

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.21.023

乳腺癌患者 T 细胞表面 PD-1、TIM-3 的表达 及其与患者临床病理特征的关系

邓 霞

山东省滕州市工人医院检验科,山东枣庄 277500

摘 要:目的 探讨程序性死亡受体 1(PD-1)、T 细胞免疫球蛋白黏蛋白分子 3(TIM-3)在乳腺癌患者 T 淋巴细胞表面的表达,分析 T 淋巴细胞中 PD-1、TIM-3 之间的相关性及其与患者临床病理特征的关系。**方法** 采用便利抽样法选取 2017 年 1 月至 2018 年 6 月在该院诊治的 35 例乳腺癌患者作为主要研究对象,手术后收集患者的肿瘤组织标本和癌旁组织标本,将两种标本剪碎消化后,采用非连续密度梯度离心法提取 T 淋巴细胞,通过实时荧光定量 PCR 技术(Real-time PCR)测定 T 淋巴细胞 PD-1、TIM-3 的 mRNA 相对表达量,同时通过 Western blotting 技术测定其蛋白表达量。**结果** 乳腺癌患者 T 淋巴细胞中 PD-1、TIM-3 的 mRNA 表达量和蛋白表达量均高于癌旁组织淋巴细胞中的表达量。患者的 T 淋巴细胞中 PD-1、TIM-3 的 mRNA 表达量会随着年龄、肿瘤大小、肿瘤分级、淋巴结转移的程度加深而增加,差异均有统计学意义($P<0.05$)。相关性分析,乳腺癌患者 T 淋巴细胞中 PD-1 与 TIM-3 的 mRNA 表达水平呈正相关($r=0.878, P<0.001$)。**结论** PD-1、TIM-3 在乳腺癌中的高水平表达,与乳腺癌患者的年龄、肿瘤大小、肿瘤级别、淋巴结是否转移等临床病理特征密切相关,两者联合阻断对抑制乳腺癌的发生、发展、转移起着重要作用,为乳腺癌的治疗提供了一个新思路。

关键词:乳腺癌; 程序性死亡受体 1; T 细胞免疫球蛋白黏蛋白分子 3; T 淋巴细胞; 临床病理特征
中图法分类号:R737.9 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2019)21-3152-04

Expression of PD-1 and TIM-3 on T cell surface in breast cancer patients and its relationship with clinicopathological features

DENG Xia

Department of Clinical Laboratory, Tengzhou Municipal Worker's Hospital,
Zaozhuang, Shandong 277500, China

Abstract:**Objective** To investigate the expression of programmed death receptor 1 (PD-1) and T cell immunoglobulin mucin 3 (TIM-3) on the surface of T lymphocytes in breast cancer patients, and to analyze the correlation between PD-1 and TIM-3 in T lymphocytes and its relationship with clinicopathological features of the patients. **Methods** A total of 35 patients with breast cancer treated in this hospital from January 2017 to June 2018 were selected as the main research subjects by using the convenient sampling method. The tumor tissue specimens and paracancerous tissue specimens were collected after surgery, and the tumor tissue specimens were cut into pieces and digested. The T lymphocytes were extracted by non-continuous density gradient centrifugation. The relative mRNA expression levels of PD-1 and TIM-3 in T lymphocytes were determined by real-time quantitative PCR (qRT-PCR), and their protein expression levels were determined by Western blot. **Results** The mRNA and protein expression levels of PD-1 and TIM-3 in T lymphocytes of breast cancer patients were higher than those in adjacent lymphocytes. The mRNA expression levels of PD-1 and TIM-3 in T lymphocytes of patients and clinicopathological features analysis showed that the mRNA expression levels of PD-1 and TIM-3 in T lymphocytes of the patients were increased with age, tumor size, tumor grade, and lymph node metastasis degree deepening, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). The correlation analysis showed that there was a positive correlation between PD-1 and TIM-3 mRNA expression levels in T lymphocytes of breast cancer patients ($r=0.878, P<0.001$). **Conclusion** PD-1 and TIM-3 are highly expressed in breast cancer, which is closely related to the clinicopathological features such as age, tumor size, tumor grade, and lymph node metastasis of breast cancer patients. The both combined block has an important role for the occurrence, development and metastasis of breast cancer cells, which provides a new thinking for the treatment of breast cancer.

Key words: breast cancer; programmed death receptor 1; T cell immunoglobulin mucin 3; T lymphocytes; clinicopathological features

乳腺癌严重危害女性身体健康,据有关数据统计,每年约有 180 万人初发乳腺癌^[1-2]。我国每年初发乳腺癌的人数较多,占世界每年新发乳腺癌人数的 12.2%^[3-4]。由于癌细胞的诱变能力和适应能力都较高,癌细胞能够避免免疫系统的攻击,因此乳腺癌的发生、发展不仅和肿瘤的恶性程度有关,还和机体的抗肿瘤免疫有关^[5]。近几年来,相关研究发现,T 淋巴细胞的免疫作用可以改变癌细胞的行为,促进侵袭以及降低治疗的敏感性,而 T 淋巴细胞不能使肿瘤消退的原因可能与 T 淋巴细胞中程序性死亡受体 1 (PD-1)、T 细胞免疫球蛋白黏蛋白分子 3 (TIM-3) 的高表达使得 T 淋巴细胞的免疫作用减退或者趋近于无有关^[6]。基于此,本文通过对 35 例乳腺癌患者进行研究,分析 T 淋巴细胞中 PD-1、TIM-3 的表达,PD-1、TIM-3 之间的相关性及其与患者临床病理特征的关系,现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 采用便利抽样法选取 2017 年 1 月至 2018 年 6 月在本院诊治的乳腺癌患者 35 例作为研究对象,年龄 30~75 岁、平均(52.37±11.49)岁,肿瘤分级 1 级 13 例、2 级 10 例、3 级 8 例、4 级 4 例,淋巴结转移阳性 22 例、阴性 13 例,手术后收集患者的肿瘤组织标本和癌旁组织标本。纳入标准:(1)临床确诊为乳腺癌;(2)拥有认知和沟通能力,依从性较高且配合随访的患者;(3)患者的临床资料无缺失。排除标准:(1)患有精神病及其他影响认知和沟通能力的疾病;(2)中途退出研究的患者。本研究经医院医学伦理委员会批准,患者自愿参与且签订知情同意书。

1.2 方法 (1)将收集的患者肿瘤组织标本和癌旁组织标本剪碎消化后,采用非连续密度梯度离心法提取两种组织标本的 T 淋巴细胞,加入 Trizol(1 mL)混合均匀后,混合液放入冷冻柜(-80 ℃)中保存备用。(2)从混合液中提取出 T 淋巴细胞中的总 RNA 和总蛋白,采用凝胶电泳质检 RNA 的质量。①mRNA 表达量检测:采用实时荧光定量 PCR 技术(Real-time PCR)检测患者 T 淋巴细胞 PD-1、TIM-3 的 mRNA 相对表达量。采用反转录试剂盒将混合液中提取的总 RNA 转换为 cRNA,对 cRNA 行 SYBR Green 染料法后,采用 ABI StepOnePlu Real-time PCR 仪器对 cRNA 进行 PCR 扩增,PCR 扩增的反应条件:先在 95 ℃行 30 s 预变性,继续在 95 ℃行 20 s 预变性,再在 72 ℃行 30 s 预变性,此为 1 个循环,共行 40 个循环,最后在 72 ℃行 5 min 预变性。PD-1、TIM-3 的 mRNA 水平的计算采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法。②蛋白表达量检测:采用 Western blotting 技术检测患者 T 淋巴细胞 PD-1、TIM-3 的蛋白表达量。总蛋白经过电泳后转印到聚偏二氟乙烯膜上,在含有 5% 脱脂奶粉的 TBST 液中封闭 2 h(室温),加入一抗(4 ℃)后在摇床

上孵育过夜,用 PBS 液清洗 10 min,共清洗 3 次,加入二抗(室温)孵育 2 h,采用试剂盒对混合液中提取的蛋白水平进行测定,试剂购自碧云天生物技术有限公司(上海)。上述操作均严格遵循试剂盒的说明书进行。

1.3 观察指标 比较 T 淋巴细胞和癌旁组织淋巴细胞中 PD-1、TIM-3 的 mRNA 表达量和蛋白表达量;分析乳腺癌患者 T 淋巴细胞中 PD-1、TIM-3 的 mRNA 表达量与患者临床病理特征(如年龄、肿瘤大小、肿瘤分级、淋巴结转移)的关系;分析乳腺癌患者 T 淋巴细胞中 PD-1、TIM-3 的 mRNA 表达量之间的相关性。

1.4 统计学处理 所有数据均采用统计软件 SPSS22.0 处理,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较行独立样本 *t* 检验或单因素 *F* 检验;采用 Pearson 进行相关性分析;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 乳腺癌患者 T 淋巴细胞总 RNA 电泳 总 RNA 电泳结果显示,18S 带和 28S 带清晰可见,表明 RNA 没有明显降解。见图 1。

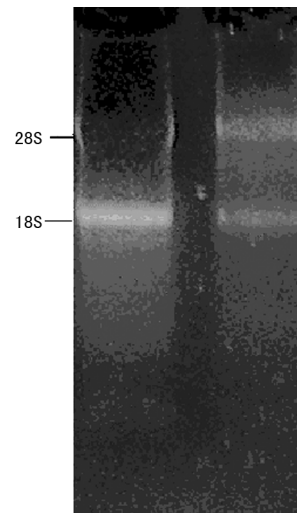


图 1 乳腺癌患者 T 淋巴细胞总 RNA 电泳

2.2 乳腺癌患者 T 淋巴细胞 PCR 图谱 PCR 图谱显示,T 淋巴细胞中 PD-1、TIM-3 的 mRNA 扩增从无到有。见图 2、3。

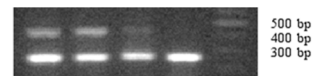


图 2 患者 T 淋巴细胞中 PD-1 的 PCR 图谱

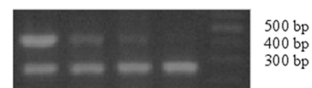


图 3 患者 T 淋巴细胞中 TIM-3 的 PCR 图谱

2.3 乳腺癌患者 T 淋巴细胞 mRNA 表达 乳腺癌患者的 mRNA 表达量中,T 淋巴细胞的 PD-1、TIM-3 水平明显高于癌旁组织淋巴细胞;蛋白表达量中,T 淋巴细胞的 PD-1、TIM-3 水平明显高于癌旁组织淋巴细胞,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 乳腺癌患者 T 淋巴细胞、癌旁组织淋巴细胞中 PD-1、TIM-3 的 mRNA 表达量和蛋白表达量比较($\bar{x}\pm s$)

项目	n	mRNA 表达量		蛋白表达量(ng/mL)	
		PD-1	TIM-3	PD-1	TIM-3
T 淋巴细胞	35	3.18±0.43	0.78±0.18	3.53±0.37	0.89±0.19
癌旁组织淋巴细胞	35	1.30±0.31	0.10±0.02	1.69±0.26	0.24±0.07
t		20.982	22.213	24.072	18.653
P		—0.001	—0.001	—0.001	—0.001

2.4 乳腺癌患者 T 淋巴细胞中 PD-1、TIM-3 的 mRNA 表达与临床病理特征的关系 患者的 T 淋巴细胞中 PD-1、TIM-3 的 mRNA 表达量与年龄、肿瘤大小、肿瘤分级、淋巴结是否转移有关($P<0.05$)。见表 2。

表 2 乳腺癌患者 T 淋巴细胞中 PD-1、TIM-3 的 mRNA 表达量与患者临床病理特征的关系($\bar{x}\pm s$)

项目	n	PD-1	TIM-3
年龄(岁)			
<65	21	2.83±0.66	3.25±0.79
≥65	14	3.61±0.88	4.21±0.98
t		2.997	3.199
P		0.005	0.003
肿瘤大小(cm)			
<2	28	2.87±0.43	3.29±0.47
≥2	7	3.65±0.54	3.97±0.54
t		4.084	3.328
P		0.001	0.002
肿瘤分级			
1 级	13	2.67±0.36	3.06±0.5
2 级	10	3.01±0.51	3.24±0.55
3 级	8	3.38±0.69	3.77±0.64
4 级	4	3.75±0.77	4.21±0.82
F		5.419	5.336
P		0.004	0.004
淋巴结转移			
阴性	22	2.74±0.64	3.24±0.59
阳性	13	3.60±0.83	4.02±0.76
t		3.438	3.394
P		0.002	0.002

2.5 乳腺癌患者 T 淋巴细胞 PD-1 与 TIM-3 mRNA 表达量之间的相关性 相关性分析显示,乳腺癌患者 T 淋巴细胞中 PD-1 与 TIM-3 的 mRNA 表达水平呈正相关($r=0.878,P<0.001$)。

3 讨 论

近年来,乳腺癌的发病率和病死率都在呈现上升趋势,且乳腺癌患者的年龄也在呈现年轻化的趋势,寻找乳腺癌的预后标志物,对于预防乳腺癌的发生或复发,以及改善乳腺癌患者的预后都具有积极作用^[7-8]。相关文献结果表明,免疫抑制性分子能够降低机体抗肿瘤的免疫作用,为提高机体的抗肿瘤免疫

作用则需阻止免疫抑制性分子,而机体的免疫抑制是通过消耗 T 细胞,使 PD-1 分子封闭,从而阻断 PD-1 和其配体 1(PD-L1)的相互作用,最终逆转 T 细胞的消耗,恢复 T 细胞的应答,提高抗肿瘤免疫作用^[9]。有关研究证明,PD-1 和肿瘤的预后有关,主要是因为 PD-1 的表达被抑制,使得 PD-1、PD-L1 之间的信号传导被阻断,肿瘤患者的症状得到改善^[10-11]。但有研究表明,单独的 PD-1 并不一定能够逆转 T 细胞的消耗,PD-1 的作用和 TIM-3 的水平有关,TIM-3 和 PD-1 被证实为 T 细胞的负调节物^[12]。因此,本文就乳腺癌患者 T 细胞表面 PD-1、TIM-3 的表达及其 PD-1、TIM-3 之间的相关性进行分析。

本文研究结果显示,乳腺癌患者 T 淋巴细胞中 PD-1、TIM-3 的 mRNA 表达量和蛋白表达量均高于癌旁组织淋巴细胞中的表达量,表明 PD-1、TIM-3 参与了乳腺癌的发生、发展,在乳腺癌患者中呈现高水平表达。本文研究结果还显示,PD-1 与 TIM-3 的 mRNA 表达量呈正相关,患者的 T 淋巴细胞中 PD-1、TIM-3 的 mRNA 表达量会随着年龄、肿瘤大小、肿瘤分级、淋巴结转移的程度加深而增加,原因可能在于乳腺癌患者的 PD-1、TIM-3 的 mRNA 表达量和蛋白表达量呈现高水平表达,T 细胞的应答作用就减小,抗肿瘤的免疫作用就会降低,从而增加了癌细胞的转移。本文的研究结果证实了乳腺癌患者 T 淋巴细胞中 PD-1、TIM-3 的高水平表达,使得 T 细胞消耗,使 T 细胞的免疫功能出现障碍甚至是丧失,抑制了机体的抗肿瘤免疫作用,使机体的癌细胞发生、发展、转移等,最终造成乳腺癌患者的肿瘤程度加深。

多种免疫检查点联合治疗乳腺癌是一种新思路,早期有实验证明,PD-1、CTLA-4 联合阻断可以增加 T 细胞的产生,降低调节性 T 细胞(Tregs)的表达,从而恢复 T 细胞的应答,提高机体的抗肿瘤免疫作用。本研究中,乳腺癌患者 T 淋巴细胞中 PD-1、TIM-3 的高表达,为我们提供了另一个新思路,PD-1、TIM-3 联合阻断可抑制肿瘤的发生、发展、转移。乳腺癌患者 PD-1、TIM-3 的 mRNA 表达量和蛋白表达量呈现高水平表达,PD-1 与 TIM-3 的 mRNA 表达量呈正相关,均证明 PD-1、TIM-3 免疫检查点联合治疗的潜力,为乳腺癌的靶向治疗提供新的方向^[13]。

综上所述,PD-1、TIM-3 在乳腺(下转第 3157 页)

坦索罗新组。特别是排尿日记的记录可以明确夜尿增多的类型,针对夜间多尿的患者该方法可作为一线治疗方案。

参考文献

- [1] 孟亚莉,郑松柏.老年人夜尿症的危害及其治疗和管理策略[J/CD].中华老年病研究电子杂志,2018,5(3):19-23.
- [2] RAHNAMA'I M S, VRIJENS D, HAJEBRAHIMI S, et al. The discrepancy between European Association of Urology (EAU) guidelines and daily practice in the evaluation and management of nocturia: results of a Dutch survey[J/OL]. World J Urol, 2019[2019-08-26]. <http://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>.
- [3] ABRAMS P, CARDOZO L, FALL M, et al. The standardisation of terminology of lower urinary tract function: report from the Standardisation Sub-committee of the International Continence Society[J]. Neurourol Urodyn, 2002, 21(2):167-178.
- [4] 夜尿症临床诊疗中国专家共识编写组.夜尿症临床诊疗中国专家共识[J].中华泌尿外科杂志,2018,39(8):561-564.
- [5] ZUBER A M, SINGER D, PENNINGER J M, et al. Increased renal responsiveness to vasopressin and enhanced V2 receptor signaling in RGS2^{-/-} mice[J]. J Am Soc Nephrol, 2007, 18(6):1672-1678.

- [6] HVISTENDAHL G M, FROKIAER J, NIELSEN S, et al. Gender differences in nighttime plasma arginine vasopressin and delayed compensatory urine output in the elderly population after desmopressin[J]. J Urol, 2007, 178(6):2671-2676.
- [7] 何志嵩,金杰.α受体阻滞剂对良性前列腺增生患者症状的影响作用[J].中华泌尿外科杂志,2002,23(6):358-360.
- [8] 李星慧,王建业,吴鹏杰,等.单一用药及联合用药治疗良性前列腺增生合并膀胱过度活动症的疗效分析[J].中华老年医学杂志,2018,37(10):1092-1097.
- [9] KOSEOGLU H, ASLAN G, OZDEMIR I, et al. Nocturnal polyuria in patients with lower urinary tract symptoms and response to alpha-blocker therapy[J]. Urology, 2006, 67(6):1188-1192.
- [10] 梁华丽.双氢克尿噻对高血压患者血脂、血糖代谢的影响研究[J].数理医药学杂志,2017,30(3):415-416.
- [11] CHO M C, KU J H, PAICK J. α-Blocker plus diuretic combination therapy as second-line treatment for nocturia in men with luts: a pilot study[J]. Urology, 2009, 73(3):549-553.
- [12] WEISS J P. Nocturia: "do the math"[J]. J Urol, 2006, 175(3 Pt 2):S16-S18.

(收稿日期:2019-08-06 修回日期:2019-08-29)

(上接第 3154 页)

癌中的高水平表达,与乳腺癌患者的年龄、肿瘤大小、肿瘤级别、淋巴结是否转移等临床病理特征密切相关,两者联合阻断对抑制乳腺癌的发生、发展、转移起着重要作用,为乳腺癌的治疗提供了一个新思路。

参考文献

- [1] Global Burden of Disease Cancer Collaboration, FITZMAURICE C, DICKER D, et al. The Global Burden of Cancer 2013[J]. JAMA Oncol, 2015, 1(4):505-527.
- [2] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, et al. Global Cancer Statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2):87-108.
- [3] FAN L, KATHRIN S W, JUN J L, et al. Breast cancer in China[J]. Lancet Oncol, 2014, 15(7):e279-e289.
- [4] 贺立彩,朱真锋,郑倩倩. ACTL8 的表达与乳腺癌临床病理特征及预后的关系[J]. 中国病理生理杂志, 2016, 32(6):1138-1141.
- [5] 周岐,钟锡明,范钰. T 细胞免疫球蛋白及黏蛋白结构域分子 3、程序性细胞死亡蛋白 1 在乳腺浸润性导管癌患者外周血中的表达及意义[J]. 中国医师进修杂志, 2018, 41(4):321-324.
- [6] NIRSCHL C J, DRAKE C G. Molecular pathways: coexpression of immune checkpoint molecules: signaling pathways and implications for cancer immunotherapy[J]. Clin

- Cancer Res, 2013, 19(18):4917-4924.
- [7] 刘洪涛,周凡涵,申媛媛,等. WNT5B 在乳腺癌中的表达及意义[J]. 中国病理生理杂志, 2015, 31(6):1032-1035.
- [8] 刘威,龙梅珺,吴珏堃,等. STAT5a 在乳腺癌组织中的低表达与患者不良预后相关[J]. 中国病理生理杂志, 2014, 30(11):2004-2008.
- [9] 余由,潘雪,邢玉斐,等. 抗程序性死亡配体 1 单抗和表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂对表皮生长因子受体敏感突变肺癌细胞中程序性死亡配体 1 表达和 T 细胞功能的影响[J]. 中华肿瘤杂志, 2016, 38(12):886-892.
- [10] 张楠,曾园园,黄建安. 免疫卡控点分子 PD-1/PD-L1 在非小细胞肺癌治疗中的研究进展[J]. 中华医学杂志, 2016, 96(24):1951-1953.
- [11] CENTZLER R, HALL R, KUNK P R, et al. Beyond melanoma: inhibiting the PD-1/PD-L1 pathway in solid tumors[J]. Immunotherapy, 2016, 8(5):583-600.
- [12] GROS A, ROBBINS P F, AO X, et al. PD-1 identifies the patient-specific CD8⁺ tumor-reactive repertoire infiltrating human tumors[J]. J Clin Invest, 2014, 124(5):2246-2259.
- [13] 沈辉,盛晗,陆建菊. 程序性死亡受体 1 和 T 细胞免疫球蛋白黏蛋白分子 3 在乳腺癌肿瘤微环境中的表达、分布及其与临床病理特征的关系[J]. 中华医学杂志, 2018, 98(17):1352-1357.

(收稿日期:2019-03-19 修回日期:2019-09-02)