

- 作用的研究[J]. 食品科学, 2000, 21(2): 48-51.
- [13] XU J J, YAO M J, XU G. Study on antioxidant activities of dihydromyricetin [J]. Food Sci(食品科学), 2007, 28(9): 43-45.
- [14] LI G Z, LU Z Y, XU J Y, et al. Effect of dihydromyricetin from *Ampelopsis grossedentata* on reducing serum uric acid in hyperuricemia model mice [J]. J Mount Agric Biol(山地农业生物学报), 2014, 33(4): 40-42.
- [15] CHEN Y Q, NI D J. Study on the hypolipidemic effect of flavones and dihydromyricetin from Tengcha [J]. J Tea Sci(茶叶科学), 2007, 27(3): 221-225.
- [16] OU X H, LV L Y. Anti-hepatofibrosis effects of Tengcha extract from *ampelopsis grossedentata* [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2011, 17(3): 132-134.
- [17] YANG Y X, CHU Y, ZU L. The therapeutic studies of Tongfengshu powder on inflammation stimulated by uric acid [J]. West China J Pharm Sci(华西药理学杂志), 2003, 18(4): 244-246.
- [18] YU J, LI W, GAO M L. Experimental Study on the efficacy of GA Rats' Serum Cytokines IL-1, TNF- α , IL-6, IL-8 by Bizhongxiaosan [J]. Guangming J Chin Med(光明中医), 2011, 26(6): 1125-1126.
- [19] HUANG J Q, SUN W J, ZHU M Z, et al. Experimental study of quercetin in the treatment of acute gouty arthritis rats [J]. Northwest Pharm J(西北药理学杂志), 2012, 27(2): 135-138.
- [20] CHEN C J, SHI Y, HEARN A, et al. MyD88-dependent IL-1 receptor signaling is essential for gouty inflammation stimulated by monosodium urate crystals [J]. J Clin Invest, 2006, 116(8): 2262-2271.

收稿日期: 2014-09-27

HEK293 细胞的传代、建库与高效表达重组 HPV16-E6E7 腺病毒的研究

吴洁¹, 李剑波¹, 高孟¹, 金素凤², 潘海桦², 陈刚¹, 姜云水¹, 庄昉成^{1*} (1.浙江省医学科学院病毒病研究所, 杭州 310013; 2.浙江普康生物技术股份有限公司, 杭州 310053)

摘要: 目的 对 HEK293 细胞进行三级细胞库的建立, 并高效表达重组的 HPV16-E6E7 腺病毒。方法 进行 HEK293 细胞传代培养, 并建立三级细胞库, 按中国药典 2010 年版 III 部要求进行常规检验; 培养重组 HPV16-E6E7 腺病毒, 测定滴度, 插入目的基因以及基因组酶切图谱鉴定。结果 HEK293 细胞传代符合其生长形态, 建立的三级细胞库和不同细胞库之间的传代数, 细胞浓度和装量均符合疫苗基质制备的要求; 能高效表达重组 HPV16-E6E7 腺病毒, 种子滴度 $>3.0 \times 10^9$ IU·mL⁻¹; 表达的目的基因和目的蛋白稳定。结论 建立的 HEK293 三级细胞库符合疫苗用细胞基质的要求。

关键词: HEK293; 细胞库; HPV16; 重组腺病毒; 高效表达

中图分类号: R963

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2015)04-0399-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.04.003

Study on HEK293 Cell to Passage, Establish Cell Banks, and Highly Efficiency Express a Recombinant HPV16-E6E7 Adenovirus Vector

WU Jie¹, LI Jianbo¹, GAO Meng¹, JIN Sufeng², PAN Haihua², CHEN Gang¹, JIANG Yunshui¹, ZHUANG Fangcheng^{1*} (1. Institute of Viral Diseases, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China; 2. Zhejiang Pukang Biotechnology Co., Ltd., Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study on HEK293 cell to passage, establish 3-level cell banks, and by that to highly efficiency express a recombinant HPV16-E6E7 adenovirus vector. **METHODS** HEK293 cell passaged and established 3-level cell banks. And general inspected according to the requirements of Chinese Pharmacopoeia III 2010. By the HEK293 to propagate a recombinant HPV16-E6E7 adenovirus vector, identified its titer, inserted target gene and genome macrorestriction. **RESULTS** HEK293 cell met the growthform of its description; the limited passages, concentration of cells, and install quantity of 3-level cell banks were all conformed to requirements of vaccine substrates; the expressed recombinant HPV16-E6E7 adenovirus titer was more than 3.0×10^9 IU·mL⁻¹; the expressed inserted target gene and genome macrorestriction map were stable. **CONCLUSION** HEK293 cell and its 3-level cell banks established are all conformed to the requirements of vaccine substrates.

KEY WORDS: HEK293; cell bank; HPV16; recombinant adenovirus; highly efficiency expression

基金项目: 浙江省科技计划项目(2008F3022); 杭州市科技局重大科技创新项目(20112313A37)

作者简介: 吴洁, 女, 实验师 Tel: (0571)89890275 E-mail: wujie1998@126.com *通信作者: 庄昉成, 男, 硕士, 研究员 Tel: (0571)88861601 E-mail: fc Zhuang@163.com

HEK293 细胞是转染腺病毒 EIA 基因的人肾上皮细胞系, 由加拿大 Graham 教授于 1976 年用 DNA 转染技术构建而成, 用于特异性腺病毒和腺相关病毒的培养^[1]。HEK293 含有 SV40 复制起始点与启动子区的质粒, 表现出典型的腺病毒转化细胞的表型, 细胞允许腺病毒和其他血清型腺病毒在其上复制, 目前常用于以腺病毒作为载体的相关生物药和疫苗的研究^[2-3]。

腺病毒在生物医药和基因治疗中因其具有以下优点, 被广泛用作载体: 外源基因容量大, 最大承载可达 37 kb; 感染范围广, 能将目的基因转移到分裂或静息的细胞中; 安全性高, 感染细胞时其 DNA 不整合到宿主染色体中, 潜在的致癌危险小; 能同时表达多个基因, 它是第 1 个可以在同一细胞株或组织中用来设计表达多个基因的表达系统。腺病毒粒子相对稳定, 外源基因插入片段在病毒连续复制几个周期后仍保持不变; 外源基因表达水平较高, 病毒滴度高, 易于制备和纯化^[3]。

目前已经证实人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)与宫颈癌的发生有关, 其中高危型 HPV 病毒(HPV16 和 HPV18)感染占宫颈癌病例的 80%。对 HPV 预防性的疫苗目前已经面世, HPV 治疗性疫苗主要针对 HPV16 和 HPV18 的早期肿瘤抗原 E6 和 E7^[4-5]。笔者和合作单位联合研发的能高效表达 HPV16-E6E7 融合蛋白的重组腺病毒, 在 HEK293 细胞上培养, 以期获得能诱发强免疫应答的 HPV16 型治疗性疫苗^[6]。

本研究按中国药典 2010 版 III 部对疫苗研发用细胞基质的要求, 对 HEK293 细胞进行主库和工作库的建立, 并能高效表达重组的 HPV16-E6E7 腺病毒, 达到疫苗下一步研发的要求。

1 材料

1.1 细胞

HEK293 细胞(35 代), 购自美国 ATCC(编号: CRL-1573)。

1.2 重组 HPV16-E6E7 腺病毒

根据技术合作协议由中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所田厚文教授研究团队提供的重组腺病毒 rAd5-HPV16SmE7E6 株(12 代)。

1.3 试剂和耗材

DMEM 培养基(Gibco 公司); 胎牛血清(Sigma 公司); 8% NaHCO₃、3%谷氨酰胺、1%胰蛋白酶

由本研究室制备。CF10 细胞培养用细胞工厂(NUNC); 细胞培养瓶(美国 CORNING); 离心管(美国 BECKMAN)。酶切反应中所用的限制性内切酶(美国 NEB 公司); 病毒基因提取盒(北京康为世纪生物科技公司)。

2 方法

2.1 HEK293 细胞库的传代和建库

HEK293 细胞 35 代 1 支, 将细胞放入 40 °C 水浴中融化, 待完全融化后, 以无菌操作法将细胞液转移至 15 mL 离心管中, 加入生长液 6 mL 吹打分散细胞, 分装至 25 cm² 小方瓶内, 37 °C+5% CO₂ 培养。

细胞培养 2~3 d 长成单层后进行细胞传代, 弃去细胞生长液, 0.25%胰酶消化液 37 °C 消化约 1 min, 细胞出现裂纹后弃去消化液, 加入细胞生长液, 按同样方法传 3 个代次至 38 代, 建立细胞原始库; 继续传 2 代至 40 代, 建立细胞主库; 主库细胞传 3 代至 43 代, 建立细胞工作库。

2.2 细胞库的检验

细胞库的检验参照中国药典 2010 版 III 部附录 XII A。其中无菌试验和支原体检测参照中国药典 2010 版 III 部附录 XII B。

2.3 重组 HPV16-E6E7 腺病毒滴度的测定

用组织培养半数感染量(TCID₅₀)方法: 细胞培养方法同上。将待测样品 10 倍倍比稀释, 选用 10⁻⁴ 到 10⁻¹¹, 8 个稀释度进行上样, 每个稀释度 10 个复孔, 同时设 2 个正常细胞对照孔。在 37 °C, 5% CO₂ 条件下培养 48 h, 弃去细胞生长液固定细胞, 加腺病毒 Hexon 单抗, 37 °C 水浴 1 h, PBS 溶液洗 3 遍; 加酶标二抗, 37 °C 水浴 1 h, PBS 溶液洗 3 遍, DAB 显色, 15 min 后在显微镜下观察细胞, 计数出现褐色或黑色的细胞斑点数, 计算 TCID₅₀ 结果。滴度 $T=10^{1+d(s-0.5)}$, $d=\log_{10}^{\text{稀释度}}=1$ (对于 10 倍的稀释度而言); s =阳性比率之和。

2.4 重组 HPV16-E6E7 腺病毒插入目的基因和基因组酶切图谱鉴定

2.4.1 PCR 反应步骤 取 0.01~1 μL 样品进行 PCR 反应。样品包括阴性对照(不含重组基因的空腺病毒, Ad5 空), 阳性对照(rAd5HPV16SmE7E6), 2 个待测样品(主种子库 MSB, 工作种子库 WSB), 空白对照(只有试剂不含任何样品), 共 5 个样本。

2.4.2 目的基因 PCR 扩增 扩增引物为 mCMVup

CAGTCTTCGGTCTGACCACCG, pE6dn GGCCG AATTCATCACAGCTGGGTCTCTCTTC。PCR 扩增程序, 循环参数: 94 °C 预变性 50 s, 94 °C 变性 30 s, 51 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环, 72 °C 延伸 10 min, 取 5 μL PCR 反应溶液上 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增产物的大小; 应该在 800 bp 左右处出现清晰的目的条带。

2.4.3 酶切图谱反应步骤 取样品 5 mL, 置于 30 kda 超滤管中, 3 000 r·min⁻¹ 离心超滤浓缩, 将供试品浓缩至 0.2~0.6 mL, 按基因组提取试剂盒提取病毒基因组, 提取后的基因组用 50 μL TE 液洗脱, 所得基因液 4 °C 待用。在冰浴中, Buffer 2 μL, 基因组 DNA 0.5~1 μg, Xho I 0.5 μL, BSA 0.2 μL, 加 H₂O 至 20 μL, 混合液稍加离心。将配制好的酶切体系置于 37 °C 水浴中反应 2 h 以上。直接取 10 μL 酶切产物与 Loading Buffer 混匀, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测。

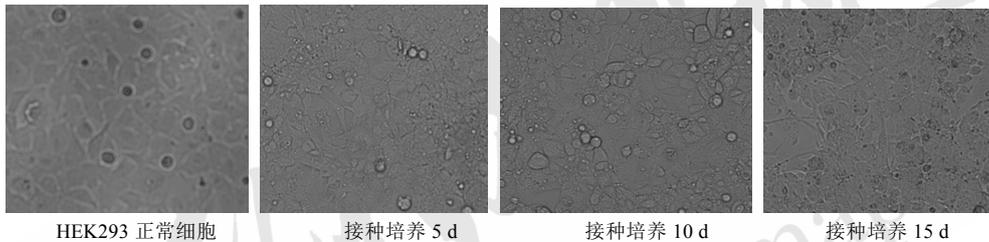


图 1 Olympus 倒置显微镜观察 HEK293 细胞生长状态(100×)

Fig. 1 Observation of HEK293 cells growth under the Olympus microscope(100×)

3.1.2 HEK293 细胞建库 根据中国药典 2010 年版 III 部“生物制品生产检定用动物细胞基质制备及检定规程”的要求^[7], 建立将来为疫苗生产所需要的细胞库。细胞库的建立可为生物制品的生产提供已标定好的、细胞质量相同的及能持续稳定传代的细胞种子。根据以上要求, 建立了 HEK293 细胞的原始细胞库, 主细胞库和工作细胞库, 不同细胞库之间的传代数, 细胞浓度和装量均符合基质制备和检定规程, 结果见表 1。

表 1 HEK293 细胞建库的批号、代次、装量、细胞浓度和储存温度

Tab. 1 Lot No., passages, loading, cell concentration and storage temperature of HEK293 cell banks

HEK293 细胞	批号	代次/ 代	装量/ mL	细胞浓度/ 个·mL ⁻¹	储存温度/ °C
原始细胞库	20080307	38	1.0	7.0×10 ⁶	-198
主细胞库	20100730	40	1.2	8.0×10 ⁶	-198
工作细胞库	20100806	43	1.0	6.5×10 ⁶	-198

2.5 重组 HPV16-E6E7 腺病毒全基因检测

采用第 2 代高通量测序法, 委托北京诺赛基因组研究中心有限公司, 分别对以 HEK293 工作细胞库表达的重组 HPV16-E6E7 腺病毒主种子库(14 代)、工作种子库(15 代)、工作种子库加 1 代(16 代)这 3 个代次的病毒基因进行全基因测序。

3 结果

3.1 HEK293 细胞传代建库

3.1.1 HEK293 细胞生长 显微镜下观察 HEK293 细胞的生长状态, 细胞呈圆形或卵圆形, 胞质透明, 大小均匀, 有少许颗粒, 呈致密生长, 同上皮细胞形态, 与 ATCC 对 HEK293 细胞的生长状态描述一致, 结果见图 1。细胞从贴壁培养第 1 天至培养第 15 天一直处于致密状态, 符合对腺病毒的培养要求; 根据镜下观察结果, 最佳培养时间为细胞贴壁培养后第 5 天和第 10 天, 培养第 15 天细胞有衰老现象, 不利于腺病毒的培养。

3.1.3 HEK293 细胞检验 用于生物制品生产的细胞系均须通过全面的检定, 并经国家药品监督管理部门的批准。根据要求对 HEK293 细胞系全面检定委托中国食品药品检定研究院进行, 在此之前需要对建立好的细胞系进行无菌试验和支原体检测。这是细胞系质量检查中最常规和最基本的项目。

无菌试验采用薄膜过滤法, 用全封闭集菌培养器无菌培养, 支原体检查培养用 2 种培养基接种法。检定结果 HEK293 原始细胞库、主细胞库、工作细胞库无菌试验和支原体检测均为阴性, 符合细胞基质要求。

3.2 高效表达重组 HPV16-E6E7 腺病毒的检定

3.2.1 高效表达重组 HPV16-E6E7 腺病毒滴度的测定 用 HEK293 工作细胞库的细胞对重组 HPV16-E6E7 腺病毒的二级病毒种子进行培养和病毒滴度的检测, 检测结果显示, 重组腺病毒滴

度分别为 6.31×10^9 IU·mL⁻¹ 和 3.98×10^9 IU·mL⁻¹, 结果见表 2。根据笔者早期研究, 重组 HPV16-E6E7 腺病毒对动物的免疫保护作用初步拟定的制剂剂量为 1.0×10^7 IU·mL⁻¹, 据此推算建立的 HEK293 工作细胞库能高效表达重组 HPV16-E6E7 腺病毒, 并能达到制剂的要求。

表 2 重组 HPV16-E6E7 腺病毒在 HEK293 细胞培养中的病毒滴度

Tab. 2 Virus titer of recombinant adenovirus expression of HPV16-E6E7 in HEK293 cell culture

重组 HPV16-E6E6 腺病毒	HEK293 细胞	传代培养	病毒滴度/ IU·mL ⁻¹
HPV16-E6E7-Ad5-2(14 代)	43 代	2 代	6.31×10^9
HPV16-E6E7-Ad5-3(15 代)	43 代	3 代	3.98×10^9

3.2.2 重组 HPV16-E6E7 腺病毒插入目的基因和基因组酶切图谱鉴定 用 HEK293 工作细胞库的细胞对重组 HPV16-E6E7 腺病毒的二级病毒种子培养的收获物进行插入目的基因与基因组酶切图谱鉴定, 结果 HPV16-E6E7-Ad5-2(P14) 和 HPV16-E6E7-Ad5-3(P15) 插入目的基因与 rAd5-HPV16SmE7E6 株相同, 结果见图 2。HPV16-E6E7-Ad5-2(P14) 和 HPV16-E6E7-Ad5-3(P15) 酶切图谱均有 7 个 DNA 片段, 根据 DNA Marker 判断, 7 个 DNA 片段大小分别接近: 14 500, 8 474, 3 476, 2 466, 1 445, 806, 595 bp, 与合作研究单位提供的重组腺病毒 rAd5-HPV16SmE7E6 株相符合, 说明用 HEK293 工作细胞库对重组腺病毒培养收获的目的蛋白表达及稳定性好。结果见图 3。

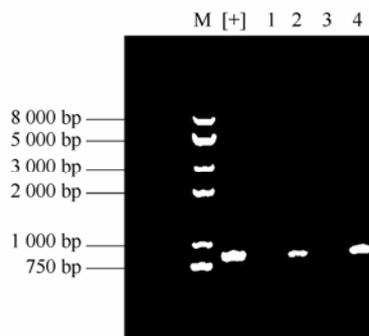


图 2 重组腺病毒 HPV16-E6E7、种子库的 PCR 鉴定结果 M-DNA 标记; 1-空 5 型腺病毒; 2-主种子库[HPV16-E6E7-Ad5-2(P14)]; 3-试剂对照; 4-工作种子库[HPV16-E6E7-Ad5-3(P15)]; [+]-原始种子(rAd5HPV16SmE7E6)。

Fig. 2 Identification by PCR of recombinant adenovirus expression of HPV 16 E6E7

M=Marker; 1-naked adenovirus type5; 2-MSB[HPV16-E6E7-Ad5-2(P14)]; 3-control of Reagent; 4-WSB[HPV16-E6E7-Ad5-3(P15)]; [+]-rAd5HPV16SmE7E6.

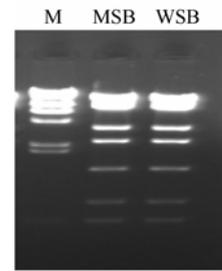


图 3 重组 HPV16-E6E7 腺病毒二级种子库的基因酶切图谱 M-DNA 标记; MSB-主种子库[HPV16-E6E7-Ad5-2(P14)]; WSB-工作种子库[HPV16-E6E7-Ad5-3(P15)]。

Fig. 3 MSB and WSB gene macrorestriction map of recombinant adenovirus expression of HPV16-E6E7.

M-DNA marker; MSB-HPV16-E6E7-Ad5-2(P14); WSB-HPV16-E6E7-Ad5-3(P15).

3.2.3 重组 HPV16-E6E7 腺病毒全基因检测 用 HEK293 工作细胞库的细胞培养, 对重组 HPV16-E6E7 腺病毒主种子库(14 代)、工作种子库(15 代)、工作库+1 代(16 代)3 个代次的病毒基因组全基因测序, 用 NCBI BLAST 比对, 经比对, 3 个代次种子基因组序列与 Gene Bank 中的基因组序列完全相符。结果见表 3。

表 3 重组 HPV16-E6E7 腺病毒全基因检测

Tab. 3 Whole genome detection of recombinant adenovirus expression of HPV16-E6E7

毒种代次	最大分值	总分值	覆盖率/%	E 值	最大匹配率/%
P14	58 650	58 985	100	0.0	100
P15	58 654	58 992	100	0.0	100
P16	58 654	58 992	100	0.0	100

4 讨论

HEK293 细胞是用 5 型腺病毒 75 株系转化, 含有 Ad5E1 区的人胚肾亚三倍体细胞系, 是一种 E1 区缺陷互补细胞系。其他 293 细胞的衍生细胞系如 293A 倾向于形成单层细胞, 适合于早期研究病毒数量的空斑试验; 293S 主要用于悬浮细胞培养; 293T 细胞表达 E1A 蛋白, S40 大 T 抗原, 对含有 S40 复制起始点与启动子区的质粒可以复制; 293FT 细胞能制造高滴度的慢病毒。相比较各细胞特性, 选择 HEK293 作为本疫苗培养细胞是因为它最适于用作腺病毒的生长扩增。293 细胞的缺陷是生长过程中贴壁强度比较小, 所以在实验过程中容易流失, 从而影响实验结果。细胞培养的方式有 3 种: 贴壁培养、微载体培养和无血清悬浮培养。在建立细胞库的过程中, 本实验使用贴壁培养方法。根据实际的操作经验, 293 细胞在无

Ca²⁺或含 Ca²⁺的培养基中可同样生长^[8],也可生长在血清浓度降低的培养基中,单层细胞在 5%~10% FBS-DMEM 中能生长很好。一般来讲 1:10 转代后,1 周可以长满。严禁过度生长,这点很重要,因为会导致细胞密度加大和堆积,影响病毒斑的形成,转染传代时也不易打散。

在细胞建库后传代检定工作中,将原始细胞库 38 代传至 40 代,主细胞库 40 代传至 44 代,工作细胞库 43 代传至 47 代,腺病毒培养过程中终末细胞传至 65 代,并观察终末细胞加 10 代至 75 代,HEK293 细胞一直是贴壁依赖型呈上皮样细胞,表现出典型的腺病毒转化细胞的表型,细胞允许重组的腺病毒在其上增殖。根据文献报道,HEK293 细胞在传代 120 次以后,其表型可能改变,生长状况不再完全是单层了,偶尔会形成局部的细胞成团聚集,应立即抛弃,重新引用新传代的细胞^[9]。

腺病毒作为载体目前已被广泛地用于基因治疗和疫苗领域,根据国外文献报道,多个应用于肿瘤疫苗的研究和临床试验正在不断进行中,如 Lubaroff 等^[10]用腺病毒载体表达前列腺特异性抗原,用于治疗前列腺癌,已完成一期临床试验;Smith 等^[11]用新型腺病毒适应性免疫治疗方法治疗转移型 EB 病毒相关的鼻咽癌。以此为发展目标,笔者和合作单位共同研发的以 HPV16-E6E7 为靶抗原,腺病毒 5 型作为载体,构建成功的 rAd5-HPV16SmE6E7 疫苗种子已完成^[6]。重组 HPV16-E6E7 种子能否在 HEK293 细胞上高效表达是下一步研发疫苗的关键。

腺病毒载体的安全性问题主要在于在 293 细胞复制过程中保留 E1 序列具有复制成分的腺病毒(RCAs)的随机出现,由此在腺病毒载体的质量标准中有关 RCAs 的检测控制在 1 RCAs/3.0×10¹⁰VP;另外腺病毒残余基因的表达也会引起细胞毒性反应和宿主的免疫反应;腺病毒载体外源基因的增强和目的蛋白的过表达是否具有致瘤性还有待更多的研究。目前,近三分之一的基因治疗临床试

验中采用腺病毒载体,而其中 5 型腺病毒的使用最为广泛,其安全性已得到了证实。

本次研究结果显示,经过 HEK293 细胞传代培养的重组 HPV16-E6E7 腺病毒种子滴度达到 3.0×10⁹ IU·mL⁻¹ 以上,表达的目的蛋白稳定,符合对疫苗研发用病毒种子的要求,同时通过中国食品药品研究院的全面检定,符合中国药典 2010 版Ⅲ部对疫苗用细胞基质的要求,为下一步的中试研发提供了技术保障。

REFERENCES

- [1] HE T C, ZHOU S, DA COSTA L T, et al. A simplified system for generating recombinant adenoviruses [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(5): 2509-2514.
- [2] 张晓志, 张卫民, 余清, 等. 癌症进展杂志, 2004, 2(增刊): 56-63.
- [3] 胡奇婵, 陈玥, 王丽, 等. 毒载体用于基因治疗的研究进展 [J]. *军医杂志*, 2011, 23(5): 76-80.
- [4] HOWLEY P M, MUNGER K, ROMANCZUK H, et al. Cellular targets of the oncoproteins encoded by the cancer associated human papillomaviruses [J]. *Princess Takamatsun Symp*, 991(22): 239-248.
- [5] FARIDI R, ZAHRA A, KHAN K, et al. Oncogenic potential of human papillomavirus (HPV) and its relation with cervical cancer [J]. *Virology*, 2011(8): 269. Doi: 10.1186/1743-422X-8-269.
- [6] REN J, ZHAO L, TIAN H W, et al. Immunogenicity and antitumor efficacy of the recombinant adenovirus expressing E7 and E6 fusion protein of HPV type 16 in mice [J]. *Chin J Microbiol Immunol*(中华微生物学和免疫学杂志), 2012, 32(3): 276-280.
- [7] 中国药典. 三部[M]. 2010: 通则目次 15-21.
- [8] ZHAO L, ZHU M L, ZHANG X, et al. Effect of calcium on aggregation and growth of 293 cells [J]. *Chin J Biotechnol* (生物工程学报), 2005, 21(3): 482-485.
- [9] LIU H, LIU X M, WU B C, et al. Effects of hydrodynamic on aggregates formation, growth and metabolism of HEK 293 cells in suspension culture [J]. *Chin J Biotechnol*(生物工程学报), 2006, 22(1): 101-106.
- [10] LUBAROFF D M, KONETY B R, LINK B, et al. Phase I clinical trial of an adenovirus/prostate-specific antigen vaccine for prostate cancer: safety and immunologic results [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(23): 7375-7380.
- [11] SMITH C, TSANG J, BEAGLEY L, et al. Effective treatment of metastatic forms of epstein-barr virus-associated nasopharyngeal carcinoma with a novel adenovirus-based adoptive immunotherapy [J]. *Cancer Res*, 2012, 75(5): 1116-1125.

收稿日期: 2014-08-05