

来那度胺抑制 PD1/PD-L1 信号调节淋巴细胞对 HepG2 的免疫杀伤作用

阮水良, 韩晨阳, 官俏兵^{*} (嘉兴市第二医院, 浙江 嘉兴 314001)

摘要: 目的 探究来那度胺抑制 PD1/PD-L1 信号增强淋巴细胞杀伤 HepG2 的能力。方法 提取人淋巴细胞与 HepG2 共培养, 流式细胞术检测 HepG2 的凋亡, CCK-8 检测 HepG2 的活力, Western blot 检测 PD-L1/PD-1 表达, Elisa 法检测 IL-2、IL-12、TNF- α 的表达。构建 HepG2 的荷瘤小鼠模型, 来那度胺干预后, 计算抑瘤率, Western blot 检测小鼠肿瘤组织中 PD-1 和 PD-L1 的表达, qPCR 检测肿瘤组织中 IL-2、IL-12 和 TNF- α 的 mRNA 表达。结果 来那度胺可以增加淋巴细胞对于 HepG2 的杀伤能力, HepG2 凋亡率显著增高, PD-1 和 PD-L1 表达下降。IL-2、IL-12 和 TNF- α 表达增高。来那度胺对于荷瘤小鼠有明显的肿瘤抑制作用, 可以降低肿瘤组织中 PD-1 和 PD-L1 表达, IL-2、IL-12 和 TNF- α 的 mRNA 表达增高。结论 来那度胺抗肿瘤作用与其免疫调节有关, 来那度胺可以通过抑制 PD-1/PD-L1 信号增强淋巴细胞对 HepG2 的杀伤作用。

关键词: 来那度胺; PD1/PD-L1; 淋巴细胞

中图分类号: R965

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2018)10-1457-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.10.005

引用本文: 阮水良, 韩晨阳, 官俏兵. 来那度胺抑制 PD1/PD-L1 信号调节淋巴细胞对 HepG2 的免疫杀伤作用[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(10): 1457-1461.

Lenalidomide Inhibits the PD1/PD-L1 Signal to Regulate the Immune Killing Effect of Lymphocyte on HepG2

RUAN Shuiliang, HAN Chenyang, GUAN Qiaobing^{*} (*The Second Hospital of Jiaxing, Jiaxing 314001, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the inhibitory effect of lenalidomide on PD1/PD-L1 to enhance lymphocyte killing effect of HepG2. **METHODS** Human lymphocytes were co-cultured with HepG2, flow cytometry was used to detect the apoptosis of HepG2, CCK-8 detected HepG2 activity, Western blot was used to detect PD-L1/PD-1 expression. The expression of IL-2, IL-12 and TNF- α was detected by Elisa method. To construct mouse model of HepG2, after lenalidomide intervention, calculated the tumor inhibition rate, Western blot was used to detect the expression of PD-1 and PD-L1 in mouse carcinoma, qPCR was used to detect the mRNA expression of IL-2, IL-12 and TNF- α in cancer tissues. **RESULTS** Lenalidomide could increase the ability of lymphocytes to kill HepG2, HepG2 apoptosis rate was significantly increased, PD-1 and PD-L1 expression decreased, IL-2, IL-12 and TNF- α expression were increased. Lenalidomide had a significant tumor inhibitory effect on mice, it could reduce the expression of PD-1 and PD-L1 in tumor tissue, and increased IL-2, IL-12 and TNF- α mRNA expression. **CONCLUSION** The anti-tumor effect of lenalidomide is related to its immune regulation, Lenalidomide can inhibit PD-1 / PD-L1 to enhance lymphocyte killing of HepG2.

KEY WORDS: lenalidomide; PD1/PD-L1; lymphocytes

来那度胺是一种新型的免疫调节剂, 是沙利度胺的衍生物之一, 临床主要用于多发性骨髓瘤的治疗^[1]。此外研究发现, 来那度胺还具有抗实体瘤及抗炎作用, 其机理主要是通过调节 TNF- α 、白介素-1 起作用, 还可以刺激初级 T 淋巴细胞, 促进其增殖^[2]。在实体瘤方面研究发现, 来那度胺可以抑制肿瘤血管的生长, 直接抑制肿瘤细胞的增生并诱发异常细胞分解^[3]。PD-1/PD-L1 信号是一条重要的免疫抑制信号, T 细胞表面 PD-1 和肿瘤细胞表面配体 PD-L1 结合后可以抑制细胞免疫

的发生, 使肿瘤细胞免疫逃逸, 所以近年来, 针对 PD-1 抑制的药物研究得到了迅速的发展。课题组在前期的研究中发现来那度胺对于 A549、HepG2 等肿瘤细胞无明显的细胞毒性作用, 但可以促进淋巴细胞的杀伤作用, 所以本研究主要报道来那度胺通过抑制 PD-1/PD-L1 调节淋巴细胞对于 HepG2 的杀伤作用。

1 材料和方法

1.1 人淋巴细胞的分离

采集志愿者人外周血 5 mL, 等体积加入淋巴

作者简介: 阮水良, 男, 硕士, 副主任医师 Tel: 13757373960
Tel: 13757373957 E-mail: qbguan@126.com

E-mail: ruanguan@hotmail.com ^{*}通信作者: 官俏兵, 女, 主任医师

细胞分离液(ficoll paque PLUS, GE 公司), 3 000 r·min⁻¹ 下离心 30 min, 取中间细胞层, RPMI-1640 完全培养基培养 48 h, 取悬浮细胞实验, 贴壁细胞弃去(单核细胞层)。

1.2 来那度胺的配制

来那度胺(上海晶都生物技术有限公司, 批号: JD-31949; 纯度: 99%), 细胞实验中来那度胺使用 DMSO(细胞培养级, sigma 公司)溶解, -20 ℃ 保存, 使用时用细胞培养基稀释, 且维持 DMSO 浓度在千分之一以下。动物实验中将来那度胺用食品级橄榄油溶解后稀释到相应浓度后灌胃给药, 每次给药剂量 1 mL。

1.3 细胞分组

取 HepG2 细胞(购于 ATCC), RPMI-1640 培养基培养, 取对数期的 HepG2 细胞消化后, 调整细胞浓度为 $2 \times 10^6 \cdot \text{L}^{-1}$, 接种到 96 孔板, 待细胞贴壁后以 0, 1, 5, 10, 15, 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的来那度胺干预 24 h, CCK-8 测定细胞存活率。调节细胞浓度为 $2 \times 10^5 \cdot \text{L}^{-1}$ 接种到 24 孔版, 每孔 500 μL , 贴壁后按照效靶比(淋巴细胞: HepG2=1: 50)的比例加入淋巴细胞, 设置对照组, 实验组, 其中对照组无任何处理, 实验组分为高剂量组、中剂量组、低剂量组, 高剂量组来那度胺(上海晶都生物技术有限公司, 批号: JD-31949, 纯度: 99%)终浓度为 $15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、中剂量组为 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、低剂量为 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。共培养 24 h 后采用流式细胞凋亡试剂盒 Annexin V-FITC/PI 双染(BD 公司, 批号: 556545)检测细胞凋亡, CCK-8 试剂盒(武汉博士德生物技术公司, 批号: AR1160)检测 HepG2 细胞活力。

1.4 Western blot 法检淋巴细胞中 PD-1 和 HepG2 中 PD-L1 的表达

按“1.3”项下方法设置实验分组, 培养 24 h 后分别收集淋巴细胞和 HepG2 细胞, 其中淋巴细胞为悬浮细胞, 吸取培养基后 3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min 得到, HepG2 为贴壁细胞, 消化后 3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min 得到, RIPA 细胞裂解液(武汉博士德生物技术公司, 批号: AR0102)冰上裂解细胞后提取总蛋白, BCA 试剂盒(武汉博士德生物技术公司, 批号: AR0146)进行蛋白定量, PD-1, PD-L1 一抗(Abcam, 批号: 190415, 205912), 内参 GAPDH(Abcam, 批号: 8245), HRP 标记二抗(Abcam, 批号: 20272)孵育后显色。

1.5 Elisa 试剂盒检测培养基中 IL-2、IL-12、TNF- α 的表达

按“1.3”中淋巴细胞和 HepG2 共培养的方法进行细胞分组实验, 在实验后取培养基 3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 沉淀为淋巴细胞, 上清液为培养基, 收集细胞培养基进行蛋白定量后, 按照 Elisa 试剂盒(武汉博士德生物技术公司, 批号分别为: 0379、0423 和 0584)检测 IL-2、IL-12、TNF- α 的表达

1.6 荷瘤小鼠模型的构建

清洁级的近亲系 C57BL/6J 小鼠 40 只, 均为♂, 8~10 周龄, 体质量 18~22 g, 购于浙江中医药大学动物实验中心, 实验动物许可证号: SCXK(浙)2013-0184, 小鼠分笼饲养, 每笼 8 只, 共 5 笼进行适应性培养。动物实验室温度为 20~25 ℃, 湿度为 (70±5)%, 依据国家标准啮齿类动物干燥饲料喂养, 小鼠活动、摄食自由。在实验中进行分组, 每组 10 只, 单组分开饲养。取对数期的 HepG2 细胞, 调节细胞浓度为 $2 \times 10^6 \cdot \text{L}^{-1}$, 于小鼠腋下移植 1 mL 的 HepG2 细胞悬液, 1 周为取造膜成功小鼠进行实验, 设置对照组, 实验组(高剂量组, 中剂量组, 低剂量组), 将橄榄油溶解的来那度胺调整相应的浓度。其中高剂量组每日给予 $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的来那度胺 1 次, 中剂量组给予 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 低剂量组给予 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 均为灌胃给药, 每次 1 mL, 而对照组小鼠每次给予纯橄榄油 1 mL 灌胃给药, 连续给药 14 d 后断颈处死小鼠, 取肿瘤组织进行称量并进行 Western blot 和 RT-qPCR 实验。

1.7 Western blot 检测肿瘤组织中 PD-1 和 PD-L1 的表达

取肿瘤组织, 用冷 PBS 清洗后除去结缔组织, 加入 Cell lysis buffer III(Cell signaling 公司, 批号: 9803)(每 100 ng 加入 1 mL), 匀浆研磨后离心, 上清液为总蛋白, -80 ℃ 保存, Western blot 操作参照“1.4”项下方法。

1.8 RT-qPCR 检测肿瘤组织中 IL-2、IL-12 和 TNF- α 的 mRNA 表达

取肿瘤组织加入液氮研磨后, 按照 TRIzol 试剂盒(BioTeKe 公司, 批号: RP2041)操作, 提取组织中总 RNA, 紫外分光光度法检测总浓度, 定量后按照 AMV First cDNA Synthesis Kit 试剂盒(sinobio, 批号: E090)方法进行反转录, 得到的 cDNA 在 -20 ℃ 保存, 最后利用 qPCR 检测 IL-2、

IL-12 和 TNF- α mRNA 的表达。每个样本设置 3 个复孔, 计算平均 Ct 值, 设置阴性对照。采用 $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ 计算拷贝数, 并且以 GAPDH 为内参。引物设计见表 1。

表 1 引物设计表

Tab. 1 Primer design table

基因名称	引物名称	序列 5'-3'	bp
GAPDH	正向	ACCACAGTCCATGCCATCAC	439
	反向	TCCACCACCCTGTTGCTGTA	
IL-2	正向	AACTCACCAGGATGCTCACAATTTA	120
	反向	TCCCTGGGTCTTAAGTGAAAGTTT	
IL-12	正向	AACTCACCCTGTACACGCC	320
	反向	CAAGTCCATGTTTCTTTCACG	
TNF- α	正向	CCTGTAGCCACGTCGTAGC	431
	反向	AGCAATGACTCCAAAGTAGACC	

1.9 统计学分析

实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 17.0 进行统计学处理, 组间比较 $P < 0.05$ 视为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 来那度胺对于 HepG2 的细胞毒性实验结果

分别使用终浓度为 0, 1, 5, 10, 15, 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的来那度胺干预 24 h 后, CCK-8 测定细胞存活率, 结果显示, 细胞存活率分别为 $(100.0 \pm 1.21)\%$, $(98.21 \pm 0.24)\%$, $(97.85 \pm 0.55)\%$, $(97.12 \pm 0.47)\%$, $(96.87 \pm 0.37)\%$, $(96.24 \pm 0.42)\%$, 组间比较无显著性差异。说明来那度胺对 HepG2 无明显的细胞毒性。

2.2 来那度胺促进人淋巴细胞对于 HepG2 的杀伤能力

来那度胺可以促进人淋巴细胞体外对于 HepG2 的杀伤能力, 且高浓度组 HepG2 的细胞凋亡率显著高于低浓度组和中浓度组, CCK-8 结果显示, HepG2 细胞活性随着来那度胺浓度增高而下降。结果见图 1。

2.3 Western blot 检测 PD-1/PD-L1 的表达

Western blot 结果显示, 来那度胺对于淋巴细胞表面 PD-1 蛋白的表达抑制作用明显, 对于 PD-L1 也有一定的抑制作用, 且随着剂量增高, 抑制作用明显, 结果见图 2。

2.4 Elisa 法培养基中 IL-2、IL-12、TNF- α 的表达

相比对照组, 高剂量组、中剂量组和低剂量组中 IL-2、IL-12、TNF- α 的表达显著增高 ($P < 0.05$), 随着来那度胺的剂量增大, IL-2、IL-12、TNF- α 的表达呈现剂量依赖性, 结果见表 2。

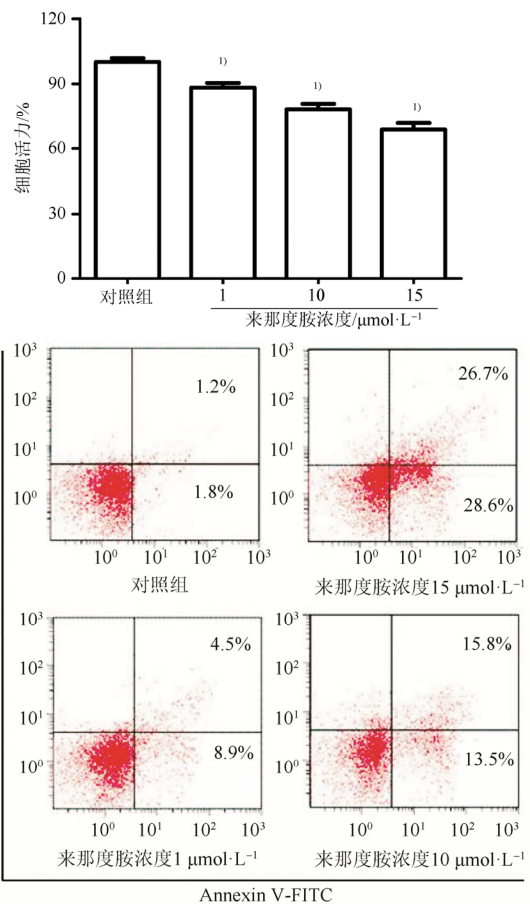


图 1 CCK-8 检测 HepG2 的细胞活力, 流式细胞术检测 HepG2 的凋亡 ($n=5$)
与对照组比较, $^1P < 0.05$ 。

Fig. 1 CCK-8 detected the cell viability of HepG2, and flow cytometry detected the apoptosis of HepG2 ($n=5$)
Compared with the control group, $^1P < 0.05$.

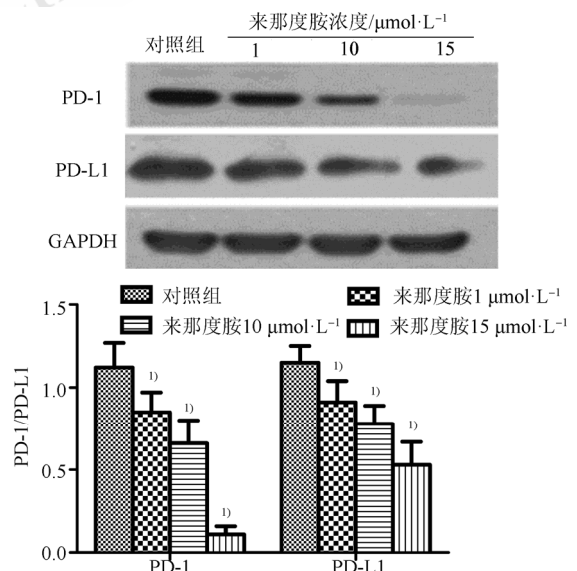


图 2 来那度胺对 PD-1/PD-L1 表达的影响 ($n=3$)
与对照组比较, $P < 0.05$ 。

Fig. 2 The effect of lenalidomide on the expression of PD-1/PD-L1 ($n=3$)
Compared with the control group, $P < 0.05$.

表 2 培养基中 IL-2、IL-12、TNF- α 的表达($n=5$)

Tab. 2 The expression of IL-2, IL-12, TNF- α in the medium($n=5$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	IL-2	IL-12	TNF- α
对照组	—	112.21 $\pm$ 15.20	25.21 $\pm$ 3.52	18.52 $\pm$ 2.14
来那度胺	1	185.21 $\pm$ 18.33 ¹⁾	38.52 $\pm$ 4.15 ¹⁾	22.34 $\pm$ 1.78 ¹⁾
	10	215.21 $\pm$ 17.62 ¹⁾	55.42 $\pm$ 7.14 ¹⁾	28.31 $\pm$ 1.52 ¹⁾
	15	255.41 $\pm$ 18.54 ¹⁾	78.52 $\pm$ 6.51 ¹⁾	38.25 $\pm$ 2.05 ¹⁾

注: 与对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with the control group, $P<0.05$.

2.5 来那度胺对于荷瘤小鼠的抑瘤作用

经过统计, 各组小鼠的肿瘤质量为(3.42 ± 0.42)g, 高剂量组小鼠的肿瘤质量为(1.35 ± 0.57)g, 中剂量组小鼠的肿瘤质量为(2.12 ± 0.47)g, 低剂量组小鼠的肿瘤质量为(3.14 ± 0.70)g。小鼠抑瘤率结果见表 3。

表 3 来那度胺对于荷瘤小鼠的抑瘤率($n=10$)

Tab. 3 The tumor suppressor rate of lenalidomide in tumor mice($n=10$)

分组	浓度/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	肿瘤质量/g	抑瘤率/%
对照组	—	3.42 $\pm$ 0.42	—
	5	3.14 $\pm$ 0.70 ¹⁾	8.20
来那度胺	10	2.12 $\pm$ 0.47 ¹⁾	38.01
	15	1.35 $\pm$ 0.57 ¹⁾	60.52

注: 与对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with the control group, $P<0.05$.

2.6 来那度胺对于荷瘤小鼠肿瘤组织中 PD-1 和 PD-L1 的表达

相比对照组, 来那度胺科显著降低肿瘤组织中 PD-1 和 PD-L1 的表达, 且具有显著性差异($P<0.05$)。结果见图 3。

2.7 肿瘤组织中 IL-2、IL-12 和 TNF- α 的 mRNA 表达

与对照组相比, 来那度胺可以显著增加肿瘤组织中 IL-2、IL-12 和 TNF- α 的表达($P<0.05$), 且存在剂量依赖性, 见表 4。

表 4 肿瘤组织中 IL-2、IL-12、TNF- α 的 mRNA 表达($n=3$)

Tab. 4 The mRNA expression of IL-2, IL-12 and TNF- α in tumor tissue($n=3$)

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	IL-2	IL-12	TNF- α
对照组	—	14.12 $\pm$ 3.22	2.57 $\pm$ 0.14	11.25 $\pm$ 1.20
	5	18.31 $\pm$ 2.54 ¹⁾	3.15 $\pm$ 0.20 ¹⁾	16.54 $\pm$ 1.52 ¹⁾
来那度胺	10	24.32 $\pm$ 3.11 ¹⁾	4.23 $\pm$ 0.23 ¹⁾	20.23 $\pm$ 1.14 ¹⁾
	15	31.54 $\pm$ 2.15 ¹⁾	5.47 $\pm$ 0.18 ¹⁾	27.50 $\pm$ 2.11 ¹⁾

注: 与对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with the control group, $P<0.05$.

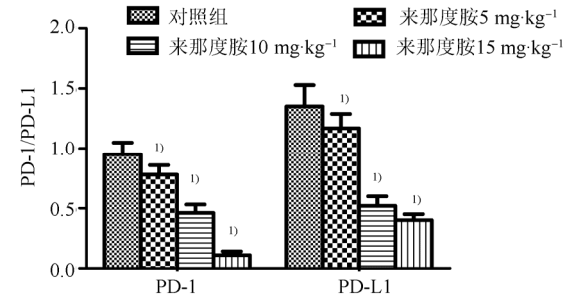
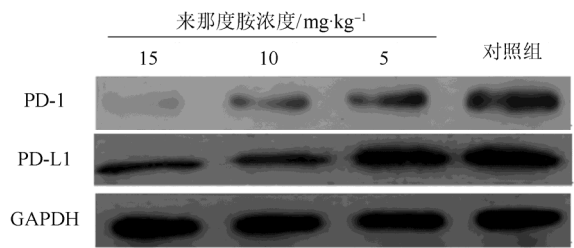


图 3 来那度胺对于肿瘤组织 PD-1/PD-L1 的表达影响($n=3$)

与对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 3 the effect of lenalidomide on the expression of PD-1/PD-L1 in tumor tissue ($n=3$)

Compared with the control group, $P<0.05$.

3 讨论

PD1 属于 I 跨膜蛋白, 主要表达于活化的 T 细胞、B 细胞和自然杀伤细胞表明^[4], PD1 是重要的免疫抑制受体, 在生理条件下可以通过 T 细胞表面受体 TCR 识别抗原, 调节外周组织中 T 细胞的功能^[5], 调控自身免疫抗原产生的免疫应答反应, PD-L1 是 PD1 重要的配体, 是免疫反应中负调控因子, PD1 和 PD-L1 结合可以抑制免疫反应的发生^[6], 而在肿瘤的研究中发现, PD-L1 在肿瘤组织中存在明显的高表达^[7], 这种高表达存在于非小细胞肺癌、黑色素瘤、胃癌、肝癌、结肠癌等^[8], 有研究发现肿瘤表面 PD-L1 和相应 T 细胞表面的 PD1 结合后可以抑制 T 细胞的增殖活化, 促进肿瘤的生长和转移^[9]。目前 PD1/PD-L1 抑制剂在不同的肿瘤治疗中取得了很好的研究基础, 作为单药的研究发现, PD1 单克隆抗体可以恢复 T 细胞表面的免疫应答反应, 缩小实体瘤体积, 增加患者的存活期^[10]。在肝癌的研究中^[11]发现 PD1 抑制剂同样有着很好的应用。

来那度胺作为新的一种抗多发性骨髓瘤药物, 近年来在实体瘤的研究中发现, 来那度胺可以激活 T 淋巴细胞改善 NK 的数目来增强细胞毒性作用, 同时还具有很好的抗血管生成作用。而

本研究发现,来那度胺在体外可以促进人淋巴细胞的免疫杀伤作用,这种作用和细胞免疫、体液免疫均有关系,IL-2 为 T 细胞生长因子,对 T 细胞的活化和分化具有重要的作用,对细胞毒性 T 细胞和 B 淋巴细胞的激活均有重要的作用^[12],IL-12 为抗原提呈细胞和 B 细胞产生,可以促进 NK 细胞的激活促进 DC 的成熟,巨噬细胞的激活等^[13],对免疫有着巨大的促进作用,TNF- α 同样有着很好的免疫调节作用,可以协同刺激 T 细胞,诱导许多细胞产生细胞因子,产生抗肿瘤作用,但是 TNF- α 的持续高表达也可以促进肿瘤的生长和转移^[14]。从实验结果来看,来那度胺可以促进人淋巴细胞体外对于肝癌细胞 HepG2 的杀伤效果,提高 IL-2、IL-12 和 TNF- α 的表达,更重要的是可以降低 PD1 和 PD-L1 的表达,尤其是 PD1 的表达降低十分显著,且随着来那度胺剂量增加,HepG2 凋亡率显著增高,在动物水平的实验同样验证了这一结果,所以笔者推测,来那度胺可以通过抑制 PD1/PD-L1 信号增强细胞免疫,还可以通过促进相关细胞因子的释放,促进体液免疫。

综上所述,来那度胺可以促进淋巴细胞对于 HepG2 的杀伤作用,这种作用的增强和细胞免疫及体液免疫均有关系,尤其是通过 PD1/PD-L1 信号的抑制。

REFERENCES

- [1] LAROCCA A, CAVALLO F, MINA R, et al. Current treatment strategies with lenalidomide in multiple myeloma and future perspectives [J]. *Future Oncol*, 2012, 8(10): 1223-1238.
- [2] ROISOVSKY R, HONG F, TOCCO D, et al. Endothelial stress products and coagulation markers in patients with multiple myeloma treated with lenalidomide plus dexamethasone: an observational study [J]. *Br J Haematol*, 2013, 160(3): 351-358.
- [3] CHEN L N, YANG M H, HUA J Y, et al. Research progress of lenalidomide applied in treatment of diffuse large B cell lymphoma [J]. *Chin J New Drugs Clin Rem*(中国新药与临床杂志), 2017, 36(2): 61-64.
- [4] BÖGER C, BEHRENS H M, MATHIAK M, et al. PD-L1 is an independent prognostic predictor in gastric cancer of Western patients [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(17): 24269-24283.
- [5] IRAOLAGOITIA X L, SPALLANZANI R G, TORRES N I, et al. NK cells restrain spontaneous antitumor CD8+ T cell priming through PD-1/PD-L1 interactions with dendritic cells [J]. *J Immunol*, 2016, 197(3): 953-961.
- [6] LIU H, BAKTHAVATSALAM R, MENG Z, et al. PD-L1 signal on liver dendritic cells is critical for Foxp3(+)CD4(+)CD25(+) Treg and liver tolerance induction in mice [J]. *Transplant Proc*, 2013, 45(5): 1853-1855.
- [7] LATCHMAN Y, WOOD C R, CHERNOVA T, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation [J]. *Nat Immunol*, 2001, 2(3): 261-268.
- [8] WOLCHOK J D, CHAN T A. Cancer: Antitumour immunity gets a boost [J]. *Nature*, 2014, 515(7528): 496-498.
- [9] KOH Y W, JEON Y K, YOON D H, et al. Programmed death 1 expression in the peritumoral microenvironment is associated with a poorer prognosis in classical Hodgkin lymphoma [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(6): 7507-7514.
- [10] TROJAN J, SARRAZIN C. Complete response of hepatocellular carcinoma in a patient with end-stage liver disease treated with nivolumab: wishful thinking or possible? [J]. *Am J Gastroenterol*, 2016, 111(8): 1208-1209.
- [11] CHEN D S, IRVING B A, HODI F S. Molecular pathways: next generation immunotherapy inhibiting programmed death lig and 1 and programmed death 1 [J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(24): 6580-6587.
- [12] YOU E, KIM M H, LEE W I, et al. Evaluation of IL-2, IL-10, IL-17 and IP-10 as potent discriminative markers for active tuberculosis among pulmonary tuberculosis suspects [J]. *Tuberculosis*, 2016(99): 100-108.
- [13] ELSHEMI A G, ASHSHI A M, NA Y, et al. Combined therapy with oncolytic adenoviruses encoding TRAIL and IL-12 genes markedly suppressed human hepatocellular carcinoma both *in vitro* and in an orthotopic transplanted mouse model [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2016, 35(1): 74.
- [14] WANGSIRICHAROEN S, LIGON C, GEDMINTAS L, et al. The rates of serious infections in HIV-infected patients who received tumor necrosis factor (TNF)- α inhibitor therapy for concomitant autoimmune diseases [J]. *Arthritis Care Res*, 2017, 69(3): 449-452.

收稿日期: 2017-12-06

(本文责编: 曹粤锋)