

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.01.005

· 专题报道 ·

趋化因子 SLC 和免疫佐剂 CpG-ODN 联合应用对小鼠移植黑素瘤的疗效

许相范¹, 许振柱², 唐丽华¹, 李安娜³, 徐显辉¹, 柳春宝¹ (厦门市第二医院 1. 病理科; 2. 检验科; 3. 呼吸科, 福建厦门 361021)

[摘要] 目的: 探讨次级淋巴组织趋化因子(secondary lymphoid tissue chemokine, SLC)和 CpG 寡聚脱氧核苷酸(CpG oligodeoxynucleotide, CpG-ODN)联合应用对小鼠移植黑素瘤的治疗效果及其可能机制。方法: 制备 SLC-Fc 融合蛋白, 体外检测 SLC-Fc 对小鼠淋巴细胞的趋化效应。建立小鼠黑素瘤移植模型, 随机分生理盐水对照组、CpG-ODN 组、SLC-Fc 组以及 SLC-Fc + CpG-ODN 组共 4 组。观察治疗后各组小鼠肿瘤的生长情况, 流式细胞术检测移植瘤组织中淋巴细胞的种类和浸润情况。结果: 成功制备 SLC-Fc 蛋白, SLC-Fc 对小鼠淋巴细胞具有剂量依赖性(0.03、0.3 和 3 $\mu\text{g/L}$)趋化作用。瘤内注射 SLC-Fc 和(或)CpG-ODN 明显抑制肿瘤的生长, 联合治疗组瘤体明显小于对照组($P < 0.01$), 并且小鼠存活时间也明显延长。联合治疗组瘤体内 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞和 CD11c⁺ 树突状细胞较对照组显著增多($P < 0.05$, $P < 0.01$), 并且其肿瘤引流淋巴结也明显增大。结论: SLC 和 CpG-ODN 联合应用对小鼠移植黑素瘤有抑制作用, 其机制与趋化 CD4⁺ T、CD8⁺ T 细胞和促进 DCs 增殖有关。

[关键词] 次级淋巴组织趋化因子; CpG 寡聚脱氧核苷酸; 黑素瘤; 抗肿瘤免疫

[中图分类号] R739.5; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2010)01-0025-05

Therapeutic effect of chemokine SLC combined with immune adjuvant CpG-ODN in treatment of implanted mouse melanoma

XU Xiang-fan¹, XU Zhen-zhu², TANG Li-hua¹, LI An-na³, XU Xian-hui¹, LIU Chun-bao¹ (1. Department of Pathology; 2. Department of Clinical Laboratory; 3. Department of Respiratory Diseases, Second Hospital of Xiamen, Xiamen 361021, Fujian, China)

[Abstract] **Objective:** To study the therapeutic effect of secondary lymphoid tissue chemokine (SLC) combined with CpG oligodeoxynucleotide (CpG-ODN) in treatment of implanted mouse melanoma and the possible mechanism. **Methods:** SLC-Fc fusion protein was prepared and its chemotaxis of lymphocytes was detected by chemotaxis assay. Implanted melanoma mouse models were established and randomly divided into 4 groups: control group, SLC-Fc group, CpG-ODN group, and SLC-Fc + CpG-ODN group. The growth of implanted tumors in each group was observed after treatment. Sub-type and infiltration of lymphocytes in implanted tumor tissues were examined by flow cytometry. **Results:** SLC-Fc protein was successfully prepared, and it dose-dependently attracted lymphocytes (0.03, 0.3, and 3 $\mu\text{g/L}$). Intra-tumor injection SLC-Fc and CpG-ODN alone or in combination significantly inhibited growth of B16-implanted tumors. Tumor size in SLC-Fc + CpG-ODN group was significantly smaller than that in control group ($P < 0.01$), and animals in SLC-Fc + CpG-ODN group survived longer. Tumor-infiltrated CD4⁺ T, CD8⁺ T, and dendritic cells (DCs) in SLC-Fc + CpG-ODN group were markedly increased as compared with those in control group ($P < 0.05$), and tumor draining lymph nodes were dramatically enlarged. **Conclusion:** SLC combined with CpG-ODN can inhibit the growth of implanted melanoma by attracting CD4⁺ T and CD8⁺ T and promoting proliferation of DCs.

[Key words] secondary lymphoid tissue chemokine (SLC); CpG-ODN; melanoma; antitumor immunity

[Chin J Cancer Biother, 2010, 17(1): 25-29]

[基金项目] 厦门市科技局计划指导性项目(No. 3502z20089020)。Project supported by the Scientific Constructive Program of Science and Technology Bureau of Xiamen(No. 3502z20089020)

[作者简介] 许相范(1970-),男,福建省厦门市人,博士,主治医师,主要从事肿瘤病理的研究

[通信作者] 许相范(XU Xiang-fan, corresponding author), E-mail: xfxu94@sina.com.cn

抗肿瘤免疫中能够攻击肿瘤细胞的 T 细胞和激活 T 细胞所需的抗原提呈细胞(antigen-presenting cell, APC)尤其重要^[1]。APC 在肿瘤周边摄取肿瘤相关抗原后转移到邻近的淋巴结内激活 T 淋巴细胞, 被激活的淋巴细胞转移到肿瘤所在部位引起抗肿瘤效应^[2-3]。但 APC 位于周边组织中, 淋巴细胞位于淋巴结内, 故该两种细胞不易迅速聚集到肿瘤组织。次级淋巴组织趋化因子(secondary lymphoid tissue chemokine, SLC)诱导淋巴细胞和 APC, 并由 CpG 寡聚脱氧核苷酸(CpG oligodeoxynucleotide, CpG-ODN)激活这些效应细胞而加强抗肿瘤效应。

SLC 是体内重要的 CC 型亚族趋化因子成员, 由高内皮微静脉、脾脏和淋巴结的 T 细胞带中所分泌。SLC 能趋化体内多种淋巴细胞到外周组织或器官, 与初始型和(或)激活 T 淋巴细胞归巢及成熟 DC 向淋巴组织的迁移有密切关系^[4-5]。CpG-ODN 是一种人工合成的 CpG 寡聚脱氧核苷酸, 是一种高效低毒的免疫佐剂, 可激活 T 细胞、B 细胞、巨噬细胞、DC 等免疫细胞, 刺激免疫细胞产生多种细胞因子和细胞表面黏附分子, 诱导 Th1 型免疫应答, 产生较强的体液免疫和细胞免疫效应^[6-7]。

本研究利用体外合成的 SLC 和 CpG-ODN, 在小鼠黑素瘤细胞移植瘤内分别或联合注射两种药物并观察其抗肿瘤效果。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料

小鼠黑素瘤细胞株 B16F10 购自美国 ATCC, 小鼠骨髓瘤细胞株 NSO 购自 ECACC(No. 85110503)。无血清 Ultra Culture 培养液购自 BioWhittaker 公司。RPMI 1640 培养液、质粒 pMT-V5-HisA、pcDNA3.1 和 lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司。含有 CpG 寡聚脱氧核苷酸 5'-TCCATGACGTTTCCT-GACGTT-3' 基序的单股 DNA 购自 Geno Tech 公司。DNA 聚合酶及各种限制酶购自 TaKaRa 公司。标有荧光素抗体, 如 APC-anti-CD4、Cych-anti-CD8 或 PE-anti-CD11c、FITC-anti-CD86 等购自 Phar Mingen 公司。10~12 周龄、雄性 C57BL/6J(H-2b)小鼠(动物合格证号为 M04-3018)购自 Seoul Polas International 公司。

1.2 细胞培养

小鼠黑素瘤细胞株 B16F10 和小鼠骨髓瘤细胞株 NSO 以及原代淋巴细胞均在含有 10% 灭活小牛血清和 1% 抗生素的 RPMI 1640 培养液中, 置 37℃、5% CO₂ 饱和湿度的细胞培养箱内培养。转

染基因后稳定的 NSO 细胞株在含有 1% L-谷氨酰胺和 1% 抗生素的无血清 UltraCulture 培养液中培养。

1.3 质粒的构建及 SLC-Fc 蛋白的制备

C57BL/6J 小鼠的淋巴结中提取总 RNA 后, 用寡聚 dT 引物反转录制作 cDNA。根据小鼠 SCL(NCBI # NM_011124)基因序列设计 PCR 引物, 上游引物: 5'-CCGCTCGAGGCCACCATGGCTCAGA-3' (下划线的部分为 Xho I 的酶切部位), 下游引物为: 5'-GAAGATCTTCTTCTTGAGGG-3' (下划线的部分为 Bgl II 的酶切部位)。反应条件是 95℃/1 min, 56℃/1 min 及 72℃/1 min 循环 30 次。PCR 产物大小为 402 bp, 该 PCR 产物引入质粒 pMT-V5-HisA-Fc 的 Xho I 和 Bgl II 的酶切位点内, 形成 pMT-V5-HisA-SCL-Fc 质粒。转染于 *E. coli* DH5, 挑取阳性克隆, 经酶切鉴定并基因测序核准后再扩增提取 pMT-V5-HisA-SCL-Fc 质粒, 并用 EcoR I 和 Xba I 酶切并回收含有 SCL-Fc 基因片段; 融合于质粒 pcDNA3.1 中, 再次扩增和 DNA 测序核准。用 lipofectamine 2000 转染于 NSO 细胞株, 含有 0.5 mg/ml Geneticin(G418)筛选培养液中培养并提取实验所需的 SLC-Fc 蛋白。

1.4 Transwell 小室法检测细胞的移行趋化

基因转染后稳定的 NSO 细胞株在含有 1% L-谷氨酰胺和 1% 抗生素的无血清 UltraCulture 培养液里培养 60 h。C57BL/6J 小鼠剥离淋巴结, 用 2 张病理玻片的毛玻璃面碾磨后用尼龙过滤网(70 μm)滤过, 再用含有 10% FBS 的 RPMI 1640 细胞培养液中悬浮备用。趋化分析过程用 24 孔板, 配有直径为 6.5 μm、5 μm 孔隙的聚碳酸酯膜进行。阳性对照组为 300 ng/L 的 rSLC, 实验组为所合成的 SLC-Fc 浓缩液 3 μg/L、300 ng/L 和 30 ng/L, 阴性对照组为细胞培养液。细胞数为含 1×10⁶ 的 100 μl 细胞悬液; 加入聚碳酸酯膜 Transwell 插板内, 然后放置于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度的细胞培养箱内, 4 h 后收集下室细胞, 计数, 并用 Cych-anti-CD4 和 FITC-anti-CD8 常规染色后用流式细胞术分析。

1.5 小鼠黑素瘤模型的制备及治疗实验

使用 10~12 周龄的雄性 C57BL/6J(H-2b)小鼠建立黑素瘤动物模型^[8], 并随机分 4 组: 第 1 组设为生理盐水对照组; 第 2 组为 CpG-ODN 组, 肿瘤细胞接种后的第 4、6 天分别用微量注射法在瘤体内注射 20 μg 的 CpG-ODN; 第 3 组为 SLC-Fc 组, 第 4、6 天分别注射 3 μg 的 SLC-Fc; 第 4 组是联合治疗组, 第 4、6 天, 分别注射 SLC-Fc 3 μg 和 20 μg 的 CpG-ODN。每周 2 次观察各组小鼠肿瘤的生长情况, 记

算瘤体体积(宽×长×高)。

1.6 流式细胞术检测荷瘤鼠引流淋巴结中免疫细胞的分布

荷瘤小鼠引流淋巴结以载玻片的毛玻璃面研磨制成细胞悬液,用尼龙网(70 μm)过滤,加入 APC-anti-CD4、Cych-anti-CD8、FITC-anti-CD25 常规染色后用流式细胞术分析。

1.7 流式细胞术检测移植瘤组织中淋巴细胞的浸润

荷瘤小鼠中剥离出瘤体,切成小块,用胶原酶消化移植瘤组织、尼龙网过滤制备成单细胞悬液,APC-anti-CD4、Cych-anti-CD8、PE-anti-CD11c、FITC-anti-CD86 常规染色后用流式细胞术分析。

1.8 统计学处理

采用 Sigma Plot 10.0 统计学软件进行处理,两组间均数比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 pcDNA3.1-SLC-Fc 质粒的成功构建

构建了含有小鼠 *SLC* 基因的 pcDNA3.1-/SLC-Fc 质粒(图1),并用 lipofectamine 2000 转染于 NSO 细胞株,大量生产 SLC-Fc 蛋白用于后续体外及体内动物实验。

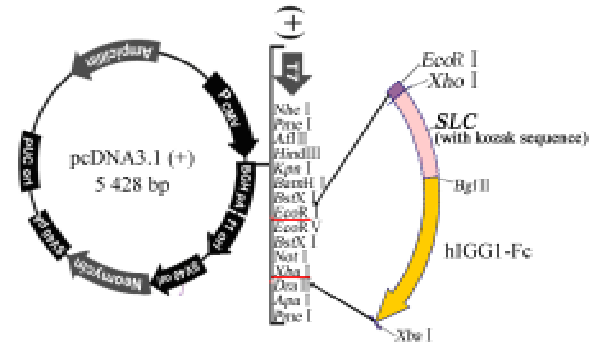


图1 pcDNA3.1-/SLC-Fc 质粒的构建

Fig.1 Construction of pcDNA3.1-/SLC-Fc plasmid

2.2 SLC-Fc 蛋白对小鼠淋巴细胞具有浓度依赖的趋化作用

Transwell 小室法检测体外合成的 SCL-Fc 蛋白的趋化活性,结果显示,实验组与对照组相比总淋巴细胞数多了 10 倍;并且,SLC-Fc 对淋巴细胞的趋化作用具有浓度依赖性。结果还显示,浓度为 3 μg/L 时 SCL-Fc 表现出很强的趋化作用,尤其对 CD4 和 CD8 淋巴细胞趋化作用最明显(图2,图3)。

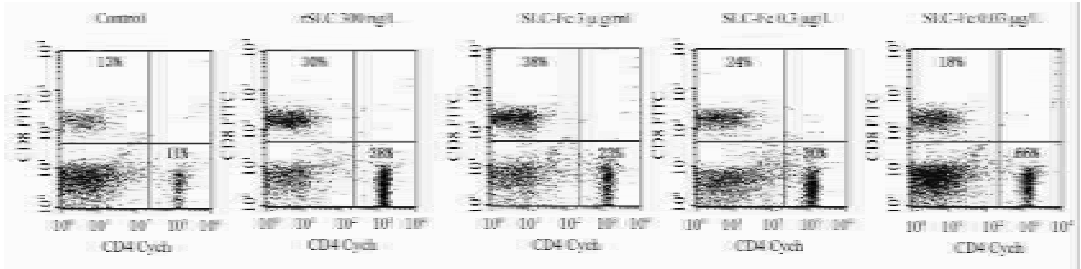


图2 SLC-Fc 蛋白浓度依赖性趋化 CD4、CD8 细胞

Fig.2 SLC-Fc protein dose-dependently attracted CD4 and CD8 cells

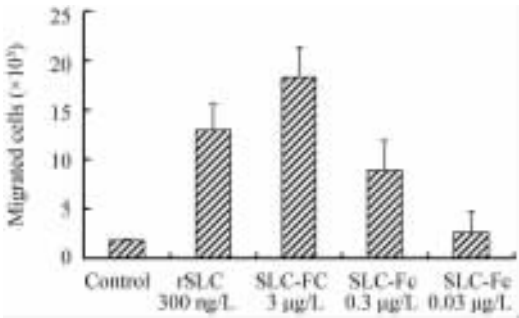


图3 SLC-Fc 蛋白浓度依赖性趋化淋巴细胞

Fig.2 SLC-Fc protein dose-dependently attracted lymphocytes

2.3 SLC-Fc 和 CpG-ODN 单独或联合应用对小鼠

黑色素移植瘤的抑制

治疗实验观察 SLC-Fc 和 CpG-ODN 对小鼠黑色素瘤模型的抗肿瘤活性。结果 SLC-Fc 和 CpG-ODN 单独治疗组的肿瘤体积均有明显抑制,当两种蛋白联合治疗时瘤体体积更明显被抑制(图4)。联合治疗组小鼠中 4 只荷瘤小鼠存活时间超过 60 d,但对照组及其他实验组小鼠 30 d 内死亡或瘤体过大猝死处理。

2.4 SLC-Fc 和 CpG-ODN 对荷黑色素瘤小鼠免疫系统的影响

为了探讨 SLC-Fc 和(或)CpG-ODN 在体内抗肿瘤作用的生物学机制,在肿瘤接种后的第 11、15、18 天,随机抽取各组实验小鼠并剥离其引流淋巴结

(肿瘤同侧腋下淋巴结)及瘤块,制成细胞悬液进行流式细胞仪分析。

2.4.1 对荷瘤小鼠引流淋巴结的影响 结果显示,单纯 SLC-Fc 或 CpG-ODN 治疗组的淋巴结比对照组淋巴结大 3 倍左右,而 SLC-Fc 和 CpG-ODN 联合治疗组的淋巴结比单纯治疗组淋巴结增大 2 倍左右。

将引流淋巴结制成细胞悬液,并以各种荧光抗体染色后以流式细胞仪分析。结果显示,各治疗组的引流淋巴结内 CD8⁺T 细胞比对照组略增多,但 CD4⁺和 CD8⁺与对照组相比差异无统计学意义;联合治疗组的引流淋巴结内 CD4⁺CD25⁺T 细胞的分布较对照组减少,而 CD8⁺CD25⁺T 细胞显著增多(图 5)。

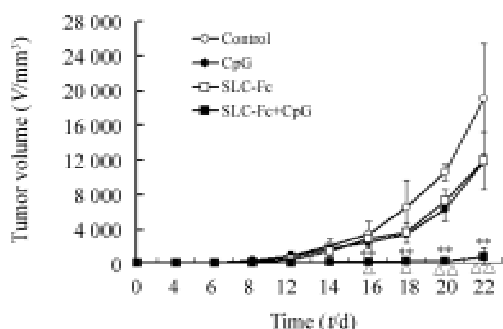


图 4 SLC-Fc 和 CpG-ODN 单独或联合应用抑制小鼠移植黑素瘤的生长

Fig. 4 SLC-Fc and CpG-ODN alone or in combination inhibited growth of B16-implanted tumors

* $P < 0.01$ vs control group; $\Delta P < 0.05$;

$\Delta\Delta P < 0.01$ vs CpG or SLC-Fc group

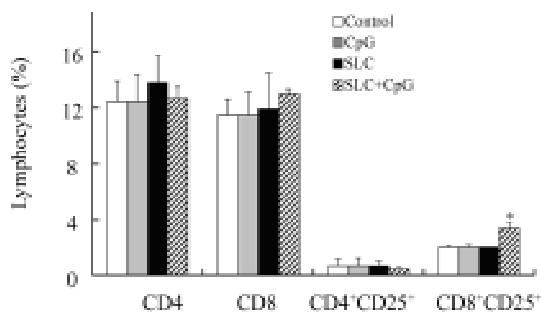


图 5 SLC-Fc 和 CpG-ODN 治疗对荷黑素瘤小鼠引流淋巴结中免疫细胞的影响

Fig. 5 Effect of SLC-Fc and CpG-ODN alone or in combination on immune cells in draining lymphnode

* $P < 0.05$ vs control

2.4.2 对小鼠移植瘤组织内淋巴细胞浸润的影响 为了进一步探讨 SLC-Fc 和/或 CpG-ODN 在瘤

组织内对抗肿瘤效应细胞的趋化作用,把剥离的瘤体用胰蛋白酶消化分离后以流式细胞仪检测。结果显示,治疗组对 CD8⁺T 和 CD4⁺T 淋巴细胞趋化聚集的作用显著强于对照组($P < 0.05$),而 SLC-Fc 和 CpG-ODN 联合治疗组更为显著($P < 0.01$)。结果还显示,单纯 SLC-Fc 或 CpG-ODN 治疗组的瘤组织内 DCs 的含量及成熟度略高于对照组,但联合治疗组作用显著高于对照组($P < 0.05$,图 6)。

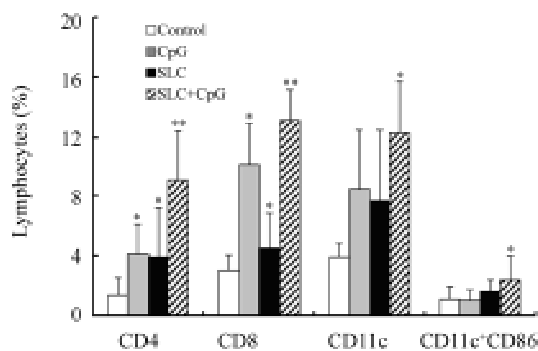


图 6 SLC-Fc 和 CpG-ODN 治疗对移植瘤组织内 T 淋巴细胞和 DCs 浸润及其成熟的影响

Fig. 6 Effects of SLC-Fc and CpG-ODN alone or in combination on intra-tumor infiltration of T lymphocytes and DCs, and DCs maturation

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

3 讨论

有效的抗肿瘤免疫既需要抗原提呈细胞又需要活化的效应淋巴细胞。刺激淋巴组织趋化因子(SLC)高表达于刺激淋巴组织,能趋化并活化 T 淋巴细胞、树突状细胞和自然杀伤细胞等免疫效应细胞,在机体淋巴细胞的迁移归巢、抗肿瘤、抗感染过程中具有重要作用^[9-10]。

CpG-ODN(CpG oligodeoxynucleotide)是一种未甲基化的 CpG 寡聚脱氧核苷酸,可通过 Toll-like 受体-9 激活抗原提呈细胞(APC),如树突细胞(DC)、B 淋巴细胞、巨噬细胞等,并促使细胞分泌多种细胞因子,如 IL-12 和 IFN- γ ,这些细胞因子通过活化 T 淋巴细胞增强相应的免疫应答,故 CpG-ODN 是一种很强的免疫佐剂。

本实验结果显示,所合成的 SLC-Fc 或 CpG-ODN 在体内均能够抑制肿瘤生长,但其效果均不如其两者试剂的联合治疗明显。经瘤体内淋巴细胞浸润情况分析发现,联合治疗组瘤体内 CD8⁺T 细胞和 CD4⁺T 细胞均较对照组显著增多。梁春敏等^[11]发

现瘤体内注射表达 SLC 的 DC 诱导 T 细胞向瘤体内聚集,并增强 DC 与 T 细胞之间的免疫突触,从而增强了抗肿瘤效应。本实验中也显示了一致的结果,联合治疗组瘤体内 CD4⁺T 和 CD8⁺T 淋巴细胞数量均较对照组显著增多。此结果的机制考虑为这些淋巴细胞通过 SLC 的趋化作用聚集到瘤体内,并由免疫佐剂 CpG-ODN 的激活,导致瘤体内这些效应细胞数量增多。

分析 SLC-Fc 和(或)CpG-ODN 治疗对肿瘤引流淋巴结的影响结果发现,治疗组尤其联合治疗组的肿瘤引流淋巴结比对照组大 4 倍,但其 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞的比率变化无显著性差异。CD4⁺CD25⁺T 细胞是已知的调节性 T 细胞,对 T 细胞活化有抑制作用,已有文献报道^[12-14]它与肿瘤免疫逃逸有关。本实验中发现 SLC-Fc 和 CpG-ODN 联合治疗对 CD4⁺CD25⁺细胞的表达有所抑制效应,但未发现显著性。对于 CD8⁺CD25⁺T 细胞的功能,Chaput 等^[15]指出 CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺T 细胞免疫表型上类似 CD4⁺CD25⁺T 细胞,在大肠癌中表达增强并与肿瘤免疫逃逸有关。但 Bienvenu 等^[16]指出在周围型 CD8⁺CD25⁺T 细胞是否与 CD4⁺CD25⁺T 细胞类似的功能待进一步研究。也有文献^[17]指出 CD8⁺CD25⁺T 细胞是一种活化的 T 细胞。本实验中发现,联合治疗组中 CD8⁺CD25⁺T 细胞显著地增多,对此结果与肿瘤抑制的相关性待进一步探讨。

总之,SLC 为次级淋巴组织趋化因子,能够趋化 T 淋巴细胞、树突状细胞等免疫效应细胞;CpG-ODN 则一种人工合成的高效低毒的免疫佐剂,可激活 T 细胞、树突状细胞等免疫细胞。它们的联合应用可使其抗肿瘤效应相辅相成,对肿瘤治疗具有着潜在的应用价值。

[参 考 文 献]

[1] Huang AY, Golumbek P, Ahmadzadeh M, Jaffee E, Pardoll D, Levitsky H. Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens [J]. Science, 1994, 264 (5161): 961-965.

[2] Frederick MJ, Clayman GL. Chemokines in cancer [J]. Expert Rev Mol Med, 2001, 3(19): 1-18.

[3] Li YG, Wang ZP, Tian JQ, Tian BQ, Rodrigues R, Shang PF. Dendritic cell transfected with secondary lymphoid-tissue chemokine and/or interleukin-2 gene-enhanced cytotoxicity of T-lymphocyte in human bladder tumor cell S *in vitro* [J]. Cancer Invest, 2009, 27(9): 909-917.

[4] Sakai N, Wada T, Yokoyama H, Lipp M, Ueha S, Matsushima K, *et al.* Secondary lymphoid tissue chemokine (SLC/CCL21) /

CCR7 signaling regulates fibrocytes in renal fibrosis [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(38): 14098-14103.

[5] Liang CM, Zhong CP, Sun RX, Liu BB, Huang C, Qin J, *et al.* Local expression of secondary lymphoid tissue chemokine delivered by adeno-associated virus within the tumor bed stimulates strong anti-liver tumor immunity [J]. J Virol, 2007, 81(17): 9502-9511.

[6] 侯 丽,赵跃然,王来城,焦玉莲,张 捷,马春燕,等. 小鼠 SLC 基因真核表达载体的构建及表达 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2005, 12(1): 79-82.

[7] Bertoni C, Rustagi A, Rando TA. Enhanced gene repair mediated by methyl-CpG-modified single-stranded oligonucleotides [J]. Nucleic Acids Res, 2009, 37(22): 7468-7482.

[8] 杨传红,王 捷,陈鸣丽,冼 江,詹纯列,肖育华,等. GM-CSF 膜修饰 B16. F10 黑色素瘤细胞疫苗对小鼠种植肿瘤的抑制作用 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2009, 16, (2): 136-139.

[9] Hisada M, Yoshimoto T, Kamiya S, Magami Y, Miyaji H, Yoneto T, *et al.* Synergistic antitumor effect by coexpression of chemokine CCL21/SLC and costimulatory molecule LIGHT [J]. Cancer Gene Therapy, 2004, 11(4): 280-288.

[10] Zhou S, Li R, Qin J, Zhong C, Liang C. SLC/CCR7 stimulates the proliferation of BMDCs by the pNF-kappaB p65 pathway [J]. Anat Rec (Hoboken), 2010, 293(1): 48-54.

[11] 梁春敏,钟翠平,郑 宁,刘彬彬,孙瑞霞,吴 欣,等. SLC 基因修饰树突状细胞及不同免疫方式抗肿瘤作用探讨 [J]. 肿瘤免疫学, 2006, 22(8): 721-726.

[12] Khazaie K, von Boehmer H. The impact of CD4⁺CD25⁺ Treg on tumor specific CD8⁺ T cell cytotoxicity and cancer [J]. Semin Cancer Biol, 2006, 16(2):124-136.

[13] 卢晓婷,刘俊田. CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞在肿瘤免疫及化疗方面的研究进展 [J]. 中国肿瘤临床, 2008, 35(11): 656-660.

[14] 李小丽,司同国,于海鹏,郭 志. 冷冻消融对肝癌患者外周血 CD4⁺CD25⁺调节 T 细胞影响的初步研究 [J]. 中国肿瘤临床, 2008, 35(08): 453-454.

[15] Chaput N, Louafi S, Bardier A, Charlotte F, Vaillant JC, Ménégau F, *et al.* Identification of CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺ suppressive T cells in colorectal cancer tissue [J]. Gut, 2009, 58 (4): 520-529.

[16] Bienvenu B, Martin B, Auffray C, Cordier C, Bécourt C, Lucas B. Peripheral CD8⁺CD25⁺T lymphocytes form MHC class II deficient mice exhibit regulatory activity [J]. J Immunol, 2005, 175 (1): 2462-2453.

[17] Karlsson I, Malleret B, Brochard P, Delache B, Calvo J, Le Grand R, *et al.* FoxP3⁺CD25⁺CD8⁺T-cell induction during primary simian immunodeficiency virus infection in cynomolgus macaques correlates with low CD4⁺T⁺ cell activation and high viral load [J]. J Virol, 2007, 81(24): 13444-13455.

[收稿日期] 2009 - 11 - 10

[修回日期] 2009 - 12 - 20

[本文编辑] 韩 丹