

文章编号 1006-8147(2017)03-0185-04

论 著

体外合成 JSRV mRNA 及其体内表达特异性中和抗体的研究

白洁¹, 李光明¹, 王金鑫¹, 宋紫暄¹, 吴志敏², 高雁³, 朱泽¹

(1.天津医科大学病原生物学教研室, 天津 300070; 2.武警广西总队医院检验科, 南宁 530021; 3.天津市美联博科技有限公司, 天津 300221)

摘要 目的:应用假病毒中和法检测体外合成 JSRV-env mRNA 免疫小鼠产生的特异性抗体。方法:优化 PT7TS 载体序列,插入目的序列经电泳验证后,体外转录合成 JSRV-env mRNA,将 mRNA 与鱼精蛋白结合后皮下注射免疫 BALB/c 小鼠。采用慢病毒包装系统制作 JSRV 假病毒,测定假病毒滴度,取不同组免疫小鼠血清进行假病毒为基础的抗体中和实验,检测小鼠体内针对 JSRV-env mRNA 的特异性抗体。结果:成功体外合成具有稳定性的 JSRV-env mRNA;重组了基于慢病毒质粒结构的 JSRV 假病毒,且具有感染能力;假病毒体外中和实验检测出 JSRV-env mRNA 免疫小鼠体内产生了针对 JSRV 的特异性抗体。结论:针对 JSRV 病毒包膜的信使 RNA,经皮下注射到小鼠体内,能够表达产生针对 JSRV-env 的中和抗体。

关键词 中和抗体;体外合成 mRNA;加亚西科逆转录病毒;病毒囊膜基因;小鼠

中图分类号 Q7

文献标志码 A

Synthesis of JSRV mRNA *in vitro* and its expression of specific antibodies in mouse

BAI Jie¹, LI Guang-ming¹, WANG Jin-xin¹, SONG Zi-xuan¹, WU Zhi-min², GAO Yan³, ZHU Ze¹

(1.Department of Microbiology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2.Clinical Laboratory, Armed Police Corps Hospital of Guangxi, Nanning 530021, China; 3.Tianjin Mei Lian Bo Technology Company, Tianjin 300221, China)

Abstract Objective: To detect the specific antibodies of JSRV-env mRNA immunized mice by pseudovirus neutralization method. **Methods:** The PT7TS vector was optimized before inserted in the target sequence. The recombinant plasmid of PT7TS-JSRV-env was verified by electrophoretic. After verifying its correctin *in vitro*, the JSRV-env mRNA was synthesized. The BALB/c mice were given subcutaneous injection with protamine and JSRV-env mRNA complex. The specific antibodies of JSRV-env mRNA immunized mice was determined by the pseudovirus neutralizing antibody test. The JSRV pseudovirus was produced by the lentivirus packaging system. **Results:** The JSRV-env mRNA was successfully synthesized *in vitro*. The JSRV pseudovirus was recombined and presented powerful infection ability. The neutralization test of the sample serum in immunized mice and JSRV pseudovirus verified the JSRV pseudovirus. **Conclusion:** JSRV-env producing antibodies can be expressed in mice by subcutaneous injections into JSRV-env eloped messenger RNA.

Key words neutralizing antibody; IVTmRNA; jaagsiekterretrovirus; env; mouse

加亚西科逆转录病毒(JSRV)经呼吸道传播,主要引起羊肺腺癌(OPA)^[1]。env 基因编码病毒包膜蛋白,由肽链穿膜蛋白(TM)和表面蛋白(SU)所构成,参与病毒融入宿主细胞过程与与细胞膜受体 HYAL2 结合引起肺腺癌的致癌信号传导。细胞、动物实验证实 JSRV-env 不仅具有呼吸道传播病毒的跨种属感染性特性,而且 JSRV-env 是原癌基因,具有致癌性^[2-3]。OPA 与人细支气管-肺泡癌(BAC)有相似的临床表现与病理特征,且抗 JSRV 衣壳蛋白(CA)血清与人 BAC 之间有 30%交叉反应。本研究前期分离纯化了我国内蒙古绵羊肺腺瘤中分离出来 JSRV 病毒内蒙古株(JSRV-NM)^[4],全基因测序

对比同源性发现,其 env 区域与内源性南非代表株和美洲代表株 env 对比,有高度同源性,证实 JSRV-NM 属于古老型很稳定。因此本研究以前期实验为基础,体外合成 JSRV-env 包膜基因 mRNA,皮下注射小鼠产生抗体,抵抗 JSRV 假病毒,揭示该 mRNA 在感染性疾病中的治疗潜力,探索对肺腺瘤的治疗性,为进一步预防我国呼吸道传染病奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞、质粒与慢病毒载体 载体 PT7TS 由本实验室保存;载体 PUC57 购自天津 GENEWIZ 公司;VSV-G 包膜质粒 pMD.G、pCMV-HIV Δ8.2 和报告质粒 pHIV-eGFP 质粒由法国国家医学与健康研究院杨光华博士惠赠。JSRV 的 env 包膜质粒

基金项目 国家自然科学基金资助项目(81672650)

作者简介 白洁(1990-),女,硕士在读,研究方向:转录机制及疾病的生物治疗;通信作者:朱泽, E-mail:zhuze@tmu.edu.cn。

pCMVJSRV 由本实验室保存。BALB/c 小鼠购自天津医科大学动物研究中心。

1.1.2 试剂及试剂盒 琼脂糖凝胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒购自天根生化科技有限公司, T7 RNA 快速高效合成试剂盒购自 Ambion 公司, PCR mix 液购自北京普利莱基因技术有限公司, 鱼精蛋白购自北京索莱宝公司。限制性内切酶 *Spe* I、*Sal* I 和 *Eco*R I 和 T4 DNA 连接酶购自 TransGen Biotech 公司。基因与引物合成及测序于 GENEWIZ 公司。绵羊 JSRV 阳性血清由内蒙古农业大学动物科学与医学学院刘淑英教授惠赠。

1.2 方法

1.2.1 JSRV-env 序列合成以及 PT7TS 载体优化 JSRV-env 序列, 查询 Genbank 获得, 序列号: NC_001494.1; 1 848 bp。前期经公司进行种属密码子优化。PT7TS 结构设计包含 T7 启动子、5'非编码区、globin 3'非编码区、PolyA 尾。

1.2.2 重组构建 PT7TS-JSRV-env 质粒 原载体 PUC57 经 *Sal* I 与 *Spe* I 双酶切获得 JSRV-env 基因片段, 经琼脂糖凝胶电泳后, 切胶回收。PT7TS 载体经 *Sal* I 与 *Spe* I 双切产物与上述回收目的产物 T4 DNA 连接酶连接。连接产物转化后 LB Amp 平板中进行蓝白斑初选。再挑取单克隆行菌液 PCR 筛选, 上游引物: 5'-CT ACTAGT (*Spe* I) TGGCATGCCGA AGCGC-3'; 下游引物序列: 5'-TA GTCGAC (*Sal* I) CGGGTCTCCCCCG-3'。PCR 反应条件为 95℃ 4 min, 95℃ 30 s, 40℃ 30 s 和 72℃ 1 min, 30 次循环后, 72℃ 10 min。小量提取阳性克隆质粒, 重组质粒经双酶切验证大小, 阳性质粒命名为 PT7TS-JSRV-env, 质粒经公司测序鉴定。

1.2.3 体外合成 JSRV-env mRNA 制备足量质粒 PT7TS-JSRV-env, 按照 T7 RNA 快速高效合成试剂盒进行体外转录操作步骤。质粒经 *Eco*R I 酶切线性化, EDTA 醋酸铵混合液和无水乙醇终止反应, 离心去除残留液体, 无酶水重悬制备 DNA 模板。取 1 μg DNA 模板与其他转录反应组分混合至 20 μL 体系, 37℃ 水浴 3 h 转录, 聚合酶转录同时加入 5'帽结构。转录后加入 1 μL DNase I 去除 DNA 模板。加入 30 μL LiCl 溶液至转录液中充分混匀后 -20℃ 放置 30 min, 4℃ 离心, 除上清加 70%乙醇 1 mL 混匀后重复离心获得纯化 mRNA 产物。无酶水溶解产物经 Nanodrop 超微量核酸蛋白测定仪测定 RNA 浓度和纯度。

1.2.4 JSRV-env mRNA-鱼精蛋白复合物小鼠皮下注射 参考文献 [5], 主要方法是鱼精蛋白 5 μg 和

JSRV-env mRNA 10 μg 溶于 100 μL 缓冲液, 轻轻摇动使其混匀, 室温避光放置 5 min。同法配制不加 mRNA 的鱼精蛋白组溶液。18 只 6~8 周 BALB/c 健康小鼠适应性饲养 1 周, 随机分为 3 组, 一组皮下注射 PBS, 一组皮下注射鱼精蛋白, 另一组皮下注射 mRNA-鱼精蛋白复合物。定时注射 3 d, 第 4 天取小鼠尾静脉血检测抗体。

1.2.5 含有 JSRV-env 的假病毒的制备及滴度测定 参考文献 [6], 包装质粒分别为 JSRV 包膜质粒 pCMVJSRV (12 μg), 质粒 pCMV-HIV Δ8.2 (8 μg), pHIV-eGFP (10 μg), pMD.G (8 μg)。将质粒溶液与转染试剂 Lipofectamine™2000 混合后共转染 293T 细胞, 37℃, 5%CO₂ 培养箱中培养 12 h 后, 倒去培养液加 PBS 液漂洗, 然后加入含 10% 血清的细胞培养液 15 mL, 培养箱内继续培养 48 h, 收集 293T 细胞上清液, 4℃, 4 000 r/min 离心 10 min, 滤器过滤后, 4℃, 25 000 r/min 离心 20 min; 冰 PBS 液重悬病毒沉淀, 溶解过夜即得到病毒液 Lv-JSRV。收集各孔细胞, 用相同体积的裂解液在 37℃ 条件下裂解 16 h, 收集上清。同法获得阴性对照病毒液 Lv-Negative, 取少量假病毒粗提液和阴性对照细胞裂解上清分别感染预先培养 6 h 的 293T 细胞, 72 h 后, 在倒置荧光显微镜下观察。根据细胞荧光蛋白的表达利用 Reed-Muench 方法计算组织细胞培养半数感染量 (TCID₅₀), 测定假病毒的滴度。

1.2.6 中和实验方法 测定假病毒的接种量, 假病毒稀释梯度为 150、200、300、400、800 TCID₅₀/50 μL, 阳性血清稀释梯度为 6×10³、1.2×10⁴、2.4×10⁴、4.8×10⁴、9.6×10⁴、1.92×10⁵。96 孔板每孔加入 50 μL 含有 JSRV-env 的假病毒稀释液及 50 μL 绵羊 JSRV 阳性血清稀释液混匀, 4℃ 放置 1 h, 加入 96 孔板培养的 293T 细胞中, 37℃、5% CO₂ 下培养 72 h, 同时设置完全培养基作为阴性对照孔。胰酶消化获得细胞液, 经流式细胞仪测定荧光细胞比例, 计算感染抑制率 (IC₅₀)=(1-阳性血清组荧光细胞比值/阴性对照组荧光细胞比值)×100%。采用 GraphPad Prism 5 软件绘制曲线图, 横坐标为阳性血清稀释浓度的对数, 纵坐标为其对应的 IC₅₀, 据结果选取最佳病毒接种量。待测血清中和抗体的检测: 3 组小鼠 72 h 尾静脉取血, 制备待测血清。假病毒选取的最佳病毒接种量稀释, 待测血清 1:40 稀释, 将病毒与血清 1:1 混合, 4℃ 放置 1 h, 加入 96 孔板培养的 293T 细胞中, 37℃、5% CO₂ 下培养 72 h, 同时设置完全培养基作为阴性对照孔。IC₅₀ 大于 50% 血清继续稀释后重复中和实验。血清中和滴度为 IC₅₀ 大于 50% 的待

测血清稀释度的倒数,因此 JSRV 特异性阳性抗体的中和滴度大于 40。

2 结果

2.1 载体优化 优化后的载体结构如图 1 所示,包含增强真核生物 mRNA 稳定性的结构。

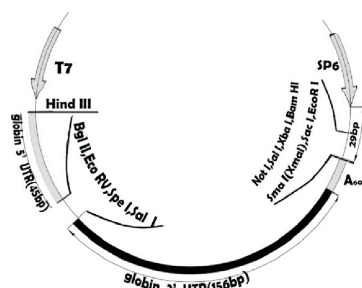
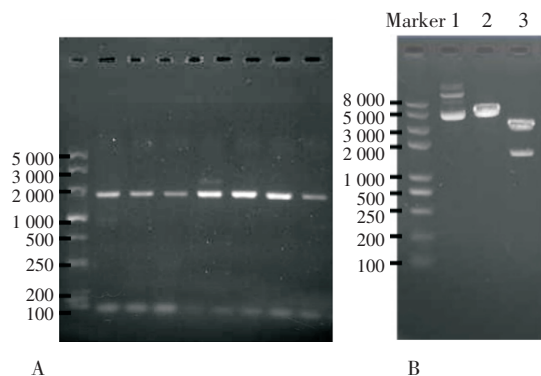


图 1 优化载体 PT7TS 结构图

Fig 1 Optimizing vector structure of PT7TS

2.2 PCR 与酶切鉴定 选择单克隆菌落进行 PCR 鉴定,扩增出目的条带符合 JSRV-env 片段大小 1 848 bp,可以初步认定为结果是阳性(图 2A)。PCR 鉴定阳性菌液小提,限制性内切酶 *Sal* I 与 *Spe* I 双酶切反应鉴定,获得的片段大小约为 3 000 bp 和 1 800 bp 左右,与载体 PT7TS 和 JSRV-env 大小一致。表明成功构建质粒(图 2B)。



A: JSRV-env 克隆 PCR; B: 1. 质粒 PT7TS-JSRV-env; 2. 质粒 PT7TS-JSRV-env 经 *Sal* I 单酶切; 3. 质粒 PT7TS-JSRV-env 经 *Spe* I 和 *Sal* I 双酶切

图 2 PT7TS-JSRV-env 验证电泳图

Fig 2 Electropherogram of PT7TS-JSRV-env confirmation

2.3 JSRV-env mRNA 电泳检测 提取 JSRV-env mRNA 经普通琼脂糖凝胶电泳鉴定,结果显示,转录获得的 mRNA 产物大小在 2 300 bp 左右,符合 JSRV-env 大小,因为 mRNA 包含 5' cap、编码区、3' UTR、5' UTR 和 poly A 尾的结构(图 3)。经 Nanodrop 测定 OD260/280 约 1.9~2.0,符合标准,每含 1 μ g DNA 模板的 20 μ L 转录体系可获得产物 150 μ g,满足后续实验需求。

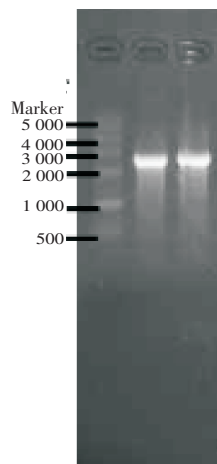
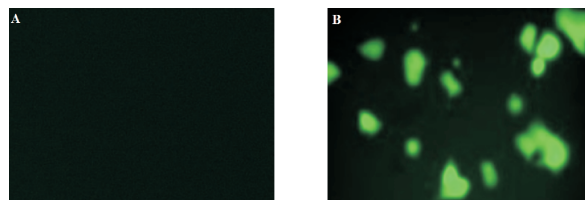


图 3 JSRV-env mRNA 电泳

Fig 3 RNA electrophoresis of JSRV-env mRNA

2.4 JSRV-env 假病毒的包装及滴度测定 JSRV 假病毒转染 293T 细胞 24 h 后,在荧光显微镜下观察结果显示,被假病毒感染的细胞可见绿色荧光,说明已形成包裹报告质粒有感染能力的 pCMVJSRV 假病毒。而阴性对照组与预期结果相符,无荧光显示,没有感染性(图 4)。测定 Lv-JSRV 的滴度为 106.5/10 μ L。



A: Lv-Negative; B: 绿色荧光为 Lv-JSRV

图 4 假病毒感染 293T 细胞

Fig 4 Pseudovirus infected 293T cells

2.5 中和实验 以 JSRV-env 假病毒和绵羊阳性 JSRV 血清进行中和实验,选定假病毒的最佳接种量结果如图 5 所示,接种量在 150、200、300 TCID₅₀/50 μ L 血清中和滴度较高,阳性血清继续进行稀释重复实验,中和滴度大于 12 800, R^2 值较高,接近 1。但 150 TCID₅₀/50 μ L 若是在细胞荧光表达差条件下,实验结果会不可信,因此选取 200~300 之间的 250 TCID₅₀/50 μ L 作为最佳假病毒接种量。

利用 JSRV 假病毒中和实验方法检测 3 组免疫小鼠体内的中和抗体水平结果表明,待测血清 1:40 稀释时,JSRVmRNA 组 6 只小鼠血清 IC₅₀ 大于 90%。而鱼精蛋白组、PBS 组中小鼠的 IC₅₀ 均小于 50%。将感染抑制率大于 50%的 JSRVmRNA 组小鼠血清继续稀释重复实验,测得小鼠最低中和滴度为 3 200,最高中和滴度为 12 800,该组血清平均中和滴度为 6 400。JSRV mRNA 免疫小鼠后可以诱导小鼠体内产生特异性针对 JSRV-env 的中和抗体。

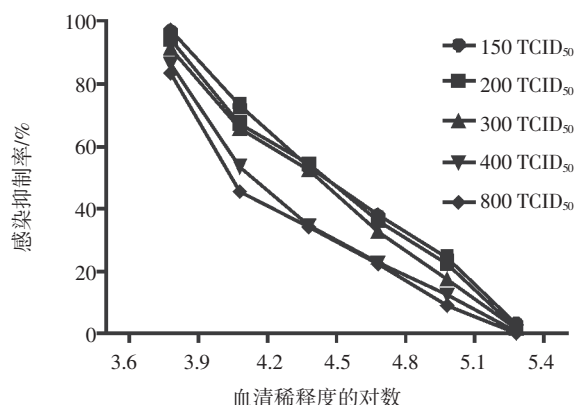


图 5 假病毒接种量的选择

Fig 5 Selecting the volume of pseudovirus for Neutralization test

3 讨论

体外合成 mRNA (IVT mRNA) 近期被认为是一种新型的有一定潜力的药物类型, 由于 mRNA 稳定性的显著提高, 使其能够在体内稳定存在并发挥作用不再成为难题。有研究表明, mRNA 细胞内的稳定性和翻译效率可以通过调节 mRNA 的翻译和 mRNA 稳定顺式作用结构元件 5' 帽和 polyA 尾区和 5' 和 3' 之间的非编码区域及编码区增强^[7]。细胞外 mRNA 主要通过特殊的设计并与鱼精蛋白^[8]结合, 增加其在细胞内外的稳定性。

本研究对体外转录载体 pT7TS 进行了优化, 适当调整酶切位点, 加入顺式作用结构元件。PT7TS 载体中 T7 启动子能被噬菌体 RNA 聚合酶特异性识别, 5' 帽结构能促进翻译过程中核糖体的招募, 3' 末端 poly A 尾引起重复复制增加翻译效率, 非编码区噬噬密集致序列更稳定, 3'-UTR、5'-UTR 分别结合有 β 球蛋白能起到稳定 mRNA 作用^[9-10]。开放阅读框密码子的优化选用可以促进翻译进行。mRNA 最终与鱼精蛋白结合形成稳定结构, 抵抗 RNA 酶的消化作用, 从而保证了目的 mRNA 在细胞内、外的相对稳定性。

体外合成的 mRNA 发挥作用途径有两条, 一是通过体外转染机体离体细胞再回输至机体, 以 DC 细胞或干细胞为主。二是采取不同的递送方式, 如肌肉注射、皮下注射、皮内注射、静脉注射、淋巴结注射、气管滴注或者神经鞘注射^[11]。

RNA 进入细胞质开始发挥作用, 部分翻译产生相应蛋白, 降解为抗原肽表位, 加载到主要组织相容性复合物 MHC I 分子上, 然后递呈给 CD8⁺ 细胞毒性 T 淋巴细胞, 诱导 T 细胞免疫应答。部分被抗原递呈细胞所吸收、降解, 与 MHC II 分子结合, 刺激辅助 T 细胞作用, 同时被分泌或释放入血与 B 细胞受体结合, 激活 B 细胞, 引起体液免疫, 产生抗体^[12-13]。

目前, 关于 JSRV 的研究, 只构建了 JSRV-CA 基因的 DNA 核酸药物, 且仅引起体液免疫, 不能引起细胞免疫反应, 抗体的持续时间短暂。2012 年, Petsch 等^[14]成功研制的 H1N1 禽流感病毒的 mRNA 疫苗, 激活机体体液免疫与细胞免疫反应, 对跨种属感染起到了积极地预防作用。中和抗体是指病毒等病原微生物侵入机体时 B 细胞产生的抗体, 与抗原结合阻止病原体侵入细胞。假病毒稳定性强、安全性高、宿主嗜性广, 因此常应用于病毒中和抗体检测研究^[15]。本研究采用 mRNA 和鱼精蛋白复合皮下注射小鼠后, JSRV-env mRNA 被郎罕细胞吞入, 即 DC 细胞递呈抗原, 在细胞中 TLR7 与 JSRV-env mRNA 结合放大信号。笔者观察和分析血液中是否存在 JSRV mRNA 产生的特异性抗体、机体免疫应答情况, 结果表明 mRNA 皮下注射能够引起小鼠体内抗原特异性免疫应答, 产生 JSRV-env 中和抗体。采用以 JSRV 假病毒为基础的中和实验是检测小鼠血清中的中和抗体及其含量最直接的方法。

综上所述, 通过前期对 JSRV 病毒的研究, 体外构建针对 JSRV 病毒株 env 基因的 mRNA, 检测到特异性中和抗体的表达, 为下一步研究构建我国内蒙古绵羊动物模型, 进一步验证 mRNA 在感染性疾病治疗中的潜力, 为开展新型有潜力 mRNA 疫苗奠定了实验基础。

参考文献:

- [1] Martin W B, Scott F M, Sharp J M, et al. Experimental production of sheep pulmonary adenomatosis (Jaagsiekte)[J]. *Nature*, 1976, 264 (5582):183
- [2] Maeda N, Palmarini M, Murgia C, et al. Direct transformation of rodent fibroblasts by jaagsiekte sheep retrovirus DNA[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(8):4449
- [3] Wootton S K, Halbert C L, Miller A D. Sheep retrovirus structural protein induces lung tumours[J]. *Nature*, 2005, 434(7035):904
- [4] 杜文才, 李咏梅, 朱泽, 等. 内源性 & 外源性加亚嘉西科逆转录病毒基因组序列分析[J]. *天津医药*, 2008, 36(9):685
- [5] Hoerr I, Obst R, Rammensee H G, et al. In vivo application of RNA leads to induction of specific cytotoxic T lymphocytes and antibodies[J]. *Eur J Immunol*, 2000, 30(1):1
- [6] 龚淑敏, 李光明, 吴志敏, 等. 基于慢病毒载体系统构建重组 JSRV-NM 假病毒[J]. *天津医药*, 2014, 42(8):749
- [7] Kallen K J, Thess A. A development that may evolve into a revolution in medicine: mRNA as the basis for novel, nucleotide-based vaccines and drugs[J]. *Ther Adv Vaccines*, 2014, 2(1):10
- [8] Weide B, Carralot J P, Reese A, et al. Results of the first phase I/II clinical vaccination trial with direct injection of mRNA[J]. *J Immunother*, 2008, 31(2):180
- [9] Holtkamp S, Kreiter S, Selmi A, et al. Modification of antigen-encoding RNA increases stability, translational efficacy, and T-cell

(下转第 198 页)

瘤抗原较少,甚至部分肿瘤缺乏特异性抗原;(2)DC 细胞表面 MHC 分子或复制蛋白缺失导致抗原递呈能力降低;(3)肿瘤免疫抑制微环境抑制 DC^[10]。而将 DC 与肿瘤融合构建融合细胞,可以提供肿瘤全部抗原信息,将识别的和尚未识别的抗原同时被内源性加工处理并得以表达,使树突状细胞提呈更丰富的抗原肽,表达更多共刺激分子,从而诱导一系列多克隆 CTL 的抗肿瘤免疫效应。最近的研究中发现在前列腺癌组织中 DC 明显少于正常的前列腺组织,且只有少数处于激活状态,提示前列腺癌患者可以抑制单核细胞分化为 DC 并抑制其成熟,因此增强 DC 摄取抗原及抗原递呈能力成为本实验的主要目标。

因患者自体肿瘤细胞原代培养的不确定性及各种治疗方法处理后肿瘤组织有可能失去体外培养可能,肿瘤细胞均选择成熟细胞系 PC3,其具有获取方便,无限传代及生长良好等特点。融合细胞采用电穿孔的方法进行融合,其融合效率较化学融合法较高并且对细胞毒性小。通过对融合细胞与单纯 DC 的对比发现其在促进 T 细胞增殖及诱导 T 细胞杀伤效应方面有明显提升。

因患者本身的肿瘤免疫抑制微环境抑制免疫细胞,失去表面的 MHC 分子和粘附因子,从而抑制 DC 将抗原递呈给 T 淋巴细胞。B7.1 作为 MHC-I 类抗原激活 T 细胞的共刺激因子,在激活 T 细胞诱导 CTL 机制中起了重要作用,因此在融合细胞表面粘附 B7.1 蛋白,成为一种增强融合细胞抗原递呈的方法。在既往的研究中发现 GM-CSF 可促进 DC 在体外分化发育和 T 细胞的增殖,提高机体抗肿瘤及抗感染免疫力,因此使融合细胞高表达 GM-CSF 可以从各个方面促进机体的抗肿瘤能力。本实验检测到 GM-CSF 修饰可以增强融合细胞 DC 表面抗原表达,而 B7.1 作为一种表面抗原,与 GM-CSF 联合应用可明显增强融合细胞促进 T 细胞增殖,提高 IFN- γ 的分泌,增强融合细胞诱导 T 细胞的杀伤效应。

综上所述,应用人前列腺癌细胞和前列腺癌患者来源树突状细胞制造的融合细胞,并用 B7.1/GM-CSF 修饰,结果证明该特定修饰的融合疫苗是一种很好的肿瘤免疫治疗手段,而 B7.1/GM-CSF 的特定修饰,对其他肿瘤的免疫治疗提供了新的方法。

参考文献:

- [1] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2016[J]. CA Cancer J Clin, 2016,66(1):7
- [2] de Bono J S, Logothetis C J, Molina A, et al. Abiraterone and increased survival in metastatic prostate cancer[J]. N Engl J Med, 2011, 364(21):1995
- [3] Scher H I, Fizazi K, Saad F, et al. Increased survival with enzalutamide in prostate cancer after chemotherapy[J]. N Engl J Med, 2012, 367(13):1187
- [4] Buttiglieri C, Tucci M, Bertaglia V, et al. Understanding and overcoming the mechanisms of primary and acquired resistance to abiraterone and enzalutamide in castration resistant prostate cancer[J]. Cancer Treat Rev, 2015,41(10):884
- [5] Saad F, Miller K. Current and Emerging Immunotherapies for castration-resistant prostate cancer[J]. Urology, 2015,85(5):976
- [6] Vuk-Pavlovic S, Bulur P A, Lin Y, et al. Immunosuppressive CD14+ HLA-DRlow/- monocytes in prostate cancer[J]. Prostate, 2010,70(4):443
- [7] Zheng Q, Long J, Jia B, et al. Transforming growth factor- β 1 deteriorates microrheological characteristics and motility of mature dendritic cells in concentration-dependent fashion[J]. Clin Hemorheol Microcirc, 2014,56(1):25
- [8] Schreiber R D, Old L J, Smyth M J. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion[J]. Science, 2011,331(6024):1565
- [9] Neves A R, Ensina L F, Anselmo L B, et al. Dendritic cells derived from metastatic cancer patients vaccinated with allogeneic dendritic cell-autologous tumor cell hybrids express more CD86 and induce higher levels of interferon- γ in mixed lymphocyte reactions[J]. Cancer Immunol Immunother, 2005,54(1):61
- [10] Kichler-Lakomy C, Budinsky A C, Wolfram R, et al. Deficiencies in phenotype expression and function of dendritic cells from patients with early breast cancer[J]. Eur J Med Res, 2006,11(1):7

(2016-09-20 收稿)

(上接第 188 页)

- stimulatory capacity of dendritic cells[J]. Blood, 2006,108(13):4009
- [10] Stepinski J, Waddell C, Stolarski R, et al. Synthesis and properties of mRNAs containing the novel "anti-reverse" cap analogs 7-methyl (3'-O-methyl)GpppG and 7-methyl (3'-deoxy)GpppG[J]. RNA, 2001,7(10):1486
 - [11] 吕建军,段大鑫,蒋帅,等. 体外转录信使 RNA 免疫疗法的研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2016,36(1):129
 - [12] Fotin-Mleczek M, Duchardt K M, Lorenz C, et al. Messenger RNA-based vaccines with dual activity induce balanced TLR-7 dependent adaptive immune responses and provide antitumor activity[J]. J Immunother, 2011,34(1):1

- [13] Hoerr I, Obst R, Rammensee H G, et al. In vivo application of RNA leads to induction of specific cytotoxic T lymphocytes and antibodies[J]. Eur J Immunol, 2000,30(1):1
- [14] Petsch B, Schnee M, Vogel A B, et al. Protective efficacy of in vitro synthesized, specific mRNA vaccines against influenza A virus infection[J]. Nat Biotechnol, 2012,30(12):1210
- [15] Du L, Jin L, Zhao G, et al. Identification and structural characterization of a broadly neutralizing antibody targeting a novel conserved epitope on the influenza virus H5N1 hemagglutinin[J]. J Virol, 2013, 87(4):2215

(2016-12-26 收稿)