

AFP Specific Liver Tumor Vaccines Inhibit Hepatocellular Carcinoma Growth

Yang Liu¹, Yueru Wang², Lisa H. Butterfield³

¹Hepatobiliary Surgery Division, Tenth People's Hospital, Tongji University, Shanghai

²Internal Medicine Division, First People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai

³Department of Surgery and Immunology, Cancer Institute of Pittsburgh University, Pittsburgh, USA.

Email: yliu6633@yahoo.com.cn

Received: Jul. 14th, 2012; revised: Jul. 26th, 2012; accepted: Aug. 1st, 2012

Abstract: Objective: Alpha-fetoprotein (AFP), a tumor-associated antigen for hepatocellular carcinoma (HCC), is an established biomarker for hepatocellular cancer (HCC). In this study, we detected antitumor activity of AFP specific T cells *in vitro*. **Methods:** We created a lentivirus expressing AFP (Lenti-AFP) and investigated the antitumor activity of AFP-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells (liver tumor vaccines), which were activated by either AFP peptide-pulsed or Lenti-AFP-engineered DC *in vitro*. **Results:** Our research demonstrated that the AFP-specific T cells could efficiently kill HepG2 cells, by significantly increasing the level of IL-2, IFN- γ , TNF- α , perforin and granzyme B, as well as by inhibiting the production of IL-10 (a negative regulator of T cell activation). **Conclusion:** AFP-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells (liver tumor vaccines) which were activated by either AFP peptide-pulsed or Lenti-AFP-engineered DC have obviously antitumor activity. This study provides new insight into the design of DC activated antigen-specific T cell-based clinical trials

Keywords: Alpha-Fetoprotein (AFP); Dendritic Cell; Cytokine; AFP-Specific T Cells

AFP 特异性肝癌疫苗抑制肝细胞癌生长

刘 扬¹, 王跃如², Lisa H. Butterfield³

¹同济大学附属第十人民医院肝胆外科, 上海

²上海交通大学附属第一人民医院内科, 上海

³美国匹兹堡大学肿瘤研究所, 外科及免疫学组, 匹兹堡, 美国

Email: yliu6633@yahoo.com.cn

收稿日期: 2012 年 7 月 14 日; 修回日期: 2012 年 7 月 26 日; 录用日期: 2012 年 8 月 1 日

摘 要: 目的: 甲胎蛋白作为一种肿瘤特异性抗原, 是临床上诊断肝癌的重要指标。本研究中, 我们检测了 AFP 特异性 T 细胞的体外抗肿瘤免疫活性。**方法:** 我们采用经过 AFP 抗原决定簇肽刺激或慢病毒转染的树突状细胞 (dendritic cells, DC), 活化 AFP 特异性的 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞(肝癌疫苗), 并在体外检测了这群 T 细胞对肝癌细胞 HepG2 的杀伤活性。**结果:** 本研究结果显示, AFP 特异性的 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞体外能有效杀伤 HepG2 细胞, 上调培养体系中 IL-2、IFN- γ 、TNF- α 、穿孔素、颗粒酶的水平, 对于 T 细胞活化的负调控因子 IL-10, 具有显著的抑制作用。**结论:** 经 DC 活化后的 AFP 特异性 T 细胞具有显著的体外抗肿瘤免疫活性, 为肝细胞癌的临床免疫治疗提供了依据。

关键词: 甲胎蛋白; 树突状细胞; 细胞因子; AFP 特异性 T 细胞

1. 引言

肝细胞癌(HCC)位居国人恶性肿瘤发病率第二

位, 年死亡人数超过 30 万人, 只有少数患者(<20%) 适合手术治疗, 因此应用肝癌特异性抗原的肿瘤疫苗

治疗成为当前研究的热点。甲胎蛋白(AFP)是肝细胞癌特异性抗原,约 60%~70%的 HCC 患者血清 AFP 不同程度升高。

树突状细胞(DC)是目前公认的体内抗原递呈功能最强的专职抗原递呈细胞,能有效的激活幼稚 T 细胞,处于启动、调控并维持免疫应答的中心环节,在机体抗肿瘤免疫中具有十分重要的作用。临床研究显示,实体肿瘤的 DC 浸润与预后较好有关,而 DC 受损则免疫抑制增强且肿瘤恶化。Butterfield 等^[1,2]鉴定出一系列可被人 T 细胞识别的 HLA-A*0201 限制性 AFP 免疫决定簇肽和亚免疫决定簇肽,并应用于 I/II 期临床实验(安全性和有效性)。本文作者^[3,4]随后报道了使用 AFP 抗原决定簇肽和亚决定簇肽片段刺激 DC,能有效诱发抗肝癌的特异性细胞免疫反应。有研究显示,CD4⁺辅助性 T 细胞可能通过促进 CD8⁺T 细胞扩增并增加肿瘤杀伤性细胞因子的释放,发挥潜在的抗肿瘤免疫作用^[5]。

在前期研究工作的基础上^[6],我们应用 HLA-A*0201 限制性 AFP 抗原决定簇肽和亚决定簇肽以及慢病毒转染的 AFP 刺激的树突状细胞与人外周血 T 细胞共同培养,在体外人肝癌细胞株模型上验证了 AFP 抗原特异性 T 细胞的抗肿瘤免疫活性,为临床治疗肝细胞癌提供了实验基础,现报道如下。

2. 材料与方法

2.1. 健康捐献者

通过标准的 HLA 血清分型及基因分型方法确定所有捐献者均为 HLA-A2 阳性(血液来自上海市中心血站自愿献血者)。

2.2. 多肽合成

多肽由上海生工生物工程技术有限公司合成(Shanghai, P.R.China),用氨基酸分析和质谱证实了氨基酸的序列正确,多肽纯度 > 95%。

2.3. 肝癌细胞株

表达 HLA-A2⁺的 HCC 细胞株(AFP 阳性)购自美国 BD 公司。

2.4. 统计分析

用 SPSS 11.0 统计软件处理各组数据,实验结果

以 mean ± SD 表示,采用配对 *t* 检验, *p* < 0.05 为具有统计学意义。

2.5. AFP 慢病毒载体的构建

以 pWPXL-MOD2 为骨架,将目的基因构建到双 GFP 表达的慢病毒载体中,替换其中一个 GFP,形成 AFP 与 GFP 共表达的慢病毒载体。使用 PCR 方法从 HepG2 细胞基因组中获取 AFP 基因片段,引入 *Bam*H1 和 *Sal*I 酶切位点。对空载体 pWPXL-MOD2 和 PCR 的回收产物用 *Bam*H1 和 *Sal*I 进行双酶切及连接反应。采用 ProFection Mammalian Transfection System 制备慢病毒穿梭质粒及其辅助包装元件载体质粒。简言之,慢病毒包装细胞转染用胰蛋白酶消化对数生长期的 293T 细胞,细胞密度为 $0.5 \times 10^9/L$ 时,重新接种于 25 mL 的 15 cm 细胞培养皿,于 37°C, 50 mL/L CO₂ 培养箱内培养。制备慢病毒包装系统中四种质粒 DNA 溶液(pRSv-REV 10 ug, pMD 1 g~pRRE 15 ug, pMD2G 7.5 ug, AFP 质粒 20 ug),定容至 1800 ul,再加入 CaCl₂ (2.5 mol/L)200 ul,混匀后加入 2XHEBS 缓冲盐溶液 2000 ul,室温放置 20~30 min;当细胞密度达 60%~70% 时转染。将 DNA 和磷酸钙混合液转移至含单层细胞的培养液中,混匀,培养 12 h 后弃去含有转染混和物的培养液,加入 PBS 15 mL,轻摇后弃去,重复该步骤 3 次;每瓶细胞中加入含 100 mL/L 胎牛血清的细胞培养液 15 mL,继续培养 48 h。收集转染 72 h 的 293T 细胞上清液;将收集的上清液于 4°C, 4000 g 离心 10 min, 10 cm/r, 收集上清液;将上清液以 0.45 μm 滤器过滤;于 40 mL 超速离心管中, 4°C, 72,000 g/min 离心 120 min; 500 ul PBS 重悬病毒沉淀。

2.6. DC 的分离和培养

DC 的获取如文献所述,通过静脉穿刺抽取外周血,通过 Ficoll 密度梯度离心法分离外周血单核细胞(PBMC)。PBMCs($3\sim 4 \times 10^7$)接种于 T-25 培养瓶中,加入含抗生素及 5%~10%人 AB 血清的 RPMI1640 培养基,于 37°C 培养箱中培养 2 h。用 PBS 轻轻漂洗,去除未贴附的细胞,已贴附的细胞在含有 800 U/mL GM-CSF 和 500 U/mL IL-4 的培养基中培养 7 d。冲洗后收集未贴附及贴附较弱的细胞(DC)。形态学和基因分型检测显示,这些细胞中一般含有 30%~50%的 DC。

2.7. 从 PBMC 中分离 CD8⁺T, CD4⁺T 淋巴细胞

通过免疫磁珠法分别分离出 CD8⁺T 细胞和 CD4⁺T 细胞。流式细胞术分析结果显示, 分离后得到的 CD8⁺T 细胞, CD4⁺T 细胞的纯度均大于 98%^[3]。

2.8. 通过 AFP 抗原决定簇肽刺激以及慢病毒转染 DC 获得 AFP 特异性的 CD8⁺T 和 CD4⁺T 细胞

通过 AFP 抗原肽刺激 DC 获得 AFP 特异性的 CD8⁺T 和 CD4⁺T 细胞的方法如前所述。简言之, 室温下用含 10 μg/mL AFP 抗原肽的无血清 RPMI 1640 培养液刺激 HLA-A2⁺样本来源的 DC 120 min。DC 经离心计数后, 按 1:20 的比例与自体同源 CD8⁺T 细胞或 CD4⁺T 细胞于 24 孔板中共培养 1 周, RPMI 1640 培养液中含有抗生素, 10%人 AB 血清及 10 ng/mL IL-7, 每 3~4 d 添加 IL-2 10 U/mL。培养一周后, 计数未贴附的细胞, 用以抗原肽处理后的 DC 再刺激 1 周。刺激两次后, 收集细胞检测。在含 2%人 AB 血清的 RPMI1640 培养基中用携带人 AFP 全长 cDNA 的重组慢病毒表达载体 Lenti-AFP 转染 DC 2 h。转染后的 DC 以 1×10^5 cells/mL 的密度铺板, 与 CD8⁺T 细胞或 CD4⁺T 细胞共培养于含有 10%人 AB 血清及 25 ng/mL IL-7 的培养液中(DC:T = 1:20), 每隔 3 d 补充 10 U/mL。

2.9. AFP 特异性的 CD8⁺T 和 CD4⁺T 淋巴细胞对 HepG2 肝癌细胞的体外杀伤活性

将上一步得到的 CD8⁺T 细胞单独或连同 CD4⁺T 细胞, 与 HepG2 细胞共同培养(CD8⁺T 细胞:HepG2 = 1:1)于 96 孔板中, 总体积 200 μL, 并设淋巴细胞和靶细胞对照, 每实验组设 3 个复孔。培养 18 h 后加入 5 mg/mL MTT 10 μL, 继续培养 6 h, 弃上清, 加 DMSO 100 μL, 于 570 nm 处测定吸光度值(A), 杀伤率 = $[1 - (\text{实验孔 A 值} - \text{淋巴细胞对照孔 A 值}) / \text{靶细胞对照孔 A 值}] \times 100\%$ 。

2.10. 淋巴细胞增殖的测定

制备细胞悬液, 加入到 96 孔培养板中(2×10^5 个/孔), 每实验组设 3 个复孔。细胞加入 20 μL $1 \mu\text{Ci}$ /孔

的 [³H]胸腺嘧啶, 于 37°C、5%CO₂ 孵育箱中培养 6 h 后, 用细胞收集仪将细胞收集至玻璃纤维膜上。加闪烁液后, 用液闪仪测定每分钟脉冲数(cpm), 以刺激指数(SI)表示增殖程度: SI = 实验孔 cpm/对照孔 cpm。

2.11. 细胞因子的检测

将上述单细胞悬液加入到 96 孔培养板中(2×10^5 个/孔), 每实验组设 3 个复孔。细胞于 37°C、5%CO₂ 孵育箱中培养 24 h 后, 收集上清, 用双抗体夹心 ELISA 法检测上清中细胞因子的水平。方法如下: 1) 包被: 将稀释好的一抗加入 96 孔酶标板中, 每孔 100 μL, 4°C 过夜; 2) 封闭: 用含 0.05%吐温-20 的 PBS 洗 3 次后, 加入 200 μL 含 10%FCS 的 PBS, 室温封闭 2 h; 3) 加样: 加入 100 μL 标准品或样品, 4°C 过夜; 4) 加二抗: 每孔加入 100 μL 稀释后的二抗, 室温放置 1 h; 5) 加酶: 每孔加入 100 μL 稀释后的辣根过氧化物酶, 室温放置 1 h; 6) 加底物: 将底物 TMB 稀释为 0.1 mg/mL, 加入 0.1% H₂O₂, 每孔 100 μL; 8) 显色: 室温显色 30 min 后, 加入 2 M H₂SO₄ 终止反应, 于 450 nm 处测吸光度值, 校正波长为 570 nm, 根据标准曲线换算出培养上清中细胞因子的含量, 结果用 pg/mL 表示。

3. 结果

3.1. AFP 抗原肽刺激及慢病毒转染处理后的 DC 能显著促进 T 细胞增殖

本实验体系中, 以人 HepG2 肝癌细胞 cDNA 为模板, PCR 扩增出 AFP 基因片段, 构建成 Lenti-AFP 慢病毒载体或阴性对照病毒 Lenti-LacZ(mock)。以该慢病毒载体转染 293T 细胞, 包装慢病毒表达载体, 再以包装好的慢病毒体外感染 DC。首先, 我们检测了慢病毒转染率和 AFP 表达情况。如图 1(A)所示, 以 18SRNA 为内参, AFP 过表达率为 (5.31 ± 0.11) 。同时也用蛋白印记分析的方法对细胞裂解物中 AFP 的含量进行验证。结果如图 1(A)和 1(B)所示。

(A) AFP 在慢病毒转染 DC 中的基因表达结果, 以 18SRNA 为内参。(B) AFP 的蛋白印记分析结果。结果以 mean ± SD 表示, 与阴性对照相比, ** $p < 0.01$, 实验重复 3 次, 得到类似结果。

3.2. AdvAFP 转染的 DC 细胞能激活 CD8⁺T 细胞产生针对一系列 AFP 肽段的特异性的免疫应答

为了检测慢病毒转染 DC 对细胞免疫应答的影响,我们检测了 T 细胞的增殖程度。我们使用了两种方法检测抗原递呈作用:第一,使用慢病毒转染 DC,得到能持续加工递呈 AFP 抗原的成熟 DC;第二,使用 AFP 蛋白联合 GM-CSF/IL-4 刺激未成熟的 DC,模拟 HCC 患者体内高水平的 AFP 刺激血循环中不成熟的 DC 递呈 AFP 抗原的过程。研究结果显示(图 2),慢病毒转染 DC 能显著促进 T 细胞增殖水平(刺激指数, $SI = 3.68 \pm 0.07$, $p < 0.01$);使用 AFP 肽段处理的 DC,尽管刺激效果略逊于前者,但同样具有统计学意义($p < 0.01$),与 Butterfield 等报道一致,AFP 抗原决定簇肽(AFP₁₃₇, AFP₁₅₈, AFP₃₂₅, AFP₅₄₂)与亚 AFP 抗原决定簇肽(AFP₁, AFP₄₉₂, AFP₅₄₇, AFP₅₅₅)刺激 T 细胞增殖的能力显示出一定的等级差异。

3.3. AFP 特异性 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞通过调节相关细胞因子的产生,有效杀伤 HepG2 细胞

体外实验结果显示,无论是 AFP 抗原肽刺激处理后的 DC,还是通过基因工程方法得到的 Lenti-AFP/DC,都能够显著的促进 T 细胞增殖。鉴于 AFP 特异性的免疫反应,尤其是 T 细胞反应在抗肿瘤免疫中的重要作用,我们检测了经抗原肽刺激或慢病毒转染处理后的 DC 诱导的 AFP 特异性的 CD8⁺T 和 CD4⁺T 细胞对人肝癌细胞 HepG2 的杀伤活性。AFP 特异性的 CD8⁺T 和 CD4⁺T 细胞的获得方法如材料与方法中所述。将 HepG2 细胞分为两组,第一组加入 DC 处理后的 AFP 特异性 CD8⁺T 细胞;另一组加入 DC 处理后的 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞(每组 HepG2:CD8⁺T = 1:1)。培养 24 小时后检测效应细胞对肝癌细胞的杀伤活性。研究结果显示(图 3),经 Lenti-AFP/DC 激活的特异性 T 细胞对 HepG2 细胞有较强的杀伤作用;经负载 AFP 抗原决定簇肽(AFP₅₄₂, AFP₁₅₈, AFP₃₂₅, AFP₁₃₇)的 DC 激活的特异性 T 细胞对 HepG2 细胞也具有较强的杀伤作用,且呈现出一定的等级关系;而经负载亚 AFP 抗原决定簇肽的 DC 激活的特异性 T 细胞对 HepG2 细胞的杀伤作用相对较弱。总体而言,

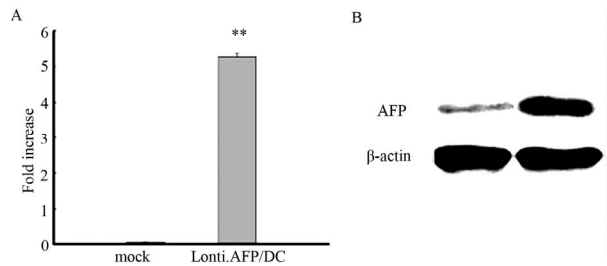


Figure 1. Lentivirus transfection rate and AFP expression level
图 1. 慢病毒转染率及 AFP 表达情况

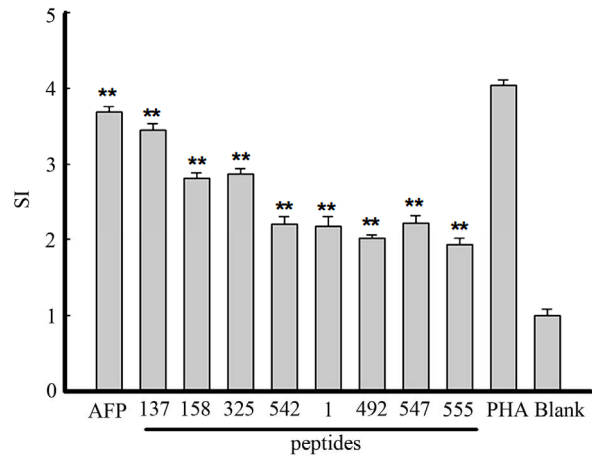


Figure 2. AFP peptide-pulsed and Lenti-AFP transduced DC could significantly induce T cell proliferation (** $p < 0.01$)
图 2. AFP 抗原肽刺激及慢病毒转染处理的 DC 能显著促进 T 细胞增殖水平(** $p < 0.01$)

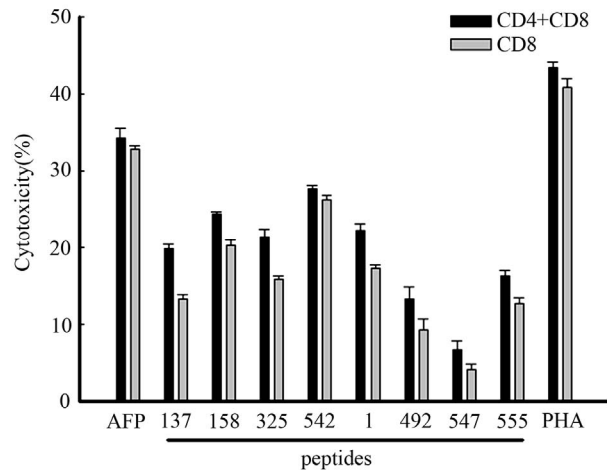


Figure 3. Killing activity of DC-activated AFP-specific CD8⁺T and CD4⁺T cells on HepG2 cell
图 3. 活化的 AFP 特异性 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞对 HepG2 细胞的杀伤作用

CD4⁺T 细胞与 CD8⁺T 细胞混合组对 HepG2 细胞的杀伤活性略强于 CD8⁺T 细胞处理组,但组间无显著性差异。

3.3. T 细胞免疫应答的过程中细胞因子的产生和变化

为了检测 AFP 特异性的 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞对 HepG2 细胞的杀伤活性是否与调节相关细胞因子的水平有关,我们用 ELISA 的方法检测了培养上清中 IL-2、IFN- γ 、IL-10、TNF- α 、穿孔素、颗粒酶、FasL 的含量。研究结果显示,经 DC 活化后的 AFP 特异性 T 细胞能显著增高培养上清中 IL-2、IFN- γ 、

TNF- α 、穿孔素、颗粒酶的水平(图 4, 图 5(A)), 尤以 Lenti-AFP/DC 处理后的 T 细胞作用最为强烈,而其他的 AFP 抗原决定簇肽和亚 AFP 抗原决定簇肽对这些细胞因子也有一定的增强作用,且呈现出一定的等级关系,但是我们并没有检测到 CD4⁺T 细胞/CD8⁺T 细胞混合组与 CD8⁺T 细胞处理组的组间差异。和对照相比,经 DC 处理后的各组 T 细胞均能明显降低培养上清中 IL-10 的水平(图 5(B)), 而对 FasL 的表达没有影响(图 5(C))。

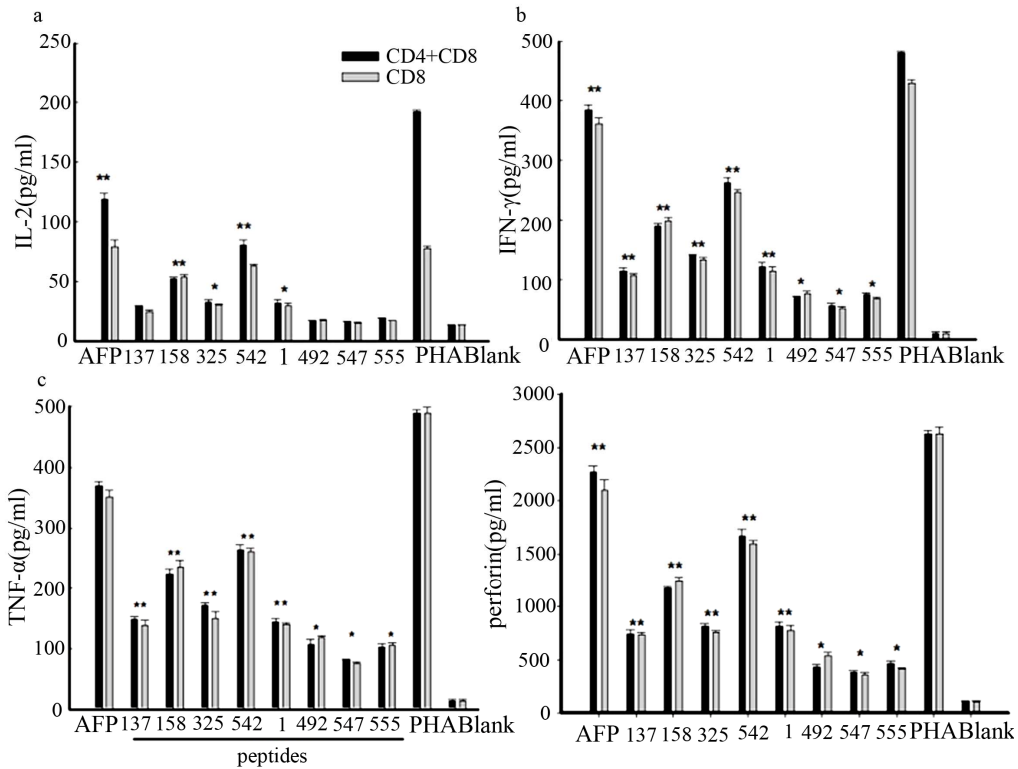


Figure 4. DC-activated AFP-specific CD8⁺T and CD4⁺T cells could increase expression of antitumor cytokines
图 4. 活化的 AFP 特异性 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞上调抗肿瘤细胞因子的表达

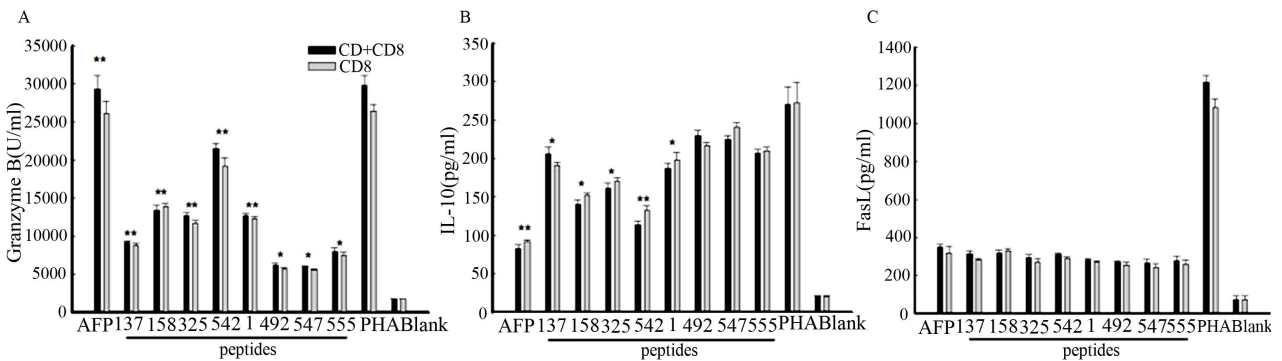


Figure 5. DC-activated AFP-specific CD8⁺T and CD4⁺T cells modulated cytokines profiles in supernatant
图 5. 活化的 AFP 特异性 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞调节培养上清中细胞因子的水平

4. 讨论

抗原递呈是 T 细胞活化过程中的一个重要步骤, 树突状细胞(DC)是功能强大的专职抗原递呈细胞, 是机体免疫的起始细胞^[7]。近年来, 发现肿瘤及其微环境通过多种途径减少肿瘤患者体 DC 的数量并可抑制 DC 的成熟, 从而下调或抑制其抗原提呈及免疫起始功能, 并且可以诱导调节性 DC 的产生, 介导免疫耐受, 最终实现免疫逃逸。故调节 DC 细胞在免疫耐受与免疫应答之间的平衡成为肿瘤疫苗治疗的一个重要发展方向。目前国内外研究的主要方法有在体外培养 DC 的过程中加入外源性肿瘤匀浆或纯化蛋白, 或直接将肿瘤抗原导入 DC, 输入体内后激活 CD4⁺T 和 CD8⁺T 细胞, 发挥抗肿瘤免疫活性。在本研究中, 我们用慢病毒载体转染 AFP, 以及多个 AFP 抗原决定簇肽片段处理的树突状细胞与人外周血 T 细胞共培养, 诱导 AFP 特异性的 T 细胞免疫应答, 体外在人肝癌细胞模型上验证了抗原特异性 T 细胞的抗肿瘤免疫活性。实验结果显示, AFP 特异性的 CD4⁺T 和 CD8⁺T 细胞对人 AFP 阳性肝癌 HepG2 株细胞有显著的杀伤活性。

抗肿瘤免疫应答反应中涉及大量细胞因子表达的变化。我们的体外研究结果显示, AFP 特异性的 CD4⁺T 和 CD8⁺T 细胞能显著增加细胞培养上清液中 IL-2、IFN- γ 、TNF- α 、穿孔素、颗粒酶的含量, 证实其抗肿瘤免疫活性与这群细胞因子表达上调密切相关。IL-10 是已知的抗原特异性 T 细胞活化的抑制剂, 在 HCC 患者血清中可以检测到 IL-10 含量的升高; 在 DC-T 细胞共培养体系中加入外源性的 IL-10 中和性抗体可以促进 Th1 细胞功能。这些现象提示, 降低 IL-10 水平对于抗肿瘤免疫具有十分积极的意义。在本研究中, 我们的实验结果显示, 经慢病毒转染 DC 处理, 或是抗原肽刺激的 DC 处理后的 AFP 特异性 CD4⁺T 和 CD8⁺T 细胞能显著降低 IL-10 的含量。

目前认为杀伤性 T 细胞(CTL)诱导的细胞凋亡途径有两条分子机制: 一是 FasL/Fas 通路, 另一个是 Perforin/Granzyme B 通路。在本研究中, 我们检测了

培养上清和血清中 Perforin/Granzyme B 以及 FasL 的水平, 实验结果显示, AFP 特异性 T 细胞能显著增加 Perforin/Granzyme B 的表达水平, 而对 FasL 的表达水平没有影响。因此, 我们推论 AFP 特异性 CD4⁺T 和 CD8⁺T 细胞对肿瘤细胞的杀伤作用与 Perforin/Granzyme B 通路有关。在本研究中, 我们使用 AFP 特异性的 CD8⁺T 细胞单独或与 CD4⁺T 细胞联用, 处理 HepG2 细胞。实验结果显示, CD4⁺T 细胞/CD8⁺T 细胞混合处理组, 或是单纯 CD8⁺T 细胞处理组均对 HepG2 细胞有较强的杀伤活性, 但混合处理组的杀伤活性更强, 且体外实验结果显示, 混合组有更多的 IL-2 的产生, 表明 CD4⁺辅助性 T 细胞可能通过促进 CD8⁺T 细胞扩增发挥潜在的抗肿瘤免疫作用^[4]。

总而言之, 经 DC 活化后的 AFP 特异性 CD4⁺T 和 CD8⁺T 细胞(肝癌疫苗)具有显著的体外抗肝细胞癌免疫活性, 有望成为 AFP 阳性肝细胞癌的免疫治疗新方法, 也为今后肝细胞癌的临床治疗提供了可靠的实验基础。

参考文献 (References)

- [1] L. H. Butterfield, A. Ribas, D. M. Potter and J. S. Economou. Spontaneous and vaccine induced AFP-specific T cell phenotypes in Subjects with AFP-positive hepatocellular cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 2007, 56: 1931-1943.
- [2] L. H. Butterfield, A. Ribas, V. B. Dissette, et al. A phase I/II trial testing immunization of hepatocellular carcinoma patients with dendritic cells pulsed with four AFP peptides. *Clinical Cancer Research*, 2006, 12: 2817-2825.
- [3] Y. Liu, S. Daley, V. N. Evdokimova, et al. Hierarchy of alpha fetoprotein (AFP)-specific T cell responses in subjects with AFP-positive hepatocellular cancer. *Journal of Immunology*, 2006, 177: 712-721.
- [4] Y. Liu, L. H. Butterfield, X.-H. Fu, et al. Lentivirally engineered DC activate AFP-specific CD8⁺/CD4⁺ T cells which inhibit hepatocellular carcinoma growth *in vitro* and *in vivo*. *International Journal of Oncology*, 2011, 39: 245-253.
- [5] V. N. Evdokimova, Y. Liu, D. M. Potter and L. H. Butterfield. AFP specific CD4⁺ helper T cell responses in healthy donors and HCC patients. *Journal of Immunotherapy*, 2007, 30: 425-437.
- [6] 刘扬, 陆崇德, 吴孟超等. HLA-A*0201 限制性 AFP 抗原决定簇肽特异性肝癌疫苗的制备[J]. *同济大学学报(医学版)*, 2009, 30: 30-33.
- [7] A. K. Palucka, H. Ueno, J. Fay, et al. Dendritic cells: A critical player in cancer therapy? *Journal of Immunology*, 2008, 31: 793-805.