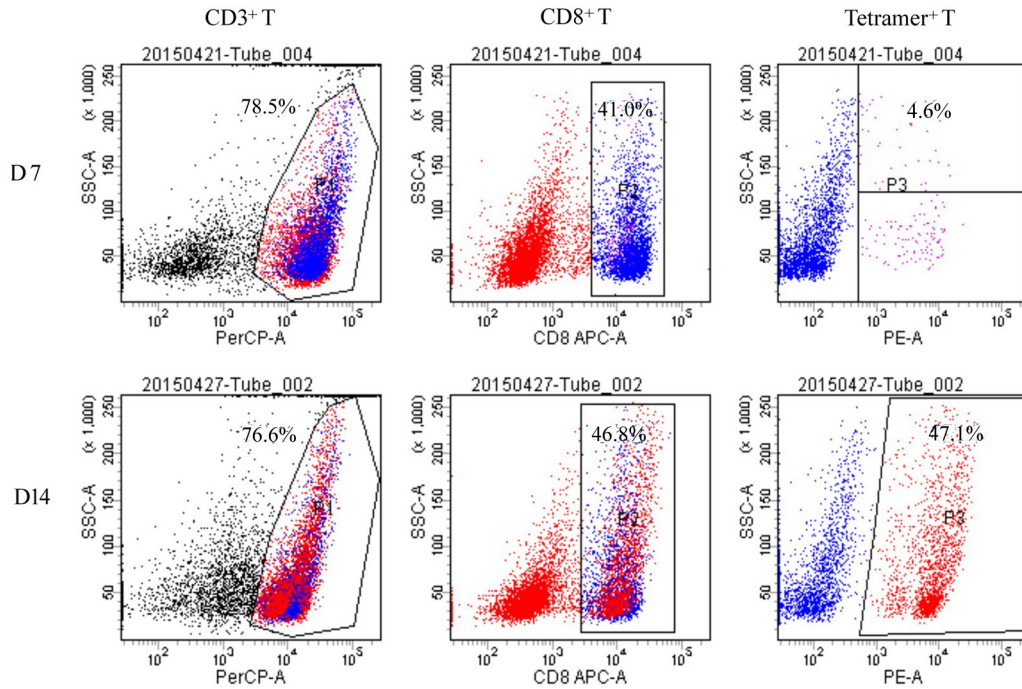
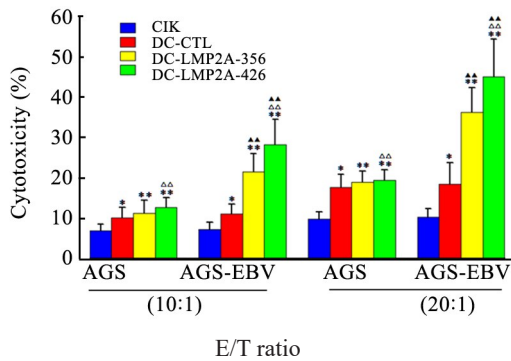


图3 EBV-LMP2A 抗原肽诱导出高比例的特异性 CTL

Fig. 3 EBV-LMP2A antigen peptide induced a high proportion of specific CTL



* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs CIK group; $\Delta\Delta P<0.01$ vs DC-LMP2A-356 or DC-CTL group; $\Delta\Delta P<0.01$ vs AGS group

图4 不同效应细胞对各种肿瘤细胞的杀伤效应(%)
Fig. 4 Cytotoxicity of different effector cells on various tumor cells(%)

EBV 为 IV 型人类疱疹病毒,是一种嗜淋巴细胞病毒,属双链 DNA 病毒,据统计,世界人口的 90% 成年以前都暴露于该病毒。EBV 与恶性肿瘤的发生发展密切相关,如鼻咽癌、霍奇金病或伯基特淋巴瘤。利用 EBV 作为抗原治疗 EBV 阳性的鼻咽癌、恶性淋巴瘤等免疫治疗技术已经在临床上取得成功,但治疗 EBV 相关的胃癌尚未见报道^[8-10]。EBV 呈潜伏 II 型感染,EB 相关肿瘤细胞的抗原表达主要局限在 EBNA1、LMP1 和 LMP2 上^[11]。EBNA1 和 LMP1 不具有成为肿瘤免疫治疗靶抗原的优势。LMP2A 在所有感染的细胞中都可以表达,是肿瘤细胞稳定表达的少数 EBV 保守抗原之一;其本身不是致癌基因,且序列相对保守,具有潜在的 T 细胞激活表位,能介导杀伤性 T 细胞发挥作用。越来越多的研究^[12]表明, LMP2A 是 EBV 相关性胃癌治疗的最理想的靶抗原之一。已经有学者鉴定了不同 HLA 表型的 LMP2A 的 CTL 表位,序列相对保守,为 LMP2A 成为 EBV-VaGC 治疗的靶抗原提供了理论依据^[6,13]。

3 讨论

与非EBVnGC相比,EBVaGC对化疗药物如多西他赛、5-氟尿嘧啶等的治疗更易耐药^[14-15];但EBVaGC较EBVnGC有更好的预后,且预后与淋巴细胞的浸润相关;EBVaGC伴有更明显的免疫应答相关基因的扩增,有明显的细胞趋化因子水平的改变,能更多地吸引T淋巴细胞的浸润,有特征性的高频基因突变^[16]。因而推测,EBVaGC这一亚类有望成为胃癌中免疫治疗的优势人群。

成功的个体化精准免疫治疗的前提条件是准确的HLA分型。肿瘤抗原肽表位的HLA特异性是免疫治疗时诱导特异性免疫反应的基础。已证实肿瘤抗原的提呈必须先经APC降解为短肽,然后与主要组织相容复合物(MHC)分子结合,形成肽-MHC-TCR复合物后提呈在细胞表面,才能为T细胞识别,并激发特异性T杀伤细胞反应^[17]。有研究^[18]表明,HLA-A2和HLA-A24是最常用的以多肽为基础的肿瘤疫苗的HLA类型。本研究中,选取免疫原性较强的EBV-LMP2A的HLA-A2相关的两条肽段LMP2A-356和LMP2A-426^[6,12]。然后通过流式术鉴定了胃癌细胞株的HLA类型,通过免疫组化技术鉴定了其EBV-LMP2A蛋白表达水平,结果显示HLA匹配的且肿瘤细胞表达相关抗原的个体化抗原肽为精准化的免疫细胞治疗提供了基础。

不同位点的肿瘤抗原肽的免疫原性不同,所以设计肿瘤抗原肽时首先要看其与HLA的亲合能力,其次要看其能否诱导出抗原特异性的杀伤细胞。本实验采用既往文献报道过的2条HLA-A2相关的抗原肽各自诱导出了EBV-LMP2A特异性的CTL。两者均有较强的免疫原性,且LMP2A-426-CTL的体外杀伤功能比LMP2A-356-CTL的体外杀伤功能还要强,说明LMP2A-426抗原肽的免疫原性更好。

抗原特异性免疫效应细胞是杀伤肿瘤细胞的根本。目前主要有两种诱导抗原特异性CTL的方法:一是应用确定的CTL多肽或病毒抗原直接注射人体以诱发免疫反应;二是可回输在体外被激活的CTL细胞进行治疗,即过继性免疫治疗。因此,在过继性免疫治疗中如何诱导出高比例的特异性免疫效应细胞是提高免疫治疗效果的关键。文献中常用的技术有磁珠分离法、流式分选法等,分选后再行细胞培养扩增,以达到一定数量的抗原特异性免疫效应细胞^[19]。由于以上技术的成本都比较高,本研究使用改良的细胞培养技术,在不同时间段先后给予两次抗原负载,再联合IL-7、IL-15等细胞因子诱导出了较高比例的抗原特异性CTL细胞,经四聚体检测技术证实抗原特异性细胞的比例可达总的CD8⁺T细胞的(47.1±5.2)%,为个体化过继性免疫细胞治疗提供了

更为经济、便捷的技术。

本研究用CFSE/PI技术证实了抗原特异性免疫细胞的高效体外杀伤活性,结果表明LMP2A抗原肽负载的DC在体外激发的特异性CTL能特异性杀伤EBV阳性的胃癌细胞。本研究为进一步开展EBV相关胃癌的临床个体化免疫治疗奠定了理论基础,也为其他病毒相关性恶性肿瘤的精准免疫细胞治疗研究提供了实验依据。

[参 考 文 献]

- [1] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132. DOI:10.3322/caac.21338.
- [2] SATOLLI M A, BUFFONI L, SPADI R, et al. Gastric cancer: the times they are a-changin'[J/OL]. *World J Gastrointest Oncol*, 2015, 7(11): 303-316[2017-03-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4644853/>. DOI:10.4251/wjgo.v7.i11.303.
- [3] Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma[J]. *Nature*, 2014, 513(7517): 202-209. DOI: 10.1038/nature13480.
- [4] SHINOZAKI-USHIKU A, KUNITA A, FUKAYAMA M. Update on Epstein-Barr virus and gastric cancer (review)[J]. *Int J Oncol*, 2015, 46(4): 1421-1434. DOI: 10.3892/ijo.2015.2856.
- [5] PANG M F, LIN K W, PEH S C. The signaling pathways of Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 2A (LMP2A) in latency and cancer[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2009, 14(2): 222-247. DOI: 10.2478/s11658-008-0045-2.
- [6] WANG B, YAO K, LIU G, et al. Computational prediction and identification of Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A antigen-specific CD8⁺ T-cell epitopes[J]. *Cell Mol Immunol*, 2009, 6(2): 97-103. DOI: 10.1038/cmi.2009.13.
- [7] LIU G, YAO K, WANG B, et al. Reconstituted complexes of mycobacterial HSP70 and EBV LMP2A-derived peptides elicit peptide-specific cytotoxic T lymphocyte responses and anti-tumor immunity [J]. *Vaccine*, 2011, 29(43): 7414-7423. DOI:10.1016/j.vaccine.2011.07.063.
- [8] JAIN A, CHIA W K, TOH H C. Immunotherapy for nasopharyngeal cancer-a review[J]. *Chin Clin Oncol*, 2016, 5(2): 22-31. DOI: 10.21037/cco.2016.03.08.
- [9] MERLO A, TURRINI R, DOLCETTI R, et al. Immunotherapy for EBV-associated malignancies[J]. *Int J Hematol*, 2011, 93(3): 281-293. DOI: 10.1007/s12185-011-0782-2.
- [10] KANAKRY J A, AMBINDER R F. EBV-related lymphomas: new approaches to treatment[J/OL]. *Curr Treat Options Oncol*, 2013, 14(2): 224-236[2017-03-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3670765/>. DOI: 10.1007/s11864-013-0231-y.
- [11] CHEN Y, SUN H, LIU G, et al. EBV LMP2A-specific T cell immune responses elicited by dendritic cells loaded with LMP2A protein[J]. *Cell Mol Immunol*, 2009, 6(4): 269-276. DOI: 10.1038/cmi.2009.36.
- [12] LIU G, YAO K, WANG B, et al. Immunotherapy of Epstein-Barr virus associated malignancies using mycobacterial HSP70 and LMP2A356-364 epitope fusion protein[J] *Cell Mol Immunol*, 2009,

- 6(6): 423-431. DOI: 10.1038/cmi.2009.54.
- [13] OKUGAWA K, ITOH T, KAWASHIMA I, et al. Recognition of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma cells by cytotoxic T lymphocytes induced in vitro with autologous lymphoblastoid cell line and LMP2-derived, HLA-A24-restricted 9-mer peptide[J/OL]. *Oncol Rep*, 2004, 12(4): 725-731[2017-03-24]. <http://www.spandidos-publications.com/or/.PMID:15375491>.
- [14] SHIN H J, KIM D N, LEE, S K. Association between Epstein-Barr virus infection and chemoresistance to docetaxel in gastric carcinoma[J]. *Mol Cells*, 2011, 32(2): 173-179. DOI: 10.1007/s10059-011-0066-y.
- [15] SEO J S, KIM T G, HONG Y S, et al. Contribution of Epstein-Barr virus infection to chemoresistance of gastric carcinoma cells to 5-fluorouracil[J]. *Arch Pharm Res*, 2011, 34(4): 635-643. DOI: 10.1007/s12272-011-0414-7.
- [16] KIM S Y, PARK C, KIM H J, et al. Deregulation of immune response genes in patients with Epstein-Barr virus-associated gastric cancer and outcomes[J]. *Gastroenterology*, 2015, 148(1): 137-147. DOI: 10.1053/j.gastro.2014.09.020.
- [17] 杜娟,刘宝瑞. 胃癌免疫治疗新趋势: 个体化肽疫苗[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2015, 22(4): 514-518. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2015.04.019.
- [18] NAGORSEN D, THIEL E. HLA typing demands for peptide-based anti-cancer vaccine[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2008, 57(12): 1903-1910. DOI: 10.1007/s00262-008-0493-6.
- [19] SMITH C, KHANNA R. Generation of cytotoxic T lymphocytes for immunotherapy of EBV-associated malignancies[J/OL]. *Methods Mol Biol*, 2010, 651: 49-59[2017-03-24]. https://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-60761-786-0_3. DOI: 10.1007/978-1-60761-786-0_3.
- [收稿日期] 2017-05-25 [修回日期] 2017-07-23
[本文编辑] 党瑞山

· 读者·作者·编者·

常见参考文献著录格式示例

1 专著

著录格式: 主要责任者. 题名[文献类型标志]. 其他责任者(例如翻译者). 版本项(1版不著录). 出版地: 出版者, 出版年: 起页-止页.

- [1] ABRAMS W B, BEERS M H, BERKOW R. 默克老年病手册[M]. 陈灏珠, 王赞舜, 刘厚钰, 等. 译. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 22-25.

2 专著析出文献

著录格式: 析出文献主要责任者. 文献题名[文献类型标志]//专著主要责任者. 专著题名. 版本项. 出版地: 出版者, 出版年: 起页-止页.

- [1] WEINSTEIN L, SWARTZ M N. Pathogenic properties of invading microorganisms[M]//SODERMAN W A Jr, SODEMAN W A. *Pathologic physiology: mechanisms of disease*. Philadelphia: Saunders, 1974: 457-472.

3 期刊文献

著录格式: 主要责任者. 题名[文献类型标志]. 刊名, 出版年, 卷号(期号): 起页-止页. 数字对象唯一标识符.

- [1] NOBLES K N, GUAN Z, XIAO K, et al. The active conformation of beta-arrestin 1: direct evidence for the phosphate sensor in the N-domain and conformational differences in the active states of beta-arrestins 1 and-2[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(29): 21370-21381. DOI: 10.1074/jbc.M611483200.

4 专利文献

著录格式: 专利申请者或所有者. 专利题名: 专利国别, 专利号[文献类型标志]. 公告日期或公开日期.

- [1] 钱其军, 李琳芳, 吴红平, 等. 一种多功能免疫杀伤转基因细胞(PIK). 其制备方法及其用途: 中国, 2010101496839[P]. 2010-10-14.

5 学位论文

著录格式: 责任者. 题名[文献类型标志]. 学位授予单位所在地: 学位授予单位, 年.

- [1] 曹新广. Cathepsin L 和 Cystatin B 的表达与大肠癌生物学行为的关系[D]. 郑州, 郑州大学, 2007.

6 电子文献

著录格式: 主要责任者. 题名[文献类型标志/文献载体标志]. 刊名, 出版年, 卷号(期号): 起页-止页(更新或修改日期)[引用日期]. 获取和访问路径. 数字对象唯一标识符.

- [1] KALOS M, LEVINE B L, PORTER D L, et al. T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia[J/OL]. *Sci Transl Med*, 2011, 3: 95ra73 [2016-06-08]. <http://stm.sciencemag.org/content/3/95/95ra73.long>. DOI: 10.1126/scitranslmed.3002842.
- [2] HOPKINSON A. UNIMARC and metadata: Dublin core[EB/OL]. [1999-12-08]. <http://www.ifla.org/IV/ifla64/138-161e.htm>.