

· 医药生物技术 ·

## 阿霉素抗 4T1 乳腺癌荷瘤小鼠的免疫调控机制

张楠<sup>1\*</sup>, 曹晓东<sup>2\*</sup>, 刘颖<sup>3</sup>, 杨冬冬<sup>3</sup>, 张子英<sup>3</sup>

1 内蒙古医科大学 公共卫生学院, 内蒙古 呼和浩特 010110

2 内蒙古医科大学 新药安全评价研究中心, 内蒙古 呼和浩特 010110

3 内蒙古医科大学 基础医学院, 内蒙古 呼和浩特 010110

张楠, 曹晓东, 刘颖, 等. 阿霉素抗 4T1 乳腺癌荷瘤小鼠的免疫调控机制. 生物工程学报, 2021, 37(7): 2522-2533.

Zhang N, Cao XD, Liu Y, et al. Immunomodulatory effect of adriamycin in mouse 4T1 model of breast cancer. Chin J Biotech, 2021, 37(7): 2522-2533.

**摘要:** 为了探讨阿霉素 (Adriamycin, ADM) 对 4T1 乳腺癌荷瘤鼠 BALB/c 的免疫调节作用, 采用定量蛋白质组学串联质量标签 (TMT) 标记技术检测 ADM 对 4T1 乳腺癌差异蛋白的影响, 利用多重数据库对差异蛋白进行生物信息学分析。根据蛋白质组学结果, 寻找差异蛋白中与免疫调节功能相关的靶点, 通过酶联免疫吸附测定 (Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 观察 ADM 对乳腺癌组织中 Th1 细胞 (Helper T cells 1, Th1) 和 Th2 细胞 (Helper T cells 2, Th2) 的影响; 通过流式细胞术分析 ADM 对 CD4<sup>+</sup> T 细胞、CD8<sup>+</sup> T 细胞和调节性 T 细胞 (Regulatory T cells, Tregs) 的影响; HE 染色观察 ADM 对 4T1 乳腺癌荷瘤鼠胸腺的改变。ADM 上调 170 种差异蛋白, 下调 58 种差异蛋白。有 73 种差异蛋白与免疫调控过程相关, KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 富集于细胞因子及受体相关的重要蛋白通路、白介素 17 (Interleukin 17, IL-17) 通路和癌症的转录调控通路。与免疫功能相关的差异蛋白与 CD4<sup>+</sup> T 细胞、CD8<sup>+</sup> T 细胞和 Tregs 细胞的功能有关, 而这些细胞的分型影响乳腺癌的预后。ADM 极显著升高白介素 2 (Interleukin 2, IL-2), CD4<sup>+</sup> T 细胞、CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞含量 ( $P < 0.01$ ), 显著降低 Tregs 细胞含量 ( $P < 0.05$ )。ADM 抗乳腺癌的免疫调节蛋白有 Ighm、Igkc、S100A8、S100A9 和 Tmsb4x。

**关键词:** 乳腺癌, 4T1 细胞, 蛋白质组学, 串联质量标签, 阿霉素

**Received:** August 27, 2020; **Accepted:** December 12, 2020

**Supported by:** National Natural Science Foundation of Inner Mongolia, China (Nos. 2020MS08136, 2020BS08015, 2020LH08041, 2018MS08077), Scientific Research Project of Inner Mongolia Autonomous Region, China (No. NJZZ18100), Science and Technology Million Project of Inner Mongolia Medical University (No. YKD2017KJBW007), Doctor Starting Fund of Inner Mongolia Medical University (No. YKD2018BSJJ005).

**Corresponding author:** Ziyang Zhang. Tel: +86-471-6657564; E-mail: 1609839488@qq.com

\*These authors contributed equally to this study.

内蒙古自治区自然科学基金 (Nos. 2020MS08136, 2020BS08015, 2020LH08041, 2018MS08077), 内蒙古自治区高等学校科学研究项目 (No. NJZZ18100), 内蒙古医科大学科技百万工程项目 (No. YKD2017KJBW007), 内蒙古医科大学博士启动金 (No. YKD2018BSJJ005) 资助。

网络出版时间: 2021-01-15

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20210114.1117.001.html>

# Immunomodulatory effect of adriamycin in mouse 4T1 model of breast cancer

Nan Zhang<sup>1\*</sup>, Xiaodong Cao<sup>2\*</sup>, Ying Liu<sup>3</sup>, Dongdong Yang<sup>3</sup>, and Ziyang Zhang<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Public Health of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, Inner Mongolia, China

<sup>2</sup> The Center for New Drug Safety Evaluation and Research of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, Inner Mongolia, China

<sup>3</sup> Basic Medical College of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, Inner Mongolia, China

**Abstract:** To explore the immunomodulatory effect of adriamycin on 4T1 breast cancer. We used a tandem mass tag-based quantitative proteomic method to detect differential proteins in breast cancer tissues, and multiple bioinformatics databases to analyze the differentially expressed proteins in the proteome. Also, we used enzyme-linked immunosorbent assay to detect the effects of adriamycin on helper T cells 1 and 2 in breast cancer tissues, and flow cytometry to detect CD4<sup>+</sup> T cells, CD8<sup>+</sup> T cells and regulatory T cells. We discovered the immunomodulatory targets of adriamycin in differential proteins. In total 170 differential proteins were significantly up-regulated, whereas 58 were markedly down-regulated. In addition, 73 proteins were involved in immune regulation. Kyoto encyclopedia of genes and genomes enriched important protein pathways related to cytokines and factor receptors, interleukin 17 pathway and cancer transcriptional regulatory pathways. These pathways and important differential proteins related to immunomodulatory functions were ultimately regulated by adriamycin on CD4<sup>+</sup> T cells, CD8<sup>+</sup> T cells and regulatory T cells, thereby affecting the prognosis of breast cancer. Moreover, adriamycin significantly increased interleukin 2, CD4<sup>+</sup> T and CD8<sup>+</sup> T ( $P < 0.01$ ) and markedly reduced regulatory T cells ( $P < 0.05$ ). The function of adriamycin against triple-negative breast cancer was closely related to the immunoregulation process of the differential proteins Ighm, Igkc, S100A8, S100A9 and Tmsb4x. Adriamycin could regulate the content of helper T cells 1 cytokines, CD4<sup>+</sup> T and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in breast cancer and reduce the number of regulatory T cells to produce immunomodulatory effects.

**Keywords:** breast cancer, 4T1 cell, proteomics, tandem repeat sequences, adriamycin

乳腺癌是全球第 2 大高发癌，死亡率在全球排第 5 位，是女性最常见的恶性肿瘤之一，且发病率趋于年轻化，并呈快速增长的趋势，给广大女性造成了严重困扰<sup>[1-2]</sup>。三阴性乳腺癌 (Triple negative breast cancer, TNBC) 在诊断初期就合并远处器官转移，患者的存活率仅为 23%<sup>[3]</sup>，TNBC 无合适的内分泌治疗靶点<sup>[4]</sup>。机体可以通过调节免疫功能产生抗肿瘤作用；但是肿瘤也可以通过形成特殊免疫抑制微环境逃避机体免疫系统的识别和攻击，产生免疫逃逸<sup>[5]</sup>，而免疫调节治疗 TNBC 具有相对较好的预后<sup>[6]</sup>。因此，免疫治疗 TNBC 已成为国际乳腺癌研究领域的新热点<sup>[7]</sup>。肿瘤免疫微环境主要由免疫细胞和免疫细胞因子构成。T 细胞包括辅助性 T 细胞 (Helper T cells, Th) 和细胞毒性 T 细胞 (Cytotoxic T cells, CTL)，Th 和 CTL 亚群重要的标记物是 CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup>，徐广伟等发现乳腺癌组 CD4<sup>+</sup> T 细胞降低表明患者预后不佳<sup>[8]</sup>。Th 按功能主要分为 Th1 和 Th2，

其中 Th1 主要分泌白细胞介素-2 (Interleukin-2, IL-2)、肿瘤坏死因子  $\alpha$  (Tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、干扰素  $\gamma$  (Interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ ) 等细胞因子介导抗肿瘤的细胞免疫应答，而 Th2 则主要分泌白介素 10 (Interleukin 10, IL-10) 等介导体液免疫应答。

阿霉素 (Adriamycin, ADM) 为细胞周期非特异性抗乳腺癌药，可直接插入 DNA 的双螺旋链，发挥解链的作用，抑制 DNA 聚合酶的活性从而抑制 DNA 及 RNA 的合成，对癌细胞各期均有杀伤作用，是 TNBC 的常规基础化疗药<sup>[9-10]</sup>。目前 ADM 抗乳腺癌的药理作用已经明确，但其抗乳腺癌的相关免疫调节作用分子机制未阐明清楚，由此有必要全面研究 ADM 抗 TNBC 免疫调节作用机制。本研究在小鼠体内复制 TNBC，以期揭示 ADM 抗 TNBC 的免疫调控作用。本课题应用蛋白质组学筛选 ADM 对 4T1 乳腺癌的免疫调节作

用靶点,并通过检测外周血细胞分型、Th1 和 Th2 含量,明确 ADM 对 4T1 荷瘤鼠的免疫调节作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 标本来源

BALB/c 健康雌性小鼠 20 只,分别接种乳腺癌 4T1 细胞  $1 \times 10^6$  个/mL 悬液,随机均分为两组。接种成瘤后一周开始腹腔注射 ADM 100 mg/mL,空白组给予同等剂量生理盐水,给药 1 周后取瘤组织进行 TMT 标记定量蛋白质组学检测。

### 1.2 主要试剂与仪器

盐酸阿霉素、DMSO,北京索莱宝科技有限公司;BALB/c 小鼠,许可证号:SCXK(京)2016-0002;BCA 试剂盒,碧云天;ELISA 试剂盒、白介素-2(IL-2)(批号:B265707)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )(批号:B288663)、白介素-10(IL-10)(批号:B299453)、干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )(批号:B298549),BioLegend 公司;TMT 标记试剂盒,Thermo 公司;三乙基碳酸氢铵(TEAB),Sigma 公司;DMEM 培养基、0.25% Trypsin-EDTA,Gibco 公司;FBS,ExCell Bio 公司;三氟乙酸,Sigma-Aldrich 公司;乙腈,Fisher Chemical 公司;二硫苏糖醇,Sigma 公司;尿素,Sigma 公司;甲酸,Fluka 公司;碘代乙酰胺,Sigma 公司;胰酶,Promega 公司;二甲苯、乙醇等均为国产试剂。

### 1.3 方法与步骤

#### 1.3.1 TMT 蛋白质组学检测方法

提取蛋白后,利用 BCA 试剂盒进行蛋白浓度测定。蛋白溶液使用二硫苏糖醇、碘代乙酰胺处理后,胰酶酶解,酶解的肽段根据 TMT 试剂盒操作说明标记肽段。肽段用高 pH 反向 HPLC 分级,色谱柱为 Agilent 300Extend C18 (5  $\mu$ m 粒径,4.6 mm 内径,250 mm 长)。肽段分级梯度为 8%–32%乙腈、pH 为 9,60 min 分离 60 个组分,随后肽段合并为 18 个组分,合并后的组分经真空冷冻干燥后进行后续操作。肽段用液相色谱流动相 A 相 (0.1% (V/V) 甲酸水溶液) 溶解后使用

EASY-nLC 1000 超高效液相系统进行分离。流动相 B 为含 0.1%甲酸的乙腈溶液,流速维持在 500 nL/min。肽段经由超高效液相系统分离后被注入 NSI 离子源中进行电离然后进 Orbitrap Fusion Lumos 质谱进行分析。二级质谱数据使用 MaxQuant (v1.5.2.8) 进行检索。检索参数设置:数据库为 Mus\_musculus\_10090\_SP\_20191115 (17 032 条序列),添加了反库以消除计算随机匹配造成的假阳性率 (FDR),并且在数据库中加入了常见的污染库,用于消除鉴定结果中污染蛋白的影响;酶切方式设置为 Trypsin/P。质谱鉴定到的肽段长度的分布符合质控要求后,分析质谱数据,使用 MoMo 分析 Motif;使用 InterProScan 注释 GO、Domain;使用 KAAS、KEGG Mapper 注释 KEGG;使用 Wolfpsort、CELLO 亚细胞定位;使用 Perl module 富集分析。

#### 1.3.2 ELISA 法检测癌组织中相关细胞因子的蛋白表达

取小鼠癌组织,加入预冷的 PBS,制成 10% 组织匀浆,3 000 r/min 离心 20 min,取上清液,保存于  $-20$   $^{\circ}$ C,按照试剂盒说明书检测组织中 IL-2、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  及 IL-10 的蛋白表达水平,绘制标准品曲线。在 96 孔板上加 100  $\mu$ L 稀释过后的一抗,2–8  $^{\circ}$ C 过夜。弃掉一抗,洗板 4 次。加入 1 $\times$ 样品稀释液,室温孵育 1 h。洗板 4 次,每孔加入 100  $\mu$ L 标准品或样品,适当摇晃,充分混匀,密封,室温孵育 2 h。洗板 4 次,每孔加入 100  $\mu$ L 酶标抗体,密封,室温孵育 1 h。洗板 4 次,每孔加入 100  $\mu$ L 稀释后的亲和素-HRP,密封,室温孵育 30 min。洗板 5 次。加 100  $\mu$ L 配制好的显色剂,避光孵育 30 min,板内颜色变为蓝色。每孔加入 100  $\mu$ L 终止液,板内溶液由蓝色变为黄色。5 min 内在酶标仪的 450 nm 读数测定  $OD_{450}$  值,根据绘制的标准曲线和样品  $OD_{450}$  值,计算样品含量。

#### 1.3.3 FCM 检测小鼠外周血中淋巴细胞的比例

小鼠眼眶取血 500–600  $\mu$ L 置于抗凝管中,

旋转抗凝管避免血液凝集,将 10 倍量的红细胞裂解液加入抗凝管中,轻摇抗凝管后 4 ℃ 静置 15 min。抗凝管中血液转入 15 mL 离心管中,1 000 r/min 离心 5 min。弃上清,再次加入 10 倍的红细胞裂解液,再次 1 000 r/min 离心 5 min。弃上清,吸至 EP 管中,加 1 mL PBS,轻轻吹打避免损伤细胞,1 000 r/min 离心 5 min。弃上清,加 150  $\mu$ L PBS 重悬细胞。所有组别的抗凝管分为两部分,一部分加入抗体 CD3-BV421、CD4-PE 和 CD25-FITC,另一部分加入抗体 CD3-BV421、CD8-PE,同时所有抗体均设置单染管,避光孵育 25–30 min。加 1 mL PBS 润洗后 1 000 r/min 离心 5 min。弃上清,加 100  $\mu$ L PBS 重悬后,上机检测。

#### 1.4 统计学方法

在 ADM/CON 两个样本中以 1.2 倍变化为差异阈值,两组间比较采用 *t* 检验,富集检验使用 Fisher's 检验。当  $P < 0.05$  时,以差异表达量变化超过 1.2 倍或 1/1.2 倍有统计学差异。FCM 和 ELISA 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 4T1 乳腺癌中 ADM/CON 差异蛋白分析

4T1 乳腺癌模型成功建立后,取乳腺癌 ADM

给药组/模型对照组 CON (ADM/CON) 癌组织 (见图 1A–B),利用 MaxQuant 软件在 IPI (International Protein Index) 数据库中检索质谱鉴定的数据,发现 ADM 上调 170 种蛋白,下调 58 种蛋白 (图 1C,表 1)。

### 2.2 差异表达蛋白的功能分类

#### 2.2.1 GO 二级注释分类

Gene Ontology (GO) 分析有 73 种蛋白参与免疫调控,与免疫调节有关的差异蛋白包括 Cyba、Mmp9、Vamp7、Fcer1g、Lbp、Ccr1、Ifi202、Itgal、Cybb、Cd36、Vtn、Ccr1、Clptm1、Zmiz1、Bst2、Ighm、Igkc、Ighm 等蛋白,其中 Ighm、Igkc 属于细胞间黏附分子,参与嘧啶代谢,与 Th1 和 Th2 细胞因子分泌、Th17 细胞分化有关 (图 2)。

#### 2.2.2 COG 功能分类

同源蛋白簇 (Clusters of orthologous groups of proteins, COG) 分析差异蛋白变化倍数较大的蛋白 Hist1h3b、H3-3a、H4c1、Kat7、Top2a 均归于染色质的结构和动力学 (Chromatin structure and dynamics); 下调差异蛋白变化倍数较大的 Tmsb4x 和 Tmsb10、Dmd 均起源于细胞运动 (Cell motility); 起源于蛋白质周转、翻译后修饰及分子伴侣的有 20 种,其中包括 Mmp8、Mmp9; COG 功能分类见图 3。

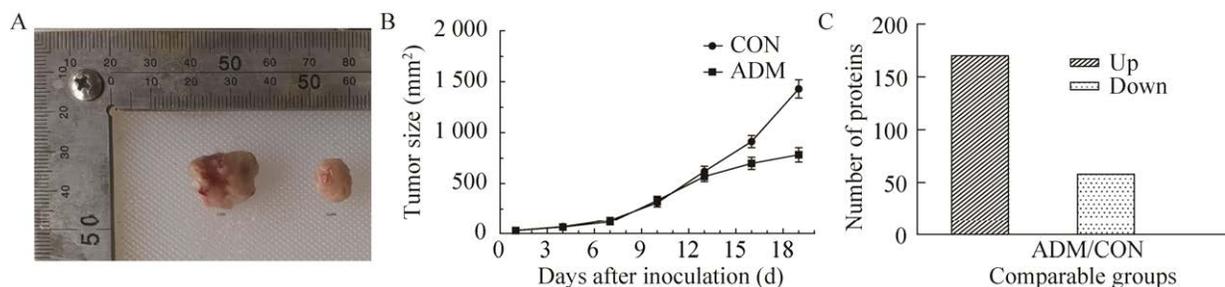


图 1 造模成功的 4T1 乳腺癌及差异表达蛋白数量

Fig. 1 Successful model of 4T1 and the number of differentially expressed proteins in breast cancer. (A) 4T1 breast cancer tissue. (B) The curve of tumor size. (C) Differential protein number of ADM/CON.

表 1 筛选 ADM/CON 的部分差异蛋白

Table 1 Differential proteins of ADM/CON

Protein description	ADM/CON ratio	Regulated type	Name
CD177 antigen	1.811	Up	Cd177
Histone H3.2	2.162	Up	Hist1h3b
Thymosin beta-4	0.392	Down	Tmsb4x
Histone H3.3	1.721	Up	H3-3a
Neutrophil collagenase	2.005	Up	Mmp8
Matrix metalloproteinase-9	1.557	Up	Mmp9
Bone marrow stromal antigen 2	1.410	Up	Bst2
Zinc finger MIZ domain-containing protein 1	1.364	Up	Zmiz1
Apoptosis regulator Bcl-2	1.201	Up	Bcl2
Matrix metalloproteinase-9	1.227	Up	Mmp9
Vesicle-associated membrane protein 7	1.289	Up	Vamp7
High affinity immunoglobulin epsilon receptor subunit gamma	1.214	Up	Fcer1g
Cytochrome b-245 light chain	1.235	Up	Cyba
Lipopolysaccharide-binding protein	1.213	Up	Lbp
C-C chemokine receptor type 1	1.232	Up	Ccr1
Interferon-activable protein 202	1.271	Up	Ifi202
Integrin alpha-L	1.352	Up	Itgal
Cytochrome b-245 heavy chain	1.241	Up	Cybb
Platelet glycoprotein 4	1.332	Up	Cd36
Vitronectin	1.391	Up	Vtn
Cleft lip and palate transmembrane protein 1 homolog	1.202	Up	Clptm1
Protein S100-A9	1.474	Up	S100a9
Protein S100-A8	1.384	Up	S100a8
Neutrophil gelatinase-associated lipocalin	1.296	Up	Lcn2
Stromelysin-1	1.398	Up	Mmp3
Myeloperoxidase	1.491	Up	Mpo
Integrin alpha-M	1.286	Up	Itgam
Macrophage colony	0.746	Down	Csf1r
Immunoglobulin kappa constant	0.689	Down	Igkc
Immunoglobulin heavy constant mu	0.734	Down	Ighm

Note: proteins associated with immune regulation against breast cancer.

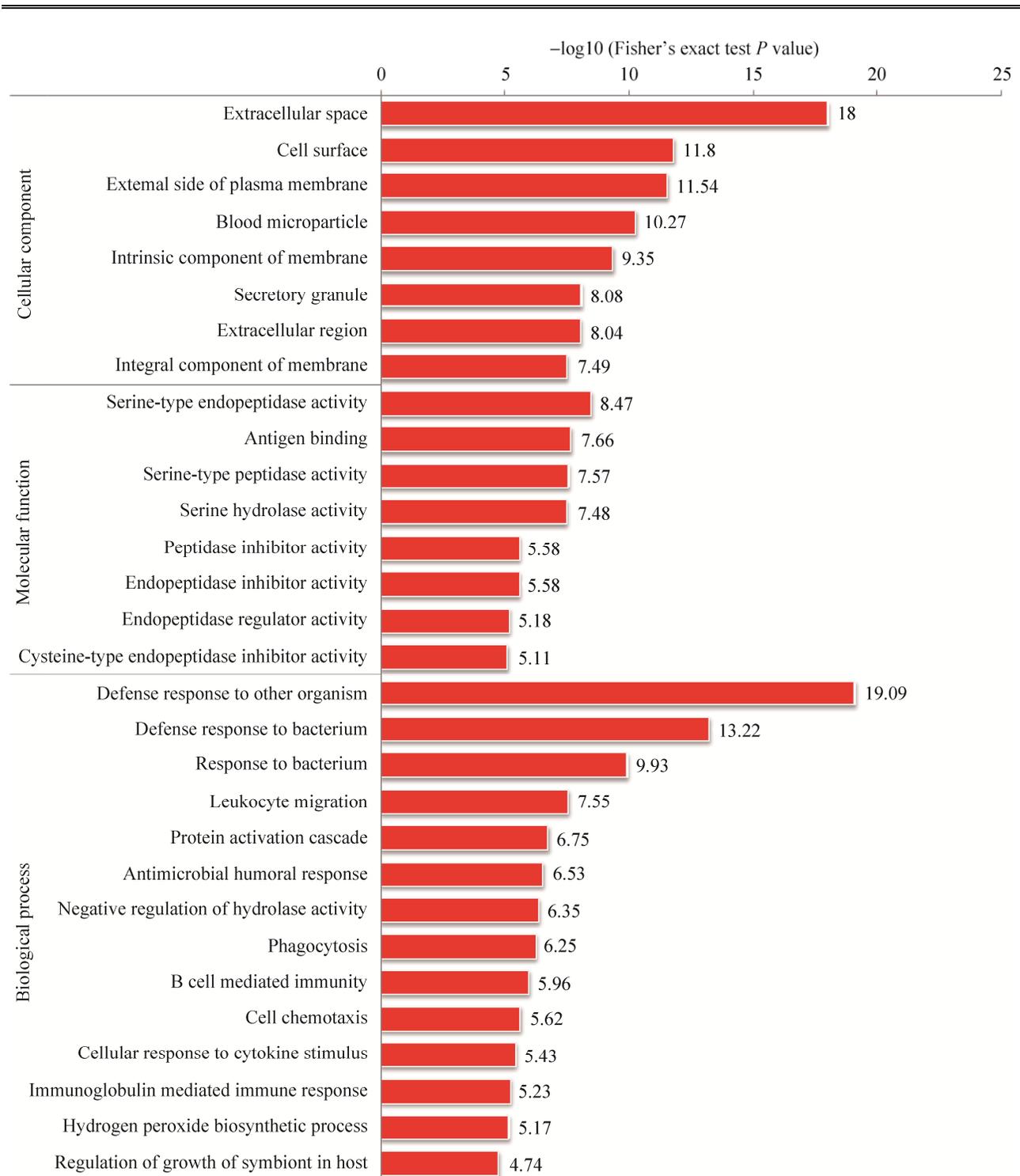


图 2 ADM/CON 差异表达蛋白在 GO 二级分类中统计分布图

Fig. 2 Statistical distribution diagram of ADM/CON differentially expressed proteins in GO secondary classification.

### 2.3 差异表达蛋白功能富集分析

差异蛋白富集的通路包括细胞因子及受体相关的重要蛋白通路、造血细胞谱系通路、自然杀

伤细胞介导的细胞毒性通路、癌症的转录调控通路。Mpo、Mmp3、H3-3a、Mmp9、Itgam 富集于癌症的转录调控；Mpo、Cyba、Itgb2、Cybb、

Igkc、Cd36、Mrc1、Ighm、Itgam 与吞噬体作用相关；上调的差异蛋白 S100a9、S100a8、Lcn2、Mmp3、Mmp9 富集于 IL-17 信号通路；上调的差异蛋白 Itgb2、Fcer1g、Itgal 富集于自然杀伤细胞介导的细胞毒性通路。上调蛋白 Ccr1 和下调蛋白 Csf1r 与细胞因子及因子受体相关的重要蛋白通路有关。上调的差异蛋白 Itgb2、Fcer1g、Itgal 富集于自然杀伤细胞介导的细胞毒性通路 (图 4)。

#### 2.4 ADM 对 Th1 和 Th2 的影响

与模型组相比,ADM 明显升高癌组织中 IL-2 的含量 ( $P<0.01$ ), 而明显降低 TNF- $\alpha$  的含量 ( $P<0.01$ ), IFN- $\gamma$  含量和 IL-10 含量变化无统计学

意义 ( $P>0.05$ ) (图 5)。

#### 2.5 ADM 对免疫细胞的影响

通过对小鼠外周血单核细胞进行 CD3-BV421、CD4-PE 和 CD25-FITC 染色标记, 以 CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> 双阳性表达代表 CD4<sup>+</sup> T 细胞, 以 CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> 三阳性代表 Tregs。横坐标 Q3 为 CD25<sup>+</sup> 表达区域, 纵坐标 Q1 为 CD4<sup>+</sup> 表达区域, Q2 为 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Tregs 共同表达区域 (图 6)。通过对小鼠外周血单核细胞进行 CD3-BV421 和 CD8-PE 以及 CD19-FITC 染色标记, 以 CD3<sup>+</sup> 为门, CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> 双阳性表达 Q1 代表 CD8<sup>+</sup> T 细胞 (图 7)。

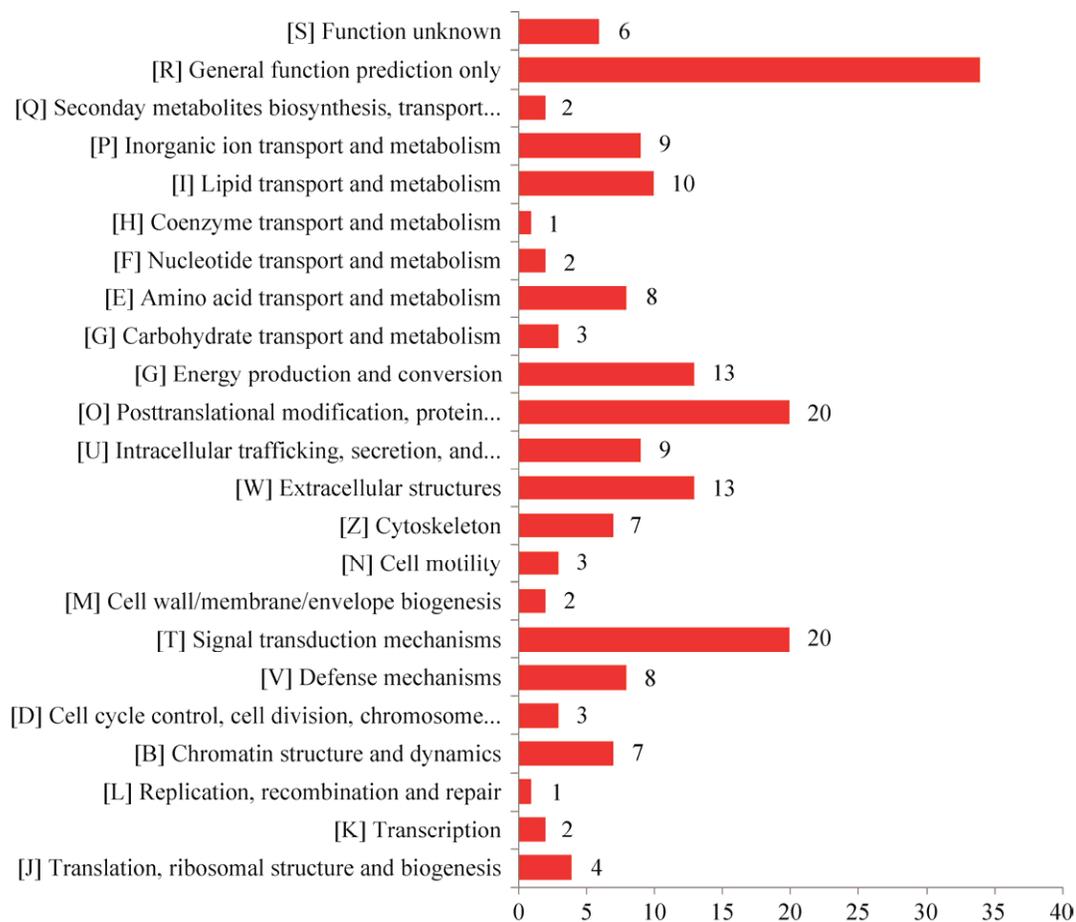


图 3 ADM/CON 差异表达蛋白的 COG 功能分类分布图

Fig. 3 Statistical distribution diagram of ADM/CON differentially expressed proteins in GOG classification.

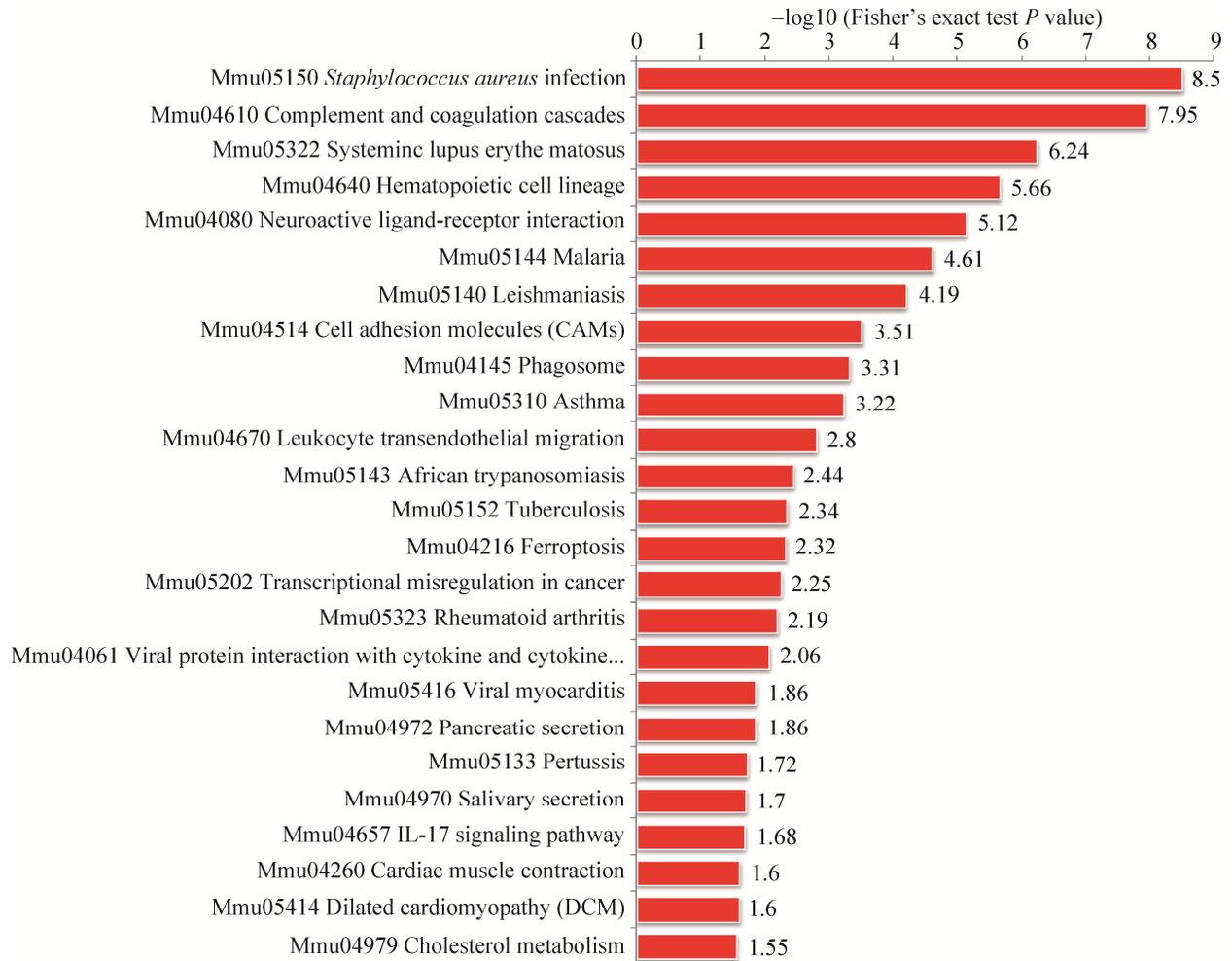


图 4 ADM/CON 差异表达蛋白在 KEGG 通路中富集图

Fig. 4 ADM/CON differentially expressed proteins in KEGG pathway.

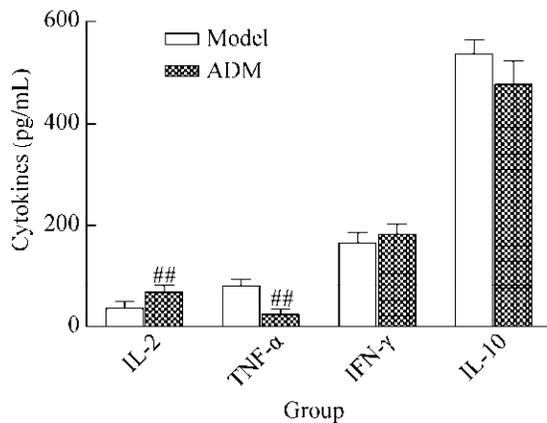


图 5 小鼠癌组织中 IL-2、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  和 IL-10 蛋白表达水平

Fig. 5 Expression levels of IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-10 in mouse cancer tissues. ##: compared with the model group,  $P < 0.01$ .

但与模型组相比, ADM 极显著升高  $CD4^+$  T 细胞和  $CD8^+$  T 细胞 ( $P < 0.01$ ), 显著降低 Tregs 细胞 ( $P < 0.05$ ), 见图 8。

### 3 讨论

鉴于人源性 TNBC 不能在具有免疫功能的小鼠体内构建动物模型, 所以国外多用于人类 TNBC 较接近的 4T1 进行造模研究乳腺癌的免疫调控机制。以 ADM 为基础的化疗方案能显著提高 TNBC 的病理完全缓解 (Pathological complete response, pCR) 率<sup>[11]</sup>, 说明 ADM 抗 TNBC 有效。因此我们有必要研究 ADM 抗 4T1 的免疫调节作用。本研究采用蛋白组学筛选 ADM 对 TNBC 的

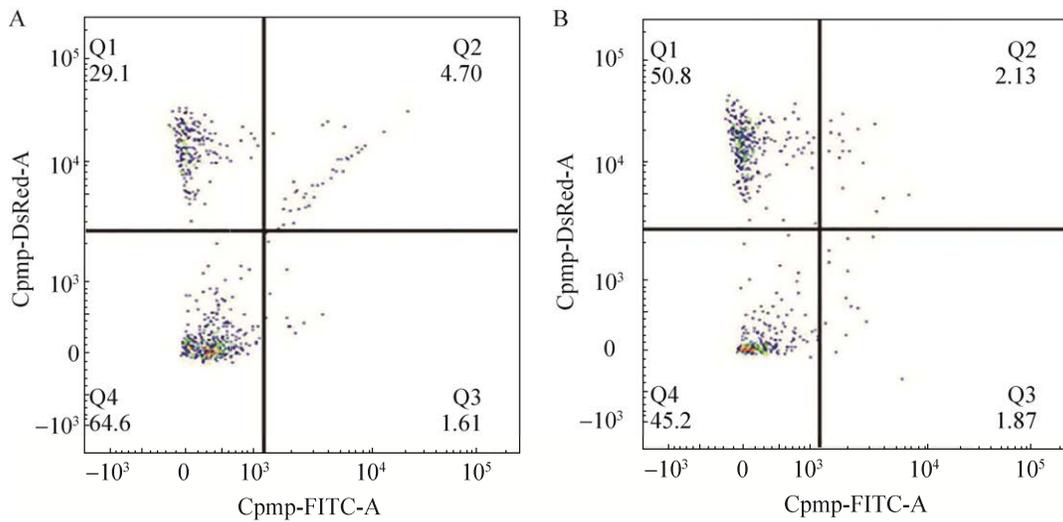


图 6 ADM 对小鼠外周血中  $CD4^+$  T 细胞与  $CD4^+ CD25^+$  Treg 细胞的影响

Fig. 6 Effects of ADM on  $CD4^+$  T cells and  $CD4^+ CD25^+$  Treg cells in peripheral blood of mice. (A) Model. (B) ADM.

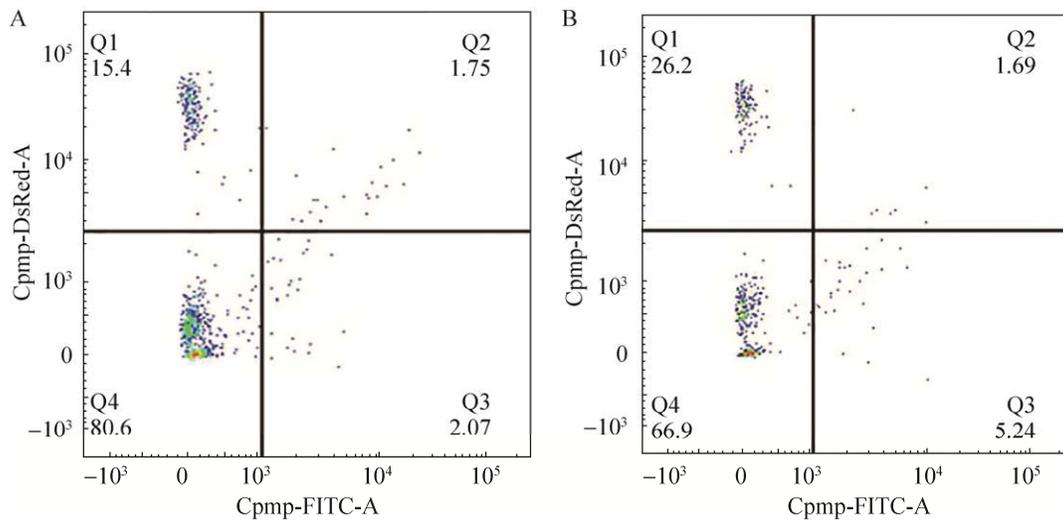


图 7 ADM 对小鼠外周血中  $CD8^+$  T 细胞的影响

Fig. 7 Effects of ADM on  $CD8^+$  T cells in peripheral blood of mice. (A) Model. (B) ADM.

免疫调节作用靶点, 有 73 种蛋白参与 ADM 抗乳腺癌的免疫调控作用, 这在以往文献中未提及。

ADM/CON 的差异蛋白阐释 ADM 参与 4T1 乳腺癌荷瘤鼠的免疫调节功能。上调的差异蛋白纤维蛋白 (原) Itgam 介导炎症驱动腺瘤增殖<sup>[12]</sup>, 启示 Itgam 可能与 TNBC 抗炎免疫调节作用相关。Ighm、Igc 属于细胞间黏附分子, 参与嘧啶代谢, 与 Th1 和 Th2 细胞因子分泌和 Th17 细胞分化有

关, 而 Th1 和 Th2 细胞因子为 Th 细胞分泌。本课题组前期研究也发现 ADM 能升高乳腺癌模型小鼠脾中 Th1 型 IL-2、TNF- $\alpha$  的含量。而本研究结果显示 ADM 可以升高乳腺癌组织中 IL-2 的蛋白含量, 降低 TNF- $\alpha$  的蛋白含量, 表达趋势与机体免疫差异及免疫微环境有关, 说明 ADM 参与调控乳腺癌的免疫微环境。

$CD4^+$  T 细胞和  $CD8^+$  T 细胞是机体免疫系统

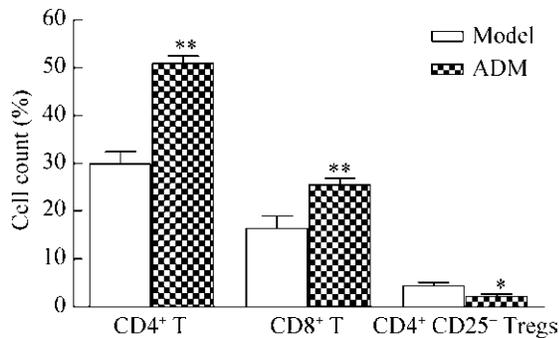


图 8 ADM 对小鼠外周血中 CD4<sup>+</sup>、Tregs 和 CD8<sup>+</sup> 细胞数量的影响

Fig. 8 Effects of ADM on changes of CD4<sup>+</sup> T cells, Tregs and CD8<sup>+</sup> T cells in peripheral blood of mice. \*: compared with the model group,  $P < 0.05$ , \*\*: compared with the model group,  $P < 0.01$ .

中的 Th 和 CTL 亚群重要的标记物, 参与抗乳腺癌的免疫调节作用。CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> 的 Treg 细胞通过产生免疫抑制功能来平衡机体的内环境。乳腺癌患者外周血中的 Treg 表达水平明显高于健康人群组, Treg 的表达促进了乳腺癌细胞的增殖。肿瘤会导致机体的 CD4<sup>+</sup> T 细胞和 CD8<sup>+</sup> T 细胞逐渐减少, 使得机体的免疫功能逐渐下降, 产生免疫逃逸。ADM 新辅助化疗可以提高乳腺癌患者 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞水平<sup>[13]</sup>。本研究发现 ADM 能够增加 4T1 乳腺癌荷瘤鼠的 Th 细胞 CD4<sup>+</sup> T、CD8<sup>+</sup> T 细胞的比例, 抑制肿瘤浸润 Treg 细胞, 增强机体抗肿瘤免疫, 从而抑制小鼠乳腺癌的发展与转移。

ADM 上调 4T1 的转录调控蛋白 Mpo 和 H3.3, 有研究表明卵巢癌原发性肿瘤活检中的 MPO 提高了 IL-17 对化学敏感性的指示值<sup>[14]</sup>, 而 IL-17 刺激 4T1 荷瘤鼠脾脏分泌 IL-12, 而 IL-12 则可诱导免疫细胞分泌 Th1 产生免疫调节作用。IL-17 通路中的 S100A8 和 S100A9 均为 S100 钙结合蛋白 (S100, a member of calcium binding proteins, S100/CaBP), 研究显示 S100A8 和 S100A9 在乳腺癌中高表达, 且预后较差<sup>[15]</sup>, S100A8/A9 在单核细胞和中性粒细胞中表达, 招

募炎性细胞, 促进肿瘤炎症微环境的发展<sup>[16]</sup>。本研究也通过 qPCR 验证 ADM 可以导致 4T1 乳腺癌免疫微环境中的 S100A8/A9 发生差异显著性变化。也有研究证实 TNBC 组织中 IL-17 的 mRNA 表达量明显高于正常乳腺组织, IL-17 增强 MCF-7、MDA-MB-231 乳腺癌细胞侵袭转移能力, 并与乳腺癌化疗的敏感性密切相关<sup>[17]</sup>, IL-17 是目前新发现的主要由 CD4<sup>+</sup> 记忆性 T 淋巴细胞、单核细胞等分泌的一种细胞因子, 腋窝淋巴结转移阳性及临床分期高的 TNBC 高表达 IL-17<sup>[17]</sup>。

综上所述, 细胞因子及因子受体、IL-17 通路均与乳腺癌相关, 也是 ADM 的作用靶点。由此推测细胞因子、IL-17 通路参与 TNBC 的免疫调控, 而本研究的 ELISA 结果和蛋白质组学结果也证实了 ADM 影响乳腺癌组织中 Th1 类因子, 且差异免疫蛋白富集于 IL-17 信号通路。

本研究还发现 ADM 能下调胸腺分泌 Tmsb4x, 而 Tmsb4x 促进 4T1 细胞的迁移及转移可能与上调 MMP2、MMP9 和 Sdf1 水平有关<sup>[18]</sup>, 因此 ADM 通过下调 Tmsb4x 产生抗 4T1 乳腺癌的免疫调节作用。qPCR 验证 ADM 可以显著下调 4T1 乳腺癌免疫微环境中的 Tmsb4x 基因。鉴于蛋白质组学筛选的 ADM 抗 4T1 乳腺癌的免疫蛋白的靶点较多, 结合与抗乳腺癌的免疫调节作用及免疫细胞分型结果发现与 ADM 密切相关的免疫调节蛋白为 Ighm、Igkc、S100A8、S100A9 和 Tmsb4x, 其中 Ighm、Igkc 富集于 Th1 和 Th2 分化通路, 而本研究也证实 ADM 可以调控乳腺癌中 Th1 的含量; S100A8、S100A9 富集于 IL-17 信号通路与 TNBC 免疫调控有关。细胞凋亡与免疫系统的发育、稳定状态及功能密切相关, 而本研究发现的差异蛋白 Bcl-2 是一种抗凋亡蛋白, Bcl-2 家族在 CD4<sup>+</sup> T 细胞的发育和发挥功能时必不可少, 参与免疫调节功能<sup>[19]</sup>。促凋亡蛋白和抗凋亡蛋白之间的失衡会导致多种癌症, 并与肿瘤的化疗和放疗抵抗有关。而敲低 Bcl-2 能增加 TNBC 细胞对 ADM 的敏感性<sup>[20]</sup>, 由此推测 ADM

上调 Bcl-2, 可能促使 4T1 细胞对其耐药; 但若是增加 Treg 淋巴细胞凋亡则可以抑制 4T1 免疫逃逸, 也说明 ADM 导致 Treg 细胞下调与促进其凋亡有关。ADM 到底是增加癌细胞表达 Bcl-2, 还是增加癌组织中 Treg 表达 Bcl-2 有待于进一步研究。

## 4 结论

分析 ADM/CON 所有蛋白质组学数据发现与 ADM 对乳腺癌免疫调节密切相关的蛋白为 Ighm、Igkc、S100A8、S100A9 和 Tmsb4x。且实验证实 ADM 能提高 IL-2, 升高 CD4<sup>+</sup> T 细胞、CD8<sup>+</sup> T 细胞, 降低 Tregs 细胞。本研究为寻找乳腺癌患者临床免疫治疗靶点提供了参考依据。

## REFERENCES

- [1] Albeshan SM, Mackey MG, Hossain SZ, et al. Breast cancer epidemiology in gulf cooperation council countries: a regional and international comparison. *Clin Breast Cancer*, 2018, 18(3): e381-e392.
- [2] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-32.
- [3] Berman AT, Thukral AD, Hwang WT, et al. Incidence and patterns of distant metastases for patients with early-stage breast cancer after breast conservation treatment. *Clin Breast Cancer*, 2013, 13(2): 88-94.
- [4] Cimino M A, Foote JB, Emena LA. Immune targeting in breast cancer. *Oncology*, 2015, 29(5): 375-385.
- [5] 张艳, 解伟, 张世伟, 等. 三阴性乳腺癌免疫治疗的研究进展. *生命科学*, 2019, 31(9): 879-885.  
Zhang Y, Xie W, Zhang SW, et al. Advances in immunotherapy for triple negative breast cancer. *Chinese Bull Life Sci*, 2019, 31(9): 879-885 (in Chinese).
- [6] Cyprian FS, Akhtar S, Gatalica Z, et al. Targeted immunotherapy with a checkpoint inhibitor in combination with chemotherapy: a new clinical paradigm in the treatment of triple-negative breast cancer. *Bosn J Basic Med Sci*, 2019, 19(3): 227-233.
- [7] 范东伟, 姚昌洋, 姚廷敬. 三阴性乳腺癌的研究进展. *医学综述*, 2018, 24(1): 71-75.  
Fan DW, Yao CY, Yao TJ. Research progress of triple negative breast cancer. *Med Recapit*, 2018, 24(1): 71-75 (in Chinese).
- [8] 徐广伟, 周姝, 任林广, 等. 乳腺癌患者外周血淋巴细胞 10 种表型的检测及其意义. *中国妇幼保健*, 2014, 29(9): 1427-1430.  
Xu GW, Zhou S, Ren LG, et al. Detection of 10 phenotypes of peripheral blood lymphocytes in patients with breast cancer and their significance. *Mater Child Health Care China*, 2014, 29(9): 1427-1430 (in Chinese).
- [9] Li RY, Cao ZJ, Issam M, et al. Immune response proteins as predictive biomarkers of doxorubicin-induced cardiotoxicity in breast cancer patients. *Exp Biol Med*, 2018, 243(3): 248-255.
- [10] Amy EC, Qian VW, Isaac C, et al. Jenkins phase I/II trial of combined pegylated liposomal doxorubicin and cyclophosphamide in metastatic breast cancer. *Clin Breast Cancer*, 2018, 18(1): e143-e149.
- [11] Liedtke C, Mazouni C, Hess K, et al. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol*, 2008, 26(8): 1275-1281.
- [12] Steinbrecher KA, Horowitz NA, Blevins E A, et al. Colitis-associated cancer is dependent on the interplay between the hemostatic and inflammatory systems and supported by integrin alpha(M) beta (2) engagement of fibrinogen. *Cancer Res*, 2010, 70(7): 2634-43.
- [13] 刘超, 杨丽萍, 程红, 等. 新辅助化疗初期局部进展期乳腺癌患者 T 淋巴细胞亚群水平变化及其意义. *实用癌症杂志*, 2019, 34(4): 627-629, 643.  
Liu C, Yang LP, Cheng H, et al. Changes and significance of T lymphocyte subsets in patients with locally advanced breast cancer at the early

- stage of neoadjuvant chemotherapy. *Practical J Cancer*, 2019, 34(4): 627-629, 643 (in Chinese).
- [14] Raoul A, Drosier, Robert Mechera, et al. MPO density in primary cancer biopsies of ovarian carcinoma enhances the indicative value of IL-17 for chemosensitivity. *BMC Cancer*, 2016, 16(1): 639-647.
- [15] Miller P, Kidwell KM, homas DT, et al. Elevated S100A8 protein expression in breast cancer cells and breast tumor stroma is prognostic of poor disease outcome. *Breast Cancer Res Treat*, 2017, 166(1): 85-94.
- [16] Gross SR, Sin CG, Barraclough R, et al. Joining S100 proteins and migration: for better or for worse, in sickness and in health. *Cell Mol Life Sci*, 2014, 71(9): 1551-1579.
- [17] Chen WC. Interleukin-17-producing cell infiltration in the breast cancer tumour microenvironment is a poor prognostic factor. *Histopathology*, 2013, 63(2): 225-233.
- [18] 马丽, 石荣珍, 邓九零, 等. 胸腺素  $\beta 4$  和  $\beta 10$  表达促进小鼠乳腺癌细胞转移. *中国药理学与毒理学杂志*, 2018, 32(7): 565-571.
- Ma L, Shi RZ, Deng JL, et al. Expression of thymosin 4 and 10 promotes metastasis of breast cancer cells in mice. *Chin J Pharmacol Toxicol*, 2018, 32(7): 565-571 (in Chinese).
- [19] Mingxue L, Dun W, He JH, et al. Bcl-XL: a multifunctional anti-apoptotic protein. *Pharmacol Res*, 2020, 151: 104547.
- [20] Touko I, Yuichi I, Tamio O, et al. Bcl-2 inhibition sensitizes triple-negative human breast cancer cells to doxorubicin. *Oncotarget*, 2018, 9(39): 25545-25556.

(本文责编 陈宏宇)