

# 分泌型 Survivin 真核表达载体的构建及其在 HeLa 细胞中的表达

韩捷<sup>1</sup>, 施焕敬<sup>1</sup>, 徐丽慧<sup>2</sup>, 卢宏松<sup>1</sup>, 何贤辉<sup>1</sup>

(暨南大学生命科学技术学院 1. 组织移植与免疫实验中心; 2. 生物工程研究所, 广东 广州 510632)

**[摘要]** 目的: 构建含6个组氨酸标签(His<sub>6</sub>)的小鼠存活素(Survivin)融合蛋白的真核表达载体, 及其在真核细胞中的表达。方法: 根据小鼠 Survivin 序列设计引物, 经过 RT-PCR 克隆 Survivin 的 cDNA 并进一步构建分泌型 Survivin 的真核表达载体, 经测序鉴定后在大肠杆菌中扩增在 HeLa 细胞中表达; 以金属离子螯合层析富集, 再用免疫印迹法鉴定。结果: 克隆到 Survivin 编码区全长序列, 经 DNA 测序后证明与已报道序列相同。构建氨基端融合小鼠 IL-2 信号肽, 羧基端带有 His<sub>6</sub> 标签的 Survivin 融合蛋白的真核表达载体, 在 HeLa 细胞中转染成功并且表达; 细胞上清经 HisTrap HP 柱层析富集后, 进行免疫印迹分析, 表明该融合蛋白以分泌型方式在 HeLa 细胞中表达。结论: 成功克隆 Survivin 的 cDNA, 并构建其分泌型真核表达载体。

**[关键词]** 存活素; 真核表达; 分泌型; 肿瘤相关抗原

**[中图分类号]** R392.11 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-9965(2008)06-0562-06

## Construction of eukaryotic expression plasmid survivin for fusion protein and its expression in HeLa cells

HAN Jie<sup>1</sup>, SHI Huan-jing<sup>1</sup>, XU Li-hui<sup>2</sup>, LU Hong-song<sup>1</sup>, HE Xian-hui<sup>1</sup>

(1. Institute of Tissue Transplantation and Immunology; 2. Institute of Bioengineering,  
College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

**[Abstract]** **Aim:** To construct the eukaryotic expression vector for mouse survivin fusion protein with a His<sub>6</sub> tag and to express it in eukaryotic cells. **Methods:** The primers were designed according to the mouse survivin gene, and the cDNA of survivin was cloned by RT-PCR. The eukaryotic expression vector for secreting type of survivin was constructed. After sequencing analysis, the plasmid was amplified in *E. coli* and expressed in HeLa cells. Then the recombinant protein was enriched by metal ion chelating chromatography and identified by Western blotting. **Results:** DNA sequence analysis showed that the cloned cDNA encoding survivin was identical to the published sequence. The eukaryotic expression vector encoding survivin which fused with an IL-2 signal sequence at amino terminus and a His<sub>6</sub> tag at carboxyl terminus was successfully expressed in HeLa cells. The fusion protein enriched by HisTrap HP column was

**[收稿日期]** 2008-06-03

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(30572199、30230350 和 30371651); 生物化学与分子生物学广东省重点学科资助项目

**[作者简介]** 韩捷(1983-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 免疫调节与免疫药理

通讯作者: 何贤辉, Tel: 020-85220679; E-mail: thexh@jnu.edu.cn

assessed by Western blotting, indicating that the protein was expressed in secreting form in HeLa cells.

**Conclusion:** The cDNA of survivin was cloned, and the eukaryotic expression vector for the secreting survivin fusion protein was constructed. This study would be useful for research of vaccine which targeted to survivin in future.

[Key words] survivin; eukaryotic expression; secreting form; tumor-associated antigen

存活素 (Survivin) 是由 Ambrosini 等<sup>[1]</sup>于 1997 年发现的凋亡抑制蛋白 (inhibitor of apoptosis of protein, IAP) 家族成员, 由 142 个氨基酸组成, 相对分子质量为 16 500 的胞浆蛋白; 在细胞分化和存活等方面起调控作用, 在正常成人的胸腺、血管内皮细胞、睾丸和分泌期子宫内膜仅少量表达<sup>[2]</sup>, 高表达于各种胚胎组织, 而在各种恶性肿瘤如肺癌<sup>[3]</sup>、结肠癌<sup>[4]</sup>、乳腺癌<sup>[5]</sup>、皮肤恶性肿瘤<sup>[6]</sup>等过量表达。此特性使 Survivin 成为肿瘤治疗的理想标靶。利用 Survivin 突变体和特异性抗体标记的肿瘤免疫治疗, 激发 Survivin 特异性免疫应答最有效的方法之一是利用转染表达的突变体 Survivin 的树突状细胞 (Dendritic cell, DC)<sup>[7]</sup>。最近, 研究显示转染人或小鼠 Survivin 的 DC 疫苗能诱发有效抗肿瘤免疫及应答<sup>[8]</sup>。而以 Survivin 为靶标的 DNA 疫苗的研究尚未见报道。本研究在克隆小鼠 Survivin 的 cDNA 后, 进一步构建分泌型 Survivin 突变体蛋白的真核表达载体并在 HeLa 细胞中转染表达。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌 DH5α 购自 Novagen 公司; pEGFP-N1 购自 Clontech; 限制性内切酶 *Bam*HI、*Hind*III、*Kpn*I、*T*<sub>4</sub> DNA 连接酶、高保真 Prime STAR HS *Taq* DNA 聚合酶、蛋白质分子量标准均为 TaKaRa 产品; PCR 引物 (见表 1) 全部由上海英骏生物公司 (Shanghai Invitrogen Biotechnology Co) 合成。QIAquick Gel Extraction Kit 和 QIAprep Spin Miniprep Kit 为德国 QIAGEN 公司产品; pFUSE-Fc 载体购自 InvivoGen 公司; FuGENE HD Transfection Reagent 为 Roche 公司产品; 小鼠抗-His<sub>6</sub> 单抗 (C-term) 和 SeeBlue Plus2 预染蛋白分子量标准为 Invitrogen 公司产品; Hybond-P 膜和 ECL 化学发光溶液为 Amersham biosciences 公司产品; 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记羊抗鼠 IgG 抗体为北京中杉进口分装。

表 1 构建表达载体所有引物序列

Primer number	Primer sequences
1	5'-ATA TAA GCT TGC CAC CAT GGG AGC TCC GGC GCT GCCC-3'
2	5'-ATA TGG ATC CTT AGG CAG CCA GCT GCT CAAT-3'
3	5'-ATA TAA GCT TGC CAC CAT GTA CAG GAT GCA ACT CCT GTC TTG CAT TGC ACT AAG TCCT-3'
4	5'-CGC CGG AGC TCC CAT CGT GAC AAG TGC AAG ACT TAG TGC AAT GCA-3'
5	5'-CTC ACG ATG GGA GCT CCG GCG CTG CCC CA-3'
6	5'-CTC TGG GGC GCA GGC GCA GTC-3'
7	5'-TGC GCC TGC GCC CCA GAG CGA-3'
8	5'-ATA TGG TAC CTC AGT GGT GGT GAT GAT GAT GTG TGG AGG CAG CCA GCT GCTC-3'

1.2 方法

(1) 小鼠 Survivin cDNA 全长编码区的克隆

参照 GenBank 中登记的小鼠 Survivin 基因序列 (登录号: NM\_009689) 设计引物 1 和引物 2。PCR-1 总体系为 50 μL, 以小鼠脾脏的 cDNA 为模板<sup>[9]</sup>, 条件为: 在 94 ℃ 预变性 2 min 后开始循环, 然后 94 ℃

变性 30 s, 57 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 1 min, 共 35 个循环, 再 72 ℃ 延伸 10 min, 并以 QIAquick Gel Extraction kit 从琼脂糖凝胶中回收。HindIII + BamHI 双酶切并再次从凝胶中回收, 与经 HindIII + BamHI 双酶切的 pEGFP-N1 载体连接后转化 *E. coli* DH5α 感受态细胞。在固体 LB 琼脂培养板上铺板 37 ℃

培养14 h后挑取单菌落,在5 mL液体LB培养基中摇菌过夜,再以QIAquick Gel Extraction kit抽提质粒,双酶切法筛选正确接入外源基因的转化子,克隆的基因序列由上海英俊公司测定。

## (2) 分泌型 Survivin 基因的 PCR 扩增

①PCR-2:根据IL-2信号肽编码序列设计引物3和引物4,以pFUSE-Fc载体(InvivoGen公司)为模板扩增IL-2信号肽编码序列。PCR总体积为50  $\mu$ L,以1  $\mu$ L pFUSE-Fc载体模板,条件为:在94  $^{\circ}$ C预变性2 min后开始循环,然后94  $^{\circ}$ C变性30 s,55  $^{\circ}$ C退火30 s,72  $^{\circ}$ C延伸30 s,共35个循环,再72  $^{\circ}$ C延伸10 min,并以QIAquick Gel Extraction kit从琼脂糖凝胶中回收备用。

②PCR-3以引物5为正向引物,引物6为反向引物,以Touch down方法进行PCR扩增Survivin全长cDNA的前半段。在50  $\mu$ L体系中,以1  $\mu$ L小鼠Survivin全长cDNA为模板,条件为:94  $^{\circ}$ C预变性2 min后开始循环,以94  $^{\circ}$ C变性30 s,72  $^{\circ}$ C延伸30 s的相同条件下,分别在68、66、64、62  $^{\circ}$ C退火,各3个循环,60  $^{\circ}$ C退火23个循环,再72  $^{\circ}$ C延伸10 min,并以QIAquick Gel Extraction kit从琼脂糖凝胶中回收备用。

③PCR-4所用正反向引物分别为引物7和引物8,模板为小鼠Survivin全长cDNA,目的为扩增Survivin全长cDNA的后半段。条件为:在94  $^{\circ}$ C预变性2 min后开始循环,然后94  $^{\circ}$ C变性30 s,55  $^{\circ}$ C退火30 s,72  $^{\circ}$ C延伸1 min,共35个循环,再72  $^{\circ}$ C延伸10 min,并以QIAquick Gel Extraction kit从琼脂糖凝胶中回收备用。

④PCR-5用引物3为正向引物,引物6为反向引物,以Touch down方法进行PCR扩增IL-2信号肽和Survivin前半段连接片段。在50  $\mu$ L体系中,以PCR-2和PCR-3产物各1  $\mu$ L为模板,其条件为:94  $^{\circ}$ C预变性2 min后开始循环,以94  $^{\circ}$ C变性30 s,72  $^{\circ}$ C延伸30 s的相同条件下,分别在58、56、54、52、50  $^{\circ}$ C退火,各3个循环,60  $^{\circ}$ C退火20个循环,再72  $^{\circ}$ C延伸10 min,并以QIAquick Gel Extraction kit从琼脂糖凝胶中回收备用。

⑤PCR-6以引物3为正向引物,引物8为反向引物。以PCR-4和PCR-5产物为模板扩增IL-2信号肽和Survivin全长cDNA序列及His<sub>6</sub>标签的Sur-

vivin融合蛋白基因。50  $\mu$ L体系,PCR条件为:在94  $^{\circ}$ C预变性2 min后开始循环,然后94  $^{\circ}$ C变性30 s,55  $^{\circ}$ C退火30 s,72  $^{\circ}$ C延伸1.5 min,共35个循环,再72  $^{\circ}$ C延伸10 min,并以QIAquick Gel Extraction kit从琼脂糖凝胶中回收备用。

## (3) pSurvivin 质粒的构建

以PCR-6产物与pEGFP-N1连接构建胞外域基因表达载体。先以HindIII单酶切pEGFP-N1,回收之后,再用KpnI单酶切。双酶切PCR-6产物后,将其与pEGFP-N1载体连接,转化至DH5 $\alpha$ 感受态细胞,筛选转化子,再从阳性克隆中提取质粒并进行测序鉴定。测序正确的命名为pSurvivin质粒。以QIAquick Gel Extraction kit制备转染所用重组质粒。

## (4) pSurvivin 转染至 HeLa 细胞中表达以及纯化

以对数生长期的HeLa细胞铺板于24孔板中,细胞数为30 000/孔。经24 h培养后将稀释好的FuGENE HD转染试剂和pSurvivin质粒混合液加入23个孔内,另一孔加入FuGENE HD转染试剂和pEGFP-N1载体的混合液作为对照。吹打均匀后在37  $^{\circ}$ C恒温培养箱内培养,分48、72 h分别收集上清液。经荧光显微镜下观察,pEGFP-N对照孔发出绿色荧光,pSurvivin质粒孔无荧光或鲜有荧光。将pSurvivin质粒孔收集的上清液以HisTrap HP金属螯合层析柱富集,另将转染的HeLa细胞收集备用。

## (5) 免疫印迹分析

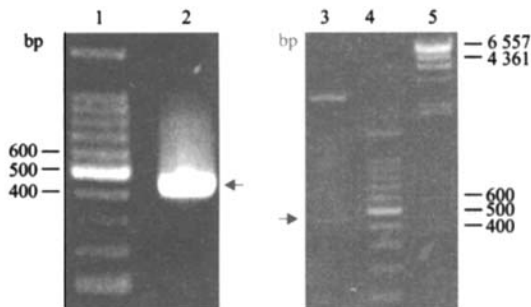
蛋白样品以150 g/L SDS-PAGE分离后,以15 V电压转移16 h,将蛋白转移至Hybond-P PVDF膜上,于37  $^{\circ}$ C以封闭液(Tris-buffered-saline, pH 7.5, 含30 mL/L小牛血清和0.5 mL/L Tween20)振荡封闭30 min,再加入以封闭液稀释(1:3 000)的小鼠抗-His<sub>6</sub>抗体,于37  $^{\circ}$ C温育2 h。洗膜后,加1:4 000的HRP-兔抗鼠IgG于37  $^{\circ}$ C温育1 h,洗涤后进行化学发光,结果以Alpha成像系统拍摄记录。

# 2 结果

## 2.1 小鼠 Survivin 全长 cDNA 的克隆

(1)根据小鼠Survivin序列设计特异性引物,以小鼠脾脏cDNA为模板PCR扩增出一条约为500 bp长的DNA片段(图1,泳道2),与预计大小相符。PCR产物经双酶切后与同样酶切的质粒pEGFP-N1连接。经双酶切鉴定正确的重组质粒(图1,泳道

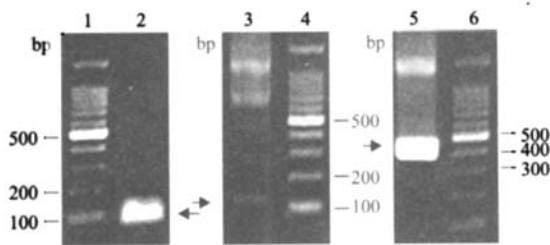
3)送测序鉴定,经分析与已报道的序列一致;序列已递交 GenBank,登录号为 EU366955。



1,4:100 bpDNA 标志;2:PCR 扩增到的小鼠 Survivin 全长 cDNA;  
3:重组质粒的双酶切产物;5:λDNA/Hind III Marker

图1 PCR 扩增小鼠 Survivin 全长 cDNA 及  
重组质粒的双酶切鉴定

(2)PCR-2、PCR-3 和 PCR-4 分别扩增 IL-2 信号肽(图 2,泳道 2)、Survivin 融合蛋白前半段 cDNA(图 2,泳道 4)和 Survivin 融合蛋白后半段 cDNA(图 2,泳道 5)。片段预计大小分别为 80 bp、100 bp 和 470 bp,前者对应的模板为 pFUSE-Fc 载体,后两者的模板为 Survivin 全长 cDNA。PCR-3 和 PCR-4 通过 overlapping 的策略将 T34 突变为 A34,以消除 Survivin 的磷酸化位点,使其失活。同时,PCR-4 在其 3'端融合编码 His<sub>6</sub> 标签的序列。

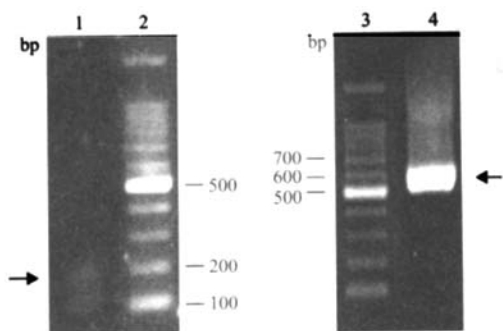


1,4,6:100 bp DNA 标志;2:IL-2 信号肽的 PCR 产物;  
3:Survivin 融合蛋白 cDNA 前半段;5:Survivin 融合蛋白 cDNA 后半段

图2 IL-2 信号肽、Survivin 胞外域 cDNA 编码区  
片段的 PCR 扩增

(3)PCR-5 以 PCR-2 和 PCR-3 产物为模板,扩增 IL-2 信号肽和 Survivin 前半段连接片段(图 3,泳道 1),符合预计的大小(箭头处,170 bp)。

(4)PCR-6 以 PCR-4、PCR-5 为模板,扩增带有 IL-2 信号肽和 Survivin 全长 cDNA 及 His<sub>6</sub> 标签的 Survivin 融合蛋白基因(图 3,泳道 4),与预计大小 500 bp 基本相同。

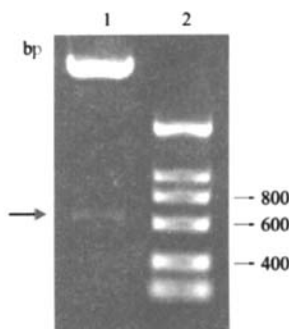


1:带 IL-2 信号肽的 Survivin 基因前半段 DNA 的 PCR 产物(箭头处);2,3:100 bp DNA 标志;4:带信号肽和 His<sub>6</sub> 编码区以及 Survivin 全长编码区的融合蛋白基因的 PCR 产物(箭头处)

图3 PCR 扩增带有信号肽编码区的 Survivin 基因前半段 DNA  
以及完整分泌型 Survivin 融合蛋白基因的 PCR 扩增

## 2.2 Survivin 细胞外表达质粒的构建

以上述分泌型的 Survivin 融合蛋白基因与 pEGFP-N1 载体构建表达载体。经 HindIII 和 KpnI 双酶切 pEGFP-N1 载体和分泌型的 Survivin 融合蛋白基因(图 4,泳道 1),以 T4 DNA 连接酶连接。从 DH5α 转化子中筛选正确接入外源基因的重组子,抽提质粒,测序鉴定其序列正确,5'端融合 IL-2 的信号肽编码序列,3'端连接编码 His<sub>6</sub> 标签的编码序列。该分泌型 Survivin 真核表达载体称为 pSurvivin。



1:重组质粒 pSurvivin 的双酶切鉴定(箭头标识处切出的为插入片段);2:100 bp DNA 标志

图4 Survivin 融合蛋白胞外域真核表达载体的双酶切鉴定

## 2.3 pSurvivin 转染至 HeLa 细胞中表达

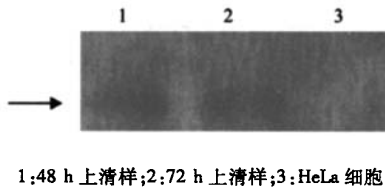
以 FuGENE HD 转染试剂和构建的 pSurvivin 质粒 DNA 混合液以及 FuGENE HD 转染试剂和 pEGFP-N1 混合液注入细胞培养液进行转染。在 24 h 取 24 孔板做镜下观察,pEGFP-N1 对照孔有绿色荧光;由于 pSurvivin 中外源的蛋白与 EGFP 并非融合

表达,故转染细胞无荧光或有微量荧光。

#### 2.4 Survivin 融合蛋白的纯化与浓缩以及免疫印迹分析

将收集的上清以 HisTrap HP 亲和层析柱富集含 His<sub>6</sub> 标签的 Survivin;经分析后收集该融合蛋白峰值下样品并分别经超滤浓缩至 200  $\mu$ L。

Survivin 融合蛋白理论相对分子质量约是 17 200 左右。免疫印迹分析显示,24、48 h 的培养上清富集液中的 Survivin 融合蛋白与小鼠抗-His<sub>6</sub> 单抗有特异性反应(图 5,泳道 1、2),而转染细胞中无特异反应条带,说明 Survivin 融合蛋白在上 HeLa 细胞中以分泌型方式表达,见图 5。



1:48 h 上清样;2:72 h 上清样;3:HeLa 细胞  
图 5 HeLa 细胞表达的 Survivin 胞外域融合蛋白及 Western 印迹分析结果

### 3 讨论

本研究在克隆得到小鼠 Survivin 的 cDNA 基础上,构建 Survivin 融合蛋白的表达载体。该载体在羧基端带有 His<sub>6</sub> 标签,使其可 HisTrap HP 柱对其进行纯化,而且在 T34 位点突变为 A34,使其缺乏磷酸化位点而丧失功能<sup>[7]</sup>,同时在氨基端融合表达小鼠 IL-2 的信号肽,使表达产物能分泌到胞外。在 HeLa 细胞中成功转染并表达,经免疫印迹分析显示,上清液中特异性表达产物,而全细胞裂解液中无反应条带,分泌型 Survivin 蛋白成功表达并且分泌到细胞外。分泌型表达的优点:添加信号肽不仅可以促进抗原的加工提呈,而且可以通过被 DC 的摄取而促进交叉提呈,从而增强 DNA 疫苗的免疫应答<sup>[10]</sup>。

Survivin 高表达与高度恶性相关,是治疗淋巴瘤的一个重要靶点<sup>[11]</sup>。Survivin 阴性突变质粒转染人乳腺癌、皮肤癌细胞株后可有效地诱导肿瘤细胞凋亡,降低细胞的成瘤性<sup>[12]</sup>,另有研究报道以 Survivin 作为特异性肿瘤抗原可诱导肿瘤特异性细胞毒细胞产生<sup>[8,13]</sup>。树突状细胞是目前最有效、能在体内直接激活初始型 T 细胞的专职抗原呈递细胞,是启动、

调控并维持免疫应答的中心环节,在肿瘤免疫治疗中具独特地位,利用 DC 疫苗治疗肿瘤是肿瘤免疫治疗的研究热点<sup>[10]</sup>。单一抗原基因转染的 DC 可刺激多个宿主 MHC 位点限制的抗原特异性 CTL 反应,使机体抗肿瘤作用增强。Schmiiz 等研究报道<sup>[14]</sup>,当 Survivin 抗原被 DC 加工并被呈递时可以在体外诱导特异性 CTL,DC 负载 Survivin 融合蛋白重组抗原后也可诱导处 MHC-I 限制性 CTL, Survivin 为主要靶抗原的肿瘤特异性治疗提供了实验依据。在研究中成功构建的 Survivin 融合蛋白表达载体,也验证了其在 HeLa 细胞中的表达,为今后研究以 Survivin 为靶标的 DNA 肿瘤疫苗提供实验基础。

总之,Survivin 是一个与肿瘤高度相关的凋亡抑制基因,可作为免疫治疗的新靶点,其作为 DNA 疫苗中的靶抗原诱发的免疫应答机制仍有待深入研究,以期找到肿瘤免疫治疗的新突破口。

#### [参考文献]

- [1] AMBROSINI C, ALTIERI D C. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma [J]. Nat Med, 1997, 3(8): 917-921.
- [2] FUKUDA S, PELUSI M. Regulation of the inhibitor of apoptosis family member survivin in normal cord blood and bone marrow CD34<sup>+</sup> T cells by hematopoietic growth factors: imp location of Survivin expression in normal hematopoiesis [J]. Blood, 2001, 98(7): 2091-2100.
- [3] MONZOM, ROSELL R, FELIP E, et al. A novel anti-apoptosis gene: re-expression of Survivin messenger RNA as a prognosis marker in non-small-cell lung cancers [J]. J Clin Oncol, 1999, 17(7): 2100-2104.
- [4] KAWASAKI H, ALTIERI D C, LU C D, et al. Inhibition of apoptosis by Survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer [J]. Cancer Res, 1998, 58(22): 5071-5074.
- [5] TANAKA K, WAMOTO S, GON G, et al. Expression of Survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas [J]. Clin Cancer Res, 2000, 6(1): 127-134.
- [6] GRADILONE A, GAZZANIGA P, RBUFFO D, et al. Survivin, bcl-2, bax, and bcl-X gene expression in sentinel lymph nodes from melanoma patients [J]. J Clin Oncol, 2003, 21(2): 306-312.

(下转第 577 页)

BA(100 mg/L)处理的细胞染成蓝色,核呈明显的固缩状或圆珠状,经高质量浓度 BA(200 mg/L)处理的细胞已发生晚期凋亡或坏死,可被活细胞拒染的 PI 染成红色。

综上,黄芩苷能够阻止 Jurkat 细胞增殖,通过胞内钙离子和线粒体途径诱导其发生凋亡,有直接抗肿瘤的作用,为黄芩苷发展成抗肿瘤药物、更准确地选择抗肿瘤靶点提供了一定的实验依据。

### [参考文献]

- [1] MARTIN J, DUSEK J. The Baikal sculcap (*Scutellaria baicalensis* Georgi)-a potential source of new drugs [J]. *Ceska Slov Farm*, 2002, 51(6): 277-283.
- [2] LI F Q, WANG T, FEI Z, et al. Inhibition of microglial activation by the herbal flavonoid baicalin attenuates inflammation-mediated degeneration of dopaminergic neurons [J]. *J Neurol Transm*, 2005, 112(3): 331-347.
- [3] LI B Q, FU T, DONGYANG Y, et al. Flavonoid baicalin inhibits HIV-1 infection at the level of viral entry [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 276(2): 534-538.
- [4] MARTIN S J, LENNON S V, BONHAM A M, et al. Induction of apoptosis (programmed cell death) in human

leukemic HL-60 cells by inhibition of RNA or protein synthesis [J]. *J Immunol*, 1990, 145(6): 1859-1867.

- [5] SUZUK M, SHINNAR A E, NACKER L A, et al. Laurinterol from red alga *L. nidificayamada* [J]. *Bull Chem Soc Japan*, 1997, 52(3): 352-355.
- [6] MA J, FU N Y, FANG D B, et al. Apoptosis induced by isoliquiritigenin in human gastric cancer MGC-803 cells [J]. *Planta Med*, 2001, 67(8): 754-757.
- [7] SALVESEN G S, DIXIT V M. Caspases: Intracellular signaling by proteolysis [J]. *Cell*, 1997, 91(4): 443-446.
- [8] MASAHIKO K, TAKASHI N, MASATOSHI M, et al. Caspases cleave the aminoterminal calpain inhibitory unit of calpastatin during apoptosis in human Jurkat T cell [J]. *J Biochem*, 2000, 127(2): 297-305.
- [9] NEWMYER D D, FERGUSON-MILLER S. Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death [J]. *Cell*, 2003, 112(4): 481-490.
- [10] GREEN D R, KROEMER G. The pathophysiology of mitochondrial cell death [J]. *Science*, 2004, 305(5684): 626-629.
- [11] KROEMER G, ZAMAMI N, SUSIN S A. Mitochondrial control of apoptosis [J]. *Immunol Today*, 1997, 18(1): 44-51.

[责任编辑:朱颖娜]

### (上接第566页)

- [7] PISAREV V, YU B, SALUP R, et al. Full-length dominant-negative survivin for cancer immunotherapy [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 15(17): 6523-6533.
- [8] NAGARAJ S, PISAREV V, KINARSKY L, et al. Dendritic cell-based full-length survivin vaccine in treatment of experimental tumors [J]. *J Immunother*, 2007, 30(2): 169-179.
- [9] 刘毅,徐丽慧,曾学思,等. H-2Db 四聚体的制备及其在检测 LCMV 特异性 CD8<sup>+</sup> T 细胞中的应用 [J]. *生物工程学报*, 2008, 24(2): 278-284.
- [10] TACKEN P J, DE VRIES I J, TORENSMA R, et al. Dendritic-cell immunotherapy: from ex vivo loading to in vivo targeting [J]. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7(10): 790-802.
- [11] ANDERSEN M H, THOR S P. Survivin: a universal

tumor antigen [J]. *Histol Histopathol*, 2002, 17(2): 669-675.

- [12] MESRI M, WALL N R, LI J, et al. Cancer gene therapy using a survivin mutant adenovirus [J]. *J Clin Invest*, 2001, 108(4): 991-999.
- [13] ANDERSEN, PERDERSEN, CAPERLL E R B, et al. Spontaneous cytotoxic T-cell responses against Survivin-derived MHC class I-restricted T-cell epitopes in situ as well as ex vivo in cancer patients [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(15): 5964-5968.
- [14] SCHMITZ M, DIESTELKOETTER P, WEIGLE B, et al. Generation of survivin-specific CD8<sup>+</sup> T effector cells by dendritic cells pulsed with protein or selected peptides [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(17): 4845-4849.

[责任编辑:朱颖娜]