

• 论著 •

## 淋巴细胞趋化因子增强柯萨奇病毒 DNA 疫苗黏膜免疫及预防小鼠心肌炎的作用

岳艳,胡林昆,徐薇,熊思东

复旦大学上海医学院免疫生物学研究所,上海 200032

**摘要:**本研究在已建立的柯萨奇病毒 B3 型(CVB3)黏膜疫苗 chitosan-pVP1 基础上,引入 C 家族趋化因子,即淋巴细胞趋化因子(LTN),以期诱导更强的黏膜免疫应答,获得更有效的免疫保护作用。将 pLTN 与 pVP1 各 50 μg 混合后,与 chitosan 形成共聚复合物,隔周滴鼻免疫小鼠,共 4 次;末次免疫后 2 周,检测血清 IgG、粪便 IgA 及肠系膜淋巴结细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)活性。同时,以 3 LD<sub>50</sub>/0.1 ml CVB3 腹腔感染小鼠,7 d 后检测血清肌酸激酶(CK)活性及心肌病理学改变。结果显示,与对照组相比,chi-(pVP1 + pLTN) 可显著提高 CVB3 特异性血清 IgG 水平、粪便 IgA 水平以及增强肠系膜淋巴结特异性 CTL 应答。病毒攻击后,chi-(pVP1 + pLTN) 组心肌炎发病率仅为 16.7%,显著低于 chi-(pVP1 + pcDNA3.1) 组的 33.3%。心肌组织病理显示,chi-(pVP1 + pLTN) 组心外膜下仅有轻微炎症,而 chi-(pVP1 + pcDNA3.1) 组除心外膜下有较多淋巴细胞聚集外,心肌内尚有少量炎症浸润和坏死灶。结果提示,LTN 与 VP1 质粒经 chitosan 共包装后进行滴鼻免疫,可增强 CVB3 特异性黏膜免疫应答,更有效地预防病毒性心肌炎的发生。

**关键词:**柯萨奇病毒 B3 型;黏膜疫苗;淋巴细胞趋化因子;滴鼻免疫;病毒性心肌炎

### Enhancement of the mucosal immune responses and prophylactic effect of a novel coxsackievirus B3-specific mucosal DNA vaccine by co-administration of lymphotactin

YUE Yan, HU Lin-Kun, XU Wei, XIONG Si-Dong

*Institute for Immunobiology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China*

**Abstract:** The goal of this study was to improve the mucosal immune responses and protection against coxsackievirus B3 (CVB3), using our previously prepared chitosan-pVP1 mucosal vaccine combined with a plasmid encoding lymphotactin (pLTN), which is a C family chemokine. The final vaccine formulation chi-(pVP1 + pLTN) was prepared by conjugating chitosan with a mixture of pVP1 and pLTN (50 μg each). Male BALB/c mice were immunized four times biweekly. Two weeks after the final immunization, the levels of CVB3-specific serum IgG, fecal IgA, and mucosal cytotoxic T lymphocyte (CTL) activity were quantified. Following a challenge with 3 LD<sub>50</sub>/0.1 ml CVB3, serum creatine kinase (CK) activity and histopathological changes in heart tissue were determined. Compared with the control group, immunization with chi-(pVP1 + pLTN) significantly increased the levels of CVB3-specific serum IgG and fecal IgA, and enhanced mucosal CTL activity. The incidence of myocarditis in mice receiving chi-(pVP1 + pLTN) was 16.7%, which was significantly lower than the 33.3% observed in mice receiving control formulation chi-(pVP1 + pcDNA3.1). Histopathological analysis showed that there were fewer inflammatory cells under the epicardium in the hearts of co-immunized mice compared with control mice. In conclusion, intranasal

基金项目:“十一五”国家科技重大专项(2009ZX10004-104),国家自然科学基金(30400396,30772020),教育部留学回国基金(徐薇),

上海市医学领军人才基金(LJ06011)

通信作者:熊思东,徐薇

Corresponding authors. XIONG Si-Dong, E-mail: sdxiong@shmu.edu.cn; XU Wei, E-mail: wx2362@hotmail.com

co-administration of a LTN plasmid via chitosan nanoparticle could enhance CVB3-specific mucosal immune responses and provide more efficient protection against CVB3-induced myocarditis.

**Key words:** Coxsackievirus B3; Mucosal vaccine; Lymphotactin; Intranasal vaccination; Viral myocarditis

病毒性心肌炎(viral myocarditis, VMC)是一种临床常见的心血管系统疾病,近年来在全球范围内发病呈上升趋势,且已成为青少年不明原因猝死的主要原因之一<sup>[1]</sup>。柯萨奇病毒B3型(coxsackievirus B3,CVB3)感染是导致人类急、慢性心肌炎和扩张性心肌病的重要原因<sup>[2]</sup>,对其预防性和治疗性疫苗研制的需求极为迫切。我们的前期工作表明,以具良好生物可容性,促黏膜黏附、吸收及安全无毒等多重优良特性的脱乙酰壳多糖chitosan包裹编码CVB3结构蛋白VP1的质粒pcDNA3.1-VP1,可制备新型chitosan-DNA(chi-pVP1)黏膜疫苗。该疫苗通过滴鼻免疫可诱导较高水平的CVB3特异性血清IgG和粪便IgA,以及较强的全身细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)应答,可保护33.3%小鼠抵抗致死性CVB3的攻击<sup>[3]</sup>。为进一步增强chi-pVP1诱导的黏膜免疫应答,本研究拟从调节黏膜局部微环境、增加免疫细胞数量及功能方面入手,以期获得更有效的免疫保护力。

趋化因子是一大类具有趋引免疫细胞[特别是抗原呈递细胞(antigen-presenting cell, APC)及T细胞]到达组织局部、发挥炎性功能的重要分子群体,其功能研究和应用一直是免疫学的研究热点<sup>[4-6]</sup>。研究发现,趋化因子除具有经典的趋化功能外,尚具有抗血管生成,促进淋巴细胞发育和成熟,以及调节局部免疫微环境、诱导免疫应答偏移等多重功效<sup>[7]</sup>,作为免疫佐剂已广泛应用于抗感染及肿瘤疫苗等诸多领域<sup>[8,9]</sup>。C家族趋化因子的唯一成员——淋巴细胞趋化因子(lymphotactin, LTN)主要由活化的CD8<sup>+</sup>T细胞和自然杀伤(natural killer, NK)细胞分泌。此外,上皮内γδT细胞、CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>T细胞、CD4<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup>T细胞也可表达LTN。由于其主要趋化T细胞和NK细胞,因此被认为是淋巴细胞特异性趋化因子<sup>[10]</sup>。LTN是肠黏膜分泌的最主要趋化因子,在一定程度上提示其可能参与黏膜免疫应答过程。Lillard等将卵清蛋白(ovalbumin,OVA)与LTN蛋白共同滴鼻免疫小鼠,发现LTN可同时促进OVA特异性黏膜Th1和Th2细胞应答,显著增高黏膜分泌型免疫球蛋白A

(secretory immunoglobulin A, SIgA)水平,显示其作为黏膜免疫佐剂的良好潜能<sup>[11]</sup>。然而,目前对于LTN能否增强黏膜CTL功能尚不清楚。为此,本研究在原有疫苗体系中引入LTN,利用其趋引免疫细胞、调节局部免疫微环境、促进Th1细胞免疫应答等诸多作用来增强chi-pVP1诱导的特异性黏膜免疫应答及免疫保护效力。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

小鼠肌酸激酶(creatine kinase, CK)活性检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所, chitosan( $390 \times 10^3$ )购自Sigma公司。BALB/c小鼠辣根过氧化酶(horseradish peroxidase, HRP)-羊抗小鼠IgG、IgM购自美国Southern Bio公司。CVB4 VP1<sub>237~249</sub> 13肽及CVB3 VP1<sub>1~15</sub> 15肽由上海吉尔生化有限公司合成。亮抑酶肽(leupeptin)、抑肽酶(aprotinin)、苯甲基磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)及羟基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺酯(5,6-carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester, CFSE)购自Sigma公司。雄性BALB/c小鼠,6周龄,购自中国科学院实验动物中心,清洁级饲养。CVB3 Nancy株由复旦大学附属中山医院卫生部病毒性心脏病重点实验室杨英珍教授提供,在HeLa细胞中繁殖和扩增,分装后置-70℃保存。

### 1.2 方法

**1.2.1 chi-(pVP1+pLTN)疫苗的制备** 首先将50 μg pVP1(400 μg/ml)与50 μg pLTN(400 μg/ml)混合,采用复合物共沉淀法,然后在55℃水浴中,将0.02% pH 5.7的chitosan溶液逐滴滴入质粒DNA溶液中,同时高速振荡20 s,即可形成均一、略带混浊的chi-(pVP1+pLTN)复合物。

**1.2.2 免疫小鼠及样品收集** 将6周龄BALB/c雄鼠分为chi-(pVP1+pLTN)组、chi-(pVP1+pcDNA3.1)组和chi-pcDNA3.1组,每组6只。轻度麻醉下,将疫苗溶液滴入小鼠鼻孔,免疫剂量为每次各质粒50 μg,隔周免疫,共4次。收集免疫第8周小鼠血清和粪便样品。小鼠粪便以100 mg/ml

溶解于磷酸缓冲液(phosphate-buffered saline, PBS)(5% 脱脂牛奶、10 mmol/L leupeptin、1 μg/ml aprotinin、1 mmol/L PMSF),充分混匀后离心,收集上清液,冻存于-70 ℃。

### 1.2.3 血清 IgG 及粪便 IgA 的酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测

以 10 μg/ml VP1<sub>237~249</sub> 13 肽包板,4 ℃过夜;PBST(PBS & Tween-20)洗3遍,以1% 牛血清白蛋白(bovine serum album, BSA)-PBS 封闭,37 ℃放置2 h;洗3遍,加入100 μl 1:40稀释血清及粪便原液,37 ℃放置2 h;洗3遍,加入100 μl HRP-羊抗小鼠 IgG、IgA,37 ℃放置1 h;洗4遍,加入100 μl 邻苯二胺(*o*-phenylenediamine, OPD)底物,避光显色7 min,加50 μl H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(1 mol/L)终止,测A<sub>490</sub>值。

### 1.2.4 免疫小鼠肠系膜淋巴结特异性 CTL 检测

制备正常 BALB/c 小鼠脾细胞悬液,调整浓度至5×10<sup>6</sup>个/ml,分2份。一份加入 CVB3 VP1<sub>1~15</sub>肽(终浓度20 μg/ml),37 ℃孵育2 h,然后在室温下用高浓度CFSE(5 μmol/L)标记;另一份未荷肽的淋巴细胞用低浓度CFSE(0.5 μmol/L)标记,作为体内对照。洗涤后,从2组中各取1×10<sup>7</sup>个细胞,混合后重悬于0.5 ml PBS 中,经尾静脉分别注入各组小鼠体内,18 h后取肠系膜淋巴结行流式细胞术(fluorescence activated cell sorting, FACS)检测。

### 1.2.5 CVB3 感染及心肌组织病理学观察

调整CVB3 剂量为3 LD<sub>50</sub>/0.1 ml,于末次免疫后2周腹腔注射各免疫组小鼠。7 d后取心脏组织行固定、

包埋、切片及HE染色,观察心肌炎症浸润及坏死情况,并对其严重程度进行分级。+:损伤累及范围<25%;++:损伤累及范围25%~50%;+++:损伤累及范围51%~75%;++++:损伤累及范围>75%。

### 1.2.6 血清 CK 活性测定

取 CVB3 感染7 d 后免疫小鼠血清20 μl,用定磷法分析测定。

### 1.3 统计学处理

实验数据用 SPSS 11.5 软件处理,P<0.05 为有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 chi-(pVP1+pLTN)诱导的 CVB3 特异性抗体免疫应答

以含每种质粒50 μg 的 chi-(pVP1 + pLTN)、chi-(pVP1 + pcDNA3.1)和 chi-pcDNA3.1于0、2、4、6周滴鼻免疫小鼠,收集第8周血清及粪便样品。ELISA 检测结果显示,chi-(pVP1 + pLTN)疫苗诱导高水平的血清特异性 IgG 和粪便 IgA, A 值分别达0.66 和 0.62,显著高于 chi-(pVP1 + pcDNA 3.1)组的0.58 和 0.48,提示 LTN 共滴鼻免疫不仅可提高全身 IgG 抗体应答水平,还可增加肠道局部 IgA 的产生(图 1)。

### 2.2 chi-(pVP1+pLTN)诱导的肠系膜淋巴结特异性 CTL 应答

在体内应用 CTL 实验检测 chi-(pVP1 + pLTN)诱导的 CVB3 特异性 CTL 功能。于末次免疫后2周,经尾静脉注射1:1混合的荷 VP1<sub>1~15</sub>和未

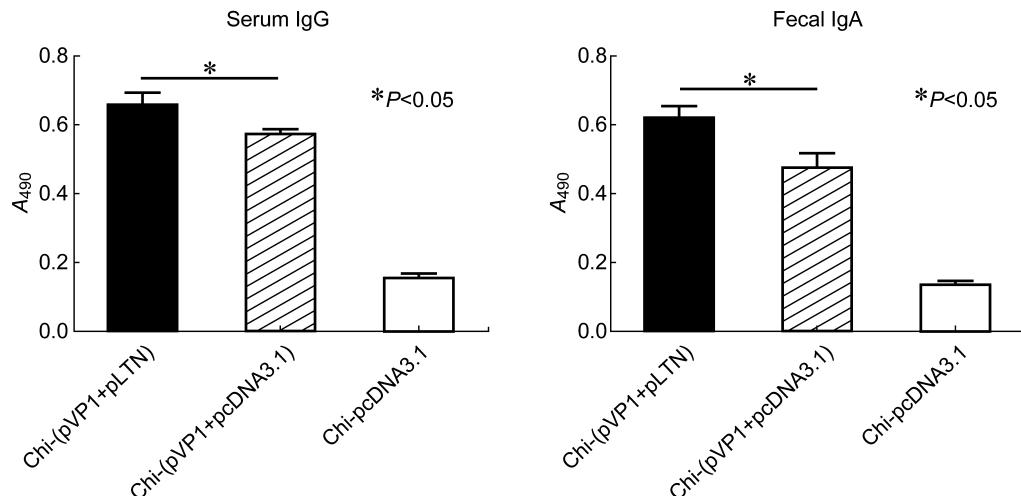


图 1 免疫小鼠第 8 周诱导的 CVB3 特异性血清 IgG 及粪便 IgA 水平

Fig. 1 The levels of CVB3-specific serum IgG and fecal IgA in immunized mice induced at week 8

荷 VP1<sub>1~15</sub>肽段的靶细胞,18 h 后取小鼠肠系膜淋巴结进行 FACS 检测。结果显示, chi-(pVP1 + pLTN)组诱生的特异性杀伤率达(67.5 ± 7.3)% ,显著高于 chi-(pVP1 + pcDNA3.1)组的(45.9 ± 4.3)%(P<0.05),提示 LTN 共免疫可增强胃肠道黏膜特异性细胞免疫应答(图 2)。

### 2.3 免疫小鼠心肌病理学观察

雄性 BALB/c 小鼠经 chi-(pVP1 + pLTN)疫苗隔周滴鼻免疫,共 4 次,于末次免疫后 2 周,以 3 LD<sub>50</sub>/0.1 ml CVB3 经腹腔感染小鼠。7 d 后以心肌组织形态特征和病理分级作为评价心肌炎严重程度的指标进行评判。结果显示, chi-pcDNA3.1 组小鼠心室内、外壁均出现大量严重的灶性坏死,大量心肌细胞被破坏,代之以成团的炎性淋巴细胞浸润,心肌坏死性损伤比较严重(表 1、图 3)。chi-(pVP1 + pcDNA3.1)组小鼠心肌坏死性损伤较轻,

心肌实质中仅见少量淋巴细胞浸润和坏死灶,炎症灶多集中于心内膜下,范围较大。chi-(pVP1 + pLTN)组小鼠心肌损伤最轻,其中仅 1 只小鼠心内膜下可见少量炎症病灶且程度较轻;其余 5 只心肌完全正常,除有细胞浊肿现象和少量淋巴细胞浸润外,无明显异常,近似于正常心肌细胞。结果提示,chi-(pVP1 + pLTN)新型疫苗滴鼻免疫可有效预防病毒性心肌炎。

表 1 各免疫组小鼠病毒性心肌炎病理分级

Tab. 1 Pathological grading of viral myocarditis in mice receiving various vaccines

Group	+	++	+++	++++
Chi-(pVP1 + pLTN)	1/6	0/6	0/6	0/6
Chi-(pVP1 + pcDNA3.1)	0/6	2/6	0/6	0/6
Chi-pcDNA3.1	0/6	1/6	2/6	3/6

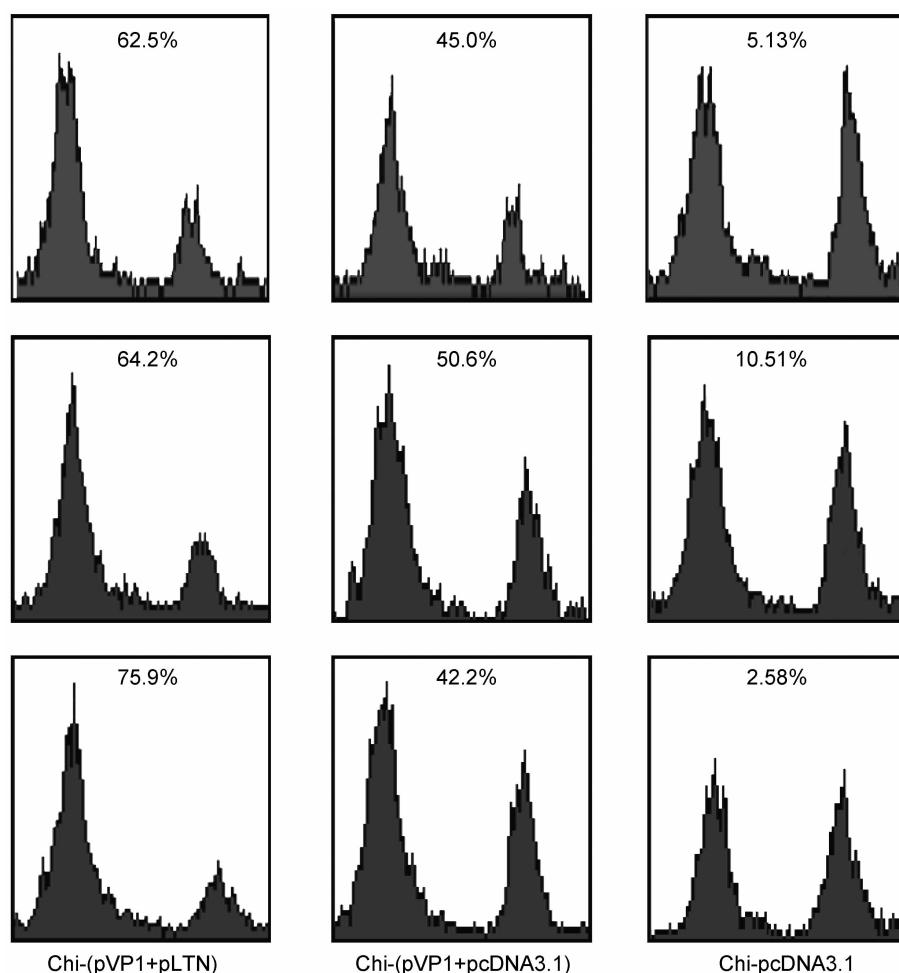


图 2 chi-(pVP1+pLTN)诱生的肠系膜淋巴结特异性 CTL 活性

Fig. 2 CTL activity in mesenteric lymph node induced by chi-(pVP1+pLTN)

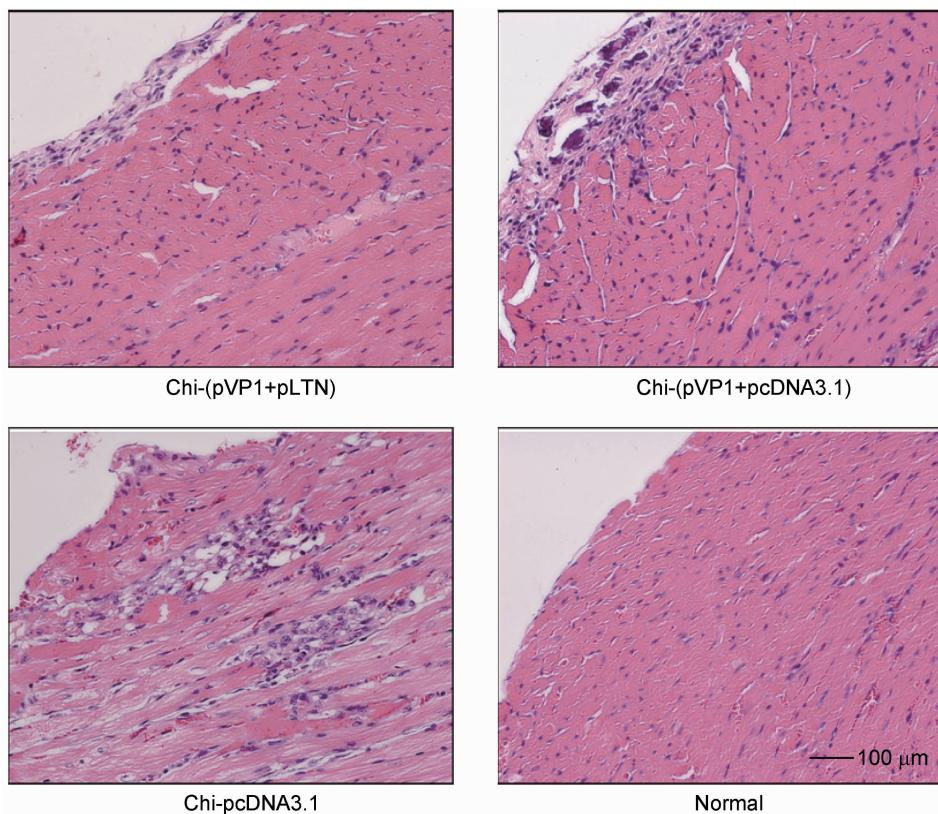


图 3  $3 \text{ LD}_{50}/0.1 \text{ ml}$  CVB3 感染 7 d 时免疫小鼠心肌组织的病理学观察

Fig. 3 Histopathological observation of myocardial tissue from immunized mice at day 7 following  $3 \text{ LD}_{50}/0.1 \text{ ml}$  CVB3 infection

#### 2.4 血清 CK 活性检测及心肌炎发病情况

为进一步观察 chi-(pVP1 + pLTN) 疫苗的免疫保护效果,我们统计 CVB3 感染 7 d 后各组小鼠心肌炎的发病率,并检测血清 CK 活性。结果显示,chi-pcDNA3.1 组小鼠 100% 出现病毒性心肌炎,血清 CK 活性显著升高(371 u/ml),提示有严重的心肌细胞损伤;chi-(pVP1 + pcDNA3.1) 组发病率为 33.3%,血清 CK 活性为 125 u/ml,心肌损伤程度较 chi-pcDNA3.1 组明显减轻,提示 chi-(pVP1 + pcDNA3.1) 具有一定的免疫保护效果;而 chi-(pVP1 + pLTN) 组仅有 16.7% 小鼠出现心肌炎,血清 CK 值也最低,仅为 54 u/ml,心肌受损范围最小,程度最轻,提示 pLTN 共免疫可增强 chi-pVP1 基因疫苗的免疫保护效果,更有效地预防病毒性心肌炎的发生(表 2、图 4)。

### 3 讨论

黏膜是机体抗感染的第一道防线,同时也是诸多病原体(如人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)、结核分枝杆菌、流行性感冒

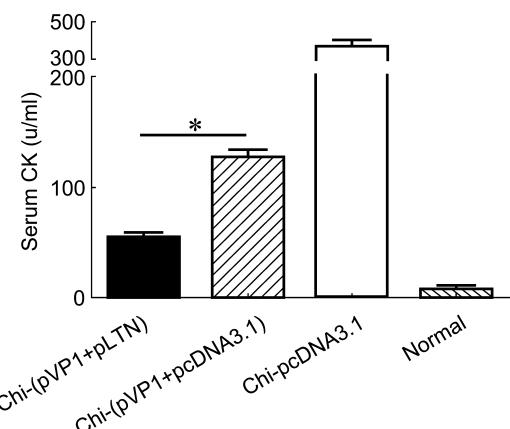


图 4  $3 \text{ LD}_{50}/0.1 \text{ ml}$  剂量 CVB3 感染 7 d 时免疫小鼠血清 CK 水平

Fig. 4 The levels of serum CK in immunized mice at day 7 following  $3 \text{ LD}_{50}/0.1 \text{ ml}$  CVB3 infection

病毒 H5N1 等)入侵的主要门户。倘若机体不能诱导有效的黏膜免疫应答,病原体会迅速扩散入血,进而侵犯全身,造成机体损伤;同时易发展为慢性感染,导致严重致死性疾病。因此如何诱导有效的黏膜局部免疫应答成为近年来免疫学领域的热点问

表 2 各免疫组小鼠病毒性心肌炎发生率

Tab. 2 Incidence of viral myocarditis in mice receiving various vaccines

Group	Total number of mice	Number of diseased mice	Incidence (%)
Chi-(pVP1 + pLTN)	6	1	16.7
Chi-(pVP1 + pcDNA3.1)	6	2	33.3
Chi-pcDNA3.1	6	6	100

题,也成为疫苗研制的重要方向和策略<sup>[12-14]</sup>。研究证实,黏膜途径给予抗原是诱导黏膜免疫应答最有效的手段。我们前期研究设计的 chi-pVP1 通过滴鼻免疫可诱生较高水平的黏膜 IgA 和脾脏 CTL 应答,具有一定的预防 CVB3 感染及病毒性心肌炎发生的效果。本研究在原有的 chi-pVP1 疫苗体系中,引入 C 家族趋化因子 LTN,以期增强黏膜免疫应答,更有效地预防病毒性心肌炎的发生。

本研究发现, pLTN 滴鼻共免疫可显著提高 chi-pVP1 诱导的特异性粪便 IgA 水平,可能是由于 LTN 诱导黏膜局部免疫应答偏离,促进 Th1 和 Th2 型细胞因子分泌。一方面白细胞介素 4(interleukin 4, IL-4)、IL-6 等细胞因子促进抗体类别转换,促进 IgA 的产生;另一方面, LTN 可能通过上调黏膜上皮细胞膜上 IgA 受体 pIgR 的表达,促进 IgA 转运<sup>[11]</sup>。SIgA 是黏膜局部重要的免疫效应分子之一,不仅可通过中和作用阻止细菌、病毒等在黏膜局部附着、定植及入侵,还可通过抗体介导的细胞毒作用及调理吞噬作用清除已进入机体循环系统和局部组织的病原体,对抵御病原体感染极为关键<sup>[15]</sup>。因此,诱导高水平的 IgA 是黏膜疫苗设计的重要目标之一。此外,本研究还发现滴鼻给予 pLTN 可增强远端黏膜淋巴组织肠系膜淋巴结的 CTL 功能。以往研究显示,用 LTN 修饰肿瘤疫苗后可上调瘤体局部 IL-2、γ 干扰素(interferon γ, IFN-γ),促进特异性 CTL 免疫应答<sup>[16]</sup>;更有学者提出, LTN 属于 Th1 型趋化因子<sup>[17]</sup>。我们的工作证实了上述 LTN 增强 CTL 功能的观点和结果,但与以往报道不同的是,本研究将其佐剂效应进一步扩展到黏膜 CTL 应答的诱导中,即黏膜途径给予 LTN DNA 质粒可促进黏膜局部淋巴细胞的杀伤功能,这一结果为增强黏膜免疫应答提供了一种新思路。

由于 chi-(pVP1 + pLTN) 疫苗显著增强 CVB3

特异性黏膜免疫应答,有效清除病毒,成功抵抗 CVB3 的攻击,因此仅有 16.7% 的小鼠出现心肌炎症状,且心肌损伤程度极轻。与 chi-(pVP1 + pcDNA3.1) 组 33.3% 的小鼠出现病毒性心肌炎、心内膜下有较多炎症浸润等相比,具有显著差异,提示 chi-(pVP1 + pLTN) 提供了更为有效的免疫保护效果,能更好地预防病毒性心肌炎的发生。本研究为柯萨奇病毒疫苗的研制、LTN 作为黏膜疫苗佐剂的进一步探讨提供了有意义的基础。

## 参考文献

- [1] Esfandiarei M, Suarez A, Amaral A, Si X, Rahmani M, Dedhar S, McManus BM. Novel role for integrin-linked kinase in modulation of coxsackievirus B3 replication and virus-induced cardiomyocyte injury [J]. Circ Res, 2006, 99 (4): 354-361.
- [2] Fairweather D, Rose NR. Coxsackievirus-induced myocarditis in mice: a model of autoimmune disease for studying immunotoxicity [J]. Methods, 2007, 41(1): 118-122.
- [3] Xu W, Shen Y, Jiang Z, Wang Y, Chu Y, Xiong S. Intranasal delivery of chitosan-DNA vaccine generates mucosal SIgA and anti-CVB3 protection [J]. Vaccine, 2004, 22(27-28): 3603-3612.
- [4] Allen SJ, Crown SE, Handel TM. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism [J]. Annu Rev Immunol, 2007, 25: 787-820.
- [5] Kuhmann SE, Hartley O. Targeting chemokine receptors in HIV: a status report [J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2008, 48: 425-461.
- [6] Miller RJ, Rostene W, Apartis E, Banisadr G, Biber K, Milligan ED, White FA, Zhang J. Chemokine action in the nervous system [J]. J Neurosci, 2008, 28 (46): 11792-11795.
- [7] Jin T, Xu X, Hereld D. Chemotaxis, chemokine receptors and human disease [J]. Cytokine, 2008, 44(1): 1-8.
- [8] Dorgham K, Abadie V, Iga M, Hartley O, Gorochov G, Combadiere B. Engineered CCR5 superagonist chemokine as adjuvant in anti-tumor DNA vaccination [J]. Vaccine, 2008, 26(26): 3252-3260.
- [9] Han YW, Aleyas AG, George JA, Kim SJ, Kim HK, Yoo DJ, Kang SH, Eo SK. Genetic co-transfer of CCR7 ligands enhances immunity and prolongs survival against virulent challenge of pseudorabies virus [J]. Immunol Cell Biol, 2009, 87(1): 91-99.
- [10] Hedrick JA, Zlotnik A. Lymphotactin [J]. Clin Immunol Immunopathol, 1998, 87(3): 218-222.
- [11] Lillard JW Jr, Boyaka PN, Hedrick JA, Zlotnik A, McGhee JR. Lymphotactin acts as an innate mucosal

- adjuvant [J]. *J Immunol*, 1999, 162(4): 1959-1965.
- [12] Iqbal SM, Kaul R. Mucosal innate immunity as a determinant of HIV susceptibility [J]. *Am J Reprod Immunol*, 2008, 59(1): 44-54.
- [13] Kersten G, Hirschberg H. Needle-free vaccine delivery [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2007, 4(5): 459-474.
- [14] Yuki Y, Nuchi T, Kiyono H. Progress towards an AIDS mucosal vaccine: an overview [J]. *Tuberculosis (Edinb)*, 2007, 87(Suppl 1): S35-S44.
- [15] Brandtzaeg P. Induction of secretory immunity and memory at mucosal surfaces [J]. *Vaccine*, 2007, 25 (30): 5467-5484.
- [16] Huang H, Bi XG, Yuan JY, Xu SL, Guo XL, Xiang J. Combined CD4<sup>+</sup> Th1 effect and lymphotactin transgene expression enhance CD8<sup>+</sup> Tc1 tumor localization and therapy [J]. *Gene Ther*, 2005, 12(12): 999-1010.
- [17] Dorner BG, Scheffold A, Rolph MS, Huser MB, Kaufmann SH, Radbruch A, Flesch IE, Krocze RA. MIP-1alpha, MIP-1beta, RANTES, and ATAC/lymphotactin function together with IFN-gamma as type 1 cytokines [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(9): 6181-6186.

(收稿日期:2010-03-04)