

· 论著 ·

DOI:10.12095/j.issn.2095-6894.2018.09.001

CpG-ODN 通过调控细胞免疫显著增强热休克蛋白肿瘤疫苗诱导的抗肿瘤免疫效应

张莹莹¹, 王晓文², 唐劲天²¹中南大学湘雅医院肿瘤科, 湖南长沙 410078; ²清华大学工程物理系医学物理与工程研究所, 北京 100084)

CpG-ODN enhanced antitumor immune effect induced by hyperthermia generated tumor cell vaccine

ZHANG Ying-Ying¹, WANG Xiao-Wen², TANG Jin-Tian²¹Department of Oncology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China; ²Institute of Medical Physics and Engineering, Department of Engineering Physics, Tsinghua University, Beijing 100084, China

[Abstract] Objective: In this study, a novel immunoadjuvant CpG-ODN was combined with a heat shock protein tumor vaccine to immunize mice, in order to improve the efficacy of heat shock protein vaccine by using the immune enhancement effect of CpG ODN. **Methods:** The C57BL/6 mouse model attached by B16 cells was prepared. The experimental group was pre-treated with B16 cell vaccine supplemented with heat shock protein 70 (HSP70) and CpG ODN injection into the mouse skin. The growth of mouse tumors was observed; the distribution of T lymphocyte subsets in peripheral blood of mice, the activity of Th1 type cytokines secreted by spleen lymphocytes, and the specific cytotoxicity of CTL were detected to evaluate immune response. **Results:** Mice receiving co-immunization can produce a strong anti-melanoma immune response. A total of 35% of the mice had no tumor growth. The survival time of the tumor-bearing mice was significantly longer than that of the control group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The ratio of $CD4^+/CD8^+$ in peripheral blood of the mice in the combined immunization group was increased, and the Th1 cytokine secretion activity and CTL-specific cytotoxicity of spleen lymphocytes were significantly increased ($P < 0.01$). There was no significant difference of the proportion of regulatory T cell subsets between the groups ($P > 0.05$). **Conclusion:** The immunologically active substance CpG-ODN can significantly enhance the immune response induced by the heat shock protein tumor vaccine in mice, stimulate specific anti-tumor cytotoxicity, and inhibit the growth of melanoma.

[Keywords] CpG-ODN; tumor cell vaccine; HSP70; anti-tumor immune response

【摘要】目的:尝试将新型免疫佐剂 CpG-ODN 与热休克蛋白肿瘤疫苗联合对小鼠进行免疫接种,以期利用 CpG-ODN 的免疫增强效应提高热休克蛋白疫苗的疗效。**方法:**制备 B16 黑色素瘤的 C57BL/6 小鼠模型,实验组预先用热处理后富含热休克蛋白 70 (HSP70) 的 B16 细胞瘤苗联合免疫佐剂 CpG-ODN 注射到小鼠皮下免疫接种,与对照组对比观察小鼠肿瘤的生长情况,检测小鼠外周血 T 淋巴细胞亚群的分布、脾淋巴细胞分泌 Th1 型细胞因子的活性以及 CTL 特异性细胞毒杀伤效率,以评价免疫应答反应的强弱。**结果:**接受联合免疫治疗的小鼠能产生较强的抗黑色素瘤免疫应答,35% 的小鼠肿瘤未长出,已出瘤小鼠与对照组相比生存期明显延长,差异有统计学意义($P < 0.05$)。联合免疫组小鼠外周血 $CD4^+/CD8^+$ 的值升高,脾淋巴细胞 Th1 型细胞因子分泌活性以及 CTL 特异性细胞毒杀伤效率均显著增强($P < 0.01$),但调节性 T 细胞亚群比例各组间无明显差异($P > 0.05$)。**结论:**免疫活性物质 CpG-ODN 可显著增强热休克蛋白肿瘤疫苗在小鼠体内诱导的免疫应答,激发特异性抗肿瘤细胞毒作用,抑制黑色素瘤的生长。

【关键词】 CpG-ODN; 肿瘤细胞疫苗; 热休克蛋白; 抗肿瘤免疫应答

【中图分类号】 R73-3 **【文献标识码】** A

0 引言

随着医学的不断发展,肿瘤治疗的技术也在不断的进步。但是对于很多恶性肿瘤来说,常规治疗效果欠佳,死亡率居高不下,仍是临床治疗中的难点。近年来,研究者们发现,部分恶性黑色素瘤患者出现肿瘤

自发性的消退现象,于是逐渐关注黑色素瘤固有的致免疫性。随着研究的不断深入,人们将其认为是恶性肿瘤中具有高免疫原性的一种。因此,免疫治疗开始成为恶性黑色素瘤治疗的研究热点和发展方向,并期待取得突破性进展^[1]。

收稿日期:2018-08-27;接受日期:2018-09-03

基金项目:湖南省科技厅重点计划专项(2016JC2073)

作者简介:张莹莹,博士,主治医师。研究方向:恶性肿瘤化疗及免疫治疗。E-mail:csuzhangyingying@163.com

已有研究^[2-3]报道热疗可以增强肿瘤细胞的免疫原性,且这种增强在很大程度上与热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)的过表达有关。大量的实验研究^[4-5]已经证实了经热诱导的癌细胞中的HSP70、HSP90等物质能够激发抗肿瘤免疫。然而,众多热休克蛋白相关肿瘤疫苗的动物或临床研究^[6-8]均显示,虽然在实验对象体内可以检测到特异性免疫反应并且肿瘤生长受到不同程度地抑制,但尚难达到满意的疗效。分析原因,发现有可能与MHC-I抗原的表达不强有关^[9]。甚至有研究^[3]表明热休克处理虽然可以增加抗原肽形成,但同时抑制了抗原的呈递。B16细胞经热诱导后,会形成免疫原性的抗原。例如检测细胞中的HS,发现其P-抗原复合物的含量有所上升,但是MHC-I分子却不能有效地将抗原传递给T细胞,从而造成免疫耐受或逃逸。因而,比较理想的肿瘤疫苗应该能够有效地激活T细胞,为其提供良好的第一和第二信号,将其特异性抗肿瘤免疫效应充分发挥出来^[8],同时也避免由于免疫强度不够而发生逃逸,影响患者身体健康。

要想抗原诱导机体更好地发生免疫反应,可适当地添加佐剂,适当的佐剂能够为T细胞的活化提供第二信号。所以在疫苗的研究过程中,对佐剂的研究也是其中很重要的部分。目前使用比较多的佐剂大多是人工合成的,寡聚核苷酸链(oligodeoxynucleotides, ODN)中含有非甲基化CpG基序(CpG-ODN),也是一种近年新引起广泛关注的水性佐剂。其自身无免疫原性,不会引起自身免疫疾病。更重要的是CpG-ODN作为Toll样受体9的配体,能够提高蛋白抗原和DNA疫苗的免疫原性,直接激活NK细胞^[10]、树突状细胞^[11]、巨噬细胞^[12]等,并刺激这些细胞分泌IFN- γ 、IL-2、TNF- α 等Th1样细胞因子,从而诱导Th1型细胞免疫应答^[13-14]。此外,它还能够一定程度上促进细胞抗原呈递,促进其细胞表面分子MHC-II、B7-1、B7-2等的表达,活化树突状细胞,促进抗原呈递,协同激活T细胞^[15-16]。因此,可将CpG-ODN作为多种抗原的免疫佐剂,以增强免疫作用^[13,15,17-19],在抗肿瘤免疫治疗领域显示出巨大的潜力。

综上所述,富含热休克蛋白的肿瘤细胞瘤苗和CpG-ODN在抗肿瘤免疫功能上具有互补性,CpG-ODN有望克服单纯肿瘤细胞疫苗抗原呈递活性的不足,起到协同增效的作用。本研究的实验模型是小鼠恶性黑色素瘤,肿瘤疫苗选择经过热诱导且富含HSP70的B16细胞裂解的产物,联合新型免疫佐剂CpG-ODN免疫小鼠,观察疫苗对小鼠产生的免疫保护作用,并研究小鼠免疫系统的功能改变。

1 材料和方法

1.1 主要试剂 羊抗鼠HSP70多克隆抗体,购自美国Cellsigna公司;抗羊二抗液,被辣根过氧化物酶标记,购自北京中杉金桥生物技术有限公司,大鼠抗小鼠CD4 R-PE和CD8a TRI-COLOR荧光抗体、大鼠抗小鼠CD25-FITC荧光抗体均购自美国Invitrogen公司;脾淋巴细胞分离液,购自达科为生物有限公司;小鼠IL-2、IFN- γ ELISA试剂盒,购自美国Bioscience公司;LDH释放法检测试剂盒购自美国Promega公司(Madison, WI)。

1.2 实验动物 实验小鼠,健康清洁级C57BL/6,雄性,体质量18~22 g,6~7周,购自中国医学科学院实验动物中心。小鼠饲养时温度为(23 \pm 2) $^{\circ}$ C,相对湿度(55% \pm 2%),普食饲养。

1.3 细胞培养 小鼠B16黑色素瘤细胞购自中国协和医科大学细胞库。B16细胞接种于DMEM培养基,接种之后放于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂环境下培养约24 h即可进行传代,观察发现细胞的数量呈对数期增长时即可提取用于实验。

1.4 制备热处理后细胞裂解瘤苗 将经45 $^{\circ}$ C 15 min热处理后的B16细胞(我们前期实验研究发现,相较42 $^{\circ}$ C 60 min和50 $^{\circ}$ C 5 min,45 $^{\circ}$ C 15 min热处理能诱导最高程度的HSP70蛋白表达,该western blot结果在补充材料中提供),立即更换培养基后放回37 $^{\circ}$ C,5%CO₂细胞培养箱复温孵育24 h后取出,收集全部细胞,用PBS将细胞洗涤两次,然后将其浓度调整至5 \times 10⁸个/mL。即可将细胞悬液转移至冷冻管中进行保存,然后再交替置于液氮内10 min,37 $^{\circ}$ C水浴中5 min,多次操作之后待细胞完全溶解后,即可放于-80 $^{\circ}$ C的环境中进行冷冻保存,以备后用。

1.5 CpG-ODN2395佐剂配制 CpG-ODN2395的序列为5'-TCGTCGTTTTTCGGCGCGCCG-3',购自上海生工生物工程技术有限公司。根据说明书,使用PBS溶解核酸,将浓度调制为0.1 mL/OD,注意即配即用。

1.6 实验分组以及小鼠肿瘤疫苗接种及攻击实验 实验小鼠随机分为下述四组。①对照组:接种PBS;②瘤苗组(heated cell lysates, HCL组):将45 $^{\circ}$ C热处理肿瘤细胞裂解产物(每0.1 mL含2 \times 10⁷个细胞的裂解产物)+PBS等体积混合后接种;③佐剂组(CpG-ODN组):CpG-ODN2395(浓度为30 μ g/0.1 mL)+PBS等体积混合后接种;④联合组(HCL+CpG-ODN组):将45 $^{\circ}$ C热处理肿瘤细胞裂解产物+CpG-ODN2395等体积混合后接种。

健康小鼠的疫苗接种:分别于第0、6、12、18及24 d向小鼠注射疫苗,需注意疫苗应分四点进行注

射,注射位置为小鼠双侧腹股沟和腋窝皮下,每个位置的注射量为 0.05 mL,每间隔 5 d 进行一次注射,每只小鼠接种 5 次。

B16 细胞攻击接种后小鼠:当 B16 细胞呈对数生长之后,取细胞放于 0.25%胰酶中进行消化。重悬于 PBS 中。并将 B16 的浓度调至 1×10^6 个/mL,于第 30 天在小鼠为右肋腹部皮下位置进行注射,每只小鼠注射 0.1 mL。

观察并记录小鼠皮下肿瘤出现的时间、体积大小和小鼠生存天数。

1.7 外周血 T 细胞亚群检测 免疫结束后的第六天(d30),随机从每组中挑选 3 只小鼠,用摘眼球取血法采集小鼠血液,并置于抗凝管中。在抗凝管中取血 100 μ L,置于 1.5 mL 离心管,分别向离心管中加入 3 L 的,在温室、避光的环境中孵育 15~20 min。1000 rpm 离心 5 min,弃上清。加入 2 mL PBS,1000 rpm 离心 5 min,将未结合抗体洗去。在溶液中加入稀释了的流式红细胞裂解液,在温室、避光的环境中孵育 15 min,观察发现溶液呈透明状后取出。以 1000 rpm 的速度离心溶液离心 5 min,弃上清。向其中加入 2 mL PBS,再以 1000 rpm 的速度离心溶液离心 5 min,重复洗涤 2 次。加入 4%多聚甲醛,固定待测。用流式细胞仪检测外周血中 $CD4^+$ T 细胞、 $CD8^+$ T 细胞以及 $CD25^+$ T 细胞的数量,计算各亚群比例。

1.8 小鼠脾淋巴细胞分离和培养 取血后将小鼠断颈处死,无菌取脾,置于 200 目尼龙网中研磨脾组织,分散的细胞经过尼龙网过滤即可进入到脾淋巴细胞分离液中。收集悬液,以 1500 rpm 的速度离心溶液离心 30 min(密度梯度法),得到脾脏单个核细胞。用 PBS 液将细胞漂洗两次,于 5 mL 10%FCS RPMI 1640 培养液重悬(含 IL-2 100 U/L),以常规细胞培养方式进行培养,培养液隔天更换。

1.9 ELISA 法检测小鼠脾细胞分泌 Th1 型细胞因子 IL-2、INF- γ 水平 将所获各组小鼠脾淋巴细胞(单核细胞)作为效应细胞,以丝裂霉素 C 灭活处理后 B16 细胞作为刺激细胞,按 10:1 的比例共培养 3 d,收集培养上清,ELISA 法检测其中 Th1 型细胞因子 IL-2、INF- γ 的水平。

1.10 LDH 释放法检测免疫后小鼠脾细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic lymphocyte, CTL)对 B16 的特异性细胞毒作用 将效应细胞(分离的脾单核细胞)和靶细胞(灭活的 B16 细胞)以效靶比为 20:1 混合培养于 10%FCS RPMI 1640 培养液(含 IL-2 100U/L)中,4 h 后用 LDH 释放法检测试剂盒检测不同组 LDH 的释放水平,CTL 杀伤效率计算公式:杀伤率(%)=OD(实验组-效应细胞自发-靶细胞自发)OD

(靶细胞最大-靶细胞自发) $\times 100\%$ 。

1.11 统计学分析 所有实验均重复至少两次。实验数据采用 StatView (version 5.0) software (SAS Institute Inc. Cary, NC) 统计软件处理。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较采用 ANOVA 分析,统计学差异显著性采用 log-rank 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 同源肿瘤细胞攻击后小鼠出瘤情况、肿瘤生长曲线及生存期观察的比较 总观察期为 40 d,将小鼠体内肿瘤体积绘制成动态图(图 1):PBS 对照组肿瘤生长迅速,平均出瘤时间为(5.3 \pm 1.8) d,并在 30 d 内全部死亡(小鼠的生存周期为 20.9 \pm 2.9 d)。相比于 PBS 组,CpG-ODN 组、HCL 组以及联合疫苗组(HCL+CpG-ODN)的小鼠肿瘤均受到不同程度的抑制,其中联合疫苗组的肿瘤抑制水平最高($P < 0.05$)。小鼠接种之后,直至观察结束,约有 35%未出瘤。已出瘤小鼠的平均出瘤天数为(11.7 \pm 5.0) d,超过 73%的小鼠在观察结束之后仍然存活,存活时间明显长于其他组($P < 0.01$)。CpG-ODN 组未出瘤小鼠仅为一只,出瘤小鼠的出瘤时间为(8.6 \pm 3.2) d,小鼠 40 d 的存活率为 52%(14/27)。HCL 组和 PBS 组的出瘤时间基本相同,为(5.6 \pm 1.7) d,但是在肿瘤生长抑制作用上,两组的差别比较明显,HCL 组 46%(12/26)的小鼠生存期超过了 40 d,较对照组延长。CpG-ODN 组相较于 HCL 组来说,无论是平均出瘤时间,还是生存期都有所延长。

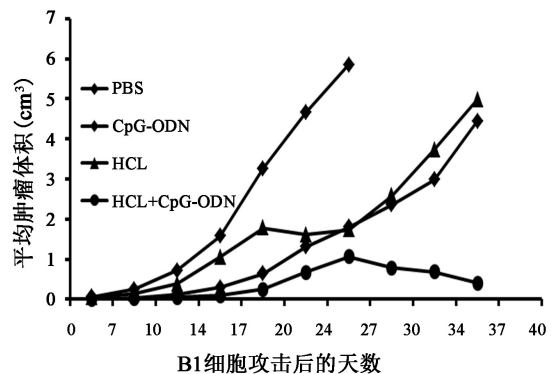
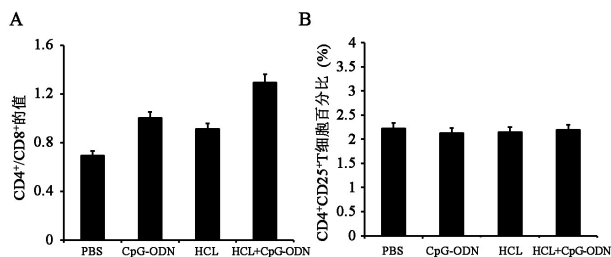


图 1 小鼠肿瘤体积生长曲线图

2.2 免疫后小鼠外周血 T 细胞亚群 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 的比值升高,但 $CD4^+CD25^+$ T 细胞比例无差异 研究显示机体的免疫功能状态在很大程度上与 T 细胞亚群的比例有关,以流式细胞术对细胞外周血进行检测, $CD4^+$ T 细胞与 $CD8^+$ T 细胞比值低提示免疫功能低下,而 HCL 组、CpG-ODN 组与 HCL+CpG-ODN 组

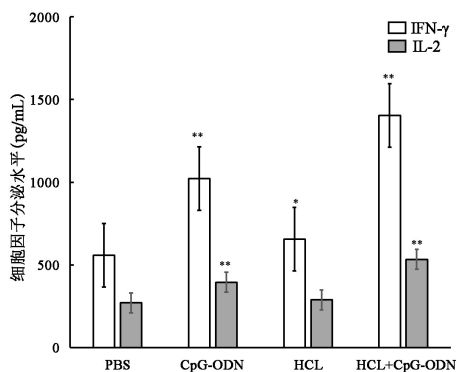
小鼠的外周血 CD4⁺/CD8⁺ 的值均较 PBS 组升高 ($P < 0.001$)。其中联合疫苗组 CD4⁺/CD8⁺ 的值最高, 与其它治疗组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。HCL 组和 CpG-ODN 组的 CD4⁺/CD8⁺ 值比较, 差异有统计学意义 ($P = 0.048$, 图 2)。



A: 外周血 T 细胞亚群 CD4⁺/CD8⁺ 的值; B: CD4⁺CD25⁺ T 细胞百分比 ($n = 12$)

图 2 外周血 T 细胞亚群分布比例

2.3 联合免疫小鼠脾细胞分泌 Th1 型细胞因子的活性显著增加 治疗组 IFN- γ 和 IL-2 的水平与对照组相比, 均有不同程度的提升 ($P < 0.05$)。其中 HCL+CpG-ODN 组的小鼠可诱导出最高水平的 IFN- γ 和 IL-2, 分别为 (1402.5 ± 156.5) pg/mL 和 (532.9 ± 41.8) pg/mL; CpG-ODN 组也可诱导出较高的 IFN- γ 和 IL-2, 分别为 (1021.8 ± 136.9) pg/mL 和 (395.3 ± 20.1) pg/mL; HCL 免疫组诱导出的 IFN- γ 和 IL-2 则相对较低, 分别为 (654.7 ± 59.5) pg/mL 和 (289.2 ± 15.5) pg/mL, 组间比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 3)。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs PBS 组, 治疗各组间比较均 $P < 0.05$

图 3 各组 Th1 细胞因子分泌水平比较

2.4 联合免疫后小鼠脾 CTL 的细胞毒效率明显增加 对 CTL 细胞进行毒效率检测, 相比于 PBS 组, 单独 HCL 起不到增强 CTL 特异性细胞毒效率的作用 ($P > 0.05$)。CpG-ODN 组和 HCL+CpG-ODN 组均能明显增强小鼠 CTL 的细胞毒杀伤效率 ($P < 0.05$), HCL+CpG-ODN 组与 CpG-ODN 组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 对细胞毒杀伤效率的增强作用最

显著 (表 1)。

表 1 各组脾 CTL 对 B16 的特异性细胞毒杀伤效率比较

组别	CTL 的细胞毒效率 (%)
PBS	15.7 \pm 3.0
CpG-ODN	22.1 \pm 3.4*
HCL	18.0 \pm 2.3
HCL+CpG-ODN	39.2 \pm 6.3 ^{ab}

* $P < 0.05$ vs PBS 组; ^b $P < 0.01$ vs CpG-ODN 组。

3 讨论

热休克蛋白相关肿瘤疫苗及免疫活性物质 CpG-ODN, 在诱导抗肿瘤免疫反应上, 能够在一定程度上起到互补的作用。本实验主要研究了小鼠的恶性黑色素瘤肿瘤细胞疫苗的疗效, 并观察了不同疫苗配方对小鼠的抗肿瘤免疫效力的增强作用, 通过检测, 联合疫苗的效果最佳。联合疫苗能使超过 35% 的小鼠抵抗住了 B16 细胞的攻击。即使长出肿瘤的小鼠, 其平均出瘤时间、生存期与其它各组相比亦有显著性延长。本研究结果与 Ito 等^[18] 研究具有一致性, 进行 HCL 瘤苗治疗, 小鼠未能产生更强的免疫保护, HCL 组的出瘤时间与 PBS 对照组相比, 差异无统计学意义, 但是在肿瘤的生长和小鼠的生存期上有一定的差异, 说明 HCL 瘤苗有一定的诱导抗肿瘤免疫作用, 这可能与热处理后肿瘤细胞内形成的大量 HSP-抗原肽复合物具有一定抗肿瘤免疫活性且不依赖于 MHC 的表达有关^[20-21]。另外, 值得一提的是 CpG-ODN 与 HCL 联合应用后部分小鼠出现了因局部变态反应导致的皮肤溃疡 (该结果未在本文中列出), 此现象在国内外尚未见类似报道, 具体原因还有待进一步研究。此局部剧烈变态反应的出现除了证实联合疫苗可诱导极强的免疫反应外, 也提醒我们需改良接种方式以减轻治疗的局部不良反应。

为对抗肿瘤机制进行更进一步的研究, 本实验还对小鼠细胞免疫状态进行了检测。在小鼠体内, CD4⁺ T 细胞是细胞免疫应答的主要效应细胞, 通过分泌 IL-2、INF- γ 等细胞因子来调节免疫反应; CD8⁺ T 细胞能够分泌物质, 抑制 T 细胞因子的免疫作用, 对于小鼠机体而言, CD4⁺/CD8⁺ 细胞比值决定着免疫是否平衡, 从侧面反映出机体免疫功能状态, 当 CD4⁺/CD8⁺ 细胞比值下降, 说明小鼠机体的免疫功能下降, 而当免疫功能有所恢复, 小鼠的 CD4⁺/CD8⁺ 细胞比值会有所上升。本实验结果显示, 当机体进行免疫治疗之后, CD4⁺/CD8⁺ 细胞比值均有明显的上调, 其中联合疫苗组的上调最为明显。后续 IL-2、INF- γ

细胞因子以及 CTL 细胞毒杀伤效率的检测结果亦印证了该结果。

CD4⁺CD25⁺ T 细胞在免疫应答过程中起着负调节的作用,所以也将其称为调节性 T 细胞(T regular cell, Treg)。有研究报道减少或清除 CD4⁺CD25⁺ T 细胞可以增强细胞疫苗的疗效^[22],而 CpG-ODN 可通过 TLR9 损伤 Treg 细胞使其数目减少^[23]。因此,本实验预期联合免疫组小鼠 CD4⁺CD25⁺ T 细胞比例会低于对照组,但结果却显示各实验组无明显差异。迄今为止,Treg 细胞的调控机制尚未完全明确,Treg 细胞可与细胞因子、T 细胞、树突状细胞以及不同肿瘤和免疫微环境等多种因素相互影响、相互调控有关^[24],本研究中各组小鼠 Treg 细胞亚群数量无明显差异,亦反过来证实了 Treg 细胞调控机制的复杂性。下一步我们拟检测 Treg 的功能状态,探索其与 CpG-ODN 相互作用的可能信号通路,以期进一步揭示 CpG-ODN 强化抗肿瘤免疫应答的可能分子机制。

综上所述,新型免疫佐剂 CpG-ODN 可显著增强热休克蛋白肿瘤疫苗的抗肿瘤免疫效应。HCL 携带多种肿瘤特异或者相关抗原的 HSP-抗原肽复合物,在免疫佐剂 CpG-ODN 的协同作用下,免疫细胞因子分泌将会更强,改善 T 细胞亚群的比例,活化肿瘤免疫微环境,进而增强单核细胞对肿瘤细胞的特异性细胞毒作用,从而抑制肿瘤生长。这些实验结果为未来肿瘤疫苗的研究提供了一定的实验依据。

【参考文献】

- [1] Malissen N, Grob JJ. Metastatic melanoma: Recent therapeutic progress and future perspectives[J]. *Drugs*,2018,78(12):1197-1209.
- [2] Mallory M, Gogineni E, Jones GC, et al. Therapeutic hyperthermia: The old, the new, and the upcoming[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2016,97:56-64.
- [3] Blom DJ, De WI, Apte RS, et al. Effect of hyperthermia on expression of histocompatibility antigens and heat-shock protein molecules on three human ocular melanoma cell lines[J]. *Melanoma Research*,1997,7(2):103.
- [4] Shevtsov M, Huile G, Multhoff G. Membrane heat shock protein 70: a theranostic target for cancer therapy[J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*,2017,373(1738):20160526.
- [5] Srivastava P. Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity[J]. *Nat Rev Immunol*,2002,2(3):185-194.
- [6] Castelli C, Rivoltini L, Rini F, et al. Heat shock proteins: biological functions and clinical application as personalized vaccines for human cancer[J]. *Cancer Immunol Immunother*,2004,53(3):227-233.
- [7] 王浩浩,滕理送. 热休克蛋白肿瘤疫苗研究进展[J]. *国际肿瘤学杂志*,2006,33(2):89-91.
- [8] di Pietro A, Tosti G, Ferrucci PF, et al. The immunological era in melanoma treatment: new challenges for heat shock protein-based vaccine in the advanced disease[J]. *Expert Opin Biol Ther*,2011,11(10):1395-1407.
- [9] Bubeník J. MHC class I down regulation, tumour escape from immune surveillance and design of therapeutic strategies[J]. *Folia Biol (Praha)*,2005,51(1):1-2.
- [10] Ballas ZK, Rasmussen WL, Krieg AM. Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA[J]. *J Immunol*,1996,157(5):1840-1845.
- [11] Warren TL, Bhatia SK, Acosta AM, et al. APC stimulated by CpG oligodeoxynucleotide enhance activation of MHC class I-restricted T cells[J]. *J Immunol*,2000,165(11):6244-6251.
- [12] Takeshita S, Takeshita F, Haddad DE, et al. CpG oligodeoxynucleotides induce murine macrophages to up-regulate chemokine mRNA expression[J]. *Cell Immunol*,2000,206(2):101-106.
- [13] Han Q, Wang X, Jia X, et al. CpG loaded MoS2 nanosheets as multifunctional agents for photothermal enhanced cancer immunotherapy[J]. *Nanoscale*,2017,9(18):5927-5934.
- [14] Sun S, Zhang X, Tough DF, et al. Type I interferon-mediated stimulation of T cells by CpG DNA[J]. *J Exp Med*,1998,188(12):2335-2342.
- [15] Ko EJ, Lee YT, Lee Y, et al. Distinct effects of monophosphoryl lipid A, oligodeoxynucleotide CpG, and combination adjuvants on modulating innate and adaptive immune responses to influenza vaccination[J]. *Immune Netw*,2017,17(5):326-342.
- [16] Chuang TH, Lee J, Kline L, et al. Toll-like receptor 9 mediates CpG-DNA signaling[J]. *J Leukoc Biol*,2002,71(3):538-544.
- [17] Cerkovnik P, Novakovic BJ, Stegel V, et al. Tumor vaccine composed of C-class CpG oligodeoxynucleotides and irradiated tumor cells induces long-term antitumor immunity [J]. *BMC Immunol*, 2010,11:45.
- [18] Ito A, Tanaka K, Kondo K, et al. Tumor regression by combined immunotherapy and hyperthermia using magnetic nanoparticles in an experimental subcutaneous murine melanoma[J]. *Cancer Sci*,2003,94(3):308-313.
- [19] Liu HM, Newbrough SE, Bhatia SK, et al. Immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides enhance the immune response to vaccine strategies involving granulocyte-macrophage colony-stimulating factor[J]. *Blood*,1998,92(10):3730-3736.
- [20] Todryk SM, Gough MJ, Pockley AG. Facets of heat shock protein 70 show immunotherapeutic potential[J]. *Immunology*,2003,110(1):1-9.
- [21] Cho JA, Lee YS, Kim SH, et al. MHC independent anti-tumor immune responses induced by Hsp70-enriched exosomes generate tumor regression in murine models[J]. *Cancer Lett*,2009,275(2):256-265.
- [22] Prasad SJ, Farrand KJ, Matthews SA, et al. Dendritic cells loaded with stressed tumor cells elicit long-lasting protective tumor immunity in mice depleted of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells[J]. *J Immunol*, 2005,174(1):90-98.
- [23] Kang X, Zhang X, Liu Z, et al. Excessive TLR9 signaling contributes to the pathogenesis of spontaneous abortion through impairment of Treg cell survival by activation of Caspase 8/3[J]. *Int Immunopharmacol*,2015,29(2):285-292.
- [24] 于益芝,曹雪涛. 调节性 T 细胞在肿瘤免疫和肿瘤免疫治疗中的作用[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*,2010,17(1):1-6.