

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.01.008

TLR1/2 信号促 CD8⁺ T 细胞功能及其机制

骆菲菲^{a,b}, 郑秀娟^{b,c}, 张丹^{b,c}, 储以微^{b,c} (复旦大学 a. 附属华山医院 消化科, 上海 200040; b. 生物治疗研究中心; c. 基础医学院 免疫学系, 上海 200032)

[摘要] **目的:** 探讨 Toll 受体 1/2 (Toll like receptor 1/2, TLR1/2) 信号对荷瘤小鼠来源的 CD8⁺ T 细胞功能的影响及其可能机制。**方法:** 利用小鼠 Lewis 肺癌细胞株 3LL 建立小鼠肺癌荷瘤模型, MACS 分选小鼠脾 CD8⁺ T 细胞; 体外经 PBS 或 TLR1/2 激动剂 BLP 刺激后, Real-time PCR 和流式细胞术分别从基因和蛋白水平检测 CD8⁺ T 细胞的 TLR 分子表达; 用 ELISA 和流式细胞术检测经 PBS 或 BLP 刺激后的 CD8⁺ T 细胞分泌细胞因子和增殖的能力, 并用关键信号分子抑制剂分析可能的分子机制。**结果:** 与 PBS 对照组相比, TLR1/2 激动剂 BLP 不但有效上调荷瘤机体 CD8⁺ T 细胞 TLR1 和 TLR2 分子的基因水平 [*TLR1*: (0.353 ± 0.015) vs (0.101 ± 0.017), *P* < 0.01; *TLR2*: (0.232 ± 0.031) vs (0.080 ± 0.004), *P* < 0.05] 及蛋白水平 (*P* < 0.05), 而且显著促进 CD8⁺ T 细胞分泌功能性细胞因子 [IFN- γ : (2 375 ± 305) vs (850 ± 50), *P* < 0.05; IL-2: (1 600 ± 200) vs (350 ± 50), *P* < 0.05] 和增殖的能力 (*P* < 0.05), 这一效应依赖于 NF- κ B 和 P38 通路。**结论:** TLR1/2 信号直接作用于荷瘤小鼠的 CD8⁺ T 细胞并促进其功能, 该研究既丰富了 TLR 的作用范围, 也为基于 TLR 激动剂的肿瘤生物治疗提供了实验依据。

[关键词] TLR1/2 信号; 细菌脂蛋白; CD8⁺ T 细胞; 信号通路

[中图分类号] R392.12

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2017)01-0038-05

TLR1/2 signaling enhances CD8⁺ T cell function and its underlying mechanism

LUO Feifei^{a,b}, ZHENG Xiujuan^{b,c}, ZHANG Dan^{b,c}, CHU Yiwei^{b,c} (a. Department of Digestive Diseases, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China; b. Biotherapy Research Center; c. Department of Immunology, School of Basic Medical Sciences, Fudan University, Shanghai 200032, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Toll like receptor 1/2 (TLR1/2) signaling on CD8⁺ T cells derived from 3LL tumor-bearing mice and its underlying mechanisms. **Methods:** 3LL Lewis lung carcinoma cell line was used to establish tumor-bearing mice model, of which CD8⁺ T cells were purified from the spleen by MACS. CD8⁺ T cells were stimulated *in vitro* with PBS or TLR1/2 agonist, BLP, and then the gene and protein expression levels of TLRs in CD8⁺ T cells were measured by Real-time PCR and Flow cytometry. What's more, cytokine secretion and proliferation of CD8⁺ T cells after PBS or BLP stimulation were detected by ELISA and Flow cytometry. The inhibitors of key signal molecules were used to explore the underlying mechanisms of BLP influencing CD8⁺ T cells derived from 3LL-bearing mice. **Results:** Compared with PBS group, BLP not only greatly increased the expressions of TLR1 and TLR2 genes (*TLR1*: [0.353 ± 0.015] vs [0.101 ± 0.017], *P* < 0.01; *TLR2*: ([0.232 ± 0.031] vs [0.080 ± 0.004], *P* < 0.05) and proteins (*P* < 0.05), but also significantly enhanced the functional cytokine secretion (IFN- γ : [2 375 ± 305] vs [850 ± 50], *P* < 0.05; IL-2: [1 600 ± 200] vs [350 ± 50], *P* < 0.05); in addition, it promoted the proliferation of CD8⁺ T cells (*P* < 0.05). All of these were dependent on NF- κ B and P38 pathways. **Conclusion:** TLR1/2 signaling could directly promote the functions of CD8⁺ T cells derived from 3LL-tumor bearing mice, which might enrich the scope of TLRs and also provide the basis for TLR agonist-based tumor immunotherapy.

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 31570892, No. 31400772)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31570892, No. 31400772)

[作者简介] 骆菲菲 (1985 -), 女, 博士, 主要从事肿瘤免疫及其生物治疗研究, E-mail: feifeiluo@fudan.edu.cn

[通信作者] 储以微 (CHU Yiwei, corresponding author), 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事肿瘤免疫及其生物治疗研究, E-mail: yiweichu@fudan.edu.cn

[优先发表] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20170110.1514.012.html>

[**Key words**] TLR1/2 signaling; bacterial lipoprotein (BLP); CD8⁺T cell; signaling pathway

[Chin J Cancer Biother, 2017, 24(1): 38-42. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.01.008]

Toll 样受体(Toll like receptors, TLRs)是一类模式识别受体,主要表达于固有免疫细胞表面,通过识别不同的病原相关分子模式激活固有免疫应答^[1]。TLR2 是 TLRs 家族的成员之一,通过与 TLR1、TLR6 或其本身结合,形成异源或同源二聚体进而发挥多种功能^[2]。近年的研究^[3]表明,TLR2 不但表达于固有免疫细胞,而且表达于适应性免疫细胞,如 T 细胞,并具有一定的功能。在自身免疫病模型中,T 辅助细胞表面的 TLR2 被激活后,其增殖能力和分泌效应性细胞因子均显著增强,进而也加速了组织局部的炎性浸润和组织损伤,而激活调节性 T 细胞表面的 TLR2 后,其对效应性免疫细胞的增殖抑制功能明显下调^[4]。在肿瘤状态下,CD8⁺T 细胞通过特异性识别、杀伤肿瘤细胞,在机体免疫监视和抗肿瘤免疫应答中发挥着关键作用;而研究^[3,5]发现,CD8⁺T 细胞也存在不同水平的 TLRs 分子表达。那么,TLR2 信号是否促进 CD8⁺T 细胞功能进而应用于抗肿瘤免疫治疗呢? 因此,本研究拟探讨 TLR2 信号对荷瘤小鼠 CD8⁺T 细胞的功能影响及其可能机制,旨在为肿瘤免疫生物治疗提供新的策略和实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株与主要试剂

小鼠 Lewis 肺癌细胞株 3LL 由美国俄勒冈州 EACRI 癌症研究所胡红明教授惠赠。TLR1/2 激动剂 BLP 购自 Invivogen 公司,磁珠(magnetic cell sorting, MACS)分选试剂盒购自 Miltenyi Biotec 公司,胎牛血清、RPMI 1640 培养基购自 Gibco 公司,IFN- γ 及 IL-2 ELISA 检测试剂盒购自 Biolegend 公司,羧基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺酯(CFSE)荧光染料购自 Life Technologies 公司,FITC 标记的 TLR2 抗体、PE 标记的 TLR1 抗体、Percp 标记的 CD3 抗体、APC 标记的 CD8 抗体均购自 BD Biosciences 公司。

1.2 实验动物

雌性、6~8 周龄 C57BL/6 小鼠(体质量 18~20 g)购自上海斯莱克实验动物有限责任公司[实验动物合格证号:SCXK(沪)2012-0002],饲养于复旦大学实验动物科学部(SPF 级)。

1.3 构建小鼠肺癌皮下荷瘤模型

收获对数生长期的 3LL 肺癌细胞,调整细胞密度至 5×10^5 /ml,制成细胞悬液。待腹腔麻醉小鼠

后,于右侧腹部皮下注射 100 μ l 肿瘤细胞悬液,观察并测量小鼠的肿瘤大小。10 d 后即可观察到明显肿瘤生长,造模成功率为 100%。

1.4 MACS 分选 CD8⁺T 细胞

待小鼠移植 3LL 肺癌细胞 20 d 后,颈脱臼法分别处死正常对照小鼠或荷瘤小鼠,取脾,碾磨获得单细胞悬液,经 ACK 法消除红细胞后,利用 MACS 分选试剂盒分选 CD8⁺T 细胞。其纯度经 BD FACS-Canto II 流式细胞仪分析大于 90%。

1.5 流式细胞术检测细胞表面分子的表达

收集正常小鼠、荷瘤小鼠脾组织中 CD8⁺T 细胞或经 PBS 或 BLP 处理 48 h 的荷瘤小鼠脾组织中 CD8⁺T 细胞,调节细胞悬液密度至 1×10^7 /ml,取 100 μ l 经鼠 Fc 段封闭抗体封闭,以表面荧光抗体标记后,利用 BD FACSCanto II 流式细胞仪检测细胞表面分子表达。

1.6 Real-time PCR 法检测 TLR1 和 TLR2 基因表达水平

收集正常小鼠、荷瘤小鼠的脾 CD8⁺T 细胞或经 PBS 或 BLP 处理 24 h 的荷瘤小鼠脾 CD8⁺T 细胞,用 TRIzol 法提取总 RNA,并测定 RNA 纯度和浓度。利用 PrimeScriptTM RT Master Mix 试剂盒逆转录 RNA 生成 cDNA。然后按照标准操作步骤在 7500 型荧光定量 PCR 仪上进行定量检测,选取 *actin* 作为内参,利用相对定量法测定 *TLR1* 和 *TLR2* 基因表达水平。实验每次设 3 复孔,并重复 3 次。

1.7 ELISA 法检测 IFN- γ 和 IL-2 细胞因子水平

荷瘤小鼠 CD8⁺T 细胞体外给予 CD3 抗体和 PBS 或 BLP 刺激,或在 CD3 抗体和 BLP 刺激的同时给予 ERK、NF- κ B、Akt、JNK 或 P38 抑制剂处理。4 d 后,收集细胞培养上清,利用 ELISA 试剂盒检测 IFN- γ 、IL-2 细胞因子水平,在酶标仪上,于 450 nm 波长处检测光密度(*D*)值。实验重复 3 次。

1.8 流式细胞术检测 CD8⁺T 细胞的增殖能力

MACS 分选荷瘤小鼠获得的脾 CD8⁺T 细胞经 3 mol/L CFSE 染色后,体外给予 CD3 抗体和 PBS 或 BLP 刺激,或在 CD3 抗体和 BLP 刺激的同时给予 NF- κ B 或 P38 抑制剂处理。4 d 后,用流式细胞仪检测 CD8⁺T 细胞的增殖水平。

1.9 统计学处理

本实验数据采用 GraphPad Prism 软件处理,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,以 *P* <

0.01 或 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 荷瘤小鼠 CD8⁺T 细胞表达 TLR1 和 TLR2 分子

Real-time PCR 检测结果发现,荷瘤小鼠脾 CD8⁺T 细胞 *TLR1* 基因表达水平近似于正常小鼠 [(0.079 ± 0.001) vs (0.057 ± 0.007)], $t = 2.883$, $P > 0.05$], 而 *TLR2* 基因表达水平显著高于正常小鼠 [(0.042 ± 0.003) vs (0.022 ± 0.002)], $t = 5.145$, $P < 0.05$]。

流式细胞术检测结果(图1)显示,荷瘤小鼠脾 CD8⁺T 细胞表面的 TLR1 和 TLR2 分子表达峰相较于正常小鼠均可见一定程度右移。因此,从基因和蛋白水平均证实,荷瘤小鼠脾 CD8⁺T 细胞确有 TLR1 和 TLR2 分子表达。

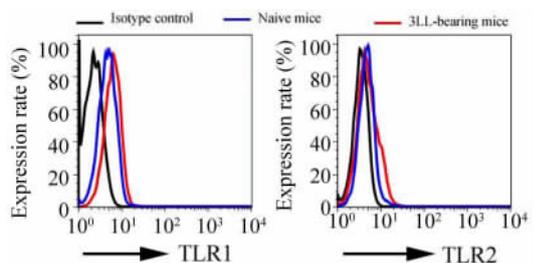


图1 荷瘤小鼠 CD8⁺T 细胞 TLR1 和 TLR2 分子表达水平

Fig. 1 Expressions of TLR1 and TLR2 on CD8⁺T cells derived from 3LL-bearing mice

2.2 TLR1/2 激动剂 BLP 上调荷瘤小鼠 CD8⁺T 细胞 TLR1 和 TLR2 分子表达

Real-time PCR 检测结果发现, BLP 刺激组的荷瘤小鼠脾 CD8⁺T 细胞 *TLR1* 和 *TLR2* 基因表达水平均明显高于 PBS 对照组 [*TLR1*: (0.353 ± 0.015) vs (0.101 ± 0.017)], $t = 11.17$, $P < 0.01$; *TLR2*: (0.232 ± 0.031) vs (0.080 ± 0.004)], $t = 4.914$, $P < 0.05$]。流式细胞术检测结果(图2)发现, BLP 组 TLR1 和 TLR2 分子表达峰相较于 PBS 组均可见明显右移。提示 TLR1/2 激动剂 BLP 有效上调荷瘤小鼠 CD8⁺T 细胞 TLR1 和 TLR2 分子的表达水平。

2.3 BLP 促进荷瘤小鼠 CD8⁺T 细胞的增殖能力和细胞因子分泌功能

ELISA 检测结果发现, BLP 刺激组 CD8⁺T 细胞培养上清中 IFN- γ 、IL-2 水平显著高于 PBS 对照组 [IFN- γ : $(2\,375 \pm 305)$ vs (850 ± 50)], $t = 4.933$, $P < 0.05$ 和 IL-2: $(1\,600 \pm 200)$ vs (350 ± 50)], $t =$

6.063 , $P < 0.05$], 同时, BLP 作用后荷瘤鼠 CD8⁺T 细胞也表现出更强的增殖能力(图3)。提示 TLR1/2 信号不但上调荷瘤小鼠 CD8⁺T 细胞表面 TLRs 分子表达,同时也有效促进 CD8⁺T 细胞的功能。

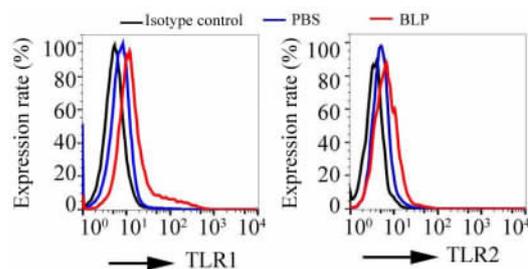


图2 BLP 上调荷瘤小鼠 CD8⁺T 细胞 TLRs 分子的表达水平
Fig. 2 BLP increased the expressions of TLR1 and TLR2 on CD8⁺T cells derived from 3LL-bearing mice

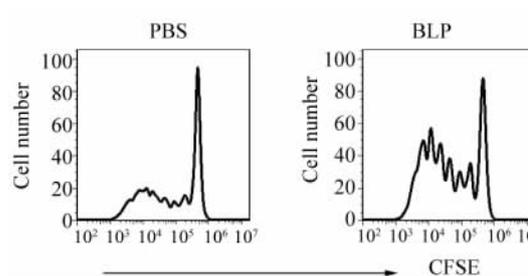


图3 BLP 促进荷瘤小鼠 CD8⁺T 细胞的增殖能力
Fig. 3 BLP enhanced the proliferation of CD8⁺T cells derived from 3LL-bearing mice

2.4 BLP 促荷瘤小鼠 CD8⁺T 细胞功能依赖 NF- κ B 和 P38 通路

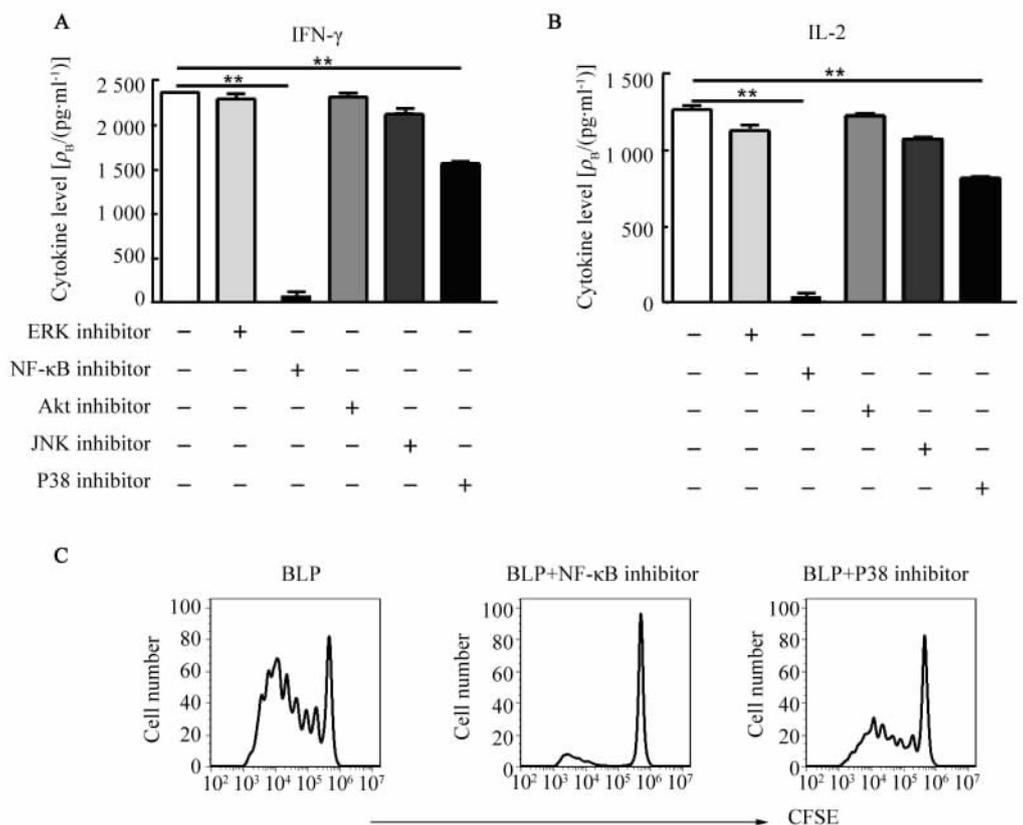
ELISA 检测结果发现,与无抑制剂的阳性对照组相比,仅当 NF- κ B 和 P38 被阻断时, CD8⁺T 细胞分泌 IFN- γ 、IL-2 的能力显著下调(图4A、B)。CFSE 增殖实验流式细胞术检测(图4C)发现,当 NF- κ B 和 P38 被阻断时,由 BLP 诱导的 CD8⁺T 细胞的增殖能力完全缺失或显著减弱。提示 TLR1/2 信号上调荷瘤小鼠 CD8⁺T 细胞功能依赖于 NF- κ B 和 P38 通路。

3 讨论

TLR 是模式识别受体家族成员之一,主要表达于固有免疫细胞,如 DC、中性粒细胞、单核细胞等^[6-7]。TLRs 通过识别并结合病原相关分子模式,启动机体的固有免疫应答,并进一步诱导适应性免疫应答发生。近年来,越来越多的研究^[8-9]表明,

TLRs 也表达于适应性免疫细胞(如 T 细胞)。在本研究中同样发现,不论是正常小鼠还是荷瘤小鼠来

源的 CD8⁺ T 细胞表面均有不同程度的 TLR1 和 TLR2 分子表达。



** P < 0.01 vs control group

图4 TLR1/2 激动剂 BLP 上调荷瘤小鼠 CD8⁺ T 细胞功能依赖 NF- κ B 和 P38 通路
 Fig. 4 TLR1/2 agonist BLP enhancing the function of CD8⁺ T cells derived from 3LL-bearing mice depended on the NF- κ B and P38 pathways

CD8⁺ T 细胞在抗肿瘤免疫应答中发挥着关键作用,其可通过 MHC 限制性直接识别肿瘤细胞并进一步分泌穿孔素和颗粒酶杀伤肿瘤。然而,在肿瘤状态下,Th1/Th2 细胞的失衡、抑制性细胞因子的大量出现、调节性 T 细胞和 MDSC 等抑制性细胞比例的显著上升等共同构成了极为抑制的肿瘤免疫微环境^[10],使 CD8⁺ T 细胞等效应性免疫细胞长期处于免疫耐受状态,从而严重限制了机体抗肿瘤免疫效应的发挥。因此,打破免疫耐受诱导增强的机体特异性免疫应答是肿瘤免疫生物治疗成功的关键。有研究者^[11-12]通过“抑制”或“沉默”多种免疫抑制性细胞或分子,解除其对效应性免疫细胞的抑制,从而逆转荷瘤机体的免疫耐受状态,即“驱邪”法。也有研究^[13-16]显示,通过外源性基因修饰、疫苗或佐剂等手段既上调效应性免疫细胞对肿瘤抗原的识别能力,又直接增强其对肿瘤细胞的杀伤能力,从而打破荷瘤机体的免疫耐受状态,即“扶正”法。本研究

建立了小鼠肺癌模型,并分选了其中的 CD8⁺ T 细胞,给予外源性 TLR1/2 信号刺激,可有效增强其分泌功能性细胞因子和自我增殖的能力,为机体诱导增强的抗肿瘤免疫应答提供基础,同时也进一步证实了 TLR 可作为佐剂直接作用于适应性免疫细胞,并促进其功能的发挥。

目前,已有多种 TLRs 激动剂针对不同肿瘤进入临床试验阶段,展现出显著的疗效,或与其他药物联用时的增效作用^[17-21]。因此,部分已被成功批准应用于临床治疗肿瘤,如 TLR7 激动剂咪喹莫特。近年来研究^[22-23]发现,多种 TLRs 内源性配体在肿瘤免疫逃逸中发挥着十分重要的作用。随着对 TLRs 及其配体的深入研究,将有助于探寻基于 TLRs 的肿瘤免疫治疗新机制、新方法。

总之,本研究证实了 TLR1/2 信号可有效上调荷瘤机体来源的 CD8⁺ T 细胞表面 TLR1 和 TLR2 分子的表达,同时显著促进其分泌功能性细胞因子和

增殖的能力,而这一效应依赖于 NF- κ B 和 P38 通路。本研究既丰富了 TLRs 的作用范围和作用机制,也为基于 TLR 激动剂的临床肿瘤生物治疗提供了理论和实验依据。

[参 考 文 献]

- [1] SONG D H, LEE J O. Sensing of microbial molecular patterns by Toll-like receptors[J]. *Immunol Rev*, 2012, 250(1): 216-229. DOI:10.1111/j.1600-065X.2012.01167.x.
- [2] LIEW F Y, XU D, BRINT E K, et al. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses[J]. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5(6): 446-458. DOI: 10.1038/nri1630.
- [3] ZHANG Y, LUO F, CAI Y, et al. TLR1/TLR2 agonist induces tumor regression by reciprocal modulation of effector and regulatory T cells[J]. *J Immunol*, 2011, 186(4): 1963-1969. DOI: 10.4049/jimmunol.1002320.
- [4] LIU H, KOMAI-KOMA M, XU D, et al. Toll-like receptor 2 signaling modulates the functions of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(18): 7048-7053. DOI: 10.1073/pnas.0601554103.
- [5] JOSEPH A M, SRIVASTAVA R, ZABALETA J, et al. Cross-talk between 4-1BB and TLR1-TLR2 signaling in CD8⁺ T cells regulate TLR2's costimulatory effects[J]. *Cancer Immunol Res*, 2016, 4(8):708-716. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0173.
- [6] KAWAI T, AKIRA S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity[J]. *Immunity*, 2011, 34(5): 637-650. DOI: 10.1016/j.immuni.2011.05.006.
- [7] IWASAKI A, MEDZHITOV R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses[J]. *Nat Immunol*, 2004, 5(10): 987-995. DOI: 10.1038/ni1112.
- [8] ZHANG M, LUO F, ZHANG Y, et al. Pseudomonas aeruginosa mannose-sensitive hemagglutinin promotes T-cell response via toll-like receptor 4-mediated dendritic cells to slow tumor progression in mice[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2014, 349(2): 279-287. DOI: 10.1124/jpet.113.212316.
- [9] ZHANG Y, LUO F, LI A, et al. Systemic injection of TLR1/2 agonist improves adoptive antigen-specific T cell therapy in glioma-bearing mice[J]. *Clin Immunol*, 2014, 154(1): 26-36. DOI: 10.1016/j.clim.2014.06.004.
- [10] YUAN Y, JIANG Y C, SUN C K, et al. Role of the tumor micro-environment in tumor progression and the clinical applications (Review) [J]. *Oncol Rep*, 2016, 35(5): 2499-2515. DOI: 10.3892/or.2016.4660.
- [11] YANG Z Z, NOVAK A J, STENSON M J, et al. Intratumoral CD4⁺ CD25⁺ regulatory T-cell-mediated suppression of infiltrating CD4⁺ T cells in B-cell non-Hodgkin lymphoma[J]. *Blood*, 2006, 107(9): 3639-3646. DOI: 10.1182/blood-2005-08-3376.
- [12] BEDOGNETTI D, MACCALLI C, BADER S B, et al. Checkpoint inhibitors and their application in breast cancer[J]. *Breast Care (Basel)*, 2016, 11(2): 108-115. DOI: 10.1159/000445335.
- [13] BARRETT D M, GRUPP S A, JUNE C H. Chimeric antigen receptor- and TCR-modified T cells enter main street and wall street [J]. *J Immunol*, 2015, 195(3): 755-761. DOI: 10.4049/jimmunol.1500751.
- [14] MAUS M V, JUNE C H. Making better chimeric antigen receptors for adoptive T-cell therapy[J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(8): 1875-1884. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-1433.
- [15] TEL J, BENITEZ-RIBAS D, JANSSEN E M, et al. Dendritic cells as vaccines: key regulators of tolerance and immunity[J/OL]. *Mediators Inflamm*, 2016, 2016: 5789725 [2016-08-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4906213/>. DOI: 10.1155/2016/5789725.
- [16] MANRIQUE S Z, DOMINGUEZ A L, MIRZA N, et al. Definitive activation of endogenous antitumor immunity by repetitive cycles of cyclophosphamide with interspersed Toll-like receptor agonists[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(28): 42919-42942. DOI: 10.18632/oncotarget.10190.
- [17] HARTMAN L L, CRAWFORD J R, MAKALE M T, et al. Pediatric phase II trials of poly-ICLC in the management of newly diagnosed and recurrent brain tumors[J]. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2014, 36(6): 451-457. DOI: 10.1097/MPH.0000000000000047.
- [18] ROSENFELD M R, CHAMBERLAIN M C, GROSSMAN S A, et al. A multi-institution phase II study of poly-ICLC and radiotherapy with concurrent and adjuvant temozolomide in adults with newly diagnosed glioblastoma [J]. *Neuro Oncol*, 2010, 12(10): 1071-1077. DOI: 10.1093/neuonc/naq071.
- [19] MICALI G, LACARRUBBA F, NASCA M R, et al. Topical pharmacotherapy for skin cancer: part II. Clinical applications[J/OL]. *J Am Acad Dermatol*, 2014, 70(6): 979 [2016-08-20]. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0190962214010020>. DOI:10.1016/j.jaad.2013.12.037.
- [20] DIETSCH G N, RANDALL T D, GOTTARDO R, et al. Late-stage cancer patients remain highly responsive to immune activation by the selective TLR8 agonist motolimod (VTX-2337) [J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(24): 5445-5452. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-0578.
- [21] SABADO R L, PAVLICK A, GNJATIC S, et al. Resiquimod as an immunologic adjuvant for NY-ESO-1 protein vaccination in patients with high-risk melanoma[J]. *Cancer Immunol Res*, 2015, 3(3): 278-287. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0202.
- [22] YANG G L, ZHANG L H, BO J J, et al. Increased expression of HMGB1 is associated with poor prognosis in human bladder cancer [J]. *J Surg Oncol*, 2012, 106(1): 57-61. DOI: 10.1002/jso.23040.
- [23] LI W, WU K, ZHAO E, et al. HMGB1 recruits myeloid derived suppressor cells to promote peritoneal dissemination of colon cancer after resection[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 436(2): 156-161. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.04.109.

[收稿日期] 2016 - 08 - 28

[修回日期] 2016 - 11 - 14

[本文编辑] 党瑞山