论著

文章编号:1000-5404(2007)17-1702-04

重组 *E. coli.* LLO/OVA 明显增强小鼠 CD11c 细胞活性及抗肿瘤免疫

徐 曼,米 粲 (重庆医科大学基础医学院病理学教研室,重庆 400016)

提 要:目的 探讨重组 *E. coli.* LLO/OVA 诱导 C57BL/6 小鼠机体免疫的途径,观察其免疫后小鼠机体抑制 B16-OVA 黑色素瘤的效果。**方法** 磁珠分离 *E. coli.* LLO/OVA 及 *E. coli.* OVA 免疫后小鼠脾脏 CD11c、$CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞并检测 CD11c 细胞诱导同源 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 增殖水平和细胞因子分泌程度;流式细胞检测小鼠脾脏内肿瘤抗原 $OVA_{257-264}$ SIINFEKL 特异的细胞毒 T 细胞含量。比较两种 *E. coli.* 免疫后,恶性黑色素瘤 B16-OVA 在小鼠肺内形成瘤结节的数量。**结果** 与 *E. coli.* OVA 相比, *E. coli.* LLO/OVA 免疫后小鼠脾脏 CD11c 细胞诱导同源 $CD4^+$ T 细胞增殖作用增强、IL-2 分泌增高;同时诱导 $CD8^+$ T 细胞增殖和 IFN-γ 分泌的作用也明显增强;$OVA_{257-264}$ SIINFEKL 特异的 $CD8^+$ T 细胞含量也明显增高;小鼠肺内形成 B16-OVA 瘤结节平均数明显减少。**结论** *E. coli.* LLO/OVA 有效地诱导小鼠 CD11c 细胞活化,增强其对 $CD4^+$ T 细胞增殖和 IL-2 分泌以及对 $CD8^+$ T 细胞增殖、IFN-γ 分泌的作用,诱导了更多的 OVA 特异的 $CD8^+$ T 细胞,使机体产生了更强的抗肿瘤免疫。

关键词:重组大肠杆菌;李斯特溶素 O;卵白蛋白;树突状细胞;淋巴细胞混合实验;磁珠分离;酶联免疫吸附试验

中图法分类号:R392.12;R392.2;R73-362 **文献标识码**:A

Effective activation of CD11c and anti-tumor immune in immunized mice with recombinant *E. coli.* LLO/OVA

XU Man, MI Can (Department of Pathology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the anti-tumor pathway and the effect of recombinant *E. coli.* LLO/OVA in C57BL/6 mice. **Methods** Magnetic sorting of splenic CD11c, $CD4^+$ and $CD8^+$ T cell from immunized mice with *E. coli.* LLO/OVA and *E. coli.* OVA vaccination were performed. In addition, the lymphocytes mixed reaction and IL-2 and IFN-γ in the supernatant were detected. The percentage of OVA257-264 SIINFEKL specific $CD8^+$ T cell were checked by flow cytometry. B16-OVA melanoma protection and inhibition response in *E. coli.* vaccinated mice were compared. **Results** Compared to *E. coli.* OVA, *E. coli.* LLO/OVA-vaccinated splenic CD11c cells stimulated proliferation of autogenic $CD4^+$ T cells and IL-2 production of these cells. CD11c cells induced autogenic $CD8^+$ T cells proliferation and IFN-γ secretion. A great number of OVA257-264 SIINFEKL-specific splenic $CD8^+$ T cells were induced and the number of lung tumor nodules was significantly reduced in *E. coli.* LLO/OVA vaccinated mice. **Conclusion** Recombinant LLO, as an effective adjuvant of *E. coli.* OVA, can induce murine splenic CD11c cells activation and play potential roles on $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells proliferation and IL-2 and IFN-γ secretion of these cells, induce more OVA-specific $CD8^+$ T cells and stimulate stronger tumor inhibition *in vivo* of vaccinated C57BL/6 mice.

Key words: recombinant *E. coli.*; listeriolysin O; ovalbumin; dendritic cells; magnetic cell sorting, mixed lymphocyte reaction; enzyme linked immunosorbent assay

构建有效而特异的肿瘤疫苗,使之能打破荷瘤机体内抗肿瘤免疫水平低下的状况,需要从分子水平理解疫苗刺激机体的免疫过程。我们实验小组构建了以卵白蛋白(Ovalbumin, OVA)为模型肿瘤抗原的重组大肠杆菌疫苗 *E. coli.* OVA。因李斯特溶素 O(Listeriolysin O, LLO)是李斯特菌诱导机体产生抗菌 T 细胞免疫的关键成分,且有文献证实同时表达重组 LLO 和抗原成分的 *E. coli.* 能更有效地刺激树突状细胞活化并上调表达共刺激分子[1]。我们将表达 LLO 的基因片段转入 *E. coli.* OVA 构建了重组 *E. coli.* LLO/OVA,用该疫苗在体外刺激树突状细胞(dendritic cell, DC)后诱导了小鼠细胞毒 T 细胞对恶性黑色素瘤 B16-

作者简介:徐 曼(1964-),女,重庆市人,博士,副教授,主要从事肿瘤病理和肿瘤免疫治疗方面的研究。电话:(023)68485789, E-mail: manxucqmu@yahoo.com.cn

收稿日期:2006-11-10;修回日期:2006-12-28

OVA 的溶瘤反应;经皮下免疫小鼠后,*E. coli.* LLO/OVA 较 *E. coli.* OVA 刺激机体产生了更强的肿瘤免疫保护反应[2]。但重组 *E. coli.* LLO/OVA 诱导机体抗肿瘤免疫的途径目前仍然不清。作为机体免疫反应最重要的诱导和调节者,树突状细胞在受到外来抗原的刺激后,其活化成熟程度对诱导机体的免疫状态起着关键性作用。在摄取外来抗原后,DC 活化并上调表达 MHC class Ⅰ、MHC class Ⅱ及共刺激分子,诱导 Th 细胞及 $CD8^+$ T 细胞分化及增殖[3,4];文献[5]报道表达 LLO 和模型肿瘤抗原的重组大肠杆菌被 DC 摄取后,通过 MHC class Ⅰ分子交叉提呈抗原诱导了细胞毒 T 细胞 IFN-γ 的分泌,脾脏 DC 刺激了效应 $CD8^+$ T 细胞的增殖和 IFN-γ 的分泌[6]。本实验拟观察 *E. coli.* LLO/OVA 免疫 C57BL/6 小鼠后,脾脏树突状细胞(CD11c)在体外诱导自身的 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞增殖及细胞因子分泌水平,以及脾脏内 $OVA_{257-264}$ SIINFEKL 特异的 $CD8^+$ T 细胞数量,探讨 LLO 作为免疫佐剂增强 *E. coli.* OVA 诱导机体抗肿瘤免疫的途径。因恶性黑色素瘤为极易早期发生转移的高度恶性肿瘤,故本实验拟对照观察 *E. coli.* LLO/OVA 或 *E. coli.* OVA 免疫 C57BL/6 小鼠后,抑制 B16-OVA 黑色素瘤在肺内形成瘤结节的效果。

1　材料与方法

1.1　实验动物

6~8 周龄雌性 C57BL/6 小鼠 62 只,体质量 20~25 g,购自 Harlan 公司(Oxfordshire,UK),于 John Wane 科学中心动物实验室无菌环境下进行灭菌饲料及饮水饲养。

1.2　试剂与仪器

胶元酶 D、Dnase Ⅰ(Roche),CD11c(N418)磁珠、CD4(L3T4)磁珠、CD8α(LY-2)磁珠(Miltenyi Biotec)。RPMI1640 培养液(CR UK),[6-^{3}H] 胸苷(3.7×10^7 Bq)(Amersham),COMBI 细胞收集仪(SKATRON),LS 6500 液闪仪(BECKMAN)。鼠血清(DAKO),抗鼠 CD16/32、抗鼠 CD11c PE、抗鼠 CD4 FITC、抗鼠 CD8 chycorone(BD Pharmingen™),PE-H_2K^b pentamer(Proimmune,UK),FACScaliber 流式细胞仪、CellQuest 分析软件(Becton Dickinson,USA)。Quantikine(mouse IL-2 和 IFN-γ ELISA 试剂盒(R & D)。

1.3　细菌菌株培养及鉴定

将 *E. coli.* LLO/ OVA 或 *E. coli.* OVA 的克隆菌落于含选择性抗生素(卡那霉素和/或氯霉素)的 LB 液体培养基中 30 ℃摇床扩大培养,培养过程中加入 1 mmol/L 异丙基 β-D-硫代半乳糖苷(Isopropyl β-D-thiogalactoside,IPTG)促 OVA 和 LLO 蛋白的表达。当 $D(600)>1$ 时收集细菌。细菌表达 LLO 或 OVA 经 Western blot 检测证实。在免疫小鼠前,用 0.5% 多聚甲醛固定 *E. coli.* 30 min,并用去内毒素的 PBS 洗 3 次,再将细菌重悬为 1×10^9/ml。

1.4　磁珠分离脾脏 CD11c、$CD4^+$ T 细胞和 $CD8^+$ T 细胞

①重组 *E. coli.* 免疫 C57BL/6 小鼠:将 1×10^8/100 μl *E. coli.* LLO/OVA 或 *E. coli.* OVA 于第 1、4、8 天经侧翼皮下注射小鼠各 10 只,于第 3 次免疫后 18 h 将所有小鼠处死,并分别收集脾细胞。②磁珠分离 CD11c 细胞:按照 Miltenyi Biotec 公司的操作说明将小鼠脾脏剪碎、1 mg/ml 胶原酶 D 和 20 μg/ml DNase Ⅰ 37 ℃消化 30 min 后,于 70 μm 尼龙网内轻轻碾磨并用磁珠分离 Buffer 冲洗制成单细胞悬液,置于 1.077A 上并经梯度离心后收集单个核细胞,用磁珠分离 Buffer 重悬细胞,每 10^8 细胞加入 CD11c(418)磁珠 100 μl,CD16/32 抗体 7.5 μl 和鼠血清 50 μl,4 ℃孵育 15 min 后,加入磁珠分离 Buffer 洗细胞后,经 MS 柱或 LS 柱正性分离 CD11c 细胞。③磁珠分离 $CD4^+$ T 或 $CD8^+$ T 细胞:小鼠脾脏于 30 μm 尼龙网内轻轻碾磨制成单细胞悬液,每 10^7 细胞加入 CD4(L3T4)磁珠或 CD8a(Ly-2)磁珠 10 μl,4 ℃孵育 15 min 后,加入磁珠分离 Buffer 清洗细胞后,经 MS 柱或 LS 柱正性分离 $CD4^+$ T 细胞或 $CD8^+$ T 细胞。磁珠分离后的细胞经 CD11c、CD4 或 CD8 荧光抗体染色和流式细胞检测,细胞纯度 > 96%。分离所得的 CD11c、$CD4^+$ T 细胞和 $CD8^+$ T 细胞用于下述混合淋巴细胞培养。

1.5　$CD4^+$ T 细胞或 $CD8^+$ T 淋巴细胞增殖实验

将磁珠分离的 $CD4^+$ T 细胞或 $CD8^+$ T 细胞加入 96 孔圆底培养板(1×10^5/100 μl/ 孔),同时加入磁珠分离的 CD11c 细胞(1×10^4,5×10^4,10×10^4/100 μl/ 孔),将培养板放入 37 ℃,5% CO_2 孵箱内孵育 72 h,加入[^{3}H] 胸苷 3.7×10^4 Bq/孔继续孵育 18 h,细胞收集仪将细胞收集于玻璃纤维膜上,纤维膜经干躁后置于检测管内,液闪仪检测细胞[^{3}H]胸苷的摄入量。每组设 3 个复孔,并同时设置仅有 CD11c、$CD4^+$ T 或 $CD8^+$ T 细胞的对照孔。每个实验重复 1 次。

1.6　细胞因子含量检测

收集经 *E. coli.* LLO/OVA 或 *E. coli.* OVA 免疫后小鼠脾脏磁珠分离的 CD11c、$CD4^+$ T 细胞或 $CD8^+$ T 细胞单独或混合培养 3 d 后的上清液,并按照 ELISA 说明书检测 IL-2 和 IFN-γ。

1.7　OVA 特异性 $CD8^+$ T 细胞检测

收集免疫 3 次后第 7 天的小鼠脾脏,制成脾细胞悬液。1×10^6/ml 脾细胞与终浓度为 10 μmol/$LOVA_{257-264}$ SIINFEKL 肽混合,培养 6 d,收集细胞并用 PBS 洗 3 次,PE 连接的 Pentarmer H-$2K^b$ 与 1×10^6 脾细胞室温避光孵育 30 min,FACS Buffer 洗 1 次后再与 Chychrone 连接的抗 CD8α 抗体室温避光孵育 30 min,FACS Buffer 洗 3 次后,重悬细胞行流式细胞检测。

1.8　肿瘤保护实验和肿瘤抑制实验

①肿瘤保护实验:小鼠分为 3 组,每组 6 只。将 1×10^8/100 μl *E. coli.*、*E. coli.* OVA 或 *E. coli.* LLO/OVA 于第 0、7、14 天经侧翼皮下注射免疫 C57BL/6 小鼠,第 21 天经鼠尾静脉注射 5×10^5/100 μl B16-OVA 黑色素瘤细胞,约 24~28 d 后当有小鼠出现病状时,将所有小鼠处死并计数肺内瘤结节数。②肿瘤抑制实验:小鼠分为 3 组,每组 8 只。于第 1 天经鼠尾静脉注射 5×10^5 B16-OVA 黑色素瘤细胞,第 8、11 和 15 天经 C57BL/6 小鼠侧翼皮下注射 1×10^8/100 μl *E. coli.*、*E. coli.* OVA 或 *E. coli.* LLO/OVA 免疫小鼠。当有小鼠出现病状时,将所有小鼠处死并计数肺内瘤结节数。

1.9 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SAS 8.0 统计软件进行 student's t 检验。

2 结果

2.1 脾脏 CD11c 与同源 $CD4^+$ T 细胞共培养

未经 *E. coli.* 免疫的小鼠脾脏 CD11c 细胞无刺激同源 $CD4^+$ T 细胞增殖的作用，但经 *E. coli.* LLO/OVA 或 *E. coli.* OVA 皮下免疫 3 次后，CD11c 细胞均刺激同源 $CD4^+$ T 细胞增殖，且随着活化 CD11c 细胞数量的增多，与之混合的 $CD4^+$ T 细胞增殖也逐渐增强，但两种 *E. coli.* 免疫后小鼠 $CD4^+$ T 细胞的增殖程度无明显差别（$P>0.05$）（图 1）。

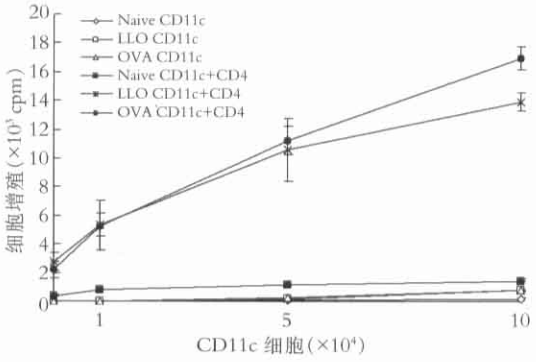
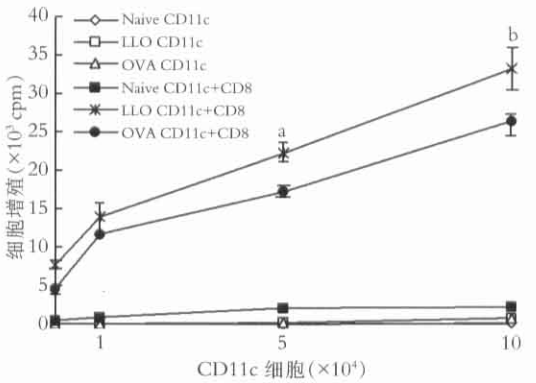


图 1 脾脏 CD11c 与 $CD4^+$ T 细胞混合培养

2.2 脾脏 CD11c 与同源 $CD8^+$ T 细胞混合培养

未经 *E. coli.* 免疫的小鼠脾脏 CD11c 细胞对同源 $CD8^+$ T 细胞无刺激生长的作用，但经 *E. coli.* LLO/OVA 或 *E. coli.* OVA 皮下免疫 3 次后，CD11c 细胞明显促进同源 $CD8^+$ T 细胞增殖。在无活化 CD11c 细胞存在的情况下，*E. coli.* 致敏 $CD8^+$ T 细胞仅出现极低水平的增殖。随着活化 CD11c 与同源 $CD8^+$ T 细胞混合比例的增高，$CD8^+$ T 细胞增殖逐渐增强。当 CD11c 与 $CD8^+$ T 细胞混合比例达到 1∶2 或 1∶1 时，*E. coli.* LLO/OVA 免疫后小鼠 CD11c 诱导同源 $CD8^+$ T 细胞的增殖程度明显高于 *E. coli.* OVA 免疫后小鼠 CD11c 诱导同源 $CD8^+$ T 细胞的增殖水平（$P<0.05$）（图 2）。



a，b：$P<0.05$，与 OVA CD11c + CD8 比较

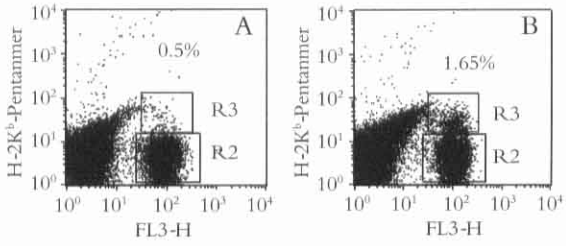
图 2 脾脏 CD11c 与 $CD8^+$ T 细胞混合培养

2.3 细胞因子含量检测结果

E. coli. LLO/OVA 免疫小鼠 $CD4^+$ T 细胞培养上清液 IL-2 的含量明显高于 *E. coli.* OVA 免疫小鼠，含量分别为（48.0 ± 0.0）pg/ml 和（34.0 ± 2.5）pg/ml（$P<0.05$）；且 *E. coli.* LLO/OVA 免疫后 CD11c 细胞与同源 $CD4^+$ T 细胞混合培养上清液 IL-2 的含量也明显增高于 *E. coli.* OVA 免疫小鼠，分别为（76.1 ± 1.6）pg/ml 和（35.0 ± 2.5）pg/ml（$P<0.01$）。当 5×10^4 活化的 CD11c 细胞与 1×10^5 同源 $CD8^+$ T 细胞混合培养 3 d 后，*E. coli.* LLO/OVA 较对照组 *E. coli.* OVA 免疫小鼠 CD11c 细胞与同源 $CD8^+$ T 细胞混合培养上清液 IFN-γ 的含量明显提高，分别为（297.7 ± 7.5）pg/ml 和（232.6 ± 14.9）pg/ml（$P<0.05$），且明显高于未经免疫的小鼠脾脏 CD11c 细胞与同源 $CD8^+$ T 细胞混合培养上清液 IFN-γ 的含量（21.01 ± 0.27）pg/ml。

2.4 OVA 特异性 $CD8^+$ T 细胞

E. coli. LLO/OVA 免疫小鼠 3 周后，脾细胞经 $OVA_{257-264}$ SIINFEKL 肽刺激 6 d 后，对 SIINFEKL 肽特异的 $CD8^+$ T 细胞占脾细胞总数的 1.65%，明显高于 *E. coli.* OVA 免疫后小鼠脾脏内 $OVA_{257-264}$ SIINFEKL 肽特异的 $CD8^+$ T 细胞数，占脾细胞总数的 0.5%（图 3）。



A：*E. coli.* OVA；B：*E. coli.* LLO/OVA

图 3 $OVA_{257-264}$SIINFEKL 特异的 $CD8^+$ T 细胞

2.5 肿瘤保护和肿瘤抑制实验

E. coli. 免疫小鼠 3 次后，从尾静脉注入的 B16-OVA 黑色素瘤细胞在肺内形成大量瘤结节，结节平均数为（41.00 ± 2.76）；经 *E. coli.* OVA 免疫后，小鼠肺内瘤结节平均数减少为（23.33 ± 2.58）（$P<0.01$）；而 *E. coli.* LLO/OVA 免疫后，仅有 2 只小鼠肺内形成瘤结节，该组小鼠肺内平均瘤结节数为（3.33 ± 2.05），明显低于 *E. coli.* OVA 免疫后的小鼠（$P<0.01$）。负载 B16-OVA 的小鼠，经皮下注射 *E. coli.* 3 次后肺内瘤结节数为（30.00 ± 2.69）；经 *E. coli.* OVA 免疫的小鼠，肺内瘤结节数平均为（14.60 ± 9.38）；而 *E. coli.* LLO/OVA 注射后，肺内瘤结节数平均为（5.75 ± 4.45），明显低于 *E. coli.* OVA 注射后肺内瘤结节的形成数（$P<0.05$）。

3 讨论

本实验所采用的大肠杆菌为侵袭性非致病菌株，由于利用大肠杆菌表达目的基因的技术已非常成熟，而且该细菌易于在普通的实验室克隆扩增，筛选出高

效特异的抗肿瘤大肠杆菌疫苗，将会有广阔的应用前景。为了确保细菌安全而又不失其抗原性，我们在细菌注射小鼠前将其用多聚甲醛固定。此前 Radford 已证明细菌用多聚甲醛固定后仍然保存其对机体的免疫刺激活性[2]。

我们的实验结果显示仅表达模型肿瘤抗原 OVA 的重组 *E. coli.* OVA 不能诱导机体产生较强的抗肿瘤免疫，但转入了 LLO 基因后，机体对 B16-OVA 黑色素瘤的免疫保护和免疫抑制作用明显增强。Xiong 等[7]的实验也证实 LLO 是李斯特菌感染后诱导小鼠机体产生 T 细胞保护性免疫反应的重要成分。由于机体的免疫反应水平主要决定于抗原提呈细胞的活化成熟程度，因此我们对 *E. coli.* LLO/OVA 免疫后小鼠脾脏内 CD11c 细胞对同源 $CD4^+$ 及 $CD8^+$ T 细胞的作用进行了研究。结果表明经 *E. coli.* LLO/OVA 免疫后，小鼠脾脏 CD11c 细胞在体外对同源 $CD4^+$ T 细胞的增殖和 IL-2 分泌均有促进作用，尤其对 IL-2 分泌促进作用明显。IL-2 是刺激 T 细胞克隆性增生的重要的细胞因子，且为抗原交叉提呈活化记忆 $CD8^+$ T 细胞所必需[8]。我们在 CD11c 与同源 $CD8^+$ T 细胞混合培养液中加入重组鼠 IL-2 后，$CD8^+$ T 细胞的增生程度较无 IL-2 存在时明显增高。实验结果显示经 *E. coli.* LLO/OVA 免疫后，在无外源性细胞因子和 Th 细胞存在的条件下，小鼠脾脏 CD11c 在体外对同源 $CD8^+$ T 细胞的增殖和 IFN-γ 的分泌均有明显促进作用。此前 Radford 也证实 *E. coli.* LLO/OVA 被 DC 吞噬后，LLO 能进入细胞浆，并经 MHC class I 途径将 OVA 提呈给 $CD8^+$ T 细胞，提示 LLO 具有较强的促 DC 的肿瘤抗原交叉提呈作用。Van-Mierlo 等[9]的实验结果也显示小鼠体内活化的 CD11c 细胞交叉提呈肿瘤抗原给 CTL 而诱导了特异的抗肿瘤 CTL。本实验流式细胞检测结果显示 *E. coli.* LLO/OVA 免疫后小鼠脾脏内对 $OVA_{257-264}$ SIINFEKL 肽特异的 $CD8^+$ T 细胞明显高于 *E. coli.* OVA 免疫后小鼠的特异性 $CD8^+$ T 细胞。Pozzi 等[10]也证实经抗原刺激的树突状细胞能刺激 $CD8^+$T 细胞增殖、分泌细胞因子，相反，当去除脾脏 CD11c 后，能产生 IFN-γ 的特异性 $CD8^+$T 细胞则明显减少[6]。活化的 $CD8^+$T 细胞分泌 IFN-γ 浓度的高低不仅预示着该细胞的功能水平，同时 IFN-γ 还有利于巨噬细胞对肿瘤细胞的吞噬、促进肿瘤细胞 MHC class 分子的表达、提高瘤细胞的免疫原性，从而增强机体的抗肿瘤免疫[11]。

综上所述，重组大肠杆菌疫苗 *E. coli.* OVA 在转入了 LLO 基因后能明显提高小鼠脾脏 CD11c 细胞的免疫活性，增强其诱导同源 $CD4^+$T 和 $CD8^+$ T 效应细胞克隆性增殖和分泌 IL-2 或 IFN-γ，使机体内对 OVA 特异的 $CD8^+$ T 细胞明显增多，从而诱导机体产生更强的特异性抗肿瘤免疫。

（致谢：作者在本课题实验中得到英国伦敦 Queen Mary 大学分子肿瘤研究所 Georges Vassaux 博士的指导和大力支持，在此表示衷心地感谢。）

参考文献：

[1] Peng X, Hussain S F, Paterson Y. The ability of two Listeria monocytogenes vaccines targeting human papillomavirus-16 E7 to induce an antitumor response correlates with myeloid dendritic cell function[J]. J Immunol, 2004, 172(10): 6030 - 6038.

[2] Radford K J, Higgins D E, Pasquini S, *et al.* A recombinant *E. coli.* vaccine to promote MHC class I-dependent antigen presentation: application to cancer immunotherapy[J]. Gene Ther, 2002, 9(21): 1455 - 1463.

[3] Kapsenberg M L. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization[J]. Nat Rev Immunol, 2003, 3(12): 984 - 993.

[4] Banchereau J, Briere F, Caux C, *et al.* Immunobiology of dendritic cells[J]. Annu Rev Immunol, 2000, 18: 767 - 811.

[5] Hu P Q, Tuma-Warrino R J, Bryan M A, *et al.* Escherichia coli expressing recombinant antigen and listeriolysin O stimulate class I-restricted $CD8^+$ T cells following uptake by human APC[J]. J Immunol, 2004, 172(3): 1595 - 1601.

[6] Behboudi S, Moore A, Hill A V. Splenic dendritic cell subsets prime and boost CD8 T cells and are involved in the generation of effector CD8 T cells[J]. Cell Immunol, 2004, 228(1): 15 - 19.

[7] Xiong H, Tanabe Y, Ohya S, *et al.* Administration of killed bacteria together with listeriolysin O induces protective immunity against Listeria monocytogenes in mice[J]. Immunology, 1998, 94(1): 14 - 21.

[8] Blachere N E, Morris H K, Braun D, *et al.* IL-2 is required for the activation of memory $CD8^+$ T cells via antigen cross-presentation[J]. J Immunol, 2006, 176(12): 7288 - 7300.

[9] Van-Mierlo G J, Boonman Z F, Dumortier H M, *et al.* Activation of dendritic cells that cross-present tumor-derived antigen licenses $CD8^+$ CTL to cause tumor eradication[J]. J Immunol, 2004, 173(11): 6753 - 6759.

[10] Pozzi L A, Maciaszek J W, Rock K L. Both dendritic cells and macrophages can stimulate naive CD8 T cells *in vivo* to proliferate, develop effector function, and differentiate into memory cells[J]. J Immunol, 2005, 175(4): 2071 - 2081.

[11] Shankaran V, Ikeda H, Bruce A T, *et al.* IFNgamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity[J]. Nature, 2001, 410(6832): 1107 - 1111.

（编辑　陈聪连）