

本文引文格式:孙悦,王耀辉,杨继文,等. MHSP65-TCL 疫苗对不同病理类型三阴性乳腺癌治疗效果的差异[J]. 右江民族医学院学报, 2024, 46(1): 65-71, 84.

【论著与临床报道】

MHSP65-TCL 疫苗对不同病理类型三阴性乳腺癌治疗效果的差异

孙悦¹, 王耀辉¹, 杨继文², 储博文³, 王俊³, 董博翰¹

(1. 皖南医学院微生物学与免疫学教研室, 安徽 芜湖 241000;

2. 皖南医学院弋矶山医院核医学科, 安徽 芜湖 241000;

3. 皖南医学院临床学院, 安徽 芜湖 241000)

摘要:目的 评估及比较改良后的结核分枝杆菌热休克蛋白 65-肿瘤细胞裂解物(MHSP65-TCL)疫苗对不同类型三阴性乳腺癌的疗效和差异。方法 首先,生物信息学分析不同病理类型三阴性乳腺癌肿瘤微环境中免疫细胞浸润活化情况;其次,分析三阴性乳腺癌细胞中 RACK1、Bcl-2、CTNBL1 等细胞活化因子,及细胞凋亡诱导因子 PDL1、HMGB1、Fas-L 在三阴性乳腺癌细胞中的丰度及其影响免疫细胞活化的信号通路。进而,在制备 MHSP65-TCL 去除 TCL 中的 PDL1 或增加 TCL 中 Bcl-2,再通过体内外抗肿瘤实验,检测、比较两种方法治疗不同类型三阴性乳腺癌效果的差异。结果 蛋白表达丰度的检测,MDA-MB-453 细胞中 HMGB1 的表达量是最高的,但 Bcl-2 表达最低,结合各类型三阴性乳腺癌淋巴浸润,体外杀伤实验以及体内动物实验,3 种不同类型的三阴性乳腺癌细胞尤其是 LAR 型细胞系 MDA-MB-453,主要依赖 HMGB1 抑制免疫细胞。从 TCL 中去除 HMGB1 可以更为有效地提高 MHSP65-TCL 的抗肿瘤效果。结论 阐明 MHSP65-TCL 疫苗对各类型三阴性乳腺癌疗效差异及机制,并建立起一种三阴性乳腺癌治疗的新方法。

关键词:三阴性乳腺癌;生物信息学;肿瘤细胞裂解物;免疫细胞浸润;抗肿瘤疫苗

中图分类号:R737.9

文献标识码:A

文章编号:1001-5817(2024)01-0065-08

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2024.01.012

Efficacy differences of MHSP65-TCL vaccine in the treatment of triple-negative breast cancer of different pathological types

Sun Yue¹, Wang Yaohui¹, Yang Jiwen², Chu Bowen³, Wang Jun³, Dong Bohan¹

(1. Department of Microbiology and Immunology, Wannan Medical College, Wuhu 241000,

Anhui, China; 2. Department of Nuclear Medicine, Yijishan Hospital of Wannan Medical

College, Wuhu 241000, Anhui, China; 3. School of Clinical Medicine, Wannan

Medical College, Wuhu 241000, Anhui, China)

Abstract: **Objective** To evaluate and compare the efficacy and differences of the MHSP65-TCL (modified mycobacterium tuberculosis heat-shock protein 65 tumor cell lysate) vaccine for different types of triple-negative breast cancer. **Methods** Firstly, bioinformatics was used to analyse immune cell infiltration and activation in the tumor microenvironment of different pathological types of triple-negative breast cancer. Secondly, this study analyzed the abundance of cell-activating factors such as RACK1, Bcl-2, CTNBL1, and apoptosis-inducing factors PDL1, HMGB1, Fas-L in triple-negative breast cancer cells and their signaling pathways affecting immune cell activation. Then, we prepared MHSP65-TCL to remove PDL1 from TCL or to increase Bcl-2 in TCL, and then tested and compared the effects of these two methods in treating different types of triple-negative breast cancer through in vivo and in vitro anti-tumor assays. **Results** The expression of HMGB1 was the highest in MDA-MB-453 cells, but the expression of Bcl-2 was the lowest. Combined with lymphatic invasion of various types of triple-negative breast cancer, in vitro killing assays and in vivo animal experiments,

基金项目:安徽省教育厅自然科学基金项目(KJ2019A0415);安徽省高校优秀青年人才支持计划(重点)(gxyqZD2019040);皖南医学院 2020 年青年卓越人才培养项目(wyqnyx202001)

第一作者:孙悦,硕士,研究方向:免疫学,E-mail:2427263349@qq.com

通讯作者:董博翰,博士,教授,硕士研究生导师,研究方向:肿瘤免疫学,E-mail:240151563@qq.com

three different types of triple-negative breast cancer cells, (especially the LAR cell line MDA-MB-453) mainly relied on HMGB1 to suppress immune cells. Removal of HMGB1 from TCL could improve the anti-tumor effect of MHSP65-TCL more effectively. **Conclusion** This study elucidates the difference in efficacy and mechanism of MHSP65-TCL vaccine on each type of triple-negative breast cancer, and establishes a new method for the treatment of triple-negative breast cancer.

Key words: triple-negative breast cancer; bioinformatics; tumor cell lysate; immune cell infiltration; anti-tumor vaccine

三阴性乳腺癌(TNBC)是指雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)和人表皮生长因子受体(HER2)均阴性的一种特殊类型乳腺癌^[1]。TNBC 约占所有乳腺癌的 15%,其许多生物学特性和基底细胞样型乳腺癌相似,但两者之间存在某些基因表达谱和免疫表型上的差异,因此亦不能完全等同。TNBC 因缺乏内分泌及抗 HER2 治疗的靶点,尚无针对性的标准治疗方案,是乳腺癌治疗中的难点^[2]。目前,TNBC 的内科治疗仍以放化疗为主。但由于这些治疗方法都存在一定的副作用,因此人们一直在尝试寻找更为新颖的方法以治疗该疾病。其中,抗肿瘤的免疫治疗是比较有前途的一个方向^[3-4]。抗肿瘤免疫治疗主要是利用肿瘤抗原或者一些免疫因子作用于机体,通过诱导特异性和非特异性抗肿瘤免疫作用来治疗肿瘤疾病^[5]。目前,人们发现的可以诱导机体产生抗肿瘤免疫作用的物质很多,肿瘤细胞裂解物(tumor cell lysate, TCL)就是其中一种^[6-9]。

本课题组此前的研究,利用结核分枝杆菌热休克蛋白 65 (mycobacterial heat shock protein 65, MHSP65)联合肺癌细胞裂解物,在体外直接混合制备了结核分枝杆菌热休克蛋白 65-肿瘤细胞裂解物(MHSP65-TCL)疫苗。该疫苗中 MHSP65 可以有效地帮助肿瘤抗原进入免疫细胞进而在实验小鼠体内诱导产生特异性及非特异性的抗肿瘤免疫作用,最终成功地抑制了 Lewis 肺癌皮下移植瘤在小鼠体内的生长并延长了荷瘤小鼠的生存期^[6]。这证明将 TCL 同 MHSP65 进行联合应用是抗肿瘤疫苗制备的一个有效策略。

为了研究肿瘤细胞裂解物疫苗对乳腺癌的治疗效果及不同类型乳腺癌对该治疗方法反应性的差异。在本研究中,利用生物信息学的方法分析 TNBC 细胞中 RACK1、Bcl-2、CTNNB1 等细胞活化因子,及细胞凋亡诱导因子 PDL1、HMGB1、Fas-L 在影响抗肿瘤免疫作用的可能机制,并选取其中的关键因子,在制备 MHSP65-TCL 是给予去除或过表达,以增强 MHSP65-TCL 的抗 TNBC 作用。

1 资料与方法

1.1 生物信息学分析

1.1.1 TNBC 组织中免疫细胞浸润情况分析 使用

免疫肿瘤生物学研究的计算工具 IOBR [DOI: 10.3389/fimmu.2021.687975],基于表达谱使用 R 软件包 IOBR 选择了 [CIBERSORT (DOI: 10.1038/nmeth.3337), ESTIMATE (DOI: 10.1038/ncomms3612), quanTIseq (DOI: 10.1186/s13073-019-0638-6), TIMER (DOI: 10.1186/s13059-016-1028-7), IPS: 10.1016/j.celrep.2016.12.019, MCPCounter (DOI: 10.1186/s13059-016-1070-5), xCell (DOI: 10.1186/s13059-017-1349-1), EPIC (DOI: 10.7554/eLife.26476)]方法计算了每个样本的(20种)免疫浸润细胞评分。TIMER 是一个全面的资源,用于系统地分析不同类型癌症的免疫浸润。该版本的网络服务器提供了通过多种免疫去卷积方法估算的免疫浸润丰度。

1.1.2 RACK1、Bcl-2、CTNNB1 等细胞活化因子,及细胞凋亡诱导因子 PDL1、HMGB1、Fas-L 凋亡信号转导通路分析 使用 GeneMANNIA 分析 TNBC 组织中同 RACK1、Bcl-2、CTNNB1、PDL1、HMGB1、Fas-L 等分子在信号通路、物理作用、共表达、共分布等方面的相关的信号通路分子,结合相关文献的查阅,归纳上述分子在 TNBC 免疫微环境中影响免疫细胞活性的可能信号通路。

1.1.3 TNBC 细胞系中 RACK1、Bcl-2、CTNNB1 等细胞活化因子,及细胞凋亡诱导因子 PDL1、HMGB1、Fas-L 表达的丰度分析 CCLE(Cancer Cell Line Encyclopedia)是一个由 Broad 研究所领导的肿瘤基因组学研究项目。它收集并整理了 1 457 个细胞系的全能数据。本研究利用 CCLE 数据集分析了 TNBC 细胞系中 6 种蛋白质(BCL2、CD274、CTNNB1、FASLG、HMGB1、RACK1)的表达水平。

1.1.4 TNBC 的 RNAseq 数据信息分析 从癌症基因组图谱(TCGA)数据集(<https://portal.gdc.com>)获得了 160 个 TNBC 的 RNAseq 数据(level3)和相应的临床信息。使用 Spearman 的相关分析来描述非正态分布的定量变量之间的相关性。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义;使用 K-M Plotter 工具计算了 Risk-Score 的最佳截断值,设置了高低蛋白表达组,基于此将患者分成高低两组,进一步使用 R 软件包 survival 的 survfit 函数分析两组的预后差异,利用 logrank test 方法评估了不同组样本之间的预后差异显著性,

最终观察到显著的预后差异 ($P = 1.2 \times 10^{-6}$, $P = 0.0017$)。

1.2 体外实验检测乳腺癌细胞裂解物活化的免疫细胞对 TNBC 细胞的杀伤作用 制备 MDA-MB-231、MDA-MB-453 和 CAL120 3 种 TNBC 细胞裂解物,培养人 PBMC 细胞,将 3 种 TNBC 细胞裂解物,分别作用于人 PBMC 细胞,每 2×10^5 个细胞制备的裂解物作用于 1×10^6 个 PBMC 细胞, 37°C 孵育 48 h。收集刺激活化的 PBMC 细胞进行细胞计数。然后按 45 : 1、15 : 1、5 : 1 的效靶比,以不同乳腺癌细胞作为靶细胞、PBMC 细胞作为效应细胞将二者混合进行杀伤, 37°C 5% CO_2 孵箱中共孵育 4 h,同时要设立单独靶细胞对照培养孔。4 h 后,弃掉培养上清中的悬浮细胞,收集贴壁细胞并用台盼蓝进行染色计数其中的活的乳腺癌细胞。按下面的公式判断细胞毒性:细胞毒性%=(靶细胞对照孔细胞数-实验孔细胞数)/靶细胞对照孔细胞数 $\times 100\%$ 。

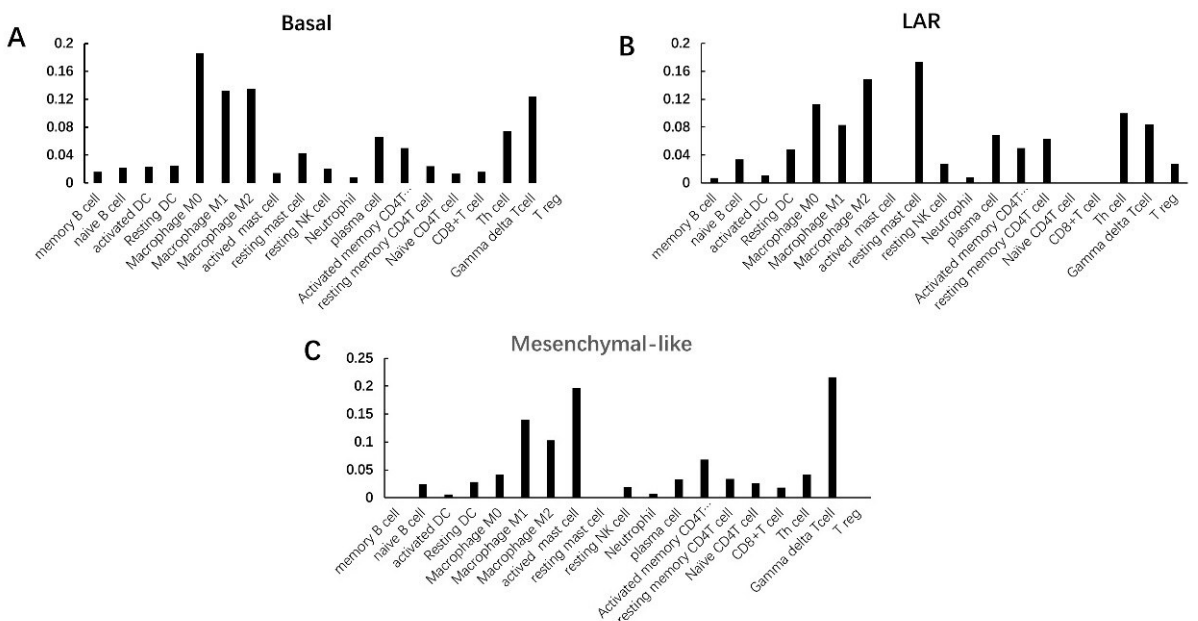
1.3 体内实验检测乳腺癌细胞裂解物活化的免疫细胞抗乳腺癌作用 分为 4 组:PBS 对照组、未改良 MHSP65-TCL 免疫组 (MHSP65-TCL)、HMGB1 去除的 MHSP65-TCL 免疫组 (HMGB1-/MT), Bcl-2 过表达的 MHSP65-TCL 免疫组 (Bcl-2+/+/MT), 每组 5 只鼠。3 种乳腺癌细胞 (MDA-MB-231、MDA-MB-453、CAL120) 均按此分组。人乳腺癌鼠模型建立裸鼠右后肢皮下接种 5×10^5 个乳腺癌细胞,待肿瘤大小生长至肉眼可见,并大小均匀方可进行后续实验。根据不同的组别, PBS 对照组, 每只小鼠的注射剂量为 150 μL PBS; PBMC 细胞免疫组, 每只小鼠的免疫剂

量为 1×10^6 PBMC 细胞/150 微升 PBS。肿瘤接种部位为右后肢腹股沟,免疫注射部位为腹腔,每隔 7 d 免疫 1 次,连续免疫 3 周。同时每隔 3 d 测量肿瘤大小,并观察裸鼠的生存期。

1.4 统计学方法 所有统计分析都用 SPSS 20.0 软件进行,单因素方差分析被用来比较多组的差异。当方差齐性时,采用 t 检验来分析两组之间差异;当方差不齐时,用秩和检验分析两组之间差异。计数资料采用 χ^2 检验进行比较。 $P < 0.05$ 被认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 生物信息学分析不同病理类型 TNBC 肿瘤微环境中免疫细胞的浸润活化情况 TNBC 主要分为 3 种类型 Basal、LAR、Mesenchymal-like。不同病理类型的 TNBC 由于癌细胞本身的生物学特征不同,因此会导致相应肿瘤组织的微环境当中,免疫细胞的出现及激活的情况也各不相同。为了对这样的推测给予验证,本研究组采用利用生物信息学数据库进行分析,结果发现:3 种病理类型的 TNBC 组织中,固有免疫细胞尤其是巨噬细胞活化较为明显,尤其是 Basal 型 TNBC 组织中, M0、M1、M2 型细胞的比例分别达到了 18.6%、13.2% 和 13.5% (见图 1A)。但相比较而言, B 细胞、T 细胞的表达在各种 TNBC 组织中都很低,尤其是 LAR 型 TNBC 中,检测不到 CD8^+ T 细胞 (占总免疫细胞比例为 0%), 但却有较高的 Treg 细胞的表达,其比例为 2.7% (见图 1B)。然而,与之相反, Mesenchymal-like 型检测不到 Treg 细胞的表达 (见总免疫细胞比例的 0%) (见图 1C)。

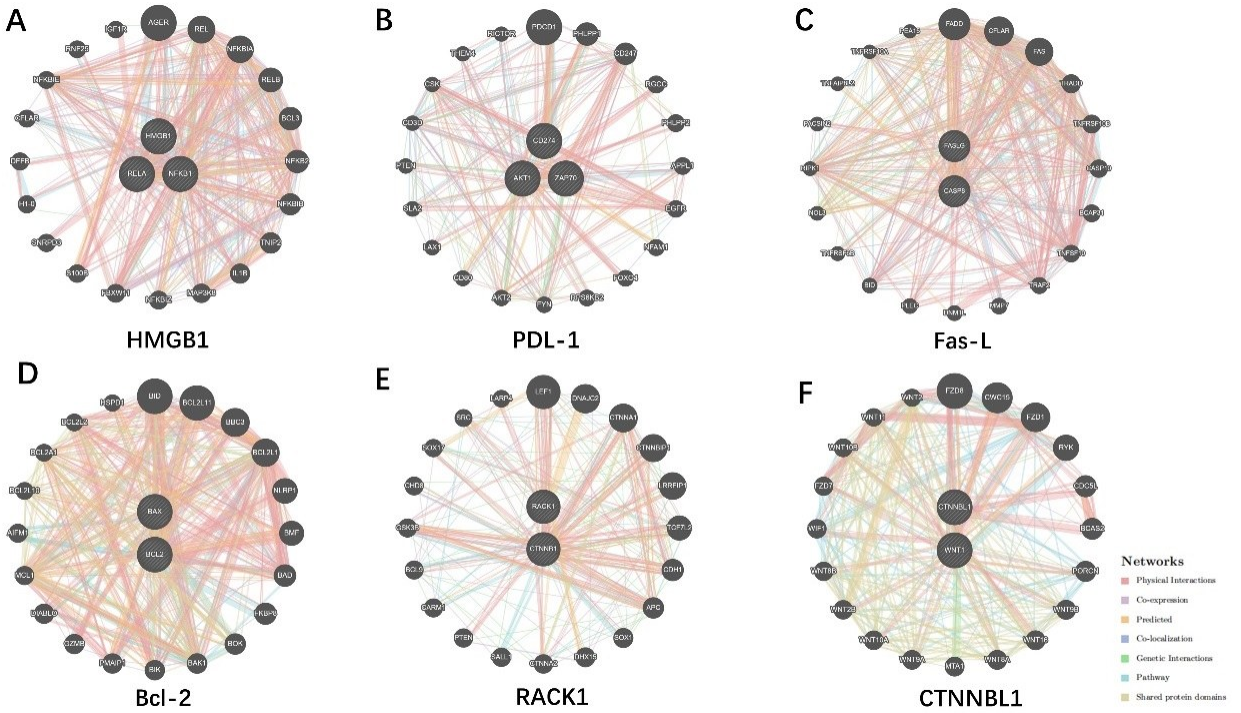


注:A为 Basal 型 TNBC;B为 LAR 型 TNBC;C为 Mesenchymal-like 型 TNBC。

图 1 生物信息学分析 3 种病理类型 TNBC 组织中免疫细胞浸润

2.2 生物信息学分析 RACK1、Bcl-2、CTNNB1 等细胞活化因子,及细胞凋亡诱导因子 PDL1、HMGB1、Fas-L 诱导免疫细胞凋亡的信号通路 不同 TNBC 肿瘤微环境中,免疫细胞表达活化情况的差异,可能同肿瘤细胞产生的某些细胞活化或抑制因子影响免疫细胞的生存状态有关。为此,进一步分析了 TNBC 细胞表达的 RACK1、Bcl-2、CTNNB1 等细胞活化因子,及细胞凋亡诱导因子 PDL1、HMGB1、Fas-L 同免疫细胞凋亡的相关性及其可能的信号通路。结果显示:

HMGB1 同 NF- κ B 有密切联系,可以激活 NF- κ B 信号转导通路,从而诱导凋亡(见图 2A)。PDL-1 主要通过抑制 ZAP70-Akt 通路引发细胞凋亡(见图 2B)。Fas-L 主要通过抑制 FABLG 通路引发凋亡(见图 2C)。Bcl-2 也同凋亡关系密切,该因子主要通过抑制 BAX 分子,抑制细胞增殖导致凋亡的发生(见图 2D)。RACK1 主要通过抑制 β -catenin 活化细胞(见图 2E),而 CTNNB1 则通过 WNT 通路促进细胞活化(见图 2F)。

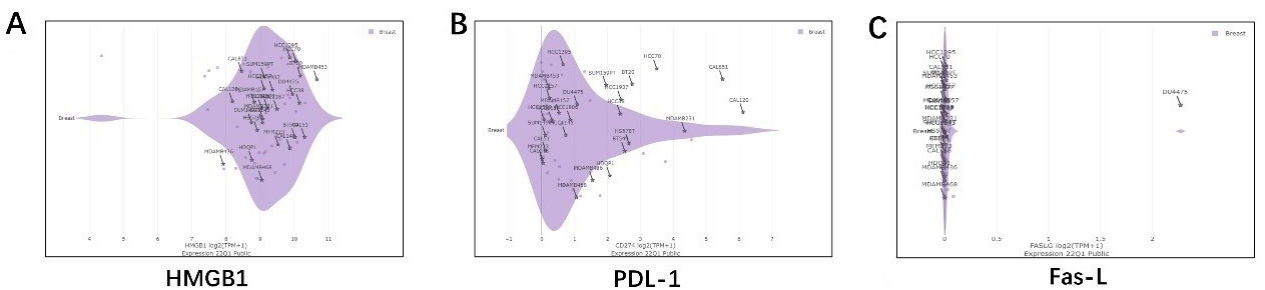


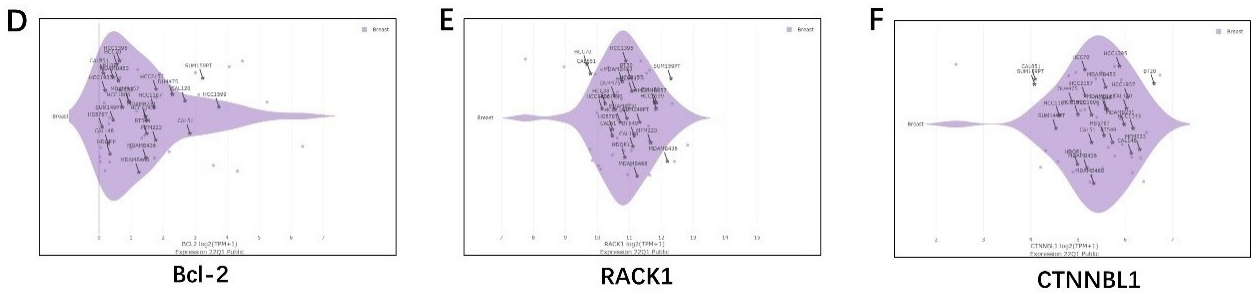
注:A为 HMGB1;B为 PDL-1;C为 Fas-L;D为 Bcl-2;E为 RACK1;F为 CTNNB1。

图 2 生物信息学分析细胞活化因子和凋亡诱导因子影响 TNBC 组织中细胞凋亡的信号通路

2.3 不同病理类型 TNBC 细胞系中,RACK1、Bcl-2、CTNNB1 等细胞活化因子及细胞凋亡诱导因子 PDL1、HMGB1、Fas-L 表达丰度分析 TNBC 细胞表达的细胞活化或抑制因子可以影响免疫细胞在肿瘤微环境中的浸润情况。而不同病理类型的 TNBC 组织之所以免疫浸润的情况不同可能和不同 TNBC 组织中各种细胞活化影响因子的表达量差异有关。为此,本研究分析了多种病理类型 TNBC 细胞中 RACK1、

Bcl-2、CTNNB1 等细胞活化因子,及细胞凋亡诱导因子 PDL1、HMGB1、Fas-L 表达的丰度情况。结果发现:在凋亡诱导的因子中 HMGB1 的平均表达丰度高达 9.07(见图 3A),而 PDL1 和 Fas-L 的表达丰度分别为 1.187、0.043(见图 3B、图 3C),在细胞活化因子中, Bcl-2 的平均表达丰度最低只有 1.43(见图 3D),而 RACK1 和 CTNNB1 在 TNBC 细胞系中的平均表达丰度分别达 10.87 和 5.37(见图 3E、图 3F)。



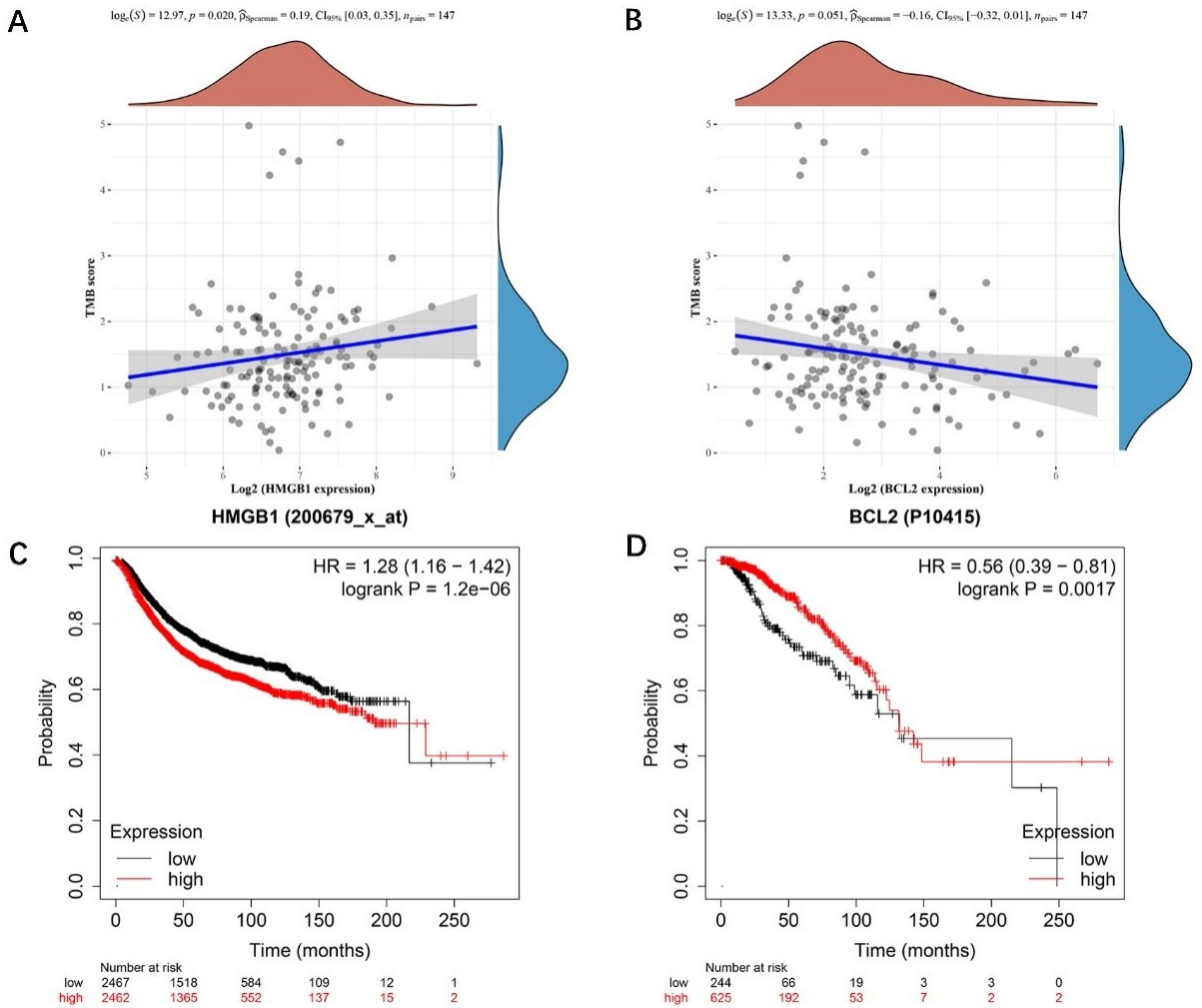


注:A 为 HMGB1;B 为 PDL-1;C 为 Fas-L;D 为 Bcl-2;E 为 RACK1;F 为 CTNNB1。

图 3 生物信息学分析细胞活化因子和凋亡诱导因子在 TNBC 细胞系中的表达丰度

2.4 通过生物信息学分析乳腺癌患者免疫治疗响应性和生存分析 鉴于之前生信分析结果,本课题组认为细胞活化因子 Bcl-2 和凋亡诱导因子 HMGB1 在 TNBC 患者中有潜在的价值,因此,通过 Kaplan-Meier Plotter 数据库对 TNBC 患者进行了 TMB 免疫治疗响

应和 K-M 生存分析。分析结果表明,在 TNBC 患者中 HMGB1 高表达与免疫治疗正相关(见图 4A),Bcl-2 高表达与免疫治疗负相关(见图 4B),HMGB1 高表达患者较低表达组的生存期短(见图 4C),Bcl-2 高表达患者的生存期高于低表达组(见图 4D)。



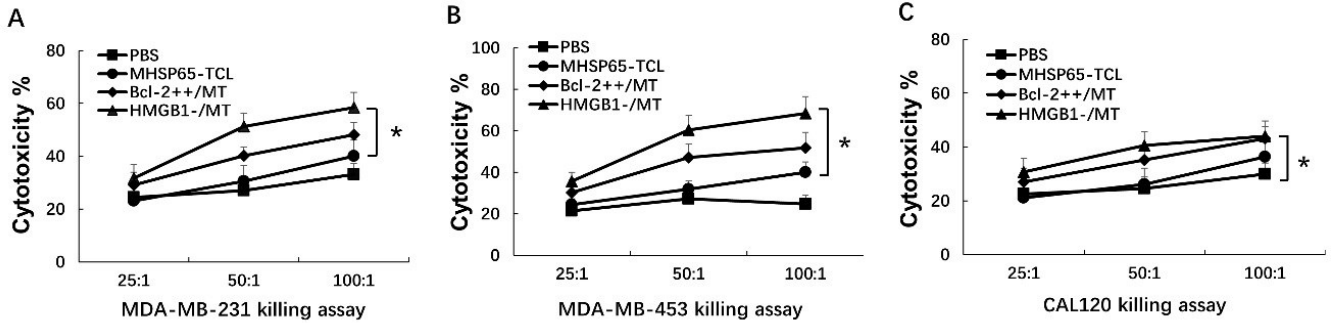
注:A 为 HMGB1 免疫治疗响应(TMB);B 为 Bcl-2 免疫治疗响应(TMB);

C 为 HMGB1 表达相关生存曲线;D 为 Bcl-2 表达相关生存曲线。

图 4 生物信息学分析细胞活化因子 Bcl-2 和凋亡诱导因子 HMGB1 在 TNBC 患者的免疫治疗响应和生存分析

2.5 去除 HMGB1 或过表达 Bcl-2 的 MHSP65-TCL 抗 TNBC 作用的体外检测 为了检测 TCL 中一些免疫活化或抑制因子的改变是否影响 MHSP65-TCL 抗 TNBC 效果,将 HMGB1 抑制剂或 Bcl-2 激动剂作用于 Basal(MDA-MB-231),LAR(MDA-MB-453),Mesenchymal-like(CAL120)3 种病理类型的 TNBC 细胞,然后制备 TCL,再使用处理后的 TCL 作用于人 PBMC,然后用激活的 PBMC 细胞针对这两种病理类型

的 TNBC 细胞进行体外杀伤实验。结果显示:HMGB1 的去除能比 Bcl-2 的过表达更为有效的激活 PBMC,并引发更强抗肿瘤杀伤作用,对 MDA-MB-231 杀伤率达 58.43%(见图 5A),对 MDA-MB-453 的杀伤率达 68.46%(见图 5B),对 CAL120 的杀伤率达 40.12%(见图 5C)。去除 HMGB1 或过表达 Bcl-2 可以针对 MDA-MB-435 产生更好的杀伤效果($P < 0.05$)。

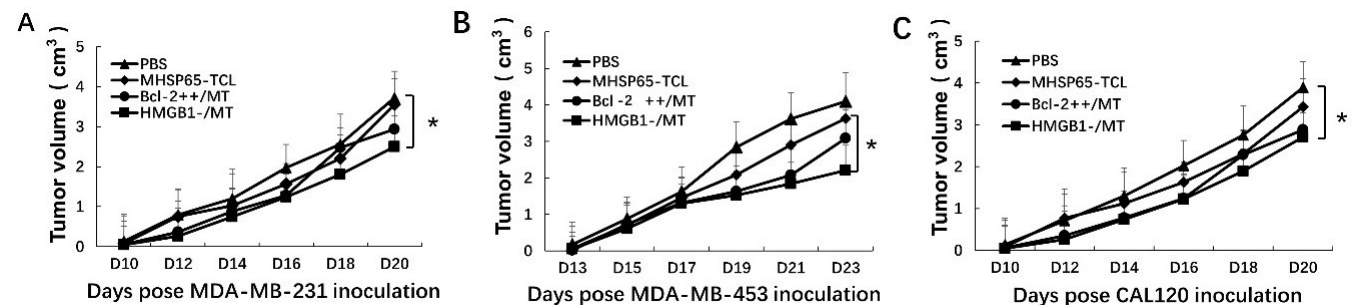


注:用不同的刺激物处理 PBMC 48 h,作为效应物。MDA-MB-231 细胞(A)或 MDA-MB-435 细胞(B)、CAL120 细胞(C)作为目标。* $P < 0.05$,以 3 个实验中的一个作为数据展示。

图 5 乳腺癌细胞杀伤试验

2.6 去除 HMGB1 或过表达 Bcl-2 的 MHSP65-TCL 抗 TNBC 作用的体内检测 为了检测 TCL 中一些免疫活化或抑制因子的改变是否影响 MHSP65-TCL 抗 TNBC 效果,将 HMGB1 抑制剂或 Bcl-2 激动剂作用于 Basal(MDA-MB-231),LAR(MDA-MB-435),Mesenchymal-like(CAL120)两种病理类型的 TNBC 细胞,然后制备 TCL,再使用处理后的 TCL 作用于人 PBMC,然后构建不同病理类型的 TNBC 动物模型,用激活的 PBMC 细胞进行体内抗肿瘤实验。结果显示:

HMGB1 的去除能比 Bcl-2 的过表达更为有效地抑制肿瘤的生长,对 MDA-MB-231 抑瘤率达 32.86%(见图 6A),对 MDA-MB-453 的抑瘤率达 46.26%(见图 6B),对 CAL120 的抑瘤率达 36.53%(见图 6C)。去除 HMGB1 或过表达 Bcl-2 可以针对 MDA-MB-435 产生更好的抑瘤效果($P < 0.05$)。裸鼠在第 0 天移植 Lewis 肺癌细胞,用 $1 \times$ PBS、MHSP65-TCL、Bcl-2+/+/MT 或 HMGB1-/MT 免疫,然后从第 1 天开始,间隔 7 d 进行 3 次免疫。每 2 天测量 1 次肿瘤体积。



注:A 为 MDA-MB-231 移植组的肿瘤生长曲线;B 为 MDA-MB-435 移植组的肿瘤生长曲线;C 为 CAL120 移植组的肿瘤生长曲线。* $P < 0.05$,Bcl-2+/+/MT 是 MHSP65-TCL 过度表达 Bcl-2;HMGB1-/MT 是 MHSP65-TCL 去除 HMGB1。

图 6 由 HMGB1 去除或 Bcl-2 过表达 MHSP65-TCL 激活的 PBMC 诱导的抗乳腺癌疗效

3 讨论

目前,人们已经发现 TNBC 细胞分为如下亚型:①基质样型(Basal-like)包括 BLA、BLB、IM 3 种类型;②腺腔 A 型(LAR);③腺腔 B 型(Mesenchymal-like),

TNBC 细胞病理类型多样、生物学背景各不相同,对免疫治疗的反应性也会存在较大差异^[10-11]。因此,根据乳腺癌具体病理类型的不同,有针对性地选择免疫治疗方法十分重要。

TNBC 病理类型多样,为了更好地研究不同类型乳腺癌对肿瘤细胞裂解物疫苗反应性的差异。本研究首先采用了生物信息学分析的方法,分析 TNBC 组织中免疫细胞浸润、激活的情况。结果显示,各类 TNBC 中固有免疫细胞浸润程度较高,但 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞的浸润都相对较低,占总免疫细胞的比例在 10% 以下,抗肿瘤免疫的发生主要依赖淋巴细胞所引发的特异性免疫应答,因 TNBC 治疗过程中,需要利用免疫治疗的方法激活更多的淋巴细胞,引发更强地抗肿瘤免疫作用。

不同病理类型的 TNBC 之所以免疫细胞浸润情况不同,这和肿瘤细胞产生的某些分子会引起免疫细胞的活化或凋亡有关。在本研究中主要关注细胞活化因子 RACK1、Bcl-2、CTNBL1^[12-13],凋亡诱导因子 PDL1、HMGB1、Fas-L^[14-15]。生物信息学分析表明,这些因子可以通过不同的通路引发肿瘤组织中细胞的凋亡。比如, HMGB1 通过激活 NF- κ B 通路,影响该通路中的 c-Rel 分子会诱导 Treg 细胞的分化生成。结合肿瘤组织中细胞的成分很复杂,有肿瘤细胞的存在,也有浸润免疫细胞的存在。结合前面组织中免疫细胞浸润的分析,推测之所以肿瘤组织中淋巴细胞所占比例较低可能和肿瘤细胞产生的 PDL1、HMGB1、Fas-L 等因子诱导了免疫细胞的凋亡,或是 RACK1、Bcl-2、CTNBL1 等因子不能很好地促进淋巴细胞活化有关。如果使用 MHSP65-TCL 治疗 TNBC, TCL 中的这些成分也会作用于免疫细胞,从而对 MHSP65-TCL 治疗效果产生影响。

不同病理类型的 TNBC,其产生细胞活化或抑制因子的能力各不相同,由此会导致肿瘤微环境中免疫细胞浸润的差异。为了评估不同类型 TNBC 中各种因子表达的能力,分析了不同类型 TNBC 细胞中 RACK1、Bcl-2、CTNBL1、PDL1、HMGB1、Fas-L 等因子的表达丰度情况。其中, HMGB1 在细胞系中的平均表达是最高的,尤其在 MDA-MB-231、MDA-MB-435、CAL120 几种细胞中,该蛋白因子的表达丰度达到了 9.07、10.66、8.18, MDA-MB-435 细胞中该因子的表达最高。HMGB1 是凋亡诱导因子,有研究也认为该蛋白因子可以诱导 Treg 细胞生成,因此在肿瘤细胞中抑制其表达,这种蛋白释放到肿瘤微环境中更少,将有利于免疫细胞的激活,同时,生物信息学结果表明 HMGB1 高表达组的患者预后往往比较差,对免疫治疗的响应比较高。因此制备 TCL 时可以考虑将其去除。在促细胞活化因子中, Bcl-2 表达量相对较低,总体丰度平均值为 1.43。在 MDA-MB-231、MDA-MB-435、CAL120 几种细胞中,该蛋白因子的表达丰度达到了 1.45、0.604、2.68, MDA-MB-435 细胞中该因子

的表达最低,另外, Bcl-2 低表达组的患者生存状态差,对免疫治疗的响应度更高。Bcl-2 促细胞活化作用是得到人们公认的,并且在 T、B 等淋巴细胞的表面也是存在 Bcl-2 受体的,因此如果能增加该因子在肿瘤细胞中的表达,进而制备的 TCL 将可以更有效地诱导淋巴细胞的活化。

基于上面的思路,本课题组用 HMGB1 抑制剂或 Bcl-2 激动剂作用于几种免疫浸润较差的 TNBC 细胞,然后制备 TCL 并同 MHSP65 联合构建 MHSP65-TCL 疫苗。接下来用该疫苗激活 PBMC 细胞,进行体内外抗肿瘤实验。相较于未去除 HMGB1 或未过表达 Bcl-2 的 MHSP65-TCL,经过相应成分处理的 MHSP65-TCL 能更为有效的在体外杀伤肿瘤细胞,在实验动物体内也显示出了较好的抗肿瘤效果,尤其抑制 MDA-MB-453 细胞生长的能力最强。结合前面, TNBC 细胞系中蛋白表达丰度的检测, MDA-MB-453 细胞中 HMGB1 的表达量是所有细胞中最高的,但 Bcl-2 表达最低,结合各类型 TNBC 淋巴浸润,由此认为 LAR 型细胞系 MDA-MB-453 主要依赖 HMGB1 诱导 Treg 抑制免疫细胞,因此从 TCL 中去除 HMGB1 可以更为有效地提高 MHSP65-TCL 的抗肿瘤效果,这也显示在对 LAR 这类病理类型的 TNBC 进行 MHSP65-TCL 治疗的时候,从其中去除 HMGB1 及过表达 Bcl-2 的必要性,这对 MHSP65-TCL 治疗 TNBC 的临床应用有一定的指导意义。

通过上述研究,本课题组建立起一种 TNBC 治疗的新方法,并比较出不同病理类型的 TNBC 对该免疫疗法反应性的差异及其可能机制,从而使 MHSP65-TCL 疫苗对 TNBC 的治疗更有针对性,这对其今后的临床应用将产生重要的指导作用。

参考文献:

- [1] JIANG Y Z, LIU Y, XIAO Y, et al. Molecular subtyping and genomic profiling expand precision medicine in refractory metastatic triple-negative breast cancer: the FUTURE trial[J]. Cell Res, 2021, 31(2): 178-186.
- [2] PUSZTAI L, YAU C, WOLF D M, et al. Durvalumab with olaparib and paclitaxel for high-risk HER2-negative stage II / III breast cancer: results from the adaptively randomized I-SPY2 trial[J]. Cancer Cell, 2021, 39(7): 989-998. e5.
- [3] YEH M T, BUJAKI E, DOLAN P T, et al. Engineering the live-attenuated polio vaccine to prevent reversion to virulence[J]. Cell Host Microbe, 2020, 27(5): 736-751. e8.

(下转第 84 页)

- 计算的代谢参数与非小细胞肺癌 TNM 分期的相关性分析[J]. 临床放射学杂志, 2023, 42(9): 1447-1452.
- [8] 杨朝辉, 邓绍强, 顾发见, 等. ¹⁸F-FDG PET/CT SUV_{max}、TLG 及 MTV 与 GIST 恶性程度的关系[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2022, 14(1): 86-90.
- [9] 张兆凯, 李清照, 李敏, 等. ¹⁸F-FDG PET/CT 代谢参数评估肺浸润性腺癌病理亚型及组织学分级的价值[J]. 山东第一医科大学(山东省医学科学院)学报, 2023, 44(8): 592-597.
- [10] 俞愈, 李继会, 章斌, 等. ¹⁸F-FDG PET/CT 影像学预测晚期非小细胞肺癌预后的价值[J]. 标记免疫分析与临床, 2023, 30(1): 51-56, 144.
- [11] 杨芳, 王雅, 梁丽红, 等. CEA、AFP 及 CYFRA21-1 在 NSCLC 中的表达及与病理特征和预后的关系[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2022, 14(4): 577-580.
- [12] KAGAWA Y, SONE K, OGURI T, et al. Predictive role of CYFRA 21-1 for S-1 monotherapy in non-small cell lung cancer patients[J]. Respir Investig, 2022, 60(3): 393-399.
- [13] 栾飞扬, 牛文霞, 吴胤瑛, 等. PD-L1、MDM2 在 EGFR 罕见突变 NSCLC 患者中的表达及其临床意义[J]. 现代肿瘤医学, 2023, 31(6): 1061-1068.
- [14] PATIL N S, NABET BY, MÜLLER S, et al. Intratumoral plasma cells predict outcomes to PD-L1 blockade in non-small cell lung cancer[J]. Cancer Cell, 2022, 40(3): 289-300. e4.
- [15] 陈然, 高翔, 徐福东, 等. 晚期 EGFR 阳性 NSCLC 患者 PD-L1 表达特点及其与 EGFR-TKIs 治疗疗效关系的真实世界研究[J]. 中国肺癌杂志, 2023, 26(3): 217-227.
- [16] HONG W J, XUE M, JIANG J, et al. Circular RNA circ-CPA4/ let-7 miRNA/PD-L1 axis regulates cell growth, stemness, drug resistance and immune evasion in non-small cell lung cancer (NSCLC) [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2020, 39(1): 149.
- [17] MANSFIELD S A, HERBST S R, JR. C D G, et al. 帕博利珠单抗单药治疗 PD-L1 阳性伴脑转移的非小细胞肺癌患者的疗效: KEYNOTE-001、010、024 和 042 研究的汇总分析[J]. 中国肺癌杂志, 2022, 25(9): 701-702.

收稿日期: 2023-10-20; 修回日期: 2023-11-23

(上接第 71 页)

- [4] ZENG D Q, WU J N, LUO H Y, et al. Tumor microenvironment evaluation promotes precise checkpoint immunotherapy of advanced gastric cancer [J]. J Immunother Cancer, 2021, 9(8): e002467.
- [5] KAUR J, ELMS J, MUNN A L, et al. Immunotherapy for non-small cell lung cancer (NSCLC), as a stand-alone and in combination therapy [J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2021, 164: 103417.
- [6] ESCHWEILER S, RAMÍREZ-SUÁSTEGUI C, LI Y C, et al. Intermittent PI3K δ inhibition sustains anti-tumour immunity and curbs irAEs [J]. Nature, 2022, 605(7911): 741-746.
- [7] OTT P A, HU-LIESKOVAN S, CHMIELOWSKI B, et al. A phase Ib trial of personalized neoantigen therapy plus anti-PD-1 in patients with advanced melanoma, non-small cell lung cancer, or bladder cancer [J]. Cell, 2020, 183(2): 347-362. e24.
- [8] OGINO H, TAYLOR J W, NEJO T, et al. Randomized trial of neoadjuvant vaccination with tumor-cell lysate induces T cell response in low-grade gliomas [J]. J Clin Invest, 2022, 132(3): e151239.
- [9] LIAU L M, ASHKAN K, BREM S, et al. Association of autologous tumor lysate-loaded dendritic cell vaccination with extension of survival among patients with newly diagnosed and recurrent glioblastoma: a phase 3 prospective externally controlled cohort trial [J]. JAMA Oncol, 2023, 9(1): 112-121.
- [10] DONG B H, DAI G L, XU L, et al. Tumor cell lysate induces the immunosuppression and apoptosis of mouse immunocytes [J]. MOL Med Rep, 2014, 10(6): 2827-2834.
- [11] AKHOUAYRI L, OSTANO P, MELLO-GRAND M, et al. Identification of a minimum number of genes to predict triple-negative breast cancer subgroups from gene expression profiles [J]. Hum Genomics, 2022, 16(1): 70.
- [12] TIAN R N, TIAN J F, ZUO X Y, et al. RACK1 facilitates breast cancer progression by competitively inhibiting the binding of β -catenin to PSMD2 and enhancing the stability of β -catenin [J]. Cell Death Dis, 2023, 14(10): 685.
- [13] 华强, 孔祥, 孟祥健, 等. MicroRNA-139-5p 靶向 Bcl-2 调控棕榈酸诱导的胰岛 β 细胞凋亡 [J]. 右江民族医学院学报, 2021, 43(6): 705-709.
- [14] ZHANG Y K, SONG Q X, CASSADY K, et al. Blockade of trans PD-L1 interaction with CD80 augments antitumor immunity [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2023, 120(16): e2205085120.
- [15] PENG G, WANG C, WANG H R, et al. Gankyrin-mediated interaction between cancer cells and tumor-associated macrophages facilitates prostate cancer progression and androgen deprivation therapy resistance [J]. Oncoimmunology, 2023, 12(1): 2173422.

收稿日期: 2023-10-17; 修回日期: 2023-11-22