

专  
家  
介  
绍

陈莉,女,南通大学医学院病理解剖学系主任、教授、博士生导师。江苏省重点临床专科南通大学附属肿瘤医院病理科主任、英国莱斯特大学联合培养博士生导师。担任第二、三届全国抗癌协会病理专业委员会委员、江苏省副主任委员、南通市病理学会主任委员等。曾在美国旧金山基因生物技术公司、韩国高丽大学、香港中文大学、香港威尔斯亲王医院、澳大利亚拉伯大学等地高访进修。先后获中国抗癌协会科技进步奖、江苏省科技进步奖、江苏省城镇妇女创新竞赛三等奖各 1 项,江苏省卫生厅医学新技术引进一等奖 2 项,南通市科技进步一等奖 3 项等。发表论文百余篇,其中 SCI 收录 30 篇;授权发明专利 8 项;先后主编出版专著、教材 14 部,获省精品教材 1 部。

## 肝癌中 TLR3 信号分子与自噬相关基因表达的相关性及临床意义

李云龙<sup>△</sup>,王 梅<sup>△</sup>,付鲁渝,刘淑岩,王桂兰,陈 莉\*

(南通大学医学院病理学系,江苏 南通 226001)

**[摘 要]** 目的:研究肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma,HCC)中 Toll 样受体 3(Toll-like receptor 3,TLR3)及信号分子含 TIR 结构域的转接蛋白(TIR-domain-containing adaptor protein including IFN- $\beta$ ,TRIF)表达与细胞自噬相关蛋白 Beclin1 和 LC3 表达的相关性及临床意义,并探讨相关机制。方法:收集与随访 101 例 HCC 病例,构建肝组织芯片。HE 染色判断 HCC 的组织分化,免疫组化染色检测 HCC 组织中 Ki-67、TLR3、TRIF、LC3 和 Beclin1 的表达,应用 TUNEL 方法检测肿瘤细胞凋亡信号。统计学分析其临床病理因素和预后。结果:本组 HCC 中 TLR3 和 TRIF 表达呈正相关( $\rho=0.640, P<0.001$ ),其高表达分别与肿瘤 HbsAg 感染、硬化背景、细胞凋亡指数(apoptosis index,AI)及患者 5 年总生存率呈正相关,与肿瘤细胞增殖、血管浸润、Edmondson 分级和 TNM 分期呈负相关。Beclin1 和 LC3 表达呈显著正相关( $\rho=0.587, P<0.001$ ),两者高表达分别与肿瘤脉管浸润、Edmondson 分级、TNM 分期、肿瘤细胞增殖呈正相关,与 AI 和预后呈负相关。并且 TLR3、TRIF 分别与 LC3 和 Beclin1 的表达呈负相关( $P$  均 $<0.001$ )。结论:HCC 中 TLR3 及其信号分子 TRIF 表达,细胞自噬相关基因 Beclin1 和 LC3 的表达分别通过调控细胞增殖、凋亡和自噬来影响肿瘤的生物行为行为和预后。HCC 组织中 Beclin1 介导的自噬途径与 TLR3 信号凋亡通路存在交叉,两条通路异常可能是 HCC 发生、进展的机制之一。

**[关键词]** 肝细胞肝癌;凋亡;自噬;临床病理因素;预后;LC3;Beclin1;TLR3;TRIF

**[中图分类号]** R735.7

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2016)11-1285-10

doi:10.7655/NYDXBNS20161102

## Correlation and clinical significance of TLR3 signaling molecules and autophagy related gene expression in hepatocellular carcinoma

Li Yunlong<sup>△</sup>, Wang Mei<sup>△</sup>, Fu Luyu, Liu Shuyan, Wang Guilan, Chen Li\*

(Department of Pathology, Medical College, Nantong University, Nantong 226001, China)

**[Abstract]** **Objective:** This paper focus on the correlation and clinical pathological significance of toll-like receptor 3 (TLR3) and its signal molecules TIR-domain-containing adaptor protein including IFN- $\beta$  (TRIF) and autophagy related gene, LC3 and Beclin 1, expressions in human hepatocellular carcinoma (HCC), and its relevant mechanism. **Methods:** We collected and followed-up 101 cases of HCC cases, and built tissue microarray. HE staining for HCC tissue differentiation and immunohistochemical staining were

**[基金项目]** 江苏省产学研前瞻性联合研究项目(BY2013042-06);南通市社会发展课题(HS2014001);南通大学课题及研究生科技创新工程项目(ykc15050);江苏省高校优势学科建设工程(PAPD)资助(苏政办发[2011]6 号)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: bll@ntu.edu.cn

<sup>△</sup>共同第一作者

performed to detect the expression of Ki-67 (cell proliferation marker), TLR3, TRIF, LC3 and Beclin 1, respectively. TUNEL was performed to detect the apoptotic signals of cancer cells. Statistical analysis was performed to analyze its correlation with cancer clinical pathological factors and prognosis. **Results:** In HCC, the expressions of TLR3 and TRIF were positive correlated ( $\rho=0.640, P < 0.001$ ). Its high expression was positively correlated with HbsAg infection, cirrhosis background, cell apoptosis index (AI) and total 5-year survival rate, and negatively correlated with cancer cell proliferation, vascular invasion, Edmondson grading and TNM staging. Beclin1 and LC3 expression was significantly positive correlated ( $\rho=0.587, P < 0.001$ ). Both high expressions were respectively positively correlated with vascular infiltration, Edmondson grading, TNM staging and cancer cell proliferation, but negatively correlated with apoptosis index (AI) and 5-year survival rate ( $P < 0.001$ ). TLR3 and TRIF respectively negatively correlated with the expression of LC3 and Beclin 1 (both  $P < 0.001$ ). **Conclusion:** The expressions of TLR3 and signaling molecules TRIF, cell autophagy related gene Beclin1 and LC3 respectively influence the biological behavior and prognosis of HCC by regulating cell proliferation, apoptosis and autophagy. There are cross points existing between Beclin1 mediated autophagy pathway and TLR3 mediated apoptosis pathway in HCC. Abnormalities of the two pathways may be one of the mechanisms in HCC occurrence and progress.

[Key words] hepatocellular carcinoma; apoptosis; autophagy; clinicopathologic factors; prognosis; LC3; Beclin1; TLR3; TRIF

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(11): 1285-1294]

原发性肝细胞肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是人类最常见的恶性肿瘤之一, 其恶性程度高, 发展迅速, 治疗困难, 病死率高<sup>[1]</sup>。在全球恶性肿瘤中发病率居第 6 位, 但病死率居第 2 位<sup>[2]</sup>, 全世界每年有近 600 000 例死于 HCC<sup>[1]</sup>。中国的 HCC 发病人数占全球总数的一半以上。乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV)、丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV)、酒精性肝硬化、代谢综合征等都是 HCC 发病的诱因。肝细胞增殖、自噬和凋亡的异常可引起细胞的恶性转化, 促进肿瘤的发生与进展。

Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR) 家族是物种进化过程中的一个保守家族, 是参与非特异性免疫 (先天免疫) 的一类重要蛋白质分子, 也是连接非特异性免疫和特异性免疫的桥梁。TLR 作为模式识别受体 (pattern recognition receptors, PRR), 能够识别某些微生物共有的高度保守结构, 即病原相关分子模式 (pathogen associated molecular patterns, PAMPs)<sup>[3]</sup>。TLR 均是 I 型跨膜蛋白, 在诱导获得性免疫反应中, 它可通过细胞因子、干扰素 (interferon, IFN)、趋化因子和细胞表面分子, 以及增加效应器的功能等发挥重要作用。目前, 在哺乳动物及人类中已经发现的 TLR 家族成员有 14 个, Toll 样受体 3 (Toll-like receptor 3, TLR3) 是 TLR 家族中重要成员之一, 是一类最重要的 PRR, 是双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 的特异性受体。由于肝脏的生理功能, 经常暴露于各种抗原, 包括饮食抗原、细菌毒素、病原体和一些死亡肝细胞的自身核酸等, 特别是 HCC 发病因素中 HBV 和 HCV 的持续感染<sup>[4]</sup>, 均为 PAMPs, 都可以被 TLR3 识别<sup>[5]</sup>。TLR3 信号依

赖于诱导产生 IFN- $\beta$  的含 TIR 结构域的转接蛋白 (TIR-domain-containing adaptor protein including IFN- $\beta$ , TRIF, 又名 TIR-domain-containing molecule 1, TICAM1) 的调节导致 NF- $\kappa$ B 和诱导干扰素调节因子 3 (interferon regulatory factor 3, IRF3) 的激活, 经过一系列分子级联反应允许招募 FADD (Fas-associated death domain protein) 并诱导 caspase-8 介导的凋亡通路<sup>[6]</sup>。同时 TRIF 可使 IRF3 磷酸化, 后者异位到细胞核诱导众多宿主防御基因的表达, 包括 IFN- $\beta$  促进细胞凋亡。因此已经明确在人类肿瘤中触发 TLR3 信号通路可导致细胞凋亡<sup>[7]</sup>。

自噬 (autophagy) 是真核细胞中一种普遍而又重要的生命现象, 是一种程序化的细胞内降解机制, 细胞可以预防一些损伤或不必要组件的毒性积累, 维持细胞稳态, 是一种必不可少的细胞功能<sup>[8]</sup>。Beclin1 又称 BECN1, 是 III 型磷脂酰肌醇三磷酸激酶复合物 (Class III PI3K 3C), 是酵母自噬基因 ATG6 的同源基因, 是自噬过程中对自噬泡形成起重要作用的正调节因子, 介导其他 ATG 定位于前自噬小体的关键因子<sup>[9]</sup>。ATG II 型微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3, MAP1-LC3, LC3) 是哺乳动物中 ATG8 的同系物, 在自噬体形成到自噬体与溶酶体融合的过程中都始终存在, 直到自噬体与溶酶体融合后, LC3-II 才被溶酶体中的酸性水解酶降解, 因而 LC3 是自噬体形成不可缺少的 ATG, 成为自噬体的标志分子, 代表自噬活动, 在肿瘤自噬中起到关键作用<sup>[10]</sup>。

由于在人类多种肿瘤中均存在自噬活性的改变, 特别是 ATG 的作用和降解均在细胞溶酶体中进

行,而TLR3的信号分子TRIF也在溶酶体中发挥作用,因此在人类HCC中触发TLR3信号通路可能影响细胞自噬。本研究采用免疫组化方法检测含101例HCC的组织芯片中TLR3、TRIF、LC3、Beclin1的表达,研究其相互关系和临床病理学意义,探讨HCC中TLR3、TRIF信号分子与细胞自噬相关蛋白LC3和Beclin1表达的相互作用,探索HCC发生相关的分子机制。

## 1 对象和方法

### 1.1 对象

150例2003年1月—2004年12月手术切除HCC石蜡标本分别由南通市肿瘤医院与南通大学附属医院提供。所有研究病例均经过患者知情同意和医院伦理委员会批准,有完整的临床病理记录,包括明确的病理诊断、肿瘤大小、肝炎肝硬化背景、淋巴结转移和血清甲胎蛋白(AFP)值等,术前均未行放化疗处理。150例HCC随访资料的收集采用随访信、电话查访两种方式同时进行,收到回随访信86例,电话随访41例,其中二者均成功者26例,总计随访到101例,随访率为67.3%(101/150),随访时间最少4个月,最长≥60个月。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 组织芯片制备

对有随访结果的101例HCC蜡块组织进行组织芯片制备。①芯片阵列的设计首先在常规切片上观察,确定蜡块取材部位,根据切片面积进一步确定每个蜡块组织的取样数量,及各组间的排列方式或阵列,同时设置正常组织对照,记录预先设计的每例植入芯样组织的数量和方位;②按二维组织芯片档案编码进行受体蜡块打孔;③供体病例蜡块组织的取样及其蜡芯的制作,组织芯片蜡块置入包埋模,放入58℃~59℃烘箱中0.5~1.0 h,使组织芯与其周边蜡体紧密整合,进行石蜡二次包埋;④芯片蜡块的熔合,常规连续切片4 μm厚待用。

#### 1.2.2 HE染色

二甲苯脱蜡2次各5 min,依次经酒精梯度下行95%、90%、85%、80%、75%,各25 min,苏木精细胞核染色5 min,水洗3~5 s,1%盐酸蓝化,然后加入伊红染色细胞质2 min。依次经酒精梯度上行75%、80%、85%、90%、95%,二甲苯2次各2 min,中性树脂胶封片。

#### 1.2.3 免疫组化染色(SP法)

切片、脱蜡、水化后用柠檬酸缓冲液(pH6.0)电

炉上加热进行抗原修复,然后按照说明书进行免疫组化SP法染色。基本流程为:3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-甲醇阻断内源性过氧化物酶,加封闭血清,分别加150 μL一抗[兔抗人LC3多克隆抗体(AP1802a, Abgent公司,美国)、鼠抗人Beclin1单克隆抗体(3613, ProSci公司,美国)、鼠抗人TLR3单克隆抗体(AB12085, Abcam公司,美国)、兔抗人TRIF多克隆抗体(AB101232, Abcam公司,美国)、Ki-67(RMA-5542, 迈新生物技术有限公司)],所有抗体1:100稀释,室温孵育1 h后4℃过夜。分别加二抗150 μL[羊抗兔IgG抗体或羊抗鼠IgG抗体(即用型免疫组化超敏SP试剂盒, KIT-9710、9720)1:200稀释],室温下孵育20 min。每张切片加150 μL DAB显色液(DAB-0031, 迈新生物技术有限公司),在光镜下观察控制显色程度,并用苏木素衬染,梯度酒精脱水、二甲苯透明、中性树脂胶封片。以PBS代替一抗为空白对照。

免疫组化结果判断:胞质表达标记判断根据肿瘤细胞占中性细胞的百分比和染色强度进行半定量判断。每张切片随机观察至少5个高倍镜(×400)视野,每个视野计数500个细胞,具体计分方法参考Formowitz评分法<sup>[1]</sup>。以染色强度的不同定为0分(无显色或不清)、1分(浅黄色)、2分(黄色)或3分(棕黄色);以阳性细胞率≤5%、>5%~25%、>25%~50%、>50%~75%、>75%,分别计分为0、1、2、3、4分。最后将阳性细胞率和染色强度计分之作为总分进行结果判定,分为3个等级:0~1分为-, 2~4分为+, 5~7分为++。癌细胞Ki-67核表达≤10%为低表达, >10%~25%为中等表达, >25%为高表达。

#### 1.2.4 T末端脱氧核苷酸转移酶介导的dUTP缺口末端标记测定法(TUNEL)检测细胞凋亡

切片、脱蜡、水化后按照TUNEL即用型检测试剂盒(11684809910, Roche公司, 美国)说明书步骤进行。用0.85% NaCl浸洗, 4%多聚甲醛固定15 min后PBS浸洗;加100 μL蛋白酶K(20 μg/mL), 细胞通透15 min;再重复固定、浸洗、加平衡液、DNase I缓冲液孵育各5 min, 甩掉液体后再加100 mL DNase I(10 U/mL)酶切10 min, 用去离子水冲洗4次, 加100 mL TUNEL反应混合液, 加盖玻片或封口膜在暗湿盒中37℃ 1 h进行标记反应。浸入2×SSC 15 min终止反应, 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 15 min封闭非特异性抗体, 加100 mL streptavidin标记HRP(按1:500 PBS稀释)30 min进行酶标反应后浸洗, 100 μL DAB混合液(50 mL DAB+50 mL DAB底物缓冲液+50 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+950 mL 三蒸水)显色10 min(避光), 在

光镜下观察控制显色程度,并用苏木素衬染,步骤同免疫组化。

TUNEL 原位法检测凋亡细胞判断标准:阳性细胞核染色呈棕黄色,并结合凋亡细胞的形态特征(如染色细胞染色质出现浓缩、边缘化,核膜裂解,细胞皱缩、脱落,凋亡小体等)进行判定。凋亡水平以凋亡指数(apoptosis index, AI)作为依据,  $AI(\%) = (\text{凋亡细胞数} / \text{肿瘤细胞数}) \times 100\%$ 。于肿瘤细胞聚集区选取 10 个 400 倍镜视野计算肿瘤细胞 AI。

### 1.3 统计学方法

运用 SPSS13.0 统计软件进行分析。对上述各观察指标在 HCC 中的表达与相应临床病理学特征之间的关系采用  $\chi^2$  检验和 Spearman 等级相关分析。

用 Log rank 检验和 Kaplan-Meier 生存曲线分析预后。对各观察指标间的相互关系采用 Spearman 等级相关分析。 $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 HCC 中 TLR3、TRIF 和 LC3、Beclin1 表达与临床病理因素的关系

免疫组化检测结果显示在 HCC 中 TLR3、TRIF、LC3 和 Beclin1 均表达于肿瘤细胞质(图 1)。各指标的阳性表达率分别为 TLR3 58.4% (59/101)、TRIF 62.4% (63/101)、LC 369.3% (70/101) 和 Beclin1 73.3% (74/101)。HCC 中 TLR3、TRIF 和 LC3、Beclin1 表达与 HCC 临床病理因素的关系见表 1。

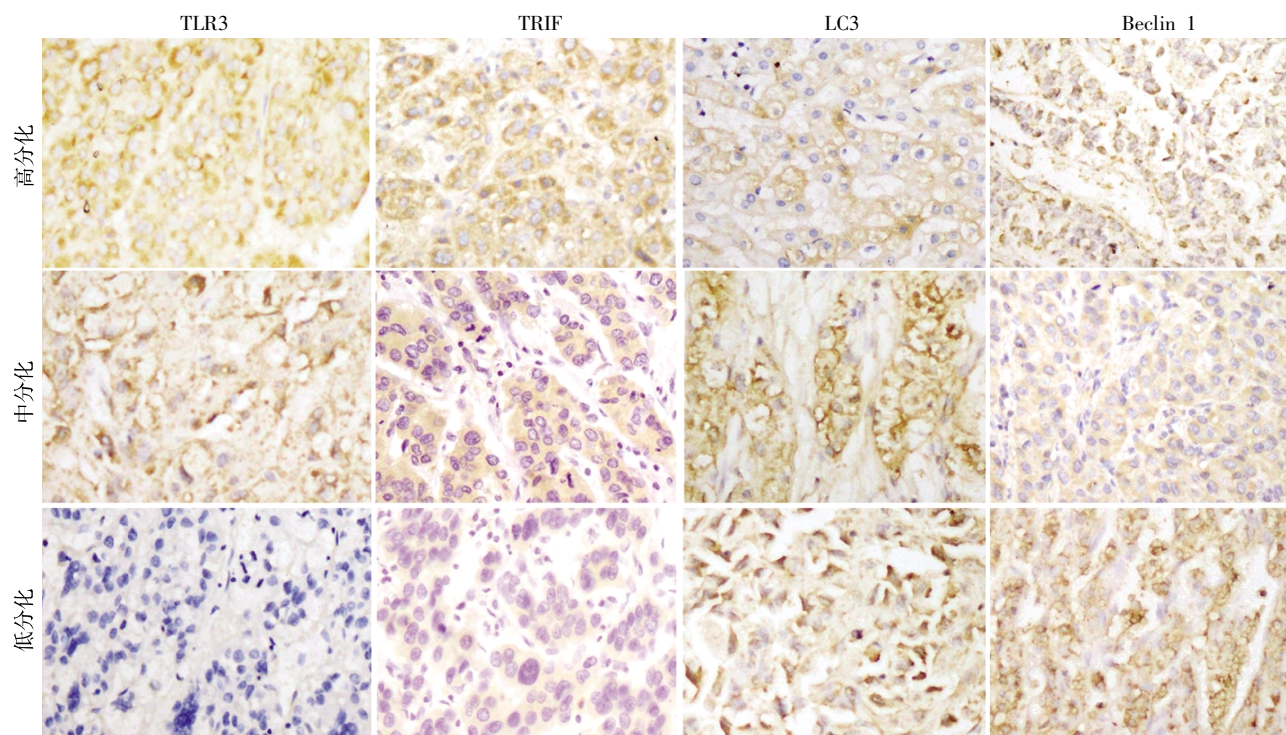


图 1 HCC 中 TLR3、TRIF、LC3 和 Beclin 1 阳性表达于肿瘤细胞胞质(免疫组化 S-P 法, ×400)

Figure 1 Expressions of TLR3, TRIF, LC3 and Beclin 1 in cytoplasm of HCC (immunohistochemical S-P, ×400)

由表 1 可见, HCC 组织中 TLR3 和 TRIF 在有 HbsAg 感染、是否硬化、血管浸润、Edmondson 分级和 TNM 分期的不同组中的表达差异有统计学意义( $P$  均  $< 0.05$ )。相关分析显示 TLR3( $\rho=0.374, P < 0.001$ )和 TRIF( $\rho=0.287, P=0.004$ )表达分别与 HbsAg 和硬化背景呈正相关, 而与血管浸润( $\rho=-0.495, P < 0.001; \rho=-0.466, P < 0.001$ )、Edmondson 分级( $\rho=-0.378, P < 0.001; \rho=-0.611, P < 0.001$ )和 TNM 分期( $\rho=-0.364, P < 0.001; \rho=-0.342, P < 0.001$ )呈负相关。在年龄、性别、肿瘤直径、肿瘤个数、胞膜表达情况、血清 AFP 水平的不同组中的表达差异无统

计学意义( $P > 0.05$ )。

HCC 组织中 LC3 和 Beclin1 蛋白表达在血管浸润、Edmondson 分级和 TNM 分期的不同组中差异有统计学意义( $P$  均  $< 0.05$ )。相关分析显示 HCC 组织中 LC3 和 Beclin1 蛋白表达分别与血管浸润( $\rho=0.362, P < 0.001; \rho=0.375, P < 0.001$ )、Edmondson 分级( $\rho=0.271, P=0.006; \rho=0.422, P < 0.001$ )和 TNM 分期( $\rho=0.204, P=0.040; \rho=0.345, P < 0.001$ )呈正相关。在年龄、性别、肿瘤直径、肿瘤个数、胞膜表达情况、HbsAg、血清 AFP 水平以及硬化表现的不同组中, LC3 和 Beclin1 蛋白表达差异无统计学意义( $P$  均  $> 0.05$ )。



表 1 TLR3、TRIF、LC3 和 Beclin1 表达与 HCC 临床病理因素的关系

Table 1 Correlation between TLR3, TRIF, LC3 and Beclin 1 expressions as well as clinicopathologic parameters in HCC

| 指标               | 例数 | TLR3 |        |    | TRIF |        |    | LC3 |        |    | Beclin1 |        |    |
|------------------|----|------|--------|----|------|--------|----|-----|--------|----|---------|--------|----|
|                  |    | -    | +      | ++ | -    | +      | ++ | -   | +      | ++ | -       | +      | ++ |
| 年龄               |    |      |        |    |      |        |    |     |        |    |         |        |    |
| <50 岁            | 52 | 23   | 13     | 16 | 17   | 13     | 22 | 14  | 26     | 12 | 11      | 27     | 14 |
| ≥50 岁            | 49 | 19   | 13     | 17 | 21   | 10     | 18 | 17  | 19     | 13 | 16      | 25     | 8  |
| χ <sup>2</sup> 值 |    |      | 0.322  |    |      | 1.124  |    |     | 1.331  |    |         | 2.552  |    |
| P 值              |    |      | 0.851  |    |      | 0.570  |    |     | 0.514  |    |         | 0.279  |    |
| 性别               |    |      |        |    |      |        |    |     |        |    |         |        |    |
| 男                | 73 | 30   | 19     | 24 | 28   | 16     | 29 | 21  | 35     | 17 | 20      | 37     | 16 |
| 女                | 28 | 12   | 7      | 9  | 10   | 7      | 11 | 10  | 10     | 8  | 7       | 15     | 6  |
| χ <sup>2</sup> 值 |    |      | 0.027  |    |      | 0.123  |    |     | 1.226  |    |         | 0.079  |    |
| P 值              |    |      | 0.987  |    |      | 0.940  |    |     | 0.542  |    |         | 0.962  |    |
| 肿瘤直径             |    |      |        |    |      |        |    |     |        |    |         |        |    |
| ≤3 cm            | 14 | 5    | 4      | 5  | 5    | 3      | 6  | 3   | 8      | 3  | 3       | 7      | 4  |
| >3~5 cm          | 35 | 13   | 10     | 12 | 12   | 9      | 14 | 12  | 16     | 7  | 10      | 17     | 8  |
| >5 cm            | 52 | 24   | 12     | 16 | 21   | 11     | 20 | 16  | 21     | 15 | 14      | 28     | 10 |
| χ <sup>2</sup> 值 |    |      | 0.011  |    |      | 0.482  |    |     | 1.984  |    |         | 0.783  |    |
| P 值              |    |      | 0.994  |    |      | 0.975  |    |     | 0.739  |    |         | 0.941  |    |
| 肿瘤个数             |    |      |        |    |      |        |    |     |        |    |         |        |    |
| 单发               | 72 | 32   | 17     | 23 | 25   | 17     | 30 | 24  | 31     | 17 | 19      | 37     | 16 |
| 多发               | 29 | 10   | 9      | 10 | 13   | 6      | 10 | 7   | 14     | 8  | 8       | 15     | 6  |
| χ <sup>2</sup> 值 |    |      | 1.027  |    |      | 0.908  |    |     | 0.828  |    |         | 0.034  |    |
| P 值              |    |      | 0.101  |    |      | 0.635  |    |     | 0.661  |    |         | 0.983  |    |
| 胞膜表达             |    |      |        |    |      |        |    |     |        |    |         |        |    |
| 阴性               | 66 | 26   | 19     | 21 | 25   | 16     | 25 | 17  | 34     | 15 | 15      | 34     | 17 |
| 阳性               | 35 | 16   | 7      | 12 | 13   | 7      | 15 | 14  | 11     | 10 | 12      | 18     | 5  |
| χ <sup>2</sup> 值 |    |      | 0.949  |    |      | 0.322  |    |     | 3.898  |    |         | 2.525  |    |
| P 值              |    |      | 0.622  |    |      | 0.849  |    |     | 0.142  |    |         | 0.283  |    |
| HbsAg            |    |      |        |    |      |        |    |     |        |    |         |        |    |
| 阴性               | 73 | 38   | 18     | 17 | 35   | 13     | 25 | 24  | 32     | 17 | 19      | 38     | 16 |
| 阳性               | 28 | 4    | 8      | 16 | 3    | 10     | 15 | 7   | 13     | 8  | 8       | 14     | 6  |
| χ <sup>2</sup> 值 |    |      | 14.162 |    |      | 12.214 |    |     | 0.668  |    |         | 0.068  |    |
| P 值              |    |      | 0.001  |    |      | 0.002  |    |     | 0.716  |    |         | 0.967  |    |
| AFP              |    |      |        |    |      |        |    |     |        |    |         |        |    |
| <50 ng/mL        | 38 | 16   | 8      | 14 | 13   | 10     | 15 | 9   | 19     | 10 | 8       | 21     | 9  |
| ≥50 ng/mL        | 63 | 26   | 18     | 19 | 25   | 13     | 25 | 22  | 26     | 15 | 19      | 31     | 13 |
| χ <sup>2</sup> 值 |    |      | 0.849  |    |      | 0.525  |    |     | 1.441  |    |         | 1.005  |    |
| P 值              |    |      | 0.654  |    |      | 0.769  |    |     | 0.487  |    |         | 0.605  |    |
| 肝硬化              |    |      |        |    |      |        |    |     |        |    |         |        |    |
| 无                | 62 | 30   | 20     | 12 | 33   | 15     | 14 | 22  | 27     | 13 | 17      | 31     | 14 |
| 有                | 39 | 12   | 6      | 21 | 5    | 8      | 26 | 9   | 18     | 12 | 10      | 21     | 8  |
| χ <sup>2</sup> 值 |    |      | 13.152 |    |      | 22.280 |    |     | 2.166  |    |         | 0.144  |    |
| P 值              |    |      | 0.001  |    |      | 0.001  |    |     | 0.339  |    |         | 0.930  |    |
| 血管浸润             |    |      |        |    |      |        |    |     |        |    |         |        |    |
| 无                | 66 | 19   | 19     | 28 | 14   | 17     | 35 | 25  | 33     | 8  | 21      | 40     | 5  |
| 有                | 35 | 23   | 7      | 5  | 24   | 6      | 5  | 6   | 12     | 17 | 6       | 12     | 17 |
| χ <sup>2</sup> 值 |    |      | 13.728 |    |      | 23.049 |    |     | 16.748 |    |         | 22.567 |    |
| P 值              |    |      | <0.001 |    |      | <0.001 |    |     | <0.001 |    |         | <0.001 |    |
| Edmondson's 分级   |    |      |        |    |      |        |    |     |        |    |         |        |    |
| I~II             | 48 | 8    | 15     | 25 | 5    | 10     | 33 | 20  | 21     | 7  | 23      | 19     | 6  |
| III~IV           | 53 | 34   | 11     | 8  | 33   | 13     | 7  | 11  | 24     | 18 | 4       | 33     | 16 |
| χ <sup>2</sup> 值 |    |      | 25.283 |    |      | 37.768 |    |     | 7.424  |    |         | 21.490 |    |
| P 值              |    |      | <0.001 |    |      | <0.001 |    |     | 0.024  |    |         | <0.001 |    |
| TNM 分期           |    |      |        |    |      |        |    |     |        |    |         |        |    |
| I~II             | 44 | 8    | 16     | 20 | 7    | 14     | 23 | 20  | 14     | 10 | 21      | 16     | 7  |
| III~IV           | 57 | 34   | 10     | 13 | 31   | 9      | 17 | 11  | 31     | 15 | 6       | 36     | 15 |
| χ <sup>2</sup> 值 |    |      | 17.583 |    |      | 15.732 |    |     | 8.503  |    |         | 17.552 |    |
| P 值              |    |      | 0.001  |    |      | <0.001 |    |     | 0.014  |    |         | <0.001 |    |

## 2.2 HCC 中 TLR3、TRIF 和 LC3、Beclin1 表达与肿瘤增殖和凋亡的关系

本组 HCC 中细胞 Ki-67 和 TUNEL 原位法检测细胞凋亡信号均表达在细胞核内 (图 2)。HCC 中 TLR3、TRIF 和 LC3、Beclin1 表达与肿瘤增殖和凋亡的关系见表 2。可见 TLR3、TRIF、LC3 和 Beclin1 表达与 Ki-67 和 AI 均有显著相关性 ( $P$  均  $< 0.05$ )。TLR3、TRIF 表达与 Ki-67 呈负相关 ( $\rho = -0.337, P =$

$0.001; \rho = -0.541, P < 0.001$ ), 与细胞 AI 呈正相关 ( $\rho = 0.563, P < 0.001; \rho = 0.567, P < 0.001$ )。LC3 和 Beclin1 表达与 Ki-67 表达呈正相关 ( $\rho = 0.355, P < 0.001; \rho = 0.559, P < 0.001$ ), 与 AI 呈负相关 ( $\rho = -0.193, P = 0.042; \rho = -0.356, P < 0.001$ )。

## 2.3 HCC 中 TLR3、TRIF、LC3 和 Beclin1 表达与 HCC 预后的关系

根据本组病例随访结果显示:1 年内死亡

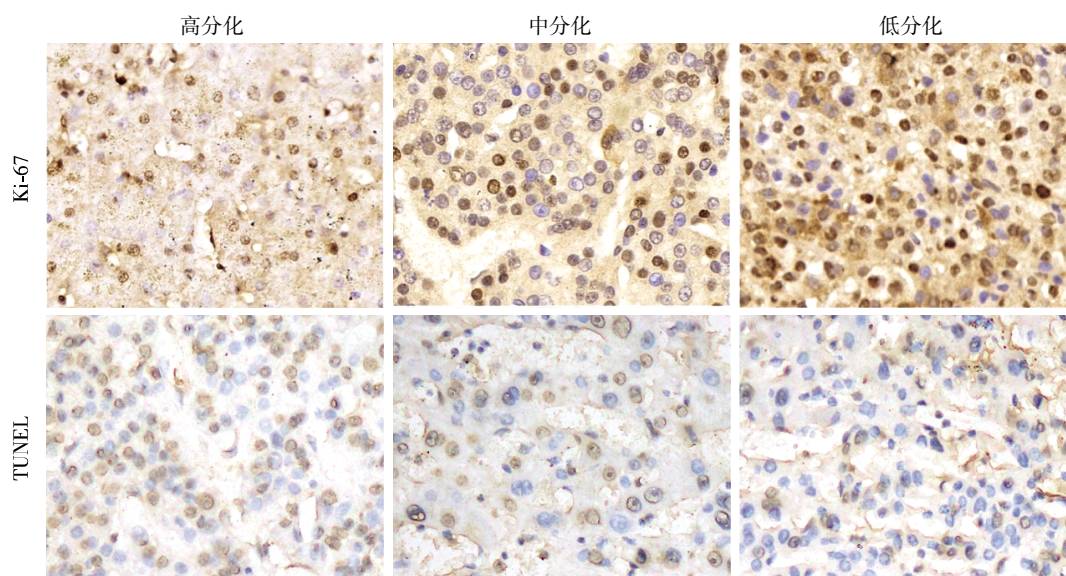


图 2 HCC 中 Ki-67(免疫组化 S-P 法)和 TUNEL 阳性表达(Tunel 原位杂交)检测( $\times 400$ )

Figure 2 Ki-67 expressed in nuclear of HCC (immunohistochemical S-P) and apoptosis signal expressed in nuclear of HCC (TUNEL hybridization) ( $\times 400$ )

表 2 TLR3、TRIF、LC3 和 Beclin1 表达与 HCC 增殖和凋亡的关系

| 因素      | 例数 | Ki-67       |                    |          | $\chi^2$ 值 | $P$ 值     | AI          |                    |          | $\chi^2$ 值 | $P$ 值     |
|---------|----|-------------|--------------------|----------|------------|-----------|-------------|--------------------|----------|------------|-----------|
|         |    | $\leq 10\%$ | $> 10\% \sim 25\%$ | $> 25\%$ |            |           | $\leq 10\%$ | $> 10\% \sim 20\%$ | $> 20\%$ |            |           |
| TLR3    |    |             |                    |          | 12.787     | 0.012     |             |                    |          | 32.754     | $< 0.001$ |
| -       | 42 | 8           | 22                 | 12       |            |           | 22          | 19                 | 1        |            |           |
| +       | 26 | 13          | 9                  | 4        |            |           | 6           | 11                 | 9        |            |           |
| ++      | 33 | 18          | 12                 | 3        |            |           | 2           | 13                 | 18       |            |           |
| TRIF    |    |             |                    |          | 29.974     | $< 0.001$ |             |                    |          | 40.742     | $< 0.001$ |
| -       | 38 | 4           | 21                 | 13       |            |           | 22          | 14                 | 2        |            |           |
| +       | 23 | 8           | 10                 | 5        |            |           | 7           | 9                  | 7        |            |           |
| ++      | 40 | 27          | 12                 | 1        |            |           | 1           | 20                 | 19       |            |           |
| LC3     |    |             |                    |          | 22.251     | $< 0.001$ |             |                    |          | 10.273     | 0.036     |
| -       | 31 | 21          | 6                  | 4        |            |           | 4           | 12                 | 15       |            |           |
| +       | 45 | 12          | 27                 | 6        |            |           | 12          | 22                 | 11       |            |           |
| ++      | 25 | 6           | 10                 | 9        |            |           | 14          | 9                  | 2        |            |           |
| Beclin1 |    |             |                    |          | 41.679     | $< 0.001$ |             |                    |          | 23.930     | $< 0.001$ |
| -       | 27 | 22          | 3                  | 2        |            |           | 3           | 16                 | 8        |            |           |
| +       | 52 | 16          | 29                 | 7        |            |           | 12          | 21                 | 19       |            |           |
| ++      | 22 | 1           | 11                 | 10       |            |           | 15          | 6                  | 1        |            |           |

18.8%(19/101),1~3 年内死亡 27.7%(28/101),3~5 年内死亡 20.8%(21/101),5 年以上存活 32.7%(33/101)。分析 TLR3、TRIF、LC3、Beclin1 的表达与 HCC 预后的关系(表 3)。显示本组 HCC 中 TLR3、TRIF、LC3 和 Beclin1 在患者不同 5 年生存组中的表达差异有统计学意义( $P$  均 $<0.001$ )。TLR3 和 TRIF 表达分别与患者 5 年生存呈正相关( $r=0.610, P<0.001$ ;  $r=0.561, P<0.001$ )。LC3 和 Beclin1 蛋白表达分别与患者 5 年生存呈负相关( $r=-0.664, P<0.001$ ;  $r=-0.444, P<0.001$ )。应用 Kaplan-Meier 生存分析显示 TLR3 和 TRIF 表达与总生存率呈显著正相关(log-rank test,  $P<0.001$ )。LC3 和 Beclin1 表达与总生存率呈显著负相关(log-rank test,  $P<0.001$ , 图 3)。

#### 2.4 HCC 中 TLR3、TRIF 和 LC3、Beclin1 表达的相关性分析

采用 Spearman 等级相关分析 HCC 中 TLR3、TRIF 和 LC3、Beclin1 表达间的相互关系。结果显

示:TLR3 与 TRIF 表达呈显著正相关( $r=0.640, P<0.001$ ),LC3 与 Beclin1 表达呈显著正相关( $r=0.587, P<0.001$ );TLR3 和 TRIF 表达分别与 LC3 表达和 Beclin1 表达均呈显著负相关(图 4)。

### 3 讨论

TLR3 同所有的 TLR 一样,都是 I 型跨膜蛋白,参与胞内信号转导。TLR3 与其他 TLR 不同的是,TLR3 不依赖转接蛋白髓样分化因子 88(myeloid differentiation factor 88, MyD88)而是通过依赖 TRIF 途径激活<sup>[11]</sup>。在许多肿瘤中均有不同程度的 TLR3 表达。本研究在 HCC 组织中应用免疫组化 SP 法检测 TLR3 和 TRIF 表达率分别为 58.4%(59/101)和 62.4%(63/101),阳性检测结果与文献报道类似<sup>[12]</sup>。且本组 HCC 中 TLR3 与 TRIF 表达呈正相关( $\rho=0.640, P<0.001$ )。TLR3 和 TRIF 表达与 HCC 临床病理因素的分析结果显示 TLR3 和 TRIF 在是否 HbsAg 感染、硬化、血管浸润、Edmondson 分级和

表 3 TLR3、TRIF、LC3 和 Beclin1 表达与 HCC 预后的关系(101 例)

Table 3 Correlation between TLR3, TRIF, LC3 and Beclin 1 expressions as well as the survival rate in HCC(101 cases)

| 因素       | 例数 | 生存[n(%)]  |           | $\chi^2$ 值 | P 值    |
|----------|----|-----------|-----------|------------|--------|
|          |    | <5 年      | ≥5 年      |            |        |
| TLR3     |    |           |           | 39.332     | <0.001 |
| -        | 42 | 40(95.24) | 2(4.76)   |            |        |
| +        | 26 | 19(73.08) | 7(26.92)  |            |        |
| ++       | 33 | 9(27.27)  | 24(72.73) |            |        |
| TRIF     |    |           |           | 31.819     | <0.001 |
| -        | 38 | 37(97.37) | 1(2.63)   |            |        |
| +        | 23 | 16(69.57) | 7(30.43)  |            |        |
| ++       | 40 | 15(37.5)  | 25(62.5)  |            |        |
| LC3      |    |           |           | 53.934     | <0.001 |
| -        | 31 | 5(16.13)  | 26(83.87) |            |        |
| +        | 45 | 39(86.87) | 6(13.13)  |            |        |
| ++       | 25 | 24(96.0)  | 1(4.0)    |            |        |
| Beclin 1 |    |           |           | 28.719     | <0.001 |
| -        | 27 | 7(25.93)  | 20(74.07) |            |        |
| +        | 52 | 43(82.69) | 9(17.30)  |            |        |
| ++       | 22 | 18(81.82) | 4(18.18)  |            |        |

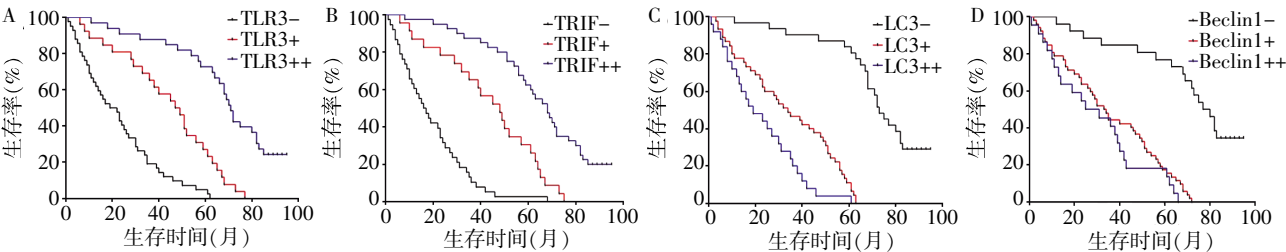
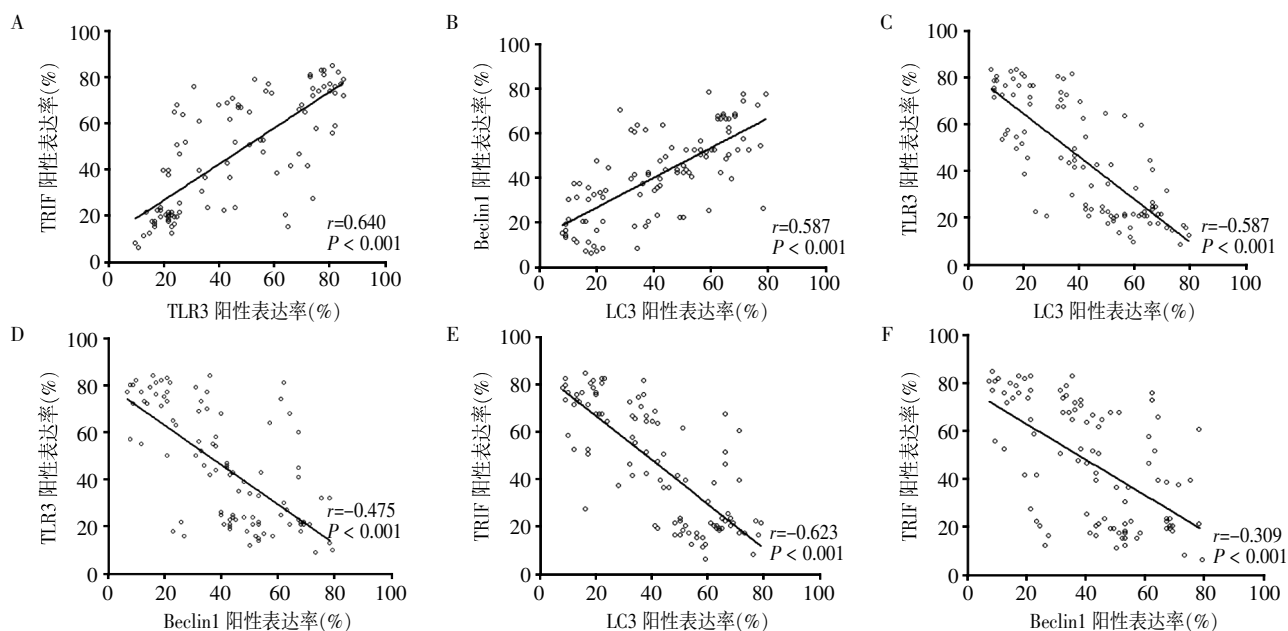


图 3 HCC 患者 TLR3(A)、TRIF(B)、LC3(C)和 Beclin1(D)表达的 Kaplan-Meier 生存曲线

Figure 3 Kaplan-Meier survival curves of HCC patients with expression of TLR3(A), TRIF(B), LC3(C) and Beclin 1(D)



A: TLR3 和 TRIF 表达间的相互关系; B: LC3 和 Beclin1 表达间的相互关系; C: TLR3 和 LC3 表达间的相互关系; D: TLR3 和 Beclin1 表达间的相互关系; E: TRIF 和 LC3 表达间的相互关系; F: TRIF 和 Beclin1 表达间的相互关系。

图 4 HCC 中 TLR3、TRIF 和 LC3、Beclin1 表达间的相互关系

Figure 4 Correlations between the expression of TLR3, TRIF, LC3 and Beclin1 in HCC

TNM 分期的不同组中的表达差异有统计学意义 ( $P$  均  $< 0.001$ )。并且 TLR3 和 TRIF 表达分别与肿瘤伴 HbsAg 感染和硬化背景呈正相关 ( $P=0.001$ ), 而与血管浸润、Edmondson 分级和 TNM 分期呈负相关 ( $P < 0.001$ )。文献报道给 HBV 转基因小鼠注射 TLR3 特异性配体 24 h 内, 诱导产生 INF- $\alpha$  和 INF- $\beta$ , 抑制 HBV 在肝脏中的复制, 说明 TLR3 影响 HBV 感染后的免疫反应<sup>[13]</sup>。本研究结果提示在肿瘤伴 HbsAg 感染时, 病毒 dsRNA 及坏死细胞释放的 dsRNA 均可激活肿瘤细胞内 TLR3 的抗病毒作用, 表明 HCC 伴 HBV 感染是 TLR3 激活的基础<sup>[14]</sup>。Okada 等<sup>[15]</sup>用 Poly I:C (一种 dsRNA, TLR3 的配体) 注射小鼠形成原发性胆汁性肝硬化 (primary biliary cirrhosis, PBC) 模型, 与人类 PBC 相似, 提示 TLR3 与 PBC 的发病机制相关。这与本研究观察到的 TLR3 和 TRIF 与肝硬化背景呈正相关的结果一致。本研究结果也显示 TLR3 和 TRIF 表达与肿瘤血管浸润呈负相关。TLR3 信号通路激活的 IFN- $\alpha$  和 IFN- $\beta$  都能通过抑制 b-FGF mRNA 和蛋白水平抑制血管生成。除了下调关键的血管生成信号因子, IFN- $\alpha$  也能抑制体内内皮细胞迁移。课题组前期研究也证实 dsRNA 促进人脐静脉内皮细胞的凋亡并且抑制其形成血管<sup>[16]</sup>。同时也证明了 HCC 中 CD34 染色微血管密度与 TLR3 和 TRIF 表达呈负相关, 并且血管内皮干细胞阳性计数与 TLR3 和 TRIF 表达呈负相

关<sup>[12]</sup>。因此 TLR3 及其信号分子 TRIF 在抑制肿瘤细胞生长的同时还能抑制肿瘤中新生血管的形成, 进而抑制肿瘤转移和进展, 正如本研究结果显示 TLR3 和 TRIF 的表达与肿瘤 Edmondson 分级和 TNM 呈负相关。

本研究结果表明 TLR3、TRIF 表达分别与 Ki-67 呈负相关, 与细胞 AI 呈正相关。该结果证明了在 HCC 中 TLR3 信号通路明显偏向细胞凋亡。Salaun 等<sup>[17]</sup>研究发现, TLR3 可以直接诱导人乳腺癌细胞的凋亡, 其凋亡与 Poly I:C 呈剂量依赖性关系。Jiang 等<sup>[18]</sup>研究发现, Poly I:C 激活 TLR3 信号通路, 可以增强人宫颈癌 Hela 细胞和小鼠大肠癌 MCA38 细胞对蛋白合成抑制剂亚胺环己酮诱导凋亡的敏感性, 且具有剂量依赖性。相似的结果在人黑色素瘤细胞、HCC 细胞及前列腺癌细胞 (LN 和 PC3) 中有报道, 因 TLR3 引起细胞周期阻滞而诱导了细胞凋亡。在黑色素瘤细胞中, TLR3 的激活在诱导细胞凋亡同时抑制细胞增殖。Shime 等<sup>[19]</sup>研究表明将 Poly I:C 腹腔内或皮下注射 Lewis 肺癌细胞制备的小鼠皮下移植瘤中会引起肿瘤衰退, 将支持肿瘤的巨噬细胞转变成抑制肿瘤的巨噬细胞, 提示活化 TLR3 可能成为肿瘤免疫治疗的新方向。

本研究还探讨了 TLR3 途径的激活与 HCC 患者预后的意义。本组病例 5 年总生存率为 32.7% (33/101)。经 Log rank 检验及 Kaplan-Meier 生存曲



线显示 TLR3 及其信号分子 TRIF 表达的病例预后较好,这可能由于 HCC 中 TLR3 途径的激活促进了肿瘤细胞的凋亡,并抑制肿瘤细胞的增殖及血管浸润等因素。提示 HCC 中 TLR3 和 TRIF 的高表达可作为肿瘤患者预后良好的判断因素。

在肿瘤发生、发展的过程中,细胞自噬的作用具有双向性,一方面防止有毒或致癌的蛋白质和损伤细胞器的累积,抑制细胞癌变;另一方面为肿瘤细胞提供生存的物质基础,这也是肿瘤进展的根本原因。肿瘤细胞通过发生自噬来维持正常代谢与细胞稳态<sup>[8]</sup>。自噬还可通过限制坏死和炎症促使肿瘤细胞存活于代谢性应激或免疫抑制中,促进肿瘤生长<sup>[20]</sup>。本研究应用免疫组化 SP 法检测 HCC 中 Beclin1 及 LC3 表达率分别为 69.3% (70/101) 和 73.3% (74/101),两者表达呈显著正相关。两指标的过度表达表明了在人 HCC 中自噬活动的增加。而且 Beclin1 和 LC3 高表达分别与 Ki-67 表达、肿瘤血管浸润、Edmondson 分级和 TNM 分期呈正相关,与 AI 和患者 5 年总生存率呈负相关。提示肿瘤细胞通过发生自噬为其提供充足的营养物质、合成代谢底物和能量,维持肿瘤细胞的生存、增殖和进展,因此在 HCC 中肿瘤细胞发生自噬更多的是一种细胞生存机制,与预后差有关<sup>[21]</sup>。

在生物体内自噬与凋亡不是孤立存在的,在特定条件下可以相互影响,并可通过重要的生长因子和关键的细胞反应与其他信号通路连接。研究细胞自噬和凋亡在肿瘤发生发展中的相互关系、结合与细胞代谢相互交织的信号通路调控是目前肿瘤研究的热点。阐明这些问题对于更好地揭示肿瘤发病机制及研制开发新的联合抗肿瘤药物具有十分重要的意义。在本研究中观察到细胞中同时出现自噬与凋亡的形态学特征与相关基因表达,如 TLR3、TRIF、Beclin1 及 LC3 的同时表达。正如 Chuang 等<sup>[22]</sup>在研究 Poly I:C 激活人神经母细胞瘤细胞中,TLR3 诱导细胞凋亡时也发现有 LC3 的表达,表明其细胞凋亡可能有自噬诱发的细胞死亡机制的参与<sup>[23]</sup>,提示 TLR3 在促进凋亡中也可以诱导细胞自噬。本研究考察 HCC 组织中 TLR3、TRIF、Beclin1 及 LC3 表达的相关性,探讨 TLR3 信号通路激活引起细胞凋亡的过程中对细胞自噬的影响。结果显示:Beclin1、LC3 的表达分别与 TLR3、TRIF 表达呈负相关,推测 Beclin1 介导自噬信息途径可参与抑制 TLR3 信号通路的成员。Biswas 等<sup>[24]</sup>研究表明 TRIF 与点状亚细胞结构中的 LC3 至少部分共定位。泛素蛋白 1 通

过减少自噬途径中信号衔接分子 TRIF 来实现对 TLR3-TRIF 信号通路的抑制。由于最近研究提出通过自噬受体可介导选择性降解蛋白,为了说明 TRIF 的降解是否由特异性自噬受体所介导,Inomata 等<sup>[25]</sup>在 HEK293T 细胞中发现激活 TRIF 信号能被 TRAF6(tumor necrosis factor receptor-associated factor 6)和自噬受体 NDP52 选择性的降解,Beclin 1 与 TRAF6 相互作用有利于自噬体的形成<sup>[24]</sup>。进而在 HEK293T 细胞中转染 NDP52 后能减弱由 TRIF 过表达引发的 NF- $\kappa$ B 和 IRF3 的转录活性,而且这一降解作用的结果能通过自噬抑制剂三甲基腺嘌呤(3-MA)来证明,提示自噬受体能直接降解 TLR3-TRIF 的信号蛋白。Gorbea 等<sup>[26]</sup>进一步研究显示只有 3-MA 抑制细胞自噬,TLR3 才能介导 I 型 INF 信号途径。这些结果表明自噬并不是 TLR3 激活的结果,而是 TLR3 信号通路的交互作用或旁路步骤发挥的作用<sup>[26]</sup>。

综上所述,HCC 中 TLR3 及其信号分子 TRIF 表达,细胞自噬相关基因 Beclin1 和 LC3 的表达分别通过对细胞增殖、凋亡和自噬的调控来影响肿瘤的生物学行为和预后。HCC 组织中 Beclin1 介导的自噬途径与 TLR3 信号凋亡通路存在交互作用,两条通路在调控细胞凋亡和自噬中既相互促进又相互抑制,分别通过对细胞增殖、凋亡和自噬的调控来影响肿瘤的生物学行为和预后。因此凋亡和自噬异常可能是 HCC 发生、进展的机制之一。但是在这两条通路研究领域,仍有许多问题尚未解决:如两条通路存在交互作用的机制需要进一步阐明,HCC 中 LC3、Beclin1 与 TLR3、TRIF 表达如何诱导特异性的信号通路调节不同基因的表达以介导不同的生物学效应等。随着研究的深入,凋亡和自噬的调控研究将会延伸到更广泛的领域。

#### [参考文献]

- [1] Forn er A,Llov et JM,Bruix J. Hepatocellular carcinoma [J]. Lancet,2012,379(9822):1245-1255
- [2] Sherman M. Hepatocellular carcinoma:epidemiology, surveillance,and diagnosis[J]. Semin Liver Dis,2010,30(1):3-16
- [3] Medzhitov R,Janeway CA. Innate immunity:the virtues of a nonclonal system of recognition [J]. Cell,1997,91(3):295-298
- [4] Conforti R,Ma Y,Morel Y,et al. Opposing effects of toll-like receptor (TLR3) signaling in tumors can be therapeutically uncoupled to optimize the anticancer efficacy of

- TLR3 ligands[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(2): 490–500
- [5] Li N, Li Q, Qian Z, et al. Impaired TLR3/IFN- $\beta$  signaling in monocyte-derived dendritic cells from patients with acute-on-chronic hepatitis B liver failure: relevance to the severity of liver damage[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 390(3): 630–635
- [6] Maelfait J, Vercammen E, Janssens S, et al. Stimulation of toll-like receptor 3 and 4 induces interleukin-1  $\beta$  maturation by caspase-8 [J]. *J Exp Med*, 2008, 205(9): 1967–1973
- [7] Gu L, Chen H, Tuo J, et al. Inhibition of experimental choroidal neovascularization in mice by anti-VEGFA/VEGFR2 or non-specific siRNA [J]. *Exp Eye Res*, 2010, 91(3): 433–439
- [8] Kroemer G, Levine B. Autophagic cell death: the story of a misnomer[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9(12): 1004–1010
- [9] Qiu DM, Wang GL, Li C, et al. The expression of beclin-1, an autophagic gene, in hepatocellular carcinoma associated with clinical pathological and prognostic significance [J]. *BMC Cancer*, 2014, 14: 327
- [10] Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing [J]. *EMBO J*, 2000, 19(21): 5720–5728
- [11] Fromowitz FB, Viola MV, Chao S, et al. Ras p21 expression in the progression of breast cancer[J]. *Hum Pathol*, 1987, 18(12): 1268–1275
- [12] Yuan MM, Xu YY, Li C, et al. TLR3 expression correlates with apoptosis, proliferation and angiogenesis in hepatocellular carcinoma and predicts prognosis[J]. *BMC Cancer*, 2015, 15: 245
- [13] Isogawa M, Robek MD, Furuichi Y, et al. Toll-like receptor signaling inhibits hepatitis B virus replication *in vivo* [J]. *J Virol*, 2005, 79(11): 7269–7272
- [14] Chen XL, Xu YY, Li C, et al. TLR3 plays significant roles against HBV-associated HCC gastroenterology [J]. *Gastroenterol Res Pract*, 2015, 2015: 572171
- [15] Okada C, Akbar SM, Horiike N, et al. Early development of primary biliary cirrhosis in female C57BL/6 mice because of poly I:C administration[J]. *Liver Int*, 2005, 25(3): 595–603
- [16] Guo ZY, Li C, Zhu Y, et al. Double-stranded RNA-induced TLR3 activation inhibits angiogenesis and triggers apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells [J]. *Oncol Rep*, 2012, 27(2): 396–402
- [17] Salaun B, Coste I, Rissoan MC, et al. TLR3 can directly trigger apoptosis in human cancer cells [J]. *J Immunol*, 2006, 176(8): 4894–4901
- [18] Jiang Q, Wei H, Tian Z. Poly I:C enhances cycloheximide-induced apoptosis of tumor cells through TLR3 pathway [J]. *BMC Cancer*, 2008, 8: 12
- [19] Shime H, Matsumoto M, Oshiumi H, et al. Toll-like receptor 3 signaling converts tumor-supporting myeloid cells to tumoricidal effectors [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(6): 2066–2071
- [20] Liu C. Guardian and selective killer: the versatile functions of TLR3 in hepatocellular carcinoma [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2012, 104(23): 1780–1782
- [21] Fujii S, Mitsunaga S, Yamazaki M, et al. Autophagy is activated in pancreatic cancer cells and correlates with poor patient outcome [J]. *Cancer Sci*, 2008(99): 1813–1819
- [22] Chuang JH, Lin TK, Tai MH, et al. Preferential involvement of mitochondria in Toll-like receptor 3 agonist-induced neuroblastoma cell apoptosis, but not in inhibition of cell growth [J]. *Apoptosis*, 2012, 17(4): 335–348
- [23] Chen GY, Yang HJ, Lu CH, et al. Simultaneous induction of autophagy and toll-like receptor signaling pathways by graphene oxide [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(27): 6559–6569
- [24] Biswas N, Liu S, Ronni T, et al. The ubiquitin-like protein PLIC-1 or ubiquilin 1 inhibits TLR3-Trif signaling [J]. *PLoS One*, 2011, 6(6): e21153
- [25] Inomata M, Niida S, Shibata K, et al. Regulation of toll-like receptor signaling by NDP52-mediated selective autophagy is normally inactivated by a20 [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2012, 69(6): 963–979
- [26] Gorbea C, Makar KA, Pauschinger M, et al. A role for Toll-like receptor 3 variants in host susceptibility to enteroviral myocarditis and dilated cardiomyopathy [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(30): 23208–23223

[收稿日期] 2016-07-01