

临床研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.000328

乌司他丁联合多西他赛对乳腺癌免疫微环境的影响

宋晓丹¹, 谭 令¹, 崔晓江², 孙治君¹

(1. 重庆医科大学附属第二医院三腺外科, 重庆 400010; 2. 洛杉矶塞德-辛奈医学中心、塞缪尔-奥斯钦综合癌症研究所、女性癌症研究中心、外科系, 洛杉矶 90048)

【摘要】目的:探讨乌司他丁(ulinastatin, UTI)联合多西他赛(docetaxel, DCT)对乳腺癌微环境中免疫细胞, 免疫因子和基质的作用, 以及对肿瘤生长的影响。**方法:**进行 4T1 乳腺癌细胞株培养, 购买 BALB/c 雌性小鼠, 建立 BALB/c 小鼠荷 4T1 细胞模型, 将 32 只小鼠荷瘤随机分为 4 组, 对照组, UTI 组, DCT 组, UTI+DCT 组。测量各组肿瘤体积, 计算肿瘤抑制率; 行流式细胞染色, 检测 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 的含量; ELISA 检测白介素(interleukin, IL)-2、IL-6 和 IL-10 的表达; Western blot 检测基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinases 9, MMP-9)以及金属蛋白酶组织抑制因子 1(tissue inhibitor of metalloproteinase 1, TIMP1)。**结果:**与对照组相比, UTI 和 DCT 均能抑制肿瘤生长, UTI 联合 DCT 作用最为明显($P=0.000$), UTI、DCT 单独和联合用药后, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg/CD4⁺T 细胞的比值较对照组降低($P=0.000$), IL-6、IL-10 和 MMP-9 的表达较对照组明显下降($P=0.000$), 同时促进 IL-2 及 TIMP1 的表达($P=0.000$)。**结论:**UTI 联合 DCT 可抑制免疫正常的小鼠乳腺癌的生长, 其机制可能与调节肿瘤微环境中 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg、IL-2、IL-6、IL-10、MMP-9 以及 TIMP1 有关。

【关键词】乳腺癌; CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg; 白介素 2; 白介素 6; 白介素 10; 基质金属蛋白酶 9; 金属蛋白酶组织抑制因子 1

【中图分类号】R655.8

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-12-24

Effect of ulinastatin and docetaxel on immune microenvironment of breast cancer

Song Xiaodan¹, Tan Ling¹, Cui Xiaojiang², Sun Zhijun¹

(1. Department of Breast, Pancreas and Thyroid Surgery, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University; 2. Department of Surgery, Department of Obstetrics and Gynecology, Women's Cancer Program Samuel Oschin Comprehensive Cancer Institute, Cedars Sinai Medical Center, Los Angeles)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of ulinastatin (UTI) and docetaxel (DCT) on immunocyte, immune factors and matrixes in breast cancer immune microenvironment and the tumor growth. **Methods:** 4T1 breast cancer cells were cultured and the BALB/c mice were purchased to establish BALB/c mice model bearing 4T1 cells. Thirty-two mice were randomly divided into four groups: control group, UTI group, DCT group and UTI + DCT group. The tumor size was measured and the inhibition rate was calculated. Line flow cytometric dyeing was used to detect CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg content. The expression of interleukin-2 (IL-2), IL-6 and IL-10 was detected by ELISA. The expression of matrix metalloproteinases 9 (MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP1) was detected by Western blot. **Results:** Both UTI and DCT can inhibit tumor growth and inhibitory effect was the most significant when UTI combined with DCT ($P=0.000$). The rate of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg/CD4⁺T cells was decreased in UTI group, DCT group and UTI + DCT group than in control group ($P=0.000$). The expression of IL-6, IL-10 and MMP-9 was significantly decreased and the expression of IL-2 and TIMP1 was increased in UTI group, DCT group and UTI + DCT group than in control group ($P=0.000$, $P=0.000$). **Conclusion:** UTI combined with DCT can suppress the tumor growth in mice with normal immune function. The mechanism may be related with regulating CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg, IL-2, IL-6, IL-10, MMP-9 and TIMP1 in the tumor microenvironment.

【Key words】breast cancer; CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg; interleukin-2; interleukin-6; interleukin-10; matrix metalloproteinases-9; tissue inhibitor of metalloproteinase 1

作者介绍: 宋晓丹, Email: sero_song@hotmail.com,

研究方向: 乳腺癌的浸润与转移。

通信作者: 孙治君, Email: cq_sunzj@sina.com。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000328.html>

乳腺癌在女性恶性肿瘤中的发病率不断在增加,在 2014 年美国恶性肿瘤统计结果女性组中,乳腺癌排在第一位,新发病例 232 670 例,占女性肿瘤 28.71%,死亡率占 14.51%,居于第二位^[1]。目前乳腺癌的治疗手段有手术、放疗、化疗、内分泌治疗、生物免疫治疗等。然而,有一类“三阴乳腺癌(triple-negative breast cancer, TNBC)”,即雌激素(estrogen, ER),孕激素(progestogen, PR)和人类表皮生长因子受体 2(human epidermal growth factor receptor 2, HER2)均阴性的乳腺癌,是临床治疗的新难题。三阴乳腺癌预后较差,由于无内分泌治疗及针对性分子靶向治疗(如曲妥珠单抗靶向治疗),因此,化疗成为此型乳腺癌患者主要的内科治疗途径,然而化疗易产生耐药,需要寻找新的治疗靶点。肿瘤免疫微环境中的免疫细胞,基质以及各种炎症因子对肿瘤的发生与侵袭发挥着重要作用,目前通过对肿瘤微环境研究基础上的综合治疗,已成为目前治疗研究的热点。乌司他丁(ulinastatin, UTI)是一种酶抑制剂,有广泛的蛋白酶抑制作用,稳定溶酶体膜,调节炎症/免疫因子的释放,保护机体免疫力和吞噬细胞功能^[2]。UTI 还可以作为免疫调节剂发挥机体保护作用^[3]。近年国内外研究提示 UTI 可增强抗肿瘤药物的效果^[4]。多西他赛(docetaxel, DCT),第二代紫杉类化疗药,其具有广谱抗实体性肿瘤作用,对乳腺癌治疗临床效果较好。课题组之前在体外和裸鼠荷瘤实验中证明 UTI 可抑制肿瘤增殖,当与 DCT 合用时效果更佳且未见明显不良反应,可能与对肿瘤相关的细胞因子及肿瘤基质的影响有关^[5-8]。本实验采用免疫正常的 BALB/c 雌性小鼠构建荷瘤模型,研究 UTI 以及联合 DCT 对肿瘤免疫微环境及其对肿瘤增殖和侵袭的影响,为指导临床用药打下基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

4T1 小鼠乳腺癌细胞株购自中国科学院上海生命科学研究院细胞库, BALB/c 小鼠由重庆医科大学实验动物中心提供(SPF 级), RPMI1640 培养基和胎牛血清均购自 GIBICO 公司。UTI 由广东天普生化医药股份有限公司提供, DCT 由江苏瑞恒医药股份有限公司提供, 基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinases-9, MMP-9)和金属蛋白酶组织抑制因子 1(tissue inhibitor of metalloproteinase 1, TIMP1)抗体购自 Santa Cruz 公司, 辣根过氧化物(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗小鼠 IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司, GAPDH 抗体购自康成公司, 发光试剂: MILLIPORE 公司,

ELISA 试剂盒购自联科生物技术有限公司, 淋巴细胞提取液由天津源洋生物制品科技有限责任公司提供, 流式各种抗体、固定剂以及穿孔剂均购自 eBioscience 公司, IV 型胶原蛋白酶购自 GIBICO 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 小鼠乳腺癌细胞 4T1, 用含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基于 37 ℃、5%CO₂、饱和湿度孵箱中培养。

1.2.2 小鼠荷瘤模型构建 收集生长对数期的 4T1 乳腺癌细胞, 调整细胞浓度约 2×10^7 个/ml, 取肿瘤细胞悬液 50 μ l (约 1×10^6 个), 皮下接种于小鼠第 4 对乳腺(近腹股沟), 构建荷瘤模型。每 2~3 d 观察并详细记录肿瘤生长及小鼠一般情况, 游标卡尺测量肿瘤长径(L)及短径(D)。约 9~12 d 可形成 5 mm $\times$ 5 mm 左右肿瘤, 小鼠荷瘤模型构建成功。

1.2.3 分组、给药及观察 将 32 只荷瘤模型构建成功的小鼠随机分为 4 组, 对照组给予腹腔注射生理盐水 200 μ l(只 $\cdot$ d), UTI 组腹腔注射 UTI 1 600 U(只 $\cdot$ d), DCT 组第 1、7、14 天腹腔注射 DCT 20 mg/kg, UTI+DCT 组给予 UTI 1600U(只 $\cdot$ d)+第 1、7、14 天给予 DCT 20 mg/kg, 给药周期为 20 d。

大体观察记录: 每 3~4 d 游标卡尺测量肿瘤长径(L)及短径(D), 按公式 $V=L \times D^2/2$ 计算肿瘤体积, 并计算肿瘤生长抑制率。肿瘤生长抑制率=(对照组肿瘤体积-实验组肿瘤体积)/对照组肿瘤体积 $\times$ 100%。

1.2.4 流式细胞术检测 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 将各组肿瘤组织、肿瘤周围组织及腹股沟淋巴结磨碎(冰上操作), 制成单细胞悬液, 用淋巴细胞分离液分离出淋巴细胞。调节细胞浓度至 2×10^7 个/ml。

取 5 支流式管, 分别标记为空白, CD4CD25, CD25 同型对照, CD4CD25Foxp3, Foxp3 同型对照, 每管加入淋巴细胞悬液 200 μ l。空白管不加抗体, CD25 同型对照管加入 CD4 抗体和 CD25 同型 IgG, CD4CD25 管, CD4CD25Foxp3 管, Foxp3 同型对照管均加入 CD4CD25 抗体。4 ℃避光孵育 30 min。然后加入染色缓冲液离心洗涤。加入固定剂, 4 ℃避光孵育 30 min。加穿膜缓冲液, 充分混悬后离心洗涤。空白、CD25 同型对照、CD4CD25 管用染色缓冲液悬浮, 混匀, 避光待测。Foxp3 同型对照、CD4CD25Foxp3 管中分别加入 Foxp3 同型抗体或抗体, 4 ℃避光孵育 1 h。用穿膜缓冲液离心洗涤后再悬浮于染色缓冲液, 上流式细胞仪检测。Cell Quest 软件分析, 以 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺的比例反应 Treg 的含量。

1.2.5 ELISA 检测各组白介素(interleukin, IL)2, IL-6, IL-10 的表达 将肿瘤组织、肿瘤周围组织磨碎, 取上清液, 备用。洗液洗酶孔板, 每孔加样本稀释液或检测缓冲液, 加等量样本, 加检测抗体(1:100), 封板震荡, 室温孵育 2 h, 洗板, 加 HRP 标记的链霉亲和素(1:100), 封板震荡, 室温孵育 45 min, 洗板, TMB 显色, 避光室温孵育 30 min, 加终止液。酶标仪 450 nm 波长测定吸光度值。依据标准曲线计算各样本 IL-2、IL-6 以及 IL-10 的浓度值。

1.2.6 Western blot 法检测各组 MMP-9 及 TIMP1 的表达 提取肿瘤组织总蛋白, 进行 12%分离胶、5%浓缩胶的 SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶电泳。GAPDH 与 MMP-9 和 TIMP1 的

小鼠一抗按 1:1 000 比例稀释,4℃孵育过夜(约 10~12 h);1×TBST 溶液洗膜 15 min×3 次,TBS 溶液洗膜 15 min×1 次。HRP 标记的山羊抗小鼠二抗按 1:1 000 比例稀释,37℃或室温孵育 1 h,3 次漂洗方式同前提及。ECL 化学发光成像。

1.3 统计分析

采用 SPSS.19.0 统计学软件处理数据,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析进行多组间比较,组间两两比较采用 LSD-*t* 或 Tamhane 法,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 各组小鼠肿瘤生长的情况

与对照组(肿瘤平均体积 1 080 mm³)相比,UTI+DCT 组明显抑制肿瘤生长,肿瘤抑制率达(76.29±0.13)%,UTI 组抑制率为(20.05±0.13)%,DCT 组抑制率为(45.15±0.12)%。3 组间的组间差异有统计学意义($F=4\,574.393, P=0.000$),进一步两两比较, P 值均为 0.000。见图 1~3。

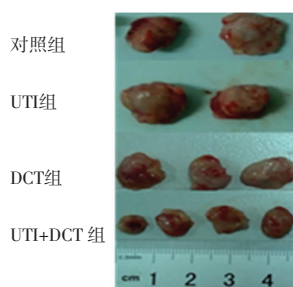


图 1 各组肿瘤样本

Fig.1 Samples of tumors in every group

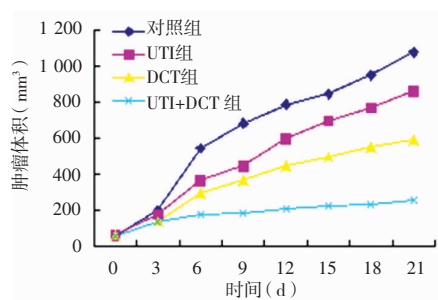


图 2 给药后各组肿瘤体积变化

Fig.2 Changes in the tumor volume in every group after the treatment

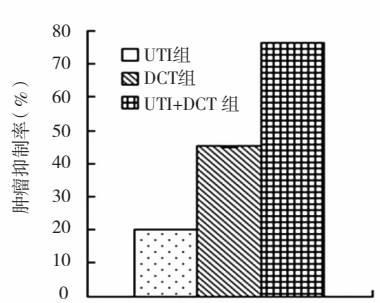


图 3 各实验组肿瘤抑制率

Fig.3 Inhibitory rate of every experimental group

2.2 各组小鼠肿瘤组织 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 的表达

Cell Quest 软件分析各组结果,见图 4,对照组 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 占 CD4⁺T 细胞比例为(12.5±0.4)%,UTI 组比例为(10.0±0.3)%,DCT 组比例为(7.9±0.1)%,UTI+DCT 组为(5.1±0.3)%。由此可见,UTI、DCT 单独以及联合用药均可降低 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 与 CD4⁺T 的比值,以联合用药作用最显著。4 组间的组间差异有统计学意义($F=296.975, P=0.000$),进一步两两比较, P 值均为 0.000。

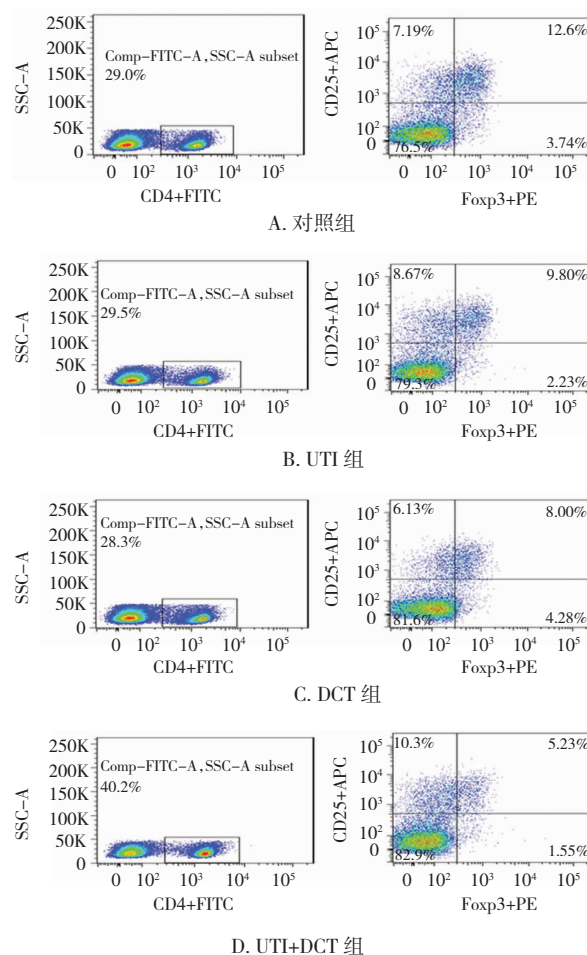


图 4 各组肿瘤微环境中 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 与 CD4⁺T 的比例

Fig.4 Ratio of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg/CD4⁺T in tumor microenvironment

2.3 各组小鼠肿瘤组织中 IL-2、IL-6、IL-10 的表达

IL-2 的表达量在 UTI 与 DCT 的干预下明显升高,用 LSD-*t* 法检测,UTI 组与对照组比较 P 值为 0.001,其它各组两两比较 P 值均等于 0.000,其差异有统计学意义;UTI、DCT 均可抑制 IL-6 的表达,以两者联合作用最为显著,用 LSD-*t* 法检测各组结果,两两比较,DCT 组与 UTI+DCT 组 P 值为 0.009,其余各组结果两两比较 P 值均等于 0.000,其差异具有显著性;IL-10 的表达在 UTI 与 DCT 的干预下明显降低,UTI 组与 DCT 组比较, P 值等于 0.001,其余各组两两比较 P

表 1 各组肿瘤组织 IL-2、IL-6 及 IL-10 的表达

Tab.1 Expression of IL-2, IL-6 and IL-10 in tumor tissues of every group

组别	IL-2 (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)
对照组	25.257 5 ± 2.611 1	983.150 0 ± 80.899 8	1 876.071 3 ± 27.189 7
UTI 组	30.484 8 ± 0.654 6 ^a	772.275 0 ± 37.986 3	1 687.142 8 ± 36.774 7
DCT 组	40.106 0 ± 1.471 6	585.900 0 ± 42.193 1	1 554.285 6 ± 64.470 6 ^c
UTI+DCT 组	49.651 4 ± 1.773 4	476.525 0 ± 16.367 7 ^b	1 301.428 5 ± 26.496 0
<i>F</i> 值	148.002	78.799	143.254
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000

注:a. 与对照组相比,*P* 值为 0.001;b. 与 DCT 组相比,*P* 值为 0.009;c. 与 UTI 组相比,*P* 值为 0.001

值均等于 0.000, 差异有统计学意义。综上所述, 与对照组相比, UTI 联合 DCT 可明显抑制 IL-6 和 IL-10, 促进 IL-2 的表达。见表 1。

2.4 各组小鼠肿瘤组织中 MMP-9 以及 TIMP1 的表达

为了解 UTI, DCT 以及两者联合对肿瘤基质的影响, Western blot 检测 MMP-9 和 TIMP1 的表达。与对照组相比, UTI+DCT 组 MMP-9 的表达量明显降低, 而 TIMP1 的表达量明显增高, MMP-9 在对照组相对于的 GAPDH 表达量为 (87.733 3 ± 1.350 3)%, UTI 组为 (74.260 0 ± 1.060 1)%, DCT 组为 (60.110 0 ± 0.227 1)%, UTI+DCT 组为 (31.123 3 ± 0.961 1)%, 各组数据经方差齐性检验, *P* 值为 0.455, 方差齐性。方差分析结果, 有统计学意义 ($F=1\ 797.418$, $P=0.000$), 各组间两两比较, 用 LSD-*t* 法检测, *P* 值均为 0.000; 而 TIMP1 在对照组表达量相对于 GAPDH 为 (32.543 3 ± 0.515 4)%, UTI 组为 (45.450 0 ± 0.555 6)%, DCT 组为 (60.226 7 ± 1.171 5)%, UTI+DCT 组为 (77.683 3 ± 0.527 8)%, 各组数据经方差齐性检验, *P* 值为 0.412, 方差齐性。方差分析结果, 有统计学意义 ($F=2\ 036.502$, $P=0.000$), 各组间两两比较, 用 LSD-*t* 法检测, *P* 值均为 0.000。见图 5、图 6。

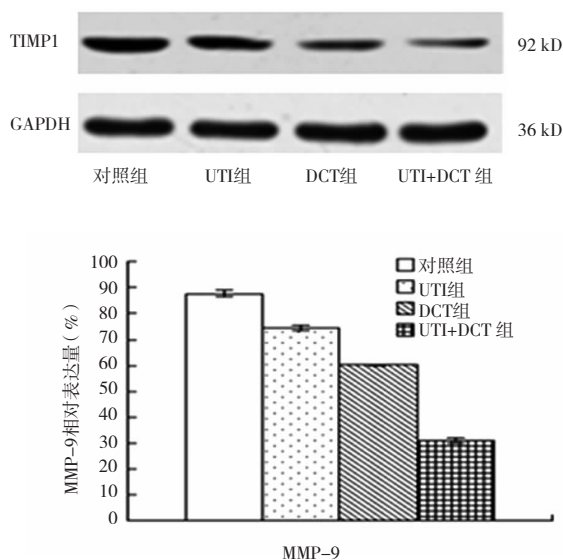


图 5 各组肿瘤中 MMP-9 的表达

Fig.5 MMP-9 expression in every group

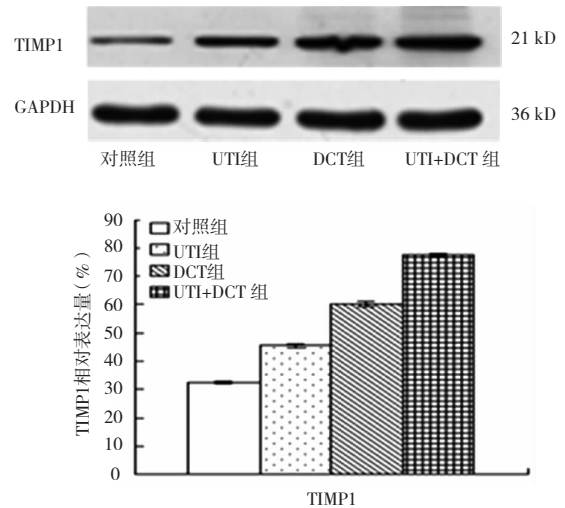


图 6 各组肿瘤中 TIMP1 的表达

Fig.6 TIMP1 expression in every group

3 讨论

肿瘤免疫微环境中的免疫细胞, 基质以及各种细胞因子对肿瘤的发生和侵袭发挥着重要作用, 正常机体的免疫系统可监视肿瘤发生并通过细胞免疫机制杀灭肿瘤, 而且这种免疫反应的强度决定了抗肿瘤的效果。临床研究^[9-10]显示, 肿瘤患者体内细胞免疫功能受损和抗肿瘤免疫效应的减弱有利于肿瘤的生长。已有的研究表明, 肿瘤细胞可分泌趋化因子, 招募 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 在肿瘤组织周围聚集, 通过细胞间直接接触和细胞因子介导 2 种方式抑制机体内多种免疫细胞的活性和增殖来发挥作用^[11-12], 使肿瘤逃脱免疫。有研究表明, 乌司他丁可以作为免疫调节剂发挥机体保护作用^[3]且未见明显毒副反应。本实验采用免疫功能健全的 BALB/c 雌性小鼠构建荷瘤模型, 较裸鼠构建的荷瘤模型, 其肿瘤组织免疫微环境更接近临床。提取新鲜的肿瘤组织及周围淋巴结中的淋巴细胞, 流式细胞术分别检测各组 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg/CD4⁺T 细胞的值,

结果发现,UTI 单药以及联合 DCT 均可减少 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 在肿瘤局部浸润且以两者联合作用最为显著,其组间差异有统计学意义,各组间肿瘤体积差异也具有显著性。可以认为 UTI 作为免疫调节剂,可改善肿瘤组织的免疫抑制状态。DCT,广谱抗实体性肿瘤,可能对肿瘤免疫微环境也有调节作用。

IL-2 是抗肿瘤免疫最重要的 Th1 型细胞因子,在细胞因子调节中起关键作用^[13]。于冰等^[14]在研究中发现,乳腺癌组织中 IL-2 水平较乳腺纤维腺瘤低,一方面提示乳腺癌组织处于免疫抑制状态,另一方面提示低表达的 IL-2 使肿瘤细胞的凋亡在一定程度上受到抑制,认为 IL-2 可通过增强 T 细胞对 FasL 的敏感性,从而诱导肿瘤细胞凋亡,对肿瘤细胞的化疗敏感性产生正性影响,可作为临床化疗疗效的指标之一。IL-10 是一种免疫负性调节因子,主要由 Th2 细胞等产生。近年来发现,乳腺癌等多种恶性肿瘤细胞也可分泌 IL-10,作为自分泌或旁分泌生长因子,促进肿瘤生长,抑制肿瘤细胞凋亡,抑制免疫反应^[15-16],调节肿瘤免疫微环境。Chandler 等^[15]发现,IL-10 与肿瘤临床分期,腋窝淋巴结转移呈正相关,IL-10 的高表达,标志着预后不良。IL-6 是一种多功能生物活性多肽,可由肿瘤微环境中的巨噬细胞、成纤维细胞分泌,也可由肿瘤细胞旁分泌和自分泌。有研究表明,IL-6 可在多种恶性肿瘤中高表达,对肿瘤细胞的增殖有重要影响,促进癌细胞的侵袭,导致紫杉类化疗耐药^[17]。Jablonowska 等^[18]提出,乳腺癌患者高水平的 IL-6,与 ER 状态和淋巴结转移相关,提示预后不良且病理分期越晚,IL-6 水平越高。我们前期研究中已确认 UTI 联合 DCT 对裸鼠移植瘤组织中的 IL-2、IL-6、IL-10 表达的影响^[19],本实验采用的免疫正常的 BALB/c 雌性小鼠构建荷瘤模型,检测肿瘤组织微环境中 IL-2、IL-6 以及 IL-10 的表达,使其结果以及药物对其影响更接近于临床病例,更具有说服力。

MMPs 是一类与肿瘤关系密切的蛋白水解酶,主要由肿瘤细胞合成和分泌,其中 MMP-9 主要在乳腺上皮组织中表达^[20],降解基底膜和细胞外机制,促进肿瘤的侵袭^[21]。Roca 等^[22]研究提出,MMP-9 可通过下调 E-cadherin 诱发上皮间质化,从而促进肿瘤的形成,而 TIMP1 能抑制 MMP-9 水解活性,从而对肿瘤的侵袭起抑制作用^[23]。郭通等^[24]在临床研究发现,TIMP1 的表达量与腋窝淋巴结转移情况相关,与乳腺癌预后也密切相关。本研究发现,UTI 联

合 DCT 可明显降低 MMP-9 的表达,促进 TIMP1 的合成,抑制肿瘤的生长及侵袭。

综上所述,肿瘤免疫微环境的中免疫细胞,炎症因子及基质等,对肿瘤的形成和侵袭发挥着重要作用。本研究发现 UTI、DCT 对免疫正常小鼠肿瘤的抑制作用且以联合用药作用最为显著。可能与调节肿瘤免疫微环境,降低 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 与 CD4⁺T 细胞的比值、促进 IL-2 的表达,抑制 IL-6 及 IL-10,以及促进 TIMP1,抑制 MMP-9 的表达有关。

参 考 文 献

- [1] Siegel R, Jemal M. Cancer statistics [J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2014, 64(1): 9-29.
- [2] Yang Q, Liu X, Liu M, et al. Ulinastatin-mediated protection against zymosan-induced multiple organ dysfunction in rats [J]. Biologics, 2010, 38(5): 552-556.
- [3] Li YM, Chen H, Li X, et al. A new immunomodulatory therapy for severe sepsis: Ulinastatin Plus Thymosin {alpha} 1 [J]. J Intensive Care Med, 2009, 24(1): 47-53.
- [4] Oka N, Okumura Y, Kanayama HO, et al. Amiloride and urinary trypsin inhibitor inhibit urothelial cancer invasion [J]. Eur Urol, 2003, 44(6): 737-741.
- [5] Hirabayashi N, Tanimura H, Yamaue H. Nitrite/nitrate oxide and cytokines changes in patients with surgical stress [J]. Dig Dis Sci, 2005, 50(5): 893-897.
- [6] Zhao X, Sun X, Gao F, et al. Effects of ulinastatin and docetaxel on breast tumor growth and expression of IL-6, IL-8, and TNF-alpha [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2011, 30(1): 22.
- [7] Zhong B, Shen H, Sun X, et al. Additive effects of ulinastatin and docetaxel on growth of breast cancer xenograft in nude mice and expression of PGE2, IL-10, and IL-2 in primary breast cancer cells [J]. Cancer Biother Radiopharm, 2012, 27(4): 252-258.
- [8] Luo J, Sun X, Gao F, et al. Effects of ulinastatin and docetaxel on breast cancer invasion and expression of uPA, uPAR and ERK [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2011(30): 71.
- [9] Lugade AA, Sorensen EW, Gerber SA, et al. Radiation-induced IFN-gamma production within the tumor microenvironment influences antitumor immunity [J]. J Immunol, 2008, 180(5): 3132-3139.
- [10] Moria M, Benotmanea MA, Tironea I, et al. Transcriptional response to ionizing radiation in lymphocyte subsets [J]. Cell Mol Life Sci Res, 2005, 62(13): 1489-1501.
- [11] Azuma T, Takahashi T, Kunisata A, et al. Human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells suppress NKT cell functions [J]. Cancer Res, 2003, 63(15): 4516-4520.
- [12] Trzonkowski P, Szmit E, Myśliwska J, et al. CD4⁺CD25⁺T regulatory cells inhibit cytotoxic activity of T CD8⁺ and NK lymphocytes in the direct cell-to-cell interaction [J]. Clin Immunol, 2004, 112(3): 258-267.
- [13] Waldmann T, Tagaya Y, Bamford R. Interleukin-2, interleukin-15, and their receptors [J]. Int Rev Immunol, 1998, 16(3-4): 205-226.
- [14] 于冰, 孙治君, 沈洪彦. 乳腺癌中 IL-2、IL-4 表达与化疗药物