

PD-1、CTLA-4 和 MMP9 在伴或不伴淋巴结转移乳腺癌患者外泌体中的表达

王爱红¹, 赵菊梅¹, 王明全²

(1. 延安大学医学院, 延安 716000; 2. 延安大学附属医院 介入放射科, 延安 716000)

摘要: 为探讨外泌体 PD-1、CTLA-4 和基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinase 9, MMP9)在乳腺癌及淋巴结转移患者中的表达, 选取 2016 年 6 月至 2018 年 6 月就诊的乳腺癌女性患者, 分为对照组(无淋巴结转移)和转移组(有淋巴结转移), 另选取健康女性为健康组。采用免疫组化检测乳腺癌组织中 PD-1、CTLA-4 和 MMP9 的表达; 分离外周血中的外泌体, 采用流式细胞术检测外泌体 PD-1、CTLA-4 和 MMP9 的表达。免疫组化的结果显示: 对照组乳腺癌组织中 PD-1 和 CTLA-4 的光密度(D)分别为 63.5 ± 6.9 和 56.4 ± 6.2 , 转移组分别为 79.2 ± 12.8 和 71.1 ± 12.1 , 两组差异无统计学意义($P > 0.05$); 对照组乳腺癌组织中 MMP9 的 D 为 98.4 ± 10.7 , 转移组为 153.1 ± 16.8 , 两组差异具有统计学意义($P = 0.013$)。流式细胞术结果显示: 对照组和转移组 PD-1⁺外泌体比例分别为 $(0.782 \pm 0.090)\%$ 和 $(0.816 \pm 0.011)\%$, 显著高于健康组 $[(0.269 \pm 0.049)\%, P < 0.001]$; 对照组和转移组 CTLA-4⁺外泌体比例分别为 $(3.995 \pm 0.233)\%$ 和 $(4.122 \pm 0.197)\%$, 显著高于健康组 $[(2.310 \pm 0.200)\%, P < 0.001]$; PD-1⁺和 CTLA-4⁺外泌体在对照组和转移组之间差异无统计学意义($P > 0.05$); 对照组和转移组 MMP9⁺外泌体比例分别为 $(0.874 \pm 0.083)\%$ 和 $(1.290 \pm 0.108)\%$, 与健康组 $[(0.515 \pm 0.083)\%]$ 比较, 差异具有统计学意义($P < 0.05$); 转移组 MMP9⁺外泌体比例显著高于对照组($P = 0.006$)。由此可见, 外泌体 PD-1 和 CTLA-4 可用于乳腺癌的早期诊断, 外泌体 MMP9 可作为一个有效的靶点应用于乳腺癌转移的早期预警和术后监测。

关键词: 乳腺癌; 外泌体; 转移; 程序性死亡受体-1; 细胞毒性 T 淋巴细胞抗原 4; 基质金属蛋白酶

中图分类号: R737.9

文献标志码: A

文章编号: 1001-2478(2019)02-0110-06

乳腺癌是主要发生在中老年女性乳腺上皮的恶性肿瘤。近几年随着人们生活习惯和饮食方式的改变, 乳腺癌的发病率显著升高, 已经成为女性最常见的恶性肿瘤^[1]。女性健康意识的提高使乳腺癌的早期检出率越来越高, 早期乳腺癌的长期预后较好, 但仍有一部分患者预后较差^[2]。淋巴结转移是影响早期乳腺癌预后的关键因素, 然而肿瘤发生早期淋巴结转移灶很小, 很难通过常规影像学检查检测到^[3], 因此, 寻找预测乳腺癌转移的靶点对于早期乳腺癌的治疗具有十分重要的临床意义。外泌体是一种直径为 30~100 nm 的细胞外囊泡, 在肿瘤发生早期即大量进入循环系统, 检测外泌体上蛋白的表达可用于疾病的早期诊断和精准治疗^[4-6]。CTLA-4 和 PD-1 在肿瘤发生、发展过程中发挥着重要作用, 目前已有数种靶向药物进入临床或正在进

行临床试验, 具有很好的治疗效果^[7-9]。基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinase 9, MMP9)维持着细胞外基质降解和重塑的动态平衡, 在乳腺癌组织, 特别是高侵袭力乳腺癌组织中表达显著升高, 可促进乳腺癌的转移^[10-11]。然而, 目前国内外还未见外泌体 PD-1、CTLA-4 和 MMP9 表达与乳腺癌转移的相关研究。本研究探讨外泌体 PD-1、CTLA-4 和 MMP9 在乳腺癌及淋巴结转移患者中的表达情况。

1 资料与方法

1.1 研究对象 选取 2016 年 6 月至 2018 年 6 月来延安大学附属医院就诊的乳腺癌女性患者 20 例, 年龄 18~70 岁, 术前未经过放疗和化疗, 排除合并其他恶性肿瘤、糖尿病、尿毒症和全身代谢性疾病等, 无酗酒、吸毒。按照有无淋巴结转移分为对照组(10 例, 乳腺癌患者, 病理及影像学检查均未检测到淋巴结转移)和转移组(10 例, 乳腺癌患者, 病理检查检测到淋巴结转移)。对照组年龄 (46.8 ± 8.2) 岁, 肿瘤大小为 $0.8 \text{ cm} \times 0.6 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm} \sim 4.3 \text{ cm} \times 3.1 \text{ cm} \times 2.8 \text{ cm}$, 病理分期:

收稿日期: 2018-10-15

基金项目: 延安市科技局项目(2017KS-19)

作者简介: 王爱红(1973-), 女, 博士, 副教授, 主要从事营养与肿瘤研究

通信作者: 王明全(E-mail: wwahong1267@yeah.net)

I级3例, II级4例, III级3例。转移组年龄(49.3 ± 10.6)岁, 肿瘤大小为 $1.2 \text{ cm} \times 0.8 \text{ cm} \times 0.4 \text{ cm} \sim 5.1 \text{ cm} \times 3.8 \text{ cm} \times 3.0 \text{ cm}$, 病理分期: I级3例, II级5例, III级2例。两组患者年龄、肿瘤大小、病理分期差异无统计学意义($P > 0.05$)。选取病理检查为乳腺组织良性病变的女性(10例)为良性病变组, 年龄(48.5 ± 8.7)岁。良性病变组与对照组、转移组年龄具有可比性($P > 0.05$)。

1.2 免疫组化检测 选取对照组和转移组患者肿瘤组织及良性病变组患者乳腺组织样本, 石蜡切片后用二甲苯脱蜡, 用羊血清工作液封闭组织30 min, 甩干, 加入PD-1、CTLA-4、MMP9一抗(Abcam公司), 4°C 冰箱过夜, PBS清洗3次后加入二抗, 于 37°C 孵箱中孵育30 min, 之后进行免疫组化染色, PBS清洗3次后封片, 显微镜下观察蛋白质的表达情况。

1.3 外泌体蛋白检测 收集对照组、转移组患者的外周血, 同时收集10例来延安大学附属医院体检的健康志愿者(健康组)外周血, 分离血清。采用外泌体CD63分离/检测试剂盒(Invitrogen公司)检测外泌体PD-1、CTLA-4和MMP9的表达。外泌体分离使用外泌体快速纯化试剂盒(Invitrogen公

司), 在外泌体溶液中加入包被抗CD63抗体的免疫亲和磁珠, 4°C 冰箱过夜, 用分离缓冲液清洗3次后加入由藻红蛋白(P-phycoerythrin, PE)标记的外泌体蛋白, 即加入抗PD-1-PE抗体、抗CTLA-4-PE抗体和抗MMP9-PE抗体(BD公司), 室温避光震荡1 h, PBS清洗3次后在FCM上检测CD63⁺外泌体蛋白的表达。

1.4 统计学处理 实验数据使用SPSS 21.0软件进行统计分析, 结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用方差分析和 t 检验进行分析, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 乳腺组织中PD-1、CTLA-4和MMP9的表达

免疫组化的结果显示, 对照组乳腺癌组织中PD-1和CTLA-4的光密度(D)分别为 63.5 ± 6.9 和 56.4 ± 6.2 , 转移组分别为 79.2 ± 12.8 和 71.1 ± 12.1 , 两组之间差异无统计学意义($t=1.073$, $P=0.297$; $t=1.079$, $P=0.294$); 对照组乳腺癌组织中MMP9的 D 为 98.4 ± 10.7 , 转移组为 153.1 ± 16.8 , 两组之间差异具有统计学意义($t=2.740$, $P=0.013$)。(图1)

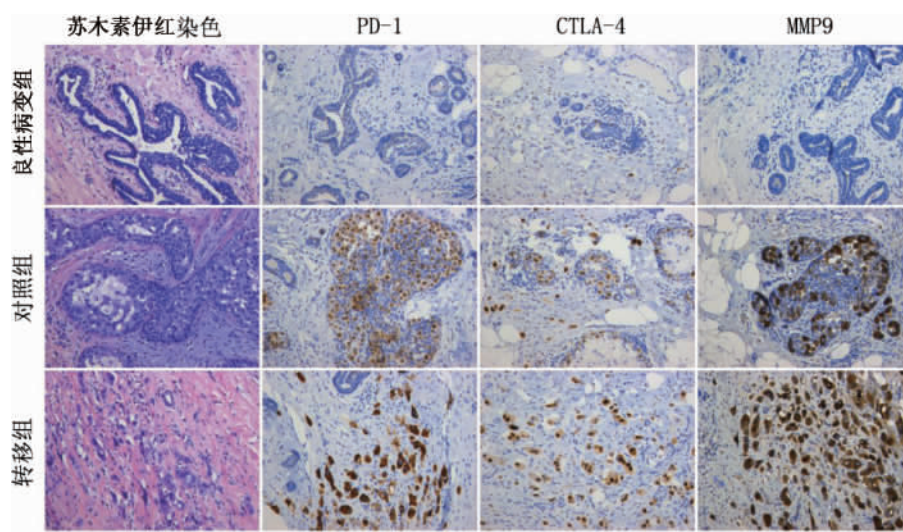


图1 各组乳腺组织中PD-1、CTLA-4和MMP9的表达

2.2 乳腺癌患者外泌体PD-1的表达 流式细胞术检测结果显示, 对照组和转移组PD-1⁺外泌体比例分别为 $(0.782 \pm 0.090)\%$ 和 $(0.816 \pm 0.011)\%$, 与健康组 $[(0.269 \pm 0.049)\%]$ 比较, 差异均有统计学意义($t=4.972$, $P < 0.001$; $t=5.250$, $P < 0.001$), PD-1⁺外泌体比例在对照组

和转移组之间差异无统计学意义($t=0.301$, $P=0.766$)。(图2)

2.3 乳腺癌患者外泌体CTLA-4的表达 流式细胞术检测结果显示, 对照组和转移组CTLA-4⁺外泌体比例分别为 $(3.995 \pm 0.233)\%$ 和 $(4.122 \pm 0.197)\%$, 与健康组 $[(2.310 \pm 0.200)\%]$ 比较,

差异均有统计学意义($t=5.475$, $P<0.001$; $t=6.432$, $P<0.001$), CTLA-4⁺外泌体比例在

对照组和转移组之间差异无统计学意义($t=0.415$, $P=0.682$)。(图3)

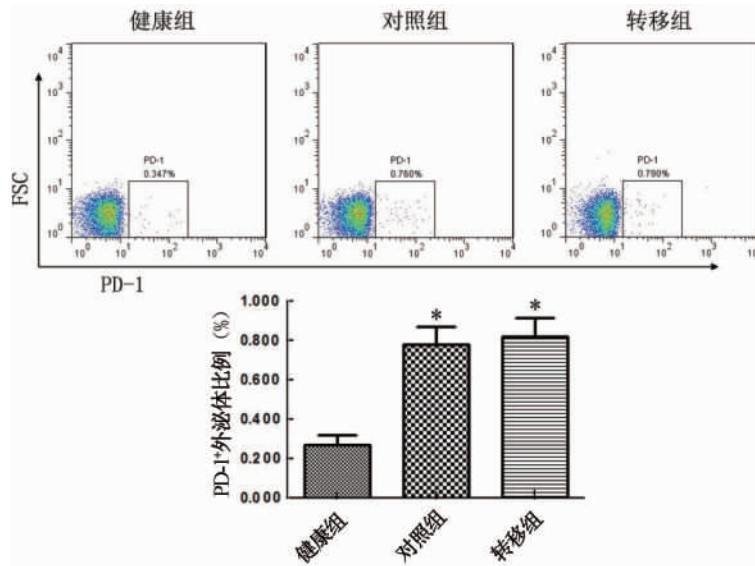


图2 各组外泌体 PD-1 的表达

注:与健康组比较, * $P<0.001$

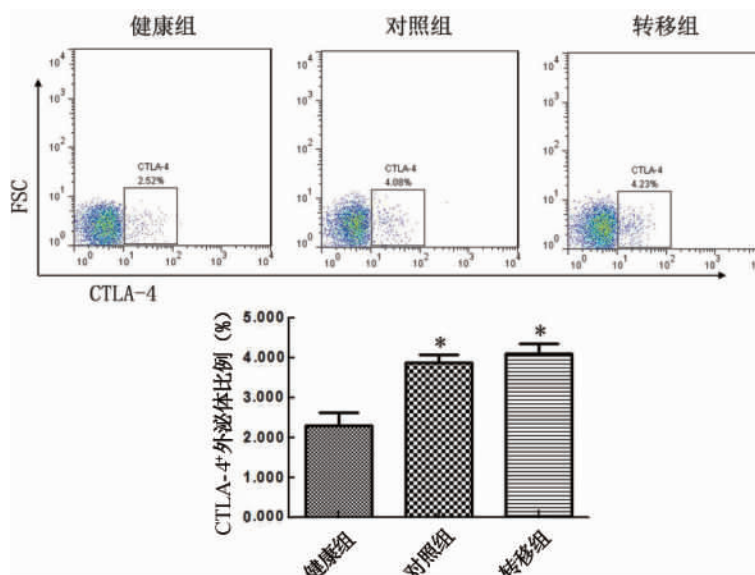


图3 各组外泌体 CTLA-4 的表达

注:与健康组比较, * $P<0.001$

2.4 乳腺癌患者外泌体 MMP9 的表达 流式细胞术结果显示, 对照组和转移组 MMP9⁺外泌体比例分别为(0.874±0.083)%和(1.290±0.108)%, 与健康组[(0.515±0.083)%]比较, 差异均有统计学意义($t=3.039$, $P=0.007$; $t=5.662$, $P<0.001$), 转移组 MMP9⁺外泌体比例显著高于对照组($t=3.047$, $P=0.006$)。(图4)

3 讨论

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤, 近几年发病趋向年轻化。检测手段的提高和人民健康体检意识的增强, 使早期乳腺癌的检出率越来越高。基于患者的个人需求, 很多早期乳腺癌患者采取保乳手术, 因此, 判断是否存在淋巴结转移对于临床治疗具有十分重要的指导意义^[12]。影像学检查以及病

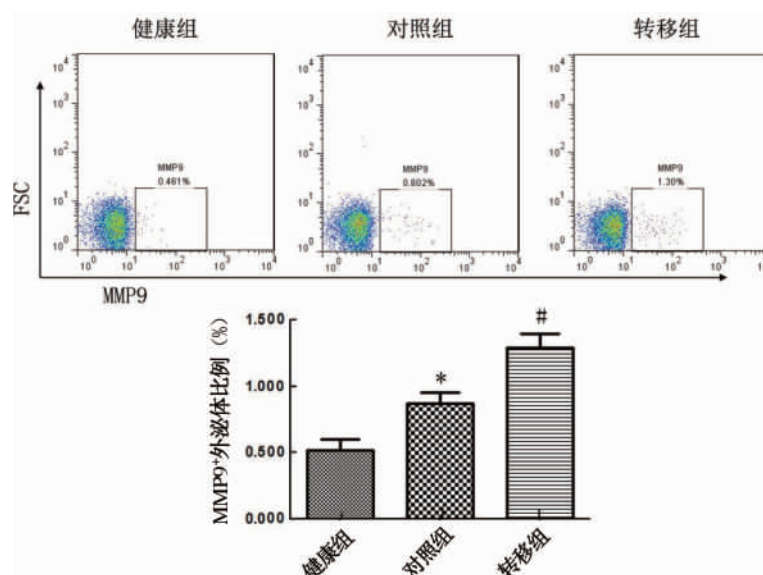


图4 各组外泌体 MMP9 的表达

注：与健康组比较，* $P < 0.05$ ；与对照组比较，# $P < 0.05$

理活检可以检出较大的肿瘤转移灶，而对于细小的转移灶，常规检测很难检测到。液态活检是2015年度十大突破性技术之一，主要包括核酸水平的循环肿瘤DNA检测、细胞水平的循环肿瘤细胞检测以及外泌体检测^[13]。外泌体是一种细胞间信息传递的微囊泡，参与了机体免疫、新陈代谢、肿瘤生长和耐药性产生等过程^[14-16]。本研究发现，乳腺癌转移患者组外泌体MMP9的表达显著升高，这说明外泌体MMP9可作为一个有效的靶点应用于乳腺癌转移的早期预警和术后监测。

分子靶向治疗是目前乳腺癌治疗的发展趋势，具有效果好且副作用少等优势。*Her-2*基因是人表皮生长因子受体家族成员之一，*Her-2*基因阳性预示着患者预后差，容易复发。针对*Her-2*基因，目前已经有曲妥珠单抗等药物进入临床应用，相对于单纯化疗，曲妥珠单抗组患者预后更好^[17]。然而仅有20%~30%的患者乳腺癌组织中*Her-2*基因表达阳性，因此，寻找新的靶点具有很重要的临床意义。PD-1和CTLA-4是目前研究最热的2个恶性肿瘤治疗靶点，已经有数种药物进入临床或正在进行临床试验。PD-1属于Ig超家族协同刺激分子，大量的研究发现PD-1的表达与多种肿瘤的病理特征和患者预后紧密相关，外泌体PD-1高表达能够协助肿瘤免疫逃逸和增强其对化疗药物的耐药性。CTLA-4又名CD152，是一种白细胞分化抗原，参与了免疫反应的负调节。CTLA-4在多种恶性肿瘤中高表达，参与了肿瘤发生、发展和转

移^[18-20]。本研究发现，乳腺癌患者外泌体PD-1和CTLA-4的表达显著高于健康组，外泌体PD-1和CTLA-4的检测可用于乳腺癌的早期诊断。然而乳腺癌转移和未转移患者之间外泌体PD-1和CTLA-4的表达差异不大，因此，外泌体PD-1和CTLA-4的检测不能用于乳腺癌转移的监测。

MMP9是MMP家族的重要成员，具有维持细胞外基质降解和重塑动态平衡的功能。癌细胞与脉管内皮及皮下基膜异质黏附是肿瘤浸润转移的关键，MMP9表达升高可加速皮下基膜和细胞外基质降解，促进肿瘤向淋巴结和血液循环转移^[21]。有研究发现，MMP9在大肠癌等恶性肿瘤组织中表达显著升高，且与肿瘤的高侵袭性紧密相关^[22]。与其他文献^[23-24]报道类似，本研究发现：乳腺癌组织中MMP9高表达，转移组MMP9的表达显著高于对照组；流式细胞术检测结果也显示，转移组外泌体MMP9表达显著高于对照组。这说明外泌体MMP9可作为一个有效的指标用来预警乳腺癌转移和监测术后复发。

综上所述，乳腺癌患者外泌体PD-1、CTLA-4和MMP9表达显著高于健康人群，乳腺癌转移患者外泌体MMP9表达升高，本研究为乳腺癌转移预警和术后复发监测提供了一个新的靶点。

参考文献

- [1] Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, *et al.* Triple-negative breast cancer: Clinical features and patterns of recurrence

- [J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(15 Pt 1): 4429-4434.
- [2] Colleoni M, Orvieto E, Nolè F, *et al.* Prediction of response to primary chemotherapy for operable breast cancer[J]. Eur J Cancer, 2016, 35(4): 574-579.
- [3] Jacobson JS, Troxel AB, Evans J, *et al.* Randomized trial of black cohosh for the treatment of hot flashes among women with a history of breast cancer[J]. J Clin Oncol, 2016, 19(10): 2739-2745.
- [4] Ko J, Carpenter E, Issadore D. Detection and isolation of circulating exosomes and microvesicles for cancer monitoring and diagnostics using micro-/nano-based devices[J]. Analyst, 2016, 141(2): 450-460.
- [5] Bliss SA, Sinha G, Sandiford O, *et al.* Mesenchymal stem cell-derived exosomes stimulates cycling quiescence and early breast cancer dormancy in bone marrow[J]. Cancer Res, 2016, 76(19): 5832.
- [6] Qi H, Liu C, Long L, *et al.* Blood exosomes endowed with magnetic and targeting properties for cancer therapy[J]. ACS Nano, 2016, 10(3): 3323-3333.
- [7] Klepsch V, Hermann-Kleiter N, Do-Dinh P, *et al.* Nuclear receptor NR2F6 inhibition potentiates responses to PD-L1/PD-1 cancer immune checkpoint blockade[J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 1538.
- [8] Champiat S, Dercle L, Ammari S, *et al.* Hyperprogressive disease is a new pattern of progression in cancer patients treated by anti-PD-1/PD-L1[J]. Clin Cancer Res, 2017, 23(8): 1920-1928.
- [9] Hofmann L, Forschner A, Loquai C, *et al.* Cutaneous, gastrointestinal, hepatic, endocrine, and renal side-effects of anti-PD-1 therapy[J]. Eur J Cancer, 2016, 60(3): 190-209.
- [10] Somiari SB, Somiari RI, Heckman CM, *et al.* Circulating MMP2 and MMP9 in breast cancer-potential role in classification of patients into low risk, high risk, benign disease and breast cancer categories[J]. Int J Cancer, 2006, 119(6): 1403-1411.
- [11] Wang X, Lu H, Urvalek AM, *et al.* KLF8 promotes human breast cancer cell invasion and metastasis by transcriptional activation of MMP9[J]. Oncogene, 2011, 30(16): 1901-1911.
- [12] Mouridsen H, Gershonovich M, Sun Y, *et al.* Phase III study of letrozole versus tamoxifen as first-line therapy of advanced breast cancer in postmenopausal women: Analysis of survival and update of efficacy from the International Letrozole Breast Cancer Group[J]. J Clin Oncol, 2003, 21(11): 2101-2109.
- [13] Sheridan C. Exosome cancer diagnostic reaches market[J]. Nat Biotechnol, 2016, 34(4): 358-359.
- [14] Hosseini A, Soleimani S, Modarres HP, *et al.* Exosome-inspired targeting of cancer cells with enhanced affinity[J]. J Mater Chem B, 2016, 4(4): 768-778.
- [15] Sagar G, Sah RP, Javeed N, *et al.* Pathogenesis of pancreatic cancer exosome-induced lipolysis in adipose tissue[J]. Gut, 2016, 65(7): 1165-1174.
- [16] Mao J, Liang Z, Zhang B, *et al.* UBR2 enriched in P53(-/-) mBMMSC-exosome promoted gastric cancer progression via Wnt/ β -catenin pathway[J]. Stem Cells, 2017, 35(11): 2267-2270.
- [17] Chia SK, Ellard SL, Mates M, *et al.* A phase-I study of lapatinib in combination with foretinib, a c-MET, AXL and vascular endothelial growth factor receptor inhibitor, in human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2)-positive metastatic breast cancer[J]. Breast Cancer Res, 2017, 19(1): 54-57.
- [18] Iwai Y, Hamanishi J, Chamoto K, *et al.* Cancer immunotherapies targeting the PD-1 signaling pathway[J]. J Biomed Sci, 2017, 24(1): 26-30.
- [19] Yoo HY, Kim P, Kim WS, *et al.* Frequent CTLA4-CD28 gene fusion in diverse types of T-cell lymphoma[J]. Haematologica, 2016, 101(6): 757-763.
- [20] Carbonnel F, Soularue E, Coutzac C, *et al.* Inflammatory bowel disease and cancer response due to anti-CTLA-4: Is it in the flora? [J]. Semin Immunopathol, 2017, 39(3): 327-331.
- [21] Zhen Y, Liu J, Huang Y, *et al.* miR-133b inhibits cell growth, migration, and invasion by targeting MMP9 in non-small cell lung cancer[J]. Oncol Res, 2016, 25(7): 1109-1112.
- [22] Chen S, Chen W, Zhan X, *et al.* Overexpression of KiSS-1 reduces colorectal cancer cell invasion by downregulating MMP-9 via blocking PI3K/Akt/NF- κ B signal pathway [J]. Int J Oncol, 2016, 48(4): 1391-1398.
- [23] 魏双琴, 李迎春, 张成, 等. MMP-7, MMP-9 基因多态性与结直肠癌发病的关系研究[J]. 中国现代医学杂志, 2018, 28(2): 42-46.
- [24] 郑红芳, 丁厚中, 李巧星, 等. 肾癌组织中 HMGB1、MMP9 的表达与临床分期、预后的相关性研究[J]. 中国现代医学杂志, 2016, 26(22): 28-33.