

靶向PD-L1分子的RNAi增强树突状细胞疫苗对胰腺癌治疗作用的实验研究

蒋浩海¹, 赵鑫^{1,2}, 赵华¹, 朱新国¹, 李德春^{1,2*}

¹苏州大学附属第一医院普外科, ²胰腺疾病研究中心, 江苏 苏州 215006

[摘要] 目的:研究通过RNA干扰敲减程序性死亡受体配体1(programmed death receptor ligand 1, PD-L1)分子能否增强树突状细胞疫苗对胰腺癌的治疗作用。方法:免疫组化法检测42例胰腺癌及对应胰腺组织中PD-L1的表达差异;纯化CD8⁺T细胞和制备成熟的树突状细胞(DC),将低表达PD-L1的Panc-1细胞Panc-1/PD-L1-RNAi、阴性对照Panc-1/LV-Control细胞以及野生型Panc-1细胞分别与CD8⁺T细胞+DC疫苗共同培养,检测细胞上清中干扰素(IFN)- γ 表达水平;3组肿瘤细胞分别建立人源化严重免疫缺陷(severe combined immunodeficiency, SCID)小鼠胰腺癌皮下移植瘤模型,以DC疫苗为治疗手段进行尾静脉注射,观察肿瘤生长情况。结果:免疫组化实验显示,胰腺癌组织较胰腺组织中PD-L1高表达,差异有统计学意义($P < 0.001$)。T细胞反应实验显示,PD-L1敲减肿瘤细胞组与DC和CD8⁺T细胞共同培养的上清中IFN- γ 表达水平明显高于其他2个对照组,差异有统计学意义($P < 0.001$)。人源化SCID小鼠体内荷瘤实验显示,敲减PD-L1表达与应用DC疫苗治疗胰腺癌皮下移植瘤具有协同作用。结论:胰腺癌较胰腺组织中PD-L1高表达,敲减胰腺癌细胞PD-L1表达与应用DC疫苗治疗可能是胰腺癌免疫治疗的有效策略。

[关键词] 胰腺癌;PD-L1;树突状细胞;疫苗

[中图分类号] R657.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)01-0040-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20180109

RNAi targeting PD-L1 enhances DC vaccination antitumor immunologic therapeutical effect against pancreatic cancer

Jiang Haohai¹, Zhao Xin^{1,2}, Zhao Hua¹, Zhu Xinguo¹, Li Dechun^{1,2*}

¹Department of General Surgery, ²Pancreatic Diseases Research Center, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, China

[Abstract] **Objective:** To investigate whether knocking down PD-L1 expression can enhance the effects of DC vaccine to treat pancreatic cancer. **Methods:** PD-L1 expression in normal pancreatic tissues and pancreatic cancer tissue specimens were detected by immunohistochemistry in tumor specimen of 42 pancreatic carcinoma patients respectively. A Panc-1 cell line with low PD-L1 expression established by lentivirus mediated RNA interference targeting PD-L1 was named Panc-1/PD-L1-RNAi. At the same time, negative control cells Panc-1/LV-Control and wide type Panc-1 cell line was used in this study. These three groups of pancreatic cancer cells were co-cultured with CD8⁺T cells and mature DC, and then IFN- γ production was detected by ELISA. Pancreatic cancer tumor-bearing hu-SCID mice model was established. DC vaccination was performed to investigate tumor inhibition effects. **Results:** Higher expressions of PD-L1 were detected in pancreatic carcinoma than in normal pancreatic tissue ($P < 0.001$) detected by immunohistochemistry examination. In the T cell reaction study, IFN- γ production is much higher in the PD-L1 knocking down group than that in the other two control groups ($P < 0.001$). *In vivo*, PD-L1 knocking down combined with DC vaccination could significantly prevent tumor growth in the hu-SCID model. **Conclusion:** PD-L1 is expressed higher in pancreatic cancer than in normal pancreatic tissue. Suppressing PD-L1 expression in cancer cells during DC vaccination might be a more efficient strategy in immunotherapy for pancreatic cancer.

[Key words] pancreatic cancer; RNAi; PD-L1; DC vaccine

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(01):0040-0043, 79]

[基金项目] 国家自然科学基金(81302146);中国博士后基金(2016M591913);江苏省青年医学人才(QNRC2016732);江苏省自然科学基金(BK20161225);江苏省卫生计生委科研课题(H201620);苏州市科技计划(SYS201539)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: dechunli.soochowedu@yahoo.com

程序性死亡受体配体1(programmed death receptor ligand 1, PD-L1)是免疫共刺激分子B7超家族的重要成员之一。PD-L1与其受体PD-1结合后向T细胞传递抑制性信号,是导致肿瘤免疫逃逸的重要原因,PD-L1主要传递抑制性信号而非刺激性信号^[1]。同时,PD-1/PD-L1信号通路抑制树突状细胞疫苗(DC疫苗)的治疗作用。本研究通过RNA干扰技术敲减人胰腺癌Panc-1细胞中PD-L1的表达,研究靶向PD-L1分子的RNAi对DC疫苗治疗胰腺癌是否具有协同增强作用。

1 材料和方法

1.1 材料

人低分化胰腺癌细胞株Panc-1(中科院上海生命科学研究院),高糖DMEM培养基(Gibco公司,美国),胎牛血清(杭州四季青公司)。PD-L1抗体以及羊抗鼠二抗(Abcam公司,美国)。免疫组化SP试剂盒(福建迈新生物公司)。SCID小鼠(上海Slaccas实验动物公司)。逆转录试剂盒以及实时定量PCR所用SYBR Premix Ex Taq试剂(TaKaRa公司,日本)。Western blot试剂盒(赛默飞世尔公司,美国),ELISA试剂盒(上海酶研生物科技有限公司)。抗CD8单克隆抗体、分选磁珠和MACS分离柱(Miltenyi Biotec公司,德国)。

1.2 方法

1.2.1 PD-L1分子在人胰腺癌组织中的表达

收集2010年12月—2012年12月间苏州大学附属第一医院普通外科接受根治性手术切除的42例胰腺癌患者标本。本研究方案经苏州大学附属第一医院伦理委员会批准,对入组病例均在术前签署知情同意书。患者入组前均未接受过任何化疗、放疗和免疫治疗等治疗干预手段。无菌条件下切取肿瘤组织及尽量远离肿瘤的胰腺组织各1块,以10%福尔马林液浸泡后石蜡包埋,4 μm厚连续切片,链霉素抗生物素蛋白-过氧化酶(streptavidin-peroxidase, S-P)法免疫组化染色,PD-L1稀释度为1:100,二氨基联苯胺显色,苏木素复染,梯度酒精脱水干燥,二甲苯透明,中性树脂封固。阳性判断标准:PD-L1蛋白以细胞膜或胞浆有棕黄色细颗粒为阳性,参照Giatromanolaki等^[2]报道的方法,根据染色强度分为阴性、弱、中、强阳性,胞浆内阴性或弱阳性表达计为1分,胞浆内中阳性或强阳性表达但细胞数少于5个视野总细胞数的平均值计为2分,胞浆内中阳性或强阳性表达且阳性表达细胞数大于5个视野总细胞

数的平均值计为3分,2分以下为低表达,2分以上为高表达。

1.2.2 稳定低表达PD-L1胰腺癌细胞株的建立

Panc-1细胞采用高糖DMEM培养基+10%胎牛血清常规培养。PD-L1分子的RNA干扰慢病毒载体LV-PD-L1-shRNA为本课题组前期构建,该载体转染Panc-1细胞后,实时定量逆转录聚合酶链反应(RT-qPCR)检测PD-L1分子mRNA水平,Western blot检测PD-L1蛋白表达,证实PD-L1分子被成功敲减^[3],该组细胞命名为Panc-1/PD-L1-RNAi。空载体病毒转染设为对照组命名为Panc-1/LV-Control。

1.2.3 检测CD8⁺T细胞体外抗肿瘤免疫反应

①CD8⁺T细胞及成熟DC的制备:人类外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)采用Ficoll-Hypaque平衡密度梯度离心法提取,由江苏省临床免疫研究所提供。CD8⁺T细胞纯化采用免疫磁珠阳性选择法从PBMCs中提取,CD8⁺T细胞经流式细胞仪检测纯度均在95%以上。同法从PBMDs中纯化CD14⁺单核细胞,采用经典的方法制备成熟DC:CD14⁺单核细胞在含粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF, 25 ng/mL)和白介素-4(IL-4, 500 U/mL)的培养基中培养4 d,第5天加入肿瘤坏死因子α(TNF-α)再培养2 d,收获DC。

②T细胞反应实验:3组肿瘤细胞Panc-1、Panc-1/PD-L1-RNAi和Panc-1/LV-Control分别用丝裂霉素C 50 mg/mL预处理30 min,然后用PBS洗3次,以抑制肿瘤细胞增殖。肿瘤细胞、成熟DC和CD8⁺T细胞按照每孔 5×10^4 、 4×10^5 、 8×10^4 的比例接种于96孔板,每组设3个复孔。每组细胞均在含10%胎牛血清的DMEM培养基中培养72 h,取培养液上清,用于检测CD8⁺T分泌干扰素-γ(IFN-γ)的差异。

③ELISA检测培养液中IFN-γ表达水平:按照Wang等^[4]报道的方法单克隆抗体包板过夜,配置标准品,加样,封闭,洗板;加辣根过氧化物酶(HRP)反应30 min后,洗板;加四甲基联苯胺(TMB)液,避光反应10 min;加硫酸终止,酶标仪450 nm下读数;绘制标准曲线,算出样品浓度,再根据所取样本量换算为培养液中的IFN-γ含量。

1.2.4 人源化SCID小鼠体内实验

①人源化SCID小鼠荷瘤模型的建立:动物实验方案符合医学伦理并由苏州大学医学伦理委员会通过,SCID小鼠饲养于苏州大学实验动物中心SPF级饲养室。人源化小鼠的构建按照本课题组曾经报道的方法^[5],即环磷酰胺按照40 mg/(kg·d)剂

量连续4 d腹腔内注射 SCID 小鼠以抑制造血。SCID 小鼠经尾静脉注射 PBMC 1×10^7 个/只小鼠建立人源化 SCID 小鼠。ELISA 检测小鼠外周血中人 IgG 的浓度以确认人源化小鼠模型构建成功。4 周后,3 组肿瘤细胞 Panc-1、Panc-1/PD-L1-RNAi 和 Panc-1/LV-Control 分别以 2×10^4 个/只 100 μ L 体积皮下注射小鼠腹腔建立胰腺癌皮下移植瘤模型,每组 12 只小鼠。

②DC 疫苗治疗实验:前述已建立的 3 组 Panc-1、Panc-1/PD-L1-RNAi 和 Panc-1/LV-Control 人源化 SCID 小鼠荷瘤模型,每组 12 只。皮下注射肿瘤细胞 4 周后,每组再随机分为 2 个亚组,每个亚组 6 只。每组中的 1 个亚组接受 DC 疫苗治疗,即瘤内注射 DC 疫苗 1×10^6 个/只,而另外的亚组作为空白对照。治疗组每周 1 次瘤内注射,连续 4 周。记录肿瘤大小,并以简易公式计算肿瘤体积(长径 \times 短径 $^2 \times 0.5$)。DC 疫苗治疗 5 周后处死小鼠。

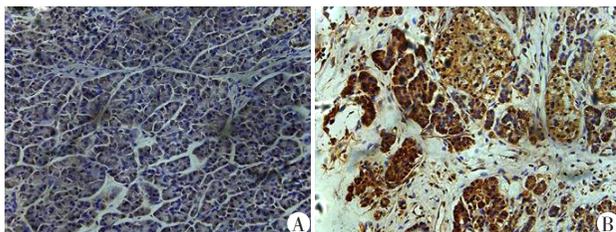
1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析。正态计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多样本均数比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)并采用 LSD 检验进行两两比较,计数资料比较采用 χ^2 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 免疫组化检测 PD-L1 在胰腺癌组织的表达与分布

组织中 PD-L1 阳性着色主要位于肿瘤细胞的胞膜和胞浆,为棕黄色(图 1)。胰腺癌中 PD-L1 阳性率为 64.3%,高表达例数占 47.6%,低表达例数占 16.7%。而胰腺组织中 PD-L1 阳性率为 14.3%,几乎均为低表达,胰腺癌和胰腺组织中 PD-L1 表达差异有统计学意义(表 1)。



PD-L1 分布在细胞的胞浆和胞膜。A:胰腺组织中低表达;B:胰腺癌中高表达。

图 1 胰腺癌和胰腺组织 PD-L1 表达免疫组化染色(SP \times 200)
Figure 1 PD-L1 expression in pancreatic cancer and normal tissue detected by immunohistochemistry (SP \times 200)

表 1 免疫组化检测 PD-L1 表达

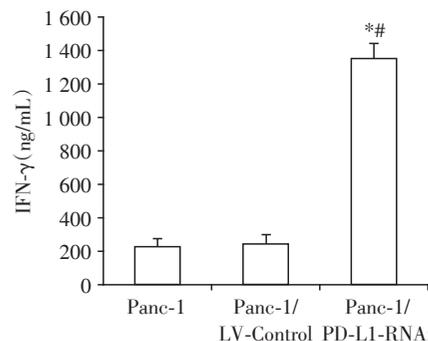
Table 1 PD-L1 expression detected by immunohistochemistry [n(%)]

组别	PD-L1		
	-	+	++
胰腺癌	15(35.7)	7(16.7)	20(47.6)
对照组	36(85.7)	5(11.9)	1(2.4)

$\chi^2=22.011, P < 0.001$ 。

2.2 T 细胞反应实验检测细胞上清 IFN- γ 表达水平

不同组别的肿瘤细胞 Panc-1、Panc-1/PD-L1-RNAi 和 Panc-1/LV-Control 分别与 DC 和 CD8 $^+$ T 细胞共同培养后,检测培养上清中的 IFN- γ 表达水平。结果提示 Panc-1/PD-L1-RNAi 组的培养上清中 IFN- γ 表达水平[(1 350 \pm 89)ng/mL]明显高于 Panc-1 组[(230 \pm 45)ng/mL]和 Panc-1/LV-Control 组[(245 \pm 54)ng/mL,图 2]。Panc-1/PD-L1-RNAi 组与 Panc-1 组比较,差异有统计学意义($P < 0.001$),Panc-1/PD-L1-RNAi 组与 Panc-1/LV-Control 组比较,差异有统计学意义($P < 0.001$)。



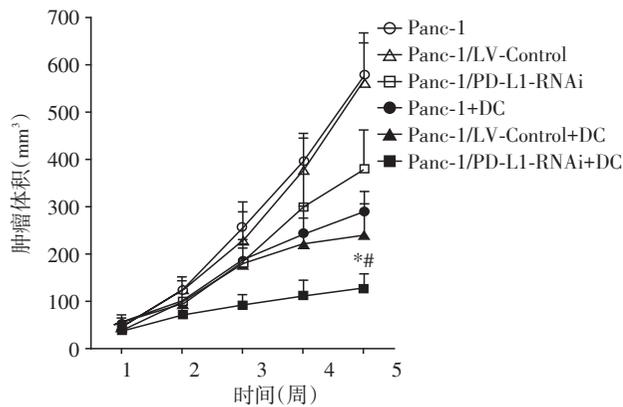
与 Panc-1 组比较,* $P < 0.001$;与 Panc-1/LV-Control 组比较,* $P < 0.001$ 。

图 2 IFN- γ 在培养上清中的表达水平

Figure 2 IFN- γ expression in the cultural supernatant

2.3 人源化 SCID 小鼠体内荷瘤实验

相同组肿瘤细胞建立的荷瘤鼠模型中,经 DC 疫苗治疗的亚组比不经治疗的亚组的肿瘤生长受到抑制(图 3)。对于 Panc-1/PD-L1-RNAi 细胞建立的荷瘤模型可以看出,DC 疫苗治疗组肿瘤生长受到抑制,Panc-1/PD-L1-RNAi+DC 组肿瘤大小明显小于 Panc-1/PD-L1-RNAi 组,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。换个分析角度,同样是经 DC 疫苗治疗的各组,PD-L1 表达敲减组 Panc-1/PD-L1-RNAi+DC 的肿瘤生长与 Panc-1+DC 组比较受到明显抑制,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。敲减 PD-L1 表达与应用 DC 疫苗治疗胰腺癌皮下移植瘤具有协同作用。



与Panc-1/PD-L1-RNAi组比较,* $P < 0.01$;与Panc-1+DC组比较,* $P < 0.01$ 。

图3 人源化SCID小鼠肿瘤生长曲线

Figure 3 Tumor growth in hu-SCID mice model

3 讨论

肿瘤免疫治疗成为继手术、放疗、化疗、分子靶向治疗后的最有希望能成功治愈肿瘤的手段,是肿瘤治疗研究的重要领域,近几年更是取得了重大进展。肿瘤免疫治疗是指激发和增强机体的免疫功能,以达到控制和杀灭肿瘤细胞的目的^[6]。T淋巴细胞是机体抗肿瘤免疫应答的核心^[7],其中肿瘤特异性CD8⁺T细胞是最重要的效应细胞^[8-9]。然而肿瘤微环境中存在多种机制抑制CD8⁺T细胞的免疫应答,使CD8⁺T细胞处于“免疫无能”状态,不能发挥有效的杀伤肿瘤作用^[10-12]。肿瘤细胞通过异常过表达的负性共刺激分子(如PD-L1),与CD8⁺T细胞表面对应的分子受体(如PD-1)结合,进而削弱CD8⁺T细胞的抗肿瘤效应,诱导免疫逃逸^[13-14]。因此,抑制PD-1/PD-L1信号途径,从而有效激活肿瘤微环境中CD8⁺T细胞的抗肿瘤免疫应答是治疗肿瘤的新思路。

除此之外,PD-1/PD-L1信号通路还可以抑制DC疫苗的治疗作用。已有学者报道了阻断PD-L1信号可以有效增强DC介导的抗肿瘤免疫效应,从而激活CD8⁺T细胞下调表达IL-10等促肿瘤细胞因子,而上调表达IL-2和IFN- γ 等抑制肿瘤细胞因子。抑制PD-L1信号可以促进DC的成熟和增殖以及IL-12的分泌,抑制T细胞功能受损,激活T细胞的抗肿瘤效应^[5]。

在本研究中,首先经免疫组化证实在胰腺癌组织中PD-L1呈高表达,然后以高表达PD-L1的胰腺癌细胞株Panc-1为研究对象,利用慢病毒载体转染的方法,以RNA干扰(RNAi)的手段建立稳定低表达PD-L1的胰腺癌细胞株Panc-1/PD-L1-RNAi。在

体外实验中,成熟DC、纯化的CD8⁺T细胞和胰腺癌细胞共同培养,检测上清中IFN- γ 的表达水平,发现胰腺癌细胞PD-L1表达敲减后,在DC疫苗的作用下,CD8⁺T细胞上调IFN- γ 的表达。IFN- γ 是公认的具有极强抗肿瘤作用的细胞因子。在人源化SCID小鼠的体内实验中发现,DC疫苗联合敲减肿瘤细胞的PD-L1对抑制肿瘤生长具有显著的协同作用。

以免疫卡控点PD-L1为靶点免疫治疗成为最近抗肿瘤免疫的热点,本研究以RNA干扰的手段敲减胰腺癌细胞PD-L1的表达,联合DC疫苗治疗胰腺癌,为胰腺癌的免疫治疗提供了新的思路。

【参考文献】

- [1] Blank C, Brown I, Peterson AC, et al. PD-L1/B7H-1 inhibits the effector phase of tumor rejection by T cell receptor (TCR) Transgenic CD8⁺T cells[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(3):1140-1145
- [2] Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Sivridis E, et al. Relation of hypoxia inducible factor 1 α and 2 α in operable non-small cell lung cancer to angiogenic/molecular profile of tumours and survival[J]. *Brit J Cancer*, 2001, 85(6):881-890
- [3] 赵鑫,张光波,干文娟,等.靶向程序性死亡因子-1配体的RNA干扰慢病毒载体构建及人胰腺癌稳转细胞株的建立[J]. *中华实验外科杂志*, 2013, 30(3):629
- [4] Wang X, Zhao X, Feng C, et al. IL-36 γ transforms the tumor microenvironment and promotes type 1 lymphocyte-mediated antitumor immune responses[J]. *Cancer Cell*, 2015, 28(3):296-306
- [5] Yan G, Hong X, Zhang XG. Vaccination with immature dendritic cells combined with CD40 mAb induces protective immunity against B lymphoma in hu-SCID mice[J]. *Biomed Pharmacother*, 2010, 64(7):487-492
- [6] Tang H, Qiao J, Fu YX. Immunotherapy and tumor microenvironment[J]. *Cancer Lett*, 2016, 370(1):85-90
- [7] Gajewski TF, Schreiber H, Fu YX. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment[J]. *Nat Immunol*, 2013, 14(10):1014-1022
- [8] Shalpour S, Fontburgada J, Caro GD, et al. Immunosuppressive plasma cells impede T cell-dependent immunogenic chemotherapy[J]. *Nature*, 2015, 521(7550):94-128
- [9] Deguine J, Breart B, Lemaître F, et al. Intravital imaging reveals distinct dynamics for natural killer and CD8(+)T cells during tumor regression[J]. *Immunity*, 2010, 33(4):632-644

(下转第79页)

为主,这一筛查方法有其局限性,部分肺结核患者并无明显可疑症状不能及时发现;肺结核是慢性传染病,病程较长,部分病例需纳入不同年度患病率统计,致使患病率差异不明显;也与调查点人群发病率处于较低水平有关。受三者影响,队列人群总体的标化患病率也无明显差异。

2013年队列人群标化发病率和65岁以上老年人发病率均高于2014年,两者间有关联性,表明老年人群对总体发病的影响较大。老年人群一直是结核病重点关注的人群之一^[3],这与老年人体质下降有关,其肺结核的症状及胸片表现不典型、并发症较多且经常合并其他疾病、治疗效果不理想,使其成为结核病防控领域的重点与难点,调查显示65岁以上老年人群年均患病率308.07/10万,略高于国内相关研究结果^[4]。重点人群病例以65岁以上老年人和既往肺结核患者为主。既往结核患者患病率最高,年均达10 863.51/10万,由于化疗药物的不良反应以及患者的依从性等原因导致患者完成疗程或治愈后会出现一定的复发率,这也是肺结核难以控制的重要原因之一,为此,有研究者建立了复发影响因素预测模型^[5-6],用于判断患者抗结核治愈后的复发可能性。糖尿病患者是肺结核高危人群,本调查糖尿病患者结核病年均患病率130.25/10万,是一般人群的3.61倍,与糖尿病患者患肺结核的危险度约为普通人群的2~5倍^[7]。

可疑症状中肺结核病例检出率2013年高于2015年,体现出了主动筛查的成效,症状调查使人群中一些有肺结核可疑症状的患者及早被发现、诊断和治疗,人群检出率逐步下降并处于较低水平。这一成效主要体现在重点人群上,重点人群病例占比近90%,表明重点人群主动筛查相较一般人群而

言,针对性更强,意义更大。

在检出效能上,2013、2014两年间主动筛查和被动发现两种模式的人群肺结核发现率无明显差异,提示了两种方法应互为补充,而不是相互替代的关系。2015年主动筛查模式的发现率低于被动发现模式,主动筛查模式3年间发现率呈逐年下降趋势,都进一步说明随着筛查时间延续,潜在病例不断被发现和清除、人群发病减少,主动筛查的效果也趋于下降。

综上所述,主动筛查与被动发现互为补充,是控制肺结核疫情的有效手段。主动筛查可在较短时间内提高患者发现率,今后可考虑间隔3年以上开展1次,以老年人和既往肺结核患者为重点。

[参考文献]

- [1] World Health Organization. Global tuberculosis control: WHO report 2015 [R]. Geneva: World Health Organization, 2015
- [2] 王黎霞,成诗明,陈明亭,等. 2010年全国第五次结核病流行病学抽样调查报告[J]. 中国防痨杂志, 2012, 34(8):485-508
- [3] 吴妍,李琦. 老年肺结核的诊治现状与进展[J]. 中国防痨杂志, 2015, 37(9):975-978
- [4] 陈伟,李洋洋,成君. 我国三个县(区)≥65岁老年人口结核病患病情况的抽样调查分析[J]. 中国防痨杂志, 2015, 37(10):1061-1066
- [5] 伍小英,谭守勇,张晋昕. 初治涂阳肺结核治愈后近期复发预测模型[J]. 中国防痨杂志, 2010, 32(1):20-24
- [6] 高建华. 广西百色市初治肺结核治愈后复发危险因素初探[J]. 实用预防医学, 2015, 22(12):1479-1481
- [7] 薛卉,陈秀平. 肺结核合并糖尿病临床研究进展(综述)[J]. 中国城乡企业卫生, 2010, 25(1):42-43

[收稿日期] 2016-10-31

(上接第43页)

- [10] Schietinger A, Greenberg PD. Tolerance and exhaustion: defining mechanisms of T cell dysfunction [J]. Trends Immunol, 2014, 35(2):51-60
- [11] Chen JH, Perry CJ, Tsui YC, et al. Prostaglandin E2 and programmed cell death 1 signaling coordinately impair CTL function and survival during chronic viral infection [J]. Nat Med, 2015, 21(4):327-334
- [12] Michonneau D, Sagoo P, Breart B, et al. The PD-1 axis enforces an anatomical segregation of CTL activity that creates tumor niches after allogeneic hematopoietic stem cell

transplantation [J]. Immunity, 2016, 44(1):143-154

- [13] Feig C, Jones JO, Kraman M, et al. Targeting CXCL12 from FAP-expressing carcinoma-associated fibroblasts synergizes with anti-PD-L1 immunotherapy in pancreatic cancer [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(50):20212-20217
- [14] Palazón A, Martínezforero I, Teijeira A, et al. The HIF-1 α hypoxia response in tumor-infiltrating T lymphocytes induces functional CD137 (4-1BB) for immunotherapy [J]. Cancer Dis, 2012, 2(7):608-623

[收稿日期] 2017-10-18