

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.09.008

· 基础研究 ·

CpG ODN 协同 MAGE-3 抗原肽致敏 DC 疫苗对膀胱癌细胞 BIU-87 的抑制作用

李秀真, 薛庆节, 路海, 聂尚丹, 王晖, 李运清, 赵龙玉, 谭文彬(济宁医学院 病原生物学教研室, 山东济宁 272067)

[摘要] **目的:** 探讨含未甲基化胞嘧啶鸟嘌呤(CpG)序列的细菌寡核苷酸(CpG oligodeoxynucleotide, CpG ODN)免疫佐剂在增强黑色素瘤抗原基因-3(melanoma antigen gene -3, MAGE-3)抗原肽致敏 DC 抗膀胱肿瘤细胞的作用及其分子机制。**方法:** 采用 Ficoll 法从健康志愿者 HLA-A2 型外周血中分离单个核细胞, 常规方法诱导培养制备成熟 DC。MTT 法检测不同方式(MAGE-3、CpG ODN、MAGE-3+CpG ODN 和无关抗原对照)致敏 DC 对 T 淋巴细胞增殖和 CTL 对靶细胞 BIU-87 的杀伤作用。CpG ODN+MAGE-3 抗原肽致敏 DC 抗裸鼠 BIU-87 膀胱癌细胞移植瘤治疗 7、11 d 测定移植瘤质量变化, MTT 和 Western blotting 法分别检测移植瘤细胞的增殖水平及其凋亡蛋白表达的变化。**结果:** CpG ODN+MAGE-3 抗原肽致敏 DC 能够促进 T 淋巴细胞增殖 ($P<0.05$), 并显著提高活化 T 淋巴细胞的 CTL 对靶细胞 BIU-87 的杀伤活性 ($P<0.05$)。体内实验表明, 致敏 DC 治疗 7、11 d 的各组移植瘤质量均明显降低(均 $P<0.05$), 移植瘤的增殖能力下降也较明显 ($P<0.05$); 与其他致敏 DC 方式相比较, 尤以 CpG ODN+MAGE-3 致敏 DC 组在治疗 11 d 时的移植瘤质量降低非常显著 ($P<0.01$), 且明显促进荷瘤小鼠脾脏单个核细胞的增殖能力 ($P<0.01$); 该组在治疗第 3 天起移植瘤组织 Bcl-2 表达水平明显降低、Bax 水平明显升高(均 $P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论:** CpG ODN 能促进 MAGE-3 抗原肽致敏 DC 对膀胱癌 BIU-87 细胞的抑制作用, 为膀胱癌 DC 疫苗的临床应用提供了实验依据。

[关键词] 膀胱癌; BIU-8 细胞; 树突状细胞; 含 CpG 序列的细菌寡核苷酸; 黑色素瘤抗原基因-3

[中图分类号] R392.11; R737.14 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)09-0891-07

Inhibitory effects of DC vaccine sensitized with MAGE-3 combined with CpG ODN on bladder cancer BIU-87 cells

LI Xiuzhen, XUE Qingjie, LU Hai, NIE Shangdan, WANG Hui, LI Yunqing, ZHAO Longyu, TAN Wenbing (Department of Pathogenic Biology of Jining Medical College, Jining 272000, Shandong, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the role of CpG ODN (CpG oligodeoxynucleotide) adjuvant in enhancing the anti-bladder cancer response induced by MAGE-3 (melanoma antigen gene -3) antigen and its molecular mechanism. **Methods:** Mononuclear cells were isolated from HLA-A2 type peripheral blood of healthy donors by Ficoll method to prepare mature DC by conventional means. DC surface markers were detected by flow cytometry. MTT assay was used to detect the promotion effect of DCs sensitized by different means (MAGE-3, CpG ODN, MAGE-3+CpG ODN, irrelevant control antigen) on the proliferation of T lymphocytes and the killing effect of CTL on BIU-87 tumor cells. The tumor mass of nude mice bearing BIU-87 bladder cell xenograft were examined on Day 7 and 11 after CpG ODN+MAGE-3 sensitized DC treatment. The expression of Bcl-2/Bax protein was detected by Western blotting while the proliferation level of xenograft cells was detected by MTT assay. **Results:** DCs sensitized by CpG ODN combined with MAGE-3 antigenic peptides could promote the proliferation of T lymphocytes and significantly enhance the killing effect of CTL on target BIU-87 cells ($P<0.05$). Compared with other sensitized DCs, *in vivo* experiments showed that 7 and 11 days after treatment, both the tumor volume and weight were significantly reduced (all $P<0.05$), and the proliferation ability of xenograft tumor was decreased ($P<0.05$). Compared with

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No.31500056);山东省高等学校科技计划资助项目(No.J11LF03);济宁市科技助推新旧动能转换计划资助项目(No.2017SMNS001);济宁医学院青年教师科研扶持基金资助项目(JNo.Y2017KJ010)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No.31500056), the Science and Technology Foundation of Higher Education of Shandong Province (No.J11LF03), the Science and Technology Boosting the Old and New Kinetic Energy Conversion Plan of Jining City (No.2017SMNS001), and the Young Teachers Scientific Research Support Fund of Jining Medical College (No.JY2017KJ010)

[作者简介] 李秀真(1970-),女,硕士,教授,主要从事微生物制剂的抗肿瘤作用研究, E-mail:bcde2020@163.com

[通信作者] 谭文彬(TAN Wenbin, corresponding author),博士,教授,主要从事肿瘤发生机制与肿瘤治疗的研究, E-mail:1392144@163.com

other sensitization means, CpG ODN+MAGE-3 especially exhibited obvious inhibitive effect on tumor growth on Day 11, and significantly promoted the proliferation of splenic monocytes of tumor bearing mice ($P<0.01$); moreover, Bcl-2 expression in xenograft tissues significantly decreased ($P<0.01$) while Bax expression significantly increased ($P<0.05$ or $P<0.01$) on Day 3 after treatment. **Conclusion:** CpG ODN can promote the inhibitory effect of MAGE-3 sensitized DC on bladder cancer BIU-87 cells, which will provide experimental basis for clinical application of DC vaccine in bladder cancer treatment.

[Key words] bladder cancer; BIU-87 cell; dendritic cell (DC); CpG oligodeoxynucleotide (CpG ODN); melanoma antigen gene-3 (MAGE-3)

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(9): 891-897. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.09.008]

目前,基于肿瘤抗原的肿瘤治疗性疫苗仍然是国内外关注的重点之一,大量肿瘤疫苗进入了临床研究阶段,有的已进入临床III期。肿瘤抗原的选择则是这一治疗模式的关键环节,其中黑色素瘤抗原基因(melanoma antigen gene, MAGE)抗原家族成员在正常组织中(除睾丸和胎盘外)不表达而常在多种肿瘤组织中表达,且存在着一种MAGE抗原表达于多种不同组织类型的肿瘤中,或者一种组织类型的肿瘤中表达多种MAGE抗原的特点。因此,由MAGE基因编码的抗原肽可以被CTL特异识别^[1-3],引起对肿瘤细胞的特异性免疫杀伤效应^[4-5]。本课题组^[6]前期实验证实,MAGE-3抗原肽致敏的单核细胞来源的DC能诱导CTL细胞活化,继而诱导MAGE-A3抗原特异性免疫应答,并产生了明显的抗肿瘤作用。为了进一步提高上述MAGE-3抗原肽致敏的DC抗肿瘤作用,根据未甲基化胞嘧啶鸟嘌呤(CpG)二核苷酸直接促进DC和巨噬细胞活化的报道^[7-10],本研究选择含CpG序列的细菌寡核苷酸(CpG oligodeoxynucleotide, CpG ODN)为佐剂,通过体内外试验,探讨CpG ODN是否具有免疫佐剂作用及增强疫苗免疫效能,并初步分析其作用机制,为实现膀胱癌DC疫苗的应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞和主要试剂

人膀胱癌BIU-87细胞由本研究室传代培养。RPMI 1640(美国GIBCO公司),L-谷胺酰氨(JRH, 2E1026),Ficoll(上海恒信化学有限公司),MAGE-3抗原九肽LLIIVLAI及MAGE-3无关抗原肽卵清蛋白YSIINFELK(北京中科亚光生物科技有限公司),CpG ODN(ODN2216, ODN2243)(InvivoGen公司, USA)。人粒巨噬细胞集落刺激因子(rhGM-CSF)、重组人白细胞介素4(rhIL-4)、重组人肿瘤坏死因子 α (rhTNF- α)(Pepro Tech公司),CD11b、CD80、CD86、HLA-DR抗体(BD公司)。

1.2 人DC的培养及鉴定

实验室常规方法分离健康自愿者的HLA-A2型外周血单个核细胞(5×10^6 /ml),以37℃、5% CO₂含重

组GM-CSF(1 000 U/ml)和IL-4(1 000 U/ml)的RPMI1640培养。第7天收集非黏附细胞和疏松黏附的增殖性DC聚集体,加入含TNF- α 1 000 U/ml的完全培养基,于6孔板中继续培养2 d。取 5×10^5 个DC, PBS洗2次,CD11b、CD80、CD86、HLA-DR抗体标记,流式细胞仪检测DC纯度及成熟度。

1.3 T淋巴细胞的制备

按照1.2中的材料与方法,取上述同一个体的外周血,Ficoll法常规分离单个核细胞,按照尼龙毛柱法进行T细胞洗脱,流式细胞仪鉴定后留用(T细胞>80%)。

1.4 DC的抗原致敏

收集共培养第9天的DC,调整细胞密度至 3×10^6 个/ml,以50 ng/ml的终质量浓度加入MAGE-3抗原九肽LLIIVLAI、MAGE-3无关抗原肽及CpG ODN,继续培养24 h。阴性对照组加入RPMI 1640培养液,相同时间培养。

1.5 MTT法检测致敏DC对T淋巴细胞增殖率的影响

将获得的T淋巴细胞密度调整为 2×10^5 个/ml,取100 μ l, T:DC为25:1,分别与100 μ l MAGE-3致敏DC(终质量浓度50 ng/ml)、CpG ODN致敏DC(终质量浓度6 μ g/ml)、MAGE-3+CpG ODN致敏DC、无关抗原YSIINFELK致敏DC, RPMI 1640完全培养液为对照组,加入96孔板,37℃、5% CO₂培养箱中培养72 h。MTT法测定细胞增殖状况。增殖率(%)=(实验组D值/对照组D值-1) \times 100%。实验重复3次。

1.6 流式细胞术检测CTL对BIU-87细胞的杀伤作用

收集上述1.5中方法诱导的T淋巴细胞,以T:DC为25:1的比例与上述各组致敏DC混合,加入96孔板,37℃、5% CO₂培养箱中培养72 h,加入100 μ l密度为 2.5×10^4 个/ml及 1.25×10^4 个/ml的BIU-87细胞,继续培养48 h。以流式细胞仪(PI/Annexin V)检测CTL对BIU-87细胞的杀伤作用,杀伤率(%)=(对照组细胞存活率-实验组细胞存活率)/对照组细胞存活率 \times 100%。实验重复3次。

1.7 MAGE疫苗和/或CpG ODN对裸鼠移植瘤生长的影响

按照致敏方法分组:A组,MAGE-3抗原致敏

DC; B 组, CpG ODN 致敏 DC; C 组, MAGE-3 抗原+ CpG ODN 致敏 DC; D 组, 无关抗原 YSIINFEKL 致敏 DC; 对照组, T 淋巴细胞+RPMI 1640 培养液。每组裸鼠 5 只。将上述方法获得的各组 DC 和 T 淋巴细胞, 以每只 1×10^6 个细胞尾静脉注入荷瘤小鼠。根据预实验结果, 于治疗第 11 天观察小鼠肿瘤生长情况, 十字交叉测瘤体直径大小, 计算肿瘤体积 ($V=1/2 \times \text{长径} \times \text{短径}^2$), 称量肿瘤质量变化。

1.8 MTT 法检测荷瘤小鼠脾脏单个核细胞和膀胱移植瘤细胞的增殖情况

分离荷瘤小鼠脾脏单个核细胞, 调整为 2×10^5 个/ml, 取 100 μl 加入 96 孔板中, MTT 法测定脾脏单个核细胞增殖变化。同时分离肿瘤细胞, 调整为 2×10^5 个/ml, MTT 法检测移植瘤细胞的增殖水平。脾脏单个核细胞增殖率 (%) = (实验组 D 值/对照组 D 值 - 1) \times 100%。移植瘤细胞增殖抑制率 (%) = (1 - 实验组 D 值/对照组 D 值) \times 100%。实验重复 3 次。

1.9 Western blotting 法测定荷瘤小鼠瘤组织细胞凋亡蛋白的变化

选择抑瘤效果最为明显的 MAGE3+CpG ODN 组, 在治疗 0、3、7 d 后, 取荷瘤小鼠瘤组织细胞, 采用 Western blotting 实验测定凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 的表达变化。实验重复 3 次。

1.10 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计学软件, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验; 多组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 致敏 DC 表面 CD83、CD86 和 CD80 阳性表达率明显提高

流式细胞仪检测共培养至第 9 天的 DC 结果 (图 1) 显示, MAGE-3 抗原、CpG ODN 和 MAGE-3 抗原+CpG ODN 致敏 DC 的 CD83、CD86 和 CD80 阳性表达率明显高于 RPMI 1640 完全培养液或 YSIINFEKL 无关抗原组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 并以 MAGE-3 抗原+CpG ODN 致敏的 DC 组为最高。

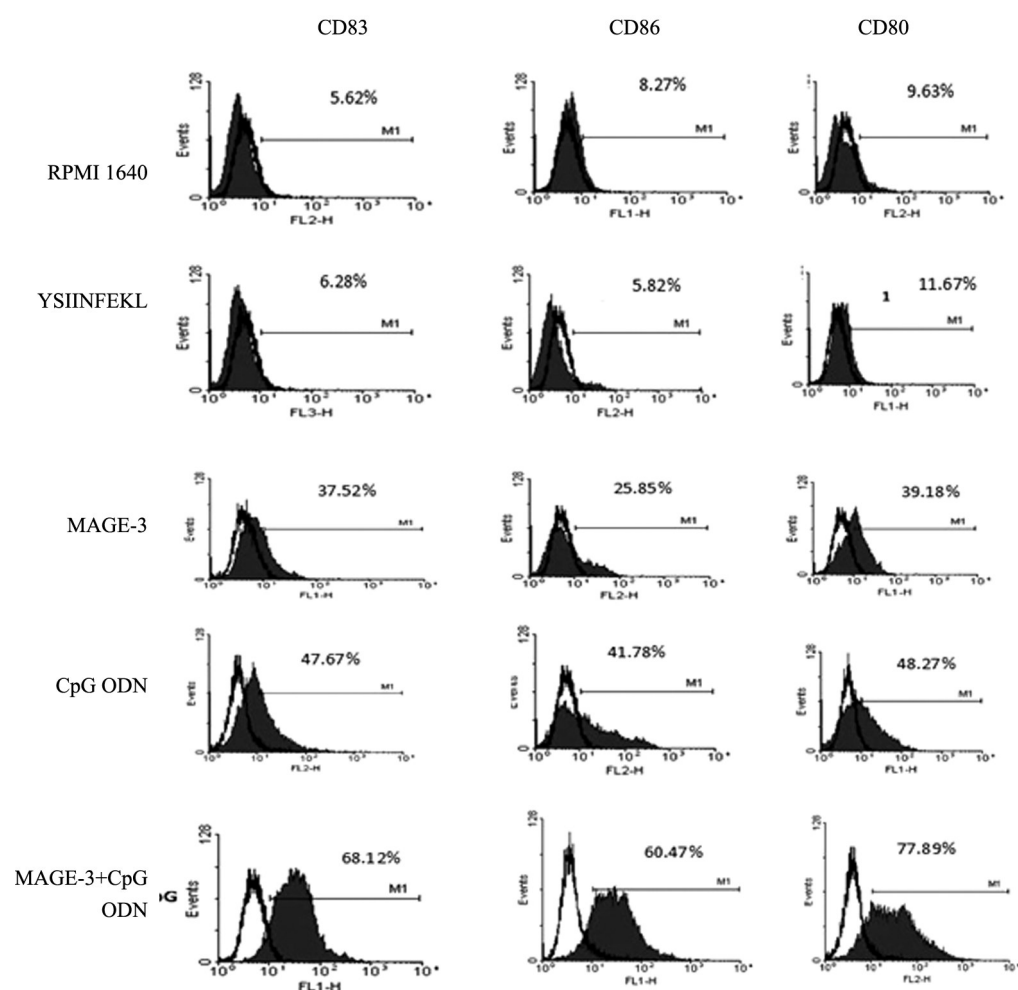
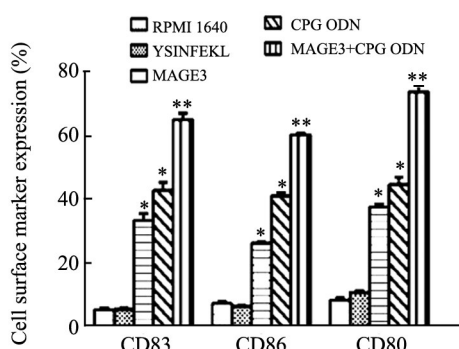


图 1 致敏后各组 DC 表面 CD83、CD86 和 CD80 表达水平的流式图

Fig.1 Flow patterns of expression levels of CD83, CD86 and CD80 on DC surface after sensitization

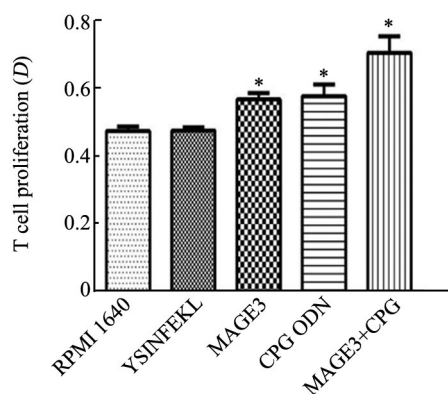


* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs RPMI 1640 or YSINFEKL group

图2 致敏后各组DC表面CD83、CD86和CD80表达水平统计图

Fig.2 Statistical expression of CD83, CD86 and CD80 expression on DC surface after sensitization

2.2 致敏DC疫苗致T淋巴细胞的增殖能力明显增强
不同方式致敏DC后, MAGE-3、CpG ODN和MAGE-3+CpG ODN致敏9 d DC活化T淋巴细胞的增殖能力均明显高于RPMI 1640或YSINFEKL组($P < 0.05$, 图3)。



* $P < 0.05$ vs RPMI 1640 or YSINFEKL group

图3 MAGE-3和/或CpG ODN对T淋巴细胞增殖的影响

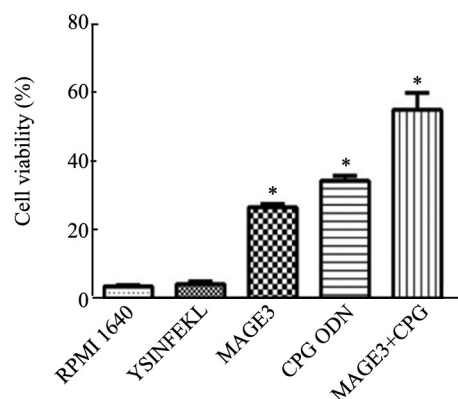
Fig.3 Effects of MAGE-3 and / or CpG ODN on proliferation of T lymphocytes

2.3 致敏DC疫苗明显提高CTL杀伤膀胱癌细胞BIU-87的活性

效靶比为1:25时, 无关抗原YSINFEKL和RPMI 1640培养液致敏DC组无明显诱导CTL对靶细胞BIU-87产生杀伤作用。MAGE-3九肽致敏DC、CpG ODN致敏DC组均诱导CTL对BIU-87的杀伤率, 均显著高于RPMI 1640或YSINFEKL组, 而以MAGE-3+CpG ODN致敏DC组的作用最强($P < 0.05$, 图4)。

2.4 致敏DC疫苗明显抑制裸鼠BIU-87移植瘤的生长
与RPMI 1640完全培养液组、无关抗原YSINFEKL组比较, MAGE-3、CpG ODN或MAGE-3+CpG ODN致敏DC组治疗7 d时移植瘤体积减小。11 d时

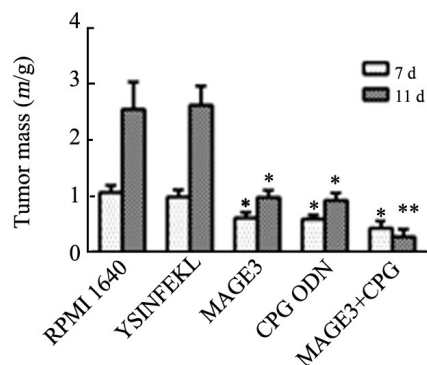
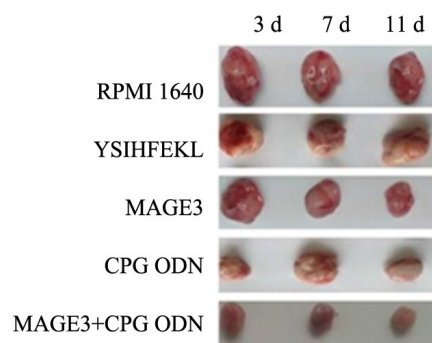
的肿瘤体质量明显降低($P < 0.05$), 并以MAGE-3+CpG ODN致敏DC组11 d时最为明显($P < 0.01$, 图5)。



* $P < 0.05$ vs RPMI 1640 or YSINFEKL group

图4 致敏DC对CTL杀伤靶细胞BIU-87活性的影响

Fig.4 Effect of sensitized DCs on the killing activity of CTL against BIU-87 cells



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs RPMI1640 or YSINFEKL group

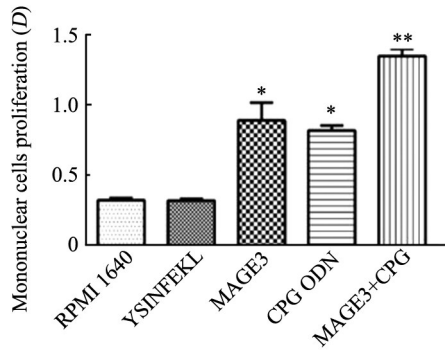
图5 致敏DC治疗7、11 d时各组BIU-87裸鼠移植瘤体质量的变化

Fig.5 Changes of tumor mass of nude mice bearing BIU-87 transplanted xenograft after treatment with sensitized DCs at 7 and 11 d

2.5 致敏DC疫苗明显促荷瘤小鼠脾脏中单个核细胞的增殖率

MTT法检测结果(图6)显示, 免疫治疗荷瘤小鼠11 d时, MAGE-3、CpG ODN和MAGE-3+CpG ODN

较 RPMI 1640 和 YSINFEKL 组均明显促进荷瘤小鼠脾脏单个核细胞的增殖能力($P<0.05$),并以 MAGE-3+CpG ODN 致敏的 DC 组最为明显($P<0.01$)。



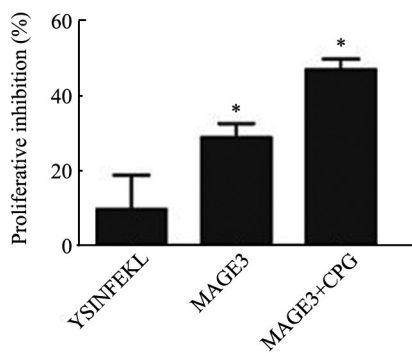
* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs RPMI 1640 or YSINFEKL group

图6 MTT 法检测致敏 DC 治疗 11 d 荷瘤小鼠脾脏中单个核细胞的增殖能力

Fig.6 The proliferative ability of mononuclear cells in splenocytes of tumor bearing mice at Day 11 of sensitized DCs treatment by MTT assay

2.6 致敏 DC 明显抑制 BIU 移植肿瘤组织细胞的增殖能力

MTT 法检测结果(图7)显示,与 YSINFEKL 组增殖抑制率比较,MAGE-3 致敏 DC 或 MAGE-3+CpG ODN 致敏 DC 组对移植瘤组织内 BIU-87 瘤细胞增殖抑制率明显增强($P<0.05$)。



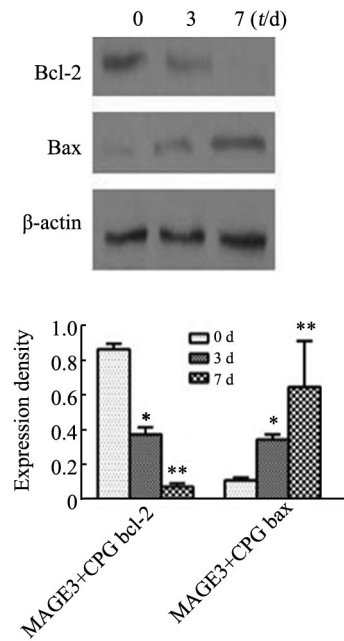
* $P<0.05$ vs YSINFEKL group

图7 MTT 法检测致敏 DC 对移植瘤细胞增殖水平的影响
Fig.7 Effect of the different sensitized DCs on proliferation ability of transplanted tumor cells by MTT

2.7 MAGE-3+CpG ODN 致敏 DC 诱导 CTL 杀伤 BIU 细胞后 Bax/Bcl-2 蛋白表达水平变化

选择抑瘤效果最为明显的 MAGE3+CpG ODN 组,Western blotting 检测结果(图8)表明,治疗第3天和第7天时,移植瘤组织 BIU-87 细胞中 Bcl-2 蛋白表达明显降低,而 Bax 表达明显升高(均 $P<0.05$),均以

治疗第7天时为最明显($P<0.01$)。



* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs 0 d

图8 MAGE3+CpG ODN 致敏组 CTL 杀伤移植瘤 BIU-87 细胞 3 或 7 d 时 Bcl-2、Bax 表达水平的变化

Fig.8 Changes of Bcl-2 and Bax protein in BIU-87 cells killed by CTL in the MAGE3+CpG ODN sensitization group at 3 or 7 d

3 讨论

DC 是专职抗原呈递细胞,在发动原发免疫应答中起关键作用^[11-13]。但是,与正常组织相比,浸润到肿瘤的 DC 明显减少,且细胞功能受损,缺乏抗原呈递能力,大多数不表达 B7,导致免疫耐受等缺陷^[14]。由于 DC 在血液中含量稀少,使得其直接从血液中分离受到限制。因此,用 GM-CSF+TNF- α 或者 GM-CSF+IL-4 等细胞因子在体外诱导 DC 的方法,成为国内外研究的重点^[15],并取得了较好的肿瘤治疗作用。由于从肿瘤宿主获取的单个核细胞培养的 DC 与正常供体培养的 DC 功能相似,因此,用载有肿瘤抗原的体外培养自体 DC 引发肿瘤宿主体内的免疫应答是一个较好的策略^[16]。部分 DC 抗肿瘤免疫临床前期研究取得了初步效果^[17-18]。将载有肿瘤蛋白抗原的颗粒或基因设计表达一个或多个肿瘤抗原的无害细菌与 DC 共同孵育等方法,使 DC 表达肿瘤抗原,甚至可能直接在体内扩增 DC,使其发挥抗肿瘤免疫^[19-23]。本研究选择 MAGE-3 为肿瘤特异性抗原,已有多 MAGE-3 的 CTL 表位被鉴定,它们可分别由 HLA-A1、HLA-A2、HLA-B44、HLA-A24 等分子提呈,

分别用其进行体外刺激健康人或肿瘤患者的外周血单个核细胞或外周血淋巴细胞均可有效诱导产生特异性的、具杀瘤作用的CTL。在本课题组前期实验^[6]中,分离HLA-A2型外周血单个核细胞,用含重组GM-CSF、IL-4和TNF- α 诱导DC,获得的含量高、纯度为91.09%、成熟度为11.92%的DC,成熟DC负载肿瘤特异性抗原MAGE-3致敏DC活化的CTL能明显抑制膀胱癌肿瘤的生长并促使肿瘤消退,且对肿瘤的抑制作用显著高于无关抗原致敏DC,MAGE-3抗原肽负载DC是一种有前景的肿瘤生物治疗方案。

大量研究^[10,24]表明,以未甲基化胞嘧啶鸟嘌呤(CpG)二核苷酸作为一种病原相关分子模式,通过与细胞表面TLR9受体特异性结合,激活TLR/IL-IR信号通路发挥作用。CpG寡核苷酸除了直接促进DC、巨噬细胞成熟和活化,分泌IL-12、IFN- γ 等Th1型细胞因子,还可为T淋巴细胞、NK细胞的活化提供共刺激信号,是一种有重要开发前景的有效Th1型免疫佐剂。为进一步增强MAGE-3九肽致敏DC疫苗免疫效能,本研究选择CpG ODN为疫苗佐剂,观察其刺激DC成熟的功能,结果证实,与MAGE3致敏DC组比较,CpG ODN联合MAGE3抗原致敏DC组更能促进DC成熟,使DC表面CD83、CD86和CD80的表达率分别明显升高至68.112%、60.47%和77.89%,表明CpG ODN能更有效提高DC提呈肿瘤抗原功能。本实验研究显示,体外实验中,CpG ODN联合MAGE-3抗原肽致敏DC组和MAGE3致敏DC组均能显著提高T淋巴细胞增殖能力($P<0.05$),活化的CTL对靶细胞BIU-87的杀伤作用增强。

本研究体内实验证实,MAGE-3抗原肽可使裸鼠移植瘤明显消退,2周生存率达100%,尤其在治疗11 d时,与其他致敏DC组比较,MAGE-3九肽+CpG ODN致敏DC组明显抑制裸鼠BIU-87移植瘤生长,其脾细胞中单个核细胞的增殖水平最高($P<0.01$),同时检测到该组治疗3 d起,小鼠移植瘤细胞增殖明显受到抑制,凋亡蛋白Bcl-2逐渐降低、Bax表达水平逐渐升高,以7 d起更为明显,显示CpG ODN发挥有效的佐剂作用,其优化的负载抗原肽DC疫苗具有明显抑制荷瘤小鼠移植瘤生长。下一步将继续深入探究CpG ODN联合MAGE肿瘤抗原致敏DC疫苗的其他抑瘤机制,如优化疫苗是否通过诱导肿瘤细胞周期阻滞而发挥抑瘤作用^[25],为选择合适疫苗佐剂优化DC疫苗提供更详实实验依据。

[参 考 文 献]

- [1] KIZILBEY K, MANSUROĞLU B, DERMAN S, et al. An in vivo study: adjuvant activity of poly-n-vinyl-2-pyrrolidone-co-acrylic acid on immune responses against melanoma synthetic peptide[J]. *Bioengineered*, 2017, 14(1): 1-10. DOI: 10.1080/21655979.2017.1373529.
- [2] YANG J, LI Z H, ZHOU J J, et al. Preparation and antitumor effects of nanovaccines with MAGE-3 peptides in transplanted gastric cancer in mice[J]. *Chin J Cancer*, 2010, 29(4): 359-364.
- [3] ATANACKOVIC D, ALTORKI NK, STOCKERT E, et al. Vaccine-induced CD4⁺ T cell responses to MAGE-3 protein in lung cancer patients[J]. *J Immunol*, 2004, 172(5): 3289-3296. DOI: 10.1007/s00262-008-0490-9.
- [4] REYNOLDS S R, ORAT Z R, SHAPIRO R L, et al. Stimulation of CD8 T cell responses to MAGE-3 and melan A/MART-1 by immunization to a polyvalent melanoma vaccine[J]. *Int J Cancer*, 1997, 72(6): 972-976.
- [5] MAMHANDM, VAN BARN N, WEYNAMSP, et al. Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-AI[J]. *Int J Cancer*, 1999, 80(2): 219-230. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0215(19990118)80:2<219::AID-IJC10>3.0.CO;2-S.
- [6] LI X Z, HAN Y, TIAN J, et al. Enhancement of dendritic cells with melanoma-associated antigen 3 for inducing cytotoxicity by cytotoxic T lymphocytes on bladder cancer BIU-87 cells[J/OL]. *Genetics Mol*, 2016, 15(3): 15039001[2018-04-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/15039001>. DOI: 10.4238/gmr.15039001.
- [7] NGUYEN H T, NGUYEN T T, WANG Y T, et al. Effectiveness of formalin-killed vaccines containing CpG oligodeoxynucleotide 1668 adjuvants against *Vibrio harveyi* in orange-spotted grouper[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2017, 68(2): 124-131. DOI: 10.1016/j.fsi.2017.07.018.
- [8] TIAN Y, LI M, YU C, et al. The novel complex combination of alum, CpG ODN and HH2 as adjuvant in cancer vaccine effectively suppresses tumor growth in vivo[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(28): 45951-45964. DOI: 10.18632/oncotarget.17504.
- [9] KRAMER K, SHIELDS N J, POPPE V, et al. Intracellular cleavable CpG oligodeoxynucleotide-antigen conjugate enhances anti-tumor immunity[J]. *Mol Ther*, 2017, 25(1): 62-70. DOI: 10.1016/j.yimthe.2016.10.001.
- [10] CHEN J, TIAN X, MEI Z, et al. The effect of the TLR9 ligand CpG-oligodeoxynucleotide on the protective immune response to radiation-induced lung fibrosis in mice[J]. *Mol Immunol*, 2016, 80(1): 33-40. DOI: 10.1016/j.molimm.2016.11.001.
- [11] SHANG N, FIGINI M, SHANG G J, et al. Dendritic cells based immunotherapy[J]. *Am J Cancer Res*, 2017, 7(10): 2091-2102. DOI: 10.1038/cr.2016.157.
- [12] ALBERT M L, SAUTER B, BHARDWAJ N, et al. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs[J]. *Nature*, 1998, 392(6671): 86-89. DOI: 10.1038/32183.
- [13] CHEN D, MELLMAN I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle[J]. *Immunity*, 2013, 9(1): 1-10. DOI: 10.1007/s11538-016-0214-9.
- [14] CAU X P, FAVRE N, MARTIN M, et al. Tumor-infiltrating dendritic cells are defective in their antigen-presenting function and inducible B7 expression in rats[J]. *J Immunother Cancer*, 2016, 4(Suppl1): 217-221. DOI: 10.1186/s40425-016-0173-6.
- [15] SALLUST O F, LANZAVE C, CHIA A. Efficient presentation of soluble antigen by culture human dendritic cells is maintained by

- granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin-4 and down-regulated by tumor necrosis factor alpha[J]. *Exp Med*, 1994,179(4):1109-1118.
- [16] SHIGETAK A S,KENJI S,KOICHI H,et al,Dendritic cell based adjuvant vaccination targeting Wilms tumor patients with advanced colorectal cancer[J]. *Vaccines*, 2015, 3(4): 1004-1018. DOI: 10.3390/vaccines3041004.
- [17] HSU F J,BENIK E C,FAGNON I F,et al.Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells[J]. *Med Sci (Basel)*, 2014, 2(2): 82-97. DOI: 10.3390/medsci2020082.
- [18] SALGALLER M L,TJOAB A,LODGE P A,et al.Dendritic cell-based immunotherapy of prostate cancer[J/OL]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 981434[2018-04-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4168152/>. DOI: 10.1155/2014/981434.
- [19] 宋东, 杨晓玲, 杨雪晶, 等. DC-CIK 免疫治疗晚期胰腺癌的临床疗效分析[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2018, 25(4): 401-406. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.04.014.
- [20] HUANG A Y,GOLUMBEC K D,AHMADZADE H M,et al.The role of bone marrow-derived cells in presenting class I-restricted tumor antigen[J]. *J Immunol*, 2016, 196(4): 1964-1976.DOI: 10.4049/jimmunol.1500541.
- [21] 任飞飞, 李峰, 李砺锋, 等. 定向编辑 CTLA4 基因的向导 RNA 体外合成体系的构建及其编辑效率[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2017,24(12): 1362-1369. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X. 2017. 12.004.
- [22] 郭振红, 曹雪涛. 肿瘤免疫细胞治疗的现状及展望[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2016, 23(2): 149-160. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.02.001.
- [23] VANTOMME V, DANTINNE C, AMRANI N, et al.Immunologic analysis of a phase I/II study of vaccination with MAGE-3 protein combined with the AS02B adjuvant in patients with MAGE-3-positive tumors[J]. *Cancer Immunol*, 2016, 65(1): 25-36. DOI: 10.1007/s00262-015-1770-9.
- [24] 张丽洁, 陈娟娟, 徐翠香, 等. 基于 HCA587 的 HLA-A2 限制性表位肽的体内免疫原性研究[J]. *免疫学杂志*, 2016, 32(1): 25-28. DOI:10.13431/j.cnki.immunol.j.20160005.
- [25] ZHANG L, JIANG G, YAO F, et al. Growth inhibition and apoptosis induced by osthole, a natural coumarin, in hepatocellular carcinoma[J/OL]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e37865[2018-04-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3360675/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0037865.

[收稿日期] 2018-05-12

[修回日期] 2018-07-20

[本文编辑] 王映红