

文章编号: 0258-5898 (2009) 10-1152-05

· 论著 ·

人细胞内 I 型血小板激活因子乙酰水解酶重组蛋白的构建、纯化及酶活性研究

陈晓莹^{1*}, 徐 静^{2*}, 杨军伟³, 张怡轩¹

(1. 沈阳药科大学 生命科学与生物制药学院, 沈阳 110016; 2. 上海医药高等专科学校基础部, 上海 201318; 3. 中国科学院 上海生命科学研究院植物生理生态研究所, 上海 200032)

摘要: 目的 构建人细胞内 I 型血小板激活因子乙酰水解酶(PAF-AH) 重组蛋白并加以纯化, 利用不同底物研究酶活性。方法 细胞内 I 型 PAF-AH β 亚基基因进行 PCR 扩增, 目的基因经纯化、连接载体转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞构建重组蛋白, 提取质粒行琼脂糖凝胶电泳、Nde I 和 Hind III 双酶切及测序鉴定。鉴定正确的重组质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3) pLysS 感受态细胞诱导蛋白表达和纯化, 15% SDS-PAGE 和 Western blotting 鉴定。分别以乙酸苯酯、1-O-hexadecyl-2-deoxy-2-thioacetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (2-Thio PAF) 和 1-myristoyl-2-(4-nitrophenylsuccinyl) phosphatidylcholine 为底物(后两者为血浆型 PAF-AH 的商业化底物), 应用分光光度法检测纯化后重组蛋白的酶活性, 以血浆型 PAF-AH 作为阳性对照。结果 人细胞内 PAF-AH I 型 β 亚基重组蛋白构建正确, 纯化后在大肠杆菌感受态细胞中诱导表达。与阳性对照血浆型 PAF-AH 比较, 纯化后的重组蛋白同样能够水解乙酸苯酯, 具有芳香酯酶活性; 能快速水解 2-Thio PAF, 但不能水解 1-myristoyl-2-(4-nitrophenylsuccinyl) phosphatidylcholine。结论 成功构建人细胞内 I 型 PAF-AH 重组蛋白, 其对血浆型 PAF-AH 的两个商业化底物具有完全不同的水解能力, 以此可快速区分细胞内和血浆型 PAF-AH 。

关键词: I 型血小板激活因子乙酰水解酶; 血浆型血小板激活因子乙酰水解酶; 重组蛋白; 纯化; 酶活性; 底物

中图分类号: Q814 文献标志码: A

Construction, purification and substrate specificity identification of recombinant human platelet-activating factor acetylhydrolase isoform I

CHEN Xiao-ying^{1*}, XU Jing^{2*}, YANG Jun-wei³, ZHANG Yi-xuan¹

(1. School of Life Science and Biopharmaceutics, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 2. Shanghai Institute of Health Sciences, Shanghai 201318, China; 3. Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institute for Biological Sciences, Shanghai 200032, China)

Abstract: **Objective** To construct and purify the recombinant protein of platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) isoform I , and study the enzyme activity by different substrates. **Methods** The β subunit of PAF-AH isoform I was cloned and expressed in *E. coli*. Exogenously expressed recombinant protein was purified to SDS-PAGE homogeneity, and its activity was identified by arylesterase detection. Phenylacetate, 1-O-hexadecyl-2-deoxy-2-thioacetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (2-Thio PAF) and 1-myristoyl-2-(4-nitrophenylsuccinyl) phosphatidylcholine (the latter two were commercial plasma PAF-AH substrates) were used for the substrate identification. The plasma type PAF-AH was served as positive control. **Results** Recombinant protein of β subunit of PAF-AH isoform I was successfully constructed and expressed in *E. coli* after purification. Compared with positive control, the recombinant protein could hydrolyze phenylacetate and 2-Thio PAF, but could not hydrolyze 1-myristoyl-2-(4-nitrophenylsuccinyl) phosphatidylcholine.

Conclusion Recombinant protein of β subunit of PAF-AH isoform I can be successfully constructed. There are differences in the substrate specification to the two commercial PAF substrates for PAF-AH isoform I and plasma type PAF-AH, which provides a quick method to differentiate PAF-AH isoform I from plasma type PAF-AH.

Key words: platelet-activating factor acetylhydrolase isoform I ; plasma platelet-activating factor acetylhydrolase; recombinant protein; purification; enzyme activity; substrate

基金项目: 国家自然科技资源平台项目(2005DKA21203)(National Natural Science and Technology Resource Platform Program, 2005DKA21203)。
* 共同第一作者。

作者简介: 陈晓莹(1984—), 女, 硕士生; 电子信箱: chxychxy@hotmail.com; 徐 静(1981—), 女, 助教, 硕士; 电子信箱: xujing_x@126.com。
通讯作者: 张怡轩, 电子信箱: zhangyixuan@sypmu.edu.cn。

血小板激活因子(platelet-activating factor, PAF)是一种具有广泛生物学活性的磷脂,可在极低浓度下与特异性G蛋白受体结合而活化多种细胞,介导炎症反应和疾病发生,影响心脑血管、呼吸、消化、生殖和皮肤等多种组织系统^[1]。PAF的活性可以被血小板激活因子乙酰水解酶(platelet-activating factor acetylhydrolase, PAF-AH)灭活,而终止其生理作用^[2]。近年来研究^[3-4]发现,血清中PAF-AH的变化在心血管疾病、哮喘、多器官衰竭、糖尿病和败血症等疾病的致病机制中具有重要作用。

血清中的PAF-AH活力主要来源于血浆型PAF-AH(70%)和细胞内I型PAF-AH(30%)^[3]。以往对于血浆型PAF-AH和细胞内I型PAF-AH的鉴定,需要通过繁琐的薄层层析来定性^[2];或运用同位素定量检测法测定各自的含量加以鉴别^[5]。近年来,美国Cayman Chemical公司和日本Azwell公司相继推出了检测血浆型PAF-AH的试剂盒,底物分别为l-O-hexadecyl-2-deoxy-2-thioacetyl-sn-glycero-3-phosphocholine(2-ThioPAF)和1-myristoyl-2-(4-nitrophenylsuccinyl)phosphatidylcholine^[6-7],由于其操作简单且无毒性,已逐步取代了传统的同位素定量检测法(底物为[³H]acetyl-PAF)^[5]。但是有关细胞内I型PAF-AH对上述两个商业化底物的水解作用尚未见报道。

鉴于细胞内I型PAF-AH中β亚基(ββ)的底物特异性与细胞内I型PAF-AH全酶(αβγ或αγγ或αββ)完全一致^[2],本研究将细胞内I型PAF-AH的β亚基基因重组入表达载体中,转入工程菌中诱导表达,利用不同底物观察纯化后重组蛋白的酶活性以探讨其底物特异性,探索建立一种简单、快捷的区分血浆型PAF-AH与细胞内I型PAF-AH的方法,为进一步研究两者的致病机制奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料 人细胞内I型PAF-AH β亚基克隆(Clone ID 4301185)(Invitrogen);T载体、T₄DNA连接酶及限制性内切酶Nde I、Hind III(TaKaRa);胶回收试剂盒(上海华舜生物工程有限公司);卡那霉素、异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)、Ni-NTA树脂和质粒小量抽提试剂盒(上海申能博彩生物技术有限公司);Anti-His小鼠单克隆抗体IgG2a(上海天根公司);底物乙酸苯酯(Sigma);人血浆型PAF-AH蛋

白及底物2-ThioPAF(Cayman Chemical);蛋白标准Marker(Fermentas);底物1-myristoyl-2-(4-nitrophenylsuccinyl)phosphatidylcholine(Azwell)。表达载体pET-28b(+),大肠杆菌DH5α和BL21(DE3)pLysS感受态细胞为本实验室保存。

1.2 人细胞内I型PAF-AH重组蛋白的构建、纯化和鉴定

1.2.1 原核表达载体质粒的构建和鉴定:根据从GenBank获得的细胞内I型PAF-AHβ亚基基因序列设计引物,由上海申能博彩生物技术有限公司合成。上游引物序列:5'-CATATGAGTGGAGAGGAGAA CCCA-3'(划线处为Nde I酶切位点),下游引物序列:5'-TTAGGGTGCGGGCTCCA-3'。在53℃的退火温度下,进行PCR扩增得到目的基因,对PCR产物进行胶回收纯化,纯化后的基因片段连接至T载体中,转化大肠杆菌DH5α感受态细胞。涂板后挑取白色重组单克隆,提取质粒进行琼脂糖凝胶电泳鉴定,鉴定正确的质粒以Nde I、Hind III双酶切,通过琼脂糖凝胶电泳分离回收目的基因,连接至以相同酶酶切的pET-28b(+)表达载体中。构建重组质粒并再次转化大肠杆菌DH5α感受态细胞。涂板挑取阳性克隆,培养后提取质粒送上海英骏生物技术有限公司测序。

1.2.2 重组蛋白诱导表达、纯化和鉴定:将测序正确的重组质粒转化至大肠杆菌BL21(DE3)pLysS感受态细胞。挑单菌落小量培养,卡那霉素终浓度为50 μg/mL,37℃过夜培养。按1:100转入600 mL LB培养基,培养至D_{600 nm}=0.6~0.8,加入IPTG至终浓度为1.0 mmol/L,经30℃诱导3 h,菌体经超声裂解后离心,各组分经15%SDS-PAGE蛋白电泳鉴定。由于重组蛋白带有His-tag序列,利用与His-tag有特异亲和作用的Ni-NTA树脂纯化蛋白。即收集超声上清液,在非变性条件下,使用柱亲和层析法吸附含有His-tag的蛋白,参照试剂盒说明书操作步骤,经上柱、洗涤、洗脱(咪唑浓度分别为20、40、60、80、100、200、1 000 mmol/L)、透析、浓缩,制备纯化的重组蛋白。蛋白浓度用考马斯亮蓝G-250法测定。并使用Anti-His小鼠单克隆抗体IgG2a(1:4 000)作为一抗对已纯化蛋白的专一性作Western blotting鉴定。

1.3 人细胞内I型PAF-AH重组蛋白酶活性检测

1.3.1 以乙酸苯酯为底物:采用分光光度法测定重组蛋白的芳香酯酶活性^[8]。反应缓冲液为2 mmol/L

CaCl_2 , pH 8.0 的 50 mmol/L Tris-Acetate, 将乙酸苯酯用无水乙醇 1:10 稀释(临用当天新鲜配制, 贮于 -20 ℃), 取 6 μL 该稀释液与 1 mL 反应缓冲液混匀, 底物终浓度为 5 mmol/L, 加入 10 μL 重组蛋白 (0.1 mg/mL) 后, 立即于 270 nm 比色, 室温下检测 4 min 内光密度值 ($D_{270 \text{ nm}}$) 的变化情况。以人血浆型 PAF-AH 蛋白标准品作为阳性对照。

1.3.2 以 2-Thio PAF 为底物:采用分光光度法进行测定, 具体操作参照试剂盒说明书。10 \times buffer 稀释成 1 \times buffer [0.1 mol/L Tris-HCl (pH 7.2), 1 mmol/L EGTA]。用 1 \times buffer 配置 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 底物反应液。在 200 μL 底物反应液中加入 15 μL 重组蛋白 (0.1 mg/mL), 室温反应 30 min 后, 迅速加入试剂盒中的 DTNB 显色剂, 室温下检测 4 min 内光密度值 ($D_{405 \text{ nm}}$) 的变化情况。以人血浆型 PAF-AH 蛋白标准品作为阳性对照。

1.3.3 以 1-myristoyl-2-(4-nitrophenylsuccinyl) phosphatidylcholine 为底物:采用分光光度法进行测定, 具体操作参照试剂盒说明书。以 19:1 比例将 HEPES buffer (pH 7.6) 与底物均匀混合, 制备底物反应液。取 4 μL 重组蛋白 (0.1 mg/mL) 加入 240 μL HEPES buffer (pH 7.6) 中, 于 37 ℃ 保温 5 min, 迅速加入 80 μL 底物反应液, 混匀后立即转移至已经预热至 37 ℃ 的比色杯中, 测定 4 min 内光密度 ($D_{405 \text{ nm}}$) 的变化情况。以人血浆型 PAF-AH 蛋白标准品作为阳性对照。

2 结果

2.1 人细胞内 I 型 PAF-AH β 亚基基因克隆鉴定 用 PCR 方法从带有 β 亚基的质粒克隆扩增 PAF-AH 的相应片段, 扩增出的片段的长度为 696 bp (图 1A)。将已经克隆的人细胞内 I 型 PAF-AH β 亚基基因片断连接到 T 载体, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 扩增后提取质粒进行酶切鉴定 (图 1B)。构建重组质粒再转化大肠杆菌 DH5 α , 经测序鉴定表明其序列与原 PAF-AH 基因序列完全一致, 且酶切位点连接正确。

2.2 重组蛋白诱导表达和纯化鉴定 重组质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3) pLysS 感受态细胞。菌体超声上清液经 His-tag 标签亲和层析分离后行 15% SDS-PAGE 电泳鉴定 (图 1A), 结果显示在咪唑浓度 200 mmol/L 时可以得到单一条带, 纯化后的蛋白大

小与在全菌中过表达蛋白的迁移率相同, 其相对分子质量在 27 000 左右, 与文献^[2] 报道的细胞内 I 型 PAF-AH β 亚基蛋白大小一致。同时, Western blotting 分析显示, 经 IPTG 诱导表达及亲和层析分离纯化后的蛋白是目标蛋白 (图 2B), 提示在大肠杆菌中重组表达人细胞内 I 型 PAF-AH β 亚基蛋白获得成功。

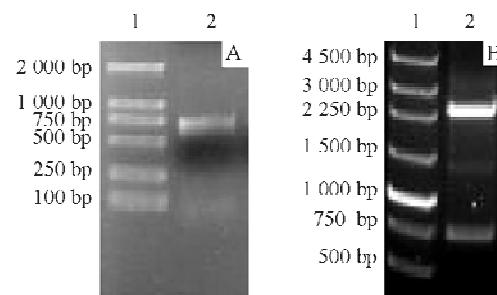


图 1 I 型 PAF-AH β 亚基基因的 PCR 扩增(A)和酶切鉴定(B)结果
Fig 1 PCR results (A) and restriction analysis (B) of β subunit of PAF-AH isoform I

1: DNA marker; 2: PAF-AH (696 bp)

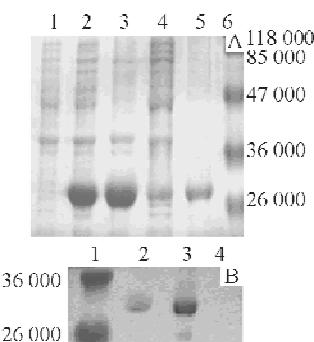


图 2 重组蛋白诱导表达和纯化鉴定
Fig 2 Identification of expression and purification of recombinant protein

A: identification by 15% SDS-PAGE. Lane 1: cell lysate of *E. coli* harboring pET-28b (+) as the negative control; lane 2: total bacterial lysate after the IPTG induction; lanes 3 and 4: the insoluble and soluble protein fractions, respectively, of the bacterial lysate after 4 h past the induction with IPTG; lane 5: protein purified with Ni-NTA column; lane 6: the molecular weight markers. Gel was stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. B: Identification by Western blotting. Lane 1: the molecular weight markers; lane 2: protein purified with Ni-NTA column; lane 3: total bacterial lysate after the IPTG induction; lane 4: cell lysate of *E. coli* harboring pET-28b (+) as the negative control

2.3 重组蛋白的酶活性和底物特异性 分光光度法检测结果显示, 纯化后的人细胞内 I 型 PAF-AH 重组蛋白具有水解乙酸苯酯的能力, 起作用与阳性对照血浆型 PAF-AH 类似 (图 3), 提示纯化后的重组人细胞内 I 型 PAF-AH 具有芳香酯酶活性。纯化后

的重组蛋白能快速水解 2-Thio PAF(图 4),却不能水解 1-myristoyl-2-(4-nitrophenylsuccinyl) phosphatidylcholine(图 5),提示纯化后的重组人细胞内 I 型 PAF-AH 对阳性对照血浆型 PAF-AH 两个商业化底物的水解能力完全不同。

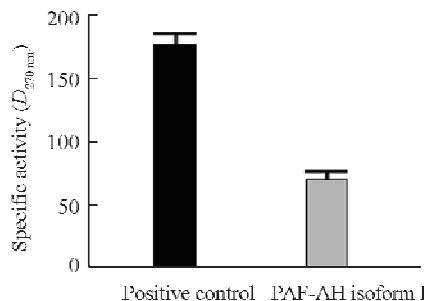


图 3 重组人细胞内 I 型 PAF-AH 芳香酯酶活性检测

Fig 3 Arylesterase activity of recombinant human PAF-AH isoform I

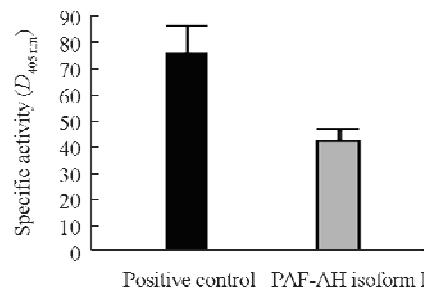


图 4 利用商业化底物(2-Thio PAF)检测重组人细胞内 I 型 PAF-AH 底物特异性

Fig 4 Specific activity of recombinant human PAF-AH isoform I detected by cayman substrate (2-Thio PAF)

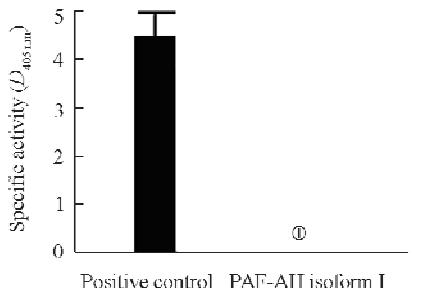


图 5 利用商业化底物 1-myristoyl-2-(4-nitrophenylsuccinyl) phosphatidylcholine 检测重组人细胞内 I 型 PAF-AH 底物特异性

Fig 5 Specific activity of recombinant human PAF-AH isoform I detected by cayman substrate [1-myristoyl-2-(4-nitrophenylsuccinyl) phosphatidylcholine]

①: represented that no enzymatic activity was determined

3 讨 论

PAF-AH 是磷脂酶 A2 家族中独特的一员,除了可以水解乙酸苯酯外,还具有显著的底物选择性,可作用于 PAF 以及结构和生物学活性类似于 PAF 的氧

化磷脂类化合物,这些底物的共同结构特点是在 sn-2 位置上具有酯键;而 sn-1 位置上的官能团不影响其反应活性。目前发现人体内 PAF-AH 共有三种类型,分别为血浆型、细胞内 I 型和细胞内 II 型,其中血浆型 PAF-AH 与细胞内 II 型 PAF-AH 氨基酸序列的一致性为 41%,都能水解在 sn-2 位置上有 1~16 个碳基团的磷脂^[2-3]。细胞内 I 型 PAF-AH 由 3 个亚基组成,分别为 α 、 β 和 γ 。其中 α 亚基没有催化活性,只具有调节酶活性的功能; β 和 γ 亚基为催化亚基,具有催化活性,两者有 63.2% 的一致性;各种亚基的不同组合($\alpha\beta\gamma$ 、 $\alpha\gamma\gamma$ 、 $\alpha\beta\beta$ 、 $\beta\beta$ 、 $\beta\gamma$ 和 $\gamma\gamma$)都有相同的底物特异性,都只能水解在 sn-2 位置上有 1~2 个碳基团的磷脂^[2-3]。

利用基因工程菌获得融合蛋白是目前分子生物学常用的一种方法。本实验采用大肠杆菌作为宿主菌,采用 pET-28b (+) 质粒作为载体,在 37 °C 培养后的表达过程中,若以正常温度诱导表达,只能获得大量的以包涵体形式表达的蛋白,这些蛋白需要进行变性纯化,之后必须要经过复性实验才能进行活性检测,成功率较低。因此在多次预实验后确定以低温条件进行诱导,结果表达出可溶的重组蛋白,并成功纯化得到 PAGE 纯的可溶重组蛋白。

由于这种利用基因工程菌获得融合蛋白的方法会使重组蛋白在表达时得到一个用于纯化的 His-Tag 标签,从而使得细胞内 I 型 PAF-AH 重组蛋白的 N 末端联有 6 个连续的组氨酸,可能会对重组蛋白的二、三级结构和酶活性造成一定影响。然而在本实验人细胞内 I 型 PAF-AH 重组蛋白的酶活性鉴定中,不仅展示出芳香酯酶的活性,同时也具有 PAF-AH 的活性(水解 2-Thio PAF),提示其 N 末端融合的组氨酸没有影响重组蛋白的活性。

本研究表明,重组人细胞内 I 型 PAF-AH 能水解 2-Thio PAF,但是不能水解 1-myristoyl-2-(4-nitrophenylsuccinyl) phosphatidylcholine,可能与它们在 sn-2 位置上分别带有不同的基团(2 和 3 个碳)有关,由此证明人细胞内 I 型 PAF-AH 和血浆型 PAF-AH 对已经商业化的两个底物具有完全不同的水解能力,因此可作为区分两者的一个特征。

鉴于血清中的 PAF-AH 活力主要来源于血浆型 PAF-AH(70%)和胞内 PAF-AH I 型(30%)^[3], Claus 等^[9]认为可能是由于细胞内 I 型 PAF-AH 的参与才导致败血症患者血浆中总体 PAF-AH 的升高。最近,本课题组研究^[10]发现,与为正常人比较,钩端螺旋

旋体黄疸出血群患者血清中 PAF-AH 酶活力约升高 100% ,而这种 PAF-AH 酶活力的升高可能与人细胞内 I 型 PAF-AH 的释放有关。本实验结果表明,可以利用两种类型 PAF-AH 对两个商业化底物特异性的不同对细胞内 I 型 PAF-AH 和血浆型 PAF-AH 进行快速区分,为进一步研究血浆型 PAF-AH 和细胞内 I 型 PAF-AH 的致病机制奠定了实验基础。

参考文献:

- [1] Kasperska-Zajac A, Brzoza Z, Rogala B. Platelet-activating factor (PAF): a review of its role in asthma and clinical efficacy of PAF antagonists in the disease therapy [J]. Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov, 2008, 2(1): 72–76.
- [2] Stafforini DM. Biology of platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH, lipoprotein associated phospholipase A2) [J]. Cardiovasc Drugs Ther, 2009, 23(1): 73–83.
- [3] Arai H, Koizumi H, Aoki J, et al. Platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) [J]. J Biochem (Tokyo), 2002, 131(5): 635–640.
- [4] Min J H, Wilder C, Aoki J, et al. Platelet-activating factor acetylhydrolases: broad substrate specificity and lipoprotein binding does not modulate the catalytic properties of the plasma enzyme [J]. Biochemistry, 2001, 40(15): 4539–4549.
- [5] Liu G, Jin G, Jin C. CMP-N-acetylnumeramic acid synthetase from Escherichia coli K1 is a bifunctional enzyme: identification of minimal catalytic domain for synthetase activity and novel functional domain for platelet-activating factor acetylhydrolase activity [J]. J Biol Chem, 2004, 279(17): 17738–17749.
- [6] Kosaka T, Yamaguchi M, Soda Y, et al. Spectrophotometric assay for serum platelet-activating factor acetylhydrolase activity [J]. Clin Chim Acta, 2000, 296(1–2): 151–161.
- [7] Memon R A, Fuller J, Moser A H, et al. In vivo regulation of plasma platelet-activating factor acetylhydrolase during the acute phase response [J]. Am J Physiol, 1999, 277(1 Pt 2): R94–R103.
- [8] Elkiran ET, Mar N, Aygen B, et al. Serum paraoxonase and arylesterase activities in patients with lung cancer in a Turkish population [J]. BMC Cancer, 2007, 7: 48.
- [9] Claus RA, Russwurm S, Dohrn B, et al. Plasma platelet-activating factor acetylhydrolase activity in critically ill patients [J]. Crit Care Med, 2005, 33(6): 1416–1419.
- [10] Yang J, Zhang Y, Xu J, et al. Serum activity of platelet-activating factor acetylhydrolase is a potential clinical marker for leptospirosis pulmonary hemorrhage [J]. PLoS One, 2009, 4(1): e4181.

收稿日期: 2009-06-12

本文编辑: 王淑平

(上接第 1151 页)

参考文献:

- [1] Wang HY, Wang RF. Regulatory T cells and cancer [J]. Curr Opin Immunol, 2007, 19(2): 217–223.
- [2] Miyara M, Sakaguchi S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression [J]. Trends Mol Med, 2007, 13(3): 108–116.
- [3] Sakaguchi S, Ono M, Setoquchi R, et al. Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease [J]. Immunol Rev, 2006, 212(8): 8–27.
- [4] Danese S, Rutella S. The Janus face of CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells in cancer and autoimmunity [J]. Curr Med Chem, 2007, 14(6): 649–666.
- [5] Levings MK, Allan S, Hennezel E, et al. Functional dynamics of naturally occurring regulatory T cells in health and autoimmunity [J]. Adv Immunol, 2006, 92(1): 119–155.
- [6] Toda A, Piccirillo CA. Development and function of naturally occurring CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells [J]. J Leukoc Biol, 2006, 80(3): 458–470.
- [7] Mudd PA, Teague BN, Farris AD. Regulatory T cells and systemic lupus erythematosus [J]. Scand J Immunol, 2006, 64(3): 211–218.
- [8] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, et al. Immunologic tolerance maintained by CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance [J]. Immunol Rev, 2001, 182: 18–32.

- [9] Antony PA, Restifo NP. Do CD4⁺ CD25⁺ immunoregulatory T cells hinder tumor immunotherapy [J]? J Immunother, 2002, 25(3): 202–206.
- [10] Comes A, Rosso O, Orengo AM, et al. CD25⁺ regulatory T cell depletion augments immunotherapy of micrometastases by an IL-21-secreting cellular vaccine [J]. J Immunol, 2006, 176(3): 1750–1758.
- [11] Finn OJ. Cancer vaccines: between the idea and the reality [J]. Nature Rev Immunol, 2003, 3(4): 630–641.
- [12] Khong HT, Restifo NP. Natural selection of tumor variants in the generation of ‘tumor escape’ phenotypes [J]. Nature Immunol, 2002, 3(8): 999–1005.
- [13] Walker LS, Ghodos A, Egguna M, et al. Antigen-dependent proliferation CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells *in vivo* [J]. J Exp Med, 2003, 198(2): 249–258.
- [14] Ziegler SF. FOXP3: of mice and men [J]. Annu Rev Immunol, 2006, 24: 209–226.
- [15] Hooley DA, Larregina AT, Erdos G, et al. Tumor cell loaded type-I polarized dendritic cells induce Th1-mediated tumor immunity [J]. Cancer Res, 2005, 65(12): 10059–10067.
- [16] Chen GJ, Li NL, Yin CQ, et al. Vaccination with selected synovial T cells in rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Rheum, 2007, 56(2): 453–463.

收稿日期: 2009-07-08

本文编辑: 吴洋