

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2021.16.001

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20210329.1701.007.html\(2021-03-30\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20210329.1701.007.html(2021-03-30))

HER2 阳性乳腺癌细胞来源的可溶性 PD-L1 对巨噬细胞极化的调控作用探讨*

袁惠玲, 吴丽华, 陈桂林, 黄珂铭

(南方医科大学附属东莞人民医院乳腺科, 广东东莞 523000)

[摘要] **目的** 探讨人表皮生长因子受体 2(HER2)阳性乳腺癌细胞对巨噬细胞极化的调控作用。**方法** ELISA 检测 HER2⁻ 和 HER2⁺ 乳腺癌患者外周血和乳腺组织中可溶性程序性死亡配体 1(sPD-L1)水平;流式细胞术检测乳腺组织中 M1 型(CD86⁺CD206⁻CD68⁺/CD68⁺)和 M2 型(CD86⁻CD206⁺CD68⁺/CD68⁺)巨噬细胞比例;ELISA 检测 HER2⁻ 和 HER2⁺ 乳腺癌细胞系培养上清液 sPD-L1 水平;流式细胞术检测 HER2⁻ 和 HER2⁺ 乳腺癌细胞系培养上清液处理后的外周血单个核细胞(PBMC)源巨噬细胞极化比例变化;实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测 PBMC 源巨噬细胞 γ -干扰素(IFN- γ)、白细胞介素(IL)-1 β 、诱导型一氧化氮合酶(INOS)、IL-10、转化生长因子- β (TGF- β)和精氨酸酶 1(ARG1)mRNA 表达水平。**结果** HER2⁺ 乳腺癌患者外周血浆和组织中 sPD-L1 表达水平明显高于 HER2⁻ 患者(均 $P < 0.001$);HER2⁺ 乳腺癌患者组织 M1 型巨噬细胞比例明显低于 HER2⁻ 患者($P < 0.001$),M2 型巨噬细胞比例明显高于 HER2⁻ 患者($P < 0.05$);HER2⁻ 腺癌细胞系(SK-BR-3)和 HER2⁺ 腺癌细胞系(MDA-MB-453)乳腺癌细胞条件性培养基(BCM)中 sPD-L1 水平随培养时间增加而上升;相比于 HER2⁻ 腺癌细胞系,HER2⁺ 腺癌细胞系 BCM 中 sPD-L1 水平明显升高($P < 0.05$);HER2⁺ 腺癌细胞系 BCM 处理的 M1 型和 M2 型巨噬细胞比例及 M1/M2 比值明显高于 HER2⁻ 腺癌细胞系($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$);HER2⁺ 腺癌细胞系 BCM 处理组 M1 型巨噬细胞相关基因 IFN- γ 、IL-1 β 和 iNOS mRNA 水平明显降低($P < 0.05$),M2 型巨噬细胞相关基因 ARG1、TGF- β 、IL-10 mRNA 水平明显升高($P < 0.001$)。**结论** HER2⁺ 和 HER2⁻ 乳腺癌细胞通过 sPD-L1 调控肿瘤组织免疫微环境巨噬细胞极化和功能。

[关键词] 乳腺癌;人表皮生长因子受体 2;可溶性程序性死亡配体 1;巨噬细胞极化

[中图分类号] R737.9

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2021)16-2701-06

Regulatory effect of soluble PD-L1 derived from HER2 positive breast cancer cells on polarization of macrophages*

YUAN Huiling, WU Lihua, CHEN Guilin, HUANG Keming

(Department of Mastopathy, Affiliated Dongguan People's Hospital, Southern Medical University, Dongguan, Guangdong 523000, China)

[Abstract] **Objective** To explore the regulatory effect of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) positive breast cancer cells on the polarization of macrophages. **Methods** ELISA was used to detect the level of soluble programmed death-ligand 1 (sPD-L1) in the peripheral blood and breast tissue of the patients with HER2⁻ and HER2⁺ breast cancer; flow cytometry was used to detect the ratio of M1 type (CD86⁺CD206⁻CD68⁺/CD68⁺) and M2 type (CD86⁻CD206⁺CD68⁺/CD68⁺) macrophages; ELISA was used to detect the sPD-L1 level in the culture supernatant of HER2⁻ and HER2⁺ breast cancer cell lines; flow cytometry was used to detect the ratio of PBMC-derived macrophages after treated with the culture supernatant of HER2⁻ and HER2⁺ breast cancer cell lines; quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was used to detect the γ -interferon (IFN- γ), interleukin-1 β (IL-1 β), inducible nitric oxide synthase (INOS), IL-10, transforming growth factor- β (TGF- β) and arginase 1 (ARG1) mRNA expression levels of PBMC-derived macrophages. **Results** The expression levels of sPD-L1 in plasma and tissue homogenate of HER2⁺ patients with breast cancer were significantly higher than those of HER2⁻ patients ($P < 0.001$); the M1 type macrophages ratio in tissue homogenate of HER2⁺ patients with breast cancer was significantly lower than that of HER2⁻ patients, the

M2 type macrophages ratio was significantly higher than that of HER2⁻ patients ($P < 0.05$); the sPD-L1 level was increased in breast cell conditional medium (BCM) of HER2⁺ adenocarcinoma cell line (MDA-MB-453) and HER2⁻ adenocarcinoma cell line (SK-BR-3) in time-dependent manner; compared with HER2⁻ adenocarcinoma cell lines, the sPD-L1 level was increased significantly in BCM of HER2⁺ adenocarcinoma cell lines ($P < 0.05$). The proportions of M1, M2 macrophages and M1/M2 ratio treated with BCM of HER2⁺ adenocarcinoma cell lines were significantly higher than those of HER2⁻ adenocarcinoma cell lines ($P < 0.05$ or $P < 0.001$); M1 type macrophages-related genes IFN- γ , IL-1 β and iNOS mRNA levels were significantly decreased in HER2⁺ adenocarcinoma cell line BCM treatment group ($P < 0.05$), M2 type macrophages-related genes IL-10, TGF- β and ARG1 levels were significantly increased ($P < 0.001$). **Conclusion** HER2⁺ and HER2⁻ breast cancer cells regulate the polarization and function of macrophages in the immune microenvironment of tumor tissues through sPD-L1.

[Key words] breast carcinoma; human epidermal growth factor receptor 2; soluble programmed death ligand-1; macrophage polarization

人表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2) 阳性乳腺癌 (以下简称 HER2⁺ 乳腺癌) 是一类由 HER2/neu 引发的低免疫力型恶性乳腺肿瘤, 占原发性浸润性乳腺癌的 15%~30%^[1-2]。研究发现, HER2/neu 是一种具有酪氨酸激酶活性的免疫原性蛋白, 可在 HER2⁺ 肿瘤患者中引起体液和细胞免疫反应^[3]。无论是通过“免疫编辑”还是其他免疫逃逸机制, 在 HER2⁺ 乳腺癌肿瘤微环境中对 HER2/neu 的细胞免疫反应减弱都与较差的预后相关^[4]。相反, 针对 HER2/neu 的细胞和体液反应增加与肿瘤发生减少和预后改善有关^[5]。HER2/neu 过表达的癌症患者通常表现出针对该蛋白的现有免疫力降低^[5]。因此, HER2/neu 在刺激致瘤性免疫微环境中起关键调节作用, 然而 HER2/neu 是否参与乳腺癌免疫微环境稳态调节尚未明确。

巨噬细胞是一群具有调控肿瘤免疫微环境稳态作用的固有免疫细胞亚群, 根据其表型分为 M1 或 M2 样状态^[6]。M1 型巨噬细胞与促炎反应有关, 而 M2 型巨噬细胞与血管新生和炎症抑制相关^[6]。乳腺癌中的肿瘤相关巨噬细胞 (tumor-associated macrophage, TAM) 主要是 M2 型巨噬细胞亚群, 其促进乳腺肿瘤细胞的多种生物学进程, 包括肿瘤细胞生长、侵袭和转移^[7]; 其次, TAM 还可以在乳腺癌模型中诱导对多种治疗的耐药性^[8]。重要的是, HER2 蛋白过表达或基因扩增发生在 20%~30% 的新诊断的晚期乳腺癌患者中, 且晚期乳腺癌表现出高度极化的 M2 型 TAM^[8]。然而, HER2⁺ 乳腺癌细胞是否影响巨噬细胞极化仍不清楚。因此, 在本研究中: (1) 论证 HER2⁺ 乳腺癌患者外周血和癌组织中可溶性程序性死亡配体 1 (soluble programmed death-ligand 1, sPD-L1) 和癌组织局部巨噬细胞极化的关系; (2) 体外探究 HER2⁻ 腺癌细胞系和 HER2⁺ 腺癌细胞系培养上清 sPD-L1 水平的差异; (3) 探究 HER2⁻ 腺癌细胞系和

HER2⁺ 腺癌细胞系培养上清对巨噬细胞极化和功能的影响, 以揭示 HER2⁺ 和 HER2⁻ 乳腺癌细胞对巨噬细胞极化的影响, 并为 HER2⁺ 和 HER2⁻ 乳腺癌的抗 PD-L1 治疗提供新的理论支持。

1 资料与方法

1.1 一般资料

征集 2018 年 4 月至 2020 年 6 月 HER2⁻ 和 HER2⁺ 乳腺癌患者各 20 例。纳入标准: (1) 术后经病理检查诊断为浸润性乳腺癌; (2) 术前未进行放疗和免疫治疗; (4) 符合 HER2⁺ 乳腺癌或 HER2⁻ 乳腺癌判定标准, 即免疫组织化学染色雌激素受体阴性 (ER⁻) 孕激素受体阴性 (PR⁻) 和 HER2⁺ 细胞 80% 以上判为 HER2⁺ 乳腺癌, ER⁻ PR⁻ 和 HER2⁻ 细胞 80% 以上判为 HER2⁻ 乳腺癌。排除标准: (1) 有远端转移者; (2) 其他肿瘤转移到乳腺者; (3) 合并严重心、肝、肾衰竭者; (4) 合并严重心血管疾病者; (5) 合并其他系统严重原发病者, 如消化道疾病、泌尿系统疾病等。收集患者一般临床资料, 两组年龄、体重指数 (BMI)、肿瘤尺寸, 以及淋巴结阳性、3 级肿瘤、HER1⁺、ER⁺、PR⁺ 患者百分比比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 两组 Ki-67⁺ 患者百分比比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1。本文研究经本院伦理委员会审核批准, 所有患者、志愿者均对本研究知情并签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和干预

乳腺癌细胞系 BT-474、SK-BR-3、MDA-MB 453 和 MDA-MB 468 购自武汉普诺赛生命科技有限公司。所有细胞系在含有 100 U/mL 青霉素、100 mg/mL 链霉素 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司) 和 10% 胎牛血清 (四季青, 浙江天杭生物科技股份有限公司) 的 RPMI-1640 培养基 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司) 中常规培养。培养条件: 37 °C,

5% CO₂ 培养箱。5×10⁵ 个细胞接种于 6 孔板,培养 24 h 贴壁后,收集 0、12、24 和 48 h 的培养上清液,1 000×g 离心 10 min。弃去沉淀后保留上清液,即为乳腺癌细胞条件性培养基(breast cell conditional medium,BCM)。

表 1 HER2⁻ 和 HER2⁺ 乳腺癌患者临床特征比较 (n=20)

临床特征	HER2 ⁻ 乳腺癌	HER2 ⁺ 乳腺癌	P
年龄($\bar{x}\pm s$,年)	57.5±14.5	58.5±17.2	0.825 2
BMI($\bar{x}\pm s$,kg/m ²)	24.5±2.8	22.5±5.2	0.426 4
肿瘤尺寸($\bar{x}\pm s$,mm)	26.2±8.8	23.3±7.6	0.563 2
淋巴结阳性[n(%)]	7(35.0)	9(45.0)	0.052 5
3 级肿瘤[n(%)]	2(10.0)	5(25.0)	0.056 2
HER1 ⁺ [n(%)]	6(30.0)	7(35.0)	0.759 3
ER ⁺ [n(%)]	11(55.0)	10(50.0)	0.952 7
PR ⁺ [n(%)]	8(40.0)	10(50.0)	0.369 8
Ki-67 ⁺ [n(%)]	11(55.0)	15(75.0)	0.042 9

1.2.2 ELISA

根据人 PD-L1 ELISA 说明书(武汉华美生物工程公司)检测 HER2⁻ 和 HER2⁺ 乳腺癌患者外周血浆和组织匀浆液中 sPD-L1 表达。称取约 100 mg 组织,用 1 mL 磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗组织。然后加入含苯甲基磺酰氟(PMSF,武汉塞维尔生物科技有限公司)的 RIPA 裂解液匀浆破碎后 14 000×g 4 ℃ 离心 20 min,收集上清液。将 50 μL 血浆和组织匀浆液加入微孔中,然后在室温下于黑暗处孵育 60 min。将液体从孔中倒出,并用吸收纸轻拍以确保液体完全通过孔排出。然后将偶联酶(50 μL)加入孔中,在室温下于黑暗处孵育 60 min。洗涤过程重复 3 次。这些过程之后,将底物(50 μL)添加到每个孔中,并在室温下在黑暗处孵育 30 min。每孔加入终止试剂,并测定 450 nm 处的吸光度值(A₄₅₀ 值)。每个样品重复测量 3 次。

1.2.3 人外周血单个核细胞分离和原代巨噬细胞培养

HER2⁻ 和 HER2⁺ 乳腺癌患者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells,PBMC)收集至乙二胺四乙酸(EDTA)处理抗凝采血管中,混匀后加入至等体积的单个核细胞淋巴分离液(天津市灏洋生物制品科技有限责任公司)上层,800×g 离心 30 min 后吸取单个核细胞层。加入 PBS 漂洗 3 次。加入含有 100 U/mL 青霉素、100 mg/mL 链霉素(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)和 10% 胎牛血清(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)的 RPMI-1640 培养基(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)中重悬并计数。1×10⁵ 个细胞接种于 12 孔板,每孔加入 50

ng/mL 重组人巨噬细胞集落刺激因子(recombinant human macrophage colony-stimulating factor, rhM-CSF,美国 PeproTech 公司),培养 7 d 贴壁后加入 BCM 培养 24 h。

1.2.4 流式细胞术

巨噬细胞的表型检测采用异硫氰酸荧光素(FITC)偶联的抗人 CD68(61D3)、PE-Cyanine7 偶联的抗人 CD86(IT2.2)和 PE-Cyanine7 偶联的抗人 CD206(19.2),均购自美国 eBioscience 公司。采用 1% TritonX-100 破膜 10 min 后,加入 PBS 漂洗重悬,加入上述抗体 2.5 mL。室温孵育 30 min 后加入 PBS 漂洗重悬。通过 NovoCyte 流式细胞仪分析巨噬细胞的表型,使用 Treestar FlowJo 10.0.7 版软件(美国 TreeStar 公司)分析数据。

1.2.5 总 RNA 提取和实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)

采用 Trizol 法提取巨噬细胞总 RNA。使用 Nanodrop 分光光度计(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)分析 RNA 浓度和纯度。1 000 ng RNA 采用第一岛链 cDNA 合成试剂盒(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)合成 cDNA。以 10 ng 为模板,采用 SYBR Green I 染料(日本 TaKaRa 公司)在 qRT-PCR 仪(型号:Applied Biosystems 7900)检测 mRNA 基因表达水平。反应条件:98 ℃ 3 min,98 ℃ 10 s,60 ℃ 30 s,扩增 40 个循环,采用 2^{-ΔΔCt} 计算扩增倍数。引物见表 2。

表 2 qPCR 引物序列

基因名称	引物序列
IFN-γ	正向:5'-GAGTGTGGAGACCATCAAGGAAG-3'
	反向:5'-TGCTTTGCGTTGGACATTC AAGTC-3'
IL-1β	正向:5'-CCACAGACCTTCCAGGAGAATG-3'
	反向:5'-GTGCAGTTCAGTGATCGTACAGG-3'
INOS	正向:5'-GCTCTACACCTCCAATGTGACC-3'
	反向:5'-CTGCCGAGATTTGAGCCTCATG-3'
IL-10	正向:5'-TCTCCGAGATGCCTTCAGCAGA-3'
	反向:5'-TCAGACAAGGCTTGGAACCCA-3'
TGF-β	正向:5'-TACCTGAACCCGTGTTGCTCTC-3'
	反向:5'-GTTGCTGAGGTATCGCCAGGAA-3'
ARG1	正向:5'-TCATCTGGGTGGATGCTCACAC-3'
	反向:5'-GAGAATCTGGCACATCGGGAA-3'
ACTB	正向:5'-CACCATTGGCAATGAGCGGTTTC-3'
	反向:5'-AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT-3'

1.2.6 Western blot

乳腺癌细胞系总蛋白采用 RIPA 裂解液(上海碧云天生物技术有限公司)提取。5×10⁵ 个细胞接种于

6 孔板,培养 24 h 贴壁后培养 48 h。弃去上清液后 PBS 漂洗 1 次,加入 300 μ L 含 1 mmol/L 的 PMSF (武汉塞维尔生物科技有限公司)孵育 10 min。收集至 1.5 mL EP 管中,超声 5 s。14 000 \times g 4 $^{\circ}$ C 离心 20 min。上清液采用 Bradford 检测蛋白浓度并变性。以 50 μ g 蛋白上样量在 10% 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离胶电泳分离,300 mA 恒流湿转 2 h 至聚偏二氟乙烯膜上,含 5% 牛血清清蛋白(BSA)的 TBST 溶液室温封闭 1 h,加入 HER2 一抗(北京博奥森生物技术有限公司)后 4 $^{\circ}$ C 摇床孵育 12 h,第 2 天 TBST 室温漂洗 3 次,每次 5 min。室温孵育二抗(北京博奥森生物技术有限公司)1 h,TBST 溶液以 1:5 000 稀释,TBST 室温漂洗 3 次,每次 5 min。电化学发光(ECL)试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)发光显示。蛋白表达采用 ImageJ 软件分析灰度值,标准化至 β -actin(北京博奥森生物技术有限公司)灰度值。

1.3 统计学处理

采用 SPSS23.0 统计软件进行数据分析。数据均为计量资料,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 Student's *t* 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ (双侧)。采用 Graphpad Prism 8 软件制图。

2 结果

2.1 HER2⁻和 HER2⁺患者外周血浆和组织匀浆液中 sPD-L1 表达水平

HER2⁺患者外周血浆和组织匀浆液中 sPD-L1 表达水平明显高于 HER2⁻患者,见图 1。

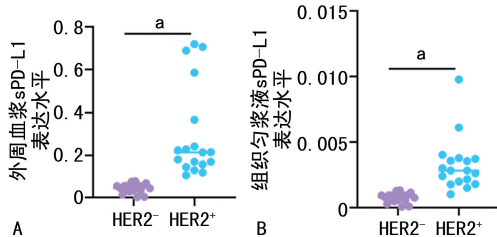


图 1 HER2⁻和 HER2⁺患者的外周血浆和组织匀浆液中 sPD-L1 水平比较

2.2 HER2⁻和 HER2⁺患者组织局部 M1 和 M2 巨噬细胞的比例

HER2⁺患者组织中 M1 型巨噬细胞比例(CD86⁺CD206⁻CD68⁺/CD68⁺)明显低于 HER2⁻患者(图 2A、B),M2 型巨噬细胞比例(CD86⁻CD206⁺CD68⁺/CD68⁺)明显高于 HER2⁻患者(图 2A、C)。

2.3 HER2⁻和 HER2⁺腺癌细胞 HER2 表达和 sPD-L1 水平

相比于 HER2⁻腺癌细胞系(BT-474 和 SK-

BR-3),HER2⁺腺癌细胞系(MDA-MB-453 和 MDA-MB-468)高表达 HER2,见图 3A、B。HER2⁻腺癌细胞系(SK-BR-3)和 HER2⁺腺癌细胞系(MDA-MB-453)BCM 中的 sPD-L1 水平随培养时间增加而上升,见图 3C、D。

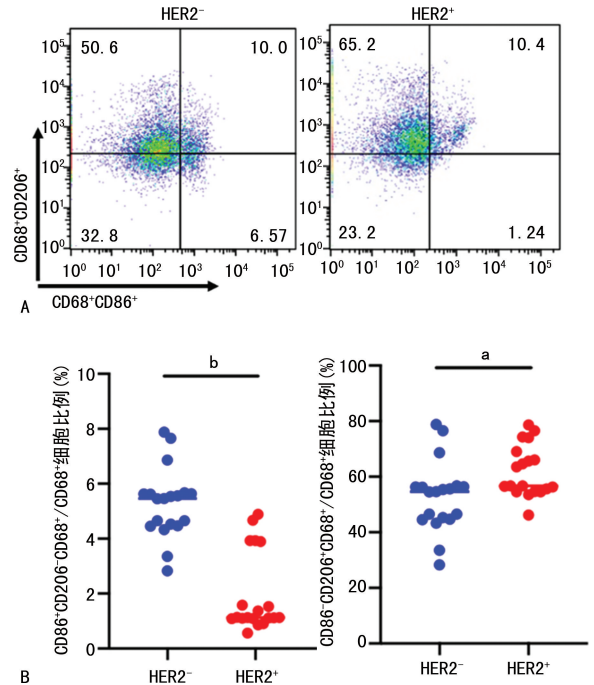


图 2 HER2⁻和 HER2⁺患者组织局部 M1 和 M2 巨噬细胞比例

2.4 HER2⁻和 HER2⁺腺癌细胞系培养上清液对 PBMC 源巨噬细胞表型极化的影响

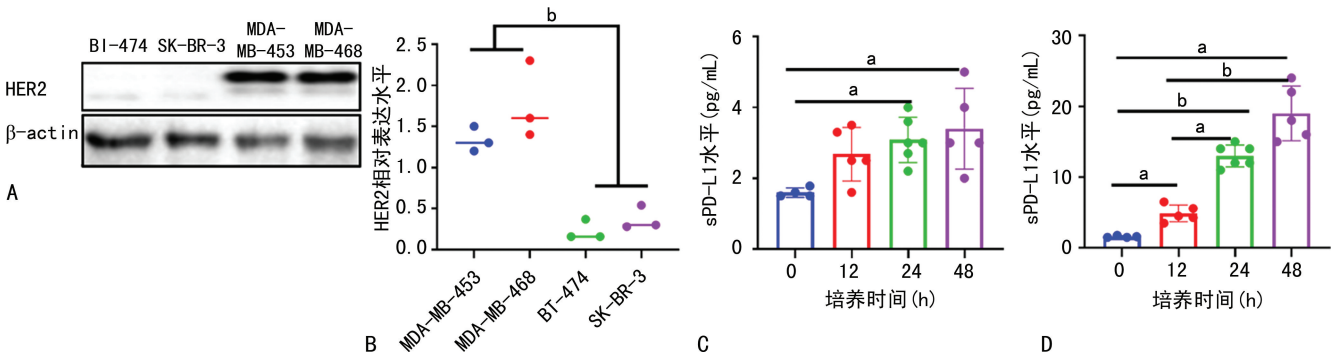
相比于 HER2⁻腺癌细胞系(BT-474 和 SK-BR-3),HER2⁺腺癌细胞系(MDA-MB-453 和 MDA-MB-468)BCM 中的 sPD-L1 明显上升,见图 4A。HER2⁺腺癌细胞系(MDA-MB-453)BCM 处理的 M1 型(CD86⁺CD206⁻CD68⁺/CD68⁺)和 M2 型(CD86⁻CD206⁺CD68⁺/CD68⁺)巨噬细胞比例明显高于 HER2⁻腺癌细胞系(SK-BR-3),见图 4B、C、D。HER2⁺腺癌细胞系(MDA-MB-453)培养上清液处理组 M1/M2 比值明显高于 HER2⁻腺癌细胞系(SK-BR-3)处理组,见图 4E。

HER2⁺腺癌细胞系(MDA-MB-453)培养上清液处理组 M1/M2 比值明显高于 HER2⁻腺癌细胞系(SK-BR-3)处理组,见图 4E。

2.5 HER2⁻和 HER2⁺腺癌细胞系 BCM 对 PBMC 源巨噬细胞功能极化的影响

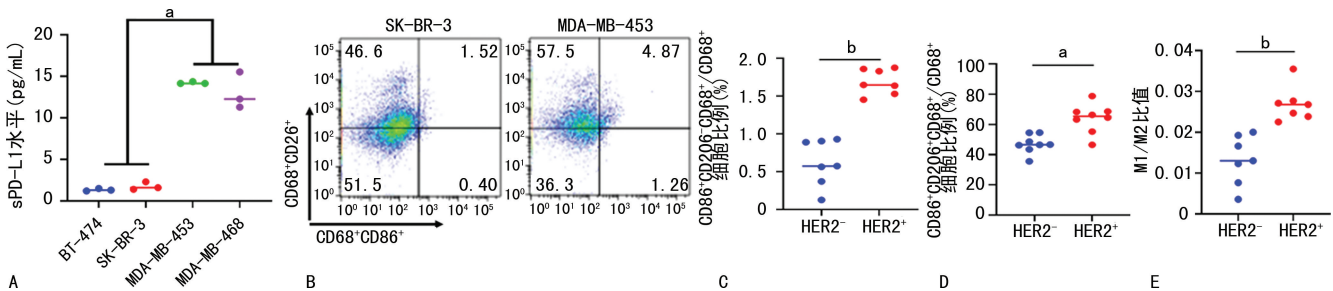
为了进一步明确 HER2⁻和 HER2⁺腺癌细胞系对 PBMC 源巨噬细胞的功能极化,检测 M1 型和 M2 型巨噬细胞功能相关基因 mRNA 水平。M1 型巨噬细胞相关基因 IFN- γ 、IL-1 β 和 INOS mRNA 水平明

显降低, M2 型巨噬细胞相关基因 IL-10、TGF-β 和 ARG1 mRNA 水平明显上升, 见图 5。



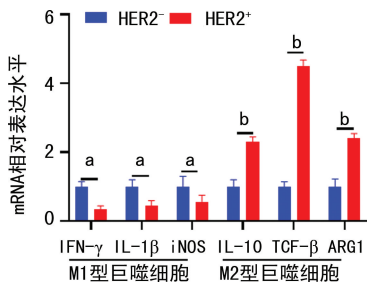
A: HER2⁻ 腺癌细胞系 (BT-474 和 SK-BR-3) 和 HER2⁺ 腺癌细胞系 (MDA-MB-453 和 MDA-MB-468) HER2 表达 Western blot 图; B: 腺癌细胞系 HER2 相对表达水平统计图; C: HER2⁻ 腺癌细胞系 (SK-BR-3) BCM 中 sPD-L1 水平统计图; D: HER2⁺ 腺癌细胞系 (MDA-MB-453) BCM 中 sPD-L1 水平统计图; ^a: $P < 0.05$, ^b: $P < 0.01$ 。

图 3 HER2⁻ 和 HER2⁺ 腺癌细胞系 HER2 表达及 sPD-L1 水平



A: HER2⁻ 腺癌细胞系 (BT-474 和 SK-BR-3) 和 HER2⁺ 腺癌细胞系 (MDA-MB-453 和 MDA-MB-468) 培养上清液 sPD-L1 水平检测; B: M1 型 (CD86⁺ CD206⁻ CD68⁺ / CD68⁺) 和 M2 型 (CD86⁻ CD206⁺ CD68⁺ / CD68⁺) 巨噬细胞极化流式细胞图; C: M1 型 (CD86⁺ CD206⁻ CD68⁺ / CD68⁺) 巨噬细胞比例统计图; D: M2 (CD86⁻ CD206⁺ CD68⁺ / CD68⁺) 巨噬细胞比例统计图; E: M1/M2 型巨噬细胞比值统计图; ^a: $P < 0.05$, ^b: $P < 0.001$ 。

图 4 HER2⁺ 腺癌细胞系 BCM 促进 M1 型 PBMC 源巨噬细胞极化



^a: $P < 0.05$, ^b: $P < 0.001$ 。

图 5 HER2⁺ 腺癌细胞系 BCM 促进 M2 型巨噬细胞功能极化并抑制 M1 型巨噬细胞功能极化

3 讨论

巨噬细胞是关键免疫细胞和炎症过程的重要调节剂^[6]。驻留的巨噬细胞可以充当组织损伤的传感器, 并且可以维持组织稳态^[6]。尽管已经使用分子标记 (如 HER2) 对乳腺癌疾病进行分类, 以预测预后并确定治疗方式^[3]。但目前的诊断和治疗方式仍存在不足, 许多患者因疾病复发而死亡。因而, 进一步发掘和明确 HER2 乳腺癌的特征有助于其诊断和治疗。本研究对 HER2 表达在乳腺癌免疫微环境巨噬细胞极化中的作用进行探讨, 结果显示: (1) HER2⁺

乳腺癌患者外周血和癌组织中 sPD-L1 水平明显升高, 并伴随癌组织局部 M2 型巨噬细胞极化, 提示 HER2⁺ 患者免疫力降低可能与外周血浆和组织微环境中升高的 sPD-L1 有关。(2) HER2⁻ 腺癌细胞系 (BT-474 和 SK-BR-3) 和 HER2⁺ 腺癌细胞系 (MDA-MB-453 和 MDA-MB-468) 均可分泌 sPD-L1, 且 HER2⁺ 腺癌细胞系分泌更多的 sPD-L1, 提示 HER2⁺ 患者组织微环境中升高的 sPD-L1 可能来自 HER2⁺ 腺癌细胞, 并可能参与组织 M1 和 M2 巨噬细胞极化。(3) HER2⁺ 腺癌细胞系 (MDA-MB-453) 促进 M1 型和 M2 型巨噬细胞比例增加, 同时促进 M1/M2 平衡向 M2 型巨噬细胞功能极化偏移, 提示 HER2⁺ 腺癌细胞系 (MDA-MB-453) 来源的 sPD-L1 可能促进 M1 和 M2 型巨噬细胞极化平衡向 M1。

HER2 在大多数原位乳腺癌中表达, 但仅在 20%~30% 的浸润性乳腺癌中得到维持^[9]。在乳腺癌的发生过程中, 观察到 HER2 表达从良性到导管癌逐渐减少, 在浸润性乳腺癌中 HER2 几乎不表达^[10]。然而, HER2 在乳腺癌中的作用尚未完全明确。本研究结果表明, 在 HER2⁺ 乳腺癌患者中, 高表达 sPD-L1 可能促进癌组织局部 M2 型巨噬细胞激活。因而,

可能促进肿瘤生长和侵袭,导致免疫力降低和肿瘤血管新生^[11-12]。

研究表明,肝细胞肝癌和滋养细胞来源的 sPD-L1 具有调控巨噬细胞极化介导免疫耐受的作用^[13-14]。且血清高水平 sPD-L1 与转移性晚期胃癌患者一线化疗的总体生存期较差有关^[12]。巨噬细胞极化是癌组织免疫微环境紊乱和肿瘤免疫治疗低效的重要因素^[15-16]。本研究体外实验证实,HER2⁺腺癌细胞来源的 sPD-L1 具有调节巨噬细胞极化的作用。这可能促进乳腺癌组织血管新生、肿瘤生长及组织炎性反应,导致抗肿瘤免疫炎症治疗低效^[11]。

综上所述,sPD-L1 高表达于 HER2⁺乳腺癌患者癌组织和外周血中,且 HER2⁺乳腺癌患者癌组织局部巨噬细胞呈现 M2 极化偏移。HER2⁺腺癌细胞来源的 sPD-L1 促进 M1 型和 M2 型巨噬细胞极化,且 M1/M2 平衡偏向 M1 型并伴随 M2 型功能增强。但是,尚需进一步的直接证据说明 sPD-L1 如何调控巨噬细胞及其分子机制。同时,下调 sPD-L1 是否在体影响 HER2⁺乳腺癌患者癌组织巨噬细胞功能极化和抑制肿瘤生长尚需进一步阐明。因此,sPD-L1 作为 HER2⁺乳腺癌的治疗靶点仍有待研究。

参考文献

- [1] WAKS A G, WINER E P. Breast cancer treatment;a review[J]. JAMA, 2019, 321(3): 288-300.
- [2] DENKERT C, VON MINCKWITZ G, BRASE J C, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes and response to neoadjuvant chemotherapy with or without carboplatin in human epidermal growth factor receptor 2-positive and triple-negative primary breast cancers[J]. J Clin Oncol, 2015, 33(9):983-991.
- [3] ARAB A, YAZDIAN-ROBATI R, BEHRAVAN J. HER2-positive breast cancer immunotherapy;a focus on vaccine development[J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2020, 68(1):2.
- [4] STANTON S E, DISIS M L. Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer[J]. J Immunother Cancer, 2016, 4:59.
- [5] SAVAS P, SALGADO R, DENKERT C, et al. Clinical relevance of host immunity in breast cancer;from TILs to the clinic[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2016, 13(4):228-241.
- [6] TARIQ M, ZHANG J, LIANG G, et al. Macrophage polarization:anti-cancer strategies to target tumor-associated macrophage in breast cancer[J]. J Cell Biochem, 2017, 118(9):2484-2501.
- [7] CASSETTA L, FRAGKOGIANNI S, SIMS A H, et al. Human tumor-associated macrophage and monocyte transcriptional landscapes reveal cancer-specific reprogramming, biomarkers, and therapeutic targets [J]. Cancer Cell, 2019, 35(4):588-602.
- [8] KIM I S, GAO Y, WELTE T, et al. Immunotyping of breast cancer reveals distinct myeloid cell profiles and immunotherapy resistance mechanisms[J]. Nat Cell Biol, 2019, 21(9): 1113-1126.
- [9] HARBECK N, GNANT M. Breast cancer[J]. Lancet, 2017, 389(10074):1134-1150.
- [10] WAKS A G, WINER E P. Breast cancer treatment;a review[J]. JAMA, 2019, 321(3): 288-300.
- [11] MA X L, QU X D, YANG W J, et al. Elevated soluble programmed death-ligand 1 levels indicate immunosuppression and poor prognosis in hepatocellular carcinoma patients undergoing transcatheter arterial chemoembolization [J]. Clin Chim Acta, 2020, 511:67-74.
- [12] TAKAHASHI N, IWASA S, SASAKI Y, et al. Serum levels of soluble programmed cell death ligand 1 as a prognostic factor on the first-line treatment of metastatic or recurrent gastric cancer[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2016, 142(8):1727-1738.
- [11] FINKELMEIER F, CANLI Ö, TAL A, et al. High levels of the soluble programmed death-ligand (sPD-L1) identify hepatocellular carcinoma patients with a poor prognosis[J]. Eur J Cancer, 2016, 59:152-159.
- [12] ZHANG Y H, ALDO P, YOU Y, et al. Trophoblast-secreted soluble-PD-L1 modulates macrophage polarization and function[J]. J Leukoc Biol, 2020, 108(3):983-998.
- [15] QIU S Q, WAAIJER S J H, ZWAGER M C, et al. Tumor-associated macrophages in breast cancer;innocent bystander or important player? [J]. Cancer Treat Rev, 2018, 70:178-189.
- [16] CIANCIARUSO C, BELTRAMINELLI T, DU VAL F, et al. Molecular profiling and functional analysis of macrophage-derived tumor extracellular vesicles [J]. Cell Rep, 2019, 27(10): 3062-3080.