

LMPs 特异性 T 淋巴细胞对鼻咽癌细胞的杀伤作用

李文杰¹,唐小军²,熊四平²,陈 志¹,蒋 帅¹,冯振卿²,朱 进³,陈仁杰^{1*}

(¹南京医科大学第二附属医院耳鼻咽喉科,江苏 南京 210011;²南京医科大学卫生部抗体技术重点实验室,江苏 南京 210029;³南京军区军事医学研究所,江苏 南京 210002)

[摘要] 目的:研究树突状细胞负载 EB 病毒潜伏膜蛋白(latent membrane proteins,LMPs)介导生成的 LMPs 特异性细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte,CTL)LMPs-CTL 的生物学特性,观察其对 LMPs 阳性鼻咽癌细胞 SUNE 的杀伤作用。方法:用淋巴细胞分离液分离人外周血单核细胞,采用贴壁分离及白细胞介素(interleukin,IL)-4、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony stimulating factor,GM-CSF)等细胞因子诱导成熟树突状细胞(dendritic cell,DC),通过 DC 细胞负载 LMPs 多肽抗原并递呈给同源 T 淋巴细胞,制备 LMPs-CTL。CCK8 法检测 LMPs-CTL 对 SUNE 细胞的杀伤作用;ELISA 和羧基荧光素二醋酸琥珀酰亚胺酯(carboxy fluorescein succinimidyl ester,CFSE)染色法检测 LMPs-CTL 分泌 IFN- γ 及其增殖。结果:LMPs-CTL 对 SUNE 细胞的杀伤率在 12 h 和 24 h 分别为(43.47 \pm 1.93) %和(77.15 \pm 3.18) %,显著高于对照组的(11.45 \pm 3.06) %和(24.27 \pm 13.20)%($P < 0.05$)。SUNE 细胞刺激后,LMPs-CTL 增殖能力较对照组有明显增强,IFN- γ 分泌量达到(613.40 \pm 121.77) pg/ml,显著高于对照组(86.90 \pm 3.70) pg/ml($P < 0.05$)。结论:通过 DC 细胞负载 LMPs 混合多肽可诱导生成 LMPs-CTL,对 LMPs 阳性鼻咽癌细胞有较强的杀伤作用。

[关键词] EB 病毒;潜伏膜蛋白;树突状细胞;细胞毒性 T 细胞;鼻咽癌;细胞免疫治疗

[中图分类号] R739.6

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)06-705-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20140603

The cytotoxic effect of LMPs specific T lymphocytes on nasopharyngeal carcinoma cells

Li Wenjie¹, Tang Xiaojun², Xiong Siping², Chen Zhi¹, Jiang Shuai¹, Feng Zhenqing², Zhu Jin³, Chen Renjie^{1*}

(¹Department of Otolaryngology, the Second Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210011; ²Key Laboratory of Antibody Technique of Ministry of Health, NJMU, Nanjing 210029; ³Huadong Medical Institute of Biotechniques, Nanjing 210002, China)

[Abstract] **Objective:** To study the biological characteristics of cytotoxic T lymphocyte (CTL) originated from dendritic cells (DC) loaded with the Epstein-Barr virus latent membrane proteins (LMPs), and to detect the cytotoxic effect of LMPs-CTL on the LMPs positive nasopharyngeal carcinoma cell SUNE. **Methods:** The mononuclear cells were isolated from human peripheral blood by lymphocyte separation medium. The adherent method was performed. Cytokines of IL-4 and GM-CSF were performed to induce mature DC. Loaded with LMPs polypeptide antigen, the mature DC presented antigen to autologous T lymphocyte for preparation of LMPs-CTL. The cytotoxic effect of LMPs-CTL on SUNE cells was detected by the CCK8 method. The secretion of interferon- γ (IFN- γ) of LMPs-CTL and cell proliferation was detected by ELISA and carboxy fluorescein succinimidyl ester (CFSE), respectively. **Results:** The killing efficiency of LMPs-CTL for SUNE was (43.47 \pm 1.93)% in 12h and (77.15 \pm 3.18)% in 24 h, which were higher than those in the control group[(11.45 \pm 3.06)% and (24.27 \pm 13.2)% ($P < 0.05$)]. The ability of LMPs-CTL cell proliferation simulated with SUNE cells was stronger than that in the control group. The IFN- γ secretion level secreted by LMPs-CTL was (613.40 \pm 121.77) pg/ml, which was significantly higher than that secreted by the control group (86.90 \pm 3.70) pg/ml ($P < 0.05$). **Conclusion:** LMPs specific CTL can be successfully induced by mature DC and possess preferable specific killing activity on LMPs positive nasopharyngeal carcinoma cells.

[基金项目] 江苏省临床医学科技专项(BL2013038); 江苏省普通高校研究生科研创新计划(CXZZ12_0563)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: renjiechen@aliyun.com

[Key words] Epstein-birr virus; latent membrane proteins; dendritic cell; cytotoxic T lymphocyte; nasopharyngeal carcinoma; cell immunotherapy

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(06): 705-710]

近年来,随着肿瘤免疫学的发展,细胞免疫治疗已经成为继手术治疗、放疗、化疗后的第4种肿瘤治疗方法,受到广泛重视。淋巴因子激活的杀伤细胞(lymphokine activated killer cells, LAK)及CD3抗体激活的杀伤细胞(CD3 McAb activated killer cells, CD3AK)均为具有广谱抗瘤作用的免疫杀伤细胞,其中LAK为淋巴细胞在体外经白细胞介素(interleukin, IL)-2激活生成^[1], CD3AK是IL-2、抗CD3单克隆抗体协同作用的结果^[2]。LAK及CD3AK在治疗某些肿瘤时已经获得一定疗效,但它们扩增能力有限、非特异性抗肿瘤活性低,对机体骨髓造血系统有明显毒副作用,这些不足使它们在临床上的应用受到限制^[3]。树突状细胞(dendritic cells, DC)在体外负载抗原后刺激淋巴细胞生成肿瘤特异性细胞毒性T细胞(cytotoxic T lymphocytes, CTL),回输患者体内能够快速重建患者保护性细胞免疫系统,从而抑制肿瘤的生长、提高患者生存率^[4]。这种方法在对EB(Epstein-birr)病毒相关的器官移植后淋巴组织增殖紊乱性疾病(posttransplantation lymphoproliferative disorders, PTLD)的治疗中已经取得了显著疗效^[5],但对肿瘤抗原免疫原性较弱的EB病毒相关鼻咽癌的治疗仍需要进一步研究^[6]。本研究以DC作为抗原提呈细胞,将潜伏膜蛋白混合多肽(latent membrane proteins, LMPs)作为抗原,体外制备EB病毒特异性CTL,以增强T细胞的靶向性和对LMPs阳性鼻咽癌细胞的杀伤作用。

1 材料和方法

1.1 材料

MIX-LMPs(JPT公司,美国)为EB病毒LMPs混合多肽,淋巴细胞分离液Ficoll(GE-Healthcare公司,美国),细胞因子IL-2、IL-4、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)等细胞因子(PeproTech公司,美国),膜表面分子抗体anti-CD4-FITC、anti-CD8-PE、anti-CD83-PE、anti-CD86-FITC(eBioscience公司,美国),CCK-8试剂盒(杭州碧云天公司),IFN- γ ELISA试剂盒和羧基荧光素二醋酸琥珀酰亚胺酯(carboxy fluoroscein succinimidyl ester, CFSE)试剂(e-

Bioscience公司,美国),RPMI1640培养基(Gibco公司,美国),胎牛血清(Wisent公司,加拿大)。

人外周血浓缩白细胞由江苏省血液中心提供,均为健康人血液;LMPs阳性鼻咽癌细胞系SUNE细胞由上海诺华制药有限公司馈赠;人脐带间充质干细胞UCSC由南京市鼓楼医院内分泌科馈赠。

1.2 方法

1.2.1 DC细胞的诱导培养及抗原负载

取人外周血浓缩白细胞,1×PBS稀释1倍后经淋巴细胞分离液梯度离心,取中间白膜层为人外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)。用完全培养基(含10%FBS的RPMI1640)重悬PBMC,4×10⁶个/ml细胞铺6孔板,37℃、5%CO₂条件下培养2h后吸弃上清,1×PBS轻轻洗培养板1次移除未贴壁细胞,加入含IL-4(800 U/ml)、GM-CSF(1 000 U/ml)细胞因子的新鲜培养基2 ml。培养过程中每2d换新鲜培养基1次,培养第5天加入成熟因子IL-6(150 ng/ml)、TNF- α (20 ng/ml)、IL-1(10 ng/ml)、PGE(500 ng/ml)并给予LMPs混合多肽刺激,培养第7天倒置显微镜观察细胞形态,流式检测细胞表面分子CD83、CD86的表达。

1.2.2 LMPs-CTL的扩增培养及细胞表型流式检测

PBMC细胞按照1×10⁶个/ml铺入经anti-CD3、anti-CD28包被的疏水24孔板,37℃、5%CO₂条件下培养,第3天移入细胞培养瓶,给予含IL-2(100 U/ml)的新鲜培养基诱导培养外周血T细胞,倒置显微镜观察细胞形态、台盼蓝染色计数绘制细胞生长曲线。将培养第7天已经负载抗原的成熟DC及外周血T细胞按照1:10的比例混合,37℃、5%CO₂条件下培养,诱导生成特异性LMPs-CTL。培养48h后做流式检测细胞表面分子CD4、CD8的表达。

1.2.3 CFSE法检测LMPs-CTL的增殖

T细胞及LMPs-CTL离心计数后各取3×10⁶个细胞,1×PBS洗2遍,去除残留培养基后用1 ml体积的1×PBS重悬细胞,加入0.2 μ l CFSE(终浓度1.0 μ mol/L)室温避光染色10 min,以5倍体积冰冷完全培养基终止反应,冰上放置5 min后用完全培养基洗3遍。每组设3个复孔,按照1×10⁶个/ml

密度铺 24 孔板。37°C、5%CO₂ 孵育 48 h 后补 1 ml 新鲜培养基,72 h 后将 3 个复孔细胞混合离心,1×PBS 洗 2 遍,500 μl 体积 1×PBS 重悬,流式细胞仪检测细胞增殖效果。观察指标为细胞的增殖百分比(为发生过增殖的细胞数目除以增殖刺激前的细胞总数)和分裂指数(所有细胞的分裂次数除以增殖刺激前的细胞总数)。

1.2.4 LMPs-CTL 体外杀伤鼻咽癌细胞能力的检测

取 LMPs 阳性鼻咽癌细胞 SUNE 作为实验组靶细胞,人脐带间充质干细胞 UCSC 作为对照组靶细胞,经胰酶消化后按照 1 × 10⁵ 个/ml 密度,每孔 100 μl 接种于 96 孔板,每组设 3 个复孔,37°C 培养箱培养 1 h 使细胞贴壁,以 10:1 的效靶比例加入效应细胞 LMPs-CTL,终体积为 200 μl;同时设立相应靶细胞对照组和效应细胞对照组。分别在 12、24 h 两个时间段加入 CCK-8 溶液 20 μl/孔,约 1 h 后,以 450 nm 波长(650 参考波长)检测各孔的吸光度值,按公式计算 LMPs-CTL 的特异性杀伤效率。

LMPs-CTL 杀伤率(%)=

$$1 - \left(\frac{\text{实验组吸光度} - \text{效应细胞对照组吸光度值}}{\text{靶细胞对照组吸光度值}} \right) \times 100\%$$

1.2.5 ELISA 检测 IFN-γ 分泌

按照 ELISA 检测试剂盒说明书步骤进行。取分离培养的 LMPs-CTL 及 T 细胞作为效应细胞,鼻咽癌细胞 SUNE 作为实验组靶细胞,人脐带间充质干细胞 UCSC 作为对照组靶细胞,按照 1.2.4 中实验方

法接种 96 孔板共培养,同时设立 T 细胞对照组、LMPs-CTL 对照组,每组设 3 个复孔。37°C、5%CO₂ 孵育 24 h 后,取上清 100 μl 检测其中 IFN-γ 含量。

1.3 统计学方法

采用 SPSS18.0 统计软件进行处理,数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,实验组与对照组用单因素方差分析(One-way Anova)进行两两比对分析,以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

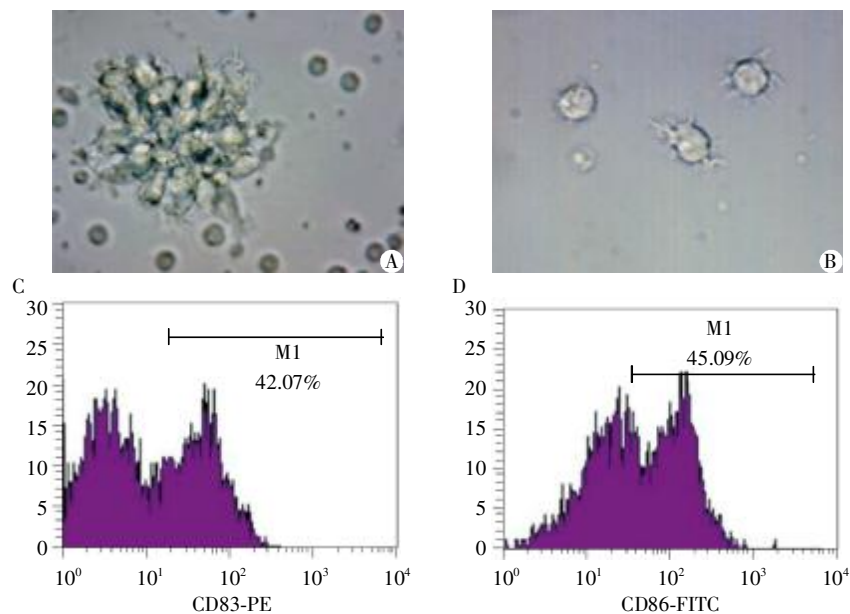
2 结果

2.1 成熟 DC 细胞的生物学特征

贴壁分离的 PBMC 经含 IL-4、GM-CSF 的培养基培养 4 d 后部分细胞悬浮变大,呈集落生长(图 1 A);培养第 5 天加入成熟因子并负载 LMPs 混合多肽,在第 7 天可观察细胞大部分悬浮,细胞体积明显增大,形态不规则,细胞边缘有明显的毛刺状突起(图 1 B),为典型成熟 DC 的形态学标志。通过流式细胞仪对细胞因子诱导的 DC 进行细胞表面分子检测,CD83、CD86 的表达分别达到 42.07% 及 45.09% (图 1 C、D),具备成熟 DC 的分子学特征。

2.2 分离培养 T 细胞的形态特征及细胞增殖特性

经过 anti-CD3、anti-CD28 刺激后的 PBMC 在含细胞因子 IL-2 的培养基中培养,显微镜观察可见细胞呈圆形、大小不均一、集落悬浮生长。经台盼蓝染色计数绘出 T 细胞生长曲线,可以看出细胞在第 7



A:成熟 DC 细胞呈集落生长(x400);B:细胞呈不规则形态,表面可见明显毛刺状突起(x400);C:DC 表面分子 CD83 检测;D:DC 表面分子 CD86 检测。

图 1 成熟 DC 的生物学特征

Figure 1 Biological characteristics of the mature DC

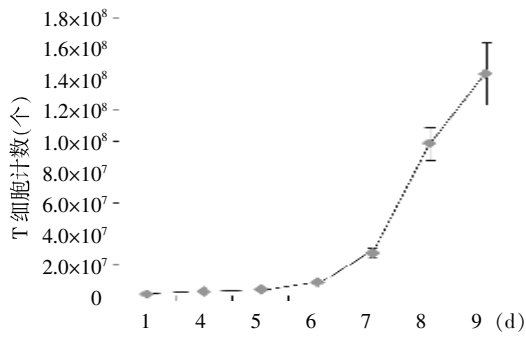


图 2 T 细胞增殖特征分析

Figure 2 Feature analysis of T cell proliferation

天增殖速度加快,培养第 9 天细胞增殖能够达到 80 倍(图 2)。

2.3 LMPs-CTL 细胞表型分析

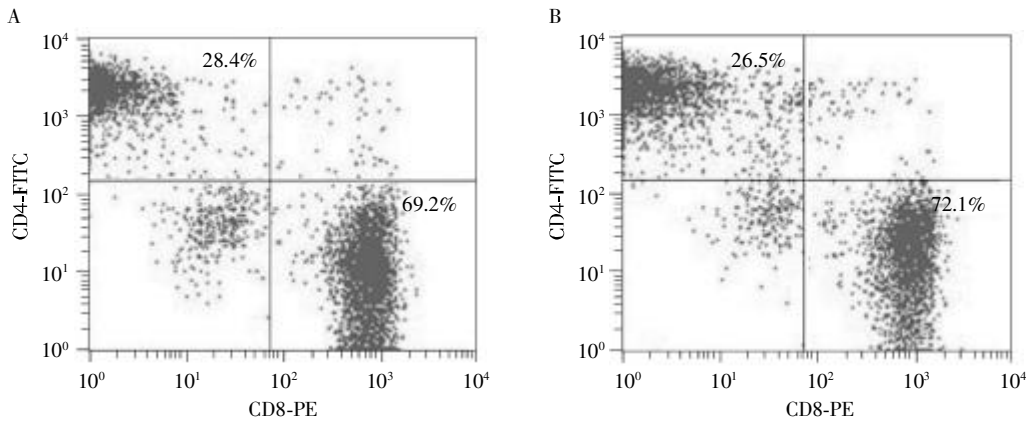
对 DC 诱导生成的 LMPs-CTL 细胞表型进行流式细胞仪检测分析(图 3),CD4⁺细胞和 CD8⁺细胞所占比例分别为 26.5%、72.1%,与未进行抗原肽刺激的 T 细胞相比未见明显差异。

2.4 CFSE 检测 DC 刺激后 T 细胞增殖的变化

流式检测分析细胞增殖情况,T 细胞经过 DC 诱导生成 LMPs-CTL 后,细胞增殖率由 30.9%提高到 84.7%,分裂指数由 0.324 增加到 1.720(图 4)。

2.5 LMPs-CTL 对鼻咽癌细胞的特异性杀伤作用

通过 CCK8 法检测发现,作用 12 h 时 LMPs-CTL 对实验组鼻咽癌细胞 SUNE 的杀伤率为(43.47 ±



A:T 细胞 CD4/CD8 表型;B:LMPs-CTL CD4/CD8 表型。

图 3 流式检测 LMPs-CTL 细胞表型

Figure 3 The cell phenotype of LMPs-CTL detected by flow cytometer

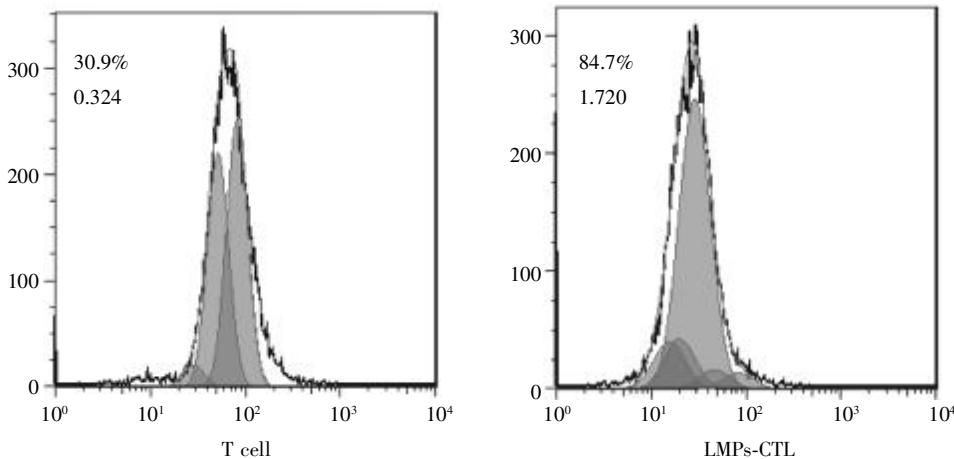


图 4 DC 刺激对 T 细胞增殖的影响

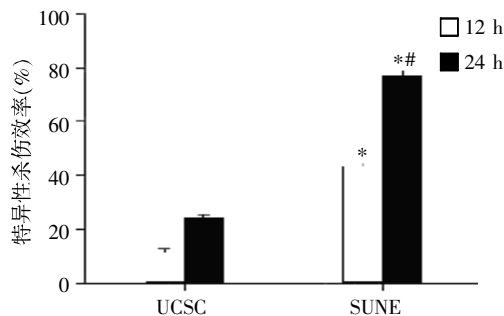
Figure 4 DC stimulation effects on T cell proliferation

1.93)%, 明显高于对对照组 UCSC 细胞的杀伤率 (11.45 ± 3.06)%(*P* < 0.05);24 h 后实验组杀伤率有较明显的提高,达(77.15 ± 3.18)%(*P* < 0.05),对照组仅为(24.27 ± 13.20)%(图 5)。

2.6 细胞分泌 IFN-γ 的检测

ELISA 检测发现,对照组两种效应细胞 LMPs-CTL 及 T 细胞本身会释放一定量的 IFN-γ, 经过 UCSC 细胞共培养刺激后,分泌量未见明显变化;实验组靶细胞 SUNE 与 LMPs-CTL 细胞共培养后,IFN-γ 分泌量达到(613.40 ± 121.77)pg/ml(图 6),

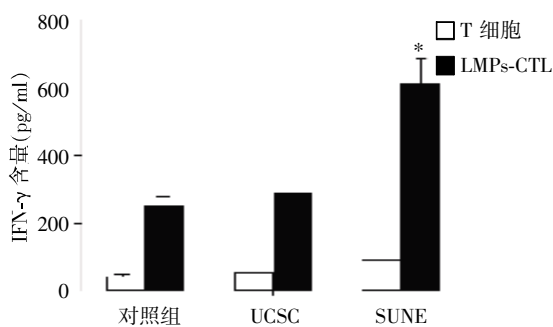
较 T 细胞组分泌量 (86.9 ± 3.70)pg/ml 有明显提高 ($P < 0.05$)。



与 UCSC 组比较, * $P < 0.05$; 与 12 h 比较, # $P < 0.05$ ($\bar{x} \pm s, n=3$)。

图 5 LMPs-CTL 体外特异性杀伤活性

Figure 5 The specific killing activity of LMPs-CTL *in vitro*



与 T 细胞对照组比较, * $P < 0.05$ ($\bar{x} \pm s, n=3$)。

图 6 ELISA 检测 IFN- γ 的分泌

Figure 6 The secretion of IFN- γ detected by ELISA

3 讨论

EB 病毒属于疱疹病毒科 γ 亚型嗜人淋巴细胞病毒,其基因组编码了一系列的病毒基因产物,主要为核抗原家族(EBNA)以及潜伏膜蛋白家族(LMP1、LMP2)。鼻咽癌呈 II 型潜伏感染,仅表达 EB 病毒基因编码的低免疫原性病毒抗原 EBNA1、LMP1、LMP2^[7]。EBNA1 在所有鼻咽癌细胞中表达,但是由于它含有大量甘氨酸-丙氨酸重复序列,使其在 MHC-I 分子抗原提呈途径中被屏蔽,因此并不适合作为免疫治疗的靶向抗原^[8-9]。潜伏膜蛋白 1(latent membrane protein 1, LMP1) 是唯一证明与癌细胞转化相关的致癌基因,能够转化 B 淋巴细胞、上皮细胞使其获得永生化^[10],其作用机制可能是介导信号转导通路,通过上调 NF- κ B 抑制细胞凋亡^[11]。LMP1 在鼻咽癌细胞中有较高的表达率,与细胞转化、增殖以及未分化都密切相关^[12],有研究报道 DC 转染 LMP1 基因诱导生成的 CTL 对靶细胞具有较明显的杀伤效果,杀伤效率能够达到 40% 以上^[13]。潜伏膜蛋白 2(latent membrane protein 2, LMP2)在维持 EB 病

毒的潜伏感染中起到决定性作用,其 mRNA 在鼻咽癌患者体内检测率高达 95% 左右^[14-15]。另外, LMP2 表面存在潜在 T 细胞激活表位,能够更充分地介导 T 细胞免疫反应。Bollard 等^[16]研究发现,在 6 例 EBV 阳性复发性淋巴瘤患者中有 5 例输入自身 LMP2 特异性 CTL 后激活免疫反应,进一步证实了 LMP2 有潜力成为有价值的特异性抗原。因此,本研究结合 2 种潜伏膜蛋白在鼻咽癌形成、复发以及转移过程中发挥的作用,选择 LMPs 混合多肽作为鼻咽癌免疫治疗的靶抗原,以期能够达到更好地激活 T 细胞免疫反应、提高特异性杀伤效率的目的。

DC 作为机体内抗原递呈功能最强的细胞,摄取加工处理内源性的肿瘤特异性抗原,生成 MHC-抗原肽-TCR 复合体,作为 T 细胞激活的第一信号;同时 DC 表面高表达共刺激分子(B7 分子等)与 T 细胞表面相应受体结合,作为第二信号共同刺激初始 T 细胞的增殖与分化,促进肿瘤特异性细胞毒性 T 淋巴细胞的生成,成为直接杀伤肿瘤细胞的主要方式^[17]。由于单核细胞 DC 转化率和分化成熟能力较健康人低^[18],外周血中特异性 CTL 数量较 EB 病毒健康携带者少^[19],以及肿瘤细胞分泌 IL-10 等免疫抑制细胞因子下调机体免疫反应等原因^[20],鼻咽癌患者体内肿瘤细胞能够逃避机体的免疫杀伤作用。本研究在避开免疫抑制微环境的基础上,利用 IL-4、GM-CSF 等细胞因子成功诱导生成成熟 DC 细胞,通过 DC 细胞负载 LMPs 混合多肽激活自身 T 淋巴细胞,较快制备大量稳定增殖的 LMPs-CTL。研究表明,体外制备的 LMPs-CTL 中 CD8⁺ 比例达到 72.1%,与正常 T 细胞的 CD4⁺/CD8⁺ 比例相当,在杀伤肿瘤细胞的过程中起重要作用。按照 10:1 的效靶比例设计 LMPs-CTL 体外杀伤实验,通过对比不同作用时间杀伤肿瘤细胞的效率,认为在作用 24 h 后可以得到明显杀伤效果。与对照组 UCSC 细胞 24 h 的杀伤效率 (24.27 ± 13.20) % 相比, LMPs-CTL 对实验组 SUNE 细胞的杀伤效率达到了 (77.15 ± 3.18) %,证明 LMPs-CTL 对 LMPs 阳性鼻咽癌细胞具有较好地特异性杀伤活性。IFN- γ 由活化的 T 细胞分泌, DC 负载 EB 病毒特异性抗原后在双信号刺激的作用下激活初始 T 细胞,生成大量活化的 LMPs-CTL。ELISA 分析表明,与未激活的外周 T 细胞相比,初次激活的 LMPs-CTL 即可释放一定量的 IFN- γ 。当与靶细胞共培养时, LMPs-CTL 细胞再次遇到相同抗原刺激,能够更迅速、更强烈地增殖分化为效应细胞,使得 IFN- γ 的分泌量在杀伤肿瘤细胞的过程中明显

上调至(613.40 ± 121.77) pg/ml,通过促进巨噬细胞 Fc γ R 表达、协同诱导 TNF 以及促进 T 细胞 IL-2R 表达等多种机制增强自然杀伤细胞 (NK 细胞)、巨噬细胞和 T 淋巴细胞的活力,从而更好介导 LMPs-CTL 对肿瘤细胞的杀伤效应。

综上所述,DC 负载 LMPs 刺激的 LMPs-CTL 在体外能够有效杀伤 LMPs 阳性的鼻咽癌细胞,为进一步回输患者体内进行临床治疗以及发展鼻咽癌免疫治疗提供了客观依据。

[参考文献]

- [1] Yashin DV, Sashchenko LP, Kabanova OD, et al. The CD8⁺ population of LAK cells can lyse both HLA-positive and HLA-negative cancer cell lines[J]. Dokl Biol Sci, 2009, 426: 296-297
- [2] Sebastian M, Passlick B, Friccius-Quecke H, et al. Treatment of non-small cell lung cancer patients with the tri-functional monoclonal antibody catumaxomab (anti-Ep-CAM x anti-CD3): a phase I study[J]. Cancer Immunol Immunother, 2007, 56(10): 1637-1644
- [3] 匡志鹏, 梁安民. CIK 细胞联合树突状细胞治疗恶性肿瘤的研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2006, 14 (2): 240-242
- [4] Yao Y, Chen L, Wei W, et al. Tumor cell-derived exosome-targeted dendritic cells stimulate stronger CD8⁺ CTL responses and antitumor immunities[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 436(1): 60-65
- [5] Haque T, Wilkie GM, Jones MM, et al. Allogeneic cytotoxic T-cell therapy for EBV-positive posttransplantation lymphoproliferative disease: results of a phase 2 multicenter clinical trial[J]. Blood, 2007, 110(4): 1123-1131
- [6] Icheva V, Kayser S, Wolff D, et al. Adoptive transfer of Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 1-specific T cells as treatment for EBV reactivation and lymphoproliferative disorders after allogeneic stem-cell transplantation [J]. J Clin Oncol, 2013, 31(1): 39-48
- [7] Basso S, Zecca M, Merli P, et al. T cell therapy for nasopharyngeal carcinoma[J]. J Cancer, 2011, 2: 341-346
- [8] Pan J, Zhang Q, Zhou J, et al. Recombinant adeno-associated virus encoding Epstein-Barr virus latent membrane proteins fused with heat shock protein as a potential vaccine for nasopharyngeal carcinoma[J]. Mol Cancer Ther, 2009, 8(9): 2754-2761
- [9] Smith C, Tsang J, Beagley L, et al. Effective treatment of metastatic forms of Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinoma with a novel adenovirus-based adoptive immunotherapy[J]. Cancer Res, 2012, 72 (5): 1116-1125
- [10] Zhang D, Mao Y, Xiong L, et al. Characterization of human Fab antibody fragments specific to LMP1 (HLEAFab) in nasopharyngeal carcinoma for potential molecular diagnosis and therapeutic applications[J]. Oncol Lett, 2013, 5(5): 1694-1698
- [11] Xiong A, Clarke-Katzenberg RH, Valenzuela G, et al. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 activates nuclear factor-kappa B in human endothelial cells and inhibits apoptosis[J]. Transplantation, 2004, 78(1): 41-49
- [12] 林 隽, 李瑞玉, 陈 明. EB 病毒膜潜伏蛋白 LMP1 和基质金属蛋白酶 MMP9 表达与鼻咽癌转移的关系[J]. 福建医药杂志, 2010, 2 (5): 76-79
- [13] 徐瑞凤, 石 敏, 尤长宣, 等. 负载 LMP-1 基因的树突状细胞诱导 CTL 对鼻咽癌细胞的杀伤效应[J]. 河北医学, 2010, 16(12): 1409-1413
- [14] Konishi K, Maruo S, Kato H, et al. Role of Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 2A on virus-induced immortalization and virus activation[J]. J Gen Virol, 2001, 82(Pt 6): 1451-1456
- [15] 曹 清, 唐小军, 李文杰, 等. BV 编码潜伏膜蛋白 2A 抗原表位的串联表达及其免疫原性分析[J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2013, 33(5): 593-597
- [16] Bollard CM, Gottschalk S, Leen AM, et al. Complete responses of relapsed lymphoma following genetic modification of tumor-antigen presenting cells and T-lymphocyte transfer[J]. Blood, 2007, 110(8): 2838-2845
- [17] Figdor CG. Molecular characterization of dendritic cells operating at the interface of innate or acquired immunity [J]. Pathologie-biologie, 2003, 51(2): 61-63
- [18] 韦正波, 黄光武, 温文胜, 等. 鼻咽癌患者外周血树突状细胞体外扩增及生物学特性的研究[J]. 临床耳鼻咽喉科杂志, 2005, 17(23): 1068-1071
- [19] Chua D, Huang J, Zheng B, et al. Adoptive transfer of autologous Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T cells for nasopharyngeal carcinoma [J]. Int J Cancer, 2001, 94 (1): 73-80
- [20] Yao M, Ohshima K, Suzumiya J, et al. Interleukin-10 expression and cytotoxic-T-cell response in Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinoma[J]. Int J Cancer, 1997, 72(3): 398-402

[收稿日期] 2014-01-14