

# MAGE-3 DNA 疫苗的构建及其免疫效果的观察

刘杏娥<sup>1\*</sup> 孙晓东<sup>2</sup> 吴金民<sup>1</sup>

(浙江大学医学院附属邵逸夫医院<sup>1</sup> 肿瘤中心<sup>2</sup> 普外科 杭州 310016)

**摘 要** 通过 RT-PCR 方法扩增 MAGE-3 cDNA,以 pcDNA3.1+ 为载体 构建重组表达质粒 pcDNA3.1/MAGE-3。重组质粒用脂质体转染鼠 B16 细胞 经 RT-PCR、细胞免疫染色及免疫印迹法鉴定转化细胞中 MAGE-3 的表达。以 100 $\mu$ g 质粒剂量肌肉注射接种小鼠 间隔 10 天 共 3 次 以空载体和 PBS 为对照。结果 重组质粒免疫的小鼠 其脾淋巴细胞对 MAGE-3 阳性靶细胞的杀伤活性为  $51.08 \pm 7.41\%$  与空载体组 ( $8.44 \pm 1.89\%$ )及 PBS 组 ( $5.76 \pm 1.75\%$ )相比, 差异有显著性 ( $P < 0.01$ ),而对 MAGE-3 阴性靶细胞的杀伤活性分别为  $8.21 \pm 1.65\%$ 、 $7.68 \pm 1.56\%$  和  $5.13 \pm 1.42\%$  其差异无显著性;MAGE-3 DNA 疫苗组免疫血清 1:15 稀释时能检测到抗 MAGE-3 抗体 脾细胞培养上清中 Th1 类细胞因子 IFN- $\gamma$ 、IL-2 水平明显升高 外周血中 CD4+、CD8+ T 细胞也提高 小鼠肿瘤的生长速度明显减慢 与对照组相比 差异显著 ( $P < 0.01$ )。说明 MAGE-3 重组质粒免疫小鼠可以诱导小鼠产生特异性的体液和细胞免疫应答。

**关键词** MAGE-3,真核表达,DNA 疫苗,肿瘤,免疫应答

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)02-0165-05

肿瘤特异性主动免疫治疗的关键是发现肿瘤特异性抗原。人黑色素瘤抗原 MAGE-3 是一种 CT 抗原 (Cancer testis antigens),在多种肿瘤组织中表达,但在正常组织中除胎盘和睾丸外均不表达,因此是肿瘤免疫治疗中理想的靶抗原<sup>[1,2]</sup>。目前,国外以 MAGE-3 蛋白抗原表位肽段体外负载树突状细胞进行免疫治疗的报道较多,并取得了一定的疗效<sup>[3~5]</sup>。但由于 MHC 限制性及树突状细胞得率低等问题,限制了 DC 瘤苗的应用。核酸疫苗是近几年才发展起来的新型疫苗,可以激发强大的细胞免疫,并在动物模型中取得了满意的结果<sup>[6]</sup>。本实验旨在通过 RT-PCR 克隆 MAGE-3 cDNA 构建 pcDNA3.1/MAGE-3 真核表达质粒,建立稳定表达人 MAGE-3 的鼠肿瘤细胞株;将 pcDNA3.1/MAGE-3 重组质粒免疫小鼠,以空载体和 PBS 为对照,观察其诱导细胞免疫和体液免疫应答的能力,为进一步开展以 MAGE-3 为靶抗原的 DNA 疫苗研究提供基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验动物、细胞株和载体

C57BL/6 小鼠由浙江大学动物实验中心提供;克隆载体 pGEM-T vector 为 Promega 产品;真核表达

载体 pcDNA3.1+ 为 Invitrogen 产品;小鼠黑色素瘤细胞 B16 购自中科院上海细胞所细胞库。

### 1.2 主要材料与试剂

限制性内切酶 *Kpn* I、*Eco*RV 购自 Promega 公司,Trizol、逆转录酶、TaqDNA 合成酶、T4DNA 连接酶、G418、质粒提取试剂盒及 DNA 纯化试剂盒等购自上海生工;Lipofect AMINE 脂质体购自 Invitrogen 公司;抗人 MAGE-3 多抗为 Santa cruz 公司产品,二抗购自北京中山生物技术公司;免疫组化试剂盒购自福州迈新生物技术开发公司;流式细胞仪检测试剂购自联科公司。

### 1.3 真核表达载体 pcDNA-MAGE-3 的构建

通过 RT-PCR 从胎盘组织中扩增 MAGE-3 全部编码序列,片段长度为 957bp,与 pGEM-T vector 连接后送上海生工测序。将 pcDNA3.1+ 和 pGEM-T/MAGE-3 分别用 *Kpn* I 和 *Eco*RV 双酶切,电泳回收目的基因和载体片段。将载体与目的基因以 1:5 的比率连接,转化 JM109 在 Amp<sup>r</sup> 琼脂平板上挑选克隆,抽提质粒后,以 *Kpn* I 和 *Eco*RV 双酶切鉴定。

### 1.4 pcDNA3.1-MAGE-3 重组质粒转染 B16 细胞

参照 LipofectAMINE 脂质体说明书进行。B16 细胞分为实验组、空载体组和未转染组。转染细胞

经 G418 选择培养 2 周后,挑选单克隆继续筛选培养 2 周。经 RT-PCR、免疫细胞化学染色及 Western blot 鉴定,转染成功细胞扩大培养,并冻存储备用,命名为 B16/MAGE-3。

### 1.5 DNA 疫苗免疫动物

6~8 周龄 C57BL/6 雌性小鼠(18~20g),分为 pcDNA3.1+/MAGE-3 组、pcDNA3.1+ 组和 PBS 三组,每组 5 只小鼠。将稀释为  $1 \times 10^7/\text{mL}$  的 B16/MAGE-3 细胞接种于小鼠的右侧背部皮下,每只小鼠  $100\mu\text{L}$ 。3 天后于小鼠大腿肌肉注射  $100\mu\text{g}$  pcDNA3.1+/MAGE-3、pcDNA3.1+ 组或  $100\mu\text{L}$  PBS,每 10 天重复 1 次,共 3 次。于末次免疫 5 天后,扎眼球取血,测抗 MAGE-3 抗体滴度,流式细胞仪测 T 细胞亚群,取脾细胞制成脾细胞悬液,测 CTL 杀伤活性及上清中细胞因子的浓度,同时切下肿瘤组织,称重后计算抑瘤率。

### 1.6 测脾淋巴细胞 CTL 杀伤活性(MTT 法)

取免疫后小鼠脾脏制成单细胞悬液接种 24 孔板中培养 5 天,收集悬浮细胞作为效应细胞。分别以 B16/MAGE-3 细胞和 B16 细胞作为靶细胞,效靶比为 25:1,采用 MTT 法检测其杀伤活性,以单纯效应细胞和单纯靶细胞为对照。按以下公式计算 CTL 杀伤活性:

$$\text{CTL 杀伤活性} = \frac{\text{靶细胞对照组 A 值} - (\text{实验组 A} - \text{效应细胞对照组 A 值})}{\text{靶细胞对照组 A 值}} \times 100\%$$

### 1.7 脾淋巴细胞上清液中细胞因子 IL-2 和 IFN- $\gamma$ 的测定(ELISA 法)

取培养 48h 后的脾细胞上清液,以 ELISA 法检测细胞因子 IL-2 和 IFN- $\gamma$  的浓度。步骤如下:稀释标准品浓度为  $1000\text{pg/mL}$ 、 $500\text{pg/mL}$ 、 $250\text{pg/mL}$ 、 $125\text{pg/mL}$ 、 $62.5\text{pg/mL}$ 、 $31.25\text{pg/mL}$ 、 $0\text{pg/mL}$ ;取出酶标板除 A1 空白孔外,分别加入标准品或样品,每孔加  $100\mu\text{L}$ ,设复孔,用封片胶住反应孔,室温孵育 120min,加入检测工作液  $100\mu\text{L}/\text{孔}$ ,封住板条,室温 60min,加入显色剂  $100\mu\text{L}/\text{孔}$ ,避光室温 20min;加入终止液  $100\mu\text{L}/\text{孔}$ ,混匀后测  $A_{450}$  值,绘标准曲线,并推算各样本的浓度。

### 1.8 小鼠血清中 MAGE-3 抗体的检测

将 MAGE-3 阳性的人 SGC-7901 胃癌细胞接种于 24 孔板中,  $37^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  培养,待长至 80% 左右汇合度时吸去上清液,加入  $-20^\circ\text{C}$  预冷的甲醇固定 15min,3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  甲醇阻断 25min,1:200 猪血清封闭 30min,再加免疫血清(浓度为 1:1,1:20,1:50)  $4^\circ\text{C}$

过夜,加羊抗鼠生物素化二抗工作液,室温 30min,加辣根酶标记链霉卵白素工作液,DAB 显色,苏木素染色,梯度酒精脱水。倒置显微镜下观察结果。

### 1.9 流式细胞仪测 T 细胞亚群

取  $100\mu\text{L}$  肝素抗凝全血,分别加 FITC 标记的抗鼠 CD3、CD4 或 CD8 抗体  $5\mu\text{L}$ ,室温孵育 15min 后上机分析。

### 1.10 体内抑瘤试验

将切下的肿瘤组织称重后,按以下公式计算抑瘤率:

$$\text{抑瘤率} = \frac{\text{对照组平均瘤重} - \text{治疗组平均瘤重}}{\text{对照组平均瘤重}} \times 100\%$$

### 1.11 统计学分析

成组  $t$  检验,采用 SPSS10.0 软件处理数据。

## 2 结 果

### 2.1 RT-PCR 扩增 MAGE-3 cDNA

从胎盘组织中扩增出 957bp 的目标片段后,构建 pGEM-T/MAGE-3 克隆载体,送上海生工测序,并与 GenBank 中的 MAGE-3 cDNA 序列对照,序列完全正确,说明已成功扩增了人 MAGE-3 cDNA。

### 2.2 pcDNA3.1/MAGE-3 真核表达质粒的构建和鉴定

将 pcDNA3.1+ 和 pGEM-T/MAGE-3 分别用  $Kpn$  I 和  $Eco$  R V 双酶切后回收目的基因和载体片段,并进行连接反应,构建 pcDNA3.1/MAGE-3 重组质粒。重组质粒以  $Kpn$  I 和  $Eco$  R V 双酶切,经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,能切出 957bp 的目标片段,说明重组载体构建正确(见图 1)。

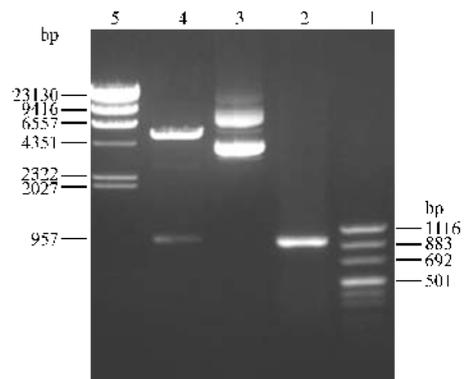


图 1 重组质粒酶切鉴定结果

Fig.1 Restriction analysis of recombinant pcDNA3.1/MAGE-3 plasmid

1 : puc mix marker 8 (1116, 883, 692, 501, 404, 331, 242, 190, 147, 110, 67, 34, 26, 19) bp;  
2 : products of RT-PCR  
3 : recombinant pcDNA3.1/MAGE-3 plasmid;  
4 : the result of double-digestion with  $Kpn$  I and  $Eco$  R V;  
5 : another view of double-digestion with  $Kpn$  I and  $Eco$  R V (23130, 9416, 6557, 4351, 2322, 2027, 957) bp.

### 2.3 MAGE-3 在转染细胞中的表达

实验组和空载体组细胞经 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$  G418 筛选培养 2 周左右长出单细胞克隆,而未转染对照组细胞已全部死亡。单克隆继续经 G418 选择培养 2 周后,经 RT-PCR、免疫细胞化学染色及 Western blot 鉴定。

**2.3.1 RT-PCR 鉴定:**共挑取 36 个单克隆细胞进行选择培养,分别提取它们的总 RNA 后进行 RT-PCR,结果有 28 个克隆 RT-PCR 阳性,其中有 20 个克隆的 mRNA 表达水平较高(见图 2)。

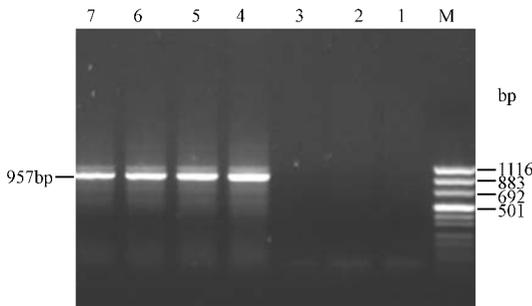


图 2 RT-PCR 检测转染细胞中 MAGE-3 转录

Fig.2 Expression of human MAGE-3 in transfected B16 cells by RT-PCR

M:pc mix marker 8 (1116, 883, 692, 501, 404, 331, 242, 190, 147, 110, 67, 34, 26, 19)bp

1:Expression of MAGE-3 in B16 cells; 2:Expression of MAGE-3 in B16 cells transfected with pcDNA3.1 + ; 3:RNA ; 4-7:Expression of MAGE-3 in B16 cells transfected with pcDNA3.1/MAGE-3

**2.3.2 对 20 个 mRNA 表达较高的克隆降低 G418 浓度继续培养数天,用细胞爬片法收集细胞于盖玻片上,经丙酮固定 10min 后进行细胞化学染色,阳性者胞浆染成棕色(见图 3)。**

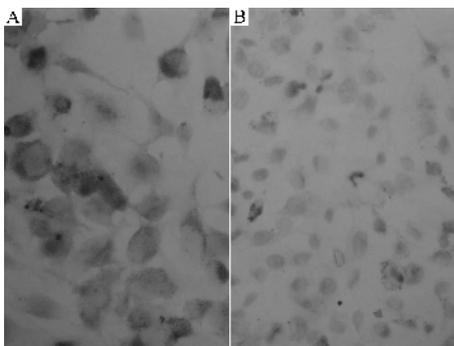


图 3 MAGE-3 蛋白在 B16 细胞中的表达

Fig.3 Immunocytochemistry analysis of MAGE-3 protein in B16 cells

A: B16 cells transfected with pcDNA3.1/MAGE-3 ( $\times 400$ ) B: B16 cells untransfected ( $\times 200$ )

**2.3.3 Western blot 鉴定:**收集细胞进行裂解,离心收集上清,按常规方法进行 SDS-PAGE 电泳、转膜、

封闭,依次加入抗 MAGE-3 的一抗和生物素标记的二抗,最后加 ECL 曝光显色,结果有目标蛋白条带出现(见图 4)。

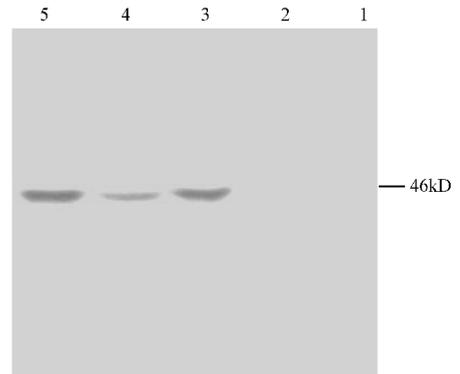


图 4 B16 细胞中 MAGE-3 的 Western blot 分析

Fig.4 Western blot analysis of MAGE-3 protein expressed in B16 cells

1: B16 cells untransfected; 2: B16 cells transfected with pcDNA3.1  
3~5: B16 cells transfected with pcDNA3.1/MAGE-3

### 2.4 免疫鼠血清中 MAGE-3 抗体的检测

以 SGC-7901 人胃癌细胞作为阳性抗原片,免疫鼠血清作为一抗,按 SP 法免疫组化试剂盒说明书进行操作。结果在重组质粒免疫组中,每只小鼠都产生了抗体,抗体滴度最高 1:15,而空载体和 PBS 免疫组均未产生特异性抗体。

### 2.5 免疫鼠脾淋巴细胞 CTL 杀伤活性的检测

取脾脏制成单细胞悬液接种 24 孔板中培养 5d,收集悬浮细胞作为效应细胞。分别以 B16/MAGE-3 和 B16 细胞作为靶细胞,按效:靶 = 20:1 的比例混合,37 $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜,采用 MTT 法检测杀伤率,结果见表 1。

表 1 MAGE-3 DNA 疫苗诱导鼠脾淋巴细胞的特异性杀伤活性 ( $n = 5$ )

Table 1 Tumor-specific cytotoxicity of lymphocytes activated by MAGE-3 DNA vaccine ( $n = 5$ )

Groups	Cytotoxicity to tumor cell( % $\bar{x} \pm s$ )	
	B16/MAGE-3	B16
PBS	5.76 $\pm$ 1.75	5.13 $\pm$ 1.42
pcDNA3.1 +	8.44 $\pm$ 1.89	7.68 $\pm$ 1.56
pcDNA3.1/MAGE-3	51.08 $\pm$ 7.41 *	8.21 $\pm$ 1.65

Note : \* compared with others ,  $P < 0.01$

### 2.6 脾淋巴细胞上清液中细胞因子的测定

将刺激细胞和反应细胞共培养 2d 时取上清液,采用 ELISA 方法测细胞因子 IL-2 和 IFN- $\gamma$  的浓度,依据标准品浓度绘出标准曲线,再推算出各样本的

浓度。结果见表 2。

表 2 脾淋巴细胞上清液中 IL-2、IFN- $\gamma$  的浓度

Table 2 Concentrations of IL-2 and IFN- $\gamma$  in lysate of lymphocytes (pg/mL,  $\bar{x} \pm SD$ ,  $n = 5$ )

Groups	Concentration of IL-2	Concentration of IFN- $\gamma$
pcDNA3.1 + /MAGE-3 Group*	193.33 $\pm$ 14.02	941.67 $\pm$ 8.16
pcDNA3.1 + Group	45.83 $\pm$ 12.81	199.17 $\pm$ 36.11
PBS Group	31.67 $\pm$ 12.11	146.67 $\pm$ 10.08

\* :  $P < 0.01$  vs other groups (T-test)

结果发现 pcDNA3.1 + /MAGE-3 组细胞因子 IL-2 和 IFN- $\gamma$  的浓度, 与 pcDNA3.1 + 组、PBS 组相比, 有显著性差异 ( $P < 0.01$ )。

## 2.7 T 细胞亚群的变化

表 3 小鼠外周血中 T 细胞亚群分析

Table 3 Analysis of T cell subsets in murine peripheral blood ( $\bar{x} \pm SD$ ,  $n = 5$ )

Groups	CD3 (%)	CD4 (%)	CD8 (%)
pcDNA3.1 + /MAGE-3	63.60 $\pm$ 3.86	44.88 $\pm$ 3.37*	22.03 $\pm$ 1.85**
pcDNA3.1 +	60.70 $\pm$ 3.85	41.34 $\pm$ 2.33	14.56 $\pm$ 1.56
PBS	59.65 $\pm$ 3.51	38.76 $\pm$ 2.65	13.32 $\pm$ 1.02

\*  $P < 0.05$  vs controls, \*\*  $P < 0.01$  vs controls (T-test)

## 2.8 体内抑瘤试验结果

表 4 各组免疫后抑瘤率结果

Table 4 Tumor growth control rates of vaccinated mice (% ,  $\bar{x} \pm SD$ ,  $n = 5$ )

Groups	Tumor growth control rates
pcDNA3.1 + /MAGE-3 Group*	59.83 $\pm$ 6.51
pcDNA3.1 + Group	10.64 $\pm$ 1.54
PBS Group (Control)	0

\* :  $P < 0.01$  vs other groups (T-test)

结果发现 pcDNA3.1 + /MAGE-3 组的肿瘤抑瘤率与 pcDNA3.1 + 组、PBS 组相比, 有显著性差异 ( $P < 0.01$ )。

## 3 讨论

在肿瘤免疫治疗中, MAGE-3 基因是国内外学者研究的热点之一。在 MAGE-3 蛋白分子内已知至少有 5 个 MHC-I 类分子限制的表位和 4 个 MHC-II 类分子限制的表位<sup>[7,8]</sup>。人工合成 MAGE-3 分子内 MHC I 类分子限制 CTL 表位肽段, 在体外确能诱导出特异性抗肿瘤免疫应答。但小肽在体内很容易被降解, 且受特定的 HLA 表型的限制。根据 MAGE-3

已知抗原表位设计多表位疫苗可以激发针对几种不同抗原表位的 CTLs, 但由于对表位的认知还不够充分, 所谓的多表位疫苗可能还是遗漏了某些重要的表位。使用 MAGE-3 完整蛋白作为疫苗, 理论上它不仅含 CTL 表位, 而且还包含 CD4 + T 细胞表位, 免疫效果会更好, 且其作用不被特定的 HLA 表型限制, 使用更方便、范围更广泛。用 MAGE-3 全蛋白体外冲击树突状细胞能诱导 MAGE-3 特异性的细胞免疫和体液免疫<sup>[9]</sup>。

核酸疫苗又名 DNA 疫苗或基因工程疫苗, 其与传统蛋白疫苗相比具有以下优势<sup>[10,11]</sup> (1) 制备容易、成本低, 储存和运输方便, 使用简单 (2) 易制备多价疫苗, 诱导产生针对多种不同抗原表位的抗肿瘤免疫 (3) 在体内可长期表达抗原蛋白, 持续刺激免疫系统, 产生持久的免疫应答 (4) 与病毒载体相比, 质粒载体免疫原性低, 可重复使用 (5) DNA 疫苗表达的内源性抗原, 有利于 MHC-I 类分子的抗原提呈, 有利于诱导 CTL 的产生, 从而更有效地诱导抗肿瘤免疫应答。

本研究成功构建了 pcDNA3.1/MAGE-3 真核表达载体, 并证实其在鼠 B16 细胞得到了较好的表达。用 pcDNA3.1/MAGE-3 重组质粒免疫小鼠, 其外周血中 CD4 + 及 CD8 + T 细胞升高, 脾淋巴细胞在体外对 MAGE-3 阳性肿瘤细胞表现出明显的杀伤活性, 脾细胞培养上清中 INF- $\gamma$ 、IL-2 水平明显升高, 血清中抗 MAGE-3 抗体阳性, 说明 pcDNA3.1/MAGE-3 重组质粒在体内能诱导小鼠产生 MAGE-3 特异性细胞免疫和体液免疫应答。

## REFERENCES (参考文献)

- [1] Kim YM, Lee YH, Shin SH *et al.* Expression of MAGE-1, -2, -3 genes in gastric carcinomas and cancer cell lines derived from Korean patients. *J Korean Med Sci*, 2001, **16**(1): 62 - 68
- [2] Melief CJ, Toes RE, Medema JP *et al.* Strategies for immunotherapy of cancer. *Adv Immunol*, 2000, **75**: 235 - 282
- [3] Andersen MH, Keikavoussi P, Brocker EB *et al.* Induction of systemic CTL responses in melanoma patients by dendritic cell vaccination: cessation of CTL responses is associated with disease progression. *Int J Cancer*, 2001, **94**(6): 820 - 824
- [4] Adanaga N, Nagashima H, Mashino K *et al.* Dendritic cell vaccination with MAGE peptide is a novel therapeutic approach for gastrointestinal carcinomas. *Clin Cancer Res*, 2001, **7**(8): 2277 - 2284
- [5] Nishiyama T, Tachibana M, Horiguchi Y *et al.* Immunotherapy of bladder cancer using autologous dendritic cells pulsed with human lymphocyte antigen-A24-specific MAGE-3 peptide. *Clin Cancer Res*,

- [ 6 ] Mokelo PH. Vaccines coming of age after 200 years. *FEMS Microbiology Reviews*, 2000, **24**( 1 ): 9 - 20
- [ 7 ] Chau P, Vantomme V, Stroobant V *et al.* Identification of MAGE-3 Epitopes presented by HLA-DR Molecules to CD4 + T lymphocytes. *J Exp Med*, 1999, **185**( 5 ): 767 - 777
- [ 8 ] Eifuku R, Takenoyama M, Yoshino I *et al.* Analysis of Mage-3 driven synthetic peptide as a human lung cancer antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes. *Int J Clin Oncol*, 2001, **6**( 1 ): 34 - 39
- [ 9 ] Sun XD( 孙晓东 ), Wu JM( 吴金民 ), Liu XE( 刘杏娥 ). Construction of MAGE-3 Prokaryotic Expression Plasmid and Its Expression in Escherichia coli. *Chinese Journal of Biotechnology*( 生物工程学报 ), 2003, **19**( 3 ): 277 - 280
- [ 10 ] Leitner WW, Ying H, Restifo NP. DNA and Rna based vaccines : principles , progress and prospects. *Vaccines*, 2000, **18**( 9/10 ): 765 - 777
- [ 11 ] Gurunathan S, Klinman DM, Seder RA. DNA vaccines : immunology , application , and optimization. *Annu Rev Immunol*, 2000, **18**: 927 - 974

## Construction of Human MAGE-3 DNA Vaccine and Its Immune Effects Observed *in vivo*

LIU Xing-E<sup>1</sup>\* SUN Xiao-Dong<sup>2</sup> WU Jin-Min<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Center of Oncology, <sup>2</sup> Department of General Surgery, Sir Run Run Shaw Hospital, Zhejiang University, Hangzhou 310016, China)

**Abstract** To investigate the antitumor immune responses induced by MAGE-3 DNA vaccine, the recombinant mammalian expression plasmid pcDNA3.1/MAGE-3 was constructed by ligating MAGE-3 gene, which was amplified by RT-PCR, and the pcDNA3.1+ vector. The recombinant plasmids were transfected into B16 cells by liposome, the expression of MAGE-3 was checked by RT-PCR, immunocytochemistry and Western blot. Then, 100ug recombinant plasmids were injected intramuscularly per C57BL/6 mouse on 0, 10 and 20 days, with pcDNA3.1+ plasmid and PBS as controls. Splenocytes CTLs, the level of antibodies against MAGE-3, the changes of the T lymphocyte subsets and the levels of cytokines were checked after 3 times immunization. As a result, the mice immunized with pcDNA3.1/MAGE-3 plasmid can produce MAGE-3 specific immune response. The CTLs kill activities against B16/MAGE-3 cells was  $51.08 \pm 7.41\%$ , and had significant difference ( $P < 0.01$ ) compared with that of pcDNA3.1+ group ( $8.44 \pm 1.89\%$ ) and PBS group ( $5.76 \pm 1.75\%$ ). The titre of antibody against MAGE-3 was 1:15, while controls were negative. The number of CD4+, CD8+ and the levels of IFN- $\gamma$ , IL-2 increased significantly after immunization with pcDNA3.1/MAGE-3 plasmid as compared with those of control groups ( $P < 0.01$ ). It is concluded that the pcDNA3.1-MAGE-3 DNA vaccine are able to induce both cellular and humoral immune responses *in vivo*.

**Key words** MAGE-3, RT-PCR, clone, mammalian expression, DNA vaccine, immune response