

肿瘤内分泌

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.002350

2型固有淋巴细胞的极化效应在乳腺癌中的研究

饶明月¹, 高陈林², 谭晓珍³, 徐 勇³

(1. 西南医科大学附属医院肿瘤科, 泸州 646000; 2. 西南医科大学附属医院内分泌科, 泸州 646000;

3. 泸州市心血管代谢病重点实验室, 泸州 646000)

【摘要】目的:探讨 2 型固有淋巴细胞(group 2 innate lymphoid cells, ILC2)及其转录调控因子和产物在乳腺癌中的作用。**方法:**收集正常人和乳腺癌患者(早期和晚期)的外周血。分离所有受试者的外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC),流式细胞术检测 PBMC 中 ILC2 的比例。从 PBMC 中提取总 RNA,检测调控 ILC2 发育的特异性转录因子(GATA3 和 ROR α)和 ILC2 产物(IL-13 和 IL-4)的基因表达水平,并检测血浆中 Th2 型细胞因子(IL-13、IL-4、IL-33 和 IL-10)的蛋白表达水平。用外源性 IL-13 和 IL-4 刺激 MCF-7 和 MDA-MB 231 癌细胞,以模拟乳腺癌患者体内 ILC2 的极化后效应:检测癌细胞的增殖活力;检测增殖及自噬信号分子蛋白表达的改变;流式细胞术和荧光显微镜观察细胞凋亡情况。**结果:**乳腺癌患者外周循环中的 ILC2 水平增高(正常组与早期组:0.019 6% vs. 0.028 9%, $P=0.008$;正常组与晚期组:0.019 6% vs. 0.027 3%, $P=0.032$);雌/孕激素表达状态是影响 ILC2 水平的重要因素($HR=0.436$, $P=0.038$)。GATA3、ROR α 、IL-13、IL-4、IL-33 和 IL-10 的表达随着肿瘤负荷的加重而增加($P<0.05$)。外源性 IL-13 和 IL-4 联合刺激可通过上调 ERK 1/2 和 pERK 1/2 来增强乳腺癌细胞的增殖活力($P=0.000$);联合刺激可诱导 MCF-7 和 MDA-MB 231 癌细胞的自噬信号分子表达($P=0.000$),还可诱导 MDA-MB 231 癌细胞的凋亡($P=0.000$),但对 MCF-7 细胞凋亡无明显诱导作用($P>0.05$)。**结论:**ILC2 在外周循环中比例增高和 ILC2 上下游因子表达增高与乳腺癌的发生发展有关。

【关键词】乳腺癌;2 型固有淋巴细胞;固有免疫;Th2 型细胞因子**【中图分类号】**R730.3**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2019-09-06

Polarization effect of group 2 innate lymphoid cells in breast cancer

Rao Mingyue¹, Gao Chenlin², Tan Xiaozhen³, Xu Yong³

(1. Department of Oncology, The Affiliated Hospital of Southwest Medical University;

2. Department of Endocrinology, The Affiliated Hospital of Southwest Medical University;

3. Luzhou Key Laboratory of Cardiovascular and Metabolic Diseases)

【Abstract】Objective: To investigate the role of group 2 innate lymphoid cells(ILC2) and its transcription factors and products in the breast cancer(BC). **Methods:** The peripheral blood from healthy subjects and BC patients(at early and advanced stage) was collected. The peripheral blood mononuclear cell(PBMC) was isolated and the level of ILC2 in PBMC was detected by flow cytometry. Total RNA was extracted from PBMC. The gene expression level of specific transcription factor(GATA3 and ROR α) and ILC2 production(IL-13 and IL-4), which regulated ILC2 development, was detected. The protein expression of T-helper 2 cytokine in serum(IL-13, IL-4, IL-33 and IL-10) were detected. Exogenous IL-13 and IL-4 were used to stimulate MCF-7 and MDA-MB 231 cancer cells, so as to simulate the polarization effect of ILC2 in BC patients; detecting the proliferation activity of cancer cells, detecting changes of protein expression of proliferation and autophagy signal factors; observing cell apoptosis via flow cytometry and fluorescence microscope. **Results:** ILC2 level in peripheral circulation of BC patients was increased(normal group vs. early stage group, 0.019 6% vs. 0.028 9%, $P=0.008$; normal group vs. advanced stage group, 0.019 6% vs. 0.027 3%, $P=0.032$). Estrogen/progesterone expression status was an important factor influencing ILC2 level($HR=0.436$, $P=0.038$). The expression of GATA3, ROR α , IL-13, IL-4, IL-33 and IL-10 was increased with tumor burden aggravation($P<0.05$). Combined stimulation of exogenous IL-13 and IL-4 was able to enhance the proliferation viability of BC cells by up-regulating ERK1/2 and pERK1/2($P=0.000$). Combined stimulation was able to induce the expression of autophagy signaling molecules of MCF-7 and MDA-MB 231 cells($P=0.000$) and to induce the

作者介绍: 饶明月, Email: nowitzki741@126.com,

研究方向: 内分泌代谢与肿瘤, 免疫与肿瘤病因。

通信作者: 徐 勇, Email: xywyll@aliyun.com。

基金项目: 泸州市心血管代谢病重点实验室资助项目。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20191118.1723.008.html>

(2019-11-19)

apoptosis of MDA-MB 231 cells ($P=0.000$), but it had no obvious induction for the apoptosis of MCF-7 cells ($P>0.05$). **Conclusion:** The increased proportion of ILC2 in peripheral circulation and the increased expression of up-and-down-stream factors of ILC2 is related to the oncogenesis and development of BC.

【Key words】breast cancer; group 2 innate lymphoid cells; innate immune; T-helper 2 cytokines

乳腺癌是全世界最常见的恶性肿瘤之一。2018 年乳腺癌新发病例数约占全部癌症总数的 11.6%, 已与肺癌并列第一^[1]。包括乳腺癌在内的多种实体肿瘤在病程中都将不可避免地发生进展, 其机制有待进一步发掘。2 型辅助性 T (T helper 2, Th2) 细胞因子中的白介素-13 (interleukin-13, IL-13) 和 IL-4 被认为在乳腺癌的进展和转移中起着重要作用, 并与预后不良有关^[2]。

共同淋巴祖细胞在特异性转录因子 GATA 结合蛋白 3 (GATA binding protein 3, GATA3) 和 RAR 相关孤儿素受体 α (retinoic acid-related orphan receptor- α , ROR α) 的调控下, 分化为 2 型固有淋巴细胞 (group 2 innate lymphoid cells, ILC2)^[3-4]。IL-33 和 IL-25 可促进 ILC2 的扩增和活化, 产生 IL-13、IL-4 和其他 Th2 型细胞因子, 以抵御蠕虫感染, 诱导炎症、过敏性疾病患者体内的 Th2 型免疫应答, 参与疾病的进程。在 Th2 型免疫应答中, Th2 型细胞因子的早期来源为 ILC2^[5-6]。ILC2 除在 Th2 型炎症性疾病中的重要作用, 胃癌和肺癌患者外周循环中 ILC2 水平增高并伴随调控 ILC2 生成的转录因子 (GATA3 和 ROR α) 和 Th2 型细胞因子产物 (IL-13 和 IL-4) 增高^[7-8], 这一改变被称为 ILC2 极化。IL-13 或 IL-4 不仅调控着 Th2 型免疫应答, 还可直接上调癌细胞抗凋亡蛋白的表达^[9], 增强卵巢癌细胞细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK) 信号^[10], 抑制饥饿诱导的肠癌细胞自噬^[11-12], 以促进肿瘤细胞的增殖和转移。此外, IL-13 和 IL-4 受体在乳腺癌组织中亦被激活和表达上调^[13]。

然而, ILC2 群体及其上下游因子在乳腺癌发生和病程中的状态尚未确定; ILC2 是否是乳腺癌发生或发展的危险因素, 需要用多变量回归分析检验。肿瘤患者外周循环中 ILC2 极化后, 是否可通过产生 IL-13 和 IL-4 以调节癌细胞增殖、凋亡和自噬信号通路参与乳腺癌的发展亦未见报道。本研究探讨了

ILC2 极化状态在不同病期乳腺癌患者及正常人中的差异, 以及 ILC2 极化后效应对乳腺癌细胞的影响。

1 材料和方法

1.1 患者和标本

本研究共纳入在西南医科大学附属医院诊断的 46 例乳腺癌患者 (2018 年 1 至 12 月)。所有患者均为女性, 年龄 34~69 岁。21 名女性健康志愿者作为正常对照纳入本研究, 年龄 31~63 岁。本研究得到所有受试者的知情同意。本研究经西南医科大学附属医院伦理委员会批准, 注册于中国临床试验注册中心 (ChiCTR1800014575)。纳入标准为组织学证实的乳腺癌瘤; 在血检前未给予任何抗肿瘤或免疫治疗; 患者预期存活时间 >12 周; 体力状况评分为 0~2 分; 主要器官功能基本正常。排除标准为: 病程中合并有急性慢性微生物感染、炎症、过敏、自身免疫性疾病、甲状腺功能亢进症、高血压和糖尿病的患者。根据美国国家综合癌症网络 (The National Comprehensive Cancer Network, NCCN) 分期标准, 将所有乳腺癌患者分为 2 个肿瘤负荷组: 早期组 (乳腺肿瘤最大径 ≤ 5 cm, 无或仅有同侧可活动的 I、II 级腋窝淋巴结转移, 无远处脏器和淋巴结转移) 和晚期组 (有远处脏器或淋巴结转移)。每组各 23 例。

早期组和晚期组的患者都在任何抗肿瘤治疗前采集肝素抗凝静脉血。将血液标本离心, 血浆立即冻存于 -80°C 冰箱, 用于后续检测。外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 采用标准 Ficoll-Hypaque 密度离心法离心分离。

1.2 实验方法

1.2.1 流式细胞术检测 ILC2 文献中定义 ILC2 群体的表面分子表达状况为 Lin⁻CD45⁺CD127⁺CD294⁺^[14]。PBMC 用以下混合抗体孵育: lineage cocktail 4、抗 CD 45、抗 CD 127 和抗 CD 294 抗体 (均购自美国 BD 公司)。同型对照抗体同时被应用。用 BD™ CompBead 优化荧光补偿, 用于多色分析。流式细胞检测时, 在 FACS Verse™ 上获取数据, 用 Flowjo 软件进行分析。

1.2.2 实时荧光定量 PCR 用总 RNA 提取试剂盒从 PBMC 中提取总 RNA。用 PrimeScript RT 试剂盒逆转录总 RNA 为 cDNA。根据基因库序列, 利用 Premier 5.0 软件设计并合成引物 (上海生工) (表 1)。实时荧光定量 PCR 按说明书步骤进行

操作。用 Thermo Scientific PikoReal 软件分析各目标基因与内参的循环阈值(cycle threshold, CT)值的比值。用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算基因表达的倍数变化。所有步骤都是按照制造商提供的说明书进行的。

1.2.3 细胞因子的表达 采用酶联免疫吸附测定法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒 (北京诚林) 检测血浆中 ILC2 相关的 Th2 型细胞因子 (IL-13、IL-4、IL-10 和 IL-33) 水平, 均按制造商提供的说明书进行操作。所有样品同时检测 3 次, 根据标准曲线计算各指标的平均浓度。

1.2.4 细胞培养及细胞活力检测 人乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB 231 细胞株分别代表雌/孕激素受体阳性和阴性, 均购自中国科学院细胞库。MCF-7 细胞培养于 DMEM 培养基中, MDA-MB 231 细胞培养于 RPMI 1640 中。培养基中都添加 10% 胎牛血清和 1% 青-链霉素。两种细胞于含 5% CO₂, 37 °C 培养箱中培养, 每隔 2~3 d 更换新培养基。使用 0.25 % 胰蛋白酶消化细胞并进行传代, 细胞传代 3 次/周。用重组人 IL-13 和 IL-4 (美国 Perprotech 公司) 刺激 MCF-7 和 MDA-MB 231 细胞, 以模拟体内 ILC2 极化后效应, 并测定细胞活力。将这两种细胞接种到 96 孔板中, 分别用 1、10、20、30、40、50、100、500 ng/mL 的 IL-13 和 IL-4 刺激 24 h。各孔加入 5 mg/mL 噻唑蓝, 孵育 4 h。用分光光度计测定二甲亚砷溶解细胞后在 490 nm 波长处的吸光率。在进行 IL-13/IL-4 浓度筛选后, 将 MCF-7 和 MDA-MB 231 细胞分为正常培养基组 (normal control, NC 组)、IL-13 单独刺激组 (IL-13, 30 ng/mL)、IL-4 单独刺激组 (IL-4, 30 ng/mL)、IL-13+IL-4 联合刺激组 (IL-13+IL-4, 均为 30 ng/mL)。

1.2.5 蛋白免疫印迹检测 用蛋白提取试剂盒 (中国碧云天公司) 提取上述 4 组 MCF-7 和 MDA-MB 231 细胞的总蛋白, 用蛋白分析试剂盒 (中国碧云天公司) 测定总蛋白的浓度。用 10%~12% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白, 并将其湿转至 PVDF 膜上。将 PVDF 膜置于配置好的一抗溶液中 4 °C 孵育过夜: 抗 p-ERK 1/2 (兔, 1:1 000, 美国 CST 公司), 抗 ERK 1/2 (兔, 1:1 000, 美国 CST 公司), 抗 p-mTOR (兔, 1:1 000, 美国 CST 公司), 抗 mTOR (兔, 1:1 000, 美国 CST 公司), 抗 LC3B (兔, 1:1 000, 英国 Abcam 公司), 抗 GAPDH (小鼠, 1:8 000, 美国 Bioworld 公司), 抗 β -actin (小鼠, 1:2 000, 中国碧云天公司)。将膜清洗 3 次后, 室温孵育于辣根过氧化物酶结合的二抗 (兔或小鼠, 1:8 000, 中国碧云天公司) 中 1 h。最后采用增强型化学发光系统进行检测。

1.2.6 细胞凋亡检测 将 MCF-7 和 MDA-MB 231 细胞接种于 6 孔板中, 按上述分组培养 48 h。2 种细胞用胰蛋白酶消化, 洗涤 2 次, 用缓冲液悬浮, 然后离心除去上清液。细胞用 DCFH-DA (美国 BD 公司) 避光孵育 30 min。用流式细胞仪检测 Annexin-V/7-AAD 阳性细胞的百分率。同时采用 Hoechst 33342 染料 (中国碧云天公司) 对上述 4 组的 MCF-7 和 MDA-MB 231 细胞进行染色, 以检测细胞凋亡。细胞接种于 24 孔板中, 培养 48 h。每孔细胞用 500 μ L Hoechst 33342 染料在 37 °C 下孵育 10 min。在去除含染料的培养基之前, 使用离心机充分沉淀已经漂浮的凋亡细胞。用胰蛋白酶消化并洗涤 2 次后, 荧光显微镜下观察凋亡细胞的细胞核密集染色情况。

1.3 统计学分析

所有数据均来自独立重复的 3 次或多次实验, 用 SPSS 22.0 软件进行分析。将符合正态分布的计量资料表示为均值 $\pm$ 标准差, 用单因素方差分析多组间的差异, 进一步两两比较采用 LSD-*t* 法。不符合正态分布的计量资料表示为中位数 (四分位数间距), 进行 Kruskal-Wallis H 秩和检验。将分类变量转换为计数或等级资料, 采用卡方检验或 Mann-Whitney U 检验比较患者的基线特征。采用单因素和多因素 COX 回归模型分析 ILC2 水平与临床因素的相关性, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 乳腺癌患者外周循环中 ILC2 与肿瘤关联

流式细胞仪检测不同病期的乳腺癌患者和正常人 PBMC 中 ILC2 的水平 (图 1)。早期组及晚期组乳腺癌患者外周循环中 ILC2 水平都明显高于正常组 (0.028 9% vs. 0.019 6%, $P=0.008$; 0.027 3% vs. 0.019 6%, $P=0.032$; $F=4.356$) (图 2), 晚期组的水平稍低于早期组。收集的乳腺癌患者临床病例特征见表 2, 早期组和晚期组的受试者在组织学、分子分型、T 分期、N 分期和 NCCN 分期的构成上均无统计学差异。单、多因素 COX 回归分析都发现 ILC2 是乳腺癌的危险因素 ($HR=2.032$, $P=0.028$; $HR=2.002$, $P=0.032$); 单因素分析显示雌孕激素受体状态与 ILC2 相关 ($HR=0.436$, $P=0.038$), 但多因素分析其无统计学差异 ($HR=0.647$, $P=0.288$)。N 分期、NCCN 分期在多因素分析中与 ILC2 有关联 ($HR=14.74$, $P=0.008$; $HR=0.136$, $P=0.046$); 年龄、组织学类型与 ILC2 水平无明显性相关 (表 3)。

表 1 qRT-PCR 引物序列

基因	上游引物	下游引物
GAPDH	5' -CCACTCCTCCACCTTTG-3'	5' -CACCACCCTGTTGCTGT-3'
GATA3	5' -CCCGCACCTCTTCACCTTC-3'	5' -CCTGGTACTTGAGGCACTCTTTC-3'
ROR α	5' -AGCATCAGGCTTCTTTCCC-3'	5' -CAAGTATTGGCAGGTTTCC-3'
IL-13	5' -ACTTGCCTTGGCGGCTTTG-3'	5' -GCCTTCTGCTTCTGGGTGA-3'
IL-4	5' -TGACGGTGTGTGATGTAAGATG-3'	5' -ACAGAGTGTTCTTGTGTTGG-3'

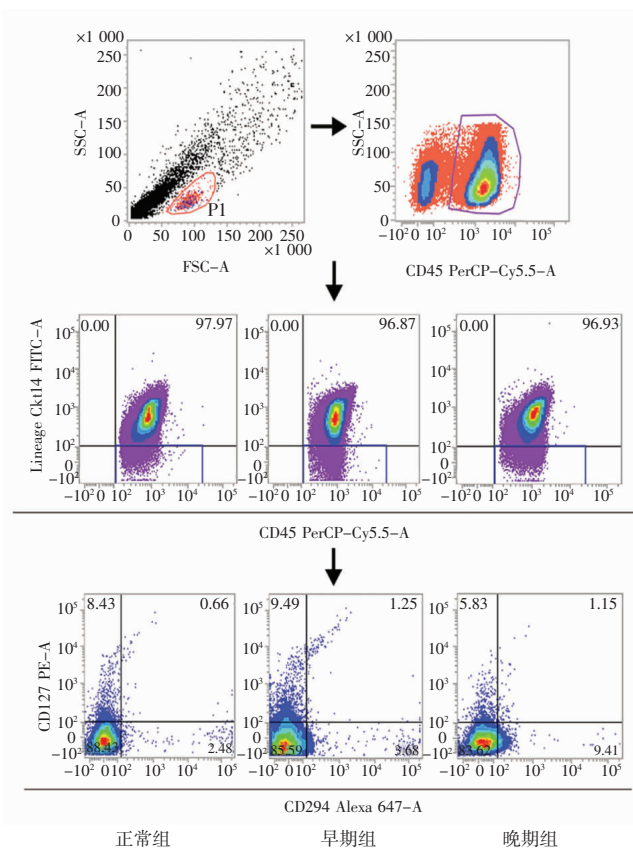


图 1 流式细胞术检测各组受试者外周循环中 ILC2 的流程图

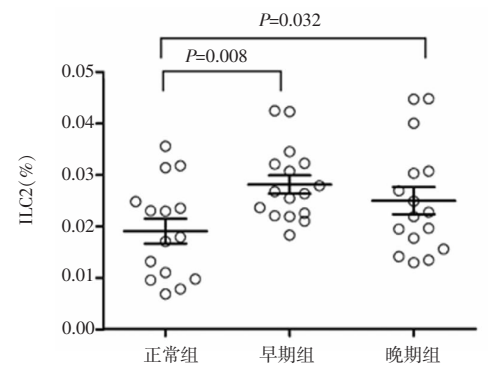


图 2 各组受试者外周循环中 ILC2 水平的统计图

表 2 受试者的临床特征

	早期组 (n=23)	晚期组 (n=23)	正常组 (n=21)	χ^2/U 值	P 值
年龄(岁)	48.8 ± 8.4	49.5 ± 7.4	46.1 ± 8.0		—
组织学(浸润性)				3.450	0.178
非特殊型癌	11	5	0		
导管/小叶癌	10	15	0		
其他类型	2	3	0		
分子分型				4.177	0.243
Luminal A	5	2	0		
Luminal B	7	13	0		
HER2	4	5	0		
三阴性	6	3	0		
T 分期		a		193.500	0.085
T1	10	5	0		
T2	11	13	0		
T3	0	1	0		
T4	2	4	0		
N 分期		a		187.500	0.072
N0	9	8	0		
N1	13	5	0		
N2	1	4	0		
N3	0	6	0		
NCCN 分期		a		190.000	0.073
I	5	4	0		
II	15	9	0		
III	3	9	0		
IV	0	1	0		

注:a,代表晚期组患者在首次手术时的病理分期

2.2 ILC2 的上下游因子在外周循环中的表达

乳腺癌患者 PBMC 中转录调控因子 GATA3 和 ROR α 的 mRNA 表达水平较正常组水平有所增高,但仅 ROR α 有统计学差异 ($F=93.784, P=0.019$);随着肿瘤负荷的增加,两者在晚期组中的表达水平较早期组明显增高 ($F=6.897, P=0.005; F=93.784, P=0.000$)。如图 3 所示。

乳腺癌患者外周血中 ILC2 的产物 IL-13 和 IL-4 的 mRNA 表达略高于正常组,但差异均无统计学意义;两者在晚期组中的表达水平明显高于早期组 ($F=13.047, P=0.002; F=22.687, P=0.000$) ,如图 3 所示。IL-33 和 IL-10 被归类为

表 3 ILC2 水平与临床特征的单因素及多因素 COX 回归分析

变量	比较	单因素分析			多因素分析		
		HR	95%CI	P 值	HR	95%CI	P 值
乳腺癌 vs.正常组	早期组 vs.正常组	2.217	1.058~4.643	0.035	2.013	0.963~4.206	0.063
	晚期组 vs.正常组	1.786	0.856~3.725	0.122	1.006	0.486~2.082	0.986
	乳腺癌 vs.正常组	2.032	1.079~3.828	0.028	2.006	1.061~3.793	0.032
年龄	>50 vs. ≤50	1.200	0.629~2.289	0.581	1.124	0.578~2.185	0.732
组织学	非特殊型 vs.导管 + 小叶	1.485	0.712~3.097	0.292	2.093	0.893~4.905	0.089
分子分型	Luminal A+B vs. HER2+TNBC	0.436	0.199~0.955	0.038	0.647	0.290~1.444	0.288
T 分期	T3/T4 vs. T1/T2	1.451	0.426~4.939	0.551	4.339	0.687~27.381	0.118
N 分期	N2/N3 vs. N0/N1	2.069	0.900~4.756	0.087	14.74	2.003~108.51	0.008
NCCN 分期	III/IV vs. I/II	1.421	0.668~3.025	0.362	0.136	0.019~0.965	0.046

Th2 型细胞因子,它们也发挥着促进肿瘤的作用^[15-16]。这些 Th2 型细胞因子的过表达都与肿瘤负荷增加有关。ELISA 结果显示乳腺癌患者血浆中 IL-13、IL-4、IL-33 和 IL-10 的蛋白表达均高于正常组,且晚期组明显高于早期组($F=680.377$, $P=0.000$; $F=207.327$, $P=0.000$; $F=709.533$, $P=0.000$; $F=554.39$, $P=0.000$)(图 3)。

2.3 IL-13/IL-4 促进乳腺癌细胞增殖

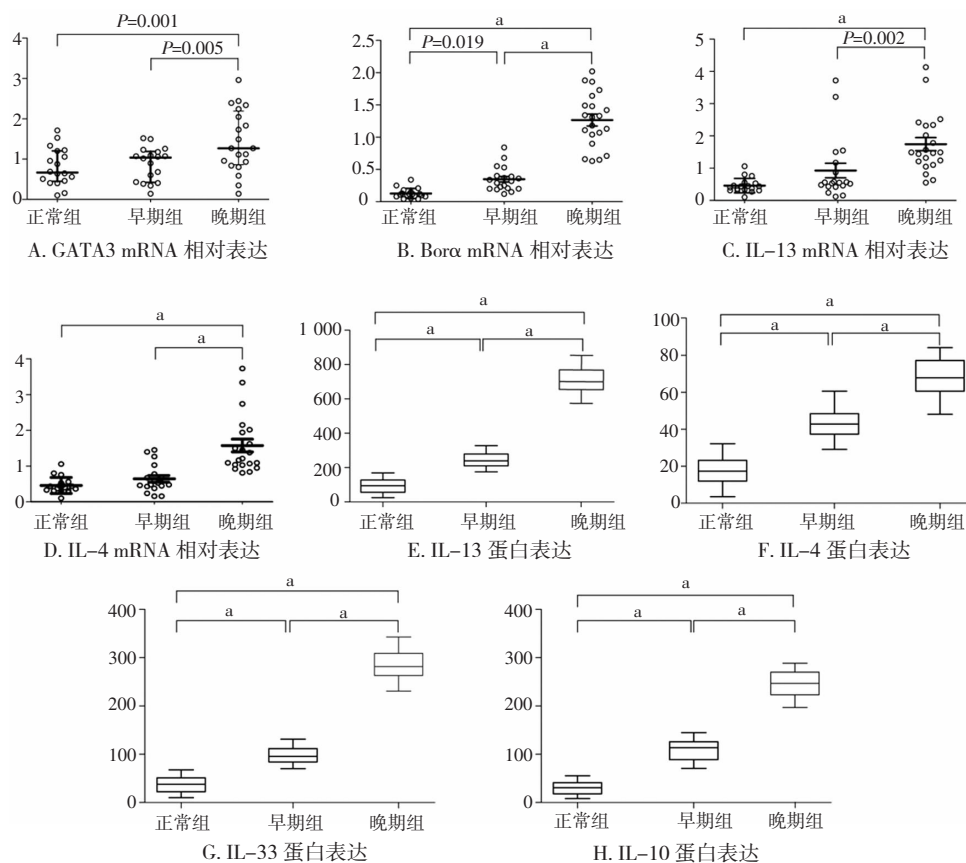
重组人 IL-13 和 IL-4 对 MCF-7 和 MDA-MB 231 细胞的存活率有剂量依赖性的促进作用。两者在浓度 30 ng/mL 以上时均有显著性作用(图 4)。Western blot 检测细胞增殖信号(p-ERK1/2 和 ERK1/2)表达的结果发现,IL-13 或 IL-4 单独应用均能增加 2 种癌细胞上述增殖信号的表达(MCF-7: $F=71.502$, $P=0.014$ 和 $P=0.000$; MDA-MB 231: $F=498.733$, $P=0.000$ 和 $P=0.000$),且 IL-4 的作用强于 IL-13;IL-13+IL-4 组仅使 MDA-MB 231 细胞的 p-ERK1/2/ERK1/2 比值明显高

于 IL-13 或 IL-4 组($P=0.000$, $P=0.033$)。如图 5 所示。

2.4 IL-13/IL-4 调控乳腺癌细胞自噬与凋亡

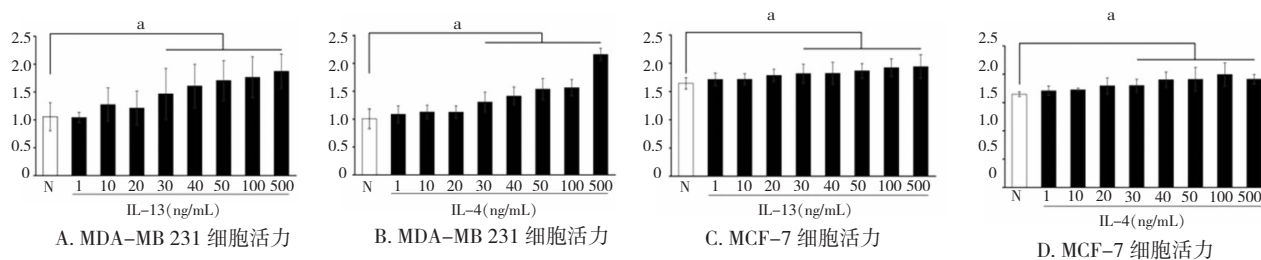
IL-13 单独刺激对两种乳腺癌细胞的自噬均无明显影响。在 MDA-MB 231 细胞中,IL-4 单独刺激能增高 LC3B II/I 比值($F=265.539$, $P=0.000$),但对 p-mTOR/mTOR 无影响($F=512.173$, $P=0.588$)。IL-13+IL-4 能明显增高 LC3B II/I 比值,降低 p-mTOR/mTOR 比值,作用强于 IL-13 或 IL-4 单独刺激组(均 $P=0.000$)。这些结果提示联合刺激能诱导癌细胞自噬。在 MCF-7 细胞中,IL-4 单独刺激亦能诱导癌细胞自噬,表现为 LC3B II/I 增高($F=237.369$, $P=0.168$),p-mTOR/mTOR 降低($F=3723.577$, $P=0.000$)。与 IL-4 相比,IL-13+IL-4 可进一步降低 p-mTOR/mTOR,但对 LC3B II/I 无明显影响($P=0.000$; $P=0.093$)。如图 5 所示。

流式细胞仪检测 IL-13/IL-4 对乳腺癌细胞凋亡的影响。AnnexinV/7-AAD 双染结果显示,IL-13 和 IL-4 联合刺激可诱



注:a, $P=0.000$

图3 受试者 PBMC 中调控 ILC2 的转录因子及血浆中 ILC2 产物的表达水平



注:a, $P=0.000$

图4 两种乳腺癌细胞的增殖活力评估

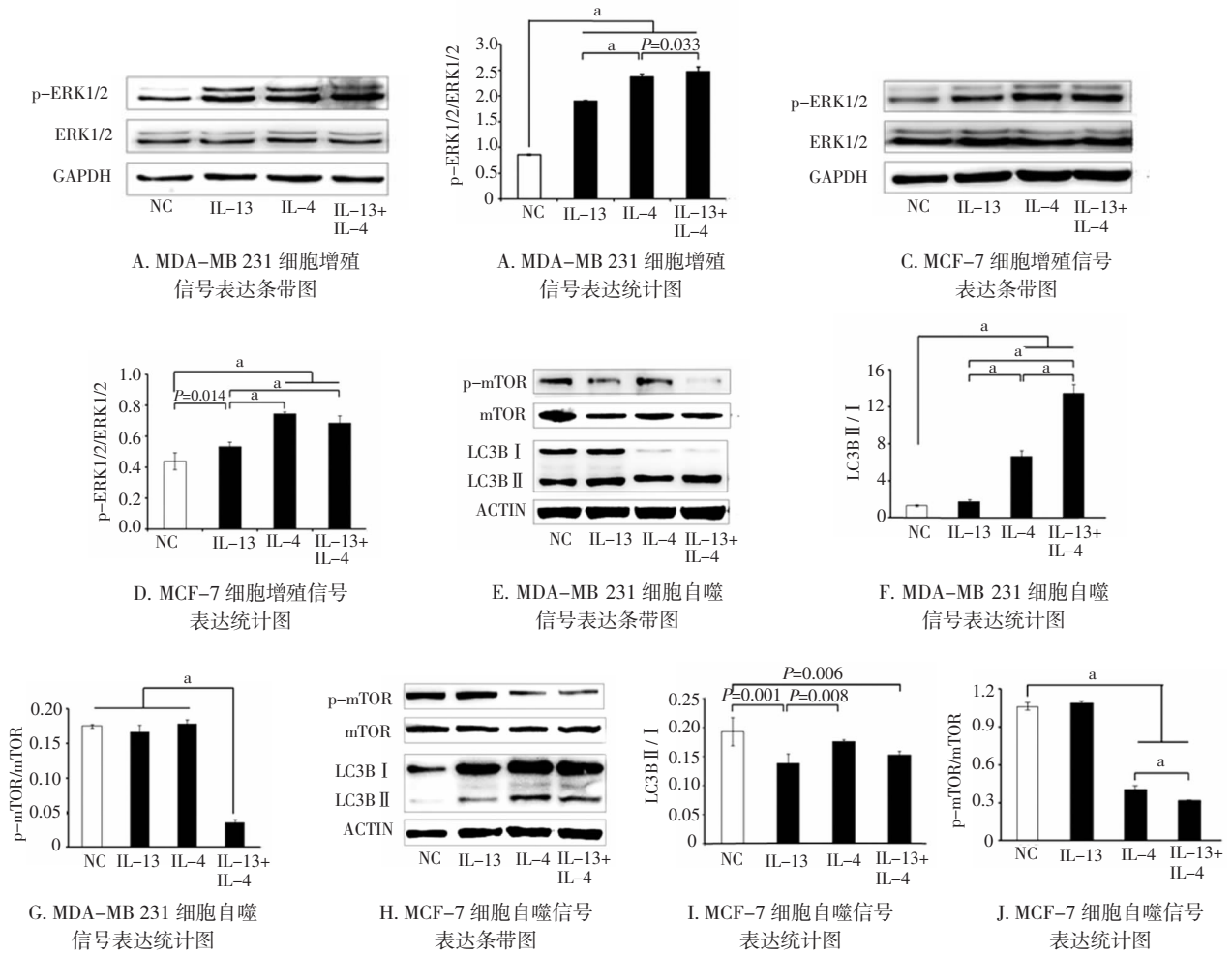

 注: a, $P=0.000$

图 5 IL-13 和 IL-4 刺激 2 种乳腺癌细胞后增殖、自噬信号表达的改变

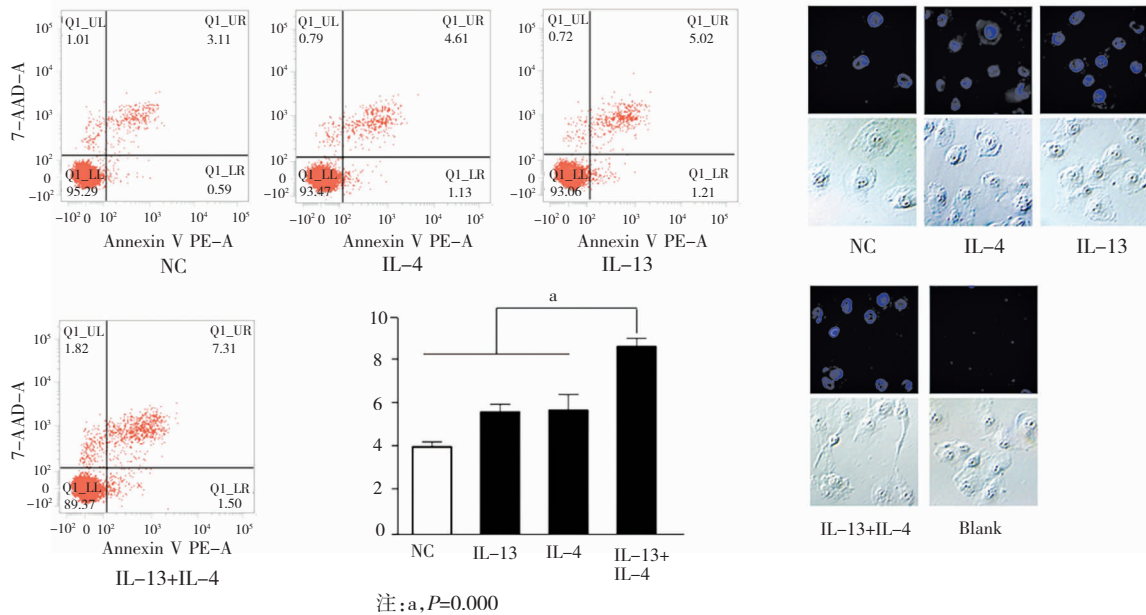

 注: a, $P=0.000$

图 6 IL-13 和 IL-4 刺激 MDA-MB 231 癌细胞后的凋亡改变

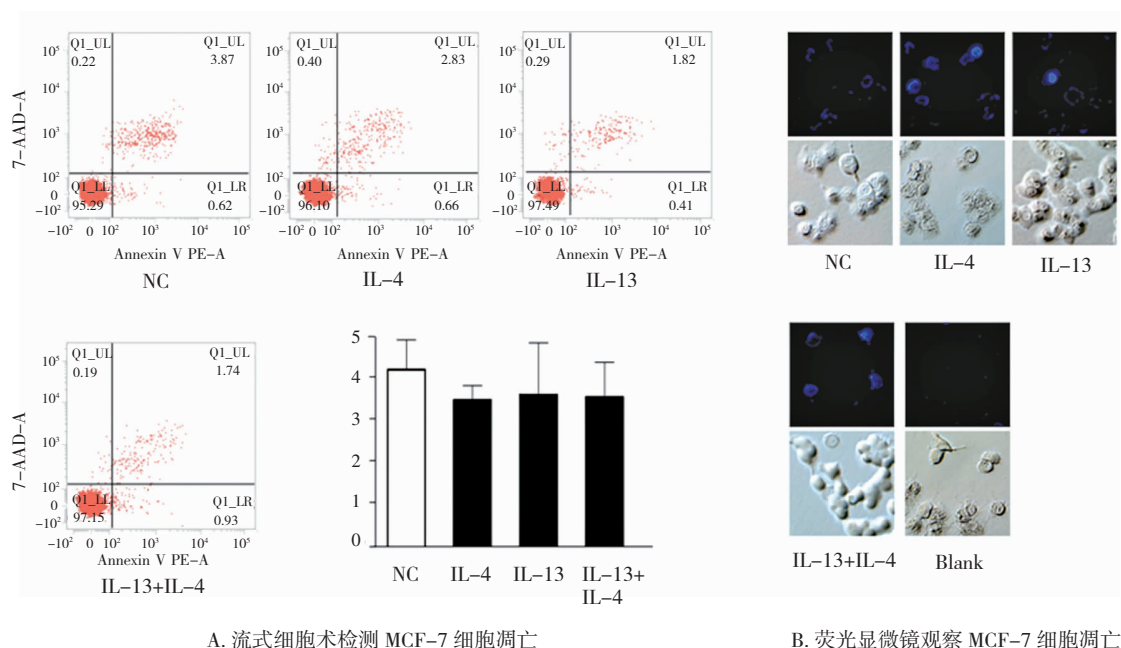


图 7 IL-13 和 IL-4 刺激 MCF-7 癌细胞后的凋亡改变

导 MDA-MB 231 癌细胞凋亡 (IL-13+IL-4 组 vs. 正常组: $F=51.057, P=0.000$), 但对 MCF-7 癌细胞的凋亡无明显影响 (IL-13+IL-4 组 vs. 正常组: $F=0.489, P=0.376$)。用 Hoechst 33342 染料染色各组乳腺癌细胞后, 在荧光显微镜下观察发现, IL-13+IL-4 组的致密蓝染的 MDA-MB 231 癌细胞较多, 凋亡被诱导; 而在 MCF-7 细胞中诱导的凋亡程度不明显。如图 6 和图 7 所示。

3 讨论

乳腺癌是全世界女性最常见的恶性肿瘤^[1]。Th2 型细胞因子中的 IL-13 和 IL-4 被认为在乳腺癌的发生发展中起着促进作用, 并与预后不良有关^[2]。最近的研究结果表明, 代表固有免疫系统的 ILC2 群体可参与炎症、过敏性疾病的发病, 正是通过快速而大量地产生 Th2 型细胞因子 (IL-13、IL-4 等) 实现^[17]。这种 ILC2 的极化现象 (ILC2 水平增高伴 Th2 型细胞因子过量表达) 也在胃癌和肺癌患者中被发现^[7-8], 提示 ILC2 可能通过 Th2 型细胞因子而在肿瘤的发生发展中发挥重要作用。本研究旨在进一步探讨 ILC2 和 Th2 型细胞因子在乳腺癌不同病期中的动态变化, 以及模拟 ILC2 极化后效应作为乳腺癌细胞生长促进剂的能力。本结果表明, 乳腺癌患者外周循环中 ILC2 比例增高; 晚期组 ILC2 水平略低于早期组, 可能与晚期乳腺癌患者体内的肿瘤弱免疫原性和免疫抑制状态有关^[18], 但目前尚无该领域的报道, 本猜测需扩大样本量进一步验证。患者外周血的 PBMC 中与 ILC2 相关的上下游因子的 mRNA 表

达与正常组相比有所增高, 而蛋白表达明显高于正常组; 上述基因和蛋白表达随着肿瘤进展转移而继续增高。

ILC2 与 Th2 型细胞因子在晚期组的趋势不一致, 根据固有免疫和适应性免疫的特点可以推断出其可能的原因。关键在于 Th2 型细胞因子也可由适应性免疫反应中的 Th2 细胞分泌产生。ILC2 和 Th2 细胞具有共同的转录调节因子 (GATA3 和 ROR α), 两者协同调节 Th2 型免疫应答^[19]。ILC2 群体应答于免疫反应的早期阶段, 表现为达高峰时间快、持续时间短; 而 Th2 细胞则应答于较后期阶段, 达高峰时间缓慢、持续时间较长^[20]。ILC2 不仅与 Th2 细胞协同产生 IL-13 和 IL-4^[21], 而且以细胞接触依赖的方式调节幼稚 T 细胞的活化, 有利于 Th2 并抑制 Th1 细胞分化^[22]。肿瘤发生后, 固有免疫系统中 ILC2 水平迅速增加, 产生 Th2 型细胞因子。随着肿瘤病程的持续, Th2 细胞被 ILC2 诱导致敏, 协同产生 Th2 型细胞因子。ILC2 效应的高峰时间过去后, Th2 细胞效应持续存在, 分泌 Th2 型细胞因子。由此可见, 虽然固有免疫是快速和短暂的, 但 ILC2 似乎是癌症进展的一个驱动因素。鉴于 ILC2 与肿瘤的密切关系, 采用 COX 回归分析乳腺癌患者的临床资料与 ILC2 的相关性。单因素和多因素的 COX 回归分析都提示 ILC2 是乳腺癌的危险因素; 此外雌孕受体表达状态与 ILC2 具有相关性。但该部分研究仍存在局限性: 检测样本数量有限造成数据非正态性分布; 在不同的疾病过程中, 研究对象应该是固定的, 而不

是随机选择;还需估计检测 ILC2 的时间窗;ILC2 在不同的研究中被定义的表型还存在差异。然而,本研究仍发现 ILC2 水平与雌孕激素受体阴性的乳腺癌患者之间有很高的相关性。这在任何研究中都没有被报告过。

ILC2 在多种肿瘤患者的外周循环中发生极化,且在本研究与乳腺癌病期相关。故在体外模拟 ILC2 的极化效应中,用高浓度的重组人 IL-13 和 IL-4 刺激乳腺癌细胞,观察细胞生长状况。鉴于在体内 ILC2 与雌孕激素受体状态间存在的关联,本研究选取其阳性表达的 MCF-7 细胞和阴性表达的 MDA-MB 231 细胞作为研究对象。发现 IL-13+IL-4 可增强 MCF-7 和 MDA-MB 231 细胞的增殖信号分子表达;并能诱导 2 种乳腺癌细胞的自噬。在 MDA-MB 231 细胞中,经刺激后的增殖和自噬信号分子表达的增强程度更明显。从这些结果来看,激素受体阴性细胞(MDA-MB 231)似乎比激素受体阳性细胞(MCF-7)更容易受模拟 ILC2 极化的影响。这些在 MDA-MB 231 细胞中的结果可能和 ILC2 与受体状态的相关分析结果有一定的关联,但需进一步探讨。此外 ILC2 的潜在促肿瘤效应还需在动物模型中检验。

总之,目前的研究结果发现,ILC2 增高和 ILC2 触发的 Th2 型细胞因子过表达与乳腺癌发生发展有关。外源性 IL-13 和 IL-4 模拟的 ILC2 极化效应能促进乳腺癌细胞的增殖。据悉,这是首次报道 ILC2 与乳腺癌病程的动态关系。这些发现可为了解乳腺癌进展的机制提供新的见解。

参 考 文 献

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] Espinoza JA, Jabeen S, Batra R, et al. Cytokine profiling of tumor interstitial fluid of the breast and its relationship with lymphocyte infiltration and clinicopathological characteristics[J]. Oncoimmunology, 2016, 5(12): e1248015.
- [3] Yagi R, Zhong C, Northrup DL, et al. The transcription factor GATA3 is critical for the development of all IL-7R α -expressing innate lymphoid cells[J]. Immunity, 2014, 40(3): 378-388.
- [4] Wong SH, Walker JA, Jolin HE, et al. Transcription factor ROR α is critical for nuocyte development [J]. Nat Immunol, 2012, 13(3): 229-236.
- [5] Montaldo E, Vacca P, Vitale C, et al. Human innate lymphoid cells [J]. Immunol Lett, 2016, 179: 2-8.
- [6] Fuchs A, Colonna M. Innate lymphoid cells in homeostasis, infection, chronic inflammation and tumors of the gastrointestinal tract[J]. Curr Opin Gastroenterol, 2013, 29(6): 581-587.
- [7] Bie Q, Zhang P, Su Z, et al. Polarization of ILC2s in peripheral blood might contribute to immunosuppressive microenvironment in patients with gastric cancer[J]. J Immunol Res, 2014, 2014: 923135.
- [8] Wu Y, Yan Y, Su Z, et al. Enhanced circulating ILC2s and MDSCs may contribute to ensure maintenance of Th2 predominant in patients with lung cancer[J]. Mol Med Rep, 2017, 15(6): 4374-4381.
- [9] Todaro M, Lombardo Y, Francipane MG, et al. Apoptosis resistance in epithelial tumors is mediated by tumor-cell-derived interleukin-4 [J]. Cell Death Differ, 2008, 15(4): 762-772.
- [10] Fujisawa T, Joshi BH, Puri RK. IL-13 regulates cancer invasion and metastasis through IL-13R α 2 via ERK/AP-1 pathway in mouse model of human ovarian cancer[J]. Int J Cancer, 2012, 131(2): 344-356.
- [11] Petiot A, Ogier-Denis E, Blommaert EF, et al. Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells[J]. J Biol Chem, 2000, 275(2): 992-998.
- [12] Arico S, Petiot A, Bauvy C, et al. The tumor suppressor PTEN positively regulates macroautophagy by inhibiting the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway[J]. J Biol Chem, 2001, 276(38): 35243-35246.
- [13] Kwon HJ, Choi JE, Bae YK. Interleukin-13 receptor alpha 2 expression in tumor cells is associated with reduced disease-free survival in patients with luminal subtype invasive breast cancer[J]. Tumour Biol, 2018, 40(6): 1010428318783657.
- [14] Vély F, Barlogis V, Vallentin B, et al. Evidence of innate lymphoid cell redundancy in humans[J]. Nat Immunol, 2016, 17(11): 1291-1299.
- [15] Lu B, Yang M, Wang Q. Interleukin-33 in tumorigenesis, tumor immune evasion, and cancer immunotherapy[J]. J Mol Med (Berl), 2016, 94(5): 535-543.
- [16] Zhao S, Wu D, Wu P, et al. Serum IL-10 predicts worse outcome in cancer patients: a meta-analysis[J]. PLoS One, 2015, 10(10): e0139598.
- [17] Doherty TA, Broide DH. Group 2 innate lymphoid cells: new players in human allergic diseases[J]. J Investig Allergol Clin Immunol, 2015, 25(1): 1-11.
- [18] Bates JP, Derakhshandeh R, Jones L, et al. Mechanisms of immune evasion in breast cancer [J]. BMC Cancer, 2018, 18(1): 556.
- [19] Drake LY, Iijima K, Kita H. Group 2 innate lymphoid cells and CD4⁺ T cells cooperate to mediate type 2 immune response in mice[J]. Allergy, 2014, 69(10): 1300-1307.
- [20] Neill DR, Wong SH, Bellosi A, et al. Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity[J]. Nature, 2010, 464(7293): 1367-1370.
- [21] Zhu J. T helper 2(Th2) cell differentiation, type 2 innate lymphoid cell(ILC2) development and regulation of interleukin-4(IL-4) and IL-13 production [J]. Cytokine, 2015, 75(1): 14-24.
- [22] Mirchandani AS, Besnard AG, Yip E, et al. Type 2 innate lymphoid cells drive CD4⁺ Th2 cell responses[J]. J Immunol, 2014, 192(5): 2442-2448.

(责任编辑:唐秋姗)