

抗原致敏 IL-12 基因修饰的树突状细胞诱导 抗肾癌免疫的体外研究

罗道升¹, 戴宇平¹, 张琰涓², 赵继宗², 郑伏甫¹, 罗彬¹
(中山大学附属第一医院 1. 泌尿外科, 2. 外科实验室, 广东 广州 510080)

摘要: 【目的】探讨肾癌细胞抗原致敏白介素-12(IL-12)基因修饰的树突状细胞(DC)体外诱导、激活细胞毒性T淋巴细胞(CTL)免疫杀伤肾癌细胞的效能及相关免疫机制。【方法】采用重组逆转录病毒介导IL-12基因修饰人外周血单个核细胞(PBMC)来源的DC, 超声细胞破碎法提取肾癌细胞粗提抗原(Ag)致敏经IL-12转染的DC, ELISA法检测各组DCs和每组CTLs上清中IL-12、IFN- γ 因子的分泌水平; 流式细胞仪(FACS)分析各组DCs表面CD₈₃、CD₈₆、HLA-DR的表达; MTT法检测DC刺激同源T淋巴细胞增殖的能力及CTL免疫杀伤肾癌细胞的效能, 统计学分析比较各组间的差异。【结果】经IL-12基因修饰和抗原致敏后的DC高表达CD₈₃和CD₈₆分子分别为(65.9% \pm 3.1%, 92.8% \pm 3.4%), 分泌高水平IL-12(279.6 \pm 1.7)pg/mL及IFN- γ (892 \pm 31)pg/mL, 刺激同源T淋巴细胞增殖明显, 诱导激活的CTL上清中IFN- γ 水平(1146 \pm 31)pg/mL显著高于对照组; CTL对肾癌细胞有强大的杀伤作用, 显著高于各对照组。【结论】经IL-12基因修饰和抗原致敏后的DC能有效地诱导CTL特异性抗肿瘤免疫应答。其机制可能与IL-12基因修饰和抗原致敏激活了DC抗原提呈第二信号, 促进了DC高分泌IL-12因子, 激活了T淋巴细胞致使CTL分泌IFN- γ 的能力增强密切相关。

关键词: 肾细胞癌; 肿瘤抗原; 白细胞介素-12; 树突状细胞; 肿瘤疫苗

中图分类号: R737.11

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2007)04-0397-05

In Vitro Induction of Specific Anti-tumor Immunity against Renal Cell Carcinoma by Tumor Antigen-pulsed, Interleukin-12 Gene-modified Dendritic Cells

LUO Dao-sheng¹, DAI Yu-ping¹, ZHANG Long-juan², ZHAO Ji-zong², ZHENG Fu-fu¹, LUO Bing¹

(1. Department of Urology, 2. Laboratory of Surgery, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China.)

Abstract: 【Objectives】To investigate the effects of tumor antigen-pulsed and interleukin-12 gene-modified dendritic cells (DCs) in activating cytotoxic T lymphocyte (CTL) inducing specific anti-tumor immunity against renal cell carcinoma (RCC) in vitro as well as the related immunological mechanisms. 【Methods】DCs were derived from human peripheral blood mononuclear cells (hPBMCs), modified by recombinant IL-12 retrovirus, and pulsed with tumor antigen of RCC by ultrasonic cell-disintegrator. The IL-12 and IFN- γ levels in culture supernatant of DCs and CTLs were examined by ELISA. The expression of CD₈₃ and CD₈₆ molecules on DCs surface was measured by FACS. Proliferation capacity of activating autologous T lymphocytes and cytotoxicity of CTL against RCC was evaluated by MTT. 【Results】After being modified by IL-12 gene and pulsed with tumor antigen, DCs produced high level of IL-12 [(279.6 \pm 1.7) pg/mL] and IFN- γ [(892 \pm 31) pg/mL], and increased the expression of CD₈₃ and CD₈₆ molecules (65.9% \pm 3.1%, 92.8% \pm 3.4% respectively). Proliferation of autologous T lymphocytes was also enhanced after stimulated by DC vaccine. DC vaccine could induce and activate CTL to produce high level of IFN- γ [(1146 \pm 31)pg/mL]. "DC-IL-12+Ag" could induce the strongest cytotoxicity of antigen-specific CTL against RCC, significantly compared with other groups. 【Conclusion】After being modified by IL-12 gene and pulsed with RCC tumor antigen, DCs could effectively induce specific immune response against RCC. Owing to IL-12 gene

收稿日期: 2007-03-10

基金项目: 广东省卫生厅基金资助(2002010)

作者简介: 罗道升(1975-), 男, 江西赣州人, 博士生, 讲师, 主要从事泌尿系统肿瘤的临床及基础免疫治疗研究, 戴宇平, 通讯作者, 教授, 博士生导师, E-mail: daiye428@163.net

modification and tumor antigen pulsed, the second signal of antigen presenting of DCs was activated, the functions of IL-12 excretion and T cell activation of DCs was promoted, the capacity of CTL excreting IFN- γ was enhanced, which are relevant to the immune mechanism.

Key words: renal cell carcinoma; tumor antigen; interleukin-12; dendritic cell; tumor vaccine

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(4):397-401]

树突状细胞(dendritic cell, DC)是体内功能最强的抗原提呈细胞,它能直接诱导、增殖、活化 T 淋巴细胞,产生特异性免疫应答^[1],在启动抗肿瘤免疫反应中起关键作用^[2]。研究表明癌组织中 DC 的数量是肿瘤预后的重要参数之一^[3],研究也发现荷瘤宿主体内存在一定数量的 DC,但 DC 的数量、形态、表型异常,免疫能力差^[4]。因此,构建一种以 DC 为基础的瘤苗,对 DC 进行一定的修饰,藉以增强 DC 的免疫功能将能增强肿瘤患者的免疫功能。本研究采用 786-0 肾癌细胞株粗提抗原致敏和 IL-12 基因转染 DC,制备成 DC 瘤苗,观察其体外诱导自体 T 淋巴细胞产生特异性抗肾癌免疫的效能,并对结果进行分析。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 RPMI-1640 购自 Gibco 公司;特优级胎牛血清(FBS)购自 Hyclone 公司;重组人粒细胞-巨噬细胞集落群体刺激因子(rhGM-CSF),重组人白细胞介素-4(rhIL-4),重组人白细胞介素-2(rhIL-2)购自 Peprotech 公司;人 IL-12p70 和 IFN- γ ELISA 检测试剂盒购自晶美公司;FITC 标记的鼠抗人 HLA-DR、CD₈₃、CD₈₆ 抗体均为 PharMingen 及 caltag 公司产品;淋巴细胞分离液(Ficoll-Hypaque)为上海试剂二厂;流式细胞仪为美国 BECKMAN-COULTER(贝克曼-库尔特)公司产品;酶标仪为荷兰 MULTISKAN MK3 公司产品;超声细胞破碎仪为美国 SONICS&MATERIALS 公司产品。

1.1.2 病毒载体和细胞系 PA317-IL-12 重组逆转录病毒由北京大学深圳医院李宝金博士后惠赠,其病毒滴度为 $1.1 \times 10^5 \sim 1.4 \times 10^5$ CFU/mL;786-0 肾癌细胞株购自上海中国科学院细胞库。

1.2 实验分组设计

1.2.1 DC 分组 实验组:抗原致敏 IL-12 基因修饰 DC 组(DC_{IL-12+Ag}); 对照组:抗原致敏 DC 组(DC_{Ag}); 对照组:IL-12 基因修饰 DC 组(DC_{IL-12});

DC 对照组(DC_{naive})。各组样本数均为 6。

1.2.2 CTL 分组 实验组:抗原致敏 IL-12 基因修饰 DC 刺激组(CTL_{DC-IL-12+Ag}); 对照组:抗原致敏 DC 刺激组(CTL_{DC+Ag}); 对照组:IL-12 基因修饰 DC 刺激组(CTL_{DC-IL-12}); 对照组:DC 刺激组(CTL_{DC-naive}); T 细胞对照组(T_{naive})。各组样本数均为 6。

1.3 方法

1.3.1 树突状细胞的体外诱导和培养 外周血来自临床血库新鲜全血 300 mL,每次取 50 mL,用淋巴细胞分离液分离,收集单个核细胞(PBMC),用无钙镁 PBS 液(pH 7.2)洗 2~3 遍,调整细胞浓度为 10^6 cells/mL,接种在两 6 孔板上贴壁,每孔加 2 mL,4 h 后吸去悬浮的淋巴细胞(冻存备用),留下贴壁细胞(DC 前体细胞)加入含 GM-CSF(1000 U/mL)、IL-4(500 u/mL)和 10% FBS 的 RPMI-1640 完全培养液,在 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养,每 2 d~3 d 更换培养液,培养 7 d~9 d 收集 DC 和上清。

1.3.2 树突状细胞的表型检测 收集 DC 并计数,按分组设计,每管细胞数约 10^5 个细胞,采用流式细胞仪检测 DC 表面 CD₈₃、CD₈₆、HLA-DR 的表达。

1.3.3 肿瘤抗原的制备 常规培养并收集 786-0 肾癌细胞,显微镜下计数,根据细胞数的多少按 10^6 /mL 比率用 PBS 重悬,用超声细胞破碎仪 30% 强度(输出功率为 20 kHz)破碎细胞 4~5 min,离心收集上清即为肿瘤粗提抗原,过滤除菌,80℃ 保存备用。

1.3.4 树突状细胞的转染和致敏 DC 培养至第 6 天,按 DC 分组设计,用 PA317-IL-12(MOI 100)常规对 DC 转染 4 h,PBS 液洗涤去除游离病毒后重悬,经 IL-12 基因转染过的 DC(DC-IL-12)在上述条件完全培养液中继续培养,同时加入 786-0 肾癌细胞抗原悬液(抗原细胞 DC 约为 10⁶)混合培养致敏 DC 72 h(为减少实验误差,未转染组在第 4 天时也弃上清重悬)。于转染后第 3 天收集各组 DC 培养上清,ELISA 法检测上清中 IL-12、IFN- γ 的分泌水平,收集的 DC 计数用于诱导、刺激 T 淋巴细胞增殖实验和进行流式细胞检测。

1.3.5 树突状细胞诱导自体 T 淋巴细胞增殖与活化 复苏前述冻存的淋巴细胞, 尼龙毛柱法分离纯化, 获得 T 淋巴细胞, 按分组设计, 按 DC 淋巴细胞=1:10 比例, 将 DC 和淋巴细胞在含 IL-2 (200 U/mL)、10% FBS 的 RPMI-1640 培养液中, 37℃、5% CO₂ 条件下混合培养, 每 2~3 d 加入少量更高浓度 IL-2 因子的培养液, 不更换原培养液以免丢失细胞, 第 6 天收集各组细胞(CTL)和培养上清, ELISA 检测上清中 IL-12、IFN- γ 因子的分泌水平; MTT 法测定各组淋巴细胞增殖情况, 按公式计算刺激指数(SI)。SI = [(反应组 A 值 - 淋巴细胞组 A 值) / DCs 组 A 值] / 淋巴细胞组 A 值; 对照组 T 淋巴细胞增殖指数 = [(淋巴细胞组 A 值 - 增殖前淋巴细胞组 A 值) / 增殖前淋巴细胞组 A 值]。

1.3.6 细胞毒实验 以 5 组 CTL 为效应细胞, 786-0 肾癌细胞为靶细胞, 效靶比均设计为 50:1, 25:1 和 10:1 进行细胞毒实验, MTT 法测定细胞毒性, 计算杀伤率。效应细胞对靶细胞的杀伤率 = [(靶细胞 A 值 + 相应效应细胞 A 值 - 效靶混合细胞 A 值) / 靶细胞 A 值] \times 100 %

1.4 统计学分析

所有变量均表示为表示, 采用 SPSS11.0 软件包, 各组之间比较用单因素方差分析(ONEWAY ANOVA), 各组间比较用最小差异法(LSD), 与实验组比较用 DUNNETT 法比较, 以双侧 P < 0.05 为有统计学意义。

2 结果

2.1 DC 体外培养和表型检测

每 50 mL 外周血收集到的 PBMC 经 rhGM-CSF 与 rhIL-4 细胞因子体外共培养 7 d 后, DC 呈集落增殖, 由 2.5 \times 10⁵ 增至约 2.0 \times 10⁶, 倒置显微镜下可观察到细胞有大量的星状、树枝状突起, 细胞形态大小不一, 为悬浮生长, 具有典型的 DC 特征。未经任何处理的 DC 第 7 天仍处于非成熟状态, CD₈₃ 表达低(10.0% \pm 1.1%), 经 IL-12 基因修饰和/或抗原致敏后的 DC 第 7 天表现成熟, 抗原提呈能力增强, 其表面的成熟标志分子 CD₈₃ 及共刺激分子 CD₈₆ 高表达, 其中以 DC_{IL-12+Ag} 组最高(分别为 65.9% \pm 3.1% 和 92.8% \pm 3.4%), CD₈₃、CD₈₆ 各组间比较具有统计学差异(表 1)。

表 1 抗原致敏、IL-12 修饰对 DC 表面分子的影响

Table 1 The expression of CD₈₃, CD₈₆, HLA-DR molecules on DCs surface ($\bar{x} \pm s$, %)

Groups	n	CD83	CD86	HLA-DR
DC _{IL-12+Ag}	6	65.9 \pm 3.1	92.8 \pm 3.4 ¹⁾	93.9 \pm 1.9
DC _{Ag}	6	52.8 \pm 2.3	85.1 \pm 2.8 ²⁾	91.7 \pm 2.5
DC _{IL-12}	6	34.1 \pm 1.8	68.8 \pm 2.8	93.2 \pm 3.0
DC _{naive}	6	10.0 \pm 1.1	55.3 \pm 2.3	91.5 \pm 4.2
P		< 0.01	< 0.01	> 0.05

CD cluster of differentiation antigen; HLA-DR human leukocyte antigen (locus DR :1) compared with 2), P < 0.05

2.2 抗原致敏和 IL-12 基因修饰促进 DC 分泌 IL-12、IFN- γ

ELISA 检测结果显示, 按 1 \times 10⁶ DCs/mL 计算, 经 IL-12 基因修饰、抗原致敏后的 DC 能高分分泌 IL-12 和 IFN- γ 因子, 其中以 DC_{IL-12+Ag} 组最高, 各组间比较具有统计学差异, P < 0.01 (表 2)。

表 2 抗原致敏、IL-12 修饰的 DC 培养上清中 IL-12、IFN- γ 含量

Table 2 The IL-12 and IFN- γ levels in culture supernatant of DCs ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

Groups	n	IL-12	IFN- γ
DC _{IL-12+Ag}	6	279.6 \pm 1.7	892 \pm 31
DC _{Ag}	6	105.8 \pm 4.2	512 \pm 22
DC _{IL-12}	6	217.1 \pm 1.6	684 \pm 20
DC _{naive}	6	31.5 \pm 3.1	212 \pm 15
P		< 0.01	< 0.01

DCs dendritic cells

2.3 抗原致敏和 IL-12 基因修饰的 DC 诱导、促进 T 淋巴细胞增殖

经抗原致敏和 IL-12 基因修饰的 DC 明显诱导、促进 T 淋巴细胞增殖, 以 DC_{IL-12+Ag} 组最显著, T 淋巴细胞增殖刺激指数为 9.88, 未经刺激的 T 淋巴细胞在 IL-2 培养条件下也能少量增殖, 增殖指数为 1.16, 组间比较差异有统计学意义(表 3)。

2.4 抗原致敏和 IL-12 基因修饰的 DC 促进 CTL 分泌 IFN- γ , DC 继续分泌 IL-12

ELISA 检测结果显示, 经 IL-12 基因修饰、抗原致敏后的 DC 能有效地诱导 T 淋巴细胞活化, 促进 CTL 分泌高水平的 IFN- γ 因子, DC 瘤苗仍继续高分分泌 IL-12 因子, 其中以实验组最高, 分别为(1 146 \pm 31)pg/mL 和(215 \pm 25)pg/mL, 与其他组比

较具有统计学差异(表 4)。

表 3 DCs 刺激 T 淋巴细胞增殖反应

Table 3 The proliferation of autologous T lymphocytes after stimulated by DCs ($\bar{x} \pm s$)

Groups	A value	SI
CTL _{DC-IL-12+Ag}	1.0823 ± 0.0154	9.88 ¹⁾
CTL _{DC+Ag}	0.8374 ± 0.0097	7.17
CTL _{DC-IL-12}	0.8805 ± 0.0105	7.64
CTL _{DC-naïve}	0.5744 ± 0.0647	4.34
T _{naïve}	0.0412 ± 0.0025	1.16
DC _{IL-12+Ag}	0.1129 ± 0.0832	-
DC _{Ag}	0.1095 ± 0.0521	-
DC _{IL-12}	0.1107 ± 0.1109	-
DC _{naïve}	0.0986 ± 0.0453	-
T _{cells}	0.0981 ± 0.0038	-

A :absorbances ;SI :simulation index ;1) compared with the control groups, P< 0.01

表 4 抗原致敏、IL-12 修饰的 CTL 培养上清中 IL-12、IFN- 含量

Table 4 The IL-12 and IFN- levels in culture supernatant of CTLs ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

Groups	n	IL-12	IFN-
CTL _{DC-IL-12+Ag}	6	215 ± 25	1146 ± 31
CTL _{DC+Ag}	6	78 ± 25	762 ± 22
CTL _{DC-IL-12}	6	171 ± 19	817 ± 26
CTL _{DC-naïve}	6	28 ± 3	387 ± 16
T _{naïve}	6	-	266 ± 16
P		< 0.01	< 0.01

CTLs :cytotoxic T lymphocytes

表 5 肿瘤特异性 CTL 对肾癌细胞的杀伤效能

Table 5 The cytotoxicity against RCC of antigen-specific CTL ($\bar{x} \pm s$, %)

Groups	n	Effective cells to target cells					
		50	1	25	1	10	1
CTL _{DC-IL-12+Ag}	6	79.1 ± 5.3		70.0 ± 5.1		31.8 ± 1.9	
CTL _{DC+Ag}	6	54.3 ± 1.8 ¹⁾		41.8 ± 3.4 ²⁾		20.5 ± 2.2 ³⁾	
CTL _{DC-IL-12}	6	48.6 ± 2.6 ¹⁾		34.5 ± 2.1 ²⁾		18.3 ± 2.4 ³⁾	
CTL _{DC-naïve}	6	30.7 ± 1.4		22.7 ± 3.0		10.0 ± 2.9	
T _{naïve}	6	12.6 ± 3.0		7.9 ± 4.2		3.1 ± 3.4	
P		< 0.01		< 0.01		< 0.01	

Compared between 1) ,P< 0.05 ;Compared between 2) ,P< 0.05 ; Compared between 3) ,P >0.05

2.5 细胞毒实验

经转染、致敏后的 DC 能诱导 CTL 对肾癌细胞发挥强烈的杀伤作用,杀伤率随效靶比的升高而增强,其中以 DC_{IL-12+Ag} 组最强;DC_{naïve} 组也表现有一定的杀伤作用,而且比单纯 T 细胞对照组强,可能是 DC 在体外未受到肿瘤环境的长期抑制作用,T 细胞对照组在效靶比高时也表现有一定的杀伤力,可能为非特异性免疫杀伤作用(表 5)。

3 讨论

DC 是人体内最重要的专职抗原提呈细胞,在启动抗肿瘤免疫反应中起关键作用^[2,5]。以 DC 为基础的各种形式的 DC 多价疫苗已经广泛研究^[6-9],并取得了初步成效。白细胞介素 12 (IL-12) 由 p35 (IL-12A)及 p40(IL-12B)两条多肽链组成,是一种重要的细胞因子,有明显的抗肿瘤免疫作用,主要由 DC、M 等抗原提呈细胞分泌产生,具有激活 NK 细胞、促进 T 细胞增殖分化、促进 CD₄₀⁺TH₀ 细胞分化为 TH₁ 细胞,可诱导静息的和激活的 T 淋巴细胞产生 IFN- γ ,促进 IFN- γ 、IFN- β 和 IL-2 合成,同时可上调 CD₈₀、CD₈₆ 等多种共刺激分子的表达,从而增强 DC 提呈抗原能力,诱导 CTL 产生特异性免疫应答^[10-12]。

本研究以 786-0 肾癌细胞株肿瘤抗原体外致敏 IL-12 基因修饰的 DC,制备成 DC 疫苗,观察到其能诱导 CTL 特异性杀伤 786-0 细胞效能显著,明显强于对照组。实验结果显示 DC_{IL-12+Ag} 组 DC 高表达成熟分子标记 CD₈₃ 和共刺激分子 CD₈₆,提示 DC 提呈抗原能力增强;DC_{IL-12+Ag} 组上清中 IL-12、IFN- γ 水平高于对照组,而 IL-12 对 CD₄⁺T 细胞、NK 细胞有促进作用,这也解释了实验中 DC_{IL-12+Ag} 组和 DC_{IL-12} 组对 T 淋巴细胞的增殖作用强于其他组,这种 DC-IL-12+Ag 疫苗持续分泌 IL-12,IL-12 持续刺激 T 细胞增殖、活化,发挥强大的抗肿瘤免疫。综合其免疫机制可能是 DC-IL-12+Ag 疫苗综合了对照组 DC_{IL-12}、DC_{Ag} 疫苗的优点,又保持了 DC 本身的特点,即在增强了抗原提呈能力,增强了诱导激活 CTL 发挥特异性抗肿瘤细胞免疫,同时又持续高分分泌 IL-12、IFN- γ 因子发挥非特异性抗肿瘤体液免疫,从而起到协同抗肿瘤作用。另外,在荷瘤宿主中,肿瘤细胞能释放一些免疫抑制因子,如转化生长因子 (TGF)、血管内皮生长因

(VEGF)和白细胞介素 4(IL-4),可降低 DC 细胞表面的 MHC 分子和共刺激分子 B7 的表达,使其分泌 IL-12 能力下降,从而不能有效激活 T 细胞杀伤肿瘤细胞^[13]。也有研究发现,肿瘤细胞不仅可以诱导 DC 细胞凋亡,而且可以抑制 DC 细胞产生和成熟,导致肿瘤微环境中 DC 缺失功能表达^[4]。为此,有针对性地改变 DC 所处肿瘤微环境相关细胞因子的浓度,可以提高 DC 抗原呈递和抗肿瘤免疫效应。DC-IL-12+Ag 瘤苗因能持续高分分泌 IL-12 因子,从而可以解除宿主因肿瘤释放的 IL-10、IL-4、VEGF 等多种因子对 DC 功能的抑制作用,这为 DC-IL-12+Ag 瘤苗回输体内发挥抗肿瘤作用提供了理论依据。

临床上肾癌的表现具有隐蔽性,出现“三联征”大部分已是晚期^[14],晚期肾癌根治术并不能达到根治的目的。肾癌对放疗和化疗均不敏感,由于肾癌是一种免疫原性很强的肿瘤,所以对晚期肾癌的治疗上免疫治疗有其独特的优势,这为 DC 疫苗开辟了前景。本研究虽为体外实验,但为进一步深入临床应用,探索肾癌的免疫治疗提供了重要的依据。

参考文献:

- [1] AVIGAN D. Dendritic cells: development, function and potential use for cancer immunotherapy [J]. *Blood Rev*, 1999,13(1):51-64.
- [2] NAIR S K. Immunotherapy of cancer with dendritic cell-based vaccines [J]. *Gene Ther*, 1998, 5(11): 1445-1446.
- [3] HAMADA, IKUTO. A clinical study on tumor-associated monocyte lineage cells in renal cell carcinoma [J]. *Acta Urologica Japonica*, 2002, 48(4): 213-220.
- [4] ALMAND B, RESSER J R, LINDMAN B, et al. Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer [J]. *Clinical Cancer Research*, 2000, 6(5): 1755-1766.
- [5] 张双民,吴忠道. 树突状细胞疫苗治疗肿瘤的实验研究进展 [J]. *热带医学杂志*, 2006, 6(11):1230-1233.
- [6] OOSTERWIJK - WAKKA J C, TIEMESSEN D M, BLEUMER I, et al. Vaccination of patients with metastatic renal cell carcinoma with autologous dendritic cells pulsed with autologous tumor antigens in combination with interleukin-2: a phase 1 study [J]. *J Immunother*, 2002, 25(6): 500-508.
- [7] RINGHOFFER M, GSCHWEND J E. Specific cellular immunotherapy for renal cell cancer: Current state and future perspectives [J]. *J Urol*, 2002, 41(3): 249-257.
- [8] FONG L, BROCKSTEDT D, BENIKE C, et al. Dendritic cells injected via different routes induce immunity in cancer patients [J]. *J Immunol*, 2001, 166(6): 4254-4259.
- [9] HOLTL L, RIESER C, PAPERH C, et al. Cellular and humoral immune responses in patients with metastatic renal cell carcinoma after vaccination with antigen pulsed dendritic cells [J]. *J Urol*, 1999,161(3): 777-782.
- [10] TATSUMI T, TAKEHARA T, KANTO T, et al. Administration of interleukin -12 enhances the therapeutic efficacy of dendritic cell-based tumor vaccines in mouse hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2001,61(20): 7563-7567.
- [11] MELERO I, MAZZOLINI G, NARVAIZA I, et al. IL-12 gene therapy for cancer: in synergy with other immunotherapies [J]. *Trends Immunol*, 2001,22(3):113-115.
- [12] ZEUTHEN L H, CHRISTENSEN H R, FROKIAER H, et al. Lactic acid bacteria inducing a weak interleukin-12 and tumor necrosis factor alpha response in human dendritic cells inhibit strongly stimulating lactic acid bacteria but act synergistically with gram negative bacteria [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2006, 13(3):365-375.
- [13] DANNULL J, SU Z, RIZZIERI D, et al. Enhancement of vaccine mediated anti tumor immunity in cancer patient after depletion of regulatory T cells [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(11):3623-3633.
- [14] LEIBOVICH B C, PANTUCK A J, BUI M H, et al. Current staging of renal cell carcinoma [J]. *Urol Clin North Am*, 2003, 30(3):481-497.

(编辑 徐杰)